

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

DISSERTATION

**Interaktion zwischen Tendozyten und aus dem peripheren Blut  
stammenden autologen Leukozyten vor dem Hintergrund der  
Sehnenheilung**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Onays Al-Sadi

aus Berlin

Gutachter/in: 1. PD Dr. med. vet. Gundula Schulze Tanzil

2. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Thomas Pufe

3. Univ.-Prof. Dr. Carsten Staszky

**Datum der Promotion: 23.06.2013**

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Die Sehne</b>	<b>1</b>
<b>1.1.1 Struktureller Aufbau der Sehne</b>	<b>3</b>
1.1.2 Zelluläre Bestandteile der Sehne	5
1.1.3 Extrazellulärmatrix	6
1.1.4 Vaskularisierung und Innervation der Sehne	8
1.1.5 Die Sehnenpathologie	9
1.1.6 Die Sehnenheilung	12
<b>1.2 Zytokine</b>	<b>14</b>
1.2.1 Tumor-Nekrose-Faktor $\alpha$ (TNF $\alpha$ )	15
1.2.2 Interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )	17
1.2.3 Interleukin-6 (IL-6)	17
<b>1.3 Apoptose</b>	<b>20</b>
<b>1.4 Zielstellung</b>	<b>23</b>
<b>2. METHODEN</b>	<b>24</b>
<b>2.1 Zellkulturexperimente mit Sehnenzellen</b>	<b>24</b>
2.1.1 Isolierung und Kultivierung lapiner Tendozyten	24
2.1.2 Isolierung lapiner Leukozyten	25
2.1.3 Zellzählung	26
2.1.4 Kryokonservierung von Tendozyten und Leukozyten	26
2.1.5 Auftauen von Tendozyten, PBMCs und Neutrophilen	26
2.1.6 Beschichtung von Glasplättchen mit Poly-L-Lysin	27
2.1.7 Immunfluoreszenzmarkierung	27
2.1.8 Haematoxilin-Färbung	27
2.1.9 Ko-Kultur im Transwellssystem	28
<b>2.2 Genexpressionsanalysen</b>	<b>28</b>
2.2.1 RNA-Isolierung	28
2.2.2 Bestimmung der RNA-Konzentration	29
2.2.3 cDNA-Synthese	30
2.2.4 Die Standard-PCR	30
<b>2.2.5 Semi-quantitative Real-Time-PCR</b>	<b>31</b>
<b>2.3 Western Blot und Caspase-3/7-Assay</b>	<b>38</b>
2.3.1 Proteinisolierung aus Tendozyten	38
2.3.2 Proteinbestimmung nach Bradford	38
2.3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	39
2.3.4 Western Blot	41
2.3.5 Caspase-3/7-Assay	41
<b>2.4 TUNEL-Assay</b>	<b>42</b>
<b>2.5 Statistik</b>	<b>42</b>
<b>2.6 Richtlinien</b>	<b>42</b>
<b>3. ERGEBNISSE</b>	<b>43</b>

<b>3.1 Tendozyten- und Leukozytencharakterisierung in der Kultur</b>	<b>43</b>
<b>3.2 Validierung der zur Amplifikation von lapinen Tendozyten cDNA genutzten Primer</b>	<b>44</b>
<b>3.3 Effizienzbestimmung</b>	<b>46</b>
<b>3.4 Analysen der Genexpression von Zytokinen, dem ECM-Rezeptor <math>\beta</math>1-Integrin, Myodulin, extrazellulären Matrix-Proteinen und MMP1 in lapinen Tendozyten</b>	<b>48</b>
3.4.1 Genexpression von Zytokinen in autologen Tendozyten, stimuliert mit Leukozyten	48
3.4.2 Genexpression des Angiogenesefaktors Myodulin und des Zell-Matrix- Rezeptors $\beta$ 1-Integrin in autologen Tendozyten, stimuliert mit Leukozyten	49
3.4.3 Genexpression von Matrixkomponenten und MMP1 in autologen Tendozyten, stimuliert mit Leukozyten	50
<b>3.5 Exemplarische Analyse der Genexpression von Zytokinen und extrazellulären Matrixproteinen in humanen Hamstringsehnen</b>	<b>51</b>
3.5.1 Zytokin-Genexpression in Tendozyten aus humanen Hamstringsehnen, stimuliert mit PBMCs	51
3.5.2 Genexpression von Matrixkomponenten und MMP1 in humanen Hamstringsehnenzellen, stimuliert mit PBMCs	52
<b>3.6 Western Blot-Analyse für die <math>\beta</math>1-Integrin- und MMP1-Proteinexpression</b>	<b>53</b>
<b>3.7 Ergebnisse der Zellvitalitätsprüfung und des Zelluntergangs mittels TUNEL-Assay und Caspase-3/7-Assay</b>	<b>55</b>
<b>4. DISKUSSION</b>	<b>56</b>
<b>5. AUSBLICK</b>	<b>68</b>
<b>6. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>69</b>
<b>7. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>70</b>
<b>8. ANHANG</b>	<b>77</b>
8.1 Materialien	77
8.2 Zellkultur- und Versuchsmaterialien	78
8.3 Medien und Puffer	78
8.4 Zytokin, Antikörper und Primer	80
8.5 Kits	81
8.6 Geräte und Auswertungsprogramme	81
8.7 Abkürzungen	83
<b>9. DANKSAGUNG</b>	<b>85</b>
<b>10. EIDESTÄTTLICHE ERKLÄRUNG</b>	<b>86</b>
<b>11. LEBENS LAUF</b>	<b>87</b>
<b>12. WISSENSCHAFTLICHE ARBEITEN</b>	<b>89</b>

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1</b>	Sehne im Längs- und Querschnitt	<b>2</b>
<b>Abbildung 2</b>	Hierarchischer Aufbau der Sehne	<b>4</b>
<b>Abbildung 3</b>	Zusammensetzung der Sehne	<b>8</b>
<b>Abbildung 4</b>	Rupturkallus einer lapinen Achillessehne im Vergleich zur gesunden Sehne	<b>12</b>
<b>Abbildung 5</b>	Schematische Darstellung der Wundheilungsphasen einer rupturierten Sehne	<b>14</b>
<b>Abbildung 6</b>	TNF $\alpha$ -Signalkaskade	<b>16</b>
<b>Abbildung 7</b>	IL-6-Signalkaskade	<b>19</b>
<b>Abbildung 8</b>	Stark vereinfachte Darstellung des extrinsischen und intrinsischen Aktivierungswegs der Apoptose	<b>22</b>
<b>Abbildung 9</b>	Der RNA Nano LabChip von Agilent Technologies	<b>30</b>
<b>Abbildung 10</b>	QuantiTect $\text{\textcircled{R}}$ Probe Prinzip in der RT-PCR	<b>33</b>
<b>Abbildung 11</b>	TaqMan $\text{\textcircled{R}}$ Prinzip in der RT-PCR	<b>34</b>
<b>Abbildung 12</b>	HE Färbungen der lapinen Sehne und für die Ko-Kulturen verwendeter Zellen	<b>43</b>
<b>Abbildung 13</b>	Immunzytochemische Färbungen zur Charakterisierung der Sehnenzellen	<b>44</b>
<b>Abbildung 14</b>	Agarosegelelektrophorese zur Charakterisierung von PCR-Amplifikaten	<b>45</b>
<b>Abbildung 15</b>	Primereffizienzbestimmung	<b>46</b>
<b>Abbildung 16</b>	Genexpression von IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ und IL-6	<b>49</b>
<b>Abbildung 17</b>	Genexpression von Myodulin und $\beta$ 1-Integrin	<b>50</b>
<b>Abbildung 18</b>	Genexpression von Komponenten der extrazellulären Sehnenmatrix	<b>50</b>
<b>Abbildung 19</b>	Genexpression von Zytokinen in Ko-/Kulturen humaner Tendozyten	<b>52</b>
<b>Abbildung 20</b>	Genexpression von Matrixkomponenten und MMP1 in Ko-/Kulturen humaner Tendozyten	<b>53</b>
<b>Abbildung 21</b>	Proteinexpressionsanalysen für $\beta$ 1-Integrin und MMP1	<b>54</b>
<b>Abbildung 22</b>	TUNEL-Assay	<b>55</b>
<b>Abbildung 23</b>	Caspase-3/7-Assay	<b>55</b>

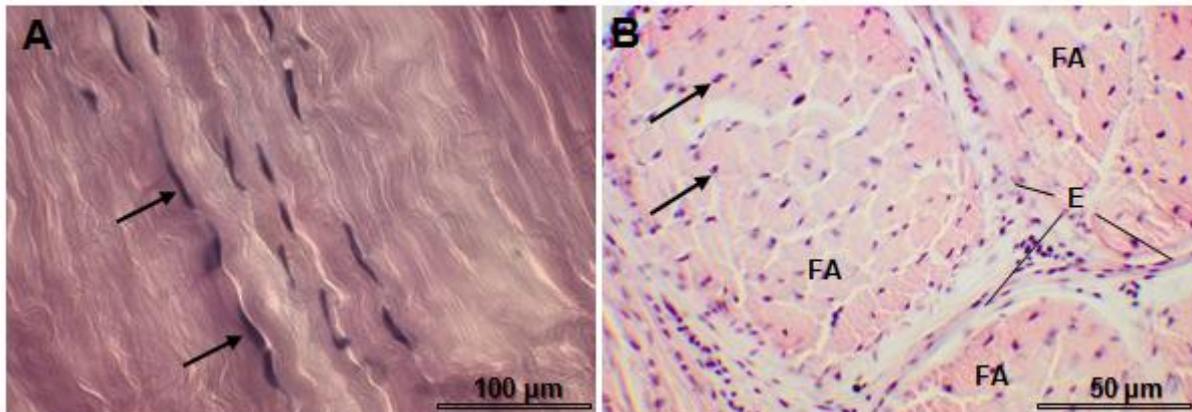
## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1</b>	Temperaturprogramm für das Qiagen-System	<b>36</b>
<b>Tabelle 2</b>	Temperaturprogramm für das ABI-System	<b>36</b>
<b>Tabelle 3</b>	Temperaturprogramm für die kombinierten Programme	<b>36</b>
<b>Tabelle 4</b>	Pipettierschema für die Primer von Qiagen und ABI	<b>37</b>
<b>Tabelle 5</b>	Zusammensetzung verwendeter Polyacrylamidgele	<b>40</b>
<b>Tabelle 6</b>	Primereffizienzen	<b>47</b>
<b>Tabelle 7</b>	Verwendete Primer von Qiagen und Applied Biosystems	<b>80</b>

## 1. Einleitung

### 1.1 Die Sehne

Sehnen werden wie Knochen und Knorpel histologisch dem Binde- und Stützgewebe zugeordnet. Sie bestehen aus ortständigen Zellen (Tendozyten) und einer Extrazellulärmatrix (EZM), in die besonders kollagene Fasern vom Typ I eingelagert sind, die der Sehne ihre Zugfestigkeit verleihen. Beim gesunden Sehngewebe handelt es sich typischerweise um weißlich-glänzendes straffes, parallelfaseriges Bindegewebe, welches die Muskulatur mit dem Knochen verbindet. Auf diese Art und Weise kann die vom Muskel aufgebrachte Kraft auf den Knochen übertragen werden, so dass im Gelenk Bewegung entstehen kann [1-4]. Dabei wirken bei den funktionell-dynamischen Bewegungsabläufen Zug-, Scher- und Rotationskräfte auf das Gewebe ein, die durch die dreidimensionale Ultrastruktur der Sehnen, die im wesentlichen aus Kollagen, Elastin, Proteoglykanen (PG) und anorganischen Komponenten bestehen, kompensiert werden [2]. Insbesondere die hohe Zugfestigkeit ist für die mechanische Stabilität entscheidend, neben der jedoch auch elastische Eigenschaften bestehen, die der Sehne lichtmikroskopisch in Ruhe eine Wellenform verleihen. Diese Wellenform dient als funktionelle Dehnungsreserve bei abrupten Muskelkontraktionen und überträgt so die Muskelkraft dynamisch auf den Knochen, was wesentlich zu einem flüssigen Bewegungsablauf beiträgt.



**Abbildung 1: Sehne im Längs- und Querschnitt.** A Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung eines Längsschnittes einer humanen Hamstringsehne (*M. semitendinosus*). **A** Longitudinaler Schnitt einer Hamstringsehne in der HE-Färbung. Zu sehen ist eine wellenförmige Anordnung der Kollagenfasern (rot-violett) im Ruhezustand. Längs zum Verlauf der Kollagenfasern liegen die Sehnenzellen. Sie sind anhand ihrer dunkel gefärbten Zellkerne (Pfeile) erkennbar. **B** Gezeigt ist ein HE-gefärbter transversaler Schnitt durch eine Rattenschwanzsehne. Die Kollagenfasern sind in Sekundärbündeln (FA: Faszikel), welche durch ein Endotendineum (E) umgeben sind, angeordnet. In den Sekundärbündeln lassen sich die Kerne der Sehnenzellen erkennen (Pfeile). Quelle: Schulze-Tanzil et al., 2011; AG Bioreconstruction [5].

Bei einer Dehnung von bis zu 4 % ermöglichen die elastischen Elemente des Sehngewebes eine reversible Dehnbarkeit. Diese Fähigkeit bezeichnet man als Viskoelastizität. Eine Dehnung von über 4 % kann in den Kollagenfasern zu Mikrorupturen führen, wodurch das Gewebe sich plastisch verformt. Wird eine akute Überdehnung der Sehne herbeigeführt, die zu einer Verlängerung von mindestens 8 % führt, kann die Sehne reißen [6, 7].

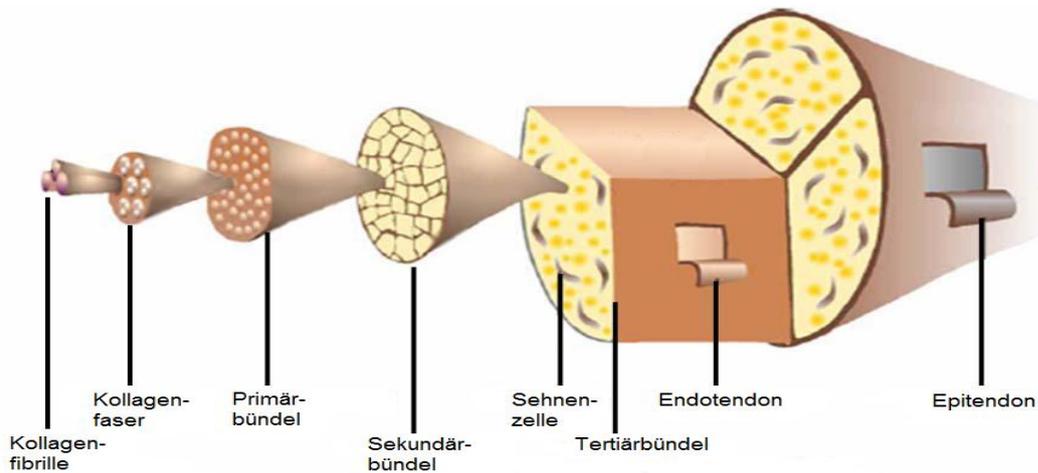
In ihrer Form und Ausprägung können sich die Sehnen des Körpers erheblich stark voneinander unterscheiden. Die jeweiligen auf die Sehne einwirkenden Kräfte können morphologische Unterschiede entstehen lassen, von flachen und breiten über zylindrisch-fächerartigen, bis hin zu bandartigen Sehnen. Die Verbindung der Sehne zum Muskel wird als myotendinöser Übergang bezeichnet, wobei jeder Muskel über mindestens eine proximal gelegene Ursprungssehne und eine distal gelegene Insertionssehne verfügt. Am Übergang der Sehne zum Knochen, dem osteotendinösen Übergang (Enthesis), inseriert die Sehne entweder an der Knochenhaut (Periost) oder zieht über Sharpeysche-Fasern (mineralisierte Kollagenfasern) zu ihrer apophysären Ansatzzone am Knochen. Innerhalb dieser Enthesis sowie in Bereichen erhöhter Druckbelastung finden sich Komponenten der EZM des Knorpels in der Sehne [8]. Mit Synovialflüssigkeit gefüllte Sehnenscheiden

und Schleimbeutel (*Bursae*) sollen die Sehne vor Reibung und Kompressionskräften schützen [2, 9] sowie die Tendozyten ernähren [7, 10].

Beim Sehnengewebe handelt es sich grundsätzlich um spärlich innerviertes und *bradytrophes* Gewebe (stoffwechselarmes Gewebe) mit einer nur geringen Kapillarversorgung. Die Ernährung des Sehnengewebes erfolgt meist durch Diffusion der Gewebsflüssigkeiten [1]. Unterschiedliche physiologische Belastungsmuster in den einzelnen Gelenken und alter- oder medikamentenbedingte biomechanische Veränderungen in der Sehne können tiefgreifende Umbauprozesse generieren, die eine Sehnenverletzung, wie zum Beispiel eine Ruptur, begünstigen. Eine grundlegende Kenntnis vom Aufbau und der Funktion der Sehne sowie der extrazellulären Matrix (EZM) ist daher wichtig, um die Pathogenese, den Heilungsprozess sowie die Behandlungsmöglichkeiten besser verstehen zu können.

### **1.1.1 Struktureller Aufbau der Sehne**

Um der funktionell periodisch hohen Zugbelastung entsprechen zu können, besitzt die Sehne einen hierarchischen Aufbau aus immer größer werdenden Baueinheiten (Primär-, Sekundär-, Tertiärbündel). Die kleinste strukturelle Einheit ist die Kollagenfibrille, die einen Durchmesser von 20 - 150 nm aufweist und hauptsächlich aus Kollagen Typ I besteht [2, 11, 12]. Die Kollagenfibrillen schließen sich zu Kollagenfasern zusammen und bilden die sog. Primärbündel oder Subfaszikel. Mehrere Primärbündel lagern sich zu einem Sekundärbündel (Faszikel) zusammen. Tertiärbündel wiederum entstehen durch den Zusammenschluss der Sekundärbündel und setzen sich zur eigentlichen Sehne zusammen. Innerhalb der Tertiärbündel sind die Tendozyten oder Flügelzellen eingebettet, die neben dem Kollagen Typ I auch alle anderen Bestandteile der EZM synthetisieren.



**Abbildung 2: Hierarchischer Aufbau der Sehne.** Ausgehend von einzelnen Kollagenfibrillen lagern sich die Kollagenfasern zu Primärbündeln zusammen. Die Primärbündel formieren sich zu Sekundärbündeln, die ihrerseits in Tertiärbündel organisiert sind. Die Primär-, Sekundär- und Tertiärbündel werden vom Endotendoneum (Synonym: Endotendon) umgeben. Das Epitendoneum (Synonym: Ependon) umgibt schließlich die von Tertiärbündeln gebildete Sehne. Quelle: modifiziert nach Hoffmann A. (2007) und Sharma P. (2005) [4, 13].

Die Tertiärbündel werden von einer feinen äußeren Bindegewebshülle, dem Epitendoneum, umgeben. Das Epitendoneum steht mit einer zweiten, in der Tiefe liegenden Bindegewebshülle, dem Endotendoneum, in Verbindung [1, 2, 11]. Das Epitendoneum erfüllt zwei wesentliche Aufgaben. Zum einen umhüllt es die einzelnen Kollagenfasern, die Primär-, Sekundär- und Tertiärbündel und ermöglicht den einzelnen Fasern übereinander zu gleiten und zum anderen beinhaltet das Endotendoneum wie auch das Epitendoneum Blut- und Lymphgefäße sowie Nerven [2, 13]. An der Außenseite des Epitendoneums verhaftet sich das Paratendoneum, eine weitere Bindegewebshülle, die die Sehne an das umgebende Gewebe anbindet. Um die bei der Bewegung entstehende Reibung zu minimieren, befindet sich zwischen den Bindegewebshüllen eine mukopolysaccharidreiche Flüssigkeit [14]. Aufgrund der hohen mechanischen Beanspruchung schützen die Sehnen von Händen und Füßen statt des Paratendoneums echte Sehnenscheiden, bestehend aus einem *Stratum fibrosum* und einem *Stratum synoviale*, um die bei der Bewegung entstehende Reibung effizient zu minimieren [4]. Der hierarchische Sehnenaufbau ermöglicht bei mechanischen Belastungen eine Verschiebung einzelner Subfaszikel sowie Faszikel gegeneinander. Außerdem werden durch diese Bauweise die Elastizität und Flexibilität der Sehne erhöht und Versorgungsstrukturen wie Gefäße und Nerven, die bevorzugt im Sehnenbindegewebe verlaufen, geschützt.

### 1.1.2 Zelluläre Bestandteile der Sehne

Das Sehngewebe ist relativ zellarm. Nur etwa 5 % der Trockenmasse entfällt auf die Sehnenzellen. Etwa 90 - 95 % der Zellen machen die Tendozyten aus [2-4]. Die verbleibenden 5 - 10 % der Zellen stellen Knorpel-, Synovial-, Gefäßendothel und Gefäßmuskelzellen dar [2-4]. Lichtmikroskopisch findet man die synthesesarken Tendoblasten und die etwas syntheseschwächeren Tendozyten längs zur Sehne angeordnet. Die Tendoblasten sind die dominierende Zellform in einer jungen Sehne, die eine spindelförmige Gestalt mit zahlreichen langen Ausläufern aufweisen [2, 4, 14]. Ihr Reichtum an Zellorganellen, insbesondere dem Endoplasmatischen Retikulum (rER) und zahlreichen Golgi-Apparaten, ist für die hohe metabolische Aktivität verantwortlich. Im Laufe der Sehnenentwicklung sinkt zum einen die absolute Anzahl von Tendoblasten und zum anderen transformieren sie zu Tendozyten.

Die Tendozyten besitzen ebenfalls langgestreckte und dünne Zellausläufer, mit denen sie Kontakt zu anderen Zellen via Gap junctions bzw. Matrixkomponenten aufnehmen [2, 3, 11]. Tendozyten sind mechanosensitiv und können durch eine Mechanotransduktion mit Hilfe der Gap junctions den Umbau der Matrix als Antwort auf veränderte biomechanische Belastung initiieren [15, 16]. Die Gap Junction Proteine Connexin 32 und 43 agieren als chemische Synapsen und spielen bei der Mechanotransduktion zwischen den Nachbarzellen eine entscheidende Rolle. Durch die flügelartigen Fortsätze der Tendozyten agieren sie über die Kollagenfasern hinweg mit Sehnenzellen aus den Nachbarreihen über Gap Junctions aus Connexin 43 [17]. Connexin 32 verbindet Sehnenzellen in Reihe. Für die Adhärenz-Zellkontakte benachbarter Tendozyten sind Aktinfilamente verantwortlich [18]. Longitudinale Aktin-Stressfasern sind über N-Cadherin und Vinculin innerhalb der Zelle in Zugrichtung miteinander verbunden [19]. Tendoblasten und reife Tendozyten exprimieren in Form von *Scleraxis* einen spezifischen Transkriptionsfaktor [20], der in der vorliegenden Arbeit zur Identifizierung der eingesetzten humanen Zellen als Tendozyten diente.

Die benötigte Energie für die Biosynthese der Matrixkomponenten wie deren Degradation und Neustrukturierung während des Remodellingprozesses gewinnen die Sehnenzellen mit Hilfe des Citratzyklus, der anaeroben Glykolyse und dem

Pentosephosphatweg [2, 4]. Im Laufe der Entwicklung transformieren die Tendoblasten zu Tendozyten. Mit dieser Entwicklung geht auch eine veränderte Stoffwechsellage einher, so dass die Energiegewinnung der reifen Tendozyten hauptsächlich durch die anaerobe Glykolyse gedeckt wird [2, 4]. Diese Tatsache hat eine wesentliche funktionelle Bedeutung. Lange Folgen von zyklischen Bewegungen können zu einer Hypoxie im Sehngewebe führen. Um diesen Zeitraum halbwegs schadensfrei zu überstehen, ist die anaerobe Glykolyse daher essentiell [2]. Die geringe metabolische Aktivität der Tendozyten bedingt jedoch auch eine verlängerte Erholungsphase und einen nur sehr langsamen Heilungsprozess nach einem Trauma [2, 4, 14].

### 1.1.3 Extrazellulärmatrix

Da das Sehngewebe zum Binde- und Stützgewebe gezählt wird, ist die Zusammensetzung der EZM für die Funktion des Gewebes entscheidend. Für die Synthese aller EZM-Bestandteile und deren Organisation sind die Sehnzellen hauptverantwortlich. Durch die große Wasserbindungskraft macht die EZM ca. 95 % des Sehnvolumens aus und vermittelt zwischen einem hohen Maß an mechanischer Beanspruchbarkeit und Elastizität, um eine optimale Biomechanik zu ermöglichen [1-4, 11, 12].

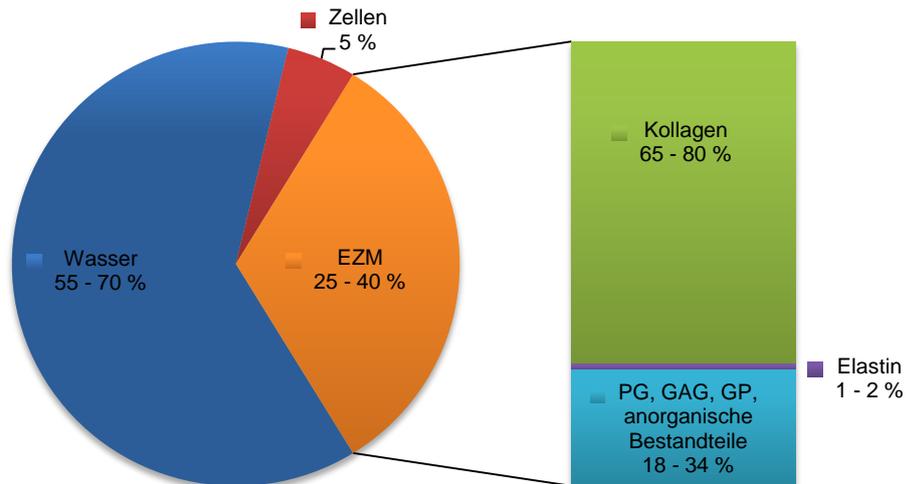
Die funktionell und quantitativ wichtigste Komponente der EZM stellt mit 56 - 80 % der Trockenmasse das Kollagen dar. Besonders hoch ist die Menge an zugfestem Kollagen Typ I. In geringen Mengen sind jedoch auch andere Kollagentypen vertreten (Typ II, III, IV, V, VI, IX, X, XI, XII, XIV) [1-4, 11, 14]. Kollagen Typ III ist nach dem Kollagen Typ I das zweithäufigste Kollagen der Sehne und ist für deren Fibrillogene (Faseraufbau) mitverantwortlich.

Während der Sehnenheilung wird die Synthese von Kollagen Typ III hochreguliert, wodurch das traumatisierte Gewebe insgesamt eine temporär höhere Elastizität im Narbengewebe aufweist [21]. Die anderen Kollagene bewirken vor allem die Quervernetzung der Kollagen Typ I-Fasern. Für die lichtmikroskopische Wellenform der parallel verlaufenden Kollagenfasern sind die 1 - 2 % elastischen Fasern verantwortlich. Sie verleihen dem Gewebe eine funktionell bedeutsame reversible Dehnbarkeit, die zum einen vor einer Schädigung der Kollagenfasern bei starkem Zug schützt und zum anderen die Zugkraft des Muskels dynamisch auf den Knochen

überträgt. Nach der Beendigung der Belastung ermöglichen die Fasern ein Rückkehren in die Ausgangsposition [2-4, 14].

Der Anteil der elastischen Fasern steigt in verletzten Sehnen deutlich an [22, 23]. Die Grundsubstanz, die wichtig für die Trophik der Zellen und deren Kommunikation ist, umgibt gleichsam die Kollagenfibrillen und Sehnenzellen. Sie macht etwa 18 - 34 % der Trockenmasse der Sehne aus und besteht hauptsächlich aus Proteoglykane (PG), Glykosaminoglykanen (GAG), Glykoproteinen (GP) und anorganischen Bestandteilen [2-4]. Die in der Grundsubstanz enthaltenen GP und PG sind für den hohen Wasseranteil (55 - 70 %) im Sehngewebe hauptverantwortlich. Das Wasser verbessert die biomechanische Aufnahme von Druck- und Scherkräften [3, 4, 13]. Die großen negativ geladenen PG, wie z.B. das quantitativ wichtigste Decorin, verfügen über zahlreiche kovalent gebundene GAG (wie z.B. Chondroitinsulfat) und begünstigen somit die Migration von Zellen und die Fusion von Kollagenfibrillen [2, 3, 11]. An Decorin-Knockout-Tieren konnte beispielsweise gezeigt werden, dass das Kollagen-Netzwerk mit einer veränderten Faserausrichtung und erhöhter Faserlänge nur lose gepackt wird [24]. Chondroitinsulfat findet man besonders in Zonen erhöhten Drucks, Heparansulfat dagegen nur im myotendinösen Übergang [2, 25, 26]. Für die Adhäsion von Makromolekülen scheinen GP eine wichtige Rolle zu spielen [2]. Fibronectin, Thrombospondin, Tenascin-C und Undulin sind wichtige GP, wobei insbesondere Fibronectin und Thrombospondin an Heilungs- und Regenerationsprozessen beteiligt sein sollen [4].

Der Gehalt an anorganischen Bestandteilen in der Sehne beträgt nur ca. 0,2 % des Trockengewichts, ist aber am Wachstum, der Entwicklung und dem Metabolismus der Tendozyten beteiligt. An der Ausbildung der osteotendinösen Verbindung spielt Calcium eine zentrale Rolle. Mangan ist ein wichtiger Cofaktor für zahlreiche enzymatische Reaktionen sowie Kupfer, welches notwendig für die Querverbindung von Kollagenfibrillen ist. Weitere anorganische Bestandteile sind Magnesium, Cadmium, Kobalt, Zink und Phosphor [2].



**Abbildung 3: Zusammensetzung der Sehne.** In den Kreisdiagrammen wird die prozentuale Zusammensetzung der Sehne dargestellt, wobei zu beachten ist, dass die prozentuale Verteilung der einzelnen Bestandteile je nach Lokalisation der Sehne im Organismus variieren kann. Die Sehne besteht aus Wasser, der Extrazellulärmatrix (EZM) und zellulären Bestandteilen. Neben dem quantitativ wichtigsten Bestandteil Kollagen (insbesondere Typ I) gehören auch Proteoglykane (PG), Glykosaminoglykane (GAG), Glykoproteine (GP) und Elastin sowie anorganische Bestandteile zur EZM der Sehne. Quelle: modifiziert nach Hoffmann A. (2007), Kannus P. (2000), Kjaer M. (2004) und Sharma P. (2005) [2-4, 13].

#### 1.1.4 Vaskularisierung und Innervation der Sehne

Wie bereits erwähnt, handelt es sich beim Sehngewebe um *bradytrophes* Gewebe mit nur wenigen Blutgefäßen [27], wobei nur etwa 1 - 2 % der EZM durch Blutgefäße ausgefüllt wird [1, 3]. Die Blut- und Lymphversorgung wird generell durch zwei Bereiche sichergestellt. Oberflächlich gelegene Blutgefäße werden über die Sehnenscheiden bzw. das Paratendineum (extrinsisch) an die Sehne herangeführt oder gelangen über myo- bzw. osteotendinöse Verbindungen (intrinsisch) in die Sehne [4]. Die Gefäße des Paratendineums verlaufen transversal ins Sehngewebe und richten sich im Endotendineum longitudinal zu den Kollagenfasern aus [28]. Der Großteil der Sehne wird von den extrinsischen Blutgefäßen versorgt, die oberflächliche Plexus ausbilden, sich weit verzweigen und vereinzelt auch in die Tiefe reichen können. Die Gefäße aus den myo- bzw. osteotendinösen Verbindungen reichen meistens nicht über das erste Drittel der Sehne hinaus [1, 4]. Da die Blutversorgung der Sehne sehr stark von ihrer funktionellen Belastung abhängt, findet man häufig in Bereichen, die hoher Kompression und Reibung ausgesetzt sind, stark minderdurchblutete Areale [4]. Diese Areale haben große klinische Relevanz, da sie häufig einen Ausgangspunkt für Degenerationen und Rupturen darstellen können [1].

Entzündliche Prozesse, wie sie bei der Wundheilung oder bei chronisch-degenerativen Ereignissen zu finden sind, führen in der Regel zu einer verstärkten Gefäßneubildung (Neoangiogenese), die besonders durch den Wachstumsfaktor Vascular endothelial growth factor (VEGF) beeinflusst wird. VEGF führt ebenfalls zu einer verstärkten Migration und Proliferation von Endothelzellen und Leukozyten [29]. Ein funktioneller Antagonist der Angiogenese ist das Endostatin, ein Fragment des Kollagen Typ XVIII. Die Interaktion zwischen VEGF und Endostatin ist in der Sehne abhängig von der mechanischen Belastung [30]. In den Bereichen der myotendinösen Verbindung soll das Matrixmolekül Myodulin ebenfalls die Angiogenese fördern [31].

Die nervale Innervation der Sehne erfolgt durch vegetative Fasern sowie durch kutane, muskuläre und peritendinöse Nervenendigungen, die als spezialisierte Mechanorezeptoren fungieren oder der Schmerzdetektion dienen [4, 14]. Dabei verlaufen die Nervenfasern parallel zu den Blutgefäßen entlang der myotendinösen Verbindung. Vom Paratendineum ausgehend ziehen einige Nervenäste bis in die Tiefe zum Endotendineum [4].

Vaskularisation und Innervation der Sehne sind von besonderem klinischen Interesse hinsichtlich ihres Einflusses auf den Heilungsprozess nach Sehnen-traumata und bei der Entstehung von Tendopathien [1, 3, 5, 12].

### **1.1.5 Die Sehnenpathologie**

Circa 8,8 % der muskuloskelettalen Verletzungen und Zerrungen betreffen Läsionen der Sehnen und der Muskulatur [32]. Epidemiologische Daten belegen, dass Sehnenverletzungen bei einem mittleren Alter von 33 Jahren bei Männern und 43 Jahren bei Frauen auftreten [33]. Grundsätzlich wird zwischen akuten Verletzungen, wie z. B. der Sehnenruptur und chronisch verlaufenden Tendopathien unterschieden [34]. Besonders häufig betroffen sind die Achillessehne und die Rotatorenmanschette [35]. In Abhängigkeit vom Alter und der Belastung finden sich Achillessehnenverletzungen eher bei jüngeren, sportlichen Patienten und Verletzungen der Quadricepssehne des Kniegelenks bei Patienten zwischen dem 40. - 80. Lebensjahr [33]. Diese Beobachtung kann als wertvoller Hinweis für unterschiedliche Pathogenesen gewertet werden.

Es ist nicht sinnvoll, strikt zwischen akuten und chronisch-degenerativen Tendopathien zu unterscheiden, da der häufigste histologische Befund bei spontanen Sehnenrupturen degenerative Veränderungen aufweist [4].

Der wichtigste Stimulus für die Entstehung einer Degeneration scheint eine übermäßige körperliche Belastung zu sein. 30 % aller mit dem Laufsport assoziierten Erkrankungen sind auf chronische Probleme überbelasteter Sehnen zurückzuführen [4]. Ferner entwickeln bis zu 40 % aller Tennisspieler im Laufe der Zeit eine Ansatzentzündung der Unterarmstreckmuskulatur, den sog. Tennisarm, 55 % aller jungen Athleten eines Sprung-geprägten Sportes entwickeln eine Tendopathie [4, 36].

Ursächlich für diese Beobachtungen scheint eine lokale Hypoxie des Sehngewebes unter maximaler Belastung zu sein. Während der Ischämiephase werden freie Radikale gebildet, die sich dann während der Reperfusion im Gewebe verteilen [4, 37]. Bewegungs-Monolateralismen und fehlerhafte Belastungen führen zu einer Übermüdung der Sehne, die bei unzureichender Schonung und Regenerationszeit eine Degeneration fördert [11, 14, 37].

Für das Regenerationspotenzial des Sehngewebes sind die Tendozyten verantwortlich, die die EZM-Produktion und -Degradation regulieren. Hierbei ist zu beachten, dass Alterungsprozesse der Sehne, die mit einer Verringerung der Zellzahl, der elastischen Fasern und der Durchblutung einhergehen, sich bereits ab dem 30. Lebensjahr beobachten lassen [38]. Das zunehmende Alter ist kein beeinflussbarer Faktor. Er geht mit einer geringeren arteriellen Versorgung, einem verminderten Tendozytenmetabolismus und - durch die lokale Hypoxie bedingt - mit der Bildung freier Radikale einher [2, 14, 37]. Außerdem sind mit zunehmendem Alter Veränderungen der EZM zu beobachten. Durch veränderte Verknüpfung der GAG von PG mit anderen Kernproteinen sinkt die Wasserbindungskapazität von 80 - 85 % auf nur noch 30 - 70 %. [39]. Die steigende Viskosität der EZM bedingt eine Reduktion der Gleitfähigkeit der Kollagenfasern und fördert so den mechanischen Abrieb und Mikroläsionen.

Ein weiteres Problem stellt die Bildung von *Crosslinks* dar. Diese unlöslichen Querverbindungen zwischen den Kollagenfasern lassen die Sehne insgesamt steifer

werden. Eine zusätzliche Akkumulation von Lipiden kann folglich ein Reißen der Faszikelstruktur hervorrufen [40]. Dies könnte ein möglicher Grund für die Beobachtung sein, dass Verletzungen der Quadricepssehne des Kniegelenks bei Patienten zwischen dem 40. - 80. Lebensjahr [33] gehäuft auftreten, zumal für die Entstehung einer Sehnedegeneration noch weitere Faktoren in Betracht gezogen werden müssen, wie z.B. die Einnahme verschiedener Medikamente. Es gibt Hinweise darauf, dass Fluorchinolone (Antibiotika) mit Tendopathien assoziiert sein können [3, 4, 14, 37]. Fluorchinolone aktivieren über Zytokine Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), eine Familie von proteolytischen Enzymen, die für den Abbau der EZM und das Remodelling des Gewebes verantwortlich sind [3, 4]. Dadurch wird besonders der Abbau für das in der EZM dominierende und funktionell wichtige Kollagen Typ I gefördert. Der Einfluss auf den Tendozytenmetabolismus verringert zusätzlich die Zellproliferation, die Kollagen- und Matrixsynthese [4].

Als weitere medikamentöse Ursachen für sehnedegenerative Veränderungen werden ebenfalls Statine, orale Kontrazeptiva und lokal injizierte Glukokortikoide diskutiert [14, 37]. Bisher ist der tendotoxische Wirkungsmechanismus dieser Verbindungen allerdings weitgehend ungeklärt. Auch Systemerkrankungen wie z.B. Diabetes mellitus, Übergewicht und Hypertonie, die die Blutversorgung des ohnehin bradytrophen Gewebes verschlechtern können, machen die Sehne anfälliger für Degenerationen [11, 14, 37].

Eine gehäufte Assoziation mit Tendopathien zeigen auch genetisch bedingte Erkrankungen, die die Synthese der kollagenen- und elastischen Fasern stören, wie z.B. das Marfan-Syndrom und die Osteogenesis imperfecta. Bei dem Ehlers-Danlos-Syndrom Typ I und II sind Sequenzvariationen im Typ-V-Kollagen-Gen bzw. im Tenascin-C-Gen gehäuft und mit Tendopathien assoziiert [14, 35].

Weitere relevante Krankheitsbilder sind den endokrinen und metabolischen Erkrankungen zuzuordnen, wie beispielsweise Störungen der Schild- und Nebenschilddrüse, Nebenniere und chronisches Nierenversagen. Aus dem rheumatoiden Formenkreis kommen die rheumatoide Arthritis, die reaktive Arthritis und das Reiter-Syndrom sowie autoimmunologische Erkrankungen, wie der systemische *Lupus erythematoses* in Betracht [11, 14, 35, 37].

Im Hinblick auf chronisch-degenerative Verläufe wird die Beteiligung inflammatorischer Komponenten immer mehr kontrovers diskutiert. Studien haben gezeigt, dass zyklische Belastungen der Sehne die Expression der proinflammatorischen Zytokine Interleukin 6 (IL-6) und Interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) sowie des proinflammatorischen Prostaglandins E (PGE) und der Cyclooxygenasen (COX)-1 und 2 steigern. Die COX-1 wird konstitutiv exprimiert und ist für die physiologischen Epithelfunktionen zuständig, wohingegen die COX-2 vermehrt bei inflammatorischen Prozessen exprimiert wird [4, 11, 37, 41, 42]. In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass durch die lokale Gabe von PGE1 das histologische Bild einer Tendopathie induziert werden kann [4, 43].

### 1.1.6 Die Sehnenheilung

Wie bereits beschrieben handelt es sich bei der Sehne um *bradytrophes* Gewebe. In Abhängigkeit vom Alter liegen ein verringerter Tendozytenmetabolismus sowie eine veränderte EZM vor. Diese Faktoren bilden denkbar schlechte Voraussetzungen für die Sehnenheilung. Die häufig unzureichende Vaskularisation und die verminderte metabolische Aktivität der Tendozyten lassen das Sehngewebe meist nur langsam und unzureichend heilen.

Geht die Sehnenheilung von proliferierenden Tendozyten oder „intrinsischen“ Fibroblasten des Endotendineums und vermehrter EZM-Sekretion aus, wird sie als intrinsisch bezeichnet. Bei der extrinsischen Heilung, die im Folgenden näher besprochen werden soll, beruht die Heilung hingegen auf der Migration von extrinsischen Fibroblasten aus dem umgebenden Gewebe [4]. Bei ihr kommt es regelmäßig zur Ausbildung von Narbengewebe und Adhäsion mit dem umgebenden Gewebe, wodurch das Sehnengleiten behindert wird [44].



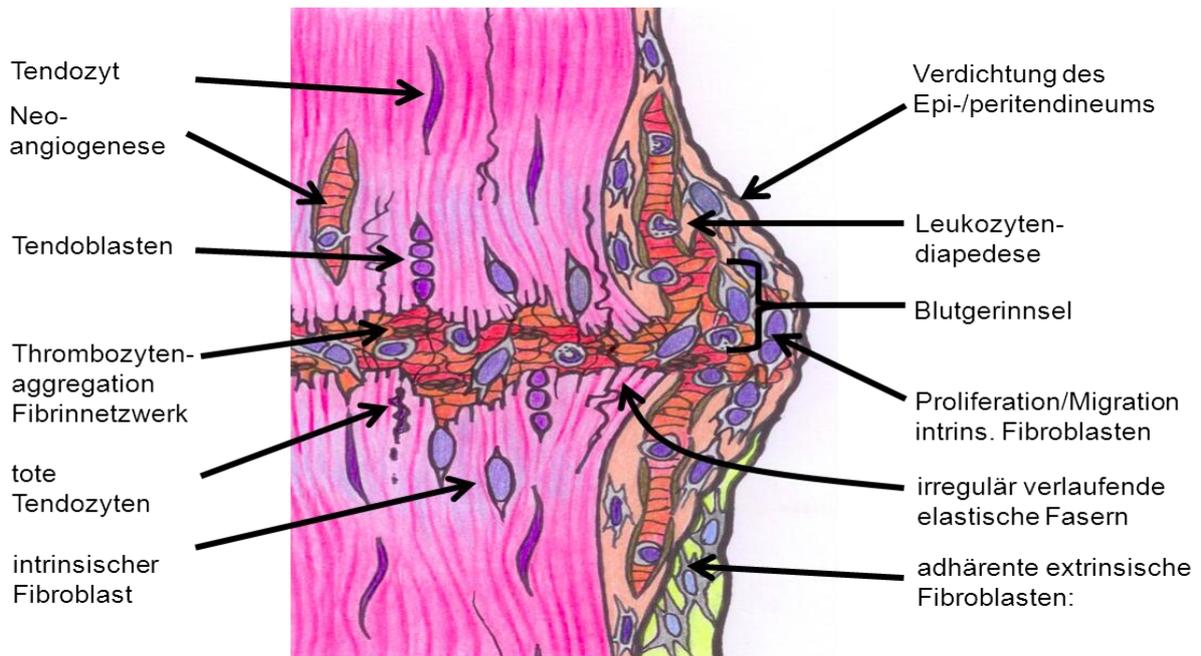
**Abbildung 4: Rupturkallus einer lapinen Achillessehne im Vergleich zur gesunden Sehne.** Rechts: die unbehandelte Kontrolle und links: der Defekt. Quelle: Stoll et al., 2011; AG Bioconstruction [45].

Grundsätzlich lässt sich die extrinsische Sehnenheilung in drei Phasen einteilen, die sich nicht eindeutig voneinander abgrenzen lassen. Am Anfang steht die initiale hämorrhagisch-inflammatorische Phase (3 - 7. Tage), die direkt nach dem Trauma durch eine Hämatombildung dominiert wird. Durch das einströmende Blut gelangen u.a. Thrombozyten, von ihnen freigesetzte Wachstumsfaktoren und Zytokine ins Gewebe [5, 14]. Die freigesetzten Mediatoren rekrutieren chemotaktisch aus dem retikulohistozytären System Leukozyten, insbesondere neutrophile Granulozyten, Lymphozyten und Makrophagen und locken sie an den Ort der Verletzung [4, 5, 14]. In den ersten 24 Stunden phagozytieren die neutrophilen Granulozyten und Makro-phagen nekrotisches Material [4, 5, 14].

Parallel zu ihrer phagozytierenden Aktivität setzen die immigrierten Entzündungszellen Wachstumsfaktoren wie Zytokine, Transforming growth factor beta -1(TGFβ1), Insuline-like growth factor (IGF) -1, Basic fibroblast growth factor (bFGF), Platelet derived growth factor (PDGF). Hinzu kommen vasoaktive und chemotaktische Faktoren, die zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität, Initiation der Angiogenese, Stimulation der Tendozytenproliferation und zum Anlocken zusätzlicher inflammatorischer Zellen führen, frei [4, 5, 14].

Die sich anschließende zweite Phase ist die Proliferationsphase, die innerhalb von 5. bis 21. Tagen verläuft [14] und durch die Fibroblastenaktivität dominiert wird. Unter dem Einfluss von verschiedenen Wachstumsfaktoren produzieren sie eine unreife Neomatrix, die sich durch einen hohen Gehalt von Kollagen Typ III auszeichnet [4, 5].

Die letzte Phase der Sehnenheilung wird als Remodelling-Phase bezeichnet und kann Monate bis Jahre umfassen [46, 47]. An Stelle des vorher stark exprimierten Kollagen Typ III tritt nun allmählich das Kollagen Typ I. Durch zunehmende funktionelle Belastung richten sich die Fasern in der EZM entlang der Hauptbeanspruchungsrichtung aus [4]. Insgesamt nehmen nun aber der Tendozytenmetabolismus und die Vaskularisation des defekten Sehngewebes ab und ein narbenähnliches Gewebe tritt an die Defektstelle [4, 5, 14]. Das gebildete Narbengewebe verfügt nicht über die biomechanische Belastbarkeit wie gesundes Sehngewebe [48]. Inwieweit auch Zytokine auf den Prozess und das Ergebnis der Sehnenheilung Einfluss nehmen, ist noch weitgehend ungeklärt.



**Abbildung 5: Schematische Darstellung der Wundheilungsphasen einer rupturierten Sehne.** Gezeigt wird eine rupturierte Sehne mit Hämatomausbildung (wenige Stunden). Es folgt eine Entzündungsreaktion mit Immigration von Abwehrzellen, insbesondere von neutrophilen Granulozyten und PBMCs (1 - 2 Tage). Anschließend erfolgt die Proliferationsphase ausgehend von den Wundrändern und Angiogenese (wenige Tage). Granulationsgewebe mit Faservermehrung, insbesondere Kollagen Typ III, wird gebildet (1 - 2 Wochen). Kallusreifung – remodelling, Gewebsbrücke über dem Rupturspalt und Umbau der EZM (6 - 8 Wochen). Quelle: Al-Sadi et al., 2011; AG Bioreconstruction [49].

## 1.2 Zytokine

Zytokine sind Glykoproteine, die an der Regulierung vieler Reaktionen im Körper beteiligt sind. Eine besondere Rolle kommt ihnen bei proinflammatorischen und immunregulatorischen Geschehnissen zu. Sie werden vorwiegend parakrin und autokrin, seltener endokrin sezerniert [50]. Sie spielen nicht nur eine wichtige Rolle bei Sehnenerkrankungen, sondern auch bei der Sehnenheilung, da sie als Wachstumsfaktoren nicht nur die Hämatopoese, sondern auch das Proliferationsverhalten der Tendozyten, die Matrixrezeptorexpression und das Matrixremodelling beeinflussen [50, 51]. In der vorliegenden Arbeit soll die regulatorische Wirkung der Schlüssel-Zytokine Tumornekrosefaktor-alpha (TNF $\alpha$ ), IL-1 $\beta$  und IL-6 auf die Expression von Matrix-Komponenten durch die Tendozyten und deren Vitalität genauer untersucht werden.

### 1.2.1 Tumor-Nekrose-Faktor $\alpha$ (TNF $\alpha$ )

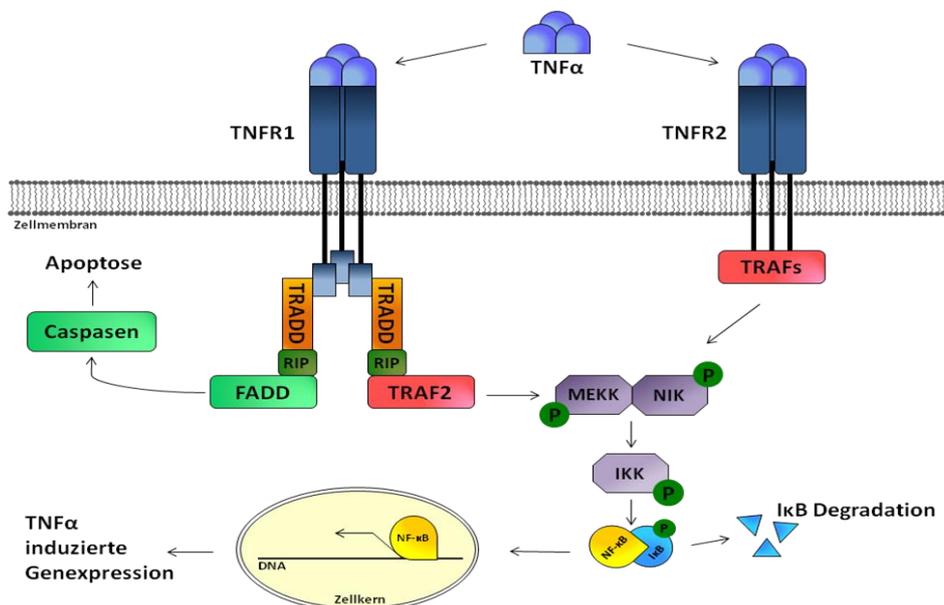
Das proinflammatorische Zytokin TNF $\alpha$  ist ein pleiotropes Zytokin, welches von Makrophagen, stimulierten T-Zellen und Mastzellen freigesetzt wird und zum Überleben, zur Proliferation, aber auch zur Apoptose von Zellen führen kann [52]. Außerdem ist es dazu befähigt, die Freisetzung von anderen Zytokinen und die Chemotaxis von Phagozyten herbeizuführen sowie die Phagozytenaktivität und die Endothelpermeabilität zu steigern [53-55].

Durch seinen Einfluss auf die Gefäßpermeabilität und die Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Endotheloberfläche begünstigt TNF $\alpha$  die Extravasation von Leukozyten aus dem Blut an den Entzündungsherd [56-58]. TNF $\alpha$  scheint konstitutiv exprimiert zu werden, wobei die Konzentration in unbelasteten Sehnen größer ist [59]. Physiologische Bewegung scheint ein wesentlicher Faktor für die Expression des Zytokins zu sein, denn Uchida et al. (2005) wiesen nach, dass ein Belastungsmangel im Sehngewebe zu einer vermehrten Expression von TNF $\alpha$  führt [60]. Das genaue Expressions- und Regulationsprofil ist jedoch noch weitgehend ungeklärt.

Zyklische Belastungen der Sehne verursachen Reibung und somit einen Temperaturanstieg im Gewebe. Temperaturen von ca. 40°C induzieren ebenfalls die TNF $\alpha$ -Synthese in den Tendozyten [5, 61]. Vor dem Hintergrund eines inflammatorischen Kontextes ist die Beobachtung wichtig, dass am 3. Tag der Sehnenheilung ebenfalls eine erhöhte TNF $\alpha$ -Konzentration festgestellt werden konnte [5, 59], ebenso eine erhöhte Caspase-3-Aktivität, was als Hinweis für einen möglichen pro-apoptotischen Effekt von TNF $\alpha$  betrachtet werden kann [5, 54, 62]. Die vielfältigen Effekte von TNF $\alpha$  erklären sich durch das Vorhandensein von zwei verschiedenen TNF-Rezeptoren (TNF-R1 und TNF-R2).

Vor allem TNF-R1 ist für die Einleitung von Apoptosesignalwegen durch die Aktivierung der Caspase-3 und für die katabole Wirkung von TNF $\alpha$  verantwortlich [62]. In traumatisiertem Sehngewebe ist es u. a. gelungen, TNF-R1 zu detektieren und bei TNF $\alpha$  stimulierten Tendozyten eine erhöhte Konzentration von TNF $\alpha$ , ebenso und dem Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B festzustellen sowie eine erhöhte Expression der pro- und antiinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-6 sowie Matrix-abbauender

Enzyme wie MMP1 zu zeigen [5, 54, 63]. Der Einfluss von TNF $\alpha$  auf die Matrix scheint vielschichtig zu sein.



**Abbildung 6: TNF $\alpha$ -Signalkaskade.** Diese läuft über die beiden TNF-Rezeptoren: TNF-R1 und TNF-R2, die der TNF-Rezeptor Superfamilie angehören. Die Bindung von TNF $\alpha$  an TNF-R1 führt durch eine intrazelluläre Signalkaskade mittels TRADD (TNF-receptor associated death domain) über das Rezeptor-interagierende Protein (RIP) mit FADD (Fas-associated protein with death domain) zu einer Aktivierung von Caspasen und somit zu einer Induktion von Apoptose. Außerdem kann über den TNF-R1 die Aktivierung des TNF $\alpha$ -Rezeptor assoziierten Faktors 2 (TRAF2) erfolgen. Die Bindung von TNF $\alpha$  am TNF-R2-Rezeptor induziert ebenfalls die Aktivierung von TRAFs, die die MEK-Kinase (MEKK) und NF- $\kappa$ B-induzierenden Kinasen (NIK) phosphoryliert und somit aktiviert. Sowohl MEKK als auch NIK können über eine Phosphorylierung der I $\kappa$ B-Kinase (IKK) den physiologischen Inhibitor des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B abspalten. Der freigewordene Transkriptionsfaktor kann daraufhin in den Zellkern translozieren und beispielsweise weitere Zytokine und immunregulatorische Proteine induzieren. Durch eine Ubiquitinierung kann das phosphorylierte I $\kappa$ B im Proteasomen abgebaut werden. Quelle: modifiziert nach Yang Q. (2005) [64] und Rahman MM. (2009) [65].

Neben der Induktion von MMP1 [66, 67] konnten John et al. (2010) zeigen, dass die TNF $\alpha$ -Stimulation humaner Tendozyten auch zu einer verminderten Kollagen Typ I Synthese führt und gleichzeitig zu einer verstärkten Elastin-Expression [63]. Diese Ergebnisse bestätigen die Beobachtungen von Jozsa et al. (1978); die zeigen konnten, dass der Anteil der elastischen Fasern in verletzten Sehnen deutlich ansteigt [22, 23]. Diese Umbauprozesse in der EZM begünstigen wahrscheinlich die Wundheilung im Gewebe. Im Hinblick auf die Kollagen Typ I Expression scheint es Spezies-spezifische Unterschiede zu geben. Hosaka et al. (2010) konnten eine Zunahme der Kollagen Typ I Synthese durch die Stimulation mit TNF $\alpha$  in equinen Tendozyten zeigen [68]. Die Wirkung von TNF $\alpha$  ist in Tendozyten jedoch bisher noch weitgehend unbekannt. Eine Aufklärung der Rolle von TNF $\alpha$  und den Abläufen des

Signalweges wäre von großer Bedeutung für das Verständnis von Sehnenerkrankungen und Sehnenheilung.

### **1.2.2 Interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )**

IL-1 $\beta$  ist wie TNF $\alpha$  ein proinflammatorisches Zytokin mit kataboler Wirkung, welches synergistisch mit TNF $\alpha$  bei der Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen mitwirkt [57, 58]. In humanen Sehnenzellkulturen induziert es die Synthese von MMP1 (letztere spaltet die Kollagen Typen I, II, III), MMP3 (diese spaltet unter anderem Kollagen Typ IX und PG) und MMP13 (spaltet vor allem Kollagen Typ II) [69, 70]. In geringen Dosen wird die Elastinexpression gesteigert und in hohen Dosen die Kollagen Typ I Expression verringert [71]. Somit beeinflusst es die Wundheilung und EZM-Zusammensetzung im Sehngewebe.

### **1.2.3 Interleukin-6 (IL-6)**

IL-6 ist ein pleiotropes Zytokin, welches hauptsächlich von Monozyten, Endothelzellen, Fibroblasten und aktivierten T-Zellen gebildet und freigesetzt wird [50]. In den Hepatozyten ist es ein starker Induktor der Synthese von Akut-Phase-Proteinen, wie z.B. dem C-reaktiven Protein, Fibrinogen oder Serum Amyloid A.

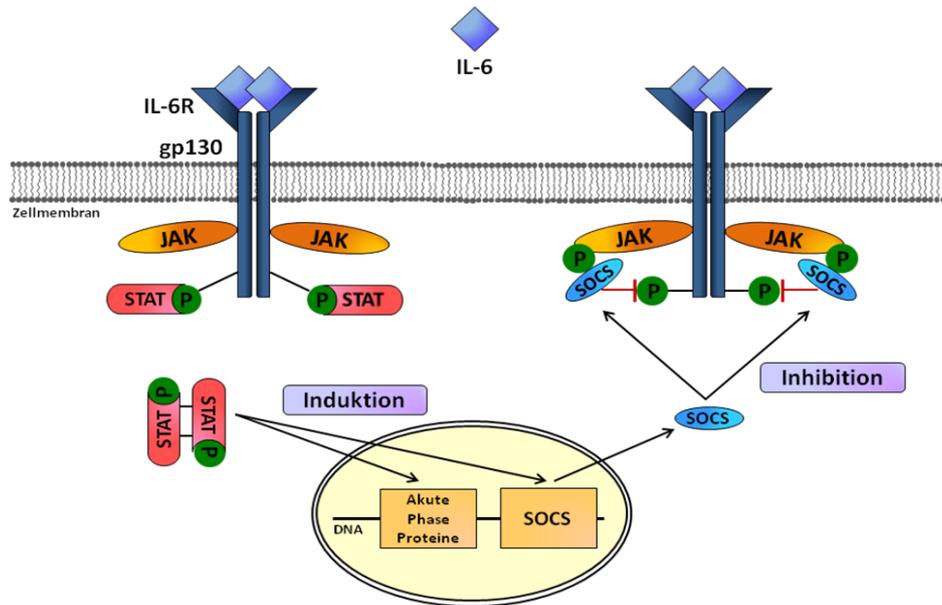
B- und T- Lymphozyten werden aktiviert und die Differenzierung zu zytotoxischen T-Zellen gefördert [72, 73]. Durch die endotheliale Expression von Adhäsionsmolekülen und die Bildung von monocyte-chemoattractant-protein-1 wirkt es chemotaktisch auf Leukozyten [73].

Die IL-6-Expression ist bei entzündlichen Erkrankungen, wie der rheumatoiden Arthritis, einem synovialen Entzündungsgeschehen mit angrenzender Schädigung von periartikulärem Knorpel- und Knochengewebe, erhöht [72]. Des weiteren beeinflusst es den Metabolismus des Kollagens der EZM in Bindegeweben [3]. So bilden auch Sehnenzellen IL-6 und den IL-6-Rezeptor [74]. Im Muskel- und Sehngewebe konnte sowohl nach einem Langzeittraining als auch bei Entzündungen oder Rupturen der Rotatorenmanschette ein Anstieg der IL-6-Konzentration nachgewiesen werden [74-76]. Darüber hinaus konnte eine positive Korrelation der IL-6-Konzentration mit dem Entzündungsgrad sowie eine negative mit dem Kollagengehalt festgestellt werden [3, 76, 77].

IL-6 scheint ferner eine Rolle in der Sehnenheilung zu spielen. An IL-6-knockout-Mäusen konnte gezeigt werden, dass das Zytokin einen Effekt auf die biomechanischen Eigenschaften der gesunden Sehne hat, der Heilungsprozess verletzter Sehnen dieser Knock-out-Mäuse schlechter und die biomechanischen Eigenschaften verminderter als in der Kontrollgruppe waren [78, 79]. Es zeigte sich ebenfalls eine verminderte Akkumulation von Leukozyten im Entzündungsgebiet [73]. Zudem kam es in den IL-6-knockout-Mäusen zu einer verzögerten Wundheilung mit einer verminderten Entzündungsreaktion und unvollständiger Reepithelialisierung nach Hautbiopsien [78, 79].

Die Signaltransduktion des IL-6 erfolgt über ein Rezeptorsystem aus der IL-6-Rezeptor (IL-6R)-Kette, die IL-6 bindet und dem signalübermittelnden gp130, einem Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 130 kDa [72, 73]. Während die IL-6R-Untereinheit spezifisch für IL-6 ist, ist die gp130-Untereinheit auch Bestandteil von Rezeptorkomplexen anderer Zytokine der IL-6-Familie und kommt ubiquitär auf der Oberfläche einer Vielzahl von Zellen vor. Intrazellulär wird durch die Bindung von IL-6 an den IL-6R eine Signalkaskade über die Protein-Tyrosin-Kinasen JAK1, JAK2 oder Tyk2 in Gang gesetzt.

Durch Bindung von IL-6 werden die Tyrosin-Kinasen transphosphoryliert und dadurch aktiviert. Die aktivierten Tyrosin-Kinasen phosphorylieren die Rezeptormoleküle, an die daraufhin der Transkriptionsfaktor STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) bindet. Dies kann dann beispielsweise die Expression der Akut-Phase-Proteine induzieren [56, 72, 73, 80, 81]. In humanen Tendozyten konnte die Expression von IL-6, dem IL-6-Rezeptor und Bestandteilen der IL-6-Signalkaskade in Form von STAT3, SOCS1 (*Suppressor of Cytokine Signalling*) und SOCS3 sowie eine Induktion der IL-6-Genexpression durch TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  bereits nachgewiesen werden [5, 63, 70, 74], wohingegen die Stimulation humaner Tendozyten mit IL-6 keinen signifikanten Effekt auf die IL-6-, TNF $\alpha$ - oder IL-1 $\beta$ -Genexpression ausübte [5, 63].



**Abbildung 7: IL-6-Signalkaskade.** Das IL-6-Rezeptorsystem besteht aus einem 80 kDa großen IL-6-Rezeptor (IL-6R) und einem 130 kDa großen Signaltransduktor (gp130). Durch die Bindung von IL-6 dimerisiert das Rezeptorsystem und die intrazelluläre Janus-Tyrosin-Kinase (JAK) wird aktiviert, die anschließend die endständigen Tyrosinreste der gp130 Moleküle und die bindenden Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription (STAT)-Moleküle phosphoryliert. Die dimerisierten STAT-Moleküle translozieren in den Zellkern und induzieren dort die Expression von verschiedenen Genen, wie z.B. Akute-Phase-Proteine oder SOCS (*suppressors of cytokine signalling*). SOCS können beispielsweise durch eine direkte Interaktion und Hemmung der JAK, in die IL-6-Signalkaskade eingreifen und so die Wirkung von IL-6 regulieren. Quelle: modifiziert nach Kishimoto T. (2006) [72].

Eine bedeutende Regulationsmöglichkeit des IL-6-Signals ist eine intrazelluläre negative Rückkopplungsschleife. Durch IL-6 kommt es zur verstärkten Expression des SOCS3-Gens. Das SOCS3-Protein bindet an gp130 und verhindert dadurch die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT3, wodurch die Wirkung von IL-6 beendet wird [56, 72, 80-84]. Neben SOCS3 können IL-6 und TNF $\alpha$  auch die Expression von SOCS1 induzieren, welches im Rahmen einer negativen Rückkopplung die Expression beider Zytokine unterdrücken kann [84]. Da in rupturiertem Sehngewebe die Zellen in und rund um die proliferierenden Gefäße IL-6, IL-6R und STAT3 exprimieren, ist eine Beteiligung des Zytokins an der Neoangiogenese bei der Sehnenheilung denkbar [74].

### 1.3 Apoptose

Als Apoptose wird der programmierte Zelltod bezeichnet. Bei dieser kontrollierten Form des Zellensterbens wird anders als bei Nekrose keine Entzündungsreaktion ausgelöst. Im irreversiblen Stadium der Apoptose kommt es zur Karyorhexis, einer Kondensation des Chromatins mit Spaltung der DNA und Abschnürung von Membranvesikeln. Schließlich werden die Zellüberreste durch benachbarte Zellen oder von Phagozyten abgebaut. Die Apoptose ist ein wichtiger Prozess zur Elimination nicht mehr benötigter oder beschädigter Zellen und somit essentiell für die Homöostase von Geweben und bei der Bekämpfung von infizierten Zellen [85].

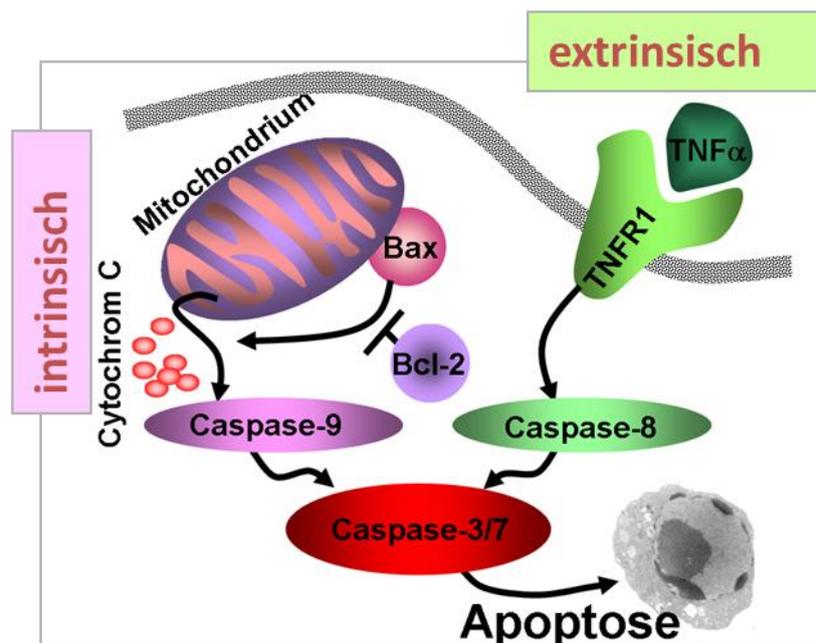
Zwei unterschiedliche Signalwege können in der Zelle zur Apoptose führen. Man unterscheidet einen extrinsischen und einen intrinsischen Weg. Extrinsisch bedeutet, dass der proapoptotische Stimulus über einen membranständigen Oberflächenrezeptor vermittelt wird. Auslöser für den intrinsischen Apoptoseweg ergeben sich aus einer Dysbalance mitochondrialer Signalkaskaden.

Für die Regulation der intrinsischen Apoptose spielen Vertreter der Bcl-2-Familie eine entscheidende Rolle. Das Protein Bax (Bcl-2 associated X protein) der Bcl-2-Familie unterstützt z.B. den Austritt von Cytochrom C aus den Mitochondrien und hat folglich eine proapoptotische Wirkung. Das B-cell lymphoma 2-Protein der Bcl-Familie kann wiederum an der Mitochondrienmembran binden und dadurch den Austritt von Cytochrom C verhindern, wodurch es antiapoptotisch wirkt. Das Gleichgewicht der beiden Bcl-2-Vertreter entscheidet, ob die Apoptose eingeleitet wird oder nicht. Die gegenseitige Beeinflussung der Proteine beruht wahrscheinlich darauf, dass sie sowohl Homo- als auch Heterodimere bilden können und sich dadurch neutralisieren [86].

Die Regulation der Apoptose scheint aber von noch weiteren Faktoren beeinflusst zu werden, da gezeigt werden konnte, dass z. B. bei Bcl-2 und Bax auch ohne das jeweils andere Protein regulierende Effekte auf die Apoptose haben können [86]. Das Zytokin TNF $\alpha$  kann sowohl pro- als auch antiapoptotische Effekte hervorrufen. Konzentrationsabhängig kann die Bindung von trimerem TNF $\alpha$  an den TNF-Rezeptor 1 (TNFR1, 55 kD) sowohl das Überleben als auch die Apoptose der Zelle bewirken.

Die Bindung an den TNF-Rezeptor 2 (TNFR2, 75 kDa) führt hingegen zur Proliferation von Zellen [57, 58, 62]. Die Bindung von TNF $\alpha$  an TNFR1 kann die Trimerisierung des Rezeptors und die Anlagerung von Adaptorproteinen (z. B. TNF receptor-associated death domain, TRADD) auf der zytoplasmatischen Seite des Rezeptors auslösen.

Die Adaptorproteine aktivieren die Procaspase 8. Die aktivierte Caspase 8 führt über eine Caspasen-Kaskade zur Aktivierung der Effektor-Caspase 3. Bei der Caspase-3 handelt es sich um eine Cysteinprotease. Sie vermittelt den Übertritt der Zelle in die Apoptose durch Spaltung eines inhibitorischen Proteins von der DNAse CAD (Caspase aktivierbare DNase). Danach transloziert die DNase in den Zellkern und zerlegt die DNA irreversibel in ca. 200 bp große Fragmente, so dass die Apoptose ein irreversibles Stadium erreicht [62].



**Abbildung 8: Stark vereinfachte Darstellung des extrinsischen und intrinsischen Aktivierungswegs der Apoptose.** Der extrinsische Weg wird durch die Bindung von TNF $\alpha$  am membranständigen TNFR1-Rezeptor vermittelt. Beim intrinsischen Weg veranlasst das Protein Bax (Bcl-2 associated X protein) der Bcl-2-Familie den Austritt von Cytochrom C aus den Mitochondrien. Bei beiden Wegen werden die Effektor-Caspasen-3/7 aktiv und somit die Apoptose eingeleitet. Quelle: AG Bioreconstruction.

Neben dem extrinsischen Apoptoseweg über den TNFR1 kann TNF $\alpha$  auch den intrinsischen Apoptoseweg beeinflussen. Das Zytokin kann in Chondrozyten z. B. das Bax/Bcl-2-Verhältnis steigern, die Procaspase 9 aktivieren [87] oder die Produktion

von reaktiven Sauerstoffspezies in den Mitochondrien erhöhen und dadurch den Übergang in die Apoptose induzieren [88]. Neben der pro-apoptotischen Wirkung des TNF $\alpha$  über die Bindung an TNF-R1 ist auch eine Anlagerung des Adaptorproteins TRADD möglich, das den NF $\kappa$ B-Signalweg (nuclear factor  $\kappa$ B) aktivieren kann, welcher zur Zellproliferation führt [62, 89]. Die Regulation des pro- und anti-apoptotischen Weges, welcher über die Bindung an TNF-R1 eingeschlagen wird, ist derzeit noch nicht restlos aufgeklärt.

### 1.4 Zielstellung

Der Einfluss von proinflammatorischen und immunregulatorischen Zytokinen ist sowohl in der gesunden Sehne als auch in der geschädigten Sehne nicht restlos aufgeklärt. Allerdings ist mittlerweile bekannt, dass Sehnenzellen unter dem Einfluß proinflammatorischer Zytokine aktiviert werden können, vermehrt weitere Zytokine und Matrix-abbauende Enzyme wie MMPs exprimieren und andererseits die Expression von typischen Sehnenmatrixkomponenten reduzieren. Über die Interaktion von Sehnenzellen mit Blutzellen (insbesondere Leukozyten) nach einem Trauma ist bisher wenig bekannt. Die Kenntnis der Wechselbeziehung von Leukozyten und Sehnenzellen könnte jedoch neue Ansatzpunkte zur Unterstützung der Sehnenheilung bieten. Es ergibt sich die Frage, welchen Einfluss die durch eine Blutung ausgelöste Präsenz von Leukozyten auf die Vitalität, Proliferation und Matrixsynthese der Tendozyten ausüben könnte.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit soll im *in-vitro*-Modell mit Hilfe einer indirekten Ko-Kultur die Wechselwirkung zwischen primären lapinen Tendozyten und autologen Leukozyten im Hinblick auf das Expressionsprofil der Sehnenzellen für immunregulatorische Zytokine (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und IL-6), extrazelluläre Sehnenmatrixproteine (Kollagen Typ I, Fibronectin und Decorin) sowie ein Matrix-abbauendes Enzym (MMP1) und ihre Vitalität analysiert werden.

Die Zytokininduktion und die Induktion des degradativen MMP1 in Sehnenzellen durch Leukozyten werden mit Hilfe der RTD-PCR untersucht. Der Einfluss auf die Proteinexpression von MMP1 und den Zellmatrixrezeptor  $\beta$ 1-Integrin wird im Western Blot analysiert. Mit Hilfe des Caspase-3/7-Aktivitätsassays und des TUNEL-Assays sollen Hinweise auf Zelluntergang (Apoptose und Nekrose) aufgezeigt werden.

Aus den gewonnenen Erkenntnissen über den inflammatorischen Prozess und die Wechselwirkung zwischen Sehnenzellen und Leukozyten könnten bestehende pharmakologische Therapieoptionen und Strategien im Hinblick auf das gewünschte Wirkspektrum überprüft und ggf. ergänzt werden.

## 2. Methoden

### 2.1 Zellkulturexperimente mit Sehnenzellen

Um mögliche Kontaminationen beim Arbeiten in der Zellkultur zu verhindern, ist grundsätzlich auf sterile Bedingungen zu achten. Die Sterilbank wurde vor jedem Tätigkeitsbeginn und nach Beendigung der Arbeit mit 70 % Ethanol ausgewischt sowie am Arbeitsende für 1 h mit UV-Licht bestrahlt. Handschuhe und Flaschen wurden vor Gebrauch mit 70 % Ethanol gereinigt. Gemäß den üblichen Vorschriften zur Kultivierung von Zellen kamen Antibiotika gegen Bakterien und Antimykotika gegen Pilze zur Anwendung. Es wurden ausschließlich autoklavierte oder sterilfiltrierte Lösungen verwendet. Alle Gegenstände, die in direkte Berührung mit den Zellen gekommen sind, wurden nur unter der Sterilbank geöffnet, um eventuelle Kontaminationen zu vermeiden.

#### 2.1.1 Isolierung und Kultivierung lapiner Tendozyten

Im Rahmen genehmigter Tierversuchsvorhaben (G0396/09 und A0332/08) wurden sieben weibliche New Zealand White Rabbits euthanasiert und deren Achillessehnen *post mortem* explantiert. Desweiteren wurden humane Hamstringsehnenzellen aus Überschussgewebe von Kreuzbandersatzplastiken unter Beachtung der ethischen Grundsätze gewonnen (Ethikantrag EA4-033-08).

Um einer Kontamination entgegenzuwirken, erfolgte ein dreimaliger Spülgang der gewonnenen Achilles- und Hamstringsehnen mit antibiotikahaltigem Kulturmedium (Penicillin/ Streptomycin/ Gentamycin, 1 %). Unter aseptischen Bedingungen wurde unter der Sterilbank das Sehnenexplantat vom Epitendineum befreit, um eine Auswanderung der Tendozyten während der Kultivierungsphase zu ermöglichen und die Kontamination mit Fibroblasten des Epitendineums zu vermeiden. Die Sehne wurde in etwa 5 - 10 Stücke à 2x4 mm in einer Petrischale (5,5 cm Durchmesser) portioniert und von Kulturmedium mit 10 % fetalem Kälberserum (FKS) überschichtet. Bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> erfolgte die Inkubation im Brutschrank. Alle zwei bis drei Tage erfolgte ein Wechsel des Kulturmediums. Nach wenigen Tagen begannen Tendozyten auszuwandern und auf der Zellkulturschalenoberfläche zu adhären.

Anschließend wurden die Explantate entfernt und die ausgewanderten Tendozyten als Monolayerkulturen nach Erreichen der Konfluenz subkultiviert.

Nachdem die Tendozyten in einer Kulturflasche >85 % Konfluenz erreicht hatten, erfolgte eine Zellpassagierung. Dies erforderte es als erstes, das Kulturmedium vollständig abzusaugen und die Zellen mit HANKs Salzlösung zu spülen. Je nach Zelldichte und Größe des Kulturgefäßes mussten 1 bis 2 ml 5 %iges Trypsin zugegeben und die Zellen für 3 bis 5 min. im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert werden. Das Ablösen der Zellen wurde durch kräftiges, allseitiges Klopfen des Kulturgefäßes unterstützt und optisch unter dem Mikroskop kontrolliert. Die Beendigung der Trypsinierung erfolgte durch Zugabe von ca. 5 ml Tendozytenkulturmedium mit 10 % FKS. Die so resuspendierten Zellen mussten bei 400 g für 5 min. zentrifugiert werden. Der Überstand wurde verworfen und das so erhaltene Zellpellet gleichmäßig zur weiteren Vermehrung in größeren Zellkulturflaschen mit Kulturmedium weiter subkultiviert.

### **2.1.2 Isolierung lapiner Leukozyten**

Die autologen Blutzellen konnten von den gleichen Tieren gewonnen werden, da in den Projekten Blutentnahmen zur Serum/Plasmagewinnung vorgenommen wurden. Das Blut wurde in 10 ml Heparin-Röhrchen aufgenommen, die Blutzellen durch Zentrifugation sedimentiert und die Zellen nach Abnahme des Plasmaüberstandes anschließend in einem Verhältnis von 1:3 mit Solution B verdünnt. Danach wurde die Zellsuspension sehr vorsichtig auf Biocoll aufpipettiert, das in einem 50 ml Falcon vorgelegt war. Nach 30-minütiger Zentrifugation bei 400 g und 20°C ohne Bremse befanden sich die PBMCs in der Interphase. Die Interphase wurde in einem 50 ml Röhrchen mit 25 ml Solution B gesammelt und dann weiterhin mit 40 ml Solution B aufgefüllt. Nach einem erneuten Zentrifugations- und Waschvorgang erfolgte die PBMC-Zellzahl-Bestimmung. Zur Isolierung der neutrophilen Granulozyten wurde das Pellet aus der Biocollseparation in 40 ml Solution B suspendiert und 6 % Dextran-Lösung zu einer Endkonzentration von 1 % dazugeben. Die neutrophilen Granulozyten ließ man anschließend über eine 1stündige Dextranfällung bei Raumtemperatur (RT) sedimentieren. Anschließend wurde 10 min. bei 600 g ohne Bremse zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das Pellet wurde nun zweimal mit

20 ml Solution B, 5 min. bei 400 g gewaschen, die Zellzahl bestimmt und die Zellen kryokonserviert.

### **2.1.3 Zellzählung**

Die Zellzählung wurde mit einer Neubauer-Zählkammer in 4 Quadranten durchgeführt. Hierfür musste aus der Zellsuspension ein Aliquot mit 1 % Trypanblau verdünnt und die vitalen Zellen darin ausgezählt werden. Da Trypanblau zytotoxisch ist, musste die Auszählung zügig innerhalb von 3 - 5 min. nach der Farbstoffzugabe erfolgen. Die Lebendzellzahl wurde nach folgender Formel berechnet:

Zellzahl in 4 Großquadranten/4 × Verdünnungsfaktor ×  $10^4$  = Zellzahl/ ml

### **2.1.4 Kryokonservierung von Tendozyten und Leukozyten**

Nach der Trypsinierung der Zellen in ihren Kulturbehältnissen wurden die Tendozyten wie bei der Subkultivierung bei 400 g zentrifugiert. Suspendiert in 10 % DMSO in FKS enthaltendem Einfriermedium wurden die Tendozyten in 2 ml-Kryoröhrchen transferiert. Um ein schonendes Einfrieren der Zellen zu ermöglichen, wurden sie anschließend in eine Isopropanol-Einfrierbox überführt. In dieser Box kam es zu einem Temperaturabfall von ca. 1°C pro min. Nach 24 h wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt und bei -196°C kryo-konserviert. Die PBMCs wurden nach einer Zellzählung gleichermaßen behandelt und in 10 Mio. Aliquots kryokonserviert.

### **2.1.5 Auftauen von Tendozyten, PBMCs und Neutrophilen**

Nach dem zügigen Auftauen der Zellen in ihren Kryoröhrchen wurden sie in ein 15 ml-Falcon-Röhrchen mit 5 ml Kulturmedium mit 10 % FKS überführt und so das DMSO-haltige Einfriermedium verdünnt. Es folgte eine fünfminütige Zentrifugation bei 400 g und RT. Die Resuspendierung des Zellpellets wurde mit frischem Kulturmedium und 10 % FKS durchgeführt und die Zellsuspension in ein Zellkulturgefäß überführt und bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Leukozyten (PBMCs und Neutrophile) wurden in gleicher Weise aufgetaut, jedoch in 1 % FKS enthaltenden Kulturmedium gespült und - suspendiert in 2 ml Medium - in die Inserts der Transwell-Platten gefüllt.

### **2.1.6 Beschichtung von Glasplättchen mit Poly-L-Lysin**

Zu Beginn wurden Glasplättchen mit einem Durchmesser von 12 mm mit Ethanol geputzt und in eine Petrischale für die Autoklavierung gelegt und danach bis zur weiteren Verwendung steril aufbewahrt. Für den Gebrauch wurden die Glasplättchen in eine sterile Zellkultur- Petrischale mit einer Pinzette überführt. Die Plättchen sollten einzeln liegen. Anschließend wurde Poly-L-Lysin 1:100 in PBS gelöst. Bevor die Glasplättchen mit der Poly-L-Lysin-Lösung überschichtet werden konnte, mussten die Plättchen zweimal mit PBS gewaschen werden. Die überschichteten Plättchen wurden für 20 min. bei RT inkubiert, bevor sie dreimal mit A. dest. gewaschen und auf ein Gitter einer sterilen Pipettenspitzenbox für ca. 2 h unter die Sterilbank zum Trocknen gelegt wurden. Nach der Trocknung konnten die Glasplättchen in eine saubere Petrischale überführt, mit Parafilm luftdicht verschlossen und bei 4°C gelagert werden.

### **2.1.7 Immunfluoreszenzmarkierung**

Lapine Tendozyten wurden auf Glasplättchen mit 4 %igen Paraformaldehyd fixiert, anschließend mit TBS gespült und dann mit Protease-freiem Eselserum für 30 min. bei RT blockiert. Nach erneuter Spülung mit TBS wurden die Glasplättchen im Brutschrank bei 4°C über Nacht mit polyclonalem Ziegen-Tenomodulin, monoclonalem Maus-Tenascin C Antikörper, polyclonalem Kaninchen Kollagen Typ I Antikörper und polyclonalem Kaninchen Decorin Antikörpern inkubiert. Bevor die Glasplättchen mit dem sekundär Antikörper Affe-anti-Kaninchen-Fluor R488 erneut für 30 min. bei RT inkubiert wurden, erfolgte ein weiterer Waschschrift mit TBS. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt und Überstände mit TBS weggespült. Im letzten Schritt wurden die Glasplättchen mit Fluoromount G bedeckt, mit Hilfe des Fluoreszenz-Mikroskops untersucht und mit dem Olympus Color View II-System photodokumentiert.

### **2.1.8 Haematoxilin-Färbung**

Die Tendozyten wurden 15 min. lang mit 4 %igen Paraformaldehyd fixiert und durch eine ansteigend-konzentrierte Ethanollösung entwässert, bevor sie sie mit Paraffin überdeckt wurden. 7 mm starke Schnitte der nativen und behandelten Sehne wurde für 6 min. mit Harry's Haematoxylin bedeckt, der Überstand mit A. dest.

abgewaschen und für 4 min. mit Eosin gegengefärbt. Abschließend wurden die gefärbten Schnitte mit Entellan überschichtet.

### **2.1.9 Ko-Kultur im Transwellsystem**

Nach 3 - 5 Passagen erfolgte die Zellzählung für einen anschließenden Transfer der Zellen in eine Transwellplatte (6 Well). In jedes Well wurden 80.000-120.000 Achillessehnen-Tendozyten für 24 h angezüchtet. Für den TUNEL-Assay wurden vor der Einsaat der Zellen in jedes Well 4 Glasplättchen platziert. Dann wurden die adhärennten Zellen einmal mit serumreduziertem Medium (1 % FKS) gespült und 30 min. in 1 % FKS enthaltendem Medium bis zur Ko-Kultivierung inkubiert. Ein semipermeables Transwell-Insert, welches durch eine permeable Membran für das Kulturmedium durchlässig ist, aber direkte Zell-Zell-Kontakte nicht erlaubt, wurde danach in die Transwellplatte eingelassen. Neben einem unbehandelten Kontroll-Well wurden die fünf weiteren Wells der 6-Wellplatte jeweils mit 4 Mio. PBMCs oder Neutrophilen pro Well inkubiert sowie mit +/-10 ng/ml TNF $\alpha$ . Die letzten beiden Wells wurden mit PBMCs/TNF $\alpha$  sowie mit Neutrophilen/TNF $\alpha$  beschickt. Die Inkubation erfolgte für 24 h bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank. Die Leukozyten wurden dabei, suspendiert in 2 ml Kulturmedium (1 % FKS), in das Transwell-Insert gefüllt. Auf dem Tendozyten-Monolayer waren jeweils 1 ml Kulturmedium vorgelegt worden.

## **2.2 Genexpressionsanalysen**

Für die Genexpressionsanalysen mittels semi-quantitativer Real-Time-PCR wurde aus lapinen Tendozyten die Gesamt-RNA isoliert, ihre Konzentration bestimmt und die Qualität überprüft. RNA-Aliquots wurden als Matrize für die cDNA-Synthese verwendet, die cDNA dann für die PCR-Analysen eingesetzt.

### **2.2.1 RNA-Isolierung**

Da die RNA gegenüber abbauenden RNAsen sehr anfällig ist und um mögliche Verunreinigungen zu vermeiden, wurden RNase-freie Lösungen und Reaktionsgefäße verwendet sowie die Proben während des Pipettierens auf Eis gelagert.

Bei den RNAsen handelt es sich um ubiquitär vorkommende und sehr stabile Enzyme, die für die laborchemische Isolierung von RNA in der Regel keine Ko-

faktoren benötigen. Für die Isolierung der gesamten RNA fand das RNeasy Mini Kit von der Firma Qiagen GmbH Verwendung.

Als erstes wurde aus den besiedelten Zellkulturflaschen das Kulturmedium entfernt und die Zellen zweimal mit einer PBS-Lösung gewaschen.

Nach gründlicher Entfernung der Salzlösung wurden die Tendozyten für zwei min. mit dem RLT-Lysepuffer überschichtet. Dieser war zuvor mit 1 %  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt worden. Unter Zuhilfenahme eines Zellschabers konnten neben den lysierten Zellen die letzten adhärenen Zellen vom Boden der Kulturflasche gelöst und als Lysat in ein RNase-freies 2 ml-Reaktionsgefäß überführt werden. Im Anschluss wurde ein äquivalentes Volumen an 70 %igem Ethanol in DEPC-H<sub>2</sub>O zugegeben. Die im Gemisch befindlichen Zellen konnten mit Hilfe einer Spritze mit Kanüle (0,9 mm) homogenisiert werden. Die gefällte RNA wurde nach einem Zentrifugationsschritt in einer Säule mit einer Silikamembran gebunden. Es folgte ein mehrfacher Waschvorgang mit den Puffern „RW1“ und „RPE“ sowie ein Verdau mit DNase I zur Entfernung genomischer DNA. Die verbliebene RNA wurde mit 30  $\mu$ l RNase-freiem Wasser eluiert und jeweils 1,5  $\mu$ l RNA-Lösung für die RNA-Konzentrationsbestimmung mit dem NanoDrop 1000 Spectrophotometer sowie 3  $\mu$ l in einigen repräsentativen Versuchen, um weitere RNA-Qualitätsparameter mit Hilfe des RNANano LabChip zu untersuchen, entnommen. Die restliche RNA wurde bei -80°C bis zur cDNASynthese eingefroren.

### 2.2.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

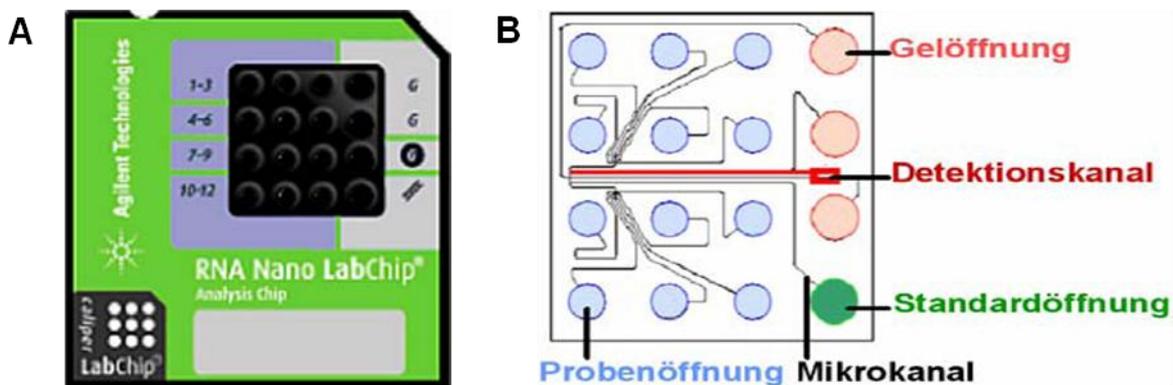
Die Konzentrationsbestimmungen der isolierten RNA-Proben erfolgten mit dem NanoDrop 1000 Spectrophotometer. Für die Messungen wurden 1,5  $\mu$ l RNA-Lösung verwendet. Die RNA-Konzentration wird durch Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt und wie folgt berechnet:

$$\text{RNA-Konzentration (ng/\mu l)} = \text{OD}_{260} \cdot 40 \text{ (Faktor für RNA)}$$

Um die Reinheit der RNA-Präparation zu überprüfen, wurde die Ratio OD<sub>260</sub> / OD<sub>280</sub> gemessen, wobei eine reine RNA-Lösung zwischen 1,8 und 2 liegt. Die gewonnenen Messergebnisse wurden durch die Herstellersoftware innerhalb eines

Absorptionsspektrums von 220 – 350 nm Wellenlänge graphisch dargestellt.

Ferner wurde bei einigen repräsentativen Versuchen die Konzentration der isolierten RNA mit dem RNA Nano LabChip und dem Bioanalyzer von Agilent Technologies bestimmt. Auf dem Chip befindet sich ein siebartiges Polymer (Gel-Matrix) und ein Fluoreszenzfarbstoff sowie miteinander verbundene Mikrokanäle. Die mit dem Fluoreszenzfarbstoff angefärbten Nukleinsäurefragmente werden in der Gelmatrix elektrophoretisch entsprechend ihrer Größe aufgetrennt, detektiert und mit Hilfe der Software als Gelbild oder Elektropherogramm dargestellt. Der Chip ermöglicht eine qualitative Bewertung der Gesamt-RNA, da Kontaminationen in Form von genomischer DNA oder RNA-Degradationen ebenfalls im Elektropherogramm erkennbar sind.



**Abbildung 9:** Der RNA Nano LabChip von Agilent Technologies, Inc. USA. **A** Photo eines RNA Nano LabChips. **B** Schematischer Aufbau des Chips. Quelle: modifiziert nach Agilent Technologies, Inc. USA.

### 2.2.3 cDNA-Synthese

Die Synthese der cDNA erfolgte mit dem QuantiTec Reverse Transcription Kit von Qiagen nach Herstellerangaben. Die Lagerung der synthetisierten cDNA erfolgte bei  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2.4 Die Standard-PCR

Die Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) kann zur Amplifizierung spezifischer DNA-Sequenzen herangezogen werden. Mittels einer *in vitro* durchgeführten DNA-Replikation können kleinste Mengen DNA nachgewiesen werden.

Für die Replikation werden eine DNA-Matrize (Template), eine thermostabile DNA-Polymerase, zwei Oligonukleotid-Primer, vier Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) und eine Pufferlösung, die  $Mg^{2+}$ -Ionen als Ko-Faktor enthält, benötigt. Das typische PCR-Programm besteht aus einem Denaturierungsschritt, einem Annealings- und Elongationsschritt.

### Denaturierung:

Durch das Erhitzen der DNA-Matrize auf  $95^{\circ}C$  wird diese in zwei Einzelstränge aufgetrennt.

### Annealing (Hybridisierung):

In Abhängigkeit von der Basenzusammensetzung und der Länge der Primer lagern sich die Primer am komplementären DNA-Einzelstrang bei einer Temperatur zwischen  $40 - 70^{\circ}C$  an. Da die Primer sich im Überschuss befinden, erfolgt praktisch keine Rückbildung der Einzelstränge zum DNA-Doppelstrang.

### Elongation:

Im Elongationsschritt wird die Temperatur auf das Temperaturoptimum der Taq-Polymerase, aus dem thermophilen Eubakterium *Thermus aquaticus*, bei ca.  $72^{\circ}C$  erhöht. Mit Hilfe der dNTPs verlängern die Polymerasen die Primer in 5'-3'-Richtung, bis die ursprüngliche Länge der Template-DNA erreicht ist.

Nach dem Elongationsschritt ist ein Zyklus abgeschlossen. In der Regel werden 20-40 Zyklen wiederholt, wobei die jeweils im vorherigen Schritt neu entstandenen DNA-Stränge ebenfalls als Matrize dienen. Somit kommt es zu einer exponentiellen Amplifikation der DNA ( $2^n$ -fache Vermehrung,  $n = \text{Zyklen}$ ).

### **2.2.5 Semi-quantitative Real-Time-PCR**

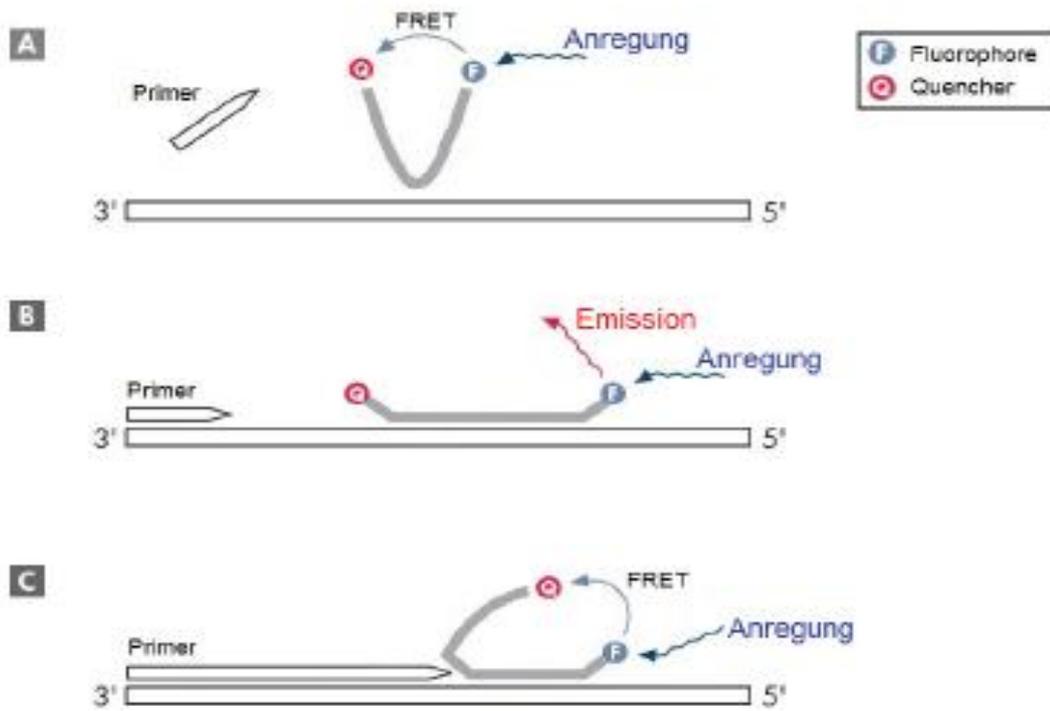
Mit Hilfe der PCR-Analysen sollte die Veränderung des Genexpressionsprofils der mit rekombinanten Zytokinen stimulierten Tendozyten untersucht werden. Da die Genexpression von stimulierten Zellen mit unstimulierten Zellen (Kontrollen) verglichen wurde, spricht man deshalb von einer relativen Quantifizierung (semiquantitativ).

Die Echtzeit-PCR (real-time) ermöglicht es, die Synthese von amplifizierten cDNA-Sequenzen zeitgleich zu detektieren und darzustellen.

Möglich gemacht wird dies technisch durch den Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET), wie er von Cardullo et al. (1988) beschrieben wurde [90]. Praktisch werden Fluoreszenz-markierte sequenzspezifische Sonden verwendet. Die detektierbare Fluoreszenz ist proportional zur Menge an amplifiziertem Produkt, so dass eine Quantifizierung der Probenmenge möglich ist. Gemessen wird das Licht mit Hilfe einer Messeinheit des *Thermocyclers*. Aus den Amplifikationsgraphen wird ein spezifisches Fluoreszenzsignal detektiert, das man als so genannten CT-Wert (Cycle of Threshold) bezeichnet, sobald es den Grenzwert (Threshold) der unspezifischen Hintergrundfluoreszenz übersteigt. Ist das zu amplifizierende Gen in der eingesetzten cDNA-Matrize nur in geringer Kopienzahl vorhanden, ist dieser Wert hoch, bei einer großen Kopienzahl dagegen niedrig. Er muss sich eindeutig von den unspezifischen Hintergrundfluoreszenzsignalen unterscheiden. Die Durchführung der PCR erfolgte sowohl mit dem Quantitec Gene Expression Assay von Qiagen als auch mit dem TaqMan Gene Expression Assay von Applied Biosystems (ABI), da nicht alle verwendeten Primer bei einer der beiden Firmen verfügbar waren.

Das Quantitec Gene Expression Assay von Qiagen basiert auf sequenzspezifischen zweifach-markierten Oligonukleotiden, die zwischen den beiden Primern an die Ziel-DNA binden. Am 3' Ende besitzen die QuantiProbe-Sonden einen Fluoreszenzfarbstoff und am 5' Ende ein nicht fluoreszierendes "Quenching-Molekül" sowie den sog. „Minor Groove Binder“ (MGB), mit dessen Hilfe sie sich in die doppelsträngige DNA einlagern können. Der MGB-Komplex hat eine wichtige Funktion während der Synthese des komplementären DNA-Stranges, da er eine Hydrolyse des QuantiProbe-Oligonukleotids durch die 5'→3' Exonucleaseaktivität der *Taq* DNA-Polymerase verhindert. Im ungebundenen Zustand unterdrückt durch räumliche Nähe das "Quenching-Molekül" die Fluoreszenz der QuantiProbe-Sonden. Bei der Hybridisierung durch die Primer-Anlagerung bindet die Sonde an ihre spezifische Zielsequenz, wodurch das "Quenching-Molekül" räumlich so weit vom Fluoreszenzfarbstoff am 3' Ende getrennt wird, dass ein Fluoreszenzsignal entsteht. Da die Stärke der Emission direkt proportional zur im Ansatz vorhandenen Menge an PCR-Produkt ist, ist so eine Quantifizierung der Zielsequenz möglich. Sobald die Probe

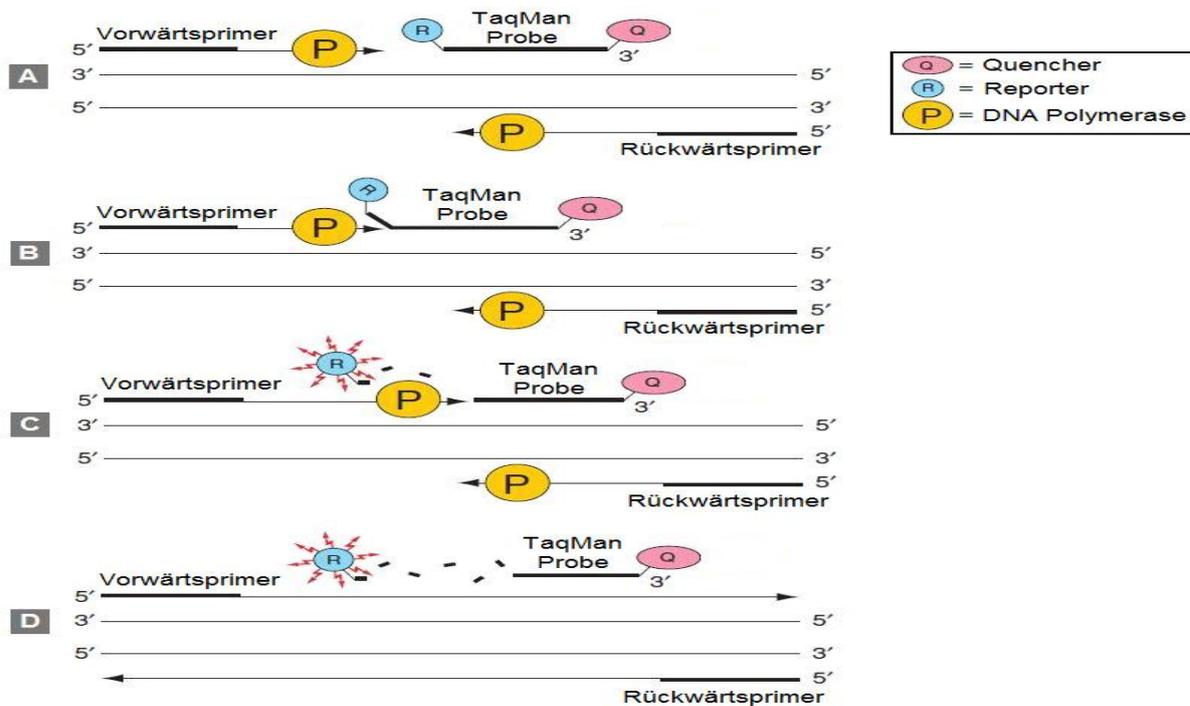
sich von der Ziel-DNA abgelöst hat, nähern sich der Fluoreszenzfarbstoff und das "Quenching-Molekül" wieder einander an, und das Fluoreszenzsignal erlischt.



**Abbildung 10: QuantiTect® Probe Prinzip in der RT-PCR.** A) In Lösung bildet die QuantiTect® Sonde eine willkürliche Struktur. Durch die räumliche Nähe von Fluorophor und Quencher kommt es zum FRET, wodurch die Fluoreszenz unterbunden wird. B) Während des Annealings hybridisiert die QuantiTect® Sonde spezifisch an die Zielsequenz. Dies separiert Fluorophor und Quencher voneinander und es entsteht ein Fluoreszenzsignal, welches proportional zur PCR-Produktzunahme ist. C) Während der Elongation wird die Sonde durch die Taq Polymerase mit 5' → 3' Exonuklease-Aktivität von der Zielsequenz gelöst. Dabei tritt zwischen Fluorophor und Quenchern wieder eine räumliche Nähe auf, wodurch die Fluoreszenz unterdrückt wird. Die QuantiTect® Sonde wird im Gegensatz zur TaqMan® nicht zerstört und kann erneut an die Zielsequenz binden (modifiziert nach QuantiTect® Gene Expression Assay Handbook, Qiagen (05/2004).

Das TaqMan Gene Expression Assay von Applied Biosystems (ABI) basiert auf einer Sonde, die am 5'-Ende mit einer Reportfluoreszenz und am 3'-Ende mit einer Quencherfluoreszenz markiert ist. Die Sonde hybridisiert mit der gewünschten Zielsequenz zwischen den beiden Primerbindungsstellen. Im inaktivierten Zustand ist der Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer zwischen diesen beiden Fluoreszenz-Farbstoffen dafür verantwortlich, dass der Quencherfarbstoff durch seine räumliche Nähe zum Reporterfarbstoff die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffs unterdrückt (Quenching-Effekt). Im Rahmen der Amplifikation bei der PCR trifft die Taq DNA-Polymerase auf die Sonde und baut sie mit ihrer 5'→3'-Exonuklease-Aktivität am 5'Ende ab und löst so die räumliche Nähe beider Farbstoffe zueinander auf, wodurch

der Quenching-Effekt aufgehoben wird und das Fluoreszenz-Signal des Reporterstoffs detektierbar wird. Die Emission der Reporterfluoreszenz steigt in Abhängigkeit von der Ausgangskonzentration des Ausgangs-Template mit zunehmender Zyklusanzahl an, wodurch die Stärke der Emission als ein Maß für die quantifizierende Template-Konzentration der Probe dienen kann.



**Abbildung 11: TaqMan® Prinzip in der RT-PCR.** A) Die TaqMan® Sonde besteht aus einer spezifischen Oligonukleotidsequenz, die am 5' Ende mit einem Reporter (FAM) und am 3' Ende mit einem Quencher (TAMRA) gelabelt ist. Solange die Sonde intakt ist, wird das Fluoreszenzsignal durch das FRET Prinzip unterbunden. B) Während des Annealings hybridisiert die Sonde spezifisch an die Zielsequenz. C) Während der Elongation wird die Sonde durch die Taq Polymerase mit 5' → 3' Exonuklease-Aktivität von der Zielsequenz hydrolysiert. D) Reporter und Quencher werden durch die Taq Polymerase getrennt, wodurch ein Fluoreszenzsignal generiert, welches proportional zur PCR-Produktzunahme ist (modifiziert nach TaqMan® Gene Expression Assays Protocol, Applied Biosystems (05/2004)).

Für die Real-Time-PCR wurde eine 96-Well-Platte verwendet. Es erfolgte für alle Proben eine Doppelbestimmung sowie für jeden Primer zusätzlich eine Kontrolle („Blank“), die alle notwendigen Bestandteile bis auf die cDNA (Non Template Control, NTC) enthielt, um mögliche Kontaminationen mit DNA, cDNA oder PCR-Amplifikaten aufzuzeigen. Um Reamplifikationen durch Kontaminationen aus vorangegangenen PCRs zu verhindern, enthält der TaqMan Mastermix UTP (anstelle von TTP) und das Enzym AmpErase UNG (Uracil-N-Glycosylase). Das Enzym UNG baut in einem 2-minütigen Verdau doppelsträngige DNA, die UTP enthält, vor der eigentlichen PCR ab. Für jeden Primer wurde in Abhängigkeit von der eingesetzten Probenmenge ein

Gemisch aus RT-H<sub>2</sub>O, Master Mix und Primer zusammenpipettiert, kurz gemischt und zentrifugiert. In den Versuchen wurde generell eine gleiche cDNA-Menge (16,7 ng) verwendet. Zunächst wurden je 19 µl des Primer-Master Mix-Gemisches für jede Probe sowie die entsprechenden Kontrollen in die Vertiefungen der 96-Well-Platte pipettiert. Nach dem Abdecken der Kontrollen erfolgte als nächstes das Pipettieren von je 1 µl cDNA in jede Vertiefung der 96-Well-Platte mit dem vorgelegten RT-H<sub>2</sub>O-Master Mix-Gemisch. Im Anschluss wurden die Proben mit Deckeln fest verschlossen, die Platte kurz zentrifugiert (400 g). Die Detektion erfolgte im Thermocycler (Opticon I).

Primer beider Firmen und ihre entsprechenden Mastermix-Gemische sind in derselben PCR zum Einsatz gekommen. Aufgrund der unterschiedlichen Detektionsprinzipien musste ein kombiniertes Temperaturprogramm mit zwei Detektionsschritten zusammengestellt werden.

Mögliche unterschiedliche cDNA-Konzentrationen der Proben wurden gegen ein endogenes Referenzgen normalisiert. Dazu dient ein so genanntes „Housekeeping Gene“. Diese Gene zeichnen sich dadurch aus, dass sie konstitutiv exprimiert und nur wenig von einer Stimulation beeinflusst werden. Als Referenzgen wurde das Zytoskelettprotein  $\beta$ -Aktin kodierende Gen verwendet. Wie alle übrigen Werte auch wurde der C<sub>T</sub>-Wert für  $\beta$ -Aktin ebenfalls semiquantitativ bestimmt. Über die Expressionsstärke können indirekt Rückschlüsse auf die mRNA-Menge und somit auf die Menge an eingesetzter cDNA geschlossen werden. Anhand des C<sub>T</sub>-Werts des Referenzgens erfolgte dann die Normalisierung der Genexpressionen aller folgenden Proben.

Ferner ist es möglich, eine relative Probenquantifizierung nach Pfaffl (2004) vorzunehmen [91]. Dabei wird das PCR-Signal des relevanten Transkriptes einer Behandlungsgruppe mit einer unbehandelten Probe verglichen. Auf diesem Wege ist es möglich, die relativen Veränderungen der Genexpression aus den Real-time-PCR-Daten zu bestimmen. Die aus den Doppelbestimmungen gemittelten C<sub>T</sub>-Werte werden gegen das endogene Referenzgen ( $\beta$ -Aktin) normalisiert. Dabei müssen die Effizienzen aus der Effizienzbestimmung Berücksichtigung finden und mit ausgewertet werden.

Die nach Pfaffl aufgestellte Gleichung gibt das Verhältnis der Genexpression eines bestimmten Zielgens in zwei unterschiedlichen Proben (Test und Kalibrator) wieder. Dabei werden die  $C_T$ -Werte des Zielgens um die Werte des Referenzgens ( $\beta$ -Aktin) korrigiert. Im Folgenden ist die Pfaffl-Gleichung [92] dargestellt:

$$Ratio = \frac{E_{GOI} (CT_{GOI_{Ko}} - CT_{GOI_{Beh}})}{E_{REF} (CT_{REF_{Ko}} - CT_{REF_{Beh}})}$$

**Tabelle 1: Temperaturprogramm für das Qiagen-System**

1. Aktivierung der HotStarTaq DNA-Polymerase	15 min	95°C	} <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">41 Zyklen</span>
2. Denaturierung	15 s	94°C	
3. Hybridisierung	30 s	56°C	
4. Detektion			
5. Elongation	30 s	76°C	
6. Abkühlen	$\infty$	6°C	

**Tabelle 2: Temperaturprogramm für das ABI-System**

1. UNG-Verdau	2 min	50°C	} <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">41 Zyklen</span>
2. Inaktivierung der UNG + Aktivierung der AmpliTaq Gold DNA-Polymerase	10 min	95°C	
3. Denaturierung	15 s	95°C	
4. Hybridisierung & Elongation	1 min	60°C	
5. Detektion			
6. Abkühlen	$\infty$	6°C	

**Tabelle 3: Temperaturprogramm für die kombinierten Programme**

1. UNG-Verdau	2 min	50°C	} <span style="border: 1px solid black; padding: 2px;">41 Zyklen</span>
2. Inaktivierung der UNG + Aktivierung der DNA-Polymerasen	10 min	95°C	
3. Denaturierung	15 s	95°C	
4. Hybridisierung	30 s	56°C	
5. Detektion			
6. Hybridisierung & Elongation	1 min	60°C	
7. Detektion			
8. Abkühlen	$\infty$	6°C	

Tabelle 4: Pipettierschema für die Primer von Qiagen und ABI

	QuantiProbe	TaqMan-Sonde
Master Mix	10 µl	10 µl
RT-H <sub>2</sub> O	7 µl	8 µl
Primer	2 µl	1 µl
Ansatz je Probe	19 µl	19 µl
eingesetzte cDNA	1 µl	1 µl

### 2.2.6 Effizienzbestimmung

Zu Beginn meiner Genexpressionsanalysen waren die verwendeten Primer für die Zielgene IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6, Myodulin, MMP1 und Glycerinaldehyd-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) für lapine Tendozyten noch nicht validiert. Die Effizienz der PCR hängt stark von der Validität der verwendeten Primer ab, weshalb zunächst die Eignung der Primer zur Amplifizierung der cDNA lapiner Tendozyten überprüft werden musste. Da meist keine exakte Verdopplung (Effizienz = 2, d.h. 100 %) der Menge an PCR-Produkt in jedem Zyklus stattfindet, wurden Effizienzbestimmungen der verwendeten Primer durchgeführt. Die Effizienz ist abhängig vom Primer-Paar und somit von dem amplifizierten Fragment. Es erfolgte eine Dreifachbestimmung für jedes Primer-Paar über eine Verdünnungsreihe bzw. Standardkurve mit mindestens 5 Verdünnungsstufen. Nach Rutledge et al. (2003) und Pfaffl et al. (2004) ist eine Effizienz zwischen 1,85 und 2,10 wünschenswert [91, 93]. Da der Ct-Wert (Threshold Cycle) vom Logarithmus der Template-Menge linear abhängig ist, ist die Steigung der Geraden abhängig von der Effizienz. Aus dem Anstieg der erhaltenen Geraden ( $r > 0,98$ ) konnte über die Gleichung  $E = 10^{-(1/\text{Anstieg})}$  die Effizienz E ermittelt werden.

## **2.3 Western Blot und Caspase-3/7-Assay**

Um den Einfluss der Zytokine auf den Gehalt bestimmter Proteine sowie die Caspase-3/7-Aktivität zu untersuchen, wurden aus den stimulierten Tendozyten die Gesamtzell-Proteine isoliert und für die Western Blot-Analysen und die Bestimmung der Caspase-3/7-Aktivität eingesetzt.

### **2.3.1 Proteinisolierung aus Tendozyten**

Alle Arbeitsschritte für die Proteinisolierung erfolgten auf Eis und mit gekühlten Reagenzien.

Die Tendozyten wurden zunächst mit PBS gewaschen und je nach Zelldichte und Größe des Kulturgefäßes mit 150 bis 300 µl Lysepuffer überschichtet und für 5 min. inkubiert. Mit Hilfe eines Zellschabers wurden die Zellen von der Oberfläche des Zellkulturgefäßes abgelöst und mit einer Spritze in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt. Die Homogenisierung der Zellsuspension erfolgte mittels einer Spritze mit Kanüle (0,90 x 40 mm) durch mehrmaliges Aufziehen und Herausdrücken. Im Anschluss wurde die Zelllösung für 30 min. bei 26000 g und 4°C zentrifugiert. Die im Überstand befindliche Proteinfraction wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und 20 bis 30 µl für die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford abgenommen. Die Proteinlysate wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### **2.3.2 Proteinbestimmung nach Bradford**

Für die Konzentrationsbestimmung aus den Proteinlösungen wurde die Methode nach Bradford verwendet. Die Methode beruht darauf, dass der ionische Farbstoff Coomassie Brilliant Blue nach seiner Bindung an basischen Aminosäuren von Proteinen sein Absorptionsmaximum verändert. Ungebunden liegt es bei 465 nm und mit Proteinbindung bei 595 nm. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung.

Die Proteinproben wurden auf Eis aufgetaut und eine BSA-Verdünnungsreihe mit Verdünnungsstufen zwischen 0 µg/ml und 100 µg/ml BSA als Proteinstandard angefertigt.

Die Proben wurden in A. dest. verdünnt, um die Proteinkonzentration innerhalb des Konzentrationsbereiches der Standardreihe einzustellen. In die Kavitäten einer 96-Well-Platte wurden jeweils 50 µl der Standardverdünnungsreihe und der verdünnten Proben für die Doppelbestimmung pipettiert. Lichtgeschützt und zügig wurde das Bradfordreagenz (5 x Roti-Nanoquant) 1:5 in A. dest. verdünnt und zu der Verdünnungsreihe und den Proben pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 min. bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei den Wellenlängen 595 nm und 465 nm gemessen (Mikrotiterplattenphotometer GENios) und der Quotient aus den optischen Dichten gebildet. Anhand der BSA-Standardverdünnungsreihe wurde die Proteinkonzentration berechnet.

### **2.3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Mit Hilfe der SDS-PAGE kann das Molekulargewicht von Proteinen in einem Proteingemisch bestimmt werden. Das SDS (Natriumdodecylsulfat) kann Proteine denaturieren. Diese Wirkung kann durch vorherige Reduktion mit Mercaptoethanol oder DTT verstärkt werden. An den denaturierten Proteinen kann dann das Natriumdodecylsulfat binden, so dass ein negativ geladener SDS-Protein-Komplex mit konstantem Ladung-zu-Masse-Verhältnis entsteht. Die verschiedenen Proteine im SDS-Gel werden nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die SDS-Protein-Komplexe wandern im elektrischen Feld zur Anode. Bei der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Lämmli (1970) werden die Proteine zunächst im großporigen Sammelgel ohne Molekularsiebeffekt konzentriert und anschließend im Trenngel mit geringerer Porengröße und auftretendem Molekularsiebeffekt ihrer Größe nach aufgetrennt [94].

Das Gelgießsystem und Zubehör wurden mit 70 % Ethanol gereinigt und zusammengebaut. Das 10 %ige Trenngel wurde in einem Reaktionsgefäß hergestellt (Tabelle 5), wobei 5 % Ammoniumperoxodisulfat (APS) und Tetramethylethylen-diamin (TEMED) erst am Ende dazu gegeben wurden und kurz gemischt, um ein vorzeitiges Polymerisieren zu verhindern und ein reibungsloses Gießen in die zwei abgedichteten Glasplatten bis in eine Höhe von ca. 2/3 der Glasplatten zu gewährleisten. Für eine gerade Gel-Oberkante wurde das Trenngel mit H<sub>2</sub>O-Isobutanol überschichtet. Die Auspolymerisation des Trenngels erfolgte nach ca. 30 min. Anschließend wurde die Geloberfläche mit Ionen-freien Wasser gespült und

die Reste des H<sub>2</sub>O-Isobutanols mit einem Filterpapier vorsichtig und - ohne das Gel zu berühren - entfernt.

Das in der Zwischenzeit hergestellte Sammelgel wurde danach zügig auf das Trenngel gegossen und ein Kamm für die Aussparungen der Probestaschen eingesetzt und bis 3 mm über das Trenngel geschoben. Nach ca. 30 min. polymerisiert das Sammelgel ebenfalls aus. Das fertige Gel wurde in die Elektrophoresekammer eingesetzt, der Kamm gezogen und die leeren Probestaschen mit 1x Laufpuffer gespült. Anschließend wurde die Elektrophoresekammer mit dem Laufpuffer aufgefüllt. In jede Probestasche wurden jeweils 20 µl (entsprechen 40 µg) der konzentrierten Proteinlösungen gefüllt sowie 10 µl Marker (Kaleidoskop Prestained Standards) in die dafür vorgesehenen Geltaschen. Anschließend wurde der Deckel auf die Elektrophoresekammer gesetzt und der Strom angeschlossen. Das Sammeln der Proben erfolgte 15 min. bei 80 V und die Auftrennung 1 h bei 120 V.

**Tabelle 5: Zusammensetzung verwendeter Polyacrylamidgele.** Die angegebenen Volumina beziehen sich auf 2 Gele

	<b>Trenngel</b>	<b>Sammelgel</b>
	10 %	4 %
30 % Polyacrylamid-Stammlösung	3,3 ml	0,67 ml
Trenn- bzw. Sammelgelpuffer	2,5 ml	1,25 ml
20 % SDS	50 µl	25 µl
H <sub>2</sub> O	4,05 ml	3 ml
5 % APS	100 µl	50 µl
TEMED	10 µl	10 µl

### **2.3.4 Western Blot**

Als erstes wurden die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine bei 120 V für 70 – 90 min. in Richtung Anode auf eine Nitrozellulosemembran (0,2 µm Porengröße) übertragen, um anschließend mittels Antikörpern spezifische Proteine zu detektieren. Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern, musste die Membran bei RT für 1 h in einer Roti Block-Blockierlösung geschwenkt werden. Danach wurde die Membran mit dem primären Antikörper inkubiert, der an die spezifischen Proteine bindet. Der primäre Antikörper wurde zuvor 1:1000 in der Blockierlösung verdünnt und die Membran für zwei Stunden bei RT oder bei 4°C die Nacht hindurch geschwenkt. Danach wurde die Membran dreimal für 5 min. in PBST gewaschen. Im Anschluss daran erfolgte die Inkubation durch einen sekundären, enzymgekoppelten Antikörper, der an die primären Antikörper bindet. Der sekundäre Antikörper wurde ebenfalls in 15 ml der Blockierlösung verdünnt und zusammen mit der Nitrozellulosemembran für 1 – 2 h bei RT geschwenkt. Nach dreimaligen Waschschritten für 5 min. mit PBST und einem letzten Waschvorgang mit PBS erfolgte die Detektion der gebundenen Antikörper mittels der ECL-Reagenzien, einem Röntgenfilm und entsprechender Röntgenkassette. Die densitometrische Auswertung wurde mit dem Programm Alpha DigiDoc vorgenommen.

### **2.3.5 Caspase-3/7-Assay**

Die Bestimmung der Caspase-3/7-Aktivität wurde durchgeführt, um Informationen über apoptotische Vorgänge, die überwiegend mit einer Caspase-3 Aktivierung einhergehen, zu gewinnen. Den Proteinproben wurde ein pro-fluoreszierendes Substrat zugegeben, welches durch die aktive Caspase-3 und Caspase-7 in ein fluoreszierendes Produkt umgesetzt wird. Eine Unterscheidung zwischen den beiden Caspasen ist nicht möglich, da beide das Substrat (Z-DEVD)<sub>2</sub>-Rhodamin 110 umsetzen. Je stärker die gemessene Fluoreszenz ist, desto höher ist der Gehalt an aktiver Caspase-3/-7 und desto mehr Zellen sind apoptotisch.

Vor den Versuchen wurden alle Proben auf die gleiche Protein-Konzentration (100 µg/ml) eingestellt. In die ersten beiden Vertiefungen der schwarzen 96-Well-Platte wurden 100 µl PBS für die Bestimmung der unspezifischen Hintergrundfluoreszenz pipettiert sowie je 100 µl Probe in Doppelbestimmung.

Während der Puffer bei RT aufgetaut werden kann, muss das Substrat lichtgeschützt auf Eis aufgetaut werden. Das Substrat wurde 1:100 im Puffer verdünnt und dann jeweils 100 µl zu den Proben und zum PBS pipettiert. Durch Alufolie vor Licht geschützt, wurde die Platte 45 min. auf einem Schwenker inkubiert und danach die Fluoreszenz bei einer Wellenlänge 535 nm mit dem Mikrotiterplattenphotometer bestimmt.

### **2.4 TUNEL-Assay**

Die TUNEL-Methode dient dazu, einen Zelluntergang nachzuweisen. Eine Unterscheidung zwischen Apoptose und Nekrose ist jedoch nicht möglich.

Die Präparation der Zellen für den TUNEL-Assay erfolgte durch das in Situ Cell Death Detection Kit der Firma Roche entsprechend der Herstellerangaben. Es ermöglicht eine Markierung und Detektion von fragmentierter DNA mit Hilfe der Fluoreszenz-Mikroskopie. Beim Zelluntergang wird durch Endonukleasen der DNA-Strang fragmentiert und 3'-OH-Gruppen dabei freigesetzt. Durch das Enzym TdT (Desoxyribonukleotidytransferase) werden an die freien Hydroxylgruppen fluoreszierende dUTP-Biotin gekoppelt und mikroskopisch sichtbar gemacht.

### **2.5 Statistik**

Die statistischen Analysen erfolgten mit dem gepaarten Student-t-Test mit Hilfe des Auswertungsprogramms GraphPad Prism 5.0. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte +/- SD (Standard Deviation – Standardabweichung) angegeben. Als signifikant wurden p Werte  $\leq 0,05$  bezeichnet. Es galten folgende Signifikanzniveaus:  $p \leq 0,05$  (signifikant, \*),  $p \leq 0,01$  (sehr signifikant, \*\*) und  $p \leq 0,005$  (hochsignifikant, \*\*\*).

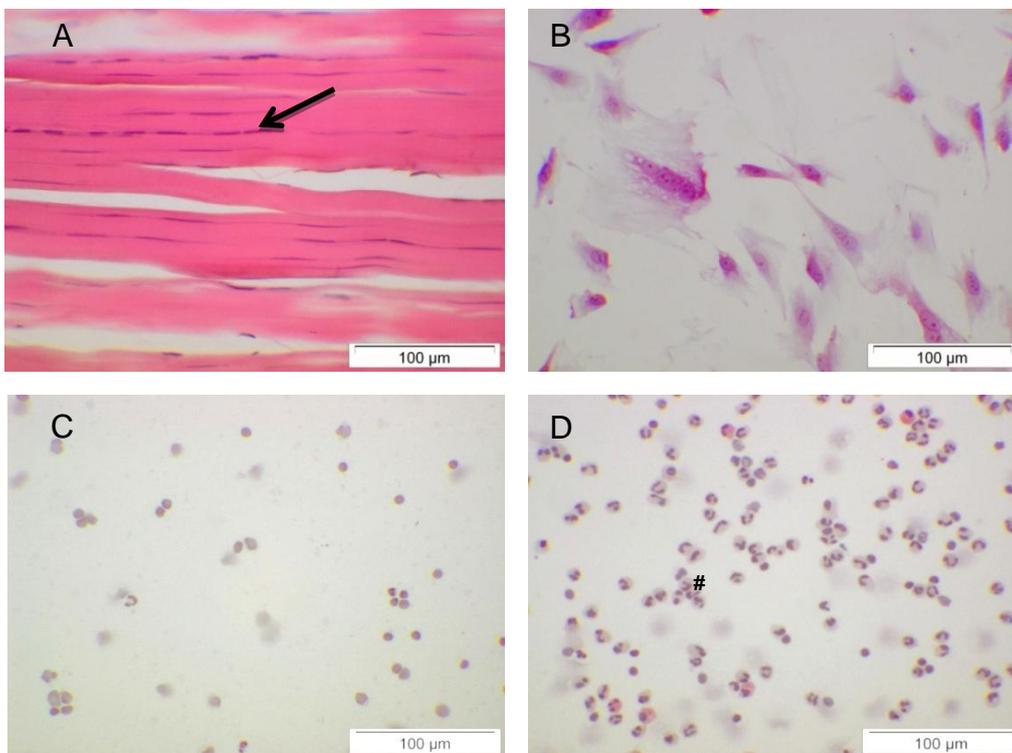
### **2.6 Richtlinien**

Die experimentellen Arbeiten erfolgten nach den Grundsätzen der Charité zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis.

### 3. Ergebnisse

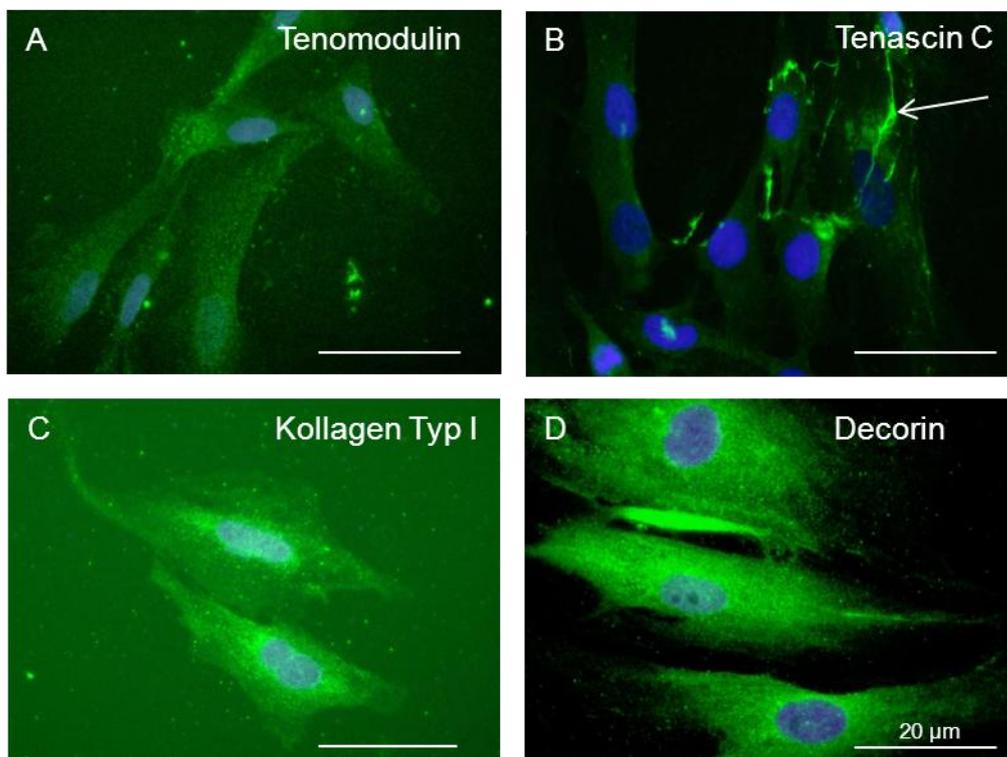
#### 3.1 Tendozyten- und Leukozytencharakterisierung in der Kultur

Die Tendozyten der Sehnenstückchen, die zur Zellgewinnung genutzt wurden, zeigten längliche, in Reihen angeordnete Zellkerne, die zwischen den Kollagenfasern zu liegen kommen (Abb. 12A). In der Zellkultur besaßen die Tendozyten eine für diese Zellen typische Morphologie. Neben rundlichen Zellkörpern waren langgestreckte Zellkörper mit mehreren, z. T. sehr langen Ausläufern, über die sie untereinander in Verbindung stehen, aufzufinden. Einige der Ausläufer waren flächig ausgebreitet, andere blieben sehr schmal und langgezogen (Abb. 12B).



**Abbildung 12: HE Färbungen der lapinen Sehne und für die Ko-Kulturen verwendeter Zellen.** A) HE-Färbung eines Sehnenlängsschnittes. Die EZM ist rötlich angefärbt, die Zellkerne der Tendozyten dunkelviolett. Die relative Zellarmut sowie die Anordnung der Zellen entlang der leicht wellenförmig verlaufenden Kollagenfasern, sind gut zu erkennen. Vergrößerung: 100x. B) HE-gefärbte Tendozyten *in vitro*. Die kultivierten Tendozyten in langgestreckter Form nehmen über Zellfortsätze Kontakt zu ihren Nachbarzellen auf. C) Dargestellt sind HE-gefärbte PBMCs mit einem typischen nierenförmigen Zellkern sowie D) merfachsegmentierte neutrophile und eosinophile (\*) Granulozyten. Vergrößerung: 100x. Quelle: Al-Sadi et al., 2011; AG Bioreconstruction [49].

In den Abbildungen 12 C und D sind die deutlich kleineren Leukozyten dargestellt. Neben den PBMCs konnten ebenfalls Granulozyten identifiziert werden. In den Granulozytenpräparationen waren auch vereinzelte eosinophile Granulozyten an ihren eosinophilen Zytoplasmaeinschlüssen erkennbar. Auf der Proteinebene exprimierten die Tendozyten den anti-angiogenetischen Sehnenmarker Tenomodulin, das ECM-Glykoprotein Tenascin C, Kollagen Typ I als Hauptprotein der ECM und das sehrentypische Proteoglykan Decorin (Abb. 13). Außerdem synthetisierten die Zellen das Protein Fibronectin, welches hier nicht dargestellt wird.

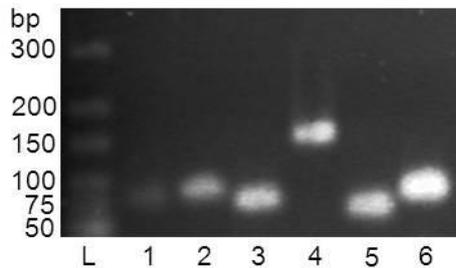


**Abbildung 13: Immunzytochemische Färbungen zur Charakterisierung der Sehnenzellen.** A) Abgebildet sind für Tenomodulin immunmarkierte Tendozyten mit langgestreckten Fortsätzen, mit denen sie untereinander Kontakt aufnehmen. In den Abbildungen B-D werden die bereits im Text beschriebenen Matrixbestandteile, die von den Tendozyten produziert werden, dargestellt. Vergrößerung: 1000x. Quelle: Al-Sadi et al., 2011; AG Bioreconstruction [49].

### 3.2 Validierung der zur Amplifikation von lapinen Tendozyten cDNA genutzten Primer

Mit Hilfe der semi-quantitativen Real-Time-PCR-Analysen sollte festgestellt werden, ob die 24stündige Stimulation von Achillessehnen Tendozyten mit humanen rekombinanten Zytokinen und autologen PBMCs sowie Neutrophilen eine veränderte Genexpression bestimmter Gene induziert. Hierfür wurden lapine Tendozyten aus sieben verschiedenen Achillessehnen verwendet. Da für die Sehnenheilung der Auf-

und Umbau der EZM von entscheidender Bedeutung ist, wurden die Auswirkungen der Zytokinstimulationen auf die Genexpression der EZM-Proteine Decorin und Fibronectin untersucht sowie die Genexpression des Hauptmatrixproteins der Sehne, Kollagen Typ I und von MMP1.



**Abbildung 14: Agarosegelelektrophorese zur Charakterisierung von PCR-Amplifikaten.** Dargestellt ist ein Agarose-Gelbild der mit verschiedenen Primern und Kaninchen-Achillessehnen cDNA gewonnenen PCR-Amplifikate. (L) Marker (1) TNF $\alpha$  (2) IL-1 $\beta$  (3) IL-6 (4) Myodulin (5) MMP1 (6) GAPDH.

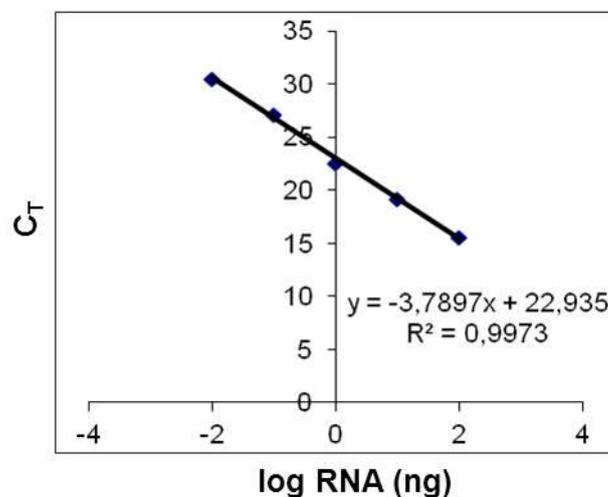
Zum Start-Zeitpunkt meiner ersten Versuche waren die Primer für die Matrixkomponenten Kollagen Typ I, Decorin und Fibronectin für ein lapines Modell nicht kommerziell erhältlich. Laborinterne Voruntersuchungen haben aber gezeigt, dass vorhandene Primer für das murine  $\beta$ -Aktin- und die humanen Kollagen Typ I-, Decorin- und Fibronectin-Gene im lapinen Modell mit ausreichender Bindungseffizienz verwendbar sind. IL-1 $\beta$ -, TNF $\alpha$ -, IL-6- und MMP1-Primer waren für Kaninchensehnenzellen bereits erhältlich, ebenso wie für den entsprechenden „Housekeeper“ GAPDH.

Als Referenzgen („Housekeeping-Gen“) für Primer der Firma Qiagen wurde das Zytoskelettprotein  $\beta$ -Aktin kodierende Gen verwendet, da es weitestgehend unabhängig vom Zellzyklus und äußeren Einflüssen konstitutiv exprimiert wird. Für die von der Firma Applied Biosystems (ABI) verwendeten Primer wurde als Referenzgen GAPDH verwendet.

Die mit den verschiedenen Primern und cDNA eines Sehnenzell-Spenders gewonnenen PCR-Amplifikate wurden exemplarisch auf ein Agarosegel aufgetragen, um durch Bestimmung der Amplifikatgröße die Spezifität der Reaktion nachzuweisen. Es konnte jeweils ausschließlich eine Bande der errechneten Größe für jeden Primer generiert werden (Abb. 14).

### 3.3 Effizienzbestimmung

Da zu Beginn dieser Arbeit noch nicht alle Primer für lapine Tendozyten validiert waren, erfolgte zunächst eine Analyse der Eignung dieser Primer für Expressionsanalysen in Form einer Primereffizienzbestimmung. Hierfür wurden die in der RTD-PCR ermittelten  $C_T$ -Werte jeder Verdünnungsstufe gegen den Logarithmus der jeweiligen Menge an eingesetzter Ausgangs-RNA, welche zur Synthese der cDNA verwendet wurde, aufgetragen (Abb. 15). Über die Gleichung  $E = 10^{-1/\text{Anstieg}}$  konnte aus dem Anstieg der ermittelten Geraden die Effizienz  $E$  errechnet werden (s.u.).



**Abbildung 15: Primereffizienzbestimmung.** Es ist die Gerade über den Messpunkten aus der Primer-Effizienzbestimmung für das Beispiel des GAPDH-Gens dargestellt. Es wurde der in der RTD-PCR ermittelte  $C_T$ -Wert der jeweiligen cDNA-Verdünnungsstufe gegen den Logarithmus der ursprünglich eingesetzten RNA-Menge aufgetragen.

Eine Prozentangabe der Effizienz erfolgte über die Gleichung  $E_{[\%]} = (E-1) \cdot 100$ . Die auf diese Weise ermittelten Primereffizienzen für lapine Tendozyten lagen zwischen 89 % und 112 % (Tabelle 6) und damit nahe der idealen Effizienz von 100 %, was eine Verwendung der Primer und ein Heranziehen der Effizienzen für die Auswertung der Genexpressionsanalysen nach Pfaffl (2001) erlaubte (s. u.) [92].

**Tabelle 6: Primereffizienzen.** Die RNA für die cDNA-Synthese wurde aus lapinen Tendozyten der Passage 2, nach Erreichen von über 80 % Konfluenz, isoliert. Neben den in der vorliegenden Arbeit für die lapinen Tendozyten ermittelten Effizienzen der Primer sind zur Vervollständigung auch alle weiteren Primereffizienzen, die in der Arbeitsgruppe bereits vorlagen und für die Genexpressionsanalysen dieser Arbeit Verwendung fanden, aufgeführt (mit \*Sternchen gekennzeichnet).

Gen	Spezies	Effizienz
IL-1 $\beta$	lapin	112 %
TNF $\alpha$	lapin	110 %
IL-6	lapin	91 %
Myodulin	lapin	89 %
MMP1	lapin	89 %
GAPDH	lapin	95 %
Kollagen Typ I*	human	86 %
Decorin*	human	88 %
Fibronektin*	human	108 %
$\beta$ 1-Integrin*	human	108 %
$\beta$ -Aktin*	Maus	86 %

### **3.4 Analysen der Genexpression von Zytokinen, dem ECM-Rezeptor $\beta$ 1-Integrin, Myodulin, extrazellulären Matrix-Proteinen und MMP1 in lapinen Tendozyten**

Mit Hilfe der PCR-Analysen sollte festgestellt werden, ob die 24stündige Stimulation der Tendozyten mit lapinen autologen Leukozyten allein oder in Kombination mit rekombinantem TNF $\alpha$  eine veränderte Expression bestimmter Gene induziert.

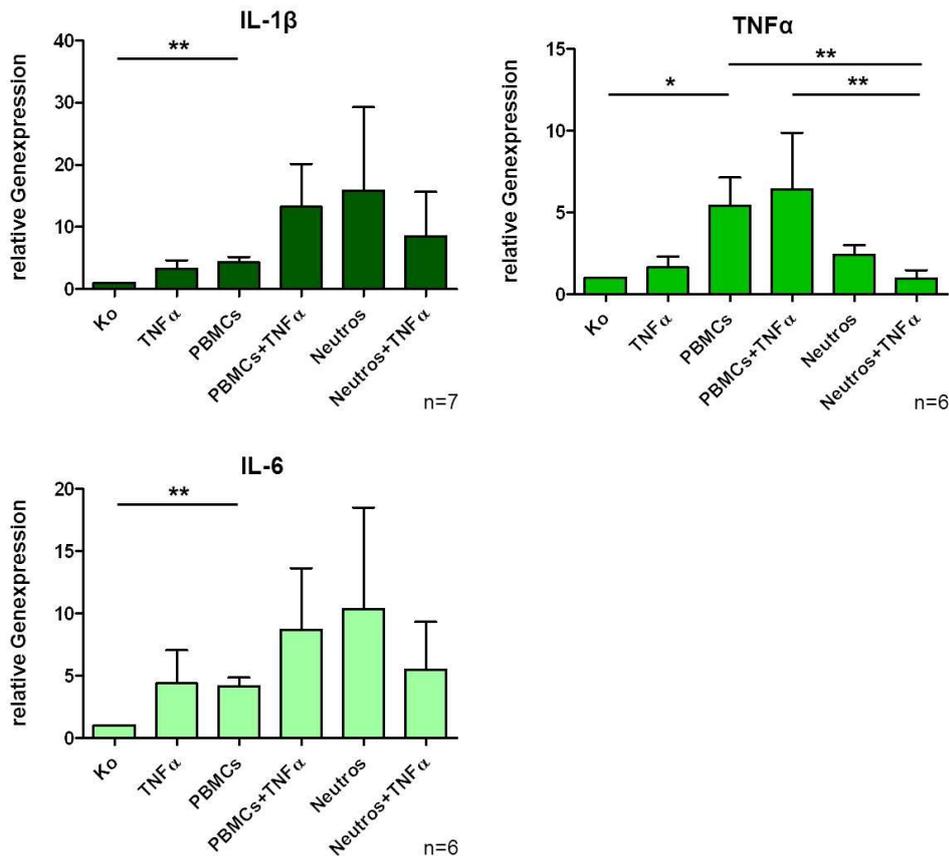
Die Genexpressionanalysen wurden mit Sehnenzellen von sieben verschiedenen lapinen Spendertieren durchgeführt. Die Stimulation erfolgte für 24 Stunden mit 10 ng/ml TNF $\alpha$  und  $4 \times 10^6$  PBMCs oder neutrophilen Granulozyten in einem Transwellsystem.

#### **3.4.1 Genexpression von Zytokinen in autologen Tendozyten, stimuliert mit Leukozyten**

##### **IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ und IL-6**

Die Genexpression der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  sowie des immunoregulatorischen IL-6 wurde durch die Stimulation der Tendozyten mit PBMCs signifikant gesteigert (Abb. 16).

Die Einzelstimulation mit TNF $\alpha$  sowie die Kombination von PBMCs mit TNF $\alpha$  hatten bei den drei untersuchten Interleukinen einen induzierenden, aber nicht signifikanten Einfluss auf die Zytokinexpression der lapinen Tendozyten. Die Ko-Kultivierung mit neutrophilen Granulozyten zeigte ebenfalls für IL-1 $\beta$  und IL-6 einen induzierenden, aber nicht signifikanten Effekt, wohingegen die Kombination aus neutrophilen Granulozyten mit TNF $\alpha$  in der Tendozyten-Ko-Kultur bei den untersuchten Interleukinen eine geringere Zytokinexpression im Vergleich zur Einzelstimulation mit neutrophilen Granulozyten gezeigt hat.

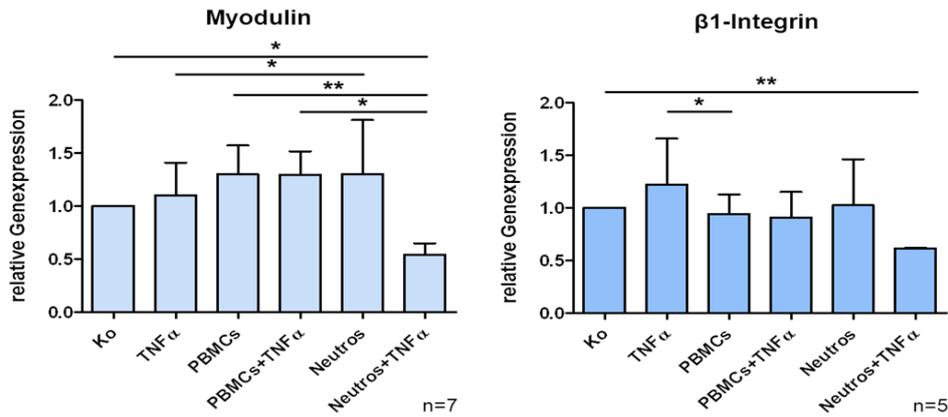


**Abbildung 16: Genexpression von IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und IL-6.** Graphische Darstellung der Ergebnisse einer Genexpressionsanalyse mittels RTD-PCR für IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und IL-6 in autologen lapinen Tendozyten, die 24 h mit  $4 \times 10^6$  PBMCs oder neutrophilen Granulozyten stimuliert wurden. Einige Kulturen wurden zusätzlich mit TNF $\alpha$  (10 ng/mL, 24 h) behandelt. Dargestellt ist das Vielfache der Genexpression gegenüber der unstimulierten Kontrolle.

### 3.4.2 Genexpression des Angiogenesefaktors Myodulin und des Zell-Matrix-Rezeptors $\beta$ 1-Integrin in autologen Tendozyten, stimuliert mit Leukozyten

#### Myodulin, $\beta$ 1-Integrin

Die kombinierte Behandlung der Tendozyten mit neutrophilen Granulozyten und TNF $\alpha$  verringerte signifikant die Genexpression von Myodulin und  $\beta$ 1-Integrin (Abb. 17). Die anderen Stimulationen ergaben keine signifikanten Veränderungen der Genexpression von Myodulin und  $\beta$ 1-Integrin.

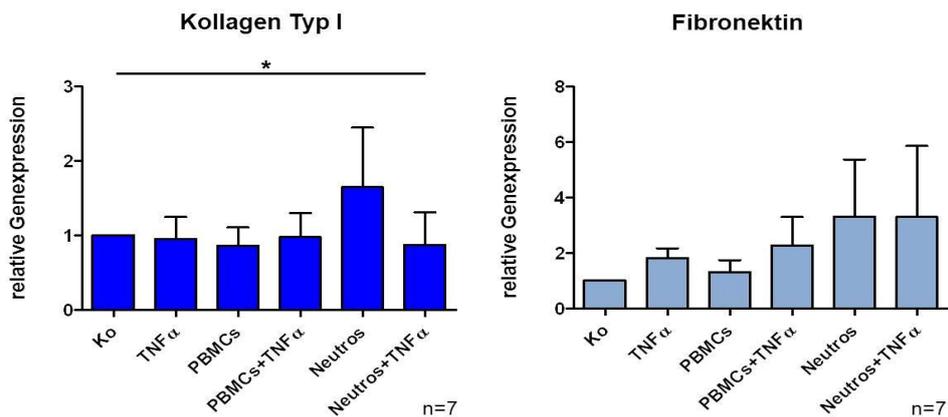


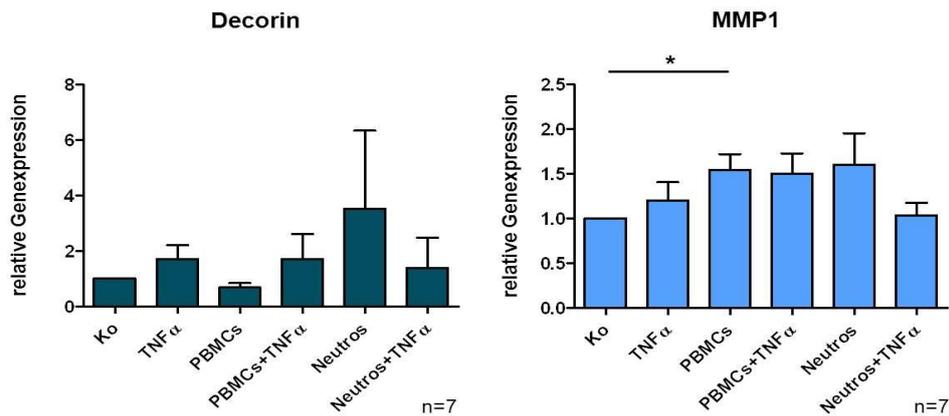
**Abbildung 17: Genexpression von Myodulin und  $\beta$ 1-Integrin.** Graphische Darstellung der Ergebnisse der RTD-PCR Genexpressions-Analyse für Myodulin und  $\beta$ 1-Integrin in autologen lapinen Tendozyten für 24 h stimuliert mit  $4 \times 10^6$  PBMCs oder neutrophilen Granulozyten. Einige Kulturen wurden zusätzlich mit TNF $\alpha$  (10 ng/mL, 24 h) behandelt. Dargestellt ist das Vielfache der Genexpression gegenüber der unstimulierten Kontrolle.

### 3.4.3 Genexpression von Matrixkomponenten und MMP1 in autologen Tendozyten, stimuliert mit Leukozyten

#### Kollagen Typ I, Fibronektin, Decorin und MMP1

Für die Matrixbestandteile Decorin und Fibronektin konnte durch die Stimulation mit PBMCs und neutrophilen Granulozyten kein signifikanter Einfluss im Hinblick auf die Genexpression nachgewiesen werden (Abb. 18). PBMCs ließen die Expression von MMP1 in den autologen Tendozyten deutlich ansteigen (Abb. 18).





**Abbildung 18: Genexpression von Komponenten der extrazellulären Sehnenmatrix.** Graphische Darstellung der Ergebnisse einer der RTD-PCR Analyse der untersuchten Matrixkomponenten in autologen lapinen Tendozyten für 24 h stimuliert mit  $4 \times 10^6$  PBMCs oder neutrophilen Granulozyten. Einige Kulturen wurden zusätzlich mit TNF $\alpha$  (10 ng/mL, 24 h) behandelt. Dargestellt ist das Vielfache der Genexpression gegenüber der unstimulierten Kontrolle.

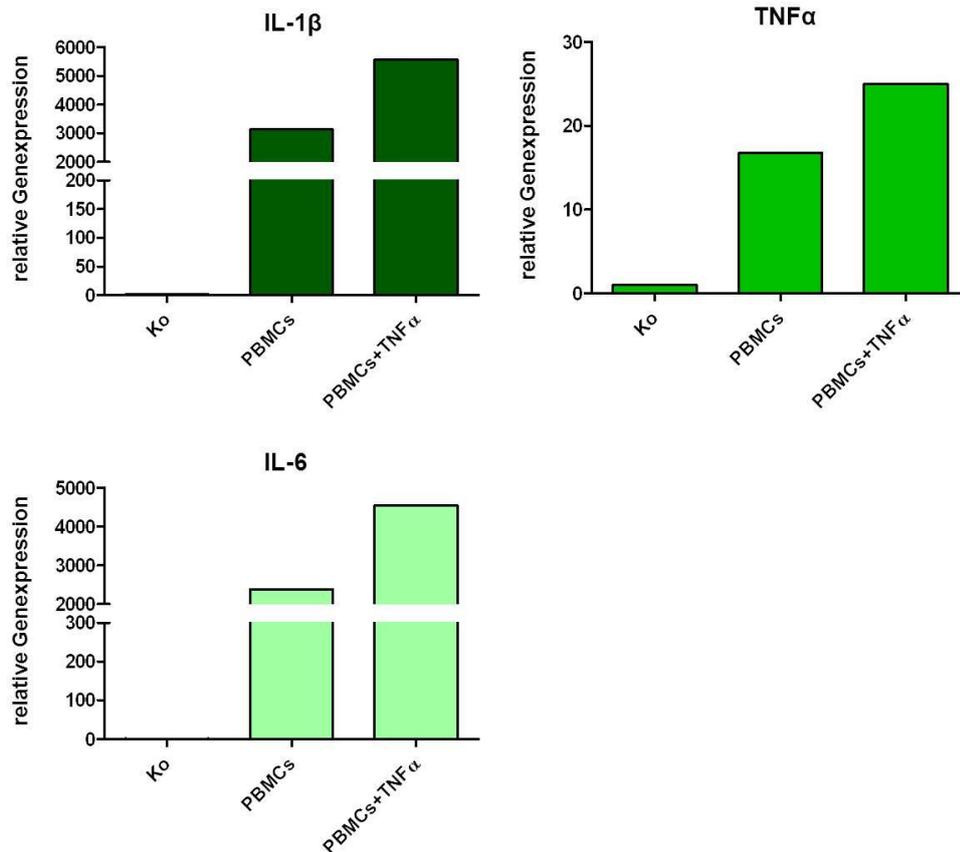
### 3.5 Exemplarische Analyse der Genexpression von Zytokinen und extrazellulären Matrixproteinen in humanen Hamstringsehnen

Menschliche Tendozyten von gesunden humanen Hamstringsehnen, die für eine Rekonstruktion eines vorderen Kreuzbandes Verwendung fanden, wurden mit allogenen PBMCs ko-kultiviert und mit Hilfe von PCR-Analysen exemplarisch untersucht. Es sollte die Frage geklärt werden inwieweit allogenes Spenderblut Veränderungen im Hinblick auf die Expression immunoregulatorischer Zytokine und Matrixkomponenten hervorruft. Die Stimulation erfolgte für 24 Stunden mit 10 ng/ml TNF $\alpha$  und  $4 \times 10^6$  PBMCs in einem Transwellsystem

#### 3.5.1 Zytokin-Genexpression in Tendozyten aus humanen Hamstringsehnen, stimuliert mit PBMCs

##### IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ und IL-6

PBMCs und PBMCs+TNF $\alpha$  induzierten auch in humanen Tendozyten die Expression der immunoregulatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und IL-6 (Abb. 19). Insbesondere die Genexpression des pro-inflammatorischen Zytokins IL-1 $\beta$  wurde durch die kombinierte Stimulation mit PBMCs+TNF $\alpha$  um das mehrere Tausendfache, im Vergleich zum Kaninchenmodell deutlich stärker angeregt. Ein ähnlich starker Effekt konnte ebenfalls für IL-6 nachgewiesen werden.

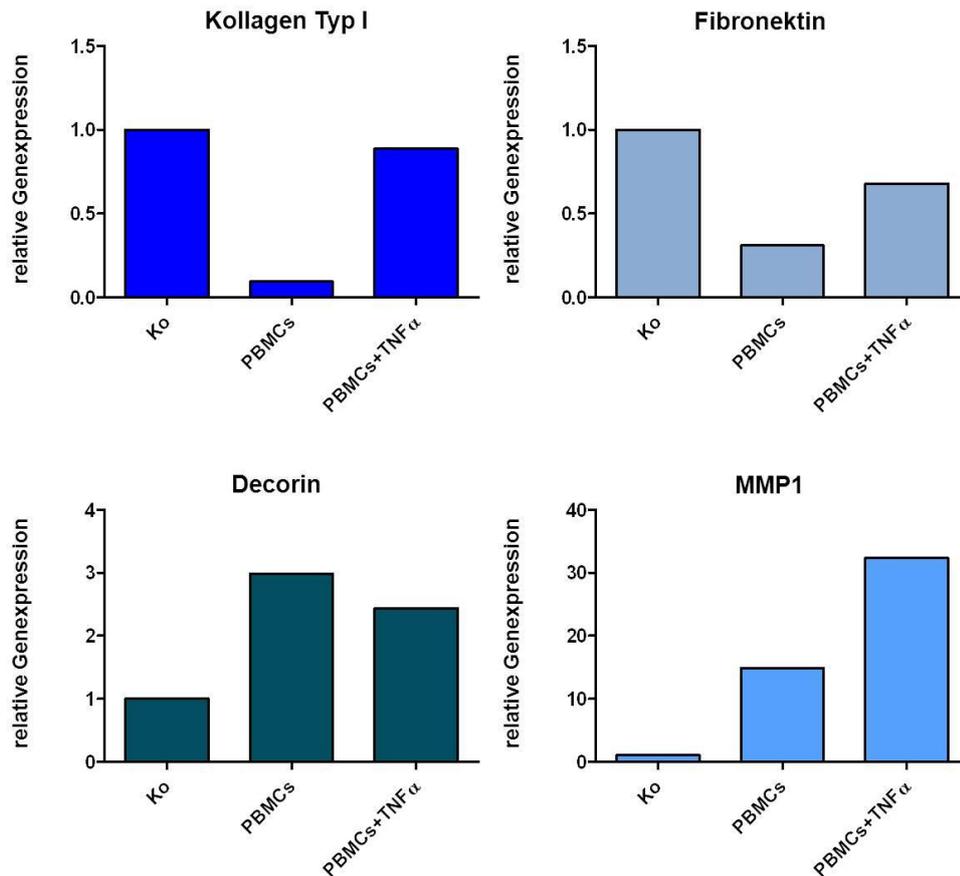


**Abbildung 19: Genexpression von Zytokinen in Ko-/Kulturen humaner Tendozyten.** Graphische Darstellung der RTD-PCR Analyse der untersuchten Zytokine in humanen Hamstring-Tendozyten, stimuliert mit allogenen humanen  $4 \times 10^6$  PBMCs mit oder ohne TNF $\alpha$  (10 ng/ml). Dargestellt ist das Vielfache der Genexpression gegenüber der unstimulierten Kontrolle n= 1.

### 3.5.2 Genexpression von Matrixkomponenten und MMP1 in humanen Hamstringsehnenzellen, stimuliert mit PBMCs

#### Kollagen Typ I, Fibronectin, Decorin und MMP1

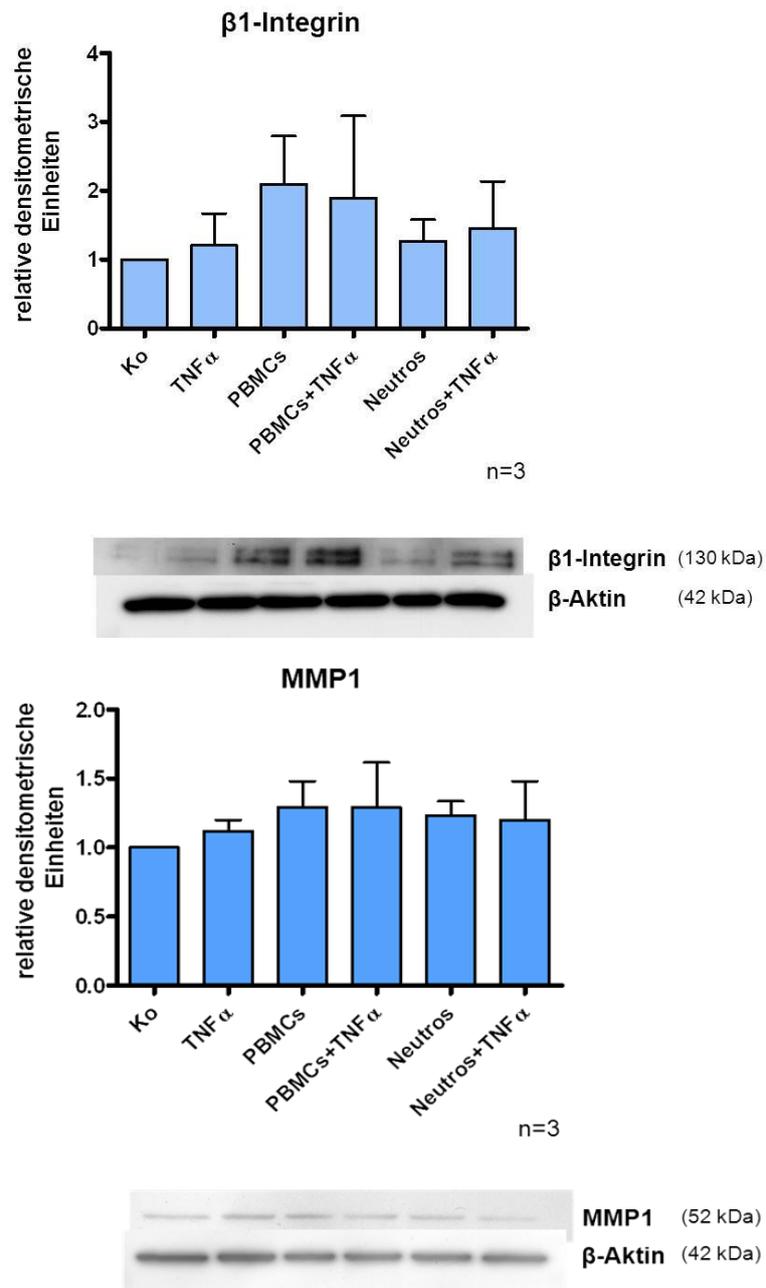
Unter dem Einfluss von PBMCs und PBMCs+TNF $\alpha$  wurde im Verhältnis zur Kontrolle mehr MMP1 und Decorin exprimiert, wohingegen die Genexpression für das Hauptkollagen im Sehngewebe, Kollagen Typ I und die Matrix-Komponente Fibronectin insbesondere durch die Stimulierung mit PBMCs abgenommen hat (Abb. 20).



**Abbildung 20: Genexpression von Matrixkomponenten und MMP1 in Ko-/Kulturen humaner Tendozyten.** Graphische Darstellung der RTD-PCR Analyse der untersuchten Matrixkomponenten in humanen Hamstring- Tendozyten stimuliert mit allogenen humanen  $4 \times 10^6$  PBMCs mit oder ohne TNF $\alpha$  (10 ng/ml). Dargestellt ist das Vielfache der Genexpression gegenüber der unstimulierten Kontrolle n= 1.

### 3.6 Western Blot-Analyse für die $\beta$ 1-Integrin- und MMP1-Proteinexpression

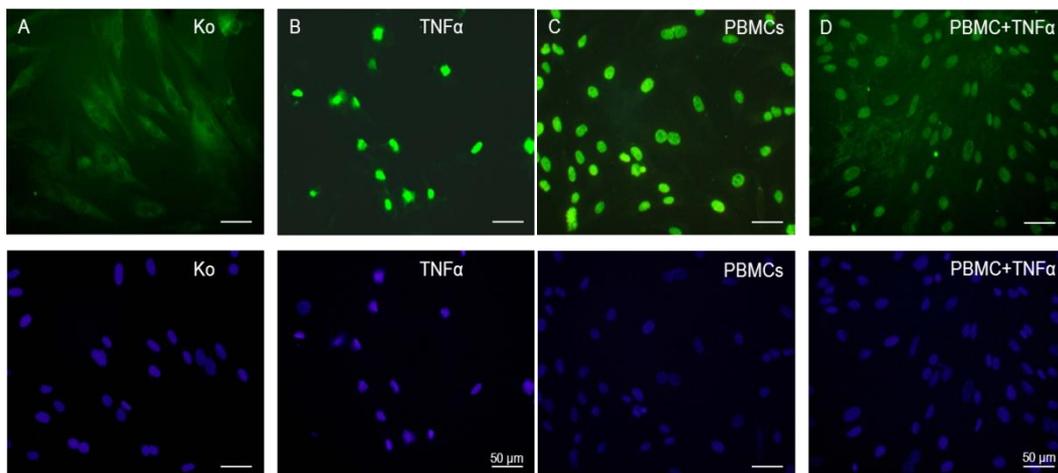
An vier Spendern wurde die  $\beta$ 1-Integrin- und MMP1-Proteinexpression untersucht. Die lapinen Tendozyten wurden für 24 h mit 10 ng/ml TNF $\alpha$  und  $4 \times 10^6$  PBMCs oder neutrophilen Granulozyten behandelt. Die Sehnenzellen zeigten unter der Behandlung mit TNF $\alpha$ , PBMCs, neutrophilen Granulozyten allein oder in Kombination mit TNF $\alpha$  keinen signifikanten Einfluss auf die  $\beta$ 1-Integrin-Proteinexpression im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 21). Die MMP1-Proteinexpression wird leicht durch die Stimulation mit PBMCs angeregt, aber in einem geringeren, nicht signifikanten Ausmaß, wie bereits bei den Genexpressionsanalysen gezeigt.



**Abbildung 21: Proteinexpressionsanalysen für β1-Integrin und MMP1.** Graphische Darstellung der Western Blot-Analyse der untersuchten β1-Integrin- und MMP1-Proteinexpression in autologen lapinen Tendozyten, stimuliert über 24 h mit 10 ng/ml TNFα oder  $4 \times 10^6$  PBMCs.

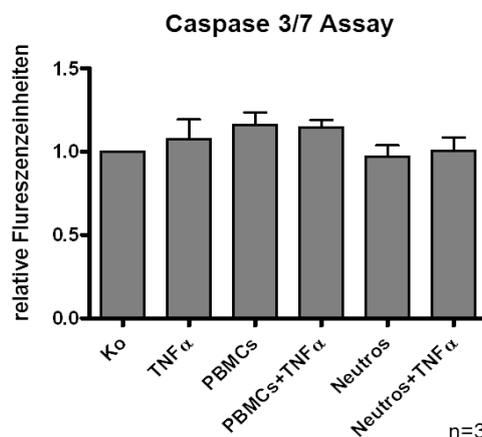
### 3.7 Ergebnisse der Zellvitalitätsprüfung und des Zelluntergangs mittels TUNEL-Assay und Caspase-3/7-Assay

Mit Zellen eines Spenders wurde exemplarisch ein TUNEL-Assay durchgeführt sowie mit Zellen von drei Spendern ein Caspase-3/7-Aktivitäts Assay. Mit Hilfe des TUNEL-Assays konnte gezeigt werden (Abb. 22), dass PBMCs und TNF $\alpha$  eine DNA-Fragmentation in den mit autologen Leukozyten und TNF $\alpha$  stimulierten lapinen Tendozyten hervorruft.



**Abbildung 22: TUNEL Assay.** Gezeigt wird ein exemplarisch durchgeführter TUNEL-Assay. Die autologen lapinen Tendozyten wurden für 24 h mit  $4 \times 10^6$  Leukozyten und oder 10 ng/mL TNF $\alpha$  behandelt. Die DNA in den Zellkernen, markiert durch den Fluoreszenzfarbstoff DAPI, leuchtet in den Kontrollen blau auf. Grün leuchten die mit Fluorescein gefärbten TUNEL-positiven Zellkerne.

Der Caspase-3/7-Aktivitäts Assay (n=3) hat hingegen keinen signifikanten Einfluss der Zytokine im Hinblick auf Apoptose zeigen können (Abb. 23).



**Abbildung 23: Caspase-3/7-Assay.** Gezeigt wird das Ergebnis des Caspase 3/7 Assay im Hinblick auf die Caspase-3/7 Aktivität und damit Apoptose der autologen Tendozyten. Die lapinen Tendozyten wurden für 24 h mit  $4 \times 10^6$  Leukozyten und oder 10 ng/mL TNF $\alpha$  behandelt.

### 4. Diskussion

Der geringe Prozentsatz von Zellen im bradytrophem Sehngewebe und die dichte EZM führen zu einer relativ schlechten Regenerationsfähigkeit und zu langen Heilungsprozessen im traumatisierten Sehngewebe. Eine entscheidende Rolle spielen in diesem Kontext Fehl- und Überbelastung während körperlicher Aktivität. Die Fragestellung nach der Beteiligung einer durch Zytokine vermittelten inflammatorischen Komponente an der Ausbildung von Sehnenpathologien, Sehnenheilung und posttraumatischen Folgeschäden ist noch nicht abschließend geklärt und wird gegenwärtig noch kontrovers diskutiert.

Zytokine sind eine wichtige Komponente innerhalb des Immunsystems. Sie ermöglichen die Kommunikation zwischen den immunkompetenten und anderen somatischen Zellen, können lokale und systemische Wirkungen entfalten sowie pro- und antiinflammatorisch wirken. Ihre genaue Funktion im Sehngewebe und ob sie an der Ausbildung und Progression von Sehnenpathologien, der Sehnenheilung und am post-traumatischen Entzündungsprozess beteiligt sind, wurde bisher noch nicht abschließend untersucht und verstanden.

In der vorliegenden Arbeit konnte ein indirektes autologes Ko-Kultursystem aus lapinen Achillessehnenzellen und autologen Blutzellen etabliert und nachgewiesen werden, dass im Ko-Kultur-System unter dem Einfluss von PBMCs die proinflammatorischen Zytokine, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und IL-6 signifikant verstärkt exprimiert werden.

Grundsätzlich scheinen Zytokine an den meisten Phasen der Sehnenpathologie beteiligt zu sein [14]. So führen zyklische Belastungen in der Sehne dazu, dass die Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-6 ansteigt und somit auch die Wahrscheinlichkeit eines Schadens durch ein Trauma wächst [4, 11, 37, 41, 42]. Ferner induzieren Zytokine MMPs, führen zu einer Suppression der Kollagen Typ I Synthese und forcieren den Kollagenabbau, wodurch das Gewebe an Zugstabilität verliert [70]. Darüber hinaus ist auch eine durch Medikamenten

hervorgerufene Induktion von Zytokinen denkbar, wie z.B. durch Fluorchinolone, die dann eine Tendopathie auslösen können [3, 4, 14, 37].

Wie bereits erwähnt, scheinen Fehl- und Überbelastung der Sehne, insbesondere bei zyklischen Bewegungen und die spärliche Gefäßversorgung und die damit verbundene Ischämie, eine lokale Hypoxie sowie die Bildung freier Radikale zu begünstigen [4, 37]. Die beschriebene Ischämie und anschließende Reperfusion ist ein bekannter Pathomechanismus, der vielen Leiden zugrunde liegt und eine Schädigung des betroffenen Gewebes induziert [95].

Aufgrund der genannten Erkenntnisse scheint eine Beteiligung der Zytokine an der Entstehung von Tendopathien, der Heilung nach Sehnenruptur und posttraumatischen Folgeschäden durchaus denkbar.

Wenn es möglich wäre, in diesem Kontext Zytokine als Bestandteil der Ätiologie zu identifizieren, könnte in der medikamentösen Hemmung inflammatorischer Zytokine möglicherweise eine zusätzliche Behandlungsoption bei Tendopathien hinzukommen.

In der vorliegenden Arbeit wurden Stimulationen der Tendozyten mit Einzeldosen von +/-10 ng/mL TNF $\alpha$  sowie kombiniert Stimulationen mit TNF $\alpha$  und  $4 \times 10^6$  PBMCs oder Neutrophilen durchgeführt. In einer Literaturrecherche konnten keine vergleichbaren Versuchsansätze und damit keine validen Referenzwerte für die verwendete Konzentration der Leukozyten und TNF $\alpha$  gefunden werden. Die auf den ersten Blick hohe Zellzahl von  $4 \times 10^6$  PBMCs oder Neutrophilen wurde gewählt, da die Aktivierung der Leukozyten komplexer ist, als es in der Ko-Kultur nachvollzogen werden kann. Es ist daher nicht davon auszugehen, dass auch tatsächlich alle Leukozyten im Stimulationsversuch aktiv sind. Ferner kommt es bei einem Trauma mit anschließender Inflammationsphase zu einem vermehrten Einströmen von aktivierten Leukozyten ins traumatisierte Gewebe.

TNF $\alpha$  alleine induzierte nicht signifikant die Zytokinexpression. Beim Einsatz von lapinen TNF $\alpha$  hätte möglicherweise ein stärkerer Effekt in den Versuchen beobachtet werden können. TNF $\alpha$  wird selbst hingegen durch die Stimulation mit PBMCs verstärkt exprimiert und in Kombination mit neutrophilen Granulozyten kann es die Zytokin-, Myodulin und  $\beta$ 1-Integrin-Genexpression sogar inhibieren.

TNF $\alpha$  fördert die Adhärenz von neutrophilen Granulozyten am Endothel. Für dessen erhöhte Konzentration im traumatisierten Gewebe sind insbesondere Makrophagen verantwortlich, die zusätzlich die Hauptquelle für TGF $\beta$  darstellen [96].

Beide Zytokine sind mitverantwortlich für die Entstehung von Narbengewebe am Ende der Wundheilung. Welche Zytokine und andere Mediatoren im Ko-Kulturmodell von den Leukozyten freigesetzt werden und auf die Tendozyten einwirken können, wurde in diesem Projekt noch nicht analysiert.

Liechty et al. (2000) konnten im Gegensatz dazu bei der Wundheilung von Embryonen und Feten zeigen, dass wenn eine signifikante Präsenz von Leukozyten, insbesondere Makrophagen ausbleibt und somit auch hohe TNF $\alpha$ - und TGF $\beta$  – Spiegel, hier das traumatisierte Gewebe funktionell ersetzt werden kann ohne die Bildung von Narbengewebe [97]. Eine Wirkung auf die Matrixkomponenten konnte nicht gemessen werden.

Es lässt sich aber nicht ausschließen, dass weitere Untersuchungszeitpunkte auch Veränderungen der Matrix-Genexpression aufgezeigt haben könnten. Hier müsste allerdings in Zukunft ergänzend zu den Genexpressionsdaten eine Bestimmung der Zytokinfreisetzung z.B. über ELISA-Analysen erfolgen.

Inwiefern der tatsächliche Regenerationsprozess im traumatisierten Gewebe dadurch *in vivo* gefördert wird, ist aus den Daten der vorliegenden Arbeit nicht abzuschätzen, da keine signifikanten Veränderungen in der ECM feststellbar waren und somit keine Aussagen zu Remodellingprozessen gemacht werden können. MMP1 spielt beim Kallus-Remodelling in der Phase der späten Sehnenheilung eine zentrale Rolle. Die MMP1-Genexpression wurde zwar in der vorliegenden Studie durch PBMCs induziert, nicht aber die Kollagen Typ I Genexpression beeinflusst. Kollagen Typ I ist die Hauptkollagenkomponente in Sehnen und hauptverantwortlich für die Zugfestigkeit des Gewebes.

Ebenfalls konnte keine Veränderung in der Fibronektin- und  $\beta$ 1-Integrin-Genexpression gemessen werden, die mitverantwortlich für eine gesteigerte Adhäsivität des Gewebes und somit für die Leukozyteneinwanderung bedeutsam sind [98].

In der vorliegenden Arbeit wurden lapine Tendozyten mit autologen Leukozyten ko-kultiviert, um die Effekte der löslichen Mediatoren auf die Tendozyten zu untersuchen. Lapine Tendozyten als Basis für ein experimentelles Modell wurden *in vitro* bereits beschrieben [99]. Bernard-Beaubois et al. (1997) verwendeten jedoch kein Leukozyten-Ko-Kultur-System, sondern eine Monolayer-Kultur, die sie über den Zeitraum von 36 Passagen kultivierten und anschließend u. a. elektronenmikroskopisch- morphologisch charakterisierten sowie Kollagen Typ I- und Decorin- Transkripte mittels Northern Blot detektierten. Im Hinblick auf die Kollagen Typ I- und Decorin- Expression sind sie zu dem Ergebnis gekommen, dass bereits ab der 3. Passage beide Matrix-Komponenten dauerhaft vermindert exprimiert werden. Mauviel et al. (1995) vermuteten, dass wenn die Tendozyten in der Monolayer-Kultur Konfluenz erreichen, die Decorin-Expression verringert wird [99, 100].

In dieser Arbeit wurden lapine Tendozyten in der 3. - 5. Passage für die anschließenden Untersuchungen verwendet. Signifikante Veränderungen konnten im Hinblick auf die Matrix-Komponenten Kollagen Typ I und Decorin nicht festgestellt werden. Im Gegensatz zu den vorangegangenen Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen wurde ein Leukozyten-Ko-Kultur-System verwendet. Inwiefern dieser Trend über weitere Passagen aufrecht erhalten bleibt, wird aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nicht deutlich. Um dies abschließend beurteilen zu können, müsste das Leukozyten-Ko-Kultur-System über mehrere Passagen fortgeführt werden.

In exemplarisch durchgeführten vergleichbaren Untersuchungen an humanen Hamstring-Tendozyten, kultiviert mit allogenen, humanen Leukozyten, konnten vergleichbare Effekte im Hinblick auf die Zytokinfreisetzung der Sehnenzellen, stimuliert durch die PBMCs, beobachtet werden.

Anders als bei den Zellen lapiner Spender, die mit autologen Leukozyten stimuliert wurden, konnte an den humanen Hamstringsehnen gezeigt werden, dass unter dem Einfluss von PBMCs und PBMCs+TNF $\alpha$  nicht nur MMP1 verstärkt exprimiert wurde, sondern auch Decorin. Kollagen Typ I und Fibronectin wurden hingegen weniger stark exprimiert.

Für diese divergenten Ergebnisse zwischen dem humanen und lapinen Modell kommen mehrere Faktoren in Betracht. Möglicherweise üben allogene Leukozyten einen größeren Stimulus als autologe Leukozyten auf die Tendozyten aus. Ferner stammten im humanen Modell die Sehnenzellen und das verwendete Blut von unterschiedlichen Geschlechtern. Zudem musste im lapinen System eine Kryokonservierung der Leukozyten erfolgen, bis die Isolierung und Expansion der Sehnenzellen abgeschlossen war. Diese kann auf die Aktivität der Leukozyten Einfluss genommen haben. Diese Gegebenheiten und die Schwierigkeiten autologes menschliches Untersuchungsmaterial als Proben zu gewinnen, haben den Anlass gegeben, in ein lapines Modell überzugehen.

Die lapinen Tendozyten wurden mit  $4 \times 10^6$  PBMCs oder Neutrophilen pro Well inkubiert sowie mit  $\pm 10$  ng/mL TNF $\alpha$ . Bei den gewählten Stimulationskonzentrationen handelt es sich um in der Literatur allgemein gebräuchliche Mengen [63]. Rysz et al. (2006) geben die TNF $\alpha$  Konzentration im Serum gesunder Probanden mit circa 7 mg/l an [101]. Im Ko-Kultursystem wurde daher eine höhere Konzentration ausgewählt, da durch die Anwesenheit der Leukozyten, insbesondere der Makrophagen, von einer höheren TNF $\alpha$  Konzentration auszugehen ist [96]. Ferner erfolgte nur eine einmalige Gabe, die über den Zeitraum von 24 h einen Wirkspiegel gewährleisten sollte. *In vivo* ist damit zu rechnen, dass durch die Anwesenheit der Leukozyten ein kontinuierlich erhöhter TNF $\alpha$  Spiegel erreicht werden kann.

PBMCs stimulieren die Freisetzung der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und IL-6 sowie des Matrix-abbauenden Enzyms MMP1, welches Kollagen Typ I abbauen kann. Für die Matrixbestandteile Decorin und Fibronectin konnte durch die Stimulation mit PBMCs und neutrophilen Granulozyten kein signifikanter Einfluss im Hinblick auf die Genexpression nachgewiesen werden. Möglicherweise ist die Stimulationsdauer von 24 h zu kurz und nur eine Momentaufnahme, so dass noch keine Veränderung in der Expression von Matrixbestandteilen gemessen werden konnte. In folgenden Untersuchungen müsste man mehrere Messzeitpunkte wählen, um einen Verlauf dokumentieren zu können.

Neben dem kurzen Stimulationsintervall ist daher auch an eine unzureichende Konzentration an PBMCs oder TNF $\alpha$  zu denken, zumal man davon ausgehen muss, dass sich *in vivo* sowohl die Zellzahl als auch die Zytokinkonzentration im Verlauf der Inflammationsphase verändern. Ferner subsumieren sich unter der großen Gruppe der PBMCs verschiedene Zellpopulationen, die durchaus unterschiedliche Wirkungen im Gewebe erzielen können. Da in der vorliegenden Arbeit keine Auftrennung der PBMCs in die entsprechenden Fraktionen erfolgt ist, können die beschriebenen Effekte keiner einzelnen Zellpopulation zugeordnet werden.

Um den Anteil der verschiedenen Zellpopulationen an den PBMCs zu ermitteln, könnte eine Dichtegradienten-Zentrifugation mit anschließender Differentialzytologie durchgeführt werden. Dabei lassen sich folgende Ergebnisse für die Subpopulationen der PBMCs ermitteln: 80,5 % Lymphozyten, 16,5 % Monozyten und 1,5 % Granulozyten [102].

Von den am stärksten vertretenen Lymphozyten ist bekannt, dass beispielsweise TH1-Zellen neben IL-2 und INF- $\gamma$  auch TNF $\alpha$  sezernieren können. Ferner fördern sie dadurch die Aktivierung von Makrophagen, die über die Produktion von IL-6 und TNF $\alpha$  in Gewebezellen zur Apoptose führen können, für die es in der vorliegenden Arbeit keine Hinweise gibt. Außerdem ist bekannt, dass sie die Angiogenese über IL-6 und den STAT3-Weg stimulieren können.

Ein weiterer Hinweis auf eine ungenügende Stimulationsdauer oder unzureichende Anzahl an PBMCs kann möglicher Weise darin gesehen werden, dass die Sehnenzellen unter der Behandlung mit TNF $\alpha$ , PBMCs, neutrophilen Granulozyten allein oder in Kombination mit TNF $\alpha$  keinen signifikanten Einfluss auf die  $\beta$ 1-Integrin-Proteinexpression im Vergleich zur Kontrolle zeigten, obwohl bekannt ist, dass insbesondere TNF $\alpha$  ein starker Induktor für die Expression des  $\beta$ 1-Integrin ist [103].  $\beta$ 1-Integrin steigert die Adhäsionsfähigkeit im Gewebe und ermöglicht die Extravasation der Leukozyten und auch Thrombozyten ins traumatisierte Gewebe [98]. Beide Zellreihen gelten als extrinsische Quelle für inflammatorische Zytokine und stellen so einen grundlegenden Mechanismus dar, der für die Initiation der Inflammation von entscheidender Bedeutung ist.

Die Rolle der Thrombozyten, von denen bekannt ist, dass sie neben den Leukozyten in der inflammatorischen Phase der Sehnenheilung auch wichtige Wachstumsfaktoren freisetzen [4], die für die Angiogenese, Zelldifferenzierung und -proliferation sowie für die Chemotaxis wichtig sind, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht berücksichtigt.

Thrombozyten sind für die Freisetzung von TGF $\beta$ 1 und VEGF mitverantwortlich [104]. Diese Mediatoren unterstützen die Neoangiogenese, Kollagensynthese und die Migration von Leukozyten aus den Gefäßen ins Gewebe.

Diese Beobachtung hat zur Entwicklung von Thrombozytenkonzentraten geführt, für die es in der Orthopädie und Sportmedizin verschiedene Anwendungsmöglichkeiten gibt. Unter der Vielzahl der verschiedenen Konzentrate gibt es auch ein leukozytenhaltiges Thrombozytenkonzentrat, das L-PRF (Leukocyte-Platelet-Rich Fibrin) [105, 106]. Dieses Präparat kann durch Pressen zwischen zwei Mullbinden als Membran chirurgisch verwendet werden [105-107].

Bei diesen Konzentraten konnte nachgewiesen werden, dass die Konzentration von TGF- $\beta$ 1 und VEGF im Vergleich zu reinen Blutplättchenkonzentraten ohne Leukozyten- Zusatz höher ist [108]. Die Expression dieser Faktoren könnte zukünftig auch im Ko-Kulturmodell betrachtet werden. Der operative Einsatz von L-PRFs wurde schon bei Abriss von Sehnen der Rotatorenmanschette, bei Tendinopathien der Patellar- und Quadricepssehne sowie bei der Augmentation des anterioren Kreuzbandes getestet. Die wichtigen klinischen Parameter verbesserten sich nach dem Eingriff. Es konnte auch eine frühere Vaskularisierung als in der Kontrollgruppe verzeichnet werden [109]. Der genaue Einfluss der aus dem peripheren Blut stammenden Leukozyten im Hinblick auf ihre Zytokinfreisetzung und deren Wechselwirkung mit den Tendozyten kann noch nicht abschließend beurteilt werden.

Im vorliegenden Versuchsaufbau wurden die aus dem Blut isolierten Leukozyten über das Transwell-System in einem indirekten Kultursystem mit den Tendozyten zusammengebracht. Es ist daher durchaus denkbar, dass chemotaktisch angelockte Leukozyten, die dann *in vivo* auch direkte Zell-Zell-Kontakte zu den Tendozyten haben, ein anderes Zytokin-Expressionsmuster aufweisen. Außerdem ist bekannt, dass Leukozyten neben den bekannten Zytokinen auch Wachstumsfaktoren wie z.B.

den TGF $\beta$ 1 und VEGF freisetzen [107, 108, 110]. Eine genaue Identifizierung der freigesetzten Zytokine und Chemokine wäre also sinnvoll, um mögliche Wechselwirkungen aufzuzeigen und besser verstehen zu können. Im Hinblick auf die von den Tendozyten produzierten ECM-Komponenten und  $\beta$ 1-Integrin konnte keine signifikante Veränderung der Genexpression festgestellt werden. Nur die Kombination aus neutrophilen Granulozyten und TNF $\alpha$  supprimiert die Synthese von  $\beta$ 1-Integrin und Kollagen Typ I. Die exemplarische Durchführung eines TUNEL-Assays an einem Spender hat ergeben, dass PBMCs und TNF $\alpha$  eine DNA-Fragmentation in den mit autologen Leukozyten und TNF $\alpha$  stimulierten lapinen Tendozyten hervorgerufen hat.

Der Caspase-3/7-Assay hat hingegen keinen signifikanten Einfluss der Zytokine im Hinblick auf Apoptose zeigen können. Die unterschiedlichen Aussagen beider Tests lassen sich möglicherweise darauf zurückführen, dass der Caspase-3/7-Assay eine hohe Sensibilität für die Effektor-Caspasen aufweist und daher sehr apoptosespezifisch ist, wohingegen beim TUNEL-Assay DNA Fragmentationen nachgewiesen werden, die auch in Zusammenhang eines nekrotischen Zelltodes zu beobachten sind. Ob der Mechanismus, der zur Fragmentierung der DNA geführt hat, durch Apoptose oder Nekrose ausgelöst worden ist, kann nicht abschließend nachvollzogen werden.

Es ist jedoch auch bekannt, dass z.B. oxidativer Stress zu einer Aktivierung des Apoptose-induzierenden Faktors (AIF) führen kann. AIF wird im Zytosol produziert und zwischen der inneren und äußeren Mitochondrienmembran eingelagert. Seine Aktivierung kann im Zellkern eine Caspase-3/7 unabhängige Fragmentation der DNA auslösen [111, 112] und dies könnte möglicherweise zu einem positiven Ergebnis im TUNEL-Assay führen.

Lapine Tendozyten als residente Zellen eines bradytrophen Gewebes lassen sich durch lösliche Mediatoren von Leukozyten aktivieren. Das Zytokinexpressionprofil der Tendozyten wurde durch die Stimulierung mit PBMCs signifikant verändert. Die Genexpression der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6 und des ECM-degradierenden Enzyms MMP1 wurde hochreguliert. Auf der Proteinebene ist ein stimulierender, nicht signifikanter Effekt von PBMCs und neutrophilen Granulozyten auf die MMP1-Expression deutlich geworden. Jedoch muss eine Induktion der MMP1

Genexpression auf Proteinebene weiter bestätigt werden, bevor ein verstärktes Matrix-Remodelling vermutet werden darf. Durch den Einfluss der proinflammatorischen Zytokine konnte ein erhöhter Zellertrag durch den Caspase-3/7-Aktivitäts Assay und den TUNEL-Assay nicht bestätigt werden.

Die Komplexität einer medikamentösen Beeinflussung der Wundheilung wird an den seit Jahrzehnten im klinischen Alltag verwendeten *non steroidal anti inflammatory drugs* (NSAIDs) deutlich. Tan V. et al. (2010) [113] haben gezeigt, dass NSAIDs wie Ibuprofen, die die COX I und II hemmen, die Entstehung von Gewebeadhäsionen verringern können und somit eine bessere Funktionalität gewährleistet ist [114].

Tsai WC et al. (2006) haben die Wirkung von Ibuprofen in Tendozyten aus Achillessehnen von Ratten anhand einer Untersuchung der Expression von Paxillin, Kollagen und MMPs nachgewiesen, dass durch die Behandlung mit Ibuprofen die Tendozytenmigration in das Wundgebiet gestört ist [115].

Das Protein Paxillin ist Bestandteil des Zytosklettes und u. a. auch an der Zellmigration beteiligt. Tsai et al. (2006) haben eine dosisabhängige Verringerung der Zellmigration innerhalb der ersten sechs Tage in der Kultur zeigen können [115]. Ferner wurde eine Reduktion von Paxillin auf mRNA und Protein-Ebene registriert. Dadurch konnte gezeigt werden, dass Ibuprofen Bindegewebsadhäsionen verringern kann. Ein direkter Einfluss auf die Kollagensynthese wurde nicht nachgewiesen, wohl aber eine Zunahme der MMP-1, 8 und 13 Genexpression nach 24 h Behandlung. Durch den Abbau der EZM kann von einer geringeren biomechanischen Stabilität ausgegangen werden [116]. Für die COX II Inhibitoren wie z.B. Celecoxib hat sich sogar gezeigt, dass die mechanische Belastbarkeit der Sehne unter ihrer Anwendung verringert ist [114].

Diese Beobachtung könnte in einem Ko-Kultur-System Berücksichtigung finden, indem der Effekt der COX I- und II Inhibitoren in der Ko-Stimulation der Tendozyten mit PBMCs und neutrophilen Granulozyten überprüft wird. Möglicherweise beeinflussen die Cyclooxygenase-Inhibitoren auch die Interaktion der Tendozyten mit den Abwehrzellen oder sogar den Thrombozyten, die in ihrer Aktivität durch COX I-Hemmer, wie z.B. Acetylsalicylsäure (ASS), ohnehin beeinflusst werden.

Von den NK-Zellen ist bekannt, dass sie eine entscheidende Rolle am inflammatorischen Prozess chronischer Gelenkentzündungen sowie bei der Pathogenese der rheumatischen Arthritis spielen. Eine gezielte Inhibition der NK-Zellen und der T-Lymphozyten, die an einer vermehrten IL-1 $\beta$ -Expression beteiligt sind, könnte möglicherweise auch eine Therapieoption von chronisch-entzündlichen Tendopathien sein [117]. Bei dieser Form der Pharmakotherapie ist jedoch zu bedenken, dass die Patienten insgesamt anfälliger gegenüber Infektionen sind, insbesondere für Tbc-Infektionen. Vor dem Therapiebeginn sollte zwingend eine Schutzimpfung gegen Pneumokokken, Influenza- und Hepatitis-B-Viren erfolgen. Eine Hepatitis-B-Infektion oder eine vorbestehende *Enzephalomyelitis disseminata* und die Herzinsuffizienz (NYHA III-IV) gelten als absolute Kontraindikationen. Daher eignet sich diese Therapieoption für eine gewisse Patientengruppe nur eingeschränkt oder gar nicht, denn ein Großteil der Patienten mit Ansatzendopathien der Quadricepssehne befindet sich zwischen dem 40. - 80. Lebensjahr [33]. Außerdem wird eine erhöhte Inzidenz für Malignität nach wie vor kontrovers diskutiert [118].

Die Schlüsselrolle der neutrophilen Granulozyten und Makrophagen bei der Entstehung von Narbengewebe konnte durch die Arbeiten von Hays und Kawamura et al. (2008) bestätigt werden, die zeigen konnten, dass im *Ligamentum cruciatum anterior*-Modell der Ratte durch die Gabe von Bisphosphonaten die Konzentration der neutrophilen Granulozyten und Makrophagen gesenkt werden konnte und weniger Narbengewebe produziert wurde [119]. Ferner wurden erhöhte Konzentrationen von Kollagen Typ I im Bereich zwischen der Sehne und der knöchernen Enthesis im Vergleich mit der Kontrollgruppe gemessen.

Insbesondere die neutrophilen Granulozyten sind für einen sauerstoffabhängigen Mechanismus verantwortlich, der als respiratorischer Burst bezeichnet wird, bei dem reaktive Sauerstoffmetabolite gebildet werden. Die Aktivierung dieses Mechanismus kann z.B. durch Komplementfaktoren (C5a) begünstigt werden. Durch das Enzym NADPH-Oxidase wird molekularer Sauerstoff mit Hilfe des Co-Enzyms NADPH (Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat) aus dem Penthosephosphatweg zu Superoxid umgewandelt [120]. Das Superoxid wird durch eine Superoxid-Dismutase zu Wasserstoffperoxid reduziert und mit Hilfe des Enzyms Myeloperoxidase und in Anwesenheit von Chloridionen zu Hypochlorit oxidiert. Die reaktiven Hypochloritionen

reagieren mit oxidierbaren Biomolekülen, wie z.B. mit Membranlipiden oder Tyrosinresten von Proteinen. Durch diesen Vorgang können Zellen nachhaltig geschädigt und die Apoptose begünstigt werden [121].

Eine Blockade von TNF $\alpha$  könnte möglicherweise die Konzentration der Makrophagen im Wundgebiet verringern und somit insgesamt die TNF $\alpha$ -Konzentration, wodurch die Bildung von biomechanisch minderwertigem Narbengewebe zu funktionellerem Gewebe hin verschoben werden könnte [96].

Dieser Behandlungsansatz findet derzeitig beispielsweise Berücksichtigung in Form des chimären monoklonalen TNF $\alpha$ -Antikörpers Infliximab, der für die Behandlung des Morbus Crohn und der rheumatischen Arthritis zugelassen ist. Etanercept ist derzeitig nur für die rheumatische Arthritis zugelassen, nicht jedoch für die Behandlung des Morbus Crohn. Gulotta et al. (2011) haben anhand einer Blockade von TNF $\alpha$  im Rattenmodell einen schnelleren Heilungsbeginn bei Verletzungen der Rotatorenmanschette zeigen können [96]. Beide Präparate können sowohl die transmembranär gebundene Form sowie die lösliche Form des TNF $\alpha$  binden. Unter der Behandlung mit Infliximab konnten höhere IL-6-Spiegel gemessen werden sowie vermehrt aktive B-Lymphozyten. Beide Medikamente senken die Expression von CD69 von CD8 positiven zytotoxischen T-Zellen und CD56 positiven natürlichen Killerzellen (NK-Zellen).

Dem gegenüber haben Lin et al. (2006) gezeigt, dass die Sehnenheilung in IL-6-knock out bei Mäusen signifikant reduziert ist [78]. Die Übertragbarkeit der am Tiermodell gewonnenen Ergebnisse auf den Menschen ist naturgemäß begrenzt. Erschwerend kommt hinzu, dass es sich bei den Zytokinen um pleiotrophe Metabolite handelt, die nicht nur durch verschiedene Rezeptoren, sondern auch in Abhängigkeit ihrer Konzentration unterschiedliche Wirkung erzielen.

Galluci et al. (2000) weisen auf die wichtige Funktion von IL-6 während der Wundheilung hin [122]. In diesem Kontext muss die Angiogenese hervorgehoben werden, die von IL-6 über den STAT3 Signalweg *via* vascular endothelial growth factor (VEGF) ausgelöst werden kann [74]. Da sowohl die zyklisch belastete Sehne, als auch die akut traumatisierte Sehne ischämischem Stress ausgesetzt ist, wäre es denkbar, dass über den STAT3-Signalweg eine Anpassung an diesen katabolen Zustand stattfinden soll. Die Ödembildung bei traumatisierten und überbelasteten

Sehnen, die charakteristisch für die ersten Stunden nach der Belastung ist, könnte ein möglicher Effekt der IL-6 vermittelten Permeabilitätssteigerung sein und den Beginn der Wundheilungsphase markieren. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass Myodulin, ein pro-angiogentischer Faktor, ebenfalls in den kultivierten lapinen Tendozyten exprimiert wird. Zwar bewirkten PBMCs und neutrophile Granulozyten allein keine signifikante Regulation der Myodulin-Expression, aber die Kombination aus neutrophilen Granulozyten und TNF $\alpha$  haben die Myodulin-Expression signifikant reduziert.

## 5. Ausblick

In anschließenden Untersuchungen sollte die Stimulationsdauer auf 48 h verlängert und Messungen zu verschiedenen Zeitpunkten vorgenommen werden, um evtl. deutlichere Veränderungen der extrazellulären Matrix zu induzieren. Außerdem ist an Stimulationsversuche mit unterschiedlichen Zytokinkonzentrationen zu denken, da davon ausgegangen werden darf, dass sich die Zytokinkonzentrationen auch *in vivo* über den Zeitraum des inflammatorischen Prozesses verändern. Entsprechend dazu sollten weitere Untersuchungen im Hinblick auf die Sehnenzellapoptose durchgeführt werden. Hierfür könnten Informationen über die Rolle des Komplementsystems aufschlussreich sein, durch das ebenfalls eine Apoptose ausgelöst werden kann. Ferner könnten in diesem Ko-Kultur Modell Bestrebungen unternommen werden, die Wirkung und Wirkungsunterschiede zwischen COXI- und COXII-Inhibitoren weiter aufzuklären. Da *in vivo* die Leukozyten und Thrombozyten direkten Kontakt zu den Tendozyten haben, ist der Verzicht auf ein Transwell-System zu erwägen, um den direkten Kontakt zwischen Tendozyten und Blutzellen zu gewährleisten. In diesem Zusammenhang sollten PBMC-Subpopulations-Analysen durchgeführt werden, um möglicherweise dominierende Zelltypen bei der Sehnenheilung zu identifizieren. Um die komplizierte Interaktion zwischen den Tendozyten und den Leukozyten besser verstehen zu können, sollte eine genauere Charakterisierung der freigesetzten Zytokine und Chemokine seitens der beteiligten Zellpopulationen durchgeführt werden. Um den biologischen Prozessen möglichst nahe zu kommen, kann eine Defektsetzung in einem *in vivo* Modell mit regelmäßigen Messungen der Zytokinkonzentrationen über 6 - 8 Wochen erfolgen. Anschließend kann das Sehnenewebe histologischen Untersuchungen im Hinblick auf den Heilungsfortschritt unterzogen werden.

### 6. Zusammenfassung

Der Einfluss von pro-inflammatorischen Zytokinen sowie anderen katabolen Mediatoren, die von Leukozyten freigesetzt werden und auf die Tendozyten während der Sehnenheilung und bei der Bildung von Narbengewebe einwirken, ist weitestgehend unbekannt. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit ein indirektes Ko-Kultur-System verwendet, um den Effekt von autologen Leukozyten auf die Genexpression der Tendozyten im Hinblick auf pro-inflammatorische Zytokine und Matrixkomponenten zu untersuchen.

Lapine Tendozyten von New Zealand White Rabbits wurden isoliert und *in vitro* expandiert. Aus dem peripheren Blut derselben Spendertiere wurden autologe Leukozyten (peripheral blood mononuclear cells [PBMCs]) und neutrophile Granulozyten isoliert und mit den Tendozyten in einem Transwell-System kultiviert. Einige Kulturen wurden zusätzlich mit TNF $\alpha$  behandelt. Nach einer Stimulationsdauer von 24 h wurden die ECM-Komponenten (Kollagen Typ I, Decorin und Fibronectin), der Zell-ECM Rezeptor  $\beta$ 1-Integrin, der pro-angiogenetische Faktor Myodulin, die ECM degradierende Matrix-Metalloproteinase (MMP) 1 und die pro-inflammatorischen Zytokine Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), Interleukin IL-1 $\beta$  und IL-6 mit Hilfe der RTD-PCR und z.T. mittels Western Blot analysiert. Ferner wurden Caspase-3/7 Aktivitäten bestimmt und ein TUNEL-Assay durchgeführt.

Der einzige signifikante Effekt der Leukozyten im Hinblick auf die Genexpression der untersuchten ECM-Komponenten bestand in der Suppression von Kollagen Typ I durch neutrophile Granulozyten, kombiniert mit TNF $\alpha$ . Der gleiche Effekt konnte auch bei der Analyse der Genexpression von  $\beta$ 1-Integrin und Myodulin festgestellt werden. PBMCs haben die Genexpression der Zytokine und MMP1 signifikant hochreguliert. Im Western Blot konnten keine signifikanten Effekte der Ko-Kultivierung für das  $\beta$ 1-Integrin und die MMP1 ermittelt werden. Obwohl im TUNEL-Assay eine vermehrte DNA Fragmentation bei den Tendozyten die mit PBMCs stimuliert wurden erkennbar war, konnte in keiner der Ko-Kulturen eine signifikant veränderte Caspase-Aktivität beobachtet werden.

Die Ergebnisse der *in vitro* Untersuchungen lassen vermuten, dass PBMCs als exogener Stimulus für die Induktion von pro-inflammatorischen und katabolen Mediatoren im Sehnengewebe wirken könnten.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Benjamin, M., E. Kaiser, and S. Milz, *Structure-function relationships in tendons: a review*. J Anat, 2008. **212**(3): p. 211-28.
2. Kannus, P., *Structure of the tendon connective tissue*. Scand J Med Sci Sports, 2000. **10**(6): p. 312-20.
3. Kjaer, M., *Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading*. Physiol Rev, 2004. **84**(2): p. 649-98.
4. Sharma, P. and N. Maffulli, *Tendon injury and tendinopathy: healing and repair*. J Bone Joint Surg Am, 2005. **87**(1): p. 187-202.
5. Schulze-Tanzil, G., O. Al-Sadi, E. Wiegand, et al., *The role of pro-inflammatory and immunoregulatory cytokines in tendon healing and rupture: new insights*. Scand J Med Sci Sports, 2011. **21**(3): p. 337-51.
6. Wang, J.H., *Mechanobiology of tendon*. J Biomech, 2006. **39**(9): p. 1563-82.
7. Zschabitz, A., *[Structure and behavior of tendons and ligaments]*. Orthopade, 2005. **34**(6): p. 516-25.
8. Yoon, J.H. and J. Halper, *Tendon proteoglycans: biochemistry and function*. J Musculoskelet Neuronal Interact, 2005. **5**(1): p. 22-34.
9. James, R., G. Kesturu, G. Balian, and A.B. Chhabra, *Tendon: biology, biomechanics, repair, growth factors, and evolving treatment options*. J Hand Surg Am, 2008. **33**(1): p. 102-12.
10. Jozsa, L. and P. Kannus, *Histopathological findings in spontaneous tendon ruptures*. Scand J Med Sci Sports, 1997. **7**(2): p. 113-8.
11. Riley, G., *The pathogenesis of tendinopathy. A molecular perspective*. Rheumatology (Oxford), 2004. **43**(2): p. 131-42.
12. Riley, G., *Tendinopathy--from basic science to treatment*. Nat Clin Pract Rheumatol, 2008. **4**(2): p. 82-9.
13. Hoffmann, A. and G. Gross, *Tendon and ligament engineering in the adult organism: mesenchymal stem cells and gene-therapeutic approaches*. Int Orthop, 2007. **31**(6): p. 791-7.
14. Abate, M., K.G. Silbernagel, C. Siljeholm, et al., *Pathogenesis of tendinopathies: inflammation or degeneration?* Arthritis Res Ther, 2009. **11**(3): p. 235.
15. Asundi, K.R. and D.M. Rempel, *MMP-1, IL-1beta, and COX-2 mRNA expression is modulated by static load in rabbit flexor tendons*. Ann Biomed Eng, 2008. **36**(2): p. 237-43.
16. Chiquet, M., A.S. Renedo, F. Huber, and M. Fluck, *How do fibroblasts translate mechanical signals into changes in extracellular matrix production?* Matrix Biol, 2003. **22**(1): p. 73-80.
17. Waggett, A.D., M. Benjamin, and J.R. Ralphs, *Connexin 32 and 43 gap junctions differentially modulate tenocyte response to cyclic mechanical load*. Eur J Cell Biol, 2006. **85**(11): p. 1145-54.
18. Ralphs, J.R., A.D. Waggett, and M. Benjamin, *Actin stress fibres and cell-cell adhesion molecules in tendons: organisation in vivo and response to mechanical loading of tendon cells in vitro*. Matrix Biol, 2002. **21**(1): p. 67-74.
19. Wall, M.E. and A.J. Banes, *Early responses to mechanical load in tendon: role for calcium signaling, gap junctions and intercellular communication*. J Musculoskelet Neuronal Interact, 2005. **5**(1): p. 70-84.

20. Schweitzer, R., J.H. Chyung, L.C. Murtaugh, et al., *Analysis of the tendon cell fate using Scleraxis, a specific marker for tendons and ligaments*. Development, 2001. **128**(19): p. 3855-66.
21. Liu, S.H., R.S. Yang, R. al-Shaikh, and J.M. Lane, *Collagen in tendon, ligament, and bone healing. A current review*. Clin Orthop Relat Res, 1995(318): p. 265-78.
22. Jozsa, L. and J. Balint, [*Pathology of the spontaneous tendon ruptures (author's transl)*]. Magy Traumatol Orthop Helyreallito Seb, 1978. **21**(3): p. 176-93.
23. Jozsa, L., J.B. Balint, and S. Demel, *Histochemical and ultrastructural study of human muscles after spontaneous rupture of the tendon*. Acta Histochem, 1978. **63**(1): p. 61-73.
24. Nakamura, N., D.A. Hart, R.S. Boorman, et al., *Decorin antisense gene therapy improves functional healing of early rabbit ligament scar with enhanced collagen fibrillogenesis in vivo*. J Orthop Res, 2000. **18**(4): p. 517-23.
25. Jarvinen, M., P. Kannus, M. Kvist, et al., *Macromolecular composition of the myotendinous junction*. Exp Mol Pathol, 1991. **55**(3): p. 230-7.
26. Jozsa, L., M. Kvist, P. Kannus, et al., *Structure and macromolecular composition of the myotendineal junction. Histochemical, immunohistochemical and electron microscopic study of the rat calf muscles*. Acta Morphol Hung, 1991. **39**(4): p. 287-97.
27. Lang, J., [*On the sheath of tendons, muscles, fascia and blood vessels*]. Z Anat Entwicklungsgesch, 1960. **122**: p. 197-231.
28. O'Brien, M., *Structure and metabolism of tendons*. Scand J Med Sci Sports, 1997. **7**(2): p. 55-61.
29. Pufe, T., W.J. Petersen, R. Mentlein, and B.N. Tillmann, *The role of vasculature and angiogenesis for the pathogenesis of degenerative tendons disease*. Scand J Med Sci Sports, 2005. **15**(4): p. 211-22.
30. Pufe, T., B. Kurz, W. Petersen, et al., *The influence of biomechanical parameters on the expression of VEGF and endostatin in the bone and joint system*. Ann Anat, 2005. **187**(5-6): p. 461-72.
31. Pisani, D.F., P.M. Pierson, A. Massoudi, et al., *Myodulin is a novel potential angiogenic factor in skeletal muscle*. Experimental Cell Research, 2004. **292**(1): p. 40-50.
32. Steinbruck, K., [*Epidemiology of sports injuries--25-year-analysis of sports orthopedic-traumatologic ambulatory care*]. Sportverletz Sportschaden, 1999. **13**(2): p. 38-52.
33. Clayton, R.A. and C.M. Court-Brown, *The epidemiology of musculoskeletal tendinous and ligamentous injuries*. Injury, 2008. **39**(12): p. 1338-44.
34. September, A.V., M.P. Schweltnus, and M. Collins, *Tendon and ligament injuries: the genetic component*. Br J Sports Med, 2007. **41**(4): p. 241-6; discussion 246.
35. Rees, J.D., A.M. Wilson, and R.L. Wolman, *Current concepts in the management of tendon disorders*. Rheumatology (Oxford), 2006. **45**(5): p. 508-21.
36. Kjaer, M., H. Langberg, K. Heinemeier, et al., *From mechanical loading to collagen synthesis, structural changes and function in human tendon*. Scand J Med Sci Sports, 2009. **19**(4): p. 500-10.

37. Fredberg, U. and K. Stengaard-Pedersen, *Chronic tendinopathy tissue pathology, pain mechanisms, and etiology with a special focus on inflammation*. Scand J Med Sci Sports, 2008. **18**(1): p. 3-15.
38. Amlang, M.H. and H. Zwipp, [*Damage to large tendons: Achilles, patellar and quadriceps tendons*]. Chirurg, 2006. **77**(7): p. 637-49, quiz 649.
39. P. Kannus, M.P., L. Józsa, *Tendon injuries*. Aging and degeneration of tendons 2005, London: Springer-Verlag. p. 25-31.
40. Tuite, D.J., P.A. Renstrom, and M. O'Brien, *The aging tendon*. Scand J Med Sci Sports, 1997. **7**(2): p. 72-7.
41. Li, Z., G. Yang, M. Khan, et al., *Inflammatory response of human tendon fibroblasts to cyclic mechanical stretching*. Am J Sports Med, 2004. **32**(2): p. 435-40.
42. Wang, J.H., Z. Li, G. Yang, and M. Khan, *Repetitively stretched tendon fibroblasts produce inflammatory mediators*. Clin Orthop Relat Res, 2004(422): p. 243-50.
43. Sullo, A., N. Maffulli, G. Capasso, and V. Testa, *The effects of prolonged peritendinous administration of PGE1 to the rat Achilles tendon: a possible animal model of chronic Achilles tendinopathy*. J Orthop Sci, 2001. **6**(4): p. 349-57.
44. Koob, T.J. and A.P. Summers, *Tendon--bridging the gap*. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 2002. **133**(4): p. 905-9.
45. Stoll, C., T. John, C. Conrad, et al., *Healing parameters in a rabbit partial tendon defect following tenocyte/biomaterial implantation*. Biomaterials, 2011. **32**(21): p. 4806-15.
46. Aspenberg, P., *Stimulation of tendon repair: mechanical loading, GDFs and platelets. A mini-review*. Int Orthop, 2007. **31**(6): p. 783-9.
47. Woo, S.L.Y., R. Liang, and M.B. Fisher, *Future of Orthopaedic Sports Medicine and Soft Tissue Healing: The Important Role of Engineering*. Cellular and Molecular Bioengineering, 2009. **2**(3): p. 448-461.
48. Hildebrand, K.A., F. Jia, and S.L. Woo, *Response of donor and recipient cells after transplantation of cells to the ligament and tendon*. Microsc Res Tech, 2002. **58**(1): p. 34-8.
49. Al-Sadi, O., G. Schulze-Tanzil, B. Kohl, A. Lohan, M. Lemke, T. John *Tenocytes, pro-inflammatory cytokines and leukocytes: A relationship? . MLTJ Muscles, Ligaments and Tendons Journal, 2011. Vol. I(3): p. 68 - 76.*
50. Siegenthaler, W., *Klinische Pathophysiologie*, 2006, Thieme-Verlag: Stuttgart. p. 529-535.
51. Malfait, A.M., G. Verbruggen, K.F. Almqvist, C. Broddelez, and E.M. Veys, *Coculture of human articular chondrocytes with peripheral blood mononuclear cells as a model to study cytokine-mediated interactions between inflammatory cells and target cells in the rheumatoid joint*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 1994. **30A**(11): p. 747-52.
52. Fischer, B.A., S. Mundle, and A.A. Cole, *Tumor necrosis factor-alpha induced DNA cleavage in human articular chondrocytes may involve multiple endonucleolytic activities during apoptosis*. Microsc Res Tech, 2000. **50**(3): p. 236-42.
53. Hietbrink, F., L. Koenderman, G. Rijkers, and L. Leenen, *Trauma: the role of the innate immune system*. World J Emerg Surg, 2006. **1**: p. 15.
54. Hosaka, Y., H. Teraoka, E. Yamamoto, H. Ueda, and K. Takehana, *Mechanism of cell death in inflamed superficial digital flexor tendon in the horse*. J Comp Pathol, 2005. **132**(1): p. 51-8.

55. Liu, Z.G., *Molecular mechanism of TNF signaling and beyond*. Cell Res, 2005. **15**(1): p. 24-7.
56. Ahmed, S.T. and L.B. Ivashkiv, *Inhibition of IL-6 and IL-10 signaling and Stat activation by inflammatory and stress pathways*. J Immunol, 2000. **165**(9): p. 5227-37.
57. DeLong, W.G., Jr. and C.T. Born, *Cytokines in patients with polytrauma*. Clin Orthop Relat Res, 2004(422): p. 57-65.
58. Hildebrand, F., H.C. Pape, and C. Krettek, *[The importance of cytokines in the posttraumatic inflammatory reaction]*. Unfallchirurg, 2005. **108**(10): p. 793-4, 796-803.
59. Eliasson, P., T. Andersson, and P. Aspenberg, *Rat Achilles tendon healing: mechanical loading and gene expression*. J Appl Physiol, 2009. **107**(2): p. 399-407.
60. Uchida, H., H. Tohyama, K. Nagashima, et al., *Stress deprivation simultaneously induces over-expression of interleukin-1beta, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-beta in fibroblasts and mechanical deterioration of the tissue in the patellar tendon*. J Biomech, 2005. **38**(4): p. 791-8.
61. Hosaka, Y., S. Ozoe, R. Kirisawa, et al., *Effect of heat on synthesis of gelatinases and pro-inflammatory cytokines in equine tendinocytes*. Biomed Res, 2006. **27**(5): p. 233-41.
62. Hosaka, Y., R. Kirisawa, H. Ueda, M. Yamaguchi, and K. Takehana, *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): p. 985-91.
63. John, T., D. Lodka, B. Kohl, et al., *Effect of pro-inflammatory and immunoregulatory cytokines on human tenocytes*. J Orthop Res, 2010. **28**(8): p. 1071-7.
64. Yang, Q., W. Huang, C. Jozwik, et al., *Cardiac glycosides inhibit TNF-alpha/NF-kappaB signaling by blocking recruitment of TNF receptor-associated death domain to the TNF receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(27): p. 9631-6.
65. Rahman, M.M., A.R. Lucas, and G. McFadden, *Viral TNF inhibitors as potential therapeutics*. Adv Exp Med Biol, 2009. **666**: p. 64-77.
66. Leng, J., H. Yao, J. Shen, et al., *Co-expression of IL-18 binding protein and IL-4 regulates Th1/Th2 cytokine response in murine collagen-induced arthritis*. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2008. **40**(2): p. 116-124.
67. Pan, H. and J. Halper, *Regulation of heat shock protein 47 and type I procollagen expression in avian tendon cells*. Cell Tissue Res, 2003. **311**(3): p. 373-82.
68. Hosaka, Y.Z., T. Uratsuji, H. Ueda, M. Uehara, and K. Takehana, *Comparative study of the properties of tendinocytes derived from three different sites in the equine superficial digital flexor tendon*. Biomed Res, 2010. **31**(1): p. 35-44.
69. Qi, J., A.M. Fox, L.G. Alexopoulos, et al., *IL-1beta decreases the elastic modulus of human tenocytes*. J Appl Physiol, 2006. **101**(1): p. 189-95.
70. Tsuzaki, M., G. Guyton, W. Garrett, et al., *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): p. 256-64.
71. Qi, J., L. Chi, M. Maloney, et al., *Interleukin-1beta increases elasticity of human bioartificial tendons*. Tissue Eng, 2006. **12**(10): p. 2913-25.

72. Kishimoto, T., *Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine*. Arthritis Res Ther, 2006. **8 Suppl 2**: p. S2.
73. Romano, M., M. Sironi, C. Toniatti, et al., *Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment*. Immunity, 1997. **6**(3): p. 315-25.
74. Nakama, K., M. Gotoh, T. Yamada, et al., *Interleukin-6-induced activation of signal transducer and activator of transcription-3 in ruptured rotator cuff tendon*. J Int Med Res, 2006. **34**(6): p. 624-31.
75. Kjaer, M., P. Magnusson, M. Krosgaard, et al., *Extracellular matrix adaptation of tendon and skeletal muscle to exercise*. J Anat, 2006. **208**(4): p. 445-50.
76. Skutek, M., M. van Griensven, J. Zeichen, N. Brauer, and U. Bosch, *Cyclic mechanical stretching enhances secretion of Interleukin 6 in human tendon fibroblasts*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2001. **9**(5): p. 322-6.
77. Lin, T.W., L. Cardenas, and L.J. Soslowsky, *Biomechanics of tendon injury and repair*. J Biomech, 2004. **37**(6): p. 865-77.
78. Lin, T.W., L. Cardenas, D.L. Glaser, and L.J. Soslowsky, *Tendon healing in interleukin-4 and interleukin-6 knockout mice*. J Biomech, 2006. **39**(1): p. 61-9.
79. Lin, T.W., L. Cardenas, and L.J. Soslowsky, *Tendon properties in interleukin-4 and interleukin-6 knockout mice*. J Biomech, 2005. **38**(1): p. 99-105.
80. Nishimoto, N. and T. Kishimoto, *Interleukin 6: from bench to bedside*. Nat Clin Pract Rheumatol, 2006. **2**(11): p. 619-26.
81. Scheller, J. and S. Rose-John, *Interleukin-6 and its receptor: from bench to bedside*. Med Microbiol Immunol, 2006. **195**(4): p. 173-83.
82. Knisz, J. and P.B. Rothman, *Suppressor of cytokine signaling in allergic inflammation*. J Allergy Clin Immunol, 2007. **119**(3): p. 739-45.
83. Lang, R., A.L. Pauleau, E. Parganas, et al., *SOCS3 regulates the plasticity of gp130 signaling*. Nat Immunol, 2003. **4**(6): p. 546-50.
84. Tan, J.C. and R. Rabkin, *Suppressors of cytokine signaling in health and disease*. Pediatr Nephrol, 2005. **20**(5): p. 567-75.
85. Janeway C.A, T.P., Walport M., Shlomchik M., *Immunologie*. Vol. 5. Auflage. 2002, Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag.
86. Gross, A., J.M. McDonnell, and S.J. Korsmeyer, *BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis*. Genes Dev, 1999. **13**(15): p. 1899-911.
87. John, T., R.D. Muller, A. Oberholzer, et al., *Interleukin-10 modulates pro-apoptotic effects of TNF-alpha in human articular chondrocytes in vitro*. Cytokine, 2007. **40**(3): p. 226-34.
88. Shakibaei, M., G. Schulze-Tanzil, Y. Takada, and B.B. Aggarwal, *Redox regulation of apoptosis by members of the TNF superfamily*. Antioxid Redox Signal, 2005. **7**(3-4): p. 482-96.
89. Relic, B., M. Bentires-Alj, C. Ribbens, et al., *TNF-alpha protects human primary articular chondrocytes from nitric oxide-induced apoptosis via nuclear factor-kappaB*. Lab Invest, 2002. **82**(12): p. 1661-72.
90. Cardullo, R.A., S. Agrawal, C. Flores, P.C. Zamecnik, and D.E. Wolf, *Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(23): p. 8790-4.
91. Pfaffl, M.W., A. Tichopad, C. Prgomet, and T.P. Neuvians, *Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations*. Biotechnol Lett, 2004. **26**(6): p. 509-15.
92. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(9): p. e45.

93. Rutledge, R.G. and C. Cote, *Mathematics of quantitative kinetic PCR and the application of standard curves*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(16): p. e93.
94. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
95. Fleming, S.D. and G.C. Tsokos, *Complement, natural antibodies, autoantibodies and tissue injury*. Autoimmun Rev, 2006. **5**(2): p. 89-92.
96. Gulotta, L.V., D. Kovacevic, F. Cordasco, and S.A. Rodeo, *Evaluation of tumor necrosis factor alpha blockade on early tendon-to-bone healing in a rat rotator cuff repair model*. Arthroscopy, 2011. **27**(10): p. 1351-7.
97. Liechty, K.W., H.B. Kim, N.S. Adzick, and T.M. Crombleholme, *Fetal wound repair results in scar formation in interleukin-10-deficient mice in a syngeneic murine model of scarless fetal wound repair*. J Pediatr Surg, 2000. **35**(6): p. 866-72; discussion 872-3.
98. Thomas, S. and D.C. Baumgart, *Targeting leukocyte migration and adhesion in Crohn's disease and ulcerative colitis*. Inflammopharmacology, 2012. **20**(1): p. 1-18.
99. Bernard-Beaubois, K., C. Hecquet, O. Houcine, G. Hayem, and M. Adolphe, *Culture and characterization of juvenile rabbit tenocytes*. Cell Biol Toxicol, 1997. **13**(2): p. 103-13.
100. Mauviel, A., M. Santra, Y.Q. Chen, J. Uitto, and R.V. Iozzo, *Transcriptional regulation of decorin gene expression. Induction by quiescence and repression by tumor necrosis factor-alpha*. J Biol Chem, 1995. **270**(19): p. 11692-700.
101. Rysz, J., M. Banach, A. Cialkowska-Rysz, et al., *Blood serum levels of IL-2, IL-6, IL-8, TNF-alpha and IL-1beta in patients on maintenance hemodialysis*. Cell Mol Immunol, 2006. **3**(2): p. 151-4.
102. Kronsbein, J., *Einfluß einer RSV-Exposition auf das Zytokinmuster humaner T-Lymphozyten und PBMC in vitro*. Aus der Medizinischen Klinik III (Pneumologie, Allergologie und Schlafmedizin) der Berufsgenossenschaftlichen Kliniken Bergmannsheil - Universitätsklinik -. Vol. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin. 2004, Bochum: Universität Bochum. S. 34.
103. Brayton, J., Z. Qing, M.N. Hart, J.C. VanGilder, and Z. Fabry, *Influence of adhesion molecule expression by human brain microvessel endothelium on cancer cell adhesion*. J Neuroimmunol, 1998. **89**(1-2): p. 104-12.
104. Foster, T.E., B.L. Puskas, B.R. Mandelbaum, M.B. Gerhardt, and S.A. Rodeo, *Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications*. Am J Sports Med, 2009. **37**(11): p. 2259-72.
105. Choukroun, J., A. Diss, A. Simonpieri, et al., *Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part IV: clinical effects on tissue healing*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2006. **101**(3): p. e56-60.
106. Choukroun, J., A. Diss, A. Simonpieri, et al., *Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part V: histologic evaluations of PRF effects on bone allograft maturation in sinus lift*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2006. **101**(3): p. 299-303.
107. Dohan Ehrenfest, D.M., L. Rasmusson, and T. Albrektsson, *Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF)*. Trends Biotechnol, 2009. **27**(3): p. 158-67.
108. Zumstein, M.A., S. Berger, M. Schober, et al., *Leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin (L-PRF) for Long-Term Delivery of Growth Factor in Rotator Cuff Repair:*

- Review, Preliminary Results and Future Directions.* Curr Pharm Biotechnol, 2011.
109. Zumstein, M.A., T. Bielecki, and D.M. Dohan Ehrenfest, *The Future of Platelet Concentrates in Sports Medicine: Platelet-Rich Plasma, Platelet-Rich Fibrin, and the Impact of Scaffolds and Cells on the Long-term Delivery of Growth Factors.* Operative Techniques in Sports Medicine, 2011. **19**(3): p. 190-197.
  110. Bielecki, T.M., T.S. Gazdzik, J. Arendt, et al., *Antibacterial effect of autologous platelet gel enriched with growth factors and other active substances: an in vitro study.* J Bone Joint Surg Br, 2007. **89**(3): p. 417-20.
  111. Armand, A.S., I. Laziz, D. Djeghloul, et al., *Apoptosis-inducing factor regulates skeletal muscle progenitor cell number and muscle phenotype.* PLoS One, 2011. **6**(11): p. e27283.
  112. Daugas, E., S.A. Susin, N. Zamzami, et al., *Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis.* FASEB J, 2000. **14**(5): p. 729-39.
  113. Tan, V., A. Nourbakhsh, J. Capo, et al., *Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on flexor tendon adhesion.* J Hand Surg Am, 2010. **35**(6): p. 941-7.
  114. Ferry, S.T., L.E. Dahners, H.M. Afshari, and P.S. Weinhold, *The effects of common anti-inflammatory drugs on the healing rat patellar tendon.* Am J Sports Med, 2007. **35**(8): p. 1326-33.
  115. Tsai, W.C., C.C. Hsu, C.P. Chen, et al., *Ibuprofen inhibition of tendon cell migration and down-regulation of paxillin expression.* J Orthop Res, 2006. **24**(3): p. 551-8.
  116. Tsai, W.C., C.C. Hsu, H.N. Chang, et al., *Ibuprofen upregulates expressions of matrix metalloproteinase-1, -8, -9, and -13 without affecting expressions of types I and III collagen in tendon cells.* J Orthop Res, 2010. **28**(4): p. 487-91.
  117. Thaher, F., S. Plankenhorn, and R. Klein, *Differential effects of the tumor necrosis factor alpha-blocker infliximab and etanercept on immunocompetent cells in vitro.* Int Immunopharmacol, 2011. **11**(11): p. 1724-31.
  118. Agarwal, S.K., *Biologic agents in rheumatoid arthritis: an update for managed care professionals.* J Manag Care Pharm, 2011. **17**(9 Suppl B): p. S14-8.
  119. Hays, P.L., S. Kawamura, X.H. Deng, et al., *The role of macrophages in early healing of a tendon graft in a bone tunnel.* J Bone Joint Surg Am, 2008. **90**(3): p. 565-79.
  120. Baldauf, C.B., *Einfluß von Fluconazol auf die Phagozytose-, Burst- und Killingaktivität humaner Phagozyten. Anwendung einer durchflußzytometrischen Methode mit Vollblut,* 1999, München: Herbert Utz Verlag Wissenschaft.
  121. Klebanoff, S.J., M.A. Vadas, J.M. Harlan, et al., *Stimulation of neutrophils by tumor necrosis factor.* J Immunol, 1986. **136**(11): p. 4220-5.
  122. Gallucci, R.M., P.P. Simeonova, J.M. Matheson, et al., *Impaired cutaneous wound healing in interleukin-6-deficient and immunosuppressed mice.* FASEB J, 2000. **14**(15): p. 2525-31.

## 8. Anhang

### 8.1 Materialien

#### Chemikalien

β-Mercaptoethanol  
 2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)- ethansulfonsäure  
 4',6-Diamidino-2-phenylindol  
 Aceton, ≥ 99,8 %  
 Acrylamid, 30 %  
 Agarose, high resolution  
 Ammoniumperoxodisulfat 5 %  
 bovines Serumalbumin  
 Dimethylsulfoxid  
 Dithiothreitol, 200 mM  
 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)  
 Entellan  
 Eselserum  
 essentielle Aminosäuren, 50x  
 Essigsäure  
 Ethanol, 70 %  
 Ethidiumbromidlösung, 1 %  
 Ethylenglykoltetraacetat 0,1 M  
 Eosin-Lösung  
 fetales Kälberserum  
 Fluoromount-G  
 GeneRuler DNA ladder, ultra low range  
 Gentamycin  
 Glycin  
 Ham's F12  
 HANKs Salt Solution  
 Immobilon Western HRP Substrate Peroxide Solution  
 and Luminol Reagent  
 Hematoxylin-Lösung  
 Kaleidoskop Prestained Standard  
 Kaliumchlorid  
 L-Glutamin, 200 mM  
 Loading Dye Solution, 6x Konzentrat  
 Magnesiumchlorid, 0,5 M  
 Methanol  
 Natriumazid  
 Natriumchlorid  
 Natriumdodecylsulfat 20 %  
 Natrium-Ethylendiamintetraacetat  
 Nitrozellulosemembran  
 Paraformaldehyd 4 %

#### Firma

Sigma-Aldrich, USA  
 Biochrom AG, DE  
 Roche Diagnostics GmbH, DE  
 Carl Roth GmbH und Co KG, DE  
 Bio-Rad Laboratories, Inc., USA  
 Carl Roth GmbH und Co KG, DE  
 Biochrom AG, DE  
 Merck KGaA, DE  
 Chemicon, USA  
 Biochrom AG, DE  
 Merck KGaA, DE  
 Merck KGaA, DE  
 Carl Roth GmbH und Co KG, DE  
 Sigma-Aldrich, USA  
 Carl Roth GmbH und Co KG, DE  
 Biochrom AG, DE  
 Southern Biotech, USA  
 Fermentas International Inc., CA  
 Biochrom AG, DE  
 Sigma-Aldrich, USA  
 Biochrom AG, DE  
 Biochrom AG, DE  
 Millipore Corporation, USA  
 Carl Roth GmbH und Co KG, DE  
 Bio-Rad Laboratories, Inc., USA  
 Carl Roth GmbH und Co KG, DE  
 Biochrom AG, DE  
 Fermentas International Inc., CA  
 Carl Roth GmbH und Co KG, DE  
 Carl Roth GmbH und Co KG, DE  
 Merck KGaA, DE  
 Carl Roth GmbH und Co KG, DE  
 Carl Roth GmbH und Co KG, DE  
 Carl Roth GmbH und Co KG, DE  
 Biorad Laboratories, Inc., USA  
 Carl Roth GmbH und Co KG, DE

Partricin 50 mg/ml	Biochrom AG, DE
Penicillin / Streptomycin 10000 U / 10 mg/ml	Biochrom AG, DE
Phosphate Buffered Saline	Biochrom AG, DE
Poly-L-Lysin	Biochrom AG, DE
Ponceaurot-S	Sigma-Aldrich, USA
Proteaseinhibitoren complete mini	Roche Diagnostics GmbH, DE
Roti-Block, 10x Konzentrat	Carl Roth GmbH und Co KG, DE
Roti-Load 1, 4x Konzentrat	Carl Roth GmbH und Co KG, DE
Roti-Nanoquant	Carl Roth GmbH und Co KG, DE
Tetramethylethyldiamin	Sigma-Aldrich, USA
Trichloressigsäure	Carl Roth GmbH und Co KG, DE
Tris(hydroxymethyl)aminomethan Base/HCl	Merck KGaA, DE
Triton X-100	Sigma-Aldrich, USA
Trypanblau, 1 %	Biochrom AG, DE
Trypsin / EDTA Solution (10x)	Biochrom AG, DE
Tween-20	Sigma-Aldrich, USA
Vitamin C	Sigma-Aldrich, USA

## 8.2 Zellkultur- und Versuchsmaterialien

### Material

Cell plus T25/T75/T175 Gewebekulturflasche  
 Cell plus 6-Well Zellkulturplatte  
 Objektträger  
 Deckgläser  
 Glasplättchen  
 Transwell, 24 mm/0,4 µm PS

### Firma

Sarstedt AG & Co., DE  
 Sarstedt AG & Co., DE  
 Menzel, DE  
 Menzel, DE  
 VWR, DE  
 Costar, USA

## 8.3 Medien und Puffer

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Puffer in Reinstwasser hergestellt.

### Zellkultur

#### Medium mit 0,5 % FKS:

236,25 ml Ham's F 12  
 236,25 ml DMEM  
 2,5 ml FKS  
 5 ml Penicillin / Streptomycin  
 5 ml Partricin  
 5 ml essentielle Aminosäuren  
 5 ml Vitamin C  
 5 ml L-Glutamin

#### Einfriermedium:

10 % DMSO  
 90 % FKS

<u>Medium mit 10 % FKS:</u>	9,5 % FKS Medium mit 0,5 % FKS
<u>Poly-L-Lysin-Lösung:</u>	500 µl Poly-L-Lysin in 49,5 ml PBS
<b>Proteinisolierung</b>	
<u>Lysepuffer:</u>	25 mM HEPES pH 7,5 1 % Triton X-100 5 mM MgCl <sub>2</sub> 2 mM DTT 1 mM EGTA Proteaseinhibitoren, complete mini (1 Tablette auf 10 ml) ad 10 ml Reinstwasser
<b>Western Blot</b>	
<u>Trenngelpuffer 0,5 l</u>	38,5 g TRIS-Base 9,3 g TRIS-HCl 1 g SDS pH 8,8
<u>Probenpuffer:</u>	4x Roti-Load 1 1:4 in 1x PBS
<u>Laufpuffer 10x 1 l:</u>	30 g TRIS Base 144,2 g Glycin 10 g SDS
<u>PBST (Waschpuffer):</u>	1x PBS 0,05 % Tween-20
<u>Transferpuffer, 4x, 1 l:</u>	9,69 g TRIS Base 45 g Glycin 200 ml Methanol
<u>Blockierpuffer:</u>	Roti-Block 1:10 H <sub>2</sub> O
<u>Sammelgelpuffer, 0,5 l:</u>	19,7 g TRIS-Base 1 g SDS, pH 6,8
<u>ECL-Lösung:</u>	Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate

## 8.4 Zytokin, Antikörper und Primer

<b>Zytokin (human, rekombinant)</b>		<b>Firma</b>
Tumornekrosefaktor $\alpha$		Pepto Tech, DE
<b>Antikörper</b>	<b>Methode</b>	<b>Firma</b>
Tenomodulin	Immunzytochemische Färbungen	Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA
Tenascin C	Immunzytochemische Färbungen	GeneTex, Inc., USA
Kollagen Typ I	Immunzytochemische Färbungen	Acris Antibodies GmbH, DE
Decorin	Immunzytochemische Färbungen	Acris Antibodies GmbH, DE
<b>Primärer Antikörper</b>	<b>Methode</b>	<b>Firma</b>
anti-hMMP1	Western-Blot	R&D Systems USA
$\beta$ 1-Integrin	Western-Blot	Millipore Corporation, USA
$\beta$ -Aktin	Western-Blot	Sigma-Aldrich, USA
<b>sekundärer Antikörper</b>	<b>Methode</b>	<b>Firma</b>
Ziege-anti-Maus-Ig-HRP	Western-Blot	Dako Cytomation, DK
Ziege-anti-Kaninchen-Ig-HRP	Western-Blot	Dako Cytomation, DK
Affe-anti-Kaninchen-Fluor R488	Immunfluoreszenz-markierung	Invitrogen, USA

Tabelle 7: Verwendete Primer von Qiagen und Applied Biosystems

<b>Gen</b>	<b>Firma</b>	<b>Vorwärts-/ Rückwärts-primer</b>	<b>Sonde/Referenz</b>	<b>bp</b>
$\beta$ -Aktin	Qia	TGGGACGACATGGAGAA GAAGGTCTCAAACATGATCTGG	GCCCCCTGAACCCTAA	147
Typ I Kollagen	Qia	GGCAACGATGGTGCTAA GACCAGCATCACCTCTGTC	AATGCCTGGTGAACGTG	138
Decorin	ABI	NA	Hs00370384_m1	77
Fibronektin	ABI	NA	Hs01549940_m1	66
$\beta$ 1-Integrin	ABI	NA	Hs00559595_m1	75
HPRT	ABI	NA	Hs99999909_m1	100
TNF $\alpha$	ABI	NA	Hs00174128_m1	80
IL-1 $\beta$	ABI	NA	Hs00174097_m1	94
IL-6	ABI	NA	Hs00174131_m1	95
MMP1	ABI	NA	Oc03398637_m1	64
TNF $\alpha$	ABI	NA	Oc03397715_m1	74
IL-1 $\beta$	ABI	NA	Oc03823250_s1	86
IL-6	ABI	NA	Oc04097053_m1	72
Myodulin	ABI	NA	Oc03399505_m1	146
GAPDH	ABI	NA	Oc03823402_g1	82

Qia = Qiagen, Deutschland; ABI = Applied Biosystems, USA

ABI stellt keine Sequenzen zur Verfügung (NA), nur TaqMan Gene Expression Assay ID

## 8.5 Kits

<b>Methode</b>	<b>Kit, Firma</b>
RNA-Isolation	RNeasy Mini Kit, Qiagen, DE
RNA-Konzentrationsmessung	RNA Nano LabChip, Agilent Technologies, Inc., USA
cDNA-Synthese	QuantiTect Reverse Transcription Kit, DE
PCR	TaqMan Gene Expression Assay, Applied Biosystems, USA Quantitect Gene Expression Assay, Qiagen, DE
Caspase-Assay	Apo-ONE Homogeneous Caspase-3/7 Assay, Promega Corporation, USA
TUNEL-Assay	DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System Promega Corporation, USA

## 8.6 Geräte und Auswertungsprogramme

### Zellkultivierung

Brutschrank	Binder, DE
Inkubator Heracell 150	Thermo Scientific, DE
Zentrifuge 5810R	Eppendorf, DE
Zentrifuge Multifuge 1S-R	Heraeus, UK

### Kryokonservierung

Mr. Frosty	Nalgene Labware, USA
------------	----------------------

### RNA-Konzentrationsmessung

NanoDrop 1000 Spectrophotometer	Thermo Fischer Scientific, Inc., USA
RNA Nano LabChip	Agilent Technologies, Inc., USA
Bioanalyzer	Agilent Technologies, Inc., USA
Software: 2100 expert	Agilent Technologies, Inc., USA

### Reverse Transkription

Mastercycler	Eppendorf, DE
--------------	---------------

### **RTD-PCR**

Chromo4	Bio-Rad Laboratories, Inc., USA
Opticon I	Bio-Rad Laboratories, Inc., USA
Software: Opticon Monitor 3.1	Bio-Rad Laboratories, Inc., USA

### **Agarose-Gelelektrophorese**

GelDoc 2000	Bio-Rad Laboratories, Inc., USA
Software: Quantity One	Bio-Rad Laboratories, Inc., USA

### **Fluoreszenz-Mikroskopie**

Mikroskop: Axioskop 40 + HBO 50	Carl Zeiss AG, DE
Kamera: Color View II	Olympus Soft Imaging Solution (SIS) GmbH, DE
Software: analySIS FIVE cellID-Modul	Olympus Soft Imaging Solution GmbH, DE

### **Proteinkonzentrationsbestimmung, Caspase-3/7-Assay**

Mikrotiterplattenphotometer GENios	Tecan Trading AG, CH
------------------------------------	----------------------

### **Western-Blot**

Film: Amersham Hyperfilm ECL (24 × 30 cm)	GE Healthcare, USA
Röntgenkassette: Hypercassette Neutral (24 × 30 cm)	GE Healthcare, USA
Densitometrie: Programm: Alpha DigiDoc	Alpha Innotech, USA

### **Statistische Analysen**

Software: GraphPad Prism	GraphPad Software Inc., USA
--------------------------	-----------------------------

## 8.7 Abkürzungen

<b>°C</b>	Grad Celsius	<b>mRNA</b>	messenger Ribonukleinsäure
<b>µg</b>	Mikrogramm	<b>NFκB</b>	nuclear factor κB
<b>µl</b>	Mikroliter	<b>NIK</b>	NFκB-induzierende Kinasen
<b>ABI</b>	Applied Biosystems	<b>NK-Zellen</b>	natürlichen Killerzellen
<b>APS</b>	Ammoniumperoxodisulfat	<b>nm</b>	Nanometer
<b>BAX</b>	Bcl-2 associated X protein	<b>NTC</b>	Non Template Control
<b>Bcl</b>	B-cell lymphoma 2	<b>PBMC</b>	Peripheral Blood Mononuclear Cell
<b>bFGF</b>	Basic fibroblast growth factor	<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline
<b>bp</b>	Basenpaare	<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>BSA</b>	bovines Serumalbumin	<b>PDGF</b>	Platelet derived growth factor
<b>CAD</b>	Caspaseaktivierbare DNase	<b>PG</b>	Proteoglykane
<b>cDNA</b>	komplementäre Desoxyribonukleinsäure	<b>PGE</b>	Prostaglandin E
<b>cm</b>	Zentimeter	<b>rER</b>	Raues Endoplasmatisches Retikulum
<b>CO<sub>2</sub></b>	Kohlenstoffdioxid	<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>COX</b>	Cyclooxygenasen	<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>CT</b>	Cycle of Threshold	<b>RTD-PCR</b>	Real Time Detection PCR
<b>DAPI</b>	4',6-Diamidino-2-phenylindol	<b>SDS-PAGE</b>	SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle's Medium	<b>SOCS</b>	Suppressors of cytokine signalling
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid	<b>STAT</b>	Signal Transducer and Activator of Transcription
<b>dNTPs</b>	Desoxyribonukleosid-triphosphate	<b>STAT</b>	Signal transducer and activator of transcription
<b>DTT</b>	Dithiothreitol	<b>TdT</b>	Desoxyribonukleotidyltransferase
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat	<b>TEMED</b>	Tetramethylethylen-diamin
<b>EGTA</b>	Ethylenglykoltetraacetat	<b>TGFβ</b>	Transforming growth factor beta
<b>EZM</b>	Extrazellulärmatrix	<b>TNFα</b>	Tumornekrosefaktor-alpha
<b>FA</b>	Faszikel	<b>TRADD</b>	TNF-receptor associated death domain
<b>FADD</b>	Fas-associated protein with death domain	<b>TRAF</b>	TNFα-Rezeptor assoziierter Faktor
<b>FKS</b>	fetales Kälberserum	<b>TRIS</b>	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
<b>FRET</b>	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer	<b>UNG</b>	Uracil-N-Glycosylase
<b>g</b>	Erdbeschleunigung	<b>UV</b>	Ultraviolettstrahlung
<b>g</b>	Gramm	<b>V</b>	Volt
<b>GAG</b>	Glykosaminoglykane	<b>VEGF</b>	Vascular endothelial growth factor
<b>GAPDH</b>	Glycerinaldehyd-Phosphat-Dehydrogenase		

<b>ggf.</b>	gegebenenfalls
<b>GP/gp</b>	Glykoproteinen
<b>h</b>	Stunden
<b>HE</b>	Hämatoxylin-Eosin
<b>HEPES</b>	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperaziny)- ethansulfonsäure
<b>IGF</b>	Insuline-like growth factor
<b>IKK</b>	I $\kappa$ B-Kinase
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleukin 1 $\beta$
<b>IL-6</b>	Interleukin 6
<b>IL-6R</b>	IL-6-Rezeptor
<b>JAK</b>	Janus-Tyrosin-Kinase
<b>kDa</b>	Kilo-Dalton
<b>MEKK</b>	MEK-Kinase
<b>MGB</b>	Minor Groove Binder
<b>min.</b>	Minuten
<b>Mio.</b>	Millionen
<b>ml</b>	Milliliter
<b>mm</b>	Millimeter
<b>MMP</b>	Matrix-Metalloproteinase

### 9. Danksagung

Für das Erscheinen der Arbeit in der vorliegenden Form bin ich verschiedenen Seiten zu Dank verpflichtet: Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Ertel für die Möglichkeit, im Forschungslabor der Klinik für Orthopädische, Unfall- und Wiederherstellungschirurgie promovieren zu können sowie allen gegenwärtigen und ehemaligen Mitarbeitern des Labors, die mich auf diesem langen Weg zur Promotion begleitet und unterstützt haben. Dabei möchte ich mich vor allem bei Herrn Benjamin Kohl für die Einarbeitung in die Labortätigkeit sowie für die vielen guten Ratschläge bei der Lösung von Problemen bedanken.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei Frau Uschi Teidel und Herrn Peter Teidel für die Offenheit und anregende Zeit während meiner Ausbildung zum Physiotherapeuten bedanken und für das Vertrauen und die Möglichkeit, eine Lehrtätigkeit an ihrer Schule ausüben zu dürfen.

Mein ganz persönlicher Dank aber gilt der Leiterin des Forschungslabors, Frau PD Dr. med. vet. Gundula Schulze-Tanzil, deren Fragestellung und Anregungen die Voraussetzungen für meine Arbeit bildeten und ihr Zustandekommen stets mit besonderem Interesse, großzügiger Hilfe und wertvollen Ratschlägen begleitete.

## **10. Eidesstattliche Erklärung**

„Ich, Onays Al-Sadi, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

Interaktion zwischen Tendozyten und aus dem peripheren Blut stammenden  
autologen Leukozyten vor dem Hintergrund der Sehnenheilung,

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel  
benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien  
anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

## **11. Lebenslauf**

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

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

## 12. Wissenschaftliche Arbeiten

### Publikationen

---

- O. Al-Sadi, G. Schulze-Tanzil, B. Kohl, A. Lohan, M. Lemke, T. John  
Tenocytes, pro-inflammatory cytokines and leukocytes: A relationship? MLTJ  
Muscles, Ligaments and Tendons Journal, 2011.
- 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 Sports, 2011.

### Posterbeiträge

---

- Onays Al-Sadi, Benjamin Kohl, Marion Lemke, Anke Lohan, Christiane Stoll,  
Wolfgang Ertel, Gundula Schulze-Tanzil. Interaktion zwischen lapinen  
Tendozyten und autologen Leukozyten. Posterbeitrag zur 27. Arbeitstagung  
der Anatomischen Gesellschaft, Würzburg, September 2010.

### Kongresse

---

- Teilnahme an: 22<sup>nd</sup> European Students´ Conference, September 2011  
“Challenges and Perspectives in Regenerative Medicine”

#### **Oral Session Winner: Orthopedic Surgery**

“Cross talk between blood-derived leukocytes and autologous tenocytes”