

**Die Modulation zellulärer Reaktionen
humaner Patellarsehnenfibroblasten
durch repetitive, zyklische mechanische
Dehnung**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von
Dipl.-Biol. Tanja Barkhausen
geboren am 11.09.1973 in Hannover

2002

Referent: Prof. Dr. W. Müller

Korreferent: Prof. Dr. M. van Griensven

Tag der Promotion: 20. November 2002

Abstract

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, inwiefern definierte repetitive Dehnungsmuster in der Lage sind, unterschiedliche zelluläre Funktionen wie Proliferation, Apoptose, HSP 72-Synthese, TGF- β 1-Sekretion, IL-6-Sekretion und Typ I und Typ III Kollagen-Expression von humanen Patellarsehnenfibroblasten zu modulieren. Im Rahmen der durchgeführten Versuche sollte zum einen extrapoliert werden, ob unterschiedliche Dehnungsmuster unterscheidbare zelluläre Antworten hervorrufen können, zum anderen stand die Frage im Vordergrund, ob eine repetitive Dehnung einen anderen Effekt auslöst als es eine einfache Dehnung vermag, und somit eventuell eine Adaptation des Gewebes bewirkt. Dabei zeigte sich, daß sowohl Unterschiede zwischen verschiedenen repetitiven Dehnungsmustern als auch zwischen einmalig applizierter Dehnung und repetitiver Dehnung vorliegen. Repetitive Dehnung wirkt sich durch die wiederholte Stimulation der Zellen umfassender auf die untersuchten zellulären Funktionen aus als einmalige Dehnung. Im Hinblick auf unterschiedliche repetitive Dehnungsmuster ließ sich ermitteln, daß repetitive Dehnungsmuster, die über einen Tag appliziert wurden, die meisten Zellfunktionen stimulieren während ein repetitives Dehnungsmuster, das über zwei Tage appliziert wurde, zu einer Inhibition vieler Zellparameter führt, was auf ein Übermaß an Dehnung zurückzuführen ist und möglicherweise durch HSP 72 vermittelt wird. Diese Ergebnisse können wichtige Hinweise für die Heilung von Bandverletzungen liefern und stellen sich als wegweisend für das Tissue Engineering von Bändern und Sehnen dar.

Schlagwörter: mechanische Dehnung, zelluläre Reaktionen, Fibroblasten

Abstract

The aim of the present study was to investigate the influence of repetitive cyclic biaxial strain on a variety of cell functions. The parameters determined were cell proliferation, apoptosis, heat shock protein 72 synthesis, cytokine secretion (TGF- β 1, IL-6) and the expression of extracellular matrix proteins (type I and type III collagen). The main questions of this study concerned whether different cellular reactions exist in reaction to different strain patterns. Secondly, the possibly different reactions between repetitive strain and singular strain were determined in association with adaptive responses. The results showed that differences occur between the different repetitive strain patterns on the one hand and between repetitive and singular strain application on the other. Repetitive strain application exerts an increased influence on the studied parameters in comparison to singular strain. Comparing repetitive strain patterns, it was shown that repetitive strain applied during one day stimulated most cellular functions in contrast to a strain duration over two days. The latter induced an inhibition of the observed functions probably through an increased HSP 72 activity. This may be related to an excess of applied strain. These results exhibit important functional data for tissue engineering and rehabilitation purposes.

Key words: mechanical strain, cellular reactions, fibroblasts

1 Inhaltsverzeichnis

1	INHALTSVERZEICHNIS	1
2	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	4
3	EINLEITUNG	6
4	KENNTNISSTAND	9
4.1	Proliferation	9
4.1.1	Zellzyklus	10
4.1.2	Signaltransduktion bei mechanischer Dehnung	11
4.1.3	Mechanische Dehnung und Proliferation.....	14
4.2	Apoptose	16
4.2.1	Molekulare Mechanismen der Apoptose.....	17
4.2.2	Mechanische Dehnung und Apoptose	21
4.3	Hitzeschockprotein 72	22
4.3.1	Struktur von HSP 70/ 72	23
4.3.2	Funktion von HSP 70/ 72	23
4.3.3	Genregulatorische Mechanismen	24
4.3.4	HSP 72 und Apoptose	25
4.3.5	HSP 72 und mechanische Dehnung.....	27
4.4	Zytokine.....	29
4.4.1	TGF- β 1	29
4.4.1.1	Struktur und Signaltransduktion.....	29
4.4.1.2	TGF- β 1 und Wundheilung.....	31
4.4.1.3	TGF- β 1 und mechanische Dehnung	32
4.4.2	IL-6 33	
4.4.2.1	Biochemie des IL-6.....	34
4.4.2.2	IL-6 bei mechanischer Dehnung.....	34
4.5	Extrazelluläre Matrix (ECM)	35
4.5.1	Struktur und Synthese von Typ I und III Kollagen.....	36
4.5.2	Funktion der ECM	36
4.5.3	Die ECM und mechanische Dehnung.....	37
5	FRAGESTELLUNG	40

6	MATERIAL UND METHODEN	41
6.1	Fibroblastenisolierung aus Gewebeproben.....	41
6.2	Silikonschalen.....	43
6.3	Dehnungsexperimente.....	44
6.3.1	<i>Elektromechanisches Stimulationsgerät</i>	<i>44</i>
6.3.2	<i>Versuchsgruppen</i>	<i>46</i>
6.3.3	<i>Versuchsparameter und Zeitintervall nach repetitiver Dehnung.....</i>	<i>46</i>
6.4	Quantifizierung der Zellproliferation.....	47
6.5	Quantifizierung der Apoptoserate	50
6.5.1	<i>Funktionsweise des Durchflußzytometers (FACS)</i>	<i>50</i>
6.5.2	<i>Quantifizierung mittels Annexin-V</i>	<i>50</i>
6.5.3	<i>Färbeprotokoll.....</i>	<i>51</i>
6.6	Hsp 72-Quantifizierung.....	53
6.6.1	<i>SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....</i>	<i>53</i>
6.6.2	<i>Western Blot.....</i>	<i>55</i>
6.6.3	<i>Immundetektion der Proteine</i>	<i>55</i>
6.7	Zytokinbestimmungen.....	57
6.7.1	<i>Interleukin 6.....</i>	<i>57</i>
6.7.2	<i>Transforming Growth Factor-β1</i>	<i>59</i>
6.8	Quantifizierung der mRNA der extrazellulären Matrixproteine	59
6.8.1	<i>RNA Isolierung</i>	<i>60</i>
6.8.2	<i>RT-PCR.....</i>	<i>61</i>
6.8.2.1	<i>Polymerase-Kettenreaktion.....</i>	<i>61</i>
6.8.3	<i>Generierung des Standards 63</i>	
6.8.3.1	<i>Klonierung der PCR-Produkte</i>	<i>63</i>
6.8.3.2	<i>Plasmid-Präparation.....</i>	<i>65</i>
6.8.3.3	<i>Restriktionsverdau</i>	<i>65</i>
6.8.3.4	<i>Geleluation.....</i>	<i>66</i>
6.8.4	<i>Real-Time-PCR</i>	<i>66</i>
6.9	Statistik.....	68
7	ERGEBNISSE	69
7.1	Einfluß von mechanischer Dehnung auf die Proliferation.....	69
7.2	Einfluß von mechanischer Dehnung auf die Apoptoserate	73
7.3	Einfluß von mechanischer Dehnung auf die HSP 72-Synthese.....	77
7.4	Einfluß von mechanischer Dehnung auf die TGF- β 1-Sekretion.....	80

7.5 Einfluß von mechanischer Dehnung auf die IL-6 Sekretion.....	83
7.6 Einfluß von mechanischer Dehnung auf die Typ I Kollagen mRNA- Expression	86
7.7 Einfluß von mechanischer Dehnung auf die Typ III Kollagen mRNA- Expression	89
8 DISKUSSION	93
8.1 Dehnungsmuster-bedingte Unterschiede der zellulären Stressantwort.....	93
8.2 Stressadaptation der Zellen durch repetitive Dehnung.....	103
8.3 Aussagekraft der Studie	105
9 ZUSAMMENFASSUNG	108
10 LITERATURVERZEICHNIS	110
11 LEBENSLAUF	144
12 PUBLIKATIONSVERZEICHNIS.....	145
13 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....	146
14 DANKSAGUNG.....	147

2 Abkürzungsverzeichnis

AS	=	Aminosäure
BrdU	=	5-Bromo-2'-desoxy-Uridin
cAMP	=	cyclic Adenosin-Mono-Phosphate
cDNA	=	copy Desoxyribonucleicacid
DMEM	=	Dulbecco's Modified Essential Medium
DNA	=	Desoxyribonucleicacid
dNTP	=	Desoxynukleotidtriphosphate
ECM	=	Extrazelluläre Matrix
EDTA	=	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	=	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
ERK	=	Extrazellulär Signal-Regulierte Kinasen
FACS	=	Fluorescent Activated Cell Sorter
FITC	=	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	=	Fetales Kälberserum
HSF	=	Hitzeschockfaktor
HSP	=	Hitzeschockprotein
Hz	=	Hertz
JNK	=	C-jun N-terminale Kinase
MAPK	=	Mitogen-Aktivierte Proteinkinasen

mRNA	=	messenger Ribonucleicacid
PAGE	=	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBGD	=	Porphobilinogen-Desaminase
PBS	=	Phosphate Buffered Saline
PCR	=	Polymerase-Kettenreaktion
PI	=	Propidiumiodid
PKC	=	Proteinkinase C
PS	=	Phosphatidylserin
RNA	=	Ribonucleicacid
RT	=	Reverse Transkriptase
SDS	=	Sodiumdodecylsulfat
SRE	=	Stress Response Element
SSRE	=	Shear Stress Response Element
TGF- β 1	=	Transforming Growth Factor Beta 1
TMB	=	3-3'-5-5'-Tetramethylbenzidin

3 Einleitung

Sehnen- und Kapsel-Band-Läsionen gehören heute neben Knochenläsionen zu den häufigsten Verletzungen, die im unfallchirurgischen Bereich auftreten. Ursächlich dafür verantwortlich sind das wachsende Gesundheitsbewußtsein der Bevölkerung, ein damit zusammenhängender Anstieg an Freizeitsportlern und eine verbesserte Diagnostik derartiger Verletzungen. Der sich durch stationären und ambulanten Behandlungsaufwand ergebende zunehmende Kostendruck im Gesundheitswesen impliziert dementsprechend auch die sozioökonomische Bedeutung einer Therapieoptimierung von Bandverletzungen.

Kniebänder sind unter physiologischen Bedingungen einer permanenten, wechselnd intensiven mechanischen Dehnung und Belastung ausgesetzt. Aus diesem Grund ist es naheliegend, daß Dehnung einen nicht unerheblichen Einfluß auf zelluläre Reaktionen in Bändern und Sehnen hat und daß sie das Remodeling nach Verletzungen zumindest beeinflussen kann. Ähnliches kann auch in anderen Gewebsverbänden und Organen beobachtet werden, bei denen mechanische Dehnung zur „normalen“ physiologischen Umgebung gehört, wie z.B. bei Knochen, Herz und Arterien.

Die oben erwähnte Therapie von Bandverletzungen wird bis zum heutigen Tag kontrovers diskutiert. Einerseits ist bekannt, daß langfristig immobilisierende Maßnahmen negative Begleiterscheinungen wie Inaktivitätsosteoporose, Muskelatrophie, Kapselkontrakturen, Adhäsion von Gleitschichten und eine Degeneration des Gelenkknorpels mit sich führen. Andererseits kann eine frühfunktionelle Therapie mit einer inflammatorischen Reaktion und somit Schmerzen, Gelenksteife und Ödembildung einher gehen (NOYES 2000). Außerdem ist das vorrangige Ziel einer optimierten Behandlung nicht nur ein beschleunigter

Heilungsprozeß sondern auch eine nahezu uneingeschränkte Wiederherstellung der Funktion des verletzten Gewebes. Es wurde jedoch bereits von mehreren Arbeitsgruppen dargestellt, daß sich die biochemischen, morphologischen und vor allem biomechanischen Eigenschaften von Patellarsehnen durch frühe Mobilisierung im Gegensatz zu immobilisierten Patellarsehnen nicht verbesserten sondern Gegenteilig noch schlechtere Ergebnisse lieferten (ALMEKINDERS 1995; BASKIN 1993; BURKS 1990).

Weiterhin stellt sich also die Frage, welche Dosierung mechanischer Belastung notwendig respektive sinnvoll ist, um den Heilungsprozeß von Kniebandverletzungen zu beschleunigen, die mechanischen Eigenschaften des betroffenen Gewebes weitestgehend wiederherzustellen und dabei „Immobilisationschäden“ vorzubeugen ohne das Gewebe zu überlasten.

In vorausgegangenen Untersuchungen der Arbeitsgruppe wurde in einem *in vitro*-System ermittelt, daß die einmalige Applikation von zyklischer mechanischer Dehnung bei unterschiedlicher Länge der Dehnungsapplikation verschiedene Auswirkungen auf zelluläre Funktionen wie Proliferation, Apoptose, HSP 72-Expression und Synthese von Proteinen der extrazellulären Matrix von Fibroblasten der Kniesehne hat. Ziel dieser Studie war es, herauszufinden, welchen Effekt eine definierte repetitive zyklische mechanische Dehnung auf die zellulären Funktionen von Patellarsehnenfibroblasten hat. Dabei steht die Frage im Vordergrund, ob es bei der Applikation einer wiederholten Dehnung zu einer Adaptation des Gewebes an die externen Bedingungen, zu einer Stresstoleranz, kommt und sich die negativen Effekte, die nach einmaliger Dehnungsapplikation auftreten, reduzieren lassen.

Auf zellulärer Ebene hat mechanische Dehnung erwiesenermaßen einen Einfluß, da Signale über Mechanotransduktoren und Cytoplasma in den Zellkern weitergeleitet werden und hier eine Veränderung der Genexpression bewirken. Diese Veränderungen können sich auf die Proliferations- und Apoptoserate beziehen oder eine Modulation im

Expressionsmuster von Proteinen hervorrufen. Im Rahmen dieses Forschungsprojektes wurde weitergehend untersucht, welchen Einfluß repetitive Dehnungsmuster unterschiedlicher Länge und Anzahl auf die Proliferation, Apoptose, HSP 72-Expression, TGF- β 1- und IL-6-Sekretion und die Expression von Proteinen der extrazellulären Matrix (Kollagen Typ I und III) haben.

Das Verständnis für die biologischen Grundlagen zellulärer Stressreaktionen ist einerseits wichtig für eine Optimierung der Heilungsvorgänge in Bändern und Sehnen. Andererseits kann sich das Wissen auch zu Nutze gemacht werden beim „Tissue Engineering“ von Binde- und Stützgeweben, da auch hier die mechanische Belastung in Form von Dehnung oder Druck möglicherweise einen essentiellen Faktor bei der Gewebsentwicklung darstellen kann.

4 Kenntnisstand

Nach einer Gewebsverletzung ist die Wiederherstellung der Integrität dieses Gewebes häufig von entscheidender Bedeutung für den Gesamtorganismus. Diese Regeneration verläuft bei Bändern und Sehnen immer nach einem festgelegten Schema.

Direkt nach einem Gewebetrauma kommt es zu einer lokalen Entzündungsreaktion des betroffenen Gewebes, verbunden mit IL-6-Freisetzung, erhöhter Durchblutung des Gewebes und Influx von Leukozyten. In dieser Phase werden potentiell eingedrungene Erreger eliminiert und Zellebris phagozytiert. Im Anschluß an diese Reaktion beginnt die Reparatur des geschädigten Gewebes, die gekennzeichnet ist durch eine erhöhte Proliferation von Fibroblasten und Endothelzellen sowie einen gesteigerten Kollagenumsatz und die Produktion von Glykosaminoglykanen. Hierbei wird innerhalb kürzester Zeit ein „Gerüst“ errichtet, an dem der Aufbau neuen Gewebes stattfinden kann. Die Phase der Gewebereparatur ist gefolgt von einer Remodelierungsphase, in der die Zelldichte und Anzahl der Blutgefäße zurückgehen und die Bindegewebsmatrix neu strukturiert wird. Bei dem remodelierten Gewebe handelt es sich jedoch um ein Narbengewebe, das andere histologische, biochemische und vor allem auch biomechanische Eigenschaften aufweist als das ursprüngliche Gewebe der Bänder und Sehnen. Dieses Narbengewebe befindet sich zum Teil auch Jahre später noch in einer permanenten Umwandlung, wobei nach und nach ein Gewebe synthetisiert wird, das dem ursprünglichen Gewebe annähernd gleich ist.

4.1 *Proliferation*

Die Proliferation von Zellen, also deren Vervielfältigung, ist ein bei dem Heilungsprozeß (s.o.) unerläßlicher Vorgang. Bei Verletzungen kommt es zu Lücken im Gewebe, die nur durch eine verstärkte Migration von Zellen,

unter anderem Fibroblasten, in den Wundbereich und deren erhöhte Proliferations- und Stoffwechselrate wieder geschlossen werden können.

4.1.1 Zellzyklus

Reife Zellen entstehen durch Proliferation und Differenzierung aus Progenitorzellen. Während dieser Reifung entstehen im zellulären Genom feststehende Muster, die über die Länge des Zellzyklus (2-4 Tage), die Anpassungsfähigkeit der Zellen, die Häufigkeit der Zellteilung und die Anzahl der Zellen in der Wachstumsfraktion entscheiden.

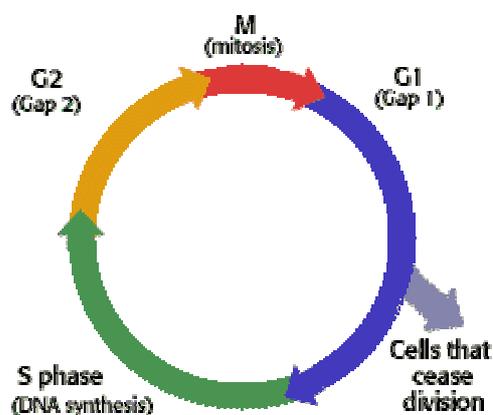


Abbildung 1: Zellzyklus

Zellen innerhalb eines Gewebes befinden sich in unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus (Abbildung 1). Im Anschluß an eine Mitose gelangen die Zellen entweder in die G (Gap)₀-Phase, das heißt, in eine Phase, in der sie außerhalb des Zellzyklus ruhen, oder in die G₁-Phase. In dieser Phase hat die Zelle die höchste Sensitivität für Schäden des zellulären Genoms, was als „cell cycle checkpoint“ bezeichnet wird (IATROPOULUS 1996). Funktion dessen ist die Prävention, geschädigte DNA zu replizieren. Liegt geschädigte DNA, zum Beispiel in Form von Strangbrüchen, vor, kommt es zu einem Anstieg des Tumorsuppressorgens p53 (IATROPOULUS 1996). In der Folge kommt es zu einem Arretieren der Zelle in G₁ und nach Behebung des Schadens zur Fortsetzung des Zellzyklus. Wenn eine Reparatur der DNA nicht möglich ist, resultiert dieses in der Apoptose der Zelle. Die G₁-Phase ist das Zellzyklusstadium, in dem Wachstumsfaktoren die größte Wirkung ausüben können. Im Anschluß an die G₁-Phase

gelangt die Zelle in die S (Synthese)-Phase, in der das zelluläre Genom repliziert wird. Darauf folgt ein zweiter „cell cycle checkpoint“, die G₂-Phase, in der die replizierte DNA erneut auf mögliche Schäden geprüft wird. Aus der G₂-Phase geht die Zelle in die Mitose über (IATROPOULUS 1996).

4.1.2 Signaltransduktion bei mechanischer Dehnung

Über die Art und Weise, in der bei Patellarsehnenfibroblasten eine Mechanotransduktion, das heißt eine Aufnahme mechanischer Reize über Sensoren, eine Übermittlung dieser Signale in den Zellkern und eine Initiation der Genexpression erfolgt, ist sehr wenig bekannt. Es ist jedoch naheliegend, daß die Signalübermittlung ähnlich der anderer beschriebener Zellsysteme verläuft. So ist die Signaltransduktion mechanischer Reize für Endothelzellen (CHIEN 1998), kardiale Myozyten (SADOSHIMA 1997) und Lungenzellen (LIU 1999; LIU 2000) zum Teil beschrieben. Man geht davon aus, daß mechanische Reize von bestimmten Mechanosensoren aufgenommen und in biochemische Reaktionen umgewandelt werden, die ein intrazelluläres Signalling ermöglichen. Diese Signale gelangen über das Zytoplasma in den Nukleus und führen hier zu einer Aktivierung bzw. Inaktivierung von Genen, die unter anderem eine Proliferation der Zelle ermöglichen. Dazu gehören Gene, die für Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren kodieren und somit auto- oder parakrin eine Initiation der Proliferation ermöglichen, sowie zellzyklusspezifische Gene, die direkt eine Proliferation bewirken.

Als mögliche Mechanosensoren kommen stress-aktivierte Ionenkanäle, Tyrosinkinase und vor allem Integrine (4.5.2) in Frage (SADOSHIMA 1997). Bei den Integrinen handelt es sich um heterodimere Transmembranrezeptoren, die Komponenten der extrazellulären Matrix mit dem Aktin-Cytoskelett koppeln (PIMENTEL 2001), sowie direkt und indirekt mit Kinasen, z.B. der Mitogen-Aktivierten Proteinkinase (MAPK) und der Proteinkinase C (PKC), interagieren (PIMENTEL 2001; SCHWARTZ 1995). Indirekt vermitteln sie auf diesem Weg die Aktivierung von

Transkriptionsfaktoren, z.B. c-fos, die eine Proliferationsstimulation der Zelle vermitteln. Bei kardialen Myozyten findet eine c-fos Expression jedoch trotz einer Blockierung der Integrine statt (SADOSHIMA 1992), weshalb Integrine nicht in jedem System essentiell für die Mechanotransduktion sein können. Möglicherweise spielen Integrine auch bei der Potenzierung von Signalen eine Rolle, die durch andere Mechanosensoren generiert werden (SADOSHIMA 1997). Wie oben schon erwähnt, können mechanische Kräfte die Permeabilität der Zellmembran für verschiedene Ionen beeinflussen. So existieren bei Lungenzellen und anderen Zelltypen stress-aktivierte Ionenkanäle, die den Eintritt von Ca^{2+} durch mechanische Dehnung ermöglichen.

Für die Vermittlung der Signalkaskade können mehrere Signalwege verantwortlich sein. Die Signaltransduktion zur Vermittlung einer Aktivierung der Proliferation läuft bei fetalen Lungenzellen (LIU 1999) über die Proteinkinase C (PKC) (Abbildung 2), die die Bindung von Transkriptionsfaktoren an „stress response elements“ (SRE) in den Promotorregionen bestimmter Gene initiiert. So existiert z.B. ein SRE im Promotor des c-fos-Gens (LIU 1999), sowie „shear stress response elements“ (SSRE) in den Promotorregionen der Gene für PDGF-B (RESNICK 1993) und TGF- β 1 (RESNICK 1995).

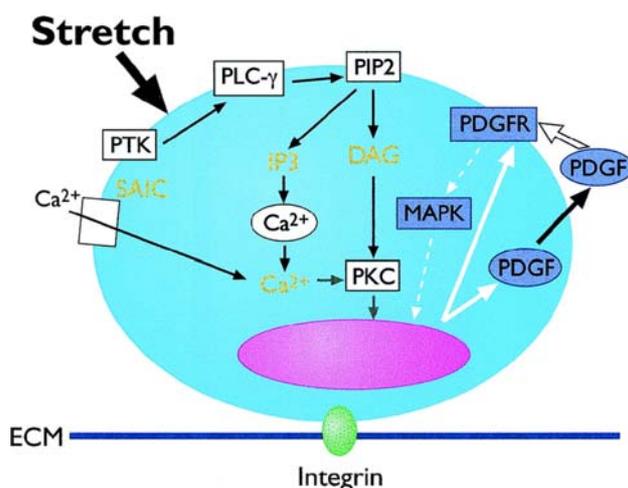


Abbildung 2: Signalübermittlungskaskaden ausgelöst durch mechanische Stimulierung

PKC wird über die Protein Tyrosin Kinase (PTK)-Phospholipase C- γ (PLC- γ)-Kaskade aktiviert (Abbildung 2). Mechanischer Stress aktiviert dabei PTK wie pp60^{src} und pp125^{FAK} (LIU 2000). Letztere ist über Paxillin mit dem Cytoskelett verbunden und interagiert mit Signaltransduktionsproteinen, was ihre Involvierung in die Mechanotransduktion bestimmter Zelltypen denkbar macht. PTK's phosphorylieren nach Aktivierung Tyrosinreste an der PLC- γ , was zur Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat zu Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerin (DAG) führt. Beide aktivieren PKC direkt (DAG) oder indirekt (IP₃) durch Freisetzung von Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern.

Ein weiterer wichtiger Übertragungsweg kann über die MAPK erfolgen. Die MAPK sind 42-44 kDa Proteine, das von „upstream“ Kinasen (MAP Kinase Kinase (MEK); MAP Kinase Kinase Kinase (Raf-1)) reguliert werden. Eventuell kann die Aktivierung der MAPK indirekt über einen Anstieg der PDGF-Expression und dessen Rezeptor erfolgen (LIU 1999).

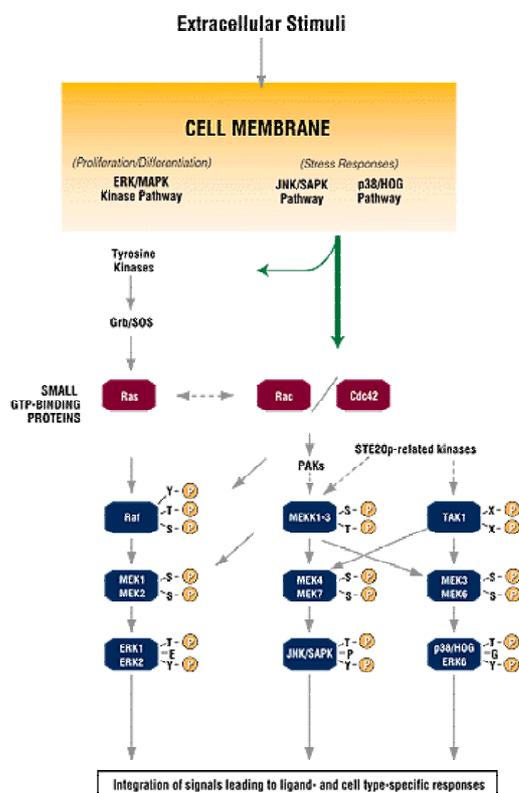


Abbildung 3: Signaltransduktion durch die MAPK-Familie

Zur Familie der MAPK gehören die Extrazellulär Signal-Regulierten Kinasen (ERK 1/2), die p38 und die Jun N-terminalen Kinasen (JNK) (Abbildung 3). Beide Typen von Kinasen werden unter anderem durch kleine G-Proteine, Ras und Rac reguliert (COSO 1995; HILL 1995; MINDEN 1995). Mechanischer Stress führt zu einer Transkription der „immediate early genes“ durch MAPK. Dazu gehören c-fos, c-jun, c-myc, und EGR-1. Die ERK-Aktivierung könnte über eine Expressionsinitiation von c-fos mit dem Zellwachstum gekoppelt sein (MURPHY 2002).

Eine Signaltransduktion findet bei Fibroblasten auch über cAMP und einen Anstieg der Proteinkinase A (PKA) statt. (HE 1994). Dieser mechanoregulierte Weg erfordert den Influx von extrazellulärem Ca^{2+} , der eine Freisetzung von Arachidonsäure bewirkt. Erhöhte Arachidonsäurekonzentrationen stimulieren wiederum die cAMP-Synthese über einen Indomethacin-sensitiven Mechanismus, welcher in einer PKA-Aktivierung resultiert. Abhängig von Umwelteinflüssen, wie zum Beispiel der Präsenz bestimmter Wachstumsfaktoren, kann sich eine erhöhte cAMP-Konzentration stimulatorisch (ROZENGURT 1981) oder inhibitorisch (PASTAN 1975) auf die Proliferation von Fibroblasten auswirken. Es sollte jedoch davon ausgegangen werden, daß die oben beschriebenen Signaltransduktionswege nicht unabhängig voneinander ablaufen müssen, sondern daß die Wege der Signalübertragung fein aufeinander abgestimmt sind und somit Interaktionen zwischen einzelnen Wegen auftreten.

4.1.3 Mechanische Dehnung und Proliferation

Die Auswirkungen von mechanischer Dehnung sind mittlerweile in vielen verschiedenen Zellsystemen untersucht worden. So wurde von Zeichen et al. gezeigt, daß sich eine einmalige zyklische mechanische Dehnung von 15 und 60 Minuten, nicht aber von 30 Minuten, stimulatorisch auf die Proliferation von Fibroblasten der Patellarsehne auswirkt (ZEICHEN 2000). Ebenso führt eine zyklische mechanische Dehnung bei Ratten-Fibroblasten aus dem Seitenband zu einem Anstieg von Zellzahl und DNA-

Synthese (SUTKER 1990). Auch dermale Fibroblasten, die einer 24stündigen zyklischen Dehnung ausgesetzt werden, reagieren mit der Produktion von Transkriptionsfaktoren, die als positive Regulatoren des Zellwachstums fungieren (KESSLER 2001). Osteoblasten reagieren auf zyklische Dehnung ebenfalls mit einem Anstieg der Proliferationsrate, allerdings kann hier eine Abhängigkeit zur Stressfrequenz aufgezeigt werden. So wirkt eine Frequenz von einem Hertz stimulierend, während höhere Frequenzen keinen Wachstumsanstieg bewirken (NEIDLINGER-WILKE 1994). Bei vaskulären glatten Muskelzellen ist ebenfalls eine Proliferationsinduktion durch radiäre Dehnung (mit einer Flexercell Unit) zu beobachten, die allerdings von einem hohen Serumspiegel im Medium abhängig ist (BIRUKOV 1995), was auf die Notwendigkeit von Wachstumsfaktoren hindeutet. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen wurde jedoch auch belegt, daß zyklische mechanische Dehnung die Proliferation von Fibroblasten inhibieren kann (SANCHEZ-ESTEBAN 2002). Ebenso nimmt bei vaskulären glatten Muskelzellen die Proliferation nach einer über 48 Stunden applizierten zyklischen Dehnung ab (HIPPER 2000).

Die Ergebnisse belegen, daß bei Zellen, in deren physiologischem Umfeld Dehnung als permanenter oder zyklisch auftretender Faktor vorhanden ist, diese Dehnung eine Proliferationsinduktion auslösen kann. Jedoch ist davon auszugehen, daß je nach Zelltyp und Ursprungsgewebe zusätzliche Faktoren beeinflussend agieren, so daß z.B. die Zellzyklusphase, in der die Zelle sich befindet, relevant sein kann, daß bestimmte Wachstumsfaktoren obligat vorhanden sein müssen oder nur bestimmte, eventuell die physiologisch vorkommenden, Frequenzen wachstumsstimulierend wirken. Auch die Dauer und die Art der zyklischen Dehnung können einen entscheidenden Einfluß auf die Proliferation haben, so daß eine longitudinale Dehnung einen anderen Einfluß auf bestimmte Zelltypen hat als eine radiäre Dehnung.

Für die vorliegende Studie besteht die Erwartung, daß repetitive Dehnung, ähnlich der einmaligen Dehnung von Fibroblasten, die Proliferation dieser

Zellen stimuliert. Eine Proliferationsaktivierung könnte als Indikator für eine bessere Gewebereperatur fungieren. Somit könnte davon ausgegangen werden, daß repetitive Dehnung als „positiver“ Faktor bei Heilung und Tissue Engineering gewertet werden kann.

4.2 Apoptose

Der Begriff Apoptose ist griechisch und bedeutet: Herabfallen der Blätter. Diese Bezeichnung wird aus dem morphologischen Erscheinungsbild der Apoptose hergeleitet, da apoptotische Zellen mikroskopisch sichtbar kleine Bläschen abschnüren, die so genannten apoptotischen Körper. Weitere morphologische Merkmale der Apoptose sind die Kondensation des nukleären Chromatins, die zelluläre Schrumpfung und Fragmentierung sowie die schnelle Aufnahme der apoptotischen Körper durch angrenzende Zellen (KERR 1972; WYLLIE 1980).

Die Apoptose ist von der Nekrose abzugrenzen, da es sich hierbei im Gegensatz zur Nekrose um einen vom Körper gesteuerten Prozeß handelt. Die Nekrose findet meist im Anschluß an eine Gewebsverletzung statt wobei in der Folge die Zellen anschwellen, platzen und den Zellinhalt in die Umgebung freisetzen, was eine Entzündungsreaktion hervorruft. Bei der Apoptose hingegen werden als Antwort auf bestimmte Signale festgelegte Signaltransduktionskaskaden abgerufen (Effektorphase), in deren Folge die zellulären Bestandteile zersetzt werden (Degradierungsphase) und eine sofortige Aufnahme der Zellfragmente durch umliegende Zellen erfolgt (Clearingphase). Somit kommt es nicht zu einer Freisetzung von Zytoplasma in die Umgebung und in der Folge nicht zu einer gewebsschädigenden Entzündungsreaktion. Typisch für die oben genannte Degradierungsphase ist die Aktivierung von Endonukleasen und Transaminasen. Endonukleasen spalten die zelluläre DNA zuerst in 300 kb und/oder 50 kb große Fragmente (OBERHAMMER 1993), im Anschluß erfolgt eine Spaltung der DNA durch Endonukleasen und eine Caspase aktivierte DNase (CAD) in Fragmente, deren Größen Multiple von 180 bp

darstellen (LIU 1997). Hierdurch ergibt sich das für die Apoptose typische „laddering“ der DNA. Die Transaminasen kreuzvernetzen zelluläre Proteine und verhindern somit ein Auslaufen des Zytoplasmas bei der Bildung der apoptotischen Körper.

Eine wichtige Funktion nimmt die Apoptose z.B. in der Embryogenese bei der Entwicklung der Finger und Zehen aus den Hand- und Fußstellern ein. Im adulten Organismus gehen zum Ende einer Immunantwort immer mehr Zellen in die Apoptose, wodurch es zum Anhalten der Immunreaktion kommt. Generell tritt Apoptose physiologisch überall dort auf, wo sich der Organismus Zellen entledigen muß. Gründe für das Eintreten in die Apoptose können dann sein, daß diese Zellen überflüssig oder irreparabel verletzt sind, oder daß sie ihre Funktion erfüllt haben.

4.2.1 Molekulare Mechanismen der Apoptose

Apoptose kann durch eine Vielzahl von Faktoren ausgelöst werden. Dazu gehören Hitze, Strahlung, Chemotherapeutika, Viren, Bakterien, Steroide, Ischämie sowie parakrine Signale oder das Fehlen von Wachstumsfaktoren und Zytokinen. Welche Signale bei welchen Zellen Apoptose auslösen ist jedoch abhängig vom Umfeld, zelltypspezifischer Genexpression sowie dem Differenzierungs- und Zellzyklusstadium.

Ein wichtiges Instrument bei der Durchführung der Apoptose ist eine Familie von Proteasen, die Caspasen. Bei diesen Proteasen handelt es sich um Cystein Proteasen, die Proteine an Aspartatresten spalten und selbst durch Spaltung an einem Aspartatrest ihrer N-terminalen Prodomäne in die aktive Form überführt werden (SONG 1999). Caspase steht somit als Abkürzung für Cystein Aspartat Protease. Man unterscheidet hierbei die Initiator-Caspasen (Caspase-2, -8, -9, -10, -12), die Effektor-Caspasen in ihre aktive Form überführen, von den eben genannten Effektor-Caspasen (Caspase-3, -6, -7), die nach ihrer Aktivierung zelluläre Proteine spalten (WOLF 1999). Zu diesen Proteinen gehören Bestandteile des Zytoskeletts, wie z.B. Aktin, deren Spaltungen morphologische Veränderungen der Zelle hervorrufen sowie die Poly ADP-Ribose Polymerase (PARP), die an der

Reparatur der zellulären DNA beteiligt ist (KAUFMANN 1993). Weitere Caspase-Targets sind z.B. nucleäres Laminin und die Proteinkinase C. Die gezielte Spaltung dieser Proteine führt neben dem DNA-Abbau zu einem gesteuerten Abbau der Zelle und zur Entstehung der apoptotischen Körper.

Gemeinhin kann unterschieden werden zwischen einer rezeptorvermittelten Apoptose (positive Induktion) und einer rezeptorunabhängigen Apoptose (negative Induktion).

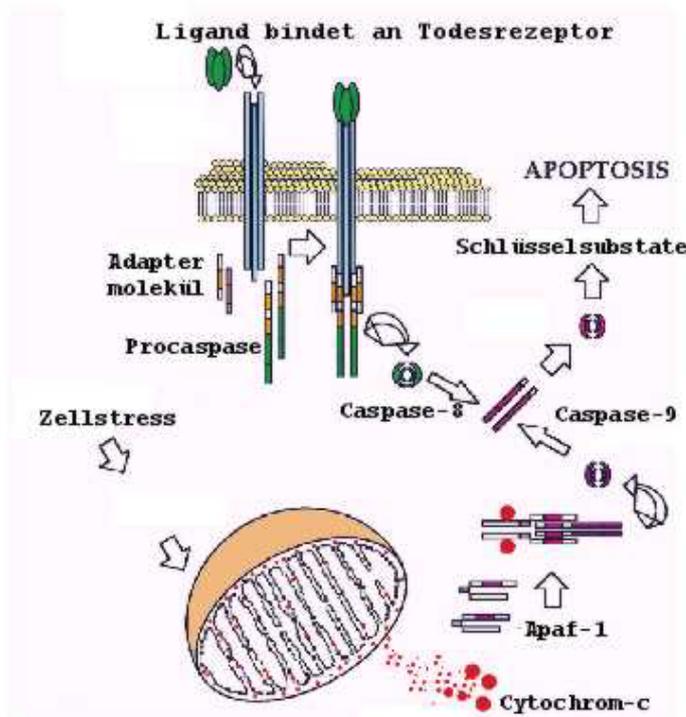


Abbildung 4: Rezeptorvermittelte und rezeptorunabhängige Apoptose

Der bekannteste Apoptose-vermittelnde Rezeptor ist CD95 (Fas/Apo-1) (TRAUTH 1989; YONEHARA 1989). Er gehört zur TNF-Rezeptor-Superfamilie und leitet bei Trimerisierung durch seinen Liganden (Fas-Ligand) das Signal über ein Adaptermolekül („Fas associated death domain“; FADD) in die Zelle weiter (BOLDIN 1995; CHINNAIYAN 1995). Dieses führt zu einer Aktivierung von Proteasen, die im Anschluß zu einer Degradierung der Zelle führen. Weitere Rezeptoren dieser Familie sind die TNF-Rezeptoren (TNF-R1/p50 und TNF-R2/p75) selbst sowie die „death

receptors“ 4 und 5 (DR4 und DR5), die durch TNF selbst bzw. durch den Liganden TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) aktiviert werden (CHAUDHARY 1997; SCHNEIDER 1997; TARTAGLIA 1991). Eine weiteres an diese Rezeptoren assoziiertes Adaptermolekül ist TRADD (TNF-receptor associated death domain), welches ähnlich FADD zu einer weiteren Signaltransduktion führt (HSU 1995) (Abbildung 4).

Bei der rezeptorvermittelten Apoptose kommt es durch Ligandenbindung des Rezeptors zu einer Konformationsänderung der assoziierten Todesdomäne. In der Folge wird die Initiator-Caspase-8 rekrutiert, die ihrerseits Effektor-Caspasen, z.B. Caspase-3, aktiviert und somit die Apoptose der Zelle einleitet (Abbildung 4). Außerdem kommt es nach Ligandenbindung an z.B. CD95 zu einer Signaltransduktionskaskade, bei der MAPK aktiviert werden (CAHILL 1996; JUO 1997). Die dabei aktivierte MAPK JNK vermittelt unter anderem durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktor c-jun die Expression von pro-apoptotischen Genen, so daß auto- und parakrin weitere Apoptose-Signale getriggert werden können (SCHULZE-OSTHOFF 1998).

Apoptose kann auch rezeptorunabhängig durch den Verlust eines Apoptose-Suppressors oder durch extrazelluläre Signale wie z.B. Strahlung induziert werden. Dabei spielt eine mitochondrielle Involvierung eine wichtige Rolle (TSUJIMOTO 1998) (Abbildung 4). Cytochrom C gelangt nach solch einem Signal über Poren in der mitochondriellen Membran, die wahrscheinlich durch Proteine der bcl-2-Familie entstehen, ins Zytoplasma. Nach dem Austritt von Cytochrom C aus den Mitochondrien bindet es unter Anwesenheit von ATP/dATP an das 130 kDa Protein „apoptotic protease activating factor-1“ (Apaf-1) (LI 1997), was zur Bildung eines Apaf-1-Oligomers führt, dem Apoptosom (Abbildung 5). Dieser Komplex bindet Procaspase-9 und aktiviert diese (ZOU 1999). Aktivierte Caspase-9 wiederum rekrutiert Caspase-3 und führt so zur Apoptose.

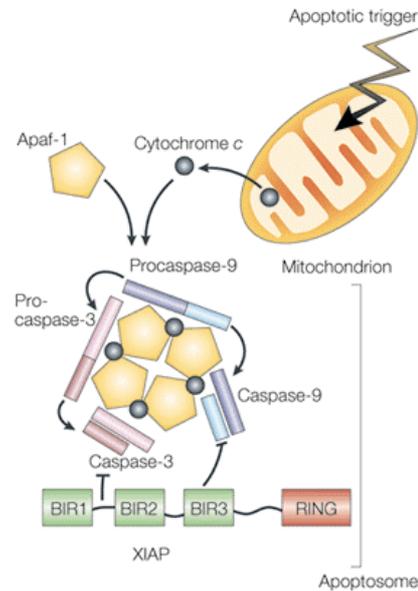


Abbildung 5: Apoptosom-Komplex

Als weiterer Faktor liegt in den Mitochondrien der „apoptosis inducing factor“ (AIF) vor, der bei Freisetzung aus den Mitochondrien durch vorhandene Membranporen ebenfalls Caspase 3 aktiviert (KROEMER 1997).

Eine weitere wichtige Rolle kommt hierbei auch den Proteinen der bcl-2-Familie zu. Innerhalb dieser Familie existieren pro-apoptotische Mitglieder wie bax (YIN 1997), bad (DOWNWARD 1999) und bid (SCHENDEL 1999) sowie anti-apoptotische Mitglieder wie bcl-2 und bcl-x_L (WHITE 1996). Das Mengenverhältnis der pro- und anti-apoptotischen Mitglieder der bcl-2-Familie scheint eine wichtige Rolle bei der Apoptose-Induktion zu spielen. Das Protein bax besitzt eine porenbildende Funktion und ermöglicht auf diesem Weg wahrscheinlich die oben erwähnte Cytochrom C-Freisetzung. Diese Porenbildung hat zusätzlich einen Energiemangel der Zelle zur Folge, da hierbei der Elektronentransport von der ATP-Synthese entkoppelt wird (ZORATTI 1994), und führt somit auch auf diese Weise zum Zelltod. Bcl-2 hat die Fähigkeit, mit bax Heterodimere zu bilden und exerziert so möglicherweise seine anti-apoptotische Wirkung, indem es die biologische Aktivität von bax inhibiert. Außerdem inhibieren bcl-2 und bcl-

x_L die Cytochrom C-Freisetzung eventuell durch eine direkte Interaktion mit Cytochrom C (KHARBANDA 1997).

Die verschiedenen Induktionswege, über die Apoptose vermittelt werden kann, laufen jedoch nicht völlig unabhängig voneinander ab. So kann z.B. das im Cytosol vorliegende pro-apoptotische Protein bid von Caspase 8 gespalten und dadurch aktiviert werden. In Folge dessen gelangt es zu den Mitochondrien und vermittelt dort die Freisetzung von Cytochrom C (LI 1998; LUO 1998).

Weitere wichtige Proteine, die Apoptose einleiten können, sind der Onkosuppressor p53, der als Transkriptionsfaktor für Apoptose-induzierende Gene wirkt (PRIVES 1999) und das Protoonkogen c-myc, das Apoptose unter bestimmten Bedingungen, z.B. beim Fehlen von Wachstumsfaktoren, einleitet (RYAN 1996).

4.2.2 Mechanische Dehnung und Apoptose

Säugetierzellen reagieren auf Umweltstress mit Anpassung an die veränderten Bedingungen oder, wenn eine Anpassung nicht möglich ist, mit Apoptose. Dies ist abhängig von Art, Stärke und Dauer des Stresses und von der zelltypspezifischen Genexpression. Ein möglicher Umweltstress ist mechanische Dehnung. Diese wird unter anderem über Integrine und das Zytoskelett in die Zelle übertragen und setzt dort unterschiedliche Signaltransduktionskaskaden in Gang (JULIANO 1993; WANG 1993). So konnten Pimentel et al. zeigen, daß zyklische mechanische Dehnung mit hoher Amplitude (25%) bei ventrikulären Myozyten der Ratte Apoptose induziert, eine niedrigere Amplitude (5%) hingegen keine Apoptose auslöst. Bei beiden Amplituden wurden MAPK aktiviert, jedoch kam es nur bei starker Dehnung zu einer Aktivierung der in die Apoptosekaskade involvierten JNKs (PIMENTEL 2001). Generell ist bekannt, daß ein mechanischer Stress bzw. eine mechanische Dehnung bei verschiedenen Zelltypen eine Signaltransduktion über MAPK vermittelt (INGRAM 2000; JESSOP 2002; KITO 2000; KOMURO 1996; YAMAZAKI 1993). Bei fetalen Rattenlungenzellen induziert eine radiäre Dehnung

einen Apoptoseanstieg auf das zwei- bis dreifache der Kontrollwerte (SANCHEZ-ESTEBAN 2002). Auch bei arteriellen glatten Muskelzellen löst zyklische radiäre Dehnung zeit- und stärkeabhängig eine Induktion der Apoptose aus, die in diesem Modell über die p38 MAPK vermittelt wird (MAYR 2000). Kniesehnenfibroblasten reagieren auf 15 und 30 Minuten zyklische mechanische Dehnung mit einem biphasischen Apoptose-Verlauf, der durch Anstiege in der Apoptoserate nach 6 und 24 Stunden und einen Abfall der Apoptoserate nach 12 Stunden gekennzeichnet ist (SKUTEK 2002a). Im Gegensatz dazu verändert sich die Apoptoserate nach einer 60minütigen Dehnung im Vergleich zur Kontrolle kaum (SKUTEK 2002a).

Die Apoptose ist bei Verletzungen und bei der sich anschließenden Wundheilung ein wichtiger und unerläßlicher Parameter. Im Anschluß an eine Verletzung kommt es im Gewebe zu einer Immunreaktion, die wichtig ist, weil im Zuge dieser Reaktion Zelldebris, eventuell auftretende Mikroben und degradierte Matrix abgebaut und phagozytiert werden. Allerdings ist das Beenden dieser Reaktion ebenso unerläßlich, weil eine andauernde Immunreaktion die nachfolgenden Heilungsvorgänge negativ beeinflußt und zu Gewebsveränderungen bis hin zu ulcerösen Wüchsen führt. Apoptose, die nach Aktivierung der Immunzellen durch spezifische Zytokine initiiert werden kann, führt zur Beendigung dieser Immunantwort.

4.3 Hitzeschockprotein 72

Zellen reagieren auf unterschiedlichste Belastungen mit der Produktion von Stressproteinen (Hitzeschockproteine; HSP), die einer Schädigung der Zelle entgegenwirken. Diese HSP's werden außer bei Hitzestress, wie der Name impliziert, auch bei anderen Arten von Stress wie mechanischer Belastung, Ischämie, NO, Hormonen, Antibiotika sowie durch Bakterien gebildet. Die Nomenklatur der Hitzeschockproteine beruft sich auf das jeweilige Molekulargewicht des entsprechenden Proteins. So hat das hier

beschriebene HSP 72, welches die induzierbare Form des konstitutiv exprimierten HSP 70 darstellt, ein Molekulargewicht von 72 kDa.

HSP's sind hoch konservierte Proteine. Sie können in der Zelle in Cytosol, Nukleus, Mitochondrien und endoplasmatischem Retikulum vorkommen. HSP 70 tritt universell in allen Organismen auf. Die Homologie der HSP 70 Proteine liegt innerhalb der Eukaryonten zwischen 60-78% (CRAIG 1985), die Homologie zwischen eukaryontischem HSP 70 und dem prokaryontischen *E. coli*-Analogon DnaK beträgt immerhin noch 40%.

4.3.1 Struktur von HSP 70/72

Das HSP 70/72-Protein setzt sich strukturell aus drei Teilen zusammen. Es besteht aus einem N-terminalen 44 kDa-Fragment, gefolgt von einer 18 kDa-Domäne, an die sich eine 10 kDa-Domäne am C-Terminus anschließt. Alle Hitzeschockproteine besitzen ATP-bindende Eigenschaften. Das 44 kDa-Fragment beinhaltet die ATPase-Domäne von HSP 70/72, das 18 kDa-Fragment bildet die Peptid-bindende Domäne und das C-terminale 10 kDa-Fragment besitzt eine hoch konservierte terminale Sequenz (EEVD), die die Menge der translatierten mRNA während eines Hitzeschocks beeinflusst. Es scheinen also für die HSP-Umsetzung außer der in 4.3.3 beschriebenen Genregulation auch noch weitere Mechanismen der Mengenregulation zu existieren, die eine Feinregulation ermöglichen.

4.3.2 Funktion von HSP 70/72

Die Hauptfunktion der Hitzeschockproteine ist, als molekulare Chaperone zu wirken, also neu synthetisierte oder denaturierte Proteine in ihre native Form zu falten und zu stabilisieren. HSP 70 selbst hat weniger Chaperonaktivität, sondern ist vor allem für den Transport von Proteinen zuständig. Dazu gehört der Transport von Proteinen zu bestimmten zellulären Kompartimenten, die Translokation von Proteinen durch die Mitochondrienmembran und das Zuführen von ungefalteten Proteinen zu Mitgliedern der HSP 60-Familie, die ihrerseits wieder als Chaperone wie

im oben beschriebenen Sinne wirken. Alle diese Funktionen sind ATP-abhängig. Wichtig für die Wirkungsweise der HSP sind sogenannte Kohort-Proteine, die die HSP in ihrer Funktion unterstützen. Ein Kohort-Protein von HSP 70 ist z.B. HSP 40, welches unterstützend wirkt, indem es die ATP-Bindungsaktivität von HSP 70 stimuliert. Die Schutzfunktion von HSP kann allerdings auch ins Gegenteil umschlagen, z.B. bei der zelleigenen Tumorsuppression oder einer Chemotherapie. Krebszellen sind erheblich resistenter gegen eine Hitzebehandlung, wenn in den Zellen eine Stressantwort ausgelöst wurde und eine Adaptation der Zelle stattgefunden hat (FRACELLA 1995).

4.3.3 Genregulatorische Mechanismen

Die Kontrolle der Genexpression des induzierbaren HSP 72 unterliegt einem negativen Regulationsmechanismus. Der für die Stressantwort wichtige Hitzeschock-Transkriptionsfaktor 1 (HSF1) liegt unter ungestressten Bedingungen an HSP 70 gebunden als Monomer im Cytosol vor (SCHLESINGER 1990). Beim Einwirken eines Stresses auf die Zelle wird HSF1 von HSP 70 freigesetzt, was wahrscheinlich mit den steigenden Mengen ungefalteten Proteins zusammenhängt. Die HSF1-Moleküle werden nach ihrer Freisetzung von der Proteinkinase C oder einer anderen Serin/Threonin-Kinase phosphoryliert und bilden dadurch eine homotrimere Struktur aus (KROEGER 1993). Diese Trimere gelangen in den Nukleus und binden dort an spezielle Hitzeschockelemente (HSE), die in der Promotorregion des HSP-Gens liegen. Nach Bindung an HSE werden die HSF1-Trimere durch eine HSF-Kinase weiter phosphoryliert (PRICE 1991). Dadurch kommt es zu einer Transkriptionsinitiation und weiterhin zur Translation von HSP 70. HSF1 gelangt nach Dephosphorylierung und Zerfall in die Monomere zurück ins Zytoplasma. Das neu synthetisierte HSP reguliert im Zytosol durch eine erneute Bindung an HSF1 seine eigene Expression.

Es existieren mehrere homologe HSF mit unterschiedlicher Funktion. Alle Hitzeschockfaktoren besitzen eine einheitliche Struktur mit einer DNA-

bindenden Domäne am N-Terminus, die sowohl für DNA- als auch für Protein-Bindungen zuständig ist, einem angrenzenden Leucin-Zipper-Motiv, das sowohl in die Trimerisierung (KIANG 1998) als auch in die negative Regulation (KALESNIKOFF 2002; RABINDRAN 1993) involviert ist, sowie einem kurzen, konservierten C-terminalen Element. HSF1 reagiert vor allem unter Stressbedingungen, HSF2 hingegen spielt eine Rolle in Differenzierungsvorgängen und wird nach einem Zellstress nicht aktiviert. HSF3 ist wie HSF1 in eine Stressantwort involviert, allerdings mit einer verzögerten Kinetik (FRACELLA 1995). HSF4 führt bei Hela-Zellen zu einer Repression der Expression von HSP 27, HSP 70 und HSP 90 (RABINDRAN 1993).

4.3.4 HSP 72 und Apoptose

Es ist bekannt, daß Zellpopulationen, die einem leichten Hitzeschock ausgesetzt wurden, erheblich resistenter gegenüber einem späteren, stärkeren Hitzebehandlung sind als Zellen, die keine derartige Vorbehandlung erfuhren. Dieses Phänomen wird als „erworbene Thermotoleranz“ bezeichnet. Dieser zytoprotektive Toleranzeffekt zeichnet sich dadurch aus, daß im Gegensatz zu den sofort hochthermisch behandelten Zellen eine verringerte Apoptoserate auftritt. Mittlerweile ist ebenfalls bekannt, daß dieser Effekt zumindest partiell auf der Wirkung von HSP 72 beruht, welches nach einem moderaten Hitzestress in der Zelle akkumuliert. Allerdings wirkt HSP 72 nur bei bestimmten Apoptose auslösenden Stressarten. So reduziert HSP 72 Apoptose bei Mausembryofibroblasten zwar nach Hitzestress, TNF- α - und Ceramidbehandlung, nicht aber nach Einwirkung von ionisierender Strahlung (BUZZARD 1998), was eventuell auf unterschiedliche Apoptose-induzierende Signaltransduktionen zurückzuführen ist.

Ein mögliches Target, über das HSP 72 seinen zytoprotektiven Effekt ausüben kann, ist die in die Apoptose-Signaltransduktionskaskade involvierte Kinase JNK, da die erworbene Toleranz und die Akkumulation von HSP 72 in humanen Fibroblasten der Lunge mit einer

Herunterregulation von JNK korrelieren (GABAI 2000). Allerdings findet diese Inhibition von JNK in nichttoleranten Mausembryofibroblasten, die HSP 72 durch Transfektion konstitutiv exprimieren, nicht statt (BUZZARD 1998), was eventuell für die Involvierung eines anderen, in toleranten Zellen ebenfalls verstärkt exprimierten Proteins, möglicherweise HSP 27, spricht (BUZZARD 1998). Einen Brückenschlag zwischen diesen beiden kongruierenden Ergebnissen machten Volloch et al., die herausfanden, daß Apoptose mit der Dauer der JNK-Aktivierung korreliert, nicht aber mit der Magnitude. Die Tatsache, daß HSP 72 die Dauer der JNK-Aktivierung reduziert, die initiale Aktivierung aber nicht beeinflusst, kann diese gegensätzlichen Beobachtungen erklären (VOLLOCH 2000). Jäätelä et al. postulieren, daß HSP 72 an einem späteren Punkt in der Kaskade eingreift, und zwar nach einer Aktivierung von Caspase 3 (JÄÄTTELÄ 1998). Sie fanden heraus, daß Tumorzelllinien nach einem Hitzestress frühapoptotische Anzeichen wie JNK-Aktivierung, Cytochrom C-Freisetzung und Caspase 3-Aktivierung trotz einer Aktivierung von HSP 72 aufweisen, spätapoptotische Merkmale wie Aktivierung von Phospholipase A und Veränderungen in der nukleären Morphologie hingegen nicht auftreten (JÄÄTTELÄ 1998).

Sicher vermittelt HSP 72 seinen anti-apoptotischen Effekt, zumindest in vitro, über eine direkte Assoziation mit dem cytosolischen Protein Apaf-1, das im Apoptosomen-Komplex eine Aktivierung von Procaspase 9 vermittelt (4.2.1) (SALEH 2000). Die HSP 72-Bindung an die „caspase recruitment domain“ (CARD) von Apaf-1 verhindert dessen Cytochrom C-/ATP-vermittelte Oligomerisierung und in der Folge eine Caspaseaktivierung. Für diese Bindung ist die ATP-Bindungsaktivität von HSP unerlässlich (SALEH 2000).

Ein weiteres HSP 72-Target ist wahrscheinlich das in der Mitochondrienmembran lokalisierte Flavoprotein AIF. Dieses Protein wird bei einem apoptotischen Signal aus den Mitochondrien freigesetzt und vermittelt Apoptose über eine Aktivierung der Caspase 3 (4.2.1). Ravagnan et al. fanden heraus, daß HSP 72 die AIF-vermittelte Chromatin-

Kondensation inhibiert, wobei die AIF-Bindung und Inhibierung über einen Mechanismus verläuft, der unabhängig von der ATP-Bindungsdomäne von HSP 72 ist (RAVAGNAN 2001).

Weiterhin ist bekannt, daß HSP 72 eine Fas/FasL-medierte Apoptose, die unabhängig von Cytochrom C und den Mitochondrien abläuft, nicht blockieren kann (BEERE 2000). Eine solcherart induzierte Apoptose kann jedoch von einem weiteren Hitzeschockprotein, HSP 27, gehemmt werden. HSP 27 wirkt nicht auf die Caspase-Aktivierung, supprimiert statt dessen aber Apoptose, die durch Fas/FasL initiiert ist (MEHLEN 1996), indem es mit dem Fas-Rezeptor assoziierten Protein Daxx interagiert (CHARETTE 2000).

Bei HSP 72 handelt es sich um ein Protein, daß eine wichtige Rolle bei der Protektion der Zelle vor verschiedenen Formen von Stress spielt. Das Protein hat die Möglichkeit, an verschiedenen Stellen in die Mediation der Apoptose einzugreifen. Dies ist wahrscheinlich wichtig, da Apoptose bei unterschiedlichen Stressarten und Zelltypen auf verschiedenen Wegen vermittelt werden kann. So läuft Apoptose, die durch einen Hitzestress ausgelöst wird, bei humanen Fibroblasten auf einem Caspase-unabhängigen Weg, bei dem die Blockade von JNK durch HSP 72 eine wichtige Rolle spielt (GABAI 2000). Hitzestress bei Hela- und Jurkatzellen hingegen führt zu einer Assoziation von HSP 72 an Apaf-1 (SALEH 2000), was eine Indikation dafür sein könnte, daß die Apoptose hier über einen anderen Weg verläuft. Die Chaperonaktivität von HSP 72 scheint für seine Funktion bei diesen Formen der Zellprotektivität jedoch nur eine untergeordnete Rolle zu spielen (NOLLEN 2000; TAKAYAMA 1997).

4.3.5 HSP 72 und mechanische Dehnung

Es ist bekannt, daß HSP 72 bei verschiedenen pathologischen Erkrankungen wie Entzündungen, viralen und bakteriellen Infektionen, Tumoren und Ischämie verstärkt synthetisiert wird (FEDER 1999; FEIGE 1996; JÄÄTTELÄ 1995). So sind Tumorzellen, in denen eine erhöhte Expression von HSP 72 ausgelöst wurde, erheblich resistenter gegenüber

einer Chemotherapie als Zellen, in denen keine Stressantwort stattfindet. HSP 72-Überexpressionen oder Vorbehandlungen, die zu einer erhöhten HSP 72-Expression führen, mindern die schädigenden Effekte einer nachfolgenden Ischämie, führen also zu einer Art Ischämie-Toleranz (BENJAMIN 1994).

Über die Wirkung von HSP 72 bei mechanischem Stress gibt es bislang nicht viele Erkenntnisse. Zeichen et al. ermittelten, daß eine einfache zyklische, mechanische Dehnung von fünfzehn Minuten zu keiner Veränderung der HSP-Konzentration führt. Nach einer 60-minütigen Dehnung hingegen zeigt die HSP-Konzentration einen biphasischen Verlauf mit Anstiegen des HSP 72-Spiegels auf ca. 45 % nach 2 und 8 Stunden und einem Abfall der Konzentration auf Basiswerte nach 4 Stunden (ZEICHEN 2002a). Dieses korreliert mit den in 4.2.2 dargestellten Daten von Skutek et al., in denen dargestellt wurde, daß eine mechanische Dehnung von 15 und 30 Minuten Apoptose induziert, eine 60-minütige Dehnung zu keiner Veränderung der Apoptoserate im Vergleich zu Kontrollzellen führt (SKUTEK 2002a). Eine Induktion von HSP scheint also eine direkte Beeinflussung der Apoptose in Form einer Inhibierung zu bewirken.

HSP 72 wurde für diese Arbeit als Parameter gewählt, da die Vermutung besteht, daß HSP 72 auch nach mechanischer Dehnung von Fibroblasten, ähnlich der erworbenen Thermotoleranz, zu einer Adaptation der Zellen an den Stress führen kann. Die Erwartung besteht, daß bei repetitivem Stress, im Gegensatz zu einfacher Dehnungsapplikation, eine Anpassung der Zellen an die veränderten Umweltbedingungen erfolgt und die Zellen auf diese Veränderung mit einer beschleunigten oder verbesserten „Heilung“ reagieren. Über HSP 72 könnte solch eine Anpassung der Zellen an den Stress vermittelt werden.

4.4 Zytokine

Zytokine stellen eine wichtige Klasse löslicher interzellulärer Signalmoleküle dar und vermitteln unter anderem Proliferation und Apoptose (ICHIKI 1995; SAINI 1998; SEKO 1995). Zytokine können in autokriner und parakriner Weise wirken und Informationen vermitteln, die je nach Kontext und Zelltyp unterschiedliche Reaktionen bei Zellen auslösen. Bei TGF- β 1 handelt es sich um ein Zytokin, daß auto- und parakrin auf Fibroblasten wirken kann und in diesem Zusammenhang einen wichtigen Faktor bei der Wundheilung darstellt. Il-6 ist ein Zytokin, daß direkt von Fibroblasten gebildet wird und eine wichtige Rolle in der Entzündungskaskade spielt.

4.4.1 TGF- β 1

TGF- β 1 ist ein multifunktionelles Enzym, das sehr unterschiedliche Funktionen erfüllt. Es nimmt je nach Zelltyp, Differenzierungsstadium und Kontext Einfluß auf die Proliferation und/oder Apoptose von Zellen, und ist in die Synthese von extrazellulärer Matrix (ECM), die Angiogenese und in die Immunmodulation involviert. Durch diese Funktionen spielt TGF- β 1 vor allem auch bei Wundheilungsprozessen (4.4.1.2) eine große Rolle.

4.4.1.1 Struktur und Signaltransduktion

Die TGF- β -Superfamilie besteht bei Säugetieren aus über 30 Mitgliedern, darunter 3 TGF- β 's, 4 Aktivine und über 20 „bone morphogenic proteins“ (BMP). Die 3 humanen Isoformen des TGF- β werden als TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF- β 3 bezeichnet. Die aktive Form des TGF- β 1 besteht aus zwei TGF- β 1-Homodimeren, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. TGF- β 1 wird sezerniert als latenter Precursor in einem Proteinkomplex mit dem 75 kDa „latency-associated peptide“ (LAP). Das N-terminale LAP ist in diesem Komplex nicht-kovalent mit dem bioaktiven C-terminalen Dimer verbunden. Für die Aktivierung muß der Precursor

proteolytisch prozessiert werden (PIRCHER 1986), wobei das LAP vom Dimer abgespalten wird. TGF- β 1 besitzt eine sehr kurze Halbwertszeit (WAKEFIELD 1990) und zusätzlich ein sehr breites Wirkungsspektrum. Seine Rezeptoren (s.u.) kommen auf einer Vielzahl von Zellen vor. Durch das LAP wird TGF- β 1 nach der Sezernierung geschützt und somit wird ermöglicht, daß eine Aktivierung des Moleküls ausschließlich direkt am Wirkort stattfindet.

Die Signaltransduktion von TGF- β findet über zwei Rezeptoren statt, die als Typ I und Typ II Rezeptoren bezeichnet werden (DERYNCK 1997; MASSAGUE 1998). TGF- β bindet dabei im ersten Schritt den Typ II Rezeptor. Nach Bindung rekrutiert dieser Typ II Rezeptor den Typ I Rezeptor und phosphoryliert über seine konstitutiv aktive Kinase eine Region im Typ I Rezeptor, die reich an Glycin, Serin und Threonin ist, die sogenannte GS-Region (WRANA 1994). Dadurch kommt es zu einer Konformationsänderung des Typ I Rezeptors, wodurch dessen Kinasen aktiviert werden. Die weitere TGF- β -spezifische Signalübermittlung läuft über spezielle intrazelluläre Signalmoleküle, die sogenannten Smads.

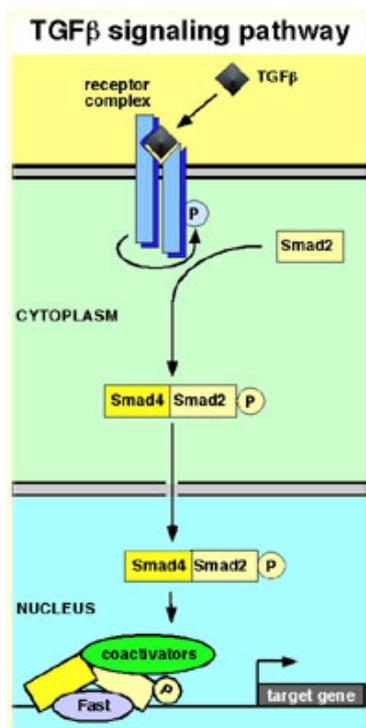


Abbildung 6: TGF- β Signaltransduktion

Es existieren drei Klassen von Smads: die rezeptor-aktivierten Smads (R-Smads), die „common-mediator“ Smads (Co-Smads) und die inhibitorischen Smads (I-Smads) (DENNLER 2002). Durch rezeptor-vermittelte Aktivierung der R-Smads Smad-2 und Smad-3 wird ein Komplex gebildet mit dem Co-Smad Smad-4 (Abbildung 6). Dieser Komplex aus Smad-2/-3/-4 ist in der Lage in den Zellkern zu translozieren, und dort über Interaktion mit Transkriptionsfaktoren die Transkription TGF- β -spezifischer Gene zu aktivieren.

Diese Gene haben unterschiedliche Funktion. TGF- β ist in der Lage, eine Blockade des Zellzyklus hervorzurufen, indem es über den oben genannten Weg z.B. die Bildung von Inhibitoren (p15 und p21) der Cyclin-abhängigen Kinasen aktiviert. Diese Wachstumsinhibierung kann bei B-Zellen von einer Einleitung der Apoptose begleitet sein (ARSURA 1996; ISHISAKI 1999), was zu einer Blockade der Immunantwort führen kann. Die Apoptose kann induziert werden, indem TGF- β 1 in die Regulation der pro- und anti-apoptischen Mitglieder der bcl-2-Familie eingreift (FRANCIS 2000; MOTYL 1998). Ebenfalls kann Apoptose eingeleitet werden über eine Aktivierung der Kinasen p38 (PIRCHER 1986) und JNK (PERLMAN 2001).

4.4.1.2 TGF- β 1 und Wundheilung

TGF- β 1 hat einen Einfluß auf unterschiedliche zelluläre Funktionen. Dies kommt im Wundheilungsprozeß zum Ausdruck, in dem es mehrere wichtige Funktionen übernimmt. Zum einen ist es in der frühen Phase in die Chemotaxis von Neutrophilen und Makrophagen involviert, um die Wunde von Bakterien, Zelldebris u.a. zu klären (WAHL 1987). Außerdem ermöglicht eine autokrine Expression von TGF- β 1 durch Leukozyten und Fibroblasten die Ausschüttung weiterer Zytokine, was zu einer Potenzierung der inflammatorischen Antwort führt (MCCARTNEY-FRANCIS 2001). Weiterhin unterstützt TGF- β 1 die proteolytische Aktivität von Leukozyten. Aber auch das Ende einer Immunantwort wird unter anderem durch TGF- β 1 eingeleitet, da die inflammatorischen Zellen nach

ihrer Aktivierung für eine TGF- β 1 vermittelte Suppression empfänglich werden (MCCARTNEY-FRANCIS 2001; WAHL 1994). Zum anderen ist TGF- β 1 auch in den späteren Phasen des Wundheilungsprozesses von Bedeutung, indem es zum Beispiel die Migration von Keratinozyten in den Wundbereich beeinflussen kann (ASHCROFT 1999) sowie ebenfalls die Rekrutierung und Proliferation von Fibroblasten. Diese Fibroblasten beginnen nach ihrer Einwanderung in den Wundbereich mit der für die Bildung eines neuen Gewebes wichtigen Produktion von Typ I Kollagen, Typ III Kollagen, Fibronectin und anderen wichtigen ECM-Komponenten, was ebenfalls durch TGF- β 1 stimuliert wird (ARSURA 1996; WAHL 1999).

4.4.1.3 TGF- β 1 und mechanische Dehnung

Für die einmalige zyklische mechanische Dehnung von Fibroblasten der Patellarsehne ist bekannt, daß sie das Sekretionsmuster von Zytokinen verändern kann. So führt sowohl eine 15-minütige als auch eine 60-minütige Dehnung zu einer leichten, wenn auch nicht signifikanten, Erhöhung der TGF- β 1-Sekretion (SKUTEK 2001a). Auch für andere Zelltypen wurde beschrieben, daß eine mechanische Dehnung die Sekretion von TGF- β 1 bzw. dessen mRNA-Expression erhöht (Abbildung 7).

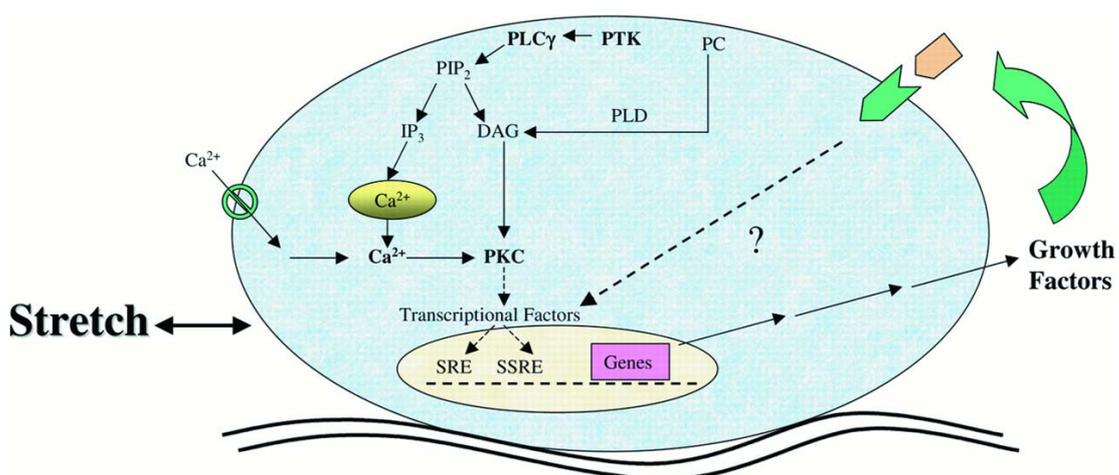


Abbildung 7: Induktion von TGF- β 1 und intrazellulärer Signalwege durch mechanischen Stress

Eine Erhöhung der TGF- β 1-mRNA-Expression durch zyklische mechanische Dehnung ist z.B. für verschiedene Osteoblastenzelllinien beschrieben worden (ZHUANG 1996), allerdings ist der TGF- β 1-Anstieg bei diesem Zelltyp nicht für die ebenfalls auftretende Proliferationsinduktion verantwortlich, was durch eine TGF- β 1-Blockade durch monoklonale Antikörper belegt wurde (ZHUANG 1996). Auch für kardiale und periodontale Fibroblasten wurden Anstiege der TGF- β 1-Konzentration durch die Einwirkung zyklischer mechanischer Dehnung unterschiedlicher Frequenz und Amplitude dokumentiert (KIMOTO 1999; RUWHOF 2000). Über die Wege, auf denen es zu einem Anstieg der TGF- β 1-Produktion bei mechanischer Dehnung kommt, ist noch nicht viel bekannt. Es existiert jedoch eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor AP-1 in der TGF- β 1 Promotorregion. In Übereinstimmung dazu wurde eine Aktivierung von AP-1 bei Zellstress durch ionisierende Strahlung belegt (MARTIN 1997), wodurch eine ähnliche Form der TGF- β 1- Aktivierung auch bei mechanischem Stress in Betracht zu ziehen ist (VAN GRIENSVEN 2002).

Für die repetitive zyklische mechanische Dehnung von Fibroblasten besteht die Erwartung, daß die TGF- β 1-Sekretion, ähnlich wie in anderen beschriebenen Zellsystemen, ansteigt. Solch ein Anstieg könnte über autokrine und parakrine Regelmechanismen Einfluß auf andere Faktoren, wie z.B. die Proliferation und die ECM-Synthese Einfluß nehmen, was im Hinblick auf Wundheilungsmechanismen und auch das Tissue Engineering von Bändern und Sehnen von Bedeutung sein könnte.

4.4.2 IL-6

Das IL-6 ist ähnlich dem TGF- β 1 ein Zytokin mit pleiotroper Funktion. Dieses zeigt sich auch in der Tatsache, daß ursprünglich mehrere Namen für IL-6 existierten, die sich aus seinen verschiedenen Funktionen herleiteten. Als bekannt wurde, daß alle diese Faktoren ihren Ursprung in einem Gen haben, wurde dem Protein der einheitliche Name IL-6 gegeben. IL-6 ist im Rahmen dieser Studie vor allem wegen seiner pro-

inflammatorischen Wirkung von Bedeutung, da hohe IL-6 Spiegel häufig mit einer ausgeprägten Entzündungsreaktion und diversen Erkrankungen einher gehen.

4.4.2.1 Biochemie des IL-6

Humanes IL-6 ist ein variabel glykosyliertes Protein von helikalem Aufbau, das mit einem Molekulargewicht von 22-27 kDa sezerniert wird. Es wird als 212 Aminosäuren (AS) großes Molekül translatiert und liegt nach der posttranslationalen Abspaltung einer 28 AS Signalsequenz als reifes 184 AS Peptid vor (HAEGEMAN 1986; HIRANO 1986; MAY 1986; ZILBERSTEIN 1986).

Der funktionelle Rezeptor des IL-6 besteht aus einem Komplex aus zwei Transmembranglykoproteinen, dem gp130 und dem IL-6 Rezeptor (IL-6 R). gp130 hat ein Molekulargewicht von 130-145 kDa, IL-6 R besitzt ein Molekulargewicht von 80 kDa. Beide Proteine existieren im Blut auch in einer löslichen Form. Innerhalb des Rezeptorkomplexes übernimmt der IL-6 R die Ligandenbindung (HIBI 1996), gp130 hingegen ist unerlässlich für die Signaltransduktion (TAGA 1996). gp130 besitzt selbst keine zytoplasmatische Tyrosinkinasedomäne. Die Signalübermittlung läuft über zytoplasmatische Tyrosinkinasen, mit denen gp130 nach Homodimerisierung von zwei Rezeptorkomplexen aus IL-6, IL-6 R und gp130 assoziiert. Die dabei angeschalteten Signaltransduktionswege beinhalten den JAK/STAT-Weg, den Ras/Raf-Weg und eine Übermittlung über die Src-Kinase-Familie (POUPART 1987).

4.4.2.2 IL-6 bei mechanischer Dehnung

Über die Auswirkungen von zyklischer mechanischer Dehnung auf die Produktion des pro-inflammatorischen Zytokins IL-6 ist bisher wenig bekannt. Skutek et al. konnten nachweisen, daß eine einfache zyklische mechanische Dehnung von sowohl 15 als auch von 60 Minuten zu einem signifikanten Anstieg der IL-6-Produktion von kultivierten Patellarsehnenfibroblasten führt. Dabei wurde auch gezeigt, daß die

Menge der IL-6-Sekretion mit verlängerter Dehnungseinwirkung ansteigt (SKUTEK 2001b). Im Gegensatz dazu konnte für periodontale Ligamente gezeigt werden, daß eine equibiaxiale Dehnung von geringer Magnitude anti-inflammatorisch wirkt. Dabei verringert der Stress einerseits die IL-1 β -induzierte transkriptionelle Regulation von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-6, zum anderen wird durch die Dehnung die Synthese des anti-inflammatorisch wirkenden Zytokins IL-10 induziert (LONG 2001).

4.5 Extrazelluläre Matrix (ECM)

Die extrazelluläre Matrix nimmt bei Bändern und Sehnen eine wichtige Position ein. Durch sie wird die Zugfestigkeit dieser Gewebe, beziehungsweise ihre Dehnbarkeit gewährleistet, zudem bildet sie die Grundlage für Zelladhäsion, Wachstum und Differenzierung. Zu den Proteinen der extrazellulären Matrix gehören neben Fibronectin und anderen Komponenten vor allem die Kollagene. Die Hauptkomponente der extrazellulären Matrix von Bändern und Sehnen ist Typ I Kollagen. Typ III Kollagen hingegen macht bei Bändern nur 9-12% des Gesamtkollagengehaltes aus und kommt bei Sehnen lediglich in Konzentrationen außerhalb des Meßbereiches vor. Der Gehalt an Typ III Kollagen steigt jedoch bei Wundheilungsprozessen stark an. Die für Typ III Kollagen charakteristischen kleinen Fibrillen sind dabei wahrscheinlich für die verringerte Zugfestigkeit des entstandenen Narbengewebes verantwortlich. Das neu synthetisierte Kollagen ist bei diesen Reparaturprozessen wichtig, da es als Stützgerüst für die Migration von Epithelzellen und Fibroblasten fungiert und am Verschuß des Wundbereichs teilnimmt. Allerdings kann es durch eine dysregulierte Produktion von ECM-Proteinen auch zu fibrotischen Erkrankungen kommen.

4.5.1 Struktur und Synthese von Typ I und III Kollagen

Kollagene sind strukturelle Proteine, deren Polypeptidketten sich in Form einer Triple-Helix zusammenlagern. Typ I Kollagen setzt sich dabei z.B. aus zwei verschiedenen Arten von Ketten zusammen, aus zwei $\alpha 1$ (I)-Ketten und einer $\alpha 2$ (I)-Kette. Jede der drei Polypeptidketten dieser Triple-Helix besteht zum großen Teil aus dem sich wiederholenden Sequenzmotiv Gly-X-Y. In einem Drittel der Fälle befindet sich an Position X ein Prolin-Rest und an Position Y ein Hydroxyprolin. Das Glycin bildet aufgrund seiner geringen Größe das Zentrum der Helix, während die anderen beiden AS lateral liegen. Das Hydroxyprolin spielt ebenfalls eine wichtige Rolle für die Kollagenstruktur, da es für die Stabilisierung der Kette und die Bildung von Quervernetzungen notwendig ist. Die neusynthetisierte Triple-Helix wird von der Zelle in einer Vorform, als sogenannter Precursor, sezerniert, bei dem sich C- und N-terminal an jeder Polypeptidkette ein Propeptid befindet. Erst nach Abspaltung dieser Propeptide und der Zusammenlagerung der Tropokollagenbündel, also der Kollagen-Triple-Helix ohne Propeptide, entsteht durch intra- und intermolekulare Quervernetzungen die reife Kollagenfaser, die aus einer Vielzahl parallel angeordneter und miteinander verknüpfter Triple-Helices besteht (STRYER 1994).

4.5.2 Funktion der ECM

Wie eingangs erwähnt ist die ECM unerlässlich als zelluläres Stützskelett sowie bei der zellulären Migration und Differenzierung. Eine weitere wichtige Rolle spielt die ECM neben diesen mechanischen Funktionen auch bei der Übermittlung von Signalen aus der Umwelt. Es ist bekannt, daß Zellen der Stützgewebe ihre ECM an Veränderungen der mechanischen Belastung ihrer Umgebung anpassen. So werden Typ I und III Kollagen sowie Proteoglykan von vaskulären glatten Muskelzellen hochreguliert, wenn diese einer definierten zyklischen Dehnung ausgesetzt werden (LEUNG 1976). Andersherum führt eine Relaxierung des Zelluntergrundes zu einer Verringerung der ECM. Dies geschieht

durch eine verstärkte interstitielle Kollagenase-Synthese (LAMBERT 1992; MAUCH 1989) sowie durch eine Herunterregulation der Produktion von Typ I Kollagen (ECKES 1993; HATAMUCHI 1989; LAMBERT 1992).

Bei der Signalübermittlung durch die ECM könnte eine Gruppe von Membranproteinen eine wichtige Rolle spielen, die als Integrine bezeichnet wird (4.1.2). Diese Integrine besitzen neben der Signal- zusätzlich auch eine mechanische Funktion, indem sie die Zelle mit der ECM verankern (HYNES 1992; RUOSLAHTI 1994). Integrine sind spezielle heterodimere Zelloberflächenmoleküle, die aus einer langen extrazellulären Domäne und einer kurzen zytoplasmatischen Domäne ohne bekannte Signalmotive bestehen, die aber trotzdem eine Signaltransduktion ermöglichen. Integrine akkumulieren an sogenannten „focal adhesion complexes“ in der Membran und stellen durch Adapter-Proteine Verbindungen zum Aktin-Zytoskelett her (MIYAMOTO 1995; MIYAMOTO 1996; VUORI 1995). Es wird vermutet, daß die Verbindung Integrin-Adhäsionskomplex-Zytoskelett eine mechanosensitive Signalorganelle darstellt (WANG 1993). Über die spezifische Kombination ihrer α - und β -Ketten wird wahrscheinlich eine Ligandenspezifität für einzelne ECM-Proteine erreicht (MACKENNA 1998). So wurde herausgefunden, daß spezielle Integrintypen eine Signaltransduktion nur auf bestimmten ECM-Substraten vermitteln und daß je nach ECM-Substrat eine selektive Aktivierung hauptsächlich von ERK und/oder JNK stattfindet (MACKENNA 2000).

4.5.3 Die ECM und mechanische Dehnung

Die Auswirkung von mechanischer Dehnung auf die Matrixsynthese ist mittlerweile bei einer Vielzahl von Zelltypen untersucht worden. So steigen bei mechanisch gedehnten Fibroblasten des Herzens und des Seitenbandes die Verhältnisse von Typ III Kollagen zu Typ I Kollagen an, bzw. nimmt die Expression von Typ III Kollagen-mRNA zu (CARVER 1991; HSIEH 2000; LEE 1999). Bei Fibroblasten der Harnwege kommt es infolge einer Dehnungsapplikation zu einem Anstieg von sowohl Typ I Kollagen als auch Typ III Kollagen. Allerdings ist hierbei auch eine Abhängigkeit

von der Stärke der angelegten Dehnung zu beobachten, da nur eine Dehnung mit einer höheren Amplitude (4,9%) diese Syntheseinduktion auslösen kann, nicht aber eine niedrige Amplitude (1,8%) (BASKIN 1993). Fibroblasten des vorderen Kreuzbandes reagieren auf zyklische mechanische Dehnung konträr zu Fibroblasten anderer beschriebener Zellsysteme. Sie exprimieren als Reaktion auf zyklische mechanische Dehnung verstärkt Typ I Kollagen-mRNA und zeigen keine signifikante Erhöhung der Typ III Kollagen-mRNA (HSIEH 2000). Dieses korreliert mit der Tatsache, daß Typ III Kollagen verstärkt bei der Wundheilung produziert wird und daß das Gewebe des vorderen Kreuzbandes nach einer Verletzung nicht gut regeneriert.

Auch bei Fibroblasten der Patellarsehne kommt es zeitabhängig zu einer differenzierten Regulation der Synthese von Typ I und Typ III Kollagen. Die Menge an Typ III Kollagen steigt 12 h nach einer 30-minütigen Dehnung an und ist nach einer 60-minütigen Dehnung schon früher, nämlich nach 6h erhöht. Typ I Kollagen steigt nur nach einer 60 Minuten andauernden Dehnung an (ZEICHEN 2002a). Diese Ergebnisse belegen, daß die Kollagen-Synthese durch mechanische Dehnung reguliert werden kann, und daß diese Regulation scheinbar beeinflusst wird von Faktoren wie Stärke und Zeitdauer der mechanischen Belastung. Eventuell sind diese Faktoren auch im Hinblick auf den Zellursprung unterschiedlich zu bewerten.

Ein Faktor, der in die Kollagen-Synthese nach Dehnung involviert ist, ist das in 4.4.1 beschriebene Zytokin TGF- β 1. Butt et al. fanden heraus, daß eine gleichzeitige Applikation von mechanischer Dehnung und TGF- β 1 zu einer 4,3 fachen Erhöhung der Typ I Kollagen-mRNA-Synthese gegenüber alleiniger Zugabe von Wachstumsfaktoren führt. Mechanische Dehnung in Abwesenheit von Serum bzw. Wachstumsfaktoren beeinflusste die Kollagensynthese in diesem System nicht (BUTT 1997). Mittlerweile konnte nachgewiesen werden, daß ein TGF- β 1 „response element“ im Typ I Kollagen-Promotor existiert. TGF- β 1 vermittelt dabei wahrscheinlich die

Bindung eines CCAAT-Bindungsfaktors (CBF) an eine CCAAT-Box in der Promotorregion (LINDAHL 2002).

5 Fragestellung

In der vorliegenden Studie soll untersucht werden, inwiefern eine repetitive Dehnung unterschiedliche zelluläre Reaktionen von Fibroblasten aus der Kniesehne beeinflussen kann, die in einem Zusammenhang mit Wundheilung und Tissue Engineering von Bändern und Sehnen stehen. Dabei stehen vor allem zwei Fragen im Mittelpunkt:

- 1a. Gibt es einen Unterschied bei der zellulären Reaktion auf Stress, der auf unterschiedliche Dehnungsmuster zurückgeführt werden kann?
 - b. Läßt sich ein Optimum an Dehnung ermitteln, bzw. existiert ein Übermaß an Dehnung, daß sich als schädigend für die Zellen erweist?
 - c. Beeinflußt die repetitive Dehnung unterschiedliche Zellparameter wie Proliferation, Apoptose, HSP 72-Synthese, TGF- β 1- und IL-6-Sekretion sowie Typ I und Typ III Kollagen-Expression?
 - d. Kommt es zu einer gegenseitigen Beeinflussung der unterschiedlichen Parameter?
- 2a. Kommt es durch die wiederholte Dehnung im Gegensatz zu einer einmalig applizierten Dehnung zu einer Anpassung der Zellen an den Umweltstress und somit zu Effekten, die sich positiv bzw. positiver auf eine Wundheilung und Gewebegeneration auswirken als es bei einem einfachen Stress möglich ist?
- b. Findet eine Adaptation der Zellen mittels HSP 72 statt?

6 Material und Methoden

6.1 *Fibroblastenisolierung aus Gewebeproben*

Im Rahmen operativer Eingriffe am Kniegelenk wurden 30 Patienten Gewebeproben aus unverletzten Patellarsehnen entnommen, die für die Rekonstruktion von rupturierten vorderen Kreuzbändern benötigt wurden. Patienten mit Verletzungen der Patellarsehne oder systemischen Erkrankungen wurden ausgeschlossen. Die Entnahme der Gewebeprobe führte zu keiner mechanischen Schwächung der Patellarsehne, und wirkte sich dementsprechend nicht nachteilig auf den Patienten aus. Die Entnahme erfolgte in der Unfallchirurgischen Abteilung der Medizinischen Hochschule Hannover. Die Genehmigung der Ethikkommission der MHH lag vor, die Patienten wurden in einem präoperativen Aufklärungsgespräch um ihre Einwilligung gebeten.

Die Größe der entnommenen Gewebeproben betrug ca. 8 mm². Direkt nach der Entnahme wurden die Proben in sterile NaCl-Lösung überführt und sofort steril weiter bearbeitet.

Je nach Größe der Gewebeprobe wurde das Isolat in eine unterschiedliche Anzahl ca. 1 mm² großer Stücke zerkleinert und auf den mit einem Skalpell aufgerauhten Boden einer Petrischale (Corning, New York, USA) aufgebracht. Es wurden Petrischalen mit einem Durchmesser von 6 cm eingesetzt. Das Aufrauhlen des Schalenbodens dient der besseren Adhäsion der Gewebestücke. Nach kurzer Antrocknungszeit der Stücke wurden 4 ml Dulbecco's Modified Essential Medium (DMEM) (Biochrom, Berlin), angereichert mit 10% fötalem Kälberserum (FKS) (Biochrom, Berlin), 2,5 µg/ml Amphotericin B (Biochrom, Berlin), 50 U/ml Penicillin G (Invitrogen, Karlsruhe) und 50 µg/ml Streptomycin (Invitrogen, Karlsruhe), vorsichtig auf die Gewebsisolate aufgetropft. Die Kultivierung erfolgte in einem Zellinkubator (Heraeus, Hanau) bei 37°C und 5% CO₂.

Nach einem Zeitraum von circa 3-4 Tagen begannen erste Zellen aus den Gewebestücken auszuwachsen (Abbildung 8). Weitere drei bis vier Wochen später hatten die Zellen ein konfluentes Wachstumsstadium erreicht. Zur Expansion der Kultur wurden die adhärennten Zellen mit einer 1:250 in PBS verdünnten Trypsinlösung (Biochrom, Berlin) vom Boden gelöst. Nach Zugabe von einigen Tropfen Medium zur Inaktivierung des Trypsins wurde die Suspension in Zentrifugenröhrchen (Greiner, Solingen) überführt und 5 Minuten bei $600 \times g$ zentrifugiert. Im Anschluß wurde der Überstand dekantiert, die Zellen wurden in 10 ml Medium aufgenommen und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Dazu wurden 10 μl der Zellsuspension mit 90 μl Trypanblau- Lösung (Biochrom, Berlin) vermischt, ca. 15 μl des Gemisches wurden in die Zählkammer pipettiert, im Anschluß wurden 8 Großquadrate ausgezählt. Die Zellen wurden dann mit einer Zellzahl von 2×10^5 in T75 Flaschen (Nunc, Wiesbaden) passagiert (ca. 4 Flaschen). Um eine für die Versuche ausreichende Zellzahl zu erhalten, wurden die Zellen eines Patienten mindestens bis zur 3. Passage kultiviert. Für die vorliegende Arbeit wurden Zellen der Passagen 3 bis 6 eingesetzt.

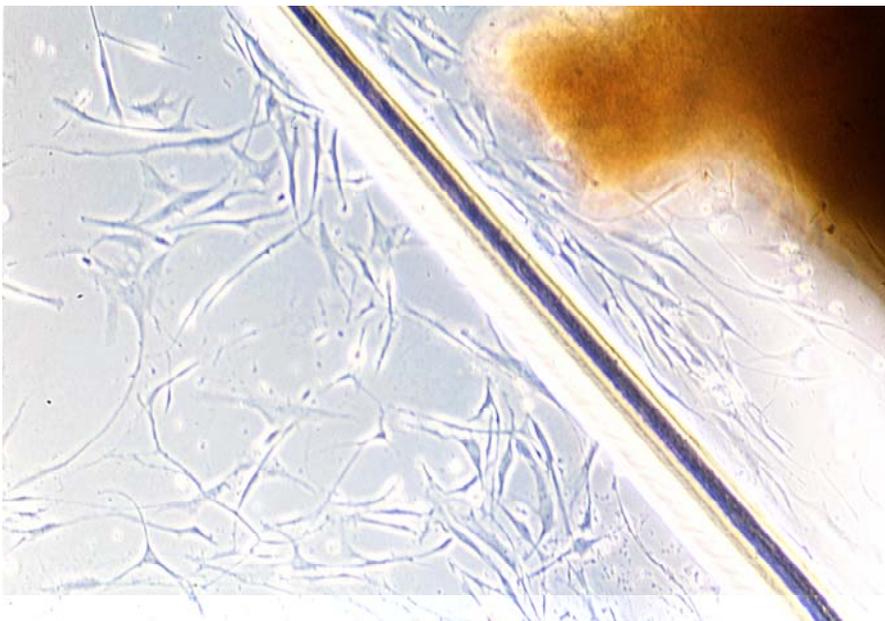


Abbildung 8: Das Auswachsen von Fibroblasten aus Gewebestücken der Patellarsehne nach 3-4 Tagen in Kultur (100fache Vergrößerung im Phasenkontrastmikroskop).

6.2 Silikonschalen

Die Silikonschalen für die Dehnungsexperimente bestehen aus einem Zwei-Komponenten-Silikonelastomer (Rhodia Silicon GmbH, Lübeck), das additionsvernetzend bei Raumtemperatur aushärtet. Die Reaktion kann durch Erwärmen auf 60°C beschleunigt werden. Die beiden Komponenten härten nach dem Mischen zu einem elastischen Vulkanisat aus, das laut Hersteller biokompatibel und nicht zytotoxisch ist.

Zur Herstellung der Schalen wurden das Silicosehl und der Vernetzer im Verhältnis 10:1 bis zur Homogenität der Masse verrührt und in vorgefertigte Formen, die speziell für die Silikonschalen entwickelt wurden, gegossen. Die Formen wurden zum Entlüften des Silikons zuerst 20 Minuten bei 600 mbar im Vakuumschrank (Heraeus, Hanau) inkubiert. Im Anschluß wurde der luftblasenreiche obere Rand der flüssigen Silikonschicht abgezogen, wodurch gleichzeitig der spätere „Boden“ der Silikonschalen geglättet wurde. Die Formen wurden dann für mindestens 2 Stunden zum Aushärten im Wärmeschrank bei 60°C inkubiert. Danach konnten die fertigen Silikonschalen aus den Formen gelöst werden. Die so gefertigten Schalen sind 8 cm lang, 3 cm breit und 1 cm hoch. Die Vertiefung für die Aufnahme der Zellen ist 5 cm x 2,3 cm groß (Abbildung 9).

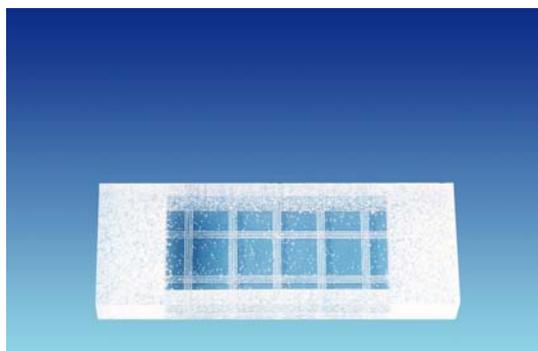


Abbildung 9: Silikonschalen für die Aussaat der Zellen und die Durchführung der Dehnungsexperimente. Die zentrale Vertiefung für die Aufnahme der Zellen hat die Maße 5 cm × 2,3 cm.

Vor der Aussaat der Zellen wurden die Schalen bei 121°C autoklaviert und zur Konditionierung 3 Tage in DMEM-Medium mit Antibiotikazusatz bei 37°C eingelegt. Im Anschluß an die Inkubation wurden die Silikonschalen in Petrischalen überführt um die Sterilität zu gewährleisten, und pro Schale wurden 150.000 Zellen in 3 ml Medium ausgesät. Die Zellen adhärten innerhalb eines Tages fest am Boden der Silikonschalen. Dann wurde das Medium mit 10% FKS ausgetauscht gegen ein Minimalmedium mit 1% FKS. Diese Serumreduktion dient der Synchronisation der Zellen in der G₀-Phase. Nach 24 Stunden Inkubation im Minimalmedium wurde mit den Dehnungsexperimenten gestartet.

6.3 Dehnungsexperimente

Für die vorliegende Arbeit wurde für alle gemessenen Parameter eine Versuchsanzahl von n=10 gewählt. Bei der Auswertung bilden die RNA-Quantifizierungen eine Ausnahme, da hier aus technischen Gründen nur eine Anzahl von n=5 gemessen werden konnte. Es wurden drei verschiedene repetitive Dehnungsmuster gewählt (6.3.2). Die Abbrüche der Versuche nach Beendigung der Dehnung erfolgten zu unterschiedlichen Zeitpunkten abhängig vom gemessenen Parameter und physiologischer Relevanz.

6.3.1 Elektromechanisches Stimulationsgerät

Das elektromechanische Stimulationsgerät zur zyklischen mechanischen Dehnung von Silikonschalen wurde in Zusammenarbeit mit den Zentralen Forschungswerkstätten der Medizinischen Hochschule Hannover entwickelt. Die Vorrichtung besteht aus 6 Linearmotoren, Einspannvorrichtungen für 6 Silikonschalen und 6 programmierbaren Antriebssteuerungen mit gemeinsamer Stromversorgung (Abbildung 10).



Abbildung 10: Elektromechanisches Stimulationsgerät zur Dehnung von Silikonschalen, bestehend aus einer computergestützten Antriebssteuerung, sowie den Einspannvorrichtungen mit Linearmotor.

So können mit dem Gerät 6 Silikonschalen gleichzeitig gedehnt werden. Die Silikonschalen werden mit beiden Enden an Fixationsbacken befestigt (Abbildung 11). Eine dieser Backen ist über eine Verbindungsstange mit dem Linearmotor verbunden. Die Fixationsbacke wird rhythmisch in der Längsrichtung vor und zurück bewegt.

Mit dem Gerät können prinzipiell die Parameter Dehnung (2-10%), Frequenz (0,5-2 Hz) und die Stressdauer (1-99 Minuten) variiert werden.

Während der gesamten Untersuchungen wurden die Parameter Dehnung mit 5 % und Frequenz mit 1 Hz konstant gehalten.

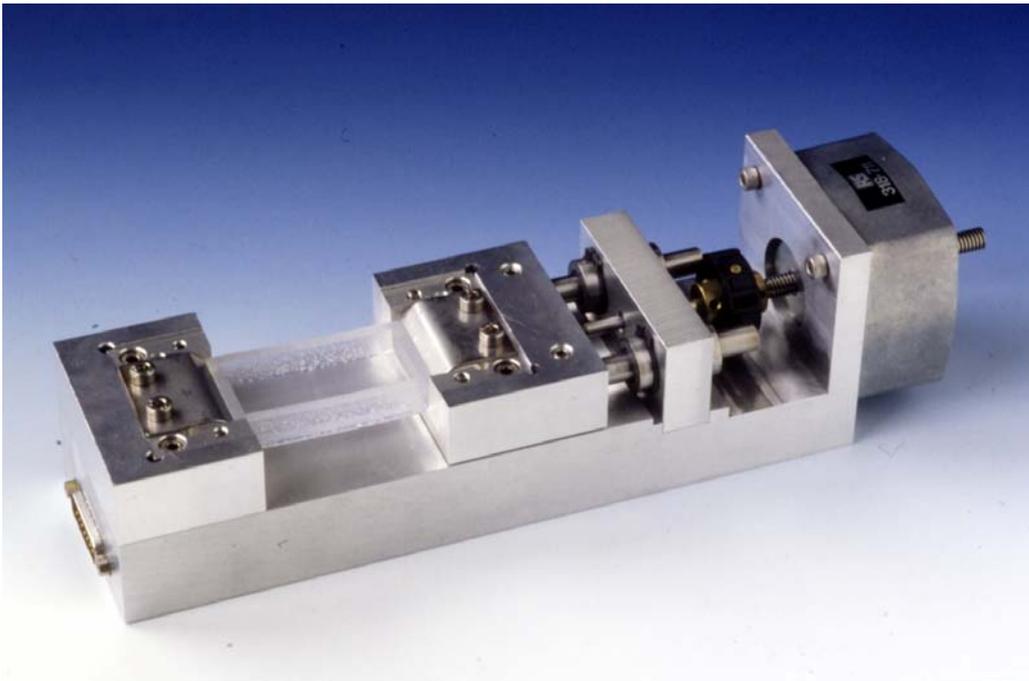


Abbildung 11: Einspannvorrichtung für die Fixierung einer Silikonschale

6.3.2 Versuchsgruppen

Für die vorliegende Arbeit wurden drei verschiedene repetitive Dehnungsmuster hinsichtlich ihrer Auswirkung auf zelluläre Respons ausgetestet (Tabelle 1)

Dehnungsmuster der Versuchsgruppen

V	Stressdauer	Pause	n
I	2 × 30′	1 × 240′	10
II	4 × 15′	1 × 240′; 1 × 17,5 h; 1 × 240′	10
III	1 × 15′ u. 1 × 30′	1 × 240′	10

Tabelle 1: Gruppeneinteilung für repetitiven Stress

V = Nummer des Versuchsblockes mit unterschiedlichem Dehnungsmuster

Stressdauer = Dauer der zyklischen, mechanischen Dehnung mit 5% und 1 Hz

Pause = Abstand zwischen aufeinanderfolgenden repetitiven Dehnungsblöcken

n = Anzahl der Versuche im Versuchsblock

6.3.3 Versuchsparameter und Zeitintervall nach repetitiver Dehnung

Der Einfluß von repetitivem Stress auf zelluläre Funktionen wurde an spezifischen Parametern untersucht und ausgewertet (Tabelle 2).

Die Zeitdauer zwischen letzter Stressapplikation und dem Abbruch der Zellkultur ist aufgrund der unterschiedlich langen Zeiten, die z.B. für die Aktivierung von Genen und die Proteinneusynthese benötigt werden abhängig vom zu untersuchenden Parameter. Als interner Standard wurden für jeden Parameter und bei jeder Zelllinie zwei Null-Kontrollen mitgeführt, das heißt Zellen, die keinem Dehnungsstress ausgesetzt wurden.

Für die durchgeführten Versuchseinheiten sind jeweils folgende Zeitintervalle für die respektiven Parameter eingehalten (Tabelle 2).

Parameter	Zeitintervall nach Stress	Methodik
Zellproliferation	0, 6, 12 und 24 Stunden	BrdU/Spektrophotometrie
Apoptose	0, 6, 12 und 24 Stunden	Annexin-V/ FACS
Expression von HSP 72-Protein	0, 2, 4 und 8 Stunden	Western Blot
Zytokinsekretion (IL-6; TGF- β 1)	0, 6, 12 und 24 Stunden	ELISA
mRNA-Quantifizierung der ECM-Proteine (Kollagen I; Kollagen III)	0, 15, 30 und 60 Minuten	Real Time PCR (Light Cycler)

Tabelle 2: Auswahl der Versuchsparameter, sowie Zeitpunkte der Versuchsabbrüche nach Stressende und Art der Auswertung. HSP=Hitzeschockprotein, IL=Interleukin, TGF=Transforming Growthfactor, ECM=Extrazelluläre Matrix

6.4 Quantifizierung der Zellproliferation

Die Proliferation der humanen Fibroblasten wurde über die Inkorporierung des Thymidin-Analogons 5-Bromo-2'-deoxy-Uridin (BrdU) bestimmt. Zur Quantifizierung wurde der „BrdU Labeling and Detection Kit III“ (Boehringer, Mannheim) genutzt (Tabelle 3).

Das Prinzip dieser Nachweismethode ist, daß BrdU während der S-Phase des Zellzyklus anstelle von Thymidin in die DNA eingebaut und über ein ELISA- Verfahren densitometrisch quantifiziert wird. Die DNA-Synthese wird in diesem Verfahren als Maß für die Zellproliferation verwendet.

Der BrdU-ELISA wurde für den direkten Nachweis in Silikonschalen optimiert und standardisiert. Zwei Stunden vor Versuchsbeginn wurden aus jeder Silikonschale 1,5 ml Kulturmedium entnommen, zu den verbleibenden 1,5 ml Medium wurden 150 µl BrdU-Lösung zugefügt. Die finale BrdU-Konzentration betrug 10 µM. Nach Applikation des mechanischen Stress und der sich anschließenden Inkubationszeiten (0, 6, 12, 24 Stunden) wurden die Zellen mit 70% Ethanol in 0,5 M HCl dreißig Minuten bei -20°C fixiert. Das Fixativ wurde bei -20°C vorgekühlt.

Nach der Fixierung wurden die Zellen dreimal mit PBS (Tabelle 4) gewaschen, die Proben konnten im Anschluß bei 4°C gelagert und bis zur weiteren Bearbeitung am nächsten Tag gesammelt werden.

Nach der Lagerung der Proben wurde der fixierte Zellrasen erneut mit PBS gewaschen. Die Proben wurden dann eine halbe Stunde bei 37°C in einer Nukleaselösung (je 1ml) (Tabelle 3) inkubiert. Die Nukleasen sorgen für einen partiellen Verdau der zellulären DNA und ermöglichen so den Zugang zum inkorporierten BrdU durch einen spezifischen Antikörper (s.u.). Um die Nukleasen zu entfernen, wurde die Proben nach der Inkubation erneut dreimal mit PBS gewaschen. Die spezifische Detektion des BrdU erfolgte dann durch die Zugabe von 1ml Antikörper-Lösung (Tabelle 3), die Proben wurden nochmals 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Bei dem Antikörper handelt es sich um peroxidasekonjugierte monoklonale Maus-Fab-Fragmente gegen BrdU. Nach diesem Inkubationsschritt wurde erneut dreimal mit je 1ml Waschpuffer gewaschen und anschließend mit je 1ml Peroxidase-Substratlösung (ABTS-Lösung) (Tabelle 3) je Probe bis zur grünen Farbbildung bei Raumtemperatur inkubiert.. Die an die Fab-Fragmente konjugierte Peroxidase katalysiert die Spaltung des chromogenen Substrats ABTS, bei der ein farbiges (grünes) Reaktionsprodukt entsteht. Der Überstand in den Silikonschalen wurde bis zur farblichen Homogenität vermischt, je 400 µl der Probe (Doppelbestimmungen mit je 200 µl) wurden dann in eine 96-well-Mikrotiterplatte (Nunc, Wiesbaden) überführt, die Absorption der Proben wurde bei 405 nm und als Referenz zur Erfassung des

Hintergrundes bei 490 nm in einem ELISA-Reader (Biotec, Winooski, USA) gemessen. Aus den beiden vorliegenden Meßwerten (bei 405 nm und 490 nm) wurde für jede Probe die Differenz gebildet um Plattenunebenheiten bei der Messung auszugleichen. Die Absorption konnte dann direkt mit der in die zelluläre DNA inkorporierten BrdU- Menge korreliert werden.

Arbeitslösungen des BrdU Labeling and Detection Kit III:

BrdU Lösung	BrdU labeling Reagenz (110 µM) in Kulturmedium
Nukleaselösung	Nukleasen in 66 mM Tris-Puffer mit 0,66 mM MgCl ₂ ; 1 mM 2-Mercaptoethanol
Anti-BrdU-POD-Lösung	200 mU/ml Anti-BrdU-POD in PBS (Waschpuffer) mit 10 mg/ml BSA
Substratlösung	ABTS-Substrat mit 1 mg/ml Substratverstärker in einem Natriumperborat/Citrat/Phosphat-Puffer

Tabelle 3: BrdU Labeling and Detection Kit III; Bestandteile des Kits und Zusammensetzung der Arbeitslösungen

PBS:

137 mM NaCl (J.T. Baker, Deventer, Niederlande)

2,7 mM KCl (Merck, Darmstadt)

1,5 mM KH₂PO₄ (Merck, Darmstadt)

8 mM Na₂HPO₄•2H₂O (Merck, Darmstadt)

pH 7,3

Tabelle 4: Zusammensetzung des PBS-Puffers

6.5 Quantifizierung der Apoptoserate

Die Apoptoserate der gedehnten Zellkulturen wurde mittels Annexin V und Analyse im FACS nachgewiesen.

6.5.1 Funktionsweise des Durchflußzytometers (FACS)

Für die Messung im Durchflußzytometer (Fluorescent Activated Cell Sorter [FACS]) werden die zu messenden Zellen in einem Flüssigkeitsstrahl vereinzelt und von einem fokussierten Laserstrahl erfaßt (Argon-Laser; 488 nm). Abhängig von der Zellgröße und der granulären Beschaffenheit der Binnenstrukturen der Zelle kommt es hierbei zu einer Streuung des Laserlichts. Der Streulichtdetektor für die Erfassung der Größe (Vorwärtsstreulicht; FSC) befindet sich in einem Winkel von 5° bis 15° zur Achse des einfallenden Lichtes, der Detektor zur Erfassung der Granularität (Seitwärtsstreulicht; SSC) ist in einem 90°-Winkel zur Achse des einfallenden Lichtes angeordnet. Nachfolgend befinden sich Fluoreszenzdetektoren, die Wellenlängen verschiedener Bereiche emittiert von Fluorochromen messen, so z.B. 530 nm ± 30 in der Fluoreszenz 1 (grüner Bereich) und 585 nm ± 42 in der Fluoreszenz 2 (roter Bereich). Das emittierte Fluoreszenzlicht gelangt über ein System von optischen Spiegeln und Filtern zu den oben genannten Detektoren, die sich in unterschiedlichen Winkeln zum emittierten Licht befinden. In dem beschriebenen System werden auch und vor allem die Fluoreszenzintensitäten gemessen, die proportional zur Zahl der gebundenen Fluorochrommoleküle sind.

6.5.2 Quantifizierung mittels Annexin-V

Die Quantifizierung der Apoptoserate wurde durchflußzytometrisch mittels eines Annexin-V-Assays durchgeführt.

Bei Annexin-V handelt es sich um ein Molekül, daß in Gegenwart einer geeigneten Ca²⁺-Konzentration eine hohe Affinität zu dem Phospholipid Phosphatidylserin (PS) aufweist. Phosphatidylserin kommt in der

Plasmamembran intakter Zellen ausschließlich auf der Innenseite der zweischichtigen Lipidhülle vor. Im Zuge der apoptotischen Kaskade gelangen die PS-Moleküle über einen Flipflop-Mechanismus von der Innenseite an die Außenseite der Membran, ohne daß dabei die Membranintegrität zerstört wird. Diese Translokation des PS findet in der frühen bis intermediären Phase der Apoptose statt. Somit werden mit Annexin-V nur solche Zellen detektiert, die schon in den apoptotischen Zyklus eingetreten sind, jedoch keine intakten „gesunden“ Zellen. Es werden mit dieser Nachweismethode allerdings auch nekrotische Zellen nachgewiesen, da bei ihnen die Integrität der Zellwand aufgehoben ist, so daß Annexin-V in die Zelle gelangen und an PS-Moleküle binden kann, die sich auf der Membraninnenseite befinden. Um die nekrotischen von den apoptotischen Zellen abzugrenzen, wird normalerweise eine Doppelbestimmung mit Propidiumiodid (PI) durchgeführt. PI detektiert nur Zellen, die keine intakte Membran mehr aufweisen, wie es z.B. bei nekrotischen Zellen der Fall ist, die eine höher permeable Membran besitzen. Das relativ kleine PI-Molekül interkaliert in die DNA dieser Zellen und kann dann durch seine rote Eigenfluoreszenz quantifiziert werden. Bei den hier untersuchten Fibroblasten muß auf eine Färbung mit PI verzichtet werden, da diese Zellen eine starke Eigenfluoreszenz im roten Bereich aufweisen die nicht von der PI-Fluoreszenz unterschieden werden kann, da die Farbspektren überlappen.

Das für diese Versuche verwendete Annexin-V ist mit einem Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-Molekül, einem Fluorochrom, konjugiert. Dieses FITC-Molekül fluoresziert im grünen Bereich bei 530 nm und kann somit im FACS-Gerät in der Fluoreszenz 1 detektiert werden.

6.5.3 Färbeprotokoll

Für die FACS-Färbung mit Annexin-V-FITC (Bender Med Systems, Wien, Österreich) wurde der sich in der Silikonschale befindliche Überstand mit einer Pasteurpipette abgenommen und der Zellrasen mit PBS (Tabelle 4) gewaschen. Anschließend wurde 1 ml FACS-Bindungspuffer (Tabelle 5) je

Silikonschale auf die Zellen pipettiert, die adhären Zellen wurden dann vorsichtig mit einem Zellschaber vom Boden der Schale abgelöst und in ein FACS-Röhrchen (Greiner, Solingen) überführt. Die Zellen wurden 5 Minuten bei 4°C und 2000 rpm zentrifugiert, der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet in 100 µl FACS-Bindungspuffer (Tabelle 5) mit 5 µl Annexin-V-FITC-Lösung resuspendiert. Um die Bindung des Annexins an das PS zu gewährleisten wurde die Suspension 20 Minuten bei 4°C inkubiert. Im Anschluß erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt, um das nicht gebundene Annexin zu entfernen. Zum Schluß wurde das Pellet in 500 µl FACS-Bindungspuffer aufgenommen. Da die Proben zum gleichen Zeitpunkt gemessen wurden, erfolgte eine Fixierung der Zellen mit 50 µl 5% PBS-gepuffertem Formalin (Merck, Darmstadt).

FACS-Bindungspuffer:

10 mM HEPES (Roth, Karlsruhe)

140 mM NaCl (J.T. Baker, Deventer, Holland)

2,5 mM CaCl₂ (Merck, Darmstadt)

pH 7,4

Tabelle 5: Zusammensetzung des FACS-Bindungspuffers

Die durchflußzytometrische Bestimmung wurde zum Teil auf einem Becton Dickinson FACScan (BD, Heidelberg) mit Lysis II Software durchgeführt, die Auswertung der Daten erfolgte in diesem Fall unter Verwendung von WinMDI 2.6. Das letzte Drittel der Messungen erfolgte auf einem Becton Dickinson FACSCalibur (BD, Heidelberg) mit CellquestPro Software, wobei die Auswertung im gleichen Programm stattfand.

6.6 Hsp 72-Quantifizierung

Die Quantifizierung des bei mechanischem Stress gebildeten Hitzeschockproteins HSP 72 erfolgte mit Hilfe des Western Blot-Verfahrens. Bei diesem Verfahren werden Proteine über eine SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Auf dieser Membran können die Proteine über spezifische Antikörper markiert und detektiert werden.

Nach dem Dehnungsversuch wurde das Kulturmedium aus den Schalen entfernt. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in erwärmten Probenpuffer modifiziert nach Laemmli (100 µl/Schale)

Probenpuffer nach Laemmli:

10 % SDS (Merck,Darmstadt)

50 % Glycerin (Merck,Darmstadt)

0,1 M Tris (Merck,Darmstadt)

2 mM EDTA (Merck,Darmstadt)

10 % β-Mercaptoethanol (Sigma, Taufkirchen)

0,04 % Bromphenolblau (Sigma, Taufkirchen)

Tabelle 6: Zusammensetzung des Probenpuffers nach Laemmli

6.6.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Vor dem Laden auf ein Polyacrylamidgel wurden die Proben 10 Minuten bei 96°C erhitzt. Dieses führt zu einer Denaturierung der Proben, die Proteine liegen danach, gebunden an das im Probenpuffer enthaltene SDS, mit einer stark negativen Nettoladung vor. Dadurch werden die Proteine im Molekularsieb des Gels gemäß ihrer Größe und nicht gemäß ihrer Ladung aufgetrennt. Nach dem Erhitzen wurden die Proben zwei Minuten im Eisbad abgekühlt, anschließend wurden 20 µl jeder Probe in einem 12%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt.

Das Gießen des Gels erfolgte in einer speziellen Gießvorrichtung (Pharmacia, San Francisco, USA). Das Gel wurde zwischen einer Glas- und einer Aluminiumplatte gegossen, die in diese Vorrichtung eingespannt waren und durch zwei Spacer einen Abstand von 0,75 mm zueinander aufwiesen. Zuerst wurden 3 ml Trenngellösung (Tabelle 7) in den Zwischenraum pipettiert und mit Isopropanol (Merck, Darmstadt) überschichtet, um die obere Kante des Trenngels luftblasenfrei zu gestalten. Nach ca. 15 Minuten war das Gel ausreichend vernetzt. Das Isopropanol wurde dann entfernt und ein 12-zähliger Kamm wurde zwischen die Platten gesteckt. Der bis zum oberen Rand verbleibende Raum wurde dann mit Sammelgellösung (Tabelle 7) gefüllt. Nach weiteren 15 Minuten war auch das Sammelgel ausreichend ausgehärtet, die beiden Platten mit dem sich dazwischen befindlichen SDS-Gel wurden aus der Gießvorrichtung entfernt und in eine Gelelektrophesezelle (Pharmacia, San Francisco, USA) eingespannt. Der Lauf der geladenen Proben erfolgte ca. 15 Minuten, bis zum Erreichen der Sammelgelgrenze, bei 70 V und anschließend erfolgte die Trennung der Proben bei 200 V in einem Tris-Glycin-Puffer bei pH 8,3 (Tabelle 8).

	Trenngel (17 ml)	Sammelgel (6 ml)
H ₂ O (Millipore, Eschborn))	5,95 ml	4,16 ml
Acrylamid/Bisacrylamid 29:1 (Serva, Heidelberg)	5,10 ml	1 ml
1,5 M Tris (Merck)-HCl pH 8,8	5,70 ml	-
0,5 M Tris (Merck)-HCl pH 6,8	-	0,75 ml
SDS 10 % (Merck, Darmstadt)	170 µl	60 µl
TEMED (Merck)	10 µl	6 µl
APS (Merck)	70 µl	24 µl

Tabelle 7: Trenn-und Sammelgelansatz für 4 Polyacrylamidgele

Tris-Glycin-Puffer:

50 mM Tris (Merck, Darmstadt)

370 mM Glycin (Roth, Karlsruhe)

0,1 % SDS (Merck, Darmstadt)

Tabelle 8: Die Zusammensetzung des Tris-Glycin-Puffers

6.6.2 Western Blot

Zum Blotting der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (Schleicher&Schuell, Dassel) mittels der Semi-dry-Methode wurde das Gel nach dem Lauf für 5 Minuten in Transferpuffer inkubiert, in dem schon zwei Lagen Blottingpapier (Roth, Karlsruhe) und die Membran equilibriert waren. In der Western Blot-Apparatur (Biorad, Hercules, USA) wurden von der Anode ausgehend zuerst eine Lage Blotting Papier, die Membran, das Gel und zum Abschluß wieder eine Lage Blotting Papier übereinander geschichtet. Die Proteine wanderten dann unter Anlegen einer Spannung von 15 V zur Anode und wurden dabei an die Nitrocellulosemembran gebunden. Die Dauer des Laufs betrug 15 Minuten. Um den Erfolg des Blots zu kontrollieren, wurden die Proteine auf der Membran mit Ponceau S-Lösung (Merck, Darmstadt) angefärbt und anschließend mit destilliertem Wasser wieder entfärbt.

6.6.3 Immundetektion der Proteine

Um unspezifische Proteinbindungsstellen zu blockieren, wurde die Membran mindestens eine Stunde in PBS (Tabelle 4) mit 0,3% Tween 20 (Sigma, Taufkirchen) (PBST) und 5% Milchpulver (Heirler, Radolfzell) inkubiert. Die Inkubation des Primärantiköpers (Stressgen, Victoria, Canada), eines Kaninchen-anti-Human HSP 72-Antiköpers, erfolgte über Nacht. Der Antikörper wurde 1:1000 verdünnt in PBST mit 5% Milch eingesetzt. Nach dreimaligem 10minütigem Waschen in PBST wurde erneut 10 Minuten blockiert, anschließend erfolgte eine zweistündige Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Stressgen, Victoria, Canada) (Ziege-anti-Kaninchen IgG-Meerrettichperoxidase), der 1:10000 verdünnt

in PBST eingesetzt wurde. Nach der Inkubation wurde die Membran erneut dreimal eine halbe Stunde mit PBST gewaschen. Die die Detektion der Peroxidase erfolgte mit einem Gemisch aus je 5 ml der Lösungen A und B der ECL (enhanced chemiluminescence)-Detektionsreagenz (Tabelle 9, Tabelle 10). Die Membran wurde eine Minute in der Lösung geschwenkt, dann vorsichtig getrocknet und in Klarsichtfolie eingeschweißt. In einer Filmkassette wurden Röntgenfilme (Amersham, Freiburg) je nach Signalstärke zwischen 15 Sekunden und 2 Minuten exponiert und anschließend entwickelt (Protec, Oberstenfeld).

Die Membran wurde dann nochmals mindestens zwei Stunden blockiert und der Vorgang wurde mit einem β -Aktin-Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) (1:1000 in PBST) und einem Anti-IgG-AK (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) (1:10000 in PBST) wiederholt. Die Intensität der Banden wurde densitometrisch ausgewertet. Die Auswertung fand mit dem BioDocAnalyse (Biometra, Göttingen) in den Programmen bio2 und Pcbas statt. Um die unterschiedlichen Proteinnengen zu standardisieren, wurde jede Probe in den Vergleich zu ihrem jeweiligen β -Aktin Wert gesetzt.

Lösung A für ECL:

100 mM Tris (Merck, Darmstadt)
2,5 mM Luminol (Fluka, Buchs)
0,4 mM Coumarinsäure (Sigma, Steinheim)

Tabelle 9: Zusammensetzung der Lösung A für ECL

Lösung B für ECL:

100 mM Tris (Merck, Darmstadt)
H₂O₂ 30 % (Merck, Darmstadt)

Tabelle 10: Zusammensetzung der Lösung B für ECL

6.7 Zytokinbestimmungen

Die in der Arbeit gemessenen Zytokine IL-6 und TGF- β 1 wurden mit Hilfe eines „Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay“ (ELISA) auf Proteinebene bestimmt. Für die Messung wurden Zellkulturüberstände eingesetzt, die zu den Zeitpunkten 0, 6, 12 und 24 Stunden aus den Silikonschalen abgezogen wurden. Die hier genutzten ELISA's funktionieren nach dem so genannten „Sandwich-Prinzip“. Dabei ist ein Antikörper gegen das entsprechende Protein am Boden einer 96-Well-Platte befestigt (capture-antibody), ein zweiter biotinylierter Antikörper gegen ein anderes Epitop des gleichen Proteins wird in Lösung dazugegeben (detection-antibody). Das Protein befindet sich schließlich zwischen diesen Antikörpern, detektiert wird dieser Komplex mit HRP-konjugiertem Streptavidin. Nach Zugabe des HRP-Substrates 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) entsteht ein blaues Reaktionsprodukt, das nach Zugabe einer Stop-Lösung (2N H₂SO₄) in ein gelbes Produkt umgewandelt wird. Dieses Produkt wird bei einer Wellenlänge von 450 nm in einem ELISA-Reader gemessen. Die ermittelte optische Dichte ist proportional zur Menge des gebundenen Proteins. Über eine mitgeführte Standardreihe mit rekombinantem humanen Zytokin kann die direkte Konzentration des jeweiligen Zytokins mittels Interpolation berechnet werden.

6.7.1 Interleukin 6

Die Messung erfolgte mit einem DuoSet für humanes IL-6 (R&D Systems, Minneapolis, USA), einem Kit, in dem Capture- und Detection-Antikörper sowie ein Standard und Streptavidin-HRP enthalten waren.

100 μ l eines murin-anti-humanen IL-6 Capture-Antikörper wurden in einer Konzentration von 2 μ g/ml in PBS (Tabelle 4) in die Vertiefungen einer 96-Well-Platte (Nunc, Wiesbaden) pipettiert und zur Adhärenz des Antikörpers an die Platte über Nacht inkubiert. Zur Entfernung des nicht gebundenen Antikörpers wurde dreimal mit Waschpuffer (Tabelle 12) gewaschen, anschließend wurde eine Stunde mit Block Buffer (Tabelle 11)

inkubiert, um unspezifische Bindungen zu minimieren. Im Anschluß erfolgte eine zweistündige Inkubation der Proben bzw. einer Standardreihe aus rekombinantem humanen IL-6. Nach erneutem Waschen wurde zur Detektion des IL-6 zwei Stunden mit einem biotinylierten Ziege-anti-human IL-6 Antikörper inkubiert, der in einer Konzentration von 200 ng/ml in Reagent Diluent (Tabelle 13) eingesetzt wurde. Nach wiederholtem Waschen reagierte das Biotin mit Streptavidin, das 1:200 in Reagent Diluent verdünnt eingesetzt wurde und mit einer Peroxidase (HRP) konjugiert war. Die Peroxidase setzte das Substrat TMB (Sigma, Steinheim) in ein blaues Reaktionsprodukt um. Durch das Abstoppen der Reaktion mit konzentrierter Schwefelsäure erfuhr das Reaktionsprodukt einen Farbumschlag nach gelb. Dieses gelbe Produkt hat ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 450 nm. Die Extinktion wurde bei dieser Wellenlänge und zur Referenz auch bei einer Wellenlänge von 540 nm gemessen, um Unebenheiten der Platte auszugleichen. Die ermittelte optische Dichte der Proben war proportional zur Konzentration, diese konnte somit über die Standardreihe errechnet werden. Da die höchste Standardkonzentration 300 pg/ml betrug, die Proben aber erheblich höhere Konzentrationen an humanem IL-6 aufwiesen, mußten sämtliche Proben vor der Messung verdünnt werden.

Blockpuffer:

1 % BSA (PAA Laboratories, Linz, Österreich)

5% Sucrose (Fluka, Buchs)

0,05 % NaN₃ (Merck, Darmstadt)

in PBS

Tabelle 11: Zusammensetzung des Blockpuffers für den IL-6-ELISA

Waschpuffer:

0,05 % Tween 20 (Sigma, Steinheim) in PBS

pH 7,3

Tabelle 12: Zusammensetzung des Waschpuffers für den IL-6-ELISA

Reagent Diluent:

0,1 % BSA (PAA Laboratories, Linz, Austria)

0,05 % Tween 20 (Sigma, Steinheim)

in TBS

pH 7,3

Tabelle 13: Zusammensetzung des Reagent Diluent für den IL-6-ELISA

6.7.2 Transforming Growth Factor- β 1

Der ELISA für den humanen Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1) wurde durchgeführt wie schon im Abschnitt 6.7.1 (Interleukin-6) beschrieben. Eingesetzt wurde das DuoSet für humanes TGF- β 1 (R&D Systems). Als Capture-Antikörper wurde ein murin-anti-TGF- β 1-Antikörper in einer Konzentration von 2 μ g/ml eingesetzt. Der Detection-Antikörper ist ein chicken-anti-human TGF- β 1-Antikörper, eingesetzt in einer Konzentration von 300 ng/ml.

Um das latente TGF- β 1 mittels des ELISA's detektieren zu können, wurden die Proben in die immunoreaktive Form überführt. Die Aktivierung erfolgte mittels 0,1 N HCl (Merck, Darmstadt) für 10 Minuten bei Raumtemperatur, die Neutralisierung anschließend mit 1,2 N NaOH (Merck, Darmstadt) in 0,5 M HEPES (Roth, Karlsruhe). Der so erzeugte Verdünnungsfaktor wurde später in die ermittelte Konzentration eingerechnet.

6.8 Quantifizierung der mRNA der extrazellulären Matrixproteine

Für diese Arbeit wurde die Expression von zwei Proteinen der extrazellulären Matrix (ECM) auf RNA-Ebene untersucht. Bei den untersuchten Proteinen handelt es sich um die Matrixproteine Typ I Kollagen und Typ III Kollagen. Typ I Kollagen wird unter normalen Bedingungen in der Fibroblastenmatrix gebildet, während Typ III Kollagen

als „Rescue-Protein“ betrachtet wird, da es erst nach Verletzungen des Gewebes bzw. nach Zellstress produziert wird. Um einen internen Standard für die eingesetzte Menge an mRNA zu bekommen, wurde zusätzlich das „housekeeping“-Gen Porphobilinogen-Desaminase (PBGD) gemessen, das von jeder Zelle in der gleichen Quantität gebildet wird.

Nach Applikation der Zelldehnung wurde der Zellkulturüberstand verworfen, der Zellrasen wurde zweimal mit PBS (Tabelle 4) gewaschen und die Zellen wurden in 500 µl Trizol (Invitrogen, Carlsbad, USA) vom Schalenboden gekratzt und in ein Eppendorfreaktionsgefäß (Sarstedt, Nümbrecht) überführt. Um eine ausreichende Menge RNA für die Messung zu erhalten, sind für jeden Stresswert (0, 15, 30, 60 Minuten nach Stress) zwei Silikonschalen angesetzt worden. Die Dupletten wurden beim Abbruch des Experiments im Eppendorfreaktionsgefäß gepoolt. Die in Trizol konservierten Proben konnten dann bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert werden.

6.8.1 RNA Isolierung

Zur Isolierung der RNA wurden die in Trizol gelagerten Proben zuerst mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze auf und ab pipettiert, um die chromosomale DNA zu scheren. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform (Merck, Darmstadt), mehrmaligem Invertieren, einer zweiminütigen Inkubation bei Raumtemperatur und einem Zentrifugationsschritt bei $12000 \times g$ (Heraeus, Hanau) befand sich die RNA in der oberen wässrigen Phase. Diese Phase wurde vorsichtig in ein neues Gefäß überführt und zur Fällung der RNA mit 600 µl Isopropanol (Merck, Darmstadt) 15 Minuten inkubiert. Zum Pelletieren der RNA wurde die Lösung 30 Minuten bei $12000 \times g$ zentrifugiert. Das Pellet wurde noch einmal mit Ethanol (J.T.Baker, Deventer, Niederlande) gewaschen und nach der Trocknung in einer Speedvac (Eppendorf, Hamburg) in 10 µl DEPC-Wasser (Sigma, Deisenhofen) aufgenommen. Die Nukleinsäuremenge der Lösung wurde dann photometrisch bei 260 nm bestimmt (Amersham, Freiburg). Um die Reinheit der Nukleinsäure zu überprüfen, fand gleichzeitig eine Messung bei 280 nm statt. Nukleinsäuren haben ihr Absorptionsmaximum bei 260

nm, das von Proteinen befindet sich bei 280 nm. Durch die Bildung des Quotienten der bei 260 und 280 nm gemessenen Werte läßt sich die Reinheit der Lösung ermitteln. Der errechnete Wert sollte sich für RNA in einem Bereich zwischen 1,5 und 1,8 aufhalten.

6.8.2 RT-PCR

Die RT-PCR (RT = Reverse Transkription) dient der Umschreibung der sehr instabilen RNA in die stabilere Form der cDNA (copy DNA), die für die Polymerase-Kettenreaktion (s.u.) als Template benötigt wird. Das für diesen Vorgang benutzte Enzym MMLV-Reverse Transkriptase kommt nur bei einigen RNA-Viren vor, und wird sich in der Molekularbiologie zu Nutze gemacht.

Dabei wurde zur Streckung der einzelnen Nukleinsäurebestandteile eine Mischung aus maximal 2 µg RNA, 1 µl Oligo (dT)₁₂₋₁₈-Primern (Invitrogen, Carlsbad, USA), 1 µl (40mM) Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTP's) (Promega, Madison, USA) und destilliertem Wasser 10 Minuten auf 95°C erhitzt. In einer sich anschließenden Abkühlphase wurde ein Mastermix aus 2,4 µl MgCl₂, 2 µl Reaktionspuffer (alles Qiagen, Hilden), 1 µl Enzym (Invitrogen, Carlsbad, USA) 1 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma, Taufkirchen) und destilliertem Wasser dazugegeben. Das Volumen des Ansatzes betrug 20 µl. Die Umschreibung der RNA in cDNA fand innerhalb einer Stunde bei 37°C statt. Anschließend erfolgte eine Inaktivierung des Enzyms für 5 Minuten bei 90°C. Die cDNA wurde im Anschluß an die Reaktion 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt und konnte dann für weitere Versuche bei -20 °C gelagert werden.

6.8.2.1 Polymerase-Kettenreaktion

Als Polymerase-Kettenreaktion wird eine Reaktion bezeichnet, bei der eine bestimmte Gensequenz mit Hilfe eines speziellen Primerpaares und des Enzyms Polymerase in einer sich mehrfach wiederholenden Reaktion hoch amplifiziert wird. Der sich 30 bis 40 Mal wiederholende Zyklus besteht aus einer Denaturierungsphase der cDNA bei 94°C, einer Primer-

Annealingsphase, deren Temperatur Primer-spezifisch ist, und einer DNA-Elongationsphase bei 72°C. In diesem Zyklus werden die DNA-Doppelstränge in Einzelstränge getrennt, die Primer lagern sich dann an je eine spezielle Sequenz auf den zwei Einzelsträngen an und von diesen Startpunkt aus wird ein neuer Strang durch die Polymerase synthetisiert. Durch das häufige Erhitzen auf 94°C muß das verwendete Enzym extrem thermostabil sein, aus diesem Grund wird ein Enzym aus dem thermophilen Archaeobakterium *Thermus aquaticus* verwendet, die *Taq*-Polymerase.

Zur Überprüfung der RT-PCR wurde nach der Umschreibung in cDNA eine PCR mit einem „housekeeping“-Gen durchgeführt (Tabelle 14;Tabelle 15). Bei dem hier nachgewiesenen Gen handelt es sich um die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, ein Enzym der Glykolyse, das ubiquitär in Zellen vorkommt.

PCR-Reaktion für GAPDH:

1 Zyklus	33 Zyklen			1 Zyklus
5 Minuten 94 °C	45 sec 94 °C	45 sec 58 °C	45 sec 72 °C	7 Minuten 72 °C

Tabelle 14: PCR-Programm für GAPDH

Eingesetzte Menge	Reagenz	Endkonzentration
5 µl	10×PCR-Puffer	1×final
10 µl	5×Q-Solution	1×final
1 µl	40 mM dNTP's	0,8 mM final
1 µl	20 µM Primer sense	0,4 µM final
1 µl	20 µM Primer antisense	0,4 µM final
0,5 µl	<i>Taq</i> -Polymerase	2,5 U final
10 µl	Template cDNA	
21,5 µl	Aqua dest.	

Tabelle 15: Zusammensetzung des Mastermix für den PCR-Ansatz à 50 µl

6.8.3 Generierung des Standards

Um die mRNA korrekt quantifizieren zu können, mußten für den einzusetzenden Standard (s. Real-Time-PCR) größere Mengen cDNA der einzelnen mRNA-Sequenzen (Typ I Kollagen, Typ III Kollagen, PBGD) vorliegen. Dazu wurden zuerst PCR`s mit den spezifischen Sequenzen für Typ I und Typ III Kollagen und PBGD durchgeführt.

Primer-Sequenzen:

Kollagen I	„sense primer“:	5'- GAA AAC ATC CCA GCC AAG AA
	„antisense primer“:	5'- CAG GTT GCC AGT CTC CTC AT
Kollagen III	„sense primer“:	5'- CAT CTG GTC ATC CTG GTT CC
	„antisense primer“:	5'- CCT TTT CTC CAT TTC GTC CA
PBGD	„sense primer“:	5'- GCT CGC ATA CAG ACG GAC A
	„antisense primer“:	5'- TTG GGT GAA AGA CAA CAG CA

6.8.3.1 Klonierung der PCR-Produkte

Die PCR-Reaktionen wurden wie in 6.8.2.1 beschrieben durchgeführt. Zur Sicherung wurden die PCR-Produkte mit Hilfe des TA Cloning Kits (Invitrogen, Carlsbad, USA) in das Plasmid pCR 2.1 kloniert. Dieses Plasmid ist durch seinen T-Überhang für die direkte Klonierung von PCR-Produkten konzipiert, da die Polymerase immer einen A-Überhang generiert.

Ligationsansatz (10 µl):

- ca. 5 µl steriles Wasser
- 1 µl 10×Ligationspuffer
- 2 µl pCR-Vektor (25ng/µl)
- ca. 1 µl PCR-Produkt (10 ng)
- 1 µl T4-DNA-Ligase

Tabelle 16: Zusammensetzung des Ligationsansatzes zur Klonierung eines PCR-Produktes

Die Ligation wurde über Nacht bei 14 °C inkubiert.

Transformation:

2 µl des Ligationsansatzes (Tabelle 16) wurden zu 50 µl kompetenten Zellen (*E.coli* INVαF') pipettiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluß wurde ein Hitzeschock für 30 Sekunden bei 42 °C appliziert, die Zellen wurden sofort danach erneut auf Eis plaziert. Zur Regeneration wurden die Zellen anschließend eine Stunde bei 37 °C in 250 µl SOC-Medium geschüttelt. Um die Transformanden zu selektieren, wurden 100 µl der Zellsuspension auf Luria Bertani (LB)-Agarplatten (Tabelle 17) mit X-Gal und 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C wurden 10 weiße Kolonien zur Überprüfung gepickt, da solche Kolonien das PCR-Produkt potentiell in das lacZα-Gen insertiert haben. Ihnen fehlt die Fähigkeit, X-Gal in ein blaues Produkt umzusetzen, da das α-Fragment der β-Galactosidase, das durch lacZ kodiert wird, nicht mehr korrekt abgelesen werden kann.

Nach Überprüfung des korrekten PCR-Fragment-Einbaus der in *E.coli* INVαF' klonierten Plasmide mittels entsprechender PCR konnten die positiven Klone in Glycerin-stocks bei -80 °C gelagert werden.

Von den für die jeweiligen Gene (Kollagen I und III, PBGD) positiven Klonen wurden Über-Nacht-Kulturen in LB-Medium (Tabelle 17) mit einem Zusatz von 100 µg/ml Ampicillin (Roth, Karlsruhe) angelegt. Das Ampicillin selektiert dabei auf definitiv Plasmid-tragende Klone, da das Plasmid eine Ampicillin-Resistenz trägt. Die Plasmide wurden mit Hilfe des Plasmid Mini-Spin-Kits (Qiagen, Hilden) präpariert und mit EcoR I verdaut (6.8.3.3). Die EcoR I-Schnittstellen grenzen auf dem Plasmid pCR 2.1 direkt an die polyT-Überhänge, so daß durch diesen Verdau ausschließlich das klonierte PCR-Produkt ausgeschnitten wird. Nach dem Verdau wurde das spezifische DNA-Fragment über eine Agarose-Gelelektrophorese vom Plasmid getrennt und mittels des GeneClean-Kits (BIO 101, Carlsbad, USA) aus dem Gel eluiert und aufgereinigt. Die Menge der einzelnen DNA-Lösungen wurde dann photometrisch bestimmt und

eingestellt, die Lösungen standen schließlich als Mengen-Standards für die Real-Time-PCR zur Verfügung.

<u>LB-Medium:</u>	<u>LB-Agar:</u>
10g Pepton (Roth, Karlsruhe)	LB-Medium mit
5g Hefeextrakt (Roth, Karlsruhe)	1,5 % Agar
10 g NaCl (J.T. Baker, Deventer, Niederlande)	(Fluka, Taufkirchen)
pH 7,0	
ad 1 Liter Aqua dest.	

Tabelle 17: Zusammensetzung von Luria Bertani-Medium und Luria Bertani-Agar

6.8.3.2 Plasmid-Präparation

Die Plasmid-Präparation mittels des Plasmid-Mini-Spin Kits (Qiagen, Hilden) basiert auf dem Prinzip der alkalischen Lyse. Das Bakterienpellet wurde in Puffer P1 (50 mM Tris/Cl; 10 mM EDTA; 100 µg/ml Rnase A) resuspendiert, die Bakterien wurden dann 5 Minuten in Puffer P2 (200 mM NaOH; 1% SDS) lysiert. Anschließend wurden genomische DNA, Proteine, SDS und Debris durch zehnmünütige Inkubation in Puffer P3 (3 M K-Acetat) auf Eis präzipitiert. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation pelletiert, der plasmidhaltige Überstand wurde auf eine Qiagen-Säule pipettiert. Beim anschließenden Zentrifugationsschritt wurden die Plasmide an eine in der Säule enthaltene Silicagelmembran gebunden. Die Bindung der DNA an die Matrix findet unter hoch salzhaltigen Bedingungen statt, die Eluation erfolgt unter schwach salzhaltigen Bedingungen. Um Salze zu entfernen, wurde die Säule einmalig mit dem Puffer PE gewaschen, anschließend wurde die DNA mit dem Puffer EB von der Membran eluiert.

6.8.3.3 Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau wurde durchgeführt mit dem Enzym EcoR I (Gibco, Karlsruhe). Pipettiert wurde ein 20 µl Ansatz mit 1 U Enzym pro 1 µg DNA und Schnittstelle, 2 µl 10fach-Puffer React 3 (Gibco, Karlsruhe),

cDNA und destilliertem Wasser. Der Verdau wurde eine Stunde bei 37°C inkubiert, anschließend 10 Minuten bei 65°C hitzeinaktiviert und bei – 20°C bis zur weiteren Bearbeitung gelagert.

6.8.3.4 Geleluatation

Die Geleluatation basiert auf der Bindung der negativ geladenen DNA an eine Silicamatrix unter definierten Bedingungen. Die Eluatation wurde mit dem GeneClean Kit (Bio 101, Carlsbad, USA) durchgeführt.

Das aus dem Gel ausgeschnittene DNA-haltige Agarosestück wurde gewogen und im dreifachen Volumen Natriumiodid-Lösung bei 55°C gelöst. Danach erfolgten die Zugabe von 10 µl Glasmilch und eine fünfminütige Inkubation bei Raumtemperatur. Die jetzt an die Matrix gebundene DNA wurde dreimal mit New Wash gewaschen und anschließend durch Zugabe von destilliertem Wasser wieder von der Matrix gelöst. Nach Pelletierung der Glasmilch wurde der DNA-haltige Überstand in ein neues Gefäß überführt. Die DNA-Konzentration der Lösung wurde photometrisch bestimmt und konnte somit für Standardreihen genutzt werden.

6.8.4 Real-Time-PCR

Die Real Time PCR zur Quantifizierung der RNA-Mengen wurde in einem Light Cycler (Roche, Mannheim) im Fraunhofer Institut für Toxikologie und Aerosolforschung durchgeführt.

Das Prinzip des Light Cyclers ist dem einer PCR-Maschine gleich. Nach einer einmaligen Denaturierungsphase wird ein Zyklus aus Denaturierung, Primer-Annealing und DNA-Elongation 45 Mal wiederholt. Während dieses Prozesses wird eine bestimmte Zielsequenz, die von den spezifischen Primern erkannt wird, hoch amplifiziert. Im Gegensatz zur ursprünglichen PCR kann in diesem bestimmten Gerät die Menge der neu synthetisierten DNA jedoch online verfolgt werden. Der Mastermix der Reaktion enthält neben den üblichen Agenzien den Fluoreszenzfarbstoff „SYBR Green“, der sich ähnlich Ethidiumbromid in doppelsträngige DNA

einlagert und in diesem interkalierten Auftreten eine 40fach höhere Fluoreszenz aufweist als in ungebundenem Zustand. Der Light Cycler verfügt über eine Photozelle, die am Ende jeder 72°C-Elongationsphase die Fluoreszenz aller Proben detektiert und an den angeschlossenen Rechner weiterleitet. Die Fluoreszenzstärke ist proportional zum in die DNA eingelagerten „SYBR Green“ und kann dementsprechend direkt für die Quantifizierung herangezogen werden. Der Verlauf der einzelnen Reaktionen kann mittels der „Light Cycler Software Version 3.5“ „real time“ verfolgt werden. Die Quantifizierung des Laufs bzw. der Proben findet im Programm „RelQuant“ (Roche; Mannheim) statt, wobei die Quantifizierung über den „crossing point“ erfolgt.

Die Light Cycler Reaktion wurde in einem 20 µl Ansatz gefahren. Für alle Reaktionen wurde der „Light Cycler-Fast Start DNA Master SYBR Green I“-Kit (Roche; Mannheim) genutzt, in dem, mit Ausnahme der cDNA und der Primer, sämtliche für die Reaktion benötigte Agenzien enthalten waren.

Light Cycler Mastermix:

11,6 µl H₂O

4 mM MgCl₂ (2,4 µl)

je 0,5 µM Primer (je 1 µl)

1 x Light Cycler –FastStart DNA Master SYBR Green I (2 µl)

Tabelle 18: Zusammensetzung des Mastermix für die Light Cycler Reaktion (einfacher Ansatz; 20 µl)

Diese 18 µl Mastermix (Tabelle 18) wurden in den Kopf einer vorbereiteten Kapillare pipettiert, in der die Reaktion stattfindet. Zum Mastermix wurden dann 2 µl Template-cDNA gegeben, die Lösung wurde durch mehrmaliges auf- und abpipettieren vermischt. Die Proben wurden dann in einer Mikrozentrifuge kurz an zentrifugiert, um die Lösung in den schmalen Teil der Kapillare zu befördern. Im Anschluß wurden die Proben in den Light Cycler überführt und der Lauf gestartet.

6.9 Statistik

Für den Ergebnisteil wurden für alle Versuchsparameter die ungestressten Kontrollen mit den Stresswerten der unterschiedlichen Zeitpunkte mit Hilfe des gepaarten T-tests verglichen. Alle Werte, die $p < 0,05$ aufwiesen wurden als statistisch signifikant gewertet. Um Veränderungen im zeitlichen Verlauf oder zwischen den einzelnen Gruppen nachzuweisen, wurde als statische Auswertung das „repeated measurement“ Verfahren gewählt. Auch hier wurden Werte, die $p < 0,05$ aufwiesen, als signifikant angesehen.

7 Ergebnisse

Die zehn Versuche in jedem der drei Versuchsblöcke wurden mit jeweils zehn unterschiedlichen primären Fibroblastenzelllinien durchgeführt. Humane Zelllinien reagieren jedoch mit sehr großer Diversität auf Dehnung, und zeigen mitunter schon in der „baseline“, d.h. bei Zellen ohne Dehnungsstress, sehr große Unterschiede. Um die einzelnen Versuche interpretieren zu können, war es notwendig, die Zahlen in ein vergleichbares Maß zu bringen. So wurden für jede Zelllinie die Meßwerte der nicht gedehnten Kontrollen auf 100% gesetzt und die Werte der gedehnten Zellen der gleichen Zelllinie prozentual an diesen Wert angeglichen.

7.1 *Einfluß von mechanischer Dehnung auf die Proliferation*

Für den ersten Versuchsblock (V1) mit dem Dehnungsmuster 30' Dehnung/4 h Pause/30' Dehnung (30'-4-30') zeigte sich ein kontinuierlicher Anstieg der Proliferation (Abbildung 12). Direkt nach Beendigung der repetitiven Dehnung, zum Zeitpunkt 0 h, war die Proliferationsrate im Vergleich zu den ungestressten Kontrollen kaum erhöht (5,9%). 6 h nach Dehnungsende zeigte sich jedoch schon eine signifikante Erhöhung ($p = 0,034$) der Proliferationsrate gegenüber den Kontrollen um 32,4% ($132,4 \pm 13\%$), die in einem Plateau 12 und 24 Stunden nach Dehnung mündete (Abbildung 12). Die Proliferationsrate lag zu diesen Zeitpunkten 49,4% ($149,4 \pm 19,5\%$) und 47,4% ($147,4 \pm 18,6\%$) über der Proliferationsrate der Kontrollen und war ebenfalls signifikant erhöht ($p = 0,032$; $p = 0,034$).

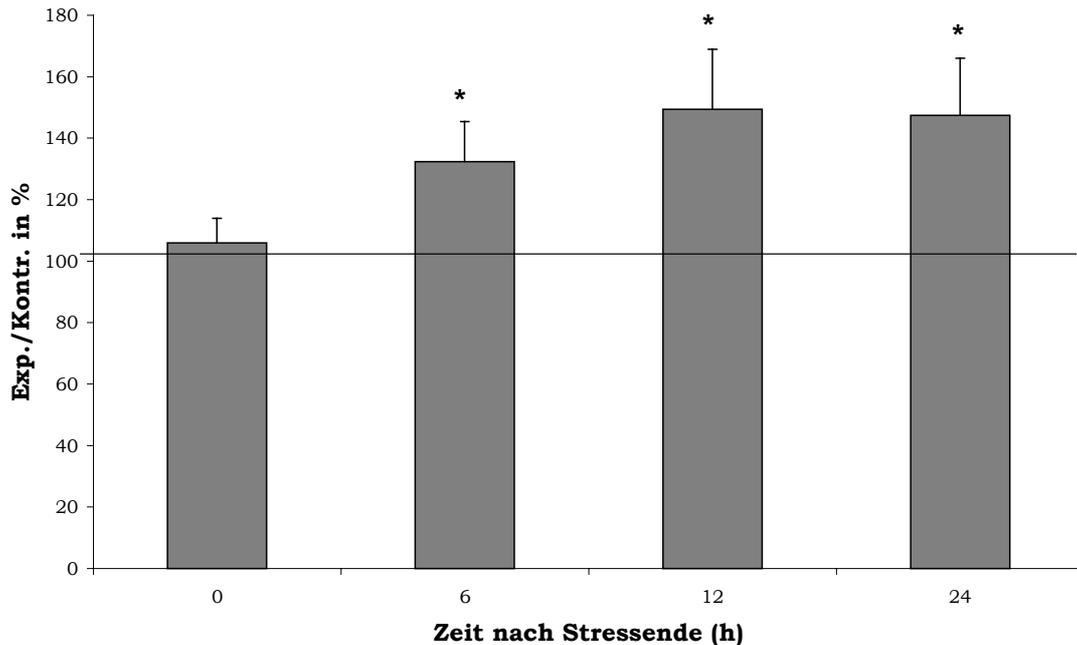


Abbildung 12: Zeitlicher Verlauf der Proliferation im Versuchsblock 1. Die Proliferationsmessung fand mittels eines BrdU-Assays statt. Die 100 %-Markierung gibt die Werte der ungedehnten Kontrollen (Kontr.) an, die Meßwerte der gedehnten Zellen (Exp.) sind prozentual an diesen Wert angeglichen. * $p < 0,05$

Im zweiten Versuchsblock (V2), in dem an zwei aufeinanderfolgenden Tagen das Dehnungsmuster 15' Dehnung/4 h Pause/15' Dehnung (15'-4-15'/15'-4-15') appliziert wurde, zeigte die Proliferationsrate im Gegensatz zu V1 keinen Anstieg verglichen mit den Kontrollen. Die Proliferationsrate war mit einem Wert von $81,7 \pm 5,7\%$ zum Zeitpunkt 0 h um 18,3% gegenüber den Kontrollen signifikant verringert ($p = 0,011$) (Abbildung 13). Die Werte zu den Zeitpunkten 6, 12 und 24 Stunden nach Dehnung wiesen mit $94,6 \pm 13,7\%$, $85,1 \pm 8,6\%$ und $86,1 \pm 11,5\%$ keine signifikante Veränderung gegenüber den ungestressten Kontrollen auf (Abbildung 13).

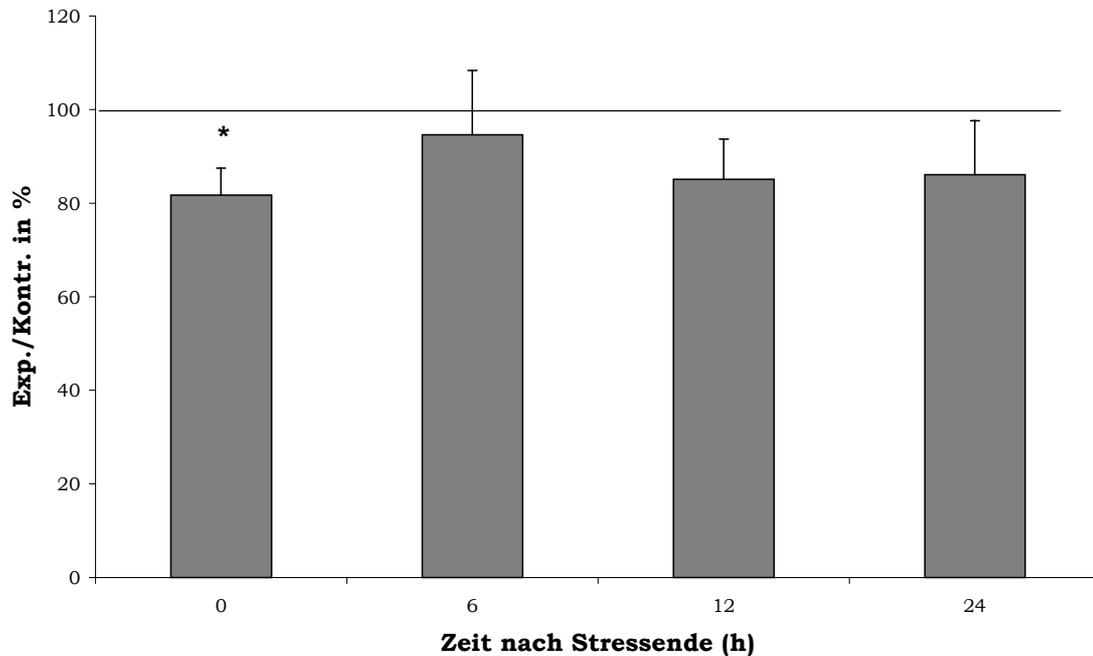


Abbildung 13: Zeitlicher Verlauf der Proliferation im Versuchsblock 2. Die Proliferationsmessung fand mittels eines BrdU-Assays statt. Die 100 %-Markierung gibt die Werte der ungedehnten Kontrollen (Kontr.) an, die Meßwerte der gedehnten Zellen (Exp.) sind prozentual an diesen Wert angeglichen. * $p < 0,05$

Im letzten der drei Versuchsblöcke (V3) mit dem Dehnungsmuster 15' Dehnung/4 h Pause/30' Dehnung (15'-4-30') zeigte die Proliferationsrate einen ähnlichen Verlauf wie in V1 (Abbildung 12). Hier kam es im Zeitverlauf von 0 bis 12 h nach Dehnung zu tendenziösen Anstiegen der Proliferationsrate von 22% ($122 \pm 20,3\%$), 27% ($127 \pm 21,4\%$) und 38,4% ($138,4 \pm 21\%$). 24 h nach Stressende lag die Proliferationsrate der repetitiv gedehnten Fibroblasten 54,4% ($154,4 \pm 19,3\%$) über dem Wert der ungestressten Kontrollen (Abbildung 14) und war hierbei signifikant erhöht ($p = 0,02$).

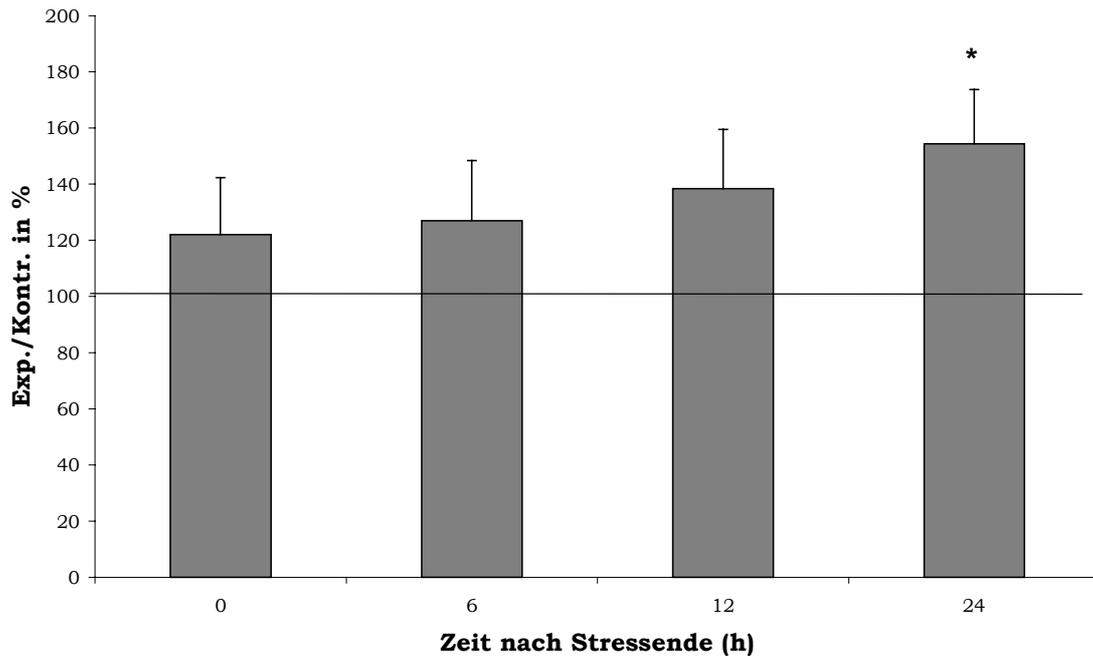


Abbildung 14: Zeitlicher Verlauf der Proliferation im Versuchsblock 3. Die Proliferationsmessung fand mittels eines BrdU-Assays statt. Die 100 %-Markierung gibt die Werte der ungedehnten Kontrollen (Kontr.) an, die Meßwerte der gedehnten Zellen (Exp.) sind prozentual an diesen Wert angeglichen. * $p < 0,05$

Die statistische Auswertung ergab für die drei Dehnungsmodelle das Auftreten sowohl eines Zeiteffektes ($p = 0,020$) als auch eines Gruppeneffektes ($p = 0,027$). Während sich die Gruppen V1 (30'-4-30') und V3 (15'-4-30') im Verlauf gleichen (Abbildung 15) und einen signifikanten zeitlichen Anstieg der Proliferationsrate aufwiesen, stieg die Proliferationsrate in der Gruppe V2 nicht an und zeigte im Gegenteil dazu im gesamten zeitlichen Verlauf nach Dehnungsende eine im Vergleich zu den Kontrollen verminderte Rate (Abbildung 15).

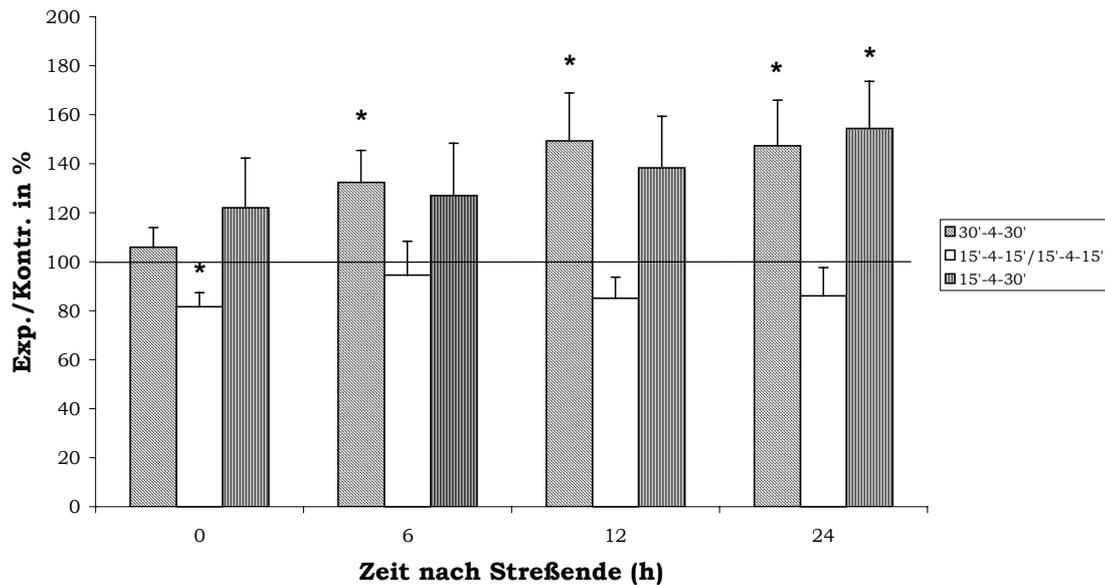


Abbildung 15: Gegenüberstellung der Proliferation innerhalb der Versuchsblöcke 1 bis 3 * $p < 0,05$

7.2 Einfluß von mechanischer Dehnung auf die Apoptoserate

In V1 lag die Apoptoserate der Proben direkt nach Stressende mit $73,9 \pm 12,9\%$ deutlich unter der Rate der Kontrollen (Abbildung 16). Zum Zeitpunkt 6 h nach Stressende war die Rate um 12,7% über die Kontrollwerte erhöht und fiel nach 12 h wieder auf das „baseline-level“ ($100 \pm 22,7\%$). Dieses Absinken der Rate war gefolgt von einem erneuten Anstieg der Apoptoserate auf 67% über die Kontrollwerte nach 24 h (Abbildung 16).

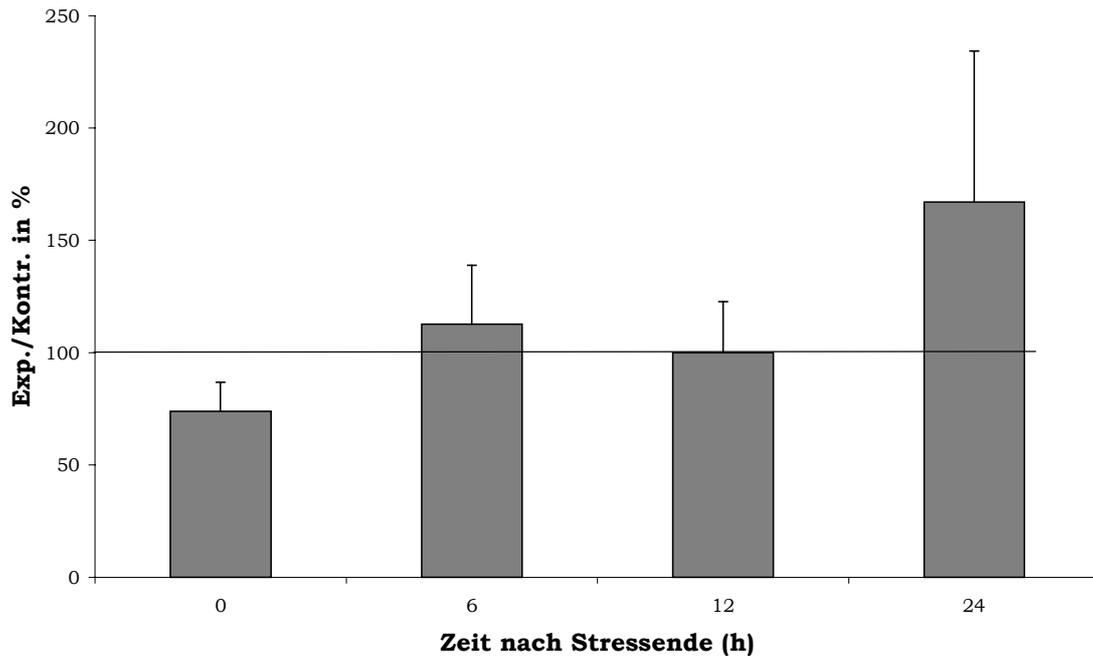


Abbildung 16: Zeitlicher Verlauf der Apoptose im Versuchsblock 1. Die Apoptoserate wurde über ein Annexin-V-Assay gemessen. Die 100 %-Markierung gibt die Werte der ungedehnten Kontrollen (Kontr.) an, die Meßwerte der gedehnten Zellen (Exp.) sind prozentual an diesen Wert angeglichen

In V2 zeigten die Werte der gedehnten Zellen mit $107,2 \pm 8,9\%$ nach 0 h, $99,9 \pm 11,4\%$ nach 6 h, $81,6 \pm 10,4\%$ nach 12 h und $98 \pm 19,2\%$ nach 24 h keine nennenswerten Veränderungen im Vergleich zu den ungestressten Kontrollen (Abbildung 17). Allerdings konnte man auch in diesem Dehnungsschema die Tendenz zu einem biphasischen Verlauf der Apoptoserate ähnlich wie in V1 erkennen.

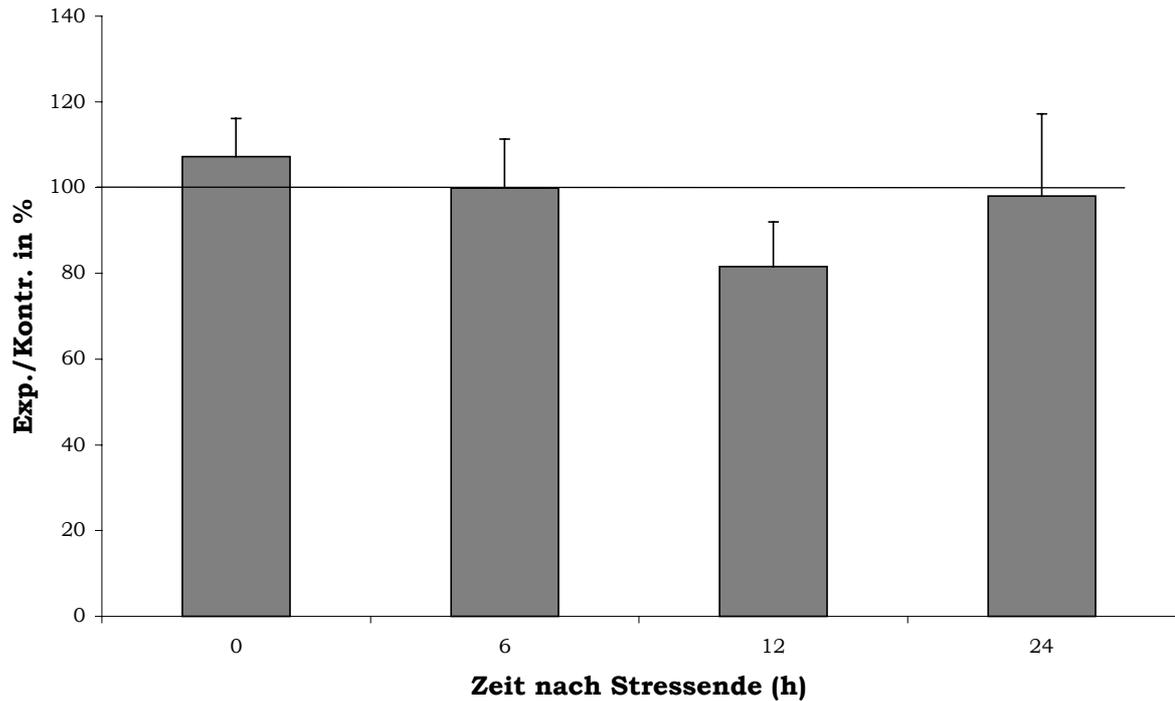


Abbildung 17: Zeitlicher Verlauf der Apoptose im Versuchsblock 2. Die Apoptoserate wurde über ein Annexin-V-Assay gemessen. Die 100 %-Markierung gibt die Werte der ungedehnten Kontrollen (Kontr.) an, die Meßwerte der gedehnten Zellen (Exp.) sind prozentual an diesen Wert angeglichen

Im dritten Dehnungsblock V3 zeigte sich ein biphasischer Verlauf ähnlich dem in den Blöcken V1 und V2 beschriebenen Verlauf. Die Apoptoserate stieg zu den Zeitpunkten 0 h und 6 h auf $114,4 \pm 15\%$ bzw. $125,7 \pm 20,8\%$ an und sank nach 12 h auf einen Wert unterhalb der Kontrollen ab ($92,6 \pm 12,4\%$) (Abbildung 18). 24 h nach Dehnungsende kam es zu einem erneuten Anstieg der Rate auf $140,8 \pm 16,8\%$ ($p = 0,038$) (Abbildung 18).

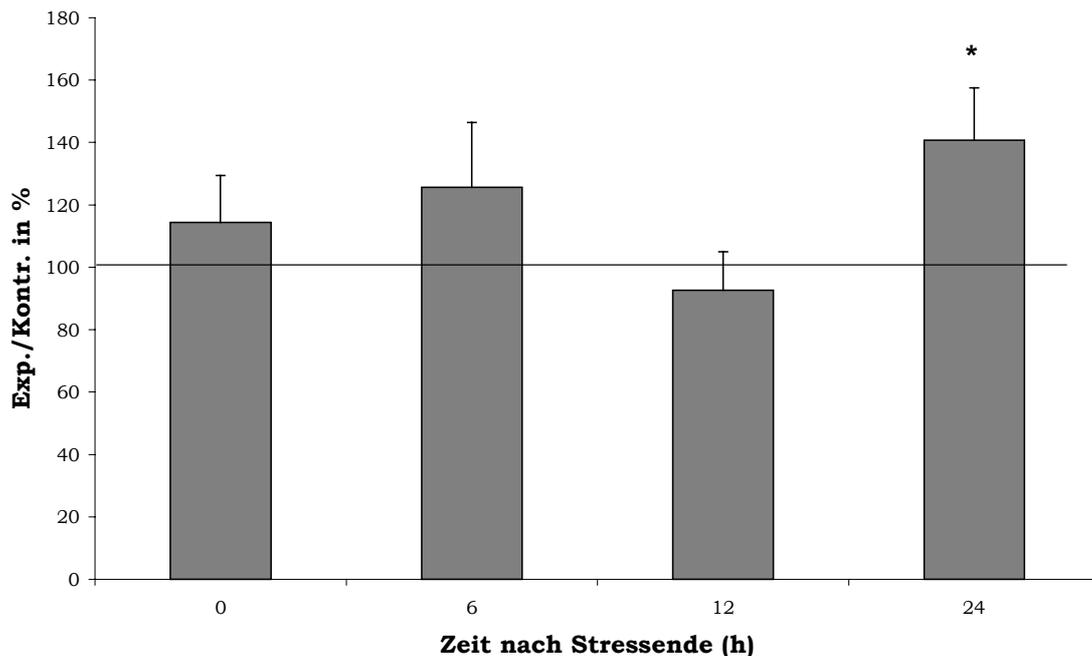


Abbildung 18: Zeitlicher Verlauf der Apoptose im Versuchsblock 3. Die Apoptoserate wurde über ein Annexin-V-Assay gemessen. Die 100 %-Markierung gibt die Werte der ungedehnten Kontrollen (Kontr.) an, die Meßwerte der gedehnten Zellen (Exp.) sind prozentual an diesen Wert angeglichen *p<0,05

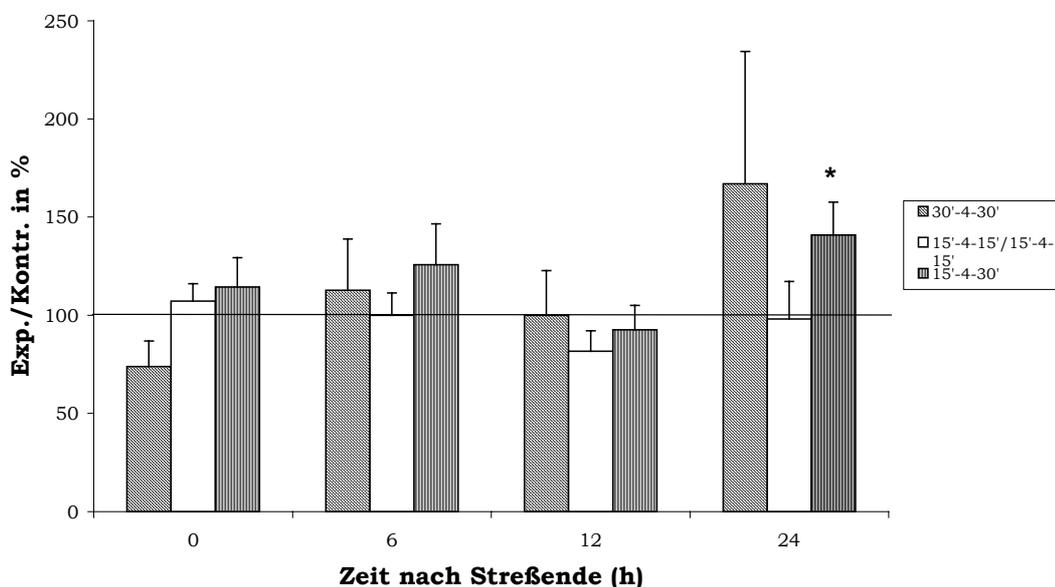


Abbildung 19: Gegenüberstellung der Apoptoserate innerhalb der Versuchsblöcke 1 bis 3 *p<0,05
Die Apoptoserate zeigte tendenziell bei allen drei Dehnungsmustern einen biphasischen Verlauf mit Anstiegen bis 6 h nach Dehnungsende, einem Absinken der Apoptoserate 12 h nach zyklischer Dehnung und einem

erneuten Anstieg der Rate nach 24 h (Abbildung 19). Dabei ist anzumerken, daß sich die Schwankungen bei V2 im Vergleich zu V1 und V3 in einem geringeren Bereich bewegten und die Werte von der Tendenz generell eher unterhalb der Kontrollwerte lagen. Ein Gruppen- oder ein Zeiteffekt konnte im Hinblick auf die Apoptoserate nicht beobachtet werden.

7.3 Einfluß von mechanischer Dehnung auf die HSP 72-Synthese

Im Versuchsblock 1 mit dem Dehnungsmuster 30'-4-30' war die HSP 72-Expression der Zellen im gesamten zeitlichen Verlauf nach Beendigung der Dehnungsapplikation leicht erhöht. Sie erreichte ein Expressionsmaximum zum Zeitpunkt 2 h nach Dehnung mit einem Anstieg von 43,1% über die Kontrollwerte (Abbildung 20). Zu allen anderen Zeitpunkten lag die HSP 72-Expression mit 25,5% nach 0 h, 23,1% nach 4 h und 22,3% nach 8 h auf einem ähnlichen leicht über die Basiswerte erhöhtem Niveau (Abbildung 20). Eine signifikante Veränderung lag zu keinem der vier Zeitpunkte vor.

Im zweiten Versuchsblock (15'-4-15'/15'-4-15') kam es im zeitlichen Verlauf zu einem stetigen Anstieg der zellulären HSP 72-Synthese (Abbildung 21). Die Expression lag direkt nach der letzten Dehnungsapplikation (Zeitpunkt 0 h) mit $101,6 \pm 14\%$ auf dem ungefähren Niveau der ungestressten Kontrollen. 2 h nach Dehnung war die Expression auf einen Wert von $142,4 \pm 20,2\%$ über die Basiswerte erhöht. Zu den Zeitpunkten 4 h und 8 h nach Dehnung stieg die HSP 72-Expression mit 105% bzw. 113,1% ($p = 0,049$) weit über die Basiswerten an (Abbildung 21).

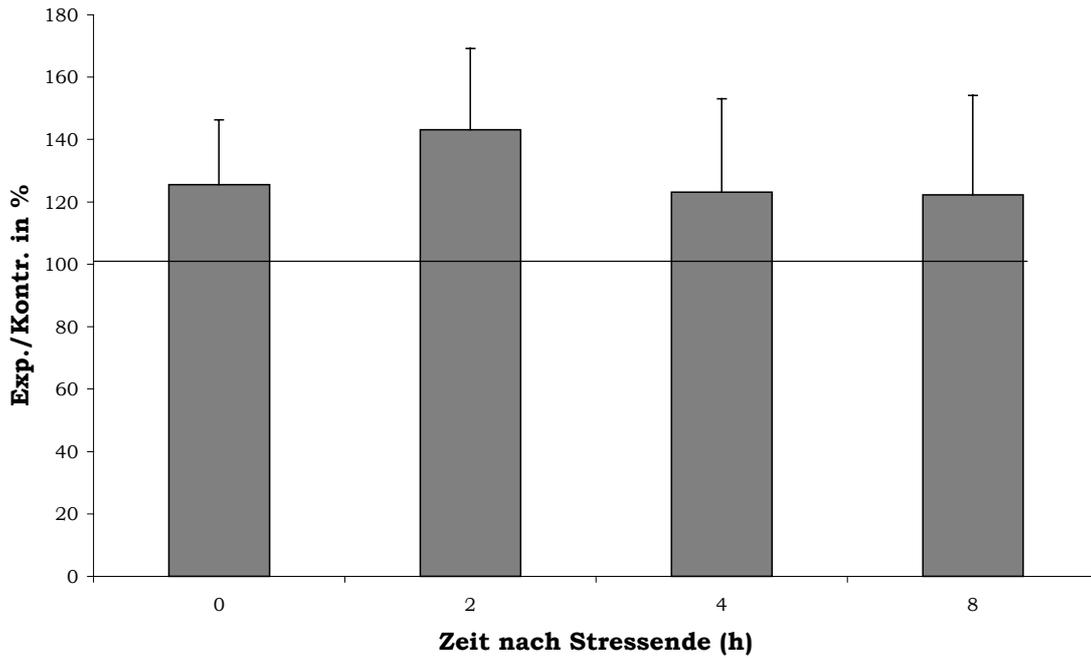


Abbildung 20: Zeitlicher Verlauf der HSP 72-Expression im Versuchsblock 1. Die Veränderung der HSP-72-Expression wurde über einen Western Blot detektiert. Die 100 %-Markierung gibt die Werte der ungedehnten Kontrollen (Kontr.) an, die Meßwerte der gedehnten Zellen (Exp.) sind prozentual an diesen Wert angeglichen.

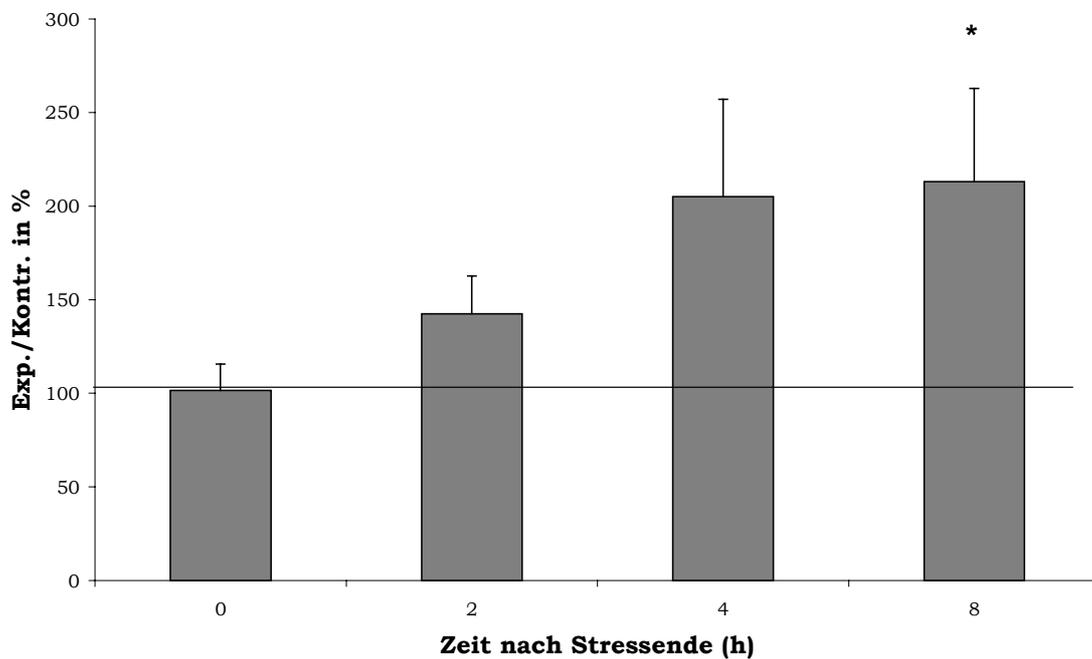


Abbildung 21: Zeitlicher Verlauf der HSP 72-Expression im Versuchsblock 2. Die Veränderung der HSP-72-Expression wurde über einen Western Blot detektiert. Die 100 %-Markierung gibt die Werte der ungedehnten Kontrollen (Kontr.) an, die Meßwerte der gedehnten Zellen (Exp.) sind prozentual an diesen Wert angeglichen. * $p < 0,05$

Im V3 (15'-4-30') befand sich die HSP 72-Expression mit $93,89 \pm 18,5\%$ direkt nach Dehnung auf einem eher geringen Niveau. Die Expression erreichte in diesem zeitlichen Verlauf ihr Maximum 2 h nach Dehnung mit $151,7 \pm 50,4\%$ (Abbildung 22). Im weiteren Verlauf war die Expression mit einer Erhöhung von 38,9% über die Basiswerte nach 4h wieder leicht rückgängig. 8 h nach Dehnung kam es erneut zu einem leichten Anstieg der HSP 72-Synthese auf 44,9% über die Kontrollwerte (Abbildung 22). Auch hier sind die Werte, wie in V1, nicht signifikant erhöht.

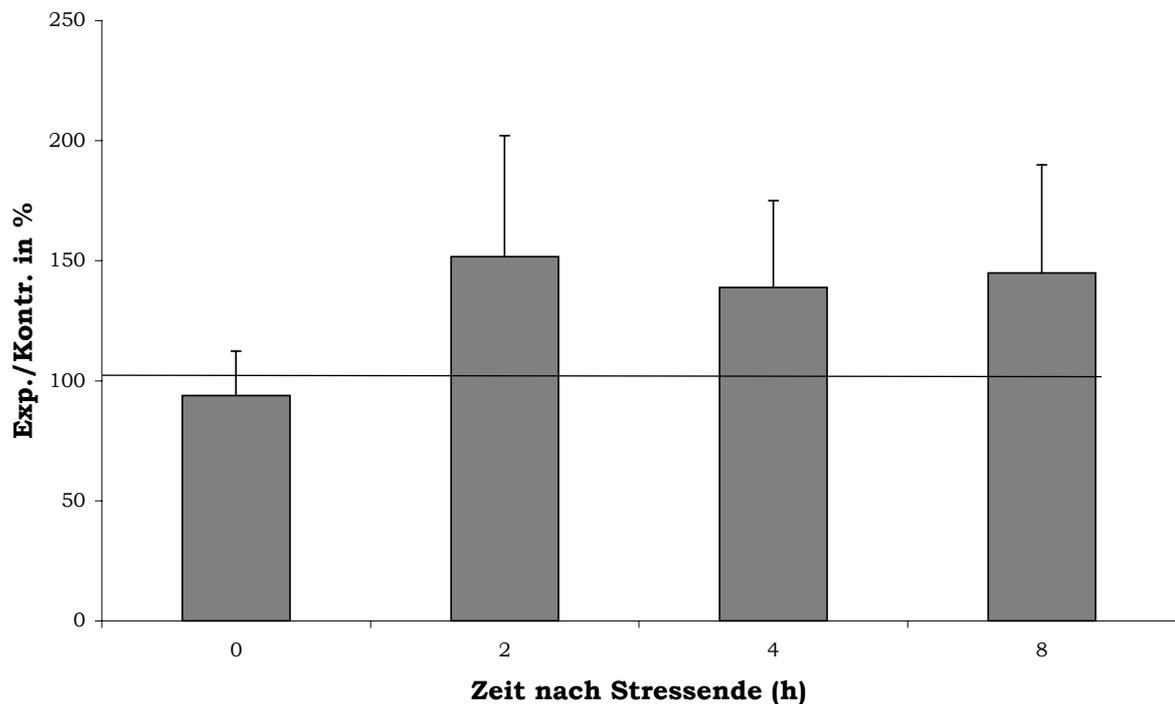


Abbildung 22: Zeitlicher Verlauf der HSP 72-Expression im Versuchsblock 3. Die Veränderung der HSP-72-Expression wurde über einen Western Blot detektiert. Die 100 %-Markierung gibt die Werte der ungedehnten Kontrollen (Kontr.) an, die Meßwerte der gedehnten Zellen (Exp.) sind prozentual an diesen Wert angeglichen.

Es existierte kein Gruppen- oder Zeiteffekt in der zellulären HSP 72-Synthese nach Dehnung. Jedoch läßt sich ein Vergleich ziehen zwischen den im V1 und V3 aufgezeigten Verläufen mit moderaten Anstiegen der Expression im gesamten zeitlichen Verlauf und dem Maximum zum Zeitpunkt 2 h nach Dehnung. Der Verlauf der Konzentrationsveränderung von HSP 72 hob sich im Versuchsblock 2 mit dem stetigen Anstieg auf

über das zweifache der Basiswerte deutlich von den Verläufen in den anderen beiden Versuchsblöcken ab (Abbildung 23).

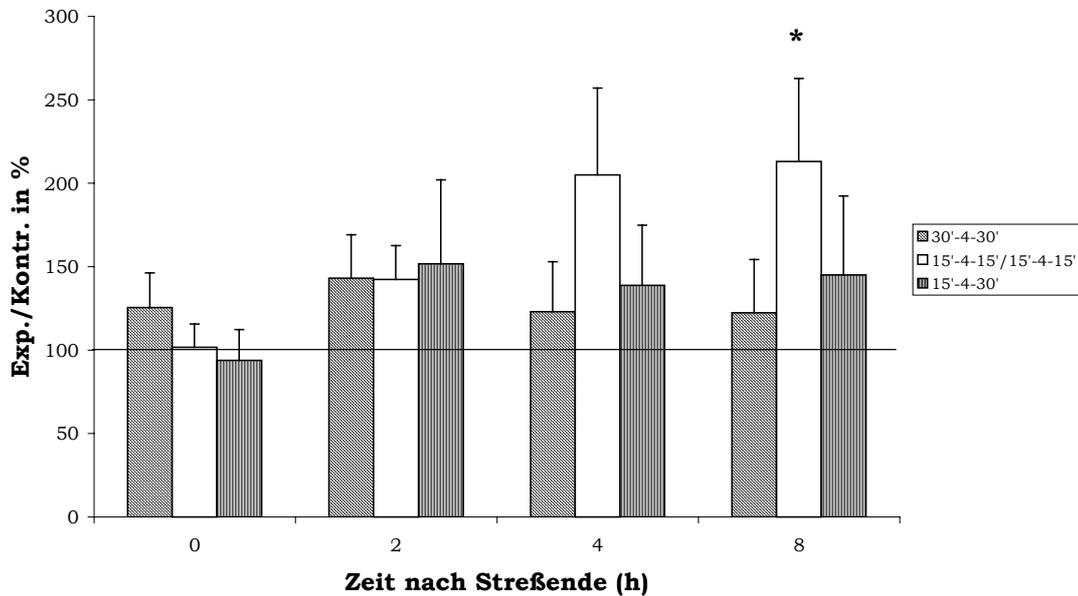


Abbildung 23: Gegenüberstellung der Verläufe der HSP 72-Expression innerhalb der drei Versuchsblöcke * $p < 0,05$

7.4 Einfluß von mechanischer Dehnung auf die TGF- β 1-Sekretion

Die TGF- β 1-Konzentration wies im Versuchsblock 1 zu allen Zeitpunkten eine über die Basiswerte erhöhte Sekretion auf (Abbildung 24). Die Konzentration stieg bis 12 h (66,1%, $p = 0,033$) nach Dehnung stetig über die Basiswerte an, und lag 24 h nach Dehnung wieder leicht unterhalb des 12 h Maximums (36%, $p = 0,022$).

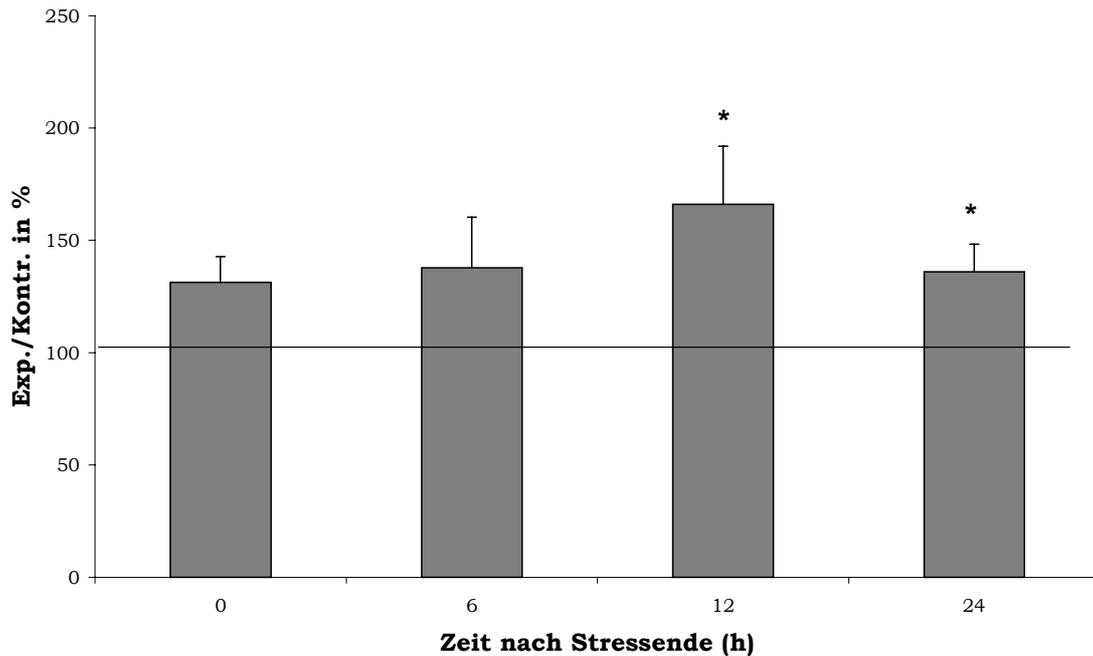


Abbildung 24: Zeitlicher Verlauf der TGF- β 1-Sekretion im Versuchsblock 1. Die Detektion erfolgte über einen ELISA. Die 100 %-Markierung gibt die Werte der ungedehnten Kontrollen (Kontr.) an, die Meßwerte der gedehnten Zellen (Exp.) sind prozentual an diesen Wert angeglichen. * $p < 0,05$

Im Versuchsblock 2 war die TGF- β 1-Konzentration zu keinem Zeitpunkt nach Dehnungsapplikation signifikant verändert. Die Werte lagen auch in der Tendenz nur knapp über den Werten der ungestressten Kontrollen und wiesen zu allen Zeitpunkten mit 5,6% direkt nach der Dehnung, 14,2% nach 6 h, 17,7% nach 12 h und 16,4% nach 24 h eine leichte Erhöhung gegenüber den Basiswerten auf (Abbildung 25).

Im letzten Versuchsblock (V3) kam es zu einem ähnlichen zeitlichen Verlauf der TGF- β 1-Sekretion wie in V1 (Abbildung 24, Abbildung 26). Auch hier stiegen die Werte nach Beendigung der Dehnungsapplikation an und erreichten 12 h nach Dehnungsende ein Sekretionsmaximum (44%, $p = 0,005$). 24 h nach Dehnungsende war die TGF- β 1-Konzentration im Vergleich zum 12 h-Wert leicht erniedrigt und lag 37,9% über dem Basalwert ($p = 0,035$).

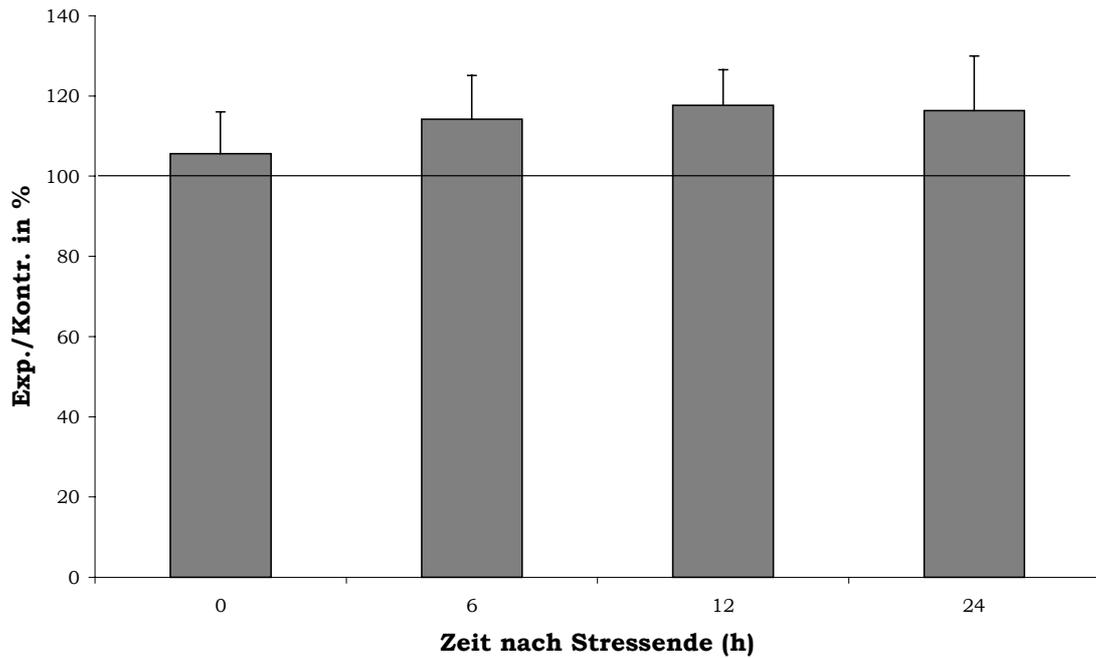


Abbildung 25: Zeitlicher Verlauf der TGF-β1-Sekretion im Versuchsblock 2. Die Detektion erfolgte über einen ELISA. Die 100 %-Markierung gibt die Werte der ungedehnten Kontrollen (Kontr.) an, die Meßwerte der gedehnten Zellen (Exp.) sind prozentual an diesen Wert angeglichen.

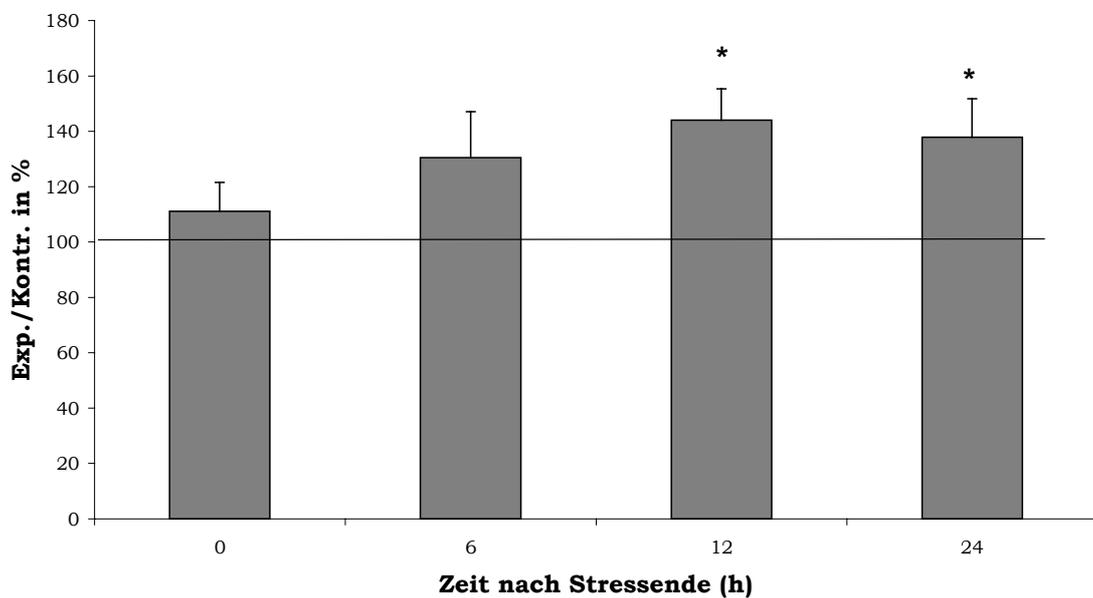


Abbildung 26: Zeitlicher Verlauf der TGF-β1-Sekretion im Versuchsblock 3. Die Detektion erfolgte über einen ELISA. Die 100 %-Markierung gibt die Werte der ungedehnten Kontrollen (Kontr.) an, die Meßwerte der gedehnten Zellen (Exp.) sind prozentual an diesen Wert angeglichen. *p<0,05

Auch im Falle der TGF-β1-Konzentration wiesen die Versuchsblöcke 1 und 3 große Ähnlichkeit auf. Beide Kurven zeigten signifikante Anstiege der

TGF- β 1-Konzentration gegenüber den Basiswerten mit Maximalwerten nach 12 h auf. Der Versuchsblock 2 mit der Dehnungsapplikation über zwei Tage wies im Gegensatz zu den anderen beiden Versuchsblöcken keinen signifikanten Anstieg der TGF- β 1-Konzentration auf. Ein Zeit- bzw. Gruppeneffekt war nicht zu erkennen.

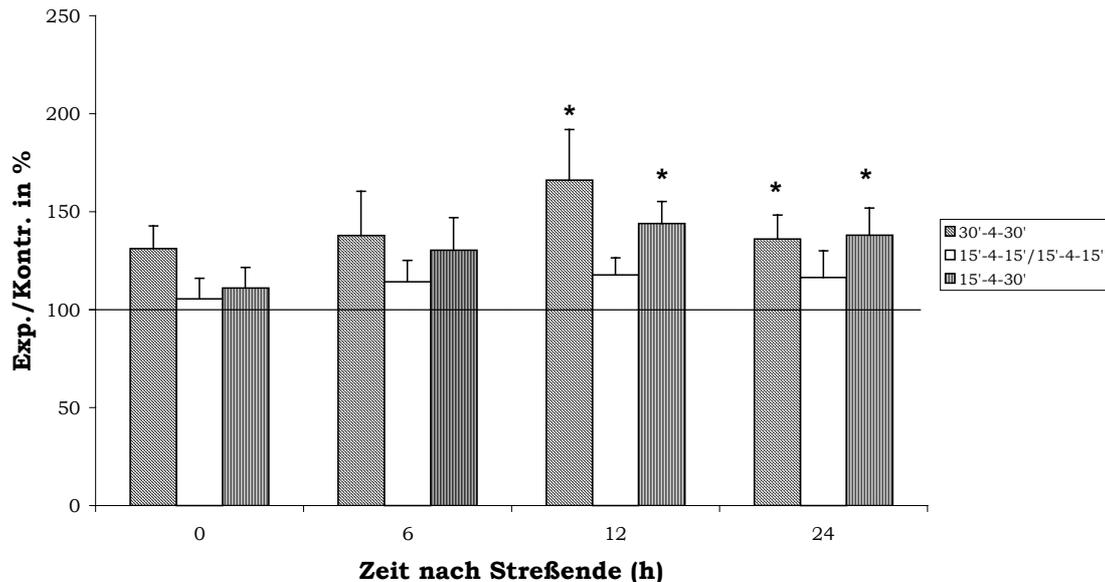


Abbildung 27: Gegenüberstellung der Verläufe der TGF- β 1-Sekretion innerhalb der drei Gruppen
* $p < 0,05$

7.5 Einfluß von mechanischer Dehnung auf die IL-6 Sekretion

Die IL-6-Konzentration zeigte im zeitlichen Verlauf nach zyklischer mechanischer Dehnung im ersten Versuchsblock (30'-4-30') einen leichten Anstieg gegenüber den Kontrollzellen, die keine Dehnung erfuhren (Abbildung 28). Die Konzentrationen lag im Schnitt 15,2% über den Kontrollwerten. Zu den Zeitpunkten 0 h und 12 h nach Dehnung waren die Werte gegenüber der „baseline“ mit $108,3 \pm 3,4\%$ ($p = 0,043$) und $119,3 \pm 5,8\%$ ($p = 0,013$) signifikant erhöht (Abbildung 28).

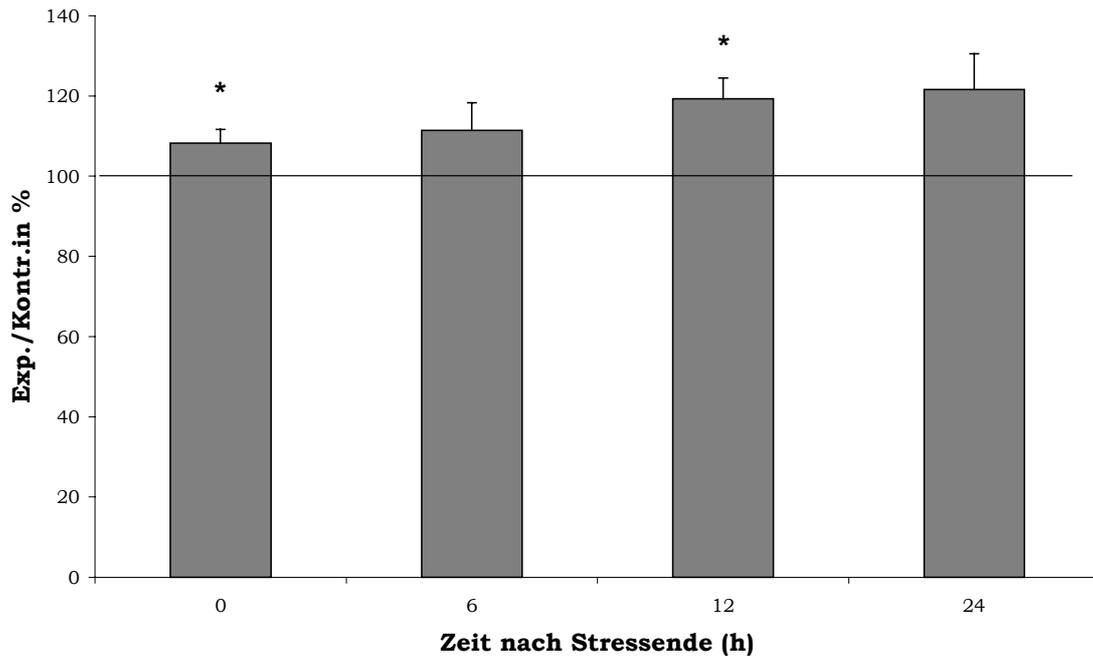


Abbildung 28: Zeitlicher Verlauf der IL-6-Sekretion im Versuchsblock 1. Die Detektion erfolgte über einen ELISA. Die 100 %-Markierung gibt die Werte der ungedehnten Kontrollen (Kontr.) an, die Meßwerte der gedehnten Zellen (Exp.) sind prozentual an diesen Wert angeglichen. * $p < 0,05$

Auch im zweiten Versuchsblock kam es nur zu einer leichten Erhöhung der IL-6-Konzentration. Die Werte stiegen bis 12 h nach Dehnung von 3,9% und 14,5% auf 25,6% über die Kontrollwerte an (Abbildung 29), sanken aber bis zum Meßzeitpunkt 24 h signifikant auf 16,8% ($p = 0,02$) über die Basiswerte ab (Abbildung 29).

Auch bei IL-6 lag im V3 (15'-4-30') ein ähnlicher Verlauf vor wie im V1. Die IL-6-Werte stiegen im zeitlichen Verlauf von 16,3% direkt nach Dehnungsende über 20% und 24,1% nach 6 h und 12 h auf 32,3% über die „baseline“ nach 24 h (Abbildung 30). Dieses war jedoch nur ein trendmäßiger Anstieg. Die Werte lagen zwar etwas höher als im ersten Versuchsblock, waren aber aufgrund höherer Standardabweichungen zu keinem Zeitpunkt signifikant erhöht.

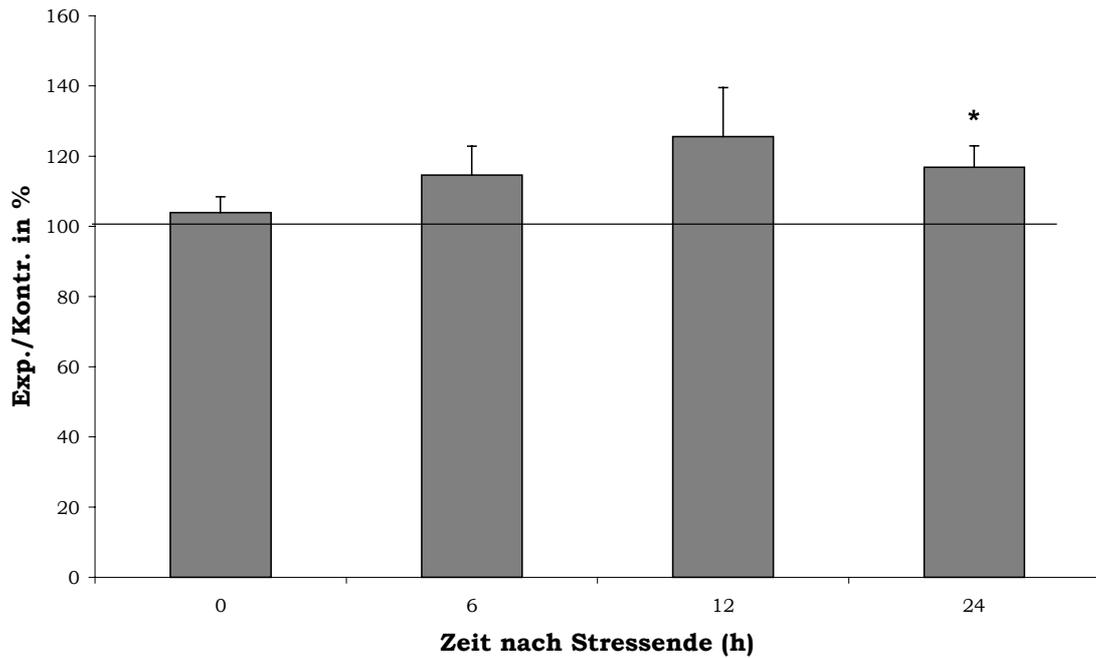


Abbildung 29: Zeitlicher Verlauf der IL-6-Sekretion im Versuchsblock 2. Die Detektion erfolgte über einen ELISA. Die 100 %-Markierung gibt die Werte der ungedehnten Kontrollen (Kontr.) an, die Meßwerte der gedehnten Zellen (Exp.) sind prozentual an diesen Wert angeglichen. * $p < 0,05$

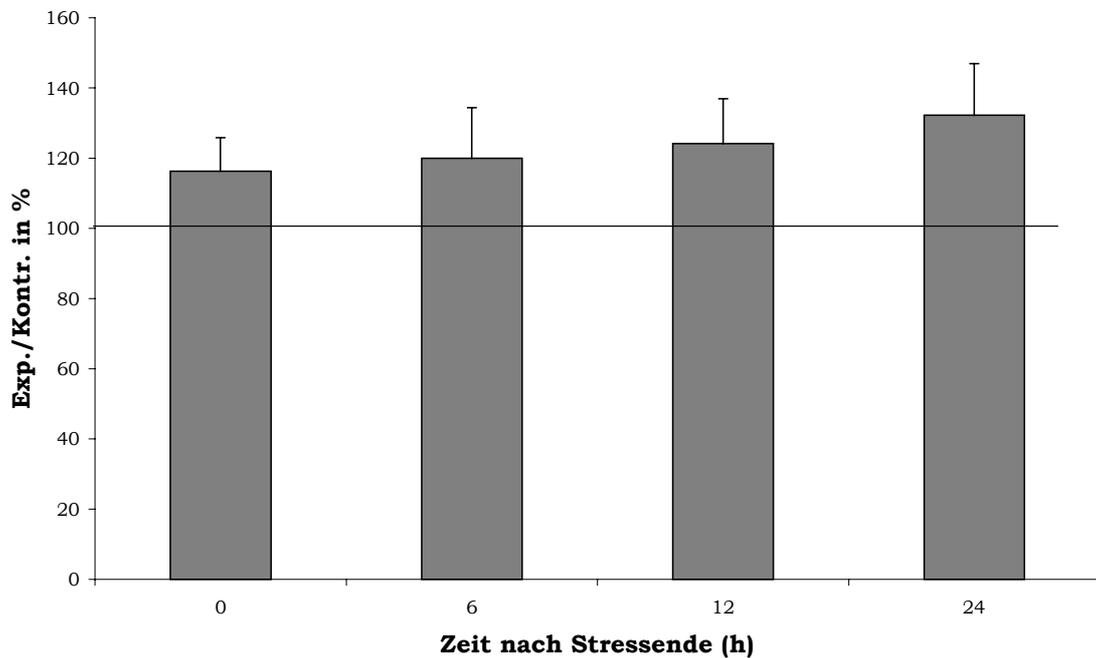


Abbildung 30: Zeitlicher Verlauf der IL-6-Sekretion im Versuchsblock 3. Die Detektion erfolgte über einen ELISA. Die 100 %-Markierung gibt die Werte der ungedehnten Kontrollen (Kontr.) an, die Meßwerte der gedehnten Zellen (Exp.) sind prozentual an diesen Wert angeglichen.

Auch bei der IL-6-Sekretion verhielten sich die beiden vom Dehnungsmuster ähnlichen Gruppen V1 und V3 annähernd gleich

(Abbildung 31). In beiden Versuchsblöcken kam es zu einem stetigen Anstieg der IL-6-Konzentration nach repetitiver Dehnung, der bis 24 h nach Dehnungsende anhielt. Im Versuchsblock 2 kam es zu einem ähnlichen Anstieg der IL-6-Konzentration nach Dehnung, allerdings war hierbei ein Konzentrationsmaximum nach 12 h erreicht, die Konzentration sank im Anschluß wieder leicht ab (Abbildung 31). Dieser IL-6-Anstieg nach Dehnung war im zeitlichen Verlauf signifikant erhöht ($p=0,049$). Ein Unterschied zwischen den Gruppen ist jedoch nicht zu beobachten (

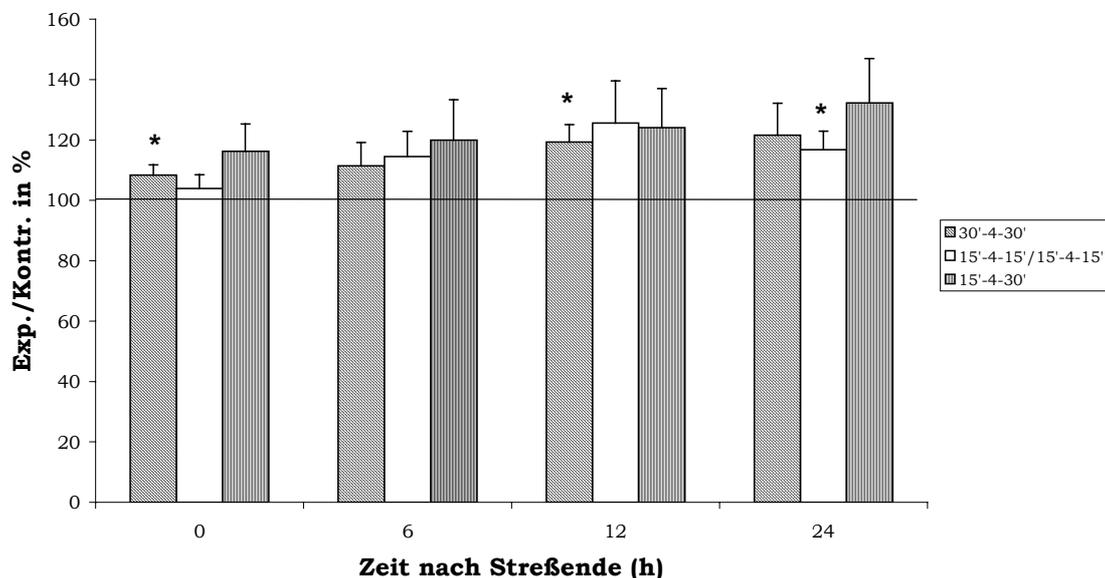


Abbildung 31: Gegenüberstellung der Verläufe der IL-6-Sekretion innerhalb der drei Gruppen
* $p<0,05$

7.6 Einfluß von mechanischer Dehnung auf die Typ I Kollagen mRNA-Expression

Im Versuchsblock 1 zeigte die Expression der Typ I Kollagen mRNA im Vergleich zu den ungestressten Kontrollen kaum Veränderungen. Die Expression deckte sich direkt nach der Dehnung mit dem Basiswert, und stieg im biphasischen Verlauf auf 19% über die „baseline“ (Abbildung 32). Keine der Expressionsveränderungen wies eine Signifikanz auf.

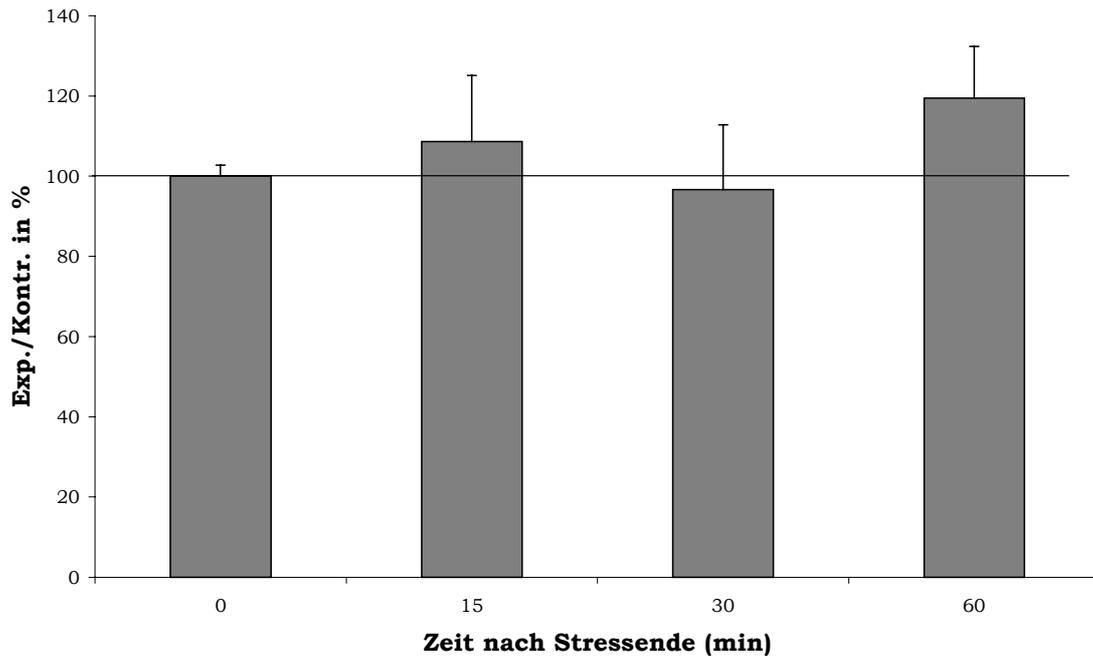


Abbildung 32: Zeitlicher Verlauf der Typ I Kollagen mRNA-Expression im Versuchsblock 1. Die Quantifizierung der mRNA erfolgte über eine Light Cycler-PCR. Die 100 %-Markierung gibt die Werte der ungedehnten Kontrollen (Kontr.) an, die Meßwerte der gedehnten Zellen (Exp.) sind prozentual an diesen Wert angeglichen.

Im Versuchsblock 2 stieg die mRNA-Expression 15 Minuten nach Dehnung auf einen maximalen Wert von 47,6% über den Grundwert ungestresster Kontrollen an und sank im weiteren Verlauf auf Werte knapp unterhalb der Basiswerte ab (Abbildung 33). Allerdings zeigte sich auch in diesem Versuchsblock keine signifikante Veränderung der Typ I Kollagen mRNA-Expression gegenüber ungedehnten Zellen.

Für den Versuchsblock 3 zeigte die Typ I Kollagen-Expression ein maximalen Anstieg direkt nach Dehnung auf 21,8% über die Basiswerte (Abbildung 34). Im weiteren Verlauf sank die Expressionsrate unter die Basiswerte (Abbildung 34). Auch bei diesem Dehnungsmuster zeigte sich keine signifikante Veränderung der Typ I Kollagen mRNA-Expression.

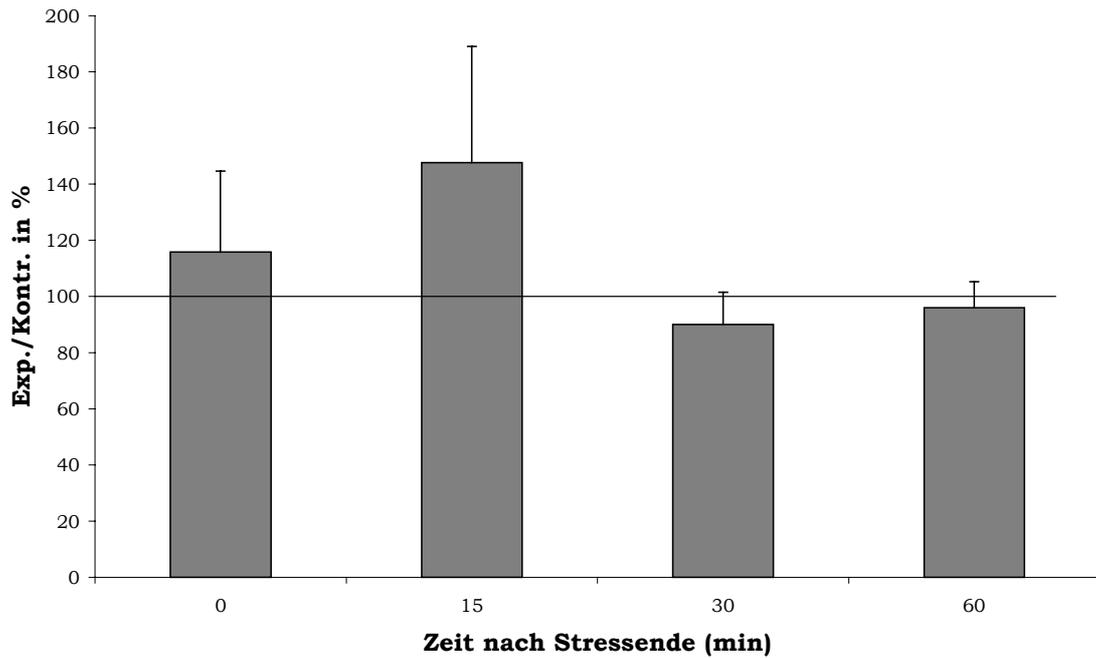


Abbildung 33: Zeitlicher Verlauf der Typ I Kollagen mRNA-Expression im Versuchsblock 2. Die Quantifizierung der mRNA erfolgte über eine Light Cycler-PCR. Die 100 %-Markierung gibt die Werte der ungedehnten Kontrollen (Kontr.) an, die Meßwerte der gedehnten Zellen (Exp.) sind prozentual an diesen Wert angeglichen.

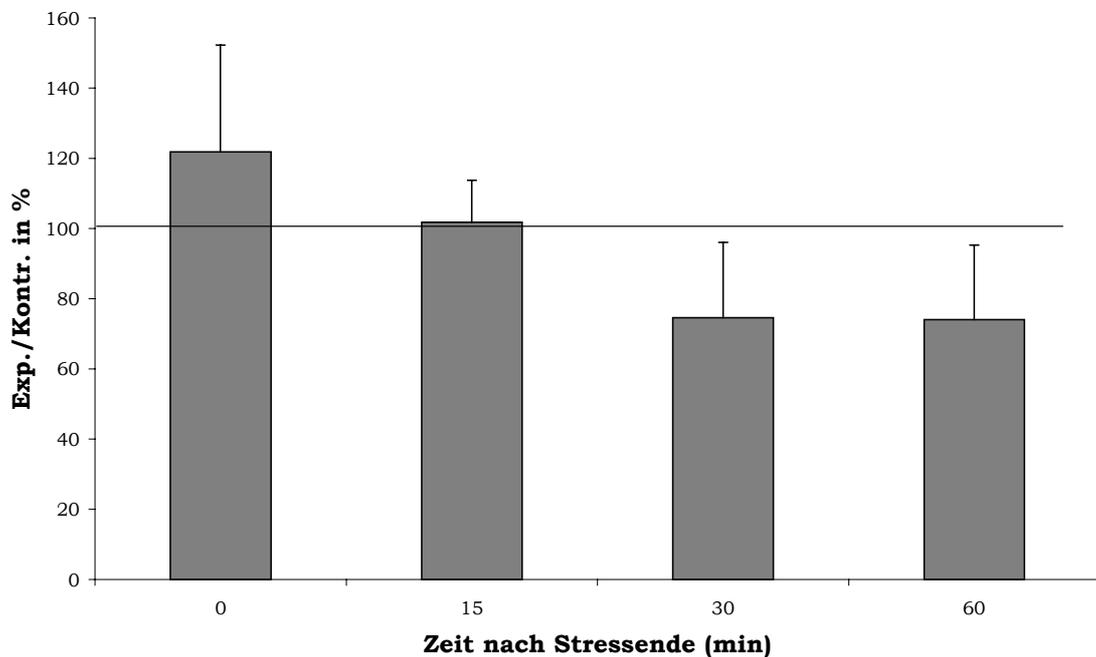


Abbildung 34: Zeitlicher Verlauf der Typ I Kollagen mRNA-Expression im Versuchsblock 3. Die Quantifizierung der mRNA erfolgte über eine Light Cycler-PCR. Die 100 %-Markierung gibt die Werte der ungedehnten Kontrollen (Kontr.) an, die Meßwerte der gedehnten Zellen (Exp.) sind prozentual an diesen Wert angeglichen.

Die Typ I Kollagen mRNA- Expression wurde durch mechanische Dehnung zu den gemessenen Zeitpunkten in keinem der Versuchsblöcke signifikant beeinflusst (Abbildung 35). Ebenso konnte kein Gruppen- oder Zeiteffekt nachgewiesen werden.

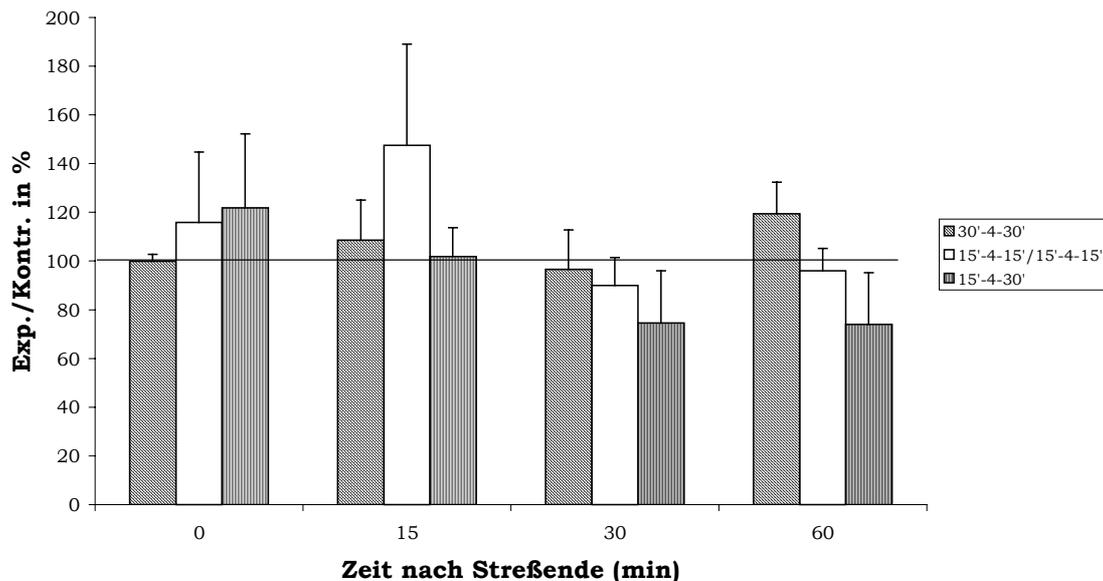


Abbildung 35: Gegenüberstellung der Verläufe der Typ I Kollagen mRNA-Expression innerhalb der drei Versuchsblöcke

7.7 Einfluß von mechanischer Dehnung auf die Typ III Kollagen mRNA-Expression

Die Typ III Kollagen mRNA-Expression lag im Versuchsblock 1 direkt nach Dehnung weit unterhalb der Basiswerte. Die Expressionsrate stieg bis zum Zeitpunkt 60 Minuten nach Dehnung auf 13,6% über die Basiswerte an (Abbildung 36).

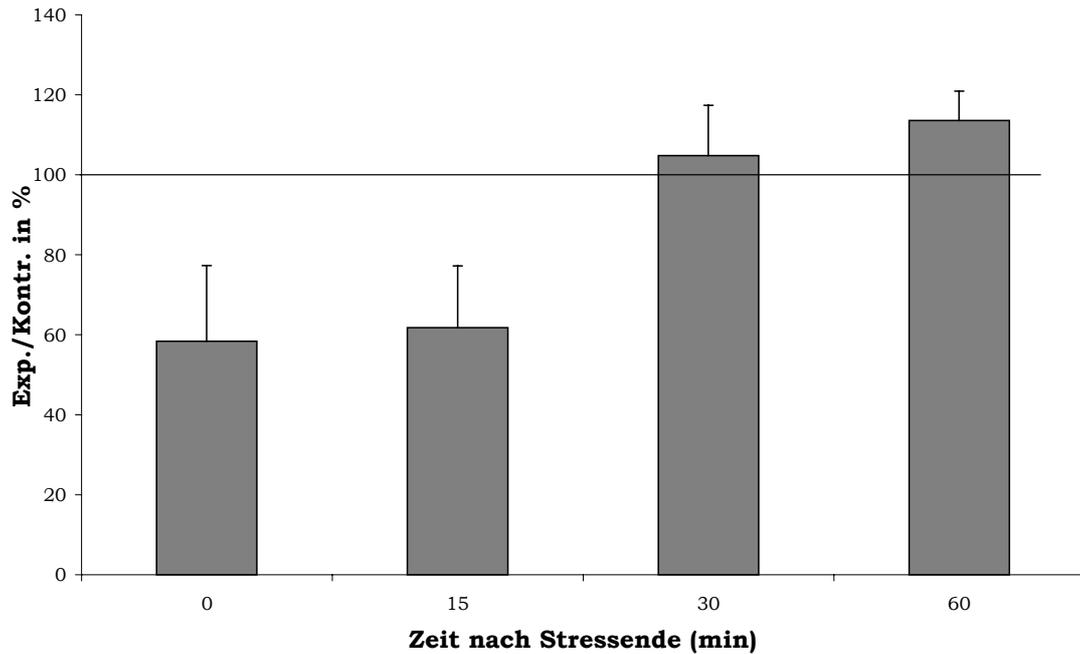


Abbildung 36: Zeitlicher Verlauf der Typ III Kollagen mRNA-Expression im Versuchsblock 1. Die Quantifizierung der mRNA erfolgte über eine Light Cycler-PCR. Die 100 %-Markierung gibt die Werte der ungedehnten Kontrollen (Kontr.) an, die Meßwerte der gedehnten Zellen (Exp.) sind prozentual an diesen Wert angeglichen.

Im V 2 war der Verlauf der Typ III Kollagen mRNA-Expression gegenläufig zum Verlauf in V 1. Die Expressionsrate lag direkt nach Dehnung 44% über den Grundwerten ungestresster Zellen (Abbildung 37). Die Rate sank schließlich im weiteren Verlauf unter die Basiswerte (Abbildung 37). Aufgrund der hohen Standardabweichung war keine der Veränderungen im Expressionsmuster als signifikant anzusehen.

Im Versuchsblock 3 lag die Expression der Typ III Kollagen mRNA zu fast allen Zeitpunkten weit unterhalb der Basiswerte. Lediglich zum Zeitpunkt 15 Minuten nach Dehnung lag die Expressionsrate 16,4% über den Basiswerten (Abbildung 38). Auch bei diesem Versuchsblock lagen keine signifikanten Veränderungen der Typ III Kollagen mRNA-Expression vor.

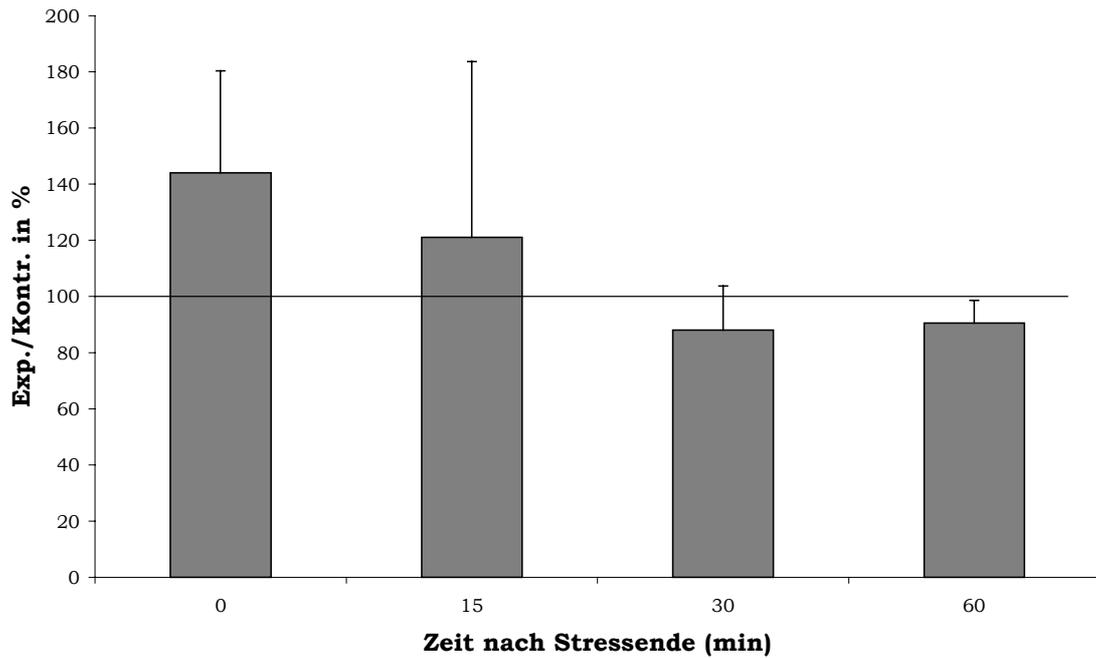


Abbildung 37: Zeitlicher Verlauf der Typ III Kollagen mRNA-Expression im Versuchsblock 2. Die Quantifizierung der mRNA erfolgte über eine Light Cycler-PCR. Die 100 %-Markierung gibt die Werte der ungedehnten Kontrollen (Kontr.) an, die Meßwerte der gedehnten Zellen (Exp.) sind prozentual an diesen Wert angeglichen.

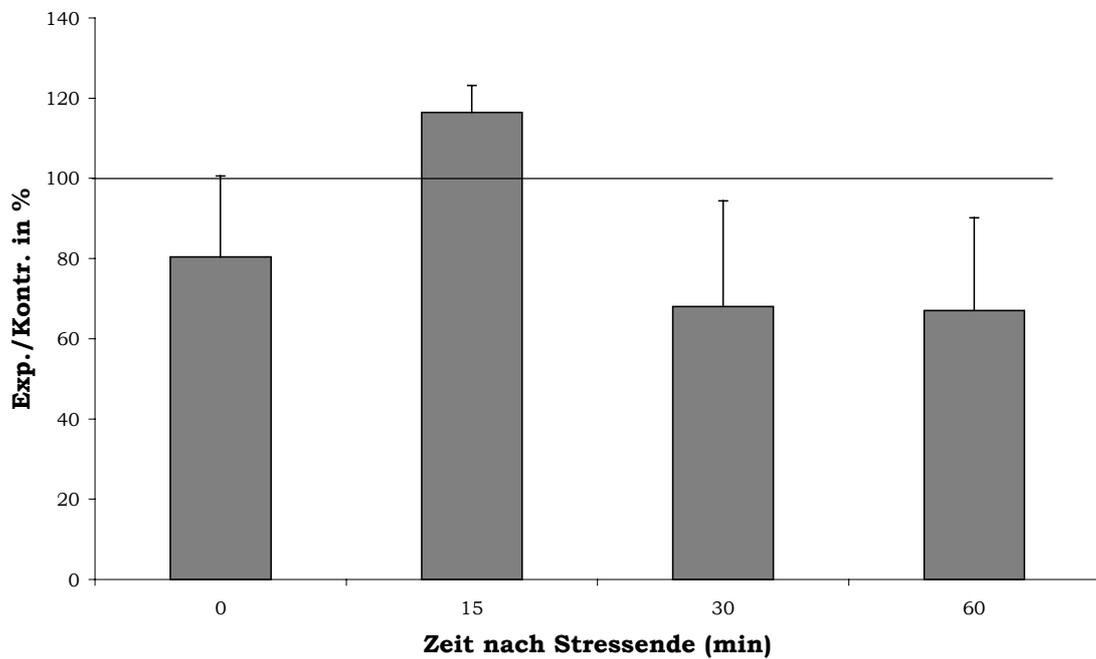


Abbildung 38: Zeitlicher Verlauf der Typ III Kollagen mRNA-Expression im Versuchsblock 3. Die Quantifizierung der mRNA erfolgte über eine Light Cycler-PCR. Die 100 %-Markierung gibt die Werte der ungedehnten Kontrollen (Kontr.) an, die Meßwerte der gedehnten Zellen (Exp.) sind prozentual an diesen Wert angeglichen.

In keinem der drei Versuchsblöcke zeigte sich beeinflusst durch mechanische Dehnung eine signifikante Veränderung im Typ III Kollagen Expressionsmuster (Abbildung 39). Auch ein Gruppen- oder Zeiteffekt war nicht zu erkennen.

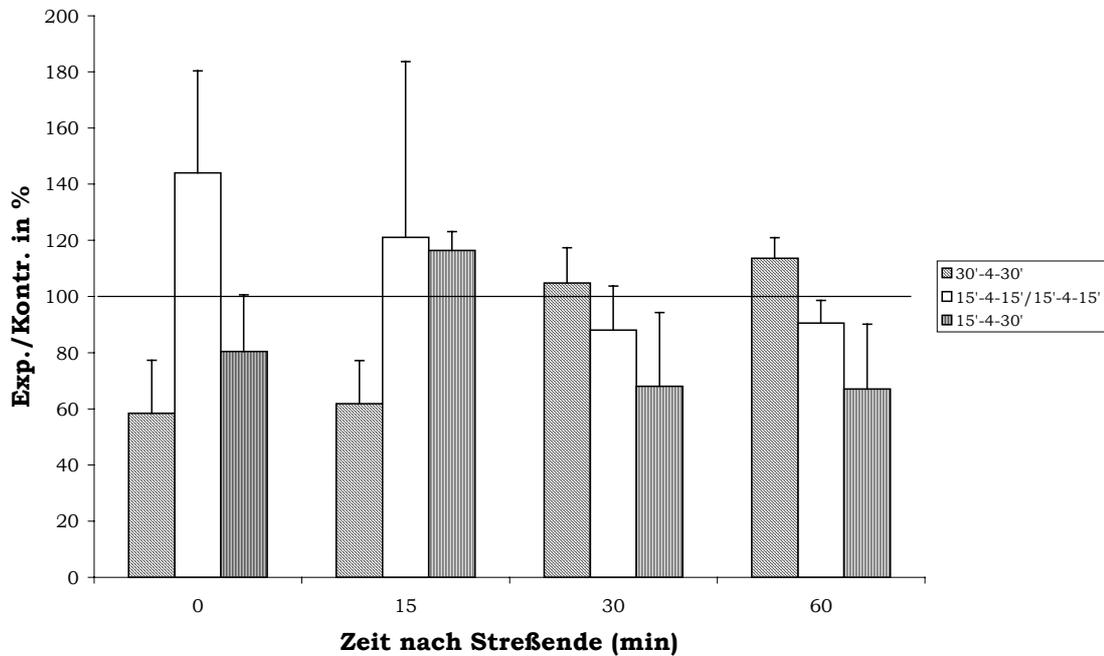


Abbildung 39: Gegenüberstellung der Verläufe der Typ III Kollagen mRNA-Expression innerhalb der drei Versuchsblöcke.

8 Diskussion

Um Antworten auf die in Kapitel 3 gestellten Fragen zu liefern, wurden je zehn humane Fibroblasten-Primärzelllinien mit drei verschiedenen Dehnungsapplikationen behandelt, von denen zwei Dehnungsmuster an einem Tag appliziert wurden (V1 und V3) und ein dritter Dehnungsstress an zwei aufeinanderfolgenden Tagen (V2) auf die Zellen ausgeübt wurde. Von allen Zelllinien wurden zu festgelegten Zeitpunkten nach Dehnungsapplikation die Proliferations- und Apoptoserate, die HSP 72-Expression, die TGF- β 1- und die IL-6-Sekretion sowie die Typ I und Typ III Kollagen-Synthese bestimmt und quantifiziert.

8.1 Dehnungsmuster-bedingte Unterschiede der zellulären Stressantwort

Bei der Auswertung der Versuche stellte sich heraus, daß tatsächlich unterschiedliche zelluläre Reaktionen auf verschieden angelegte Stressmuster existieren. So kann sehr klar eine Trennlinie gezogen werden zwischen den Dehnungsapplikationen, die innerhalb eines Tages auf die Zellen ausgeübt wurden, und dem Dehnungsmuster, das mit Unterbrechungen über zwei Tage appliziert wurde. Zwischen den Zellpopulationen, die einem sehr ähnlichen Dehnungsmuster unterzogen wurden, das sich in der Stressdauer nur um 15 Minuten unterschied, ließ sich hingegen kein statistisch signifikanter Unterschied feststellen.

Repetitive Dehnung, die innerhalb eines Tages appliziert wird, führt zu einem Proliferationsanstieg. Ähnliche Ergebnisse sind für unterschiedliche Zelltypen und Dehnungsapplikationen auch in der Literatur zu finden (BIRUKOV 1995; KESSLER 2001; NEIDLINGER-WILKE 1994; ZEICHEN 2000). Für die Stressmuster in den Versuchsblöcken V1 (30'-4-30') und V3 (15'-4-30') waren sehr ähnliche signifikante Proliferationsveränderungen mit stetigen Anstiegen auf bis zu 50% über

die Kontrollwerte zu verzeichnen. Die Proliferation im Versuchsblock V2 (15'-4-15'/15'-4-15') wies im Gegensatz zu diesen Ergebnissen keine signifikante Veränderung auf, verglichen mit den Basiswerten fand keine vermehrte Proliferation statt. Somit ist hervorzuheben, daß ein Unterschied in der Proliferationsinduktion besteht zwischen Zellen, die über einen kürzeren Zeitraum repetitiv gedehnt wurden (V1 und V3) und Zellen, deren repetitive Dehnung über einen längeren Zeitraum erfolgte (V2). Dieses korreliert auch mit den Ergebnissen für TGF- β 1, ein Zytokin, welches sich stimulierend auf die Proliferation von Fibroblasten auswirken kann (DE ANDRADE 2001; SIMMONS 2002). In den Versuchsblöcken V1 und V3, in denen die Proliferationsrate nach mechanischer Dehnung ansteigt, kommt es im gesamten zeitlichen Verlauf zu einem signifikanten Anstieg der TGF- β 1-Sekretion. Die Kinetik ist innerhalb der beiden Versuchsgruppen gleich, allerdings reagieren die Zellen im V1 bis 12h nach Dehnung mit einer stärkeren TGF- β 1-Sekretion als im V3, im weiteren Verlauf gleichen sich die Werte annähernd. Im Gegensatz dazu zeigt die TGF- β 1-Sekretion im Versuchsblock 2, in dem keine Stimulation der Proliferation nach Dehnung erfolgte, keine Veränderung im Vergleich zu ungestressten Kontrollen. Allerdings besteht die Möglichkeit, daß die zeitgleichen Anstiege von Proliferation und TGF- β 1-Sekretion unabhängig voneinander ablaufen, und der Proliferationsanstieg durch einen anderen Faktor als TGF- β 1 induziert wird, da der Versuchsaufbau keinen konkreten Beweis für eine direkte Involvierung von TGF- β 1 in den Proliferationsanstieg liefert. So ist z.B. bekannt, daß bei Osteoblastenzelllinien eine simultaner Anstieg beider Parameter unabhängig voneinander stattfinden kann (ZHUANG 1996). Weitere mögliche Faktoren, die in die Proliferationsinduktion humaner Patellarsehnenfibroblasten involviert sind, könnten IL-6, FGF-b und Oncostatin M darstellen. Für Oncostatin M wurde entdeckt, daß es sowohl die Proliferation als auch Synthese von Pro-Kollagen stimulieren kann (SCAFFIDI 2002). FGF-b ist unter anderem in die Proliferationsinduktion von Endothelzellen verwickelt, und wird selbst nach Einwirkung von Scherstress auf die Zellen gebildet (GLOE 2002). Über IL-6 ist bekannt,

daß es die Proliferation synovialer Fibroblasten in Anwesenheit von löslichem IL-6 Rezeptor induziert (MIHARA 1995). Ebenso ist bekannt, daß die Wachstumsfaktor-vermittelte Proliferation von Lungentumor-Zelllinien und humanen Lungenfibroblasten IL-6 mediiert ist (BIHL 1998; ROTH 1995), wobei diese IL-6 Expression wiederum über den Transkriptionsfaktor AP-1, der sich in diesem Fall aus JunD Homodimeren zusammensetzt, durch TGF- β 1 induziert werden kann (EICKELBERG 1999).

In der Literatur sind neben den oben genannten Stellen auch Beispiele vorhanden, die aufzeigen, daß bestimmte mechanische Dehnungen die Proliferationsrate senken oder unbeeinflusst lassen können. So wiesen Hipper et al. nach, daß eine 48stündige biaxiale Dehnung die Proliferation vaskulärer glatter Muskelzellen senkt (HIPPER 2000). Möglicherweise spielt hierbei einerseits der Zelltyp eine Rolle, der aufgrund seiner physiologischen Umgebung nicht auf eine uniaxiale Dehnung konditioniert ist, andererseits könnte auch die relativ lange Dauer des Stresses für die fehlende Proliferationsstimulierung verantwortlich sein (HIPPER 2000). Letzteres würde auch mit der Tatsache übereinstimmen, daß eine repetitive Dehnung der Kniesehnenfibroblasten über zwei Tage keinen Anstieg der Proliferation dieser Zellen bewirkt. Scheinbar existiert ein Punkt, ab dem die Dehnung nicht mehr stimulierend auf die Proliferation wirkt, welcher in diesen beiden Fällen überschritten ist. Ebenso scheint bei der Proliferationsinduktion durch mechanische Dehnung eine Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren vorhanden zu sein (BIRUKOV 1995). Möglicherweise sind nach zwei Tagen Zellkultur unter den vorhandenen Bedingungen die Wachstumsfaktoren im Medium soweit abgebaut oder verstoffwechselt, daß bedingt durch diesen Mangel an Wachstumsfaktoren keine Proliferation mehr zu den Meßzeitpunkten stattfindet. Ebenso fügt sich die fehlende TGF- β 1-Sekretion im V2 in dieses Bild ein. Eventuell ist der zelluläre Stoffwechsel an dem beschriebenen Punkt soweit herunterreguliert, daß weder eine Zytokinproduktion durch die Zellen stattfindet noch eine Proliferation der

Zellpopulation, die durch eine Zytokinsekretion hätte getriggert werden können. Ein Problem kann sich hierbei auch aus dem für die Versuche gewählten Meßverfahren ergeben haben. Für die Messung der BrdU-Inkorporation mußte das BrdU mindestens zwei Stunden vor der Applikation der mechanischen Dehnung zum Medium zugefügt werden. Gleichzeitig sollten zwischen Zugabe und Messung nicht mehr als 24 Stunden liegen, so daß zu den Zeitpunkten der Messung im V2, die mindestens 30 Stunden hinter dem Zeitpunkt der BrdU-Zugabe lagen, möglicherweise schon ein großer Teil des BrdU's abgebaut war. Eventuell kommt es durch den vorgegebenen langen Zeitraum der Zellkultur im V2 auch zu einer Kontaktinhibition der Zellen, durch die eine weitere Proliferation der Zellen nicht stattfinden konnte.

Da neben einer Veränderung der Proliferation auch eine Veränderung der Apoptose der Zellen auftreten kann, wurde zusätzlich die Apoptoserate der Fibroblasten nach Dehnung untersucht. So ist festzustellen, daß auch die Veränderung in der Apoptoserate in den Versuchsblöcken 1 und 3 ein ähnliches Verhalten zeigt, während sich im Versuchsblock 2 wiederum ein Unterschied zu den anderen beiden Versuchsblöcken erkennen läßt. In den Versuchsblöcken 1 und 3 weist die Apoptoserate einen biphasischen Verlauf auf. Im Versuchsblock 2 ist tendenziell ein ähnlicher biphasischer Verlauf zu beobachten, allerdings ist die Veränderung der Apoptoserate zu keinem der Zeitpunkte signifikant und die Magnitude bewegt sich im Vergleich zu den Basiswerten auf einem erheblich geringeren Niveau als in den anderen beiden Versuchsblöcken. Eine mögliche Erklärung für die biphasische Schwankung ist, daß Apoptose in speziellen Phasen des Zellzyklus (G_1 und G_2) induziert wird (KING 1995). Durch die vor dem Versuch stattfindende Serumreduktion sollten alle Zellen in der gleichen Phase des Zellzyklus synchronisiert sein und dementsprechend zeitgleich in die Apoptose gehen. So kann es zutreffen, daß sich die Zellen 12 Stunden nach Dehnungsende in einer Phase des Zellzyklus befinden, in der keine Apoptose stattfindet und in der Zellen, die schon zu einem früheren Zeitpunkt in die Apoptose gingen, mit Annexin-V nicht mehr

detektierbar sind, da das apoptotische Material bereits von angrenzenden Zellen phagozytiert wurde (GUCHELAAR 1997; KROEMER 1995)

Der Anstieg der Apoptoserate in den Versuchsblöcken 1 und 3 könnte einerseits auf die erhöhte Expression von TGF- β 1 zurückzuführen sein. Über TGF- β 1 ist bekannt, daß es in der Lage ist, bei verschiedenen Zelltypen, so z.B. B-Zellen (ARSURA 1996; ISHISAKI 1999) und vaskulären Endothelzellen (HYMAN 2002), eine Induktion der Apoptose auszulösen. Bei Endothelzellen erfolgt dies über eine Aktivierung von p38 MAPK (HYMAN 2002). Das Einleiten der Apoptose durch TGF- β 1 ist in der Wundheilung wichtig für das Beenden einer Immunreaktion/Entzündungsreaktion nach einem Gewebstrauma (MCCARTNEY-FRANCIS 2001; WAHL 1994). Da Fibroblasten eine wichtige Zellpopulation im Wundbereich darstellen, die notwendig ist, um eine Matrix für neu entstehendes Gewebe zu produzieren (BRANTON 1999; WAHL 1999), wäre eine erhöhte Apoptoserate von Fibroblasten induziert durch TGF- β 1 physiologisch weniger erklärbar. Andererseits ist auch bekannt, daß in einem stark proliferierenden Gewebe die Apoptoserate zeitgleich ansteigt, wie es z.B. auch in Tumorgewebe zu detektieren ist (FRANKEL 2002; KONSTANTINIDOU 2002; VASKIVUO 2002). Möglicherweise ist die erhöhte Apoptoserate in den Versuchsblöcken 1 und 3 also ein physiologischer Anstieg, wie er bei den erhöhten Proliferationsraten erwartet werden könnte. Der Anstieg der TGF- β 1-Konzentration in diesen Blöcken wäre im Bezug auf eine Therapie dementsprechend eher positiv zu deuten.

Im Versuchsblock 2 kommt es gegensätzlich dazu zu keiner signifikanten Erhöhung der Apoptoserate als Reaktion auf mechanische Dehnung. Diese Inhibition der Apoptose, die zeitweise zu einer Rate führt, die sogar unterhalb der Kontrollzellen liegt, könnte zumindest teilweise im starken Anstieg der HSP 72-Expression im Versuchsblock 2 begründet sein. Das Hitzeschockprotein 72 ist aus der Literatur als zytoprotektives Protein bekannt, daß als Antwort auf Hitzestress von den meisten Zelltypen produziert wird (CURRIE 1987). Neuere Erkenntnisse aus der Literatur

belegen, daß HSP 72 dabei nicht über die für Hitzeschockproteine typische Chaperonaktivität agiert (NOLLEN 2000; TAKAYAMA 1997), sondern seine Zytoprotektivität vermittelt, indem es über unterschiedliche Mechanismen bestimmte Wege, über die Apoptose vermittelt werden kann, inhibiert. Als bekannte Targets für HSP 72 gelten die Kinase JNK (BUZZARD 1998; GABAI 1998; GABAI 2000; VOLLOCH 1999; VOLLOCH 2000), die in die apoptotische Signaltransduktion involviert ist, das cytosolische Protein Apaf-1, das an der Aktivierung von Procaspase 9 beteiligt ist und über die der apoptotische Prozeß ausgelöst werden kann (BEERE 2000; SALEH 2000), sowie das Flavoprotein AIF, das Apoptose über eine Aktivierung von Caspase 3 vermittelt (RAVAGNAN 2001). Durch den Anstieg der HSP-Konzentration im V2 und die gleichzeitig beobachtete niedrige Apoptoserate liegt die Vermutung nahe, daß HSP 72 die Apoptose der Fibroblasten durch Interaktion mit einem oder mehreren der oben genannten Faktoren inhibiert. Skutek et al. wiesen nach, daß eine Dehnung von Patellarsehnenfibroblasten über 15 Minuten zu einer starken Aktivierung von JNK1 und JNK2 führt. Eine Dehnung über 60 Minuten erwirkt im Verhältnis dazu eine geringere Aktivierung von JNK's (SKUTEK 2002b). Sie postulierten dabei, daß diese verminderte Aktivierung der Kinasen auf einen Anstieg der HSP 72-Expression zurückzuführen ist, der schon nach einer 15minütigen Dehnung detektiert werden kann, in diesem Zeitraum aber noch keine Inhibition der JNK-Aktivierung bewirkt. Die bei einer 60minütigen Dehnung stärkere Induktion der HSP 72-Aktivierung ist jedoch in der Lage, die Aktivierung von JNK reprimieren (SKUTEK 2002a). Auffallend bei der Analyse des repetitiven Stresses ist, daß in dem Versuchsblock 2, in dem eine signifikante Erhöhung der HSP 72-Konzentration festzustellen ist, und in dem kein Anstieg der Apoptoserate zu erkennen ist, auch die Proliferationsrate und die TGF- β 1-Konzentration keine Erhöhung im Vergleich zu den Kontrollen aufweisen. Dies könnte ein Anzeichen dafür sein, daß eine Erhöhung der HSP 72-Expression nicht nur zu einer Inhibition der Apoptose führt, sondern im gleichen Zug auch die Signaltransduktionswege gehemmt, die die Aktivierung der

Zytokinexpression und der Proliferationsinduktion vermitteln. Dabei ist es jedoch nicht ausgeschlossen, daß diese Hemmung durch ein anderes Protein als HSP 72 vermittelt wird, welches in dem vorgegebenen Versuchsaufbau nicht nachgewiesen wurde. Nachgewiesen ist jedoch, daß ein über einen längeren Zeitraum applizierter Zellstress zu einer starken HSP 72-Aktivierung führt, im Gegensatz dazu jedoch eine Inhibition vieler Stoffwechselfunktionen vorliegt, so daß dieses eventuell in einem Zusammenhang steht. Bei einer geringeren Stressapplikation kommt es hingegen zu keiner signifikanten Aktivierung von HSP 72 und es sind alle anderen Zellfunktionen weiterhin aktiv. Hierbei läßt sich also ein klarer Unterschied feststellen zwischen einer repetitiven Dehnung, die über einen Tag verläuft und einer repetitiven Dehnung über zwei Tage, wobei das Schlüsselprotein, welches für diese unterschiedliche Stressantwort verantwortlich ist, HSP 72 zu sein scheint. Eine Beobachtung, die die Postulation unterstützt, daß eine verstärkte HSP 72-Expression neben der Apoptose auch die Proliferation blockiert, wurde von Gabai et al. (GABAI 1997) und Song et al. (SONG 2001) gemacht. Sie stellten fest, daß HSP 72 neben JNK auch andere MAPK supprimiert. Zu diesen Kinasen gehören p38 (GABAI 1997) und ERK (SONG 2001). Im Kapitel 4.1.2 wurde erwähnt, daß die ERK-Aktivierung über eine Expressionsinitiation von c-fos mit dem Zellwachstum gekoppelt sein kann (MURPHY 2002). In Folge dessen ist anzunehmen, daß die im Versuchsblock 2 beobachtete stark erhöhte HSP 72-Expression über eine Blockade von ERK in einem direkten Zusammenhang steht mit der ebenfalls in diesem Versuchsblock auftretenden Proliferationsblockade.

Neben dem Wachstumsfaktor TGF- β 1 wurde auch das Zytokin IL-6 bestimmt, welches ebenfalls eine Rolle bei der Proliferation spielen kann (EICKELBERG 1999; MIHARA 1995). Die IL-6-Sekretion verhält sich in allen drei Gruppen sehr ähnlich, wobei eine leichte Erhöhung der IL-6-Sekretion im gesamten zeitlichen Verlauf vorliegt. IL-6 stellt ein wichtiges Zytokin in der Inflammationskaskade dar. Dies geht mit der Tatsache einher, daß bei einer Mobilisationstherapie häufig eine

Entzündungsreaktion zu beobachten ist. Die erhöhte HSP 72-Expression, die im Versuchsblock V2 auffällig ist, hat auf die IL-6-Sekretion scheinbar keinen Einfluß. Möglicherweise wird dieser Faktor über andere Signalwege reguliert, als es für Apoptose, Proliferation und TGF- β 1 der Fall ist, so daß IL-6 durch dieses Dehnungsmuster nicht auf die gleiche Art und Weise beeinflußt wird wie die anderen Faktoren. Wenn HSP 72 der Faktor ist, der allein für die Hemmung dieser anderen Faktoren zuständig ist und seine Wirkung dabei vor allem über eine Regulation der MAPK ausübt (GABAI 2002), dann ließe sich daraus schließen, daß eine Regulation der IL-6-Expression in diesem Modell unabhängig von MAPK stattfindet. Ähnliches wurde für verschiedene Zellsysteme bereits beschrieben (KALESNIKOFF 2002; ROBB 2002; VIEDT 2002). Übertragen auf eine Bewegungstherapie nach Verletzung würde dieses bedeuten, daß immer mit einer Inflammation gerechnet werden muß, da ein Anstieg von IL-6 auch in Dehnungsmustern ermittelt wird, in denen alle anderen Parameter (z.B. Proliferation und TGF- β 1) auf eine positive Auswirkung der Dehnung hindeuten. Eventuell kann dem über eine sehr genau dosierte Dehnung entgegengewirkt werden. Zusätzlich kann durch die pleiotrope Wirkung des IL-6 keine genaue Voraussage über die Auswirkung dieses Anstieges getroffen werden.

Als problematisch erweist sich die Interpretation der Ergebnisse der Typ I und Typ III Kollagen mRNA-Expressionsanalyse. Aus der Literatur ist bekannt, daß mechanische Dehnung einen großen Einfluß auf die Produktion der extrazellulären Matrix besitzt (CARVER 1991; HSIEH 2000; LEE 1999). Außerdem ist bekannt, daß die Reaktion auf Dehnung stark von der Amplitude der Dehnung abhängt (BASKIN 1993). Dies ist leicht erklärbar, da für Zellen eine feste Verankerung in einem stark mechanisch belasteten Untergrund unerlässlich ist. Bei sich leicht ablösenden Zellen wäre eine Gewebeintegrität bei Belastung des Gewebes nicht mehr gewährleistet, somit ist eine schnelle zelluläre Antwort, und vor allem auch eine Feinregulation dieser Antwort auf sich verändernde Umweltbedingungen, von großer Bedeutung.

Die Ergebnisse für den repetitiven Stress zeigen jedoch keine Veränderung der Transkription für Typ I und Typ III Kollagen mRNA durch eine angelegte Dehnung. Zwar sind Schwankungen der mRNA-Level zu erkennen, jedoch unterliegen sie einer hohen Biodiversität und sind zu keinem der Zeitpunkte signifikant. Dieses Ergebnis ist konträr zu sämtlichen in der Literatur verzeichneten Daten, zumal in den Versuchsblöcken 1 und 3 die TGF- β 1-Konzentration ansteigt und dementsprechend auch eine Antwort der Kollagen-Synthese zu erwarten ist (BRANTON 1999; WAHL 1999). Ein mögliches Problem bei der Auswertung der Daten könnte sein, daß die Quantifizierung von Typ I und Typ III Kollagen aus technischen Gründen auf mRNA-Ebene stattgefunden hat. Es wird also nicht das Endprodukt auf Proteinebene nachgewiesen sondern eine mRNA, die einem schnelleren Abbau unterlegen sein kann, als es für ein Protein zutrifft. Eventuell ist das Zeitfenster für die Messung des Expressionsanstieg nicht korrekt, so daß eine Hochregulation der mRNA schon zu einem Zeitpunkt zwischen den einzelnen Dehnungsblöcken stattfand oder erst zu einem späteren Zeitpunkt reguliert wird (MALTER 2001; RAUE 1994). In Versuchsaufbauten anderer Arbeitsgruppen findet die mRNA-Messung z.T. 24 Stunden nach Beendigung einer Dehnung bzw. einer anderen Behandlung der Zellen statt (LEE 1999; SAED 1999). Zum Zeitpunkt der Materialabnahme, also mehrere Stunden nach der ersten Dehnung, könnte ein Teil der neu synthetisierten mRNA schon wieder abgebaut und dementsprechend nicht mehr detektierbar sein. Andererseits besteht die Möglichkeit, daß die repetitive Dehnung keinen Stimulus für eine Veränderung der Typ I und Typ III Kollagen-mRNA bietet. Eventuell findet eine Regulation auch ausschließlich auf posttranskriptionaler Ebene statt, so daß sie über eine mRNA-Quantifizierung nicht detektiert werden kann. Ähnliches wurde für fetale Lungenzellen humaner Herkunft bereits beschrieben. Diese Zellen zeigten nach mechanischer Dehnung reduzierte Mengen von Typ I Kollagen mRNA, trotzdem ein Anstieg von Typ I Kollagen Protein nachgewiesen werden konnte (XU 1999). Bei fetalen Rattenlungenzellen wurde eine ähnliche Beobachtung gemacht, da in diesem Fall ein Anstieg

von Fibronectin-Protein bei zeitgleicher Inhibition der Akkumulation der Fibronectin-mRNA auftrat (MOURGEON 1999). Überdies wurde durch die Messung der Propeptide für Typ I und Typ III Kollagen bereits nachgewiesen, daß mechanische Dehnung die Kollagensynthese von humanen Patellarsehnenfibroblasten auf Proteinebene modulieren kann (BOSCH 2002).

In der Literatur ist nachgewiesen, daß das Zytokin TGF- β 1 einen großen Einfluß auf die Synthese von Kollagenen besitzt. Butt et al. fanden heraus, daß die Typ I Kollagen-Synthese von kardialen Fibroblasten nur in Anwesenheit von TGF- β 1 durch Dehnung induziert wird (BUTT 1997). In Abwesenheit dieses Zytokins findet keine Synthesestimulation statt. Für humane peritoneale Mesothelzellen ist bekannt, daß die Zugabe von TGF- β 1 zum Medium zu einer Hochregulation der Typ III Kollagen mRNA führt und im gleichen Zug die Typ I Kollagen mRNA herunter reguliert wird (SAED 1999). Diese Reaktion auf TGF- β 1 wird über „response elements“ in der Promotorregion der Gene induziert. Für Typ I Kollagen wurde dieses Element bereits nachgewiesen (CUTRONEO 2000; LINDAHL 2002; ZHANG 2000) und mit großer Wahrscheinlichkeit existiert ein ähnliches Element auch in der Promotorregion für Typ III Kollagen. Möglicherweise existiert ein ähnlicher Regelkreis für mehrere Gene, so daß bei Dehnung die TGF- β 1-Expression über SRE angeregt wird. TGF- β 1 kann wiederum über TGF- β 1-„response elements“ in den Promotorregionen diverser Gene andere zelluläre Reaktionen wie die Kollagen-Synthese (CUTRONEO 2000; LINDAHL 2002; ZHANG 2000) und möglicherweise bei mechanisch gedehnten Fibroblasten auch die Proliferation induzieren. So wurde ein TGF- β 1 responsives Element in der Promotorregion des c-fos-Gens von Ratten-Chondrozyten bereits nachgewiesen (OSAKI 1999).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß ein Unterschied bei der zellulären Antwort auf Dehnung existiert, die Dehnungsmuster bedingt ist. So führt ein Dehnungsmuster, daß über einen Tag appliziert wird, zu einer

ausgeprägten Antwort. Hierbei werden die meisten untersuchten Parameter aktiviert, so daß sowohl Proliferation als auch Apoptose induziert werden und auch eine Sekretion von Zytokinen stattfindet. Lediglich die HSP 72-Synthese wird bei diesem Dehnungsmuster nicht signifikant aktiviert. Dabei machen kleine Veränderungen im Dehnungsmuster keinen großen Unterschied, so daß die Zellen in den Versuchsblöcken V1 und V3 annähernd gleich reagieren. Der Versuchsblock, in dem eine Dehnung über zwei Tage stattfand, zeigte hingegen eine sehr gegensätzliche Antwort auf die angelegte repetitive Dehnung. So kommt es in diesem Versuchsblock 2 nur zu sehr geringen Reaktionen auf Dehnung, lediglich die HSP 72-Synthese und die IL-6-Synthese werden signifikant induziert. Möglicherweise wird durch die in diesem Block angelegte Dehnungsstärke eine über einen „kritischen“ Punkt reichende HSP 72-Synthese induziert, die alle anderen Reaktionen inhibiert. Physiologisch ist solch eine Reaktion möglicherweise erklärbar, da HSP an einem Punkt in den Zellstoffwechsel eingreift, an dem für die Zelle schädigende Bedingungen vorliegen (GABAI 2002; JÄÄTTELÄ 1999). An diesem besagten Punkt wären ein weiteres Wachstum bzw. diverse Stoffwechselfunktionen schädlich für die Zelle, da es unter anderem durch falsch gefaltete Proteine und nicht korrekt funktionierende Enzyme zu Fehlern z.B. im Replikationsapparat kommen kann, die schwere Folgeschäden auslösen können (BENSAUDE 1996; LEPOCK 1993; NGUYEN 1989). Möglicherweise arretiert die Zelle mit Hilfe von HSP 72 in einem „ist“-Zustand bis sich die externen Bedingungen wieder entspannt haben und mögliche Schäden repariert sind (GABAI 2002).

8.2 Stressadaptation der Zellen durch repetitive Dehnung

Im Vergleich der repetitiv gedehnten Patellarsehnenfibroblasten mit einmalig gedehnten Zellen zeigte sich, daß sich die repetitive Dehnung über einen Tag (Versuchsblöcke 1 und 3) eher mit kurzen einmaligen Dehnungsapplikationen (15 Minuten) vergleichen läßt als mit einer länger andauernden Dehnung (60 Minuten), die wiederum eher mit einer

repetitiven Dehnung über zwei Tage vergleichbar ist. So steigt beispielsweise die Apoptoserate von Patellarsehnenfibroblasten, die einmalig 15 oder 30 Minuten gedehnt wurden, biphasisch an, während sich die Rate nach einer 60minütigen Dehnung nicht verändert (SKUTEK 2002a). Bei repetitiver Dehnung zeigt sich dieser biphasische Anstieg der Apoptoserate nach Dehnungsapplikation über einen Tag, nicht aber bei Dehnung über zwei Tage. Bei der HSP 72-Expression verhält es sich ähnlich. Bei diesem Parameter erfolgt eine Induktion durch einen schwereren Zellstress, also durch einmalige Dehnung über 60 Minuten (ZEICHEN 2002a) bzw. repetitive Dehnung über zwei Tage. Kürzere einmalige Dehnungsapplikationen und repetitive Dehnung über einen Tag können keinen signifikanten Anstieg der HSP 72-Expression bewirken (ZEICHEN 2002a). IL-6 steigt hingegen in allen Dehnungsmustern an. Da IL-6 jedoch ein Zytokin mit pleiotropen Funktionen ist, und die zelluläre Antwort abhängig ist von den auf der Zelloberfläche exprimierten Rezeptoren und unterschiedlichen Signaltransduktionskaskaden, könnte trotz der gleichen zellulären Reaktionen eine differenzierte Antwort auf IL-6 innerhalb der unterschiedlichen Dehnungsmuster vorliegen. Repetitive Dehnung führt jedoch auch zu anderen bzw. zusätzlichen Reaktionen als es bei einmaliger Dehnung beobachtet werden kann. Die TGF- β 1-Sekretion steigt bei einfacher Dehnung in keinem der Fälle signifikant an (SKUTEK 2001a), während eine repetitive Dehnung über einen Tag (V1 und V3) einen signifikanten Anstieg der TGF- β 1-Sekretion auslöst. Für die Proliferation gilt, daß einmalige Dehnungen von 15 und 60 Minuten zu einem Anstieg der Proliferationsrate führen, während eine mittelfristige Dehnung über 30 Minuten keinen Anstieg der Proliferation auslöst (ZEICHEN 2000). Im Vergleich dazu führt repetitive Dehnung über einen Tag zu einem Proliferationsanstieg, während repetitive Dehnung über zwei Tage die Proliferation der Zellen nicht induziert.

Es läßt sich also kein direkter Vergleich zwischen kurzer einmaliger Dehnung und repetitiver Dehnung über einen Tag sowie länger andauernder einmaliger Dehnung und repetitiver Dehnung über zwei Tage

ziehen. Die Repetition der Dehnung scheint einen anderen Effekt auf die Zellantwort auszuüben, als es die einfache Dehnung vermag (SKUTEK 2002a; ZEICHEN 2002a). So unterscheidet sich auch die Stärke des Anstiegs einzelner Parameter zwischen einmaliger und repetitiver Dehnung (SKUTEK 2002a; ZEICHEN 2002a). Der Anstieg der Apoptoserate nach repetitiver Dehnung über einen Tag ist zum Zeitpunkt 24 Stunden erheblich höher als nach 15 oder 30 Minuten einfacher Dehnung (SKUTEK 2002a). Bei der Proliferationsrate liegt nach repetitiver Dehnung über einen Tag nur ein moderat höherer Anstieg vor, allerdings ist dieser Anstieg über den gesamten zeitlichen Verlauf zu beobachten, und hatte keinen biphasischen Charakter wie bei einfachem Stress (ZEICHEN 2000). Auffallend ist vor allem der erheblich höhere Anstieg der HSP 72-Expression nach repetitiver Dehnung über zwei Tage als nach 60 Minuten einfacher Dehnung (ZEICHEN 2002b). Wenn HSP 72 im Versuchsblock 2 für die Blockade der TGF- β 1-Sekretion und Proliferation verantwortlich ist, könnte die HSP 72-Expression durch den Stress über zwei Tage einen kritischen Punkt überschritten zu haben. Möglicherweise hemmt HSP 72 in moderater Konzentration nur die Induktion einer Apoptose der Zelle, während eine höhere Konzentration auch andere Signaltransduktionswege supprimieren kann (GABAI 1997; SONG 2001). Zusammenfassend ist zu sagen, daß durch die Wiederholung der Dehnung diverse Zellfunktionen stärker aktiviert werden, als es mit einem einzelnen abgeschlossenen Dehnungsblock möglich ist. Somit können die Ergebnisse dieser Studie einen sinnvollen Einsatz in *in vivo*-Studien und im Tissue Engineering finden. Allerdings ist eine Feinabstimmung der Dehnung in anderen Versuchsmodellen weiterhin sinnvoll, da ein Übermaß an Dehnung zu negativen Effekten führen könnte.

8.3 Aussagekraft der Studie

Bei der durchgeführten Studie handelt es um ein *in vitro*-Modell, daß sich nicht direkt auf eine *in vivo*-Behandlung übertragen läßt. Durch diese Studie läßt sich jedoch definitiv aussagen, daß mechanische Dehnung in

der Lage ist, diverse Zellparameter zu modulieren. Dabei besteht ein Unterschied zwischen einfacher und repetitiver Dehnung sowie zwischen unterschiedlichen definierten Dehnungsmustern. Die Vorstellung besteht, daß die Induktion einzelner Parameter über eine Aktivierung der Genexpression erfolgt. Zum Beispiel ist für den Typ I Kollagen-Promotor ein TGF- β 1 „response element“ bekannt, über das TGF- β 1 durch Bindung eine Expression des Gens induziert (LINDAHL 2002). Ebenso wurden eine dehnungsresponsive Region im PDGF-A Genpromotor von vaskulären glatten Muskelzellen nachgewiesen (WILSON 1998), sowie Östrogen-sensible Elemente in diversen Genen von Knochenzellen (ZAMAN 2000). Für eine Übertragung der Ergebnisse in *in vivo*-Systeme muß jedoch bedacht werden, daß hierbei eine Vielzahl von Faktoren hinzukommt, die regulierend auf die Modulation bestimmter Gene einwirken. So kommen eine Vielzahl von Zelltypen hinzu, z.B. Immunzellen, die unter anderem Proliferation und Apoptose von Fibroblasten beeinflussen können (BLOTNICK 1994; CONCANNON 1993; MATEO 1994). Über diverse Zytokine die in einem physiologischen System vorhanden sind und die in einer Monokultur fehlen, können unterschiedliche Reaktionen induziert werden, durch die ein Reaktion *in vivo* anders verlaufen kann als in einem abgeschlossenen *in vitro*-System.

Ebenfalls zu erwähnen sind die in der Studie auffällig hohen Standardabweichungen. Für die Versuche wurde mit Primärkulturen gearbeitet. Dies hat einerseits den Vorteil, daß das System nicht so stark artifiziell ist wie bei der Arbeit mit einer Zelllinie. Interindividuelle Parameter spielen somit eine große Rolle und bewirken die höhere Standardabweichung. Man arbeitet hierbei jedoch mit einem *in vitro*-Modell, das einer *in vivo*-Situation näher kommt, als es mit einer Zelllinie möglich wäre. Allerdings ist die Auswertung solcher Ergebnisse dadurch gestört, daß humane Zellen verschiedenen Ursprungs sehr unterschiedlich reagieren können. So lassen sich unterschiedliche Zeitkinetiken beobachten ebenso wie das Auftreten von „Nonresponder“-Primärkulturen. Dadurch erschwert sich eine definierte Aussage. Eine

weitere Spezifikation in Untergruppen war jedoch nicht möglich, da die Anzahl der Meßwerte für eine Aufsplittung der Gruppen nicht ausreichte, um eine Statistik durchzuführen. Möglicherweise läßt dies auch Rückschlüsse auf die Problematik zu, bei der es sich als schwierig erwiesen hat, eine optimale Stärke und Dauer von Dehnung festzulegen, die sich positiv auf Zellen auswirkt. So kann ausgesagt werden, daß sich ein moderater Stress generell positiv auf bestimmte Zellreaktionen auswirkt, daß aber ebenfalls berücksichtigt werden muß, daß in einigen Fällen keine Reaktion oder eine komplett unterschiedliche Reaktion stattfindet.

Für eine Bewegungstherapie nach Verletzung oder für das Tissue Engineering von Bändern und Sehnen würde die Aussage zutreffen, daß eine repetitive Dehnung sich durchaus positiv auf eine Heilung bzw. eine Gewebe(re)generation auswirken kann, da z.B. die Proliferation angeregt wird, allerdings steigen gleichzeitig auch Entzündungsparameter wie IL-6 an, die darauf hindeuten, daß bei zu starker Belastung eine Entzündungsreaktion auftreten könnte. Außerdem sind längere Pausen zwischen den Dehnungsblöcken wahrscheinlich sinnvoll, da zumindest in der Zellkultur nach zwei Tagen repetitiver Dehnung Inhibierungen der Zellfunktionen auftreten, die auf ein Übermaß an Dehnung zurückgeführt werden können.

Diese Ergebnisse *in vitro* sind jedoch wegweisend und sollten in *in vivo*-Studien extrapoliert und geprüft werden.

9 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Fragestellung bearbeitet, inwiefern eine repetitive Dehnung in der Lage ist, in einem *in vitro*-System diverse Zellparameter von Patellarsehnenfibroblasten zu modulieren. Hintergrund dieser Studie ist, daß im Hinblick auf die Heilung von Bandverletzungen eine Bewegungstherapie bzw. die Immobilisierung des verletzten Gewebes noch immer kontrovers diskutiert werden. Dehnung hat im physiologischen Umfeld des Knies einen hohen Stellenwert. Aus diesem Grund und auch im Bezug auf diverse Studien in unterschiedlichen Zellsystemen liegt es nahe, daß Dehnung einen nicht unerheblichen Einfluß auf die Heilung von Knieverletzungen hat. Im Rahmen der durchgeführten Versuche sollte zum einen extrapoliert werden, ob unterschiedliche Dehnungsmuster unterscheidbare zelluläre Antworten hervorrufen können, zum anderen stand die Frage im Vordergrund, ob eine repetitive Dehnung einen anderen Effekt auslöst als es eine einfache Dehnung vermag, und somit eventuell eine Adaptation des Gewebes bewirkt. Zur Beantwortung der Fragen wurden mit Hilfe einer speziellen Dehnungsapparatur drei unterschiedliche repetitive Dehnungsmuster appliziert und im Anschluß die Parameter Proliferation, Apoptose, HSP 72-Expression, TGF- β 1-Sekretion, IL-6-Sekretion und Typ I/Typ III-Kollagensynthese zu unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt. Dabei zeigte sich, daß sowohl Unterschiede zwischen verschiedenen repetitiven Dehnungsmustern als auch zwischen einfacher und repetitiver Dehnung existieren. Repetitive Dehnungen, die innerhalb eines Tages appliziert werden, wirken sich stimulatив auf die meisten Zellparameter aus, wobei die HSP 72-Expression nicht signifikant induziert werden kann. Repetitive Dehnung über zwei Tage induziert hingegen die HSP 72-Expression signifikant, während alle weiteren Parameter außer der IL-6-Sekretion inhibiert sind. Insgesamt ist die Auswirkung der repetitiven Dehnung auf die Zellen umfassender als die einfacher Dehnung. Diese Ergebnisse stellen sich wegweisend für die Heilung von Bandverletzungen

dar und können wichtige Hinweise für das Tissue Engineering von Bändern und Sehnen liefern.

10Literaturverzeichnis

ALMEKINDERS,L.C., A.J.BAYNES, und L.W.BRACEY (1995):

An in vitro investigation into the effects of repetitive motion and nonsteroidal antiinflammatory medication on human tendon fibroblasts.
Am J Sports Med 23:119-123

ARSURA,M., M.WU, und G.E.SONENSHEIN (1996):

TGF beta 1 inhibits NF-kappa B/Rel activity inducing apoptosis of B cells: transcriptional activation of I kappa B alpha.
Immunity. 5:31-40

ASHCROFT,G.S., X.YANG, A.B.GLICK, M.WEINSTEIN, J.L.LETTERIO, D.E.MIZEL, M.ANZANO, T.GREENWELL-WILD, S.M.WAHL, C.DENG, und A.B.ROBERTS (1999):

Mice lacking Smad3 show accelerated wound healing and an impaired local inflammatory response.
Nat.Cell Biol 1:260-266

BASKIN,L., P.S.HOWARD, und E.MACARAK (1993):

Effect of mechanical forces on extracellular matrix synthesis by bovine urethral fibroblasts in vitro.
J.Urol. 150:637-641

BEERE,H.M., B.B.WOLF, K.CAIN, D.D.MOSSER, A.K.T.MAHBOUBI, P.TAILOR, R.I.MORIMOTO, G.M.COHEN, und D.R.GREEN (2000):

Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the apaf-1 apoptosome.
Nature Cell Biology 2:469-475

BENJAMIN,I.J. und WILLIAMS R.S. (1994):

The biology of heat shock proteins and molecular chaperones.

Morimoto, R. I., Tissieres, A., und Georgopoulos, C.

Cold Spring Harbor Laboratory.

**BENSAUDE,O., S.BELLIER, M.F.DUBOIS, F.GIANNONI, und
V.T.NGUYEN (1996):**

Heat-shock induced protein modifications and modulation of enzyme activities.

EXS 77:199-219

**BIHL,M., M.TAMM, M.NAUCK, H.WIELAND, A.P.PERRUCHOUD, und
M.ROTH (1998):**

Proliferation of human non-small-cell lung cancer cell lines: role of interleukin-6.

Am J Respir.Cell Mol.Biol 19:606-612

**BIRUKOV,K.G., V.P.SHIRINSKY, O.V.STEPANOVA, V.A.TKACHUK,
A.W.A.HAHN, T.J.RESINK, und V.N.SMIRNOV (1995):**

Stretch affects phenotype and proliferation of vascular smooth muscle cells.

Molecular and Cellular Biochemistry 144:131-139

**BLOTNICK,S., G.E.PEOPLES, M.R.FREEMAN, T.J.EBERLEIN, und
M.KLAGSBRUN (1994):**

T lymphocytes synthesize and export heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and basic fibroblast growth factor, mitogens for vascular cells and fibroblasts: differential production and release by CD4+ and CD8+ T cells.

Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A 91:2890-2894

**BOLDIN,M.P., E.E.VARFOLOMEEV, Z.PANCER, I.L.METT,
J.H.CAMONIS, und D.WALLACH (1995):**

A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1
contains a sequence motif related to the death domain.

J Biol Chem 270:7795-7798

**BOSCH,U., J.ZEICHEN, M.SKUTEK, I.ALBERS, M.VAN GRIENSVEN,
und N.GASSLER (2002):**

Einfluss von zyklischer Dehnung auf die Matrixsynthese
von humanen Patallarsehnenzellen.

Unfallchirurg 105:437-442

BRANTON,M.H. und J.B.KOPP (1999):

TGF-beta and fibrosis.

Microbes.Infect. 1:1349-1365

BURKS,R.T., R.C.HAUT, und R.L.LANCASTER (1990):

Biomechanical and histological observations of the dog patellar tendon
after removal of its central one-third.

Am J Sports Med 18:146-153

BUTT,R.P. und J.E.BISHOP (1997):

Mechanical load enhances the stimulatory effect of serum growth factors
on cardiac fibroblast procollagen synthesis.

J.Mol.Cell.Cardiol. 29:1141-1151

**BUZZARD,K.A., A.J.GIACCIA, M.KILLENDER, und R.L.ANDERSON
(1998):**

Heat Shock Protein 72 modulates pathways of stress-induced apoptosis.

J.Biol.Chem. 273:17147-17153

**CAHILL, M.A., M.E.PETER, F.C.KISCHKEL, A.M.CHINNAIYAN,
V.M.DIXIT, P.H.KRAMMER, und A.NORDHEIM (1996):**

CD95 (APO-1/Fas) induces activation of SAP kinases downstream of ICE-like proteases.

oncogene 13:2087-2096

**CARVER, W., M.L.NAGPAL, M.NACHTIGAL, T.K.BORG, und
L.TERRACIO (1991):**

Collagen expression in mechanically stimulated cardiac fibroblasts.

Circ.Res. 69:116-122

CHARETTE, S.J. und J.LANDRY (2000):

The interaction of HSP27 with Daxx identifies a potential regulatory role of HSP27 in Fas-induced apoptosis.

Ann.N.Y.Acad.Sci 926:126-131

**CHAUDHARY, P.M., M.EBY, A.JASMIN, A.BOOKWALTER, J.MURRAY,
und L.HOOD (1997):**

Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway.

Immunity. 7:821-830

CHIEN, S., S.LI, und J.SHYY (1998):

Effects of mechanical forces on signal transduction and gene expression in endothelial cells.

Hypertension 31:162-169

CHINNAIYAN, A.M., K.O'ROURKE, M.TEWARI, und V.M.DIXIT (1995):

FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis.

Cell 81:505-512

**CONCANNON, M.J., B.B. BARRETT, E.H. ADELSTEIN, W.H. THORNTON,
und C.L. PUCKETT (1993):**

The inhibition of fibroblast proliferation by a novel monokine: an in vitro and in vivo study.

J Burn Care Rehabil. 14:141-147

**COSO, O.A., M. CHIARIELLO, J.C. YU, H. TERAMOTO, P. CRESPO, N. XU,
T. MIKI, und J.S. GUTKIND (1995):**

The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway.

Cell 81:1137-1146

CRAIG, E.A. (1985):

The heat shock response.

CRC Crit Rev. Biochem 18:239-280

CURRIE, R.W. (1987):

Effects of ischemia and perfusion temperature on the synthesis of stress-induced (heat shock) proteins in isolated and perfused rat hearts.

J Mol. Cell Cardiol. 19:795-808

CUTRONEO, K.R. (2000):

Human SP1 but not human AP1 binding to the TGF-beta element in the 5' flanking region of the rat PROalpha1(I) collagen gene.

Mol. Biol Rep 27:191-194

**DE ANDRADE, C.R., P. COTRIN, E. GRANER, O.P. ALMEIDA, J.J. SAUK,
und R.D. COLETTA (2001):**

Transforming growth factor-beta1 autocrine stimulation regulates fibroblast proliferation in hereditary gingival fibromatosis.

J Periodontol. 72:1726-1733

DENNLER,S., M.-J.GOUMANS, und P.TEN DIJKE (2002):

Transforming growth factor beta signal transduction.

J.Leukuc.Biol. 71:731-740

DERYNCK,R. und X.H.FENG (1997):

TGF-beta receptor signaling.

Biochim.Biophys.Acta 1333:F105-F150

DOWNWARD,J. (1999):

How BAD phosphorylation is good for survival.

Nat.Cell Biol 1:E33-E35

ECKES,B., C.MAUCH, G.HUPPE, und T.KRIEG (1993):

Downregulation of collagen synthesis in fibroblasts within three-dimensional collagen lattices involves transcriptional and posttranscriptional mechanisms.

FEBS Lett. 318:129-133

**EICKELBERG,O., A.PANSKY, R.MUSSMANN, M.BIHL, M.TAMM,
P.HILDEBRAND, A.P.PERRUCHOUD, und M.ROTH (1999):**

Transforming growth factor-beta1 induces interleukin-6 expression via activating protein-1 consisting of JunD homodimers in primary human lung fibroblasts.

J Biol Chem 274:12933-12938

FEDER,M.E. und G.E.HOFMANN (1999):

Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology.

Annu.Rev.Physiol 61:243-282

FEIGE,U. und W.VAN EDEN (1996):

Infection, autoimmunity and autoimmune disease.

EXS 77:359-373

FRACELLA,F. und L.RENSING (1995):

Streßproteine: Ihre wachsende Bedeutung in der Medizin.

Naturwissenschaften 82:303-309

**FRANCIS,J.M., C.M.HEYWORTH, E.SPOONCER, A.PIERCE,
T.M.DEXTER, und A.D.WHETTON (2000):**

Transforming growth factor-beta 1 induces apoptosis independently of p53 and selectively reduces expression of Bcl-2 in multipotent hematopoietic cells.

J Biol Chem 275:39137-39145

**FRANKEL,B., S.L.LONGO, C.LEACH, G.W.CANUTE, und T.C.RYKEN
(2002):**

Apoptosis and survival in high-grade astrocytomas as related to tumor Fas (APO-1/CD95) expression.

J Neurooncol 59:27-34

**GABAI,V.L., A.B.MERIIN, D.D.MOSSER, A.W.CARON, S.RITS,
V.I.SHIFRIN, und M.Y.SHERMAN (1997):**

Hsp70 prevents activation of stress kinases. A novel pathway of cellular thermotolerance.

J Biol Chem 272:18033-18037

**GABAI,V.L., A.B.MERIIN, J.L.YAGLOM, V.VOLLOCH, und
M.Y.SHERMAN (1998):**

Role of hsp70 in regulation of stress-kinase JNK: implications in apoptosis and aging.

FEBS Letters 438:1-4

GABAI, V.L. und M.Y.SHERMAN (2002):

Invited Review: interplay between molecular chaperones and signaling pathways in survival of heat shock.

J.Appl.Physiol. 92:1743-1748

GABAI, V.L., J.L.YAGLOM, V.VOLLOCH, A.B.MERIIN, T.FORCE, M.KOUTROUMANIS, B.MASSIE, M.Y.SHERMAN, und D.D.MOSSER (2000):

HSP72-mediated suppression of c-jun N-terminal kinase is implicated in development of tolerance to caspase-independent cell death.

Mol.Cell.Biol. 20:6826-6836

GLOE, T., H.Y.SOHN, G.A.MEININGER, und U.POHL (2002):

Shear stress-induced release of basic fibroblast growth factor from endothelial cells is mediated by matrix interaction via integrin alpha(v)beta3.

J Biol Chem 277:23453-23458

GUCHELAAR, H.J., A.VERMES, I.VERMES, und C.HAANEN (1997):

Apoptosis: molecular mechanisms and implications for cancer chemotherapy.

Pharm. World Sci 19:119-125

HAEGEMAN, G., J.CONTENT, G.VOLCKAERT, R.DERYNCK, J.TAVERNIER, und W.FIERS (1986):

Structural analysis of the sequence coding for an inducible 26-kDa protein in human fibroblasts.

Eur.J Biochem 159:625-632

HATAMOCHI,A., M.AUMAILLEY, C.MAUCH, M.L.CHU, R.TIMPL, und T.KRIEG (1989):

Regulation of collagen VI expression in fibroblasts. Effects of cell density, cell-matrix interactions, and chemical transformation.

J Biol Chem 264:3494-3499

HE,Y. und F.GRINELL (1994):

A cyclic AMP signaling pathway.

J.Cell.Biol. 126:457-463

HIBI,M., K.NAKAJIMA, und T.HIRANO (1996):

IL-6 cytokine family and signal transduction: a model of the cytokine system.

J Mol.Med 74:1-12

HILL,C.S., J.WYNNE, und R.TREISMAN (1995):

The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF.

Cell 81:1159-1170

HIPPER, A. und ISENBERG, G. (2000):

Cyclic mechanical strain decreases the DNA synthesis of vascular smooth muscle cells.

Pflugers Arch 440:19-27

HIRANO,T., K.YASUKAWA, H.HARADA, T.TAGA, Y.WATANABE, T.MATSUDA, S.KASHIWAMURA, K.NAKAJIMA, K.KOYAMA, A.IWAMATSU, und . (1986):

Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin.

Nature 324:73-76

**HSIEH,A.H., C.M.-H.TSAI, Q.-J.MA, T.LIN, A.J.BANES,
F.J.VILLAREAL, W.H.AKESON, und K.-L.P.SUNG (2000):**

Time-dependent increases in type-III collagen gene expression in medial collateral ligament fibroblasts under cyclic strains.

J.Orthop.Res. 18:220-227

HSU,H., J.XIONG, und D.V.GOEDDEL (1995):

The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation.

Cell 81:495-504

**HYMAN,K.M., G.SEGHEZZI, G.PINTUCCI, G.STELLARI, J.H.KIM,
E.A.GROSSI, A.C.GALLOWAY, und P.MIGNATTI (2002):**

Transforming growth factor-beta1 induces apoptosis in vascular endothelial cells by activation of mitogen-activated protein kinase.

Surgery 132:173-179

HYNES,R.O. (1992):

Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion.

Cell 69:11-25

IATROPOULUS,M.J. und G.M.WILLIAMS (1996):

Proliferation markers.

Exp.Toxic.Pathol. 48:175-181

ICHIKI,Y., E.SMITH, E.C.LEROY, und M.TROJANOWSKA (1995):

Different effects of basic fibroblast growth factor and transforming growth factor-beta on the two platelet-derived growth factor receptors' expression in scleroderma and healthy human dermal fibroblasts.

J Invest Dermatol. 104:124-127

INGRAM,A.J., L.JAMES, H.LY, K.THAI, und J.W.SCHOLEY (2000):

Stretch activation of jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase in mesangial cells.

Kidney Int 58:1431-1439

ISHISAKI,A., K.YAMATO, S.HASHIMOTO, A.NAKAO, K.TAMAKI, K.NONAKA, P.TEN DIJKE, H.SUGINO, und T.NISHIHARA (1999):

Differential inhibition of Smad6 and Smad7 on bone morphogenetic protein- and activin-mediated growth arrest and apoptosis in B cells.

J Biol Chem 274:13637-13642

JÄÄTTELÄ,M. (1995):

Over-expression of hsp70 confers tumorigenicity to mouse fibrosarcoma cells.

Int J Cancer 60:689-693

JÄÄTTELÄ,M. (1999):

Escaping cell death: survival proteins in cancer.

Exp.Cell Res 248:30-43

JÄÄTTELÄ,M., D.WISSING, K.KOKHOLM, T.KALLUNKI, und M.EGEBLAD (1998):

Hsp 70 exerts its anti-apoptotic function downstream of caspase-3-like proteases.

EMBO J 17:6124-6134

JESSOP,H.L., S.C.RAWLINSON, A.A.PITSILLIDES, UND LANYON, L. E. (2002):

Mechanical strain and fluid movement both activate extracellular regulated kinase (ERK) in osteoblast-like cells but via different signalling pathways.

Bone 31:186-194

JULIANO,R.L. und S.HASKILL (1993):

Signal transduction from the extracellular matrix.

J Cell Biol 120:577-585

**JUO,P., C.J.KUO, S.E.REYNOLDS, R.F.KONZ, J.RAINGEAUD,
R.J.DAVIS, H.P.BIEMANN, und J.BLENIS (1997):**

Fas activation of the p38 mitogen-activated protein kinase signalling pathway requires ICE/CED-3 family proteases.

Mol.Cell Biol 17:24-35

**KALESNIKOFF,J., N.BAUR, M.LEITGES, M.R.HUGHES, J.E.DAMEN,
M.HUBER, und G.KRYSTAL (2002):**

SHIP negatively regulates IgE + antigen-induced IL-6 production in mast cells by inhibiting NF-kappa B activity.

J Immunol. 168:4737-4746

**KAUFMANN,S.H., S.DESNOYERS, Y.OTTAVIANO, N.E.DAVIDSON, und
G.G.POIRIER (1993):**

Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis.

Cancer Res 53:3976-3985

KERR,J.F., A.H.WYLLIE, und A.R.CURRIE (1972):

Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.

Br.J Cancer 26:239-257

**KESSLER,D., S.DETHLEFSEN, I.HAASE, M.PLOMANN, F.HIRCHE,
T.KRIEG, und B.ECKES (2001):**

Fibroblasts in mechanically stressed collagen lattices assume a sythetic phenotype.

J.Biol.Chem. 276:36575-36585

**KHARBANDA,S., P.PANDEY, L.SCHOFIELD, S.ISRAELS,
R.RONCINSKE, K.YOSHIDA, A.BHARTI, Z.M.YUAN, S.SAXENA,
R.WEICHSELBAUM, C.NALIN, und D.KUFE (1997):**

Role for Bcl-xL as an inhibitor of cytosolic cytochrome C accumulation in DNA damage-induced apoptosis.

Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A 94:6939-6942

KIANG,J.G. und G.C.TSOKOS (1998):

Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology.

Pharmacol.Ther. 80:183-201

**KIMOTO,S., M.MATSUZAWA, S.MATSUBARA, T.KOMATSU,
N.UCHIMURA, T.KAWASE, und S.SAITO (1999):**

Cytokine secretion of periodontal ligament fibroblasts derived from deciduous teeth: effect of mechanical stress on the secretion of TGF-beta 1 and macrophage colony stimulating factor.

J.Periodontal.Res. 34:235-243

KING,K.L. und J.A.CIDLOWSKI (1995):

Cell cycle and apoptosis:common pathways to life and death.

J.Cell.Bioch. 58:175-180

**KITO, H., E. L.CHEN, M.IKEDA, N.AZUMA, N.NAKAJIMA, V.GAHTAN,
und B.ESUMPIO (2000):**

Role of mitogen-activated protein kinases in pulmonary endothelial cells exposed to cyclic strain.

J Appl Physiol 89:2391-2400

KOMURO,I., S.KUDO, T.YAMAZAKI, Y.ZOU, I.SHIOJIMA, und Y.YAZAKI (1996):

Mechanical stretch activates the stress-activated protein kinases in cardiac myocytes.

FASEB J 10:631-636

KONSTANTINIDOU,A.E., P.KORKOLOPOULOU, und E.PATSOURIS (2002):

Apoptotic markers for tumor recurrence: A minireview.

Apoptosis. 7:461-470

KROEGER,P.E., K.D.SARGE, und R.I.MORIMOTO (1993):

Mouse heat shock transcription factors 1 and 2 prefer a trimeric binding site but interact differently with the HSP70 heat shock element.

Mol.Cell Biol 13:3370-3383

KROEMER,G., P.PETIT, N.ZAMZAMI, J.L.VAYSSIÈRE, und B.MIGNOTTE (1995):

The biochemistry of programmed cell death.

FASEB J 9:1277-1287

KROEMER,G., N.ZAMZAMI, und S.A.SUSIN (1997):

Mitochondrial control of apoptosis.

Immunol.Today 18:44-51

LAMBERT,C.A., E.P.SOUDANT, B.V.NUSGENS, und C.M.LAPIÈRE (1992):

Pretranslational regulation of extracellular matrix macromolecules and collagenase expression in fibroblasts by mechanical forces.

Lab Invest 66:444-451

LEE,A.A., T.DELHAAS, A.D.MCCULLOCH, und F.J.VILLARREAL (1999):

Differential responses of adult cardiac fibroblasts to in vitro biaxial strain patterns.

J Mol.Cell Cardiol. 31:1833-1843

LEPOCK,J.R., H.E.FREY, und K.P.RITCHIE (1993):

Protein denaturation in intact hepatocytes and isolated cellular organelles during heat shock.

J Cell Biol 122:1267-1276

LEUNG,D.Y., S.GLAGOV, und M.B.MATHEWS (1976):

Cyclic stretching stimulates synthesis of matrix components by arterial smooth muscle cells in vitro.

Science 191:475-477

LI,H., H.ZHU, C.J.XU, und J.YUAN (1998):

Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis.

Cell 94:491-501

LI,P., D.NIJHAWAN, I.BUDIHardJO, S.M.SRINIVASULA, M.AHMAD, E.S.ALNEMRI, und X.WANG (1997):

Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade.

Cell 91:479-489

LINDAHL,G.E., R.C.CHAMBERS, J.PAPAKRIVOPOULOU, S.J.DAWSON, M.C.JACOBSEN, J.E.BISHOP, und G.J.LAURENT (2002):

Activation of fibroblast procollagen alpha 1(I) transcription by mechanical strain is transforming growth factor-beta-dependent and involves increased binding of CCAAT-binding factor (CBF/NF-Y) at the proximal promotor.

J.Biol.Chem. 277:6153-6161

LIU,M. und M.POST (2000):

Invited review: mechanochemical signal transduction in the fetal lung.

J Appl Physiol 89:2078-2084

LIU,M., K.TANSWELL, und M.POST (1999):

Mechanical force induced signal transduction in lung cells.

Am J Physiol 277:L667-L683

LIU,X., H.ZOU, C.SLAUGHTER, und X.WANG (1997):

DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis.

Cell 89:175-184

LONG,P., J.HU, N.PIESCO, M.BUCKLEY, und S.AGARWAL (2001):

Low magnitude of tensile strain inhibits IL-1beta-dependent induction of pro-inflammatory cytokines and induces synthesis of IL-10 in human periodontal ligament cells in vitro.

J.Dent.Res. 80:1416-1420

LUO,X., I.BUDIHARDJO, H.ZOU, C.SLAUGHTER, und X.WANG (1998):

Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors.

Cell 94:481-490

MACKENNA,D., S.R.SUMMEROUR, und F.J.VILLARREAL (2000):

Role of mechanical factors in modulating cardiac fibroblast function and extracellular matrix synthesis.

Cardiovascular Research 46:257-263

MACKENNA,D.A., F.DOLFI, K.VUORI, und E.RUOSLAHTI (1998):

Extracellular signal-regulated kinase and c-Jun NH₂-terminal kinase activation by mechanical stretch is integrin-dependent and matrix-specific in rat cardiac fibroblasts.

J Clin.Invest 101:301-310

MALTER,J.S. (2001):

Regulation of mRNA stability in the nervous system and beyond.

J Neurosci.Res 66:311-316

MARTIN, M., M.C.VOZENIN, N.GAULT, F.CRECHET, C.M.PFARR, und J.L.LEFAIX (1997):

Coactivation of AP-1 activity and TGF-beta1 gene expression in the stress response of normal skin cells to ionizing radiation.

Oncogene 15:981-989

MASSAGUE,J. (1998):

TGF-beta signal transduction.

Annu.Rev.Biochem 67:753-791

MATEO,R.B., J.S.REICHNER, und J.E.ALBINA (1994):

Interleukin-6 activity in wounds.

Am J Physiol 266:R1840-R1844

MAUCH,C., B.ADELMANN-GRILL, A.HATAMOCHI, und T.KRIEG (1989):

Collagenase gene expression in fibroblasts is regulated by a three-dimensional contact with collagen.

FEBS Lett. 250:301-305

MAY,L.T., D.C.HELFGOTT, und P.B.SEHGAL (1986):

Anti-beta-interferon antibodies inhibit the increased expression of HLA-B7 mRNA in tumor necrosis factor-treated human fibroblasts: structural studies of the beta 2 interferon involved.

Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A 83:8957-8961

MAYR, M., C.LI, Y.ZOU, U.HUEMER, Y.HU, und Q.XU (2000):

Biomechanical stress-induced apoptosis in vein grafts involves p38 mitogen-activated protein kinases.

FASEB J. 14:261-270

MCCARTNEY-FRANCIS,N.L. und S.M.WAHL (2001):

TGF-beta and macrophages in the rise and fall of inflammation.

In: *TGF-beta and related cytokines in inflammation* by S.N.Breit und S. M. Wahl (Hrsg.)

Birkhauser, Basel, S. 65-90

MEHLEN,P., K.SCHULZE-OSTHOFF, und A.P.ARRIGO (1996):

Small stress proteins as novel regulators of apoptosis. Heat shock protein 27 blocks Fas/APO-1- and staurosporine-induced cell death.

J Biol Chem 271:16510-16514

MIHARA,M., Y.MORIYA, T.KISHIMOTO, und Y.OHSUGI (1995):

Interleukin-6 (IL-6) induces the proliferation of synovial fibroblastic cells in the presence of soluble IL-6 receptor.

Br.J Rheumatol. 34:321-325

MINDEN,A., A.LIN, F.X.CLARET, A.ABO, und M.KARIN (1995):

Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs.

Cell 81:1147-1157

MIYAMOTO,S., H.TERAMOTO, O.A.COSO, J.S.GUTKIND, P.D.BURBELO, S.K.AKIYAMA, und K.M.YAMADA (1995):

Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules.

J Cell Biol 131:791-805

MIYAMOTO,S., H.TERAMOTO, J.S.GUTKIND, und K.M.YAMADA (1996):

Integrins can collaborate with growth factors for phosphorylation of receptor tyrosine kinases and MAP kinase activation: roles of integrin aggregation and occupancy of receptors.

J Cell Biol 135:1633-1642

MOTYL,T., K.GRZELKOWSKA, W.ZIMOWSKA, J.SKIERSKI, P.WARESKI, T.PLOSZAJ, und L.TRZECIAK (1998):

Expression of bcl-2 and bax in TGF-beta 1-induced apoptosis of L1210 leukemic cells.

Eur.J Cell Biol 75:367-374

MOURGEON,E., J.XU, A.K.TANSWELL, M.LIU, und M.POST (1999):

Mechanical strain-induced posttranscriptional regulation of fibronectin production in fetal lung cells.

Am J Physiol 277:L142-L149

MURPHY,L.O., S.SMITH, R.H.CHEN, D.C.FINGAR, und J.BLENIS (2002):

Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products.

Nat.Cell Biol 4:556-564

NEIDLINGER-WILKE,C., H.-J.WILKE, und L.CLAES (1994):

Cyclic stretching of human osteoblasts affects proliferation and metabolism: a new experimental method and its application.

J.Orthop.Res. 12:70-78

NGUYEN,V.T., M.MORANGE, und O.BENSAUDE (1989):

Protein denaturation during heat shock and related stress. Escherichia coli beta-galactosidase and Photinus pyralis luciferase inactivation in mouse cells.

J Biol Chem 264:10487-10492

NOLLEN,E.A., J.F.BRUNSTING, J.SONG, H.H.KAMPINGA, und R.I.MORIMOTO (2000):

Bag1 functions in vivo as a negative regulator of Hsp70 chaperone activity.

Mol.Cell Biol 20:1083-1088

NOYES,F.R., S.BERRIOS-TORRES, S.D.BARBER-WESTIN, und T.P.HECKMANN (2000):

Prevention of permanent arthrofibrosis after anterior cruciate ligament reconstruction alone or combined with associated procedures: a prospective study in 443 knees.

Knee.Surg Sports Traumatol.Arthrosc. 8:196-206

OBERHAMMER,F., J.W.WILSON, C.DIVE, I.D.MORRIS, J.A.HICKMAN, A.E.WAKELING, P.R.WALKER, und M.SIKORSKA (1993):

Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation.

EMBO J 12:3679-3684

OSAKI,M., T.TSUKAZAKI, A.YONEKURA, Y.MIYAZAKI, K.IWASAKI, H.SHINDO, und S.YAMASHITA (1999):

Regulation of c-fos gene induction and mitogenic effect of transforming growth factor-beta1 in rat articular chondrocyte.

Endocr.J 46:253-261

PASTAN,I.H., G.S.JOHNSON, und W.B.ANDERSON (1975):

Role of cyclic nucleotides in growth control.

Annu.Rev.Biochem 44:491-522

PERLMAN,R., W.P.SCHIEMANN, M.W.BROOKS, H.F.LODISH, und R.A.WEINBERG (2001):

TGF-beta-induced apoptosis is mediated by the adapter protein Daxx that facilitates JNK activation.

Nat.Cell Biol 3:708-714

PIMENTEL,D.R., J.K.AMIN, L.XIAO, T.MILLER, J.VIERECK, J.OLIVER-KRASINSKI, R.BALIGA, J.WANG, D.A.SIWIK, K.SINGH, P.PAGANO, W.S.COLUCCI, und D.B.SAWYER (2001):

Reactive oxygen species mediate amplitude-dependent hypertrophic and apoptotic responses to mechanical stretch in cardiac myocytes.

Circ Res 89:453-460

PIRCHER,R., P.JULLIEN, und D.A.LAWRENCE (1986):

Beta-transforming growth factor is stored in human blood platelets as a latent high molecular weight complex.

Biochem Biophys.Res Commun. 136:30-37

POUPART,P., P.VANDENABEELE, S.CAYPHAS, J.VAN SNICK, G.HAEGEMAN, V.KRUYSS, W.FIERS, und J.CONTENT (1987):

B cell growth modulating and differentiating activity of recombinant human 26-kd protein (BSF-2, HuIFN-beta 2, HPGF).

EMBO J 6:1219-1224

PRICE,B.D. und S.K.CALDERWOOD (1991):

Ca²⁺ is essential for multistep activation of the heat shock factor in permeabilized cells.

Mol.Cell Biol 11:3365-3368

PRIVES,C. und P.A.HALL (1999):

The p53 pathway.

J Pathol. 187:112-126

RABINDRAN,S.K., R.I.HAROON, J.CLOS, J.WISNIEWSKI, und C.WU (1993):

Regulation of heat shock factor trimer formation: role of a conserved leucine zipper.

Science 259:230-234

RAUE,H.A. (1994):

Metabolic stability of mRNA in yeast--a potential target for modulating productivity?

Trends Biotechnol. 12:444-449

RAVAGNAN,L., S.GURBUXANI, S.A.SUSIN, C.MAISSE, E.DAUGAS, N.ZAMZANI, T.MAK, M.JÄÄTTELÄ, J.M.PENNINGER, C.GARRIDO, und G.KROEMER (2001):

Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor.

Nature Cell Biology 3:839-842

RESNICK,N., T.COLLINS, W.ATKINSON, D.T.BONTRON, C.F.DEWEY, JR., und M.A.GIMBRONE, JR. (1993):

Platelet-derived growth factor B chain promoter contains a cis-acting fluid shear-stress-responsive element.

Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A 90:4591-4595

RESNICK,N. und M.A.GIMBRONE, JR. (1995):

Hemodynamic forces are complex regulators of endothelial gene expression.

FASEB J 9:874-882

ROBB,B.W., D.D.HERSHKO, J.H.PAXTON, G.J.LUO, und P.O.HASSELGREN (2002):

Interleukin-10 activates the transcription factor C/EBP and the interleukin-6 gene promoter in human intestinal epithelial cells.

Surgery 132:226-231

ROTH,M., M.NAUCK, M.TAMM, A.P.PERRUCHOUD, R.ZIESCHE, und L.H.BLOCK (1995):

Intracellular interleukin 6 mediates platelet-derived growth factor-induced proliferation of nontransformed cells.

Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A 92:1312-1316

**ROZENGURT,E., A.LEGG, G.STRANG, und N.COURTENAY-LUCK
(1981):**

Cyclic AMP: a mitogenic signal for Swiss 3T3 cells.

Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A 78:4392-4396

RUOSLAHTI,E., N.A.NOBLE, S.KAGAMI, und W.A.BORDER (1994):

Integrins.

Kidney Int Suppl 44:S17-S22

**RUWHOF, C., A.E.VAN WAMEL, J.M.EGAS, und A.VAN DER LAARSE
(2000):**

Cyclic stretch induces the release of growth promoting factors from cultered neonatal cardiomyocytes and cardiac fibroblasts.

Mol.Cell.Biochem. 208:89-98

RYAN,K.M. und G.D.BIRNIE (1996):

Myc oncogenes: the enigmatic family.

Biochem J 314 (Pt 3):713-721

SADOSHIMA,J., T.TAKAHASHI, L.JAHN, und S.IZUMO (1992):

Roles of mechano-sensitive ion channels, cytoskeleton, and contractile activity in stretch-induced immediate-early gene expression and hypertrophy of cardiac myocytes.

Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A 89:9905-9909

SADOSHIMA,J. und S.IZUMO (1997):

The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress.

Annu.Rev.Physiol. 59:551-571

SAED,G.M., W.ZHANG, N.CHEGINI, L.HOLMDAHL, und M.P.DIAMOND (1999):

Alteration in type I and III collagen expression in human peritoneal mesothelial cells in response to hypoxia and transforming growth factor beta-1.

Wound Rep Reg 7:504-510

SAINI,K.S. und N.I.WALKER (1998):

Biochemical and molecular mechanisms regulating apoptosis.

Molecular and Cellular Biochemistry 178:9-25

SALEH,A., S.M.SRINIVASULA, L.BALKIR, P.D.ROBBINS, und E.S.ALNEMRI (2000):

Negative regulation of the apaf-1 apoptosome by hsp70.

Cell Biology 2:476-482

SANCHEZ-ESTEBAN,J., Y.WANG, L.A.CICCHIELLO, und L.P.RUBIN (2002):

Cyclic mechanical stretch inhibits cell proliferation and induces apoptosis in fetal rat lung fibroblasts.

Am.J.Physiol.Lung.Cell.Mol.Physiol. 282:448-456

SCAFFIDI,A.K., S.E.MUTSAERS, Y.P.MOODLEY, R.J.MCANULTY, G.J.LAURENT, P.J.THOMPSON, und D.A.KNIGHT (2002):

Oncostatin M stimulates proliferation, induces collagen production and inhibits apoptosis of human lung fibroblasts.

Br.J Pharmacol. 136:793-801

SCHENDEL,S.L., R.AZIMOV, K.PAWLOWSKI, A.GODZIK, B.L.KAGAN, und J.C.REED (1999):

Ion channel activity of the BH3 only Bcl-2 family member, BID.

J Biol Chem 274:21932-21936

SCHLESINGER,M.J. (1990):

Heat shock proteins.

J Biol Chem 265:12111-12114

**SCHNEIDER,P., M.THOME, K.BURNS, J.L.BODMER, K.HOFMANN,
T.KATAOKA, N.HOLLER, und J.TSCHOPP (1997):**

TRAIL receptors 1 (DR4) and 2 (DR5) signal FADD-dependent apoptosis and activate NF-kappaB.

Immunity. 7:831-836

**SCHULZE-OSTHOFF,K., D.FERRARI, S.WESSELBORG, und
M.E.PETER (1998):**

Apoptosis signaling by death receptors.

Eur.J.Biochem 254:439-459

SCHWARTZ,M.A., M.D.SCHALLER, und M.H.GINSBERG (1995):

Integrins: emerging paradigms of signal transduction.

Annu.Rev.Cell Dev.Biol 11:549-599

SEKO,Y., Y.TANAKA, und T.TOKORO (1995):

Influence of bFGF as a potent growth stimulator and TGF-beta as a growth regulator on scleral chondrocytes and scleral fibroblasts in vitro.

Ophthalmic Res. 27:144-152

SIMMONS,J.G., J.B.PUCILOWSKA, T.O.KEKU, und P.K.LUND (2002):

IGF-I and TGF-beta1 have distinct effects on phenotype and proliferation of intestinal fibroblasts.

Am J Physiol Gastrointest.Liver Physiol 283:G809-G818

SKUTEK,M. (2002a):

Zyklische mechanische Dehnung von humanen Patellarsehnenfibroblasten moduliert die Apoptoserate.

Habilitation MHH (eingereicht)

SKUTEK,M., M.VAN GRIENSVEN, J.ZEICHEN, N.BRAUER, und U.BOSCH (2001a):

Cyclic mechanical stretching modulates secretion pattern of growth factors in human tendon fibroblasts.

European Journal of Applied Physiology

SKUTEK,M., M.VAN GRIENSVEN, J.ZEICHEN, N.BRAUER, und U.BOSCH (2001b):

Mechanical stretching enhances secretion of interleukin 6 in human tendon fibroblasts.

Arthroscopy

SKUTEK,M., M.VAN GRIENSVEN, J.ZEICHEN, N.BRAUER, und U.BOSCH (2002b):

Cyclic mechanical stretching activates Stress-activated Protein Kinase/c-Jun NH₂-terminal Kinase in human patellar tendon fibroblasts.

eingereicht

SONG,J., M.TAKEDA, und R.I.MORIMOTO (2001):

Bag1-Hsp70 mediates a physiological stress signalling pathway that regulates Raf-1/ERK and cell growth.

Nat. Cell Biol 3:276-282

SONG,Z. und H.STELLER (1999):

Death by design: mechanism and control of apoptosis.

Trends Cell Biol 9:M49-M52

STRYER, L. (1994):

Biochemie.

Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag GmbH.

SUTKER, B.D., G.E. LESTER, und A.J. BANES (1990):

Cyclic strain stimulates DNA synthesis and collagen Synthesis in fibroblasts cultured from rat medial collateral ligaments.

Trans Orthop Res Soc 14:103-

TAGA, T. (1996):

Gp130, a shared signal transducing receptor component for hematopoietic and neuropoietic cytokines.

J Neurochem. 67:1-10

TAKAYAMA, S., D.N. BIMSTON, S. MATSUZAWA, B.C. FREEMAN, C. AIME-SEMPE, Z. XIE, R.I. MORIMOTO, und J.C. REED (1997):

BAG-1 modulates the chaperone activity of Hsp70/Hsc70.

EMBO J 16:4887-4896

TARTAGLIA, L.A., R.F. WEBER, I.S. FIGARI, C. REYNOLDS, M.A. PALLADINO, JR., und D.V. GOEDDEL (1991):

The two different receptors for tumor necrosis factor mediate distinct cellular responses.

Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A 88:9292-9296

TRAUTH, B.C., C. KLAS, A.M. PETERS, S. MATZKU, P. MOLLER, W. FALK, K.M. DEBATIN, und P.H. KRAMMER (1989):

Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis.

Science 245:301-305

TSUJIMOTO, Y. (1998):

Role of bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria.
Genes to Cells 3:697-707

VAN GRIENSVEN, M., J. ZEICHEN, M. SKUTEK, und U. BOSCH (2002):

Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-kappaB und des Protoonkogens c-fos in humanen Fibroblasten nach zyklischer mechanischer Dehnung.

In: *Tissue Engineering in der Orthopädie* by G. Bruns (Hrsg.)
Springer, Hamburg

VASKIVUO, T. E., F. STENBACK, und J. S. TAPANAINEN (2002):

Apoptosis and apoptosis-related factors Bcl-2, Bax, tumor necrosis factor-alpha, and NF-kappaB in human endometrial hyperplasia and carcinoma.
Cancer 95:1463-1471

VIEDT, C., J. VOGEL, T. ATHANASIOU, W. SHEN, S. R. ORTH, W. KUBLER, und J. KREUZER (2002):

Monocyte chemoattractant protein-1 induces proliferation and interleukin-6 production in human smooth muscle cells by differential activation of nuclear factor-kappaB and activator protein-1.

Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol 22:914-920

VOLLOCH, V., V. L. GABAI, S. RITS, und M. Y. SHERMAN (1999):

ATPase activity of the heat shock protein HSP72 is dispensable for its effects on dephosphorylation of stress kinase JNK and on heat-induced apoptosis.

FEBS Letters 461:73-76

VOLLOCH,V., V.L.GABAI, S.RITS, T.FORCE, und M.Y.SHERMAN

(2000):

HSP72 can protect cells from heat-induced apoptosis by accelerating the inactivation of stress kinase JNK.

Cell Stress.Chaperones. 5:139-147

VUORI,K. und E.RUOSLAHTI (1995):

Tyrosine phosphorylation of p130Cas and cortactin accompanies integrin-mediated cell adhesion to extracellular matrix.

J Biol Chem 270:22259-22262

WAHL,S.M. (1994):

Transforming growth factor beta: the good, the bad, and the ugly.

J Exp.Med 180:1587-1590

WAHL,S.M. (1999):

Transforming growth factor beta.

In: *Inflammation: basic principles and clinical correlates* by J.Gallin und R. Snyderman (Hrsg.)

Lippincott-Raven, 883-892

WAHL,S.M., D.A.HUNT, L.M.WAKEFIELD, N.MCCARTNEY-FRANCIS,

L.M.WAHL, A.B.ROBERTS, und M.B.SPORN (1987):

Transforming growth factor type beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production.

Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A 84:5788-5792

WAKEFIELD, L.M., T.S. WINOKUR, R.S. HOLLANDS,

K. CHRISTOPHERSON, A.D. LEVINSON, und M.B. SPORN (1990):

Recombinant latent transforming growth factor beta 1 has a longer plasma half-life in rats than active transforming growth factor beta 1, and a different tissue distribution.

J Clin. Invest 86:1976-1984

WANG, N., J.P. BUTLER, und D.E. INGBER (1993):

Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton.

Science 260:1124-1127

WHITE, E. (1996):

Life, death, and the pursuit of apoptosis.

Genes Dev. 10:1-15

WILSON, E., F. VIVES, T. COLLINS, und H.E. IVES (1998):

Strain-responsive regions in the platelet-derived growth factor-A gene promoter.

Hypertension 31:170-175

WOLF, B.B. und D.R. GREEN (1999):

Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases.

J Biol Chem 274:20049-20052

WRANA, J.L., L. ATTISANO, R. WIESER, F. VENTURA, und J. MASSAGUE (1994):

Mechanism of activation of the TGF-beta receptor.

Nature 370:341-347

WYLLIE,A.H., J.F.KERR, und A.R.CURRIE (1980):

Cell death: the significance of apoptosis.

Int Rev.Cytol. 68:251-306

XU,J., M.LIU, und M.POST (1999):

Differential regulation of extracellular matrix molecules by mechanical strain of fetal lung cells.

Am J Physiol 276:L728-L735

YAMAZAKI,T., K.TOBE, E.HOH, K.MAEMURA, T.KAIDA, I.KOMURO, H.TAMEMOTO, T.KADOWAKI, R.NAGAI, und Y.YAZAKI (1993):

Mechanical loading activates mitogen-activated protein kinase and S6 peptide kinase in cultured rat cardiac myocytes.

J Biol Chem 268:12069-12076

YIN,C., C.M.KNUDSON, S.J.KORSMEYER, und T.VAN DYKE (1997):

Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis in vivo.

Nature 385:637-640

YONEHARA,S., A.ISHII, und M.YONEHARA (1989):

A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor.

J Exp.Med 169:1747-1756

ZAMAN,G., M.Z.CHENG, H.L.JESSOP, R.WHITE, und L.E.LANYON (2000):

Mechanical strain activates estrogen response elements in bone cells.

Bone 27:233-239

ZEICHEN,J. (2002a):

Modulation zellulärer Reaktionen von humanen Fibroblasten unter dem Einfluß von zyklischer mechanischer Dehnung.

Habilitation MHH

ZEICHEN,J., M.SKUTEK, M.VAN GRIENSVEN, und U.BOSCH (2002b):

Hitzeschockprotein 72 (HSP 72) verstärkt die Streßtoleranz humaner Fibroblasten nach zyklischer mechanischer Dehnung.

In: *Tissue Engineering in der Orthopädie* by G.Bruns (Hrsg.)

Springer, Hamburg, S.

ZEICHEN,J., M.VAN GRIENSVEN, und U.BOSCH (2000):

The proliferative response of isolated human tendon fibroblasts to cyclic biaxial mechanical strain.

Am J Sports Med 28:888-892

ZHANG,W., J.OU, Y.INAGAKI, P.GREENWEL, und F.RAMIREZ (2000):

Synergistic cooperation between Sp1 and Smad3/Smad4 mediates transforming growth factor beta1 stimulation of alpha 2(I)-collagen (COL1A2) transcription.

J Biol Chem 275:39237-39245

ZHUANG,H., W.WANG, A.D.TAHERNIA, C.L.LEVITZ, W.T.LUCHETTI, und C.T.BRIGHTON (1996):

Mechanical strain-induced proliferation of osteoblastic cells parallels increased TGF-beta 1 mRNA.

Biochem.Biophys.Res.Commun. 229:449-453

ZILBERSTEIN,A., R.RUGGIERI, J.H.KORN, und M.REVEL (1986):

Structure and expression of cDNA and genes for human interferon-beta-2, a distinct species inducible by growth-stimulatory cytokines.

EMBO J 5:2529-2537

ZORATTI,M. und I.SZABO (1994):

Electrophysiology of the inner mitochondrial membrane.

J Bioenerg.Biomembr. 26:543-553

ZOU,H., Y.LI, X.LIU, und X.WANG (1999):

An apaf-1 cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9.

J Biol Chem 274:11549-11556

11 Lebenslauf

Tanja Barkhausen

geboren am 11. September 1973 in Hannover

Schulische Laufbahn:

- 1980-1984: Grundschule in Hagenburg
- 1984-1986: Orientierungsstufe in Steinhude
- 1986-1993: Hölty-Gymnasium Wunstorf

Studium:

- 1993-1999: Studiengang „Diplombiologie“ an der Universität Hannover
- 1998: Diplomprüfung in den Fächern Mikrobiologie, Genetik, Biochemie und Virologie
- 1999: Abschluß und Erwerb des Diploms mit der Arbeit: „Konstruktion und Charakterisierung einer RecA-negativen Mutante eines enterohämorrhagischen *E.coli* der Serogruppe O157:H7“
- seit 1999: Studiengang „Promotion Biologie“

Berufliche Laufbahn:

- seit 2000: Anstellung in der Unfallchirurgischen Klinik der Medizinischen Hochschule Hannover als wissenschaftliche Mitarbeiterin

12 Publikationsverzeichnis

BARKHAUSEN, T., M. VAN GRIENSVEN, J. ZEICHEN, und U. BOSCH (2001):

The effects of repetitive cyclic biaxial strain on proliferation and apoptosis of human tendon fibroblasts.

Tissue Engineering 7:665

VAN GRIENSVEN, M., J. ZEICHEN, M. SKUTEK, T. BARKHAUSEN, und U. BOSCH (2001):

The modulation of NO activation in human patellar tendon fibroblasts by cyclic mechanical strain.

Tissue Engineering 7:616

BARKHAUSEN, T., M. VAN GRIENSVEN, J. ZEICHEN, M. SKUTEK, und U. BOSCH (2001):

The effects of repetitive cyclic biaxial strain to proliferation and apoptosis of human tendon fibroblasts.

Langenbeck's Archives of Surgery 386:455

BARKHAUSEN, T., M. VAN GRIENSVEN, J. ZEICHEN, und U. BOSCH (2002):

Repetitive zyklische biaxiale Dehnung beeinflusst die Proliferations- und Apoptoserate sowie die FGF basic- und HSP 72-Produktion humaner Kniesehnenfibroblasten.

Der Unfallchirurg angenommen

KASTEN, P., M. BOHNER, T. BARKHAUSEN, R. LUGINBÜHL, M. VAN GRIENSVEN, C. KRETTEK, und U. BOSCH (2002):

Calcium-deficient hydroxyapatite: evaluation of a new biomaterial during cultivation with human bone marrow stromal cells.

eingereicht

13 Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre, daß ich die dem Fachbereich Chemie der Universität Hannover zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

**Die Modulation zellulärer Reaktionen humaner
Patellarsehnenfibroblasten durch repetitive, zyklische mechanische
Dehnung**

an der Medizinischen Hochschule Hannover

unter der Anleitung von Prof. Dr. W. Müller

mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft

selbständig verfaßt und keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Die vorliegende Dissertation ist von mir nicht bereits als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet worden.

Tanja Barkhausen

14Danksagung

Ich möchte mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Müller für die Übernahme des Referats bedanken sowie für die Möglichkeit, mir jederzeit Rat vor allem in organisatorischen Fragen einzuholen.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Martijn van Griensven, der sich als Korreferent zur Verfügung stellte und mir weiterhin in den 2 1/2 Jahren meiner Promotion helfend zur Seite stand, immer Zeit erübrigen konnte und für (fast) jedes Problem eine Lösung fand.

Herrn Prof. Krettek und Herrn Prof. Bosch danke ich für die Möglichkeit, meine Dissertation in der Unfallchirurgischen Klinik der MHH anfertigen zu können. Mittragsteller bei der DFG, über deren Mittel meine Stelle finanziert wurde, waren neben Prof. Bosch und Prof. van Griensven auch PD Dr. Johannes Zeichen und Dr. Michael Skutek, denen an dieser Stelle ebenfalls danken möchte.

Vielen Dank auch an Iris Albers und Nicole Brauer-Dewor, die große Teile der Zellkultur für mich übernahmen. Besonders freue ich mich über die Anstellung von Claudia Pütz, die seit ein paar Monaten Schwung in unser Laborleben bringt!

Ein besonders großes „Dankeschön“ geht auch an die Leute, die mir schon seit Beginn des Studiums, und zum Teil schon lange davor, zur Seite stehen und mich immer wieder aufgerichtet haben, wenn die Motivation mal abnahm: Pamela, Susanne, Anke, Marcello und Berit!

Mein letzter und größter Dank geht natürlich an meine Familie, die mich in all den Jahren immer unterstützt hat, mit denen ich die schwersten Zeiten überstanden habe und die auch jetzt immer noch sofort zur Stelle sind, wenn ich sie brauche.