

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

DISSERTATION

**Expression von Anaphylatoxinrezeptoren und  
Komplement-regulierenden Proteinen in der Sehne**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Catharina Busch

aus Lutherstadt Wittenberg

Gutachter/in:     1. PD Dr. Gundula Schulze-Tanzil  
                          2. Prof. Dr. Horst Claassen  
                          3. Prof. Dr. Henning Madry

**Datum der Promotion: 14.02.2014**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Die Sehne</b>	<b>1</b>
1.1.1	Struktureller Aufbau	2
1.1.2	Extrazellulärmatrix der Sehne	4
1.1.3	Zelluläre Bestandteile der Sehne	6
1.1.4	Vaskularisation und Innervation	7
1.1.5	Die Sehnenpathologie	8
1.1.6	Die Sehnenheilung	11
<b>1.2</b>	<b>Zytokine</b>	<b>12</b>
1.2.1	Tumornekrosefaktor $\alpha$	12
1.2.2	Interleukin-6	14
1.2.3	Interleukin-10	16
<b>1.3</b>	<b>Das Komplementsystem</b>	<b>18</b>
1.3.1	Aufbau und Aktivierungskaskaden des Komplementsystems	18
1.3.2	Anaphylatoxine und ihre Rezeptoren	22
1.3.3	Komplement-regulierende Proteine	23
<b>1.4</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>27</b>
<b>2</b>	<b>Material</b>	<b>29</b>
<b>2.1</b>	<b>Chemikalien</b>	<b>29</b>
<b>2.2</b>	<b>Zellkultur- und Versuchsmaterialien</b>	<b>30</b>
<b>2.3</b>	<b>Medien und Puffer</b>	<b>30</b>
<b>2.4</b>	<b>Zytokine, Antikörper, Primer</b>	<b>31</b>
<b>2.5</b>	<b>Kits</b>	<b>32</b>
<b>2.6</b>	<b>Geräte und Auswertungsprogramme</b>	<b>32</b>
<b>3</b>	<b>Methoden</b>	<b>34</b>
<b>3.1</b>	<b>Zellkulturexperimente mit Tendozyten</b>	<b>34</b>
3.1.1	Isolierung von Tendozyten aus humaner Sehne	34
3.1.2	Isolierung von PBMCs und Granulozyten	34
3.1.3	Passagieren von Tendozyten	35
3.1.4	Zellzählung	35
3.1.5	Kryokonservierung von Tendozyten	36

3.1.6	Auftauen von Tendozyten.....	36
3.1.7	Stimulationsexperimente mit humanen rekombinanten Zytokinen.....	36
3.1.8	Stimulationsexperimente mit PBMCs und Vollblut.....	37
<b>3.2</b>	<b>Genexpressionsanalyse.....</b>	<b>37</b>
3.2.1	RNA-Isolation aus der Tendozytenkultur.....	37
3.2.2	RNA-Isolation aus humanem Sehngewebe.....	38
3.2.3	Bestimmung der RNA-Konzentration.....	38
3.2.4	cDNA-Synthese.....	39
3.2.5	Semi-quantitative Real-Time Detection PCR.....	40
3.2.6	Primereffizienzbestimmung.....	43
3.2.7	Agarosegelelektrophorese.....	43
<b>3.3</b>	<b>Immunfluoreszenzmikroskopie.....</b>	<b>44</b>
<b>3.4</b>	<b>Statistik.....</b>	<b>45</b>
<b>3.5</b>	<b>Richtlinien.....</b>	<b>45</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>46</b>
<hr/>		
<b>4.1</b>	<b>Charakterisierung der Tendozyten <i>in vitro</i>.....</b>	<b>46</b>
<b>4.2</b>	<b>Genexpressionsanalysen in nativer Sehne.....</b>	<b>46</b>
4.2.1	Primereffizienzbestimmung.....	46
4.2.2	Genexpression der untersuchten Komplementfaktoren in nativer Sehne und kultivierten humanen Tendozyten.....	48
<b>4.3</b>	<b>Genexpression der untersuchten Komplementfaktoren in PBMCs und Granulozyten.....</b>	<b>50</b>
<b>4.4</b>	<b>Einfluss humaner rekombinanter Zytokine auf die Genexpression der untersuchten Komplementfaktoren in kultivierten humanen Tendozyten.....</b>	<b>52</b>
4.4.1	C3aR-Genexpression.....	52
4.4.2	C5aR-Genexpression.....	54
4.4.3	CD46-Genexpression.....	55
4.4.4	CD55-Genexpression.....	57
4.4.5	CD59-Genexpression.....	59
<b>4.5</b>	<b>Einfluss von humanen PBMCs und Vollblut auf die Genexpression der untersuchten Komplementfaktoren in kultivierten humanen Tendozyten.....</b>	<b>60</b>
<b>4.6</b>	<b>Immunhistochemischer Nachweis der CD55-Proteinexpression in nativer Sehne.....</b>	<b>62</b>
<b>4.7</b>	<b>Immunhistochemischer Nachweis der C5aR- und CD55-Proteinexpression in kultivierten humanen Tendozyten.....</b>	<b>63</b>
4.7.1	C5aR-Proteinexpression.....	63
4.7.2	CD55-Proteinexpression.....	64

---

<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>66</b>
5.1.	Genexpression der untersuchten Komplementfaktoren in nativer Sehne und kultivierten humanen Tendozyten.....	67
5.2	Genexpression der untersuchten Komplementfaktoren in PBMCs und Granulozyten.....	72
5.3	Einfluss humaner rekombinanter Zytokine auf die Expression der untersuchten Komplementfaktoren in kultivierten humanen Tendozyten.....	74
5.3.1	Einfluss von Zytokinen auf die Expression der Anaphylatoxinrezeptoren C3aR und C5aR.....	75
5.3.2	Einfluss von Zytokinen auf die Expression der CRPs CD46, CD55 und CD59.....	80
5.4	Einfluss von humanen PBMCs und Vollblut auf die Genexpression der untersuchten Komplementfaktoren in kultivierten humanen Tendozyten.....	86
<b>6</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>88</b>
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>92</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>94</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>106</b>
<b>10</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>107</b>
<b>11</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>108</b>
<b>12</b>	<b>Publikationsliste.....</b>	<b>110</b>

## Abkürzungen

ABI	Applied Biosystems
ARDS	Acute respiratory distress syndrome
bFGF	Basic fibroblast growth factor
C	Komplementfaktor
C <sub>T</sub>	Cycle of Threshold
C3aR	C3a-Rezeptor
C5aR	C5a-Rezeptor
COMP	Cartilage oligomeric matrix protein
COX	Cyclooxygenase
CR1	Complement Receptor 1
CRASP	Complement-regulator-acquiring-surface-proteins
CRP	Komplement-regulierendes Protein
DAF	Decay accelerating factor
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
E	Effizienz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EZM	Extrazellulärmatrix
FCS	Fetales Kälberserum
GAG	Glykosaminoglykan
GP, gp	Glykoprotein
GPI	Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol
HE	Hämatoxylin-Eosin
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IL-6R	IL-6-Rezeptor
IL-10R	IL-10-Rezeptor
IR	Ischämie/Reperfusion
IGF	Insuline-like growth factor
Ig	Immunglobulin
JAK	Janus-Tyrosin-Kinase
LPS	Lipopolysaccharid
M	Musculus
MAC	Membrane attack complex
mAK	monoklonaler Antikörper
MASP	MBL-associated serine protease
MBL	Mannose-bindendes Lektin
MCP	Membrane cofactor protein
MMP	Matrix-Metalloproteinase
NTC	No template control
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
pAK	polyklonaler Antikörper
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PBS	Phosphate-buffered saline
PDGF	Platelet derived growth factor
PG	Proteoglykan

---

PGE	Prostaglandin E
PNH	Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie
PRR	Pattern-recognition receptors
RTD-PCR	Real-Time Detection PCR
SD	Standardabweichung
SOCS	Suppressors of cytokine signalling
STAT	Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription
TAE	Tris-Essigsäure-EDTA
TBS	Tris-buffered saline
TGF	Transforming growth factor
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TNFR	TNF-Rezeptor
TRAF	TNF $\alpha$ -Rezeptor assoziierter Faktor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
VEGF	Vascular endothelial growth factor

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Sehne

Sehnen bestehen aus straffem, parallelfasrigem Bindegewebe, das Muskeln und Knochen miteinander verbindet, Kraft vom Muskel auf den Knochen überträgt und somit Bewegungen der Gelenke ermöglicht <sup>[1-4]</sup>. Gesunde Sehnen sind typischerweise glänzend weiß und besitzen eine fibroelastische Beschaffenheit <sup>[2, 4]</sup>. In ihrer Form können sich die Sehnen des Körpers stark unterscheiden. Variationen bestehen dabei von flachen und breiten über zylindrisch-fächerartigen bis hin zu bandartigen Sehnen.

In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich mit Sehnengewebe gearbeitet, das bei Kreuzbandersatzoperationen als Überschuss gewonnen wurde. Dabei handelte es sich um Gewebe der Ansatzsehnen des *Musculus (M.) semitendinosus*, *M. semimembranosus* und *M. gracilis*. Der *M. semitendinosus* und *M. semimembranosus* werden zusammen mit dem *M. biceps femoris* auch als Hamstringmuskulatur bezeichnet (Abbildung 1). Da das verwendete Sehnengewebe zum größten Teil der Hamstringmuskulatur entstammte, wird im Folgenden von Hamstringsehnengewebe gesprochen.



**Abbildung 1** Darstellung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Ansatzsehnen des *M. semitendinosus* und *M. semimembranosus*. Nicht dargestellt ist der *M. gracilis*, der medial des *M. semimembranosus* verläuft und zusammen mit dem *M. semitendinosus* am Schienbein ansetzt. Quelle: modifiziert nach <sup>[5]</sup>

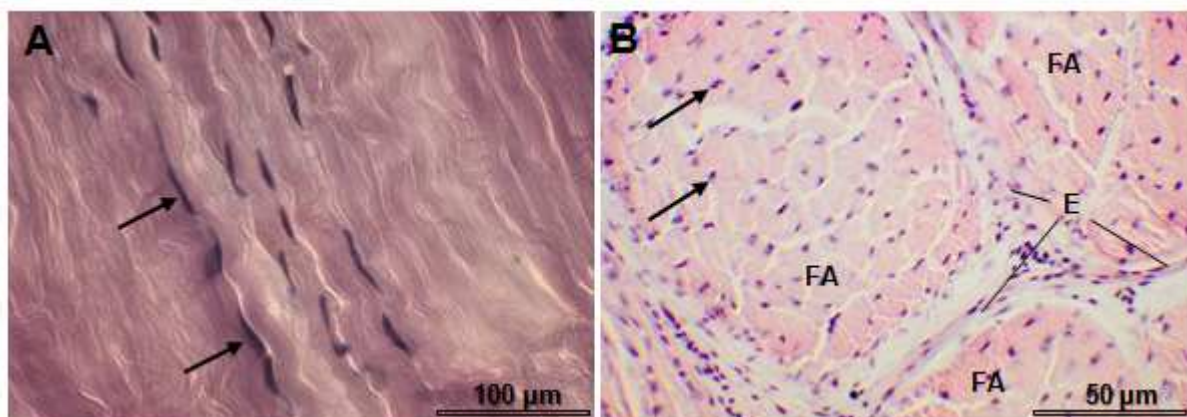




### 1.1.1 Struktureller Aufbau

Die Sehne ist durch einen komplexen Aufbau verschiedener funktioneller Strukturen charakterisiert. Die kleinste strukturelle Einheit ist die Kollagenfibrille, die einen Durchmesser von 20-150 nm aufweist und hauptsächlich aus Kollagen Typ I besteht [2, 6, 7]. Durch die Aggregation mehrerer Kollagenfibrillen entsteht eine Kollagenfaser, die auch als Grundbaustein der Sehne bezeichnet wird [2]. Dabei sind sowohl die Anzahl als auch die Anordnung der Kollagenfibrillen innerhalb der Faser sehr variabel. Bedingt durch die weiterhin in der Sehne enthaltenen Elastinfasern, sind Kollagenfibrillen und -fasern im Ruhezustand wellenförmig angeordnet, was der Sehne eine gewisse Dehnung erlaubt (Abbildung 2A) [2, 6, 8].

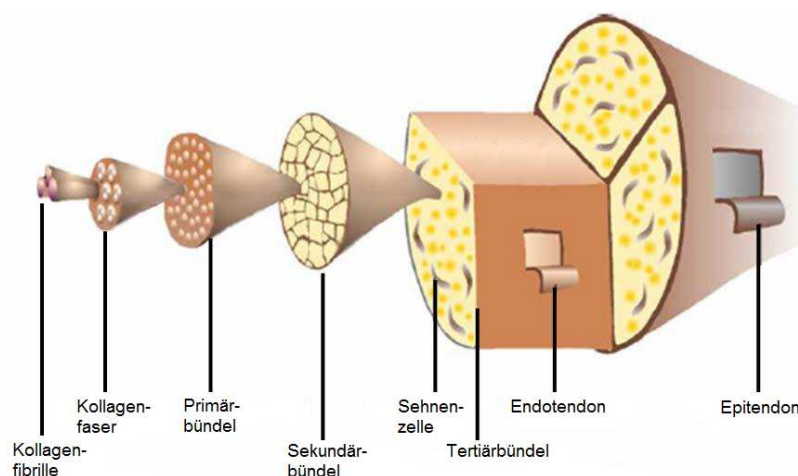
Die Kollagenfasern bilden sog. Primärbündel (auch Subfaszikel genannt). Im Allgemeinen schließen sich mehrere dieser Primärbündel zu einem Sekundärbündel (auch Faszikel genannt) zusammen (Abbildung 2B und 3). Sekundärbündel hingegen sind in sog. tertiären Faserbündeln organisiert, die sich zur Sehne zusammensetzen. Umgeben ist die Sehne vollständig von einer feinen Bindegewebshülle, dem Epitendon, das im Inneren mit einer zweiten Bindegewebshülle, dem Endotendon in Verbindung steht [2, 6, 9]. Das Endotendon umhüllt zum einen die einzelnen Kollagenfasern, die Primär-, Sekundär- und Tertiärbündel und ermöglicht den einzelnen Fasern somit ein Gleiten aufeinander (Abbildung 3). Zum anderen führt das Endotendon wie auch das Epitendon Blut- und Lymphgefäße sowie Nerven [1, 2].



**Abbildung 2 A-B** Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung eines Längs- und Transversalschnittes humaner Hamstringsehne (*M. semitendinosus*). **A** Abgebildet ist ein longitudinaler Schnitt einer

Hamstringsehne in der HE-Färbung. Es wird die im Ruhezustand vorliegende wellenförmige Anordnung der Kollagenfasern (rot-violett) deutlich. Sehnenzellen liegen eingebettet in Reihen längs zum Verlauf der Kollagenfasern und sind an ihren dunkelgefärbten Zellkern (Pfeile) erkennbar. Quelle: <sup>[10]</sup> **B** Gezeigt ist ein transversaler Schnitt durch eine HE-gefärbte Schwanzsehne der Ratte. Die Kollagenfasern sind in Sekundärbündeln (FA - Faszikel), welche durch ein Endotendon (E) umgeben sind, angeordnet. In den Sekundärbündeln lassen sich die Kerne der Sehnenzellen erkennen (Pfeile).

Das Epitendon steht an seiner Außenseite mit dem Paratendon, einer weiteren Bindegewebshülle, die die Sehne an das umgebende Gewebe anbindet, in Verbindung. Um Reibung zu verhindern, befindet sich zwischen den Bindegewebshüllen eine mukopolysaccharidreiche Flüssigkeit <sup>[8]</sup>. Die Sehnen einiger Muskeln, vor allem an Händen und Füßen, besitzen anstelle des Paratendon eine echte Sehnenscheide, bestehend aus *Stratum fibrosum* und *Stratum synoviale* <sup>[2, 4]</sup>. Echte Sehnenscheiden befinden sich vor allem dort, wo aufgrund einer hohen mechanischen Beanspruchung der Sehnen, eine effiziente Reduzierung der Reibung erfolgen muss <sup>[2, 4]</sup>. Der hierarchische Aufbau der Sehnen aus Kollagenfibrillen und -fasern, primären, sekundären und tertiären Faserbündeln in Kombination mit dünnen bindegewebigen Verschiebe- und Versorgungsschichten stellt eine optimale und plastische Anpassung des Sehngewebes an periodisch hohe Zugbelastungen dar.



**Abbildung 3** Gezeigt ist der hierarchische Aufbau der Sehne. Kollagenfasern, die sich aus einzelnen Kollagenfibrillen zusammensetzen, lagern sich zu Primärbündel zusammen. Diese formieren sich zu

Sekundärbündeln, die ihrerseits in Tertiärbündel organisiert sind. Das Endotendon umgibt Primär-, Sekundär- und Tertiärbündel. Das Epitendon umgibt die von Tertiärbündeln gebildete Sehne. Quelle: modifiziert nach <sup>[1, 4]</sup>

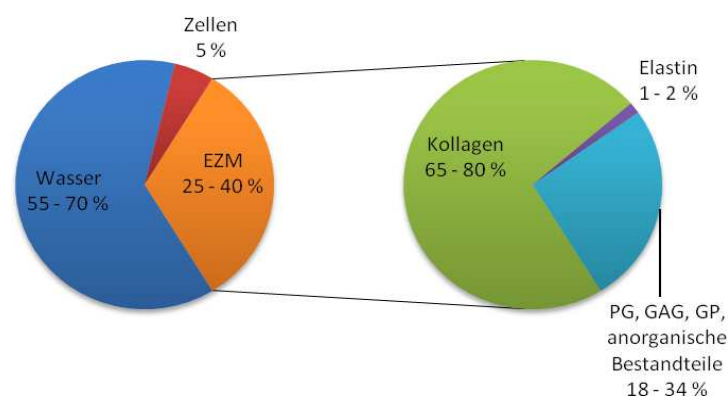
### 1.1.2 Extrazellulärmatrix der Sehne

Die Extrazellulärmatrix (EZM) macht zusammen mit dem durch sie gebundenen Wasser 95 % des Sehnenvolumens aus (Abbildung 4). Sie vermittelt die hohe mechanische Beanspruchbarkeit der Sehne sowie ein optimales Maß an Elastizität und Flexibilität und ist somit essentiell für die Biomechanik des Sehnengewebes <sup>[2-4, 6, 7, 9]</sup>.

65-80 % der Trockenmasse besteht aus der quantitativ wichtigsten Komponente der EZM, dem Kollagen (Abbildung 4) <sup>[2-4, 6, 8]</sup>. Neben Kollagen Typ I, das wie bereits erwähnt, den Hauptbestandteil der Kollagenfibrillen darstellt, sind weitere Kollagene in der Sehne in geringen Mengen präsent (Typ II, III, IV, V, VI, IX, X, XI, XII, XIV) <sup>[3, 6, 9]</sup>. Etwa 1-2 % der Trockenmasse des Sehnengewebes sind elastische Fasern, die die Ursache für die bereits erwähnte wellenförmige Anordnung der Kollagenfibrillen und -fasern im Ruhezustand sind und somit der Sehne eine gewisse Dehnbarkeit ohne Schädigung der Kollagenfasern sowie ein Zurückkehren der Fasern in den Ausgangszustand nach Belastung erlauben <sup>[2-4, 8]</sup>.

Die Grundsubstanz, die Kollagenfibrillen und Sehnenzellen umgibt, macht etwa 18-34 % der Trockenmasse der Sehne aus und besteht aus Proteoglykanen (PG), Glykosaminoglykanen (GAG), Glykoproteinen (GP) und anorganischen Bestandteilen (Abbildung 4) <sup>[2-4]</sup>. Der mit 55-70 % am Gesamtgewicht relativ hohe Wasseranteil der Sehne ist bedingt durch die beträchtliche Wasserbindungskapazität der PG und GAG, die dadurch die biomechanischen Eigenschaften der Sehne, vor allem gegenüber Scher- und Druckkräften deutlich verbessern <sup>[1, 2, 4]</sup>. Weiterhin scheinen PG, die große negativ geladene Moleküle sind und aus einem zentralen Kernprotein bestehen, an das Seitenketten aus GAG kovalent gebunden sind, auch an der Migration von Zellen und der Fusion von Kollagenfibrillen beteiligt zu sein <sup>[2, 3, 6]</sup>. Zu den quantitativ wichtigsten PG in der Sehne zählen Decorin und Cartilage oligomeric matrix protein (COMP). Die überwiegend enthaltenen GAG sind Dermatansulfat und Chondroitinsulfat <sup>[2, 3, 6]</sup>.

Fibronektin, Thrombospondin, Tenascin-C und Undulin sind 4 wichtige GP, die in der Sehne identifiziert werden konnten und die Fähigkeit zu besitzen scheinen, Makromoleküle oder Zelloberflächen miteinander zur Adhäsion zu bringen [2]. Ferner sind GP in Form von Fibronektin und Thrombospondin an Heilungs- und Regenerationsprozessen beteiligt [4]. Neben PG, GAG und GP gehören auch anorganische Bestandteile, die 0,2 % des Trockengewichtes ausmachen und an Wachstum, Entwicklung und Metabolismus der Zellen beteiligt sind, zur EZM der Sehne. Wichtige anorganische Bestandteile sind u.a. Calcium, das eine entscheidende Rolle in der Ausbildung der osteotendinösen Verbindung spielt, Mangan, essentiell für verschiedene enzymatische Reaktionen, Kupfer, notwendig für die Quervernetzung von Kollagenmolekülen, Magnesium, Cadmium, Kobalt, Zink und Phosphor [2]. Die Synthese aller Bestandteile der EZM sowie die Organisation dieser, ist Leistung der wichtigsten zellulären Komponente des Sehngewebes, der Sehnenzellen.

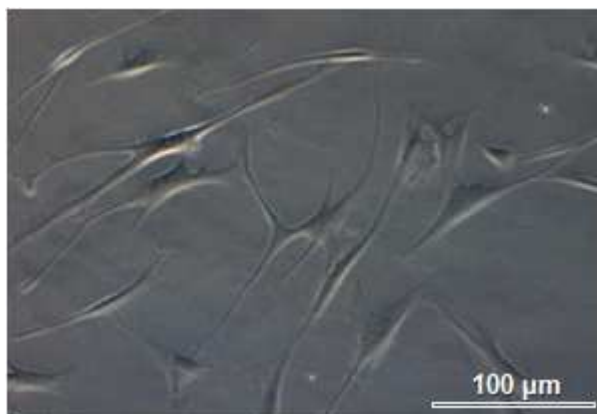


**Abbildung 4** Dargestellt ist die prozentuale Zusammensetzung der Sehne in Kreisdiagrammen. Die Sehne besteht aus Wasser, der Extrazellulärmatrix (EZM) und zellulären Bestandteilen. Neben dem quantitativ wichtigsten Bestandteil Kollagen, gehören auch Elastin, Proteoglykane (PG), Glykosaminoglykane (GAG) und Glykoproteine (GP) sowie anorganische Bestandteile zur EZM der Sehne. Dabei ist zu beachten, dass die prozentuale Verteilung der einzelnen Bestandteile je nach Lokalisation der Sehne im Organismus variiert. Quelle: modifiziert nach [1-4]

### 1.1.3 Zelluläre Bestandteile der Sehne

Die Sehne stellt ein hypozelluläres Gewebe dar, in dem nur etwa 5 % des Gewebevolumentums auf Sehnenzellen entfallen (Abbildung 4) [2-4, 7-9]. Die zellulären Bestandteile bestehen zu 90-95 % aus Sehnenzellen, die mikroskopisch in Reihen längs zur Sehne angeordnet sind und je nach Entwicklungsgrad auch Tendoblasten oder Tendozyten genannt werden, sowie zu 5-10 % aus weiteren Zellarten wie Synovial-, Knorpel-, Gefäßendothel- und Gefäßmuskelzellen (Abbildung 2A) [2-4, 7-9].

Tendoblasten sind unreife Sehnenzellen der jungen Sehne, die nach einer anfänglichen großen Variation in Form und Größe, eine spindelförmige Gestalt mit zahlreichen langen schmalen Zellausläufern aufweisen [2, 4, 8]. Sie sind reich an Zellorganellen, ein Umstand, der für eine hohe metabolische Aktivität dieser Zellen spricht. Mit zunehmendem Alter der Sehne sinkt jedoch die in der jungen Sehne noch recht hohe Zell-Matrix-Ratio und die Tendoblasten transformieren zu reifen Tendozyten, die ebenfalls sehr langgestreckt sind und noch längere und dünnere Zellausläufer besitzen, um den Kontakt zu anderen Zellen via Gap junctions bzw. zu Matrixkomponenten halten zu können (Abbildung 5) [2, 3, 6]. Sowohl Tendoblasten als auch die reifen Tendozyten exprimieren in Form von Scleraxis einen spezifischen Transkriptionsfaktor [11]. In der vorliegenden Arbeit diente der Nachweis einer Scleraxisexpression als Identifizierung der eingesetzten Zellen als Tendozyten.



**Abbildung 5** Isolierte und kultivierte humane Hamstringtendozyten in der 1. Passage. Die Tendozyten präsentieren sich in ihrer typischen Morphologie mit sehr langgestreckten Zellkörpern und langen dünnen Zellausläufern, die den Kontakt der einzelnen Zellen untereinander ermöglichen. Quelle: [10]

Auch Tendozyten weisen einige zum Teil gut entwickelte Zellorganellen auf, was auf eine metabolische Aktivität hindeutet, die allerdings in ihrem Umfang nicht mit dem

tendoblastären Metabolismus vergleichbar ist <sup>[2]</sup>. Die Hauptaufgabe der Sehnenzellen liegt in der Biosynthese aller Matrixkomponenten. Die dafür benötigte Energie wird über drei wichtige Stoffwechselwege, den Citratzyklus, die anaerobe Glykolyse und den Pentosephosphatweg gewonnen <sup>[2, 4]</sup>. Während in der Wachstumsphase der jungen Sehne die Syntheseaktivität hoch und alle drei Stoffwechselwege sehr aktiv sind, sinkt mit zunehmendem Alter die Syntheseaktivität der Tendozyten sowie die Aktivität des aeroben Citratzyklus und des Pentosephosphatweges <sup>[2, 4]</sup>. Die benötigte Energie für Synthese und Turnover der Matrix wird in diesem Stadium fast ausschließlich durch die anaerobe Glykolyse bereitgestellt <sup>[2, 4]</sup>. Die geringe metabolische Aktivität und die anaerobe Energiegewinnung sind essentiell für das reife Sehngewebe. Nur so ist es in der Lage eine Beanspruchung über längere Zeit, die meist mit einer Unterbrechung der Sauerstoffversorgung des Gewebes einhergeht, ohne Ischämie und Nekrose zu überstehen <sup>[2]</sup>. Jedoch hat eine geringe metabolische Aktivität auch längere Erholungszeiten nach Beanspruchung und einen langsamen Heilungsprozess nach Verletzungen zur Folge <sup>[2, 4, 8]</sup>.

### 1.1.4 Vaskularisation und Innervation

Da gerade einmal 1-2 % der gesamten EZM durch Blutgefäße ausgefüllt werden, besitzt die Sehne, verglichen mit Muskelgewebe, eine relativ limitierte Blutversorgung <sup>[3, 9]</sup>. Dennoch ist die Blutversorgung essentiell für die Funktion der Sehnenzellen und die Fähigkeit zur Regeneration nach Verletzungen <sup>[9]</sup>.

Blutgefäße erreichen die Sehne entweder durch die Sehnenscheide bzw. das Paratendon (extrinsisch) oder gehen von der myo- bzw. osteotendinösen Verbindung aus (intrinsisch) <sup>[4]</sup>. Bedeutung für die Blutversorgung des Sehngewebes haben vor allem extrinsische Blutgefäße, die Plexus ausbilden und vorwiegend das oberflächliche Gewebe versorgen, sowie Blutgefäße, die sich aus der myotendinösen Verbindung, meist jedoch nicht über das erste Drittel hinaus fortsetzen <sup>[4, 9]</sup>. Das Innere der Sehne wird durch einige wenige Gefäße, die dem oberflächlichen Plexus entstammen, gespeist <sup>[4]</sup>.

Die genaue Blutversorgung variiert häufig innerhalb der Sehne und kann in Bereichen, die durch Reibung oder Kompression beansprucht werden, stark eingeschränkt sein <sup>[4]</sup>. Diese minderperfundierte Bereiche der Sehne sind von

besonderer klinischer Bedeutung, da sie den Ausgangspunkt für eine Degeneration oder Ruptur darstellen können [9].

Die nervale Versorgung des Sehngewebes erfolgt durch kutane, muskuläre und peritendinöse Nervenfasern [4, 8]. Analog der Blutversorgung erfolgt der Eintritt der muskulären Nervenäste an der myotendinösen Verbindung und eine Fortsetzung einiger Äste im Endotendon sowie die Ausbildung von Plexus innerhalb des Paratendons durch peritendinöse Nervenäste [4]. Die Nervenendigungen der einzelnen Nervenfasern fungieren hauptsächlich als spezialisierte Mechanorezeptoren oder dienen der Schmerzdetektion [4, 8]. Ferner sind sowohl sympathische als auch parasympathische Fasern in der Sehne präsent [4].

Da bereits gezeigt werden konnte, dass Vascular endothelial growth factor (VEGF), ein für die Neovaskularisation wichtiges Signalmolekül, in heilemdem und chronisch degenerierten Sehngewebe vermehrt exprimiert ist und Blutgefäße und Nervenfasern in der Lage sind, in rupturiertes bzw. geschädigtes Sehngewebe einzuwachsen, stehen Vaskularisation und Innervation der Sehne in besonderem Interesse hinsichtlich ihres Einflusses auf den Heilungsprozess nach Sehnenverletzungen und die Entstehung von Tendopathien [3, 7, 9, 10].

### 1.1.5 Die Sehnenpathologie

Grundsätzlich unterscheidet man sehnenpathologisch akute Verletzungen, beispielsweise die Sehnenruptur, von den chronisch verlaufenden Tendopathien. Eine strikte Trennung beider ist allerdings nicht sinnvoll, da degenerative Veränderungen des Sehngewebes, wie sie bei einer Tendopathie vorliegen, auch der häufigste histologische Befund bei spontanen Sehnenrupturen sind [4]. Die Ursachen für das Entstehen von degenerativen Veränderungen und Sehnenverletzungen werden vielfältig diskutiert. Sharma und Kollegen sehen in einer zu starken Belastung der Sehne während des körperlichen Trainings den wichtigsten Stimulus für das Entstehen einer Degeneration [4]. So sind beispielsweise 30 % aller mit dem Laufsport assoziierten Erkrankungen auf chronische Probleme überbelasteter Sehnen zurückzuführen [4]. Weiterhin entwickeln bis zu 40 % aller Tennisspieler im Laufe der Zeit eine Ansatzentendinose der Unterarmstreckmuskulatur,



den sog. Tennisarm, sowie 55 % aller jungen Athleten eines Sprung-geprägten Sportes eine Tendopathie <sup>[4, 12]</sup>. Grundsätzlich scheinen hierbei vor allem die lokale Hypoxie, wie sie unter maximaler Belastung der Sehne auftritt, und die Bildung von freien Radikalen im Zuge der Reperfusion nach Ischämie für die Schädigung des Sehngewebes verantwortlich zu sein <sup>[4, 13]</sup>. Neben einer Maximalbelastung können auch fehlerhafte Belastungen und die Ermüdung der Sehne eine Degeneration des Gewebes auslösen <sup>[6, 8, 13]</sup>. Grundsätzlich münden Sehnenschäden, die besonders bei Fehl- oder Überbelastung entstehen, in eine Degeneration, wenn sie nicht genug Zeit zum Abheilen finden <sup>[4]</sup>. Die Behebung der Verletzung erfolgt durch residente Tendozyten, die eine feine Balance zwischen EZM-Produktion und -Degradation („Remodelling“) aufrechterhalten.

Neben Fehl- und Überbelastung der Sehne werden weitere Faktoren als Ursachen für die Entstehung einer Sehnendegeneration in Betracht gezogen. So scheint die Einnahme der Antibiotikagruppe Fluorchinolone mit der Ausbildung von Tendopathien assoziiert zu sein <sup>[3, 4, 8, 13]</sup>. Fluorchinolone aktivieren Zytokin-vermittelt Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), eine Familie von proteolytischen Enzymen, die die EZM abbauen und das Remodelling des Gewebes fördern <sup>[3, 4]</sup>. Zusätzlich inhibieren Fluorchinolone den Tendozytenmetabolismus, verringern die Zellproliferation und die Kollagen- und Matrixsynthese <sup>[4]</sup>. Eine sehnendegenerative Wirkung wird ebenfalls für Statine, orale Kontrazeptiva und lokal injizierte Glukokortikoide diskutiert <sup>[8, 13]</sup>. Bisher ist der tendotoxische Wirkungsmechanismus dieser Verbindungen allerdings weitgehend ungeklärt.

Wie bereits erwähnt wurde, ist die Blutversorgung essentiell für die Funktion der Sehnenzellen und ein schlecht perfundierter Bereich der Sehne anfälliger für die Ausbildung einer Degeneration. Daher stehen Faktoren, die die Mikrovaskularität beeinflussen, wie Diabetes mellitus, Übergewicht und Hypertonie ebenfalls in Verdacht die Ausbildung von Sehnenpathologien zu fördern <sup>[6, 8, 13]</sup>. Weitere Erkrankungen, die eine gehäufte Assoziation mit Tendopathien zeigen, sind hereditäre Erkrankungen, wie das Marfan-Syndrom, Ehlers-Danlos-Syndrom, Osteogenesis imperfecta, , denen eine gestörte Synthese kollagener oder elastischer Fasern zugrundeliegt, sowie endokrine und metabolische Krankheitsbilder, beispielsweise chronisches Nierenversagen, Störungen des Schild- und

Nebenschilddrüsenstoffwechsels, Störungen der Nebenniere und Amyloidose, Erkrankungen des rheumatoiden Formenkreises, beispielsweise die rheumatoide Arthritis, reaktive Arthritis und das Reiter-Syndrom sowie autoimmunologische Erkrankungen, wie systemischer *Lupus erythematoses* [6, 8, 13, 14]. Da vermehrt auch hereditäre Erkrankungen mit Tendopathien assoziiert sind, könnte ein genetischer Hintergrund als Ursache für das Entstehen von Tendopathien eine wichtige Rolle spielen. Diesbezüglich ist bereits bekannt, dass Sequenzvariationen im Typ-V-Kollagen-Gen (Ehlers-Danlos-Syndrom Typ I und II) bzw. im Tenascin-C-Gen gehäuft mit Tendopathien assoziiert sind [8, 14]. Abgesehen von einem genetischen Hintergrund scheint auch das Alter als nicht beeinflussbarer Faktor Einfluss zu nehmen [6, 8, 13, 14]. Grund für die im Alter schlechteren mechanischen Eigenschaften des Sehngewebes könnten hauptsächlich ein verminderter arterieller Blutfluss, lokale Hypoxie, Bildung freier Radikale und ein verminderter Metabolismus der Tendozyten sein [8, 13].

Die Frage nach der Beteiligung einer inflammatorischen Komponente an der Ausbildung von Sehnenpathologien ist nicht abschließend geklärt und wird kontrovers diskutiert. Grundsätzlich induziert eine zyklische Belastung der Sehne die Expression der proinflammatorischen Zytokine Interleukin 6 (IL-6) und Interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), des proinflammatorischen Prostaglandins E (PGE) und der Cyclooxygenasen (COX)-1 und -2, zwei Enzyme, die für die Bildung inflammatorischer Prostaglandine verantwortlich sind [4, 6, 13, 15-18]. Weiterhin konnte in Tierversuchen durch die lokale Gabe von inflammatorischen Mediatoren, wie PGE<sub>1</sub> das histologische Bild einer Tendopathie induziert werden [4, 19]. Inwieweit auch Komplementfaktoren in der Lage sind auf die Ausbildung von Tendopathien Einfluss zu nehmen, ist bislang noch nicht bekannt. In anderen Gewebearten wurde bereits eine Komplementaktivierung im Rahmen von Pathologien beobachtet. So zeigte sich, beispielsweise in einem Mausmodell die Aktivierung des Komplementsystems im Zuge einer Medikamenten-induzierten Nephropathie [20]. In Ratten konnte durch die Gabe von Antikörpern eine Teilblockierung des Komplementsystems und somit die Ausbildung einer Kardiomyopathie verhindert werden [21]. Weiterhin zeigten Herzmuskelzellen, die von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie stammten, eine verstärkte Expression bestimmter Komplementfaktoren, sodass eine Mitwirkung des Komplementsystems an Ausbildung oder Progression der dilatativen Kardiomyopathie vermutet wird [22].

Grundsätzlich scheint eine Beteiligung des Komplementsystems auch an der Entstehung von Tendopathien möglich und eine Untersuchung dieser Fragestellung sinnvoll.

### 1.1.6 Die Sehnenheilung

Die Voraussetzungen für eine Heilung von Sehnengewebe nach Verletzungen sind denkbar schlecht. Aufgrund der bereits erwähnten geringen metabolischen Aktivität der Tendozyten und der schlechten Vaskularisation des Gewebes geht der Prozess der Heilung meist sehr langsam und unzureichend vonstatten.

Grundsätzlich verläuft die Sehnenheilung in drei sich überlappenden Phasen. Die initiale inflammatorische Phase dauert 3 bis 7 Tage und beginnt zunächst mit der Ausbildung eines Hämatoms und der Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen, beispielsweise durch aktivierte Thrombozyten [8, 10]. Die freigesetzten Mediatoren induzieren die Chemotaxis von Leukozyten, besonders neutrophiler Granulozyten, Lymphozyten und Makrophagen an den Ort der Verletzung [4, 8, 10]. In den ersten 24 Stunden überwiegen dabei die neutrophilen Granulozyten und Makrophagen und die Phagozytose von nekrotischem Material findet statt [4, 8, 10]. Gleichzeitig erfolgt u.a. durch die eingewanderten Entzündungszellen eine Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen, wie Transforming growth factor beta (TGF $\beta$ ) -1, Insuline-like growth factor (IGF) -1, Basic fibroblast growth factor (bFGF), Platelet derived growth factor (PDGF) sowie vasoaktiven und chemotaktischen Faktoren, die zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität, Initiation der Angiogenese, Stimulation der Tendozytenproliferation und zum Anlocken zusätzlicher inflammatorischer Zellen führen [4, 8, 10]. Nach einigen Tagen beginnt dann die Proliferationsphase, die ihrerseits zwischen 5 und 21 Tage andauert [8]. Fibroblasten proliferieren und produzieren unter dem Einfluss von verschiedenen Wachstumsfaktoren eine unreife Neomatrix, die sich vor allem durch das Übergewicht von Kollagen Typ III von der Matrix ausgereifter Sehnen unterscheidet [4, 10]. An die proliferative Phase schließt sich die letzte Phase der Sehnenheilung, die Remodelling-Phase an, die zunächst durch einen weitergehend hohen tendozytären Zellmetabolismus, einer zunehmenden Kollagen-Typ-I-Synthese

und der Ausrichtung der Kollagenfasern zur Hauptbeanspruchungsrichtung der Sehne charakterisiert ist <sup>[4]</sup>. Abschließend nehmen der Tendozytenmetabolismus und die Vaskularisation des Gewebes jedoch ab und narbenähnliches Gewebe bildet sich aus <sup>[4, 8, 10]</sup>. Inwieweit auch Zytokine auf den Prozess und das Ergebnis der Sehnenheilung Einfluss nehmen, ist noch weitgehend unklar.

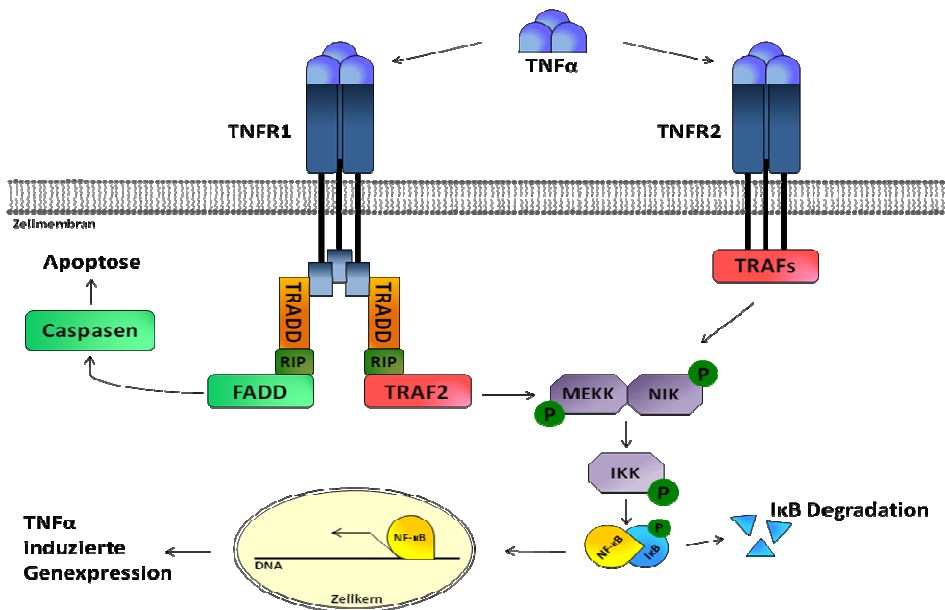
## 1.2 Zytokine

Zytokine sind GP, die multiple insbesondere proinflammatorische, immunregulatorische, die Hämatopoese steuernde und chemotaktische Wirkungen haben, die sie vorwiegend über einen parakrinen oder autokrinen, seltener über einen endokrinen Mechanismus entfalten <sup>[23]</sup>. Des Weiteren sind sie an Reparaturmechanismen von Gewebeschäden beteiligt und wirken als Wachstumsfaktoren für viele Zielzellen <sup>[23]</sup>. In der vorliegenden Arbeit soll die regulatorische Wirkung der Schlüssel-Zytokine Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), IL-6 und Interleukin 10 (IL-10) auf die Expression von Komplementkomponenten in Sehnenzellen genauer untersucht werden.

### 1.2.1 Tumornekrosefaktor $\alpha$

Das proinflammatorische Zytokin TNF $\alpha$  wird hauptsächlich von Monozyten bzw. Makrophagen, aber auch von stimulierten T-Zellen und Mastzellen freigesetzt und hat ein weites Wirkungsspektrum. Es kann u.a. die Zellproliferation und -differenzierung, Nekrose- und Apoptosevorgänge, die Freisetzung von anderen Zytokinen und die Chemotaxis von Phagozyten induzieren sowie die Phagozytenaktivität und die Endothelpermeabilität erhöhen <sup>[23-26]</sup>.

Viele der durch TNF $\alpha$ -induzierten Zellvorgänge werden durch einen der beiden TNF-Rezeptoren, TNFR1 oder TNFR2, und eine anschließende intrazelluläre Signalkaskade vermittelt, die in der Induktion verschiedener Gene mündet (Abbildung 6) <sup>[23, 25-27]</sup>.



**Abbildung 6** TNF $\alpha$ -Signalkaskade. TNF $\alpha$  entfaltet seine Wirkungen über die beiden Rezeptoren, TNFR1 und TNFR2, die der TNF-Rezeptor Superfamilie angehören <sup>[25, 26]</sup>. Durch die Bindung des TNF $\alpha$  an TNFR1 kann durch die Interaktion von TRADD (TNF-receptor associated death domain) über das Rezeptor-interagierende Protein (RIP) mit FADD (Fas-associated protein with death domain) und die anschließende Aktivierung von Caspasen die Apoptose induziert werden <sup>[23, 25-27]</sup>. Ferner kann über den TNFR1 die Aktivierung des TNF $\alpha$ -Rezeptor assoziierten Faktors 2 (TRAF2) erfolgen. TRAFs werden zusätzlich durch die Bindung von TNF $\alpha$  an den TNFR2 aktiviert und induzieren ihrerseits die Phosphorylierung der MEK-Kinase (MEKK) und NF $\kappa$ B-induzierenden Kinase (NIK) <sup>[23, 25-27]</sup>. Über die anschließende Phosphorylierung der I $\kappa$ B-Kinase (IKK) und die damit verbundene Phosphorylierung des I $\kappa$ B wird der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B von seinem natürlichen Inhibitoren abgespalten, kann in den Zellkern translozieren und dort die Expression verschiedener Gene, beispielsweise weitere Zytokine und immunregulatorischer Proteine induzieren <sup>[23, 25-27]</sup>. Phosphoryliertes I $\kappa$ B wird ubiquitiniert und durch Proteosomen abgebaut. Quelle: modifiziert nach <sup>[27, 28]</sup>

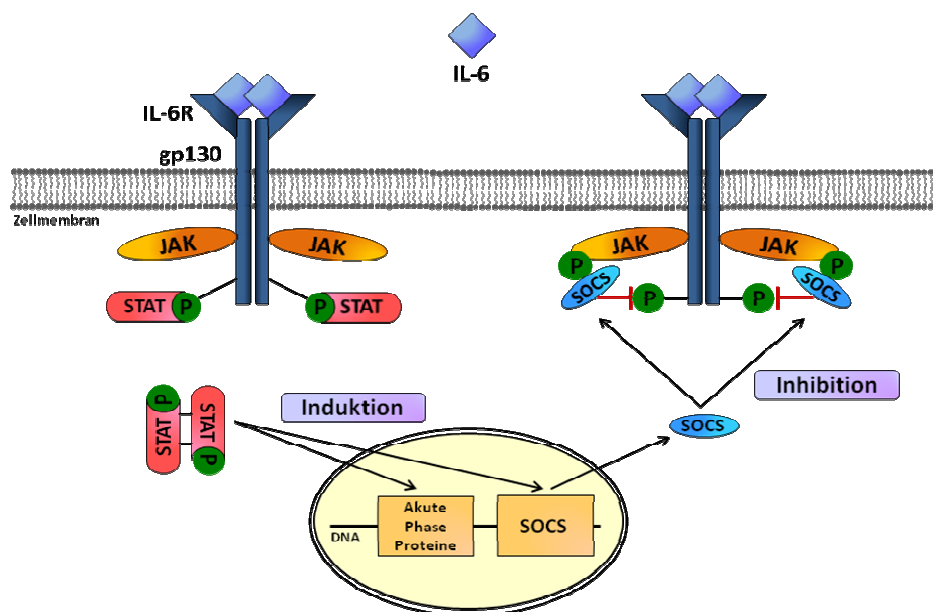
In Tendozyten des Pferdes konnte die Existenz des TNFR1, TNFR2, TRAF2 und des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B sowie die Expression von TNF $\alpha$  bereits nachgewiesen werden <sup>[10, 25, 29]</sup>. Auch nach einer Verletzung des Sehngewebes gelang die Detektion einer TNFR1- und TRAF2-Expression <sup>[25]</sup>. Durch die Stimulation der Tendozyten mit TNF $\alpha$  wurde sowohl der eher schwach exprimierte TNFR1 als auch TRAF2 und NF- $\kappa$ B hochreguliert <sup>[25, 29]</sup>. Die Expression von TNF $\alpha$  ist ferner für humane Tendozyten beschrieben worden <sup>[10, 25, 30]</sup>. Die Stimulation humaner Tendozyten mit TNF $\alpha$  induzierte dabei eine vermehrte Expression von TNF $\alpha$  selbst,

sowie weiterer pro- und antiinflammatorischer Zytokine, wie IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 und Matrix-abbauender Enzyme wie MMP-1 <sup>[10, 30]</sup>. In der Arbeit von John *et al.* (2010) führte die TNF $\alpha$ -Stimulation humaner Tendozyten zu einer verstärkten Elastin-Expression sowie zu einer verminderten Synthese von Kollagen Typ I <sup>[10, 30]</sup>. Dieses Ergebnis steht im Kontrast zu Hosaka und Kollegen, die eine Zunahme der Kollagen-Typ-I-Synthese durch die Stimulation von equinen Tendozyten mit TNF $\alpha$  beobachteten <sup>[31]</sup>. Da am 3. Tag der Sehnenheilung eine hohe TNF $\alpha$ -Expression detektiert werden konnte, scheint TNF $\alpha$  auch eine Rolle in der Sehnenheilung zu spielen <sup>[10, 32]</sup>. TNF $\alpha$  wird ferner in unbelasteten, ruhenden Sehnen stärker exprimiert als in jenem Sehnengewebe, das weiterhin beansprucht wird <sup>[32]</sup>. Auch Uchida und Kollegen zeigten, dass der Mangel an Belastung zu einer Überexpression von TNF $\alpha$  im Sehnengewebe führt <sup>[33]</sup>. Eine Exposition mit Temperaturen von 40°C, wie sie im Zuge einer Überbelastung auftreten können, induzierte jedoch auch eine Expression von TNF $\alpha$  in Tendozyten <sup>[10, 34]</sup>. Ferner konnte in entzündetem Sehnengewebe eine starke Expression des TNF $\alpha$  und des TRAF2 sowie eine erhöhte Caspase-3-Aktivität detektiert werden, was einen möglichen pro-apoptischen Effekt des TNF $\alpha$  andeutet <sup>[10, 25, 35]</sup>.

## 1.2.2 Interleukin-6

Das Zytokin IL-6 wird hauptsächlich von Monozyten, Endothelzellen, Fibroblasten und aktivierten T-Zellen gebildet und freigesetzt <sup>[23]</sup>. Es spielt vor allem im Zuge eines Entzündungsgeschehens eine wichtige Rolle, da IL-6 sowohl ein starker Induktor der Synthese von Akute-Phase-Proteinen in der Leber, wie C-reaktives Protein, Fibrinogen oder Serum Amyloid A, als auch ein Aktivator von B- und T-Lymphozyten ist und die Differenzierung von zytotoxischen T-Zellen fördert <sup>[23, 36, 37]</sup>. IL-6 triggert ferner die Chemotaxis von Leukozyten, indem es die endotheliale Expression von Adhäsionsmolekülen und die Bildung von monocyte-chemoattractant-protein-1 induziert <sup>[37]</sup>. So zeigte sich beispielsweise in IL-6 Knock-out-Mäusen eine verminderte Akkumulation von Leukozyten im Entzündungsgebiet <sup>[37]</sup>. Des Weiteren scheint IL-6 im synovialen Entzündungsgeschehen und an der Schädigung von periartikulären Knorpel- und Knochengewebe beteiligt zu sein <sup>[36]</sup>.

Die Signaltransduktion des IL-6 erfolgt über ein Rezeptorsystem, das aus einem 80 kDa großen IL-6-Rezeptor (IL-6R) und einem 130 kDa großen Signaltransduktor (gp130) besteht (Abbildung 7) <sup>[36, 37]</sup>. Intrazellulär wird durch die Bindung von IL-6 an den IL-6R eine Signalkaskade über den JAK/STAT-Weg in Gang gesetzt und die Expression verschiedener Gene, beispielsweise der Akute-Phase-Proteine, induziert (Abbildung 7) <sup>[36, 37]</sup>.



**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) <sup>[36, 37]</sup>. Die Bindung von IL-6 induziert die Dimerisierung des Rezeptorsystems sowie die Aktivierung der intrazellulären Janus-Tyrosin-Kinasen (JAK), die anschließend die endständigen Tyrosinreste der gp130 Moleküle und die bindenden Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription (STAT)-Moleküle phosphorylieren <sup>[38]</sup>. Die STAT-Moleküle dimerisieren, translokieren in den Zellkern und induzieren dort die Expression verschiedener Gene, wie Akute-Phase-Proteine oder SOCS (suppressors of cytokine signalling) <sup>[36]</sup>. SOCS greifen auf verschiedenen Stufen, beispielsweise durch eine direkte Interaktion und Hemmung der JAK, in die IL-6-Signalkaskade ein und regulieren so die Wirkung von IL-6 <sup>[36]</sup>. Quelle: modifiziert nach <sup>[36]</sup>

In humanen Tendozyten wurde die Expression von IL-6, IL-6-Rezeptor, Bestandteilen der IL-6-Signalkaskade in Form von STAT3, SOCS1 und SOCS3, sowie eine Induktion der IL-6-Genexpression durch TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  bereits

nachgewiesen<sup>[10, 30, 39, 40]</sup>. Die Stimulation humaner Tendozyten mit IL-6 übte allerdings keinen Effekt auf die IL-6-, TNF $\alpha$ - oder IL-1 $\beta$ -Genexpression aus<sup>[10, 30]</sup>. Lediglich IL-10 wurde in geringerem Umfang durch eine IL-6-Stimulation induziert<sup>[10, 30]</sup>. Eine verstärkte IL-6-Genexpression konnte nicht nur durch die Stimulation mit TNF $\alpha$  oder IL-1 $\beta$  sondern auch durch eine mechanische Dehnung und Beanspruchung der Sehne hervorgerufen, sowie in rupturierten Sehnengewebe der Rotatorenmanschette detektiert werden<sup>[39, 41, 42]</sup>. IL-6 scheint ferner eine Rolle in der Sehnenheilung zu spielen. Während das unbehandelte Sehnengewebe von IL-6 Knock-out-Mäusen bessere mechanische und organisatorische Eigenschaften aufwies, zeigte das posttraumatische Sehnengewebe dieser Knock-out-Mäuse schlechtere biomechanische Eigenschaften als die Kontrollgruppe<sup>[43, 44]</sup>. Da in rupturiertem Sehnengewebe vor allem die Zellen in und um proliferierende Gefäße IL-6, IL-6R und STAT3 exprimierten, ist des weiteren eine Beteiligung des IL-6 an der Neoangiogenese im Zuge der Sehnenheilung denkbar<sup>[39]</sup>.

### 1.2.3 Interleukin-10

Das Zytokin IL-10 ist einer der bedeutendsten Inhibitoren der Inflammation<sup>[45, 46]</sup>. Neben Monozyten bzw. Makrophagen, die im menschlichen Organismus die Hauptquelle von endogenem IL-10 darstellen, sind vor allem Leukozyten in der Lage IL-10 zu synthetisieren und freizusetzen<sup>[45]</sup>. Die antiinflammatorische Wirkung übt IL-10 hauptsächlich über eine Hemmung der Makrophagenaktivierung aus<sup>[45]</sup>. Ferner ist IL-10 in der Lage die Bildung von nahezu jedem proinflammatorischen Zytokin einschließlich der eigenen Synthese in Makrophagen zu inhibieren sowie die Synthese von natürlichen Antagonisten, wie den Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist zu induzieren<sup>[46]</sup>.

Der IL-10-Rezeptor (IL-10R) ist ein stark glykosyliertes 110 kDa großes transmembranöses Glykoprotein. Er besteht aus einer ligandbindenden (IL-10R1) und einer signaltransduzierenden Untereinheit (IL-10R2)<sup>[45]</sup>. Ähnlich dem IL-6 Signalweg, wird auch die IL-10-Signaltransduktion über den JAK/STAT-Weg vermittelt und die Expression verschiedener Gene, wie SOCS, die überwiegend für die inhibierende Wirkung des IL-10 verantwortlich sind, induziert (Abbildung 7)<sup>[45, 46]</sup>.



Über die Rolle des IL-10 im Sehngewebe und dessen Einfluss auf den Tendozytenmetabolismus ist bisher nur wenig bekannt. John und Kollegen konnten die Expression von IL-10 und IL-10R1 in Tendozyten nachweisen [30]. Die IL-10-Genexpression wurde dabei durch TNF $\alpha$  und in geringerem Maße auch durch IL-6, die IL-10R1-Genexpression durch TNF $\alpha$  und IL-10 selbst induziert [10, 30]. In IL-4 Knock-out-Mäusen zeigte sich nach einem Sehnen trauma neben einer IL-13-Expressionssteigerung auch eine IL-10-Induktion bei gleichzeitig höheren biomechanischen Eigenschaften des heilenden Sehngewebes gegenüber der Kontrollgruppe [43]. Hier deutet sich zum einen ein Einfluss des IL-10 auf die Sehnenheilung und zum anderen ein IL-4-Kompensationsmechanismus in Form einer Induktion dieser beiden Zytokine an [43]. Auch Riccetti *et al.* berichten in ihrer Arbeit mit einem IL-10-Überexpressionsmodell der Maus von zeitabhängigen Effekten des IL-10 auf die Biomechanik des heilenden Sehngewebes [47]. In Fibroblasten anderer Gewebearten supprimierte IL-10 ferner die Kollagen-Typ-I-Expression und übte einen induzierenden Effekt auf die MMP-, Kollagenase- und Elastinexpression aus [10, 48, 49]. Der genaue Einfluss von IL-10 auf die Kollagensynthese oder die MMP- und Elastinexpression von Tendozyten konnte noch nicht abschließend geklärt werden.

Durch die vorausgegangenen Ausführungen wird deutlich, dass die Zytokine TNF $\alpha$ , IL-6 und IL-10 multiple, insbesondere proinflammatorische bzw. immunregulatorische Effekte induzieren. Ein geeigneter Ansatzpunkt für diese Regulation der Immunantwort durch Zytokine ist dabei das Komplementsystem. In einigen Zell- und Gewebearten konnte bereits gezeigt werden, dass proinflammatorische und immunregulatorische Zytokine die Expression von Proteinen des Komplementsystems beeinflussen und somit Einfluss auf das lokale Entzündungsgeschehen nehmen können [50-60]. Da im Sehngewebe die Wirkung von Zytokinen auf die Expression von Komplementfaktoren bisher völlig unklar ist, aber auch hier ein Einfluss auf das Entzündungsgeschehen und die Ausbildung von Sehnenpathologien über eine Regulation des Komplementsystems möglich scheint, ist eine Analyse der Komplementexpression im Sehngewebe und die Wechselwirkung mit Zytokinen sinnvoll.

## 1.3 Das Komplementsystem

### 1.3.1 Aufbau und Aktivierungskaskaden des Komplementsystems

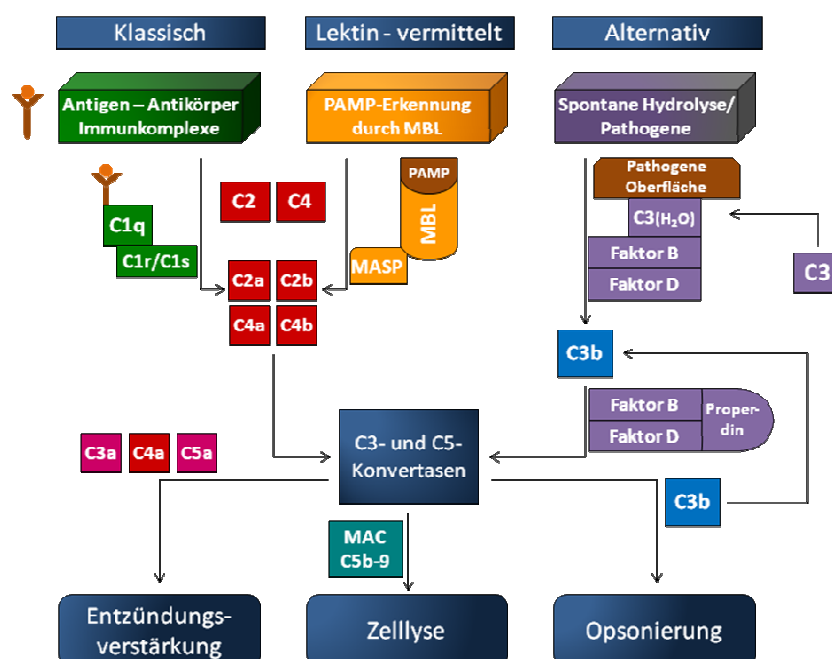
Das Komplementsystem besteht aus mehr als 30 Proteinen, die im Plasma und auf der Zelloberfläche befindlich sind <sup>[61]</sup>. Angeordnet ist diese Fülle an Proteinen in der Hierarchie proteolytischer Kaskaden, die meist durch die Identifikation von pathogenen Oberflächen in Gang gesetzt werden und in der Bildung von wirksamen proinflammatorischen Mediatoren (Anaphylatoxine), in der Opsonierung pathogener Oberflächen durch Komplementopsonine und in der zielgerichteten Lyse von Zellen durch den porenbildenden Membrane attack complex (MAC) münden <sup>[61]</sup>. Das Komplementsystem schützt den Organismus aber nicht nur vor Pathogenen und somit der Ausbildung von Krankheiten sondern scheint bei übermäßiger Aktivierung selbst mit einer Vielzahl von Krankheitsbildern, wie verschiedenen Autoimmunerkrankungen (beispielsweise systemischer Lupus erythematodes oder rheumatoide Arthritis), einigen neurologischen Erkrankungen (wie Multiple Sklerose oder Myasthenia gravis), Pneumonie, Sepsis und septischer Schock, Trauma und hämorrhagischer Schock, Asthma und ARDS (Acute respiratory distress syndrome) assoziiert zu sein <sup>[45, 62-64]</sup>.

Die Aktivierung des Komplementsystems kann prinzipiell über drei verschiedene Wege erfolgen, dem klassischen, Lektin-vermittelten oder alternativen Aktivierungsweg (Abbildung 8).

Der klassische Aktivierungsweg wird initiiert, wenn sich der Komplementfaktor C1q, der mit den Serinproteasen C1r und C1s den C1-Komplex bildet, an die Fc-Region von Antikörpern anlagert, die bereits an pathogenen Oberflächen gebunden sind <sup>[45, 61, 63, 65]</sup>. Durch die autokatalytische Aktivierung der Serinproteasen C1r und C1s wird die Spaltung der Komplementfaktoren C2 und C4 in die Spaltprodukte C2a/C2b und C4a/C4b induziert <sup>[61, 63]</sup>. Die größeren Spaltprodukte C2a und C4b lagern sich zu einem Komplex (C4bC2a) zusammen, der ebenfalls Proteaseaktivität besitzt, welche ihm erlaubt den Komplementfaktor C3 zu spalten <sup>[45, 61, 63]</sup>. Er wird daher auch als C3-Konvertase bezeichnet. Das Enzym C3-Konvertase, das C3 in das Anaphylatoxin C3a und das Opsonin C3b spaltet, stellt den Beginn der gemeinsamen Endstrecke aller drei Aktivierungswege dar (Abbildung 8) <sup>[45, 61]</sup>.

Initiator des antikörperunabhängigen Lektin-vermittelten Aktivierungsweges ist das Mannose-bindende Lektin (MBL) <sup>[45, 61]</sup>. MBL ist ein Akute-Phase-Protein und wird im Zuge eines Entzündungsgeschehens vermehrt in der Leber gebildet und ins Blut abgegeben <sup>[45, 61]</sup>. MBL gehört zu den germline-encoded pattern-recognition receptors (PRRs), die einige wenige, aber auf den meisten pathogenen Oberflächen exprimierte Strukturen, sog. pathogen-associated molecular patterns (PAMP) binden können und ist somit in der Lage viele grampositive und gramnegative Bakterien sowie Hefepilze, einige Viren und Parasiten als Pathogene zu identifizieren <sup>[61]</sup>. Ähnlich dem C1-Komplex ist auch MBL mit Serinproteasen (MASP - MBL-associated serine proteases) komplexiert, die durch Bindung des MBL an pathogene Oberflächen aktiviert werden und die Komplementfaktoren C2 und C4 spalten, was erneut in der Formation der C3-Konvertase des klassischen und Lektin-vermittelten Weges, C4bC2a, mündet (Abbildung 8) <sup>[45, 61, 65]</sup>.

Der alternative Aktivierungsweg weist einige Unterschiede zu den ersten beiden Wegen auf. Er wird ausgelöst durch die ständig in geringem Maße ablaufende Hydrolyse von C3 im Plasma <sup>[45, 61, 63]</sup>. Dabei bildet sich C3(H<sub>2</sub>O), das dem Spaltprodukt C3b sehr ähnlich ist. Findet C3(H<sub>2</sub>O) eine Bindungsstelle auf einer pathogenen Oberfläche, wird die Anlagerung des Faktor B und eine Spaltung in Ba und Bb durch den Faktor D ermöglicht <sup>[45, 61, 63]</sup>. C3(H<sub>2</sub>O) und Faktor Bb lagern sich nun zur initialen C3-Konvertase des alternativen Weges zusammen. Diese Konvertase spaltet C3-Moleküle in das Anaphylatoxin C3a und das Spaltprodukt C3b, das sich erneut an pathogenen Oberflächen der Umgebung anlagern und durch Bindung von Faktor B und die Faktor D-vermittelte Spaltung die eigentliche C3-Konvertase des alternativen Weges, C3bBb, bilden kann <sup>[45, 61, 63]</sup>. Durch die Bindung von Properdin (Faktor P) wird die C3-Konvertase des alternativen Weges zusätzlich stabilisiert und die Halbwertszeit des Komplexes erhöht <sup>[61, 63]</sup>. Die ständige Spaltung von zusätzlichen C3-Molekülen durch die entstandenen C3-Konvertasen und die mit der Spaltung verbundene Bildung neuer C3-Konvertasen, stellen einen kontinuierlichen Verstärkungsmechanismus dar und induzieren eine Potenzierung der Komplementaktivierung (Abbildung 8) <sup>[45, 61, 63]</sup>.



**Abbildung 8** Die Komplementkaskade mit klassischer, Lektin-vermittelter und alternativer Aktivierungsmöglichkeit. Gemeinsamer Mündungspunkt aller Aktivierungswege ist die Bildung der C3-Konvertase, die durch die Spaltung des C3 die Bildung der C5-Konvertase induziert <sup>[61]</sup>. Die Konvertasen vermitteln die wichtigsten Wirkungen des Komplementsystems, die Bildung von Anaphylatoxinen (C3a, C4a, C5a), des Membrane attack complex (MAC) und der Opsonine (z.B. C3b). Der MAC, das finale Produkt der Komplementkaskade, wird durch die Aggregation der Komplementfaktoren C5b-C9 formiert <sup>[45, 61]</sup>. PAMP - pathogen-associated molecular patterns; MBL - Mannose-bindendes Lektin; MASP - MBL-associated serine protease. Quelle: modifiziert nach <sup>[61]</sup>

Der Komplementfaktor C3b ist ein wichtiges Spaltprodukt in der Komplementkaskade und entsteht im Zuge aller Aktivierungswege. Mit Hilfe einer Thioesterbindung ist es dem C3b möglich eine kovalente Bindung mit naheliegenden Kohlenhydraten oder Proteinen einzugehen und somit als Opsonin zu wirken <sup>[61, 63, 65]</sup>. Eine fälschliche Opsonierung körpereigener Oberflächenstrukturen wird durch den im Blut zirkulierenden und proteolytisch aktiven Faktor I sowie den Kofaktor H, der an Oberflächenstrukturen körpereigener Zellen binden kann, in Form einer sofortigen Spaltung des C3, verhindert <sup>[45, 61]</sup>.

Durch die Anlagerung von C3b an die C3-Konvertase, C4bC2a bzw. C3bBb, formiert sich ein weiteres proteolytisches Enzym, die C5-Konvertase <sup>[45, 61, 63]</sup>. Diese ist in der Lage den Komplementfaktor C5 in das Anaphylatoxin C5a und das Spaltprodukt C5b zu spalten, was am C5b eine Bindungsstelle für C6 und C7 freiglegt <sup>[45, 61, 63]</sup>. Der

sich nun formierende Komplex aus C5b, C6, C7, C8 und C9 – auch als MAC bezeichnet - lagert sich in die Phospholipidmembran der Zielzelle ein und bildet mit Hilfe der Polymerisation multipler C9-Moleküle eine stabile Pore aus <sup>[45, 61, 63, 65]</sup>.

Grundsätzlich bewirkt die Formation des MAC nicht immer die Lyse der Zelle. Liegt MAC in einer geringen sublytischen Konzentration vor, besitzt er in einigen Zelltypen sogar stimulatorische Effekte, wie die Induktion des Zellzykluses, die Bildung von Sauerstoffradikalen, Zytokinen und Metaboliten der Arachidonsäure oder reduziert die Apoptoserate <sup>[66-68]</sup>. In einer hohen lytischen Dosis induziert MAC hingegen einen schnellen Zelltod, der charakterisiert ist durch ein Anschwellen der Mitochondrien, eine Dilatation des rauen endoplasmatischen Retikulum, eine Fragmentation des Golgi-Apparates und die Ruptur der plasmatischen und nukleären Membranen sowie ein Verschwinden von Heterochromatin <sup>[66]</sup>. Des Weiteren kommt es zu einem schnellen Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und einem Verlust des Adenosin-Nukleotid-Pools <sup>[61]</sup>.

Die Bildung des MAC und die damit verbundene zielgerichtete Zellyse ist ein wichtiger Bestandteil der antipathogenen Wirkung des Komplementsystems. Allerdings haben einige Pathogene Mechanismen zum Schutz vor der Komplement-induzierten Zellyse entwickelt, was das destruktive Potenzial des Komplementsystems deutlich mindert <sup>[61]</sup>. So exprimiert das Bakterium *Borrelia burgdorferi* beispielsweise bestimmte Oberflächenproteine, sog. Complement-regulator-acquiring-surface-proteins (CRASP), mit denen es lösliche Komplementregulatoren binden und sich vor dem Komplementsystem schützen kann <sup>[69]</sup>. Weiterhin entziehen sich auch einige Tumorarten durch die Expression von Komplementregulatoren einer Komplement-induzierten Zellyse <sup>[70, 71]</sup>. Es ist daher wichtig, dass im Zuge der Komplementaktivierung weitere Komponenten des Immunsystems durch wirksame proinflammatorische Mediatoren aktiviert werden. Potente proinflammatorisch wirksame Moleküle, die als Spaltprodukte in der Komplementkaskade gebildet werden und als Alarmsignal für das Immunsystem wirken, sind Anaphylatoxine.

### 1.3.2 Anaphylatoxine und ihre Rezeptoren

Anaphylatoxine sind eng verwandte, proinflammatorische Moleküle mit einer Größe von etwa 9 kDa, die im Zuge der Spaltung der Komplementfaktoren C3, C4 und C5 durch Komplementproteasen entstehen (Abbildung 9) <sup>[61, 63, 65]</sup>. Zusätzlich können C3 und C5 auch durch Proteasen gespalten werden, die nicht im unmittelbaren Zusammenhang mit dem Komplementsystem stehen, beispielsweise Kallikrein, Thrombin und Plasmin, was eine weitere Quelle für Anaphylatoxine und eine möglicherweise wichtige Verbindung zwischen dem Komplementsystem und der Gerinnungskaskade darstellt <sup>[24, 61, 72, 73]</sup>. Des Weiteren besitzen Phagozyten, wie neutrophile Granulozyten oder Gewebsmakrophagen, eine C5-Konvertase und sind somit in der Lage in Abwesenheit anderer Komplementproteine C5 in C5a zu spalten <sup>[74]</sup>. Grundsätzlich ist zu beachten, dass neben C3a und C5a auch das Spaltprodukt C4a als Anaphylatoxin wirkt. Aufgrund der in der vorliegenden Arbeit im Fokus stehenden Rezeptoren C3aR und C5aR liegt das Hauptaugenmerk jedoch auf diesen Anaphylatoxinen.

Die proinflammatorische Wirkung von C3a und C5a besteht u.a. in der Erhöhung der Gefäßpermeabilität, Kontraktion der glatten Muskulatur, Chemotaxis, Migration und Phagozytoseaktivität von Entzündungszellen, der Produktion und Freisetzung weiterer inflammatorischer Mediatoren und einer Thrombozytenaktivierung und -aggregation <sup>[61, 63, 65, 75, 76]</sup>. Dabei zeigt C5a die größte Wirksamkeit und stellt somit das potenteste aller Anaphylatoxine dar <sup>[61, 63, 65, 75, 76]</sup>. Die Wirkungen der Anaphylatoxine werden durch die Interaktion mit 7-Transmembran-G-Proteingekoppelten-Rezeptoren der Rhodopsin-Familie vermittelt <sup>[61, 65, 73, 76]</sup>. Die Bindung des Anaphylatoxin an die extrazelluläre, N-terminale Region des Anaphylatoxinrezeptors induziert eine Konformationsänderung der intrazellulären, C-terminalen Domäne des Rezeptors, was in einer Interaktion mit gekoppelten G-Proteinen mündet. Die Aktivierung der gekoppelten G-Proteine führt anschließend zur Aktivierung weiterer Signalkaskaden <sup>[61]</sup>. Grundsätzlich ist eine Expression von Anaphylatoxinrezeptoren für viele Gewebe- und Zellarten, beispielsweise für Haut, Leber, Niere, Lunge, Zellen des Immunsystems, Endothelzellen, Zellen des ZNS, Bindegewebszellen, Kardiomyozyten und verschiedene Zellen des Blutes, beschrieben worden <sup>[64, 65, 73, 76-79]</sup>. Dabei scheinen die Anaphylatoxine jedoch

verstärkt auf Zellen des myeloischen Ursprungs, wie Mastzellen, dendritische Zellen sowie die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) und neutrophile Granulozyten, zu wirken <sup>[61]</sup>.

Die Inaktivierung der Anaphylatoxine ist ein bestimmender Faktor für die Dauer und das Ausmaß ihrer Wirkung und stellt einen Mechanismus der Komplementregulation dar. Durch das Abspalten des N-terminalen Arginins durch Serum-Carboxypeptidasen, beispielsweise Carboxypeptidase N, entstehen die inaktiven des-arg-Formen der Anaphylatoxine <sup>[61, 63, 73]</sup>.

Da durch die Aktivierung der Komplementkaskade nicht nur die Bildung von Anaphylatoxine und Opsonine, sondern durch die Formation des MAC auch eine Lyse von Zellen induziert werden kann, ist die Regulation der Komplementaktivierung zur Verhinderung der Zerstörung von körpereigenen Zellen und die Wirkungsbegrenzung auf pathogene Oberflächen von enormer Bedeutung. Eine solche Regulation der Komplementaktivierung erfolgt an zentralen Schritten der Komplementkaskade durch effektive Inhibitoren, sog. Komplement-regulierende Proteine (CRPs).

### 1.3.3 Komplement-regulierende Proteine

CRPs greifen hauptsächlich an zwei Stellen der Kaskade ein, zum einem auf dem Level der Konvertasen durch Inhibition von Bildung und enzymatischer Aktivität, zum anderen durch die Hemmung der MAC-Formation <sup>[45, 61]</sup>. CRPs können sowohl in löslicher Form im Plasma als auch zellgebunden vorliegen. Da in der vorliegenden Arbeit (neben den Anaphylatoxinrezeptoren) zellgebundene CRPs im Fokus stehen, wird an dieser Stelle hauptsächlich auf diese CRPs eingegangen.

Eine sehr effektive Regulation der Komplementkaskade kann am Mündungspunkt aller drei Aktivierungswege in die gemeinsame Endstrecke, der C3-Konvertase erfolgen. Der erste wichtige Regulationsmechanismus ist der Katabolismus der Komplementfaktoren C3b und C4b durch die lösliche Serinprotease Faktor I, die C3b und C4b in inaktive Fragmente spaltet und somit die Bildung aktiver Konvertasen

verhindert<sup>[61]</sup>. Um eine unspezifische C3b-Degradation, beispielsweise im Zuge einer angemessenen Komplementaktivierung zu verhindern, sind für die proteolytische Aktivität des Faktor I Kofaktoren nötig. Zu diesen Kofaktoren gehören die zellgebundenen CRPs Complement Receptor 1 (CR1; CD35) und Membrane Cofactor Protein (MCP; CD46) (Abbildung 9)<sup>[61]</sup>.

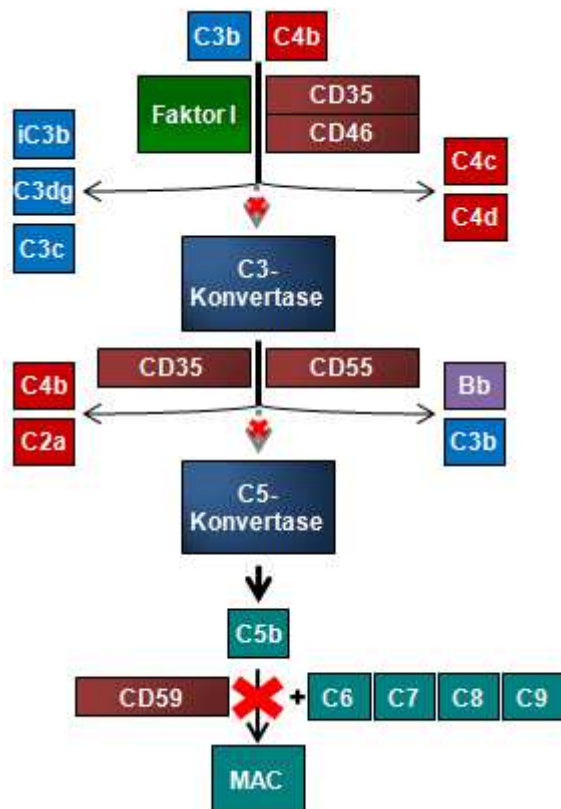
CD35 ist ein polymorphes Glykoprotein, das zellgebunden bestehend aus einer großen extrazellulären, einer transmembranösen und einer zytoplasmatischen Domäne oder als löslicher Rezeptor vorliegen kann<sup>[45, 63, 80]</sup>. Grundsätzlich ist CD35 ein sehr multifunktionales CRP, da es nicht nur Faktor-I-Kofaktoraktivität für die Degradation von C3b und C4b besitzt, sondern auch den Zerfall der C3- und C5-Konvertasen aller drei Aktivierungswege beschleunigt (Abbildung 9)<sup>[61, 63, 80]</sup>. Abgesehen von der Komplement-regulatorischen Wirkung stellt CD35 ferner ein wichtiges Bindeglied in der Opsonierung dar. Durch die Expression auf Phagozyten sind diese mittels CD35 in der Lage C3b, das pathogene Oberflächen markiert, zu binden, Pathogene somit als solche zu erkennen und die Phagozytose einzuleiten<sup>[61]</sup>. Trotz der Multifunktionalität scheint die Bedeutung des CD35 als physiologischer Komplementregulator eher gering zu sein, da eine CD35-Expression auf wenige Zellen, wie Erythrozyten, dendritische Zellen, glomeruläre Podozyten, Hypoxie-induziert in Endothelzellen sowie den in der vorliegenden Arbeit eingesetzten neutrophilen Granulozyten und PBMCs, wie Lymphozyten und Monozyten, beschränkt zu sein scheint und das lösliche CD35 gegenüber anderen löslichen CRPs meist nur in geringer Plasmakonzentration vorliegt<sup>[45, 77, 80, 81]</sup>.

Im Gegensatz zum CD35 exprimieren fast alle körpereigenen Zellen, so beispielsweise auch PBMCs und Granulozyten, CD46 auf ihrer Oberfläche<sup>[45, 54, 77, 82-84]</sup>. Dabei übt CD46 lediglich eine Faktor-I-Kofaktoraktivität aus und scheint bevorzugt im alternativen Weg zu wirken (Abbildung 9)<sup>[45, 63]</sup>. CD46 ist ein intrinsischer Regulator, was bedeutet, dass es nur die Zellen schützt, auf denen es exprimiert ist, nicht aber benachbarte Zellen<sup>[63, 83]</sup>. Neben der Komplement-regulatorischen Funktion wirkt CD46 ferner als Rezeptor für verschiedene Pathogene, wie das Rötelnvirus, Masernvirus, Herpesvirus 6, *Streptococcus pyogenes* und pathogene Neisserien<sup>[82-84]</sup>.



Ein weiteres ebenfalls auf der Ebene der Konvertasen wirkendes CRP ist der Decay accelerating Factor (DAF; CD55) (Abbildung 9). CD55 ist über einen Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI) Anker in der Zellmembran verankert und verhindert durch seine Fähigkeit zur Bindung von C3b und C4b die Formation von C3- und C5-Konvertasen aller Aktivierungswege [45, 61, 63]. Dabei wirkt auch CD55 ausschließlich intrinsisch, stellt jedoch keinen Kofaktor für den proteolytisch aktiven Faktor I dar [63]. Neben der Formationshemmung verkürzt CD55 zusätzlich die Halbwertszeit bereits gebildeter Konvertasen [61]. CD55 scheint nicht nur Komplement-regulatorische Funktionen zu besitzen, sondern beeinflusst ferner die Aktivierung von T-Zellen [85, 86]. Neben gesunden körpereigenen Zellen bedienen sich auch Tumorzellen dem CD55 als Schutz vor der Komplement-induzierten Zellyse. So zeigten beispielsweise Zellen des Prostatakarzinoms, Adenokarzinoms des Magens, kolorektalen Karzinoms und Blasenkarzinoms eine erhöhte CD55-Expression gegenüber dem gesunden Ursprungsgewebe [70, 71]. CD55 ist weiterhin in der Tumorgenese des Mammakarzinoms beteiligt. Eine CD55-Überexpression im Tumorgewebe korreliert hierbei mit einer schlechteren Prognose für die Patientin [70]. Ähnlich dem CD46 fungiert CD55 einigen Pathogenen, z.B. verschiedenen Echoviren und Coxsackieviren, als Rezeptor [87, 88].

Wie bereits angesprochen kann eine effektive Regulation der Komplementkaskade nicht nur durch Hemmung der Konvertasenbildung und -aktivität erfolgen, sondern auch durch Eingriff auf die Formation des MAC. Diese letzte Stufe der Komplementregulation, die vor allem im Zuge einer raschen ungezügelten Aktivierung große Bedeutung hat, wird durch das CRP CD59 (Protectin; MIRL) realisiert (Abbildung 10) [45, 61]. CD59 ist ein Glykoprotein, das via GPI-Anker in der Zellmembran fixiert ist und durch die Bindung des Komplementkomplexes C5b-8 sowie einer Inhibition der C9-Polymerisation die Formation des MAC unterdrückt [45, 63]. Eine somatische Mutation im PIGA-Gen des X-Chromosoms verhindert die Bildung von GPI-verankerten Oberflächenproteinen auf hämatopoetischen Stammzellen und führt zur Ausbildung des Krankheitsbildes der paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie (PNH) [89, 90]. Die intravasale Hämolyse von Erythrozyten, ein Charakteristikum dieser Erkrankung, ist hierbei durch das Fehlen von CD59 und CD55 und die damit verbundene vermehrte Anfälligkeit gegenüber einer Komplement-induzierten Zellyse bedingt [89, 90].



**Abbildung 9** Vereinfachte Darstellung der Komplementkaskade mit den Angriffspunkten der CRPs CD35, CD46, CD55 und CD59. CD35 und CD46 wirken als Kofaktoren für die Faktor I-vermittelte Spaltung von C3b und C4b und verhindern somit die Bildung von C3-Konvertasen <sup>[61, 63]</sup>. Der Zerfall von bereits gebildeten C3-Konvertasen wird durch die CRPs CD35 und CD55 beschleunigt, die die Halbwertszeit dieser Enzyme stark vermindern <sup>[61]</sup>. Die letzte Stufe der Komplementregulation erfolgt durch das CRP CD59, indem die Zusammenlagerung der Komplementfaktoren C5b-C8 sowie die Polymerisation von C9 und somit die Formation des zelllytischen MAC (Membrane Attack Complex) verhindert wird <sup>[61]</sup>. Quelle: modifiziert nach <sup>[61]</sup>

Das Komplementsystem ist durch seine vielfältigen proinflammatorischen und immunregulatorischen Wirkungen eine wichtige Säule des Immunsystems. Im Zuge der Komplementaktivierung werden zum einen Anaphylatoxine und Opsonine als Spaltprodukte gebildet und damit eine Verstärkung der lokalen Entzündungsantwort induziert, zum anderen kann sich auch ein zelllytischer MAC formieren. Versagt der körpereigene Schutzmechanismus vor einer Komplement-induzierten Zellyse in Form von CRPs bzw. ist die Komplementaktivierung im Zuge einer Entzündungsantwort zu stark, kann eine Zerstörung körpereigener Zellen und somit eine Komplement-induzierte Ausbildung oder Begünstigung von Gewebepathologien auftreten <sup>[65]</sup>.

Im Sehngewebe ist die Rolle des Komplementsystems sowie eine mögliche Wechselbeziehung mit proinflammatorischen und immunregulatorischen Zytokinen, wie sie möglicherweise im Zuge eines Entzündungsgeschehen auftritt, bisher noch nicht untersucht worden und steht daher im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit.

## 1.4 Zielsetzung der Arbeit

In verschiedenen Gewebearten konnte dem Komplementsystem bereits eine Beteiligung an der Ausbildung von posttraumatischen Folgeschäden und eine Rolle in der Pathophysiologie von Degradation und Heilung nach Gewebetraumata zugeschrieben werden [24, 62, 65, 91, 92]. So tritt eine Komplementaktivierung beispielsweise als unmittelbare Folge eines Schädelhirntraumas auf und ist beteiligt an der Ischämie/Reperfusionen-bedingten Gewebsschädigung [62, 92, 93].

Es stellt sich daher die Frage, ob eine Aktivierung des Komplementsystems auch im Zuge eines Sehnentraumas stattfindet und Einfluss auf die Ausbildung von Sehnenpathologien oder den Prozess der Sehnenheilung nimmt. Die Expression von Komplementfaktoren ist in vielen Gewebe- und Zellarten bereits untersucht worden, so auch in Zellen mesenchymalen Ursprungs wie Knorpelzellen, Muskelzellen, Adipozyten und Hautfibroblasten [53, 57, 94-99].

Die Expression und die Regulation des Komplementsystems in der Sehne waren bisher allerdings völlig unklar. Daher war es das Ziel der vorliegenden Arbeit erstmals natives Sehngewebe sowie kultivierte Tendozyten auf eine Expression von Komplementfaktoren und eine mögliche Regulation dieser Expression durch proinflammatorische und immunregulatorische Zytokine zu untersuchen. Mit TNF $\alpha$  und IL-6 wurden immunregulatorische Zytokine ausgewählt, die mit pathologischen Prozessen in der Sehne und deren Heilung bereits in Zusammenhang gebracht wurden [25, 32, 35, 39, 41, 42]. IL-10 wurde als typisches anti-inflammatorisches Zytokin und potentieller Gegenspieler dieser proinflammatorischen Zytokine in die Analysen eingeschlossen. Dabei bildete die Hypothese einer engen Wechselbeziehung zwischen Zytokinen und der Expression von Komplementfaktoren auf mRNA- und Proteinebene, wie es bereits für andere Zellarten beschrieben wurde, die Basis der Experimente [50-54, 56-60].

Um die Frage nach einer Komplementexpression und einer möglichen Regulation durch Zytokine in der Sehne nachzugehen, sollten sowohl natives humanes Sehngewebe als auch kultivierte humane Tendozyten auf eine Expression der Anaphylatoxinrezeptoren C3aR und C5aR sowie der CRPs CD35, CD46, CD55 und CD59 untersucht und an kultivierten Tendozyten der Einfluss der Zytokine TNF $\alpha$ , IL-6 und IL-10 auf die Expression der untersuchten Komplementfaktoren analysiert

werden. Bei den ausgewählten Komplementfaktoren handelt es sich um regulatorische Schlüsselkomponenten der Kaskade. Blut und auch Blutzellen, wie Leukozyten, könnten eine potentielle Quelle regulatorischer Mediatoren im Rahmen einer Inflammationsantwort in der Sehne darstellen. Daher sollte weiterhin die Expressionsstärke der Komplementfaktoren in der Sehne und kultivierten Sehnenzellen zu der in Leukozyten in direkte Beziehung gesetzt und exemplarisch ein Stimulationsversuch kultivierter Tendozyten mit Leukozyten und Vollblut durchgeführt werden.

## 2 Material

### 2.1 Chemikalien

Substanz	Firma
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Roche Diagnostics GmbH, DE
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH und Co KG, DE
Dulbecco´s modified Eagle´s Medium (DMEM)	Biochrom AG, DE
Eserserum	Chemicon, USA
essentielle Aminosäuren, 50x MEM-AS	Biochrom AG, DE
Ethanol, 70 %	Merck KGaA, DE
Ethidiumbromidlösung, 1 %	Carl Roth GmbH und Co KG, DE
Fluoromount	Southern Biotech, USA
Formalin, 35 %	Hedinger GmbH & Co. KG, DE
fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG, DE
GeneRuler DNA Ladder, ultra low range	Fermentas International Inc., CA
Gentamycin	Biochrom AG, DE
Glycin	Sigma-Aldrich, USA
Ham´s F12	Biochrom AG, DE
HANKs	Biochrom AG, DE
L-Glukose, 10 %	Merck KGaA, DE
L-Glutamin, 200 mM	Biochrom AG, DE
Loading Dye Solution, 6x Konzentrat (Ladepuffer für DNA-Gele)	Fermentas International Inc., CA
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, USA
Natrium-Ethylendiamintetraacetat (Na-EDTA)	Sigma-Aldrich, USA
Paraformaldehyd, 4 %	Carl Roth GmbH und Co KG, DE
Partricin, 50 µg/ml	Biochrom AG, DE
Penicillin / Streptomycin, 10000 U / 10 mg/ml	Biochrom AG, DE
Phosphate-buffered saline (PBS)	Biochrom AG, DE
Qiazol	Qiagen, DE
RNAlater-Reagenz	Qiagen, DE
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS) Base/HCl	Merck KGaA, DE
Triton X-100	Sigma-Aldrich, USA
Trypanblau, 1 %	Biochrom AG, DE
Trypsin / EDTA	Biochrom AG, DE
Vitamin C (25 mg/ml)	Sigma-Aldrich, USA

## 2.2 Zellkultur- und Versuchsmaterialien

Material	Firma
Cell plus T75/T175 Gewebekulturflasche	Sarstedt AG & Co., DE
Cell plus 6-Well Zellkulturplatte	Sarstedt AG & Co., DE
Objektträger	Firma Menzel, DE
Deckgläser	Firma Menzel, DE

## 2.3 Medien und Puffer

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

### Zellkultur

#### Medium mit 0,5 % FCS

47,25 % Ham´s F12	1 % Partricin
47,25 % DMEM	1 % essentielle Aminosäuren
0,5 % FCS	1 % Vitamin C
1 % Penicillin / Streptomycin	1 % L-Glutamin

#### Medium mit 10 % FCS

9,5 % FCS
Medium mit 0,5 % FCS

#### Einfriermedium

90 % FCS
10 % DMSO

#### Poly-L-Lysin-Lösung

1% Poly-L-Lysin
99 % PBS

### Agarosegelelektrophorese

#### TE-Puffer

10 mM TRIS-HCl
1 mM Na-EDTA

#### TAE-Puffer, 50x

2 M TRIS Base
1 M Essigsäure
0,1 M Na-EDTA

#### Probenpuffer

6x Ladepuffer 1:6 in TE - Puffer (mit Bromphenolblau & Xylen-Cyanol)

## Immunfluoreszenzmikroskopie

<u>TBS, 1x</u>	<u>Blockier- &amp; Permeabilisierungsmedium</u>
0,05 M TRIS	5 % Eseserum
0,015 M NaCl	0,1 % Triton X-100
(pH 7,6)	in 1x TBS

## 2.4 Zytokine, Antikörper, Primer

Zytokin (human, rekombinant)	Firma
Interleukin-6	R&D Systems, USA
Interleukin-10	Pepto Tech, DE
Tumornekrosefaktor $\alpha$	Pepto Tech, DE

primärer Antikörper	Firma
mAK-Maus-anti-C5aR	Genetex, USA
pAK-Ziege-anti-CD55	R&D Systems, USA
Maus-IgG1-Isotypkontrolle	Caltag Laboratories, USA

sekundärer Antikörper	Firma
Esel-anti-Maus-IgG-Alexa Fluor 488	Invitrogen molecular probes, USA
Esel-anti-Ziege-IgG-Alexa Fluor 488	Invitrogen molecular probes, USA

Gen	Firma	Vor- / Rückwärtsprimer	Sonde / Ref Seq	Ampfilikat
$\beta$ -Aktin	Qiagen	TGGGACGACATGGAGAA GAAGGTCTCAAACATGATCTGG	GCCCCCTGAACCCTAA	147 bp
HPRT	ABI	NM_000194.2		100 bp
C3aR	ABI	NM_004054.2		82 bp
C5aR	Qiagen	TGCCATCTGGTTCCTCAA GCCAGTGGTGATGCTGTA	ACTTCCTCTCCTGCCT	95 bp
CD35	ABI	NM_000573.3		91 bp
CD46	ABI	NM_172351.1		94 bp
CD55	ABI	NM_000574.2		62 bp
CD59	ABI	NM_203331.1		70 bp
Scleraxis	Qiagen	TGAAAGGCGGAGTGAAAA AGGTGCCCAAGATGGCTTA	GCAAGAGAGGAAGGAC	119 bp

## 2.5 Kits

Methoden	Kit / Firma
RNA-Isolation	RNeasy Mini Kit, Qiagen, DE
RNA-Konzentrationsmessung	RNA Nano LabChip, Agilent Technologies, Inc., USA
cDNA-Synthese	Quantitect Reverse Transcription Kit, Qiagen, DE
PCR	TaqMan Gene Expression Assay, Applied Biosystems, USA Quantitect Gene Expression Assay, Qiagen, DE

## 2.6 Geräte und Auswertungsprogramme

Methoden	Geräte / 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-Konzentrations-/Qualitätsbestimmung	RNA Nano LabChip von Agilent Technologies, Inc., USA Gerät: Bioanalyzer von Agilent Technologies, Inc., USA Programm: 2100 expert von Agilent Technologies, Inc., USA Gerät: NanoDrop 1000 Spektralphotometer von Thermo Scientific, DE
Reverse Transkription	Mastercycler, Eppendorf, DE
PCR	Gerät: Opticon I von Bio-Rad Laboratories, Inc., USA Programm: Opticon Monitor 3.1 von Bio-Rad Laboratories, Inc., USA
Agarose-Gelelektrophorese	Gerät: GelDoc 2000 von Bio-Rad Laboratories, Inc., USA Programm: Quantity One von Bio-Rad Laboratories, Inc., USA



Immunfluoreszenzmikroskopie

Mikroskop: Axioskop 40 von Carl Zeiss AG,  
Deutschland  
Kamera: Color View II von Olympus Europa  
Holding GmbH  
Programm: analySIS FIVE cellID-Modul von  
Olympus Europa Holding GmbH

## 3 Methoden

### 3.1 Zellkulturexperimente mit Tendozyten

#### 3.1.1 Isolierung von Tendozyten aus humaner Sehne

Während Kreuzbandersatzoperationen konnte natives Sehnenmaterial der Ansatzsehnen des *M. semitendinosus*, *M. semimembranosus* und *M. gracilis*, das als Überschuss nach dem Ersatz verworfen werden musste, von 8 verschiedenen humanen Spendern (Altersdurchschnitt: 42,4 Jahre, männlich) unter Beachtung der ethischen Grundsätze gewonnen werden (Ethikantrag: EA4-033-08).

Nach der Entnahme wurde das Sehnenmaterial in einem Medium aus PBS + Penicillin/Streptomycin/Gentamycin (1 %) gekühlt transportiert. Im Labor wurde das Sehngewebe in eine Zellkulturschale überführt, dreimalig mit DMEM/Ham's F12 1:1 + Penicillin/Streptomycin/Gentamycin (1 %) gespült und anschließend in antibiotikahaltigem Kulturmedium (mit 10 % FCS und Gentamycin) 5 Minuten inkubiert. Bindegewebe wurde von den Sehnenexplantaten abpräpariert, diese in 2 x 5 mm große Stücke geschnitten und in eine Zellkulturschale überführt. Es erfolgte eine Inkubation mit Kulturmedium und 10 % FCS bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> über einen Zeitraum von 1-2 Wochen, in denen die Tendozyten begannen die Explantate zu verlassen und auf der Oberfläche der Zellkulturschale zu adhären. Während der Inkubation fand alle 2-3 Tage ein Wechsel des Kulturmediums statt. Nach der Auswanderung der Tendozyten wurden die Explantate entfernt. Bei einer Konfluenz von > 75 % wurden die Tendozyten mittels Trypsin/EDTA (0,1 Vol % Trypsin mit 0,04 Vol % in PBS) abgelöst und in Zellkulturflaschen für die Stimulationsversuche expandiert.

#### 3.1.2 Isolierung von PBMCs und Granulozyten

Die Isolierung der PBMCs und Granulozyten erfolgte aus heparinisiertem humanem Vollblut mittels Biocoll-Gradienten (PBMCs) bzw. einer Dextran-Fällung (neutrophile Granulozyten). Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurde diese Isolierung allerdings

nicht selbst durchgeführt, sondern die bereits isolierten Zellen oder RNA von jeweils 3 verschiedenen humanen Spendern (Altersdurchschnitt: 27,7 [PBMCs], 40,3 Jahre [Granulozyten]; Geschlecht: weiblich und männlich [PBMCs], männlich [Granulozyten]) durch die Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt.

### **3.1.3 Passagieren von Tendozyten**

Für die Vermehrung der Tendozyten wurden diese bei einer Konfluenz von > 75 % passagiert. Dafür wurde der Überstand des Kulturmediums abgesaugt und der Zellrasen mit Hanks-Salzlösung gespült. Je nach Zelldichte und Größe des Kulturgefäßes wurden 1-2 ml Trypsin/EDTA auf die Zellen gegeben und diese für 3-5 Minuten bei Standardbedingungen (37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>) inkubiert. Das Ablösen der Zellen wurde unter dem Mikroskop kontrolliert und gegebenenfalls durch Klopfen des Kulturgefäßes verstärkt. Durch Zugabe von 5 ml Kulturmedium mit 10 % FCS wurde die Trypsinaktivität gestoppt und die Zellen im Medium suspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend in ein 15 ml Falcon überführt und für 5 Minuten bei 400 g zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands wurde das Pellet erneut in Kulturmedium mit 10 % FCS resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl und Vitalität mit der Neubauer – Zählkammer und dem Vitalfarbstoff Trypanblau, wurden 7.000-13.000 Zellen/cm<sup>2</sup> in ein Zellkulturgefäß ausgesät.

### **3.1.4 Zellzählung**

Um die Zellzahl und die Vitalität mit Hilfe der Neubauer – Zählkammer bestimmen zu können, wurden, je nach erwarteter Zellzahl, 10-20 µl Zellsuspension mit 0,5 % Trypanblau verdünnt. Anschließend konnten die vitalen Zellen in den 4 Quadranten der Zählkammer ausgezählt und die Zellzahl durch folgende Formel berechnet werden:

$$\text{Zellzahl/ml} = (\text{Summe der vitalen Zellen} / 4) \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

### 3.1.5 Kryokonservierung von Tendozyten

Um Tendozyten für spätere Experimente verwenden zu können, wurden diese kryokonserviert. Nachdem die Zellen mit Trypsin/EDTA (0,1/0,04 Vol %) abgelöst, in Kulturmedium suspendiert und bei 400 g für 5 Minuten zentrifugiert wurden, erfolgte eine Resuspendierung in 1,8 ml Einfriermedium und der anschließende Transfer in ein 2 ml Kryoröhrchen.

Anschließend wurde das Kryoröhrchen in ein Gradienten-Einfrier-Gefäß verbracht (Mr. Frosty). Hierbei handelt es sich um ein schonendes Einfrierverfahren, da die Temperatur pro Minute um 1 °C abfällt. Nach 24 Stunden wurde das Kryoröhrchen in flüssigen Stickstoff überführt und bei -196 °C kryokonserviert.

### 3.1.6 Auftauen von Tendozyten

Es erfolgte ein rasches Auftauen der Tendozyten im Kryoröhrchen und eine anschließende Überführung in ein 15 ml Falcon. Zur Neutralisierung des DMSO-haltigen Einfriermediums wurden 5 ml Kulturmedium mit 10 % FCS hinzugegeben. Anschließend wurde 5 Minuten bei 400 g zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Zellpellet in Kulturmedium mit 10 % FCS resuspendiert, in ein Zellkulturgefäß überführt und unter Standardbedingungen kultiviert.

### 3.1.7 Stimulationsexperimente mit humanen rekombinanten Zytokinen

Sind die Tendozyten, mit einer Konfluenz von > 75 % in ausreichender Zahl in den Zellkulturgefäßen gewachsen, erfolgte eine Aussaat von 7.000-13.000 Zellen/cm<sup>2</sup> in 6-Well Platten zur Durchführung der Zellstimulation mit humanen rekombinanten Zytokinen. Nach 24 Stunden wurde bei zufriedenstellender Adhärenz der Tendozyten ein Wechsel des Kulturmediums durchgeführt, indem der Überstand des Kulturmediums abgesaugt, einmalig mit PBS gespült und auf das Inkubationsmedium mit 1 % FCS umgestellt wurde. Durch den reduzierten FCS-Gehalt sollten Einflüsse von Substanzen des FCS (z. B. Wachstumsfaktoren) auf die Zellstimulation ausgeschlossen werden. Nach 1-stündiger Inkubation wurde das Inkubationsmedium erneut abgesaugt und die Zellen in einem Kulturmedium mit 0,5 % FCS und

10 ng/ml TNF $\alpha$ , IL-6, IL-10, TNF $\alpha$ +IL-6 oder TNF $\alpha$ +IL-10 stimuliert. Die Inkubation erfolgte für 6, 24 bzw. 48 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Ein Well blieb jeweils unstimuliert zur Rekrutierung einer Kontrolle.

### **3.1.8 Stimulationsexperimente mit PBMCs und Vollblut**

Neben der Zellstimulation mit humanen rekombinanten Zytokinen wurde zusätzlich ein Stimulationsversuch mit PBMCs und Vollblut durchgeführt. Hierfür wurden ähnlich dem Zytokinstimulationsversuch Tendozyten in 6-Well Platten überführt und für 24 Stunden bei Standardbedingungen inkubiert. 1 Stunde vor Stimulationsbeginn erfolgte ein Wechsel auf das serumarme Inkubationsmedium. Anschließend wurden die kultivierten Tendozyten mit PBMCs (2 Mio. pro Well), PBMCs (2 Mio. pro Well) + TNF (5 ng/ml) bzw. mit Vollblut (200  $\mu$ l pro Well) für 24 Stunden stimuliert. Die Stimulation erfolgte dabei über ein Transwell, d.h. die Tendozyten standen mit den PBMCs bzw. dem Vollblut über eine dünne Membran und das Kulturmedium in Kontakt, konnten aber keine direkten Zell-Zellkontakte ausbilden.

## **3.2 Genexpressionsanalyse**

Um die Genexpression der Komplement-regulierenden Proteine, der Anaphylatoxinrezeptoren und des sehnentypischen Transkriptionsfaktors Scleraxis bestimmen zu können, wurde aus nativem Sehnengewebe und aus kultivierten Tendozyten die Gesamt-RNA isoliert und deren Konzentration und Qualität bestimmt. Die gewonnene RNA diente als Matrize für die Synthese von cDNA, die anschließend für die Genexpressionsanalyse mittels semiquantitativer Real-Time PCR verwendet wurde.

### **3.2.1 RNA-Isolation aus der Tendozytenkultur**

Für die Isolierung von Gesamt-RNA wurde das RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen GmbH verwendet. Grundsätzlich ist bei jeder RNA-Isolation darauf zu

achten, dass die einzelsträngige RNA, vor allem gegen RNAsen sehr empfindlich ist. RNAsen sind sehr stabile und aktive Enzyme, die in der Lage sind RNA abzubauen. Um eine Degradierung der RNA zu verhindern, wurden ausschließlich RNase freie Lösungen und Reaktionsgefäße verwendet. Die Durchführung der RNA-Isolation erfolgte laut Herstellerangaben.

Für die RNA-Konzentrationsbestimmung wurden 3 µl aus der gewonnen RNA-Lösung entnommen. Die Lagerung der RNA erfolgte bei - 80 °C.

### **3.2.2 RNA-Isolation aus humanem Sehnengewebe**

Das humane Sehnengewebe wurde unmittelbar nach der Operation für 24 Stunden in RNA-stabilisierendem RNAlater-Reagenz (Qiagen) bei 4 °C gelagert und anschließend bei - 80°C aufbewahrt. In flüssigem Stickstoff wurden die Gewebestücke zerkleinert und für 10 Minuten mit 2 ml Qiazol Reagenz bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 200 µl Chloroform dazugegeben und die Proben vorsichtig geschüttelt bis es zu einer Durchmischung der beiden Phasen gekommen ist. Es erfolgte eine 5-minütige Inkubation bei Raumtemperatur sowie eine Zentrifugation der Proben für 15 Minuten bei 12000 g und 4 °C. Der klare Überstand wurde abgenommen und 70 % Ethanol in gleicher Menge hinzugefügt. Die weitere RNA-Isolation erfolgte mit dem Qiagen RNeasy Mini Kit laut Herstellerangaben.

### **3.2.3 Bestimmung der RNA-Konzentration**

Die Konzentration und Qualität der RNA wurde sowohl mit Hilfe des RNA 6000 Nano LabChip von Agilent Technologies als auch mit dem NanoDrop 1000 Spektralphotometer von Thermo Scientific bestimmt.

Der RNA Nano LabChip beinhaltet ein System aus miteinander verbundenen Mikrokanälen, das eine Auftrennung der Nukleinsäurefragmente hinsichtlich ihrer Größe ermöglicht, während sie aufgrund eines elektrischen Feldes durch die Mikrokanäle wandern.

Da die Nukleinsäurefragmente mit einem Marker angefärbt werden, kann ihre Fluoreszenz detektiert und mit Hilfe der Software in ein Gelbild oder Elektropherogramm umgeschrieben werden. Der RNA Nano LabChip bietet die Möglichkeit sowohl die Gesamt-RNA-Konzentration zu bestimmen als auch eine qualitative Bewertung des RNA-Isolates vorzunehmen, da bei Kontaminationen zusätzliche Fluoreszenzmaxima erkannt werden können. Die Vorbereitung der RNA-Proben und Reagenzien sowie die Beladung des Chips erfolgten laut Herstellerangaben.

Die Messung mittels NanoDrop 1000 Spektralphotometers erfolgte mit einem benötigten Probenvolumen von 1 µl vollautomatisch.

Mit Hilfe der ermittelten RNA-Konzentrationen konnte das einzusetzende RNA-Probenvolumen für die cDNA-Synthese berechnet werden.

#### **3.2.4 cDNA-Synthese**

Für die Umschreibung von RNA in die für die Genexpressionsanalysen mittels Real-Time PCR benötigte cDNA, wurde das QuantiTect Reverse Transcription Kit von Qiagen verwendet. Die grundsätzlich immer eingesetzten 500 ng RNA wurden zunächst für 2 Minuten und 42 °C mit gDNA Wipeout Buffer von Qiagen inkubiert, um eine mögliche Kontamination mit genomischer DNA effizient zu beseitigen. Anschließend folgte die Umschreibung der RNA mit Hilfe eines Mastermixes aus Quantiscript Reverse Transcriptase, Quantiscript RT Buffer und RT Primer Mix von Qiagen und eine Inkubation bei 42 °C für 15 Minuten um eine optimale Transkription zu erreichen. Anschließend wurde das Enzym durch eine 3-minütige Inkubation bei 95 °C inaktiviert. Da die eukaryotische mRNA eine Poly(A)-Sequenz am 3' Ende besitzt, ist es durch den Einsatz spezifischer Oligo-(dT)-Primer möglich, nur diese RNA-Art anzureichern und in cDNA umzuschreiben. Die Reverse Transcriptase besitzt dafür eine RNA-abhängige DNA-Polymerase-Aktivität. Gleichzeitig ist das Enzym aber auch in der Lage den nach der cDNA-Synthese noch vorhandenen RNA-Strang abzubauen. Diese RNase-Aktivität wirkt dabei nur auf RNA ein, die an cDNA hybridisiert vorliegt, sodass ungebundene RNA nicht abgebaut wird.

Die anschließende Aufbewahrung der gewonnenen cDNA erfolgte bei - 20 °C.

### 3.2.5 Semi-quantitative Real-Time Detection PCR

Die Polymerasekettenreaktion bietet die Möglichkeit einer selektiven DNA-Vervielfältigung *in vitro*. Neben einer thermostabilen DNA-Polymerase werden dafür die Matrizen-cDNA, Desoxynukleosidtriphosphate, Oligonukleotidprimer und geeignete Pufferbedingungen benötigt.

Die Real-Time Detection PCR (RTD-PCR) durchlief 40 (ABI - Applied Biosystems) bzw. 45 Zyklen (Qiagen), wobei ein Zyklus jeweils aus drei Reaktionsschritten besteht. Jeder Zyklus beginnt mit einer kurzen Inkubation bei 95 °C, um die Denaturierung der DNA durch die Spaltung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem DNA-Doppelstrang zu induzieren. Dabei erfolgt initial zum Beginn der RTD-PCR ein ausgedehnterer Inkubationsschritt bei 95 °C, der für eine adäquate Aktivierung der DNA-Polymerase nötig ist. Durch die Denaturierung der DNA liegt diese in Einzelsträngen vor und das folgende Annealing kann stattfinden. Bei einer Temperatur von 56 °C bzw. 60 °C erfolgt die Anlagerung der Oligonukleotidprimer an die spezifische DNA-Sequenz. Die thermostabile DNA-Polymerase nutzt das 3'Ende des angelagerten Primers für die anschließende Elongation. Hierbei wird der fehlende DNA-Strang mit Hilfe der freien Desoxynukleosidtriphosphate neu synthetisiert. Durch die Verwendung eines gegenläufig orientierten Primerpaares kann gezielt nur eine bestimmte DNA-Sequenz exponentiell vervielfältigt werden.

Die semi-quantitative RTD-PCR erlaubt neben der selektiven Vervielfältigung von DNA-Fragmenten auch eine Quantifizierung der gewonnenen DNA. Durch die Verwendung von fluoreszenzmarkierten sequenzspezifischen Sonden kann während der Amplifikation in Echtzeit (Real-Time) ein Fluoreszenzsignal detektiert werden.

Da nicht alle Primer bei einer Firma in gewünschter Qualität verfügbar waren, erfolgte die Durchführung der RTD-PCR sowohl mit dem TaqMan Gene Expression Assay von der Firma ABI als auch mit dem Quantitect Gene Expression Assay von der Firma Qiagen.

Zur Durchführung der RTD-PCR wurde jeweils ein Gemisch aus Master Mix, RNase-freiem H<sub>2</sub>O und Primer erstellt und nach kurzer Zentrifugation je 19 µl in die Vertiefungen der 96-Well PCR-Platte pipettiert. Dazu wurde anschließend je 1 µl der cDNA ergänzt. Pro Primer wurden zusätzlich 2 NTCs (No template control) belassen,



die nur aus Master Mix, RNase-freiem H<sub>2</sub>O und Primer bestanden und keine cDNA enthielten.

Es erfolgte ein Dreifachbestimmung der Proben. Abschließend wurden die Vertiefungen mit Deckeln oder Folie verschlossen und die PCR-Platte für 30 Sekunden bei 400 g zentrifugiert.

**Tabelle 1** Pipettierschema RTD-PCR. Es erfolgte der Einsatz unterschiedlicher Volumina für die Primer der Firma Qiagen und ABI.

	ABI	Qiagen
<b>Master Mix</b>	10 µl	10 µl
<b>RNase-freies H<sub>2</sub>O</b>	8 µl	7 µl
<b>Primer</b>	1 µl	2 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>19 µl</b>	<b>19 µl</b>

Die Durchführung der PCR erfolgte mit dem Opticon I Thermocycler von Biorad, wobei je nach Firma des Primers unterschiedliche Temperaturprogramme verwendet wurden.

**Tabelle 2** Temperaturprogramm für die Verwendung von Primer der Firma ABI.

1.	Uracil-DNA-Glycosylase Inkubation	2 min	50 °C	
2.	UDG-Inaktivierung und Aktivierung der DNA-Polymerase	10 min	95 °C	
3.	Denaturierung der DNA	15 s	95 °C	} 40 Zyklen
4.	Annealing und Elongation	30 s	60 °C	
5.	Detektion des Fluoreszenzsignals			
6.	Abkühlen	∞	6 °C	

**Tabelle 3** Temperaturprogramm für die Verwendung von Primern der Firma Qiagen.

1.	Aktivierung der DNA - Polymerase	15 min	95 °C	
2.	Denaturierung der DNA	15 s	94 °C	
3.	Annealing	30 s	56 °C	} 45 Zyklen
4.	Detektion des Fluoreszenzsignals			
5.	Elongation	30s	76 °C	
6.	Abkühlen	∞	6 °C	

Obwohl standardisiert die gleiche Menge an cDNA eingesetzt wurde, kann es erfahrungsgemäß trotzdem zu kleinen Schwankungen im cDNA-Gehalt kommen. Um diesen und weitere Störfaktoren zu kompensieren, wurde jeweils ein Housekeeping-Gen mitgeführt. Da die Expression dieses Referenzgenes als stimulationsunabhängig und konstitutiv angesehen werden kann, war der ermittelte  $C_T$ -Wert (Cycle Threshold) abhängig von der eingesetzten cDNA-Menge und diente der Normalisierung der Genexpressionen. Eingesetzte Referenzgene waren das Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-Gen (HPRT), das für ein Enzym aus dem eukaryotischen Purinstoffwechsel kodiert, bei der Verwendung von Primern der Firma ABI, und das  $\beta$ -Aktin-Gen, das für ein Strukturprotein in eukaryotischen Zellen kodiert, bei der Verwendung von Primern der Firma Qiagen.

Die Auswertung der PCR-Analysen erfolgte semiquantitativ, indem die Expression des Zielgens in den stimulierten Proben mit der unstimulierten Kontrolle verglichen wurde. Dafür wurde für jede Probe der Cycle of Threshold ( $C_T$ )-Wert bestimmt. Dieser Wert beschreibt den Zyklus, an dem das Fluoreszenzsignal erstmalig die Hintergrundfluoreszenz übersteigt. Mathematisch erfolgte die relative Quantifizierung und Normalisierung auf das Referenzgen mit Hilfe einer von Pfaffl geprägten Gleichung <sup>[100]</sup>. Diese berücksichtigt neben dem  $C_T$ -Wert auch die Effizienz eines Primers, die in Effizienzbestimmungs-Versuchen ermittelt wurde. Im Folgenden ist die Gleichung zur Berechnung der Ratio, dem Expressionsverhältnis des Zielgens in der stimulierten Probe zur unstimulierten Kontrolle, nach Pfaffl dargestellt <sup>[100]</sup>.

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{Zielgen}})^{\Delta C_T \text{Zielgen (Kontrolle - Stimulation)}}}{(E_{\text{Referenzgen}})^{\Delta C_T \text{Referenzgen (Kontrolle - Stimulation)}}$$

### 3.2.6 Primereffizienzbestimmung

Zu Beginn der Arbeit waren die Primer für die Zielgene C3aR, C5aR, CD35, CD46, CD55 und CD59 für die native Sehne, im Gegensatz zu kultivierten Tendozyten, noch nicht validiert, sodass zunächst die Eignung der Primer für die Amplifizierung der cDNA der nativen Sehne und die Effizienz der Primer analysiert werden musste. Nicht immer arbeiten die verwendeten Primer mit einer idealen Effizienz (100 % entspricht Effizienz = 2) und führen somit zu einer exakten Verdopplung des PCR-Produktes in jedem Zyklus. Daher ist die Bestimmung der Effizienz eines Primers notwendig, die zum einen vom Primer-Paar und zum anderen vom amplifizierten Fragment abhängt. Die Ermittlung der Primereffizienzen erfolgte dabei über eine Verdünnungsreihe bzw. Standardkurve mit mindestens 5 Verdünnungstufen in einer Dreifachbestimmung. Da zwischen dem  $C_T$ -Wert und dem Logarithmus der RNA-Menge eine lineare Abhängigkeit besteht, ist die Steigung der Geraden abhängig von der Effizienz <sup>[100]</sup>. Aus dem Anstieg der erhaltenen Geraden konnte so über die Gleichung  $E = 10^{-(1/\text{Anstieg})}$  die Effizienz E ermittelt werden <sup>[100]</sup>.

### 3.2.7 Agarosegelelektrophorese

Die Auftragung der PCR-Amplifikate auf ein Agarosegel ermöglichte sowohl eine Kontrolle, ob die entstandenen Amplifikate der erwarteten Basenpaargröße entsprachen, als auch eine Visualisierung möglicher unspezifischer Nebenprodukte in Form zusätzlicher Banden. Ferner konnten quantitative Unterschiede der Amplifikate der einzelnen stimulierten Proben untersucht werden. Grundlage der Agarosegelelektrophorese ist die unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit der negativ geladenen Amplifikate im elektrischen Feld aufgrund unterschiedlicher Fragmentgrößen.

Es wurde ein 3 %iges Agarosegel (3 g Agarose in 100 ml TAE Puffer) hergestellt. Jeweils 5 µl PCR-Amplifikat und 5 µl Ladepuffer wurden gemischt und 8 µl davon in eine Geltasche pipettiert. Die innere und äußere Geltasche wurden mit je 5 µL der DNA-Leiter (Generuler Fa. Fermentas) befüllt. Die Gelelektrophorese wurde bei 80 V für 180 Minuten durchgeführt. Um die Banden unter UV-Licht sichtbar zu machen, wurde das Agarosegel anschließend für 15 Minuten in eine Ethidiumbromidlösung (50 µg/ml Ethidiumbromid) gegeben. Die Aufnahme erfolgte mit Hilfe des Detektionsgerät GelDoc 2000.

### 3.3 Immunfluoreszenzmikroskopie

Für die immunzytochemischen Experimente wurden Poly-L-Lysin beschichtete Glasplättchen in eine 6-Well Platte überführt (3 Glasplättchen pro Well), 7.000-13.000 Zellen/cm<sup>2</sup> in 2 ml Kulturmedium mit 10 % FCS ausgesät und für 24 Stunden unter Standardbedingungen inkubiert. Es erfolgte eine Umstellung auf das Inkubationsmedium mit 1 % FCS und nach 1-stündiger Inkubation die 6- bzw. 24-stündige Zellstimulation mit 10 ng/ml der humanen rekombinanten Zytokine TNF $\alpha$ , IL-6 oder IL-10. Eine unstimulierte Kontrolle wurde mitgeführt. Nach Ablauf der Stimulationszeit wurde das Stimulationsmedium abgesaugt, mit PBS gewaschen und die Glasplättchen mit 4 % Paraformaldehyd zur Fixierung für 15 Minuten überschichtet. Es folgte erneut ein Waschschriff mit PBS. Die Lagerung der Glasplättchen für eine spätere Verwendung fand in PBS bei 4 °C statt.

Die besiedelten fixierten Glasplättchen wurden auf dem Schwenker zunächst für 5 Minuten in TBS gewaschen und anschließend für 15 Minuten in einer Blockierlösung inkubiert, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern. Auch die Kryoschnitte (8-10 µm dick) von nativer Sehne wurden initial für 5 Minuten mit 4 % Paraformaldehyd fixiert und anschließend zweimalig mit TBS gespült.

Der Primärantikörper (C5aR, CD55, Isotyp) wurde 1:20 in der Blockierlösung verdünnt und jeweils 50 µl auf ein Glasplättchen bzw. Kryoschnitt gegeben. Um eine vollständige Bedeckung der gesamten Oberfläche mit der Primärantikörperlösung zu gewährleisten, erfolgte eine Abdeckung mit Folie. Die Inkubation fand in einer feuchten Kammer für 45 Minuten statt. Nach dreimaligem Waschen mit TBS für jeweils 5 Minuten auf dem Schwenker, folgte die Inkubation mit dem 1:200 in

Blockierlösung verdünnten Sekundärantikörper (Alexa 488). Für die Anfärbung der Zellkerne wurde zusätzlich DAPI hinzugegeben (Verdünnung 1:20). Erneut erfolgte eine 45-minütige Inkubation in einer feuchten Kammer nun in dunkler Umgebung sowie ein dreimaliger 5-minütiger Waschschrift mit TBS. Mit Hilfe von Fluoromount G wurden Glasdeckel auf den Plättchen fixiert und die Zellen bzw. Schnitte somit geschützt. Die Glasplättchen bzw. Kryoschnitte wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop begutachtet, fotografiert und anschließend bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt.

### **3.4 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, \*\*\*).

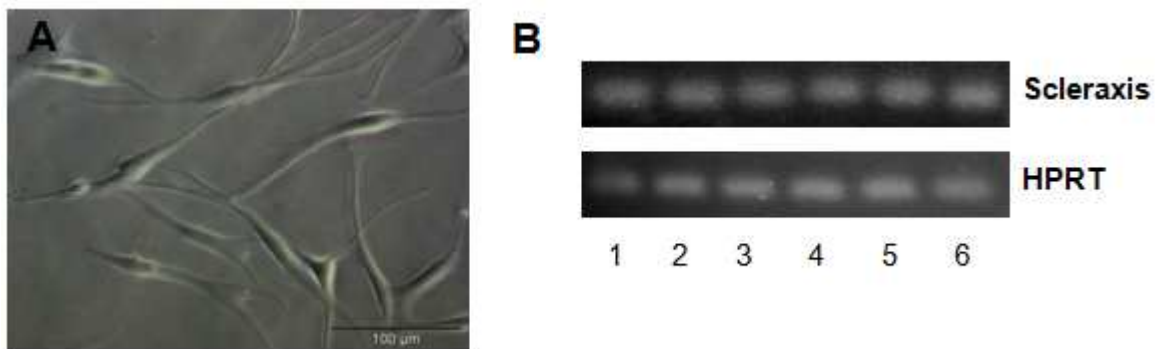
### **3.5 Richtlinien**

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

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Charakterisierung der Tendozyten *in vitro*

Die Tendozyten zeigten in der Zellkultur eine für diesen Zelltypen typische Morphologie mit rundlichen bis langgestreckten Zellkörpern und mehreren z.T. sehr langen Zellausläufern, über die sie miteinander in Kontakt standen (Abbildung 10 A). Zusätzlich wurde in Tendozyten aller Spender die Genexpression des sehnentypischen Transkriptionsfaktors Scleraxis nachgewiesen (Abbildung 10 B).



**Abbildung 10 A-B** Lichtmikroskopische Aufnahme von humanen kultivierten Tendozyten und Nachweis der Scleraxis-Expression. **A** Gut erkennbar ist die typische langgestreckte Morphologie der nach der 1. Passage aufgenommenen primären humanen Hamstringtendozyten. Sie verfügen über z.T. sehr lange verzweigte Zellausläufer, über die Zell-Zell-Kontakte ausgebildet werden. **B** Zur Verdeutlichung der Genexpression des sehnentypischen Transkriptionsfaktors Scleraxis wurden die PCR-Amplifikate aus den Analysen mit Hamstringtendozyten von 6 verschiedenen Spendern (1-6) exemplarisch auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Sie zeigten ein Amplifikat der gewünschten Fragmentgröße von 119 bp. Als Housekeeping-Gen wird das HPRT-Amplifikat zusätzlich gezeigt.

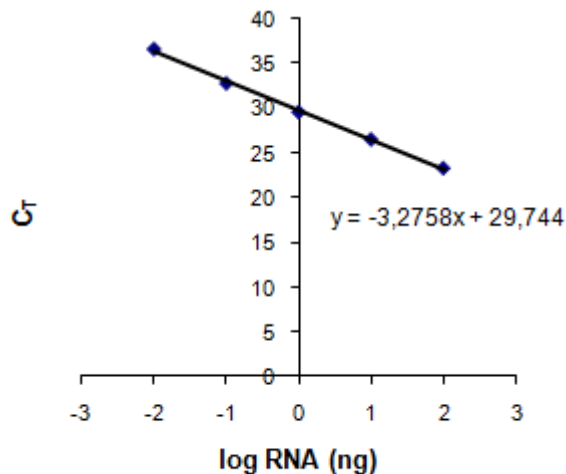
### 4.2 Genexpressionsanalysen in nativer Sehne

#### 4.2.1 Primereffizienzbestimmung

Da zu Beginn dieser Arbeit die eingesetzten Komplementprimer - im Gegensatz zu kultivierten Tendozyten - für die native Sehne noch nicht validiert waren, erfolgte

zunächst eine Analyse der Eignung dieser Primer für Expressionsanalysen in nativer Sehne 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 (Abbildung 11).



**Abbildung 11** Gerade über den Messpunkten aus der Primereffizienzbestimmung am Beispiel des C3aR-Gens. Es wurde der in der RTD-PCR ermittelte  $C_T$ -Wert der jeweiligen cDNA-Verdünnungsstufe gegen den Logarithmus der ursprünglich eingesetzten RNA-Menge aufgetragen.

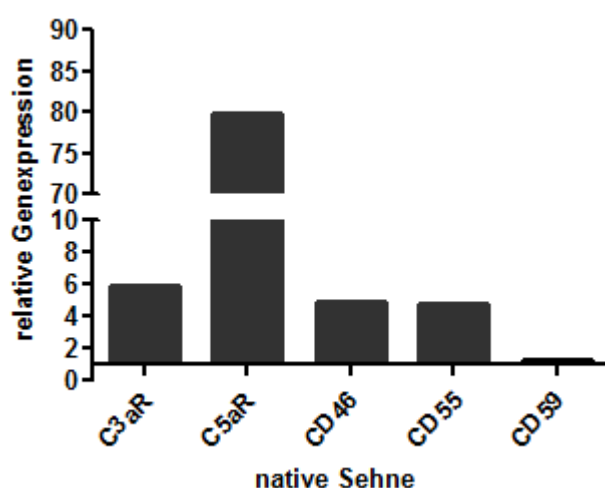
Über die Gleichung  $E = 10^{-(1/\text{Anstieg})}$  konnte aus dem Anstieg der ermittelten Geraden die Effizienz  $E$  errechnet werden <sup>[100]</sup>. Eine Prozentangabe der Effizienz erfolgte über die Gleichung  $E_{[\%]} = (E-1)*100$ . Die auf diese Weise ermittelten Primereffizienzen für native Tendozyten lagen zwischen 1,92 und 2,05 bzw. 92 % und 105 % (Tabelle 4) und damit nahe der idealen Effizienz von 2 bzw. 100 %, was eine Verwendung der Primer und ein Heranziehen der Effizienzen für die Auswertung der Genexpressionsanalysen nach Pfaffl (2001) erlaubte <sup>[100]</sup>.

Primer	Native Sehne	Monolayer- kultur
HPRT	1,98	1,97
$\beta$ -Aktin	1,94	1,84
C3aR	2,02 *	1,82
C5aR	1,96 *	2,00
CD35	2,00 *	-
CD46	1,92 *	1,96
CD55	2,05 *	2,15
CD59	1,94 *	1,96

**Tabelle 4** Primereffizienzen. Neben den in der vorliegenden Arbeit für die native Sehne ermittelten Effizienzen der Komplementprimer (\*) sind zur Vervollständigung auch alle weiteren Primereffizienzen, die in der Arbeitsgruppe bereits vorlagen und für die Genexpressionsanalysen dieser Arbeit Verwendung fanden, aufgeführt.

#### 4.2.2 Genexpression der untersuchten Komplementfaktoren in nativer Sehne und kultivierten humanen Tendozyten

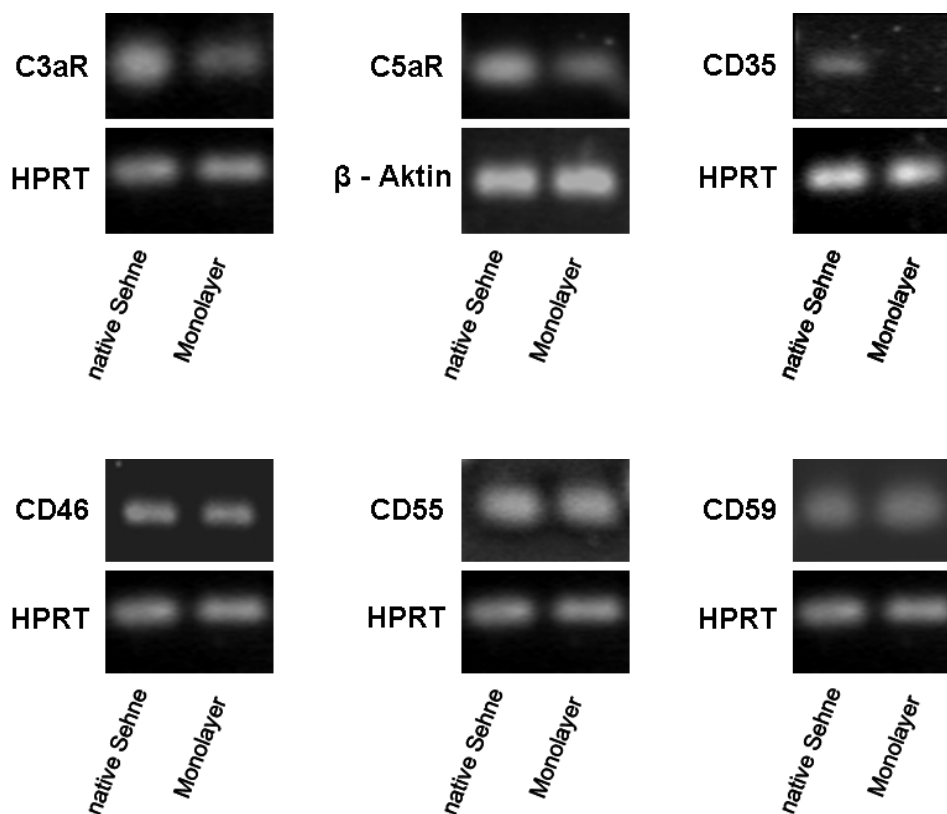
Mit Hilfe einer Genexpressionsanalyse sollte untersucht werden, ob und in welchem Umfang in kultivierten Tendozyten und nativer Sehne eine Expression von Anaphylatoxinrezeptoren und Komplement-regulierenden Proteinen nachweisbar ist. Hierfür wurde aus RNA von nativer Sehne von insgesamt drei Sehnen zweier Spender bzw. von kultivierten Tendozyten von drei verschiedenen Spendern zu gleichen Anteilen ein Pool hergestellt. Beide Spenderpools wurden mittels RTD-PCR im direkten Vergleich analysiert (Abbildung 12).



**Abbildung 12** RTD-PCR Analyse der Genexpression der untersuchten Komplementfaktoren in nativer Sehne im Vergleich zu kultivierten Tendozyten. Dargestellt ist das Vielfache der Genexpression in nativer Sehne (RNA aus drei Sehnen zweier Spender gepooled) gegenüber der in kultivierten Tendozyten (RNA aus Sehnenzellen dreier Spender gepooled), die auf 1 normiert wurde (n=1).



Sowohl in nativer Sehne als auch in kultivierten Tendozyten konnte eine Genexpression der Anaphylatoxinrezeptoren und der CRPs CD46, CD55 und CD59 detektiert werden (Abbildung 12 und 13). Im Gegensatz dazu exprimierten kultivierte Tendozyten und auch zusätzlich untersuchte kultivierte Tendozyten aus dreidimensionalen 14 und 28 Tage alten Massenkulturen kein CD35 (Abbildung 13; Massenkulturen nicht gezeigt). Im Expressionsniveau zeigte sich eine z.T. deutlich stärkere Expression aller untersuchten Komplementfaktoren in der nativen Sehne (Abbildung 12). Um die nicht vorhandene CD35-Genexpression in kultivierten Tendozyten sowie die z.T. starken Expressionsunterschiede zwischen nativer Sehne und kultivierten Tendozyten, die sich vor allem in der C3aR- und der C5aR-Genexpression zeigten, zu verdeutlichen, wurden die PCR-Amplifikate auf ein Agarose-Gel aufgetragen (Abbildung 13).



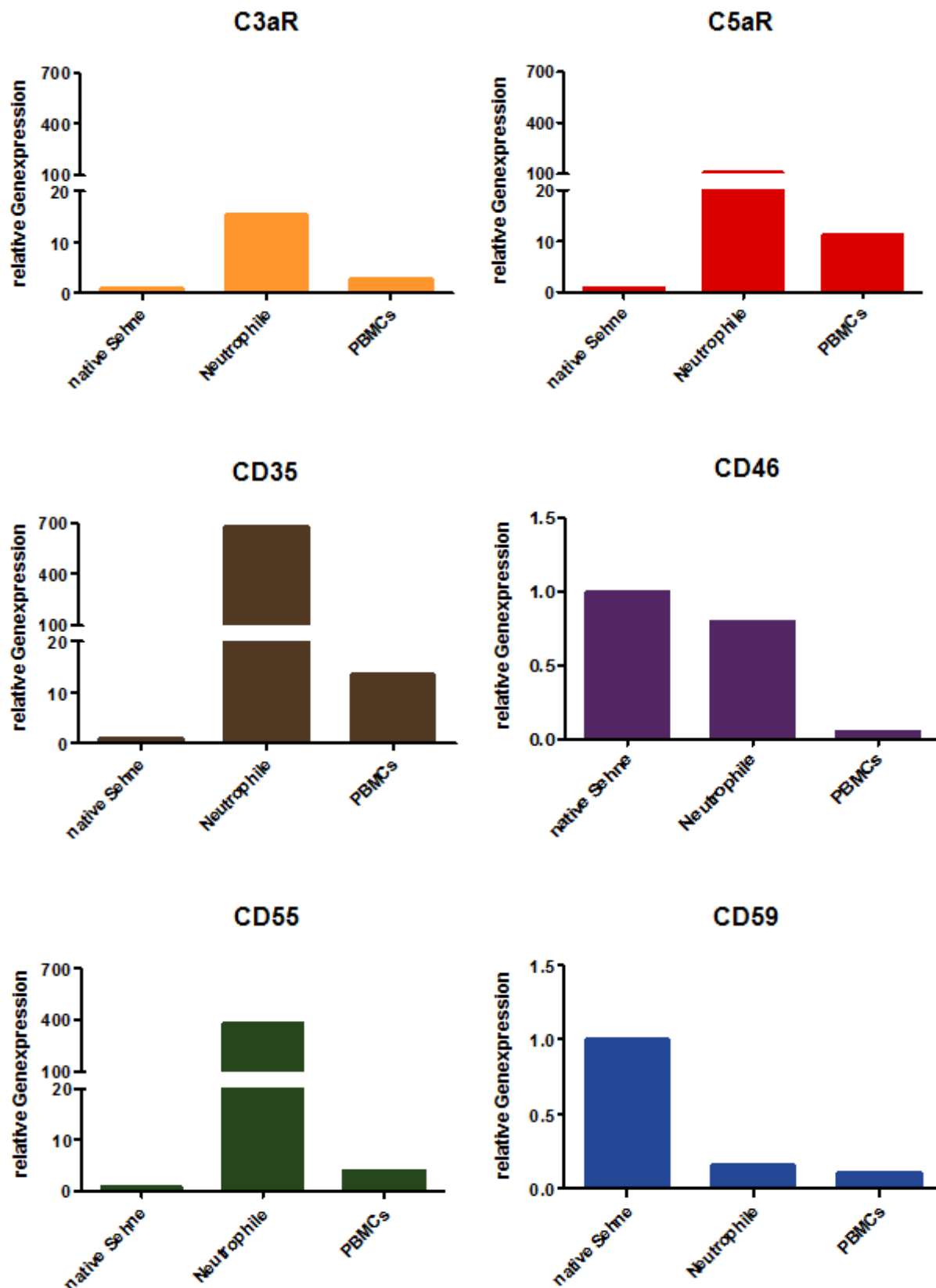
**Abbildung 13** PCR-Amplifikate als Nachweis der Genexpression der Anaphylatoxinrezeptoren und Komplement-regulierenden Proteinen in nativer Sehne und kultivierten Tendozyten. Dargestellt sind die auf Agarosegel aufgetragenen PCR-Amplifikate mit jeweiligem Housekeeping-Gen zur Verdeutlichung des Genexpressionsunterschiedes zwischen nativer Sehne und kultivierten Tendozyten. Hierbei konnte gezeigt werden, dass kultivierte Tendozyten im Gegensatz zur nativen

Sehne kein CD35 sowie C3aR und C5aR weniger stark exprimieren. Die nachgewiesenen Amplifikate wiesen die errechnete Größe auf.

### **4.3 Genexpression der untersuchten Komplementfaktoren in PBMCs und Granulozyten**

Ein Grund für die stärkere Genexpression der untersuchten Komplementfaktoren in nativer Sehne und für die nicht vorhandene CD35-Genexpression in kultivierten Tendozyten könnte die Existenz von Blutzellen im nativen Gewebe sein, die vor der RNA-Isolierung nicht vollständig aus dem Gewebe entfernt werden können. Um einen Eindruck über die Expression der untersuchten Komplementfaktoren in Blutzellen gewinnen zu können, wurde die Genexpression in den Leukozytenfraktionen PBMCs (Monozyten, Lymphozyten, Makrophagen) und Granulozyten (im Folgenden kurz: Neutrophile, da v.a. neutrophile Granulozyten und nur wenige Eosinophile und Basophile enthalten waren) untersucht. Dabei wurde für PBMCs und Granulozyten jeweils ein Pool aus 3 verschiedenen Spendern hergestellt sowie der gleiche Pool aus nativer Tendozyten- bzw. Sehnen-RNA eingesetzt, der bereits für den Expressionsvergleich mit kultivierten Tendozyten verwendet wurde (siehe 4.1).

In den Neutrophilen und PBMCs konnte, verglichen mit nativer Sehne, eine stärkere C3aR-, C5aR-, CD35- und CD55-Genexpression detektiert werden. Dabei zeigten sich vor allem in der CD35-Genexpression große Unterschiede zwischen den untersuchten Zelltypen. Die CRPs CD46 und CD59 waren dagegen in der nativen Sehne stärker exprimiert. Grundsätzlich lag die Expression der untersuchten Komplementfaktoren durch Neutrophile immer über dem Expressionsniveau der PBMCs (Abbildung 14).



**Abbildung 14** Vergleichende RTD-PCR Analyse der Genexpression der untersuchten Komplementfaktoren in nativer Sehne im Vergleich zu Blutzellen. RNA aus nativer Sehne (dreier Sehnen von insgesamt zwei humanen Spendern), sowie neutrophilen Granulozyten (kurz:

Neutrophile) und PBMCs von 3 verschiedenen humanen Spendern wurde gepooled. Dargestellt ist das Vielfache der Genexpression der neutrophilen Granulozyten und PBMCs gegenüber der nativen Sehne (n=1).

#### **4.4 Einfluss humaner rekombinanter Zytokine auf die Genexpression der untersuchten Komplementfaktoren in kultivierten humanen Tendozyten**

Das Ziel der Genexpressionsanalyse in kultivierten Tendozyten war die Untersuchung des Einflusses verschiedener humaner rekombinanter Zytokine auf die Genexpression der untersuchten Komplementfaktoren. Mittels RTD-PCR wurden 5 Spender nach 6-stündiger sowie 48-stündiger Stimulation und 8 Spender nach 24-stündiger Stimulation untersucht.

Die Daten der PCR wurden bei Verwendung von Primern der Firma ABI gegen das Housekeeping-Gen HPRT bzw. bei Verwendung von Primern der Firma Qiagen gegen  $\beta$ -Aktin normalisiert und als ein Vielfaches der Genexpression der unbehandelten Kontrolle dargestellt.

Zur besseren Übersicht werden zunächst die Genexpressionsdiagramme der einzelnen Zeitpunkte mit den entsprechenden Signifikanzen aufgeführt und anschließend zusätzlich alle Stimulationen und Zeitpunkte in einem Diagramm zusammengefasst, um einen Einblick in den zeitlichen Verlauf der Genexpression erhalten zu können. In diesem Diagramm erfolgte nur die Darstellung der Signifikanzen, die sich zwischen den einzelnen Zeitpunkten einer Stimulation ergaben.

Die CD35-Genexpression konnte auch durch eine Zytokinstimulation in kultivierten Tendozyten nicht induziert werden und ist daher nicht aufgeführt.

##### **4.4.1 C3aR-Genexpression**

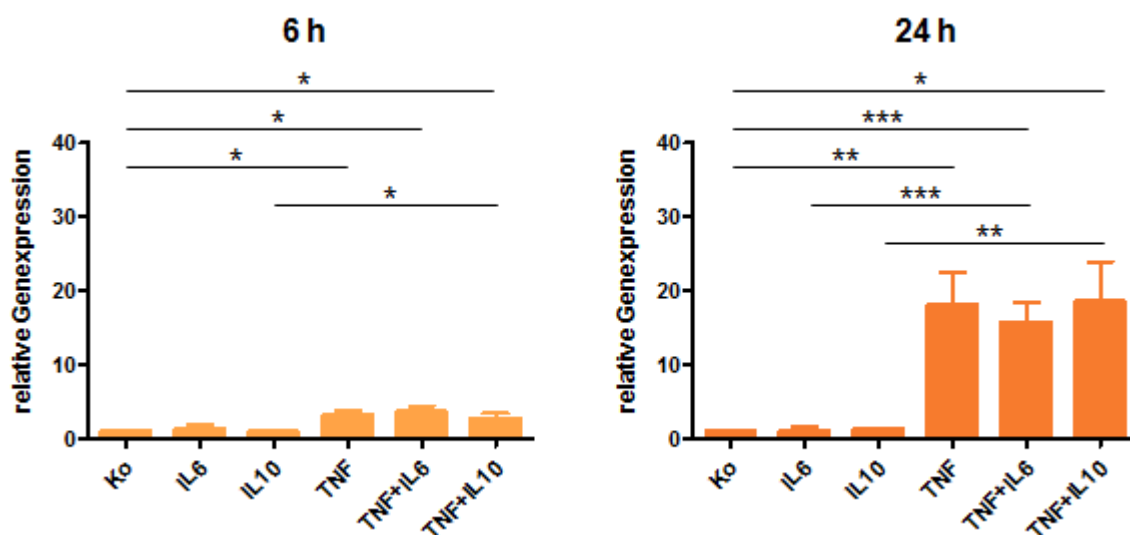
Eine signifikante Expressionssteigerung des C3aR zeigte sich nach 6- und 24-stündiger Stimulation mit TNF $\alpha$  und den Kombinationsstimulationen TNF $\alpha$ +IL-6

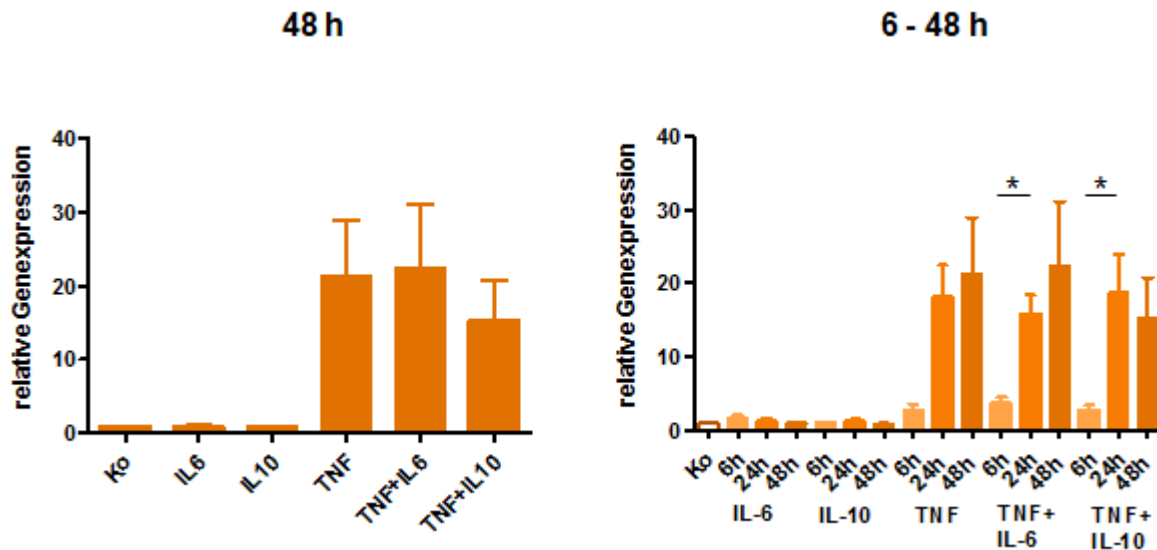
und TNF $\alpha$ +IL-10 (Abbildung 15). Auch nach 48-stündiger Stimulation war unter dem Einfluss von TNF $\alpha$  und TNF $\alpha$  in Kombination mit IL-6 bzw. mit IL-10 ein expressionssteigernder Effekt erkennbar, der allerdings nicht mehr signifikant war.

IL-6 induzierte zu allen Zeitpunkten uneinheitliche Effekte. Auch die Stimulation mit IL-10 allein hatte keinen erkennbaren Einfluss auf die C3aR-Genexpression.

Tendozyten, die mit einer Kombinationsstimulation behandelt wurden, zeigten ferner signifikant höhere C3aR-Expressionen als Tendozyten, die mit dem jeweiligen Interleukin allein stimuliert wurden, was den expressionssteigernden Effekt des TNF $\alpha$  unterstreicht (Abbildung 15).

Im zeitlichen Verlauf der Genexpression zeigte sich eine Verstärkung der Expression mit zunehmender Stimulationsdauer (Abbildung 15). Unter der Behandlung mit TNF $\alpha$  allein und in Kombination mit IL-6 stieg das Expressionsniveau dabei über den gesamten Stimulationszeitraum an. Der Expressionsanstieg vom 6- zum 24-stündigem Stimulationszeitpunkt war unter Einwirkung der Kombinationsstimulationen signifikant.





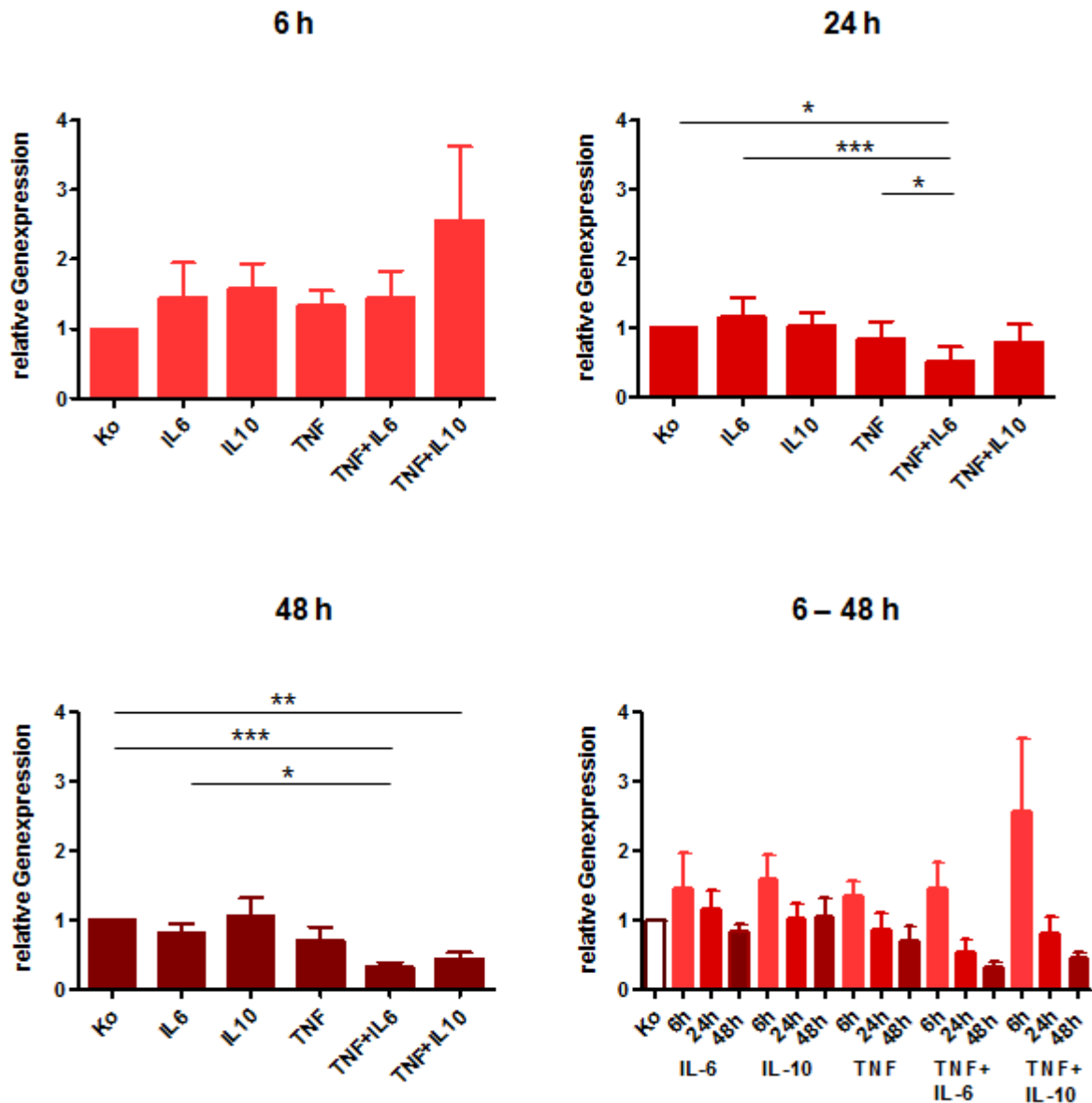
**Abbildung 15** C3aR-Genexpression in kultivierten Tendozyten unter dem Einfluss von Zytokinen. **Oben** C3aR-Genexpression nach 6 und 24 Stunden. **Unten** C3aR-Genexpression nach 48-stündiger Zytokinstimulation und über den gesamten Stimulationszeitraum betrachtet. In den Diagrammen sind die gegen das Housekeeping-Gen HPRT normalisierten und auf die unstimulierte Kontrolle bezogenen Genexpressionswerte der Zytokinstimulationen dargestellt (6 h / 48 h: n=5; 24 h: n=8).

#### 4.4.2 C5aR-Genexpression

Die Effekte der Zytokinstimulationen auf die C5aR-Genexpression waren nach 6 Stunden gering (Abbildung 16).

Die 24-stündige und 48-stündige Stimulation mit TNF $\alpha$ +IL-6, sowie die 48-stündige Stimulation mit TNF $\alpha$ +IL-10 führte zu einer signifikanten Suppression der C5aR-Expression. Dabei zeigten die mit TNF $\alpha$ +IL-6 stimulierten Zellen eine signifikant geringere C5aR-Expression gegenüber den Tendozyten, die mit TNF $\alpha$  allein stimuliert wurden (Abbildung 16). Die Effekte von rekombinantem IL-6 und IL-10 allein waren zu allen Stimulationszeitpunkten uneinheitlich. Insgesamt schienen die Kombinationsstimulationen einen stärkeren Einfluss auf die C5aR-Genexpression zu nehmen als TNF $\alpha$ , IL-6 und IL-10 allein (Abbildung 16).

Im zeitlichen Verlauf zeigte sich eine Abnahme der Genexpression unter allen Zytokinstimulationen mit zunehmender Stimulationsdauer.



**Abbildung 16** C5aR-Genexpression in kultivierten Tendozyten unter dem Einfluss von Zytokinen. **Oben** C5aR-Genexpression nach 6 und 24 Stunden. **Unten** C5aR-Genexpression nach 48-stündiger Zytokinstimulation und über den gesamten Stimulationszeitraum betrachtet. In den Diagrammen sind die gegen das Housekeeping-Gen  $\beta$ -Aktin normalisierten und auf die unstimulierte Kontrolle bezogenen Genexpressionswerte der Zytokinstimulationen dargestellt (6 h / 48 h: n=5; 24 h: n=8).

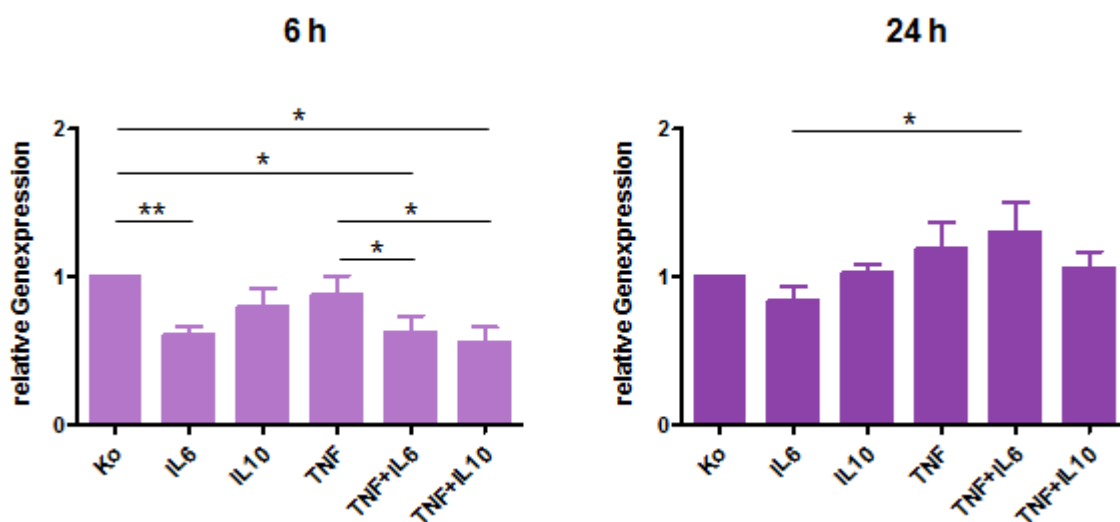
#### 4.4.3 CD46-Genexpression

Das CRP CD46 ist ein wichtiger Kofaktor für die Inaktivierung der Spaltprodukte C3b und C4b durch Serum-Faktor I. Einen Einfluss auf die CD46-Expression nahmen vor allem IL-6 und die Kombinationsstimulationen.

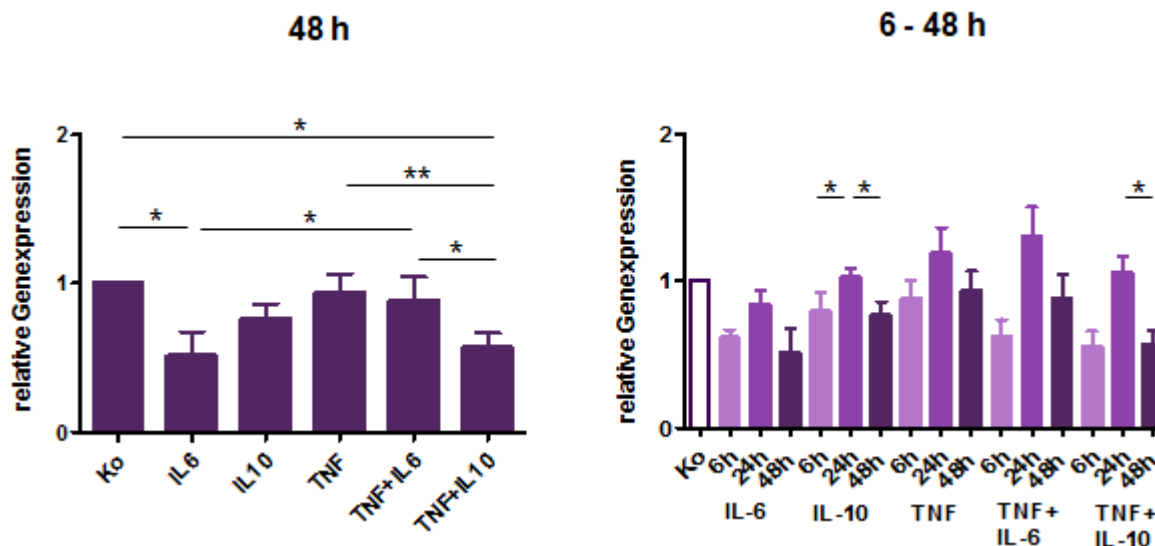
Dabei erfolgte eine signifikante Suppression der Genexpression des CRP CD46 nach 6-stündiger Stimulation durch IL-6, TNF $\alpha$ +IL-6 und TNF $\alpha$ +IL-10. Nach 24-stündiger Stimulation waren die supprimierenden Effekte des IL-6 und der Kombinationsstimulationen nicht erkennbar.

Im Gegensatz dazu führten die Stimulationen mit IL-6 und TNF $\alpha$ +IL-10 nach 48 Stunden erneut zu einer Suppression der CD46-Expression. Weiterhin bestanden signifikante Expressionsunterschiede zwischen den mit TNF $\alpha$  und den mit TNF $\alpha$ +IL-10 stimulierten Tendozyten nach 6 und 48 Stunden, sowie zwischen den mit IL-6 stimulierten Zellen gegenüber der Stimulation mit TNF $\alpha$ +IL-6 nach 24 und 48 Stunden (Abbildung 17). Es deuteten sich hier zum einen eine suppressive Wirkung des IL-10 in der Kombination mit TNF $\alpha$  und zum anderen ein zunehmender Einfluss des TNF $\alpha$  in der Kombinationsstimulation mit IL-6 mit fortschreitender Stimulationsdauer an (Abbildung 17).

Im zeitlichen Verlauf wurde eine biphasische Regulation der CD46-Genexpression unter allen Stimulationen mit einem Expressionsmaximum nach 24 Stunden deutlich. Unter IL-10 war dabei sowohl der Expressionsanstieg nach 24 Stunden im Vergleich zu 6 Stunden als auch der Expressionsabfall nach 48 Stunden im Vergleich zu 24-stündiger IL-10-Gabe signifikant.







**Abbildung 17** CD46-Genexpression in kultivierten Tendozyten unter dem Einfluss von Zytokinen. **Oben** CD46-Genexpression nach 6 und 24 Stunden. **Unten** CD46-Genexpression nach 48-stündiger Zytokinstimulation sowie über den gesamten Stimulationszeitraum betrachtet. In den Diagrammen sind die gegen das Housekeeping-Gen HPRT normalisierten und auf die unstimulierte Kontrolle bezogenen Genexpressionswerte der Zytokinstimulationen dargestellt (6 h / 48 h: n=5; 24 h: n=8).

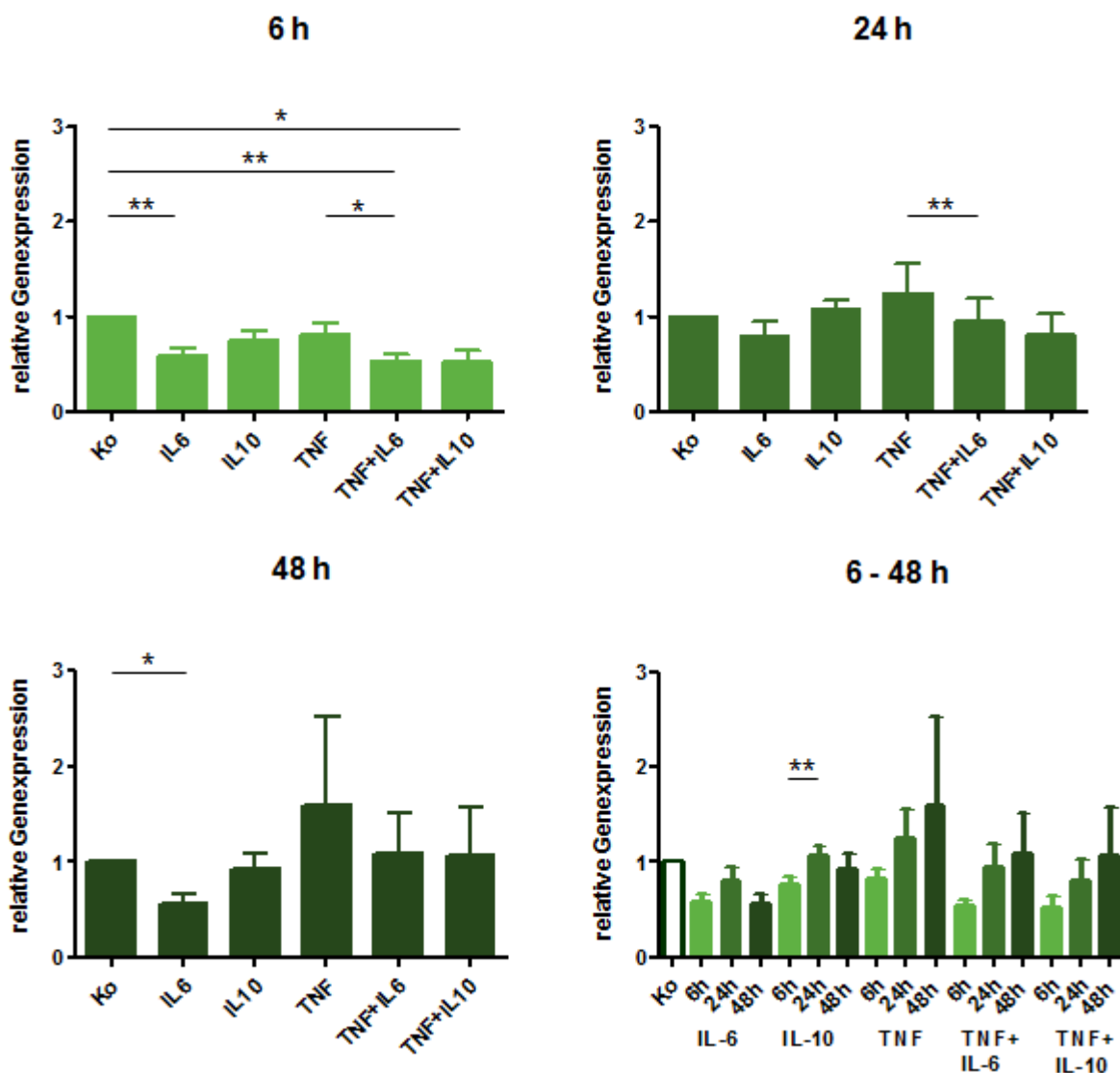
#### 4.4.4 CD55-Genexpression

Das CRP CD55 ist, durch Bindung von C3b und C4b, in der Lage die Bildung der C3- und C5-Konvertasen zu verhindern und neben dieser Formationshemmung ferner auch die Halbwertszeit der Konvertasen zu verkürzen. Ähnlich dem CD46 erfolgte eine Regulation der CD55-Expression hauptsächlich durch IL-6 und die Kombinationsstimulationen (Abbildung 18).

Die Genexpression des CD55 wurde durch die 6-stündige Stimulation mit IL-6, TNF $\alpha$ +IL-6 und TNF $\alpha$ +IL-10 sowie durch die 48-stündige Stimulation mit IL-6 signifikant supprimiert. Im Gegensatz zu IL-6 übten die Kombinationsstimulationen jedoch mit zunehmender Stimulationsdauer immer weniger Einfluss auf die CD55-Genexpression aus. So lag das Expressionsniveau der mit TNF $\alpha$ +IL-6 stimulierten Tendozyten nach 24- und 48-stündiger und der mit TNF $\alpha$ +IL-10 stimulierten Tendozyten nach 48-stündiger Stimulation etwa auf Kontrollniveau (Abbildung 18).

Ferner zeigten die mit  $\text{TNF}\alpha$ +IL-6 stimulierten Tendozyten gegenüber den mit  $\text{TNF}\alpha$  allein behandelten Zellen eine signifikant geringere CD55-Expression nach 6 und 24 Stunden, was den supprimierenden Effekt des IL-6 erneut unterstreicht.

Im zeitlichen Verlauf zeigte sich, ähnlich der CD46-Genexpression, bei der Einzelbehandlung mit IL-6 und IL-10 eine zweiphasische Regulation der CD55-Genexpression mit einem Expressionshöhepunkt nach 24 Stunden. Die Genexpression unter  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{TNF}\alpha$ +IL-6 und  $\text{TNF}\alpha$ +IL-10 stieg über den Stimulationszeitraum kontinuierlich an (Abbildung 18).



**Abbildung 18** CD55-Genexpression in kultivierten Tendozyten unter dem Einfluss von Zytokinen. **Oben** CD55-Genexpression nach 6 und 24 Stunden. **Unten** CD55-Genexpression nach 48 Stunden sowie über den gesamten Stimulationszeitraum betrachtet. In den Diagrammen sind die gegen das

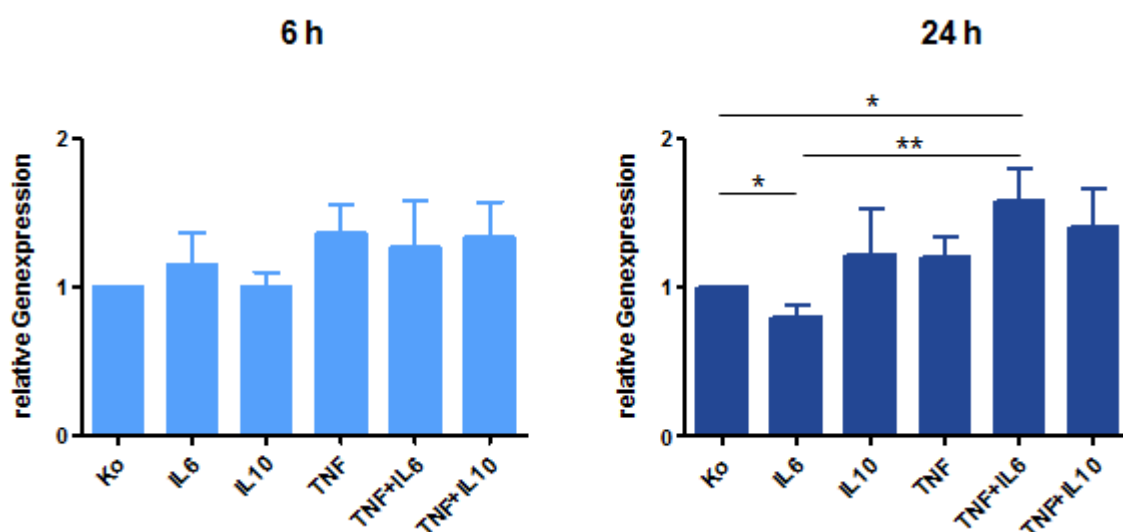
Housekeeping-Gen HPRT normalisierten und auf die unstimulierte Kontrolle bezogenen Genexpressionswerte der Zytokinstimulationen dargestellt (6 h / 48 h: n=5; 24 h: n=8).

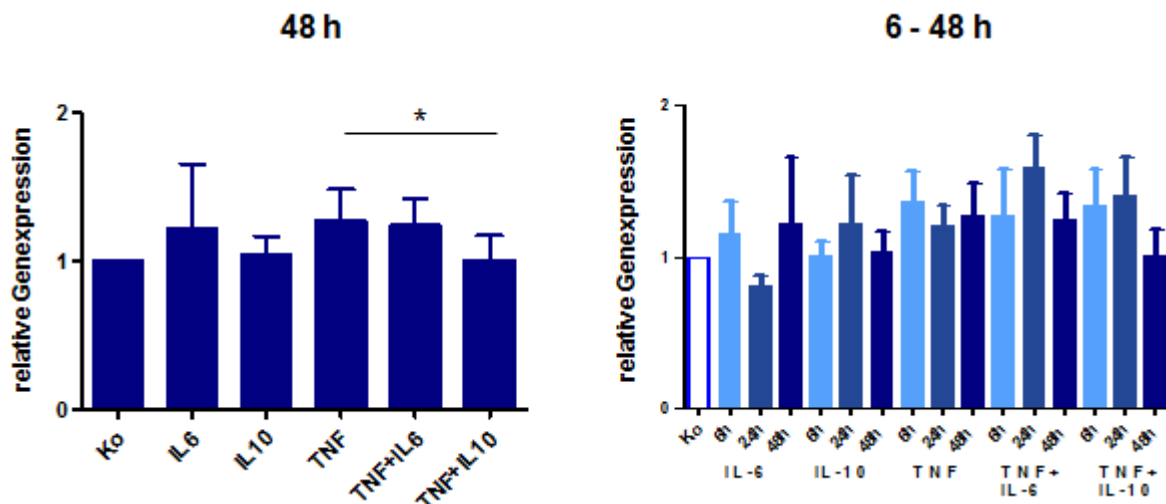
#### 4.4.5 CD59-Genexpression

Das CRP CD59 stellt die letzte Stufe der Komplementregulierung dar, in dem es die Formation des zelllytischen MAC durch die Bindung der Komplementkomplexe C5b-8 bzw. C5b-9 verhindert und die C9-Polymerisation inhibiert.

Dieses vor allem im Zuge einer raschen ungezügelter Aktivierung des Komplementsystems wichtige CRP, wurde im Vergleich zu den Anaphylatoxinrezeptoren und den CRPs CD46 und CD55 durch die verwendeten Zytokinstimulationen nur gering reguliert (Abbildung 19).

Die 6- und 48-stündige Stimulation hatte keinen Einfluss auf die CD59-Genexpression und führte lediglich zu uneinheitlichen Effekten (Abbildung 19). Nach 24 Stunden zeigte sich jedoch eine signifikante Suppression der CD59-Genexpression durch IL-6, sowie eine Induktion durch TNF $\alpha$ +IL-6 (Abbildung 19). Zeitabhängige Wirkungen der Zytokine konnten ebenfalls nicht detektiert werden, sodass die CD59-Genexpression in kultivierten Tendozyten insgesamt kaum von den eingesetzten Zytokinen beeinflusst wurde.





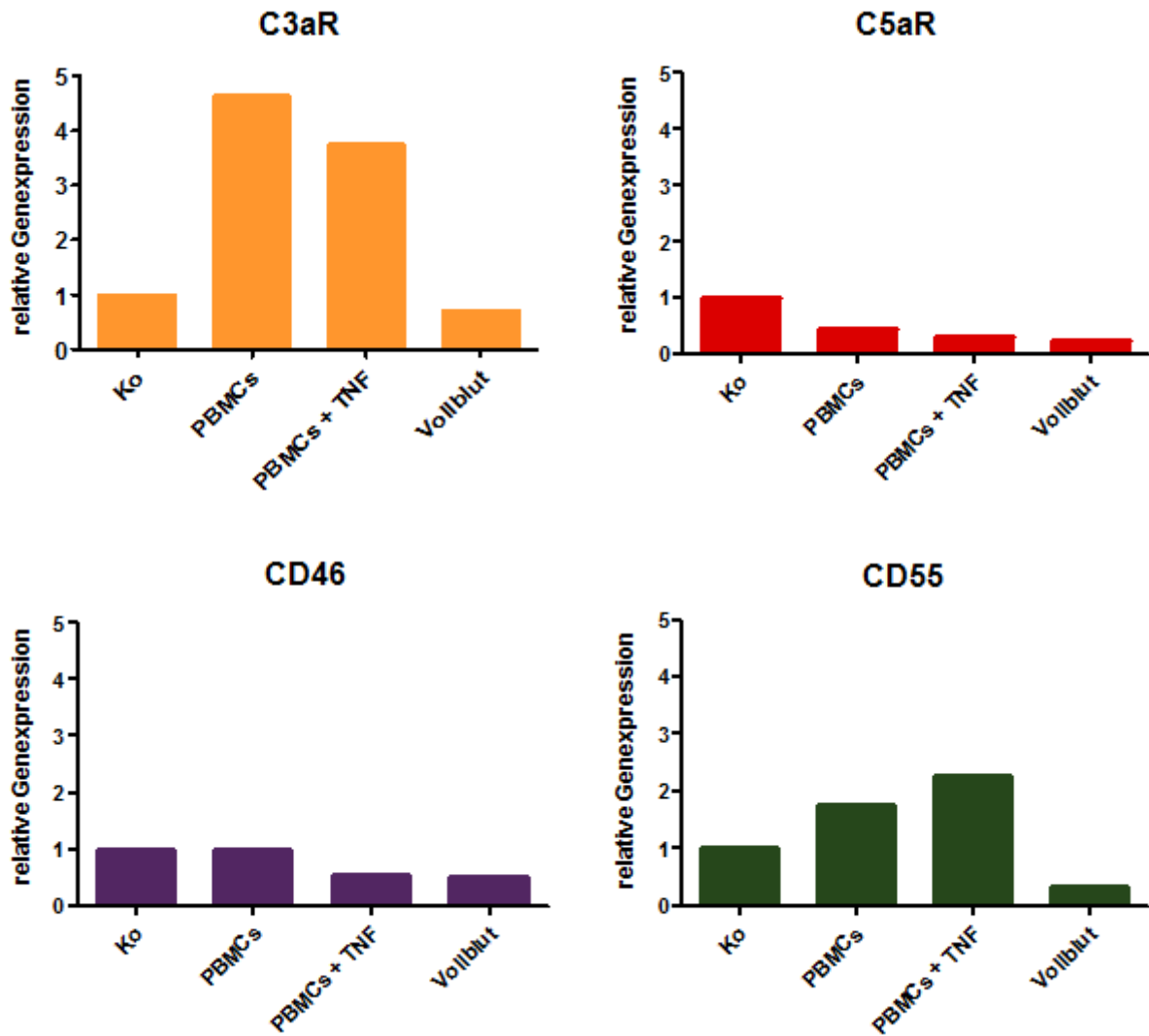
**Abbildung 19** CD59-Genexpression in kultivierten Tendozyten unter dem Einfluss von Zytokinen. **Oben** CD59-Genexpression nach 6 und 24 Stunden. **Unten** CD59-Genexpression nach 48 Stunden sowie über den gesamten Stimulationszeitraum betrachtet. In dem Diagramm sind die gegen das Housekeeping-Gen HPRT normalisierten und auf die unstimulierte Kontrolle bezogenen Genexpressionswerte der Zytokinstimulationen dargestellt (6 h / 48 h: n=5; 24 h: n=8).

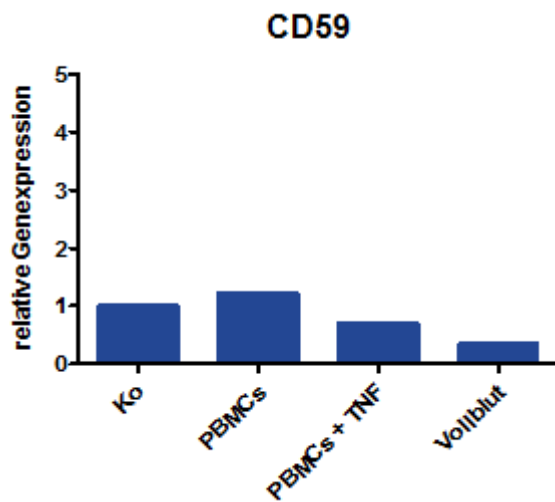
#### 4.5 Einfluss von humanen PBMCs und Vollblut auf die Genexpression der untersuchten Komplementfaktoren in kultivierten humanen Tendozyten

Bezugnehmend auf die Frage nach Ursachen der stärkeren Komplementexpression in nativer Sehne und der nicht detektierbaren CD35-Genexpression in kultivierten Tendozyten, wurde exemplarisch ein Stimulationsversuch durchgeführt. Dabei wurden kultivierte Tendozyten mit PBMCs, PBMCs + TNF $\alpha$  und Vollblut über ein Transwell stimuliert und so ein möglicher Einfluss löslicher Mediatoren der Blutzellen auf Sehnenzellen bestimmt.

Eine CD35-Genexpression konnte durch den Kontakt mit PBMCs, PBMCs + TNF $\alpha$  bzw. Vollblut in kultivierten Tendozyten nicht induziert werden. Tendozyten, die mit PBMCs bzw. PBMCs + TNF $\alpha$  behandelt wurden, exprimierten gegenüber der unstimulierten Kontrolle und den mit Vollblut stimulierten Tendozyten jedoch vermehrt C3aR und CD55 (Abbildung 20). Die C5aR-Genexpression wurde hingegen durch alle Stimulationen supprimiert. Ferner wurde die CD46-Expression durch die Behandlung mit PBMCs + TNF $\alpha$  bzw. Vollblut sowie die CD59-Expression durch die

Vollblut-Stimulation supprimiert (Abbildung 20). Grundsätzlich lag die Expression der mit Vollblut behandelten Tendozyten bei allen untersuchten Komplementfaktoren unter Kontrollniveau und war jeweils geringer als die Expression der mit PBMCs stimulierten Tendozyten (Abbildung 20).

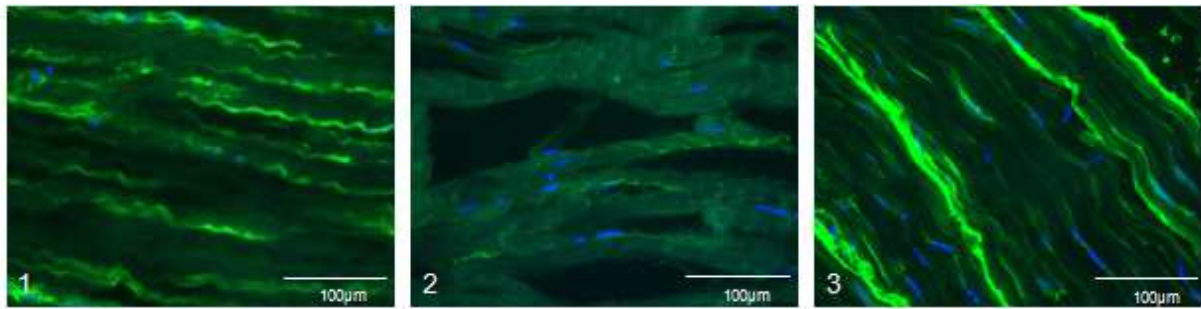




**Abbildung 20** RTD-PCR Analyse der untersuchten Komplementfaktoren in kultivierten Endozyten stimuliert mit PBMCs (2 Mio.), PBMCs + TNF $\alpha$  (2 Mio. + 5 ng/ml) und Vollblut. Dargestellt ist das Vielfache der Genexpression der stimulierten Endozyten gegenüber der unstimulierten Kontrolle (n=1).

#### 4.6 Immunhistochemischer Nachweis der CD55-Proteinexpression in nativer Sehne

Zum Nachweis einer CD55-Proteinexpression in nativer Hamstringsehne wurden exemplarisch Gefrierschnitte von 3 verschiedenen Spendern immunhistochemisch mit CD55-spezifischen Antikörpern markiert. Dabei konnte in den Sehnen aller 3 Spender mittels Immunfluoreszenz eine CD55-Proteinexpression in unterschiedlicher Intensität nachgewiesen werden (Abbildung 21). Die Immunmarkierung zeigte, dass die Expression von CD55 in der Sehne zellassoziiert ist, da eine deutliche Kolo-kalisation mit den über die DAPI-Färbung dargestellten Zellkernen zu erkennen war. Der Nachweis einer C5aR-Proteinexpression ist mit den verwendeten C5aR-spezifischen Antikörpern nicht gelungen.



**Abbildung 21** Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung der CD55-Proteinexpression (grün) in nativer Sehne von 3 verschiedenen humanen Spendern (1-3). Die Zellkerne sind mit DAPI (blau) angefärbt (n=3).

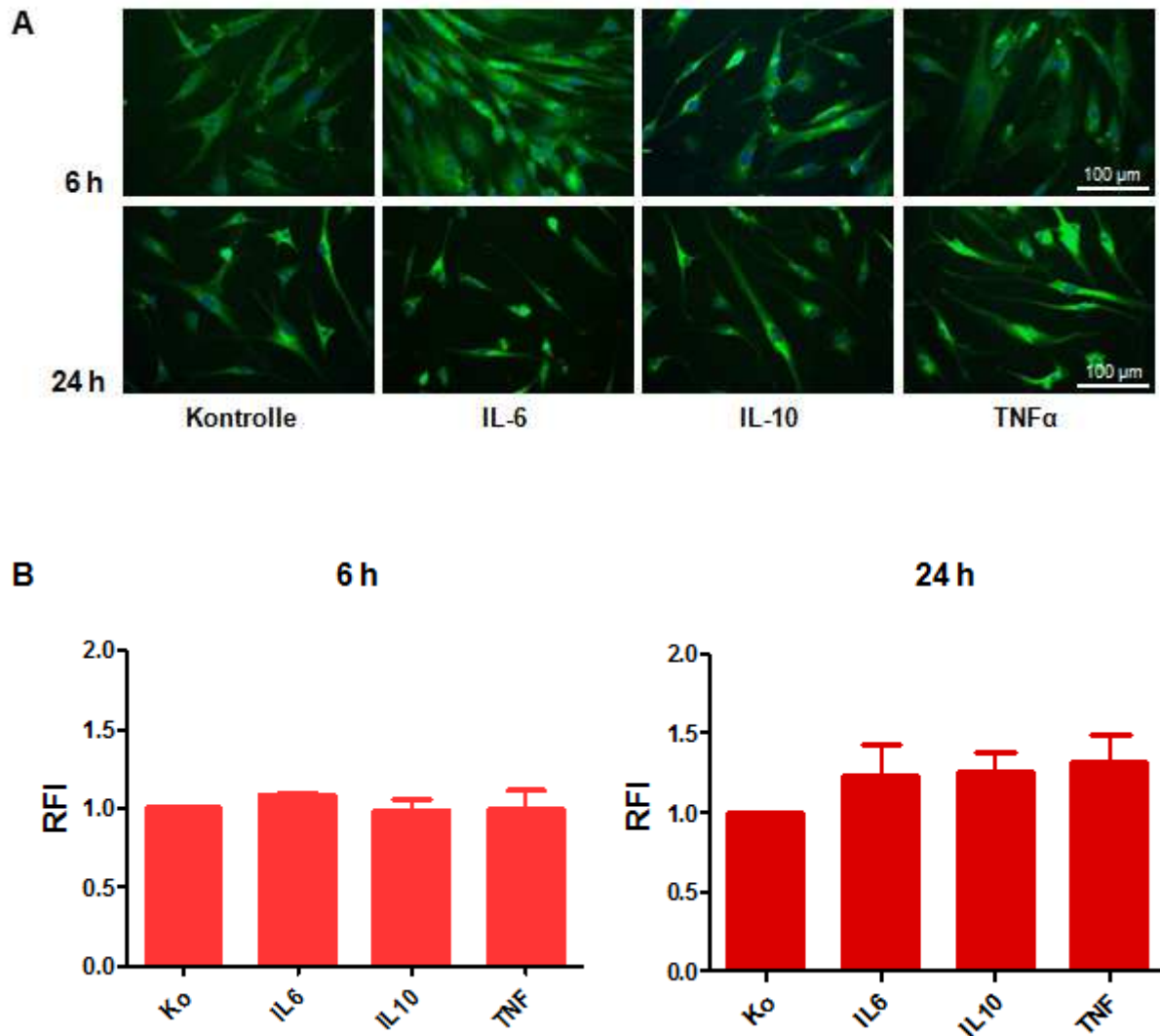
## **4.7 Immunhistochemischer Nachweis der C5aR- und CD55-Proteinexpression in kultivierten humanen Tendozyten**

Für den immunzytochemischen Nachweis von C5aR und CD55 wurden Tendozyten von 2 verschiedenen Spendern für 6 Stunden bzw. von 3 verschiedenen Spendern für 24 Stunden mit den Zytokinen TNF $\alpha$ , IL-6 und IL-10 stimuliert und anschließend mit spezifischen Antikörpern markiert. Mit Hilfe des Computerprogramms *analySIS FIVE cell<sup>D</sup>*-Modul wurde die relative Fluoreszenzintensität von 10 Zellen je Spender, Zeitpunkt und Stimulation bestimmt, der Mittelwert berechnet und ins Verhältnis zur unstimulierten Kontrolle gesetzt.

### **4.7.1 C5aR-Proteinexpression**

In den kultivierten Tendozyten aller untersuchten Spender wurde eine C5aR-Proteinexpression durch die Immunfluoreszenz deutlich, wobei eine zytoplasmatische Lokalisation der Immunmarkierung erkennbar war (Abbildung 22 A).

Während die durchgeführten Zytokinstimulationen nach 6 Stunden keinen Effekt auf die C5aR-Proteinexpression ausübten, zeigte sich nach 24 Stunden eine leichte Induktion durch TNF $\alpha$ , IL-6 und IL-10 (nicht signifikant) (Abbildung 22 B).



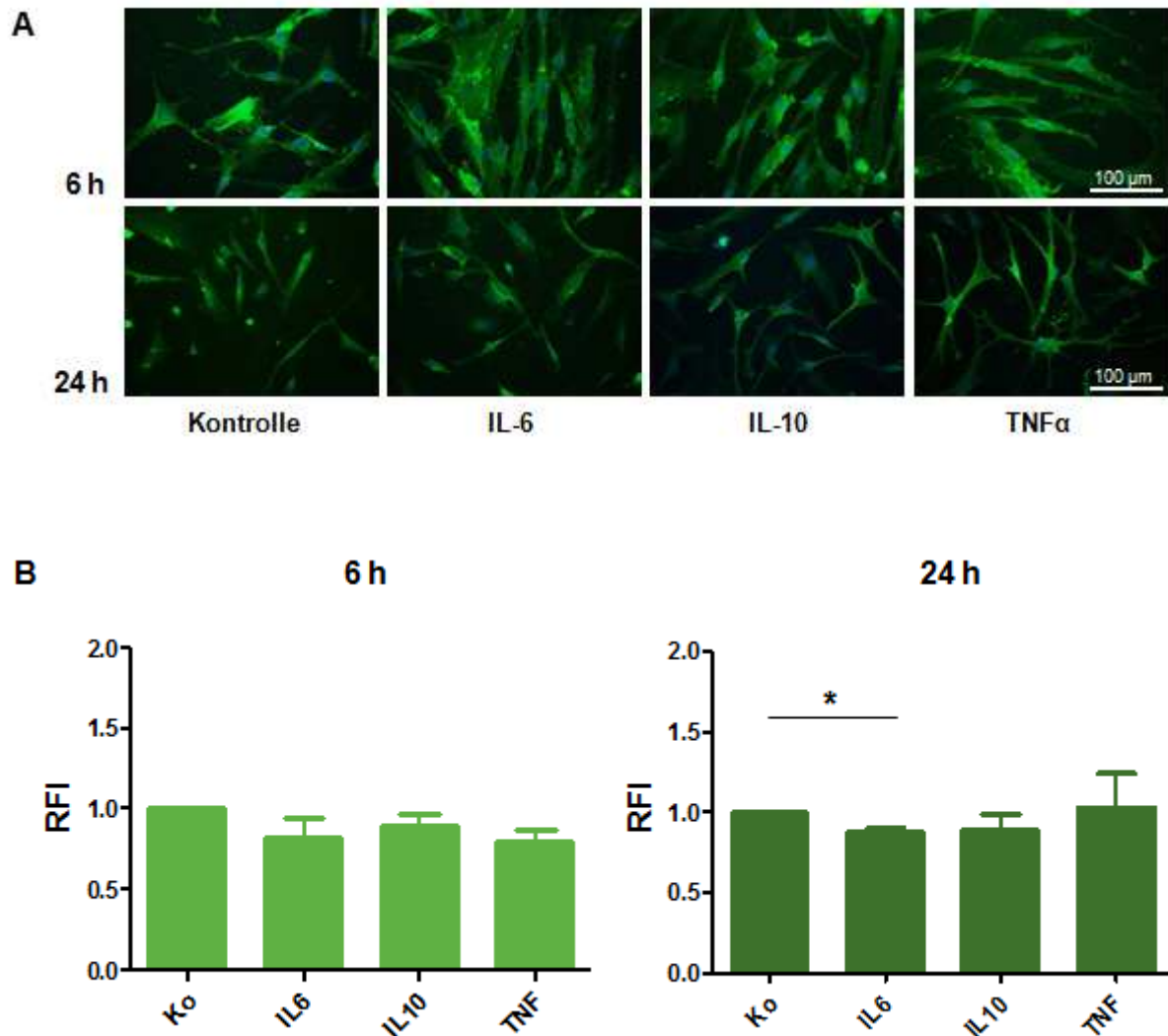
**Abbildung 22 A-B** C5aR-Proteinexpression in kultivierten Tendozyten. **A** Gezeigt ist die immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung der C5aR-Proteinexpression (grün) kultivierter Tendozyten eines repräsentativen Versuches nach 6- und 24-stündiger Stimulation mit den Zytokinen IL-6, IL-10 und TNF $\alpha$  (jeweils 10 ng/ml). Die Zellkerne sind mittels DAPI-Färbung blau angefärbt. **B** Die relative Fluoreszenzintensität (RFI) als Maß der C5aR-Proteinexpression wurde gegen die Stimulationen aufgetragen (6 h: n=2; 24 h: n=3).

#### 4.7.2 CD55-Proteinexpression

Die kultivierten Tendozyten aller untersuchten Spender exprimierten CD55 auf Proteinebene, wobei auch hier eine zytoplasmatische Immunmarkierung beobachtet werden konnte (Abbildung 23 A).



Alle Zytokinstimulationen führten nach 6-stündiger Stimulation zu einer leichten Suppression der CD55-Expression. Dieser supprimierende Effekt wurde auch nach 24 Stunden durch IL-10 und signifikant durch IL-6 ausgelöst. TNF $\alpha$  hingegen schien nach 24 Stunden keinen Einfluss mehr auf die CD55-Proteinexpression zu nehmen (Abbildung 23B).



**Abbildung 23 A-B** CD55-Proteinexpression in kultivierten Tendozyten. **A** Gezeigt ist die immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung der CD55-Proteinexpression (grün) kultivierter Tendozyten eines repräsentativen Versuches nach 6- und 24-stündiger Stimulation mit den Zytokinen IL-6, IL-10 und TNF $\alpha$  (jeweils 10 ng/ml). Die Zellkerne sind mittels DAPI-Färbung blau angefärbt. **B** Die relative Fluoreszenzintensität (RFI) als Maß der CD55-Proteinexpression wurde gegen die Stimulationen aufgetragen (6 h: n=2; 24 h: n=3).

## 5 Diskussion

Das Sehngewebe ist geprägt durch eine Hypozellularität, eine limitierte Blutversorgung und eine dichte EZM. Diese Charakteristika führen zu einer relativ schlechten Regenerationsfähigkeit des Gewebes und langen Heilungsphasen nach Sehnenverletzungen. Die Ätiologie der Sehnenpathologie ist sehr vielfältig. Vor allem aber Fehl- und Überbelastungen der Sehne während körperlicher Aktivität scheinen eine entscheidende Rolle in der Entstehung von Sehnenpathologien zu spielen. Die Fragestellung nach der Beteiligung einer inflammatorischen Komponente an der Ausbildung von Sehnenpathologien und posttraumatischen Folgeschäden ist noch nicht abschließend geklärt und wird kontrovers diskutiert. Eine wichtige Komponente des Immunsystems ist das Komplementsystem. Ob Faktoren des Komplementsystems in der Sehne exprimiert werden und ob es an der Ausbildung und Progression von Sehnenpathologien, am posttraumatischen Entzündungsprozess oder der Sehnenheilung beteiligt ist, wurde bisher noch nicht untersucht und ist völlig unklar. Grundsätzlich scheint eine Komplement-Beteiligung an Sehnenpathologien angesichts der Erkenntnisse über die Komplementexpression und -regulation in anderen Gewebearten durchaus möglich.

So konnte in verschiedenen Gewebe- und Zellarten eine Komplementaktivierung im Zuge von Pathologien – beispielsweise einer Medikamenten-induzierten Nephropathie in der Maus – bereits beobachtet werden <sup>[20]</sup>. Auch im Rahmen einer Medikamenten-induzierten Tendopathie, z.B. in Folge einer Therapie mit Fluorchinolonen, wäre daher eine Komplementaktivierung denkbar. Weiterhin scheint das Komplementsystems auch posttraumatisch, beispielsweise nach einem Schädelhirntrauma, vermehrt aktiviert zu werden und könnte daher eine entscheidende Rolle in der Ausbildung posttraumatischer Folgeschäden spielen <sup>[92, 93]</sup>.

Wie bereits erwähnt, scheint die Maximal- oder Überbelastung der Sehne und die damit verbundene lokale Hypoxie sowie die Bildung freier Radikale im Zuge der anschließenden Reperfusion, ein wichtiger Auslöser für Schädigung und Degeneration des Gewebes zu sein <sup>[4, 13]</sup>. Die beschriebene Ischämie und anschließende Reperfusion ist ein Pathomechanismus, der vielen Leiden zugrunde

liegt und eine Schädigung des betroffenen Gewebes induziert <sup>[62]</sup>. Seit einigen Jahren ist bekannt, dass im Zuge dieser Ischämie/Reperfusion (IR) das Komplementsystem aktiviert wird <sup>[62]</sup>. In mehreren Gewebearten bzw. Organsystemen, wie Muskulatur, Myokard, Darm, Niere und Gehirn konnte mittlerweile die Aktivierung des Komplementsystems als hauptsächliche Ursache der Gewebsschädigung, die im Zuge einer IR auftritt, identifiziert werden <sup>[62]</sup>. Es zeigte sich beispielsweise in einem Tiermodell eine vermehrte Ablagerung von C3 sowie Immunglobulin M (IgM), einem potentiellen Aktivator des klassischen Komplementaktivierungsweges, an geschädigten Muskelfasern nach einer IR der Skelettmuskulatur <sup>[62]</sup>. Des Weiteren zeigten C4-defiziente und Immunglobulindefiziente Mäuse eine Resistenz gegen die IR und bildeten keine Schädigung in der betroffenen Skelettmuskulatur aus <sup>[62]</sup>. Die in der stark belasteten Sehne häufig auftretende Ischämie und anschließende Reperfusion könnte daher möglicherweise auch im Sehnengewebe zu einer Komplementaktivierung und der Ausbildung von Gewebsschädigungen führen.

Aufgrund der genannten Erkenntnisse scheint eine Beteiligung des Komplementsystems an der Entstehung von Tendopathien und/oder posttraumatischen Folgeschäden durchaus denkbar. Wird ein überaktives Komplementsystem als Bestandteil der Ätiologie dieser identifiziert, könnte in der medikamentösen Hemmung der Komplementaktivierung, beispielsweise in Form des C5-Antikörpers Eculizumab, der bereits bei der PNH Anwendung findet, eine Therapieoption bestehen <sup>[89]</sup>.

### **5.1 Genexpression der untersuchten Komplementfaktoren in nativer Sehne und kultivierten humanen Tendozyten**

Da es noch keinerlei Informationen zu der Expression von Komplementfaktoren in der Sehne bzw. kultivierten Tendozyten gab, musste zunächst analysiert werden, ob regulatorische Komponenten wie die Anaphylatoxinrezeptoren C3aR und C5aR und die CRPs CD35, CD46, CD55 und CD59 überhaupt exprimiert werden.

Da es in diesem ersten wichtigen Teil der Arbeit nicht darum ging Expressionsunterschiede zwischen verschiedenen Spendern zu untersuchen, sondern lediglich darum einen Eindruck über die Komplementexpression und einen möglichen Expressionsunterschied zwischen nativer Sehne und kultivierten Tendozyten zu erhalten, wurde aus RNA von nativer Sehne dreier Sehngewebsstücke von insgesamt zwei verschiedenen Spendern bzw. von kultivierten Tendozyten dreier verschiedener Spender zu gleichen Anteilen ein Pool hergestellt.

Der erfolgreiche Nachweis der Expression aller untersuchten Komplementfaktoren in der nativen Sehne war Grundbaustein der weiteren Arbeit und zeigt an, dass das Komplementsystem in der Sehne präsent ist. Auch die kultivierten Tendozyten exprimierten – mit Ausnahme von CD35 – den Großteil der untersuchten Komplementfaktoren. Quantitativ zeigte sich eine stärkere Expression aller Komplementfaktoren im nativen Gewebe, wobei zum Teil große Expressionsunterschiede, vor allem in Hinblick auf C5aR, bestanden. Grundsätzlich kann die stärkere Genexpression *in vivo* und die nicht detektierbare CD35-Genexpression *in vitro* durch mehrere Ursachen bedingt sein und verschiedene Erklärungsansätze kommen dafür in Betracht.

Zum einen könnte die dreidimensionale Anordnung der Sehnenzellen möglicherweise Einfluss auf die Genexpression von Komplementfaktoren *in vivo* nehmen und die planare Anordnung der Tendozyten im zweidimensionalen Monolayer den Verlust der CD35-Genexpression erklären. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurden zusätzlich Tendozyten aus dreidimensionalen 14 und 28 Tage alten Massenkulturen auf eine CD35-Expression hin untersucht. Jedoch exprimierten auch diese Tendozyten kein CD35. Eine nicht detektierbare CD35-Genexpression scheint nicht nur ein Phänomen von kultivierten Tendozyten zu sein. Auch in zweidimensional-kultivierten Knorpelzellen konnte eine CD35-Expression nicht nachgewiesen werden <sup>[53]</sup>. Hierbei ist aber anzumerken, dass nicht bekannt ist, ob CD35 im nativen Knorpel exprimiert wird. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit konnten Halme und Kollegen selbst in frisch isolierten nativen primären Hepatozyten keine CD35-Gen- oder Proteinexpression detektieren <sup>[52]</sup>.

Grundsätzlich schließt die durch 3D-Kultivierung nicht induzierbare CD35-Expression aber nicht aus, dass die räumliche Anordnung die stärkere Genexpression der anderen Komplementfaktoren im nativen Gewebe bedingt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Anordnung der Sehnenzellen Einfluss auf die Genexpression nimmt und Expressionsunterschiede zwischen der *in vivo*- und *in vitro*-Expression bestehen. So offenbarten sich beispielsweise in der Arbeit von Stoll und Kollegen Unterschiede in der Expression von Decorin, COMP und dem sehnen-spezifischen Transkriptionsfaktor Scleraxis sowie der Kollagen-Typ-I-Expression in zweidimensional kultivierten Tendozyten gegenüber der nativen Sehne <sup>[101]</sup>. Dieser als Dedifferenzierung bezeichnete Prozess kann im Zuge einer Monolayer-Kultivierung von Tendozyten beobachtet werden und umfasst nicht nur einen Shift im Expressionsprofil sondern auch phänotypische Veränderungen der Tendozyten sowie eine Abnahme der Zelldichte <sup>[102, 103]</sup>. Durch den Einsatz von dreidimensionalen Kultursystemen konnte dieser Expressionsshift in der Arbeit von Stoll und Kollegen vermindert und somit eine Differenzierung der kultivierten Tendozyten zu Sehnen-ähnlichem Gewebe gefördert werden <sup>[101]</sup>.

Zusätzlich scheint neben der Kultivierung an sich, auch die Anzahl der Passagierungen Einfluss auf Tendozyten zu nehmen. Van den Berg und Kollegen konnten in ihrer Arbeit an Endothelzellen des Schweins sowohl eine Verringerung der CD59-Expression um 20 % sowie eine vermehrte Komplement-Anfälligkeit der Endothelzellen über 5 Passagen einer *in vitro*-Kultivierung beobachten <sup>[104]</sup>. Da die für die vorliegende Genexpressionsanalyse eingesetzten kultivierten Tendozyten ebenfalls recht hohe Passagenzahlen (Passage 5 bzw. 6) aufwiesen, scheint der Verlust bzw. Abnahme der Genexpression über die Passagen möglich.

Im Zuge der Kultivierung könnte ferner der O<sub>2</sub>-Gehalt die Expression der Tendozyten *in vitro* beeinflusst haben. Grundsätzlich ist das Sehnen-gewebe, wie bereits beschrieben, ein schlecht vaskularisiertes Gewebe und die Tendozyten sind daher an eine O<sub>2</sub>-arme Umgebung gewöhnt <sup>[105]</sup>. Dass der O<sub>2</sub>-Gehalt während der Kultivierung Einfluss auf die Tendozytenproliferation und -expression nimmt, wurde bereits von Zhang und Kollegen beschrieben. In ihrer Arbeit zeigte sich eine stärkere Zellproliferation sowie eine verminderte Expression von MMP-1 und IL-6 in 2 % O<sub>2</sub>-Tendozytenkulturen gegenüber den mit 21 % O<sub>2</sub> kultivierten Tendozyten <sup>[105]</sup>.

Weiterhin scheint auch die Expression von Komplementfaktoren durch den O<sub>2</sub>-Gehalt beeinflussbar. Humane Gefäßendothelzellen exprimierten beispielsweise nach 48-stündiger Kultivierung mit 1 % O<sub>2</sub> das CRP CD35 gegenüber den normoxisch-kultivierten Gefäßendothelzellen vermehrt <sup>[81]</sup>. Da die Tendozytenkultivierung in der vorliegenden Arbeit mit Luftsauerstoff bei 5 % CO<sub>2</sub>-Zufuhr (ca. 20 % O<sub>2</sub>) erfolgte, scheint es denkbar, dass der O<sub>2</sub>-Gehalt die Komplementexpression der Tendozyten beeinflusst haben könnte.

Ein weiterer möglicher, nur *in vivo* existenter Einflussfaktor auf die Genexpression könnte die mechanische Beanspruchung der Tendozyten sein. Dass eine physiologische Beanspruchung die tendozytäre Expression und Sekretion beeinflusst, wurde bereits in mehreren Arbeiten beschrieben. So exprimierten mechanisch beanspruchte Tendozyten vermehrt MMPs, Kollagen Typ I und Typ III, Zytokine und Wachstumsfaktoren, wie IL-6, IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$ 1, PDGF, bFGF, IGF-1, sowie PGE<sub>2</sub> und COX-1 und -2 <sup>[3, 12, 13, 15, 17, 27, 42, 106-109]</sup>. Es scheint daher durchaus möglich, dass die mechanische Belastung *in vivo* direkt oder durch die Induktion von Wachstumsfaktoren und Zytokinen die Komplementexpression der Tendozyten beeinflusst haben könnte.

Das in dieser Arbeit verwendete Sehngewebe wurde während Kreuzbandersatzoperationen gewonnen und stammt somit von Patienten, die eine akute oder chronische Kreuzbandschädigung erlitten haben. Meist wird ein Kreuzbandersatz nach einer Ruptur des vorderen Kreuzbandes notwendig. Sobald wie möglich wird nach der Kreuzbandruptur zunächst jedoch mit einer konservativen Therapie in Form einer Remobilisation des Patienten durch Physiotherapie begonnen. Erst wenn diese versagt oder der Patient durch ein junges Alter besonders gefährdet ist, im weiteren Verlauf Sekundärschäden an Menisken und Gelenkknorpel zu erleiden, wird meist 6 Wochen nach Trauma eine OP angestrebt (Erfahrungswert der Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie, Charité Campus Benjamin Franklin). Im Vordergrund der konservativen Therapie steht vor allem eine Stärkung der Muskulatur zur Kompensation der Knieinstabilität. Die Hamstringmuskulatur ist eine wichtige Muskelgruppe, die nach einer Kreuzbandruptur vermehrt beansprucht wird und für das Wiederherstellen einer gewissen Stabilität des Kniegelenks unabdingbar ist <sup>[110]</sup>. Hurd und Kollegen konnten

in ihrer Arbeit zeigen, dass die Hamstringmuskulatur in Patienten mit vorderen Kreuzbandrupturen während des Gehens auf der verletzten Seite – verglichen mit der unverletzten Seite – eine größere Muskelaktivität zeigt und somit die Hamstringmuskulatur und –sehnen eine kompensatorische Mehrbelastung erfahren<sup>[110]</sup>. Wie bereits erwähnt, nimmt eine mechanische Belastung zumindest *in vitro* Einfluss auf die tendozytäre Expression und führt u.a. zu einer vermehrten Freisetzung von Zytokinen wie IL-1 $\beta$  und TGF- $\beta$ 1 im Sehngewebe. Natürlich könnte diese Mehrbelastung der Hamstringsehnen vor der OP auch die Genexpression der Komplementfaktoren beeinflusst haben und unterstreicht erneut den möglichen Einfluss mechanischer Beanspruchung des Sehngewebes auf die Genexpression *in vivo*. Da durch eine gesteigerte mechanische Belastung des Sehngewebes im Zuge der Remobilisation u.a. die Zytokine IL-1 $\beta$  und TGF- $\beta$ 1 induziert werden, könnte der Einfluss dieser Zytokine eine entscheidende Rolle für die Komplementexpression *in vivo* spielen<sup>[17, 109]</sup>. Der Einfluss von Zytokinen auf die Genexpression der untersuchten Komplementfaktoren wurde im weiteren Verlauf der Arbeit durch *in vitro* – Zytokinstimulationsversuche intensiv untersucht und wird an anderer Stelle ausgiebig diskutiert. IL-1 $\beta$  und TGF- $\beta$ 1 kamen in diesen Zytokinstimulationsversuchen jedoch nicht zum Einsatz, sodass die Effekte der beiden Zytokine auf die Komplementexpression in anderen Zell- und Gewebearten bereits an dieser Stelle erörtert wird<sup>[52, 53, 55-57, 59, 111, 112]</sup>.

Für das proinflammatorische Zytokin IL-1 $\beta$  wurde bereits in vielen Zellarten eine Induktion von Komplementfaktoren beschrieben. So konnte durch eine IL-1 $\beta$ -Stimulation die Expression des Anaphylatoxinrezeptors C5aR und der CRPs CD46, CD55 und CD59 in Chondrozyten, CD55 und CD59 in Hepatozyten, CD55 in Gefäßendothelzellen sowie CD59 in glomerulären Epithelzellen induziert werden<sup>[52, 53, 55-57]</sup>. Auch für den Wachstumsfaktor TGF- $\beta$ 1 sind induzierende Effekte auf die Komplementexpression bekannt. TGF- $\beta$ 1 induziert beispielsweise eine CD46- und CD59-Expression in Keratinozyten sowie CD59 in glomerulären Epithelzellen<sup>[55, 112]</sup>. Die Wirkung von IL-1 $\beta$  und TGF- $\beta$ 1 auf die Tendozyten *in vivo* könnte daher ebenfalls zu dem zum Teil großen Expressionsunterschied der untersuchten Komplementfaktoren zwischen nativem Sehngewebe und kultivierten Tendozyten beigetragen haben. Grundsätzlich könnten IL-1 $\beta$  und TGF- $\beta$ 1 auch für die Genexpression von CD35 *in vivo* bzw. ihre Abwesenheit für die fehlende CD35-

Expression *in vitro* verantwortlich sein. Der Effekt der beiden Zytokine auf die CD35-Expression wurde bisher allerdings nur spärlich untersucht. Lediglich in einer Arbeit mit neutrophilen Granulozyten wurde ein induzierender Effekt von IL-1 $\beta$  auf die CD35-Expression beobachtet <sup>[111]</sup>. Ob IL-1 $\beta$  oder TGF- $\beta$ 1 tatsächlich in der Lage sind, eine CD35-Expression in Tendozyten zu induzieren, wäre eine mögliche Fragestellung für zukünftige Untersuchungen.

Im folgenden Abschnitt der Arbeit wurden neben Tendozyten zusätzlich Blutzellen auf eine Expression der Komplementfaktoren untersucht und somit die Tatsache berücksichtigt, dass sich zum Zeitpunkt der RNA-Isolierung auch weitere Zellarten, wie beispielsweise Blutzellen, im Gewebe befinden. Die aus dem nativen Sehngewebe gewonnene RNA ist somit keine reine Tendozyten-RNA, was ebenfalls ein möglicher Erklärungsansatz für die detektierten Expressionsunterschiede darstellen könnte.

## **5.2 Genexpression der untersuchten Komplementfaktoren in PBMCs und Granulozyten**

Zum Zeitpunkt der RNA-Isolierung befinden sich nicht nur Tendozyten im nativen Gewebe, sondern in geringer Menge (5-10 %) auch weitere Zellarten, wie Blut-, Gefäßendothel-, Gefäßmuskel-, Knorpel- und Synovialzellen <sup>[2-4, 7-9]</sup>. Diese zusätzlichen Zellarten können vor der RNA-Isolation nicht vollständig aus dem Gewebe entfernt werden, sodass ihre RNA zwangsläufig mitisoliert wird und somit in Form von Fremdzell-RNA in den gewonnenen Sehnenzell-RNA-Pool eingeht.

Um abschätzen zu können, ob das Vorhandensein von Blut- bzw. Entzündungszellen im Sehngewebe zum Zeitpunkt der RNA-Isolation Einfluss auf die Genexpressionsergebnisse der native Sehne genommen hat, wurden zusätzlich auch Granulozyten, wobei es sich fast ausschließlich um Neutrophile handelte, und PBMCs (Monozyten, Lymphozyten, Makrophagen) auf eine Genexpression der untersuchten Komplementfaktoren getestet. Weil neutrophile Granulozyten und PBMCs die quantitativ wichtigsten Entzündungszellen sind und sich auch im Zuge



einer Entzündungsantwort, beispielsweise nach einem Trauma, vermehrt im Gewebe ansammeln, konzentrierten sich die Analysen auf diese Zellarten <sup>[4, 8, 10]</sup>.

Die Anaphylatoxinrezeptoren C3aR und C5aR sowie die CRPs CD35 und CD55 waren dabei in Leukozyten, besonders in den Neutrophilen stärker, die CRPs CD46 und CD59 schwächer exprimiert als in der nativen Sehne. Die detektierte Expression der Anaphylatoxinrezeptoren und CRPs durch PBMCs und Neutrophile bestätigt die Ergebnisse anderer Arbeiten. So wurde bereits eine C3aR- und C5aR-Expression in Monozyten und Neutrophilen sowie eine Expression der CRPs in Monozyten, Lymphozyten und Neutrophilen beschrieben <sup>[51, 54, 59, 77, 78, 82, 113-115]</sup>.

Da die untersuchten Entzündungszellen einige der Komplementfaktoren stärker exprimierten als das native Sehngewebe, ist nicht auszuschließen, dass der Nicht-Tendozyten-RNA-Anteil, beispielsweise aus Leukozyten, die Genexpressionsergebnisse *in vivo* beeinflusst hat. Grundsätzlich nehmen Blutgefäße jedoch gerade einmal 1-2 % der gesamten EZM ein <sup>[3, 9]</sup>. Vor diesem Hintergrund und aufgrund der Tatsache, dass die CRPs CD46 und CD59 in den Blutzellen schwächer exprimiert waren als im nativen Gewebe, scheint ein Einfluss der Nicht-Tendozyten-RNA auf die Genexpressionsergebnisse *in vivo* zwar möglich aber nicht der Hauptgrund für die detektierten Expressionsunterschiede sein zu können. Grundsätzlich muss dieser RNA-Anteil aber berücksichtigt werden und könnte am ehesten eine Erklärung für die CD35-Genexpression in nativem Sehngewebe sein.

Wahrscheinlicher als ein Einfluss von Nicht-Tendozyten-RNA auf die *in vivo* Genexpressionsergebnisse scheint der Kontakt der Tendozyten zu Zellen und Mediatoren des Blutes zu sein, wie er im Zuge einer Blutung bei Sehnenruptur beispielsweise auftreten kann. Wichtige Mediatoren des Blutes sowie Sekretionsprodukte von Leukozyten sind proinflammatorische und immunregulatorische Zytokine. Um die Hypothese eines möglichen Einflusses von Zytokinen auf die Komplementexpression der Tendozyten zu untersuchen, wurden im sich anschließenden Hauptteil der Arbeit Zytokinstimulationsexperimente mit kultivierten Tendozyten durchgeführt.

### **5.3 Einfluss humaner rekombinanter Zytokine auf die Expression der untersuchten Komplementfaktoren in kultivierten humanen Tendozyten**

Zytokine besitzen multiple, insbesondere proinflammatorische bzw. immunregulatorische Wirkungen. Wichtige Schlüssel-Zytokine sind dabei TNF $\alpha$ , IL-6 und IL-10. Welche Rolle diese Zytokine im Sehngewebe spielen, ist bisher nur unvollständig untersucht. Lin und Kollegen lieferten in ihrer Arbeit Hinweise dafür, dass IL-6 Einfluss auf die biomechanischen Eigenschaften des Sehngewebes nimmt und eine Rolle in der Sehnenheilung spielen könnte<sup>[43, 44]</sup>. Vor allem die Arbeit von John und Kollegen lieferte erstmals umfassendere Erkenntnisse über den Einfluss dieser Zytokine auf die Gen- und Proteinexpression der Tendozyten<sup>[30]</sup>. Ob die genannten Zytokine auch in der Lage sind die tendozytäre Expression von Komplementfaktoren zu beeinflussen, war bisher noch völlig unklar. Grundsätzlich stellt das Komplementsystem aber einen geeigneten Ansatzpunkt für die Regulation der Immunantwort durch Zytokine dar, sodass eine Wechselbeziehung dieser beiden wichtigen Komponenten des Immunsystems, wie sie bereits in einigen anderen Zell- und Gewebearten gezeigt werden konnte, auch im Sehngewebe denkbar scheint.

Zur Klärung dieser Hypothese wurden kultivierte Tendozyten mit den genannten Zytokinen bzw. Kombinationen dieser stimuliert und anschließend die Gen- und Proteinexpression der untersuchten Komplementfaktoren analysiert. Es wurde dabei stets eine Zytokinkonzentration von 10 ng/ml eingesetzt. Ob diese gewählte Zytokinkonzentration, die am besten geeignetste ist und die physiologischen Bedingungen am ehesten widerspiegelt, kann nicht abschließend beantwortet werden. Grundsätzlich ist nicht bekannt, welche Zytokinkonzentrationen unter physiologischen Bedingungen im Sehngewebe vorliegen oder im Rahmen einer Entzündungsantwort im Sehngewebe lokal erreicht werden können. Eine Messung dieser im Gewebe scheint aufgrund der z.T. kurzen Halbwertszeit der Zytokine schwierig. Eine Bestimmung der Konzentration im Blut ist ebenfalls nicht ergebnisführend, da diese wahrscheinlich nicht exakt die Gewebskonzentration widerspiegelt, die aufgrund einer lokalen Zytokinexpression durch aktivierte Tendozyten in der Sehne, wie durch John und Kollegen auf Genexpressionsebene gezeigt, wesentlich höher sein könnte<sup>[30]</sup>. Konzentrationsabhängige

Stimulationsexperimente mit TNF $\alpha$  an Tendozyten, die in der Arbeitsgruppe selbst durchgeführt wurden, zeigten, dass sich die Effekte der eingesetzten Konzentrationen von 1-100 ng/ml auf die Kollagen-Typ-I-Proteinexpression nicht signifikant unterschieden. Furebring und Kollegen untersuchten in ihrer Arbeit an Granulozyten und Monozyten u.a. den Einfluss verschiedener TNF $\alpha$ -Konzentrationen auf die C5aR-Expression, wobei auch hier kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Konzentrationen bestand <sup>[51]</sup>.

Es wurde daher in der vorliegenden Arbeit mit einer mäßig hohen Zytokinkonzentration von 10 ng/ml gearbeitet, wie sie entsprechend der Fachliteratur für vergleichbare Untersuchungen verwendet wurde <sup>[29, 30, 54, 116]</sup>.

### **5.3.1 Einfluss von Zytokinen auf die Expression der Anaphylatoxinrezeptoren C3aR und C5aR**

Zu Beginn wurde zunächst der Einfluss der eingesetzten Zytokine auf die Expression der Anaphylatoxinrezeptoren C3aR und C5aR untersucht.

Dabei zeigte sich eine deutliche C3aR-Induktion durch TNF $\alpha$  und den Kombinationen aus TNF $\alpha$  mit IL-6 bzw. IL-10. Dass TNF $\alpha$  die Expression des C3aR induziert, wurde bereits durch Helske und Kollegen beschrieben, die nach einer 24-stündigen TNF $\alpha$ -Stimulation von Kardiomyozyten eine 10-fache Expressionssteigerung des C3aR beobachtet haben <sup>[117]</sup>. In der vorliegenden Arbeit umfasste die C3aR-Expressionssteigerung durch TNF $\alpha$  sogar das etwa 18-fache nach 24-stündiger- bzw. das 21-fache des Kontrollniveaus nach 48-stündiger Expression. Neben TNF $\alpha$  scheinen weitere Zytokine die Expression von C3aR induzieren zu können (Tabelle 5) <sup>[59, 119-121]</sup>.

**Tabelle 5** Darstellung des Einflusses von Stimulationen, Zytokinen und systemischen Reaktionen auf die C3aR-Expression in verschiedenen Zell- und Gewebearten. Hervorgehoben sind die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Zytokinstimulationen.

Stimulation/Zytokine	Effekt	Zell- oder Gewebeart	Referenz
<b>IL-10</b> , IL-1 $\alpha$	↑	humane Monozyten	[54, 59]
<b>TNF<math>\alpha</math></b> , Inflammation, Zigarettenrauch	↑	humane Myofibroblasten	[117]
IFN- $\gamma$	↑	humane myeloblastische Zelllinien	[119]
IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , PGE <sub>2</sub>	↑	humane dendritische Zellen	[120]
IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$	↑	humane umbilikale Endothelzellen	[121]
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	↓	humane dendritische Zellen	[120]

Wie bereits erwähnt, nahm mit der Stimulationsdauer auch die C3aR-Expression unter TNF $\alpha$  und den TNF $\alpha$ -Kombinationen zu. Dabei fiel vor allem ein größerer Expressionsunterschied zwischen dem 6- und 24-Stunden-Zeitpunkt auf, der unter den TNF $\alpha$ -Kombinationen signifikant war. Erklären könnte sich dieser Expressionsunterschied durch die induktiven Effekte des TNF $\alpha$  auf die Tendozyten. Durch die Arbeit von John und Kollegen ist bekannt, dass TNF $\alpha$  zunächst seine eigene Genexpression induziert, was die stärkere Expressionssteigerung nach 6-stündiger im Vergleich zu 24-stündiger Stimulation erklären könnte, sowie hauptsächlich nach 24-stündiger Stimulation die Expression von IL-6 und IL-10 verstärkt <sup>[30]</sup>. Weiterhin induziert TNF $\alpha$  die Expression des IL-10-R1 in humanen sowie den TNFR1 in equinen Tendozyten <sup>[29, 30]</sup>. Turner und Kollegen konnten in ihrer Arbeit an humanen Kardiomyozyten zeigen, dass der Einsatz von TNFR1-Antikörpern die TNF $\alpha$ -induzierte IL-6-, IL-1 $\alpha$ - und IL-1 $\beta$ -Genexpression inhibiert, während TNFR2-Antikörper lediglich die Genexpression von IL-1 $\alpha$  beeinflussten <sup>[122]</sup>. Es deutet sich daher an, dass vor allem der TNFR1, der in der Arbeit von Hosaka und Kollegen durch TNF $\alpha$  induziert werden konnte, für die TNF $\alpha$  induzierte Zytokinexpressionssteigerung verantwortlich zu sein scheint <sup>[29]</sup>. Grundsätzlich könnte sich die gegenüber dem 6 Stunden-Zeitpunkt erhöhte C3aR-Genexpression nach 24 und 48 Stunden daher u.a. auch durch die Induktion von Zytokinrezeptoren und „sekundären“ Zytokinen durch TNF $\alpha$  und den möglichen Einfluss dieser auf die C3aR-Expression erklären.

Zwischen den Auswirkungen der Einzelstimulation mit TNF $\alpha$  und den TNF $\alpha$ -Kombinationen mit IL-6 bzw. IL-10 auf die Sehnenzellen bestanden zu allen Zeitpunkten nur marginale, nicht signifikante Unterschiede. Weiterhin hatten die Zytokine IL-6 bzw. IL-10 allein keinen Einfluss auf die C3aR-Expression der Tendozyten. Diese Beobachtungen deuten an, dass die C3aR-Expressionssteigerung vor allem durch TNF $\alpha$  getragen ist und die zunehmende Expression über die Stimulationsdauer durch die Zytokin-induzierenden Effekte des TNF $\alpha$  erklärt werden könnte<sup>[10, 30]</sup>. Grundsätzlich könnten die fehlenden Effekte des IL-6 bzw. IL-10 auch ein Hinweis darauf sein, dass TNF $\alpha$  möglicherweise neben IL-6 und IL-10 andere Zytokine induziert und diese für die C3aR-Genexpressionsteigerung über die Stimulationszeit mitverantwortlich sein könnten. Denkbar wäre beispielsweise eine Induktion von Interferonen (IFN) durch TNF $\alpha$ , wie es für andere Zell- und Gewebearten bereits bekannt ist<sup>[123]</sup>. Interferone üben in anderen Zellarten einen induktiven Effekt auf die C3aR-Expression aus (Tabelle 5). Auch im Knorpelgewebe, das wie die Sehne mesenchymalem Ursprungs ist, konnte bereits ein stimulierender Effekt des IFN- $\gamma$  auf die Synthese von Komplementfaktoren beobachtet werden<sup>[116]</sup>. Ferner ist die Existenz von IFN- $\gamma$  in Sehnengewebe bereits durch Hosaka und Kollegen nachgewiesen worden<sup>[124]</sup>. Ob TNF $\alpha$  allerdings einen induktiven Effekt auf die IFN-Expression in Tendozyten hat, ist rein hypothetisch und erfordert weitere Untersuchungen.

Die Wirkungen, die die eingesetzten Zytokine auf die C3aR-Genexpression ausübten, spiegelten sich in der C5aR-Genexpression nicht wieder. Hier zeichnete sich eine grundsätzlich andere Regulation ab. Die Kombinationsstimulationen supprimierten – im Gegensatz zur C3aR-Genexpression – die C5aR-Expression nach 24- bzw. 48-stündiger Stimulation signifikant. Die Zytokine allein nahmen sowohl auf Gen- als auch Proteinebene nur geringen Einfluss. Aufgrund dieser geringen Effekte durch die einzelnen Zytokine selbst und den signifikanten Unterschieden zu den Kombinationsstimulationen deutete sich an, dass die Effekte der Kombinationsstimulationen hier nicht, wie bei der C3aR-Expression durch ein Zytokin allein getragen wurden, sondern eher durch ein Zusammenspiel der Zytokine entstanden. Im zeitlichen Verlauf konnte eine Abnahme der C5aR-Genexpression unter allen Stimulationen mit zunehmender Stimulationsdauer beobachtet werden.

In der Fachliteratur ist mehrfach beschrieben worden, dass C5aR vor allem unter inflammatorischen und pathologischen Bedingungen in vielen Zell- und Gewebearten vermehrt exprimiert wird (Tabelle 6) <sup>[125-129]</sup>. In einigen dieser inflammatorischen Reaktionen wurden die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Zytokine TNF $\alpha$  und IL-6 als mitverantwortlich für die verstärkte C5aR-Expression oder als Induktoren dieser identifiziert. Stahel und Kollegen beschrieben beispielsweise eine signifikant geringere C5aR-Expression der ZNS-Neurone in TNF/Lymphotoxin- $\alpha$  Knock-out-Mäusen nach Listeria-Infektion bzw. nach traumatischer Hirnverletzung gegenüber dem Wildtyp <sup>[128]</sup>. Riedemann und Kollegen lieferten durch Untersuchungen an einem Tiermodell Beweise dafür, dass die während einer Sepsis beobachtete verstärkte C5aR-Expression durch IL-6 vermittelt wird. Die Gabe eines IL-6-Antikörpers (Anti-IL-6) resultierte in einer verminderten C5aR-Expression in Lungen-, Nieren-, Leber- und Herzgewebe sowie einer signifikant verbesserten Überlebensrate der Tiere, die dabei eine Abhängigkeit zur applizierten Menge an Anti-IL-6 zeigte <sup>[131]</sup>.

Diese induzierenden Effekte auf die C5aR-Expression durch TNF $\alpha$  und IL-6 konnten in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Grundsätzlich scheinen die proinflammatorischen Zytokine – zumindest TNF $\alpha$  – nicht in jeder Zell- bzw. Gewebeart gleiche Effekte auf die C5aR-Expression auszuüben (Tabelle 6). Die in der vorliegenden Arbeit detektierte Abnahme der C5aR-Expression unter alleiniger TNF $\alpha$ -Stimulation könnte durch den bereits erwähnten Zytokin-induzierende Effekt des TNF $\alpha$  bedingt sein. Da die C5aR-Suppression unter den Einzelzytokinstimulationen nicht signifikant war, scheint, wie bereits erwähnt, für die Suppression der C5aR-Expression über die Stimulationsdauer die Kombination aus mehreren Zytokinen notwendig zu sein. Leider lassen sich in der Fachliteratur keine Angaben zu Effekten der verwendeten Zytokinkombinationen auf die C5aR-Expression in anderen Zell- und Gewebearten finden.

**Tabelle 6** Darstellung des Einflusses von Stimulationen, Zytokinen und systemischen Reaktionen auf die C5aR-Expression in verschiedenen Zell- und Gewebearten. Hervorgehoben sind die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Zytokinstimulationen.

Stimulation/Zytokine	Effekt	Zell- oder Gewebeart	Referenz
IL-1 $\alpha$	↑	humane Monozyten	[59]
PGE <sub>2</sub>	↑	humane dendritische Zellen	[60]
Sepsis	↑	murines Lungen-, Leber-, Nieren- und Herzgewebe	[76]
IFN- $\gamma$	↑	humane myeloblastische Zelllinien	[119]
Exposition von Zigarettenrauch	↑	humanen Bronchialepithelzellen	[125]
Inflammation, im Zuge verschiedener Pathologien	↑	humane Astrozyten und Mikroglia (ZNS)	[126]
<b>IL-6</b> , LPS-Injektion	↑	murine Hepatozyten	[127]
Listeria-Meningitis, traumatische Kopfverletzung (jeweils vermittelt durch TNF/Lymphotoxin- $\alpha$ )	↑	murine ZNS-Neurone	[128, 129]
<b>TNF<math>\alpha</math></b> , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$	-	humane Astrozyten, Oligodendrozyten und Neurone (ZNS)	[126]
<b>TNF<math>\alpha</math></b> , IFN- $\gamma$	↓	humane dendritische Zellen	[60]
Polytrauma	↓	humane Monozyten und Neutrophile	[77]

Die vorliegende Arbeit beweist, dass Tendozyten die Anaphylatoxinrezeptoren C3aR und C5aR exprimieren und diese Expression durch Zytokine beeinflusst werden kann. Durch die Expression der Rezeptoren könnten Tendozyten natürlich auch in der Lage sein die Liganden dieser Rezeptoren – C3a und C5a – zu binden. Grundsätzlich stellt sich dabei die Frage, welche Wirkungen C3a und C5a auf Tendozyten ausüben. Diese Frage kann aufgrund des jetzigen Wissensstands nur hypothetisch beantwortet werden und erfordert weitergehende Untersuchungen.

In anderen Zell- und Gewebearten ist die Wirkung der Anaphylatoxine bereits untersucht worden. So beeinflussen sie zum einen die Zytokinexpression, vor allem in Form einer Induktion von IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 und TNF $\alpha$ , zum anderen Zellprozesse, beispielsweise das Zytoskelett-Remodelling oder den Einbau von Adhäsionsmolekülen [57, 117, 121, 132-135]. Ferner reguliert C5a die Expression der eigenen Rezeptoren [113, 114]. Auch im Rahmen komplexer Gewebsreaktionen, wie beispielsweise Regenerations- oder Fibroseprozessen scheinen C3/C3a und C5/C5a eine entscheidende Rolle zu spielen. So zeigte sich eine Beteiligung von C3a und

C5a an der Regeneration von Lebergewebe nach partieller Hepatektomie bzw. toxischer Leberschädigung, die in C3- und C5-defizienten Mäusen durch eine verminderte Zellproliferation und eine geringere mitotische Aktivität der Hepatozyten, eingeschränkt war <sup>[136, 137]</sup>. Im Lungengewebe scheint C5 das Ausmaß der frühen Inflammation nach Bleomycin-induzierter Schädigung zwar begrenzen zu können, langfristig aber eher profibrotisch zu wirken und die Entwicklung einer chronischen Bleomycin-induzierten Lungenfibrose zu triggern <sup>[138]</sup>.

Die aufgeführten Erkenntnisse über die Wirkung und Funktionen der Anaphylatoxine in anderen Zell- und Gewebearten unterstreichen die Vielseitigkeit und Bedeutung dieser. Eine Wirkung der Anaphylatoxine auf die Tendozyten scheint denkbar und eine Prüfung dieser Hypothese in zukünftigen Untersuchungen sinnvoll und notwendig.

### **5.3.2 Einfluss von Zytokinen auf die Expression der CRPs CD46, CD55 und CD59**

Durch die Expression von CRPs kann sich die exprimierende Zelle nicht nur vor einer Komplement-induzierten Zellyse schützen, sondern – durch eine Hemmung der C3- und C5-Konvertase – auch die Komplementaktivierung in unmittelbarer Umgebung reduzieren. Um zu analysieren, welchen Einfluss Zytokine auf die tendozytäre Expression von CRPs haben, wurde mit Hilfe von Zytokinstimulationsexperimenten die Wechselbeziehung zwischen TNF $\alpha$ , IL-6 und IL-10 und der CRP-Expression untersucht.

Bereits zu Beginn der Arbeit gelang es nicht eine CD35-Expression in kultivierten Tendozyten nachzuweisen. Dabei wurden aber nicht nur in 3D-Konstrukten kultivierte Tendozyten sowie unstimulierte zweidimensional kultivierte Tendozyten auf eine CD35-Expression untersucht, sondern auch analysiert, ob durch eine Zytokinstimulation die CD35-Expression in zweidimensional kultivierten Tendozyten induziert werden kann, was nicht der Fall war. Wie bereits erwähnt, exprimierten primäre Hepatozyten sowie kultivierte Chondrozyten in den Arbeiten von Halme bzw. Hyc und Kollegen ebenfalls kein CD35 <sup>[52, 53]</sup>. Die Expression des CD35 wurde bisher



vor allem für verschiedene Zellen des Blutes sehr gut untersucht und vielfach bestätigt <sup>[45, 77, 80]</sup>. In diesen Zellen konnte zusätzlich auch eine Zytokin-abhängige Expression des CD35 beobachtet werden. So induzierte eine IL-10-Stimulation die CD35-Expression in Monozyten sowie die Stimulation mit TNF $\alpha$  bzw. IL-8 diese in Granulozyten <sup>[51, 54]</sup>. Ferner konnte die CD35-Expression durch die Arbeit von Collard und Kollegen für Gefäßendothelzellen bestätigt werden. Diese exprimierten CD35 nicht nur nach Hypoxie sondern auch nach TNF $\alpha$ -Stimulation verstärkt <sup>[81]</sup>. Sicherlich sollte man sich mit den in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnissen zur CD35-Expression in Tendozyten nicht zufrieden geben und in zukünftigen Untersuchungen weitere Einflussfaktoren betrachten. Weiteres zu möglichen Ansatzpunkten zukünftiger Untersuchungen wird im Ausblick dieser Arbeit diskutiert.

Im Gegensatz zu CD35 erfolgte eine Regulation der Expression der CRPs CD46, CD55 und CD59 durch die eingesetzten Zytokine.

Die CD46-Genexpression wurde dabei vor allem durch die IL-6-Stimulation sowie die Kombinationsstimulationen beeinflusst und nach 6- sowie 48-stündiger Stimulation supprimiert. TNF $\alpha$  übte keinen Effekt auf die CD46-Expression aus. Ferner bestanden signifikante Expressionsunterschiede zwischen TNF $\alpha$  und den Kombinationsstimulationen nach 6 und z.T. nach 48 Stunden, was andeuten könnte, dass die Suppression unter den Kombinationsstimulationen entweder aus dem Zusammenspiel beider Zytokine entstand oder durch das Interleukin getragen wurde. Grundsätzlich scheint CD46 ein CRP zu sein, das nicht immer durch die wichtigen proinflammatorischen und immunregulatorischen Zytokine in seiner Expression beeinflusst werden kann (Tabelle 7). Ferner zeigten sich abhängig von der Zellart und Zytokinstimulation sowohl induktive als auch supprimierende Effekte auf die CD46-Expression (Tabelle 7). Die in der vorliegenden Arbeit detektierte Suppression durch TNF $\alpha$ +IL-6 sowie der fehlende Einfluss einer alleinigen TNF $\alpha$ -Stimulation auf die CD46-Expression konnte dabei durch die Fachliteratur bestätigt werden <sup>[52, 55, 56, 58, 112, 118]</sup>.

**Tabelle 7** Darstellung des Einflusses von Stimulationen, Zytokinen und systemischen Reaktionen auf die CD46-Expression in verschiedenen Zell- und Gewebearten. Hervorgehoben sind die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Zytokinstimulationen.

Stimulation/Zytokine	Effekt	Zellart	Referenz
<b>TNF<math>\alpha</math></b> , IL-1 $\beta$ , IL-4	↑	humane Gelenkchondrozyten	[53]
TGF- $\beta$	↑	humane Keratinozyten	[112]
<b>TNF<math>\alpha</math></b> , <b>IL-6</b> , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$	-	primäre humane Hepatozyten	[52]
<b>TNF<math>\alpha</math></b> , <b>IL-6</b> , IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$	-	humane Glomeruloepithelzellen	[55]
<b>TNF<math>\alpha</math></b> , IL-1 $\beta$ , IL-4	-	humane Gefäßendothelzellen	[56]
<b>IL-6</b> , IFN- $\gamma$	-	humane Hepatomazellen	[58]
<b>TNF<math>\alpha</math></b> , <b>IL-6</b> , IL-1 $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2	-	humane Keratinozyten	[112]
<b>TNF<math>\alpha</math></b> , IL-1 $\alpha$ , IFN- $\gamma$	-	humane Bronchialepithelzellen	[118]
<b>IL-10</b>	↓	humane Monozyten	[54]
<b>TNF<math>\alpha</math></b> , IL-1 $\beta$ , <b>TNF<math>\alpha</math>+IL-6</b> (u.a.)	↓	humane Hepatomazellen	[58]
Polytrauma	↓	humane Monozyten, Neutrophile, Leukozyten	[77]

Ähnlich dem CD46 wurde auch die CD55-Genexpression durch die Kombinationsstimulationen nach 6 Stunden sowie durch IL-6 nach 6 und 48 Stunden supprimiert. Eine IL-6 induzierte CD55-Suppression konnte dabei auf Proteinebene bestätigt werden. TNF $\alpha$  übte erneut keinen Effekt auf die Genexpression aus. Ferner bestätigte sich durch signifikante Unterschiede zwischen den Einzelstimulationen und den Kombinationsstimulationen die Vermutung, dass die Suppression unter den Kombinationsstimulationen ein Zusammenspiel der Zytokine bzw. durch das Interleukin allein getragen sein muss.

Im Gegensatz zum CD46 wird für das CD55 in der Fachliteratur häufiger von Zytokinregulatorischen Effekten berichtet. Dabei handelt es sich meist um eine Expressionsverstärkung (Tabelle 8). Jedoch zeigte sich auch in einigen Zell- und Gewebearten kein Einfluss jeglicher Zytokinstimulationen auf die CD55-Expression (Tabelle 8).

Im zeitlichen Verlauf der CD55-Genexpression wurde in der vorliegenden Arbeit unter Interleukin-Stimulation ein CD46-ähnlicher Trend mit einem Expressionsmaximum nach 24 Stunden deutlich. Unter TNF $\alpha$  und den Kombinationsstimulationen hingegen nahm – wie schon bei der C3aR-Expression –

das Expressionsniveau mit der Stimulationsdauer zu. Diese Beobachtung wurde auch durch Spiller sowie Amara und Kollegen gemacht. Spiller *et al.* berichteten in ihrer Arbeit an Hepatomazellen von einer zunehmenden CD55-Expression mit der Stimulationsdauer unter einer Kombinationsstimulation aus TNF $\alpha$ , IL-6 und IL-1 $\beta$  [58]. Ferner konnte durch Amara und Kollegen in Neutrophilen polytraumatischer Patienten eine stetige CD55-Expressionszunahme bis 48 Stunden nach Polytrauma detektiert werden [77].

**Tabelle 8** Darstellung des Einflusses von Stimulationen, Zytokinen und systemischen Reaktionen auf die CD55-Expression in verschiedenen Zell- und Gewebearten. Hervorgehoben sind die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Zytokinstimulationen.

Stimulation/Zytokine	Effekt	Zellart	Referenz
<b>TNF<math>\alpha</math></b> , IL-1 $\beta$ , IL-1,	↑	humane Chondrozyten	[50, 53]
<b>TNF<math>\alpha</math></b> , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$	↑	humane primäre Hepatozyten	[52]
<b>IL-10</b>	↑	humane Monozyten	[54]
IL-1 $\beta$ , IL-4, LPS	↑	humane Gefäßendothelzellen	[56]
IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , <b>IL-6</b> +IL-1 $\beta$ , <b>TNF<math>\alpha</math></b> +IL-1 $\beta$ , <b>TNF<math>\alpha</math></b> + <b>IL-6</b> +IL-1 $\beta$	↑	humane Hepatomazellen	[58]
Polytrauma	↑	humane Monozyten und Neutrophile	[77]
<b>TNF<math>\alpha</math></b> , IFN- $\gamma$	↑	humane Bronchialepithelzellen	[118]
<b>IL-6</b>	-	humane primäre Hepatozyten	[52]
<b>TNF<math>\alpha</math></b> , <b>IL-6</b> , IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$	-	humane Glomeruloepithelzellen	[55]
<b>TNF<math>\alpha</math></b> , <b>IL-6</b> , TNF $\alpha$ +IL-6 (u.a.)	-	humane Hepatomazellen	[58]
<b>TNF<math>\alpha</math></b> , <b>IL-6</b> , IL-1 $\alpha$ , IL-2, TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$	-	humane Keratinozyten	[112]

Die CD59-Genexpression wurde durch die eingesetzten Zytokine nur in geringem Umfang und in uneinheitlicher Weise reguliert. Lediglich nach 24 Stunden zeigte sich eine signifikante Suppression durch IL-6 sowie eine Induktion durch die Kombination aus TNF $\alpha$ +IL-6. Spiller und Kollegen berichteten in ihrer Arbeit an Hepatomazellen ebenfalls von induktiven Effekten dieser Kombinationsstimulation auf die CD59-Expression [58]. Ferner sind in der Fachliteratur unterschiedliche Effekte von verschiedenen Stimulationen auf die CD59-Expression in anderen Zell- und Gewebearten beschrieben (Tabelle 9).

**Tabelle 9** Darstellung des Einflusses von Stimulationen, Zytokinen und systemischen Reaktionen auf die CD59-Expression in verschiedenen Zell- und Gewebearten. Hervorgehoben sind die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Zytokinstimulationen.

Stimulation/Zytokine	Effekt	Zellart	Referenz
<b>TNF<math>\alpha</math></b> , IL-1 $\beta$	↑	humane primäre Hepatozyten	[52]
<b>TNF<math>\alpha</math></b> , IL-1 $\beta$	↑	humane Chondrozyten	[53]
<b>IL-10</b>	↑	humane Monozyten	[54]
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	↑	humane Gefäßendothelzellen	[56]
<b>TNF<math>\alpha</math></b> , IL-1 $\beta$ , <b>TNF<math>\alpha</math>+IL-6</b> (u.a.)	↑	humane Hepatomazellen	[58]
Polytrauma	↑	humane Monozyten, Neutrophile und Leukozyten	[77]
TGF- $\beta$	↑	humane Keratinozyten	[112]
<b>TNF<math>\alpha</math></b> , <b>IL-6</b> , IL-1 $\alpha$ , IL-2, IFN- $\gamma$	-	humane Keratinozyten	[112]
<b>TNF<math>\alpha</math></b> , IL-1 $\alpha$ , IFN- $\gamma$	-	humane Bronchialepithelzellen	[118]

Grundsätzlich zeigt der aktuelle Wissenstand, dass das Komplementsystem in verschiedenen Gewebe- und Zellarten unterschiedlich exprimiert und auf unterschiedliche Art und Weise durch verschiedene Zytokine reguliert wird oder unbeeinflusst bleibt. Es scheint daher schwierig eine allgemein gültige Aussage über den Einfluss von Zytokinen auf die Komplementexpression zu formulieren und sollte für jede Zell- und Gewebeart getrennt betrachtet werden.

In Tendozyten zeigte sich vor allem eine durch TNF $\alpha$  getragene C3aR-Induktion. Grundsätzlich ist noch nicht bekannt, was eine vermehrte C3aR-Expression für Tendozyten bedeutet bzw. welche Wirkung C3a auf Tendozyten ausübt, sodass dem TNF $\alpha$  zum jetzigen Zeitpunkt diesbezüglich keine anabole oder katabole Funktion zugesprochen werden kann. Die Effekte des TNF $\alpha$  auf C5aR und den CRPs waren von geringem Ausmaß. Es deutete sich jedoch an, dass TNF $\alpha$  zumindest die supprimierende Wirkung des IL-6 auf die Expression der CRPs mit zunehmender Stimulationsdauer neutralisieren kann, was dem TNF $\alpha$  tendenziell eine zellschützende Wirkung zu sprechen würde.

IL-6 wirkte hauptsächlich auf die CRP-Expression und suppressierte alle untersuchten CRPs zu verschiedenen Zeitpunkten. Auf die Anaphylatoxinrezeptoren hatte IL-6 hingegen keinen Einfluss. IL-6 scheint durch eine verminderte CRP-Expression die

tendozytäre Anfälligkeit gegenüber einer Komplement-induzierten Zellyse zu erhöhen, was im Rahmen einer verstärkten Komplementaktivierung, möglicherweise im Zuge einer IR oder einer Inflammation, zu einem vermehrten Absterben der Zellen führen könnte. Grundsätzlich liefert der jetzige Wissenstand noch keinerlei Information ob, wann und im welchem Rahmen das Komplementsystem im Sehngewebe aktiviert wird. Diese Fragestellung sollte in zukünftigen Untersuchungen dringend untersucht werden.

Die Wirkung von IL-10 im Sehngewebe war zu Beginn der Arbeit völlig unklar. Auf die Komplementexpression übte IL-10 allein keine signifikanten Effekte aus. Nur in Kombination mit TNF $\alpha$  konnte IL-10 die Komplementexpression beeinflussen und bewirkte eine C3aR-Induktion sowie eine C5aR-, CD46- und CD55-Suppression. Es bleibt grundsätzlich unklar, ob IL-10 überhaupt ein potenter Modulator der Komplementexpression in Sehnenzellen ist.

Da Tendozyten *in vivo* nicht nur Kontakt zu Mediatoren des Blutes sondern physiologisch über Gefäßendothelien bzw. pathologisch – beispielsweise im Zuge einer Blutung bei Sehnenruptur – auch direkt Kontakt zu Blutzellen haben, wurde zum Abschluss dieser Arbeit ein Stimulationsexperiment mit Blutzellen durchgeführt und somit der Einfluss von Blutzellen auf die Komplementexpression der Tendozyten untersucht.

#### **5.4 Einfluss von humanen PBMCs und Vollblut auf die Genexpression der untersuchten Komplementfaktoren in kultivierten humanen Tendozyten**

Grundsätzlich ist der letzte Versuch der vorliegenden Arbeit als Pilotversuch und kleiner Ausblick auf mögliche Folgeprojekte zu verstehen. In diesem Stimationsversuch wurden kultivierte Tendozyten mit Blutzellen, mit Vollblut oder einer Kombination von Blutzellen mit TNF $\alpha$  über ein Transwell für 24 Stunden stimuliert und anschließend Genexpressionsanalysen durchgeführt. Der Kontakt zu PBMCs bzw. die Stimulation mit PBMCs + TNF $\alpha$  induzierte in den Tendozyten eine

C3aR- und CD55-Expression. Im Gegensatz dazu wurde die C5aR-Expression durch alle Stimulationen, CD46 und CD59 teilweise supprimiert. Auffällig war, dass eine Vollblutstimulation die Genexpression supprimierte oder keinen Effekt ausübte.

Juel und Kollegen wählten für Stimulation von Retinapigmentepithelzellen mit aktivierten T-Zellen mit dem Einsatz eines *in vitro* Ko-Kultursystems einen ähnlichen Versuchsansatz. Die anschließende Expressionsanalyse verschiedenster Komplementfaktoren offenbarte u.a. eine Induktion der CRPs CD46, CD55 und CD59 sowie des Komplementfaktors C3 <sup>[139]</sup>. Strainic und Kollegen konnten in Ihrer Arbeit nach einer Stimulation von Antigen-präsentierenden Zellen mit T-Zellen ebenfalls eine Induktion des C3aR aber auch des C5aR in beiden Zelltypen beobachten <sup>[140]</sup>. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit erfolgte die Stimulation allerdings im direkten Zell-Zell-Kontakt und lediglich für eine 1 Stunde.

Da die Stimulation nicht über einen direkten Kontakt der Tendozyten mit den PBMCs, sondern über ein Transwell erfolgte, konnten die PBMCs die Komplementexpression in Tendozyten nur über lösliche Mediatoren – beispielsweise Zytokine – beeinflussen. Dass PBMCs verschiedene Zytokine, wie TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, und IL-8 exprimieren, und sich dieses Expressionsprofil im Zuge verschiedener Pathologien, beispielsweise der multiplen Sklerose, verändert, wurde in der Fachliteratur bereits mehrfach beschrieben <sup>[141, 142]</sup>.

Die Stimulation mit Vollblut führt zu einer Suppression der CRPs und macht die Tendozyten somit anfälliger für eine Komplement-induzierte Zellyse. Zur Erklärung dieser Beobachtung muss erneut berücksichtigt werden, dass das Sehnengewebe physiologisch ein schlecht vaskularisiertes Gewebe ist <sup>[2, 4]</sup>. Der Kontakt zu Mediatoren des Blutes sowie Blutzellen ist daher eher gering. Ein übermäßiger Kontakt zu PBMCs könnte im Zuge einer Verletzung des Sehnengewebes und anschließender Einwanderung der Entzündungszellen ins Gewebe erfolgen. Im Zuge einer Verletzung bzw. anschließenden Heilungsphase kommt es, wie bereits erwähnt, zwangsläufig zu einer Inflammation und der vermehrten Freisetzung von Zytokinen durch die eingewanderten Entzündungszellen. Denkbar wäre, dass die durch den Kontakt zu PBMCs induzierte CD55-Induktion die Tendozyten während dieser Phase der Inflammation vor einer möglichen verstärkten

Komplementaktivierung schützen soll. Der Kontakt zu Vollblut erfordert hingegen eine stärkere Verletzung des Gewebes mit Ruptur von Gefäßen und Einblutungen ins Gewebe. Ein mögliches Absterben der Tendozyten im Zuge einer solchen Sehnenverletzung könnte daher u.a. auch durch den Kontakt der Zellen zum Vollblut erklärt werden.

Grundsätzlich sei nochmal erwähnt, dass es sich lediglich um einen Pilotstimulationsversuch gehandelt hat und die gewonnenen Tendenzen durch weitere Untersuchungen und Spender bestätigt werden müssen.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit ein im Vergleich zu Blutzellen spezifisches Expressions-Profil für regulatorische Komponenten des Komplementsystems im Sehngewebe und in Sehnenzellen dargestellt werden. Desweiteren wurde eine Wechselbeziehung zwischen der Komplementexpression und den Zytokinen TNF $\alpha$  und IL-6 aufgezeigt. Ferner deuteten sich in einem Pilotversuch ein Einfluss von PBMCs sowie Vollblut auf die Komplementexpression in Sehnenzellen an. Es können jedoch noch keine endgültigen Aussagen über die Wirkung und Funktion der einzelnen Zytokine sowie dem Kontakt zu Blut und Blutzellen auf die Komplementexpression gemacht werden. Lediglich Einblicke in dieses komplexe Geschehen konnten gewonnen werden, sowie Hinweise darauf, welches Potential in diesem Thema steckt und dass weitere Untersuchungen sinnvoll und notwendig erscheinen.

## 6 Ausblick

Die vorliegende Arbeit untersuchte eine Komplementexpression im Sehnengewebe sowie die Wechselbeziehung zu Zytokinen. Da keine Vergleichsdaten in der Sehne publiziert sind, konnten die gewonnenen Ergebnisse nur mit Arbeiten an anderen Zell- und Gewebearten verglichen werden und die Interpretationsansätze lediglich hypothetisch formuliert werden.

Obwohl die vorliegende Arbeit zunächst einige Fragen unbeantwortet lassen muss, lieferten die gewonnenen Ergebnisse bereits Hinweise dafür, dass das Komplementsystem eine wichtige Rolle im Sehnengewebe spielen könnte, sodass zusätzliche Untersuchungen notwendig erscheinen und ergebnisreich sein könnten.

Da bisher nur Hamstringsehnengewebe verwendet wurde, sollte zukünftig überprüft werden, ob die gewonnenen Ergebnisse auf jegliches Sehnengewebe übertragbar sind und weitere Sehnenarten, beispielsweise die Achillessehne oder Sehnen der Rotatorenmanschette hinsichtlich einer Komplementexpression untersucht werden. Wichtig erscheint es auch, zusätzliche Stimulationszeitpunkte zu untersuchen, um somit mögliche Effekte der Zytokine, die sich außerhalb der bereits analysierten Zeitpunkte abspielen, aufzudecken. Denkbar wäre eine Expressionsanalyse nach bereits 1- oder 2-stündiger Stimulation bzw. eine Verlängerung des Zeitrahmens auf 60 oder 72 Stunden. Weiterhin erscheint eine Ausweitung der Expressionsanalysen, die auf Proteinebene bisher nur für von C5aR und CD55 durchgeführt wurden, erstrebenswert und sollte nicht auf die Anaphylatoxinrezeptoren und CRPs beschränkt bleiben. Möglich wäre auch eine Expressionsanalyse weiterer Komplementregulatoren, wie Clusterin oder Vitronektin, deren Expression beispielsweise in Pigmentepithelzellen der Retina bereits beschrieben wurde <sup>[139, 143]</sup>.

Neben den bisher eingesetzten Zytokinstimulationen sollten weitere Zytokine wie TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$  und IFN- $\gamma$  zur Anwendung kommen, da für diese Zytokine in vielen anderen Zell- und Gewebearten bereits Effekte auf die Komplementexpression beschrieben wurden und TGF- $\beta$  und IL-1 $\beta$  explizit bedeutende Zytokine für das Sehnengewebe *in vivo* zu sein scheinen. Dabei wäre es möglich verschiedene Zytokinkonzentrationen einzusetzen und somit Hinweise zu gewinnen, ob der



Einfluss der Zytokine auf die Komplementexpression konzentrationsabhängig ist. Zu Beginn einer solchen umfangreichen Analyse der Komplementexpression in einer bestimmten Zell- oder Gewebeart ist es zunächst wichtig zu wissen, wie einzelne Zytokine die Komplementexpression beeinflussen. Grundsätzlich spiegeln diese Einzelstimulationen aber nicht die physiologischen Bedingungen *in vivo* wider, sodass im weiteren Verlauf verstärkt auch Zytokinkombinationen eingesetzt werden sollten.

Es wäre weiterhin wichtig zu wissen, ob das Komplementsystem im Sehngewebe überhaupt aktiv ist bzw. in pathologischen Zuständen (Ruptur, Heilung, Tendopathie) aktiviert werden kann. Dafür wären Proteinexpressionsanalysen von C3a, C5a oder weiteren Spaltprodukten bzw. ein Nachweis dieser in gesunder und rupturierter bzw. heilender Sehne *in situ* oder nach verschiedensten Zytokinstimulationen von kultivierten Sehnenzellen *in vitro* im Zellkulturmediumüberstand notwendig. Ferner wäre es interessant, die Wirkung essentieller Spaltprodukte z.B. durch eine C3a- bzw. C5a-Behandlung auf die Komplement- und Zytokinexpression in Tendozyten zu untersuchen. Dabei sollten in die Expressionanalyse neben den bisher untersuchten Komplementfaktoren weitere Komponenten und Spaltprodukte der Kaskade einbezogen werden.

Die vorliegende Arbeit zeigte, dass eine Tendozyteninkubation mit IL-6 bzw. mit Vollblut in eine CRP-Suppression mündet. Eine solche Suppression führt zu einer erhöhten Anfälligkeit der Tendozyten für eine Komplement-induzierte Zelllyse. Ob diese Komplement-induzierte Zelllyse tatsächlich stattfindet, ist dabei noch nicht klar. Um diese Hypothese zu prüfen, wäre beispielsweise eine Expressionsanalyse des MAC bzw. seinen Komponenten nach IL-6- bzw. Vollblut-Stimulation sinnvoll.

Auch wenn das Sehngewebe ein eher schlecht vaskularisiertes Gewebe ist, sollte der Einfluss von Blut bzw. Blutzellen auf die Komplementexpression auch in zukünftigen Projekten Berücksichtigung finden, denn Sehnenverletzungen sind i.d.R. von einer Einblutung begleitet. In der vorliegenden Arbeit handelte es bei dem Stimulationsversuch mit PBMCs und Vollblut lediglich um einen Pilotversuch. Daher sind weitere Untersuchungen mit zusätzlichen Spendern dringend notwendig. Ferner

wäre eine Ausweitung des Versuches auf eine Stimulation mit Neutrophilen sowie weiteren Zell-Zytokin-Kombinationen denkbar.

Die Diskussion beschäftigte sich recht ausführlich mit möglichen Ursachen der Expressionsunterschiede *in vivo* und *in vitro*. Diese angeführten Hypothesen bedürfen weiterer Untersuchungen. Dabei scheint vor allem der Einfluss einer mechanischen Stimulation auf die Expression *in vivo* von herausragender Bedeutung, sodass eine Expressionsanalyse nach mechanischer Stimulation von kultivierten Tendozyten, wie beispielsweise durch Skutek und Kollegen durchgeführt, aussichtsreich erscheint <sup>[42, 108]</sup>. Ferner könnte auch die Kultivierung der Tendozyten im Monolayer die Komplementexpression beeinflusst haben. Obwohl in der vorliegenden Arbeit eine CD35-Expression auch für die 3D-kultivierten Tendozyten nicht beschrieben werden konnte, ist nicht auszuschließen, dass die Expression weiterer Komplementfaktoren durch die zweidimensionale Kultivierung beeinflusst wurde. Um diese Hypothese optimal zu untersuchen, wäre es notwendig von einer möglichst hohen Spenderanzahl, jeweils von einem gleichen Spender sowohl native Zellen, als auch 2D- und 3D-kultivierte Tendozyten auf die Komplementexpression hin zu untersuchen. Dabei wäre zusätzlich noch interessant, ob die Komplementexpression in 2D- und 3D-kultivierten Tendozyten durch Zytokine unterschiedlich beeinflusst wird.

Bereits mehrfach wurde beschrieben, dass Tendozyten in ihrer Proliferation, in ihrem Phänotyp und ihrer Expression durch die Anzahl der Passagierungen beeinflusst werden <sup>[102-104]</sup>. Denkbar ist natürlich, dass auch die Komplementexpression durch diese beeinflusst wird. Daher scheinen Passagenversuche, in denen Tendozyten von gleichen Spendern über mehrere Passagen kultiviert werden und eine Expressionsanalyse nach jeder Passage erfolgt, sinnvoll. Die Recherche der Fachliteratur lieferte weiterhin Hinweise darüber, dass auch der O<sub>2</sub>-Gehalt während der Kultivierung einen Einfluss auf das Expressionsprofil der Tendozyten hat <sup>[105]</sup>. Um dieser Hypothese nachzugehen, müssten Tendozyten eines Spenders unter verschiedenen Bedingungen im Bezug auf den O<sub>2</sub>-Gehalt kultiviert werden und anschließend eine Expressionsanalyse stattfinden.

Um die diskutierten Unterschiede zwischen den *in vivo* vorherrschenden und den *in vitro* vorliegenden Bedingungen und deren Einfluss auf die Expression der Tendozyten zu vermeiden, sollten auf lange Sicht *in vivo* Studien angestrebt werden. Dabei wäre die Analyse der Komplementexpression in gesundem, langfristig ruhig gestelltem, chronisch überbelastetem und rupturiertem Sehngewebe hinsichtlich einer Komplementexpression und einer Beeinflussung dieser durch Zytokine denkbar. Um eine optimale Vergleichbarkeit herstellen zu können, wäre es wünschenswert das jeweilige Sehngewebe von einem gleichen Spender zu verwenden. Ein Tiermodell würde diesen Anforderungen am ehesten gerecht, sodass eine Untersuchung dieser komplexen Thematik der Komplementexpression in Sehngewebe und die Beeinflussung dieser in einem Tiermodell angestrebt werden sollte.

## 7 Zusammenfassung

Das posttraumatische Entzündungsgeschehen wird nicht nur durch proinflammatorische und immunregulatorische Zytokine, sondern auch durch eine weitere wichtige Komponente des Immunsystems, dem Komplementsystem, getragen. Dass proinflammatorische Zytokine im Zuge einer lokalen Entzündungsreaktion nach einer Sehnenverletzung induziert werden, konnte bereits gezeigt werden. Ob das Komplementsystem auch in der Sehne exprimiert ist, eine Rolle im Sehngewebe spielt, und eine Wechselbeziehung zu proinflammatorischen und immunregulatorischen Zytokinen wie in anderen Geweben besteht, blieb bisher allerdings noch völlig unklar. Ziel der vorliegenden Arbeit war es dieser Fragestellung mittels Genexpressionsanalysen und Immunfluoreszenzmarkierungen nachzugehen. Dabei wurden humane native Hamstringsehne und aus ihr isolierte primäre Tendozyten sowie Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) und neutrophile Granulozyten, auf eine Expression der Anaphylatoxinrezeptoren C3aR und C5aR und der zellschützenden Komplement-regulierenden Proteine (CRPs) CD35, CD46, CD55 und CD59 analysiert. Im Fokus stand die Charakterisierung einer möglichen Wechselbeziehung zwischen Zytokinen und der Expression der aufgeführten Komplementfaktoren mit Hilfe von zeitabhängigen Stimulationsexperimenten. Hierfür wurden Hamstringtendozyten von 8 verschiedenen Spendern mit den Zytokinen TNF $\alpha$ , IL-6 oder IL-10 oder der Kombination aus TNF $\alpha$  mit IL-6 bzw. TNF $\alpha$  mit IL-10 (eingesetzte Konzentration: 10 ng/ml) für 6, 24 und 48 Stunden stimuliert. Als Pilotversuch wurde zum Abschluss der Arbeit eine Stimulation der Tendozyten mit PBMCs, PBMCs + TNF $\alpha$  bzw. Vollblut über ein Transwell durchgeführt.

Außer dem CRP CD35, das in kultivierten Tendozyten nicht exprimiert wurde, konnten alle Komplementfaktoren in nativer Sehne und kultivierten Tendozyten sowie den untersuchten Leukozyten nachgewiesen werden. Dabei war die Komplementexpression in nativer Sehne z.T. deutlich höher als in kultivierten Tendozyten. Im Vergleich zu den Leukozyten waren die CRPs CD46 und CD59 in nativer Sehne stärker, C3aR, C5aR sowie CD35 und CD55 jedoch geringer exprimiert. Die C3aR-Expression konnte in kultivierten Tendozyten vor allem durch TNF $\alpha$  allein oder in Kombination mit IL-10 oder IL-6 induziert werden. C5aR

hingegen wurde durch TNF $\alpha$ +IL-6 (24 und 48 h) sowie TNF $\alpha$ +IL-10 (48 h) supprimiert. IL-6 allein war in der Lage die Expression der CRPs CD46 und CD55 nach 6 und 48 Stunden sowie die CD59-Expression nach 24 Stunden zu supprimieren. Ferner verringerten auch die beiden Kombinationsstimulationen die Expression von CD46 und CD55 nach 6 Stunden. Durch die Stimulation mit PBMCs konnte in kultivierten Tendozyten vor allem die Expression von C3aR aber auch von CD55 und CD59 induziert werden. Vollblut wirkte hauptsächlich supprimierend auf die Komplementexpression. Die C5aR- und CD55-Expression in kultivierten Tendozyten wurde zusätzlich auch auf Proteinebene durch Immunfluoreszenzmarkierungen erfolgreich nachgewiesen.

In der vorliegenden Arbeit gelang es ein Expressionsprofil von Komplementfaktoren in der Sehne und kultivierten Tendozyten sowie eine Wechselbeziehung zu wichtigen proinflammatorischen und immunregulatorischen Zytokinen nachzuweisen. Die Regulation der Komplementexpression durch diese Zytokine könnte Relevanz für das posttraumatische Entzündungsgeschehen und die Heilung nach Sehnenverletzungen haben. Zukünftige Untersuchungen sollten sich vor allem auf die Komplementaktivität in der verletzten und heilenden Sehne sowie die Wechselbeziehung von Komplementexpression und systemischen Faktoren, wie beispielsweise die mechanische Beanspruchung der Zellen, fokussieren.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Hoffmann A and Gross G. Tendon and ligament engineering in the adult organism: mesenchymal stem cells and gene-therapeutic approaches. *Int Orthop*, 2007. 31(6): p. 791-7.
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 Maffulli N. Tendon injury and tendinopathy: healing and repair. *J Bone Joint Surg Am*, 2005. 87(1): p. 187-202.
5. Gefunden am 22.01.2011:  
[http://www.google.de/imgres?imgurl=http://www.beebleblog.com/images/hamstrings.jpg&imgrefurl=http://beebleblog.com/2007/09/12/leg-stretcheshamstringstretches/&usq=\\_\\_peLAj0YpQYbEaplhc7UpMY2R8jY=&h=273&w=250&sz=47&hl=de&start=4&zoom=1&um=1&itbs=1&tbnid=u0VF1io7jtJLM:&tbnh=113&tbnw=103&prev=/images%3Fq%3Dhamstring%26um%3D1%26hl%3Dde%26client%3Dopera%26sa%3DN%26rls%3Dde%26channel%3Dsuggest%26tbs%3Disch:1&ei=J9VnTdjCOoPUtAb2nbTiDA](http://www.google.de/imgres?imgurl=http://www.beebleblog.com/images/hamstrings.jpg&imgrefurl=http://beebleblog.com/2007/09/12/leg-stretcheshamstringstretches/&usq=__peLAj0YpQYbEaplhc7UpMY2R8jY=&h=273&w=250&sz=47&hl=de&start=4&zoom=1&um=1&itbs=1&tbnid=u0VF1io7jtJLM:&tbnh=113&tbnw=103&prev=/images%3Fq%3Dhamstring%26um%3D1%26hl%3Dde%26client%3Dopera%26sa%3DN%26rls%3Dde%26channel%3Dsuggest%26tbs%3Disch:1&ei=J9VnTdjCOoPUtAb2nbTiDA)
6. Riley G. The pathogenesis of tendinopathy. A molecular perspective. *Rheumatology (Oxford)*, 2004. 43(2): p. 131-42.
7. Riley G. Tendinopathy--from basic science to treatment. *Nat Clin Pract Rheumatol*, 2008. 4(2): p. 82-9.
8. Abate M, Silbernagel KG, Siljeholm C, et al. Pathogenesis of tendinopathies: inflammation or degeneration? *Arthritis Res Ther*, 2009. 11(3): p. 235.
9. Benjamin M, Kaiser E and Milz S. Structure-function relationships in tendons: a review. *J Anat*, 2008. 212(3): p. 211-28.
10. Schulze-Tanzil G, Al-Sadi O, Wiegand E, et al. The role of pro-inflammatory and immunoregulatory cytokines in tendon healing and rupture: new insights. *Scand J Med Sci Sports*, 2011.
11. Schweitzer R, Chyung JH, Murtaugh LC, et al. Analysis of the tendon cell fate using Scleraxis, a specific marker for tendons and ligaments. *Development*, 2001. 128(19): p. 3855-66.
12. Kjaer M, Landberg H, Heinemeier K, 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.

13. Fredberg U and Stengaard-Pedersen K. 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.
14. Rees JD, Wilson AM and Wolman RL. Current concepts in the management of tendon disorders. *Rheumatology (Oxford)*, 2006. 45(5): p. 508-21.
15. Li Z, Yang G, Khan M, Stone D, Woo SL, Wang JH. Inflammatory response of human tendon fibroblasts to cyclic mechanical stretching. *Am J Sports Med*, 2004. 32(2): p. 435-40.
16. Skutek M, van Griensven M, Zeichen J, Brauer N, Bosch U. Cyclic mechanical stretching of human patellar tendon fibroblasts: activation of JNK and modulation of apoptosis. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2003. 11(2): p. 122-9.
17. Tsuzaki M, Bynum D, Almekinders L, Yang X, Faber J, Banes AJ. ATP modulates load-inducible IL-1beta, COX 2, and MMP-3 gene expression in human tendon cells. *J Cell Biochem*, 2003. 89(3): p. 556-62.
18. Wang JH, Li Z, Yang G, Khan M. Repetitively stretched tendon fibroblasts produce inflammatory mediators. *Clin Orthop Relat Res*, 2004(422): p. 243-50.
19. Sullo A, Maffulli N, Capasso G, Testa V. 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.
20. Lenderink AM, Liegel K, Ljubanovic D, et al. The alternative pathway of complement is activated in the glomeruli and tubulointerstitium of mice with adriamycin nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2007. 293(2): p. F555-64.
21. Niederbichler AD, Hoesel LM, Westfall MV, et al. An essential role for complement C5a in the pathogenesis of septic cardiac dysfunction. *J Exp Med*, 2006. 203(1): p. 53-61.
22. Zwaka TP, Manolov D, Ozdemir C, et al. Complement and dilated cardiomyopathy: a role of sublytic terminal complement complex-induced tumor necrosis factor-alpha synthesis in cardiac myocytes. *Am J Pathol*, 2002. 161(2): p. 449-57.
23. Siegenthaler W. *Klinische Pathophysiologie*. 9. Auflage, 2006, Stuttgart, Thieme-Verlag. S. 529-535.
24. Hietbrink F, Koenderman L, Rijkers G, Leenen L. Trauma: the role of the innate immune system. *World J Emerg Surg*, 2006. 1: p. 15.
25. Hosaka Y, Kirisawa R, Ueda H, Yamaguchi M, Takehana K. Differences in tumor necrosis factor (TNF)alpha and TNF receptor-1-mediated intracellular signaling factors in normal, inflamed and scar-formed horse tendons. *J Vet Med Sci*, 2005. 67(10): p. 985-91.

26. Liu ZG. Molecular mechanism of TNF signaling and beyond. *Cell Res*, 2005. 15(1): p. 24-7.
27. Yang Q, Huang W, Jozwik C, 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.
28. Rahman MM, Lucas AR and McFadden G. Viral TNF inhibitors as potential therapeutics. *Adv Exp Med Biol*, 2009. 666: p. 64-77.
29. Hosaka Y, Sakamoto Y, Kirisawa R, et al. Distribution of TNF receptors and TNF receptor-associated intracellular signaling factors on equine tendinocytes in vitro. *Jpn J Vet Res*, 2004. 52(3): p. 135-44.
30. John T, Lodka D, Kohl B, et al. Effect of pro-inflammatory and immunoregulatory cytokines on human tenocytes. *J Orthop Res*, 2010. 28(8): p. 1071-7.
31. Hosaka YZ, Uratsuji T, Ueda H, Uehara M, Takehana K. 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.
32. Eliasson P, Andersson T and Aspenberg P. Rat Achilles tendon healing: mechanical loading and gene expression. *J Appl Physiol*, 2009. 107(2): p. 399-407.
33. Uchida H, Tohyama H, Nagashima K, 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.
34. Hosaka Y, Ozoe S, Kirisawa R, Ueda H, Takehana K, Yamaguchi M. Effect of heat on synthesis of gelatinases and pro-inflammatory cytokines in equine tendinocytes. *Biomed Res*, 2006. 27(5): p. 233-41.
35. Hosaka Y, Teraoka H, Yamamoto E, Ueda H, Takehana K. Mechanism of cell death in inflamed superficial digital flexor tendon in the horse. *J Comp Pathol*, 2005. 132(1): p. 51-8.
36. Kishimoto T. Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine. *Arthritis Res Ther*, 2006. 8 Suppl 2: p. S2.
37. Romano M, Sironi M, Toniatti C, et al. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity*, 1997. 6(3): p. 315-25.
38. Karlson P, Doenecke D, Koolman J, Fuchs G, Gerok W. *Karlsons Biochemie und Pathobiochemie*. 15. Auflage, 2005, Stuttgart, Thieme-Verlag. S. 501-502.



39. Nakama K, Gotoh M, Yamada T, 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.
40. Tsuzaki M, Guyton G, Garrett W, 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.
41. Kjaer M, Magnusson P, Krogsgaard M, et al. Extracellular matrix adaptation of tendon and skeletal muscle to exercise. *J Anat*, 2006. 208(4): p. 445-50.
42. Skutek M, van Griensven M, Zeichen J, Brauer N, Bosch U. Cyclic mechanical stretching enhances secretion of Interleukin 6 in human tendon fibroblasts. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 2001. 9(5): p. 322-6.
43. Lin TW, Cardenas L, Glaser DL, Soslowsky LJ. Tendon healing in interleukin-4 and interleukin-6 knockout mice. *J Biomech*, 2006. 39(1): p. 61-9.
44. Lin TW, Cardenas L and Soslowsky LJ. Tendon properties in interleukin-4 and interleukin-6 knockout mice. *J Biomech*, 2005. 38(1): p. 99-105.
45. Austen KF. *Therapeutic immunology*. 2. Auflage, 2001, Blackwell Science Inc. S. 209-210, 287-297.
46. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol*, 2001. 19: p. 683-765.
47. Ricchetti ET, Reddy SC, Ansorge HL, et al. Effect of interleukin-10 overexpression on the properties of healing tendon in a murine patellar tendon model. *J Hand Surg Am*, 2008. 33(10): p. 1843-52.
48. Reitamo S, Remitz A, Tamai K, Ledo I, Uitto J. Interleukin 10 up-regulates elastin gene expression in vivo and in vitro at the transcriptional level. *Biochem J*, 1994. 302 ( Pt 2): p. 331-3.
49. Reitamo S, Remitz A, Tamai K, Uitto J. Interleukin-10 modulates type I collagen and matrix metalloprotease gene expression in cultured human skin fibroblasts. *J Clin Invest*, 1994. 94(6): p. 2489-92.
50. Davies ME, Horner A, Loveland BE, McKenzie IF. Upregulation of complement regulators MCP (CD46), DAF (CD55) and protectin (CD59) in arthritic joint disease. *Scand J Rheumatol*, 1994. 23(6): p. 316-21.
51. Furebring M, Hakansson L, Venge P, Sjolín J. C5a, interleukin-8 and tumour necrosis factor-alpha-induced changes in granulocyte and monocyte expression of complement receptors in whole blood and on isolated leukocytes. *Scand J Immunol*, 2006. 63(3): p. 208-16.
52. Halme J, Sachse M, Vogel H, Giese T, Klar E, Kirschfink M. Primary human hepatocytes are protected against complement by multiple regulators. *Mol Immunol*, 2009. 46(11-12): p. 2284-9.

53. Hyc A, Osiecka-Iwan A, Strzelczyk P, Moskalewski S. Effect of IL-1beta, TNF-alpha and IL-4 on complement regulatory protein mRNA expression in human articular chondrocytes. *Int J Mol Med*, 2003. 11(1): p. 91-4.
54. Koch N, Jung M, Sabat R, et al. IL-10 protects monocytes and macrophages from complement-mediated lysis. *J Leukoc Biol*, 2009. 86(1): p. 155-66.
55. Moutabarrik A, Nakanishi I, Matsumoto M, Zaid D, Seya T. Human glomerular epithelial cells synthesize and secrete the third component of complement. *Nephron*, 1995. 70(1): p. 55-61.
56. Moutabarrik A, Nakanishi I, Namiki M, et al. Cytokine-mediated regulation of the surface expression of complement regulatory proteins, CD46(MCP), CD55(DAF), and CD59 on human vascular endothelial cells. *Lymphokine Cytokine Res*, 1993. 12(3): p. 167-72.
57. Onuma H, Masuko-Hongo K, Yuan G, et al. Expression of the anaphylatoxin receptor C5aR (CD88) by human articular chondrocytes. *Rheumatol Int*, 2002. 22(2): p. 52-5.
58. Spiller OB, Criado-Garcia O, Rodriguez De Cordoba S, Morgan BP. Cytokine-mediated up-regulation of CD55 and CD59 protects human hepatoma cells from complement attack. *Clin Exp Immunol*, 2000. 121(2): p. 234-41.
59. Takabayashi T, Shimizu S, Clark BD, Beinborn M, Burke JF, Gelfand JA. Interleukin-1 upregulates anaphylatoxin receptors on mononuclear cells. *Surgery*, 2004. 135(5): p. 544-54.
60. Weinmann O, Gutzmer R, Zwirner J, et al. Up-regulation of C5a receptor expression and function on human monocyte derived dendritic cells by prostaglandin E2. *Immunology*, 2003. 110(4): p. 458-65.
61. Dunkelberger JR and Song WC. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res*, 2010. 20(1): p. 34-50.
62. Fleming SD and Tsokos GC. Complement, natural antibodies, autoantibodies and tissue injury. *Autoimmun Rev*, 2006. 5(2): p. 89-92.
63. Makrides, S.C., Therapeutic inhibition of the complement system. *Pharmacol Rev*, 1998. 50(1): p. 59-87.
64. Ward PA. Role of the complement in experimental sepsis. *J Leukoc Biol*, 2008. 83(3): p. 467-70.
65. Gasque P. Complement: a unique innate immune sensor for danger signals. *Mol Immunol*, 2004. 41(11): p. 1089-98.
66. Fishelson Z, Attali G and Mevorach D, Complement and apoptosis. *Mol Immunol*, 2001. 38(2-3): p. 207-19.

67. Morgan BP. Complement membrane attack on nucleated cells: resistance, recovery and non-lethal effects. *Biochem J*, 1989. 264(1): p. 1-14.
68. Soane L, Rus H, Niculescu F, Shin ML. Inhibition of oligodendrocyte apoptosis by sublytic C5b-9 is associated with enhanced synthesis of bcl-2 and mediated by inhibition of caspase-3 activation. *J Immunol*, 1999. 163(11): p. 6132-8.
69. Bykowski T, Woodman ME, Cooley AE, et al. *Borrelia burgdorferi* complement regulator-acquiring surface proteins (BbCRASPs): Expression patterns during the mammal-tick infection cycle. *Int J Med Microbiol*, 2008. 298 Suppl 1: p. 249-56.
70. Ikeda J, Morii E, Liu Y, et al. Prognostic significance of CD55 expression in breast cancer. *Clin Cancer Res*, 2008. 14(15): p. 4780-6.
71. Varela JC, Atkinson C, Woolson R, Keane TE, Tomlinson S. Upregulated expression of complement inhibitory proteins on bladder cancer cells and anti-MUC1 antibody immune selection. *Int J Cancer*, 2008. 123(6): p. 1357-63.
72. Huber-Lang M, Sarma JV, Zetoune FS, et al. Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. *Nat Med*, 2006. 12(6): p. 682-7.
73. Monk PN, Scola AM, Madala P, Fairlie DP. Function, structure and therapeutic potential of complement C5a receptors. *Br J Pharmacol*, 2007. 152(4): p. 429-48.
74. Huber-Lang M, Younkin EM, Sarma JV, et al. Generation of C5a by phagocytic cells. *Am J Pathol*, 2002. 161(5): p. 1849-59.
75. Guo RF, Riedemann NC and Ward PA, Role of C5a-C5aR interaction in sepsis. *Shock*, 2004. 21(1): p. 1-7.
76. Riedemann NC, Guo RF, Neff TA et al. Increased C5a receptor expression in sepsis. *J Clin Invest*, 2002. 110(1): p. 101-8.
77. Amara U, Kalbitz M, Perl M, et al. Early expression changes of complement regulatory proteins and C5A receptor (CD88) on leukocytes after multiple injury in humans. *Shock*, 2010. 33(6): p. 568-75.
78. Zwirner J, Gotze O, Begemann G, Kapp A, Kirchhoff K, Werfel T. Evaluation of C3a receptor expression on human leucocytes by the use of novel monoclonal antibodies. *Immunology*, 1999. 97(1): p. 166-72.
79. Werfel T, Kirchhoff K, Wittmann M, et al. Activated human T lymphocytes express a functional C3a receptor. *J Immunol*, 2000. 165(11): p. 6599-605.
80. Rochowiak A and Niemir ZI. The structure and role of CR1 complement receptor in physiology. *Pol Merkur Lekarski*, 2010. 28(163): p. 79-83.

81. Collard CD, Bukusoglu C, Agah A, et al. Hypoxia-induced expression of complement receptor type 1 (CR1, CD35) in human vascular endothelial cells. *Am J Physiol*, 1999. 276(2 Pt 1): p. C450-8.
82. Hawkins ED and Oliaro J. CD46 signaling in T cells: linking pathogens with polarity. *FEBS Lett*, 2010. 584(24): p. 4838-44.
83. Liszewski MK, Leung MK and Atkinson JP. Membrane cofactor protein: importance of N- and O-glycosylation for complement regulatory function. *J Immunol*, 1998. 161(7): p. 3711-8.
84. Naniche D, Varior-Krishnan G, Cervoni F, et al. Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *J Virol*, 1993. 67(10): p. 6025-32.
85. An F, Li Q, Tu Z, et al. Role of DAF in protecting against T-cell autoreactivity that leads to experimental autoimmune uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009. 50(8): p. 3778-82.
86. Capasso M, Durrant LG, Stacey M, Gordon S, Ramage J, Spendlove I. Costimulation via CD55 on human CD4+ T cells mediated by CD97. *J Immunol*, 2006. 177(2): p. 1070-7.
87. Bergelson JM, Chan M, Solomon KR, St John NF, Lin H, Finberg RW. Decay-accelerating factor (CD55), a glycosylphosphatidylinositol-anchored complement regulatory protein, is a receptor for several echoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91(13): p. 6245-8.
88. Bergelson JM, Mohanty JG, Crowell RL, St John NF, Lublin DM, Finberg RW. Coxsackievirus B3 adapted to growth in RD cells binds to decay-accelerating factor (CD55). *J Virol*, 1995. 69(3): p. 1903-6.
89. Herold G. Innere Medizin 2010: eine vorlesungsorientierte Darstellung ; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung ; mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis. Vol. 2010. 2009: Selbstverl. S. 41-42.
90. Sloand EM, Mainwaring L, Keyvanfar K, et al. Transfer of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins to deficient cells after erythrocyte transfusion in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*, 2004. 104(12): p. 3782-8.
91. John T, Stahel PF, Morgan SJ, Schulze-Tanzil G. Impact of the complement cascade on posttraumatic cartilage inflammation and degradation. *Histol Histopathol*, 2007. 22(7): p. 781-90.
92. Stahel PF, Morganti-Kossmann MC and Kossmann T. The role of the complement system in traumatic brain injury. *Brain Res Brain Res Rev*, 1998. 27(3): p. 243-56.

93. Bellander BM, Singhrao SK, Ohlsson M, Mattsson P, Svensson M. Complement activation in the human brain after traumatic head injury. *J Neurotrauma*, 2001. 18(12): p. 1295-311.
94. Katz Y, Nativ O, Rapoport MJ, Loos M. IL-17 regulates gene expression and protein synthesis of the complement system, C3 and factor B, in skin fibroblasts. *Clin Exp Immunol*, 2000. 120(1): p. 22-9.
95. Keslar K, Rodriguez ER, Tan CD, Starling RC, Heeger PS. Complement gene expression in human cardiac allograft biopsies as a correlate of histologic grade of injury. *Transplantation*, 2008. 86(9): p. 1319-21.
96. Kulics J, Circolo A, Strunk RC, Colten HR. Regulation of synthesis of complement protein C4 in human fibroblasts: cell- and gene-specific effects of cytokines and lipopolysaccharide. *Immunology*, 1994. 82(4): p. 509-15.
97. Larochelle N, Deol JR, Srivastava V, et al. Downregulation of CD46 during muscle differentiation: implications for gene transfer to human skeletal muscle using group B adenoviruses. *Hum Gene Ther*, 2008. 19(2): p. 133-42.
98. Patrick M, Lockett J, Yue L, Stover C. Dual role of complement in adipose tissue. *Mol Immunol*, 2009. 46(5): p. 755-60.
99. Shagdarsuren E, Bidzhekov K, Mause SF, et al. C5a receptor targeting in neointima formation after arterial injury in atherosclerosis-prone mice. *Circulation*, 2010. 122(10): p. 1026-36.
100. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 2001. 29(9): p. e45.
101. Stoll C, John T, Endres M, et al. Extracellular matrix expression of human tenocytes in three-dimensional air-liquid and PLGA cultures compared with tendon tissue: implications for tendon tissue engineering. *J Orthop Res*, 2010. 28(9): p. 1170-7.
102. Almarza AJ, Augustine SM and Woo SL. Changes in gene expression of matrix constituents with respect to passage of ligament and tendon fibroblasts. *Ann Biomed Eng*, 2008. 36(12): p. 1927-33.
103. Yao L, Bestwick CS, Bestwick LA, Maffulli N, Aspden RM. Phenotypic drift in human tenocyte culture. *Tissue Eng*, 2006. 12(7): p. 1843-9.
104. van den Berg CW, Rix C, Hanna SM, Perez de la Lastra JM, Morgan BP. Role and regulation of pig CD59 and membrane cofactor protein/CD46 expressed on pig aortic endothelial cells. *Transplantation*, 2000. 70(4): p. 667-73..
105. Zhang Y, Wang B, Zhang WJ, Zhou G, Cao Y, Liu W. Enhanced proliferation capacity of porcine tenocytes in low O<sub>2</sub> tension culture. *Biotechnol Lett*, 2010. 32(2): p. 181-7.

106. Sawaguchi N, Majima T, Funakoshi T, et al. Effect of cyclic three-dimensional strain on cell proliferation and collagen synthesis of fibroblast-seeded chitosan-hyaluronan hybrid polymer fiber. *J Orthop Sci*, 2010. 15(4): p. 569-77.
107. Archambault JM, Hart DA and Herzog W. Response of rabbit Achilles tendon to chronic repetitive loading. *Connect Tissue Res*, 2001. 42(1): p. 13-23.
108. Skutek M, van Griensven M, Zeichen J, Brauer N, Bosch U. Cyclic mechanical stretching modulates secretion pattern of growth factors in human tendon fibroblasts. *Eur J Appl Physiol*, 2001. 86(1): p. 48-52.
109. Yang G, Crawford RC and Wang JH. Proliferation and collagen production of human patellar tendon fibroblasts in response to cyclic uniaxial stretching in serum-free conditions. *J Biomech*, 2004. 37(10): p. 1543-50.
110. Hurd WJ and Snyder-Mackler L. Knee instability after acute ACL rupture affects movement patterns during the mid-stance phase of gait. *J Orthop Res*, 2007. 25(10): p. 1369-77.
111. Ogle JD, Noel JG, Sramkoski RM, Ogle CK, Alexander JW. The effects of cytokines, platelet activating factor, and arachidonate metabolites on C3b receptor (CR1, CD35) expression and phagocytosis by neutrophils. *Cytokine*, 1990. 2(6): p. 447-55.
112. Pasch MC, Bos JD, Daha MR, Asghar SS. Transforming growth factor-beta isoforms regulate the surface expression of membrane cofactor protein (CD46) and CD59 on human keratinocytes [corrected]. *Eur J Immunol*, 1999. 29(1): p. 100-8.
113. Guo RF, Riedemann NC, Bernacki KD et al. Neutrophil C5a receptor and the outcome in a rat model of sepsis. *Faseb J*, 2003. 17(13): p. 1889-91.
114. Huber-Lang M, Sarma JV, Rittirsch D et al. Changes in the novel orphan, C5a receptor (C5L2), during experimental sepsis and sepsis in humans. *J Immunol*, 2005. 174(2): p. 1104-10.
115. Soruri A, Kim S, Kiafard Z, Zwirner J. Characterization of C5aR expression on murine myeloid and lymphoid cells by the use of a novel monoclonal antibody. *Immunol Lett*, 2003. 88(1): p. 47-52.
116. Bradley K, North J, Saunders D, et al. Synthesis of classical pathway complement components by chondrocytes. *Immunology*, 1996. 88(4): p. 648-56.
117. Helske S, Oksjoki R, Lindstedt KA, et al. Complement system is activated in stenotic aortic valves. *Atherosclerosis*, 2008. 196(1): p. 190-200.
118. Varsano S, Kaminsky M, Kaiser M, Rashkovsky, L. Generation of complement C3 and expression of cell membrane complement inhibitory proteins by human bronchial epithelium cell line. *Thorax*, 2000. 55(5): p. 364-9.

119. Burg M, Martin U, Bock D, et al. Differential regulation of the C3a and C5a receptors (CD88) by IFN-gamma and PMA in U937 cells and related myeloblastic cell lines. *J Immunol*, 1996. 157(12): p. 5574-81.
120. Gutzmer R, Lisewski M, Zwirner J, et al. Human monocyte-derived dendritic cells are chemoattracted to C3a after up-regulation of the C3a receptor with interferons. *Immunology*, 2004. 111(4): p. 435-43.
121. Monsinjon T, Gasque P, Chan P, Ischenko A, Brady JJ, Fontaine MC. Regulation by complement C3a and C5a anaphylatoxins of cytokine production in human umbilical vein endothelial cells. *Faseb J*, 2003. 17(9): p. 1003-14.
122. Turner NA, Mughal RS, Warburton P, O'Regan DJ, Ball SG, Porter KE. Mechanism of TNFalpha-induced IL-1alpha, IL-1beta and IL-6 expression in human cardiac fibroblasts: effects of statins and thiazolidinediones. *Cardiovasc Res*, 2007. 76(1): p. 81-90.
123. Tracey KJ and Cerami A. Tumor necrosis factor, other cytokines and disease. *Annu Rev Cell Biol*, 1993. 9: p. 317-43.
124. Hosaka Y, Kirisawa R, Yamamoto E, Ueda H, Iwai H, Takehana K. Localization of cytokines in tendinocytes of the superficial digital flexor tendon in the horse. *J Vet Med Sci*, 2002. 64(10): p. 945-7.
125. Allen-Gipson DS, Floreani AA, Heires AJ, Sanderson SD, MacDonald RG, Wyatt TA. Cigarette smoke extract increases C5a receptor expression in human bronchial epithelial cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005. 314(1): p. 476-82.
126. Gasque P, Singhrao SK, Neal JW, Gotze O, Morgan BP. Expression of the receptor for complement C5a (CD88) is up-regulated on reactive astrocytes, microglia, and endothelial cells in the inflamed human central nervous system. *Am J Pathol*, 1997. 150(1): p. 31-41.
127. Schlaf G, Schmitz M, Rothermel E, Jungermann K, Schieferdecker HL, Gotze O. Expression and induction of anaphylatoxin C5a receptors in the rat liver. *Histol Histopathol*, 2003. 18(1): p. 299-308.
128. Stahel PF, Frei K, Eugster HP, et al. TNF-alpha-mediated expression of the receptor for anaphylatoxin C5a on neurons in experimental *Listeria* meningoencephalitis. *J Immunol*, 1997. 159(2): p. 861-9.
129. Stahel PF, Kariya K, Shohami E, et al. Intracerebral complement C5a receptor (CD88) expression is regulated by TNF and lymphotoxin-alpha following closed head injury in mice. *J Neuroimmunol*, 2000. 109(2): p. 164-72.
130. Huber-Lang MS, Riedemann NC, Sarma JV, et al. Protection of innate immunity by C5aR antagonist in septic mice. *Faseb J*, 2002. 16(12): p. 1567-74.

131. Riedemann NC, Neff TA, Guo RF, et al. Protective effects of IL-6 blockade in sepsis are linked to reduced C5a receptor expression. *J Immunol*, 2003. 170(1): p. 503-7.
132. Fukuoka Y, Strainic M and Medof ME. Differential cytokine expression of human retinal pigment epithelial cells in response to stimulation by C5a. *Clin Exp Immunol*, 2003. 131(2): p. 248-53.
133. Pobanz JM, Reinhardt RA, Koka S, Sanderson SD. C5a modulation of interleukin-1 beta-induced interleukin-6 production by human osteoblast-like cells. *J Periodontal Res*, 2000. 35(3): p. 137-45.
134. Sayah S, Ischenko AM, Zhakhov A, Bonnard AS, Fontaine M. Expression of cytokines by human astrocytomas following stimulation by C3a and C5a anaphylatoxins: specific increase in interleukin-6 mRNA expression. *J Neurochem*, 1999. 72(6): p. 2426-36.
135. Wittmann M, Zwirner J, Larsson VA, et al. C5a suppresses the production of IL-12 by IFN-gamma-primed and lipopolysaccharide-challenged human monocytes. *J Immunol*, 1999. 162(11): p. 6763-9.
136. Markiewski MM, Mastellos D, Tudoran R, et al. C3a and C3b activation products of the third component of complement (C3) are critical for normal liver recovery after toxic injury. *J Immunol*, 2004. 173(2): p. 747-54.
137. Strey CW, Markiewski M, Mastellos D, et al. The proinflammatory mediators C3a and C5a are essential for liver regeneration. *J Exp Med*, 2003. 198(6): p. 913-23.
138. Addis-Lieser E, Kohl J and Chiaramonte MG. Opposing regulatory roles of complement factor 5 in the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *J Immunol*, 2005. 175(3): p. 1894-902.
139. Juel HB, Kaestel C, Folkersen L, et al. Retinal pigment epithelial cells upregulate expression of complement factors after co-culture with activated T cells. *Exp Eye Res*, 2011. 92(3): p. 180-8.
140. Strainic MG, Liu J, Huang D et al. Locally produced complement fragments C5a and C3a provide both costimulatory and survival signals to naive CD4+ T cells. *Immunity*, 2008. 28(3): p. 425-35.
141. Patanella AK, Zinno M, Quaranta D, et al. Correlations between peripheral blood mononuclear cell production of BDNF, TNF-alpha, IL-6, IL-10 and cognitive performances in multiple sclerosis patients. *J Neurosci Res*, 2010. 88(5): p. 1106-12.
142. Xing L and Remick DG. Relative cytokine and cytokine inhibitor production by mononuclear cells and neutrophils. *Shock*, 2003. 20(1): p. 10-6.



143. Wasmuth S, Lueck K, Baehler H, Lommatzsch A, Pauleikhoff D. Increased vitronectin production by complement-stimulated human retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009. 50(11): p. 5304-9.

## 9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. med. vet. Gundula Schulze-Tanzil, Leiterin des Labors für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie mit dem Arbeitsbereich Orthopädie, für die interessante Themenstellung, ihr Vertrauen und die herausragende Betreuung über die gesamte Zeit.

Weiterhin bedanke ich mich bei 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 Benjamin Kohl für sein immer offenes Ohr und die ein oder andere Krisenhilfe bedanken.

Meiner Familie danke ich von ganzen Herzen für die stetige moralische Unterstützung über die gesamte Dauer meines Studiums und ihren unerschütterlichen Glauben an mich.

## 10 Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Catharina Busch, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

Expression von Anaphylatoxinrezeptoren und  
Komplement-regulierenden Proteinen in der Sehne

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.



## 12 Publikationsliste

### Publikationen

---

- John T, Lodka D, Kohl B, Ertel W, Jammrath J, Conrad C, Stoll C, **Busch C**, Schulze-Tanzil, G. Effect of pro-inflammatory and immunoregulatory cytokines on human tenocytes. J Orthop Res, 2010. 28(8): p. 1071-7.
- 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

---

- **Busch C**, Kohl B, John T, Stoll C, Ertel W, Schulze-Tanzil G. Expression von Anaphylatoxinrezeptoren und Complement-regulierenden Proteinen in der Sehne. Posterbeitrag zur 26. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft, Würzburg, September 2009.
- **Busch C**, John T, Kohl B, Ertel W, Stoll C, Schulze-Tanzil G. Komplement in der Sehne: Einfluss von Zytokinen auf die Expression von Komplementfaktoren in menschlichen Sehnenzellen. Posterbeitrag zum Dt. Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie, Berlin, Oktober 2010.
- Schulze-Tanzil G, **Busch C**, Kohl B, Ertel W, Stoll C, John T (2010). Anaphylatoxine receptors and complement regulatory proteins in tendon: Interrelation with immunoregulatory cytokines. OARSI, Brüssel 23-26.9.2010.