

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

DISSERTATION

**Komplementregulation in Sehnervenzellen, vermittelt durch das
Anaphylatoxin C5a und Leukozyten**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sandeep Silawal
aus Kathmandu, Nepal

Datum der Promotion: 08.12.2017

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	5
Tabellenverzeichnis.....	6
Abstrakt	7
Abstract	9
1 Einleitung	10
1.1 Sehne	10
1.1.1 Biologische Zusammensetzung der Sehne	10
1.1.2 Synthese der Kollagenfibrillen.....	11
1.1.3 Mechanik der Sehne	12
1.2 Tendinopathie.....	12
1.2.1 Ursachen der Tendinopathien.....	13
1.2.2 Sehnenruptur und Heilung	13
1.3 Komplementsystem.....	14
1.3.1 Komplementaktivierung.....	14
1.3.3 C5a Rezeptor und die Komplement-regulatorischen Proteine	17
1.3.4 Zytokine und Bedeutung des TNF α in einer Sehnenentzündung.....	19
1.4 Fragestellung	20
2 Material	22
2.1 Materialien	22
2.2 Chemikalien	22
2.3 Geräte	23
2.4 Medien und Puffer.....	24
2.5 Rekombinante Proteine	25
2.6 Primer	25
2.7 Antikörper	25
2.8 Kits und Software.....	25

3 Methodik	27
3.1 Zellkultur	27
3.1.1 Stimulationsversuche	28
3.1.1.1 C5a Stimulationsversuch	28
3.1.1.2 Leukozyten Stimulationsversuch	28
3.2 RNA-Isolierung	30
3.3 cDNA-Synthese	31
3.4 RTD-PCR	32
3.6 Vitalitätsfärbung	35
3.7 Statistik	35
4 Ergebnisse	36
4.1 C5a-Stimulation der Tendozyten	36
4.1.1 Genexpressionsanalysen	36
4.1.2 Vitalitätsfärbung	41
4.1.3 Immunfluoreszenzfärbung	42
4.2 Leukozyten Stimulation der Tendozyten	45
4.2.1 Genexpressionsanalysen	45
4.2.2 Vitalitätsfärbung der Tendozyten nach Leukozytenstimulation	49
4.2.3 Leukozytenfärbungen	50
4.2.4 Immunfluoreszenzfärbung	57
5 Diskussion	62
5.1 C5a Stimulation der Tendozyten	63
5.2 Leukozyten Stimulation der Tendozyten	65
6 Fazit und Ausblick	70
7 Abkürzungsverzeichnis	71
8 Literaturverzeichnis	73
Lebenslauf	81

Publikationsverzeichnis.....	83
Eidesstattliche Versicherung	84
Danksagung	85

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Schematische Darstellung der Hauptaktivierungswege des CS	16
Abb. 2:	Genexpressionsanalyse des C5aRs nach C5a Stimulation	37
Abb. 3:	Genexpressionsanalyse des CRP CD46 nach C5a Stimulation	38
Abb. 4:	Genexpressionsanalyse des CRP CD55 nach C5a Stimulation	39
Abb. 5:	Genexpressionsanalyse des CRP CD59 nach C5a Stimulation	40
Abb. 6:	Vitalitätsfärbung der Tendozyten nach 24 h C5a Stimulation	41
Abb. 7:	Immunfluoreszenzfärbung von C5aR in Tendozyten nach C5a Stimulation	42
Abb. 8:	Bestimmung der Fluoreszenzintensität des C5aR Proteins nach C5a Stimulation	42
Abb. 9:	Immunfluoreszenzfärbung von CD55 in Tendozyten nach C5a Stimulation	43
Abb. 10:	Bestimmung der Fluoreszenzintensität des CD55 Proteins nach C5a Stimulation	43
Abb. 11:	Isotypkontrollfärbung und Negativkontrollfärbung der Tendozyten nach C5a Stimulation	44
Abb. 12:	Genexpressionsanalyse des C5aRs nach Leukozyten Stimulation	45
Abb. 13:	Genexpressionsanalyse des CRP CD46 nach Leukozyten Stimulation	46
Abb. 14:	Genexpressionsanalyse des CRP CD55 nach Leukozyten Stimulation	47
Abb. 15:	Genexpressionsanalyse des CRP CD59 nach Leukozyten Stimulation	48
Abb. 16:	Vitalitätsfärbung der Tendozyten nach 24 h Leukozyten Stimulation	49
Abb. 17:	Giemsafärbung der isolierten PBMCs und der Neutros	50
Abb. 18:	Vitalitätsfärbung der zur Stimulation eingesetzten Leukozyten (PBMCs und Neutros) nach Isolierung	51
Abb. 19:	Vitalitätsfärbung der für die Stimulation eingesetzten Leukozyten (PBMCs und Neutros; +/-TNF α) nach 4 h	52
Abb. 20:	Vitalitätsfärbung der für die Stimulation Leukozyten (PBMCs und Neutros; +/-TNF α) nach 24 h Leukozyten Stimulation der Tendozyten	53
Abb. 21:	DAPI- und Phalloidin-Färbung der Leukozyten nach Isolierung	54
Abb. 22:	DAPI- und Phalloidin-Färbung der Leukozyten nach 24 h (auf den Insert-Membranen)	55

Abb. 23:	Hellfeldaufnahme der Insertmembran des Transwells und Fluoreszenzaufnahme nach 24 h Leukozyten Stimulation	56
Abb. 24:	Immunfluoreszenzfärbung von C5aR in Tendozyten nach 4 h Leukozyten Stimulation	57
Abb. 25:	Immunfluoreszenzfärbung von C5aR in Tendozyten nach 24 h Leukozyten Stimulation	58
Abb. 26:	Bestimmung der Fluoreszenzintensität des C5aR Proteins nach Leukozyten Stimulation	58
Abb. 27:	Immunfluoreszenzfärbung von CRP CD55 in Tendozyten nach 4 h Leukozyten Stimulation	59
Abb. 28:	Immunfluoreszenzfärbung von CRP CD55 in Tendozyten nach 24 h Leukozyten Stimulation	60
Abb 29:	Bestimmung der Fluoreszenzintensität des CD55 Proteins nach Leukozyten Stimulation	60
Abb. 30:	Isotypkontrollfärbung und Negativkontrollfärbung der Tendozyten nach Leukozytenstimulation	61

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Die mittlere Dichte der Blutkomponenten im Verhältnis zur Dichte des Biocolls	29
------------	--	----

Abstrakt

Einleitung: Bei Entzündungen des Sehngewebes kommt es zu einem Zusammenspiel von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen und dem Komplementsystem (CS) sowie einer erhöhten Präsenz von Leukozyten. Während das Spaltprodukt des Komplementproteins C5, C5b durch MAC-Bildung zur osmotischen Lyse einer Zelle führt, bindet C5a am C5aR um seine inflammatorische Wirkung zu entfalten. Die Komplement-regulatorischen Proteine (CRPs) verhindern im Gegensatz dazu die spontane Aktivierung des CS. Leukozyten könnten in einer Tendinopathie Signale vermitteln, die eine Komplementregulation beeinflussen könnten.

Ziel: Das Ziel dieser in vitro Studie ist die Wechselwirkung des Anaphylatoxins C5a und von Leukozyten mit Tendozyten sowohl in Bezug auf die Genexpression (GE) als auch die Proteinsynthese des C5aRs und der CRPs (CD46, CD55 und CD59) zu verstehen.

Methodik: Kultivierte primäre humane Hamstring-Sehnenzellen wurden für 30 min, 4 h und 24 h mit rekombinantem C5a in zwei verschiedenen Konzentrationen (25 ng/mL und 100 ng/mL) stimuliert. Zusätzlich wurden Tendozyten mit humanen Leukozyten (Peripheral Blood Mononuclear Cells [PBMCs] und neutrophilen Granulozyten [Neutros]) 1:40 in einem indirekten Ko-Kultursystem (+/-10 ng/mL TNF α) für 4 h und 24 h kultiviert. Die GE von C5aR, CD46, CD55 und CD59 wurde mit Hilfe der RTD-PCR analysiert. Das Überleben der Tendozyten- und Leukozyten wurde nach 24 h durch eine Lebend-Tod Färbung analysiert. Darüber hinaus wurden die Proteine C5aR und CD55 in den Tendozyten durch eine Immunfluoreszenzmarkierung untersucht.

Ergebnisse: Die 30 minütige C5a-Stimulation (25 ng/mL) führte in Tendozyten zu einer Induktion der GE von CD55 und CD59, wobei gleichzeitig eine signifikante Reduktion der GE von C5aR, CD46 und CD59 nach 24 h Stimulation nachgewiesen werden konnte.

Im Ko-Kulturversuch bewirkte TNF α nach 4 h eine signifikante Induktion der C5aR Genaktivität. Nach 24 h konnte bei Präsenz der PMBCs (+TNF α) eine signifikante Hemmung der C5aR GE beobachtet werden. Die GE des zytoprotektiven CD59 wurde durch TNF α , PBMCs (+/-TNF α) und Neutros (-TNF α) supprimiert und die Expression des CD46 durch Neutros (-TNF α). Auch eine Stimulation der Tendozyten for 24 h mit Neutros (+/-TNF α) führte zu einer Suppression der CD55 GE, die Stimulation mit PBMCs (-TNF α) supprimierte die CD46 Genaktivität. Die Immunfärbung der Proteine C5aR und CD55 bestätigte weitgehend die GE.

Keine der Stimulationen führte zu Vitalitätseinschränkungen der Tendozyten nach 24 h.

Schlussfolgerung: Es konnte nachgewiesen werden, dass Zeit- und Konzentrations-abhängige Effekte der C5a und Leukozyten auf die Komplementregulation in den Tendozyten ausgelöst

werden. Die Komplementaktivität könnte sowohl bei der Entstehung als auch im Heilungsprozess der Sehnenruptur im Rahmen einer Tendinopathie eine Rolle spielen.

Abstract

Introduction: Inflammatory events in tendon tissues lead to an interplay of pro-/anti-inflammatory cytokines and the complement system (CS). The split fragment of complement protein C5, C5a unfolds its inflammatory effects by binding to C5aR. On the contrary, the complement regulatory proteins (CRP) prevent the ubiquitous complement activation. The leukocytes could also influence the regulation of the complement system in case of a tendinopathy.

Objective: The main objective of the present *in vitro* study was to learn more about the effects of anaphylatoxin C5a and leukocytes on tenocytes in respect to gene regulation of C5aR and CRP (CD46, CD55 and CD59).

Methods: Primary human tenocytes derived from Hamstring tendons were cultured in monolayer before directly stimulated with recombinant C5a in concentrations (25 ng/mL, 100 ng/mL) for 30 min, 4 h and 24 h. Additionally, tenocytes and human leukocytes (Peripheral Blood Mononuclear Cells [*PBMCs*] and neutrophil granulocytes [*Neutros*]) were combined 1:40 in an indirect co-culture system (\pm 10 ng/mL TNF α) for 4 h and 24 h. The gene expression of C5aR, CD46, CD55 and CD59 was monitored using RTD-PCR. Tenocyte vitality after 24 h stimulation was assessed in both cases by live-dead assay. Immunofluorescence labelling of the proteins C5aR and CD55 on tenocytes was also performed.

Results: Tenocytes stimulated with C5a (25 ng/mL) for 30 min showed an induction of the CD55 and CD59 gene expression (GE), whereas a significant decrease of C5aR, CD46 and CD59 mRNA was observed after 24 h stimulation. In the co-culture, tenocytes stimulated with TNF α for 4 h revealed a significant induction of C5aR GE. After 4 h CD59 GE was suppressed by TNF α , *PBMCs* (\pm TNF α) and *Neutros* (-TNF α) and that of CD46 by *Neutros* (-TNF α). Stimulation of tenocytes for 24 h with *Neutros* (\pm TNF α) led to a significant suppression of CD55 GE and stimulation with *PBMCs* (-TNF α) suppressed CD46 GE. Live-dead staining showed in both cases no relevant impairment of the vitality of the tenocytes after 24 h.

Conclusion: There are time and concentration dependent response in the regulation of complement system in tenocytes to C5a and leukocytes. A misbalance in complement activity could possibly be involved in genesis of tendinopathy as well as in healing process after a tendon rupture in basis of tendinopathy.

1 Einleitung

1.1 Sehne

Der Sehnenapparat ist ein wichtiger Bestandteil des muskuloskeletalen Systems. Seine Aufgabe besteht darin, die durch Muskelkontraktion erzeugte Kraft auf den Knochen zu übertragen und so zu einer der Gelenkart entsprechenden Bewegung zu führen. Dieses weißlich glänzende, straffe Bindegewebe erstreckt sich vom myotendinösen Übergang bis zum osteotendinösen Übergang (Enthesis) und sorgt für eine zugfeste, reißfeste und elastische Verbindung zwischen Muskulatur und Knochen. Die physiologisch korrekte Verankerung der Kollagenfibrillen an den Muskelfasern im myotendinösen Übergang und an dem periostalen Bindegewebe des osteotendinösen Übergangs ist ausschlaggebend für die Reißfestigkeit dieser Zugbelastungsstellen des muskuloskeletalen Apparats und daher verantwortlich für eine physiologische Kraftübertragung zur Fortbewegung.

1.1.1 Biologische Zusammensetzung der Sehne

Nur 30% eines Gesamtsehnengewebes besteht aus der Trockenmasse. In letzterer macht der zelluläre Anteil nur 10-20% aus. Die reifen Tendozyten, mesenchymale Zellen und die Tendoblasten machen ca. 90-95% der zellulären Bestandteile der Sehne aus und sind für die Produktion der Sehnen-eigenen extrazellulären Matrix (EZM) zuständig. Zu den weiteren Bestandteilen gehören die Chondrozyten an den Druck- und Insertionsstellen der Sehne, die Synoviozyten an den Sehnenscheiden, kapilläre Endothelzellen und glatte Muskelzellen in Endo- und Epitenon (1). Die EZM im Sehnengewebe setzt sich zusammen aus Kollagenfasern (hauptsächlich Typ I) 65–80%, Elastin 1–2%, Proteoglykanen (PG) und diversen anorganischen Elementen wie Kalzium, Magnesium, Mangan, Cadmium, Kobalt, Kupfer, Zink, Nickel, Lithium, Blei, Fluor, Phosphor und Silizium (1). Während die Kollagenfibrillen dem Gewebe Zugfestigkeit verleihen, vermitteln die elastischen Fasern die Dehnbarkeit der Sehne. Die Wasserbindung im Gewebe ist den PG und den Glykosaminoglykanen (GAG) zu verdanken, die für die Kompressions- und Scherbelastung der Sehne eine wichtige Funktion leisten. Bei einer gesunden Sehne ist die Verteilung der PG im Sehnengewebe unterschiedlich, z.B. Leucinreiche PG; Decorin, Fibromodulin und Lumican sind häufig im mittleren Abschnitt einer Sehne, wo maximale Zugspannung aufgenommen wird, ausgeprägt. Im Gegensatz dazu findet man Enthesis-nah analog zu einem artikulären Knorpel Aggrekan, Biglycan und Lubricin (2-4). Versican, Syndecan und Perlecan sind außerdem genauso als EZM Bestandteile des Sehnengewebes nachweisbar (5). Übrig geblieben sind die anorganischen Elemente, die ihre

Rolle bei der Synthese und im regulären Umbau des muskuloskeletalen Systems und Bindegewebes spielen (1, 6).

Die äußere Hülle einer Sehne ist unterschiedlich aufgebaut abhängig von ihrer Lokalisation und ihrer Aufgabe. Stellen, die von außen mit wenig Druck belastet sind, werden vom Paratenon, einer lockeren, gut vaskularisierten fibrösen Hüllstruktur umgeben. Das Paratenon besteht hauptsächlich aus Typ I und III Kollagenfibrillen und elastischen Fasern (7). Die Abschnitte in einer Sehne, bei denen sich die Sehnenverlaufsrichtung ändert oder ein zusätzlicher Druck von außen herrscht, besitzen eine zusätzliche Scheide, eine sog. Vagina tendinea. Hier befinden sich das parietale sowie das viszerale seröse Blatt, die beide gemeinsam einen synovialen Flüssigkeits-gefüllten kapillären Spaltraum umgrenzen und die für eine optimale Gleitbewegung der Sehne sorgen. Die fibröse Umhüllung der Muskeln durch das lockere Perimysium geht kontinuierlich ins Sehnengewebe über und wird als Peritendineum externum bezeichnet (8). Diese Struktur ist auch als Epitenon bekannt und steht nach außen im Kontakt mit oben erwähnten Paratenon und nach innen mit dem Endotenon. Das Epitenon umrahmt die tertiär-, sekundär- und die primären Faszikeln in allen Ebenen (9) mit seinem kompakten transversal, schräg sowie longitudinal verlaufenden fibrillären Netzwerk aus Kollagenfasern (10).

Ein primärer Faszikel ist ein Bündel aus den mikroskopisch erkennbaren Kollagenfasern; die funktionelle Baueinheit des Sehnengewebes. Diese Kollagenfasern sind als wellige Strukturen in der Lichtmikroskopie zu erkennen und bestehen aus elektronmikroskopisch sichtbaren Kollagenfibrillen (1).

1.1.2 Synthese der Kollagenfibrillen

Tendozyten bilden die EZM der Sehne, die hauptsächlich aus Kollagen (Typ I und III) und PG besteht. Diese spindelartigen Zellen produzieren Kollagenpolypeptide aus drei repetitiven Ketten aus Aminosäuren in der Abfolge „Glycin-X-Y“ im endoplasmatischen Retikulum. Die Stelle X- ist häufig besetzt mit der Aminosäure Prolin und das Y oft mit Hydroxyprolin (11). Die drei einzelnen Helices winden sich jeweils rechtsgängig und bilden ein Prokollagenmolekül. Kovalenten Bindungen innerhalb der Helix und zwischen zwei Helices sorgen für die Stabilität und die Rigidität des kollagenen Bindegewebes. Ascorbinsäure ist essentiell für diesen Prozess der Stabilisierung der Tripelhelices über eine Hydroxylierung von Prolin und Lysin. Skorbut als Folge eines Ascorbinsäure Mangels äußert sich daher in einer Bindegewebsschwäche durch fehlende Stabilisierung der Kollagenfibrillen. Nach der Glykolysierung in den Golgi Apparaten werden die Prokollagenmoleküle in den Extrazellulärraum ausgeschleust.

Extrazellulär entsteht nach Abspaltung der Endpeptide durch Peptidasen das Tropokollagen. Die entstandenen Fibrillen stehen in einem engen Verbund mit PG und GAG, die sich innerhalb und um die Fibrillen herum befinden. Diese ziehen Ionen und Flüssigkeit zu sich und erhöhen dadurch deren Druckfestigkeit. Die parallel gelagerten Verbände aus quervernetztem tripelhelicalen Tropokollagen bilden die endgültigen Kollagenfasern, die bei menschlichen Sehnen einen Durchmesser von bis zu 300 µm erreichen können (9) und für die hohe Zugstabilität der Sehnen verantwortlich sind sowie bei der Mechanik der Sehne eine entscheidende Rolle spielen.

1.1.3 Mechanik der Sehne

Die Kollagenfibrillen und die Fasern zeigen eine wellige Struktur in der Ruhephase, die sich durch Elektronenmikroskopie bzw. Lichtmikroskopie darstellen lässt (12). Wegen des welligen Konstrukts aus einzelnen Fibrillen und Fasern kann sich eine Sehne bei einem Zugstress bis zu 5% der Ursprungslänge reproduzierbar elongieren (1, 13). In dieser Belastungsphase ist eine Aufhebung der Reservefalten d.h. mikroskopisch eine Begradigung der Fasern zu erkennen. Aber ein akuter Zugstress über 8% wird eher zu einer Sehnenruptur führen (14). Die optimale Zugkraft einer Sehne ist von mehreren Faktoren abhängig. Hierzu zählen die intra- und intermolekularen Crosslinks, die Orientierung der Fasern, die Dichte und Länge der Kollagenfasern und -fibrillen. Mit einer Querschnittfläche von 1 cm² ist eine Sehne fähig Gewichte von ca. 500 bis 1000 kg zu tragen (9, 13). Die maximale Kraft, die unter physiologischen Bedingungen zu einer Sehnenruptur führen würde, ist in der Regel selten erreicht. Das heißt eine spontane Sehnenruptur ist meistens mit einer morphologischen Vorschädigung des Gewebes wie einer Tendinopathie vergesellschaftet (15).

1.2 Tendinopathie

Die sogenannte „Tendinosis“ ist eine degenerative Erkrankung der Sehne, die sich nicht durch klinische Symptome darstellt. Im Gegensatz dazu ist die „Tendinitis“ eine Entzündung mit klassischen Entzündungsmerkmalen im Gewebe. Daher ist die Spezifizierung erst nach einer histopathologischen Untersuchung möglich (16). Die beiden Modalitäten werden als „Tendinopathie“ zusammengefasst und können als wichtigste Ursache für eine Sehnenruptur betrachtet werden (16, 17). Die histopathologischen Merkmale bei einer Tendinosis sind fehlende inflammatorische Zellen, sowie fortschreitende Degeneration der EZM, die durch eine zunehmende Desorientierung des Faserverlaufes, Verdünnung der Fasern, Erhöhung des Anteils von dünnfaserigem Kollagen Typ III begleitet ist, Hyperzellularität, Gefäßvermehrung und vermehrte interfibrilläre GAG gekennzeichnet ist (18).

Die Rupturen der Achillessehne, der langen Sehne des M. biceps brachii, M. quadriceps femoris Sehnen und der Rotatorenmanschette sind die häufigsten Sehnenrisse (15).

Ein plötzlicher Belastungsstress an der Sehne, besonders bei einer sportlichen Aktivität und interessanterweise oft bei Männern im Alter von 35-45 Jahren bei einer vorbestehenden Tendinopathie wird als der häufigste Auslöser für eine spontane Sehnenruptur angesehen (19).

1.2.1 Ursachen der Tendinopathien

Als potentielle Ursachen lassen sich einige häufige Faktoren nennen (20). Dauerhafte Fehlbelastung, Überbelastung und Erschöpfung der Sehne zählen zu den mechanischen Faktoren, die zu einer Tendinopathie führen können. Aber nicht nur mechanische sondern auch endokrinologische metabolische Störungen wie Adipositas, Diabetes mellitus, Hypertension, Hyperlipidämie und Hyperurikämie werden auch mit Tendinopathien in Verbindung gebracht (21).

Der Effekt von Antibiotika wie Fluorchinolonen (22, 23) ist bekannt als Auslöser für Sehnen-Schädigungen, wobei der Einfluss von Statinen (24), oralen Kontrazeptiva und lokal injiziertem Kortison (23) auf die Sehne immer noch in der Diskussion ist.

Kannus und Josza, (1999) haben die verschiedenen Arten von Sehnendegenerationen kategorisiert. Eine durch Hypoxie bedingte degenerative Tendinopathie (44%) zählt zu der häufigsten, gefolgt von mukoider Degeneration (21%), Tendolipomatosis (8%) und kalzifizierender Tendinopathie (5%) (15). Auf molekularer Ebene ist die Pathogenese der Tendinopathien jedoch weitgehend unbekannt.

1.2.2 Sehnenruptur und Heilung

Mit steigender Inzidenz der Sehnenruptur (15) stellt die Sehnenheilung eine große Herausforderung für den klinischen Alltag dar. Die Regenerationsphase nach einem Riss oder Ruptur in der Sehne verläuft in vier Phasen (25). In der ersten Phase, der hämorrhagischen Phase, ist das Gewebe einer Blutung exponiert. Ist die Hämostase nach einer Verletzung eingetreten, gelangen weiterhin Leukozyten wie die Neutros ins verletzte Gewebe. Makrophagen werden in den nächsten 24-48 Stunden durch Zytokine und andere Mediatoren wie C5a (26) ins Zielgewebe gelockt. In dieser zweiten, inflammatorischen Phase phagozytieren die Makrophagen und Neutros die abgestorbenen Zellen des nekrotisierten Gewebes. Außerdem produzieren sie Wachstumsfaktoren wie Insulin-like growth factor-I (IGF-I), Transforming growth factor (TGF β), Vascular endothelial growth factor (VEGF), Platelet-derived growth factor (PDGF), Basic fibroblast growth factor (bFGF) u.s.w. um eine RepARATION des geschädigten Gewebes anzuregen (25, 27).

Zu Beginn einer Proliferationsphase werden die Tendoblasten in der Sehne aktiviert und die Fibroblasten aus dem umgebenden Gewebe durch Chemotaxis angelockt (28). Diese Tendoblasten proliferieren und bilden neue EZM, die keine physiologische Struktur aufzeigen. Diese Phase dauert etwa 6 Wochen. In der vierten Phase, der Remodelling Phase, sinkt der zelluläre Anteil und das Verhältnis von Kollagen Typ I zu Typ III wendet sich langsam zu Gunsten des Typ I. Hier werden die Fasern kompakter und orientieren sich in einer longitudinalen Zugrichtung. Diese Reorganisation erfolgt mit Hilfe des gezielten Abbaus des überflüssigen Reparatur-Bindegewebes durch Proteinasen, z.B. Matrix-Metalloproteinasen (MMPs). Es wurde nachgewiesen, dass nach einer Sehnenruptur die Proteinaseaktivität der MMP-1 im Sehnengewebe im Vergleich zum normalen Gewebe deutlich erhöht vorliegt (29). Ein Heilungsprozess kann über 1 Jahr dauern, aber das neu entstandene Sehnengewebe wird wahrscheinlich nie seine ursprüngliche Histologie und die Physiologie wiedererlangen (25). Die immunologische Wirkung des CS in dem Prozess der allgemeinen Wundheilung ist bekannt, nämlich dass es direkt im Anschluss an die primäre Hämostase in der hämorrhagischen Phase d.h. sehr früh aktiviert wird. Es ist zwar bekannt, dass sowohl das Sehnengewebe als auch die Tendozyten *in vitro* in der Lage sind Komplement und CRP zu synthetisieren (30, 31), allerdings bleibt ihre Funktion im Sehnengewebe weiterhin unbekannt.

1.3 Komplementsystem

Das CS gehört zu dem angeborenen humoralen Immunsystem mit seinen über 25 verschiedenen Komplementproteinen (CP), die kaskadenartig zur Aktivierung des Zielproteins führen und zielführend zur Abtötung einer Zelle. Seine Funktion besteht darin den Körper gegen Fremdmikroorganismen zu schützen, entweder durch eine direkte Tötung oder durch Einleitung einer Entzündungsreaktion. Durch seine Regulation auf den B1 Lymphozyten ist dieses angeborene Immunsystem außerdem mit dem erworbenen Immunsystem verknüpft und dient auch als eine Brücke zwischen beiden Systemen (32). Dieser Urabwehrmechanismus der Evolution (33) kann im Organismus durch drei unterschiedliche Wege aktiviert werden.

1.3.1 Komplementaktivierung

Die Aktivierung des klassischen Wegs des CSs wird durch die Bindung des Antikörper-Antigen-Komplexes (meistens IgG1 oder IgM) an die globuläre Einheit des C1 Proteins initiiert (Abb.1). Diese C1q-Einheit induziert die Aktivierung der Serinproteasen C1r und C1s, die die CP C4 und C2 abspalten und dadurch zur Bildung der C3-Konvertase C4bC2a führen. Es wurde außerdem beschrieben, dass C-reaktives Protein, Viren Proteine, β -Amyloide, Polyanionen (bakterielle Lipopolysaccharide, DNA und RNA), mitochondriale Fragmente, nekrotische/ apoptotische

Zellen und Amyloid-P durchaus in die Aktivierung des klassischen Wegs involviert sein können (32, 34-37). EZM Fragmente, z.B. Fibromodulin und Osteoadherin gehören auch zur Auslösergruppe, die bei einer Bindegewebeverletzung freigesetzt werden und zur Aktivierung dieses Weges beitragen können (38).

In einem anderen Modell (Lektinweg, Abb. 1) spielen die Mustererkennungsrezeptoren (PRR) wie Mannan-bindendes-Lektin (MBL) oder Ficolin eine zentrale Rolle für die Aktivierung der Komplement-vermittelten Immunabwehr. In diesem Immunglobulin unabhängigen Weg binden die PRRs an sich auf der Oberfläche von Bakterien oder Viren befindlichen Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (PAMPs), sodass die MBL-assoziierten Serinproteasen; MASP-1 und -2 aktiviert werden (39). Die Endotoxine oder Lipopolysaccharide der Gram-negativen Bakterien, Lipoteichonsäure der Gram-positiven Bakterien und β -Glucan der Pilze gehören zu den PAMPs (40). Die proteolytische Spaltung der CP, C2 und C4 durch MASP-1 und -2 führt zur Bildung der C3-Konvertase ähnlich wie im klassischen Weg (41).

Der entwicklungsgeschichtlich älteste Weg der Komplementaktivierung ist der alternative Weg (Abb. 1), der unabhängig von der Beteiligung eines Antikörpers oder Pathogens, durch kontinuierliche Hydrolyse des mit 1,2 mg/mL im Serum verfügbaren CP C3 zur Bildung von $C3(H_2O)$ führt. Faktor B bindet sich daran und lässt sich durch Faktor D in Ba und Bb spalten. Der Bb-Teil bildet nun die initiale C3-Konvertase, $C3(H_2O)Bb$. Dieser Komplex wird durch ein weiteres Protein Properdin stabilisiert (42). Von einer dauerhaften Aktivierung profitiert das Immunsystem, weil bei einem akuten Bedarf die Abwehr schnellstmöglich hochreguliert werden kann (43).

Alle Komplementaktivierungswege führen zur Bildung der C3-Konvertase, die zur Spaltung des CP C3 leitet. Die Abspaltprodukte sind Anaphylatoxin (AP) C3a und C3b. Die Opsonierung der Pathogene für die Makrophagen ist als älteste Funktion des C3b im CS bekannt. Das abgespaltene C3b im alternativen Weg kann nochmals wieder an Faktor D bindend den Faktor B spalten und dadurch eine weitere C3-Konvertase $C3bBb$ bilden.

Aber der Hauptweg in der Aktivierungskaskade liegt in der Bildung der C5-Konvertase ($C4bC2aC3b$ und $C3(H_2O)BbC3b$ bei dem alternativen Weg), die zur Spaltung des CP C5 führt. Es kommt zur Bildung des inflammatorisch hochpotenten AP C5a und des Großfragments C5b. C5b bildet durch Assoziation mit den weiteren CP C6, C7, C8 und C9 den $C5b-C9$ / Membran Attack Complex (MAC) auf der Oberfläche einer Zelle. Es kommt durch die MAC-Poren zu einer unkontrollierten Flüssigkeitsaufnahme in die Zelle und diese führt zum Aufplatzen der Zielzelle. Diese angeborene Immunabwehr läuft unwillkürlich in allen Zellen im Körper ab. Aus diesem Grund braucht der Körper eigene Schutzmechanismen in allen Stufen der

Komplementaktivierung. Dafür sind die inhibitorischen, serumlöslichen und Membran gebundenen Regulatoren zuständig.

Aktivierungswege (vereinfacht)

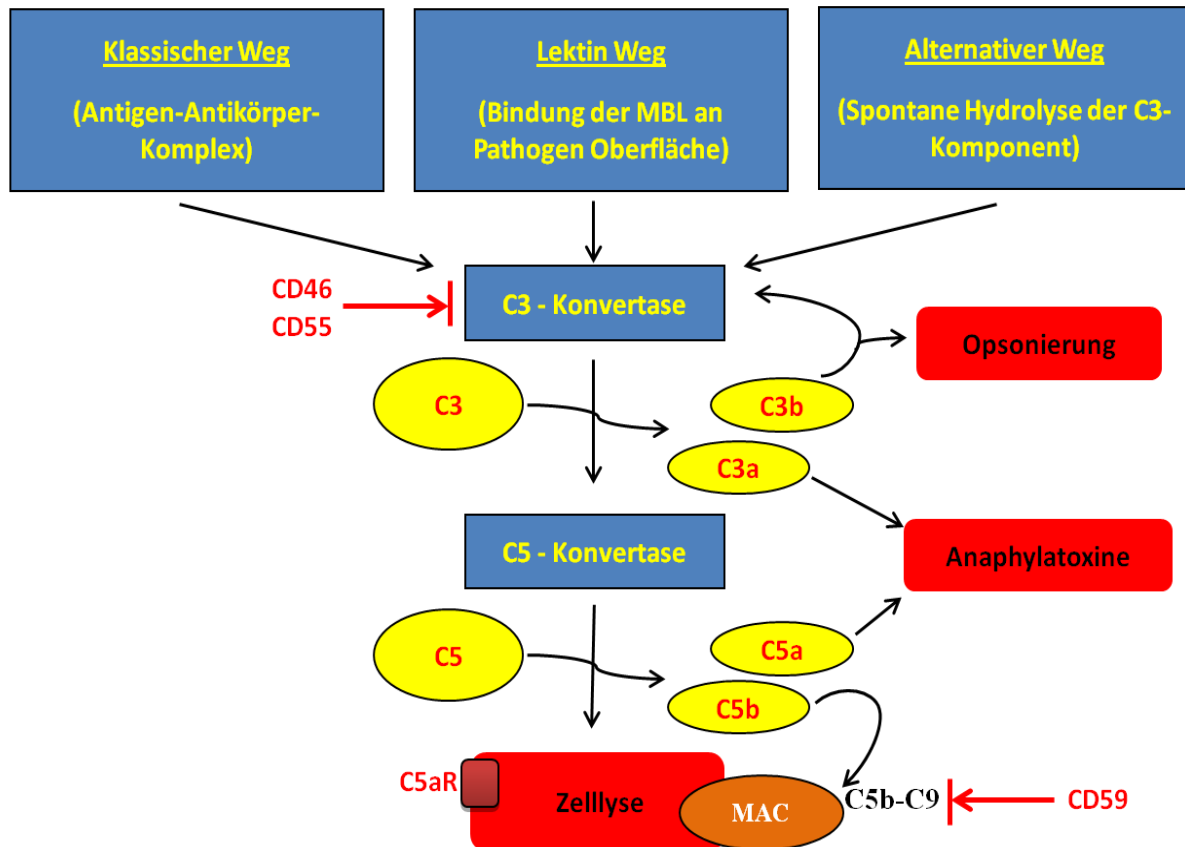


Abb. 1: Schematische Darstellung der Hauptaktivierungswege des CSs. Alle Wege führen zur Bildung der C3-Konvertase und weiterführend der C5-Konvertase. Bei der Aktivierung entsteht C3b, das durch Opsonierung zur Phagozytose eines Mikroorganismus führt. Außerdem werden APs gebildet, die eine inflammatorische Wirkung im Organismus entfalten. Die Ausbildung des MAC an der Membranoberfläche zerstört eine Zelle durch osmotische Lyse. Die Zellen sind mit einigen membranständigen CRP ausgestattet, sodass die körpereigenen Zellen vor Komplement-vermittelter Zerstörung geschützt werden.

1.3.2 Anaphylatoxine

Während der Komplementaktivierung findet die Spaltung der CPs C4, C3 und C5 und dadurch die Bildung der Kleinfragmente, der sogenannten APs C4a, C3a und C5a im Serum statt. Diese reaktiven humoralen Proteine kommen im Körper in unterschiedlichen Konzentrationen und Aktivitätspotenzen vor und leiten durch ihre inflammatorische Wirkung die Migration der Phagozyten in Entzündungsorte durch Chemotaxis ein (44). Durch Degranulation von Mastzellen und basophilen Granulozyten und daraus freigesetzte vasoaktive Substanzen wie Histamine, Prostaglandine, Kinine und Serotonin wird eine Vasodilatation durch Relaxation glatter Muskeln bewirkt sowie gleichzeitig die Kapillarpermeabilität gesteigert (45, 46). Eine

Komplementaktivierung führt auch zur Induktion weiterer Zytokine, die die Inflammation aufrechterhalten. Weiterhin können die AP durch die ins Gewebe eingewanderten Abwehrzellen die Produktion von Eicosanoiden, Sauerstoffradikalen und lysosomalen Enzymen fördern, welche Pathogene neutralisieren können (47-51).

Seine inflammatorische Wirkung wird erst über Aktivierung des C5aRs entfaltet. Bei einer Sepsis zum Beispiel ist die Konzentration des C5aRs erhöht (52) und durch Blockade des Rezeptors wird nicht nur die Bildung von Zytokinen reduziert, sondern insgesamt die Mortalität auch gesenkt (52, 53).

1.3.3 C5a Rezeptor und die Komplement-regulatorischen Proteine

C5aR (CD88) und der C5L2, als sogenannter C5aR like receptor (GPR77) sind die Rezeptoren, an denen C5a andocken und seine anaphylatoxische Wirkung entfalten kann. Die Gene dieser transmembranären Rezeptoren liegen im 19. Chromosom, q13.33–13.34 (54). C5aR wurde zwar früher nur den myeloischen Zellen zugeordnet, aber es wurde bewiesen, dass die AP ihre Wirkungen darüber hinaus auch bei nicht myeloischen Zellen wie Endothelzellen (55), Kardiomyozyten (56), Astrozyten (57), proximalen und distalen Tubulusepithelzellen eines Nephrons (58, 59), Urothelzellen der Harnleiter und Harnblase (58), glomerulären Mesangialzellen (60), Keratinozyten (59), artikulären Chondrozyten (61), Tendozyten (30, 31) usw. zeigen. Haviland et al. bestätigten das Vorhandensein des C5aRs in den alveolaren und bronchialen Epithelzellen, vaskulären glatten Muskelzellen der Lunge einer tierischen Lunge (62). Allerdings besteht noch Kontroverse zu dieser Behauptung im Fall des menschlichen Gewebes (59). Außerdem wurde auch gezeigt, dass der C5aR eher in den normalen humanen hepatischen Kupferzellen (59, 63), also Gewebe-spezifischen Immunzellen, zu finden ist als in den Hepatozyten selbst. Der Klassische Weg und der Lektinweg brauchen exogene Substanzen für die Aktivierung des CS. Der alternative Weg hingegen ist fähig das CS eigenständig in Gang zu bringen. Unsere eigenen Körperzellen wären gefährdet, wenn andauernd durch Opsonierung eine Aktivierung des erworbenen Abwehrsystems eingeleitet würde, durch osmotische Lyse die Zellen zerstört würden oder sich unser Körper durch AP Bildung in Dauerentzündung befinden würde. Um unseren Körper dagegen zu schützen, sind die CRPs in der Lage die Komplementaktivierung in unterschiedlichen Stadien abzubremsen und so den Organismus zu schützen.

Die freien löslichen C-Inhibitoren wie der C1-Inhibitor (C1-INH), Faktor I, C4b binding Protein (C4bP), Faktor H verhindern die Bildung der C3-Konvertase, wobei S-Protein und Clusterin eine Inhibition der MAC-Bildung bewirken (64). Zu den membranständigen Komplementinhibitoren

gehören u.a. Komplement Rezeptor 1 (CD35), Membran Cofaktor Protein (MCP, CD46), der Decay accelerating Faktor (DAF, CD55) und Protektin (CD59) (Abb. 1). In dieser Arbeit beschäftigen wir uns nur mit drei dieser CRPs CD46, CD55 und CD59. Daher werden ihre Funktionen einzeln besprochen.

CD46 [Membrane Cofactor Protein (MCP)] ist ein membranständiges Glykoprotein, ein Cofaktor für die Plasma-Serinprotease, Faktor I, die die an der Zelloberfläche liegenden C3b und C4b-Rezeptoren spaltet und inaktiviert. Obwohl eine häufige Ursache der Entstehung eines hämolytisch-urämischen Syndroms infektiösbedingt, meistens durch *Shiga-Toxin* produzierende *Escherichia coli* ist, entsteht bei etwa 5% der Patienten ein atypisches Hämolytisches Urämisches Syndrom (aHUS), das durch eine Mutation im CD46 Gen entsteht. Dieses Syndrom stellt eine Symptomtrias aus mikroangiopathischer hämolytischer Anämie, Thrombozytopenie und akutem Nierenversagen dar (65), obwohl sich die Ausprägungen in unterschiedlichen Formen zeigen. Die Dysfunktion des CD46 wurde auch mit Krankheiten wie Multipler Sklerose, Rheumatoider Arthritis, systemischen Lupus erythematodes und Asthma in Verbindung gebracht (66). Außerdem ist das Protein CD46 ein Angriffspunkt für einige virale und bakterielle Pathogene (66, 67), die Infektionen im Körper einleiten können.

CD55 [Decay Accelerating Faktor (DAF)] ist ein Glykosylphosphatidylinositol (GPI) geankertes membranständiges Protein mit einer Molekulargröße von 70 kDa. CD55 verhindert spezifisch die Assemblierung der C3- und C5-Konvertasen des alternativen und klassischen Wegs und fördert den Abbau der fertigen Konvertasen, wodurch die Fortleitung in die tieferen Kaskadenebenen inhibiert wird (68).

CD59 [Protectin] ist ein 18-21 kDa großes membranständiges GPI geankertes Glykoprotein. Dieses Protein bindet die Komplementfaktoren C8 und/oder C9, wodurch eine Inhibition der Bildung des MAC-Komplexes ermöglicht wird. Darauf folgend bleibt die Komplement-bedingte osmotische Sprengung einer Zelle aus.

Ein Mangel an den oben genannten zwei GPI Ankerungsproteinen, CD55 und CD59 in intravasal zirkulierenden Erythrozyten kann zu einem klinischen Syndrom, einer sogenannten Paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie (PNH) führen. Die Erythrozyten von PNH Patienten zeigen eine erhöhte Sensitivität gegenüber dem CS. Dadurch kommt es zu einer Hämolyse der Erythrozyten. Das Krankheitsmuster der PNH ist meist charakterisiert durch eine hämolytische Anämie, Thrombophilie und Panzytopenie (69).

1.3.4 Zytokine und Bedeutung des TNF α in einer Sehnenentzündung

TNF α ist neben IL-1 β und IL-6 einer der wichtigsten pro-inflammatorischen Mediatoren im Körper, die die Produktion der Akute-Phase-Proteine in den Hepatozyten modulieren (70) und dadurch die Entzündung lokal oder systemisch beeinflussen. Zwar werden Makrophagen als die Hauptquelle von TNF α anerkannt (71), allerdings sind sowohl andere Immunzellen wie T-Zellen (72), B-Zellen (73), Mastzellen (74), NK-Zellen, neutrophile Granulozyten, eosinophile Granulozyten als auch Nicht-Immunzellen wie Osteoblasten (75), Fibroblasten (75), Tendozyten (76, 77), endotheliale Zellen (78) in der Lage das pro-inflammatorische Zytokin TNF α zu produzieren. Auch die oben genannten weiteren pro-inflammatorischen Zytokine (IL-1 und IL-6) werden in den Sehnenzellen produziert (76).

TNF α ist ein pleiotropes Zytokin, das an zwei unterschiedlichen Rezeptoren TNF-R1 und TNF-R2 binden kann und durch Aktivierung von unterschiedlichen Signalkaskaden zu einer Zellproliferation, Apoptose oder zur Inflammation führen kann. Der Rezeptor TNF-R1 kann durch Einschaltung der Fas-Liganden durch den Kaspase-Aktivierungsweg (Cysteinyl ASpartic Acid-protease) zur Apoptose der Zelle führen. Der gleiche Rezeptor kann allerdings auch durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors N(F)- κ B der Zellproliferation und der Apoptose entgegenwirken (79). Die inflammatorischen Wirkungen lassen sich durch die Produktion weiterer Zytokine und Prostaglandine erklären.

Bei Kontakt mit TNF α produzieren Tendozyten proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β , TNF α , IL-6, VEGF, MMP-1 (77) sowie den C3aR (30, 80) und daraufhin zeitversetzt das antiinflammatorisch wirkende Zytokin IL-10 und IL-10R1 sowie SOCS1 (80). TNF α ist ein Schlüsselfaktor bei degenerativen (81) und entzündlichen Prozessen (79). Suppression des Kollagen Typ I Gens, Induktion von Elastin (77), MMP-1 GE und weitere zytoskeletale Veränderungen werden durch TNF α induziert (80), was die EZM-Degradation erklären kann. Aus diesem Grund ist das Konzept, zukünftig TNF α -Inhibitoren als therapeutische Ansätze bei degenerativen Erkrankungen wie Tendinopathien mitzuberücksichtigen nicht abwegig. Beide, TNF α und AP C5a haben mit ihrer chemotaktischen Wirkung eine Schlüsselfunktion im Hinblick auf die Rekrutierung von Neutros und Monozyten (44, 82) sowohl bei der Entstehung als auch bei der Regulation einer Entzündung. Nach einer Ruptur ist das Sehnenewebe im Kontakt mit den Leukozyten. PBMCs und Neutros spielen eine entscheidende Rolle bei der Immunabwehr, insbesondere durch die Aktivierung weiterer Zytokine, die den Heilungsprozess beeinflussen.

Busch et al., haben 2013 erstmals verifiziert, dass nicht nur die native Sehne, sondern auch kultivierte Tendozyten die Anaphylatoxinrezeptoren C5aR und C3aR sowie die CRPs CD46,

CD55, CD59, nicht aber CD35 exprimieren. Darüber hinaus konnte bei einigen der Komplementfaktoren eine Regulation durch Zytokine wie IL-6, IL-10 und TNF α nachgewiesen werden (30). Girke et al., 2014 simulierte ein Sehnenverletzungsmodell *in vitro* mit und ohne Stimulation der Sehnenzellen mit dem AP C3a vor dem Hintergrund der Sehnenheilung und hat dabei die Expression von C3aR, C5aR, CD46, CD55, TNF α , IL-1 β und MMP-1 analysiert. Hier konnte man feststellen, dass sowohl das AP als auch eine Rissverletzung des Tendozytenmonolayers eine zeit- und konzentrationsabhängige Regulation des CS zeigen konnten (31).

1.4 Fragestellung

Nach einer Sehnenruptur werden diverse inflammatorische Prozesse in Gang gesetzt, die sich durch das Zusammenspiel von humoralen und zellulären Komponenten des Immunsystems u.a. über die Regulation von Zytokinen gegenseitig beeinflussen. Hier bildet das CS keine Ausnahme. Seine Rolle bei posttraumatischen Folgeschäden in verschiedenen Geweben und in der Pathophysiologie der Sehnen Degeneration und -heilung ist weiterhin von großem Interesse. Jede Form der oben genannten Aktivierungswege führt zur Produktion der AP C3a, C4a und C5a. Die Kontrolle ihrer proinflammatorischen Wirkung könnte einen großen Einfluss auf den Sehnenheilungsprozess haben. Der Einfluss von C3a auf Tendozyten wurde bereits in einer publizierten Arbeit näher betrachtet (31). C5a liegt zwar in der Aktivierungskaskade tiefer als C3a, aber wegen der 50-fach stärkeren (82) Aktivierungspotenz im Vergleich zu C3a, und einer kürzeren Halbwertszeit im Blut ist dieses AP auch ein interessanter Einflussfaktor im gesamten Entzündungsprozess.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Frage beantwortet werden, welchen Einfluss dieses hochpotente AP C5a auf Tendozyten hat. Hier wurde nach Stimulation von Tendozyten mit rekombinanten C5a die GE des C5aRs, der den inflammatorischen Effekt auf den Tendozyten vorantreiben könnte und der CRPs CD46, CD55 und CD59, als membranständige GPI-Proteine, die für den Schutz der Tendozyten sorgen, betrachtet.

Eine Ko-Kultur der Tendozyten mit Leukozyten wurde durchgeführt um einen inflammatorischen Prozess bei einer Sehnenruptur zu simulieren. Deswegen wurde hier der Einfluss der Leukozyten auf die CRPs in Tendozyten analysiert. Exemplarisch wurde außerdem die Proteinexpression des C5aR und von CD55 nach einem Stimulationsversuch kultivierter Tendozyten mit C5a oder Leukozyten mithilfe der Konfokalen Laser-Scanning Mikroskopie dargestellt.

Ergänzend wurde die Zellvitalität nach 24 h Stimulation mittels Lebend-Tot-Färbung nach beiden Stimulationsversuchen geprüft. Hier wurden nicht nur die stimulierten Tendozyten sondern auch die Leukozyten analysiert.

2 Material

2.1 Materialien

Produkt

Zellkulturflasche Cell +T25/T75/T175
Zellkulturplatte Cell +6 Well
96 Well Platte (Tissue culture treated)
Transwell 24 mm Diameter Inserts 3450
Falcon Conical Tubes Polypropylene
Zellschaber 24 cm
Spritzen Plastipak und Kanülen 22G
Glasplättchen, Menzel-Gläser

Firma

Sarstedt AG, DE
Sarstedt AG, DE
Sarstedt AG, DE
Corning Incorporated NY, USA
Corning Incorporated NY, USA
Techno Plastic Products AG, CH
BD, ES
Thermo Scientific, DE

2.2 Chemikalien

Substanz

4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)
4% Paraformaldehyd in PBS
 β -Mercaptoethanol
Biocoll
Dextran 500
DMEM/ Ham's F12 (1:1)
DMSO (Dimethylsulfoxid)
Erythrozyten Lysis Puffer (EL-Puffer)
Eselserum (Donkey-Serum)
Essentielle Aminosäuren, 50x MEM-AS
Ethanol 70% (vergällt)
Ethanol reinst (unvergällt)
FCS (fetales Kälberserum)
Fluoresceindiacetat (FDA)
Gentamycin
Partricin, 50 μ g/mL
Penicillin / Streptomycin, 10 mg/mL
Phalloidin Alexa Fluor 633
Phalloidin Alexa Fluor 488

Firma

Roche Diagnostics GmbH, DE
Thermo Fisher Scientific, DE
Sigma-Aldrich, USA
Biochrom AG, DE
Amersham, UK
Biochrom AG, DE
Carl Roth GmbH, DE
Qiagen, DE
Chemicon, USA
Biochrom AG, DE
Merck KGaA, DE
Mallinckrodt Baker, NL
Biochrom AG, DE
Sigma-Aldrich, USA
Biochrom AG, DE
Biochrom AG, DE
Biochrom AG, DE
Santa Cruz Biotechnology, Inc, USA
Santa Cruz Biotechnology, Inc, USA

Phosphate Buffered Saline (PBS)	Biochrom AG, DE
Propidiumiodid	Thermo Fisher Scientific, DE
RNase-Away	Carl Roth, DE
Triton X-100	Sigma-Aldrich, USA
TRIS (Trishydroxymethylaminomethan)	Merck KGaA, DE
Trypanblau, 1%	Biochrom AG, DE
(10 x) Trypsin (1:250) /EDTA (0,5/0,2 %)	Biochrom AG, DE
Vitamin C (25 mg/mL)	Sigma-Aldrich, USA

2.3 Geräte

Verfahren

Zellkultivierung

Kryokonservierung

RNA-Isolation

RNA-Konzentrationsbestimmung

cDNA-Synthese

PCR Geräte

Immunfluoreszenzmikroskopie

Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Firma

Brutschrank, Binder, DE

Sicherheitswerkbank, HERAsafe®,

ThermoFisher Scientific, DE

Zentrifuge Multifuge 1S-R, Heraeus, UK

Mr. Frosty, Nalgene Labware, USA

Eppendorf Zentrifuge 5415D, DE

NanoDrop 1000 Spektralphotometer,

ThermoFisher Scientific, DE

Mastercycler, Eppendorf, DE

Opticon I, Bio-Rad Laboratories Inc., USA

Chromo 4, Bio-Rad Laboratories, Inc.,
USA

Axioskop 40, Carl Zeiss AG, DE

Color View II Kamera, Olympus Europa
Holding GmbH, DE

Leica TCS SPE II und DMI8, DE

2.4 Medien und Puffer

DMEM / Ham's-Medium

96% DMEM/Ham's F-12 Flüssigmedium mit stabilem Glutamin

1% essentielle Aminosäuren

1% Partricin

1% Penicillin / Streptomycin

1% Vitamin C

Kulturmedium (KM)

90% DMEM / Ham's-Medium

10% FCS

Stimulationsmedium

99,0% DMEM / Ham's-Medium

1,0% FCS

Einfriermedium

90% FCS

10% Dimethylsulfoxid (DMSO)

Tris [tris(hydroxymethyl)aminomethane] Buffered Saline (TBS-Puffer)

0,05 M TRIS

0,015 M NaCl

in Reinstwasser, pH 7,6

Blockierungsmedium

5% Eselserum

0,1% Triton X-100

94,9% 1 X TBS

Solution B (Sol B)

2% FCS in PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}

Dextran Lösung

6% Dextran in 100 mL Reinstwasser

2.5 Rekombinante Proteine, Primer und Antikörper

2.5 Rekombinante Proteine

C5a

Rekombinant humanes C5a (aus *E. coli*), R&D Systems, USA

TNF α

Rekombinantes humanes TNF α (aus *E. coli*), PeptoTech, USA

2.6 Primer

Gen	Firma	NCBI Genreferenz	Amplifikatgröße
C5aR	ABI	NM_001736.3	68 bp
CD46	ABI	NM_172351.1	94 bp
CD55	ABI	NM_000574.2	62 bp
CD59	ABI	NM_203331.1	70 bp
HPRT	ABI	NM_000194.2	100 bp

ABI=Applied Biosystems

2.7 Antikörper

Primäre Antikörper (AK) der Immunfluoreszenzmarkierungen

Polyklonaler Ziege-anti-human CD55	R&D Systems, USA
Monoklonaler Maus-anti-human C5aR (CD88)	GeneTex, USA
Ziege-IgG-Isotyp	Invitrogen AG, USA
Maus-IgG1-Isotyp	Invitrogen AG, USA

Sekundäre AK der Immunfluoreszenzmarkierungen

Esel-anti-Maus-IgG-Alexa Fluor 488	Invitrogen AG, USA
Esel-anti-Ziege-IgG-Cy3	Invitrogen AG, USA

2.8 Kits und Software

Kits

Verfahren

Kit / Firma

RNA-Isolation

RNeasy Mini Kit, Qiagen, DE

cDNA-Synthese

QuantiTect Reverse Transcription Kit, Qiagen, DE

PCR
TaqMan Gene Expression Master Mix und
TaqMan Gene Expression Assay, Applied Biosystems, USA
QuantiTect Probe PCR Kit und
QuantiTect Gene Expression Assay, Qiagen, DE

Software

Verfahren

Software / Firma

RNA-Konzentrationsmessung

Nanodrop 1000, ThermoFisher Scientific, DE

PCR

Opticon Monitor 3.1, Bio-Rad Laboratories, Inc., USA

Immunfluoreszenz

CellD, Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, DE
Leica LAS-AF, DE

Bildverarbeitung

ImageJ 1.44p, National Institute of Health, USA

Statistik

GraphPad Prism 6.0, GraphPad Software, Inc., USA

3 Methodik

Die Tendozyten wurden aus den Hamstring-Sehnenproben (Mittelsubstanz) isoliert, die im Rahmen von Kreuzbandersatzplastiken in der Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, nach der Operation verblieben (EA4-033-08). Die entnommenen Sehnenstücke stammten von männlichen (12x) und weiblichen (2x) Spendern mit einem Durchschnittsalter von 33 Jahren (18 bis 46).

3.1 Zellkultur

Der Transport der Gewebe erfolgte gekühlt in einem sterilen Gefäß, das PBS, versetzt mit Penicillin/Streptomycin (1%), enthielt. Die Öffnung des Gefäßes und Präparation wurde unter der Sicherheitswerkbank vorgenommen.

Zunächst wurde das anhaftende peritendineale Bindegewebe des entnommenen Sehngewebes nach Spülung mit PBS in einer Petrischale mittels Skalpell entfernt. Das Sehnenstück wurde in kleinen Stücken lamelliert und im KM mit 10% FCS in T-25 Zellkulturflaschen zum Auswachsen der Zellen im Brutschrank kultiviert. Im Brutschrank wurden die Zellen bei einer Temperatur von 37°C und bei einem CO₂-Gehalt von 5% inkubiert. Die Tendozyten wandern aus ihrer Matrix aus und wachsen auf dem Boden der Flasche als adhärenter Monolayer an. Das Nährmedium für die Zellen wurde in Zeitabständen von 2-3 Tagen gewechselt bis die Zellen eine Konfluenz von ca. 80% erreicht haben.

Die primären Zellkulturen wurden so lange subkultiviert bis die gewünschte Anzahl Tendozyten erreicht wurde, die notwendig war um ein Versuch durchzuführen. Die Zellen wurden bis zur maximal 7. Passage für die Versuche verwendet. Zur Subkultivierung wurde eine Trypsinierung durchgeführt.

Für den Prozess der Trypsinierung wurde erst das Medium aus der Flasche abgesaugt und der Zellrasen mit Ca²⁺- und Mg²⁺- freier PBS-Lösung gespült. Im Anschluss wurde eine 5x Trypsin/EDTA-Lösung auf den Zellrasen gegeben, gleichmäßig über den Boden verteilt und für 3 min bei 37°C inkubiert. Durch leichtes Klopfen gegen die Flasche und unter Kontrolle im Durchlichtmikroskop wurden die Zellen mobilisiert. Unmittelbar danach wurde das Trypsin durch mindestens die dreifache Menge Nährmedium inaktiviert. Diese Zellensuspension wurde danach 5 min mit 400 g zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde zur weiteren Kultivierung in KM resuspendiert und in eine größere Zellkulturflasche überführt. Nach Erlangen einer

ausreichenden Menge an Zellen für einen Stimulationsversuch wurde eine Zellzahlbestimmung mit Hilfe der Neubauer Zählkammer durchgeführt und die Zellen in 6 Well Platten ausgesät.

3.1.1 Stimulationsversuche

10.000 – 12.000 Tendozyten/cm² wurden in 6 Well Platten eingesät und in 10% FCS haltigem KM für 24 h - 48 h vorkultiviert. Eine Stunde vor einem Stimulationsversuch wurde das 10% FCS enthaltende KM durch KM mit 1% FCS ersetzt. Danach wurde die 6 Well Platte bis zur Stimulation im Brutschrank inkubiert.

3.1.1.1 C5a Stimulationsversuch

Stimulationslösungen wurden aus dem rekombinanten humanen AP C5a Protein in 1% FCS haltigen KM stets frisch hergestellt. Diese wurden in zwei Konzentrationen: 25 ng/mL und 100 ng/mL eingesetzt. Als Kontrolle wurde nur das o.g. KM verwendet. Neben dem Einfluss der unterschiedlichen Konzentrationen des C5a auf die Tendozyten wurden auch die Auswirkungen dieser nach unterschiedlichen Zeitspannen untersucht. Dementsprechend wurden 3 Zeitpunkte von 0,5 h, 4 h und 24 h für den Versuch ausgesucht.

3.1.1.2 Leukozyten Stimulationsversuch

Für eine Stimulation der Tendozyten mit Leukozyten wurde zuerst die Isolierung der PBMCs und der Neutros durchgeführt. Dafür wurden unter sterilen Bedingungen 20 mL menschliches Blut aus einem gesunden Spender in einem Lithium- Heparin beschichteten Röhrchen entnommen. Dieses Blut wurde in ein 50 mL Falcon überführt und für 10 min mit 400 g ohne Bremse zentrifugiert. Das Plasma wurde entfernt und das Blutzellpellet anschließend mit Solution B auf 30 mL aufgefüllt und in ein Falcon mit 15 mL Biocoll langsam und vorsichtig überführt, sodass die Blutmischung sich nicht mit dem Biocoll durchmischte. Danach wurde diese für 30 min ohne Bremse bei 400 g zentrifugiert. Durch das synthetische Polysaccharid Biocoll mit einer Moleküldichte von 1,077 g/mL gelangen die Neutros und Erythrozyten als Pellet auf den Boden des Röhrchen und die PBMCs mit den Thrombozyten lassen sich wegen ihrer, im Vergleich zum Biocoll geringeren mittleren Dichte als Interphasenring zwischen Plasma und Biocoll abnehmen (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Die mittlere Dichte der Blutkomponenten beträgt im Verhältnis zur Dichte des Biocolls 1,077 g/mL.

	Blutbestandteile	Dichtebereich [g/cm³]	mittlere Dichte [g/cm³]
	Plasma/Serum	–	1,026
Interphase	Thrombozyten	1,040–1,060	1,058
	Monozyten	1,059–1,068	1,065
	Lymphozyten	1,066–1,077	1,070
Biocoll 1,077 g/mL			
Pellet	Basophile Granulozyten	1,075–1,081	1,079
	Neutrophile Granulozyten	1,080–1,099	1,082
	Eosinophile Granulozyten	1,088–1,096	1,092
	Erythrozyten	1,090–1,110	1,100

Quelle: „Der Experimentator: Immunologie“, 4. Auflage, ©Springer-Verlag Heidelberg 2014

Um die PBMCs zu isolieren wird die Interphase vorsichtig in ein 50 mL Falcon aufgenommen. Sie wird vorsichtig in Solution B suspendiert, auf 40 mL aufgefüllt und dann für 5 min bei 400 g zentrifugiert. Zum Waschen dieser Zellen wird das Pellet erneut in 20 mL Solution B resuspendiert und erneut zentrifugiert. Anschließend wird eine Zellzahlbestimmung durchgeführt. Die Zellen werden nun bis zum Stimulationszeitpunkt in 5 mL Solution B bei Raumtemperatur (RT) gelagert.

Nach Abnahme der Interphase vom Gradienten wurde das dazwischen liegende Biocoll entfernt. Das verbleibende Pellet aus Erythrozyten und Neutros wurde nun in 40 mL Solution B und 6% Dextran-Lösung zu einer Endkonzentration von 1% Dextran gemischt. Die Mischung wurde 1 h bei RT sedimentiert. Darauf folgend wurde die obere Fraktion in ein neues Falcon überführt und mit Solution B auf 50 mL aufgefüllt, danach 10 min bei 600 g ohne Bremse zentrifugiert. Das Pellet wurde nun mit 10 mL EL-Puffer für 5 min zur Lyse inkubiert. Danach wurde das Pellet in Solution B suspendiert, bis auf 40 mL aufgefüllt und anschließend mit Bremse Stufe 4 bei 400 g

zentrifugiert. Nach nochmaligen Waschen mit Solution B und Zentrifugation bei 400 g für 5 min mit Bremse in Stufe 4 wurde der Überstand dekantiert und die Anzahl Zellen im Pellet bestimmt. Exemplarisch erfolgte eine Kontrolle der isolierten Zellen mit Hilfe einer Giemsa-Färbung und einer Vitalitätsfärbung.

Es wurde wie oben beschrieben jeweils eine 6 Well Platte für die zwei unterschiedlichen Stimulationszeitpunkte; 4 h und 24 h, mit 10.000 Tendozyten /cm² vorbereitet.

Nach der Vorkultivierung der Leukozyten wurde für die Aktivierung der Zellen eine TNF α Lösung in 1% FCS-KM in einer Konzentration von 10 ng/mL aus einer TNF α Stammlösung (100 ng/mL) hergestellt. In den oberen Reihen wurden die Tendozyten pro Well mit 2 mL 1% FCS-KM ohne TNF α und in den unteren Reihen mit 2 mL 1% FCS-KM mit TNF α befüllt. Außer bei den Kontrollgruppen (+/-TNF α) wurde für jedes Well ein Insert (Transwell), das eine semipermeable Membran mit einer Porengröße von 0,4 μ m enthielt, für die indirekte Leukozyten-Stimulation eingesetzt. In die Inserts wurden also getrennt von den auf dem Boden der 6 Wellplatten wachsenden Tendozyten 4 Millionen der frisch isolierten PBMCs oder Neutros in entsprechend TNF α freiem KM oder KM mit TNF α hinzugefügt. Danach wurden die Platten mit den Ko-Kulturen im Brutschrank für den 4 h und 24 h Zeitpunkt zur Stimulation inkubiert. Nach Stimulationsende wurden die stimulierten Tendozyten für die RNA-Isolierung lysiert.

3.2 RNA-Isolierung

Nach Ende der Stimulation, wurde das Transwell mit den Leukozyten und die Stimulationslösung entfernt, die Platte mit PBS gespült und das PBS aus den Wells abgezogen. Um den Abbau der gewünschten RNA durch natürliche RNasen zu verhindern, wurden ausschließlich RNase-freie Eppendorf Gefäße und Chemikalien benutzt. Die Arbeitsfläche und die Handschuhe wurden während der Arbeitsschritte mit einem Dekontaminationsreagenz für RNasen (RNase-Away) gereinigt.

Das weitere Vorgehen bei der RNA Isolierung erfolgte unter Nutzung des RNeasy Mini Kits der Firma Qiagen. Nach der Herstellung des Lysepuffers aus RNeasy Lysis Puffer (RLT Puffer) und β -Mercaptoethanol im Verhältnis 100:1 wurden je Well 300 μ l hinzugegeben. Nach 2 min Einwirkzeit wurden die lysierten Zellen mittels Zellschaber vom Boden gelöst. Die im Lysepuffer suspendierten Zellen wurden nun durch eine sterile 1 mL Insulinspritze mit 22G Kanüle in einem 2 mL RNase-freien Eppendorf Cup homogenisiert. Anschließend wurde das Lysat mit dem gleichen Volumen 70% unvergälltem Ethanol in DEPC-H₂O aufgefüllt. Diese Mischung wurde nun in eine Filtrationssäule überführt und 30 sec. mit 8000 x g zentrifugiert. Die Säule wurde danach mit 350 μ L RW1-Puffer für 30 sec. mit 8000 x g zentrifugiert. Ein DNA-

Verdau wurde durchgeführt, indem jede Probe mit 10 μL DNase (Qiagen) und 70 μL RDD Puffer für 15 min bei RT inkubiert wurde. In die Säule wurde erneut RW1 Puffer gegeben und anschließend für 30 sec. bei 8000 x g zentrifugiert. Die Säule wurde auf ein neues Eppendorf Cup umgesetzt. Danach wurde die Säule zweimal mit 500 μL RPE – Puffer (1:5 verdünnt mit Ethanol absolut reinst) gewaschen. Die erste Zentrifugation erfolgte für 30 sec. bei 8000 x g und die zweite für 2 min. Nach der zweiten Zentrifugation wurde jede Säule auf ein neues 2 mL Eppendorf Cup gesetzt. Es folgte einer Zentrifugation bei voller Geschwindigkeit für 1 min, die eine absolute Trocknung der Säule erbringt, damit keine zusätzliche Flüssigkeit die RNA verunreinigen und verdünnen kann. Anschließend wurde auf die Säule, die sich auf einem neuen 1,5 mL Eppendorf Cup befand, 33 μL RNase freies Wasser aufgetragen. Das eluierte Produkt wurde nach einer Zentrifugation für 1 min bei 8000 x g noch einmal auf die gleiche Säule pipettiert und erneut zentrifugiert. Die Säule konnte anschließend verworfen werden; der RNA-haltige Durchlauf wurde für die Messung der RNA Konzentration benutzt. Die Lagerung der RNA erfolgte danach in einem -80°C Gefrierschrank.

Mit Hilfe des Gerätes NanoDrop 1000 konnte die Konzentration und Reinheit der gewonnenen RNA bestimmt werden. Die aufgetragene RNA Probe wurde photometrisch gemessen und anhand der Software (Nanodrop 1000, ThermoFisher Scientific, DE) konnte die Konzentration der RNA in der Probe gemessen werden.

3.3 cDNA-Synthese

Die RNA-Umschreibung in cDNA erfolgte mittels QuantiTec Reverse Transkription Kit® der Firma Qiagen. Um ein Endprodukt mit 500 ng cDNA herzustellen wurde zuerst anhand der ausgemessenen RNA-Konzentration die benötigte Menge an RNA ausgerechnet, die als Template eingesetzt wurde. Diese wurde mit 2 μL Wipeout Buffer und je nach RNA-Konzentration variablem Volumen an RNA freiem Wasser verdünnt, damit insgesamt ein Volumen von 14 μL entstand. Danach wurde das Eppendorf-Cup mit 14 μL verdünnter RNA 2 min in einem Thermocycler bei 42°C erhitzt und sofort auf Eis gelagert. Der RT-Mix wurde aus 1 μL Reverser Transkriptase, 4 μL Quantiscript RT Buffer und 1 μL RT- Primer Mix hergestellt und zu den 14 μL hinzugefügt damit ein Endvolumen von 20 μL entstanden ist. Anschließend wurde wieder im Thermocycler für 15 min bei 42°C inkubiert. Schließlich wurde die Temperatur für 3 min auf 95°C erhöht, um die Reverse Transkriptase zu inaktivieren. 10 μL RNase freies Wasser wurden dazu addiert um dann eine cDNA Konzentration von 16,7 ng/ μL und ein Endvolumen von 30 μL zu erreichen. Die Lagerung der cDNA bis zu ihrer Verwendung

in der Real Time Detection Polymerase Chain Reaction (RTD-PCR) erfolgte bei -20°C im Gefrierschrank.

3.4 RTD-PCR

Eine quantitative Messung der GE der untersuchten Gene konnte mit Hilfe der RTD-PCR vorgenommen werden. In zwei Eppendorf Cups wurde die für den entsprechenden Ansatz berechnete Menge Mastermix und RNA freies Wasser mit jeweils einem Primer gemischt. Als Primer wurden das Referenz-Gen Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) und die gesuchten Ziel-Gene: C5aR, CD46, CD55 oder CD59 eingesetzt. Von diesen Primer-Mastermix-Wasser Lösungen wurden pro Well einer 96 Well Platte $19\ \mu\text{L}$ vorgelegt und $1\ \mu\text{L}$ der cDNA jeder Probe als Template zugefügt um den gesuchten Genabschnitt der DNA zu quantifizieren. In einer 96 Well Platte wurden für jeden Probeansatz drei technische Replikate angesetzt.

Der TaqMan Gene Expression Master Mix (83) enthält laut Hersteller Applied Biosystems AmpliTaq Gold® DNA Polymerase (Ultra Pure), Uracil-DNA Glykosylase (UNG), Desoxy-Nukleotid-Triphosphate (dNTPs) mit Desoxy-Uridin-Triphosphat (dUTP), ROX™ als inerten Referenzfarbstoff zur Kompensation von Artefakten sowie verschiedene optimierte Puffer Komponenten.

- Die thermostabile Taq-DNA Polymerase aus thermophilen Bakterien *Thermus aquaticus* ist eine Oligonukleotid-Sonde, die am 5' Ende als Reporter den fluoreszierenden Farbstoff FAM™ besitzt und am 3' Ende einen nicht-fluoreszierenden Quencher hat.
- Die Amperase, Uracil N-Glycosylase (UNG) ist ein reines, Nuklease freies rekombinantes Enzym mit einem Molekulargewicht vom 26 kDa. Eine Dekontamination der unerwünschten PCR-Produkte wird dadurch erreicht, dass die UNG eine Uracil-Glykosid Bindung in einzel- oder doppelsträngiger dU-DNA hydrolysiert und zur Entstehung einer sensiblen basischen Stelle in der DNA beiträgt. Diese Stellen verhindern die Bindung von DNA Polymerasen und damit die Replikation einer fremden DNA. Auf RNA und dT- enthaltender DNA hat dieses Enzym keine Wirkung.
- Nukleotid-Triphosphate wie dATP, dCTP, dGTP und cTTP sind die Bausteine für die Bildung der DNA-Replikate.
- Mg^{2+} stabilisiert die Interaktionen zwischen dem Primer, der DNA Polymerase und den Templates (cDNA). Eine optimale enzymatische Aktivität kann erst hervorgerufen werden, wenn der pH-Wert auf 8 steigt.

Zum Beginn einer PCR wird zur Aktivierung der Amperase, UNG, die 96 Well Platte erst mit 50°C für 2 min gewärmt. Dann wird für 10 min die Temperatur auf 95°C erhöht. Dies erfolgt um erstens die aus dem Verdau durch Amperaseaktivität entstandenen abasischen Carryover-Kontaminationsmoleküle und zweitens die UNG selbst zu inaktivieren. Bei einer Temperatur von 95°C starten auch die Zyklen mit der Denaturierung des DNA Templates, die 15 sec. lang dauern. Die Temperatur sinkt danach für die Vorbereitung des 60 sec. langen Annealing Prozesses auf 60°C ab. Hier lagern nun die Primer an die denaturierten DNA Stränge an ihrer entsprechenden Sequenz auf der 5´ Seite der DNA. Die DNA Polymerase mit ihrer fluoreszierenden Sonde lagert sich an dem 3´ Ende des Primers an. Nun werden die Nukleotidbausteine an dem 3´ Ende des Primers beginnend an die DNA Sequenz komplementär angelagert und die entstehenden Fragmente verlängert.

Wenn diese Elongationsphase beginnt, kann der Quencher nicht mehr die Fluoreszenz der Reporter unterdrücken, wodurch der fluoreszierende Reporter vom 5´-Ende der DNA-Polymerase abgeschnitten und freigesetzt wird. Dieser Zyklus mit Denaturierung, Annealing und Elongation kann bis über 40-fach durchgeführt werden. Die Anzahl der Kopien zum Schluss lässt sich aus folgender Formel errechnen:

$$X_n = X_0 \times 2^n$$

n = Anzahl der Zyklen

X_n = Endanzahl cDNA

X₀ = Ausgangszahl cDNA

z.B.:

$$n = 40$$

$$X_0 = 1$$

$$X_{40} = 2^{40}$$

$$= 1,099,511,627,776 - 1 \text{ Kopien}$$

Der phasenabhängige Replikationsverlauf lässt sich zeigen durch einen steilen Anstieg des Fluoreszenz-Signals in der anfänglichen exponentiellen Phase, dem eine lineare Phase folgt und die dann mit einer abflachenden Plateauphase endet. Diese Phasen werden anhand der freigesetzten Fluoreszenz des Farbstoffes FAMTM, die von der PCR-Maschine detektiert, analysiert und in Abhängigkeit vom Replikationszyklus graphisch abgetragen wird. Die Software gibt anschließend die mit Hilfe eines Threshold ermittelten Ct(Cycle Threshold)- Werte für alle einzelnen Wells tabellarisch aus. Aus der dreifachen Bestimmung der einzelnen Proben wurde ein Ct-Mittelwert errechnet und für die weitere Auswertung der PCR benutzt.

Bei jedem PCR-Zyklus verdoppelt sich die cDNA und dadurch verläuft die Vermehrung der Kopien exponentiell. Wie oben erwähnt, werden bei jedem Zyklus fluoreszierende Reporter freigesetzt. Ein Ct-Wert ist der PCR-Zyklus, in dem die allzeit vorhandene

Hintergrundfluoreszenz durch die freigesetzte Fluoreszenz des Reporters überschritten wird. Jede Gensequenz weist in Abhängigkeit von der anfänglichen Anzahl an Kopien in der Probe unterschiedliche Zeitpunkte an dem dies passiert auf, und zeigt dementsprechend unterschiedliche Ct-Werte. Dabei gilt, dass je kleiner dieser Wert ist desto mehr Genkopien in der Probe vorlagen. Der Ct-Wert ist damit eine Größe für die Expression eines Gens.

Eine Quantifizierung des untersuchten Zielgens wurde dann relativ zu dem Referenzgen HPRT (30) unter Mitberücksichtigung der Effizienz der jeweiligen Primer mit Hilfe der sogenannten Pfaffl-Gleichung durchgeführt (84).

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

ΔCt errechnet sich aus der Differenz der Ct-Werte von Kontrollprobe und behandelter Probe.

Als Referenz-Gen wurde HPRT ausgesucht, nachdem die Ct-Werte der Primer GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), ACTB (beta-Actin), TBP (TATA-box-binding protein) und HPRT in unstimulierten Tendozyten verglichen wurden. HPRT zeigte die geringste Varianz.

3.5 Immunhistochemie

10.000 Tendozyten/cm² wurden auf Poly-L-Lysin beschichteten Glasplättchen in einer 6 Well Platte kultiviert. Sowohl nach C5a-Stimulation als auch Leukozyten-Stimulation wurden die Glasplättchen mit den Tendozyten aus der Stimulationslösung entnommen und mit PBS Lösung vorsichtig gespült. Die Glasplättchen wurden anschließend fixiert, indem die Glasplättchen für 15 min in 4% Paraformaldehydlösung inkubiert wurden. Darauf folgend wurden diese fixierten Zellen mit TBS gespült. Die Zellen wurden mit 100 µL des Blockierungsmediums 20 min behandelt. Der Primär-AK wurde in einem vom Hersteller vorgegebenen Verhältnis mit dem o.g. Blockierungsmedium verdünnt. 50 µL dieser fertigen Primär-AK-Lösung (C5aR-AK, CD55-AK) wurden nun auf die Glasplättchen pipettiert und über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4°C zur Inkubation gelagert. Als Isotypkontrolle wurde ein entsprechend unspezifischer IgG-AK mit Blockierungsmedium statt des Primär-AKs genommen. Als Negativkontrolle diente das Blockierungsmedium ohne Primär-AK. Nach der Inkubation über Nacht wurden die Glasplättchen 3 Mal mit TBS gespült. Daraufhin wurden die Glasplättchen im Dunkeln mit dem gegen den jeweiligen genutzten Primär-AK gerichteten Sekundär-AK, verdünnt in Blockierungslösung inkubiert. Neben den Sekundär-AKs, die jeweils mit einem Fluorophor (Cy3 oder Alexa 488) gekoppelt waren, enthielt diese auch den Fluoreszenzfarbstoff DAPI, der in die

DNA der Zellkerne interkaliert und Fluorophor-gelabeltes Phalloidin Alexa 633, welches das Aktinzytoskelett färbt. Nach 60-minütiger Inkubation in einer feuchten Kammer bei RT wurden die Präparate wiederholt mit TBS gespült. Mit Hilfe von Fluoromount-G wurden die Glasplättchen auf den Objektträger aufgetragen und eingedeckelt. Zum Trocknen dieser Präparate wurden sie im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

Die Aufnahmen dieser immunzytochemischen Färbungen wurden am konfokalen Laserscanningmikroskop angefertigt. Die Software „Leica LAS-AF“ wurde für die Aufnahme der Bilder verwendet und die Bildauswertung erfolgte mit Hilfe von „ImageJ“. Hier wurden aus jeder Aufnahme mit 200 facher Vergrößerung fünf repräsentative Zellen erfaßt, ihre Fluoreszenzintensität gemessen und aus dem Durchschnittswert ein endgültiger Wert (CTCF = corrected total cell fluorescence) ausgerechnet (85). Die Berechnung der Fluoreszenzintensitäten erfolgte nach der folgenden Formel:

$$CTCF = \text{Fluoreszenzdichte der selektierten Zellen} - (\text{Fläche der selektierten Zellen} \times \text{Fluoreszenzmittelwert der Hintergrundfläche})$$

3.6 Vitalitätsfärbung

24 h sowohl nach direkter Stimulation der Tendozyten mit dem AP C5a als auch nach einer indirekten Ko-Kultur der Tendozyten mit den Leukozyten (+/-TNF α) wurde der Einfluss der Stimulationen auf die Vitalität der Zellen untersucht. Zu Beginn wurde eine Stammlösung aus 3 mg Fluoresceindiacetat (FDA) hergestellt, das dafür in 1 mL Aceton gelöst wurde. Aus dieser FDA-Stammlösung wurde nun eine Färbelösung hergestellt. Dafür wurden pro 1 mL PBS 5 μ l aus der 3 mg/mL FDA-Stammlösung dazugegeben und noch 1 μ l des in die DNA interkalierenden Propidiumiodid zugefügt. Dieses dient zur Anfärbung der Zellkerne toter Zellen, denn die Zellmembran toter Zellen ist für diese Substanz durchlässig. Nach Fertigstellung der Färbelösung wurden 100 μ l auf die Glasplättchen mit den Zellen gegeben, diese nach kurzer Wartezeit 2x mit PBS gewaschen und danach sofort mikroskopiert.

3.7 Statistik

Für die Auswertung der gesamten statistischen Arbeit wurde Graphpad Prism (Version 7) benutzt. Der ROUT-Test wurde durchgeführt um Ausreißer zu identifizieren und sie auszuschließen. Die statistischen Analysen erfolgten mit Hilfe des gepaarten, doppelseitigen Student t-test und der ANOVA. Bei der ANOVA Analyse wurde der Bonferroni post hoc Test verwendet. Als Signifikanzniveau galten p-Werte \leq 0,05.

4 Ergebnisse

Die Arbeitsgruppe beschäftigte sich in Vorarbeiten bereits mit der Frage, welchen Einfluss das Komplementspaltfragment AP C3a auf menschliche Tendozyten ausübt (31). Außerdem wurde in dieser Arbeit auch eine Sehnenschnittverletzung simuliert, in dem ein Monolayer aus Tendozyten mit feinen Schnittverletzungen durchgezogen wurde (31).

Die vorliegende Arbeit widmet sich der Fragestellung, welche Wirkungen AP C5a in humanen Tendozyten in Bezug auf die GE des pro-inflammatorischen Rezeptorproteins C5aR und der zytoprotektiven CRPs CD46, CD55 und CD59 auslösen kann.

Dieser Versuchsansatz wurde außerdem ergänzt durch die *in vitro* Simulation einer Entzündung des Sehnengewebes, bei der die Leukozyten (PBMCs und Neutros) in einem Ko-Kultursystem in einen indirekten Kontakt zu den Tendozyten gebracht wurden. Es ist bekannt, dass TNF α als inflammatorisches Zytokin im humoralen System bei einer Entzündung vermehrt vorhanden ist (86). Dieses Experiment wurde mit und ohne TNF α Stimulation durchgeführt. Dabei wurde eine Genexpressionsanalyse der oben genannten Proteine durchgeführt. Zur Ergänzung der beiden Versuche wurde eine Vitalitätsprüfung durch Lebend-Tot-Färbung durchgeführt. Anschließend wurden immunzytochemische Färbungen der zwei Proteine C5aR und CD55 angefertigt um eine relative Expression der gesuchten Proteine nach dem Stimulationsversuch mit AP C5a und Leukozyten im Vergleich zu den Genexpressionsdaten zu beurteilen.

Die Gesamtergebnisse werden in folgenden Abschnitten durchgesprochen.

4.1 C5a-Stimulation der Tendozyten

4.1.1 Genexpressionsanalysen

Die aus den menschlichen Hamstring-Sehnen isolierten Tendozyten wurden in diesem Experiment mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen des humanen rekombinanten AP C5a (25 ng/mL und 100 ng/mL) für drei unterschiedliche Zeitpunkte (0,5 h, 4 h und 24 h) stimuliert. Danach wurden Genexpressionsanalysen für den C5a-Rezeptor und die zytoprotektiven Komponenten des angeborenen Immunabwehrsystems, die membranständigen CRPs CD46, CD55 und CD59 durchgeführt.

C5aR

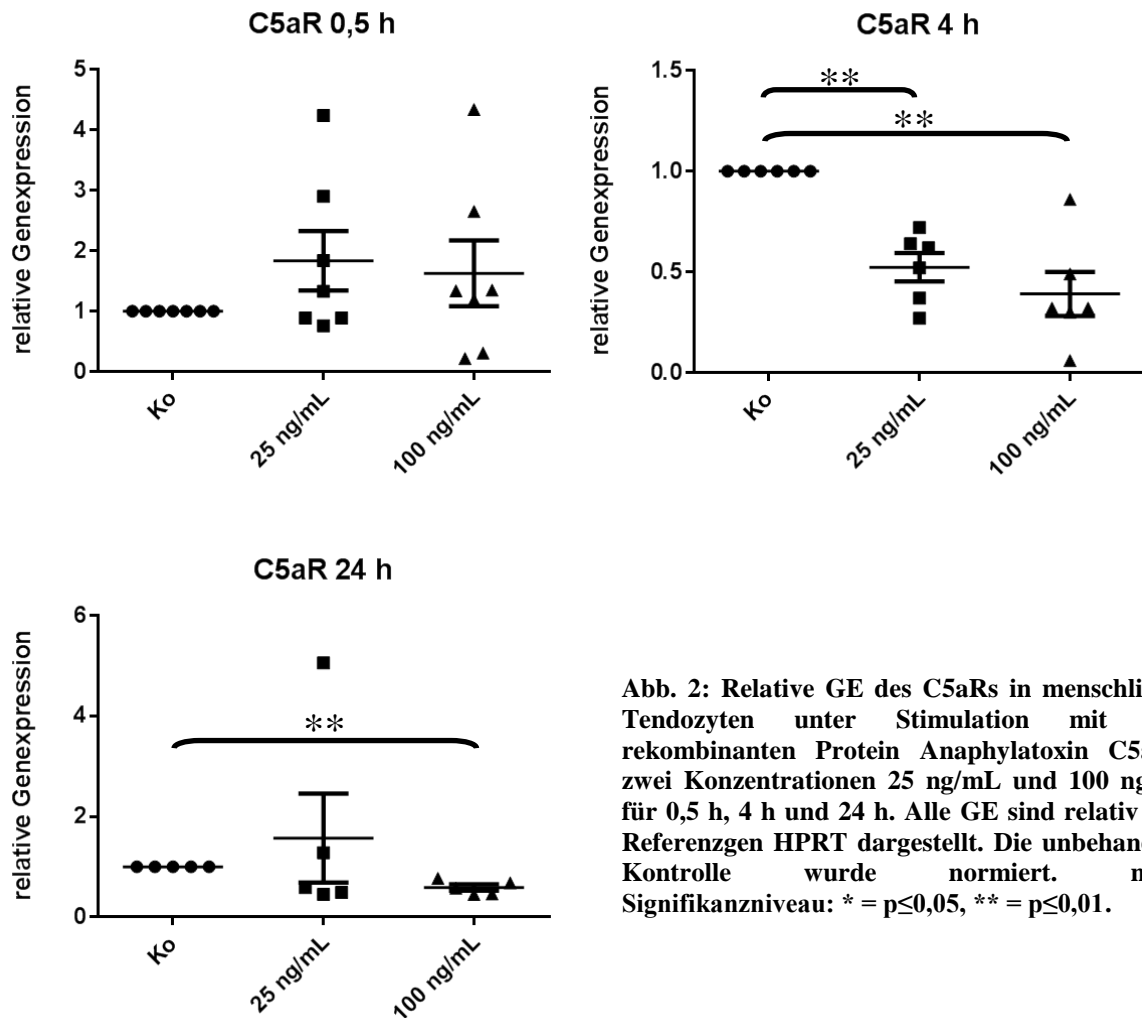
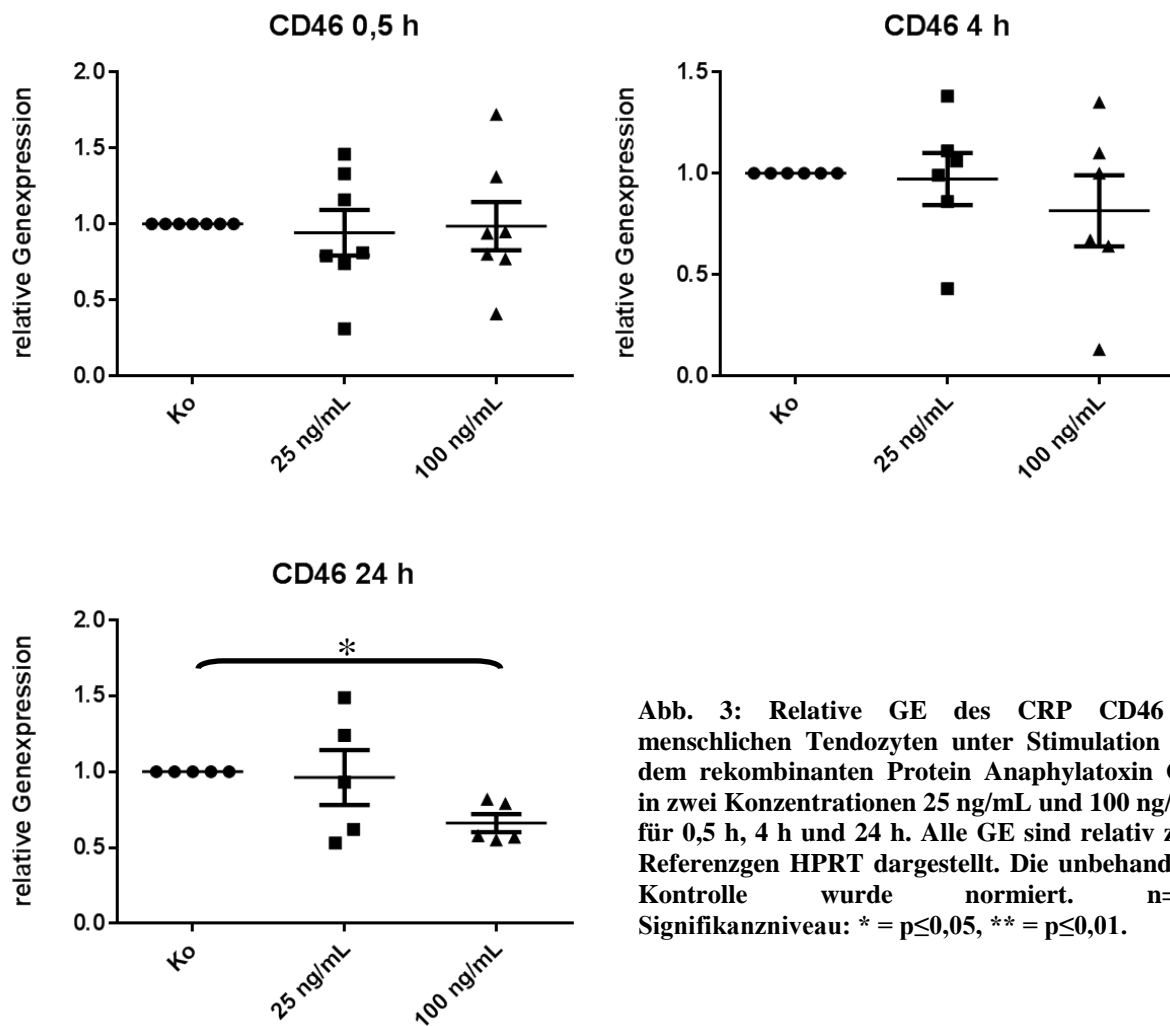


Abb. 2: Relative GE des C5aRs in menschlichen Tendozyten unter Stimulation mit dem rekombinanten Protein Anaphylatoxin C5a in zwei Konzentrationen 25 ng/mL und 100 ng/mL für 0,5 h, 4 h und 24 h. Alle GE sind relativ zum Referenzgen HPRT dargestellt. Die unbehandelte Kontrolle wurde normiert. n=5-7
Signifikanzniveau: * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$.

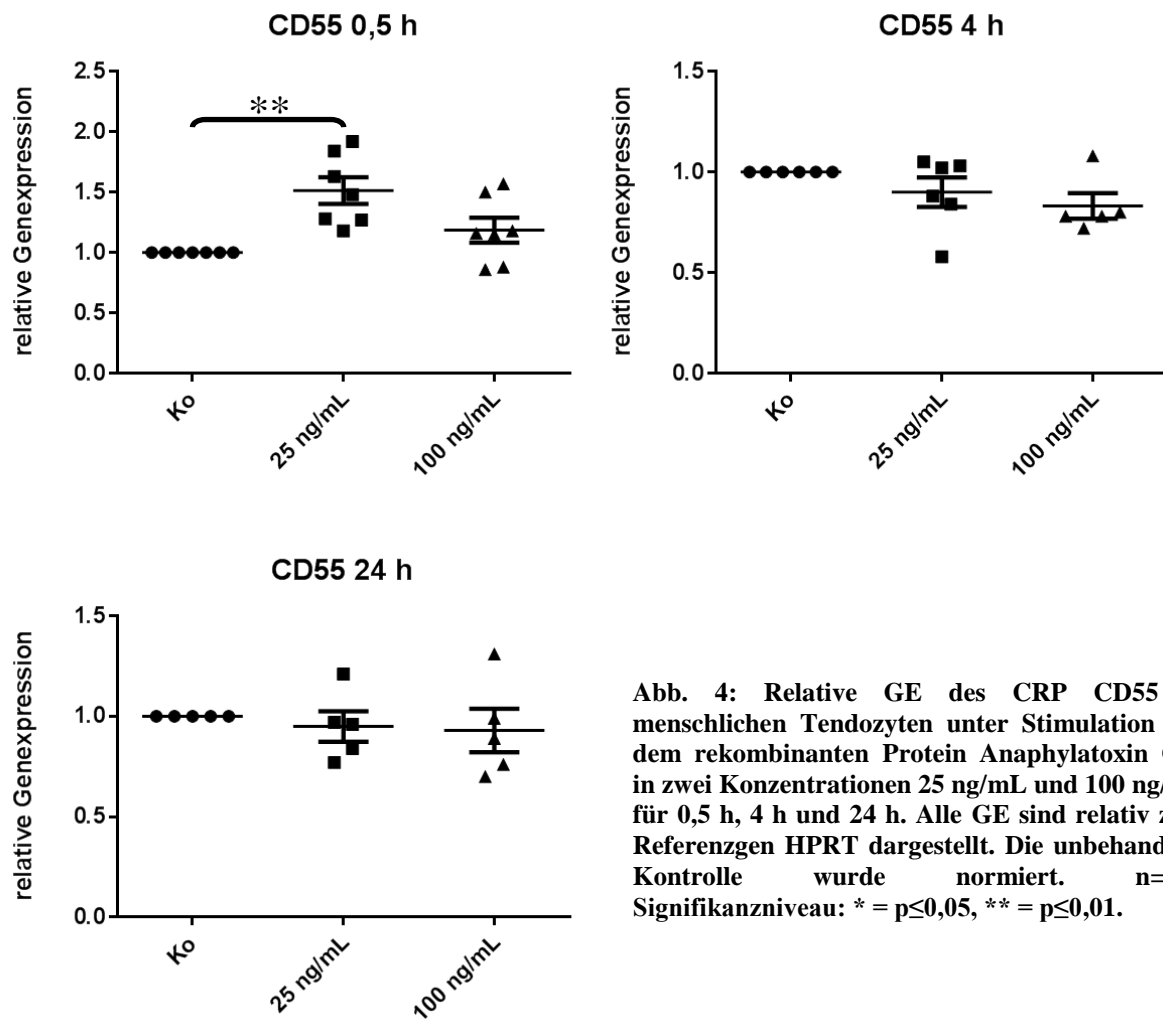
Bei einer halbstündigen C5a-Stimulation der Tendozyten zeigte sich eine erhöhte Expression des C5aR-Gens bei beiden unterschiedlichen Konzentrationen (25 ng/mL und 100 ng/mL), allerdings ohne Signifikanz. Nach 4 h Stimulationszeit wurde die GE signifikant unter beiden Konzentrationen 25 ng/mL und 100 ng/mL supprimiert. Hier zeigte die Konzentration von 100 ng/mL eine stärkere Inhibition der GE im Vergleich zu 25 ng/mL. Genauso bewirkte die höhere Stimulations-Konzentration von 100 ng/mL eine signifikante Suppression der C5aR GE bei einer Stimulations-Zeit von 24 h (Abb. 2).

CD46



Die Stimulation der Tendozyten mit C5a hatte bei einer halbstündigen und vierstündigen Stimulation keinen signifikanten Einfluss auf die GE des CRP CD46. Obwohl sich im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ein Trend im Sinne einer Suppression der CD46 GE bei 4 h Stimulation mit 100 ng/mL C5a erkennen lässt, konnte eine signifikante Unterdrückung der GE allerdings erst bei 24 h gezeigt werden (Abb. 3).

CD55



Zum Zeitpunkt 0,5 h wurde gezeigt, dass mit der Stimulationskonzentration von 25 ng/mL des rekombinanten Proteins C5a eine signifikante Steigerung der GE von CD55 in den Tendozyten herbeigeführt werden konnte. Für die späteren Zeitpunkte konnten aber bezüglich der GE unter beiden Konzentrationen keine signifikanten Veränderungen nachgewiesen werden (Abb. 4).

CD59

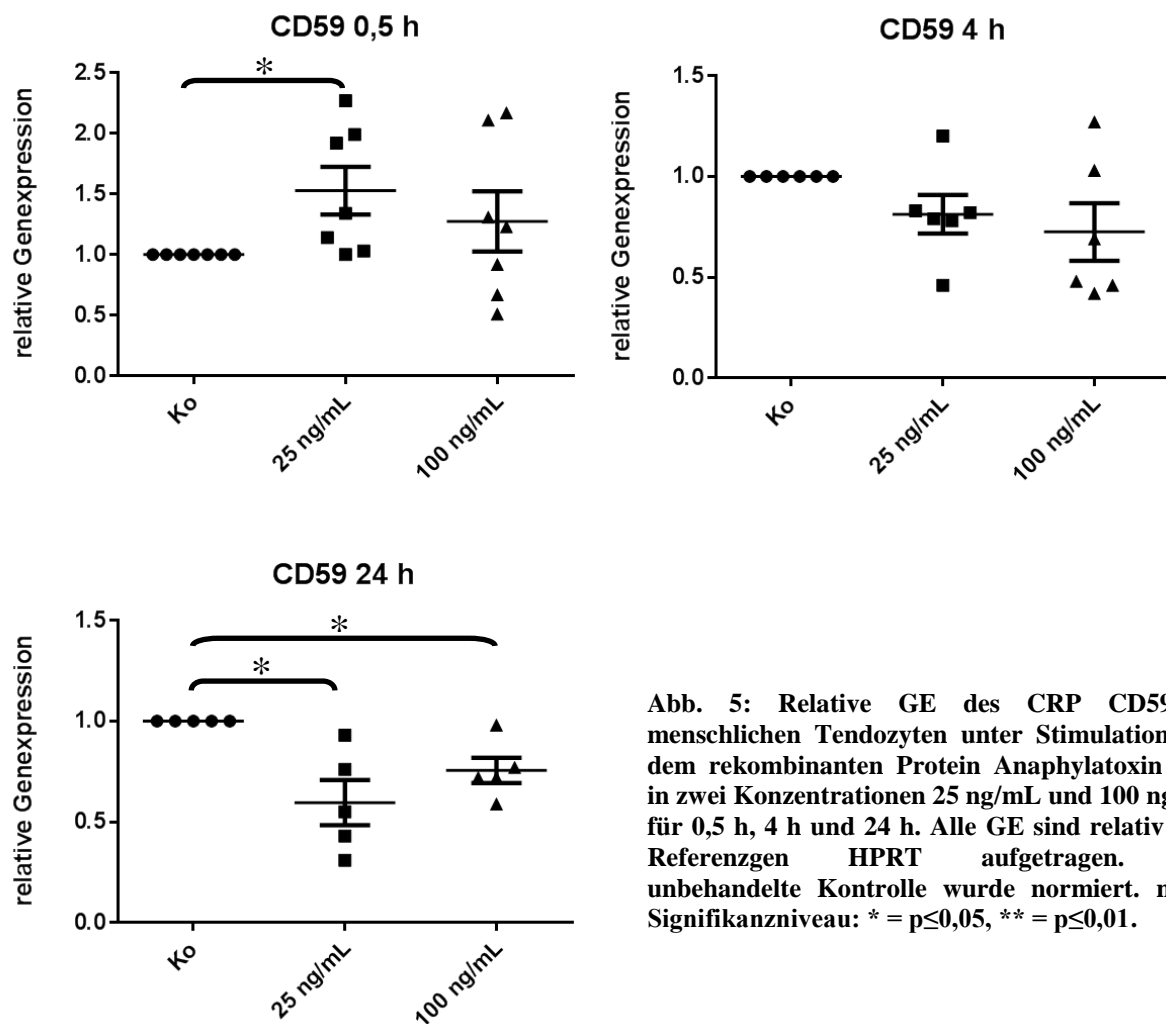


Abb. 5: Relative GE des CRP CD59 in menschlichen Tendozyten unter Stimulation mit dem rekombinanten Protein Anaphylatoxin C5a in zwei Konzentrationen 25 ng/mL und 100 ng/mL für 0,5 h, 4 h und 24 h. Alle GE sind relativ zum Referenzgen HPRT aufgetragen. Die unbehandelte Kontrolle wurde normiert. n=5-7 Signifikanzniveau: * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$.

Eine Stimulation für eine halbe Stunde konnte hier eine signifikante Zunahme in der GE von CD59 unter der C5a Konzentration von 25 ng/mL induzieren. Nach 4 h erkennt man allerdings den Trend, dass die Expression dieses Gens nach Stimulation mit beiden C5a Konzentrationen unter dem Niveau der Kontrolle liegt. Bei einer längeren Stimulation von 24 h ist eine signifikante Unterdrückung der Aktivität dieses Gens bei beiden Konzentrationen 25 ng/mL und 100 ng/mL zu beobachten (Abb. 5).

4.1.2 Vitalitätsfärbung

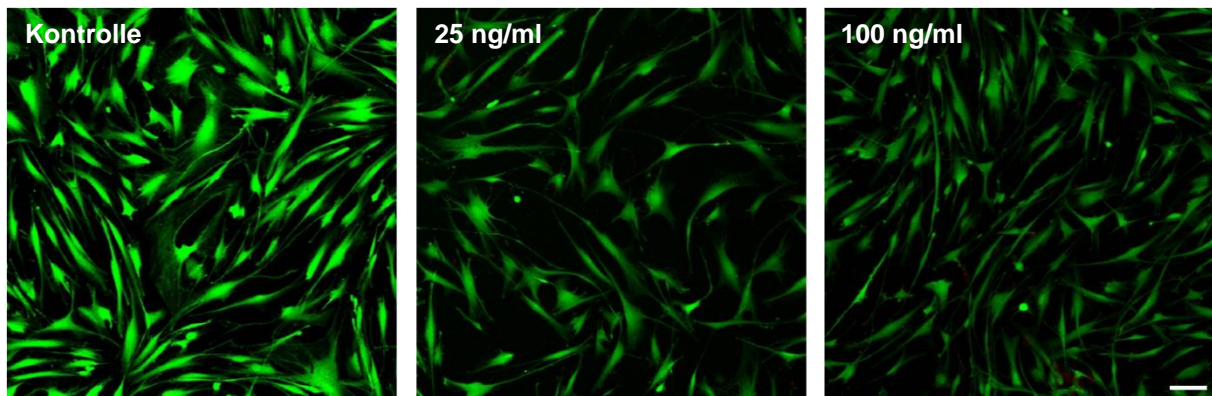


Abb. 6: Vitalitätsfärbung der Tendozyten mit Fluoresceindiacetat (grün: vitale Zellen) und Propidiumiodid (rot: tote Zellen) nach 24 h Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen des humanen rekombinanten Anaphylatoxinproteins C5a. Einsaatdichte = 10.000/cm². Maßstab = 100 µm.

Die Bilder der Tendozyten wurden exemplarisch nach 24 h Stimulation mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen rekombinanten AP C5a aufgenommen. Hier wurde eine Lebend-Tod-Färbung durchgeführt, wodurch gezeigt werden kann, dass fast alle Tendozyten, hier grün angefärbt, überleben. Im Vergleich zur Kontrolle sind im Hinblick auf die Anzahl lebender Zellen keine Unterschiede erkennbar. Die toten Zellen werden durch diese Färbung rot dargestellt. Es wurden allerdings kaum abgestorbene Zellen nachgewiesen (Abb. 6).

4.1.3 Immunfluoreszenzfärbung

C5aR

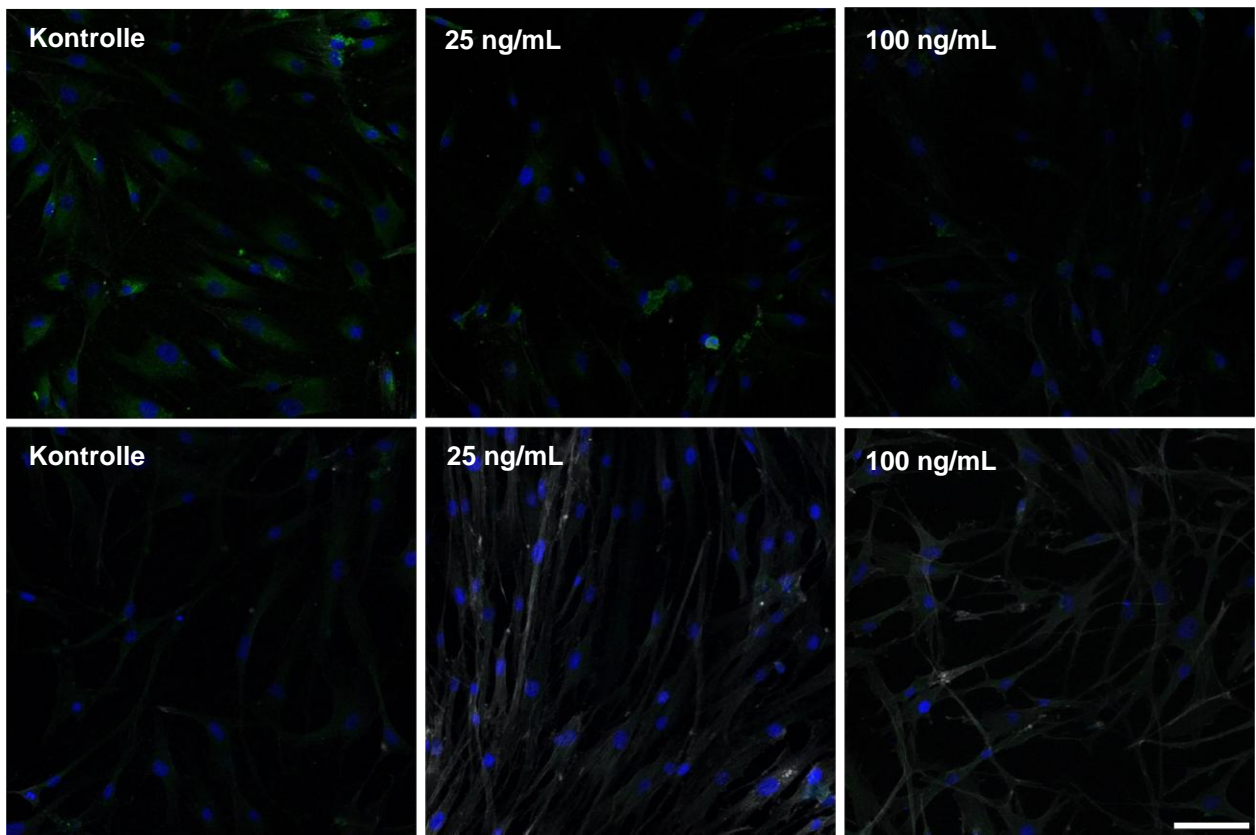


Abb. 7: Immunfluoreszenzfärbung der Tendozyten nach Stimulation mit dem rekombinanten AP C5a in unterschiedlichen Konzentrationen nach 4 h (obere Reihe) und 24 h (untere Reihe). Grün (Alexa 488) = C5aR, blau (DAPI) = Zellkerne, grau = Aktinzytoskelett. Einsaatdichte = 10,000/cm². Masstab = 100 µm. n = 1

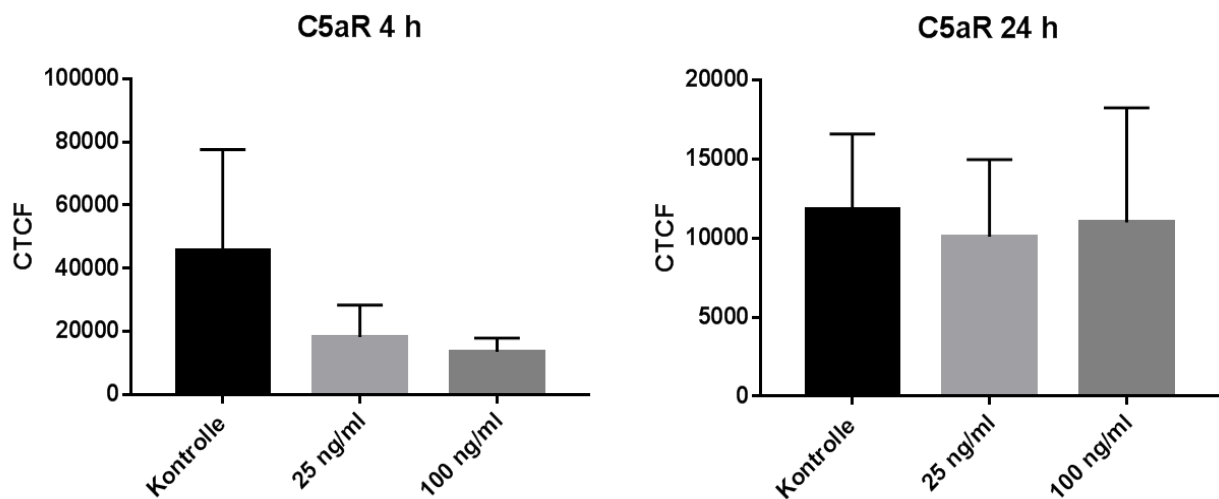


Abb. 8: Dargestellt ist der CTCF Wert des C5aR Proteins in Abhängigkeit von der Behandlung der Tendozyten. Die Immunfluoreszenzbilder wurden mit Hilfe von ImageJ ausgewertet. Die X-Achse zeigt die unterschiedlichen Konzentrationen der C5a-Stimulation. Die Y-Achse zeigt den CTCF Wert an. Eine ANOVA Analyse wurde durchgeführt. Signifikanzniveau: * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$.

Die Immunfluoreszenzbilder der Tendozyten nach 4 h Stimulation mit dem AP C5a mit beiden angegebenen Konzentrationen zeigen einen Trend der Suppression des C5aR-Proteins in den Tendozyten (Abb. 7 und 8).

CD55

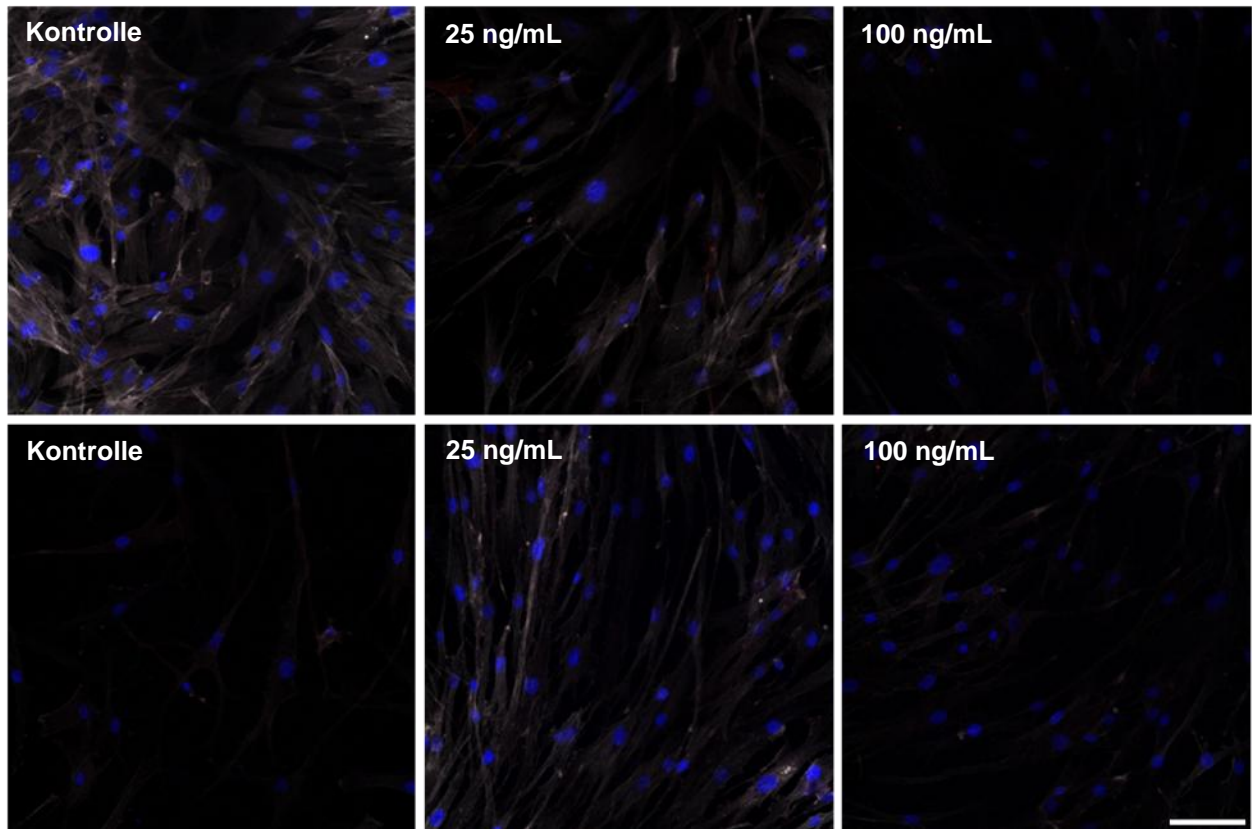


Abb. 9: Immunofluoreszenzfärbung der Tendozyten nach Stimulation mit rekombinanten AP C5a in unterschiedlichen Konzentrationen nach 4 h (obere Reihe) und 24 h (untere Reihe). Rot (Cy3) = CD55, blau (DAPI) = Zellkerne, grau (Phalloidin Alexa 633) = Aktinzytoskelett. Einsaatdichte= 10.000/cm². Masstab = 100 µm. n= 1

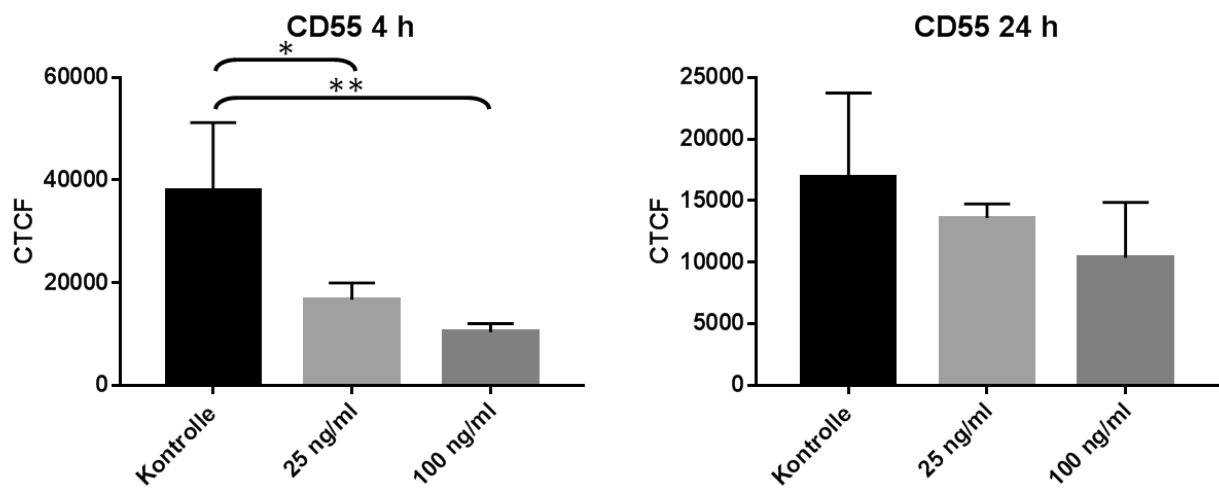


Abb. 10: Dargestellt ist der CTCF Wert des CD55 Proteins in Abhängigkeit von der Behandlung der Tendozyten. Die Immunfluoreszenzbilder wurden mit Hilfe von ImageJ ausgewertet. Die X-Achse zeigt die unterschiedlichen Konzentrationen der C5a-Stimulation. Die Y-Achse zeigt den CTCF Wert an. Eine ANOVA Analyse wurde durchgeführt. Signifikanzniveau: * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$.

Nach 4 h und 24 h wurde auch die Proteinexpression von CD55 in den Tendozyten mittels Immunfluoreszenzfärbung analysiert. Hier konnte man signifikante Effekte nach 4 h C5a-Stimulation mit beiden gegebenen Konzentrationen zeigen, indem eine Suppression der CD55 Proteinsynthese in den Tendozyten zu erkennen war. Einen ähnlichen Effekt, allerdings ohne Signifikanz, konnte man auch bei der 24 h Stimulation beobachten.

Die Isotypkontrolle und Negativkontrolle zeigten keine Signale. Es wurden nur blauen Zellkerne wegen der DAPI-Färbung dargestellt (Abb. 11).

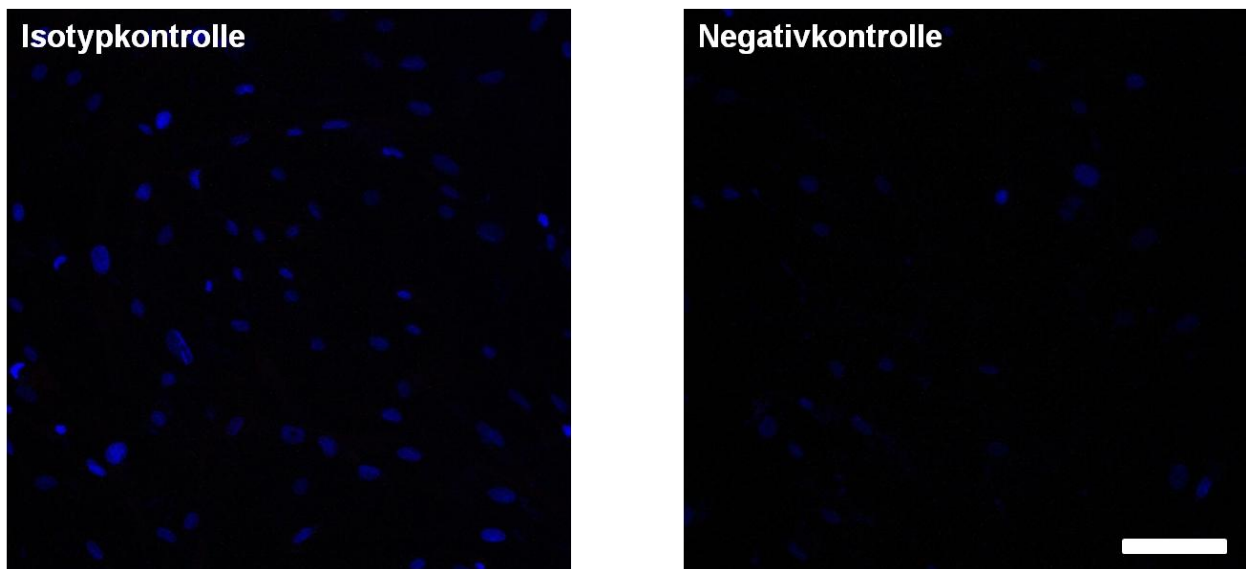


Abb. 11: Immunofluoreszenzfärbung der Tendozyten nach Stimulation mit rekombinanten AP C5a. Die Abbildungen zeigen die Isotyp Kontrolle und negative Kontrolle. Grün (Alexa 488) = C5aR, rot (Cy3) = CD55, blau (DAPI) = Zellkerne. Einsaatdichte= 10.000/cm². Massstab = 100 μ m. n= 1

4.2 Leukozyten Stimulation der Tendozyten

In dieser Versuchsreihe wurden die Tendozyten im Monolayer mit Hilfe eines Transwells indirekt mit Leukozyten (PBMCs und Neutros) stimuliert. Die Leukozyten wurden aus humanem Blut isoliert und in Anwesenheit von TNF α (10 ng/mL) aktiviert oder ohne TNF α mit den Tendozyten über die Transwellmembran in indirekten Kontakt gebracht.

4.2.1 Genexpressionsanalysen

C5aR

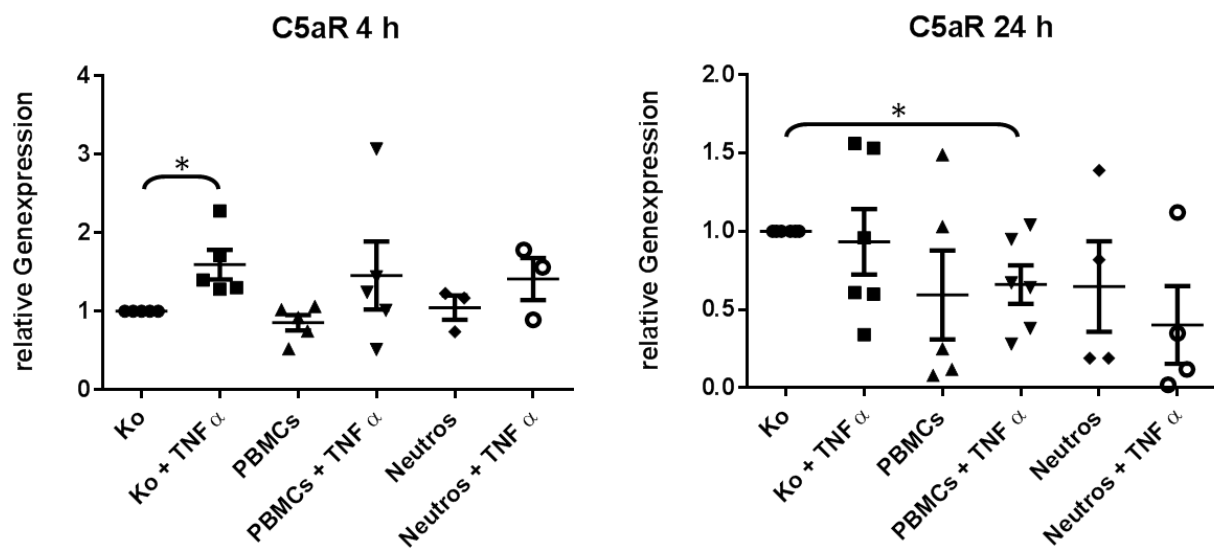


Abb. 12: Relative GE des C5aRs in menschlichen Tendozyten unter Stimulation mit TNF α , PBMC (+/-TNF α) und Neutros (+/-TNF α) für 4 h und 24 h. Alle GE sind relativ zum Referenzgen HPRT dargestellt. Die unbehandelte Kontrolle wurde normiert. n=3-6. Signifikanzniveau: * = p \leq 0,05, ** = p \leq 0,01.

Die Graphik zeigt, dass die TNF α Stimulation zum 4 h Zeitpunkt eine signifikante stimulatorische Wirkung auf die GE des C5aRs in den Tendozyten ausübt. Weiterhin kann man nach 4 h den Trend erkennen, dass die Leukozyten-Stimulation nur in Anwesenheit von TNF α eine induktive Wirkung auf die GE von C5aR hat.

Eine 24 stündige Stimulation mit PBMCs kombiniert mit TNF α zeigte allerdings eine signifikante Suppression der C5aR-GE in den Tendozyten gegenüber der Kontrolle. Im Trend wiesen auch alle weiteren Stimulationsregimes auf eine Unterdrückung der GE des C5aRs, allerdings ohne Signifikanz, hin (Abb.12).

CD46

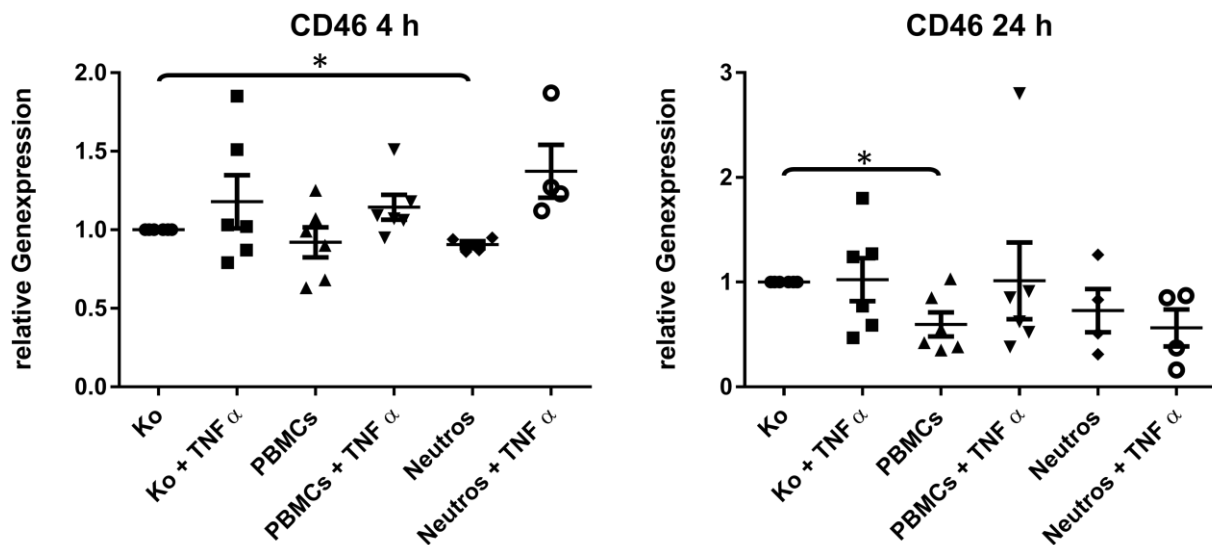


Abb. 13: Relative GE des CRP CD46 in menschlichen Tendozyten unter Stimulation mit TNF α , PBMC (+/- TNF α) und Neutros (+/- TNF α) für 4 h und 24 h. Alle GE sind relativ zum Referenzgen HPRT dargestellt. Die unbehandelte Kontrolle wurde normiert. n=4-6. Signifikanzniveau: * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$.

Eine Regulation des Genexpressionsmusters des CRP CD46 konnte in der indirekten Ko-Kultur der Tendozyten mit Leukozyten gesehen werden. Bei einer Stimulation für 4 h zeigt sich im Trend bei Präsenz von TNF α mit oder ohne Leukozyten auch eine induktive Wirkung auf die GE von CD46. Ein signifikanter Effekt, nämlich eine leichte Suppression der CD46 GE, konnte allerdings nur bei Behandlung mit Neutros ohne TNF α beobachtet werden. Nach 24 h war dieser Effekt nur noch als suppressiver Trend zu erkennen. Allerdings war nach 24 h Stimulation mit PBMCs (-TNF α) bei der CD46 GE der Tendozyten jetzt eine signifikante Verminderung zu erkennen (Abb. 13).

CD55

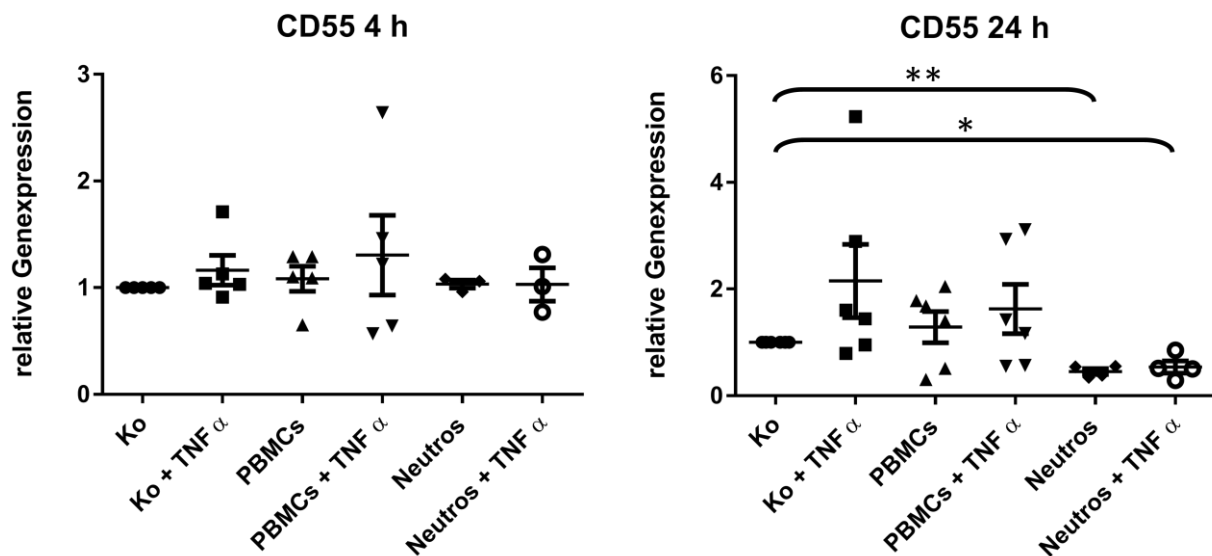


Abb. 14: Relative GE des CRP CD55 in menschlichen Tendozyten unter Stimulation mit TNF α , PBMCs (+/-TNF α) und Neutros (+/-TNF α) für 4 h und 24 h. Alle GE sind relativ zum Referenzgen HPRT berechnet. Die unbehandelte Kontrolle wurde normiert. n=3-6. Signifikanzniveau: * = p≤0,05, ** = p≤0,01.

Nach 4 h Stimulation konnten keine signifikanten Effekte in der CD55 GE abgelesen werden. Durch die Neutros sowohl mit als auch ohne TNF α wurde aber die CD55 GE in den Tendozyten zum 24 h Zeitpunkt signifikant unterdrückt. Die anderen Stimulantien hingegen hatten nach 24 h keine signifikanten Effekte auf die Expression dieses Gens (Abb. 14).

CD59

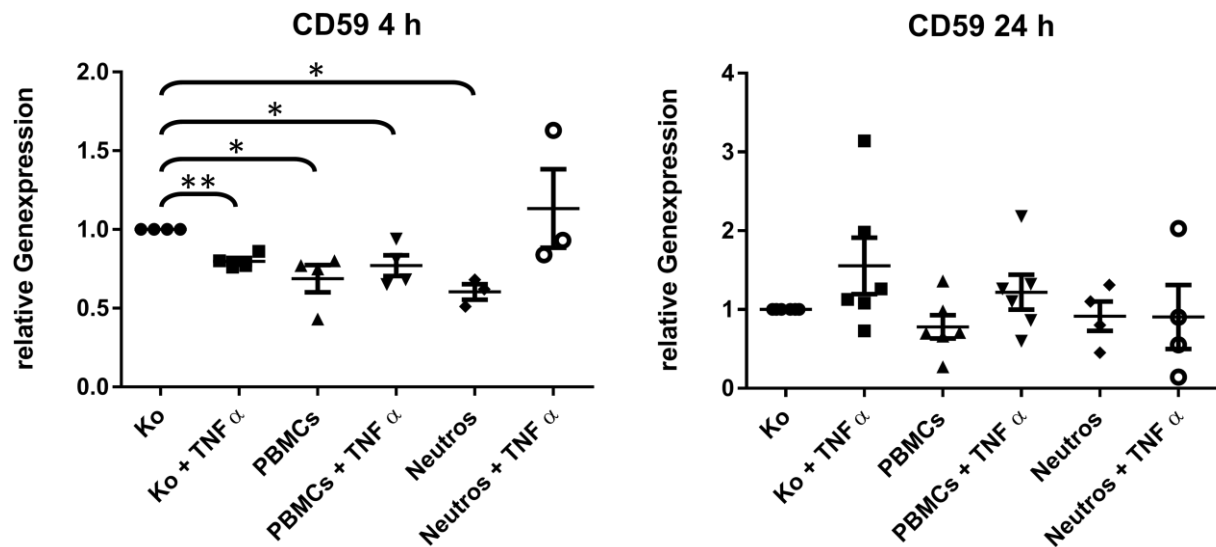


Abb. 15: Relative GE des CRP CD59 in menschlichen Tendozyten unter Stimulation mit TNF α , PBMCs (+/- TNF α) und Neutros (+/-TNF α) für 4 h und 24 h. Alle GE sind relativ zum Referenzgen HPRT aufgetragen. Die unbehandelte Kontrolle wurde normiert. n=3-6. Signifikanzniveau: * = p \leq 0,05, ** = p \leq 0,01.

Alle Stimulantien außer die Neutros (+TNF α) führten zu einer signifikanten Suppression der GE von CD59 nach 4 h in den Tendozyten. Die Neutros hatten in Anwesenheit von TNF α im Trend eine induktive Wirkung, allerdings hier ohne Signifikanz.

Beim 24 h Simulationszeitpunkt konnte kein signifikanter Effekt auf die GE von CD59 gezeigt werden (Abb. 15).

4.2.2 Vitalitätsfärbung der Tendozyten nach Leukozytenstimulation

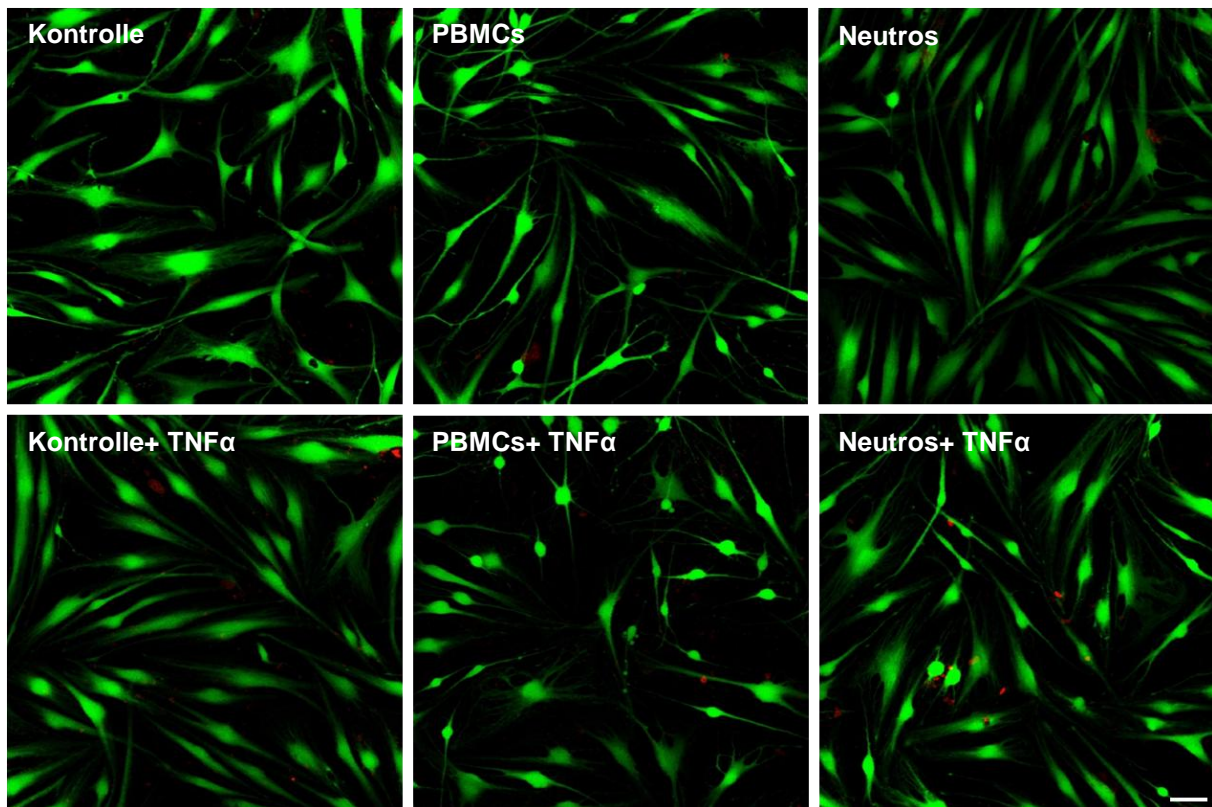


Abb. 16: Vitalitätsfärbung der Tendozyten mit Fluoresceindiaceetat (grün: vitale Zellen) und Propidiumiodid (rot: tote Zellen) nach 24 h indirekter Stimulation mit den Leukozyten (PBMCs und Neutros; +/-TNF α). Einsaatdichte = 10.000/cm². Massstab = 100 μ m.

Die Bilder wurden von den Tendozyten 24 h nach dem Stimulationsversuch aufgenommen. Eine Lebend-Tod-Färbung nach Stimulation mit PBMCs (mit/ohne TNF α) und Neutros (mit/ohne TNF α) im Vergleich zur Kontrolle zeigte überwiegend vitale Zellen. Allerdings sahen einige Sehnenzellen nach Leukozytenstimulation v.a. auch bei gleichzeitiger TNF α -Behandlung abgekugelt mit spindeldünnen Fortsätzen und spärlicher gewachsen aus (Abb. 16).

4.2.3 Leukozytenfärbungen

4.2.3.1 Giemsa-Färbung der Leukozyten nach der Isolierung

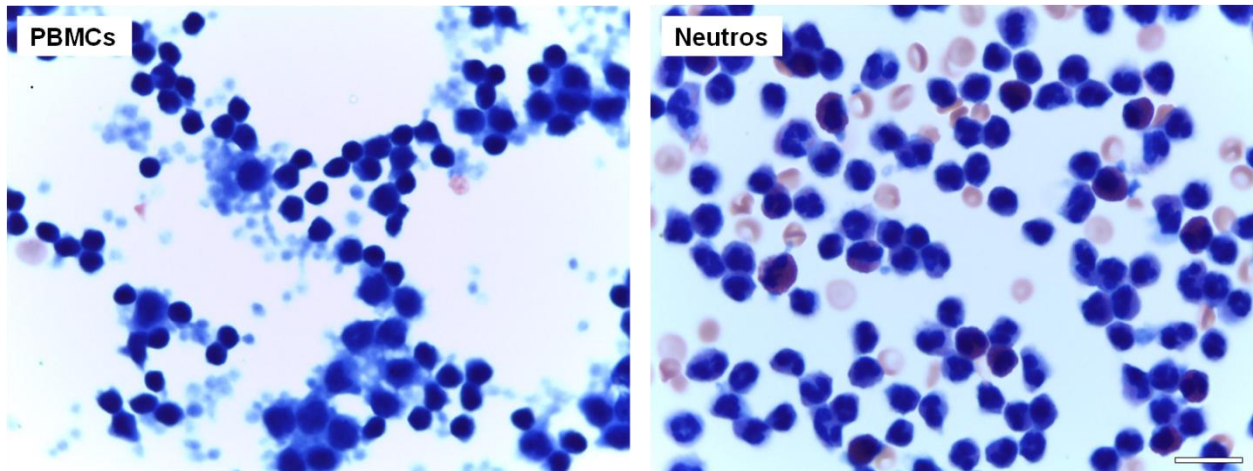


Abb. 17: Giemsa-Färbung der isolierten PBMCs und der Neutros. Die Bilder wurden 1000-fach vergrößert. Maßstab = 20 µm.

Zusätzlich wurden auch die PBMCs und Neutros auch mit Hilfe der Giemsa-Färbung dargestellt, um die Reinheit der Präparation zu prüfen. Die Zellen wurden nach der Isolierung in 4% PFA-Lösung fixiert und die Färbung wurde freundlicherweise in der Klinik für Hämatonkologie im Klinikum Nürnberg Nord angefertigt. In der Abbildung links mit PBMCs konnte man größere Zellen, PBMCs mit einem runden oder leicht eingekerbten Kern und die kleineren kernlosen Zellen, die Thrombozyten erkennen. Außerdem konnte man sehen, dass die Zellen auch kleine Grüppchen bilden. Auf der rechten Seite ist das Bild mit den Neutros in leicht unterschiedlichen Größen mit überwiegend Neutros. Außerdem sieht man auch einige kernlose rötliche Zellen, die Erythrozyten (Abb. 17).

4.2.3.2 Vitalitätsfärbung der Leukozyten nach Isolierung, 4 h und 24 h

Es wurde direkt nach der Isolierung, nach 4 h und 24 h Stimulationsversuch eine Lebend-Tod-Färbung der isolierten und danach in der Ko-Kultur eingesetzten Leukozyten durchgeführt.

nach Isolierung

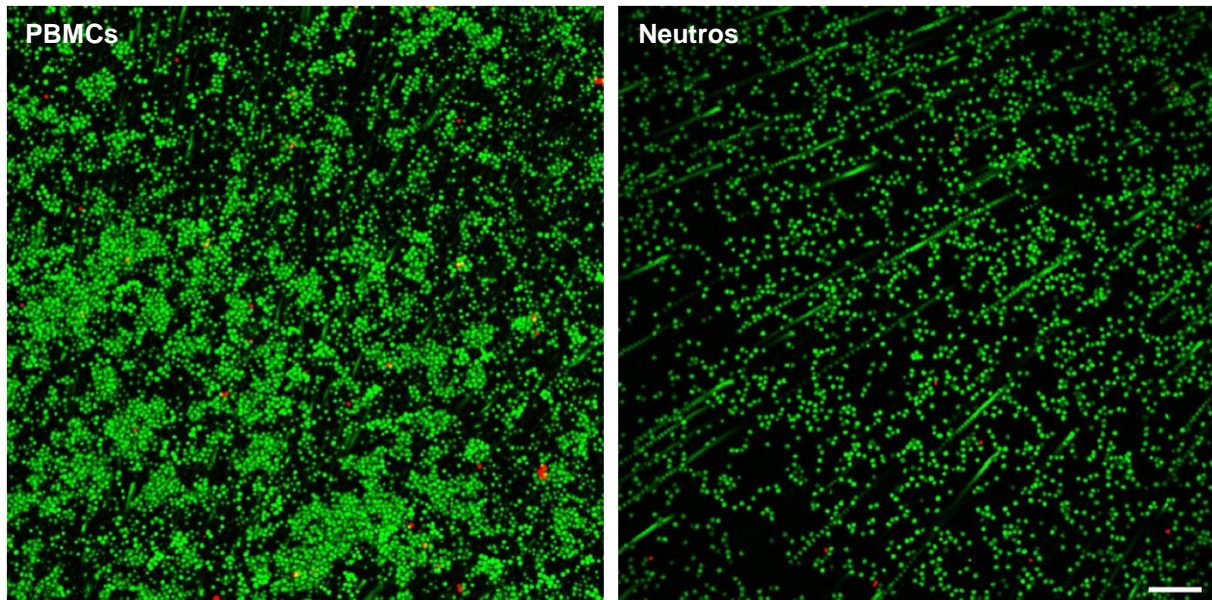


Abb. 18: Vitalitätsfärbung der zur Stimulation eingesetzten Leukozyten (PBMCs und Neutros) mit Fluoresceindiacetat (grün: vitale Zellen) und Propidiumiodid (rot: tote Zellen) nach Isolierung. Massstab = 100 μm .

Nach der Isolierung konnte man sehen, dass sowohl die PBMCs als auch die Neutros vital sind; mit zunächst nur wenigen, rot dargestellten, toten Leukozyten. Allerdings konnte man bei den PBMCs in dieser 100 fachen Vergrößerung beobachten, dass die PBMCs sich eher in Clustern befanden (Abb. 18).

Für die Stimulationszeitpunkte 4 h und 24 h wurden auch beide Leukozytenansätze (PBMCs [+/- $\text{TNF}\alpha$] und Neutros [+/- $\text{TNF}\alpha$]) mitberücksichtigt und jeweils eine Vitalitätsfärbung durchgeführt (Abb. 19 und 20).

nach 4 h

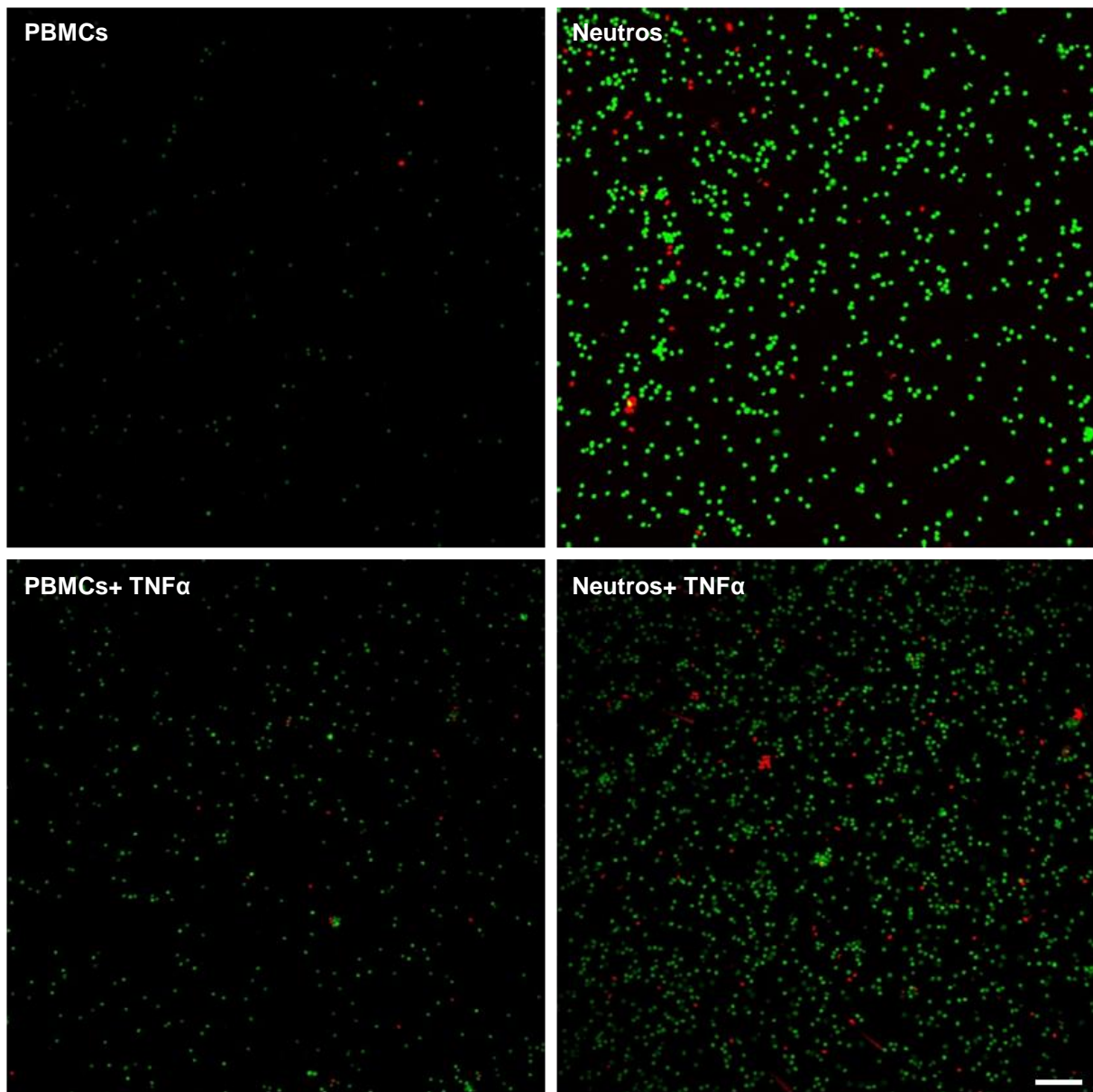


Abb. 19: Vitalitätsfärbung der für die Stimulation eingesetzten Leukozyten (PBMCs und Neutros; +/-TNF α) mit Fluoresceindiacetat (grün: vitale Zellen) und Propidiumiodid (rot: tote Zellen) nach 4 h indirekter Stimulation der Tendozyten. TNF α Konzentration = 10 ng/mL. Einsattdichte = 100.000/cm². Masstab = 100 μ m.

Nach 4 h war erkennbar, dass einzelne PBMCs sowohl mit und ohne TNF α -Behandlung rot gefärbt waren; d.h. abgestorben sind. Allerdings waren mehr abgestorbene Neutros (+/-TNF α) im Vergleich zu den PBMCs zu sehen. Nichtsdestotrotz besteht der überwiegende Anteil der Zellen aus lebendigen Neutros (Abb. 19).

nach 24 h

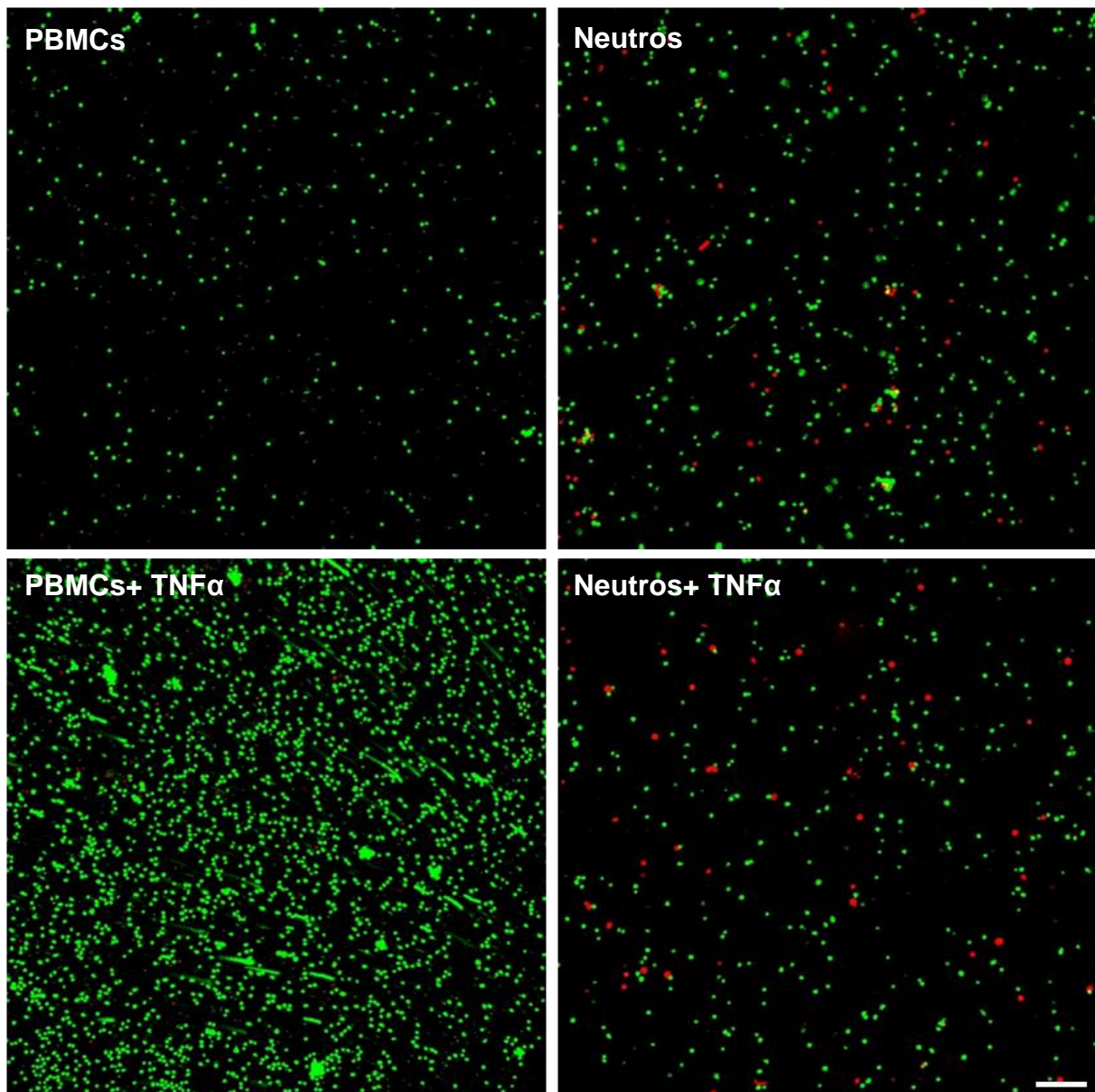


Abb. 20: Vitalitätsfärbung der Leukozyten (PBMCs und neutrophile Granulozyten [Neutros]; +/-TNF α = 10 ng/mL) mit Fluoresceindiacetat (grün: vitale Zellen) und Propidiumiodid (rot: tote Zellen) nach 24 h indirekter Stimulation der Tendozyten. TNF α Konzentration = 10 ng/mL. Einsaatdichte = 100.000/cm². Massstab = 100 μ m.

Nach 24 h war ein ähnliches Muster erkennbar, dass die PBMC (+/-TNF α) Population einzelne tote Zellen enthielt und im Vergleich dazu die Neutrophilen-Population noch mehr abgestorbene Zellen aufwies (Abb. 20).

4.2.3.3 Kern und Aktinzytoskelettfärbung der Leukozyten

nach der Isolierung

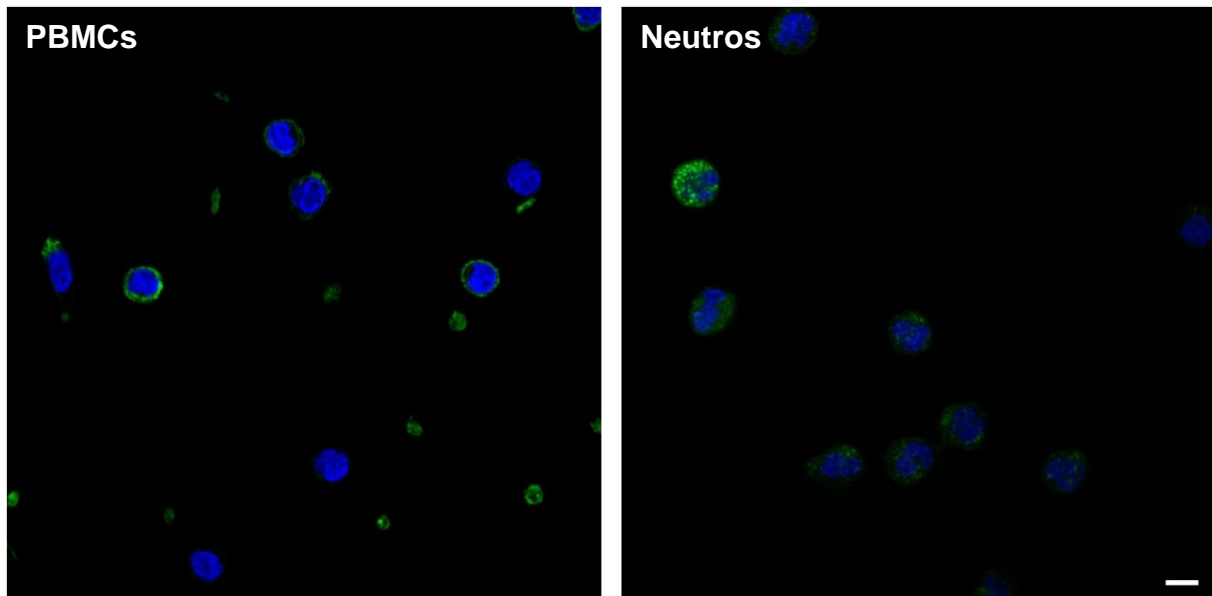


Abb. 21: DAPI- und Phalloidin-Färbung der Leukozyten nach Isolierung. Die blaue DAPI-Färbung zeigt die Zellkerne und die grüne Phalloidin Alexa 488 Färbung repräsentiert das Aktinzytoskelett in den Leukozyten. Massstab = 10 μm .

Mit Hilfe der DAPI- und Phalloidin Alexa 488 Färbung konnten die Zellkerne und das Aktinzytoskelett der Leukozyten mit dem konfokalen Mikroskop dargestellt werden. Allerdings sind auch einige kleine kernlose Zellen (Thrombozyten) in der PBMC Population zu sehen (Abb. 21).

nach 24 h Ko-Kultur

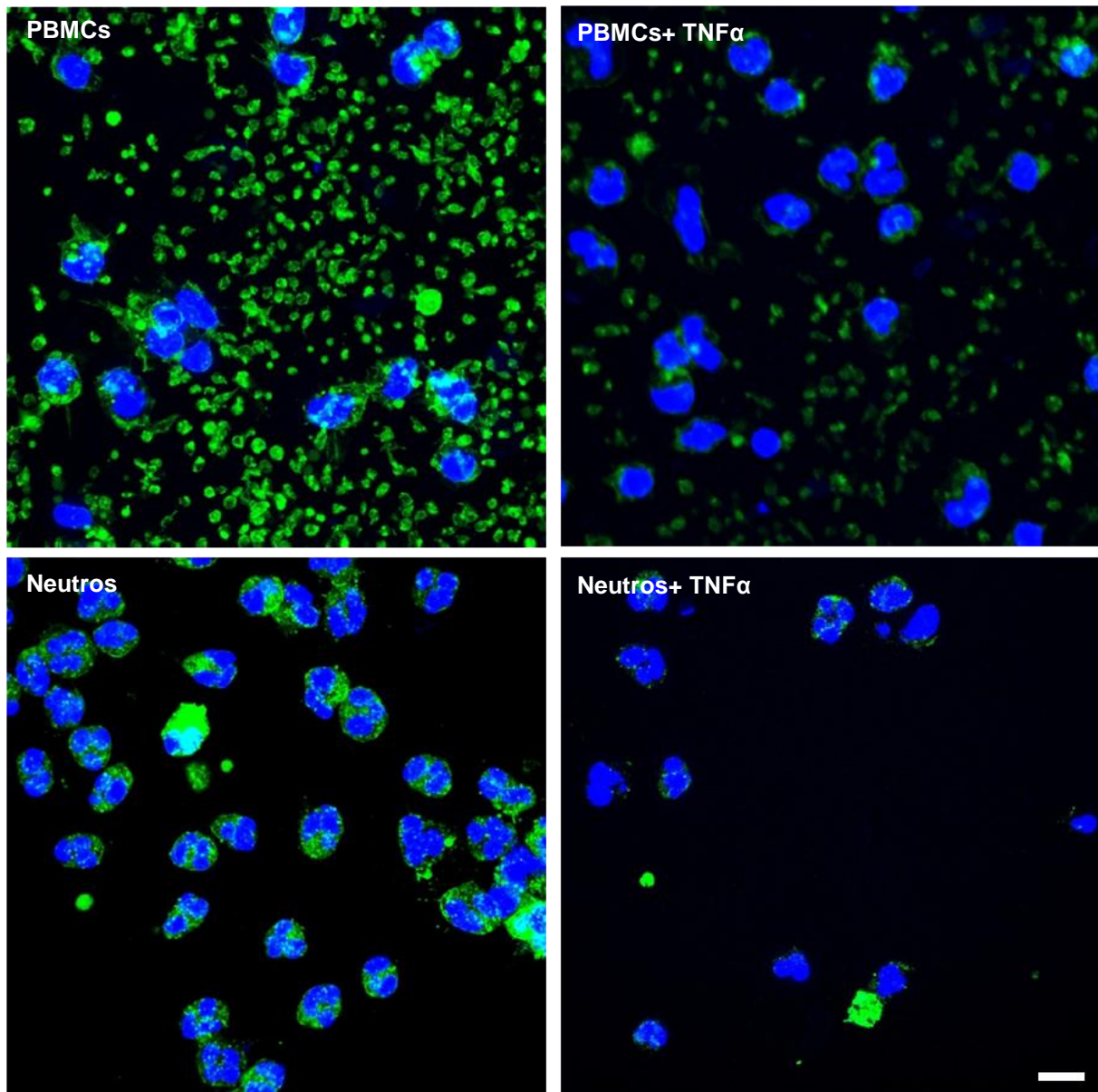


Abb. 22: DAPI- und Phalloidin-Färbung der Leukozyten nach 24 h (auf den Insert-Membranen). Die blaue DAPI Färbung zeigt die Zellkerne und die grüne Phalloidin Alexa 488 Färbung stellt das Aktinzytoskelett in den Leukozyten dar. $\text{TNF}\alpha$ Konzentration = 10 ng/mL. Einsaatdichte = 100.000/cm². Massstab = 10 μm .

Die Inserts mit den jeweiligen Leukozyten-Populationen wurden nach 24 h Ko-Kultur mit den Tendozyten mit 4% PFA fixiert. Ein Ausschnitt aus den Inserts der jeweiligen Stimulationen wurde entnommen und die gleiche Färbung mit DAPI und Phalloidin Alexa 488 mit den anhaftenden Zellen durchgeführt (Abb. 22).

4.2.3.4 Aufnahme der Insertmembran mit den Leukozyten nach 24 h Ko-Kultur

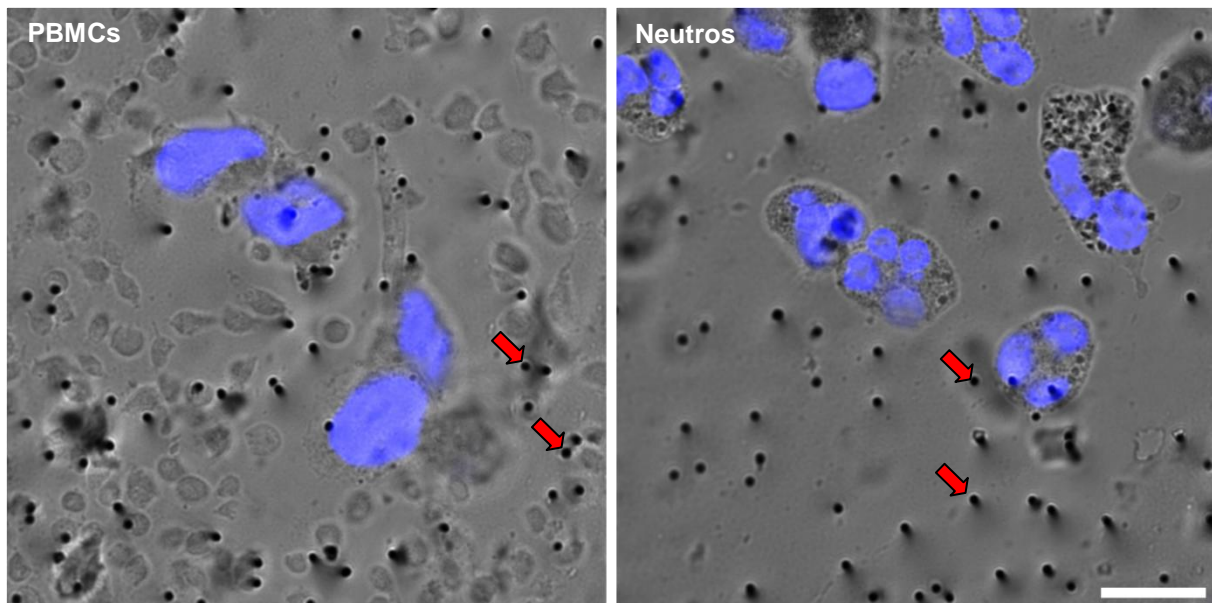


Abb. 23: Hellfeldaufnahme der Insertmembran des Transwells und Fluoreszenzaufnahme nach 24 h Stimulation. Die Zellkerne wurden durch eine DAPI-Färbung gegengefärbt. Blau = Zellkern mit DAPI Färbung. Rote Pfeile = Poren. Einsaatdichte der Leukozyten = 100.000/cm². Masstab = 10 µm.

Mit Hilfe einer kombinierten Hellfeldaufnahme der Insertmembran und einer Fluoreszenzaufnahme der Zellkerne mit DAPI-Färbung konnte das Größenverhältnis und die Beziehung der Leukozyten zu den Poren der Insertmembran bei einem Stimulationsversuch dargestellt werden. Alle kernhaltigen Zellen haben Verbindung zu den Poren entweder direkt oder mit Hilfe ihrer Zellausläufer (Abb. 23).

4.2.4 Immunfluoreszenzfärbung

C5aR

nach 4 h

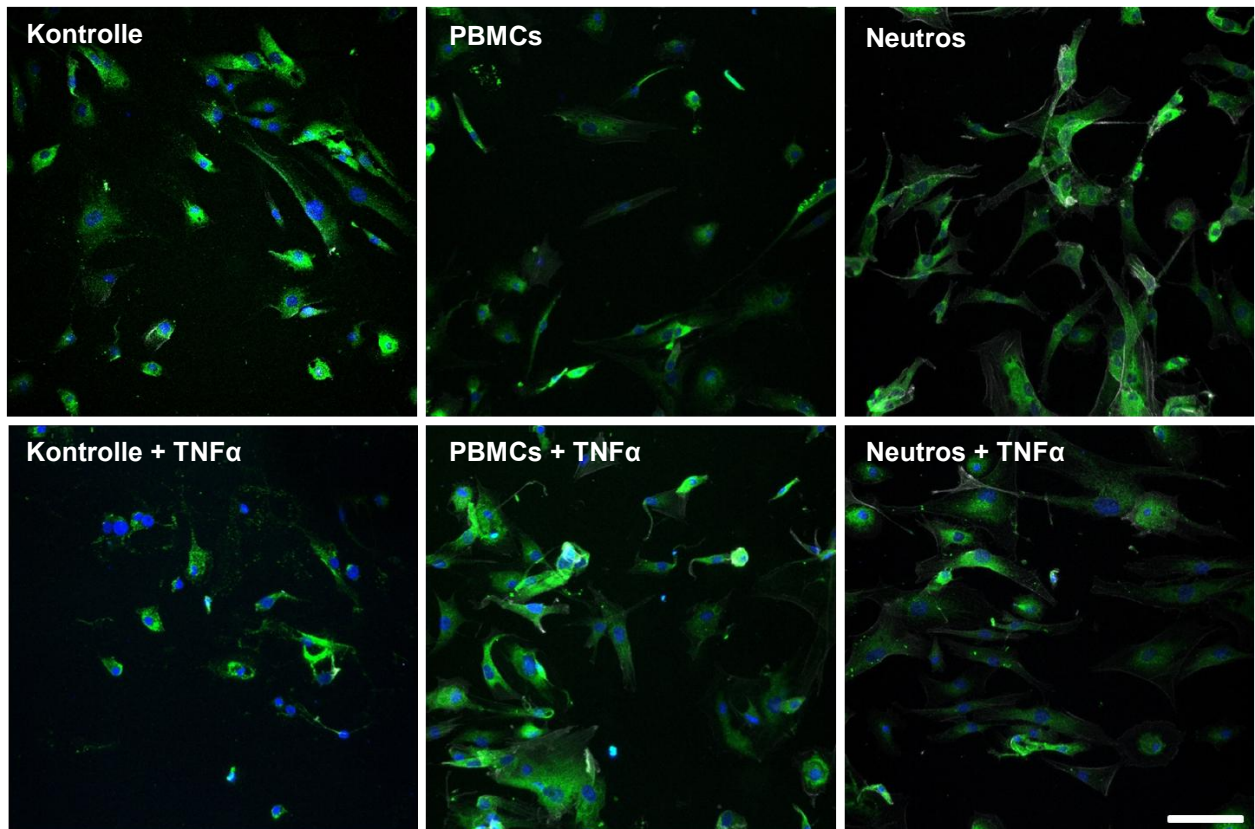


Abb. 24: Immunfluoreszenzfärbung der Tendozyten nach Stimulation mit Leukozyten nach 4 h. Grün (Alexa 488) = C5aR, blau (DAPI) = Zellkerne, grau (Phalloidin Alexa 633) = Aktinzytoskelett. TNF α Konzentration = 10 ng/mL. Einsaatdichte = 10.000/cm². Masstab = 100 μ m. n= 2

nach 24 h

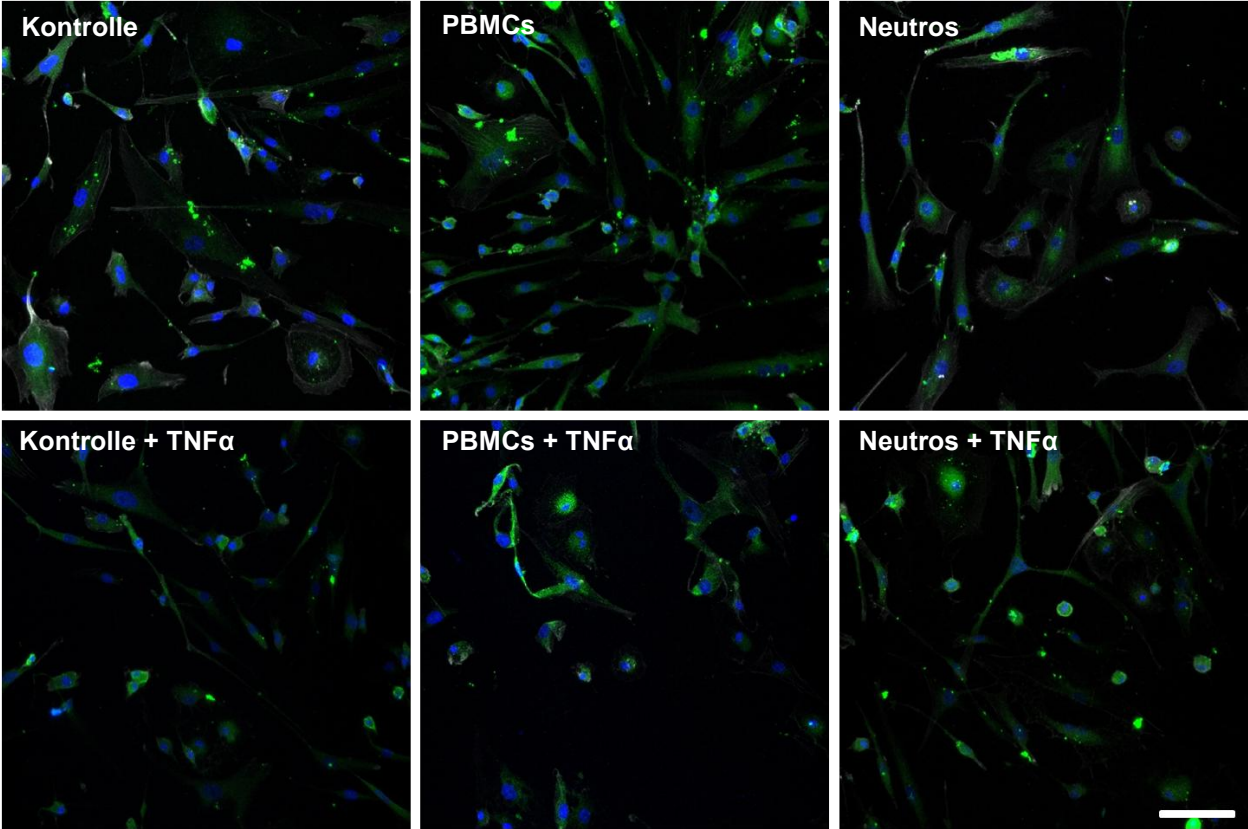


Abb. 25: Immunofluoreszenzfärbung der Tendozyten nach Stimulation mit Leukozyten nach 24 h. Grün (Alexa 488) = C5aR, blau (DAPI) = Zellkerne, grau (Phalloidin Alexa 633) = Aktinzytoskelett. TNFα Konzentration = 10 ng/mL. Einsaatdichte = 10.000/cm². Massstab = 100 µm. n= 2

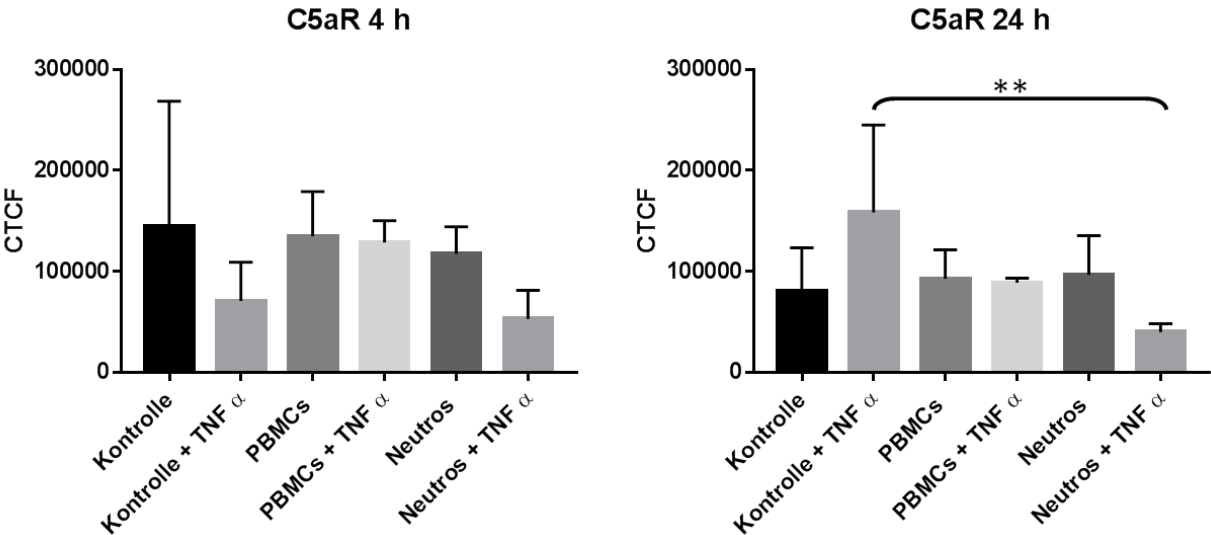


Abb. 26: Dargestellt ist der CTCF-Wert des C5aR Proteins in Abhängigkeit von der Behandlung der Tendozyten. Die Immunfluoreszenzbilder wurden mit Hilfe von ImageJ ausgewertet. Die X-Achse zeigt die unterschiedlichen Leukozytenstimulationen. Die Y-Achse zeigt den CTCF Wert an. Eine ANOVA Analyse wurden durchgeführt. Signifikanzniveau: * = p≤0,05, ** = p≤0,01

Nach 4 h und 24 h Stimulation der Tendozyten mit Leukozyten-Subpopulationen wurde die Proteinexpression von C5aR mit Hilfe von ImageJ analysiert (Abb. 24-26). Dieser Versuch wurde mit zwei Spendern durchgeführt. Wie auf der Abbildung dargestellt ist, zeigten alle stimulierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle eine Suppression der C5aR Synthese. Die Stimulation mit TNF α und Neutros (+TNF α) ergab eine stärkere Hemmung dieser Proteinsynthese als die anderen Stimulationen. TNF α nach 24 h ließ einen induktiven Einfluss auf C5aR im Gegensatz zu 4 h erkennen. Nach 24 h führte die gleichzeitige Behandlung mit Neutros (+TNF α) im Vergleich zur Behandlung mit TNF α allein zu einer signifikanten Inhibition der C5aR Expression (Abb. 24-26).

CD55

nach 4 h

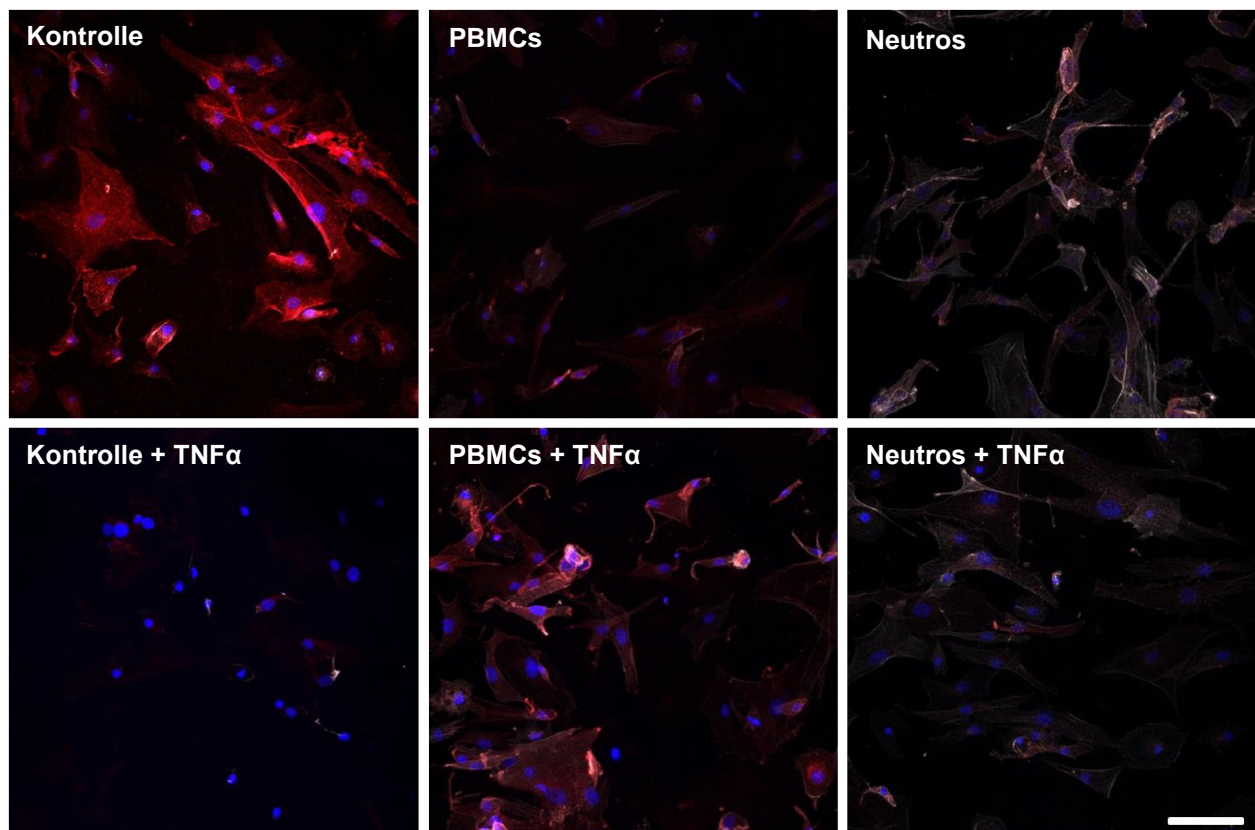


Abb. 27: Immunfluoreszenzfärbung der Tendozyten nach Stimulation mit Leukozyten nach 4 h. Rot (Cy3) = CD55, blau (DAPI) = Zellkerne, grau (Phalloidin Alexa 633) = Aktinzytoskelett. TNF α Konzentration = 10 ng/mL. Einsaatdichte = 10.000/cm². Massstab = 100 μ m. n= 2

nach 24 h

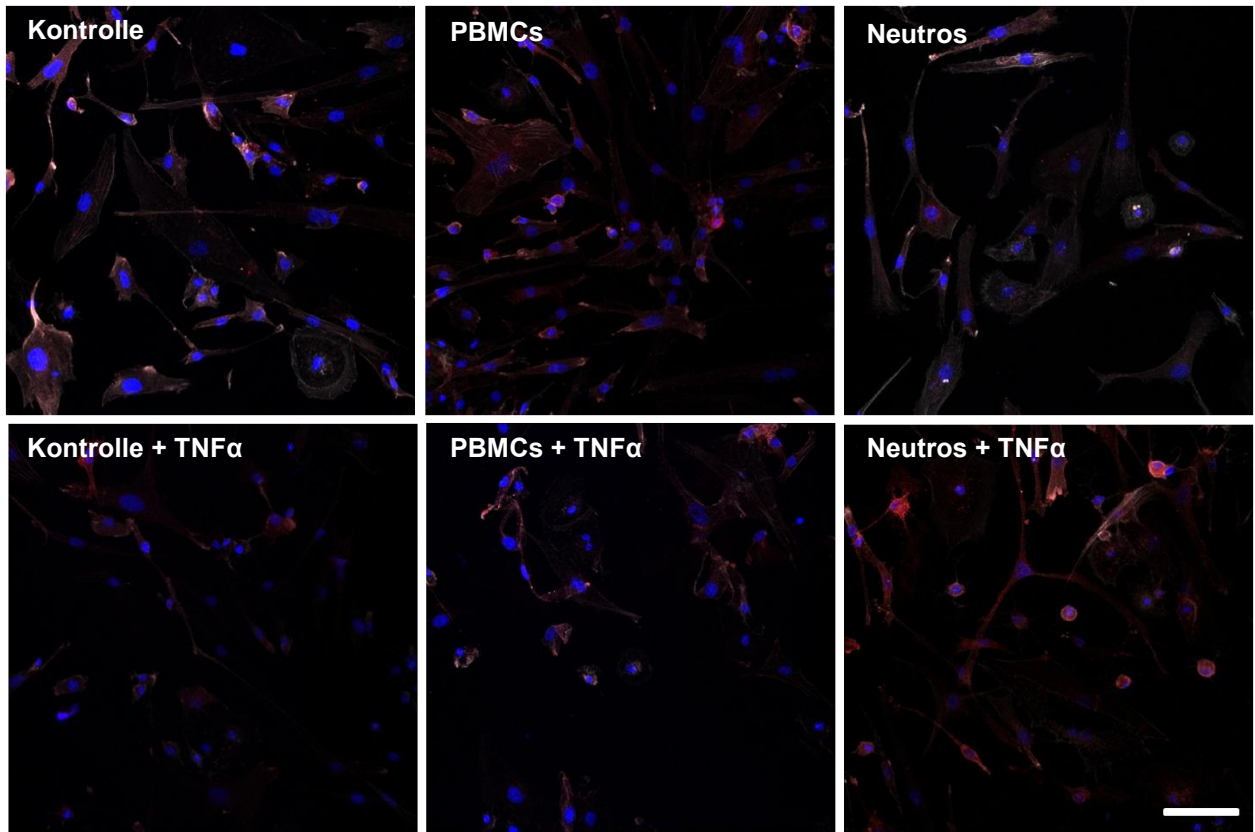


Abb. 28: Immunfluoreszenzfärbung der Tendozyten nach Stimulation mit Leukozyten nach 24 h. Rot (Cy3) = CD55, blau (DAPI) = Zellkerne, grau (Phalloidin Alexa 633) = Aktinzytoskelett. TNF α Konzentration = 10 ng/mL. Einsaatdichte = 10.000/cm². Massstab = 100 μ m. n = 2

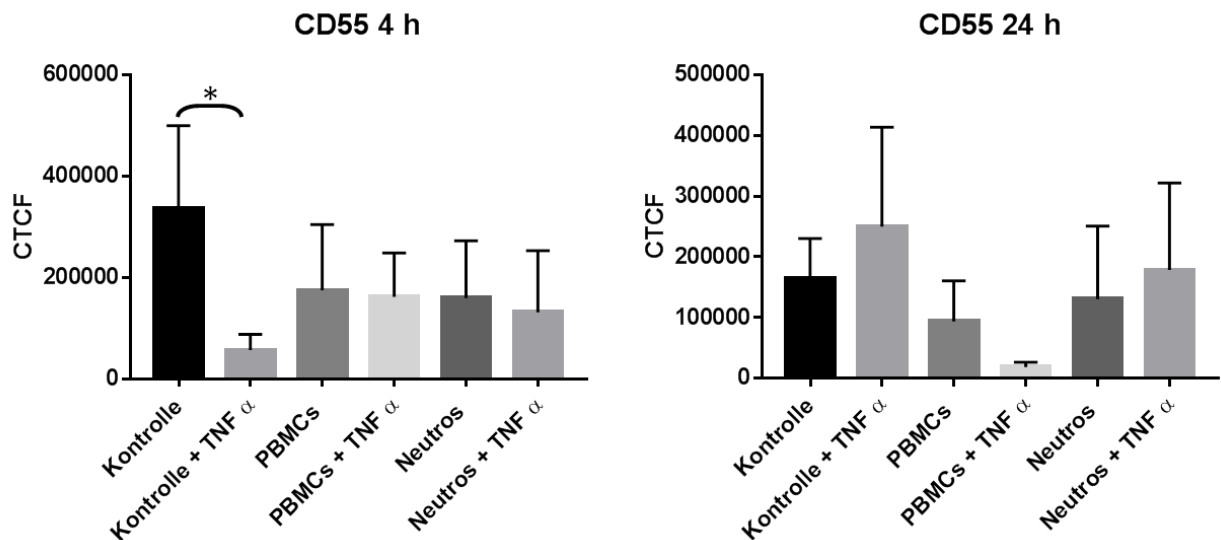


Abb. 29: Dargestellt ist der CTCF-Wert des Proteins CD55 in Abhängigkeit von der Behandlung der Tendozyten. Die Immunfluoreszenzbilder wurden mit Hilfe von ImageJ ausgewertet. Die X-Achse zeigt die unterschiedlichen Leukozytenstimulationen. Die Y-Achse zeigt den CTCF Wert an. Eine ANOVA Analyse wurden durchgeführt. Signifikanzniveau: * = p \leq 0,05, ** = p \leq 0,01.

Nach 4 h und 24 h Stimulation der Tendozyten wurden die Proteinexpression von CD55 analysiert (Abb. 27-29). Dieser Versuch wurde mit zwei Spendern durchgeführt. Wie auf der Abbildung dargestellt ist, zeigen alle stimulierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle eine Suppression der CD55 Synthese unter 4 h Stimulation. Die Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ führte zu einer signifikanten Inhibition dieser Proteinsynthese im Gegensatz zu den anderen Stimulationen. $\text{TNF}\alpha$ allein hat nach 24 h einen induktiven Einfluss im Vergleich zur 4 h, aber ohne Signifikanz. Alle Stimulationen mit Leukozyten mit oder ohne $\text{TNF}\alpha$ zeigten einen Trend der Suppression in der CD55 Proteinsynthese (Abb. 27-29).

Die Isotypkontrolle und Negativkontrolle ließen keine Signale erkennen. Nur die blauen Zellkerne waren wegen der DAPI-Färbung sichtbar.

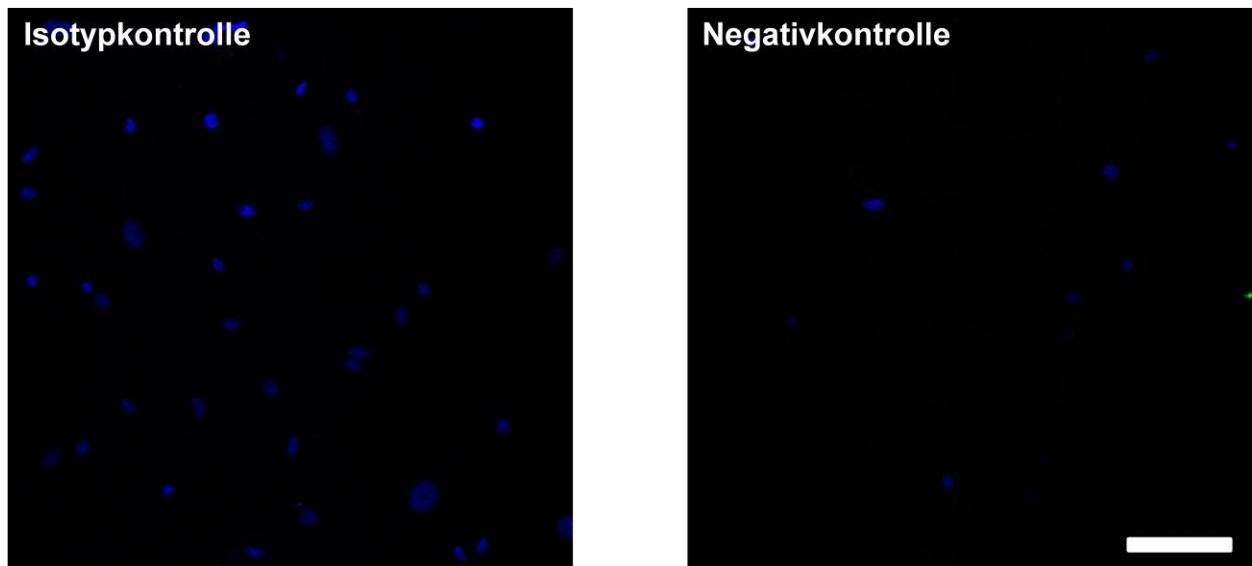


Abb. 30: Immunfluoreszenzfärbung der Tendozyten nach Stimulation mit Leukozyten. Die Abbildungen zeigen die Isotypkontrolle und Negativkontrolle. Grün (Alexa 488) = C5aR, rot (Cy3) = CD55, blau (DAPI) = Zellkerne. Einsaatdichte = $10.000/\text{cm}^2$. Massstab = $100\ \mu\text{m}$. $n=2$

5 Diskussion

Die Therapie einer Sehnenruptur ist eine große Herausforderung. In vielen Fällen kann weder durch eine chirurgische noch durch eine konservative Maßnahme, oder durch die Kombination beider Erfolg im Hinblick auf eine vollständige Ausheilung im Sinne einer Regeneration erzielt werden. Das größte Problem besteht darin, dass eine Sehnenruptur meistens auf Basis einer degenerativen Veränderung der Sehne entsteht (14).

Die genaue Pathophysiologie einer Tendinopathie, die das Resultat einer Sehnendegeneration darstellen kann, ist weiterhin unklar. Seine Bedeutung für den betroffenen Patienten wird aber durch die klinische Symptomatik evident. Symptome wie Schmerzen, Schwellung und daraus resultierende Leistungsminderung können durch eine Entzündung des die Sehne umgebenden Gewebes (Paratendinitis) entstehen. Solche Entzündungen können dann aber auch eine Ursache für die Entstehung von chronischen Tendinopathien werden.

Interessanterweise wurde bei etwa 97% der Patienten mit einer spontanen Sehnenruptur (15) eine histologische Veränderung der Sehne gefunden, die schon vor der Ruptur bestand. Vor dem Zeitpunkt der Sehnenruptur wurden aber keine Beschwerden in der Anamnese angegeben. Jedoch ist die Tatsache, dass jede dritte Person über 35 Jahre laut Kannus et al., 1991 mit oder ohne subjektive Symptome an einem degenerativen Sehnenschaden leidet (15), durchaus alarmierend. Die histologischen Veränderungen können sich allerdings in unterschiedlichen Formen darstellen. Eine hypoxische Degeneration ist die häufigste Art einer Tendinopathie mit ihren weiteren Begleitern wie mukoiden Veränderungen, Tendolipomatosis, kalzifizierender Degeneration oder eine Kombination aus mehreren (15). Alle diese Veränderungen können unterschiedliche Ursachen haben, aber letztendlich zu einer Tendinopathie führen. Für Gewebeveränderungen, anaboler wie kataboler Art spielt das Signalsystem mit Zytokinen und das CS eine wichtige Rolle. Seine Bedeutung in der Sehne ist bisher jedoch wenig erforscht.

Derzeit ist zur Therapie einer kompletten Sehnenruptur die chirurgische Maßnahme ohne Zweifel die erste Wahl. Aber im Fall eines Teilrisses oder einer symptomatischen Tendinopathie werden unterschiedliche konservative Therapiemöglichkeiten bevorzugt. Kontrolliertes exzentrisches Training wird als Prophylaxe und Therapie positiv bewertet (87). Es gibt aber Kontroversen bei fast allen anderen Therapieempfehlungen. Das lässt den Kliniker auf keine standardisierte Therapiemöglichkeit zugreifen, sondern oft läuft der Therapieversuch auf „Trial and Error“ Basis ab. Extrakorporale Schockwellentherapie und Nitratsalben zeigen beispielweise eine positive Bilanz, wobei die Kryotherapie, niedrig dosierte Heparin-Therapie,

Kortisoninjektionen (88) u.s.w. nur mit Teilerfolgen belohnt werden. Der Einsatz von Zytokinen, CP und ihren Inhibitoren könnte zur Therapie der Tendinopathie eine neue Perspektive anbieten.

5.1 C5a Stimulation der Tendozyten

Das Komplement Spaltprodukt C5a wurde in dieser Arbeit auf seine Wirkung auf die Tendozyten untersucht. Außerdem wurden die Proteine, die für den Schutz der körpereigenen Zellen zuständig sind und die auch potenziell antientzündlich wirken, die sog. CRPs, mituntersucht.

Die Induktion einer Chemotaxis der Leukozyten an den Entzündungsorten, Blutflussregulation der Gefäße, Ödem Bildung usw. gehören zu den klassischen Effekten des AP C5a. Genauso wie die Auswirkungen des Zytokins TNF α , wird die Rolle des CS in Bezug auf Infektionen (89) und vor allem, einem systemischen inflammatorischen Schock (52) in den letzten Jahren experimentell wie klinisch intensiv beforscht. Es zeigt, dass eine erhöhte C5a-Konzentration mit einer erhöhten Mortalität bei einer Sepsis assoziiert ist (90). Dass der Einfluss dieses AP in einer Sehnenentzündung auch eine entscheidende Rolle spielen könnte und seine erhöhte Präsenz für die Prognose einer Sehnenentzündung Bedeutung hat, ist eine denkbare Hypothese. Wir wissen, dass in Immunzellen die anaphylatoxische Wirkung erst zur Geltung kommt, wenn C5a an seinen Rezeptor andockt (62, 91). Dieser G-Protein abhängige Rezeptor mit sieben Transmembrandomänen wird allerdings nicht nur in den myeloiden Zelltypen exprimiert, wie ursprünglich vermutet, sondern auch Tendozyten als nicht-myeloide Zellen sind in der Lage selber C5aR zu produzieren (30, 80). Riedemann et al., (52) zeigten 2012 in einem Tierversuch, dass in Lungen, Leber, Niere und Herz-Gewebe ein Expressionsanstieg des C5a Rezeptors während und nach einer Sepsis zu beobachten war, während in Zellen des Dünndarms und Gehirns keine nachweisbare mRNA Induktion zu erkennen war (52). Obwohl wir wissen, dass diese Zellen in der Lage sind C5aR herzustellen, wissen wir aber noch nicht, welche Bedeutung es auf die Immunzellen und die Nicht- Immunzellen hat. Außerdem ist in Bezug auf eine Tendinopathie die mögliche Funktion der humanen Tendozyten bei der Komplementregulation unklar.

In humanen Monozyten und Makrophagen regte die Aktivierung des C5aR die Produktion von Zytokinen wie TNF α , IL-1 β , IL-6 und IL-8 an und induzierte damit deren immunregulatorische Aktivität (92). In HUVEC Zellen wurde nachgewiesen, dass eine C5a Stimulation zwar eine Induktion der GE von IL-8 und IL-1 β erzeugt, die eine Inflammation erkennen lassen, aber gleichzeitig präsentierte sich auch eine Suppression der IL-6 GE (93), was eine anti-

inflammatorische Wirkung vermuten lässt. Dieser Kontrast könnte wieder auf einer Gewebetyp-abhängigen Wirkung beruhen.

Die Tendozyten wurden deshalb in der vorliegenden Studie mit rekombinantem AP C5a, das bei einem Entzündungsgeschehen im System erhöht vorliegt (52, 89) in zwei Konzentrationen (25 ng/mL und 100 ng/mL) für drei Zeitpunkte 0,5 h, 4 h und 24 h stimuliert. Stahel et al., beschrieb 1997, dass die Expression von C5aR in den neuronalen Zellen durch Stimulation mit TNF α nach 6 h einen drastischen Anstieg annimmt und ein Expressionsmaximum zwischen 24 h und 36 h erreicht (94). In verschiedenen nicht-myeloiden Geweben wurde beschrieben, dass die C5aR GE nach 6 h am höchsten ausfällt (55). Durch die ausgewählten Zeitpunkte sollte auch die Bedingung einer kurzen Halbwertszeit der *in vivo* verfügbaren C5a Proteine, die schnell inaktiviert werden, mitberücksichtigt werden (95). Zwar wird eine kurze Halbwertszeit von 2 - 3 min (96) für C5a beschrieben, aber die Halbwertszeit *in vivo* ist u.a. von der Anzahl der C5aR auf der Leukozyten-Zellmembran abhängig. Nicht nur die schnelle und kurze Wirkung des C5a durch Bindung an seinen Rezeptor muss bedacht werden, sondern auch die Abdämpfung der Wirkung durch Internalisierung des Rezeptors, denn die Entfaltung der C5a-Wirkung korreliert mit der Rezeptoranzahl der Zellen (96). Die Neutros mit ihrer Rezeptoranzahl von ca. 5×10^4 - 1×10^5 Bindungsstellen/ Zelle neutralisieren C5a am schnellsten (96). Außerdem wird humanes C5a im Serum durch N-Carboxypeptidasen, die Arginylreste aus dem Carboxyterminus unter Entstehung einer C5adesArg abspalten, transformiert. Letzteres ist zwar weniger potent im Vergleich zu C5a, aber es behält durchaus seine chemotaktischen und anderen biologische Funktionen (97). Die halbstündige Stimulation durch das AP C5a mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen von 25 ng/mL und 100 ng/mL, bewirkte zwar keine signifikante Erhöhung der GE des C5aR, aber eine steigende Tendenz konnte beobachtet werden. Dieser Effekt war Spender-abhängig. Die Auswirkung könnte für eine schnelle reaktive inflammatorische Wirkung in der Sehne sprechen. Die Tendozyten sind wahrscheinlich selbst in der Lage, bei Stimulation mit C5a ihre GE für die C5aR hochzuregulieren, um ihre Sensitivität gegen C5a zu erhöhen. Hierdurch könnte z.B. eine Zytokinproduktion induziert werden, die eventuell weitere inflammatorische oder chemotaktische Effekte in Gang setzt. Es bleibt die Frage wie lange diese anhält und ob es körpereigene regulatorische Mechanismen für diese gibt. Zwei Beobachtungen sind bei der Betrachtung der Ergebnisse dieser Arbeit interessant. Nach 4 h wurde die GE des C5aRs bei C5a Behandlung in beiden eingesetzten Konzentrationen im Vergleich zu der Kontrolle signifikant unterdrückt. Die inflammatorische Wirkung des C5a erzwingt wahrscheinlich durch eine negative Rückkopplung die Suppression der C5aR GE nach 4 h. Man könnte hier auch von einer C5a Resistenz sprechen; ein Abwehrmechanismus der Tendozyten

gegen C5a, damit weniger C5a Moleküle an den Rezeptoren andocken können und dadurch der Entzündungsprozess limitiert wird. Diese Wirkung ließ sich nach 24 h immer noch bei der höheren untersuchten Konzentration von 100 ng/mL C5a in den Zellen als signifikant nachweisen. Es findet ein kontinuierlicher Abbau des Proteins im Serum statt. Man könnte vermuten, dass C5a bei niedrigeren Konzentrationen wie 25 ng/mL nach 24 h keine stimulierende Wirkung mehr ausübt und dadurch keinen bedeutsamen Effekt mehr zeigte. Durch einen weiteren Versuch durch Gewinnung von Zelllysaten und nachfolgenden ELISA Untersuchungen könnte man das Verhältnis C5a zu der inaktiven Form C5adesArg ermitteln und der Frage nach der Stabilität des C5a im Versuchsansatz genauer nachzugehen. Vergleichend zu den Genexpressionsdaten konnte man auf Proteinebene auch eine verminderte Synthese des C5aRs zu den Zeitpunkten 4 h und 24 h und beiden Konzentrationen bestätigen.

Es wurde der Einfluss vom AP C5a auf die GE zytoprotektiver Faktoren, den Komplement-regulatorischen Proteinen CD46, CD55 und CD59 in den Tendozyten untersucht. Die CRPs CD55 und CD59 zeigten auch einen zeit- und konzentrationsabhängig synchronen Trend ähnlich zu C5aR bei der halbstündigen Stimulation mit C5a. Angesichts der induzierten GE dieser zwei CRPs CD55 und CD59 nach 30 min Stimulation mit C5a kann man herleiten, dass die Tendozyten selbst durchaus eine Induktion dieser CRPs zeigen um die weitere Entstehung der AP durch kontrollierte Hemmung der Konvertasen oder den Zellschutz durch Hemmung der Entstehung des MAC-Komplexes zu gewährleisten. Zum 4 h und 24 h Zeitpunkt sieht man, dass alle CRPs GE geringer als in der unbehandelten Kontrolle sind. Die weitere Beobachtung über 72 h oder länger würde auch interessant sein um zu erfahren, ob sich die GE aller CRPs wieder auf Kontrollniveau normalisiert. Auf der Proteinebene wurde nur ein CRP CD55 untersucht. In Übereinstimmung mit der GE konnte man auch eine signifikante Suppression der CD55 Proteinsynthese nachweisen. Das lässt vermuten, dass die Tendozyten nach 4 h und 24 h anfälliger gegen das CS sein könnten.

Die anaphylatoxische Wirkung des C5a könnte auch Einfluss auf die Vitalität der Tendozyten nehmen. Deshalb wurde die Vitalität der Tendozyten nach Stimulation mit dem hochpotenten AP geprüft, und zu diesem Zweck eine Lebend-Tod-Färbung gemacht. Diese zeigte nach 24 h, dass die Zellen den gesamten Untersuchungszeitraum überlebten.

5.2 Leukozyten Stimulation der Tendozyten

CP wird zwar hauptsächlich in der Leber synthetisiert (98), aber sowohl myeloische (99) als auch lymphatische Zellen (100) gehören zu den relevanten Quellen für das Protein C5. Das eine Spaltprodukt dieses Proteins, C5a ist als ein Chemotaxin in der Lage, neutrophile Granulozyten

(101), Makrophagen (26) und Mastzellen an den Entzündungsort anzulocken. D.h. es besteht nicht nur eine C5a Exposition der Tendozyten an einem Entzündungsort, sondern auch eine Anlockung der oben genannten Leukozyten-Subpopulation zu diesem Ort. Hier ist dadurch entweder ein direkter oder indirekter Kontakt der Leukozyten mit den Tendozyten zu erwarten.

Außer dem CS werden auch verschiedene pro- und anti-inflammatorische Zytokine wie TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-10, VEGF, TGF- β , MMPs (76, 77, 102) u.s.w. in den Tendozyten während der Sehnenheilung endogen exprimiert. TNF α ist einer der wichtigsten Entzündungsmediatoren, der unter verschiedenen Bedingungen wie Hitze (103), Entzündung (77) oder Verletzung durch mechanischer Beanspruchung in den Tendozyten (31) freigesetzt wird. In einem *in vitro* Versuch zeigte John et al., 2009, dass die GE des Kollagen Typ I, als wichtigster Baustein der EZM des Sehnen Gewebes, durch den Einfluss von TNF α beeinträchtigt wird (77). In dem gleichen Versuch wurde auch gezeigt, dass die GE des für den EZM Abbau in der Sehne relevanten Enzyms MMP-1 auch durch TNF α induziert wird. Dadurch übt TNF α eine katabole Wirkung auf die Sehnen EZM aus, die eine Degeneration des Sehnen Gewebes einleiten kann. TNF α fördert in Tendozyten wiederum eine autokrine Produktion von TNF α und führt dadurch zur Amplifikation der katabolen Wirkung auf das Sehnen Gewebe (77).

Vor diesem Hintergrund wurde mithilfe von TNF α im *in vitro* Leukozyten Ko-Kulturmodell eine katabole Stoffwechsellage in den humanen Sehnenzellen nachgebildet um den Einfluss von CS genauer zu analysieren. Die Größe der Poren (4 μ m) im Transwellsystem erlaubt einen Austausch von Mediatoren, aber nicht von Zellen. Die aktuellen Untersuchungen zeigten im Ko-Kulturmodell die auf der Membran adhärierenden Leukozyten, die oft Kontakt zu den Membranporen zeigten als Hinweis auf eine mögliche Kommunikation mit den Sehnenzellen.

Für den Versuch isolierte Zellpopulationen enthielten tatsächlich im Wesentlichen entweder Neutros oder PBMCs. Allerdings enthält die PBMC-Population, die aus der Interphase isoliert wurde, auch Thrombozyten, die wahrscheinlich für die beobachtete Clusterbildung verantwortlich waren. Es muss allerdings auch in Betracht gezogen werden, dass die Thrombozyten durchaus einen Einfluss bezüglich Komplementaktivierung (104), vermutlich auch in Tendozyten haben. Einige Wachstumsfaktoren werden beschrieben (105), die in den Thrombozyten produziert werden, die das Tendozyten Wachstum *in vitro* positiv beeinflussen.

Auch lassen die durchgeführten Vitalitätstest erkennen, dass die Leukozyten den Untersuchungszeitraum überleben. Wobei die Vitalität bei den Neutros im Vergleich zu den PBMCs stärker nachließ.

Dieses Ko-Kulturmodell ist bereits im lapinen autologen Ansatz für Sehnenzellen in der Arbeitsgruppe etabliert worden um den Einfluss von Leukozyten auf die Expression von

Zytokinen und EZM Komponenten zu analysieren (106). Es konnte in dieser zurückliegenden Studie eine signifikante Induktion von Zytokinen wie TNF α , IL-1 β , IL-6 sowie des Matrix abbauenden Enzyms MMP1 durch PBMCs beobachtet werden sowie eine Suppression der GE von Kollagen Typ I, dem lapinen Sehnenmarker Myodulin und β 1-Integrin durch Neutros in Kombination mit TNF α (106).

Die Leukozyten spielen sowohl in der Anfangsphase als auch in der späteren Phase des Heilungsprozesses eine wichtige Rolle mit der Synthese von etlichen Zytokinen. Allerdings wurde hier versucht den Einfluss von Leukozyten nur auf die Komplementregulation in Tendozyten in den Mittelpunkt zu stellen um dessen Effekt besser verstehen zu können. In der aktuellen Arbeit konnte man nach 4 h Stimulationszeit ein Muster in der GE von C5aR erkennen, in dem die Ko-Kultur der Tendozyten mit PBMCs und Neutros nur bei Präsenz von TNF α zum Trend einer gesteigerten C5aR GE zeigte. TNF α allein bewirkte allerdings eine signifikante Induktion der C5aR GE. Dieses Ergebnis bestätigt die pro-inflammatorische Wirkung von TNF α auf Tendozyten in Bezug auf eine C5aR Induktion. Diese gleiche Wirkung konnte auch *in vitro* in Bezug auf den C3aR in einer anderen Studie nachgewiesen werden (30). Zur Therapie einer rheumatoiden Arthritis wird Infliximab oder weitere TNF α Blocker in der Klinik verwendet. Bei der Therapie mit TNF α Blockern konnte man eine verminderte Komplementaktivierung sehen (107). Das zeigt, dass TNF α einen direkten Effekt auf die Komplementregulation hat.

Der exemplarische Versuch den Effekt der Stimulationen auf die C5aR Proteinsynthese nachzuweisen konnte allerdings keinen signifikanten Wert liefern. Nach 24 h Ko-Stimulationszeit der Tendozyten mit den Leukozyten ließ sich jedoch mit allen genannten Stimulationen einen Trend im Sinne einer Suppression der GE von C5aR erkennen. Besonders aber die Behandlung der PBMCs mit TNF α zeigte eine signifikante Suppression der C5aR GE. D.h. PBMCs in Kombination mit TNF α könnten einer C5aR-vermittelten Entzündung entgegenwirken, indem die C5aR GE unterdrückt wird.

Die GE von CD46 zeigte nach 4 h bei allen Stimulationen in Präsenz von TNF α im Trend einer Induktion. Im Gegensatz dazu führten Neutros ohne TNF α zu leichter Suppression in der GE von CD46. Da CD46 in der Synthese der C3-Konvertase eingreift, und die Komplementkaskadenverlauf abbremsen sollte, deren Suppression zugunsten einer Inflammation wirkt. Nach 24 h allerdings bewirkten PBMCs ohne TNF α den gleichen Effekt. Das zeigt, dass in Bezug auf das CRP CD46, die Leukozyten eine schädliche Wirkung auf die Tendozyten haben.

Interessanterweise führte die Stimulation mit Neutros mit und ohne TNF α zu einer Unterdrückung der CD55 GE nach 24 h, nach 4 h war jedoch noch kein Einfluss erkennbar. Die

Neutros sind also unabhängig von $\text{TNF}\alpha$ in der Lage die GE von CD55 zu unterdrücken, dieser Effekt könnte letztendlich wieder durch das Ausbleiben der C3 Konvertase zur Förderung der Komplementaktivierung führen.

Die Unterdrückung von der CD59 GE nach Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$, PBMCs, PBMCs mit $\text{TNF}\alpha$ und Neutros zeigte deren inflammatorischen sowie lytischen Einfluss in einem kürzeren Zeitpunkt von 4 h auf. Weniger Hemmung der MAC-Synthese kann dazu beitragen, dass die Tendozyten osmolytisch aufplatzen können. Eine weitere Abbremsung von AP kann hierdurch jedoch wahrscheinlich nicht beeinflusst werden. In der Lebend-Tot Färbung nach 24 h sind jedoch nur wenige tote Zellen und diese vor allem bei Kombination der Leukozyten-Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ erkennbar und damit ist kein Hinweis auf eine erhöhte Zellyse nachweisbar. Hier hätte evtl. ein späterer Zeitpunkt untersucht werden müssen. Da sich die toten Zellen ablösen, könnte hier auch eine Untersuchung des Zellüberstandes auf tote Zellen weiterhelfen oder ein direkter Nachweis des MAC mit einem gegen den bei der MAC Bildung entstehenden Neoepitop gerichteten Antikörper.

Eine therapeutische Inhibition von CP bietet interessante Ansatzpunkte für eine Hemmung von inflammatorischen Erkrankungen nicht nur im Zusammenhang mit Sepsis, sondern auch Multi-Organ-Versagen oder hyperakuter Transplantatabstoßung. Der Einsatz von Komplementfaktoren/-inhibitoren ist darüber hinaus bei allen entzündlichen Erkrankungen vorstellbar. Im Einsatz sind schon einige Therapeutika, die in bestimmten Stufen der Komplementkaskade an Proteinen gezielt hemmend oder fördernd angreifen (108). So wird zum Beispiel ein rekombinanter löslicher Komplement Rezeptor 1, rsCR1, der einen endogenen Mangel an C1-Esterase-Inhibitor (C1-INH) kompensieren soll, zur Therapie des hereditären Angioödems verwendet (109). Es gibt potentielle Therapieansätze, die die Verwendung von Antikörpern gegen die Aktivierung der Schlüsselproteine C3/C5, Blockierung der C3 Rezeptoren und Neutralisierung der AP umfassen sowie Therapieansätze mit dem Ziel einer Kompensation der CRPs CD46 und CD55 mit Hemmung der Bildung der C3-Konvertasen oder eine Protektion, die die MAC-Bildung verhindern soll. Diese Strategien sollen eine überschießende Abwehrreaktion des Systems unter Kontrolle halten. Eculizimab, ein C5 Antikörper, verhindert die Assemblierung des MAC, dadurch dass der C5 Komplex blockiert wird und keine Bausteine mehr zur Verfügung stehen. Diese Therapie von PNH und aHUS (110) ist ein gutes Beispiel für die Implikation des CS zur Therapie einer schwerwiegenden Erkrankung. In Bezug auf degenerative Erkrankungen konnte in einem Gelenkentzündungsmodell im Tier festgestellt werden, dass sowohl durch Blockierung eines C5aRs oder direkte Blockierung des C5 Moleküls

nicht nur der Synovitis bei einer Gelenkentzündung entgegengewirkt wurde, sondern auch der durch die Inflammation entstehende Knorpelschaden reduziert wurde (111).

6 Fazit und Ausblick

In dieser Arbeit wurde versucht die Bedeutung des AP C5a in einem Sehnenzellmodell zu definieren als Basis für eine zukünftige Entwicklung therapeutischer Strategien mit Wirkung am CS bei einer Sehnenpathologie.

Das AP C5a führt zu einer zeit- und konzentrationsabhängigen Antwort in den Tendozyten. Es ist erkennbar, dass die Tendozyten wahrscheinlich in der Lage sind in der akuten Phase d.h. 4 h und 24 h nach einer Entzündung durch Unterdrückung der GE des C5aR entgegen zu wirken. Die zytoprotektiven CRPs allerdings wurden auch zur späteren Zeit in ihrer GE unterdrückt. Eine exogene Zufuhr von diesen Proteinen könnte das CS abdämmen und ev. eine schnellere Genesung nach einer Sehnenruptur begünstigen. Allerdings muss hierbei beachtet werden, dass eine zu starke Hemmung des CS auch eine gefährliche Wirkung hat, die mit einer Immunschwäche einhergeht.

Im Ausblick auf weitere Versuche sollte man die Stimulation für längere Zeit durchführen um einen Langzeiteffekt zu verstehen. Da die Zellen im Monolayer bis 24 h weitgehend vital geblieben sind, wäre nun auch wichtig den Versuchsansatz auch in eine 3D-Kultur, die den natürlichen Verhältnissen der Sehne näher kommt, und ggf. in ein geeignetes *in vivo* Tiermodell zu transferieren.

Nach einer Sehnenruptur kommt das Sehngewebe in direkten und indirekten Kontakt mit den Blutzellen. Die in dieser Arbeit durchgeführten Ko-Kulturexperimente bezogen sich auf die indirekte Stimulation mithilfe eines Transwells und zeigten den durch die Mediatoren der Leukozyten vermittelten Einfluss auf die Tendozyten. Sowohl die PBMCs als auch die Neutros haben einen zeitabhängigen Einfluss auf die GE der untersuchten CPs C5aR und CRPs. TNF α hat einen aktivierenden Effekt auf das CS. Eine Kombination aus TNF α - und C5aR-Inhibition unter Berücksichtigung der CRP Regulation (112) kann als eine Therapiemöglichkeit zu einer schnelleren Genesung der Sehne nach einer Ruptur in Betracht gezogen werden. Da direkte Zell-Zellinteraktionen denkbar sind, sollte zukünftig auch in einem direkten Kokulturmodell weitergearbeitet werden.

Das CS umfasst inflammatorische und anti-inflammatorische Proteine, d.h. durchaus spielt möglicherweise jede Stufe in der Kaskade eine Rolle in der Entstehung und bei der Therapie einer Tendinopathie. Deswegen müssen nicht nur weitere Komplementkaskadenproteine untersucht werden, sondern auch die Wirkung der anderen löslichen und membranständigen regulatorischen Proteine und ihr Wechselspiel in Bezug auf eine denkbare Rolle in der Entstehung einer Tendinopathie überprüft werden.

7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
aHUS	Atypisches Hämolytisch-urämisches Syndrom
AK	Antikörper
ANOVA	Analysis of Variance (<i>engl.</i>)
AP	Anaphylatoxin
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor (<i>engl.</i>)
C3aR	C3a Rezeptor
C5aR	C5a Rezeptor
CD	Cluster of Differentiation (<i>engl.</i>)
cDNA	Complementary DNA (<i>engl.</i>)
CP	Complement Protein (<i>engl.</i>)
CRP	Complement Regulating Protein (<i>engl.</i>)
CS	Complement System (<i>engl.</i>)
Ct	Cycle threshold (<i>engl.</i>)
CTCF	Corrected total cell fluorescence (<i>engl.</i>)
DAF	Decay Accelerating Factor
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (<i>engl.</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EL-Puffer	Erythrozyten Lysis Puffer
FCS	Fetales Kälberserum
EZM	Extrazelluläre Matrix
FDA	Fluoresceindiacetat
GAG	Glykosaminoglykane
GPI	Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells (<i>engl.</i>)
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
IGF-1	Insulin like Growth Factor 1 (<i>engl.</i>)
IL	Interleukin
IVM	In vitro Verletzungsmodell

KM	Kulturmedium
LPS	Lipopolysaccharide
MAC	Membrane Attack Complex (<i>engl.</i>)
MBL	Mannose-bindende Lektin
MASP	MBL-assoziierte Serinprotease
MCP	Membrane Cofactor Protein (<i>engl.</i>)
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	Messenger RNA
Neutros	Neutrophile Granulozyten
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns (<i>engl.</i>)
PBS	Phosphate Buffered Saline (<i>engl.</i>)
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PCR	Polymerase chain reaction (<i>engl.</i>)
PDGF	Platelet Derived Growth Factor (<i>engl.</i>)
PG	Proteoglykane
PNH	Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie
PRR	Pattern Recognition Receptor (<i>engl.</i>)
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RTD	Real-Time Detection (<i>engl.</i>)
UNG	Uracil N-Glycosylase
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor α
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TGF β	Tumor Growth Faktor β
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor (<i>engl.</i>)

8 Literaturverzeichnis

1. Kannus P. Structure of the tendon connective tissue. *Scand J Med Sci Sports*. 2000;10(6):312-20.
2. Abrahamsson SO, Lundborg G, Lohmander LS. Segmental variation in microstructure, matrix synthesis and cell proliferation in rabbit flexor tendon. *Scandinavian journal of plastic and reconstructive surgery and hand surgery / Nordisk plastikkirurgisk forening [and] Nordisk klubb for handkirurgi*. 1989;23(3):191-8.
3. Waggett AD, Ralphs JR, Kwan AP, Woodnutt D, Benjamin M. Characterization of collagens and proteoglycans at the insertion of the human Achilles tendon. *Matrix Biol*. 1998;16(8):457-70.
4. Rees SG, Dent CM, Caterson B. Metabolism of proteoglycans in tendon. *Scand J Med Sci Sports*. 2009;19(4):470-8.
5. Rees SG, Flannery CR, Little CB, Hughes CE, Caterson B, Dent CM. Catabolism of aggrecan, decorin and biglycan in tendon. *Biochem J*. 2000;350 Pt 1:181-8.
6. Minor RR. Collagen metabolism: a comparison of diseases of collagen and diseases affecting collagen. *The American journal of pathology*. 1980;98(1):225-80.
7. Kvist M, Jozsa L, Jarvinen M, Kvist H. Fine structural alterations in chronic Achilles paratenonitis in athletes. *Pathol Res Pract*. 1985;180(4):416-23.
8. Schünke M. *Topografie und Funktion des Bewegungssystems: funktionelle Anatomie*: Georg Thieme Verlag; 2014.
9. Elliott DH. Structure and Function of Mammalian Tendon. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 1965;40:392-421.
10. Jozsa L, Kannus P, Balint JB, Reffy A. Three-dimensional ultrastructure of human tendons. *Acta Anat (Basel)*. 1991;142(4):306-12.
11. Löffler G. *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*, 3., vollst. überarb. Aufl, Berlin Heidelberg New York Barcelona Budapest Hongkong London Mailand Paris Singapur Tokio: Springer. 1999;97:665-73.
12. Rowe RW. The structure of rat tail tendon fascicles. *Connect Tissue Res*. 1985;14(1):21-30.
13. Shadwick RE. Elastic Energy-Storage in Tendons - Mechanical Differences Related to Function and Age. *J Appl Physiol*. 1990;68(3):1033-40.
14. Jozsa L, Kannus P. Histopathological findings in spontaneous tendon ruptures. *Scand J Med Sci Sports*. 1997;7(2):113-8.
15. Kannus P, Jozsa L. Histopathological changes preceding spontaneous rupture of a tendon. A controlled study of 891 patients. *J Bone Joint Surg Am*. 1991;73(10):1507-25.

16. Maffulli N, Khan KM, Puddu G. Overuse tendon conditions: time to change a confusing terminology. *Arthroscopy*. 1998;14(8):840-3.
17. Puddu G, Ippolito E, Postacchini F. A classification of Achilles tendon disease. *Am J Sports Med*. 1976;4(4):145-50.
18. Maffulli N, Sharma P, Luscombe KL. Achilles tendinopathy: aetiology and management. *J R Soc Med*. 2004;97(10):472-6.
19. Selvanetti A, Cipolla M, Puddu G. Overuse tendon injuries: basic science and classification. *Operative Techniques in Sports Medicine*. 1997;5(3):110-7.
20. Renstrom P, Woo SLY. Tendinopathy: a major medical problem in sport. *Tendinopathy in Athletes*. 2008:1-9.
21. Holmes GB, Lin J. Etiologic factors associated with symptomatic achilles tendinopathy. *Foot Ankle Int*. 2006;27(11):952-9.
22. Chhajed PN, Plit ML, Hopkins PM, Malouf MA, Glanville AR. Achilles tendon disease in lung transplant recipients: association with ciprofloxacin. *Eur Respir J*. 2002;19(3):469-71.
23. van der Linden PD, Sturkenboom MC, Herings RM, Leufkens HM, Rowlands S, Stricker BH. Increased risk of achilles tendon rupture with quinolone antibacterial use, especially in elderly patients taking oral corticosteroids. *Arch Intern Med*. 2003;163(15):1801-7.
24. Marie I, Delafenetre H, Massy N, Thuillez C, Noblet C, Network of the French Pharmacovigilance C. Tendinous disorders attributed to statins: a study on ninety-six spontaneous reports in the period 1990-2005 and review of the literature. *Arthritis Rheum*. 2008;59(3):367-72.
25. Woo SL, Hildebrand K, Watanabe N, Fenwick JA, Papageorgiou CD, Wang JH. Tissue engineering of ligament and tendon healing. *Clin Orthop Relat Res*. 1999(367 Suppl):S312-23.
26. Snyderman R, Pike MC, McCarley D, Lang L. Quantification of mouse macrophage chemotaxis in vitro: role of C5 for the production of chemotactic activity. *Infect Immun*. 1975;11(3):488-92.
27. Molloy T, Wang Y, Murrell G. The roles of growth factors in tendon and ligament healing. *Sports Med*. 2003;33(5):381-94.
28. Sharma P, Maffulli N. Current concepts review tendon injury and tendinopathy: Healing and repair. *J Bone Joint Surg Am*. 2005;87A(1):187-202.
29. Riley GP, Curry V, DeGroot J, van El B, Verzijl N, Hazleman BL, Bank RA. Matrix metalloproteinase activities and their relationship with collagen remodelling in tendon pathology. *Matrix Biol*. 2002;21(2):185-95.
30. Busch C, Girke G, Kohl B, Stoll C, Lemke M, Krasnici S, Ertel W, Silawal S, John T, Schulze-Tanzil G. Complement gene expression is regulated by pro-inflammatory cytokines and the anaphylatoxin C3a in human tenocytes. *Molecular immunology*. 2013;53(4):363-73.

31. Girke G, Kohl B, Busch C, John T, Godkin O, Ertel W, Schulze-Tanzil G. Tenocyte activation and regulation of complement factors in response to in vitro cell injury. *Molecular immunology*. 2014;60(1):14-22.
32. Barrington R, Zhang M, Fischer M, Carroll MC. The role of complement in inflammation and adaptive immunity. *Immunol Rev*. 2001;180:5-15.
33. Zhu Y, Thangamani S, Ho B, Ding JL. The ancient origin of the complement system. *Embo J*. 2005;24(2):382-94.
34. Gewurz H, Ying SC, Jiang H, Lint TF. Nonimmune activation of the classical complement pathway. *Behring Inst Mitt*. 1993(93):138-47.
35. Gasque P. Complement: a unique innate immune sensor for danger signals. *Molecular immunology*. 2004;41(11):1089-98.
36. Thurman JM, Holers VM. The central role of the alternative complement pathway in human disease. *J Immunol*. 2006;176(3):1305-10.
37. Fishelson Z, Attali G, Mevorach D. Complement and apoptosis. *Molecular immunology*. 2001;38(2-3):207-19.
38. Sjöberg A, Önnarfjord P, Mörgelin M, Heinegård D, Blom AM. The Extracellular Matrix and Inflammation fibromodulin activates the classical pathway of complement by directly binding C1q. *J Biol Chem*. 2005;280(37):32301-8.
39. Dahl MR, Thiel S, Matsushita M, Fujita T, Willis AC, Christensen T, Vorup-Jensen T, Jensenius JC. MASP-3 and its association with distinct complexes of the mannan-binding lectin complement activation pathway. *Immunity*. 2001;15(1):127-35.
40. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science*. 2002;296(5566):298-300.
41. Gal P, Barna L, Kocsis A, Zavodszky P. Serine proteases of the classical and lectin pathways: similarities and differences. *Immunobiology*. 2007;212(4-5):267-77.
42. Dunkelberger JR, Song WC. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell research*. 2010;20(1):34-50.
43. Liszewski MK, Atkinson J. Complement regulator CD46: genetic variants and disease associations. *Hum Genomics*. 2015;9(1):1-13.
44. Marder SR, Chenoweth DE, Goldstein IM, Perez HD. Chemotactic responses of human peripheral blood monocytes to the complement-derived peptides C5a and C5a des Arg. *J Immunol*. 1985;134(5):3325-31.
45. Ember JA, Hugli TE. Complement factors and their receptors. *Immunopharmacology*. 1997;38(1-2):3-15.
46. Schumacher WA, Fantone JC, Kunkel SE, Webb RC, Lucchesi BR. The anaphylatoxins C3a and C5a are vasodilators in the canine coronary vasculature in vitro and in vivo. *Agents Actions*. 1991;34(3-4):345-9.

47. Eglite S, Pluss K, Dahinden CA. Requirements for C5a receptor-mediated IL-4 and IL-13 production and leukotriene C4 generation in human basophils. *J Immunol.* 2000;165(4):2183-9.
48. Bischoff SC, de Weck AL, Dahinden CA. Interleukin 3 and granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor render human basophils responsive to low concentrations of complement component C3a. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(17):6813-7.
49. Haurand M, Flohe L. Leukotriene formation by human polymorphonuclear leukocytes from endogenous arachidonate. Physiological triggers and modulation by prostanoids. *Biochem Pharmacol.* 1989;38(13):2129-37.
50. Mollnes TE, Brekke OL, Fung M, Fure H, Christiansen D, Bergseth G, Videm V, Lappégard KT, Kohl J, Lambris JD. Essential role of the C5a receptor in E coli-induced oxidative burst and phagocytosis revealed by a novel lepirudin-based human whole blood model of inflammation. *Blood.* 2002;100(5):1869-77.
51. Goldstein IM, Weissmann G. Generation of C5-derived lysosomal enzyme-releasing activity (C5a) by lysates of leukocyte lysosomes. *J Immunol.* 1974;113(5):1583-8.
52. Riedemann NC, Guo R-F, Neff TA, Laudes IJ, Keller KA, Sarma VJ, Markiewski MM, Mastellos D, Strey CW, Pierson CL, Lambris JD, Zetoune FS, Ward PA. Increased C5a receptor expression in sepsis. *The Journal of Clinical Investigation.* 2002;110(1):101-8.
53. Ward PA, Riedemann NC, Guo R-f, Huber-lang M, Sarma JV, Zetoune FS. Anti-complement strategies in experimental sepsis. *Scandinavian journal of infectious diseases.* 2003;35(9):601-3.
54. Bao L, Gerard NP, Eddy RL, Jr., Shows TB, Gerard C. Mapping of genes for the human C5a receptor (C5AR), human FMLP receptor (FPR), and two FMLP receptor homologue orphan receptors (FPRH1, FPRH2) to chromosome 19. *Genomics.* 1992;13(2):437-40.
55. Laudes IJ, Chu JC, Huber-Lang M, Guo RF, Riedemann NC, Sarma JV, Mahdi F, Murphy HS, Speyer C, Lu KT, Lambris JD, Zetoune FS, Ward PA. Expression and function of C5a receptor in mouse microvascular endothelial cells. *J Immunol.* 2002;169(10):5962-70.
56. Niederbichler AD, Hoesel LM, Westfall MV, Gao H, Ipaktchi KR, Sun L, Zetoune FS, Su GL, Arbabi S, Sarma JV, Wang SC, Hemmila MR, Ward PA. An essential role for complement C5a in the pathogenesis of septic cardiac dysfunction. *J Exp Med.* 2006;203(1):53-61.
57. Gasque P, Singhrao SK, Neal JW, Gotze O, Morgan BP. Expression of the receptor for complement C5a (CD88) is up-regulated on reactive astrocytes, microglia, and endothelial cells in the inflamed human central nervous system. *The American journal of pathology.* 1997;150(1):31-41.
58. Zahedi R, Braun M, Wetsel RA, Ault BH, Khan A, Welch TR, Frenzke M, Davis AE. The C5a receptor is expressed by human renal proximal tubular epithelial cells. *Clinical and Experimental Immunology.* 2000;121(2):226-33.
59. Fayyazi A, Sandau R, Duong LQ, Gotze O, Radzun HJ, Schweyer S, Soruri A, Zwirner J. C5a receptor and interleukin-6 are expressed in tissue macrophages and stimulated keratinocytes

but not in pulmonary and intestinal epithelial cells. *The American journal of pathology*. 1999;154(2):495-501.

60. Braun M, Davis AE, 3rd. Cultured human glomerular mesangial cells express the C5a receptor. *Kidney international*. 1998;54(5):1542-9.

61. Schulze-Tanzil G, Kohl B, El Sayed K, Arens S, Ertel W, Stolzel K, John T. Anaphylatoxin receptors and complement regulatory proteins in human articular and non-articular chondrocytes: interrelation with cytokines. *Cell and tissue research*. 2012;350(3):465-75.

62. Haviland DL, McCoy RL, Whitehead WT, Akama H, Molmenti EP, Brown A, Haviland JC, Parks WC, Perlmutter DH, Wetsel RA. Cellular expression of the C5a anaphylatoxin receptor (C5aR): demonstration of C5aR on nonmyeloid cells of the liver and lung. *J Immunol*. 1995;154(4):1861-9.

63. Zwirner J, Fayyazi A, Gotze O. Expression of the anaphylatoxin C5a receptor in non-myeloid cells. *Molecular immunology*. 1999;36(13-14):877-84.

64. Ehrnthaller C, Ignatius A, Gebhard F, Huber-Lang M. New Insights of an Old Defense System: Structure, Function, and Clinical Relevance of the Complement System. *Mol Med*. 2011;17(3-4):317-29.

65. Richards A, Kemp EJ, Liszewski MK, Goodship JA, Lampe AK, Decorte R, Muslumanoglu MH, Kavukcu S, Filler G, Pirson Y, Wen LS, Atkinson JP, Goodship TH. Mutations in human complement regulator, membrane cofactor protein (CD46), predispose to development of familial hemolytic uremic syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(22):12966-71.

66. Cardone J, Le Fric G, Kemper C. CD46 in innate and adaptive immunity: an update. *Clin Exp Immunol*. 2011;164(3):301-11.

67. Cattaneo R. Four viruses, two bacteria, and one receptor: membrane cofactor protein (CD46) as pathogens' magnet. *J Virol*. 2004;78(9):4385-8.

68. Lublin DM, Atkinson JP. Decay-accelerating factor: biochemistry, molecular biology, and function. *Annu Rev Immunol*. 1989;7:35-58.

69. Brodsky RA. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 2014;124(18):2804-11.

70. Castell JV, Gomez-Lechon MJ, David M, Andus T, Geiger T, Trullenque R, Fabra R, Heinrich PC. Interleukin-6 is the major regulator of acute phase protein synthesis in adult human hepatocytes. *Febs Lett*. 1989;242(2):237-9.

71. Männel D, Moore R, Mergenhagen S. Macrophages as a source of tumoricidal activity (tumor-necrotizing factor). *Infect Immun*. 1980;30(2):523-30.

72. Steffen M, Ottmann O, Moore M. Simultaneous production of tumor necrosis factor-alpha and lymphotoxin by normal T cells after induction with IL-2 and anti-T3. *The Journal of Immunology*. 1988;140(8):2621-4.

73. Sung SS, Jung LK, Walters JA, Chen W, Wang CY, Fu SM. Production of tumor necrosis factor/cachectin by human B cell lines and tonsillar B cells. *J Exp Med.* 1988;168(5):1539-51.
74. Gordon JR, Galli SJ. Mast cells as a source of both preformed and immunologically inducible TNF-[alpha]/cachectin. *Nature.* 1990;346(6281):274-6.
75. Gowen M, Chapman K, Littlewood A, Hughes D, Evans D, Russell G. Production of tumor necrosis factor by human osteoblasts is modulated by other cytokines, but not by osteotropic hormones. *Endocrinology.* 1990;126(2):1250-5.
76. Tsuzaki M, Guyton G, Garrett W, Archambault JM, Herzog W, Almekinders L, Bynum D, Yang X, Banes AJ. 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.* 2003;21(2):256-64.
77. John T, Lodka D, Kohl B, Ertel W, Jammrath J, Conrad C, Stoll C, Busch C, Schulze-Tanzil G. Effect of pro-inflammatory and immunoregulatory cytokines on human tenocytes. *J Orthop Res.* 2010;28(8):1071-7.
78. Zhaowei J, D'Souza MJ, Oettinger CW. Reversal of LPS induced endothelial cell TNF synthesis and increased permeability with microencapsulated antisense oligomers to NF- κ B. *Journal of microencapsulation.* 2007;24(6):596-607.
79. Hosaka Y, Kirisawa R, Ueda H, Yamaguchi M, Takehana K. 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.* 2005;67(10):985-91.
80. Schulze-Tanzil G, Al-Sadi O, Wiegand E, Ertel W, Busch C, Kohl B, Pufe T. The role of pro-inflammatory and immunoregulatory cytokines in tendon healing and rupture: new insights. *Scand J Med Sci Spor.* 2011;21(3):337-51.
81. Hosaka Y, Sakamoto Y, Kirisawa R, Watanabe T, Ueda H, Takehana K, Yamaguchi M. Distribution of TNF receptors and TNF receptor-associated intracellular signaling factors on equine tendinocytes in vitro. *Jpn J Vet Res.* 2004;52(3):135-44.
82. Ehrenguber MU, Geiser T, Deranleau DA. Activation of human neutrophils by C3a and C5A. Comparison of the effects on shape changes, chemotaxis, secretion, and respiratory burst. *Febs Lett.* 1994;346(2-3):181-4.
83. Schild T. Einführung in die Real-Time TaqMan PCR-Technologie Version 2.1. *Applied Biosystems Handbooks.* 1996.
84. Pfaffl MW. Quantification strategies in real-time PCR. *AZ of quantitative PCR.* 2004;1:89-113.
85. McCloy RA, Rogers S, Caldon CE, Lorca T, Castro A, Burgess A. Partial inhibition of Cdk1 in G2 phase overrides the SAC and decouples mitotic events. *Cell Cycle.* 2014;13(9):1400-12.
86. Damas P, Reuter A, Gysen P, Demonty J, Lamy M, Franchimont P. Tumor Necrosis Factor and Interleukin-1 Serum Levels during Severe Sepsis in Humans. *Crit Care Med.* 1989;17(10):975-8.

87. Alfredson H, Pietilä T, Jonsson P, Lorentzon R. Heavy-load eccentric calf muscle training for the treatment of chronic Achilles tendinosis. *The American journal of sports medicine*. 1998;26(3):360-6.
88. Riley G. Tendinopathy--from basic science to treatment. *Nat Clin Pract Rheumatol*. 2008;4(2):82-9.
89. Ohta R, Torii Y, Imai M, Kimura H, Okada N, Ito Y. Serum concentrations of complement anaphylatoxins and proinflammatory mediators in patients with 2009 H1N1 influenza. *Microbiol Immunol*. 2011;55(3):191-8.
90. Gressner OA, Koch A, Sanson E, Trautwein C, Tacke F. High C5a levels are associated with increased mortality in sepsis patients--no enhancing effect by actin-free Gc-globulin. *Clin Biochem*. 2008;41(12):974-80.
91. Wetsel RA. Structure, function and cellular expression of complement anaphylatoxin receptors. *Curr Opin Immunol*. 1995;7(1):48-53.
92. Cavaillon JM, Fitting C, Haeffner-Cavaillon N. Recombinant C5a enhances interleukin 1 and tumor necrosis factor release by lipopolysaccharide-stimulated monocytes and macrophages. *European journal of immunology*. 1990;20(2):253-7.
93. Monsinjon T, Gasque P, Chan P, Ischenko A, Brady JJ, Fontaine MC. Regulation by complement C3a and C5a anaphylatoxins of cytokine production in human umbilical vein endothelial cells. *FASEB J*. 2003;17(9):1003-14.
94. Stahel PF, Frei K, Eugster HP, Fontana A, Hummel KM, Wetsel RA, Ames RS, Barnum SR. TNF-alpha-mediated expression of the receptor for anaphylatoxin C5a on neurons in experimental *Listeria meningoenzephalitis*. *The Journal of Immunology*. 1997;159(2):861-9.
95. Bokisch VA, Muller-Eberhard HJ. Anaphylatoxin inactivator of human plasma: its isolation and characterization as a carboxypeptidase. *J Clin Invest*. 1970;49(12):2427-36.
96. Oppermann M, Gotze O. Plasma clearance of the human C5a anaphylatoxin by binding to leucocyte C5a receptors. *Immunology*. 1994;82(4):516-21.
97. Swerlick RA, Yancey KB, Lawley TJ. A direct in vivo comparison of the inflammatory properties of human C5a and C5a des Arg in human skin. *The Journal of Immunology*. 1988;140(7):2376-81.
98. Ramadori G, Rasokat H, Burger R, Meyer Zum Buschenfelde KH, Bitter-Suermann D. Quantitative determination of complement components produced by purified hepatocytes. *Clin Exp Immunol*. 1984;55(1):189-96.
99. Hetland G, Johnson E, Falk RJ, Eskeland T. Synthesis of complement components C5, C6, C7, C8 and C9 in vitro by human monocytes and assembly of the terminal complement complex. *Scand J Immunol*. 1986;24(4):421-8.
100. Kwan WH, van der Touw W, Heeger PS. Complement regulation of T cell immunity. *Immunologic research*. 2012;54(1-3):247-53.

101. Snyderman R, Phillips J, Mergenhagen SE. Polymorphonuclear leukocyte chemotactic activity in rabbit serum and Guinea pig serum treated with immune complexes: evidence for c5a as the major chemotactic factor. *Infect Immun.* 1970;1(6):521-5.
102. Pufe T, Petersen W, Tillmann B, Mentlein R. The angiogenic peptide vascular endothelial growth factor is expressed in foetal and ruptured tendons. *Virchows Arch.* 2001;439(4):579-85.
103. Hosaka Y, Ozoe S, Kirisawa R, Ueda H, Takehana K, Yamaguchi M. Effect of heat on synthesis of gelatinases and pro-inflammatory cytokines in equine tendinocytes. *Biomed Res.* 2006;27(5):233-41.
104. Peerschke EIB, Yin W, Ghebrehiwet B. Platelet Mediated Complement Activation. *Advances in experimental medicine and biology.* 2008;632:81-91.
105. Arslan E, Nellesen T, Bayer A, Prescher A, Lippross S, Nebelung S, Jahr H, Jaeger C, Huebner WD, Fischer H, Stoffel M, Shakibaei M, Pufe T, Tohidnezhad M. Effect of platelet mediator concentrate (PMC) on Achilles tenocytes: an in vitro study. *BMC Musculoskelet Disord.* 2016;17:307.
106. Al-Sadi O, Schulze-Tanzil G, Kohl B, Lohan A, Lemke M, Ertel W, John T. Tenocytes, pro-inflammatory cytokines and leukocytes: a relationship? *Muscles, Ligaments and Tendons Journal.* 2011;1(3):68-76.
107. Familian A, Voskuyl AE, van Mierlo GJ, Heijst HA, Twisk JW, Dijkmans BA, Hack CE. Infliximab treatment reduces complement activation in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2005;64(7):1003-8.
108. Ricklin D, Lambris JD. Complement-targeted therapeutics. *Nat Biotechnol.* 2007;25(11):1265-75.
109. Caliezi C, Wuillemin WA, Zeerleder S, Redondo M, Eisele B, Hack CE. C1-Esterase Inhibitor: An Anti-Inflammatory Agent and Its Potential Use in the Treatment of Diseases Other Than Hereditary Angioedema. *Pharmacological Reviews.* 2000;52(1):91-112.
110. Christmann M, Hansen M, Bergmann C, Schwabe D, Brand J, Schneider W. Eculizumab as first-line therapy for atypical hemolytic uremic syndrome. *Pediatrics.* 2014;133(6):e1759-63.
111. Lee H, Zahra D, Vogelzang A, Newton R, Thatcher J, Quan A, So T, Zwirner J, Koentgen F, Padkjaer SB, Mackay F, Whitfeld PL, Mackay CR. Human C5aR knock-in mice facilitate the production and assessment of anti-inflammatory monoclonal antibodies. *Nat Biotechnol.* 2006;24(10):1279-84.
112. Ballanti E, Perricone C, di Muzio G, Kroegler B, Chimenti MS, Graceffa D, Perricone R. Role of the complement system in rheumatoid arthritis and psoriatic arthritis: relationship with anti-TNF inhibitors. *Autoimmunity reviews.* 2011;10(10):617-23.

Lebenslauf

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

Publikationsverzeichnis

Publikationen in Zeitschriften mit peer-review

Busch C, Girke G, Kohl B, Stoll C, Lemke M, Krasnici S, Ertel W, **Silawal S**, John T, Schulze-Tanzil G. Complement gene expression is regulated by pro-inflammatory cytokines and the anaphylatoxin C3a in human tenocytes. Mol Immunol. 2013 53(4):363-73. (original research article)

Beiträge zu wissenschaftlichen Veranstaltungen

Posterpräsentation: 109. Jahrestagung der Anatomischen Gesellschaft, Salzburg, 26.09.2014, **Regulation of complement system in tenocytes by stimulation with recombinant C5a-protein and by co-culture with leukocytes.**

Posterpräsentation: Science Get-together, Klinikum Nürnberg, 3.07.2015, **Regulation of complement system in tenocytes by stimulation with recombinant C5a-protein and by co-culture with leukocytes.**

Vortrag Forschungsworkshop, Klinikum Nürnberg, 11.05.2016, **Komplementregulation in Sehnenzellen, vermittelt durch das Anaphylatoxin C5a und Leukozyten – im Hinblick auf Sehnenpathologien.**

Nürnberg, den 17.02.2017

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Silawal Sandeep, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „*Komplementregulation in Sehnenzellen, vermittelt durch das Anaphylatoxin C5a und Leukozyten*“ 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 dem/der Betreuer/in, 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.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an der erfolgten Publikation

Publikation:

Busch, C., G. Girke, B. Kohl, C. Stoll, M. Lemke, S. Krasnici, W. Ertel, **S. Silawal**, T. John and G. Schulze-Tanzil (2013). "Complement gene expression is regulated by pro-inflammatory cytokines and the anaphylatoxin C3a in human tenocytes." Mol Immunol **53**(4): 363-373.

Beitrag im Einzelnen:

Ich, Sandeep Silawal habe im Einzelnen sowohl an der Analyse der Ergebnisse für das Manuskript mitgewirkt als auch bei Erstellen und Korrektur der Arbeit mitgearbeitet. Damit habe ich mit ca. 8% für die gesamte Arbeit meinen Beitrag geleistet.

Unterschrift

Danksagung

Zum Abschluss meiner Dissertation möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Lehrerin, Kollegin, Betreuerin und Chefin, Frau Univ.-Prof. Dr. med. vet. Gundula Schulze-Tanzil bedanken. Du hast mich all die Jahre dabei unterstützt, mich sowohl fachlich als auch meine Persönlichkeit weiter zu entwickeln. Vielen Dank vor allem für Dein Vertrauen.

Außerdem möchte ich mich bei Dir, Herrn Benjamin Kohl, für Deine kompetente Unterstützung und gute Laune im Labor bedanken. Ich konnte viel von Dir lernen. Ebenso bei Herrn Dr. Tobias Schneider, Du hast mich nicht nur in Berlin, sondern auch in Nürnberg fachlich beraten. Mit Dir habe ich nicht nur einen kompetenten Kollegen, sondern auch einen guten Freund gewonnen.

Bei Frau Marion Lemke und Frau Carola Meier bedanke ich mich auch ganz herzlich für die tolle Unterstützung im Labor. Dem Ärzte-Team der Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie, Charité CBF möchte ich mich für die Probenasservierung bedanken. Darüber hinaus bedanke ich mich beim Team des Instituts für Anatomie, Abteilung Nürnberg der Paracelsus Medizinische Privatuniversität für die tolle Arbeitsatmosphäre.

Vor allem möchte ich mich bei meiner Mutter, Frau Pampha Silawal, bedanken für alles, was ich im Leben erreicht habe. Diese Arbeit widme ich Dir. In ewiger Dankbarkeit.