

**Immungenetische Untersuchungen zur Ätiopathogenese
der Induratio penis plastica**

Immungenetische Untersuchungen zur Ätiopathogenese der Induratio penis plastica

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Hauptmann, Arne
aus Lich

Gießen 2005

Aus dem Medizinischen Zentrum für Chirurgie, Anästhesiologie und Urologie
Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie¹
und
dem Medizinischen Zentrum für Klinische Chemie, Klinische Immunologie und
Humangenetik
Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin²

Direktor¹: Prof. Dr. med. W. Weidner

Direktor²: Prof. Dr. med. G. Bein

des Universitätsklinikums Gießen

Gutachter: PD. Dr. E. Hauck

Gutachter: Frau PD. Dr. D. Nolte

Tag der Disputation: 31.10.2005

meinen Eltern gewidmet

1. Einleitung und Fragestellungen	3
1.1. Einleitung	3
1.2. Fragestellungen.....	3
2. Grundlagen	5
2.1. Krankheitsbild, Historie und Epidemiologie	5
2.2. Pathogenese.....	6
2.3. Ätiologie.....	7
2.3.1. Assoziation mit M. Dupuytren.....	7
2.3.2. Trauma	7
2.3.3. Infektiöse Genese und Autoimmunologie.....	9
2.3.4. Genetische Untersuchungen.....	10
2.3.4.1. Antigene des HLA-Systems	10
2.3.4.2. Transforming Growth Factor-Beta1 (TGF-beta1)	11
2.3.4.3. Alpha-1-Antitrypsin (AAT)	13
2.3.4.4. Genexpression	15
2.3.4.5. Chromosomale Veränderungen.....	16
2.3.5. Serummarker	16
2.3.6. Medikamente und nutritive Ursachen.....	17
2.4. Diagnostik.....	18
2.5. Therapie	19
3. Patienten und Methoden	21
3.1. Patienten	21
3.2. Kontrollgruppe	22
3.3. Geräte und Kleinmaterialien.....	23
3.3.1. Geräte.....	23
3.3.2. Kleinmaterialien.....	24
3.3.3. Reagenzien	25
3.3.4. Oligonukleotide.....	26
3.4. Untersuchungen zur genetischen Disposition	27
3.4.1. Koinzidenz mit M. Dupuytren	27
3.4.2. DNA-Isolierung	27
3.4.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	27
3.4.4. Sequenzspezifische PCR (SSP-PCR)	29
3.4.4.1. HLA-Genotypisierung.....	31
3.4.4.2. Transforming Growth Factor-Beta1 (TGF-β1)-Genotypisierung.....	33
3.4.4.3. Alpha-1-Antitrypsin (AAT)-Genotypisierung.....	35
3.5. Alpha-1-Antitrypsin (AAT)-Serumspiegel – Immunnephelometrie	39
3.6. Gelelektrophorese	40
3.7. DNA-Sequenzierung.....	42
3.8. Statistik	46
3.8.1. HLA-Statistik.....	46
3.8.2. Transforming Growth Factor-Beta1 (TGF-β1)-Statistik	47
3.8.3. Alpha-1-Antitrypsin (AAT)-Statistik.....	47
4. Ergebnisse	48
4.1. Basisdaten.....	48
4.1.1. HLA-Genotypisierung	48
4.1.2. TGF-beta1-Genotypisierung.....	49
4.1.3. Alpha-1-Antitrypsin-Genotypisierung und Serumspiegel	49
4.2. Koinzidenz mit M. Dupuytren	50
4.3. HLA-Genotypisierung	51
4.4. TGF-beta1-Genotypisierung.....	56
4.5. Alpha-1-Antitrypsin (AAT).....	65
4.5.1. Serumspiegel.....	65
4.5.2. Genotypisierung	70

5. Diskussion	74
5.1. Basisdaten und Koinzidenz mit M. Dupuytren	74
5.2. HLA-Genotypisierung	77
5.3. TGF-beta1 Genotypisierung	79
5.4. Alpha-1-Antitrypsin (AAT).....	80
5.4.1. Serumspiegel.....	81
5.4.2. Genotypisierung	82
6. Zusammenfassung.....	85
7. Literatur	89
8. Anlagen	102
8.1. Aufnahmebogen	102
8.2. Auswertungsbogen zur Zytokingenotypisierung	104
9. Publikationen	105
9.1. Originalarbeiten (Co-Autor)	105
9.2. Übersichtsarbeiten (Co-Autor).....	105
9.3. Publierte Abstracts (Erstautor).....	106
9.4. Publierte Abstracts (Co-Autor).....	106
10. Abkürzungsverzeichnis	108
11. Danksagung	110
12. Lebenslauf.....	111

1. Einleitung und Fragestellung

1.1. Einleitung

Die Induratio penis plastica (IPP) ist eine Erkrankung des älteren Mannes mit den Symptomen peniler Plaque, Penisdeviation, Erektionsschmerz und erektiler Dysfunktion. Die IPP tritt bei 0,4 – 3% der männlichen Bevölkerung auf. Eine häufig beobachtete Begleiterkrankung ist der durch palmare Fibrosierungen gekennzeichnete M. Dupuytren. Entzündliche Prozesse mit Veränderungen der bindegewebigen Strukturen und Kollagenablagerungen im Bereich der penilen Tunica albuginea führen zu dem häufig gut palpablen, meist an der dorsalen Seite des Penis gelegenen Plaque. Infolge dieser anatomischen Veränderungen mit narbiger Kontraktur ist die Deviation des erigierten Penis in Richtung des Plaque zu beobachten. Trotz variabler klinischer Verläufe ist die Diagnose aufgrund der typischen Symptome relativ einfach. Nach einer ausführlichen Anamnese und der körperlichen Untersuchung hat sich in der Praxis die Sonographie und Photographie des erigierten Penis zur Verifizierung des Befundes und zur Verlaufsbeobachtung als wertvoll erwiesen.

Trotz der jahrhundertelangen wissenschaftlichen Beschäftigung mit der IPP bleiben viele Aspekte der IPP unklar. Die genaue Ätiopathogenese und ein daraus resultierender kausaler Therapieansatz konnten bislang nicht identifiziert werden. Im Rahmen von Forschungen zur Ätiopathogenese wurden u.a. genetische, traumatische, infektiöse und medikamentöse Ursachen diskutiert.

1.2. Fragestellungen

Aus den in der Literatur beschriebenen Hypothesen zur Ätiopathogenese der IPP ergeben sich verschiedene Fragestellungen, die im Rahmen dieser Promotionsarbeit bearbeitet wurden. Ein besonderes Augenmerk gilt den immungenetischen Veränderungen, die bei der IPP zu beobachten sind. Die Entstehung des Krankheitsbildes der IPP könnte Folge einer immunologischen Fehlregulation sein. Aufgrund dieser Annahme wurden in der vorliegenden Promotionsarbeit HLA-Genotypisierungen durchgeführt. Die Frage nach einer möglichen Assoziation der

IPP mit den Antigenen des HLA-Systems sollte geklärt werden. Da fast alle Autoimmunerkrankungen mit HLA-Antigenen assoziiert sind, sollte durch die HLA-Genotypisierungen aufgezeigt werden, ob es sich bei der IPP um eine Autoimmunerkrankung handeln könnte.

Ein weiterer genetischer Aspekt bei der Entstehung der IPP ergibt sich aus der Rolle des Zytokins TGF-beta1 in der Ätiopathogenese dieser Erkrankung. Bislang konnte eine vermehrte Expression von TGF-beta1 bei IPP-Patienten nachgewiesen werden. Gibt es bei IPP-Patienten genetische Veränderungen, aus der diese vermehrte Expression von TGF-beta1 resultiert? Auch dieser Fragestellung wurde in einer prospektiven Studie im Rahmen dieser Arbeit nachgegangen.

Die dritte immungenetische Untersuchung dieser Arbeit beschäftigt sich mit dem möglichen Einfluss des Proteinaseinhibitors Alpha-1-Antitrypsin auf die Ätiopathogenese. Ein Mangel dieses Proteins könnte zu Veränderungen der Kollagensynthese führen, aus denen ihrerseits das Krankheitsbild IPP resultieren kann. Zunächst sollte der schon beschriebene Mangel des Alpha-1-Antitrypsins im Serum von IPP-Patienten verifiziert werden und im Folgenden eine genetische Variante als Ursache für die verminderte Expression dieses Proteins aufgezeigt werden. Auf der Suche nach genetischen Varianten des Alpha-1-Antitrypsin Gens und daraus resultierendem erniedrigten Alpha-1-Antitrypsinserumspiegel wurden weitere Untersuchungen an einem großen Kollektiv von IPP-Patienten durchgeführt.

Daraus ergeben sich folgende Fragestellungen:

1. Besteht ein Zusammenhang der IPP mit HLA-Antigenen und handelt es sich somit wahrscheinlich bei der IPP um eine Autoimmunerkrankung?
2. Haben gemessene Veränderungen der Expression von TGF-beta1 in Plaques von IPP-Patienten einen Einfluss auf die Ätiopathogenese der IPP?
3. Bestehen erniedrigte Alpha-1-Antitrypsinspiegel im Serum bei IPP-Patienten, und können diese durch Veränderungen des Kollagenstoffwechsels das Krankheitsbild der IPP hervorrufen?

2. Grundlagen

2.1. Krankheitsbild, Historie und Epidemiologie

Die Induratio penis plastica (IPP) ist ein Krankheitsbild, welches durch die Symptomtrias peniler Plaque, Penisdeviation und Erektionsschmerz gekennzeichnet ist [59]. Die als Plaque bezeichnete flache, erhabene und flächenförmige Verhärtung des Gewebes im Bereich der penilen Tunica albuginea ist das führende Symptom [28, 126]. Der Plaque führt zu einer meist nach dorsal gerichteten Deviation. Zudem kann der narbige Schrumpfungsprozess zu einer Penisverkürzung führen [48, 59, 54, 61]. Begleitend können Kohabitationsschwierigkeiten und eine erektile Dysfunktion auftreten [143]. Diese Konstellation von Symptomen führt häufig zu einer erheblichen Beeinträchtigung bei der Ausübung des Geschlechtsverkehrs.

In der Literatur gilt häufig François Gigot de la Peyronie als der Erstbeschreiber dieser Krankheit. Daher wird sie im englischsprachigen Raum Peyronie's disease genannt. De la Peyronie beschrieb 1743 die Symptomatik der IPP ausführlich in einem Fallbericht über einen Patienten mit Ejakulationsstörungen [29]. Eigentlich wurde die IPP jedoch schon früher beschrieben. Unter der Bezeichnung „pudendi distortio“ beschrieb Giulio Cesare Aranzi bereits im 16. Jahrhundert "knotenartige, bohnenförmige Tumore des Penis, die bei der Erektion den Penis in der Form eines Widderhorns erscheinen ließen" [6]. Auch die Anatomen Fallopius und Vesalius beschrieben in ihren Werken "Observationes anatomicae" und "Examen" 1561 beziehungsweise 1564 eingehend das Krankheitsbild der IPP [100].

Ca. 0,4 - 3% der männlichen Bevölkerung, vorwiegend zwischen dem 50. und 60. Lebensjahr, sind von der Erkrankung betroffen [81, 118, 126]. Ein milde Form der Erkrankung konnte durch Autopsie verstorbener Personen und Untersuchung der Histologie in 23% der Fälle beobachtet werden [121]. Es kann somit von einer relevanten Zahl nicht bekannter Krankheitsfälle bei Patienten über 50 Jahren ausgegangen werden. Eine positive Familienanamnese ist in den wenigsten Fällen zu erheben [67].

Die klinischen Verläufe der Erkrankung sind sehr variabel. In der akuten, entzündlichen Phase überwiegen die penilen Schmerzen, vor allem bei der Erektion. Diese lassen jedoch bei der überwiegenden Mehrheit der Patienten in einem Zeitraum von 12 bis 18 Monaten nach [43, 46, 67, 105, 107]. Von einem stabilen

Krankheitsverlauf wird dann ausgegangen, wenn über einen Zeitraum von 6 Monaten keine Progression der Erkrankung beobachtet werden konnte und der Patient schmerzfrei ist [67, 107]. Eine vollständige Remission der Erkrankung wird ebenso wie ein progressives Fortschreiten beobachtet. Eine Restitutio ad integrum ist nur bei dem Vorkommen eines nicht kalzifizierenden Plaque möglich. Bei einer ausgeprägten Progression der IPP kann es im Verlauf zu erheblichen Penisdeformitäten kommen. Deviationen von über 90° sind zu beobachten. Ein vollständiger Verlust der Erektionsfähigkeit und somit eine erheblichen Einschränkung der Kohabitationsfähigkeit ist zusätzlich möglich [46, 54, 67].

2.2. Pathogenese

Die IPP stellt sich initial als ein entzündlicher Prozeß mit perivaskulären B- und T-Lymphozyteninfiltrationen im Bereich der Tunica albuginea und dem umliegenden Bindegewebe dar [28]. Im Verlauf kommt es durch eine lokale Fibrinvermehrung [18, 122, 133], zu einer exzessiven Kollagenablagerung [18, 28, 123, 135] und zu einem narbigen Umbau mit Verlust von elastischen Fasern [18, 28, 64]. Ein fibrotischer Plaque im Bereich der Tunica albuginea ist das Resultat. Die narbige Schrumpfung führt zu der plaquewärts gerichteten Deviation während der Erektion [54]. Diese vermehrte Kollagenansammlung besteht hauptsächlich aus den Kollagentypen I und III [18, 28, 123, 135]. In Zellkulturen aus Myofibroblasten konnte dies bestätigt werden [1]. Allerdings wurden die Kulturen aus Zellen der Corpora cavernosa und nicht aus Zellen der Tunica albuginea der IPP-Patienten und Kontrollen entnommen [1].

Der Plaque ist meistens unifokal dorsal lokalisiert, zwischen 15 und 30 mm groß und kann im Extremfall vom Sulcus coronarius bis zum Ligamentum suspensorium reichen [28, 105, 134, 143]. Eine von diesem Plaque ausgehende Einstrahlung von fibrotischem Gewebe in die Corpora cavernosa ist möglich [18, 28]. Bei einem chronischem Verlauf kann es in ca. 30% der Fälle zu einer Kalzifizierung des Plaques kommen [18, 28]. Intraluminal können sich Strukturen bilden, die spongiosen Knochen ähneln. Hier ist zum Teil der Nachweis eines Osteoblasten-ähnlichen Zelltyps möglich. Diese perivaskulär gelegenen Knochenlamellen sind dann häufig von zellarmem Bindegewebe umgeben [134].

2.3. Ätiologie

Die genaue Ätiopathogenese der Induratio penis plastica ist bis heute unklar. Viele verschiedene Vorstellungen zur Entstehung dieser Erkrankung werden diskutiert. Die folgenden Kapitel geben einen Überblick über die bisher untersuchten Theorien zur Ätiologie der IPP.

2.3.1. Assoziation mit M. Dupuytren

Bei Studien zur Ätiologie der IPP stehen Assoziationen zu Fibromatosen im Mittelpunkt der Diskussion. An erster Stelle ist der M. Dupuytren zu nennen, der bei IPP-Patienten wesentlich häufiger als in der Normalbevölkerung auftreten soll [49, 54, 61]. Ein gleichzeitiges Vorkommen dieser Bindegewebserkrankung der Palmaraponeurose bei Patienten mit IPP wird zwischen 1,0 [67] – 30,8% [114] beobachtet. Weitere vereinzelte Assoziationen sind mit dem M. Ledderhose beschrieben. Über eine Assoziation mit der Sklerodermie wurde dagegen nur sporadisch berichtet [23]. Der Zusammenhang zwischen der IPP und dem M. Dupuytren könnte auf eine bislang unbekannte genetische Konstellation hindeuten. Diese besondere genetische Veranlagung der Patienten könnte zu einer vermehrten Fibrose disponieren.

2.3.2. Trauma

Durch Biegung des erigierten Penis bei der Kohabitation kommt es zu einer Hyperextension der Tunica albuginea. Dadurch entstehen vor allem in der dorsalen Tunica albuginea Scherkräfte (ABBILDUNG 1), die einen mikrovaskulären Schaden verursachen und zur Hämatomentstehung zwischen den Schichten der Tunica albuginea führen können [33, 82]. Dieser Mechanismus wird als einer der wichtigsten ätiopathogenetischen Faktoren diskutiert. In der Wundheilungsphase soll es im weiteren Verlauf zur Entstehung von IPP-typischen Plaques kommen [33, 45, 65, 82, 87]. Das Septum, welches die beiden Corpora cavernosa voneinander trennt, hat Faserverbindungen zu der inneren zirkulären Schicht der Tunica albuginea und ist für

die vertikale Rigidität verantwortlich. Diese anatomische Konstellation erklärt das häufige Vorkommen eines dorsalen Plaques in der Mittellinie des Penis [33].

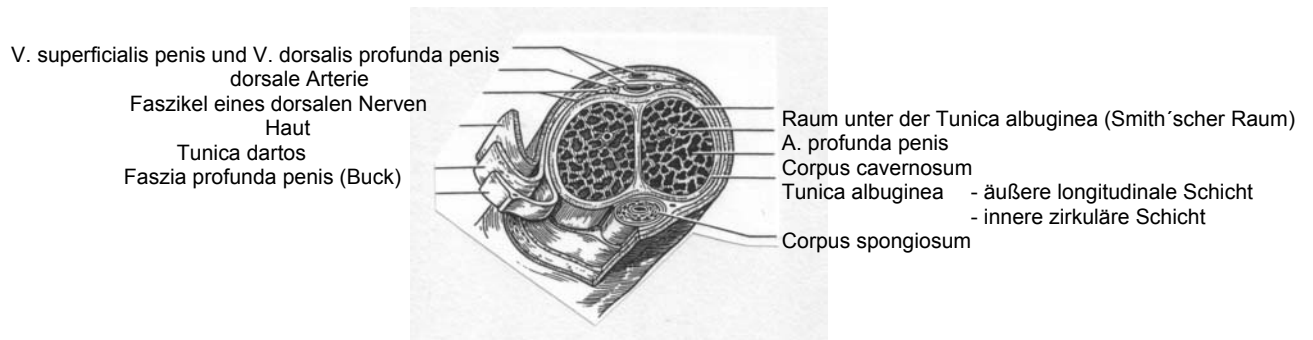


ABBILDUNG 1 ZEIGT EINEN PENISQUERSCHNITT. ZU SEHEN IST DIE BEZIEHUNG DER SCHWELLKÖRPER ZU DEN SIE UMGEBENDEN FASZIEN, NERVALEN STRUKTUREN UND GEFÄßEN (MODIFIZIERT NACH DEVINE ET. AL. [33]).

Rezidivierende Gewebsschädigungen führen im Rahmen des Wundheilungsprozesses zu einer entzündlichen Reaktion. Konsekutiv erfolgt eine Fibroblastenaktivierung und Narbenbildung [18, 64, 122, 133, 137].

Schon im 16. Jahrhundert wurde die traumatische Genese der IPP von Giulio Cesare Aranzi beschrieben [6]. Er beschrieb bohnenförmige Knoten im Penis bei Männern, die der Liebe sklavisch zugewandt waren [6]. Ein signifikant häufiges Vorkommen von penilen Traumen konnte bei Patienten mit IPP (40%) und bei Patienten mit erektiler Dysfunktion (37%) gegenüber einer Kontrollgruppe von urologischen Patienten (11%), die nicht an einer dieser beiden Erkrankungen litten, festgestellt werden [65].

Dieses Modell der traumatisch induzierten IPP konnte auch im Tierexperiment bestätigt werden. In einer Studie wurde Ratten eine chirurgische Läsion im Bereich der Tunica albuginea zugefügt und die histologische Entwicklung beobachtet [39]. Vorübergehend konnten morphologische Veränderungen beobachtet werden, die denen der Frühphase der IPP, nicht aber der chronischen Phase der Erkrankung ähnlich waren [39].

2.3.3. Infektiöse Genese und Autoimmunologie

François Gigot de la Peyronie vermutete eine infektiöse Genese [29] und sah die Induratio penis plastica im Formenkreis der „sexual transmitted diseases“ (STD). Auch in einer neueren Studie wurde ein Zusammenhang mit einer durch pathogene Bakterien verursachte Autoimmunreaktion gesehen [110]. Untersucht wurde das Phänomen der molekularen Mimikrie oder auch „cross tolerance theory“. Bakterien sind als Auslöser der IPP denkbar, wenn mikrobielle Pathogene gleiche Epitope wie Histokompatibilitätsantigene aufweisen und somit der Zerstörung durch das Immunsystem aus dem Wege gehen können [75, 110]. Bei dieser Konstellation könnte eine autoimmunologische Reaktion die klinischen Symptome der IPP hervorrufen. Bekannt ist diese Kreuztoleranz u.a. zwischen Klebsiella pneumoniae und dem HLA-B27 Antigen, welches signifikant häufiger bei Patienten mit M. Bechterew im Gegensatz zu Kontrollkollektiven vorkommt [110]. Bei IPP-Patienten wurden Allelfrequenzen von HLA-Antigenen und Antikörpertiter gegen Klebsiella-, Proteus- und E. coli-Spezies untersucht, um einen möglichen Zusammenhang zwischen beiden herstellen zu können [110]. Bei Patienten mit IPP konnte jedoch keine Assoziation zwischen dem Human Leukozyten Antigen-System (HLA-System) und Antikörpertitern gegen Bakterien nachgewiesen werden [110]. Die Vermutung, dass es keinen Zusammenhang zwischen der Entzündungsreaktion bei der IPP und einer bakteriellen Infektion gibt, konnte durch eine aktuelle Studie bestätigt werden [52]. Bei dieser Untersuchung wurde mittels molekularer PCR-Technik der Versuch unternommen, 16S rDNA nachzuweisen. 16S rDNA ist eine kleine Untereinheit der in allen Bakterien vorkommenden DNA des prokaryotischen Ribosoms [111]. 16S rDNA ist damit ein hoch sensibler Marker für die Anwesenheit von Bakterien. Weder in Proben aus Plauegewebe noch in den Kontrollgeweben konnte diese Untereinheit nachgewiesen werden, sodass eine bakteriell infektiöse Genese der IPP ausgeschlossen werden kann [52].

2.3.4. Genetische Untersuchungen

2.3.4.1. Antigene des Human Leukozyte Antigen-Systems

Das HLA-System entspricht dem MHC-Komplex (major histocompatibility complex). Immunologisch ist dieser Komplex von großer Bedeutung, da er für die Unterscheidung von körpereigenen und körperfremden Zellen zuständig ist. Er beeinflusst die Entwicklung der T-Zellen, die Abstoßung von übertragenem Gewebe und die Anfälligkeit für viele immunologische Erkrankungen [139]. Der Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) besteht aus ungefähr 4×10^6 Basenpaaren und enthält beim Menschen über 100 Gene. Die Einteilung der HLA-Antigene erfolgt nach Klassen. Unterschieden werden Klasse I (HLA-A, -B, -C) und Klasse II (HLA-DR, -DP und -DQ) Antigene. Die Komplementfaktoren C2, C4A, C4B und Bf, die 21-Hydroxylase sowie die zwei Loci für den Tumornekrosefaktor und ein Hitzeschockprotein (HSP70) können als Klasse III des HLA-Systems zusammengefasst werden. Der MHC ist polygen, d.h. es gibt mehrere MHC Klasse I und Klasse II Gene. Er ist auch polymorph, da für jedes Gen multiple Allele existieren.

Verschiedene autoimmunologische Erkrankungen sind mit Antigenen des HLA-Systems assoziiert. Da auch die IPP durch eine immunologische Fehlregulation bedingt sein könnte und ein Zusammenhang zu lokalisierten fibrotischen Veränderungen mit dem HLA-B27 Antigen möglich erscheint [147], wurde diese Hypothese in mehreren Arbeiten untersucht. Insgesamt zehn Studien versuchten bisher eine mögliche Assoziation der IPP mit Antigenen des HLA-Systems aufzuzeigen [11, 31, 74, 93, 99, 110, 113, 114, 146, 150].

HLA-Antigene der Klasse I wurden in allen Studien untersucht, wobei eine Assoziation zu den Antigenen der B7-kreuzreagierenden Gruppe in fünf Arbeiten postuliert wurde [11, 99, 110, 146, 150]. Es handelt sich bei den Antigenen der B7-kreuzreagierenden Gruppe um die Antigene B7, Bw22, B27 und Bw42. In einem standardisierten Test mit lymphozytentoxischem Gewebe kommt es unter diesen vier Antigenen zu einer Kreuzreaktion [128]. In einer anderen Studie wurde für das HLA-A1 Antigen, welches ebenfalls der Klasse I zugehört, eine Assoziation zur IPP beschrieben [114]. Vier Arbeitsgruppen untersuchten zusätzlich Antigene der Klasse

II des HLA-Systems [93, 110, 113, 114]. Assoziationen wurden für die Antigene HLA-DQw2, HLA-DR3 und HLA-DQ5 beschrieben [93, 113, 114].

2.3.4.2. Transforming Growth Factor-beta1 (TGF-beta1)

Die vielfältigen Auswirkungen von Transforming-Growth-Factor-beta (TGF-beta) auf entzündliche Gewebe, unterschiedlichste Zellen und Proteine, sowie die Tatsache, dass TGF-beta eine Rolle in der Ätiopathogenese von Lungen [7, 35, 69] - und Leberfibrose [5] spielt, forderte Untersuchungen über die Zusammenhänge von TGF-beta und der IPP. Dieses Zytokin scheint einen entscheidenden Einfluss auf die Ätiopathogenese der Induratio penis plastica zu nehmen.

Im Einzelnen besteht die Wirkung von TGF-beta in der Beeinflussung von Gewebereparatur durch chemotaktische Wirkung auf Monocyten, Anstoßung der Angiogenese sowie Produktionskontrolle von Zytokinen und anderen Entzündungsmediatoren [16]. TGF-beta1 stimuliert die Produktion von Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1). Die daraus resultierende lokale Akkumulation von Monozyten führt wiederum zu einer gesteigerten Freisetzung von TGF-beta1 [82]. Die MCP-1-Expression ist bei vielen fibrotischen Erkrankungen der Haut, Lunge, Leber und Niere erhöht [80].

Eine hohe Anzahl von Mastzellen konnten in der Tunica albuginea von IPP-Patienten beobachtet werden [77]. TGF-beta hat eine chemotaktische Wirkung auf Mastzellen. Diese sind auch an Prozessen der Gewebsheilung beteiligt. In einer Studie wurde das Vorkommen von Mastzellen in verschiedenen Bereichen von penilem Gewebe bei IPP-Patienten und einem Vergleichskollektiv quantitativ bestimmt [77]. Bei 23 IPP-Patienten konnte eine erhöhte Anzahl von Mastzellen/mm² in der Tunica albuginea und in dem dünnen Gewebe zwischen der Tunica und dem erektilen Gewebe gegenüber der Kontrollgruppe festgestellt werden [77].

Des Weiteren stimuliert TGF-beta die Synthese von extrazellulären Matrixkomponenten, wie Kollagen und Proteoglykanen, mit gleichzeitiger Blockierung der Matrixgeneration [117]. Zudem hat TGF-beta die Fähigkeit, seine eigene Produktion zu veranlassen und kann somit ausschlaggebend für die Entstehung einer chronischen Fibromatose sein [117]. In einer neueren Studie konnte die fibrotische Wirkung von TGF-beta1 auf die Tunica albuginea von Kaninchen gezeigt

werden [95]. In einem weiteren Tiermodell konnten, durch dosisabhängige Injektionen von Cytomodulin – ein Peptid mit TGF-beta-ähnlicher Aktivität - Veränderungen beobachtet werden, die dem histologischen Krankheitsbild der IPP ähnelten [37]. Die gleiche Arbeitsgruppe untersuchte daraufhin Tunica albuginea von 30 IPP Patienten auf Proteinexpression von TGF-beta1, TGF-beta2 und TGF-beta3 [38]. Eine Expression von TGF-beta1 konnte bei 26 Patienten (86%) festgestellt werden [38]. TGF-beta2 wurde bei 7 (23%) und TGF-beta3 bei 5 (17%) der Patienten exprimiert [38]. Da in der Kontrollgruppe dieser Studie nur jeweils eine Expression von TGF-beta1, 2 und 3 nachgewiesen werden konnte, wurde die TGF-beta1 Expression als mit der IPP signifikant assoziiert beschrieben [38].

Der Einfluss von TGF-beta1 auf die Entstehung von Fibrosierungen ist durch weitere Vorgänge charakterisiert. Zum einen wird die Produktion von Connective Tissue Growth Factor (CTGF) durch TGF-beta stimuliert und auf der anderen Seite die Bildung von dem antifibrotisch wirkenden Stickoxid (NO) durch die Supprimierung der induzierbaren Stickoxidsynthetase (iNOS) gehemmt [20, 82, 94]. Beides fördert die Fibrosierung im Gewebe. Zudem stimuliert TGF-beta auch die Produktion der reaktive Fibrose fördernde Sauerstoffspezies (ROS) [50, 104]. Eine Verschiebung des NO/ROS-Verhältnisses zugunsten von ROS führte im Tierversuch zu einer vermehrten Kollagenablagerung in Fibroblasten aus Ratten-Tunica [13, 14, 15]. Eine Übertragung dieses Phänomens auf die Pathogenese der IPP erscheint möglich.

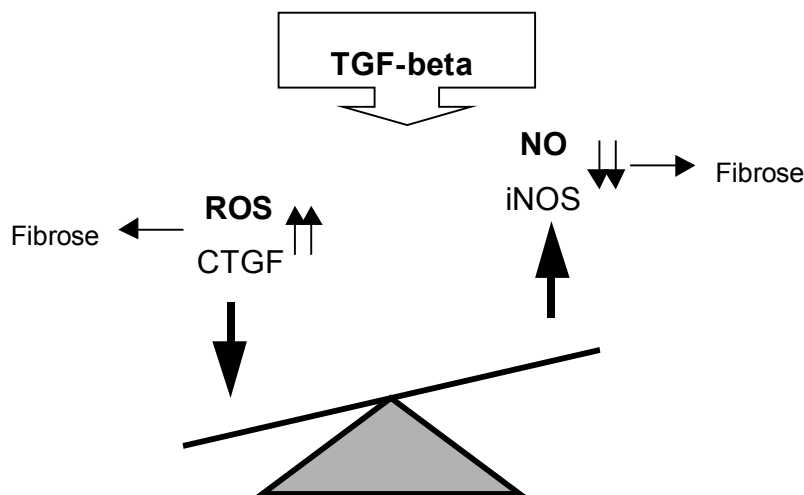


ABBILDUNG 2 ZEIGT DEN EINFLUSS DER MEDIATOREN NO, iNOS, ROS UND CTGF BEI DER ENTSTEHUNG EINER FIBROSE. EINE VERÄNDERUNG DER KOLLAGENSYNTHESE IN FIBROBLASTEN AUS RATTEN-TUNICA KONNTE IM TIERVERSUCH GEZEIGT WERDEN [13, 14, 15]. BESONDERE BEACHTUNG GILT DEM VERHÄLTNIS VON NO ZU ROS (MODIFIZIERT NACH GONZALEZ ET. AL. [50].)

Als Transmitter der Erektion könnte Stickoxid einen weiteren Einfluss auf das Krankheitsbild der IPP haben [20].

Die durch TGF-beta1 induzierte Kollagensynthese in den Fibroblasten kann durch Prostaglandin E1 unterdrückt werden [88]. Eine Untersuchung von Zellkulturen führte zu der Annahme, daß TGF-beta1 und Prostaglandin E1 eine entscheidende Rolle in der Modulation der Kollagensynthese in der Tunica albuginea und dem Corpus cavernosum spielen [88]. Durch weitere Vergleiche von Zellkulturen aus penilem Gewebe der IPP-Patienten und einem Normalkollektiv konnten erhebliche morphologische Differenzen zwischen den Geweben festgestellt werden [125]. Ein Ungleichgewicht in der Regulation der Synthese von extrazellulärer Matrix wurde postuliert [123]. Auch hier kann es sich um eine immunologische Fehlregulation handeln, die sich als gesteigerte, fibroproliferative Kapazität der Zellen auswirkt.

2.3.4.3. Alpha-1-Antitrypsin (AAT)

Alpha-1-Antitrypsin (AAT) ist ein Proteinaseinhibitor. Unterschiedliche Expression von Alpha-1-Antitrypsin wird mit verschiedenen Erkrankungen in Verbindung gebracht. Ein Mangel dieses Proteins ist mit dem Lungenemphysem bei Erwachsenen und Lebererkrankungen bei Kindern assoziiert [24, 40]. Eine mangelnde Aktivität ist mit verschiedenen elektrophoretisch differenzierbaren Varianten des Alpha-1-Antitrypsin assoziiert. Die häufigste ist die Z-Variante, die ca. 95% aller klinischen Alpha-1-Antitrypsin Mangelsyndrome bedingt [98].

Alpha-1-Antitrypsin ist ein Akute-Phase-Protein. Eine Zunahme des Alpha-1-Antitrypsin Serumspiegels wird bei entzündlichen Erkrankungen beobachtet [40]. Seine Funktion besteht hauptsächlich in der Aktivitätsverminderung von Proteasen. Es ist der wichtigste Proteinaseinhibitor von Serinproteasen im menschlichen Blutplasma. Syntheseorte sind neben den Hepatozyten die Alveolarmakrophagen und Blutmonozyten. Das Gen (PI), welches für AAT kodiert, ist auf dem langen Arm des Chromosom 14 lokalisiert und besteht aus sieben Exons und sechs Introns.

Der Einfluss von Alpha-1-Antitrypsin auf den Kollagenstoffwechsel und seine Funktion als Proteinaseinhibitor (ABBILDUNG 3) wurde in Bezug auf die Ätiologie der IPP in verschiedenen Studien untersucht [12, 42, 70, 72].

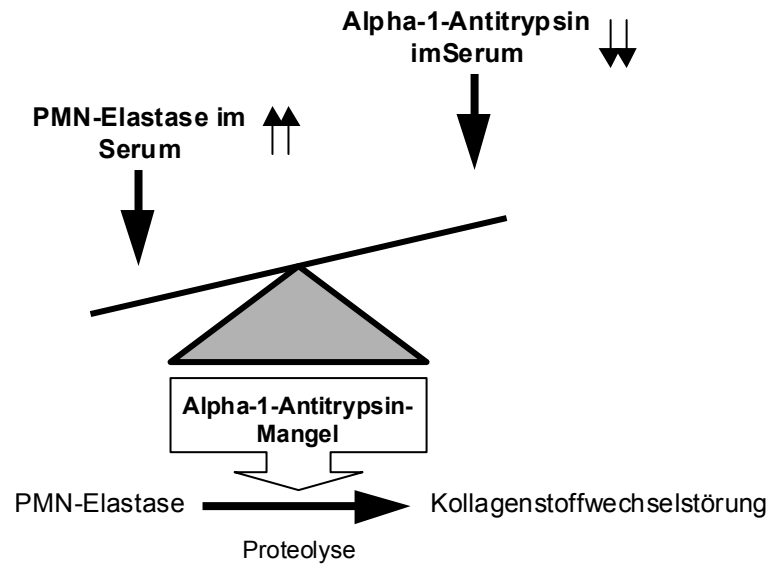


ABBILDUNG 3 STELLT DEN EINFLUSS DES ALPHA-1-ANTITRYPSIN AUF DIE KOLLAGENSYNTHESE UND DIE FUNKTION ALS PROTEINASEINHIBITOR DAR. EINE HEMMUNG DES ALPHA-1-PROTEINASEINHIBITORS WÜRD ZU EINER GESTEIGERTEN PROTEOLYSE FÜHREN. (MODIFIZIERT NACH BICHLER ET. AL. [12]).

Eine Arbeitsgruppe konnte an einem Kollektiv von IPP-Patienten einen erniedrigten Alpha-1-Antitrypsinspiegel im Serum im Gegensatz zu einem Kontrollkollektiv feststellen [72]. Ein Defizit von Alpha-1-Antitrypsin könnte über die allgemeine Steigerung von Proteasen und somit auch der PMN-Elastase (Polymorphkernige-neutrophile Granulozyten-Elastase) zu einer Änderung des Kollagenstoffwechsels führen [72]. Dies könnte zu einer vermehrten Produktion des Kollagen III führen, welches im Plaque von IPP-Patienten gehäuft gefunden wurde [70, 72].

2.3.4.4. Genexpression

Die Ergebnisse von Untersuchungen der Genexpression in Plauegewebe sind in TABELLE 1 zusammengefasst [50, 80, 83, 90, 92].

Vermehrte Expression	Verminderte Expression
Transforming Growth Factor-beta1	Ubiquitin
TGF-beta1	
Monocyte Chemotatic Protein 1 (MCP-1)	id-2
Early Growth Response Protein	Kollagenase IV
Elastase	TGF-beta1-Modulatoren
Alpha Smooth Muscle Actin (ASMA)	Connective Tissue Growth Factor (CTGF)
Gamma Smooth Muscle Actin (GSMA)	
Desmin	
Osteoblast Factor-1 (OSF-1)	
Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)	
Kollagen I und III	
Pleiotrophin	

DIE TABELLE 1 ZEIGT DIE ERGEBNISSE VON UNTERSUCHUNGEN DER GENEXPRESSION IN PLAUEGEWEBE [50, 80, 83, 90, 92]. DIE MCP-1- UND CTGF-EXPRESSION IST BEI VIELEN FIBROTISCHEN ERKRANKUNGEN DER HAUT, LUNGE, LEBER UND NIERE ERHÖHT [80]. DER ZUSAMMENHANG ZU TGF-BETA WURDE BEREITS ERLÄUTERT (KAPITEL 2.3.4.2.).

Bei vielen fibrotischen Erkrankungen parenchymatöser Organe und der Haut ist eine erhöhte MCP-1- und CTGF-Expression bekannt [80]. Die mögliche Induktion einer MCP-1-Sekretion und Stimulation von CTGF durch TGF-beta1 wurde bereits in Kapitel 2.3.4.2. erläutert. Auch der Basiswachstumsfaktor der Fibroblasten (bFGF), dessen Expression ebenfalls gesteigert in Zellkulturen aus Fibroblasten von IPP-Plaques gefunden wurde, soll an fibrotischen Prozessen und dem Remodelling des Gewebes beteiligt sein [90, 92]. Die Arbeitsgruppe um Mulhall beschrieb in diesem Zusammenhang auch die Morphologie von Fibroblastenkulturen aus Plauegewebe [3, 90]. Unter anderem wurden plumpe Zellkörper, ein Verlust der Kontaktinhibition und ein generell ungeordnetes Wachstumsmuster gegenüber den Kontrollen festgestellt [90]. In verkalkten Plaques wurde eine gesteigerte Expression von Osteoblast-Factor-1 (OSF-1) dokumentiert [50]. Im Rahmen einer Kalzifizierung des Plaques im Verlauf der Erkrankung an IPP könnte dieser Zusammenhang einen Einfluss haben [50].

Eine wichtige Steuerungsfunktion in der Ätiologie der IPP scheint auch dem Zellzyklusregulator und proapoptotischen Faktor Protein-p53 zuzukommen. Nach einer Bestrahlung von Fibroblastenzellkulturen aus Plaques war dieses Protein im Gegensatz zu Kulturen eines Kontrollkollektivs weiter aktiv [90, 91].

2.3.4.5. Chromosomale Veränderungen

Schon in älteren Studien wurden Zellkulturen untersucht und in Plauegewebe von IPP-Patienten chromosomale Abnormalitäten festgestellt [51, 124]. Eine daraus resultierende pathologische lokalisierte Fibrosierung wurde postuliert [124]. In neueren genotypischen Analysen konnte eine Aneusomie für die Chromosomen 7, 8, 17, und 18 aufgezeigt werden [90]. Diese Ergebnisse wurden durch Fibroblastenkulturen aus Plauegewebe gewonnen [90]. Zytogenetische Instabilität in Form von Mikrosatellitenalterationen und ein Verlust der Heterozygotie konnten von einer anderen Autorengruppe beobachtet werden [102].

2.3.5. Serummarker

Eine grundsätzliche Involvierung des Immunsystems bei der Pathogenese der IPP zeigte eine italienische Arbeitsgruppe anhand von Serummarkern wie z.B. CRP, Komplement C3 und Komplement C4 [116]. 50 von 66 (75%) der untersuchten Patienten zeigten pathologische Veränderungen in mindestens einem der durchgeführten Tests. In einer Vergleichsgruppe konnten nur 10% der Fälle als pathologisch eingeordnet werden. IPP Patienten wiesen Veränderungen in folgenden immunpathologischen Serummarkern auf: LTT (Lymphozyten Transformations Test) (48%), Immunglobuline (31,8%), Autoimmunantikörper und Komplementaktivatoren (37,9%), antinukleärer Antikörper (25,8%) sowie CRP in (19,7%) [116]. Ferner wurde gezeigt, dass bei Patienten mit IPP höhere Antikörpertiter gegen Tropoelastin und α -Elastin als im Kontrollkollektiv auftreten [127]. Elastin ist ein Strukturprotein der extrazellulären Matrix und kommt in dehnbaren Organen wie z.B. Haut, Blutgefäßen und Lungen vor. Es ist ein Hauptprotein der elastischen Fasern, Sehnen, Bändern, Bronchien und Arterienwände. Diese Studie zeigte eine erhöhte Umsatzrate von

Elastin bei Patienten mit IPP [127]. Außerdem wurde bei einem Kollektiv von 100 IPP-Patienten in 24 Fällen über ein vermehrtes Vorkommen von antinukleären Antikörpern, Hypergammaglobulinämien (13%) und über eine erhöhte Konzentration von Rheumafaktoren (11%) berichtet [109]. Subtunikal wurde eine gesteigerte T-Lymphozyten- und Makrophageninfiltration, sowie vermehrte IgM-Ablagerungen festgestellt [109]. Diese Ergebnisse stehen im Zeichen einer insgesamt gesteigerten Immunantwort [109]. In einer neueren Untersuchung konnten keine signifikanten Unterschiede von den im Serum gemessenen Markern CRP, Antinukleären Antikörpern, Serum- und Mukoproteinen, sowie Rheumafaktoren und LE-Zellen im Vergleich von IPP-Patienten mit Kontrollen festgestellt werden [112]. Ein statistisch signifikant erhöhtes Ergebnis beim Waaler-Rose Test (Hämagglutinationshemmtest) wurde dokumentiert [112]. Über die Studie, die erniedrigte Alpha-1-Antitrypsinspiegel im Serum von IPP-Patienten im Gegensatz zu einem Kontrollkollektiv festgestellt hat [72], wurde bereits berichtet (Kapitel 2.3.4.3.).

2.3.6. Medikamente und nutritive Ursachen

In Betracht gezogen wurden auch mögliche Assoziationen der Ätiopathogenese der IPP mit verschiedenen Medikamenten. Untersucht wurden β -Blocker [132, 138, 148] und Methotrexat [103]. Eine endgültige Klärung der Ätiologie konnte durch diese Studien nicht aufgezeigt werden. Diese Tatsache trifft auch auf Untersuchungen über nutritive Ursachen [54, 76] (Alkoholabusus, Vitaminmangel), sowie auf Studien, die eine vermehrte Inzidenz der IPP bei Rauchern [71] beschrieben, zu [25, 71]. Der Einfluss verschiedener Substanzen auf das Wachstum von Fibroblasten wurde in Zellkulturen untersucht [3, 90]. Dokumentiert wurde dabei ein hemmender Effekt von Colchizin, Prostaglandin E1, Verapamil und Interferon [3, 90].

2.4. Diagnostik

Die Anamnese des Patienten stellt den Grundpfeiler des diagnostischen Vorgehens dar. Man erhält Informationen über den vom Patienten selbst erkannten Plaque, über eine mögliche Deviation, über Schmerzen bei der Erektion oder eine schon bestehende erektile Dysfunktion [54, 58, 62, 120]. Aufgrund der bekannten Koinzidenzen wird auf das Vorhandensein einer Dupuytrenschen Kontraktur, einer Plantarfibrose (M. Ledderhose) und Fingerknöchelpolster besonders geachtet [49, 54, 61].

Bestätigt sich eine positive Plaqueanamnese beim körperlichen Untersuchungsbefund, ist differentialdiagnostisch an eine Schwellkörperfibrose z.B. nach Schwellkörperautoinjektion oder an Schwellkörper Tumoren wie Sarkome oder Metastasen zu denken [56, 129]. Bei der Untersuchung empfiehlt es sich, eine sorgfältige Palpation bei leicht gestrecktem Glied durchzuführen. Hierbei ist die Anzahl der Plaques, deren genaue Lage und ihre Ausdehnung zu eruieren [54]. Eine weitere Methode zum Nachweis eines Plaques ist die Sonographie in zwei Ebenen mit einer 7,5-10-MHz-Sonde und Wasservorlaufstrecke [54]. Die Nachweisraten von Plaques mittels Sonographie schwanken deutlich, jedoch sind Kalzifizierungen zu 100% darstellbar [4, 10, 136]. Zur Verifizierung einer Deviation sollten Photographien des erigierten Penis in drei Ebenen (von oben, vorne und seitlich) nach Kelâmi angefertigt werden [68]. Dies kann als Autophotographie oder mit Hilfe eines Schwellkörperautoinjektionstests (SKAT-Test) mit z.B. 10 µg Prostaglandin E₁ durchgeführt werden [54]. Eine unzureichende Erektion im SKAT-Test ist gleichzeitig ein Zeichen einer bestehenden venookklusiven Dysfunktion [54]. 68% - 84% der untersuchten IPP-Patienten hatten eine solche venookklusive Dysfunktion, die von verschiedenen Arbeitsgruppen mittels einer dynamischen Infusionskavernometrie und -graphie (DICC) dargestellt wurde [66, 143]. Die DICC findet auch vor aufwändigen Korrekturoperationen zur Abschätzung der Schwellkörperinfiltration des Plaques Verwendung [66]. Durch Kombination eines SKAT-Tests mit einer farbkodierten Duplexsonographie läßt sich auch der arterielle Gefäßstatus evaluieren [58, 86]. Untersuchungen mit Computertomographie und Kernspintomographie haben im Vergleich zu dem hohen Kostenaufwand nur einen geringen Informationszugewinn [52, 54]. Ihr Einsatz hatte daher bislang nur wissenschaftlichen Charakter [4, 62, 120, 136]. In einer neueren Studie wird jedoch die hohe Sensitivität

bei Diagnostik von Plauegewebe bei IPP-Patienten mittels MRT im Gegensatz zur Sonographie hervorgehoben [73]

2.5. Therapie

Da die Ätiopathogenese der IPP bislang nicht gekärt werden konnte, gibt es bislang keinen kausalen Therapieansatz [48, 54, 61]. Wegen des häufig fehlenden Effektivitätsnachweises existiert zudem kein einheitliches Therapieschema. Die orale Applikation verschiedener Substanzen steht als nicht-invasives Verfahren am Beginn des therapeutischen Spektrums [54]. Das am häufigsten eingesetzte Präparat ist das Kalium-Paraaminobenzoat (Potaba®) in einer Dosierung von 4x3 g/Tag [54]. In Fibroblastenkulturen konnte mit dieser Substanz die Bildung von Kollagen reduziert werden [149]. Bei einem Teil der Patienten vermindert Kalium-Paraaminobenzoat die Progression der Erkrankung, reduziert die Plauegröße und sollte in der akuten, schmerzhaften Phase der Erkrankung über einen Zeitraum von mindesten sechs Monaten eingenommen werden [140, 141]. Des Weiteren wird die Gabe des antiinflammatorisch wirkenden Vitamin E durchgeführt [115]. Studien über Therapieerfolge zeigten bisher jedoch unterschiedliche Ergebnisse [32, 46, 106, 119]. Gute Therapieeffekte bezüglich Plaue Rückbildung, Schmerzen und Deviation wurden auch über Colchicin berichtet [2]. In einem Tierversuch wurde eine mögliche Suppression IPP-ähnlicher Veränderungen unter einer frühen Colchizinthherapie postuliert [36]. In verschiedenen Studien über die Wirkung weiterer Medikamente wie u.a. Tamoxifen konnte bisher kein eindeutiger Behandlungserfolg nachgewiesen werden [108, 131].

Die intraläsionale Injektionstherapie mit Substanzen wie Verapamil, Interferon-alpha-2b und Cortison erwies sich für die Therapie der IPP in unterschiedlichen Studien bisher nicht als sicher wirksam [54, 57].

Sollte der Plaue eines IPP-Patienten verkalkte Anteile aufweisen oder vollständig verkalkt sein, scheint eine medikamentöse Therapie nicht sinnvoll [54, 57]. Bei diesem Patientengut kann die extrakorporale Stoßwellentherapie (ESWT) angewendet werden. Die ESWT befindet sich in einem experimentellen Stadium [142]. Angenommen wird, dass durch die ESWT eine verbesserte Vaskularisation des Gewebes mit Auflockerung der Kollagenstruktur erreicht werden kann [60, 84,

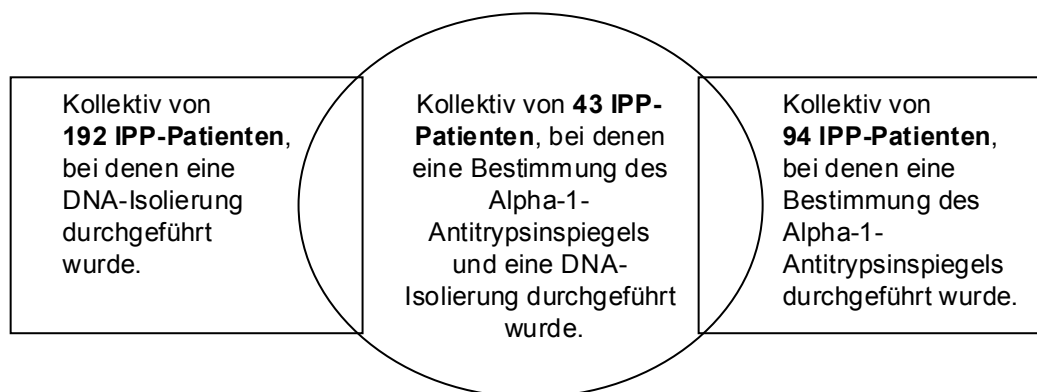
145]. Eine Auflösung von Kalkstrukturen erscheint möglich, der genaue Wirkmechanismus ist jedoch unbekannt. Da bei dieser Therapieform eine kontrollierte, einfach-blinde Multizenterstudie noch nicht durchgeführt wurde, konnte auch in neueren Untersuchungen eine sichere Wirksamkeit für die Gesamtheit der Patienten nicht aufgezeigt werden [54].

In der Behandlung der IPP haben auch operative Verfahren einen bedeutenden Stellenwert. Wichtig ist die sorgfältige Indikationsstellung. Nur in der stabilen, progressionsfreien Phase der Erkrankung, wenn also die Erkrankung zum Zeitpunkt der Operation mindestens seit einem Jahr besteht und der Patient mindestens über einen Zeitraum von sechs Monaten schmerz- und progressionsfrei ist, sollte ein operatives Therapieverfahren in Betracht gezogen werden [79, 144]. Das jeweilige Operationsverfahren richtet sich nach dem Ausmaß der Deviation und einer eventuell bestehenden erektilen Dysfunktion [78, 79]. Zur Verfügung stehen Verfahren nach Essed-Schroeder, Nesbit, plaquechirurgische Verfahren (Inzision, Exzision mit Deckung), sowie die Implantation einer hydraulischen Penisprothese mit Begradigung der Deviation [41, 78, 79, 96].

3. Material und Methoden

3.1. Patienten

In die Studie wurden IPP-Patienten eingeschlossen, die sich in der andrologischen Sprechstunde der Klinik für Urologie und Kinderurologie der Justus-Liebig-Universität Gießen vorstellten. Einschlusskriterium war die Diagnose Induratio penis plastica im Alter über 18 Jahren. Auf die häufigen Symptome Plaque, Deviation, Erektionsschmerz sowie auf eine begleitende erektile Dysfunktion wurde ein besonderes Augenmerk gelegt. Anamnese, die körperliche Untersuchung, sowie die Plaquesonographie und der Schwellkörperautoinjektionstest (SKAT-Test) bestätigten die Diagnose. Ein Auswertungsbogen zur Befunderhebung ist im Anhang beigefügt (S. 102). Im Verlauf der durchgeführten Studien wurden 192 Patienten mit Induratio penis plastica eingeschlossen. Von diesen Patienten wurden die Basisdaten Alter, Krankheitsdauer, Anzahl der Plaques, Kalzifikationen, Ausmaß der Deviation sowie das Vorliegen eines M. Dupuytren erfasst. Zudem erfolgten Blutentnahmen zur Bestimmung der HLA-Antigene der Klasse I und zur DNA-Isolierung für alle genetischen Untersuchungen. Da die drei Studien zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt wurden, variiert die jeweilige Größe des Patientenkollektivs der TGF-beta1-, der HLA- und der Alpha-1-Antitrypsinstudie.



DIE ABBILDUNG 4 ZEIGT DIE ZUSAMMENSETZUNG DER PATIENTENKOLLEKTIVE DER ALPHA-1-ANTITRYPSINSTUDIE. DIE BESTIMMUNG DES SERUMSPIEGELS ERFOLGTE BEI 94 IPP-PATIENTEN. ZUR GENOTYPISIERUNG VON ALPHA-1-ANTITRYPYSIN STAND ISOLIERTE DNA EINES KOLLEKTIVS VON 192 IPP-PATIENTEN ZUR VERFÜGUNG. EINE GLEICHZEITIGE UNTERSUCHUNG DES ALPHA-1-ANTITRYPSIN SERUMSPIEGELS UND EINE DNA-ISOLIERUNG ZUR GENOTYPISIERUNG KONNTE BEI 43 PATIENTEN DURCHGEFÜHRT WERDEN.

Im Verlauf der Studien zu TGF-beta1 und den HLA-Antigenen wurde eine gesonderte Blutentnahme zur Bestimmung des Alpha-1-Antitrypsin-Serumspiegels begonnen. Eine Ermittlung des Serumspiegels konnte bei 94 Patienten durchgeführt werden. Zur Genotypisierung des Alpha-1-Antitrypsin stand isolierte DNA eines größeren Kollektivs von IPP-Patienten zur Verfügung. Alle drei Studien wurden mit Einverständnis der Ethikkommission durchgeführt (Ethikvotum Nr. 16/99 und 12/03).

3.2. Kontrollgruppe

Das Kontrollkollektiv der HLA-Studie bestand aus einem Pool von 2450 (n_1) gesunden Knochenmarkspendern des Instituts für Immunologie und Transfusionsmedizin der Justus-Liebig-Universität. Bei allen Personen der Kontrollgruppe n_1 wurden die Antigene der Klasse I des HLA-Systems typisiert, bei 316 Knochenmarkspendern aus dieser Gruppe ebenso die Antigene der Klasse II. Zusätzlich dienten publizierte Daten [89] eines Kollektivs von 14835 (n_2) gesunden Knochenmarkspendern als Kontrollwerte. Alle Personen der Gruppe n_2 wurden bezüglich der HLA-Antigene Klasse I und II untersucht.

Bei zusätzlich 100 gesunden Knochenmarkspendern erfolgte eine Blutentnahme zur DNA-Isolierung. Eine Genotypisierung des TGF-beta1 und des Alpha-1-Antitrypsin konnte mit diesem Kollektiv durchgeführt werden. Für die Alpha-1-Antitrypsin-Studie wurden 100 gesunde Knochenmarkspender ausgewählt und alle vier SNPs typisiert. Für die selten vorkommenden Mutationen S und Z des Alpha-1-Antitrypsin Gens wurden zum Vergleich der Typisierungsergebnisse der Patienten Daten aus der Literatur verwendet [30].

Zum Vergleich der Alpha-1-Antitrypsin Serumspiegel wurden 134 männliche Blutspender ausgewählt und es wurde ebenfalls eine Blutentnahme durchgeführt. Auswahlkriterien waren das Geschlecht (männlich) und das Alter (>50 Jahre). Bei der Bestimmung der HLA-Antigene und bei der TGF-beta1-Genotypisierung wurden männliche und weibliche Probanden eingeschlossen. Populationsgenetische Erkenntnisse der HLA-Moleküle ermöglichen diese Konstellation der Kontrollgruppe [139].

3.3. Geräte und Kleinmaterial

3.3.1. Geräte

Elektrophoresekammer:	Keutz, Reiskirchen	
Feinwaage:	Mettler AE100, Giessen	
Magnetrührer	Ikamag RET, Janke & Kunkel, Staufen	
Pipette 0,5 - 10 μ l:	Eppendorf, Hamburg	
Pipette 10 - 100 μ l:	Eppendorf, Hamburg	
Pipette 100 – 1000 μ l:	Eppendorf, Hamburg	
Pipetus:	Hirschmann [®] EM Techcolor, Eberstadt	
Sequenziergerät:	ABI-PRISM [™] 310 Genetic Analyser, Perkin Elmer Cetus, Norwalk, USA	
Sofortbildkamera:	IBI, New Haven, Connecticut, USA	
Spannungsquelle:	PHERO-Stab 500, Biotec Fisher, Nidderau	
Thermocycler:	Gene [®] Amp PCR System 2400, Perkin Elmer Cetus, Norwalk, USA	
Thermocycler:	Gene [®] Amp PCR System 9600, Perkin Elmer Cetus, Norwalk, USA	
TRIO-Thermoblock:	Biometra, Göttingen	
Vakuumpumpe:	VacuGene Pump, Pharmacia LKB Biotechnology, USA	
Vakuummotordrehmaschine:	Keutz, Reiskirchen	
Vortex:	Heidolph REAX 2000, Deutschland	
Zentrifugen:	1. Biofuge 22R 2. Biofuge A 3. Biofuge 13	Heraeus, Hanau Heraeus, Hanau Heraeus, Hanau

3.3.2. Kleinmaterial

Blue-cap-Tubes 15 ml und 50 ml:	Becton Dickinson Labware Europe, Meylan Cedex, Frankreich
Butterfly [®] -21 Kanüle:	Venissystem [™] , Abott Ireland, Sligo, Rep. of Irland
EDTA- Monovetten:	Sarstedt, Nümbrecht
Einfrierampullen 1,8 ml:	Fa. Nunc Intermed, Dänemark
Einmalpipetten:	Becton Dickinson, USA
Elektrophoresegelkämme:	Kreutz, Reiskirchen
Genetic Analyser Sample Tubes 0,5 ml	ABI PRISM, Genetic Analyser, Perkin Elmer, Langen
Glaswaren:	Braun, Melsungen
PCR-Tubes:	Strip-ease-8, 0,2 ml, Robbins Scientific Corporation, Sunnyvale, USA
Pipettenspitzen:	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen:	Filtertips 10 μ l / 100 μ l / 1000 μ l, ART Molecular Bio-Products Inc. San Diego, USA
Polaroidfilm:	Typ 667, Hertfordshire, England
Serumröhrchen:	Greiner, Frickenhausen
Skalpelle:	steril, pfm, Köln

3.3.3. Reagenzien

10 x PCR Puffer:	Perkin Elmer Cetus, Norwalk, USA
100 bp Ladder:	New England BioLabs Inc., Frankfurt
ABI Prism® BigDye™ Terminator Cycle Reaction Kit	PE Biosystems, Langen
Agarose NA:	Amersham Pharmacia Biotech AB Uppsala, Schweden
Ampli Taq Gold:	Perkin Elmer Cetus, Norwalk, USA
Aqua ad iniectabilia:	Braun, Melsungen
Bromphenolblau:	Sigma, Deisenhofen
Desoxynukleotide (dNTPs):	Ultrapure dNTP Set, Pharmacia Biotech, NJ, USA
Ethanol:	Riedel-de Haen AG, Seelze
Ethidiumbromid:	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraacetat (EDTA):	Merck, Darmstadt
Isopropanol:	Merck, Darmstadt
Natrium-Acetat ph 4,6:	Merck, Darmstadt
Puregene® DNA Isolation Kit:	Puregene®, genra Systems, Minneapolis, USA
Sequencing Ready Reaction Kit:	PE Biosystems, Langen
QIAquick® Spinn Handbook for QIAquick Gelextraction Kit:	Quiagen, Hilden
SeaKem Agarose:	Seakem®GTG® Agarose, BMA, Rocklad, ME, USA
TRIS-(hydroxymethyl)-aminomethan:	Roth, Karlsruhe
Kit zur DNA-Isolierung:	Genomic DNA Isolation Kit, Puregene™, Genra Systems, Minneapolis, USA
Kits zur HLA-Typisierung:	1. Inno-Train, HLA Ready Plate ABC 120/1 Kit (Inno Train Diagnostik GmbH, Kronberg 2. Biotest Lymphotype HLA-ABC 144/1 Italia Kit, Biotest AG, Dreieich 3. PCR-SSP, OLERUP-SSP™, GenoVision, Wien, Österreich

Kit zur TGF-beta1-Typisierung : Cytokine Genotyping Tray, One Lambda, Inc., Canoga Park, CA, USA

Oligonukleotidprimer (Kapitel 3.3.4.) MWG-Biotech AG, Ebersberg

3.3.4. Oligonukleotide

M2

Polymorphismus ARG101His on M3 im AAT-Gen Exon 2, Pos. 7689 in Acession gi:177830

Primer AAT-M2 com:

5'-GTC CAA CAG CAC CAA TAT CT-3'

Primer AAT-M2 Hist do:

5'-TCT GGC TGG TTT AGG GTA T-3'

Primer AAT-M2 Hist do:

5'-TCT GGC TGG TTT AGG GTA C-3'

M3

Polymorphismus Glu376Asp on M1V im AAT-Gen Exon 5, Pos. 12044 in Acession gi:177830

Primer AAT-M3 com:

5'-CAT AAG GCT GTG CTG ACC AT-3'

Primer AAT-M3 Asp do:

5'-GGG GAG ACT TGG TAT TTT GG-3'

Primer AAT-M3 Glu do:

5'-GGG GAG ACT TGG TAT TTT GT-3'

S

Polymorphismus Glu264Val on M1V im AAT-Gen Exon 3, Pos. 9667 in Acession gi:177830

Primer AAT-S com:

5'-GTG AAG GTC CCT ATG ATG AAG-3'

Primer AAT-S Val up:

5'-TAT CGT GGG TGA GGT CAT TTA-3'

Primer AAT-S Glu up:

5'-TAT CGT GGG TGA GGT CAT TTT-3'

Z

Polymorphismus Glu342Lys on M1A im AAT-Gen Exon 5, Pos. 11940 in Acession gi:177830

Primer AAT-Z com:

5'-ATG ATC TGA AGA GCG TCC TG-3'

Primer AAT-Z Lys do:

5'-CAG CTT CAG TCC CCT TCT C-3'

Primer AAT-Z Glu do:

5'-CAG CTT CAG TCC CCT TCT T-3'

AAT 3'-SEQUENZIERUNG

Primer AAT-3' up:

5'-CTA CCA GGA ATG GCC TTG T-3'

Primer AAT-3' do:

5'-GAA ACA GTC GGT ATC CAT TGA-3'

A-396T

Polymorphismus A-396T im AAT-Gen 5'-Region, Pos. 6921 in Acession gi:177830

Primer A-396T com:

5'-GCAGTT TCC CTG GCC ACT AA-3'

Primer A-396T-A do:

5'-AGG CTC TGG ACA GCA ACA CTT T-3'

Primer A-396T-T do:

5'-AGG CTC TGG ACA GCA ACA CTT A-3'

G6118A

Polymorphismus G6118 im AAT-Gen 3'-Region, Pos. 13434 in Acession gi:177830

Primer G6118A com:

5'-GTA TTT GTG GAG AGT GAA AGG-3'

Primer G6118A-A up:

5'-GTA ATA CCA AAT AGT GAT TTC A-3'

Primer G6118A-G up:

5'-GTA ATA CCA AAT AGT GAT TTC G-3'

3.4. Untersuchungen zur genetischen Disposition

3.4.1. Koinzidenz mit M. Dupuytren

In der andrologischen Sprechstunde der Klinik für Urologie und Kinderurologie der Universität Gießen wurde eine ausführliche Anamnese mit den an Induratio penis plastica erkrankten Patienten durchgeführt.

Ein besonderer Schwerpunkt der Befragung lag in der Erkennung von anderen Erkrankungen aus dem Formenkreis der Fibromatosen, da schon in verschiedenen Studien eine Koinzidenz zwischen M. Dupuytren und der IPP beschrieben wurde [49, 54, 61]. Eine gezielte Anamnese und eine körperliche Untersuchung in Hinblick auf diese Fragestellung wurde durchgeführt. Eine Evaluierung der Koinzidenz beider Erkrankungen wurde somit bei dem gesamten Kollektiv von Patienten durchgeführt.

3.4.2. DNA-Isolierung

Bei dem Prinzip der DNA-Isolierung handelt es sich um eine Ansatzmethode der Firma Gentra Systems (Genomic DNA Isolation Kit, Puregene®). Die folgenden Arbeitsschritte wurden gemäß den Herstellerangaben durchgeführt

Für die DNA-Isolierung wurden Zellen aus venösem, peripheren EDTA-Blut verwendet. Der durch Zentrifugieren gewonnene Buffy coat (Leukozyten) wurde für die weitere DNA-Isolierung verwendet, da es sich bei den Leukozyten um kernhaltige und daher auch DNA-reiche Zellen handelt.

3.4.3. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) dient der selektiven Vervielfältigung von DNA-Sequenzen. Diese in mehreren Zyklen ablaufende Technik ermöglicht es, eine gewünschte Zielsequenz aus dem ausgesuchten Gen in großer Anzahl zu amplifizieren. Voraussetzung für die Durchführung ist die Kenntnis über die Basenabfolge vor und hinter der Region, die vervielfältigt werden soll. An diesen bekannten Stellen einer DNA-Sequenz setzen Oligonukleotide an und hybridisieren

mit dem DNA-Molekül. Diese Oligonukleotide dienen als Primer für die DNA Synthesereaktion und können von einer Polymerase verlängert werden. Für den vollständigen PCR-Reaktionsansatz benötigt man zusätzlich zu den synthetisch hergestellten Oligonukleotidprimern (Vorwärts- und Rückwärtsprimer) und der thermostabilen DNA-Polymerase noch die Desoxyribonukleosidtriphosphate dATP, dGTP, dCTP und dTTP. Die Buchstaben A und G stehen für die beiden Purinbasen Adenin und Guanin, C und T stehen für die Pyrimidinbasen Cytosin und Thymin.

Ein kompletter Zyklus einer PCR gliedert sich grundsätzlich in die drei Abschnitte Denaturierung, "Annealing" und "Extension":

a) Denaturierung

Der Reaktionsablauf beginnt mit der Denaturierung, bei dem sich der DNA-Doppelstrang in zwei einzelne auf trennt. Dies erreicht man durch Erhitzen des Reaktionsansatzes auf 95°C.

b) "Annealing"

Die entstandene Matrize ermöglicht es, den Primer zu binden. Diesen Vorgang nennt man Annealing. Bei diesem Schritt kann eine grundsätzlich richtige Temperatur nicht angegeben werden, da sich die idealen Reaktionstemperaturen der verschiedenen Primer erheblich unterscheiden. Diese Temperaturdifferenzen kommen durch die unterschiedliche Länge der Primer zustande, wobei die Anzahl der Basen der verwendeten Oligonukleotide von 19 bis 22 variierte. Ein weiterer Faktor, der die Reaktionstemperatur beeinflusst, ist der Anteil der Basen Guanin und Cytosin. Der Grund dafür ist die Ausbildung von drei Wasserstoffbrücken zwischen diesen jeweils komplementären Basen bei der Anordnung zu einem Doppelstrang. Ein hoher Gehalt an Guanin und Cytosin hat eine hohe Reaktionstemperatur zur Folge. Um die Bindung der Primer an einen nicht gewünschten DNA-Abschnitt (unspezifischen DNA-Abschnitt) zu verhindern, kann es notwendig sein, die Annealingtemperatur zu erhöhen.

c) "Extension"

Der von den Primern gesetzte Startpunkt wird nun durch das hitzestabile Enzym Taq-DNA-Polymerase in Anwesenheit von Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs, N steht für eine der vier Basen) zur Bildung neuer DNA-Stränge verwendet. Diese

Primerverlängerung erfolgt mit den jeweils komplementären Primern bei einem Temperaturoptimum von 72°C. Dieser Extensionsschritt vollzieht sich mit einer Geschwindigkeit von ca. 75 Nukleotiden pro Sekunde in 5' nach 3'-Richtung. Da alle DNA-Moleküle am Ende dieser drei Schritte wieder als Doppelstrang vorliegen, beginnt ein neuer Zyklus wieder mit dem Aufschmelzen der DNA durch Erhitzen. Bei jedem nachfolgenden Schritt dienen die schon synthetisierten DNA-Stränge als Matrize, und so erhält man eine exponentielle Vervielfältigung der Zielsequenz. Diese Zyklen werden in der Regel 20-40 mal wiederholt. Die DNA ist nach 25-30 Zyklen schon millionenfach vermehrt. Bei jedem weiteren Zyklus verringert sich die Effektivität der Reaktion. In unseren Versuchen wurden verschiedene Techniken der Polymerase Kettenreaktion verwendet, die im Folgenden aufgeführt werden.

3.4.4. Sequenzspezifische PCR (SSP-PCR)

Die SSP-PCR wurde verwendet, um Single Nukleotide Polymorphisms (SNPs) in Genen zu identifizieren, welche bei der Pathogenese der IPP eine entscheidende Rolle spielen könnten.

Bei dieser PCR-Technik wird dieselbe DNA in zwei getrennten Reaktionen amplifiziert. In jeweils einem Ansatz wird ein Primer verwendet, der für eines von zwei möglichen Allelen spezifisch ist. Anwendung findet diese Methode bei der Analysierung von bekannten Polymorphismen. Die Spezifität der Primer für ein Allel beruht auf dem Nukleotid am 3'-Ende des Primers. Der Primer kann nur dann binden und eine Extension ermöglichen, wenn das 3'-Ende komplementär zur DNA-Sequenz ist. Das heißt, dass der Primer für die Normalform (homozygoter Wildtyp) nur binden kann, wenn diese Form im Genom vorliegt. Dies gilt ebenso für die mutierte Region. Bei Heterozygotie des untersuchten Alleles können beide Primer binden, da das eine Allele sowohl als Wildtyp als auch in mutierter Form vorliegt. Eine Region von ca. 200-230 Basenpaaren kann amplifiziert werden. Sie wird von einem Up- und einem Down-Primer eingegrenzt. Man erhält somit ein ausreichend langes, amplifiziertes DNA-Teilstück, welches gut mittels Agarose-Gelelektrophorese auswertbar ist. Eine ergänzende PCR-Reaktion wurde mit einem Paar interner Kontrollprimer bei jedem Versuchsansatz mitgeführt. Diese Kontrolle dient zur Vermeidung von falschnegativen Resultaten und amplifiziert eine andere Region des

Genoms. In unserem Fall wurden u.a. die Regionen des C-Reaktiven Proteins (CRP) und die des humanen Beta-Globulins verwendet. Zusätzlich wurden Proben mit einer bekannten Test-positiven und Test-negativen DNA mitgeführt. Eine Probe mit Wasser anstelle von DNA wurde als dritte Kontrolle des jeweiligen PCR-Ansatzes verwendet. Alle vier Proben wurden bei jedem durchgeführten PCR-Ansatz mitgeführt und bei der Auswertung der Ergebnisse berücksichtigt.

Die verwendete Taq-Polymerase darf auch nicht die Fähigkeit besitzen, falsch eingefügte Nukleotide wieder auszuschneiden. Dies kommt in der Natur vor und steigert die Kopiergenauigkeit der Polymerase. Die fehlende 3' → 5' - Proofreading-Aktivität der Taq-DNA-Polymerase ist Voraussetzung für die Spezifität der Primer. Die SSP-PCR wird in **ABBILDUNG 5** erläutert.

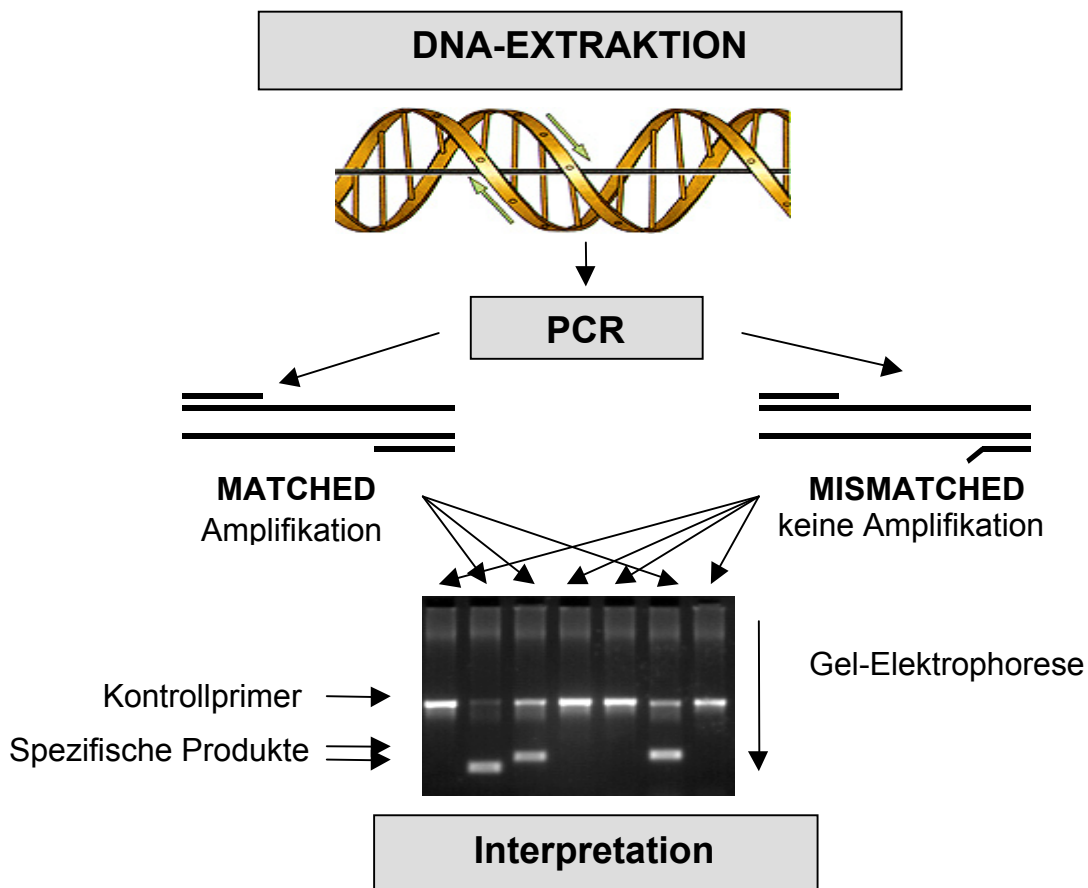


ABBILDUNG 5 ZEIGT DAS PRINZIP DER SSP-PCR-METHODE: HABEN DIE SPEZIFISCHEN PRIMER DIE GLEICHE SEQUENZ WIE DIE ZU UNTERSUCHENDE DNA, ERFOLGT EINE AMPLIFIKATION, DIE IN DER GELELEKTROPHORESE ALS SPEZIFISCHES PRODUKT DARGESTELLT WERDEN KANN.

3.4.4.1. HLA-Genotypisierung

Die Untersuchungen des HLA-Systems lassen sich in serologische und molekulargenetische Analysen unterteilen.

a) Serologische Typisierung

Wie schon beschrieben gliedert sich das HLA-System in zwei Klassen. Die Klasse I mit den Loci A, B und C wurden mit der serologischen Methode bestimmt. Die Typisierung der Klasse II Antigene wurde molekulargenetisch mit der PCR-Methode durchgeführt. Die serologische Bestimmung der C-Antigene aus der HLA Klasse I war aus technischen Gründen nicht immer möglich. Aus diesem Grund wurde bei 12 Patienten eine zusätzliche Auswertung des C-Antigens mit der PCR-Genotypisierungstechnik vorgenommen. Bei der Auswertung wurden beide Gruppen nicht unterschieden.

Die serologische Charakterisierung erfolgte mit dem Lymphozytentoxizitätstest. Dieser Test beruht auf der Lyse von separierten Lymphozyten nach Inkubation mit Antikörpern in Gegenwart von Komplement. Die Reaktion findet statt, falls die im Serum vorhandenen Antikörper entsprechende HLA-Antigene auf den Zelloberflächen der Lymphozyten vorfinden. In diesem Fall ist eine korrespondierende Spezifität zu den verschiedenen HLA-Merkmalen vorhanden. Die lytischen Produkte der Komplementkaskade bewirken eine Destruktion der Zellmembranen der Lymphozyten. Dem osmotischen Druck folgend kommt es zu einem starken Wassereinstrom in die Zelle und damit zu ihrer Zerstörung. Diese Lyse kann abschließend mit einem Farbstoff sichtbar gemacht werden. Für die Typisierung der HLA Klasse I sind T-Lymphozyten von Bedeutung. Eine Bestimmung der Klasse II-Antigene sollte mit B-Lymphozyten durchgeführt werden, da ruhende T-Lymphozyten HLA Klasse II-Moleküle nicht oder nur in geringem Ausmaß exprimieren. Die Trennung von T- und B-Lymphozyten erfolgt nach Kopplung mit monoklonalen Antikörpern an immunomagnetischen Kügelchen (Beads). Die separierten Lymphozyten werden mit den Beads in den Test eingebracht.

b) Typisierung mittels PCR

Die Bestimmung der Klasse II-Antigene erfolgte nur mit Hilfe der SSP-PCR-Methode, da diese Technik eine hohe Sensitivität aufweist. Die Typisierung der HLA Klasse II-

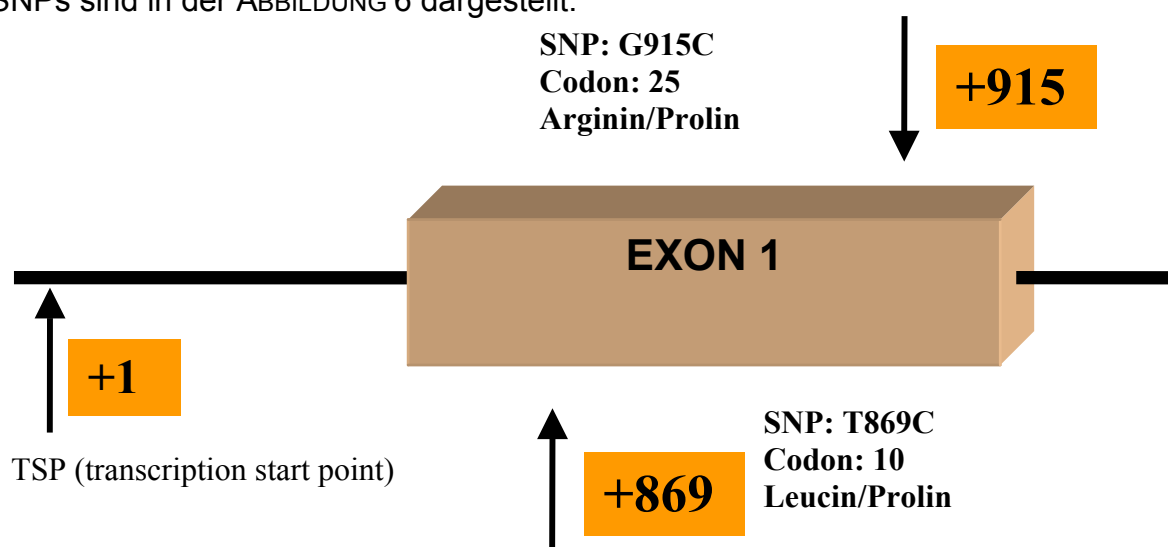
Antigene erfolgte mit einem Kit der Firma Olerup (PCR-SSP, Olerup-SSPTM, GenoVision, Wien, Österreich). Der Inhalt des Olerup-SSPTM-Kit besteht aus vorpipettierten und lyophilisierten Reaktionsansätzen mit allelspezifischen Primern, internen Kontrollprimern (spezifisch für das humane Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (G3PDH) -Gen), PCR-Puffer und dNTPs. Zusätzlich wurden noch der Reaktionsmix E (PCR Enhancer), eine Ampli-Taq GoldTM (Perkin Elmer, Langen, Deutschland) und die isolierte DNA dem Reaktionsansatz zugegeben. Die Zusammensetzung des Probenmix besteht aus 18,0 µl Farblösung, 144 µl steriles Aqua dest., 1,8 µl Taq/Reagenz E-Mix (0,9 µl Taq Polymerase und 0,9 µl Reagenz E) und 18,0 µl DNA-Lösung.

Die abschließende Auswertung erfolgt mit Spezifitätstabellen und Auswertungsdiagrammen. Das bedeutet, dass nur solche Banden als positiv gewertet wurden, die bezüglich des DNA-Längenstandards die richtige Größe besitzen. Auch bei dieser Reaktion trifft wieder zu, dass die interne Kontrollbande stärker in Erscheinung tritt, wenn die Reaktion der spezifischen Primer nicht stattgefunden hat.

Es wurde bei insgesamt 154 IPP-Patienten eine HLA-Genotypisierung durchgeführt. Da es eine sehr große Anzahl von verschiedenen Antigenen der Klasse I als auch der Klasse II im HLA-System gibt, wurde bei der Darstellung der Typisierungsergebnisse eine Auswahl von Antigenen ausgewählt, die eine übersichtliche Analyse der Daten ermöglichte. Die Auswahl wurde so getroffen, dass alle HLA-Antigene, die in vorangegangenen Studien bereits untersucht wurden, Berücksichtigung fanden. Weiterhin erfolgte eine Unterteilung in Klasse I und Klasse II Antigene. Obwohl die Antigene der B7-kreuzreagierenden Gruppe zu den Antigenen der Klasse I gehören, wurden diese eigenständig betrachtet. In fünf Studien über den Zusammenhang von HLA-Antigenen und der IPP standen die B7-kreuzreagierenden Antigene im Mittelpunkt der Untersuchungen [11, 99, 110, 146, 150].

3.4.4.2. TGF-Beta1-Genotypisierung

Diese Zytokin Genotypisierung wurde auch mit einer SSP-PCR-Methode durchgeführt. Hierzu wurde das Kit der Firma One Lambda, Canoga Park, CA (USA) verwendet. In diesem Kit sind außer dem spezifischen Oligonukleotidprimer für TGF-beta1 auch spezifische Primer für vier weitere Zytokine TNF-Alpha, INF-Gamma, Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-10 (IL-10) vorhanden. Das humane Beta-Globulin wurde als Kontrollgenabschnitt verwendet. Die SNPs, die mit diesem Kit untersucht wurden, sind in TABELLE 2 (S. 34) detailliert aufgeführt. Unterschiede ergaben sich in der Anzahl der betrachteten Allele. Bei TNF-Alpha, Interferon-Gamma und Interleukin-6 wurde nur ein SNP typisiert. Bei Interleukin-10 hingegen wurden drei verschiedene SNPs in der Promotorregion betrachtet. Nach der Auswertung der Gelelektrophorese mit dem Arbeitsbogen des Kits war eine Gliederung der verschiedenen Zytokinvarianten in low-, intermediate und high-Producer möglich. Bei TGF-beta1 wurden Polymorphismen am Codon 10 und am Codon 25 untersucht. Es wurden somit zwei von fünf bekannten SNPs [7, 8] des TGF-beta1-Gens untersucht. Der SNP T869C (Codon 10) und der SNP G915C (Codon 25) liegen beide im Exon 1 des TGF-beta1-Gens und sind, im Gegensatz zu den anderen drei bekannten SNPs, mit einer veränderten TGF-beta1-Produktion assoziiert [7, 8]. Die Einteilung nach der Aminosäureposition (Codon) wurde zusätzlich beibehalten, da dies in dem Auswertungsbogen der Firma One Lambda vorgegeben wurde (S. 104). Die beiden SNPs sind in der ABBILDUNG 6 dargestellt.



DIE ABBILDUNG 6 ZEIGT DIE POSITIONEN DER SNPs T869C UND G915C IM EXON 1 DES TGF-BETA1 GENS. IM VERGLEICH DAZU IST DER AUSGANGSPUNKT DER TRANSKRIPTION MIT AUFGEFÜHRT (TSP). DIE BEIDEN SNPs BEFINDEN SICH SOMIT IN EINER KODIERENDEN REGION DES GENS.

Bei den Zytokinen TGF-beta1 und IL-10 wurden diese zwei bzw. drei SNP-Regionen in mehreren Primerpaaren zusammengefasst und später mit dem vorgegebenen Arbeitsbogen als Haplotypen betrachtet. In einer separaten Statistik wurden einzelne SNPs betrachtet und beide Möglichkeiten der Auswertung miteinander verglichen. Bei TNF-Alpha, IL-6- und INF-Gamma wurde mit der SSP-PCR jeweils nur ein SNP untersucht.

	TNF- α	TGF- β	IL-10	IL-6	IFN- γ
SNPs	A-308G	1. T10C 2. G25C	1. G-1082C 2. C-819T 3. C-592A	G-174C	T874A
Region	Promotor	Codon	Promotor	Promotor	Intron
Produktgröße (bp)	125	200	300/250	175	250
Spezifitäten					
1. High (hoch)	G/G	T/T G/G T/C G/G	GCC/GCC	G/G	T/T
2. Intermediate (mittel)	G/A A/A	T/C G/C C/C G/G T/T G/C	GCC/ACC GCC/ATA	G/C	T/A
3. Low (niedrig)		C/C G/C C/C C/C T/T C/C T/C C/C	ACC/ACC ACC/ATA ATA/ATA	C/C	A/A

IN DER TABELLE 2 SIND ALLE 5 SNPs DER ZYTOKIN-GENOTYPISIERUNGEN AUFGEFÜHRT. WEITERHIN SIND IN DIESER TABELLE DIE REGIONEN DER SNPs, SOWIE DIE ANZAHL DER BASENPAARE DES GENPRODUKTES AUFGEFÜHRT. JE NACH GENOTYP KÖNNEN DIE SNPs IN HIGH- LOW- ODER INTERMEDIATE-PRODUCER UNTERTEILT WERDEN.

Für die insgesamt 16 Reaktionen pro PCR-Ansatz wurde ein Gesamtvolumen von 200 μ l vorbereitet, bestehend aus 19 μ l DNA, 1 μ l Taq-Polymerase und 180 μ l D-Mix (Taq-Puffer, dNTPs, Farbstoff und Wasser).

Die Analyse des TGF-beta1 Genpolymorphismus wurde bei 111 IPP-Patienten und 100 Personen einer Kontrollgruppe von gesunden Knochenmarkspendern durchgeführt.

3.4.4.3. Alpha-1-Antitrypsin (AAT)-Genotypisierung

Weiterführende Analysen wurden am Alpha-1-Antitrypsin (AAT)-Gen durchgeführt, Außer den aus der Literatur bekannten S- und Z- Mutationen des Alpha-1-Antitrypsin Gens [22] wurden die SNPs zur Genotypisierung so gewählt, dass die Genabschnitte 5'-Region (T-395A), Exon (M2 und M3) und die 3'-Region (G6118A) berücksichtigt wurden. Die SNPs G6118A, M2 und M3 sind vorbeschriebene Varianten des Alpha-1-Antitrypsin Gens [63, 98]. Der SNP T-395A wurde durch vorangehende Sequenzierung der 3'-Region des Alpha-1-Antitrypsin Gens ausgewählt und nachfolgend typisiert. Die Oligonukleotidprimer wurden so ausgewählt, dass eine Differenzierung zwischen den Varianten M2, M3, S und Z möglich war. Aus diesen ermittelten Konstellationen kann auf das Vorkommen der M1 Variante geschlossen werden, wobei keine Unterscheidung zwischen den Untervarianten M1A und M1V gemacht wurde.

Die Positionen der Polymorphismen sind in Bezug auf die Aminosäureposition und die Basenabfolge angegeben. Als Ausgangspunkt wurde das Initiationscodon ATG der Aminosäure Methionin gewählt und von dort bis zur Base des Polymorphismus gezählt.

Variante	Aminosäuren- position	Aminosäuren wild/mutiert	Exon	Basentriplets wild/mutiert	Basen- position	Allele
M1 M1V M1A	213	Valin (V) und Alanin (A) (beides Normvarianten)	3	GTG/GCG	+2157	T/C
M2	101	Arginin (R) / Histidin (H)	2	CGT/CAT	+371	G/C
M3	376	Glutamin (E) / Asparagin (D)	5	GAA/GAC	+4726	A/C
S	264	Glutamin (E) / Valin (V)	3	GAA/GTA	+2349	A/T
Z	342	Glutamin (E) / Lysin (K)	5	GAG/AAG	+4622	G/A

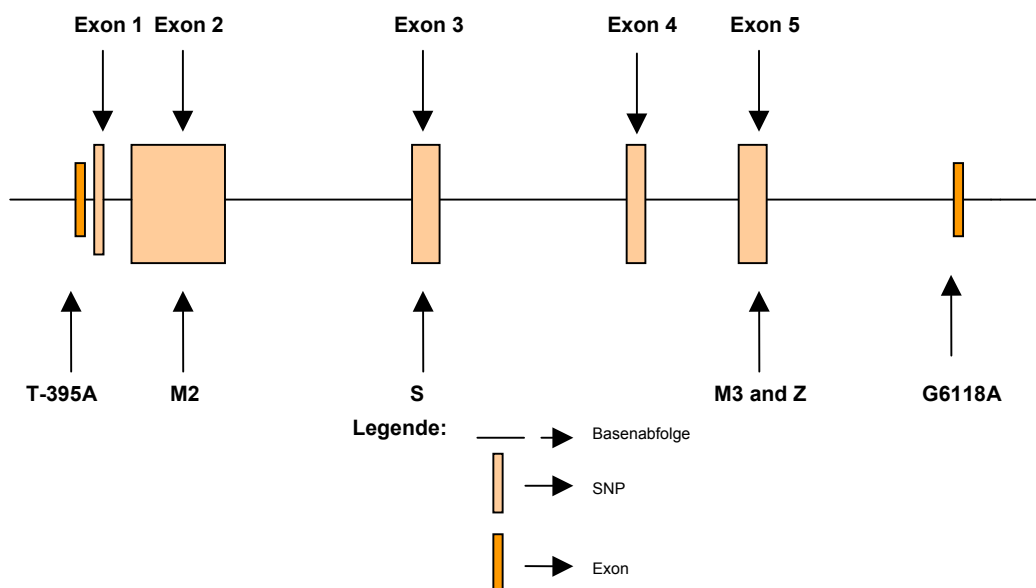
IN DER TABELLE 3 SIND DIE BEKANNTEN SNPs DER AAT-GENOTYPISIERUNGEN AUFGEFÜHRT. WEITERHIN SIND DIESER TABELLE DIE REGIONEN DER SNPs, DIE AMINOSÄUREPOSITIONEN, DIE BASEN- UND AMINOSÄUREVERÄNDERUNGEN, SOWIE DIE BASENPOSITIONEN IM GEN ANGEZEIGT.

Bei den aufgelisteten Varianten gibt es die Besonderheit, dass die Mutationen an einer bestimmten Stelle mit einer anderen aus dem Gen gekoppelt sind. So ist die Voraussetzung der M2 Variante die oben genannte Mutation an der Aminosäureposition 101, bei gleichzeitiger Mutation an der Stelle 376, welche der M3 Variante entspricht. Dargestellt wird dieser M2 Polymorphismus als G371C on M3). Analog dazu ist die M3 Variante A4726C on M1V, die S Variante A2349T on M1V und die Z Variante G4622A on M1A. Die Auswertung der Häufigkeiten erfolgte für jedes Allel sowie für die vorgegebenen Haplotypen der IPP-Patienten im Vergleich zu Werten von einem Kollektiv aus gesunden Knochenmarkspendern. In gleicher Weise wurde bei den beiden weiteren Polymorphismen vorgegangen. Die SNPs in den nicht kodierenden Regionen sind im Folgenden aufgeführt.

Region	Basenposition	Allele
Promotor	-395	T/A
3'	+6116	G/A

IN DER TABELLE 4 SIND ZWEI WEITERE SNPs DER AAT-GENOTYPISIERUNGEN AUFGEFÜHRT. IM GEGENSATZ ZU DEN IN TABELLE 3 ANGEgebenEN SNPs BEFINDEN SICH DIESE NICHT IN KODIERENDEN REGIONEN, SONDERN IN DER 5'- UND 3'- REGION DES GENS.

Die Basenposition dieser beiden Mutationen befinden sich 395 Basenpaare vor bzw. 6116 Basenpaare hinter dem Initiationscodon. Die Lokalisation der Mutationen im Gen des Alpha-1-Antitrypsin sind in der nachgestellten Abbildung zusammengefasst.



IN DER ABBILDUNG 7 WERDEN ALLE UNTERSUCHTEN SNPs DES AAT-GENS ANHAND EINER VEREINFACHTEN GENKARTE DARGESTELLT UND DER ABSTAND ZWISCHEN DEN JEWELIGEN SNPs DEUTLICH.

DER PCR-REAKTIONSANSATZ UND DIE VERSCHIEDENEN REAKTIONSBEDINGUNGEN, DIE FÜR DIE VERSCHIEDENEN POLYMORPHISMEN ANGEWENDET WURDEN, SIND IM FOLGENDEN TABELLARISCH AUFGEFÜHRT (Tabellen 5-10).

Substanzen	Konzentration	Volumen
DNA	n.b.	5 ηg
H ₂ O	-	6,11 μl
dNTP-Mix (Master-Mix)	10 x Taq buffer	1,50 μl
dATP	0,4 μmol/l	0,04 μl
dGTP	0,4 μmol/l	0,04 μl
dCTP	0,4 μmol/l	0,04 μl
dTTP	0,4 μmol/l	0,04 μl
Gesamt		1,66 μl
Primer upstream	10 pmol/μl	1 μl
Primer downstream	10 pmol/μl	1 μl
10x Taq-Puffer	-	4,9 μl
Ampli-Taq Gold™	-	0,16 μl
CRP-Mix	10 pmol/μl	0,17 μl

IN DER TABELLE 5 SIND ALLE SUBSTANZEN MIT IHREN KONZENTRATIONEN UND VOLUMINA AUFGEFÜHRT, DIE FÜR EINEN PCR-REAKTIONSANSATZ DER AAT-GENOTYPISIERUNGEN VERWENDET WURDEN.

TABELLE 6. PCR-BEDINGUNGEN FÜR VARIANTEN M2, M3 UND S

	Temperatur	Dauer	Zyklen
Vorlauf	95° C	10 min.	
Denaturierung	95° C	30 sec.	32
Annealing	58° C	45 sec.	
Polymerisation	72° C	1 min.	
Stop	4° C	∞	

TABELLE 7. PCR-BEDINGUNGEN FÜR Z-VARIANTE

	Temperatur	Dauer	Zyklen
Vorlauf	95° C	10 min.	
Denaturierung	95° C	30 sec.	10 23
Annealing	65° C	1 min.	
	61° C	30 sec.	
Polymerisation	72° C	1 min.	
Stop	4° C	∞	

TABELLE 8. PCR-BEDINGUNGEN FÜR 3'-POLYMORPHISMUS

	Temperatur	Dauer	Zyklen
Vorlauf	95° C	10 min.	
Denaturierung	95° C	30 sec.	10 22
Annealing	60° C	1 min.	
	58° C	40 sec.	
Polymerisation	72° C	40 sec.	
Stop	4° C	∞	

TABELLE 9. PCR-BEDINGUNGEN FÜR 5'-POLYMORPHISMUS

	Temperatur	Dauer	Zyklen
Vorlauf	95° C	10 min.	
Denaturierung	95° C	30 sec.	10 22
Annealing	65° C	1 min.	
	63° C	45 sec.	
Polymerisation	72°	40 sec.	
Stop	4° C	∞	

IN DEN TABELLEN 6-9 SIND NACHEINANDER ALLE PCR-BEDINGUNGEN AUFGEFÜHRT, DIE ZUR GENOTYPISIERUNG DER SNPs DES AAT-GENS VERWENDET WURDEN.

Die Reaktionsansätze einer SSP-PCR waren auf ein Totalvolumen von 20 µl pro PCR-Tube ausgerechnet. Die einzelnen Substanzen mit ihren Konzentrationen und den entsprechenden Volumina sind der folgenden Tabelle zu entnehmen.

Substanzen	Konzentration	Volumen
DNA	n.b.	5 µl
H ₂ O	-	6,11 µl
dNTP-Mix (Master-Mix)	10 x Taq buffer	1,50 µl
dATP	0,4 µmol/l	0,04 µl
dGTP	0,4 µmol/l	0,04 µl
dCTP	0,4 µmol/l	0,04 µl
dTTP	0,4 µmol/l	0,04 µl
Gesamt		1,66 µl
Primer upstream	10 pmol/µl	1 µl
Primer downstream	10 pmol/µl	1 µl
10x Taq-Puffer	-	4,9 µl
Ampli-Taq Gold™	-	0,16 µl
CRP-Mix	10 pmol/µl	0,17 µl

IN DER TABELLE 10 SIND ALLE SUBSTANZEN MIT IHREN KONZENTRATIONEN UND VOLUMINA AUFGEFÜHRT, DIE FÜR EINEN PCR-REAKTIONSANSATZ DER AAT-GENOTYPISIERUNGEN VERWENDET WURDEN.

3.5. Alpha-1-Antitrypsin (AAT)-Immunnephelometrie

Die Immunnephelometrie (N Antisera to Human Alpha-1-Antitrypsin and Alpha-2-Makroglobulin, Dade Behring Marburg GmbH, Marburg, Deutschland) wurde als in-vitro-Diagnostikum zur quantitativen Bestimmung von Alpha-1-Antitrypsin im Humanserum verwendet. Dazu wurden von IPP-Patienten und einer Kontrollgruppe aus gesunden Knochenmarkspendern Serumproben abgenommen, und mit Hilfe eines Nephelometers wurde eine Bestimmung des Alpha-1-Antitrypsinspiegels vorgenommen. Zur Bestimmung der Alpha-1-Antitrypsin Serumwerte beider Gruppen wurde die Immunnephelometrie in gleicher Weise für beide Gruppen verwendet.

Diese Bestimmungen erfolgten im Institut für Klinische Chemie und Labordiagnostik der Justus-Liebig-Universität Gießen. Die Standardwerte liegen nach Angaben der

Firma Behring zwischen 0,9 und 2,0 g/l. Die Normwerte werden in der Literatur mit 1,3 g/l angegeben [40].

Das Prinzip dieser Messmethode ist, dass im menschlichen Serum enthaltene Proteine in einer immunchemischen Reaktion mit spezifischen Antikörpern (N Antiserum gegen Human-alpha-1-Antitrypsin) Immunkomplexe bilden. An diesen Komplexen wird eingestrahktes Licht gestreut. Die Intensität des Streulichts variiert in Abhängigkeit des jeweiligen Proteins in der Probe, in diesem Fall in Abhängigkeit des Proteins Alpha-1-Antitrypsin. Die Auswertung der Streuintensität erfolgt durch einen Vergleich mit der Streuintensität eines Standards mit bekannter Konzentration.

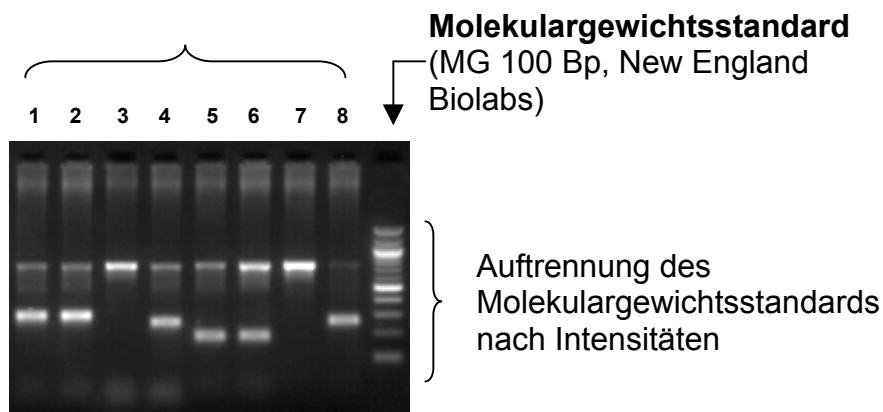
3.6. Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist ein biochemisches Verfahren, durch das eine Auftrennung und Identifikation von DNA-Fragmenten möglich wird. Die langkettige Polysaccharid Agarose wird als Pulver im Gelelektrophoresepuffer (TAE-Puffer 1x, entspricht 40 mM Tris, 0,12% Essigsäure, 1 mM EDTA) durch Erhitzen gelöst. Nach Erkalten entsteht eine besondere Proteinstruktur, die wie ein Molekularsieb wirkt. Die Porengröße des Siebes wird durch die Konzentration von Agarose in dem Gel bestimmt. Je niedriger die Konzentration von Agarose ist, desto größer sind die Poren und dementsprechend schneller können DNA-Fragmente durch das Gel wandern.

Nach dem PCR-Vorgang wurde das PCR-Produkt separat auf ein Agarosegel pipettiert. Bei 80 bis 120 Volt wurde für ca. 15-25 Minuten eine Gelelektrophorese in einer Kammer mit TAE-Puffer 1x (40mM Tris, 0,12% Essigsäure, 1mM EDTA) gestartet. Die zurückgelegte Wegstrecke der Bande ist umgekehrt proportional zum \log_{10} der Anzahl der Basen. Eine höhere Anzahl von Basenpaaren braucht länger um durch das Gel zu wandern als weniger Basenpaare. Diese Art der Gelelektrophorese basiert darauf, dass Nukleinsäuren bei einem neutralen pH polyanionisch sind. Das heißt, dass sie an ihren Phosphatgruppen im Phosphodiesterückrat viele negative Ladungen trägt. Deshalb wandern die Moleküle im elektrischen Feld in Richtung der positiven Elektrode. Ohne den Trennungsmechanismus des Agarosegels würden Nukleinsäuren aller Größen in der Pufferflüssigkeit gleich schnell wandern, und es würde nicht zu der gewünschten Auftrennung kommen. Der Trennungsbereich des

Agarosegele liegt bei ca. 200 bis 3000 Basenpaaren, wobei die Konzentration der Agarose dabei zwischen 0,8 und 2% liegt. Parallel zu der amplifizierten DNA lief ein Molekulargewichtsstandard (MG) mit Loading Buffer als Farbstoff. Dieser Molekulargewichtsstandard ist ein Gemisch aus DNA-Fragmenten definierter Länge. 1 μ l des verwendeten Molekulargewichtsstandards (MG 100 bp, New England Biolabs, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp.) wurde mit 1 μ l Loading Buffer und 8 μ l Aqua dest. verdünnt. Zum Abschätzen der PCR-Produktmenge ist es wichtig, dass mit der gleichen μ l-Menge wie der MG aufgetragen wird. Nach der Auftrennung konnten sich die Nukleinsäuren im Gel mit dem interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid anfärben. Unter UV-Licht (322 nm) waren die Banden gut erkennbar und ließen sich zur Dokumentation photographieren. Für präparative Gele wurde SeaKem GTG Agarose (FMC Bioproducts, Rockland, USA) verwendet.

In Slot 1,2,4,5,6 und 8 sind amplifizierte SSP-PCR-Produkte, in Slot 3 und 7 ist keine Amplifikation zu sehen.



IN DER ABBILDUNG 8 IST EIN GELELEKTROPHORESEBILD DARGESTELLT. ZUR ABSCHÄTZUNG DER BASENLÄNGE EINES AMPLIFIZIERTEN PRODUKTES WURDE EINE MOLEKULARGEWICHTSSTANDARD BEIGEFÜGT.

3.7. DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzanalysen wurden nach der enzymatischen Kettenabbruch-Methode nach *Sanger und Coulson* durchgeführt [97]. Der Kettenabbruch während der Strangsynthese beruht auf dem Einsatz von fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleosidtriphosphaten (ddNTPs). Diese werden gleichzeitig mit den üblichen Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) eingesetzt und konkurrieren mit diesen um die jeweiligen Bindungsstellen bei der DNA-Synthese. Wird eines dieser ddNTPs eingebaut, kommt es danach zu einem Kettenabbruch. Diesen modifizierten dNTPs fehlt im Folgenden an der 3'-Strich Position ihrer Desoxyribose die Hydroxylgruppe, und somit ist eine Verlängerung des DNA-Stranges nicht mehr möglich. Die Konzentration der Didesoxynukleosidtriphosphate wird dabei so gering gewählt, dass sie selten eingebaut werden. Allerdings kommt es statistisch gesehen an jeder Position des zu sequenzierenden DNA-Stranges zu einem Abbruch. In jedem Ansatz erscheint eine ganze Serie von Fragmenten, die alle mit einem ddNTP enden. Für jedes der vier vorkommenden ddNTPs (A-, G-, T-, C-Form) wird eine spezifische Fluoreszenzmarkierung vorgenommen, die nun eine Identifizierung jedes am 3'-Strich Ende eingebauten ddNTPs möglich macht. Die Längen der verschiedenen DNA-Fragmente wurden mit Polymer gefüllten Kapillaren am Sequenzer bestimmt. Anhand dieser Vorgänge kann ein computergestütztes Laser-Detektionssystem die Basenabfolge des zu sequenzierenden DNA-Abschnittes analysieren und graphisch darstellen. Diese direkte Sequenzierung erfolgte mit einem Sequenzierungskit (ABI Prism[®] BigDye[™] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit; Perkin Elmer, Langen, Deutschland). Die verschiedenen Schritte einer Sequenzierungsreaktion vom Erstellen eines PCR-Produktes bis zur Sequenzierungs-PCR und der darauffolgenden Analyse im Sequenzierer werden nun einzeln erläutert:

a) Erstellung eines PCR-Produktes

In diesem ersten Schritt wird mittels der PCR-Methode eine Matrize erstellt, die in der Sequenzier-PCR als Vorlage diente. Der PCR-Ansatz setzte sich aus folgenden Materialien zusammen:

Substanzen	Konzentration	Volumen
DNA	n.b.	5 µl
H ₂ O	-	6,28 µl
dNTP-Mix (Master-Mix)	10 x Taq buffer	1,50 µl
dATP	0,4 mmol/l	0,04 µl
dGTP	0,4 mmol/l	0,04 µl
dCTP	0,4 mmol/l	0,04 µl
dTTP	0,4 mmol/l	0,04 µl
Gesamt		1,66 µl
Primer upstream	10 pmol/µl	1 µl
Primer downstream	10 pmol/µl	1 µl
10x Taq-Puffer	-	4,9 µl
Ampli-Taq Gold™	-	0,16 µl

IN DER TABELLE 11 SIND ALLE SUBSTANZEN MIT IHREN KONZENTRATIONEN UND VOLUMINA AUFGEFÜHRT, DIE FÜR EINEN PCR-REAKTIONSANSATZ DER DNA-SEQUENZIERUNG VERWENDET WURDEN.

	Temperatur	Dauer	Zyklen
Vorlauf	95° C	10 min.	
Denaturierung	95° C	30 sec.	32
Annealing	58° C	50 sec.	
Polymerisation	72° C	45 sec.	
Stop	4° C	∞	

IN DER TABELLE 12 SIND DIE PCR-BEDINGUNGEN FÜR DIE SEQUENZIERUNGS-PCR GEGLIEDERT IN TEMPERATUR, DAUER UND ANZAHL DER DURCHLAUFENDEN ZYKLEN AUFGEFÜHRT.

Die Annealingtemperatur variierte bei den verschiedenen Primerpaaren, die für die unterschiedliche Sequenzanalysen eingesetzt wurden.

b) Gelextrahierung aus präparativen SeaKem-Gel

Nach Erkennen von positiven Banden wurde der Rest des gleichen PCR-Produktes auf ein SeaKem-Gel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Die Aufreinigung und Extrahierung erfolgte laut Anleitung des QIAquick® Spin Handbook For QIquick Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland). Begonnen wurde mit dem Ausschneiden der Banden auf dem SeaKem-Gel auf dem UV-Schirm. Die Gelstücke wurden mit QG-Puffer in einem 50° C – Wasserbad gelöst und die DNA mittels einer im Kit enthaltenen Kieselerde-Gelmembran abgefiltert. Drei µl dieser gereinigten DNA wurden mit 1 µl Loading Buffer und 3 µl H₂O versetzt und auf ein 1,5%iges Agarose-Schätzgel aufgetragen. Die Auswertung erfolgte im Vergleich zu einem Molekulargewichtsstandard (MG 100 Bp, New England, Biolabs Inc., Frankfurt: 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp).

c) DNA-Sequenzierung

Die errechnete Konzentration des PCR-Produktes mit Hilfe der 100 bp DNA Ladder (New England Biolabs) wurde zur Durchführung der Sequenzierungsreaktion herangezogen. Die verwendeten Materialien und das Programm der Sequenzierungs-PCR sind im folgenden aufgeführt:

Substanzen	Konzentration	Volumen
PCR-Produkt	10-20 ng/µl.	X (der Konz. des PCR-Produktes entsprechend)
H ₂ O	-	15 µl-X
Terminator Ready Reaction Mix	-	4 µl
Primer upstream oder Primer downstream	10 pmol/µl	1 µl

IN DER TABELLE 13 SIND ALLE SUBSTANZEN MIT IHREN KONZENTRATIONEN UND VOLUMINA AUFGEFÜHRT, DIE FÜR DIE DNA-SEQUENZIERUNG VERWENDET WURDEN.

Das Gesamtvolumen jeder Sequenzierungsreaktion lag bei 20 µl. Je nach Konzentration des PCR-Produktes wurde eine entsprechende Verdünnung mit Aqua dest. vorgenommen.

	Temperatur	Dauer	Zyklen
Denaturierung	96° C	10 sec.	25
Annealing	50° C	5 sec.	
Polymerisation	60° C	4 min.	
Stop	4° C	∞	

IN DER TABELLE 14 SIND DIE PCR-BEDINGUNGEN FÜR DIE SEQUENZIERUNGS-PCR GEGLIEDERT IN TEMPERATUR, DAUER UND ANZAHL DER DURCHLAUFENDEN ZYKLEN AUFGEFÜHRT.

d) Fällung

Das aus der Sequenzierungs-PCR hervorgegangene PCR-Produkt wurde durch eine Natriumacetat-/Ethanol-Fällung aufgereinigt und im Speed-Vac getrocknet. Das in dieser Vakuumzentrifuge entstandene DNA-Pellet wurde mit 25 µl TSR-Puffer (Template Suppresion Reagent) versetzt und anschließend denaturiert. Diese Fällungs- und Aufreinigungsschritte erfolgten gemäß den Herstellerangaben des ABI Prism® BigDye™ Terminator Cycle Sequenzing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer, Langen, Deutschland).

e) Sequenzierreaktion

Die in Schritt 4 entstandenen denaturierten DNA-Proben wurden im Sequenziergerät (ABI Prism™ 310 Genetic Analyser) analysiert und graphisch dargestellt.

3.8. Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der SPSS® 10.0 Software (SPSS Inc., Chicago, USA). Alle Tests wurden zweiseitig mit einem Konfidenzintervall von 95% durchgeführt. Ein Ergebnis von p-Werten <0,05 wurde als signifikant angenommen. Analysen der Untergruppe von IPP-Patienten, die gleichzeitig an einem M. Dupuytren erkrankten, wurden jeweils gesondert berechnet.

3.8.1. HLA-Statistik

Zur Berechnung der p-Werte wurde der Chi-Square Test verwendet. Zur Berücksichtigung des multiplen Testens wurden signifikante p-Werte durch die Korrektur nach Bonferroni berichtigt [26, 27].

Klasse/ Spezifität	Anzahl	Antigene
Klasse I HLA-A	n=15	HLA-A1, A2, A3, A10, A11, A23, A24, A25, A26, A28, A29, A30, A31, A32, A33
Klasse I HLA-B	n=28	HLA-B7, B8, B13, B14, B15, B18, B22, B27, B35, B37, B38, B39, B40, B41, B44, B45, B49, B50, B51, B52, B55, B56, B57, B58, B60, B61, B62, B63
Klasse I HLA-C	n=8	HLA-Cw1, Cw2, Cw3, Cw4, Cw5, Cw6, Cw7, Cw8
Klasse II HLA-DRB1	n=14	HLA-DRB1 01, 0103, 03, 04, 07, 08, 09, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16

IN DER TABELLE 15 SIND ALLE TYPISIERTEN HLA-ANTIGENE AUFGEFÜHRT. AUSGEHEND VON DER ANZAHL DER ANTIGENE EINER SPEZIFITÄT KONNTE DIE KORREKTUR NACH BONFERRONI [26, 27] DURCHGEFÜHRT WERDEN.

Für die Bonferronikorrektur wurde der errechnete p-Wert für ein getestetes HLA-Antigen mit der Anzahl aller Antigene der zugehörigen HLA-Spezifitäten multipliziert, um eine signifikante Assoziation zu der Erkrankung aufzeigen zu können. Die Anzahl der getesteten Antigene wurde mit dem errechneten p-Wert wie folgt mutipliziert: HLA-A x 15, HLA-B x 28, HLA-C x 8 und HLA-DR x 14. Um eine tatsächlich signifikante Assoziation zwischen der IPP und HLA-Antigenen annehmen zu können, sollte der p-Wert nach dieser Korrektur immer noch < 0,05 sein.

3.8.2. TGF-beta1-Statistik

Auch hier wurde für die statistischen Berechnungen der Chi-Square Test angewandt. Die Verteilung von homozygoten und heterozygoten Merkmalsträgern wurde mit Hilfe des Hardy-Weinberg-Equilibriums dargestellt. Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht besagt, dass unter bestimmten Voraussetzungen die Häufigkeiten der Homozygoten und Heterozygoten über Generationen hinweg konstant bleibt. Nach dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht können die Häufigkeiten der Heterozygoten ermittelt werden. Beim Vorliegen von zwei Allelen kann sie niemals den Wert 0,5 übersteigen. Zur Überprüfung dieser Aussage wurden die Häufigkeiten der TGF-beta1-Allele mit Hilfe eines Statistikprogramms von Prof. Wienker¹ ausgewertet, welches unter <http://ihg.gsf.de> im Internet zur Verfügung steht. Die graphische Auswertung erfolgte mit Hilfe des de Fieniti Diagramms. Die statistischen Berechnungen wurden für die vier weiteren SNPs von Zytokinen in gleicher Weise wie für TGF-beta1 durchgeführt.

3.8.3. Alpha-1-Antitrypsin-Statistik

Beim Vergleich der Alpha-1-Antitrypsin Serumwerte zwischen den Gruppen von IPP-Patienten und der Kontrollgruppe aus gesunden Knochenmarkspendern wurde der Mann-Whitney-U Test benutzt. Bei den Berechnungen zur Altersabhängigkeit der Alpha-1-Antitrypsin Serumwerte wurden mehr als zwei Untergruppen miteinander verglichen. Hier kam der Kruskal-Wallis Test zur Anwendung. Der statistische Vergleich von Frequenzen der Genvarianten des Alpha-1-Antitrypsin wurde mit Hilfe des Chi-Square Tests durchgeführt.

¹ Institut für Medizinische Biometrie, Informatik und Epidemiologie, Bonn

4. Ergebnisse

4.1. Basisdaten

Die in der Sprechstunde der Klinik für Urologie und Kinderurologie der Justus-Liebig-Universität Gießen erhobenen Basisdaten wurden sowohl für das gesamte Kollektiv von 192 IPP-Patienten, als auch für die variierenden Kollektivgrößen der einzelnen Studien zusammengefaßt und mit publizierten Daten verglichen. In die HLA-Studie wurden 154 Patienten, in die TGF-beta1-Studie 111 Patienten und in die Alpha-1-Antitrypsin-Studie das gesamte Kollektiv eingeschlossen. Bei der Analyse dieser Daten wurden weitere charakteristische Krankheitsmerkmale der IPP-Patienten anamnestisch und durch Untersuchungen erhoben. Im Folgenden sind für diese drei Untersuchungen die Daten von Alter, Erkrankungsbeginn, Anzahl der Plaques, Kalzifizierung und die durchschnittliche Deviation aufgeführt. Signifikante Unterschiede dieser Basisdaten zwischen den drei Studien konnten nicht aufgezeigt werden.

4.1.1. HLA-Genotypisierung

Patienten (n)	154	
Altersdurchschnitt, min./max. (Jahre)	53,3	(17-70)
Erkrankungsbeginn, min./max. (Monate)	23,3	(1-240)
Anzahl von Plaques/Patient		
1	123/154	(79,9%)
2	22/154	(14,3%)
3 und mehr	6/154	(3,9%)
Kalzifizierung	58/154	(37,7%)
Deviation, min./max. (°)	42,3	(10-100)

IN DER TABELLE 16 SIND DIE BASISDATEN DER IPP-PATIENTEN, BEI DENEN EINE HLA-GENOTYPSIERUNG DURCHGEFÜHRT WURDE, AUFGEFÜHRT.

4.1.2. TGF-beta1-Genotypisierung

Die in TABELLE 17 dargestellten Basisdaten des Kollektives von 111 IPP-Patienten entspricht den Daten für die Typisierungen der Zytokine.

Patienten (n)	111	
Altersdurchschnitt, min./max. (Jahre)	54,3	(17-71)
Erkrankungsbeginn, min./max. (Monate)	22	(1-195)
Anzahl von Plaques/Patient		
1	91/111	(82,0%)
2	16/111	(14,4%)
3 und mehr	4/111	(3,6%)
Kalzifizierung	42/111	(37,8%)
Deviation, min./max. (°)	43,4	(10-100)

IN DER TABELLE 17 SIND DIE BASISDATEN DER IPP-PATIENTEN DARGESTELLT, BEI DENEN EINE TGF-BETA1-GENOTYPSIERUNG DURCHGEFÜHRT WURDE.

4.1.3. Alpha-1-Antitrypsin-Genotypisierung und Serumspiegel

Die Messung von Alpha-1-Antitrypsin-Serumspiegeln sowie die AAT-Genotypisierung erfolgte aus einem Pool von insgesamt 192 IPP-Patienten. Bei 94 Patienten wurden Serumspiegel ermittelt und bei 100 (Mutationen S und Z) bzw. 141 Patienten (Mutationen M2 und M3, sowie SNPs T-395A und G6118A) wurde eine Genotypisierung durchgeführt. Beide Untersuchungen erfolgten an einem Kollektiv von 43 Patienten aus den beiden oben genannten Gruppen (ABBILDUNG 4, S. 21)

Zur besseren Übersicht wurden die Basisdaten für das gesamte Kollektiv von 192 Patienten mit IPP in nachfolgender Tabelle zusammengefasst. Ein signifikanter Unterschied der Basisdaten zwischen den einzelnen Untergruppen dieser Untersuchung konnte ausgeschlossen werden.

Patienten (n)	192	
Altersdurchschnitt, min./max. (Jahre)	53,7	(18-71)
Erkrankungsbeginn, min./max. (Monate)	22	
Anzahl von Plaques/Patient		
1	155/192	(80,7%)
2	29/192	(15,1%)
3 und mehr	5/192	(2,6%)
Kalzifizierung	80/192	(41,7%)
Deviation, min./max. (°)	45	(10-100)

DIE TABELLE 18 ENTHÄLT BASISDATEN DES KOLLEKTIVS VON IPP-PATIENTEN, BEI DENEN EINE MESSUNG DES ALPHA-1-ANTITRYPSIN- SERUMSPIEGELS BZW. EINE ALPHA-1-ANTITRYPSIN GENOTYPISIERUNG DURCHGEFÜHRT WURDE.

4.2. Koinzidenz mit M. Dupuytren

In unseren Patientenkollektiven wurden das gemeinsame Vorkommen der Induratio penis plastica und des M. Dupuytren beobachtet. Da es sich um Untersuchungen eines Kollektivs von IPP-Patienten handelt, werden Aussagen darüber gemacht, in wie viel Fällen bei IPP-Patienten gleichzeitig ein M. Dupuytren zu beobachten war. Analog zu den Basisdaten sind in der folgenden Tabelle für alle durchgeführten Studien die jeweiligen Koinzidenzen von den Patienten mit IPP mit dem M. Dupuytren dargestellt, da die drei verschiedenen genetischen Studien über die Ätiopathogenese der IPP mit unterschiedlich großen Kollektiven von Patienten mit IPP durchgeführt wurden.

Bei Studien zu TGF-beta1, den HLA-Antigenen und Alpha-1-Antitrypsin wurden die Kollektive der IPP-Patienten, die gleichzeitig an M. Dupuytren erkrankten, separat analysiert. So konnte bei jeder Untersuchung eine Aussage über dieses spezielle Krankenkollektiv gemacht werden.

	Untersuchte IPP-Patienten (n)	Anzahl von Patienten mit IPP und M. Dupuytren (n)	Anteil der IPP-Patienten mit M. Dupuytren (%)
HLA-Studie	154	38	24,7
TGF-beta-Studie	111	32	28,8
Alpha-1-Antitrypsin-Studie	192	48	25,0

IN DER TABELLE 19 WIRD AUFGEZEIGT, IN WIE VIELEN FÄLLEN EIN GLEICHZEITIGES VORKOMMEN VON IPP UND M. DUPUYTREN ZU BEOBACHTEN IST. DA DIE KOLLEKTIVGRÖßEN DER STUDIEN VARIERTEN, SIND DATEN ALLER DREI STUDIEN VERGLEICHEND DARGESTELLT.

4.3. HLA-Genotypisierung

Es folgt die Auswertung der HLA-Genotypisierung, die bei insgesamt 154 IPP-Patienten durchgeführt wurde. Die Ergebnisse der HLA-Genotypisierung von IPP-Patienten werden im Folgenden mit den Ergebnissen der beiden Kontrollkollektive (n_1 , n_2) aus gesunden Knochenmarkspendern dargestellt. In mehreren Studien über den Zusammenhang von HLA-Antigenen und der IPP standen die B7-kreuzreagierenden Antigene im Mittelpunkt der Untersuchungen [11, 146, 99, 150, 110]. Bei der Darstellung der Ergebnisse der HLA-Genotypisierung wurde daher eine separate Betrachtung dieser Gruppe durchgeführt.

HLA-Antigene	Patienten (n=154)	Kontrolle n_1 (Klasse I n=2450) (Klasse II n=316)	Kontrolle n_2 (n=14835)	p^1	p^2	p^c
KLASSE I ANTIGENE DES HLA-SYSTEMS						
A1	22,08	29,14	26,86	n.s.	n.s.	n.s.
B8	14,93	20,53	17,27	n.s.	n.s.	n.s.
Cw7	42,86	42,65	-	n.s.	-	n.s.
KLASSE II ANTIGENE DES HLA-SYSTEMS						
DRB1*03	18,18	18,67	19,41	n.s.	n.s.	n.s.
DRB1*06	35,71	27,21	30,73	0,018	n.s.	n.s.
DRB1*13 und DRB1*14	29,22 6,49	22,78 4,43	25,52 5,21	n.s. n.s.	n.s. n.s.	n.s. n.s.

DIE TABELLE 20 ZEIGT PHÄNOTYPFREQUENZEN VON AUSGESUCHTEN ANTIGENEN DER KLASSE I UND II DES HLA-SYSTEMS BEI IPP-PATIENTEN IM VERGLEICH ZU ZWEI UNTERSCHIEDLICHEN KONTROLLKOLLEKTIVEN AUS GESUNDEN KNOCHENMARKSPENDERN. N.S. = NICHT SIGNIFIKANT.

Ergebnisse

HLA-Antigene	Patienten (n=154)	Kontrolle n ₁ (Klasse I n=2450)	Kontrolle n ₂ (n=14835)	p ¹	p ^c
B7	22,08	27,84	23,14	n.s.	n.s.
B22	-	0,24	0,14	-	-
B27	9,74	7,92	9,48	n.s.	n.s.
B40	10,39	11,39	13,12	n.s.	n.s.
B60 und	6,49	9,55	9,79	n.s.	n.s.
B61	3,90	1,84	3,33	n.s.	n.s.
Total:	42,21	47,39	45,88	n.s.	n.s.

DIE TABELLE 21 ZEIGT PHÄNOTYPFREQUENZEN VON ANTIGENEN DER B7-KREUZREAGIERENDEN GRUPPE DES HLA-SYSTEMS BEI IPP-PATIENTEN IM VERGLEICH ZU ZWEI UNTERSCHIEDLICHEN KONTROLLKOLLEKTIVEN AUS GESUNDEN KNOCHENMARKSPENDERN. N.S. = NICHT SIGNIFIKANT.

Beim Vergleich der Phänotypfrequenzen der Klasse I des HLA-Systems bei nicht verwandten IPP-Patienten und den beiden beschriebenen Kontrollgruppen aus gesunden Knochenmarkspendern (n₁,n₂) zeigte sich bei keinem der untersuchten HLA-Antigene ein signifikanter Unterschied der p-Werte. Bei der Betrachtung des Antigens A1 ergab sich vor der Korrektur nach Bonferroni ein p-Wert von 0,054. Nach der Berücksichtigung der Bedingungen für multiples Testen zeigte dieser neu berechnete Wert, dass es bezüglich des Antigens A1 der Klasse I des HLA-Systems keine signifikanten Unterschiede zwischen IPP-Patienten und den Kontrollgruppen gibt. Alle weiteren getesteten Antigene der Klasse I des HLA-Systems wiesen schon vor der Korrektur nach Bonferroni keine Tendenz zu einem signifikanten Unterschied der Antigenfrequenzen der analysierten Gruppen auf. Alle untersuchten Antigenvarianten wurden wiederum unter Verwendung des Chi-Quadrat-Testes verglichen. Alle Berechnungen zeigten nicht signifikante Ergebnisse. Exemplarisch für diese Feststellung wurden zusätzlich zu dem schon beschriebenen Antigen A1 noch die Antigene B8 und Cw7 aufgeführt.

Die Auswertung der Phänotypfrequenzen der Klasse II ergab folgende Ergebnisse. Das Antigen DRB1*06, das sich aus den Antigenen DRB1*13 und DRB1*14 zusammensetzt, kommt vor der Korrektur nach Bonferroni signifikant häufiger bei IPP-Patienten vor als bei den beiden Kontrollgruppen. Der p-Wert betrug vor der Korrektur 0,018. Beide Antigene, aus denen sich DRB1*06 zusammensetzt, weisen einzeln betrachtet schon vor der Korrektur keine signifikanten Abweichungen auf.

Nach der Multiplikation der getesteten Antigene mit dem p-Wert der DRB1*06-Analyse ist auch hier kein signifikanter Unterschied zwischen den IPP-Patienten und den Kontrollen zu erkennen. Wie auch schon bei der Analyse der Klasse I Antigene des HLA-Systems zeigte sich bei keinem der untersuchten Merkmale ein signifikanter Unterschied der Antigenfrequenzen zwischen den Gruppen. Als weiteres Beispiel zu dem beschriebenen DRB1*06 Antigen ist das DRB1*03 Antigen aufgeführt.

Alle beschriebenen Differenzen der p-Werte vor der Korrektur des multiplen Testens sind nur beim Vergleich der IPP-Patienten mit der Kontrollgruppe n_1 zu erkennen. Sowohl bei den Antigenen der Klasse I, als auch bei denen der Klasse II war bei der Auswertung der Phänotypfrequenzen der IPP-Patienten mit dem Kontrollkollektiv von 14835 Knochenmarkspendern (n_2) schon vor der Korrektur nach Bonferroni keine signifikante Abweichung der p-Werte zu beobachten.

Eine gesonderte Betrachtung wurde für die 38 IPP-Patienten durchgeführt, die eine Koinzidenz mit M. Dupuytren zeigten. Für diese Gruppe wurde eine separate Statistik bezüglich der HLA-Antigenvarianten durchgeführt. Die Berechnung und Auswertung wurde in gleicher Weise wie die des gesamten Kollektivs durchgeführt. Als Kontrollgruppen wurden wieder die beiden großen Kollektive von gesunden Knochenmarkspendern (n_1 , n_2) verwendet.

HLA-Antigene	Patienten (n=38)	Kontrolle n_1 (Klasse I n=2450) (Klasse II n=316)	Kontrolle n_2 (n=14835)	p^1	p^2	p^c
KLASSE I ANTIGENE DES HLA-SYSTEMS						
A1	28,95	29,14	26,86	n.s.	n.s.	n.s.
B8	18,42	20,53	17,27	n.s.	n.s.	n.s.
Cw7	44,74	42,65	-	n.s.	-	n.s.
KLASSE II ANTIGENE DES HLA-SYSTEMS						
DRB1*03	21,05	18,67	19,41	n.s.	n.s.	n.s.
DRB1*06	52,63	27,21	30,73	<0,01	<0,01	0,0017 (n_1) 0,051 (n_2)
DRB1*13 und DRB1*14	39,47 13,16	22,78 4,43	25,52 5,21	0,014 0,009	0,048 0,027	n.s. n.s.

DIE TABELLE 22 ZEIGT PHÄNOTYPFREQUENZEN VON AUSGESUCHTEN ANTIGENEN DER KLASSE I UND II DES HLA-SYSTEMS BEI IPP-PATIENTEN MIT M. DUPUYTREN IM VERGLEICH ZU ZWEI UNTERSCHIEDLICHEN KONTROLLKOLLEKTIVEN AUS GESUNDEN KNOCHENMARKSPENDERN. N.S. = NICHT SIGNIFIKANT.

HLA-Antigene	Patienten (n=38)	Kontrolle n ₁ (Klasse I n=2450)	Kontrolle n ₂ (n=14835)	p ¹	p ^c
B7	23,68	27,84	23,14	n.s.	n.s.
Bw22	-	0,24	0,14	-	-
B27	10,53	7,92	9,48	n.s.	n.s.
B40	7,81	11,39	13,12	n.s.	n.s.
B60 and B61	5,26 2,63	9,55 1,84	9,79 3,33	n.s. n.s.	n.s. n.s.
Total:	42,02	47,39	45,88	n.s.	n.s.

DIE TABELLE 23 ZEIGT PHÄNOTYPFREQUENZEN VON ANTIGENEN DER B7-KREUZREAGIERENDEN GRUPPE DES HLA-SYSTEMS BEI IPP-PATIENTEN MIT M. DUPUYTREN IM VERGLEICH ZU ZWEI UNTERSCHIEDLICHEN KONTROLLKOLLEKTIVEN AUS GESUNDEN KNOCHENMARKSPENDERN. N.S. = NICHT SIGNIFIKANT.

Bei der Auswertung der HLA-Antigene der Klasse I bei IPP-Patienten mit M. Dupuytren zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Phänotypfrequenzen zwischen den Patienten und den beiden Kontrollgruppen. Auch beim Vergleich der B7-kreuzreagierenden Gruppe wurden keine deutlichen Veränderungen sichtbar. Bei der Betrachtung der Häufigkeiten der HLA-Antigene der Klasse II wurde eine Differenz zwischen Patienten und Kontrollen beim DRB1*06 Antigen sichtbar. Dieses Antigen setzt sich aus den Antigenen DRB1*13 und DRB1*14 zusammen. Bei der getrennten Betrachtung von DRB1*13 und DRB1*14 zeigte sich nur ein signifikant häufigeres Vorkommen dieser Antigene vor der Korrektur nach Bonferroni. Nach Addition der Häufigkeiten fiel ein signifikanter Unterschied des DRB1*06-Antigens nach der Korrektur für multiples Testen auf. Beim Vergleich der IPP-Patienten mit der Kontrollgruppe (n₁) ergab sich ein p-Wert von 0,0017, beim Vergleich mit der Kontrollgruppe (n₂) ein p-Wert von 0,051. In Anbetracht der Größe der Kontrollgruppe (n₂) kann hier nur von einer grenzwertigen Signifikanz oder einer „Borderlinie-Signifikanz“ gesprochen werden. Zum deutlichen Vergleich der Ergebnisse von den IPP-Patienten ohne M. Dupuytren und dem Kollektiv aus IPP-Patienten mit M. Dupuytren sind die Phänotypfrequenzen der besprochenen HLA-Antigene in TABELLE 24 und TABELLE 25 zusammengefasst.

Ergebnisse

HLA-Antigene	IPP-Patienten mit M. Dupuytren N = (38)	IPP-Patienten ohne M. Dupuytren n = (116)	p ¹	p ^c
KLASSE I ANTIGENE DES HLA-SYSTEMS				
A1	28,95	19,83	0,030	n.s.
B8	18,42	13,79	n.s.	n.s.
Cw7	44,74	42,24	n.s.	n.s.
KLASSE II ANTIGENE DES HLA-SYSTEMS				
DRB1*03	21,05	17,24	n.s.	n.s.
DRB1*06	52,63	30,17	<0,01	0,0017
DRB1*13 und	39,47	25,86	0,003	0,051
DRB1*14	13,16	4,31	0,005	n.s.

IN DER TABELLE 24 SIND PHÄNOTYPFREQUENZEN VON AUSGESUCHTEN ANTIGENEN DER KLASSE I UND II DES HLA-SYSTEMS BEI IPP-PATIENTEN MIT M. DUPUYTREN IM VERGLEICH ZU DEM KOLLEKTIV AUS IPP-PATIENTEN OHNE M. DUPUYTREN DARGESTELLT. N.S. = NICHT SIGNIFIKANT.

HLA-Antigene	IPP-Patienten mit M. Dupuytren n = (38)	IPP-Patienten ohne M. Dupuytren n = (116)	p ¹	p ^c
B7	23,68	21,55	n.s.	n.s.
B22	-	-	-	-
B27	10,53	9,48	n.s.	n.s.
B40	7,81	10,34	n.s.	n.s.
B60 and	5,26	6,03	n.s.	n.s.
B61	2,63	4,31	n.s.	n.s.
Total:	42,02	41,37	n.s.	n.s.

IN DER TABELLE 25 SIND PHÄNOTYPFREQUENZEN VON ANTIGENEN DER B7-KREUZREAGIERENDEN GRUPPE DES HLA-SYSTEMS BEI IPP-PATIENTEN MIT M. DUPUYTREN IM VERGLEICH ZU DEM KOLLEKTIV AUS IPP-PATIENTEN OHNE M. DUPUYTREN DARGESTELLT. N.S. = NICHT SIGNIFIKANT.

Bei der Analyse der HLA-Genotypisierungsergebnisse der IPP-Patienten mit und ohne M. Dupuytren zeigte sich ein vergleichbares Bild wie bei der Untersuchung mit den beiden großen Kontrollgruppen aus gesunden Knochenmarkspendern (n_1 , n_2). In allen untersuchten Antigenvarianten, außer dem DRB1*06-Antigen des HLA-Systems, zeigte sich kein signifikanter Unterschied in den HLA-Antigenfrequenzen. Vor der Bonferroni-Korrektur sind die Antigenfrequenzen von DRB1*13 und DRB1*14, aus denen sich das DRB1*06-Antigen zusammensetzt, bei den IPP-Patienten mit p-Werten von 0,003 und 0,005 bei IPP-Patienten mit M. Dupuytren signifikant häufiger zu beobachten. Mit einem p-Wert von 0,017 war somit eine identische Signifikanz zu den Berechnungen der IPP-Patienten mit M. Dupuytren und den Kontrollen aus Knochenmarkspendern erkennbar.

4.4. TGF-beta1-Genotypisierung

Bei 111 IPP-Patienten wurde eine prospektive Genotypisierung von SNPs des TGF-beta1 Gens durchgeführt. Untersucht werden sollte eine mögliche genetische Assoziation zwischen definierten TGF-beta1 Genotypen und der IPP. Die Analyse des TGF-beta1 Genpolymorphismus wurde bei 111 IPP-Patienten und 100 Personen einer Kontrollgruppe von gesunden Knochenmarkspendern durchgeführt.

Die Auswertung der durch die Genotypisierung erhaltenen Ergebnisse erfolgte anhand zweier Ansätze:

1. Phänotypanalyse mit Einteilung nach High-, Intermediate- und Low-producer (vorgegeben durch Auswertungsbogen der Firma One Lambda)
2. Auswertung der untersuchten SNPs T869C und G915C

Die Genotypisierung wurde für die Zytokine TGF-beta1, TNF-Alpha, Interferon-Gamma, Interleukin-10 und Interleukin-6-Haplotypen vorgenommen. Im Folgenden wird bei der Auswertung ein Augenmerk auf die Ergebnisse der TGF-beta1-Genotypisierung gelegt. Die Darstellung der anderen Zytokingenotypisierungen erfolgt im Anschluss an diese Auswertung.

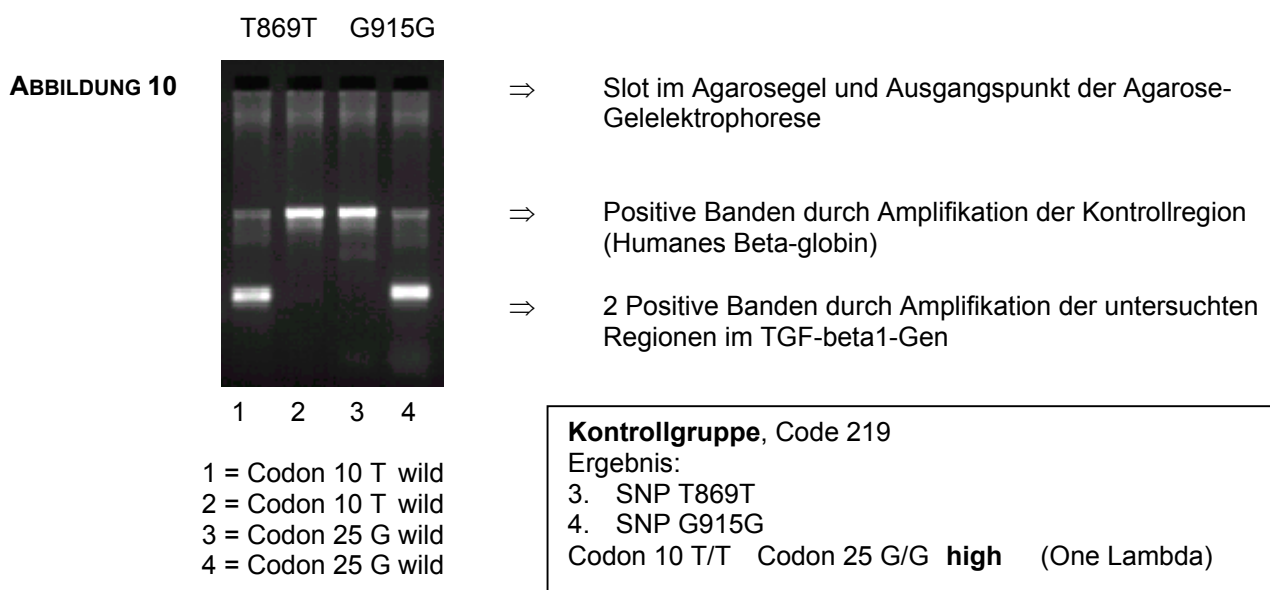
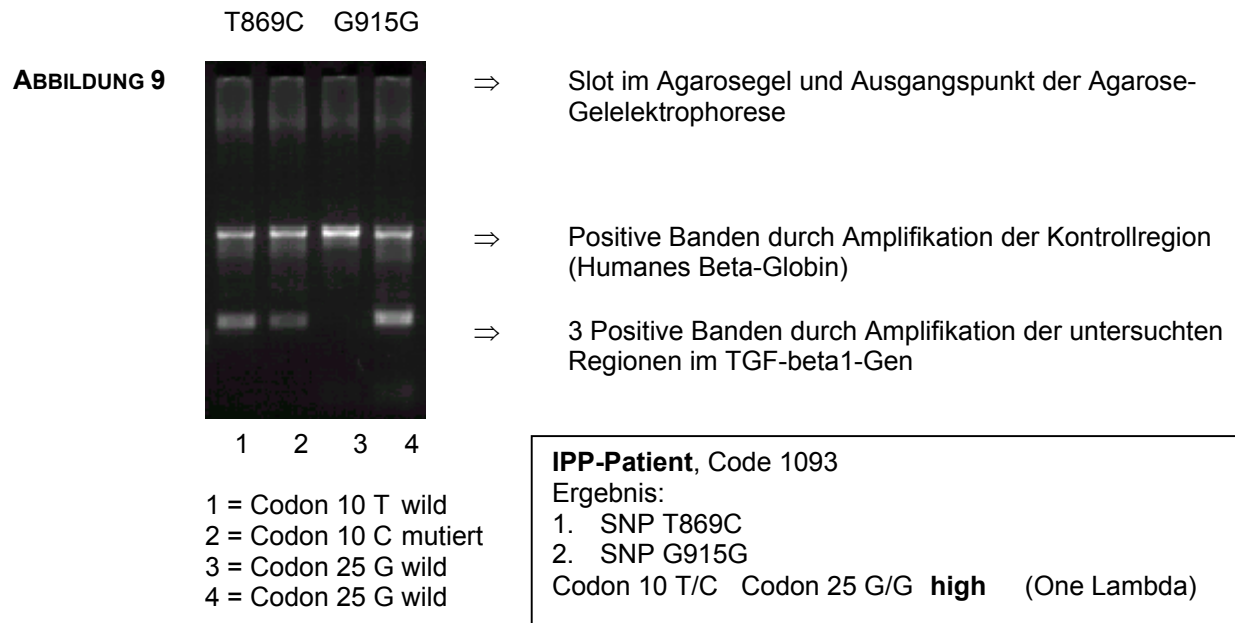
SNP		T869C		G915C	
Spezifität		TGF-beta1 Codon 10	TGF-beta1 Codon 10	TGF-beta1 Codon 25	TGF-beta1 Codon 25
		T	C	C	G
TGF-beta1	T/T G/G (high)				
	T/T G/G (high)				
	T/C G/C (intermediate)				
	C/C G/G (intermediate)				
	T/T G/C (intermediate)				
	C/C G/C (low)				
	C/C C/C (low)				
	T/T C/C (low)				
	T/C C/C (low)				

ZUR BESSEREN ÜBERSICHT IST IN DER TABELLE 26 DER ANTEIL DER AUSWERTUNG DER TGF-BETA1-GENOTYPISIERUNG VOM GESAMTEN WORKSHEET DER FIRMA ONE LAMBDA SEPARAT DARGESTELLT.

Auf diesem Auswertungsbogen sind vier Spalten für die Analyse des Genotyps von TGF-beta1 vorgesehen. Zwei für den SNP T869C (Codon 10) und zwei für den SNP G915C (Codon 25). Diese beiden SNPs werden in der folgenden Auswertung nicht getrennt betrachtet. Durch die Kombination ihrer beiden Allele ergeben sich neun Variationsmöglichkeiten. Diese Variationen errechnen sich aus der Multiplikation der Kombinationsmöglichkeiten an der Stelle des Gens. Da für ein Allel drei Kombinationsmöglichkeiten vorhanden sind, ergeben sich 3^2 Varianten bei zwei betrachteten Punktmutationen. Diese Möglichkeiten werden unter High-, Intermediate- und Low-Producer eingeteilt. High-Producer sind die T869T oder T869C und gleichzeitig G915G. Die Intermediate-Producer sind T869T mit G915C, T869C mit G915C oder C869C mit G915G. Die restlichen vier Kombinationsmöglichkeiten werden als Low-Producer eingestuft (T869T und C915C, T869C und C915C, C869C und G915C, C869C und C915C). Anhand der TABELLE 26 wird die Auswertung deutlich. Wenn zum Beispiel in der Gelelektrophorese positive Banden für den SNP T869C bei C und für den SNP G915C ebenfalls bei C

erschieden, zeigt die Verbindungslinie der Kästchen auf den Haplotyp C869C und C915C. Dieser Phänotyp ist mit einer geringeren Expression von TGF-beta1 assoziiert und als Low-Producer kategorisiert.

Die Auswertung einer Gelelektrophorese erfolgte für die 111 IPP-Patienten und den 100 Personen der Kontrollgruppe in gleicher Weise und soll exemplarisch für jeweils eine Person aus einer Gruppe dargestellt werden.



IN DEN ABBILDUNGEN 9 UND 10 SIND BEISPIELE EINER AUSWERTUNG DER TGF-BETA1 GENOTYPISIERUNG ANHAND EINES IPP-PATIENTEN UND ANHAND EINER PERSON DER KONTROLLGRUPPE AUFGEZEIGT.

TGF-beta1 der SNP T869C und G915C

		T869T G915G (high)	T869C G915G (high)	T869C G915C (intermediate)	C869C G915G (intermediate)	C869C G915C (low)	C869C G915C (low)	Gesamt
Gruppe	IPP-Patienten	40	42	8	17	3	1	
	Kontrollgruppe	33	35	14	11	7	0	100
Gesamt		73	77	22	28	10	1	211

IN DER TABELLE 27 IST DIE HAPLOTYPENANALYSE DER TGF-BETA1 GENOTYPISIERUNG DARGESTELLT. SECHS DER NEUN MÖGLICHEN KOMBINATIONEN KAMEN VOR. DIE TABELLE ZEIGT VERGLEICHEND DIE WERTE DER IPP-PATIENTEN UND DER KONTROLLGRUPPE. INSGESAMT WURDEN 211 PERSONEN TYPISIERT.

Mit einem p-Wert von 0,281 ergibt sich für die Allelkombinationen der High-, Intermediate- und Low-Producer kein signifikanter Unterschied zwischen den IPP-Patienten und dem Kontrollkollektiv.

In einer zweiten Betrachtungsweise wurde jeder der beiden untersuchten SNPs getrennt analysiert. Die Auswertung in SPSS 10.0 gliederte sich bei dieser Analyse in die Statistik des SNP T869C und in die des SNP G815C. Bisher konnte keine Assoziation der Proteinproduktion von TGF-beta1 und diesen beiden SNPs in Verbindung gebracht werden. Auch bei dieser Darstellung wird ergänzend die Aminosäureposition des jeweiligen SNPs mit aufgeführt. In den TABELLEN 28 UND 29 sind die Häufigkeiten der SNP-Varianten in absoluten Zahlen angegeben. Die prozentualen Angaben folgen in TABELLE 30.

Bei dem Vergleich der SNP-Varianten des SNP T869C von 111 IPP-Patienten mit denen von 100 gesunden Knochenmarkspendern zeigten sich weder bei dem homozygoten Wildtyp (G869G) noch bei den mutierten Varianten (heterozygot = G869C, homozygot-mutiert = C869C) signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen.

TGF-beta1 SNP T869C

	T869T	T869T	C869C	Gesamt
Gruppe IPP-Patienten	40	50	21	111
Kontrollgruppe	33	49	18	100
Gesamt	73	99	39	211

IN DER TABELLE 28 SIND DIE HÄUFIGKEITEN DER SNP-VARIANTEN (HOMOZYGOT-WILD, HETEROZYGOT UND HOMOZYGOT-MUTIERT) DER SNPs T869C BEI IPP-PATIENTEN IM VERGLEICH ZU DENEN DER KONTROLLGRUPPE STATISTISCH DARGESTELLT.

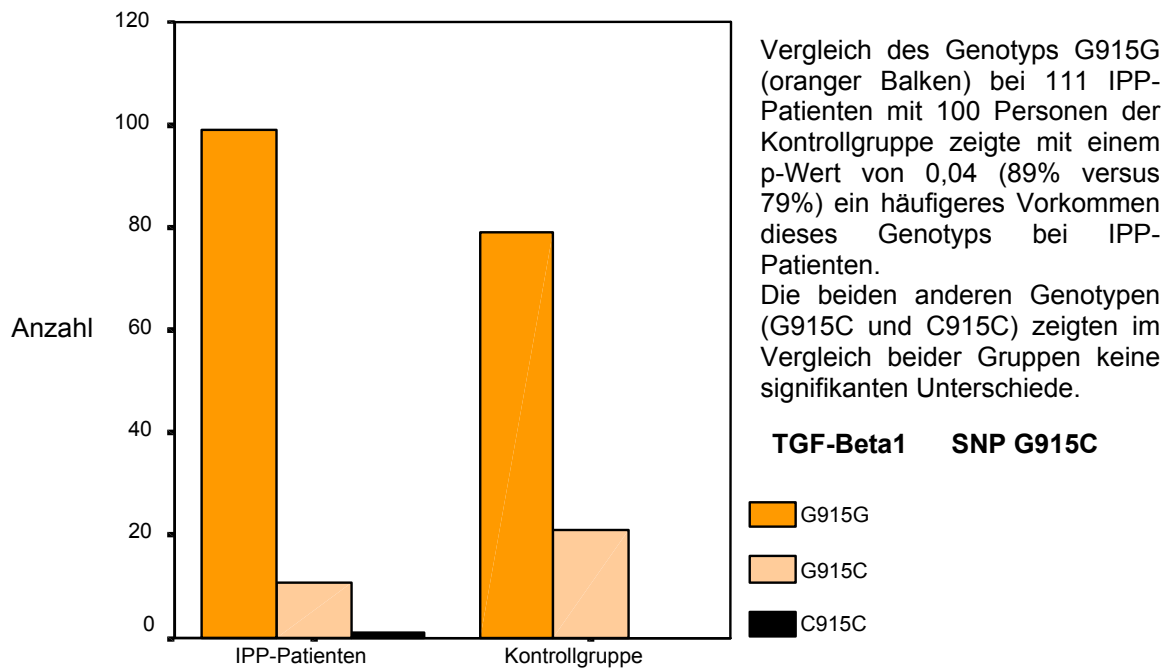
Bei dem Vergleich der SNP-Varianten des SNP G915C mit der gleichen Anzahl von untersuchten Personen gab es die Besonderheit, dass der homozygot-mutierte Typ dieses SNP (C915C) nur einmal bei der Patientengruppe und gar nicht bei den Kontrollen auftrat. Um eine aussagekräftige statistische Analyse machen zu können, wurde dieser Fall zu den Häufigkeiten der heterozygoten Fälle hinzu gerechnet. Die statistische Auswertung zeigte mit einem p-Wert von 0,04 ein häufigeres Vorkommen der homozygoten Wildvariante bei dem Kollektiv der 111 IPP-Patienten.

TGF-beta1 SNP G915C

	G915G	G915C	C915C	Gesamt
Gruppe IPP-Patienten	99	11	1	111
Kontrollgruppe	79	21	0	100
Gesamt	178	32	1	211

IN DER TABELLE 29 SIND DIE HÄUFIGKEITEN DER SNP-VARIANTEN (HOMOZYGOT-WILD, HETEROZYGOT UND HOMOZYGOT-MUTIERT) DER SNPs G915C BEI IPP-PATIENTEN IM VERGLEICH ZU DENEN DER KONTROLLGRUPPE STATISTISCH DARGESTELLT.

89% der IPP-Patienten hatten das Genotypisierungsergebnis G915G, im Gegensatz dazu nur 79% der Personen aus der Kontrollgruppe. Der Vergleich der zusammengefassten Varianten mit einem oder beiden mutierten Allelen (G915C = heterozygot und C915C = homozygot-mutierte) bei IPP-Patienten zeigte keine signifikanten Unterschiede zu der Kontrollgruppe.



DIE ABBILDUNG 11 ZEIGT DIE HÄUFIGKEITEN DER VERSCHIEDENEN SNP-VARIANTEN BEI IPP-PATIENTEN AN DER POSITION +915 IM VERGLEICH ZU DEM KONTROLLKOLLEKTIV IN FORM EINES BALKENDIAGRAMMS. DIE SELTEN HOMOZYGOT-MUTIERTE VARIANTE IST NOCH MIT EINGEFÜGT, IN DER ABSCHLIEßENDEN STATISTIK ABER DER HETEROZYGOTEN KATEGORIE ZUGEORNET.

Abschließend sind in der TABELLE 30 die Ergebnisse aus den Genotypisierungen beider untersuchten SNPs des TGF-beta1 Gens zusammengefasst. Die Angaben der Häufigkeiten sind in Prozent ausgedrückt und zeigen den Frequenzunterschied des G915G Genotyps der 111 IPP-Patienten im Vergleich zu den 100 gesunden Knochenmarkspendern mit einem p-Wert von 0,04.

TGF-beta1 SNPs		Anzahl IPP-Patienten (%)	Anzahl Kontrollen (%)	p-Wert (2-seitiger Chi- Quadrat-Test)
T869C (Codon 10)				
1. Homozygot	Wildtyp (Genotyp C/C)	36	33	n.s.
2. Mutationen	(Genotyp T/C oder T/T)	64	67	n.s.
Total		111	100	
G915C (Codon 25)				
1. Homozygot	Wildtyp (Genotyp G/G)	89	79	0,04
2. Mutationen	(Genotyp G/C oder C/C)	11	21	n.s.
Total		111	100	

IN DER TABELLE 30 SIND DIE HÄUFIGKEITEN DER SNP-VARIANTEN (HOMOZYGOT-WILD, HETEROZYGOT UND HOMOZYGOT-MUTIERT) DER SNPs T869C UND G915C BEI IPP-PATIENTEN IM VERGLEICH ZU DENEN DER KONTROLLGRUPPE STATISTISCH DARGESTELLT.

Die Untersuchung der einzelnen Allelfrequenzen der beiden SNPs (T869C und G915C) zeigte im Vergleich der IPP-Patienten mit dem Kontrollkollektiv keine signifikanten Unterschiede. Eine erhöhte Frequenz des homozygoten Wildtyps bei Patienten mit IPP konnte im Vergleich zu der Kontrollgruppe aufgezeigt werden.

Analog der HLA-Genotypisierung wurde eine separate Statistik für das Kollektiv von IPP-Patienten, die gleichzeitig an M. Dupuytren erkrankt sind, im Vergleich zu der Kontrollgruppe durchgeführt. Dieses Kollektiv bestand aus 32 IPP-Patienten. Die statistische Auswertung der TGF-beta1 Genotypisierungsergebnisse erfolgte analog der Berechnungen für das gesamte Patientengut. Sowohl in den Haplotypfrequenzen, als auch in den Frequenzen der einzelnen SNPs und Allelen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen IPP-Patienten mit M. Dupuytren und dem Kontrollkollektiv aus 100 gesunden Knochenmarkspendern.

Zur weiteren Verifizierung der Ergebnisse wurde überprüft, ob das Hardy-Weinberg-Equilibrium gegeben ist. Für den SNP T869C wurde ein p-Wert (pearson) von 0,98 errechnet. Der p-Wert des SNP G915C lag nach dieser Berechnung bei 0,24. Bei einem p-Wert von $> 0,05$ gilt das Hardy-Weinberg-Equilibrium als gegeben und das

Versuchsergebnis als gültig. Zur Veranschaulichung der Statistiken beider SNPs wurden die Berechnungen graphisch im *de Finetti-Diagramm* dargestellt. Sowohl die blauen Geraden (IPP-Patienten), als auch die grauen Geraden (Kontrollgruppe) liegen bei dieser Berechnung auf der Parabel. Dies trifft für den SNP T869C genauso zu wie für den SNP G915C und verdeutlicht die errechnete Gültigkeit des Hardy-Weinberg-Equilibriums.

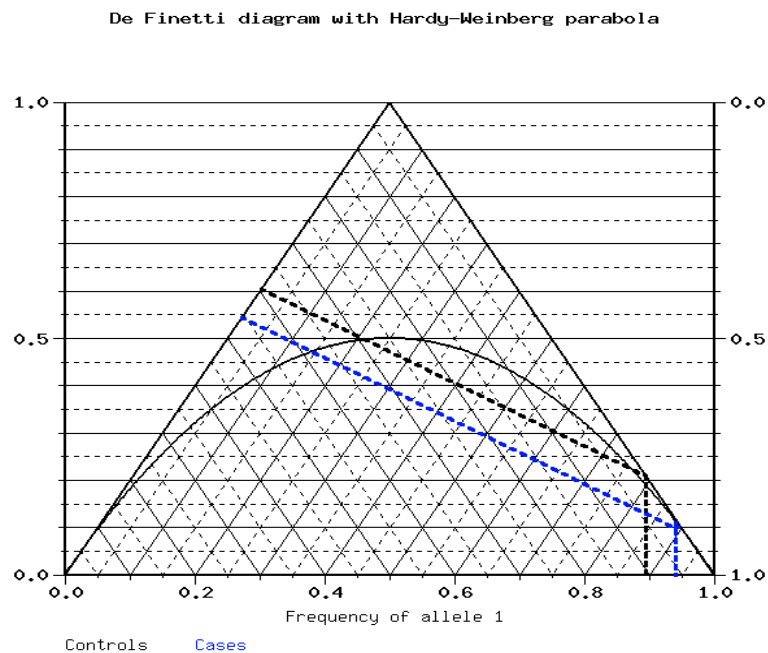
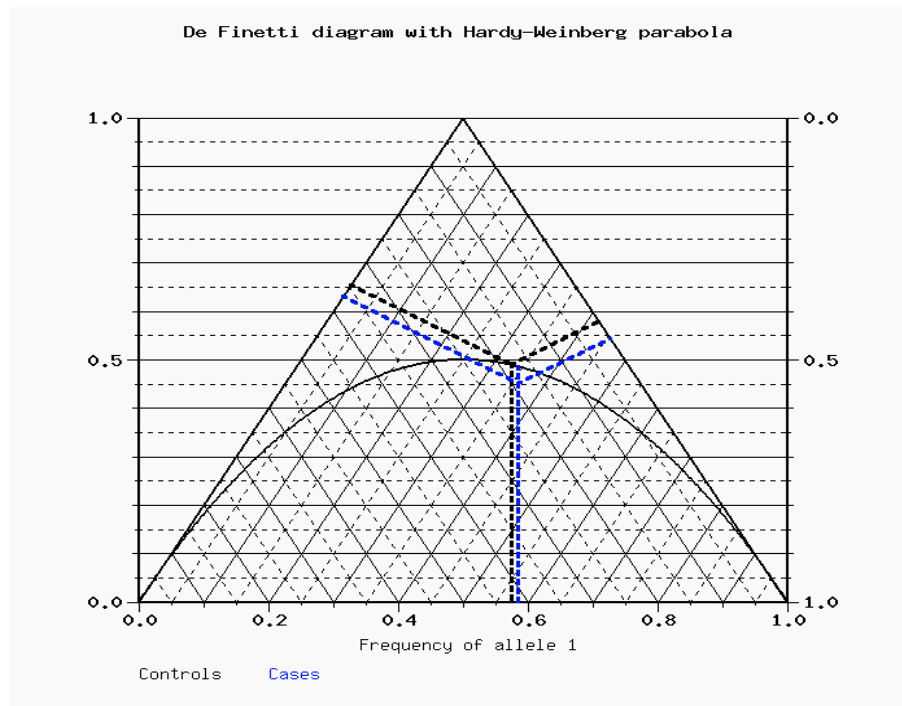


ABBILDUNG 12 ZEIGT DAS HARDY-WEINBERG-EQUILIBRIUM IN FORM DES DE FINETTI DIAGRAMMS FÜR DEN SNP G915C.



DIE ABBILDUNGEN 12 UND 13 VERANSCHAULICHEN DIE GÜLTIGKEIT DES HARDY-WEINBERG-EQUILIBRIUMS. SOWOHL DIE BLAUEN GERADEN (IPP-PATIENTEN) ALS AUCH DIE GRAUEN GERADEN (KONTROLLGRUPPE) LIEGEN BEI DIESER BERECHNUNG AUF DER PARABEL. DIES TRIFFT FÜR DEN SNP T869C GENAUSO ZU WIE FÜR DEN SNP G915C.

Zum Abschluss der Auswertung der TGF-beta1 Genotypisierung wurde überprüft, ob ein Zusammenhang zwischen den beiden beobachteten SNPs zu finden ist. Eine mögliche Kopplung der SNPs T869C und G915C wurde mit Hilfe von Allelfrequenzen der möglichen Locuspaarungen bei IPP-Patienten mit den Frequenzen derselben Paarungen bei der Kontrollgruppe verglichen.

Es zeigten sich keine signifikanten Differenzen der Frequenzen von Locuspaarungen zwischen den 111 IPP-Patienten und den 100 Kontrollen. Ein Zusammenhang der beiden SNPs kann somit nicht begründet werden.

Die statistischen Auswertungen der Zytokine TNF-Alpha, Interferon-Gamma, Interleukin-6 und Interleukin-10. erfolgten analog der TGF-beta1-Genopolymorphismusanalyse. Die statistischen Analysen der High-, Intermediate- und Low-Producer jedes untersuchten Zytokins, sowie die einzelnen Auswertungen der jeweiligen SNPs zeigten keine Unterschiede zwischen den IPP-Patienten und den Kontrollen.

4.5. Alpha-1-Antitrypsin (AAT)

Die Messung von Alpha-1-Antitrypsin-Serumspiegeln sowie die AAT-Genotypisierung erfolgte bei insgesamt 192 IPP-Patienten. Bei 94 Patienten wurden Serumspiegel ermittelt und bei 100 (Mutationen S und Z) bzw. 141 Patienten (Mutationen M2 und M3, sowie SNPs T-395A und G6118A) eine Genotypisierung durchgeführt. Beide Untersuchungen erfolgten an einem Kollektiv von 43 Patienten aus den beiden oben genannten Gruppen.

4.5.1. Serumspiegel

Die Ergebnisse der Serumspiegelbestimmung von Alpha-1-Antitrypsin bei 94 Patienten mit IPP wurde mit denen von 134 gesunden männlichen Knochenmarkspendern verglichen. Die bei der Messung der IPP-Patienten erhaltenen Alpha-1-Antitrypsin Serumwerte lagen bei 91 Fällen im Normbereich. Ein Wert (1,1%) lag darüber und zwei (2,1%) hatten Werte unterhalb der von der Firma Behring angegebenen Spannbreite. Die Ergebnisse des Kontrollkollektivs von 134 männlichen Knochenmarkspendern zeigte folgende Verteilung der Serumwerte. Zwei Personen aus der Kontrollgruppe zeigten Werte über 2,0 g/l. Dies entspricht 1,5%. Bei 5 männlichen Knochenmarkspendern (3,7%) wurden Werte unter 0,9 g/l gemessen.

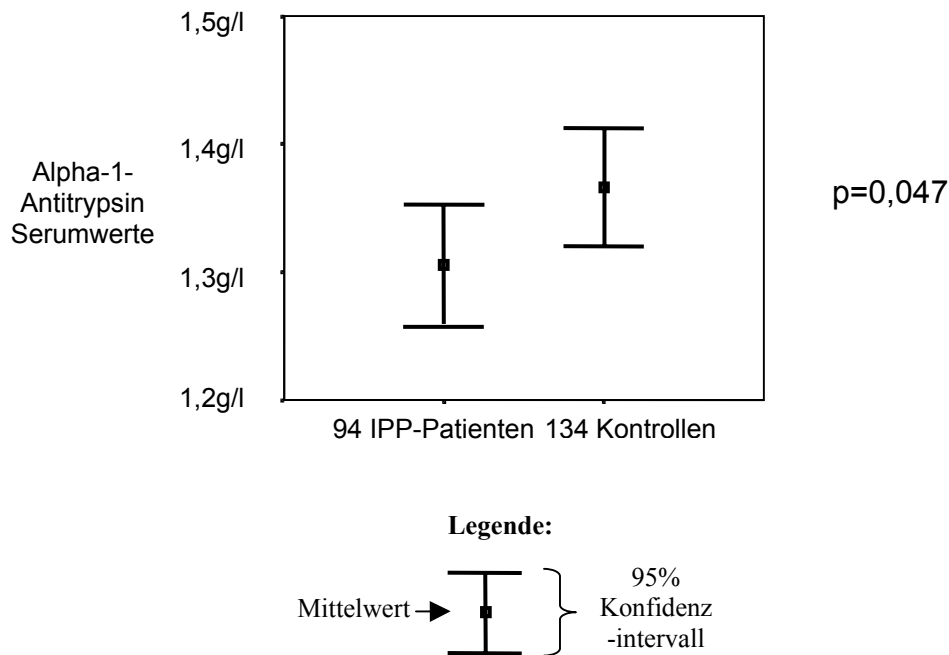
Der Mittelwert lag bei 1,3058 g/l (+/- 0,2268) bei Patienten mit IPP im Gegensatz zu einem Wert von 1,3662 g/l (+/- 0,2694) der Kontrollgruppe.

	N	Mittelwert	σ	Median	Min.	Max.	Spannweite
IPP-Patienten	94	1,3058	0,2268	1,3100	0,70	2,04	1,34
Kontrollgruppe	134	1,3661	0,2694	1,3800	0,55	2,32	1,77

TABELLE 31 ZEIGTE DIE DESKRIPTIVE AUSWERTUNG DER ALPHA-1-SERUMWERTE VON IPP-PATIENTEN UND 134 KONTROLLEN. GEZEIGT SIND DIE MITTELWERTE, DIE STANDARDABWEICHUNG, DER MEDIAN, DIE SPANNWEITE, SOWIE DIE MAXIMAL- UND MINIMALWERTE.

Die Mittelwerte und der Median der Alpha-1-Antitrypsin Serumspiegelmessungen beider Gruppen liegen dicht beieinander und zeigen somit die Homogenität der verschiedenen Kollektive auf.

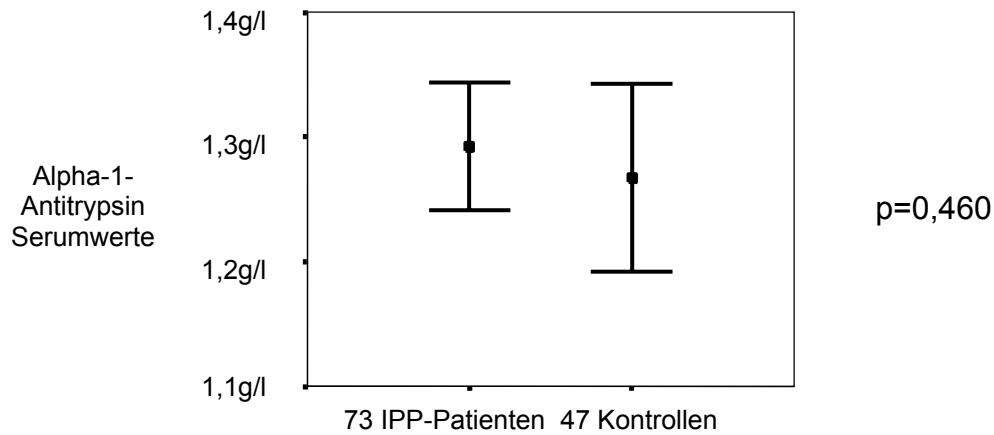
Unter Verwendung des Mann-Whitney-U-Testes mit SPSS 10.0 zeigten sich beim Vergleich der Alpha-1-Antitrypsin Serumspiegel von 94 Patienten und 134 Kontrollen signifikant erniedrigte Werte bei IPP-Patienten ($p=0,047$).



DIE ABBILDUNG 14 ZEIGT DEN VERGLEICH DER ALPHA-1-ANTITRYPSIN SERUMSPIEGEL VON 94 PATIENTEN MIT IPP UND 134 GESUNDEN MÄNNLICHEN KNOCHENMARKSPENDERN. DIE GEMESSENEN WERTE SIND BEI IPP-PATIENTEN MIT EINEM P-WERT VON 0,047 SIGNIFIKANT ERNIEDRIGT. DIE UNTERSCHIEDLICHE ALTERSSTRUKTUR BEIDER KOLLEKTIVE WURDE BEI DIESER ANALYSE NICHT BERÜCKSICHTIGT (MEDIAN, 5 UND 95% PERZENTILE, T-TEST P-WERT = 0,047).

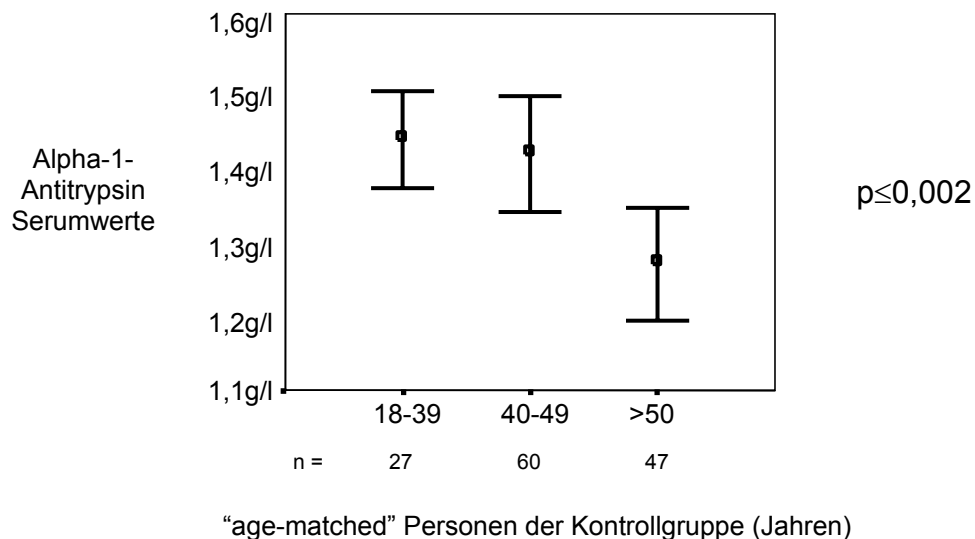
Die Altersstruktur der IPP-Patienten zeigte im Vergleich zu dem Kollektiv von gesunden Knochenmarkspendern große Unterschiede. Bei Mittelwerten von 55,2 Jahren bei Patienten mit IPP und 46,3 Jahren bei dem Kontrollkollektiv bedeutet dies einen signifikanten Unterschied des durchschnittlichen Alters. Die Einteilung in Subgruppen erfolgte für Patienten und Kontrollen in gleicher Weise. In die Alterskategorie 1 wurden Personen zwischen 18 und 39 Jahren eingeteilt. Die Alterskategorie 2 waren Patienten und Kontrollen vom 40.– 49. Lebensjahr und Alterskategorie 3 Personen über 50 Jahre. Beim Vergleich von Alpha-1-Antitrypsin Serumspiegel zwischen allen Gruppen gleicher Altersverteilung zeigten sich keine signifikanten Differenzen mehr. Als Beispiel ist im Folgenden die Auswertung der

Alpha-1-Antitrypsin Serumspiegel bei Patienten und Kontrollen der Alterskategorie 3 graphisch dargestellt.



IN DER ABBILDUNG 15 SIND DIE ALPHA-1-ANTITRYPSIN SERUMSPIEGEL VON 73 PATIENTEN MIT IPP UND 47 GESUNDEN MÄNNLICHEN KNOCHENMARKSPENDERN VERGLEICHEND DARGESTELLT. BEIDE SUBGRUPPEN WURDEN DER ALTERSKATEGORIE 3 (ERKRANKUNGSALTER >50 JAHRE) ZUGETEILT. DIE GEMESSENEN WERTE ZEIGEN MIT EINEM P-WERT VON 0,460 KEINEN SIGNIFIKANTEN UNTERSCHIED (MEDIAN, 5 UND 95% PERZENTILE, T-TEST P-WERT = 0,460).

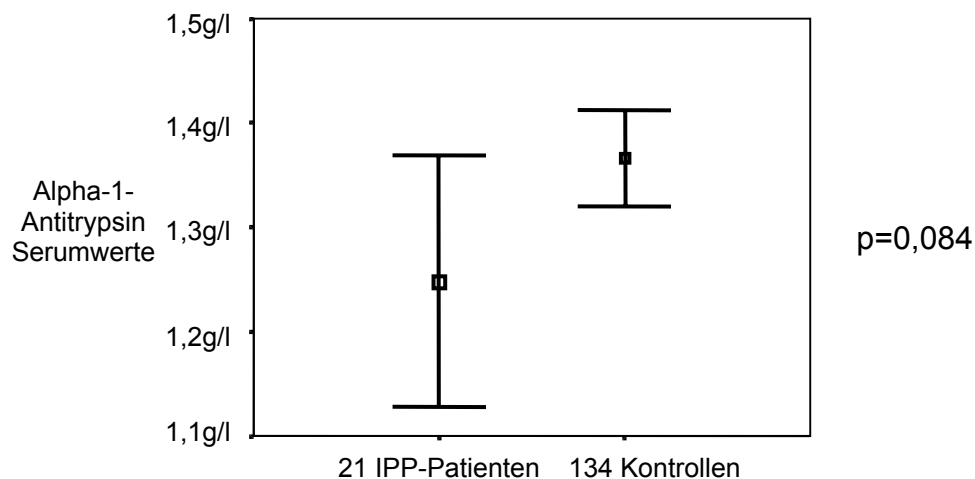
Nach Erkenntnis der Auswirkung des Alters auf die Alpha-1-Antitrypsin Serumspiegel wurden die Werte des Kontrollkollektivs der einzelnen Alterskategorien untereinander verglichen. Die Auswertung erfolgte unter Verwendung des Kruskal-Wallis Testes. Das Ergebnis zeigte bei dem Kontrollkollektiv einen mit zunehmendem Alter abfallenden Serumspiegel von Alpha-1-Antitrypsin.



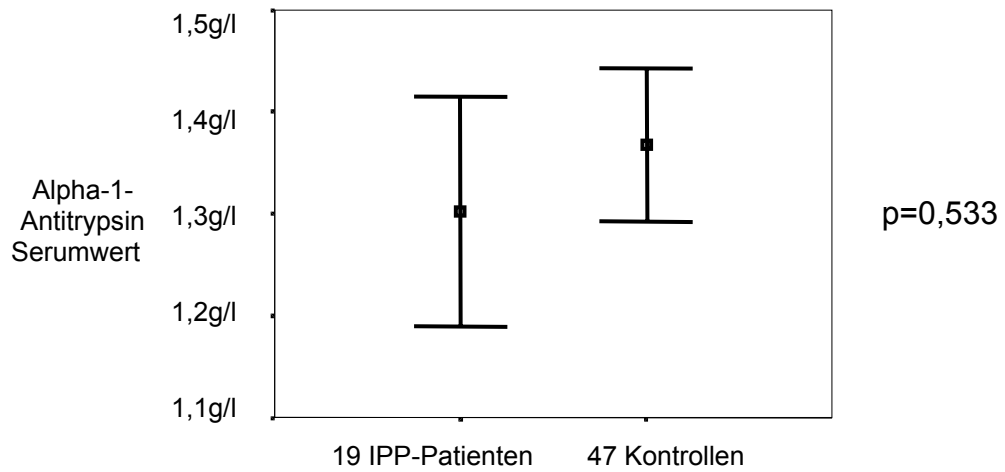
IN DER ABBILDUNG 16 SIND DIE ALPHA-1-ANTITRYPSIN SERUMSPIEGEL VON 134 MÄNNLICHEN KNOCHENMARKSPENDERN IN ABHÄNGIGKEIT DES ALTERS DARGESTELLT. MIT EINEM P-WERT VON $p < 0,002$ KONNTE EIN MIT ZUNEHMENDEM ALTER SIGNIFIKANT ABFALLENDER ALPHA-1-ANTITRYPSIN SERUMSPIEGEL AUFGEZEIGT WERDEN (MEDIAN, 5 UND 95% PERZENTILE, T-TEST P-WERT $\leq 0,002$).

Da sich 73 von 94 IPP-Patienten in der Alterskategorie 3 befanden, wurde auf eine Darstellung der Auswirkung des Alters auf die Serumspiegel für Patienten mit Induratio penis plastica verzichtet. Bei 43 Patienten wurde sowohl der Serumspiegel von Alpha-1-Antitrypsin gemessen als auch eine Bestimmung der Genvarianten durchgeführt. Die Analyse der Serumspiegel zeigte im Vergleich zu den Daten des Kontrollkollektivs keine signifikanten Differenzen. Eine alterskorrelierte Analyse der Serumspiegel wurde daher bei diesem Kollektiv nicht durchgeführt.

Von den 94 Patienten mit IPP, die in dieser Studie untersucht wurden, waren 21 gleichzeitig an einem M. Dupuytren erkrankt. Die Alpha-1-Antitrypsin Serumwerte dieser Subgruppe von IPP-Patienten wurde in gleicher Weise wie das Gesamtkollektiv mit den Werten der Kontrollgruppe aus 134 gesunden Knochenmarkspendern verglichen. Mit einem p-Wert von 0,084 konnte kein signifikanter Unterschied von Alpha-1-Antitrypsin Serumwerten von dieser Subgruppe und den Kontrollen festgestellt werden. Analog dazu sind die Ergebnisse dieser beiden Gruppen in der Alterskategorie 3 (Erkrankungsalter über 50 Jahre) in der Abbildung 18 aufgezeigt. Bei 19 Patienten und 47 Kontrollen zeigt sich ein p-Wert von 0,533.



DIE ABBILDUNG 17 ZEIGT DIE ALPHA-1-ANTITRYPSIN SERUMSPIEGEL VON 21 IPP-PATIENTEN MIT M. DUPUYTREN IM VERGLEICH ZU DEN SERUMWERTEN DES KOLLEKTIVS AUS 134 GESUNDEN KNOCHENMARKSPENDERN. MIT EINEM P-WERT VON 0,084 KONNTE KEIN SIGNIFIKANTER UNTERSCHIED DER WERTE ZWISCHEN DIESEN BEIDEN GRUPPEN FESTGESTELLT WERDEN (MEDIAN, 5 UND 95% PERZENTILE, T-TEST P-WERT = 0,084).



DIE ABBILDUNG 18 ZEIGT DIE ALPHA-1-ANTITRYPSIN SERUMSPIEGELVERTEILUNG VON 19 PATIENTEN MIT IPP UND M. DUPUYTREN IM VERGLEICH ZU 47 GESUNDEN MÄNNLICHEN KNOCHENMARKSPENDERN. BEIDE SUBGRUPPEN WURDEN DER ALTERSKATEGORIE 3 (ERKRANKUNGSALTER >50 JAHRE) ZUGETEILT. DIE GEMESSENEN WERTE ZEIGEN MIT EINEM P-WERT VON 0,533 KEINEN SIGNIFIKANTEN UNTERSCHIED (MEDIAN, 5 UND 95% PERZENTILE, T-TEST P-WERT = 0,533).

4.5.2. Genotypisierung

Zur weiteren Abklärung eines möglichen Zusammenhangs zwischen Alpha-1-Antitrypsin und der IPP wurde bei 100 (Mutationen S und Z) bzw. 141 Patienten (SNPs M2 und M3, sowie SNPs T-395A und G6118A) eine Genotypisierung durchgeführt. Diese Untersuchungen erfolgten unabhängig von den Ergebnissen der Alpha-1-Antitrypsin-Serumspiegelbestimmung. Alle typisierten Varianten zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patienten mit Induratio penis plastica und den Kontrollen. Beim Vergleich von Patienten mit IPP und den Kontrollen wurde die Verteilung der homozygot-wild, heterozygot und homozygot-mutierten Varianten gemeinsam unter Anwendung des Chi-Quadrat-Testes verglichen. Die detaillierten Daten sind in den TABELLEN 32- 35 aufgeführt.

TABELLE 32.

		SNP T-395A			
		HOMOZYGOT- WILD TYP	HETEROZYGOT	HOMOZYGOT- MUTIERT	GESAMT
PATIENTEN	ANZAHL	81	50	8	139
	%	58.3	36.0	5.8	100
KONTROLLEN	ANZAHL	68	26	6	100
	%	68	26	6	100

P=0,258 (CHI-QUADRAT-TEST DER VARIANTEN DES SNP T-395A)

TABELLE 33.

		SNP M2			
		HOMOZYGOT- WILD TYP	HETEROZYGOT	HOMOZYGOT- MUTIERT	GESAMT
PATIENTEN	ANZAHL	89	50	2	141
	%	63.1	35.5	1.4	100
KONTROLLEN	ANZAHL	65	30	5	100
	%	65	30	5	100

P=0,208 (CHI-QUADRAT-TEST DER VARIANTEN DES SNP M2)

TABELLE 34.

SNP M3

		HOMOZYGOT- WILD TYP	HETEROZYGOT	HOMOZYGOT- MUTIERT	GESAMT
PATIENTEN	ANZAHL	74	54	12	140
	%	52.9	38.6	8.6	100
KONTROLLEN	ANZAHL	49	43	7	99
	%	49.5	43.4	7.1	100

P=0,730 (CHI-QUADRAT-TEST DER VARIANTEN DES SNP M3)

TABELLE 35.

SNP G6118A

		HOMOZYGOT- WILD TYP	HETEROZYGOT	HOMOZYGOT- MUTIERT	GESAMT
PATIENTEN	ANZAHL	115	19	1	135
	%	85.2	14.1	0.7	100
KONTROLLEN	ANZAHL	84	16	-	100
	%	84	16	-	100

P=0,640 (CHI-QUADRAT-TEST DER VARIANTEN DES SNP G6118A)

IN DEN TABELLEN 32-35 SIND DIE ERGEBNISSE DER ALPHA-1-ANTITRYPSIN GENOTYPISIERUNG DARGESTELLT. BEIM VERGLEICH VON PATIENTEN MIT IPP UND DEN KONTROLLEN WURDE DIE VERTEILUNG DER HOMOZYGOT-WILD, HETEROZYGOT UND HOMOZYGOT-MUTIERTEN VARIANTEN GEMEINSAM UNTER ANWENDUNG DES CHI-QUADRAT-TESTES VERGlichen. FÜR KEINEN DER VIER TYPISIERTEN SNPs ZEIGTEN SICH SIGNIFIKANTE UNTERSCHIEDE IN DEN FREQUENZEN.

Die Typisierung der S- und Z-Mutationen des Alpha-1-Antitrypsin Gens zeigte ein seltenes Vorkommen beider Varianten bei Patienten mit IPP. Die S-Mutation kam in dem Kollektiv in 3,88% vor, die Z-Mutation in 1,46%.

Für eine Subgruppe aus 38 IPP-Patienten, die auch an einem M. Dupuytren erkrankten, wurden die statistischen Analysen zu den SNPs der 5´-Region (T-395A), der Exons (M2 und M3) und der 3´-Region (G6118A) analog durchgeführt. Wie schon bei den Ergebnissen des gesamten Kollektivs von Patienten bestand kein Unterschied zu den Daten des Kontrollkollektivs. Die detaillierten Ergebnisse sind in den TABELLEN 36 - 39 aufgeführt.

TABELLE 36.

		SNP T-395A			
		HOMOZYGOT- WILD TYP	HETEROZYGOT	HOMOZYGOT- MUTIERT	GESAMT
PATIENTEN	ANZAHL	24	13	1	38
	%	63,2	34,2	2,6	100
KONTROLLEN	ANZAHL	68	26	6	100
	%		26	6	100

P=0,504 (CHI-QUADRAT-TEST DER VARIANTEN DES SNP T-395A)

TABELLE 37.

		SNP M2			
		HOMOZYGOT- WILD TYP	HETEROZYGOT	HOMOZYGOT- MUTIERT	GESAMT
PATIENTEN	ANZAHL	23	14	-	37
	%	62,2	37,8	-	100
KONTROLLEN	ANZAHL	65	30	5	100
	%	65	30	5	100

P=0,301 (CHI-QUADRAT-TEST DER VARIANTEN DES SNP M2)

TABELLE 38.

		SNP M3			
		HOMOZYGOT- WILD TYP	HETEROZYGOT	HOMOZYGOT- MUTIERT	GESAMT
PATIENTEN	ANZAHL	19	16	2	37
	%	51,4	43,2	5,4	100
KONTROLLEN	ANZAHL	49	43	7	99
	%	49.5	43.4	7.1	100

P=0,936 (CHI-QUADRAT-TEST DER VARIANTEN DES SNP M3)

TABELLE 39.

		SNP G6118A			
		HOMOZYGOT- WILD TYP	HETEROZYGOT	HOMOZYGOT- MUTIERT	GESAMT
PATIENTEN	ANZAHL	29	8	-	37
	%	78,4	21,6	-	100
KONTROLLEN	ANZAHL	84	16	-	100
	%	84	16	-	100

P=0,442 (CHI-QUADRAT-TEST DER VARIANTEN DES SNP G6118A)

IN DEN TABELLEN 36- 39 SIND DIE ERGEBNISSE DER ALPHA-1-ANTITRYPSIN GENOTYPISIERUNG BEI IPP-PATIENTEN MIT M. DUPUYTREN IM VERGLEICH ZU EINEM KOLLEKTIV AUS GESUNDEN KNOCHENMARKSPENDERN DARGESTELLT. BEIM VERGLEICH VON PATIENTEN MIT IPP UND DEN KONTROLLEN WURDEN HOMOZYGOTE-WILDE, HETEROZYGOTE UND HOMOZYGOT-MUTIERTE VARIANTEN GEMEINSAM UNTER ANWENDUNG DES CHI-QUADRAT-TESTES VERGLEICHEN. FÜR KEINEN DER VIER TYPISIERTEN SNPs ZEIGTEN SICH SIGNIFIKANTE UNTERSCHIEDE IN DEN FREQUENZEN.

5. Diskussion

5.1. Basisdaten und Koinzidenz mit M. Dupuytren

Die bei Durchführung der Studien prospektiv erhobenen Daten der IPP-Patienten dienen zur Beschreibung und Charakterisierung des gesamten Kollektivs. Eine Auswahl von Parametern ist anamnestisch oder durch die klinische Untersuchung des Patienten erhoben worden. Die Zusammenstellung der Daten erfolgte in vergleichbarer Weise zu vorangegangenen Serien anderer Arbeitsgruppen [21, 47, 67, 101, 107]. Anhand dieser Daten kann die Repräsentativität des Kollektivs von IPP-Patienten, die in Studien unserer Arbeitsgruppe eingeschlossen wurden, aufgezeigt werden. Die Kollektivgröße von IPP-Patienten variierte zwischen der Alpha-1-Antitrypsin-, HLA- und der TGF-beta1-Studie, da Planung und Ausführung dieser drei Untersuchungen zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt wurden. In die Alpha-1-Antitrypsin-Studie wurde das gesamte Kollektiv von IPP-Patienten mit einbezogen. Die Schnittmenge der Patienten, bei denen die Alpha-1-Antitrypsin-Spiegelmessung sowie die Alpha-1-Antitrypsin-Genotypisierung durchgeführt wurde, beinhaltet 43 Patienten. Bezogen auf das gesamte Kollektiv von 192 IPP-Patienten werden im Folgenden die verschiedenen Parameter im Einzelnen diskutiert.

- 1. Alter:** In früheren Studien mit 142 [118], 182 [126] und 307 [67] IPP-Patienten wurde das Durchschnittsalter mit 57,4 Jahren [118], 50,9 Jahren [126] bzw. 52,8 Jahren [67] angegeben. Das Durchschnittsalter des Patientenkollektivs dieser vorliegenden Arbeit liegt bei 53,7 Jahren. Das gesamte Kollektiv von 192 Patienten mit IPP ist hier mit eingeschlossen. Das Ergebnis zeigt keine signifikante Abweichung zu den vorangegangenen Studien. Für die Aussagefähigkeit einer Studie ist eine dem Patientenkollektiv altersentsprechende Kontrollgruppe von großer Bedeutung. Wie in der Alpha-1-Antitrypsin-Studie dargestellt, könnten ansonsten unzutreffende Ergebnisse über Zusammenhänge beider Kollektive zustandekommen.
- 2. Erkrankungsbeginn:** Vom Auftreten der ersten Symptome und der Diagnosestellung vergehen gerade wie bei einem Krankheitsbild der IPP oft viele Monate. Bis zur endgültigen Diagnosestellung liegt der Erkrankungsbeginn in dem Patientenkollektiv dieser Arbeit im Mittel 22 Monate zurück. In einer anderen

Studie kommen nur 34,3% der IPP-Patienten früher als sechs Monate nach Auftreten der ersten Symptome zur klinischen Untersuchung durch einen Arzt. An dieser Stelle sei noch einmal erwähnt, dass bis zur möglichen operativen Therapie der Patient über einen Zeitraum von mindestens zwölf Monaten schmerz- und progressionsfrei sein muß. Der Krankheitsverlauf ist somit in vielen Fällen von langer Dauer und für den einzelnen Patienten stark belastend.

- 3. Plaque:** Ein palpabler Plaque ist in den allermeisten Fällen der IPP-Patienten zu beobachten. In einer vorangegangenen Studie wurde ein Plaque in 103 von 106 IPP-Patienten beobachtet [21]. Dies entspricht einem Anteil von 97,2% [21]. Für manche Arbeitsgruppen ist der palpable Plaque ein Einschlusskriterium zur Diagnose der IPP [126]. In unserem Patientenkollektiv war in 98,4% der Fälle ein Plaque bei der klinischen Untersuchung palpabel. In den wenigen restlichen Fällen sind Deviation und Erektionsschmerz zu beobachten gewesen, so dass auch hier die Diagnose der IPP gestellt wurde. Eine genaue Aufgliederung der Anzahl der palpablen Plaques bei IPP-Patienten wurde in der Literatur bislang nicht aufgeführt. In der vorliegenden Arbeit hatten 80,7% der IPP-Patienten einen palpablen Plaque. Bei 15,1% waren bei der körperlichen Untersuchung zwei und bei 2,6% Patienten sogar drei Plaques palpabel.
- 4. Kalzifizierung der Plaque:** Der Nachweis eines Plaques ist bei einem großen Teil der Patienten mit IPP möglich [21]. Kalzifizierungen der Plaques wurden in einer vorangegangenen Studie bei 33% der untersuchten Patienten festgestellt [47]. Die Darstellung der Kalzifizierungen erfolgte in unserer Studie mit Hilfe der Sonographie, in der beschriebenen Serie von 66 Patienten mittels einer speziellen Röntgenmethode [47]. Der Vergleich beider Kollektive für diesen Parameter sind daher nur orientierend möglich.
- 5. Deviation:** In einer epidemiologischen Studie mit 134 IPP-Patienten wurde eine Deviation in 65% der Fälle beobachtet [101]. Die durchschnittliche Deviation lag in dieser Serie bei 35° [101]. Die in dieser Studie beobachtete maximale Deviation lag bei 60°, die geringste bei 10° [101]. Die Daten des Kollektivs unserer Arbeit zeigt eine ähnliche Verteilung. Die durchschnittlich gemessene Deviation liegt hier bei 45° mit einer maximal beobachteten Deviation von 100°. Die geringste Deviation in diesem Kollektiv von IPP-Patienten liegt bei 10°. Aufgrund unterschiedlicher Untersuchungsbedingungen sind geringe

Abweichungen in den Messergebnissen des Parameters Deviation zu vernachlässigen.

Signifikante Unterschiede bezüglich der Basisdaten Alter, Erkrankungsbeginn, Anzahl der Plaques, Kalzifizierung und Deviation zwischen den verschiedenen Subgruppen waren nicht zu beobachten. Die Aussagen über das gesamte Kollektiv von 192 IPP-Patienten können somit auf diese Untergruppen übertragen werden. Anhand dieser Daten kann bei dem Kollektiv von IPP-Patienten, die in unseren Studien eingeschlossen wurden, von einer repräsentativen Gruppe ausgegangen werden. Insgesamt entsprechen die Ergebnisse unserer Studie denen vorangegangener Studien.

6. Koinzidenz mit M. Dupuytren: Ein weiteres, häufig angeführtes Kriterium eines Kollektivs von Patienten mit IPP ist die Koinzidenz mit dem M. Dupuytren [21, 49, 54, 61, 67, 101, 107, 110, 114]. Bei Studien zur Ätiologie der IPP stehen Assoziationen zu Fibromatosen im Mittelpunkt der Diskussion. Eine Koinzidenz der IPP mit dem M. Dupuytren wurde in unterschiedlichen Serien beobachtet [21, 49, 54, 61, 107, 110, 114]. Der M. Dupuytren soll bei IPP-Patienten wesentlich häufiger als in der Normalbevölkerung auftreten [21, 49, 54, 61, 107, 110, 114]. Dies konnte in unserer Studie bestätigt werden, wobei in unserem Kollektiv von 192 Patienten eine Komorbidität der IPP mit dem M. Dupuytren in 25% der Fälle beobachtet worden ist. Ein gleichzeitiges Vorkommen dieser beiden Erkrankungen wurde in einer anderen Studie in 30,8% beobachtet [114]. In zwei weiteren Serien konnte nur eine Koinzidenz bei 1,0 [67] bzw. 2,2% [101] der Patienten festgestellt werden. Eine mögliche Erklärung für diese Differenzen ist die nachgewiesene unterschiedliche Prävalenz des M. Dupuytren in verschiedenen geographischen Regionen [19, 34]. Für die IPP sind solche epidemiologischen Daten uneinheitlich [19, 126]. Der Zusammenhang zwischen der IPP und dem M. Dupuytren könnte auf eine bislang unbekannte genetische Konstellation hindeuten. Eine autosomal dominant vererbte Form der IPP mit gleichzeitiger Assoziation zu dem M. Dupuytren wurde in einer Studie identifiziert [99]. Diese besondere genetische Veranlagung der Patienten könnte zu einer vermehrten Fibrose disponieren. Gemeinsamkeiten der Ätiopathogenese beider Erkrankungen erscheinen nach dieser Hypothese wahrscheinlich.

Familienstudien konnten in unserer Serie nicht durchgeführt werden. Trotz der Ähnlichkeiten beider Erkrankungen in der Altersprävalenz, dem Vorkommen einer Induration sowie das gemeinsame Antreffen der IPP und des M. Dupuytren zeigten sich gravierende Unterschiede in der Pathogenese und der Pathomorphologie [85]. Die Hypothese eines möglichen genetischen Zusammenhangs beider Erkrankungen wurde in dieser Studie angezweifelt [85]. Ein entscheidender Faktor dafür ist, dass Verkalkungen beim M. Dupuytren nicht zu beobachten sind [85]. Die IPP sollte daher nach dieser Einteilung nicht zu dem Formenkreis der Fibromatosen, zu denen der M. Dupuytren zählt, gerechnet werden [85]. Weiterführende Studien zur Koinzidenz beider Erkrankungen erscheinen sinnvoll. Eine besondere Bedeutung kommt den epidemiologischen Daten der Patienten und Kontrollen zu. Die familiäre Disposition sollte ebenso berücksichtigt werden.

5.2. HLA-Genotypisierung

HLA-Antigene sind immunologisch von großer Bedeutung. Als klassische Transplantationsantigene sind sie für die Unterscheidung von "körpereigen" und "körperfremd" verantwortlich [130, 139]. Für verschiedene HLA-Antigene wurden bereits Assoziationen zu Autoimmunerkrankungen beschrieben. Ein Beispiel für eine Erkrankung, die mit einem HLA-Antigen der Klasse I assoziiert ist, ist die ankylosierende Spondylitis mit dem HLA-B27 Antigen [130]. Für HLA-DR3, ein Antigen der Klasse II des HLA-Systems, existiert ein solcher Zusammenhang mit dem juvenilen Diabetes mellitus [130].

Aufgrund eines möglichen Zusammenhangs von lokalisierten fibrotischen Veränderungen mit HLA-B27 [147] wurde eine autoimmune Genese bei der IPP diskutiert. Zehn Arbeitsgruppen versuchten bisher eine mögliche Assoziation der IPP mit Antigenen des HLA-Systems aufzuzeigen [11, 31, 74, 93, 99, 110, 113, 114, 146, 150]. Ein besonderes Augenmerk galt der B7-kreuzreagierenden Gruppe, welches unter anderem das HLA-B27 Antigen beinhaltet. Fünf Studien postulierten einen signifikanten Zusammenhang der IPP mit dieser Gruppe [11, 99, 110, 146, 150]. Für HLA-A1, HLA-B8, HLA-Cw7, sowie für HLA-DQw2, HLA-DR3 und HLA-DQ5 wurden signifikante Assoziationen zur IPP beschrieben [93, 113, 114]. Zwei Studien

schlossen mit ihren Ergebnissen eine solche Assoziation der IPP mit Antigenen der Klasse I des HLA-Systems aus [31, 74]. Eine Untersuchung zu Antigenen der Klasse II wurde in diesen beiden Studien nicht durchgeführt [31, 74]. Auch in unserer Studie, bei der 154 Patienten mit IPP auf HLA-Merkmale untersucht wurden, konnten keine signifikanten Zusammenhänge von HLA-Antigenen und der IPP aufgezeigt werden. Untersucht wurden Antigene der Klasse I und der Klasse II. Die DQ-Klasse des HLA-Systems wurde nicht speziell untersucht. Eine Assoziation der IPP mit den Antigenen der DQ-Klasse ist anhand der erhaltenen Ergebnisse nicht zu erwarten, da eine signifikante Beziehung von Antigenen der DR-Klasse mit denen der DQ-Klasse existiert [139]. Die Klassen I und II der HLA-Antigene wurden bisher nur in drei Studien gemeinsam untersucht [110, 114, 113]. Die Größe der Kollektive der bisher durchgeführten Studien variierte von 9 bis 52 Patienten [11, 31, 74, 93, 99, 110, 113, 114, 146, 150]. Diese kleinen Kollektive erklären zum Teil die unterschiedlichen Ergebnisse der verschiedenen Arbeitsgruppen. Der Einfluss verwendeter Untersuchungsmethoden ist gleichermaßen zu berücksichtigen. Die Durchführung des serologischen Nachweises von HLA-Antigenen der Klasse II könnte eine zusätzliche Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse der bisher durchgeführten Studien darstellen. Diese mittlerweile obsolete Methode wurde von drei Arbeitsgruppen verwendet [110, 114, 113]. Ein weiteres wichtiges Kriterium zur Beurteilung der Ergebnisse einer HLA-Typisierung ist die Verwendung der Bonferroni-Korrektur [26, 27]. Bei einer hohen Anzahl von Testvariablen (HLA-Antigene) dient diese statistische Maßnahme des multiplen Testens dem Ausschluss eines zufälligen Auftretens von signifikanten Befunden. In sieben von zehn Studien [11, 31, 74, 99, 113, 146, 150] kam diese statistische Korrektur nicht zur Anwendung.

Mit unserem Kollektiv von 154 IPP-Patienten konnten die gewonnenen Untersuchungsdaten in ihrer Fallzahl deutlich angehoben werden und somit aussagekräftige Ergebnisse erzielt werden. Die Korrektur für multiples Testen nach Bonferroni wurde angewendet. Zur Identifikation der Klasse I Antigene wurde die serologische Methode, zur Genotypisierung der Klasse II Antigene die PCR-Technik verwendet. Sowohl die HLA-Antigenfrequenzen der Klasse I als auch die der Klasse II zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen IPP-Patienten und den Kontrollgruppen. Unsere Ergebnisse bestätigen somit die Aussage, dass keine

Assoziation von HLA-Antigenen mit der IPP besteht. Bei der Betrachtung der IPP-Patienten mit M. Dupuytren zeigte sich, nach Bonferroni-Korrektur, ein signifikant häufigeres Vorkommen des HLA-DRB1*06 Antigen. Beim Vergleich dieses Kollektivs mit der Kontrollgruppe (n_1) ergab sich ein p-Wert von 0,0017, beim Vergleich mit der Kontrollgruppe (n_2) ein p-Wert von 0,051. In Anbetracht der Größe der Kontrollgruppe (n_2) mit 14.385 gesunden Knochenmarkspendern erscheint der p-Wert von 0,051 aussagekräftiger. Somit sollte hier nur von einer „Borderlinie-Signifikanz“ gesprochen werden. Insgesamt kann eine Assoziation der IPP mit Antigenen des HLA-Systems ausgeschlossen werden.

5.3. TGF-beta1 Genotypisierung

TGF-beta1 spielt eine wesentliche Rolle bei unterschiedlichen fibrotischen Erkrankungen [5, 7, 35, 69] und hat mannigfaltige Wirkungen auf entzündliches Gewebe, Zellen und Proteine. Beide Erkenntnisse führten zu der Annahme, dass TGF-beta1 in der Ätiopathogenese der IPP involviert sein könnte. Verschiedene Studien schreiben TGF-beta1 in der Genese der IPP eine entscheidende Bedeutung zu [37, 38]. Diese Hypothese wird durch die Entdeckung einer signifikant vermehrten Expression von TGF-beta1 aus intraoperativ gewonnenem Plauegewebe im Vergleich zu einer Kontrollgruppe gestützt [38]. Des Weiteren konnte im Tierversuch durch penile Injektion eines Peptids mit TGF-beta-ähnlicher Aktivität eine der IPP entsprechende Gewebsveränderung erzeugt werden [37]. Diese Veränderungen ähnelten den histologischen Bildern, die in der Frühphase der IPP zu beobachten sind [37]. Die weitergehende Frage nach einem genetischen Risiko für eine vermehrte Expression von TGF-beta1 wird diskutiert und in unserer Studie weiter verfolgt. Für zwei SNPs des für TGF-beta1 kodierenden Gen wurde in der Literatur ein Zusammenhang zu fibrotischen Erkrankungen beschrieben [7, 8]. Die beiden SNPs T869C und G915C liegen im Exon 1 des TGF-beta1-Gens und sind, im Gegensatz zu den anderen drei bekannten SNPs, mit einer veränderten TGF-beta1-Produktion assoziiert [7, 8]. Eine häufige Frequenz eines oder beider SNPs könnte eine vermehrte Expression von TGF-beta1 mit konsekutiv erhöhter Produktion zur Folge haben. In einer prospektiven Serie von 111 Patienten und 100 Kontrollen wurde eine Genotypisierung für die beiden SNPs T869C und G915C durchgeführt.

89% der IPP-Patienten hatten das Genotypisierungsergebnis G915G, im Gegensatz dazu nur 79% der Personen aus der Kontrollgruppe. Mit einem p-Wert von 0,04 war dies ein signifikanter Unterschied im Vergleich von IPP-Patienten und Kontrollen. Alle anderen statistischen Analysen der SNPs zeigten keine signifikanten Differenzen zwischen den beiden Kollektiven. Aufgrund der hohen Anzahl eingeschlossener Patienten und einer adäquaten Kontrollgruppe von gesunden Knochenmarkspendern erscheinen die gewonnenen Daten aussagekräftig. Ein Zusammenhang zwischen der IPP und dem Genotyp G915G des SNP auf dem TGF-beta1 Gen kann hergestellt werden und ermöglicht, durch die schon bekannte erhöhte Aktivität von TGF-beta1 durch diesen Genotyp, eine plausible Beziehung zu der Ätiopathogenese der IPP. Das Vorkommen dieses homozygoten Wildtyps an der Stelle +915 könnte bei Männern eine Prädisposition für die Erkrankung an der IPP darstellen. Einen wesentlichen genetischen Risikofaktor zeigt dieses Ergebnis vermutlich nicht auf. Eine größere Anzahl von untersuchten IPP-Patienten und Kontrollen sowie eine deutlichere Signifikanz im statistischen Vergleich der Genotypisierungsergebnisse erscheint dafür notwendig. Ein diagnostisches Vorgehen über Bestimmung des Genotyps kann bislang ausgeschlossen werden. Obwohl zu der Hypothese des möglichen genetischen Risikos für eine vermehrte Expression von TGF-beta1 keine weiteren Studien von anderen Arbeitsgruppen durchgeführt wurden, scheinen ergänzende Serien mit noch größeren Kollektiven zur Verifizierung der Ergebnisse sinnvoll. Die Bedeutung weiterer Assoziationsstudien begründet sich in der Tatsache, dass eine vermehrte Expression von TGF-beta1 in Plaquegewebe von IPP-Patienten beobachtet wird [38]. Grundlagen dafür sind die experimentellen Daten eines Rattenversuchs [37] und das häufige Vorkommen eines Genotyps von TGF-beta1, der mit der Entstehung von fibrotischen Erkrankungen assoziiert ist. Andere Steuerungsmechanismen in der Signaltransduktionskette des TGF-beta-Systems, die eine erhöhte Expression in Plaquegewebe von IPP-Patienten erklären, sollten in nachfolgenden Studien mit einbezogen werden.

5.4. Alpha-1-Antitrypsin (AAT)

Der Mangel an Alpha-1-Antitrypsin stellt eine der häufigsten erblichen Erkrankungen dar [40]. Bekannt ist bisher der Zusammenhang einer ungehemmten

Proteasenaktivität mit der Erkrankung an einem Lungenemphysem bei Erwachsenen und Lebererkrankungen bei Kindern [24, 40]. Fraglich ist die Beeinflussung des Kollagenstoffwechsels durch den Proteinaseinhibitor Alpha-1-Antitrypsin im Rahmen der Ätiopathogenese der IPP [40]. Denkbar ist diese Hypothese durch eine erhöhte Aktivität von Serumproteasen, die als Folge eines Mangels des Proteinaseinhibitors auftritt. Bei bestehendem Alpha-1-Antitrypsindefizit im Serum ist eine konsekutiv erhöhte PMN-Elastase infolge eines inadäquaten Abbaus möglich. Diese Änderung der biochemischen Regulation könnte somit den Einfluss auf den Kollagenstoffwechsel erklären. Folge wäre eine vermehrte Synthese des Kollagen III, welches in Plaques von IPP-Patienten vermehrt nachgewiesen wurde [70, 72]. Eine Verbindung zur Ätiopathogenese der IPP ist auf diesem Weg gegeben. Auch der M. Dupuytren ist durch eine Veränderung der normalen Kollagenstruktur der Palmaraponeurose charakterisiert [9, 17]. Eine Zunahme des Verhältnisses von Typ III Kollagen zu Typ I Kollagen wurde beschrieben [17]. Eine Übertragung dieser morphologischen Veränderungen des M. Dupuytren auf die IPP erscheint durch die Koinzidenz beider Erkrankungen möglich. Eine erniedrigte Serumkonzentration von Alpha-1-Antitrypsin oder PMN-Elastase konnte bei Patienten mit M. Dupuytren von einer Arbeitsgruppe nicht nachgewiesen werden [44].

5.4.1. Serumspiegel (AAT)

Im Rahmen einer Studie, in der verschiedene Parameter des Kollagenstoffwechsels bei Patienten mit IPP analysiert wurden, konnte ein signifikant erniedrigter Serumspiegel von Alpha-1-Antitrypsin bei Patienten mit IPP im Vergleich zu gesunden Probanden aufgezeigt werden [72]. Dieser Befund wurde sowohl im peripher venösen Blut als auch im cavernös entnommenen Blut beobachtet [72]. Der ebenfalls untersuchte Kollagenparameter PMN-Elastase zeigte keine Konzentrationsunterschiede zwischen beiden Kollektiven [72]. Eine genetische Ursache der erniedrigten Serumkonzentration konnte in dieser Serie nicht identifiziert werden [72]. 11 IPP-Patienten und 11 Personen einer Kontrollgruppe waren in dieser Studie eingeschlossen [72]. Basierend auf dieser Datenlage sollten in unserer Studie diese Ergebnisse weitergehend untersucht werden. Eine prospektive Bestimmung von Alpha-1-Antitrypsin Serumwerten aus peripher venösem Blut bei einem

repräsentativen Kollektiv von 94 IPP-Patienten wurde durchgeführt. Verglichen wurden die erhaltenen Werte mit denen von 134 gesunden Knochenmarkspendern. Bei der Betrachtung dieser beiden Gesamtkollektive konnte zunächst das Ergebnis der vorangegangenen Studie bestätigt werden. Es zeigte sich ebenfalls ein signifikant erniedrigter Alpha-1-Antitrypsinspiegel im Serum von IPP-Patienten. Als stringente Hypothese erschien zu diesem Zeitpunkt die Beeinflussung der Alpha-1-Antitrypsin-Serumwerte bei der Ätiopathogenese der IPP. Ein weitergehender Versuchsaufbau nach einer genetischen Ursache über die Tatsache, dass bei IPP-Patienten ein erniedrigter Alpha-1-Antitrypsin-Serumspiegel in zwei von einander unabhängigen Studien gemessen wurde, war die Folgerung.

Da die Altersstrukturen der beiden Kollektive bei den vorangegangenen Berechnungen keine Berücksichtigung fanden, wurde ein alterskorrelierter Vergleich der Serumwerte durchgeführt. Diese Analyse zeigte keinen signifikanten Unterschied der Alpha-1-Antitrypsin Serumspiegel mehr auf. Die erforderliche Aufteilung der Kontrollgruppe führte somit zu einem neuen Ergebnis, das nicht den bisher publizierten Daten entspricht. Die Veränderung des Ergebnisses ist durch die Kategorisierung der Gruppen zu erklären. Der statistische Effekt bei der Analyse von kleinen Kollektiven von 11 bzw. 26 Patienten ist ebenfalls zu berücksichtigen [12, 42, 72]. Durch Gruppierung der Kontrollgruppe in Alterskategorien kann ein deutliches Absinken der Serumspiegel im höheren Lebensalter aufgezeigt werden. Diese Assoziation wurde nach unserem Kenntnisstand bislang nicht beschrieben, allerdings bleibt die klinische Relevanz unklar.

5.4.2. Genotypisierung (AAT)

Zahlreiche Varianten des Alpha-1-Antitrypsingens sind bis heute entdeckt worden. Nur wenige dieser genetischen Abweichungen von den als „normal“ bezeichneten Gensequenzen M1A und M1V des Alpha-1-Antitrypsingens sind mit einer Erniedrigung des Serumspiegels dieses Proteinaseinhibitors assoziiert [98]. Am bekanntesten ist die Z-Variante, die ca. 95% aller klinischen Alpha-1-Antitrypsin Mangelsyndrome bedingt [98]. In einer vorangegangenen Studie konnte eine genetische Ursache für den erniedrigten Alpha-1-Antitrypsinspiegel bei 11 Patienten mit IPP nicht gefunden werden [70]. Die Darstellung der genetischen Varianten

erfolgte in dieser Serie mittels Hybrid-Isoelektrischer-Fokussierung (HIEF) in Polyacrylamidgelen [70]. Untersucht wurden die drei Genvarianten M, S und Z [70]. Es wurde keine Unterscheidung der einzelnen M-Varianten vorgenommen. Die Kombinationen dieser drei Genvarianten korrelieren mit unterschiedlichen Serumkonzentrationen von Alpha-1-Antitrypsin [70]. Die erniedrigten Alpha-1-Antitrypsin Serumspiegel sollten durch diese Studie erklärt werden. Signifikante Differenzen von Verteilungen der Genotypen zwischen 19 IPP-Patienten und 33 gesunden Personen wurden nicht identifiziert [70]. Unsere genetischen Untersuchungen an einem Kollektiv von 141 IPP-Patienten und 100 Kontrollen bestätigen diese Ergebnisse. Es wurden keine signifikanten Unterschiede von Frequenzen der verschiedenen Varianten gefunden. Diese Daten lassen sich mit den identischen Plasmakonzentrationen des Proteinaseinhibitors bei alterskorrelierten Patienten und Kontrollen vereinbaren. Die Analyse der Genvarianten erfolgte in beiden Studien auf andere Art und Weise. Neben den bekannten S- und Z-Mutationen wurden vier weitere SNPs des Alpha-1-Antitrypsingens mittels PCR typisiert und deren Häufigkeiten mit Kontrollkollektiven verglichen. Hier wurde eine Unterscheidung zwischen der M2- und M3-Variante des Alpha-1-Antitrypsin vorgenommen. Allerdings sind für diese beiden Varianten keine Auswirkungen auf den Serumspiegel des Proteins beschrieben. Eine modifizierte Auswahl der SNPs ermöglichte ein „Abdecken“ zusätzlicher Genabschnitte, die Einfluss auf die Alpha-1-Antitrypsinproduktion haben. Zusätzlich zu den Exons, in denen die Varianten M, S und Z zu finden sind, wurde die Promotorregion und ein SNP aus der 3'-Region berücksichtigt. Des Weiteren sind die demographischen Daten beider Kollektivgruppen relevant. Die Frequenzen der Genvarianten des Alpha-1-Antitrypsin verschiedener Populationen weisen deutliche Unterschiede auf [30, 70]. Um eine abschließende Aussage über die Verteilung der genetischen Varianten machen zu können, wäre eine Analyse der Daten in Bezug auf das demographische Profil der Patienten und Kontrollen notwendig. Daten der IPP-Patienten und Kontrollen werden der lokalen Population zugeschrieben. Eine genaue demographische Analyse wurde für beide Kollektive nicht durchgeführt. Für die S- und Z-Varianten, denen die häufigsten Mangelsyndrome zugeschrieben werden, wurde eine Kontrollgruppe einer epidemiologischen Studie verwendet [30]. Hierbei wurden die Daten für die Region Deutschland für die statistische Auswertung verwendet [30]. Die Frequenz der S-Mutation wurde in Deutschland mit 2,2%, die der Z-Mutation mit 0,9% angegeben

[30]. Wegen des seltenen Vorkommens dieser beiden Varianten wurde auf eine Aufgliederung in homozygot-wild, heterozygot und homozygot-mutiert verzichtet und von einer statistischen Analyse dieser Daten abgesehen. In Anbetracht der Ergebnisse der alterskorrelierten Serumspiegel von Alpha-1-Antitrypsin bei IPP-Patienten und Kontrollen scheinen in diesem Zusammenhang weitere Untersuchungen nicht notwendig. Da bei einem kleinen Kollektiv von 43 IPP-Patienten sowohl eine Bestimmung des Alpha-1-Antitrypsinspiegels als auch eine Analyse der Genvarianten durchgeführt wurde, erschien zunächst eine Studie mit einem größeren Kollektiv zur Verifizierung der Daten erforderlich. Nach Erkenntnis über den Zusammenhang zwischen Alter der und Serumspiegel von Alpha-1-Antitrypsin, welche sich aus unseren Studien ergibt, ist eine Assoziation mit der IPP unwahrscheinlich.

Schlußfolgerungen zu den drei Hypothesen:

1. Die Hypothese, dass die IPP eine durch das HLA-System gesteuerte Fehlregulation sein könnte, wurde in vorangegangenen Studien nicht eindeutig geklärt. In Anbetracht der in dieser Arbeit beschriebenen HLA-Genotypisierungsergebnisse eines großen repräsentativen Kollektivs von IPP-Patienten und Kontrollen lässt sich eine Assoziation der IPP mit Antigenen des HLA-Systems anhand der eigenen Resultate ausschließen. Da nicht jede Autoimmunerkrankung HLA-assoziiert ist, kann die Theorie einer autoimmunen Genese der IPP jedoch nicht endgültig verworfen werden.
2. Die beschriebenen Zusammenhänge der Ätiopathogenese der IPP mit dem Zytokin TGF-beta1 erscheinen auch nach Durchführung unsere Analysen möglich. Eine genetische Ursache für eine vermehrte Expression von TGF-beta1 sollte aufgezeigt werden. Die statistischen Ergebnisse lassen einen Einfluss von TGF-beta1 auf die Entstehung des Krankheitsbildes der IPP vermuten. Genetische Varianten des TGF-beta1 Gens als Hauptrisikofaktoren zur Entstehung der IPP zu deklarieren erscheint jedoch unangemessen. Weitere Untersuchungen sollten in diesem Zusammenhang folgen.
3. Die IPP ist nicht durch einen Mangel an Alpha-1-Antitrypsin zu erklären. Anhand der alterkorrelierten Studie konnte kein Mangel dieses Proteinaseinhibitors im Serum bei IPP aufgezeigt werden. Die Genotypisierungen, die in dieser Untersuchung mit inbegriffen waren, bestätigen diese Aussage.

6. Zusammenfassung

Folgende Fragestellungen zur bislang ungeklärten Ätiopathogenese der IPP wurden in der vorliegenden Promotionsarbeit bearbeitet.

1. Besteht ein Zusammenhang der IPP mit HLA-Antigenen und handelt es sich somit wahrscheinlich bei der IPP um eine Autoimmunerkrankung?
 2. Haben gemessene Veränderungen der Expression von TGF-beta1 in Plaques von IPP-Patienten einen Einfluss auf die Ätiopathogenese der IPP?
 3. Bestehen erniedrigte Alpha-1-Antitrypsinspiegel im Serum bei IPP-Patienten, und können diese durch Veränderungen des Kollagenstoffwechsels das Krankheitsbild der IPP hervorrufen?
-
1. Auf der Grundlage der Hypothese, dass die IPP durch eine immunologische Fehlregulation bedingt sein könnte und aufgrund des Zusammenhangs des HLA-B27 Antigen mit lokalen fibrotischen Veränderungen wurden HLA-Genotypisierungen bei IPP-Patienten durchgeführt. Bislang wurden verschiedene Assoziationsstudien zur IPP und Antigenen des HLA-Systems mit uneinheitlichen Ergebnissen durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit wurde eine HLA-Genotypisierung bei 154 IPP-Patienten durchgeführt. Ein signifikanter Unterschied der Antigenfrequenzen des HLA-Systems zwischen den IPP-Patienten und den Kontrollgruppen konnte nicht beobachtet werden. Aufgrund dieser Datenlage ist eine Assoziation der IPP mit den Antigenen des HLA-Systems unwahrscheinlich.
 2. Verschiedene Wirkmechanismen von TGF-beta sowie eine erhöhte TGF-beta-Expression in der Tunica albuginea von IPP-Patienten waren Gründe für Untersuchungen über den Einfluss dieses Zytokins auf die Ätiopathogenese der IPP. Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurde untersucht, ob bei Patienten mit IPP ein genetisches Risiko für eine vermehrte TGF-beta1-Expression existiert. Die vorliegende Arbeit stellt eine Genotypisierung von zwei SNPs im Gen von TGF-beta1 an einem Kollektiv von 111 IPP-Patienten vor. Die Ergebnisse zeigen eine erhöhte Frequenz des homozygoten Genotyps des SNP G915C bei IPP-Patienten im Vergleich zu dem Kontrollkollektiv. Dieser homozygote Wildtyp mit einer erhöhten TGF-beta-Expression assoziiert. Diese genetische Variation könnte die Prädisposition zur IPP beeinflussen.

3. Expressionsveränderungen des Proteinaseinhibitor Alpha-1-Antitrypsin werden mit verschiedenen Erkrankungen in Verbindung gebracht. Es wurde postuliert, dass ein entdecktes Alpha-1-Antitrypsindefizit bei IPP-Patienten zu einer vermehrten Aktivität von Serumproteasen führen könnte. Dies könnte den Kollagenstoffwechsel beeinflussen und die Entstehung der IPP begünstigen. In unserer Studie wurde anhand einer repräsentativen Serie von IPP-Patienten und Kontrollen die Alpha-1-Antitrypsinkonzentration im Serum gemessen werden und versucht ein genetisches Korrelat für ein Alpha-1-Antitrypsindefizit aufzuzeigen. Ein zunächst gefundener Alpha-1-Antitrypsinmangel bei IPP-Patienten im Vergleich zu einem Kontrollkollektiv konnte in der alterskorrelierten Gegenüberstellung nicht bestätigt werden. Es konnte aber ein signifikantes Absinken der Alpha-1-Antitrypsinspiegel mit zunehmendem Alter beobachtet werden. Die Genotypisierungsergebnisse von vier definierten SNPs und den bekannten S- und Z-Mutationen des Alpha-1-Antitrypsingens ergaben keine signifikanten Unterschiede bezüglich Ihrer Frequenzen zwischen Patienten und Kontrollen. Aufgrund der Daten dieser Studie kann eine Assoziation der IPP mit Alpha-1-Antitrypsin ausgeschlossen werden.

Summary:

Because of the unknown pathogenesis of Peyronie's disease the following questions have been worked out in this doctoral thesis.

1. Is there an association among Peyronie's disease and HLA-antigens? If this is true, could this be an immunological dysregulation?
2. Has TGF-beta1 as an mediator of fibrotic diseases an important impact on the etiological pathway of Peyronie's disease?
3. Are there decreased alpha-1-antitrypsin levels in patients with Peyronie's disease and could this result in a change of collagen metabolism which may have an influence of the etiopathology of Peyronie's disease?

1. With regard that Peyronie's disease is based on an immunological dysregulation and because of the possible association of HLAs and Peyronie's disease, we investigated the patients with Peyronie's disease using the HLA typing. The possible association of Peyronie's disease with the HLA system have been described with heterogeneous results many times before. This prospective study comprises 154 patients with Peyronie's. Comparing the results of HLA typing in our patients with Peyronie's disease and controls, no significant association has been occurred. The results of this study do not indicate any significant associations of Peyronie's disease with the HLA antigens.
2. The detection of increased TGF-beta1 expression in plaques of Peyronie's disease and the fact that TGF-beta1 has been implicated in many fibrotic conditions has provided evidence that this cytokine plays a central role in the pathogenetic cascade of this entity. The aim of this doctoral thesis was to look for a genetic predisposition in patients with Peyronie's disease. In this study we prospectively investigated the genetic association of distinct TGF-beta1 SNPs in 111 patients. In patients with Peyronie's disease we found an increased frequency of the SNP G915C compared the healthy controls. This homozygous wild-type is associated with an increased TGF-beta1 expression. This genetic variation may influence the predisposition of Peyronie's disease, but does not constitute a mayor risk factor.

3. Many diseases are associated with different expression of the proteinase inhibitor alpha-1-antitrypsin. In this regard, the influence of alpha-1-antitrypsin has been suggested to be influential considering the observation, that reduced plasma levels have been observed in patients with Peyronie's. It was postulated that alpha-1-antitrypsin deficiency could lead to higher activity of serum proteases that could result in a change of collagen metabolism. We prospectively analysed the alpha-1-antitrypsin levels of patients with Peyronie's disease compared to healthy controls. The alpha-1-antitrypsin gene was analysed to investigate whether mutations of the DNA could explain differences in levels of alpha-1-antitrypsin expression. The comparison of patients with Peyronie's disease with the controls revealed significant decreased alpha-1-antitrypsin levels. Overall the alpha-1-antitrypsin levels were almost identical when age-matches groups were compared. We found that the alpha-1-antitrypsin levels decreased significantly with increasing age. No significant differences occurred concerning the results of the genotyping of the four SNPs and two further well-known S- and Z-mutations. Our study indicates that there is no association of Peyronie's disease with alpha-1-antitrypsin.

7. Literatur

1. AHUJA, S.K., SIKKA, S.C., HELLSTROM, W.J.G.: Stimulation of collagen production in an vitro model for Peyronie's disease. In: *Int. J. Impotence. Res.* 1999, Nr. 11: S. 207-212
2. AKKUS, E., CARRIER, S., REHMAN, J., BREZA, J., KADIOGLU, A., LUE, T.F.: Is colchicine effective in Peyronie's disease? A pilot study. In: *Urology* 1994, Nr. 44: S. 291-295
3. ANDERSON, M.S., SHANKEY, T.V., LUBRANO, T., MULHALL, J.P.: Inhibition of Peyronie's plaque fibroblast proliferation by biologic agents. In: *Int. J. Impotence Res.* 2000, Nr. 12 (suppl. 3): S. 25-31
4. ANDRESEN, R., WEGNER, H.E.H., MILLER, K., BANZER, D.: Imaging modalities in Peyronie's disease. In: *Eur. Urol.* 1998, Nr. 34: S. 128-135
5. ANSCHER, M.S., CROCKER, I.R., JIRTLE, R.L.: Transforming growth factor- β 1 expression in irradiated liver. In: *Radiat. Res.* 1990, Nr. 122: S. 77-85
6. ARANZI, G., J.: De tumoribus secundum locos affectos, Bono 1571; Chapter 50. In Gurlt, E. (ed). *Geschichte der Chirurgie und ihrer Ausübung*, Georg Olms Verlag, Hildesheim, 1964, S.: 424-427
7. AWAD, M.R., EL-GAMEL, A., HASLETON, P., TURNER, D.M., SINOTT, P.J., HUTCHINSON, I.V.: Genotypic variation in the transforming growth factor-beta1 gene: association with transforming growth factor-beta1 production, fibrotic lung disease, and graft fibrosis after lung transplantation. In: *Transplantation* 1998, Nr. 66: S. 1014-1020
8. AWAD, M.R., TURNER, D.M., SINNOTT, P.J., HUTCHINSON, I.V.: Polymorphism in the TGF- β 1 gene. In: *Eur. J. Immunogenetics* 1997, Nr. 24: S. 45 abstract 4.6
9. BADALAMENTE, M., HURST, L.C.: The biochemistry of Dupuytren's disease. In: *Hand Clinics* 1999, Nr. 15: S. 35-42
10. BALCONI, G., ANGELI, E., NESSI, R., DE FLAVIIS, L.: Ultrasonographic evaluation of Peyronie's disease. In: *Urol. Radiol.* 1988, Nr. 10: S. 85-88
11. BIAS, W.B., NYBERG, L.M. JR., HOCHBERG, M.C., WALSH, P.C.: Peyronie's disease: a newly recognized autosomal-dominant trait. In: *Am. J. Med. Genet.* 1982, Nr. 12: S. 227-235

12. BICHLER, K. H., LAHME, S., MATTAUCH, W., PETRI, E.: Untersuchungen zum Kollagenstoffwechsel bei Induratio penis plastica (IPP). In: *Urologe A* 1998, Nr. 37: S. 306-311
13. BIVALACQUA, T.J., CHAMPION, H.C., HELLSTROM, W.J.G.: Implications of nitric oxide synthase isoforms in the pathophysiology of Peyronie's disease. In: *Int. J. Impotence Res.* 2002, Nr. 14: S. 345-352
14. BIVALACQUA, T.J., CHAMPION, H.C., LEUNGWATTANAKIJ, S., YANG, D.Y., HYUN, J.S., ABDEL-MAGDEED, A.B., SIKKA, S.C., KADOWITZ, P.J., HELLSTROM, W.J.G.: Evaluation of nitric oxide synthase and arginase in the induction of a Peyronie's-like condition in the rat. In: *J. Androl.* 2001, Nr. 22: S. 497-506
15. BIVALACQUA, T.J., DINER, E.K., NOVAK, T.E., VOHRA, Y., SIKKA, S.C., CHAMPION, H.C., HELLSTROM, W.J.G.: A rat model of Peyronie's disease associated with a decrease in erectile activity and an increase in inducible nitric oxide synthase protein expression. In: *J. Urol.* 2000, Nr. 163: S. 1992-1998
16. BORDER, W.A., RUOSLATHI, E.: Transforming growth factor β in diseases: the dark side of tissue repair. In: *J. Clin. Invest.* 1992, Nr. 90: S. 1-7
17. BRICKLEY-PARSONS, D., GLIMCHER, M.J., SMITH, R.J.: Biochemical changes in the collagen of the palmar fascia in patients with Dupuytren's disease. In: *J. Bone Joint. Surg.* 1981, Nr. 63: S. 787-797
18. BROCK, G., HSU, G.L., NUNES, L., VON HEYDEN, B., LUE, T.F.: The anatomy of the tunica albuginea in the normal penis and Peyronie's disease. In: *J. Urol.* 1997, Nr. 157: S. 276-281
19. BURGE, P.: Genetics of Dupuytren's disease. In: *Hand Clinics* 1999, Nr. 1 (Vol. 15): S. 63-71
20. BURNETT, A.L.: Nitric oxide in the penis: physiology and pathology. In: *J. Urol.* 1997, Nr. 157: S. 320-324
21. BYSTRÖM, J., RUBIO, C.: Induratio penis plastica. Peyronie's disease. Clinical features and etiology. In: *Scand. J. Urol.* 1975, Nr. 10: S. 12-20
22. CARRELL, R.W., LOMAS, D.A.: Alpha1-Antitrypsin deficiency – a model for conformational diseases. In: *N. Engl. J. Med.* 2002, Vol. 346, Nr. 1: S. 45-53
23. CHEN, T.Y.H., ZAHRAN, A.R., CARRIER, S.: Penile curvature associated with Scleroderma. In: *Urology* 2001, Nr. 58: S. 282

24. COAKLEY, R. J., TAGGART, C., O'NEILL, S., MCELVANEY, N. G.: Alpha1-antitrypsin deficiency: biological answers to clinical questions. In: *Am. J. Med. Sci.* 2001, Nr. 321: S. 33-41
25. ÇULHA, M., ALICI, B., ACAR, O., MUTLU, N., GÖKALP, A.: The relationship between diabetes mellitus, impotence and venoocclusive dysfunction in Peyronie's disease patients. In: *Urol. Int.* 1998, Nr. 60: S. 101-104
26. CUPPLES, L.A., HEEREN, T., SCHATZIN, A., COLTON, T.: Multiple testing of hypotheses in comparing two groups. In: *Ann. Intern. Med.* 1984, Nr. 100: S. 122-129
27. CURTIN, F., SCHULZ, P.: Multiple correlations and Bonferroni's correction. In: *Biol. Psychiatry.* 1998, Nr. 44: S. 775-777
28. DAVIS, C.J.: The microscopic pathology of Peyronie's disease. In: *J. Urol.* 1997, Nr. 157: S. 282-284
29. DE LA PEYRONIE, F.: Sur quelques obstacles qui s'opposent à l'éjaculation naturelle de la semence. In: *Mem. Acad. Roy. Chir.* 1743, Nr. 1: S. 318-333
30. DE SERRES, F.J.: Worldwide racial and ethnic distribution of alpha1-Antitrypsin deficiency: summary of an analysis of published genetic epidemiologic surveys. In: *Chest.* 2002, Nr. 122: S. 1818-1829
31. DEGUCHI, T., MAEDA, S., SAKAI, S., KURIYAMA, M., KAWADA, Y., NISHIURA, T.: HLA-A and B antigens in patients with Peyronie's disease. In: *Urology* 1984, Nr. 23: S. 547-548
32. DEVINE, C.J. JR., HORTON, C.E.: Bent penis. In: *Semin. Urol.* 1987, Nr. 5: S. 251-267
33. DEVINE, C.J. JR., SOMERS, K.D., JORDAN, G.H., SCHLOSSBERG, S.M.: Proposal: trauma as the cause of the Peyronie's lesion. In: *J. Urol.* 1997, Nr. 157: S. 285-290
34. DOUGLAS, C.R.: Epidemiology of Dupuytren's disease. In: *Hand Clinics* 1999, Vol. 15: S. 53-62
35. EL-GAMEL, A., AWAD, M., SIM, E., HASLETON, P., YONAN, N., EGAN, J., DEIRANIYA, A., HUTCHINSON, I.V.: Transforming growth factor-beta1 and lung allograft fibrosis. In: *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 1998, Nr. 13: S. 424-430
36. EL-SAKKA, A.I., BAKIRCIOGLU, M.E., BHATNAGAR, R.S., YEN, T.S.B., DAHIYA, R., LUE, T.F.: The effects of colchicine on a Peyronie's-like condition in an animal model. In: *J. Urol.* 1999, Nr. 161: S. 1980-1983

37. EL-SAKKA, A.I., HASSOBA, H.M., CHUI, R.M., BHATNAGAR, R.S., DAHIYA, R., LUE, T.F.: An animal model of Peyronie's-like condition associated with an increase of transforming growth factor beta mRNA and protein expression. In: *J. Urol.* 1997, Nr.158: S. 2284-2290
38. EL-SAKKA, A.I., HASSOBA, H.M., PILLARISETTY, R.J., DAHIYA, R., LUE, T.F.: Peyronie's disease is associated with an increase in transforming growth factor- β protein expression. In: *J. Urol.* 1997, Nr. 158: S. 1391-1394
39. EL-SAKKA, A.I., SELPH, C.A., YEN, T.S.B., LUE, T.F.: The effect of surgical trauma on rat tunica albuginea. In *J. Urol.* 1998, Nr. 159: S. 1700-1707
40. ERIKSSON, S., ELZOUKI, A. N.: Alpha1-antitrypsin deficiency. In: *Baillière's Clin. Gastroenterol.* 1998, Nr. 12: S. 257-273
41. ESSED, E., SCHROEDER, F.H.: New surgical treatment for Peyronie's disease. In: *Urology* 1985, Nr. 25: S. 582-587
42. FEIL, G., BICHLER, K. H., LAHME, S., GOETZ, T.: Investigations of cytokines and acute-phase proteins in Peyronie's disease. In: *J. Urol.* 2002, Nr. 167 (suppl): S. 206 abstract 831
43. FURLOW, W.L., SWANSON, H.E. JR., LEE, R.E.: Peyronie's disease: a study of its natural history and treatment with orthovoltage radiotherapy. In: *J. Urol.* 1975, Nr. 114: S. 69-71
44. GÄSSLER, N., PRENNER, P.: Morphologische und biochemische Veränderungen bei der Dupuytren'schen Kontraktur. In: *Aktuel. Urol.* 2001, Nr. 32: S. 28-32
45. GEFEN, A., ELAD, D., CHEN, J.: Biomechanical aspects of Peyronie's disease in development stages and following reconstructive surgeries. In: *Int. J. Impotence Res.* 2002, Nr. 14: S. 389-396
46. GELBARD, M.K., DOREY, F., JAMES, K.: The natural history of Peyronie's disease. In: *J. Urol.* 1990, Nr. 144: S. 1376-1379
47. GELBARD, M.K.: Dystrophic penile calcification in Peyronie's disease. In: *J. Urol.* 1988, Nr. 139: S. 738-740
48. GHOLAMI, S.S., GONZALEZ-CADAVID, N.F., LIN, C.S., RAJFER, J., LUE, T.F.: Peyronie's disease: a review. In: *J. Urol.* 2003, Nr. 169: S. 1234-1241
49. GHOLAMI, S.S., LUE, T.F.: Peyronie's disease. In: *Urol. Clin. N. Am.* 2001, Nr. 28: S. 377-390

50. GONZALEZ-CADAVID, N.F., MAGEE, T.R., FERRINI, M., QIAN, A., VERNET, D., RAJFER, J.: Gene expression in Peyronie's disease. In: *Int. J. Impotence Res.* 2002, Nr. 14: S. 361-374
51. GUERNERI, S., STIOUI, S., MANTOVANI, F., AUSTONI, E., SIMONI, G.: Multiple clonal chromosome abnormalities in Peyronie's disease. In: *Cancer Genet. Cytogenet.* 1991, Nr. 52: S. 181-185
52. HAUCK, E.W., DOMANN, E., HAUPTMANN, A., WEIDNER, W., CHAKRABORTY, T., HOSSAIN, H.M.: Prospective analysis of 16S rDNA as a highly sensitive marker for bacterial presence in Peyronie's disease plaques. In: *J. Urol.* 2003, Nr. 170: S. 2053-2056
53. HAUCK, E.W., HACKSTEIN, N., VOSSHENRICH, R., DIEMER, T., SCHMELZ, H.U., BSCHLEIPFER, T., SCHROEDER-PRINTZEN, I., WEIDNER, W.: Diagnostic value of magnetic resonance imaging in Peyronie's disease - a comparison both with palpation and ultrasound in the evaluation of plaque formation. In: *Eur. Urol.* 2003, Nr. 43: S. 293-300
54. HAUCK, E.W., HAUPTMANN, A., BSCHLEIPFER, T., SCHMELZ, H.U., ALTINKILIC, B.M., WEIDNER, W.: Questionable efficacy of extracorporeal shock wave therapy in Peyronie's disease – results of a prospective approach. In: *J. Urol.* 2004, Nr. 171: S. 296-299
55. HAUCK, E.W., HEITZ, M., SCHREITER, F., WEIDNER, W.: Induratio penis plastica. In: *Aktuel. Urol.* 1999, Nr. 30: S. 386-404
56. HAUCK, E.W., SCHMELZ, H.U., DIEMER, T., HACKSTEIN, N., FENCHEL, K., WEIDNER, W., KNOBLAUCH, B.: Epithelioid sarcoma of the penis – a rare differential diagnosis of Peyronie's disease. In: *Int. J. Impotence Res.* 2003, Nr. 15: S. 378-382
57. HAUCK, E.W., SCHROEDER-PRINTZEN, I., WEIDNER, W.: Konservative Therapie der Induratio penis plastica. In: *Aktuel. Urol.* 2001, Nr. 32 (suppl 1): S. 44-47
58. HAUCK, E.W., SCHROEDER-PRINTZEN, I., WEIDNER, W.: Rationelle Diagnostik der erektilen Dysfunktion. In: *Urologe A* 1998, Nr. 37: S. 495-502
59. HAUCK, E.W., WEIDNER, W.: François de la Peyronie and the disease named after him. In: *Lancet* 2001, Nr. 357: S. 2049-2051
60. HAUPT, G.: Use of extracorporeal shock waves in the treatment of pseudarthrosis, tendinopathy and other orthopedic diseases. In: *J. Urol.* 1997, Nr. 158: S. 4-11
61. HELLSTROM, W.J.G., BIVALACQUA, T.J.: Peyronie's disease: Etiology, medical and surgical therapy. In: *J. Androl.* 2000, Nr. 21: 347-35

62. HELWEG, G.: Die Wertigkeit bildgebender Verfahren in der Diagnostik und Therapie der Induratio penis plastica (Peyronie-Krankheit). In: *Urologe A* 1992, Nr. 31: S. 19-23
63. HENRY, M.T., CAVE, S., RENDALL, J., CONNOR, C.M., MORGAN, K., FITZGERALD, M.X., KALSHEKER, N.: An alpha1-antitrypsin enhancer polymorphism is a genetic modifier of pulmonary outcome in cystic fibrosis. In: *Eur. J. Human Genet.* 2001, Nr. 9: S. 273-278
64. IACONO, F., BARRA, S., DE ROSA, G., BOSCAINO, A., LOTTI, T.: Microstructural disorders of tunica albuginea in patients affected by Peyronie's disease with or without erection dysfunction. In: *J. Urol.* 1993, Nr. 150: S. 1806-1809
65. JAROW, J.P., LOWE, F.C.: Penile Trauma: An etiologic factor in Peyronie's disease and erectile dysfunction. In: *J. Urol.* 1997, Nr. 158: S. 1388-1390
66. JORDAN, G.H., ANGERMEIER, K.W.: Preoperative evaluation of erectile function with dynamic infusion cavernosometry/cavernosography in patients undergoing surgery for Peyronie's disease: correlation with postoperative results. In: *J. Urol.* 1993, Nr. 150: 1138-1142
67. KADIOGLU, A., TEFEKLI, A., EROL, B., OKTAR, T., TUNC, M., TELLALOGLU, S.: A retrospective review of 307 men with Peyronie's disease. In: *J. Urol.* 2002, Nr. 168: S. 1075-1079
68. KELÂMI, A.: Autophotography in evaluation of functional penile disorders. In: *Urology* 1983, Nr. 21: S. 628-629
69. KELLY, J., KOVACS, E.J., NICHOLSON, K., FABISIAK, J.P.: Transforming growth factor- β production by lung macrophages and fibroblasts. In: *Chest.* 1991, Nr. 99: S. 85
70. KÖMPF, J., TOMIUK, J., FEIL, G., LAHME, S., BICHLER, K. H.: Induratio penis plastica and genetic variation of the alpha-1-antitrypsin locus. In: *Aktuel. Urol.* 2001, Nr. 32 (suppl 1): S. 41-43
71. LA PERA, G., PESCATORI, E.S., CALABRESE, M., BOFFINI, A., COLOMBO, F., ADRIANI, E., NATALI, A., VAGGI, L., CATUOGNO, C., GIUSTINI, M., TAGGI, F. AND THE SIMONA GROUP.: Peyronie's disease: Prevalence and association with cigarette smoking. In: *Eur. Urol.* 2001, Nr. 40: S. 525-530
72. LAHME, S., FEIL, G., BICHLER, K. H.: Untersuchungen zum Kollagenstoffwechsel bei Patienten mit Induratio penis plastica. In: *Aktuel. Urol.* 2001, Nr. 32 (suppl 1): S. 37-40

73. LAHME, S., ZIMMERMANN, R., LENK, S., CLAUSSEN, C., STENZEL, A.: Plaque formation in Peyronie's disease: Comparison of the clinical findings by means of magnetic resonance tomography vs. sonography. In: *Eur. Urol. Supplement* 2004, Nr. 2 (Vol. 3): S. 186 abstract 734
74. LEFFELL, M.S., DEVINE, C.J. JR., HORTON, C.E., SOMERS, K.D., DAWSON, D., VANDEBERG, J.S., BLUEMINK, G.G., WRIGHT, G.L. JR.: Non-association of Peyronie's disease with HLA B7 cross-reactive antigens. In: *J. Urol.* 1982, Nr. 127: S. 1223-1224
75. LEFFELL, M.S.: Is there an immunogenetic basis for Peyronie's disease? In: *J. Urol.* 1997, Nr. 157: S. 295-297
76. LEIKIN, L.B.: Association of Peyronie's disease following petrochemical exposure – a case series. Letter to the editor. In: *JOEM* 2002, Nr. 44: S. 105-106
77. LEOPARDI, O., COLOMBO, F., FRIGO, B., ZUCCHI, B., PATELLI, E.: Immunohistochemical and quantitative study of mast cells in Peyronie's disease. In: *Eur. Urol.* 2000, Nr. 37, S. 176-182
78. LEVINE, L.A., DIMITRIOU, R.J.: A surgical algorithm for penile prosthesis implantation in men with erectile failure and Peyronie's disease. In: *Int. J. Impotence Res.* 2000, Nr. 12: S. 147-151
79. LEVINE, L.A., LENTING, E.L.: A surgical algorithm for the treatment of Peyronie's disease. In: *J. Urol.* 1997, Nr. 158: S. 2149-2152
80. LIN, C.S., LIN, G., WHANG, Z., MADDAH, S.A., LUE, T.F.: Upregulation of monocyte chemoattractant protein 1 and effects of transforming growth-factor-beta1 in Peyronie's disease. In: *Biochem. Biophys. Res. Com.* 2002, Nr. 295: S. 1014-1019
81. LINDSAY, M.B., SCHAIN, D.M., GRAMBSCH, P., BENSON, R.C., BEARD, C.M., KURLAND, L.T.: The incidence of Peyronie's disease in Rochester, Minnesota, 1950 through 1984. In: *J. Urol.* 1991, Nr. 146: S. 1007-1009
82. LUE, T.F.: Peyronie's disease: an anatomically-based hypothesis and beyond. In: *Int. J. Impotence Res.* 2002, Nr. 14: S. 411-413
83. MAGEE, T.R., QIAN, A., RAJFER, J., SANDER, F.C., LEVINE, L.A., GONZALEZ-CADAVID, N.F.: Gene expression profiles in the Peyronie's disease plaque. In: *Urology* 2002, Nr. 59: S. 451-457
84. MIRONE, V., IMBIMBO, C., PALMIERI, A., LONGO, N., FUSCO, F., TAJANA, G.: A new biopsy technique to investigate Peyronie's disease associated histologic

- alterations: results with two different forms of therapy. In: *Eur. Urol.* 2002, Nr. 42: S. 239-244
85. MOHR, W.: Sind Peyronie-Krankheit und Dupuytren-Kontraktur gleichartige Leiden? In: *Aktuel. Urol.* 2001, Nr. 32 (suppl. 1): S. 18-24
86. MONTORSI, F., GUAZZONI, G., BERGAMASCHI, F., CONSONNI, P., RIGATTI, P., PIZZINI, G., MIANI, A.: Vascular abnormalities in Peyronie's disease: the role of color doppler sonography. In: *J. Urol.* 1994, Nr. 151: S. 373-375
87. MORELAND, R.B., NEHRA, A.: Pathophysiology of Peyronie's disease. In: *Int. J. Impotence Res.* 2002, Nr. 14: S. 406-410
88. MORELAND, R.B., TRAISH, A., MCMILLIN, M.A., SMITH, B., GOLDSTEIN, I., SAENZ DE TEJADA, I.: PGE1 suppresses the induction of collagen synthesis by transforming growth factor- β 1 in human corpus cavernosum smooth muscle. In: *J. Urol.* 1995, Nr.153: S. 826-840
89. MUELLER, C.R., GOLDMANN, S.F., WEGENER, S.: German Normal. In: *HLA 1998 (American Society for Histocompatibility and Immunogenetics)*. Edited by D.W. Giestson and P.I. Terasaki. Los Angeles: University of California-Los Angeles Tissue Typing Laboratory. 1998, S. 154-157
90. MULHALL, J.P., ANDERSON, M.S., LUBRANO, T., SHANKEY, T.V.: Peyronie's disease cell culture models: phenotypic, genotypic and functional analyses. In: *Int. J. Impotence Res.* 2002, Nr. 14: S. 397-405
91. MULHALL, J.P., BRANCH, J., LUBRANO, T., SHANKEY, T.V.: Perturbation of cell cycle regulators in Peyronie's disease. In: *Int. J. Impotence Res.* 2001, Nr. 13 (suppl 5): S. 21-S28
92. MULHALL, J.P., THOM, J., LUBRANO, T., SHANKEY, T.V.: Basic fibroblast growth factor expression in Peyronie's disease. In: *J. Urol.* 2001, Nr. 165: S. 419-423
93. NACHTSHEIM, D.A., REARDEN, A.: Peyronie's disease is associated with an HLA class II antigen, HLA-DQ5, implying an autoimmune etiology. In: *J. Urol.* 1996, Nr. 156: S. 1330-1334
94. NATHAN, C.: Inducible nitric oxide synthase: What difference does it make? In: *J. Clin. Invest.* 1997, Nr. 100: S. 2417-2423
95. NEHRA, A., GETTMAN, M.T., NUGENT, M., BOSTWICK, D.G., BARRETT, D.M., GOLDSTEIN, I., KRANE, R.J., MORELAND, R.B.: Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) is sufficient to induce fibrosis of rabbit corpus cavernosum in vivo. In: *J. Urol.* 1999, Nr.162, S. 910-916

96. NESBIT, R.M.: The surgical treatment of congenital chordee without hypospadias. In: *J. Urol.* 1954, Nr. 72: S. 1178-1180
97. NICHOLL, Desmond: *Gentechnische Methoden*. 1. Aufl. Heidelberg, Berlin, Oxford. Spektrum Akademischer Verlag, 1995 (Reihe: Labor im Fokus), - ISBN 3-86025-298-4
98. NORMAN, M. R., MOWAT, A. P., HUTCHISON, D. C. S.: Molecular basis, clinical consequences and diagnosis of alpha-1 antitrypsin deficiency. In: *Ann. Clin. Biochem.* 1997, Nr. 34: S. 230-246
99. NYBERG, L.M. JR., BIAS, W.B., HOCHBERG, M.C., WALSH, P.C.: Identification of an inherited form of Peyronie's disease with autosomal dominant inheritance and association with Dupuytren's contracture and histocompatibility B7 cross-reacting antigens. In: *J. Urol.* 1982, Nr. 128: S. 48-51
100. O'MALLEY, C.D.: Andreas Vesalius of Brussels (1514-1564). In: *University of California Press*, Berkeley and Los Angeles. 1965, S. 468
101. PERIMENIS, P., ATHANASOPOULOS, A., GYFTOPOULOS, K., KATSENIS, G., BARBALIAS, G.: Peyronie's disease: Epidemiology and clinical presentation of 134 cases. In: *Int. J. Urol. and Nephrol.* 2001, Nr. 32: S. 691-694
102. PERINCHERY, G., EL-SAKKA, A.I., ANGAN, A., NAKAJIMA, K., DHARIA, A., TANAKA, Y., LUE, T.F., DAHIYA, R.: Microsatellite alterations and loss of heterozygosity in Peyronie's disease. In: *J. Urol.* 2000, Nr. 164: S. 842-846
103. PHELAN, M.J.I., RILEY, P.L., LYNCH, M.P.: Methotexate associated Peyronie's disease in the treatment of rheumatoid arthritis. In: *Br. J. Rheumat.* 1992, Nr. 31: S. 425-426
104. POLI, G., PAROLA, M.: Oxidative damage and fibrogenesis. In: *Free. Radic. Biol. Med.* 1997, Nr. 22: S. 287-305
105. POUTASSE, E.F.: Peyronie's disease. In: *J. Urol.* 1972, Nr. 107: S. 419-422
106. PRYOR, J.P., FARELL, C.R.: Controlled clinical trial of vitamin E in Peyronie's disease. In: *Prog. Reprod. Biol. Med.* 1983, Nr. 9: S. 41-45
107. PRYOR, J.P., RALPH, D.J.: Clinical presentations of Peyronie's disease. In: *Int. J. Impotence Res.* 2002, Nr. 14: S. 414-417
108. RALPH, D.J., BROOKS, M.D., BOTTAZZO, G.F., PRYOR, J.P.: The treatment of Peyronie's disease with Tamoxifen. In: *Br. J. Urol.* 1992, Nr. 70: S. 648-651
109. RALPH, D.J., MIRAKIAN, R., PRYOR, J.P., BOTTAZZO, G.F.: The immunological features of Peyronie's disease. In: *J. Urol.* 1996, Nr. 155: S. 159-162

110. RALPH, D.J., SCHWARTZ, G., MOORE, W., PRYOR, J.P., ERBRINGER, A., BOTTAZZO, G.F.: The genetic and bacteriological aspects of Peyronie's disease. In: *J. Urol.* 1997, Nr. 157: S. 291-294
111. RELMAN, D.A.: Universal bacterial 16S rDNA amplification and sequencing. In: PERSING, D.H., SMITH, T.F., TENOVER, F.C., WHITE, T.J. (EDS): Diagnostic molecular microbiology: principles and applications. *Mayo Foundation*, Rochester, 1993, S. 489-496
112. RHODEN, E.L., BUSELATO, L.G., TING, H.Y., TELÖKEN, C., SOUTO, C.A.V.: Is there any association between Peyronie's disease and serum collagen markers? In: *Int. J. Impotence Res.* 2000, Nr. 12: S. 302-304
113. ROMPEL, R., MUELLER-ECKHARDT, G., SCHROEDER-PRINTZEN, I., WEIDNER, W.: HLA antigens in Peyronie's disease. In: *Urol. Int.* 1994, Nr. 52: S. 34-37
114. ROMPEL, R., WEIDNER, W., MUELLER-ECKHARDT, G.: HLA association of idiopathic Peyronie's disease: An indication of autoimmune phenomena in etiopathogenesis? In: *Tissue Antigens* 1991, Nr. 38: S. 104-106
115. SCARDINO, P.L., SCOTT, W.W. The use of tocopherols in the treatment of Peyronie's disease. In: *Ann. New York Acad. Sci.* 1949, Nr. 52: S. 390-394
116. SCHIAVINO, D., SASSO, F., NUCERA, E., ALCINI, E., GULINO, G., MILANI, A., PATRIARCA, G.: Immunologic findings in Peyronie's disease: a controlled study. In: *Urology* 1997, Nr. 50: S. 764-768
117. SCHROEDER-PRINTZEN, I., HAUCK, E.W., WEIDNER, W.: New aspects in Peyronie's disease - a mini review. In: *Andrologia* 1999, Nr. 31, S. 31-35
118. SCHWARZER, U., SOMMER, F., KLOTZ, T., BRAUN, M., REIFENRATH, B., ENGELMANN, U.: The prevalence of Peyronie's disease: results of a large survey. In: *BJU International* 2001, Nr. 88: S. 727-730
119. SCOTT, W.W., SCARDINO, P.L.: A new concept in the treatment of Peyronie's disease. In: *South Med. J.* 1948, Nr. 41: S. 173-177
120. SHEPLER, P., SCHUBERT, J.: Die Wertigkeit nichtinvasiver Diagnostikverfahren zur Klassifikation der Induratio penis plastica. In: *Radiol. Diag.* (Berl.) 1987, Nr. 28: S. 363-368
121. SMITH, B.H.: Subclinical Peyronie's disease. In: *Am. J. Clin. Path.* 1969, Nr. 52: S. 385-390
122. SOMERS, K.D., DAWSON, D.M.: Fibrin deposition in Peyronie's disease plaque. In: *J. Urol.* 1997, Nr. 157: S. 311-315

123. SOMERS, K.D., SISMOUR, E.N., WRIGHT, G.L., DEVINE, C.J., GILBERT, D.A., HORTON, C.E.: Isolation and characterization of collagen in Peyronie's disease. In: *J. Urol.* 1989, Nr. 141: S. 629-631
124. SOMERS, K.D., WINTERS, B.A., DAWSON, D.M., LEFFELL, M.S., WRIGHT, G.L., DEVINE, C.J. JR., GILBERT, D.A., HORTON, C.E.: Chromosome abnormalities in Peyronie's disease. In: *J. Urol.* 1987, Nr.137: S. 672-675
125. SOMERS, K.D.; DAWSON, D.M., WRIGHT, G.L.JR., LEFFELL, M.S., ROWE, M.J., BLUEMINK, G.G., VANDE BERG, J.S., GLEISCHMAN, H., DEVINE, C.J., HORTON, C.E.: Cell culture of Peyronie's disease plaque and normal penile tissue. In: *J. Urol.* 1982, Nr. 127: S. 585- 588
126. SOMMER, F., SCHWARZER, U., WASSMER, G., BLOCH, W., BRAUN, M. KLOTZ, T. ENGELMANN, U.: Epidemiology of Peyronie's disease. In: *Int. J. Impotence Res.* 2002, Nr. 14: S. 379-383
127. STEWART, S., MALTO, M., SANDBERG, L., COLBURN, K.K.: Increased serum levels of anti-elastin antibodies in patients with Peyronie's disease. In: *J. Urol.* 1994, Nr. 152: S. 105-106
128. STITES, D.P., TERR, A.I.: Variability in tissue-typing results and cross matching. In: *Basic and Clinical Immunology* 1991, 7th edition, S. 301-302
129. SUNIL, K. CASE, A.J., VINCENT, M., SIKKA, S.C., HELLSTROM, W.J.: Intralesion injection of alpha-Interferon-2b in the treatment of Peyronie's disease. In: *J. Urol.* 1998, Nr. 159 (suppl. 5): S. 117
130. SVEJGAARD, A., PLATZ, P., RYDER, L.P.: HLA and disease 1982 - a survey. In: *Immunol. Rev.* 1983, Nr. 70: S. 193-218
131. TELÖKEN, C., DA ROS, C., GRAZIOTTIN, T., RHODIN, E., SOGARI, P., SOUTO, C.: The use of tamoxifen in Peyronie's disease. In: *Int. J. Impotence Res.* 1998, Nr. 10 (suppl 3): S. 63 abstract 458
132. TUNUGUNTLA, H.S.G.R.: Management of Peyronie's disease. In: *World J. Urol.* 2001, Nr. 19: S. 244-250
133. VAN DER WATER, L.: Mechanisms by which fibrin and fibronectin appear in healing wounds: implications for Peyronie's disease. In: *J. Urol.* 1997, Nr. 157: S. 306-310
134. VANDE BERG, J.S., DEVINE, C.J., HORTON, C.E., SOMERS, K.D., WRIGHT, G.L., LEFFELL, M.S., DAWSON, D.M., GLEISCHMAN, S.H., ROWE, M.J.: Mechanisms of calcification in Peyronie's Disease. In: *J. Urol.* 1982, Nr. 127: S. 52-54

135. VANDE BERG, J.S., DEVINE, C.J., HORTON, C.E., SOMERS, K.D., WRIGHT, G.L., LEFFELL, M.S., DAWSON, D.M., GLEISCHMAN, S.H., ROWE, M.J.: Peyronie's disease: an electron microscopic study. In: *J. Urol.* 1981, Nr. 126: S. 333-336
136. VOSSHENRICH, R., SCHROEDER-PRINTZEN, I., WEIDNER, W., FISCHER, U., FUNKE, M., RINGERT, R.H.: Value of magnetic resonance imaging in patients with penile induration (Peyronie's disease). In: *J. Urol.* 1995, Nr. 153: S. 1122-1125
137. WAHL, S.H.: Inflammation and growth factors. In: *J. Urol.* 1997, Nr. 157: S. 303-305
138. WALLIS, A.A., BELL, R., SUTHERLAND, P.W.: Propranolol and Peyronie's disease. Letter to the editor. In: *Lancet* 1977, Nr. 5: S. 980
139. WAßMUTH, R. (Hrsg.): *Einführung in das HLA-System*. Dreieich: ecomed Verlagsgesellschaft, Biotest AG (Informationsheft der Firma Biotest zum HLA-System)
140. WEIDNER, W., HAUCK, E.W., SCHNITKER, J.: Potassium Paraaminobenzoate (POTABATM) in the treatment of Peyronie's disease: A prospective, placebo-controlled randomized study. In: *Eur. Urol.* 2005, Nr. 47: S. 530-536
141. WEIDNER, W., HAUCK, E.W., SCHROEDER-PRINTZEN, I., RUDNICK, J., KRAUSE, W., WEISKE, W.H., DRAWZ, B., REBMANN, U., PASTERMADJEFF, L., KALLERHOFF, M., LENK, S., SPERLING, H., KIESCH, S., SCHNITTKER, J., AULITZKY, W.: Aminobenzoate Potassium (PotabaTM) in the therapy of Peyronie's disease - Results of a randomized, prospective, placebo-controlled multicentre study. In: *Int. J. Impotence Res.* 2001, Nr. 13 (suppl 1): S. 48 abstract M36
142. WEIDNER, W., MÜLLER, S.: Stellungnahme zur ESWT bei Induratio penis plastica. In: *Urologe A* 1998, Nr. 37: S. 107
143. WEIDNER, W., SCHROEDER-PRINTZEN, I., WEISKE, W.H., VOSSHENRICH, R.: Sexual dysfunction in Peyronie's disease: an analysis of 222 patients without previous local plaque therapy. In: *J. Urol.* 1997, Nr. 157: S. 325-328
144. WEIDNER, W.: Internationale Konferenz über Induratio penis plastica (IPP) 17.-19. März 1993, Washington Bethesda. In: *Aktuel. Urol.* 1993, Nr. 24: S. 372-374
145. WILD, C., KHENE, M., WANKE, S.: Extracorporeal shock wave therapy in orthopedics. Assessment of an emerging health technology. In: *Int. J. Technol. Assess Health Care* 2000, Nr. 16: S. 199-209

146. WILLSCHER, M.K., CWAZKA, W.F., NOVICKI, D.E.: The association of histocompatibility antigens of the B7 cross-reacting group with Peyronie's disease. In: *J. Urol.* 1979, Nr. 122: S. 34-35
147. WILLSCHER, M.K., NOVICKI, D.E., CWAZKA, W.F.: Association of HLA-B27 antigen with retroperitoneal fibrosis. In: *J. Urol.* 1978, Nr. 120: S. 681
148. YUDKIN, J.S.: Peyronie's disease in association with metoprolol. Letter to the editor. In: *Lancet* 1977, Nr. 2: S. 1355
149. ZARAFONETIS, C.J.D.: Antifibrotic therapy with Potaba. In: *Am. J. Med. Sci.* 1964, Nr. 248: S. 550-561
150. ZIEGELBAUM, M., THOMAS, A. JR., ZACHARY, A.A.: The association of Peyronie's disease with HLA B7 cross-reactive antigens. A case report of identical twins. In: *Cleve. Clin. J. Med.* 1987, Nr. 54: S. 427-43

8. Anlagen

8.1. Aufnahmebogen

Name
Datum

Aufnahmebogen 'Induratio Penis Plastica'

Beschwerdebeginn _____ (Monat/Jahr)

Erstes Symptom ₁ Deviation ₂ Schmerz ₃ Plaque ₄ ED

Hauptdeviation zur Zeit ____ ° ₁ dorsal ₂ ventral ₃ links ₄ rechts

Zusätzliche Deviation zur Zeit ____ ° ₁ dorsal ₂ ventral ₃ links ₄ rechts

Plaque ₁ ja ₂ nein

Lage ₁ dorsal ₂ ventral ₃ vorne ₄ mitte ₅ hinten

Schmerzen zur Zeit ₁ Ruhe ₂ Erektion ₃ GV ₄ keine

Frühere Schmerzen ₁ Ruhe ₂ Erektion ₃ GV

Schmerzfrei seit _____ (Monat/Jahr)

Stabile Phase ₁ ja, seit _____; ₂ nein

GV zur Zeit ° ₁ uneingeschränkt möglich ₂ leicht eingeschränkt möglich

₃ stark eingeschränkt möglich ₄ unmöglich

Spontane Erektion ₁ E0 ₂ E1 ₃ E2 ₄ E3 ₅ E4 ₆ E5

ED ₁ nein, ₂ ja, seit _____, Therapie mit _____, keine Therapie ₃

falls ED: Erektionsdauer _____ min, vorzeitige Detumeszenz ₁ nein, ₂ ja

Libido ₁ vollständig vorhanden ₂ reduziert seit _____ Monaten ₃ fehlend seit _____ Monaten

distale Flaccidität ₁ nein, ₂ ja

Sanduhrphänomen ₁ nein, ₂ ja

Peniles Trauma ₁ nein, ₂ ja, wann _____ (Monat/Jahr)

IPP-typ. Begleiterkrankungen ₁ nein, ₂ ja, _____ ₁ Dupuytren rechts, ₂ Dupuytren links

Vorbehandlung ₀ nein ₁ ja, wenn ja, wie

Potaba ₁ nein, ₂ ja **Wann?** von _____ (Monat/Jahr) bis von _____ (Monat/Jahr),

Dosierung ____ x ____ Beutel/Tabletten

Vitamin E ₁ nein, ₂ ja **Wann?** von _____ (Monat/Jahr) bis von _____ (Monat/Jahr),

Dosierung ____ x ____

Anlagen

Intraläsional ₁ nein, ₂ ja Wann?

von _____ (Monat/Jahr) bis von _____ (Monat/Jahr),
insgesamt ___ x, Präparat ___

ESWT ₁ nein, ₂ ja Wann?

von _____ (Monat/Jahr) bis von _____ (Monat/Jahr),

insgesamt ___ x, wo _____

OP ₁ nein, ₂ ja Wann?

_____ (Monat/Jahr), wo Technik _____

Körperliche Untersuchung

Gynäkomastie ₀ nein ₁ ja

Behaarung Tanner _____ (1-6)

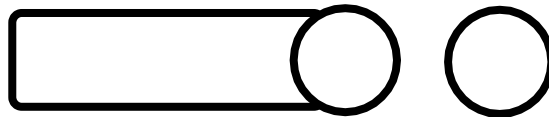
Penis ₀ o.B. _A Phimose _B Zustand nach Zirkumzision _C IPP

1. Plaque ₀ dorsal _D ventral ₀ proximal ₀ mitte _D distal **Palpation** L ___ mm x B ___ mm

2. Plaque ₀ dorsal _D ventral ₀ proximal ₀ mitte _D distal **Palpation** L ___ mm x B ___ mm

Sono: 1. Plaque L ___ mm x B ___ mm, verkalkt ₀ nein ₁ ja

Sono: 2. Plaque L ___ mm x B ___ mm, verkalkt ₀ nein ₁ ja



Hoden **Palpation** ₀ o.B. _D sonstiges _____

Sonographie ₀ o.B. _D sonstiges _____ **HV re** ___ ml, **HV li** ___ ml

Prostata **Größe** ₁ 1 Kastanie ₂ 1,5 Kastanie ₃ 2 Kastanie ₄ Mandarine ₅ > Mandarine

Konsistenz ₁ prall ₂ derb

Befund ₀ unauffällig ₁ suspekt

SKAT-Test

Präparat ₁ PGE₁ 5 10 20 40 µg (zutreffendes markieren)

Erektionsgrad E _____ (0-5) **Deviation Richtung** _____, **Grad** _____°

Duplex A. prof. penis re VSM _____ cm/sec VDM _____ cm/sec RI _____

Duplex A. prof. penis li VSM _____ cm/sec VDM _____ cm/sec RI _____

Labor

Testosteron basal _____ ng/ml **AT1** _____

Therapie

₁ Potaba

₂ ESWT

₄ Plikatur

₅ Inzision/Graft

₆ Penis-Prothese

8.2. Auswertungsbogen zur Zytokingenotypisierung

WORKSHEET
Cytokine Genotyping Tray, Lot 3



Name _____ Patient Male
 Donor Female

Sample I.D. _____ Race _____ Birthdate _____ ABO/Rh _____

Disease _____ Relationship to Patient _____

TNF- α Results _____
 TGF- β Results _____
 IL-10 Results _____
 IL-6 Results _____
 IFN- γ Results _____

Tray Exp. Date _____
 Tray Lot # _____
 Dmix Lot #/Batch # _____

POSITIONS	1H/3H/ 5H/7H/ 9H/11H	1G/3G/ 5G/7G/ 9G/11G	1F/3F/ 5F/7F/ 9F/11F	1E/3E/ 5E/7E/ 9E/11E	1D/3D/ 5D/7D/ 9D/11D	1C/3C/ 5C/7C/ 9C/11C	1B/3B/ 5B/7B/ 9B/11B	1A/3A/ 5A/7A/ 9A/11A	2H/4H/ 6H/8H/ 10H/12H	2G/4G/ 6G/8G/ 10G/12G	2F/4F/ 6F/8F/ 10F/12F	2E/4E/ 6E/8E/ 10E/12E	2D/4D/ 6D/8D/ 10D/12D	2C/4C/ 6C/8C/ 10C/12C	2B/4B/ 6B/8B/ 10B/12B	2A/4A/ 6A/8A/ 10A/12A
RESULTS <small>(mark positive locations)</small>																
PRODUCT SIZE (bp)	750	125	125	200	200	200	200	300	300	300	250	250	175	175	250	250
SPECIFICITY	Neg Ctrl	TNF- α promoter -308A	TNF- α promoter -308G	TGF- β codon 10T	TGF- β codon 10C	TGF- β codon 25C	TGF- β codon 25G	IL-10 promoter -1082A,-819T	IL-10 promoter -1082G,-819C	IL-10 promoter -1082A,-819C	IL-10 promoter -819T,-592A	IL-10 promoter -819C,-592C	IL-6 promoter -174C	IL-6 promoter -174G	IFN- γ intron 1 +874T	IFN- γ intron 1 +874A
TNF- α																
G/G (low)																
G/A (high)																
A/A (high)																
TGF- β																
T/T G/G (high)																
T/C G/G (high)																
T/C G/C (intermediate)																
C/C G/G (intermediate)																
T/T G/C (intermediate)																
C/C G/C (low)																
C/C C/C (low)																
T/T C/C (low)																
T/C C/C (low)																
IL-10																
GCC/GCC (high)																
GCC/ACC (intermediate)																
GCC/ATA (intermediate)																
ACC/ACC (low)																
ACC/ATA (low)																
ATA/ATA (low)																
IL-6																
G/G (high)																
G/C (high)																
C/C (low)																
IFN- γ																
T/T (high)																
T/A (intermediate)																
A/A (low)																



Test Performed by _____ Date _____

Read by _____ Date _____

Reviewed by _____ Date _____

9. Publikationen

9.1. Originalarbeiten (Co-Autor)

1. HAUCK, E.W., **HAUPTMANN, A.**, SCHMELZ, H.U., BEIN, G., WEIDNER, W., HACKSTEIN, H. Prospektive analysis of single nucleotide polymorphisms of the transforming growth factor beta-1 gene in Peyronie's disease. In: *J. Urol.* 2003, Nr. 169: S. 369-372
2. HAUCK, E.W., **HAUPTMANN, A.**, WEIDNER, W., BEIN, G., HACKSTEIN, H. Prospective analysis of HLA classes I and II antigen frequency in patients with Peyronie's disease. In: *J. Urol.* 2003, Nr. 170: S. 1443-1446
3. HAUCK, E.W., **HAUPTMANN, A.**, BSCHLEIPFER, T., SCHMELZ, H.U., ALTINKILIC, B.M., WEIDNER, W. Questionable efficacy of extracorporeal shock wave therapy in Peyronie's disease - results of a prospective approach. In: *J. Urol.* 2004, Nr. 171: S. 296-299
4. HAUCK, E.W., **HAUPTMANN, A.**, HAAG, S.M., BOHNERT, A., WEIDNER, W., BEIN, G., HACKSTEIN, H. Alpha-1-antitrypsin levels and genetic variation of the alpha-1-antitrypsin gene in Peyronie's disease. In: *Eur. Urol.* 2004, Nr. 46: S. 623-628
5. HAUCK, E.W., DOMANN, E., **HAUPTMANN, A.**, WEIDNER, W., CHAKRABORTY, T., HOSSAIN, H.M. Prospective analysis of 16S rDNA as a highly sensitive marker for bacterial evidence in Peyronie's disease plaques. In: *J. Urol.* 2003, Nr. 170: S. 2053-2056

9.2. Übersichtsarbeiten (Co-Autor)

1. HAUCK, E.W., **HAUPTMANN, A.**, HAAG, S.M., WEIDNER, W. Neue Aspekte zur Ätiopathogenese der Induratio penis plastica. In: *Aktuel. Urol.* 2003, Nr. 34: S. 387-391

9.3. Publierte Abstracts (Erstautor)

1. **HAUPTMANN, A.**, HAUCK, E.W., BEIN, G., WEIDNER, W., HACKSTEIN, H. Single nucleotide polymorphisms of the transforming growth factor beta-1 gene in Peyronie's disease. In: *Int. J. Impotence Res.* 2002, Nr. 4 (suppl. 4): S. 25, abstract P-148
2. **HAUPTMANN, A.**, HAUCK, E.W., WEIDNER, W., BEIN, G., HACKSTEIN, H. Prospektive analysis of –HLA class I and II phenotypes frequencies in patients with Peyronie's disease. In: *Genes and Immunity* 2003, Nr. 4: S. 42, abstract 166
3. **HAUPTMANN, A.**, HAUCK, E.W., BOHNERT, A., HAAG, S.M., WEIDNER, W., BEIN, G., HACKSTEIN, H. Alpha-1-antitrypsin levels and genetic variation of the alpha-1-antitrypsin gene in Peyronie's disease. In: *Eur. Urol.* 2004, Vol. 3, Nr. 2 (suppl.): S. 732, abstract 732

9.4. Publierte Abstracts (Co-Autor)

1. HAUCK, E.W., **HAUPTMANN, A.**, WEIDNER, W., BEIN, G., HACKSTEIN, H. Non-association of Peyronie's disease with antigens of the human leukocyte antigen (HLA)-system. In: *Eur. Urol.* 2003, Nr. 2 (suppl.): S. 123, abstract 484
2. HAUCK, E.W., HACKSTEIN, H., **HAUPTMANN, A.**, BEIN, G., WEIDNER, W. HLA-Assoziation bei Induratio penis plastica? In: *Urologe [A]* 2002, Nr. 41 (suppl. 1): S. 10, abstract P3.1
3. HAUCK, E.W., **HAUPTMANN, A.**, BEIN, G., LUDWIG, M., WEIDNER, W., HACKSTEIN, H. Prospektive analysis of transforming growth factor-beta-1 (TGF- β 1) polymorphisms in Peyronie's disease. In: *J. Urol.* 2002, Nr. 167 (suppl.): S. 206, abstract 830
4. HAUCK, E.W., HACKSTEIN, H., **HAUPTMANN, A.**, BEIN, G., WEIDNER, W. Genotypisierung von TGF- β 1-Polymorphismen bei Induratio penis plastica. In: *Urologe [A]* 2001, Nr. 40 (suppl. 1): S. 3 abstract P1.12
5. HAUCK, E.W., **HAUPTMANN, A.**, BEIN, G., MILLER, J., WEIDNER, W., HACKSTEIN, H. Genotyping for TGF- β polymorphisms in Peyronie's disease. In: *Eur. Urol.* 2001, Nr. 39 (suppl. 5): S. 109, abstract 425

6. HAUCK, E.W., **HAUPTMANN, A.**, HAAG, S.M., BOHNERT, A., WEIDNER, W., BEIN, G., HACKSTEIN, H. Prospective analysis of alpha-1-antitrypsin levels and investigations of genetic variation of the alpha-1-antitrypsin gene in Peyronie's disease. In: *Urologe [A]* 2004 , Nr. 43 (suppl. 1): S. 39, abstract P exp 6.15
7. HAUCK, E.W., **HAUPTMANN, A.**, HAAG, S.M., BOHNERT, A., WEIDNER, W., BEIN, G., HACKSTEIN, H. Prospective analysis of alpha-1-antitrypsin levels and of genetic variation of the alpha-1-antitrypsin gene in patients with Peyronie's disease. In: *Sex. Med.* 2004 , Nr. 1 (supple. 1): S. 49, abstract 066
8. HAUCK, E.W., **HAUPTMANN, A.**, WEIDNER, W., CHAKRABORTY, T., DOMANN, E., HOSSAIN. H.M. Prospective Analyse von 16S rDNA bei Induratio penis plastica (IPP). In: *Urologe [A]* 2003, Nr. 42 (supple. 1): S. 64, abstract V4.6

10. Abkürzungsverzeichnis

AAT	Alpha-1-Antitrypsin
ASMA	Alpha Smooth Muscle Actin
ATP	Adenosin Triphosphat
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
C	Komplement
CRP	C-reaktives Protein
CT	Computertomographie
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
CTP	Cytosine Triphosphat
ddNTP	Dideoxyribonukleotidtriphosphat
DICC	Dynamische Infusionskavernosometrie und –graphie
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ED	Erektile Dysfunktion
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESWT	Extrakorporale Stoßwellentherapie
EtBr	Ethidium Bromid
G-CSF	Granulocyte Colony Stimulating Factor
GSMA	Gamma Smooth Muscle Actin
GTP	Guanosin Triphosphat
HLA	Human Leukozyte Antigen
HSP 70	Hitzeschockprotein 70
Id-2	Inhibitor of DNA binding 2
IL-10	Interleukin-10
IL-6	Interleukin-6

INF-Gamma	Interferon-Gamma
iNOS	inducible Nitric Oxide Synthase
IPP	Induratio penis plastica
MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein-1
MG	Molekulargewichtsstandard
MHC	Major Histocompatibility Complex
MRT	Magnetresonanztomographie
NO	Nitric Oxide
NOS	Nitric Oxide Synthase
OSF-1	Osteoblast Stimulating Factor-1
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCR-SSP	Polymerase Chain Reaction with Sequence-Specific Primers
PD	Peyronie's disease
PI	Proteinaseinhibitor
PMN-Elastase	Polymorphkernige-neutrophile Granulozyten-Elastase
rDNA	ribosomale Desoxyribonukleinsäure
ROS	Reactive Oxygen Species
SKAT	Schwellkörperautoinjektionstherapie
SNP	Single Nucleotid Polymorphism
STD	Sexual Transmitted Disease
TGF-beta	Transforming Growth Factor-beta
TNF-alpha	Tumornekrosefaktor-alpha
TTP	Tyrosin Triphosphat

11. Danksagung

Herrn Prof. Dr. W. Weidner, Direktor der Klinik und Poliklinik für Urologie und Kinderurologie, danke ich ganz herzlich für den steten Beistand bei der Realisierung der Arbeit. Vielen Dank für die Ermöglichung von Publikationen und Präsentationen der Dissertationsergebnisse.

Herrn Prof. Dr. G. Bein, Direktor des Instituts für klinische Immunologie und Transfusionsmedizin, gilt mein besonderer Dank für den uneingeschränkt gewährten Rat bei der Verwirklichung der genetischen Untersuchungen sowie für die freundliche Bereitstellung von Labor und Labormaterialien.

Ein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn PD. Dr. E. W. Hauck für die lange freundschaftliche Zusammenarbeit, die Überlassung des Dissertationsthemas und seine konsequente Unterstützung bei der Durchführung meiner Arbeit. Vielen Dank für die vielen interessanten und fachübergreifenden Diskussionen.

Herrn PD. Dr. H. Hackstein danke ich ganz herzlich für die vielen Anregungen und vor allem für die unschätzbare Hilfestellung bei der Durchführung der statistischen Analysen.

Als stete Ansprechpartnerin schulde ich Frau Dr. A. Bohnert großen Dank. Danke für den unermüdlichen Beistand bei allen Laborarbeiten und besonders für die vielen fachlichen Diskussionen und aufmunternden Worte.

Für die freundliche Bereitschaft zur Messung der Alpha-1-Antitrypsin Serumspiegel danke ich Herrn Prof. Dr. Gardemann ganz herzlich.

Besondere Anerkennung gebührt Frau Uta Schellenberg für die zahllosen medizintechnischen Hilfestellungen.

Frau Kerstin Wilhelm und Frau Tania Bloch möchte ich ganz herzlich für die liebenswürdige „Starthilfe“, die Unterstützung bei den DNA-Isolierungen und die fröhliche Arbeitsatmosphäre danken.

Meiner Familie danke ich von ganzem Herzen. Ganz besonders meinen Eltern, die mir mein Studium ermöglichten. Vielen Dank auch Ulla und Alexander Hauptmann für ihr Interesse, den unschätzbaren „Computer-Support“ und die vielen kompetenten Anregungen.

12. Lebenslauf

Persönliche Daten

Arne Hauptmann
Liebigstr. 49
35392 Gießen

geb. am 28. Januar 1975 in Lich
ledig

Eltern:

PD. Dr. Wolfgang Hauptmann
Leitender Schulamtsdirektor am Staatlichen Schulamt
Gießen

Gerlinde Hauptmann
Lehrerin i. R.

Schulische Ausbildung:

1981 – 1985

Korzcak-Schule in Gießen

1985 – 1987

Ludwig-Uhland-Schule in Gießen

1987 – 1994

Liebigschule in Gießen
Abitur: Juni 1994

Zivildienst:

Juli 1994 – August 1995

Pflegedienst im St. Josefs Krankenhaus in Gießen

Ausbildung zum Bankkaufmann:

August 1995 – August 1997

Dresdner Bank AG in Frankfurt

Universitäre Ausbildung:

Oktober 1997 – April/Mai 2004

Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität
in Gießen

Examina:

September 1999

Physikum

April 2001

1. Staatsexamen

April 2003

2. Staatsexamen

Mai 2004

3. Staatsexamen (Wahlfach: Urologie)

AiP:

Ab Juni 2004:

Chirurgische Abteilung des Evangelisches Krankenhauses in
Gießen

Assistenzarzt:

ab Oktober 2004

Chirurgische Abteilung des Evangelisches Krankenhauses in
Gießen

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“