

Aus der Klinik für Allgemeine-, Unfall-, Hand und Plastische Chirurgie
der Ludwig-Maximilians-Universität München,
Direktor: Prof. Dr. med. Wolf Mutschler,
Experimentelle Chirurgie und Regenerative Medizin, ExperiMed
Leiter: Prof. Dr. med. Matthias Schieker

Neue molekulare Charakteristika von Zellisolaten aus Dupuytren- Gewebe

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanmedizin
(Dr. med.)
an der Medizinischen Fakultät
der Universität zu München

vorgelegt von

Barbara Alice Vaerst
aus Hamburg

2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Matthias Schieker

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Raphaela Waidelich

Priv. Doz. Dr. med. Christoph Walz

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter:

Dr. med. Elias Volkmer

Priv. Doz. Dr. rer. nat. Denitsa Docheva

Dekan:

Prof. Dr. med. Dr. h. c. Maximilian Reiser,
FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Juli 2013

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1. Morbus Dupuytren.....	6
1.1.1. Klinisches Bild.....	7
1.1.2. Diagnosestellung	8
1.1.3. Epidemiologie	9
1.1.4. Ätiologie und Begleiterkrankungen	9
1.1.5. Therapie des Morbus Dupuytren.....	12
1.1.5.1. Konservative Therapie.....	12
1.1.5.2. Chirurgische Therapie	13
1.1.6. Prognose.....	17
1.1.7. Pathohistologie	17
1.2. Aktueller Stand der Forschung.....	18
1.2.1. Die Rolle der Myofibroblasten im Morbus Dupuytren.....	18
1.2.2. Veränderungen in der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix.....	20
1.2.3. Regulation von Wachstumsfaktoren, Rezeptoren und Enzymen im Dupuytrogewebe.....	21
1.2.4. Verändertes Integrinprofil der Dupuytrenzellen.....	22
1.2.5. Genetische Veränderungen im Zusammenhang mit Morbus Dupuytren	24
1.2.6. Hypoxie und freie Sauerstoffradikale als mögliche Ursachen	24
1.3. Ziel der Arbeit - Charakterisierung der Zellen aus der Dupuytren'schen Kontraktur auf molekularbiologischer Ebene.....	25
2. Material und Methoden.....	27
2.1. Operationspräparate	27
2.2. Spenderkollektiv.....	27
2.2.1. Epidemiologie des Spenderkollektivs.....	27
2.2.2. Selektion der Spender	28
2.3. Zellkultur.....	29
2.3.1. Zellisolation	29
2.3.2. Zellkulturbedingungen.....	31
2.3.3. Zellen passagieren.....	32
2.3.4. Zellen zählen.....	32
2.3.5. Zellen einfrieren und auftauen	32

2.3.6. Wachstumskurve	33
2.3.7. Berechnung der kumulativen Populationsverdopplungszeit.....	33
2.3.8. <i>Colony forming units</i> (CFU) Assay	33
2.3.9. Osteogene Differenzierung	34
2.3.9.1. Induktion der osteogenen Differenzierung	34
2.3.9.2. Alzarin Rot Färbung	35
2.3.9.3. Osteogene Quantifizierung	35
2.3.10. Adipogene Differenzierung.....	35
2.3.10.1. Induktion der adipogenen Differenzierung	35
2.3.10.2. Oil Red O Färbung.....	36
2.4. <i>Myotube formation</i>	36
2.4.1. Induktion der <i>Myotube formation</i>	36
2.4.2. Wright Färbung	36
2.5. PCR Analyse.....	37
2.5.1. RNA und cDNA Isolation.....	37
2.5.2. cDNA Synthese.....	37
2.5.3. RT-PCR	37
2.6. Mikroskop.....	39
2.7. Statistische Methoden.....	40
3. Ergebnisse	41
3.1. Morphologie der drei Zelltypen.....	41
3.2. Wachstumsverhalten.....	41
3.2.1. Unterschiede in der Wachstumskinetik von Zellen der Palmaraponeurose gesunder und an Morbus Dupuytren erkrankten Patienten.....	41
3.2.2. Dupuytren Rezidivzellen erreichen in hohen Passagen das Seneszenzstadium nicht	43
3.3. Differenzierungspotenzial in andere Gewebetypen.....	44
3.3.1. Dupuytrenzellen sind exzellent osteogen und adipogen differenzierbar .	44
3.3.2. Differenzierung in die myoblastische Linie	45
3.4. PCR Analyse.....	46
3.4.1. In Dupuytrenzellen ist die Expression der Integrine auf mRNA-Ebene verändert.....	46
3.4.2. Die Fibronektin bindenden Integrine $\beta 3$ und $\beta 5$ sind in Dupuytrenzellen hochreguliert	48

4. Diskussion	49
4.1. Isolation der Zellen im Vergleich – Zellmigration und Gewebeverdau.....	49
4.2. Unterschiede zwischen Erstmanifestationen und Rezidivzellen.....	50
4.3. Rezidivdupuytrenzellen erreichen das Seneszenzstadium nicht.....	51
4.4. Zellen aus Palmaraponeurosen von Morbus Dupuytren Patienten haben ein erhöhtes Stammzellpotential	52
4.5. Die Integrine $\alpha 2$, $\beta 3$ und $\beta 5$ sind in Dupuytren-Zellen hochreguliert	53
4.6. Schlussfolgerungen und Ausblick	55
5. Zusammenfassung.....	58
6. Literaturverzeichnis	60
Anhang.....	72
Abkürzungsverzeichnis.....	74
Danksagung	76
Publikationen.....	77
Eidesstattliche Versicherung	78

1. Einleitung

1.1. Morbus Dupuytren

Morbus Dupuytren ist eine benigne Erkrankung der Palmaraponeurose und zählt zu den superfiziellen Fibromatosen. Ausgehend von den straffen Bindegewebsfasern der Palmaraponeurose entstehen zu Beginn der Erkrankung hyperproliferative Zellknoten in der Hohlhand. Hieraus bilden sich Faserbündel, die in Längsrichtung in die Finger ziehen und im Verlauf zu einer ständigen Beugekontraktur der Metacarpophalangealgelenke (MCP) und der proximalen Interphalangealgelenke (PIP) der Finger führen. Am häufigsten erkranken der 4. und 5. Finger, grundsätzlich können aber alle Finger betroffen sein (Townley et al. 2006).

In Deutschland gibt es etwa 2 Millionen Patienten (Brenner et al. 2001), wobei der Erkrankungsgipfel bei Männern in der fünften Lebensdekade und bei Frauen in der sechsten liegt (Shaw et al. 2007). In der neunten Lebensdekade ist die Geschlechterverteilung so gut wie ausgeglichen (Saar et al. 2000). Männer erkranken bis zu sechsmal so häufig wie Frauen, dieses Phänomen wird als Androtopie bezeichnet (Shaw et al. 2007). Kinder sind extrem selten betroffen (Urban et al. 1996, Foucher et al. 2001). Patienten, die in einem jüngeren Lebensalter erkranken, erleiden häufig einen aggressiveren Verlauf mit erhöhter Rezidivneigung (sog. Dupuytren-Diathese) (Berger et al. 1990, Wilbrand et al. 1999). Das Verhältnis Männer zu Frauen liegt in Bezug auf die Operationen bei 7:1 (Brenner et al. 2001). Fingerknöchelpolster (Caroli et al. 1991), Morbus Ledderhose an der Plantaraponeurose (de Palma et al. 1999) und die Induratio penis plastica (Nugteren et al. 2011) sind ätiologisch ähnlich und treffen gehäuft in Assoziation mit Morbus Dupuytren auf.

Erstmalig medizinhistorisch verbürgt wurde der Morbus Dupuytren 1647 von Felix Platter dokumentiert. Dieser führte die Erkrankung allerdings auf eine Luxation der Beugesehnen zurück. 1831 beschrieb der Pariser Chirurg Guillaume Dupuytren die digitopalmare Kontraktur als Erkrankung der Palmaraponeurose. Das Krankheitsbild war bereits früher beschrieben worden und auch erste Versuche einer Aponeurotomie waren durchgeführt worden, wie z.B. durch Henry Cline (1808) und Sir Astley Cooper (1824). Seit 1831 ist es aber nach Guillaume Dupuytren benannt (Brenner et

al. 2001, Khashan et al. 2011). Der frühen Erstbeschreibung zum Trotz ist die exakte Pathogenese des Morbus Dupuytren bis heute noch nicht verstanden. Daher bestehen nach wie vor keine kausalen Therapiemöglichkeiten.

1.1.1. Klinisches Bild

Der typische Verlauf der Erkrankung entwickelt sich langsam und über viele Jahre. Die Knotenbildung bleibt durch viele Patienten unbeachtet, da sie selten Einschränkungen verursacht. Durch die Strangbildung entsteht üblicher Weise über die Jahre eine progressive Beugekontraktur der Finger. Weder Knoten noch Stränge sind schmerzhaft, es sei denn ein Strang drückt direkt auf einen Hautnerven. Lediglich die forcierte Dehnung gegen die Beugekontraktur wird als unangenehm bis schmerzhaft empfunden. Außerdem treten Hauteinziehungen (hauptsächlich beidseits der distalen Beugefalte) sowie unspezifische Verdickungen und Verhärtungen auf. Sensibilitätsveränderungen, vor allem im Innervationsgebiet des Nervus ulnaris, werden beschrieben, diese sind aber selten (Berger 2009). Die Patienten leiden hauptsächlich unter dem Kontrakturbedingten fortschreitenden Funktionsverlust der Hand. Im Verlauf der Erkrankung werden Alltagsverrichtungen wie z.B. das Greifen und Schreiben zunehmend unmöglich. Häufig sind beide Hände betroffen. Wenngleich häufiger die rechte als die linke Hand operiert wird, kommt die Erkrankung an beiden Händen gleich häufig vor.

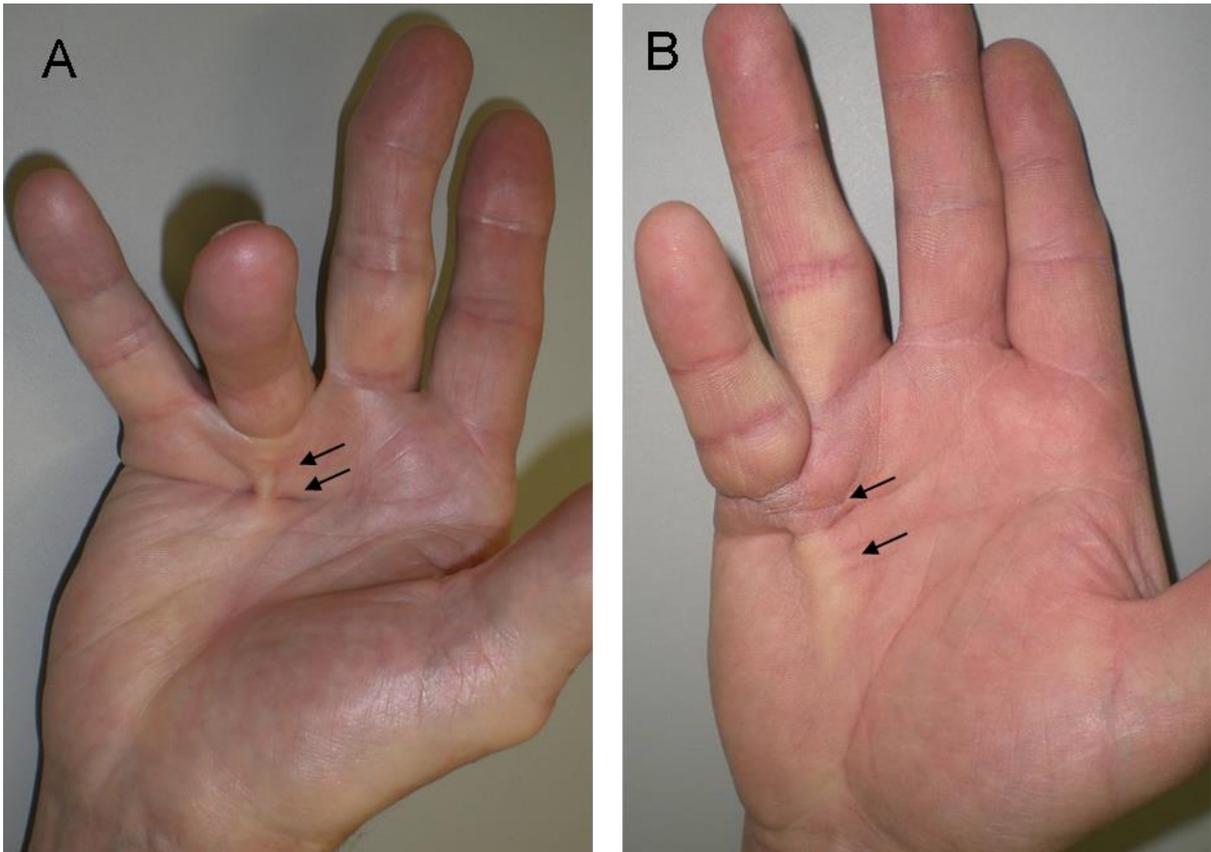


Abbildung 1: Hände mit Dupuytrenbefall, es zeigt sich eine dauerhafte Kontraktur im MCP des vierten bzw. fünften Fingers. Gut sichtbar ist ebenfalls die Strangbildung in der Hohlhand.

1.1.2. Diagnosestellung

Die Diagnosestellung ist aufgrund des typischen klinischen Bildes meist einfach. Lediglich Kontrakturen anderer Genese können bisweilen differenzialdiagnostisch anspruchsvoll sein. Ebenso bei sehr frühen Stadien nur mit Knotenbildung, kann es schwierig sein, eine eindeutige Diagnose zu stellen (Lennox et al. 1993). Bei der Beurteilung eines Rezidivs muss zwischen Narbenkontraktur und echtem Rezidiv unterschieden werden.

Zur exakten Beschreibung wie auch zur Verlaufserfassung kann das Ausmaß der Kontraktur nach Tubiana (Tubiana et al. 1968) eingeteilt werden. Hierbei werden die Streckdefizite aller beteiligten Finger und Gelenke aufaddiert.

Stadium 0	Knoten in der Hand ohne Kontraktur
Stadium 1	Kontraktur bis 45°
Stadium 2	Kontraktur 46 – 90°
Stadium 3	Kontraktur 91 – 135°
Stadium 4	Kontraktur > 135°

Tabelle 1: Klassifikation nach Tubiana (Tubiana et al. 1968).

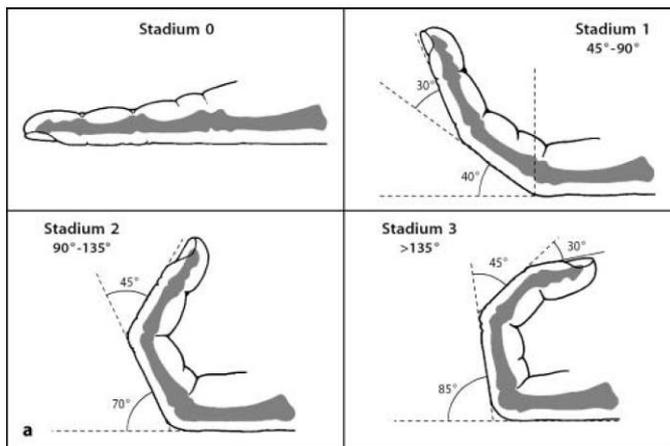


Abbildung 2: Erfassung des Streckdefizits (Brenner et al. 2001).

1.1.3. Epidemiologie

Allgemein tritt der Morbus Dupuytren am häufigsten in Nordeuropa auf (McFarlane 2002). Er gilt als die Krankheit der Wikinger bzw. Kaukasier. Schwarze Menschen erkranken nicht bzw. nur äußerst selten (Mitra et al. 1994, Sladicka et al. 1996), in Asien ist die Erkrankung weitgehend unbekannt, selten treten milde Formen auf, bei denen sich nur Knoten bilden ohne operationsbedürftige Kontraktur der Finger (Slattery 2010).

1.1.4. Ätiologie und Begleiterkrankungen

Die Ätiologie des Morbus Dupuytren ist bislang nicht geklärt. Auf Grund typischer Begleiterkrankungen werden verschiedene endogene und exogene Faktoren diskutiert. Bei der Vielzahl der verschiedenen Begleiterkrankungen ist eine eindeutige Korrelation bezüglich einer einheitlichen Ätiologie schwierig, vor allem, da weiterhin nicht

geklärt ist, ob die jeweiligen Erkrankungen wirklich einen gemeinsamen Ursprung haben oder lediglich Einfluss auf einander haben.

Die familiäre Häufung weist auf eine genetische Ursache der Erkrankung hin. In der Literatur werden autosomal-dominante mit variabler Penetranz oder rezessive Erbgänge diskutiert (Ling 1963, Burge 1999). Mögliche Ursachen hierfür wären Mutationen in einzelnen bzw. in mehreren Genen. So haben Hu et al. (2005) in einer schwedischen Familie eine veränderte Chromosomregion auf Chromosom 16 beschrieben haben. In dieser Region liegen die bekannten Gene CHD 9, RBL 2, AKTIP, RPGRIP11, FTO, IRX 3, IRX 5, IRX 6. Für weitergehende Aussagen müsste allerdings ebenfalls die Veränderung der Genprodukte untersucht werden.

Dolmans et al. (2011) haben in einer großen Studie (2300 Patienten) 9 Genloci beschrieben, die bei Dupuytrenpatienten verändert sind. Auf 6 dieser 9 Loci liegen Gene, deren Produkte den Wnt- Signalweg beeinflussen wie z.B. WTN2, WNT4 und WNT7B.

Sowohl Leberzirrhose ohne alkoholtoxische Ursache als auch erhöhter Alkoholkonsum (Burge et al. 1997) sind vergesellschaftet mit dem Auftreten von Morbus Dupuytren. Dabei ist unklar, ob primär der Alkohol oder die Lebererkrankung das Auftreten des Morbus Dupuytren befördert (Noble et al. 1992). Es stellt sich die Frage, ob die veränderte metabolische Funktion der Leber eine Ursache sein könnte. Dies ist aber noch nicht geklärt (Rabinowitz et al. 1983)

Auch bei erhöhtem Nikotinkonsum tritt Morbus Dupuytren vermehrt auf. Ein Erklärungsansatz könnte sein, dass die beim Morbus Dupuytren beschriebenen vaskulären Veränderungen im Sinne einer mikrovaskulären Einengung bis zur Okklusion durch die durch das Rauchen ebenfalls verschlechterte Mikrozirkulation in der Hand die Entstehung und Progression von Fibrose und in der Folge dann des Dupuytren befördert (An et al. 1988, van Adrichem et al. 1992, Burge et al. 1997, Brenner et al. 2001).

Epilepsie tritt bei männlichen Patienten verglichen mit gesunden Probanden mit einer fünffach erhöhten Wahrscheinlichkeit mit Morbus Dupuytren vergesellschaftet

auf. Bei weiblichen Patienten ist das Risiko sogar um das Elffache höher (Early 1962). Interessanter Weise tritt Morbus Dupuytren hauptsächlich bei idiopathischer und nicht bei posttraumatischer Epilepsie auf (Stuhler et al. 1977). Dies ist als Hinweis darauf zu werten, dass beide Erkrankungen möglicher Weise einen gemeinsamen genetischen Hintergrund haben.

Morbus Dupuytren tritt außerdem gehäuft bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ I und Typ II auf. In diesem Patientenkollektiv zeigt sich kein geschlechtsspezifischer Unterschied. Allerdings erkranken Patienten mit Diabetes mellitus Typ I durchschnittlich früher als das normale Dupuytrenkollektiv (Arkkila et al. 1997). Diabetiker erleiden einen milderen Verlauf und werden daher seltener operiert (Noble et al. 1992, Brenner et al. 2003). Jennings et al. (1989) und Rosenbloom et al. (1996) zeigten übereinstimmend, dass die Streckhemmung der Fingergelenke bei Morbus Dupuytren sowohl mit der diabetischen Retino- als auch mit der Neuropathie assoziiert ist. Die Mikroangiopathie, die bei Diabetes mellitus häufig auftritt, wird hier als mögliche Ursache gesehen. Aber auch erhöhte Cholesterin- und Triglyzerinwerte, wie bei Diabetikern häufig, treten bei Morbus Dupuytren signifikant vermehrt auf (Sanderson et al. 1992).

Die These, dass Morbus Dupuytren eine Autoimmunerkrankung ist, bzw. zumindest eine autoimmunologische Komponente hat besteht schon seit Langem und wird dadurch untermauert, dass die Therapie mit Steroiden einen Effekt zeigt (Ketchum et al. 2000). Es wurden verschiedene Antikörper gegen die Kollagene Typ I-IV bei Dupuytrenpatienten nachgewiesen (Menzel et al. 1979, Neumuller et al. 1994). Darüber hinaus leiden auch HIV-Patienten zu einem signifikant höheren Prozentsatz unter Morbus Dupuytren (Bower et al. 1990).

Bereits seit langer Zeit wird als Ursache für Morbus Dupuytren handwerkliches Arbeiten und Traumata in der Anamnese diskutiert (Mikkelsen 1978, Liss et al. 1996). Der Erklärungsansatz war die Vermutung, dass durch Mikrotraumata in den Kapillaren und Kollagenfasern die Entstehung und Progression der Erkrankung befördert werden könnte. Die Definition von Trauma per se ist schwierig, genauso wie eine Messung des Ausmaßes. Ebenfalls werden die Ergebnisse zum Teil dadurch beeinflusst, zum Teil sogar verfälscht, dass sich Patienten, die beruflich nicht körperlich arbeiten,

in ihrer Freizeit manuell betätigen (z.B. Tennis, Golf) und ihre Hände dadurch ebenfalls mechanischem Stress ausgesetzt sind. Daher gibt es einige Autoren, die eine direkte Korrelation ablehnen (Wulle 1986, Bergenudd et al. 1993, Burke et al. 2007). Dennoch ist auf die Menge der epidemiologischen Daten hin zumindest eine Koinzidenz festzustellen (Bovenzi 1994, Brenner et al. 2001, Descatha et al. 2011).

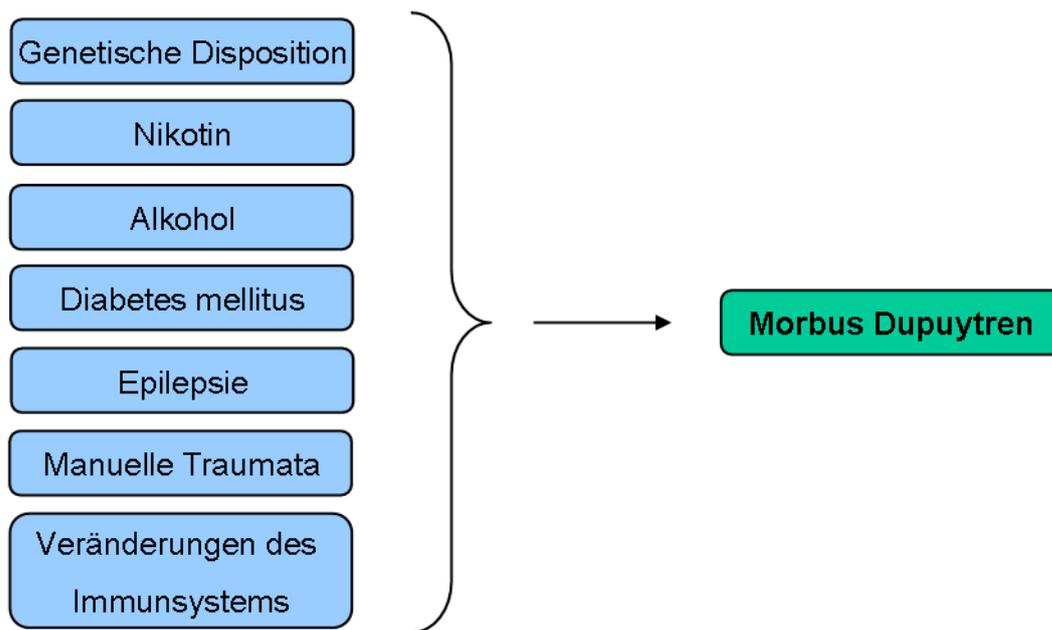


Abbildung 3: Ätiologische Einflüsse auf Morbus Dupuytren.

1.1.5. Therapie des Morbus Dupuytren

1.1.5.1. Konservative Therapie

Viele verschiedene konservative Therapieansätze des Morbus Dupuytren wurden in der Vergangenheit propagiert und zum großen Teil wieder verworfen. Eine kurze Übersicht soll der Vollständigkeit halber gegeben werden. Ausschließlich physiotherapeutische Versuche werden immer wieder beschrieben, führen aber nie zu einer dauerhaften Besserung. Behandlungsversuche mit Vitamin E, Dimethylsulfoxid (DMSO) und γ -Interferon haben nachgewiesener Weise keinen Effekt auf die Erkrankung (Rayan 2008). Die lokale Injektion von Steroiden bewirkt zwar Besserung im Sinne von kleineren und weicheren Knoten, sowie einer verlangsamten Progression und verminderten Rezidivraten (Ketchum et al. 2000, Meek et al. 2002). Allerdings

verhindern aber Nebenwirkungen wie Hautatrophie und Sehnenrupturen einen verbreiteten Einsatz dieser Methode (Rayan 2008). Strahlentherapie verhindert die akute Progression des Morbus Dupuytren vor allem in den frühen Tubiana-Stadien 0 und 1 und kann daher bei solchen Patienten zur Anwendung kommen. Die Strahlentherapie verschlechtert die Bedingungen für eine eventuell dennoch später notwendige Operation nicht (Betz et al. 2010).

Der zurzeit erfolgreichste und aktuellste Ansatz unter den nicht-operativen Therapiemöglichkeiten ist die enzymatische Aponeurotomie durch Injektion mikrobieller Kollagenase. Erste Versuche gab es bereits in den 1970er Jahren (Hueston 1971). Nach Phase II und III Studien durch Badalamente et al. (2007) haben Hurst et al. (Hurst et al. 2009) eine Placebo-kontrollierte, randomisierte, doppelblinde Multicenterstudie veröffentlicht, in der bei 308 Patienten mit Kontrakturen von 20° und mehr drei Kollagenaseinjektionen vorgenommen wurden. Die Bewegungsfreiheit in den betroffenen Gelenken stieg daraufhin signifikant. Nebenwirkungen dieser Behandlung waren Hämatome, Hautverletzungen, Schwellung und diffuse Schmerzen; ebenfalls wurden zwei Fälle von Sehnenrupturen berichtet. Das Ergebnis dieser Studien ist sehr vielversprechend und stellt eine relevante Alternative für bestimmte Patienten dar; insbesondere für Patienten, für die aus verschiedenen Gründen eine Operation nicht in Frage kommt.

1.1.5.2. Chirurgische Therapie

In Folge der begrenzten Möglichkeiten der nicht-operativen Therapie und wegen des sehr eingeschränkten Verständnisses der Ätiologie des Morbus Dupuytren ist aktuell bei fortgeschrittenen Stadien eine operative Entfernung des erkrankten Gewebes die Methode der Wahl. Die alleinige Knoten- und Strangbildung in der Hohlhand stellt nur bei Schmerzen eine Indikation für eine Operation dar. Sobald allerdings eine Strangbildung zu einer Kontraktur in einem Metacarpophalangealgelenk von über 30° führt oder eine Kontraktur, gleich welchen Ausmaßes, in einem proximalen Interphalangealgelenk auftritt, sollte die Operations-Indikation gestellt werden (Smith 1991, Shaw et al. 2007).

Es gibt verschiedene Operationsverfahren; bei allen können als Nebenwirkungen Hämatombildung, Sehnenverletzung, Wundheilungsstörungen, Hautnekrose, CRPS

(complex regional pain syndrome), Schwellung und erneute Narbenkontraktur entstehen. Nebenwirkungen sowie die Rezidivrate variieren allerdings je nach Verfahren.

Partielle Aponeurektomie: Dies ist das aktuell am häufigsten verwendete Verfahren. Hierbei wird die Haut der Hohlhand eröffnet und das kontrahierende Gewebe zusammen mit der umgebenden Palmaraponeurose präpariert und entfernt. Da sich die Erkrankung nicht auf die makroskopisch sichtbaren Bereiche beschränkt, können auf diesem Weg einzelne erkrankte Gewebeteile zurückbleiben. Dennoch werden mit der partiellen Aponeurektomie gute Ergebnisse mit relativ niedrigen Rezidivraten (20% nach 5 Jahren) erzielt. Die Nebenwirkungsrate ist auf Grund der Invasivität höher als bei der Nadelaponeurotomie, aber niedriger als z.B. bei der radikalen Aponeurektomie (van Rijssen et al. 2012).

Aponeurotomie: Es kann eine offene oder geschlossene Aponeurotomie durchgeführt werden. Dies ist das älteste Operationsverfahren; dabei wird der Strang, der die Kontraktur bewirkt, durchtrennt, ohne das erkrankte Gewebe zu exzidieren. Besonders bei älteren Patienten ist die Nadelaponeurotomie eine häufig angewendete Option, da das minimal invasive Verfahren zu einer schnelle Erholung mit geringen Nebenwirkungen führt. Nach fünf Jahren ist die Rezidivrate mit 85% allerdings sehr hoch (van Rijssen et al. 2012).

Radikale Aponeurektomie: Um die Rezidivrate maximal zu senken wurde die radikale Aponeurektomie nach McIndoe (1958) entwickelt. Hierbei wird die gesamte Aponeurose der Hohlhand- und der Finger entfernt. Aktuelle Studien zeigen allerdings nicht die angestrebte deutliche Senkung der Rezidivrate. Da das Verfahren darüber hinaus relativ hohe Komplikationsraten mit Hämatombildung, verzögerter Wundheilung, Hautnekrosen und CRPS aufweist, wird es nur sehr selten bei besonders aggressiven Verläufen mit flächigem Befall der Hohlhand eingesetzt (Khashan et al. 2011).

Dermatofasziektomie: Ebenfalls um die Rezidivrate zu senken (Hall et al. 1997), wurde die Exzision des erkrankten Gewebes mit geringem Erfolg auf die darüber liegende Haut ausgedehnt (Gordon 1957, Townley et al. 2006). Der Defekt wird anschließend durch ein Vollhauttransplantat gedeckt (Tonkin et al. 1984).

Amputation: Eine ultima Ratio stellt die Amputation eines Fingers im proximalen Interphalangeal-Gelenk dar. Dies kann dann indiziert sein, wenn die Hand bereits mehrfach operiert wurde und sich eine Kontraktur nicht mehr korrigieren lässt. Auch bei einer schweren neurovaskulären Beeinträchtigung kommt eine Amputation in Frage (Degreef et al. 2009). Alternativ kommt ebenfalls eine Versteifung der betroffenen Gelenke infrage. Diese führt interessanter Weise zu einem Stillstand der Erkrankung.

Unabhängig von der gewählten Operationsmethode ist eine gute Nachbehandlung mit Physiotherapie und Schienung der Hand in jedem Fall wichtig, um eine Narbenkontraktur zu verhindern und die Beweglichkeit der Finger maximal zu verbessern (Saar et al. 2000).

Abbildung 4 zeigt eine partielle Aponeurektomie, mit ihren Vorteilen, da das betroffene Gewebe so gut wie vollständig entfernt wird und dadurch die Rezidivrate relativ niedrig gehalten werden kann und ihren Nachteilen, da auf Grund der Größe des Eingriffes Nebenwirkungen häufiger auftreten und die Zeit bis zur vollständigen Erholung länger ist als bei weniger invasiven Verfahren wie der Nadelaponeurektomie.



Abbildung 4: zeigt eine partielle Aponeurektomie. A: Planung der Schnitfführung; B: Präparation des Strangs; C: Resektion des Strangs; D: Nach Hautnaht.

1.1.6. Prognose

Häufig ist die Progression der Kontraktur sehr langsam (in einzelnen Fällen wurde sogar eine Regression beschrieben), so dass die Situation der Finger lange Zeit stabil bleibt und keine Therapie benötigt wird (Townley et al. 2006). Je nachdem wie stark Patienten im Alltag auf Feinmotorik und alle Finger angewiesen sind, muss zum Teil die Operations-Indikation schon sehr früh gestellt werden. Leider ist der Verlauf bei jüngeren Patienten oft aggressiver (sog. Dupuytreniathese), so dass diese ebenfalls schneller eine Operation zur Erhaltung der Handfunktion benötigen. Dies stellt vor allem deshalb ein Problem dar, da die Rezidivrate bei diesen Patienten relativ hoch ist. Die kontralaterale Seite ist dabei häufig ebenfalls, aber in einem niedrigeren Ausmaß, betroffen (Wilbrand et al. 1999). Die Rezidivrate nach Aponeurektomie wird mit 20% innerhalb von 5 Jahren angegeben (van Rijssen et al. 2012).

1.1.7. Pathohistologie

Morbus Dupuytren gehört pathohistologisch zu der Gruppe der Fibromatosen. Diese präsentieren sich als fibröse Proliferation und haben eine Zwischenstellung zwischen benignen fibrösen Tumoren und den Fibrosarkomen. Sie wachsen zwar lokal infiltrierend, metastasieren aber nicht (Riede 2004). Das histologische Bild des Morbus Dupuytren ähnelt den Prozessen, die bei der aktiven Wundheilung von Bindegewebe ablaufen (Howard et al. 2004). Es gibt eine hohe Anzahl von Fibroblasten und es wird eine erhöhte Menge von Proteinen der Extrazellulären Matrix, besonders Kollagen, eingelagert. Darüber hinaus ist die Anwesenheit von Myofibroblasten sowohl für Morbus Dupuytren als auch für die Wundheilung charakteristisch (Tomasek et al. 2002). Ausgehend von den histologischen Veränderungen haben Luck et al. (1959) drei Stadien definiert, in die sich die Erkrankung einteilen lässt.

1. Proliferationsstadium: Dieses Stadium ist gekennzeichnet durch das Entstehen von einzelnen Knoten, die gut vaskularisiert sind; sie bilden sich aus Endothelzellen und der gleichzeitigen Vermehrung von retikulären Fasern. Das Proliferationsstadium ist sehr zellreich.

2. Involutionsstadium: Das Involutionsstadium ist das Übergangsstadium vom zellreichen zum zellarmen Stadium. Der Kollagenanteil steigt und die Zellen ordnen sich entlang der Belastungslinien des Gewebes an und führen so zur Kontraktur. Subkutanes Gewebe und die Haut werden ebenfalls von Kollagen infiltriert. Die Knoten bilden sich zurück.

3. Residualstadium: Die Knoten sind fast vollständig verschwunden. Es haben sich zellarme Stränge gebildet, die von Kollagenfasern umhüllt sind. Es kommt zur fortgeschrittenen Kontraktur und Hautfixation.

Diese Phasen können allerdings bei einem Patienten unabhängig von einander an mehreren Stellen der Hohlhand gleichzeitig ablaufen. In der Literatur wird die Einteilung nach Luck häufig benutzt, allerdings hat sie für die Klinik keine wesentliche Bedeutung (Shih et al. 2010).

1.2. Aktueller Stand der Forschung

1.2.1. Die Rolle der Myofibroblasten im Morbus Dupuytren

Die Verkürzung der Palmaraponeurose führt bei Patienten, die an Morbus Dupuytren erkrankt sind, zu einer dauerhaften Flexionskontraktur (McFarlane et al. 1990). Wie es zu dieser Kontraktur kommt, war lange Zeit ungeklärt. Gabbiani et al. (1972) beschrieben als erste eine besondere Zellart in aus Dupuytrenoperationen gewonnenem Gewebe. Es handelt sich dabei um Fibroblasten, die Eigenschaften glatter Muskelzellen aufweisen und sich kontrahieren können. Daher wurden diese als „Myofibroblasten“ bezeichnet. Diese Zellen werden ebenfalls bei der aktiven Wundheilung gefunden und führen dort zur Kontraktion des Gewebes (Hinz 2007). Im Unterschied zu Fibroblasten enthalten sie mehr Bündel intrazellulärer Aktin-Mikrofilamente, auch Stressfasern genannt, die ähnlich den Myofibrillen von glatten Muskelzellen längs zur Zellachse organisiert sind, anstatt wie in Fibroblasten ein kortikales Netzwerk zu bilden (Tomasek et al. 1987). Wie in glatten Muskelzellen sind die Zellkerne eingedellt (Tomasek et al. 1999). Über die sogenannten transmembranösen Fibronexus sind die Aktin-Mikrofilamente der Myofibroblasten mit extrazellulären Fibronektin-Filamenten verbunden (Singer 1979, Tomasek et al. 1991, Hinz et al. 2007). Dadurch

wird die Kraftübertragung von der Zelle auf das umliegende Gewebe möglich (Shaw et al. 2007).

In Myofibroblasten findet sich ein ausgedehntes raues endoplasmatische Retikulum, ein gut entwickelter Golgi-Apparat und typischer Weise keine Basalmembran. Außerdem sind sie über Gap-Junctions verbunden. Diese Eigenschaften sind ebenfalls typisch für Fibroblasten (Sandbo et al. 2011). Für Fibroblasten als Ursprung der Myofibroblasten spricht außerdem, dass sich in den Zellen Vimentin und nicht-muskuläres Myosin nachweisen lassen; zusätzlich sind sie negativ für Laminin und Desmin, die beide glattmuskuläre Proteine sind (Tomasek et al. 1987, Hinz et al. 2007).

Das spezifische Mikrofilament der Myofibroblasten ist α -SMA (*smooth muscle actin*). Dieses wird auch als Nachweis der Anwesenheit von Myofibroblasten im Gewebe verwendet (Hinz et al. 2007). In Dupuytren-Gewebe ist die Konzentration von α -SMA erhöht (Hindman et al. 2003) und die Expression von α -SMA ist positiv korreliert mit der Entstehung bzw. Erzeugung von kontraktile Kraft in Dupuytren'schen Zellen (Tomasek et al. 1995). Myofibroblasten werden in den Knoten der Zellproliferation gefunden und verschwinden in den Kontraktursträngen (McFarlane et al. 1990).

Die Proliferation von Myofibroblasten kann *in vitro* stimuliert werden durch die Gabe von TGF- β 1 und 2 (*transforming growth factor*) sowie Fibronektin ED-A (Hinz et al. 2007). Außerdem stimuliert mechanischer Stress ebenfalls die Proliferation von Myofibroblasten (Halliday et al. 1995, Tomasek et al. 2002). Weitere Zytokine und Wachstumsfaktoren wie PDGF (*platelet-derived growth factor*) und TNF- α (Tumor Nekrose Faktor) induzieren zwar die Proliferation von Myofibroblasten, nicht aber die Expression von α -SMA im Gewebe, welches ein entscheidender Effekt zu sein scheint (Tomasek et al. 1999). Das Wachstum der Myofibroblasten wird durch die Gabe von Interleukin 1 α und β und Interferon- γ dahin gegen inhibiert (Pittet et al. 1994, Shephard et al. 2004).

1.2.2. Veränderungen in der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix

Fibroblasten produzieren sowohl Kollagen als auch Glykosaminoglykane. Da die Zellproliferation in dem erkrankten Gewebe erhöht ist, ist auch die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix verändert. Im Gewebe der Dupuytren-Aponeurose ist der Gesamtkollagengehalt erhöht (Bazin et al. 1980). Hierbei ist das Kollagen Typ III im Verhältnis zu Kollagen Typ I erhöht, was dadurch bedingt ist, dass wegen der erhöhten Zellproliferation und –dichte weniger Kollagen-Typ I durch die Myofibroblasten produziert wird (Lam et al. 2010). Kollagen-Typ IV, V und VI sind ebenfalls erhöht. Diese Kollagen-Typen finden sich hauptsächlich in den zellreichen Gewebebereichen (McFarlane et al. 1990, Berndt et al. 1994, Magro et al. 1997, Lee et al. 2006). Die Überexpression von TGF- β führt auf mehreren Wegen zu einer Verstärkung der pathologischen Situation. Zum einen stimuliert TGF- β die Produktion von extrazellulären Matrix Proteinen wie Kollagen, Fibronectin und Integrine durch die Fibroblasten und zum anderen inhibiert es die Enzyme wie z.B. Kollagenasen, die diese abbauen, (Blobe et al. 2000).

Fibronectin ist ein adhäsives extrazelluläres Glykoprotein. Durch alternatives Spleißen der prä-mRNA werden aus einem Gen mehrere Variationen des Fibronectin kodiert (Van Obberghen-Schilling et al. 2011). Während des aktiven Krankheitsprozesses ist die Fibronectin-Konzentration im Gewebe erhöht und nimmt zur Residualphase langsam wieder ab (Halliday et al. 1994). Interessanter Weise ist besonders die fötale Isoform des Fibronectin ED-B+ hoch reguliert. Dies zeigt, dass vermutlich der Pathogenese des Morbus Dupuytren Parallelen von bei der Wundheilung wirksamen Prozessen zu Grunde liegen (Halliday et al. 1994, Berndt et al. 1998). Fibronectin verbindet Fibroblasten mit dem umliegenden Kollagen. Auf diese Weise überträgt es die intrazelluläre Kontraktionskraft auf die extrazelluläre Matrix (Tomasek et al. 1987). Damit hat es eine Schlüsselrolle bei Remodellierungsabläufen im Bindegewebe inne (Halliday et al. 1994).

Laminin, ein Protein der Basalmembran und Tenascin, ein Glykoprotein der extrazellulären Matrix, zeigen ein ähnliches Expressionsprofil wie Fibronectin (Berndt et al. 1994). Forsman et al. (2008) haben gezeigt, dass zum einen im Dupuytren-Gewebe Myoglobulin herunter reguliert ist und zum anderen der Tyrosinkinase Orphanlike Rezeptor 2 (ROR2) deutlich stärker exprimiert wird als im gesunden Gewebe. Interes-

santer Weise ist der ROR 2 auch mit anderen Erkrankungen mit Handdeformitäten assoziiert (Schwabe et al. 2000). Diese Veränderungen müssen aber noch weiter erforscht werden.

Glykosaminoglykane sind Makromoleküle der extrazellulären Matrix, die aus einem Kernprotein (core-protein) und mindestens einem peripheren Polysaccharid-Fragment bestehen. Diese bestimmen in ihrer unterschiedlichen Zusammensetzung wesentlich die Steifigkeit und Stabilität der Extrazellulären Matrix. Die jeweilige Zusammensetzung der Glykosaminoglykanarten ist gewebespezifisch. Diese Mischung bestimmt die Viskosität und Permeabilität des Gewebes. Außerdem hängt die Wasserbindungsfähigkeit und damit der Turgor der extrazellulären Matrix von ihr ab (Löffler et al. 2007). Dieser ist beim Morbus Dupuytren signifikant erhöht (Bazin et al. 1980). In erkranktem Gewebe ist zum einen der Gesamtgehalt an Glykosaminoglykanen erhöht und zum anderen die Zusammensetzung der verschiedenen Proteine verändert. Dies haben z. B. Strukturanalysen von Kozma et al. (2007) ergeben. Obwohl alle Glykosaminoglykane durch einen hohen Umsatz gekennzeichnet sind, kann man bei Dupuytrenpatienten erhöhte Werte im Blutserum nachweisen (Brenner et al. 2003).

1.2.3. Regulation von Wachstumsfaktoren, Rezeptoren und Enzymen im Dupuytrogewebe

Eine Vielzahl an Wachstumsfaktoren sind im Rahmen der Dupuytren'schen Kontraktur verändert; diese sind daher entweder ursächlich oder als Folge der Erkrankung beteiligt. Ein kurzer Überblick über den aktuellen Stand der Forschung soll hier gegeben werden. Die Überexpression von TGF- β , ist eine der bekanntesten und am besten untersuchten Veränderungen im Dupuytrogewebe (Baird et al. 1993, Zhang et al. 2008). Dieser Wachstumsfaktor ist für die Regulation diverser Matrixproteine, wie Fibronectin, Kollagen, Glykosaminoglykane und weiterer, welche beim Morbus Dupuytren verändert sind, verantwortlich. Darüber hinaus wird TGF- β häufig bei Entzündungs- und Fibroseprozessen ausgeschüttet (Oberringer et al. 2008). Insofern sind die Interaktionswege zwischen der Erkrankung und diesem Wachstumsfaktor vielfältig. Der PDFG (*platelet-derived growth factor*) und der FGF (*fibroblast growth factor*) sind Stimulatoren der Fibroblastenproliferation und werden im Dupuytrogewebe

webe vermehrt exprimiert (Gonzalez et al. 1992, Khashan et al. 2011). Hinzu kommt, dass mit zunehmender Zugkraft auf das Gewebe, die Expression von PDGF durch die Fibroblasten steigt (Terek et al. 1995, Alman et al. 1996). Ebenfalls hoch reguliert ist der EGF (*epidermal growth factor*) (Augoff et al. 2005). Der EGF spielt eine Rolle bei Zellproliferation und -differenzierung.

Mehrere Studien haben gezeigt, dass die Regulation der Matrix-Metalloproteinasen stark verändert ist. So sind MMP 2, 13, 14 und TIMP 1 (Tissue Inhibitors of Metalloproteinasen) hoch reguliert (Ulrich et al. 2003, Johnston et al. 2007, 2009). Da diese Enzymgruppe wesentlich die Synthese und Ablagerung von Kollagen beeinflussen, verstärken diese Veränderungen maßgebend die Entstehung der Fibrose. Townley et al. (2009) haben daher *in vitro* die Wirkung von dem MMP-Inhibitor Ilo-mastat auf Dupuytren-Fibroblasten untersucht. Diese Studien zeigten eine Verringerung der Kontraktion der Fibroblasten bei Gabe von Ilo-mastat, allerdings fehlt noch die Untersuchung *in vivo*.

Pagnotta et al. (2002) haben gezeigt, dass in Dupuytren-Gewebe Androgenrezeptoren stärker exprimiert werden; dies könnte die Androtopie des Morbus Dupuytren mitbegründen. Die Expression des *heat shock protein 47*, Interleukin 1 und von MafB sind hoch reguliert (Baird et al. 1993, Howard et al. 2004, Lee et al. 2006). Die Bedeutung der Ergebnisse dieser Studien muss noch weiter untersucht werden. Vi et al. (2009) haben gezeigt, dass Periostin, ein Matrixprotein, das sezerniert wird, in Dupuytrentgewebe in erhöhter Konzentration nachweisbar ist. Interessanter Weise bindet Periostin an $\alpha V\beta 3$ und $\alpha V\beta 5$ Integrine und moduliert darüber die Zellmotilität und -proliferation (Gillan et al. 2002).

1.2.4. Verändertes Integrinprofil der Dupuytrenzellen

Die Veränderungen in der extrazellulären Matrix, besonders in Hinsicht auf die Hochregulation von Fibronectin aber auch die Veränderungen im Adhäsionsverhalten, weisen auf die Möglichkeit hin, dass das Integrinprofil der Dupuytrenzellen ebenfalls verändert sein könnte. Integrine sind transmembranäre Proteine, die sowohl bei Zell-Zell- als auch bei Zell-Matrixkontakten eine wichtige Rolle spielen. Sie spielen unter anderem eine Rolle bei Zellproliferation, -migration, -morphologie, -differenzierung

und Apoptose. Integrine sind Dimere, die jeweils aus einer α und einer β Untereinheit bestehen, es sind 18 α - und 8 β -Untereinheiten bekannt. Fibronektin ist ein wichtiger Integrinligand (Docheva et al. 2007).

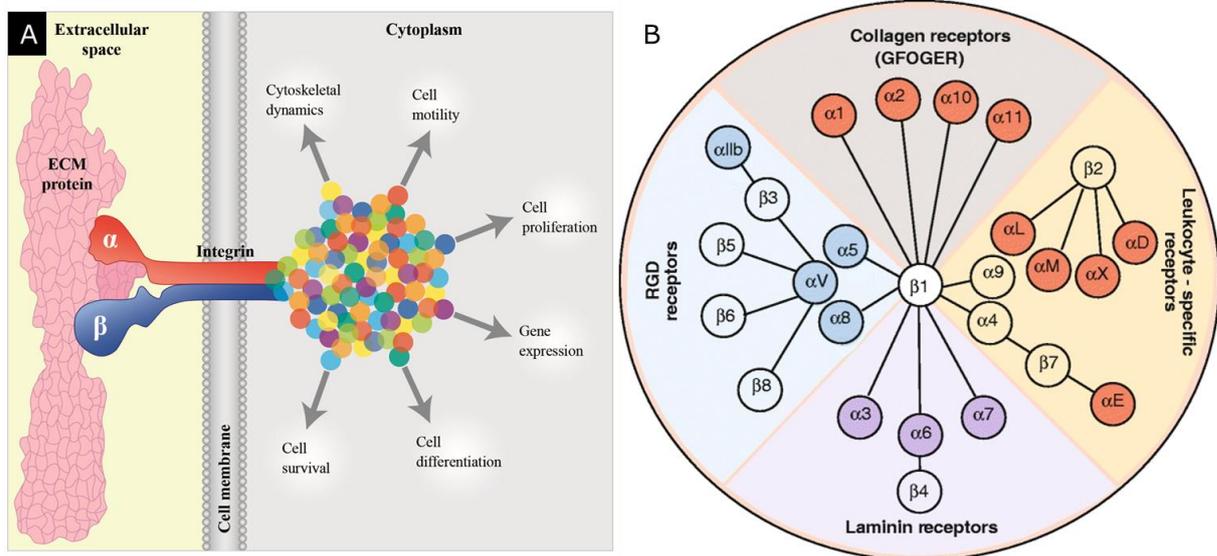


Abbildung 5: Schematisches Integrinmodell. 5A zeigt den Aufbau des transmembranösen Integrinrezeptors aus einer α - und einer β -Untereinheit (Docheva et al. 2007). 5B gibt eine Übersicht über die vielfachen Liganden der Integrinrezeptoren (Barczyk et al. 2010).

Magro et al. (1995, 1997) wiesen mittels Immunofärbung die Hochregulation des $\alpha5\beta1$ -Integrins in den zellreichen Knoten nach. In den zellarmen Strangregionen, ließ sich diese Veränderung nicht zeigen. Für die ebenfalls untersuchten Integrine $\alpha2\beta1$ und $\alpha6\beta1$ ließen sich dahingegen keine Veränderung nachweisen. Bereits 1997 untersuchten (Quaglino et al.) Dupuytrenzellen mittels FACS (*fluorescence activated cell sorting*, Durchflusszytometrie) und zeigten, dass die Expression der Integrine verändert ist. Sie fanden eine Erniedrigung der $\alpha2$ Integrine und eine Erhöhung der $\alpha5$ Integrine, vor allem in Zellen, die aus Strangpräparaten gewonnen worden waren. Hoch et al. untersuchten (2002) ebenfalls per FACS Dupuytrenzellen auf ihr Integrinprofil, allerdings fanden sie keine Unterschiede zu den Kontrollzellen für die Integrine $\alpha2$ und $\alpha3$ und $\beta1$.

1.2.5. Genetische Veränderungen im Zusammenhang mit Morbus Dupuytren

Da eine familiäre Häufung bei Morbus Dupuytren bekannt ist, wird seit langem untersucht, welche Risikofaktoren auf genetischer Ebene zu finden sind. Dabei ließen sich verschiedene Veränderungen feststellen. Hu et al. (2005) haben bei einer schwedischen Familie mit Morbus Dupuytren einen Abschnitt auf Chromosom 16q identifiziert, der dominant für die Erkrankung ist. Shih et al. (2009) fanden aufbauend auf dieser Studie ein Gen, IRX 6, das bei Morbus Dupuytren hoch reguliert ist.

Dass HLA-DR3 positive Patienten ein erhöhtes Risiko haben an Morbus Dupuytren zu erkranken, fanden Neumüller et al. (1994). Spencer et al. (1984) konnten ebenfalls eine signifikante Assoziation für HLA-DR4 positive Patienten nachweisen. Weiterhin wurde eine erhöhte Inzidenz des Morbus Dupuytren für Patienten, die HLA-DR1*15 positiv sind, festgestellt (Brown et al. 2008).

Bekannt Polymorphismen für TGF- β wurden untersucht, sind aber nicht mit Morbus Dupuytren assoziiert (Bayat et al. 2002, 2003). Dahingegen konnte ein Polymorphismus für Zf9 signifikant mit dem Risiko Morbus Dupuytren zu entwickeln, assoziiert werden (Bayat et al. 2003). Des Weiteren wurde ebenfalls eine mitochondriale Mutation gefunden, die hoch signifikant für Dupuytrenpatienten ist (Bayat et al. 2005). Dolmans et al. (2011) haben bei 2300 Dupuytren- Patienten 9 SNPs nachgewiesen, von denen 6 die Signalkaskade des Wnt-Proteins beeinflussen. Dies ist zum einen ein Beleg für eine genetische Ursache des Morbus Dupuytren und zum anderen ein Nachweis, dass das Wnt-Protein eine Beteiligung an der Pathogenese haben könnte.

1.2.6. Hypoxie und freie Sauerstoffradikale als mögliche Ursachen

Histologisch findet sich beim Morbus Dupuytren eine Einengung der Lumina der Endgefäße, die durch eine Verdickung der Endothelwände bedingt wird (Comtet et al. 1985). Dadurch kommt es zu einer Minderperfusion, welche die Proliferation von Fibroblasten stimuliert und durch die lokale Hypoxie die Bildung von Myofibroblasten begünstigt. Das Interessante an dieser These ist, dass sie auf der Mikroangiopathie gründet, die sowohl Nikotinabusus, Alkoholabusus, Diabetes mellitus, Leberzirrhose als auch das repetitive Handtrauma als Ursache haben kann.

Die Frage, ob es das Trigonum palmare, also eine per se hypovaskuläre Zone, in der Hohlhand gibt, wird in der Literatur diskutiert (Conway et al. 1954, Schrader et al. 1997, Elsner et al. 2001). Die Hypothese, dass Hypoxie allein die Progression der Erkrankung befördert, wird erweitert durch die Frage nach der Rolle der freien Sauerstoffradikale im Gewebe. Murrell et al. (1987, 1990) fanden 6-fach erhöhte Hypoxanthinwerte in erkrankter Aponeurose, was ebenfalls durch Hypoxie bedingt zu sein scheint (Kloen 1999). Der Abbau von Hypoxanthin durch die Hypoxanthinoxidase läuft mit der Abgabe freier Sauerstoffradikale einher. Freie Sauerstoffradikale stimulieren die Proliferation von perivaskulären Zellen, was wiederum die Gefäßverengung und die damit die Gewebhypoxie verstärkt. Dazu kommt, dass außerdem die Fibroblastenproliferation sowie die Kollagenproduktion angeregt wird und sich dadurch die Fibrose verstärkt (Shih et al. 2010).

1.3. Ziel der Arbeit - Charakterisierung der Zellen aus der Dupuytren'schen Kontraktur auf molekularbiologischer Ebene

Die Tatsache, dass bislang weder die Ätiologie noch die Pathogenese des Morbus Dupuytren umfassend verstanden sind, ist ein grundlegendes Problem für die Entwicklung kausaler Therapieansätze. Die Forschung hat sich, wie oben dargestellt, mit vielen Veränderungen im erkrankten Gewebe beschäftigt; allerdings wurde die Charakterisierung der Zellen selbst erst sehr wenig erforscht. Mit dem Ziel einen neuen Therapieansatz für den Morbus Dupuytren zu finden haben wir in der vorliegenden Studie Zellen aus Palmaraponeurosen von Morbus-Dupuytren-Patienten isoliert und mit Zellen aus gesunder Palmaraponeurose verglichen.

Die hohe Rate an Rezidivkrankungen wirft außerdem die Frage auf, ob sich grundlegende Unterschiede zwischen Zellen aus Dupuytrenerstmanifestationen und Zellen aus Rezidivoperationen feststellen lassen.

Dazu wurden zuerst grundlegende Techniken etabliert, die Frage der Isolation und Kultivierung der Zellen betreffend. In einem zweiten Schritt wurden das Wachstumsverhalten in der Langzeitkultur und die Stammzeleigenschaften der Zellen untersucht.

Die Bezeichnung der Zellen als Myofibroblasten führte zur Untersuchung der Fragestellung ob und in welchem Ausmaß sich Dupuytren'sche Zellen in andere Zelllinien differenzieren lassen. Hierbei galt das vorrangige Forschungsinteresse der Frage, inwieweit sich die Zellspezifität der Zellen verändert hat.

Außerdem sollte ausgehend von den bereits bekannten Veränderungen im Gewebe ein Profil der Veränderungen auf RNA-Ebene mittels PCR-Untersuchung erstellt werden. Die bereits erforschten Veränderungen (Quaglino et al. 1997, Hoch et al. 2002) ließen uns dabei einen Schwerpunkt auf das Integrinprofil der Zellen legen. Da die bisherigen Untersuchungen nicht auf PCR-Ebene durchgeführt worden waren, interessierte uns das Expressionsprofil in dieser Untersuchung besonders.

2. Material und Methoden

2.1. Operationspräparate

Alle verwendeten Proben stammen aus geplanten ambulanten Operationen des Fachbereiches Handchirurgie, plastische Chirurgie der Chirurgischen Klinik und Poliklinik Innenstadt, der Ludwig-Maximilians-Universität München. Die Patienten wurden vor den Operationen über ihre Teilnahme an der Studie aufgeklärt und mit Hilfe eines Fragebogens (s. Anhang) aufgenommen. Alle Patienten willigten schriftlich in die Teilnahme ein. Für die Verwendung der Proben zu Forschungszwecken liegt der bewilligte Antrag an die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der LMU (Ethikantrag 166-08) vor.

2.2. Spenderkollektiv

2.2.1. Epidemiologie des Spenderkollektivs

Tabelle 2 zeigt die Übersicht über alle Spender der Präparate, die im Rahmen dieser Studie untersucht wurden. Alle Patienten wurden anonymisiert mit der Kennung HA. Dabei steht HA für humane Aponeurose und die Zahl für die Reihenfolge, in der die Proben im Labor eintrafen. Es wurden ausschließlich Männer kaukasischer Herkunft untersucht. Wie die Tabelle zeigt, kamen in dem Kollektiv die Risikofaktoren Nikotin sowie Alkoholabusus gehäuft vor. Eine Erkrankung an Diabetes mellitus Typ 2 wurde einmal angegeben. Außerdem wiesen mehrere Spender eine positive Familienanamnese auf.

Nr.	Gruppe	Familie	Nikotin	Alkohol	Diabetes	Rezidiv	Tubiana
HA-1	PrimDup 1						2
HA-2			x		x		4
HA-3							2
HA-4							1
HA-5	PrimDup 2	x					4
HA-6			4 PY				2
HA-7	RezDup 1		ex 20 PY			3x	4
HA-8	RezDup 2			2/d		1x	3
HA-9	PrimDup 3	x					2
HA-10		x		1/d			2
HA-11			ex 3PY	1/d			1
HA-12		x	ex 10PY				1
HA-13		x					1
HA-14	RezDup 3					1x	2
HA-15	Kon						

Tabelle 2: Das Spenderkollektiv zeigt die Übersicht über alle Spender der Präparate, die im Rahmen dieser Studie untersucht wurden. Alle Patienten wurden anonymisiert mit der Kennung HA. Dabei steht HA für humane Aponeurose und die Zahl für die Reihenfolge, in der die Proben im Labor eintrafen. Es wurden ausschließlich Männer kaukasischer Herkunft untersucht. Abkürzungen: HA humane Aponeurose, PrimDup primärer Dupuytren, RezDup Rezidivdupuytren, Kon Kontrollzellen, PY Pack Years, d Tag.

2.2.2. Selektion der Spender

Auf Grund des gut belegten Einflusses von Nikotin (Burge et al. 1997), Alkohol (Burge et al. 1997), Diabetes (Brenner et al. 2001), Epilepsie (Stuhler et al. 1977) und HIV (Bower et al. 1990) wurden Präparate der Patienten mit diesen Kriterien ausgeschlossen. Eine familiäre Belastung wurde so häufig festgestellt, dass es nicht möglich war ausschließlich Patienten ohne jegliche Risikofaktoren einzuschließen. Es konnte aber eine Gruppe ohne extrinsische Risikofaktoren für M.Dupuytren gebildet werden. Es resultierten, wie in Tabelle 3 dargestellt, zwei Gruppen á drei Spender. Die Spender HA1, HA5 und HA9 wurden in die Gruppe der Zellen aus primären Dupuytren, d.h. ohne extrinsische Risikofaktoren, eingeschlossen und als PrimDup1, PrimDup2 und PrimDup3 bezeichnet. Die Spender HA7, HA8 und HA14 wurden in

die Gruppe der Rezidivpatienten eingeschlossen und als RezDup1, RezDup2 und RezDup3 bezeichnet. In dieser Gruppe treten externe Risikofaktoren gehäuft auf (s. Tabelle 3). Die Kontrollzellen aus gesunder Palmaraponeurose stammen aus einer Operation zur Entlastung eines Karpaltunnelsyndroms und wurden als Kon bezeichnet.

	Familie	Nikotin	Alkohol	Diabetes	Rezidiv	Tubiana
PrimDup 1						2
PrimDup 2	x					4
PrimDup 3	x					2
RezDup 1		Ex 20 PY			3x	4
RezDup 2			2/d		1x	3
RezDup 3					1x	2
Kon						

Tabelle 3: Selektion der Spender. Aus dem Kollektiv der Spender wurde sowohl eine Gruppe mit Patienten ohne extrinsische Risikofaktoren gebildet und als PrimDup benannt als auch eine Gruppe mit Patienten, die wegen eines Rezidivs operiert wurden und diese als RezDup benannt. Die Kontrollzellen stammen aus einer Operation zur Entlastung eines Karpaltunnelsyndroms. Abkürzungen: PrimDup primärer Dupuytren, RezDup Rezidivdupuytren, Kon Kontrollzellen, PY Pack Years, d Tag.

2.3. Zellkultur

2.3.1. Zellisolation

Alle Präparate wurden unter sterilen Bedingungen in 50ml Falcon-Röhrchen (Sarstedt, Deutschland) mit Nährmedium bestehend aus 85% DMEM/HAM'S mit Glutamin (Gibco, USA), 10% fötalem Kälberserum (Sigma), 2% MEM-Aminosäuren (Biochrom, Deutschland), 1% Ascorbinsäurephosphat (Sigma), 1% Penicillin /Streptomycin (Gibco, USA), 1% Patricin (Biochrom, Deutschland) gegeben. Direkt im Anschluss erfolgte die erste Waschung in einer 100mm Petri-Schale (Falcon, USA) mit PBS (phosphate-buffered saline; Merck, Deutschland), so dass keine Blutreste mehr zurückblieben. Mit Hilfe eines Skalpell und Pinzette wurde sämtliches

Fettgewebe ab präpariert. Bei der Isolierung der Zellen wurden zwei unterschiedliche Protokolle verwendet, veröffentlicht von Salingcarnboriboon et al. (2003) und von Schulze-Tanzil et al. (2004):

Protokoll nach Salingcarnboriboon:

Das Dupuytregewebe wurde mit einem Skalpell in möglichst kleine Stücke geschnitten. In einem sterilen 15ml Falconröhrchen (Sarstedt) wurde Dupuytren Zellmedium mit 0,15% Kollagenase II (Worthington, USA) gemischt, danach wurden die Gewebestückchen in dem Verdaumedium für 14-16h in einem 37°C Inkubator auf einer Schüttelplatte inkubiert. Dabei war es wichtig, nicht zu viel Gewebe in ein Falconröhrchen (Sarstedt) zu geben, damit alles Gewebe gleichmäßig verdaut werden konnte. Nach Ablauf der Verdaupzeit wurde die gesamte Probe durch ein steriles Nylonnetz (70µm) (Falcon) gefiltert und das Filtrat zentrifugiert (CT 422, Jouan, Frankreich) bei 500 x g für 5min. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in Zellmedium aufgelöst und die Zellen in Kulturflaschen (Nunc GmbH & Co. KG, Deutschland) bei nicht mehr als 30-40% Konfluenz ausgesät.

Protokoll nach Schulze- Tanzil:

Das Dupuytregewebe wurde ebenfalls in möglichst kleine Stücke geschnitten. Diese Stücke wurden mit viel Abstand zwischen den Gewebestücken in sterilen 100mm Petri-Schalen (Falcon, USA) verteilt und gerade so mit Zellmedium bedeckt, dass sie den Bodenkontakt sicher nicht verlieren konnten. Die Schalen wurden im Brutschrank (Ser. Nr.: 39709355, Jouan, France) bei konstant 37°C und 5% CO₂ gelagert. Das Medium wurde alle drei Tage gewechselt. Dabei wurde mittels einer sterilen Glaspipette etwa 2/3 des alten Mediums abgesaugt und dieses durch frisches Medium ersetzt. Sobald so viele Zellen aus dem Gewebe ausgewandert waren, dass ihre Konfluenz 50-60% erreichte, wurde das Gewebe entfernt und die Zellen trypsiniert.

Um Dupuytrenzellen aus molekularbiologischer Sicht besser charakterisieren zu können, war es essenziell diejenige Isolationsmethode zu wählen mit der die Zellen am wenigsten verändert werden. Die Isolation der Zellen aus dem Dupuytregewebe per Verdau dauert einen Tag, wohin gegen die Migration der Zellen aus dem Gewebe ca. 14 Tage dauert. Dies bedeutet, dass die Zellen länger den *in vitro*

Bedingungen ausgesetzt sind, bevor weitere Versuche eingeleitet werden und z.B. RNA isoliert werden kann. Zusätzlich werden die Zellen durch den Migrationsprozess bereits selektiert und verändert. Außerdem kommt hinzu dass die Zellen morphologisch weniger homogen sind. Um vergleichbare und möglichst originäre Zellen zu untersuchen, wurden für alle Experimente nur Zellen, die per Verdau isoliert wurden, verwendet.



Abbildung 6: Dupuytrenpräparat.

2.3.2. Zellkulturbedingungen

Die Zellen wurden in Zellmedium (siehe Tabelle 4) in Kulturflaschen (Nunc) in Brutschrank (Jouan) unter konstant 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Bei den frühen Passagen (0-2) wurde Patrizin (Biochrom, Deutschland) zum Medium dazugegeben um eine Pilzinfektion zu verhindern. Alle Arbeiten mit den Zellen wurden in einer sterilen Arbeitsbank, die über einen ständigen laminaren Luftstrom verfügt, durchgeführt. FBS (Sigma, Deutschland) wurde vor der Verwendung im Wasserbad bei 56°C hitzeinaktiviert.

Zusätze	Konzentration	Volumen auf 500ml	Unternehmen
DMEM/ HAM'S mit Glutamin	85%	425 ml	Gibco, USA
Fetales Kälber Serum (FBS)	10%	50 ml	Sigma, Deutschland
MEM- AS	2%	10 ml	Biochrom, Deutschland
Ascorbin Säure Phosphat	1%	5 ml	Sigma
Penicillin/ Streptomycin	1%	5 ml	Gibco
Patrizin	1%	5 ml	Biochrom

Tabelle 4: Medium für Dupuytrenzellen.

2.3.3. Zellen passagieren

Bei einer Konfluenz von 85-90% wurden die Zellen passagiert. Dabei wurde zuerst das alte Medium verworfen und die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen in 2ml Trypsin/ EDTA-Lösung (PAA, Österreich) für ca. 5min inkubiert (37°C, 5% CO₂) und nach Ablauf der Zeit unter dem Mikroskop kontrolliert, dass alle Zellen sich abgelöst haben. Das Trypsin (PAA) wurde mit 5ml Zellmedium inaktiviert und nach sorgfältigem Durchmischen mittels einer sterilen Pipette in ein 15ml Falconröhrchen (Sarstedt) umgefüllt und bei 500 x g für 5min zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum verworfen und das Zellpellet in neuem Medium resuspendiert. Daraufhin wurden die Zellen gezählt und neu ausgesät.

2.3.4. Zellen zählen

Für die Zellzählung wurden eine Neubauer Zählkammer (Fa. Brand, Deutschland) genutzt. Dabei pipettiert man 10µl der Zellsuspension unter das Deckglas der Zählkammer. Im Mikroskop (10x Vergrößerung) wurden die vier Hauptfelder der Zählkammer ausgezählt, wobei von den Zellen, die auf den Rändern lagen, nur die Zellen auf dem linken und oberen Rand berücksichtigt wurden.

Die Zellzahl wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl/ ml} = (\text{Summe der vier Quadranten}/4) \times 10^4$$

2.3.5. Zellen einfrieren und auftauen

Zellen wurden trypsiniert und gezählt (s.o.) und dann in gekühltem (4°C) Einfriermedium resuspendiert und in 1,8ml Cryovials pipettiert. Dabei wurden Zellkonzentrationen von $0,5 \times 10^6$ – 1×10^6 /ml eingehalten. Das Einfriermedium bestand aus Zellmedium 70%, FBS 20% (Sigma) und Dimethyl Sulfoxid (DMSO) 10% (Merck, Deutschland). DMSO (Merck) verhindert die Bildung von Kristallen und schützt so die Zellen vor Beschädigung durch Scherkräfte. Die Cryovials wurden 15-30min in Trockeneis gelagert bis die gesamte Flüssigkeit im Cryovial gefroren war. Danach wurden die Cryovials im -80°C Gefrierschrank oder in flüssigem Stickstoff gelagert. Um die Zellen wieder aufzutauen, wurden die Cryovials in Wasserbad bei 37°C solange erwärmt bis der gesamte Inhalt wieder flüssig war. In einem 15ml Falconröhrchen

(Sarstedt) mit 2ml frischem Medium wurden die Zellen für 5min bei 500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen resuspendiert und in sterilen Zellkulturflaschen (Nunc) bei 30-40% Konfluenz ausgesät.

2.3.6. Wachstumskurve

Für die Langzeitwachstumskurve wurden jeweils 60.000 Zellen in eine T25 Zellkulturflasche (Nunc) ausgesät. Sobald die Zellen 85-90% Konfluenz erreichten, wurden die Zellen passagiert, gezählt und erneut 60.000 Zellen in eine neue T25 Zellkulturflasche (Nunc) ausgesät.

2.3.7. Berechnung der kumulativen Populationsverdopplungszeit

Für das Langzeitwachstumsverhalten der Zellen wurden die Zellen nach dem oben beschriebenen Protokoll beobachtet. Daraus wurde die Populationsverdopplungszeit (PD) berechnet. Die PD wird genutzt um das Zellwachstum auf logarithmischer Basis zu beschreiben.

Für die Berechnung wurde in jeder Passage die folgende Formel benutzt:

$$PD = (\log (N_n / N_0)) / \log 2$$

N_n = Anzahl der Zellen zum Zeitpunkt des Trypsinierens

N_0 = Anzahl der Zellen, die ausgesät wurden

Die kumulative PD ergibt sich hieraus und ist die Summe der einzelnen Populationsverdopplungszeiten.

2.3.8. Colony forming units (CFU) Assay

Das CFU-Assay erfolgte nach dem Protokoll von Alberton et al. (2011). Zusammengefasst wurden 1.500 Zellen in einer 100mm Petri-Schale ($A=56,7\text{cm}^2$) in 7ml Zellmedium mit β -Mercaptoethanol ausgesät. Die Zellen wurden für 14Tage im Brutschrank unter Standardbedingungen inkubiert. Das Medium wurde alle 3Tage gewechselt. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 3ml Crystal Violet

(250mg Crystal Violet in 50ml Methanol; Sigma) gefärbt. Anschließend wurden die überschüssigen Reste des Crystal Violets abgesaugt, die Kolonien sorgfältig mit PBS gewaschen und gezählt. Die Effizienz des Assays wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{CFU Effizienz [\%]} = (\text{Anzahl der Kolonien} / \text{Anzahl der ausgesäten Zellen}) \times 100$$

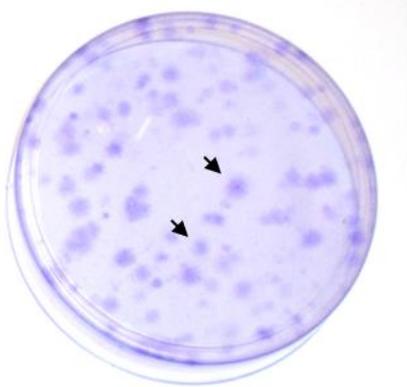


Abbildung 7: (Petri-Schale 100mm) Die Anzahl der gebildeten Kolonien spiegelt die Fähigkeit der Zellen, Kolonien zu bilden, wieder. Die Pfeile weisen beispielhaft auf einzelne Kolonien.

2.3.9. Osteogene Differenzierung

2.3.9.1. Induktion der osteogenen Differenzierung

Um eine osteogene Differenzierung zu induzieren wurden die Zellen mit einer Dichte von 5000 Zellen/cm² in einer 6-*well*-Platte (BD Biosciences, Deutschland) ausgesät. Bis zu einer Konfluenz von 70-80% wurden sie im Standardzellmedium inkubiert. Anschließend wurde für die Dauer von 21 Tagen in der Hälfte der *wells* auf osteogenes Induktionsmedium bestehend aus DMEM high glucose medium (PAA Laboratories GmbH, Österreich), 10% FBS, 40IU/ml Penicillin/Streptomycin, 100µM Dexamethason (Sigma) und 50µM L-Ascorbinsäurephosphat umgestellt. Die andere Hälfte der *wells* wurde als Negativkontrolle weiter mit Standardzellmedium inkubiert. Das Medium wurde alle drei Tage gewechselt (Bocker et al. 2008, Alberton et al. 2011).

2.3.9.2. Alzarin Rot Färbung

Die osteogene Induktion wurde für jeweils 21Tage durchgeführt. Danach wurden die Zellen mit PBS (Merck) gewaschen und für 15min mit Formaldehyd (Sigma) bei Raumtemperatur fixiert. Nach der Fixierung wurde der Formaldehyd (Sigma) mit destilliertem Wasser gewegewaschen und die Zellen mit 40mM Alzarin Rot Lösung (Sigma) für 20min bei Raumtemperatur gefärbt. Die Reste der Farbe wurden wiederum mit destilliertem Wasser gewegewaschen und die Zellen unter dem Axiovert100 Mikroskop mit einer AxioCam ICc3 Farbkamera (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Deutschland) fotografiert.

2.3.9.3. Osteogene Quantifizierung

Die Quantifizierung der osteogenen Differenzierung wurde mittels eines Osteogenesis Quantitations Kit (Millipore, Deutschland) durchgeführt. Für die Quantifizierung wurde das Protokoll des Herstellers befolgt.

Hierbei wurde das Ausmaß der osteogenen Differenzierung mittels des Vergleichs zwischen der Alzarin Rot Aufnahme durch die Zellen und einer Standardkurve einer Alzarin Rot Verdünnung quantifiziert.

2.3.10. Adipogene Differenzierung

2.3.10.1. Induktion der adipogenen Differenzierung

Um eine adipogene Differenzierung zu induzieren wurden die Zellen mit einer Dichte von 5000 Zellen/cm² in einer 6-well-Platte ausgesät. Bis zu einer Konfluenz von 90% wurden sie im Standardzellmedium inkubiert, anschließend wurde das Medium in der Hälfte der wells für eine Dauer von 5Tagen durch adipogenes Induktionsmedium ausgetauscht. Dieses bestand aus DMEM high glucose medium, 10% FBS, 40IU/ml Penicillin/Streptomycin, 4mM L-Glutamin, 1µM Dexamethason, 0,2mM Indomethacin, 0,01mg/ml Insulin und 1mM 3-Isobutyl-1-Methyl-Xanthin (alle Sigma). Nach fünf Tagen wurden die Zellen für 2 Tage in adipogenem Erhaltungsmedium inkubiert. Dieses enthielt DMEM high glucose medium, 10% FBS, 40IU/ml Penicillin/Streptomycin, 4mM L-Glutamin und 0,01mg/ml Insulin. Abschließend erfolgte erneut eine fünftägige Kultur in Induktionsmedium sowie eine zweitägige Kultur in Erhaltungsmedium. Die

andere Hälfte der *wells* wurde als Negativ-Kontrolle weiter in Standardzellmedium inkubiert.

2.3.10.2. Oil Red O Färbung

Die adipogene Differenzierung nach oben beschriebenem Protokoll wurde jeweils für 16 Tage ausgeführt. Danach wurden die Zellen mit PBS (Merck) gewaschen und mit Formaldehyd (Sigma) auf -20° C für 2min fixiert. Daraufhin wurde der Formaldehyd (Sigma) mit 50% Ethanol gewaschen und die Zellen mit 0,2% Oil Red O Lösung (Sigma) für 20min bei Raumtemperatur gefärbt. Nach erfolgter Färbung wurden die Überreste der Farbe mit destilliertem Wasser gewaschen und die Zellen unter dem Mikroskop (Carl Zeiss) fotografiert.

2.4. *Myotube formation*

2.4.1. Induktion der *Myotube formation*

Das Protokoll für die Induktion der *Myotube formation* wurde adaptiert nach Tourovskaia et al. (2006). Es wurden jeweils 6000/cm² Zellen in eine 6-*well*-Platte (BD Biosciences) ausgesät und Standardzellmedium inkubiert bis eine 95-100% Konfluenz erreicht war. Daraufhin wurde das Medium in drei *wells* zu Myotuben-Induktionsmedium gewechselt. Das Induktionsmedium bestand aus DMEM/HAM'S 94% (Gibco), Pferdeserum 2%, MEM-AS 2%, Penicillin/Streptomycin 1%, Ascorbinsäure Phosphat 1% (alle Sigma). Die Zellen wurden für 14Tage im Induktionsmedium inkubiert. Die restlichen drei *wells* dienten als Negativ-Kontrolle. Ein Mediumwechsel wurde alle drei Tage durchgeführt. Eine Positivkontrolle wurde mit Mausmyoblasten (C2C12) durchgeführt.

2.4.2. Wright Färbung

Für die Färbung wurde das Protokoll, veröffentlicht bei Vyas et al. (2002), verwendet. Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS (Merck) gewaschen und dann in 10 % Methanol (Sigma) für 15 min fixiert. Dann wurden die Zellen für 2min mit Wright Lösung (Sigma Aldrich, Deutschland) gefärbt. Die Überreste der Farbe wurden entfernt,

die Zellen mit destilliertem Wasser gewaschen und unter dem Mikroskop (Carl Zeiss) fotografiert.

2.5. PCR Analyse

2.5.1. RNA und cDNA Isolation

Für die Isolierung von RNA aus Zellen wurde das RNAeasy Mini Kit (Qiagen, USA), verwendet und das Protokoll des Herstellers befolgt. Dementsprechend wurden jeweils ca. 10^6 Zellen bei einer Konfluenz von 80-90 % mit PBS (Merck) gewaschen, mit RTL Buffer und 1% β -Mercaptoethanol lysiert und daraufhin mit einem Zellschratcher von der Zellkulturflasche gekratzt. Das Zelllysat wurde durch einen Quiashredder filtriert, im Verhältnis 1:1 mit 70% Ethanol (Sigma) gemischt und auf die Membran einer Quiashredder-Säule geladen. Kontaminationen mit genomischer DNA wurde mit 10U DNase verdaut. Die Säulen wurden mit Waschbuffer gewaschen und durch Zentrifugieren mit maximaler Geschwindigkeit getrocknet. Die RNA wurde in RNase-freiem Wasser eluiert und mittels Spectrofotometrie die Konzentration der RNA ermittelt. Für kurzfristige Verwendung (bis vier Wochen) wurde die RNA auf -20°C gelagert, zur längeren Aufbewahrung auf -80°C .

2.5.2. cDNA Synthese

Für die Synthese von cDNA wurde das Cloned AMV First-Strand cDNA Synthesis Kit (Invitrogen) verwendet und das Protokoll des Herstellers befolgt. Es wurde jeweils $1\mu\text{g}$ RNA mit Aqua des. auf $10\mu\text{l}$ verdünnt und für 15min auf 65°C erhitzt, so dass die RNA denaturiert. Dann wurde eine Mischung aus Random-Hexamer-Primern, 10mM dNTPs, Synthesepuffer, 15U reverser Transkriptase, 40U RNase Inhibitor und 0,1M DTT dazu gegeben und im PCR-Thermocycler für 60min auf 50°C erhitzt. Die neu synthetisierte cDNA wurde auf das „housekeeping“-Gen GAPDH getestet und alle weiter verwendeten Proben auf dieses Gen normalisiert.

2.5.3. RT-PCR

Der Mastermix aus PCR Puffer, 1,5mM MgCl, 0,2mM dNTPs, 0,5 μM Primern (s. Tab. 5) und 1U Taq DNA Polymerase (alles Invitrogen) wurde jeweils mit einer spezifische

Menge DNA, abhängig von der Expression der GAPDH in PCR-Gefäßen (Eppendorf, Deutschland), gemischt. Für die PCRs wurde eine MG Research PCR Maschine (BioRad, USA) genutzt. Das PCR-Programm durchläuft standardmäßig folgenden Ablauf: Denaturierung bei 95°C für 3min, anschließend wird das folgende Programm für 35 Zyklen wiederholt: Denaturierung bei 95°C für 30sec, *annealing* bei 45-65°C für 30sec, Elongation bei 72°C für 60sec, Zyklusende; nach weiteren 10min bei 72°C kühlt die PCR Maschine die Proben, bis diese wieder entnommen werden, auf 4°C. Die *annealing*-Temperatur ist abhängig von der spezifischen Größe der Primer. Die Protokolle wurden etabliert von Popov et al. (2011). Die PCR Produkte wurden mit Ethidium Bromid markiert und in einem 2% Agarosegel mit Elektrophorese analysiert. Zum Nachweis der korrekten Größe der Produkte wurde eine DNA *ladder* (Invitrogen) genutzt. Die Bilder wurden mit einem Gel Imaging System (Vilber Lourmat, Deutschland) analysiert. Die Ergebnisse repräsentieren eine relative Expression der Gene.

Gene	Primer		Produktgröße, bp	Annealing Temp, °C	Referenz
$\alpha 1$	F	ACATCAGCCAAGTCAATGTTTCG	241	51	[Popov 2011]
	R	AGCATTAAACAGCAACAATCCGG			
$\alpha 2$	F	GCTGCTGTGCATTAGATATTAG	217	48	[Popov 2011]
	R	CTGTAACCTTCTGGTGAAATCCT			
$\alpha 3$	F	ATCTTGAGAGCCACAGTCA	201	52	[Popov 2011]
	R	CTGGGTCCTTCTTTCTAGTTC			
$\alpha 4$	F	AATGGATGAGACTTCAGCACT	278	48	[Popov 2011]
	R	CTCTTCTGTTTTCTTCTTGTAGG			
$\alpha 5$	F	ACTAGGAAATCCATTACAGTTC	201	52	[Popov 2011]
	R	GCATAGTTAGTGTCTTTGTTGG			
$\alpha 6$	F	CTTGGAGAAGATGGGTTTATT	213	48	[Popov 2011]
	R	GAATACAGATAGGGGAGGAAA			
$\alpha 11$	F	TGGGCGCACCCATGTACTTC	223	55	[Popov 2011]
	R	ATGGCTCCTGCGTGGTTGTC			
αV	F	GGAGCACATTTAGTTGAGGTAT	274	46	[Popov 2011]
	R	ACTGTTGCTAGGTGGTAAACT			
$\beta 1$	F	ATGAATGAAATGAGGAGGATTACTTCG	322	52	[Popov 2011]
	R	AAAACACCAGCAGCCGTGTAAC			
$\beta 3$	F	CTGCTGTAGACATTTGCTATGA	211	52	[Popov 2011]
	R	GCCAAGAGGTAGAAGGTAAATA			
$\beta 5$	F	CTGTGGACTGATGTTTCCTT	407	54	[Popov 2011]
	R	GTATGCTGGTTTTACAGACTCC			
Fibro- nektin	F	CCTCAATTGTTGTTTCGCTGGA	83	51	[Popov 2011]
	R	GCTACCTTCTACTGATGGCGAATAG			
GAPDH	F	CAACTACATGGTTTACATGTTC	181	50	[Böcker 2008]
	R	GCCGTGGCTCCACGAC			

Tabelle 5: Auflistung der Primer mit Länge (bp), *annealing*-Temperatur und Referenz. F=*forward*, R=*reverse*. Referenzen: (Böcker et al. 2008, Popov et al. 2011).

2.6. Mikroskop

Für die Untersuchungen der Zellen wurde ein invertiertes Phasenkontrastmikroskop Axiovert 100 (Carl Zeiss) verwendet. Die Bilder wurden in verschiedenen Vergrößerungen mit einer AxioCam ICc 3 Kamera (Carl Zeiss MicroImaging GmbH) aufgenommen.

2.7. Statistische Methoden

Die statistische Signifikanz wurde mit dem t-Test für zwei unabhängige Proben ermittelt. Dafür wurde die Software SigmaBlot 8.0 (SSPS, Deutschland) genutzt. Eine statistische Signifikanz wurde ab einem Wert von $P < 0,05$ angenommen.

3. Ergebnisse

3.1. Morphologie der drei Zelltypen

Direkt nach Isolierung der Zellen wurde unter dem Mikroskop deutlich, dass sich die PrimDup-Zellen hinsichtlich ihrer Morphologie sowohl von den Kontroll-Zellen als auch von den RezDup-Zellen unterscheiden (Abb. 8). Die Kontroll-Zellen sind im Vergleich am größten und gleichen in ihrer Konfiguration klassischen Fibroblasten. Sie sind dünn, spindelförmig und meist bipolar. Im Unterschied dazu waren die PrimDup-Zellen kleiner und kompakter, aber ebenfalls spindelförmig und bipolar. RezDup-Zellen hingegen waren breiter und unregelmäßig geformt.

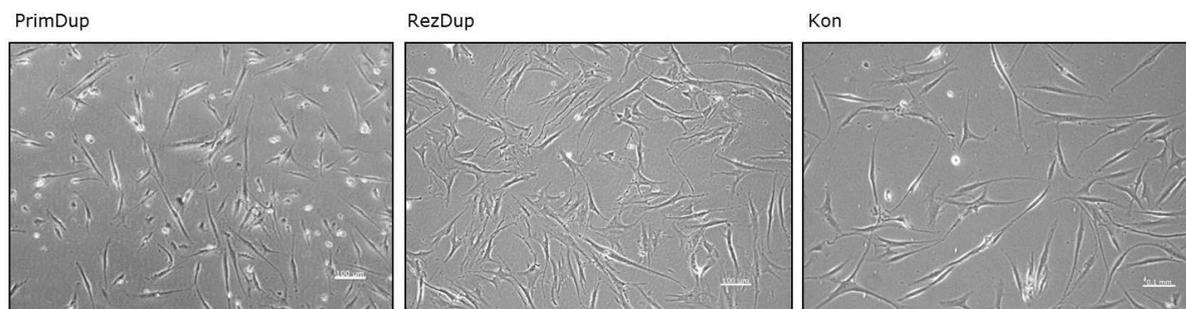


Abbildung 8: Unterschiede in der Morphologie von RezDup- (P1), PrimDup-, und Kontroll-Zellen (beide P0). Die drei Zelltypen unterscheiden sich in frühen Passagen (P0 bzw. P1) hinsichtlich ihrer Morphologie. Zellen aus gesunder Palmaraponeurose ähneln in ihrer Konfiguration Fibroblasten: sie sind schlank, spindelförmig und bipolar, während PrimDup-Zellen kleiner und kompakter sind. RezDup-Zellen sind breiter und unregelmäßiger geformt. Maßstabsbalken 100µm. Abkürzungen: PrimDup primäre Dupuytrenzellen, RezDup Zellen aus Rezidivdupuytren, Kon gesunde Aponeurosezellen.

3.2. Wachstumsverhalten

3.2.1. Unterschiede in der Wachstumskinetik von Zellen der Palmaraponeurose gesunder und an Morbus Dupuytren erkrankten Patienten

Das Wachstumsverhalten wurde in der Langzeitkultur durch die Bestimmung der kumulativen Populationsverdopplung beobachtet. Abbildung 9 zeigt aufgetragen über

die Zeit in Tagen, wie oft sich die Population des jeweiligen Zelltyps verdoppelte. Die PrimDup-Zellen vermehrten sich in den ersten vierzig Tagen mit einer relativ hohen, aber konstanten Proliferationsrate und gelangten schließlich in eine Plateauphase (Seneszenz). Demgegenüber proliferierten die Kontroll-Zellen mit einer deutlich geringeren Rate, erreichten aber etwa zeitgleich das Seneszenzstadium. Die Proliferationsrate der RezDup-Zellen hingegen war anfangs deutlich geringer um nach etwa sechzig Tagen erheblich anzusteigen. Während des gesamten untersuchten Zeitraums wurde das Seneszenzstadium nicht erreicht.

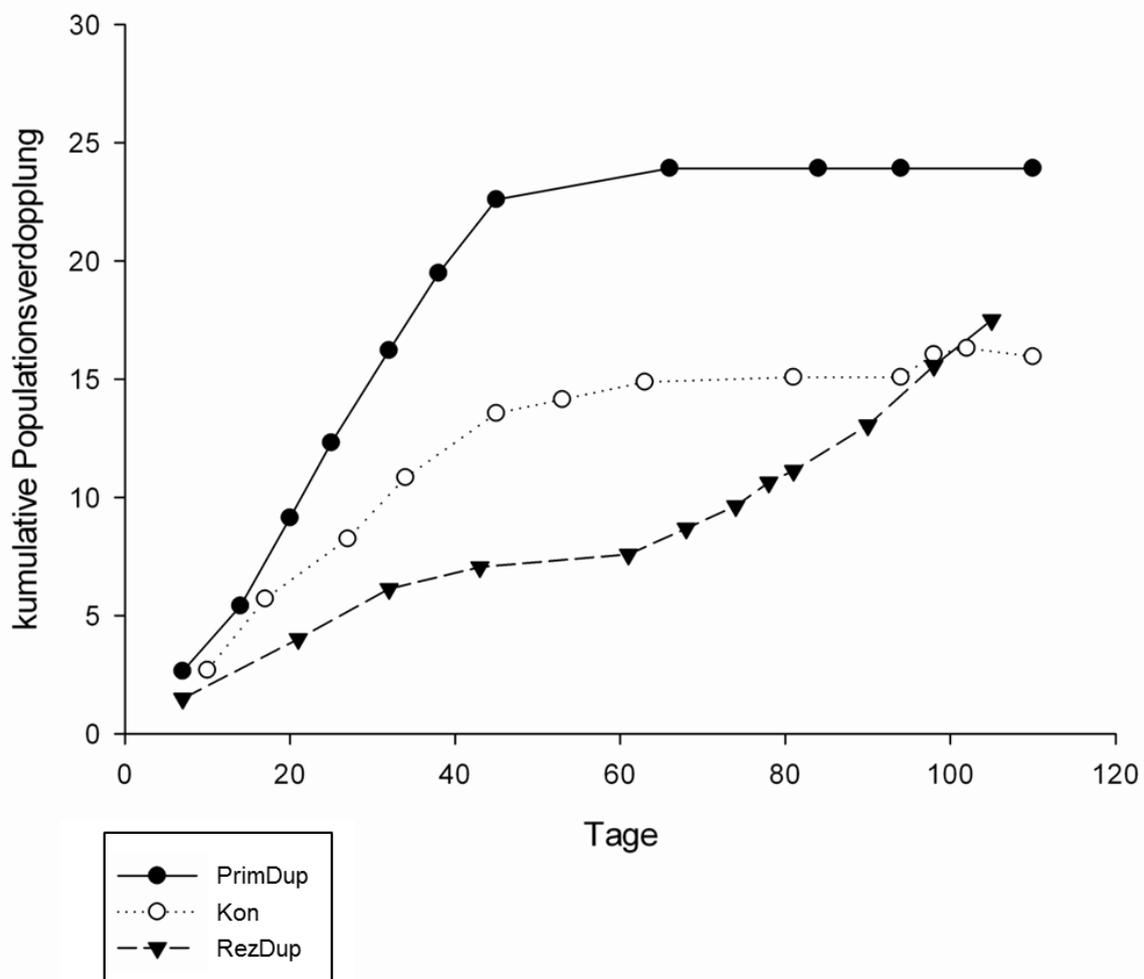


Abbildung 9: Wachstumskinetik der Zellisolate aus Palmaraponeurose von Patienten mit Erstmanifestation eines Morbus Dupuytren (PrimDup), von Patienten mit Rezidiv-Kontraktur (RezDup) und von Zellen aus gesunder Palmaraponeurose (Kon) in der Langzeitkultur. Die PrimDup-Zellen zeigen über 40 Tage einer relativ konstante Proliferation und gelangen dann in Seneszenz. Ähnlich, wenngleich mit insgesamt niedrigerer Proliferationsrate verhalten sich die Kontrollzellen (Kon). Dahingegen proliferierten die Zellen aus rezidiviertem Morbus Dupuytren durchgehend und gelangten auch nach 100 Tage nicht in eine Plateauphase. Abkür-

zungen: PrimDup primäre Dupuytrenzellen, RezDup Zellen aus Rezidivdupuytren, Kon gesunde Aponeurosezellen.

3.2.2. Dupuytren Rezidivzellen erreichen in hohen Passagen das Seneszenzstadium nicht

Mithilfe eines sogenannten *colony-forming-units-assays* (CFU) wurden die in der Langzeitkultur getätigten Beobachtungen überprüft (Abb. 10). In niedrigen (2-5) und in hohen Passagen (16-18) wurde mit allen drei Zelltypen ein CFU-Assay durchgeführt. In den frühen Passagen bildeten die PrimDup-Zellen signifikant mehr Kolonien als die anderen beiden Zelltypen (Abb. 10A). In den hohen Passagen jedoch bildeten weder die PrimDup- noch die Kontroll-Zellen Kolonien, während die RezDup-Zellen intensiv weiter proliferierten (Abb. 10B).

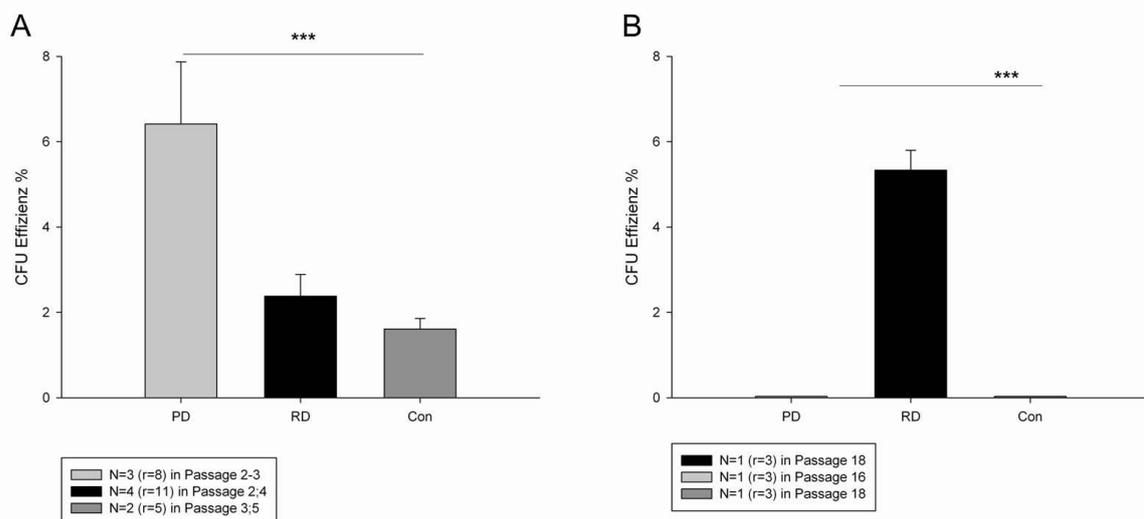


Abbildung 10: *Colony-forming-units*-Effizienz (CFU-Effizienz) der drei Zelltypen in früher Passage (A) und in später Passage (B). In den frühen Passagen bilden die Zellen von Patienten mit primärem Dupuytren (PrimDup) signifikant mehr Kolonien als die der Patienten mit Rezidiv (RezDup) und von Kontrollzellen (Kon). Dahingegen verändert sich das Verhältnis deutlich bei Zellen später Passagen: Sowohl PrimDup- als auch Kontroll-Zellen gelangen in Seneszenz und bilden überhaupt keine Kolonien mehr. Die RezDup-Zellen hingegen bilden bis zur Passage 18 ungebremst Kolonien, die in der Anzahl vergleichbar sind mit denen der PrimDup-Zellen in niedrigen Passagen. Die *Colony-forming-units*-Effizienz der Zellen unterscheidet sich hier hochsignifikant (***) $P < 0,01$). Abkürzungen: PrimDup primäre Dupuytrenzellen, RezDup Zellen aus Rezidivdupuytren, Kon gesunde Aponeurosezellen.

3.3. Differenzierungspotenzial in andere Gewebetypen

3.3.1. Dupuytrenzellen sind exzellent osteogen und adipogen differenzierbar

Um die sogenannte *stemness*, also das Ausmaß des Stammzellcharakters der Zellen der Palmaraponeurose von Morbus Dupuytren-Patienten zu untersuchen, wurden alle Zellen nach standardisierten Protokollen osteogen und adipogen stimuliert. Sowohl die PrimDup- als auch die RezDup-Zellen differenzierten hervorragend osteogen, was sich quantitativ in einem signifikanten Unterschied gegenüber den Kontrollzellen bemerkbar machte (Abb. 11A). Mittels einer Quantifizierung wurde objektivierend nachgewiesen, dass das Ausmaß des Differenzierungserfolges der Aponeurosezellen vergleichbar ist mit der Differenzierbarkeit von hMSCs (Volkmer et al. 2010), während die primären Dupuytrenzellen diesen Erfolg um ca. den Faktor 10 übertrafen (Abb. 11B). Der Unterschied zwischen der Alizarin Rot Aufnahme der primären Dupuytrenzellen und der Aponeurosezellen war signifikant. Die PrimDup-Zellen differenzierten nochmals signifikant stärker osteogen als die RezDup-Zellen.

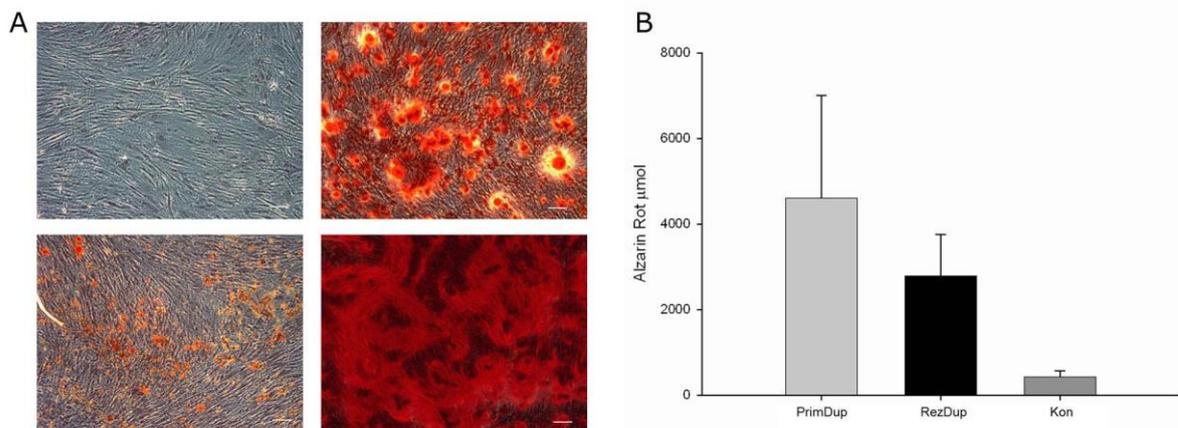


Abbildung 11: Zellen aus Palmaraponeurosen von Patienten mit Morbus Dupuytren differenzieren signifikant stärker osteogen als Kontrollzellen. Die Alizarin-Rot-Färbung nach stattgehabter osteogener Differenzierung dokumentiert eine kräftige osteogene Differenzierung (rot) der Zellen von Patienten mit Morbus Dupuytren (PrimDup-Zellen unten rechts, RezDup-Zellen oben rechts; linke Bildtafel) und eine schwache osteogene Differenzierung der Zellen aus gesunder Palmaraponeurose (linke Bildtafel unten links), oben links nichtdifferenzierte Zellen als Negativkontrolle. Die Quantifizierung der Alizarin-Rot-Färbung (rechte Bildtafel) zeigt, dass PrimDup-Zellen signifikant stärker osteogen differenzieren als RezDup-Zellen. Diese haben wiederum ein signifikant höheres Differenzierungspotential als Zellen gesunder Aponeurose (* $P < 0,05$, *** $P < 0,01$; Maßstabsbalken 100µm). Abkürzungen: PrimDup pri-

märe Dupuytrenzellen, RezDup Zellen aus Rezidivdupuytren, Kon gesunde Aponeurosezellen.

Auch die adipogene Differenzierung der PrimDup- und RezDup-Zellen fiel kräftiger aus. Die Kontrollzellen differenzierten im Gegensatz dazu schwächer, wenngleich auch sie zumindest partiell entlang der adipogenen Linie differenziert werden konnten (Abb. 12).

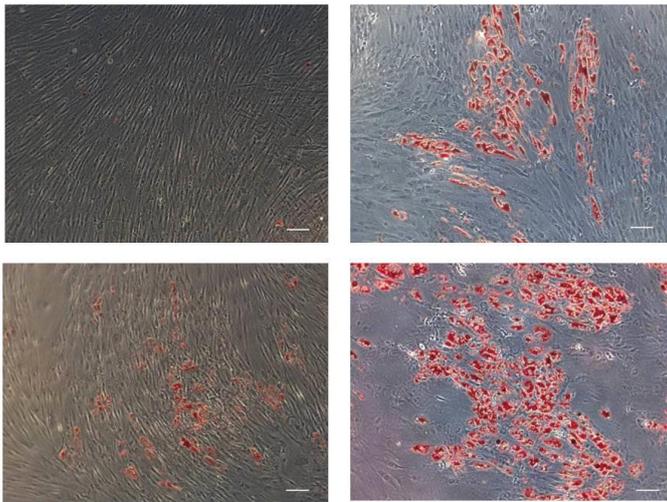


Abbildung 12: Zellen aus Palmaraponeurosen von Patienten mit Morbus Dupuytren lassen sich auch adipogen differenzieren. Die Oil-Red-O-Färbung nach adipogener Differenzierung zeigt eine kräftige Differenzierung (rot) der Zellen von Patienten mit Morbus Dupuytren (PrimDup-Zellen unten rechts, RezDup-Zellen oben rechts) und eine schwache adipogene Differenzierung der Zellen aus gesunder Palmaraponeurose (unten links), oben links nichtdifferenzierte Zellen als Negativkontrolle. Maßstabsbalken 100µm.

3.3.2. Differenzierung in die myoblastische Linie

Aufgrund der erfolgreichen Differenzierung in die osteo- und adipogene Stammzelllinie ergab sich als nächster Schritt die Differenzierung in die myoblastische Linie. Wir etablierten zunächst eine Positivkontrolle mit Mausmyoblasten (C2C12). Wie Abbildung 13A und B zeigen erreichte diese eine deutliche Bildung von *myotubes* in Mausmyoblasten. Dupuytrenzellen bildeten im Vergleich eher keine oder nur sehr vereinzelt *myotubes* (Abbildung 13C). In der Wrightfärbung (Abbildung 13D) sieht man an einzelnen Stellen, wie sich polynukleäre Zellen gebildet haben.

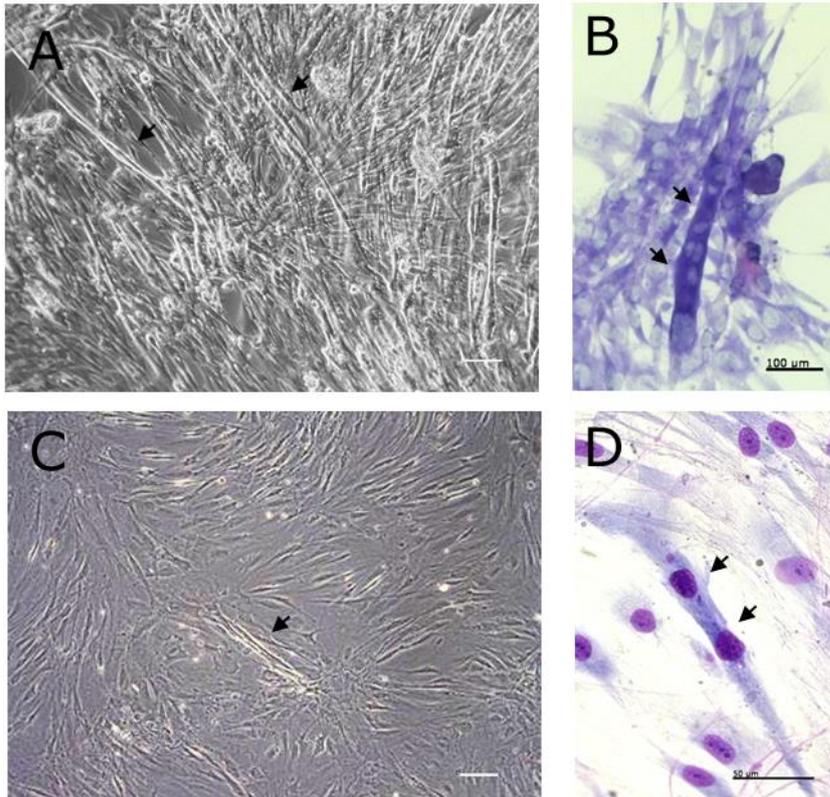


Abbildung 13: Dupuytrenzellen bilden nur sehr vereinzelt *myotubes*. Die Positivkontrolle mit Mausmyoblasten (C2C12) zeigt (13A, 10x Vergrößerung, Maßbalken 100µm) wie sich mehrere *myotubes* quer durchs Bild ziehen und in 13B (10x Vergrößerung, Maßbalken 100µm) sieht man den polynukleären Zellverband vertikal mittig durchs Bild ziehen. Dabei lösen sich neben den *myotubes* Zellen, die vorher 100% konfluent waren, teilweise ab. In den Dupuytrenzellproben konnte man solche *myotube formation* nur sehr vereinzelt beobachten, wie z.B. in 13C (10x Vergrößerung, Maßbalken 100µm) bei hoher Auflösung fanden sich vereinzelt mehrere Kerne in elongierten Zellen (13D, 40x Vergrößerung, Maßbalken 50µm).

3.4. PCR Analyse

3.4.1. In Dupuytrenzellen ist die Expression der Integrine auf mRNA-Ebene verändert

Ausgehend von den unterschiedlichen Morphologien der Zellen und in Anbetracht der Tatsache, dass es in der Literatur einige Hinweise darauf gibt, dass das Expressionsprofil von Integrinen bei Morbus Dupuytren verändert ist, wurde in einer scree-

ning-Untersuchung die Expression der wichtigsten Integrine auf mRNA-Ebene per semiquantitativer RT-PCR verglichen. Hierbei zeigte sich vor allem bei den Integrinen $\alpha 2$, $\beta 3$ und $\beta 5$ eine Hochregulierung der Genexpression in Dupuytrenzellen im Vergleich zu Aponeurosezellen. Die Integrine $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, αV , $\alpha 11$ und $\beta 1$ sind im Unterschied dazu unverändert und zeigen kein Unterschiede in der Expression.

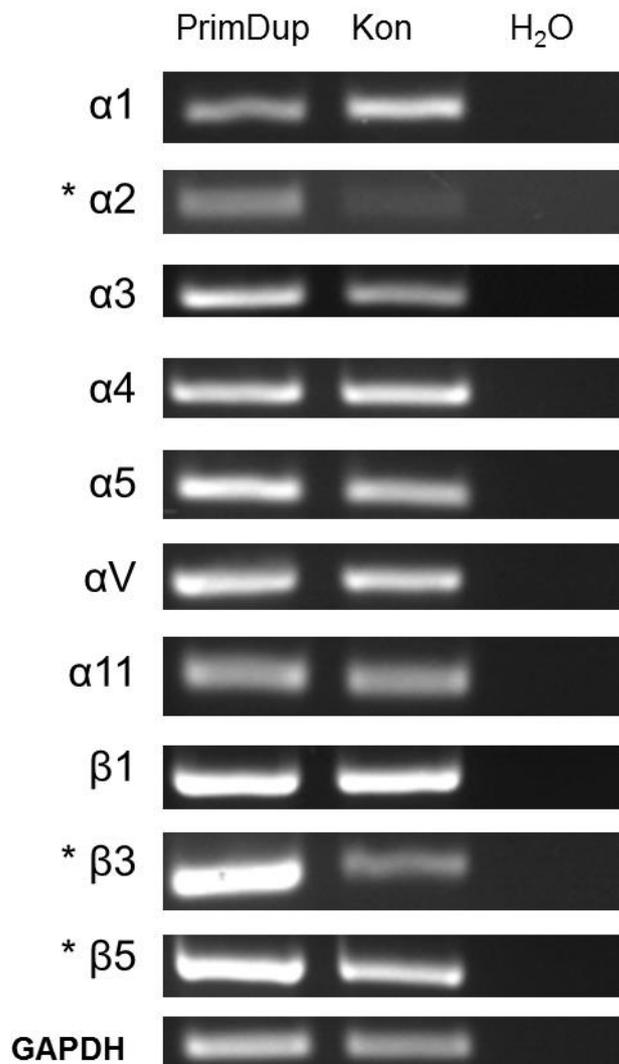


Abbildung 14: Expressionsprofil der Dupuytrenzellen für Integrine. Mit semiquantitativer RT-PCR wurde in den Integrinen $\alpha 2$, $\beta 3$ und $\beta 5$ eine Hochregulierung der Genexpression in Dupuytrenzellen im Vergleich zu Aponeurosezellen nachgewiesen. Die Integrine $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, αV , $\alpha 11$ und $\beta 1$ sind dahingegen gleichmäßig exprimiert und zeigen kein Unterschiede in der RT-PCR. Abkürzungen: PrimDup primäre Dupuytrenzellen, Kon gesunde Aponeurosezellen.

3.4.2. Die Fibronektin bindenden Integrine $\beta 3$ und $\beta 5$ sind in Dupuytrenzellen hochreguliert

Um die in der *screening*-Untersuchung gefundenen Veränderungen zu verifizieren, wurden die drei Zelltypen auf die veränderten Integrine hin untersucht. In der semi-quantitativen RT-PCR zeigte sich, dass in allen Proben die Integrine $\alpha 2$, $\beta 3$ und $\beta 5$ im Vergleich zu den Kontrollzellen hochreguliert waren (Abb. 15). Die Integrine $\beta 3$ und $\beta 5$ sind Integrine, welche Fibronektin binden (Docheva et al. 2007). Daher wurde ebenfalls die Expression von Fibronektin untersucht. Das Protein selbst war auf mRNA-Ebene nicht hochreguliert.

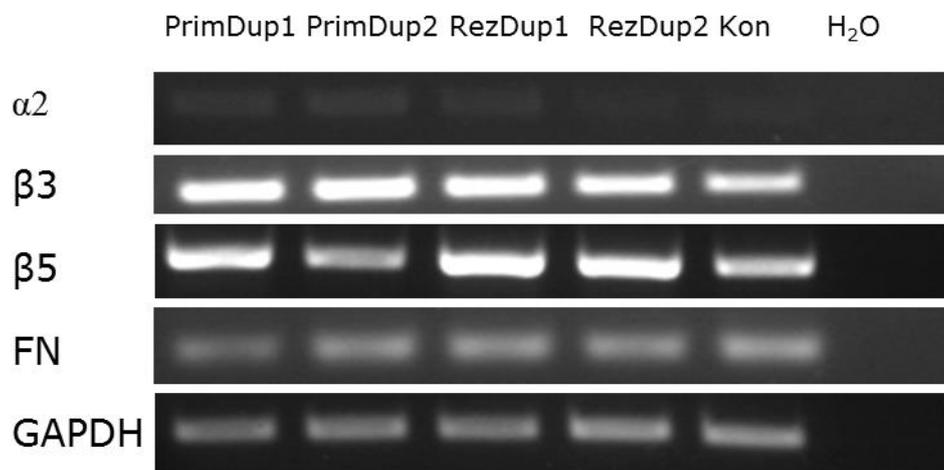


Abbildung 15 PCR Analyse der Dupuytrenzellen. In der semiquantitativen RT-PCR konnte gezeigt werden, dass in allen vier Dupuytrenproben die Integrine $\alpha 2$, $\beta 3$ und $\beta 5$ im Vergleich zu den Aponeurosezellen hochreguliert sind. Im Vergleich dazu zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Expression zwischen den einzelnen Spendern. Fibronektin selbst ist ebenfalls nicht hochreguliert. Abkürzungen: PrimDup primäre Dupuytrenzellen, RezDup Zellen aus Rezidivdupuytren, Kon gesunde Aponeurosezellen.

4. Diskussion

Der Morbus Dupuytren ist bereits in vielen Einzelfacetten untersucht worden. Dennoch ist die Ätiologie und die kausale Pathogenese bislang noch nicht gänzlich aufgeklärt, und die Therapieansätze sind entsprechend symptomorientiert. Um das Verständnis der Erkrankung zu verbessern und um neue Therapieansätze zu entwickeln, haben wir in der vorliegenden Untersuchung die Zellen aus Palmaraponeurosen-Präparaten isoliert und molekularbiologisch charakterisiert. Die Präparate stammten einerseits von Patienten mit Rezidiv-Kontraktur und andererseits von Patienten mit Erstmanifestation des Morbus Dupuytren. Zellen aus gesunder Palmaraponeurose dienten als Kontrolle. Ein spezieller Fokus lag auf der Untersuchung der sogenannten *stemness* der Zellen, also des Stammzellpotenzials, da gezeigt wurde, dass Fibroblasten aus Dupuytregewebe einige Charakteristika mit Progenitor-Zellen teilen.

4.1. Isolation der Zellen im Vergleich – Zellmigration und Gewebeverdau

Der erste Schritt um mit den Untersuchungen beginnen zu können, bestand in der erfolgreichen Isolation von Zellen aus dem Dupuytregewebe. Es wurden die beiden bekanntesten Isolationsmethoden, Gewebeverdau mit Kollagenase nach dem Protokoll von Salingcarboriboon et al. (2003) und Migration der Zellen etabliert von Schulze-Tanzil et al. (2004), getestet. Beide Methoden konnten erfolgreich und problemlos durchgeführt werden. Bei der Isolation von Zellen treten zwei Fragenstellungen auf: zum einen geht es darum auf welchem Weg die Zellen möglichst schnell zur Untersuchung und weiteren Verwendung zur Verfügung stehen und zum Anderen, besonders bei den Dupuytrenpräparaten, die mit diversen Fremdgewebe verwachsen sind, geht es um das Problem, wie man möglichst originäre und homogene Zellen erhält. Die Gewinnung von Zellen, in dem man sie aus Gewebestückchen migrieren lässt, dauert 10-14 Tage und setzt diese in dieser Zeit den *in vitro*-Bedingungen aus, was zu Veränderungen führt. Auch wenn die Selektion, die durch den Vorgang der Migration vorgenommen wird, ein Argument für diese Methode ist, da Myofibroblasten die Fähigkeit zur Migration haben (Hinz 2007) und genau diese zu isolieren das Ziel ist. Wandeln sich Myofibroblasten auf der anderen Seite wieder in Fib-

roblasten um, wenn sie weniger Spannung ausgesetzt sind und sich die allgemeinen Umgebungsbedingungen wie u.a. auch die Zelldichte ändern (Halliday et al. 1995). Allerdings waren die Zellen, die durch Kollagenaseverdau isoliert wurden, homogener, man erhält mehr Zellen aus der gleichen Menge Gewebe und die Zellen werden kürzer den Zellkulturbedingungen ausgesetzt, bevor es möglich ist, RNA zu isolieren. Vor allem auf Grund des letztgenannten Argumentes haben wir uns dafür entschieden nur Zellen zu verwenden, die per Kollagenaseverdau isoliert wurden. Bei der Untersuchung der Zellen muss allerdings beachtet werden, dass es sich im Letzten immer um Mischkulturen handelt, da es auf Grund der Beschaffenheit des Gewebes bei der Präparation nicht möglich ist, eine wirklich hundertprozentige Reinheit zu erreichen.

4.2. Unterschiede zwischen Erstmanifestationen und Rezidivzellen

Die Frage warum ein Rezidiv nach einer Dupuytrenoperation auftreten kann, hat diverse Aspekte. Bei vielen Patienten bilden sich mehrere Knoten entweder nur in einer Hand oder auch bilateral parallel (Brenner et al. 2001), so dass ein Patient gleichzeitig unterschiedlich weit fortgeschrittene ‚Erkrankungszentren‘ haben kann (Shih et al. 2010). Dies macht die Beurteilung des Rezidivs schwierig, da es sowohl sein kann, dass sich Knoten völlig neu in zuvor gesunder Aponeurose gebildet haben, oder das nach einer Operation zurück gebliebene Gewebereste erneut proliferiert haben (Desai et al. 2011). Zuletzt gilt es auch immer zu beurteilen, ob es sich bei dem vermeintlichen Rezidiv nicht um eine Narbenkontraktur handelt. Bei der Untersuchung der Zellen muss außerdem auch immer berücksichtigt werden, dass man noch nicht weiß, ob ein primär aufgetretener Dupuytren rezidivieren wird oder nicht; Bulstrode et al. (2005) postulieren sogar, dass das Auftreten eines Rezidives nur davon abhängt, ob der Patient ausreichend lange weiterlebe. Bei der Gruppenbildung ging es uns in Anbetracht dieser Überlegungen nicht vorrangig um eine scharfe Grenzziehung, sondern diese ergab sich vielmehr aus der Abgrenzung zur Bildung einer Gruppe ohne extrinsische Risikofaktoren. Da bei vielen Risikofaktoren nicht gesichert ist, ob sie Auslöser oder lediglich Verstärker der Erkrankung sind, wollten wir bei der Auswahl der Spender eine Gruppe bilden, die keine extrinsischen Risikofaktoren, wie Rauchen, Alkoholabusus oder Diabetes mellitus etc. (Khashan et al. 2011), aufwies. Gerade bei der durch diese Risikofaktoren verursachten Mikroangio-

pathie ist nicht klar (Kischer et al. 1984), ob sie im Vergleich zu den Veränderungen der Kapillaren, die bei Morbus Dupuytren immer auftreten, parallel auftritt oder eben imstande ist, die Erkrankung überhaupt auszulösen (Murrell et al. 1990).

Bei der Gruppenbildung der Patienten mit primären Dupuytren haben wir daher versucht, alle Patienten mit extrinsischen Risikofaktoren auszuschließen, so dass ausschließlich Zellen, die nur durch den Morbus Dupuytren geschädigt bzw. verändert wurden, untersucht werden und die Ergebnisse nicht durch zusätzliche Sekundärschäden verfälscht werden. Interessanter Weise wiesen alle Patienten, die an einem Rezidiv operiert werden mussten, einen oder mehrere extrinsische Risikofaktoren auf.

Dazu kam, dass wir in der Zellkultur morphologisch (Abb. 8) und in Hinsicht auf das Proliferationsverhalten den Eindruck gewonnen haben, dass die Zellen der verschiedenen Gruppen sich grundsätzlich unterscheiden und sich die Frage stellte, ob dies nur ein durch den Umfang der Proben bedingte Beobachtung bei einzelnen Spendern ist oder ob sich wirklich grundsätzliche Unterschiede zwischen den Gruppen feststellen lassen.

4.3. Rezidivdupuytrenzellen erreichen das Seneszenzstadium nicht

Das Wachstumsverhalten der Zellen im Morbus Dupuytren gehört zu den in der Literatur viel diskutierten Fragestellungen (Khashan et al. 2011). Hierunter fallen die Fragen, warum die Dupuytren-Knoten so zellreich sind, oder warum manche Patienten jahrelang mit einer stabilen Situation leben und es dann scheinbar unvermittelt zu einer Progression der Erkrankung kommt (Townley et al. 2006). Bis heute gab es keine detaillierte Wachstumsanalyse von Zellen aus erkrankter Palmaraponeurose. Die in Abb. 9 dargestellte Wachstumskurve zeigt, dass PrimDup-Zellen ähnlich wie Kontroll-Zellen in den ersten vierzig Tagen stark proliferieren, schließlich aber eine Plateauphase (Seneszenz) erreichten. Die Proliferationsrate der PrimDup-Zellen war allerdings in der frühen Wachstumsphase gegenüber gesunden Zellen deutlich erhöht.

Eine sehr interessante Beobachtung war, dass die Zellen aus Palmaraponeurosen von Patienten mit Rezidivkontraktur gar keine Plateauphase erreichten. Sie proliferierten bis zum Ende des Beobachtungsintervalls nach 100 Tagen weiter, was durch die Untersuchung der CFU-Effizienz bestätigt werden konnte. Es scheint also, dass die Seneszenzregulation bei Morbus Dupuytren-Rezidiv gestört ist. Dies deckt sich mit Beobachtungen, dass die Regulation von verschiedenen Wachstumsfaktoren, die auch eine Rolle bei der Zellproliferation und der Apoptose spielen, gestört sind. So sind z.B. die Expressionslevel von TGF- β , PDGF, EGF und bFGF verändert (Zhang et al. 2008, Khashan et al. 2011). Spekulativ aber spannend ist die Frage, ob man durch Messung derlei Unterschiede vorhersagen kann, ob ein Rezidiv auftreten wird, ähnlich dem Modell von Degreef et al. (2011), das anhand von Merkmalen wie Geschlecht, Alter, oder Familienanamnese ein Rezidiv vorherzusagen suchte.

4.4. Zellen aus Palmaraponeurosen von Morbus Dupuytren Patienten haben ein erhöhtes Stammzellpotential

Im nächsten Schritt haben wir die Zellen auf ihre Zellspezifität hin untersucht. Die in der Literatur beschriebene Fähigkeit von Fibroblasten zu Myofibroblasten zu differenzieren war ein erster Hinweis darauf, dass die Zellen der Dupuytren'schen Kontraktur zumindest gewisse Eigenschaften von Progenitorzellen besitzen und nicht vollständig ausdifferenziert sind (Tomasek et al. 1987, Hinz et al. 2007, Shih et al. 2010). Die Fähigkeit in andere Zelllinien zu differenzieren ist ein Attribut der humanen mesenchymalen Stammzellen (Schieker et al. 2007, Bocker et al. 2008). Wie unsere Untersuchung gezeigt hat, sind Zellen aus Palmaraponeurosen von Morbus Dupuytren-Patienten besser osteogen und adipogen differenzierbar als die Kontrollzellen. Sie besitzen also eine erhöhte *stemness*, d.h. sie haben im Verhältnis zu gesunden Zellen stärker ausgeprägte Stammzeleigenschaften. Der Versuch, Dupuytrenzellen *myotubes* bilden zu lassen, fiel nicht sehr deutlich aus. Dies könnte daran liegen, dass die Zellen, auch wenn sie als Myofibroblasten bezeichnet werden (Shaw et al. 2007) und bestimmte Eigenschaften mit diesen gemeinsam haben (Tomasek et al. 1999), ätiologisch dennoch den Fibroblasten näher stehen. Um diese Annahme zu bestätigen, sind allerdings noch weitere Untersuchungen z.B. auch auf PCR Ebene nötig.

4.5. Die Integrine $\alpha 2$, $\beta 3$ und $\beta 5$ sind in Dupuytren-Zellen hochreguliert

Diese Arbeit hat zum ersten Mal das Integrinprofil von Zellen aus Morbus Dupuytren auf PCR-Ebene untersucht. Die bereits in der Literatur beschriebenen Veränderungen in der extrazellulären Matrix, insbesondere die Hochregulation von Fibronectin aber auch die Veränderungen im Adhäsionsverhalten und einiger Integrin-Rezeptoren ließen uns vermuten, dass eventuell das Expressionsprofil für Integrine bei Morbus Dupuytren weiterreichend verändert sein könnte. Für Myofibroblasten wurde gezeigt, dass das $\alpha 5$ Integrin ihre Expression stimuliert und das $\beta 1$ Integrin zu stärkerer Kontraktion führt (Norman et al. 1999). Darüber hinaus sind wenige Veränderungen bezüglich der Integrinexpression beschrieben. In unserer PCR-Untersuchung war das Integrin $\alpha 2$ in Zellen von Morbus Dupuytren-Patienten leicht hochreguliert. Quaglino et al (Quaglino et al. 1997) hatte mittels FACS-Untersuchung ebenfalls gezeigt, dass die Integrine $\alpha 2$ und $\alpha 5$ in Zellen der Palmaraponeurose von Morbus Dupuytren-Patienten vermehrt exprimiert waren. Das Integrin $\alpha 2$ bindet hauptsächlich Kollagen und bewirkt darüber Matrixinteraktionen und -modulationen (Tuckwell et al. 1995). Hoch et al. (Hoch et al. 2002) untersuchten ebenfalls die Integrine $\alpha 2$, $\alpha 3$ und $\beta 1$ per FACS. Allerdings fanden sie keine Unterschiede zu den Kontrollzellen. In Hinblick auf die Funktion dieser Integrin-Untereinheit erscheint eine Veränderung der Regulation der Zell-Zell- und Zell-Matrixinteraktionen (Halliday et al. 1994, Magro et al. 1995, Quaglino et al. 1997, Hinz et al. 2003) wahrscheinlich. Es könnte allerdings sein, dass die Regulation des Integrin $\alpha 2$ nur bei einigen Patienten verändert ist. Es könnte ebenfalls sein, dass diesem Integrin keine endgültig entscheidende Rolle zukommt, oder es lediglich beeinflusst wie stark ausgeprägt die Erkrankung jeweils auftritt. Diese Hypothesen sind Ausgangspunkte für mögliche weitere Untersuchungen.

Das Integrin $\beta 1$ war in unserer Studie nicht verändert. Hierin stimmen unsere Ergebnisse mit denen von Hoch et al. (2002) überein. Eventuell ist es nur in Verbindung mit der $\alpha 5$ Untereinheit erhöht. Allerdings war dessen Expressionsprofil auf PCR-Level ebenfalls nicht erhöht. Interessanter Weise korreliert die Expression des Integrins $\alpha 5\beta 1$ mit der Konzentration von Fibronectin, welches dessen wichtigster Ligand im Gewebe ist (Magro et al. 1995, AbiEzzi et al. 1997, Manabe et al. 1997). Es wurde

darüber hinaus gezeigt, dass das Integrin $\beta 1$ durch Fibronectin aktiviert wird und durch diese Aktivierung die Zell-Matrixkontakte und die Bildung von Stressfasern induziert (Chi-Rosso et al. 1997, Hocking et al. 1998, Gabbiani 2003). Dies könnte erklären, warum die Untereinheit $\beta 1$ auf PCR-Level nicht vermehrt exprimiert sein muss und trotzdem in ihrer Funktion verstärkt ist.

Die Fibronectin-bindenden Integrine $\beta 3$ und $\beta 5$ zeigten sich in unserer Untersuchung ebenfalls hochreguliert. Dies ist eine wichtige Erkenntnis, die das Krankheitsverständnis grundlegend ändern könnte. In der Literatur wurden bisher diese beiden Integrin-Untereinheiten in ihrer Korrelation zu Morbus Dupuytren noch nicht untersucht. Es sind aber zwei wichtige Liganden für Fibronectin (Docheva et al. 2007), welches eine Schlüsselrolle bei der Pathogenese des Morbus Dupuytren (Tomasek et al. 1987, Berndt et al. 1994, Halliday et al. 1994) spielt. Wenn man die Funktion der Integrine bezüglich Zellproliferation, -migration, -morphologie, -differenzierung und Apoptose (Docheva et al. 2007) und die Aufgaben von Fibronectin in Hinblick auf Zell-Zell- sowie Zell-Matrixkontakte, aber auch Remodelling des Gewebes und Übertragung der intrazellulären Kontraktionskraft, welche vorrangig über Integrine ablaufen, betrachtet, ergeben sich aus dem Wissen, dass beides verstärkt in Dupuytrogewebe wirkt, viele Ansatzpunkte für ein besseres Verständnis der veränderten Zellproliferation, Zell-Zell- sowie Zell-Matrixinteraktionen. Die Untereinheit $\beta 3$ bindet außerdem Tenascin, welches ebenfalls im Dupuytrogewebe hochreguliert ist (Berndt et al. 1994). Tenascin moduliert ebenfalls Zellproliferation und -migration (Midwood et al. 2009) und hat daher wahrscheinlich gemeinsam mit dem hochregulierten Integrin $\beta 3$ einen Einfluss auf die Krankheitsprogression.

Auch die Konzentration von Fibronectin ist im Dupuytren'schen Gewebe erhöht (Halliday et al. 1994). Sechler et al. (Sechler et al. 1997) haben gezeigt, dass das aktivierte Integrin $\alpha V\beta 3$ die Fibronectinsynthese beeinflussen kann. Hier besteht ein weiterer potenzieller Interventionspunkt, durch dessen Modulation die Progredienz des Morbus Dupuytren beeinflusst werden könnte. Dass Fibronectin in unseren Untersuchungen auf mRNA-Ebene nicht hochreguliert ist, könnte daran liegen dass es ein Matrixprotein ist und von den Fibroblasten sezerniert wird.

In Bezug auf die Veränderungen im Expressionsprofil der Integrine haben wir keine Unterschiede zwischen RezDup- und PrimDup-Zellen festgestellt. Dies zeigt, dass die Zellen unabhängig von der Krankheitsprogression ein relativ stabiles Integrinprofil haben. Wilbrand et al. (Wilbrand et al. 2003) untersuchten immunhistologisch Patienten sowohl nach Erst- wie nach Rezidivoperationen auf die Expression der Integrin-Untereinheit $\alpha 5$ und konnten ebenfalls keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen feststellen. Für weitergehende Aussagen wird es wichtig sein, die Probenanzahl zu vergrößern. Die gezielte Manipulation der Integrinrezeptoren könnte sich als zukunftssträchtige Strategie in der Therapie der Dupuytren'schen Beugekontraktur bewähren. So befindet sich z.B. der Integrin-Inhibitor Cilengitide in der klinischen Testung zur Glioblastomtherapie. Cilengitide blockiert spezifisch die Integrine $\alpha V\beta 3$ und $\alpha V\beta 5$ (Stupp et al. 2007), könnte aber aufgrund seiner Spezifität auch für die Therapie des Morbus Dupuytren interessant sein.

4.6. Schlussfolgerungen und Ausblick

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war Zellen aus Morbus Dupuytrenpräparaten zu isolieren und mit molekularbiologischen Methoden zu charakterisieren, um neuen Ansätze Therapiemöglichkeiten zu finden.

Wenn man die Ergebnisse unserer Untersuchungen zusammen fasst (Abb. 16), ist zu sehen, dass die Zellen in vielfältiger Weise verändert sind. Das Proliferationsverhalten von Zellen in Morbus Dupuytren ist stark erhöht und Zellen aus rezidiviertem Dupuytren gehen nicht in Seneszenz. Des Weiteren ist ihre Zellspezifität erniedrigt und ihre Transdifferenzierung zu anderen Zelllinien erhöht. Sowohl das Kollagenbindende Integrin $\alpha 2$ als auch die Fibronektin-bindenden Integrine $\beta 3$ und $\beta 5$ in den Zellen sowie das Fibronektin im Gewebe sind erhöht.

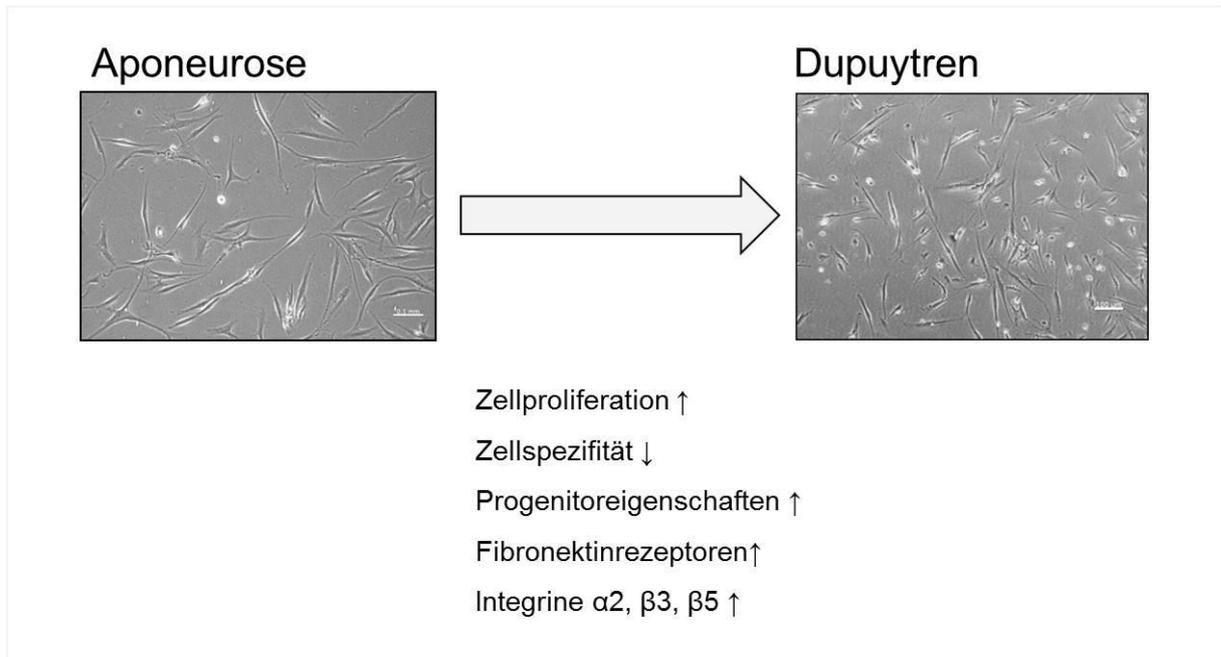


Abbildung 16: Modell Veränderungen von Zellen aus Morbus Dupuytren im Vergleich zu Kontrollzellen aus gesunder Aponeurose: Dupuytrenzellen sind hochproliferativ bei herabgesetzter Zellspezifität, was sich darin zeigt, dass sie sehr gut osteogen und adipogen differenzieren. Sowohl das Kollagen-bindende Integrin $\alpha 2$ als auch die Fibronektin-bindenden Integrine $\beta 3$ und $\beta 5$ in den Zellen und das Fibronektin im Gewebe sind erhöht.

Unsere Ergebnisse bestätigen und konkretisieren die aktuelle Literatur, die davon ausgeht, dass das Gewebe grundsätzlich in Bezug auf die Zell- Zell- und Zell- Matrixkontakten verändert ist (Cordova et al. 2005, Hinz 2007).

Darüber hinaus stellen sich auf der Basis dieser Arbeit viele neue Fragen. Für die Entwicklung alternativer Therapiemöglichkeiten wäre es ein interessanter Ansatz, ob sich durch Inhibition der vermehrt exprimierten Integrine die Progression der Erkrankung verzögern bzw. beenden oder sogar deren Ausbruch verhindern lässt. So befindet sich z.B. der Integrin- Inhibitor Cilengitide in der klinischen Entwicklung, der spezifisch die Integrine $\alpha V\beta 3$ und $\alpha V\beta 5$ angreift (Stupp et al. 2007). Dieser wird aktuell für Glioblastome, getestet, könnte aber in seiner Spezifität auch für die Dupuytrentherapie interessant sein. Hierbei wäre sowohl die weitere Untersuchung des Integrinprofils der Zellen interessant als auch die Entwicklung eines *in vivo*-Modells zur Testung eines Integrin-Inhibitors.

Vi et al. (2009) haben gezeigt, dass Periostin, ein Matrixprotein, das sezerniert wird, in Dupuytrogewebe in erhöhter Konzentration nachweisbar ist. Interessanter Weise bindet Periostin die Integrine $\alpha V\beta 3$ und $\alpha V\beta 5$ und moduliert darüber Zellmotilität und -proliferation (Gillan et al. 2002). In Verbindung mit unserer Untersuchung entsteht so eine mehrfache Verstärkung der Krankheitsprogression, wenn sowohl die Integrinuntereinheiten als auch ein Ligand überexprimiert werden.

Es ist bekannt, dass die Regulation von TGF- β und diversen MMPs in Dupuytrogewebe verändert ist (Zhang et al. 2008, Ulrich et al. 2009), beide interagieren in vielfältiger Weise mit Integrinen (Brakebusch et al. 2002, Docheva et al. 2007, Goodwin et al. 2009), auch hier bieten sich zahlreiche neue Ansatzpunkte, um die Pathogenese des Morbus Dupuytren weiter aufzuklären.

Ein verbessertes Verständnis der Proliferationskinetik könnte eventuell die Einschätzung des Risikos eines Rezidivs erleichtern. Dazu müsste die Überwindung der Seneszenz durch Zellen aus rezidiviertem Dupuytren weiter untersucht und verstanden werden. Unsere Untersuchungen zur Möglichkeit die Zellen in die myoblastische Linie zu differenzieren, waren nicht eindeutig. Um zu weitergehenden Aussagen zu kommen, sind auch hier weiterführende Versuche nötig.

5. Zusammenfassung

Zielsetzung und Fragestellung:

Goldstandard in der Therapie des fortgeschrittenen Morbus Dupuytren ist nach wie vor die partielle Aponeurektomie mit allen bekannten Nebenwirkungen. Mit dem Ziel, neue therapeutische Strategien zu entwickeln, haben wir Zellen aus gesunder Palmaraponeurose (Kon) isoliert, molekularbiologisch charakterisiert und mit Zellisolaten der Palmaraponeurose von Patienten mit einer Erstmanifestation von Morbus Dupuytren (PrimDup) sowie von Patienten mit Morbus-Dupuytren-Rezidiv (RezDup) verglichen. Da Zellen der Palmaraponeurose von Morbus-Dupuytren-Patienten Merkmale von Stammzellen wie z.B. die Fähigkeit von Fibroblasten zu Myofibroblasten zu transdifferenzieren haben, wurde neben der Zellmorphologie und dem Integrinprofil der Zellen auf RNA-Ebene insbesondere das Wachstumsverhalten und der Stammzellcharakter untersucht.

Material und Methoden:

Aus insgesamt 15 Dupuytren-Präparaten, die im Rahmen von partiellen Aponeurektomien angefallen waren, wurden jeweils 3 Spender ohne extrinsische Risikofaktoren (PrimDup) und 3 Spender, die an einem Rezidiv erkrankt waren (RezDup), selektiert. Die Zellen wurden mittels Kollagenaseverdau isoliert und unter Standard-Zellkulturbedingungen expandiert. Palmaraponeurose gesunder Spender diente als Kontrolle (Kon). Wachstumskurven der 3 Zelltypen wurden über 100 Tage erstellt. Außerdem wurden *Colony forming units* Assays (CFU) über 14 Tage in jungen und alten Passagen durchgeführt. Die Zellen wurden nach etablierten Protokollen osteogen und adipogen differenziert. Darüber hinaus wurde die Fähigkeit der Zellen *myotubes* zu bilden untersucht. Eine semiquantitative PCR Analyse wurde als Screening für alle Integrine und als detaillierte Untersuchung für die Integrine $\alpha 2$, $\beta 3$, $\beta 5$ und für Fibronectin durchgeführt.

Ergebnisse:

PrimDup-Zellen wuchsen signifikant schneller als RezDup-Zellen, die wiederum schneller wuchsen als Kon-Zellen. PrimDup- und Kon-Zellen gelangten nach ca. 40 Tagen in Seneszenz, während RezDup-Zellen über 100 Tage in Zellkultur proliferierten. Der CFU Assay ergab vergleichbar für Zellen der Passagen 2-5, dass PrimDup

Zellen ca. 100 Kolonien pro Petrischale ergeben, während RezDup Zellen 40 Kolonien pro Schale und Kon Zellen 20 Kolonien pro Schale erreichten. In hohen Passagen drehte sich dieses Verhältnis um, denn PrimDup und Kon Zellen bildeten keine Kolonien mehr, während RezDup Zellen ca. 80 Kolonien pro Schale formten. RezDup- und PrimDup-Zellen differenzierten am stärksten adipogen und osteogen. Demgegenüber differenzierten Kon-Zellen nur mäßig adipogen und osteogen. Die PCR-Analyse zeigte, dass sowohl die Fibronektin-bindenden Integrine $\beta 3$ und $\beta 5$ als auch das Kollagen-bindende Integrin $\alpha 2$ in PrimDup- und RezDup-Zellen im Vergleich zu gesunden Zellen der Palmaraponeurose deutlich vermehrt exprimiert wurden. Fibronektin selber war in den Zellen allerdings nicht erhöht.

Schlussfolgerungen:

Die Zellen der verschiedenen Gruppen unterscheiden sich phänotypisch erheblich. PrimDup-Zellen wachsen schneller als RezDup-Zellen, was nahelegt, dass in PrimDup-Zellen eine Störung der Wachstumsregulation vorliegt. Da RezDup-Zellen innerhalb von 100 Tagen nicht das Seneszenzstadium erreichen, muss angenommen werden, dass diese Zellen zusätzliche Defekte in Seneszenz-kontrollierenden Genen haben. Dies könnte erklären, warum der Morbus Dupuytren in einigen Fällen rezidiert und in anderen nicht. Sowohl RezDup- als auch PrimDup-Zellen zeigten eine deutlich bessere adipogene und osteogene Differenzierbarkeit als die gesunden Kontrollen, was darauf hinweist, dass Morbus Dupuytren-Zellen eine weniger differenzierte Vorstufe von Fibroblasten darstellen könnten. Fibronektin, welches, wie bereits gezeigt, in Dupuytren-Gewebe hoch reguliert ist, zeigt sich in allen isolierten Zellen in der PCR-Analyse auf dem gleichen Level. Der Grund dafür könnte in der Tatsache begründet sein, dass Fibronektin ein Matrixprotein ist, welches sezerniert wird. Dass allerdings die fibronektin-bindenden Integrine $\beta 3$ und $\beta 5$, sowie das Kollagen-bindende Integrin $\alpha 2$ in Dupuytren-Zellen erhöht sind, könnte bedeuten, dass Zell-Matrix-Interaktionen ebenfalls den Verlauf der Krankheit beeinflussen. Hier könnte ein Ansatzpunkt für zukünftige Therapieansätze liegen.

6. Literaturverzeichnis

1. AbiEzzi SS, Foulk RA, Harwood FL, Akeson WH and Amiel D (1997). Decrease in fibronectin occurs coincident with the increased expression of its integrin receptor alpha5beta1 in stress-deprived ligaments. *Iowa Orthop J* 17: 102-109.
2. Alberton P, Popov C, Pragert M, Kohler J, Shukunami C, Schieker M and Docheva D (2011). Conversion of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells into Tendon Progenitor Cells by Ectopic Expression of Scleraxis. *Stem Cells Dev.*
3. Alman BA, Greel DA, Ruby LK, Goldberg MJ and Wolfe HJ (1996). Regulation of proliferation and platelet-derived growth factor expression in palmar fibromatosis (Dupuytren contracture) by mechanical strain. *J Orthop Res* 14(5): 722-728.
4. An HS, Southworth SR, Jackson WT and Russ B (1988). Cigarette smoking and Dupuytren's contracture of the hand. *J Hand Surg Am* 13(6): 872-874.
5. Arkkila PE, Kantola IM and Viikari JS (1997). Dupuytren's disease: association with chronic diabetic complications. *J Rheumatol* 24(1): 153-159.
6. Augoff K, Kula J, Gosk J and Rutowski R (2005). Epidermal growth factor in Dupuytren's disease. *Plast Reconstr Surg* 115(1): 128-133.
7. Badalamente MA and Hurst LC (2007). Efficacy and safety of injectable mixed collagenase subtypes in the treatment of Dupuytren's contracture. *J Hand Surg Am* 32(6): 767-774.
8. Baird KS, Crossan JF and Ralston SH (1993). Abnormal growth factor and cytokine expression in Dupuytren's contracture. *J Clin Pathol* 46(5): 425-428.
9. Barczyk M, Carracedo S and Gullberg D (2010). Integrins. *Cell Tissue Res* 339(1): 269-280.
10. Bayat A, Alansar A, Hajeer AH, Shah M, Watson JS, Stanley JK, . . . Ollier WE (2002). Genetic susceptibility in Dupuytren's disease: lack of association of a novel transforming growth factor beta(2) polymorphism in Dupuytren's disease. *J Hand Surg Br* 27(1): 47-49.
11. Bayat A, Stanley JK, Watson JS, Ferguson MW and Ollier WE (2003). Genetic susceptibility to Dupuytren's disease: transforming growth factor beta receptor (TGFbetaR) gene polymorphisms and Dupuytren's disease. *Br J Plast Surg* 56(4): 328-333.
12. Bayat A, Walter J, Lambe H, Watson JS, Stanley JK, Marino M, . . . Ollier WE (2005). Identification of a novel mitochondrial mutation in Dupuytren's disease using multiplex DHPLC. *Plast Reconstr Surg* 115(1): 134-141.

13. Bayat A, Watson JS, Stanley JK, Ferguson MW and Ollier WE (2003). Genetic susceptibility to Dupuytren disease: association of Zf9 transcription factor gene. *Plast Reconstr Surg* 111(7): 2133-2139.
14. Bazin S, Le Lous M, Duance VC, Sims TJ, Bailey AJ, Gabbiani G, . . . Delaunay A (1980). Biochemistry and histology of the connective tissue of Dupuytren's disease lesions. *Eur J Clin Invest* 10(1): 9-16.
15. Bergenudd H, Lindgarde F and Nilsson BE (1993). Prevalence of Dupuytren's contracture and its correlation with degenerative changes of the hands and feet and with criteria of general health. *J Hand Surg Br* 18(2): 254-257.
16. Berger A, Flory PJ and Brenner P (1990). [Clinical aspects and surgical treatment of Dupuytren contracture]. *Unfallchirurg* 93(4): 181-185.
17. Berger H (2009). *Plastische Chirurgie*. Berlin Heidelberg, Springer.
18. Berndt A, Borsi L, Luo X, Zardi L, Katenkamp D and Kosmehl H (1998). Evidence of ED-B+ fibronectin synthesis in human tissues by non-radioactive RNA in situ hybridization. Investigations on carcinoma (oral squamous cell and breast carcinoma), chronic inflammation (rheumatoid synovitis) and fibromatosis (Morbus Dupuytren). *Histochem Cell Biol* 109(3): 249-255.
19. Berndt A, Kosmehl H, Katenkamp D and Tauchmann V (1994). Appearance of the myofibroblastic phenotype in Dupuytren's disease is associated with a fibronectin, laminin, collagen type IV and tenascin extracellular matrix. *Pathobiology* 62(2): 55-58.
20. Betz N, Ott OJ, Adamietz B, Sauer R, Fietkau R and Keilholz L (2010). Radiotherapy in early-stage Dupuytren's contracture. Long-term results after 13 years. *Strahlenther Onkol* 186(2): 82-90.
21. Blobel GC, Schiemann WP and Lodish HF (2000). Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med* 342(18): 1350-1358.
22. Bocker W, Docheva D, Prall WC, Egea V, Pappou E, Rossmann O, . . . Schieker M (2008). IKK-2 is required for TNF-alpha-induced invasion and proliferation of human mesenchymal stem cells. *J Mol Med (Berl)* 86(10): 1183-1192.
23. Bovenzi M (1994). Hand-arm vibration syndrome and dose-response relation for vibration induced white finger among quarry drillers and stonecarvers. Italian Study Group on Physical Hazards in the Stone Industry. *Occup Environ Med* 51(9): 603-611.
24. Bower M, Nelson M and Gazzard BG (1990). Dupuytren's contractures in patients infected with HIV. *BMJ* 300(6718): 164-165.
25. Brakebusch C, Bouvard D, Stanchi F, Sakai T and Fassler R (2002). Integrins in invasive growth. *J Clin Invest* 109(8): 999-1006.

26. Brenner P, Krause-Bergmann A and Van VH (2001). [Dupuytren contracture in North Germany. Epidemiological study of 500 cases]. *Unfallchirurg* 104(4): 303-311.
27. Brenner P, Rayan GM and Gratzner J (2003). *Morbus Dupuytren: Ein Chirurgisches Therapiekonzept*, Springer.
28. Brown JJ, Ollier W, Thomson W and Bayat A (2008). Positive association of HLA-DRB1*15 with Dupuytren's disease in Caucasians. *Tissue Antigens* 72(2): 166-170.
29. Bulstrode NW, Jemec B and Smith PJ (2005). The complications of Dupuytren's contracture surgery. *J Hand Surg Am* 30(5): 1021-1025.
30. Burge P (1999). Genetics of Dupuytren's disease. *Hand Clin* 15(1): 63-71.
31. Burge P, Hoy G, Regan P and Milne R (1997). Smoking, alcohol and the risk of Dupuytren's contracture. *J Bone Joint Surg Br* 79(2): 206-210.
32. Burke FD, Proud G, Lawson IJ, McGeoch KL and Miles JN (2007). An assessment of the effects of exposure to vibration, smoking, alcohol and diabetes on the prevalence of Dupuytren's disease in 97,537 miners. *J Hand Surg Eur Vol* 32(4): 400-406.
33. Caroli A, Zanasi S, Marcuzzi A, Guerra D, Cristiani G and Ronchetti IP (1991). Epidemiological and structural findings supporting the fibromatous origin of dorsal knuckle pads. *J Hand Surg Br* 16(3): 258-262.
34. Chi-Rosso G, Gotwals PJ, Yang J, Ling L, Jiang K, Chao B, . . . Koteliensky VE (1997). Fibronectin type III repeats mediate RGD-independent adhesion and signaling through activated beta1 integrins. *J Biol Chem* 272(50): 31447-31452.
35. Comtet JJ, Bourne-Branchu B, Herzberg G, Bertrand HG and Loire R (1985). Lesions of digital arteries in Dupuytren's disease. A study of twelve cases. *Ann Chir Main* 4(3): 226-232.
36. Conway H and Stark RB (1954). Arterial vascularization of the soft tissues of the hand. *J Bone Joint Surg Am* 36-A(6): 1238-1240.
37. Cordova A, Tripoli M, Corradino B, Napoli P and Moschella F (2005). Dupuytren's contracture: an update of biomolecular aspects and therapeutic perspectives. *J Hand Surg Br* 30(6): 557-562.
38. de Palma L, Santucci A, Gigante A, Di Giulio A and Carloni S (1999). Plantar fibromatosis: an immunohistochemical and ultrastructural study. *Foot Ankle Int* 20(4): 253-257.
39. Degreef I and De Smet L (2009). Dupuytren's disease: a predominant reason for elective finger amputation in adults. *Acta Chir Belg* 109(4): 494-497.

40. Degreef I and De Smet L (2011). Risk factors in Dupuytren's diathesis: is recurrence after surgery predictable? *Acta Orthop Belg* 77(1): 27-32.
41. Desai SS and Hentz VR (2011). The treatment of Dupuytren disease. *J Hand Surg Am* 36(5): 936-942.
42. Descatha A, Jauffret P, Chastang JF, Roquelaure Y and Leclerc A (2011). Should we consider Dupuytren's contracture as work-related? A review and meta-analysis of an old debate. *BMC Musculoskelet Disord* 12: 96.
43. Docheva D, Popov C, Mutschler W and Schieker M (2007). Human mesenchymal stem cells in contact with their environment: surface characteristics and the integrin system. *J Cell Mol Med* 11(1): 21-38.
44. Dolmans GH, Werker PM, Hennies HC, Furniss D, Festen EA, Franke L, . . . Wijmenga C (2011). Wnt signaling and Dupuytren's disease. *N Engl J Med* 365(4): 307-317.
45. Early PF (1962). Population studies in Dupuytren's contracture. *J Bone Joint Surg Br* 44-B(3): 602 - 613.
46. Elsner T, Schramm U and Schrader M (2001). Analysis of the vascular anatomy of the palm and its clinical relevance in Morbus Dupuytren. *Ann Anat* 183(4): 379-382.
47. Forsman M, Paakkonen V, Tjaderhane L, Vuoristo J, Kallioinen L, Salo T, . . . Ryhanen J (2008). The expression of myoglobin and ROR2 protein in Dupuytren's disease. *J Surg Res* 146(2): 271-275.
48. Foucher G, Medina J and Malizos K (2001). Percutaneous needle fasciotomy in dupuytren disease. *Tech Hand Up Extrem Surg* 5(3): 161-164.
49. Gabbiani G (2003). The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol* 200(4): 500-503.
50. Gabbiani G and Majno G (1972). Dupuytren's contracture: fibroblast contraction? An ultrastructural study. *Am J Pathol* 66(1): 131-146.
51. Gillan L, Matei D, Fishman DA, Gerbin CS, Karlan BY and Chang DD (2002). Periostin secreted by epithelial ovarian carcinoma is a ligand for alpha(V)beta(3) and alpha(V)beta(5) integrins and promotes cell motility. *Cancer Res* 62(18): 5358-5364.
52. Gonzalez AM, Buscaglia M, Fox R, Isacchi A, Sarmientos P, Farris J, . . . Baird A (1992). Basic fibroblast growth factor in Dupuytren's contracture. *Am J Pathol* 141(3): 661-671.
53. Goodwin A and Jenkins G (2009). Role of integrin-mediated TGFbeta activation in the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *Biochem Soc Trans* 37(Pt 4): 849-854.

54. Gordon S (1957). Dupuytren's contracture: recurrence and extension following surgical treatment. *Br J Plast Surg* 9(4): 286-288.
55. Hall PN, Fitzgerald A, Sterne GD and Logan AM (1997). Skin replacement in Dupuytren's disease. *J Hand Surg Br* 22(2): 193-197.
56. Halliday NL, Rayan GM, Zardi L and Tomasek JJ (1994). Distribution of ED-A and ED-B containing fibronectin isoforms in Dupuytren's disease. *J Hand Surg Am* 19(3): 428-434.
57. Halliday NL and Tomasek JJ (1995). Mechanical properties of the extracellular matrix influence fibronectin fibril assembly in vitro. *Exp Cell Res* 217(1): 109-117.
58. Hindman HB, Marty-Roix R, Tang JB, Jupiter JB, Simmons BP and Spector M (2003). Regulation of expression of alpha-smooth muscle actin in cells of Dupuytren's contracture. *J Bone Joint Surg Br* 85(3): 448-455.
59. Hinz B (2007). Formation and function of the myofibroblast during tissue repair. *J Invest Dermatol* 127(3): 526-537.
60. Hinz B and Gabbiani G (2003). Cell-matrix and cell-cell contacts of myofibroblasts: role in connective tissue remodeling. *Thromb Haemost* 90(6): 993-1002.
61. Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat ML and Gabbiani G (2007). The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol* 170(6): 1807-1816.
62. Hoch J, Felouzis E, Meyer-Walters O, Nebe B and Notbohm H (2002). [Fibronectin-chemotaxis and collagen-gel contraction of the palmar aponeurosis in morbus dupuytren]. *Handchir Mikrochir Plast Chir* 34(5): 292-297.
63. Hocking DC, Sottile J and McKeown-Longo PJ (1998). Activation of distinct alpha5beta1-mediated signaling pathways by fibronectin's cell adhesion and matrix assembly domains. *J Cell Biol* 141(1): 241-253.
64. Howard JC, Varallo VM, Ross DC, Faber KJ, Roth JH, Seney S and Gan BS (2004). Wound healing-associated proteins Hsp47 and fibronectin are elevated in Dupuytren's contracture. *J Surg Res* 117(2): 232-238.
65. Hu FZ, Nystrom A, Ahmed A, Palmquist M, Dopico R, Mossberg I, . . . Preston RA (2005). Mapping of an autosomal dominant gene for Dupuytren's contracture to chromosome 16q in a Swedish family. *Clin Genet* 68(5): 424-429.
66. Hueston JT (1971). Enzymic fasciotomy. *Hand* 3(1): 38-40.

67. Hurst LC, Badalamente MA, Hentz VR, Hotchkiss RN, Kaplan FT, Meals RA, . . . Rodzvilla J (2009). Injectable collagenase clostridium histolyticum for Dupuytren's contracture. *N Engl J Med* 361(10): 968-979.
68. Jennings AM, Milner PC and Ward JD (1989). Hand abnormalities are associated with the complications of diabetes in type 2 diabetes. *Diabet Med* 6(1): 43-47.
69. Johnston P, Chojnowski AJ, Davidson RK, Riley GP, Donell ST and Clark IM (2007). A complete expression profile of matrix-degrading metalloproteinases in Dupuytren's disease. *J Hand Surg Am* 32(3): 343-351.
70. Ketchum LD and Donahue TK (2000). The injection of nodules of Dupuytren's disease with triamcinolone acetonide. *J Hand Surg Am* 25(6): 1157-1162.
71. Khashan M, Smitham PJ, Khan WS and Goddard NJ (2011). Dupuytren's Disease: Review of the Current Literature. *Open Orthop J* 5 Suppl 2: 283-288.
72. Kischer CW and Speer DP (1984). Microvascular changes in Dupuytren's contracture. *J Hand Surg Am* 9A(1): 58-62.
73. Kloen P (1999). New insights in the development of Dupuytren's contracture: a review. *Br J Plast Surg* 52(8): 629-635.
74. Kozma EM, Glowacki A, Olczyk K and Ciecierska M (2007). Dermatan sulfate remodeling associated with advanced Dupuytren's contracture. *Acta Biochim Pol* 54(4): 821-830.
75. Lam WL, Rawlins JM, Karoo RO, Naylor I and Sharpe DT (2010). Re-visiting Luck's classification: a histological analysis of Dupuytren's disease. *J Hand Surg Eur Vol* 35(4): 312-317.
76. Lee LC, Zhang AY, Chong AK, Pham H, Longaker MT and Chang J (2006). Expression of a novel gene, MafB, in Dupuytren's disease. *J Hand Surg Am* 31(2): 211-218.
77. Lennox IA, Murali SR and Porter R (1993). A study of the repeatability of the diagnosis of Dupuytren's contracture and its prevalence in the grampian region. *J Hand Surg Br* 18(2): 258-261.
78. Ling RS (1963). The Genetic Factor in Dupuytren's Disease. *J Bone Joint Surg Br* 45: 709-718.
79. Liss GM and Stock SR (1996). Can Dupuytren's contracture be work-related?: review of the evidence. *Am J Ind Med* 29(5): 521-532.
80. Löffler G, Heinrich PC and Petrides PE (2007). *Biochemie und Pathobiochemie*, Springer Medizin Verlag Heidelberg.
81. Luck JV (1959). Dupuytren's contracture; a new concept of the pathogenesis correlated with surgical management. *J Bone Joint Surg Am* 41-A(4): 635-664.

82. Magro G, Fraggetta F, Travali S and Lanzafame S (1997). Immunohistochemical expression and distribution of alpha2beta1, alpha6beta1, alpha5beta1 integrins and their extracellular ligands, type IV collagen, laminin and fibronectin in palmar fibromatosis. *Gen Diagn Pathol* 143(4): 203-208.
83. Magro G, Lanzafame S and Micali G (1995). Co-ordinate expression of alpha 5 beta 1 integrin and fibronectin in Dupuytren's disease. *Acta Histochem* 97(3): 229-233.
84. Manabe R, Ohe N, Maeda T, Fukuda T and Sekiguchi K (1997). Modulation of cell-adhesive activity of fibronectin by the alternatively spliced EDA segment. *J Cell Biol* 139(1): 295-307.
85. McFarlane RM (2002). On the origin and spread of Dupuytren's disease. *J Hand Surg Am* 27(3): 385-390.
86. McFarlane RM, McGrouther DA and Flint MH (1990). Dupuytren's disease: biology and treatment, Churchill Livingstone.
87. McIndoe A and Beare RL (1958). The surgical management of Dupuytren's contracture. *Am J Surg* 95(2): 197-203.
88. Meek RM, McLellan S, Reilly J and Crossan JF (2002). The effect of steroids on Dupuytren's disease: role of programmed cell death. *J Hand Surg Br* 27(3): 270-273.
89. Menzel EJ, Piza H, Zielinski C, Endler AT, Steffen C and Millesi H (1979). Collagen types and anticollagen-antibodies in Dupuytren's disease. *Hand* 11(3): 243-248.
90. Midwood KS and Orend G (2009). The role of tenascin-C in tissue injury and tumorigenesis. *J Cell Commun Signal* 3(3-4): 287-310.
91. Mikkelsen OA (1978). Dupuytren's disease--the influence of occupation and previous hand injuries. *Hand* 10(1): 1-8.
92. Mitra A and Goldstein RY (1994). Dupuytren's contracture in the black population: a review. *Ann Plast Surg* 32(6): 619-622.
93. Murrell GA, Francis MJ and Bromley L (1987). Free radicals and Dupuytren's contracture. *Br Med J (Clin Res Ed)* 295(6610): 1373-1375.
94. Murrell GA, Francis MJ and Bromley L (1990). Modulation of fibroblast proliferation by oxygen free radicals. *Biochem J* 265(3): 659-665.
95. Murrell GA and Hueston JT (1990). Aetiology of Dupuytren's contracture. *Aust N Z J Surg* 60(4): 247-252.

96. Neumuller J, Menzel J and Millesi H (1994). Prevalence of HLA-DR3 and autoantibodies to connective tissue components in Dupuytren's contracture. *Clin Immunol Immunopathol* 71(2): 142-148.
97. Noble J, Arafa M, Royle SG, McGeorge G and Crank S (1992). The association between alcohol, hepatic pathology and Dupuytren's disease. *J Hand Surg Br* 17(1): 71-74.
98. Norman JT and Fine LG (1999). Progressive renal disease: fibroblasts, extracellular matrix, and integrins. *Exp Nephrol* 7(2): 167-177.
99. Nugteren HM, Nijman JM, de Jong IJ and van Driel MF (2011). The association between Peyronie's and Dupuytren's disease. *Int J Impot Res* 23(4): 142-145.
100. Oberringer M, Meins C, Bubel M and Pohlemann T (2008). In vitro wounding: effects of hypoxia and transforming growth factor beta1 on proliferation, migration and myofibroblastic differentiation in an endothelial cell-fibroblast co-culture model. *J Mol Histol* 39(1): 37-47.
101. Pagnotta A, Specchia N and Greco F (2002). Androgen receptors in Dupuytren's contracture. *J Orthop Res* 20(1): 163-168.
102. Pittet B, Rubbia-Brandt L, Desmouliere A, Sappino AP, Roggero P, Guerret S, . . . Gabbiani G (1994). Effect of gamma-interferon on the clinical and biologic evolution of hypertrophic scars and Dupuytren's disease: an open pilot study. *Plast Reconstr Surg* 93(6): 1224-1235.
103. Popov C, Radic T, Haasters F, Prall WC, Aszodi A, Gullberg D, . . . Docheva D (2011). Integrins alpha2beta1 and alpha11beta1 regulate the survival of mesenchymal stem cells on collagen I. *Cell Death Dis* 2: e186.
104. Quaglino D, Bergamini G, Croce A, Boraldi F, Barbieri D, Caroli A, . . . Ronchetti IP (1997). Cell behavior and cell-matrix interactions of human palmar aponeurotic cells in vitro. *J Cell Physiol* 173(3): 415-422.
105. Rabinowitz JL, Ostermann L, Jr., Bora FW and Staeffen J (1983). Lipid composition and de novo lipid biosynthesis of human palmar fat in Dupuytren's disease. *Lipids* 18(5): 371-374.
106. Rayan GM (2008). Nonoperative treatment of Dupuytren's disease. *J Hand Surg Am* 33(7): 1208-1210.
107. Riede US, HE; Werner, M (2004). *Allgemeine und spezielle Pathologie*. Stuttgart, Thieme.
108. Rosenbloom AL and Silverstein JH (1996). Connective tissue and joint disease in diabetes mellitus. *Endocrinol Metab Clin North Am* 25(2): 473-483.
109. Saar JD and Grothaus PC (2000). Dupuytren's disease: an overview. *Plast Reconstr Surg* 106(1): 125-134; quiz 135-126.

110. Salingcarnboriboon R, Yoshitake H, Tsuji K, Obinata M, Amagasa T, Nifuji A and Noda M (2003). Establishment of tendon-derived cell lines exhibiting pluripotent mesenchymal stem cell-like property. *Exp Cell Res* 287(2): 289-300.
111. Sandbo N and Dulin N (2011). Actin cytoskeleton in myofibroblast differentiation: ultrastructure defining form and driving function. *Transl Res* 158(4): 181-196.
112. Sanderson PL, Morris MA, Stanley JK and Fahmy NR (1992). Lipids and Dupuytren's disease. *J Bone Joint Surg Br* 74(6): 923-927.
113. Schieker M, Pautke C, Haasters F, Schieker J, Docheva D, Bocker W, . . . Mutschler W (2007). Human mesenchymal stem cells at the single-cell level: simultaneous seven-colour immunofluorescence. *J Anat* 210(5): 592-599.
114. Schrader M, Lang K and Schramm U (1997). [Arterial and neural supply of the skin of the palm. Surgical-anatomical findings in Dupuytren's contracture]. *Ann Anat* 179(4): 349-353.
115. Schulze-Tanzil G, Mobasheri A, Clegg PD, Sendzik J, John T and Shakibaei M (2004). Cultivation of human tenocytes in high-density culture. *Histochem Cell Biol* 122(3): 219-228.
116. Schwabe GC, Tinschert S, Buschow C, Meinecke P, Wolff G, Gillessen-Kaesbach G, . . . Mundlos S (2000). Distinct mutations in the receptor tyrosine kinase gene ROR2 cause brachydactyly type B. *Am J Hum Genet* 67(4): 822-831.
117. Sechler JL, Corbett SA and Schwarzbauer JE (1997). Modulatory Roles for Integrin Activation and the Synergy Site of Fibronectin during Matrix Assembly. *Molecular Biology of the Cell* 8(12): 2563-2573.
118. Shaw RB, Jr., Chong AK, Zhang A, Hentz VR and Chang J (2007). Dupuytren's disease: history, diagnosis, and treatment. *Plast Reconstr Surg* 120(3): 44e-54e.
119. Shephard P, Martin G, Smola-Hess S, Brunner G, Krieg T and Smola H (2004). Myofibroblast differentiation is induced in keratinocyte-fibroblast co-cultures and is antagonistically regulated by endogenous transforming growth factor-beta and interleukin-1. *Am J Pathol* 164(6): 2055-2066.
120. Shih B and Bayat A (2010). Scientific understanding and clinical management of Dupuytren disease. *Nat Rev Rheumatol* 6(12): 715-726.
121. Shih B, Wijeratne D, Armstrong DJ, Lindau T, Day P and Bayat A (2009). Identification of biomarkers in Dupuytren's disease by comparative analysis of fibroblasts versus tissue biopsies in disease-specific phenotypes. *J Hand Surg Am* 34(1): 124-136.

122. Singer, II (1979). The fibronexus: a transmembrane association of fibronectin-containing fibers and bundles of 5 nm microfilaments in hamster and human fibroblasts. *Cell* 16(3): 675-685.
123. Sladicka MS, Benfanti P, Raab M and Becton J (1996). Dupuytren's contracture in the black population: a case report and review of the literature. *J Hand Surg Am* 21(5): 898-899.
124. Slattery D (2010). Review: Dupuytren's disease in Asia and the migration theory of Dupuytren's disease. *ANZ J Surg* 80(7-8): 495-499.
125. Smith AC (1991). Diagnosis and indications for surgical treatment. *Hand Clin* 7(4): 635-642; discussion 643.
126. Spencer JD and Walsh KI (1984). Histocompatibility antigen patterns in Dupuytren's contracture. *J Hand Surg Br* 9(3): 276-278.
127. Stuhler T, Stankovic P, Ritter G and Schmulder E (1977). [Epilepsy and Dupuytren's contracture--a syntropy of 2 diseases?]. *Handchirurgie* 9(4): 219-223.
128. Stupp R and Rugg C (2007). Integrin Inhibitors Reaching the Clinic. *Journal of Clinical Oncology* 25(13): 1637-1638.
129. Terek RM, Jiranek WA, Goldberg MJ, Wolfe HJ and Alman BA (1995). The expression of platelet-derived growth-factor gene in Dupuytren contracture. *J Bone Joint Surg Am* 77(1): 1-9.
130. Tomasek J and Rayan GM (1995). Correlation of alpha-smooth muscle actin expression and contraction in Dupuytren's disease fibroblasts. *J Hand Surg Am* 20(3): 450-455.
131. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C and Brown RA (2002). Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(5): 349-363.
132. Tomasek JJ and Haaksma CJ (1991). Fibronectin filaments and actin microfilaments are organized into a fibronexus in Dupuytren's diseased tissue. *Anat Rec* 230(2): 175-182.
133. Tomasek JJ, Schultz RJ and Haaksma CJ (1987). Extracellular matrix-cytoskeletal connections at the surface of the specialized contractile fibroblast (myofibroblast) in Dupuytren disease. *J Bone Joint Surg Am* 69(9): 1400-1407.
134. Tomasek JJ, Vaughan MB and Haaksma CJ (1999). Cellular structure and biology of Dupuytren's disease. *Hand Clin* 15(1): 21-34.
135. Tonkin MA, Burke FD and Varian JP (1984). Dupuytren's contracture: a comparative study of fasciectomy and dermofasciectomy in one hundred patients. *J Hand Surg Br* 9(2): 156-162.

136. Tourovskaja A, Kosar TF and Folch A (2006). Local induction of acetylcholine receptor clustering in myotube cultures using microfluidic application of agrin. *Biophys J* 90(6): 2192-2198.
137. Townley WA, Baker R, Sheppard N and Grobbelaar AO (2006). Dupuytren's contracture unfolded. *BMJ* 332(7538): 397-400.
138. Townley WA, Cambrey AD, Khaw PT and Grobbelaar AO (2009). The role of an MMP inhibitor in the regulation of mechanical tension by Dupuytren's disease fibroblasts. *J Hand Surg Eur Vol* 34(6): 783-787.
139. Tubiana R, Michon J and Thomine JM (1968). Scheme for the assessment of deformities in Dupuytren's disease. *Surg Clin North Am* 48(5): 979-984.
140. Tuckwell D, Calderwood DA, Green LJ and Humphries MJ (1995). Integrin alpha 2 I-domain is a binding site for collagens. *Journal of Cell Science* 108(4): 1629-1637.
141. Ulrich D, Hrynyschyn K and Pallua N (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in sera and tissue of patients with Dupuytren's disease. *Plast Reconstr Surg* 112(5): 1279-1286.
142. Ulrich D, Ulrich F, Piatkowski A and Pallua N (2009). Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in cords and nodules of patients with Dupuytren's disease. *Arch Orthop Trauma Surg* 129(11): 1453-1459.
143. Urban M, Feldberg L, Janssen A and Elliot D (1996). Dupuytren's disease in children. *J Hand Surg Br* 21(1): 112-116.
144. van Adrichem LN, Hovius SE, van Strik R and van der Meulen JC (1992). Acute effects of cigarette smoking on microcirculation of the thumb. *Br J Plast Surg* 45(1): 9-11.
145. Van Obberghen-Schilling E, Tucker RP, Saupe F, Gasser I, Cseh B and Orend G (2011). Fibronectin and tenascin-C: accomplices in vascular morphogenesis during development and tumor growth. *Int J Dev Biol* 55(4-5): 511-525.
146. van Rijssen AL, ter Linden H and Werker PM (2012). Five-year results of a randomized clinical trial on treatment in Dupuytren's disease: percutaneous needle fasciotomy versus limited fasciectomy. *Plast Reconstr Surg* 129(2): 469-477.
147. Vi L, Feng L, Zhu RD, Wu Y, Satish L, Gan BS and O'Gorman DB (2009). Periostin differentially induces proliferation, contraction and apoptosis of primary Dupuytren's disease and adjacent palmar fascia cells. *Exp Cell Res* 315(20): 3574-3586.
148. Volkmer E, Kallukalam BC, Maertz J, Otto S, Drosse I, Polzer H, . . . Schieker M (2010). Hypoxic preconditioning of human mesenchymal stem cells

- overcomes hypoxia-induced inhibition of osteogenic differentiation. *Tissue Eng Part A* 16(1): 153-164.
149. Vyas DR, Spangenburg EE, Abraha TW, Childs TE and Booth FW (2002). GSK-3beta negatively regulates skeletal myotube hypertrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* 283(2): C545-551.
 150. Wilbrand S, Ekbom A and Gerdin B (1999). The sex ratio and rate of reoperation for Dupuytren's contracture in men and women. *J Hand Surg Br* 24(4): 456-459.
 151. Wilbrand S, Flodmark C, Ekbom A and Gerdin B (2003). Activation markers of connective tissue in Dupuytren's contracture: relation to postoperative outcome. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 37(5): 283-292.
 152. Wulle C (1986). [Dupuytren's contracture as an accident sequela. Can progression of Dupuytren's contracture be recognized as an accident sequela?]. *Handchir Mikrochir Plast Chir* 18(4): 216-217.
 153. Zhang AY, Fong KD, Pham H, Nacamuli RP, Longaker MT and Chang J (2008). Gene expression analysis of Dupuytren's disease: the role of TGF-beta2. *J Hand Surg Eur Vol* 33(6): 783-790.

Anhang

Fragebögen:

Morbus Dupuytren Studie

Name:

Pat Nr.:

Geschlecht:

Händigkeit: rechts links

betroffene Hand: rechts links beidseits

Dup Erkrankung seit (y):

Risikofaktoren:

Familienanamnese:

Diabetes:

Nikotinkonsum in PY:

Alkoholkonsum:

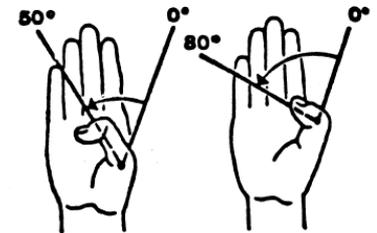
Epilepsie:

manuelle Arbeit:

Beruf:

Tubiana:

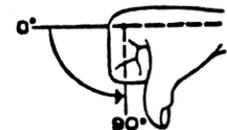
sonstiges:



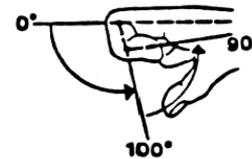
Beugung des Daumens im Grund- u. Endgelenk



Streckung im Grundgelenk



Beugung im Grundgelenk



Beugung im Mittel- und Endgelenk

Funktion:

Streckung/Beugung des Daumens (I)

rechts links links

I MCP

DIP

weitere Daumenfunktionen/ Streckung/ Beugung im Sattelgelenk

Streckung/Beugung der Finger (II - V)

rechts links

rechts links

II MCP

PIP

DIP

III MCP

PIP

DIP

IV MCP

PIP

DIP

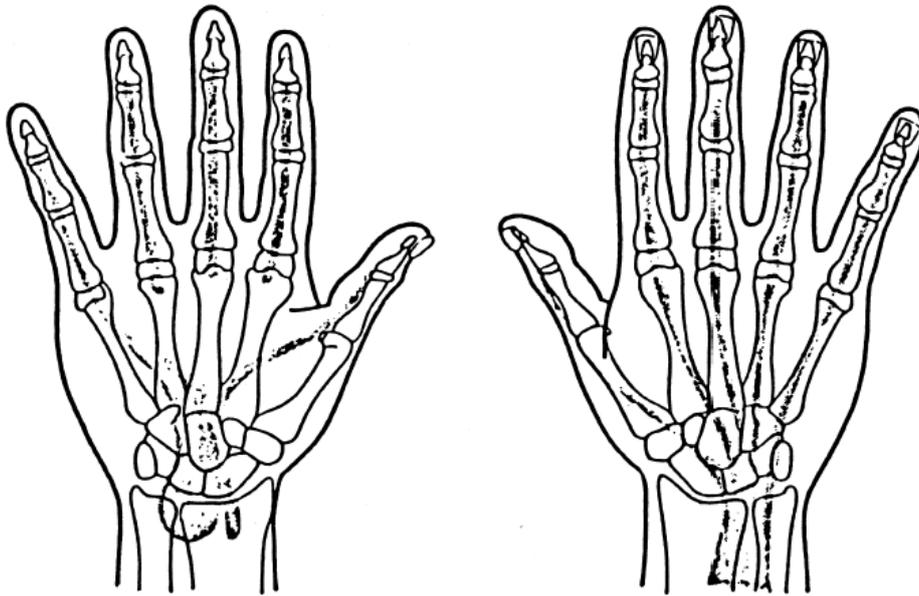
V MCP

PIP

DIP

Gesamtfunktion der Hände (z.B. Faustschluss)

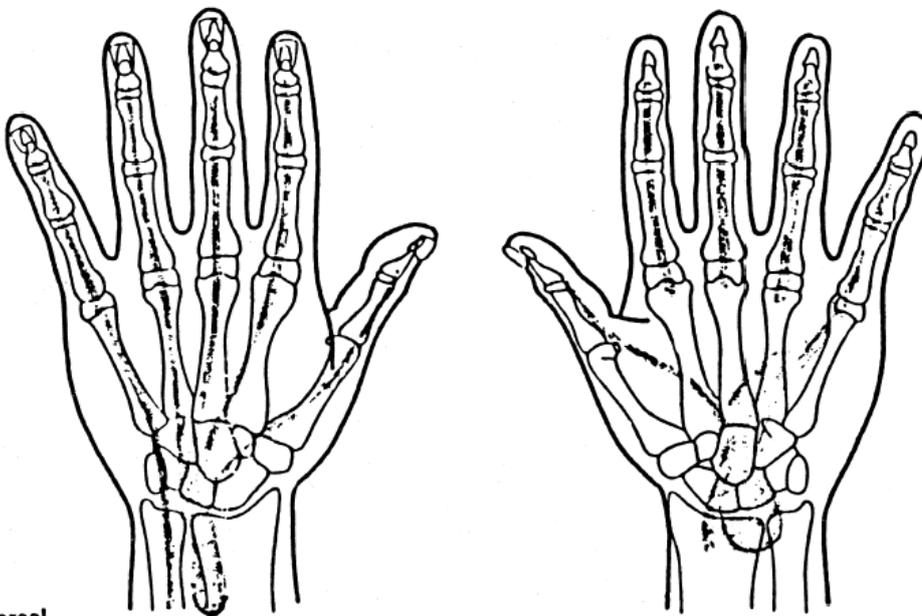
Skizze rechte Hand



volar

dorsal

Skizze linke Hand



dorsal

volar

Lokalisation:

Stränge, Knoten, Histologie

Sensibilität

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ALP	Alkalische Phosphatase
bzw.	Beziehungsweise
°C	Celsius
ca.	Circa
cDNA	complementary Desoxyribonucleic acid
CFU	Colony forming unit, Klonogenes Assay
Cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Kon	gesunde Aponeurosezellen
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTPs	Desoxynucleotid- triphosphate, Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
FACS	fluorescence activated cell sorting, Durchflusszytometrie
FBS	fetal bovine serum, fetales Kälberserum
FGF	Fibroblast growth factor
G	Erdschwerebeschleunigung
G	Gramm
GAPDH	Human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HA	Handaponeurose
hMSC	Humane mesenchymale Stammzelle
MCP	Metacarpophalangealgelenk
Mg	Milligramm
Min	Minute
ml	Milliliter
Mm	Millimeter
mM	Millimolar

MMP	Matrix- Metalloproteinase
mRNA	Messenger ribo nucleic acid, Messenger- Ribonukleinsäure
N.	Nervus
P	Passage
PBS	Phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Salzlösung
PrimDup	primärer Dupuytren
PDGF	Platelet- derived growth factor
PIP	proximalen Interphangealgelenke
PY	Pack Years
RezDup	Rezidivdupuytren
RNA	Ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse transkriptase polymerase chain reaction
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
s.o.	siehe oben
Sec	Sekunde
TE	Tissue engineering
TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Mg	Mikrogramm
MI	Mikroliter
Mm	Mikrometer
μM	Mikromolar

Danksagung

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Matthias Schieker, danke ich für die Vergabe des Themas, sowie für die freundliche Aufnahme am Institut und die großzügige Unterstützung und Förderung der Arbeit.

Besonders meinen Betreuern, Herrn Dr. Elias Volkmer und Frau PD Dr. Denitsa Docheva, danke ich sehr herzlich, für die Heranführung an das wissenschaftliche Arbeiten und an das Thema, die weiterführenden Beiträge und Ideen und die beständige Unterstützung. Viele fachliche wie auch persönliche Gespräche haben diese Arbeit erst ermöglicht.

Beim dem ganzen Team des Labors Experimented, der Chirurgischen Klinik, bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit, die Unterstützung bei der Durchführung der Experimente und viele aufmunternde Worte. Besonders danken möchte ich Frau Julia Kohler und Herrn Paolo Alberton, die mich inhaltlich fachlich und auch persönlich freundschaftlich sehr unterstützt haben sowie bei Herrn Dr. Tzetvan Popov, der mir unter anderem auch die Protokolle für die PCRs zur Verfügung gestellt hat.

Ich danke Herrn Dr. Stephan Deiler und dem gesamten Op-Personal, der Chirurgischen Klinik, LMU Innenstadt, für gute Zusammenarbeit bei der Beschaffung der Proben.

Mein Dank gilt meinen Eltern und Geschwistern für all ihre Unterstützung und Liebe.

Publikationen

Docheva D, Vaerst B, Deiler S, Giunta RE, Schieker M, Volkmer E. Veränderung des Zell-Phänotyps durch Morbus Dupuytren - eine in-vitro-Analyse. Handchirurgie Mik-rochirurgie plastische Chirurgie 2012; 44: 59-66

Eidesstattliche Versicherung

Vaerst, Barbara

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Neue molekulare Charakteristika von Zellisolaten aus Dupuytren- Gewebe

selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin