

Aus der Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie,
Arbeitsbereich Orthopädie, Campus Benjamin Franklin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Komplementaktivierung in der Sehne
Wirkung des Anaphylatoxins C3a und des
***in-vitro* Sehnenverletzungsmodells auf Tendozyten**
vor dem Hintergrund der Sehnenheilung

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Georg Girke
aus Berlin

Datum der Promotion: 22.06.2014

INHALTSVERZEICHNIS

Abbildungsverzeichnis	1
Abstract	3
Zusammenfassung	5
1 Einleitung.....	7
1.1 Die Sehne.....	7
1.1.1 Makroskopische Sehnenstruktur.....	8
1.1.2 Mikroskopische Sehnenstruktur.....	9
1.1.3 Metabolismus, Innervation und Vaskularisierung	11
1.1.4 Epidemiologie und Sehnenheilung nach Ruptur	13
1.2 Das Komplementsystem	15
1.2.1 Aufbau und Funktion des Komplementsystems	15
1.2.2 Proinflammatorische Zytokine	18
1.2.3 Anaphylatoxine und Anaphylatoxinrezeptoren.....	19
1.2.4 Wirkung des Anaphylatoxins C3a auf andere Organe und Gewebe	19
1.2.5 Komplementmodulation durch Tendozyten.....	20
1.3 Fragestellung	21
2 Material.....	22
2.1 Chemikalien und Versuchsmaterialien	22
2.2 Medien und Puffer.....	23
2.3 Antikörper, Anaphylatoxine und Primer	23
2.4 Kits	24
2.5 Geräte.....	25
2.6 Software	25
3 Methodik.....	26
3.1 Zellkultur	26
3.1.1 Tendozytenisolierung aus humaner Sehne.....	26
3.1.2 Kryokonservierung und Auftauen der Tendozyten	27
3.1.3 Kultivierung und Passagierung der Tendozyten.....	27
3.1.4 Tendozytenzählung	28
3.1.5 Stimulationsversuch mit C3a	28
3.1.6 Stimulationsversuch im <i>in-vitro</i> Verletzungsmodell	28

3.1.7	Kostimulationsversuch mit C3a im <i>in-vitro</i> Verletzungsmodell	30
3.1.8	Time-lapse-Videodokumentation	31
3.1.9	Vitalitätsfärbung.....	31
3.1.10	Mitosenzählung	31
3.2	Genexpressionsanalysen.....	32
3.2.1	RNA-Isolation	32
3.2.2	RNA-Konzentrationsbestimmung.....	32
3.2.3	Reverse Transkription	33
3.2.4	Real Time Detection Polymerase Chain Reaction	33
3.2.5	Primereffizienzbestimmung	36
3.3	Immunfluoreszenzmikroskopie.....	37
3.3.1	Immunfluoreszenzfärbung	37
3.3.2	Immunfluoreszenzintensitätsauswertung	38
3.4	Histologische Färbungen	38
3.5	Statistik	39
3.6	Richtlinien	39
4	Ergebnisse.....	40
4.1	Time-lapse Experimente	40
4.1.1	Verlaufsbeobachtung des <i>in-vitro</i> Verletzungsmodells.....	40
4.1.2	Analyse des Mitoseverhaltens der Tendozyten im <i>in-vitro</i> Verletzungsmodell	41
4.2	Vitalitätsfärbung im Verletzungsassay.....	43
4.3	Genexpressionsanalysen.....	44
4.3.1	Auswirkung der Zellkulturpassage auf C3aR, CD46 und CD59	44
4.3.2	Auswirkung der Stimulation mit C3a auf Tendozyten.....	45
4.3.3	Auswirkung des Verletzungsassays auf Tendozyten	50
4.3.4	Auswirkung der kombinierten Stimulation von C3a und Verletzungsassay auf Tendozyten	53
4.4	Histologische Färbungen	56
4.5	Immunhistologische Färbungen	59
4.5.1	Immunfärbungen nativer Sehnenpräparate	59
4.5.2	Immunfärbung C3a-stimulierter Tendozyten	61
4.5.3	Immunfärbung von Tendozyten im Verletzungsassay.....	65
5	Diskussion	69
5.1	Expressionsveränderungen durch das Anaphylatoxin C3a.....	70
5.2	Time-lapse-Videodokumentation und Mitosenanalysen.....	75

5.3	Vitalitätsfärbung	76
5.4	Expressionsveränderungen durch das <i>in-vitro</i> Verletzungsmodell.....	77
5.5	Expressionsveränderungen durch die Kombination von C3a und Verletzungsmodell.	80
5.6	Histologische und immunhistologische Färbungen nativer Sehnen	84
6	Fazit und Ausblick	87
7	Abkürzungsverzeichnis.....	89
8	Literaturverzeichnis	90
	Eidesstattliche Erklärung	100
	Anteilerklärung an erfolgten Publikationen	101
	Lebenslauf.....	102
	Publikationsliste.....	104
	Danksagung	105

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Hamstring-Muskulatur:	7
Abbildung 2: Aufbau einer Sehne.....	8
Abbildung 3: Humane Fingersehne im Längsschnitt in einer Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung	9
Abbildung 4: Sehnenbestandteile.....	10
Abbildung 5: Das Komplementsystem.	16
Abbildung 6: Tendozytenemigration.....	26
Abbildung 7: <i>In-vitro</i> Verletzungsmodell Aufbau.	29
Abbildung 8: Das <i>in-vitro</i> Verletzungsmodell in der Zellkultur.....	30
Abbildung 9: Time-Lapse-Beobachtung des Verletzungsmodells im Brutschrank.	41
Abbildung 10: Bildserie einer Mitose im Verletzungsmodell.	42
Abbildung 11: Mitosenanalyse.	42
Abbildung 12: Vitalitätsfärbung von humanen Hamstring-Tendozyten.	43
Abbildung 13: Genexpressionsanalyse für C3aR, CD59 und CD46 in Abhängigkeit von der Zellkulturpassage.	44
Abbildung 14: Genexpressionsanalyse des C3a-Rezeptors bei C3a stimulierten Tendozyten nach 4 h und 24 h.....	46
Abbildung 15: Genexpressionsanalyse des C5a-Rezeptors bei C3a stimulierten Tendozyten nach 4 h und 24 h.....	46
Abbildung 16: Genexpressionsanalyse von CD46 bei C3a-stimulierten Tendozyten nach 4 h und 24 h.....	47
Abbildung 17: Genexpressionsanalyse von CD55 bei C3a-stimulierten Tendozyten.....	48
Abbildung 18: Genexpressionsanalyse von MMP-1 bei C3a-stimulierten Tendozyten.	48
Abbildung 19: Genexpressionsanalyse von TNF α bei C3a-stimulierten Tendozyten.....	49
Abbildung 20: Genexpressionsanalyse von IL-1 β bei C3a-stimulierten Tendozyten.....	49
Abbildung 21: Genexpressionsanalyse von IL-6 bei C3a-stimulierten Tendozyten.....	50
Abbildung 22: Genexpressionsanalyse des C3a- und C5a-Rezeptors bei <i>in-vitro</i> verletzten Tendozyten.	51
Abbildung 23: Genexpressionsanalysen von CD46 und CD55 bei <i>in-vitro</i> verletzten Tendozyten.	51
Abbildung 24: Genexpressionsanalyse von MMP-1 und TNF α bei <i>in-vitro</i> verletzten Tendozyten.....	52
Abbildung 25: Genexpressionsanalyse von IL-1 β bei <i>in-vitro</i> verletzten Tendozyten.	52
Abbildung 26: Genexpressionsanalyse von C3aR bei der kombinierten Stimulation von C3a (1 μ g/mL) und Verletzungsassay.	53
Abbildung 27: Genexpressionsanalyse des C5a-Rezeptor bei der kombinierten Stimulation von C3a (1 μ g/mL) und Verletzungsassay.....	54
Abbildung 28: Genexpressionsanalyse von CD55 bei der kombinierten Stimulation von C3a (1 μ g/mL) und Verletzungsassay.	54
Abbildung 29: Genexpressionsanalyse von TNF α bei der kombinierten Stimulation von C3a (1 μ g/mL) und Verletzungsassay.	55

Abbildung 30: Genexpressionsanalyse von MMP-1 bei der kombinierten Stimulation von C3a (1 µg/mL) und Verletzungsassay.	55
Abbildung 31: HE- und AB-Färbung einer gesunden humanen Fingersehne.....	56
Abbildung 32: HE- und AB-Färbung einer gequetschten humanen Fingersehne.....	57
Abbildung 33: HE- und AB-Färbung einer degenerierten humanen Achillessehne.....	58
Abbildung 34: HE- und AB-Färbung einer degenerierten humanen Fingersehne.	58
Abbildung 35: C5aR – Immunfluoreszenzfärbung humaner Sehnen.....	59
Abbildung 36: CD55 – Immunfluoreszenzfärbung humaner Sehnen.....	60
Abbildung 37: C5aR – Immunfluoreszenzfärbung kultivierter humaner Tendozyten.....	61
Abbildung 38: CD55 – Immunfluoreszenzfärbung kultivierter humaner Tendozyten.....	62
Abbildung 39: CD55 – Statistische Auswertung der absoluten Fluoreszenzintensität in kultivierten Tendozyten.....	63
Abbildung 40: C5aR – Statistische Auswertung der absoluten Fluoreszenzintensität in kultivierten Tendozyten.....	63
Abbildung 41: TNFα – Immunfluoreszenzfärbung kultivierter humaner Tendozyten.....	64
Abbildung 42: TNFα – Statistische Auswertung der absoluten Fluoreszenzintensität in kultivierten Tendozyten.....	65
Abbildung 43: C5aR – Immunfluoreszenzfärbung kultivierter, humaner Tendozyten.....	66
Abbildung 44: CD55 – Immunfluoreszenzfärbung kultivierter, humaner Tendozyten.....	67
Abbildung 45: CD55 – Statistische Auswertung der absoluten Fluoreszenzintensität in kultivierten Tendozyten.....	68
Abbildung 46: C5aR – Statistische Auswertung der absoluten Fluoreszenzintensität in kultivierten Tendozyten.....	68

ABSTRACT

Introduction: Human tendons have to sustain high mechanical stresses and strains and exhibit a typical hyporegenerative metabolism. The regulation of complement factors and cytokines by complement split fragments such as anaphylatoxins is completely unclear in tendons. The aim of this work was to investigate the interplay between the anaphylatoxin C3a, complement regulatory proteins and cytokines, which could be involved in tendon healing and scar formation. Furthermore, the impact of direct mechanical injuries of human tenocytes was characterized using an *in-vitro* Cell-Injury-System (CIS).

Methods: Primary human tenocytes were either treated with recombinant C3a or applied to the developed CIS. RTD-PCR analyses were performed to identify possible changes in gene expression of the anaphylatoxin receptors C3aR, C5aR, the complement regulatory proteins (CRP) CD46, CD55, the matrix metalloprotease MMP-1, the pro-inflammatory cytokines TNF α , IL-1 β , and IL-6 of C3a- and CIS-stimulated tenocytes in comparison to untreated controls. Immunohistological staining of tenocytes and paraffin sections of tendons allowed a semiquantitative evaluation of C5aR (CD88), CD55, TNF α and MMP-1. Statistic: students t-test, significance level $p < 0.05$.

Results: After stimulation with C3a, the gene expression of the C3aR and C5aR was significantly increased, whereas the expression of CD46, CD55 and MMP-1 was suppressed. For the proinflammatory cytokines TNF α and IL-1 β an induction of their gene expression could be observed. In the CIS the C3aR showed an enhanced gene expression, whereas C5aR was inhibited. Interestingly, the CRP CD46 and CD55 as well as MMP-1 displayed an increased gene expression in the CIS. The immunofluorescence staining revealed for the C5aR a reduced and for the CRP CD55 an elevated protein expression after injury in CIS, whereas after C3a stimulation C5aR and TNF α were elevated and CD55 was suppressed.

Conclusions: The induction of the anaphylatoxin receptors C3aR and C5aR by C3a, for C3aR also verified in the CIS, suggests an increased sensitivity of the tenocytes towards an activated complement system. Suppression of the complement inhibiting proteins CD46 and CD55 by C3a can probably enhance the complement activity. The

elevated gene expression of TNF α and IL-1 β could reflect a proinflammatory response of the tenocytes induced by C3a. Induced expression of cytoprotective CD46 and CD55 can possibly reduce an activation of the complement system in injured tendons. In summary, the present work shows a regulation of complement by complement split fragments and in injured cells. Dysregulated or activated complement could be a pathomechanism in tendon scar formation and diseases and needs to be further investigated.

ZUSAMMENFASSUNG

Einleitung: Humane Sehnen müssen hohen mechanischen Beanspruchungen standhalten und weisen einen hyporegeneratorischen Stoffwechsel auf. Die Regulation von Komplementfaktoren und Zytokinen durch Anaphylatoxine ist im Sehngewebe bislang unklar, könnte aber auf die Sehnenheilung und Narbenbildung Einfluss nehmen. Ziel dieser Arbeit ist es gewesen, den Einfluss der Aktivierung des Komplementsystems durch die Effekte des Anaphylatoxins C3a und durch eine direkte Verletzung von Tendozyten im *in-vitro* Sehnenverletzungsmodell (IVM) auf Tendozyten zu untersuchen.

Methodik: Für die Analysen wurden primäre humane Tendozyten mit dem Anaphylatoxin C3a und dem in dieser Arbeit entwickelten IVM behandelt. Es wurde eine RTD-PCR-Analyse der Genexpressionsveränderungen der Komplementrezeptoren C3aR (CD88), C5aR, der Matrix-Metalloprotease (MMP)-1, der Komplement regulatorischen Proteine (CRP) CD46, CD55 sowie der proinflammatorischen Zytokine TNF α , IL-1 β und IL-6 in mit C3a und IVM stimulierten Tendozyten im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen durchgeführt, n=4 für C3a, n=5 für IVM. Immunhistologische Färbungen ermöglichten eine semiquantitative Auswertung der Expression von C5aR, CD55, TNF α und MMP-1. Statistik: students t-test, Signifikanzniveau p<0,05.

Ergebnisse: Für den C3aR und C5aR konnte nach C3a-Stimulation eine Genexpressionsinduktion gezeigt werden. Die CRP CD46 und CD55 sowie die MMP-1 waren in ihrer Genexpression supprimiert. Für die proinflammatorischen Zytokine TNF α und IL-1 β konnte eine Genexpressionsinduktion nachgewiesen werden. Im IVM zeigte sich für den C3aR eine Induktion, während der C5aR im IVM in seiner Expression gehemmt wurde. Die komplementinhibitorischen Proteine CD46 und CD55 zeigten im IVM eine Expressionssteigerung. Auch konnte nachgewiesen werden, dass die Genexpression der MMP-1 durch die Verletzung induziert wurde. Die Immunfluoreszenzfärbungen konnten für den C5aR eine verminderte und für CD55 eine erhöhte Proteinexpression nach Verletzung nachweisen, während nach C3a-Stimulation die Expression von C5aR und TNF α erhöht und von CD55 supprimiert war.

Schlussfolgerungen: Die Induktion der Anaphylatoxinrezeptoren C3aR und C5aR durch C3a, für C3aR auch durch das IVM, spricht für eine erhöhte Sensitivität der Tendozyten

gegenüber einer Komplementaktivierung. Die Suppression der beiden komplementinhibitorischen Proteine CD46 und CD55 durch C3a kann einen, die Aktivität des Komplementsystems begünstigenden Effekt ausüben. Ferner deutet die Induktion der beiden proinflammatorischen Zytokine TNF α und IL-1 β eine durch C3a ausgelöste proinflammatorische Reaktion der Tendozyten an. Der Anstieg von zytoprotektivem CD46 und CD55 kann bei mechanischen Verletzungen eine Komplementaktivierung sowie die damit einhergehende chemotaktische Anlockung von immunkompetenten Zellen im Sehngewebe vermindern. Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit eine Regulation des Komplementsystems durch Komplementspaltprodukte sowie durch mechanische Verletzungen nachgewiesen werden. Eine Komplementdysregulation oder -aktivierung könnte als Pathomechanismus bei Sehnerkrankungen und Narbenbildung relevant sein und muss in zukünftigen Studien weiter erforscht werden.

1 EINLEITUNG

1.1 DIE SEHNE

Die Sehne ermöglicht die Kraftübertragung des Muskels auf den Knochen, sie verbindet den dynamisch muskulären mit dem statisch knöchernen Teil des Bewegungsapparats. Hierbei unterliegt sie hohen mechanischen Belastungen, beispielsweise hält eine humane Achillessehne einem Zug von 60-100 N/mm² stand, dies entspricht einer tragenden Last von 815 kg (Grafe 1969; Thermann 1998).

Für diese Arbeit wurden ausschließlich humane Sehnen untersucht, welche entweder als gesunde Präparate bei Kreuzbandtransplantationsplastiken als Überschuss anfielen oder welche als krankhaft veränderte Präparate nach Ruptur entnommen werden mussten. Bei den gesunden Sehnen handelte es sich um Sehnen der Hamstring-Muskelgruppe, auch genannt ischiocrurale Muskulatur, bestehend aus *Musculus (M.) semitendinosus*, *M. semimembranosus* und *M. biceps femoris* (Abb. 1).

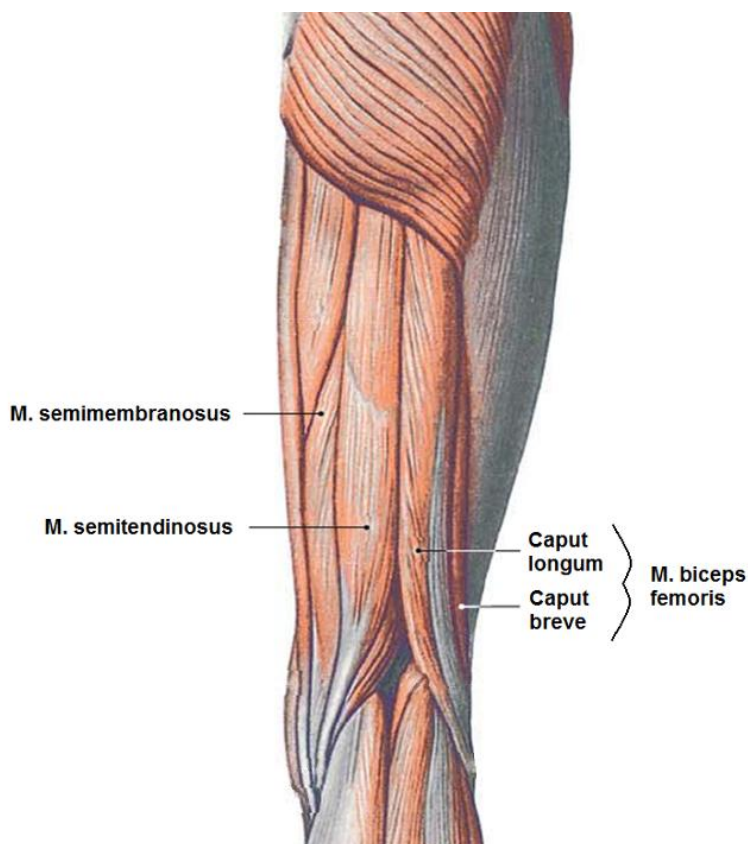


Abbildung 1: Hamstring-Muskulatur:
M. semitendinosus,
M. semimembranosus
und *M. biceps femoris*
modifiziert nach Tillmann (2005).

1.1.1 MAKROSKOPISCHE SEHNENSTRUKTUR

Gesunde Sehnen zeigen eine glänzende, weiße Oberfläche und sind von harter Konsistenz. Sie sind gegenüber orthogonal zur Zugrichtung verlaufenden Kräften und intratendinösen Scherkräften sehr empfindlich, daher bedarf es weiterer Strukturen, um auftretende Reibung und seitliche Belastung zu mindern und eine gleichmäßige Längsbelastung zu gewährleisten. Diese Umgebungsstrukturen werden in fünf Kategorien eingeteilt:

Als äußere Hülle der Sehne dient das Epitendon, ein fibröses Mantelgewebe, dessen Aufgabe es ist, die Sehne kompakt in ihrem Gleitbett zu halten (Abb. 2). An Umlenkpunkten, den sog. Hypomochlia, kann das Epitendon durch eine knorpelartige Wandverstärkung die seitliche Kraft auf eine größere Fläche verteilen und damit den seitlichen Druck auf die Sehne minimieren (Kannus 2000). Die Tertiärbündel unterteilen die gesamte Sehne in mehrere parallel laufende Bündel, damit eine ausreichende Flexibilität und Verschiebbarkeit gegeneinander besteht, um z.B. an Hypomochlia einem Brechen oder Einreißen der Sehne vorzubeugen. Das Tertiärbündel wird vom Endotendon umgeben (Abb. 2). Dieses Flexibilität vermittelnde Aufteilungsprinzip setzt sich fort in den Faszikeln und Subfaszikeln der Sehne, umgeben jeweils vom Endotendon. Ein Subfaszikel wiederum umfasst die Kollagenfasern, welche sich ihrerseits aus Kollagenfibrillen zusammensetzen (Kannus 2000).

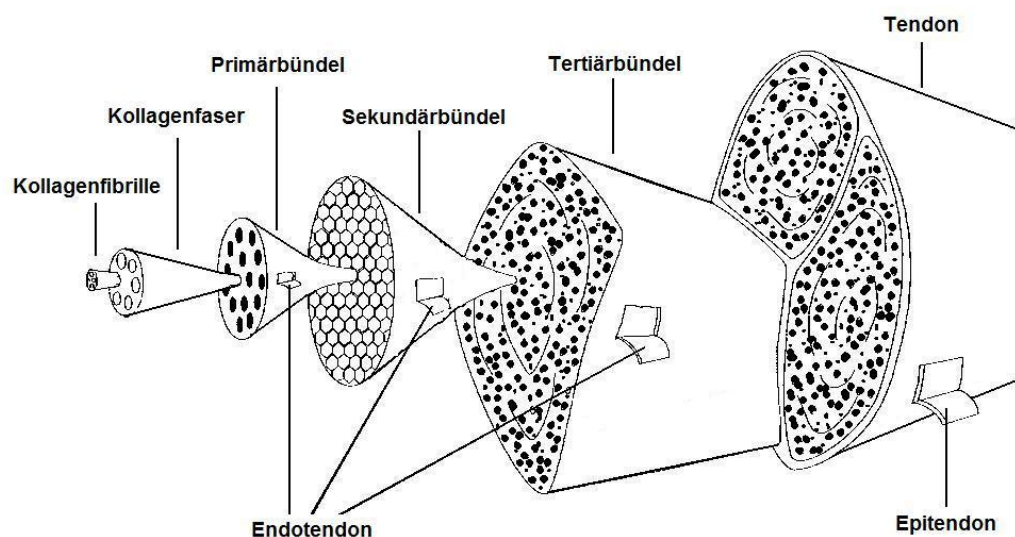


Abbildung 2: Aufbau einer Sehne. Darstellung ausgehend von dem kleinsten Bauelement, der Kollagenfibrille zur Kollagenfaser, welche Subfaszikel bildet und über Faszikel zu Tertiärbündeln als Elemente der Sehne zusammengefasst wird. Zeichnung modifiziert nach Kannus (2000).

1.1.2 MIKROSKOPISCHE SEHNENSTRUKTUR

Zwischen den Kollagenfasern befinden sich, strangartig angeordnet, langgestreckte Tendozyten mit einer Länge von 80-300 μm und länglichen Zellkernen (Abb. 3, gelber Pfeil), sie repräsentieren spezialisierte Fibroblasten und sind in der Lage Komponenten der extrazellulären Matrix zu synthetisieren und zu resorbieren (Birk and Trelstad 1984). Die Versorgung der Tendozyten erfolgt durch das Endotendon.

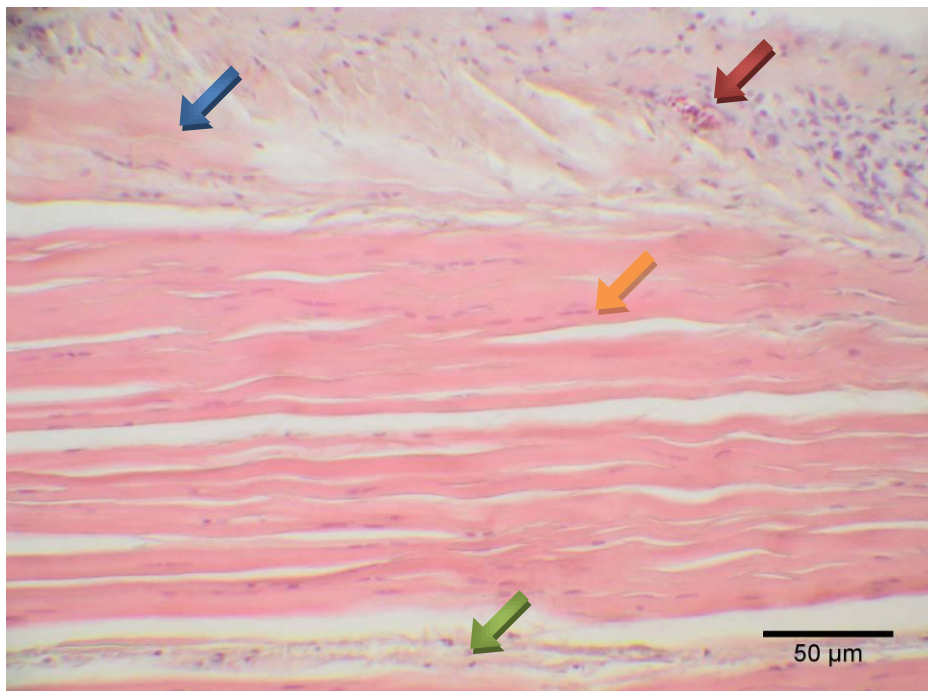


Abbildung 3: Humane Fingersehne im Längsschnitt in einer Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung, Messbalken 50 μm . Blauer Pfeil: Epitenon, roter Pfeil: Kapillare, gelber Pfeil: Tendozyten, grüner Pfeil: Endotendon.

Das Endotendon (grüner Pfeil) umschließt die Faszikel als lockeres, kollagenes Bindegewebe, in dem ebenfalls auch Blutkapillaren (roter Pfeil), Lymphgefäße und Nerven enthalten sind (Hoffmann and Gross 2007). Die Tendozyten exprimieren „gap junctions“ zur interzellulären Kommunikation auf ihren lang ausgestreckten, flügelartigen Zellfortsätzen.

Insgesamt besteht Sehnengewebe vom Trockengewicht ausgehend zu 70 % aus Kollagen (Abb. 4), wovon 95 % auf Kollagen Typ I entfallen und 5 % auf Kollagen Typ III und V (Hoffmann and Gross 2007). Zelluläre Bestandteile des Sehnengewebes bilden nur 5 % des Trockengewichts (Abb. 4) und setzen sich zu etwa 90 % aus Tendozyten und zu etwa 10 % aus Chondrozyten am tendo-ossären Übergang oder Endothelzellen der versorgenden Blutgefäße zusammen (Kannus 2000).

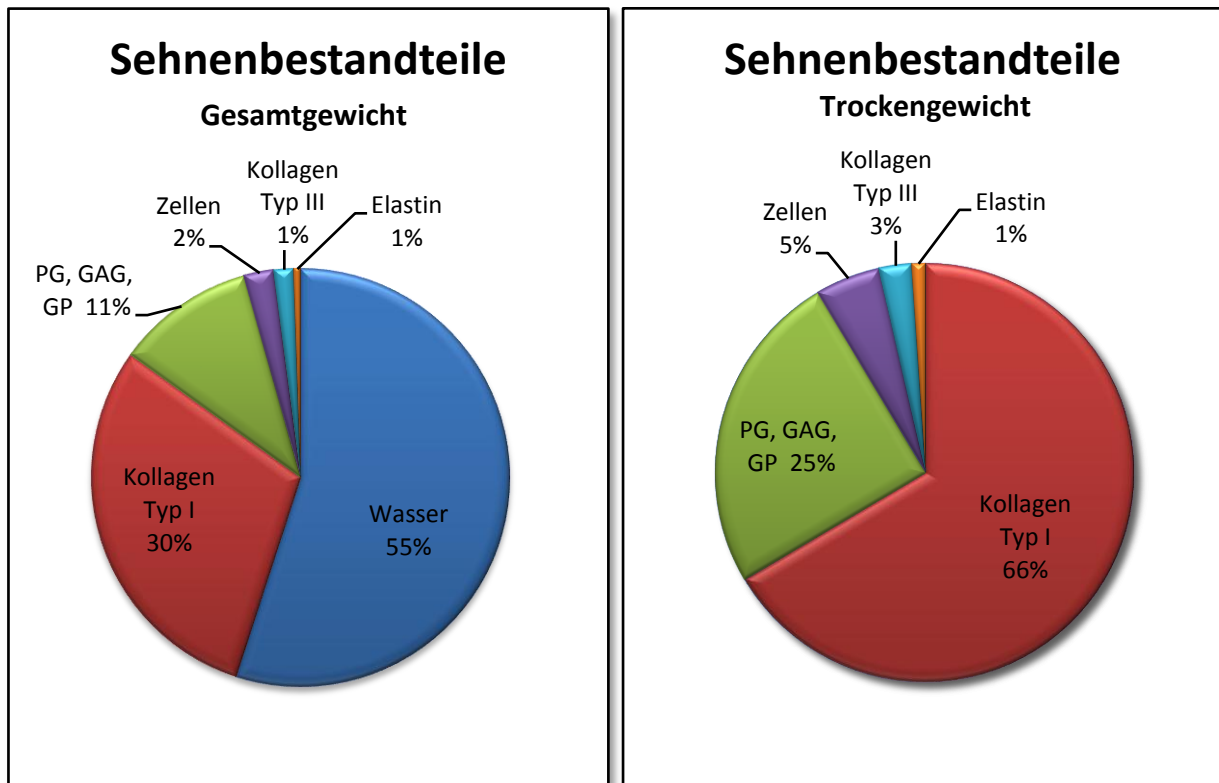


Abbildung 4: Sehnensbestandteile. Gezeigt ist links die Zusammensetzung der Sehnensbestandteile *in-vivo* aus Wasser, Kollagen Typ I und III, PG (Proteoglykanen), GAG (Glykosaminoglykanen) und GP (Glykoproteinen), Elastin, Tendozyten, Chondrozyten und Endothelzellen. Die rechte Grafik zeigt die relativen Anteile am Trockengewicht der Sehne. Daten von (Kannus 2000; Hoffmann and Gross 2007)

Die extrazelluläre Matrix (EZM) wird hauptsächlich durch Kollagene und Proteoglykane (PG) gebildet. Das Kollagen zeigt eine schraubenförmige Anordnung auf Ebene der Faszikel und Fibrillen, welche einerseits eine leichte Dehnbarkeit der Sehne ermöglicht und andererseits gegenüber longitudinalen Scherkräften die nötige Elastizität gewährleistet (Milz, Ockert et al. 2009). Eine Kollagenmikrofibrille zeichnet sich dabei durch fünf rechtsgängige Tripelhelices aus, welche sich aus jeweils drei linksgängigen Kollagenhelices zusammensetzen. Eine einzelne Kollagenhelix enthält dabei häufig die Tripeptidsequenz Glycin – Prolin – Hydroxyprolin. Die seitliche Stabilität erhält die Kollagenhelix durch das Vorkommen von Hydroxylysinresten, welche an Disaccharide anknüpfen und so eine seitliche Biegung der Helix einschränken (Löffler 2005).

Die Biosynthese der fibrillären Kollagenhelices erfolgt intra- und extrazellulär. Intrazellulär beginnt sie mit der Synthese der $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Prokollagen-Polypeptidketten, deren Lysyl- und Prolylreste durch Hydroxylasen Vitamin C-abhängig hydroxyliert und an Lysylresten mit Disacchariden verknüpft werden (Löffler 2005). Hierbei entsteht die Helixstruktur und es werden Disulfidbrücken zwischen den Helices am C-, bzw. N-

terminalen Ende eingefügt. In diesem Stadium erfolgt die Sekretion in den Extrazellulärraum, wo die Propeptide durch Peptidasen entfernt werden und sich jeweils fünf Tripelhelices zu einer Mikrofibrille zusammenlagern. Die EZM wird untereinander und mit dem Zellverbund über Fibronectin befestigt (Löffler 2005).

PG sind Makromoleküle, die aus Proteinen mit gebundenen Glykosaminoglykanen (GAG) bestehen. Sie können auf Grund ihrer starken anionischen Ladungen ein Vielfaches ihres Eigengewichts an Wasser binden und so der Sehne ihre viskoelastischen Eigenschaften verleihen (Matuszewski, Chen et al. 2012).

Als weiteres Bauelement geht Elastin im Sehnengewebe eine Komplexbildung mit Kollagen ein, es kann nur im Verbund mit Fibrillin elastische Fasern ausbilden (Smith, Vaughan-Thomas et al. 2011). Elastin ist leicht dehnbar und selbstständig rückstellend und daher maßgeblich für die Dämpfung plötzlicher Stöße und Zugkräfte in der Sehne verantwortlich (Smith, Vaughan-Thomas et al. 2011; UniProt_Consortium 2011).

1.1.3 METABOLISMUS, INNERVATION UND VASKULARISIERUNG

Die Tendozyten sind nicht nur für die Synthese des Kollagens, sondern auch für dessen Abbau verantwortlich. Ähnlich dem Knochenstoffwechsel zeigt die EZM der Sehnen auch ohne Verletzungen einen beständigen Umbau. Die durchschnittliche Halbwertszeit einer Kollagenfibrille beträgt 30-200 Tage (Löffler 2005). In diesem andauernden Erneuerungsprozess kann die Sehne sich den aktuellen lokalen und biomechanischen Anforderungen durch eine Regulation der am Kollagenabbau beteiligten Enzyme, den Matrix-Metalloproteinasen (MMP) anpassen. Die MMP werden von den Tendozyten selbst synthetisiert (Löffler 2005). Hierbei ist insbesondere die MMP-1 eine wichtige Kollagenase der Sehne (Fu, Chan et al. 2002). Die Regulation der MMP hat eine zentrale Bedeutung für den Erhalt oder Verlust der biomechanischen Eigenschaften der Sehne. Hierbei können auch exogene Faktoren, wie z.B. Zytokine im Rahmen proinflammatorischer Reaktionen, die physiologisch ablaufenden Umbauprozesse wesentlich beeinflussen. Eine gesteigerte Aktivität der MMP-1 konnte für Tendinopathien der Patellasehne bereits beschrieben werden (Fu, Chan et al. 2002). Inwiefern die MMP-1 auch durch die Aktivität des Komplementsystems in der Sehne beeinflusst werden kann, ist bislang unbekannt.

Zur Deckung ihres Energiebedarfs nutzen die Tendozyten drei Wege der zellulären Energiebereitstellung: Die aerobe Glykolyse mit Zitratzyklus, den oxidativen

Pentosephosphatweg und die anaerobe Glykolyse (Kannus 2000). Die Tendozyten sind durch ihre grundsätzlich niedrige metabolische Aktivität und ihren geringen Sauerstoffbedarf auch in der Lage langanhaltende Belastungen der Sehnen unter lokal hypoxischen Bedingungen auszuhalten, ohne dabei durch eine Ischämie Schaden zu nehmen (Vailas, Tipton et al. 1978).

Die Innervation der Sehne ist maßgeblich beteiligt an der Koordination der Motorik auf spinaler Ebene. Nahe dem tendomuskulären Übergang liegen die Golgi-Sehnenorgane, welche als mechanozeptive Afferenzen Informationen über die Änderung der Muskelspannung an das Motoneuron im Rückenmark über Ia-Fasern weiterleiten können. Golgi-Sehnenorgane bestehen aus stark verzweigten und marklosen Nervenendigungen, welche zwischen den Kollagenfaserbündeln liegen. Das Golgi-Sehnenorgan wird von einer bindegewebigen, 1 mm langen Kapsel umgeben. Mit einer phasisch-statischen Reizantwort übt es auf das Motoneuron der agonistischen Muskulatur eine disynaptisch inhibitorische Wirkung aus, wohingegen das Motoneuron der antagonistischen Muskulatur exzitatorisch erregt werden kann. Diese spinale Verschaltung stellt neben einer protektiven Begrenzung des Muskeltonus auch die Grundlage für die Muskeleigenreflexe dar (Lehmann-Horn 2007). Neben der Beteiligung an der motorischen Integration zeigt das Sehnengewebe auch eine Innervation der Gefäßwände (Bjur, Alfredson et al. 2005).

Das Sehnengewebe ist, verglichen mit anderen Geweben, gering vaskularisiert und wird, im Falle von intrasynovialen Sehnen, wesentlich durch die Synovialflüssigkeit ernährt (Fenwick, Hazleman et al. 2002). Feine Gefäße treten am tendoperiostalen und tendomuskulären Übergang in die Sehne ein und breiten sich in longitudinaler Richtung im Paratendon aus (Peacock 1959). Von dieser versorgenden Arterie treten orthogonal wiederum kleine Gefäße als Äste durch das Mesotendon hindurch in die Sehne hinein (Fenwick, Hazleman et al. 2002). Diese arterielle Versorgung erreicht nicht alle Bereiche der Sehnen, typische Regionen verminderter Vaskularisierung wurden vielfach in der Supraspinatussehne (Ling, Chen et al. 1990), in der Bizepssehne (Rathbun and Macnab 1970; Cheng, Pan et al. 2010) sowie in der Achillessehne (Stein, Laprell et al. 2000) und in der Patellasehne beschrieben (Clancy, Narechania et al. 1981). Diese hypovaskularisierten Bereiche werden als Prädilektionsstellen für typische Rupturen in Betracht gezogen (Yepes, Tang et al. 2008).

1.1.4 EPIDEMIOLOGIE UND SEHNENHEILUNG NACH RUPTUR

Die Inzidenz von Sehnenrupturen ist in den vergangenen Jahrzehnten deutlich angestiegen. Die häufigste und daher hier beschriebene Sehnenruptur ist heutzutage die Achillessehnenruptur, wozu die Zunahme der sportlichen Aktivität im höheren Alter maßgeblich beigetragen hat (Wills, Washburn et al. 1986). Die Inzidenz der Achillessehnenruptur liegt bei 12/100.000 Menschen pro Jahr (Leppilahti, Puranen et al. 1996). In der Studie von Majewski et al. (2002) lag das durchschnittliche Alter der Achillessehnenruptur bei 38 Jahren, wobei Männer ein erhöhtes Rupturrisiko von 9:1 gegenüber Frauen aufwiesen und 82,8 % der Rupturen sich beim Sport ereigneten. Bei 11,9 % der in dieser Studie untersuchten Achillessehnenrupturen konnten prädisponierende Faktoren, wie Achillodynie, Zustand nach Achillessehnenruptur auf der Gegenseite oder Reruptur sowie Zustand nach Kortisoninjektion nachgewiesen werden. Interessanterweise geht die Achillessehnenruptur bei der Betrachtung des durchschnittlichen Rupturalters den Rupturen anderer Sehnen, wie des *M. biceps brachii*, *M. quadriceps femoris*, *M. extensor pollicis longus* oder *M. supraspinatus* um 10 - 15 Jahre voraus (Thermann 1998). Spannend bleibt auch die von Thermann beschriebene Korrelation von Achillessehnenrupturen und Blutgruppen, hierbei wiesen 53,7 % der Patienten mit einer Achillessehnenruptur die Blutgruppe 0 auf.

Die histologische Betrachtung von Randschnitten frischer Rupturen bei Achillessehnen zeigte in 27,6 % der Fälle leichte bis schwere Degenerationen der Sehnen, weitere 5,8 % wiesen vorbestehende Vernarbungen und weitere 4,5 % Nekrosegebiete an der Rupturstelle auf (Majewski M 2002). Dahingehend beschrieb ebenfalls Thermann et al. (1998) in einer histologischen Untersuchung von Achillessehnen einer normalen Population bei 45 % hypoxische Veränderungen und 19 % mukoide Degenerationen.

Die nach der Ruptur einsetzende Heilungsphase gliedert sich in vier von Woo et al. (1999) beschriebene Stadien. Unmittelbar nach der Ruptur beginnt die hämorrhagische Phase mit dem Einstrom von Blut in das Rupturgebiet. Dabei werden Zytokine freigesetzt, welche wiederum immunkompetente Zellen, wie Lymphozyten und etwas später Makrophagen anlocken und somit in die inflammatorische Phase nach 24 - 48 h überleiten. In der inflammatorischen Phase beginnt auf der einen Seite der Abbau des alten, teils nekrotischen Sehnengewebes und auf der anderen Seite bereits der Aufbau von neuem Granulationsgewebe. Für den Abbau der alten EZM sind die MMP zuständig, in der Sehne sind mehrere Subtypen exprimiert. Insbesondere ist

hierbei die MMP-1 relevant, da sie in der Lage ist, nahezu alle Kollagene zu spalten (Del Buono, Oliva et al. 2012). Die Makrophagen phagozytieren dabei nekrotisches Gewebe und sind in der Lage Wachstumsfaktoren auszuschütten, die die Neovaskularisation induzieren. Die dritte Phase der Rupturheilung wird nach einer Woche erreicht, hier treten Fibroblasten ein und beginnen mit der Synthese von Kollagen und weiteren Matrixproteinen. Die abschließende vierte Phase zeichnet sich durch die bereits aus der Adoleszenz bekannten Veränderungen der Sehne aus, der Zellgehalt des neuen Sehnengewebes geht zurück, die Sehne gewinnt an Zugfestigkeit und die Dichte der Matrix nimmt zu. Auch die Kollagenzusammensetzung entspricht wieder weitgehend der bekannten Dominanz von Kollagen Typ I. Nach mehreren Monaten ist dieser letzte Reparaturschritt beendet und das Sehnengewebe wieder voll einsatzfähig (Woo, Hildebrand et al. 1999). Aus diesem Phasenmodell begründet sich auch die mehrwöchige Ruhigstellung der Sehne bei konservativer Therapie der Sehnenruptur. Die Stabilität und Funktionalität des posttraumatisch gebildeten Gewebes wird durch den individuellen Verlauf der Heilungsphasen wesentlich beeinflusst. Typischerweise kann eine traumatische Verletzung eines Gewebes auch mit einer Aktivierung des Komplementsystems einhergehen (Hietbrink, Koenderman et al. 2006). Hierbei vermitteln apoptotische Zellen, Neoepitope sowie Fragmente extrazellulärer Matrix die Komplementaktivierung (Fishelson, Attali et al. 2001). Für mehrere Gewebe konnte eine spezifische Komplementaktivierung infolge mechanischer Traumata bereits beschrieben werden, zum Beispiel bei traumatischen Verletzungen des Gehirns (Bellander, Singhrao et al. 2001). Auch im muskuloskeletalen Gewebe kommt der Komplementaktivität eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Arthrose nach Knorpelschaden und Arthritiden zu (John, Stahel et al. 2007; Wang, Rozelle et al. 2011). Mögliche Einflüsse des Komplementsystems auf das Outcome von Sehnenverletzungen sind ebenfalls denkbar und daher nachfolgend von besonderem Interesse.

1.2 DAS KOMPLEMENTSYSTEM

1.2.1 AUFBAU UND FUNKTION DES KOMPLEMENTSYSTEMS

Das Komplementsystem ist ein Teil der angeborenen Immunabwehr und besteht aus mehreren Proteinen, welche als Faktoren in einer Kaskade aktiviert werden können und letztlich einen Proteinkomplex bilden, der in der Lage ist infektiöse Erreger abzutöten (Dunkelberger and Song 2010). Hierbei ist dem Komplementsystem diese Fähigkeit schon bereits zu Beginn des Lebens gegeben und muss im Vergleich zu der adaptiven Immunabwehr nicht erst erworben werden (Dunkelberger and Song 2010). Das Komplementsystem besteht aus den neun Faktoren C1-C9 sowie den Kofaktoren B, D und P. Die Faktoren des Komplementsystems werden in der Leber synthetisiert (Dunkelberger and Song 2010). Ziel der Aktivierung ist die Bildung eines Membranangriffskomplexes (MAC), welcher in der Lage ist sich in die Zellmembran der pathogenen Zelle einzubauen und somit ein Loch in die Membran einzubringen (Ricklin, Hajishengallis et al. 2010). Dadurch verliert die Zelle ihr Zytosol und stirbt ab (Ricklin, Hajishengallis et al. 2010). Die folgende Abbildung (Abb. 5) stellt die wesentlichen Faktoren und Kofaktoren des Komplementsystems in der Kaskade ihrer Aktivierung dar.

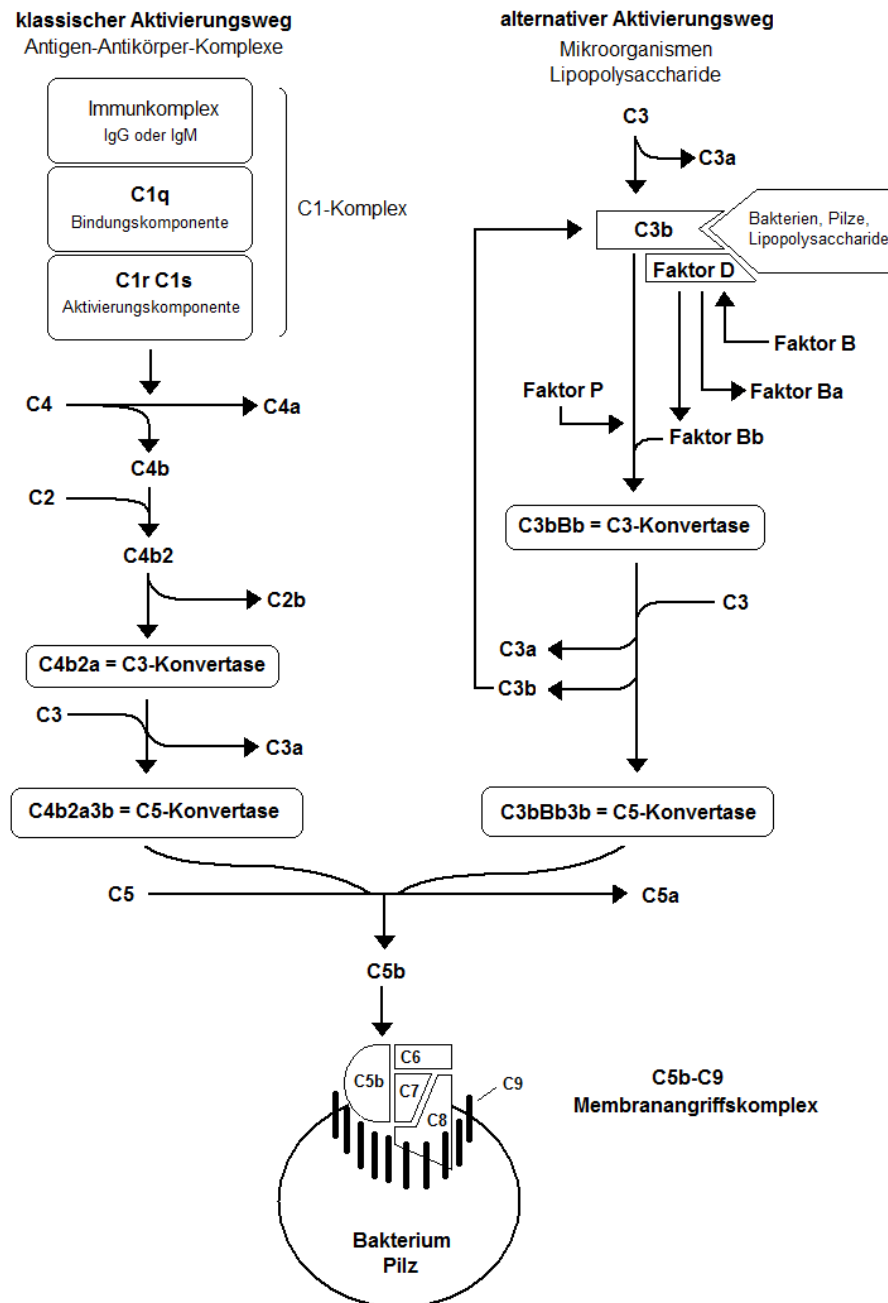


Abbildung 5: Das Komplementsystem. Die Abbildung zeigt die Aktivierungskaskade im Komplementsystem des klassischen und alternativen Aktivierungswegs. Quelle: eigene Abbildung auf der Grundlage der Darstellung des Komplementsystems unter www.laborlexikon.de (Laborlexikon 2011).

Der klassische Aktivierungsweg erfordert einen Antikörper-Antigen-Komplex, der aus dem abzutötenden Bakterium und einem Antikörper der Klasse IgG oder IgM besteht. Über die Bindungskomponente C1q und die Aktivierungskomponente C1rC1s wird der Antikörper-Antigen-Komplex gebunden (Gulbins 2007; Laborlexikon 2011). Der nun vorliegende C1-Komplex kann mit seiner Proteaseaktivität C4 zu C4b spalten. Das freiwerdende C4b induziert die Aktivierung von C2 zu C2b und übt nebenbei noch als Opsonin eine Induktion der Phagozytose aus. Der C4b2a-Komplex wird auch als C3-

Konvertase des klassischen Aktivierungswegs bezeichnet, er ist für die zentrale Spaltung des C3 zu C3a und C3b verantwortlich. Mit C3b kann die C5-Konvertase bestehend aus C4b2a3b gebildet werden, welche in der gemeinsamen Endstrecke des Komplementsystems den Faktor C5 zu C5a und C5b spaltet (Walport 2001; Huppelsberg 2005; Gulbins 2007).

Der alternative Aktivierungsweg erfordert nicht die Präsenz eines Antikörpers, er wird initiiert durch das Opsonin C3b, welches die Oberflächenpolysaccharide der mikrobiellen Zelle erkennt und bindet (Gulbins 2007; Dunkelberger and Song 2010). In Anwesenheit des Kofaktors D kann der Kofaktor B zu dem Kofaktor Ba und Bb gespalten werden. Der Kofaktor P (Properdin) ist an der Initiation beteiligt und stabilisiert die Konvertasen des alternativen Weges (Dunkelberger and Song 2010). Die C3-Konvertase des alternativen Aktivierungsweges bildet sich aus dem C3bBb-Komplex und spaltet den Faktor C3 zu C3a und C3b (Gulbins 2007). Hierbei kann das freiwerdende C3b bereits weitere mikrobielle Erreger opsonieren und so das Wirkungspotential des Komplementsystems vervielfachen. Weiter geht die Aktivierung des alternativen Weges über die erneute C3b-Anlagerung, sodass der C3bBb3b-Komplex mit einer aktiven Proteaseaktivität entsteht (Gulbins 2007). Auf der Ebene der Spaltung des Faktors C5 zu C5a und C5b tritt auch der alternative Aktivierungsweg in die gemeinsame Endstrecke des Komplementsystems ein (Huppelsberg 2005; Gulbins 2007; Dunkelberger and Song 2010).

Eine dritte Aktivierungsmöglichkeit des Komplementsystems ist der Lektin-vermittelte Weg. Dieser Weg gleicht weitgehend dem klassischen Aktivierungsweg, nur bindet C1 hierbei ohne einen Antikörper an Oberflächen mikrobieller Keime (Walport 2001; Dunkelberger and Song 2010). Nötig für die Aktivierung auf Grund des nicht vorhandenen Antikörpers sind Struktur-erkennende-Moleküle (SEM), die Ficoline (Ficolin 1-3), welche spezifische Kohlenhydratstrukturen auf der Oberfläche der pathogenen Keime erkennen und mit dem Mannose-bindenden Lektin und einer assoziierten Serinprotease eine ähnliche funktionelle Eigenschaft wie die Bindungs- und Aktivierungskomponenten C1q und C1s des klassischen Weges erreichen (Dunkelberger and Song 2010; Ricklin, Hajishengallis et al. 2010). Der Lektin-Aktivierungsweg stellt eine Ergänzung des klassischen Aktivierungsweges dar und steigert die Effizienz der Konvertasen des Kaskadensystems (Ricklin, Hajishengallis et al. 2010).

Gemeinsam ist allen drei Aktivierungswegen die Synthese des C5b-Fragments, welches sich mit den Faktoren C6, C7, C8 und C9 zu dem MAC zusammenlagert. Der

MAC dringt in die Zellmembran des Keimes ein und lässt über seine zentrale Öffnung das Zytosol des Erregers ausströmen. Der Keim wird infolgedessen schwer geschädigt und stirbt ab (Walport 2001; Gulbins 2007; Ricklin, Hajishengallis et al. 2010).

1.2.2 PROINFLAMMATORISCHE ZYTOKINE

Neben der Aktivierung des Komplementsystems können auch Zytokine einen wesentlichen Einfluss auf eine proinflammatorische Reaktion in der Sehne haben. So konnte beispielsweise nachgewiesen werden, dass TNF α eine starke Induktion des C3a-Rezeptors auf Tendozyten und Interleukin (IL)-6 eine verminderte Expression der komplementinhibitorischen Proteine CD46 und CD55 bewirken kann (Busch, Girke et al. 2012). Daher sind die sich andeutenden, vielfältigen Interaktionen zwischen den proinflammatorischen Zytokinen und dem Komplement für diese Arbeit von Bedeutung.

Proinflammatorische Zytokine sind Signalstoffe, welche den Beginn einer inflammatorischen Reaktion koordinieren, immunkompetente Zellen an den Ort der Entzündung leiten und die Kommunikation zwischen ihnen steuern. Als Vertreter der proinflammatorischen Zytokine kommen in den folgenden Experimenten der Tumor Nekrose Faktor (TNF)- α , IL-1 β und IL-6 zum Einsatz. TNF α wird hauptsächlich von Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, Monozyten sowie T-Zellen und natürlichen Killer-Zellen sezerniert, sofern diese zuvor durch bakterielle Lipopolysaccharide aktiviert wurden (Tsuzaki, Guyton et al. 2003; Hosaka, Kirisawa et al. 2005). TNF α verfügt über ein breites Wirkspektrum, neben einer TNF α -induzierten gesteigerten Phagozytoseaktivität und Zytotoxizität neutrophiler Granulozyten ist hierbei auch die wachstumsfördernde Wirkung auf Fibroblasten sowie die Induktion der MMP in Fibroblasten interessant. Ferner werden auch Osteoklasten durch TNF α aktiviert (Ibelgaufts 2011). Die proinflammatorischen Zytokine TNF α , IL-1 β und IL-6 werden ebenfalls in Sehnenzellen exprimiert (Tsuzaki, Guyton et al. 2003; Tohyama, Yasuda et al. 2007). IL-1 β weist in verletzten Sehnen im Kaninchenmodell eine gesteigerte Expression auf (Berglund, Hart et al. 2007). IL-1 β selbst induziert eine proinflammatorische Reaktion in den Tendozyten, welche sich in einer Aktivitätszunahme der Cyclooxygenase (COX)-2 und des Prostaglandins E₂ widerspiegelt (Tsuzaki, Guyton et al. 2003). Auch wird durch IL1 β der Abbau der Sehnenmatrix durch die Induktion der MMP beschleunigt (Corps, Harrall et al. 2002). IL-6 kann durch eine Stimulation der Tendozyten mit TNF α und IL-1 β hochreguliert und

bei mechanischen Belastungen der Tendozyten verstärkt freigesetzt werden (Skutek, van Griensven et al. 2001; Tsuzaki, Guyton et al. 2003).

1.2.3 ANAPHYLATOXINE UND ANAPHYLATOXINREZEPTOREN

Bei der Aktivierung des Komplementsystems werden kleine Spaltprodukte der Komplementfaktoren frei, es sind die Anaphylatoxine C2a, C3a, C4a und C5a. Die Anaphylatoxine besitzen eine chemotaktische Wirkung auf Leukozyten, welche angelockt und aktiviert werden (Dunkelberger and Song 2010; Ricklin, Hajishengallis et al. 2010). Weiterhin sind die Anaphylatoxine in der Lage, Mastzellen an den Ort der Entzündung zu leiten, Mastzellen sezernieren als Entzündungsmediatoren Leukotriene und Histamin (Wetsel 1995). Histamin sorgt in den regionalen Blutgefäßen für eine Dilatation, durch die die Geschwindigkeit des Blutstroms herabgesetzt und so die Diapedese der Leukozyten erleichtert wird (Wetsel 1995; Huppelsberg 2005).

1.2.4 WIRKUNG DES ANAPHYLATOXINS C3A AUF ANDERE ORGANE UND GEWEBE

In anderen Organen und Gewebewarten ist vielfach eine Beeinflussung durch das Anaphylatoxin C3a beschrieben worden. So wurde zum Beispiel in renalen Tubulusepithelzellen und Makrophagen für das Anaphylatoxin C3a eine Induktion der Expression von IL-1, IL-6 und IL-8 *in-vitro* nachgewiesen. Die Abwesenheit des C3a-Rezeptors in C3aR-negativen Mäusen führte dabei zu einer verminderten zellulären Infiltration in postischämisches Nierengewebe (Peng, Li et al. 2012). Wenderfer und Kollegen (2009) konnten jedoch für den systemischen Lupus erythematodes am C3aR-negativen Mausmodell eine frühere Nierenbeteiligung messen. Auch konnten sie einen erhöhten Titer an Anti-Doppelstrang-DNA-Antikörpern im Vergleich zur C3aR-normalen Kontrollgruppe nachweisen. Wenderfer und Kollegen postulierten daher eine protektive Wirkung der C3a-Rezeptoraktivierung. Aus kardiologischer Sicht konnte gezeigt werden, dass erhöhte Serumspiegel von C3a mit einer ungünstigeren Prognose bei Herzinsuffizienz vergesellschaftet sind, wobei eine signifikante Assoziation von peripheren Ödemen und höheren C3a-Serumwerten nachgewiesen werden konnte (Gombos, Forhecz et al. 2012). Weiterhin konnten Muscari und Kollegen (1995) bei erhöhten Serumwerten des Komplementfaktors C3 ein signifikant erhöhtes Risiko für einen Myokardinfarkt bei Männern nachweisen. Der Zusammenhang zwischen der

Inzidenz von Diabetes mellitus und C3 wurde ebenfalls in der Fachliteratur beschrieben. Ein erhöhter Serumspiegel von C3 war hierbei prospektiv mit einer signifikant erhöhten Inzidenz von Diabetes mellitus Typ II assoziiert, sofern andere Confounder, wie ein hoher Body-Mass-Index (BMI) oder bereits erniedrigte Insulinspiegel ausgenommen werden (Engström, Hedblad et al. 2005). Ebenso waren es Engström und Kollegen (2007), die in einer longitudinalen Kohortenstudie an 1719 Männern über 15 Jahre eine Zunahme an systolischen und diastolischen Blutdruckwerten bei gleichzeitig steigendem Komplementfaktor C3 nachweisen konnten. Ferner ist das Komplementsystem auch maßgeblich an der Entstehung der Immunkomplex-vermittelten Arthritis beteiligt, bei der Banda und Kollegen (2010) eine deutliche Anreicherung des Anaphylatoxins C3a beobachten konnten.

1.2.5 KOMPLEMENTMODULATION DURCH TENDOZYTEN

Tendozyten exprimieren mit CD46 und CD55 komplementregulatorische Membranproteine (CRP) (Busch, Girke et al. 2012), welche in der Lage sind, die Aktivität des Komplementsystems zu vermindern. CD46 kann dabei als Kofaktor der Faktor I-vermittelten Inaktivierung von C3b und C4b die Bildung der C3-Konvertase verhindern (Dunkelberger and Song 2010). Anhand anderer Zelltypen konnte gezeigt werden, dass die Bildung des C3bBb-Komplexes direkt durch CD55 blockiert wird, wodurch die C3-Konvertase im alternativen Weg inhibiert wird und es zu einer reduzierten Aktivität des MAC kommt (Dunkelberger and Song 2010).

1.3 FRAGESTELLUNG

Eine Komplementaktivierung könnte Prozesse wie die Sehnenheilung, Narbenbildung und entzündliche Sehnenerkrankungen beeinflussen. Allerdings gibt es bislang keine Untersuchungen, die die Auswirkungen einer Komplementaktivierung in der Sehne beschreiben. Die vorliegende Arbeit verfolgte daher zwei wesentliche Ziele. Auf der einen Seite sollte zunächst die Auswirkung der Aktivierung des Komplementsystems auf inflammatorische und komplementregulatorische Proteine von Tendozyten charakterisiert werden. Dazu wurde das bei der Komplementaktivierung freiwerdende Anaphylatoxin C3a zur *in-vitro* Stimulation von humanen Tendozyten ausgewählt. Auf der anderen Seite sollte der Einfluss einer rein mechanischen Verletzung einer Tendozytenkultur auf die Komplementexpression im *in-vitro* Verletzungsmodell analysiert werden. Dazu wurde ein standardisierbarer Verletzungssassay etabliert. Die wesentlichen Ergebnisse der mittels RTD-PCR gewonnenen Genexpressionsanalysen wurden auf Proteinebene durch semiquantitative Analysen von Immunfluoreszenzfärbungen verifiziert. Welchen Einfluss eine mechanische Verletzung von Sehnenzellen und eine parallel stattfindende Komplementaktivierung auf Sehnenzellen ausübt, sollte durch eine Kombination der bisher separat angewandten Methoden der C3a-Stimulation und des Verletzungsmodells analysiert werden. Ferner sollten auch histologische Färbungen nativer und pathologisch veränderter Sehnen angefertigt werden, um diese vor dem Hintergrund der aus der Zellkultur gewonnenen *in-vitro* Ergebnisse betrachten zu können. Zur Verlaufsbeobachtung einer Sehnenzellkulturverletzung sollte ein Time-lapse-Mikroskop gebaut werden. Damit konnte über 24 h ein Film der verletzten Zellkultur erstellt werden und das Mitoseverhalten der verletzten Tendozyten im Vergleich zu unbehandelten Sehnenzellen ausgewertet werden. Um das Überleben der Sehnenzellen nach einer Verletzung dokumentieren zu können, wurden Vitalitätsfärbungen durchgeführt.

Es stellt sich daher die Frage, inwieweit sowohl eine Komplementaktivierung als auch eine Verletzung *in-vitro* einen Effekt auf Tendozyten ausüben kann und inwiefern sich daraus eine Aussage zu einer möglichen Beeinflussung des Heilungsverhaltens von Tendozyten bei Sehnenrupturen ableiten lässt.

2 MATERIAL

2.1 CHEMIKALIEN UND VERSUCHSMATERIALIEN

Chemikalie

β-Mercaptoethanol
 Alcianblau 8GX, 1 %
 DMEM (Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium)
 DMSO (Dimethylsulfoxid)
 Eselserum (Donkey-Serum)
 Essentielle Aminosäuren, 50x MEM-AS
 Essigsäure, 96 %
 Ethanol, 70 %
 Ethidiumbromidlösung, 10 mg/mL
 FKS (fetales Kälberserum)
 Fluoresceindiacetat
 Fluoromount
 Gentamycin
 Ham´s F12
 Paraformaldehyd, 4 %
 Partricin, 50 µg/mL
 Penicillin / Streptomycin, 10 mg/mL
 Phosphate Buffered Saline (PBS)
 Roticlear
 TRIS (Trishydroxymethylaminomethan)
 Triton X-100
 Trypanblau, 1 %
 Trypsin / EDTA
 Vitamin C (25 mg/mL)

Firma

Sigma-Aldrich, USA
 Carl Roth GmbH, DE
 Biochrom AG, DE
 Carl Roth GmbH, DE
 Chemicon, USA
 Biochrom AG, DE
 Merck KGaA, DE
 Merck KGaA, DE
 Carl Roth GmbH, DE
 Biochrom AG, DE
 Sigma-Aldrich, USA
 Southern Biotech, USA
 Biochrom AG, DE
 Biochrom AG, DE
 Carl Roth GmbH, DE
 Biochrom AG, DE
 Biochrom AG, DE
 Biochrom AG, DE
 Carl Roth GmbH, DE
 Merck KGaA, DE
 Sigma-Aldrich, USA
 Biochrom AG, DE
 Biochrom AG, DE
 Sigma-Aldrich, USA

Versuchsmaterial

Zellkulturflasche Cell plus T175
 Zellkulturplatte Cell plus 6-Well
 Objektträger und Deckgläser
 Scraper 24 cm
 Spritzen Plastipak und Kanülen 22G

Firma

Sarstedt AG, DE
 Sarstedt AG, DE
 Menzel, DE
 TPP, CH
 BD, ES

2.2 MEDIEN UND PUFFER

Immunfluoreszenzfärbungen

TBS-Puffer, 1x

0,05 M TRIS
0,015 M NaCl
in Reinstwasser, pH 7,6

Blockierungsmedium

5 % Eseserum
0,1 % Triton X-100
94,9 % 1x TBS

Pronase-Lösung

5 mg/mL Pronase
in 1x TBS
frisch ansetzen

Zellkultur

DMEM / Ham's-Medium

48 % Ham's F12
48 % DMEM
1 % essentielle Aminosäuren
1 % Partricin
1 % Penicillin / Streptomycin
1 % Vitamin C

Kultivierungsmedium

90 % DMEM / Ham's-Medium
10 % FKS

Stimulationsmedium

99,5 % DMEM / Ham's-Medium
0,5 % FKS

Poly-L-Lysin-Lösung

99 % PBS
1 % Poly-L-Lysin

Einfriermedium

90 % FKS
10 % DMSO

2.3 ANTIKÖRPER, ANAPHYLATOXINE UND PRIMER

Primäre Antikörper der Immunfluoreszenzmarkierung

mAK-goat-anti-TNF α

mAK-mouse-anti-C5aR (CD88)

pAK-goat-anti-CD55

goat-IgG1-Isotyp

mouse-IgG1-Isotyp

mAK-mouse-anti-MMP-1

mAK-mouse-anti-C3

mAK-mouse-anti-C5

Repro Tech, DE

GeneTex, USA

R&D Systems, USA

Invitrogen AG, USA

Invitrogen AG, USA

R&D Systems, USA

Abcam plc, UK

Abcam plc, UK

Sekundäre Antikörper der Immunfluoreszenzmarkierung

donkey-anti-goat-IgG-Alexa Fluor 488	Invitrogen AG, USA
donkey-anti-mouse-IgG-Alexa Fluor 488	Invitrogen AG, USA
donkey-anti-rabbit-IgG-Alexa Fluor 488	Invitrogen AG, USA

Anaphylatoxin

C3a human	Complement Technology Inc., USA
-----------	---------------------------------

Primer

Gen	Firma	Amplifikat	Vor- / Rückwärtsprimer	NCBI Genreferenz	Bande
β-Aktin	Qiagen	147bp	TGGGACGACATGGAGAA GAAGGTCTCAAACATGATCTGG	NM_001101.2	7p15-p12
C5aR	Qiagen	95bp	TGCCATCTGGTTCCTCAA GCCAGTGGTGATGCTGTA	NM_001736.3	19q13.3
β-Aktin	ABI	171bp	*	NM_001101.2	7p15-p12
C3aR	ABI	82bp	*	NM_004054.2	12p13.31
CD46	ABI	94bp	*	NM_172351.1	1q32
CD55	ABI	62bp	*	NM_000574.2	1q32
CD59	ABI	70bp	*	NM_203331.1	11p13
TNFα	ABI	80bp	*	NM_000594.2	6p21.3
IL-1β	ABI	94bp	*	NM_000576.2	2q14
IL-6	ABI	95bp	*	NM_000600.3	7p21
MMP-1	ABI	133bp	*	NM_001145938.1	11q22.3

* Die Primersequenzen der Firma ABI stehen nicht zur Verfügung.

2.4 KITS

Verfahren	Kit / Firma
RNA-Isolation	RNeasy Mini Kit, Qiagen, DE
cDNA-Synthese	Quantitec Reverse Transcription Kit, Qiagen, DE
PCR	TaqMan Gene Expression Assay, Applied Biosystems, USA Quantitec Gene Expression Assay, Qiagen, DE

2.5 GERÄTE

Verfahren	Firma
Zellkultivierung	Brutschrank, Binder, DE Zentrifuge Multifuge 1S-R, Heraeus, UK
Kryokonservierung	Mr. Frosty, Nalgene Labware, USA
RNA-Isolation	Eppendorf Zentrifuge 5415D, DE
RNA-Konzentrationsbestimmung	NanoDrop 1000 Spektralphotometer, Thermo Scientific, DE
cDNA-Synthese	Mastercycler, Eppendorf, DE
PCR	Gerät: Opticon I, Bio-Rad Laboratories, Inc., USA
Immunfluoreszenz	Axioskop 40, Carl Zeiss AG, Deutschland Color View II, Olympus Europa Holding GmbH
Time-lapse-Imaging	Eigenbau – unter Verwendung des Mikroskops Bresser Bino Researcher, der Kamera Müller DCM130E und des Computers ASUS EeePC
<i>In-vitro</i> Verletzungsmodell	Verwendung eines selbstgebauten Großformatplotters

2.6 SOFTWARE

Verfahren	Software / Firma
RNA-Konzentrationsmessung	2100 expert, Agilent Technologies, Inc., USA
PCR	Opticon Monitor 3.1, Bio-Rad Laboratories, Inc., USA
Immunfluoreszenz	CellID, Olympus Europa Holding GmbH ImageJ 1.44p, National Institute of Health, USA
<i>In-vitro</i> Verletzungsmodell	Steuerungssoftware programmiert von Johannes Girke
Time-lapse-Imaging	ScopePhoto 3.0, ScopeTek, China JPGVideo 1.05.0, NDW Ltd., UK ImageJ 1.44p, National Institute of Health, USA

3 METHODIK

3.1 ZELLKULTUR

3.1.1 TENDOZYTENISOLIERUNG AUS HUMANER SEHNE

Für die Zellkultur-Experimente kamen humane Sehnenzellen von 14 verschiedenen Spendern zur Anwendung. Das mittlere Alter der Spender lag bei 35,7 Jahren, die Extreme lagen bei 21 und 52 Jahren, wobei insgesamt 79 % der Spender männlich waren. Die Tendozyten entstammen Sehnenpräparaten, welche bei Operationen entnommen und als Reste nicht weiter benötigt wurden (Ethikantrag: EA4-033-08). Operativ nicht weiter zu verwendendes Sehnenmaterial fällt hierbei vor allem bei kreuzbandersetzenden Operationen an, bei denen das alte, rupturierte Kreuzband entfernt und durch Autografts des *M. semitendinosus* und *M. gracilis* ersetzt wird. Die verwendeten Sehnenstücke entstammten, sofern nicht anders gekennzeichnet, gesunden Sehnen und wurden nach Entnahme gekühlt in einer Phosphat gepufferten Salzlösung in das Labor gebracht und in DMEM/Ham's-Medium unter Beigabe von Gentamycin, Penicillin und Streptomycin gespült. Anschließend erfolgte die Präparation der Sehnenstücke und Aufteilung in kleine Fragmente, welche in DMEM/Ham's-Medium mit 10 % FKS bei 37 °C und 5 % CO₂ über zwei Wochen inkubiert wurden (Schulze-Tanzil, Mobasheri et al. 2004). Die Emigration der Tendozyten aus der Sehne wurde mittels einem in dieser Arbeit entwickelten Time-lapse-Verfahren dokumentiert und ist in der folgenden Abbildung ausschnittsweise dargestellt.

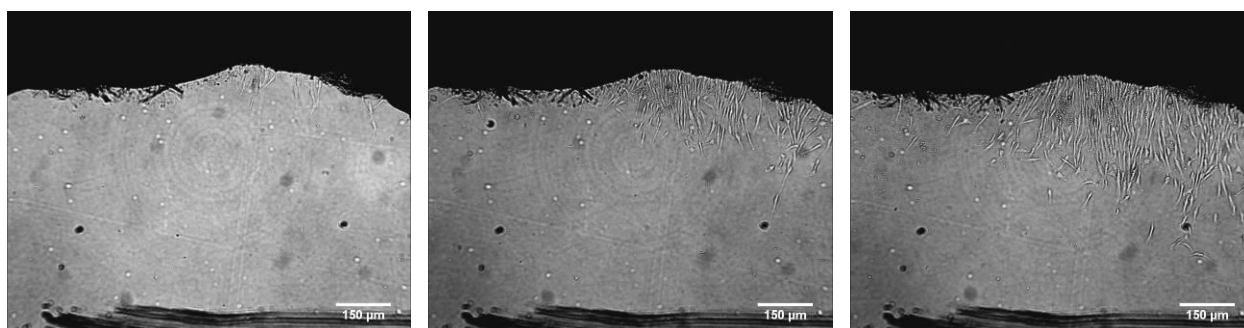


Abbildung 6: Tendozytenemigration. Gezeigt sind drei Phasen der Tendozytenisolation aus einem Sehnenpräparat, wobei der schwarze obere Rand im Bild das Sehnenpräparat darstellt, Messbalken 150 µm. Die drei Aufnahmen entstanden im Abstand von jeweils 4,5 h.

Die Abbildung 6 zeigt den Beginn der Emigration von Sehnenzellen aus einem Sehnenpräparat. Der zeitliche Abstand zwischen zwei Aufnahmen betrug hierbei 4,5 h. Zum Zeitpunkt einer flächendeckenden Konfluenz von mindestens 75 % der Zellkulturschale wurden die Sehnenfragmente entnommen. Die so gewonnenen Tendozyten konnten nun zur direkten Kultivierung verwendet oder zur Kryokonservierung bei -80 °C in ein geeignetes Konservierungsmedium überführt werden.

3.1.2 KRYOKONSERVIERUNG UND AUFTAUEN DER TENDOZYTEN

Die Kryokonservierung war notwendig, um die Zellen nach der Isolation zur Verwendung für einen späteren Zeitpunkt zu erhalten. Dazu wurde nach der Spülung der Zellkultur mit PBS die Adhärenz der Sehnenzellen an der Zellkulturschale mit Trypsin (0,1 Vol % Trypsin in PBS) gelöst und die Trypsinaktivität nach 3 min mit 10 % FKS in DMEM/Ham's-Medium abgestoppt. Die Zellsuspension wurde anschließend für 5 min bei 400 x g zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstands erfolgte die Einlagerung der Zellen in 1,8 mL einer aus 90 % FKS und 10 % DMSO bestehenden Lösung in Kryoröhrchen, welche in einem Gradienten-Einfriergefäß schonend um ein Grad Celsius pro min innerhalb von 24 h abgekühlt wurden. Die Lagerung der Kryoröhrchen erfolgte daraufhin in flüssigem Stickstoff bei -196 °C.

Zur Wiederverwendung konnten die Kryoröhrchen rasch aufgetaut und die Tendozyten in ein Falcon mit 13,5 mL DMEM/Ham's-Medium und 1,5 mL FKS überführt werden. Dieses wurde für 5 min bei 400 g zentrifugiert und das Zellpellet in 90 % DMEM/Ham's-Medium mit 10 % FKS resuspendiert und zur Kultivierung in einer sterilen T175-Zellkulturflasche in den Brutschrank gegeben.

3.1.3 KULTIVIERUNG UND PASSAGIERUNG DER TENDOZYTEN

Die Kultivierungsbedingungen im Brutschrank lagen bei 37 °C und 5 % CO₂, es erfolgte ein Mediumwechsel der Zellkultur alle 2 Tage. Bei einer Konfluenz von 80 % wurden die Tendozyten mittels Trypsin aus der Zellkulturflasche gelöst, aufgeteilt und in zwei neue, sterile Kulturflaschen überführt. Dieser Prozess wird im Folgenden „Passagierung“ genannt, die Tendozyten erlangten damit die Passage 1. Jede folgende Passagierung wurde mit der entsprechenden Passagennummer P(x) dokumentiert.

3.1.4 TENDOZYTENZÄHLUNG

Für die Zellzählung war es erforderlich, die Zellen mittels Trypsin aus der Zellkulturflasche abzulösen, die Zellsuspension für 5 min bei 400 g zu zentrifugieren sowie das Zellpellets in einem definierten Volumen von 1 mL DMEM/Ham's-Medium zu resuspendieren. Daraus wurden 10 µL entnommen und mit 20 µL Trypanblau vermischt in die Neubauer-Zählkammer gegeben. Nach visueller Auszählung wurde der Mittelwert der Zellanzahl in den jeweiligen Quadranten gebildet. Die Berechnung der Zellkonzentration erfolgte anschließend mit folgender Formel:

$$\text{Zellanzahl/mL} = \text{Mittelwert der Zellzählung} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

3.1.5 STIMULATIONSVERSUCH MIT C3A

Für dieses Experiment wurden Tendozyten von fünf verschiedenen Spendern kultiviert. Es erfolgte die Aussaat der Zellen in Petrischalen mit einer jeweiligen Zelldichte von 14000 Zellen/cm². Nach 24 h wurde bei vollständiger Adhäsion der Zellen am Boden der Petrischale die Stimulation mit C3a durchgeführt. Jeweils eine Gruppe von fünf Schalen verschiedener Spender wurde mit C3a in einer Konzentration von 0,1 µg/mL und von 1 µg/mL stimuliert. Die Ernte der Zellen und Isolierung der RNA erfolgte 4 h nach Stimulationsbeginn. Für die Analyse 24 h nach Stimulation wurde das Experiment erneut durchgeführt.

3.1.6 STIMULATIONSVERSUCH IM IN-VITRO VERLETZUNGSMODELL

Der Stimulation der Sehnenzellen im *in-vitro* Verletzungsmodell (IVM) gingen Experimente voraus, bei denen Sehnenzellen in der Zellkulturschale durch ein Skalpell verletzt wurden. Die Analyse der erhobenen Genexpressionsdaten zeigte eine nur schwache Beeinflussung der Sehnenzellen durch die Skalpellverletzung. Um einen stärkeren Effekt der Verletzung in der Genexpression zu erzielen, war eine quantitative Steigerung der Anzahl der verletzten Zellen erforderlich. Dazu wurde ein Gerät gebaut, welches in der Lage war, computergesteuert und v. a. standardisiert Verletzungen in Form von parallelen Scratchspuren alle 500 µm in den Zellrasen der Zellkultur einzubringen. Die folgende Abbildung zeigt den Aufbau des Zellkulturplotters und das schematische Verletzungsmuster.

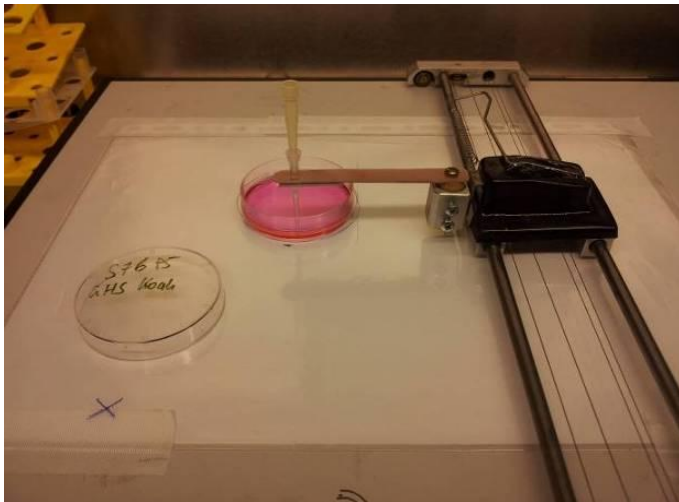


Abbildung 7: *In-vitro* Verletzungsmodell Aufbau. Die Abbildung zeigt auf der linken Seite den Versuchsaufbau des eigens für dieses Experiment entwickelten Zellkulturplotters. Eine sterile Pipettenspitze war an dem beweglichen Wagen befestigt. Dieser Wagen fuhr computergesteuert das in dem rechten Bild dargestellte Schema ab, wobei der Abstand von zwei parallelen Schnitten bei 500 μm lag. Es wurden Petrischalen mit einem Durchmesser von 5 cm verwendet.

Die Abbildung 7 zeigt den Zellkulturplotter bei der Verletzung einer Sehnenzellkultur. Analysiert wurden Tendozyten von fünf verschiedenen Spendern, welche in einer Zelldichte von 14000 Zellen/ cm^2 in die Petrischalen ausgesät und in DMEM/Ham's-Medium mit 10 % FKS kultiviert wurden. Mit diesem Versuchsaufbau konnten nun 100 parallele Schnitte standardisiert anstelle von nur manuell gesetzten Schnitten in die Zellkulturschale eingebracht werden. Darüber hinaus konnten auf Grund der 500 μm breiten Scratchspur verschiedene Sehnenzellen links und rechts der Scratchspur verletzt werden, dies war zuvor bei den sehr dünnen Skalpellschnitten nicht gegeben. Insgesamt konnte so gegenüber den manuellen Skalpellschnitten eine deutlich stärkere Verletzungskapazität erreicht werden. Nach der Zellkulturverletzung erfolgte eine Inkubation für 4 oder 24 h im Brutschrank.

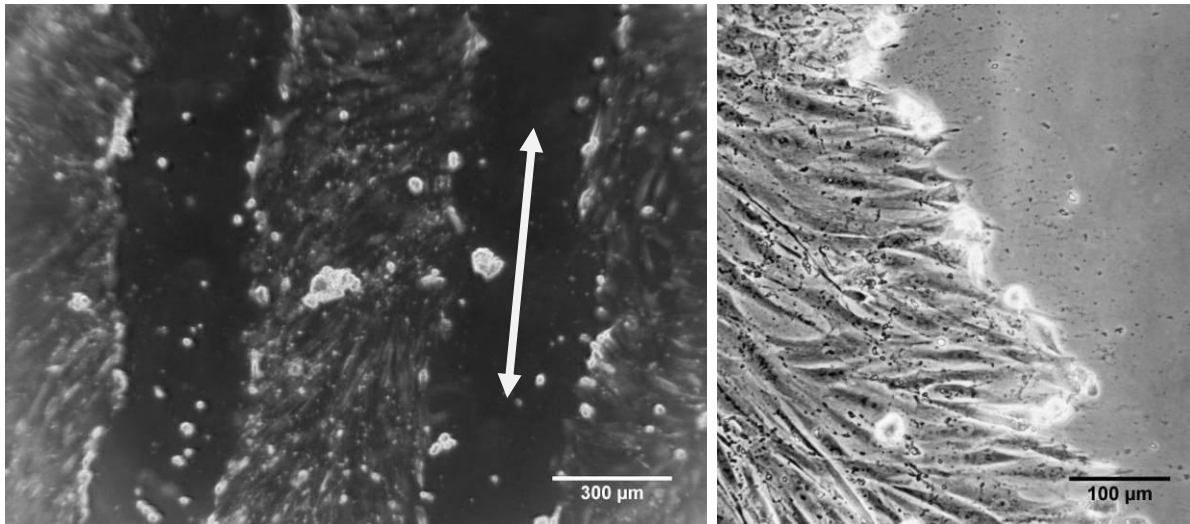


Abbildung 8: Das *in-vitro* Verletzungsmodell in der Zellkultur. Die linke Abbildung zeigt den durch den Zellkulturplotter verletzten Zellrasen direkt nach Behandlung in einer Dunkelfeldaufnahme, wobei der Doppelpfeil eine Scratchspur anzeigt, Messbalken 300 µm. Die rechte Abbildung gibt den Rand einer Scratchspur bei höherer Vergrößerung wieder, hierbei stellen sich die verletzten Zellen hell und abgerundet dar, die Zelldichte betrug 14000 Zellen/cm², Messbalken 100 µm.

3.1.7 KOSTIMLUATIONSVERSUCH MIT C3A IM IN-VITRO VERLETZUNGSMODELL

Nachdem die Auswirkungen der solitären C3a-Stimulation auf Tendozyten sowie die Effekte der Sehnenzellverletzung auf Genexpressionsebene analysiert wurden, folgte eine Kombination der beiden Stimulationsarten in einem Experiment. Es konnte so eine Aussage über den zusätzlichen Effekt der Anwesenheit von C3a bei einer verletzten Sehnenzellkultur getroffen werden. Auch für dieses Experiment wurden Tendozyten von fünf verschiedenen Spendern in einer Zelldichte von 14000 Zellen/cm² in Petrischalen eingesät und in DMEM/Ham's-Medium mit 10 % FKS kultiviert. Bei der zu analysierenden Behandlungsgruppe erfolgte neben der Zellkulturverletzung eine Stimulation durch C3a in der bereits verwendeten Konzentration von 1 µg/mL. Die Kontrollgruppen wurden hierbei einer isolierten Verletzung ohne eine Präsenz des Anaphylatoxins C3a gemäß des IVM unterzogen. Ebenfalls erfolgte nach 24 h-Inkubation die Zellernte und RNA-Isolation.

3.1.8 TIME-LAPSE-VIDEODOKUMENTATION

Die Time-lapse-Videodokumentation ermöglicht es, lebende Zellen über einen langen Zeitraum in einem Zeitraffer zu beobachten. Dazu wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Mikroskop umgebaut, welches mittels einer Kamera, einer kalten Lichtquelle sowie eines geeigneten Kontrastfilters und einer Time-lapse fähigen Software alle zwei Minuten eine Aufnahme der Zellkultur über einen Zeitraum von 24 h erstellte. Die Aufnahmen erfolgten bei 37 °C und 5 % CO₂ in 40-facher und 100-facher Vergrößerung. Mit der Software JPGVideo wurde aus den in 24 h aufgenommenen 720 Einzelbildern ein Film erstellt. Ferner gelang es auch die in Kap. 3.1.1 beschriebene Emigration der Tendozyten aus einem Sehnenpräparat im Isolationsmedium über 24 h visuell darzustellen.

3.1.9 VITALITÄTSFÄRBUNG

Um das Überleben oder Absterben der Sehnenzellen unmittelbar nach Verletzung darstellen zu können, wurde eine Vitalitätsfärbung durchgeführt. Zur Färbung wurden 1 mL PBS mit 15 µg in Aceton gelöstem Fluoresceindiacetat sowie 10 µg Ethidiumbromid angewandt. Die Aufnahmen erfolgten im direkten Anschluss an die Färbung am Axioskop 40 Firma Carl Zeiss AG.

3.1.10 MITOSENZÄHLUNG

Ebenso konnte mithilfe der Methodik der Time-lapse-Videodokumentation die Reorganisation der Zellen in der Kultur nach Behandlung im IVM dokumentiert und ausgewertet werden. Zur Quantifizierung der Mitosen wurden in einem zuvor definierten Gesichtsfeld sämtliche innerhalb von 24 h stattgefundenen Mitosen anhand des Filmmaterials manuell ausgezählt. Die Auszählung der Mitosen wurde insgesamt bei drei unbehandelten Zellkulturen als Kontrollgruppe sowie bei drei im IVM behandelten Zellkulturen jeweils über 24 h durchgeführt. Die Anzahl der eingesetzten Tendozyten wurde zuvor auf 15.000/cm² normiert.

3.2 GENEXPRESSIONSANALYSEN

3.2.1 RNA-ISOLATION

Die RNA-Isolierungen wurden mit dem RNeasy Mini Kit[®] der Firma Qiagen durchgeführt. Für die gesamte Verarbeitung wurden ausschließlich RNase-freie Gefäße und Cups verwendet sowie alle Arbeitsflächen und Handschuhe RNase-frei behandelt, um eine Degradation der RNA zu verhindern. Zunächst musste das Kultivierungsmedium entfernt und die Zellkultur durch einen Waschschrift mit PBS von Resten des Mediums gereinigt und anschließend trocken gesaugt werden. Den Beginn der RNA-Isolierung stellt die Lyse der Sehnenzellen dar. Pro Zellkulturschale ($\varnothing=5$ cm) wurden 346,5 μ L RLT-Lysepuffer mit 3,5 μ L β -Mercaptoethanol aufgetragen und mit einem Scraper der Zellrasen von der Zellkulturschale für eine Minute abgeschabt. Anschließend erfolgte eine vorsichtige zehnfache Homogenisierung der Zellsuspension mittels einer sterilen 1 mL Spritze und einer 22G Kanüle, um bisher nicht lysierte Zellverbände zu trennen. Danach wurden 350 μ L 70 % Ethanol in DEPC-H₂O zugegeben, die gesamte Suspension auf die Filtrationssäule mit einer Silikatmembran aufgetragen und bei 8000 x g für 30 sec zentrifugiert. Anschließend wurde als Waschpuffer 350 μ L RW1-Puffer aufgetragen und jede Säule für 30 sec bei 8000 x g zentrifugiert. Es folgte ein DNase-Verdau mit 10 μ L DNase (Qiagen) und 70 μ L RDD-Puffer pro Säule über 15 min. Im weiteren Verlauf wurde ein weiterer Waschschrift mit 350 μ L RW1-Puffer durchgeführt und jede Säule erneut für 30 sec bei 8000 x g zentrifugiert. Es wurden 500 μ L RPE-Puffer aufgetragen und bei 8000 x g für 30 sec zentrifugiert. Dieser Schritt wurde mit 500 μ L RPE-Puffer wiederholt und für 120 sec bei 8000 x g zentrifugiert. Zuletzt wurde auf jede Säule 33 μ L RNase-freies Wasser gegeben und eine Minute bei 8000 x g zentrifugiert. Für die gewonnene RNA erfolgte direkt nach der Isolation die Bestimmung der Konzentration und Qualität. Zur späteren Verwendung wurde die RNA anschließend bei -80 °C eingefroren.

3.2.2 RNA-KONZENTRATIONSBESTIMMUNG

Die Bestimmung der RNA-Konzentration wurde mit dem Gerät NanoDrop 1000 der Firma Thermo Scientific durchgeführt. Die Analyse der Nukleinsäuren erfolgte durch eine spektralphotometrische Messung vollautomatisch. Die hierbei gemessene RNA-Konzentration war die Berechnungsgrundlage für die konstant eingesetzte Menge an RNA in der reversen Transkription.

3.2.3 REVERSE TRANSKRIPTION

Die reverse Transkription erfolgte unter Verwendung des QuantiTec Reverse Transcription Kit[®] der Firma Qiagen. Voraussetzung zur Synthese von cDNA ist die Kenntnis über die vorliegende RNA-Konzentration, welche zuvor spektralphotometrisch ermittelt wurde. Zu Beginn wurde 1 µg RNA je Probe mit 2 µL gDNA Wipeout-Buffer versehen und mit RNase-freiem Wasser zu 14 µL aufgefüllt. Die Entfernung der genomischen DNA erfolgte für zwei Minuten bei 42 °C. Anschließend wurden als MasterMix 4 µL Quantiscript RT-Puffer, 1 µL RT-Primermix sowie 1 µL reverse Transkriptase je Probe hinzugegeben, sodass ein Synthesevolumen von 20 µL vorlag. Die cDNA-Synthese erfolgte durch eine Inkubation der Proben für 15 min bei 42 °C. Auf Grund der Poly(A)-Sequenz am 3'-Ende der eukaryotischen mRNA ist durch den Einsatz von spezifischen Oligo-(dT)-Primern gewährleistet, dass nur mRNA umgeschrieben wird. Hierbei besitzt die reverse Transkriptase die Aktivität einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase. Nach abschließender Inaktivierung der reversen Transkriptase für drei Minuten bei 95 °C wurden je Probe 40 µL RNase-freies Wasser hinzugegeben, sodass eine cDNA-Konzentration von 16,67 ng/µL bei einem Gesamtvolumen von 60 µL erreicht werden konnte. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20 °C.

3.2.4 REAL TIME DETECTION POLYMERASE CHAIN REACTION

Die RTD-PCR (Real Time Detection Polymerase Chain Reaction) ermöglicht eine quantitative Analyse der Amplifikation der cDNA-Sequenzen in Echtzeit durch den Einsatz von fluoreszenzgekoppelten Primern. Es wurden die PCR-Protokolle der Firmen ABI und Qiagen verwendet. Beide gehen von einem 20 µL Ansatz pro Well aus, welcher sich aus 10 µL Mastermix, weiteren 8 µL RNase-freiem Wasser, 1 µL des genspezifischen Primers sowie 1 µL cDNA-Template zusammensetzt. Es wurden sämtliche Proben einer Dreifachbestimmung unterzogen und in der darauffolgenden Auswertung erfolgte die Mittelwertbildung über die C_T-Werte (Cycle Threshold) der drei technischen Replikate. Ferner wurde für jeden Primer zwei Wells ohne cDNA als Blank-Wert mitgeführt, um die spezifische Bindung des Primers an die eingesetzte cDNA zu bestätigen. Die folgende Tabelle stellt die Pipettierschemata der Firmen ABI und Qiagen dar.

Tabelle 1: PCR-Pipettierschemata von ABI und Qiagen im 20 µL Ansatz

Substanz	ABI	Qiagen
Mastermix	10 µL	10 µL
PCR-H ₂ O	8 µL	7 µL
Primer	1 µL	2 µL
cDNA	1 µL	1 µL

Das PCR-Protokoll der Firma ABI erfordert eine initiale Inkubation der 96-Well Platte bei 50 °C für zwei Minuten, um die Amperase UNG (Uracil-N-Glykosylase) zur Dekontamination eventuell vorbestehender PCR-Produkte zu aktivieren. Anschließend erfolgte die Aktivierung der DNA-Polymerase und Inaktivierung der Amperase UNG für 10 min bei 95 °C. Alle folgenden Schritte werden als Zyklen 40-fach durchlaufen. Den Beginn stellt hier jeweils eine 15 sec andauernde Denaturierung der DNA bei 95 °C dar, welche vom Annealing der Oligonukleotidprimer und der Elongation durch die DNA-Polymerase innerhalb einer Minute bei 60 °C gefolgt wird. Im Anschluss wird die Fluoreszenzintensität jedes einzelnen Wells photometrisch erfasst. Durch die Anwesenheit einer Quencherstruktur am 3'-Ende des Primers wird die Fluoreszenz bei nicht an die DNA gebundenen Primersequenzen unterdrückt und fließt somit nicht in die Detektion des Fluoreszenzsignals mit ein. Durch die Amplifikation der DNA steigt stetig der Anteil an dem an der DNA gebundenen und damit fluoreszierenden Primer. Die folgenden Tabellen (Tabelle 2 und 3) geben eine Übersicht über die Zyklen der PCR-Protokolle von ABI und Qiagen.

Tabelle 2: PCR-Protokoll der Firma ABI

Schritt:	Aktion:	Verfahren:
1	Inkubation bei 50 °C für 2 min	Aktivierung der Amperase UNG
2	Inkubation bei 95 °C für 10 min	Aktivierung der DNA-Polymerase und Inaktivierung der Amperase UNG
3	Inkubation bei 95 °C für 15 sec	Denaturierung der eingesetzten cDNA
4	Inkubation bei 60 °C für 1 min	Annealing der Primer und Elongation der Einzelstränge
5	Detektion der Platte	Fluoreszenzintensitätsmessung der 96-Well Platte <i>Wiederholen der Schritte 3 – 5 für insgesamt 40 Zyklen</i>
6	Inkubation bei 4 °C andauernd	Kühlung der PCR-Produkte zur Aufbewahrung

Tabelle 3: PCR-Protokoll der Firma Qiagen

Schritt:	Aktion:	Verfahren:
1	Inkubation bei 95 °C für 15 min	Aktivierung der DNA-Polymerase
2	Inkubation bei 94 °C für 15 sec	Denaturierung der eingesetzten cDNA
3	Inkubation bei 56 °C für 30 sec	Annealing der Oligonukleotidprimer
4	Detektion der Platte	Fluoreszenzintensitätsmessung der 96-Well Platte
5	Inkubation bei 76 °C für 30 sec	Elongation der DNA-Einzelstränge
	<i>Wiederholen der Schritte 2 – 5 für insgesamt 45 Zyklen</i>	
6	Inkubation bei 4 °C andauernd	Kühlung der PCR-Produkte zur Aufbewahrung

Neben der durch die angewandten Primer untersuchten Genloci wurde auf jeder PCR-Platte ein Primer eines Housekeepers mitgeführt. Die Genexpression des Housekeepers wird definitionsgemäß durch die zu untersuchende Behandlung der Zellen nicht beeinflusst. Er wird als Referenzgen mitbestimmt, um die trotz konstant eingesetzter RNA-Menge in der cDNA-Synthese auftretenden Schwankungen der cDNA-Konzentration auszugleichen. Sowohl für das ABI- als auch für das Qiagen-Protokoll wurde als Housekeeper β -Actin verwendet.

Nach Abschluss der PCR wurden die gewonnenen Daten statistisch ausgewertet. Der C_T -Wert kennzeichnet das Fluoreszenzniveau, welches erstmals über dem Niveau der Hintergrundfluoreszenz liegt und den Beginn des exponentiellen Wachstums der Fluoreszenzintensität darstellt. Es erfolgte zunächst die Mittelwertbildung der C_T -Werte der technischen Replikate. Die Berechnung der relativen Genexpressionsveränderungen wurde anhand der mathematischen Auswertung nach Pfaffl durchgeführt, welche zusätzlich auch die Effizienz eines Primers berücksichtigt (Pfaffl 2001). Die der Auswertung zugrunde liegende Formel ist nachfolgend dargestellt.

$$Ratio = \frac{(Effizienz\ Zielgen)^{\Delta CT\ Zielgen}}{(Effizienz\ Referenzgen)^{\Delta CT\ Referenzgen}}$$

Die Ratio bezeichnet hierbei das Verhältnis der relativen Genexpression von Kontrolle und behandelte Probe. Aus der Differenz der C_T -Werte des Kontrollgens und Ziel-/Referenzgens wird entsprechend ΔC_T berechnet. Es erfolgte eine Bestimmung der Effizienz der eingesetzten Primer, wie in Kapitel 3.2.5 nachfolgend beschrieben ist.

3.2.5 PRIMEREFFIZIENZBESTIMMUNG

Die Effizienz eines Primers charakterisiert seine Fähigkeit, die Verdopplung einer DNA-Sequenz nach einem PCR-Zyklus durch eine Verdopplung der Fluoreszenzintensität anzuzeigen. Die tatsächliche Effizienz eines Primers kann jedoch technisch bedingt leicht unter oder über der exakten Verdopplung nach einem Zyklus liegen, daher war eine Effizienzbestimmung der verwendeten Primer nötig.

Zunächst wurde aus RNA humaner Tendozyten eine Verdünnungsreihe in vier Stufen mit jeweils bekannter Konzentration hergestellt und in cDNA mittels der reversen Transkription umgeschrieben. Anschließend erfolgte in der PCR für die zu validierenden Primer unter Verwendung von jeweils drei technischen Replikaten die Bestimmung der Genexpression. Nach Mittelwertbildung wurden die erzielten C_T-Werte in einem Diagramm aufgetragen, dessen X-Achse die logarithmische RNA-Konzentration aller vier Verdünnungsstufen und dessen Y-Achse die gemessenen C_T-Werte angibt. Da zwischen den ermittelten C_T-Werten und dem dekadischen Logarithmus der RNA-Konzentrationen eine lineare Abhängigkeit besteht, kann aus dem Anstieg der Geraden über die Gleichung $E = 10^{-1/\text{Anstieg}}$ die Effizienz des Primers abgelesen werden (Pfaffl 2001). Die Effizienzen der Primer MMP-1 und IL-6 mussten für diese Arbeit neu bestimmt werden, die anderen Primer lagen in der Arbeitsgruppe bereits validiert vor. Die folgende Tabelle gibt die Effizienzen der verwendeten Primer an.

Tabelle 4: Primereffizienzen

Primer	Effizienz	Primer	Effizienz
TNF α	1,97	β -Actin (ABI)	1,88
MMP-1	1,99	β -Actin (Qiagen)	2,00
CD55	1,86	IL-6	2,09
CD46	1,92	IL-1 β	1,87
C3a-Rezeptor	1,82	C5a-Rezeptor	2,00

3.3 IMMUNFLUORESZENZMIKROSKOPIE

3.3.1 IMMUNFLUORESZENZFÄRBUNG

Die Immunfluoreszenzfärbungen erfolgten an nativen Sehenschnitten sowie an kultivierten Tendozyten auf Glasplättchen. Zur Färbung der nativen Präparate wurden mit dem Mikrotom Paraffinschnitte von humanen Sehnen in der Stärke von 9 µm angefertigt und auf Objektträger gebracht. Es erfolgte die Inkubation der Paraffinschnitte in Roticlear für 5 min und die anschließende Behandlung der Präparate in einer alkoholischen Verdünnungsreihe für jeweils 2 min in 100 %, 96 %, 80 % und 70 % Ethanol. Zur Demaskierung der Epitope der Gewebeschnitte wurden die Präparate für 30 min bei 37 °C in einer Pronase-Lösung (5 mg/mL) inkubiert und darauf mit 1xTBS gespült.

Für die Färbung von isolierten Tendozyten wurden sterile Glasplättchen verwendet, welche mit Poly-L-Lysin beschichtet wurden, um eine Adhärenz der Sehnenzellen an den Glasplättchen zu erleichtern. Anschließend wurden die beschichteten Glasplättchen in eine 6-Well-Platte gegeben, humane Tendozyten in einer Konzentration von 14000 Zellen/cm² ausgesät und anschließend über 24 h im Brutschrank inkubiert. Die Stimulation mit C3a erfolgte mit der bereits in den Genexpressionsanalysen verwendeten C3a-Konzentration von 1 µg/mL in 2 mL DMEM/Ham's-Medium und 0,5 % FKS für weitere 24 h. Die Verletzung der Sehnenzellen wurde mit parallelen Skalpellenschnitten auf den Glasplättchen nach Adhäsion der Zellen durchgeführt.

Zur Fixierung der Zellen wurden die Glasplättchen ebenfalls mit 4 % PFA zu Beginn der Färbung über 15 min überschichtet. Nach Spülung mit 1xTBS wurde zur Blockierung 100 µL 5 % Eselserum in 1xTBS mit 0,1 % Triton X100 zur Permeabilisierung für 20 min auf die Glasplättchen und Paraffinschnitte aufgetragen. Anschließend erfolgte ohne einen zusätzlichen Waschschrift die Inkubation des Primärantikörpers (1:50 verdünnt) in dem Blockierungsmedium über Nacht bei 4 °C in einer Feuchtkammer. Die Isotypkontrollfärbung erfolgte mittels eines unspezifisch bindenden IgG1-Antikörpers des gleichen Spenderorganismus. Als weitere Kontrollfärbung wurde anstelle eines Primärantikörpers nur Blockierungsmedium aufgetragen. Nach der Inkubation über Nacht wurden die Schnitte erneut mit 1xTBS gespült und unter UV-freien Bedingungen mit der Sekundärantikörperlösung behandelt. Diese bestand aus dem blauen Zellkernfarbstoff DAPI (1:25 verdünnt) und dem fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper Alexa 488 in Blockierungsmedium. Es erfolgte bei Raumtemperatur

eine Inkubation für 60 min. Nach letztmaliger Spülung mit 1xTBS wurden die gefärbten Schnitte mit Fluoromount auf Objektträgern eingedeckelt. Die mikroskopische Kontrolle und Auswertung der Färbungen erfolgte im direkten Anschluss.

3.3.2 IMMUNFLUORESZENZINTENSITÄTSAUSWERTUNG

Um eine Aussage über unterschiedliche Immunfluoreszenzintensitäten treffen zu können, ist es erforderlich gewesen, die Aufnahmen unter standardisierten Einstellungen des Fluoreszenzmikroskops durchzuführen. Grundsätzlich wurden für jede Färbung drei Aufnahmen erstellt, bei denen mit der Software ImageJ pro Aufnahme (bei 200-facher Vergrößerung) jeweils acht Zellen auf ihre Fluoreszenzintensität hin ausgewertet wurden. Hierbei wurde die Anzahl der maximal auswertbaren Zellen pro Gesichtsfeld auf Grundlage der Zelldichte vor Beginn der Auswertung festgelegt. Es erfolgte nach der Mittelwertbildung der jeweils gemessenen Fluoreszenzintensitäten die Subtraktion der Hintergrundfluoreszenz. So konnten für jede Kontrollfärbung, Isotypfärbung und spezifische Färbung der Behandlung jeweils drei Mittelwerte in die statistische Analyse einbezogen werden.

3.4 HISTOLOGISCHE FÄRBUNGEN

Für die histologischen Färbungen mit HE wurden Paraffinschnitte nativer Sehnenpräparate in der Stärke von 9 µm angefertigt. Verwendet wurden hierbei Präparate humaner Finger- und Achillessehnen, welche aus medizinischer Indikation bei Operationen entnommen werden mussten und nicht weiter benötigt wurden (Ethikantrag: EA4-033-08). Das mittlere Alter der Spender der Fingersehnen lag bei 49,5 Jahren, wobei 75 % der Spender männlich waren.

Zur Vorbereitung der Färbung mussten die angewärmten Paraffinschnitte für 5 min in Xylol Roticlear zur Entfernung des Paraffins gegeben werden. Die Rehydrierung der Präparate erfolgte in einer absteigenden alkoholischen Verdünnungsreihe für jeweils 2 min in 100 %, 96 %, 80 % und 70 % Ethanol. Abschließend wurden die Präparate in Aqua dest. gewaschen. Die erste Färbung erfolgte mit Harris' Hämatoxylin für 1 min. Die Differenzierung der Färbungen erfolgte in saurem Wasser (Aqua dest. mit einigen Tropfen Eisessig), mit Leitungswasser wurde die Differenzierung gestoppt, um die Präparate anschließend in alkalischem Wasser für 5 sec zu bläuen. Nach Spülung in

96 % Alkohol konnten die Schnitte in 2 % alkoholischer Eosin-Färbelösung für 15 sec inkubiert werden. Zur Dehydrierung wurden die Proben anschließend in eine aufsteigende Alkoholreihe aus 96 % - 100 % - 100 % Ethanol gegeben und nach Spülung mit Butylacetat mit Deckgläschen mit Fluoromount-Eindeckmedium eingedeckelt. Die Fotografie der Färbungen erfolgte mit dem Axioskop 40 der Firma Carl Zeiss AG.

Für die Alcianblau-(AB-)Färbungen wurden die Paraffinschnitte ebenfalls für 5 min in Xylol Roticlear zur Entfernung des Paraffins gegeben. Auch die Rehydrierung der Präparate erfolgte in einer absteigenden alkoholischen Verdünnungsreihe für jeweils 2 min in 100 %, 96 %, 80 % und 70 % Ethanol. Nach einem Waschschrift in Aqua dest. wurden die Schnitte für 3 min in eine 3 %-Essigsäurelösung gegeben und danach für weitere 20 min in einer ebenfalls 3 %-Essigsäurelösung mit 1 %-Alcianblau 8GX gefärbt. Anschließend wurden die Schnitte in Aqua dest. gewaschen und nach Passage einer aufsteigenden Alkoholreihe aus 96 % - 100 % - 100 % Ethanol mit Deckgläschen und Fluoromount-Eindeckmedium eingedeckelt.

3.5 STATISTIK

Die statistischen Analysen wurden mit der Software GraphPad Prism 5.0 und dem gepaarten student t-test durchgeführt. Es galten die folgenden Signifikanzniveaus: signifikant (*) p-Wert < 0,05, sehr signifikant (**) p-Wert < 0,01 und hochsignifikant p-Wert < 0,005 (***). In den Diagrammen sind Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben.

3.6 RICHTLINIEN

Die experimentelle Arbeit basiert auf den Grundsätzen der Charité zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis. Eine Zustimmung der Ethikkommission der Charité Universitätsmedizin Berlin für die Arbeit mit menschlichen Probenmaterialien lag vor (Ethikantrag: EA4-033-08).

4 ERGEBNISSE

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit den Auswirkungen und Effekten der Komplementaktivierung auf Sehnenzellen. Es wurde zuerst auf Genexpressionsebene untersucht, welchen Einfluss die Präsenz des bei der Komplementaktivierung frei werdenden Anaphylatoxins C3a auf die Sehnenzellen und ihr komplementregulatorisches Verhalten ausübt. In der vergleichenden Betrachtung dazu wurden anschließend die Effekte des IVM auf Tendozyten untersucht. Vor dem Hintergrund der durch diese beiden experimentellen Ansätze gewonnenen Daten erfolgte die Analyse der Auswirkungen einer zeitgleichen Stimulation mit C3a und einer Verletzungsinduktion in Bezug auf eine mögliche proinflammatorische Reaktion und eine veränderte Komplementregulation der Tendozyten. Auf Proteinebene wurden darauffolgend die Genexpressionsdaten mittels immunhistologischer Färbungen verifiziert. Um zu den wesentlichen Sehnenpathologien ein histologisches Korrelat zu erstellen, erfolgten HE-Färbungen nativer Paraffinschnitte.

4.1 TIME-LAPSE EXPERIMENTE

4.1.1 VERLAUFSBEOBACHTUNG DES IN-VITRO VERLETZUNGSMODELLS

Um eine lückenlose Beobachtung einer verletzten Sehnenzellkultur über 24 h zu ermöglichen, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Time-lapse-Mikroskop gebaut, welches die Verletzungen in einem Zellrasen aus Tendozyten über 24 h alle zwei Minuten im Brutschrank automatisch fotografierte und anschließend zu einem Video zusammenfügte. Diese Zeitverlaufsbeobachtung wurde hier in Form von 16 Filmausschnitten dargestellt (Abb. 9). Der zeitliche Abstand zwischen zwei hier dargestellten Aufnahmen lag bei 45 min. Nach 24 h war die Scratchspur weitgehend von Sehnenzellen neu kolonisiert, wobei sich dieser Prozess in zwei Phasen teilte. Unmittelbar nach Verletzung begannen die Sehnenzellen die durch die Scratchspur entstandene Lücke durch Migration zu schließen und erst im Verlauf nach mehreren Stunden zeigte sich eine Induktion von Mitosen.

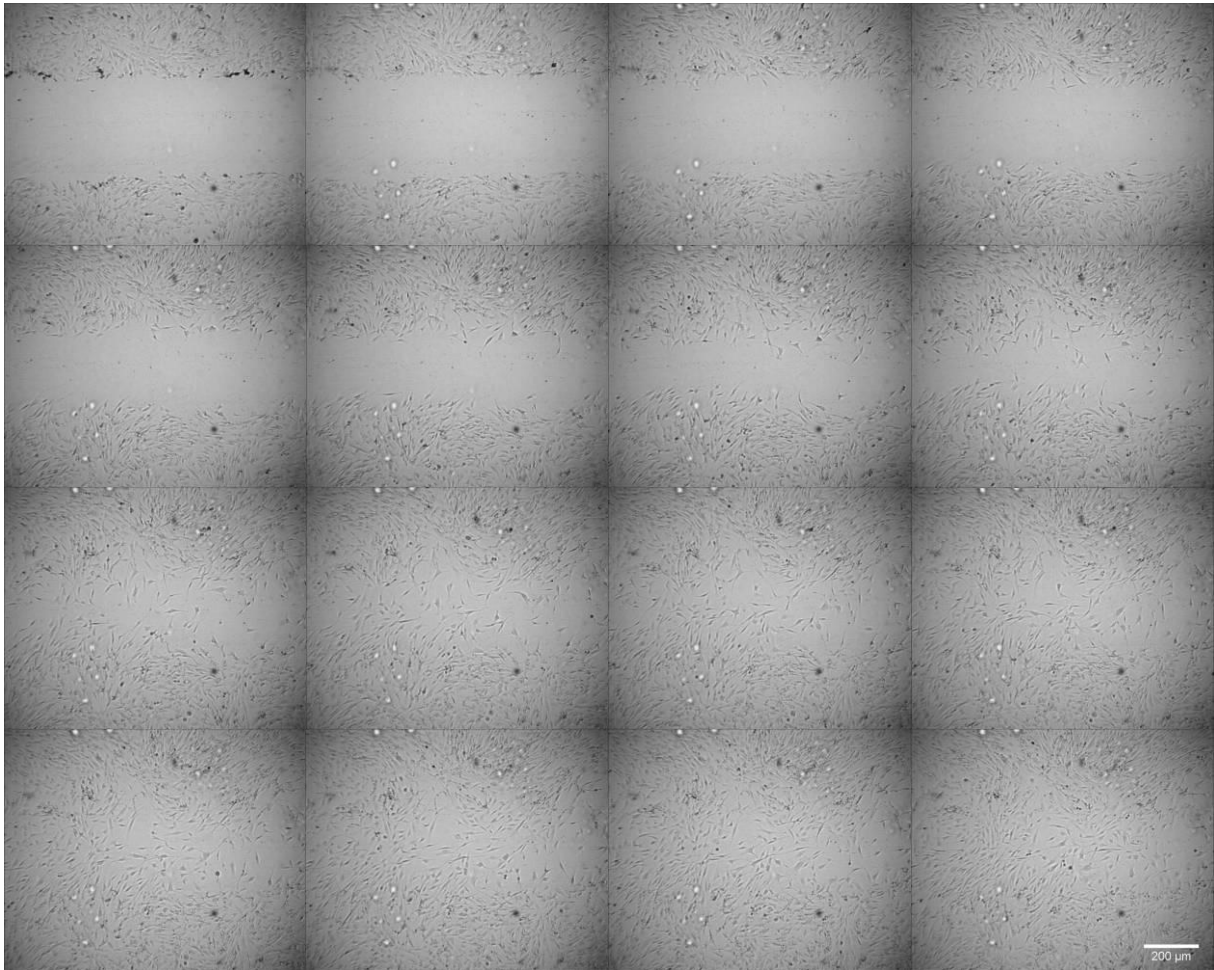


Abbildung 9: Time-Lapse-Beobachtung des Verletzungsmodells im Brutschrank. Dargestellt sind hier 16 Filmausschnitte der Beobachtung über 24 h, der zeitliche Abstand zweier dargestellter Aufnahmen beträgt 45 min, Messbalken 200 µm.

4.1.2 ANALYSE DES MITOSEVERHALTENS DER TENDOZYTEN IM IN-VITRO VERLETZUNGSMODELL

Das Ziel des folgenden Experiments war es zu klären, inwieweit die Verletzung des Sehnenzellrasens Mitosen der Tendozyten induzieren kann. Dazu wurden von drei Spendern jeweils eine unbehandelte Kontrollkultur sowie eine verletzte Zellkultur über 24 h im Time-lapse-Mikroskop beobachtet. In der folgenden Abbildung wird beispielhaft eine Mitose an fünf Momentaufnahmen des Time-lapse-Films dargestellt.

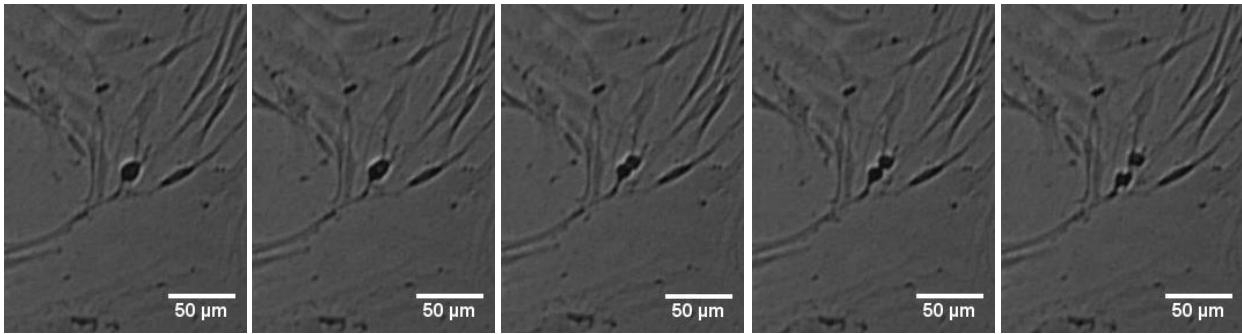


Abbildung 10: Bildserie einer Mitose im Verletzungsmodell. Dargestellt ist ein Ausschnitt aus einem Time-lapse-Film der Mitosenanalyse bei verletzten Tendozytenkulturen, der zeitliche Abstand zwischen zwei Aufnahmen betrug 2 min, damit liegt die Zeitspanne von der ersten bis zur letzten hier dargestellten Aufnahme bei 8 min, Messbalken 50 µm.

Die Abbildung 10 zeigt eine Mitose einer Sehnenzelle am Rand der Scratchspur, wie sie in der Auswertung der Time-lapse-Filme beobachtet werden konnte. Es erfolgte die visuelle Auszählung der Mitosen der drei unbehandelten sowie der drei verletzten Zellkulturen anhand des Filmmaterials und eine statistische Auswertung der gewonnenen Daten.

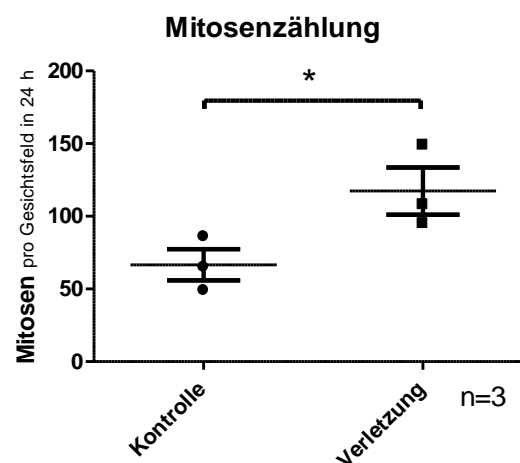


Abbildung 11: Mitosenanalyse.

Die Abbildung 11 stellt die statistische Auswertung der innerhalb von 24 h erfolgten Mitosen in der Kontrollgruppe und der behandelten Gruppe dar. Die Analyse der Mitoseaktivität zeigte eine signifikante Steigerung der Mitoserate bei den im IVM behandelten Tendozyten. In der erfolgten Videodokumentation konnte bei 100x-Vergrößerung eine direkte Interaktion von Zellfortsätzen der Tendozyten beobachtet werden.

4.2 VITALITÄTSFÄRBUNG IM VERLETZUNGSASSAY

Das IVM bringt Verletzungen in Form von multiplen, parallelen Scratchspuren in den Zellrasen aus Tendozyten ein. Um eine Aussage darüber zu erhalten, inwieweit die unmittelbar verletzte Tendozyten diese Behandlung überlebten, wurden Vitalitätsfärbungen am Beispiel einer solitären Scratchspur durchgeführt.

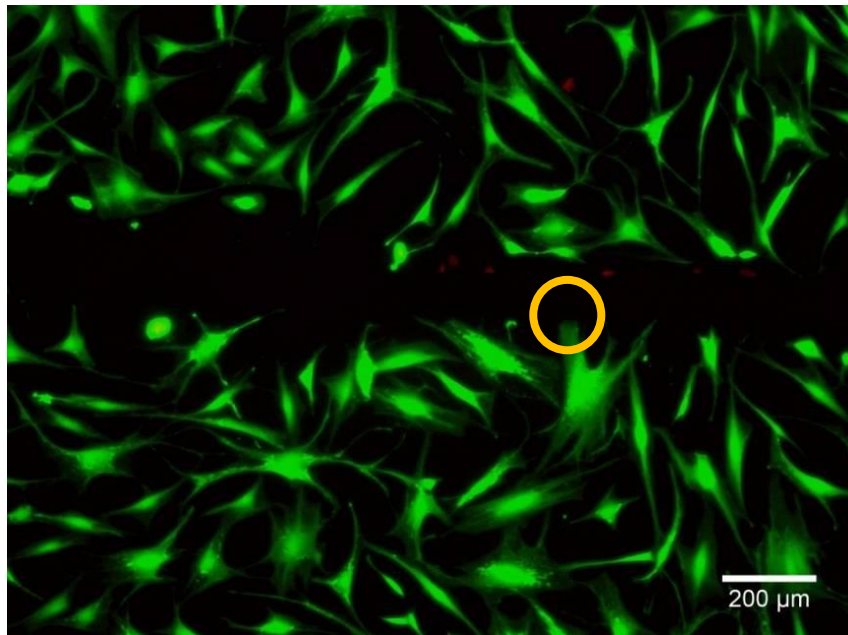


Abbildung 12: Vitalitätsfärbung von humanen Hamstring-Tendozyten. Die vereinzelt liegenden roten Zellen entlang der Scratchspur sind abgestorben, die grün gefärbten Zellen leben. Der gelbe Kreis zeigt exemplarisch die Stelle eines abgetrennten Zellfortsatzes einer weiterhin lebenden Sehnenzelle. Die Färbung wurde unmittelbar nach der Verletzung durchgeführt, Messbalken 200 μm .

Diese Immunfluoreszenzfärbung zeigte lebende Zellen durch den Fluoreszenzfarbstoff FDA grün angefärbt. Tote Zellen wurden für Ethidiumbromid durchlässig, ihre Kerne färbten sich daher rot an. Mehrere tote Zellen befanden sich entlang der Scratchspur und vereinzelt waren auch tote Zellen zwischen lebenden Zellen im Zellrasen erkennbar (Abb. 12). Daraus wird ersichtlich, dass durch diese mechanische Verletzung einige wenige Zellen abstarben, die verbleibenden Zellen jedoch diese Stimulation überlebten. Der gelbe Kreis weist auf eine lebende Sehnenzelle hin, deren langer Zellfortsatz durch die Verletzung abgetrennt wurde und hier nur noch als Stumpf zu sehen ist.

4.3 GENEXPRESSIONSANALYSEN

4.3.1 AUSWIRKUNG DER ZELLKULTURPASSAGE AUF C3aR, CD46 UND CD59

Zu Beginn der folgenden Genexpressionsanalysen galt es zu klären, inwieweit die Höhe der Zellkulturpassage und damit die Kulturdauer der Tendozyten einen Einfluss auf die Expression der für die weiteren Untersuchungen wichtigen Gene nehmen können. Dadurch kann eine ungewollte Beeinflussung der erzielten Ergebnisse durch einen langen Kultivierungszeitraum der Sehnenzellen erkannt und minimiert werden. Hierzu wurden Tendozyten von 3 verschiedenen Spendern in den Passagen P3, P6, P8 und P12 kultiviert und auf die Expression der Gene des C3a-Rezeptors, CD46 und CD59 hin untersucht.

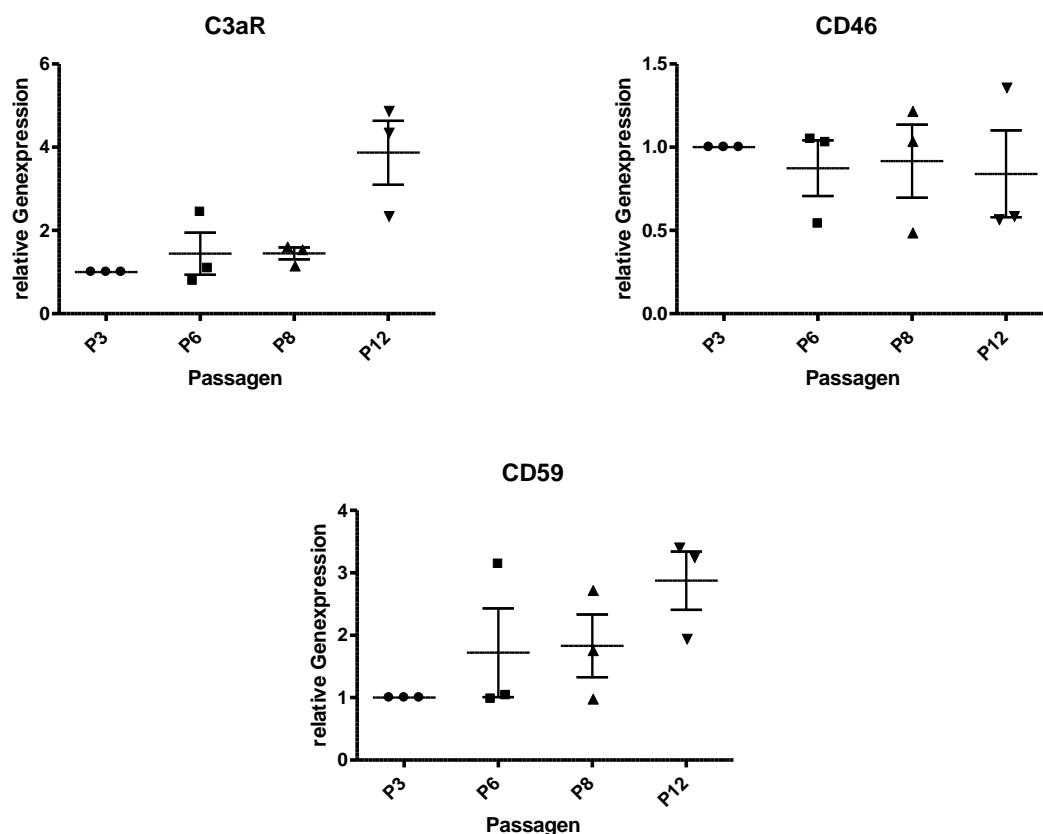


Abbildung 13: Genexpressionsanalyse für C3aR, CD59 und CD46 in Abhängigkeit von der Zellkulturpassage. Die Tendozyten aus Hamstringsehnen von 3 verschiedenen Spendern wurden in 3 unabhängigen Experimenten für 3, 6, 8 und 12 Passagen (P) kultiviert und auf die Genexpression des C3a-Rezeptors, CD46 und CD59 hin untersucht. Die Kontrollen wurden auf 1 normiert.

Die Abbildung 13 zeigt die relativen Expressionsveränderungen der Gene des C3a-Rezeptor, CD46 und CD59 bei zunehmender Höhe der Zellkulturpassage. Die Analyse des C3a-Rezeptors ergab keine signifikanten Expressions-Veränderungen bei zunehmender Passage. Die Passage P12 stellte jedoch sprunghaft die größte Abweichung in der relativen Genexpression im Vergleich zur Passage P3 dar. Für CD46 war keine signifikante Veränderung der Genexpression, allerdings eine leichte Expressionsminderung als Tendenz zu erkennen. CD59 zeigte ebenfalls keine signifikanten Veränderungen, es war jedoch in Passage P12 im Vergleich zu den Passagen P3, 6 und P8, genau wie für den C3aR beschrieben, stärker exprimiert. Konsequenz dieser Untersuchung war es, keine Tendozyten in Passagen größer als der Passage P8 für die folgenden Versuche zu verwenden, um eine möglichst geringe Beeinflussung der Genexpressionsveränderungen durch die Höhe der Passage und damit auch die Kultivierungsdauer der Zellen zu gewährleisten.

4.3.2 AUSWIRKUNG DER STIMULATION MIT C3A AUF TENDOZYTEN

Um den Einfluss der Aktivierung des Komplementsystems auf Tendozyten darstellen zu können, wurden Sehnenzellen mit dem Anaphylatoxin C3a in zwei physiologischen Konzentrationen 0,1 µg/mL und 1 µg/mL über 4 h und 24 h kultiviert, vgl. dazu Gebhard et al. (2000) und Ignatius et al. (2011). Untersucht wurden die Expression der Gene für den C3a-Rezeptor, der zytoprotektiven Komplement-regulatorischen Proteine CD46 und CD55 und zusätzlich als Marker für eine mögliche proinflammatorische Reaktion die Genexpression der Zytokine TNF α , IL-6 und IL- β sowie der MMP-1 als matrixabbauendes Enzym.

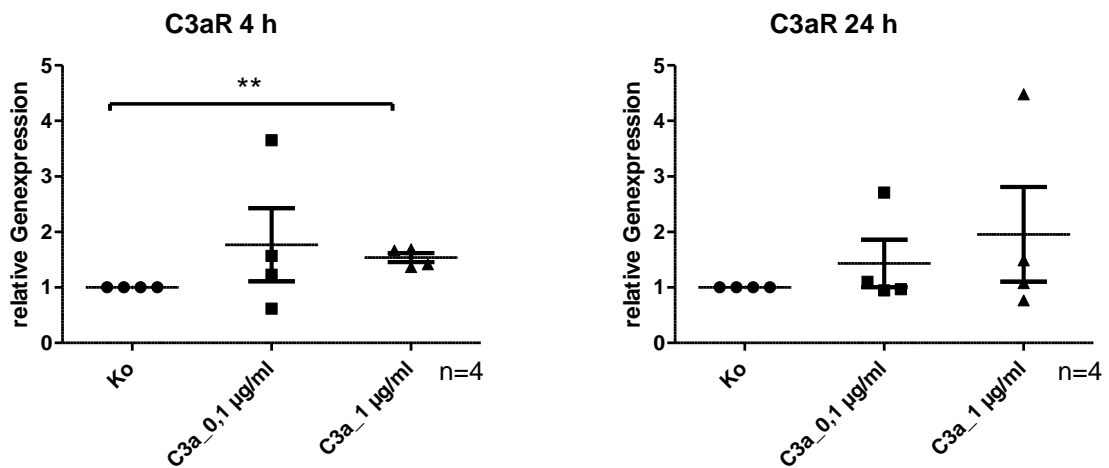


Abbildung 14: Genexpressionsanalyse des C3a-Rezeptors bei C3a stimulierten Tendozyten nach 4 h und 24 h. Die Genexpression von Tendozyten aus Hamstringsehnen von 4 verschiedenen Spendern wurde in 4 unabhängigen Experimenten überprüft. Die Kontrollen (Ko) wurden auf 1 normiert.

Die Stimulation der Sehnenzellen mit dem durch die Aktivität der C3-Konvertase aus C3 entstandenen Spaltprodukt C3a zeigte hier in der Konzentration 1 µg/mL zum Zeitpunkt 4 h eine signifikante Steigerung der Genexpression des C3a-Rezeptors. Die schwächere C3a-Konzentration von 0,1 µg/mL induzierte hier keinen signifikanten Effekt (Abb. 14).

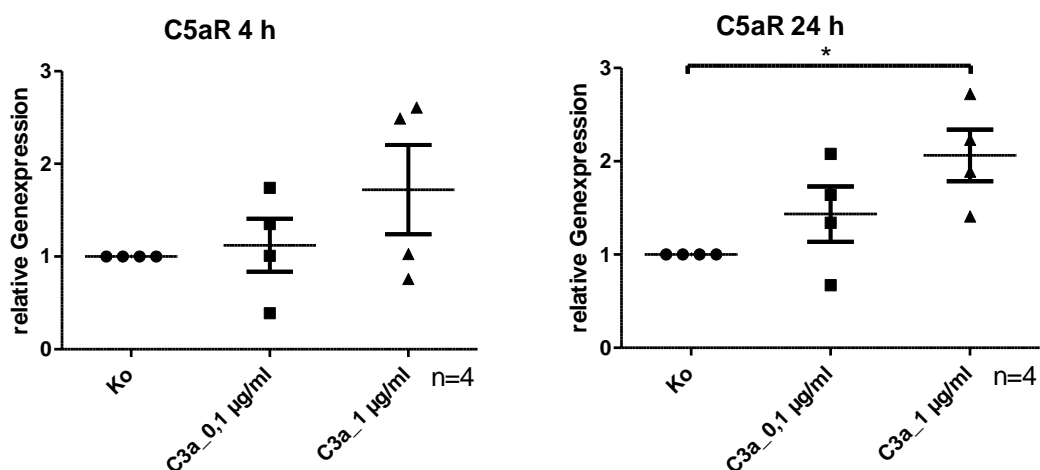


Abbildung 15: Genexpressionsanalyse des C5a-Rezeptors bei C3a stimulierten Tendozyten nach 4 h und 24 h. Die Genexpression von Tendozyten aus Hamstringsehnen von 4 verschiedenen Spendern wurde in 4 unabhängigen Experimenten überprüft. Die Kontrollen (Ko) wurden auf 1 normiert.

Der Rezeptor für das Anaphylatoxin C5a zeigte nach der C3a-Stimulation ebenfalls eine Genexpressionssteigerung, welche 24 h nach Stimulation mit C3a in der Konzentration von 1 µg/mL signifikant erhöht war (Abb. 15). Zum Zeitpunkt 4 h nach Stimulation ist eine Tendenz der Genexpressionssteigerung erkennbar. Zu beiden Zeitpunkten lässt sich ein stärkerer Effekt der Genexpressionsveränderung bei der C3a-Konzentration von 1 µg/mL gegenüber der C3a-Konzentration von 0,1 µg/mL feststellen.

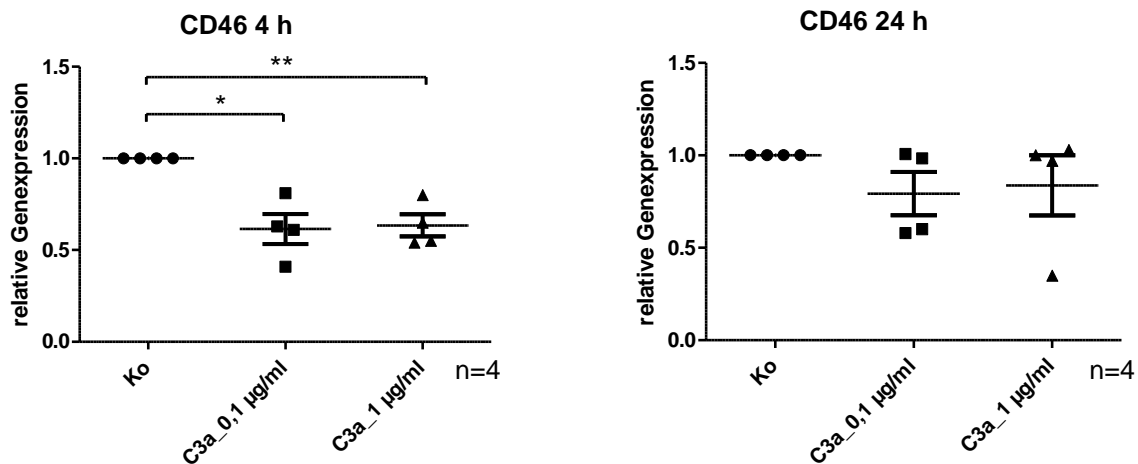


Abbildung 16: Genexpressionsanalyse von CD46 bei C3a-stimulierten Tendozyten nach 4 h und 24 h. Die Genexpression von Tendozyten aus Hamstringsehnen von 4 verschiedenen Spendern wurde in 4 unabhängigen Experimenten überprüft. Die Kontrollen (Ko) wurden auf 1 normiert.

Das Gen für das C3b- und C4b-inhibierende Protein CD46 wurde zum Zeitpunkt 4 h nach C3a-Stimulation in beiden Konzentrationsstufen signifikant vermindert exprimiert, nach 24 h konnte kein signifikanter Effekt mehr beobachtet werden (siehe Abb. 16).

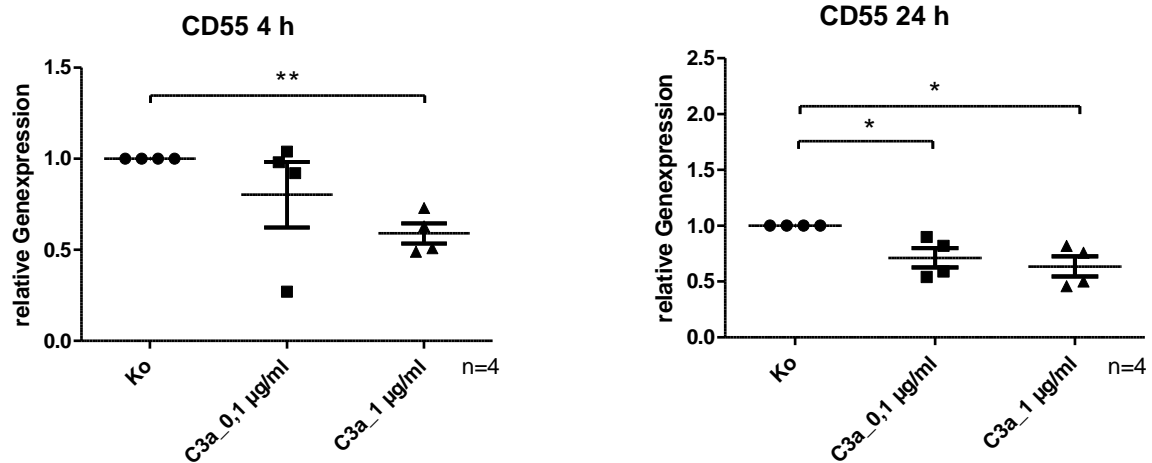


Abbildung 17: Genexpressionsanalyse von CD55 bei C3a-stimulierten Tendozyten. Die Genexpression von Tendozyten aus Hamstringsehnen von 4 verschiedenen Spendern wurde in 4 unabhängigen Experimenten überprüft. Die Kontrollen (Ko) wurden auf 1 normiert.

Auch das Gen des komplementinhibitorischen Proteins CD55 war zu dem 4 h-Zeitpunkt bei einer C3a-Stimulationskonzentration von 1 µg/mL signifikant vermindert exprimiert (Abb. 17). Die schwächere C3a-Konzentration blieb hierbei ohne signifikanten Einfluss auf die Expression von CD55. Interessanterweise zeigte sich diesmal eine Genexpressionsminderung für CD55 bei beiden Stimulationskonzentrationen auch zu dem 24 h-Zeitpunkt.

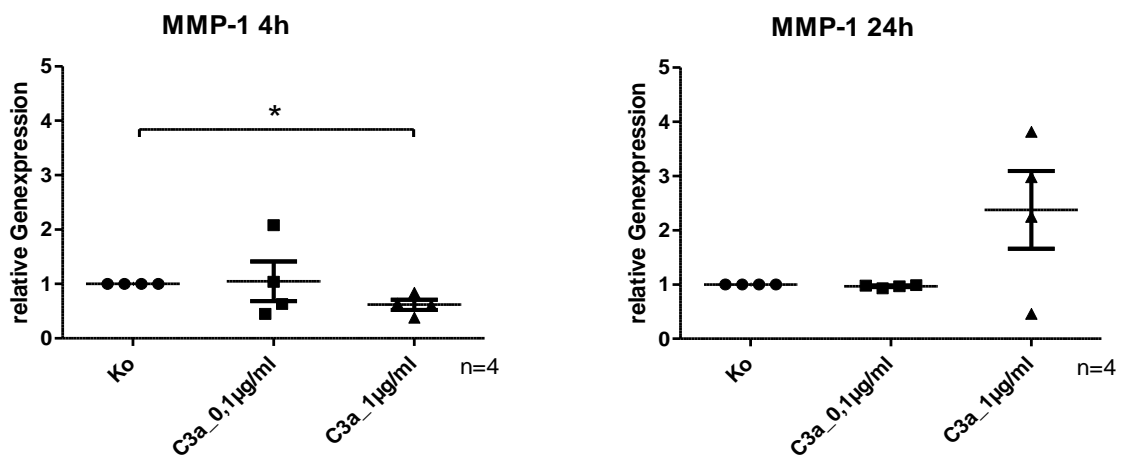


Abbildung 18: Genexpressionsanalyse von MMP-1 bei C3a-stimulierten Tendozyten. Die Genexpression von Tendozyten aus Hamstringsehnen von 4 verschiedenen Spendern wurde in 4 unabhängigen Experimenten überprüft. Die Kontrollen (Ko) wurden auf 1 normiert.

Die matrixabbauende MMP-1 wurde zum Zeitpunkt 4 h unter der Stimulation mit C3a in der Konzentration von 1 µg/mL signifikant geringer exprimiert. Zum 24 h-Zeitpunkt

zeigte sich für die MMP-1 in der C3a Stimulation keine signifikante Veränderung der Genexpression (Abb. 18).

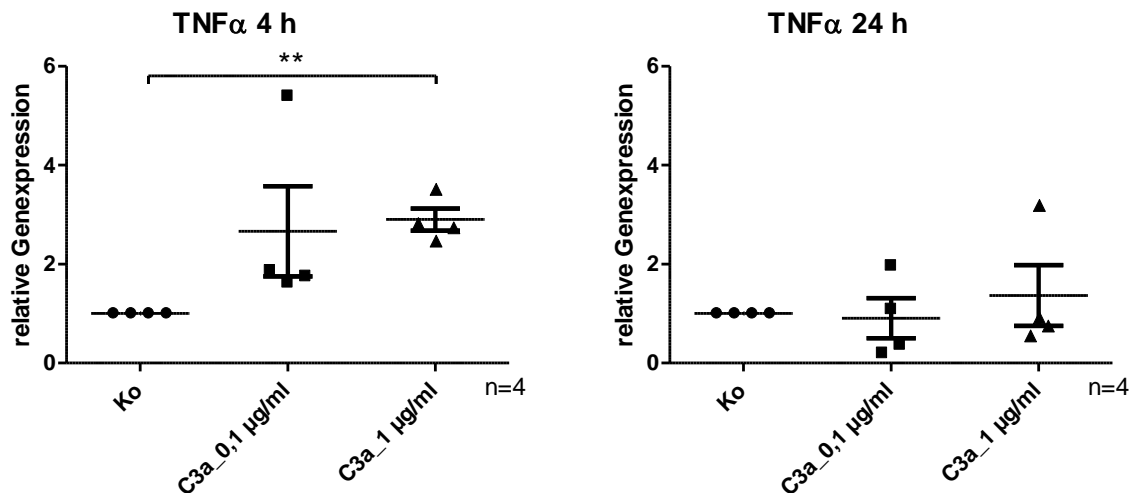


Abbildung 19: Genexpressionsanalyse von TNF α bei C3a-stimulierten Tendozyten. Die Genexpression von Tendozyten aus Hamstringsehnen von 4 verschiedenen Spendern wurde in 4 unabhängigen Experimenten überprüft. Die Kontrollen (Ko) wurden auf 1 normiert.

Als Marker einer möglichen proinflammatorischen Reaktion der Tendozyten auf die Stimulation mit C3a wurde hier TNF α untersucht. 4 h nach Beginn der C3a-Stimulation in einer Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ zeigte sich TNF α hochsignifikant in seiner Genexpression gesteigert, wobei die schwächere C3a Stimulationskonzentration von 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ zumindest eine gleichgerichtete Tendenz hervorrief (Abb. 19).

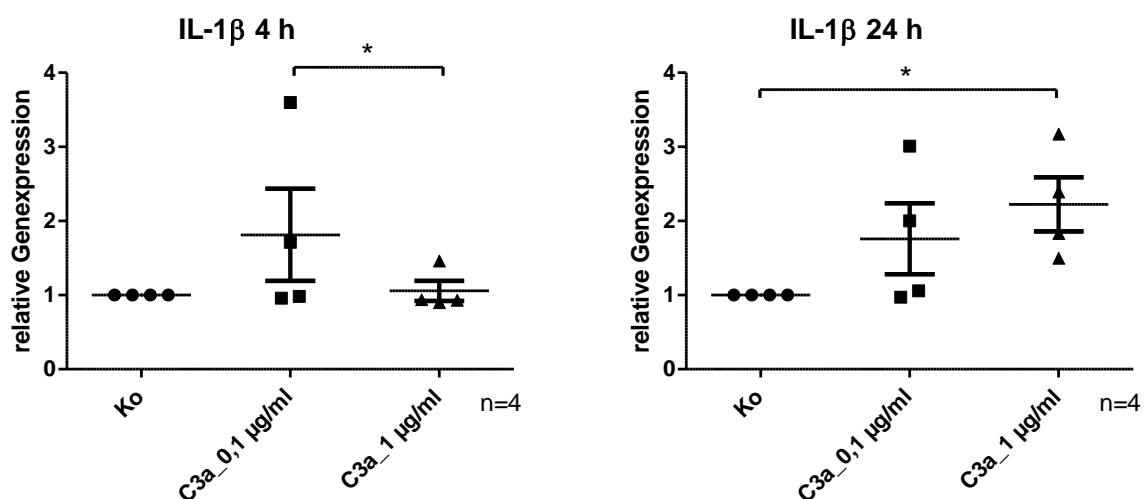


Abbildung 20: Genexpressionsanalyse von IL-1 β bei C3a-stimulierten Tendozyten. Die Genexpression von Tendozyten aus Hamstringsehnen von 4 verschiedenen Spendern wurde in 4 unabhängigen Experimenten überprüft. Die Kontrollen (Ko) wurden auf 1 normiert.

IL-1 β wurde hier ebenfalls als Hinweis auf eine mögliche proinflammatorische Reaktionsbildung untersucht. 24 h nach Behandlung, nicht aber nach 4 h, konnte die C3a Stimulation in der Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ eine signifikante Genexpressionssteigerung des Gens für IL-1 β in den Tendozyten induzieren (Abb. 20).

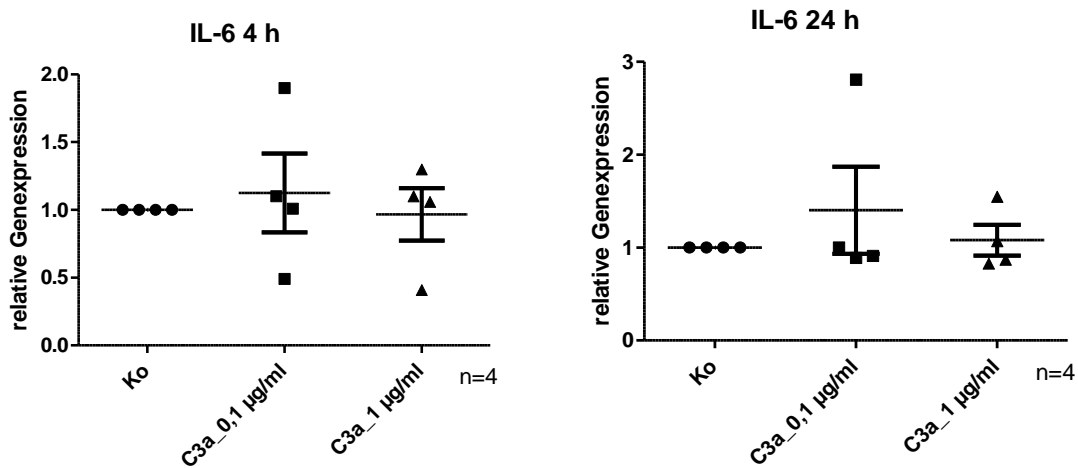


Abbildung 21: Genexpressionsanalyse von IL-6 bei C3a-stimulierten Tendozyten. Die Genexpression von Tendozyten aus Hamstringsehnen von 4 verschiedenen Spendern wurde in 4 unabhängigen Experimenten überprüft. Die Kontrollen (Ko) wurden auf 1 normiert.

Für IL-6, als weiteren Marker einer proinflammatorischen Reaktion, konnten zu beiden Untersuchungszeitpunkten keine signifikanten Veränderungen nachgewiesen werden (Abb. 21).

4.3.3 AUSWIRKUNG DES VERLETZUNGSASSAYS AUF TENDOZYTEN

Um den Einfluss von isolierten Verletzungen auf Tendozyten zu charakterisieren, wurden im folgenden Experiment lebende Tendozyten mechanisch verletzt und auf die Expression der im vorausgegangenen Versuch untersuchten Gene hin analysiert. Um sowohl eine reproduzierbare als auch eine ausreichend starke Verletzung des Zellkulturrasens setzen zu können, wurde für den folgenden Versuch eine neue Verletzungsmethode entwickelt, bei der computergesteuert und standardisiert über die gesamte Petrischale alle 500 μm ein Schnitt in den Zellrasen gesetzt wurde (vgl. Abb. 7 und 8). Diese Methode des IVM war Grundlage der folgenden Ergebnisse.

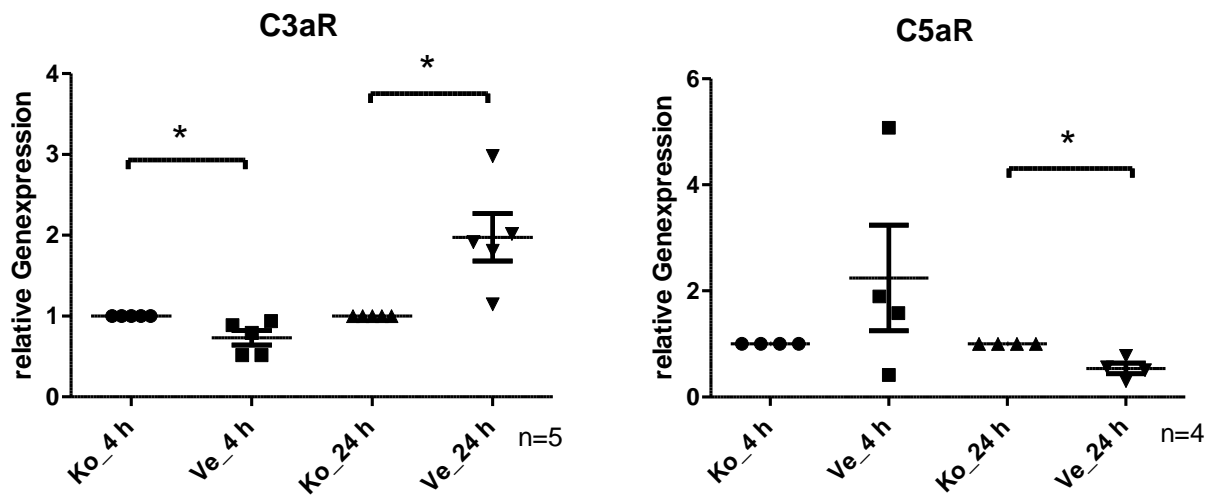


Abbildung 22: Genexpressionsanalyse des C3a- und C5a-Rezeptors bei *in-vitro* verletzten Tendozyten. Die Genexpression von Tendozyten aus Hamstringsehnen von 5 verschiedenen Spendern wurde in 5 unabhängigen Experimenten überprüft. Die Kontrollen (Ko) wurden auf 1 normiert. Ve: Verletzung.

Die *in-vitro* Verletzung bewirkte hinsichtlich des C3a-Rezeptors zum Zeitpunkt 4 h eine signifikant geringere Genexpression, wohingegen zu dem 24 h-Zeitpunkt das Gen des C3a-Rezeptors in den Tendozyten signifikant stärker exprimiert wurde (Abb. 22). Der C5a-Rezeptor zeigte nach 24 h eine signifikant verminderte Genexpression (Abb. 23).

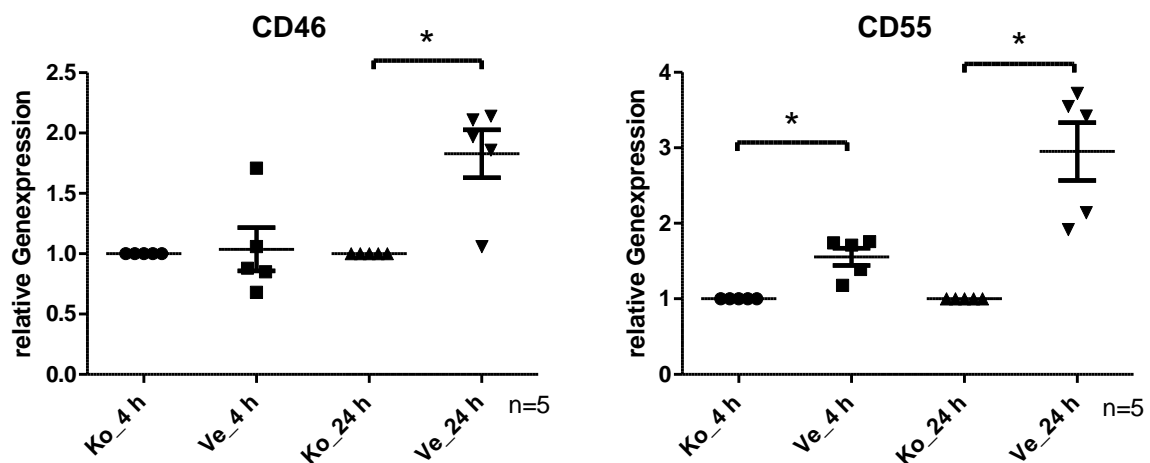


Abbildung 23: Genexpressionsanalysen von CD46 und CD55 bei *in-vitro* verletzten Tendozyten. Die Genexpression von Tendozyten aus Hamstringsehnen von 5 verschiedenen Spendern wurde in 5 unabhängigen Experimenten überprüft. Die Kontrollen (Ko) wurden auf 1 normiert. Ve: Verletzung.

Das komplementinhibitorische Protein CD55 zeigte hier in seiner Genexpression sowohl zum 4 h- als auch zum 24 h-Zeitpunkt eine signifikant gesteigerte Genexpression. Auch

das Gen des Komplementinhibitors CD46 wies zu dem 24 h-Zeitpunkt eine signifikante Genexpressionssteigerung auf (Abb. 23).

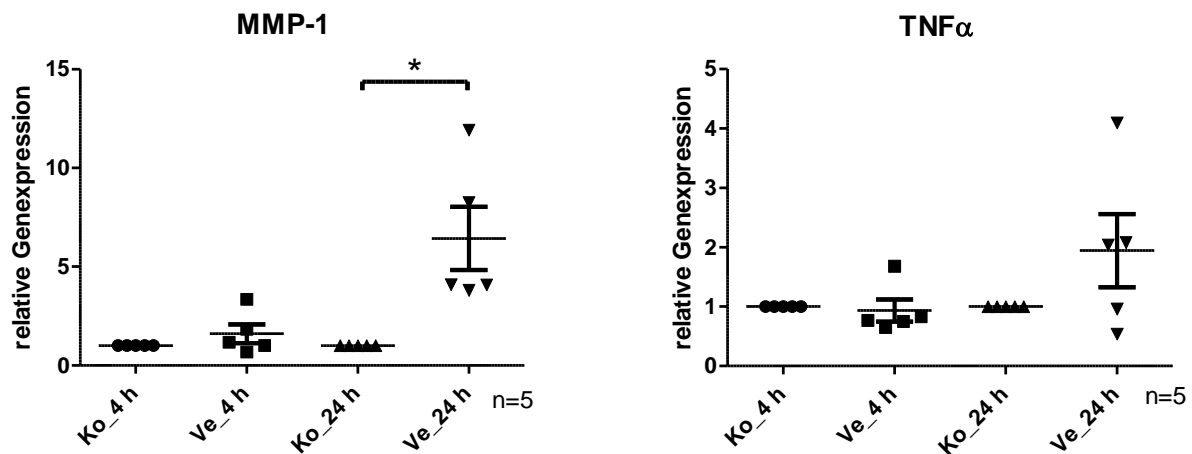


Abbildung 24: Genexpressionsanalyse von MMP-1 und TNFα bei *in-vitro* verletzten Tendozyten. Die Genexpression von Tendozyten aus Hamstringsehnen von 5 verschiedenen Spendern wurde in 5 unabhängigen Experimenten überprüft. Die Kontrollen (Ko) wurden auf 1 normiert. Ve: Verletzung.

Die matrixabbauende MMP-1 zeigte durch die Verletzung eine signifikante und deutliche Expressionssteigerung 24 h nach Verletzung. Die Analyse der TNFα-Genexpression ergab hingegen keine signifikante Veränderung (Abb. 24).

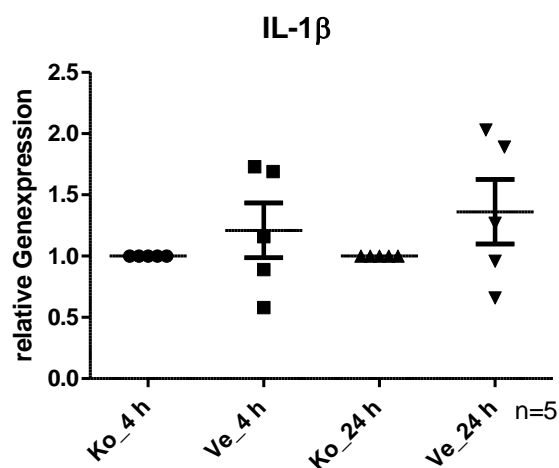


Abbildung 25: Genexpressionsanalyse von IL-1β bei *in-vitro* verletzten Tendozyten. Die Genexpression von Tendozyten aus Hamstringsehnen von 5 verschiedenen Spendern wurde in 5 unabhängigen Experimenten überprüft. Die Kontrollen (Ko) wurden auf 1 normiert. Ve: Verletzung.

Die Verletzung der Tendozyten konnte keine signifikante Veränderung der Genexpression von IL-1β zeigen (Abb. 25).

4.3.4 AUSWIRKUNG DER KOMBINIERTEN STIMULATION VON C3A UND VERLETZUNGSASSAY AUF TENDOZYTEN

In den beiden bisher erfolgten Versuchen wurden Sehnenzellen jeweils entweder mit dem Anaphylatoxin C3a stimuliert oder mit dem IVM getestet. In dem nun folgenden Versuch wurden die Stimulation mit C3a sowie die Stimulation durch die beschriebene Verletzung der Zellen zusammengeführt. Dadurch wird eine Analyse der zusätzlichen Auswirkungen der C3a-Präsenz bei mechanischen Zellverletzungen, wie sie auch bei Sehnenrupturen denkbar sind, ermöglicht. Die Auswahl der analysierten Gene bezog sich hierbei auf die Targets, bei denen wesentliche Genexpressionsveränderungen in den beiden vorangegangenen Versuchsreihen beobachtet wurden.

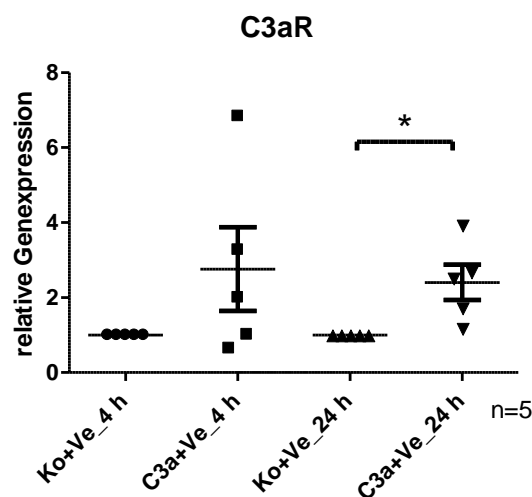


Abbildung 26: Genexpressionsanalyse von C3aR bei der kombinierten Stimulation von C3a (1 µg/mL) und Verletzungsassay. Die Genexpression von Tendozyten aus Hamstringsehnen von 5 verschiedenen Spendern wurde in 5 unabhängigen Experimenten überprüft. Die Kontrollen (Ko), bei denen der Zellrasen verletzt wurde (Ve), die aber keine Stimulation mit C3a erhielten, wurden auf 1 normiert.

Eine zusätzliche Stimulation der zuvor verletzten Tendozytenkultur mit C3a spiegelte hier in der signifikanten Genexpressionssteigerung des C3a-Rezeptors der Tendozyten zum 24 h-Zeitpunkt die bereits vorher bei isolierter C3a-Stimulation beobachtete Genexpressionssteigerung des C3a-Rezeptors wider. Die durch die Zellkulturverletzung allein bewirkte signifikante Gensuppression des C3a-Rezeptors nach 4 h ist bei kombinierter Stimulation nicht mehr zu beobachten. Auch die Ergebnisse des 4 h-Zeitpunktes weisen eine Tendenz der Genexpressionssteigerung auf (Abb. 26).

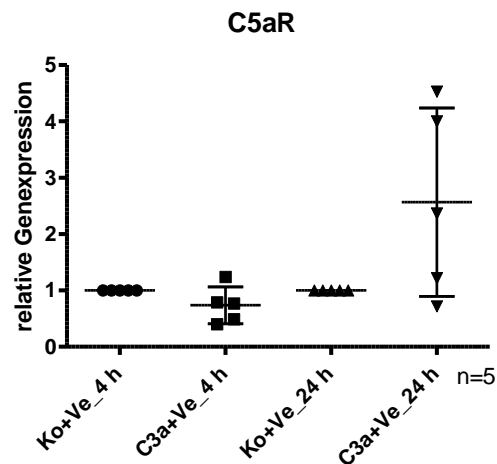


Abbildung 27: Genexpressionsanalyse des C5a-Rezeptor bei der kombinierten Stimulation von C3a (1 µg/mL) und Verletzungsassay. Die Genexpression von Tendozyten aus Hamstringsehnen von 5 verschiedenen Spendern wurde in 5 unabhängigen Experimenten überprüft. Die Kontrollen wurden auf 1 normiert.

Die kombinierte Stimulation mit C3a und der Verletzung konnte keine signifikanten Genexpressionsveränderungen des C5a-Rezeptors erzielen. Es überwiegt jedoch zum Zeitpunkt 24 h nach Stimulation die Tendenz der bereits aus der alleinigen C3a-Stimulation bekannten Steigerung der Genexpression des C5a-Rezeptors (Abb. 27).

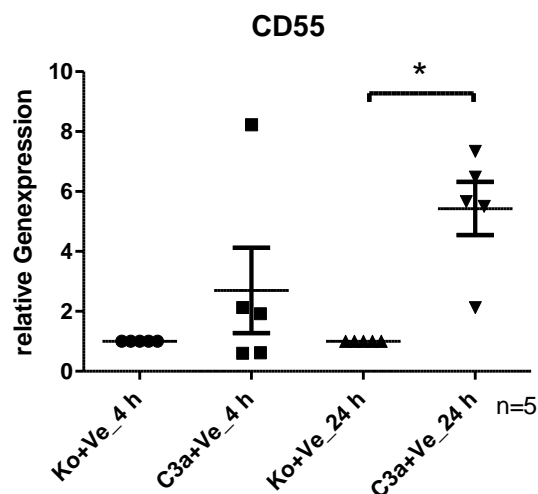


Abbildung 28: Genexpressionsanalyse von CD55 bei der kombinierten Stimulation von C3a (1 µg/mL) und Verletzungsassay. Die Genexpression von Tendozyten aus Hamstringsehnen von 5 verschiedenen Spendern wurde in 5 unabhängigen Experimenten überprüft. Die Kontrollen wurden auf 1 normiert.

Das Gen für das komplementinhibitorische CD55-Oberflächenprotein der Tendozyten reagierte ähnlich dem C3a-Rezeptor nach 24 h mit einer signifikanten und starken Genexpressionssteigerung, wobei auch bereits nach 4 h eine nicht signifikante Tendenz der Expressionssteigerung zu sehen war (Abb. 28).

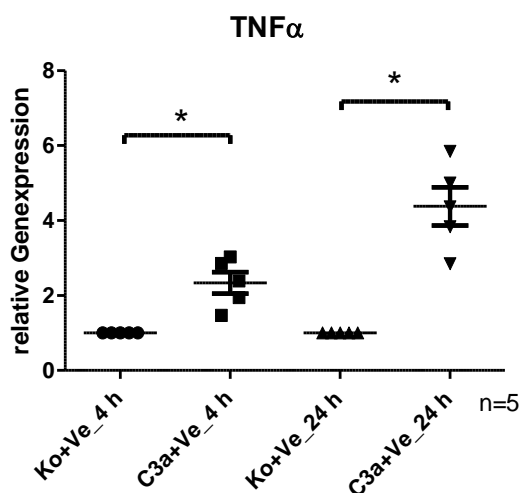


Abbildung 29: Genexpressionsanalyse von TNF α bei der kombinierten Stimulation von C3a (1 μ g/mL) und Verletzungsassay. Die Genexpression von Tendozyten aus Hamstringsehnen von 5 verschiedenen Spendern wurde in 5 unabhängigen Experimenten überprüft. Die Kontrollen wurden auf 1 normiert.

Besonders interessant war in diesem Experiment das Verhalten der TNF α -Genexpression, die sowohl nach 4 h als auch nach 24 h eine signifikante Genexpressionserhöhung aufwies, welche sich deutlich von der 4 h-Analyse zu der 24 h-Analyse steigerte. In den bisherigen Experimenten hingegen konnte nur in der C3a-Stimulation nach 4 h eine signifikant erhöhte TNF α -Genexpression gemessen werden (Abb. 29).

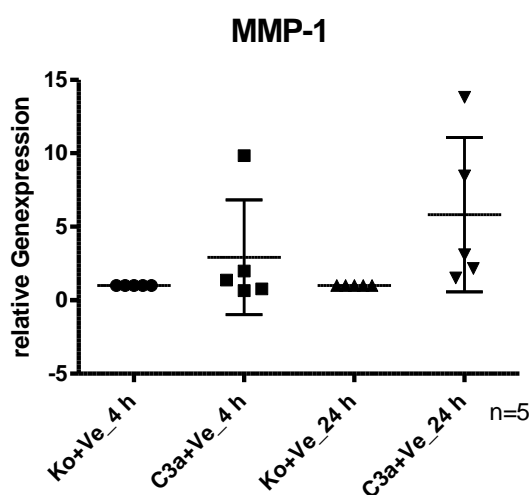


Abbildung 30: Genexpressionsanalyse von MMP-1 bei der kombinierten Stimulation von C3a (1 μ g/mL) und Verletzungsassay. Die Genexpression von Tendozyten aus Hamstringsehnen von 5 verschiedenen Spendern wurde in 5 unabhängigen Experimenten überprüft. Die Kontrollen wurden auf 1 normiert.

Für die Genexpression der MMP-1 konnte mit der Kombination aus Zellverletzung und C3a Stimulation kein signifikanter Effekt nachgewiesen werden (Abb. 30).

4.4 HISTOLOGISCHE FÄRBUNGEN

Um für relevante Sehnenpathologien exemplarisch histologische Färbungen den nachfolgenden Immunmarkierungen gegenüberstellen zu können, wurden Paraffinschnitte von humanen Sehnen hergestellt. Die verwendeten humanen Sehnenpräparate entstammen Operationen, bei denen aus medizinischen Indikationen Sehngewebe entfernt werden musste. Für die Arbeit mit humanen Tendozyten ist die Kenntnis ihrer Herkunft und die Indikation der Entnahme des Sehnenpräparates eine wichtige Grundlage. Neben HE-Färbungen wurden auch AB-Färbungen angefertigt, um saure GAG als Bestandteile von PG in der Sehne darstellen zu können. PG werden in der Literatur mit Wasserbindung und Aggregation der Kollagenfibrillen in Verbindung gebracht (Zhang, Ezura et al. 2006). Normalerweise haben PG einen Anteil von ungefähr 5 % des Trockengewichts der Sehne, wobei Decorin das am häufigsten vertretene PG in der Sehne ist (Matuszewski, Chen et al. 2012). In einer AB-Färbung können sulfatierte PG histologisch blau angefärbt werden. Nachfolgend ist in der Abbildung 31 eine HE- sowie AB-Färbung einer gesunden humanen Fingersehne gezeigt.

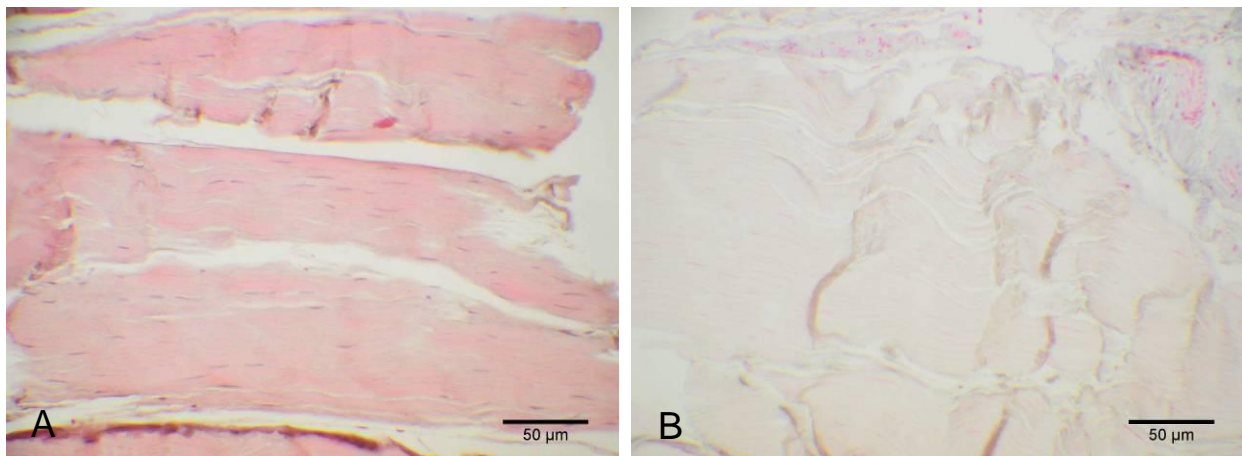


Abbildung 31: HE- und AB-Färbung einer gesunden humanen Fingersehne. A: gesunde humane Fingersehne in HE-Färbung, B: gesunde humane Fingersehne in AB-Färbung; Messbalken 50 µm.

Abbildung 31A stellt eine humane Fingersehne dar, welche die typische längsgerichtete, leicht gewellte, aber dichte Struktur der parallel verlaufenden Kollagenfaserbündel der EZM aufweist. Ablösungen einzelner Sehnenbündel können als Artefakt durch die angewandte Schnitttechnik entstehen. Abbildung 31B zeigt dieselbe gesunde Fingersehne in einer AB-Färbung, durch die PG blau dargestellt

werden können. Bei der gesunden Fingersehne in Abbildung 31B konnten keine PG histologisch dargestellt werden.

Die folgenden Abbildungen zeigen histologische Korrelate von degenerierten, rupturierten und gequetschten Sehnenpräparaten.

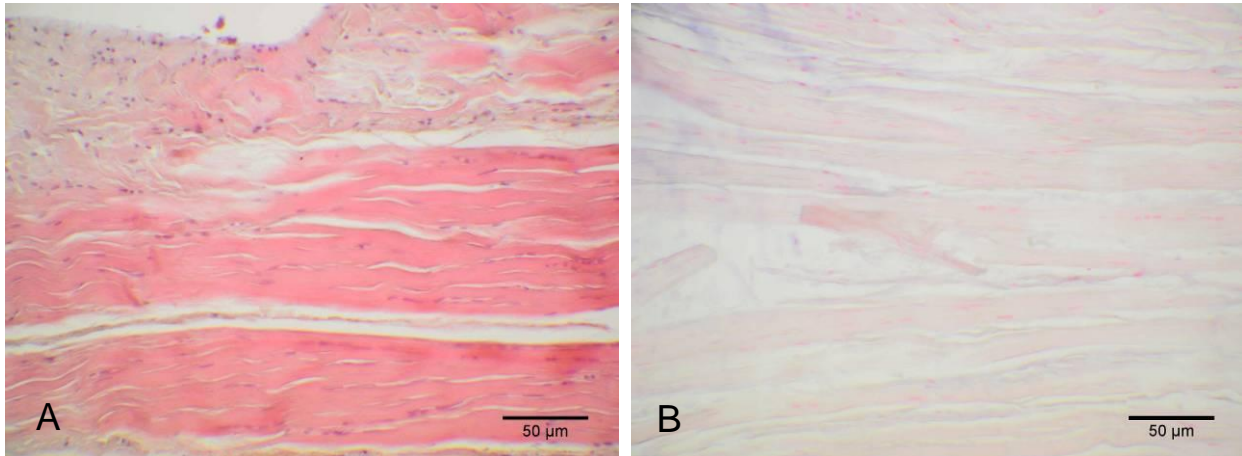


Abbildung 32: HE- und AB-Färbung einer gequetschten humanen Fingersehne. A: gequetschte humane Fingersehne in HE-Färbung, B: gequetschte humane Fingersehne in AB-Färbung; Messbalken 50 µm.

Abbildung 32 stellt eine humane Fingersehne dar, welche im Rahmen einer traumatischen Abtrennung eines Fingers gequetscht wurde und anschließend nach fehlgeschlagener Rekonstruktion des Fingers als Präparat entnommen wurde. In der Abbildung 32A ist eine HE-Färbung der Sehne gezeigt, bei der eine Auflockerung der parallel verlaufenden Kollagenfaserbündel und eine Zellimmigration aus dem Epitendon erkennbar ist. Die Abbildung 32B stellt eine AB-Färbung derselben Sehne dar, aus der sich kein Nachweis von PG ergibt.

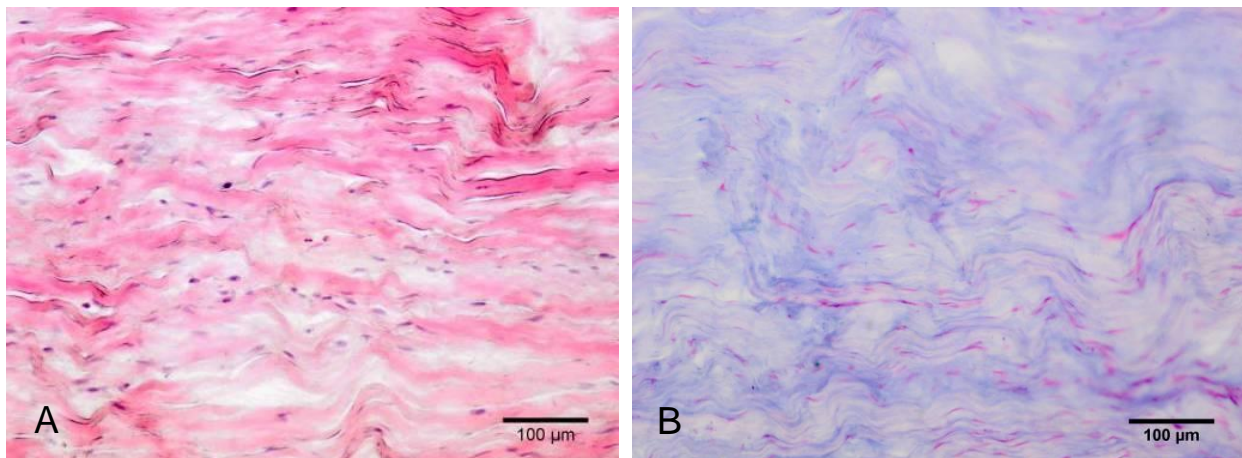


Abbildung 33: HE- und AB-Färbung einer degenerierten humanen Achillessehne. A: degenerierte humane Achillessehne in HE-Färbung, B: degenerierte humane Achillessehne in AB-Färbung; Messbalken 100 µm.

In Abbildung 33 ist eine degenerierte humane Achillessehne dargestellt. Degenerative Veränderungen in Sehnen können sich histologisch in einem Strukturverlust der Kollagenfasern und in einem vermehrten PG-Gehalt widerspiegeln. Blau angefärbte PG waren in der Abbildung 33B entlang der Kollagenfasern darstellbar. Im Vergleich zu der gesunden Fingersehne aus Abbildung 31 ist bei der degenerierten Achillessehne ein deutlicher Strukturverlust sowie eine Auflockerung der Kollagenfaserbündel erkennbar.

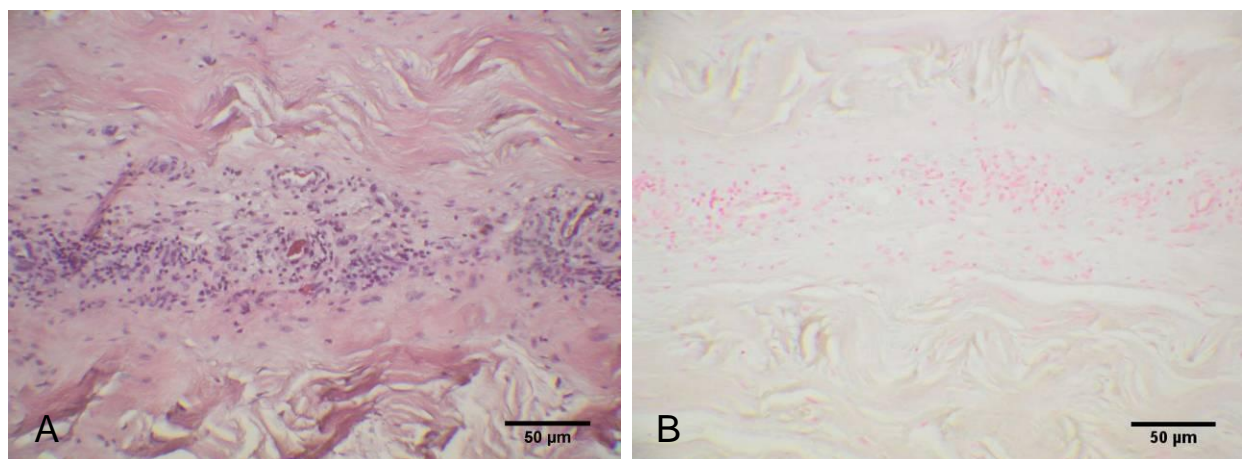


Abbildung 34: HE- und AB-Färbung einer stark degenerierten humanen Fingersehne. A: stark degenerierte humane Fingersehne in HE-Färbung, B: stark degenerierte Fingersehne in AB-Färbung; Messbalken 50 µm.

In Abbildung 34A ist eine stark degenerierte humane Fingersehne in HE-Färbung abgebildet. Der bereits aus der degenerierten Achillessehne (vgl. Abb. 33A) bekannte Strukturverlust der Sehnenarchitektur spiegelt sich auch hier stark ausgeprägt wider. Die Tendozyten haben ihre schnurartige, längliche Ausrichtung zueinander verloren. Eingewanderte Entzündungszellen und neugebildete, kleine Kapillaren sind zu

erkennen. In der Abb. 34B ist dieselbe Fingersehne dargestellt, blau angefärbte PG konnten jedoch in der AB-Färbung nicht nachgewiesen werden.

4.5 IMMUNHISTOLOGISCHE FÄRBUNGEN

4.5.1 IMMUNFÄRBUNGEN NATIVER SEHNENPRÄPARATE

Ähnlich den zuvor gezeigten histologischen Färbungen wurden auch auf immunhistologischer Ebene exemplarische Übersichtsaufnahmen für in der weiteren Analyse wichtige Proteine erstellt. Die immunhistologischen Färbungen erfolgten an Paraffinschnitten nativer Sehnenpräparate. Die folgenden Abbildungen stellen Immunmarkierungen des C5a-Rezeptors und des CRP CD55 einer degenerierten und einer gesunden Fingersehne dar.

C5a-Rezeptor – Sehne

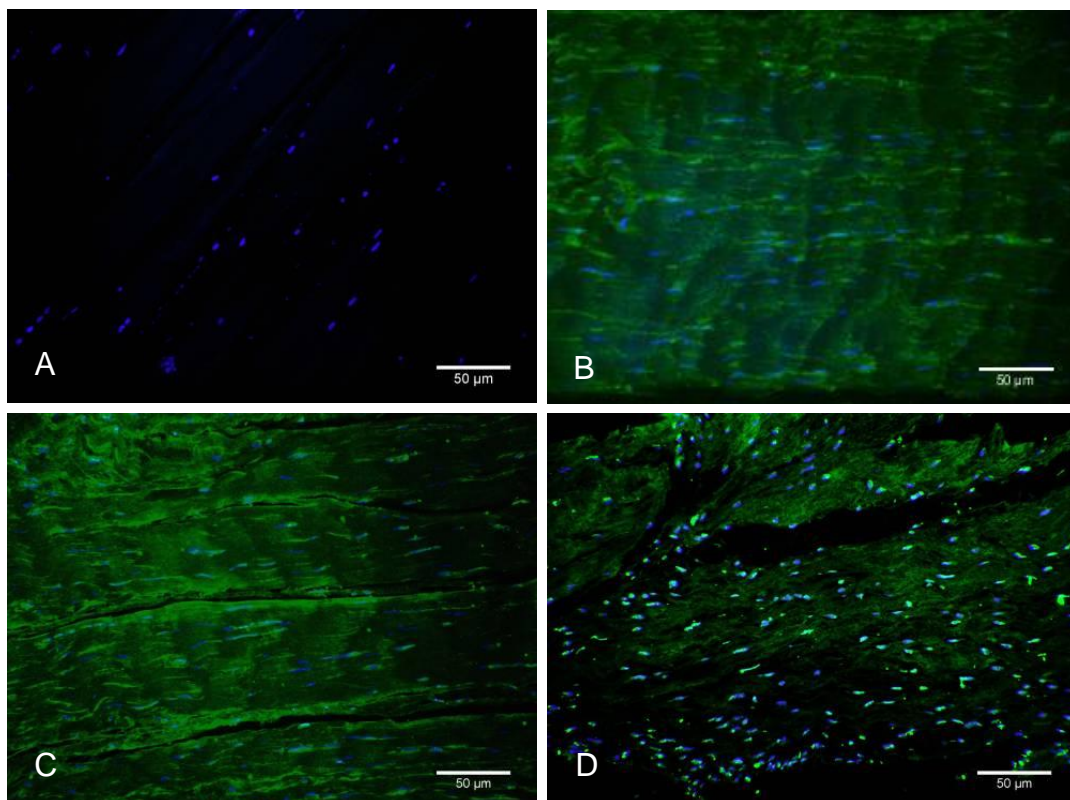


Abbildung 35: C5aR – Immunfluoreszenzfärbung humaner Sehnen. A: Isotyp-Kontrollfärbung mit anti-mouse IgG; B: C5aR-immunmarkierter Paraffinschnitt einer gesunden nativen Fingersehne; C: C5aR-immunmarkierter Paraffinschnitt einer gequetschten nativen Fingersehne nach Amputation bei erfolgloser Fingerrekonstruktion; D: C5aR-immunmarkierter Paraffinschnitt einer stark degenerierten nativen Fingersehne, Messbalken 50 µm.

Die Abbildung 35 zeigt den C5a-Rezeptor im immungefärbten Paraffinschnitt eines nativen Fingersehnenpräparats. Abbildung 35B zeigt dabei eine gesunde Fingersehne, bei der eine schwache Fluoreszenz die Expression des C5a-Rezeptors belegt. In Abbildung 35C ist eine gequetschte native Fingersehne im Zustand nach Amputation bei erfolgloser Fingerrekonstruktion abgebildet. Abgesehen von der stärkeren Anfärbung des Sehngewebes, scheint die zellassozierte Fluoreszenz in der gesunden und der gequetschten Fingersehne vergleichbar zu sein. In Abbildung 35D ist eine stark degenerierte Fingersehne gezeigt, welche eine deutlich stärkere zellassozierte Fluoreszenz als in Abbildung 35B und 35C erkennen lässt.

CD55 – Sehne

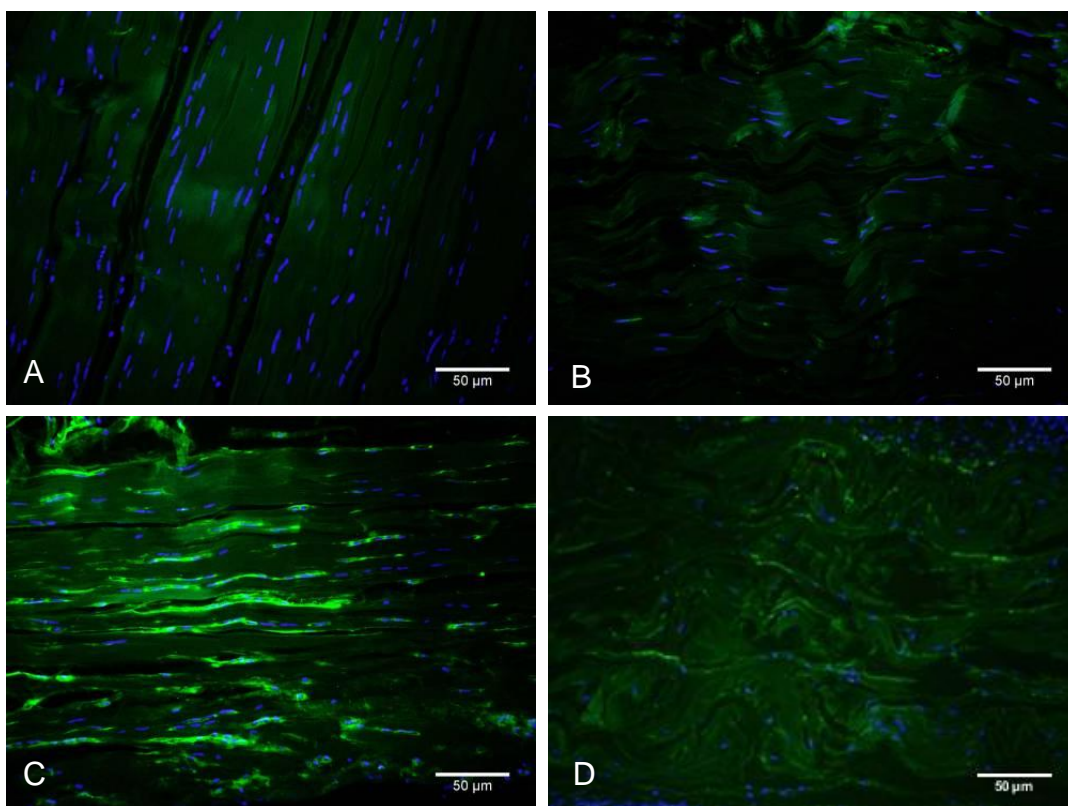


Abbildung 36: CD55 – Immunfluoreszenzfärbung humaner Sehnen. A: Isotyp-Kontrollfärbung mit anti-goat IgG; B: CD55-immunmarkierter Paraffinschnitt einer gesunden nativen Fingersehne; C: CD55-immunmarkierter Paraffinschnitt einer gequetschten nativen Fingersehne nach Amputation bei erfolgloser Fingerrekonstruktion; D: CD55-immunmarkierter Paraffinschnitt einer stark degenerierten nativen Fingersehne, Messbalken 50 µm.

Die Abbildung 36B stellt einen CD55-immungefärbten Paraffinschnitt einer gesunden Fingersehne dar. In dieser Aufnahme konnte nahezu keine zellassozierte Fluoreszenz nachgewiesen werden. In der Abbildung 36C ist eine gequetschte native Fingersehne im Zustand nach Amputation bei erfolgloser Fingerrekonstruktion gezeigt. Hierbei kann ein deutliches Fluoreszenzsignal entlang der länglich angeordneten Tendozyten

beobachtet werden. In der Abbildung 36D ist eine stark degenerierte Fingersehne dargestellt, bei der eine nur schwache Fluoreszenz nachgewiesen werden konnte.

4.5.2 IMMUNFÄRBUNG C3A-STIMULIERTER TENDOZYTEN

Der folgende Abschnitt galt der Untersuchung der erhobenen Genexpressionsdaten auf Proteinebene durch immunhistologische und immunzytochemische Färbungen. Anschließend erfolgte eine statistische Auswertung der Zellfluoreszenzintensität unter standardisierten Bedingungen, um so eine Aussage über eine eventuelle Veränderung der Proteinexpression erhalten zu können.

Zur Analyse der Genexpressionsdaten auf Proteinebene wurden Tendozyten von jeweils drei unterschiedlichen Spendern in drei unabhängigen Experimenten auf Glasplättchen angezchtet, mit 1 $\mu\text{g/mL}$ C3a über 24 h stimuliert und anschließend für mehrere Proteine immunmarkiert, deren Gene in den Genexpressionsanalysen zuvor untersucht wurden.

C5a-Rezeptor – Tendozyten

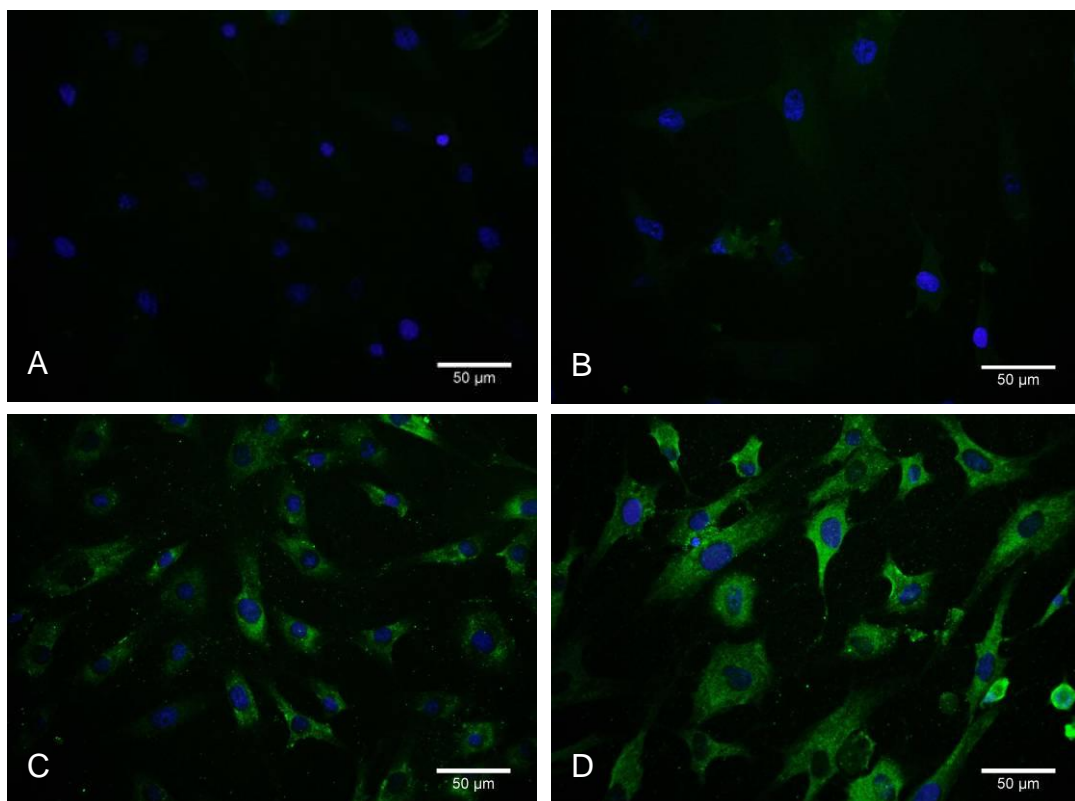


Abbildung 37: C5aR – Immunfluoreszenzfärbung kultivierter humaner Tendozyten. A: Kontrollfärbungen ohne Primärantikörper; B: Isotyp-Färbung mit unspezifisch bindendem Primärantikörper; C: C5aR-immunmarkierte Tendozyten ohne C3a-Stimulation; D: nach C3a-Stimulation C5aR-immunmarkierte Tendozyten, Messbalken 50 μm .

Diese Abbildung 37 zeigt die immunzytochemische Markierung des C5a-Rezeptors, hierbei ist eine zellassoziierte Fluoreszenz ersichtlich, die Kontrollfärbung ohne Primärantikörper weist dahingegen keine entsprechende zellassoziierte Fluoreszenz auf.

CD55 – Tendozyten

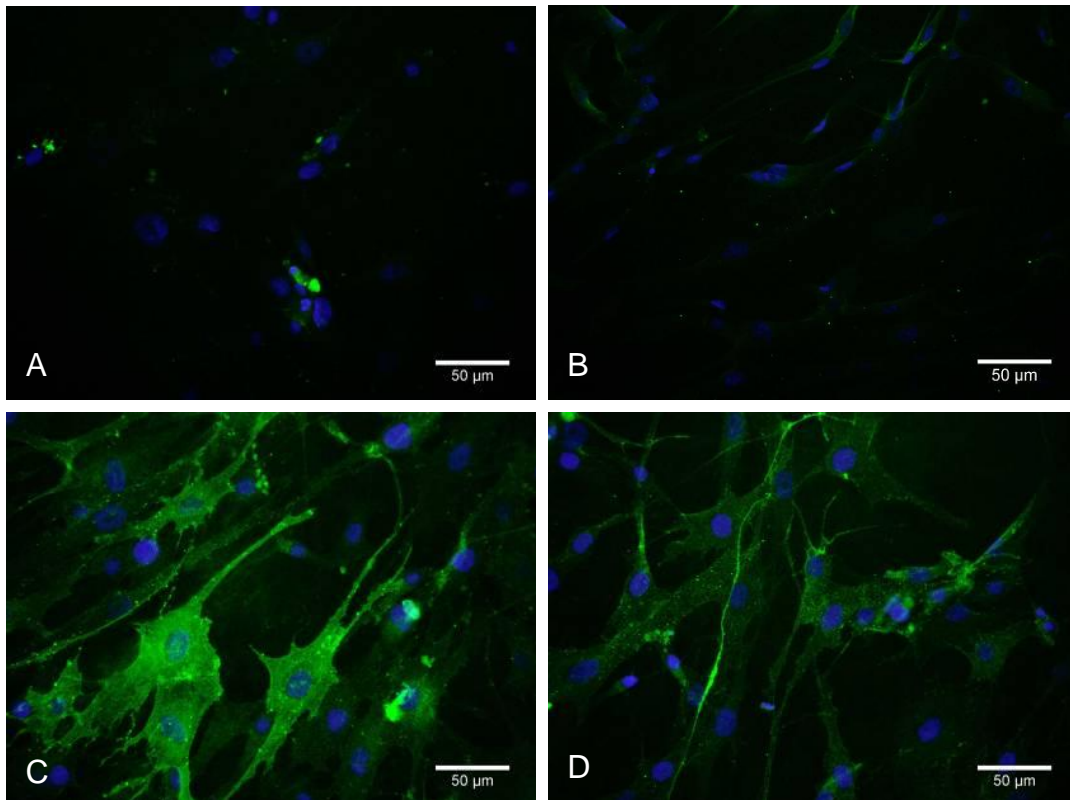


Abbildung 38: CD55 – Immunfluoreszenzfärbung kultivierter humaner Tendozyten. A: Kontrollfärbungen ohne Primärantikörper; B: Isotyp-Kontrollfärbung mit unspezifisch bindendem Primärantikörper; C: CD55-immunmarkierte Tendozyten ohne C3a-Stimulation; D: nach C3a-Stimulation CD55-immunmarkierte Tendozyten, Messbalken 50 µm.

Die Immunmarkierung lässt eine durch die C3a Behandlung hervorgerufene unterschiedliche Fluoreszenzintensität der CD55 gefärbten Tendozyten erkennen. Mittels einer parallel erfolgten DAPI-Färbung wurden Zellkerne hier blau dargestellt. Die Kontrollfärbungen zeigten keine vergleichbare zellassoziierte Fluoreszenz (Abb. 38).

Zur Verifizierung einer Fluoreszenzintensitätsdifferenz zwischen den C3a-stimulierten Tendozyten und den unbehandelten Tendozyten wurde eine statistische Auswertung der absoluten Zellfluoreszenzintensität pro Zellfläche durchgeführt.

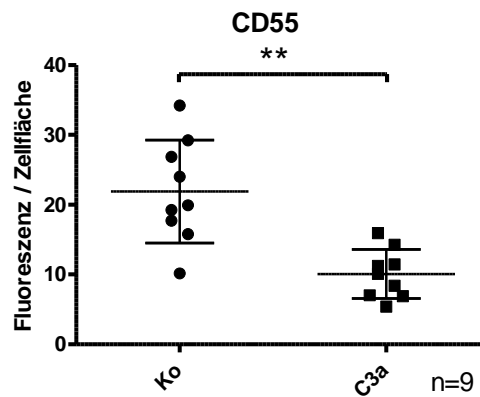


Abbildung 39: CD55 – Statistische Auswertung der absoluten Fluoreszenzintensität in kultivierten Tendozyten. Fluoreszenz pro Zellfläche von C3a-stimulierten und CD55-gefärbten Tendozyten im Vergleich zu einer nicht stimulierten CD55-gefärbten Kontrollgruppe. Für alle Fluoreszenzintensitätsauswertungen hier und im Folgenden wurden von drei Spendern jeweils drei repräsentative Aufnahmen erstellt und pro Aufnahme die mittlere Fluoreszenzintensität von jeweils acht Zellen ausgewertet, daher n=9. Ko: Kontrolle.

Die statistische Analyse der absoluten Zellfluoreszenzintensität des CD55 zeigte eine signifikant verminderte Zellfluoreszenz für die zuvor mit C3a inkubierten Tendozyten im Vergleich zu der unbehandelten Kontrollgruppe (Abb. 39).

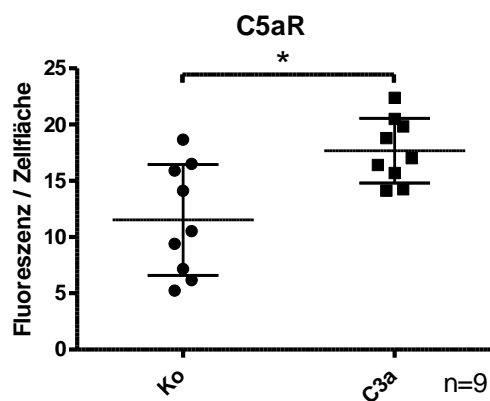


Abbildung 40: C5aR – Statistische Auswertung der absoluten Fluoreszenzintensität in kultivierten Tendozyten. Fluoreszenz pro Zellfläche von C3a-stimulierten und C5aR gefärbten Tendozyten im Vergleich zu einer nicht stimulierten C5aR-gefärbten Kontrollgruppe. Ko: Kontrolle.

Die Analyse der absoluten Fluoreszenzintensität pro Zellfläche wies eine signifikant erhöhte Proteinexpression des C5a-Rezeptors nach C3a-Stimulation der Tendozyten auf (Abb. 40).

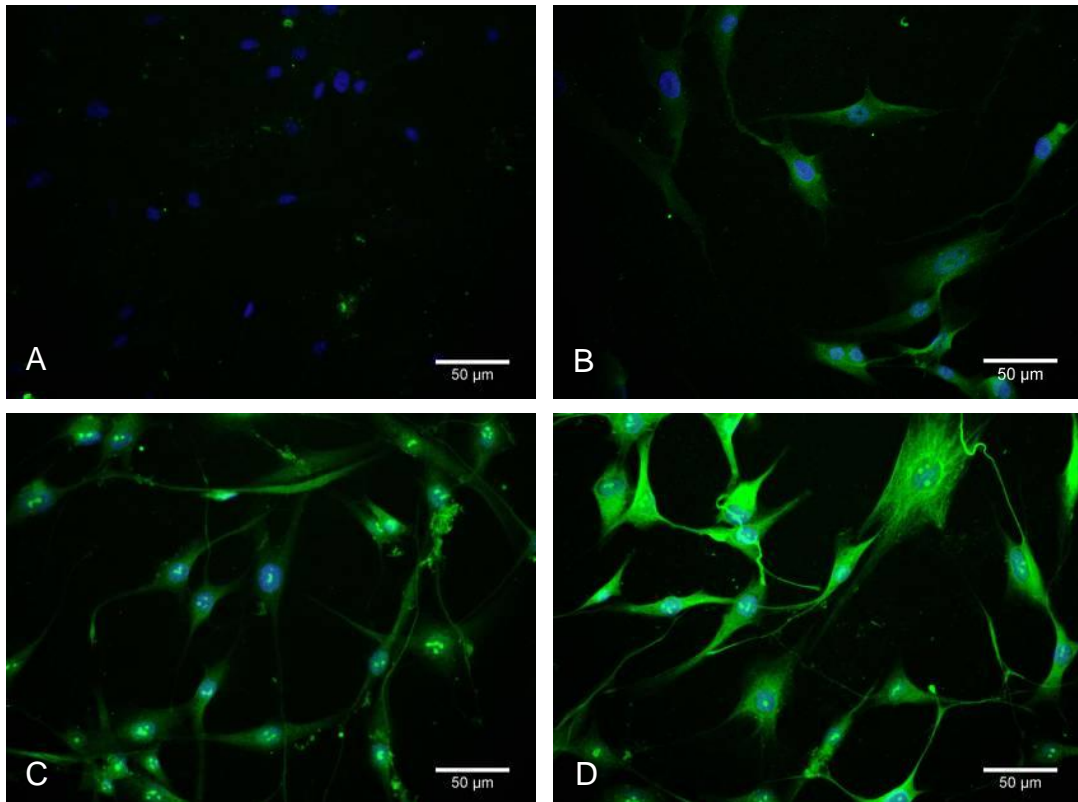
TNF α – Tendozyten

Abbildung 41: TNF α – Immunfluoreszenzfärbung kultivierter humaner Tendozyten. A: Kontrollfärbungen ohne Primärantikörper; B: Isotyp-Kontrollfärbung mit unspezifisch bindendem Primärantikörper; C: TNF α -immunmarkierte Tendozyten ohne C3a-Stimulation; D: nach C3a-Stimulation TNF α -immunmarkierte Tendozyten, Messbalken 50 μ m.

Ebenfalls war bei den mit TNF α -Antikörpern immunzytochemisch markierten Tendozyten eine spezifische zellassoziierte Färbung nachweisbar, die Kontrollfärbung zeigte hingegen keine spezifische Fluoreszenz. Zum Nachweis einer stärkeren TNF α -Expression wurde hier auch eine statistische Auswertung der absoluten Fluoreszenzintensität pro Zellfläche vorgenommen (Abb. 42).

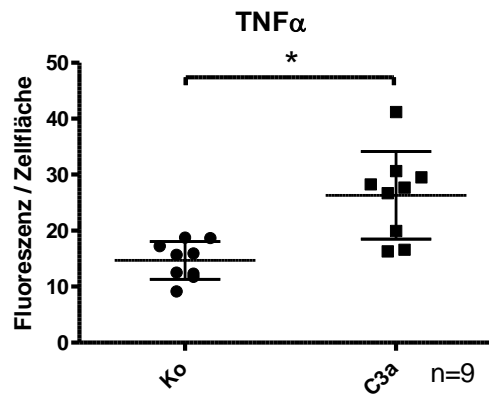


Abbildung 42: TNF α – Statistische Auswertung der absoluten Fluoreszenzintensität in kultivierten Tendozyten. Fluoreszenz pro Zellfläche von C3a-stimulierten und TNF α -gefärbten Tendozyten im Vergleich zu einer nicht stimulierten TNF α -gefärbten Kontrollgruppe. Ko: Kontrolle.

Die Grafik zeigt eine signifikant stärkere Fluoreszenzintensität pro Zellgröße bei den C3a-stimulierten Tendozyten im Vergleich zu der unbehandelten Kontrollgruppe. Damit konnte auch auf der Ebene der Proteinexpression eine gesteigerte TNF α -Synthese nach Stimulation mit C3a nachgewiesen werden (Abb. 42).

4.5.3 IMMUNFÄRBUNG VON TENDOZYTEN IM VERLETZUNGSASSAY

Zur Verifizierung der Genexpressionsdaten der im IVM behandelten Tendozyten auf Proteinebene wurden Sehnenzellen auf Glasplättchen durch multiple, parallele Scratchspuren im Zellrasen stimuliert und anschließend nach einer 24 h-Inkubation immunzytochemisch die Proteine der zuvor in der Genexpressionsanalyse untersuchten Gene immunmarkiert.

C5a-Rezeptor – Tendozyten

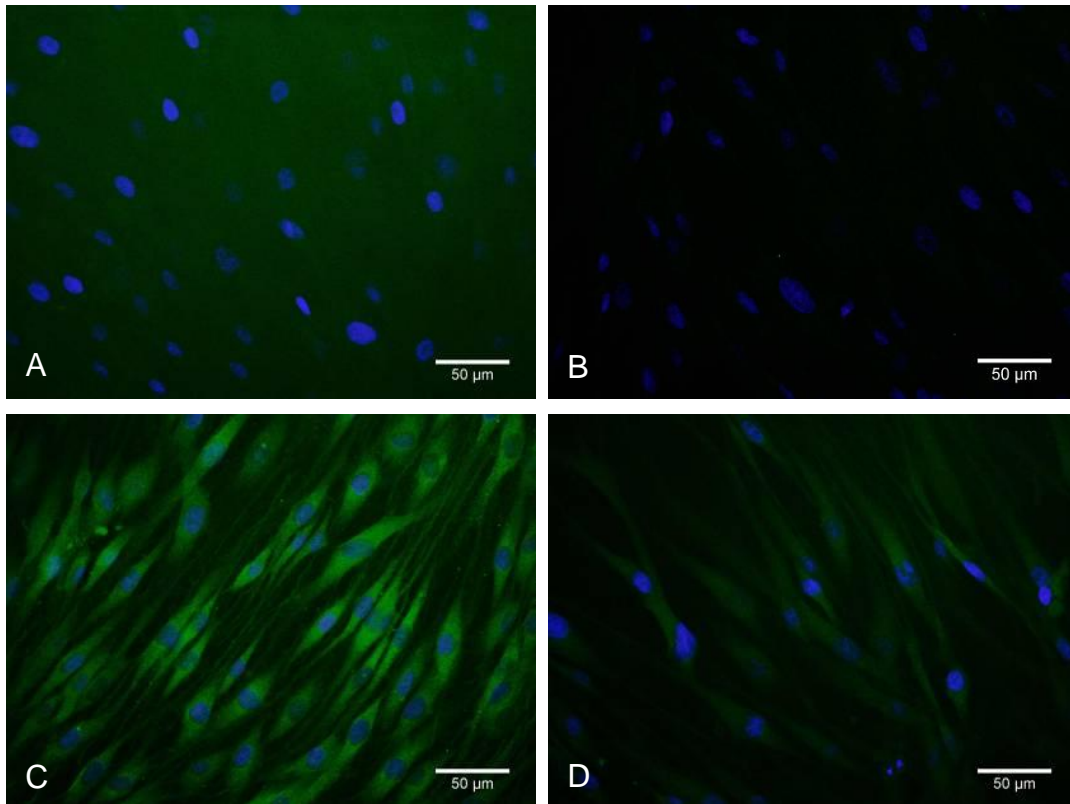


Abbildung 43: C5aR – Immunfluoreszenzfärbung kultivierter, humaner Tendozyten. A: Kontrollfärbungen ohne Primärantikörper; B: Isotyp-Kontrollfärbung mit unspezifisch bindendem Primärantikörper; C: C5aR-immunmarkierte Tendozyten ohne Verletzung; D: C5aR-immunmarkierte Tendozyten 24 h nach Verletzung, Messbalken 50 µm.

Bei dieser immunhistologischen Färbung wurde der C5a-Rezeptor der Tendozyten 24 h nach Verletzung der Sehnenzellen im Verletzungssassay gefärbt. Sowohl die verletzten als auch die unbehandelten Tendozyten zeigten eine C5aR-spezifische Immunfluoreszenz. Sowohl die Kontrollfärbung ohne Primärantikörper als auch die Kontrollfärbung mit unspezifisch bindendem Primärantikörper wies keine spezifische Fluoreszenz auf (Abb. 43).

CD55 – Tendozyten

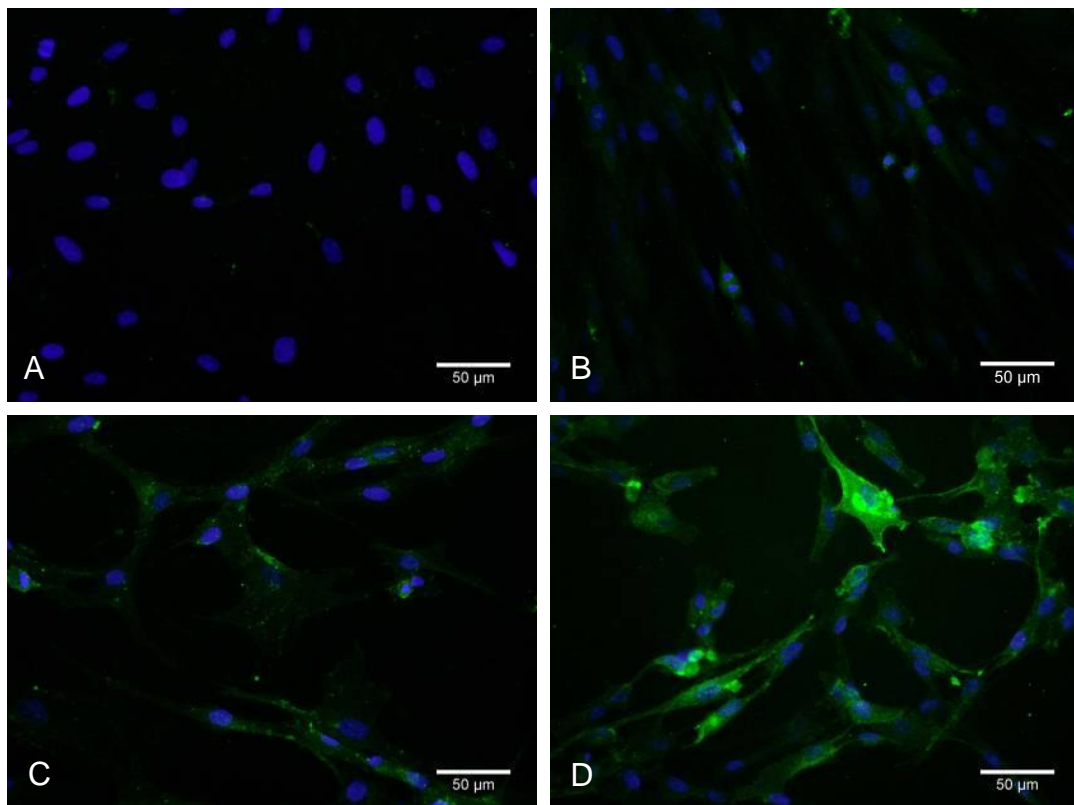


Abbildung 44: CD55 – Immunfluoreszenzfärbung kultivierter, humaner Tendozyten. A: Kontrollfärbungen ohne Primärantikörper; B: Isotyp-Färbung mit unspezifisch bindendem Primärantikörper; C: CD55-immunmarkierte Tendozyten ohne Verletzung; D: CD55-immunmarkierte Tendozyten 24 h nach Verletzung, Messbalken 50 µm.

In der Abbildung 44 ist eine CD55-spezifische Immunmarkierung von verletzten Tendozyten im Vergleich zu unbehandelten Tendozyten zu sehen. Die Gruppe der mit C3a behandelten Tendozyten sowie die Gruppe der Kontrollfärbung ohne C3a Behandlung der Tendozyten weisen im Gegensatz zu der Kontrollfärbung ohne primären Antikörper eine deutlich stärkere zellassoziierte Färbung auf. Bei insgesamt niedrigem Fluoreszenzniveau zeigten die verletzten Tendozyten eine etwas höhere Expression von CD55, dieses wurde ebenfalls in der statistischen Auswertung der Fluoreszenzintensität validiert.

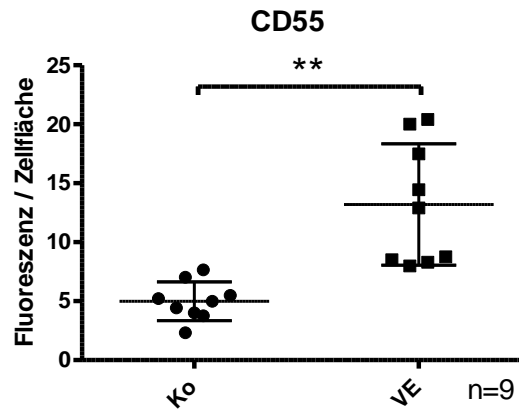


Abbildung 45: CD55 – Statistische Auswertung der absoluten Fluoreszenzintensität in kultivierten Tendozyten. Fluoreszenzintensität pro Zellgröße von 24 h nach Verletzung CD55-gefärbten Tendozyten im Vergleich zu einer nicht verletzten CD55-gefärbten Kontrollgruppe. Ko: Kontrolle.

Aus der Abbildung 45 kann eine signifikant höhere Expression des CD55-Oberflächenproteins in Tendozyten durch die Verletzung der Sehnenzellen im Rahmen eines Verletzungsassays abgeleitet werden. Dies bestätigte die bereits auf Genebene vorliegende Expressionssteigerung von CD55.

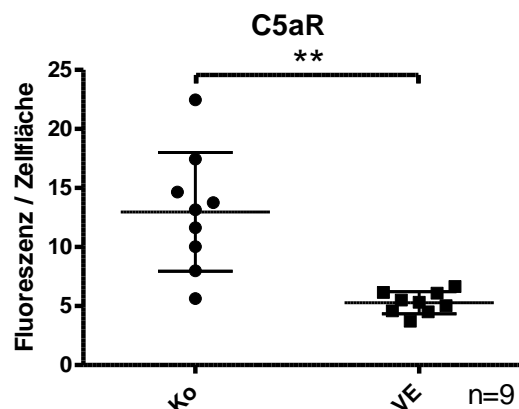


Abbildung 46: C5aR – Statistische Auswertung der absoluten Fluoreszenzintensität in kultivierten Tendozyten. Fluoreszenzintensität pro Zellgröße von 24h nach Verletzung C5aR-gefärbten Tendozyten im Vergleich zu einer nicht verletzten C5aR-gefärbten Kontrollgruppe. Ko: Kontrolle.

Die Analyse der absoluten Fluoreszenzintensität pro Zellfläche zeigte für den C5a-Rezeptor eine signifikante Suppression der Proteinexpression durch Verletzung der Tendozyten (Abb. 46).

Ferner wurde auch MMP-1 in verletzten Tendozyten gefärbt. Diese Färbung hat mit dem verwendeten Antikörper keine zellspezifischen Fluoreszenzen erbracht, sodass eine statistische Auswertung nicht erfolgte.

5 DISKUSSION

Humanes Sehnengewebe verfügt über charakteristische Besonderheiten im Vergleich zu anderen humanen Gewebearten – so gehört es zu den hypovaskulären und hyporegeneratorischen Geweben des menschlichen Körpers und hat einen Zellanteil von nur 5 % (Kannus 2000). Bei Verletzungen und Erkrankungen des Sehnengewebes ist daher auch das Regenerationspotential verglichen mit anderen Geweben deutlich eingeschränkt. Die histologischen Färbungen aus Kap. 4.4 zeigen histologische Aspekte verschiedener Sehnenpathologien im Vergleich zur gesunden Sehne. Wesentliche Merkmale hierfür finden sich in dem Strukturverlust der typisch parallel verlaufenden Kollagenfasern und in der Auflockerung der EZM. Bereits degenerativ verändertes Sehnengewebe kann eine Prädisposition für eine Sehnenruptur bedeuten (Maffulli, Del Buono et al. 2012). Verletzungen und Rupturen erfordern von den ohnehin schon in geringer Anzahl im Sehnengewebe vorhandenen Tendozyten während des Heilungsprozesses eine hohe Syntheseleistung beim Wiederaufbau extrazellulärer Matrixkomponenten. Auch aus diesem Grund nehmen die Tendozyten bei mechanischen Verletzungen und inflammatorischen Prozessen eine Schlüsselfunktion im Hinblick auf die Perspektive des Heilungserfolges einer Sehnenverletzung ein.

Es sind mehrere proinflammatorische Zytokine bekannt, welche einen direkten Einfluss auf Tendozyten ausüben können. John und Kollegen (2010) beschrieben den TNF α als potenten Induktor der Genexpression von matrixabbauenden Enzymen in der Sehne. Auch können IL, wie das IL-1 β , die MMP aktivieren und durch eine Verminderung der Expression von Kollagen Typ I wesentliche Eigenschaften einer Sehne, wie deren Elastizität, verändern (Qi, Chi et al. 2006; Thampatty, Li et al. 2007). Neben den Effekten der proinflammatorischen Zytokine auf Tendozyten stellt sich die Frage, welchen Einfluss das Komplementsystem als wesentlicher Bestandteil des angeborenen Immunsystems auf die Rupturheilung der Sehne hat. Grundsätzlich müssen Unterschiede in den Ergebnissen von *in-vivo* Experimenten gegenüber den hier angewandten *in-vitro* Versuchen beachtet werden. Für diese Arbeit wurden ausschließlich *in-vitro* Experimente mit humanen Tendozyten durchgeführt. Es konnte so sichergestellt werden, dass die beobachteten Expressionsveränderungen in den Tendozyten spezifisch auf der Behandlung beruhten und nicht durch eine Interaktion mit den sonst *in-vivo* vorhandenen immunkompetenten Zellen des Körpers beeinflusst werden konnten. Zu Beginn erfolgte die Analyse der möglichen Genexpressions-

Veränderungen durch die Zunahme der Zellkulturpassagen. In der Fachliteratur sind Hinweise für eine veränderte Genexpressionen durch zunehmende Passagen der Sehnenzellkultur beschrieben worden (Yao, Bestwick et al. 2006; Almarza, Augustine et al. 2008; Mazzocca, Chowaniec et al. 2011). Daher erfolgte in dieser Arbeit eine eigene Analyse der Genexpressionsveränderungen des C3a-Rezeptors und der komplementregulatorischen Proteine CD46 und CD59 in verschiedenen Passagen der Sehnenzellkultur. Weder für den C3a-Rezeptor noch für CD46 oder CD59 konnte eine signifikante Expressionsveränderung über die Passagen ausgehend von Passage 3 bis zu Passage 12 dokumentiert werden (siehe Abb. 13). Die Passage 12 zeigte jedoch eine deutliche Tendenz der Genexpressionssteigerung für C3aR und CD59, daher wurden für die folgenden Experimente keine Tendozyten aus Passagen größer Passage 8 verwendet. Die spezifischen Auswirkungen des Anaphylatoxins C3a auf Tendozyten werden nun im folgenden Kapitel näher betrachtet.

5.1 EXPRESSIONSVERÄNDERUNGEN DURCH DAS ANAPHYLATOXIN C3A

Die bei einer Infektion stattfindende Komplementaktivierung führt durch die Aktivität der C3-Konvertase sowohl im klassischen als auch im alternativen Aktivierungsweg zu der Freisetzung des Anaphylatoxins C3a. Es war bisher unbekannt, welchen Einfluss das Anaphylatoxin C3a auf humane Tendozyten ausüben kann und ob es seinerseits in der Lage ist in Tendozyten eine proinflammatorische Antwort auszulösen oder die Aktivität des Abbaus der EZM zu verändern.

Zunächst wurde die Beeinflussung der Genexpression der C3a- und C5a-Rezeptoren durch die Stimulation mit C3a untersucht. Bei beiden Anaphylatoxinrezeptoren handelt es sich um transmembrane G-Protein gekoppelte Rezeptoren (Cain and Monk 2002). Es zeigte sich für den C3a-Rezeptor eine signifikante Expressionszunahme 4 h nach Stimulation mit C3a (vgl. Abb. 14). Ebenso ließ der C5a-Rezeptor 4 h nach Stimulation mit C3a eine tendenzielle Genexpressionssteigerung erkennen, welche 24 h nach Stimulation mit C3a als signifikant nachzuweisen war (vgl. Abb. 15). Auch war auf Proteinebene übereinstimmend in der Immunfluoreszenz eine signifikant höhere Expression des C5a-Rezeptors nach C3a-Stimulation nachweisbar (siehe Abb. 40). Hieraus kann eine erhöhte Sensitivität der Tendozyten gegenüber den bei der Komplementaktivierung freiwerdenden Anaphylatoxinen C3a und C5a abgeleitet

werden. In der Fachliteratur finden sich zu der Autoregulation der Anaphylatoxinrezeptoren C3aR und C5aR kaum Vergleichsdaten. Es ist lediglich bekannt, dass der Komplementfaktor C5 die Expression des C3a-Rezeptors im Lungengewebe der Maus vermindern kann (Melendi, Hoffman et al. 2007). Inwiefern sich hieraus ein Widerspruch zu der C3a induzierten Expressionssteigerung des C3a- und C5a-Rezeptors ergeben kann, ist nicht zuletzt von der biologischen ähnlichen Aktivität von C3a und C5a abhängig und bedarf weiterer Untersuchungen.

Für das komplementinhibierende Membranprotein CD46 der Tendozyten folgten weitere Experimente. CD46 ist auch als Membrane Cofactor Protein (MCP) bekannt, da es als Kofaktor an der Faktor I-abhängigen Inaktivierung von C3b und C4b im alternativen Aktivierungsweg des Komplementsystems beteiligt ist (Barilla-LaBarca, Liszewski et al. 2002). Liszewski und Kollegen (2007) konnten zeigen, dass bereits ein heterozygoter Gendefekt für CD46 eine Prädisposition für ein hämolytisch urämisches Syndrom darstellt. Eine weitere Funktion nimmt CD46 in der Abwehr pathogener Erreger ein. Über CD46 treten Viren, wie das Masernvirus oder das Humane Herpesvirus Typ-6 intrazellulär ein und können dann zytotoxischen T-Lymphozyten präsentiert werden (Cardoso, Beauverger et al. 1995).

Für Sehnengewebe lagen bislang keine Erkenntnisse über mögliche komplementregulatorische Eigenschaften im Zusammenhang mit der Aktivierung des Komplementsystems vor. In dieser Arbeit konnte für die Expression von CD46 in Tendozyten eine signifikant verminderte Genexpression 4 h nach Stimulation mit C3a gezeigt werden. Daraus kann die Hypothese abgeleitet werden, dass durch die Anwesenheit von C3a die Expression von CD46 auf Tendozyten reduziert wird (vgl. Abb. 16). Interessant wäre der daraus ableitbare Effekt, dass das Anaphylatoxin C3a eine gesteigerte Aktivität des sonst durch CD46 inhibierten Spaltprodukts C3b erreichen kann und somit eine weitere Komplementaktivierung begünstigen würde. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die Auswirkungen dieser *in-vitro* gewonnenen Erkenntnis *in-vivo* zu verifizieren.

CD55 wird ebenfalls als komplementinhibierendes Membranprotein auf Tendozyten exprimiert. CD55 ist auch als Decay Accelerating Factor (DAF) bekannt, da es durch die Inhibition der C3-Konvertase des alternativen Aktivierungsweges eine dämpfende Wirkung auf das Komplementsystem ausüben kann. Im Vergleich der biologischen Aktivitäten von CD46 und CD55 konnten Johnson und Kollegen zeigen, dass CD55 über eine stärkere Potenz als CD46 in der Inhibition des Komplementsystems verfügt

(Johnson, Lyles et al. 2012). In den hier durchgeführten Experimenten konnte für CD55 sowohl nach 4 h wie auch nach 24 h eine signifikante Genexpressionsminderung bei Stimulation der Tendozyten mit C3a gezeigt werden (vgl. Abb. 17). Diese Ergebnisse könnten auf eine verminderte Inhibition des Komplementsystems der Tendozyten bei Anwesenheit des Anaphylatoxins C3a hindeuten. Dadurch kann C3a neben seinen chemotaktischen Eigenschaften auch eine die Aktivität des Komplementsystems verstärkende Funktion zukommen. Die reduzierte Expression von CD55 nach C3a-Stimulation konnte auch in Immunfluoreszenzfärbungen auf Proteinebene nachgewiesen werden. Es ist für andere Gewebe bereits bekannt, dass CD55 eine protektive Wirkung durch die Inhibition des Komplementsystems entfalten kann. McGregor und Kollegen (2012) führten kardiale Xenotransplantationen von Schweinen auf Primaten durch. Sie konnten in der Gruppe der CD55-defizienten Tiere eine verstärkte Komplementaktivität sowie eine höhere Rate an hyperakuten Abstoßungsreaktionen als in der Gruppe der CD55-positiven Tiere beobachten. Auch für neuronale Zellen konnte eine ähnliche Wirkung von CD55 belegt werden. Hypoxischer Stress führte in Neuronen zur einer Akkumulation von C3, C3a und dem MAC sowie zu einer erhöhten apoptotischen Aktivität (Wang, Li et al. 2010). Durch die Behandlung mit CD55 konnte eine geringere Akkumulation von C3, C3a und MAC sowie niedrigere Apoptoseraten gegenüber den nicht mit CD55 behandelten Neuronen nachgewiesen werden (Wang, Li et al. 2010). Diese Ergebnisse deuten an, dass hypoxischer Stress zu einer Komplementaktivierung führen kann, wobei CD55 hier das Outcome der Neuronen durch eine Komplementinhibition verbessern kann. Die Erkenntnisse von Wang et al., und McGregor et al., lassen mit den eigenen Ergebnissen zusammen betrachtet eine protektive Wirkung von CD55 in Sehnen vermuten. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um die Auswirkungen der detektierten Expressionsminderung von CD55 auf beispielsweise Apoptoseraten im Sehngewebe zu erforschen.

Inwieweit die Anwesenheit von C3a auch eine Auswirkung auf die Expression der matrixabbauenden Enzyme in der Sehne besitzt, wurde mit der Analyse von MMP-1 untersucht. Die MMP-1 ist eine Zink-abhängige Endopeptidase, welche in der Lage ist das Kollagen der EZM abzubauen (Lakemeier, Braun et al. 2011). Unter der Stimulation mit C3a zeigte die Genexpression der MMP-1 nach 4 h eine marginale Expressionsminderung, wobei sich jedoch nach 24 h eine Tendenz der Expressionssteigerung der MMP-1 abzeichnete (vgl. Abb. 18). Bandyopadhyay und Kollegen (2012) untersuchten den Einfluss der Komplementaktivierung auf die Aktivität

der MMP-2 und MMP-9 an retinalen Pigmentepithelzellen. Sie konnten eine induzierte Expression und eine gesteigerte Proteaseaktivität der MMPs bei Komplementaktivierung nachweisen. Auch für das Patellaspitzenyndrom, eine chronisch schmerzhaft Degeneration der Patellasehne, sowie für rupturierte Sehnen der Rotatorenmanschette konnte eine induzierte Genexpression der MMP-1 nachgewiesen werden (Fu, Chan et al. 2002; Lakemeier, Braun et al. 2011). Die Erkenntnisse der zitierten Arbeitsgruppen sprechen für eine gesteigerte Aktivität der MMP in der Sehne bei Komplementaktivierung, chronisch degenerativen Prozessen und Rupturen. Die eigenen Ergebnisse zum Zeitpunkt 24 h nach C3a-Stimulation unterstützen diese Beobachtungen, nicht jedoch die leichte Expressionsminderung der MMP-1 zum Zeitpunkt 4 h nach C3a-Stimulation. Hierfür sind verschiedene Gründe möglich. Denkbar wäre, dass die Proteinsynthesekapazität der Tendozyten im Fall der Komplementaktivierung primär für die Regulation des Entzündungsprozesses genutzt wird. Dies würde sich in der Expressionssteigerung des TNF α nach 4 h entsprechend widerspiegeln. Hierbei würde erst an zweiter Stelle der zellulären Antwort auf C3a die Expression der MMP-1 stehen. Ferner könnte der beobachtete Effekt aber auch auf einer indirekten Induktion beruhen, bei der die C3a-Stimulation zunächst die Expression proinflammatorischer Zytokine induziert (vgl. Abb. 20), welche dann wiederum die MMP-1 induzieren können. Die Induktion der MMP-1 durch IL-1 β ist für Sehnenzellen bereits beschrieben (Tsuzaki, Guyton et al. 2003).

Die Ruptur einer Sehne führt *in-vivo* zu einer inflammatorischen Reaktion, bei der proinflammatorische Zytokine, wie TNF α und IL-1 β , freigesetzt werden (Berglund, Hart et al. 2007; Tohyama, Yasuda et al. 2007; Schulze-Tanzil, Al-Sadi et al. 2011). Die in das Entzündungsgebiet eingewanderten Leukozyten stellen hierbei eine wesentliche Quelle proinflammatorischer Zytokine dar (Tsuzaki, Guyton et al. 2003). Auch Tendozyten sind in der Lage, proinflammatorische Zytokine, wie TNF α , IL-1 β , IL-6 zu produzieren (Pufe, Petersen et al. 2001; Tohyama, Yasuda et al. 2007; John, Lodka et al. 2010; Gaida, Bagge et al. 2012). In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich *in-vitro* Analysen durchgeführt, um beeinflussende Effekte externer inflammatorischer Reaktionspartner auf Tendozyten zu vermeiden. Dabei wurde der Einfluss der Komplementaktivierung auf die Expression von TNF α und IL-1 β hin untersucht. Es zeigte sich für TNF α eine signifikante Steigerung der Genexpression 4 h nach der Stimulation mit dem Anaphylatoxin C3a (siehe Abb. 19), welche auch auf Proteinebene in der Immunfluoreszenzfärbung bestätigt werden konnte (siehe Abb. 42). Daraus lässt sich auf eine Induktion proinflammatorischer Zytokine durch die Komplementaktivierung

schließen. Auch für entzündete Sehnen des Pferdes wurde eine verstärkte Expression von TNF α gezeigt (Hosaka, Kirisawa et al. 2005). John et al. (2010) beschrieben die autokrine Aktivierung der Tendozyten durch TNF α . TNF α kann hierbei die Produktion von IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF α sowie MMP-1 in Tendozyten induzieren. Interessanterweise kann TNF α auch die Expression des C3a-Rezeptors auf Tendozyten steigern (Schulze-Tanzil, Al-Sadi et al. 2011; Busch, Girke et al. 2012). Als pharmakologischer Therapieansatz konnte bereits durch Antikörper gegen TNF α eine verbesserte Heilung bei akuten Rupturen von Rotatorenmanschetten bei Ratten erzielt werden (Gulotta, Kovacevic et al. 2011). Dies beschreibt die zentrale Rolle des TNF α unter den proinflammatorischen Zytokinen in der Heilung von Sehnenverletzungen. Durch die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse wird die Aktivierung des Komplementsystems mit den bereits bekannten Effekten des TNF α auf Tendozyten verknüpft.

Als weiteres proinflammatorisches Zytokin wurde IL-1 β untersucht. IL-1 β steht in funktionell engem Zusammenhang zu TNF α und wird in rupturierten sowie in entzündeten Sehnen verstärkt exprimiert (Hosaka, Kirisawa et al. 2002; Berglund, Hart et al. 2007). IL-1 β bewirkt in Tendozyten eine verstärkte Expression von MMP-1, IL-1 β , IL-6 und der COX-2, sodass auch für das IL-1 β eine autokrine Aktivität bei Tendozyten gezeigt ist (Tsuzaki, Guyton et al. 2003). Qi und Kollegen (2006) konnten für IL-1 β eine Induktion der Expression von Elastin und eine Reduktion von Kollagen Typ I in der Sehne feststellen, sie postulieren einen protektiven Effekt des IL-1 β auf die Sehnenintegrität. Durch die Zunahme der Elastizität und Reißfestigkeit könnten Sehnen während eines Entzündungsprozesses über einen zusätzlichen Schutz verfügen. Für das IL-17 ist bereits eine C3a-abhängige Expressionssteigerung in neutrophilen Granulozyten dargestellt worden (Mizutani, Goshima et al. 2012). In der vorliegenden Arbeit konnte durch die Stimulation mit C3a nach 24 h eine signifikante Genexpressionssteigerung des IL-1 β in Tendozyten nachgewiesen werden (siehe Abb. 20). Damit gelang neben TNF α eine zweite Verknüpfung der Komplementaktivierung mit der Induktion einer proinflammatorischen Antwort in Tendozyten.

Inwieweit das proinflammatorische IL-6 durch die Stimulation der Tendozyten mit C3a beeinflusst werden kann, ist bislang unbekannt. Die hier durchgeführten Experimente konnten weder zum Zeitpunkt 4 h noch zum Zeitpunkt 24 h nach Stimulation mit C3a eine signifikante Genexpressionsveränderung nachweisen (vgl. Abb. 21). Die generelle Expression von IL-6 in Tendozyten ist jedoch mehrfach belegt (Tsuzaki, Guyton et al.

2003; John, Lodka et al. 2010). Auch in rupturierten sowie in entzündeten Achillessehnen ist in der Literatur eine höhere Expression von IL-6 als in gesunden Sehnen beschrieben worden (Legerlotz, Jones et al. 2012). Andersen und Kollegen (2011) zufolge soll IL-6 ein potenter Induktor für die Expression von Kollagen Typ I in Sehnenzellen sein. Eine direkte Induktion von IL-6 durch eine Komplementaktivierung lässt sich gegenwärtig weder ausschließen noch beweisen. Aus den bisher nachgewiesenen einzelnen Effekten wäre in der Theorie eine C3a-induzierte Induktion von IL-6 jedoch wahrscheinlich. Hierbei kann C3a, wie in dieser Arbeit gezeigt, zu einer gesteigerten Expression von IL-1 β führen (vgl. Abb. 20), wobei IL-1 β seinerseits IL-6 induzieren könnte (Tsuzaki, Guyton et al. 2003). Mögliche Gründe, warum dieser Nachweis in dem vorliegenden Experiment nicht gelungen ist, könnten auch in einer zu geringen C3a-Stimulationskonzentration zu finden sein. Eine über den Zwischenschritt des IL-1 β laufende C3a-vermittelte Induktion von IL-6 erfordert eventuell eine höhere Ausgangskonzentration an C3a, um auch stärkere Effekte des IL-1 β auf IL-6 erreichen zu können. Ein weiterer Grund kann in der Nichterfassung einer Expressionsveränderung zu anderen, hier nicht analysierten Zeitpunkten liegen. Um die Frage nach dem Zusammenhang zwischen C3a und IL-6 zu erforschen, könnten in künftigen Experimenten höhere Stimulationskonzentrationen von C3a sowie weitere Untersuchungszeitpunkte angewandt werden.

5.2 TIME-LAPSE-VIDEODOKUMENTATION UND MITOSENANALYSEN

Das IVM sorgt neben einer direkten Verletzung der Tendozyten auch durch die mechanische Abtragung von Sehnenzellen innerhalb der Scratchspur für einen Freiraum in der Zellkultur. Die beobachteten Effekte des IVM beruhen daher möglicherweise nicht nur auf einer direkten Zellverletzung, sondern können auch die Entstehung des ebenfalls bei einer Sehnenruptur *in-vivo* stattfindenden Raumgewinns widerspiegeln. Die Time-lapse-Videodokumentation einer exemplarischen Scratchspur, wie sie auch im IVM zur Anwendung kam, zeigte über 24 h eine vollständige Defektheilung (siehe Abb. 9). Neben der morphologischen Betrachtung wurde eine Analyse der jeweils während 24 h erfolgten Mitosen in drei behandelten sowie drei unbehandelten Zellkulturen durchgeführt. Die quantitative Auswertung ergab einen signifikanten Anstieg der Mitoseraten in den verletzten Zellkulturen, wobei die direkt

verletzten Zellen nur einen Teil der mitotisch aktiven Tendozyten darstellten. Dieses Ergebnis deutet eine spezifische Zell-Zellkommunikation an, bei der es den umliegenden Sehnenzellen gelang, Lücken im Zellrasen zu erkennen und durch die induzierte Proliferation zu schließen. Wu und Kollegen (2010) untersuchten das Apoptose- und Proliferationsverhalten von Tendozyten bei operativ getrennten und wieder refixierten Sehnen während des Heilungsprozesses zu verschiedenen Zeitpunkten. Eine induzierte Apoptose konnte in der Heilungszone nachgewiesen werden. Im Vergleich zu der Situation am Tag 0 nach der Verletzung entwickelte sich im weiteren Verlauf eine signifikant höhere Zellularität des Sehngewebes, welche nach drei Tagen ihr Maximum erreichte. Zum Zeitpunkt 56 und 84 Tage nach der Operation konnte lediglich noch eine minimale mitotische Aktivität nachgewiesen werden (Wu, Zhou et al. 2012). Sofern es im Rahmen der Sehnenruptur zu einer Einblutung in das verletzte Gewebe kommt, können anwesende Thrombozyten zusätzlich eine Induktion der mitotischen Aktivität der Sehnenzellen bewirken (Wang, Qiu et al. 2012). Die beschriebene Induktion der Proliferation in der frühen Heilungsphase spiegelt sich in dem in der vorliegenden Arbeit untersuchten Mitoseverhalten der Tendozyten somit auch *in-vitro* wider. Für künftige Studien wäre es interessant zu untersuchen, inwieweit auch das Mitoseverhalten der Tendozyten unter dem Einfluss von C3a beeinflusst wird.

5.3 VITALITÄTSFÄRBUNG

Mit einer Vitalitätsfärbung wurde eine exemplarische Verletzung der Zellkultur auf abgestorbene Zellen unmittelbar nach der Verletzung hin untersucht. Hierbei konnten einzelne tote Zellen entlang der Scratchspur dargestellt werden. Methodisch muss hierbei berücksichtigt werden, dass nur adhärente Zellen dargestellt werden können, während abgestorbene und bereits abgelöste Zellen durch die Färbelösung möglicherweise abgeschwemmt wurden. Ursächlich ist hierbei eine Verletzung der Zellmembran, die unmittelbar zur Lyse der betroffenen Zelle führt. Ferner ist neben einer direkten mechanischen Zerstörung auch die kontrollierte Induktion des programmierten Zelltodes im Rahmen einer Sehnenverletzung denkbar (Wu, Chen et al. 2010). Wesentliche Aussage der durchgeführten Vitalitätsfärbung ist der morphologische Nachweis des zwar beschädigten, aber dennoch überlebenden Tendozyten. Das Überleben der Tendozyten nach Verletzung konnte mikroskopisch bei alleiniger Abtrennung der Zellfortsätze, aber intaktem Zellsoma beobachtet werden

(vgl. Abb. 12, gelber Kreis). Dass Tendozyten die Verletzung im IVM grundsätzlich überleben können, ist eine wesentliche Voraussetzung dafür, dass die beobachteten Effekte auch auf die direkte Zellverletzung zurückführbar sein können. Der Abriss von Tendozytenfortsätzen kann auch bei der Sehnenruptur *in-vivo* einen relevanten Verletzungsmechanismus darstellen, insofern ist hierfür ein Vergleich der *in-vitro* Ergebnisse mit der Situation nach einer Sehnenruptur *in-vivo* denkbar.

5.4 EXPRESSIONSVERÄNDERUNGEN DURCH DAS *IN-VITRO* VERLETZUNGSMODELL

Ein direkter Vergleich der Effekte von verletzten Tendozyten mit denen einer Sehnenruptur *in-vivo* ist nicht ohne weiteres möglich. Um die Auswirkungen mechanischer Traumata auf Sehnenzellen analysieren zu können, wurde in dieser Arbeit das IVM entwickelt. Es ermöglichte die Analyse der Genexpressionsveränderungen in Tendozyten ohne die Anwesenheit exogener Faktoren. Eine mögliche proinflammatorische Reaktion kann daher in dem *in-vitro* Verletzungsassay nur durch Tendozyten eingeleitet werden, exogene Komplementfaktoren sowie immunkompetente Zellen und ihre Interleukine sind nicht im Medium enthalten. Die im IVM gewonnenen Erkenntnisse über das Eigenverhalten der Tendozyten können anschließend mit den bislang bekannten *in-vivo* Effekten einer Sehnenruptur diskutiert werden.

Die verletzten Tendozyten zeigten differenzierte Genexpressionsveränderungen für die Anaphylatoxinrezeptoren C3aR und C5aR. Der C3a-Rezeptor war 4 h nach der Verletzung nur marginal supprimiert (siehe Abb. 22), der Einfluss auf die Proteinexpression bleibt daher unbestimmt. Verglichen mit den durch die C3a-Stimulation hervorgerufenen Expressionssteigerungen nach 4 h (siehe Abb. 14) konnte eine Induktion des C3a-Rezeptors hier erst 24 h nach Verletzung nachgewiesen werden (vgl. Abb. 22). Dies lässt eine erhöhte Sensitivität der Tendozyten gegenüber C3a vermuten, welche bei einer *in-vivo* stattfindenden Komplementaktivierung die Induktion der proinflammatorischen Zytokine TNF α und IL-1 β in Tendozyten verstärken könnte (vgl. Kap. 5.1). Die Genexpressionsanalyse des C5a-Rezeptors wies 24 h nach Verletzung eine leichte Reduktion auf (siehe Abb. 22), welche auf Proteinebene in der Immunfluoreszenz bestätigt werden konnte (vgl. Abb. 43). Dieses Ergebnis stellt einen Anhaltspunkt für eine unterschiedliche Regulation des C3a- und C5a-Rezeptors dar.

Entgegen der bisher aus Kap 5.1 bekannten Annahme einer weitgehend ähnlichen Regulation von C3aR und C5aR, könnte die hier beobachtete verletzungsinduzierte Reduktion auf bisher unbekannte Eigenschaften des C5a-Rezeptors in Tendozyten hinweisen. In der Fachliteratur sind dazu bislang keine Erkenntnisse beschrieben. Die Expressionsminderung oder Blockade des C5a-Rezeptors wird jedoch häufig mit protektiven Effekten auf verschiedene Zellen in Zusammenhang gebracht. Thundyil und Kollegen (2012) beschrieben bei infolge eines Hirninfarkts geschädigten Neuronen einen positiven Effekt der Blockade des C5a-Rezeptors in Bezug auf das Outcome der Patienten. Auch für die Parodontitis konnte eine signifikant geringere Gewebedestruktion in der Gruppe der mit einem C5aR-Antagonisten behandelten Ratten gegenüber unbehandelten Ratten beobachtet werden (Breivik, Gundersen et al. 2011). Denkbar wäre daher auch bei der verletzungsinduzierten Reduktion des C5a-Rezeptors ein protektiver Effekt auf Tendozyten. Um einen Nachweis dafür erbringen zu können sind weitere Studien erforderlich. Es sollte zunächst analysiert werden, inwieweit sich der Effekt der verletzungsinduzierten C5aR-Reduktion auch im *in-vivo* Modell nach einer Sehnenruptur nachweisen lässt. Möglicherweise unterliegt dabei die hier beobachtete Expressionsreduktion einer *in-vivo* stattfindenden komplementinduzierten Induktion des C5a-Rezeptors bei einer Sehnenruptur.

Die komplementinhibitorischen Proteine CD46 und CD55 wurden durch die Verletzung der Sehnenzellen hochreguliert. Bereits zum Zeitpunkt 4 h nach Verletzung zeigte CD55 eine Induktion, wobei 24 h nach Behandlung CD46 und CD55 eine signifikant erhöhte Genexpression aufwiesen (siehe Abb. 23). Auch in den durchgeführten Immunfluoreszenzfärbungen konnte für CD55 eine gesteigerte Proteinexpression nachgewiesen werden. Diese Erkenntnis legt nahe, dass mechanisch verletzte Sehnenzellen durch eine Induktion ihrer CRP über eine komplementinhibierende Wirkung verfügen. Inwieweit es bei einer Sehnenruptur zu der Aktivierung des Komplementsystems *in-vivo* kommen kann, ist für Sehngewebe bislang nicht nachgewiesen. Allgemein ist die Komplementaktivierung eine typische Folge der traumatischen Schädigung des Gewebes (Bellander, Singhrao et al. 2001; Hietbrink, Koenderman et al. 2006; John, Stahel et al. 2007). Für zerebrale Traumata bei schweren Kopfverletzungen konnte eine Zunahme der Komplementfaktoren C1q, C3b und C5-9 festgestellt werden (Bellander, Singhrao et al. 2001). Eine Komplementaktivierung bei inflammatorischer Arthritis und verletztem Knorpelgewebe ist in der Literatur vielfach beschrieben (Banda, Thurman et al. 2006; Mizuno 2006; John, Stahel et al. 2007). Sofern es auch im Rahmen der Sehnenruptur zu einer

Aktivierung des Komplementsystems kommt, könnten Tendozyten die Aktivität des Komplementsystems durch eine verstärkte Expression von CD46 und CD55 abschwächen.

Die Genexpression der MMP-1 konnte durch die Verletzung der Tendozyten um das Sechsfache induziert werden (siehe Abb. 24). Verglichen mit der aus Kapitel 5.1 bekannten tendenziellen Expressionssteigerung der MMP-1 durch C3a (siehe Abb. 18), wird durch das IVM ein wesentlich stärkerer Effekt als durch die Stimulation mit C3a erreicht. Für eine ähnliche Expressionssteigerung der MMP-1 nach Sehnenverletzungen auch *in-vivo*, lassen sich in der Fachliteratur mehrere Anhaltspunkte finden (Fu, Chan et al. 2002; Lakemeier, Braun et al. 2011). Auch wurde beschrieben, dass ruhenden Sehnen im Vergleich zu zyklisch belasteten Sehnen eine geringere Expression der MMP-1 aufweisen (Lavagnino, Arnoczky et al. 2003). Dieses Erkenntnis belegt ebenfalls die enge Verknüpfung von mechanischer Beanspruchung der Sehne und Regulation ihrer MMP. Den MMP kommt eine zentrale Rolle in dem Abbau der posttraumatisch defekten, extrazellulären Matrix zu. Als therapeutische Konsequenz dieser Ergebnisse wäre daher die Steigerung der extrazellulären Umbauprozesse durch künstliche, intraoperativ gesetzte Mikroverletzungen in beispielsweise teilrupturierten Sehnen denkbar. Bei inkompletten Meniskuseinrissen oder zweitgradigen Meniskusläsionen werden künstliche Verletzung durch ein sog. Needling zur Förderung der Vaskularisation bereits therapeutisch angewendet (Borner, Ruhmann et al. 2005). Die Evidenz einer solchen Behandlung im Sehngewebe sollte zunächst in *in-vivo* Studien weiter erforscht werden.

Für TNF α konnte keine signifikante Genexpressionsveränderung durch die *in-vitro* Verletzung der Tendozyten nachgewiesen werden (vgl. Abb. 24). Für die Heilungsphase von Sehnenrupturen *in-vivo* wurde in der Literatur jedoch auch eine Expression des TNF α beschrieben, wobei belastete Sehnen während der Heilungsphase eine geringere Expression an TNF α aufwiesen als unbelastete Sehnen (Uchida, Tohyama et al. 2005; Eliasson, Andersson et al. 2009). Dies deutet darauf hin, dass eine mechanische Verletzung der Sehnenzellen *in-vitro* keine proinflammatorische Antwort der Tendozyten auslösen kann. Zyklische Dehnungen der Sehne zeigten keine Expressionszunahme des TNF α (Skutek, van Griensven et al. 2001). Hingegen konnten Millar und Kollegen (2009) bei Rotatorenmanschettenrupturen eine stark erhöhte TNF α -Expression nachweisen. Dies ist ein deutlicher Hinweis auf exogene proinflammatorische Faktoren, welche *in-vitro* nicht beteiligt sind. Die Anwesenheit

proinflammatorischer Zytokine sowie immunkompetenter Zellen scheinen daher eine wesentliche Voraussetzung einer proinflammatorischen Reaktion in der Sehne nach Ruptur zu sein. Für die alleinige Stimulation mit C3a konnte jedoch *in-vitro* bereits eine Genexpressionssteigerung des TNF α gezeigt werden (vgl. Kap. 5.1). Vor einer Übertragung dieser Ergebnisse auf die Situation *in-vivo*, sollte zunächst der kostimulatorische Effekt von C3a und der Verletzung *in-vitro* im folgenden Kapitel betrachtet werden.

Als weiterer Marker einer möglichen proinflammatorischen Reaktion der Tendozyten auf die Verletzung konnte auch für IL-1 β keine signifikante Expressionsveränderung durch die alleinige Behandlung im IVM nachgewiesen werden. Jedoch sind auch für IL-1 β in der Fachliteratur Hinweise einer verstärkten Expression bei rupturierten Sehnen *in-vivo* zu finden (Berglund, Hart et al. 2007). Deshalb muss analog zum TNF α auch hier von einer notwendigen Anwesenheit des Immunsystems bei Ruptur ausgegangen werden, um eine proinflammatorische Reaktion auslösen zu können. Die vorliegenden Ergebnisse sprechen daher gegen eine unmittelbar von verletzten Tendozyten ausgehende Initiierung einer proinflammatorischen Reaktion über TNF α und IL-1 β *in-vitro*. Wahrscheinlicher erscheint in diesem Zusammenhang eine durch exogene, proinflammatorische Faktoren getriggerte Stimulation der Tendozyten nach einer Sehnenruptur *in-vivo*, auf die das Komplementsystem mit C3a wesentliche regulatorische Eigenschaften ausübt.

5.5 EXPRESSIONSVERÄNDERUNGEN DURCH DIE KOMBINATION VON C3A UND VERLETZUNGSMODELL

In den bisherigen Experimenten wurden die Sehnenzellen jeweils entweder mit dem Anaphylatoxin C3a oder mit dem IVM stimuliert. Die daraus resultierenden Ergebnisse dienten dem Verständnis der partialen Effekte. Um aus *in-vitro* Experimenten mögliche Rückschlüsse auf die Sehnenruptur *in-vivo* ziehen zu können, wurden in den folgenden Versuchen diese beiden Stimulationsmethoden kombiniert angewandt. Die Kontrollgruppe wurde dabei ausschließlich im IVM behandelt, sodass die gewonnenen Ergebnisse den zusätzlichen Effekt der C3a-Präsenz bei vorliegender Sehnenzellverletzung widerspiegeln. Die gleichzeitige mechanische Verletzung der Tendozyten sowie die Stimulation mit dem Anaphylatoxin C3a *in-vitro* kommen einer möglichen Komplementaktivierung *in-vivo* bei Sehnenrupturen damit näher.

Für den Anaphylatoxinrezeptor C3aR konnte durch die Kostimulation von C3a und dem IVM eine signifikante Genexpressionsinduktion zu dem Zeitpunkt 24 h nach Behandlung nachgewiesen werden (siehe Abb. 26). Der C5aR zeigte lediglich eine tendenzielle Genexpressionsinduktion 24 h nach Stimulation (siehe Abb. 28). Eine Steigerung der Genexpression des C3aR wurde bereits in den bisher durchgeführten Einzelstimulationsversuchen dargestellt (vgl. Kap. 5.1 und 5.4). Dieses Ergebnis liefert einen weiteren Anhaltspunkt dafür, dass eine posttraumatische Komplementaktivierung zu einer erhöhten Sensibilität der Tendozyten gegenüber dem Anaphylatoxin C3a führt. Eine erhöhte Expression der Anaphylatoxinrezeptoren konnten auch Takabayashi und Kollegen (2004) durch die Wirkung proinflammatorischer Zytokine auf Monozyten darstellen. Durch die Stimulation mit IL-1 wurde hierbei die Genexpression der C3a- und C5a-Rezeptoren auf Monozyten signifikant gesteigert. Auch in anderen Geweben führt eine inflammatorische Reaktion zu einer verstärkten Expression der Anaphylatoxinrezeptoren. Bei Patienten mit bakteriellen Meningitiden konnte in einer anderen Studie eine erhöhte Expression des C3a-Rezeptors auf Astrozyten, Mikrogliazellen sowie Makrophagen und neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden (Gasque, Singhrao et al. 1998). Auch aktivierte Monozyten weisen eine erhöhte Expression des C5a-Rezeptors auf (Soruri, Grigat et al. 2008). Interessanterweise kann wiederum die Stimulation der Monozyten mit C3a und C5a eine gesteigerte Sekretion von IL-1 bewirken (Takabayashi, Shimizu et al. 2004). Dieser Effekt der Anaphylatoxinvermittelten Induktion proinflammatorischer Zytokine konnte in der vorliegenden Arbeit für Tendozyten dargestellt werden. Daher könnte eine Komplementaktivierung bei entzündlichen Erkrankungen des Sehnengewebes durch die Induktion proinflammatorischer Zytokine die ablaufende Immunantwort des Organismus verstärken. Für viele Organe und Gewebe konnte inzwischen eine zentrale Rolle des C3a-Rezeptors bei inflammatorischen Prozessen gezeigt werden (Boos, Szalai et al. 2005; Wenderfer, Wang et al. 2009; Tokodai, Goto et al. 2011; Banda, Hyatt et al. 2012; Wang, Irani et al. 2012). In zukünftigen *in-vivo* Studien sollte die Bedeutung der Anaphylatoxinrezeptoren für das Sehnengewebe an C3aR- oder C5aR-defizienten Tieren weiter erforscht werden.

In den bisherigen Experimenten zeigte das komplementinhibitorische Protein CD55 unter C3a-Stimulation eine Suppression (vgl. Abb. 17) sowie im IVM eine Induktion seiner Genexpression (vgl. Abb. 23). Durch die Kostimulation aus C3a und IVM konnte hier eine starke Genexpressionsinduktion nachgewiesen werden (siehe Abb. 28). Die Kostimulation scheint einen ähnlichen Einfluss wie die alleinige Verletzung auf die

Sehnenzellen auszuüben. Es kann daher angenommen werden, dass verletzte Tendozyten über die gesteigerte Expression von CD55 eine direkte Inhibition der C3-Konvertase des Komplementsystems bewirken könnten. Als Folge wären sinkende Level an C3a, MAC und weiteren Markern einer Komplementaktivierung denkbar. Eine vergleichbare inhibitorische Wirkung des CD55 konnten Wang und Kollegen (2010) für neuronale Zellen belegen. Eine Stimulation mit CD55 führte hierbei zu einer geringeren Produktion von C3a und MAC unter hypoxisch-ischämischen Bedingungen. Auch die Expression des C3aR auf Neuronen wurde durch die CD55-Stimulation erniedrigt. Inwieweit CD55 auch in Tendozyten die Expression des C3aR vermindern kann, ist bislang unbekannt. Für CD55 ist jedoch eine hormonell induzierbare Expressionssteigerung durch Progesteron bekannt (Kaul, Nagamani et al. 1995). Untersuchungen der therapeutischen Nutzbarkeit einer hormonellen Induktion des CD55 durch die Behandlung schwerer zerebraler Traumata bei Ratten wurden bereits durchgeführt. Dabei kann die Induktion von CD55 durch die Inhibierung der Komplementaktivität eine zentrale Rolle in einem verbesserten Outcome spielen (VanLandingham, Cekic et al. 2007). In dem IVM zeigten Tendozyten bereits bei alleiniger Verletzung eine inhibitorische Wirkung auf die Aktivität des Komplementsystems durch die Genexpressionssteigerung von CD46 und CD55 (vgl. Abb. 23). Inwiefern sich auch für inflammatorische Prozesse bei Tendinopathien eine therapeutische Option für die Behandlung mit Progesteron ergeben kann, sollte im Tiermodell anhand weiterer Studien untersucht werden.

Die Kostimulation mit dem Anaphylatoxin C3a und IVM führte zu einer starken Geninduktion des TNF α sowohl 4 h als auch 24 h nach Behandlung der Tendozyten. Eine Expressionssteigerung des TNF α konnte in den bisherigen Ergebnissen auch für die alleinige C3a-Stimulation gezeigt werden, nicht jedoch für die alleinige Verletzung der Tendozyten. Für die aktive Beteiligung der Tendozyten an einer proinflammatorischen Reaktion ist offenbar ein chemotaktisches Signal, wie das Anaphylatoxin C3a erforderlich. Dafür spricht die von Millar und Kollegen (2009) bei rupturierten Sehnen der Rotatorenmanschette *in-vivo* beschriebene starke Induktion der Genexpression des TNF α . Für Tendozyten lässt sich in Anbetracht dieser Erkenntnisse auf eine aktive Verstärkung proinflammatorischer Reaktionen im Rahmen entzündlicher Sehnenenerkrankungen *in-vivo* schließen. Für das Sehngewebe konnten bereits Veränderungen in der EZM aufgrund einer verminderten Produktion an Kollagen Typ I unter dem Einfluss von TNF α belegt werden (John, Lodka et al. 2010). Im Vergleich zu einer gesunden Supraspinatussehne konnten Millar und Kollegen in rupturierten

Supraspinatussehnen auch eine deutliche Steigerung weiterer proinflammatorischer Interleukine, wie IL-6, IL-15 und IL-18 nachweisen. Zentrale Enzyme der Apoptose, wie die Caspase 3 und 8 zeigten sich in rupturierten Sehnen ebenfalls erhöht (Millar, Wei et al. 2009). Inwieweit TNF α hier die Induktion der Apoptose bewirken kann, ist jedoch in der Fachliteratur nicht eindeutig geklärt. Machner und Kollegen postulieren eine antiapoptotische Wirkung des TNF α auf Tendozyten aus an Osteoarthritis erkrankten Kniegelenken. Eine proapoptotische Wirkung des TNF α wurde für Tendozyten hingegen häufiger beschrieben (Bradham, Qian et al. 1998; Shakibaei, Schulze-Tanzil et al. 2005; Schulze-Tanzil, Al-Sadi et al. 2011). Während der Heilungsphase einer operativ gesetzten Sehnenverletzung konnte eine vermehrte Apoptose beobachtet werden (Wu, Chen et al. 2010; Wu, Zhou et al. 2012). Es kann daher angenommen werden, dass auch TNF α in der Lage ist, in verletztem Sehngewebe eine Apoptose zu induzieren. Durch die Regulation der Apoptose, der Expression weiterer proinflammatorischer Zytokine sowie durch Veränderungen der EZM verfügt TNF α über eine zentrale Funktion in der posttraumatischen Heilungsphase des Sehngewebes. Die in dieser Arbeit beschriebenen Expressionsveränderungen des TNF α legen eine Veränderung bei Anwesenheit von Anaphylatoxinen nahe. Bei Übertragung der *in-vitro* Ergebnisse auf die Situation *in-vivo* könnte eine Komplementaktivierung schließlich auch eine Verstärkung der mit TNF α bereits assoziierten Veränderungen in Tendozyten führen.

Die Genexpression der MMP-1 wies bei der angewandten Kostimulation von C3a und der mechanischen Verletzung der Tendozyten keine signifikanten Veränderungen auf (siehe Abb. 30). Aus der Analyse der Einzelstimulation von entweder mit C3a oder im IVM behandelten Tendozyten ist eine gegensätzliche Genexpressionsveränderungen der MMP-1 bekannt (vgl. Abb. 18 und 24). Möglicherweise kam es bei der Kostimulation zu einer gegenseitigen Abschwächung der beschriebenen Partialeffekte von C3a und einer Verletzung der Tendozyten. Diese Ergebnisse sprechen für eine Regulation der MMP-1, welche maßgeblich von den zugrunde liegenden molekularen Pathomechanismen einzelner Sehnenpathologien abhängig sind. Bei primär infektiösen Sehnenenerkrankungen, wie zum Beispiel einer bakteriellen Tendinitis kann es zu einer verminderten Expression der MMP-1 kommen. Steht jedoch primär eine Ruptur im Vordergrund, könnte durch eine Induktion der MMP-1 der Abbau defekter EZM und damit die Reorganisation des Sehngewebes erleichtert werden. Für die Regulation der MMP sind weitere Inhibitoren bekannt. Ein potenter unspezifischer Inhibitor der MMP ist das Plasmaprotein α 2-Makroglobulin. Histologisch konnte ein signifikant

geringerer Kollagenabbau bei mit α 2-Makroglobulin behandelten rupturierten Supraspinatussehnen von Ratten dargestellt werden (Bedi, Kovacevic et al. 2010). Das α 2-Makroglobulin wird hauptsächlich in Gewebsmakrophagen und Fibroblasten produziert (Larin, Gorlina et al. 2002) und kann bei inflammatorischen Prozessen verstärkt sezerniert werden (Jinbo, Sakamoto et al. 2002). Daraus lässt sich eine verminderte Aktivität der MMP-1 im Rahmen einer proinflammatorischen Reaktion ableiten. Dieser Effekt konnte in der vorliegenden Arbeit *in-vitro* auch durch die supprimierende Wirkung des Anaphylatoxins C3a auf die MMP-1 nachvollzogen werden. Ferner kann eine spezifische Inhibition der MMP auch durch die von Tendozyten synthetisierten Gewebeinhibitoren, den sog. tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) ausgeübt werden (Baker, Edwards et al. 2002; Del Buono, Oliva et al. 2012). Die Regulation der Aktivität der MMP unterliegt daher einer feinen Balance zwischen induzierenden und supprimierenden Faktoren, wobei die Aktivität der MMP stark von der zugrunde liegenden Erkrankung abhängig zu sein scheint. Für eine therapeutische Intervention bietet diese Regulation interessante Angriffspunkte, welche in weiteren Studien zukünftig erforscht werden müssen.

5.6 HISTOLOGISCHE UND IMMUNHISTOLOGISCHE FÄRBUNGEN NATIVER SEHNEN

Die durchgeführten histologischen Färbungen dienen der Veranschaulichung der histomorphologischen Korrelate verschiedener Sehnenpathologien und einer Verknüpfung mit der Expression exemplarisch immunhistologisch dargestellter Komplementfaktoren. Gesunde Sehnen zeigen hierbei eine typische längsgerichtete Struktur mit parallel verlaufenden Kollagenfaserbündeln (Kannus 2000), vergleichbar mit der HE-Färbung einer gesunden Fingersehne der Abb. 31A. In der Abb. 31B der gesunden Fingersehne konnte kein histologisches Korrelat für sulfatierte PG gefunden werden. Möglicherweise war der Gehalt an PG für einen histologischen Nachweis zu gering. In heilenden oder pathologisch veränderten Sehnen kann es gegenüber gesunden Sehnen, in denen mit der Alcianblau-Färbung kaum PG nachweisbar sind, zu einer Erhöhung des PG-Gehaltes kommen (Stoll, John et al. 2011).

Eine traumatisch gequetschte Fingersehne ist in Abb. 32 dargestellt. Die HE-Färbung zeigt dabei eine leichte Auflockerung der Kollagenfaserbündel, wobei die Sehnenarchitektur insgesamt erhalten ist (Abb. 32A). Die AB-Färbung in der Abb. 32B

konnte keinen Anhaltspunkt für vermehrte sulfatierte PG erbringen. Hierbei deutet sich aufgrund des lokalen Traumas der mittels Paraffinschnitten untersuchte Ort der gequetschten Sehne als ein entscheidender Faktor für die später darstellbare histologische Morphologie an. Um eine fundierte Aussage über unterschiedliche histologische Korrelate erhalten zu können, müssen erst in weiteren Studien mit einer großen Anzahl an dicht benachbarten Schnitten systematische Untersuchungen des gesamten Sehnenpräparates durchgeführt werden.

Järvinen et al. (1997) beschrieben akute Sehnenrupturen als häufiges Resultat einer langjährig bestehenden chronischen Degeneration der Sehne. Histologische Kriterien degenerierter Sehnen können dabei eine Verminderung der Kollagensynthese und Vaskularisierung der Sehne sein. Die geringere Durchblutung der Sehnen kann konsekutiv zu einer lokalen Hypoxie und einer eingeschränkten Versorgung der Sehne mit Nährstoffen führen und für das histologische Korrelat mitverantwortlich sein. In Abb. 33 wird eine degenerierte humane Achillessehne dargestellt. Histologisch ist ein Strukturverlust der Kollagenfasern in der HE-Färbung erkennbar (Abb. 33A). Auch zeigt sich in der AB-Färbung ein vermehrter Gehalt an PG entlang der Kollagenfaserbündel (Abb. 33B).

Die Abb. 34A zeigt eine stark degenerierte humane Fingersehne mit einer deutlich aufgelockerten Sehnenstruktur. Die ursprünglich parallelverlaufenden Kollagenfaserbündel erscheinen hier gewellt und aus dem Verband gelöst. Die Kollagenolyse, z.B. ausgelöst durch aktivierte MMPs, ist für Tendinitiden und chronisch degenerative Prozesse ein charakteristisches Merkmal und kann zu einer aufgelockerten Sehnenstruktur führen (Fu, Chan et al. 2002). Auch konnten Riley et al. (1994) für degenerierte Sehnen der Rotatorenmanschette einen reduzierten Gehalt an Kollagen nachweisen. In der AB-Färbung konnten bei der stark degenerierten Fingersehne keine PG dargestellt werden (Abb. 34B).

Auch wurden immunhistologische Färbungen nativer Sehnenpräparate zur Darstellung des Expressionsprofils des C5a-Rezeptors und CD55 durchgeführt. Die gesunde Fingersehne (Abb. 35B) weist hierbei eine ähnlich schwache Fluoreszenzintensität wie die immunhistologische Färbung der traumatisch geschädigten Fingersehne (Abb. 35C) auf. Hingegen konnte bei der stark degenerierten Fingersehne (Abb. 35D) eine deutliche zellassozierte Fluoreszenz beobachtet werden. Eine verstärkte Expression des C5a-Rezeptors konnte in degenerierten Sehnen nachgewiesen werden, wenngleich eine schwächere Expression auch in gesunden Sehnen nachweisbar war (Busch, Girke

et al. 2012). Die in dieser Arbeit durchgeführten exemplarischen Betrachtungen können zwar die Expression des C5a-Rezeptors immunhistologisch nachweisen, jedoch sind weitere systematische Studien erforderlich, um signifikant veränderte Expressionsprofile des C5a-Rezeptors immunhistologisch belegen zu können.

Auch das komplementregulatorische Protein CD55 wurde exemplarisch in nativen Sehnen Schnitten immunhistologisch gefärbt. Die Abb. 36B zeigt einen CD55-gefärbten nativen Sehnen schnitt einer gesunden Fingersehne, während in Abb. 36C CD55 in einer traumatisch geschädigten Fingersehne dargestellt wurde. Hierbei ist in der gequetschten Fingersehne eine deutliche Fluoreszenz entlang der länglich angeordneten Tendozyten zu beobachten, welche einen Hinweis auf eine durch Verletzung gesteigerte Expression des CD55 darstellen kann. Auf Genexpressionsebene konnte bereits die Induktion des CD55 durch eine Verletzung von Sehnenzellen gezeigt werden (vgl. Abb. 23). Die Abb. 36D stellt eine CD55-immunmarkierte, stark degenerierte Fingersehne dar. Eine zellassoziierte Fluoreszenz ist hierbei kaum erkennbar. Auch Busch et al. (2012) konnten für das komplementinhibitorische Protein CD55 eine reduzierte Expression in nativen und degenerierten Fingersehnen nachweisen. Für traumatisch verletztes Sehnen gewebe sind bislang keine Daten für CD55 in nativen Sehnenpräparaten bekannt. Die in dieser Arbeit exemplarisch durchgeführten immunhistologischen Färbungen nativer Sehnenpräparate müssen in zukünftigen Studien durch eine systematische Untersuchung diverser Sehnenpathologien im direkten Vergleich zu gesundem Kontrollgewebe fortgesetzt werden. Hierzu kann vor allem die direkte Analyse von OP-Präparaten aus pathologisch veränderten Sehnen, insbesondere von frischen Verletzungen sinnvoll sein.

6 FAZIT UND AUSBLICK

Die vorliegenden Ergebnisse deuten vielfältige Interaktionen in der Modulation proinflammatorischer Reaktionen zwischen Tendozyten und dem Komplementsystem an. Es bleiben jedoch weiterhin mehrere Aspekte der vorliegenden Daten in zukünftigen Studien näher zu erforschen. So sollten mögliche Unterschiede der Bedeutung der Anaphylatoxinrezeptoren C3aR und C5aR für Tendozyten weiter analysiert werden. Interessant ist die Frage, inwieweit die pharmakologische Blockade der Anaphylatoxinrezeptoren die tendozyteneigene, proinflammatorische Aktivität vermindern kann und daraus ein verbessertes Outcome nach Verletzung resultieren könnte. Grundsätzlich sollte ein wesentlicher Endpunkt weiterer *in-vivo* Studien die histologisch darstellbare Aufrechterhaltung der Struktur und Funktionalität der Sehne sein. Im Tiermodell könnten zusätzlich Sehnen nach einer Behandlung explantiert und zum Beispiel auf physikalische Parameter, wie Elastizität und Reißfestigkeit gegenüber einer unbehandelten Kontrollgruppe überprüft werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für die C3a-Stimulationsexperimente Konzentrationen zwischen 0,1 µg/mL und 1 µg/mL C3a verwendet. In künftigen Studien könnten möglicherweise durch die Verwendung noch höherer C3a-Konzentrationen weitere signifikante Expressionsveränderungen nachgewiesen werden. Wünschenswert wären auch langfristige Untersuchungszeiträume. In dieser Arbeit wurde die Frühphase der Expressionsveränderungen zu den Zeitpunkten 4 h und 24 h nach Behandlung dargestellt. Für zukünftige Analysen wären größere Inkubationszeiträume sinnvoll. Da in dieser Arbeit ausschließlich C3a als Anaphylatoxin in den Stimulationsexperimenten angewendet wurde, sollte in zukünftigen Arbeiten das Anaphylatoxin C5a und weitere Spaltprodukte des Komplementsystems erforscht werden. Auf diese Weise kann ein möglichst vollständiges Bild der Auswirkung der bei der Komplementaktivierung freiwerdenden Anaphylatoxine erstellt werden, welches die Anaphylatoxine hinsichtlich ähnlicher Eigenschaften vergleichbarer macht.

Ein pharmakologischer Ansatzpunkt weiterer Therapieoptionen findet sich in der Zufuhr von CRP. Für neuronale Zellen konnten Wang und Kollegen (2010) bereits verminderte Apoptoseraten und eine geringere C3a-Freisetzung unter hypoxischem Stress durch eine exogene Zufuhr von CD55 nachweisen. Wenn diese Effekte auch für das Sehngewebe nachweisbar wären, könnte zum Beispiel durch eine intratendinäre

Applikation von CRPs ein verbessertes Outcome nach Sehnenrupturen erzielt werden. Sinnvoll kann für eine pharmakologische Therapie weiterhin auch die zusätzliche Blockade der MMP durch α 2-Makroglobulin oder TIMP sein, um die Aufrechterhaltung der Struktur und Funktionalität der Sehne trotz proinflammatorischer Reaktion zu ermöglichen.

Kritisch betrachtet wurden in dieser Arbeit viele *in-vitro* Experimente durchgeführt, welche ohne Weiteres keine gesicherte Übertragung der Ergebnisse auf eine Situation *in-vivo* zulassen. Nach einer Sehnenverletzung *in-vivo* können Komplementfaktoren im Rahmen einer Einblutung anfluten. Die reine Zellverletzung einer Sehnenzellkultur *in-vitro* kann die *in-vivo* Verhältnisse, geprägt durch die Präsenz von Komplement-Spaltprodukten aus dem Serum oder freigesetzt von immigrierenden Entzündungszellen nicht nachstellen. Die Anwesenheit immunkompetenter Zellen, ihrer proinflammatorischen Zytokine sowie der in der Leber synthetisierten Komplementfaktoren können *in-vitro* nachgewiesene Effekte *in-vivo* in dem Sehnenewebe dominieren. Die in dieser Arbeit beschriebenen Effekte sind zwar grundsätzlich auch *in-vivo* denkbar, erfordern jedoch auf Grund der erwähnten Aspekte vielfach weitere Überprüfungen im Tiermodell. Zukünftige Studien sollten daher systematisch native und pathologisch veränderte Sehnen auf eine mögliche Komplementaktivierung hin untersuchen.

Insgesamt stellt die vorliegende Arbeit viele Auswirkungen der Aktivierung des Komplementsystems sowie der mechanischen Verletzung von Tendozyten auf Sehnenzellen dar. Die beschriebenen Veränderungen können wesentlich das Heilungsverhalten von infizierten, rupturierten oder degenerativ veränderten Sehnen beeinflussen.

Es kann abschließend festgestellt werden, dass die in dieser Arbeit gewonnenen *in-vitro* Ergebnisse noch *in-vivo* in Bezug auf ihre Auswirkung und fortbestehende Gültigkeit validiert werden müssen. Sie bieten jedoch einen wesentlichen Teil des notwendigen Verständnisses der immunologischen Regulationen in Tendozyten und können damit neue Ansatzpunkte einer spezifischen Pharmakotherapie eröffnen.

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AB	Alcianblau
BMI	<i>Body-Mass-Index</i>
bp	Basenpaare
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CIS	Cell-Injury-System (engl. für IVM)
CRP	<i>Complement Regulating Protein</i>
DAF	<i>Decay Accelerating Factor</i> – CD55
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EZM	Extrazelluläre Matrix
GAG	Glykosaminoglykane
GP	Glykoproteine
HE	Hämatoxylin-Eosin
IL	Interleukin
IVM	<i>in-vitro</i> Verletzungsmodell
LPS	Lipopolysaccharide
MAC	<i>Membrane Attack Complex</i>
MCP	<i>Membrane Cofactor Protein</i> – CD46
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	<i>messenger RNA</i>
PG	Proteoglykane
RNA	Ribonukleinsäure (engl.)
RTD	<i>Real-Time Detected</i>
TIMP	<i>Tissue Inhibitors of Metalloproteinases</i>
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor α
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

8 LITERATURVERZEICHNIS

Almarza, A. J., S. M. Augustine, et al. (2008). "Changes in gene expression of matrix constituents with respect to passage of ligament and tendon fibroblasts." Ann Biomed Eng **36**(12): 1927-1933.

Andersen, M. B., J. Pingel, et al. (2011). "Interleukin-6: a growth factor stimulating collagen synthesis in human tendon." J Appl Physiol **110**(6): 1549-1554.

Baker, A. H., D. R. Edwards, et al. (2002). "Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities." J Cell Sci **115**(Pt 19): 3719-3727.

Banda, N. K., S. Hyatt, et al. (2012). "Role of C3a receptors, C5a receptors, and complement protein C6 deficiency in collagen antibody-induced arthritis in mice." J Immunol **188**(3): 1469-1478.

Banda, N. K., B. Levitt, et al. (2010). "Complement activation pathways in murine immune complex-induced arthritis and in C3a and C5a generation in vitro." Clin Exp Immunol **159**(1): 100-108.

Banda, N. K., J. M. Thurman, et al. (2006). "Alternative complement pathway activation is essential for inflammation and joint destruction in the passive transfer model of collagen-induced arthritis." J Immunol **177**(3): 1904-1912.

Bandyopadhyay, M. and B. Rohrer (2012). "Matrix metalloproteinase activity creates pro-angiogenic environment in primary human retinal pigment epithelial cells exposed to complement." Invest Ophthalmol Vis Sci **53**(4): 1953-1961.

Barilla-LaBarca, M. L., M. K. Liszewski, et al. (2002). "Role of membrane cofactor protein (CD46) in regulation of C4b and C3b deposited on cells." J Immunol **168**(12): 6298-6304.

Bedi, A., D. Kovacevic, et al. (2010). "The effect of matrix metalloproteinase inhibition on tendon-to-bone healing in a rotator cuff repair model." J Shoulder Elbow Surg **19**(3): 384-391.

Bellander, B. M., S. K. Singhrao, et al. (2001). "Complement activation in the human brain after traumatic head injury." J Neurotrauma **18**(12): 1295-1311.

Berglund, M., D. A. Hart, et al. (2007). "The inflammatory response and hyaluronan synthases in the rabbit flexor tendon and tendon sheath following injury." J Hand Surg Eur Vol **32**(5): 581-587.

Birk, D. E. and R. L. Trelstad (1984). "Extracellular compartments in matrix morphogenesis: collagen fibril, bundle, and lamellar formation by corneal fibroblasts." J Cell Biol **99**(6): 2024-2033.

Bjur, D., H. Alfredson, et al. (2005). "The innervation pattern of the human Achilles tendon: studies of the normal and tendinosis tendon with markers for general and sensory innervation." Cell Tissue Res **320**(1): 201-206.

Boos, L., A. J. Szalai, et al. (2005). "C3a expressed in the central nervous system protects against LPS-induced shock." Neurosci Lett **387**(2): 68-71.

Borner, C. E., O. Ruhmann, et al. (2005). "[Treatment of incomplete meniscal lesions in athletes]." Sportverletz Sportschaden **19**(4): 200-204.

Bradham, C. A., T. Qian, et al. (1998). "The mitochondrial permeability transition is required for tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis and cytochrome c release." Mol Cell Biol **18**(11): 6353-6364.

Breivik, T., Y. Gundersen, et al. (2011). "Oral treatment with complement factor C5a receptor (CD88) antagonists inhibits experimental periodontitis in rats." J Periodontal Res **46**(6): 643-647.

Busch, C., G. Girke, et al. (2012). "Complement gene expression is regulated by pro-inflammatory cytokines and the anaphylatoxin C3a in human tenocytes." Mol Immunol **53**(4): 363-373.

Cain, S. A. and P. N. Monk (2002). "The orphan receptor C5L2 has high affinity binding sites for complement fragments C5a and C5a des-Arg(74)." J Biol Chem **277**(9): 7165-7169.

Cardoso, A. I., P. Beauverger, et al. (1995). "Formaldehyde inactivation of measles virus abolishes CD46-dependent presentation of nucleoprotein to murine class I-restricted CTLs but not to class II-restricted helper T cells." Virology **212**(1): 255-258.

Cheng, N. M., W. R. Pan, et al. (2010). "The arterial supply of the long head of biceps tendon: Anatomical study with implications for tendon rupture." Clin Anat **23**(6): 683-692.

Clancy, W. G., Jr., R. G. Narechania, et al. (1981). "Anterior and posterior cruciate ligament reconstruction in rhesus monkeys." J Bone Joint Surg Am **63**(8): 1270-1284.

Corps, A. N., R. L. Harrall, et al. (2002). "Ciprofloxacin enhances the stimulation of matrix metalloproteinase 3 expression by interleukin-1beta in human tendon-derived

cells. A potential mechanism of fluoroquinolone-induced tendinopathy." Arthritis Rheum **46**(11): 3034-3040.

Del Buono, A., F. Oliva, et al. (2012). "Metalloproteases and rotator cuff disease." J Shoulder Elbow Surg **21**(2): 200-208.

Dunkelberger, J. R. and W. C. Song (2010). "Complement and its role in innate and adaptive immune responses." Cell Res **20**(1): 34-50.

Eliasson, P., T. Andersson, et al. (2009). "Rat Achilles tendon healing: mechanical loading and gene expression." J Appl Physiol **107**(2): 399-407.

Engström, G., B. Hedblad, et al. (2007). "Plasma levels of complement C3 is associated with development of hypertension: a longitudinal cohort study." J Hum Hypertens **21**(4): 276-282.

Engström, G., B. Hedblad, et al. (2005). "Complement C3 is a risk factor for the development of diabetes: a population-based cohort study." Diabetes **54**(2): 570-575.

Fenwick, S. A., B. L. Hazleman, et al. (2002). "The vasculature and its role in the damaged and healing tendon." Arthritis Res **4**(4): 252-260.

Fishelson, Z., G. Attali, et al. (2001). "Complement and apoptosis." Mol Immunol **38**(2-3): 207-219.

Fu, S. C., B. P. Chan, et al. (2002). "Increased expression of matrix metalloproteinase 1 (MMP1) in 11 patients with patellar tendinosis." Acta Orthop Scand **73**(6): 658-662.

Gaida, J. E., J. Bagge, et al. (2012). "Evidence of the TNF-alpha System in the Human Achilles Tendon: Expression of TNF-alpha and TNF Receptor at both Protein and mRNA Levels in the Tenocytes." Cells Tissues Organs.

Gasque, P., S. K. Singhrao, et al. (1998). "The receptor for complement anaphylatoxin C3a is expressed by myeloid cells and nonmyeloid cells in inflamed human central nervous system: analysis in multiple sclerosis and bacterial meningitis." J Immunol **160**(7): 3543-3554.

Gebhard F, S. W., Brückner U, Kinzl L (2000). "Untersuchungen zur systemischen posttraumatischen Inflammation in der Frühphase nach Trauma." Der Unfallchirurg: 1-96.

Gombos, T., Z. Forhecz, et al. (2012). "Complement anaphylatoxin C3a as a novel independent prognostic marker in heart failure." Clin Res Cardiol **101**(8): 607-615.

Grafe, H. (1969). "Aspekte zur Ätiologie der subkutanen Achillessehneruptur." Zbl Chir **94**: 1073-1082.

Gulbins, E., Lang, K (2007). Physiologie des Menschen. L. F. Schmidt R, Springer-Verlag Heidelberg. **30**: 553 f.

Gulotta, L. V., D. Kovacevic, et al. (2011). "Evaluation of tumor necrosis factor alpha blockade on early tendon-to-bone healing in a rat rotator cuff repair model." Arthroscopy **27**(10): 1351-1357.

Hietbrink, F., L. Koenderman, et al. (2006). "Trauma: the role of the innate immune system." World J Emerg Surg **1**: 15.

Hoffmann, A. and G. Gross (2007). "Tendon and ligament engineering in the adult organism: mesenchymal stem cells and gene-therapeutic approaches." Int Orthop **31**(6): 791-797.

Hosaka, Y., R. Kirisawa, et al. (2005). "Differences in tumor necrosis factor (TNF)alpha and TNF receptor-1-mediated intracellular signaling factors in normal, inflamed and scar-formed horse tendons." J Vet Med Sci **67**(10): 985-991.

Hosaka, Y., R. Kirisawa, et al. (2002). "Localization of cytokines in tendinocytes of the superficial digital flexor tendon in the horse." J Vet Med Sci **64**(10): 945-947.

Huppelsberg, J. (2005). Physiologie, Thieme-Verlag Stuttgart. **2**: 32 ff.

Ibelgaufts, H. (2011). "TNF-alpha." Retrieved 2012-08-08, from <http://www.copewithcytokines.de/cope.cgi?key=TNF-alpha>.

Ignatius, A., P. Schoengraf, et al. (2011). "Complement C3a and C5a modulate osteoclast formation and inflammatory response of osteoblasts in synergism with IL-1beta." J Cell Biochem **112**(9): 2594-2605.

Jarvinen, M., L. Jozsa, et al. (1997). "Histopathological findings in chronic tendon disorders." Scand J Med Sci Sports **7**(2): 86-95.

Jinbo, T., T. Sakamoto, et al. (2002). "Serum alpha2-macroglobulin and cytokine measurements in an acute inflammation model in rats." Lab Anim **36**(2): 153-157.

John, T., D. Lodka, et al. (2010). "Effect of pro-inflammatory and immunoregulatory cytokines on human tenocytes." J Orthop Res **28**(8): 1071-1077.

John, T., P. F. Stahel, et al. (2007). "Impact of the complement cascade on posttraumatic cartilage inflammation and degradation." Histol Histopathol **22**(7): 781-790.

Johnson, J. B., D. S. Lyles, et al. (2012). "Virion-Associated Complement Regulator CD55 is More Potent than CD46 in Mediating Resistance of Mumps Virus and VSV to Neutralization." J Virol.

Kannus, P. (2000). "Structure of the tendon connective tissue." Scand J Med Sci Sports **10**(6): 312-320.

Kaul, A., M. Nagamani, et al. (1995). "Decreased expression of endometrial decay accelerating factor (DAF), a complement regulatory protein, in patients with luteal phase defect." Am J Reprod Immunol **34**(4): 236-240.

Laborlexikon (2011). "Das Komplementsystem." Retrieved 2012-05-14, from www.laborlexikon.de.

Lakemeier, S., J. Braun, et al. (2011). "Expression of matrix metalloproteinases 1, 3, and 9 in differing extents of tendon retraction in the torn rotator cuff." Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc **19**(10): 1760-1765.

Larin, S. S., N. K. Gorlina, et al. (2002). "Binding of alpha2-macroglobulin to collagen type I: modification of collagen matrix by alpha2-macroglobulin induces the enhancement of macrophage migration." Russ J Immunol **7**(1): 34-40.

Lavagnino, M., S. P. Arnoczky, et al. (2003). "Effect of amplitude and frequency of cyclic tensile strain on the inhibition of MMP-1 mRNA expression in tendon cells: an in vitro study." Connect Tissue Res **44**(3-4): 181-187.

Legerlotz, K., E. R. Jones, et al. (2012). "Increased expression of IL-6 family members in tendon pathology." Rheumatology (Oxford) **51**(7): 1161-1165.

Lehmann-Horn, F. (2007). Motorische Systeme. Physiologie des Menschen. Berlin, Springer-Verlag. **30**: 148 f.

Leppilahti, J., J. Puranen, et al. (1996). "Incidence of Achilles tendon rupture." Acta Orthop Scand **67**(3): 277-279.

Ling, S. C., C. F. Chen, et al. (1990). "A study on the vascular supply of the supraspinatus tendon." Surg Radiol Anat **12**(3): 161-165.

Liszewski, M. K., M. K. Leung, et al. (2007). "Modeling how CD46 deficiency predisposes to atypical hemolytic uremic syndrome." Mol Immunol **44**(7): 1559-1568.

Löffler, G. (2005). Basiswissen Biochemie Heidelberg, Springer-Verlag. **6**: p. 683-693.

Maffulli, N., A. Del Buono, et al. (2012). "Light microscopic histology of quadriceps tendon ruptures." Int Orthop.

Majewski M, W. K. H., Steinbrück K (2002). Achilles Tendon Ruptures: 25 Year's Experience in Sport-Orthopedic Treatment. Sportverl Sportschad, Georg Thieme Verlag Stuttgart. **16**: 167–173.

Matuszewski, P. E., Y. L. Chen, et al. (2012). "Regional Variation in Human Supraspinatus Tendon Proteoglycans: Decorin, Biglycan, and Aggrecan." Connect Tissue Res.

Matuszewski, P. E., Y. L. Chen, et al. (2012). "Regional variation in human supraspinatus tendon proteoglycans: decorin, biglycan, and aggrecan." Connect Tissue Res **53**(5): 343-348.

Mazzocca, A. D., D. Chowanec, et al. (2011). "In vitro changes in human tenocyte cultures obtained from proximal biceps tendon: multiple passages result in changes in routine cell markers." Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.

McGregor, C. G., D. Ricci, et al. (2012). "Human CD55 expression blocks hyperacute rejection and restricts complement activation in Gal knockout cardiac xenografts." Transplantation **93**(7): 686-692.

Melendi, G. A., S. J. Hoffman, et al. (2007). "C5 modulates airway hyperreactivity and pulmonary eosinophilia during enhanced respiratory syncytial virus disease by decreasing C3a receptor expression." J Virol **81**(2): 991-999.

Millar, N. L., A. Q. Wei, et al. (2009). "Cytokines and apoptosis in supraspinatus tendinopathy." J Bone Joint Surg Br **91**(3): 417-424.

Milz, S., B. Ockert, et al. (2009). "[Tenocytes and the extracellular matrix : a reciprocal relationship]." Orthopade **38**(11): 1071-1079.

Mizuno, M. (2006). "A review of current knowledge of the complement system and the therapeutic opportunities in inflammatory arthritis." Curr Med Chem **13**(14): 1707-1717.

Mizutani, N., H. Goshima, et al. (2012). "Complement C3a-induced IL-17 plays a critical role in an IgE-mediated late-phase asthmatic response and airway hyperresponsiveness via neutrophilic inflammation in mice." J Immunol **188**(11): 5694-5705.

Muscari, A., C. Bozzoli, et al. (1995). "Association of serum C3 levels with the risk of myocardial infarction." Am J Med **98**(4): 357-364.

Peacock, E. E., Jr. (1959). "A study of the circulation in normal tendons and healing grafts." Ann Surg **149**(3): 415-428.

Peng, Q., K. Li, et al. (2012). "C3a and C5a Promote Renal Ischemia-Reperfusion Injury." J Am Soc Nephrol.

Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." Nucleic Acids Res **29**(9): e45.

Pufe, T., W. Petersen, et al. (2001). "The angiogenic peptide vascular endothelial growth factor is expressed in foetal and ruptured tendons." Virchows Arch **439**(4): 579-585.

Qi, J., L. Chi, et al. (2006). "Interleukin-1beta increases elasticity of human bioartificial tendons." Tissue Eng **12**(10): 2913-2925.

Rathbun, J. B. and I. Macnab (1970). "The microvascular pattern of the rotator cuff." J Bone Joint Surg Br **52**(3): 540-553.

Ricklin, D., G. Hajishengallis, et al. (2010). "Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis." Nat Immunol **11**(9): 785-797.

Riley, G. P., R. L. Harrall, et al. (1994). "Tendon degeneration and chronic shoulder pain: changes in the collagen composition of the human rotator cuff tendons in rotator cuff tendinitis." Ann Rheum Dis **53**(6): 359-366.

Schulze-Tanzil, G., O. Al-Sadi, et al. (2011). "The role of pro-inflammatory and immunoregulatory cytokines in tendon healing and rupture: new insights." Scand J Med Sci Sports **21**(3): 337-351.

Schulze-Tanzil, G., A. Mobasheri, et al. (2004). "Cultivation of human tenocytes in high-density culture." Histochem Cell Biol **122**(3): 219-228.

Shakibaei, M., G. Schulze-Tanzil, et al. (2005). "Redox regulation of apoptosis by members of the TNF superfamily." Antioxid Redox Signal **7**(3-4): 482-496.

Skutek, M., M. van Griensven, et al. (2001). "Cyclic mechanical stretching enhances secretion of Interleukin 6 in human tendon fibroblasts." Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc **9**(5): 322-326.

- Smith, K. D., A. Vaughan-Thomas, et al. (2011). "The organisation of elastin and fibrillins 1 and 2 in the cruciate ligament complex." J Anat **218**(6): 600-607.
- Soruri, A., J. Grigat, et al. (2008). "Mast cell activation is characterized by upregulation of a functional anaphylatoxin C5a receptor." BMC Immunol **9**: 29.
- Stein, V., H. Laprell, et al. (2000). "Quantitative assessment of intravascular volume of the human Achilles tendon." Acta Orthop Scand **71**(1): 60-63.
- Stoll, C., T. John, et al. (2011). "Healing parameters in a rabbit partial tendon defect following tenocyte/biomaterial implantation." Biomaterials **32**(21): 4806-4815.
- Takabayashi, T., S. Shimizu, et al. (2004). "Interleukin-1 upregulates anaphylatoxin receptors on mononuclear cells." Surgery **135**(5): 544-554.
- Thampatty, B. P., H. Li, et al. (2007). "EP4 receptor regulates collagen type-I, MMP-1, and MMP-3 gene expression in human tendon fibroblasts in response to IL-1 beta treatment." Gene **386**(1-2): 154-161.
- Thermann, H. (1998). "[Treatment of Achilles tendon rupture]." Unfallchirurg **101**(4): 299-314.
- Thundyil, J., D. Pavlovski, et al. (2012). "C5a receptor (CD88) inhibition improves hypothermia-induced neuroprotection in an in vitro ischemic model." Neuromolecular Med **14**(1): 30-39.
- Tillmann, B. N. (2005). Atlas der Anatomie des Menschen, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. **2**: 493.
- Tohyama, H., K. Yasuda, et al. (2007). "The responses of extrinsic fibroblasts infiltrating the devitalised patellar tendon to IL-1beta are different from those of normal tendon fibroblasts." J Bone Joint Surg Br **89**(9): 1261-1267.
- Tokodai, K., M. Goto, et al. (2011). "Expression of receptors for anaphylatoxins C3a and C5a on rat islet preparations." Transplant Proc **43**(9): 3179-3180.
- Tsuzaki, M., G. Guyton, et al. (2003). "IL-1 beta induces COX2, MMP-1, -3 and -13, ADAMTS-4, IL-1 beta and IL-6 in human tendon cells." J Orthop Res **21**(2): 256-264.
- Uchida, H., H. Tohyama, et al. (2005). "Stress deprivation simultaneously induces over-expression of interleukin-1beta, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-beta in fibroblasts and mechanical deterioration of the tissue in the patellar tendon." J Biomech **38**(4): 791-798.

UniProt Consortium (2011). "P15502 (ELN_HUMAN)." Retrieved 2011-11-01, from <http://www.uniprot.org/uniprot/P15502>.

Vailas, A. C., C. M. Tipton, et al. (1978). "Physical activity and hypophysectomy on the aerobic capacity of ligaments and tendons." J Appl Physiol **44**(4): 542-546.

VanLandingham, J. W., M. Cekic, et al. (2007). "Neurosteroids reduce inflammation after TBI through CD55 induction." Neurosci Lett **425**(2): 94-98.

Walport, M. J. (2001). "Complement. First of two parts." N Engl J Med **344**(14): 1058-1066.

Wang, Q., A. L. Rozelle, et al. (2011). "Identification of a central role for complement in osteoarthritis." Nat Med **17**(12): 1674-1679.

Wang, W., R. A. Irani, et al. (2012). "Autoantibody-mediated complement c3a receptor activation contributes to the pathogenesis of preeclampsia." Hypertension **60**(3): 712-721.

Wang, X., Y. Qiu, et al. (2012). "Proliferation and differentiation of human tenocytes in response to platelet rich plasma: an in vitro and in vivo study." J Orthop Res **30**(6): 982-990.

Wang, Y., Y. Li, et al. (2010). "Decay accelerating factor (CD55) protects neuronal cells from chemical hypoxia-induced injury." J Neuroinflammation **7**: 24.

Wenderfer, S. E., H. Wang, et al. (2009). "C3a receptor deficiency accelerates the onset of renal injury in the MRL/lpr mouse." Mol Immunol **46**(7): 1397-1404.

Wetsel, R. A. (1995). "Structure, function and cellular expression of complement anaphylatoxin receptors." Curr Opin Immunol **7**(1): 48-53.

Wills, C. A., S. Washburn, et al. (1986). "Achilles tendon rupture. A review of the literature comparing surgical versus nonsurgical treatment." Clin Orthop Relat Res(207): 156-163.

Woo, S. L., K. Hildebrand, et al. (1999). "Tissue engineering of ligament and tendon healing." Clin Orthop Relat Res(367 Suppl): S312-323.

Wu, Y. F., C. H. Chen, et al. (2010). "Molecular events of cellular apoptosis and proliferation in the early tendon healing period." J Hand Surg Am **35**(1): 2-10.

Wu, Y. F., Y. L. Zhou, et al. (2012). "Cellular apoptosis and proliferation in the middle and late intrasynovial tendon healing periods." J Hand Surg Am **37**(2): 209-216.

Yao, L., C. S. Bestwick, et al. (2006). "Phenotypic drift in human tenocyte culture." Tissue Eng **12**(7): 1843-1849.

Yepes, H., M. Tang, et al. (2008). "Relationship between hypovascular zones and patterns of ruptures of the quadriceps tendon." J Bone Joint Surg Am **90**(10): 2135-2141.

Zhang, G., Y. Ezura, et al. (2006). "Decorin regulates assembly of collagen fibrils and acquisition of biomechanical properties during tendon development." J Cell Biochem **98**(6): 1436-1449.

EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG

„Ich, Georg Girke, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema

*„Komplementaktivierung in der Sehne
Wirkung des Anaphylatoxins C3a und des
in-vitro Sehnenverletzungsmodells auf Tendozyten
vor dem Hintergrund der Sehnenheilung“*

selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Betreuerin, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Ort, Datum

Unterschrift

ANTEILSERKLÄRUNG AN ERFOLGTEN PUBLIKATIONEN

Herr Georg Girke hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Busch, C.¹, G. Girke¹, et al. (2012). "Complement gene expression is regulated by pro-inflammatory cytokines and the anaphylatoxin C3a in human tenocytes." Mol Immunol **53**(4): 363-373.

¹ *geteilte Erstautorenschaft*

Beitrag im Einzelnen:

Herr Girke führte die Stimulation der Tendozyten mit dem Anaphylatoxin C3a sowie die folgenden Genexpressionsanalysen, immunhistologischen Färbungen und Datenauswertungen durch und wirkte an der Verfassung des Manuskripts mit.

Unterschrift des Doktoranden

LEBENS LAUF

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

PUBLIKATIONSLISTE

Publikationen

- Busch, C.¹, Girke, G.¹, et al. (2012). "Complement gene expression is regulated by pro-inflammatory cytokines and the anaphylatoxin C3a in human tenocytes." Mol Immunol **53**(4): 363-373.

¹ *geteilte Erstautorenschaft*

Posterbeiträge

- Girke, G., Kohl B, Ertel W, John T, Schulze-Tanzil G. Komplementexpression bei *in-vitro* verletzten humanen Tendozyten, Posterbeitrag zur 29. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft, Würzburg, September 2012.

DANKSAGUNG

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau PD Dr. med. vet. Gundula Schulze-Tanzil für die Ermöglichung dieser Dissertation in ihrer Arbeitsgruppe. Ihre kreativen Ideen, wertvollen Ratschläge und hilfreichen Korrekturen haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ich bedanke mich für eine brillante Betreuung meiner Arbeit.

Auch möchte ich mich bei Benjamin Kohl für die kompetente, stets ermunternde und zu jeder Zeit erreichbare Hilfe bei Fragen und Problemen im Laboralltag bedanken. Es war mir jeden Tag eine große Freude mit Benjamin zu arbeiten.

Herzlich danken möchte ich auch Dr. med. vet. Anke Lohan für ihre wertvolle und zuverlässige Unterstützung bei der Pflege der Zellkulturen.

Nicht zuletzt stand mir das gesamte Laborteam immer hilfreich zur Seite und bot auf diese Weise eine bestmögliche Betreuung meiner Arbeit. Die Arbeitsgemeinschaft zeichnete sich durch ein ausgesprochen kollegiales und freundliches Miteinander aus, in dem es mir eine Freude war, meine Dissertation anfertigen zu können.

Annabel Salinas sowie meinen Eltern, meiner Schwester und meiner gesamten Familie danke ich für ihre liebevolle Begleitung und Unterstützung von ganzem Herzen.