

Judith Sendzik

**Wirkungen von Glukokortikoiden und Chinolonen auf
Tenozyten vom Menschen *in vitro***

Berliner Beiträge zur Pharmazie

Band 6

Die Deutsche Bibliothek - CIP-Einheitsaufnahme

Bibliografische Information Der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

Gedruckt auf holz- und säurefreiem Papier, 100 % chlorfrei gebleicht.

© Weißensee Verlag, Berlin 2006
Kreuzbergstr. 30, 10965 Berlin
Tel. 0 30 / 91 20 7-100
www.weissensee-verlag.de
e-mail: mail@weissensee-verlag.de

Alle Rechte vorbehalten

Printed in Germany

ISSN 1611-0536
ISBN 3-89998-078-6

**Wirkungen von Glukokortikoiden und
Chinolonen auf Tenozyten vom Menschen
*in vitro***

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Judith Sendzik
aus Berlin

Berlin 01/2006

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. Ralf Stahlmann
 2. Gutachter: Frau Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting
- Datum der Disputation: 16.02.2006

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von

Herrn Prof. Dr. Ralf Stahlmann

in Kooperation mit Herrn Prof. Dr. Mehdi Shakibaei und

Frau Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting

im Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie

der Charité - Universitätsmedizin Berlin,

Campus Benjamin Franklin angefertigt.

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | EINLEITUNG..... | 16 |
| 1.1 | Sehne..... | 16 |
| 1.1.1 | Sehnenzellen..... | 16 |
| 1.1.2 | Extrazelluläre Matrix..... | 17 |
| 1.1.3 | Integrine..... | 18 |
| 1.1.4 | Tendopathien..... | 19 |
| 1.1.4.1 | Chinolon-induzierte Arthropathie..... | 20 |
| 1.1.4.2 | Chinolon-induzierte Tendopathie..... | 22 |
| 1.2 | Chinolone / Fluorchinolone..... | 25 |
| 1.2.1 | Herkunft und Einteilung..... | 25 |
| 1.2.2 | Wirkungsmechanismus..... | 27 |
| 1.2.3 | Struktur-Wirkungsbeziehungen..... | 28 |
| 1.2.4 | Wechselwirkungen..... | 30 |
| 1.2.5 | Nebenwirkungen und Kontraindikationen..... | 31 |
| 1.2.6 | Ciprofloxacin..... | 33 |
| 1.2.7 | Levofloxacin..... | 34 |
| 1.3 | Glukokortikoide - Dexamethason..... | 35 |
| 1.3.1 | Wirkmechanismus..... | 36 |
| 1.3.2 | Struktur-Wirkungsbeziehungen..... | 36 |
| 1.3.3 | Nebenwirkungen..... | 37 |
| 1.3.4 | Kontraindikationen..... | 38 |
| 1.3.5 | Dexamethason..... | 38 |
| 1.4 | Fragestellung und Zielsetzung..... | 39 |
| 2 | MATERIAL UND METHODEN..... | 44 |
| 2.1 | Material..... | 44 |
| 2.1.1 | Geräte..... | 44 |
| 2.1.2 | Reagenzien und Verbrauchsmaterialien..... | 45 |

INHALT

| | | |
|------------|--|-----------|
| 2.1.3 | Antikörper..... | 47 |
| 2.1.4 | Kulturmedien und Lösungen | 48 |
| 2.1.4.1 | Medien..... | 48 |
| 2.1.4.2 | Lösungen | 49 |
| 2.2 | Methoden..... | 53 |
| 2.2.1 | Zellkultur | 53 |
| 2.2.1.1 | Gewinnung und Kultivierung von humanen Tenozyten..... | 53 |
| 2.2.1.2 | Passagierung..... | 54 |
| 2.2.1.3 | Einfrieren | 55 |
| 2.2.1.4 | Quantifizierung..... | 55 |
| 2.2.1.5 | Lösung der Testsubstanzen..... | 56 |
| 2.2.1.6 | Versuchsaufbau für die Transmissionselektronenmikroskopie und biochemische Untersuchungen mittels Western Blot..... | 56 |
| 2.2.2 | Lichtmikroskopie | 57 |
| 2.2.3 | Elektronenmikroskopie..... | 58 |
| 2.2.4 | Spezifische Proteindetektion mittels SDS-Gelelektrophorese und Western Blot | 58 |
| 2.2.4.1 | Probenvorbereitung | 58 |
| 2.2.4.2 | SDS-Gelelektrophorese | 60 |
| 2.2.4.3 | Western Blot | 60 |
| 2.2.4.4 | Densitometrie..... | 61 |
| 2.2.4.5 | Statistik | 61 |
| 3 | ERGEBNISSE | 64 |
| 3.1 | Lichtmikroskopie | 64 |
| 3.2 | Elektronenmikroskopie | 65 |
| 3.3 | Western Blot Analyse..... | 71 |
| 3.3.1 | Effekte auf die extrazelluläre Matrix | 71 |
| 3.3.2 | Beeinflussung von transmembranären und intrazellulären Signalproteinen | 75 |
| 3.3.3 | Einfluss auf die Matrix-Metalloproteinasen..... | 92 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 3.3.4 | Aktivierung des Apoptosemarkers „Caspase-3“ | 101 |
| 4 | DISKUSSION | 110 |
| 4.1 | Chinolon-induzierte Effekte auf Tenozyten <i>in vitro und in vivo</i> | 113 |
| 4.2 | Dexamethason-induzierte Effekte auf Tenozyten <i>in vitro und in vivo</i> | 118 |
| 4.3 | Effekte der Kombination von Chinolonen und Glukokortikoiden auf Tenozyten..... | 122 |
| 4.4 | Ausblick..... | 124 |
| 5 | ZUSAMMENFASSUNG..... | 126 |
| 6 | LITERATURVERZEICHNIS..... | 134 |

1 EINLEITUNG

1 EINLEITUNG

1 EINLEITUNG

1.1 Sehne

Die Sehne zählt, neben anderen Geweben, wie z.B. dem Knorpel oder Knochengewebe, zum Bindegewebe. Sehnen verbinden Knochen und Muskeln oder Muskelbäuche untereinander. Sie dienen der Kraftübertragung der Muskeln auf die Knochen und ermöglichen die Beweglichkeit der Gelenke. Für diese Funktion müssen sie eine hohe Zugfestigkeit, hohe mechanische Stabilität aber auch elastische Eigenschaften aufweisen. Verantwortlich für diese Eigenschaften ist die ausgedehnte extrazelluläre Sehnenmatrix. Sie bildet ein dreidimensionales Netzwerk, welches zu 65-80% aus Collagen (hauptsächlich Collagen Typ I, wenig Collagen Typ III und V) und daneben Elastin (1-2%), anorganischen Komponenten sowie der sogenannten Grundsubstanz besteht. Die Grundsubstanz umgibt die collagenen und elastischen Fasern und besteht aus Wasser, Proteoglykanen, Glykosaminoglykanen und Glykoproteinen. Den zellulären Anteil der Sehne bilden die Sehnenzellen (Teno- oder Tendozyten), die zwischen den Collagenfasern angeordnet sind. Sie synthetisieren die Komponenten der extrazellulären Matrix und haben somit eine zentrale Bedeutung bei der Erneuerung (Remodelling) der Matrix und folglich der Funktionstüchtigkeit der gesamten Sehne (Jozsa et al. 1991, Benjamin und Ralphs 2000, Kannus 2000).

Unter physiologischen Bedingungen ist die Sehne nur schwach vaskularisiert (bradytrophes Gewebe), so dass Veränderungen im Elektrolyt- oder Nährstoffgehalt kaum oder nur sehr langsam ausgeglichen werden können (Ahmed et al. 1998).

1.1.1 Sehnenzellen

Sehnenzellen sind langgestreckte spindelförmige Zellen mit langen Fortsätzen durch die der Zell-Zell- und Zell-Matrixkontakt vermittelt wird (Benjamin und Ralphs 2000, Kannus 2000). Aufgrund ihrer charakteristischen Form werden sie auch Flügelzellen genannt. Zellform und Fortsätze sind von besonderer Wichtigkeit, da unter physiologischen Bedingungen die Zelldichte in der Sehne insgesamt gering ist und der essentielle Zell-Zell- und Zell-Matrixkontakt trotz wachsender Matrix auf diese Weise gewährleistet ist. Sehnenzellen bilden über diese Fortsätze ein kommunizierendes

Netzwerk in der Sehne. Der Informationsaustausch zwischen den Zellen bzw. Zellfortsätzen wird über sogenannte „gap junctions“ vermittelt (Ralphs et al. 1998, Benjamin und Ralphs 2000, Kannus 2000). Tenozyten variieren in ihrer Größe, sie können 80-300 µm lang werden. Ihr Zellkern ist oval und langgezogen. Die hohe metabolische Aktivität der Sehnenzellen wird bei der ultrastrukturellen Analyse durch ein gut ausgebildetes raues Endoplasmatisches Retikulum (rER) und zahlreiche Golgi Apparate deutlich. Mitochondrien sind in kleiner Zahl vorhanden, zeigen aber eine definierte Cristae-Struktur (Benjamin und Ralphs 2000, Kannus 2000). Dieser ultrastrukturelle Aufbau spiegelt die hohe Synthesekapazität der Tenozyten wider. Sie sind für die Herstellung sämtlicher Matrixbestandteile verantwortlich und legen außerdem die Anordnung der Collagenfaserbündel fest (Benjamin und Ralphs 2000, Kannus 2000).

1.1.2 Extrazelluläre Matrix

Die kleinste Einheit des Collagenfasernetzwerkes bilden die löslichen Tropocollagenmoleküle. Sie werden von den Sehnenzellen gebildet, durch Quervernetzung entstehen unlösliche Collagenmoleküle, die zu Mikro- bzw. anschließend zu Collagenfibrillen aggregieren. Einzelne Collagenfibrillen lagern sich zunächst zu Fasern und schließlich zu primären Faserbündeln (Subfaszikel) zusammen. Mehrere primäre Faserbündel bilden zusammen ein sekundäres Faserbündel (Faszikel), und mehrere sekundäre Faserbündel formen ein tertiäres Faserbündel. Tertiäre Faserbündel schließen sich spiralförmig zur endgültigen Sehne zusammen. Jede Collagenfaser und auch die primären und sekundären Faserbündel sind von einer dünnen Schicht lockerem Bindegewebe, dem sogenannten „Endotenon bzw. Peritenon“, ummantelt, welches für die Anbindung an weitere Fasern sorgt. Die Sehne selbst ist vom sogenannten „Epitenon“ umgeben, welches aus einem dichten Netzwerk von Collagenfibrillen besteht. Diese elastische Hülle ermöglicht die Beweglichkeit der Sehne gegenüber dem umliegenden Gewebe. Viele Sehnen sind außerdem in einer Schicht von lockerem Bindegewebe, dem sogenannten „Paratenon“, eingebettet. Die komplexe Mikro- und Makrostruktur der Collagenfasern verhindert die Zerstörung oder die Trennung der Fasern bei den während des Bewegungsablaufs auftretenden Zug-

1 EINLEITUNG

Scher- und Rotationskräften (Jozsa et al. 1991, Benjamin und Ralphs 2000, Kannus 2000).

Neben den Collagenfasern sind in der Sehne auch elastische Fasern (1-2%) vorhanden. Ihre Bedeutung ist bisher noch nicht vollständig geklärt. Möglicherweise sind sie an der Wiederherstellung der wellenartigen Struktur der Collagenfasern nach einer Streckung beteiligt (Butler et al. 1978, Kannus 2000).

Die Collagenfasern und die elastischen Fasern sind von der sogenannten Grundsubstanz umgeben. Sie besteht hauptsächlich aus Wasser, Proteoglykanen, Glykosaminoglykanen, wie z.B. Dermatansulfat, Chondroitinsulfat oder Hyaluronsäure und Glykoproteinen, wie z.B. Fibronectin und Thrombospondin. Proteoglykane und Glykosaminoglykane sind hydrophile Makromoleküle mit hoher Wasserbindungskapazität. Sie bilden ein hydrophiles Gel, welches für die biomechanischen Eigenschaften (Elastizität) der Sehne essentiell ist und das Collagennetzwerk stabilisiert. Glykoproteine haben adhäsive Eigenschaften und können entweder andere Makromoleküle oder Zelloberflächenproteine binden. Die anorganischen Komponenten der extrazellulären Matrix, wie Calcium, Magnesium, Mangan, Cadmium, Kobalt, Kupfer, Zink, Nickel, Lithium, Blei, Fluor, Phosphor oder Silizium bilden nur ca. 0,2% der Sehnen-Trockenmasse. Sie sind am Wachstum, der Entwicklung und dem Stoffwechsel der Sehne beteiligt (Kannus 2000).

Das sogenannte „Remodelling“ der extrazellulären Matrix obliegt, wie schon unter 1.1.1 beschrieben, den Sehnenzellen. Der Informationsfluss zwischen der extrazellulären Matrix und den Zellen wird über membranständige Rezeptorproteine, die Integrine, vermittelt (Hynes 1992).

1.1.3 Integrine

Die Integrine sind glykosylierte Adhäsionsmoleküle, die als membranständige Signaltransduktionsrezeptoren zwischen der extrazellulären Matrix und dem Zellinneren fungieren. Sie vermitteln den Signalweg zwischen dem Zelläußeren und zellinternen Signalkaskaden. Es handelt sich um Zelladhäsionsrezeptoren, die verschiedene Signaltransduktionswege, wie den in dieser Arbeit untersuchten Mitogen-Activated-Protein(MAP)-Kinase-Signaltransduktionsweg, aktivieren und somit bei Prozessen, wie der Proliferation, Differenzierung, dem Überleben und der