Aus der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. J. Windolf

Die Rolle von Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator und seinem Rezeptor bei der humanen Sehnenregeneration *in vitro* 

# Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von Stephanie Raff

2023

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: PD Dr. Bernd Bittersohl

Zweitgutacher: PD Dr. Georg Flügen

Für meine Familie!

"Puh" oder "Per aspera ad astra"

Auflistung der Publikationen

Kongressbeitrag:

DKOU 2015, Berlin, Deutschland

Stephanie Raff, Sabine Lensing-Höhn, Christoph Zilkens, Thilo Patzer, Julia Fröbel, Rüdiger Krauspe - Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator und Rezeptor zur Geweberegeneration humaner Sehnen

#### I. Zusammenfassung

Sehnen- und Bandverletzungen gehören zu den häufigsten Diagnosen einer traumatologischen oder orthopädischen Fachabteilung. Es kann vom jungen, trainierten Leistungssportler bis zum alternden "Schreibtischtäter" jeden treffen. Jährlich verursachen Sehnenverletzungen einen enormen ökonomischen, aber auch persönlichen Schaden, da sie zu großen Beeinträchtigungen der Beweglichkeit des menschlichen Körpers führen. Dabei haben sich jedoch klinische Unterschiede in den Heilungskapazitäten unterschiedlicher Sehnen und Bänder gezeigt, die in der individuellen Behandlung berücksichtigt werden müssen (1, 2). In den vergangenen 15 Jahren sind deshalb die Regenerationsvorgänge von Sehnen und Bändern und die Möglichkeiten der unterstützenden Therapien in den Fokus wissenschaftlicher Untersuchungen gerückt.

Die Serinprotease Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator (uPA) und ihr Rezeptor (uPAR) werden, neben ihrer fibrinolytischen Aktivität, in Verbindung mit Mechanismen der Zellproliferation, Migration, Angiogenese und Geweberegeneration gebracht (3 - 9). Die Untersuchung der Expression und Freisetzung von uPA und uPAR aus humanen Tendozyten unterschiedlichen Ursprungs ist Ziel dieser Arbeit. Es wurden 27 Proben humaner Sehnen und Bänder (Bizepssehnen, Hüftkopfband (Ligamentum capitis femoris, LCF), vorderes Kreuzband (VKB), Quadrizepssehne, Achillessehne, Patellarsehne) mit Collagenase verdaut und die Primärzellen eine Woche lang *in vitro* vermehrt. Nach einer Passage wurden alle Kulturen in gleicher Zelldichte neu ausgesät und über 14 Tage ohne weitere Trypsinierung kultiviert. Zu definierten Zeitpunkten (Tag 1, 4, 7, 11, 14) wurde die Proliferationsrate jeder Kultur durch Zellzählung bestimmt und die Tendozyten sowie das Medium konserviert. Aus den Zellen wurden anschließend mittels qRT-PCR neben der uPA- und uPAR-Expression tendozytencharakteristische Marker (Scleraxis, Tenomodulin, Tenascin C, Collagen 1A1) untersucht. Zur Untersuchung der Freisetzung von uPA und uPAR aus den Zellen wurde ein ELISA auf die konservierten Zellkulturüberständen angewandt.

In unseren Experimenten exprimierten und sezernierten alle humanen Tendozyten *in vitro* uPA und uPAR, mit der jeweils höchsten mRNA-Konzentration zu Beginn der Kultivierung und kontinuierlich ansteigender Freisetzung beider Proteine. Unterteilt nach ihrem anatomischen Ursprung proliferierten Tendozyten aus VKB langsamer und sezernierten die geringste Menge uPAR, zeigten jedoch über die gesamte Kultivierung die höchste Expression beider Proteine und die höchste Freisetzung von uPA. Am schnellsten proliferierten Tendozyten des Ursprungs LCF, welche gegen Ende der Kultivierung die niedrigsten uPA - Mengen sezernierten. Gruppiert nach dem Verlauf der entnommenen Sehnenproben im Gewebe (Bizeps und LCF intrasynovial, VKB und Quadrizeps extrasynovial) ergaben sich geringe Unterschiede der Zellproliferation und der Freisetzung von uPAR. Jedoch zeigte die

T

extrasynoviale Gruppe während der gesamten Kultivierung erhöhte Expressionslevel und eine deutlich gesteigerte uPA-Sekretion.

Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass in Abhängigkeit des anatomischen Verlaufs der Sehnen Unterschiede in der Proliferation der humanen Tendozyten sowie in der Expression und Freisetzung von uPA und uPAR bestehen. Es zeigt sich ein reziproker Zusammenhang zwischen der uPA-Freisetzung und Zellproliferation, welcher in weiteren Untersuchungen Rückschlüsse auf die Regenerationsfähigkeit verschiedener Sehnen zulassen könnte.

## Summary

Tendon and ligament injuries are among the most frequent diagnoses of a traumatological or orthopaedic department. It can affect anyone from the young, trained competitive athlete to the elderly with sedentary lifestyle. Every year, tendon injuries cause enormous economic, but also personal damage, as they lead to great impairments of the mobility in affected individuals.

However, there are clinical differences in the healing capacities of different tendons and ligaments, which must be considered in the treatment individually. Therefore, during the past 15 years, regeneration processes of tendons and ligaments and the possibilities of supportive therapies have been subjects of extended research.

The serine protease urokinase type plasminogen activator (uPA) and its receptor (uPAR) are associated with mechanisms of cell proliferation, migration, angiogenesis, and tissue regeneration in addition to their fibrinolytic activity.

The study of the expression and release of uPA and uPAR from human tendocytes of different origins is the aim of this work. 27 samples of human tendons and ligaments (biceps tendons, femoral head ligament, anterior cruciate ligament (ACL), quadriceps tendons, Achilles' tendon, patellar tendon) were digested with collagenase and then cultivated as primary cell culture *in vitro* for one week. After one passage, all cultures were reseeded in the same cell density and cultivated over 14 days without further trypsination. At defined times (day 1, 4, 7, 11, 14), the proliferation rate of each culture was determined by cell counting and the tendocytes and the medium were preserved. In addition to uPA and uPAR expression, tendocyte-characteristic markers (scleraxis, tenomodulin, tenascin C, collagen 1) were investigated from the cells by means of qRT-PCR. To measure the release of uPA and uPAR from the cells, an ELISA was applied to the preserved cell culture medium.

In our experiments, all human tendocytes expressed and secreted uPA and uPAR *in vitro*, each with the highest mRNA concentration at the beginning of cultivation and continuously

increasing release of both proteins. Divided by their anatomical origin, tendocytes from ACL proliferated more slowly and secreted the smallest amount of uPAR but showed the highest expression of both proteins and the highest release of uPA over the entire cultivation. Tendocytes of LCF origin proliferated the fastest and secreted the lowest uPA amounts towards the end of cultivation. Grouped according to the course of the tendon samples taken in the tissue (biceps and LCF intrasynovial, ACL and quadriceps extrasynovial), there were slight differences in cell proliferation and the release of uPAR. However, the extrasynovial group showed increased expression levels and significantly increased uPA secretion throughout cultivation.

Our results suggest that depending on the anatomical course of the tendons, there are differences in proliferation of human tendocytes, as well as in expression and release of uPA and uPAR. There is a reciprocal relationship between uPA release and cell proliferation, which might allow conclusions about the regenerative capacity of different tendons in further investigations.

## II. Abkürzungsverzeichnis

ACL / VKB	Vorderes Kreuzband	engl.: anterior cruciate ligament
ANOVA	Varianzanalyse	engl.: analysis of variance
AS	Aminosäure	
ATF	aminoterminales Fragment	
°C	Grad Celsius	
cDNA		engl.: complementary DNA
cm	Zentimeter	
Cm²	Quadratzentimeter	
Ct		engl.: threshold cycle
∆Ct / dCt	Delta-Ct	engl.: Comparative Ct
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid	
COL1A1/ Col1	Collagen 1A1	
d1/ d4/ d7/ d11/ d14	Versuchstage 1 - 14	
DMEM	Nahrmedium	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid	
DNA / DNS	Desoxyribonukleinsäure	
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphate	
dt	deutsch	
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	
EGF		engl.: <i>Epidermal growth</i> factor
EGFR		engl.: <i>Epidermal growth</i> factor receptor
ELISA		engl.: Enzyme linked Immunosorbent Assay
engl.	englisch	
ERK		engl.: extracellular-signal regulated kinases
EZM	Extrazellularmatrix	
FCS	fötales Kälberserum	engl.: fetal calf serum
fg	Femtogramm	
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor	

g [h]	Generationszeit in Stunden	
g	Gramm	
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat- Dehydrogenase	
gDNA	genomische DNA	
GF	Wachstumsfaktor	engl.: Growth factor
GFD		engl.: Growth factor-like domain
GPI	Glycosylphosphatidylinositol	
h	Stunde(n)	
HMW	hochmolekular	engl.:high-molecular-weight
H <sub>2</sub> O	Wasser	
ICD-10	10. Version der internationalen statistischen Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme	engl.: International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems
kDa	Kilodalton	
lat.	lateinisch	
LCF	Hüftkopfband	lat.: Ligamentum capitis femoris
log	Logarithmus	
Μ	männlich	
mg	Milligramm	
mL	Milliliter	
MW	Mittelwert	
min	Minute(n)	
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure	engl.: messenger RNA
mM	Millimol	
mm	Millimeter	
mm²	Quadratmillimeter	
mm³	Kubikmillimeter	
MMP	Matrix-Metalloproteasen	
MSC	mesenchymale Stammzellen	
μL	Mikroliter	
μm	Mikrometer	
n	Anzahl von z.B. Generationen, Proben	

n	Generationszahl	
n/24h	Proliferationsrate in 24h	
Ν	Newton	
No	Ausgangszellzahl	
N <sub>1</sub>	Erreichte Zellzahl zum Versuchszeit- punkt	
N <sub>2</sub>	Stickstoff	
NaCl	Kochsalzlösung	
ng	Nanogramm	
NK	Negativkontrolle	
nm	Nanometer	
NSAR	Nichtsteroidales Antirheumatikum	
OPS-Code	Operationen- und Prozedurenschlüssel	
P0	Passage 0, Primärkultur	
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1	
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung	engl.: Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion	engl.: <i>polymerase chain</i> reaction
pq	Pikogramm	
	nlättebenreichen Diesme	
PRP	plattenenreiches Plasma	engl.: platelet rich plasma
PRP PSG	Penicillin/Streptomycin/L-Glutamin	engl.: platelet rich plasma
PRP PSG qRT-PCR	Penicillin/Streptomycin/L-Glutamin	engl.: platelet rich plasma engl. Real-Time Quantitative Reverse Transcription polymerase chain reaction
PRP PSG qRT-PCR r	Penicillin/Streptomycin/L-Glutamin Korrelationskoeffizient	engl.: platelet rich plasma engl. Real-Time Quantitative Reverse Transcription polymerase chain reaction
PRP PSG qRT-PCR r RLT-Puffer	Penicillin/Streptomycin/L-Glutamin Korrelationskoeffizient Lyse-Puffer des RNeasy Kits (Firma Qiagen, Hilden, Deutschland)	engl.: platelet rich plasma engl. Real-Time Quantitative Reverse Transcription polymerase chain reaction
PRP PSG qRT-PCR r RLT-Puffer RNA	Penicillin/Streptomycin/L-Glutamin Korrelationskoeffizient Lyse-Puffer des RNeasy Kits (Firma Qiagen, Hilden, Deutschland) Ribonukleinsäure	engl.: platelet rich plasma engl. Real-Time Quantitative Reverse Transcription polymerase chain reaction
PRP PSG qRT-PCR r RLT-Puffer RNA rpm	Penicillin/Streptomycin/L-Glutamin Korrelationskoeffizient Lyse-Puffer des RNeasy Kits (Firma Qiagen, Hilden, Deutschland) Ribonukleinsäure Umdrehungen pro Minute	engl.: platelet rich plasma engl. Real-Time Quantitative Reverse Transcription polymerase chain reaction engl.: Rounds per minute
PRP PSG qRT-PCR r RLT-Puffer RNA rpm RT	Penicillin/Streptomycin/L-Glutamin Korrelationskoeffizient Lyse-Puffer des RNeasy Kits (Firma Qiagen, Hilden, Deutschland) Ribonukleinsäure Umdrehungen pro Minute Raumtemperatur	engl.: platelet rich plasma engl. Real-Time Quantitative Reverse Transcription polymerase chain reaction engl.: Rounds per minute
PRP PSG qRT-PCR r RLT-Puffer RNA rpm RT SCX	Penicillin/Streptomycin/L-Glutamin Korrelationskoeffizient Lyse-Puffer des RNeasy Kits (Firma Qiagen, Hilden, Deutschland) Ribonukleinsäure Umdrehungen pro Minute Raumtemperatur Scleraxis	engl.: platelet rich plasma engl. Real-Time Quantitative Reverse Transcription polymerase chain reaction engl.: Rounds per minute
PRP PSG qRT-PCR r RLT-Puffer RNA rpm RT SCX SD	Penicillin/Streptomycin/L-Glutamin Korrelationskoeffizient Lyse-Puffer des RNeasy Kits (Firma Qiagen, Hilden, Deutschland) Ribonukleinsäure Umdrehungen pro Minute Raumtemperatur Scleraxis Standardabweichung	engl.: platelet rich plasma engl. Real-Time Quantitative Reverse Transcription polymerase chain reaction engl.: Rounds per minute engl.: standard deviation

SMAD-Kaskade	Verschaltung intrazellulärer Proteine	
SPECT		engl.: single photon emission computed tomography
STD	Standard	
suPAR	löslicher Urokinase-Rezeptor	engl.: soluble uPAR
t	Zeit	
TAK1	Proteinkinase	
TGFβ		engl.: <i>transforming growth</i> factor-beta
TNC	Tenascin C	
TNMD	Tenomodulin	
TSPC	Sehnenvorläuferzellen	engl.: <i>tendon stem /</i> progenitor cells
U	Einheiten	engl.: <i>units</i>
uPA	Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator	engl.: Urokinase-type plasminogen activator
uPAR	Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator Rezeptor	engl: Urokinase-type plasminogen activator receptor
VEGF		engl.: vascular endothelial growth factor
W	weiblich	

## III. Inhaltsverzeichnis

1	E	Einleit	leitung1		
	1.1	Seh	ehnen und Bänder 1		
	1.1	.1	Entstehung von Sehnen und Bändern	2	
	1.1	.2	Aufbau und Funktion von Sehnen und Bändern	3	
	1.1	.3	Verletzungen an Sehnen und Bändern	7	
	1.1	.4	"Heilung" von Sehnen und Bändern	8	
	1.1	.5	Behandlungsoptionen bei Verletzungen von Sehnen und Bändern	9	
	1.2	Uro	kinase-Typ Plasminogen Aktivator (uPA) und sein Rezeptor (uPAR)	. 12	
	1.2	.1	uPA = Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator / Urokinase	. 12	
	1.2	.2	uPAR = Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator Rezeptor / CD87	. 13	
2	Z	Ziele d	er Arbeit	. 16	
3	ſ	Mater	ial und Methoden	. 17	
	3.1	Pati	entenkollektiv	. 17	
	3.2	Prol	pengewinnung und Aufbereitung	. 17	
	3.3	Ten	dozytenproliferation	. 19	
	3.4	Best	timmung der Proliferationsrate	. 21	
	3.5	Qua	ntitative <i>real-time</i> Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (qRT - PCR)	. 22	
	3.5	.1	Begriffsklärung	. 22	
	3.5	.2	Probengewinnung für die qRT-PCR	. 25	
	3.5	.3	Versuchsansatz und Belegungsplan	. 27	
	3.5	.4	Verwendete PCR-Primerpaare	. 28	
	3.6	Enzy	yme linked Immunosorbent Assay (ELISA)	. 28	
	3.6	.1	Probengewinnung für den ELISA	. 29	
	3.6	.2	Versuchsansatz und Plattenbelegung im ELISA	. 30	
	3.7	Stat	istische Auswertung	. 31	
4	E	Ergebr	nisse	. 32	
	4.1	Pati	entenkollektiv	. 32	
	4.2	Zelll	kultur und Proliferationsrate	. 35	
	4.3	Zusa	ammenhang Proliferationsrate und Spenderalter	. 41	
	4.4	qRT	-PCR	. 42	
	4.4	.1	Expressionslevel der Marker	. 42	
	4.4	.2	Expression im Vergleich von intra- und extrasynovialem Probenursprung	. 51	
	4.5	Korı	relation Teilungsrate (n/24h) vs. relative Expression uPA / uPAR	. 59	
	4.6	ELISA		. 60	

	4.	6.1	.1 Freisetzung von uPA ins Zellkulturmedium über den Versuchszeitraum		
	4.	6.2	Freisetzung von uPAR ins Zellkulturmedium über den Versuchszeitraum	. 66	
5		Diskus	sion:	. 71	
	5.1	Prol	iferationsrate der Tendozyten als Maß der Regenerationsfähigkeit	. 72	
	5.	1.1	Exogene Einflüsse auf die Proliferation	. 72	
	5.	1.2	Endogene Faktoren für die Proliferation	. 77	
	5.2	Zellu	uläre Interaktionswege von uPA / uPAR	. 80	
6		Zusam	menfassung und Ausblick	. 83	
7		Literat	ur- und Quellenverzeichnis	. 84	
8		Abbild	ungs- und Tabellenverzeichnis	100	
	8.1	Abb	ildungen	100	
	8.2	Tabe	ellen	102	
9		Danksa	agung	103	

## 1 Einleitung

### 1.1 Sehnen und Bänder

Sehnen (lat. tendo) und Bänder (lat. ligamentum) bilden im menschlichen Körper belastbare Verbindungen im Bereich von Gelenken oder als Verbindung zwischen Muskeln und Knochen. In Form von Bändern dienen sie der Stabilität von Gelenken, während Sehnen eine Kraftübertragung von Muskeln auf Knochen und somit die Beweglichkeit der Gelenke ermöglichen. Die einzelnen Sehnen und Bänder zeigen eine große Variabilität nicht nur in ihrer Funktion, sondern auch in Morphologie, Belastbarkeit, und der klinischen Beobachtung nach, auch in ihrer individuellen Regenerationsfähigkeit. Da Verletzungen, ob traumatisch oder degenerativ, in jedem Alter auftreten, und zu unterschiedlichsten Beeinträchtigungen des Individuums führen, rücken wissenschaftliche Untersuchungen zur Regenerationsfähigkeit oder Behandlungskonzepten immer wieder in den wissenschaftlichen Fokus. Die einzelnen Vorgänge der Regeneration und ihre Beeinflussbarkeit sind nach wie vor noch nicht in Gänze wissenschaftlich erfasst. Auch wenn sich Sehnen und Bänder in verschiedenen Aspekten unterscheiden, sollen sie in dieser Arbeit zusammengefasst bearbeitet werden, da verschiedene Arbeitsgruppen eine ähnliche Ultrastruktur und Physiologie beschrieben haben (10-13). Die makroskopisch sehr divergierende Form von Sehnen und Bändern, von fächerförmig über flach, bis hin zu rund oder zylinderförmig, ist stark von der Lokalisierung und Beanspruchung der einzelnen Struktur abhängig (14). So existieren, neben Ursprungs- oder Ansatzsehnen eines Muskels, auch Sehnenplatten zwischen einzelnen Muskelbäuchen. Während manche Sehnen und Bänder durch Weichteilgewebe gedeckt ihren Zielort erreichen, ziehen andere frei durch Gelenkhöhlen oder in separaten Sehnenscheiden. Durch ihre Verläufe und Ansatzpunkte in Abhängigkeit vom Rotationszentrum eines Gelenks tragen Sehnen und Bänder selbst maßgeblich zu dessen Stabilität und Beweglichkeit bei (15). Durch diese Unterschiede divergieren Sehnen und Bänder sehr in Länge und Durchmesser, von einigen Millimetern bis zu mehreren Zentimetern. Die längste Sehne des menschlichen Körpers bildet mit einer Länge von bis zu 45 cm die Sehne des Fußsohlenmuskels (lat. Musculus plantaris) im Unterschenkel. Die kräftigste Sehne ist mit einem Durchmesser von gut 1 cm die Achillessehne. Diese ist gleichzeitig auch die belastbarste Sehne des menschlichen Körpers. So kann sie maximalen Belastungen von bis zu 60-100 N/mm<sup>2</sup> gewachsen sein. Dies entspricht teilweise dem zehnfachen Körpergewicht, zum Beispiel beim Springen und Rennen (16, 17).

Die mechanische Belastung einer Sehne scheint zusätzlich essenziell für die Entwicklung der Sehne, ihre Stabilität und letztlich auch Regenerationsfähigkeit zu sein, wie verschiedene Arbeitsgruppen in den letzten Jahren zeigen konnten (18, 19).

Da Sehnen- und Bandverletzungen eine häufige klinische Entität darstellen, sind die Kosten im Gesundheitssystem und sozio-ökonomische Folgen nicht außer Acht zu lassen (20). Betrachtet man nur die häufigsten Verletzungen, zum Beispiel die Achillessehnenruptur, die Rotatorenmanschettenruptur oder die Ruptur des vorderen Kreuzbandes anhand der Daten des *"Instituts für das Entgeltsystem im Krankenhaus"* (InEK GmbH), so findet man für das Kalenderjahr 2021 eine Kodierungshäufigkeit des ICD-10-Codes für Achillessehnenruptur (S86.0) als Hauptdiagnose von 10.937 Fällen, für die Rotatorenmanschettenruptur (traumatisch oder degenerativ, S46.0 bzw. M75.1) von insgesamt 49.345 Fällen und bei der vorderen Kreuzbandruptur (S83.53) von 19.293 Fällen, unabhängig von der angeschlossenen Behandlungsform (21; abgerufen am 23.03.2022, 12h).

Aus diesen Gründen besteht ein wissenschaftliches Interesse an der Erforschung und Entwicklung von alternativen Behandlungsansätzen.

## 1.1.1 Entstehung von Sehnen und Bändern

Sehnen und Bänder entstehen im menschlichen Körper in der Embryonalzeit aus dem sogenannten Mesoderm, also dem mittleren der drei Keimblätter. Hier zeigt sich bereits der enge Zusammenhang zu den anderen Bestandteilen des Bewegungsapparats, wie zum Beispiel Knorpel und Knochen, die ebenfalls aus dem Mesoderm entstehen (22, 23). Über die Entwicklung der Somiten entstehen das sogenannte Sklerotom und das Myotom und hieraus letztlich die Muskeln, Knochen und Knorpel des Bewegungsapparats (22). Lange Zeit wurde auch der Ursprung der Sehnen und Bänder hier vermutet. Mittlerweile ist aber, über die Expression des sehnenspezifischen Transkriptionsfaktors Scleraxis durch Schweitzer et al., ein separates Kompartiment beschrieben worden, in dem sich aus Vorläuferzellen über die Differenzierung zu Tendozyten Sehnen und Bänder entwickeln (24). Dieses Kompartiment nannten sie, in Anlehnung an das griechische Wort *syndesis* (dt. "etwas zusammenfügen") und die spätere Funktion des hier entstehenden Gewebes, Syndetom (23-25).



Abb. 1: Schematische Darstellung der embryologischen Entwicklung von Sehnen und Bändern im sogenannten Syndetom. Aus den Somiten entwickeln sich das Sklerotom und das Dermomyotom. Letzteres teilt sich im Folgenden in das Dermotom und das Myotom, aus denen später Haut und Skelettmuskulatur entstehen. Aus dem ventralen Sklerotom bildet sich das Syndetom als Grundlage der Sehnen und Bändern (26)

## 1.1.2 Aufbau und Funktion von Sehnen und Bändern

Der Aufbau von Sehnen und Bändern ist wissenschaftlich erforscht. In Arbeiten wurde ein streng hierarchischer, mikroskopischer und makroskopischer Aufbau gezeigt, wobei sich die meisten Arbeiten mit dem Aufbau von Sehnen und weniger mit Bändern im Einzelnen beschäftigen. Vergleichende Arbeiten, wie zum Beispiel von Rumian et al. 2007, zeigten im

Tiermodell Unterschiede, zum Beispiel in der Collagenfibrillenlänge bei Sehnen und Bändern (11).

Insgesamt sind Sehnen und Bänder hypozelluläre Gewebe. In frühen Arbeiten wurden sie auf

Grund der geringen Zellzahl und schlechten Blutversorgung als "dead, during life" (27) beschrieben, da bereits im letzten Jahrhundert die Heilungstendenz von Sehnenverletzungen als limitiert beurteilt und die Chirurgie bei ihrer Behandlung vor Probleme gestellt wurde. Den größten, zellulären Bestandteil von Sehnen und Bändern bilden mit 90-95 % die Tenozyten bzw. Tendozyten und tendon stem/progenitor cells (TSPC) (28-34). Bei diesen spindelförmigen Zellen handelt es sich um spezialisierte Fibroblasten, die sich im Prozess der Sehnenentwicklung in überwiegend paralleler Anordnung entlang des Längsverlaufs der Sehne bzw. des Bandes zusammenlagern. Umgeben werden die Zellen von der Extrazellulären Matrix (EZM), die von den Zellen gebildet und moduliert wird (35). Der Hauptbestandteil der EZM, das Collagen (ca. 70-80 % der Trockenmasse), wird als Procollagen von den Tendozyten selbst gebildet und sezerniert. (14, 36-38). Collagen ist ein wichtiger Bestandteil von verschiedenen Gewebeverbänden. Insgesamt sind in der Literatur 28 verschiedene Collagentypen beschrieben, die in ihrer Anzahl und Zusammensetzung typisch für die unterschiedlichen Gewebe sind. In Sehnen sind hauptsächlich die Collagentypen I und III vertreten (97–98 %). Beschrieben werden auch Collagen II, V, und XI, während die übrigen Untergruppen so gut wie nicht vorkommen (36, 39, 40). Man unterscheidet die verschiedenen Collagen-Subtypen anhand ihrer Zusammensetzung aus unterschiedlichen Polypeptidketten, den sogenannten alpha-Ketten (Sekundärstruktur). Collagen I besteht aus zwei alpha-1-Ketten und einer alpha-2-Kette, die sich intrazellulär zusammen lagern und eine etwa 300 nm lange Triplehelix formen (14, 28, 35). Diese Tertiärstruktur wird durch die spezifische Aminosäurezusammensetzung der alpha-Ketten ermöglicht, die sehr viel Glycin und Prolin enthalten. Glycin, die kleinste Aminosäure, ermöglicht die enge Helixform, während das Prolin über seine Ringstruktur für Stabilität sorgt (35, 41). So entsteht in den Tendozyten das Procollagen, als Vorläufer des reifen Collagen I. Bei Freisetzung des Procollagens in die EZM werden die C- und N-terminalen Propeptide durch Telopeptidasen abgespalten. Die Aminosäureketten lagern sich anschließend spontan zu Mikrofibrillen zusammen und bilden die Grundlage der reifen Sehnenstruktur (35, 38, 41, 42). Durch weitere Anlagerungen entstehen Collagenfibrillen mit einem Durchmesser von etwa 100-500 nm. Lagern sich nun wiederrum mehrere dieser Collagenfibrillen zu einem Bündel zusammen, entsteht die kleinste lichtmikroskopisch sichtbare Einheit, die Collagenfaser mit einem Durchmesser von ca. 1-50 µm. Umgeben werden diese als Primärbündel bezeichneten Einheiten vom sogenannten Endotenon, einem Bindegewebe, welches als Leitstruktur für die versorgenden Gefäße und Nerven fungiert. Durch die weitere Zusammenlagerung einzelner Primärbündel entstehen sogenannte Sekundärbündel und aus diesen letztlich die ausgereifte

Sehne mit einem Durchmesser von bis zu 12 mm und der bereits beschriebenen sehr variablen Form. Den äußeren Abschluss der Sehne bildet das Epitenon. Manche Sehnen, wie zum Beispiel die langen Hand- und Fußsehnen, umgeben sich zuletzt, je nach Verlauf und Funktion, noch mit einem Paratenon, welches hauptsächlich als Gleit- und Verschiebeschicht im Bereich von Sehnenscheiden, dient (43).



Abb. 2: Hierarchischer Aufbau einer Sehne. In der kleinsten anatomischen Einheit lagern sich mehrere Collagenmoleküle zu einer Collagenfibrille zusammen. Aus mehreren Fibrillen entstehen die Collagenfasern und letztlich die Faserbündel. Umgeben werden die einzelnen Bündel von dem bindegewebigen Endotenon. Die letzte Grenzschicht der Sehne bildet das Epitenon (43).

Neben den Collagenbestandteilen mit einem Anteil von circa 65-75 % an der Gesamtmasse der Sehne, sind es vor allem Wasser, Proteoglykane, Glykoproteine und elastische Fasern der EZM, die für die Belastbarkeit und Dehnung der Sehnen notwendig und somit entscheidend für die Funktion sind. Zu den Proteoglykanen in Sehnen und Bändern werden zum Beispiel Decorin, Biglykan, Fibromodulin und Lumican gezählt (44). Diese sind vor allem bei der Vernetzung der Collagenfibrillen von Nutzen (40-42). Weitere vorhandene Glykoproteine sind Tenomodulin und Tenascin. Tenomodulin scheint eine wesentliche Rolle in der Tendozytenadhäsion und -Proliferation sowie bei der Collagenfibrillenreifung zu spielen (45), während Tenascin ein Bindeglied bei der Zelladhäsion und der Interaktion mit Matrix-Metalloproteinasen ist (46, 47). Durch den Aufbau der EZM erhalten die Sehnen und Bänder ihre unter dem Mikroskop sichtbare, wellenförmige Struktur, auch als "crimp" bezeichnet (48). Hierdurch sind sie in der Lage, auf wechselnde mechanische Belastungen zu reagieren. Steigert sich die mechanische Belastung, so nähert sich die jeweilige Konfiguration einer linearen Anordnung an. Durch diesen Mechanismus sind Belastungen bis zu einem gewissen Grad ohne bleibende Schäden tolerabel und die Struktur kehrt nach Beendigung der Belastung wieder in ihre Ausgangsform zurück (17, 49). Die maximale Belastbarkeit ist somit abhängig von der Collagenanordnung (14, 18). Dies stellt einen der größten Unterschiede zwischen Sehnen und Bändern dar. Während Sehnen eine parallele Anordnung des Collagens aufweisen und somit eine optimale Kraftübertragung gewährleisten, zeigen Bänder auch

quervernetzende Collagenmoleküle und dienen überwiegend der Stabilisierung (13, 17, 49, 50). Bei Sehnen und Bändern handelt es sich um ein hypozelluläres, hypovaskuläres Gewebe. Die Gefäßversorgung und Innervation verläuft innerhalb des Endotenons. Für die einzelnen Sehnen ergibt sich eine mögliche Blutversorgung aus den Übergangsbereichen von Muskel zu Sehne und Sehne zu Knochen. Die übrigen Bereiche werden überwiegend durch benachbarte Gewebe ernährt, so dass man Sehnen und Bänder, ähnlich wie Knorpel, als bradytrophes Gewebe ansehen muss, welches anfällig für Veränderungen und Verletzungen ist (51, 52). Im Laufe des Lebens verändern sich die Sehnen und Bänder (31, 53-55). Dabei nimmt die Anzahl der Tendozyten ab, die verbleibenden Zellen werden flacher und ihre zytoplasmatischen Fortsätze reduzieren sich. Die von den verbliebenen Zellen gebildete EZM verändert sich ebenfalls, wie Peffers et al. 2014 in einem Tiermodell anhand der in den vergangenen Jahren aufgekommenen Proteomanalyse zeigen konnten (56). Die Anzahl der Collagenfibrillen nimmt ab, das für die Belastbarkeit elementare "crimping" geht zurück (57). All diese Vorgänge begünstigen degenerative Veränderungen und bilden somit Risikofaktoren für die Entstehung akuter oder chronischer Sehnenverletzungen im Alter. Sie können aber auch Ansatzpunkt bei der Entwicklung neuer Behandlungsmethoden sein.

Obwohl sich Sehnen und Bänder in ihrem histologischen Aufbau ähneln und beide Bestandteile des Bewegungsapparats mit vergleichbarer Physiologie sind, verfügen sie, bei genauer Betrachtung, über grundlegend unterschiedliche Funktionen (10-13). Während Sehnen als Verbindung zwischen Muskulatur und Knochen der Lastübertragung und letztlich der Bewegung an sich dienen, limitieren Bänder die Beweglichkeit, vor allem im Bereich von Gelenken und sorgen so für eine höhere Stabilität. Zusätzlich können die Funktionen oder Verläufe von Sehnen noch durch die Einbettung so genannter Sesambeine modifiziert werden, wie dies zum Beispiel bei der Patella der Fall ist. Proximal der Patella zieht die Quadrizepssehne von der Muskulatur zum oberen Patellapol, während vom unteren Patellapol die Patellarsehne zur Insertion an der *Tuberositas tibiae* des Unterschenkels zieht.

Für die einzelnen Funktionen von Sehnen und Bändern sind die Strukturen und Bestandteile der EZM unabdingbar. In Kadaverstudien konnten durchschnittliche, passive Dehnbarkeiten bei menschlichen Sehnen von 5-6 % gezeigt werden (58-60). Ab einer Belastung >8-10 % wurden makroskopische Verletzungen der Fibrillenstruktur festgestellt (17, 61). Dabei spielen auch die zahlreichen elastischen Fasern der EZM eine große Rolle. Erst durch sie wird eine Energiespeicherung und -freisetzung und somit Erleichterung der körperlichen Arbeit bei Bewegung ermöglicht (11, 50). Bei allen Bewegungen sind es die Tendozyten, die die mechanischen Belastungen in den Sehnen und Bändern wahrnehmen. Sie verfügen über ein gewisses Maß an Propriozeption und tragen durch Modulation der EZM maßgeblich zur Anpassung an die wechselnden Belastungen bei (62). Sind die Belastungen zu hoch oder

6

versagen die Schutzmechanismen, so kommt es zu unterschiedlichsten Umbauprozessen, aus denen wiederrum Verletzungen und Funktionsverlust resultieren können.

## 1.1.3 Verletzungen an Sehnen und Bändern

Sehnen- und Bandverletzungen oder -erkrankungen sind ein häufiges klinisches Erscheinungsbild. Dabei sind alle Altersgruppen und beide Geschlechter gleichermaßen betroffen. Neben akuten traumatischen Verletzungen kommen degenerative Veränderungen vor, so dass diese Pathologien einen großen sozio-ökonomischen Faktor darstellen. Zu den Sehnenerkrankungen, den sogenannten Tendinopathien, zählen die entzündlichen Veränderungen oder die altersbedingten Degenerationen. Zu den akuten Sehnenverletzungen muss man vor allem die Sehnenrupturen zählen. Diese treten sowohl spontan, durch äußere Einwirkung eines direkten Traumas, bei Fehlbe- oder Überlastung, aber auch aufgrund von degenerativen oder entzündlichen Prozessen auf. So fanden Kannus und Josza 1991 in 97 % der untersuchten Rupturen vorbestehende, degenerative Veränderungen (63). Des Weiteren sind als spezielle Entität direkte Durchtrennungen, zum Beispiel im Rahmen von Schnittverletzungen, keine Seltenheit.



**Abb. 3: Übersicht über pathologische Sehnenveränderungen modifiziert nach Hopkins et al.** (20). Man unterscheidet akute Verletzungen (Durchtrennung) und Veränderungsprozesse (entzündlich/ degenerativ).

In der Literatur werden verschiedene Risikofaktoren beschrieben, die mit einer erhöhten Rate an Sehnenverletzungen einhergehen. Dazu zählen neben extrinsischen Faktoren, wie zum Beispiel Rauchen und Übergewicht, auch intrinsische Faktoren wie Alter, Geschlecht oder genetische Faktoren (41, 58, 64-66). Weiteren Einfluss haben auch die (sportliche) Be- und Überlastung. Auf andauernde Überlastung reagieren Sehnen und Bänder mit Entzündungen oder degenerativen Veränderungen, was neben langanhaltenden Beschwerden auch zu akuten Rupturen führen kann (17, 67-70). Zusätzlich wurde ein Zusammenhang mit der Einnahme bestimmter Medikamente beobachtet. Hier stellte sich vor allem die Einnahme bestimmter Antibiotika der Fluorchinolongruppe oder die Therapie mit Glucocorticoiden als Risikofaktor für Sehnenverletzungen heraus (71-73). Neben den prädisponierenden Faktoren für die Entstehung einer Sehnen- oder Bandverletzung scheint es auch protektive Mechanismen zu geben. So zeigten Studien an einem Tiermodell, dass moderate körperliche Belastung zu einer erhöhten Zellproliferationsrate und einer verbesserten Collagensynthese führen kann (18, 41). Zu den häufigsten Sehnenverletzungen in Bezug auf die Jahresinzidenz zählen unter anderem die Achillessehnenruptur, die Rotatorenmanschettenruptur und die Ruptur der Beugesehnen der Hand (41, 74).

#### 1.1.4 "Heilung" von Sehnen und Bändern

Die Vorgänge, die im Anschluss an ein Trauma zu einer Reparatur der verletzten Sehnen und Bänder führen, sind noch nicht vollständig aufgeklärt und verstanden. Allgemein anerkannt ist ein überlappender, phasenartiger Verlauf, beginnend mit einer Inflammationsphase, einer folgenden Proliferationsphase und einem abschließenden Remodellierungsvorgang, der letztlich zu einer Defektdeckung führt (17, 75, 76). In der Inflammationsphase, die unmittelbar an das Trauma anschließt, dominiert initial eine Hämatombildung. Es kommt zu einer Freisetzung von chemotaktischen und vasoaktiven Faktoren (77). Erythrozyten und Entzündungszellen, einschließlich neutrophiler Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten wandern ein. Diese dienen einer Nekroseabtragung in den ersten Stunden nach der Verletzung. Es kommt zu einer gesteigerten Gefäßpermeabilität, einer Induktion der Neoangiogenese und zu einer Aktivierung von Tendozyten (77). Diese werden entweder intrinsisch aus dem Endo-/ Epitenon der Sehne selbst oder extrinsisch aus angrenzenden Hüllen rekrutiert (17, 51). Im Laufe der nächsten Tage kommt es zur zweiten Phase der Sehnenregeneration, der Proliferationsphase. In dieser Phase erreicht die Tendozytenmigration und -proliferation ihren Höhepunkt. Daraus resultiert auch die höchste Collagensyntheserate und Bildung der EZM zu diesem Zeitpunkt (17, 61). Nach einigen Wochen kommt es nach weiteren Umbauprozessen zum Abschluss der Sehnenregeneration. Die Tendozyten ordnen sich in Zugrichtung der Sehne an und die Zellzahl nimmt insgesamt wieder deutlich ab. Nach etwa 10 Wochen ist der Gewebedefekt vollständig gedeckt. Das neu entstandene Gewebe ist aber deutlich schwächer als das Ursprungsgewebe und narbenähnlich. Aus diesem Grund sprechen unterschiedliche Autoren auch nicht von einer Sehnenregeneration, sondern lediglich von einer Sehnenreparatur (41, 63, 78, 79).

Wodurch werden diese Limitationen der Regenerationsfähigkeiten erklärt? Bei Sehnen und Bändern handelt es sich um ein hypozelluläres Gewebe. Im Alter nehmen die absoluten Zellzahlen noch weiter ab. Ebenso ändert sich die Zellmorphologie der Tendozyten. Es überwiegt dann ein collagenhaltiges Bindegewebe, in dem die typischen Funktionen von Sehnen und Bändern wie Kraftübertragung, Energiespeicherung oder Propriozeption nicht

8

abgebildet werden können (80). Neben der geringeren Zellzahl im reifen Gewebe ist auch die Vaskularisierung kritisch. So befinden sich die versorgenden Gefäße vor allem im umgebenden Gewebe bzw. in den Insertionsregionen der Sehnen. Die Sehne selbst wird in ihrem Verlauf häufig durch Diffusion ernährt (81, 82). Die Rekrutierung von Zellen und auch von weiteren, für die Reparatur notwendigen Stoffen, wird somit im zunehmenden Alter schwieriger. Zusätzlich beschreiben einige Autoren auch generelle Unterschiede in den Selbstheilungskapazitäten von einigen Sehnen und Bändern, wie zum Beispiel dem VKB oder bei transmuralen Rupturen der Rotatorenmanschette (83-86). Dies wird durch klinische Beobachtungen und in vitro Studien gestützt, jedoch bleiben die genauen Mechanismen bisher ungeklärt. Denkbare Theorien liegen in den beschriebenen unterschiedlichen anatomischen Gegebenheiten der einzelnen Sehnen und Bänder. So ist es vorstellbar, dass durch den unterschiedlichsten angrenzenden Geweben variablen Verlauf mit verschiedene Ausgangssituationen bei der Sehnenregeneration geschaffen werden. Während der Regeneration freigesetzte Wachstumsfaktoren könnten, in einem gewebegedeckten Verlauf zum Beispiel, eher an der Defektzone gebunden werden als bei einem frei durch eine Körperhöhle ziehendem Verlauf. Notwendige Zellen könnten zusätzlich aus den angrenzenden Schichten aktiviert und rekrutiert werden. Hier werden in den kommenden Jahren noch weitere Arbeiten notwendig werden.

## 1.1.5 Behandlungsoptionen bei Verletzungen von Sehnen und Bändern

Im klinischen Alltag unterscheiden sich Sehnen- und Bandverletzungen sehr stark in ihren Therapieoptionen und -notwendigkeiten. Während einige Verletzungen mit gutem Ergebnis konservativ behandelt werden können, benötigen andere eine operative Versorgung, um ein Höchstmaß an Funktionalität zu gewährleisten. Im Jahre 2020 wurden in Deutschland laut Statistischem Bundesamt insgesamt 79.473 Operationen mit den OPS-Codes 5-854 (Rekonstruktion von Sehnen) und 5-855 (Naht und andere Operationen an Sehnen und Sehnenscheiden) bei vollstationären Patienten kodiert (87, <u>www.destatis.de</u>, abgerufen am 23.03.22; 15h). Dabei sollte die jeweilige Therapieentscheidung immer auf den individuellen Patienten abgestimmt sein (88). Insgesamt ist die wissenschaftliche Datenlage sehr inhomogen, so dass man häufig nur aus der klinischen Beobachtung Empfehlungen ableitet, während eindeutige Klassifikationen und somit Therapieindikationen fehlen (89-92).

Zu den konservativen Behandlungsmethoden auf der einen Seite zählt man alle Verfahren, die nicht eine primäre operative Behandlung der vorliegenden Sehnen- oder Bandverletzung bedingen. Diese können teilweise auch prophylaktisch eingesetzt werden (93, 94). Den meisten konservativen Behandlungskonzepten liegt initial eine Schonung der betroffenen Körperregion zu Grunde. Ob eine tatsächliche Ruhigstellung von Extremitäten oder Gelenken, zum Beispiel mittels stabilisierender Verbände oder Orthesen, oder eine vollständige Entlastung notwendig sind, ist sehr unterschiedlich (95, 96). Zusätzlich zählen alle Arten der physikalischen Therapie zu den gängigen verwendeten konservativen Therapieverfahren (97). Dabei gilt es, ein optimales Verhältnis von Be- und Entlastung zu schaffen, um ein gutes rehabilitatives Ergebnis zu erzielen. Eine medikamentöse Behandlung mit NSAR oder Injektionen (zum Beispiel Steroide, *Platelet-rich plasma* (PRP)) kann unterstützend eingesetzt werden (98-100). Weitere konservative Verfahren basieren auf therapeutischer Ultraschallanwendung oder Stoßwellentherapie (101-103).

Auf der anderen Seite stehen die operativen Behandlungen. Allgemein muss man festhalten, dass es bisher keinen Goldstandard bei der operativen Behandlung von Sehnen und Bändern gibt (41). Da sich die Methoden je nach Sehne oder Band sehr unterscheiden können, sollen hier nur allgemeine Prinzipien und spezielle Risiken aufgezeigt werden.

Die ursprünglichste Operationsmethode stellt die Rekonstruktion durch Naht, zum Beispiel nach Kirchmayr-Kessler oder Bunnell, dar (104). Dies ist sowohl offen chirurgisch als auch minimalinvasiv endoskopisch/ arthroskopisch, je nach Verlauf der betroffenen Bänder/ Sehnen möglich. Grundprinzip ist jedoch immer, dass die Stümpfe aneinander adaptiert werden und somit leichter verheilen können, da kein großer Defekt überbrückt werden muss.



Abb. 4: Schematische Darstellung der bekannten Sehnennaht nach Kirchmayr-Kessler.

Alternativ kann die rupturierte Sehne durch verschiedene Plastiken (zum Beispiel Z-Plastik, Griffschachtelplastik oder Umkippplastik) verlängert werden, wenn der Gewebedefekt zu groß ist. Sollte eine spannungsfreie Annäherung der rupturierten Enden nicht möglich sein, so sind auch Operationstechniken mit Interposition von *Auto-/ Allo-* oder *Xenografts* etabliert. Hierbei wird die entstandene Lücke durch anderes Sehnenmaterial gedeckt. Dieses kann vom Patienten selbst gewonnen werden (*Autograft*) oder aber auch von einem anderen menschlichen Spender (*Allograft*) bzw. aus tierischem Material (*Xenograft*) bestehen. Beim Sehnenersatz/ -transfer bleibt, als häufig die Heilung limitierendes Problem, die reduzierte Vaskularisierung und das damit verbundene Nekroserisiko. Als Alternative zu biologischen *grafts* werden Versuche mit künstlichen Prothesen (zum Beispiel aus Collagen oder Seide) auch in Kombination mit biologischen Zusätzen, wie Wachstumsfaktoren oder PRP

unternommen (105-113). Ein optimales Material konnte jedoch noch nicht identifiziert werden. Hierbei sind die Grenzen bisher vor allem in der nicht flexiblen Belastbarkeit und in körpereigenen Umbau-/ Abbauprozessen zu sehen. Bei ansatznahen Rupturen besteht eine weitere operative Behandlungsmethode in der Fixierung des Sehnenstumpfes am Knochen, zum Beispiel mittels Titan-Ankern. Hier variieren die klinischen Ergebnisse je nach Lokalisation stark. So fanden Schönberger et al. in einer Studie von 2008 bei der vergleichenden Untersuchung von klassischer End-zu-End-Naht und Fixierung mittels Mitek-Anker bei der Achillessehnenruptur eine Unterlegenheit der Ankermethode (114), während zum Beispiel die Refixierung der distalen Bizepssehne mittels Fadenanker in einer retrospektiven Studie von Al-Taher et al. 2014 sehr gute funktionelle Ergebnisse erbrachte (115).

Da bisher keine der operativen Maßnahmen die volle Funktionsfähigkeit und direkte Belastbarkeit, ähnlich einer intakten Sehne, gewährleisten konnte, rückten in den vergangenen Jahren neue Behandlungsversuche zur Beeinflussung der Selbstheilungskapazität von Sehnen und Bändern in den Fokus wissenschaftlicher Arbeit. So gab es neue Ansätze mit beschichtetem Nahtmaterial oder beschichteten Trägerstoffen, in die Wachstumsfaktoren oder Zellen eingearbeitet sind. Diese im Rahmen des *tissue engineering* (Gewebekonstruktion) entwickelten Systeme bestehen aus drei Komponenten: einer Zellreihe, einem Trägermaterial oder "scaffold" und bioaktiven Substanzen wie zum Beispiel Wachstumsfaktoren. Dadurch kann die Proliferation der Zellen unterstützt bzw. eine vollständige Defektdeckung erzielt werden. Allerdings treten bei der Entwicklung dieser Behandlungsmethoden eigene Schwierigkeiten auf. So werden vitale Zellen für die Einbettung in das Trägermaterial benötigt, deren Gewinnung in ausreichender Zahl bisher nicht sichergestellt werden kann (41). Ein möglicher Lösungsansatz liegt im Bereich der Stammzellforschung. Hierbei zeigen vor allem mesenchymale Stammzellen (MSC) und TSPC vielversprechende Eigenschaften (29, 116-120). Inwieweit sie sich therapeutisch nutzen lassen, muss weiter untersucht werden. Ebenso müssen die Trägerstoffe unterschiedlichsten mechanischen Belastungen und biologischen Anforderungen gerecht werden können. In der Entwicklung und Erprobung befinden sich ursprüngliche Sehnengrundgerüste (121, 122), synthetische Polymere (112, 113, 123) und Proteinabkömmlinge, wie zum Beispiel Collagenderivate (124, 125). Auch im Bereich der zugesetzten, bioaktiven Substanzen bzw. Wachstumsfaktoren konnte bisher keine klare Empfehlung ausgesprochen werden, da die bisherigen Untersuchungen zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen führten (126-129). Insgesamt scheint dieser Ansatzpunkt jedoch vielversprechend, auch wenn hier noch viel Forschungsarbeit geleistet werden muss. Unabhängig von der gewählten operativen Behandlungsform ist die Re-Rupturrate von Sehnen- und Bandverletzungen nicht zu unterschätzen, liegt jedoch je nach Autor und beschriebener Lokalisation unter der Re-Rupturrate bei konservativer Therapie (130-132). Zusätzlich werden nach operativer Behandlung Insuffizienzen durch inadäguate

11

Verlängerungen beschrieben (133, 134). Diese können ähnlich der präoperativen Verletzung zu Beeinträchtigungen der Funktion der Sehnen und Bänder führen. Auf weitere allgemeine Komplikationen der operativen Behandlung, wie Wundheilungsstörungen oder thromboembolische Ereignisse, soll an dieser Stelle nicht weiter eingegangen werden (135, 136).

## 1.2 Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator (uPA) und sein Rezeptor (uPAR)

Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator (uPA) und sein Rezeptor (uPAR) wurden im Laufe der vergangenen Jahre in einer Vielzahl von humanen Zellen und Körperflüssigkeiten nachgewiesen (137-140). Dabei konnten sie mit den verschiedensten Prozessen der Zellmigration, der Angiogenese oder Gewebeorganisation, aber auch mit diversen Karzinommetastasierungsvorgängen in Verbindung gebracht werden (3-7). Zunehmend findet der Komplex aus Plasminogenaktivatoren und ihren Rezeptoren auch klinische Anwendung (8, 9). Seit Jahren etabliert ist die Verwendung als Fibrinolytikum bei der Behandlung von Thrombosen und Embolien. In jüngerer Vergangenheit wurde auf Basis von uPA/PAI-1 als prognostischen Markern ein Test für Brustkrebspatienten/-innen entwickelt, der Rückschlüsse auf Metastasierungsrisiken zulassen soll (Femtelle® uPA/PAI-1 Test, BioMedica Diagnostics, Windsor, Kanada). Ebenfalls laufen onkologische Medikamentenstudien, in denen uPA als Zielstruktur dient (s. Medikament upamostat, RedHill Biopharma Ltd., Tel Aviv, Israel) und auch verschiedene *in vitro* und *in vivo* Studien über den Nutzen des uPA/uPAR-Komplexes als Zielstruktur in der medizinischen Bildgebung, zum Beispiel zur Überwachung von Krankheitsprogressionen (138, 139).

## 1.2.1 uPA = Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator / Urokinase

uPA ist eine katalytisch aktive Serinprotease. Sie besteht aus 411 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von etwa 54 kDa. Sie wird als inaktive Form pro-uPA in verschiedenen humanen Zellen, wie Endothel-/ Epithelzellen, Fibroblasten oder Monozyten produziert und freigesetzt (141-143). Durch proteolytische Prozesse wird sie in die aktive Form uPA umgewandelt und mittels Disulfid-Brücken zu einem Dimer verlinkt. Dieses besteht wiederrum aus drei separaten Domänen. Die sogenannte A-Kette am N-terminalen Ende besteht aus einer *EGF-like*-Domäne und einer *"Kringle"*-Domäne, beide verantwortlich für die Bindungsfähigkeit des uPA (144). Am C-terminalen Ende befindet sich die sogenannte B-Kette mit einer Peptidase-Domäne, die proteolytische Aktivität besitzt.



**Abb. 5: Primärstruktur von uPA**. Die Serinprotease besteht aus 411 Aminosäuren verteilt auf 3 Domänen. Am N-terminalen Ende befindet sich die EGF-like-Domäne und die Kringle-Domäne, die für die Bindungsfähigkeit des uPA zuständig sind. Am C-terminalen Ende findet sich die proteolytische Peptidase-Domäne, die unterschiedliche Funktionen des uPA ermöglicht. (145)

Durch die proteolytische Aktivität erklärt sich die namensgebende Funktion bei der Spaltung von Plasminogen zu Plasmin und somit der Fibrinolyse (146). Zusätzlich werden über die Plasmin-Aktivität und die Proteolyse weitere Prozesse in der EZM reguliert (147, 148). Durch Bindung an den zugehörigen Rezeptor uPAR über die *EGF-like*-Domäne können weitere Signalwege angesteuert werden. Dies führt dann zu der Vielzahl an beschriebenen Funktionen im Rahmen der Zellmigration und –adhäsion, Angiogenese, Tumormetastasierung und bei Inflammationsvorgängen (149-153).

## 1.2.2 uPAR = Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator Rezeptor / CD87

uPAR ist ein oberflächengebundener Rezeptor, der erstmalig in den 1980er Jahren auf Monozyten nachgewiesen werden konnte (154). Mittlerweile wurden zusätzliche Zellreihen detektiert, darunter Epithel- und Endothelzellen, die über eine uPAR-Expression verfügen (137, 146, 155-161).

Der Aufbau des uPA-Rezeptors ist seit vielen Jahren wissenschaftlich ergründet. Er besteht nach posttranslationaler Modifizierung aus drei homologen Domänen (I-III) von jeweils etwa 90 Aminosäuren mit einem molekularen Gesamtgewicht von 55-60 kDa.



**Abb. 6: Primärstruktur von uPAR**. Der Rezeptor besteht aus insgesamt 3 Domänen (I - III), die über einen Glycosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) an der Zelloberfläche verschiedener Zellen verankert sind. (162)

In der N-terminalen Domäne I liegt die Bindungsstelle der Liganden, während die Domänen II und III lediglich die Bindungsaffinität beeinflussen. Am Rezeptor werden sowohl uPA als auch die Vorläuferform pro-uPA, ungefähr mit der gleichen Affinität gebunden (163). Durch diese Ligand-Rezeptor-Bindung wird eine starke, aber lokal begrenzte, proteolytische Aktivität getriggert, welche unter anderem an der namensgebenden Umwandlung von Plasminogen ins aktive Plasmin und somit an der Fibrinolyse maßgeblich beteiligt ist (164) oder zusätzlich Einfluss auf die umgebende EZM nimmt (163, 165).

An die strukturelle Domäne III schließt sich ein Glycophosphatidylinositol-Anker (GPI) an. Über dieses GPI ist das Glykoprotein an den Zelloberflächen verankert, verfügt selbst jedoch nicht über eine intrazelluläre Signaldomäne (163). Daher ist für eine Signaltransduktion eine unmittelbare Zusammenarbeit mit anderen Molekülen und Rezeptoren, wie zum Beispiel Integrinen und Wachstumsfaktor-Rezeptoren, notwendig. Zusätzlich ist der Rezeptor Bestandteil sogenannter *lipid rafts*, die in der Zellmembran liegen und dort entlang der Membran verschieblich sind (166). Diese Verschieblichkeit verbessert die Interaktionsfähigkeit mit den unterschiedlichen Signalkaskaden (167). Durch Bindung von uPA und in Interaktion

mit dem Inhibitor PAI-1 wird der Rezeptor internalisiert und später erneut exprimiert (168, 169, 170).

Auf den Oberflächen verschiedener Zellen wurden bisher drei Formen des Rezeptors entdeckt. Dabei handelt es sich um einen monomeren, einen Dimer-bildenden und die gespaltene Form des uPAR (148, 166, 171, 172). Die proteolytische Spaltung des Rezeptors wird dabei auch durch den eigenen Liganden uPA getriggert. Dabei entstehen je nach Spaltungsstelle unterschiedliche Formen des Rezeptors. Neben der bereits beschriebenen membrangebundenen Form des uPAR wird durch Abspaltung von der Zelloberfläche die lösliche Form, der sogenannte *soluble Urokinase-type plasminogen activator receptor* (suPAR), gebildet. Dieser besitzt keinen GPI-Anker mehr, bietet aber die gleiche Bindungskapazität, wie der oberflächengebundene Rezeptor und wurde erstmals 1991 durch Ploug et al. beschrieben (163, 167, 173, 174). Im Verlauf der letzten Jahre konnte der lösliche Rezeptor in den unterschiedlichsten Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden. Er wird vermehrt mit Metastasierungsprozessen in Verbindung gebracht und dient als Prognosemarker verschiedener Karzinome (172, 175). Zusätzlich bildet uPAR neue Ansatzpunkte in der medizinischen Bildgebung mittels SPECT (176) oder für die Entwicklung neuer Tumortherapeutika (177, 178).

Neben uPA existieren weitere Liganden des Rezeptors. So sind unter anderem Bindungen der Liganden Vitronectin (179) und HMW-Kininogen (180) bekannt. Eden et al. beschrieben 2011 eine bisher bekannte Anzahl von 42 Proteinen, darunter 9 lösliche Liganden und 33 weitere Bindungspartner, die mit dem Rezeptor interagieren können (181). Da die angesprochenen Signalwege in den unterschiedlichen Zellreihen divergieren und der genaue Weg in Tendozyten bisher nicht erforscht ist, kann der uPA/ uPAR-Komplex einen wissenschaftlichen Ansatzpunkt zum besseren Verständnis der vielfältigen, gesteuerten Prozesse im Rahmen der Sehnenregeneration bilden.

#### 2 Ziele der Arbeit

Im Laufe der letzten Jahre gelangte die Serinprotease uPA und ihr Rezeptor uPAR durch die Entdeckung der Einflüsse auf verschiedene Tumorzellen immer mehr in den Fokus wissenschaftlicher Arbeiten. Bereits 2003 untersuchten Xia et al. in einer Studie am Tiermodell die Expression von uPA und uPAR im Verlauf von 21 Tagen nach Achillessehnenverletzung (182). Es fand sich eine erhöhte Expression von uPA in der ersten Phase der Sehnenregeneration nach Trauma. Daraus leiteten sie eine mögliche Bedeutung für die Abläufe bei der Sehnenregeneration ab, die weiterer Untersuchung bedürfe.

Es stellt sich nun die Frage einer Übertragbarkeit auf menschliche Tendozyten. Da bisher, nach ausgiebiger Recherche in gängigen Datenbanken (pubmed, Stand 21.12.2021), keine Untersuchungen zum Thema uPA und uPAR an humanen Tendozyten vorliegen, ist das Ziel der vorliegenden Arbeit die *in vitro* Untersuchung der Expression und Sekretion von uPA und uPAR in humanen Tendozyten unterschiedlichen Ursprungs im Verlauf einer 14-tägigen Proliferationsphase. Zusätzlich sollte der Frage nachgegangen werden, ob es je nach anatomischem Verlauf (mit abschließender Gewebedeckung/ intrasynovial vs. frei durch Gelenkhöhlen/ extrasynovial) offensichtliche Unterschiede in der Expression und Sekretion von regenerationsspezifischen Markern gibt.

Dazu wurden Proben verschiedener humaner Sehnen und Bänder bei orthopädischen Operationen entnommen und enzymatisch verdaut. Die so gewonnenen Tendozyten wurden anschließend in vitro kultiviert. Gemäß den gängigen Modellen der Sehnenregeneration wurde von einem phasenhaften Verlauf ausgegangen, bestehend aus Inflammations-, Proliferationsund Remodellierungsphase. Da Xia 2003 in seiner Arbeit die signifikantesten Ergebnisse bis 7 Tage nach Trauma feststellte (182), wurde der Zeitraum unserer Untersuchung auf eine maximale Dauer von 14 Tagen nach Ausbringen der Zellen festgelegt. Exemplarisch wurden folgende Versuchstage für die Messungen gewählt: 1, 4, 7, 11 und 14 Tage nach Beginn der Kultivierung. Zu den festgelegten Zeitpunkten wurde die Zellkultur beendet und die Proliferationsraten der einzelnen Zelllinien bestimmt. Aus diesen Zellzahlen konnten vergleichende Wachstumskurven der Zellen unterschiedlichen Ursprungs gewonnen werden. Im weiteren Verlauf wurden aus den asservierten Proben, sowohl die Genexpression verschiedener in Sehnen und Bändern etablierter Marker und erstmalig auch uPA und uPAR mittels quantitativer real-time RT-PCR (qRT-PCR) als auch die Proteinexpression von uPA und uPAR mittels ELISA bestimmt. Mit Hilfe der Analyse der so gewonnenen Ergebnisse erhoffen wir, Rückschlüsse auf die unterschiedlichen Regenerationstendenzen von Sehnen und Bändern verschiedener Ursprünge zu gewinnen. Des Weiteren können sich aus dem Nachweis von uPA und uPAR in den Sehnen und Bändern Ansatzpunkte für die Verwendung dieser Marker im Rahmen von weiteren in vitro und/ oder in vivo Studien ergeben.

16

## 3 Material und Methoden

## 3.1 Patientenkollektiv

Insgesamt wurden 27 Proben verschiedener Sehnen und Bänder während orthopädischer Operationen im Zeitraum von 01.01.2013 bis 31.12.2014 in der Klinik für Orthopädie der Universitätsklinik Düsseldorf gesammelt. Es erfolgte keine Einschränkung bei der Auswahl der durchgeführten Operation. Bei den in die Versuche eingeschlossenen Patienten handelte es sich um 14 Männer und 13 Frauen im Alter von 2 Jahren bis 80 Jahren (Mittelwert = 51 Jahre; SD ± 21 Jahre). Es wurden 7 Proben der langen Bizepssehne, 7 Proben des Ligamentum capitis femoris, 7 Proben des vorderen Kreuzbandes, 4 Proben der Sehne des Musculus quadrizeps und jeweils 1 Probe von Achillessehne und Patellarsehne gewonnen. Die Proben wurden nach Entnahme anonymisiert, mit einer laborinternen Kulturnummer versehen und nach standardisierten Protokollen weiterbehandelt.

Die Patienten waren präoperativ über die Entnahme von Proben und deren Verwendung aufgeklärt worden und das schriftliche Einverständnis der Patienten lag vor. Ein Ethikvotum über die Verwendung von humanen Sehnen und Bändern lag an der medizinischen Fakultät der Universitätsklinik Düsseldorf ebenso vor (#3506).

## 3.2 Probengewinnung und Aufbereitung

Die Operationspräparate wurden unter sterilen Bedingungen intraoperativ in 0,9 % NaCl überführt, um ein Austrocknen der Präparate zu verhindern und maximal für 24 h bei 4°C gelagert. Anschließend wurden die Sehnenstücke im orthopädischen Forschungslabor in einer Arbeitsbank mit Laminar-Air-Flow-System gründlich mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) gespült. Offensichtlich schadhafte oder pathologisch veränderte Stellen wurden sorgfältig reseziert und die Präparate in gleichmäßige Stücke von circa 3 mm<sup>3</sup> Größe zerteilt. Nun wurde gemäß dem laborinternen Standard ein Collagenaseverdau durchgeführt. Hierfür wurden die Probenstücke in eine Petrischale mit Rührfisch überführt. Es wurden 15 mL Dulbecco's Modified Eagle's Medium low alucose (DMEM, Glucosegehalt 1000 mg/L) (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) und 60 µL Collagenase B (Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland) zugegeben, so dass sich eine Endkonzentration von 2 mg/mL ergab. Über Nacht wurden die Proben bei 37°C auf dem Magnetrührer inkubiert. Die Zellsuspension wurde durch ein 40 µm-Zellsieb in ein 50 mL Röhrchen (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) filtriert. Die Petrischale wurde mit PBS gespült und die Spülflüssigkeit ebenfalls in das 50 mL Röhrchen überführt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt (Zentrifuge 5810R, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) bei

17

Raumtemperatur (RT) für 5 min mit 1800 rpm. Der Zentrifugationsüberstand wurde anschließend verworfen. Das Zellpellet, welches sich am Boden des Röhrchens abgesetzt hatte, wurde mit 10 mL frischem DMEM aufgenommen und die Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer (Marienfeld Superior, Lauda-Königshofen, Deutschland) bestimmt. Dafür wurden pro Kultur 10  $\mu$ L der Zellsuspension mit 10  $\mu$ L Trypanblaulösung (0,4%, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) versetzt und dann 10  $\mu$ L der Suspension in die Zählkammer gegeben. Der Zusatz von Trypanblaulösung diente der Unterscheidung von vitalen und nicht-vitalen Zellen unter dem Lichtmikroskop, da der Farbstoff die Membran intakter Zellen nicht durchdringen kann (183). Unter dem Lichtmikroskop konnten nun die äußeren Quadrate ausgezählt und daraus die Gesamtzellzahl errechnet werden.



**Abb. 7: Schematischer Ablauf der Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer**. In einer Neubauer-Zählkammer werden die 4 äußeren Eckquadrate meanderförmig ausgezählt und anschließend der Mittelwert ermittelt (Mittelwert Zellzahl x  $10^4$  = Zellkonzentration/mL).

Im Anschluss wurden die Zellen in einer Gewebekulturflasche (Cellstar® T25, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) ausgesät und bis zur 80–90 % Konfluenz bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> mit Standardmedium (s. Tabelle 1) kultiviert. Bei Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen mit Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure (Trypsin-EDTA) (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) enzymatisch von der Kulturflasche gelöst. Hierfür wurde das Standardmedium entfernt und die Zellkulturflasche sorgsam mit PBS gespült. Nun wurden 7 mL des 1:10 mit PBS verdünnten Trypsin-EDTA zugegeben und im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> für 3-5 min inkubiert. Die Ablösung der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche konnte mittels Lichtmikroskop beurteilt werden. Damit die Tendozyten durch den enzymatischen Prozess nicht geschädigt werden, musste die Reaktion nach maximal 5 min durch die Zugabe eines Volumenäquivalents des Standardmediums gestoppt werden. Die Suspension wurde nun vollständig in ein 50 mL Röhrchen überführt und bei RT für 5 min mit 1800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet mit PBS resuspendiert. Anschließend konnte erneut die Zellzahl mittels Zählkammer bestimmt werden. Diese Tendozyten wurden als Primärkultur in Einfriermedium (s. Tabelle 2) bei -196°C in flüssigem Stickstoff (N<sub>2</sub>, MVE Cryosystem 4000) bis zur Verwendung im Versuchsansatz eingelagert.

	Tabelle	1:	Standardmedium
--	---------	----	----------------

Stoff	Volumen	Hersteller
DMEM low glucose	500 mL	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
FCS	100 mL	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Penicillin 100 U/mL, Streptomycin 100 µg/mL; Glutamin 2 mM (PSG) in 0,9 % Natriumchlorid	6 mL	Sigma Aldrich, St. Louis, USA

### Tabelle 2: Einfriermedium

Stoff	Volumen	Hersteller
FCS		Sigma Aldrich, St. Louis, USA
10% Dimethylsulfoxid (DMSO)		Sigma Aldrich, St. Louis, USA

## 3.3 Tendozytenproliferation

Für die Versuchsansätze wurden die kryokonservierten Zellen der Primärkultur mit auf 37°C angewärmtem Standardmedium aus den Kryoröhrchen entnommen und in 50 mL Röhrchen mit warmem Standardmedium überführt. Zur Entfernung des Dimethylsulfoxid (DMSO) wurden die Proben anschließend für 5 min bei 1800 rpm und 20°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit frischem Standardmedium resuspendiert. Die Zellzahl wurde erneut mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt, wie in Kapitel 3.2 beschrieben.

Da bekannt ist, dass die Tendozyten durch zu hohe Passagezahlen dedifferenzieren, sollte der Versuchszeitraum ohne weitere Passagierungen bestritten werden (184). Jedoch unterdrückt eine zu große Zelldichte ebenfalls das Zellwachstum, so dass Zellzahlen gewählt wurden, die, angepasst an die Dauer der Kultivierung, zu einem fast konfluenten Wachstum führen würden. Somit sollte das Erreichen einer ausreichenden Zellzahl zur Durchführung der geplanten Messreihen gesichert werden. Hierbei konnten wir uns auf laborinterne Vorversuche berufen. Die gewählten Zelldichten pro 25 cm<sup>2</sup> Kulturflasche können der Tabelle 3 entnommen werden. Die entsprechenden Zellzahlen konnten nun jeweils in eine 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche je Versuchstag (Tag 1, 4, 7, 11, 14) ausgesät werden.

Tabelle 3: Übersicht der geplant ausgebrachten Zellzahlen bei der Anlage der Zellkulturen für die einzelnen Versuchstage

Tag	Zellzahl in 1000
1	400
4	125
7	62,5
11	31,25
14	31,25

Wurde in einer Primärkultur eine zu geringe Zellzahl erreicht, wurden die auszusäenden Zelldichten reduziert. Diese Anpassung geschah vorrangig an den Kulturen des ersten Versuchstags, da hier trotz der Reduzierung von einer ausreichenden Zellzahl für die Durchführung der Versuchsreihen auszugehen war. Eine Anpassung der Zellzahl war bei folgenden Kulturen notwendig:

Kulturnummer	Ursprung	Angepasste Zellzahl d1 in 1000
37a/14	LCF	250
29a/13	Bizepssehne	230
19a/14	VKB	250
06a/14	Bizepssehne	344
64a/14	Quadrizepssehne	300
67a/13	Bizepssehne	300
73a/13	VKB	300
53a/14	Patellarsehne	200
40a/14	VKB	200
80a/14	Quadrizepssehne	300
115a/14	LCF	350

Tabelle 4: Übersicht über die Kulturen mit von Tabelle 3 abweichenden Zellzahlen

Zusätzlich musste bei der Probe mit der Kulturnummer 29a/13 zusätzlich zu d1 auch die Zellzahl für d4 auf 115.000 Zellen verringert werden.

Überzählige Zellen der Primärkultur wurden in RLT-Puffer (Qiagen, Hilden, Deutschland) kryokonserviert und zusätzlich als P0, also Zellen ohne weitere Passagierung, für die transkriptionelle Analyse verwendet.

Über die festgelegten Zeiträume wurden die Zellen bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> ohne weitere Passagierung mit Standardmedium kultiviert. Das Medium wurde regelmäßig am Tag nach

dem Aussäen, sowie weiterhin zweimal wöchentlich ausgetauscht. Die Adhäsion und Proliferation wurden während der Kultivierung lichtmikroskopisch beobachtet.

Bei Erreichen der Endzeitpunkte (Tag 1, 4, 7, 11, 14) wurde die Kultivierung beendet. Dies erfolgte über eine erneute Trypsinierung. Das dabei entfernte Zellkulturmedium wurde für die spätere Untersuchung der Proteinfreisetzung mittels *Enzyme linked Immunosorbent Assay* (ELISA, s. Kapitel 3.6.) zentrifugiert, zu je 1,5 mL aliquotiert und bei -20°C verwahrt. Das nach Zentifugation vorliegende Zellpellet wurde mit 1 mL Standardmedium erneut resuspendiert und mittels Neubauer-Zählkammer die Zellzahl bestimmt. Die Ergebnisse wurden dokumentiert und im Verlauf zur Bestimmung der Proliferationsrate (s. Kapitel 3.4.) genutzt. Die Zellsuspensionen selbst wurden erneut zentrifugiert und anschließend für die weiteren Untersuchungen mittels qRT-PCR, entsprechend dem in Kapitel 3.5. beschriebenen Protokoll, mit 350–700 µL RLT-Puffer kryokonserviert. Dabei hing die gewählte Puffermenge direkt von der Zellzahl ab, so wurde bei Zellzahlen <1x10<sup>6</sup> Zellen 350 µL Puffer und bei Zellzahlen >1x10<sup>6</sup> Zellen 700 µL Puffer verwendet.

## 3.4 Bestimmung der Proliferationsrate

Zur Berechnung der Proliferationsraten wurden die bei der Anlage der Zellkulturen ausgebrachten Zellzahlen und die bei der Trypsinierung der Kulturen bestimmten Zellzahlen verwendet. Die Zählung der Zellen erfolgte mittels Neubauer-Zählkammer. Erfasst wurden sowohl eine Proliferationsrate als Generationszahl (n), eine Generationszeit (g), als auch eine Proliferationsrate in 24 h (n/24 h) der einzelnen Kulturen bzw. Gruppen.

Mit der Generationszahl n wird ausgedrückt, wie viele Generationen sich insgesamt im untersuchten Zeitraum entwickelt haben. Dies wird durch den Term (1) ausgedrückt, wobei  $N_1$  die erreichte Zellzahl zum Versuchszeitpunkt ist und  $N_0$  die Ausgangszellzahl. Beide Größen wurden durch die Zellzählungen bestimmt.

$$n = \frac{(\log(N_1) - \log(N_0))}{\log(2)}$$
(1)

Aus dieser berechneten Generationszahl n ließ sich die Generationszeit g ableiten (2). Dies ist die Zeit, die von einer Zelle theoretisch benötigt wird, um sich einmal zu teilen. Hierfür rechnet man:

$$g = \frac{t}{n} \tag{2}$$

In dieser Formel ist t der Kultivierungszeitraum in Tagen.

+

Zuletzt konnte man aus diesen Werten noch auf die Teilungsrate in 24 h schließen und erhielt somit den Wert für n/24 h (3).

$$n/24h = \frac{\left(\frac{\log(N1) - \log(N0)}{\log(2)}\right)}{24}$$
(3)

Mit Hilfe dieser Formeln konnten die unterschiedlichen Proliferationsraten der Probengruppen verglichen und grafisch dargestellt werden.

3.5 Quantitative *real-time* Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion (qRT - PCR)

## 3.5.1 Begriffsklärung

Die qRT-PCR ist ein Verfahren basierend auf der klassischen Polymerasekettenreaktion (PCR), bei dem in Echtzeit eine quantitative Bestimmung der vervielfältigten Produkte erfolgt. Bei der klassischen PCR wird ein ausgewählter doppelsträngiger Nukleinsäureabschnitt denaturiert und durch Zugabe eines spezifischen, komplementären Primers künstlich vervielfältigt, bis eine nachweisbare Menge der Sequenz vorliegt. Somit können auch kleinste Nukleinsäuremengen nachgewiesen werden.



**Abb. 8: Schematischer Ablauf der PCR**. Eine klassische PCR besteht aus mehreren Schritten. Im ersten Schritt wird die doppelsträngige DNS in zwei Einzelstränge aufgeteilt (Denaturierung). An die Einzelstränge wird dann ein, zur Zielsequenz passender, Primer angehängt und die Sequenz komplementär verlängert. Es ergeben sich zwei neue doppelsträngige DNS-Sequenzen. Insgesamt durchläuft die PCR mehrere Zyklen.

Bei der klassischen PCR erfolgt lediglich eine Endpunktanalyse zum Beispiel durch anschließende Durchführung einer Gelelektrophorese. Die Quantifizierung der Produkte in der gRT-PCR erfolgt mit Hilfe einer Fluoreszenzreaktion nach jedem Zyklus. Dabei nimmt die Fluoreszenz während der Amplifikation bei Zunahme der Produkte gleichsam proportional zu, da ein messbarer Fluoreszenzmarker an die neu entstehenden Amplifikate angeheftet wird. Als Fluoreszenzmittel können verschiedene Sonden eingesetzt werden. Gängige Varianten sind SYBR-Green oder Taq-Man-Sonden (185). In unseren Versuchsreihen wurde mit SYBR-Green gearbeitet. Hierbei handelt es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff, der an die Nukleinsäuren, vor allem an Doppelstrang-DNA, bindet. Je mehr Doppelstrang-DNA vorliegt, desto stärker ist die Fluoreszenz, unabhängig von der eigentlichen Zielseguenz. Hierbei sind Bindungen des Farbstoffs an sogenannte Primer-Dimere (Primer-Primer-Verbindungen) nicht ausgeschlossen. Um die Spezifizität der Ergebnisse nach Abschluss der Messzyklen zu überprüfen, kann durch erneutes Aufspalten und Verbinden der neu gebildeten Doppelstränge eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden. Dabei zeigt sich beim schrittweisen Erhitzen bei einer spezifischen Temperatur eine Zusammenlagerung der Einzelstränge zu Doppelsträngen, die sich von der Temperatur der Bildung von Primer-Dimeren unterscheidet. Die Durchführung der gRT-PCR und der Schmelzkurve erfolgt in Kombinationsgeräten, die aus einem Thermocycler und einer Messeinrichtung bestehen (StepOne Real-Time PCR System, Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, USA mit StepOne Software). Während der Amplifikationsvorgänge wird, wie oben bereits beschrieben, kontinuierlich die Fluoreszenz gemessen und grafisch dargestellt.



Abb. 9: Beispielhafte grafische Darstellung der Amplifikationsvorgänge mittels StepOne Software (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, USA). Es zeigt sich nach einer in diesem Beispiel circa 20 Zyklen umfassenden Startphase eine annähernd exponentielle Zunahme des Amplifikats, bis eine sogenannte Plateauphase eintritt.  $\Delta Rn =$  generiertes Signal (Quelle: eigene Vorversuche)
In der grafischen Darstellung (Abb. 9) stellt der Übergang von der *baseline* in den exponentiellen Verlauf, der sogenannte *threshold* oder Ct-Wert, den Beginn einer messbaren Fluoreszenz dar. In den Zyklen vor dem *threshold* liegen erst wenige Amplifikate vor, es besteht eine geringe Änderung der Fluoreszenz. Es handelt sich somit um die Messung eines *backgrounds*, um den die Werte bei der Auswertung korrigiert werden. Während der exponentiellen Phase kommt es zu einer konstanten Verdopplung der Amplifikate mit jedem Zyklus, bis sich bei Aufbrauch der in der Probe vorliegenden Reaktionspartner oder durch andere Störfaktoren eine Plateauphase einstellt. Für die Quantifizierung wird nur der Bereich der konstanten exponentiellen Zunahme einbezogen.

Da sich die ursprünglich eingesetzte Menge cDNA durch Pipettierabweichungen unterscheiden kann, werden die Ct-Werte jedes untersuchten Primers in jeder Probe mit den Ct-Werten eines so genannten *housekeeping*-Gens verglichen, dessen Expression als konstant angesehen wird (186, 187). In vielen Arbeiten wird hierfür GAPDH eingesetzt, das als Enzym der Glykolyse in allen Lebewesen exprimiert wird (187). Dies wird als *comparative Ct* ( $\Delta Ct$ ) bezeichnet und dient der Normierung der Ergebnisse. Berechnet wird dies anhand der Formel (4):

$$\Delta Ct = Ct (Zielgen) - Ct (housekeeping - Gen)$$
(4)

Es handelt sich somit nicht um die Angabe einer absoluten Expression des Zielgens der Messung, sondern um die Angabe der Expression im Vergleich zur GAPDH Expression.

Ein weiterer wichtiger Begriff ist die relative Expression. Dies bezeichnet den Expressionsunterschied eines Markers in einer Probe im Vergleich zwischen einer Behandlung und einer internen Kontrolle, also einer unbehandelten Probe. Auch diese Werte werden zum Referenzgen normiert und auf eine Standardprobe bezogen. Berechnet werden kann dies über den Term (5):

$$Relative Expression = 2^{-\Delta Ct}$$
(5)

Die ermittelten Ergebnisse konnten anschließend grafisch darstellt und verglichen werden.

#### 3.5.2 Probengewinnung für die qRT-PCR

## 3.5.2.1 RNA-Isolation

Nach Abschluss der gewählten Kultivierungszeiträume wurden die gewonnenen Zellen, je nach vorliegender Zellzahl, in 350 bis 700 µL RLT-Puffer aufgenommen und dadurch lysiert. Anschließend erfolgte die Kryokonservierung bei -20°C bis zur weiteren Versuchsdurchführung.

Der erste Schritt der Probengewinnung für die qRT-PCR war die RNA-Isolation. Hierfür wurde ein vorgefertigtes RNA-Isolationskit (RNeasy Mini Kit) der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) verwendet. Das angewandte Verfahren basiert auf der Bindung der RNA an eine Silicamembran, während andere Bestandteile und Verunreinigungen in mehreren Schritten ausgewaschen werden können. Zuletzt kann die RNA dann in Wasser gelöst und für weitere Analysen verwendet werden.

Die Probe wurde aufgetaut und laut Herstellerprotokoll mit dem im Isolationskit enthaltenen RLT-Puffer vollständig auf die QIAshredder-Säule pipettiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (Zentrifuge Mikro 22R, Hettich, Tuttlingen, Deutschland) mit 13000 rpm bei RT für 2 min wurde ein Probenvolumenäquivalent 70% iges Ethanol zum Lysat zugefügt und sorgfältig mit der Probe vermengt. Anschließend wurde die Probe auf die RNeasy-Säule übertragen und die Säule erneut für 30 Sekunden zentrifugiert. Der so entstandene Durchfluss wurde verworfen, so wie auch der Durchfluss nach jedem der weiteren Zentrifugationsschritte verworfen wurde. Es folgte ein Waschschritt. Hierfür wurden 350 µL RW1-Buffer auf die RNeasy-Säule gegeben, gefolgt von einer erneuten Zentrifugation. Im Anschluss wurden 10 µL DNase I und 70 µL RDD-Buffer sorgfältig auf die Membran pipettiert. Bei RT wurden die Proben nun für 15 min inkubiert. Nach einem erneuten Waschschritt mit 350 µL RW1-Buffer und anschließender Zentrifugation erfolgte die zweimalige Zugabe von 500 µL RPE-Buffer. Nun folgte ein Trocknungsschritt durch 5-minütige Zentrifugation bei 13000 rpm und RT. Während der Trocknungszeit wurde 1 µL RNasin (Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor, Promega, Madison, WI, USA) in frische 1,5 mL Röhrchen (Eppendorf Tube, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) vorgelegt. Nach Abschluss der Trocknung konnte nun die RNeasy-Säule in dieses 1,5 mL Röhrchen überführt und 50 µL RNase-freies Wasser (Millipore Corporation, Billerica, USA) zugegeben werden. Bei dem nun abschließenden Zentrifugationsdurchgang von 1 min Länge bei RT wurde die im Durchfluss gelöste RNA im frischen Röhrchen aufgefangen. Aus diesem Eluat konnte mit Hilfe eines NanoDrop 2000 (Peqlap Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland; Software: Thermo Fisher Scientific Inc. Version 1.4.2) die RNA-Konzentration der Proben bestimmt werden.

## 3.5.2.2 Reverse Transkription

Da für eine PCR-Analyse eine DNA-Sequenz vorliegen muss, erfolgte als nächster Versuchsschritt die reverse Transkription.

Bei der reversen Transkription wird durch das Enzym Reverse Transkriptase aus der vorliegenden mRNA ein komplementärer cDNA Strang synthetisiert. Durch die Zugabe entsprechender Oligo(dT)-Primer, die an den am 3'-Ende befindlichen poly(A)-Schwanz der mRNA binden, wird die für die Transkription benötigte Hydroxygruppe angefügt. Nun kann die Reverse Transkriptase durch die Bindung von Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) einen DNA-Strang generieren. Die so gewonnene cDNA kann dann als Ausgangsmaterial für die Messungen im Rahmen der qRT-PCR verwendet werden.



**Abb. 10: Schematischer Ablauf der Reversen Transkription**. Bei dieser wird ein RNA-Strang mittels Zugabe eines Primers und entsprechender Nukleinbasen unter Einwirkung des Enzyms Reverse Transkriptase in DNA umgewandelt.

Für unsere Versuche wurde die Reverse Transkription mit Hilfe des *QuantiTect Reverse Transcription Kit* der *Firma Qiagen* (Hilden, Deutschland) durchgeführt. Hierfür wurde aus den gemessenen RNA-Konzentrationen das benötigte Volumen für einen Gehalt von 1  $\mu$ g RNA bei der Umschreibung errechnet. Das ermittelte Volumen wurde mit *gDNA-Puffer* (7x) und H<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 14  $\mu$ L aufgefüllt. Durch das Zufügen des *gDNA-Puffer* (7x) und H<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 14  $\mu$ L aufgefüllt. Durch das Zufügen des *gDNA-Puffers* wurden Reste von vorliegenden genomischer DNA (gDNA) eliminiert. Anschließend wurde diese Mischung nun für 2 min bei 42°C inkubiert. Während der Inkubation wurde ein *MasterMix* aus 4  $\mu$ L Puffer, 1  $\mu$ L Reverse Transkriptase und 1  $\mu$ L RT-Primer (Oligo(dT)-Primer) pro umzuschreibende Probe erstellt. Pro Probe wurde 6  $\mu$ L dieses Mix nach Abschluss der Inkubationszeit zum Probenvolumen zugefügt. Nun erfolgte die eigentliche cDNA Synthese durch Erhitzen der Proben für 30 min auf 42°C und anschließende Reaktionsinaktivierung durch weiteres Erhitzen auf 95°C für die Dauer von 3 min (Mastercycler gradient, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland).

#### 3.5.3 Versuchsansatz und Belegungsplan

Für die Durchführung der Messungen wurden 48-Well-Platten der Firma Life Technologies (Carlsbad, USA) verwendet. Pro *well* wurde von einem Gesamt-Versuchsvolumen von 25  $\mu$ L ausgegangen. Davon entfiel 1  $\mu$ L pro Well auf die jeweiligen Primerpaare. Die restlichen 24  $\mu$ L bestanden aus dem entsprechenden cDNA-Probenvolumen mit einem Gehalt von 50 ng, aus 12,5  $\mu$ L eines vorgefertigten SYBR-Green MasterMix (Firma Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, USA) und der entsprechenden ergänzenden Menge H<sub>2</sub>O. Es erfolgte die Plattenbelegung im Doppelansatz mit zusätzlichen Negativkontrollen.

In der Versuchsdurchführung wurden nach Plan jeweils 1 µL der entsprechenden Primerpaare je well vorgelegt und 24 µL des erstellten Proben-Mastermixes zugegeben. Zuletzt wurden die Platten verschlossen und die Messreihen im StepOne Real-Time PCR System der Firma Applied Biosystems (Life Technologies, Carlsbad, USA) durchgeführt. Das Cyclerprogramm startete mit der Denaturierungsphase, in der für 10 min eine Temperatur von 95°C gehalten wurde, wodurch die Wasserstoffbrückenbindungen der Doppelstrang-DNA getrennt wurden. Die nun vorliegenden Einzelstränge dienten als Grundlage der Amplifikation in den anschließenden insgesamt 40 Zyklen. In jedem dieser Zyklen kam es zu einer Abkühlung auf 60°C. Bei dieser Temperatur banden die zugefügten Primer an die Einzelstränge (primer Anschließend begann die eigentliche Amplifikation, annealing). in der durch Nukleotidbindungen komplementäre DNA-Stränge entstanden. Dafür wurde die Temperatur von 60°C für jeweils 60 Sekunden gehalten, bevor ein neuer Messzyklus durch Erhitzen auf 95°C und daraus resultierender erneuter Denaturierung der neu gebildeten Doppelstränge, eingeleitet wurde. So nahm die Menge der gewünschten DNA-Sequenz mit jedem Amplifikationszyklus exponentiell zu. Durch die zusätzliche Bindung eines Fluoreszenzmarkers während der Amplifikationsvorgänge wurde die guantitative Bestimmung der Amplifikate mittels Fluoreszenzmessung möglich. Nach Abschluss der insgesamt 40 Zyklen wurde zur Qualitätskontrolle eine Schmelzkurve gefertigt. Dafür erfolgte die schrittweise Temperaturerhöhung von 60°C bis auf 95°C in 0,5°C Schritten, wobei nach jedem Erhöhungsschritt die Fluoreszenz gemessen wurde. Da es für jeden Primer eine spezifische Bindungstemperatur gibt, konnte man anhand dieses Verfahrens unerwünschte Nebenprodukte, wie zum Beispiel Primer-Dimere, ausschließen. Aus den Messwerten der Doppelansätze wurde ein Mittelwert des Ct - Wertes pro Versuchstag, Probe und Primer ermittelt. Durch die Verwendung des housekeeping-Gens GAPDH zur relativen Quantifizierung waren Rückschlüsse auf die in den Proben ursprünglich vorliegende cDNA-Menge über eine Normalisierung der Expressionsergebnisse möglich.

27

# 3.5.4 Verwendete PCR-Primerpaare

In der vorliegenden Arbeit haben wir für die qRT-PCR folgende Primerpaare ausgewählt: GAPDH (endogene Kontrolle), uPA, uPAR, Collagen1A1 (COL1A1), Tenascin C, Tenomodulin, Scleraxis. Alle Primer wurden von Biolegio B.V. (Nijmegen, Niederlande) oder Qiagen (Hilden, Deutschland) bezogen.

Zielgen	Sequenz forward Primer (5' - 3')	Sequenz reverse Primer (3' - 5')			
GAPDH	GAAGGCTGGGGCTCATTTG	CAGGAGGCATTGCTGATGATC			
uPA	CACACTGCTTCATTGATTACCCA	CTTCAGCAAGGCAATGTCGTT			
uPAR	TTGTGGGAAGAAGGAGAAGAGC	GGCTTCGGGAATAGGTGACA			
COL1A1	Qiagen Hs_COL1A1_1_SG QuantiTect Primer Assay				
Tenascin C	CCACACTCACAGGTCTGAGG	TGTCCAACTCTGTGGCTGC			
Tenomodulin	Qiagen Hs_TNMD_1_SG QuantiTect Primer Assay				
Scleraxis	Qiagen Hs_SCXB_1_SG QuantiTect Primer Assay				

Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Primer-Sequenzen

# 3.6 Enzyme linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Beim ELISA handelt es sich um ein immunologisches Verfahren, durch das ein Antigen mit Hilfe einer Antikörperbindung nachweisbar gemacht wird. Als Antigen kann dabei zum Beispiel ein exprimiertes Protein, aber auch ein Hormon, ein Virus, oder verschiedene Tumormarker fungieren. Die vorliegenden Proteinmengen werden dann photometrisch über einen Farbumschlag in Korrelation zu einer Standardreihe gemessen.

Das Verfahren wird entweder in direkter Form oder in der Sandwich-Methode durchgeführt.

Bei der direkten Form bindet das nachzuweisende Antigen einer Probe an eine Mikrotiterplatte. Es folgt die Zugabe eines spezifischen Antikörpers. Über eine passende, direkte Antikörperbindung werden die an die Platte gebundenen Antigene, nach Zugabe eines Farbstoffs, nachweisbar. Bei der Sandwich-Methode wird die Mikrotiterplatte primär mit einem Antikörper beschichtet. Bei Zugabe der Probe bindet das nachzuweisende Antigen an den stationären Antikörper. Fügt man nun einen zweiten, mit Farbstoff markierten, Antikörper hinzu, welcher an das gebundene Antigen bindet, so kann man die vorliegende Menge des exprimierten Antigens in der Probe über eine Farbreaktion bestimmen.



Abb. 11: Schematische Darstellung der verwendeten ELISA-Sandwich-Methode. Das Antigen bindet an einen stationären Antikörper und wird über einen weiteren, farbstoffmarkierten Antikörper sichtbar gemacht.

Für die vorliegende Arbeit wurden die Versuche unter Verwendung von vorgefertigten Assays für uPA und uPAR der Firma R&D Systems (Minneapolis, USA) durchgeführt. Hierbei handelt es sich um einen quantitativen Assay in der zuvor beschriebenen Sandwich-Technik. Die photometrische Messung wurde im Wellenlängenbereich 450 nm unter Verwendung des Multiskan <sup>™</sup> FC (Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA) durchgeführt.

## 3.6.1 Probengewinnung für den ELISA

Als Proben zur Bestimmung der Freisetzung von uPA und uPAR aus den Tendozyten wurden die Zellkulturüberstände der einzelnen Versuchstage verwendet. Dabei wurde das jeweils letzte Medium bei Beendigung der Kultivierung zentrifugiert, aliquotiert und bei -80°C eingefroren (s. Kapitel 3.2). Zur Durchführung der *Assays* wurden die Proben aufgetaut und entsprechend der Herstellervorgaben aufbereitet. Dies entsprach bei uPA einer 3-fachen Verdünnung und bei uPAR einer 5-fachen Verdünnung. Da wir jedoch davon ausgehen müssen, dass die Zellen während der Kultivierungsphasen kontinuierlich uPA und uPAR ins Kulturmedium freigesetzt haben, dieses jedoch durch die regelmäßigen Mediumwechsel verloren gegangen ist, wurden die Ergebnisse der *Assays* der einzelnen Versuchstage in der Auswertung aufsummiert, um letztlich näherungsweise eine Gesamtmenge abbilden zu können.

#### 3.6.2 Versuchsansatz und Plattenbelegung im ELISA

Für die Durchführung der ELISAs wurden die Reagenzien entsprechend des vom Hersteller mitgelieferten Protokolls vorbereitet und die Proben, wie oben beschrieben, verdünnt.

Zuerst wurden 100 µL *Assay Diluent RD1W* pro Well vorgelegt. Zu diesem wurden, entsprechend dem Belegungsplan, in jedes well 50 µL Probe, Standardlösung oder Negativkontrolle zugegeben. Diese Mischung wurde anschließend für jeweils 2 h bei RT inkubiert. Hierbei kam es zur Bindung des Antigens an den stationären Antikörper der Wellplatten. Nach Ablauf der Inkubationsphase wurden, die nicht gebundenen Antigene und Mediumreste durch mehrere Waschschritte mit *Wash Buffer* entfernt. Auch die Reste des *Wash Buffer* wurden weitestgehend entfernt und die Wellplatten leicht getrocknet. Es folgte die Zugabe der uPA bzw. uPAR-Antikörpersuspension, welche bei RT für 2 h inkubiert wurde. Überschüssige Antikörper, die nach Ablauf der Reaktionszeit nicht gebunden waren, wurden durch einen Waschvorgang entfernt. Im letzten Schritt der ELISA–Reaktion wurde ein Farbreagenz zugefügt, welches nach Inkubation im Dunkeln für 30 min und nach Zugabe eines Stop-Mediums einen photometrisch messbaren Farbumschlag von blau nach gelb vollzog. Direkt im Anschluss wurde die Intensität der gelben Farbe mit Hilfe des Photometers bei 450 nm Wellenlänge gemessen und dokumentiert.

Da es sich bei dem verwendeten ELISA um ein vorgefertigtes Kit handelte, wurden für die Berechnung der uPA und uPAR-Konzentrationen jeweils definierte Standardlösungen mitgeliefert. Durch das Mitführen einer Standardverdünnungsreihe im Doppelansatz während der Messungen konnte die Berechnung der in den Proben vorliegenden Proteinkonzentrationen in pg/mL vorgenommen werden. Da wir pro Versuchstag ein Mediumvolumen von 7 mL eingesetzt haben, wurde dieser Wert zuletzt auf 7 mL hochgerechnet.

Für die Standardkurve uPA lag eine Stocklösung mit einer Konzentration von 20.000 pg/mL vor. Aus dieser wurde eine Standardreihe mit folgenden Konzentrationen erstellt: 2000 pg/mL; 1000 pg/mL; 500 pg/mL; 250 pg/mL; 125 pg/mL; 62,5 pg/mL; 31,25 pg/mL. Zusätzlich wurde mit reiner Verdünnungslösung (*calibrator diluent*) eine Negativkontrolle erstellt.

Für die Standardkurve uPAR lag eine Stocklösung mit einer Konzentration von 40.000 pg/mL vor. Es ergab sich folgende Verdünnungsreihe: 4000 pg/mL; 2000 pg/mL; 1000 pg/mL; 500 pg/mL; 250 pg/mL; 125 pg/mL; 62,5 pg/mL. Zusätzlich wurde mit reinem *calibrator diluent* eine Negativkontrolle erstellt. Die Standards wurden jeweils im Doppelansatz in jeder 96-Well-Platte mitgeführt (s. Abb. 12) und bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Dadurch wurde es möglich, anhand des definierten uPA- bzw. uPAR-Gehalts und der gemessenen Extinktion, den in den Proben vorliegenden Gehalt an uPA und uPAR in pg/mL zu bestimmen.

30

î.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	А	A	A	A	А	В	В	В	В	В	1000	
	d1	d4	d7	d11	d14	d1	d4	d7	d11	d14	STD 1	STD 1
B	С	С	С	С	С	D	D	D	D	D		
	d1	d4	d7	d11	d14	d1	d4	d7	d11	d14	STD 2	STD 2
C	E	E	E	E	E	F	F	F	F	F		
	d1	d4	d7	d11	d14	d1	d4	d7	d11	d14	STD 3	STD 3
n	G	G	G	G	G	H	H	H	H	H		1
	d1	d4	d7	d11	d14	d1	d4	d7	d11	d14	STD 4	STD 4
E	Т	1	1	T	I.	J	J	J	J	J		
	d1	d4	d7	d11	d14	d1	d4	d7	d11	d14	STD 5	STD 5
E	к	ĸ	ĸ	ĸ	ĸ	L	L	L	L	L		
-	d1	d4	d7	d11	d14	d1	d4	d7	d11	d14	STD 6	STD 6
G	М	М	Μ	М	M	N	N	N	N	N		
0	d1	d4	d7	d11	d14	d1	d4	d7	d11	d14	STD 7	STD 7
u	0	0	0	0	0	Р	P	P	P	P		
n	d1	d4	d7	d11	d14	d1	d4	d7	d11	d14	Blank	Blank

Für die Durchführung der ELISAs wurde die in Abbildung 12 dargestellte Plattenbelegung der 96-Well-Platten gewählt.

**Abb. 12: Belegungsplan für die Durchführung des ELISA**. Es wurden jeweils zwei 96-Well-Platten für den vorgefertigten uPA- und uPAR-Assay verwendet. A-P = Proben, jeweils Tag (d) 1, 4, 7, 11, 14; STD =Standardreihe, Blank = Negativkontrolle

# 3.7 Statistische Auswertung

Alle für die Auswertungen der Versuchsreihen notwendigen Berechnungen und grafischen Darstellungen wurden mit Hilfe von Microsoft Office Excel® (Microsoft Corporation, Redmond, USA, Version 2007) oder mit GraphPad Prism® (Graph Pad Software Inc., San Diego, USA, Version 9.2.0) erstellt. Dabei wurde der Mittelwert (*mean*)  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben, wenn im Text nicht explizit anders vermerkt. Zur Berechnung der Signifikanz der unterschiedlichen Ergebnisse wurden ein ungepaarter, zweiseitiger *Student`s t-Test* mit gleicher Varianz (bei 2 Gruppen) oder eine einfaktorielle, ungepaarte Varianzanalyse mittels *one-way ANOVA* (bei >2 Gruppen) mit *post hoc Tukey-Kramer-Test* genutzt. Bei der Beschreibung wurden Signifikanzlevel definiert. So wurde in signifikant (\*) bei einem p-Wert ≤0,05, in hoch-signifikant (\*\*) bei p≤0,01 und in höchst-signifikant (\*\*\*) bei p≤0,001 unterschieden. In der grafischen Darstellung wurde hierfür die Darstellung mittels Sternchen gewählt, während die p-Werte im Text genannt werden.

## 4 Ergebnisse

## 4.1 Patientenkollektiv

Die Untersuchungen wurden an allen der insgesamt 27 gewonnenen Proben vorgenommen. Die Zuordnung der Proben kann der folgenden Tabelle 6 entnommen werden, wobei die Nummerierung willkürlich gewählt ist.

Interne Kulturnummer Entnahmeort Nr. Geschlecht Alter / Jahre 1 62/14 Achillessehne Μ 16 76 2 29/13 Bizepssehne W 17/14 W 64 3 Bizepssehne 4 64/13 53 Bizepssehne Μ 65/13 56 5 Bizepssehne Μ 6 72/13 Bizepssehne Μ 62 7 06/14 Μ 46 Bizepssehne 8 67/14 Bizepssehne Μ 64 W 9 67/13 LCF 2 10 09/14 LCF W 11 11 16/14 LCF W 6 12 115/14 LCF W 77 123/14 LCF W 3 13 37/14 LCF 15 14 Μ 15 52/14 LCF Μ 7 53/14 Patellarsehne 80 16 Μ 17 75/14 72 Quadrizepssehne W 18 54/14 80 Quadrizepssehne Μ 19 64/14 Quadrizepssehne Μ 69 20 80/14 Quadrizepssehne Μ 53 21 73/13 VKB W 71 22 19/14 VKB W 58 23 40/14 VKB W 60 24 76/14 VKB W 72 25 83/14 VKB W 71 26 24/14 VKB Μ 56 27 48/14 VKB 77 Μ

**Tabelle 6: Übersicht über die Proben und die Zuordnung zum Entnahmeort, Geschlecht und Alter der Spender.** LCF = Ligamentum capitis femoris, VKB = vorderes Kreuzband, M = männlich, W = weiblich

Wie in Tabelle 6 ersichtlich, lagen jeweils 7 Proben einer Bizepssehne, 7 Proben des Hüftkopfbandes (LCF) und ebenfalls 7 Proben des vorderen Kreuzbandes (VKB) vor (jeweils 25,9 %). Vier Proben (14,8 %) waren Quadrizepssehnen und 3,75 % Patellar- oder Achillessehne (jeweils 1 Probe).

Bei den Spendern handelte es sich mit 14 Männer und 13 Frauen um eine ausgewogene Geschlechterverteilung. Das Alter der Patienten lag zwischen 2 und 80 Jahren, es ergab sich ein Mittelwert von 51 Jahren (SD  $\pm$  21 Jahre).



*Abb. 13: Altersverteilung der absoluten Probenanzahl*. *Mittelwert 51 Jahre (± 21 Jahre); Median 60 Jahre.* 

26 % der Proben (insgesamt 7) wurden bei jungen Spendern unter 20 Jahren entnommen. 74% der Spender konnten der Altersgruppe > 46 Jahren zugeordnet werden (insgesamt 20 Proben).

Unterschieden nach den Subgruppen des Probenursprungs ergab sich für Proben der Bizepssehne ein Mittelwert von 60 Jahren (SEM  $\pm$  3,62 Jahre), für LCF von 17 Jahren (SEM  $\pm$  10,09 Jahre), für das VKB von 66 Jahren (SEM  $\pm$  3,10 Jahre) und für die Quadrizepssehne von 68 Jahren (SEM  $\pm$  5,66 Jahre). Das Alter des Spenders des Achillessehnenpräparates betrug 16 Jahre und der Patellarsehne 80 Jahre. Da jeweils nur eine Probe vorlagen, entfällt die Berechnung der Mittelwerte. Die Altersverteilung der Proben nach Ursprung ist in Abbildung 14 dargestellt.



Abb. 14: Altersverteilung nach Probenursprung. LCF = Ligamentum capitis femoris, VKB = vorderes Kreuzband

Um eine zusätzliche Auswertung entsprechend des anatomischen Verlaufs nach "intrasynovialem" und "extrasynovialem" Probenursprung zu ermöglichen wurde eine weitere Subgruppierung geschaffen. In dieser umfasste die Gruppe der frei durch Gelenke bzw. Körperhöhlen ziehenden Sehnen und Bänder ("intrasynovialer Verlauf") die Bizepssehnenproben und die Proben des LCF. Als "extrasynovialer" Verlauf wurden das VKB, die Sehne des Quadrizeps und die Proben von Achilles- und Patellarsehne definiert. In dieser Gruppierung standen somit 14 Proben (51,9%) mit "intrasynovialem Verlauf" insgesamt 13 Proben (48,1 %) mit "extrasynovialem Verlauf" gegenüber (s. Tabelle 7).

intrasynovialer Verlauf	extrasynovialer Verlauf		
(n= 14)	(n= 13)		
Bizepssehne	Vorderes Kreuzband (VKB)		
Hüftkopfband (LCF)	Quadrizepssehne		
	Achillessehne		
	Patellarsehne		

Tabelle 7: Subgruppierung mit Einteilung nach anatomischem Verlauf. n= Probenzahl

Auch diese Gruppierungen wurden nach ihrer Altersverteilung untersucht. Hierbei ergab sich die in Abbildung 15 dargestellte Verteilung nach Alter.



**Abb. 15: Altersverteilung im Vergleich intra- und extrasynovialer Verlauf**. Der Mittelwert des Alters in der intrasynovialen Gruppe war signifikant geringer als in der extrasynovialen Gruppe (38 Jahre vs. 64 Jahre; p=0,01; Mittelwert ± SEM).

In der intrasynovialen Gruppe lag der Mittelwert bei 38,71 Jahren (SEM  $\pm$  7,86 Jahre). Dem gegenübergestellt wurde die extrasynoviale Gruppe mit einem Altersmittelwert von 64,23 Jahren (SEM  $\pm$  4,72 Jahre). Daraus ergab sich ein signifikant jüngeres Alter bei den intrasynovialen Proben als in der Vergleichsgruppe des extrasynovialen Ursprungs (p=0,01).

## 4.2 Zellkultur und Proliferationsrate

Alle untersuchten Proben ließen sich als Primärkultur in der Zellkultur kultivieren. Dabei zeigten sie, wie beispielhaft in Abbildung 16 A-C abgebildet, ein adhärentes Wachstum und eine Proliferationstendenz über den gesamten Versuchszeitraum.



Abb. 16 A-C: Native Tendozyten (hier Ursprung Bizepssehne) in Zellkultur nach 1 (A), 7 (B) und 14 (C) Tagen im lichtmikroskopischen Bild (Objektiv 10x). Es zeigt sich eine zunehmende Zellzahl und Konfluenz.

Zur Beurteilung der Proliferationsrate wurden die ausgebrachten Zellzahlen ( $N_0$ ) mit den erreichten Zellzahlen ( $N_1$ ) zu den gewählten Versuchstagen 1, 4, 7, 11 und 14 verglichen. Mit Hilfe der in Kapitel 3.4. genannten Formeln wurden Generationszahl, Generationszeit und Generationszahl pro 24 h berechnet und grafisch dargestellt.

Das nach dem Ausbringen der Zellen in die Zellkulturflaschen innerhalb der ersten 24 h vor allem die Adhäsion und noch nicht die Proliferation der vitalen Tendozyten im Vordergrund stand, zeigte sich in den erreichten Zellzahlen an d1, die bei 92,6 % der Proben (25 von 27 Proben) geringer war als die ausgesäte Zellzahl N<sub>0</sub>. Im weiteren Verlauf der Kultivierung nahmen die Zellzahlen in allen Proben zu. Erst zum Ende des gewählten Versuchszeitraums verlangsamte sich die Zunahme wieder und nahm bei einigen Proben im letzten Versuchsabschnitt von d11 zu d14 sogar ab.



**Abb. 17: Absolute Zellzahl der einzelnen Subgruppen** (Mittelwert ±SEM). Es zeigte sich in allen Gruppen eine Zunahme der Zellzahlen über den Versuchszeitraum. LCF = Ligamentum capitis femoris, VKB = vorderes Kreuzband, d1 - d14 = Versuchstage

Bei der Untersuchung der Generationszeit g in Stunden (g [h]) der Versuchstage d4 bis d14, also der Bestimmung der Zeit bis zur Verdopplung der Zellzahl, ergaben sich Zeiträume von 32,23 h (d4) bis 84 h (d14). Es zeigte sich deutlich, dass zu Beginn der Kultivierung die Generationszeiten geringer (durchschnittlich 48,57 h an d4), als gegen Ende des Kultivierungszeitraums (durchschnittlich 69,34 h an d14) waren. Die Ergebnisse sind in der folgenden Abbildung 18 dargestellt:



**Abb. 18: Generationszeit in Stunden (g [h]) der Versuchstage d1 bis d14** (Mittelwert ± SEM). Die Proliferationsgeschwindigkeit nahm mit zunehmender Kulturdauer in allen Gruppen ab. LCF = Ligamentum capitis femoris, VKB = vorderes Kreuzband, d1 - d14 = Versuchstage

Generell zeigten zu allen Versuchszeitpunkten Proben des LCF die schnellste Proliferationsrate (durchschnittlich 50,20 h über alle Versuchstage), während sich die jeweils langsamste Kultur von Versuchstag zu Versuchstag unterschied.

 Tabelle 8: Schnellste Generationszeit in Stunden (g[h]) je Versuchstag. LCF = Ligamentum capitis femoris

Kulturnummer	Probenursprung	Tag	g [h]
123a/14	LCF	4	32,23
16a/14	LCF	7	35,67
123a/14	LCF	11	43,77
115a/14	LCF	14	54,23

**Tabelle 9: Langsamste Generationszeit in Stunden (g[h]) je Versuchstag**. LCF = Ligamentum capitis femoris, VKB = vorderes Kreuzband

Kulturnummer	Probenursprung	Tag	g [h]
52a/14	LCF	4	64,63
75a/14	Quadrizepssehne	7	77,42
76a/14	VKB	11	67,24
64a/13	Bizepssehne	14	84

Im Versuchszeitraums nahm die absolute Zellzahl, wie in Abbildung 17 ersichtlich, zu. Dabei zeigte sich zu Beginn der Kultivierung die größte Zunahme. Diese flachte dann zunehmend ab. Entsprechend der in Kapitel 3.4. genannten Formel (3) wurden unter Verwendung der ausgebrachten Zellzahl N<sub>0</sub> und der an den jeweiligen Versuchstagen erreichten Zellzahlen N<sub>1</sub>

die in Abbildung 19 dargestellte Teilungsrate (n/24h) in allen Kulturen errechnet. Bei der Betrachtung der Ergebnisse ergab sich für die Gruppen der in Tabelle 10 gezeigte Mittelwert für die Generationszahl n/24 h und der folgende Standardfehler des Mittelwerts (SEM).

**Tabelle 10: Übersicht über die durchschnittlichen Generationszahlen (n/24h) der unterschiedlichen Probenursprünge an den Versuchstagen d1 - d14** (Mittelwert ± SEM). LCF = Ligamentum capitis femoris, VKB = vorderes Kreuzband, d1 - d14 = Versuchstage

	d1	d4	d7	d11	d14
LCF	-0,48 ± 0,20	0,58 ± 0,06	0,57 ± 0,04	0,47 ± 0,02	0,39 ± 0,01
Bizepssehne	-0,34 ± 0,10	$0,49 \pm 0,02$	$0,43 \pm 0,02$	0,40 ± 0,01	0,33 ± 0,01
VKB	-0,58 ± 0,09	0,47 ± 0,03	$0,45 \pm 0,02$	0,37 ± 0,01	0,32 ± 0,01
Quadrizepssehne	-0,80 ± 0,14	0,47 ± 0,02	0,46 ± 0,05	0,38 ± 0,02	0,34 ± 0,02

Auch hier zeigte sich zu Kulturbeginn in allen Gruppen eine höhere Teilungsrate, die an den folgenden Versuchstagen gleichermaßen abnahm. Durch die an d1 negative Teilungsrate ergab sich in allen Proben zu allen folgenden Versuchstagen eine höchst-signifikante Zunahme (jeweils p<0,001). Auf die Darstellung in Abbildung 19 wurde aus Übersichtlichkeitsgründen verzichtet. Signifikante Unterschiede ergaben sich zusätzlich an d7 bis d14 zwischen LCF, VKB und Bizepssehne, an d11 zusätzlich auch im Vergleich der LCF- mit den Quadrizepssehnenproben, wobei jeweils die Proben des LCF eine signifikant höhere Teilungsrate boten (d7:  $p_{LCF/VKB}=0,04$  (\*) und  $p_{LCF/Bizepssehne}=0,003$  ( $\Delta$ ); d14:  $p_{LCF/VKB}<0,001$  (\*) und  $p_{LCF/Bizepssehne}=0,002$  (#)). Dies ist in Abbildung 19 ersichtlich.



Abb. 19: Teilungsrate (n/24h) als Ausdruck der Proliferation im Vergleich der Gruppen über den Versuchszeitraum (Mittelwert  $\pm$  SEM). Durch die zunehmende Konfluenz der Zellkulturen nahmen die Teilungsraten in 24h im Versuchszeitraum in allen Gruppen ab. In den Subgruppen ergab sich in Bezug auf d1 an allen Versuchstagen eine höchst-signifikant höhere Teilungsrate (p<0,001). Der Übersichtlichkeit halber wurde auf die Darstellung in der Grafik verzichtet. An den einzelnen Versuchstagen zeigte sich ab d7 eine signifikant höhere Teilungsrate in den LCF-Proben bezogen auf Bizepssehne (#) (p=0,01 / p=0,004 / p=0,002), VKB (\*) (p=0,04 / p<0,001 / p<0,001) und an d11 auch gegenüber der Quadrizepssehne ( $\Delta$ ) (p=0,003). d = Versuchstag, LCF = Ligamentum capitis femoris, VKB = vorderes Kreuzband

Da in dieser Arbeit zusätzlich der Frage nachgegangen werden sollte, ob in Abhängigkeit des Gewebeverlaufs Unterschiede in der Proliferationskapazität der Tendozyten nachweisbar sind, ist die ab d7 messbare, signifikant höhere Proliferation in den Kulturen des LCF im Vergleich mit den anderen Gruppen auffällig. Deshalb wurde zur weiteren Analyse ebenfalls die Subgruppierung in intra- und extrasynovialen Verlauf (s. Tabelle 7) betrachtet.

Durchschnittlich betrug die Generationszeit g [h] nach d1 bei intrasynovialem Verlauf 55,08 h  $(\pm 1,56 \text{ h})$  und bei extrasynovialem Verlauf 58,74 h  $(\pm 1,60 \text{ h})$ . Im Einzelnen lassen sich die Ergebnisse, wie in Tabelle 11 dargestellt, zusammenfassen.

 Tabelle 11: Durchschnittliche Generationszeit (g[h]) in den intra-/extrasynovialen Gruppen an

 den Versuchstagen d1 - d14 (Mittelwert ± SEM). d= Versuchstag

	d1	d4	d7	d11	d14
intrasynovial	-71,54 ± 115,3	47,08 ± 2,62	49,51 ± 2,47	55,88 ± 1,68	67,85 ± 2,29
extrasynovial	-45,46 ± 9,63	50,17 ± 2,02	51,88 ± 2,84	61,97 ± 1,95	70,93 ± 2,10

Es zeigte sich im Gruppenvergleich eine an allen Versuchstagen durchschnittlich geringere Generationszeit in den Proben mit intrasynovialem Ursprung, und somit eine schnellere Proliferation. Dabei fand sich in der intrasynovialen Gruppe die größte Zunahme von d11 zu d14 (55,88 h auf 67,85 h, p=0,003) und bei der extrasynovialen Gruppe von d7 zu d11 (51,88 h auf 61,97 h, p=0,03). In der extrasynovialen Gruppe kam es von d11 zu d14 zu einer etwas geringeren Zunahme der Generationszeit (+8,96 h) als von d7 zu d11 (+10,09 h) und somit wieder leicht beschleunigten Proliferation. Ein signifikantes Niveau wurde dadurch nicht erreicht.

Den größten Unterschied zwischen den beiden Subgruppen fanden wir an d11 (55,88 h zu 61,97 h). Hier zeigte sich eine signifikant schnellere Proliferation in den Proben des intrasynovialen Ursprungs (p=0,025), wie in Abbildung 20 dargestellt. Ohne Einbeziehung der Einzelproben von Achilles- und Patellarsehne erhöhte sich sogar das Signifikanzlevel an d11 (p=0,0014), ansonsten ergaben sich keine wesentlichen Änderungen, so dass keine separate Darstellung ohne diese Proben erfolgte.



**Abb. 20: Generationszeit (g[h]) im Vergleich intra-**/ **extrasynovialer Verlauf**. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied an d11 (p= 0,025) mit schnellerer Generationszeit in den Proben des intrasynovialen Ursprungs und eine signifikante Zunahme der Generationszeit extrasynovial zwischen d7 und d11 (p=0,03) und intrasynovial zwischen d11 und d14 (p=0,003) (Mittelwert ± SEM). d = Versuchstag

Gemäß Formel (3) wurde im Anschluss die Teilungsrate (n/24h) berechnet und verglichen. Es ergaben sich für den intrasynovialen Verlauf die in Tabelle 12 dargestellten und in Abbildung 21 abgebildeten Generationszahlen in 24 h zwischen 0,532 (d4) und 0,359 (d14) und beim extrasynovialen Verlauf zwischen 0,488 (d4) und 0,342 (d14). In beiden Gruppierungen waren die Mittelwerte des ersten Versuchstages negativ, das heißt, dass nicht alle an Tag 0 ausgebrachten Zellen innerhalb der ersten 24 h adhärent waren. Die Ergebnisse wurden daher in der grafischen Darstellung nicht berücksichtigt.

•	,	•			
	d1	d4	d7	d11	d14
intrasynovial	-0,408 ± 0,110	0,532 ± 0,031	0,502 ± 0,027	0,435 ± 0,014	0,359 ± 0,012
extrasynovial	-0,663 ± 0,068	0,488 ± 0,020	0,478 ± 0,024	0,393 ± 0,014	0,342 ± 0,011

Tabelle 12: Vergleich der durchschnittlichen Teilungsrate (n/24h) im intra-/ extrasynovialenVerlauf (Mittelwert ± SEM). d = Versuchstage



**Abb. 21:Vergleich der Teilungsrate (n/24h) im intra-/ extrasynovialen Verlauf** (Mittelwert  $\pm$  SEM). Über den gesamten Versuchszeitraum kam es in beiden Gruppen zu einem kontinuierlichen Abfall der Teilungsrate in 24h. Dabei erreichte die Abnahme von d7 zu d11 und d14 intrasynovial Signifikanzniveau (p<sub>d11</sub>=0,003 und p<sub>d14</sub><0,001). Ebenfalls höchst-signifikant war der Abfall von d7 zu d11 im extrasynovialen Verlauf (p<0,001). Im Gruppenvergleich zeigte sich eine signifikant höhere Teilungsrate intrasynovial an d11 (p=0,047). d = Versuchstage

Wie in Abbildung 21 ersichtlich nahm die Generationszahl in 24 h in beiden Gruppierungen von Versuchstag zu Versuchstag ab. Dies bedeutet, dass weniger Zellverdopplungen pro 24 h stattfanden, die Proliferation verlangsamte sich somit. Diese Abnahme war in beiden Gruppen vor allem zwischen d7 und d11 sehr groß. In der intrasynovialen Gruppe fiel die Generationszahl hier hoch-signifikant von durchschnittlich 0,502 auf 0,435 (p=0,003) und in der extrasynovialen Gruppe höchst-signifikant von durchschnittlich 0,478 auf 0,393 (p<0,001). Aber auch die Abnahme der Generationszahl von d11 auf d14 fiel in der intrasynovialen Gruppe höchst-signifikant aus (p<0,001). Beim Vergleich der intra- und extrasynovialen Gruppe untereinander auf Unterschiede im Wachstumsverhalten mittels t-Test zeigte sich ebenfalls an d11 eine signifikant geringere Generationszahl in der extrasynovialen Gruppe und somit eine langsamere Proliferation (p= 0,047). Vergleichbar mit dem Ergebnis der Generationszeit (g [h]), bei dem das Signifikanzlevel durch Auslassung der Einzelproben von Achilles- und Patellarsehne stieg, fand sich auch in diesem Subgruppenvergleich eine höhere Signifikanz an d11 unter Auslassung dieser Proben (p=0,0036).

#### 4.3 Zusammenhang Proliferationsrate und Spenderalter

Die bisherigen Ergebnisse der Proliferationsrate (n/24h) sind in Abbildung 22 im Zusammenhang mit dem Spenderalter dargestellt. Es ergab sich ein Korrelationskoeffizient

von (-0,37). Es zeigte sich eine etwas höhere Proliferation in den Proben der jüngeren Spender.



**Abb. 22: Korrelation von Alter (Jahre) und durchschnittlicher Proliferation (n/24h).** Es zeigte sich eine etwas höhere Proliferation bei jüngerem Spenderalter. n/24h = Generationszahl in 24 h, *r* = Korrelationskoeffizient

#### 4.4 qRT-PCR

Bei der Auswertung der qRT-PCR wurde, wie bei der Auswertung der Proliferationsraten, eine Zuordnung der Einzelergebnisse sowohl zu einer der anatomischen Ursprungsgruppen (Bizepssehne, Quadrizepssehne, VKB und LCF) als auch zum anatomischen Verlauf (intraund extrasynovial) vorgenommen. Zusätzlich wurde, soweit vorhanden, zum Vergleich die Genexpression der Primärkultur (P0), also der Zellen ohne weitere Trypsinierung, bestimmt.

## 4.4.1 Expressionslevel der Marker

Alle verwendeten *Primer* zeigten in unseren Zellreihen eine Bindung an die Zielsequenzen, so dass eine PCR-Untersuchung der gewählten Transkripte möglich war. Lediglich bei einzelnen Proben lag der *threshold* außerhalb des verwertbaren Bereiches, so dass diese Ergebnisse nicht in der Auswertung berücksichtigt werden konnten (*"undetermined"*).

Wir betrachteten die relative Expression der einzelnen gewählten Marker über den Versuchszeitraum im Vergleich der Ursprungsgruppen. Hierbei ist jeweils zu beachten, dass die Achillessehne und die Patellarsehne nur als Einzelproben vorlagen. Diese sind in den

grafischen Darstellungen mit aufgeführt, bleiben jedoch in den Testungen auf signifikante Unterschiede im Allgemeinen unberücksichtigt.

## 4.4.1.1 Collagen 1A1

Abbildung 23 zeigt die durchschnittliche relative Expression des Markers Collagen 1A1 in den unterschiedlichen Probengruppen im Verlauf der Zeit.

Es zeigt sich überwiegend ein ähnlicher Verlauf im Vergleich der Subgruppen. Auffällig ist die in allen Gruppen, bis auf das VKB, deutlich höchste Expression in den Proben der Primärkulturen P0 (VKB: 0,05 / Bizepssehne: 0,38 / LCF: 0,39 / Quadrizepssehne: 0,32). Anschließend erreichten allen Gruppen ähnliche Mittelwerte an d1, wobei erneut das VKB die geringsten Werte generierte (VKB: 0,12 / Bizepssehne: 0,19 / LCF: 0,14 / Quadrizepssehne: 0,15). Im weiteren Verlauf stieg die Expression in allen Gruppen mit Ausnahme der Bizepssehne zum Zeitpunkt d4 auf vergleichbare Werte an (VKB: 0,18 / Bizepssehne: 0,17 / LCF: 0,2 / Quadrizepssehne: 0,2). Eine weitere Ausnahme bildeten die einzelnen Patellarsehnen- und Achillessehnenproben, die an diesem Tag eine deutlich höhere Expression von Collagen 1A1 zeigten (Patellarsehne: 0,33 Achillessehne: 0,28). Zu d7 stieg die Expression in allen Gruppen außer der LCF-Gruppe und der Achillessehnenprobe an. An diesem Tag erreichten zudem die Proben von Quadrizepssehne (0,21), Bizepssehne (0,2) und VKB (0,25) ihre Maximalwerte, wenn man die Primärkultur P0 mit den abweichenden Probenzahlen außer Acht lässt. An d11 sank die Expression in allen Gruppen, mit Ausnahme der Einzelproben von Achillessehne und Patellarsehne, und zeigte nur geringe Unterschiede (VKB: 0,13 / Bizepssehne: 0,11 / LCF: 0,09 / Quadrizepssehne: 0,11). Zum Ende des Versuchszeitraums an d14 kam es wiederrum in allen Gruppen zu einem leichten Anstieg, außer bei der Achillessehne. Bei dieser fiel die Expression an d14 auf ihren Minimalwert (0,15). Den Maximalwert der übrigen Gruppen bildete an d14 die Kreuzbandgruppe, die sich somit erneut deutlich von den anderen Gruppen (VKB: 0,21 / Bizepssehne: 0,14 / LCF: 0,11 / Quadrizepssehne: unterschied 0,13). Signifikante Änderungen der einzelnen Marker ergaben sich über den Versuchszeitraum jeweils nur unter Einbeziehung der Primärkultur P0. Hier zeigte sich eine signifikante Absenkung der relativen Expression in der Bizepssehnengruppe zwischen P0 im Vergleich zu d4 (p=0,05), d11 (p=0,005) und d14 (p=0,01) und in der LCF-Gruppe zu d11 (p=0,01) und d14 (p=0,03).

Im Vergleich der verschiedenen Sehnen zu den Versuchszeitpunkten untereinander ergaben sich signifikanten Unterschiede der Collagenexpression vor allem in der Primärkultur P0. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass die Probenzahlen je Gruppe in P0 abwichen, da nicht bei allen Proben eine Primärkultur angelegt werden konnte. In den Primärkulturen P0 ergab sich

43

eine signifikant höhere Expression in den Proben des LCF (p=0,002; (\*)), der Bizepssehnen-(p=0,003; (#)) und der Quadrizepssehnengruppe (p=0,02;  $(\bigtriangledown)$ ) gegenüber dem VKB. Die auffällig höhere Expression an allen Versuchstagen in der Probe der Patellarsehne und an d11 auch in der Achillessehnenprobe, blieb aufgrund der fehlenden Vergleichbarkeit der Einzelproben in der Signifikanztestung unbeachtet, so dass sich an den übrigen Versuchstagen keine signifikanten Unterschiede in den Subgruppen ergaben.



**Abb. 23:** Relative Expression von Collagen 1A1 im Verlauf der Zeit (Mittelwert ± SEM). Signifikante Unterschiede ergaben sich in den Proben der Bizepssehne und des Hüftkopfbandes, jeweils bezogen auf P0 an d11 und d14 (p <sub>Bizepssehne d11</sub>=0,005, p <sub>Bizepssehne d14</sub>=0,01 und p <sub>LCF d11</sub> = 0,01, p <sub>LCF d14</sub> =0,03). In der Bizepssehne zeigte sich zusätzlich ein signifikanter Abfall zwischen P0 und d4 (p=0,05). Im Subgruppenvergleich bestand eine teils hoch-signifikant geringere Expression in den Primärkulturen P0 des Kreuzbandes gegenüber dem LCF ((\*), p=0,002), der Bizepssehne ((#), p=0,003) und der Quadrizpssehne (( $\nabla$ ), p=0,02). Die Patellarsehne und Achillessehne blieben als Einzelproben ohne Signifikanztestung. d = Versuchstage, P0=Primärkultur, LCF = Ligamentum capitis femoris, VKB = vorderes Kreuzband

## 4.4.1.2 Scleraxis

Als zweiter Marker wurde Scleraxis untersucht. Die relative Expression war durchschnittlich in allen Proben an allen Versuchstagen nur gering, wie Abbildung 24 zeigt. In allen Primärkulturen wurde eine vergleichbar geringe Expression von Scleraxis nachgewiesen (VKB: 0,02 / Bizepssehne: 0,01 / LCF: 0,03 / Quadrizepssehne: 0,02 / Achillessehne: 0,03 / Patellarsehne: 0,03), während dann an d1 in allen Proben, mit Ausnahme der Einzelprobe der Patellarsehne, ein deutlicher Anstieg zu verzeichnen war (VKB: 0,05 / Bizepssehne: 0,1 / LCF: 0,13 / Quadrizepssehne: 0,05 / Achillessehne: 0,1 / Patellarsehne: 0,02). Überwiegend wurde hier das Maximum der Expression erreicht. Zu d4 kam es in der Folge bei LCF (0,04), VKB (0,03), Quadrizepssehne (0,03), Bizepssehne (0,02) und auch bei der Patellarsehne (0,009) zu einem deutlichen Abfall der Expression. Lediglich die Achillessehnenprobe verzeichnete einen weiteren Anstieg der Expression bis auf den Maximalwert der Probe

von 0,15. An d7 ähnelte die Expression in allen Gruppen den vorherigen Werten und auch in der Achillessehnenprobe fiel die Expression nun auf ein vergleichbares Level ab (VKB: 0,03 / Bizepssehne: 0,02 / LCF: 0,04 / Quadrizepssehne: 0,02 / Achillessehne: 0,02 / Patellarsehne: 0,009). Zu d11 sank die Expression in allen Gruppen weiter ab und generierte durchschnittlich die geringsten Werte (VKB: 0,01 / Bizepssehne: 0,01 / LCF: 0,03 / Quadrizepssehne: 0,01 / Achillessehne: 0,007 / Patellarsehne: 0,02). Hier zeigte sich eine signifikant höhere Expression in den LCF-Proben im Vergleich zu den Bizepssehnenproben (p=0,04; (\*)). Zum Ende des Versuchszeitraums (d14) kam es durchschnittlich zu geringen Zunahmen der Expression (VKB: 0,08 / Bizepssehne: 0,01 / LCF: 0,04 / Quadrizepssehne: 0,02 / Achillessehne: 0,01 / Patellarsehne: 0,01 / LCF: 0,04 / Quadrizepssehne: 0,02 / Achillessehne: 0,01 / Patellarsehne: 0,01 / LCF: 0,04 / Quadrizepssehne: 0,02 / Achillessehne: 0,01 / Patellarsehne: 0,01 / LCF: 0,04 / Quadrizepssehne: 0,02 / Achillessehne: 0,01 / Patellarsehne: 0,01 / LCF: 0,04 / Quadrizepssehne: 0,02 / Achillessehne: 0,01 / Patellarsehne: 0,01 / LCF: 0,04 / Quadrizepssehne: 0,02 / Achillessehne: 0,01 / Patellarsehne: 0,01 / LCF: 0,04 / Quadrizepssehne: 0,02 / Achillessehne: 0,01 / Patellarsehne: 0,01). Lediglich die Proben des Kreuzbandes zeigten erst hier ihre maximale Expression.

Bei Betrachtung der gemessenen Genexpression von Scleraxis über die Zeit waren in den Probengruppen trotz deutlicher Unterschiede der Mittelwerte über den gesamten Versuchszeitraum keine signifikanten Veränderungen nachzuweisen.



**Abb. 24: Relative Expression von Scleraxis im Verlauf der Zeit** (Mittelwert ± SEM). An d11 zeigte sich eine signifikant höhere Scleraxisexpression in den Proben des LCF im Vergleich zur Bizepssehne (p= 0,04). LCF = Ligamentum capitis femoris, VKB = vorderes Kreuzband, d = Versuchstage, P0 = Primärkultur

## 4.4.1.3 Tenascin C

Der nächste untersuchte Marker war Tenascin C. Auch dieser wurde in allen Proben nachgewiesen. Wie in Abbildung 25 ersichtlich, ähnelte sich dabei bei jedem Probenursprung der muldenförmige Verlauf der relativen Expression mit einem Minimum an d4. Lediglich bei der Einzelprobe der Patellarsehne wurde der Minimalwert bereits an d1 erreicht (0,21). In den Proben des VKB zeigte sich bei der Untersuchung der Genexpression des Tenascin C eine hohe Expression zu Beginn der Versuche (P0=0,36 / d1=0,41). Unmittelbar im Anschluss

kam es zum Abfall der Werte und an d4 zur niedrigsten Expressionsrate (0,23). Diese stieg zum Ende der Kultivierungsspanne wieder sehr deutlich an und lag am Ende im Mittel höher als an d1 (d7=0,31 / d11=0,35 / d14=0,48). Ein vergleichbarer, muldenförmiger Verlauf der Tenascin C-Expression wie beim VKB fand sich im LCF mit einem Minimum an d4 (0,34). Die sehr hohe Expression zu Beginn (P0=0,72 / d1=0,58) und Ende des Versuchszeitraums (d7=0,42 / d11=0,44 / d14=0,68) erreichte vergleichbare Werte. Bei den Bizepssehnenproben zeigten sich deutliche Unterschiede in der relativen Genexpression des Tenascin C an den Versuchstagen. Zu Beginn war die Expression am höchsten (P0=0,81), fiel dann bis d4 ab (d1=0,46 / d4=0,28) und pendelte dann im restlichen zeitlichen Verlauf zwischen (0,39) an d7, (0,28) an d11 und (0,40) an d14. Unter Berücksichtigung der wenigen P0 Proben konnten signifikante Unterschiede generiert werden. Diese zeigten sich im Vergleich mit allen Versuchstagen teilweise hoch-signifikant (p d1=0,007 / p d4<0,001 / p d7<0,001 / p d11<0,001 / p<sub>d14</sub>=0,001). Bei der Quadrizepssehne wurde gleichfalls ein muldenförmiger Verlauf der Expression mit dem geringsten Mittelwert an d4 gesehen (0,23). Anders als beim VKB und beim LCF lag hier jedoch der höchste Wert nicht am Ende, sondern zu Beginn der Kultivierung vor (P0=0,56 / d1=0,34). Unter Einbeziehung der P0 Proben zeigte sich eine signifikante Abnahme zu d4 (p=0,04) und d7 (p=0,04).

Im Vergleich der Expressionswerte der Subgruppen an den unterschiedlichen Versuchstagen ergab sich an d14 eine signifikant höhere Expression in der Gruppe der LCF-Proben im Vergleich zu der Quadrizepssehnengruppe (p=0,05; (\*)).



**Abb. 25: Relative Expression von Tenascin C im Verlauf der Zeit** (Mittelwert  $\pm$  SEM). In den Proben der Bizepssehne zeigte sich ein teils höchst-signifikanter Abfall der Expression an allen Versuchstagen in Bezug auf P0 (p<sub>d1</sub>=0,007 / p<sub>d4</sub><0,001 / p<sub>d7</sub><0,001 / p<sub>d11</sub><0,001 / p<sub>d14</sub>=0,001). Bei den Quadrizepssehnenproben bestand ein signifikanter Rückgang der Expression an d4 (p=0,04) und d7 (p=0,04) in Bezug auf P0. Zusätzlich wurde an d14 eine signifikant höhere Expression in den LCF-Proben im Vergleich zur Quadrizepssehne gemessen (p=0,05). LCF = Ligamentum capitis femoris, VKB = vorderes Kreuzband, d = Versuchstage, P0 = Primärkultur

### 4.4.1.4 Tenomodulin

Als nächstes untersuchten wir Tenomodulin. Wie Abbildung 26 zeigt, war ein Nachweis von Tenomodulin möglich, jedoch war die relative Expression in allen Proben sehr gering.

Auffällig war hier der divergente Expressionsverlauf in den VKB- und in der Achillessehnenprobe. Hier fiel die Expression durchschnittlich höher aus. Von allen Gruppen erbrachten die VKB-Proben an P0 und d1 die niedrigste Expressionsrate (P0=0,00012 / d1=0,000012). Ab d4 stieg sie jedoch deutlich über die durchschnittlichen Mittelwerte der anderen Gruppen (0.0003). Das Maximum ergab sich beim VKB an d7 (0.0016). Signifikante Unterschiede im Vergleich der Versuchszeiträume fanden sich in dieser Gruppe jedoch nicht. Alle anderen Subgruppen erbrachten die durchschnittlich höchste Expression an d1 (Bizepssehne 0,000048 / LCF 0,000063 / Quadrizepssehne 0,000048). Diese nahm dann in allen Gruppen im Mittel zu d4 ab (Bizepssehne 0,000019 / LCF 0,000055 / Quadrizepssehne 0,000012) und hielt sich auf niedrigem Niveau an d7 (Bizepssehne 0,000019 / LCF 0,000055 / Quadrizepssehne 0,000017) bzw. sank bei den Bizepssehnenproben und Proben des LCF ab d11 leicht weiter ab (d11 Bizepssehne 0,000018 / LCF 0,000032 / Quadrizepssehne 0,000011 und d14 Bizepssehne 0,000015 / LCF 0,000029 / Quadrizepssehne 0,0000079). Unter Berücksichtigung der wenigen P0 Proben ergaben sich signifikante Rückgänge der Expression in den Proben der Bizepssehne zu allen Versuchstagen (p d1=0,01 / p d4=0,009 / p<sub>d7</sub>=0,009 / p<sub>d11</sub>=0,009 / p<sub>d14</sub>=0,009) und ebenfalls in den Proben der Quadrizepssehne (p<sub>d1</sub>=0,001 / p<sub>d4</sub><0,001 / p<sub>d7</sub><0,001 / p<sub>d11</sub><0,001 / p<sub>d14</sub><0,001). Die signifikant geringste Expression an Tenomodulin beim VKB in den Primärkulturproben P0 im Vergleich mit allen anderen Ursprungsgruppen erreichte ein hoch-signifikantes Level (jeweils p<0,001). Trotz der deutlich höheren Expression im Verlauf blieb dies der einzige signifikante Unterschied im Subgruppenvergleich.





**Abb. 26 A-B:** A: Relative Expression von Tenomodulin im Verlauf der Zeit (Mittelwert  $\pm$  SEM). Die Expression war insgesamt an allen Versuchstagen nur sehr gering. In den Proben von Bizepssehne ( $p_{d1}=0,01/p_{d4}=0,009/p_{d7}=0,009/p_{d11}=0,009/p_{d14}=0,009$ ) und Quadrizepssehne ( $p_{d1}=0,001/p_{d1}=0,001/p_{d1}<0,001/p_{d14}<0,001$ ) ergab sich eine signifikante Abnahme der Expression an allen Versuchstagen bezogen auf P0. B: Relative Expression von TNMD in den Proben der Primärkultur P0 (Mittelwert  $\pm$  SEM). Es zeigte sich eine höchst-signifikant geringere Expression in den Kreuzbandproben im Vergleich zu allen anderen Subgruppen (jeweils p<0,001). LCF = Ligamentum capitis femoris, VKB = vorderes Kreuzband, d = Versuchstage, P0 = Primärkultur

## 4.4.1.5 uPA

Auch bei der Betrachtung der Ergebnisse der qRT-PCR für uPA ist festzuhalten, dass der Nachweis der Expression in allen Proben gelang, wie Abbildung 27 zeigt. Erstmals wurde die Expression von uPA an unterschiedlichen humanen Sehnen mittels PCR dargestellt. Hierbei zeigten alle Subgruppen einen vergleichbaren Verlauf mit der höchsten Expression zu Beginn, einem Abfall der Expression bis d4 und anschließend erneutem Anstieg zum Ende des Versuchszeitraums.

Insgesamt zeigte das VKB die höchste Expression im gesamten Versuchszeitraum. Betrachtete man diese Ergebnisse näher, so zeigte sich das Expressionsmaximum in der Primärkultur (0,27) und das Minimum an d4 (0,12). Der Ausgangswert wird, trotz erneutem Anstieg der Expression in der zweiten Versuchshälfte, nicht wieder erreicht (d7=0,17/ d11=0,18 / d14=0,17). Es finden sich im Zeitverlauf keine signifikanten Unterschiede. Der Verlauf uPA-Expression den **Bizepssehnen** der in ist insgesamt mit den Kreuzbandergebnissen vergleichbar. Auffällig scheinen hier, neben den signifikanten Unterschieden von P0 zu d1, d4 und d7 (p  $_{d1}$ =0,007 / p  $_{d4}$ <0,001 / p  $_{d7}$ =0,02) und von d4 zu d14 (p=0,004), die insgesamt geringeren Mittelwerten (0,14 / 0,08 / 0,62 / 0,08 / 0,10 / 0,12). Bei Betrachtung der Ergebnisse der Messungen der uPA-Expression im LCF zeigte sich ein vergleichbarer Verlauf wie bei den anderen Probenursprüngen (0,2 / 0,1 / 0,06 / 0,09 / 0,11 / 0,11). Auch hier zeigten sich signifikante Unterschiede der P0 Proben zu d4 (p=0,009) und d7 (p=0,04). Die durch uns untersuchten Quadrizepssehnenproben zeigten teilweise höchst-signifikante Unterschiede in der Expression von uPA mit vergleichbarem Verlauf wie bei den anderen Sehnenursprüngen (0,2 / 0,13 / 0,05 / 0,07 / 0,10 / 0,12). Eine Signifikanz konnte an d4, d7 und d11 in Bezug auf die P0-Zellreihe gezeigt werden (p  $_{d4}$  <0,001 / p  $_{d7}$  =0,003 / p  $_{d11}$ =0,03).

Im Verlauf der Tage zeigte sich stets die höchste Expressionsrate in den Proben des VKB. An d1 und d11 kam es zu einer signifikant höheren Expression in den Proben des VKB im Vergleich mit den Proben der Bizepssehne (d1: p=0,03 und d11: p=0,03). An d11 bestand zusätzlich auch eine signifikant höhere Expression in den Proben des VKB im Vergleich mit der LCF-Gruppe (p=0,04). Trotz ähnlicher Mittelwerte wurde im Vergleich des VKB mit der Quadrizepssehnengruppe an diesem Tag kein signifikanter Unterschied berechnet. Hier sei zu beachten, dass in der Quadrizepssehnengruppe lediglich 4 Proben vorlagen.



**Abb. 27: Relative Expression von uPA im Verlauf der Zeit** (Mittelwert  $\pm$  SEM). Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der Expression in den Proben der Bizepssehne (p<sub>d1</sub>=0,007 / p<sub>d4</sub><0,001 / p<sub>d7</sub>=0,02), des LCF (p<sub>d4</sub>=0,009/ p<sub>d7</sub>=0,04) und der Quadrizepssehne (p<sub>d4</sub> <0,001 / p<sub>d7</sub>=0,003 / p<sub>d11</sub>=0,03) in Bezug auf die P0 Proben. In der Bizepssehne ergab sich zusätzlich ein hoch-signifikanter Anstieg von d4 zu d14 (p=0,004). Im Vergleich der Subgruppen an den Versuchstagen konnten an d1 und d11 signifikante Unterschiede zwischen den Proben des Kreuzbandes und der Bizepssehne ((\*, jeweils p= 0,03) und an d11 zusätzlich zwischen VKB und LCF ((#), p=0,04) gezeigt werden. LCF = Ligamentum capitis femoris, VKB = vorderes Kreuzband, d= Versuchstage, P0 = Primärkultur

## 4.4.1.6 uPAR

Der letzte untersuchte Marker war uPAR. Ebenfalls erstmalig erfolgte die Messung der Genexpression von uPAR in Sehnenproben humanen Ursprungs. In allen Ursprungssehnen konnte eine Expression von uPAR nachgewiesen werden. Es zeigte sich in allen Gruppen ein vergleichbarer Verlauf der Expressionshöhe mit den höchsten Expressionsraten zu Beginn der Versuche (P0 und d1), einem Abfall zu d4 hin und einem langsamen erneuten Anstieg bis zum Ende der Versuchsreihe. Insgesamt ähnelt dieser Verlauf der uPA-Expression. Die höchste Expression wurde mit Ausnahme der Einzelproben von Achillessehne und Patellarsehne in allen Gruppen an d1 generiert (VKB: 0,32 / Bizepssehne: 0,19 / LCF: 0,28 / Quadrizepssehne: 0,22). Hier zeigte das VKB insgesamt die höchste Expression (0,32), die geringste Expression an d1 fand sich bei der Bizepssehnengruppe (0,19). Anschließend fiel die Expression in allen Gruppen deutlich zu d4 hin ab (VKB: 0,08 / Bizepssehne: 0,05 / LCF: 0,05 / Quadrizepssehne: 0,07). Der durchschnittlich geringste Mittelwert aller Versuchstage wurde durch die LCF-Proben an d7 erzeugt (0,049). Ab d7 kam es zu einem langsamen erneuten Anstieg der Mittelwerte (VKB: 0,07 / Bizepssehne: 0,05 / LCF: 0,049 / Quadrizepssehne: 0,06) bis zum Ende des Versuchszeitraums. Dabei blieben die Messwerte an d11 (VKB: 0,11 / Bizepssehne: 0,07 / LCF: 0,07 / Quadrizepssehne: 0,08) und d14 (VKB: 0,15 / Bizepssehne: 0,07 / LCF: 0,07 / Quadrizepssehne: 0,08) jedoch weit hinter den Werten zu Beginn der Versuchsreihen zurück. Im Verlauf der Versuchstage zeigten sich in allen Gruppen signifikante Unterschiede in der Expression von uPAR. Durch die vergleichsweise hohe Expression zu Versuchsbeginn wurden in der Bizepssehnengruppe, in der LCF-Gruppe und in der Quadrizepssehnengruppe überwiegend höchst-signifikante Abfälle der Expression im Vergleich der Primärkulturproben P0 zu den übrigen Versuchstagen (p Bizens d4-14 < 0,001; p<sub>LCF d1</sub>=0,003; p<sub>Quadrizeps d4</sub><0,001 / p<sub>Quadrizeps d7</sub><0,001 / p<sub>Quadrizeps d1</sub>=0,002 / p Quadrizeps d14=0,002) und auch im Vergleich von d1 mit den folgenden Messungen gezeigt (jeweils p<0,001). Zusätzlich zeigte auch die Kreuzbandgruppe im Vergleich von d1 mit den folgenden Tagen eine signifikante Reduktion der Expression (p d4 =0,001 / p d7 <0,001 / p<sub>d11</sub>=0,007 / p<sub>d14</sub>=0,04).

Abbildung 28 zeigt, vergleichbar mit dem Ergebnis der transkriptionellen uPA-Analyse, in den Proben des VKB an jedem Versuchstag die höchsten Expressionsraten. Vor allem an d1 war die Expression signifikant höher als in den Bizepssehnenproben (p=0,02). An den übrigen Versuchstagen konnten im Subgruppenvergleich keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden.



Abb. 28: Relative Expression von uPAR im Verlauf der Zeit (Mittelwert ± SEM). Es zeigten sich in allen Probenursprüngen überwiegend höchst-signifikante Abfälle der Expression von d1 auf d4 (Bizeps, LCF, Quadrizeps jeweils p<0,001; VKB p= 0,001). Bei der Bizepssehne und der Quadrizepssehne zeigte sich der signifikante Abfall auch unter Einbeziehung der P0 Proben (*p* Bizeps d4-14<0,001; *p* Quadrizeps d4<0,001 / *p* Quadrizeps d7<0,001 / *p* Quadrizeps d1=0,002 / *p* Quadrizeps d14=0,002). Zusätzlich kam es beim LCF zu einem hoch-signifikanten Anstieg der relativen Expression von P0 zu d1 (p=0,003). An d1 war die Expression zudem in den VKB-Proben signifikant höher als in der Bizepssehnengruppe ((\*), p=0,02). LCF = Ligamentum capitis femoris, VKB = vorderes Kreuzband, d= Versuchstage, P0 = Primärkultur

### 4.4.2 Expression im Vergleich von intra- und extrasynovialem Probenursprung

Zuletzt wurde die Gruppierung der Ergebnisse nach intra- bzw. extrasynovialem Verlauf vorgenommen (s. Tabelle 7). Hier wurden die Expression der Sehnenmarker im Verlauf der Versuchstage untersucht und die Subgruppen an den jeweiligen Tagen miteinander verglichen. Um eine Verzerrung der Ergebnisse durch die Einbeziehung der Einzelproben von Achilles- und Patellarsehne zu vermeiden, wurden die Signifikanztestungen zusätzlich ohne diese Messwerte durchgeführt. Ergaben sich signifikante Unterschiede zur Berechnung mit den Proben wird dies im Fließtext erwähnt und gegebenenfalls separat grafisch dargestellt.

### 4.4.2.1 Collagen 1A1



Für Collagen 1A1 ergab sich das in Abbildung 29 abgebildete Ergebnis.

**Abb. 29:** Relative Expression von Collagen 1A1 im Vergleich intra-/ extrasynovialer Verlauf (Mittelwert ± SEM). Im intrasynovialen Verlauf zeigte sich eine hoch-signifikant bzw. höchst-signifikant geringere Expression von Collagen 1A1 an allen Versuchstagen im Vergleich mit den P0-Proben ( $p_{d1} = 0,002 / p_{d4} = 0,004 / p_{d7} = 0,004 / p_{d11} < 0,001 / p_{d14} < 0,001$ ). Im direkten Vergleich des intrasynovialen mit dem extrasynovialen Verlauf der Proben konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. d= Versuchstage, P0 = Primärkultur

Der in den einzelnen Gruppen bereits beschriebene Verlauf von Anstieg der Genexpression von Collagen 1A1 von d1 bis d7 mit folgendem Abfall an d11 und dann wieder leichter Erhöhung zum Ende der Versuchsphase spiegelt sich auch in der Unterteilung nach intra- und extrasynovialem Verlauf wider (intrasynovial: 0,38 / 0,17 / 0,18 / 0,18 / 0,1 / 0,13 und extrasynovial: 0,21 / 0,16 / 0,2 / 0,25 / 0,18 / 0,22). Beim direkten Vergleich der zwei Subgruppen an den jeweiligen Versuchstagen ergaben sich ab d1 vergleichbare Verläufe, auch wenn der Anstieg bis d7 unterschiedlich stark ausgeprägt war. Von d7 zu d11 kam es in beiden Gruppen zu einem Abfall der Expressionsraten. An d14 hatten sich die Werte wieder etwas erholt. Insgesamt war die Expression in den Proben des intrasynovialen Ursprungs geringer als in den Proben mit gewebegedecktem Verlauf. In den Zellen, die ohne weitere Trypsinierung als P0 konserviert wurden, war das Ergebnis genau umgekehrt. Da zeigte sich eine deutlich höhere Expression in den intrasynovialen Proben. Auffällig sind die zusätzlichen Ergebnisse der P0 Kulturen vor allem in Bezug auf ihre Streubreite. In diesen Primärkulturen zeigte sich eine durchschnittlich höhere Expression als an d1 in beiden Gruppen. In der intrasynovialen Gruppe wurde hier die mit Abstand höchste Expression gezeigt (0,38). Durch diese sehr hohe Expression zeigte sich ein teilweise höchst-signifikanter Abfall in der intrasynovialen Gruppe an allen Versuchstagen in Bezug auf P0 (p d1 = 0,002 / p d4 = 0,004 / p<sub>d7</sub>=0,004 / p<sub>d11</sub><0,001 / p<sub>d14</sub><0,001). Im extrasynovialem Verlauf wurden keine signifikanten

Unterschiede gesehen. Insgesamt war die Spanne der Messwerte in der Gruppe der extrasynovialen Ursprünge jedoch deutlich größer.

Im Vergleich der einzelnen Versuchszeitpunkte konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen intra- zu extrasynovialem Verlauf mittels t- Test gezeigt werden.

## 4.4.2.2 Scleraxis

Bei der Untersuchung von Scleraxis nach intrasynovialem und extrasynovialem Verlauf der Ursprungssehnen zeigten sich die in Abbildung 30 dargestellten Ergebnisse.



**Abb. 30:** Relative Expression von Scleraxis im Vergleich intra-/ extrasynovialer Verlauf (Mittelwert ± SEM). Beim intrasynovialen Verlauf der Sehnen zeigte sich ein teils hoch-signifikanter Abfall der Scleraxisexpression nach d1 im Vergleich mit allen anderen Versuchstagen ( $p_{d4} = 0,02 / p_{d7} = 0,02 / p_{d11} = 0,003 / p_{d14} = 0,009$ ). Zusätzlich fand sich ein signifikanter Anstieg der Expression im Vergleich der P0-Proben mit d1 (p=0,04). Im Subgruppenvergleich fanden sich keine signifikanten Unterschiede über die Zeit. d= Versuchstage, P0 = Primärkultur

In dieser Unterteilung war die Expression von Scleraxis in beiden Gruppen insgesamt gering. Betrachtet man jedoch die Mittelwerte, so unterschieden sich die beiden Gruppen in ihren Tendenzen deutlich (intrasynovial: 0,02 / 0,11 / 0,03 / 0,03 / 0,02 / 0,03 und extrasynovial: 0,02 / 0,05 / 0,04 / 0,02 / 0,01 / 0,05). Während die Expression mit gewebegedecktem Verlauf im Mittel konstant erschien, sah man bei der Gruppe mit intrasynovialem Ursprung eine signifikant bzw. hoch-signifikant höhere Expression an d1 im Vergleich mit allen anderen Versuchstagen (p <sub>d4</sub>=0,02 / p <sub>d7</sub>=0,02 / p <sub>d11</sub>=0,003 / p <sub>d14</sub>=0,009). Auch zwischen P0 und d1 gab es im intrasynovialem Verlauf einen signifikanten Anstieg (p=0,04). Anschließend pendelten sich die Mittelwerte des intrasynovialen Ursprungs auf einem niedrigeren Niveau ein.

Im direkten Vergleich intra- vs. extrasynovialer Verlauf zeigte sich vor allem an d1 eine höhere Scleraxisexpression in den intrasynovialen Proben. Der Unterschied zeigte jedoch kein Signifikanzniveau. Im weiteren Versuchsverlauf fielen die Werte in beiden Subgruppen auf ähnliche Vergleichswerte ab und stiegen zum Ende der Versuchsreihen an d14 erneut leicht an.

# 4.4.2.3 Tenascin C

Die Ergebnisse der Untersuchung von Tenascin C sind in Abbildung 31 dargestellt. Es zeigte sich in der Subgruppierung nach intra- und extrasynovialem Verlauf ein mit den Ergebnissen des Ursprungsgruppenvergleichs vergleichbarer, muldenförmiger Verlauf mit Tiefpunkt an d4 und teilweise signifikanten Unterschieden in beiden Gruppen (intrasynovial: 0,76 / 0,51 / 0,31 / 0,41 / 0,36 / 0,54 und extrasynovial: 0,43 / 0,37 / 0,22 / 0,32 / 0,35 / 0,45).



Abb. 31: Relative Expression von Tenascin C im Vergleich intra-/ extrasynovialer Verlauf (Mittelwert ± SEM). Es fand sich im intrasynovialen Verlauf eine signifikant geringere Expression an d4, d7, d11 verglichen mit den P0-Proben ( $p_{d4} < 0,001 / p_{d7} = 0,01 / p_{d11} = 0,003$ ). Auch im extrasynovialen Verlauf ergaben sich signifikante Unterschiede mit einem Abfall der Expression von P0 zu d4 (p=0,04) und einem signifikanten Anstieg zwischen d4 und d14 (p=0,01). Im Gruppenvergleich ergab sich eine signifikant geringere Expression in den extrasynovialen Proben zum Versuchszeitpunkt P0 (p=0,03). d= Versuchstage, P0 = Primärkultur

Es zeigten sich bei Betrachtung der Gruppen über die Zeit signifikant geringere Expressionen beim intrasynovialen Verlauf bezogen jeweils auf P0 (p  $_{d4}$  <0,001 / p  $_{d7}$  =0,01 / p  $_{d11}$  =0,003). Im extrasynovialen Verlauf zeigte sich ebenfalls im Vergleich zu den Ursprungsproben P0 eine signifikant geringere Expression des Tenascin C an d4 (p=0,04). Zusätzlich kam es auch zu einem signifikanten Anstieg der Expression zwischen d4 und d14 (p=0,01).

Insgesamt war die Expression in den Proben mit intrasynovialem Verlauf etwas höher. Ein signifikanter Unterschied zwischen intra- und extrasynovialem Verlauf ergab sich nur in den Proben der Primärkultur (p=0,03).

# 4.4.2.4 Tenomodulin

Die nachgewiesene Expression des Tenomodulins war in beiden Ursprungsgruppen nur sehr gering und ist in Abbildung 32 dargestellt.



**Abb. 32:** Relative Expression von Tenomodulin im Vergleich intra-/ extrasynovialer Verlauf (Mittelwert ± SEM). Es zeigte sich ein höchst-signifikanter Abfall der Expression im Vergleich der P0-Proben mit allen folgenden Versuchstagen im intrasynovialen Verlauf (jeweils p<0,001). Im Subgruppenvergleich ergaben sich keine signifikanten Unterschiede der Expression an den einzelnen Versuchstagen. d= Versuchstage, P0 = Primärkultur

Beide Gruppen zeigten die deutlich höchste Expression in P0. Es kam zu einem höchst-signifikanten Abfall der Expression an den folgenden Versuchstagen in der intrasynovialen Subgruppe jeweils bezogen auf P0 (jeweils p<0,001). In der extrasynovialen Gruppe demonstrierten sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Expression im Verlauf der Zeit, aufgrund der höheren Streubreite um die jeweiligen Mittelwerte (intrasynovial: 0,0007 / 0,000055 / 0,000037 / 0,000037 / 0,000025 / 0,000021 und extrasynovial: 0,0024 / 0,00067 / 0,00026 / 0,00069 / 0,00032 / 0,00017).

Bei der Expression des Tenomodulins im Vergleich des intra- mit dem extrasynovialen Verlaufs fiel eine durchschnittlich höhere Expression im extrasynovialen Verlauf auf. Den deutlichsten Unterschied konnte man an d7 feststellen. Ein Signifikanzniveau wurde jedoch nicht erreicht.

#### 4.4.2.5 uPA

Die Ergebnisse der transkriptionellen Analyse von uPA nach intra- und extrasynovialem Ursprung sind in Abbildung 33 abgebildet. Es zeigte sich in beiden untersuchten Subgruppen ein muldenförmiger Verlauf mit Maximum an P0 und Minimum an d4 (intrasynovial: 0,17 / 0,09 / 0,06 / 0,09 / 0,10 / 0,11 und extrasynovial: 0,21 / 0,16 / 0,08 / 0,12 / 0,14 / 0,14).



**Abb. 33: Relative Expression von uPA im Vergleich intra-** /extrasynovialer Verlauf (Mittelwert ± SEM). Im intrasynovialen Verlauf zeigte sich eine teils höchst-signifikante Abnahme der Expression über den Versuchszeitraum in Bezug auf die P0-Proben (p <sub>d1</sub> <0,001 / p <sub>d4</sub> <0,001 / p <sub>d1</sub> =0,001 / p <sub>d14</sub> =0,04) und eine signifikante Zunahme zwischen d4 und d14 (p=0,03). Im extrasynovialen Verlauf ergab sich ein hoch-signifikanter Abfall der Expression von P0 auf d4 (p=0,003). Zusätzlich fand sich an d1 eine signifikant geringere Expression im intrasynovialen Ursprung (p=0,04). d= Versuchstage, P0 = Primärkultur

Auch wenn man die P0 Proben aus der Betrachtung lässt, wurden zu Beginn des Versuchszeitraums an d1 höhere Expressionsraten erzielt als an d4. Ein Signifikanzniveau wurde bei den intrasynovialen Proben bei Einbeziehung der P0 Proben zu allen folgenden Versuchstagen erreicht (p  $_{d1}$  <0,001 / p  $_{d4}$  <0,001 / p  $_{d7}$  <0,001 / p  $_{d11}$  =0,01 / p  $_{d14}$  =0,04). Zusätzlich kam es in dieser Gruppe zu einem signifikanten Anstieg von d4 zu d14 (p=0,03). Bei den Proben des extrasynovialen Verlaufs fand sich ein vergleichbarer hoch-signifikanter Abfall der Expression von P0 zu d4 (p=0,003).

In beiden Gruppen zeigte sich der jeweils niedrigste Wert an d4 (intrasynovial: 0,06 / extrasynovial: 0,08), bevor es bis zum Versuchsende wieder zu einem kontinuierlichen Anstieg der Expression kam. Dabei wurden in der intrasynovialen Gruppe sogar Mittelwerte erreicht, die über den Messwerten von d1 lagen (0,10 und 0,11). Auch in der extrasynovialen Gruppe

wurden die Ausgangswerte annähernd wieder erzielt (0,16 vs. 0,14). Im direkten Vergleich der Subgruppen zeigte sich ein signifikanter Unterschied der uPA-Expression an d1 (p=0,04). Dort fiel die Expression in den Proben des extrasynovialen Ursprungs signifikant höher aus.

Um auszuschließen, dass durch die nur als Einzelproben vorliegenden Achilles- und Patellarsehnenproben der Mittelwert der extrasynovialen Gruppe verzerrt wird, wurde zusätzlich eine Berechnung der Mittelwerte ohne diese Einzelwerte angestellt. Am Verlauf der relativen Expression änderte sich hierdurch nur sehr wenig, allerdings erreichten die Unterschiede zwischen den Gruppen an d1 ein höheres Signifikanzlevel durch eine Erhöhung des Mittelwerts von 0,16 auf 0,19 (p=0,008). Zusätzlich erhöhten sich die Mittelwerte an d11 (von 0,14 auf 0,15) und an d14 (von 0,14 auf 0,15), so dass hier ebenfalls eine signifikant höhere Expression im extrasynovialen Ursprung erreicht wurde (p  $_{d11}$ =0,03 und p  $_{d14}$ =0,03). Dieses Zusatzergebnis ist in Abbildung 34 dargestellt.



Abb. 34: Relative Expression von uPA im Vergleich intra-/ extrasynovialer Verlauf ohne Achillessehnen- und Patellarsehnenprobe. Es ergibt sich bei vergleichbarem Verlauf im Subgruppenvergleich eine Erhöhung der Signifikanz an d1 (p=0,008) und zusätzlich eine signifikant höhere Expression extrasynovial an d11 (p=0,03) und d14 (p=0,03). d= Versuchstage, P0 = Primärkultur

## 4.4.2.6 uPAR

Bei der Untersuchung der Expression von uPAR zeigten sich im Verlauf der Versuchstage in beiden Gruppen ähnliche Expressionsverläufe. Eine initial hohe Expression an P0 stieg zu d1 noch weiter an, fiel massiv zu d4 ab, um sich dann in der Folge erneut langsam wieder zu erhöhen (intrasynovial: 0,15 / 0,23 / 0,05 / 0,05 / 0,07 / 0,07 und extrasynovial: 0,23 / 0,28 / 0,07 / 0,07 / 0,10 / 0,12). Dies ist in Abbildung 35 dargestellt.



Abb. 35: Relative Expression von uPAR im Vergleich intra-/ extrasynovialer Verlauf (Mittelwert ± SEM). Auf die hohe Expression zu Beginn des Versuchszeitraum an P0 und d1 kam es in beiden Gruppen zu einer überwiegend höchst-signifikanten Abnahme im Vergleich mit den folgenden Versuchstagen. Intrasynovial ergab sich von P0 zu d1 eine hoch-signifikante Zunahme ( $p_{d1}$  =0,004) und in Folge zu allen weiteren Versuchstagen eine deutlich signifikante Abnahme ( $p_{d4}$  <0,001 /  $p_{d7}$  <0,001 /  $p_{d11}$  =0,002 /  $p_{d14}$  =0,002). Von d1 zu allen folgenden Tagen bestand eine höchst-signifikante Reduktion der Expression (jeweils p<0,001). In der extrasynovialen Gruppe ergab sich vergleichbar eine teils höchst-signifikante Abnahme von P0 zu d4-14 ( $p_{d4}$  <0,001 /  $p_{d7}$  <0,001 /  $p_{d11}$  =0,002 /  $p_{d14}$  =0,02) und auch von d1 zu allen folgenden Tagen (jeweils p <0,001). Im direkten Subgruppenvergleich fanden sich signifikante Unterschiede der Expression an d4 und d7 mit einer jeweils höheren Expression in den extrasynovialen Proben ( $p_{d4}$  = 0,02 /  $p_{d7}$  =0,03). d= Versuchstage, P0 = Primärkultur

In beiden Gruppen kam es zu einer jeweils höchst-signifikanten Abnahme der Expression im Vergleich der Ergebnisse des ersten Versuchstags mit den übrigen Versuchstagen (jeweils p <0,001). Auch unter Einbeziehung der Primärkulturen zeigten sich in beiden Gruppen signifikante Unterschiede in der Expression. Im intrasynovialen Verlauf kam es zu einem hoch-signifikanten Expressionsanstieg zwischen den Ursprungszellen in P0 und den Zellen von Versuchstag d1 (p=0,004). In der extrasynovialen Vergleichsgruppe erreichte der Anstieg von P0 zu d1 kein Signifikanzniveau. Im weiteren Verlauf war die Expression in beiden Gruppen an allen folgenden Versuchstagen signifikant geringer als in der Primärkultur (p intra d4 <0,001 / p intra d7 <0,001 / p intra d11 =0,002 / p intra d14 =0,002 und p extra d4 <0,001 / p extra d7 <0,001 / p extra d14 =0,02).

Vergleicht man den intra- mit dem extrasynovialen Ursprung, zeigte die extrasynoviale Gruppe an d4 und d7 eine signifikant höhere Expression (p  $_{d4}$  = 0,02 und p  $_{d7}$  =0,03).

#### 4.5 Korrelation Teilungsrate (n/24h) vs. relative Expression uPA / uPAR

Im Vergleich von relativer Expression der Marker uPA und uPAR mit der Teilungsrate in 24 h ergab sich ein heterogenes Bild. Die Ergebnisse sind in Abbildung 36 und 37 dargestellt.



**Abb. 36: Korrelation von Teilungsrate (n/24h) und relativer Expression von uPA**. Es ergaben sich nur mäßige Zusammenhänge zwischen relativer uPA-Expression und Teilungsrate der Zellkulturen. r = Korrelationskoeffizient, vkb = vorderes Kreuzband, biz = Bizepssehne, lcf = Ligamentum capitis femoris, quad = Quadrizepssehne, ach = Achillessehne, pat = Patellarsehne



**Abb. 37: Korrelation von Teilungsrate (n/24h) und relativer Expression von uPAR**. Es ergaben sich überwiegend deutliche Zusammenhänge zwischen relativer uPAR-Expression und Teilungsrate in der Zellkultur. r = Korrelationskoeffizient, vkb = vorderes Kreuzband, biz = Bizepssehne, lcf = Ligamentum capitis femoris, quad = Quadrizepssehne, ach = Achillessehne, pat = Patellarsehne

Während sich beim Rezeptor uPAR mit Korrelationskoeffizienten zwischen (-0,89) und (-0,99) ein deutlicher reziproker Zusammenhang zwischen Proliferationsrate und Expression
andeutete, blieb dieses Ergebnis bei uPA deutlich inhomogener mit Korrelationskoeffizienten zwischen (-0,79) und (0,19). Dies könnte für eine höhere Expression des Rezeptors zu Beginn der Proliferation sprechen, die dann mit zunehmender Proliferation herabreguliert wird, während ein solcher Zusammenhang der Proliferationsrate der Zellen mit der uPA-Expression nicht zu bestehen scheint.

# 4.6 ELISA

Für die Untersuchung der Freisetzung von uPA und uPAR aus den Tendozyten mittels ELISA wurde das konservierte Zellkulturmedium verwendet. Dieses wurde entsprechend der Vorgaben des Herstellers des *Assays* verdünnt und der *Assay* laut Herstellerprotokoll durchgeführt (s. Kapitel 3.6.).

Nach Beendigung der Reaktionsphase konnten im *Assay* für uPA bereits deutliche Unterschiede in der Farbintensität der verschiedenen Proben beobachtet werden (Abb. 38). Im uPAR-*Assay* war die Färbung insgesamt makroskopisch deutlich schwächer ausgeprägt (Abb. 39).



**Abb. 38: uPA-ELISA** (Firma R&D Systems, Minneapolis, USA). Es zeigte sich ein deutlich sichtbarer Farbumschlag von blau zu gelb bei Bindung des farbstoffmarkierten Sekundärantikörpers an das adhärente UPA-Antigen nach Abschluss der Reaktionsphase.



**Abb. 39: uPAR-ELISA** (Firma R&D Systems, Minneapolis, USA). Schwach ausgeprägter Farbumschlag von blau zu gelb bei Bindung des farbstoffmarkierten Sekundärantikörpers an das adhärente uPAR-Antigen nach Abschluss der Reaktionsphase.

Die geringen Werte bestätigten sich auch nach Durchführung der photometrischen Messungen. Somit konnten in den Auswertungen für uPAR nicht alle Probenergebnisse berücksichtigt werden.

Mit Hilfe der bei den Messreihen mitgeführten Standardreihen ließen sich die Mengen an uPA und uPAR in pg/mL berechnen. Da in der Zellkultur das Medium durchschnittlich alle zwei Tage gewechselt und verworfen wurde und nur das Medium des jeweiligen Versuchstags konserviert wurde, wurden die einzelnen Ergebnisse der Tage aufsummiert, um einen Gesamtgehalt über den gesamten Versuchszeitraum zu erhalten, da von einer kontinuierlichen Freisetzung von uPA und uPAR auszugehen war.

4.6.1 Freisetzung von uPA ins Zellkulturmedium über den Versuchszeitraum

Der genutzte *Assay* der Firma R&D Systems (Minneapolis, USA) war in unseren Versuchen für den Nachweis von uPA in Zellkulturüberständen von Tendozyten geeignet. In allen Proben konnte uPA im Zellkulturmedium nachgewiesen werden.

Zuerst betrachteten wir die summierte Freisetzung von uPA über den gesamten Versuchszeitraum in den einzelnen Ursprungsgruppen als pg pro mL Zellkulturmedium. Es ergaben sich die in Abbildung 40 dargestellten Ergebnisse.



Abb. 40: Freisetzung von uPA ins Zellkulturmedium (pg/ mL, summiert) im Versuchszeitraum d1 - 14 (Mittelwert  $\pm$  SEM). Die freigesetzte uPA-Menge nahm in allen Gruppen durch die Aufsummierung zu. In der Bizepssehnengruppe zeigten sich teils höchst-signifikante Zunahmen der uPA-Menge an d11 und d14 bezogen auf d1 ( $p_{11} < 0,001 / p_{14} < 0,001$ ), d4 ( $p_{11} < 0,001 / p_{14} < 0,001$ ), d7 ( $p_{14} < 0,001$ ) und d11 (p=0,04). In der LCF-Gruppe fanden sich vergleichbare Zunahmen von d1 ( $p_{11}=0,01 / p_{14} < 0,001$ ), d4 ( $p_{11}=0,02$ ) zu d11 und d14. In der Quadrizepssehnengruppe bestand die signifikante Zunahme an d1 ( $p_{14} < 0,001$ ), d4 ( $p_{14}=0,002$ ) und d7 ( $p_{14}=0,006$ ) jeweils bezogen auf d14. Bei den Kreuzbandproben verzeichneten wir eine signifikante Zunahme zwischen d1 ( $p_{11}=0,02 / p_{14} < 0,001$ ), d4 ( $p_{14}=0,002$ ) und d7( $p_{14}=0,04$ ) und d11 bzw. d14. Im Subgruppenvergleich an den einzelnen Versuchstagen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. d= Versuchstage, VKB = vorderes Kreuzband, LCF = Ligamentum capitis femoris

Es zeigte sich der größte Gehalt an uPA in pg/mL bei den Proben des VKB. Der geringste Gehalt zeigte sich in den nur einzeln vorliegenden Proben der Patellar- und Achillessehne. Diese wurden bei den Ergebnissen vorrangig nur bei der Gruppierung nach intra- und extrasynovialem Verlauf berücksichtigt. In allen anderen Subgruppen fanden sich signifikante Zunahmen der uPA-Menge im Zellkulturmedium bezogen auf d1, d4 und d7. In den Kreuzbandproben nahm der uPA-Gehalt von d1 (2172 pg/mL) zu d11 (10620 pg/mL, p= 0,02) und zu d14 (14404 pg/mL, p< 0,001) zu. Auch von d4 (4288 pg/mL) zu d14 (p= 0,002) und von d7 (7113 pg/mL) zu d14 (p= 0,04) war die Zunahme signifikant. Bei den LCF-Proben nahm die uPA-Menge signifikant von d1 (981 pg/mL) zu d11 (7684 pg/mL, p=0,01) und d14 (10687pg/mL, p< 0,001) zu. Vergleichbar war die Zunahme von d4 (2169 pg/mL) zu d11

(p=0,04) und d14 (p< 0,001). Eine signifikante Zunahme zeigte sich von d7 (4588pg/mL) zu d14 (p=0,02). Bei der Bizepssehnengruppe ergaben sich jeweils höchst-signifikante Zunahmen (p< 0,001) von d1 (558 pg/mL) zu d11 (6722 pg/mL) und d14 (10265 pg/mL), von d4 (1316 pg/mL) zu d11 und d14 und von d7 (3242 pg/mL) zu d14. Zusätzlich bestand eine signifikante Zunahme (p=0,04) von d11 zu d14. In den Quadrizepssehnenproben zeigte sich die hoch-signifikante bzw. höchst-signifikante Zunahme jeweils bezogen auf d14 (8319 pg/mL) bei den Proben von d1 (739 pg/mL, p< 0,001), d4 (1394 pg/mL, p=0,002) und d7 (2314 pg/mL, p=0,006).

Im Vergleich der Subgruppen an den einzelnen Versuchstagen untereinander ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

Da die einzelnen Kulturen sehr unterschiedliche Zellzahlen in der Proliferationsphase erreichten und dadurch einen direkten Einfluss auf den uPA-Gehalt im Zellkulturmedium hatten, wurden nun unter Einbeziehung der jeweiligen, für die Proliferationsrate ermittelten Zellzahlen der einzelnen Versuchstage (s. Kap. 4.2.), der durchschnittliche Proteingehalt pro Zelle in den einzelnen Gruppen errechnet. Dies sollte in der Betrachtung der Ergebnisse als Vergleichswert dienen und ist in Tabelle 13 und Abbildung 41 dargestellt.

**Tabelle 13: Durchschnittlicher uPA-Gehalt (pg/ Zelle) der Probenursprünge**. MW = Mittelwert, d= Versuchstage, VKB = vorderes Kreuzband, Bizeps = Bizepssehne, Quadrizeps = Quadrizepssehne, LCF = Ligamentum capitis femoris

		-			
	MW d1	MW d4	MW d7	MW d11	MW d14
LCF	0,026	0,024	0,028	0,050	0,061
Bizeps	0,012	0,018	0,042	0,073	0,097
Quadrizeps	0,025	0,022	0,048	0,084	0,089
VKB	0,07	0,063	0,083	0,146	0,149



Abb. 41: Freisetzung von uPA ins Zellkulturmedium unter Einbeziehung der erreichten Zellzahlen (pg/ Zelle, summiert) im Versuchszeitraum d1 - 14 (Mittelwert ± SEM). Die Proben des VKB zeigten an allen Tagen die höchste Proteinsekretion. Teils höchst-signifikante Zunahmen zeigten sich bei den Bizepssehnenproben von d1 zu d11 und d14 (jeweils p< 0,001), von d4 zu d11 (p= 0,002) und d14 (p<0,001) und von d7 zu d14 (p= 0,002). Es ergab sich eine signifikant höhere Freisetzung zwischen dem VKB und der Bizepssehne an d4 ((#), p= 0,04) und zwischen dem VKB und dem LCF an d11 und d14 ((\*), p d11 = 0,02 / p d14 = 0,02). d= Versuchstage, VKB = vorderes Kreuzband, LCF = Ligamentum capitis femoris

An d1 zeigte sich die größte uPA-Menge in den Proben des VKB (0,07 pg/Zelle). Die geringste Proteinmenge war in den Bizepssehnenproben nachzuweisen (0,01 pg/Zelle). Trotz großem Sekretionsunterschied konnte in der Signifikanztestung kein signifikanter Unterschied an d1 im Subgruppenvergleich nachgewiesen werden. An d4 produzierten die Zellen des VKB weiterhin den durchschnittlich höchsten uPA-Gehalt (0,06 pg/Zelle). Die Proben aus LCF (0,02 pg/Zelle), Bizeps- (0,02 pg/Zelle) und Quadrizepssehne (0,02 pg/Zelle) zeigten im Mittel nur eine geringe Differenz. Allerdings war die Streubreite in den Bizepssehnenproben deutlich geringer, so dass hier eine signifikant geringere uPA-Sekretion als im Kreuzband gemessen wurde (p=0,04). Die gemessene Proteinsekretion pro Zelle nahm in allen Proben zu d7 zu. Auch an d7 war der uPA-Gehalt im VKB am größten (0,08 pg/Zelle). Die Zunahme in den Proben des LCF (0,03 pg/Zelle) blieb nun jedoch hinter den Bizepssehnenproben (0,04 pg/Zelle) zurück und auch die Quadrizepssehnenproben (0,05 pg/Zelle) zeigten eine etwas geringere Zunahme. Im weiteren Verlauf der Versuche kam es am d11 zu einer weiteren Zunahme der durchschnittlichen Proteinfreisetzung in allen Proben (VKB: 0,15 pg/Zelle / Bizepssehne: 0,07 pg/Zelle / LCF: 0,05 pg/Zelle / Quadrizepssehne: 0,08 pg/Zelle). Ein signifikanter Unterschied zeigte sich zwischen dem VKB und dem LCF (p=0,02). Dieser signifikante Unterschied blieb auch in den Proben des 14. Tages nach Versuchsbeginn erhalten (p=0,02). Lediglich in der Bizepssehnengruppe erreichte die Zunahme von Tag zu Tag signifikante Level. So war die uPA-Freisetzung an d11 und d14 signifikant größer als an d1 (jeweils p< 0,001) und d4 ( $p_{11}$ = 0,002 /  $p_{14}$  <0,001). Auch von d7 zu d14 nahm der uPA-Gehalt pro Zelle signifikant zu (p= 0,002).

Da die Theorie der unterschiedlichen Ergebnisse aufgrund des anatomischen Verlaufs als intra- bzw. extrasynovial verlaufende Sehne ebenfalls geprüft werden sollte, wurde auch bei der Auswertung des ELISAs eine Unterteilung in entsprechende Subgruppen unternommen. Hier werden nun auch die Patellarsehnenprobe und die Quadrizepssehnenprobe mitberücksichtigt. In dieser Subgruppierung zeigte sich in der Aufsummierung der Sekretion über die Versuchstage nicht nur eine kontinuierliche Zunahme der Sekretion in beiden Gruppen, sondern auch deutliche Unterschiede, je nach anatomischem Verlauf, wie in Abbildung 42 dargestellt. Die Zunahme intrasynovial von d1 zu d11 (p=0,003) und d14 (p<0,001) erreichte, gleichsam wie die Zunahme von d4 zu d11 (p=0,004) und d14 (p<0,001) und wie d7 zu d14 (p=0,001), jeweils signifikante Werte. Im Vergleich der beiden Gruppen zeigten sich an allen Versuchstagen signifikant höhere Werte in der Proteinsekretion in den Proben des extrasynovialen, also gewebegedeckten, Verlaufs (p d1=0,05 / p d4 =0,04 / p d7=0,04 / p d11 = 0,01 / p d14 =0,05).



Abb. 42: Freisetzung von uPA ins Zellkulturmedium (pg/ Zelle) im intra-/ extrasynovialen Vergleich (Mittelwert ± SEM). In der intrasynovialen Gruppe war die uPA-Freisetzung an d11 und d14 hoch-signifikant höher als an d1 ( $p_{11}=0,003/p_{14}<0,001$ ), d4 ( $p_{11}=0,004/p_{14}<0,001$ ) und d7 ( $p_{14}=0,001$ ). Im Subgruppenvergleich zeigte sich an jedem Versuchstag eine signifikant höhere Freisetzung von uPA in den extrasynovialen Proben ( $p_{d1}=0,05/p_{d4}=0,04/p_{d7}=0,04/p_{d11}=0,01/p_{d14}=0,05$ ). d= Versuchstage

#### 4.6.2 Freisetzung von uPAR ins Zellkulturmedium über den Versuchszeitraum

In den durchgeführten Versuchsreihen konnte der uPAR-*Assay* der Firma R&D Systems (Minneapolis, USA) ebenfalls auf Zellkulturüberstände angewendet werden. Makroskopisch war der Farbumschlag im uPAR-*Assay* nach Beendigung der Reaktionsphase deutlich schwächer ausgebildet als im uPA-*Assay*. Vermutlich lässt sich dies darauf zurückführen, dass im Zellkulturüberstand nur die lösliche Form des Rezeptors, der suPAR, nachgewiesen werden kann.

Nach Durchführung der photometrischen Messungen ergaben sich für uPAR die in Abbildung 43 abgebildeten, summierten Ergebnisse. Dabei konnten nicht alle Proben photometrisch gemessen werden, da sie teilweise einen zu geringen Gehalt an uPAR aufwiesen.



**Abb. 43: Freisetzung von uPAR ins Zellkulturmedium (pg/ mL, summiert) im Versuchszeitraum d1 - 14** (Mittelwert  $\pm$  SEM). Es kam nur zu einer geringen Freisetzung von uPAR ins Zellkulturmedium. In den Bizepssehnenproben nahm der uPAR-Gehalt des Mediums von d1 und d4 zu d11 ( $p_1$ =0,009 /  $p_4$ =0,009) und d14 ( $p_1$ =0,001 /  $p_4$ < 0,001) und von d7 zu d14 (p=0,04) teils höchst-signifikant zu. Beim LCF nahm die Freisetzung von d1, d4 und d7 zu d14 zu ( $p_1$ = 0,004 /  $p_4$ < 0,001 /  $p_7$ = 0,01). Zusätzlich kam es zu einem signifikanten Anstieg von d4 zu d11 (p=0,01). In der Kreuzbandgruppe stieg der uPAR-Gehalt von d1, d4 und d7 zu d14 signifikant an (p1=0,02 / p4= 0,002 / p7= 0,03). Von d4 war der Anstieg zu d11 ebenfalls signifikant (p= 0,01). Im Subgruppenvergleich an den unterschiedlichen Versuchstagen ergaben sich keine Unterschiede. d= Versuchstage, VKB = vorderes Kreuzband, LCF = Ligamentum capitis femoris

An d1 gelang keine photometrische Messung in den Proben der Quadrizeps- und Patellarsehne. Ab d4 war die Extinktion in allen Versuchsgruppen messbar. Interessanterweise war der Gehalt an uPAR in den nur vereinzelt vorliegenden Proben der Achillessehne und der Patellarsehne über den gesamten Versuchszeitraum am höchsten (Achillessehne: 21,48 pg/mL; 249,32 pg/mL; 547,83 pg/mL; 894,39 pg/mL; 1028,95 pg/mL und Patellarsehne: 222,19 pg/mL; 676,17 pg/mL; 1325,19 pg/mL; 1739,6 pg/mL) und im VKB am geringsten (11,9 pg/mL; 34,24 pg/mL; 98,04 pg/mL; 216,7 pg/mL; 261,5 pg/mL). Da es sich aber nicht um eine vergleichbare Probenanzahl handelte, sollen diese Ergebnisse wiederum nur bei der Betrachtung der anatomischen Verläufe berücksichtigt werden. Die Zunahmen erreichten bei VKB, LCF und Bizepssehnengruppe signifikante Level. So nahm der uPAR-Gehalt im VKB zwischen d1 (11,9 pg/mL) und d14 (261,5 pg/mL) signifikant zu (p=0,02). Ebenfalls signifikant war die Erhöhung zwischen d4 (34,24 pg/mL) und d11 (216,7 pg/mL; p=0,01) und d14 (p=0,002). Zwischen d7 (98,04 pg/mL) und d14 wurde ebenfalls ein Signifikanzniveau (p= 0,03) erreicht. Vergleichbar war die uPAR-Freisetzung in den Proben des LCF an d11 (419,8 pg/mL) und d14 (567,2 pg/mL) höher als an d1 (36,75 pg/mL; p<sub>14</sub>= 0,004), d4 (109,6 pg/mL; p<sub>11</sub>=0,01 und p<sub>14</sub>< 0,001) und d7 (256,9 pg/mL, p<sub>14</sub>= 0,01). Bei den Bizepssehnenproben stieg der uPAR-Gehalt ebenfalls von d1 (34,67 pg/mL) und d4 (111.8 pg/mL) zu d11 (431.5 pg/mL, p<sub>1</sub>= 0,009 / p<sub>4</sub>= 0,009) und d14 (516,1 pg/mL, p<sub>1</sub>=0,04 / p<sub>4</sub>< 0,001) signifikant an. Zwischen d7 (264,7 pg/mL) und d14 kam es gleichfalls zu einem signifikanten Anstieg (p=0,04).

Trotz deutlicher Unterschiede konnte kein Signifikanzniveau zwischen den Subgruppen an den einzelnen Versuchstagen erreicht werden.

Aus diesem gemessenen uPAR-Gehalt in pg/mL konnte nun unter Einbeziehung der Zellzahlen aus Kapitel 4.2. die durchschnittliche uPAR-Menge pro Zelle in den Subgruppen bestimmt werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 14 und Abbildung 44 dargestellt.

Tabelle 14: Durchschnittlicher uPAR-Gehalt (fg/ Zelle) der Probenursprünge. MW = Mittelwert,							
d= Versuchstage, femoris	VKB = vordere	s Kreuzband, E	Bizeps = Bizeps	ssehne, LCF =	Ligamentum capitis		
	MW d1	MW d4	MW d7	MW d11	MW d14		

	MW d1	MW d4	MW d7	MW d11	MW d14
LCF	0,811	1,462	2,478	3,148	3,238
Bizeps	0,719	1,654	3,909	4,681	4,893
VKB	0,358	0,581	1,338	3,150	2,517
Quadrizeps		1,767	2,369	5,109	4,272



Abb. 44: Freisetzung von uPAR ins Zellkulturmedium unter Einbeziehung der erreichten Zellzahlen (pg/Zelle, summiert) im Versuchszeitraum d1 - 14 (Mittelwert  $\pm$  SEM). In den Bizepssehnenproben nahm der uPAR-Gehalt pro Zelle teils höchst-signifikant von d1 zu d7 (p=0,004), d11 (p< 0,001) und d14 (p< 0,001) zu. Von d4 zu d11 und d14 wurden ebenfalls signifikante Zunahmen verzeichnet (p<sub>11</sub>= 0,03 / p<sub>14</sub>=0,01). Gleichfalls zu nahm der Gehalt in den Quadrizepssehnenproben an d7, d11 und d14 bezogen auf d1 (p<sub>7</sub>= 0,03 / p<sub>11</sub>< 0,001 / p<sub>14</sub>< 0,001). Zwischen d4 und d11 (p=0,005) bzw. d14 (p= 0,04) kam es ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg und auch im Vergleich von d7 mit dem Folgetag d11 wurde eine signifikante Zunahme verzeichnet (p= 0,01). An d14 zeigte sich zudem eine signifikant höhere Freisetzung von uPAR ins Zellkulturmedium bei der Bizepssehne im Vergleich mit dem VKB ((\*); p=0,05). d= Versuchstage, VKB = vorderes Kreuzband, LCF = Ligamentum capitis femoris

Die Freisetzung von uPAR aus den Zellen bzw. die Menge des löslichen Rezeptors war nachweislich deutlich geringer als die Sekretion des Liganden uPA. Es zeigte sich an d1 in den messbaren Proben die durchschnittlich größte Freisetzung an uPAR in den Zellen des LCF (0,81 fg/Zelle) und die geringste Sekretion bei den VKB-Zellen (0,36 /Zelle). Die Extinktion der Quadrizepssehnenproben war an d1 nicht messbar. An d4 war die rechnerische Freisetzung pro Zelle in allen Gruppen gestiegen (VKB: 0,58 fg/Zelle / Bizepssehne: 1,65 fg/Zelle / LCF: 1,46 fg/Zelle / Quadrizepssehne: 1,77 fg/Zelle). Ab d7 wechselten sich die Zellen von Bizepssehne und Quadrizepssehne mit der höchsten und die Zellen von VKB und LCF mit der geringsten Freisetzung ab (s. Tabelle 14). Die Zunahme des uPAR-Gehalts pro Zelle im Medium erzeugte in der Gruppe der Bizepssehnenproben, beim Kreuzband und in der Quadrizepssehnenprobe signifikante Unterschiede. So nahm die Freisetzung bei der Bizepssehne von d1 (0,3 fg/Zelle) zu d7 (3,9 fg/Zelle; p=0,004), d11 (4,7 fg/Zelle; p< 0,001) und d14 (4,9 fg/Zelle, p< 0,001) deutlich zu. Zusätzlich verzeichnete die Zunahme von d4

(1,7 fg/Zelle) zu d11 und d14 ein Signifikanzniveau ( $p_{11}=0,03 / p_{14}=0,01$ ). Bei den Kreuzbandproben war ebenfalls der uPAR-Gehalt an d11 (3,2 fg/Zelle) und d14 (2,5 fg/Zelle) signifikant höher als an d1 (0,1 fg/Zelle;  $p_{11}<0,001 / p_{14}<0,001$ ), d4 (0,6 fg/Zelle;  $p_{11}<0,001 / p_{14}=0,01$ ) und d7 (1,3 fg/Zelle;  $p_{11}=0,02$ ). In der Quadrizepssehnengruppe fand sich ein vergleichbarer signifikanter Anstieg im Vergleich von d1 (nicht messbar) mit d7 (2,4 fg/Zelle; p=0,03), d11 (5,1 fg/Zelle; p<0,001) und d14 (4,3 fg/Zelle; p<0,001). Ebenfalls signifikant war der Anstieg von d4 (1,8 fg/Zelle) zu d11 (p=0,005) und d14 (p=0,004) und von d7 zu d11 (p=0,01). Der Vollständigkeit halber ist in Abbildung 44 die Freisetzung aus Achilles- und Patellarsehne mit dargestellt. Dabei zeigten die Zellen aus Patellarsehne von allen Proben die höchste uPAR-Freisetzung, wohingegen die Sekretion aus den Achillessehnenzellen eher gering ausfiel. Da beide Zellreihen jedoch nur als Einzelproben vorlagen, soll auf diese Ergebnisse hier nicht weiter eingegangen werden. Aus diesem Grund kam es im Subgruppenvergleich nur an d14 zu einem signifikanten Unterschied zwischen Bizepssehne (4,89 fg/Zelle) und VKB (2,52 fg/Zelle) (p=0,05).

Ebenfalls wurde die Subgruppierung nach intra- und extrasynovialem Verlauf unterschieden und analysiert (Abb. 45). Hierbei zeigte sich an insgesamt vier Versuchstagen (d1, d4, d7, d14) ein höherer uPAR-Gehalt in den Proben mit intrasynovialem Verlauf (d1: 0,8 fg/Zelle vs. 0,4 fg/Zelle; d4: 1,6 fg/Zelle vs. 1,2 fg/Zelle; d7: 3,2 fg/Zelle vs. 2,1 fg/Zelle; d14: 4,1 fg/Zelle vs. 3,6 fg/Zelle). Lediglich an d11 war die Freisetzung aus den Zellen des extrasynovialen Ursprungs höher (3,9 vs. 4,4 fg/Zelle). Somit kam es zu einer signifikanten Erhöhung des uPAR-Gehalts intrasynovial von d1 zu d11 (p= 0,03) und d14 (p= 0,02) und von d4 zu d11 (p= 0,03) und d14 (p= 0,02). Extrasynovial kam es von d1 zu d11 (p= 0,006), von d4 zu d11 (p< 0,001) und d14 (p= 0,02) und von d7 zu d11 (p= 0,02) zu einem signifikanten Anstieg der uPAR-Freisetzung.

Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen an den Versuchstagen konnte nicht gezeigt werden.



Abb. 45: Freisetzung von uPAR ins Zellkulturmedium (pg/ Zelle) im Vergleich von intra-/ extrasynovialem Verlauf (Mittelwert  $\pm$  SEM). Der uPAR-Gehalt war sowohl intra- als auch extrasynovial zum Ende des Versuchszeitraums signifikant höher als zu Beginn. Es zeigte sich intra- und extrasynovial eine signifikante Zunahme von d1 zu d11 (p<sub>intra</sub>=0,03 / p<sub>extra</sub>= 0,006). Ebenfalls in beiden Gruppen kam es zur signifikanten Erhöhung von d4 zu d11 (p<sub>intra</sub>=0,03 / p<sub>extra</sub>< 0,001) und d14 (p<sub>intra</sub>=0,02 / p<sub>extra</sub>= 0,02). Zusätzlich gab es in der intrasynovialen Gruppe einen signifikanten Anstieg zwischen d1 und d14 (p= 0,02) und in der extrasynovialen Gruppe zwischen d7 und d11 (p= 0,02). Es ergaben sich keine Unterschiede in der Freisetzung von uPAR ins Zellkulturmedium im Subgruppenvergleich. d= Versuchstage

### 5 Diskussion:

Sehnen- und Bandverletzungen sind häufig. Die Heilungschancen und Behandlungsoptionen bleiben bislang jedoch limitiert. Aufgrund der Komplexität der Sehnenregeneration mit ihrem phasenhaften Verlauf und der Variabilität der Selbstheilungskapazität unterschiedlicher Sehnen und Bänder rücken Modulationsmöglichkeiten dieser Prozesse mittels Tissue Engineering-Systemen und dem Einsatz von löslichen und stationären Faktoren zur Verbesserung des klinischen outcome in den Fokus wissenschaftlicher Arbeiten. Bereits 2003 untersuchten Xia et al. uPA und uPAR am Tiermodell in Bezug auf die Regenerationsprozesse im Anschluss an eine Achillessehnenverletzung (182). Im Laufe der vergangenen Jahre konnten einige neue Angriffspunkte von uPA und uPAR im menschlichen Körper (vor allem im Bereich der Onkologie) identifiziert werden, so dass eine Mitwirkung dieser Faktoren auf die Sehnen- und Bandregeneration über eine Vielzahl von Interaktionen bei zum Beispiel Inflammation oder Zellproliferation/ -migration nicht auszuschließen ist. Trotz dieser neuen Erkenntnisse wurde dem Einfluss von uPA und uPAR auf die humane Sehnenregeneration bislang - laut Literaturrecherche bei pubmed - nicht nachgegangen (Abruf zuletzt am 21.12.2021).

In dieser Arbeit wurde somit erstmals die Expression und Sekretion von uPA und uPAR in bzw. aus Sehnen- und Bandproben humanen Ursprungs *in vitro* untersucht. Anhand der gängigen Modelle der Sehnenregeneration wurde der Frage nachgegangen, ob

- 1) Unterschiede in der Expression und Sekretion von uPA und uPAR im Verlauf von 14 Tagen *in vitro* Zellkultur festzustellen sind,

Dafür kultivierten wir insgesamt 27 unterschiedliche primäre Sehnengewebeproben mittels Zellkultur für insgesamt 14 Tage, bestimmten die Proliferationsraten als Maß der Regenerationsfähigkeit und untersuchten die Proben anschließend mittels qRT-PCR und ELISA auf Expression und Freisetzung von uPA und uPAR. Die gewählten Verfahren zeigten sich dabei für die Untersuchung von Zellkulturproben geeignet. Wir fanden teilweise signifikante Unterschiede, sowohl zwischen den Proben unterschiedlichen Ursprungs als auch im zeitlichen Verlauf. Wie diese Ergebnisse in den wissenschaftlichen Kontext eingeordnet werden können, und inwiefern sich aus diesen Ergebnissen mögliche neue Angriffspunkte zur Verbesserung der Sehnenregeneration ableiten lassen, wird im Folgenden dargestellt.

71

#### 5.1 Proliferationsrate der Tendozyten als Maß der Regenerationsfähigkeit

#### 5.1.1 Exogene Einflüsse auf die Proliferation

Aus dem klinischen Alltag ist bekannt, dass verschiedene Sehnen und Bänder Unterschiede in ihrer Regenerationskapazität nach traumatischer Verletzung aufweisen. Zahlreiche Untersuchungen gingen der Frage nach, worin diese Unterschiede begründet liegen. Als wissenschaftliche Modelle werden dabei häufig das vordere Kreuzband (VKB) und das mediale Kollateralband (MCL) des Knies gewählt. Dabei wird dem MCL eine gute Regenerationskapazität, und dem VKB eine vergleichsweise schlechte spontane Heilungstendenz nachgesagt. Abschließend konnte die Frage nach den Ursachen der Unterschiede jedoch nicht aufgelöst werden. Plausibel erscheinen die in unterschiedlichen Arbeiten beschriebenen zellulären Ursachen oder anatomischen Gegebenheiten (83, 188-191)

Wir verglichen in der vorliegenden Arbeit Zellen unterschiedlicher humaner Sehnen und Bänder auf ihre Proliferationstendenz als Maß für die Regenerationsfähigkeit der Ursprungssehne. Dabei stellten wir fest, dass alle gewonnenen Tendozyten *in vitro* unter den angewandten Bedingungen proliferieren. Dabei können die gewählten Verfahren als etablierte Standards angesehen werden, als deren Grundlage unter anderem laborinterne Vorversuche dienten. Die Zellzahlen der Zellkulturen wurden aufgrund der Vorversuche so gewählt, dass die erwarteten Zellverluste durch Trypsinierungsvorgänge im Rahmen der Versuchsanlage und auch die bekannten Entdifferenzierungen der Tendozyten durch zu häufige Passagierung möglichst gering blieben. Ebenfalls um der Entdifferenzierung vorzubeugen, wurden maximal Zellreihen der zweiten Passage verwendet (184, 188, 192, 193).

Es zeigten sich in allen Subgruppen höhere Proliferationsraten zu Beginn der Kultivierung. Anschließend kam es zu einer Abnahme der Proliferation mit zunehmender Versuchsdauer (s. Abb. 19). Die initial am d1 in allen Proben konstant negative Proliferationsrate kann mit den Umständen bei der Anlage der Zellkulturen, mit Reaktionen der Tendozyten auf das Auftauen und die Verarbeitung der Zellen und die im Anschluss nicht vollständige Adhäsion der Zellen an die Zellkulturflasche erklärt werden. Da jedoch für die Untersuchung der Genexpression und Proteinsekretion in der Folge der d1 als Vergleichs- bzw. Ausgangstag dienen sollte, war eine Verwendung nach so kurzer Kultivierungszeit unverzichtbar. Ab dem vierten Versuchstag nahmen die Zellzahlen in allen Kulturen zu (s. Abb. 17). Setzt man nun den Versuchsbeginn mit dem Ausbringen der Zellen in die Zellkultur mit einer Sehnenverletzung als Ausgangspunkt der Proliferation gleich, so erscheint diese initiale deutliche Zellzahlzunahme plausibel. In allen bestehenden Modellen der Sehnenregeneration wird die hauptsächliche Proliferationsphase in den ersten Tagen nach dem Trauma im Anschluss an die sogenannte Inflammationsphase

gesehen (17, 75, 76). Dabei siedeln sich Tendozyten und Tendozytenvorläuferzellen aus der Sehne selbst bzw. aus dem umliegenden Gewebe im Defektgebiet an und beginnen sich zu teilen. Unsere Versuche begannen zeitlich etwa mit diesem Schritt, da die Zellen gezielt an den Beobachtungsort (Zellkultur) gebracht wurden und dort ungehindert proliferieren konnten. Zum Ende unseres Versuchszeitraums ging die Proliferationsgeschwindigkeit zurück. Die Zellzahlen stagnierten (s. Abb. 17-19). Allerdings hatten die Zellkulturen zu diesem Zeitpunkt bereits eine weitgehende Konfluenz erreicht (s. Abb. 17). Da es in der Zellkultur allgemein bekannt ist, dass sich die Zellen bei zu dichtem Wachstum inhibieren, erscheint dieses Ergebnis kaum verwunderlich. Eine Möglichkeit der Vermeidung oder Reduktion dieser Inhibition wäre die Wahl einer größeren Zellkulturflasche für die späteren Versuchstage (zum Beispiel d7, d11, d14) gewesen. Alternativ könnten auch 3D-Zellkulturen anstatt Monolayer zum Einsatz kommen, um höhere Zellzahlen zu späteren Versuchszeitpunkten zu generieren. Nach den notwendigen zellulären Anpassungsvorgängen nach Anlage der Zellkulturen ist eine hohe Proliferationsrate in allen Zellreihen nachweisbar. Im direkten Vergleich der Subgruppen finden sich dabei generelle Unterschiede. So zeigten die Zellen des Hüftkopfbandes ab Tag 7 eine signifikant höhere Proliferationsrate als die Proben der anderen Sehnen und Bänder (s. Tabelle 8; Abb. 18-19). Wie im Grundlagenteil (s. Kapitel 1.1.2.) beschrieben, umgeben sich Sehnen und Bänder mit einem Epi- bzw. Paratenon. Auf diese Schichten folgt, je nach anatomischem Verlauf, eine Gewebedeckung, zum Beispiel aus Synovialmembran oder Bindegewebe. Bei den Reparationsvorgängen in Kapitel 1.1.4 ist beschrieben, dass die für die Regeneration benötigten Zellen entweder intrinsisch aus der Sehne selbst oder extrinsisch, zum Beispiel aus den Sehnenscheiden oder den angrenzenden Geweben, bezogen und aktiviert werden müssen. Zusätzlich sind lösliche Faktoren und auch die Blutversorgung aus den umgebenden Geweben für die Proliferation essenziell (55, 85, 86). Das Ligamentum capitis femoris liegt anatomisch intraartikulär und wird von einer Synovialmembran umgeben (194). Einen ähnlichen Aufbau und intraartikulären Verlauf zeigt die lange Bizepssehne. Dierickx et al. entwickelten ein Klassifikationssystem, aufgrund anatomischer Varianten, bei dem je nach vorliegendem Subtyp eine Synovialmembran vorhanden sein kann (195-197). Beim vorderen Kreuzband spricht man entwicklungsgeschichtlich ebenfalls von einer intraartikulären aber extrasynovialen Lage, da dieses von dorsal ins Kniegelenk einwandert (198-200). Die Quadrizepssehne, die Patellarsehne und Achillessehne verlaufen gewebegedeckt, also extraartikulär ohne Synovialkontakt. Murray et al. postulierten 2000, dass die schlechtere Heilungstendenz des Kreuzbandes in der Bildung einer Synovialmembran im Bereich der Sehnenstümpfe begründet sei, aufgrund derer es in Kombination mit der Bildung von kontraktilen Myofibroblasten zu einer Retraktion der Stümpfe komme (201). Zusätzlich komme es in Sehnen mit gewebegedeckten Verläufen, wie zum Beispiel dem medialen Kollateralband, nach Ruptur zu einer Defektüberbrückung durch die

Ausbildung eines Fibrinklumpens, in den dann die proliferierenden Zellen einwandern. Die Ausbildung dieses *clots* sei durch eine intraartikuläre Lage mit Umspülung durch Synovialflüssigkeit eingeschränkt (85, 86, 201, 202). In unseren Ergebnissen fand sich lediglich an d11 ein signifikanter Unterschied in der Proliferation zwischen Tendozyten aus Proben mit intrasynovialem im Vergleich zu extrasynovialem Verlauf (s. Abb. 20 - 21). Der anatomische Verlauf und die synoviale Lage erklären somit nicht die ab d7 signifikanten Unterschiede der Proliferationsraten zwischen LCF und VKB bzw. Bizepssehne. Zusätzlich wurde der Schritt der Tendozytenaktivierung aus der Umgebung in der vorliegenden Arbeit in vitro durch die Bearbeitung aller Sehnenproben mittels Collagenaseverdau umgangen. Eine Zellmigration an den Ort der Proliferation war nicht notwendig. Die Zellen konnten nach Adhäsion an die Zellkulturflasche direkt mit der Proliferation beginnen. Somit erscheinen die insgesamt geringen Unterschiede in der Proliferationsrate der Subgruppen erklärlich. Die Differenzen in den Heilungstendenzen der unterschiedlichen Sehnen und Bänder lassen sich jedoch in unseren Untersuchungen nicht mit den hier verglichenen anatomischen Verläufen und der Zellrekrutierung aus der Umgebung bzw. Gewebeprobe erklären. Wir bereits erwähnt postulierte Murray in diversen Arbeiten, dass die unterschiedliche Heilungskapazität der Sehnen und Bänder vor allem durch die Ausbildung eines Hämatoms im Bereich der Ruptur und einer somit lokalen Defektüberbrückung mit vermehrt vorliegenden löslichen Faktoren bzw. in den *clot* einwandernden Zellen begründet sei (201). Denkbar wäre in diesem Zusammenhang ein vermehrtes Vorkommen von uPA und uPAR in diesem Fibrinclot bzw. in der umgebenen Synovia mit direktem Einfluss auf die lokalen Regenerationsprozesse. Darauf soll bei der Analyse der Expression und Sekretion der Sehnenmarker und uPA/ uPAR weiter eingegangen werden.

Da weder die anatomische Lage noch die Zellrekrutierung als Grund für die in unseren Versuchen signifikant schnellere Zellteilungsrate im LCF anzunehmen ist, muss es noch weitere Einflussfaktoren Weitere bekannte Einflussfaktoren geben. auf die Zellproliferationsrate sind Alter, Vorerkrankungen oder Degeneration. Betrachtet man die Versuchspopulation, so ist auffällig, dass die Spender des LCF in unserer Arbeit deutlich jünger als die Vergleichsgruppen waren (s. Tabelle 6; Abb. 14). Es lässt sich somit ein Zusammenhang zwischen Spenderalter und Proliferationsrate vermuten. Grafisch wurde dies in Abbildung 22 dargestellt. Vergleicht man Spenderalter und Proliferationsrate, so ergibt sich ein Korrelationskoeffizient von r = (-0,37). Dies bedeutet, dass bei jüngerem Spenderalter eine etwas höhere Proliferationsrate erzielt werden konnte. Das Ergebnis untermauert diese These und erscheint auch hinsichtlich des allgemeinen Wachstums des Körpers in Kindheit und Adoleszenz durchaus plausibel. Das Ergebnis wird durch die Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen gestützt. So werden durch verschiedene Autoren strukturelle Sehnenveränderungen durch Alterungs- bzw. Reifungsprozesse beschrieben (32, 55, 80,

74

203). Explizit die Abnahme der absoluten Zellzahl und die reduzierte Zellteilungsrate wird als mögliche Ursache von degenerativen Veränderungen im Alter genannt (203). Im Gegensatz zu den Proben des LCF wurden die verwendeten Quadrizepssehnen-Präparate und Proben des VKB in der vorliegenden Arbeit hauptsächlich bei endoprothetischen Operationen gesammelt. Diese Operationen werden überwiegend bei älteren Patienten durchgeführt und beruhen meist auf degenerativen Gelenkveränderungen. Dies scheint auf unser Patientenkollektiv übertragbar. Bei den Proben des LCF war das durchschnittliche Spenderalter 17,28 Jahre, während es bei den Spendern von VKB und Quadrizepssehne bei 67,18 Jahren lag (s. Abb. 14). Möglicherweise wiesen die im Rahmen dieser endoprothetischen Operationen gewonnenen Sehnenproben bereits die beschriebenen Degenerationen und somit geringeren Proliferationskapazitäten auf. Neben dem Alter als eigenständigem Faktor für die Proliferationsfähigkeit von Zellen und dem Einfluss auf beschriebene, degenerative Veränderungen, postulierten Kjaer et al. den Trainingszustand der Spender als limitierenden Faktor der Proliferationsfähigkeit, da bei ausgiebigem Training Mikroverletzungen und häufigere Reparationsvorgänge auftreten können. Dies würde die Proliferationsrate insgesamt senken (58). Geht man davon aus, dass bei jüngeren Menschen die sportliche Aktivität und der Trainingszustand erwartungsgemäß größer sind, müssten in dieser Gruppe häufiger Verletzungen und Reparaturvorgänge mit den begleitenden Umbauprozessen resultieren. Daraus sollte sich gemäß dieser Hypothese eine geringere Proliferationsrate in dieser Gruppe der sportlich aktiven Menschen ergeben. Dem entgegen steht jedoch die beschriebene höhere Zellaktivität in jüngerem Alter. Da über den körperlichen Trainingszustand der Spender für die vorliegende Arbeit keine Informationen gesammelt wurden, soll er kein weiterer Bestandteil der Diskussion sein. Ein weiterer Faktor für die Entstehung von Degeneration sollen Veränderungen der Blutversorgung bei zunehmendem Alter mit resultierender geringerer Proliferationskapazität sein (55). Die pro-angiogenetische Funktion von uPA und uPAR ist bekannt (204). Aus diesen beiden Erkenntnissen ließe sich der Rückschluss ableiten, dass im alternden Spender eine geringere Expression und Sekretion von uPA und uPAR nachweisbar sein müsste. Wie Abb. 27 und Abb. 28 und auch Abb. 41 und Abb. 44 zeigen, lassen sich in unseren Untersuchungen diese Thesen nicht stützen. Vergleicht man die Ergebnisse der "jüngeren" LCF-Spender mit den Ergebnissen der "älteren" VKB-Spendern, so finden sich, entgegen der Annahme, beim VKB die höchste Expression von uPA und eine höhere Expression von uPAR (Abb. 27-28) und die höchste Sekretion von uPA (Abb. 41). Lediglich beim uPAR sieht man beim LCF eine höhere durchschnittliche Freisetzung ins Zellkulturmedium (s. Abb. 44). Es bleibt festzuhalten, dass generell bei der Entnahme der Gewebe für unsere Untersuchungen intraoperativ und in der Aufbereitung der Proben für die Zellkultur die Präparate makroskopisch auf Beschädigungen geprüft und diese gegebenenfalls reseziert wurden. Eine feingewebliche Untersuchung wurde nicht durchgeführt. Es kann somit keine Aussage über das Vorliegen degenerativer oder anderer pathologischer Veränderungen in den Operationspräparaten getroffen werden.

Zusammenfassend fanden wir eine vergleichbare Proliferationsrate mit Maximum in allen Subgruppen an d4. Die höhere Proliferationsrate in den Proben des LCF kann nicht durch den anatomischen Verlauf erklärt werden, sondern scheint bei den vorliegenden Daten am ehesten aufgrund des Spenderalters zu bestehen. Um diese Frage nach dem Zusammenhang zwischen Proliferation und Alter/ Degeneration aufzuklären, müsste in weiteren Versuchen die deutliche Lücke im Bereich zwischen 20 und 45 Jahren geschlossen werden und auch die Einseitigkeit der Proben bezüglich des Spenderalters zum Beispiel bei LCF und VKB beseitigt werden. Zusätzlich müssten bei weiteren Versuchsreihen Untersuchungen der Proben auf vorliegende degenerative Veränderungen in Erwägung gezogen werden.

Auch wenn in der vorliegenden Arbeit kein direkter Einfluss auf die Regenerationsfähigkeit der Sehnen durch die anatomischen Gegebenheiten nachgewiesen werden konnte, erscheinen unterschiedliche Gegebenheiten in direkter Nachbarschaft zu den Sehnenstümpfen von Bedeutung zu sein. In Synovialflüssigkeit konnte bereits eine Erhöhung von proteolytischen Enzymen, unter anderem UPA, im Vergleich von gesundem mit posttraumatisch verändertem Kniegelenkspunktat nachgewiesen werden (205). Eine Zunahme der Plasminkonzentration beschleunigte tendenziell in einer Zellkultur des vorderen Kreuzbandes den Wundschluss in 4 von 6 untersuchten Proben (206). Im Gegensatz dazu postulierten Murray et al. 2013 und Kiapour et al. 2014 eine schlechtere Heilungstendenz des vorderen Kreuzbandes im Vergleich mit dem medialen Kollateralband des Knies aufgrund der in der umgebenen Synovialflüssigkeit enthaltenen Faktoren und der Auflösung der bei der Sehnenverletzung an den Stümpfen entstehenden *clots* (86, 189). Da der Plasminkomplex, und somit auch uPA und uPAR, eine wichtige Rolle bei der Clotbildung/ -regulation einnimmt, wäre hier, neben den vieluntersuchten Wachstumsfaktoren (129, 207), ein direkter Zusammenhang denkbar, um die Unterschiede in der Proliferationsrate und somit Selbstheilungskapazität von intra- bzw. extrasynovial verlaufenden Sehnen und Bändern in vivo zu erklären. Insgesamt deutet sich ein Zusammenhang zwischen Modulation der Zellumgebung und Proliferationsfähigkeit und somit Heilung von Sehnen und Bändern an.

Wir untersuchten in der vorliegenden Arbeit die Freisetzung von uPA und uPAR ins Zellkulturmedium mittels ELISA. Vor allem die Protease uPA war gut nachweisbar, wohingegen der Rezeptor an der Nachweisgrenze lag. Dies könnte daran liegen, dass im Zellkulturüberstand nur der lösliche Anteil, also der suPAR, vorliegt, während die zellmembrangebundene Form nicht nachgewiesen werden kann. Somit spiegelt die nachgewiesene uPAR-Menge möglicherweise nur einen Bruchteil der tatsächlich vorliegenden Rezeptormenge wider. Ergänzend würde die qRT-PCR die membrangebundene Rezeptormenge nachweisen. Entsprechende Ergebnisse finden sich zum Beispiel in den

76

Proben des VKB. Hier zeigt sich zu Beginn der Kultivierung eine hohe Expressionsrate (Abb. 28), jedoch nur eine geringe Sekretionsmenge (Abb. 44). Diese Ergebnisse decken sich mit der Untersuchung von Chang 2018 (208). Allerdings lässt sich dieser Zusammenhang nicht in allen Proben nachvollziehen. Insgesamt korreliert die in der PCR gemessene höchste Expression an den verschiedenen Untersuchungstagen mit dem jeweils höchsten Proteingehalt im Zellkulturmedium im ELISA. Zusätzlich muss man auch zeitliche Unterschiede zwischen RNA-Expression, Translation und Proteinsekretion beachten. Es wäre somit denkbar, dass es hier zu einer zeitlich versetzten Freisetzung ins Zellkulturmedium kommt. Zur Überprüfung kann man die relative Expression von uPA und uPAR an den Versuchstagen in den einzelnen Subgruppen mit der darauffolgenden Freisetzungsdifferenz von uPA und uPAR ins Zellkulturmedium betrachten. Die jeweils höchste Expression von uPAR zeigte sich an d1 (s. Abb. 28). Ebenso zeigte sich die höchste Zunahme des uPAR-Gehalts im Zellkulturmedium zwischen d1 und d4 mit Ausnahme des VKB (s. Abb. 44). Bei uPA verhielt es sich anders. Hier fand sich bei Quadrizepssehne, VKB und Achillessehne auf die höchste Expression an d1 folgend, die geringste Freisetzungsdifferenz zwischen d1 und d4. Für die Proben von LCF und Bizepssehne fand sich der gleiche Zusammenhang an d11 (s. Abb. 27 und s. Abb. 41). Bekannt ist, dass uPA durch seine lokale proteolytische Aktivität den eigenen membrangebundenen Rezeptor spalten kann (148, 172-174, 209). Der dann vorliegende, lösliche uPAR korreliert in vielen Untersuchungen mit pathologischen Veränderungen und der verbundenen Krankheitsprognose/ Mortalität (172). Dies würde übertragen bedeuten, dass bei einer großen Menge uPA im Medium, vermehrt uPAR von den Zelloberflächen abgespalten werden würde. Unsere Ergebnisse untermauern diese Erkenntnisse nicht. Möglicherweise ist dies auf die eingeschränkte Nachweisbarkeit von uPAR in Zellkulturüberständen mittels ELISA in unseren Versuchen zurückzuführen. Denkbar wären auch negative Rückkopplungen, wie sie in vielen Regulationskreisen des menschlichen Körpers auftreten.

## 5.1.2 Endogene Faktoren für die Proliferation

Sieht man von den äußeren Faktoren wie zum Beispiel dem anatomischen Verlauf, dem Alter oder möglichen degenerativen Veränderungen auf die Proliferationsrate und somit mögliche Regenerationskapazität ab, so bleiben noch diverse durch die Zellen oder die Umgebung selbst beeinflusste Faktoren. Hierzu zählen alle Arten von humoralen Markern, die direkt auf die Zellen oder die EZM wirken.

Zu den bekannten intrinsischen Faktoren mit Einfluss auf die Zellproliferation zählen Tenascin C, Tenomodulin, aber auch der Transkriptionsfaktor Scleraxis oder das Strukturmolekül Collagen. Neben diesen bekannten Faktoren untersuchten wir in der vorliegenden Arbeit erstmals uPA und uPAR im Zusammenhand mit humanen Sehnen. Durch ihre proteolytischen Eigenschaften und die Vielzahl an bekannten Rezeptor-Interaktionswegen erscheinen sie hinsichtlich ihrer Einflussmöglichkeiten auf die Regenerationsfähigkeit von Sehnen und Bändern vielversprechend.

Tenascin C ist ein Faktor der EZM mit bekannter Funktion bei der Zellproliferation, wie bereits durch diverse Arbeitsgruppen in unterschiedlichen Zusammenhängen untersucht wurde (47, 210-212). Nemoto et al. zeigten 2013 im Tiermodell einer Sehnenverletzung eine signifikante Zunahme der Tenascin C Expression in Tendozyten in den ersten 12 h. Anschließend sank die Expressionsrate in den folgenden 12 h deutlich ab (212). Zu ähnlichen Ergebnissen kam die Arbeitsgruppe um Nishio 2005 in ihrer Untersuchung an Astrozyten von Ratten (213). Tucker et al. führten diese Einflussnahme im Rahmen der Inflammationsvorgänge und Proliferation auf eine Tenascin-Integrin-Interaktion zurück (210). Weitere Bestandteile der EZM von Sehnen und Bändern mit beschriebener Funktion bei der Zellproliferation sind Tenomodulin und Collagen. Tenomodulin ist allerdings vor allem in die embryologische Entwicklung von Sehnen und Bändern und weniger in die Regeneration von reifen Tendozyten involviert (45, 214). Collagen als Strukturprotein ist ein wichtiger Baustein der Zelle allgemein. Seine Synthese ist dabei am ehesten Bestandteil der späten Proliferationsphase der Sehnenheilung, wenn genug Zellen eingewandert sind und es um die Modellierung der Sehnenumgebung geht. Almarza verglich 2008 die Regenerationsfähigkeit verschiedener Sehnen und Bänder und beschrieb eine höhere Collagen-1-Expression in den Proben des medialen Kollateralbandes, welches mit einer besseren spontanen Regenerationsfähigkeit assoziiert sei (188). Ein wesentlicher Transkriptionsfaktor, der auch die Expression von Tenomodulin, Tenascin C und Collagen beeinflusst und somit indirekt Einfluss auf die Proliferationsrate hat, und zudem als Sehnenmarker bekannt ist, ist Scleraxis (39, 215-218). Abbildung 46 verdeutlicht die beschriebenen Zusammenhänge.

Unsere Versuchsergebnisse zeigen in Bezug auf die Proliferation vergleichbar mit den Ergebnissen von Nemoto und Nishio eine höhere Expressionsrate von Tenascin C zu Kulturbeginn (212, 213) (s. Abb. 25). Jedoch wurden in unseren Untersuchungen die Zeitpunkte zur Bestimmung der Tenascin C Expression verglichen mit den Arbeiten von Nemoto und Nishio nicht so eng gewählt, als dass man einen Unterschied in der Expression zwischen 12 h und 24 h nach Versuchsbeginn nachweisen könnte. Des Weiteren wiesen wir im Subgruppenvergleich die durchschnittlich höchste Expressionsrate an Tenascin C in den Proben des LCF nach, die, wie bereits beschrieben, auch die schnellste Proliferationsrate zeigten (s. Tabelle 8). Der separate Einfluss von Tenomodulin oder Collagen 1A1 auf die Proliferationsrate ist in unseren Ergebnissen nicht direkt nachweisbar. Auch fanden wir keine spezifischen Unterschiede in der Expression dieser Marker bei Betrachtung der anatomischen Ursprünge ab d1 (s. Abb. 23 und Abb. 26). Insgesamt entspricht dies jedoch einem

erwartbaren Ergebnis, handelt es sich bei diesen Markern um allgemeine Sehnenmarker, die am ehesten kombiniert der Identifikation der Zelltypen dienen. Lediglich in der bezüglich Probenanzahl inhomogeneren Primärkultur P0 fanden sich signifikante Unterschiede. Betrachtet man dagegen den zeitlichen Verlauf und die an den jeweiligen Versuchstagen ermittelte Expression, so finden sich deutlich mehr Unterschiede. Bei den allgemeinen Markern Collagen 1A1, Tenascin C, Tenomodulin und Scleraxis finden sich deutliche Unterschiede im Vergleich der Zellen aus P0 mit den Proben von d1 bis d14 (s. Abb. 23-26). Bei diesen P0 Zellen handelt es sich um Zellen, die bei der Anlage der Zellkulturen aufgrund einer ausreichenden Ausgangszellzahl nach Collagenaseverdau und primärer Kultivierung nicht für die weiteren Versuchsansätze verwendet wurden. Diese wurden ohne weitere Behandlung nach der Zellzählung kryokonserviert. Dadurch handelt es sich um Zellen, die keinen Zellveränderungen durch wiederholte Passagierung unterliegen. Da jedoch nicht bei allen Zellreihen übermäßige Zellzahlen vorlagen, liegen diese Ergebnisse der Expression in den "Ausgangszellen" nicht für alle Kulturen bzw. nicht in allen Gruppierungen in einer vergleichbaren Anzahl vor. Auffällig zeigen diese Proben durchgehend eine höhere Expression. Möglicherweise spielen bereits die zellulären Veränderungen durch die weitere Behandlung zur Versuchsaufbereitung und Konservierung eine Rolle, wie durch verschiedene Arbeitsgruppen in Bezug auf Passagierungen beschrieben wurde (184). Liu et al. beschrieben 2006 in einer Untersuchung der Scleraxisexpression an verschiedenen Zellen des Periodontiums eine explizite Abnahme der Expression mit Zunahme der Kulturpassagezahl (219). Denkbar wäre ebenso, dass die Zellen in der Anlage der Zellkulturen, im Gegensatz zu den konservierten P0-Zellen, initial durch Adhäsionsprozesse gebunden sind und somit weniger Kapazitäten für die RNA-Transkription zur Verfügung haben. Bereits 1998 beschrieb eine andere Arbeitsgruppe einen Urokinase-abhängige Adhäsion von Muskelzellen in vitro (220). Vergleichbar fanden wir eine ausgeprägte relative Expression von uPA und uPAR an d1 (Abb. 27-28 und Abb. 33-34).

Auch wenn sich an den übrigen Versuchstagen keine signifikanten Unterschiede in den Expressionsraten der Marker ergaben, spiegeln die Expressionsverläufe über den Versuchszeitraum, bezogen auf ihre *in vitro* oder *in vivo* beschriebenen Funktionen, nachvollziehbare Verläufe wider.

In der vorliegenden Arbeit postulierten wir einen möglichen Zusammenhang zwischen der uPA/ uPAR-Expression und -Freisetzung und der Regenerationsfähigkeit von Sehnen und Bändern und fanden hier auch die größten Unterschiede in den Expressionsraten im Vergleich der Subgruppen untereinander (s. Abb. 27 und Abb. 28). Dass der uPA / uPAR-Komplex in Zusammenhang mit der Proliferationsfähigkeit von Zellen steht, scheint unstrittig. Vor allem bei Tumorerkrankungen und Metastasierungsprozessen liegen zahlreiche wissenschaftliche Untersuchungen vor. Andreasen et al. beschrieben 2000 eine Überexpression von uPA und

uPAR in Regionen mit verstärkten Umbauprozessen (221). Kanse et al. wiesen 1997 eine Proliferationssteigerung durch uPA bei glatten Muskelzellen nach (151). In Bezug auf die Sehnenregeneration untersuchten lediglich Xia et al. 2003 die Expression von uPA und uPAR an Achillessehnenproben im Tiermodell (182). Somit wurde die Expression und Freisetzung von uPA und uPAR in der vorliegenden Arbeit, unserer Kenntnis nach, erstmals an humanen Tendozytenkulturen untersucht. Anders als Xia et al. in ihrer Arbeit, wählten wir als Untersuchungsmethoden kein Northernblot bzw. Westernblot-Verfahren mit anschließender immunhistochemischer Färbung zum Nachweis der mRNA- bzw. Proteinmenge. Der gewählte Versuchszeitraum wurde in der vorliegenden Arbeit auf 14 Tage reduziert, wodurch die Ergebnisse nicht vollständig übertragbar sind. Allgemein fanden Xia et al. eine signifikant größere mRNA Menge, sowohl von uPA als auch von uPAR, zu Beginn der Versuchsreihen an den Messtagen 4 und 7 mit zusätzlich deutlichen Unterschieden zwischen uPA und uPAR selbst, wobei uPA überwog. Wir fanden in unserer Arbeit in allen Subgruppen ebenfalls eine höhere Expression von uPA und uPAR zu Beginn der Versuche an d1 (s. Abb. 27 und Abb. 28). Allerdings hatten wir im Anschluss an d4 unsere tendenziell - im Zeitverlauf betrachtet – geringsten Expressionsraten, uPA überwog erst ab d4 in den meisten Gruppen. Diese Unterschiede der Ergebnisse können im gewählten Verfahren oder auch in der möglicherweise vorliegenden Nicht-Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Zellursprünge (Achillessehne vs. andere Sehnen / Bänder) begründet sein.

Die genaue Funktion des uPA/uPAR Komplexes in Bezug auf die Sehnenregenerationsfähigkeit bleibt bislang unklar, da die angesteuerten Signalwege nicht vollständig bekannt sind. Wir fanden einen deutlichen Zusammenhang zwischen der Teilungsrate (n/24h) der Kulturen und der relativen uPAR-Expression (s. Abb. 37). Bei der relativen uPA-Expression fiel der Zusammenhang deutlich geringer aus (s. Abb. 36). Möglicherweise exprimieren die proliferationsaktiven Tendozyten vermehrt den Rezeptor, um über Interaktion mit anderen Regulationskreisen Einfluss auf das Remodelling der EZM und somit auch auf die Geweberekonstruktion nehmen zu können. Ein stimulierender Effekt erscheint somit vorstellbar. Wie dieser Effekt möglicherweise begründet sein kann, soll im folgenden Abschnitt erläutert werden.

### 5.2 Zelluläre Interaktionswege von uPA / uPAR

Über die Vielzahl der beschriebenen Interaktionswege von uPA mit verschiedenen Rezeptoren und über die lokale Degradation der EZM mit folgender Freisetzung von Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel FGF, VEGF und TGFβ, sind Auf- und Umbauprozesse zu Beginn einer Heilungsphase erklärlich. Die am einfachsten nachvollziehbare Signalkaskade wird durch die direkte Bindung von uPA an seinen membranständigen uPA-Rezeptor und die daraus resultierende lokale proteolytische Aktivität getriggert. Diese wirkt anschließend sowohl auf die Zellumgebung (EZM) als auch auf den Rezeptor selbst. Die bekannteste ausgelöste Reaktion ist die Aktivierung der namensgebenden Plasminkaskade mit Umwandlung des Plasminogens in das aktive Plasmin. Durch eine direkte, lokale Wirkung auf den Rezeptor kommt es zur Abspaltung und somit Bildung eines löslichen Rezeptortyps (suPAR). Dieser konnte in einer Vielzahl von Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden, wodurch er auch überregional wirksam sein kann, und in Zusammenhang mit diversen pathologischen Vorgängen (zum Beispiel Metastasierung) gesehen wird (146-153). Neben dieser lokalen, proteolytischen Wirkung von uPA und seinem Rezeptor befinden sich unter der Vielzahl der wissenschaftlich beschriebenen intrazellulären Signalkaskaden die uPAR – Integrin- Interaktion oder das Zusammenspiel mit Rezeptor-Tyrosinkinasen. Zu Letzteren zählen zahlreiche Wachstumsfaktorenrezeptoren wie zum Beispiel EGFR (138, 139, 181, 222, 223). Nachweislich ist in Anwesenheit des uPAR-Komplexes die Aktivität des EGFR erhöht (224), woraus eine Stimulation des ERK-Signalweges (extracellular signal-regulated kinase) resultiert. Ebenfalls über Tyrosin-Kinase-gekoppelte-Rezeptoren und die Aktivierung unterschiedlicher Kinasen werden Zelldifferenzierung und -wachstum, aber auch Apoptose angeregt (181, 225, 226). Auch über TGF $\beta$ -Rezeptoren und die SMAD-Kaskade werden Regulationsmechanismen beschrieben (4, 5). Die genauen Abläufe bleiben jedoch unklar. In Bezug auf Sehnen und Bänder bildet der Transkriptionsfaktor Scleraxis eine mögliche gemeinsame Endstrecke, da dessen Expression ebenfalls über die beschriebenen Signalkaskaden getriggert wird (216, 217). Verschiedene Arbeitsgruppen beschrieben durch diese Verschaltungen eine erhöhte Proliferationsrate von Karzinomzellen (224, 225) oder auch von Muskelzellen (227). Im Jahr 2018 untersuchten Chang et al. uPA und uPAR und einen möglichen zugehörigen Signalweg über TGFβ-Stimulation in Zahnpulpazellen. Durch Zugabe von TGFβ<sub>1</sub> konnte hierbei eine vermehrte Expression von uPAR, PAI-1 und suPAR nachgewiesen werden, wohingegen die uPA-Expression sank. Gleiches galt für die Proteinfreisetzung (208).

Einen Überblick über bisher denkbare bzw. bekannte Verschaltungen bietet Abbildung 46.



Abb. 46: Übersicht einiger bisher untersuchter bzw. nachgewiesener Interaktionswege von uPA und uPAR.

Der uPA / uPAR - Komplex als vielfach untersuchtes Bindeglied im Zusammenhang mit Zelladhäsion, Zellproliferation und somit Wachstums- und Regenerationsprozessen erscheint somit vielversprechend. Wir fanden in der vorliegenden Arbeit Hinweise auf eine erhöhte uPA und uPAR-Expression zu Zeiten der höchsten Adhäsions- und Proliferationsbestrebungen zu Beginn der Zellkulturen. Inwiefern sich der uPA / uPAR-Komplex zukünftig eignet, um die Ergebnisse im Rahmen der voranschreitenden *Tissue Engineering* – Bestrebungen und somit das klinische *outcome* der zahlreichen Patienten zu verbessern, bleibt abzuwarten. Hierfür wären vor allem Untersuchungen interessant, ob es durch die Zugabe von uPA oder seinem Rezeptor zu einer Beeinflussbarkeit der Tendozytenproliferation *in vitro* kommt. Letztendlich sollten die durch uPA und seinen Rezeptor getriggerten Signalkaskaden in Sehnen und Bändern zukünftig Ziel weiterer Arbeiten sein, um die Vielzahl an Interaktionsmöglichkeiten zu verstehen und daraus resultierend neue Therapieoptionen ableiten zu können.

#### 6 Zusammenfassung und Ausblick

Trotz zahlreicher möglicher Interaktionswege, insbesondere im Zusammenhang mit Inflammations- und Proliferationsvorgängen und dem wachsenden wissenschaftlichen Interesse an Tissue Engineering-Techniken blieben uPA und der Rezeptor in dem Bereich der Sehnenregeneration bisher in der wissenschaftlichen Arbeit unterrepräsentiert. In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir erstmalig die Expression und Freisetzung von Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator und seinem Rezeptor in Tendozytenkulturen verschiedener humaner Sehnen und Bänder, vor allem hinsichtlich der möglichen Einflüsse auf die Proliferationsrate und somit Regenerationsfähigkeit. Dabei verglichen wir zusätzlich den anatomischen Ursprung der Sehnen und Bänder auf erkennbare Unterschiede, die Rückschlüsse auf die klinisch beobachtbare variable Selbstheilungskapazität zulassen könnten. Wir konnten in dieser Arbeit Unterschiede in den Proliferationsraten verschiedener Sehnen und Bänder, vor allem unter Beachtung des Spenderalters, messen. Der intrasynoviale bzw. extrasynoviale Verlauf der Sehnen und Bänder als angenommene Ursache der klinisch beobachtbaren unterschiedlichen Selbstheilungskapazität konnte nicht abschließend bestätigt werden. Allerdings fanden wir Unterschiede in der Expression und Freisetzung von uPA und uPAR, deren zeitlicher Verlauf zum phasenhaften Heilungsprozess von Sehnen und Bändern passt. Da der Ansatzpunkt von uPA und seinem Rezeptor im Zusammenhang mit der Sehnen- und Bandregeneration weiterhin unklar ist, sollten weitere Untersuchungen zu den möglichen Einflussnahmen auf die einzelnen Phasen der Regeneration folgen. Hierbei zeigen sich vor allem die ersten beiden Phasen vielversprechend und sollten zum Beispiel über die Zugabe von uPA und uPAR zur Zellkultur in vitro oder im Rahmen von Sehnenersatzverfahren in vivo überprüft werden. Zusätzlich müssen die angesteuerten Signalkaskaden im Rahmen der Proliferationsvorgänge genauer untersucht werden, um ein grundsätzliches Verständnis der Vielzahl an potenziellen Einsatzmöglichkeiten wissenschaftlich und klinisch zu erlangen.

83

## 7 Literatur- und Quellenverzeichnis

- 1. HSU, S.-L., LIANG, R., and WOO, S. L., 2010. Functional tissue engineering of ligament healing. Sports medicine, arthroscopy, rehabilitation, therapy & technology: SMARTT, 2, 12
- 2. WOO, S. L. et al., 1999. Tissue engineering of ligament and tendon healing. Clin Orthop Relat Res. (367 Suppl): 312-23.
- **3.** SIDENIUS, N., and BLASI, F., 2003. The urokinase plasminogen activator system in cancer: recent advances and implication for prognosis and therapy. Cancer metastasis reviews, 22(2-3), 205–222
- SANTIBANEZ, J. F., 2017. Urokinase Type Plasminogen Activator and the Molecular Mechanisms of its Regulation in Cancer. Protein and peptide letters, 24(10), 936– 946
- **5.** SANTIBANEZ, J. F. et al., 2018. Transforming growth factor-β, matrix metalloproteinases, and urokinase-type plasminogen activator interaction in the cancer epithelial to mesenchymal transition. Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists, 247(3), 382–395
- **6.** HILDENBRAND, R. et al., 2008. The urokinase-system--role of cell proliferation and apoptosis. Histology and histopathology, 23(2), 227–236
- **7.** ALFANO, D. et al., 2005. The urokinase plasminogen activator and its receptor: role in cell growth and apoptosis. Thrombosis and haemostasis, 93(2), 205–211
- **8.** LIN, H. et al., 2020. Therapeutics targeting the fibrinolytic system. Experimental & molecular medicine, 52(3), 367–379
- **9.** BOONSTRA, M. C. et al., 2011. Clinical applications of the urokinase receptor (uPAR) for cancer patients. Current pharmaceutical design, 17(19), 1890–1910
- **10.** TOZER, S., and DUPREZ, D., 2005. Tendon and ligament: development, repair and disease. Birth defects research. Part C, Embryo today: reviews, 75(3), 226–236
- **11.** RUMIAN, A. P., WALLACE, A. L., and BIRCH, H. L., 2007. Tendons and ligaments are anatomically distinct but overlap in molecular and morphological features--a comparative study in an ovine model. Journal of orthopaedic research, official publication of the Orthopaedic Research Society, 25:458-464
- **12.** AMIEL, D. et al., 1984. Tendons and ligaments: a morphological and biochemical comparison. Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society, 1(3), 257–265
- **13.** LIM, W. L. et al., 2019. Current Progress in Tendon and Ligament Tissue Engineering. Tissue engineering and regenerative medicine, 16(6), 549–571
- **14.** CONNIZZO, B. K., YANNASCOLI, S. M., and SOSLOWSKY, L. J., 2013. Structurefunction relationships of postnatal tendon development: a parallel to healing. Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology, 32(2), 106–116
- **15.** BENJAMIN, M., KAISER, E., and MILZ, S., 2008. Structure-function relationships in tendons: a review. Journal of anatomy, 212(3), 211–228

- **16.** O'BRIEN, M., 2005. The anatomy of the Achilles tendon. Foot and ankle clinics, 10(2), 225–238
- **17.** SHARMA, P., and MAFFULLI, N., 2006. Biology of tendon injury: healing, modeling and remodeling. Journal of musculoskeletal & neuronal interactions, 6(2), 181–190
- **18.** KILLIAN, M. L. et al., 2012. The role of mechanobiology in tendon healing. Journal of shoulder and elbow surgery, 21(2), 228–237
- **19.** SAKABE, T., SAKAI, T., 2011. Musculoskeletal diseases--tendon. British medical bulletin, 99, 211–225
- **20.** HOPKINS, C. et al., 2016. Critical review on the socio-economic impact of tendinopathy. Asia-Pacific journal of sports medicine, arthroscopy, rehabilitation and technology, 4, 9–20
- **21.** "Institut für das Entgeltsystem im Krankenhaus" InEK GmbH, www.g-drg.de; abgerufen am 23.03.2022, 12h
- Brand-Saberi, B., and Christ, B., 1999. 1 Evolution and Development of Distinct Cell Lineages Derived from Somites. Somitogenesis - Part 2: Elsevier (Current Topics in Developmental Biology), pp. 1–42
- **23.** CSERJESI, P. et al., 1995. Scleraxis: a basic helix-loop-helix protein that prefigures skeletal formation during mouse embryogenesis. Development (Cambridge, England), 121(4), 1099–1110
- 24. SCHWEITZER, R. et al., 2001. Analysis of the tendon cell fate using Scleraxis, a specific marker for tendons and ligaments. Development (Cambridge, England), 128(19), 3855–3866
- 25. BRENT, A. E., SCHWEITZER, R., and TABIN, C. J., 2003. A somitic compartment of tendon progenitors. Cell, 113(2), 235–248
- 26. LifeMap Discovery<sup>™</sup>: the embryonic development, stem cells, and regenerative medicine research portal. Edgar R, Mazor Y, Rinon A, Blumenthal J, Golan Y, Buzhor E, Livnat I, Ben-Ari S, Lieder I, Shitrit A, Gilboa Y, Ben-Yehudah A, Edri O, Shraga N, Bogoch Y, Leshansky L, Aharoni S, West MD, Warshawsky D, Shtrichman R. PLoS One. 2013 Jul 17;8(7)
- **27.** EDWARDS, D. A., 1946. The blood supply and lymphatic drainage of tendons. Journal of anatomy, 80(Pt 3), 147-152.2
- **28.** FRANCHI, M. et al., 2007. Collagen structure of tendon relates to function. TheScientificWorldJournal, 7, 404–420
- **29.** BI, Y. et al., 2007. Identification of tendon stem/progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche. Nature medicine, 13(10), 1219–1227
- **30.** LUI, P. P. Y., and CHAN, K. M.2, 2011. Tendon-derived stem cells (TDSCs): from basic science to potential roles in tendon pathology and tissue engineering applications. Stem cell reviews and reports, 7(4), 883–897
- **31.** LUI, P. P. Y., and WONG, C. M., 2019. Biology of Tendon Stem Cells and Tendon in Aging. Frontiers in genetics, 10, 1338

- **32.** LUI, P. P. Y. et al., 2011. Tenogenic differentiation of stem cells for tendon repairwhat is the current evidence? Journal of tissue engineering and regenerative medicine, 5(8), e144-63
- **33.** GUO, J., CHAN, K.-M., ZHANG, J.-F., LI, G., 2016. Tendon-derived stem cells undergo spontaneous tenogenic differentiation. Experimental cell research, 341(1), 1–7
- **34.** WU, F., NERLICH, M., and DOCHEVA, D., 2017. Tendon injuries: Basic science and new repair proposals. EFORT open reviews, 2(7), 332–342
- **35.** KADLER, K. E. et al., 1996. Collagen fibril formation. The Biochemical journal, 316 (Pt 1), 1–11
- **36.** CANTY, E. G., and KADLER, K. E., 2002. Collagen fibril biosynthesis in tendon: a review and recent insights. Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology, 133(4), 979–985
- **37.** TAYE, N., KAROULIAS, S. Z., and HUBMACHER, D., 2020. The "other" 15-40%: The Role of Non-Collagenous Extracellular Matrix Proteins and Minor Collagens in Tendon. Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society, 38(1), 23–35
- **38.** BANOS, C. C., THOMAS, A. H., and KUO, C. K., 2008. Collagen fibrillogenesis in tendon development: current models and regulation of fibril assembly. Birth defects research. Part C, Embryo today: reviews, 84(3), 228–244
- **39.** DOCHEVA, D. et al., 2015. Biologics for tendon repair. Advanced drug delivery reviews, 84, 222–239
- **40.** FRANCHI, M. et al., 2007. Collagen structure of tendon relates to function. TheScientificWorldJournal, 7, 404–420
- **41.** YANG, G., ROTHRAUFF, B. B., and TUAN, R. S., 2013. Tendon and ligament regeneration and repair: clinical relevance and developmental paradigm. Birth defects research. Part C, Embryo today: reviews, 99(3), 203–222
- **42.** ZHANG, G. ET AL., 2005. Development of tendon structure and function: Regulation of collagen fibrillogenesis. J Musculoskelet Neuronal Interact, 5–21
- **43.** Britannica, The Editors of Encyclopaedia. "tendon". Encyclopedia Britannica, 24 May. 2021, https://www.britannica.com/science/tendon. (abgerufen: 16.02.2022; 15h)
- 44. REES, S. G., DENT, C. M., and CATERSON, B., 2009. Metabolism of proteoglycans in tendon, Scand J Med Sci Sports 2009: 19: 470-478
- **45.** DOCHEVA, D. et al., 2005. Tenomodulin is necessary for tenocyte proliferation and tendon maturation. Molecular and cellular biology, 25(2), 699–705
- **46.** CHIQUET-EHRISMANN, R., and TUCKER, R. P., 2004. Connective tissues: signalling by tenascins. The international journal of biochemistry & cell biology, 36(6), 1085–1089
- **47.** MIDWOOD, K. S., and OREND, G., 2009. The role of tenascin-C in tissue injury and tumorigenesis. J. Cell Commun. Signal. (2009) 3:287-310

- **48.** HERCHENHAN, A. et al., 2012. Tenocyte contraction induces crimp formation in tendon-like tissue. Biomechanics and modeling in mechanobiology, 11(3-4), 449–459
- **49.** KANNUS, P., 2000. Structure of the tendon connective tissue. Scand J Med Sci Sports. 2000 Dec;10(6):312-20
- SCREEN, H. R. C. et al., 2015. Tendon functional extracellular matrix. Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society, 33(6), 793–799
- **51.** GOTT, M. et al., 2011. Tendon phenotype should dictate tissue engineering modality in tendon repair: a review. Discovery medicine, 12(62), 75–84
- **52.** TEMPFER, H., and TRAWEGER, A., 2015. Tendon Vasculature in Health and Disease. Frontiers in physiology, 6:330
- **53.** MAGNUSSON, S. P., and KJAER, M., 2019. The impact of loading, unloading, ageing and injury on the human tendon. The Journal of physiology, 597(5), 1283–1298
- **54.** STROCCHI R., 1991. Human Achilles tendon: morphological and morphometric variations as a function of age. Foot & Ankle. 1991 Oct;12(2):100-4
- **55.** MCCARTHY, M. M., and HANNAFIN, J. A., 2014. The mature athlete: aging tendon and ligament. Sports health, 6(1), 41–48
- **56.** PEFFERS, M. J. et al., 2014. Proteomic analysis reveals age-related changes in tendon matrix composition, with age- and injury-specific matrix fragmentation. The Journal of biological chemistry, 289(37), 25867–25878
- **57.** ZUSKOV, A. et al., 2020. Tendon Biomechanics and Crimp Properties Following Fatigue Loading Are Influenced by Tendon Type and Age in Mice. Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society, 38(1), 36–42
- **58.** KJAER, M., 2004. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. Physiological reviews, 84(2), 649–698
- **59.** LOREN, G. J., and LIEBER, R. L., 1995. Tendon biomechanical properties enhance human wrist muscle specialization. Journal of biomechanics, 28(7), 791–799
- **60.** MAGANARIS, C. N., NARICI, M. V., and MAFFULLI, N., 2008. Biomechanics of the Achilles tendon. Disability and rehabilitation, 30(20-22), 1542–1547
- **61.** MAFFULLI N. et al., 2011. Achilles tendon ruptures in elite athletes. Foot & Ankle international, 32(1), 9-15
- **62.** GROSS, G., and HOFFMANN, A., 2013. Therapeutic strategies for tendon healing based on novel biomaterials, factors and cells. Pathobiology: journal of immunopathology, molecular and cellular biology, 80(4), 203–210
- **63.** KANNUS, P., and JÓZSA, L., 1991. Histopathological changes preceding spontaneous rupture of a tendon. A controlled study of 891 patients. The Journal of bone and joint surgery. American volume, 73(10), 1507–1525

- **64.** JOZSA, L. 1989. Distribution of blood groups in patients with tendon rupture. An analysis of 832 cases. J Bone Joint Surg [Br] 1989; 71-B:272-4.
- **65.** KUJALA, U. M. et al., 1992. ABO blood groups and musculoskeletal injuries. Injury, 23(2), 131–133
- **66.** XU, Y., and MURRELL, G. A. C., 2008. The basic science of tendinopathy. Clinical orthopaedics and related research, 466(7), 1528–1538
- **67.** KUJALA, U. M., SARNA, S., and KAPRIO, J., 2005. Cumulative incidence of achilles tendon rupture and tendinopathy in male former elite athletes. Clinical journal of sport medicine: official journal of the Canadian Academy of Sport Medicine, 15(3), 133–135
- **68.** AICALE, R., TARANTINO, D., and MAFFULLI, N., 2018. Overuse injuries in sport: a comprehensive overview. Journal of orthopaedic surgery and research, 13(1), 309
- **69.** ROS, S. J. et al., 2019. Multiscale mechanisms of tendon fatigue damage progression and severity are strain and cycle dependent. Journal of biomechanics, 85, 148–156
- **70.** ARNOCZKY, S. P., LAVAGNINO, M., and EGERBACHER, M., 2007. The mechanobiological aetiopathogenesis of tendinopathy: is it the over-stimulation or the under-stimulation of tendon cells? International journal of experimental pathology, 88(4), 217–226
- **71.** SEEGER JD. et al., 2006. Achilles tendon rupture and its association with fluoroquinolone antibiotics and other potential risk factors in a managed care population. Pharmacoepidemiol Drug Saf. 2006 Nov;15(11):784-92
- **72.** SODE J.et al. 2007. Use of fluroquinolone and risk of Achilles tendon rupture: a population-based cohort study. Eur J Clin Pharmacol. 2007 May;63(5):499-503
- **73.** KHALIQ, Y., and ZHANEL, G. G., 2003. Fluoroquinolone-associated tendinopathy: a critical review of the literature. Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America, 36(11), 1404–1410
- **74.** NÜHRENBÖRGER, C. et al., 2017. Epidemiologie von Sehnenverletzungen im Sport. Sports Orthopaedics and Traumatology, 33(3), 241–247
- **75.** THOMOPOULOS, S. et al., 2015. Mechanisms of tendon injury and repair. Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society, 33(6), 832–839
- 76. HOPE, M., SAXBY, T., 2007. Tendon healing. Foot and ankle clinics, 12(4), 553-67
- **77.** VOLETI, P. B., BUCKLEY, M. R., and SOSLOWSKY, L. J., 2012. Tendon healing: repair and regeneration. Annual review of biomedical engineering, 14, 47–71
- **78.** Järvinen, M. et al., 1997. Histopathological findings in chronic tendon disorders. Scand J Med Sci Sports. 1997 Apr;7(2):86-95
- **79.** RILEY, G., 2008. Tendinopathy--from basic science to treatment. Nature clinical practice. Rheumatology, 4(2), 82–89

- **80.** SVENSSON, R. B. et al., 2016. Effect of aging and exercise on the tendon. Journal of applied physiology (Bethesda, Md.: 1985), 121(6), 1237–1246
- **81.** FENWICK, S. A., HAZLEMAN, B. L., and RILEY, G. P., 2002. The vasculature and its role in the damaged and healing tendon. Arthritis research, 4(4), 252–260
- **82.** SINGH, R. et al., 2015. A Review of Current Concepts in Flexor Tendon Repair: Physiology, Biomechanics, Surgical Technique and Rehabilitation. Orthopedic reviews, 7(4), 6125
- **83.** NAGINENI, C. N. et al., 1992. Characterization of the intrinsic properties of the anterior cruciate and medial collateral ligament cells: an in vitro cell culture study. Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society, 10(4), 465–475
- 84. AMIEL, D. et al., 1995. Autogenous intrasynovial and extrasynovial tendon grafts: an experimental study of pro alpha 1(I) collagen mRNA expression in dogs. Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society, 13(3), 459–463
- **85.** MURRAY, M. M., 2009. Current status and potential of primary ACL repair. Clinics in sports medicine, 28(1), 51–61
- MURRAY, M. M., and FLEMING, B. C., 2013. Biology of anterior cruciate ligament injury and repair: Kappa delta ann doner vaughn award paper 2013. Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society, 31(10), 1501–1506
- STATISTISCHES BUNDESAMT (Destatis), 2020. Fallpauschalenbezogene Krankenhausstatistik (DRG-Statistik) Operationen und Prozeduren der vollstationären Patientinnen und Patienten in Krankenhäusern (4-Steller). Artikelnummer: 5231401197014.
- **88.** AMLANG, M. H. et al., 2011. Ultrasonographic classification of achilles tendon ruptures as a rationale for individual treatment selection. ISRN orthopedics, 2011, 869703
- **89.** REDA, Y. et al., 2020. Surgical versus non-surgical treatment for acute Achilles' tendon rupture. A systematic review of literature and meta-analysis. Foot and ankle surgery: official journal of the European Society of Foot and Ankle Surgeons, 26(3), 280–288
- **90.** SMITH, T. O. et al., 2014. Is reconstruction the best management strategy for anterior cruciate ligament rupture? A systematic review and meta-analysis comparing anterior cruciate ligament reconstruction versus non-operative treatment. The Knee, 21(2), 462–470
- **91.** MONK, A. P. et al., 2016. Surgical versus conservative interventions for treating anterior cruciate ligament injuries. The Cochrane database of systematic reviews, 4, CD011166
- **92.** CEDERQVIST, S. et al., 2020. Non-surgical and surgical treatments for rotator cuff disease: a pragmatic randomised clinical trial with 2-year follow-up after initial rehabilitation. Annals of the rheumatic diseases. 2020 Dec 3;80(6):796-802

- **93.** KULIG, K. et al., 2009. Nonsurgical management of posterior tibial tendon dysfunction with orthoses and resistive exercise: a randomized controlled trial. Physical therapy, 89(1), 26–37
- **94.** DAVENPORT, T. E. et al., 2005. The EdUReP model for nonsurgical management of tendinopathy. Physical therapy, 85(10), 1093–1103
- **95.** LIST, M., Erstauflage 1978. Krankengymastische Behandlung in der Traumatologie. Krankengymnastische Behandlung nach Sehnen-, Band- und Muskelverletzungen: Springer Verlag
- COSTA, M. L. et al., 2020. Plaster cast versus functional bracing for Achilles tendon rupture: the UKSTAR RCT. Health technology assessment (Winchester, England), 24(8), 1–86
- 97. LEE, B. G., CHO, N. S., and RHEE, Y. G., 2012. Effect of two rehabilitation protocols on range of motion and healing rates after arthroscopic rotator cuff repair: aggressive versus limited early passive exercises. Arthroscopy: the journal of arthroscopic & related surgery: official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association, 28(1), 34–42
- **98.** PAAVOLA, M. et al., 2002. Treatment of tendon disorders. Is there a role for corticosteroid injection? Foot and ankle clinics, 7(3), 501–513
- **99.** COOMBES, B. K., BISSET, L., and VICENZINO, B., 2010. Efficacy and safety of corticosteroid injections and other injections for management of tendinopathy: a systematic review of randomised controlled trials. The Lancet, 376(9754), 1751–1767
- **100.** ANDIA, I. et al., 2014. Platelet-rich plasma in the conservative treatment of painful tendinopathy: a systematic review and meta-analysis of controlled studies. British medical bulletin, 110(1), 99–115
- **101.** ROSSO, F. et al., 2015. Mechanical Stimulation (Pulsed Electromagnetic Fields "PEMF" and Extracorporeal Shock Wave Therapy "ESWT") and Tendon Regeneration: A Possible Alternative. Frontiers in aging neuroscience, 7, 211
- **102.** HOTFIEL, T. et al., 2017. Konservative Therapie von Sehnenverletzungen. Sports Orthopaedics and Traumatology, 33(3), 258–269
- **103.** LOVRIC, V. et al., 2013. The effects of low-intensity pulsed ultrasound on tendonbone healing in a transosseous-equivalent sheep rotator cuff model. Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy: official journal of the ESSKA, 21(2), 466–475
- **104.** LANGER, M. F. et al., 2015. Nahttechniken für Beugesehnen der Hand. Der Orthopäde, 44(10), 748–756
- **105.** FREEDMAN, B. R., and MOONEY, D. J., 2019. Biomaterials to Mimic and Heal Connective Tissues. Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.), 31(19), e1806695
- **106.** DERWIN, K. A. et al., 2010. Extracellular matrix scaffold devices for rotator cuff repair. J Shoulder Elbow Surg (2010) 19, 467-476
- **107.** LONGO, U. G. et al., 2011. Tissue engineered biological augmentation for tendon healing: a systematic review. British medical bulletin, 98, 31–59

- **108.** QIAN, S. et al., 2019. A Collagen and Silk Scaffold for Improved Healing of the Tendon and Bone Interface in a Rabbit Model. Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research, 25, 269–278
- **109.** MURRAY, M. M., and SPECTOR, M., 2001. The migration of cells from the ruptured human anterior cruciate ligament into collagen-glycosaminoglycan regeneration templates in vitro. Biomaterials, 22(17), 2393–2402
- **110.** MURRAY, M. M. et al., 2007. Enhanced histologic repair in a central wound in the anterior cruciate ligament with a collagen-platelet-rich plasma scaffold. Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society, 25(8), 1007–1017
- **111.** RAGHAVAN, S. S. et al., 2012. Optimization of human tendon tissue engineering: synergistic effects of growth factors for use in tendon scaffold repopulation. Plast. Reconstr. Surg. 129:479
- **112.** OUYANG, H. W. et al., 2003. Knitted poly-lactide-co-glycolide scaffold loaded with bone marrow stromal cells in repair and regeneration of rabbit Achilles tendon. Tissue engineering, 9(3), 431–439
- **113.** LIU, Y., RAMANATH, H. S., and WANG, D.-A., 2008. Tendon tissue engineering using scaffold enhancing strategies. Trends in biotechnology, 26(4), 201–209
- **114.** SCHÖNBERGER, T J A et al., 2008. Operative treatment of acute Achilles tendon rupture: Open end-to-end-reconstruction versus reconstruction with Mitek-anchors. Acta chirurgica Belgica, 108(2), 236–239
- **115.** AL-TAHER, M., and WOUTERS, D. B., 2014. Fixation of acute distal biceps tendon ruptures using mitek anchors: a retrospective study. The open orthopaedics journal, 8, 52–55
- **116.** COSTA-ALMEIDA, R., CALEJO, I., and GOMES, M. E., 2019. Mesenchymal Stem Cells Empowering Tendon Regenerative Therapies. International journal of molecular sciences, 20(12)
- **117.** VAN EIJK, F. et al., 2004. Tissue engineering of ligaments: a comparison of bone marrow stromal cells, anterior cruciate ligament, and skin fibroblasts as cell source. Tissue engineering, 10(5-6), 893–903
- **118.** LIU, C.-F. et al., 2011. What we should know before using tissue engineering techniques to repair injured tendons: a developmental biology perspective. Tissue engineering. Part B, Reviews, 17(3), 165–176
- **119.** YOKOYA, S. et al., 2012. Rotator cuff regeneration using a bioabsorbable material with bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a rabbit model. The American journal of sports medicine, 40(6), 1259–1268
- 120. RANDELLI, P. et al., 2013. Isolation and characterization of 2 new human rotator cuff and long head of biceps tendon cells possessing stem cell-like self-renewal and multipotential differentiation capacity. The American journal of sports medicine, 41(7), 1653–1664
- **121.** NING, L.-J. et al., 2012. Preparation and characterization of decellularized tendon slices for tendon tissue engineering. Journal of biomedical materials research. Part A, 100(6), 1448–1456

- **122.** PRIDGEN, B. C. et al., 2011. Flexor tendon tissue engineering: acellularization of human flexor tendons with preservation of biomechanical properties and biocompatibility. Tissue engineering. Part C, Methods, 17(8), 819–828
- **123.** CAO, Y. et al., 2002. Bridging tendon defects using autologous tenocyte engineered tendon in a hen model. Plastic and reconstructive surgery, 110(5), 1280–1289
- **124.** AWAD, H. A. et al., 2003. Repair of patellar tendon injuries using a cell-collagen composite. Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society, 21(3), 420–431
- **125.** FESSEL, G., GERBER, C., and SNEDEKER, J. G., 2012. Potential of collagen crosslinking therapies to mediate tendon mechanical properties. Journal of shoulder and elbow surgery, 21(2), 209–217
- 126. ABRAHAMSSON, S. O., 1997. Similar effects of recombinant human insulin-like growth factor-I and II on cellular activities in flexor tendons of young rabbits: experimental studies in vitro. Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society, 15(2), 256–262
- 127. BEDI, A. et al., 2010. The effect of matrix metalloproteinase inhibition on tendon-tobone healing in a rotator cuff repair model. J Shoulder Elbow Surg (2010) 19, 384-391
- **128.** BEDI, A. et al., 2012. Cytokines in rotator cuff degeneration and repair. Journal of shoulder and elbow surgery, 21(2), 218–227
- **129.** MOLLOY, T., WANG, Y., and MURRELL, G., 2003. The roles of growth factors in tendon and ligament healing. Sports medicine (Auckland, N.Z.), 33(5), 381–394
- **130.** OCHEN, Y. et al., 2019. Operative treatment versus nonoperative treatment of Achilles tendon ruptures: systematic review and meta-analysis. BMJ (Clinical research ed.), 364, k5120
- **131.** SOROCEANU, A. et al., 2012. Surgical versus nonsurgical treatment of acute Achilles tendon rupture: a meta-analysis of randomized trials. The Journal of bone and joint surgery. American volume, 94(23), 2136–2143
- **132.** BERGKVIST, D. et al., 2012. Acute Achilles tendon rupture: a questionnaire followup of 487 patients. The Journal of bone and joint surgery. American volume, 94(13), 1229–1233
- 133. MAQUIRRIAIN, J., 20. Achilles Tendon Rupture: Avoiding Tendon Lengthening during Surgical Repair and Rehabilitation. The Yale Journal of Biology and Medicine, 84(3), 289–300
- **134.** BOHNSACK, M. et al., 2000. Die operative Achillessehnenverkürzung zur Korrektur der in Verlängerung ausgeheilten konservativ behandelten Achillessehnenruptur. Zeitschrift fur Orthopadie und ihre Grenzgebiete, 138(6), 501–505
- **135.** MOLLOY, A., and WOOD, E. V., 2009. Complications of the treatment of Achilles tendon ruptures. Foot and ankle clinics, 14(4), 745–759
- **136.** STRAUSS, E. J. et al., 2007. Operative treatment of acute Achilles tendon ruptures: an institutional review of clinical outcomes. Injury, 38(7), 832–838

- **137.** BLASI, F., and SIDENIUS, N., 2010. The urokinase receptor: focused cell surface proteolysis, cell adhesion and signaling. FEBS Lett. 2010 May 3;584(9):1923-30
- **138.** BAART, V. M. et al., 2020. Molecular imaging of the urokinase plasminogen activator receptor: opportunities beyond cancer. EJNMMI research, 10(1), 87
- 139. BAART, V. M., BOONSTRA, M. C., and SIER, C. F. M., 2017. uPAR directed-imaging of head-and-neck cancer. Oncotarget, 8(13), 20519–20520
- **140.** BUCKLEY, B. J. et al., 2019. The Urokinase Plasminogen Activation System in Rheumatoid Arthritis: Pathophysiological Roles and Prospective Therapeutic Targets. Current drug targets, 20(9), 970–981
- 141. TKACHUK, V. et al., 1996. Regulation and role of urokinase plasminogen activator in vascular remodelling. Clinical and experimental pharmacology & physiology, 23(9), 759–765
- **142.** CLOWES, A. W. et al., 1990. Smooth muscle cells express urokinase during mitogenesis and tissue-type plasminogen activator during migration in injured rat carotid artery. Circulation research, 67(1), 61–67
- **143.** EATON, D. L., SCOTT, R. W., and BAKER, J. B., 1984. Purification of human fibroblast urokinase proenzyme and analysis of its regulation by proteases and protease nexin. The Journal of biological chemistry, 259(10), 6241–6247
- **144.** APPELLA, E. et al., 1987. The receptor-binding sequence of urokinase. A biological function for the growth-factor module of proteases. The Journal of biological chemistry, 262(10), 4437–4440
- **145.** PETZINGER, J., 2009. Urokinase-Rezeptor (uPAR) und Zellkontakte : Mechanismen uPAR-abhängiger Zelladhäsion, Zellmigration und Signaltransduktion; http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2011/8342/ (abgerufen: 06.09.2022; 22.30h)
- **146.** BLASI, F. et al., 1990. The urokinase receptor and regulation of cell surface plasminogen activation. Cell Differentiation and Development, 32(3), 247–253
- **147.** GHOSH, A. K., and VAUGHAN, D. E., 2012. PAI-1 in tissue fibrosis. Journal of cellular physiology, 227(2), 493–507
- **148.** MAZZIERI, R., and BLASI, F., 2005. The urokinase receptor and the regulation of cell proliferation. Thrombosis and haemostasis, 93(4), 641–646
- 149. R&D Systems Minneapolis, Human u-Plasminogen Activator/ Urokinase Quantikine ELISA Data Sheet; https://resources.rndsystems.com/pdfs/datasheets/dupa00.pdf?v=20220910&\_ga= 2.205477588.591203987.1662840614-827925671.1618234089 - abgerufen am 10.09.22; 22.24h
- **150.** KANSE, S. M., CHAVAKIS, T., and KUO, A., 2004. Variability in the expression of urokinase receptor (CD87) mutants on cells: relevance to cell adhesion. Cell Biochem Funct 2004; 22:257-264
- **151.** KANSE, S. M. et al., 1997. Induction of vascular SMC proliferation by urokinase indicates a novel mechanism of action in vasoproliferative disorders. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 17(11), 2848–2854

- **152.** KAPUSTIN, A. et al., 2012. Fibulin-5 binds urokinase-type plasminogen activator and mediates urokinase-stimulated β1-integrin-dependent cell migration. The Biochemical journal, 443(2), 491–503
- **153.** POLIAKOV, A. A. et al., 1999. Chemotactic effect of urokinase plasminogen activator: a major role for mechanisms independent of its proteolytic or growth factor domains. Journal of receptor and signal transduction research, 19(6), 939–951
- **154.** VASSALLI, J. D., BACCINO, D., and BELIN, D., 1985. A cellular binding site for the Mr 55,000 form of the human plasminogen activator, urokinase. The Journal of cell biology, 100(1), 86–92
- **155.** VASSALLI, J. D., WOHLWEND, A., and BELIN, D., 1992. Urokinase-catalyzed plasminogen activation at the monocyte/macrophage cell surface: a localized and regulated proteolytic system. Current topics in microbiology and immunology, 181, 65–86
- **156.** STOPPELLI, M. P. et al., 1985. Differentiation-enhanced binding of the aminoterminal fragment of human urokinase plasminogen activator to a specific receptor on U937 monocytes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 82(15), 4939–4943
- **157.** BLASI, F., and CARMELIET, P., 2002. uPAR: a versatile signalling orchestrator. Nature reviews. Molecular cell biology, 3(12), 932–943
- **158.** NAKATA, S. et al., 1998. Involvement of vascular endothelial growth factor and urokinase-type plasminogen activator receptor in microvessel invasion in human colorectal cancers. International Journal of Cancer, 79(2), 179–186
- **159.** HILDENBRAND, R. et al., 1998. Urokinase receptor localization in breast cancer and benign lesions assessed by in situ hybridization and immunohistochemistry. Histochemistry and cell biology, 110(1), 27–32
- **160.** DUBUISSON, L. et al., 2000. Expression and cellular localization of the urokinasetype plasminogen activator and its receptor in human hepatocellular carcinoma. The Journal of Pathology, 190(2), 190–195
- **161.** BLASI, F., VASSALLI, J. D., and DANØ, K., 1987. Urokinase-type plasminogen activator: proenzyme, receptor, and inhibitors. The Journal of cell biology, 104(4), 801–804
- **162.** JACOBSEN, B., ILLEMANN, M., and PLOUG, M., 2011. PLAUR (plasminogen activator, urokinase receptor). Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology(8)
- **163.** PLOUG, M. et al., 1991. Cellular receptor for urokinase plasminogen activator. Carboxyl-terminal processing and membrane anchoring by glycosylphosphatidylinositol. The Journal of biological chemistry, 266(3), 1926–1933
- **164.** ELLIS, V., and DANØ, K., 1991. Plasminogen activation by receptor-bound urokinase. Seminars in thrombosis and hemostasis, 17(3), 194–200
- **165.** QUAX, P. H. et al., 1998. Binding of human urokinase-type plasminogen activator to its receptor: residues involved in species specificity and binding. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 18(5), 693–701

- 166. CUNNINGHAM, O. et al., 2003. Dimerization controls the lipid raft partitioning of uPAR/CD87 and regulates its biological functions. The EMBO Journal, 22(22), 5994– 6003
- 167. BARINKA C., PARRY G., CALLAHAN J., 2006. Structural Basis of Interaction between Urokinase-type Plasminogen Activator and its Receptor. J. Mol. Biol. (2006) 363, 482-495
- **168.** CUBELLIS, M. V., WUN, T. C., and BLASI, F., 1990. Receptor-mediated internalization and degradation of urokinase is caused by its specific inhibitor PAI-1. The EMBO Journal, 9(4), 1079–1085
- 169. OLSON, D. et al., 1992. Internalization of the urokinase-plasminogen activator inhibitor type-1 complex is mediated by the urokinase receptor. The Journal of biological chemistry, 267(13), 9129–9133
- **170.** NYKJAER, A. et al., 1997. Recycling of the urokinase receptor upon internalization of the uPA:serpin complexes. The EMBO Journal, 16(10), 2610–2620
- **171.** HØYER-HANSEN, G. et al., 1992. Urokinase plasminogen activator cleaves its cell surface receptor releasing the ligand-binding domain. The Journal of biological chemistry, 267(25), 18224–18229
- **172.** THUNØ, M., MACHO, B., and EUGEN-OLSEN, J., 2009. suPAR: the molecular crystal ball. Disease markers, 27(3), 157–172
- **173.** MONTUORI, N. et al., 2002. The cleavage of the urokinase receptor regulates its multiple functions. The Journal of biological chemistry, 277(49), 46932–46939
- **174.** MONTUORI, N. et al., 2005. Soluble and cleaved forms of the urokinase-receptor: degradation products or active molecules? Thrombosis and haemostasis, 93(2), 192–198
- **175.** WILHELM, O. G. et al., 1999. Cellular glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase D regulates urokinase receptor shedding and cell surface expression. Journal of cellular physiology, 180(2), 225–235
- 176. SKOVGAARD, D. et al., 2017. Safety, Dosimetry, and Tumor Detection Ability of 68Ga-NOTA-AE105: First-in-Human Study of a Novel Radioligand for uPAR PET Imaging. Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine, 58(3), 379–386
- **177.** LUND, I. K. et al., 2011. uPAR as anti-cancer target: evaluation of biomarker potential, histological localization, and antibody-based therapy. Current drug targets, 12(12), 1744–1760
- **178.** ULISSE, S. et al., 2009. The urokinase plasminogen activator system: a target for anti-cancer therapy. Current can2cer drug targets, 9(1), 32–71
- **179.** HØYER-HANSEN, G. et al., 1997. The intact urokinase receptor is required for efficient vitronectin binding: receptor cleavage prevents ligand interaction. FEBS letters, 420(1), 79–85
- **180.** CHAVAKIS, T. et al., 2002. Haemostatic factors occupy new territory: the role of the urokinase receptor system and kininogen in inflammation. Biochemical Society transactions, 30(2), 168–173
- **181.** EDEN, G. et al., 2011. The urokinase receptor interactome. Current pharmaceutical design, 17(19), 1874–1889
- 182. XIA, W. et al., 2003. Expression of urokinase-type plasminogen activator and its receptor is up-regulated during tendon healing. Journal of Orthopaedic Research 21 (2003) 819-825
- **183.** MARCHENKO, S., and FLANAGAN, L., 2007. Counting human neural stem cells. Journal of visualized experiments: JoVE(7), 262
- **184.** MAZZOCCA, A. D. et al., 2012. In vitro changes in human tenocyte cultures obtained from proximal biceps tendon: multiple passages result in changes in routine cell markers. Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy: official journal of the ESSKA, 20(9), 1666–1672
- 185. THERMOFISHER SCIENTIFIC DATENBLATT, https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/migration/en/filelibrary/nucleicacid-amplification-expressionprofiling/pdfs.par.65119.file.dat/essentials%20of%20real%20time%20pcr.pdf - abgerufen am 10.09.2022; 21:39h
- **186.** ULLMANNOVÁ, V., and HASKOVEC, C., 2003. The use of housekeeping genes (HKG) as an internal control for the detection of gene expression by quantitative real-time RT-PCR. Folia biologica, 49(6), 211–216
- 187. BARBER, R. D. et al., 2005. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. Physiological genomics, 21(3), 389–395
- **188.** ALMARZA, A. J., AUGUSTINE, S. M., and WOO, S. L.-Y., 2008. Changes in gene expression of matrix constituents with respect to passage of ligament and tendon fibroblasts. Annals of biomedical engineering, 36(12), 1927–1933
- **189.** KIAPOUR, A. M., and MURRAY, M. M., 2014. Basic science of anterior cruciate ligament injury and repair. Bone & joint research, 3(2), 20–31
- **190.** KOBAYASHI, K. et al., 2000. Novel method for the quantitative assessment of cell migration: a study on the motility of rabbit anterior cruciate (ACL) and medial collateral ligament (MCL) cells. Tissue engineering, 6(1), 29–38
- **191.** ROSS, S. M., JOSHI, R., and FRANK, C. B., 1990. Establishment and comparison of fibroblast cell lines from the medial collateral and anterior cruciate ligaments of the rabbit. In vitro cellular & developmental biology: journal of the Tissue Culture Association, 26(6), 579–584
- **192.** BERNARD-BEAUBOIS, K. et al., 1997. Culture and characterization of juvenile rabbit tenocytes. Cell biology and toxicology, 13(2), 103–113
- **193.** YAO, L. et al., 2006. Phenotypic drift in human tenocyte culture. Tissue engineering, 12(7), 1843–1849
- 194. CEREZAL, L. et al., 2010. Anatomy, biomechanics, imaging, and management of ligamentum teres injuries. Radiographics: a review publication of the Radiological Society of North America, Inc, 30(6), 1637–1651

- **195.** DIERICKX, C. et al., 2009. Variations of the intra-articular portion of the long head of the biceps tendon: a classification of embryologically explained variations. Journal of shoulder and elbow surgery, 18(4), 556–565
- **196.** ELSER, F. et al., 2011. Anatomy, function, injuries, and treatment of the long head of the biceps brachii tendon. Arthroscopy: the journal of arthroscopic & related surgery: official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association, 27(4), 581–592
- **197.** JEONG, J. Y. et al., 2017. Morphological classification of anatomical variants of the intra-articular portion of the long head of the biceps brachii tendon and analysis of the incidence and the relationship with shoulder disease for each subtype. Journal of orthopaedic surgery (Hong Kong), 25(3), 2309499017742207
- **198.** ELLISON, A. E., and BERG, E. E., 1985. Embryology, anatomy, and function of the anterior cruciate ligament. The Orthopedic clinics of North America, 16(1), 3–14
- **199.** MARKATOS, K. et al., 2013. The anatomy of the ACL and its importance in ACL reconstruction. European journal of orthopaedic surgery & traumatology: orthopedie traumatologie, 23(7), 747–752
- **200.** DUTHON, V. B. et al., 2006. Anatomy of the anterior cruciate ligament. Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy: official journal of the ESSKA, 14(3), 204–213
- **201.** MURRAY, M. M. et al., 2000. Histological changes in the human anterior cruciate ligament after rupture. The Journal of bone and joint surgery. American volume, 82(10), 1387–1397
- **202.** SPINDLER, K. P. et al., 2006. The central ACL defect as a model for failure of intraarticular healing. Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society, 24(3), 401–406
- **203.** HASEGAWA, A. et al., 2013. Cellular and extracellular matrix changes in anterior cruciate ligaments during human knee aging and osteoarthritis. Arthritis research & therapy, 15(1), R29
- **204.** ISMAIL, A. A., Shaker, B. T., and Bajou, K., 2021. The Plasminogen-Activator Plasmin System in Physiological and Pathophysiological Angiogenesis. International Journal of Molecular Sciences, 23(1)
- **205.** ROŚĆ, D. et al., 2002. Post-traumatic plasminogenesis in intraarticular exudate in the knee joint. Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research, 8(5), CR371-8
- **206.** BAKIRCI, E. et al., 2020. The importance of plasmin for the healing of the anterior cruciate ligament. Bone & joint research, 9(9), 543–553
- **207.** KRAUS, A. et al., 2018. Vascular Endothelial Growth Factor Enhances Proliferation of Human Tenocytes and Promotes Tenogenic Gene Expression. Plastic and reconstructive surgery, 142(5), 1240–1247
- **208.** CHANG, M.-C. et al., 2018. Effects of TGF-β1 on plasminogen activation in human dental pulp cells: Role of ALK5/Smad2, TAK1 and MEK/ERK signalling. Journal of tissue engineering and regenerative medicine, 12(4), 854–863

- **209.** RASCH, M. G. et al., 2008. Intact and cleaved uPAR forms: diagnostic and prognostic value in cancer. Frontiers in bioscience: a journal and virtual library, 13, 6752–6762
- **210.** TUCKER, R. P., and CHIQUET-EHRISMANN, R., 2015. Tenascin-C: Its functions as an integrin ligand. The international journal of biochemistry & cell biology, 65, 165–168
- **211.** RILEY, G. P. et al., 1996. Tenascin-C and human tendon degeneration. The American Journal of Pathology, 149(3), 933–943
- **212.** NEMOTO, M. et al., 2013. Tenascin-C Expression in Equine Tendon-derived Cells During Proliferation and Migration. Journal of equine science, 24(2), 17–24
- **213.** NISHIO, T. et al., 2005. Tenascin-C regulates proliferation and migration of cultured astrocytes in a scratch wound assay. Neuroscience, 132(1), 87–102
- **214.** ALBERTON, P. et al., 2015. Loss of tenomodulin results in reduced self-renewal and augmented senescence of tendon stem/progenitor cells. Stem cells and development, 24(5), 597–609
- 215. YIN, Z. et al., 2016. Stepwise Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Augments Tendon-Like Tissue Formation and Defect Repair In Vivo. Stem cells translational medicine, 5(8), 1106–1116
- **216.** BAGCHI, R. A., and CZUBRYT, M. P., 2012. Synergistic roles of scleraxis and Smads in the regulation of collagen 1α2 gene expression. Biochimica et biophysica acta, 1823(10), 1936–1944
- **217.** ZEGLINSKI, M. R. et al., 2016. TGFβ1 regulates Scleraxis expression in primary cardiac myofibroblasts by a Smad-independent mechanism. American journal of physiology. Heart and circulatory physiology, 310(2), H239-49
- **218.** SHUKUNAMI, C. et al., 2018. Scleraxis is a transcriptional activator that regulates the expression of Tenomodulin, a marker of mature tenocytes and ligamentocytes. Scientific reports, 8(1), 3155
- **219.** LIU, Q. et al., 2006. Expression of Scleraxis in human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts. Zhonghua kou qiang yi xue za zhi = Zhonghua kouqiang yixue zazhi = Chinese journal of stomatology, 41(9), 556–558
- **220.** CHANG, A. W. et al., 1998. Urokinase receptor-dependent upregulation of smooth muscle cell adhesion to vitronectin by urokinase. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 18(12), 1855–1860
- 221. ANDREASEN, P. A., EGELUND, R., and PETERSEN, H. H., 2000. The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis. Cellular and molecular life sciences: CMLS, 57(1), 25–40
- **222.** OSSOWSKI, L., and AGUIRRE-GHISO, J. A., 2000. Urokinase receptor and integrin partnership: coordination of signaling for cell adhesion, migration and growth. Current Opinion in Cell Biology, 12(5), 613–620
- **223.** JO, M. et al., 2007. Urokinase receptor primes cells to proliferate in response to epidermal growth factor. Oncogene, 26(18), 2585–2594

- **224.** LIU, D. et al., 2002. EGFR is a transducer of the urokinase receptor initiated signal that is required for in vivo growth of a human carcinoma. Cancer cell, 1(5), 445–457
- **225.** AGUIRRE-GHISO, J. A. et al., 2001. Urokinase receptor and fibronectin regulate the ERK(MAPK) to p38(MAPK) activity ratios that determine carcinoma cell proliferation or dormancy in vivo. Molecular biology of the cell, 12(4), 863–879
- **226.** DUMLER, I. et al., 1999. Urokinase activates the Jak/Stat signal transduction pathway in human vascular endothelial cells. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 19(2), 290–297
- **227.** NICHOLL, S. M. et al., 2005. Plasmin induces smooth muscle cell proliferation. The Journal of surgical research, 127(1), 39–45

## 8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

## 8.1 Abbildungen

Abb. 1: Schematische Darstellung der embryologischen Entwicklung von Sehnen und
Bändern im sogenannten Syndetom 3
Abb. 2: Hierarchischer Aufbau einer Sehne5
Abb. 3: Übersicht über pathologische Sehnenveränderungen modifiziert nach Hopkins et al. 7
Abb. 4: Schematische Darstellung der bekanntesten Sehnennaht nach Kirchmayr-Kessler. 10
Abb. 5: Primärstruktur von uPA13
Abb. 6: Primärstruktur von uPAR14
Abb. 7: Schematischer Ablauf der Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer
Abb. 8: Schematischer Ablauf der PCR 22
Abb. 9: Beispielhafte grafische Darstellung der Amplifikationsvorgänge mittels StepOne Software
Abb. 10: Schematischer Ablauf der Reversen Transkription
Abb. 11: Schematische Darstellung der verwendeten ELISA-Sandwich-Methode 29
Abb. 12: Belegungsplan für die Durchführung des ELISA
Abb. 13: Altersverteilung der absoluten Probenanzahl
Abb. 14: Altersverteilung nach Probenursprung
Abb. 15: Altersverteilung im Vergleich intra- und extrasynovialer Verlauf
Abb. 16 A-C: Native Tendozyten (hier Ursprung Bizepssehne) in Zellkultur nach 1 (A), 7 (B) und 14 (C) Tagen im lichtmikroskopischen Bild (Objektiv 10x)
Abb. 17: Absolute Zellzahl der einzelnen Subgruppen
Abb. 18: Generationszeit in Stunden (g [h]) der Versuchstage 1 bis 14
Abb. 19: Teilungsrate (n/24h) als Ausdruck der Proliferation im Vergleich der Gruppen über den Versuchszeitraum
Abb. 20: Generationszeit (g[h]) im Vergleich intra-/ extrasynovialer Verlauf
Abb. 21:Vergleich der Teilungsrate (n/24h) im intra-/ extrasynovialen Verlauf
Abb. 22: Korrelation von Alter (Jahre) und durchschnittlicher Proliferation (n/24h) 42

Abb. 23: Relative Expression von Collagen 1A1 im Verlauf der Zeit
Abb. 24: Relative Expression von Scleraxis im Verlauf der Zeit
Abb. 25: Relative Expression von Tenascin C im Verlauf der Zeit
Abb. 26 A-B: Relative Expression von Tenomodulin im Verlauf der Zeit
Abb. 27: Relative Expression von uPA im Verlauf der Zeit
Abb. 28: Relative Expression von uPAR im Verlauf der Zeit
Abb. 29: Relative Expression von Collagen 1A1 im Vergleich intra-/ extrasynovialer Verlauf.
Abb. 30: Relative Expression von Scleraxis im Vergleich intra-/ extrasynovialer Verlauf 53
Abb. 31: Relative Expression von Tenascin C im Vergleich intra-/ extrasynovialer Verlauf 54
Abb. 32: Relative Expression von Tenomodulin im Vergleich intra-/ extrasynovialer Verlauf.55
Abb. 33: Relative Expression von uPA im Vergleich intra- /extrasynovialer Verlauf
Abb. 34: Relative Expression von uPA im Vergleich intra-/ extrasynovialer Verlauf ohne Achillessehnen- und Patellarsehnenprobe
Abb. 35: Relative Expression von uPAR im Vergleich intra-/ extrasynovialer Verlauf
Abb. 36: Korrelation von Teilungsrate (n/24h) und relativer Expression von uPA 59
Abb. 37: Korrelation von Teilungsrate (n/24h) und relativer Expression von uPAR 59
Abb. 38: uPA-ELISA
Abb. 39: uPAR-ELISA
Abb. 40: Freisetzung von uPA ins Zellkulturmedium (pg/ mL, summiert) im Versuchszeitraum d 1 - 14
Abb. 41: Freisetzung von uPA ins Zellkulturmedium unter Einbeziehung der erreichten Zellzahlen (pg/ Zelle, summiert) im Versuchszeitraum d 1 - 14 64
Abb. 42: Freisetzung von uPA ins Zellkulturmedium (pg/ Zelle) im intra-/ extrasynovialen Vergleich
Abb. 43: Freisetzung von uPAR ins Zellkulturmedium (pg/ mL, summiert) im Versuchszeitraum d 1 - 14
Abb. 44: Freisetzung von uPAR ins Zellkulturmedium unter Einbeziehung der erreichten Zellzahlen (pg/ Zelle, summiert) im Versuchszeitraum d 1 - 14 68
Abb. 45: Freisetzung von uPAR ins Zellkulturmedium (pg/ Zelle) im Vergleich von intra-/ extrasynovialem Verlauf

Abb. 46: Übersicht der bisher untersu	uchten bzw. nachgewiesenen Interaktionswege von uPA
und uPAR	

## 8.2 Tabellen

Tabelle 1: Standardmedium
Tabelle 2: Einfriermedium
Tabelle 3: Übersicht der geplant ausgebrachten Zellzahlen bei der Anlage der Zellkulturen
für die einzelnen Versuchstage
Tabelle 4: Übersicht über die Kulturen mit von Tabelle 3 abweichenden Zellzahlen 20
Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Primer-Sequenzen
Tabelle 6: Übersicht über die Proben und die Zuordnung zum Entnahmeort, Geschlecht und
Alter der Spender
Tabelle 7: Subgruppierung mit Einteilung nach anatomischem Verlauf
Tabelle 8: Schnellste Generationszeit in Stunden (g[h]) je Versuchstag
Tabelle 9: Langsamste Generationszeit in Stunden (g[h]) je Versuchstag
Tabelle 10: Übersicht über die durchschnittlichen Generationszahlen (n/24h) der
unterschiedlichen Probenursprünge an den Versuchstagen d1 - d14
Tabelle 11: Durchschnittliche Generationszeit (g[h]) in den intra-/extrasynovialen Gruppen an
den Versuchstagen d1 - d14 39
Tabelle 12: Vergleich der durchschnittlichen Teilungsrate (n/24h) im intra-/ extrasynovialen
Verlauf
Tabelle 13: Durchschnittlicher uPA-Gehalt (pg/ Zelle) der Probenursprünge63
Tabelle 14: Durchschnittlicher uPAR-Gehalt (fg/ Zelle) der Probenursprünge67

## 9 Danksagung

Als Erstes möchte ich Prof. Dr. med. R. Krauspe danken, der mir die Möglichkeit gab, in seiner Klinik die vorliegende Arbeit durchzuführen, auch wenn es deutlich länger als erhofft gedauert hat. Ebenso danken möchte ich Fr. Dr. rer. nat. M. Herten und Dr. med. J. Kircher, die die Fragestellung erarbeitet haben und die Arbeit auf den Weg brachten. Unser gemeinsamer Weg war kurz, aber der wichtige Startschuss für die gesamte Arbeit. Ein großer Dank geht an Sabine Lensing-Höhn, die die Konstante im Forschungslabor in der langen Zeit war und mir stets hilfsbereit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ganz besonders danken möchte ich Fr. Dr. rer. nat. Julia Fröbel. Du hast zwar anfangs Vieles an meiner Arbeit über den Haufen geworfen, aber sie dadurch am Ende nur besser gemacht. Ich danke dir für deine Kritiken, Korrekturen und sonstige Hilfen, ohne die ich jetzt nicht an diesem Punkt angekommen wäre. Ebenso Dank gebührt PD Dr. med. Bernd Bittersohl. Danke, für dein: "Puh!" zu Beginn der Zusammenarbeit (besser hätte ich meine Gefühle der Arbeit gegenüber auch nicht ausdrücken können) und die positiven Rückmeldungen, nachdem du die Betreuung übernehmen durftest. Ohne diese Motivation hätte ich das Vorhaben schon längst aufgegeben.

Zum Schluss ganz besonders danken möchte ich meiner Familie, vor allem meinem Ehemann und meinen Töchtern. Ich danke euch für eure Geduld und auch für das penetrante Nerven. Ich liebe euch und bin wahnsinnig stolz auf euch!

Alina und Maike – Jetzt seid ihr dran!