

**Immunhistologische Charakterisierung der Expression des
Komplementfaktor-Rezeptors C5aR1 in normalen und
neoplastischen humanen Geweben mit Hilfe eines neuen
Kaninchen-Antikörpers**

Dissertation

**zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)**

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

vorgelegt von

Benjamin Nürge

geboren am 28. Dezember 1994 in Saalfeld

Gutachter:

1. Frau apl. Prof. Dr. med. Amelie Lupp
(Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Jena,
Drackendorfer Str. 1, 07747 Jena)
2. Herr PD Dr. med. Daniel Kämmerer
(Viszeralchirurgie, Zentralklinik Bad Berka, Robert-Koch-Allee 9, 99438 Bad
Berka)
3. Frau PD Dr. med. Heike Franke
(Rudolf-Boehm-Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Leipzig,
Härtelstraße 16-18, 04107 Leipzig)

Tag der öffentlichen Verteidigung: 30.03.2021

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	1
2	Einleitung	3
2.1	Definition des Komplementsystems	3
2.2	Bestandteile des Komplementsystems.....	3
2.3	Aktivierungswege	4
2.3.1	Klassische Aktivierung	5
2.3.2	Alternative Aktivierung	7
2.3.3	„Lektin-Weg“-Aktivierung	8
2.3.4	Aktivierung durch das C-reaktive Protein.....	10
2.3.5	Der Membran-Angriffskomplex	10
2.4	Der Rezeptor C5aR1.....	11
2.4.1	Aufbau und Funktion des Rezeptors C5aR1.....	11
2.4.2	Die Pathophysiologie des Rezeptors C5aR1	14
2.4.2.1	Der Rezeptor C5aR1 im Entzündungsgeschehen.....	14
2.4.2.2	Der Rezeptor C5aR1 bei verschiedenen Erkrankungen.....	16
3	Zielsetzung.....	20
4	Material und Methoden	21
4.1	Proben.....	21
4.1.1	Geräte und Materialien zur Probenaufbereitung	21
4.2	Immunhistochemie	22
4.2.1	Materialien und Gerätschaften für die Immunhistochemie	22
4.2.2	Prinzip der Immunhistochemie.....	24
4.2.3	Durchführung der Immunhistochemie	25
4.2.4	Auswertung der Immunhistochemie.....	28
4.2.4.1	Lichtmikroskopie.....	28
4.2.4.2	Immunreaktiver Score	28

5	Ergebnisse	30
5.1	Immunhistochemische Untersuchungen	30
5.1.1	Immunhistochemische Untersuchungen an humanen Normalgeweben	30
5.1.1.1	Cortex.....	30
5.1.1.2	Hypophyse	31
5.1.1.3	Hinterwurzelganglien	31
5.1.1.4	Tonsillen.....	32
5.1.1.5	Thymus.....	33
5.1.1.6	Herz und Herzohr	33
5.1.1.7	Lunge	34
5.1.1.8	Milz.....	35
5.1.1.9	Leber	36
5.1.1.10	Pankreas	37
5.1.1.11	Niere.....	38
5.1.1.12	Darm.....	39
5.1.1.13	Placenta	40
5.1.1.14	Knochen und Knochenmark	40
5.1.2	Immunhistochemische Untersuchungen an humanen Tumorgeweben	42
5.1.2.1	Glioblastom	42
5.1.2.2	Meningeom.....	42
5.1.2.3	Hypophysenadenom	43
5.1.2.4	Schilddrüsen-Karzinome	44
5.1.2.4.1	Papilläres Schilddrüsen-Karzinom	44
5.1.2.4.2	Follikuläres Schilddrüsen-Karzinom	45
5.1.2.4.3	Medulläres Schilddrüsen-Karzinom.....	45
5.1.2.4.4	Anaplastisches Schilddrüsen-Karzinom	46
5.1.2.5	Lungentumore	47

5.1.2.5.1	Adenokarzinom der Lunge	47
5.1.2.5.1	Plattenepithel-Karzinom der Lunge	47
5.1.2.5.2	Kleinzelliges Bronchialkarzinom	48
5.1.2.5.3	Bronchopulmonale neuroendokrine Neoplasie	48
5.1.2.6	Mamma-Karzinom	49
5.1.2.7	Magen-Karzinom	50
5.1.2.8	Lebertumore	51
5.1.2.8.1	Hepatozelluläres Karzinom	51
5.1.2.8.2	Cholangiozelluläres Karzinom	51
5.1.2.9	Pankreas-Karzinom	52
5.1.2.10	Neuroendokriner Tumor des Pankreas	53
5.1.2.11	Colon-Karzinom	53
5.1.2.12	Gastrointestinaler Stromatumor	54
5.1.2.13	Phäochromozytom	55
5.1.2.14	Klarzelliges Nieren-Karzinom	55
5.1.2.15	Prostata-Karzinom	56
5.1.2.16	Hoden-Karzinom	56
5.1.2.17	Endometrium-Karzinom	57
5.1.2.18	Cervix-Karzinom	58
5.1.2.19	Ovarial-Karzinom	59
5.1.2.20	Melanom	59
5.1.2.21	Lymphom	60
5.1.2.22	Sarkome	61
5.2	Zusammenfassung der immunhistochemischen Ergebnisse	64
6	Diskussion	67
6.1	Immunhistochemische Untersuchungen an humanem Normalgewebe	67
6.2	Immunhistochemische Untersuchung an humanen Tumorgeweben	76

7	Schlussfolgerungen.....	84
8	Literaturverzeichnis.....	86
9	Anhang.....	100
9.1	Lebenslauf.....	100
9.2	Eidesstaatliche Erklärung.....	101
9.3	Danksagung.....	102

Abkürzungsverzeichnis

AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
Ak	Antikörper
Ca	Karzinom
CD	Cluster of differentiation
CRP	C-reaktives Protein
ERK	Extracellular regulated kinase
GDP	Guanosindiphosphat
GIST	Gastrointestinaler Stromatumor
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GRK	G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase
GTP	Guanosintriphosphat
IL	Interleukin
IP3	Inositoltriphosphat
IRS	Immunreaktiver Score
kDa	Kilodalton
MAC	Membrane attack complex (Membran-Angriffskomplex)
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MASP	MBL-associated serine proteases
MBL	Mannose-bindendes Lektin
MPS	Mononukleäres-Phagozytäres System

NET	Neuroendokriner Tumor / neuroendokrine Tumore
NK	Natürliche Killerzelle(n)
PBS	Phosphate-buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PD-1	Programmed cell death protein 1
PI3P	Phosphatidylinositol-3-Phosphat
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat
PMN	Polymorphonuclear leukocytes (polymorphkernige Leukozyten)
PP	Percentage points
RSA	Rinderserumalbumin
SCLC	Small cell lung cancer (Kleinzelliges Bronchialkarzinom)
SI	Staining Intensity
TNF- α	Tumornekrosefaktor α

1 Zusammenfassung

Das Komplementsystem gehört zum angeborenen, unspezifischen Teil des Immunsystems und ist äußerst wichtig für die Abwehr von Krankheitserregern. Im Laufe der Reaktionskaskade werden unterschiedliche Proteine des Komplementsystems gespalten und lagern sich zu neuen Funktionseinheiten zusammen. Ein Komplementfragment, welches durch solch eine Abspaltung gebildet wird, ist C5a. Es wirkt als Anaphylatoxin stark proinflammatorisch und fördert die Chemotaxis von Immunzellen sowie die Ausschüttung von Zytokinen und ist unter anderem an der Degranulation von Mastzellen beteiligt. Diese biologischen Wirkungen werden über den G-Protein-gekoppelten Rezeptor C5aR1 vermittelt, welcher drei Bindungsstellen für C5a aufweist. Aus der Literatur ist die zentrale Rolle dieses Rezeptors im Entzündungsgeschehen schon länger bekannt, zusätzlich nahm mit der Entdeckung des C5aR1 in einigen Tumorgeweben die medizinische Bedeutung als mögliche Zielstruktur für die Therapie und die Diagnostik von Tumoren enorm zu.

Vor diesem Hintergrund war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, die C5aR1-Expression an einer großen Serie von insgesamt 330 in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten menschlichen Normal- und Tumorgeweben mittels Immunhistochemie zu analysieren, um ein umfassendes Expressionsprofil dieses Rezeptors für den menschlichen Körper und die entsprechenden Neoplasien zu erhalten. Hierbei wurden zahlreiche Tumorentitäten erstmals auf eine Präsenz des C5aR1 hin untersucht. Für die Färbungen wurde ein in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Jena und der Firma Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, neu generierter Kaninchen-Antikörper gegen den humanen C5aR1 verwendet, der in Vorarbeiten zu der vorliegenden Studie hinsichtlich seiner Sensitivität und Spezifität ausführlich charakterisiert worden war. Jedes Präparat wurde lichtmikroskopisch mit Hilfe des Immunreaktiven Scores nach Remmele und Stegner ausgewertet, in den sowohl der prozentuale Anteil an gefärbten Zellen als auch die Intensität der Färbung eingehen.

Im Ergebnis konnte der Rezeptor unabhängig von einer Färbung organ- oder gewebespezifischer Zellen in nahezu allen untersuchten Präparaten in verschiedenen Immunzellen wie Monozyten, Makrophagen, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, dendritischen Zellen und Mastzellen nachgewiesen werden.

In den normalen menschlichen Geweben konnte weiterhin eine starke C5aR1-Expression insbesondere in Neuronen, Astrozyten und Mikrogliazellen des Cortex, in den Alveolarmakrophagen und in den Bronchialepithelien der Lunge, in Makrophagen in der roten Pulpa der Milz, in den Kupfferzellen und Gallengangsepithelien sowie teilweise auch in den Hepatozyten der Leber, im Darmepithel, in den Synzytiotrophoblasten der Plazenta und in bestimmten Stammzellpopulationen im Knochenmark nachgewiesen werden. Von den insgesamt 33 der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Tumorentitäten fand sich ein hoher Anteil an Neoplasien mit einer starken C5aR1-Expression vor allem bei den Schilddrüsen-Karzinomen, bei den kleinzelligen Bronchialkarzinomen und neuroendokrinen Tumoren der Lunge, bei den hepatozellulären und cholangiozellulären Karzinomen, bei den Pankreas-Karzinomen, bei den Gastrointestinalen Stromatumoren, bei den klarzelligen Nieren-Karzinomen sowie bei den Ovarial- und Endometrium-Karzinomen. Aber auch bei allen anderen untersuchten Tumorentitäten fanden sich mit nur wenigen Ausnahmen, wie bei den Phäochromozytomen, Leiomyosarkomen, pleomorphen Sarkomen oder Liposarkomen, zahlreiche Neoplasien mit einer mittelstarken bis starken C5aR1-Expression. Insgesamt konnten in vielen Fällen bereits existierende Literaturangaben bestätigt werden, wobei für einige Entitäten in der Literatur auch gezeigt werden konnte, dass eine hohe C5aR1-Expression mit einem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung und mit einer schlechten Prognose für die Patienten einhergeht. Da in einigen der in der vorliegenden Arbeit erstmals auf eine C5aR1-Expression hin analysierten Tumore eine starke Präsenz des Rezeptors verzeichnet werden konnte, die möglicherweise von diagnostischer oder therapeutischer Relevanz sein könnte, wie bei den Schilddrüsen-Karzinomen, kleinzelligen Bronchialkarzinomen und neuroendokrinen Tumoren der Lunge, Gastrointestinalen Stromatumoren und Endometrium-Karzinomen, sollten in diesen Fällen weiterführende Untersuchungen mit größeren Fallzahlen und unter Einbeziehung der klinischen Daten der Patienten durchgeführt werden.

Insgesamt konnte mit der vorliegenden Arbeit ein weiterer Beitrag zur Erfassung der C5aR1-Expression in verschiedenen Normal- und Tumorgeweben des Menschen geleistet sowie eine Grundlage für zukünftige Untersuchungen hinsichtlich einer möglichen klinischen Relevanz dieses Rezeptors für bestimmte Tumorentitäten geschaffen werden. Für einige der untersuchten Tumorarten könnten sich in Zukunft so möglicherweise neue diagnostische oder therapeutische Optionen ergeben.

2 Einleitung

2.1 Definition des Komplementsystems

Zum angeborenen, unspezifischen und humoralen Teil des Immunsystems zählt das Komplementsystem, welches von Paul Ehrlich Ende des 19. Jahrhunderts definiert wurde. Dieses besteht aus zahlreichen verschiedenen Plasmaproteinen, C1-C9, welche in der Leber synthetisiert und ins Blut sezerniert werden. Die Bestandteile dieses Systems befinden sich hauptsächlich auf Zelloberflächen als Zymogene gebunden oder im Zellplasma (Rassow et al. 2016). Pathogene Zellen werden über das Komplementsystem durch eine enzymatische Kaskade entweder opsoniert oder durch Lyse gezielt ausgeschaltet. Dadurch wird eine Reihe von Entzündungsprozessen gestartet, welche die Infektion gezielt bekämpfen. Aktiviert werden kann dieser Prozess einerseits durch die Wechselwirkung mit Antikörpern (klassischer Weg), aber auch gänzlich ohne die Mithilfe dieser (alternativer Weg). Ebenso wird eine Aktivierung über das Mannose-bindende Lektin (MBL) beschrieben (Lektin-Weg). Der Signalweg des Komplementsystems ist mit dem der Blutgerinnung vergleichbar, bei der ebenfalls größere Enzymkaskaden durchlaufen werden (Janeway et al. 2001).

2.2 Bestandteile des Komplementsystems

Ferrata und Brand untersuchten bereits 1907 die einzelnen Faktoren des Komplementsystems. Beide gingen davon aus, dass das Komplementsystem nicht nur aus einem Element besteht. Sie teilten das System in eine Mittel- und Endkomponente ein und entdeckten, dass eine bakterizide Wirkung nur auftreten kann, wenn beide Teile vorhanden sind. Diese beiden Komponenten wurden später in C1 und C2 umbenannt (Nesargikar et al. 2012). Coca und Ritz separierten einige Jahre später den Faktor C3 durch ein Inaktivierungsverfahren mit Hefezellen. Die Abtrennung von C4 erfolgte durch die Zugabe von Ammoniak. Diese Faktoren sind nach der Reihenfolge ihrer Entdeckung benannt, nicht aber nach ihrer eigentlichen Abfolge im System. C3 wurde schließlich mit verbesserten Elektrophorese- und Zentrifugationsmethoden untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass dieser Komplex aus 6 Proteinen besteht, welche mit C3a bis C3f betitelt wurden. Den klassischen Aktivierungsverlauf beschrieb Nelson 1920 mit folgender Reihenfolge: C1, C2, C3a, C3b, C3e, C3f, C3c und C3d. Schließlich wurde 1968 eine

Vereinheitlichung und Vereinfachung der Nomenklatur der Komplementfaktoren durch die World Health Organization (WHO) vorgenommen und diese wie folgt bezeichnet: C1, C4, C2, C3, C5, C6, C7, C8, C9 (Nesargikar et al. 2012, Gadjeva 2014).

2.3 Aktivierungswege

Die Voraussetzungen für die Einleitung der Komplementkaskade können sehr vielfältig sein. Bisher gibt es 4 Aktivierungswege, welche alle auf ein Ziel hinauslaufen – der Zerstörung des eingedrungenen Erregers (Abbildung 1). Notwendig ist auf jeden Fall zunächst eine Detektion der pathogenen Zellen, um eine Reaktion auszulösen. Diese Kaskade ist ähnlich dem Gerinnungssystem, welches erst anfängt abzulaufen, wenn u.a. freies Kollagen durch eine Endothelverletzung erkannt wird (Hahn 2011, Nesargikar et al. 2012).

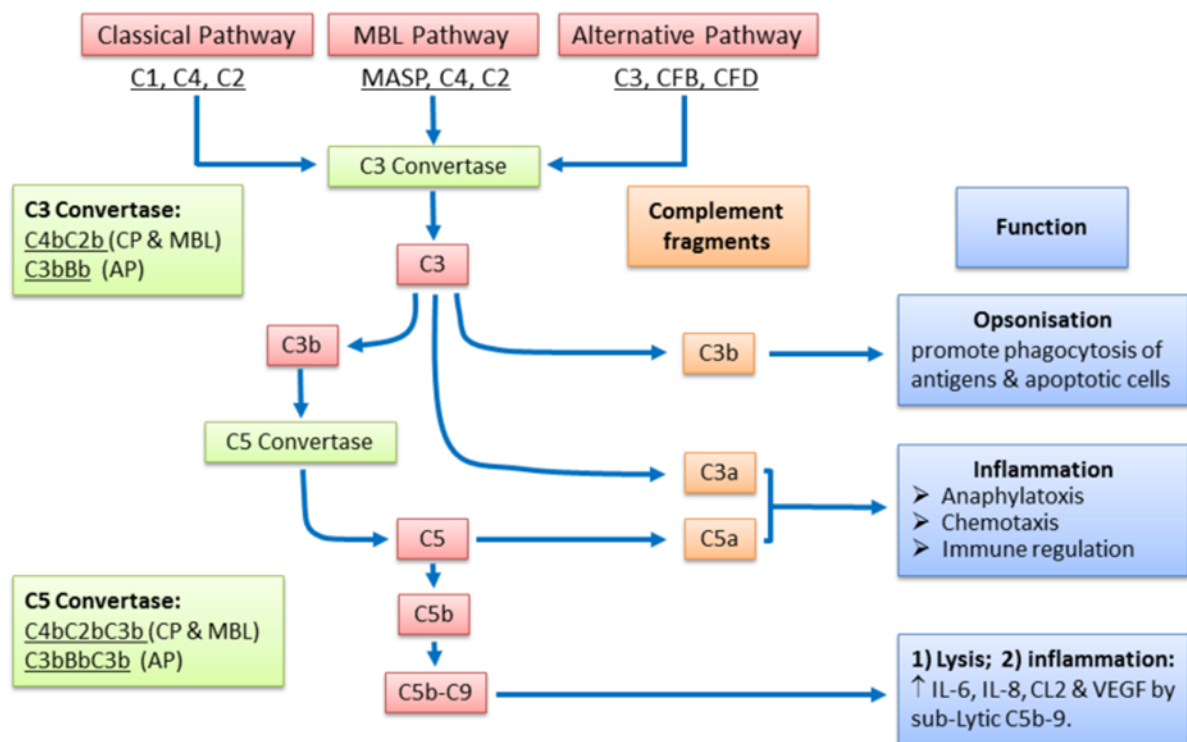


Abbildung 1: Aktivierungswege des Komplementsystems (Xu und Chen 2016).

2.3.1 Klassische Aktivierung

Dieser Aktivierungsweg ist Antikörper-abhängig. Voraussetzung für die Auslösung der Kaskade sind an ein Antigen gebundene IgG- bzw. IgM-Antikörper (Abbildung 2). IgM sind vorwiegend im frühen Stadium einer Infektion anzutreffen, wohingegen IgG erst in späteren Phasen auftreten. Die Antikörper heften sich mit ihrem Fab-Teil an die pathogene Zelle und markieren diese. An die freie Stelle, den Fc-Teil, kann nun das erste Protein C1q des Komplementsystems binden (Rassow et al. 2016).

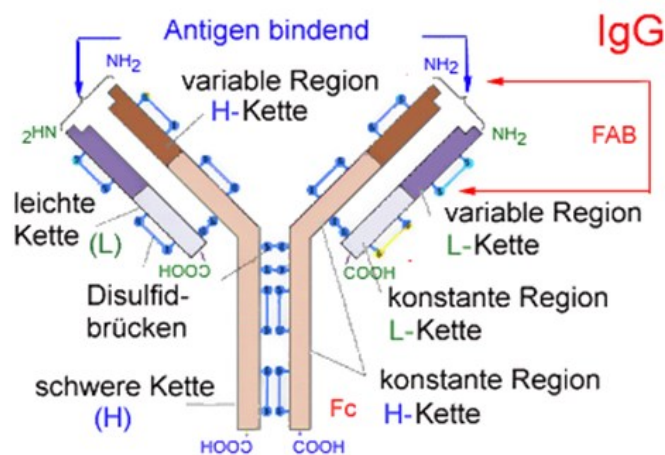


Abbildung 2: Schematischer Aufbau eines IgG-Antikörpers (<http://www.zum.de/Faecher/Materialien/beck/12/bs12-54.htm>. Zugriff am: 27.03.2020, 07:55 Uhr).

Dadurch wird C1r aktiviert, welches C1s vom C1-Komplex abspaltet. Die Serin-Protease C1s spaltet wiederum C4 und C2 auf. Es entstehen C4a, C4b, C2a und C2b. C4a wirkt anaphylatoxisch (siehe Tabelle 1). Es sorgt für eine erhöhte Ausschüttung von Histamin, wodurch die Durchblutung an der Infektionsstelle stark erhöht wird (Gorski et al. 1981). C4b und C2a formieren sich zu einem neuen Komplex, C4b2a. Dieser neu gebildete Faktor wird auch als C3-Konvertase bezeichnet und führt im Folgenden zur enzymatischen Aufspaltung von C3 in C3a und C3b. C3a besitzt eine ähnliche anaphylatoxische Wirkung wie C4a. C3b bindet an den schon vorhandenen C3-Konvertase-Komplex (C4b2a) und formt daraus die C5-Konvertase (C4b2a3b), welche C5 in C5a und C5b spaltet (Abbildung 3). C5a besitzt ebenfalls eine anaphylatoxische Wirkung. C5b wird in die Zellmembran eingebaut und führt dort zur Bildung eines Membran-Angriffskomplexes (MAC), welcher die Lyse der Zielzelle einleitet (Nesargikar et al. 2012).

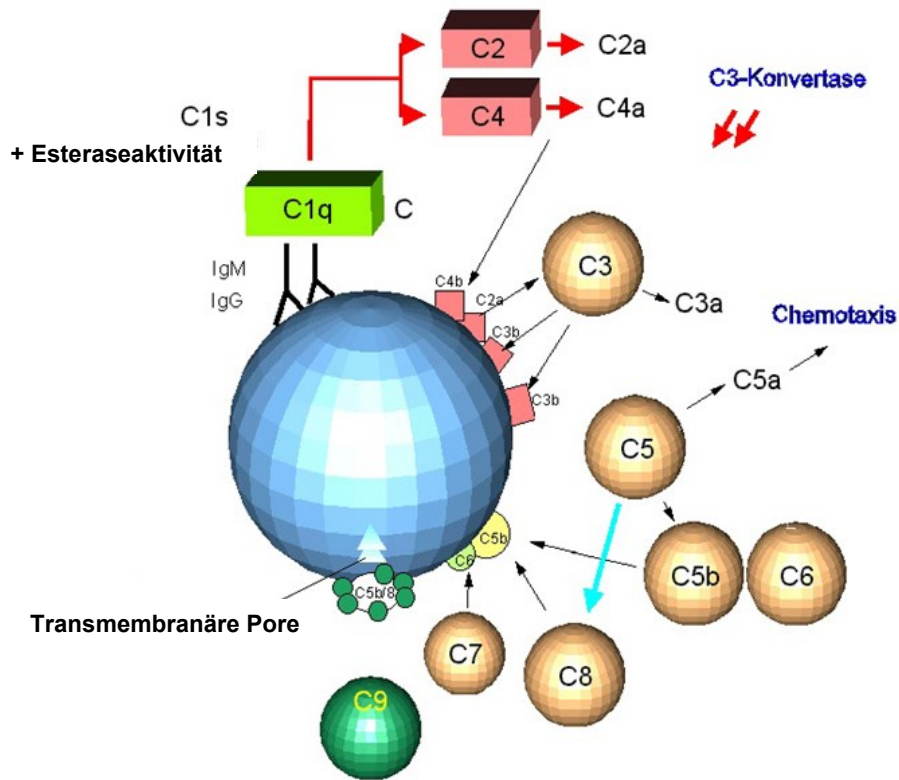


Abbildung 3: Schematische Darstellung des klassischen Aktivierungsweges (modifiziert nach http://members.inode.at/593070/patho/05_unspez_abwehr/komplementsystem.htm. Zugriff am 27.03.2020, 21:14 Uhr).

Tabelle 1: Wirkung einzelner Komplementfragmente (Doenicke et al. 2013).

<u>Faktor</u>	<u>Wirkung</u>
C3a	Anaphylatoxische Wirkung
C3b	Opsonierung, Immunadhärenz
C4a	Anaphylatoxische Wirkung
C4b	Virusneutralisation
C5a	Anaphylatoxische Wirkung, Chemotaxis, Degranulation von polymorphkernigen Leukozyten (PMN) und Zellen des Mononukleären-Phagozytären Systems (MPS), Aktivierung von PMN und von Zellen des MPS, Sekretion von IL-1

2.3.2 Alternative Aktivierung

Eine weitere Aktivierungsmöglichkeit wurde etwa 50 Jahre nach der Entdeckung des klassischen Weges gefunden. Louis Pillemer stellte die Vermutung auf, dass Komplementfaktoren ebenfalls durch direkte Bindung an ein Bakterium einen Ablauf der Kaskade auslösen können. Diese Art der Aktivierung wurde erst als Properdin-Weg beschrieben, später wurde dieser Weg in „alternative Aktivierung“ umbenannt (Pillemer et al. 1954). Im Gegensatz zum klassischen Aktivierungsweg werden für diese Kaskade die Komplementfaktoren C1, C2 und C4 nicht benötigt (Abbildung 4).

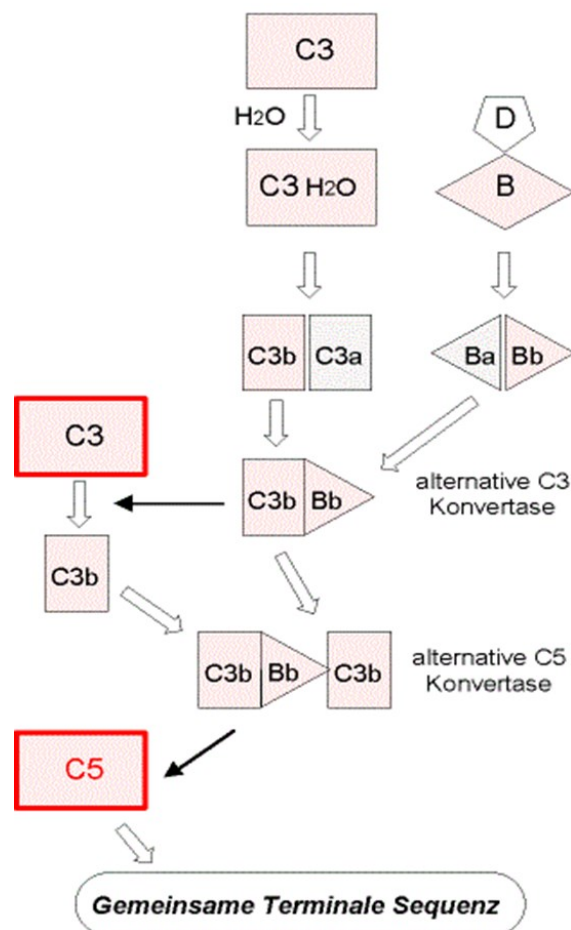


Abbildung 4: Schematische Abfolge der alternativen Aktivierung des Komplementsystems (modifiziert nach: http://members.inode.at/593070/patho/05_unspez_abwehr/komplementsystem.htm. Zugriff am 02.03.2020, 14:12 Uhr).

Der Komplex beginnt mit der Anheftung von C3 an der Oberfläche eines Pathogens (Bakterien, Pilze etc.). Anschließend zerfällt C3 durch spontane Hydrolyse, wodurch seine Oberflächenstruktur derart verändert wird, dass "falsches C3b" (iC3, oder C3_{H2O}) entsteht. An den so gebildeten Faktor iC3 lagert sich der Faktor B an. Dadurch wird die

Struktur von B ebenfalls so verändert, dass der Faktor D einen Teil von Faktor B abspalten kann. Hierbei wird Ba abgetrennt, wohingegen Bb am iC3 gebunden bleibt. Der so gebildete iC3Bb-Komplex ist sehr instabil, wird jedoch durch Magnesiumionen und Properdin stabilisiert (Pillemer et al. 1954, Schmidt 2013). Der als „alternative C3-Konvertase“ bezeichnete iC3Bb-Komplex trennt nun den Faktor C3 in C3a und C3b auf. Dieses „richtige C3b“ dockt nachfolgend an den Faktor B an, wodurch der Faktor B durch den Faktor D in Ba und Bb aufgespalten wird. Das Bb bleibt am C3b gebunden und bildet den Komplex C3bBb. Nichtgebundenes C3b wird anschließend in unwirksames „fluid-phase-C3b“ umgewandelt und von Erythrozyten aufgenommen (Arnaout et al. 1981, Salama und Mueller-Eckhardt 1985). C3bBb wird schließlich durch Properdin (P) stabilisiert, es entsteht ein C3bBbP-Komplex. Wenn sich nun ein weiterer C3b-Faktor an diesen Komplex heftet, entsteht das C5-Konvertase-Äquivalent C3bBbC3bP, welches C5 in C5a und C5b spalten kann und nachfolgend die Entstehung des Membrane-Attack-Komplexes (MAC) einleitet (Nesargikar et al. 2012, Sweigard et al. 2014).

2.3.3 „Lektin-Weg“-Aktivierung

Mannose-bindendes Lektin (MBL) ist ein Protein des Blutserums. Es ist in der Lage, an mannosehaltige Kohlenhydrate auf Bakterienoberflächen anzudocken und so die Komplementkaskade auszulösen (Rassow et al. 2016). MBL hat eine ähnliche Gestalt und weist die gleichen Funktionen wie der erste Komplementfaktor C1 auf. Durch die Kopplung zwischen dem Lektin des MBL und der mannosehaltigen Oberfläche von Bakterien, Hefepilzen oder Viren wird der Aktivierungsweg über die enzymatische Initialisierung der MBL-associated serine proteases (MASPs) eingeleitet (Abbildung 5). MASP 1 ist in der Lage, direkt auf C3 einzuwirken und eine Spaltung in C3a und C3b zu bewirken. MASP 2 kann C4 und C2 spalten, um die C3-Konvertase zu generieren. MASP 3 wirkt hemmend auf die Spaltung von C4 und C2 durch MASP 2 und reguliert diese (Wong und Sim 1997). Der MBL-Komplex ist durch seine Struktur und seine ähnlichen Funktionen mit C1 zu vergleichen, ebenso ist MASP 2 mit C1s gleichzusetzen (Vorup-Jensen et al. 2000). Es wurden auch andere Lektinstrukturen entdeckt, die mit MASPs interagieren, sogenannte Ficoline. Diese Proteine werden ebenfalls in drei Untergruppen eingeteilt (M-Ficolin, L-Ficolin und H-Ficolin) und sind in der Lage, den Lektin-abhängigen Aktivierungsweg zu starten (Matsushita und Fujita 2001, Matsushita 2013). Hansen und

Mitarbeiter beschrieben bereits 2010 ein neues Plasmaprotein namens Collectin 11 (CL-11), welches an MASP koppeln und so die Kaskade aktivieren kann. CL-11 bindet sich bevorzugt an L-Fucose und D-Mannose, die auf der Oberfläche von intakten Bakterien, Pilzen und Viren exprimiert werden (Hansen et al. 2010, Nesargikar et al. 2012, Ma et al. 2013). Über diese verschiedenen Aktivierungswege kann schlussendlich die C5-Konvertase gebildet werden.

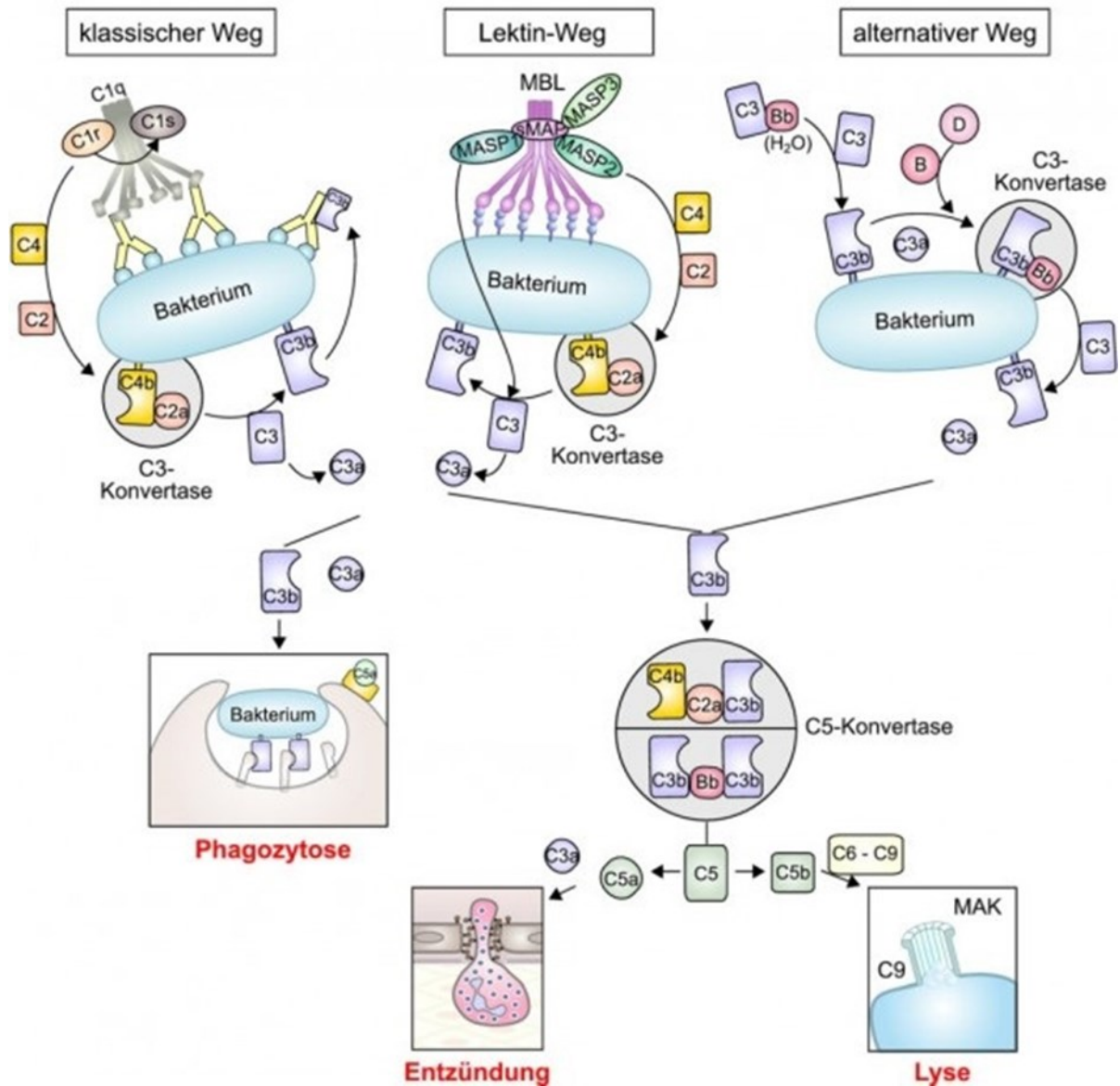


Abbildung 5: Die Aktivierungswege des Komplementsystems (modifiziert nach <https://www.deutsche-apotheker-zeitung.de/daz-az/2013/daz-9-2013/unser-immunsystem>. Zugriff am 02.03.2020, 15:32 Uhr).

2.3.4 Aktivierung durch das C-reaktive Protein

Das C-reaktive Protein (CRP) zählt zu den Akutphasenproteinen und wird in der Leber gebildet (Abbildung 6). Es ist in der Lage, die Komplementkaskade zu starten, indem es sich an Phosphorylcholin-haltige Polysaccharide vieler Bakterien anheftet und folgend C1q rekrutiert. Pathogene Zellen werden ebenfalls durch das CRP opsoniert. Makrophagen mit einer CRP-Erkennungssequenz sind in der Lage, diese Zellen gezielt auszuschalten (Volanakis und Kaplan 1974, Rassow et al. 2016).

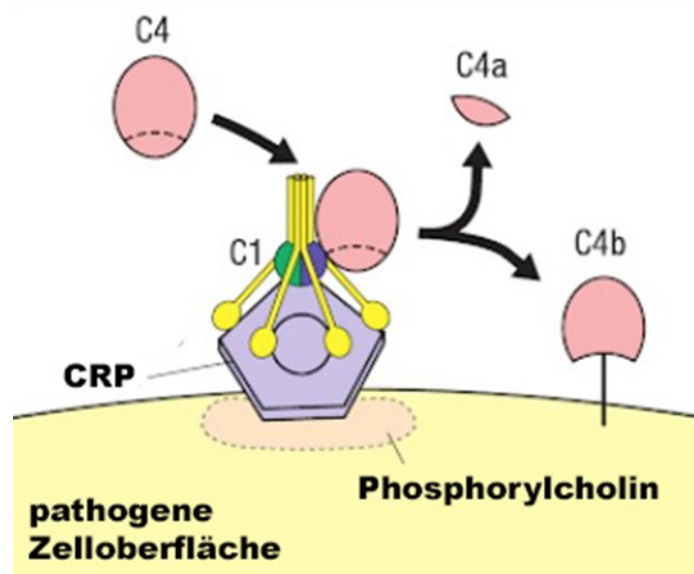


Abbildung 6: Schematische Darstellung der CRP-Aktivierung (modifiziert nach Parham 2009).

2.3.5 Der Membran-Angriffskomplex

Der Membran-Angriffskomplex setzt sich aus C5b und den Plasmaproteinen C6, C7, C8 und C9 zusammen. Diese besondere Kombination aus verschiedenen Komplement-Proteinen sorgt für eine gezielte Zellzerstörung durch Lyse. Die entstehende Pore fügt sich nahtlos in die biologische Membran ein und schädigt die körperfremde Zelle durch einen konstanten Wassereinstrom (Morgan 2016). Aktuell sind zwei Poren-bildende Proteine bekannt, welche eine wichtige Rolle im Immunsystem spielen. Auf der einen Seite wird das Protein Perforin von Natürlichen Killerzellen (NK) und Cluster-of-Differentiation (CD)-8-positiven T-Zellen im Rahmen des angeborenen Immunsystems eingesetzt. Es liegt in diesen Zellen in Vesikeln gespeichert vor und wird bei Kontakt mit der Zielzelle ausgeschüttet und in deren Membran eingebaut. Virus-infizierte oder

veränderte körpereigene Zellen sind Hauptangriffsziele des Perforins. Dem gegenüber steht der Proteinkomplex MAC, welcher hauptsächlich gramnegative Bakterien und bestimmte Parasiten attackiert (Kondos et al. 2010). Durch die Kopplung von C5b mit C6 und C7 wird eine Konformationsänderung des Komplexes bewirkt, wodurch eine hydrophobe Region entsteht, die sich in die Membran der Zelle einlagert. C8 und C9 binden sich an den vorhandenen Membrananker und führen zur Festigung und Vertiefung der Zellpore. Der Komplex sorgt für einen erhöhten Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle. Durch den veränderten osmotischen Gradienten dringt nun verstärkt Wasser in den Erreger ein, wodurch er zerstört wird. Zellkernhaltige pathogene Zellen können den Angriff durch MAC's mit bestimmten Mechanismen abschwächen, zum einen durch Internalisierung oder Abschnürung von Membranbereichen, zum anderen durch eine Expression von CD59. CD59 ist ein Glykoprotein, das die Komplement-vermittelte Lyse regulieren kann. Es befindet sich vermehrt auf der Oberfläche humaner und Säugetier-Zellen. Dieses Glykoprotein ist in der Lage, indem es sich an den Membran-Angriffskomplex bindet, diesen zu inhibieren (Farkas et al. 2002, Kondos et al. 2010).

2.4 Der Rezeptor C5aR1

2.4.1 Aufbau und Funktion des Rezeptors C5aR1

Der Rezeptor C5aR1 wird hauptsächlich auf polymorphkernigen Leukozyten, Makrophagen, Mastzellen und Endothelzellen exprimiert (Janeway et al. 2001, Brennan et al. 2015, Wahn 2018). In neueren Studien konnte die Anwesenheit dieses Moleküls auch in den verschiedensten Tumorgeweben gezeigt werden. Der C5aR1 ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor (GPCR), welcher von C5a, dem am stärksten entzündlich wirkenden Komplementfaktor, stimuliert wird. In einigen Literaturangaben findet sich für den C5aR1 auch die Bezeichnung CD88 (Sahoo et al. 2018). Der C5aR1 besitzt 7 Transmembrandomänen, besteht aus 350 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 43 Kilodalton (kDa) (Fonseca et al. 2013, Wahn 2018) (Abbildung 7). Das Molekül weist drei Ligandenbindungsstellen für C5a auf, welche alle vom C5a besetzt werden können. Die erste Bindungsstelle wird durch negativ geladene Amino-Reste der Aminosäuren 21-30 gebildet. Die positiv geladene D1-Region von C5a bindet perfekt an diesen Abschnitt des Rezeptormoleküls. Es wurde lange angenommen, dass die Aminosäuren 10-18 ebenso zur Bindung von C5a beitragen, allerdings zeigen neueste

Erkenntnisse, dass dieser Abschnitt die zweite Andockstelle stabilisiert. In der Nähe der vierten Transmembranhelix, am Ende der extrazellulären Schleife II, befindet sich die zweite Bindungsstelle. Die Disulfidbrücke zwischen dem Cystein 109 in der extrazellulären Schleife I und dem Cystein 189 in der extrazellulären Schleife II bildet einen perfekten Bindungspartner für den Abschnitt D2 des Komplements C5a. Im Bereich des Arginins 206, nahe der fünften Transmembrandomäne, wird schließlich eine dritte Bindungsstelle vermutet. Das Arginin 74 von C5a stellt sich als passender Gegenspieler zum Arginin 206 des Rezeptors dar. In den meisten Literaturangaben werden aber nur zwei Bindungsstellen erwähnt (Ward 2004).

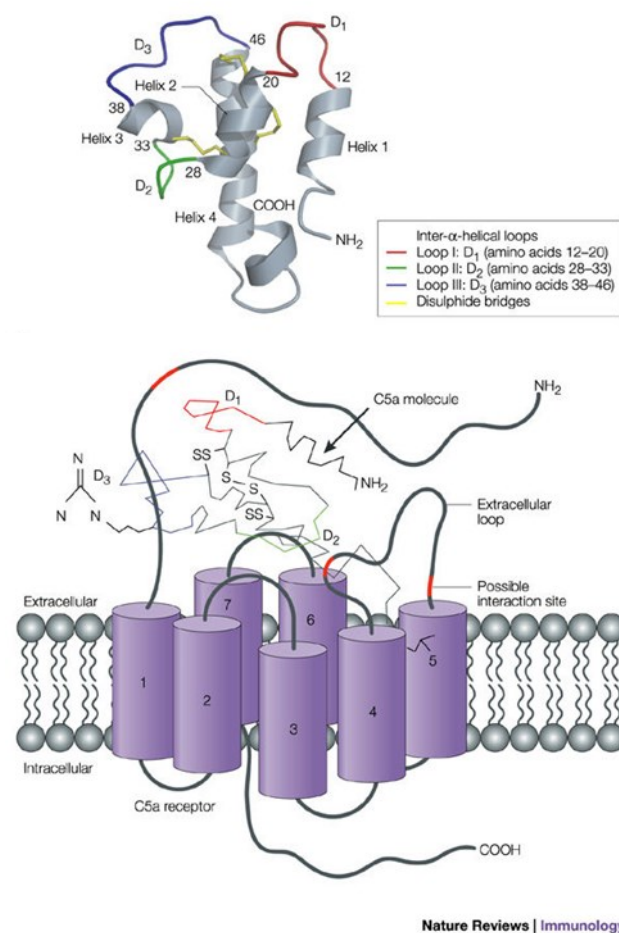


Abbildung 7: Schematische Struktur des menschlichen C5a und des C5aR1 (Ward 2004).

Der C5aR1 ist ein GPCR, welcher ein G-Protein mit einer inhibitorischen α -Untereinheit besitzt ($G_{\alpha i}$) (Monk et al. 2007). Nach Bindung von C5a am Rezeptor erfährt dieser eine Konformationsänderung und das G-Protein wird aktiviert (Abbildung 8). An der $G_{\alpha i}$ -Untereinheit wird das Guanosindiphosphat (GDP) durch Guanosintriphosphat (GTP) ausgetauscht und die α -Untereinheit spaltet sich von der $\beta\gamma$ -Untereinheit ab.

Danach wird der Rezeptor durch die G-Protein-gekoppelten-Rezeptorkinasen (GRK) phosphoryliert. Anschließend folgt die Rekrutierung und Anlagerung von β -Arrestin. Der Komplex wird jetzt in Clathrin-beschichtete Vesikel verpackt und internalisiert. Die Stimulation des GPCR resultiert in einer Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K). Die PI3K ist für die Bildung von Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP3) aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) verantwortlich. Am endoplasmatischen Retikulum befinden sich Inositoltriphosphat (IP3)-sensitive Ca^{2+} -Kanäle. Durch Bindung von IP3 werden diese Kanäle geöffnet und sorgen für eine Zunahme der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration (Monk et al. 2007, Ward 2009, Rassow et al. 2016). Verbunden mit der erhöhten intrazellulären Kalziummobilisation werden Signalweg-Moleküle wie die MAP-Kinase (MAPK), ERK (Extracellular-signal regulated kinase) und Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PI3P) aktiviert. Dadurch wird die Entzündung beschleunigt, da unter anderem Interleukin (IL)-8, IL-6, IL-17 und Tumornekrosefaktor α (TNF- α) vermehrt ausgeschüttet werden (Ji et al. 2016, Ridemann et al. 2018). Der internalisierte Rezeptor kann entweder im Lysosom vollständig abgebaut oder wieder zur Membran recycelt werden, um dann für eine erneute Aktivierung zur Verfügung zu stehen (Morgan 2000, Bamberg et al. 2010). Die Signalübertragung ist selbstlimitierend, da die G_{α} -Untereinheit über eine GTPase-Aktivität verfügt. Nach vollständiger Hydrolyse des GTP verbindet sich die G_{α} -GDP-Untereinheit mit der $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit erneut zu einem Komplex, die Signal-Weiterleitung wird gestoppt und das G-Protein steht für die nächste Aktivierung zur Verfügung (Aktories et al. 2004).

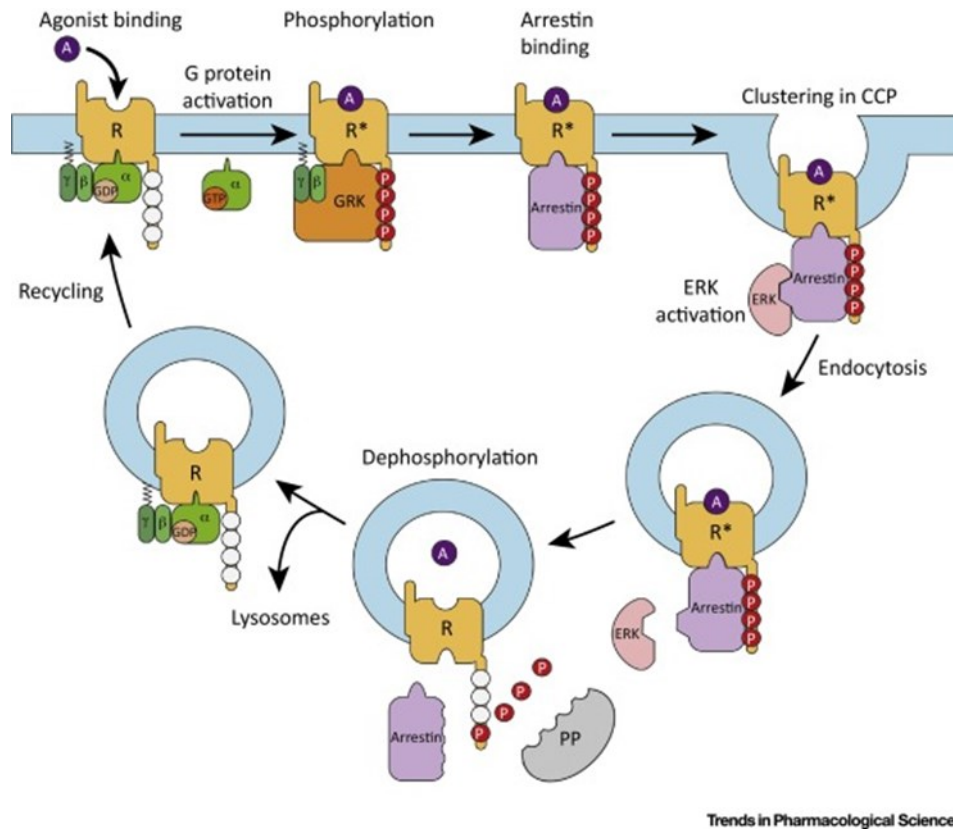


Abbildung 8: Darstellung der allgemeinen Wirkweise eines G-Protein gekoppelten Rezeptors (Kliwer et al. 2017).

2.4.2 Die Pathophysiologie des Rezeptors C5aR1

Neben einer äußerst wichtigen und zentralen Rolle im Entzündungsgeschehen und einer möglichen Bedeutung bei bestimmten Tumorerkrankungen, findet man eine erhöhte Expression des C5aR1 auch bei weiteren Krankheitsbildern.

2.4.2.1 Der Rezeptor C5aR1 im Entzündungsgeschehen

Die abgespalteten Untereinheiten der Komplementfaktoren C3a, C4a und C5a werden als Anaphylatoxine bezeichnet. Vergleichbar mit dem Antikörper IgE werden allergische Immunreaktionen ausgelöst. Zielzellen der Anaphylatoxine weisen Rezeptoren für C3a und C5a auf. In verschiedenen Studien wurden diese Rezeptoren auf neutrophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten, Makrophagen und Mastzellen gefunden, während die Existenz dieser Moleküle auf B- und T-Lymphozyten kontrovers diskutiert

wird (Werfel et al. 1992, Soruri et al. 2003, Egger 2005 Dunkelberger et al. 2012, Karsten et al. 2015).

Das Gefäßendothel stellt im Normalzustand eine natürliche Barriere für Leukozyten und andere Immunzellen dar. C5a und C3a führen zu einer signifikanten Erhöhung der Gefäßpermeabilität. Nachfolgend können Leukozyten ins entzündete Gewebe eintreten. Dieser Vorgang wird unter dem Begriff der Diapedese zusammengefasst. Durch eine Exsudation kommt es in der Region zu einem Ödem und dementsprechend zu einem Funktionsausfall des betroffenen Gewebes. Die Rezeptoren für den C3a und den C5a sind vor allem in Endstrombereichen, d.h. in den Arteriolen und Venolen, aufzufinden. In den Mastzellen wird neben der erhöhten Histaminausschüttung auch die Bildung von Arachidonsäure-Metaboliten, wie z.B. von Leukotrienen und Prostaglandinen eingeleitet. Die PMN verhalten sich ähnlich den Mastzellen und bilden bevorzugt Arachidonsäure-Metabolite. Die Abkömmlinge der Arachidonsäure sind unter anderem für die Ausbildung von Schmerzen, einer verstärkten Blutgerinnung und allgemeine Entzündungszeichen verantwortlich. Bei den Makrophagen kommt es zu einer Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen, welche Immunvorgänge drastisch verstärken können, indem sie die Proliferation und Differenzierung von weiteren Immunzellen initiieren. Ebenso wird aus den Granulozyten vermehrt Histamin freigesetzt (Egger 2005). Histamin ist in erster Linie für eine Dilatation der peripheren Gefäße verantwortlich und bindet an spezifische Rezeptoren (H_1 - H_4 -Rezeptor), welche ubiquitär im Organismus zu finden sind. Der an den Endothelzellen vorhandene H_1 -Rezeptor führt im aktivierten Zustand zur zytosolischen Erhöhung der Calcium-Konzentration (Rassow et al. 2016). Der veränderte Calciumgehalt aktiviert die Stickstoffmonoxid-Synthasen und endotheliales NO wird produziert. Das NO diffundiert in die benachbarten Zellen der glatten Muskulatur der Gefäße und führt dort zu einem Anstieg des cGMP-Spiegels. Die glatte Muskulatur relaxiert, das entzündete Gewebe wird vermehrt durchblutet und weitere Immunzellen strömen ein (Possel 2018). Am Infektionsort entsteht eine verstärkte Rötung und Wärmeentwicklung, in Folge der Gefäßweitstellung. Ebenfalls bedingt die Ödembildung eine Funktionsstörung und eine Schwellung sowie eine verstärkte Bildung von Schmerzreizen, aufgrund der gebildeten Arachidonsäure-Metaboliten.

Eintreffende Granulozyten können am Infektionsort durch C5a zum oxidativen Burst angeregt werden. Es werden vermehrt toxische Sauerstoffradikale und -metaboliten gebildet, wie z.B. Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Superoxidanion-Radikale ($O_2^{\cdot-}$), Hydroxyl-

Radikale (OH•) und Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) (Lang und Greiling 1983). Der oxidative Stress wird zusätzlich durch die Aktivität der Cyclooxygenase und der Lipoxygenase erhöht (Pompeia et al. 2003). Die Immunzellen im betroffenen Gewebe nehmen verstärkt Sauerstoff auf und erhöhen deutlich ihren Stoffwechsel, um die reaktiven Sauerstoffspezies herzustellen. Das bei der anaeroben Glykolyse gebildete Laktat wird in das umliegende Entzündungsgewebe abgegeben und führt so zur Ansäuerung der Umgebung. Die kurzlebigen, aber sehr reaktiven Sauerstoffradikale greifen bevorzugt die Kohlenwasserstoffketten ungesättigter Fettsäuren an. Bakterienbestandteile auf Lipidbasis, wie z.B. die Zellmembran, werden somit gezielt zerstört (Egger 2005).

2.4.2.2 Der Rezeptor C5aR1 bei verschiedenen Erkrankungen

Im Rahmen eines **septischen Geschehens** wird C5a exzessiv produziert und führt unter anderem dazu, dass Makrophagen stark vermehrt Zytokine ausschütten. Der drastische Anstieg von diversen Faktoren wie z.B. TNF-alpha, IL-1 und IL-8 wird als „Zytokinsturm“ bezeichnet und ist auf die überschießende Aktivität der Makrophagen zurückzuführen. Daraus resultiert eine unkontrollierbare Entzündung, welche schlussendlich zum Tod durch Multiorganversagen führen kann (Yan und Gao 2012). Ebenfalls führt der extrem hohe C5a-Spiegel im Blut zu einer gesteigerten Gewebethromboplastin- bzw. Tissue-Factor-Ausschüttung durch Endothelzellen. Durch die erhöhte Anzahl von aktivierten Gerinnungsfaktoren im Blutplasma können überall im Körper Thrombosen entstehen (Ward 2004, Yan und Gao 2012). 2002 entdeckten Furebring und Mitarbeiter bei 12 Patienten, welche an einer schweren Sepsis litten, dass sich die C5aR-Expression auf Granulozyten mit einer Anti-C5a-Therapie deutlich reduzieren lassen kann. In den zugehörigen Tierversuchen wurde die Anti-C5a-Behandlung kurz vor der Endotoxin-Injektion vorgenommen. Bereits nach wenigen Stunden war eine Reduktion der C5aR1-Expression feststellbar. Die Autoren kamen daher zu dem Schluss, dass eine Anti-C5a-Therapie einen interessanten Behandlungsansatz bei der Sepsis darstellen könnte und daher weiterführende Untersuchungen angestrebt werden sollten (Furebring et al. 2002).

Eine weitere Erkrankung, welche mit dem Komplementfaktor C5a und dem C5aR1 in Verbindung gebracht wird, ist der **Morbus Alzheimer**. Diese Krankheit tritt häufig im fortgeschrittenen Lebensalter auf und ist mit einem Untergang des Cortex cerebri assoziiert. Die Alzheimer-Erkrankung resultiert aus einer Anhäufung von

Proteinaggregaten. Unter dem Mikroskop lassen sich im betroffenen Cortexareal zahlreiche Tau-Proteine und β -Amyloid-Ablagerungen erkennen. Neben diesen Proteinen reichern sich auch vermehrt Entzündungszellen und Komplementfaktoren im Alzheimer-Cortex an. 2008 wurden von Ager und Mitarbeitern die Auswirkungen einer C5aR1-Blockade in einem Maus-Modell für den Morbus Alzheimer getestet. Über 12 Wochen bekamen 17 Mäuse einen C5aR-Antagonisten verabreicht. Als Kontrollgruppe dienten 11 weitere Mäuse. Nach Analyse aller Ergebnisse konnte man eine deutliche Reduktion von β -Amyloid im Gehirn der behandelten Mäuse zeigen. Zusätzlich waren die kognitiven Fähigkeiten der Tiere nach C5aR-Blockade verbessert. Eine Anti-C5a- oder -C5aR1-Therapie könnte daher in Zukunft einen neuen Ansatz in der Behandlung von Patienten mit Morbus Alzheimer darstellen (Ager et al. 2008).

Eine verstärkte C5aR1-Expression konnte auch in **einigen Tumorentitäten** gefunden werden. Im Folgenden soll beispielhaft auf die Befunde bei drei wichtigen Tumorerkrankungen eingegangen werden.

In einer Tissue-Microarray-Studie an insgesamt 208 **nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen** konnte in fast allen der analysierten 85 Plattenepithelkarzinome und 110 Adenokarzinome eine deutliche C5aR1-Expression verzeichnet werden, wobei eine hohe Präsenz des Rezeptors mit der Anwesenheit von Lymphknoten-Metastasen und einer schlechten Prognose verbunden war (Gu et al. 2013). Einige Jahre später wurden von einer anderen Arbeitsgruppe im Maus-Lungentumor-Modell die möglichen positiven Auswirkungen einer kombinierten PD-1 (programmed cell death protein 1)- und C5a-Blockade erforscht. Dabei konnte gezeigt werden, dass sowohl eine C5aR1-Defizienz als auch eine Behandlung der Tiere mit einem Anti-C5a-Aptamer zu einer deutlichen Wirkungsverstärkung der Anti-PD-1-Therapie und damit zu einer zusätzlichen Reduktion der Tumorgrößen und zu einer signifikanten Verlängerung der Überlebenszeit der Tiere führten (Ajona et al. 2017, Sharma und Dubinett 2017). In einer weiteren Untersuchung konnte nachgewiesen werden, dass eine hohe C5aR1-Expressionsrate in den Lungentumoren mit einem kürzeren Gesamtüberleben der Tiere und mit einer vermehrten Entstehung von Knochenmetastasen verbunden ist. Durch eine Aptamer-vermittelte C5a-Blockade konnte die Anzahl an Knochenmetastasen bei den Tieren auch hier signifikant verringert werden (Ajona et al. 2018).

2016 wurde von Kaida und Kollegen die Auswirkungen einer erhöhten C5aR1-Expression in **Magentumoren** erforscht (Kaida et al. 2016). In dieser Studie wurden Gewebeproben von 100 Patienten mit einem Magentumor hinsichtlich der Zellreaktion auf einen C5a-Stimulus untersucht. Es wurde herausgefunden, dass sich die Zellbeweglichkeit und die Invasivität der Tumorzellen nach der Erhöhung der C5a-Konzentration intensivierten. Das C5a-Signal regte die Bildung von RhoA-GTP aus RhoA-GDP an und induzierte so morphologische Veränderungen an den Magentumorzellen. So wurde durch das gebildete RhoA-GTP das Zytoskelett der Zellen derart verändert, dass dadurch die Invasivität deutlich zunahm. RhoA ist für die Kontraktilität, die zelluläre Beweglichkeit und das Metastasierungsverhalten von Magentumorzellen und anderen malignen Tumoren verantwortlich. Durch die Gabe eines C5aR-Antagonisten konnten diese Effekte signifikant verringert werden. Aus der Studie ging ebenso hervor, dass Patienten mit einer hohen C5aR-Expression eine ausgeprägtere Invasionstiefe, eine stärkere Vaskularisierung und ein fortgeschrittenes Stadium des Magentumors aufweisen. Die Überlebensrate nach fünf Jahren betrug bei einer hohen C5aR-Expressionsrate 58,2%, während sie bei Patienten mit einer niedrigen C5aR-Expressionsrate bei 88,5% lag (Kaida et al. 2016). In einer anderen Studie wurde Tumorgewebe von 72 Patienten mit gesundem Magengewebe von 32 Patienten verglichen (Chen et al. 2018). Hier konnte ein direkter Zusammenhang zwischen der C5a-C5aR-Aktivierung und einer verminderten Expression des Tumor-Suppressors p21 sowie einer verstärkten Stimulation des PI3K-Akt-Signalweges gezeigt werden. So wurde in den Magentumoren eine signifikant höhere C5aR-Expression nachgewiesen als im gesunden Gewebe. Die p21-Level waren in den Tumorgeweben dagegen deutlich reduziert. In parallel dazu durchgeführten Untersuchungen wurden in Nacktmäusen Magentumore durch Transplantation von Tumorzellen erzeugt. Einem Teil der Mäuse wurde ein C5aR1-Antagonist verabreicht. Bei der Untersuchung der entstandenen Tumore zeigten sich eine verstärkte p21-Expression, eine deutliche Verminderung der PI3K/AKT-Aktivierung und eine daraus resultierende Reduktion des Tumorwachstums bei den mit dem C5aR1-Antagonisten behandelten Tieren (Chen et al. 2018).

Das **Nierenzellkarzinom** ist eine der häufigsten malignen Tumorerkrankungen im mittleren Lebensalter. Im Geschlechtervergleich tritt diese Erkrankung bei Männern 1,5x häufiger auf, als bei Frauen (Bergmann et al. 2020). Die Standardtherapie stellt hierbei eine radikale oder partielle Nephrektomie in Kombination mit einer Zytostatika-Therapie

dar. Bereits 2013 konnte in einer Studie an 11 Nierentumoren die Anwesenheit des C5aR1 in 60% der Fälle nachgewiesen werden (Nitta et al. 2013). In einer weiteren Untersuchung an 127 Nierenkarzinom-Patienten fand sich der Rezeptor in 50,5% der nicht-metastasierten und 96,7% der metastasierten Nierenkarzinome (Maeda et al. 2015). Ähnliche Befunde konnten auch durch eine andere Arbeitsgruppe erhoben werden (Yoneda et al. 2019). Die C5a-C5aR1-Achse scheint somit auch bei der Invasion und Metastasierung von Nierenkarzinomzellen eine entscheidende Rolle zu spielen. Die Blockade der C5a-C5aR1-Achse könnte daher in ferner Zukunft bei verschiedenen Tumoren eine alternative therapeutische Interventionsmöglichkeit darstellen.

3 Zielstellung

Bisher existieren nur wenige umfassende Literaturdaten über die Expression des C5aR1 in normalen menschlichen Organen und Geweben und in menschlichen Tumoren. Die zurzeit verfügbaren Untersuchungen fokussieren sich vor allem auf die Rolle des Rezeptors im septischen Geschehen und beim Morbus Alzheimer sowie auf die Präsenz bei einer Reihe von Tumoren, wie beim Bronchial-, Mamma-, Magen- primären Leber-, Pankreas-, Nieren-, Colon-, Prostata oder Cervix-Karzinom. Daher war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Expression des C5aR1 an einer großen Serie von in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Präparaten von menschlichen Normalgeweben und insgesamt 33 verschiedenen Tumorentitäten ausführlich zu analysieren, um ein umfassendes Expressionsprofil dieses Rezeptors für den menschlichen Körper und die entsprechenden Neoplasien zu erhalten. Die Untersuchungen erfolgten immunhistochemisch unter Verwendung eines polyklonalen Kaninchen-Antikörpers, welcher vom Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Jena in Zusammenarbeit mit der Firma Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, neu gegen den humanen C5aR1 generiert und in Vorarbeiten zu der vorliegenden Arbeit hinsichtlich seiner Affinität und Spezifität umfangreich charakterisiert worden war.

4 Material und Methoden

4.1 Proben

Insgesamt standen 330 in Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete Präparate von Patienten der Zentralklinik Bad Berka, des Universitätsklinikums Greifswald und des Universitätsklinikums Jena zur Verfügung. Die Gewebelöcke stammen von Biopsien, Schnellschnitten und Resektionen und teilen sich wie folgt auf die verschiedenen Normalgewebe und Tumorentitäten auf:

Normalgewebe: Cortex (n=4), Hypophyse (n=2), Hinterwurzelganglien (n=3), Tonsille (n=6), Thymus (n=6), Herz (n=1), Herzohr (n=1), Lunge (n=5), Milz (n=4), Leber (n=10), Pankreas (n=3), Niere (n=4), Duodenum (n=3), Colon (n=3), Placenta (n=4), Knochen und Knochenmark (n=4).

Tumorgewebe: Glioblastom (n=8), Meningeom (n=6), Hypophysenadenom (n=10), papilläres Schilddrüsenkarzinom (n=10), follikuläres Schilddrüsenkarzinom (n=10), medulläres Schilddrüsenkarzinom (n=9), anaplastisches Schilddrüsenkarzinom (n=8), Adenokarzinom der Lunge (n=10), Plattenepithelkarzinom der Lunge (n=10), Kleinzelliges Bronchialkarzinom (SCLC) (n=10), Neuroendokriner Tumor der Lunge (n=10), Mamma-Karzinom (n=9), Magen-Karzinom (n=10), Hepatozelluläres Karzinom (HCC) (n=10), Cholangiozelluläres Karzinom (n=9), Pankreas-Karzinom (n=10), Neuroendokriner Tumor des Pankreas (n=10), Colon-Karzinom (n=9), Gastrointestinaler Stromatumor (GIST) (n=10), Phäochromozytom (n=6), Klarzelliges Nieren-Karzinom (n=7), Prostata-Karzinom (n=10), Hoden-Karzinom (n=10), Endometrium-Karzinom (n=10), Cervix-Karzinom (n=9), Ovarial-Karzinom (n=9), Melanom (n=5), Lymphom (n=10), Leiomyosarkom (n=4), Rhabdomyosarkom (n=3), Pleomorphes Sarkom (n=2), Liposarkom (n=4), Angiosarkom (n=1).

Das Normalgewebe um die Tumoren, so vorhanden, wurde ebenfalls bewertet.

4.1.1 Materialien und Geräte zur Probenaufbereitung

Von den Gewebelöcken wurden mittels eines Mikrotoms 4 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Adhesivobjektträger aufgebracht.

Die Herstellung der Gewebeschnitte erfolgte mit folgenden Geräten und Materialien:

Objektträger SuperFrost® plus	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Rotationsmikrotom	HM 335 E, Microm, Walldorf, Deutschland
Streckbad	Medax Nagel GmbH, Kiel, Deutschland

4.2 Immunhistochemie

4.2.1 Materialien und Gerätschaften für die Immunhistochemie

Substanzen und Chemikalien

3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC)	BioGenex Laboratories, Fremont, CA, USA
Ammoniak-Lösung 25%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Citronensäure-Monohydrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 99,8%	Echter Nordhäuser Spirituosen GmbH, Nordhausen, Deutschland
Glycerin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Mayer`s Hämatoxylin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Methanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Mowiol 4-88	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumcitrat-Monohydrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Rinderserumalbumin (RSA)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Salzsäure 37%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Triethylendiamin (DABCO)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Trometamol (TRIS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Wasserstoffperoxid 30%	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Xylol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Lösungen und Standardpuffer für die ImmunhistochemiePBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung) pH 7,4

NaCl	8,18 g
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	1,77 g
KCl	0,20 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
Aqua bidest.	ad 1000 ml

PBS/RSA 1% (Rinderserumalbumin)

RSA	5,00 g
PBS	495 ml

Stammlösung A (0,1 M) für Citratpuffer

C ₆ H ₈ O ₇ x H ₂ O	21,01 g
Aqua bidest.	ad 1000 ml

Stammlösung B (0,1 M) für Citratpuffer

C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ x H ₂ O	29,41 g
Aqua bidest.	ad 1000 ml

Citratpuffer (0,01 M), pH 6,0

Stammlösung A	36 ml
Stammlösung B	164 ml
Aqua bidest.	1800 ml

Mowiol-Eindecklösung

Glycerin	6,00 g
Mowiol 4-88	2,40 g
Aqua bidest.	6,00 ml
0,2 M TRIS-HCl	12,00 ml
DABCO	25 mg pro ml Lösung

Antikörper für die Immunhistochemie

Kaninchen Anti-Mensch C5aR1 (5227) Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Kits für die Immunhistochemie

AEC Substrate Pack	BioGenex, Fremont, CA, USA
VECTASTAIN® Elite ABC-Kit (Kaninchen-IgG)	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA

Gerätschaften für die Immunhistochemie

Analysenwaage A200S	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
Färbekästen (Glas)	Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland
Glas-Färbegestelle	Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland
Magnetrührer	Schott Instruments, Mainz, Deutschland
Mikroskop Axio Imager A1	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Mikrowelle CB1271	Bomann, Kempen, Deutschland
pH-Meter pH 211	Hanna Instruments, Kehl, Deutschland
Shandon Coverplates™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Shandon Sequenza®-Färbesystem	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

4.2.2 Prinzip der Immunhistochemie

Ziel der Immunhistochemie ist es, eine Struktur, im vorliegenden Fall den Rezeptor C5aR1, mit spezifischen Antikörpern zu markieren. Dadurch wird die Anwesenheit des Rezeptors in den verfügbaren Präparaten aufgezeigt. Bei der in der vorliegenden Arbeit eingesetzten sogenannten „indirekten Peroxidase-Methode“ wird zunächst ein Primär-Antikörper verwendet. Damit wird die gesuchte Zielstruktur markiert. Anschließend wird an den verwendeten Primär-Antikörper ein Sekundär-Antikörper gekoppelt, welcher biotinyliert vorliegt. Im nächsten Schritt wird ein Meerrettich-Peroxidase-gekoppeltes Avidin hinzugegeben, welches sich an das an den Sekundär-Antikörper gebundene Biotin anheftet. Als nächstes wird das Chromogen 3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC) hinzugegeben, welches durch die Meerrettich-Peroxidase oxidiert wird. Dadurch entwickelt sich ein Farbumschlag von einer Gelbfärbung zu einem rötlichen Brauntönen, welcher nun die markierten Rezeptoren selektiv anfärbt. Um eine bessere Orientierung in den Präparaten zu ermöglichen, wurde anschließend eine Gegenfärbung der Zellkerne mit Mayer`s Hämatoxylin durchgeführt.

4.2.3 Durchführung der Immunhistochemie

Entparaffinierung der Schnitte

Um die Immunfärbung durchführen zu können, müssen die Schnitte zunächst entparaffiniert und rehydriert werden. Die Präparate wurden hierfür 3 Mal für 20 min. in Xylol eingelegt. Im Anschluss wurde das Xylol durch 99,8% Ethanol entfernt, in welchem die Gewebsschnitte ebenfalls 3 Mal für 20 min. inkubiert wurden.

Blockierung endogener Peroxidasen

Bei der indirekten Peroxidase-Methode ist es äußerst wichtig, im Gewebe endogen vorhandene Peroxidasen zu blockieren. Würde dieser Schritt nicht durchgeführt werden, wären im mikroskopischen Bild nicht nur die gesuchten Rezeptoren, sondern auch die Peroxidase-aktiven-Zellen angefärbt. Um dies zu verhindern, wurden die Präparate für 45 min. in 0,3% H₂O₂ (in Methanol) inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte durch eine absteigende Alkoholreihe (95%, 80%, 70% Ethanol) in einem 2-minütigen Intervall in Aqua bidest. transferiert und somit rehydriert.

Antigendemaskierung

Durch die Fixierung in Formalin entstehen Aldehyd-Quervernetzungen im Gewebe zwischen den Carboxyl- und Aminogruppen der Aminosäuren. Diese setzen die Antigenität signifikant herab. Ebenso kann dadurch die dreidimensionale Struktur des zu untersuchenden Proteins variieren. Es besteht die Gefahr, dass der Antikörper das Antigen nicht erkennt. Die gebräuchlichste Variante, diese Bindungen aufzuspalten ist die Hitzedemaskierung. Im vorliegenden Fall wurden die Schnitte in kalziumpräzipitierendem Citrat-Puffer (0,01 M, pH 6,0) 3 Mal in einer Mikrowelle zum Kochen gebracht (8 min., 4min. und 4min.). Zwischen den Kochvorgängen mussten die Präparate jeweils 4 Minuten abkühlen. Eine weitere Möglichkeit wäre die enzymatische Antigendemaskierung durch eine Inkubation der Proben in einer sogenannte „Antigen-Retrieval-Lösung“, welche Enzyme wie Neuraminidase, Protease, Pronase, Pepsin oder Trypsin enthält. Diese enzymatischen Methoden sind allerdings kostenintensiver,

weshalb man in der Regel auf die Hitzedemaskierung in der Mikrowelle zurückgreift (Noll und Schaub-Kuhnen 2000).

pH-Pufferung und Einsortierung der Proben in das Sequenza®-Färbesystem

Um eine störende Hintergrundfärbung in den Präparaten zu vermeiden, wurden im nächsten Schritt unterschiedliche Ladungen innerhalb des Gewebes durch eine 1%ige Rinderserumalbumin (RSA)-Phosphatpufferlösung (PBS) (PBS/RSA 1%), pH 7,4, abgesättigt. Unspezifische Bindungen werden dadurch verhindert. Membranen oder Fettgewebe könnten sonst Immunglobuline unspezifisch binden. Durch diese zustande kommenden hydrophoben Bindungen würden fehlerhafte Färbungen ungewollt erzeugt werden (Noll und Schaub-Kuhnen 2000). Anschließend wurden die Objektträger mittels spezieller Klammern in die Sequenza®-Färbesysteme einsortiert. Nach Einbringen der Präparate entsteht zwischen den Klammern und den Präparaten jeweils ein kapillärer Spalt, welcher einen optimalen Kontakt zwischen den im Folgenden zugegebenen Antikörpern und Lösungen und dem Präparat vermittelt.

Antikörperbindung und Färbung

Nach der Einsortierung in die Färbesysteme wurden die Schnitte wieder mit 1%iger RSA in PBS gespült. Nach Zugabe des Primär-Antikörpers wurden die Gewebeschnitte für mindestens zwölf Stunden über Nacht bei 4°C gekühlt gelagert. Durch diese Methode erfolgt eine optimale und spezifische Bindung des Primärantikörpers an den gesuchten Rezeptor. Am nächsten Tag wurden die nicht oder nur unspezifisch gebundenen Antikörper in einem Waschschrift mit PBS/RSA 1% entfernt. Im Anschluss wurde der biotinylierte Sekundär-Antikörper zugesetzt, welcher sich selektiv an den Primär-Antikörper heftet. Nicht-gebundene Sekundärantikörper wurden nach 30 min. Inkubationszeit mit PBS/RSA 1% abgewaschen. Danach wurde der Avidin-Peroxidase-Komplex hinzugegeben, welcher sich selektiv an das Biotin des Sekundär-Antikörpers koppelt. Nach 30 min. Inkubationszeit wurde erneut mit PBS/RSA 1% gewaschen. Nicht oder unspezifisch gebundene Komplexe werden damit entfernt. Das Chromogen AEC wurde 2 Mal für 15 min. auf die Präparate aufgetragen. Durch die Oxidation der im Avidin-Komplex vorhandene Peroxidase resultiert eine Rot-Braunfärbung. Zum Schluss wurden

die Gewebeschnitte mit Aqua bidest. gewaschen, wodurch die Reaktion der Peroxidase gestoppt wird (siehe Abbildung 9).

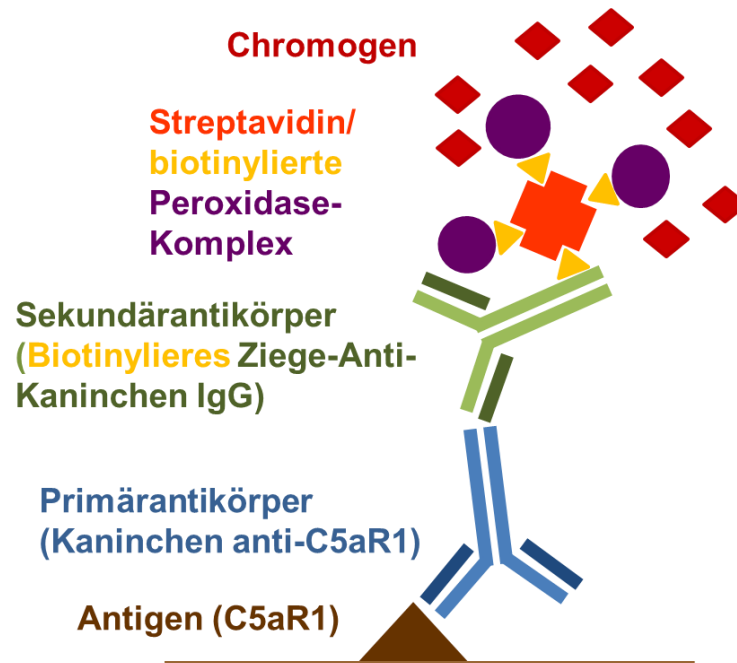


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Immunhistochemie mit Hilfe der indirekten Peroxidase-Methode.

Gegenfärbung mit Mayer`s Hämatoxylin und Eindecken der Präparate

Für eine bessere Übersicht im Mikroskop und zur Erleichterung der Auswertung wurden die Präparate mit Mayer`s Hämatoxylin gegengefärbt. Die Präparate wurden hierfür wieder aus dem Sequenza®-Färbesystem ausgespannt und in Aqua bidest. für 2,5 min. gewaschen. Nach 5-maligem Eintauchen in Ammoniakwasser (1,5 ml 25% Ammoniak in 250 ml Aqua bidest.) entstand eine blau-violette Färbung. Durch die Blau-Violett-färbung lassen sich die mit AEC markierten Rezeptor-tragenden Zellen sehr zuverlässig von den umliegenden Zellen abgrenzen (Feldmann und Wolfe 2014). Die Präparate wurden abschließend nochmals für 2,5 min. in Aqua bidest. gespült und dann mit Mowiol 4-88 und Deckgläsern eingedeckt.

4.2.4 Auswertung der Immunhistochemie

4.2.4.1 Lichtmikroskopie

Alle Gewebeschnitte wurden im Institut für Pharmakologie und Toxikologie mit einem Zeiss-Mikroskop (AXIO Imager.A1), welches über die Vergrößerungen 2,5x, 5x, 10x, 20x, 40x, und 63x verfügt, ausgewertet und mit der an das Mikroskop angeschlossenen Kamera (ProgRes C5, Jenoptik, Jena, Deutschland) fotografisch dokumentiert.

4.2.4.2 Immunreaktiver Score

Bereits 1987 veröffentlichten Wolfgang Remmele und Hans Egon Stegner den Vorschlag eines einheitlichen immunhistochemischen Bewertungskonzeptes von Färbungen für membranständige Rezeptoren wie Östrogenrezeptoren in Mammakarzinomen mittels des sogenannten Immunreaktiven Scores (IRS) (Remmele und Stegner 1987, Remmele und Schicketanz 1993).

Alle vorliegenden Präparate wurden mit Hilfe des IRS ausgewertet, bei dem sowohl die Anzahl der positiv gefärbten Zellen als auch die Intensität der Färbereaktion im gesamten Präparat in die Bewertung einbezogen werden. Aus diesen beiden Werten errechnet sich der IRS. Da diese Methode sehr subjektiv ist, sollte die Bewertung der Gewebeschnitte Aufgabe einer einzigen Person sein. Beim IRS wird zuerst die Färbeintensität (Staining Intensity - SI) mit einem Wert von 0-3 beschrieben (siehe Tabelle 2). Anschließend ermittelt man den Prozentsatz positiver Zellen im zu untersuchenden Tumorgewebe (Percentage Points - PP), welcher einen Wert von 0-4 umfassen kann. Aus diesen beiden Werten errechnet sich der IRS. Als positive Färbung wird alles größer gleich einem Score-Wert von 3 gewertet.

Tabelle 2: Immunreaktiver Score nach Remmele und Stegner (1987); IRS = Färbeintensität (Staining Intensity: SI) x Prozentsatz an positiv gefärbten Zellen (Percentage Points: PP).

	Keine Färbung nachweisbar SI = 0	Geringe Färbung SI = 1	Mäßige Färbung SI = 2	Starke Färbung SI = 3
Keine positiven Zellen PP = 0	IRS = 0	IRS = 0	IRS = 0	IRS = 0
< 10% positive Zellen PP = 1	IRS = 0	IRS = 1	IRS = 2	IRS = 3
11-50% positive Zellen PP = 2	IRS = 0	IRS = 2	IRS = 4	IRS = 6
51-80% positive Zellen PP = 3	IRS = 0	IRS = 3	IRS = 6	IRS = 9
> 81% positive Zellen PP = 4	IRS = 0	IRS = 4	IRS = 8	IRS = 12

5 Ergebnisse

5.1 Immunhistochemische Untersuchungen

Bei der immunhistochemischen Analyse der 330 Präparate konnte eine Anfärbung spezifischer Zellen in nahezu allen Gewebeschnitten nachgewiesen werden. Diese ließen sich anhand der Thymus- und Milz-Präparate eindeutig als reife B-Zellen identifizieren. Diese B-Lymphozyten befanden sich außerhalb lymphatischer Gewebe häufig in angeschnittenen Blutgefäßen und im angrenzenden Gewebe. Weiterhin zeigten sich Mastzellen, Granulozyten, Monozyten und Makrophagen C5aR1-positiv. Die Präsenz dieser Immunzellen wird daher im Folgenden nicht in jedem der Gewebe nochmals gesondert beschrieben.

5.1.1 Immunhistochemische Untersuchungen an humanen Normalgeweben

5.1.1.1 Cortex

In den analysierten Präparaten vom menschlichen Cortex zeigten sich zahlreiche Zellpopulationen C5aR1-positiv. Neben den Neuronen scheinen diese positiven Zellen vor allem Astroglia- und Mikrogliazellen zu umfassen, während Oligodendrogliazellen den Rezeptor eher nicht zu exprimieren scheinen (Abbildung 10). Insgesamt wurde den Cortexpräparaten ein IRS von 4,00 zugewiesen (Tabelle 3).

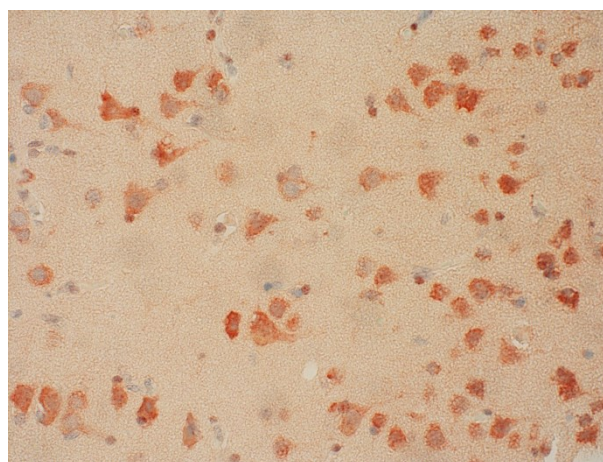


Abbildung 10: C5aR1-Expression im menschlichen Cortex. Immunhistochemie (rot-braune Färbung), Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

5.1.1.2 Hypophyse

Bei den beiden untersuchten Schnitten handelte es sich um Präparate aus dem Hypophysenvorderlappen. Die Präparate waren größtenteils C5aR1-negativ. Lediglich sporadisch waren einzelne Zellen oder kleine Gruppen von Zellen leicht gefärbt (Abbildung 11). Die C5aR1-Expression in den beiden Hypophysen wurde insgesamt mit einem IRS von 1,10 bewertet (Tabelle 3).

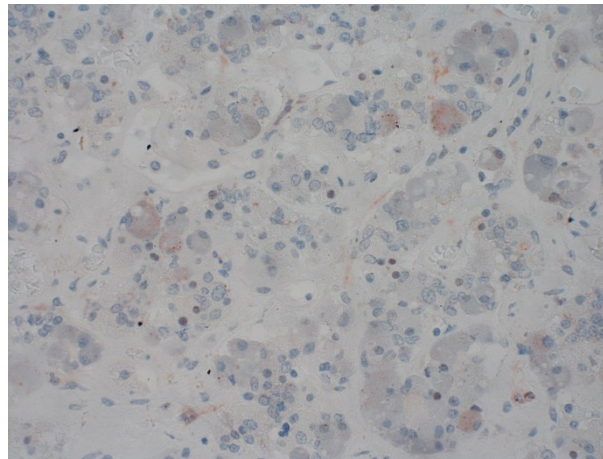


Abbildung 11: C5aR1-Expression im Hypophysenvorderlappen. Immunhistochemie (rot-braune Färbung), Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

5.1.1.3 Hinterwurzelganglien

In den Hinterwurzelganglien zeigten sich nur vereinzelte positive Immunzellen im Gewebe. Eine Färbung der Ganglienzellen selbst war nicht zu beobachten (Abbildung 12A). Auch die zugehörigen Nervenfasern waren negativ (Abbildung 12B). Der IRS lag im Durchschnitt bei 0 (Tabelle 3).

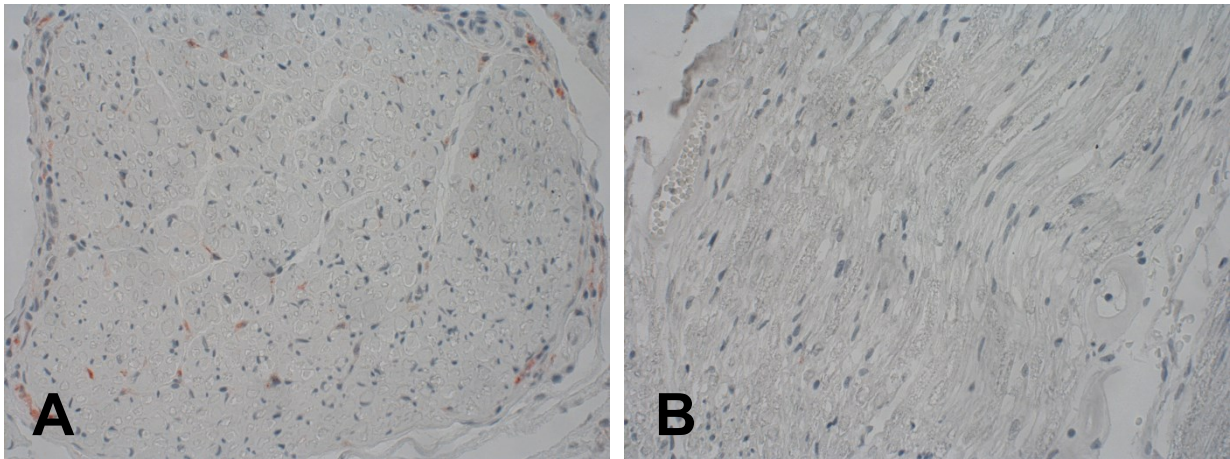


Abbildung 12: C5aR1-Expression im Hinterwurzelganglion (A) und in den entsprechenden Nervenfasern (B). Immunhistochemie (rot-braune Färbung), Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

5.1.1.4 Tonsillen

Die typische Einteilung der Tonsillen in T-Zone, Lymphfollikel und Krypten war in den analysierten Präparaten gut zu erkennen. An der inneren Kryptenwand wurden Detritusreste unspezifisch angefärbt; diese Färbung wurde daher bei der Bewertung der Präparate nicht berücksichtigt. In der T-Zell-Zone (Abbildung 13A) fanden sich vereinzelt B-Lymphozyten, welche sehr stark angefärbt erschienen. Weiterhin zeigten sich die Kapillaren C5aR1-positiv (Abbildung 13B). Den Präparaten der Tonsille wurde im Durchschnitt ein IRS-Wert von 2,92 zugeordnet (Tabelle 3).

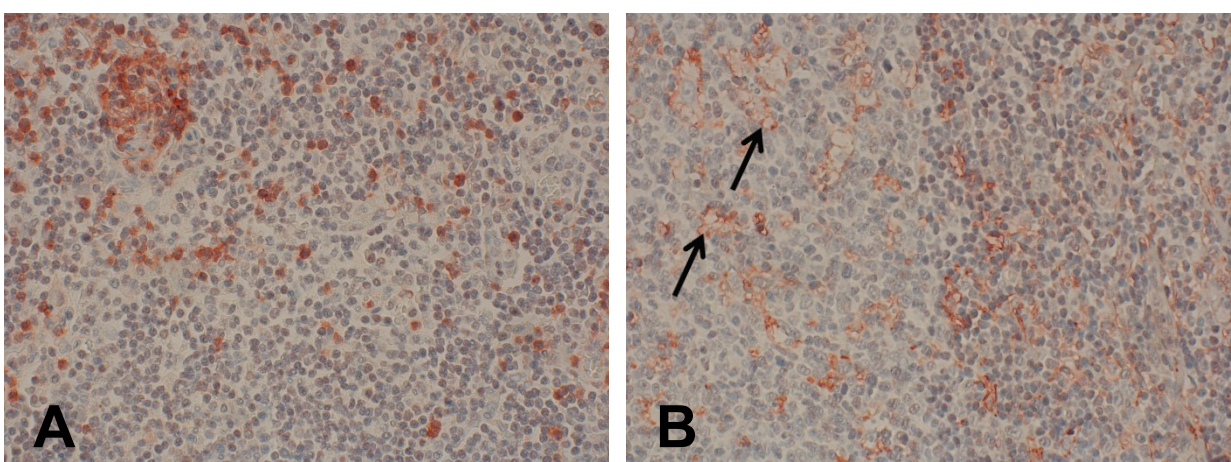


Abbildung 13: C5aR1-Expression im Tonsillargewebe. Immunhistochemie (rot-braune Färbung), Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x. Pfeile in B: positive Gefäße.

5.1.1.5 Thymus

Die analysierten Thymus-Präparate waren komplett negativ (Abbildung 14). Ein Vorhandensein des C5aR1 in den T-Lymphozyten und deren Vorläuferzellen kann somit ausgeschlossen werden. Die Präparate wurden insgesamt mit einem IRS von 0 bewertet (Tabelle 3).

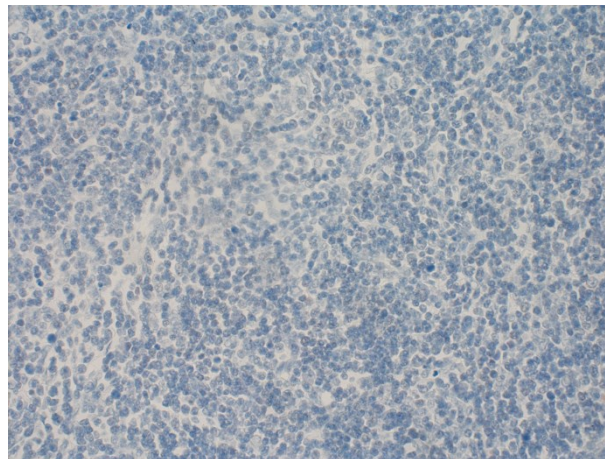


Abbildung 14: C5aR1-Expression im Thymus. Immunhistochemie (rot-braune Färbung), Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

5.1.1.6 Herz und Herzohr

Bei beiden untersuchten Präparaten des Herzmuskels und vom Herzohr war das Sarkoplasma der Kardiomyozyten leicht rötlich angefärbt (Abbildung 15). Gelegentlich fanden sich zusätzlich stark positive Zellen zwischen den Muskelfasern, die Immunzellen entsprechen könnten. Insgesamt wurde für beide Präparate ein IRS von 1,75 vergeben (Tabelle 3).



Abbildung 15: C5aR1-Expression im Myokard. Immunhistochemie (rot-braune Färbung), Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x. Pfeile: stark positive Immunzellen.

5.1.1.7 Lunge

In den untersuchten Lungen-Präparaten fanden sich in den Alveolarwänden stark C5aR1-positive Immunzellen, wie in Abbildung 16A beispielhaft zu erkennen ist. Auch die Alveolarmakrophagen zeigten eine leichte Anfärbung, während der Rest des Gewebes negativ war. In einem Präparat (Abbildung 16B) wurde eine deutliche Alveolitis verzeichnet, welche durch eine entzündliche Infiltration und eine Anhäufung von stark und membranständig C5aR1-positiven Alveolarmakrophagen gekennzeichnet war. Auffallend war in den analysierten Präparaten weiterhin eine deutliche Anfärbbarkeit des hochprismatischen respiratorischen Epithels. Der IRS im gesunden Lungengewebe lag gemittelt bei 2,28.

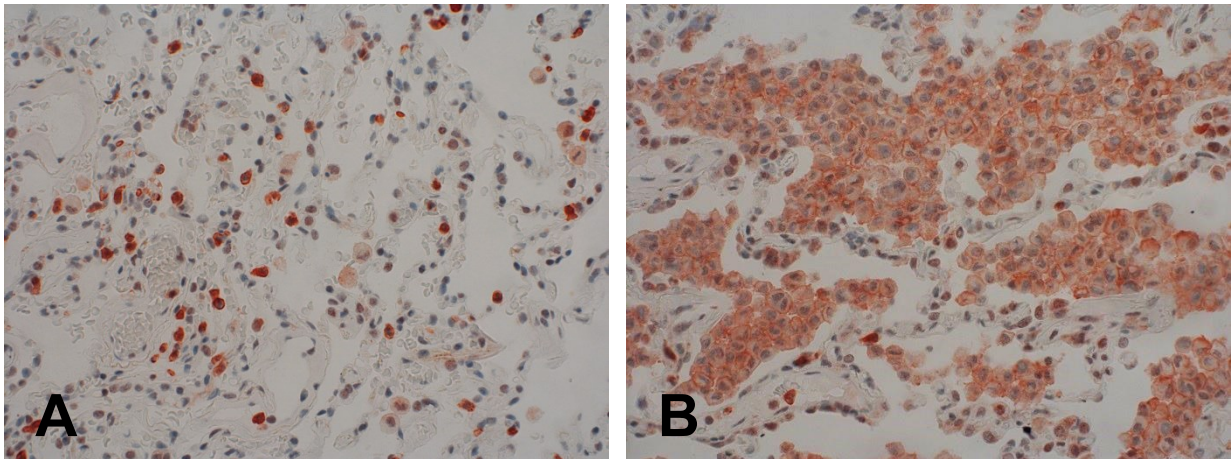


Abbildung 16: C5aR1-Expression im Lungengewebe. Immunhistochemie (rot-braune Färbung), Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x. A: normales Lungengewebe; B: Alveolitis mit deutlicher Anhäufung von stark membranständig positiven Alveolarmakrophagen.

5.1.1.8 Milz

Die Milz wies mit einem gemittelten IRS von 6,94 (Tabelle 3) die stärkste Färbung der normalen Gewebe auf. Eine histologische Unterteilung in rote und weiße Pulpa, bestehend aus den periarteriellen Lymphecheiden (PALS), Lymphfollikeln und der Marginalzone konnte in den untersuchten Präparaten gut nachvollzogen werden. Die Zellen der PALS und des Keimzentrums zeigten keine C5aR1-Expression (Abbildung 17A). In der Marginalzone fanden sich vereinzelt angefärbte B-Lymphozyten. Ausgehend von der perifollikulären Zone nahm der Anteil an C5aR1-positiven Zellen in Richtung roter Pulpa zu. Die rote Milzpulpa besteht zu einem großen Anteil aus Makrophagen und Plasmazellen. Diese Zellen zeigten eine sehr starke C5aR1-Expression. Die zahlreich in der roten Pulpa aufzufindenden Erythrozyten waren dagegen C5aR1-negativ (Abbildung 17B).

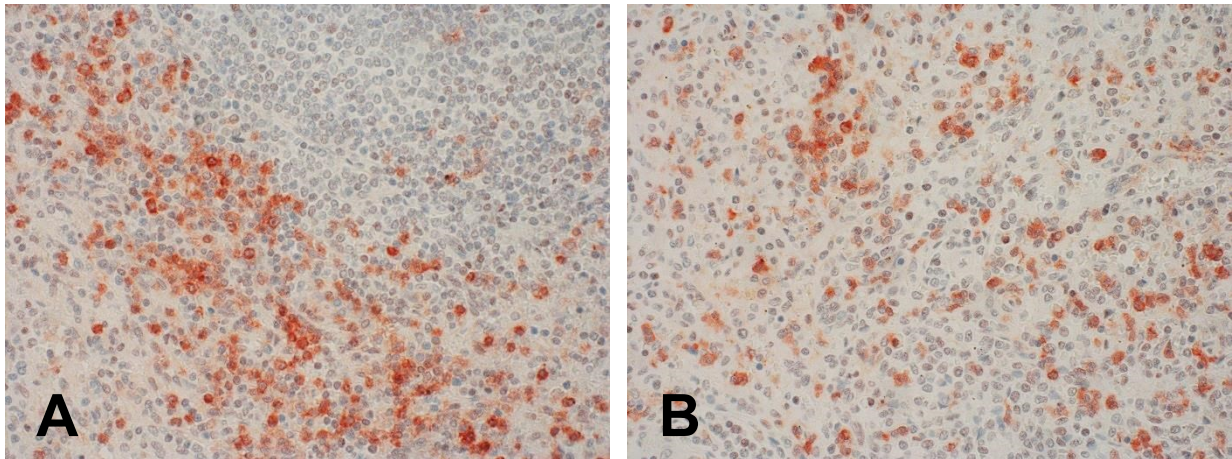


Abbildung 17: C5aR1-Expression im Milzgewebe. Immunhistochemie (rot-braune Färbung), Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x. A: Keimzentrum (rechts oben) und Marginalzone; B: rote Pulpa.

5.1.1.9 Leber

Bei etwa der Hälfte der untersuchten Leber-Präparate zeigte sich eine deutliche zytoplasmatische und teilweise auch membranständige Färbung vor allem der periportal lokalisierten Hepatozyten (Abbildungen 18A und 18B), während in der anderen Hälfte der Lebern die Leberzellen weitgehend negativ waren (Abbildung 18C). In allen Präparaten waren allerdings die infiltrierenden Immunzellen und häufig auch die Kupferzellen (Abbildung 18D) stark positiv. Eine deutliche C5aR1-Expression zeigte sich oftmals auch in den Gallengangsepithelien. Insgesamt ergab sich über alle Präparate gemittelt ein IRS-Wert von 4,80 (Tabelle 3).

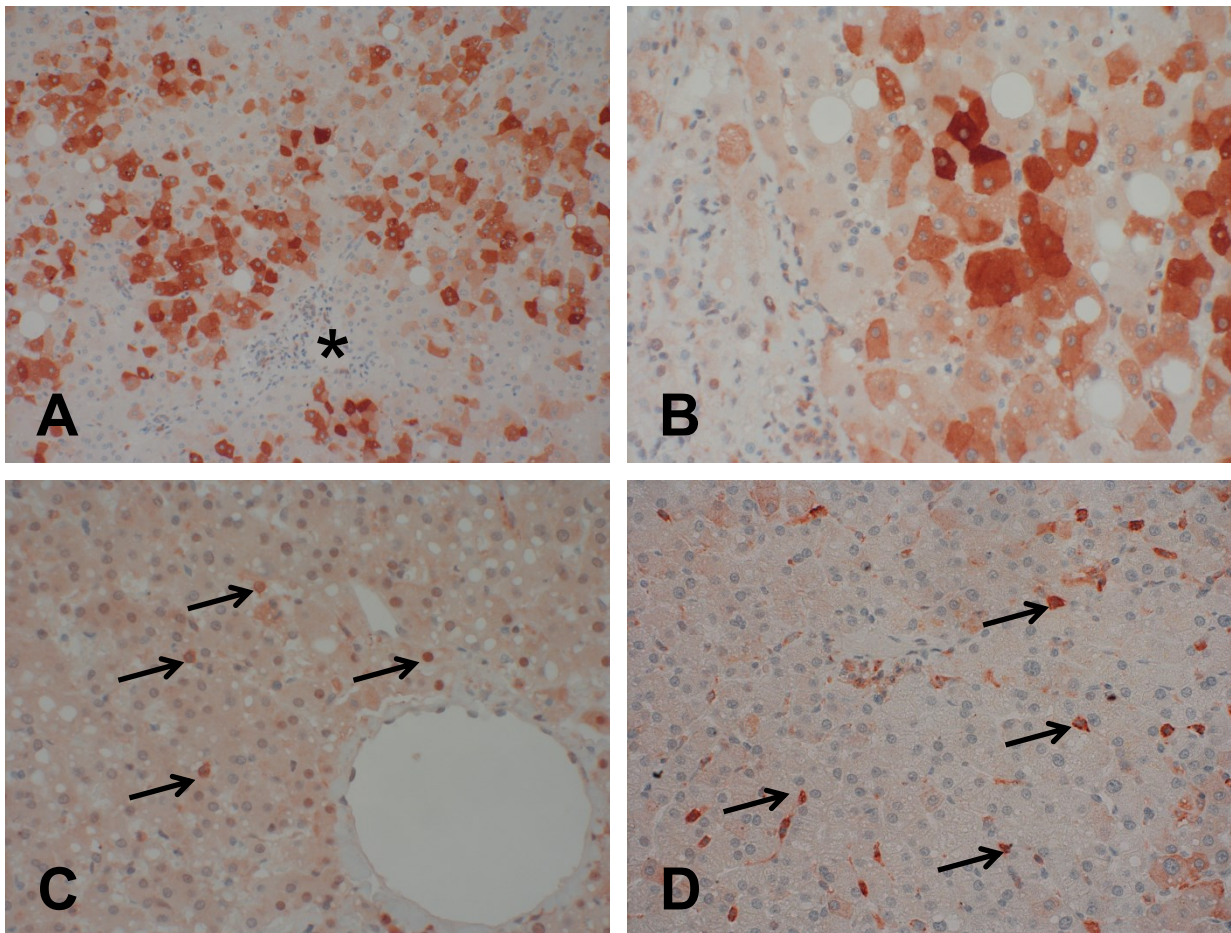


Abbildung 18: C5aR1-Expression im Lebergewebe. Immunhistochemie (rot-braune Färbung), Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: A: 200x, B-D: 400x. A, B: positive Hepatozyten; Stern in A: Portalfeld; C: weitgehend nur schwach gefärbtes Lebergewebe mit einzelnen positiven Immunzellen (Pfeile); D: stark positive Kupferzellen (Pfeile) in ansonsten nur schwach gefärbtem Lebergewebe.

5.1.1.10 Pankreas

Während das exokrine Pankreasgewebe nur eine unspezifische Braunfärbung aufwies und sich damit als komplett C5aR1-negativ darstellte, konnte in einigen äußeren Zellen der Inseln eine leichte Expression des Rezeptors verzeichnet werden (Abbildung 19). Insgesamt wurde den Pankreas-Präparaten ein IRS von 1,50 zugeordnet (Tabelle 3).

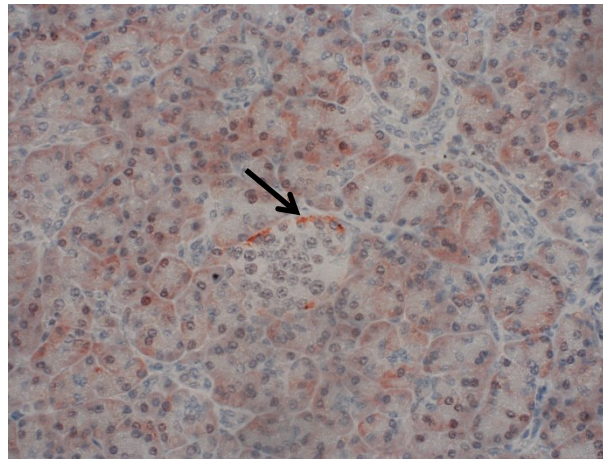


Abbildung 19: C5aR1-Expression im Pankreasgewebe. Immunhistochemie (rot-braune Färbung), Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x. Pfeil: positive Zellen einer Pankreas-Insel.

5.1.1.11 Niere

Im Nierengewebe waren gelegentlich positive B-Lymphozyten und Monozyten/Makrophagen zwischen den Tubuli und in den Glomeruli zu erkennen. Das Nierengewebe selbst war in zwei Präparaten komplett negativ (Abbildung 20A), während in den beiden anderen Proben insbesondere die proximalen Tubuli den C5aR1 deutlich exprimierten (Abbildung 20B). Der durchschnittliche IRS betrug daher 2,00 (Tabelle 3).

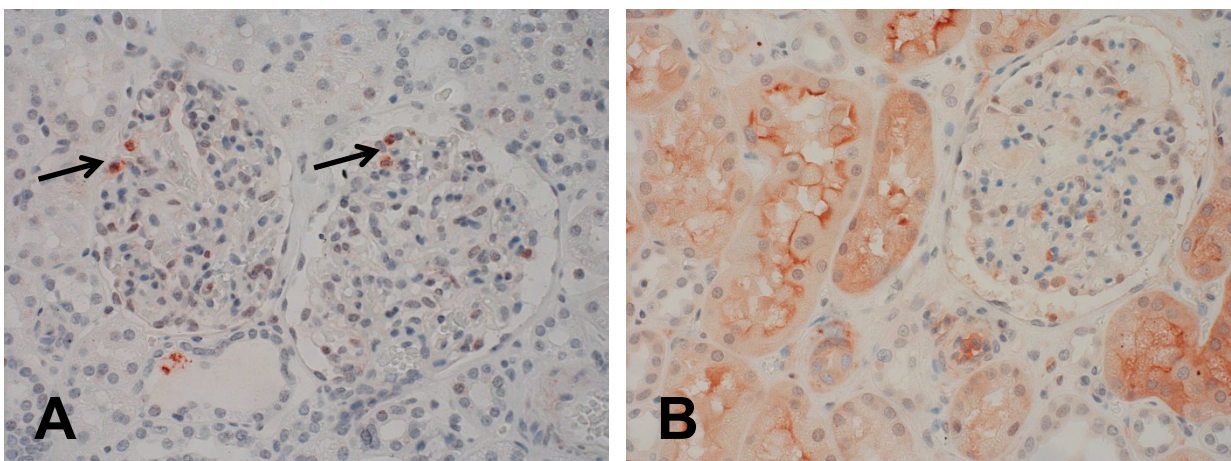


Abbildung 20: C5aR1-Expression im Nierengewebe. Zentral in A dargestellt sind zwei Glomeruli. In B befindet sich das Glomerulum rechts oben; hier sind die proximalen Tubuli deutlich C5aR1-positiv. Immunhistochemie (rot-braune Färbung), Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x. Pfeile in A: positive Immunzellen.

5.1.1.12 Darm

Im Duodenum zeigte sich das Zytoplasma des Zylinderepithels der Kerckringfalten deutlich C5aR1-positiv (Abbildung 21A), wohingegen die Mikrovilli und die für das Duodenum spezifischen Brunnerdrüsen ungefärbt blieben (Abbildung 21B). Auch die Becherzellen waren negativ. Der IRS dieser Präparate lag insgesamt bei 4,33 (Tabelle 3). Auch im Colon konnte eine C5aR1-Expression im Zytoplasma der Epithelzellen verzeichnet werden, während die Becherzellen keine Anfärbung aufwiesen (Abbildung 22). Der IRS der Colon-Präparate betrug im Durchschnitt 4,00 (Tabelle 3).

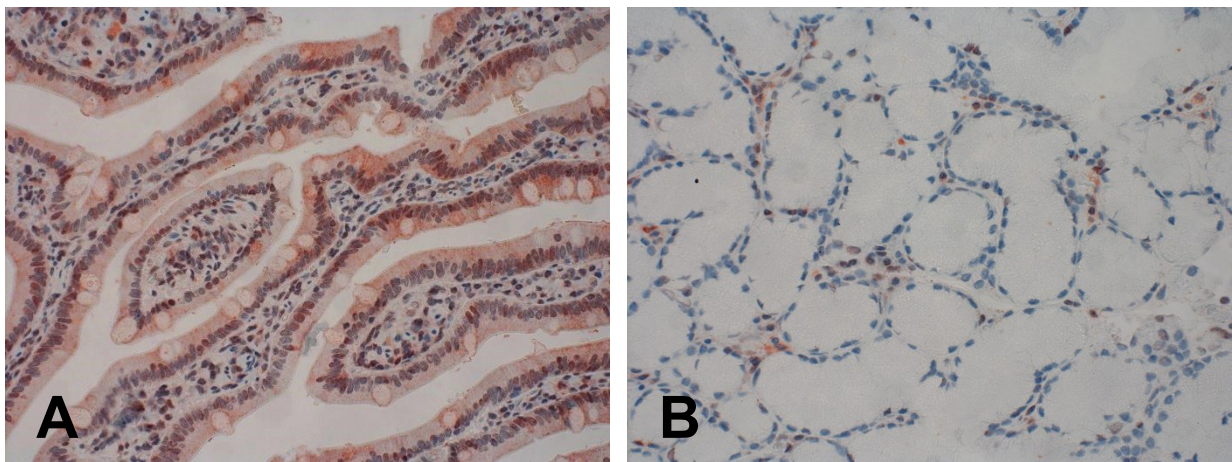


Abbildung 21: C5aR1-Expression im Duodenumgewebe. Immunhistochemie (rot-braune Färbung), Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x. A: Positives Epithel der Kerckringfalten; B: C5aR1-negative Brunner'sche Drüsen.

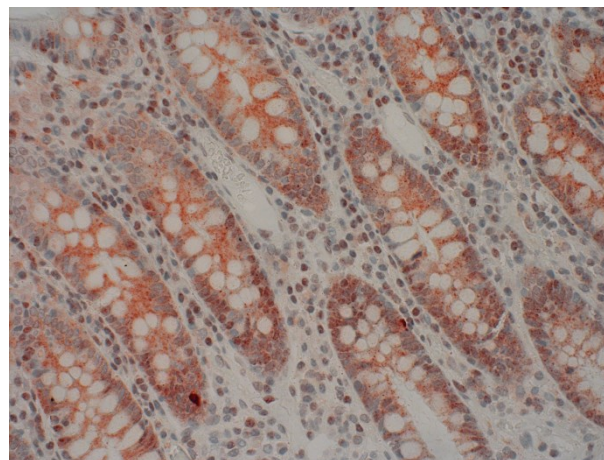


Abbildung 22: C5aR1-Expression im Colongewebe. Immunhistochemie (rot-braune Färbung), Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

5.1.1.13 Placenta

Bei den analysierten Placenta-Präparaten wiesen insbesondere die Synzytiotrophoblasten eine C5aR1-Expression auf (Abbildung 23). Ansonsten war das Gewebe bis auf einige positive Immunzellen weitgehend nicht gefärbt. Der IRS der Präparate betrug im Mittel 4,00 (Tabelle 3).

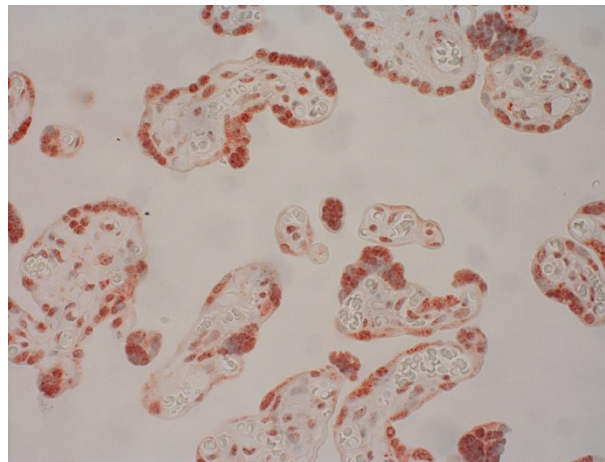


Abbildung 23: C5aR1-Expression im Placentagewebe. Immunhistochemie (rot-braune Färbung), Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

5.1.1.14 Knochen und Knochenmark

Die Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten der untersuchten Knochenproben zeigten keine C5aR1-Expression. Das Knochenmark wies hingegen zahlreiche stark rot gefärbte Zellen auf, die unter anderem myeloischen Stammzellen entsprechen könnten (Abbildung 24). Der IRS des Knochenmarks lag im Durchschnitt bei 4,50 (Tabelle 3).

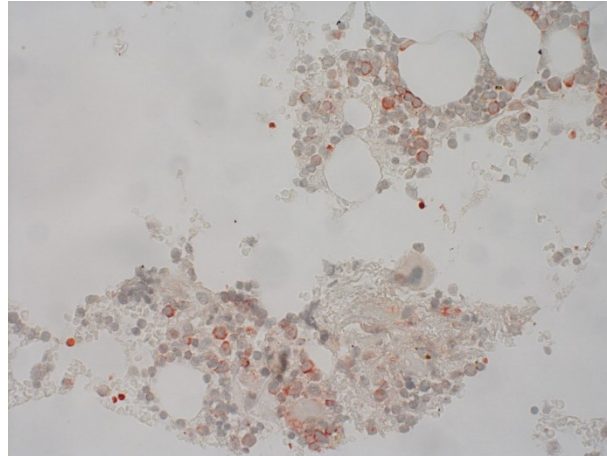


Abbildung 24: C5aR1-Expression im Knochenmark. Immunhistochemie (rot-braune Färbung), Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

5.1.2 Immunhistochemische Untersuchungen an humanen Tumorgeweben

Die meisten Tumore weisen durch eine starke Zellwachstumsrate viele Nekroseareale auf. Diese Gebiete wurden meist unspezifisch angefärbt und wurden in die Ermittlung des IRS nicht mit einbezogen.

5.1.2.1 Glioblastom

Das Glioblastom ist ein bösartiger Tumor, welcher von den Gliazellen des Kortex ausgeht. In den untersuchten Präparaten konnten neben größeren unspezifisch angefärbten Nekrosearealen auch spezifisch angefärbte Lymphozyten und Makrophagen erkannt werden. In einem der untersuchten Tumore fanden sich zusätzlich Ansammlungen von C5aR1-positiven Granulozyten. Eine starke Anfärbung eines Teils der Tumorzellen zeigte sich in vier der acht Präparate (Abbildung 25A und Abbildung 25B), in den restlichen Fällen konnte dagegen keine oder nur eine sehr schwache Positivität der Tumorzellen verzeichnet werden. Die Präparate wurden daher insgesamt mit einem IRS von 3,44 bewertet (Tabelle 4).

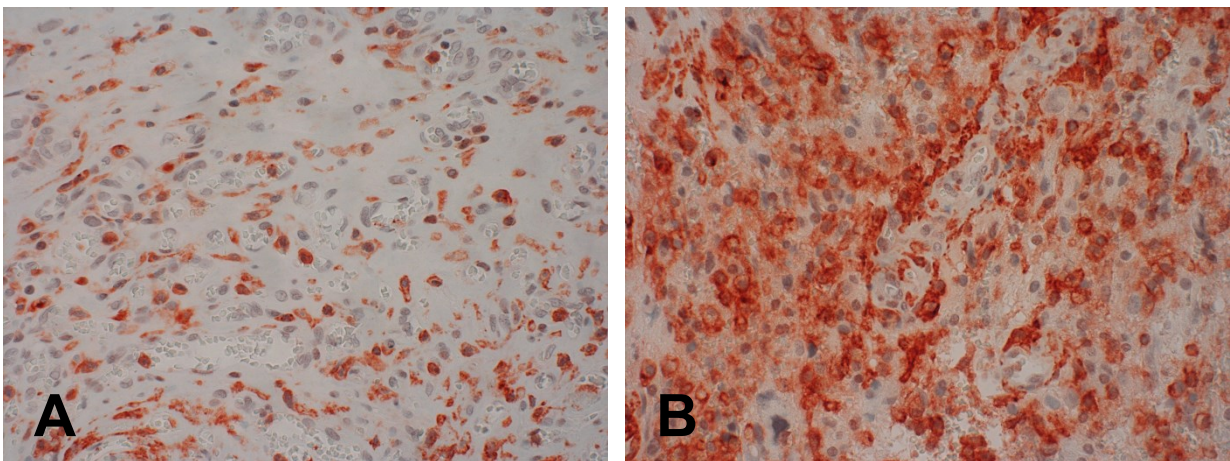


Abbildung 25: C5aR1-Expression im Glioblastom. Immunhistochemie (rot-braune Färbung), Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

5.1.2.2 Meningeom

Von den sechs Meningeom-Gewebeschnitten war einer C5aR1-negativ, während die anderen fünf Proben gering bis mittelstark gefärbt waren (Abbildung 26). Der maximal

erreichte IRS-Wert war 6. Diesen Wert wiesen drei Tumore auf. Über alle Tumore gemittelt lag der IRS insgesamt bei 4,17 (Tabelle 4).

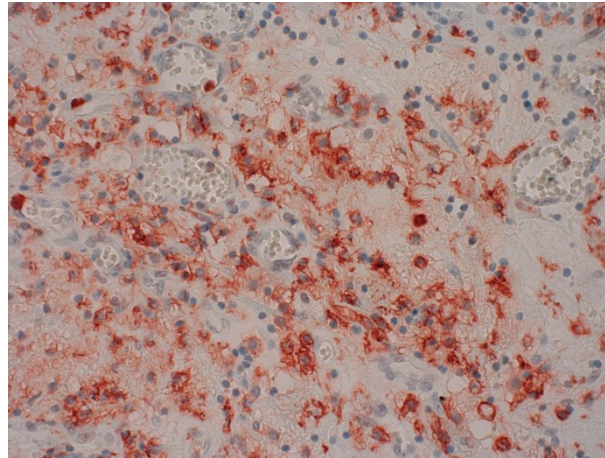


Abbildung 26: C5aR1-Expression im Meningeom. Immunhistochemie (rot-braune Färbung), Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

5.1.2.3 Hypophysenadenom

Bei der Hälfte der Hypophysenadenome konnte keine oder nur eine sehr geringe C5aR1-Expression verzeichnet werden. Die andere Hälfte der Tumore war maximal mittelstark gefärbt (Abbildung 27). Daneben ließen sich in allen Schnitten stark gefärbte Immunzellen beobachten. Auch bei den Hypophysenadenomen lag der maximal erreichte IRS-Wert bei 6. Im Mittel wurde den Präparaten ein IRS von 2,60 zugeordnet (Tabelle 4).

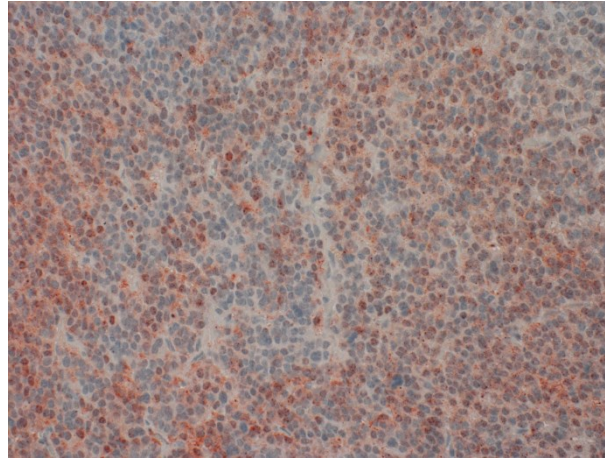


Abbildung 27: C5aR1-Expression im Hypophysenadenom. Immunhistochemie (rot-braune Färbung), Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

5.1.2.4 Schilddrüsen-Karzinome

5.1.2.4.1 Papilläres Schilddrüsen-Karzinom

Alle untersuchten papillären Schilddrüsen-Karzinome waren C5aR1-positiv. Die erreichten IRS-Werte lagen dabei zwischen 4 und 8 und im Durchschnitt bei 5,60 (Tabelle 4). In vielen Fällen konnte ein membranständiges Immunsignal beobachtet werden (Abbildung 28).

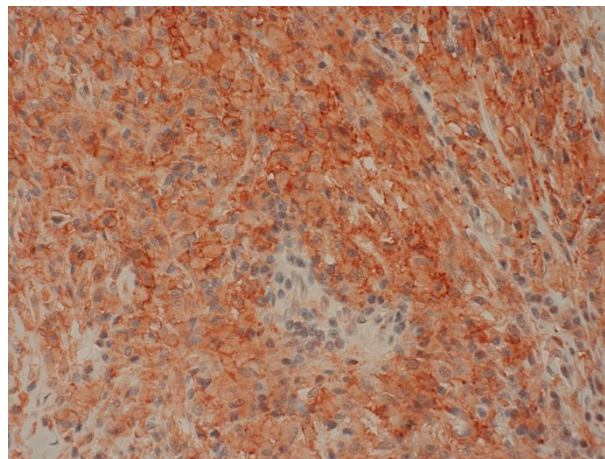


Abbildung 28: C5aR1-Expression im papillären Schilddrüsen-Karzinom. Immunhistochemie (rot-braune Färbung), Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

5.1.2.4.2 Follikuläres Schilddrüsen-Karzinom

Auch bei den untersuchten follikulären Schilddrüsen-Karzinomen wiesen fast alle Präparate eine C5aR1-Expression auf, die sich teilweise membranständig präsentierte. Der maximal erreichte IRS lag wiederum bei 8, allerdings waren die Präparate mit einem durchschnittlichen IRS von 4,50 etwas schwächer gefärbt als bei den papillären Schilddrüsen-Karzinomen (Abbildung 29, Tabelle 4).

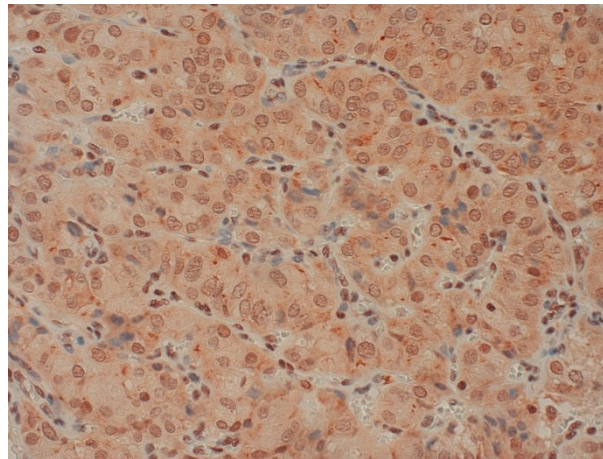


Abbildung 29: C5aR1-Expression im follikulären Schilddrüsen-Karzinom. Immunhistochemie (rot-braune Färbung), Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

5.1.2.4.3 Medulläres Schilddrüsen-Karzinom

Bei den analysierten medullären Schilddrüsen-Karzinomen waren wiederum alle Präparate C5aR1-positiv. Die Präparate wurden mit IRS-Werten zwischen 3 und 8 bewertet, die durchschnittliche Punktzahl lag bei 5,44 (Abbildung 30, Tabelle 4).

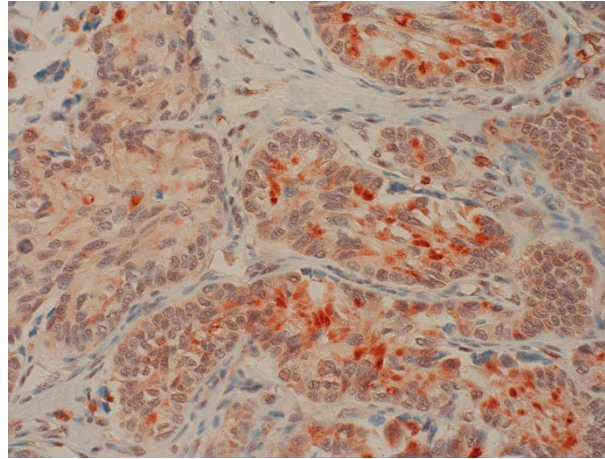


Abbildung 30: C5aR1-Expression im medullären Schilddrüsen-Karzinom. Immunhistochemie (rot-braune Färbung), Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

5.1.2.4.4 Anaplastisches Schilddrüsen-Karzinom

Alle anaplastischen Schilddrüsen-Karzinome zeigten eine mittelstarke bis starke C5aR1-Färbung, wobei das Immunsignal meist membranständig nachweisbar war. Die ermittelten IRS-Werte lagen zwischen 6 und 10 Punkten, im Durchschnitt wurde ein IRS von 7,50 erreicht. Die anaplastischen Schilddrüsen-Karzinome wiesen somit von allen Schilddrüsentumoren die stärkste C5aR1-Expression auf (Abbildung 31, Tabelle 4).

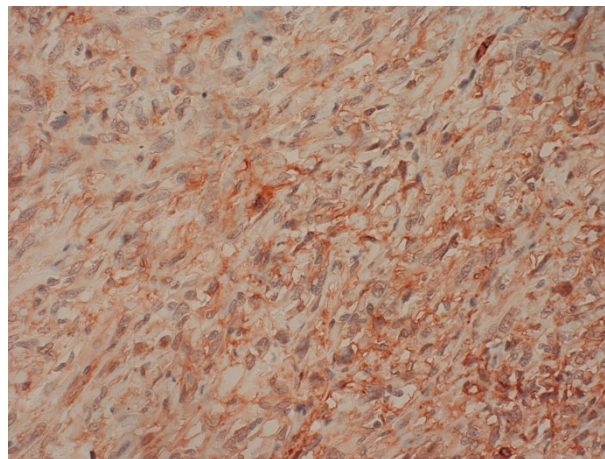


Abbildung 31: C5aR1-Expression im anaplastischen Schilddrüsen-Karzinom. Immunhistochemie (rot-braune Färbung), Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

5.1.2.5 Lungentumore

5.1.2.5.1 Adenokarzinom der Lunge

Bei den Adenokarzinomen der Lunge konnte in der Hälfte der Fälle eine schwache bis mäßig starke zytoplasmatische Färbung der Tumorzellen verzeichnet werden. Teilweise zeigte sich auch ein membranständiges Immunsignal (Abbildungen 32A und 32B). Der IRS dieser Präparate lag gemittelt bei 2,95, maximal wurde ein IRS von 6 erreicht (Tabelle 4).

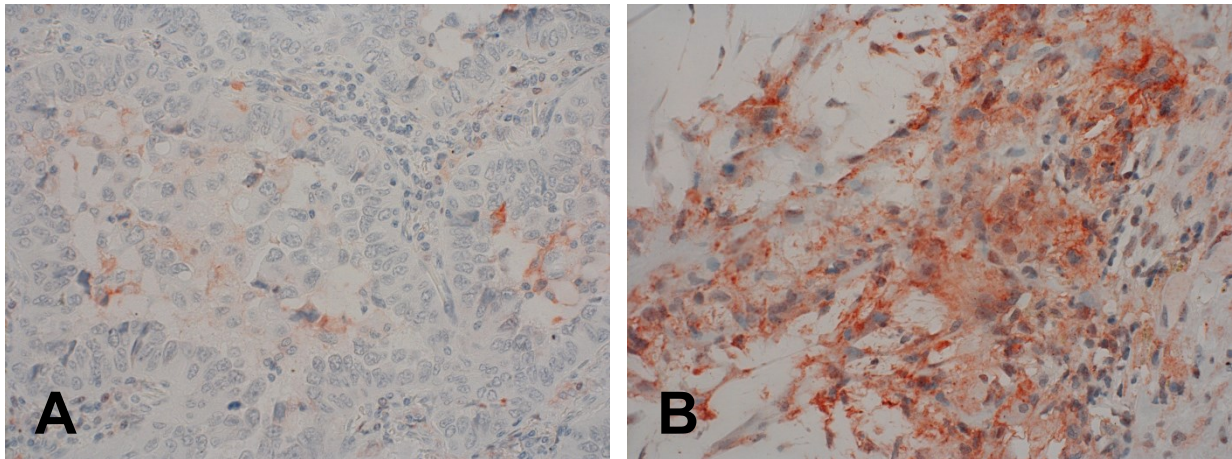


Abbildung 32: C5aR1-Expression im Adenokarzinom der Lunge. Immunhistochemie (rot-braune Färbung), Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

5.1.2.5.1 Plattenepithel-Karzinom der Lunge

Die Plattenepithel-Karzinom-Präparate der Lunge waren insgesamt nur teilweise und meist nur schwach bis mäßig stark angefärbt (Abbildung 33A). Hierbei zeigte sich insbesondere die Proliferationsfront der Karzinome rötlich dargestellt (Abbildung 33B). Auffällig war dabei eine meist membranständige Färbung der Tumorzellen. Im umliegenden Bindegewebe fanden sich zudem zahlreiche positiv gefärbte Makrophagen, Monozyten und Lymphozyten. Im Mittel wurden diese Tumore mit einem IRS von 1,50 bewertet. Der höchste erreichte IRS-Wert lag bei 4,5 (Tabelle 4).

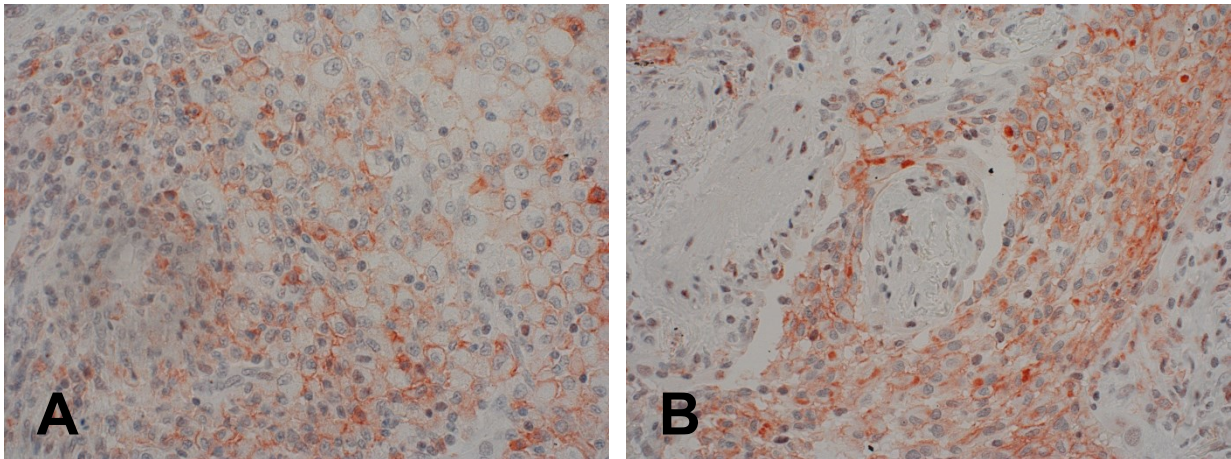


Abbildung 33: C5aR1-Expression im Plattenepithel-Karzinom der Lunge. Immunhistochemie (rot-braune Färbung), Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

5.1.2.5.2 Kleinzelliges Bronchialkarzinom

Von den untersuchten kleinzelligen Bronchialkarzinomen wies etwa die Hälfte der Tumore eine schwache (IRS 2 bis 4) (Abbildung 34A) und die andere Hälfte eine mäßig starke bis starke (IRS 6 bis 8) C5aR1-Expression auf (Abbildung 34B). Der IRS in diesen Neoplasien betrug maximal 8 und wurde im Durchschnitt mit 5,00 bewertet (Tabelle 4).

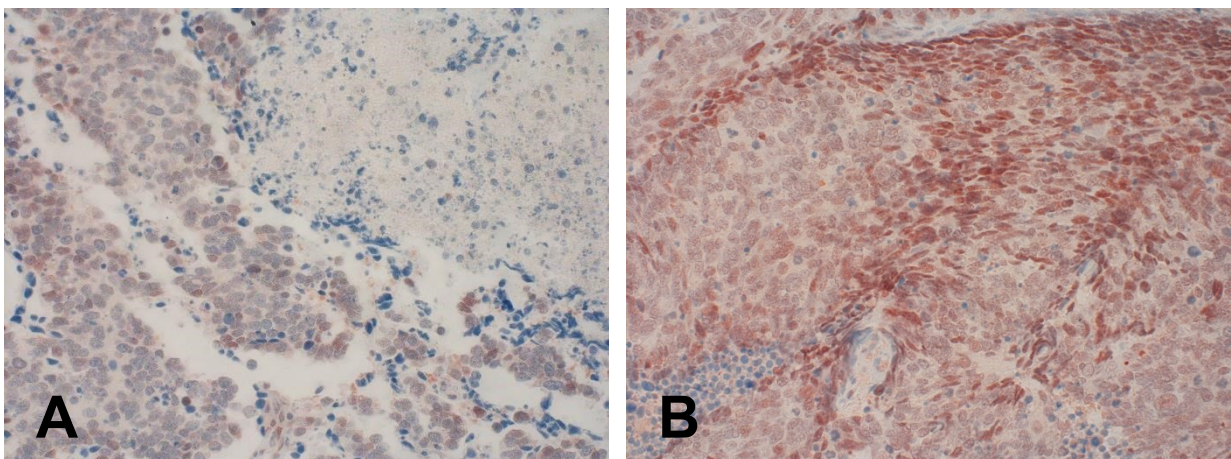


Abbildung 34: C5aR1-Expression im kleinzelligen Bronchialkarzinom. Immunhistochemie (rot-braune Färbung), Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

5.1.2.5.3 Bronchopulmonale neuroendokrine Neoplasie

In den neuroendokrinen Tumoren der Lunge waren neben den meist mäßig bis stark positiven Tumorzellen (Abbildung 35) häufig auch unspezifisch angefärbte

Nekroseareale und zahlreiche kräftig rot gefärbte Immunzellen zu erkennen. Im Durchschnitt wurden die neuroendokrinen Lungentumore mit einem IRS von 5,00 bewertet. Der maximal erreichte IRS-Wert lag sogar bei 12 (Tabelle 4).

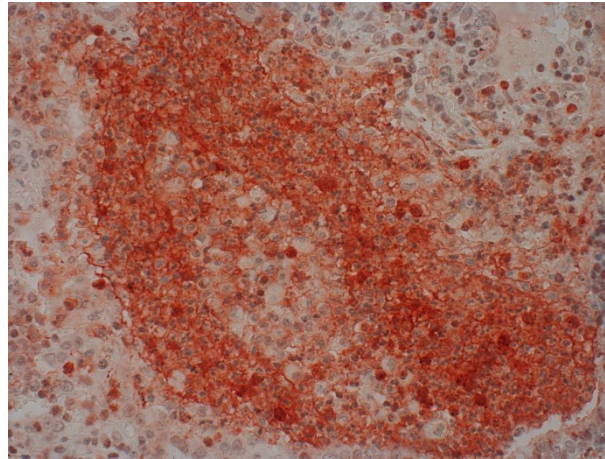


Abbildung 35: C5aR1-Expression in neuroendokrinen Neoplasien der Lunge. Immunhistochemie (rot-braune Färbung), Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

5.1.2.6 Mamma-Karzinom

Bis auf zwei Fälle mit einer geringen C5aR1-Expression waren die untersuchten Mamma-Karzinome größtenteils negativ. Auffällig war allerdings in vielen Fällen eine deutliche Immunfärbung der Kapillaren im Tumorstroma (Abbildungen 36A und 36B). Vereinzelt waren zudem neben positiven Immunzellen auch unspezifisch angefärbte Nekroseareale erkennbar. Der durchschnittliche IRS lag bei 1,22 (Tabelle 4).

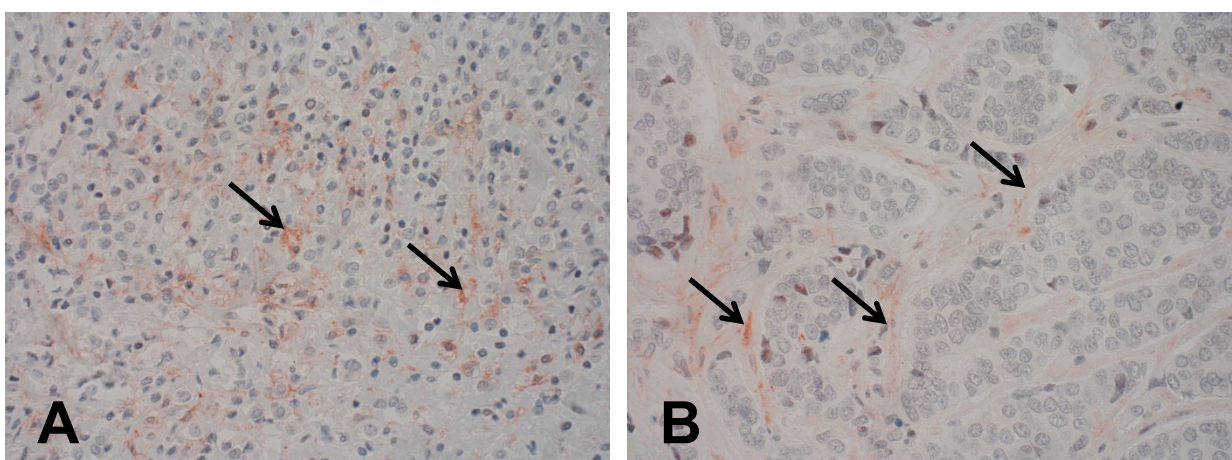


Abbildung 36: C5aR1-Expression im Mamma-Karzinom. Immunhistochemie (rot-braune Färbung), Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x. Pfeile in A und B: positive Kapillaren.

5.1.2.7 Magen-Karzinom

Bei der histologischen Auswertung der Magen-Karzinome fanden sich neben zwei komplett ungefärbten Tumoren in der Mehrzahl jedoch mittelstark bis abschnittsweise sogar stark gefärbte Präparate (Abbildung 37). Insgesamt ergab sich für die Magen-Karzinome ein durchschnittlicher IRS von 4,40 (Tabelle 4).

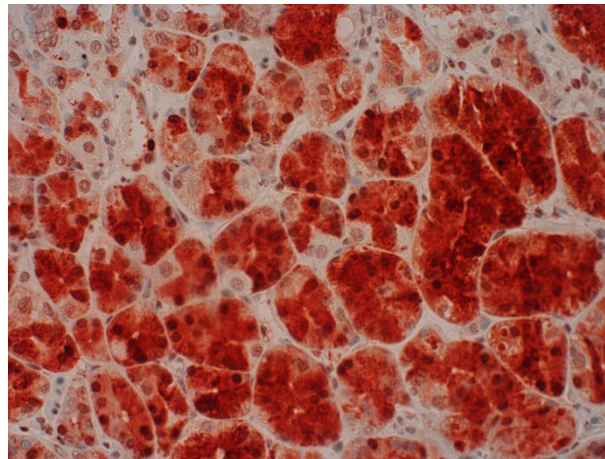


Abbildung 37: C5aR1-Expression im Magen-Karzinom. Immunhistochemie (rot-braune Färbung), Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

5.1.2.8 Lebertumore

5.1.2.8.1 Hepatozelluläres Karzinom

Die untersuchten hepatozellulären Karzinome zeigten ausnahmslos eine mäßige bis starke, teilweise auch membranständige C5aR1-Expression (Abbildungen 38A und 38B). Häufig waren auch die Gefäße in den Tumoren stark positiv. Der IRS lag im Mittel bei 6,20 (Tabelle 4).

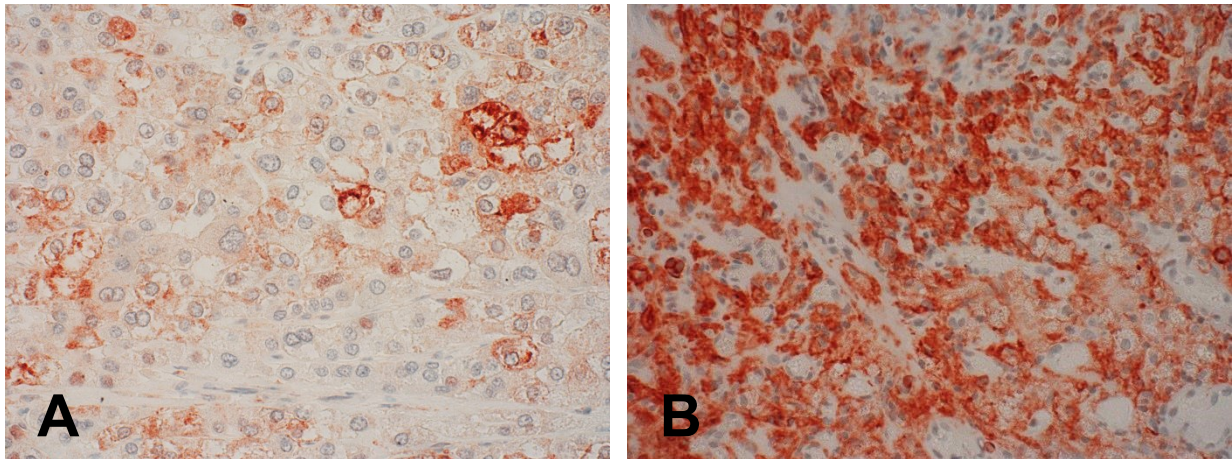


Abbildung 38: C5aR1-Expression im hepatozellulären Karzinom. Immunhistochemie (rot-braune Färbung), Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

5.1.2.8.2 Cholangiozelluläres Karzinom

Bis auf einen Tumor waren auch alle analysierten cholangiozellulären Karzinom-Präparate mäßig bis stark C5aR1-positiv (Abbildung 39). Auch hier konnte in vielen Fällen ein membranständiges Immunsignal beobachtet werden. Der durchschnittliche IRS-Wert war mit 6,77 ähnlich hoch wie bei den hepatozellulären Karzinomen (Tabelle 4).

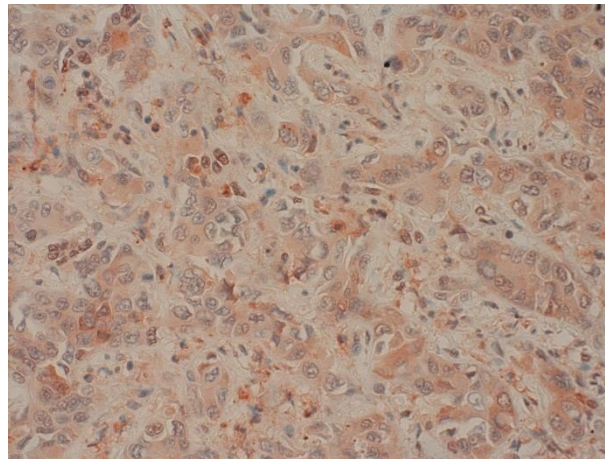


Abbildung 39: C5aR1-Expression im cholangiozellulären Karzinom. Immunhistochemie (rot-braune Färbung), Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

5.1.2.9 Pankreas-Karzinom

Bei den analysierten Pankreas-Karzinomen waren bis auf einen Tumor alle Präparate C5aR1-positiv, wobei die Intensität der Färbung zwischen den Tumoren sehr unterschiedlich war (Abbildungen 40A und 40B). So wurden bei den positiven Präparaten IRS-Werte zwischen 3 und 12 vergeben, drei Tumore wiesen einen IRS von 6 oder höher auf. Der durchschnittliche IRS lag bei 4,55 (Tabelle 4).

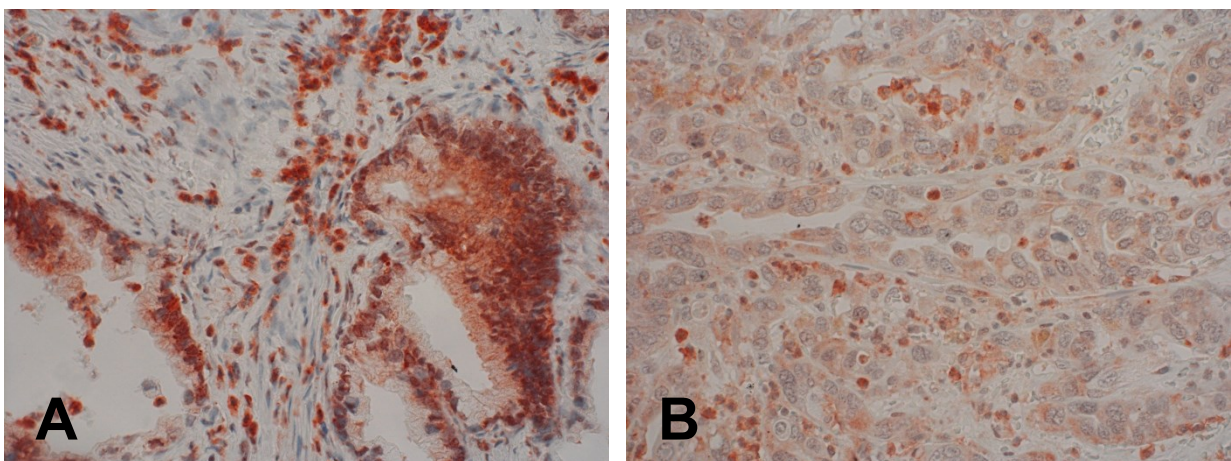


Abbildung 40: C5aR1-Expression im Pankreas-Karzinom. Immunhistochemie (rot-braune Färbung), Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

5.1.2.10 Neuroendokriner Tumor des Pankreas

Von den insgesamt zehn Präparaten der neuroendokrinen Tumore des Pankreas (PanNET) waren sechs etwas stärker angefärbt, die restlichen Tumore waren negativ (Abbildung 41A). In einem der C5aR1-positiven Fälle handelte es sich um eine Lymphknoten-Metastase (Abbildung 41B). Insgesamt ergab sich für diese Tumorentität ein mittlerer IRS von 2,05 (Tabelle 4).

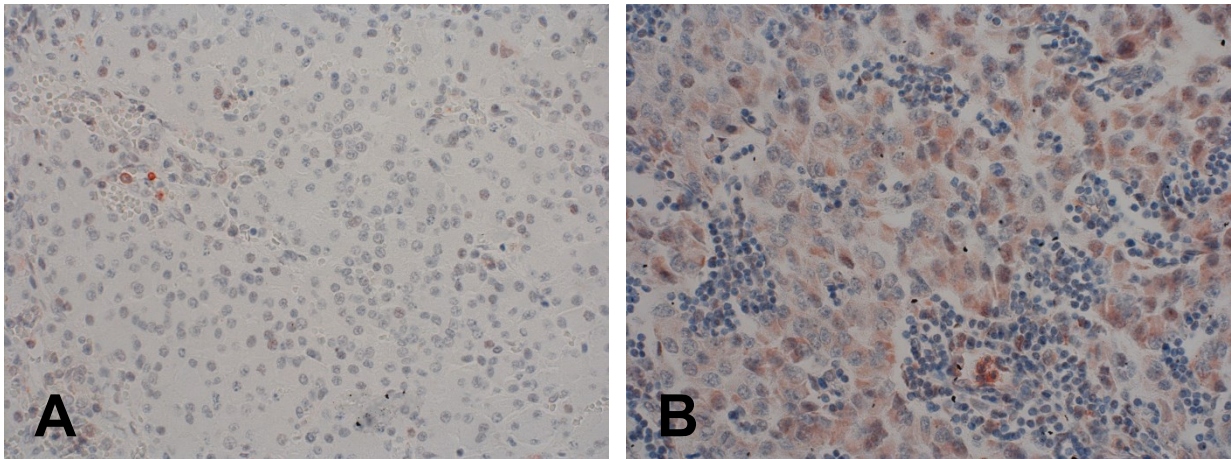


Abbildung 41: C5aR1-Expression im neuroendokrinen Tumor des Pankreas. Immunhistochemie (rotbraune Färbung), Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

5.1.2.11 Colon-Karzinom

Bei den Colon-Karzinomen wiesen fünf der untersuchten neun Präparate eine schwache bis mittelstarke C5aR1-Expression auf (Abbildung 42). Daneben zeigten sich zahlreiche stark positive Immunzellen und unspezifisch angefärbte Nekroseareale. Der IRS dieser Tumore lag im Mittel bei 3,06 (Tabelle 4).

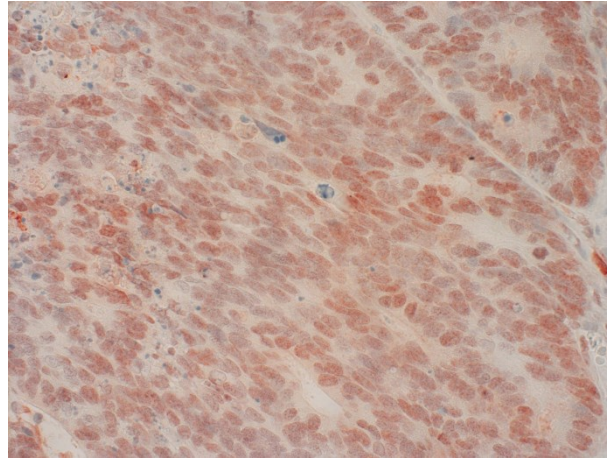


Abbildung 42: C5aR1-Expression im Colon-Karzinom. Immunhistochemie (rot-braune Färbung), Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

5.1.2.12 Gastrointestinaler Stromatumor

Es konnte eine insgesamt mäßige bis starke C5aR1-Expression bei allen GIST-Typen (spindelzellig, epitheloidzellig, gemischtzellig) festgestellt werden, wobei die meisten Präparate (sieben von zehn Tumoren) einen IRS zwischen 8 und 12 und somit eine starke Immunfärbung aufwiesen (Abbildungen 43A und 43B). Der durchschnittliche IRS betrug 8,44 (Tabelle 4).

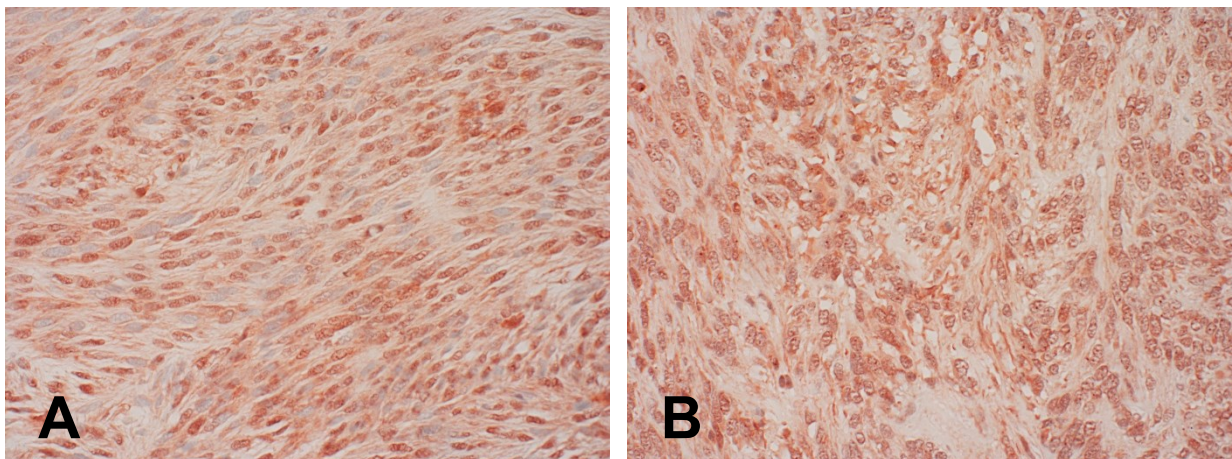


Abbildung 43: C5aR1-Expression im Gastrointestinalen Stromatumor. Immunhistochemie (rot-braune Färbung), Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x. A: spindelzelliger Typ; B: epitheloidzelliger Typ.

5.1.2.13 Phäochromozytom

Bis auf einzelne stark positiv gefärbte Immunzellen waren alle in der vorliegenden Arbeit analysierten Phäochromozytom-Präparate komplett C5aR1-negativ (Abbildung 44). Der durchschnittliche IRS für diese Tumore betrug daher 0 (Tabelle 4).

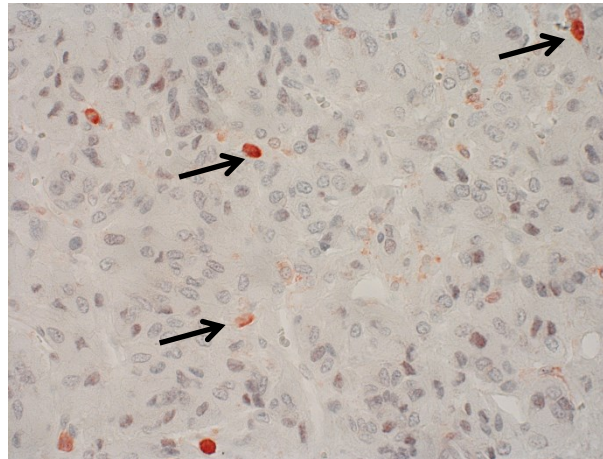


Abbildung 44: C5aR1-Expression im Phäochromozytom. Immunhistochemie (rot-braune Färbung), Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x. Pfeile: positive Immunzellen.

5.1.2.14 Klarzelliges Nieren-Karzinom

Im Gegensatz zu den Phäochromozytomen wiesen alle analysierten klarzelligeren Nieren-Karzinome eine meist membranständige C5aR1-Expression auf (Abbildung 45), wobei die vergebenen IRS-Werte zwischen 4,5 und 8 schwankten. Fünf der sieben Präparate hatten einen IRS von 6. Der mittlere IRS lag dementsprechend bei 6,07 (Tabelle 4).

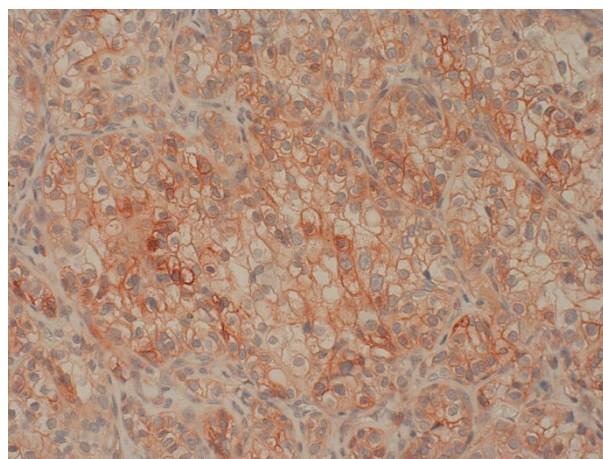


Abbildung 45: C5aR1-Expression im klarzelligem Nieren-Karzinom. Immunhistochemie (rot-braune Färbung), Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

5.1.2.15 Prostata-Karzinom

Die Prostata-Karzinom-Präparate waren fast alle bis auf einige stark positive Immunzellen nicht gefärbt (Abbildung 46A). Lediglich in einem Präparat von zehn konnte eine mittelstarke C5aR1-Expression (IRS von 6) verzeichnet werden (Abbildung 46B). Dadurch ergab sich ein durchschnittlicher IRS von 1,60 (Tabelle 4).

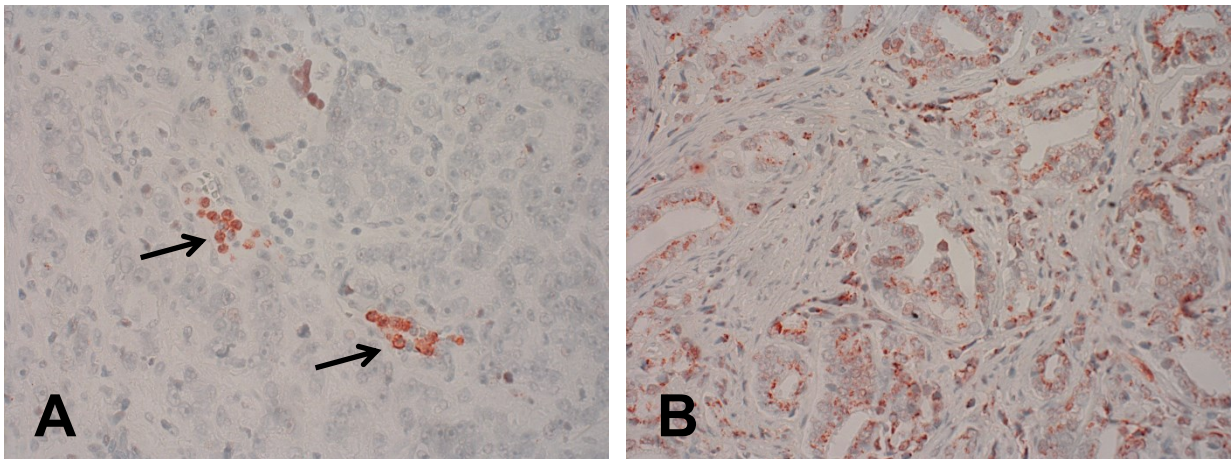


Abbildung 46: C5aR1-Expression im Prostata-Karzinom. Immunhistochemie (rot-braune Färbung), Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x. Pfeile in A: positive Immunzellen.

5.1.2.16 Hoden-Karzinom

Bis auf einen Tumor, der eine teilweise mäßig starke membranständige C5aR1-Expression aufwies, insgesamt aber nur einen IRS von 4 erreichte (Abbildung 47B), waren alle anderen untersuchten Hoden-Karzinome nur schwach gefärbt oder negativ (Abbildung 47A). Im Mittel wurden die Hodentumore daher mit einem IRS von 1,40 bewertet (Tabelle 4).

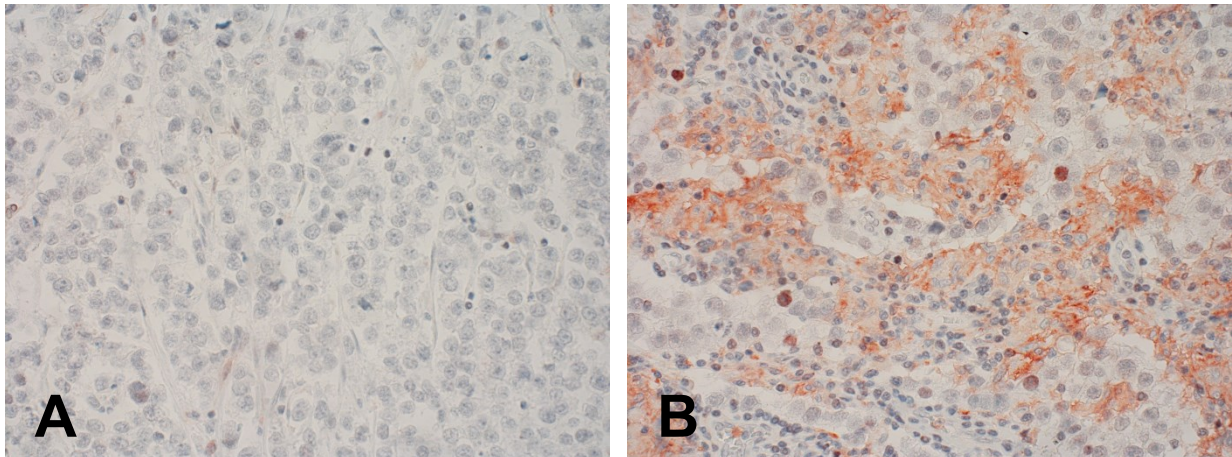


Abbildung 47: C5aR1-Expression im Hoden-Karzinom. Immunhistochemie (rot-braune Färbung), Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

5.1.2.17 Endometrium-Karzinom

Alle analysierten Endometrium-Karzinom-Präparate waren positiv für den C5aR1 (Abbildung 48), wobei sich die vergebenen IRS-Werte zwischen 4 und 8 bewegten. Der mittlere IRS wurde mit 5,60 berechnet (Tabelle 4). Auffällig waren auch hier die häufig stark positiv gefärbten Immunzellen (Abbildung 48).

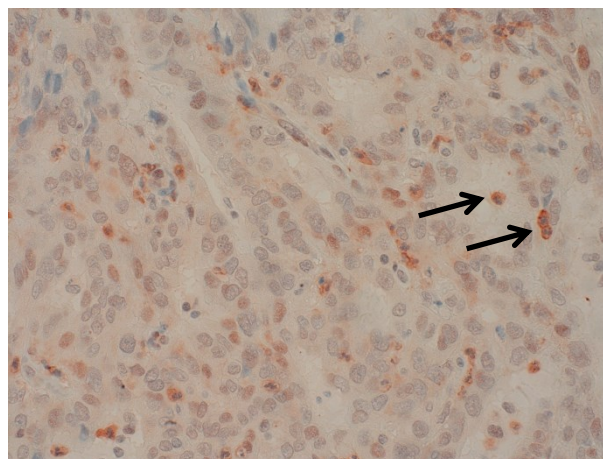


Abbildung 48: C5aR1-Expression im Endometrium-Karzinom. Immunhistochemie (rot-braune Färbung), Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x. Pfeile: stark positive Immunzellen.

5.1.2.18 Cervix-Karzinom

Das Spektrum der Färbungen bei den Cervix-Karzinom-Präparaten reichte von einer nur geringen Positivität bis hin zu einem mäßig starken Immunsignal, das teilweise auch membranständig war (Abbildungen 49A-D). Häufig waren dabei die Proliferationsfronten der Tumore und die Zellen in der Nähe von Nekrosearealen im Vergleich zu den restlichen Tumorzellen stärker gefärbt (Abbildung 49C). Abbildung 49D zeigt eine Lymphknoten-Metastase eines Cervixkarzinoms, mit einer deutlichen, möglicherweise reaktiv verstärkten C5aR1-Expression im umgebenden Lymphknotengewebe. Insgesamt wurden die Präparate mit einem IRS von 4,06 bewertet (Tabelle 4).

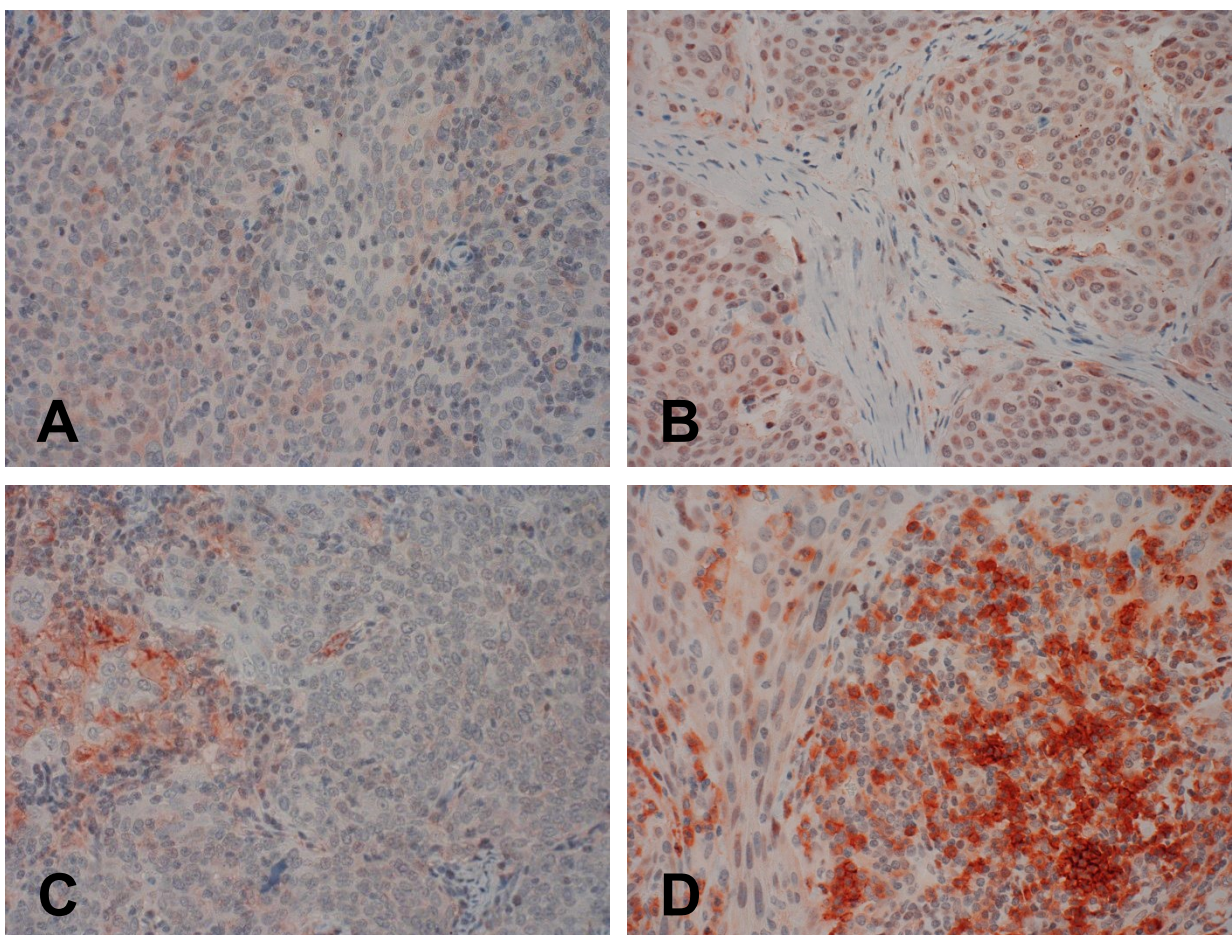


Abbildung 49: C5aR1-Expression im Cervix-Karzinom. Immunhistochemie (rot-braune Färbung), Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

5.1.2.19 Ovarial-Karzinom

Fast alle analysierten Ovarial-Karzinome zeigten eine mäßig starke bis starke C5aR1-Expression, die sich teilweise auch membranständig präsentierte. Auffällig war zudem eine meist stärkere Immunfärbung in der Nähe von Nekrosen. Abbildung 50 zeigt exemplarisch das Expressionsmuster in vier unterschiedlichen Tumoren. Die Präparate wurden insgesamt mit einem IRS von 7,89 bewertet (Tabelle 4).

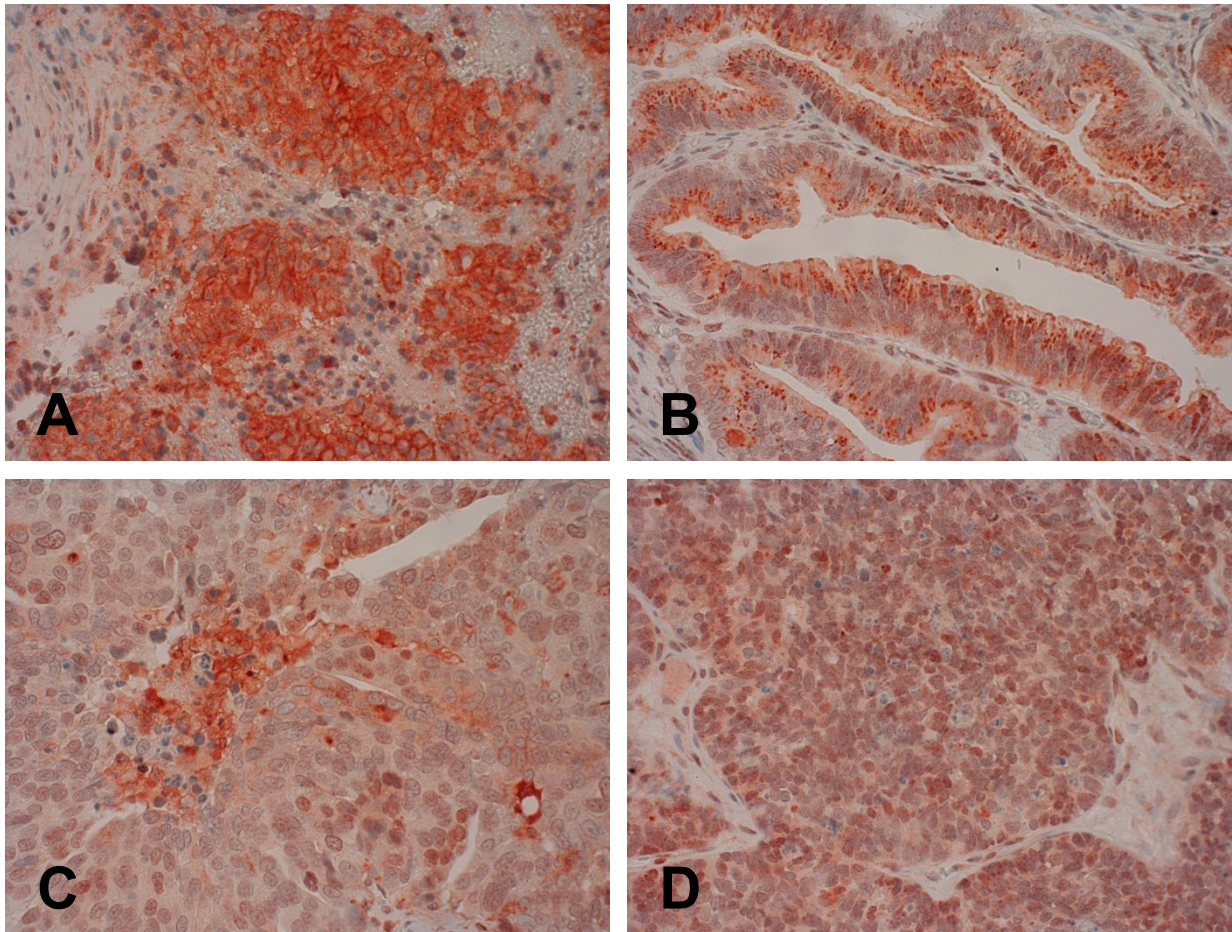


Abbildung 50: C5aR1-Expression in vier verschiedenen Ovarial-Karzinom-Präparaten. Immunhistochemie (rot-braune Färbung), Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

5.1.2.20 Melanom

Von den fünf Melanom-Präparaten konnte lediglich bei zwei Tumoren eine insgesamt geringe C5aR1-Expression beobachtet werden. Allerdings ließ sich in einigen Arealen dieser beiden Tumore eine mäßig starke Präsenz des Rezeptors verzeichnen (Abbildung

51). Die restlichen Präparate waren C5aR1-negativ. Der durchschnittliche IRS aller fünf Tumore lag bei 2,00 (Tabelle 4).

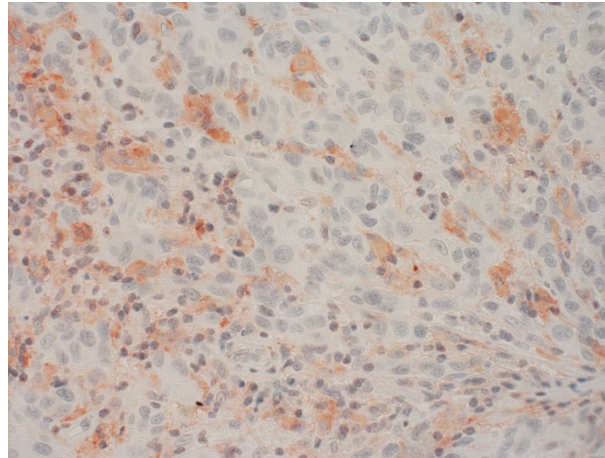


Abbildung 51: C5aR1-Expression im Melanom. Immunhistochemie (rot-braune Färbung), Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

5.1.2.21 Lymphom

Bei den untersuchten Lymphomen handelte es sich ausschließlich um Non-Hodgkin-Lymphome, da sich in den Tumoren Hodgkin- oder Sternberg-Reed-Zellen nicht auffinden ließen. In den Präparaten fielen vor allem die stark C5aR1-positiven Tumorkapillaren auf. Die Lymphomzellen selber waren insgesamt nur leicht bis mäßig stark gefärbt (Abbildung 52). Der IRS betrug im Mittel 3,70 (Tabelle 4).

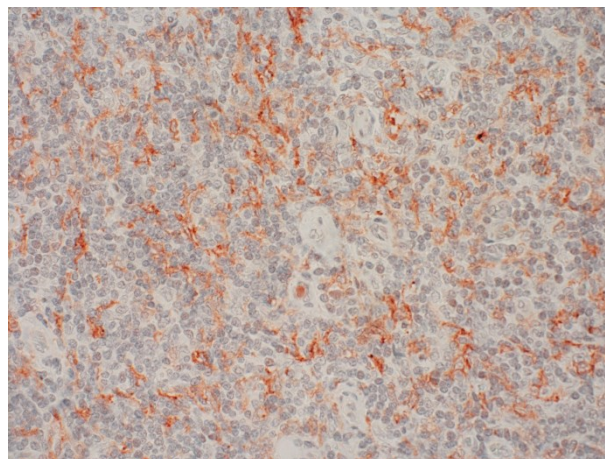


Abbildung 52: C5aR1-Expression im Lymphom. Immunhistochemie (rot-braune Färbung), Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

5.1.2.22 Sarkome

In den vier **Leiomyosarkom**-Präparaten konnte eine nennenswerte Expression des C5aR1 nicht nachgewiesen werden (Abbildung 53). Auch zeigten sich nur ganz vereinzelt stark positive Immunzellen. Der durchschnittliche IRS bei dieser Tumorentität war 0,50 (Tabelle 4).

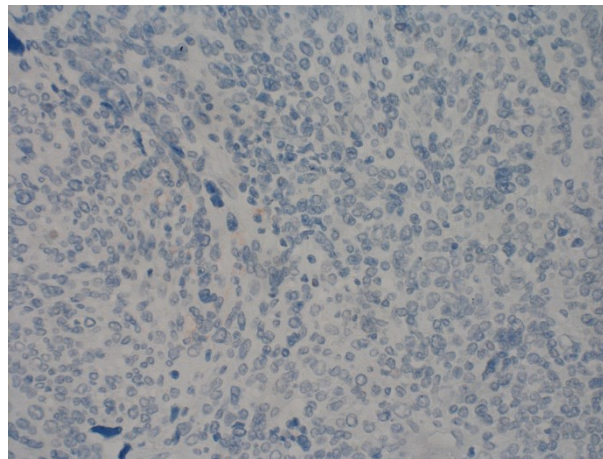


Abbildung 53: C5aR1-Expression im Leiomyosarkom. Immunhistochemie (rot-braune Färbung), Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 200x.

Im Gegensatz zu den Leiomyosarkomen waren zwei der drei **Rhabdomyosarkome** leicht bis mäßig stark C5aR1-positiv (IRS von 3 bzw. 6). Neben den Tumorzellen wiesen auch die Tumorkapillaren eine deutliche Immunfärbung auf (Abbildung 54). Die Präparate wurden insgesamt mit einem IRS von 3,00 bewertet (Tabelle 4).

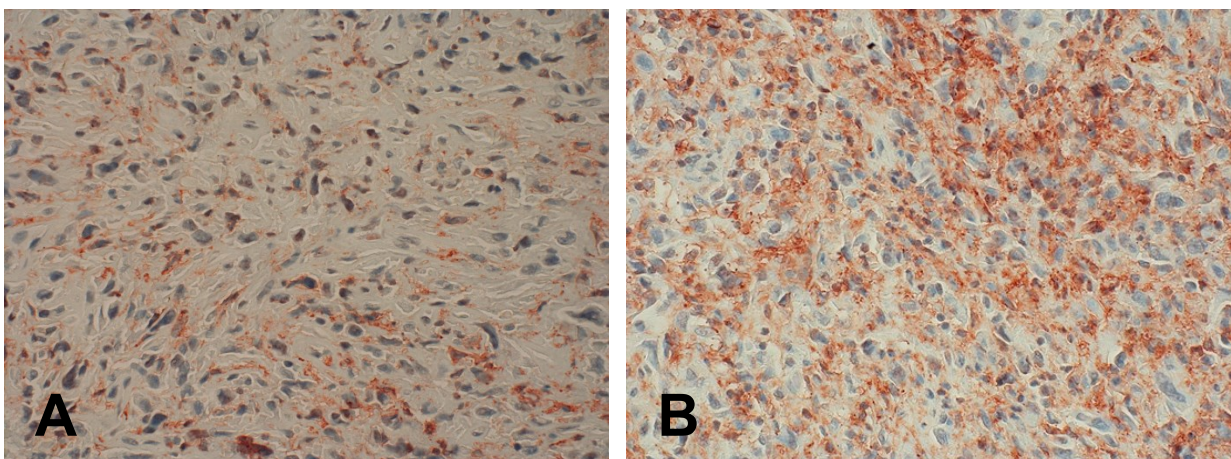


Abbildung 54: C5aR1-Expression im Rhabdomyosarkom. Immunhistochemie (rot-braune Färbung), Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

Bei den **pleomorphen Sarkomen** konnte in einem der beiden Präparate an einer Stelle eine leichte bis mäßige Anfärbung der Tumorzellen verzeichnet werden (Abbildung 55A), während der andere Tumor komplett negativ war (Abbildung 55B). Im ersten Präparat zeigten sich auch die Tumorkapillaren C5aR1-positiv. Den beiden Präparaten wurde ein durchschnittlicher IRS von 1,00 zugeordnet (Tabelle 4).

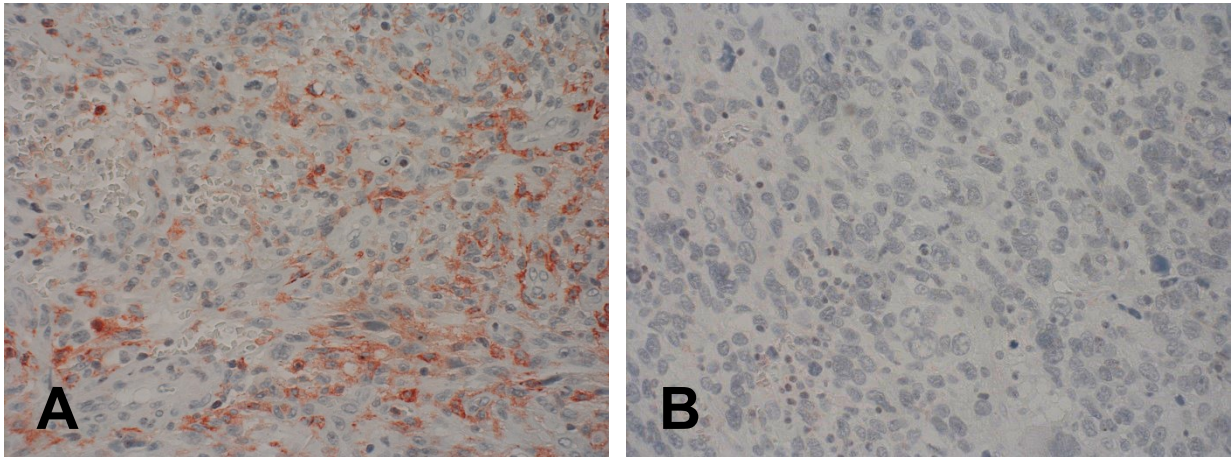


Abbildung 55: C5aR1-Expression im pleomorphen Sarkom. Immunhistochemie (rot-braune Färbung), Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

Die analysierten **Liposarkome** wiesen wiederum keine C5aR1-Expression auf (Abbildung 56). Der mittlere IRS der vier Präparate war daher 0 (Tabelle 4).

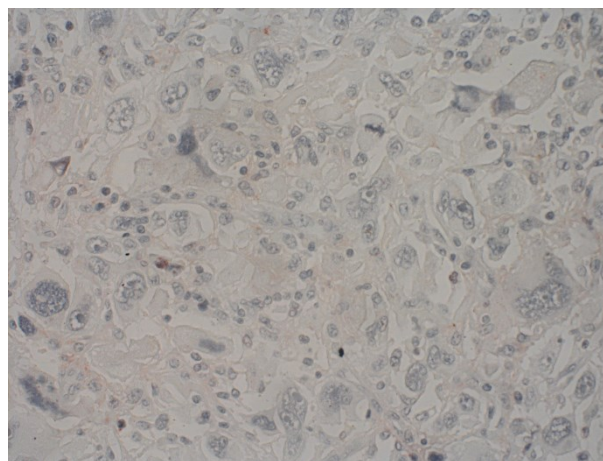


Abbildung 56: C5aR1-Expression im Liposarkom. Immunhistochemie (rot-braune Färbung), Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

Im einzigen untersuchten **Angiosarkom** konnte eine mäßig starke C5aR1-Expression sowohl in den Tumorzellen als auch in den Tumorkapillaren festgestellt werden (Abbildung 57). Diesem Präparat wurde ein IRS von 6,00 zugeordnet (Tabelle 4).

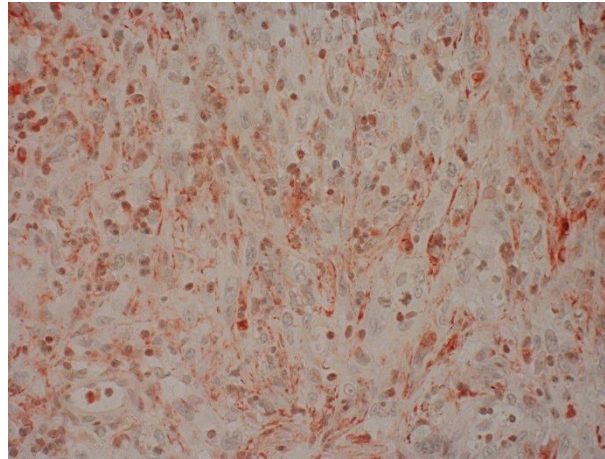


Abbildung 57: C5aR1-Expression im Angiosarkom. Immunhistochemie (rot-braune Färbung), Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 400x.

5.2 Zusammenfassung der immunhistochemischen Ergebnisse

In den Tabellen 3 und 4 sind die Ergebnisse der immunhistochemischen Auswertungen in den Normalgeweben und in den Tumoren noch einmal zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 3: Auswertung der immunhistochemischen C5aR1-Färbung der humanen Normalgewebe anhand des Immunreaktiven Scores (IRS). IRS-Mittelwerte der jeweiligen Gewebe über 3 sind rot und fett hervorgehoben.

Gewebetyp (Gesamtanzahl an Präparaten)	C5aR1-IRS		
	Mittelwert	Minimum	Maximum
Cortex (4)	4,00	4	4
Hypophyse (2)	1,10	0,2	2
Hinterwurzelganglion (3)	0	0	0
Tonsille (6)	2,92	2	4,5
Thymus (6)	0	0	0
Herz (2)	1,75	1,5	2
Lunge (5)	2,28	0,4	5
Milz (4)	6,94	4	10
Leber (10)	4,80	1	9
Pankreas (3)	1,50	1,5	1,5
Niere (4)	2,00	0	4
Duodenum (3)	4,33	3	5
Colon (3)	4,00	4	4
Plazenta (4)	4,00	4	4
Knochen (4)	0	0	0
Knochenmark (4)	4,50	4	5

Tabelle 4: Auswertung der immunhistochemischen C5aR1-Färbung der humanen Tumorgewebe mit Hilfe des Immunreaktiven Scores (IRS). IRS-Mittelwerte der jeweiligen Tumorentitäten über 3 sind rot und fett hervorgehoben.

Tumortyp (Gesamtanzahl an Präparaten)	C5aR1- positive Tumore (Anzahl)	C5aR1-IRS		
		Mittelwert	Minimum	Maximum
Glioblastom (8)	4	3,44	0	9
Meningeom (6)	5	4,17	0	6
Hypophysenadenom (10)	5	2,60	0	6
Schilddrüsen-Karzinom (37)	36	5,76	2	10
- papillär (10)	10	5,60	4	8
- follikulär (10)	9	4,50	2	8
- medullär (9)	9	5,44	3	8
- anaplastisch (8)	8	7,50	6	10
Lungentumore (40)	24	3,61	0	12
- Adenokarzinom (10)	5	2,95	0	6
- Plattenepithel-Karzinom (10)	1	1,50	0	4,5
- SCLC (10)	9	5,00	2	8
- Neuroendokriner Tumor (10)	9	5,00	0	12
Mamma-Karzinom (9)	2	1,22	0	4
Magen-Karzinom (10)	8	4,40	0	6
Hepatozelluläres Karzinom (10)	10	6,20	4	10
Cholangiozelluläres Karzinom (9)	8	6,77	2	12
Pankreas-Karzinom (10)	9	4,55	0	12
PanNET (10)	6	2,05	0	4,5
Colon-Karzinom (9)	5	3,06	1,5	6

GIST (9)	9	8,44	4	12
Phäochromozytom (6)	0	0	0	0
Klarzelliges Nieren-Karzinom (7)	7	6,07	4,5	8
Prostata-Karzinom (10)	1	1,60	0	6
Hoden-Karzinom (10)	3	1,40	0	4
Endometrium-Karzinom (10)	10	5,60	4	8
Cervix-Karzinom (9)	8	4,06	2	6
Ovarial-Karzinom (9)	9	7,89	3	12
Melanom (5)	2	2,00	1	4
Lymphom (10)	8	3,70	2	6
Sarkome (14)				
- Leiomyosarkom (4)	0	0,50	0	2
- Rhabdomyosarkom (3)	2	3,00	0	6
- Pleomorphes Sarkom (2)	0	1,00	0	2
- Liposarkom (4)	0	0	0	0
- Angiosarkom (1)	1	6,00	6	6

6 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Verteilung des C5aR1 in einer großen Zahl verschiedener menschlicher Normalgewebe und Tumore umfassend und detailliert zu charakterisieren, da in der Literatur in vielen Fällen hierzu bisher nur eine geringe Anzahl an wissenschaftlichen Arbeiten zu finden ist.

6.1 Immunhistochemische Untersuchungen an humanen Normalgeweben

Eine Expression des C5aR1 durch Monozyten, Makrophagen, neutrophile Granulozyten, eosinophile Granulozyten, von Monozyten abgeleiteten dendritische Zellen und bestimmten Mastzellpopulationen ist aus der Literatur aus zahlreichen Arbeiten bekannt (Werfel et al. 1992, Soruri et al. 2003, Dunkelberger et al. 2012, Karsten et al. 2015). Auch in der vorliegenden Arbeit konnten in vielen Gewebeschnitten unabhängig von einer Anfärbung gewebe- oder organspezifischer Zellen auch zahlreiche deutlich C5aR1-positive Immunzellen nachgewiesen werden, welche von der Lokalisation und Morphologie her am ehesten Monozoyten, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Mastzellen entsprechen.

In den in der vorliegenden Untersuchung analysierten **Cortex-Präparaten** konnte in zahlreichen Zellpopulationen eine C5aR1-Expression nachgewiesen werden. Von der Morphologie her scheint es sich dabei am ehesten um Neurone, Astrozyten und Mikrogliazellen zu handeln. Eine genaue Zuordnung der C5aR1-positiven Zellen zu den einzelnen Zelltypen ist jedoch nur durch Doppelfärbungen mit den entsprechenden Zellmarkern möglich. Diese sollten deshalb in weiterführenden Analysen unbedingt durchgeführt werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit werden jedoch durch zahlreiche Untersuchungen in der Literatur gestützt, die eine Präsenz des C5aR1 in diesen Zellpopulationen zeigen. So konnte mittels in-situ-Hybridisierung und immunhistochemischer Untersuchungen eine Expression des Rezeptors in den Pyramidenzellen des normalen humanen und murinen Hippocampus und Cortex nachgewiesen werden (O'Barr et al. 2001, Farkas et al. 2003), wobei in den Gehirnen von Alzheimer-Patienten eine Abnahme in der neuronalen C5aR1-Expression verzeichnet werden konnte (Farkas et al. 2003). Neben den Neuronen konnte auch in humanen Astrozyten und Mikrogliazellen sowie in den entsprechenden Zelllinien eine

Präsenz des Rezeptors mittels Immunhistochemie, Immunfluoreszenz, PCR und Western-Blot festgestellt werden, während Oligodendrogliazellen negativ waren (Gasque et al. 1995, Lacy et al. 1995, Gasque et al. 1997). Unter inflammatorischen Bedingungen, wie bei einer Multiplen Sklerose, konnte eine starke Zunahme der C5aR1-Expression in den Astrozyten und Mikrogliazellen beobachtet werden (Gasque et al. 1997). Insgesamt wird der C5a-C5aR-Achse eine wichtige Rolle bei der Entstehung von verschiedenen neurodegenerativen und inflammatorischen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer und Multiple Sklerose zugeschrieben. Daher könnte eine Blockade des C5a oder des C5aR1 eine interessante Therapieoption bei diesen Krankheitsbildern darstellen (Barnum 1995, Gasque et al. 1997, Farkas et al. 2003). So konnte in einem murinen Alzheimer-Modell gezeigt werden, dass C5aR1-defiziente Mäuse geringere kognitive Defizite aufweisen als entsprechende C5aR1-positive Tiere (Hernandez et al. 2017). Auch eine aktive Immunisierung gegen das C5a hatte in einem Alzheimer-Mausmodell eine verbesserte Gedächtnisleistung zur Folge. Dabei zeigte sich auch eine verminderte Aktivierung der Mikrogliazellen im Hippocampus. Bei einer frühzeitigen Behandlung der Tiere im Krankheitsverlauf konnte außerdem eine reduzierte Ablagerung von Amyloid-Plaques im Cortex verzeichnet werden (Landlinger et al. 2015).

In den Präparaten vom **Hypophysenvorderlappen** ließ sich nur in einzelnen oder in kleinen Gruppen zusammen liegenden Zellen eine sehr geringe C5aR1-Expression nachweisen. Um welche Zellpopulation es sich hierbei handelt, kann anhand der C5aR1-Färbung allein nicht beurteilt werden. Dazu wären weiterführende Doppelfärbungen mit den entsprechenden von den Zellen produzierten Hormonen oder Zellmarkern notwendig. Im Gegensatz dazu konnte in der Literatur bei der Ratte sowohl in allen Zelltypen des Hypophysenvorderlappens als auch in den entsprechenden Zelllinien (GH3, MMQ, RC-4B/C, AtT-20DV16, TtT/GF) eine deutliche C5aR1-Expression gezeigt werden. Zudem war es möglich, in AtT-20DV16-Zellen die ACTH-Freisetzung durch eine Behandlung mit dem Komplementfaktor C5a zu stimulieren, was darauf hindeutet, dass diese Zellen funktionelle C5a-Rezeptoren besitzen. Die Autoren schließen aus diesem Befund, dass der Komplementfaktor C5a möglicherweise so über eine vermehrte ACTH-Freisetzung aus der Hypophyse zu einer Herabregulation von inflammatorischen Reaktionen beitragen könnte (Francis et al. 2008).

Die **Hinterwurzelganglien** waren bis auf vereinzelte stark C5aR1-positive Immunzellen negativ. Ein ähnlicher Befund zeigte sich auch in einem Mausmodell für Multiple Sklerose.

Hier fanden sich im Rahmen der Entzündung verstärkt C5aR1-exprimierende Immunzellen bei ansonsten negativen Ganglienzellen (Yousuf et al. 2019).

Bei den **Tonsillen** konnten nur vereinzelt positive Zellen beobachtet werden. Diese waren meist außerhalb der Primärfollikel gelegen und könnten ausgereiften Plasmazellen entsprechen, was durch eine CD19-Doppelfärbung bestätigt werden müsste. Auch die Kapillaren zeigten eine C5aR1-Expression. Diese Ergebnisse entsprechen Befunden aus der Literatur. So konnte anhand von aufgereinigten tonsillären B-Zellpopulationen gezeigt werden, dass Gedächtniszellen zu 40% und naive B-Zellen zu 10% den C5aR1 exprimieren, während die Zellen der Keimzentren C5aR1-negativ sind. Der Komplementfaktor C5a erhöhte zudem die Mobilität von Gedächtniszellen und naiven B-Zellen, nicht jedoch der Zellen aus den Keimzentren. Der C5aR scheint somit auch eine wichtige Funktion im Wanderungsverhalten von Gedächtniszellen und naiven B-Zellen zu besitzen (Ottonello et al 1999).

Die **Thymuspräparate** waren komplett negativ, was gegen eine Expression des C5aR1 in T-Lymphozyten spricht. Dieser Befund entspricht Literaturangaben, nach denen der C5aR1 nur in myeloiden Zellen, wie Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und von diesen abgeleiteten dendritischen Zellen, nicht jedoch in CD4-positiven T-Zellen nachgewiesen werden konnte (Soruri et al. 2003, Dunkelberger et al. 2012, Karsten et al. 2015).

Auch in den **Herzmuskelzellen** selbst konnte eine C5aR1-Expression nicht nachgewiesen werden. In der Literatur zeigte sich jedoch eine Abnahme der Herzfrequenz nach der Behandlung von Mäusen mit einem C5aR1-Antagonisten. Dementsprechend fand sich auch in C5aR1-Knockout-Tieren eine geringere Herzfrequenz als in Wildtyp-Mäusen. Da der Beta-1-Adrenozeptor-Antagonist Atenolol zudem keinen Einfluss auf die Herzfrequenz der C5aR1-Knockout-Mäuse hatte, vermuteten die Autoren eine Interaktion zwischen dem C5aR1 und dem Beta-1-Adrenozeptor, wobei ihrer Ansicht nach noch geklärt werden muss, ob diese Wechselwirkung direkter oder kausaler Art ist (Khor et al. 2016).

Im **Lungengewebe** konnte eine spezifische Färbung des Bronchialepithels sowie von verschiedenen Immunzellen wie Makrophagen beobachtet werden. Dieser Befund stimmt mit den Literaturangaben überein. Wie in der vorliegenden Arbeit konnte auch von anderen Autoren mittels immunhistochemischer Färbungen eine C5aR1-Expression im

Bronchialepithel und in Alveolarmakrophagen von humanen Lungen nachgewiesen werden (Haviland et al. 1995). Neben Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, eosinophilen Granulozyten und residenten sowie von Monozyten abstammenden dendritischen Zellen (Haviland et al. 1995, Skokowa et al. 2005, Karsten et al. 2015, Ender et al. 2017), scheinen aber auch bestimmte Mastzellpopulationen in der Lunge den C5aR1 zu exprimieren. So konnte gezeigt werden, dass Lungen- und Hautmastzellen vom Typ TC (Tryptase-/Chymase-positiv) eine C5aR1-Expression aufweisen und auf eine C5a-Behandlung mit einer Degranulierung reagieren, während Mastzellen vom Typ T (Tryptase-positiv) diese Rezeptoren nicht besitzen und auf das Anaphylatoxin auch nicht ansprechen (Oskeritzian et al. 2005). Weiterhin konnte belegt werden, dass Asthmapatienten eine erhöhte Konzentration an C5a sowie eine gesteigerte Anzahl an neutrophilen und eosinophilen Granulozyten in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit aufweisen (Krug et al. 2001). In einem Mausmodell für allergisches Asthma führte eine Therapie mit dem Anti-C5aR1-Antikörper 20/70 zu einer verminderten bronchialen Übererregbarkeit und zu einer reduzierten Anzahl an neutrophilen und eosinophilen Granulozyten in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (Baelder et al. 2005). Eine Anti-C5a- oder Anti-C5aR1-Therapie könnte daher auch in der Asthmabehandlung eine interessante Therapieoption darstellen (Guo und Ward 2005, Khan et al. 2014).

Bei den **Milzpräparaten** waren insbesondere die Makrophagen in der roten Pulpa stark C5aR1-positiv, wobei dieser Befund noch mit Doppelmarkierungen mit entsprechenden Markern bestätigt werden müsste. Eine C5aR1-mRNA-Expression in der Milz konnte auch von anderen Autoren gezeigt werden, wobei eine Differenzierung in verschiedene Zelltypen dort nicht erfolgt ist (Haviland et al. 1995). Immunhistochemische Untersuchungen zur C5aR1-Expression in der Milz existieren in der Literatur bisher nicht. Wie schon im Thymus, konnte auch in den Milzpräparaten eine Präsenz des C5aR1 auf den T-Lymphozyten ausgeschlossen werden, da die periarteriolen lymphatischen Scheiden (PALS) ungefärbt blieben.

In etwa der Hälfte der untersuchten **Leberpräparate** konnte eine deutliche zytoplasmatische und teilweise auch membranständige Färbung vor allem der in den periportalen Leberläppchen gelegenen Hepatozyten verzeichnet werden, während sich die Leberzellen in der anderen Hälfte der Leberschnitte gänzlich negativ präsentierten. In

allen Präparaten zeigten sich allerdings die infiltrierenden Immunzellen und häufig auch die Kupfferzellen sowie die Gallengangsepithelien stark C5aR1-positiv. Diese Befunde stimmen mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen überein. In der Literatur konnte an Ratten mittels PCR, FACS-Analysen und Immunhistochemie gezeigt werden, dass unter normalen Bedingungen in Hepatozyten kein C5aR1 exprimiert wird, anders als in Kupfferzellen, hepatischen Sternzellen (Ito-Zellen) und (in geringerem Ausmaß) in Endothelzellen (Schieferdecker et al. 2001, Schlaf et al. 2003). Auch in der menschlichen Leber scheint der C5aR1 unter normalen Umständen in den Hepatozyten laut Literatur nicht präsent zu sein (Zwirner et al. 1999, Fayyazi et al. 2000). Unter inflammatorischen Bedingungen, möglicherweise ausgelöst durch eine Interleukin-6-Freisetzung aus Kupfferzellen, wird die C5aR1-Expression in Hepatozyten jedoch sowohl bei der Maus und der Ratte als auch beim Menschen deutlich induziert (Haviland et al. 1995, Schieferdecker et al. 2001, Schlaf et al. 2003). Auch nach einer partiellen Hepatektomie konnte bei Ratten eine deutliche Hochregulation der C5aR1-Expression in der regenerierenden Leber gezeigt werden (Daveau et al. 2004). Es könnte also durchaus sein, dass in den positiven Präparaten der vorliegenden Untersuchung eine Entzündung und/oder vermehrte Regenerationsvorgänge vorgelegen haben. Diese Frage müsste in weitergehenden Untersuchungen an einer größeren Anzahl von Präparaten und unter Abgleichung mit den klinischen Daten der Patienten abgeklärt werden. Eine Expression des C5aR1 in den Gallengängen von menschlichen Lebern konnte wie in der vorliegenden Arbeit auch von anderen Autoren gezeigt werden (Nitta et al. 2013).

In den untersuchten **Pankreaspräparaten** zeigten sich lediglich einige wenige äußere Zellen der Inseln C5aR1-positiv. Von der Anzahl und der Lokalisation her könnten diese Zellen entweder Glukagon-, Somatostatin- oder Pankreatisches-Polypeptid-produzierende Zellen darstellen. Die Insulin-produzierenden Beta-Zellen, welche die Mehrheit der Inselzellen ausmachen, waren dagegen komplett negativ. Die genaue Zuordnung zum Zelltyp müsste in weiterführenden Untersuchungen in Doppelfärbungen mit den entsprechenden Hormonen allerdings auf jeden Fall noch geklärt werden. Eine C5aR1-Expression in den Pankreasinseln wird in der Literatur bisher nur auf mRNA-Ebene beschrieben. So wurde in einer Arbeit über eine niedrige bis mittelstarke C5aR1-mRNA-Expression in den Pankreasinseln des Menschen und der Maus berichtet, wobei jedoch, methodisch bedingt, zwischen den verschiedenen Zelltypen nicht differenziert werden konnte. Eine Behandlung der Inseln in vitro mit dem Komplementfaktor C5a oder

mit einem C5aR1-Agonisten führte zu einer Erhöhung der intrazellulären Calcium- und ATP-Konzentration, zu einer Potenzierung der Glukose-induzierten Insulin-Sekretion und zu einem Schutz der Inselzellen vor Apoptose, während ein C5aR1-Antagonist die Insulinfreisetzung hemmte. Die Autoren vermuteten daher im Gegensatz zu den Färbeergebnissen der vorliegenden Arbeit, dass der C5aR1 auf den Beta-Zellen des Pankreas exprimiert wird und dass eine leichtgradige chronische Entzündung die Glukose-Homöostase über einen direkten Effekt auf die Beta-Zellen verbessert (Atanes et al. 2018). In einer weiteren Arbeit wird in einem Maus-Modell für eine Diät-induzierte Fettleibigkeit über einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten C5aR1-mRNA-Expression im Fettgewebe, einer vermehrten Präsenz von proinflammatorischen Makrophagen und der Entwicklung einer Insulinresistenz berichtet. Dementsprechend wiesen Mäuse mit einer C5aR1-Defizienz eine verbesserte Insulinsensitivität und eine geringere Gesamtzahl an Makrophagen sowie eine verminderte Menge an proinflammatorischen M1-Makrophagen im Fettgewebe auf. Zwischen den Wildtyp- und den C5aR1-Knockout-Tieren mit fettreicher Diät fand sich jedoch kein Unterschied in der Morphologie der Pankreas-Inseln und der Masse an Beta-Zellen. Andere Zelltypen wurden dabei leider nicht untersucht (Phieler et al. 2013). Im exokrinen Pankreas konnte in der vorliegenden Arbeit keine spezifische C5aR1-Expression festgestellt werden. In verschiedenen Maus-Modellen für eine chronische Pankreatitis konnte allerdings eine Beteiligung der C5a-C5aR1-Achse an der Entstehung einer Fibrose aufgezeigt werden. So entwickelten C5-defiziente Mäuse und Wildtyp-Mäuse, denen ein C5aR1-Antagonist injiziert worden war, eine geringere Fibrosierung des Pankreas als nicht-behandelte Wildtyp-Tiere, obwohl der initiale Schaden bei allen Tieren gleich stark ausgeprägt war. In parallel durchgeführten in-vitro-Versuchen konnte zudem eine vermehrte Aktivierung von Pankreassternzellen durch C5a demonstriert werden (Sendler et al. 2015).

Während zwei der analysierten vier **Nierenpräparate** bis auf einige positive Immunzellen komplett negativ waren, zeigte sich in den beiden anderen Proben eine zusätzliche Expression des C5aR1 in den proximalen Tubuli. Auch in der Literatur konnte von zahlreichen Arbeitsgruppen mittels PCR, in-situ-Hybridisierung, FACS-Analysen oder immunhistochemischer Untersuchungen neben der Präsenz in Immunzellen eine Anwesenheit des C5aR1 in den proximalen Tubuli der normalen menschlichen Niere beobachtet werden (Zwirner et al. 1999, Fayyazi et al. 2000, Zahedi et al. 2000, Nitta et al. 2013). Im Gegensatz dazu wurde von van Werkhoven et al. (2013) in der gesunden

menschlichen Niere mittels Immunhistochemie eine Expression des C5aR1 im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife und im ersten Stück des distalen Tubulus verzeichnet. Erst unter entzündlichen Bedingungen, bei akuter Tubulusnekrose, akuter zellulärer und vaskulärer Transplantat-Abstoßung oder interstitieller Fibrose und Tubulusatrophie, konnte der Rezeptor auch in den proximalen Tubuli aufgefunden werden. In einer weiteren Arbeit wurde zwar mittels in-situ-Hybridisierung und Immunhistochemie in den Nierentubuli von gesunden menschlichen Nieren eine C5aR1-Expression nachgewiesen, wobei die Expression des Rezeptors bei verschiedenen Nierenerkrankungen erhöht war, ohne dass jedoch eine Zuordnung zu den verschiedenen Tubulusabschnitten vorgenommen wurde (Abe et al. 2001). Vor dem Hintergrund dieser kontroversen Ergebnisse sind auf jeden Fall weiterführende Untersuchungen auch zur möglichen Funktion des Rezeptors in den Epithelzellen der unterschiedlichen Tubulusabschnitte notwendig.

In den Präparaten des **Duodenums** und **Colons** war neben den positiv gefärbten Immunzellen das Zytoplasma des Zylinderepithels deutlich C5aR1-positiv. Die Brunnerdrüsen des Duodenums und die Becherzellen exprimierten den Rezeptor dagegen nicht. Wie in den Nierentubuluszellen sind die Literaturangaben auch bezüglich einer C5aR1-Expression im Darmepithel kontrovers. Während einige Arbeitsgruppen den C5aR1 im normalen menschlichen Darmepithel nicht nachweisen konnten (Fayyazi et al. 1999, Nitta et al. 2013), konnte von anderen Autoren eine Präsenz des Rezeptors im Dünn- und Dickdarm von Maus und Pavian aufgezeigt werden (Haviland et al. 1995). Auch hier sind daher weiterführende Untersuchungen notwendig.

In der vorliegenden Untersuchung konnte in den **Plazentapräparaten** eine spezifische Expression des C5aR1 in den Synzytiotrophoblasten nachgewiesen werden. Auch dieses Ergebnis stimmt mit den Befunden aus der Literatur überein. So untersuchten Lappas et al. (2012) Plazentagewebeproben, welche nach einer normalen Schwangerschaft während eines Kaiserschnitts entnommen worden waren. Diese Präparate wurden in Gegenwart oder in Abwesenheit von C5a inkubiert und anschließend hinsichtlich einer Expression verschiedener proinflammatorischer Enzyme, Zytokine und Mediatoren untersucht. Hierbei konnte eine Zunahme der Expression dieser Entzündungsparameter nach Inkubation der Proben mit C5a beobachtet werden. Die Behandlung mit einem selektiven C5aR1-Antagonisten bewirkte dagegen eine signifikante Abnahme der Expressionsraten der Mediatoren, was darauf hindeutet, dass die C5a-vermittelte

Entzündungsmediator-Ausschüttung im Placentagewebe über den C5aR1 erfolgt sein muss (Lappas et al. 2012). In einer anderen Studie wurde das Placentagewebe von 13 Frauen mit geplantem Schwangerschaftsabbruch und 14 Frauen mit erlittener Fehlgeburt hinsichtlich der Anwesenheit von C3a und C5a untersucht. Hierbei konnte bei den Frauen mit erlittenem Abort eine deutlich höhere C5a-Konzentration im Serum festgestellt werden, als bei denen mit elektivem Schwangerschaftsabbruch. Gleichzeitig war die mRNA-Expression der das Komplementsystem hemmenden Faktoren CD46 und CD55 im Placentagewebe der Patientinnen mit spontanem Abort erniedrigt. Die Wissenschaftler schlussfolgerten daraus, dass eine Dysregulation des Komplementsystems mit der Entstehung von spontanen Aborten in Zusammenhang stehen könnte (Banadakoppa et al. 2014). Weiterhin konnte in einem Mausmodell mit spontanen Aborten und intrauteriner Wachstumsretardierung gezeigt werden, dass eine Aktivierung des Komplementsystems, speziell der C5a/C5aR1-Achse, zu einer Imbalance zwischen pro- und antiangiogenetischen Faktoren und damit zu einer Dysfunktion der Placenta führt (Girardi et al. 2006). Ein ganz ähnliches C5aR1-Expressionsmuster wie in der vorliegenden Arbeit konnte schließlich mittels Immunfluoreszenz durch Ma et al. (2018) gezeigt werden. Hierbei konnte bei Patientinnen mit Präeklampsie eine erhöhte C5a-Expression in Makrophagen und eine vermehrte C5aR1-Expression in Trophoblasten gefunden werden. Eine Stimulation der Trophoblasten mit C5a führte zu einem antiangiogenetischen Phänotyp der Trophoblasten und verhinderte deren Migration (Ma et al. 2018). Das C5a stellt somit eine wichtige Komponente bei Immunsystem-getriggerten Schwangerschaftskomplikationen, wie Abort, intrauterine Wachstumsretardierung und Präeklampsie dar und eine Blockade des C5a oder des C5aR1 könnte auch hier ein interessanter Behandlungsansatz sein (Girardi et al. 2006, Lappas et al. 2012, Banadakoppa et al. 2014).

Die Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten der untersuchten **Knochenproben** wiesen keine C5aR1-Expression auf. Diese Befunde stehen in Kontrast zu Literaturangaben, nach denen eine C5aR1-Expression sowohl auf menschlichen Osteoblasten als auch auf menschlichen Osteoklasten und mesenchymalen Stammzellen mittels PCR und Immunhistochemie nachgewiesen werden konnte, wobei die Autoren zusätzlich zeigen konnten, dass der Komplementfaktor C5a an der inflammatorischen Antwort von Osteoblasten und an der durch die Osteoblasten

gesteuerten Reifung von Osteoklasten beteiligt ist (Ignatius et al. 2011). In weiteren Arbeiten an Mäusen konnte entsprechend nachgewiesen werden, dass eine C5aR1-Überexpression auf Osteoblasten zu einer vermehrten Differenzierung von Osteoklasten und damit zu einer verzögerten Knochenbruchheilung führt (Bergdolt et al. 2017). C5aR1-Knockout-Mäuse zeigten dagegen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren weniger Osteoklasten und mehr Osteoblasten sowie daraus folgend eine vermehrte Knochenmasse (Kovtun et al. 2017). Allerdings war die Knochenbruchheilung auch bei den C5aR1-Knockout-Mäusen beeinträchtigt (Kovtun et al. 2017). Der Grund für die beobachteten Differenzen zwischen der vorliegenden Arbeit und den Literaturangaben könnte darin liegen, dass in der Arbeit von Ignatius et al (2011) Primärzellkulturen untersucht wurden und nicht menschliche Knochenpräparate, wobei sich die Expression des C5aR1 allein durch die Präparation der Zellen verändert haben könnte. Möglicherweise findet sich eine nennenswerte Expression des C5aR1 auf den Knochenzellen nur unter bestimmten Bedingungen wie bei einer Entzündungsreaktion. Auch sind Speziesunterschiede denkbar. Weitere Untersuchungen zur C5aR1-Expression auch auf normalen menschlichen Knochenproben sind daher auf jeden Fall notwendig.

Das **Knochenmark** wies im Gegensatz zum eigentlichen Knochen zahlreiche stark rot gefärbte Zellen auf, welche von der Morphologie her myeloische Vorläuferzellen sowie mesenchymale Stammzellen darstellen könnten. Eine genaue Zuordnung dieser C5aR1-exprimierenden Zellen zu einem bestimmten Zelltyp ist allerdings nur durch Doppelfärbungen mit den entsprechenden Zellmarkern möglich. Die Vermutungen werden allerdings durch Arbeiten anderer Autoren gestützt, die eine Expression des C5aR1 auf myeloischen, nicht jedoch auf lymphatischen, hämatopoetischen Vorläuferzellen nachweisen konnten (Werfel et al. 1992). Hier ist er, wie an C5aR1-defizienten Mäusen und an Mäusen, die mit einem C5a-neutralisierenden Aptamer behandelt worden waren, gezeigt werden konnte, an der Mobilisierung der Stammzellen in das Blut beteiligt (Bujko et al. 2017). Auch auf mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks konnte eine C5aR1-Expression verzeichnet werden, wobei die Autoren vermuteten, dass sie eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung von Stammzellen durch geschädigte Gewebe spielen, welche ihrerseits vermehrt den Komplementfaktor C5a exprimieren (Schraufstatter et al. 2009).

6.2 Immunhistochemische Untersuchung an humanen Tumorgeweben

Von den in der vorliegenden Arbeit untersuchten **Glioblastomen** konnte bei der Hälfte der Tumore eine C5aR1-Expression detektiert werden, die jedoch meist nur auf bestimmte Zellen/Areale in den Neoplasien beschränkt war. In der Literatur wird dem Komplementsystem bei Glioblastomen eine wichtige Rolle vor allem bei der Interaktion zwischen den Tumorstammzellen und ihrer Mikroumgebung zugeschrieben und damit indirekt eine Präsenz von C3a- und C5a-Rezeptoren in diesen Zellen postuliert (Bouwens van der Vlis et al. 2018). Weiterhin konnte in der Literatur in den Glioblastom-Zelllinien T98G, CB193 und U118MG eine C5aR1-Expression nachgewiesen werden (Sayah et al. 1999). Eine mit der vorliegenden Studie vergleichbare immunhistochemische Untersuchung von menschlichen Glioblastom-Präparaten findet sich in der Literatur jedoch bisher nicht.

Bei den **Meningeomen** zeigten sich fast alle Präparate positiv. Untersuchungen zur C5aR1-Expression in dieser Tumorentität, mit denen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit verglichen werden könnten, existieren in der Literatur bisher ebenfalls noch nicht.

Die Hälfte der untersuchten **Hypophysenadenome** war gering bis maximal mittelstark C5aR1-positiv. Eine umfangreiche CD-Marker-Untersuchung in Hypophysenadenomen wurde 2001 von Saeger vorgenommen. Die CD88/C5aR1-Expression wurde dabei allerdings nicht untersucht.

Unabhängig von der jeweiligen Entität konnte in fast allen untersuchten **Schilddrüsen-Karzinom-Präparaten** eine Präsenz des C5aR1 nachgewiesen werden, wobei die Immunfärbung in vielen Fällen sogar stark war und sich häufig membranständig zeigte. Wie bei den Glioblastomen, Meningeomen oder Hypophysenadenomen finden sich in der Literatur bisher noch keine vergleichbaren Studien zur C5aR1-Expression in Schilddrüsenmalignomen. Allerdings konnte eine im Vergleich zum Normalgewebe erhöhte Präsenz der Komplementfaktoren C3d, C4d und C5 in diesen Tumoren gezeigt werden (Lucas et al. 1996). Insgesamt wären weiterführende Untersuchungen zur Präsenz des C5aR1 in Schilddrüsentumoren, speziell in den anaplastischen Karzinomen, durchaus interessant, denn es könnte sich hier möglicherweise mit der Blockade der C5a-C5aR1-Achse eine neue Therapieoption für diese Tumorentitäten ergeben.

In den insgesamt 40 **Lungentumor-Präparaten** konnte der Rezeptor vor allem in den kleinzelligen Bronchialkarzinomen und in den neuroendokrinen Tumoren nachgewiesen werden. Hier war die Expression teilweise sehr stark ausgeprägt (IRS-Werte bis zu 8 bei den kleinzelligen Bronchialkarzinomen bzw. bis zu 12 bei den neuroendokrinen Tumoren). Auch bei den Adenokarzinomen fanden sich einzelne stark gefärbte Präparate (IRS bis zu 6), während die C5aR1-Expression in den Plattenepithelkarzinomen eher niedrig war. In der Literatur finden sich keine Angaben zu einer C5aR1-Expression in kleinzelligen Bronchialkarzinomen oder in neuroendokrinen Tumoren der Lunge. Anders sieht die Datenlage zu den nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen (NSCLC) aus. Hier konnte bereits eine C5aR1-Expression sowohl in Zelllinien als auch in menschlichen Präparaten gezeigt werden (Corrales et al. 2012, Gu et al. 2013, Ajona et al. 2018, Zhao et al. 2018). So konnte in einer Tissue-Microarray-Studie an 208 NSCLC, darunter 85 Plattenepithelkarzinome und 110 Adenokarzinome, in fast allen Präparaten eine Überexpression des C5aR1 verzeichnet werden. Hierbei war eine hohe C5aR1-Expression mit der Anwesenheit von Lymphknoten-Metastasen sowie mit einer schlechten Prognose assoziiert (Gu et al. 2013). Auch in vitro und im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass C5a die Proliferation und Migration von NSCLC-Zellen sowie die Metastasierung und die Angiogenese fördert (Corrales et al. 2012, Ajona et al. 2018). Diese Effekte konnten durch eine Hemmung oder eine Herunterregulation der Expression des C5aR1 neutralisiert werden (Ajona et al. 2018). NSCLC-Zellen produzieren und sezernieren den Komplementfaktor C5a zudem auch selbst, was zu einer das Tumorwachstum begünstigenden Unterdrückung der Immunantwort in der Tumor-Mikroumgebung führt (Corrales et al. 2012). Eine Beeinflussung des Komplementsystems wird daher als eine mögliche neue Therapiestrategie bei NSCLC angesehen (Kleczko et al. 2019).

Die **Mamma-Karzinome** waren in der vorliegenden Untersuchung nur teilweise und im geringen Maße gefärbt. Dabei schien der C5aR1 eher in lobulären als in duktalem Karzinomen exprimiert zu sein. Auch die Größe und das Ausmaß der Zellteilungsrate des Tumors waren offensichtlich entscheidend für die Anfärbbarkeit. Diese Befunde entsprechen den Ergebnissen einer Studie von Nitta et al. (2013), in der der C5aR1 in etwa 15% der analysierten Mamma-Karzinome aufgefunden werden konnte. Auch in einer Untersuchung von Imamura et al. (2016) konnte bei 22 von 171 Brustkrebspatientinnen eine C5aR1-Expression immunhistochemisch nachgewiesen

werden. Auch hier war die C5aR1-Expression höher bei großen Tumoren, bei Tumoren mit hoher Proliferationsrate, der Anwesenheit von Lymphknotenmetastasen und bei Tumoren in einem bereits fortgeschrittenen Tumorstadium. Der Rezeptor wurde nicht in in-situ-Karzinomen angetroffen. Dagegen zeigte sich eine hohe C5aR1-Positivität in Hormonrezeptor-negativen, insbesondere in dreifach-negativen Tumoren. Lymphknoten-Metastasen wiesen insgesamt eine höhere Rezeptor-Expression auf als die Primärtumore. Schließlich war auch das Überleben der Patientinnen mit C5aR1-positiven Tumoren schlechter als das der Patientinnen, deren Tumor diesen Rezeptor nicht aufwies (Imamura et al. 2016). Der C5aR1 ist also offensichtlich vorwiegend in fortgeschrittenen Mamma-Karzinomen exprimiert. Eine Anti-C5a- oder Anti-C5aR1-Therapie könnte somit auch hier eine interessante Option darstellen, insbesondere bei dreifach-negativen Tumoren (Imamura et al. 2016).

Bei den **Magen-Karzinomen** war die Mehrzahl der Präparate mittelstark, teilweise sogar stark gefärbt. Allerdings waren zwei Präparate auch komplett C5aR1-negativ, so dass sich ein mittlerer IRS von 4,40 ergab. Eine C5aR1-Expression in menschlichen Magenkarzinom-Zelllinien und in Präparaten von Magenkarzinomen wird auch in der Literatur beschrieben (Nitta et al. 2013, Kaida et al. 2016, Nitta et al. 2016, Chen et al. 2018), wobei in diesen Studien Patienten im fortgeschrittenem Tumorstadium höhere Expressionslevel aufwiesen als solche in einem niedrigen Stadium der Erkrankung (Kaida et al. 2016, Nitta et al. 2016, Chen et al. 2018). Weiterhin hatten Patienten mit einer ausgeprägten C5aR1-Expression eine höhere Inzidenz an Lebermetastasen und eine schlechtere Prognose als solche mit einer niedrigen Expression (Kaida et al. 2016, Nitta et al. 2016). Eine Hemmung der C5a/C5aR1-Achse wäre also auch bei Magenkarzinomen ein vielversprechender therapeutischer Ansatz.

Als den C5aR1 sehr stark exprimierende Tumore stellten sich die **hepatozellulären** und **cholangiozellulären Karzinome** heraus, die in der vorliegenden Arbeit mit einem durchschnittlichen IRS von 6,20 bzw. 6,77 bewertet wurden. Auch in anderen Studien konnte sowohl in verschiedenen menschlichen Zelllinien als auch in Präparaten von hepatozellulären Karzinomen eine C5aR1-Expression gezeigt werden (Buchner et al. 1995, Haviland et al. 1995, McCoy et al. 1995, Nitta et al. 2013, Hu et al. 2016). Eine Aktivierung des C5aR1 führte in den Zelllinien zu einer Zunahme der Invasion und Migration sowie zu einer verstärkten epithelial-mesenchymalen Transition. Entsprechend war bei den Tumoren eine erhöhte C5aR1-Expression mit einer gesteigerten

Kapselinfiltration, einem erhöhten Tumorstadium und einer vermehrten epithelial-mesenchymalen Transition verbunden (Hu et al. 2016). Auch bei cholangiozellulären Karzinomen konnte in der Literatur bereits ein hoher Prozentsatz an C5aR1-positiven Tumoren aufgezeigt werden, wobei auch hier eine starke Präsenz des Rezeptors mit einer vermehrten vaskulären Invasion der Tumore verbunden war (Nitta et al. 2013). Eine Hemmung des C5aR1 wurde von den Autoren daher auch bei hepatozellulären und cholangiozellulären Tumoren als vielversprechender Ansatz gesehen, um die Invasivität der Tumore zu vermindern (Nitta et al. 2013, Hu et al. 2016).

Bei den analysierten **Pankreas-Karzinomen** konnte nur bei drei der insgesamt zehn Tumore eine mäßige bis starke C5aR1-Expression festgestellt werden, der Rest der Tumore war negativ oder nur schwach gefärbt. Dieses Resultat passt gut zu den Ergebnissen einer großen Studie an verschiedenen Tumorentitäten, in der eine C5aR1-Positivität in 20% der Pankreas-Karzinome beobachtet werden konnte (Nitta et al. 2013). In einer neueren Arbeit konnte neben einer Expression in menschlichen Pankreas-Karzinomen außerdem der C5aR1 in verschiedenen Pankreas-Karzinom-Zelllinien (BxPC3, PK8, Panc1, MiaPaCa2, AsPC1) nachgewiesen werden. Hierbei war eine starke C5aR1-Positivität der Zellen mit einer erhöhten Motilität, einem verstärkten Metastasierungsverhalten im Maus-Tumormodell und mit einer vermehrten epithelial-mesenchymalen Transition verbunden (Saito et al. 2019)

Auch bei den **neuroendokrinen Tumoren des Pankreas** waren nur sechs der insgesamt zehn Präparate schwach bis maximal mäßig stark C5aR1-positiv, die anderen Neoplasien wiesen den Rezeptor nicht auf. In einem der C5aR1-positiven Fälle handelte es sich um eine Lymphknoten-Metastase, was wiederum darauf hinweist, dass der Rezeptor mit einem höheren Tumorstadium assoziiert ist. In einem Mausmodell für neuroendokrine Tumore des Pankreas konnte gezeigt werden, dass eine Defizienz des C5a zu kleineren Tumoren und zu einer geringeren Metastasierungsrate in die Leber führt. In diesen Untersuchungen zeigte sich auch ein interessanter geschlechtsspezifischer Unterschied in der C5a-Expression mit höheren Leveln bei den männlichen Tieren. (Contractor et al. 2016).

Fünf der neun untersuchten **Colon-Karzinom-Präparate** wiesen eine schwache bis mittelstarke C5aR1-Expression auf. Dieser Befund entspricht Literaturangaben, nach denen der C5aR1 in etwas mehr als 60% der analysierten Colon-Karzinom-Fälle

nachgewiesen werden konnte (Nitta et al. 2013). Auch in den Colon-Karzinom-Zelllinien T84, HT29 und Caco2 ließ sich eine C5aR1-Expression zeigen (Cao et al. 2012). Unabhängig von einer Expression des C5aR1 in den Tumorzellen selbst konnten in der vorliegenden Untersuchung zahlreiche stark C5aR1-positive Immunzellen im umgebenden Tumorstroma festgestellt werden. Auch in einer anderen Studie an insgesamt 15 Colon-Karzinom-Präparaten konnte eine im Vergleich zum normalen Gewebe vermehrte Präsenz von C5aR1-positiven Makrophagen in den Tumoren festgestellt werden. Hierbei nahm die Anzahl an C5aR1-positiven Makrophagen mit steigender Entdifferenzierung und zunehmendem TNM-Stadium der Karzinome zu (Piao et al. 2018). In einer begleitenden Untersuchung an C5aR1-Knockout-Mäusen konnte zudem nachgewiesen werden, dass eine C5aR1-Defizienz eine Polarisierung der Tumor-assoziierten Makrophagen zu einem tumorfördernden M2-Phänotyp verhindert und vor der Entstehung von Lebermetastasen schützt (Piao et al. 2018). Eine Beeinflussung des C5a-C5aR1-Signalings könnte daher auch bei Colon-Karzinom-Patienten eine interessante neue Therapieoption darstellen.

Die untersuchten **GIST**-Präparate zeigten eine meist starke C5aR1-Positivität. Studien zur Untersuchung der C5aR1-Expression in Gastrointestinalen Stromatumoren, mit denen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit verglichen werden könnten, existieren in der Literatur bisher nicht. Aufgrund der Befunde der vorliegenden Arbeit wären hier aber auf jeden Fall weiterführende Untersuchungen sinnvoll, denn sollten sie sich bestätigen, würde sich eine interessante Therapiealternative für diese Tumore ergeben.

Alle in der vorliegenden Arbeit analysierten **Phäochromozytome** waren bis auf einzelne stark positiv gefärbte Immunzellen komplett C5aR1-negativ. Untersuchungen zu einer Expression des C5aR1 in dieser Tumorentität konnten in der Literatur ebenfalls nicht gefunden werden.

Im Gegensatz dazu zeigten alle untersuchten Präparate der **klarzelligen Nieren-Karzinome** eine meist mäßig starke Immunfärbung für den C5aR1. Diese Ergebnisse stimmen mit den Resultaten mehrerer Untersuchungen in der Literatur überein. So konnte in einer Studie mit 11 Nieren-Karzinom-Präparaten eine Expression in 60% der Fälle festgestellt werden (Nitta et al. 2013). In einer weiteren Untersuchung an 127 Patienten wiesen 50,5% der nicht-metastasierten und 96,7% der metastasierten Nieren-Karzinome eine C5aR1-Expression auf (Maeda et al. 2015). Zusätzliche von den Autoren

durchgeführte Experimente an mit dem C5aR1 transfizierten Renca-Nierenzelllinien ergaben zudem, dass der Komplementfaktor C5a in diesen Zellen dynamische Aktinumlagerungen und damit morphologische Veränderungen induziert sowie ERK- und PI3K-vermittelt die Invasivität steigert (Maeda et al. 2015). Ähnliche Befunde konnten auch von einer anderen Arbeitsgruppe erhoben werden (Yoneda et al. 2019). Unabhängig von einer Präsenz des C5aR1-Rezeptors scheint auch eine hohe Expression des Komplementfaktors C5a selber in klarzelligen Nierenkarzinomen mit einer schlechten Prognose für die Patienten assoziiert zu sein (Xi et al. 2016), was die C5a-C5aR1-Achse insgesamt zu einer interessanten Zielstruktur für die Diagnostik und Therapie von klarzelligen Nierenkarzinomen macht (Maeda et al. 2015, Xi et al. 2016).

Bei den untersuchten **Prostata-Karzinomen** konnte nur in einem von zehn Tumoren eine mittelstarke C5aR1-Expression festgestellt werden. Alle anderen Präparate waren bis auf einige stark positive Immunzellen nicht gefärbt. Diese Befunde stehen im Gegensatz zu einer anderen Arbeit, in der an 25 Prostata-Karzinom-Fällen eine Expression in fast 60% der Tumore verzeichnet werden konnte (Nitta et al. 2013). Weitere Untersuchungen mit größeren Fallzahlen sind daher notwendig, um hier zu einer eindeutigen Aussage zu kommen.

Bis auf einen Tumor, bei dem einige Areale eine mäßig starke C5aR1-Immunfärbung aufwiesen, waren alle anderen untersuchten **Hoden-Karzinome** nur sehr schwach positiv oder nicht gefärbt. Entsprechende Untersuchungen, mit denen die Befunde der vorliegenden Studie verglichen werden könnten, existieren in der Literatur bisher nicht.

Die untersuchten **Endometrium-Karzinom**-Präparate waren in der Mehrzahl mäßig bis stark gefärbt. Auch hier ließen sich in der Literatur keine vergleichbaren Untersuchungen finden. Diese wären aber vor dem Hintergrund der in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse durchaus wünschenswert, da sich auch bei dieser Tumorentität mit der Hemmung des C5aR1-Signalings eine neue Therapieoption eröffnen könnte.

Das Ausmaß der Färbungen bei den **Cervix-Karzinom**-Präparaten reichte von nur geringen bis hin zu mäßig starken Positivitäten, wobei insbesondere die Proliferationsfronten der Tumore und die Umgebung von Nekrosearealen intensiver gefärbt waren. Diese Befunde entsprechen Literaturangaben an insgesamt 49 Cervix-Karzinom-Präparaten, nach denen die C5aR1-Expression in Plattenepithelkarzinomen der Cervix, welche sich bereits im Stadium I befanden, höher war, als in cervikalen

intraepithelialen Neoplasien (CIN3). Auch in diesen Untersuchungen konnte eine starke, vorwiegend membranständige Expression des Rezeptors insbesondere in den Proliferationsfronten der Tumore und in den bereits tief in das Uterusgewebe eingedrungenen Tumoranteilen verzeichnet werden (Yoneda et al. 2019). Eine Blockade der C5a-C5aR1-Achse könnte daher auch in Cervix-Karzinomen therapeutisch interessant sein.

Bei den analysierten **Ovarial-Karzinomen** zeigte sich in fast allen Fällen eine mäßig starke bis starke C5aR1-Expression in den Tumorzellen. Dieses Ergebnis stimmt mit den Resultaten einer anderen Studie überein, in der die C5aR1-mRNA-Expression an 75 Ovarial-Karzinom-Präparaten untersucht worden war. In dieser Studie war zudem eine höhere C5aR1-mRNA-Expression mit einem schlechteren Überleben der Patientinnen verbunden (Cho et al. 2014). In parallel durchgeführten Untersuchungen an der Ovarial-Karzinom-Zelllinie SKOV3ipl konnte von den Autoren weiterhin gezeigt werden, dass die Stimulation mit einem C5aR1-Agonisten zu einer verstärkten Proliferation, Migration und Invasion der Zellen führte. Die Behandlung mit einem Rezeptor-Antagonisten oder mit dem Komplement-Inhibitor Compstatin oder ein Knockdown der C5a-Expression mittels siRNA reduzierte die Proliferationsrate sowohl in vitro als auch in vivo im Maus-Tumormodell dagegen deutlich (Cho et al. 2014). In einer weiteren Studie konnte in einem Mausmodell für Ovarial-Karzinome gezeigt werden, dass eine gleichzeitige C5aR1-Defizienz der Tiere die Tumorentstehung teilweise komplett verhinderte bzw. es entstanden nur kleine, schlecht vaskularisierte Tumore. C5aR1-Knockout-Mäuse wiesen zudem eine verminderte VEGF-Expression und Tumor-Angiogenese auf. Die Autoren schlossen aus diesen Befunden, dass eine C5aR1-Blockade das Tumorstadium über eine Hemmung der Angiogenese offensichtlich vermindern kann (Nunez-Cruz et al. 2012). Die C5a-C5aR1-Achse könnte also auch in Ovarialkarzinomen eine interessante Zielstruktur für die Diagnostik und Therapie darstellen.

Obwohl die **Melanom-Präparate** in der vorliegenden Untersuchung insgesamt negativ oder nur gering gefärbt waren, wird in der Literatur von einer potenziellen C5aR1-basierten Immuntherapie bei dieser Tumorentität berichtet. Floreani und Mitarbeiter untersuchten Melanome am Mausmodell. Dabei konnte zwar keine C5aR1-Expression im Melanomgewebe nachgewiesen werden, jedoch zeigte sich eine deutliche Reduktion des Tumorstadiums und ein verbessertes Überleben der Tiere durch eine immunstimulatorische Therapie mit einem Melanom-Antigen-gekoppelten C5aR1-

Agonisten. Eine wichtige Rolle scheinen dabei C5aR1-exprimierende dendritische Zellen zu spielen, die den Melanom-Antigen-C5aR1-Agonist-Komplex aufnehmen, prozessieren und die Melanom-Antigene dann zytotoxischen T-Zellen präsentieren, welche dann ihrerseits die Melanomzellen zerstören (Floreani et al. 2007). Untersuchungen an C5aR1-Knockout-Mäusen konnten weiterhin zeigen, dass der C5aR1 offensichtlich die Infiltration von immunsuppressiven Leukozyten in die Tumormikroumgebung und somit indirekt das Tumorstadium fördert, was wiederum eine Rationale für eine Anti-C5aR1-Therapie darstellen könnte (Nabizadeh et al. 2019).

Die Tumorzellen der **Lymphome** zeigten nur eine geringe bis maximal mäßig starke Immunfärbung für den C5aR1. Untersuchungen, mit denen die vorliegenden Ergebnisse verglichen werden können, existieren in der Literatur bisher noch nicht.

Mit Ausnahme von zwei der drei Rhabdomyosarkome und des einen Angiosarkoms, die eine geringe bis mittelstarke C5aR1-Expression aufwiesen, konnte bei den **Sarkomen** keine spezifische immunhistochemische Färbung für den C5aR1 nachgewiesen werden. In der Literatur ist lediglich eine Studie zu finden, in welcher über eine Anwesenheit des Rezeptors auf einem Mastzell-Sarkom berichtet wird (Chott et al. 2003). Auch hier wären weitere Untersuchungen mit höheren Fallzahlen wünschenswert.

7 Schlussfolgerungen

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war eine umfassende immunhistochemische Analyse der C5aR1-Expression an einer großen Serie von humanen Normal- und Tumorgeweben, um ein umfassendes Expressionsprofil dieses Rezeptors für den menschlichen Körper und die entsprechenden Neoplasien zu erhalten.

Hierbei konnte der Rezeptor, wie aus der Literatur zu erwarten war, in vielen Organen und Geweben insbesondere in Immunzellen wie Monozyten, Makrophagen, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, dendritischen Zellen und Mastzellen nachgewiesen werden.

In den Normalorganen zeigte sich eine starke C5aR1-Expression insbesondere in den Neuronen, Astrozyten und Mikrogliazellen des Cortex, in den Alveolarmakrophagen und in den Bronchialepithelien der Lunge, in Makrophagen in der roten Pulpa der Milz, in den Kupfferzellen und Gallengangsepithelien sowie teilweise auch in den Hepatozyten der Leber, im Darmepithel, in den Synzytiotrophoblasten der Plazenta und in bestimmten Stammzellen im Knochenmark. Somit konnten in vielen Fällen bereits vorliegende Literaturdaten bestätigt werden. Um die positiven Zellen den verschiedenen Zelltypen genauer zuordnen zu können, wären hier allerdings weiterführende Doppelfärbungen mit den entsprechenden Zellmarkern notwendig.

Von den insgesamt 33 untersuchten Tumorentitäten zeigte sich vor allem bei den Schilddrüsenkarzinomen, hier besonders bei den anaplastischen Tumoren, bei den kleinzelligen Bronchialkarzinomen und neuroendokrinen Tumoren der Lunge, bei den hepatozellulären und cholangiozellulären Karzinomen, bei den Pankreas-Karzinomen, bei den Gastrointestinalen Stromatumoren, bei den klarzelligen Nierenkarzinomen sowie bei den Ovarial- und Endometrium-Karzinomen ein hoher Anteil an positiven Neoplasien mit einer starken C5aR1-Expression. Aber auch bei den anderen untersuchten Tumorentitäten fanden sich mit nur wenigen Ausnahmen, wie bei den Phäochromozytomen, Leiomyosarkomen, pleomorphen Sarkomen oder Liposarkomen, zahlreiche Tumore mit einer mittelstarken bis starken C5aR1-Expression. Damit konnten in vielen Fällen die Angaben in der Literatur zu einer Präsenz des C5aR1 in diesen Entitäten bestätigt werden, wie z.B. bei den Adeno- und Plattenepithelkarzinomen der Lunge, Mamma-Karzinomen, Magenkarzinomen, hepatozellulären und

cholangiozellulären Karzinomen, Pankreas-Karzinomen, Colon-Karzinomen, klarzelliger Nieren-Karzinomen, Prostata-Karzinomen und Cervix-Karzinomen. Hierbei war die C5aR1-Expression in der Literatur häufig mit einem erhöhten Tumorstadium und mit einer schlechten Prognose für die Patienten verbunden. Entsprechende Hinweise zeigten sich auch in der vorliegenden Studie. Zahlreiche der in der vorliegenden Arbeit analysierten Tumorentitäten wurden jedoch erstmals an menschlichen Präparaten auf eine C5aR1-Expression hin untersucht, wie Glioblastome, Meningeome, Hypophysenadenome, Schilddrüsenkarzinome, kleinzellige Bronchialkarzinome, neuroendokrine Tumore der Lunge, neuroendokrine Tumore des Pankreas, Gastrointestinale Stromatumore, Phäochromozytome, Hoden-Karzinome, Endometrium-Karzinome, Melanome, Lymphome und Sarkome. Da in einigen dieser Tumore eine hohe C5aR1-Expression verzeichnet werden konnte, die möglicherweise von diagnostischer oder therapeutischer Relevanz sein könnte, wären hier weiterführende Studien an größeren Fallzahlen und unter Einbeziehung der klinischen Daten der Patienten wünschenswert.

Insgesamt konnte mit der vorliegenden Arbeit ein weiterer Beitrag zur Aufklärung der C5aR1-Expression in verschiedenen normalen und neoplastischen Geweben des Menschen geleistet sowie eine Grundlage für weiterführende Untersuchungen hinsichtlich einer möglichen klinischen Bedeutung dieses Rezeptors für bestimmte Tumorentitäten geschaffen werden. Für einige der untersuchten Tumorarten könnten sich so in Zukunft möglicherweise neue diagnostische oder therapeutische Optionen eröffnen.

8 Literaturverzeichnis

- Abe K, Miyazaki M, Koji T, Furusu A, Nakamura-Kurashige T, Nishino T, Ozono Y, Harada T, Sakai H, Kohno S. 2001. Enhanced expression of complement C5a receptor mRNA in human diseased kidney assessed by in situ hybridization. *Kidney Int*, 60:137-146.
- Ager R, Fonseca M, Chu S, Yazan O, Woodruff T, Sanderson S, Taylor S, Tenner A. 2008. Decreases in Alzheimer's disease like pathology associated with C5aR inhibition correlate with improved performance in a passive avoidance task. *Mol Immunol*, 45:4109-4109.
- Ajona D, Ortiz-Espinosa S, Moreno H, Lozano T, Pajares MJ, Agorreta J, Bertolo C, Lasarte JJ, Vicent S, Hoehlig K, Vater A, Lecanda F, Montuenga LM, Pio R. 2017. A combined PD-1/C5a blockade synergistically protects against lung cancer growth and metastasis. *Cancer Discov*, 7:694-703.
- Ajona D, Zandueta C, Corrales L, Moreno H, Pajares MJ, Ortiz-Espinosa S, Martinez-Terroba E, Perurena N, de Miguel FJ, Jantus-Lewintre E, Camps C, Vicent S, Agorreta J, Montuenga LM, Pio R, Lecanda F. 2018. Blockade of the complement C5a/C5aR1 axis impairs lung cancer bone metastasis by CXCL16-mediated effects. *Am J Respir Crit Care Med*, 197:1164-1176.
- Aktories K, Förstermann U, Hofmann F. 2004. *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 9 Aufl: Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, 18-23.
- Arnaout MA, Melamed J, Tack BF, Colten HR. 1981. Characterization of the human complement (c3b) receptor with a fluid phase C3b dimer. *J Immunol*, 127:1348-1354.
- Atanes P, Ruz-Maldonado I, Pingitore A, Hawkes R, Liu B, Zhao M, Huang GC, Persaud SJ, Amisten S. 2018. C3aR and C5aR1 act as key regulators of human and mouse β -cell function. *Cell Mol Life Sci*, 75:715-726.
- Baelder R, Fuchs B, Bautsch W, Zwirner J, Köhl J, Hoymann HG, Glaab T, Erpenbeck V, Krug N, Braun A. 2005. Pharmacological targeting of anaphylatoxin receptors

- during the effector phase of allergic asthma suppresses airway hyperresponsiveness and airway inflammation. *J Immunol*, 174:783-789.
- Bamberg CE, Mackay CR, Lee H, Zahra D, Jackson J, Lim YS, Whitfield PL, Craig S, Corsini E, Lu B, Gerard C, Gerard NP. 2010. The C5a receptor (C5aR) C5L2 is a modulator of C5aR-mediated signal transduction. *J Biol Chem*, 285:7633-7644.
- Banadakoppa M, Chauhan MS, Havemann D, Balakrishnan M, Dominic JS, Yallampalli C. 2014. Spontaneous abortion is associated with elevated systemic C5a and reduced mRNA of complement inhibitory proteins in placenta. *Clin Exp Immunol*, 177:743-749.
- Barnum SR. 1995. Complement biosynthesis in the central nervous system. *Crit Rev Oral Biol Med*, 6:132-146.
- Bergdolt S, Kovtun A, Hägele Y, Liedert A, Schinke T, Amling M, Huber-Lang M, Ignatius A. 2017. Osteoblast-specific overexpression of complement receptor C5aR1 impairs fracture healing. *PLoS ONE*, 12: e0179512.
- Bergmann LB, T, Bokemeyer C, Casper J, Gauler T, Grünwald V, Kirchner H, Kuczyk M, Overkamp F, Peters I, Schmidinger M, Stenner-Liewen F. 2020. Nierenzellkarzinom (Hypernephrom). *Onkopedia Leitlinien*.
- Bouwens van der Vlis TAM, Kros JM, Mustafa DAM, van Wijck RTA, Ackermans L, van Hagen PM, van der Spek PJ. 2018. The complement system in glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol Commun*, 6:91.
- Brennan FH, Gordon R, Lao HW, Biggins PJ, Taylor SM, Franklin RJ, Woodruff TM, Ruitenber MJ. 2015. The complement receptor C5aR controls acute inflammation and astrogliosis following spinal cord injury. *J Neurosci*, 35:6517-6531.
- Buchner RR, Hugli TE, Ember JA, Morgan EL. 1995. Expression of functional receptors for human C5a anaphylatoxin (CD88) on the human hepatocellular carcinoma cell line HepG2. Stimulation of acute-phase protein-specific mRNA and protein synthesis by human C5a anaphylatoxin. *J Immunol*, 155:308-315.
- Bujko K, Rzeszotek S, Hoehlig K, Yan J, Vater A, Ratajczak MZ. 2017. Signaling of the complement cleavage product anaphylatoxin C5a through C5aR (CD88)

- contributes to pharmacological hematopoietic stem cell mobilization. *Stem Cell Rev and Rep*, 13:793-800.
- Cao Q, Mclsaac SM, Stadnyk AW. 2012. Human colonic epithelial cells detect and respond to C5a via apically expressed C5aR through the ERK pathway. *Am J Physiol Cell Physiol*, 302:C1731-C1740.
- Chen J, Li GQ, Zhang L, Tang M, Cao X, Xu GL, Wu YZ. 2018. Complement C5a/C5aR pathway potentiates the pathogenesis of gastric cancer by down-regulating p21 expression. *Cancer Lett*, 412:30-36.
- Cho MS, Vasquez HG, Rupaimoole R, Pradeep S, Wu S, Zand B, Han HD, Rodriguez-Aguayo C, Bottsford-Miller J, Huang J, Miyake T, Choi HJ, Dalton HJ, Ivan C, Baggerly K, Lopez-Berestein G, Sood AK, Afshar-Kharghan V. 2014. Autocrine effects of tumor-derived complement. *Cell Rep*, 6:1085-1095.
- Chott A, Guenther P, Huebner A, Selzer E, Parwaresch RM, Horny HP, Valent P. 2003. Morphologic and immunophenotypic properties of neoplastic cells in a case of mast cell sarcoma. *Am J Surg Pathol*, 27:1013-1019.
- Contractor T, Kobayashi S, da Silva E, Clausen R, Chan C, Vosburgh E, Tang LH, Levine AJ, Harris CR. 2016. Sexual dimorphism of liver metastasis by murine pancreatic neuroendocrine tumors is affected by expression of complement C5. *Oncotarget*, 7:30585-30596.
- Corrales L, Ajona D, Rafail S, Lasarte JJ, Riezu-Boj JI, Lambris JD, Rouzaut A, Pajares MJ, Montuenga LM, Pio R. 2012. Anaphylatoxin C5a creates a favorable microenvironment for lung cancer progression. *J Immunol*, 189:4674-4683.
- Daveau M, Benard M, Scotte M, Schouft MT, Hiron M, Francois A, Salier JP, Fontaine M. 2004. Expression of a functional receptor in regenerating hepatocytes and its involvement in a proliferative signalling pathway in rat. *J Immunol*, 173:3418-3424.
- Doenicke A, Kettler D, List WF, Tarnow J, Thomson D. 2013. *Anästhesiologie*. Bonn: Springer-Verlag.

- Dunkelberger J, Zhou L, Miwa T, Song WC. 2012. C5aR expression in a novel GFP reporter gene knockin mouse: implications for the mechanism of action of C5aR signaling in T cell immunity. *J Immunol*, 188:4032-4042.
- Egger G. 2005. Die Akute Entzündung. Grundlagen, Pathophysiologie und klinische Erscheinungsbilder der Unspezifischen Immunität. 1 Aufl. Bonn: Springer-Verlag, 92-93, 192-193.
- Ender F, Wiese AV, Schmudde I, Sun J, Vollbrandt T, König P, Laumonier Y, Köhl J. 2017. Differential expression of C5a receptor 1 in innate immune cells during the allergic asthma effector phase. *PLoS ONE*, 12:e0172446.
- Farkas I, Baranyi L, Ishikawa Y, Okada N, Bohata C, Budai D, Fukuda A, Imai M, Okada H. 2002. CD59 blocks not only the insertion of C9 into MAC but inhibits ion channel formation by homologous C5b-8 as well as C5b-9. *J Physiol*, 539 (Pt 2):537-545.
- Farkas I, Takahashi M, Fukuda A, Yamamoto N, Akatsu H, Baranyi L, Tateyama H, Yamamoto T, Okada N, Okada H. 2003. Complement C5a receptor-mediated signaling may be involved in neurodegeneration in Alzheimer's disease. *J Immunol*, 170:5764-5771.
- Fayyazi A, Sandau R, Duong LQ, Götze O, Radzun HJ, Schweyer S, Soruri A, Zwirner J. 1999. C5a receptor and interleukin-6 are expressed in tissue macrophages and stimulated keratinocytes but not in pulmonary and intestinal epithelial cells. *Am J Pathol*, 154:495-501.
- Fayyazi A, Scheel O, Werfel T, Schweyer S, Oppermann M, Götze O, Radzun HJ, Zwirner J. 2000. The C5a receptor is expressed in normal renal proximal tubular but not in normal pulmonary or hepatic epithelial cells. *Immunology*, 99:38-45.
- Feldman AT, Wolfe D. 2014. Tissue processing and hematoxylin and eosin staining. *Methods Mol Biol*, 1180:31-43.
- Floreani AA, Gunselman SJ, Heires AJ, Hauke RJ, Tarantolo S, Jackson JD. 2007. Novel C5a agonist-based dendritic cell vaccine in a murine model of melanoma. *Cell Cycle*, 6:2835-2839.

- Fonseca MI, McGuire SO, Counts SE, Tenner AJ. 2013. Complement activation fragment C5a receptors, CD88 and C5L2, are associated with neurofibrillary pathology. *J Neuroinflammation*, 10:25.
- Francis K, Lewis BM, Monk PN, Ham J. 2008. Complement C5a receptors in the pituitary gland: expression and function. *J Endocrinol*, 199:417-424.
- Furebring M, Hakansson LD, Venge P, Nilsson B, Sjolín J. 2002. Expression of the C5a receptor (CD88) on granulocytes and monocytes in patients with severe sepsis. *Crit Care*, 6:363-370.
- Gadjeva M. 2014. The complement system. Overview. *Methods Mol Biol*, 1100:1-9.
- Gasque P, Chan P, Fontaine M, Ischenko A, Lamacz M, Götze O, Morgan BP. 1995. Identification and characterization of the complement C5a anaphylatoxin receptor on human astrocytes. *J Immunol*, 155:4882-4889.
- Gasque P, Singhrao SK, Neal JW, Götze O, Morgan BP. 1997. Expression of the receptor for complement C5a (CD88) is upregulated on reactive astrocytes, microglia, and endothelial cells of the inflamed human central nervous system. *Am J Pathol*, 150:31-41.
- Girardi G, Yarilin D, Thurman JM, Holers VM, Salmon JE. 2006. Complement activation induces dysregulation of angiogenic factors and causes fetal rejection and growth restriction. *J Exp Med*, 203:2165-2175.
- Gorski JP, Hugli TE, Muller-Eberhard HJ. 1981. Characterization of human C4a anaphylatoxin. *J Biol Chem*, 256:2707-2711.
- Gu J, Ding JY, Lu CL, Lin ZW, Chu YW, Zhao GY, Guo J, Ge D. 2013. Overexpression of CD88 predicts poor prognosis in non-small-cell lung cancer. *Lung Cancer*, 81:259-265.
- Guo RF, Ward PA. 2005. Role of C5a in inflammatory responses. *Annu Rev Immunol*, 23:821-852.
- Hahn J-M. 2011. *Duale Reihe: Pharmakologie und Toxikologie*. Leipzig, New York: Thieme.

- Hansen S, Selman L, Palaniyar N, Ziegler K, Brandt J, Kliem A, Jonasson M, Skjoedt MO, Nielsen O, Hartshorn K, Jorgensen TJ, Skjodt K, Holmskov U. 2010. Collectin 11 (CL-11, CL-K1) is a MASP-1/3-associated plasma collectin with microbial-binding activity. *J Immunol*, 185:6096-6104.
- Haviland DL, McCoy RL, Whitehead WT, Akama H, Molmenti EP, Brown A, Haviland JC, Parks WC, Perlmutter DH, Wetsel RA. 1995. Cellular expression of the C5a anaphylatoxin receptor (C5aR): demonstration of C5aR on nonmyeloid cells of the liver and lung. *J Immunol*, 154:1861-1869.
- Hernandez MX, Jiang S, Cole TA, Chu SH, Fonseca ML, Fang MJ, Hohsfield LA, Torres MD, Green KN, Wetsel RA, Mortazavi A, Tenner AJ. 2017. Prevention of CaR1 signaling delays microglial inflammatory polarization, favors clearance pathways and suppresses cognitive loss. *Mol Neurodegen*, 12:66.
- Hu WH, Hu Z, Shen X, Dong LY, Zhou WZ, Yu XX. 2016. C5a receptor enhances hepatocellular carcinoma cell invasiveness via activating ERK1/2-mediated epithelial-mesenchymal transition. *Exp Mol Pathol*, 100:101-108.
- Ignatius A, Schoengraf P, Kreja L, Liedert A, Recknagel S, Kandert S, Brenner RE, Schneider M, Lambris JD, Huber-Lang M. 2011. Complement C3a and C5a modulate osteoclast formation and inflammatory response of osteoblasts in synergism with IL-1 β . *Cell Biochem*, 112:2594-2605.
- Imamura T, Yamamoto-Ibusuki M, Sueta A, Kubo T, Irie A, Kikuchi K, Kariu T, Iwase H. 2016. Influence of the C5a-C5a receptor system on breast cancer progression and patient prognosis. *Breast Cancer*, 23:876-885.
- Janeway CJ, Travers P, Walport M, Shlomchik M. 2001. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. New York: Garland Science.
- Ji M, Lu Y, Zhao C, Gao W, He F, Zhang J, Zhao D, Qiu W, Wang Y. 2016. C5a induces the synthesis of IL-6 and TNF- α in rat glomerular mesangial cells through MAPK signaling pathways. *PLoS ONE*, 11:e0161867.
- Kaida T, Nitta H, Kitano Y, Yamamura K, Arima K, Izumi D, Higashi T, Kurashige J, Imai K, Hayashi H, Iwatsuki M, Ishimoto T, Hashimoto D, Yamashita Y, Chikamoto A, Imanura T, Ishiko T, Beppu T, Baba H. 2016. C5a receptor (CD88) promotes

- motility and invasiveness of gastric cancer by activating RhoA. *Oncotarget*, 7:84798-84809.
- Karsten CM, Laumonier Y, Eurich B, Ender F, Bröker K, Roy S, Czabanska A, Vollbrandt T, Figge J, Köhl J. 2015. Monitoring and cell-specific deletion of C5aR1 using a novel floxed GFP-C5aR1 reporter knock-in mouse. *J Immunol*, 194:1841-1855.
- Khan MA, Nicolls MR, Surguladze B, Saadoun I. 2014. Complement components as potential therapeutic targets for asthma treatment. *Respiratory Med*, 108:543-549.
- Khor KH, Moore TA, Shiels IA, Greer RM, Arumugam TV, Mills PC. 2016. A potential link between the C5a receptor 1 and the beta1-adrenoreceptor in the mouse heart. *PLoS One*, 11:e0146022.
- Kleczo EK, Kwak JW, Schenk EL, Nemenoff RA. 2019. Targeting the complement pathway as a therapeutic strategy in lung cancer. *Front Immunol*, 10:954.
- Kliwer A, Reinscheid RK, Schulz S. 2017: Emerging paradigms of G protein-coupled receptor dephosphorylation. *Trends Pharmacol Sci*, 7:621-636.
- Kondos SC, Hatfaludi T, Voskoboinik I, Trapani JA, Law RH, Whisstock JC, Dunstone MA. 2010. The structure and function of mammalian membrane-attack complex/perforin-like proteins. *Tissue Antigens*, 76:341-351.
- Kovtun A, Bergdolt S, Hägele Y, Matthes R, Lambris JD, Huber-Lang M, Ignatius A. 2017. Complement receptors C5aR1 and C5aR2 act differentially during the early immune response after bone fracture but are similarly involved in bone repair. *Sci Rep*, 7:14061.
- Krug N, Tschernig T, Erpenbeck VJ, Hohlfeld JM, Köhl J. 2001. Complement factors C3a and C5a are increased in bronchoalveolar lavage fluid after segmental allergen provocation in subjects with asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, 164:1841-1843.
- Lacy M, Jones J, Whittemore SR, Haviland DL, Wetzel RA, Barnum SR. 1995. Expression of the receptors for the C5a anaphylatoxin, interleukin-8 and FMLP by human astrocytes and microglia. *J Neuroimmunol*, 61:71-78.

- Landlinger C, Oberleitner L, Gruber P, Noiges B, Yatsyk K, Santic R, Mandler M, Staffler G. 2015. Active immunization against complement factor C5a: a new therapeutic approach for Alzheimer's disease. *J Neuroinflamm*, 12:150.
- Lang H, Greiling H. 1983. *Pathobiochemie der Entzündung*. Bonn: Springer-Verlag.
- Lappas M, Woodruff TM, Taylor SM, Permezel M. 2012. Complement C5a regulates proinflammatory mediators in human placenta. *Biol Reprod*, 86:190.
- Lucas SD, Karlsson-Parra A, Nilsson B, Grimelius L, Akerström G, Rastad J, Juhlin C. 1996. Tumor-specific deposition of immunoglobulin G and complement in papillary thyroid carcinoma. *Hum Pathol*, 27:1329-1335.
- Ma YJ, Skjoedt MO, Garred P. 2013. Collectin-11/MASP complex formation triggers activation of the lectin complement pathway--the fifth lectin pathway initiation complex. *J Innate Immun*, 5:242-250.
- Ma Y, Kong LR, Ge Q, Lu YY, Hong MN, Zhang Y, Ruan CC, Gao PJ. 2018. Complement 5a-mediated trophoblasts dysfunction is involved in the development of pre-eclampsia. *J Cell Mol Med*, 22:1034-1046.
- Maeda Y, Kawano Y, Wada Y, Yatsuda J, Motoshima T, Murakami Y, Kikuchi K, Imamura T, Eto M. 2015. C5aR is frequently expressed in metastatic renal cell carcinoma and plays a crucial role in cell invasion via the ERK and PI3 kinase pathways. *Oncol Rep*, 33:1844-1850.
- Matsushita M, Fujita T. 2001. Ficolins and the lectin complement pathway. *Immunol Rev*, 180:78-85.
- Matsushita M. 2013. Ficolins in complement activation. *Mol Immunol*, 55:22-26.
- McCoy R, Haviland DL, Molmenti EP, Ziambaras T, Wetsel RA, Perlmutter DH. 1995. N-Formylpeptide and complement C5a receptors are expressed in liver cells and mediate hepatic acute phase gene regulation. *J Exp Med*, 182:207-217.
- Monk PN, Scola AM, Madala P, Fairlie DP. 2007. Function, structure and therapeutic potential of complement C5a receptors. *Br J Pharmacol*, 152:429-448.

- Morgan BP. 2000. The Complement System: An Overview. In: Morgan BP, Hrsg. Complement Methods and Protocols. Totowa, NJ, USA: Humana Press, 1-13.
- Morgan BP. 2016. The membrane attack complex as an inflammatory trigger. Immunobiol, 221:747-751.
- Nabizadeh JA, Manthey HD, Panagides N, Steyn FJ, Lee JD, Li XX, Akhir FNM, Chen W, Boyle GM, Taylor SM, Woodruff TM, Rolfe BE. 2019. C5a receptors C5aR1 and C5aR2 mediate opposing pathologies in a mouse model of melanoma. FASEB J, 33:11060-11071.
- Nesargikar PN, Spiller B, Chavez R. 2012. The complement system: history, pathways, cascade and inhibitors. Eur J Microbiol Immunol (Bp), 2:103-111.
- Nitta H, Wada Y, Kawano Y, Murakami Y, Irie A, Taniguchi K, Kikuchi K, Yamada G, Suzuki K, Honda J, Wilson-Morifuji M, Araki N, Eto M, Baba H, Imamura T. 2013. Enhancement of human cancer cell motility and invasiveness by anaphylatoxin C5a via aberrantly expressed C5a receptor (CD88). Clin Cancer Res, 19:2004-2013.
- Nitta H, Shimose T, Emi Y, Imamura T, Ohnishi K, Kusumoto T, Yamamoto M, Fukuzawa K, Takahashi I, Higashi H, Tsuji A, Akagi Y, Oki E, Maehara Y, Baba H; Kyushu Study Group of Clinical Cancer (KSCC) ancillary study. 2016. Expression of the anaphylatoxin C5a receptor in gastric cancer: implications for vascular invasion and patient outcomes. Med Oncol, 33:118.
- Noll S, Schaub-Kuhnen S. 2000. Praxis der Immunhistochemie. In: Höfler H, Müller KM, Hrsg. 1 Aufl. Jena: Urban & Fischer Verlag München, 40-45, 52-53.
- Nunez-Cruz S, Gimotty PA, Guerra MW, Connolly DC, Wu YQ, DeAngelis RA, Lambris JD, Coukos G, Scholler N. 2012. Genetic and pharmacologic inhibition of complement inhibits endothelial cell function and ablates ovarian cancer neovascularization. Neoplasia, 14:994-1004.
- O'Barr SA, Caguioa J, Gruol D, Perkins G, Ember JA, Hugli T, Cooper NR. 2001. Neuronal expression of a functional receptor for the C5a complement activation fragment. J Immunol, 166:4154-4162.

- Oskeritzian CA, Zhao W, Min HK, Xia HZ, Pozez A, Kiev J, Schwartz LB. 2005. Surface CD88 functionally distinguishes the MCTC from the MCT type of human lung mast cell. *J Allergy Clin Immunol*, 115:1162-1168.
- Ottonello L, Corcione A, Tortolina G, Airoidi I, Albesiano E, Favre A, D'Agostino R, Malavasi F, Pistoia V, Dallegri F. 1999. rC5a directs the in vitro migration of human memory and naïve tonsillar B lymphocytes: implications for B cell trafficking in secondary lymphoid tissues. *J Immunol*, 162:6510-6517.
- Parham P. 2009. *The Immune System*. New York: Garland Science.
- Phielers J, Chung KJ, Chatzigeorgiou A, Klotzsche-von Ameln A, Garcia-Martin R, Sprott D, Moisidou M, Tzanavari T, Ludwig B, Baraban E, Ehrhart-Bornstein M, Bornstein SR, Mziaut H, Solimena M, Karalis KP, Economopoulou M, Lambris JD, Chavakis T. 2013. The complement anaphylatoxin C5a receptor contributes to obese adipose tissue inflammation and insulin resistance. *J Immunol*, 191:4367-4374.
- Piao C, Zhang WM, Li TT, Zhang CC, Qiu S, Liu Y, Liu S, Jin M, Jia LX, Song WC, Du J. 2018. Complement 5a stimulates macrophage polarization and contributes to tumor metastases of colon cancer. *Exp Cell Res*, 366:127-138.
- Pillemer L, Blum L, Lepow IH, Ross OA, Todd EW, Wardlaw AC. 1954. The properdin system and immunity. I. Demonstration and isolation of a new serum protein, properdin, and its role in immune phenomena. *Science*, 120:279-285.
- Pompeia C, Cury-Boaventura MF, Curi R. 2003. Arachidonic acid triggers an oxidative burst in leukocytes. *Braz J Med Biol Res*, 36:1549-1560.
- Possel H 19.03.2018 22:29 Uhr. Stickstoffmonoxid Synthasen iNOS » eNOS » nNOS <http://www.connexin.de/nos-isoformen.html>.
- Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R. 2016. *Duale Reihe Biochemie*. 4 Aufl.: Leipzig, New York: Thieme.
- Remmele W, Stegner HE. 1987. [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathologe*, 8:138-140.

- Remmele W, Schicketanz KH. 1993. Immunohistochemical determination of estrogen and progesterone receptor content in human breast cancer. Computer-assisted image analysis (QIC score) vs. subjective grading (IRS). *Pathol Res Pract*, 189:862-866.
- Ridemann N, Guo R, Christ A, Zenker O. 17.03.2018 18:02 Uhr. The complement factor C5a. <http://www.inflarx.com/Home/Research---Development/About-C5A.html>.
- Saeger W. 2001. CD markers in pituitary adenomas. *Endocr Pathol*, 12:307-313.
- Sahoo AR, Mishra R, Rana S. 2018. The model structures of the complement component 5a receptor (C5aR) bound to the native and engineered (h)C5a. *Sci Rep*, 8:2955.
- Saito K, Ioka H, Maruyama S, Sumardika IW, Sakaguchi M, Kondo E. 2019. PODXL1 promotes metastasis of the pancreatic ductal adenocarcinoma by activating the C5aR/C5a axis from the tumor microenvironment. *Neoplasia*, 21:1121-1132.
- Salama A, Mueller-Eckhardt C. 1985. Binding of fluid phase C3b to nonsensitized bystander human red cells. A model for in vivo effects of complement activation on blood cells. *Transfusion*, 25:528-534.
- Sayah S, Ischenko AM, Zhakhov A, Bonnard AS, Fontaine M. 1999. Expression of cytokines by human astrocytomas following stimulation by C3a and C5a anaphylatoxins: specific increase in interleukin-6 mRNA expression. *J Neurochem*, 72:2426-2436.
- Schieferdecker HL, Schlaf G, Jungermann K, Götze O. 2001. Functions of anaphylatoxin C5a in rat liver: direct and indirect actions on nonparenchymal and parenchymal cells. *Intern Immunopharmacol*, 1:469-481.
- Schlaf G, Schmitz M, Rothermel E, Jungermann K, Schieferdecker HL, Götze O. 2003. Expression and induction of anaphylatoxin C5a receptors in the rat liver. *Histol Histopathol*, 18:299-308.
- Schmidt H. 2013. *Das Properdin (Immunology Reports and Reviews)*. Bonn: Springer-Verlag.

- Schraufstatter IU, DiScipio RG, Zhao M, Khaldoyanidi SK. 2009. C3a and C5a are chemotactic factors for human mesenchymal stem cells, which cause prolonged ERK1/2 phosphorylation. *J Immunol*, 182:3827-3836.
- Sendler M, Beyer G, Mahajan UM, Kauschke V, Maertin S, Schurmann C, Homuth G, Völker U, Völzke H, Halangk W, Wartmann T, Weiss FU, Hegyi P, Lerch MM, Mayerle J. 2015. Complement component 5 mediates development of fibrosis, via activation of stellate cells, in 2 mouse models of chronic pancreatitis. *Gastroenterol*, 149:765-776.
- Sharma S, Dubinett S. 2017. Inhibiting C5a/C5aR axis reduces myeloid-derived suppressor cells and enhances PD-1 blockade therapy in lung cancer. *Transl Cancer Res*, 6:S944-S948.
- Skokowa J, Ali SR, Felda O, Kumar V, Konrad S, Shushakova N, Schmidt RE, Piekorz RP, Nürnberg B, Spicher K, Birnbaumer L, Zwirner J, Claassens JW, Verbeek JS, van Rooijen N, Köhl J, Gessner JE. 2005. Macrophages induce the inflammatory response in the pulmonary Arthus reaction through G alpha i2 activation that controls C5aR and Fc receptor cooperation. *J Immunol*, 174:3041-3050.
- Soruri A, Kim S, Kiafard Z, Zwirner J. 2003. Characterization of C5aR expression on murine myeloid and lymphoid cells by the use of a novel monoclonal antibody. *Immunol Lett*, 88:47-52.
- Sweigard JH, Yanai R, Gaissert P, Saint-Geniez M, Kataoka K, Thanos A, Stahl GL, Lambris JD, Connor KM. 2014. The alternative complement pathway regulates pathological angiogenesis in the retina. *FASEB J*, 28:3171-3182.
- van Werkhoven MB, Damman J, Daha MR, Krikke C, van Goor H, van Son WJ, Hillebrands JL, van Dijk MC, Seelen MA. 2013. Novel insights in localization and expression levels of C5aR and C5L2 under native and post-transplant conditions in the kidney. *Mol Immunol*, 53:237-245.
- Volanakis JE, Kaplan MH. 1974. Interaction of C-reactive protein complexes with the complement system. II. Consumption of guinea pig complement by CRP complexes: requirement for human C1q. *J Immunol*, 113:9-17.

- Vorup-Jensen T, Petersen SV, Hansen AG, Poulsen K, Schwaeble W, Sim RB, Reid KB, Davis SJ, Thiel S, Jensenius JC. 2000. Distinct pathways of mannan-binding lectin (MBL)- and C1-complex autoactivation revealed by reconstitution of MBL with recombinant MBL-associated serine protease-2. *J Immunol*, 165:2093-2100.
- Wahn V. 13.03.2018 17:22 Uhr. Die CD Nomenklatur. <http://www.immundefekt.de/cd.shtml>.
- Ward P. 2004. The dark side of C5a in sepsis. *Nature Rev (Immunology)*, 4:133-142.
- Ward PA. 2009. Functions of C5a receptors. *J Mol Med (Berl)*, 87:375-378.
- Werfel T, Oppermann M, Schulze M, Krieger G, Weber M, Götze O. 1992. Binding of fluorescein-labeled anaphylatoxin C5a to human peripheral blood, spleen, and bone marrow leukocytes. *Blood*, 79:152-160.
- Wong N, Sim RB. 1997. Comparison of the complement system protein complexes formed by C1q and MBL. *Biochem Soc Trans*, 25:41S.
- Xi W, Liu L, Wang J, Xia Y, Bai Q, Long Q, Wang Y, Xu J, Guo J. 2016. High level of anaphylatoxin C5a predicts poor clinical outcome in patients with clear cell renal carcinoma. *Sci Rep*, 6:29177.
- Xu H, Chen M. 2016. Targeting the complement system for the management of retinal inflammatory and degenerative diseases. *Eur J Pharmacol*, 787:94-104.
- Yan C, Gao H. 2012. New insights for C5a and for C5a receptors in sepsis. *Front Immunol*, 3:368.
- Yoneda M, Imamura R, Nitta H, Taniguchi K, Saito F, Kikuchi K, Ogi H, Tanaka T, Katabuchi H, Nakayama H, Imamura T. 2019. Enhancement of cancer invasion and growth via the C5a-C5a receptor system: Implications for cancer promotion by autoimmune diseases and association with cervical cancer invasion. *Oncol Lett*, 17:913-920.
- Yousuf MS, Noh MC, Friedman TN, Zubkow K, Johnson JC, Tenorio G, Kurata HT, Smith PA, Kerr BJ. 2019. Sensory neurons of the dorsal root ganglia become hyperexcitable in a T-cell mediated MOG-EAE model of Multiple Sclerosis. *eNeuro*, 6: e0024-19.2019 1-15.

- Zahedi R, Braun M, Wetsel RA, Ault BH, Khan A, Welch TR, Frenzke M. 2000. The C5a receptor is expressed by human renal proximal tubular epithelial cells. *Clin Exp Immunol*, 121:226-233.
- Zhao C, Li Y, Qiu W, He F, Zhang W, Zhao D, Zhang Z, Zhang E, Ma P, Liu Y, Ma L, Yang F, Wang Y, Shu Y. 2018. C5a induces A549 cell proliferation of non-small cell lung cancer via GDF15 gene activation mediated by GCN5-dependent KLF5 acetylation. *Oncogene*, 37:4821-4837.
- Zwirner J, Fayyazi A, Götze O. 1999. Expression of the anaphylatoxin C5a receptor in non-myeloid cells. *Mol Immunol*, 36:877-884.

9 Anhang

9.1 Lebenslauf

9.2 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Frau apl. Prof. Dr. med. habil. A. Lupp,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Saalfeld, den 14.04.2020

Benjamin Nürge

9.3 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Frau apl. Prof. Dr. med. A. Lupp für die Themenvergabe, die fürsorgliche Betreuung während der Arbeit und die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor bedanken. Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern und Mitstudierenden des Institutes für Pharmakologie und Toxikologie bedanken. Ein besonderer Dank gilt Maria Tauchmann, welche mir zu jeder Tageszeit mit Rat und Tat zur Seite stand. Natürlich geht auch ein besonderer Dank an meine Eltern, ohne deren Rückhalt und Unterstützung ich mein Studium und die Promotion nicht geschafft hätte. Ebenso bedanke ich mich bei meiner Freundin Jenny, welche mich im Verlauf des ganzen Studiums und der Dissertation motiviert und unterstützt hat.