Universität Ulm
Klinik für Orthopädie
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Heiko Reichel

Gewebeersatz von Sehnen und Bändern: Untersuchungen zum Einfluss löslicher Faktoren und verschiedener Matrices auf humane multipotente mesenchymale Stromazellen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie
der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

Leslie Heckmann
geb. in München
2007

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Rolf E. Brenner
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Anita Ignatius
Tag der Promotion:	27. April 2007

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen VIII

A Einleitung 1

1 Sehnen und Bänder 1

1.1 Aufbau der extrazellulären Matrix (EZM) 2
1.2 Zellen und Zell-Matrix-Interaktion 6

2 „Tissue Engineering" von Sehnen- und Bandgewebe 12

2.1 Biomaterialien 13
2.2 Multipotente Mesenchymale Stromazellen 14
2.3 Wachstumsfaktoren 16

3 Zielsetzung 17

B Material und Methoden 19

1 Material 19

1.1 Patienten 19
1.2 Chemikalien und Kits 21
1.3 Geräte und Verbrauchsmaterialien 24
1.4 Wachstumsfaktoren 27
1.5 Antikörper 27
1.6 Primer 27
1.7 Zellkulturmedien 31
1.8 Computerprogramme 33

2 Methoden 33

2.1 Zellkultur 33
2.2 Herstellung von zellbesiedelten Kollagengelen 35
2.3 Besiedlung von PLLA 37
2.4 Molekularbiologie 38
2.5 Histologie 39
2.6 Zymographie 43
2.7 Statistische Auswertung 44

C Ergebnisse 45

1 Verhalten von Tenozyten in einem Kollagen-Hydrogel 45

1.1 Gel-Kontraktion, Morphologie, Proliferation 45
1.2 Matrixproduktion 47
1.3 Wechselwirkung mit der Matrix 49
1.4 Matrix-Umbau 50

2 Evaluierung des neuartigen PLLA-Zellträgers 51

3 Einfluss der Matrix auf das Verhalten von MSZ 52

3.1 Kultivierung, Morphologie, Proliferation 52
3.2 Differenzierung der MSZ 60
3.3 Matrixproduktion 61
3.4 Matrix-Anheftung über Integrine 77
3.5 Matrix-Umbau durch Matrixmetallopeptidasen (MMPs) 81

D Diskussion 89

1 Verhalten von Tenozyten in einem Kollagen-Hydrogel 89

1.1 Gel-Kontraktion, Zell-Morphologie und -Proliferation 90
1.2 Zell-Matrixproduktion 91
1.3 Zell-Matrix Interaktionen 92
1.4 Matrix-Umbau 93

2 Evaluierung des neuartigen PLLA-Zellträgers 94

3 Einfluss der Matrix auf das Verhalten von MSZ 95

3.1 Kultivierung, Zell-Morphologie und -Proliferation 96
3.2 Differenzierung der MSZ 101
3.3 Zell-Matrixproduktion 103
3.4 Matrix-Anheftung über Integrine 107
3.5 Matrix-Remodeling 109

4 Fazit 112

E Zusammenfassung 114

F Literaturverzeichnis 116

Danksagung 132

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau und Struktur von Sehnen und Bändern S.3

Abbildung 2: Runde Tenoblasten und elongierte Tenozyten in humanen Patellarsehnen S. 7

Abbildung 3: Integrin-Rezeptor-Familien S. 8

Abbildung 4: Inetrgin-Heterodimere S. 8

Abbildung 5: Separation der kernhaltigen Zellen aus dem Knochenmarkaspirat durch Dichtegradientenzentrifugation S. 34

Abbildung 6: Teflon-Form zur Herstellung von Kollagenringen S. 36

Abbildung 7: PLLA-Konstrukt für Besiedlungsversuche S. 37

Abbildung 8: Zellmorphologie humaner Tenozyten in einem dreidimensionalen Typ I-Kollagen-Gel S. 46

Abbildung 9: Bestimmung der Kollagenexpression humaner TZ nach Einbringung in ein Kollagen-Gel S. 47

Abbildung 10: Kollagen-Immunhistochemie an Paraffinpräparaten TZ-besiedelter Kollagengele S.48

Abbildung 11: Bestimmung der Proteoglykan-Expression humaner TZ nach Einbringung in ein frei flotierendes Kollagen-Gel S. 48

Abbildung 12: Färbungen an Schnitten von Paraffinpräparaten von Konstrukten humaner TZ in Kollagen-Gelen nach Kultivierung für 14d S. 49

Abbildung 13: Relative Quantifizierung der Integrin-Untereinheiten β_1, α_1, α_2 und α_3 bei TZ in Kollagen-Gelen S. 49

Abbildung 14: Bestimmung der MMP- und TIMP-Expression von TZ nach Einbringung in ein Kollagen-Gel S. 50

Abbildung 15: Vergleich der Zelladhäsion auf PLLA bei unterschiedlicher Vorbehandlung der Zellträger S. 51

Abbildung 16: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen zellbesiedelter PLLA-Konstrukte S. 51

Abbildung 17: Einfluss der Kultivierungsbedingungen auf die Kontraktion zellbesiedelter Kollagen-Gel-Konstrukte S. 53

Abbildung 18: Kontraktion von zellbesiedelten Kollagengelen S. 53

Abbildung 19: Kontraktion zellbesiedelter, uniaxial aufgespannter Kollagengele S. 54

Abbildung 20: Zellmorphologie in Kollagen-Gelen kultivierter MSZ S. 55

Abbildung 21: Paraffinschnitte und Färbungen von MSZ in statisch aufgespannten Kollagen Typ I-Ringen S. 55
Abbildung 22: Phasenkonstrast-mikroskopische Aufnahmen von MSZ auf PLLA-Fasern S. 57
Abbildung 23: Differenzierungsstatus von MSZ vor und nach Einbringung in eine Kollagen-Matrix S. 60
Abbildung 24: Differenzierungsstatus von MSZ vor und nach Einbrinung in eine aufgespannte Kollagen-Matrix S. 61
Abbildung 25: Relative Quantifizierung von Kollagen Typ I bei MSZ in Kollagen-Gelen S. 62
Abbildung 26: Semi-Quantitative Analyse der Kollagen-Expression unter verschiedenen Kulturbedingungen S. 63
Abbildung 27: Relative Quantifizierung der Kollagen Typ I-Expression von MSZ in Kollagen-Gelen S. 64
Abbildung 28: Semi-Quantitative Analyse der Kollagen-Expression unter verschiedenen Kulturbedingungen S. 64
Abbildung 29: Semi-Quantitative Analyse der Kollagen-Expression S. 65
Abbildung 30: Relative Quantifizierung von Kollagen Typ I bei MSZ auf PLLA-Konstrukten S. 65
Abbildung 31: Semi-Quantitative Auswertung der Kollagen-Expression S. 66
Abbildung 32: Relative Quantifizierung von Kollagen Typ I bei MSZ auf PLLA-Matrices S. 67
Abbildung 33: Semi-Quantitative Auswertung der Kollagen-Expression S. 67
Abbildung 34: Immunhistochemische Färbungen von Kollagen S. 68
Abbildung 35: Immunhistologische Färbungen an zellbesiedelten, statisch aufgespannten Kollagen-Gelen S. 69
Abbildung 36: Immunhistochemische Färbungen von Kollagen S. 70
Abbildung 37: Alzianbau-Färbung von Kollagen-Gelen bei pH 2,5 S. 71
Abbildung 38: Alzianbau-Färbung von PLLA-Konstrukten bei pH 2,5 S. 71
Abbildung 39: Relative Quantifizierung der Tenascin-C-Expression bei MSZ in Kollagen-Gelen S. 72
Abbildung 40: Relative Quantifizierung der Tenascin-C-Expression von MSZ in Kollagen-Gelen S. 73

Abbildung 41: Immunhistochemische Färbung von Tenascin-C S. 73
Abbildung 42: Semi-Quantitative Auswertung der Proteoglykan und Glykoprotein-Expression S. 74
Abbildung 43: Semi-Quantitative Auswertung der Proteoglykan und Glykoprotein-Expression S. 74
Abbildung 44: Relative Quantifizierung der Teanscin-C-Genexpression von MSZ auf PLLA-Konstrukten S. 75
Abbildung 45: Relative Quantifizierung von Tenascin-C bei MSZ auf PLLA-Matrices S. 75
Abbildung 46: Immunhistochemische Färbung von Tenascin-C S. 76
Abbildung 47: Semi-Quantitative Auswertung der Proteoglykan und Glykoprotein-Expression S. 76
Abbildung 48: Relative Quantifizierung der Integrin-Untereinheiten von MSZ in Kollagen-Gelen S. 77
Abbildung 49: Relative Quantifizierung der Integrin-Expression der Untereinheiten β_1, α_1, α_2 und α_3 S. 79
Abbildung 50: Regulation der Integrin-Genexpression in statisch aufgespannten Kollagen-Gelen S. 79
Abbildung 51: Relative Quantifizierung der Integrin-Expression S. 80
Abbildung 52: Relative Quantifizierung der Integrin-Untereinheiten von MSZ in PLLA Konstrukten S. 81
Abbildung 53: Relative Quantifizierung der MMP-1-Genexpression bei MSZ in Kollagen Typ I-Gelen S. 82
Abbildung 54: Relative Quantifizierung der MMP1-Genexpression von MSZ in Kollagen Typ I-Gelen S. 83
Abbildung 55: Relative Quantifizierung der MMP-1-Genexpression von MSZ auf PLLA-Konstrukten S. 83
Abbildung 56: Relative Quantifizierung der MMP-1-Genexpression bei MSZ auf PLLA-Matrices S. 84
Abbildung 57: Semi-Quantitative Auswertung der Expression von MMPs und TIMPs unter verschiedenen Kulturbedingungen S. 85
Abbildung 58: Veränderung der Expression von MMPs und TIMPs S. 85
Abbildung 59: Veränderung der Expression von MMPs und TIMPs S. 86

Abbildung 60: Semi-Quantitative Auswertung der Expression der MMPs und TIMPs- auf PLLA S. 86
Abbildung 61: Semi-Quantitative Auswertung der Expression der MMPs und TIMPs- auf PLLA S. 87
Abbildung 62: Gelatine-Zymographie von serumfreien Überständen bei Kultur für 24h S. 88
Abbildung 63: Gelatine-Zymographie von serumfreien Überständen bei Kultur für 24h S. 88

Tabellen

Tabelle 1: Patientenkollektiv S. 19
Tabelle 2: Für RT-PCR verwendetete Primer S. 28
Tabelle 3: Für relative Quantifizierung mit SYBR-Green verwendetete Primer S. 30
Tabelle 4: Für relative Quantifizierung mit internen Oligonucleotid-Sonden verwendete Primer S. 31
Tabelle 5: Für Immunfärbungen verwendete Antikörper mit zugehöriger Vorbehandlung S. 41
Tabelle 6: Anteil PCNA-positiver Zellen in Kollagen-Konstrukten an der Gesamtzellzahl S. 58
Tabelle 7: Anteil PCNA-positiver Zellen in PLLA-Konstrukten an der Gesamtzellzahl S. 59

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ALP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxidsulfat
Aqua demin.	Demineralisiertes Wasser
BMP	bone morphogenetic protein
bp	Basenpaar(e)
°C	Grad Celsius
CART1	Cartilage paired-class Homeoprotein 1
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
CO_2	Kohlendioxid
CT	threshold cycle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dd	delta-delta
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidium-Bromid
EZM	Extrazelluläre Matrix
FKS	fetales Kälberserum
g	Gramm
g_n	Normalfallbeschleunigung
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
H&E	Hämatoxylin und Eosin
KCl	Kalium-Chlorid
l	Liter
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	mikromolar
M	molar

mg	Milligramm
mL	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
mMol	Millimol
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MSZ	Multipotente Mesenchymale Stromazellen
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
NaCl	Natrium-Chlorid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	nanomolar
OC	Osteocalzin
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PDGF	platelet derived growth factor
PLLA	Poly-L-Laktid
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rotationen pro Minute
RQ	relative Quantität
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion
SD	Standard-Abweichung
SDS	Natrium Dodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TGF	transforming growth factor
TIMP	Tissue Inhibitor of Matrixmetalloproteinase
TUNEL	Terminales Deoxynucleotidyl-Transferase Deoxyuridine Nick-end Labeling
TZ	Tenozyten

A Einleitung

1 Sehnen und Bänder

Sehnen und Bänder sind untereinander sehr ähnliche fibröse Bindegewebe. Sie sind ein essentieller Bestandteil des muskuloskeletalen Systems und verbinden Knochen mit Knochen respektive Muskeln. Sie ermöglichen so die Stabilität und Bewegung von Gelenken. Die Form von Sehnen und Bändern kann je nach anatomischer Anforderung und Lage im Körper stark variieren und adaptiert sich an die jeweilige Beanspruchung (Frank al. 1999).
Die Insertionsstelle einer Sehne mit einem Muskel wird „myotendinous junction" genannt, die fibröse oder fibrokartilaginäre Verbindung mit einem Knochen erfolgt durch die „osteotendinous junction" (Doschak u. Zernicke 2005). Zusätzlich sind Sehnen und Bänder mit verschiedenen Gewebetypen umgeben, die die Aufgabe haben, diese zu schützen und vor allem Reibung zu minimieren (Kannus 2000). Sie sind nur schwach vaskularisiert und akquirieren Nährstoffe auch durch Diffusion aus dem Synovialgewebe (Fenwick et al. 2002).
Bisher sind kaum spezifische biochemische Marker für Sehnen und/oder Bänder bekannt (Chuen et al. 2004, Tozer u. Duprez 2005). Zwar sind die einzelnen Matrixbestandteile von Sehnen/Bändern sehr gut untersucht, jedoch kommen die einzelnen Komponenten auch in anderen Geweben vor.
Sehnen des *axialen muskuloskelettalen Systems* entstehen aus Somiten, die zu beiden Seiten des Neuralrohres aus dem präsomitischen Mesoderm sprossen. Die Somiten unterteilen sich in vier Kompartimente: Das Dermomyotom, das dorsale Dermis und Skelettmuskeln bildet, das Sklerotom, aus dem das axiale Skelett hervor geht, das Myotom, welches Muskeln hervorbringt und schließlich das Syndedom (aus dem Griechischen: syndesis = verbinden"), aus dem die axialen Sehnen entspringen (Brent et al. 2005, Tozer u. Duprez 2005). Die Bildung der Sehnen aus dem Syndedom erfolgt genau zwischen anteriorem und posteriorem dorsolateralem Sklerotom als Antwort auf FGF-Signale aus dem Myotom und findet räumlich somit genau zwischen Knorpel- und Muskelbildung statt. Das Syndedom ist durch Scleraxis, einem bHLH-Transkriptionsfaktor, gekennzeichnet. Scleraxis wird im Huhn auch noch in adulten Tenozyten exprimiert (Schweitzer et al. 2001, Brent et al. 2003, Tozer u. Duprez 2005).
In den *Extremitäten* entwickeln sich Sehnen direkt aus den mesodermalen Extremitätenknospen. Dort entwickeln sie sich aus den Sehnen-Anlagen, die anatomisch distinkte Sehnen ausbilden und mit den Hauptgelenken der Extremitäten assoziiert sind. In der Ent-

wicklung geschieht die Ausbildung der Anlagen zunächst autonom, in späteren Ereignissen bei der Segregation gibt es eine gewisse gegenseitige Interaktion zwischen Muskel- und Sehnenvorläufern (Kardon 1998).

1.1 Aufbau der extrazellulären Matrix (EZM)

Die Extrazelluläre Matrix (EZM) besteht aus einer Vielzahl verschiedener Makromoleküle, deren genaue Zusammensetzung gewebespezifisch ist und den jeweiligen mechanischen und biologischen Anforderungen dieses Gewebes gerecht werden muss. Sie bietet den gewebeständigen Zellen unter anderem eine Grundlage zur Reorganisation der Matrix, Wachstum, Differenzierung und Migration. Dadurch ist sie für die Gewebe- und Organ-Morphologie und –Entwicklung verantwortlich und bestimmt dessen Größe und Form (Kuo u. Tuan 2003, Rosso et al. 2004). Darüber hinaus spielt die EZM eine Rolle als Reservoir für Wachstumsfaktoren oder Wachstumsfaktor-bindende Moleküle. Die EZM spielt eine Rolle in der kontrollierten Freisetzung der Wachstumsfaktoren, indem sie durch die eingeschränkte Diffusion einen Speicher darstellt. Diese Speicherung vermindert sowohl Abtransport und Abbau der Wachstumsfaktoren als auch übermäßige Bindung an die Zielzellen (Rosso et al. 2004). Die genaue Zusammensetzung der EZM von Sehnen und Bändern variiert vor allem im jeweiligen Anteil der einzelnen Komponenten stark, sowohl zwischen verschiedenen Sehnen oder Bändern, als auch innerhalb eines Gewebes.
Im Folgenden sollen die wichtigsten Gruppen der Matrixmoleküle dargestellt werden.

1.1.1 Kollagen

Kollagen macht den Hauptbestandteil der Trockenmasse von Sehnen und Bändern aus. Dabei bildet Kollagen Typ I mit 70-80% des Trockengewichtes den bei weiten größten Bestandteil (Woo et al. 2006). Daneben liegen vor allem Typ III (etwa 8%) und Typ V (12%) vor. Außerdem werden zumindest im Hühnchen die Kollagentypen XII und XIV mit verschiedenen Expressionsmustern während der Entwicklung gebildet (Young et al. 2000, Zhang et al. 2003, Zhang et al. 2005). Diese beiden Kollagene regeln wahrscheinlich die Fibrillogenese während der Sehnenentwicklung. In Sehnen und/oder Bändern ist außerdem Kollagen XX beschrieben (Gelse et al. 2003).
Das Kollagen liegt innerhalb einer Sehne oder eines Bandes in hoch geordnetem Zustand vor. Kollagen wird zunächst als lösliches Tropokollagen synthetisiert. Noch im endoplasmatischen Retikulum erfolgt die Hydroxylierung einzelner Prolin- und Lysinreste, bevor die Tripelhelixbildung – ausgehend vom C-terminalen Propeptid – eingeleitet wird. Wäh-

rend oder nach der Exocytose werden die Propeptide abgespaltet, was die Polymerisation der Moleküle durch Quervernetzung an bestimmten Lysin- und Hydroxylysinresten erlaubt. Diese unlöslichen Kollagenmoleküle aggregieren als Mikrofibrillen und lagern sich schließlich zu den bereits elektronenmikroskopisch erkennbaren Kollagenfibrillen zusammen (Zhang et al. 2005).

Die Kollagenfibrillen bilden Kollagenfasern, die die kleinste Einheit einer Sehne oder eines Bandes darstellen. Diese Fasern sind mit einem Lichtmikroskop erkennbar. Die Kollagenfasern sind von einer feinen Bindegewebsschicht, dem Endotenon umgeben, der die Fasern untereinander verbindet, aber deren Reibung minimiert (Kannus 2000).

Mehrere Kollagenfasern sind als so genanntes Faserbündel oder Subfaszikel zusammengefasst, die wiederum in primäre, sekundäre und tertiäre Faszikel weiter strukturiert sind. Ihr Querschnitt ist in der Regel triangulär mit relativ scharfen Ecken, wobei die Form auch durch Kompressionskräfte des umliegenden Gewebes beeinflusst wird. Alle Faserbündeleinheiten sind jeweils von einer Endotenon-Schicht umgeben. Der Durchmesser dieser tertiären Bündel variiert bei humanen Sehnen zwischen 1000 und 3000µm, wobei der Durchmesser direkt mit der Größe der Sehne korreliert. Tertiäre Bündel bauen die Sehne auf und sind von einer weiteren Bindegewebsschicht, dem Epitenon, umgeben (Abb. 1).

In belastungsfreiem Zustand liegen die Kollagenfibrillen in wellenförmiger, paralleler Ausrichtung vor, die bei Dehnung auseinander gezogen wird. (Kannus, 2000).

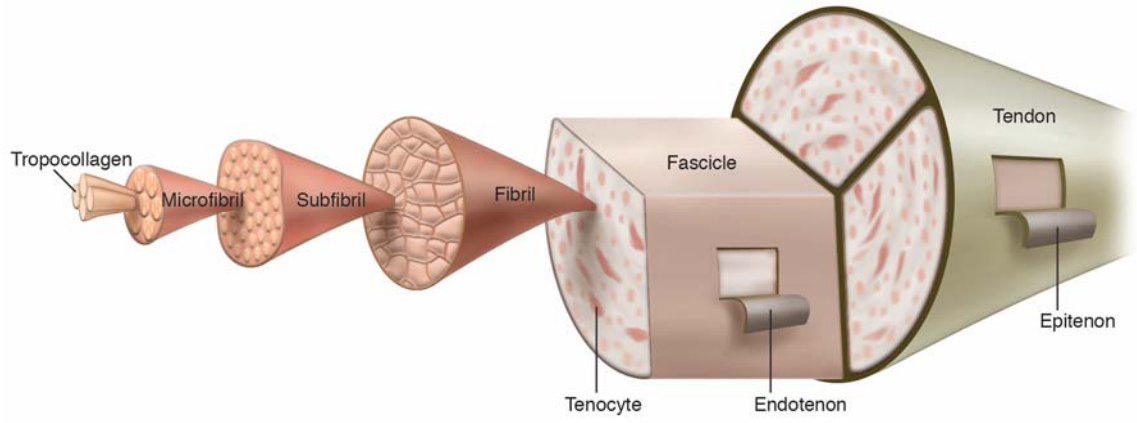


Abbildung 1: Aufbau und Struktur von Sehnen und Bändern. Der Haupt-Trockenbestandteil von Sehnen und Bändern ist Kollagen Typ I. Dieses wird von Tenozyten und Tenoblasten synthetisiert, kreuzvernetzt und in Fibrillen organisiert. Endo- und Epitenon stellen ein loses Bindegewebe dar, das die einzelnen Fibrillenbündel bzw. Faszikel weiter strukturiert. Abbildung aus: Towler u. Gelbermann 2006.

1.1.2 Proteoglykane und Glykoproteine

Proteoglykane bilden den zweitgrößten Bestandteil der Trockenmatrix von Sehnen und Bändern. Sie bestehen aus einem Kernprotein, das durch Anhängen mehrerer Glukosami-

noklykanketten modifiziert wird. Sie lassen sich vereinfacht in zwei große Gruppen einteilen: Die kleinen Leucin-reichen Proteoglykane Decorin, Biglycan, Fibromodulin, Lumikan, sowie Epiphycan („SLURPS“, aus dem englischen von „Small Leucin-Rich Proteoglycans“), und die modulär aufgebauten Protoglykane Versikan, Aggrecan, Neurocan, Brevican, Perlecan, Agrin und Testican. Eine besondere Eigenschaft kommt den SLURPS zu: Sie haben die Fähigkeit, Wachstumsfaktoren zu binden und modulieren, aber auch mit anderen Matrixproteinen, beispielsweise dem Tropoelastin, zu interagieren (Iozzo u. Murdoch 1996, Yoon u. Halper 2005).

Proteoglycane haben aufgrund ihrer negativen Ladung eine große Wasserbindungskapazität und sind meistens zwischen Kollagenfibrillen und –fasern eingebettet, deren Durchmesser sie teilweise auch regulieren. Hierbei kommt dem Decorin eine wichtige Rolle zu, welches das häufigste Proteoglykan in Sehnen und Bändern darstellt (Rahaman u. Mao 2005). Darüber hinaus wird der Proteoglykangehalt einer Sehne oder eines Bandes ständig der mechanischen Beanspruchung des Gewebes angepasst. Zugkräfte induzieren eher das kleinere Decorin, wohingegen Kompressionskräfte zur Synthese des großen, stark wasserbindenden Aggrecan führen. Innerhalb des mittleren Sehnenbereiches findet man den Anteil kleiner Proteoglykane bei 90%, die größeren Proteoglykane machen hier nur 10% des Gesamtgewichtanteils aus. In Bereichen, an denen die Sehne auch Druckkräften ausgeliefert ist, verschiebt sich dieses Verhältnis bis hin zu 1:1 (Yoon u. Halper 2005). Die Konzentration von Proteoglykanen in Sehnen ist jedoch erheblich kleiner als in Knorpel, in dem die Druckfestigkeit um ein Vielfaches höher liegt (Kannus 2000).

Glykoproteine bestehen wie die Proteoglykane aus einem glykosilierten Kernprotein, wobei der Grad der Glykosilierung hier geringer ist. Eine Untereinheit bilden die so genannten adhäsiven Glykoproteine mit der Eigenschaft, große Makromoleküle oder Zellen aneinander zu binden. Mindestens vier solcher Moleküle konnten in Sehnen nachgewiesen werden: Fibronektin, Tenascin-C, Thrombospondin und Undulin (Kannus 2000).

Wie bereits oben erwähnt ist Decorin das in Sehnen am häufigsten vorkommende Proteoglykan. Es kann an fast alle Kollagen-Typen binden und so den Fibrillendurchmesser regulieren. Während der Sehnenentwicklung ist das Anwachsen des Kollagenfibrillendurchmessers eng mit einem Rückgang and Fibrillen-gebundenem Decorin assoziiert. Weiterhin reguliert es die Zellproliferation durch eine Verhinderung der Zellspreitung und die Inhibition von TGFβ, sowie eine Bindung an den EGF-Rezeptor. Seine Primärstruktur zeigt große Homologien zu den Proteoglykanen Biglykan, Fibromodulin und Lumikan (Iozzo u. Murdoch 1996, Yoon u. Halper 2005). In experimentell rupturierten Kaninchen-

Außenbändern wird Decorin während der Heilungsphase immer weiter heraufreguliert, was seine Beteiligung auch an der Neufibrillogenese nach einem Trauma verdeutlicht (Kydd et al. 2005).

Biglycan interagiert wie Decorin mit Kollagen vom Typ I, wobei seine Bindungsaffinität mit dem des Decorin vergleichbar ist. Daneben kann es ebenfalls TGFβ binden und so einen Einfluss auf die Zellproliferation und Differenzierung nehmen (Yoon u. Halper 2005). Nach einem Trauma im Kaninchen-Außenband wird es – im Gegensatz zu Decorin – nur in der Anfangsphase der Heilung heraufreguliert, später pendelt sich seine Expression wieder in einem leicht erhöhten Bereich ein (Kydd et al. 2005).

Fibromodulin kann an die Kollagene vom Typ I und II binden, jedoch bindet es hier an unterschiedliche Stellen im Molekül. Die Bindungsstelle am Typ I-Kollagen unterscheidet sich von derjenigen des Decorin. Deshalb fördert es im Gegensatz zu Decorin die Bildung größerer, reifer Kollagenfibrillen. (Yoon u. Halper 2005) Von Fibromodulin-Knockout-Mäusen ist bekannt, dass Fibromodulin einen entscheidenden Beitrag zur Sehnensteifigkeit ausübt (Jepsen et al. 2002).

Auch Lumikan kann an Kollagen vom Typ I binden und teilt die Bindungsstelle mit Fibromodulin (Yoon u. Halper 2005). Studien an Knockout-Mäusen haben ergeben, dass Lumikan Fibromodulin in Fibromodulin-defizienten Mäusen funktionell ersetzt, wohingegen im umgekehrten Fall keine Substitution von Lumikan erfolgt. Die Struktur von Sehnen zeigt dann zwar eine geringere Organisation und einen größeren Fibrillendurchmesser, was allerdings nicht mit einer biomechanischen Beeinträchtigung einhergeht (Jepsen et al. 2002).

Versikan erscheint vorübergehend während der Mesenchymkondensation in der Hühnchen-Extremitätenknospe. Eine Erhöhung des Versikan-Gehaltes führt zu einer größeren Viskoelastizität der perizellulären Matrix, was Zellform-Veränderungen ermöglicht, die zur Proliferation und Migration von Nöten sind (Yoon u. Halper 2005).

Tenomodulin ist ein Transmembran-Glykoprotein, welches nur in Sehnen, Bändern und dem Auge zu finden ist und durch Scleraxis reguliert wird (Shukunami et al. 2006). In Mäusen konnte gezeigt werden, dass ein Verlust von Tenomodulin zu einer verminderten Tenozytenproliferation führt und damit die Tenozytendichte herabsetzt. Außerdem kommt es zu einer gestörten Kollagenfibrillogenese, was zu abnormal hohen Fibrillendurchmessern führt (Docheva et al. 2005).

Tenascin-C (auch als Hexabrachion und Zytoaktin bekannt) ist ein hexameres, Multidomänen-Glykoprotein, dessen Untereinheiten über Di-Sulfid-Brücken verknüpft sind (Luczak

et al. 1998, Hsia u. Schwarzbauer 2005). Es ist ein elastisches Protein, das sich bei Zugbelastung auf ein Vielfaches seiner Ruhelänge ausdehnen kann. Daher kommt es im Körper ausschließlich in Geweben mit hoher mechanischer Zugbelastung vor. Tenascin-C hat eine Vielzahl an Bindungsstellen für EZM-Moleküle und Zellrezeptoren. In Sehnen und Bändern findet man es sowohl perizellulär, als auch um die Kollagenfasern herum (Järvinen et al. 2000). Seine Untereinheiten werden durch mechanische Belastung reguliert, die unter anderem durch Integrin-Signale vermittelt werden (Chiquet-Erismann u. Tucker 2004).
Auch Fibronektin gehört zu den multiadhäsiven Glykoproteinen. Seine primäre Rolle besteht darin, Zellen an die Matrix zu binden, wobei die Fibronektin-Bindung sehr häufig ein einleitender Schritt ist. Durch seine Fähigkeit, die Organisation des Zytoskelettes und die Migration zu beeinflussen, sowie eine rasche Adhäsion zu stimulieren, spielt es vor allem in traumatisiertem Gewebe eine Rolle. In gesunden Sehnen findet man es vor allem im Epitenon und zu einem geringeren Teil auch in zentraleren Teilen. In nekrotischen oder rupturierten Sehnen findet man im Vergleich zu gesunden Gewebe einen deutlich erhöhten Fibronektin-Anteil, der während des Heilungsprozesses jedoch auf das Normalniveau zurückgeht (Tillander et al. 2002).

1.1.3 Elastin

Elastin ist ein sehr beständiges, unlösliches Polymer, das im gesunden Gewebe kaum biologisch erneuert wird. Eine Neusynthese findet praktisch nur nach einer Traumatisierung des Gewebes, dann aber sehr rasch, statt. Es entsteht wie das Kollagen aus einem löslichen Vorläufermolekül, dem Tropoelastin. Das Assembly des Elastins findet auf einem Gerüst aus Mikrofibrillen statt, die wiederum zu einem großen Anteil aus Fibrillin-1 und Fibrillin-2 bestehen. Elastin macht etwa 4% des Trockengewichtes von Sehnen aus und kann in Bändern sogar zu einem noch größeren Anteil vorkommen (Mitieux u. Weiss 2005). Unter Zugspannung kann sich Elastin auf mehr als die doppelte Länge ausdehnen (Scott 2003).

1.2 Zellen und Zell-Matrix-Interaktion

Gesunde Sehnen und Bänder sind relativ zellarm. In der humanen Sehne nimmt das Zell-/Matrix-Verhältnis von der Geburt bis zum Alter ab (Chuen et al. 2004). Erst bei traumatischer oder pathologischer Veränderung nimmt das Zell-/Matrix-Verhältnis zu (Frank et al. 1999). Junge humane Sehnen sind durch einen großen Anteil an Tenoblasten gekennzeichnet. Diese sind metabolisch sehr aktiv, sie besitzen ein ausgeprägtes endoplasmatisches Retikulum, einen prominenten Golgi-Apparat, sowie viele Ribosomen und proliferieren

stark (Kannus, 2000, Chuen et al. 2004). Sie liegen zwischen den parallelen Kollagenbündeln eingebettet. Tenoblasten und Tenozyten sind die matrix-synthetisierenden Zellen der Sehne. Während Tenoblasten durch eine ovoide Morphologie gekennzeichnet sind und häufig in Clustern vorliegen, sind Tenozyten spindelförmig, sehr lang und liegen meist separat in der Sehne vor (Abb. 2) (Chuen et al. 2004). Sie machen mit 90-95% den größten Anteil der Zellpopulation in Sehnen und Bändern aus (Kannus 2000, Woo et al. 2006).

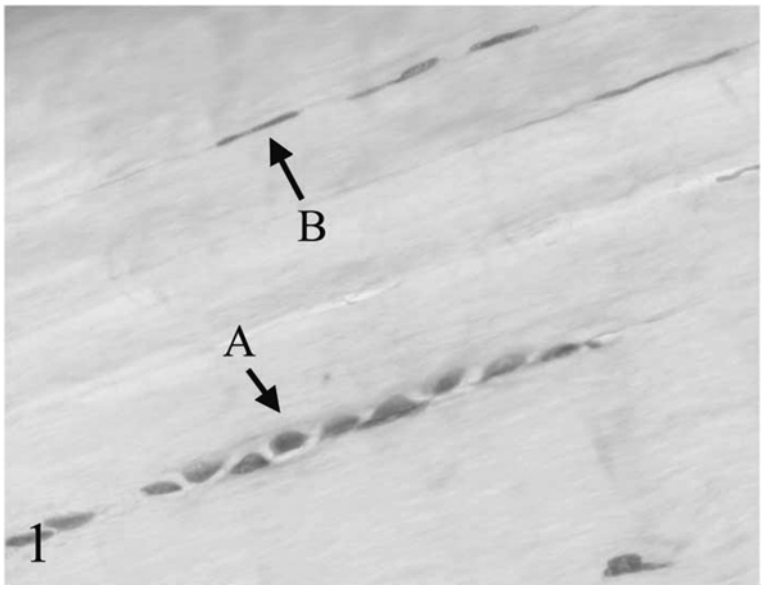


Abbildung 2: Runde Tenoblasten (A) und elongierte Tenozyten (B) in humanen Patellarsehnen. Tenoblasten und Tenozyten sind zwischen den Kollagenfaserbündeln eingebettet. H&E-Färbung, ursprüngliche Vergrößerung:400x. Abbildung aus: Chuen et al. 2004.

Daneben finden sich in geringer Zahl eine Reihe weiterer Zelltypen. Neuronen spielen für die Reizaufnahme und –weiterleitung eine Rolle, in den Sehnen-Insertionsstellen (fibrokartilaginäres Gewebe) findet man Chondrozyten. Außerdem sind durch die wenigen vorhandenen Blutgefäße innerhalb von Sehnen und Bändern vaskuläre und glatte Muskelzellen zu finden. Nur in pathologischen Situationen findet man auch eine Reihe inflammatorischer Zellen und Makrophagen.

1.2.1 Integrinwechselwirkungen mit der EZM

Die Zelladhäsion ist ein entscheidender Faktor bei der Bildung von Geweben. In Sehnen und Bändern spielen – genau wie in anderen Organen – die große Gruppe der Integrin-Rezeptoren eine sehr große Rolle. Es handelt sich bei dieser Molekülgruppe um eine Glykoproteinfamile, die stets als Heterodimere, bestehend aus einer nicht kovalent verbunden α- und einer β-Untereinheit, vorkommen (Rosso et al. 2004, Garcia 2005). Derzeit sind 18 α- und 8 β-Untereinheiten bekannt, wobei eine β-Untereinheit mit mehreren verschiedenen

α-Untereinheiten assoziiert sein kann, so dass insgesamt 24 Heterodimere bekannt sind (Abb. 3 und 4) (Hynes 2002, Thomas et al. 2006). Jedes Monomer besteht aus einer extrazellulären Domäne, die die Substratspezifität bestimmt. Weiterhin besitzen sie eine Transmembran- und eine extrazelluläre Domäne, wobei letztere mit zytoplasmatischen Strukturen interagiert.

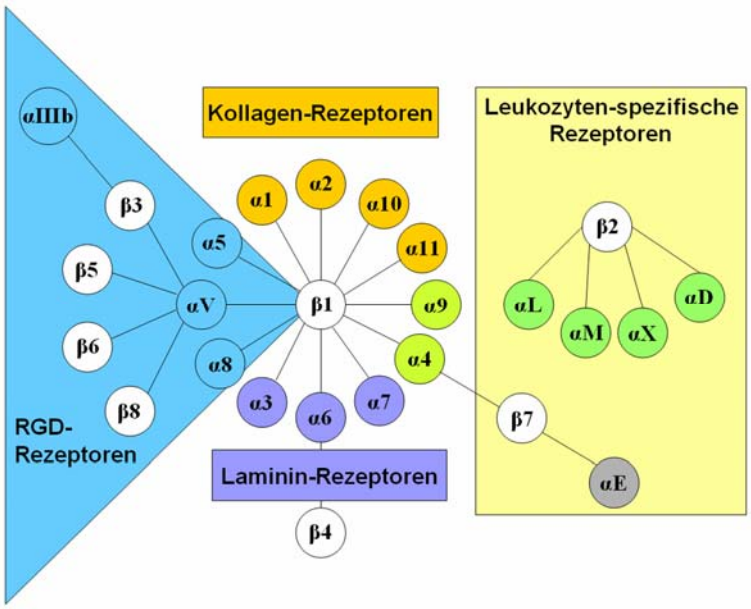


Abbildung 3: Integrin-Rezeptor-Familien. Integrine bilden αβ-Dimere. Derzeit sind 8 β- und 18 α-Integrin-Untereinheiten bekannt, wobei die β-Untereinheiten meist mit unterschiedlichen α-Untereinheiten dimerisieren können. Derzeit sind 24 Kombinationen bekannt. Abbildung nach Hynes 2002.

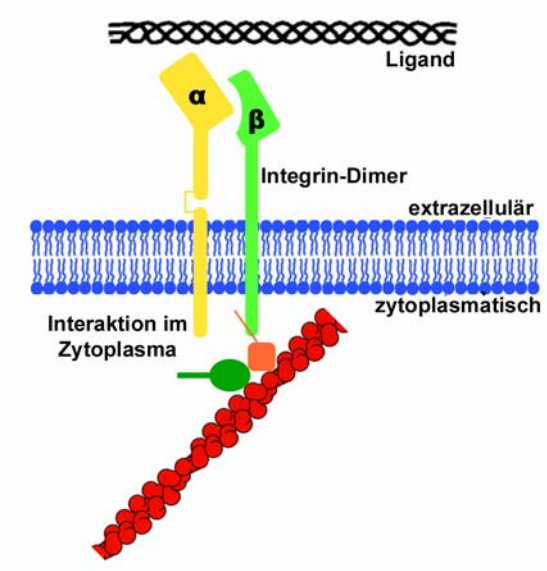


Abbildung 4: Integrin-Heterodimere. Jedes Integrin-Monomer besteht aus 3 Abschnitten: Die extrazelluläre Domäne interagiert mit spezifischen Liganden. Über eine Transmembrandomäne sind Integrine in der Zellmembran verankert. Die zytoplatmatische Domäne interagiert mit verschiedenen Strukturen des Zytoplasmas. Auf diese Weise können Informationen aus der EZM in die Zelle vermittelt, aber auch die EZM nach Signalen aus der Zelle modifiziert werden.

Alle Integrin-Dimere haben spezifische, nicht-redundante Funktionen. Zwar haben verschiedene Dimere oft überlappende Liganden, binden jedoch an unterschiedlichen Stellen oder mit unterschiedlicher Affinität (Jones u. Walker 1999). Beispielsweise bindet Integrin $\alpha_1\beta_1$ deutlich stärker an monomeres Kollagen Typ I, wohingegen Integrin $\alpha_2\beta_1$ eine stärkere Bindung zu Kollagenfibrillen aufweist. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass Kollagen-bindende Integrine die perizelluläre Kollagenfibrillogenese leiten oder sogar regulieren (Jokinen et al. 2004).

Integrine spielen aber nicht nur bei der Zelladhäsion und –struktur eine Rolle, durch ihre Transmenbrandomäne kommt ihnen auch eine Schlüsselrolle in der Signaltransduktion zu. Bei der Bindung an einen Liganden assoziieren Integrine mit dem Aktin-Zytoskelett und lagern sich zu so genannten Fokalen Adhäsionskomplexen zusammen. Dabei handelt es sich um diskrete supramolekulare Komplexe, die eine Vielzahl von weiteren Strukturproteinen beinhalten. Diese Fokalen Adhäsionskomplexe bilden die Brücke zwischen der Extrazellulären Matrix und dem Zellinneren (Garcia 2005). Dabei haben sie einen Einfluss auf Zellmigration, Adhäsionsstärke und Differenzierung (Juliano et al. 2004, Chao et al. 2006). Bei Integrinen spricht man deshalb von Signalwegen, die in zwei Richtungen laufen – sowohl von außen nach innen (Informationen über Art und biomechanische Eigenschaften der Matrix) als auch von innen nach außen (Beeinflussung der Matrix durch die Anheftung).

Obwohl Integrine unabhängig von anderen Rezeptoren intrazelluläre Signale vermitteln können, scheint die Synergie mit Wachstumsfaktor-Rezeporen noch komplexere Signale zu vermitteln. (Eliceiri 2001) Viele Wachstumsfaktor-Effekte sind daher auch abhängig von der Anheftung der Zelle an die Matrix. Es ist wichtig, sich solcher komplexer Vorgänge bewusst zu sein, da die *in vivo*-Verhältnisse sehr vielschichtig sind.

1.2.2 Reorganisation der EZM über Matrixmetallopeptidasen

Die extrazelluläre Matrix wird aktiv von den Zellen ab- und umgebaut. Solche Prozesse sind nicht nur in pathologischen Situationen, sondern auch in der Regeneration und für den Erhalt der funktionellen Integrität wichtig. Eine große Rolle spielen dabei die Matrixmetallopeptidasen (MMPs) und ihre Inhibitoren, die „Tissue Inhibitors of Matrixmetallopeptidase“ (TIMPs). Dieser Prozess muss sehr genau reguliert sein, da sonst pathologische Zustände auftreten (Bramono 2004). Mit der Ausnahme von MMP-2, das von vielen Zelltypen konstitutiv exprimiert wird, wird eine Transkription der MMPs unter anderem durch Wachstumsfaktoren beeinflusst. Als Beispiel kann MMP-13 genannt werden, dessen

Transkript von PDGF stabilisiert, von TGF-β jedoch destabilisiert wird. Eine Regulation auf Translationsebene findet unter anderem durch Integrin-Wechselwirkungen und die damit verbundene Information über die extrazelluläre Matrix statt (Sternlicht u. Werb 2001). Derzeit sind 22 MMPs und 4 TIMPs beim Menschen bekannt, die in verschiedenen Geweben unterschiedlich exprimiert werden (Nagase u. Woessner 1999, Sternlicht u. Werb 2001, Bramono et al. 2004).

MMPs sind eine Familie von Zink-abhängigen Endopeptidasen, die bei Anwesenheit von bivalenten Kationen bei neutralem pH aktiv sind. Die katalytisch-aktive Stelle der MMPs besteht aus einem konservierten Motiv aus drei Histidin-Resten, die das Zink binden, und einem Methionin-Rest. MMPs werden zunächst in einer latenten Pro-Form, dem so genannten Zymogen, sekretiert. Die Aktivierung erfolgt dann durch Abspaltung des Propeptides, was durch Autokatalyse, weitere MMPs oder andere Proteasen geschehen kann. Das Propeptid besitzt an seinem C-Terminus eine ungepaarte Cystein-Sulfhydryl-Gruppe (-SH), die sich mit dem Zink-Atom im aktiven Zentrum paart und so die Latenz des Zymogens bewahrt (Nagase u. Woessner 1999, Bramono et al. 2004).

MMPs lassen sich in vier Haupt-Kategorien einteilen: Kollagenasen spalten die nativen Kollagene vom Typ I, II und III, Gelatinasen spalten denaturiertes Kollagen und Kollagen Typ IV, Stromelysine spalten Proteoglycane und die Kollagene vom Typ III, IV und V, Casein und Fibronektin. Daneben findet man noch die Membran-gebundenen MMPs.

Im humanen anterioren Kreuzband ist die Expression von MMP 1, -2, -3, -7, -9, -11, -14, -17 und -18, nicht jedoch von MMP-8, -10, -12, -13, -15 und -16 beschrieben (Foos et al. 2001). In der humanen Achillessehne jedoch konnte ein viel breiteres Expressionsspektrum von MMPs gefunden werden, so dass dieses Muster, genauso wie die genaue Zusammensetzung der EZM, variiert (Jones et al. 2006). In dieser Arbeit wurde auf vier MMPs näher eingegangen. Dabei handelt es sich um die Kollagenasen MMP-1 und -13, sowie die Gelatinasen MMP-2 und -9, die für Sehnen und Bänder von besonderer Bedeutung sind.

MMP-1 degradiert die Kollagene vom Typ I, II, III und X, wobei Kollagen Typ III am effektivsten degradiert wird, gefolgt von Kollagen Typ I. Daher spielt es in der Reorganisation von Sehnen- oder Bandgewebe eine große Rolle. Bei Traumatisierung des Gewebes wird es stark heraufreguliert (Riley et al. 2002). MMP-1 ist in Tenoblasten stärker exprimiert als in Tenozyten.

MMP-2, auch Gelatinase-A genannt, wird in vielen Geweben auch in nicht-inflammatorischem Zustand exprimiert. Es wird direkt an der Zellmembran durch MT1-MMP bzw. TIMP-2 aktiviert, wobei diese Aktivierung strikt reguliert wird (Nagase u.

Woessner 1999). Es zeichnet sich durch eine große Substratvarianz aus. Durch seine Fähigkeit bestimmte Bestandteile der Basalmembran, wie Fibronektin und Laminin, zu spalten, legt MMP-2 promigratorische Stellen frei und erleichtert so die Zellmigration.
MMP-9 gehört ebenfalls zu den Gelatinasen und ist auch als Gelatinase-B bekannt. Aufgrund einer Fibronektin-ähnlichen und einer Kollagen V-ähnlichen Domäne ist MMP-9 die größte der MMPs. MMP-9 wird in der Regel deutlich geringer exprimiert als MMP-2 und eine Hochregulation wird hauptsächlich mit pathologischen Zuständen wie Rheumatoider und Inflammatorischer Arthritis in Verbindung gebracht (Bramono et al. 2004).
MMP-13 degradiert vornehmlich Kollagen vom Typ II, daneben aber auch Typ I und Typ III-Kollagen. Jedoch ist die gelatinolytische Aktivität noch deutlich höher als die Kollagen-spaltende Aktivität (Bramono et al. 2004).
Eine entscheidende Aufgabe von MMPs ist nicht nur der bloße Umbau der EZM, sondern dabei speziell dadurch auch die Freisetzung daran angehefteter Wachstumsfaktoren. Daneben werden durch die Spaltung verschiedener Matrixkomponenten oft Bindungssequenzen frei, an die sich die Zelle mit ihren Rezeptoren anheften kann.
Die TIMPs 1 bis 4 inhibieren die verschiedenen MMPs reversibel mit einer Stöchiometrie von 1:1 in unterschiedlicher Effektivität. TIMP-1 und TIMP-2 sind beide in der Lage, alle vier oben näher genannten MMPs (MMP-1, -2, -9 und -13) zu inhibieren. TIMPs können auch bereits die Pro-Formen der MMPs inhibieren. TIMP-1 bindet beispielsweise an Pro-MMP-9 und TIMP-2 inhibiert sowohl Pro-MMP-1 als auch Pro-MMP-2 (Nagase u. Woessner 1999).
TIMPs haben neben ihrer namensgebenden Funktion als Inhibitoren der MMPs allerdings auch noch eigenständige mitogene Funktionen. Diese Wachstums-stimulierende Funktion ist unabhängig von ihrer MMP-inhibierenden Eigenschaft (Sternlicht u. Werb 2001). Der genaue Mechanismus dieser Beeinflussung ist jedoch noch unklar. Weitere MMP-inhibierende Substanzen sind bekannt, darunter α2-Makroglobulin (Baker et al. 2002), darauf soll im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht eingegangen werden.
Die Expression der MMPs ist auch vom Zustand der Zelle anhängig. In normalen Zellen ist die MMP-Expression relativ gering und wird erst durch spezifische Stimuli wie Zytokine, Wachstumsfaktoren und gewisse EZM-Interaktionen oder aber eine onkogene Transformation heraufreguliert (Nagase u. Woessner 1999, Bramono et al. 2004). Jones et al. konnten zeigen, dass das MMP-Expressionsmuster von rupturierten oder chronisch schmerzenden humanen Achillessehnen zumindest auf mRNA-Ebene tatsächlich von dem in gesunden Achillessehnen abweicht. Bemerkenswert war hier eine 1000fach erhöhte MMP-1-

Expression in rupturierten Sehnen im Vergleich zu gesundem Gewebe (Jones et al. 2006). Kydd et al. zeigten eine ähnliche, wenn auch weniger stark ausgeprägte Reaktion von MMP-13 in Kaninchen-Außenbändern auf mRNA- und Proteinebene (Kydd et al. 2005). Daneben konnte *in vitro* gezeigt werden, dass Hunde-Sehnenfibroblasten ihre MMP-2 und -9-Expression bei Kontakt mit freiem Kollagen Typ I heraufregulieren, was ihre Bedeutung beim Matrixumbau nach einer Ruptur entspricht (Ritty u. Herzog 2003).
Es ist bekannt, dass die hier genannten Interaktionen von Zellen mit der extrazellulären Matrix miteinander verknüpft sind. Dumin et al. konnten zeigen, dass aus humanen Keratinozyten MMP-1 mit $\alpha_2\beta_1$-Integrinen ko-immnopräzipitiert werden kann (Dumin et al. 2001). Die genaue Struktur dieser Interaktion ist mittlerweile bekannt (Stricker et al. 2001). Diese Tatsache erklärt den funktionellen Zusammenhang, bei dem eine Integrin-Bindung an Kollagen die Expression von MMP-1 induziert.

2 „Tissue Engineering“ von Sehnen- und Bandgewebe

Während Rupturen von Sehnen und Bändern des Sprunggelenks meist nicht operativ behandelt werden, ist bei Rupturen des Kreuzbandes ein operativer Eingriff in der Regel indiziert, da dort keine Spontanheilung auftritt (Frank et al. 1999).
Derzeit verwendet man zur Rekonstruktion des Kreuzbandes autologe Transplantate. Dabei kommen hauptsächlich die Patellar- sowie die kombinierte Semitendinosus- und Gracilissehne zum Einsatz (Herrington et al. 2005). Das Ergebnis einer solchen Behandlung variiert jedoch stark (Woo et al. 2006). Nachteile ergeben sich außerdem hauptsächlich durch Gewebenekrosen am Entnahmeort („donor site morbidity“) und die dort auftretende Muskelschwächung. Des Weiteren wird durch das autologe Gewebe zwar eine Abstoßungsreaktion des Gewebes verhindert, das entnommene Transplantat entspricht aber in seiner Mikrostruktur auch nicht dem geschädigten Band. Eine Alternative wären frische oder kryokonservierte Allografte. Jedoch ergeben sich dabei andere Probleme, wie die Transmission von Krankheitserregern, Abstoßungsreaktionen, Größenunterschiede von Spender und Patient sowie die mangelnde Blutversorgung. In den Achtziger Jahren wurde lange Zeit eine azelluläre, synthetische Prothese als Kreuzbandersatz favorisiert („Leeds-Keio-Ligament“, „Kennedy ligament Augmentation Device“, „GoreTex“). Dieses synthetische Material muss dafür jedoch mechanisch stabil, biokompatibel und in geeigneter Kinetik degradierbar sein. Die Degradationsprodukte dürfen weder toxisch noch inflammatorisch wirksam sein. Auch wenn diese Materialien zunächst gute Bewertungen erzielten, konnten

sie über einen längeren Zeitraum hinweg doch nicht den natürlichen mechanischen Anforderungen an ein Band in ausreichendem Ausmaß genügen (Laurencin u. Freeman 2005). Auch die Stabilisierung eines genähten Kreuzbandes mit einem synthetischen Material konnte im Schafmodell keine erhöhte Heilung zeigen (Dürselen et al. 2006).

Daher ist es notwendig, eine Alternative Therapie bei solchen Verletzungen zu finden. Das „Tissue Engineering" könnte hier eine viel versprechende Methode werden. „Tissue Engineering" beschreibt eine Forschungsrichtung, deren Ziel es ist, mit Hilfe biowissenschaftlicher Technik Organfunktionen wiederherzustellen, zu ersetzen oder zu verbessern (Langer 2000), da die Transplantation allogenen oder xenogenen Materials aus den oben genannten Gründen nicht die optimale Lösung für den Gewebeersatz darstellt.

In der vorliegenden Arbeit liegt der Fokus auf dem „Tissue Engineering" von Sehnen und Bändern. Neben der Auswahl eines geeigneten Biomaterials, spielen die zur Besiedlung verwendeten Zellen eine besondere Rolle. Ihre Aufgabe ist es nicht nur, extrazelluläre Matrix zu synthetisieren und umzubauen, es sollten daneben auch geeignete Zellen aus dem umliegenden Gewebe angelockt und eine geeignete Immunreaktion für reparative Vorgänge evoziert werden. Der Erfolg eines Konstruktes hängt jedoch von einem grundlegenden Verständnis der biologischen Vorgänge innerhalb des Konstruktes und der Wechselwirkung mit dem umgebenden Gewebe ab (Tuan et al. 2003).

2.1 Biomaterialien

In einem synthetischen Konstrukt muss die Rolle der extrazellulären Matrix so lange von einem oder mehreren Biomaterialien eingenommen werden, bis die darauf angesiedelten sowie die rekrutierten Zellen eine native Matrix gebildet haben. Das bedeutet, dass ein solches Biomaterial gewissen Minimalanforderungen gerecht werden muss: Es muss zunächst in geeigneter dreidimensionaler Form herstellbar sein, wobei Form und mechanische Eigenschaften denen des nativen Gewebes im optimalen Fall gleichen. Weitere wichtige Punkte sind die Sterilisierbarkeit und die Besiedelbarkeit des Materials, die für die Herstellung des fertigen Konstruktes *in vitro* entscheidend sind. Daneben muss es biokompatibel sein und darf bei der Transplantation keine oder nur milde inflammatorische Reaktionen hervorrufen. Weiterhin muss es biodegradierbar sein, also mit einer geeigneten Abbaurate im Körper abgebaut werden. Dabei ist es wichtig, dass die Degradationsprodukte keine toxischen Eigenschaften aufweisen und nicht akkumulieren (Kuo u. Tuan 2003, Laurencin u. Freeman 2005). Nicht wichtig ist hingegen, ob es sich bei dem verwendeten Material um tatsächliches biologisches Material handelt oder ob ein synthetisches Material

verwendet wird, wenn es die oben genannten Eigenschaften aufweist. Natürliche Materialien weisen den Vorteil einer natürlichen physiologischen Aktivität auf. Mechanische Belastbarkeit und Degradationsverhalten ähnelt den *in vivo*-Gegebenheiten. Dagegen können synthetische Materialien reproduzierbar und in großem Maßstab hergestellt werden und bergen nicht das Risiko einer viralen oder bakteriellen Kontamination (Rosso et al. 2005).
In der Vergangenheit wurde eine Vielzahl verschiedener natürlicher und synthetischer Materialien für das Tissue Engineering von Sehnen und Bändern untersucht. Unter ihnen befinden sich Kollagen Typ I (Nöth et al. 2005), Hyaluronsäure (Cristino et al. 2005), Seide (Altmann et al. 2002, Chen et al. 2003) und resorbierbare Polymere wie Polylactid oder Polyglycolid (Hasegawa et al. 1999, Lu et al. 2005, Ouyang et al. 2005). Kollagen und Hyaluronan sind natürliche Polymere, die im Falle des Kollagens der tatsächlichen Matrix im Band sehr nahe kommen. Jedoch weisen sie ungenügende mechanische Stabilität auf und degradieren, in den Körper eingebracht, sehr schnell. Seide und Polylactid degradieren langsamer, haben dafür bessere mechanische Eigenschaften. In bisherigen Studien erwiesen sie sich als gute Ausgangsmaterialien, jedoch hatten alle Konstrukte eine sehr dichte Struktur, was die Besiedelbarkeit beeinträchtigte.
Die bereits beschriebenen Integrine kristallisieren sich immer mehr als wichtige Regulatoren der Zell-Biomaterial-Interaktionen heraus (Garcia 2005). Insbesondere bei MSZ sind als vorrangige Gruppe für die Adhäsion an die Extrazelluläre Matrix und damit auch an Biomaterialien, die β_1-Integrine zu nennen. Da bis jetzt die genaue Regulation und die weiteren Signalwege noch nicht vollständig geklärt sind, muss der Einfluss der Integrine auf die Zellfunktionen analysiert werden, um eine gezielte Steuerung vornehmen zu können.

2.2 Multipotente Mesenchymale Stromazellen

Die Regeneration und der Erhalt von Geweben werden von den gewebeständigen Vorläuferzellen, die es ursprünglich gebildet haben, bis zum erwachsenen Alter gewährleistet. Die Entdeckung dieses Zelltyps ermöglicht ein autologes, zellbasiertes „Tissue Engineering“. Adulte Vorläuferzellen haben, im Gegensatz zu ausdifferenzierten Zellen und auch zu embryonalen Stammzellen, mehrere Vorteile: Adulte multipotente Vorläuferzellen, können meist leicht isoliert, *in vitro* proliferiert und gewebeübergreifend differenziert werden. Je nach Entnahmeort verursacht die Isolation keine sekundäre Schädigung beim Patienten und birgt im Gegensatz zu embryonalen Stammzellen weder ethische Bedenken noch das Risiko einer Tumorgenese in sich. Weiterhin sind adulte Vorläuferzellen stets verfügbar, da sie dem Patienten direkt entnommen werden können (Tuan 2003).

Aus dem Knochenmark isolierte multipotente mesenchymale Stromazellen bieten sich als geeignete Vorläufer-Zellquelle für ein autologes „Tissue-Engineering“ an. Bei diesem Zelltyp handelt es sich um adulte Zellen mit Vorläufercharakter. Zum ersten Mal wurde dieser Zelltyp in den 70er Jahren von Friedenstein (Friedenstein et al. 1974, Friedenstein et al. 1976) beschrieben, der sie als klonale, Plastik-adhärente Zelle aus dem Knochenmark mit der Fähigkeit in Osteoblasten, Adipozyten und Chondrozyten zu differenzieren, beschrieb. Das heute weit akzeptierte Standard-Protokoll zur Isolation dieser mesenchymalen Vorläuferzellen selektioniert sie aus dem Knochenmark über Dichtegradienten-Zentrifugation und Plastikadhärenz (Pittenger et al. 1999, Pittenger et al. 2002, Gregory et al. 2005). Diese Zellpopulation wird heute von zahlreichen Gruppen verwendet. Jedoch verwenden die verschiedenen Gruppen teils unterschiedliche Bezeichnungen für diesen einen Zelltyp. Unter anderem sind sie als „Mesenchymale Stammzellen“, „Mesenchymale Vorläuferzellen“ oder „Knochenmark-Stromazellen“ bekannt. Da der Stammzellcharakter, vor allem die asymmetrische Teilung, nicht eindeutig nachgewiesen werden kann und es sich außerdem um eine heterogene Population aus mindestens drei Untergruppen handelt (Sekiya et al. 2002, Javazon et al. 2004), schlägt die „International Society for Cellular Therapy“ die Bezeichnung „Multipotente Mesenchymale Stromazelle“ (MSZ) vor (Horwitz et al. 2005). Die so gewonnene Zellfraktion besteht aus langen, spindelförmigen Zellen, aus breiten und flachen, sowie kleinen, schnell proliferierenden Zellen (Colter et al. 2001), die mit zunehmender Kultivierungsdauer immer mehr in den breiten Phänotyp übergehen (Sekiya et al. 2002).

Einige Gruppen konnten diesen Zelltyp auch aus anderen Geweben wie Synovium (Fickert et al. 2003, Sakaguchi et al. 2005), Knorpel (Fickert et al. 2004), Fett (Zuk et al. 2002, Dicker et al. 2005) und Periost (De Bari et al. 2006) isolieren. Dieser Zelltyp wird zunehmend auch für den Einsatz im „Tissue Engineering“ im Sehnen-/ und Bandersatz favorisiert. Beispielsweise verglichen Ge et al. (Ge et al. 2005) verschiedene Eigenschaften von MSZ wie Kollagenproduktion und Proliferation mit denen adulter Tenozyten. Sie konnten nachweisen, das MSZ eine deutlich erhöhte Kollagensynthese und eine stärkere Proliferationsrate aufwiesen als adulte, ausdifferenzierte Tenozyten. Sie eignen sich daher gut für den Einsatz im Tissue Engineering, wo die Bildung eines Ersatz-Gewebes nötig ist. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass mit MSZ besiedelte Konstrukte im Kaninchenmodell mindestens sechs Wochen im Kniegelenk funktionsfähig sind. Jedoch kann es dabei auch zu ektopischer Knochenbildung kommen (Awad et al. 2003). Deshalb weisen Harris et al. (Harris et al. 2004) darauf hin, dass der Wahl der *in vitro* Bedingungen eine wichtige

Rolle zukommt. Um eine Differenzierung von MSZ *in vitro* zu erlangen, ist es in der Regel notwendig, den *in vivo*-Bedingungen so nahe als möglich zu kommen.

2.3 Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktoren sind Proteine, die von Zellen sezerniert werden und dienen autokrin oder parakrin als Signale in der Entwicklung, der Differenzierung und der Homöostase. Wachstumsfaktoren können in der extrazellulären Matrix gespeichert werden, so dass eine Freisetzung oft erst mit zeitlichem Abstand zur Sekretion durch Matrixumbau stattfindet. Ihre Bedeutung in der Entwicklung wurde bereits sehr früh erkannt. Schon 1965 wurden beispielsweise erstmals die BMPs – von „Bone Morphogenic Proteins“ – in der ektopischen Knochenbildung beschrieben (Urist 1965). Bei dieser großen Gruppe von Wachstumsfaktoren handelt es sich um Mitglieder der TGFβ-Superfamilie, die in vielen Bereichen der muskuloskelettalen Entwicklung eine Rolle spielen. Sie wirken dabei häufig über Konzentrationsgradienten (Granjeiro et al. 2005).

Wachstumsfaktoren können gezielte biologische Antworten in Zellen hervorrufen, indem sie an ihre jeweils spezifischen Rezeptoren binden (Woo et al. 2006). Dabei sind bereits mehrere Wachstumsfaktoren beschrieben, die in der nativen Sehne vorkommen oder einen positiven Effekt auf deren Heilung haben und die damit auch für das Tissue Engineering von Bedeutung sein könnten.

Chuen et al. (Chuen et al. 2004) konnten verschiedene Wachstumsfaktoren in der Sehne nachweisen und einer biologischen Rolle zuordnen. Sie entdeckten unter anderem die Expression von BMP13, welches auch als GDF-5 oder CDMP-2 bekannt ist, und TGF-β1 (Nochi et al. 2004).

TGF-β1 spielt in Sehnen und Bändern eine Rolle bei der Matrixproduktion. Eine adäquate Expression dieses Wachstumsfaktors ist für die Aufrechterhaltung des Kollagen- zu Proteoglykanverhältnisses wichtig. Eine solche Regulation ist von entscheidender Bedeutung in pathologischen Prozessen wie einer Tendinosis, wo eine gezielte Steuerung von TGF-β1 versucht wurde um einen Heilungsprozess zu erwirken (Rolf et al. 2001, Fu et al. 2002, Fu et al. 2005).

Auch BMP13 kommt in nativen humanen Sehnen vor. Es konnte gezeigt werden, dass es sich vor allem in und um aktive Tenoblasten und perivaskuläre mesenchymale Zellen findet, wohingegen es in der Nähe von Tenozyten nicht lokalisiert werden konnte (Wong et al. 2005). Darüber hinaus wurde in der gleichen Studie *in vitro* ein positiver Effekt in Bezug auf Proliferation und Kollagen Typ I-Produktion in Sehnenfibroblasten nachgewiesen.

In Rind-Bandfibroblasten wurde *in vitro* darüber hinaus eine Stimulation der Proteoglycansynthese gezeigt (Bobacz et al. 2006). Wolfman et al. (Wolfman et al. 1997) berichten sogar von einer ektopischen Sehnen-/Bandentwicklung im Rattenmodell, als sie BMP13 subkutan und intramuskulär an eine Matrix koordiniert implantierten. Sowohl in der Ratte als auch im Kaninchen ist eine verbesserte Heilung einer gerissenen Achillessehne nach Injektion von BMP13 beschrieben (Forslund und Aspenberg 2001, Forslund et al. 2003, Forslund und Aspenberg 2003).

Aus dem Kaninchen- und auch dem Pferdemodell ist bekannt, dass bei der Bandheilung ebenfalls TGF-β1 und daneben auch PDGF eine Rolle spielt. Diese Wachstumsfaktoren konnten sieben Tage nach einer experimentellen Ruptur in unterschiedlichem Grade sowohl im Medialen Außenband, als auch im Anterioren Kreuzband des Kaninchens und in der Sehne des oberflächlichen Musculus flexor digitorium superficialis des Pferdes nachgewiesen werden (Lee et al. 1998, Tsubone et al. 2004, Dahlgren et al. 2005). Immunhistochemische Untersuchungen konnten sogar über die räumliche Verteilung in einem Sehnenheilungsmodell beim Kaninchen Aufschluss geben. Dabei konnte TGF-β1 vor allem innerhalb und nahe der Ruptur gefunden werden, wohingegen PDGFbb über die ganze Sehne verteilt vorlag (Tsubone et al. 2004). Die Funktion von PDGF (PDGFaa+PDGFbb) könnte es sein, Zellen für die Heilung zu rekrutieren, da bereits bekannt ist, dass vor allem die Isoform PDGFbb für MSZ sehr stark chemotaktisch wirkt (Fiedler et al. 2004). Im Schafmodell konnte die zusätzliche Gabe von PDGFbb auf eine chirurgische Naht des Anterioren Kreuzbandes die mechanischen Eigenschaften nach drei bis zwölf Wochen im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne PDGFbb deutlich verbessern (Weiler et al. 2004). Jedoch kommt es in allen Fällen nicht zu einer nativen Sehnenstruktur, sondern zur Bildung einer fibrösen Narbe (Dahlgren et al. 2005).

Bei der Erforschung der Wirkung von Wachstumsfaktoren ist es jedoch wichtig, kritisch im Umgang mit Tiermodellen zu sein. Nicht immer zeigen unterschiedliche Spezies die gleiche Reaktion auf einen Wachstumsfaktor (Gregory et al. 2005).

3 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, innerhalb des „Kompetenznetzes Biomaterialien Baden-Württemberg“ den Einsatz von humanen multipotenten mesenchymalen Stromazellen im Kontakt mit Biomaterialien beim Tissue Engineering von Sehnen- oder

Bandgewebe zu evaluieren und eine gezielte Steuerung zum Phänotyp des Sehne-/ Bandfibroblasten zu erreichen.

Es sollten verschiedene Biomaterialien auf ihre Eignung als Zellträger für einen Sehnen- oder Bandersatz getestet und verglichen werden. Zunächst sollten mit Hilfe eines Typ I-Kollagens die *in vitro*-Bedingungen für eine dreidimensionale Kultur mit MSZ etabliert werden, um dem natürlichen Zustand in einer Sehne / einem Band möglichst nahe zu kommen. Anschließend sollten die Ergebnisse auf ein optimiertes Poly-L-Lactid-Konstrukt übertragen werden, welches von Projektpartnern des Kompetenznetzes zur Verfügung gestellt wurde.

Es sollte die Besiedelung beider Materialien mit humanen MSZ etabliert und die Wechselwirkung der Zellen mit den Biomaterialien charakterisiert werden. In Bezug auf die Zelladhäsion sollte besonders auf die Integrinregulation eingegangen werden. Neben der Wechselwirkung der Zellen mit den Biomaterialien sollte auch der Anabolismus verschiedener, in Sehnen vorkommender, kollagener und nicht-kollagener Matrixmoleküle und deren Metabolismus durch Matrixmetallopeptidasen untersucht werden.

Die Untersuchung einer eventuellen Differenzierung der MSZ durch die Kultivierungsbedingungen stellte ein weiteres Ziel dieser Arbeit dar. Dabei sollte auch die Wirkung verschiedener Wachstumsfaktoren sowohl auf den Differenzierungsprozess, als auch auf Adhäsion und Matrix-Turnover eingegangen werden. Die Analyse der Vorgänge sollte sowohl auf Gen- als auch auf Proteinexpressionsebene durchgeführt werden.

B Material und Methoden

1 Material

1.1 Patienten

Humane multipotente mesenchymale Stromazellen (MSZ) wurden aus Knochenmark-Aspiraten isoliert, die im Rahmen von Routine-Operationen, gewonnen wurden. Humane primäre Tenozyten (TZ) wurden aus Kreuzbandresektaten isoliert, das bei Ersatzplastiken nach Kreuzbandruptur anfiel. Die Gewinnung aller Zellen erfolgte nach Aufklärung durch den behandelnden Stationsarzt und nach Zustimmung der Patienten gemäß den Richtlinien der Ethik-Kommission der Universität Ulm. Eine Spenderübersicht findet sich in Tab. 1.

Tabelle 1: Patientenkollektiv

Patien-ten-Nr.	**Alter** (Jahre)	**Ge-schlecht**	**Diagnose**	**Operation**	**Zell-typ**
1	23	männlich	Ruptur vorderes Kreuzband (VKB)	Ersatzplastik VKB	TZ
2	25	männlich	Ruptur VKB	Ersatzplastik VKB	TZ
3	22	männlich	Ruptur VKB	Ersatzplastik VKB	TZ
4	20	männlich	Ruptur VKB	Ersatzplastik VKB	TZ
5	21	männlich	Ruptur VKB	Ersatzplastik VKB	TZ
6	22	männlich	Ruptur VKB	Ersatzplastik VKB	TZ
7	22	männlich	Ruptur VKB	Ersatzplastik VKB	TZ
8	15	weiblich	Hüftdysplasie	Triple-Osteotomie	MSZ
9	4	männlich	M. Perthes	Triple-Osteotomie	MSZ
10	33	weiblich	Hüftdysplasie	Triple-Osteotomie	MSZ
11	58	männlich	Spondylolisthese L5S1	Spondylodese unter Verwendung eines trikortikalen Beckenkammspans li.	MSZ

12	4	männlich	Hüftdysplasie	Triple-Osteotomie	MSZ
13	16	weiblich	Hüftdysplasie	Triple-Osteotomie	MSZ
14	35	weiblich	Hüftdysplasie	Triple-Osteotomie	MSZ
15	21	weiblich	Hüftdysplasie	Triple-Osteotomie	MSZ
16	37	weiblich	Hüftdysplasie	Triple-Osteotomie	MSZ
17	25	weiblich	Hüftdysplasie	Triple-Osteotomie	MSZ
18	38	weiblich	Hüftdysplasie	Triple-Osteotomie	MSZ
19	22	weiblich	Hüftdysplasie	Triple-Osteotomie	MSZ
20	30	weiblich	Hüftdysplasie	Triple-Osteotomie	MSZ
21	43	weiblich	Hüftdysplasie	Triple-Osteotomie	MSZ
22	27	weiblich	Hüftdysplasie	Triple-Osteotomie	MSZ
23	17	weiblich	Hüftdysplasie	Triple-Osteotomie	MSZ
24	19	weiblich	Hüftdysplasie	Triple-Osteotomie	MSZ
25	12	weiblich	Hüftdysplasie	Triple-Osteotomie	MSZ
26	44	weiblich	Hüftdysplasie	Triple-Osteotomie	MSZ
27	40	weiblich	Hüftdysplasie	Triple-Osteotomie	MSZ
28	30	weiblich	Hüftdysplasie	Triple-Osteotomie	MSZ
29	37	weiblich	Hüftdysplasie	Triple-Osteotomie	MSZ
30	32	männlich	Hüftdysplasie	Triple-Osteotomie	MSZ
31	34	weiblich	Hüftdysplasie	Triple-Osteotomie	MSZ
32	35	weiblich	Hüftdysplasie	Triple-Osteotomie	MSZ
33	47	weiblich	Hüftdysplasie	Triple-Osteotomie	MSZ
34	45	männlich	Hüftdysplasie	Triple-Osteotomie	MSZ
35	24	weiblich	Hüftdysplasie	Triple-Osteotomie	MSZ

1.2 Chemikalien und Kits

• dTTP, dATP, dCTP, dGTP, 100 mM solutions each	Amersham Biosciences, Little Calfont Buckinghamshire, England
• Neutralisationslösung für Rattenschwanzkollagen	
• Rattenschwanzkollagen	ArsArthro AG, Esslingen, Deutschland
• EDTA	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
• Biocoll separation solution 1,077 • Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) • fötales Kälberserum (FKS, Cat. No. S0115, Lot. No. 627EE • L-Glutamin • Nicht-essentielle Aminosäuren • Penicillin/ Streptomycin • Trypsin/EDTA	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
• Development Buffer, 10fach • Renaturation Buffer, 10fach • Zymography Sample Buffer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
• SeaKem LE Agarose	Cambrex Bio Science German Office, Apen, Deutschland
• APS (Ammoniumperoxidsulfat) • Rotiphorese Gel A • Rotiphorese Gel B • TEMED (Tetramethylethylenediamin)	Carl Roth GmbH +Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
• Alzianblau 8GS • Eosin AG extra	Chroma-Gesellschaft Schmid GmbH+Co. Köngen/N, Deutschland

• Antibody Diluent with Background Reducing Components	
• AEC+High Sensitivity Substrat Chromogen	
• Blocking Buffer • LSAB™2 HRP-Kit	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
• Aqua Spüllösung	DeltaSelect GmbH, Dreieich, Deutschland
• Brij35	
• Bromphenolblau-Di-Natriumsalz	
• Coomassie Brillantblau	
• D+-Saccharose	
• Kernechtrot	
• Paraformaldehyd 37%	
• Propidiumiodid	Fluka Biochemika, Buchs, Deutschland
• SDS (Natrium Dodecylsulfat)	ICN Biomedicals GmbH, Eschwege, Deutschland
• Platinum® SYBR® qPCR SuperMix UDG	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
• PLLA-Biomaterialien	ITV, Denkendorf, Deutschland
• Borsäure	
• NaCl	
• Wasserstoffperoxid 30%	J.T.Baker, Deventer, Holland
• Aluminiumsulfat	
• Dinatriumhydrogenphosphat	
• Essigsäure 100% (Eisessig)	
• Extran MA 02 neutral	
• Kaiser`s Glyceringelatine	
• KCl	
• Mercaptoethanol	
• Natriumdihydrogenphosphat	
• Triton-X 100	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland

• Oligo $(dT)_{15}$	MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland
• Eukitt	O. Kindler GmbH+Co. Freiburg, Deutschland
• Aceton, techn. • Isopropanol 99 % • Methanol, Fassware	Ölfabrik Schmidt, Ulm, Deutschland
• Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	PAA, Cölbe, Deutschland
• 100bp-Basenpaarleiter	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
• HotStarTaq®*Plus* Buffer Set • DNase I • HotStarTaq® Master Mix Kit • HotStarTaq® *Plus* DNA Polymerase Set • Omniscript RT Kit • QiaShredder-Säulen • RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
• Random Primer • RNAse-Inhibitor • TUNEL Enzyme • TUNEL Label	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
• Casyclean • Casyton	Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland
• 3-Aminopropyl-Triethoxysilan • Ascorbinsäure-Phosphat • β-Glycerophosphat • Dexamethason • DEPC (Diethyl Pyrocarbonat) • Ethanol (96%) absolut für Analyse	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Taufkirchen, Deutschland

• Ethidiumbromid, 10 mg/mL, wässrige Lösung	
• Hyaluronidase	
• Hydrocortison	
• Indomethacin	
• Mayer`s Hämatoxylin	
• Na_2 EDTA	
• Pepsin	
• Phosphate buffered Saline, pH 7,4, Pulver	
• Pronase	
• Proteinase K	
• Proteinstandard 50-200 kDA	
• Tris buffered saline 10x concentrate	
• Xanthin • Xylol, Isomerengemisch	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Taufkirchen, Deutschland
• StrataScript®, Reverse Transkriptase	
• 10xStrataScript® RT Buffer	
• Absolutely RNA® Miniprep Kit 50 preps	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
• Paraplast Plus	Tyco Healthcare Deutschland GmbH, Neustadt/Donau, Deutschland
• Tris base	USB Corporation, Cleveland, USA

1.3 Geräte und Verbrauchsmaterialien

• Waage Precisa 400M	Altenrath GmbH, Wuppertal, Deutschland
• Spectrophotometer Ultrospec 3000 • UV-Lampe	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland

• AbiPrism7000 • MicroAmp Optical 96-Well Reaktionsplatten • Optical adhesive cover	Applera Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland
• Falcon Petrischalen • 15 mL Falcon-Zentrifugenröhrchen • 50 mL Falcon-Zentrifugenröhrchen • Falcon T75 Zellkulturflasche • Falcon T175 Zellkulturflasche • „6 well“-Zellkulturplatten • „24 well“-Zellkulturplatten • „96 well“-Zellkulturplatten	BD GmbH, Heidelberg, Deutschland
• Allegra 64R Zentrifuge	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
• Elektrophoresekammer AGAgel Standard ohne Kühlung • Elektrophoresekammer 10cm • Stromgenerator	Biometra GmbH i. L., Göttingen, Deutschland
• Geldoc XR, PC-Version 170	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
• Filtertips • Reaktionsgefäße	Brand GmbH + Co., Wertheim, Deutschland
• Digitalkamera EOS300D • Digitalkamera G5	Canon Deutschland GmbH, Fichtenhain, Deutschland
• Stripetten	Costar Corning B.V., NE Schiphol-Rijk, Holland
• Wasserbad Laktotherm1, Modell LTH 232312	Dinkelberg-Labortechnik, Neu-Ulm, Deutschland
• Wasserbad	GFL - Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland

• Pipette Pipetman 0,5-10 µL • Pipette Pipetman 2-20 µL • Pipette Pipetman 20-200 µL • Pipette Pipetman 100-1000 µL	Gilson International B.V., Bad Camberg, Deutschland
• Kryoröhrchen Cellstar	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
• Küvette Suprasil Quarzglas, 10mm	Hellma GmbH & Co KG, Müllheim, Deutschland
• Inkubator HeraCell240 • Megafuge 1.0 • Sterilbank Laminair	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
• Pipettierhilfe „Pipetus”	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
• Magnetrührer IKA MAG	IKA, Staufen, Deutschland
• Mikroprozessor-pH-Meter	KNICK elektr. Meßgeräte GmbH & Co, Berlin, Deutschland
• Gefrierschrank -80°C, Modell U85-360	Labotect, Güttingen, Deutschland
• Ausgießstation EG 1140H • Histokinette Reichert-Jung 2050 • Kaltlichleuchte KL1500 electronic • Kühlplatte EG 1140C • Mikrotom Reichert-Jung Supercut 2050	Leica Microsystems, Bensheim, Deutschland
• Kühl-Gefrier-Kombination premium no-frost	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
• Streckbad • Wärmeplatte Typ 13800	Medax Nagel GmbH, Kiel, Deutschland
• Desinfector Automatic G7735 • Aqua Purificator G7749	Miele, Gütersloh, Deutschland

• Deckgläser • Objektträger	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
• Feinwaage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
• Zellzählgerät Casy TT	Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland
• Robocycler Gradient 96	Stratagene Europe, Amsterdam, Holland
• Mikrotomklingen S35	Seidel Medipool, Gauting-Buchendorf, Deutschland (Feather)
• Autoklav	Tuttnauer Europe b.v., GD Breda, Holland
• Gußform für Kollgengele	Werkstatt der Universität Ulm, Deutschland
• Mikroskop Axioskop 2 mot plus • Mikroskop Axiovert 35 • Rasterelektronenmikroskop DSM 962 • STEMI SV8	Zeiss, Oberkochen, Deutschland

1.4 Wachstumsfaktoren

- rhTGF-β1, ReproTech, Rocky Hill, USA, Lot: 100-21R
- rhPDGFbb, ReproTech, Rocky Hill, USA, Lot: 100-21R
- rhBMP13, Acris, Hiddenhausen, Deutschland, Lot: R1039.

1.5 Antikörper

Der monoklonale Maus-Antikörper gegen die β_1-Integrin-Untereinheit wurde von Beckmann-Coulter, Krefeld, Germany (Klon 4B4LDC9LDH8) bezogen. Alle Antikörper für die Immunhistologie finden sich in Tab. 5, S. 41.

1.6 Primer

Primer für RT-PCR wurden mit dem Programm Primer3 (Steve Rozen, Helen J. Skaletsky, 1998; aufrufbar unter: http://fokker.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) erstellt. Hierzu wurden publizierte DNA-Sequenzen aus GenBank (NCBI) verwendet. Sie wurden von der Firma MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland oder der Firma Biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland synthetisiert. Primer-Sequenzen können Tab. 2 entnommen werden.

Für die „real time-PCR“ wurden ebenfalls teils selbst erstellte, teils kommerziell erhältliche Primer verwendet (Tabe. 3 und 4). Schmelzkurven wurden durch Dissoziation bei 60 bis 95°C erstellt.

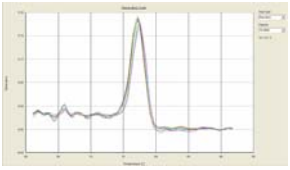
Tab. 2: Für RT-PCR verwendete Primer.

Gen	Primer-Sequenz 5’ 3’	Länge des Amplifikats
Alkalische Phosphatase Accession No. NM_000478	forward: ACCTCGTTGACACCTGGAAG reverse: CCACCATCTCGGAGAGTGAC	189bp
Biglykan Accession No. NM_001711	forward: GAGAGGCTTCTGGGACTTCA reverse: AGGTGGGTGTGACAGAGTCC	113bp
Cartilage paired-class Homeoprotein 1 Accession No. NM_006982	forward: TCATGGGCCATGTAACATAC reverse: AAACAGGGTTTGTGGAGACT	240bp
CD 29 (Integrin β_1) Accession No. NM_002211	forward: CCCTTGCACAAGTGAACAGA reverse: ATTCCTCCAGCCAATCAGTG	193bp
CD 49a (Integrin α_1) Accession No. NM_181501	forward: GGATCTTTTCCAATGCCAGA reverse: CAGAATTGTGCCTCGTTTGA	204bp
CD 49b (Integrin α_2) Accession No. NM_002203	forward: CCTGCTGGTTGAAAGACGTT reverse: CGGCTTTCTCATCAGGTTTC	210bp
CD 49c (Integrin α_3) Accession No. NM_002204	forward: GCCTGCCAAGCTAATGAGAC reverse: TGCTAAGCGAGGTCTGGAGT	220bp
Decorin Accession No. NM_001920	forward: TGCTGTTGACAATGGCTCTC reverse: GCCTTTTTGGTGTTGTGTCC	192bp
Elastin Accession No. NM_000501	forward: GCAGTGCCTGGGGTCCTTGGAG reverse: GCTGCTTTAGCGGCTGCAGCTGG	233bp
Fibromodulin Accession No. NM_002023	forward: CCTCCAAGGCAATAGGATCA reverse: AGCCAAACCAAACCATCAAG	242bp

Fibronektin 1, Transkriptvariante 2 Accession No. NM_212475	forward: ATGATGAGGTGCACGTGTGT reverse: CTCTTCATGACGCTTGTGGA	135bp
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase Accession No. NM_002046	forward: GAGTCCACTGGCGTCTTCAC reverse: GGTGCTAAGCAGTTGGTGGT	188bp
Kollagen Typ I, alpha 1 Accession No. NM_000088	forward: GGCCCAGAAGAACTGGTACA reverse: CGCTGTTCTTGCAGTGGTAG	200bp
Kollagen Typ II, alpha 1 Accession No. NM_033150	forward: CAGGGGTGAACGAGGTTTC reverse: CACGAGCACCAGCACTTCC	365bp
Kollagen Typ III, alpha 1 Accession No. NM_000090	forward: CCAGGAGCTAACGGTCTCAG reverse: CAGGGTTTCCATCTCTTCCA	103bp
Kollagen Typ V, alpha 1 Accession No. NM_000093	forward: AGGAATGCCTGGACAAACTG reverse: ACCCCTTTCTCCATCGTCTC	139bp
Kollagen Typ VI, alpha 1 Accession No. NM_001848	forward: CAAGAGGAGACCCTGGTGAA reverse: GCCTCGGTAGCCTTTAGGTC	116bp
Kollagen Typ X, alpha 1 Accession No. NM_000493	forward: GCCCAAGAGGTGCCCCTGGAATAC reverse: CCTGAGAAAGAGGAGTGGACATAC	703bp
Leptin Accession-No. NM_000230	forward: TGTCCAAGCTGTGCCCATCC reverse: CCTTCAAGGCCTCAGCACCC	462bp
Lipoprotein Lipase Accession No. NM_000237	forward: GATCCAGCTGGACCTAACTT reverse: AAAGGCCTGATTGGTATGGG	540bp
Lumikan Accession No. NM_002345	forward: TTTATGGGCAATCATCACCA reverse: GCACTTGGGTAGCTTTCAGG	64bp
Matrixmetallopeptidase-1 NM_002421	forward: TTCGGGGAGAAGTGATGTTC reverse: ATCTCTGTCGGCAAATTCGT	146bp
Matrixmetallopeptidase -2 Accession No. NM_004530	forward: GGCCCTGTCACTCCTGAGAT reverse: GGCATCCAGGTTATCGGGGA	474bp

Matrixmetallopeptidase -9 Accession No. NM_004994	forward: CAACATCACCTATTGGATCC reverse: CGGGTGTAGAGTCTCTCGCT	480bp
Matrixmetallopeptidase -13 Accession No. NM_002427	forward: TGGTCCAGGAGATGAAGACC reverse: TCCTCGGAGACTGGTAATGG	97bp
Osteocalcin Accession No. NM_199173	forward: GGCAGCGAGGTAGTGAAGA reverse: AGCAGAGCGACACCCTAGA	194bp
Scleraxis Accession No. XM_926116	forward: CTGGCCTCCAGCTACATCTC reverse: CGGTCCTTGCTCAACTTTCT	224bp
Tissue inhibitor of Matrix-metallopeptidase-1 Accession No. NM_003254	forward: AATTCCGACCTCGTCATCAG reverse: TGCAGTTTTCCAGCAATGAG	782bp
Tissue inhibitor of Matrix-metallopeptidase-2 Accession No. NM_003255	forward: GGCGTTTTGCAATGCAGATGTAG reverse: CACAGGAGCCGTCACTTCTCTTG	470bp
Tenascin-C Accession No. NM_002160	forward: TCAAGGCTGCTACGCCTTAT reverse: GTTCTGGGCTGCCTCTACTG	230bp
Tenomodulin Accession No. NM_022144	forward: CCATGCTGGATGAGAGAGGT reverse: CTCGTCCTCCTTGGTAGCAG	123bp
Versikan Accession No. NM_004385	forward: AAGATGGGAAAGGCAGGAGT reverse: TGGAACACATCACCATCCAG	101bp

Tab. 3: Für relative Quantifizierung mit SYBR-Green verwendete Primer.

Gen	**Primer-Sequenz 5' 3'**	**Länge des Amplifikats**	**Schmelzkurve**
18s rRNA Accession No. X03205	forward: CGCAGCTAGGAATAA TGGAATAGG reverse: CATGGCCTCAGTTCCGAAA	65bp	

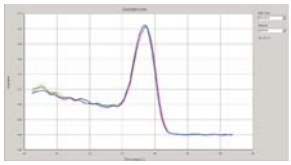
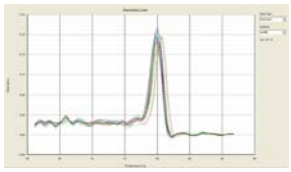
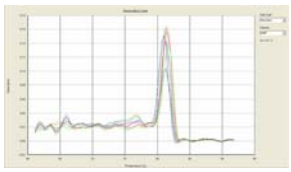
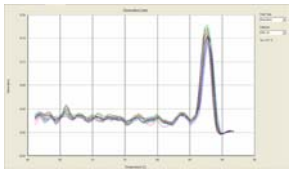
Glyceraldehyde -3-phosphate dehydrogenase Accession No. NM_002046	forward: TGGTATCGTGGAAGGACTCATG reverse: TCTTCTGGGTGGCAGTGATG	56bp	
CD 49b (Integrin α_2) Accession No. NM_002203	forward: CCTGCTGGTTGAAAGACGTT reverse: CGGCTTTCTCATCAGGTTTC	247bp	
Matrixmetallo-proteinase1 Accession No. NM_002421	forward: TTCGGGGGAAGT-GATGTTC reverse: ATCTCTGTCGGCAAATTCGT	146bp	
Kollagen Typ Ia1 Accession No. NM_000088	forward: GGCCCAGAAGAACTGGTAC reverse: CGCTGTTCTTGCAGTGGTAG	200bp	

Tabelle 4: Für relative Quantifizierung mit internen Oligonucleotid-Sonden verwendete Primer.

Primer Mastermixes von Appied Biosytems	Produktnummer	Länge des Amplifikats
18s rRNA; Accession No. U13369.1	Hs 99999901_s1	187bp
CD 29 (Integrin β_1); Accession No. NM_002211	Hs 00236976_m1	102bp
CD 49a (Integrin α_1); Accession No. NM_181501	Hs 00235006_m1	87bp
CD 49c (Integrin α_3); Accession No. NM_002204	Hs 00233707_m1	133bp
Tenascin-C; Accession No. NM_002160	Hs 00233648_m1	64bp

1.7 Zellkulturmedien

Basalmedium:

Dulbeccos modified Eagle Medium low glucose (1g/l) (DMEM)

+ 2mM L-Glutamin

+ 100U/100µg/mL Penicillin/Streptomycin

+ 10% hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (FKS, Cat. No. S0115, Lot. No. 627EE)

Tenozytenmedium

DMEM
+ 2mM L-Glutamin
+ 100U/100µg/mL Penicillin/Streptomycin
+ 10% hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (FKS, Cat. No. S0115, Lot. No. 627EE)
+ nicht-essentielle Aminosäuren (L-Alanin: 89 mg/mL, L-AsparaginxH_2O: 150 mg/mL, L-Asparaginsäure: 133mg/mL, L-Glutaminsäure: 147 mg/mL, Glycin: 75 mg/mL, L-Prolin: 115 mg/mL, L-Serin: 105 mg/mL)
+ 100µM L-Ascorbinsäure-2-phosphat
+ 75mM NaCl
+ 6mM KCl

Osteogenes Differenzierungsmedium

DMEM
+ 2mM L-Glutamin
+ 100U/100µg/mL Penicillin/Streptomycin
+ 10% hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (FKS, Cat. No. S0115, Lot. No. 627EE)
+ 50µg/mL Vitamin C-Phosphat
+ 216µg/mL β-Glycerophosphat
+ 10^{-7} M Dexamethason

Adipogenes Differenzierungsmedium

DMEM
+ 2mM L-Glutamin
+ 100U/100µg/mL Penicillin/Streptomycin
+ 10% hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (FKS, Cat. No. S0115, Lot. No. 627EE)
+ 0,5mM Hydrokortison
+ 0,5mM Isobutylmethylxanthin
+ 6µM Indomethacin

Hitzeinaktivierung des FKS

Gefrorenes FKS wurde über Nacht im Kühlschrank bei 4°C aufgetaut und bei 56°C für 30 min erhitzt. Anschließend wurden Aliquots von 50 mL portioniert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

1.8 Computerprogramme

- AbiPrism SDS 7000 system software, Version 1.2.3, Applera GmbH, Darmstadt, Deutschland
- BLAST (Homepage: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)
- Quantity One 1D Analysis Software, Version 4.6, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
- Primer3 (Homepage: http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)
- Zoom Browser Ex, Version 4.5.1.148, Canon Deutschland GmbH, Fichtenhain, Deutschland
- AxioVision 3.1, Zeiss Oberkochen, Deutschland

2 Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 Isolierung und Kultivierung humaner primärer Tenozyten

Das Kreuzbandresektat wurde mit einem sterilen Skalpell in etwa 1x1 mm kleine Stücke zerkleinert und in „6 well plates“ transferiert und in Tenozytenmedium kultiviert, bis deutlich sichtbar adhärente Tenozyten auswuchsen. Anschließend wurden die Gewebestücke entfernt.

2.1.2 Isolierung und Kultivierung humaner mesenchymaler Vorläuferzellen

Für die Isolation wurde das Knochenmarkaspirat 1:1 mit Basalmedium versetzt und durch mehrfaches Resuspendieren homogenisiert. Jeweils 4 mL Knochenmark-Medium-Mischung wurde auf einen vorbereiteten Biocoll-Dichtegradienten (Dichte 1,077 g/mL) aufgetragen und bei 600g 30 min. in einer Heraeus Megafuge 1.0 aufgetrennt. Der Biocoll-Dichtegrandient wurde durch Zentrifugation von 6 mL Biocoll-Lösung bei 4°C und 13.000g erstellt und bis zur Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt.

Die Bande der kernhaltigen Zellen (Abb. 5) wurde abgenommen und zusammen mit 10 mL Basalmedium einer 75 cm^2-Zellkulturflasche bei 37 °C, 5% CO_2, 95% Luftfeuchte im Brutschrank über Nacht kultiviert. Am darauf folgenden Tag wurden nicht adhärente Zellen abgenommen. Nach mehrmaligem Waschen mit Phosphatpuffer wurde frisches Basalmedium zugegeben und die Zellen expandiert. Die Isolation der MSZ erfolgte somit durch Dichtegradientenzentrifugation und Selektion über Plastikadhärenz. Diese Methode ist spezifisch für MSZ und erhält den Vorläuferphänotyp (Pittenger et al., 1999).

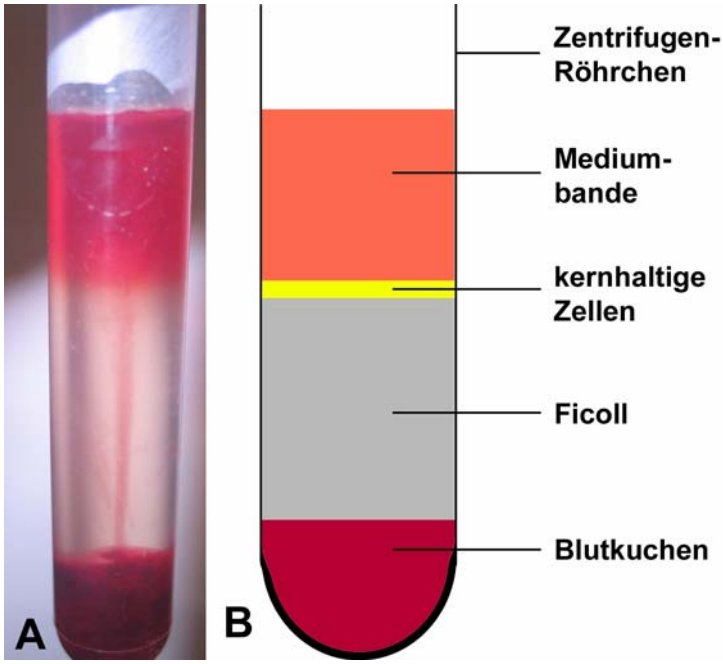


Abbildung 5 Separation der kernhaltigen Zellen aus dem Knochenmarkaspirat durch Dichtegradienten-Zentrifugation. A) Biocoll-Röhrchen nach der Zentrifugation. B) Schematische Darstellung der einzelnen Schichten innerhalb des Röhrchens. Die kernhaltigen Zellen wurden mit einer serologischen Pipette abgenommen und in Zellkulturflaschen überführt

2.1.3 Zellpassagierung

Zellpassage erfolgte nach einmaligem Waschen der Zellen mit PBS durch Zugabe von Trypsin/EDTA (0,05%/0,02% in PBS ohne Ca^{2+}, Mg^{2+}). Nach 5-10 min. Inkubation mit Trypsin/EDTA bei 37 °C, 5% CO_2, 95% Luftfeuchte waren die Zellen abgelöst. Die optische Kontrolle erfolgte an einem Zeiss Axiovert 35-Mikroskop. Die enzymatische Reaktion wurde mit Kulturmedium abgestoppt und die Zellen bei 1000rpm 10 min. in einer Heraeus Megafuge 1.0, Rotor #2704, abzentrifugiert. Anschließend wurde das erhaltene Zellpellet in Kulturmedium aufgenommen und die Zellen wieder ausgesät.

2.2 Herstellung von zellbesiedelten Kollagengelen

2.2.1 Frei flotierende Kollagengele

Für die Herstellung frei flotierender Kollagengele wurden die Zellen mit Trypsin geerntet und mit Hilfe eines Casy1 TT gezählt. Die für den Versuchsansatz benötigten Zellen, sowie ein Aliquot zur Bestimmung des Ausgangszustandes der Zellen (t=0) wurden ermittelt und separat abzentrifugiert. Die Zellen für t=0 wurden nach der Zentrifugation sofort in Quiagen-Lysispuffer (600µL RLT-Puffer + 6µL Mercaptoethanol) aufgenommen und bis zur weiteren Aufarbeitung (RNA-Isolierung) bei -80°C eingefroren.

Für Versuche zur Bestimmung des Einflusses von β_1-Integrin wurden die Zellen vor Versuchsansatz in Volmedium+10µg/mL Anti- β_1-Integrin 20 min. inkubiert und anschließend erneut abzentrifugiert. Die Kontrollzellen wurden in Vollmedium ohne Antikörper entsprechend behandelt. Bei Differenzierungsversuchen mit Wachstumsfaktoren oder Differenzierungsmedium entfiel dieser Schritt.

Das für den Versuchsansatz verwendete Kollagengel (6mg/mL Rattenschwanzkollagen) und die außerdem benötigte Neutralisierungslösung (ohne FKS) wurden von der ArsArthro AG (Esslingen, Deutschland) zur Verfügung gestellt. $3x10^5$ Zellen wurden je 0,5 mL Neutralisierungslösung (ohne FKS) resuspendiert und anschließend der gleiche Volumenanteil Kollagengel zugegeben. Die so entstandene Kollagenlösung wurde zügig unter Vermeidung von Schaumbildung gemischt und jeweils 150µL der Zell-Kollagen-Suspension in eine Vertiefung einer „96 well plate“ pipettiert. Die Vertiefungen der „96 well plate“ haben einen Querschnittsfläche von 32,2 mm². Die Konstrukte polymerisierten zunächst 30 min. bei 37°C im Brutschrank aus. Anschließend wurden sie vorsichtig mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze von dem Rand gelöst und das jeweilige Versuchsmedium zugegeben. Das Medium wurde zweimal wöchentlich gewechselt.

Die Kollagen-Endkonzentration der Konstrukte betrug somit 3 mg/mL, die Zellzahl $1.5x10^5$/mL ($2,25x10^4$/Konstrukt).

Für jede Bedingung (Zeitpunkt, Kultivierungsbedingung) wurde die End-Konstruktgröße von 2 Gelen pro Spender bestimmt. Hierzu wurden die Gele gründlich mit PBS gewaschen und geerntet. Sie wurden zusammen mit einem Längenstandard mit einer Digitalkamera (Canon G5) dokumentiert und anschließend ausgewertet. Der Waschvorgang beeinflusste die Konstruktgröße nicht.

2.2.2 Kollagengelringe unter statischer Spannung

Zur Herstellung von zellbesiedelten Kollagenringen, die unter statischer Spannung kultiviert wurden, wurden zunächst die Zellen mit Trypsin geerntet und mit Hilfe des Casy1 TT gezählt, wodurch die benötigte Zellzahl, sowie ein Aliquot für t=0 abzentrifugiert werden konnte.

Kollagenringe mit einem Ausgangsvolumen von 1 mL wurden mit Hilfe einer Teflon-Form gegossen (Abb. 6). Die Form enthielt 16 ringförmige Aussparungen, in deren Mitte zwei Metalldrähte als Aufhängungspunkte angebracht waren. Während des Guss-Vorgangs und der Auspolymerisation wurden die beiden Metalldrähte mit einem Metall-„Spacer" verbunden. $1{,}5 \times 10^5$ Zellen wurden dazu in 0,5 mL Neutralisationslösung (FKS-frei) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde mit 0,5 mL Kollagenlösung vorsichtig gemischt und in die Gussform pipettiert. Die Auspolymerisation erfolgte direkt im Anschluss für 45 min. im Brutschrank bei 37°C, 95% Luftfeuchte und 5% CO_2-Gehalt. Anschließend wurde der Metallspacer mit Hilfe einer sterilen Pinzette entfernt und 1mL Medium zugegeben.

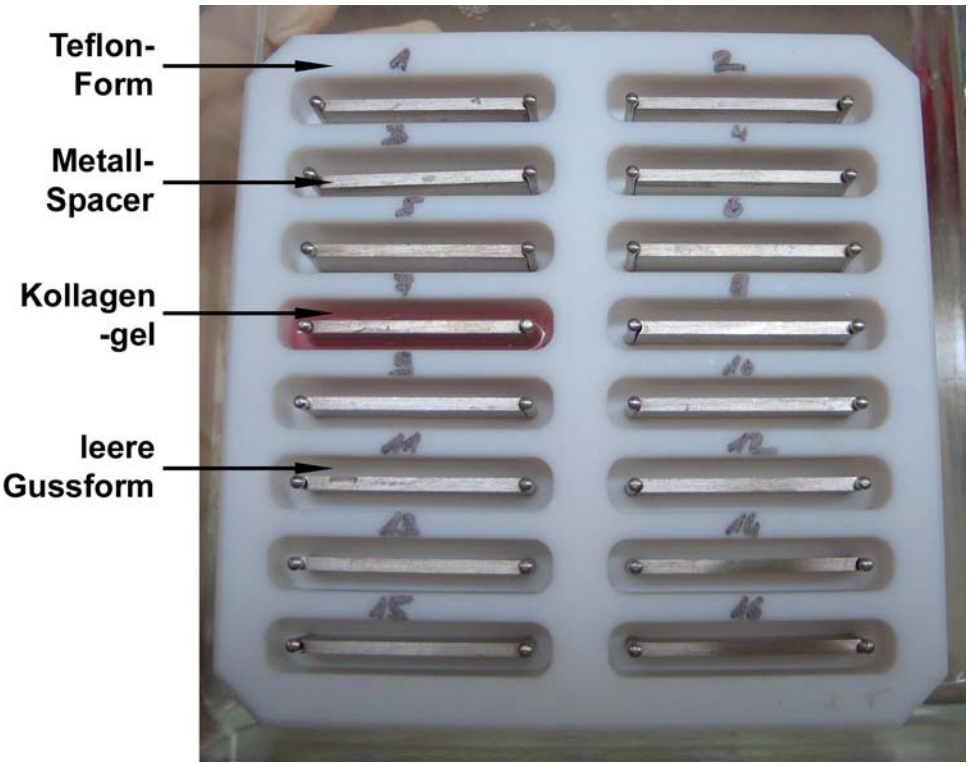


Abbildung 6: Teflon-Form zur Herstellung von Kollagenringen. Kollagengele wurden in den Gussformen auspolymerisiert. Anschließend wurde der Metall-Spacer entfernt und Medium zugegeben.

2.3 Besiedlung von PLLA

Poly(L-lactid) Polymer-Konstrukte (PLLA) für Besiedlungsversuche wurden im Rahmen des „Kompetenznetz Baden-Württemberg“ vom Institut für Textiltechnologie und Verfahrenstechnik Denkendorf (ITV) zur Verfügung gestellt.

Nach Information durch das ITV wurde das PLLA durch einen Ringöffnungsprozess hergestellt. Es wurde durch thermoplastische Extrusion bei einer Schmelztemperatur von 180-220°C verarbeitet und als ein 40-Filament-Garn gesponnen. Jedes der Filamente hatte einen Durchmesser von 11µm. Sie wurden texturiert und hatten als Folge dessen eine Kräuselung von etwa 100µm (1,2 dtex). Das Garn wurde lose in einen 79 Multi-Zwirn mit einem durchschnittlichen Durchmesser von etwa 4 mm aufgewickelt. Das Filament-Bündel wurde an beiden Enden zusammen gebunden, so dass es eine Länge von 5mm aufwies (Abb. 7). Die Filament-Zwischenräume lagen zwischen 100 und 200 µm und ergaben eine Gesamtporosität des Konstruktes von über 90% (geschätzter Wert). Die Konstrukte wurden mit Argonplasma behandelt, um die Hydrophilität und damit die Benetzbarkeit zu erhöhen. Anschließend wurden die Konstrukte plasma-sterilisiert. Nach diesen Behandlungen betrug die Viskosität des PLLA 1,28 dl/g und besaß eine geschätzte Halbwertszeit von 6 Monaten. Vor der Besiedlung wurden die Konstrukte 12 h in DMEM vorkonditioniert.

Für die Besiedlung wurde zunächst das DMEM sorgfältig abgesaugt und die Konstrukte in „12 well plates“ gelegt. 1,5 x 10^5 Zellen je Konstrukt wurden in je 50µL des jeweiligen Versuchsmediums aufgenommen und gleichmäßig im Konstrukt verteilt. Außerdem wurde ein Aliquot der Zellen für t=0 abzentrifugiert, in Stratagene- Lysispuffer (200µL Lysis-Puffer + 1,4µL Mercaptoethanol) aufgenommen und bis zur weiteren Aufarbeitung (RNA-Isolierung) bei -80°C eingefroren Die Konstrukte wurden nach der Aussaat der Zellen für 4 h im Brutschrank bei 37°C, 5% CO_2 und 95% Luftfeuchte, woraufhin die Konstrukte mit einer sterilen Pinzette gewendet und erneut 4 h im Brutschrank inkubiert wurden. Die Inkubationszeit erlaubte die vollständige Adhärenz der Zellen an den Konstrukten, das Wenden stellte sicher, dass die Zellen gleichmäßig an den PLLA-Fasern adhärierten. Nach diesen Inkubationsschritten wurde das jeweilige Versuchsmedium im Überschuss zugegeben.



Abbildung 7: PLLA-Konstrukt für Besiedlungsversuche. Das Konstrukt hat eine Länge von etwa 5mm und eine Breite von etwa 4mm.

2.4 Molekularbiologie

2.4.1 RNA-Isolation und cDNA-Synthese

Grundlage zur RNA-Isolation aus der Zellkultur bildete ein Zellpellet, das in Lysispuffer aufgenommen und bis zur Aufarbeitung bei -80°C aufbewahrt wurde. Bei Kollagengel-Konstrukten wurden die Konstrukte mit sterilem PBS gewaschen und mit einem sterilen Skalpell sorgfältig klein geschnitten und ebenfalls in Lysispuffer bei -80°C eingefroren. PLLA-Konstrukte wurden nach Waschen mit sterilem PBS als Ganzes in Lysispuffer aufgenommen und bei -80°C eingefroren.

Zur Isolation der Gesamt-RNA für die Genexpressionsanalyse wurde das RNeasy Mini Kit der Fa. Qiagen GmbH nach Herstelleranleitung benutzt. Grobe Partikel wurden über eine „Shredder"-Säule abgetrennt. Daraufhin wurde die RNA aus der Lösung mit 70% Ethanol gefällt und an eine Mini-Spin-Säule gebunden. Nach mehrfachem Waschen mit den Puffern „RW1" und „RPE", sowie einem Verdau mit DNase I wurde die RNA mit 30µL RNase-freiem Wasser eluiert.

Anschließend folgte die reverse Transkription in cDNA mit Hilfe des Omiscript RT-Kits der Firma Quiagen. Hierzu wurde die RNA zunächst bei 65°C 5 min. denaturiert. Nach Zugabe eines Mastermixes aus 10x RT-Puffer, Omniscript RT, Oligo dT_{15}, Random-Primer, dNTPs und RNAse-Inhibitor erfolgte die reverse Transkription für 1h bei 37°C gefolgt von 1h 42°C.

Einige Proben wurden auch mit Hilfe des Absolutely RNA® Miniprep-Kits der Firma Stratagene aufgearbeitet. Hierzu wurde wie im Herstellerprotokoll angegeben verfahren. Grobe Partikel wurden über ein „prefilter spin cup" abgetrennt und die RNA in der resultierenden Lösung mit 70% Ethanol gefällt. Daraufhin wurde sie an die „RNA-binding spin cup"-Säule gebunden. Nach mehrfachem Waschen mit „low salt"- und „high salt"-Puffer, sowie einem DNase-Verdau mit der im Kit enthaltenen DNase wurde die RNA mit 30µL „Elution buffer" eluiert. Die cDNA-Synthese erfolgte anschließend ebenfalls nach fünfminütiger Denaturierung bei 65°C und Zugabe eines Mastermixes aus 10µL Stratapuffer, 0,5µL Stratascript RT, 1µL Oligo dT_{15}, 1µL Random-Hexamer, 1µL dNTPs und 1µL RNAse-Inhibitor je Probe zu jeder Probe 1h bei 37°C. Die Reaktion wurde durch Erhitzen des Ansatzes auf 95°C für 5 min. terminiert.

2.4.2 RT-PCR und real quantification der mRNA-Synthese

Für die Genexpressionsanalyse mit einer RT-PCR wurde das HotStarTaq Master Mix Kit der Fa. Qiagen GmbH, Hilden, nach Anleitung des Herstellers benutzt.

Die Expression der Integrin Untereinheiten α_1, α_2, α_3 und β_1, sowie von Tenascin-C und Matrixmetallopeptidase (MMP-1) wurde mittels „real time"-PCR mit einem AbiPrism7000 bestimmt. GAPDH wurde als endogene Kontrolle verwendet und alle Werte wurden jeweils auf ihre Kontrolle vor Versuchsbeginn normalisiert. Für die Detektion der Integrin-Untereinheiten α_1, α_3 und β_1, sowie für die von Tenascin-C wurden die Genexpressions-Assays der Firma Applera Biosystems verwendet. GAPDH-, Kollagen Typ I-, MMP1- und Integrin Untereinheit α_2–mRNA wurden mit Invitrogen Platinum® SYBR® qPCR Super-Mix UDG detektiert.

Primer-Sequenzen/Bestellnummern finden sich in Tab. 2, 3 und 4 (S. 20, S. 30 und S. 31). Alle Primer wurden zunächst in Differenzierungs-Experimenten (Fickert et al., 2004) oder an humanen, primären Zellen getestet.

2.4.3 Agarose-Gelelektrophorese

Alle Amplifikate aus PCR und real time -PCR wurden auf Agarose-Gele aufgetragen. Hierfür wurde zunächst „TBE-Puffer" hergestellt. Dazu wurden 108g Tris Base, 55g Borsäure und 9,3g Dinatrium-EDTA in 10 mL demineralisiertem Wasser gelöst und auf pH 8,3 eingestellt.

Für ein 2%iges Gel wurde 1g Agarose in 50 mL TBE-Puffer gekocht. Nach Abkühlen auf unter 50°C wurden unter Rühren 2,5 µL wässrige Ethidiumbromid (EtBr)-Lösung (10 mg/mL) zugegeben. Abschließend wurde die Agarose in einer Gelkammer ca. 30 min polymerisiert.

Als Standard wurde auf jedes Gel 4 µL 10bp-Basenpaarleiter aufgetragen. Von den Proben wurden jeweils 7µL in die Taschen pipettiert. Proben mit „Choral Buffer" wurden direkt aufgetragen, farblose Reaktionsansätze wurden vor der Auftragung zu Identifikation der Lauffront mit 5µL Bromphenolblaulösung versetzt. Bromphenolblaulösung enthielt 0,25% Bromphenolblau-Di-Natriumsalz, 40% D+-Saccharose und 125mM Na_2EDTA und wurde auf pH 8,0 eingestellt.

Die Auftrennung der Amplifikate erfolgte durch Anlegen von 120V und 80mA für 30 min. Anschließend wurden die Gele am GelDocXR ausgewertet.

2.5 Histologie

2.5.1 Raster-Elektronenmikroskopie

Zellbesiedelte Konstrukte wurden in 2,5% Glutaraldehyd, 1% Saccharose, and 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,0) 12 h fixiert und anschließend in PBS gewaschen. Nach der Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Konstrukte bei 37°C und 75

bar kritisch-Punkt getrocknet. Das Sputter Coating erfolgte mit 20 nm Gold-Palladium. Die Analyse am Raster-Elektronenmikroskop wurde an einem DSM 962 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) durchgeführt.

2.5.2 Paraffineinbettung

Alle zellbesiedelten Konstrukte wurden in 4% Formaldehyd nach Lillie mindestens 18 Stunden fixiert und nach zweistündiger Wässerung unter fließendem Leitungswasser und Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe in Paraffin eingebettet. Die Dehydrierung erfolgte mit Hilfe einer Histokinette, die Einbettung an einer Leica Ausgießstation EG 1140H.

Für die Färbungen wurden an einem Reichert-Jung Supercut 2050 mit Feather S35-Klingen 3,5µm dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger aufgezogen. Für die Immunhistologie wurden silanisierte Objektträger verwendet, die mit Hilfe von 2% 3-Aminopropyl-Triethoxysilan in Aceton behandelt wurden.

2.5.3 Hämatoxylin- und Eosin-Färbung (H&E-Färbung)

Übersichtspräparate wurden mit Hilfe von Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Zunächst wurden hierfür die Schnitte 30 min. bei 65°C entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Die Zellkerne wurden mit Hilfe von Hämatoxylin nach Mayer 10 min bei Raumtemperatur (RT) unter anschließender Bläuung 10 min. in Leitungswasser gefärbt. Die umgebende Matrix wurde mit 0,5% Eosin AG extra 3 min. bei RT gefärbt. Anschließend wurden die Schnitte in demineralisiertem Wasser (Aqua demin.) gespült und in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert. Danach wurden sie mit Eukitt eingedeckt.

2.5.4 Alzianblau-Färbung

Saure Mukopolysaccharide wurden mit Hilfe von Alzianblau angefärbt. Hierfür wurden die Schnitte wiederum 30 min. bei 65°C entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Sie wurden in 3% Essigsäure (aus Eisessig 100%) angesäuert und dann 30 min bei RT mit 1% Alzianblau 8GS in 3% Essigsäure gefärbt. Nach kurzer Differenzierung in 3% Essigsäure wurden die Schnitte mit Aqua demin. gespült und die Kerne 7 min. bei RT mit 0,1% Kernechtrot gegengefärbt. Nach erneutem Spülen in Aqua demin. wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert und ebenfalls mit Eukitt eingedeckt.

2.5.5 Silanisierung von Objektträgern für die Immunhistologie

Für die Immunhistologie verwendete Schnitte wurden auf silanisierte Objektträger aufgezogen, um ein Ablösen der Präparate durch die Waschvorgänge zu vermeiden. Dafür wurden die Objektträger über Nacht in 10% Extran in demineralisiertem Wasser gelagert. Anschließend wurden sie 5 min. in fließendem Leitungswasser gespült. Nach Reinigung für 5 min. in Aceton wurden die Objektträger 5 min. in 2% 3-Aminopropyl-Triethoxysilan in Aceton silanisiert. Überschüssiges Silan wurde durch anschließende Inkubation für 5 min. in Aceton abgenommen und die Objektträger zweimal in demineralisiertem Wasser gewaschen. Die Objektträger wurden im Anschluss über Nacht bei 42°C getrocknet.

2.5.6 Immunhistologie

Für Immunfärbungen wurden die Schnitte entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Nach einem jeweils für die Färbungen spezifischen Verdau (s. Tab. 5) wurden die Schnitte 30 min. bei RT mit 3% H_2O_2 (30% H_2O „baker analyzed“, 1:10 mit Aqua demin. verdünnt) behandelt, um endogene Peroxidasen zu inaktivieren. Anschließend wurde freie Proteinadsorptionsstellen mit „Blocking Buffer“ 30 min. bei RT abgesättigt. Die Präparate wurden anschließend mit dem primären Antikörper (Tab. 5) über Nacht bei 4°C inkubiert. Der Nachweis der Antikörperbindung erfolgte durch Kopplung mit biotinyliertem Brückenantikörper und Streptavidin und Farbreaktion mit AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol)+ Substrat-Chromogen. Bei allen Färbungen außer der PCNA-Färbung wurde eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin analog zur H&E-Färbung durchgeführt. Nach der Färbung wurden die Schnitte mit Kaisers Glyceringelatine eingedeckt. Als Positiv- und Negativkontrolle dienten humane, fötale Kniegelenke, wobei bei der Negativkontrolle die Inkubation mit dem Primärantikörper durch eine PBS-Inkubation ersetzt wurde.

Tabelle 5: Für Immunfärbungen verwendete Antikörper mit zugehöriger Vorbehandlung.

Antigen	Spezies	Vorbehandlung	Verdünnung	Hersteller
Kollagen Typ I (human) Polyklonal	Kaninchen	1 mg/mL Pepsin 2h 37°C	1:1000	DPC Biermann, Bad Nauheim, Deutschland Bestell-Nr.: R1038
Kollagen Typ II (human) Polyklonal	Kaninchen	1 mg/mL Pepsin 2h 37°C	1:200	Acris Bestell-Nr.: R1039

Kollagen Typ III (human) Monoklonal	Maus	5 mg/mL Pronase 30 min. 37°C	1:1000	Acris Bestell-Nr.: AF5810
Kollagen Typ X (human) Monoklonal	Maus	1. 2 mg/mL Hyaluronidase 30 min. 37°C 2. 1 mg/mL Pepsin 1h 37°C	1:10	Prof. von der Mark, Erlangen
TenascinC (human) Monoklonal	Maus	0,1% Pronase 30 min. RT	1:1500	Prof. Chiquet-Erisman, Schweiz
Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) (human) Monoklonal	Maus	Citratpuffer pH6, 10 min., 90°C	1:1000	Labvision, Fremont, USA

2.5.7 TUNEL-Färbung

Die Apoptoseaktivität der Zellen wurde mittels „Terminaler Deoxynucleotidyl-Transferase Deoxyuridine Nick-end Labeling“ (TUNEL) evaluiert (Zheng et al. 2005). Schnitte mit einer Dicke von 3.5µm wurden über eine absteigende Alkoholreihe rehydriert und mit 0.1% Triton X-100 in 0.1% Natrium-Citrat 8 min. permeabilisiert. Die Fluoreszenz-Markierung apoptotischer Zellen erfolgte mit Hilfe des TUNEL-Enzyms in TUNEL-Label-Lösung (beides von Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) 1 h bei 37°C im Dunkeln. Nach mehrmaligem Waschen in PBS wurden die Schnitte mit 5µg/mL Propidium-Iodid gegengefärbt. Propidium-Iodid interkaliert mit der DNA aller vorhandenen Zellen und kann deshalb ein Bild über die Gesamtzellzahl geben. Zu jeder TUNEL-Färbung wurden eine Positiv-Kontolle (Vorverdau mit DNase I) und eine Negativ-Kontrolle (ohne TUNEL-Enzym) mitgeführt.

Die Färbungen wurden durch Fluoreszenzmikroskopie an einem Zeiss Axioskop 2 mot plus visualisiert. Die Gesamtzellzahl wurde durch Rot-Fluoreszenz („Fs00“-Filter, Exzitation 530-585 nm, Emission 615 nm), die TUNEL-positiven Zellen durch Grün-Fluoreszenz („Fs09“- Filter, Exzitation 450-490 nm, Emission 515 nm) sichtbar. Die Apoptoserate wurde als Anteil der TUNEL-positiven Zellen an der Gesamtzellzahl angegeben.

2.6 Zymographie

Die Translation und Aktivierung der Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 wurde mit Gelatine-Zymographie bestimmt. Hierzu wurden die entsprechenden Ansätze 24 Stunden mit serumfreiem Medium kultiviert.

Die Auftrennung erfolgte auf Acrylamid-Gelen. Hierzu wurde zunächst das Trenngel für 30 min bei Raumtemperatur auspolymerisiert, anschließend das Sammelgel darüber gegossen und ebenfalls 30 min bei Raumtemperatur auspolymerisiert. Die Zusammensetzung der Gele war wie folgt:

Trenngel:

- 2,38 mL Gel A (30% Acrylamidlösung)
- 1,875 mL Gel B (2% Bisacrylamidlösung)
- 102 µl SDS 10%
- 3,94 mL Tris 0.75 M (pH 8,8)
- 0,703 mL Aqua demin.
- 1 ml Gelatinelösung: 25 mg Gelatine in 1,25 ml Aqua demin. (20mg/ml) unter leichtem Erwärmen lösen
- zum Polymerisieren: 80 µL APS 100 mg/ml und 6 µL TEMED

Überschichten mit wassergesättigtem Butanol nach dem Härten abschütten

Sammelgel:

- 933 µL Gel A (30% Acrylamidlösung)
- 736 µL Gel B (2% Bisacrylamidlösung)
- 100 µL SDS 10%
- 1,25 mL Tris 0.625 M (pH 6,8**)**
- 6,98 mL Aqua demin.
- zum Polymerisieren: 100 µL APS 100 mg/ml und 10 µL TEMED

Der Überstand wurde 1:1 mit Probenpuffer gemischt. Jeweils 20µL der Proben, sowie des Proteinstandards wurden auf dem Polyacrylamidgel aufgetragen und ca. 5h bei 90V aufgetrennt. Die Rekonstitution wurde durch Inkubation des Acrylamidgels für 2 x 15 min in 1x Renaturation-Puffer erreicht. Der Gelatine-Verdau wurde über Nacht in 1x Develpoment-Puffer durchgeführt. Am nächsten Tag wurde das Gel mit Coomassie-Brillantblau gefärbt. Überschüssiges Coomassie Brillantblau wurde anschließend mit Entfärberlösung entfernt

und das Gel am Gel Doc XR dokumentiert. Färbelösung und Entfärber setzten sich wie folgt zusammen:

Färbelösung:

- 1,7 g Coomassie Brillantblau
- 200 ml Methanol

1 h mit Parafilm bedeckt rühren, dann filtrieren, Zugabe von:

- 250 ml Aqua demin.
- 50 ml Essigsäure konz. (100%)

Entfärber:

- 200 mL Methanol
- 50 mL Essigsäure konz. (100%)
- 250mL Aqua demin.

2.7 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse wurden als Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt. Ein zweiseitiger Studentscher t-Test wurde durchgeführt um statistische signifikante Unterschiede zwischen experimentellen Bedingungen oder unterschiedlichen Zeitpunkten zu bestimmen. Ein Wert von $p<0.05$ wurde als statistisch signifikant, $p<0.01$ als statistisch hochsignifikant erachtet.

C Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einsatz von humanen MSZ im Kontakt mit Biomaterialien beim Tissue Engineering von Sehnen- oder Bandgewebe evaluiert. Zunächst wurden mit Hilfe eines Typ I-Kollagens der Firma ArsArthro die *in vitro*-Bedingungen unter Verwendung von Tenozyten etabliert, um dem natürlichen Zustand in einer Sehne / einem Band vereinfacht darzustellen. Anschließend wurde diese Kultivierungsmethode mit MSZ angewandt. Mit diesen Kenntnissen wurden die Ergebnisse auf ein optimiertes und von den Projektpartnern des „Kompetenznetzes Biomaterialien Baden-Württemberg“ zur Verfügung gestelltes Poly-L-Lactid-Konstrukt (PLLA) übertragen. Im Mittelpunkt der Untersuchungen standen Zelladhäsion, Matrix-Metabolismus und eine mögliche gezielte Steuerung der Differenzierung über biologische Faktoren. Es wurden die Zell-Reaktion auf die unterschiedlichen Zellträger und der Einfluss externer Wachstumsfaktoren charakterisiert.

1 Verhalten von Tenozyten in einem Kollagen-Hydrogel

Die Untersuchung humaner Tenozyten aus dem Kreuzband in einem Typ I Kollagen-Gel sollte zur Beschreibung eines bestmöglich an die Bedingungen in Sehnen und Bändern angepassten Konstruktes führen. Kollagen Typ I ist der Hauptanteil der extrazellulären Matrix von Sehnen und Bändern. Das verwendete Kollagen-Gel wird bereits medizinisch angewendet (z.B. bei Autologer Chondrozyten-Transplantation). Das Kollagen-Gel weist eine fibrilläre Struktur auf und sollte deshalb als natürliches Biomaterial in Kombination mit den Zielzellen einen Standard für den Vergleich mit synthetischen Biomaterialien bieten.

1.1 Gel-Kontraktion, Morphologie, Proliferation

Humane Tenozyten (TZ) wurden in einer Zellzahl von $3x10^5$ Zellen/mL in das Kollagen-Gel eingebracht und nach der Auspolymerisation in „96 well plates“ als frei flotierende Gele bis zu 14 Tage kultiviert. Bevor auf Gen- und Proteinexpression eingegangen wurde, wurden Gel-Kontraktion, Zellmorphologie und Proliferation beurteilt.

1.1.1 Gel-Kontraktion

Humane Tenozyten kontrahierten bei Kultivierung in einem Kollagen Typ I-Gel die Matrix kontinuierlich über den gesamten Versuchszeitraum von 14 Tagen. Nach dieser Zeit war

die Durchschnittsfläche der Kollagen-Gele auf 21,4±5,4% des Ausgangswertes abgesunken (n=6) (Abb. 18, S. 53).

1.1.2 Zellmorphologie

TZ, die in ein Kollagen Typ I-Hydrogel eingebracht wurden, adhärierten gleichmäßig an die Matrix und zeigten bereits nach 24h eine elongierte Zellform. Diese behielten sie auch über die gesamte Kultivierungsdauer von bis zu 14 Tagen bei, wobei die Matrix mit zunehmender Zeit deutlich erkennbar dichtere Strukturen aufwies (Abb. 8).

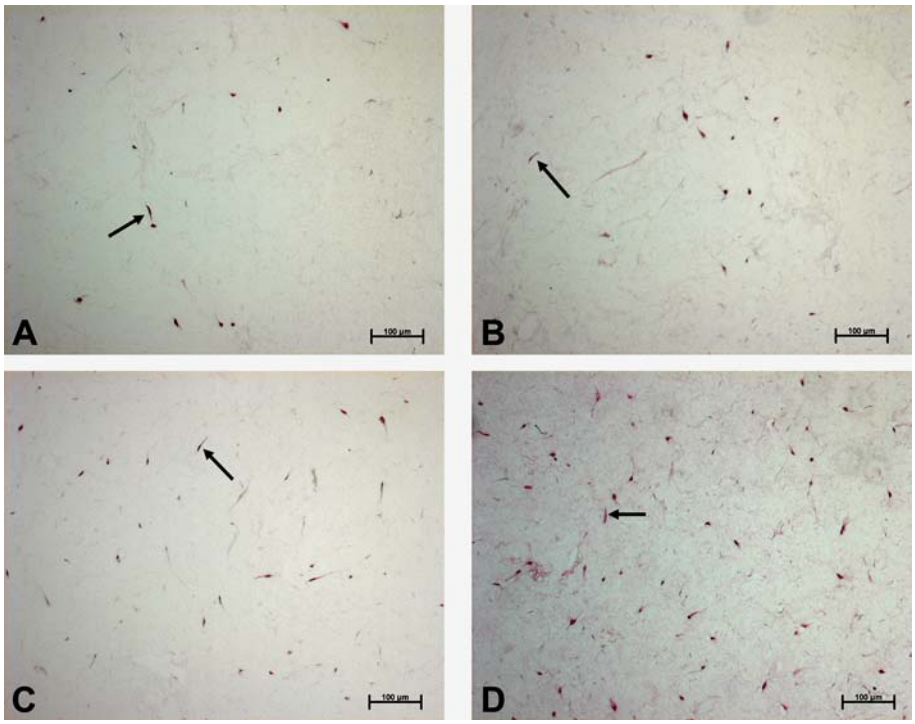


Abbildung 8: Zellmorphologie humaner Tenozyten in einem dreidimensionalen Typ I-Kollagen-Gel. H&E-Färbung an Paraffinschnitten von TZ-besiedelten, frei flotierenden Kollagen-Gelen nach 24h (A), 48h (B), 7d (C) und 14d (D). Pfeile weisen jeweils beispielhaft auf elongierte Zellen innerhalb des Gels.

1.1.3 Proliferationsassay

Die Proliferationsrate der in die Kollagen-Gele eingebrachten Zellen nach 14d wurde mit Hilfe einer PCNA-Färbung evaluiert. Hierzu wurde der Anteil PCNA-positiver Zellen im Vergleich zur Gesamtzellzahl bestimmt. Die Gesamtzellzahl wurde in einer H&E-Färbung des direkt benachbarten Schnittes ausgezählt. In diesem Ansatz wiesen nach Kultivierung in Tenozytenmedium für 14 Tage 52,6±21,8% aller Zellkerne eine positive Reaktion auf die PCNA-Färbung auf (n=6).

1.2 Matrixproduktion

Um Aufschluss über die endogene Matrixsynthese zu erhalten, wurden die Matrix-relevanten Kollagene I, III, V, VI, sowie die Kollagene II und X als Hinweis für eine Fehldifferenzierung auf Gen- und teils auch Proteinexpressionsebene untersucht. Darüber hinaus wurde die Expression verschiedener Proteoglykane und Glykoproteine betrachtet.

1.2.1 Kollagenexpression

Es konnte gezeigt werden, dass humane TZ in der zweidimensionalen Kultur auf Zellkulturplastik die Kollagene des Typs I, III, V und VI stark, sowie Kollagen Typ X schwach detektierbar exprimieren. Kollagen Typ II konnte nicht nachgewiesen werden. Nach Einbringung in ein frei flotierendes Kollagen-Hydrogel zeigte sich in der „real time"-PCR-Analyse eine Reduktion der Expression von Kollagen Typ I auf weniger als 1/50 des Ausgangswertes. Dieser Effekt war bereits nach 24h messbar und blieb dann im weiteren Beobachtungszeitraum von 14 Tagen unverändert (Abb. 9a). Daneben fand sich in der semi-quantitativen RT-PCR eine Verstärkung des Signals von Kollagen Typ X. Die übrigen untersuchten Kollagene blieben von der Kultivierungsmethode unbeeinflusst (Abb. 9b und c).

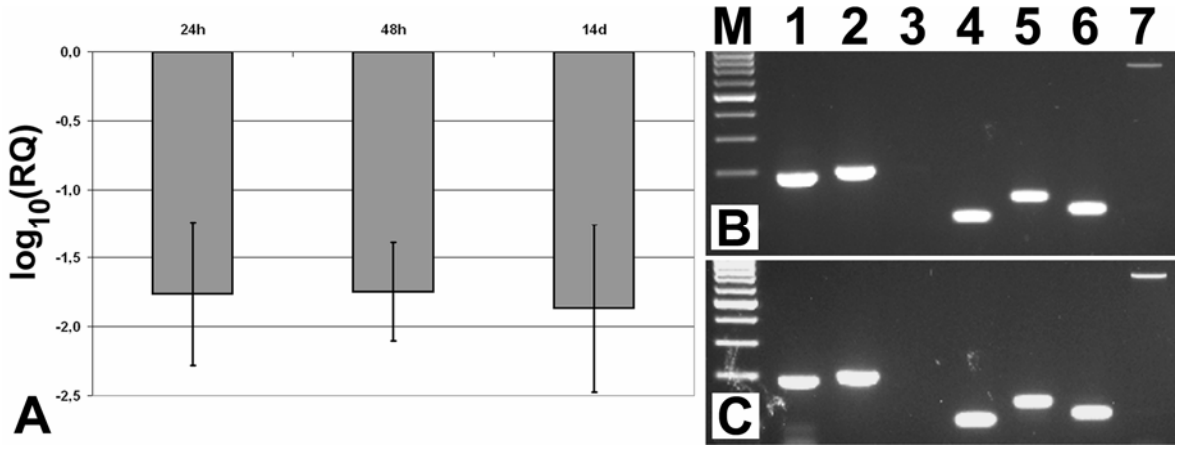


Abbildung 9: Bestimmung der Kollagenexpression humaner TZ nach Einbringung in ein Kollagen-Gel.
(A): Relative Quantifizierung von Kollagen Typ I. Gezeigt ist die Expression bei Kultivierung für 14d in Basalmedium für 24h, 48h und 14d (n=6). Als endogene Kontrolle diente die 18s-rRNA-Expression, als Kalibrator wurde die jeweilige cDNA aus zweidimensionaler Kultur direkt vor Versuchsansatz benutzt. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede der Expression zu den unterschiedlichen Zeitpunkten. (B) und (C): Semi-quantitative Bestimmung der Kollagenexpression durch RT-PCR direkt vor Versuchsbeginn (B) und nach Kultivierung für 14 Tage im Kollagen-Gel. M: 100bp-Marker, 1: GAPDH, 2: Kollagen Typ I, 3: Typ II, 4: Typ III, 5: Typ V, 6: Typ VI, 7: Typ X. EtBr-gefärbte 2%ige Agarose-Gele.

Ob die Expression der oben genannten Kollagene des Typs I, III und X auch zu einer tatsächlichen Proteinbiosynthese führen, wurde mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen überprüft. Dazu wurden Paraffinschnitte TZ-besiedelter Kollagen-Hydrogele, welche 14

Tage in Tenozytenmedium kultiviert wurden, benutzt. Die Färbung von Kollagen Typ I ergab eine stark positive Reaktion vor allem der Zellsomata. Es muss beachtet werden, dass eine unspezifische Interaktion des Kollagen Typ I Antikörpers mit dem Rattenschwanz-Kollagen auftrat und als Hintergrundfärbung identifiziert werden konnte. Kollagen Typ III konnte in schwächerem Maße gefärbt werden, Kollagen Typ X war kaum nachweisbar (Abb. 10).

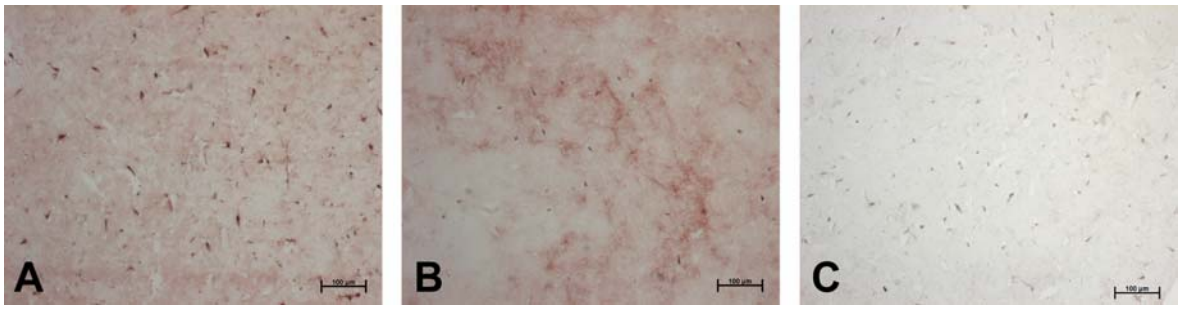


Abbildung 10: Kollagen-Immunhistochemie an Paraffinpräparaten TZ-besiedelter Kollagen-Gele.
Immunhistochemische Färbungen an Schnitten nach Kultivierung für 14d. Färbung von Kollagen Typ I (A), III (B) und X (C).

1.2.2 Nicht-kollagene Matrix-Proteine

Die Expression verschiedener Proteoglykane und Glykoproteine sowie des Transkriptionsfaktors Scleraxis wurden untersucht. Dabei konnte durch semi-quantitative RT-PCR keine Expressionsänderung der Proteine Decorin, Tenomodulin, Fibromodulin, Biglykan, Versikan, Lumikan, Fibronektin-1 und Elastin gefunden werden. Scleraxis wurde nahe der Detektionsgrenze gefunden. „Real time"-PCR-Analysen zeigten, dass die Expression von Tenascin-C sich 24 nach Einbringung der TZ in das Kollagen-Gel auf ein Drittel des Ausgangswertes verringerte, nach 14 Tagen war sie weiter auf gut 1/5 abgesunken.

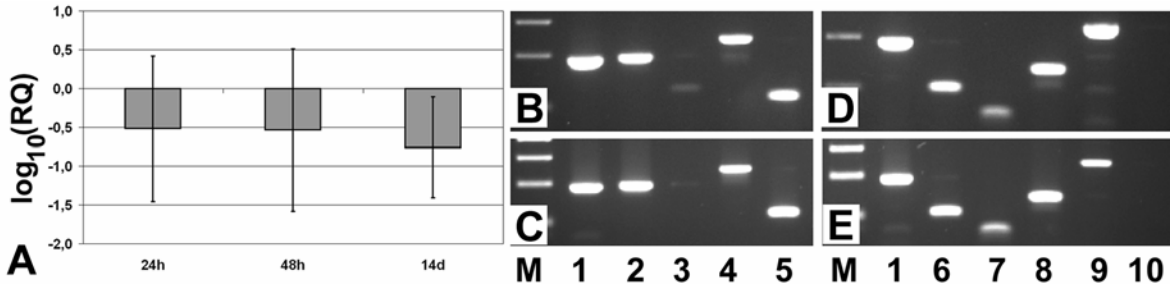


Abbildung 11: Bestimmung der Proteoglykan-Expression humaner TZ nach Einbringung in ein frei flotierendes Kollagen-Gel.
(A) Relative Quantifizierung von Tenascin-C. Gezeigt ist die Expression bei Kultivierung für 14d in Basalmedium für 24h, 48h und 14d (n=6, MW±SD). Als endogene Kontrolle diente die 18s-rRNA-Expression, als Kalibrator die jeweilige cDNA aus zweidimensionaler Kultur direkt vor Versuchsansatz. (B-E) Genexpression von GAPDH (1), Decorin (2), Tenomodulin (3), Fibromodulin (4), Biglycan (5), Versikan (6), Lumican (7), Fibronektin-1 (8), Elastin (9) und Scleraxis (10) von MSZ vor Einbringung in das Kollagen-Gel (B und D) und nach Kultivierung für 14 Tage (C und E). EtBr-gefärbte 2%ige Agarose-Gele.

Tenascin-C-Protein konnte mittels immunhistochemischer Färbung in TZ-besiedelten Kollagen-Gelen nach 14d Kultivierung nur sehr schwach in einigen Zellsomata nachgewiesen werden (Abb. 12a). Eine Alzianblau-Färbung bei pH 2,5 deutet aber auf die Anwesenheit von Mucopolysacchariden hin (Abb. 12b).

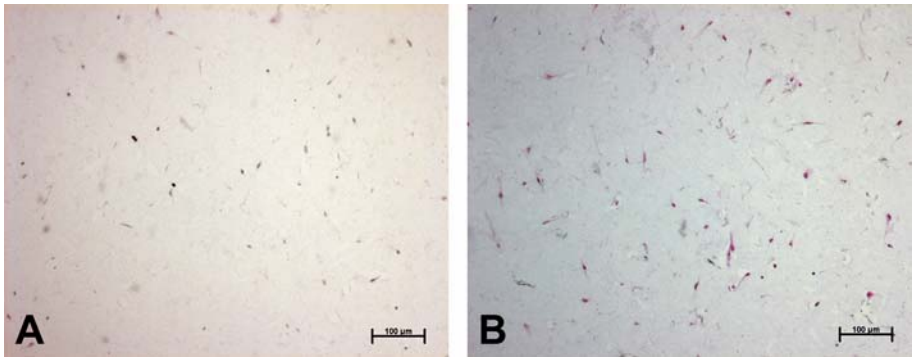


Abbildung 12: Färbungen an Schnitten von Paraffinpräparaten von Konstrukten humaner TZ in Kollagen-Gelen nach Kultivierung für 14d.
(A): Immunhistochemische Färbung von Tenascin-C, (B): Färbung saurer Mukopolysaccaride mit Alzianblau (pH2,5). Längenstandard: 100µm.

1.3 Wechselwirkung mit der Matrix

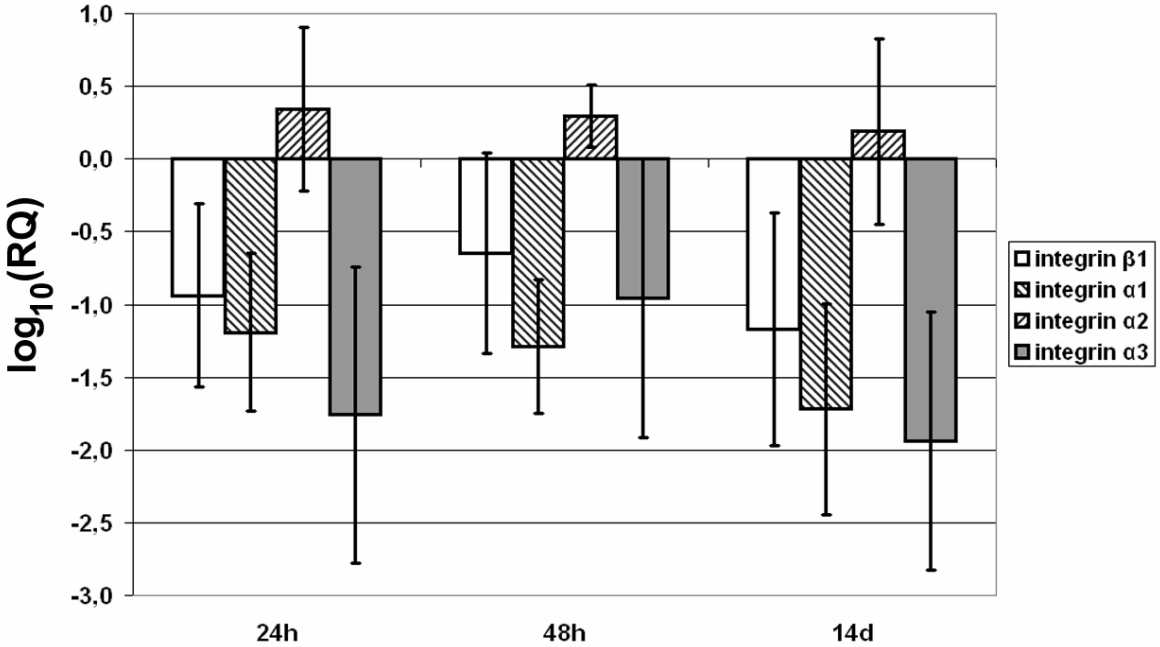


Abbildung 13: Relative Quantifizierung der Integrin-Untereinheiten β_1, α_1, α_2 und α_3 bei TZ in Kollagen-Gelen.
Gezeigt ist die Expression bei Kultivierung für 14d in Basalmedium für 24h, 48h und 14d (n=6, MW±SD). Als endogene Kontrolle diente die 18s-rRNA-Expression, als Kalibrator wurde die jeweilige cDNA aus zweidimensionaler Kultur direkt vor Versuchsansatz benutzt.

Die Änderung der Expression der Integrin-Untereinheiten α_1, α_2, α_3 und β_1 bei Einbringung und Kultivierung von TZ in dem frei flotierenden Typ I-Kollagen-Gel wurde mittels „real time"-PCR-Analyse ausgewertet. Dabei zeigte sich bei Vergleich mit dem Expressions-

muster aus der zweidimensionalen Kultur (t=0) eine Verdopplung der Expression der Kollagen-bindenen α_2-Untereinheit, die drei anderen untersuchten Untereinheiten wurden dagegen herunterreguliert, Untereinheit α_1 um rund Faktor 25, α_3 um etwa Faktor 47 und β_1 um durchschnittlich Faktor 8 (Abb. 13). Die Regulationen erfolgten bereits innerhalb der ersten 24h und blieben im Beobachtungszeitraum konstant.

1.4 Matrix-Umbau

Die relative Quantifizierung des MMP-1-Expressionsmusters von TZ, welche in ein Kollagen-Hydrogel eingebracht wurden, ergab, dass die Expression von MMP-1 24h nach Einbringung in das Gel zunächst auf ein Drittel des Expressionsniveaus vor Einbringung herabreguliert wird. Diese Reaktion wird aber schon nach 48h wieder abgeschwächt. Nach 14 Tagen Kultivierung findet man dann sogar eine Erhöhung auf das Dreifache des Ausgangswertes (Abb. 14a). Darüber hinaus konnte in der semiquantitativen RT-PCR gezeigt werden, dass auch MMP-13 nach 14tägiger Kultivierung im Kollagen-Gel verglichen mit der 2D-Kultur vor der Einbringung deutlich stärker exprimiert wird, TIMP-1 wird dagegen schwächer exprimiert. MMP-2 und TIMP-2 wird konstant stark, MMP-9 nur schwach exprimiert (Abb. 14b und c).

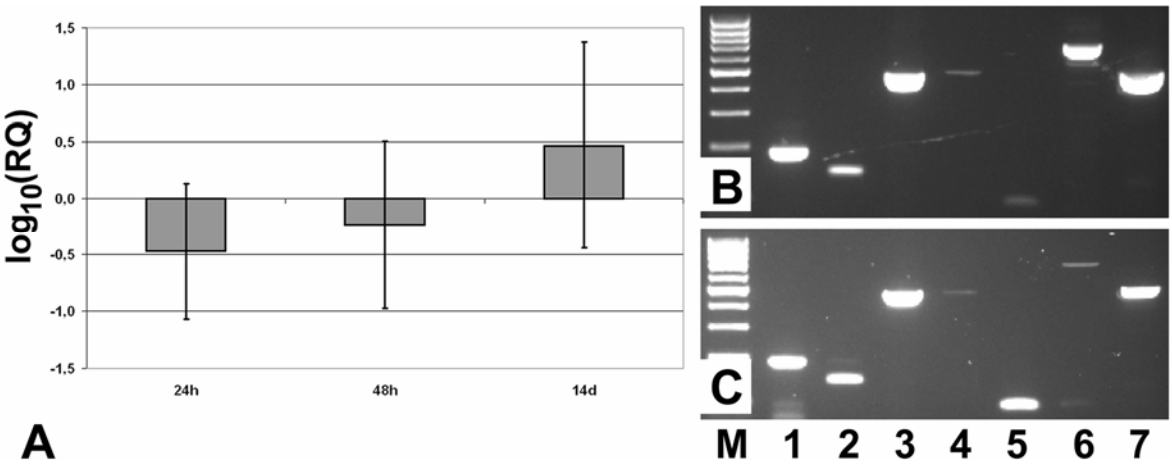


Abbildung 14: Bestimmung der MMP- und TIMP-Expression von TZ nach Einbringung in ein Kollagen-Gel.
(A): Relative Quantifizierung von MMP-1. Gezeigt ist die Expression bei Kultivierung für 14d in Basalmedium für 24h, 48h und 14d (n=6, MW±SD). Als endogene Kontrolle diente die 18s-rRNA-Expression, als Kalibrator die jeweilige cDNA aus zweidimensionaler Kultur direkt vor Versuchsansatz. (B) und (C): Semiquantitative Bestimmung der Kollagenexpression durch RT-PCR direkt vor Versuchsbeginn (B) und nach Kultivierung für 14 Tage im Kollagen-Gel (C). M: 100bp-Marker, 1: GAPDH, 2: MMP-1, 3: MMP-2, 4: MMP-9, 5: MMP-13, 6: TIMP-1, 7: TIMP-2. EtBr-gefärbte 2%ige Agarose-Gele.

2 Evaluierung des neuartigen PLLA-Zellträgers

Mit den Vorkenntnissen aus den Versuchen zu Tenozyten im Kollagen-Gel, wurde ein synthetisches Gerüst als Matrix entwickelt, welches als Zellträger, eventuell kombiniert mit einer weiteren Komponente als Lastträger, dienen soll. Im Rahmen des „Kompetenznetzes Biomaterialien Baden-Württemberg“ wurde von den Projektpartnern des ITV Denkendorf eine Poly-L-Lactid (PLLA)-Matrix zur Verfügung gestellt, deren Besiedlung etabliert wurde. Es wurde ein Protokoll entwickelt, bei dem vor der Besiedlung mit TZ die Konstrukte über Nacht in DMEM gelagert wurden, um eventuelle Rückstände vollständig zu entfernen und eine verbesserte Benetzbarkeit der Konstrukte zu erreichen. Die Besiedlung erfolgte durch eine achtstündige Inkubation der Zellen auf dem PLLA-Konstrukt, bevor Medium zugegeben wurde. Diese Besiedlungsmethode erlaubte eine gleichmäßige Verteilung der Zellen innerhalb des Konstrukts und eine vollständige Adhäsion der Zellen auf den PLLA-Fasern (Abb. 15a und 16). Eine Vorinkubation mit FKS-haltigem Medium ergab keine verbesserte Zelladhäsion (Abb. 15b).

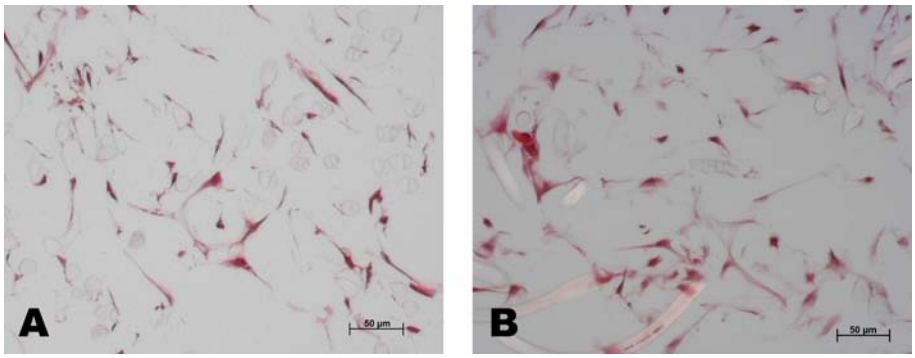


Abbildung 15: Vergleich der Zelladhäsion auf PLLA bei unterschiedlicher Vorbehandlung der Zellträger.
H&E-Färbung zweier Paraffinschnitte von TZ-besiedelten PLLA-Konstrukten, die vor der Besiedlung über nach in DMEM (A) oder DMEM+10%FKS (B) konditioniert und 7 Tage kultiviert wurden. Es sind keine Unterschiede in der Zellmorphologie zu erkennen. Längenstandard: 100µm.

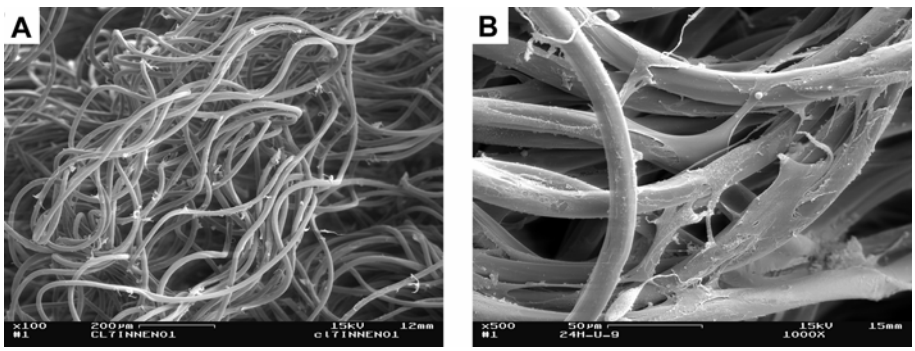


Abbildung 16: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen zellbesiedelter PLLA-Konstrukte.
TZ-besiedelte PLLA-Konstrukte nach 24h Kultivierung. Vergrößerung (A) 100x. (B) Vergrößerung 500x.

3 Einfluss der Matrix auf das Verhalten von MSZ

Da für einen zukünftigen Ersatz von Sehnen- und Bandgewebe aufgrund ihrer guten Verfügbarkeit multipotente mesenchymale Stromazellen (MSZ) als Zellquelle dienen sollen, wurde das Verhalten dieser Zellen im bereits etablierten Kollagen-Gel einerseits und in dem PLLA-Zellträger andererseits hinsichtlich Morphologie, Proliferation, Differenzierung, Matrix-Synthese und –Umbau und des Einflusses der Zelladhäsion charakterisiert.

3.1 Kultivierung, Morphologie, Proliferation

3.1.1 Gel-Kontraktion

Humane MSZ wurden in einer Konzentration von $3x10^5$ Zellen/mL Kollagen-Gel in „96-well plates“ ausgesät. Die Besiedlung frei flotierender Kollagen-Gele mit MSZ zeigte ein grundsätzlich ähnliches Kontraktionsverhalten wie bei Tenozyten beobachtet. Innerhalb von 14 Tagen kontrahierten sie die Matrix auf 9,4±1,9% der Ausgangsgröße (n=6). Der Beginn der Kontraktion war bereits nach 24 Stunden messbar und setzte sich während der gesamten Kultivierungsdauer fort. Die Kontraktion der Kollagen-Gele durch MSZ war im Vergleich zu jener durch Tenozyten nach 14 Tagen rund 10% stärker.

MSZ-besiedelte Kollagen-Gele, die in Anwesenheit von rhTGF-β1, rhPDGFbb, rhBMP13, osteogenem oder adipogenem Differenzierungsmedium kultiviert wurden, kontrahierten über den Kultivierungszeitraum von 14d ähnlich stark wie die Basalmediumkontrolle. Lediglich die mit adipogenem Differenzierungsmedium kultivierten Konstrukte kontrahierten tendenziell etwas weniger. Dieser Unterschied war nicht statistisch signifikant ($p>0,05$). Nach 14 Tagen waren Kontroll-Gele, die in Basalmedium kultiviert wurden, auf durchschnittlich 13,9±4,3% der Ausgangsgröße kontrahiert. Die zusätzliche Gabe von rhTGF-β1 bewirkte eine Kontraktion auf 10,5±4,0% der Ausgangsgröße, die Gabe von rhPDGFbb auf 12,7±4,9%, die von rhBMP13 auf 11,0±4,1%. Bei Kultivierung in osteogenem Differenzierungsmedium kontrahierten die Konstrukte auf 8,2±4,2% der Ausgangsgröße, in adipogenem Differenzierungsmedium nur auf 20,1±5,4% (je n=6) (Abb. 17).

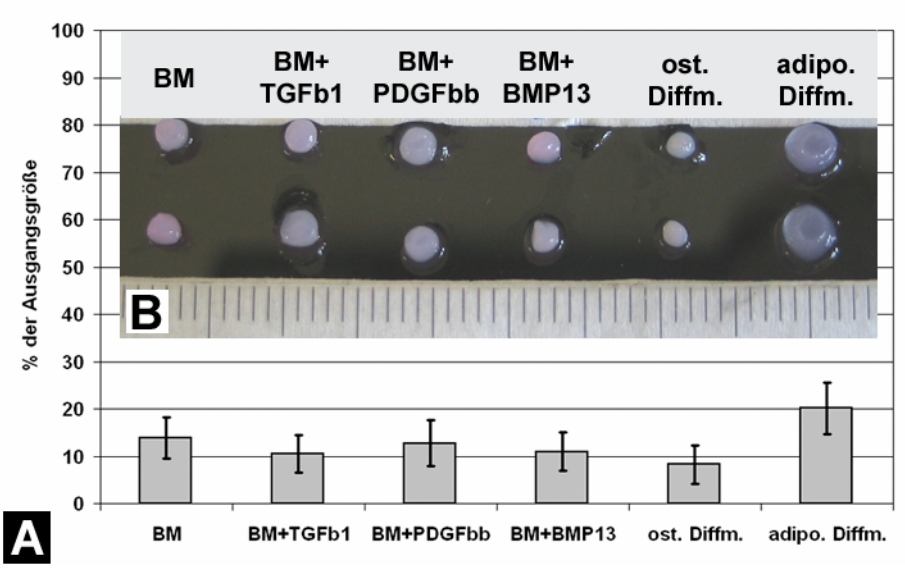


Abbildung 17: Einfluss der Kultivierungsbedingungen auf die Kontraktion zellbesiedelter Kollagen-Gel-Konstrukte.
(A) Konstruktgröße von Kollagen-Gelen, die 14 Tage in Basalmedium (BM), Basalmedium+10ng/mL rhTGF-β1 (BM+TGFb1), Basalmedium+10ng/mL rhPDGFbb (BM+PDGFbb), Basalmedium+10ng/mL rhBMP13 (BM+BMP13), osteogenem - (ost. Diffm.) oder adipogenem Differenzierungsmedium (adipo. Diffm.) kultiviert wurden, in Prozent der Ausgangsgröße (n=6; Ausgangsgröße wurde auf 100% gesetzt). Gemessen wurde der Durchmesser des Querschnitts der Kollagen-Gelkonstrukte. (B) Makroskopische Aufnahme repräsentativer Gel-Konstrukte nach 14tägiger Kultivierung.

Die Zugabe von 10µg/mL Anti-β_1-Integrin-Antikörper verhinderte die Gel-Kontraktion nahezu vollständig (Abb. 18). Die Zugabe des Antikörpers führte zu einer Reduktion der Fläche auf 85,5±14,1% der Ausgangsfläche nach 14 Tagen.

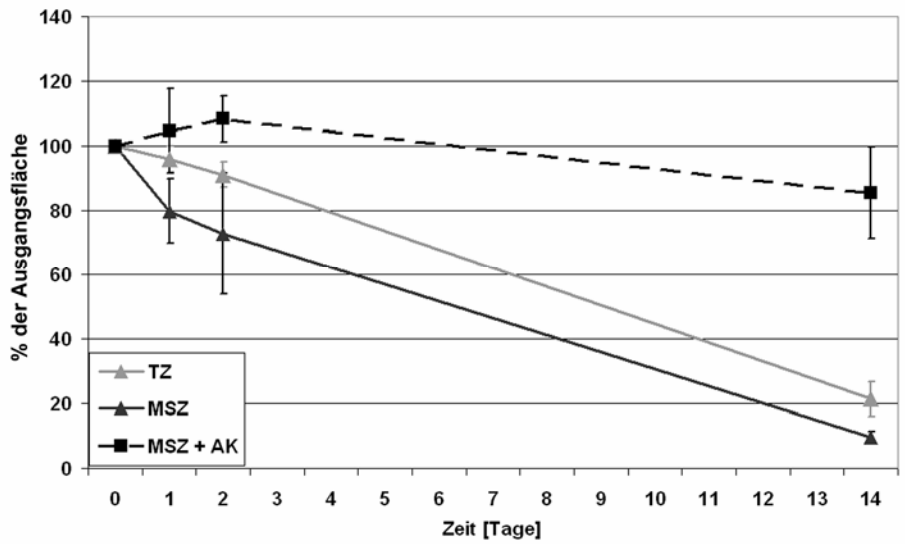


Abbildung 18: Kontraktion von zellbesiedelten Kollagen-Gelen.
Größenveränderung von Kollagen-Gelen, die mit Tenozyten in Basalmedium (▲) oder MSZ in Basalmedium (▲) bzw. Basalmedium + 10µg/mL Anti-β_1-Integrin-Antikörper (■) besiedelt und kultiviert wurden in Prozent der Ausgangsfläche. Gemessen wurde der Durchmesser der Querschnittsfläche der Kollagen-Gelkonstrukte (je n=6 Spender).

Nachdem die starke Kontraktion zellbesiedelter Kollagen-Gele beobachtet werden konnte, wurde ein Versuchsaufbau konzipiert, bei dem die uniaxiale zweiseitige Aufspannung einer nativen Sehne simuliert werden sollte. Dazu wurden zellbesiedelte Kollagenringe hergestellt, die an zwei Punkten um starre Metallhalter geführt wurden (Abb. 19). Es zeigte sich auch in den Ringen eine gleichmäßige Kontraktion, die nicht quantifiziert werden konnte (Abb. 19). Die Kontraktion war in einigen Fällen so stark, dass die Ringe nach 1-2 Wochen rissen. Solche Ansätze wurden von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen, da die statische Spannung über den gesamten Versuchszeitraum von 2 Wochen nicht mehr gegeben war.

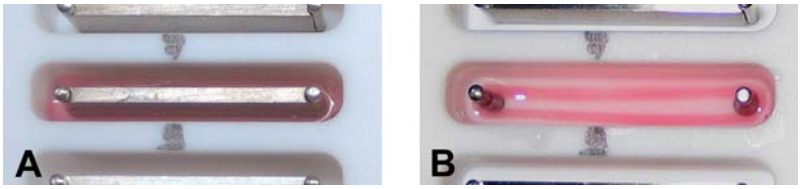


Abbildung 19: Kontraktion zellbesiedelter, uniaxial aufgespannter Kollagen-Gele.
Kollagen-Gele in der Kulturschale, um zwei Metallhalter geführt. Gelgröße direkt nach der Auspolymerisation (A) und nach Kultivierung für 14d (B).

3.1.2 Zellmorphologie innerhalb der Konstrukte

Die Zellmorphologie innerhalb der beiden unterschiedlichen Matrices bei verschiedenen Kulturbedingungen wurde mit Hilfe von H&E-Färbungen an Paraffinschnitten der Präparate beurteilt. Bei den PLLA-Konstrukten war eine zusätzliche phasenkontrastmikroskopische Beurteilung der Randbereiche möglich.

Zellmorphologie innerhalb der Kollagen-Matrix

In die Kollagen-Matrix eingebrachte Zellen zeigten bereits nach 24h eine elongierte Zellmorphologie, die über die gesamte Kultivierungsdauer beibehalten wurde (Abb. 20). Die Zellen lagen separat im Kollagen-Gel. Die Gabe von rhTGF-β1, rhPDGFbb, rhBMP13 oder Differenzierungsmedium beeinflusste die Zellmorphologie nicht. Die Zugabe von 10µg/mL Anti-β_1-Integrin-Antikörper führte zu einer runden Zellmorphologie, die auf fehlende Anheftungsmöglichkeit der Zelle an die Matrix schließen lässt.

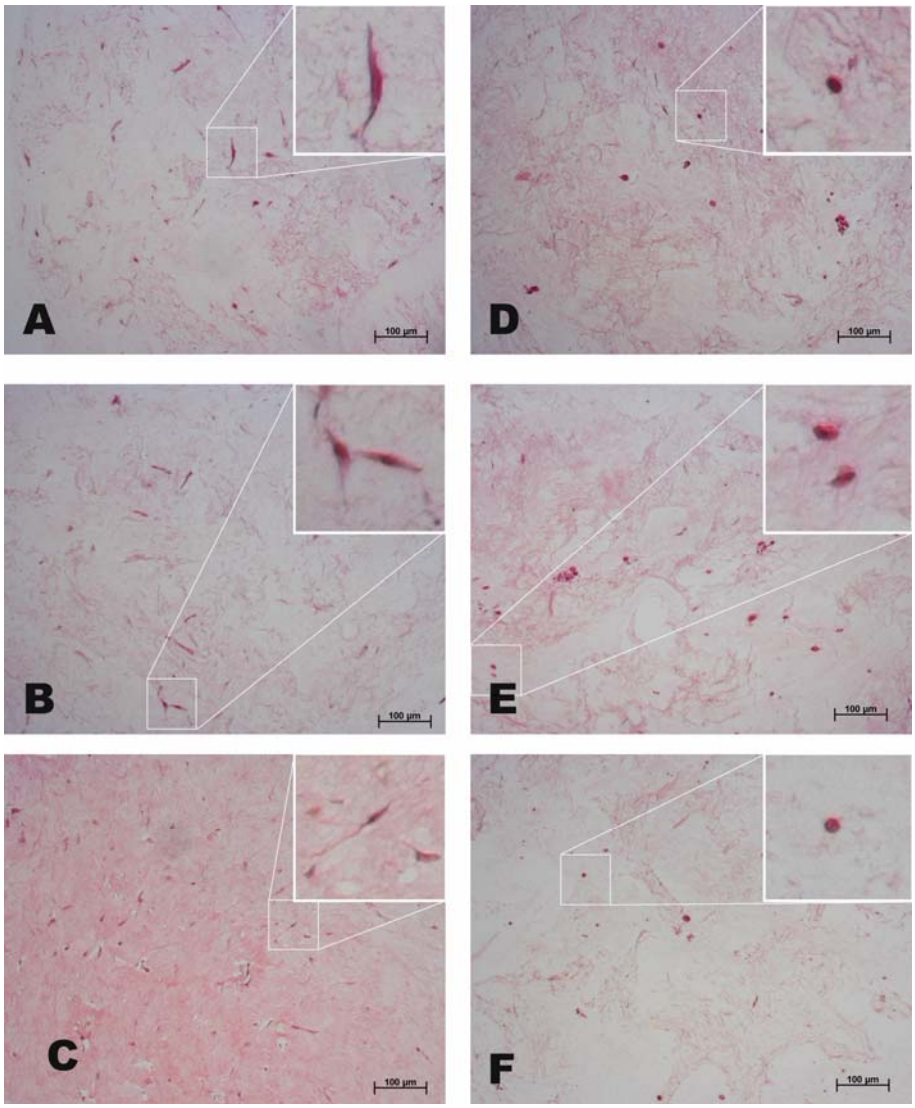


Abbildung 20: Zellmorphologie in Kollagen-Gelen kultivierter MSZ.
H&E-Färbung von Kollagen-Gelen die in Basalmedium für (A) 24h, (B) 48h, (C) 14d oder in Basalmedium + 10µg/mL Anti-β1-Integrin für (D) 24h, (E) 48h, (F) 14d kultiviert wurden. Die Ausschnitte zeigen Einzelzellen in höherer Vergrößerung. Längenstandard: 100µm.

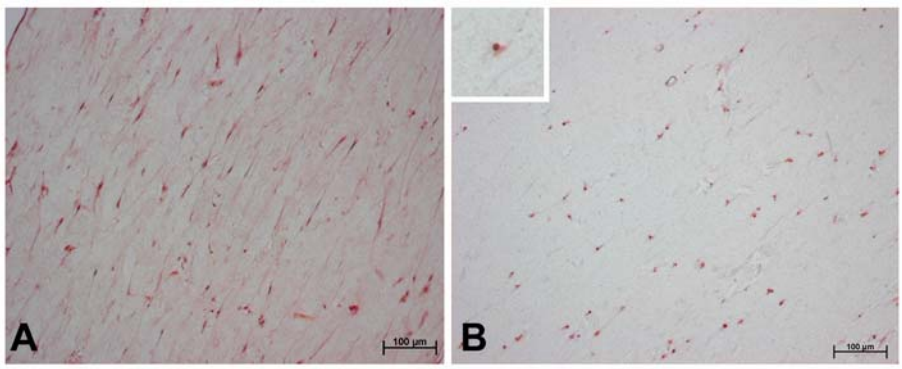


Abbildung 21: Paraffinschnitte und Färbungen von MSZ in statisch aufgespannten Kollagen Typ I-Ringen.
(A) Veranschaulichung der Zellmorphologie durch H&E-Färbung. (B) Immunhistochemische Färbung gegen PCNA. Die positiven, rot gefärbten Signale zeigen Nuclei, die das PCNA-Protein aufweisen. Links oben im Bild ist ein einzelner positiver Kern vergrößert dargestellt. Längenstandard 100µm.

Innerhalb der aufgespannten Kollagenringe waren die Zellen gleichmäßig verteilt und lagen separat im Kollagen-Gel eingebettet. Die Zellen zeigten eine elongierte Form, die entlang der Achse der statischen Spannung ausgerichtet war (Abb. 21a).

Zellmorphologie innerhalb der PLLA-Konstrukte

MSZ, die auf die dreidimensionale PLLA-Matrix aufgebracht und in Basalmedium kultiviert wurden, ummantelten die Fasern oder überspannten mehrere Fasern der Matrix (Abb. 22). Bei einer Kultivierung bis zu zwei Wochen war eine gleichmäßige Besiedlung mit Zunahme der Zellzahl beobachtbar. Die Gabe von rhTGF-β1, rhPDGFbb, rhBMP13 oder Differenzierungsmedium zeigte keine Auswirkung auf die Zellmorphologie. Eine Vorinkubation der MSZ mit einem Anti-β_1-Integrin-Antikörper und die daran anschließende Kultivierung mit 10µg/mL Anti-β_1 beeinflusste die Adhäsion der Zellen auf der Matrix zunächst ebenfalls nicht. 12h nach Zugabe des Antikörper-haltigen Mediums war kein Unterschied der Zell-Matrix-Wechselwirkung lichtmikroskopisch im Vergleich zu zellbesiedelten Konstrukten ohne Antikörper erkennbar (Abb. 22b&g). Mit längerer Kultivierungsdauer über einen Zeitraum von bis zu14 Tagen in Anwesenheit des Anti-β_1-Integrin-Antikörpers konnte eine zunehmende Abkugelung der Zellen auf den Fasern und eine Abnahme der Zelldichte beobachtet werden (Abb. 22).

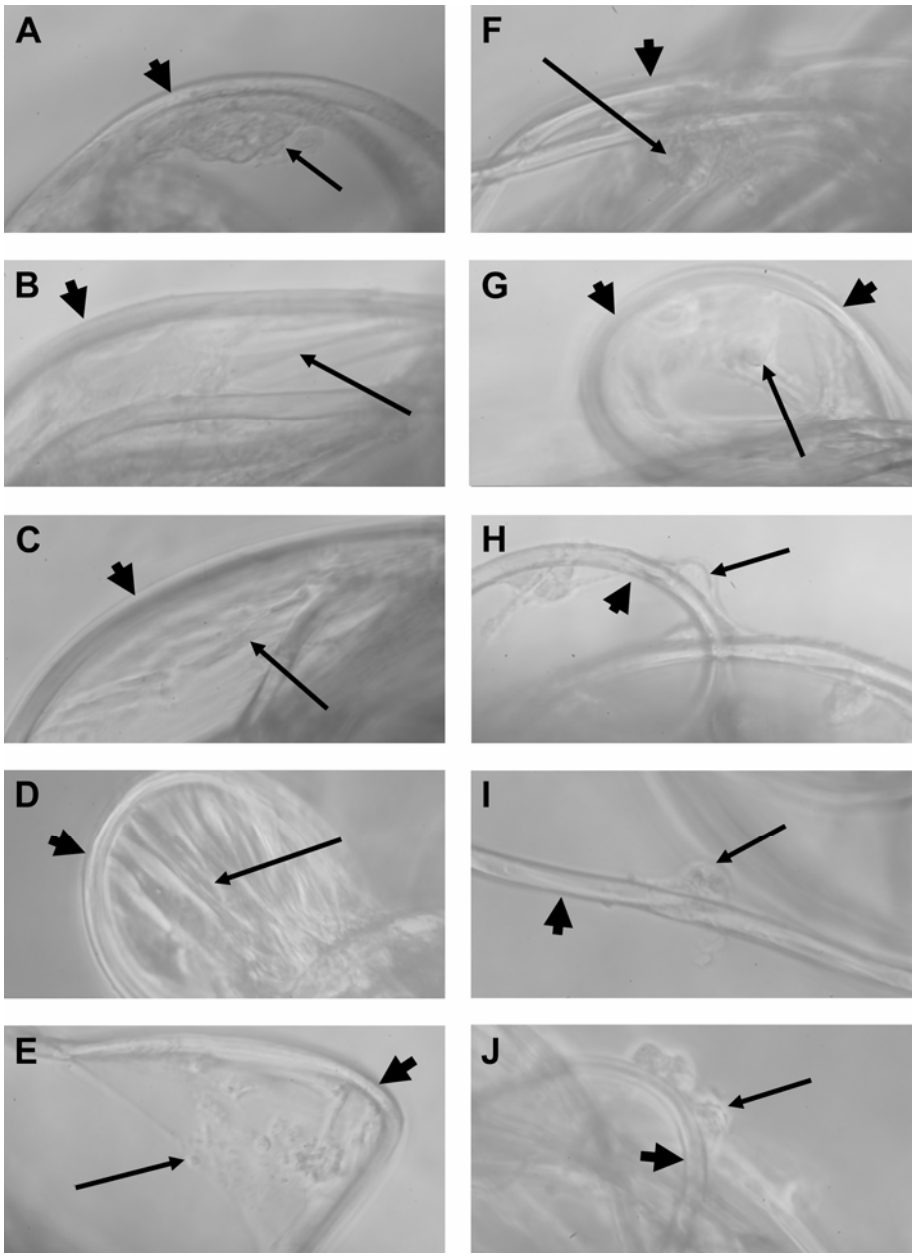


Abbildung 22: Phasenkonstrast-mikroskopische Aufnahmen von MSZ auf PLLA-Fasern.
Die Konstrukte wurden in Basalmedium (A-E) und Basalmedium + 10µg/mL Anti-β_1-Integrin (F-J) inkubiert/kultiviert. A, F: 8h nach der Aussat in Basalmedium in An-/Abwesenheit des Antikörpers und nach Kultivierung für weitere 12h (B, G), 48h (C, H), 7d (D, I) und 14d (E, J). Ursprüngliche Vergrößerung: 200x. Dicke Pfeile: PLLA-Fasern, schmale Pfeile: Zellen.

3.1.3 Proliferation und Apoptose

Die Vitalität der Zellen in den Kollagen- bzw. PLLA-Konstrukten wurde mit Hilfe eines Proliferationsassays evaluiert. Die Proliferationsaktivität der in die Kollagen-Gele eingebrachten Zellen wurde anhand einer PCNA-Färbung evaluiert. Hierzu wurde der Anteil PCNA-positiver Zellen eines Paraffinschnittes im Vergleich der Gesamtzellzahl bestimmt. Die Gesamtzellzahl wurde aus einer H&E-Färbung des darauf folgenden Schnittes ausge-

zählt. Beispielhaft wurde zusätzlich ein Apoptose-Assay durchgeführt, um die Ergebnisse des Proliferations-Assays zu validieren. Hierbei handelte es sich um einen TUNEL-Test, der die Fragmentierung der DNA während der Apoptose nachweist.

Vitalität der MSZ in Kollagen-Gelen

In einer ersten Versuchsreihe wurde die Proliferationsaktivität von MSZ in Kollagen-Gelen bei Zugabe löslicher Stimuli vergleichen. Hierbei zeigte sich, dass die Zugabe von jeweils 10 ng/mL rhTGF-β1, rhPDGFbb, rhBMP13 oder Differenzierungsmedium keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferationsaktivität – gemessen am Anteil PCNA-positiver Zellen von der Gesamtzellzahl – hat. Die Durchschnittswerte aus n=6 Zellreihen können Tab. 6 entnommen werden. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kultivierungsbedingungen ($p>0,05$).

Tabelle 6: Anteil PCNA-positiver Zellen in Kollagen-Konstrukten an der Gesamtzellzahl.
MSZ nach 14d Kultivierung in frei flotierenden Kollagen-Gelen in Basalmedium oder unter Zugabe von 10 ng/mL rhTGF-β1, 10ng/mL rhPDGFbb, 10ng/mL rhBMP13 bzw. bei Kultivierung in osteogenem oder adipogenem Differenzierungsmedium. Das Verhältnis PCNA-positiver Zellen in einem Paraffinschnitt zur Anzahl der Gesamtzellzahl im darauf folgenden Schnitt nach H&E-Färbung berechnet (n=6).

Kulturbedingung	**Anteil PCNA-positiver Zellen Mittelwert ± Standardabweichung**
Basalmedium	76,4 % ±11,0%
Basalmedium+10 ng/mL rhTGF-β1	74,6% ±10,1%
Basalmedium+10 ng/mL rhPDGFbb	64,0% ±8,9%
Basalmedium+10 ng/mL rhBMP13	70,0% ±18,3%
osteogenes Differenzierungsmedium	74,5% ±13,4%
adipogenes Differenzierungsmedium	61,9% ±13,2%

In einer weiteren Versuchsreihe wurde der Einfluss von β_1-Integrin auf die Zellvitalität untersucht. Die Basal-Proliferationsrate war in dieser Reihe insgesamt geringer, es konnten aber dennoch Unterschiede zwischen den Kultivierungsbedingungen gefunden werden. In diesem Ansatz wiesen bei Kultivierung in Basalmedium für 14 Tage 31,4±10,6% aller Zellkerne eine positive Reaktion auf die PCNA-Färbung auf, wohingegen der Wert unter Zugabe von 10µg/mL Anti-β1-Integrin auf 21,7±7,3% sank (jeweils n=6). Der Unterschied war nicht statistisch signifikant ($p=0,17$).

Zur Validierung der Ergebnisse wurde zusätzlich der Anteil apoptotischer Zellen mittels eines TUNEL-Tests bestimmt. Die Gesamtzellzahl ergab sich aus einer Propidiumiodid-Färbung des gleichen Präparates. Nach 14 Tagen betrug der Anteil apoptotischer Zellen in den Kontroll-Gelen, die mit Basalmedium kultiviert wurden 24,4 ± 13,3% (n=6), wohingegen eine Zugabe von 10 µg/mL Anti-β_1- Integrin eine leichte Erhöhung apoptotischer Zellen auf einen Wert von 41,7 ± 11,3% (n=6) bewirkte. Der Unterschied war in einem zweiseitigen Studentschen t-Test nicht signifikant (p=0,20).
Die Proliferation von MSZ, welche über 2 Wochen in einem statisch aufgespannten Kollagenring kultiviert wurden, wurde aufgrund ihrer Größe mittels PCNA-Immunfärbung nur qualitativ bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass ein großer Anteil der in die Hydrogele eingebrachten Zellen PCNA-positive Nuclei aufwies (Abb. 21b).

Vitalität der MSZ in PLLA-Konstrukten

In weiteren Versuchsreihen wurde die Vitalität von MSZ in PLLA-Konstrukten bestimmt. In einer ersten PLLA-Versuchsreihe wurde analog zu den Versuchen in Kollagen-Gel die Proliferationsaktivität der MSZ in PLLA-Konstrukten bei Zugabe löslicher Stimuli verglichen. Hierbei zeigte sich, dass die Zugabe von jeweils 10 ng/mL rhTGF-β1, rhPDGFbb, rhBMP13 oder Differenzierungsmedium keine Auswirkung auf die Proliferationsaktivität hat. Es zeigten sich Werte zwischen 50 und 70% für alle Kultivierungsbedingungen, die sich untereinander nicht signifikant unterschieden (p>0,05) (Tab 7).

Tabelle 7: Anteil PCNA-positiver Zellen in PLLA-Konstrukten an der Gesamtzellzahl.
MSZ nach 14d Kultivierung auf PLLA-Matrices in Basalmedium oder unter Zugabe von 10 ng/mL rhTGF-β1, 10ng/mL rhPDGFbb, 10ng/mL rhBMP13 bzw. bei Kultivierung in osteogenem oder adipogenem Differenzierungsmedium. Der Anteil wurde durch das Verhältnis PCNA-positiver Zellen in einem Paraffinschnitt zur Anzahl der Gesamtzellzahl im darauf folgenden Schnitt (bestimmt nach H&E-Färbung) berechnet (n=6).

Kulturbedingung	**Anteil PCNA-positiver Zellen Mittelwert±Standardabweichung**
Basalmedium	69,8%±10,1%
Basalmedium+10 ng/mL rhTGF-β1	54,8%±17,8%
Basalmedium+10 ng/mL rhPDGFbb	63,7%±14,8%
Basalmedium+10 ng/mL rhBMP13	70,0%±20,7%
osteogenes Differenzierungsmedium	49,6%±14,2%
adipogenes Differenzierungsmedium	55,9%±15,2%

In einer weiteren Versuchsreihe wurde der Einfluss von β_1-Integrin auf die Zellvitalität im PLLA-Kontext betrachtet. In diesem Ansatz wiesen bei Kultivierung in Basalmedium für 14d 55,9±13,9% aller Zellkerne eine positive Reaktion in der PCNA-Färbung auf, wohingegen der Wert unter Zugabe von 10µg/mL Anti-β_1-Integrin auf 20,7±14,2% sank (jeweils n=6). Der Unterschied war statistisch signifikant (p=0,007).

3.2 Differenzierung der MSZ

Der Einfluss der Kultivierungsbedingungen auf die Zelldifferenzierung wurde mittels RT-PCR bestimmt.

3.2.1 Differenzierung der MSZ in Kollagen-Gelen

Es wurde kein Hinweis eines spontanen osteogenen, chondrogenen oder adipogenen Differenzierungsvorganges von MSZ in Kollagen-Gelen gefunden. In MSZ, die 14 Tage im 3D-Kollagen-Gel in An- oder Abwesenheit von 10µg/mL Anti-β_1-Integrin-Antikörper kultiviert wurden, konnte keine Induktion der Marker-Gene Alkalische Phosphatase und Osteocalcin für osteogene, Cart1 und Kollagen Typ II für chondrogene, sowie LPL und Leptin für adipogene Differenzierung nachgewiesen werden (Abb. 23).

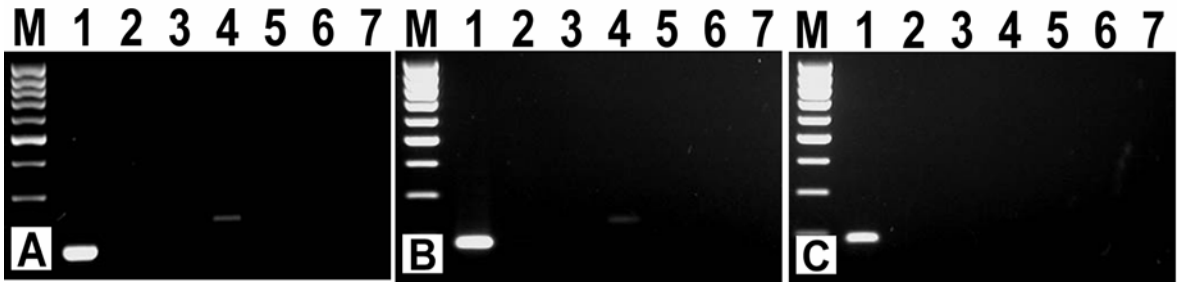


Abbildung 23: Differenzierungsstatus von MSZ vor und nach Einbringung in eine Kollagen-Matrix. Genexpressionsmuster vor (A) und nach Kultivierung für 14 Tage in Basalmedium (B) und Basalmedium + 10µg/mL Anti-β1-Integrin-Antikörper (C). Es konnte keine Expression von Alkalischer Phosphatase (2), Osteokalzin (3), Cartilage Homeoprotein 1 (4), Kollagen Typ II (5), Lipoprotein Lipase (6) oder Leptin (7) gefunden werden, wohingegen das Glyceraldehyde-3-Phosphat Dehydrogenase (1) deutlich exprimiert wird. EtBr-gefärbte 2%ige Agarose-Gele.

Ein entsprechendes Bild ergab sich ebenfalls bei Kultivierung in Anwesenheit von jeweils 10 ng/mL rhTGF-β1, rhPDGFbb, rhBMP13 oder Differenzierungsmedium oder bei Kultivierung uniaxial aufgespannter Kollagen-Gelringe in Basalmedium. Eine schwache Expression osteogener Marker, die auf eine spontane Differenzierung einiger Zellen der Population hindeutet, war teilweise vor Versuchbeginn detektierbar. Diese ging im Verlauf der Kultivierung jedoch sogar zurück (Abb. 24).

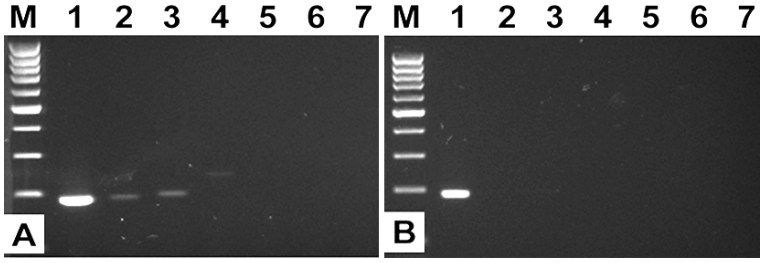


Abbildung 24: Differenzierungsstatus von MSZ vor und nach Einbringung in eine aufgespannte Kollagen-Matrix.
Expressionsmuster vor (A) und nach Kultivierung für 14 Tage in einem statisch aufgespannten Kollagen-Hydrogel (B). Es konnte keine Heraufregulierung von Alkalischer Phosphatase (2), Osteokalzin (3), Cartilage Homeoprotein 1 (4), Kollagen Typ II (5), Lipoprotein Lipase (6) oder Leptin (7) gefunden werden, wohingegen das Glyceraldehyde-3-Phosphat Dehydrogenase (1) deutlich exprimiert wird. EtBr-gefärbte 2%ige Agarose-Gele.

3.2.2 Differenzierung der MSZ in PLLA-Konstrukten

Nach zweiwöchiger Kultivierung von MSZ in den PLLA-Konstrukten unter allen genannten Kultivierungsbedingungen wurde mittels semi-quantitativer-PCR der Expressionsstatus der oben genannten Differenzierungsmarker bestimmt. Es zeigte sich ein uneinheitliches Bild, welches große Unterschiede zwischen den verschiedenen Spendern zeigte. In einigen Ansätzen konnte eine schwache Expression der osteogenen Marker ALP und/oder OC, des chondrogenen Markers Cart-1 und der adipogenen Marker LPL und/oder Leptin gefunden werden. Eine Expression von Kollagen Typ II wurde in keinem Fall gefunden. Das jeweilige Expressionsmuster konnte nicht einheitlich einer Kultivierungsbedingung zugeordnet werden.

3.3 Matrixproduktion

Bei der Beurteilung der endogenen Matrixproduktion wurde das Augenmerk auf die in Sehnen und Bändern vorkommenden Kollagene vom Typ I, II, III, V, VI und X, sowie auf die Proteoglykane und Glykoproteine Tenascin-C, Decorin, Tenomodulin, Fibromodulin, Biglykan, Versikan, Lumikan, Fibronektin-1 und Elastin und eines ihrer Transkriptionsfaktoren (Scleraxis) gelegt.

3.3.1 Kollagene

Kollagene stellen den größten Anteil des Trockengewichtes von Sehnen und Bändern dar. Die Expression dieser Matrixmoleküle ist deshalb für die Generierung eines Ersatzgewebes von entscheidender Bedeutung. Die Bildung einer eigenen Matrix soll der Annäherung an die tatsächlichen Bedingungen in Sehnen und Bändern dienen. Deshalb wurde die Expres-

sion einer Reihe von Kollagenen hier auf Genexpressions- sowie auf Proteinebene untersucht.

Kollagen-Expression der MSZ in Kollagen-Gelen

Es wurde zunächst die Änderung des Expressionsmusters des häufigsten Kollagens in Sehnen und Bändern, des Kollagens Typ I, durch Änderung der Kultivierungsbedingungen aus der 2D-Zellkultur in eine 3D-Kollgen-Gel-Kultur mittels „real time"-PCR untersucht. Darüber hinaus wurde der Einfluss von rhTGF-β1, rhPDGFbb, rhBMP13 oder Differenzierungsmedium betrachtet. Es wurde keine Veränderung der Kollagen I-Expression bei Kultivierung in Basalmedium für 14 Tage gefunden. Das gleiche Ergebnis wurde auch für eine Kultivierung mit jeweils 10 ng/mL rhTGF-β1, rhPDGFbb, rhBMP13 oder adipogenem Differenzierungsmedium erzielt. Lediglich die Kultivierung in Anwesenheit von osteogenem Differenzierungsmedium führte zu einer leichten Erhöhung der Kollagen Typ I-Expression auf den 2,5fachen Wert in 2D-Zellkultur vor Versuchsbeginn (Abb. 25). Diese Erhöhung war jedoch nicht statistisch signifikant unterschiedlich vom Expressionsniveau bei Kultur in Basalmedium (p=0,059).

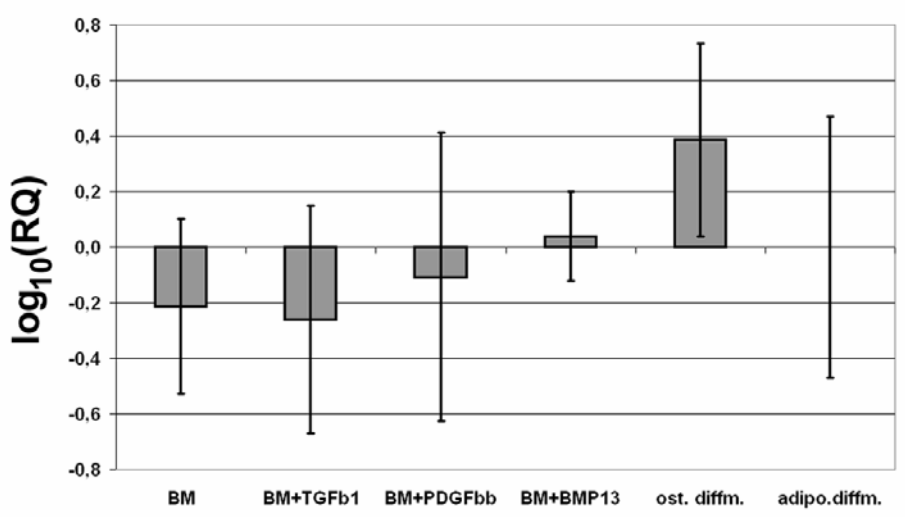


Abbildung 25: Relative Quantifizierung von Kollagen Typ I bei MSZ in Kollagen-Gelen.
Gezeigt ist die Expression bei Kultivierung für 14d in Basalmedium (BM), Basalmedium+10ng/mL rhTGF-β1 (BM+TGFb1), Basalmedium+10ng/mL rhPDGFbb (BM+PDGFbb), Basalmedium+10ng/mL rhBMP13 (BM+BMP13), osteogenem (ost. Diffm.) oder adipogenem (adipo. Diffm.) Differenzierungsmedium (n=6, MW±SD). Als endogene Kontrolle diente die GAPDH-Genexpression, als Kalibrator wurde die jeweilige cDNA aus zweidimensionaler Kultur direkt vor Versuchsansatz benutzt. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Werten.

Die Untersuchung weiterer, für Sehnen und Bändern relevanter Kollagene wurde mittels semi-quantitativer RT-PCR durchgeführt. Es zeigte sich hier – analog zu den Ergebnissen für Kollagen Typ I – kein Unterschied zwischen den Kultivierungsbedingungen. Kollagen

Typ II konnte in keinem Fall nachgewiesen werden, die Kollagene Typ III, V und VI wurden konstant in allen Ansätzen exprimiert. Eine Besiedlung des Kollagen-Gels führte zu einer deutlichen Erhöhung oder Induktion der Kollagen Typ X-Expression (Abb. 26).

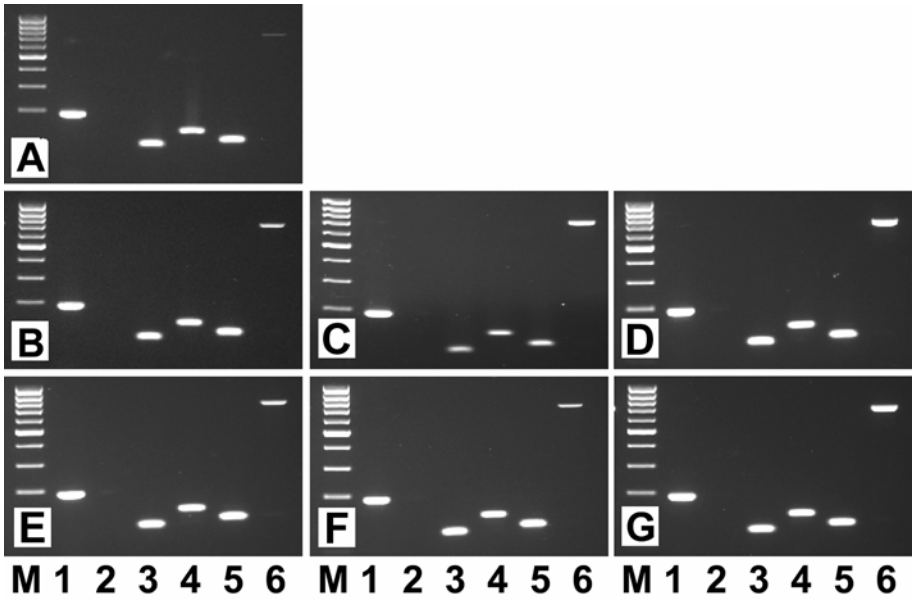


Abbildung 26: Semi-Quantitative Analyse der Kollagen-Expression unter verschiedenen Kulturbedingungen.
Genexpression von Kollagen Typ II (2), III (3), V (4), VI (5) und X (6) im Vergleich zu GADPH (1) von MSZ unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen. MSZ aus Monolayerkultur direkt vor Versuchsbeginn (A) und nach Einbringung in ein frei flotierendes Kollagen-Typ I-Gel bei Kultur für 14d in Basalmedium (B), Basalmedium+10ng/mL rhTGF-β1 (C), Basalmedium+10ng/mL rhPDGFbb (D), Basalmedium+10ng/mL rhBMP13 (E), osteogenem (F) oder adipogenem (G) Differenzierungsmedium. EtBr-gefärbte 2%ige Agarose-Gele.

Der zeitliche Verlauf der Kollagen Typ I-Expression wurde bestimmt. Um den Einfluss der Adhäsion auf die Matrixproduktion zu klären wurden in Vergleichsexperimenten MSZ vor und während der Kultivierung in Kollagen-Gelen mit einem Anti-β_1-Integrin-Antikörper inkubiert, der, wie oben gezeigt, die Adhäsion am Kollage-Gel verhinderte (je n=6). Die Kollagen Typ I-Expression wurde mittels „real time“-PCR relativ zum Zustand vor Experimentbeginn quantifiziert. Die Einbringung von MSZ in das Kollagen Typ I-Gel bewirkte keine signifikante Veränderung der Genexpression zelleigenen Kollagens vom Typ I. Nach 14tägiger Kultivierung war ein signifikanter Unterschied (p=0,002) zwischen den beiden Kultivierungsbedingungen (An- bzw. Abwesenheit von 10µg/mL Anti-β_1-Integrin-Antikörper) zu erkennen. Eine Kultivierung ohne Antikörper führte zu einer 2,6fachen Erhöhung der Kollagen I-Expression, wohingegen die Zugabe des Antikörpers eine 6,2fache Verringerung bewirkte (Abb. 27).

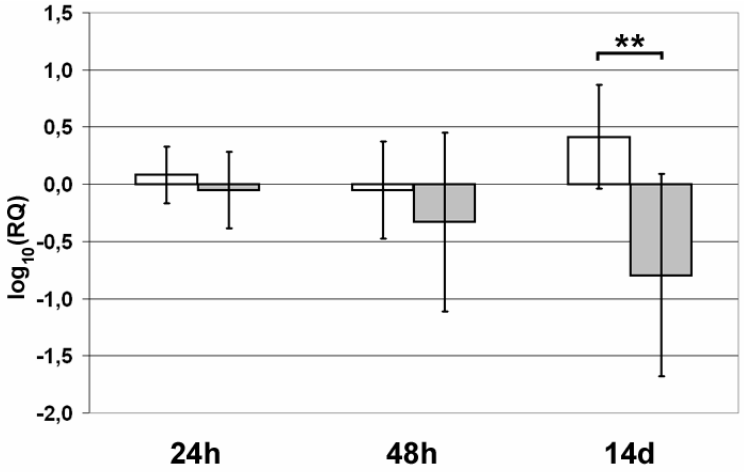


Abbildung 27: Relative Quantifizierung der Kollagen Typ I-Expression von MSZ in Kollagen-Gelen.
Gezeigt ist die Expression nach 24h, 48h und 14h bei Kultivierung in Basalmedium (weiße Balken) oder in Basalmedium + 10µg/mL Anti-β_1-Integrin-Antikörper (dunkle Balken) (n=6, MW±SD). Als endogene Kontrolle diente die GAPDH-Expression, als Kalibrator wurde die jeweilige cDNA aus zweidimensionaler Kultur direkt vor Versuchsansatz benutzt. ** signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ($p<0,01$).

Neben der relativen Quantifizierung von Kollagen Typ I, wurde eine semi-quantitative RT-PCR für die Kollagene vom Typ III, V, VI und X durchgeführt. Sowohl in der Monolayerkultur als auch im 3D-Kollagen-Gel wurden im Zeitraum von bis zu 14 Tage, die Kollagene vom Typ III, V und VI konstant exprimiert, unabhängig von der An- oder Abwesenheit eines Anti-β_1-Integrin-Antikörpers. Kollagen Typ X wird in der Monolayerkultur spenderabhängig nicht (n=2) oder nur schwach (n=4) exprimiert. Nach Einbringung und Kultur in ein Typ I-Kollagen-Gel, wurde die Expression induziert (n=2) oder deutlich verstärkt (n=4) – unbeeinflusst von der Anwesenheit des Integrin-β_1-Antikörpers (Abb. 28).

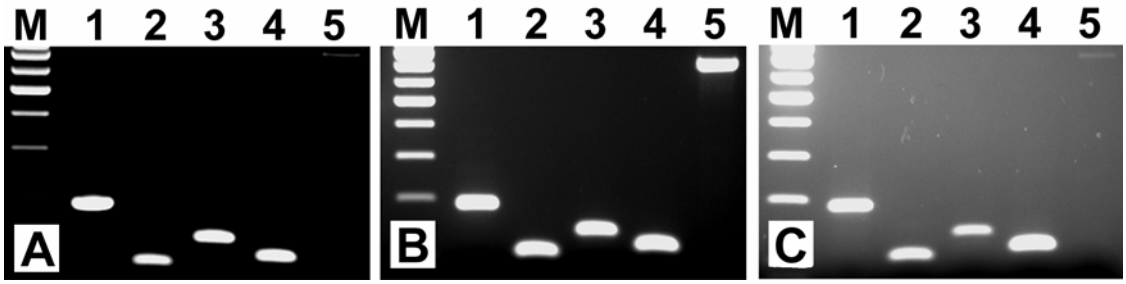


Abbildung 28: Semi-Quantitative Analyse der Kollagen-Expression unter verschiedenen Kulturbedingungen.
Genexpression von Kollagen Typ III (2), Typ V (3), Typ VI (4) und Typ X (5) im Vergleich zu GADPH (1) von MSZ unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen. MSZ aus Monolayerkultur direkt vor Versuchsbeginn (A) und nach Einbringung in ein frei flotierendes Kollagen-Typ I-Gel bei Kultur für 14d in Basalmedium (B) und Basalmedium+10µg/mL Anti-β_1-Integrin (C). EtBr-gefärbte 2%ige Agarose-Gele.

Der Einfluss uniaxialer Spannung auf die Kollagensynthese wurde für die Kollagene Typ I-VI und X semi-quantitativ mittels RT-PCR bestimmt. Die Kollagene I, III, V und VI wurden im Vergleich zur endogenen Referenz GAPDH konstant exprimiert, Kollagen Typ

II konnte nicht nachgewiesen werden. Die Expression von Kollagen Typ X wurde – wie in den frei flotierenden Gelen ebenfalls gezeigt – induziert bzw. heraufreguliert (Abb. 29).

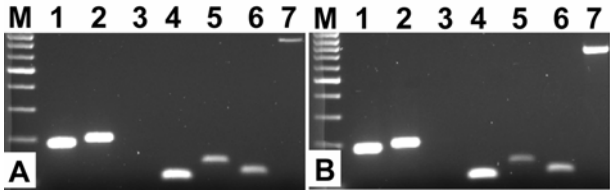


Abbildung 29: Semi-Quantitative Analyse der Kollagen-Expression.
Expression der Kollagene Typ I (2), II (3), III (4), V (5), VI (6) und X (7) und des Referenzgenes GAPDH (1) von MSZ vor Einbringung in ein statisch aufgespanntes Kollagen Typ-I-Geles (A) und nach Kultivierung für 14 Tage (B). EtBr-gefärbte 2%ige Agarose-Gele.

Um die Kollagen Typ I-Produktion bei Kultivierung von MSZ in PLLA-Konstrukten relativ zum Expressionsniveau vor Experimentbeginn abzuschätzen und diese mit der Expression bei vorhandenem exogenen Kollagen zu vergleichen, wurde die Expression dieses Hauptbestanteiles von Sehnen und Bändern mittels „real time"-PCR überprüft. Dabei zeigte sich, dass die Kultur in PLLA zu einer Reduktion der Kollagen I-Expression führt. Es wurde auf die Kultur der Konstrukte in Basalmedium, sowie in Anwesenheit von rhTGF-β1, rhPDGFbb, rhBMP13 oder Differenzierungsmedium eingegangen. Unter allen Kultivierungsbedingungen schwankte das Expressionsniveau um den Ausgangswert. Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p>0,05$) (Abb. 30).

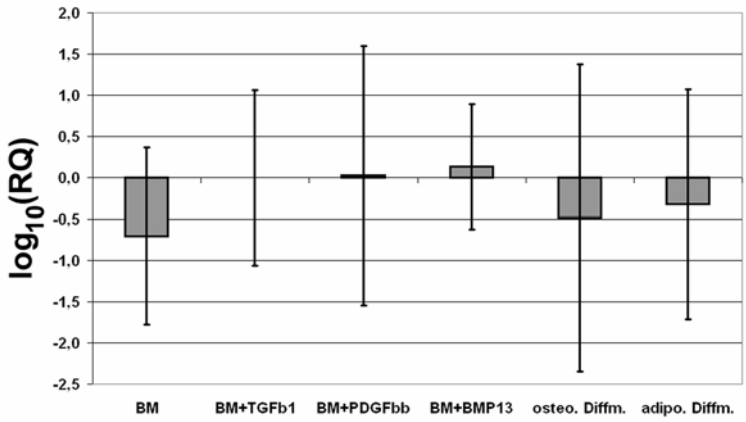


Abbildung 30: Relative Quantifizierung von Kollagen Typ I bei MSZ auf PLLA-Konstrukten.
Gezeigt ist die Expression bei Kultivierung für 14d in Basalmedium (BM), Basalmedium+10ng/mL rhTGF-β1 (BM+TGFb1), Basalmedium+10ng/mL rhPDGFbb (BM+PDGFbb), Basalmedium+10ng/mL rhBMP13 (BM+BMP13), osteogenem (ost. Diffm.) oder adipogenem (adipo. Diffm.) Differenzierungsmedium (n=6, MW±SD). Als endogene Kontrolle diente die 18s-rRNA-Expression, als Kalibrator die jeweilige cDNA aus zweidimensionaler Kultur direkt vor Versuchsansatz.

Die Auswertung der semi-quantitativen PCR der Kollagene vom Typ II, III, V, VI und X ergab zunächst keine Induktion von Kollagen Typ II und eine konstant starke Expression von Kollagen Typ III, V und VI. Die Auswertung der Ergebnisse für Kollagen Typ X zeigten eine deutliche Steigerung für eine Kultivierung der MSZ auf PLLA in Anwesenheit

von 10ng/mL rhTGF-β1. Dieser Effekt war ausschließlich für diese Kultivierungsbedingung zu finden. In allen weiteren Ansätzen wurde Kollagen Typ X im Gegensatz zur Kultur von MSZ in Kollagen-Matrices nicht durch die zweiwöchige Kultivierung auf dem dreidimensionalen PLLA-Konstrukt moduliert (Abb. 31).

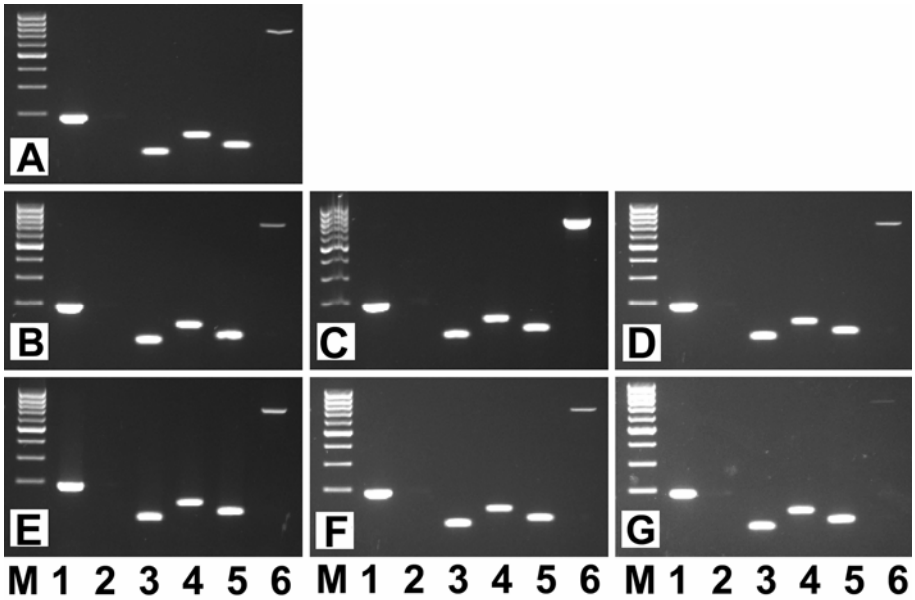


Abbildung 31: Semi-Quantitative Auswertung der Kollagen-Expression.
Expression von Kollagen Typ II (2), Typ III (3), Typ V (4), Typ VI (5) und Typ X (6) im Vergleich zu GADPH (1) von MSZ unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen. MSZ aus Monolayerkultur direkt vor Versuchsbeginn (A) und nach Aufbringung auf ein 3D-PLLA-Konstrukt bei Kultur für 14d in Basalmedium (B), Basalmedium+10ng/mL rhTGF-β1 (C), Basalmedium+10ng/mL rhPDGFbb (D), Basalmedium+10ng/mL rhBMP13 (E), osteogenem (F) oder adipogenem (G) Differenzierungsmedium. EtBr-gefärbte 2%ige Agarose-Gele.

Analog zur Bestimmung in Kollagen-Gelen wurde der Zeitverlauf der Expression von Kollagen Typ I und die Beeinflussung durch Anti-β_1-Integrin ebenfalls relativ quantifiziert. Auch hier zeigte sich eine deutlich schwächere Kollagen Typ I-Expression auf PLLA-Matrices im Vergleich zur Kultur in Kollagen-Matrices unter beiden Versuchsbedingungen (An- und Abwesenheit des Antikörpers). Des Weiteren bestätigte sich die weitere Abschwächung der Kollagen Typ I-Expression durch Anti-β_1-Integrin. Der Unterschied des Expressionsniveaus zwischen den beiden Kultivierungsbedingungen ist sowohl nach 48h ($p=0,023$) als auch nach 14 Tagen ($p=0,027$) statistisch signifikant. Es wurden jedoch keine statistisch signifikanten Veränderungen der Expression über die Zeit gefunden ($p>0,05$).

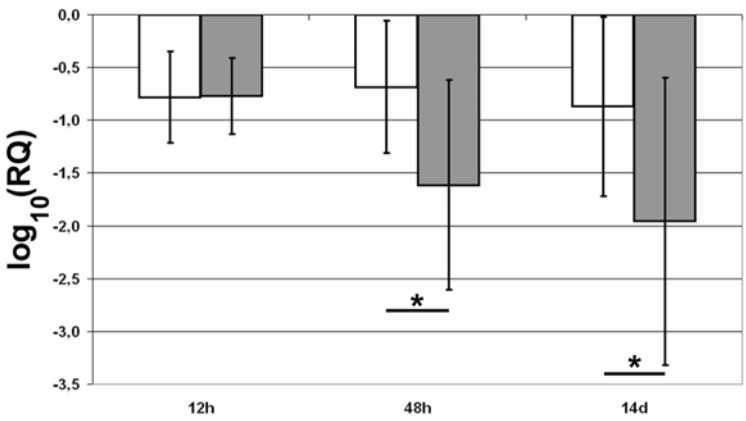


Abbildung 32: Relative Quantifizierung von Kollagen Typ I bei MSZ auf PLLA-Matrices.
Gezeigt ist die Expression nach 24h, 48h und 14h bei Kultivierung in Basalmedium (weiße Balken) oder in Basalmedium + 10µg/mL Anti-$_1$-Integrin-Antikörper (dunkle Balken) (n=6, MW±SD). Als endogene Kontrolle diente die 18s-rRNA-Expression, als Kalibrator wurde die jeweilige cDNA aus zweidimensionaler Kultur direkt vor Versuchsansatz (t=0) benutzt. * statistisch signifikante Unterschiede ($p<0,05$).

Die Kollagene vom Typ II, III, V, VI und X wurden mittels semi-quantitativer RT-PCR evaluiert. Die Expression von Kollagen Typ II konnte in keinem Fall detektiert werden, die Kollagene Typ III, V und VI wurden konstant exprimiert. Kollagen Typ X war vor der Aufbringung auf die PLLA-Matrices nicht bis wenig vorhanden. Nach 14tägiger Kultivierung ohne Antikörper blieb die Expression relativ konstant. Die Zugabe des Antikörpers gegen β_1-Integrin verringerte eine vorhandene Expression dieses Kollagens Typ X.

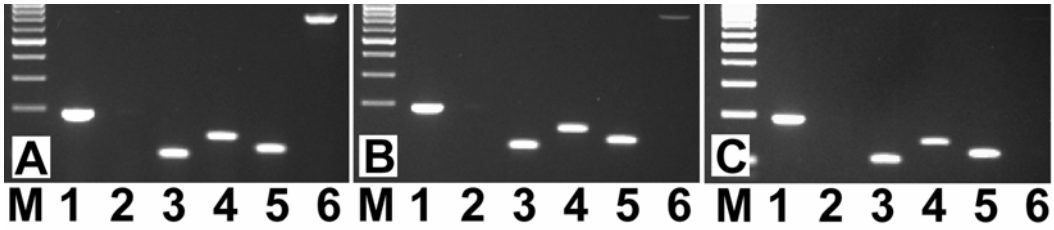


Abbildung 33: Semi-Quantitative Auswertung der Kollagen-Expression.
Expression von Kollagen Typ II (2), Typ III (3), Typ V (4), Typ VI (5) und Typ X (6) im Vergleich zu GADPH (1) von MSZ auf PLLA-Konstrukten unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen. MSZ aus Monolayerkultur direkt vor Versuchsbeginn (A) und nach Kultur für 14d in Basalmedium (B) und Basalmedium+10µg/mL Anti-β_1-Integrin (C). EtBr-gefärbte 2%ige Agarose-Gele.

Als Ergänzung zu den Genexpressionsstudien wurde die Expression der Kollagene I, III und X i Kollagen-Gelen auch auf Proteinebene mittels immunhistochemischer Färbung von Paraffinschnitten der verschiedenen Konstrukte untersucht.
Wurden MSZ für 14 Tage in Basalmedium kultiviert, konnte die Expression von Kollagen Typ I deutlich vor allem in den Zellsomata und perizellulär detektiert werden (Abb. 34a). Die Expression von Kollagen Typ III ist ebenfalls mittels immunhistochemischer Färbung nachweisbar (Abb. 34b). Kollagen Typ X konnte auf Proteinebene nicht nachgewiesen

werden (Abb. 34c). Eine Kultivierung der Konstrukte in Anwesenheit von rhTGF-β1, rhPDGFbb, rhBMP13 oder Differenzierungsmedium erzeugte analoge Ergebnisse. Die Kultivierung in Anwesenheit von Anti-β_1-Integrin zeigte zunächst – wie in den H&E-Färbungen bereits gesehen eine dazu unterschiedliche Zellmorphologie und lockere Matrix-Struktur. Kollagen Typ I konnte dennoch stark und ebenfalls vor allem in den Zellsomata angefärbt werden (Abb. 34d). Kollagen Typ III war schwächer als bei Abwesenheit des Antikörpers (Abb. 34e), Kollagen Typ X ebenso nicht nachweisbar (Abb. 34f).

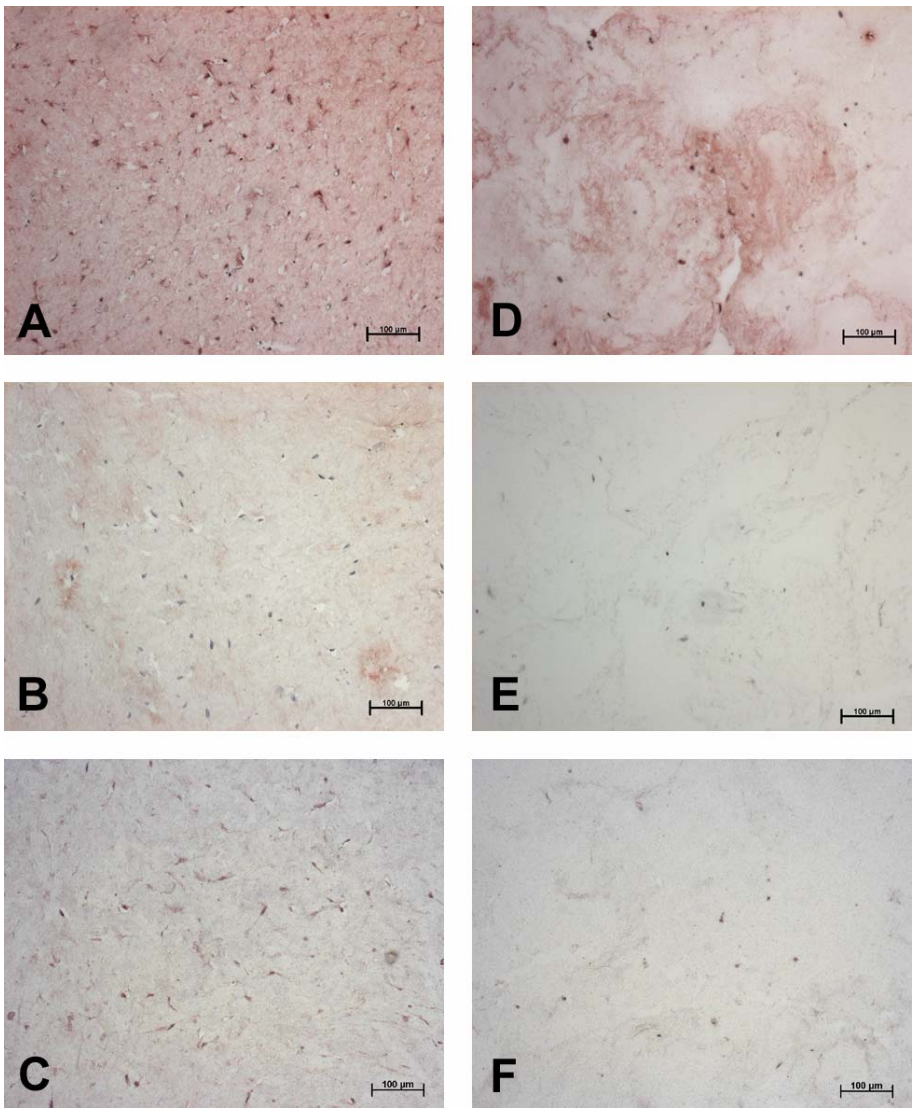


Abbildung 34: Immunhistochemische Färbungen von Kollagen.
Färbung von Kollagen Typ I (A, D), Typ III (B, E) und Typ X (C, F) von frei flotierenden MSZ-besiedelten Kollagen-Typ I-Konstrukten nach 14 Tagen Kultur in Abwesenheit (A-C) und Anwesenheit (D-F) von 10 µg/mL Anti-β1-Integrin-Antikörper.

Wie sich in immunhistochemischen Färbungen zeigte, hatte eine uniaxiale Aufspannung MSZ-besiedelter Kollagen-Gele während der Kultur für 14 Tage keinen Einfluss auf die

Kollagen Typ I, III und X-Expression. Es zeigte sich wie in den frei flotierenden Kollagen-Gelen eine deutliche Positivität bei der Färbung von Kollagen Typ I und etwas schwächere für Kollagen Typ III. Kollagen Typ X konnte nicht detektiert werden (Abb. 35).

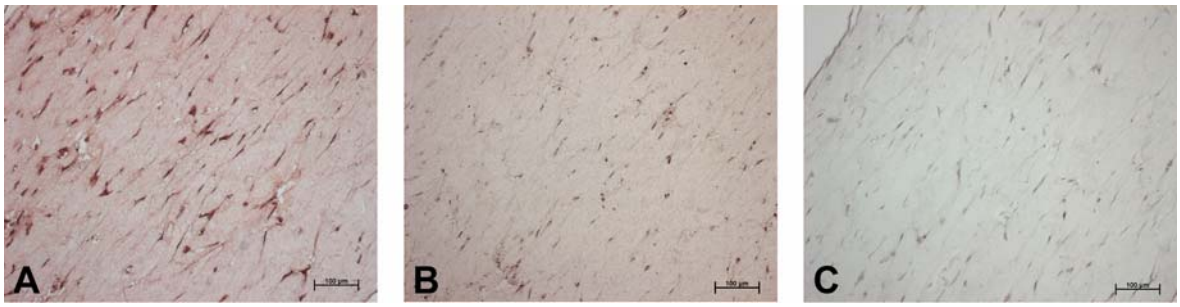


Abbildung 35: Immunhistologische Färbungen an zellbesiedelten, statisch aufgespannten Kollagen-Gelen.
Färbung von Kollagen Typ I (A), Kollagen Typ III (B) und Kollagen Typ X (C) nach Kultivierung der Konstrukte für 14d. Längenstandard: 100µm.

Immunhistochemische Färbungen an Paraffinschnitten von PLLA-Konstrukten wurden analog zu den zellbesiedelten Kollagen-Gelen durchgeführt. Wie auch in den Kollagen-Gelen beobachtet, zeigte sich eine deutlich positive Färbung von Kollagen Typ I bei Kultivierung der Konstrukte in Basalmedium (Abb. 36a). Die Färbungen an Präparaten, welche in Anwesenheit von rhTGF-β1, rhPDGFbb, rhBMP13 oder Differenzierungsmedium kultiviert wurden, unterschieden sich hiervon nicht. Bei Kultivierung in Anwesenheit von Anti-β_1-Integrin kam es zu einer geringeren Menge an immunologisch reagierender extrazellulärer Matrix, als in Abwesenheit des Antikörpers. Die Zell-morphologischen Unterschiede, die in der phasenkontrastmikroskopischen Aufnahme zu erkennen waren (Abb. 36a und d), bestätigen sich hier. Die Zellen erschienen in Abwesenheit des Antikörpers elongiert und bildeten Netzwerke, wohingegen die Anwesenheit des Antikörpers nach 14 Tagen zu einer abgekugelten Zellmorphologie führte.

Kollagen Typ III wurde bei Kultivierung in Basalmedium, genauso wie in Anwesenheit von rhTGF-β1, rhPDGFbb, rhBMP13 oder Differenzierungsmedium deutlich schwächer detektiert als Kollagen Typ I (Abb. 36b). Die Abschwächung war noch ausgeprägter, wenn die Zellen in Anwesenheit von Anti-β_1-Integrin (Abb. 36e) kultiviert wurden. Kollagen Typ III war unter dieser Kulturbedingung ausschließlich in den Zellsomata nachzuweisen. Kollagen Typ X konnte in keinem der Präparate nachgewiesen werden (Abb. 36c und f).

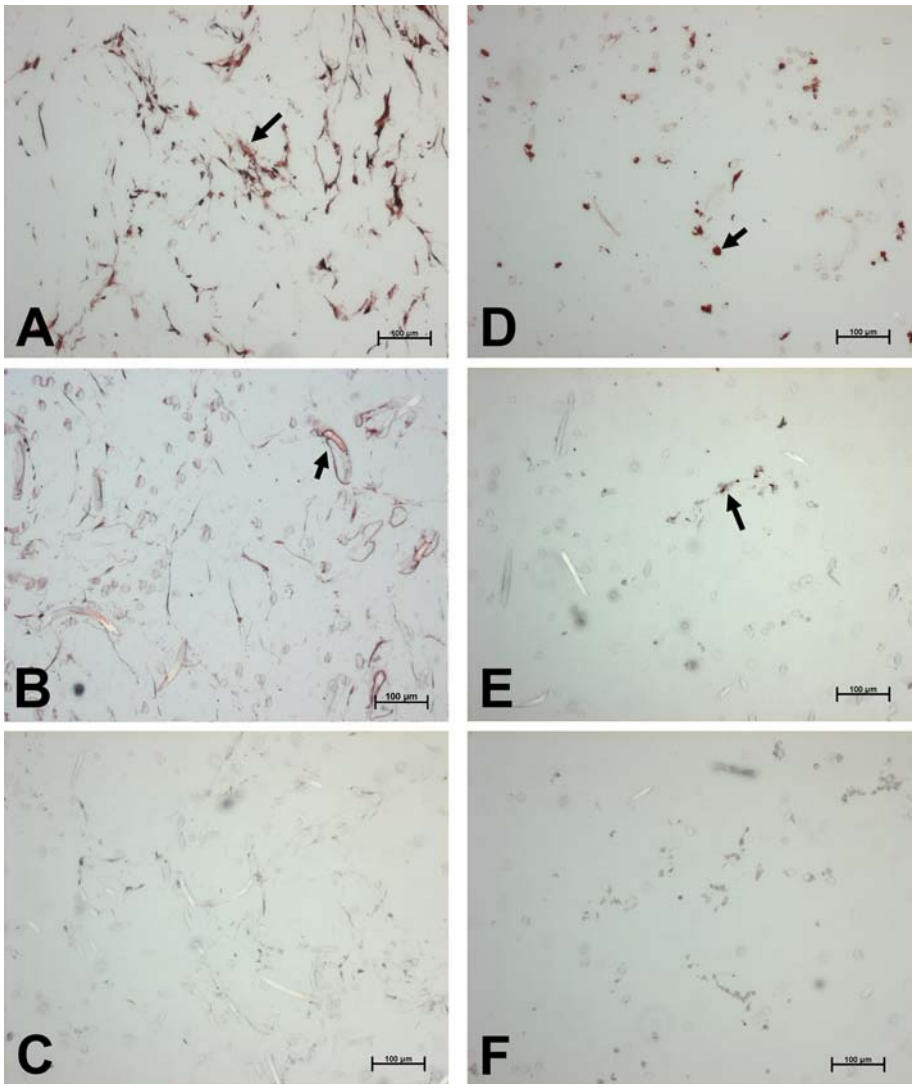


Abbildung 36: Immunhistochemische Färbungen von Kollagen.
Färbung von Kollagen Typ I (A, D), Typ III (B, E) und Typ X (C, F) von frei flotierenden MSZ-besiedelten Kollagen-Typ I-Konstrukten nach 14 Tagen Kultur in Abwesenheit (A-C) und Anwesenheit (D-F) von 10 µg/mL Anti-β1-Integrin-Antikörper.

3.3.2 Nicht-kollgagene Matrixmoleküle

Neben den Kollagenen spielen in Sehnen und Bändern die Gruppen der Proteoglykane und Glykoproteine als Struktur- und strukturierende Proteine eine wichtige Rolle. Deshalb wurde eine Untersuchung einer Reihe dieser Moleküle auf Gen- und Proteinexpressionsebene in diese Arbeit einbezogen.

Zunächst gab eine Alzianblau-Färbung bei pH 2,5 der Karboxyl- und Sulfatgruppen saurer Mukopolysaccharide einen Aufschluss über deren Anwesenheit in den verschiedenen Konstrukten. Die Alzianblau-Färbung wurde an frei flotierenden Kollagen-Gelen durchgeführt, die sowohl in Basalmedium, als auch in Anwesenheit von rhTGF-β1, rhPDGFbb, rhBMP13, Differenzierungsmedium oder Anti-β_1-Integrin kultiviert wurde. Drüber hinaus

wurden statisch aufgespannte Kollagen-Gele mit dieser Methode gefärbt. Dabei zeigte sich unter allen Kultivierungsbedingungen eine leichte Blaufärbung der Konstrukte. Abb. 37 zeigt eine beispielhafte Färbung eines frei flotierenden Kollagen-Geles, welches in Basalmedium kultiviert wurde, eines, welches in Anwesenheit des Antikörpers kultiviert wurde und ein statisch aufgespanntes Präparat. Die Ergebnisse für die weiteren Kulturbedingungen wurden als äquivalent zu 38a gefunden.

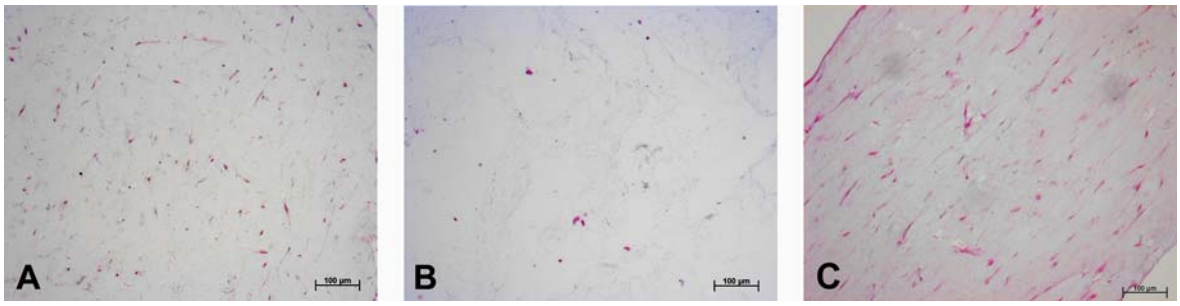


Abbildung 37: Alzianbau-Färbung von Kollagen-Gelen bei pH 2,5.
MSZ nach 14 Tagen Kultur in einem frei flotierenden Kollagen Typ I-Gel in Abwesenheit (A) und Anwesenheit (B) von 10 µg/mL Anti-β1-Integrin-Antikörper.

Um die Proteindeposition saurer Mukopolysaccharide bei MSZ in PLLA-Konstrukten sichtbar zu machen, wurden diese ebenfalls mit Alzianblau bei pH 2,5 gefärbt. Diese Methode ergab keine Färbung neu gebildeter Matrix. Die sichtbare Färbung war dadurch bedingt, dass das Alzianblau scheinbar mit den Faserquerschnitten interagierte und das PLLA daher blau schimmernd erschien. Abb. 38 zeigt beispielhafte Färbungen Die Ergebnisse für die Kultur in Anwesenheit von rhTGF-β1, rhPDGFbb, rhBMP13 oder Differenzierungsmedium wurden als äquivalent zu 39a gefunden.

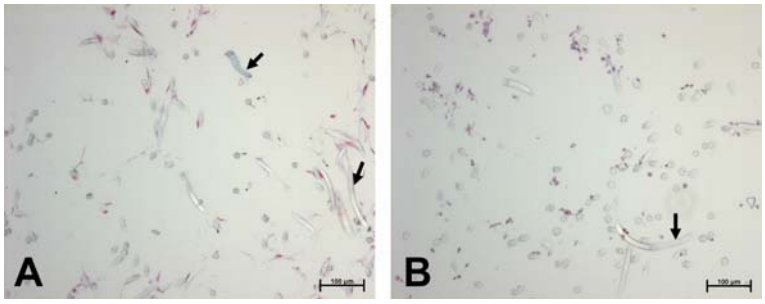


Abbildung 38: Alzianbau-Färbung von PLLA-Konstrukten bei pH 2,5.
MSZ nach 14 Tagen Kultur auf einem 3D-PLLA-Konstrukt in Abwesenheit (A) und Anwesenheit (B) von 10 µg/mL Anti-β1-Integrin-Antikörper. Pfeile weisen beispielhaft auf angefärbte PLLA-Fasern.

Die Expression von Proteoglykanen und Glykoproteinen wurde näher bestimmt, indem auf einige Vertreter dieser Gruppen, welche in Sehnen und Bändern vorkommen näher eingegangen wurde. Dabei wurde vor allem die Expression des für elastische Gewebe relevanten Tenascin-C sowohl auf Gen- als auch auf Proteinexpressionsebene eingegangen. Ergän-

zend wurde die Genexpression von Decorin, Tenomodulin, Fibromodulin, Biglykan Versikan, Lumikan, Fibronektin-1, Elastin und eines in Sehnen nachgewiesenen Transkriptionsfaktors (Scleraxis) semi-quantitativ mittels RT-PCR bestimmt.

Bei Kultivierung von MSZ in Kollagen-Gelen für 14 Tage in Basalmedium wurde in einer ersten Versuchsreihe eine Erhöhung der Tenascin-C-Expression auf den 1,5-fachen Ausgangswert vor Versuchbeginn gefunden. Diese Erhöhung zeigte sich auch bei Kultivierung der Kollagen-Gele in Anwesenheit von rhTGF-β1, rhPDGFbb, rhBMP13 oder Differenzierungsmedium. Sie war signifikant stärker, wenn rhBMP13 zum Basalmedium zugegeben wurde ($p<0,05$) bzw. die Konstrukte in adipogenem Differenzierungsmedium kultiviert wurden ($p<0,01$) (Abb. 39). Der Einfluss der statischen Spannung von MSZ-besiedelten Kollagen-Gelen auf die Tenascin-C-Expression wurde nur semiquantitativ mittels RT-PCR und Auftragung auf 2%ige Agarosegele bestimmt (Abb. 43). Es konnte keine Regulation dieses Genes nachgewiesen werden.

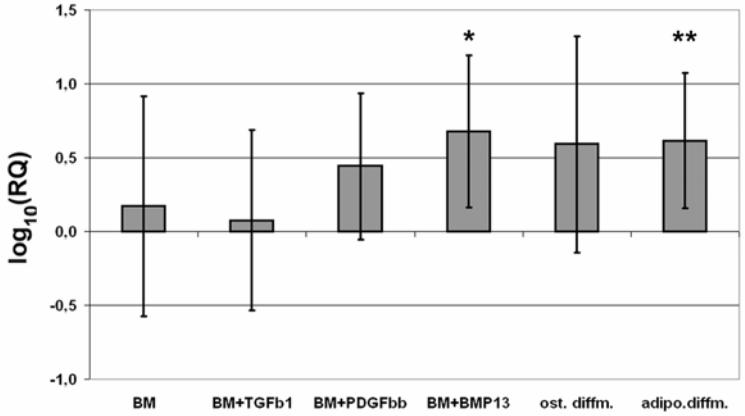


Abbildung 39: Relative Quantifizierung der Tenascin-C-Expression bei MSZ in Kollagen-Gelen.
Gezeigt ist die Expression bei Kultivierung für 14d in Basalmedium (BM), Basalmedium+10ng/mL rhTGF-β1 (BM+TGFb1), Basalmedium+10ng/mL rhPDGFbb (BM+PDGFbb), Basalmedium+10ng/mL rhBMP13 (BM+BMP13), osteogenem (ost. Diffm.) oder adipogenem (adipo. Diffm.) Differenzierungsmedium (n=6, MW±SD). Als endogene Kontrolle diente die GAPDH-Genexpression, als Kalibrator wurde die jeweilige mRNA aus zweidimensionaler Kultur direkt vor Versuchsansatz benutzt. * signifikant ($p<0,05$)** hoch signifikant ($p<0,01$).

In einer weiteren Versuchsreihe wurde auf den zeitlichen Verlauf der Tenascin-C-Expression eingegangen und der Einfluss der Kontraktion durch Gabe von Anti-β_1-Integrin untersucht. Die Expression von Tenascin-C stieg bereits nach 48h um das 5fache an ($p=0,00002$ bezogen auf den 24h-Wert) und nach 14 Tagen konnte eine im Vergleich zum 24h-Wert 10fach erhöhte Expression nachgewiesen werden ($p=0,0002$). Im Vergleich zum 48h-Wert zeigte sich eine Verdopplung der Tenascin-C-Expression ($p=0,02$). Diese Erhöhung wurde durch die Zugabe von 10µg/mL Anti-β_1-Integrin-Antikörper während der Kultivierung inhibiert. Nach 14tägiger Kultivierung unterschied sich die Veränderung der Te-

nascin-C-Expression der beiden Kultivierungsbedingungen auf einem hochsignifikanten Niveau (p=0,0003) (Abb. 40).

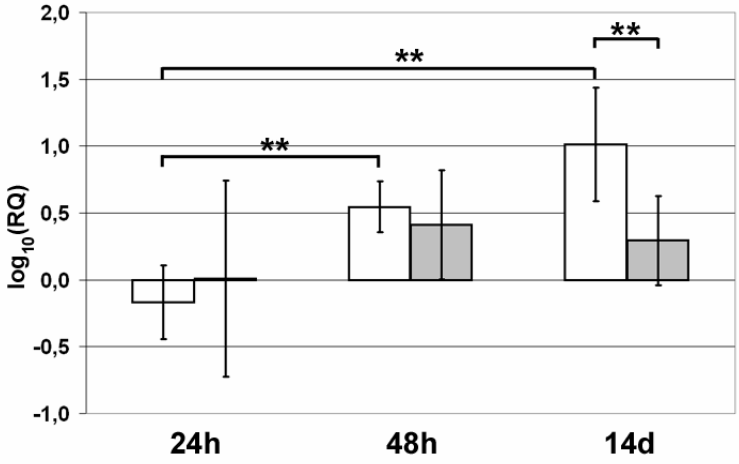


Abbildung 40: Relative Quantifizierung der Tenascin-C-Expression von MSZ in Kollagen-Gelen.
Gezeigt ist die Expression nach 24h, 48h und 14h bei Kultivierung in Basalmedium (weiße Balken) oder in Basalmedium + 10µg/mL Anti-β1-Integrin-Antikörper (dunkle Balken) (n=6, MW±SD). Als endogene Kontrolle diente die GAPDH-Genexpression, als Kalibrator wurde die jeweilige mRNA aus zweidimensionaler Kultur direkt vor Versuchsansatz benutzt. ** gibt hoch signifikante Unterschiede (p<0,01).

Die unterschiedlich starke Tenascin-C-Expression, die auf cDNA-Ebene gefunden wurde, spiegelte sich auch auf Proteinebene wider. Nach 14tägiger Kultivierung von MSZ in Kollagen-Gelen, ist eine starke Tenascin-C-Expression nachweisbar, wenn die Gele in Basalmedium respektive in Anwesenheit von rhTGF-β1, rhPDGFbb, rhBMP13 oder Differenzierungsmedium kultiviert wurden (Abb. 41a für Basalmedium). Auch statisch aufgespannte Kollagen-Gel-Konstrukte zeigten eine positive Tenascin-C-Färbung (Abb. 41b). Die positive Färbung ging bei Zugabe von 10µg/mL Anti-β_1-Integrin-Antikörper zum Basalmedium nahezu vollständig verloren (Abb. 41c).

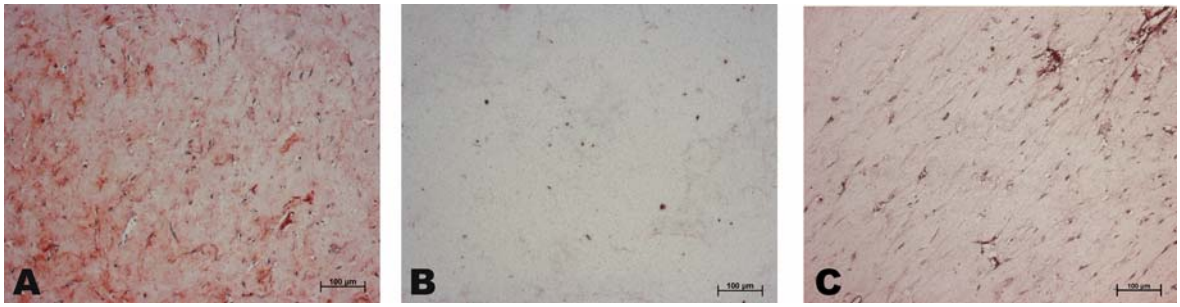


Abbildung 41: Immunhistochemische Färbung von Tenascin-C.
Paraffinschnitte von mit MSZ besiedelten, frei-flotierenden Kollagen-Gel-Konstrukten nach 14tägiger Kultivierung in Abwesenheit (A) oder Anwesenheit (B) von 10 µg/mL Anti-β1-Integrin-Antikörper und von zellbesiedelten, uniaxial aufgespannten Kollagenringen, die ohne Antikörper kultiviert wurden (C). Tenascin-C Protein konnte in relevanten Mengen nur in Abwesenheit des Antikörpers detektiert werden.

Neben Tenascin-C wurden weitere Komponenten (Decorin, Tenomodulin, Fibromodulin, Biglykan Versikan, Lumikan, Fibronektin-1 und Elastin) aus der Gruppe der Proteoglyka-

ne und Glykoproteine mittels semi-quantitativer RT-PCR untersucht. Es konnten alle untersuchten Transkripte in der PCR nachgewiesen werden (wobei Tenomodulin an der Detektionsgrenze lag). Es ergaben sich durch die oben dargestellten Kultivierungsbedingungen der Kollagen-Gel-Konstrukte keine Unterschiede im Expressionsmuster im Vergleich zur 2D-Zellkultur (Abb. 42 und Abb. 43 zeigen beispielhaft repräsentative Agarosegele). Lediglich die Expression von Elastin scheint durch die Kultivierung von MSZ in frei flottierenden Kollagen-Gelen leicht herabreguliert zu sein. Ein Nachweis der Expression des Transkriptionsfaktors Scleraxis, welcher die Expression von Tenomodulin reguliert, gelang zu keiner Zeit des Beobachtungszeitraumes.

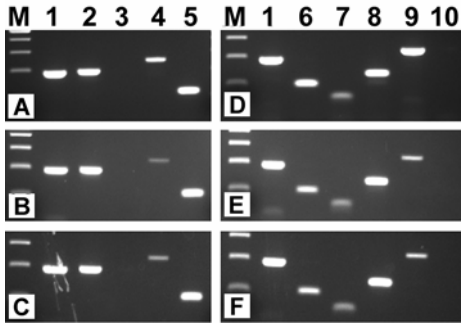


Abbildung 42: Semi-Quantitative Auswertung der Proteoglykan und Glykoprotein-Expression.
Expression von von Decorin (2), Tenomodulin (3), Fibromodulin (4), Biglycan (5), Versikan (6), Lumikan (7), Fibronektin-1 (8), Elastin (9) und Scleraxis (10) im Vergleich zu GADPH (1) von MSZ unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen. MSZ aus Monolayerkultur direkt vor Versuchsbeginn (A und D) und nach Einbringung in ein frei flotierendes Kollagen-Typ I-Gel bei Kultur für 14d in Basalmedium (B und E) im Vergleich zu Basalmedium+10µg/mL Anti-β_1-Integrin (C und F). EtBr-gefärbte 2%ige Agarose-Gele.

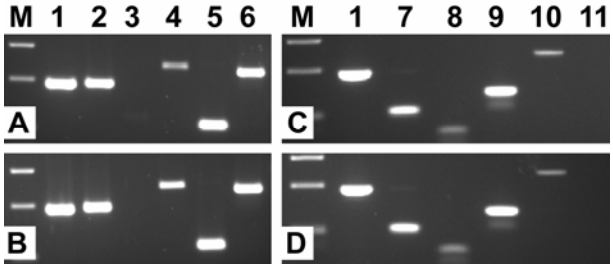


Abbildung 43: Semi-Quantitative Auswertung der Proteoglykan und Glykoprotein-Expression.
Expression von GAPDH (1), Decorin (2), Tenomodulin (3), Fibromodulin (4), Biglycan (5), Tenascin-C (6), Versikan (7), Lumican (8), Fibronektin-1 (9), Elastin (10) und Scleraxis (11) von MSZ vor Einbringung in ein statisch aufgespanntes Kollagen Typ-I-Geles (A und C) und nach Kultivierung für 14 Tage (B und D). EtBr-gefärbte 2%ige Agarose-Gele.

Nachdem gezeigt wurde, dass MSZ bei ausreichender Adhäsionsmöglichkeit und damit verbundener Kontraktion von Kollagen-Gelen die Expression von Tenascin-C erhöhen, wurde die Expression dieses Gens auf den relativ starren PLLA-Matrices unter allen oben genannten Kultivierungsbedingungen untersucht. Dabei zeigte sich eine Verminderung der Tenascin-C-Expression auf etwa 1/40 des Wertes in der 2D-Kultur durch Einbringung und Kultur in einem 3D-PLLA-Konstrukt. Diese Verminderung war bei Anwesenheit von

rhTGF-β1, rhPDGFbb, rhBMP13 oder Differenzierungsmedium stärker, aufgrund der hohen Spendervariabilität jedoch nicht statistisch signifikant unterschiedlich zur Kultur in Basalmedium (p>0,05; jeweils n=6).

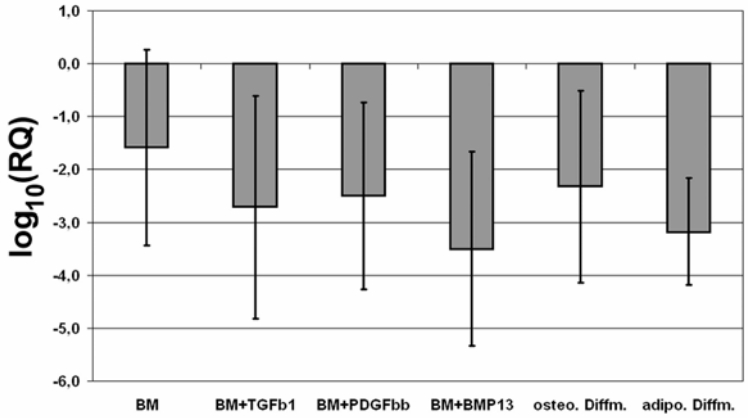


Abbildung 44: Relative Quantifizierung der Teanscin-C-Genexpression von MSZ auf PLLA-Konstrukten.
Gezeigt ist die Expression bei Kultivierung für 14d in Basalmedium (BM), Basalmedium+10ng/mL rhTGF-β1 (BM+TGFb1), Basalmedium+10ng/mL rhPDGFbb (BM+PDGFbb), Basalmedium+10ng/mL rhBMP13 (BM+BMP13), osteogenem (ost. Diffm.) oder adipogenem (adipo. Diffm.) Differenzierungsmedium (n=6, MW±SD). Als endogene Kontrolle diente die 18s-rRNA-Expression, als Kalibrator wurde die jeweilige cDNA aus zweidimensionaler Kultur direkt vor Versuchsansatz benutzt. Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Es konnte in einer weiteren Versuchsreihe gezeigt werden, dass die Verminderung der Tenascin-C-Expression durch Transfer von MSZ aus der 2D-Zellkultur in eine 3D-PLLA Matrix innerhalb von 12h stattfindet und dann konstant bleibt. Diese Regulation war auch unabhängig von der Anwesenheit des Antikörpers gegen β_1-Integrin (Abb. 45).

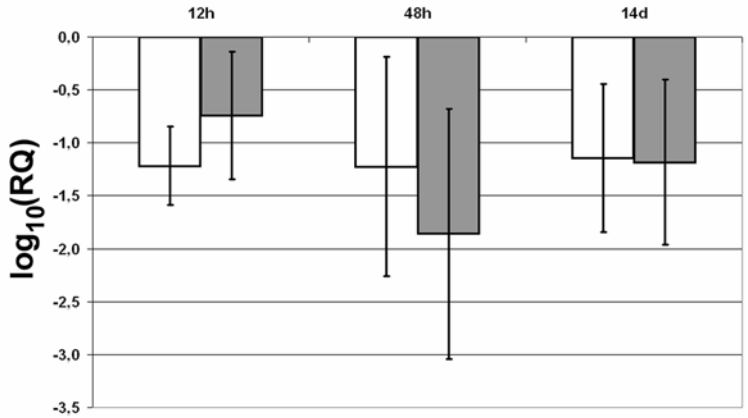


Abbildung 45: Relative Quantifizierung von Tenascin-C bei MSZ auf PLLA-Matrices.
Gezeigt ist die Expression nach 24h, 48h und 14h bei Kultivierung in Basalmedium (weiße Balken) oder in Basalmedium + 10µg/mL Anti-β_1-Integrin-Antikörper (dunkle Balken) (n=6, MW±SD). Als endogene Kontrolle diente die 18s-rRNA-Expression, als Kalibrator wurde die jeweilige cDNA aus zweidimensionaler Kultur direkt vor Versuchsansatz benutzt. Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Die immunhistochemische Färbung von Tenascin-C ergab an Schnitten von Konstrukten nach 14d Kultur eine schwache Positivität. Diese erstreckte sich bei Konstrukten, die in

Basalmedium, sowie in Anwesenheit von rhTGF-β1, rhPDGFbb, rhBMP13 oder Differenzierungsmedium kultiviert wurden, auf das gesamte Präparat, und war sowohl um die Fasern als auch Faser-übergreifend zu finden. In Konstrukten, die in Anwesenheit des Antikörpers kultiviert wurden, konnten kleine positive Areale gefunden werden (Abb. 46).

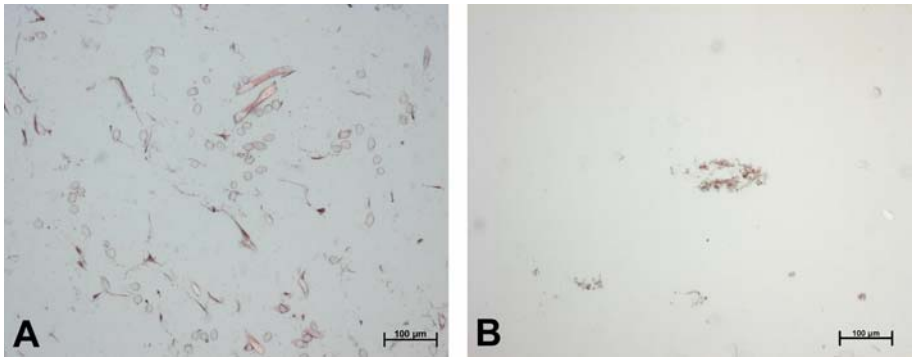


Abbildung 46: Immunhistochemische Färbung von Tenascin-C.
Paraffinschnitte von mit MSZ besiedelten PLLA-Konstrukten nach 14tägiger Kultivierung in Abwesenheit (A) oder Anwesenheit (B) von 10 µg/mL Anti-β1-Integrin-Antikörper. Tenascin-C Protein konnte in relevanten Mengen nur in Abwesenheit des Antikörpers detektiert werden.

Die semiquantitative Bestimmung von Decorin, Fibromodulin, Biglycan, Versikan, Lumikan, Fibronektin-1 und Elastin ergab durch die Kultur in PLLA, analog zu den Ergebnissen im Kollagen-Gel, keine Veränderung der Expression dieser Gene (Abb. 47). Bei einigen Ansätzen (n=2) konnte vor Versuchbeginn eine schwache Expression sowohl von Scleraxis, als auch von Tenomodulin gefunden werden (Abb. 47a). Diese geringe Expression ging in allen Fällen bei der Kultivierung auf PLLA nach 14d verloren, unabhängig von der Anwesenheit des Antikörpers.

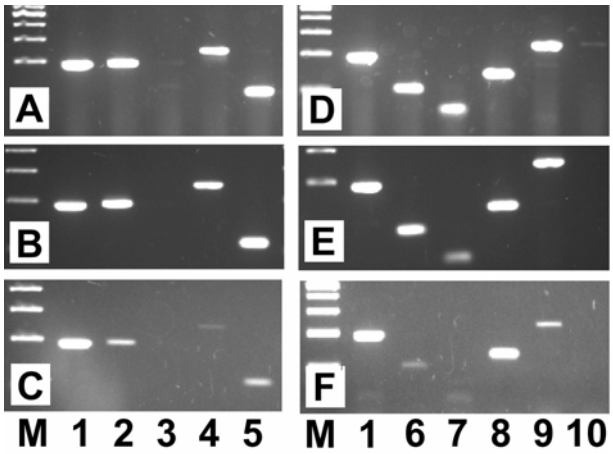


Abbildung 47: Semi-Quantitative Auswertung der Proteoglykan und Glykoprotein-Expression.
Expression von Decorin (2), Tenomodulin (3), Fibromodulin (4), Biglycan (5), Versikan (6), Lumikan (7), Fibronektin-1 (8), Elastin (9) und Scleraxis (10) im Vergleich zu GADPH (1) von MSZ unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen. MSZ aus Monolayerkultur direkt vor Versuchsbeginn (A und D) und nach Aufbringung auf ein 3D-PLLA-Konstrukt bei Kultur für 14d in Basalmedium (B und E) im Vergleich zu Basalmedium+10µg/mL Anti-β_1-Integrin (C und F). EtBr-gefärbte 2%ige Agarose-Gele.

3.4 Matrix-Anheftung über Integrine

Die Expression der adhäsions-vermittelnden Integrine wurde untersucht. Hierzu wurden die kollagen-bindenden Untereinheiten α_1, α_2 und β_1, sowie die Laminin 5-bindende Untereinheit α_3 betrachtet. Alle drei α-Untereinheiten können mit der Integrin-Untereinheit β_1 dimerisieren und ein Integrin-Heterodimer bilden.

3.4.1 Integrin-Expression von MSZ in Kollagen-Gelen

Es wurde der Einfluss der Einbringung von MSZ in ein Kollagen-Gel einerseits und die Wirkung von rhTGF-β1, rhPDGFbb, rhBMP13, osteogenem oder adipogenem Differenzierungsmedium andererseits auf die Expression der Integrinrezeptoren erfasst. MSZ in Monolayer auf Zellkulturplastik exprimierten die Integrin-Untereinheiten α_1, α_2, α_3 und β_1 (Abb. 48a). Es wurde gezeigt, dass die Integrin-Untereinheit β_1 nach 14täger Kultivierung unter allen Kultivierungsbedingungen kaum verändert exprimiert wird. Im Vergleich zur Basalmedium-Kontrolle zeigt sich jedoch eine signifikant stärkere Expression bei Zugabe von rhBMP13 ($p<0,01$) und bei Kultur mit adigogenem und osteogenem Differenzierungsmedium. Für die Integrin-Untereinheiten α_1 und α_3 ist ein ähnliches Muster nachweisbar. Einzig die Kultivierung in adipogenem Differenzierungsmedium resultiert nicht in einer signifikant unterschiedlichen Expression im Vergleich zur Basalmediumkontrolle. Integrin-α_2 wird unter allen Kultivierungsbedingungen etwa 10fach erhöht transkribiert.

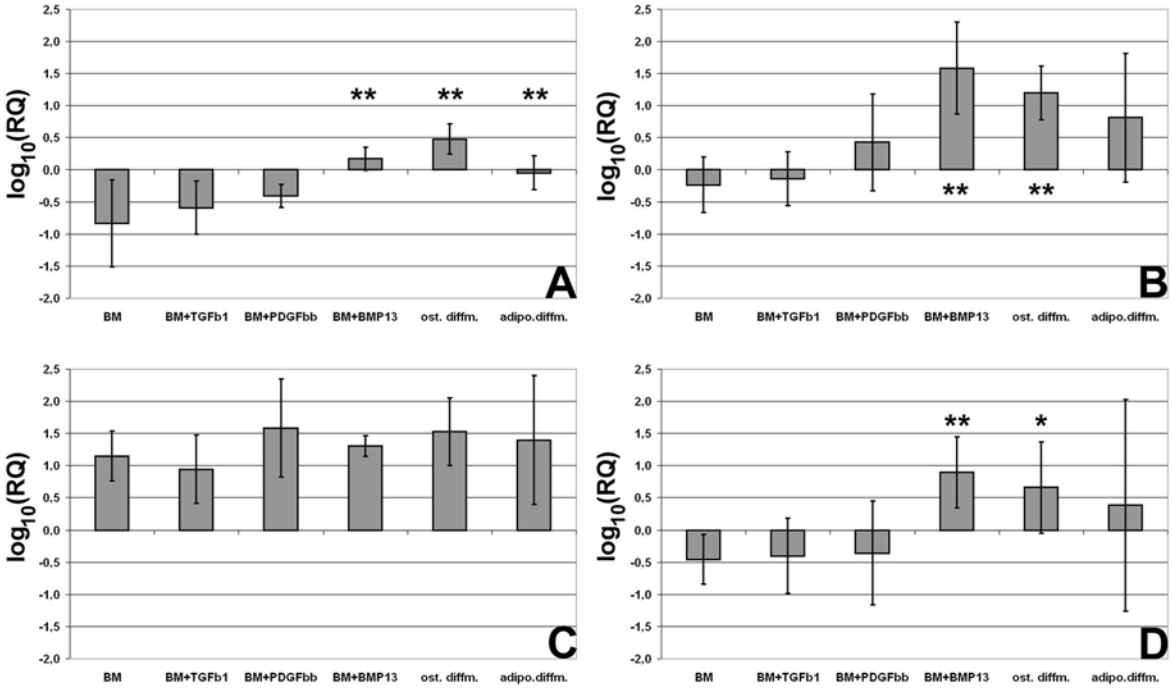


Abbildung 48: Relative Quantifizierung der Integrin-Untereinheiten von MSZ in Kollagen-Gelen. Expression von Integrin β_1 (A), α_1 (B), α_2 (C) und α_3 (D) bei MSZ in Kollagen Typ I-Gelen nach Kultivierung für 14d in Basalmedium (BM), BM+10ng/mL rhTGF-β1 (BM+TGFb1), BM+10ng/mL rhPDGFbb

(BM+PDGFbb), BM+10ng/mL rhBMP13 (BM+BMP13), osteogenem (ost. Diffm.) oder adipogenem (adipo. Diffm.) Differenzierungsmedium (n=6, MW±SD). Als endogene Kontrolle diente die GAPDH-Expression, als Kalibrator wurde die jeweilige cDNA aus zweidimensionaler Kultur direkt vor Versuchsansatz benutzt. *signifikante Unterschiede ($p<0,05$), ** hoch signifikante Unterschiede ($p<0,01$) zwischen den Gruppen.

Eine weitere Versuchsreihe sollte den Einfluss der Blockierung der β_1-Integrine mit Hilfe eines Antikörpers auf das Integrin-Expressionsmuster von MSZ in Kollagen-Matrices zeigen. Dabei wurde auch der Zeitverlauf der Regulation erfasst. Durch Einbringung der Zellen in ein Kollagen-Gel und Kultur in An- und Abwesenheit eines Anti-β_1-Integrin-Antikörpers, wurden diese Integrine zeitabhängig reguliert. Nach 14d Kultivierung im Kollagen-Gel war die β_1-Integrin-Expression im Vergleich zur Expression nach 24h erhöht ($p<0,01$). Die Blockierung des Integrin-β_1 durch den Antikörper resultierte in einer geringeren Expression von Integrin β_1 (Abb. 49a). Auch die Expression der α_1-Untereinheit stieg zwischen 24h und 48h nach Einbringung der Zellen in das Kollagen-Gel signifikant an ($p<0,01$). Dieser Effekt war unabhängig von der Anwesenheit des Antikörpers. Nach 14d war dieses erhöhte Expressionsniveau nur noch bei den Zellen zu sehen, die in Abwesenheit des Antikörpers kultiviert wurden. Die Zugabe des Antikörpers führte nach 14d zu einer α_1-Integrinexpression auf dem Niveau der 2D-Kultivierung (Abb. 49b). Die Untereinheit α_2 wurde zunächst auf den etwa 100fachen Wert nach oben reguliert. Im Anschluss verringerte sich die α_2-Integrin-Expression auf den 16fachen Wert des Niveaus vor der Einbringung in das Kollagen-Gel (Abb. 49c). Für die α_3-Untereinheit wurde eine geringe Veränderung gefunden (Abb. 49d). Die Anwesenheit des Kollagens führte zunächst zu einer leichten Verminderung 24h nach der Aussaat. Eine signifikante Erhöhung ($p<0,01$) des Expressions-Levels dagegen wurde in Abwesenheit des Anti-β_1-Integrins gefunden.

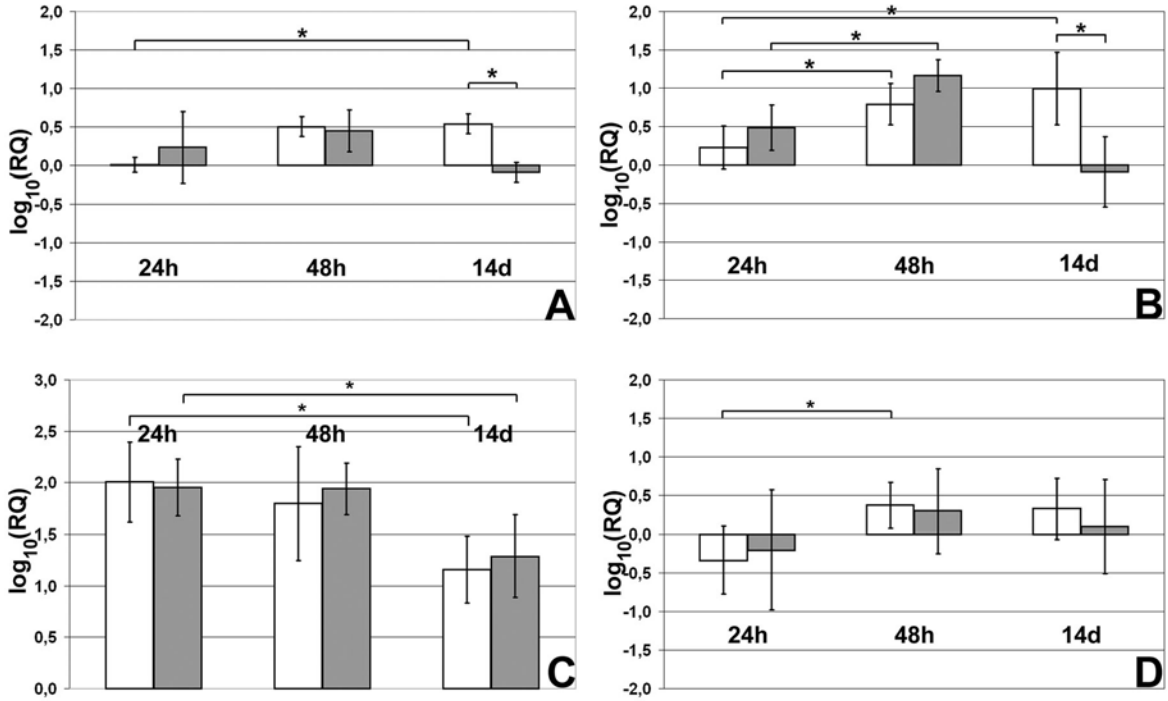


Abbildung 49: Relative Quantifizierung der Integrin-Expression der Untereinheiten β_1 (A), α_1 (B), α_2 (C) und α_3 (D).
MSZ in Kollagen-Gelen. Gezeigt ist die Expression nach 24h, 48h und 14h bei Kultivierung in Basalmedium (weiße Balken) oder in Basalmedium + 10µg/mL Anti-β_1-Integrin-Antikörper (dunkle Balken) (n=6, MW±SD). Als endogene Kontrolle diente die GAPDH-Expression, als Kalibrator die jeweilige cDNA aus zweidimensionaler Kultur direkt vor Versuchsansatz. * gibt signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen an ($p<0,01$).

Der Einfluss einer statischen Spannung der Kollagen-Gel-Konstrukte auf die Integrin-Expression wurde in einer weiteren Versuchsreihe semiquantitativ mittels RT-PCR bestimmt. Die Untereinheiten α_1, α_2, α_3 und β_1 wurden auch nach 14tägiger Kultur in einem drei dimensionalen, statisch aufgespannten Kollagen-Gel exprimiert (Abb. 50). Die Ergebnisse der semi-quantitativen RT-PCR zeigen eine Erhöhung der kollagenbindenen α_2-Untereinheit durch die Kulturbedingungen im Vergleich zur Monolayer-Kultur und eine unverändert starke Expression der weiteren untersuchten Untereinheiten.

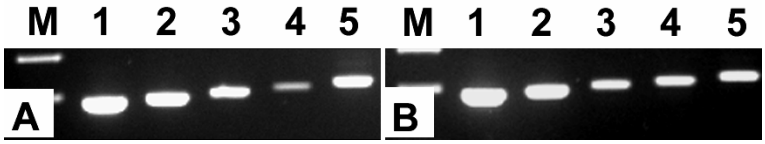


Abbildung 50: Regulation der Integrin-Genexpression in statisch aufgespannten Kollagen-Gelen.
Genexpression der Integrin-Untereinheiten β_1 (2), α_1 (3), α_2 (4) und α_3 (5) und des Referenzgenes GAPDH (1) von MSZ vor Einbringung in ein statisch aufgespanntes Kollagen Typ-I-Geles (A) und nach Kultivierung für 14 Tage (B). EtBr-gefärbte 2%ige Agarose-Gele.

3.4.2 Integrinexpression von MSZ in PLLA-Matrices

Integrin-Rezeptoren haben unterschiedliche Liganden-Bindungseigenschaften. Um eine Beschreibung des neu synthetisierten PLLA-Gerüstes, dessen Unterschiede zur Kollagen-

Matrix und Wirkungen auf MSZ zu erhalten, wurden die im Kollagen-Gel untersuchten Integrin-Untereinheiten auch für MSZ in PLLA-Matrices mittels „real time"-PCR betrachtet. Es konnte gezeigt werden, dass das Expressionsmuster deutlich von der verwendeten Matrix abhängt (n=6). Es wurde die Expression von α_1-, α_2-, α_3- und β_1-Integrin durch MSZ nach 14tägiger Kultivierung auf PLLA untersucht. Darüber hinaus wurde der Einfluss von rhTGF-β1, rhPDGFbb, rhBMP13, osteogenem oder adipogenem Differenzierungsmedium bestimmt. Es zeigte sich eine Reduktion der Expression von Integrin α_2 auf 1/6 des Niveaus vor Versuchsbeginn nach zweiwöchiger Kultur in Basalmedium. Die Expression von Integrin α_3 sank deutlich stärker auf etwa 1/700. Es konnte gezeigt werden, dass die Integrin-Untereinheiten α_2 und α_3 nicht von den hier untersuchten löslichen Differenzierungsfaktoren beeinflusst wurden. Die Expression der α_1-Untereinheit wurde ebenfalls auf 1/10 durch die Kultur in PLLA-Konstrukten verringert. Dieser Trend wurde durch die Zugabe von 10ng/mL rhPDGFbb zum Basalmedium bzw. die Kultur in adipogenem Differenzierungsmedium signifikant verstärkt ($p<0,01$). Die Expression der β_1-Untereinheit variierte stark, so dass keine Änderung zum Ausgangswert messbar war (Abb. 51a).

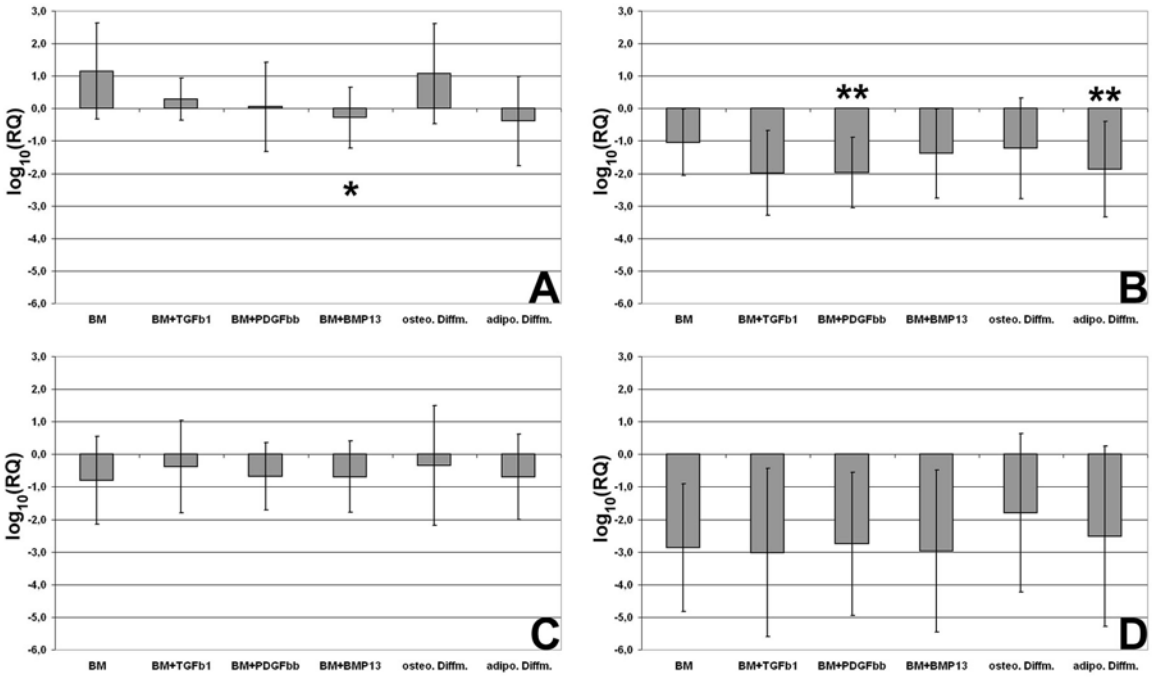


Abbildung 51: **Relative Quantifizierung der Integrin-Expression**.
Expression von Integrin β_1 (A), α_1 (B), α_2 (C) und α_3 (D) von MSZ in PLLA-Matrices unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen nach 14d (n=6, MW±SD). Als endogene Kontrolle diente die 18s-rRNA-Expression, als Kalibrator die jeweilige cDNA aus zweidimensionaler Kultur direkt vor Versuchsansatz. *statistisch signifikant ($p<0,05$), **statistisch hoch signifikant ($p<0,01$).

In einer weiteren Versuchsreihe wurde, analog zu den Versuchen in Kollagen-Gel, der Einfluss der Zugabe von Anti-β_1-Integrin im Zeitverlauf untersucht. In diesen Versuchen konnte durch eine geringere Schwankung der einzelnen Spender als in der vorhergehenden Versuchsreihe eine Verringerung der Expression von β_1-Integrin auf etwa 1/30 zu allen Zeitpunkten und unter beiden Kultvierungsbedingungen gefunden werden. Die Untereinheiten α_1 und α_3 wurden in Basalmedium zunächst auf 1/10 bzw. 1/3 nach 24h im Vergleich zur 2D-Kultur herunterreguliert. Dieser Trend verstärkte sich sogar noch auf 1/50 bzw. 1/30 des Ausgangswertes. Die Anwesenheit des Antikörpers gegen β_1-Integrin bewirkte hierzu nicht signifikant unterschiedliche Reaktionen ($p>0,05$). Die Expression von α_3-Integrin schwankte unter beiden Kultivierungsbedingungen zu allen Zeitpunkten um den Ausgangswert.

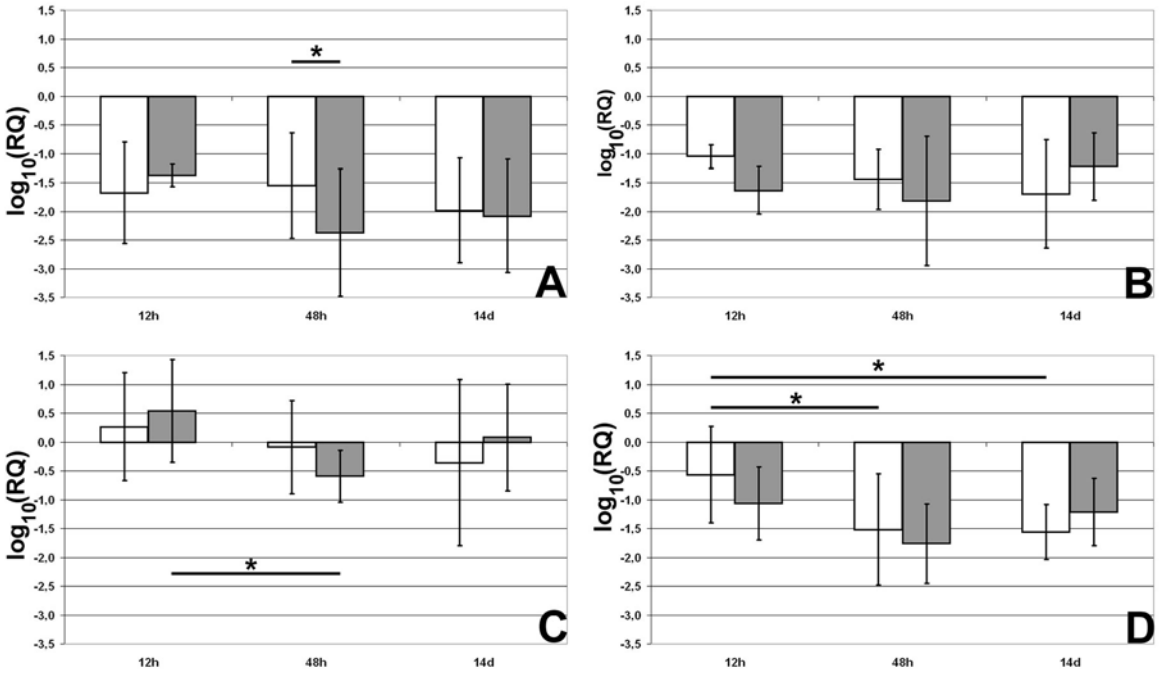


Abbildung 52: Relative Quantifizierung der Integrin-Untereinheiten von MSZ in PLLA Konstrukten. Expression von Integrin β_1 (A), α_1 (B), α_2 (C) und α_3 (D) von MSZ auf PLLA-Matrices. Gezeigt ist die Expression nach 24h, 48h und 14h bei Kultivierung in Basalmedium (weiße Balken) oder in Basalmedium + 10µg/mL Anti-β_1-Integrin-Antikörper (dunkle Balken) (n=6, MW±SD). Als endogene Kontrolle diente die 18s-rRNA-Expression, als Kalibrator die jeweilige cDNA aus zweidimensionaler Kultur direkt vor Versuchsansatz. * gibt statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen an ($p<0,05$).

3.5 Matrix-Umbau durch Matrixmetallopeptidasen (MMPs)

Neben dem Einfluss löslicher Faktoren auf die Matrixproduktion, wurde auch der Einfluss von Wachstumsfaktoren einerseits und der Integrin-Adhäsion an die Matrix andererseits auf den Matrix-Umbau überprüft werden, da bereits auf S. 54f gezeigt wurde, dass Konstrukte, die in adipogenem Differenzierungsmedium und in noch stärkerem Maße in An-

wesenheit von Anti-β_1-Integrin kultiviert wurden, weniger stark kontrahierten als Vergleichskonstrukte in Basalmedium. Entscheidend für einen Matrix-Umbau ist die Synthese von Matrixmetallopeptidasen.

3.5.1 MMP-1

Es wurde die Expression von MMP-1 in jeder Versuchsreihe bei je sechs Spendern mittels relativer Quantifizierung durch „real time"-PCR quantifiziert. Die Analyse zeigte, dass die Einbringung von MSZ in ein Kollagen-Gel die MMP-1-Expression auf den 20fachen Wert nach 14 Tagen Kultivierung ansteigen lies. Die Anwesenheit von rhTGF-β1, rhPDGFbb, rhBMP13, osteogenem oder adipogenem Differenzierungsmedium bewirkte statistisch nicht signifikant unterschiedliche Werte. Jedoch lässt sich tendenziell sagen, dass die Anwesenheit osteogenen Differenzierungsmediums mit einer ca. 90-fachen Erhöhung einen höheren Wert ergab, als die Basalmedium-Kontrolle mit ca. 20fach. Wie in Abb. 53 zu sehen, wies die Kultur in adipogenem Differenzierungsmedium dagegen einen geringeren Anstieg auf (ca. 7fach).

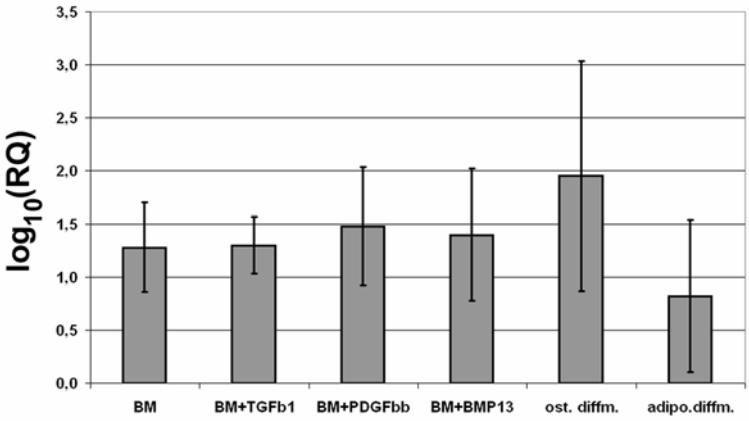


Abbildung 53: Relative Quantifizierung der MMP-1-Genexpression bei MSZ in Kollagen Typ I-Gelen. Gezeigt ist die Expression bei Kultivierung für 14d in Basalmedium (BM), Basalmedium+10ng/mL rhTGF-β1 (BM+TGFb1), Basalmedium+10ng/mL PDGF rhPDGFbb (BM+PDGFbb), Basalmedium+10ng/mL rhBMP13 (BM+BMP13), osteogenem (ost. Diffm.) oder adipogenem (adipo. Diffm.) Differenzierungsmedium (n=6, MW±SD). Als endogene Kontrolle diente die GAPDH-Expression, als Kalibrator die jeweilige cDNA aus zweidimensionaler Kultur direkt vor Versuchsansatz. Kein Wert war signifikant unterschiedlich zur Basalmediumkontrolle ($p>0.05$).

Es wurde des Weiteren untersucht, welchen Einfluss die Verhinderung der Zelladhäsion am Kollagen-Gel mit Anti-β_1-Integrin auf die Expression von MMP-1 zeigt. Die Einbringung von MSZ in das Kollagen Typ I-Hydrogel resultierte in einer 8-fachen Erhöhung der MMP-1-Genexpression in Abwesenheit von Anti-β_1-Integrin und einer 6-fachen Erhöhung in dessen Anwesenheit nach 24h (Abb. 54). Der Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant ($p=0,31$) Diese Erhöhung erfolgte schnell und stieg im Zeitverlauf nach 14 Ta-

gen weiter auf den 40- (ohne Antikörper) bzw. 200- (mit Antikörper) fachen Wert vor Versuchsbeginn an. Dieser Unterschied war trotz der großen Spendervariabilität statistisch signifikant (p=0,0106 bzw. p=0,0004).

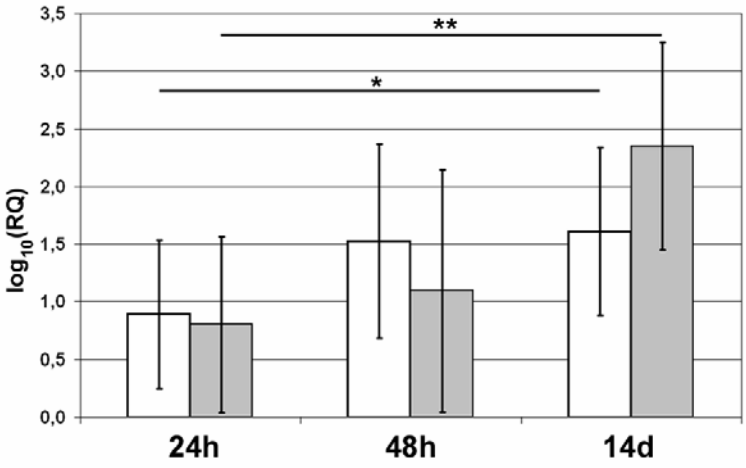


Abbildung 54: Relative Quantifizierung der MMP1-Genexpression von MSZ in Kollagen Typ I-Gelen. Gezeigt ist die Expression nach 24h, 48h und 14h bei Kultivierung in Basalmedium (weiße Balken) oder in Basalmedium + 10µg/mL Anti-β1-Integrin-Antikörper (dunkle Balken) (n=6, MW±SD). Als endogene Kontrolle diente die GAPDH-Expression, als Kalibrator die jeweilige cDNA aus zweidimensionaler Kultur direkt vor Versuchsansatz.

Die relative Quantifizierung des Kollagen-degradierenden MMP-1 bei MSZ auf PLLA-Konstrukten ergab ein im Vergleich zur Kultivierung in Kollagen-Matrices gänzlich unterschiedliches Ergebnis. Zwar war die Streuung um den Mittelwert bei n=6 ebenfalls sehr breit, jedoch war bei Kultivierung in Basalmedium keine Veränderung des Expressionsniveaus im Vergleich zur 2D-Kultur zu beobachten. Lediglich die Zugabe von rhTGF-β1 oder rhBMP13 erzeugte eine 6- bzw. 3-fache Erhöhung der MMP-1-Expression. Die Anwesenheit von PDGFbb oder Differenzierungsmedium hatte keinen Einfluss auf die MMP-1-Expression (Abb. 55).

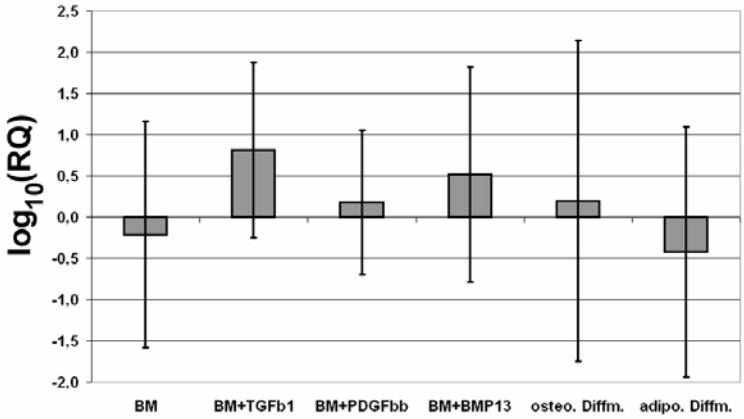


Abbildung 55: Relative Quantifizierung der MMP-1-Genexpression von MSZ auf PLLA-Konstrukten. Gezeigt ist die Expression bei Kultivierung für 14d in Basalmedium (BM), Basalmedium+10ng/mL rhTGF-β1 (BM+TGFb1), Basalmedium+10ng/mL rhPDGFbb (BM+PDGFbb), Basalmedium+10ng/mL rhBMP13 (BM+BMP13), osteogenem (ost. Diffm.) oder adipogenem (adipo. Diffm.) Differenzierungsmedium (n=6,

MW±SD). Als endogene Kontrolle diente die 18s-rRNA-Expression, als Kalibrator die jeweilige cDNA aus zweidimensionaler Kultur direkt vor Versuchsansatz.

Der Einfluss der Inhibition von β_1-Integrin auf MMP-1 wurde in einer weiteren Versuchsreihe mit PLLA-Konstrukten untersucht. Hierbei zeigte sich nach 24h weder für die Basalmedium-Kontrolle, noch für die Kultivierung in Anwesenheit von Anti-β_1-Integrin eine Veränderung der MMP-1-Expression im Vergleich zur 2D-Kultur vor Versuchbeginn. Nach 48h wurde die Expression unter beiden Kulturbedingungen zunächst auf etwa 1/5 des Ausgangswertes herabreguliert. Nach 14tägiger Kultivierung auf PLLA zeigten sich analog zur unterschiedlichen Zellmorphologie leichte Unterschiede zwischen den Kultivierungsbedingungen. In der Basalmedium-Kontrolle stieg die MMP-1-Expression leicht auf etwa 1/3 des Ausgangswertes an, bei Anwesenheit des Antikörpers sogar auf das 2,8-fache des Ausgangswertes. Die Unterschiede zwischen den Kulturbedingungen waren jedoch aufgrund der breiten Streuung nicht statistisch signifikant.

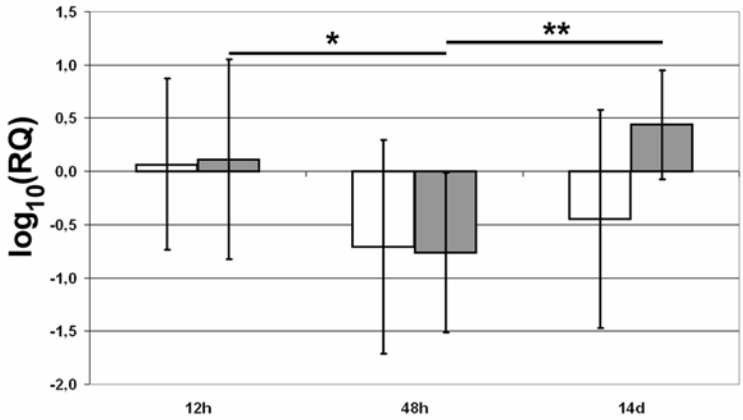


Abbildung 56: Relative Quantifizierung der MMP-1-Genexpression bei MSZ auf PLLA-Matrices.
Gezeigt ist die Expression nach 24h, 48h und 14h bei Kultivierung in Basalmedium (weiße Balken) oder in Basalmedium + 10µg/mL Anti-β_1-Integrin-Antikörper (dunkleBalken) (n=6, MW±SD). Als endogene Kontrolle diente die 18s-rRNA-Expression, als Kalibrator die jeweilige cDNA aus zweidimensionaler Kultur direkt vor Versuchsansatz. *statistisch signifikant ($p<0,05$), **statistisch hoch signifikant ($p<0,01$)

3.5.2 MMP-2, -9, -13 und TIMP-1, -2

Neben MMP-1 sind weitere Matrixmetallopeptidasen am Abbau von Kollagen beteiligt. Hierbei handelt es sich um eine weitere Kollagenase – MMP-13, sowie die Gelatinasen MMP-2 und -9, die die Spaltprodukte der Kollagenasen weiter zerlegen. Diese Moleküle werden in unterschiedlichem Ausmaß von TIMP-1 und -2 inhibiert und damit reguliert. Aus diesem Grund wurden diese MMPs und TIMPs ebenfalls betrachtet. Es wurden semiquantitative Analysen mittels RT-PCR und Auftrennung der Amplifikate auf Agarosegelen durchgeführt.

In diesen Analysen ergab sich zunächst für MSZ in der 2D-Zellkultur ein Expressionsmuster, in dem MMP-2, TIMP-1, sowie TIMP-2 deutlich exprimiert wurde. MMP-9 war bei den verschiedenen Spendern nicht oder knapp an der Nachweisgrenze detektierbar, MMP-13 konnte nie nachgewiesen werden. Nach Einbringung in ein Typ-I Kollagen-Gel und Kultur für 14 Tage in Basalmedium wurde MMP-13 induziert, die übrigen Enzyme unverändert exprimiert (Abb. 57a und 58a). Die Kultivierung in Anwesenheit Anti-β_1-Integrin, rhTGF-β1, rhPDGFbb, rhBMP13, osteogenem oder adipogenem Differenzierungsmedium beeinflusste dieses Ergebnis nicht (Abb. 57 und Abb. 58).

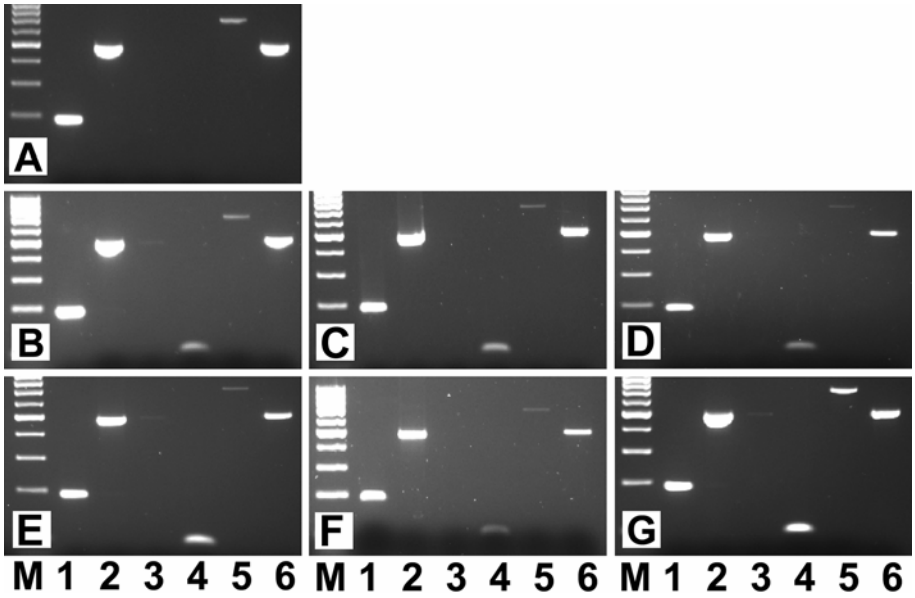


Abbildung 57: Semi-Quantitative Auswertung der Expression von MMPs und TIMPs unter verschiedenen Kulturbedingungen.
Agarosegele der Produkte einer RT-PCR. MMP-2 (2), MMP-9 (3), MMP-13 (4), TIMP-1 (5) und TIMP-2 (6) im Vergleich zu GADPH (1) von MSZ. Zellen aus Monolayerkultur direkt vor Versuchsbeginn (A) und nach Einbringung in ein frei flotierendes Kollagen-Typ I-Gel bei Kultur für 14d in Basalmedium (B), Basalmedium+10ng/mL rhTGF-β1 (C), Basalmedium+10ng/mL rhPDGFbb (D), Basalmedium+10ng/mL rhBMP13 (E), osteogenem (F) oder adipogenem (G) Differenzierungsmedium. EtBr-gefärbte 2%ige Agarose-Gele.

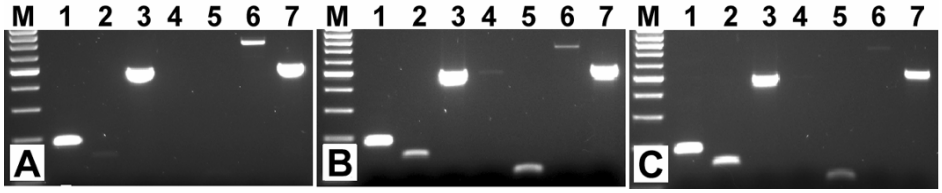


Abbildung 58: Veränderung der Expression von MMPs und TIMPs.
Agarosegele der Produkte einer RT-PCR. Expression von MMP-1 (2), MMP-2 (3), MMP-9 (4), MMP-13 (5), TIMP-1 (6) und TIMP-2 (7) im Vergleich zu GADPH (1) von MSZ unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen. MSZ aus Monolayerkultur direkt vor Versuchsbeginn (A) und nach Einbringung für 14d in ein frei flotierendes Kollagen-Typ I-Gel bei Kultur in Basalmedium (B) und Basalmedium+10µg/mL Anti-β_1-Integrin für (C). EtBr-gefärbte 2%ige Agarose-Gele.

Es zeigte sich kein Einfluss der statischen Spannung auf die MMP- und TIMP-Expression. In den aufgespannten Kollagen-Gel-Konstrukten ergab sich – genauso wie bei den frei flotierenden Kollagen-Gel-Ansätzen eine Verstärkung der MMP-1-Expression durch die

Einbringung in das Kollagen-Gel, sowie eine Induktion der MMP-13-Expression. MMP-2, TIMP-1 und -2 wurden im Vergleich zur 2D-Kultur vor Versuchsbeginn konstant stark und MMP-9 kaum oder nicht exprimiert (Abb. 59).

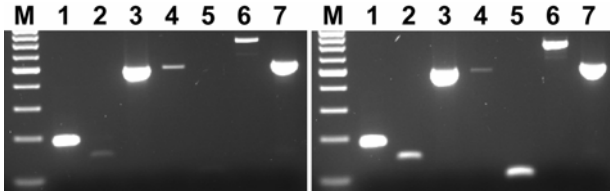


Abbildung 59: Veränderung der Expression von MMPs und TIMPs.
Expression von MMP-1 (2), MMP-2 (3), MMP-9 (4), MMP-13 (5), TIMP-1 (6) und TIMP-2 (7) und des Referenzgenes GAPDH (1) von MSZ vor Einbringung in ein statisch aufgespanntes Kollagen Typ-I-Geles (A) und nach Kultivierung für 14 Tage (B). EtBr-gefärbte 2%ige Agarose-Gele.

Für die Kultivierung von MSZ in PLLA-Konstrukten ergab sich bei der Genexpression von MMP-2, -9, -13 und TIMP-1, -2 ein ähnliches Bild wie für die Kultivierung in Kollagen-Gelen unter allen genannten Versuchsbedingungen (Basalmedium (BM), BM+rhTGFβ-1, BM+PDGFbb, BM+BMP13, adipogenes/osteogenes Differenzierungsmedium, BM+Anti-β_1-Integrin). MMP-2, sowie TIMP-1 und TIMP-2 wurden nicht durch den Zellträger beeinflusst und konstant stark exprimiert, MMP-9 war nicht oder kaum nachweisbar. MMP-13 wurde durch die dreidimensionale Kultur leicht induziert. Jedoch war die Expression von MMP-13 nach 14 Tagen deutlich schwächer als bei Kultur der Zellen in Kollagen-Gel (Abb. 60 und Abb. 61).

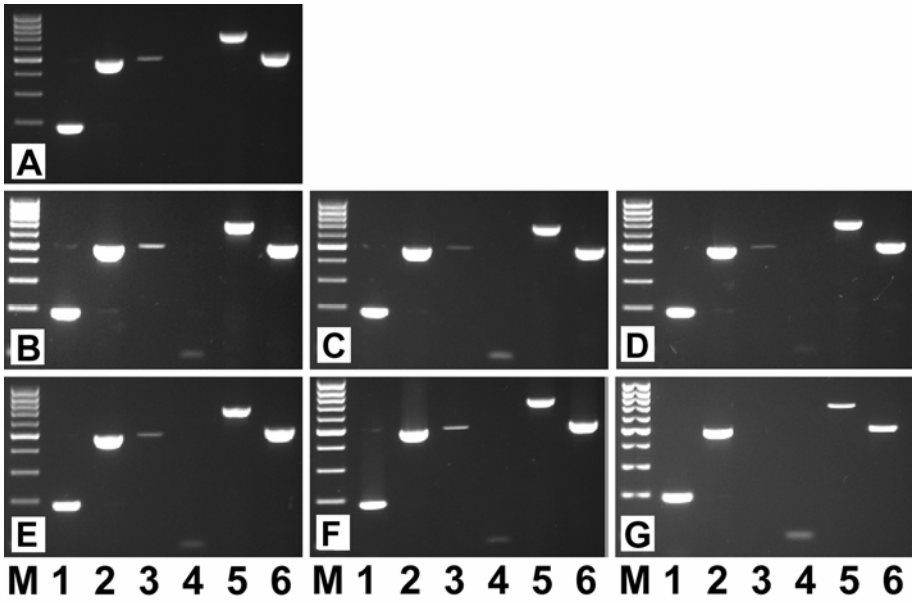


Abbildung 60: Semi-Quantitative Auswertung der Expression der MMPs und TIMPs- auf PLLA.
Expressionsmuster von MSZ unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen. MSZ aus Monolayerkultur direkt vor Versuchsbeginn (A) und nach Aufbringung auf ein 3D-PLLA-Konstrukt bei Kultur für 14d in Basalmedium (B), Basalmedium+10ng/mL rhTGF-β1 (C), Basalmedium+10ng/mL rhPDGFbb (D), Basalmedium+10ng/mL rhBMP13 (E), osteogenem (F) oder adipogenem (G) Differenzierungsmedium. 100bp Größen-Standard (M)MMP-1 (2), MMP-2 (3), MMP-9 (4), MMP-13 (5), TIMP-1 (6) und TIMP-2 (7) im Vergleich zu GADPH (1). EtBr-gefärbte 2%ige Agarose-Gele.

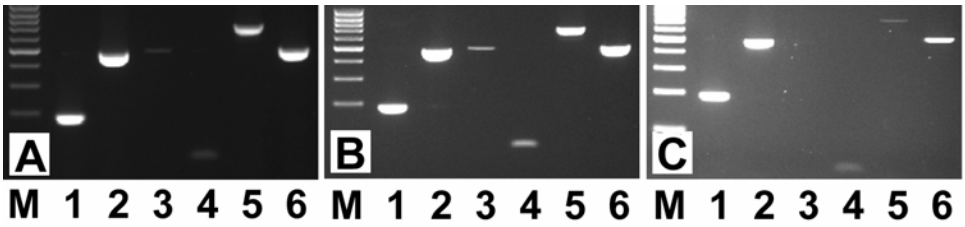


Abbildung 61: Semi-Quantitative Auswertung der Expression der MMPs und TIMPs- auf PLLA. Expression von MMP-2 (2), MMP-9 (3), MMP-13 (4), TIMP-1 (5) und TIMP-2 (6) im Vergleich zu GADPH (1) von MSZ unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen. MSZ aus Monolayerkultur direkt vor Versuchsbeginn (A) und nach Aufbringung für 14d auf eine 3D-PLLA-Matrix bei Kultur in Basalmedium (B) und Basalmedium+10µg/mL Anti-β_1-Integrin für (C). (M): 100bp Größen-Standard. EtBr-gefärbtes 2%iges Agarose-Gel.

Nachweis der Protein-Expression und Aktivierung der Gelatinasen mittels Gelatine-Zymographie

Die Proteinexpression der Gelatinasen MMP-2 und -9 wurde mittels Gelatine-Zymographie überprüft. Hierzu wurde der jeweilige Ansatz für 24h unter serumfreien Bedingungen kultiviert und der Überstand auf einem Acrylamid-Gelatine-Gel aufgetrennt. Nach Verdau und Färbung des Gels erschienen das Zymogen und die kleinere aktive Form des Enzyms als getrennte Banden (verdaute Gelatine) auf dem Acrylamid-Gel. Jeder Ansatz wurde drei Mal wiederholt. Die Ergebnisse aus den Ansätzen unterschiedlicher Spender waren sehr einheitlich.

Im Überstand aus der 2D-Zellkultur war in allen Fällen Pro-MMP-2 als 72 kDa-Bande, nicht aber dessen aktive Form nachweisbar (keine Bande bei 66 kDa). MMP-9 konnte nicht detektiert werden (keine Banden bei 92 kDa bzw. 82 kDa). Nach Einbringung in ein Kollagen-Gel und Kultur für 14d in Basalmedium konnte im Überstand der Kulturen weiter kein MMP-9-Protein nachgewiesen werden. MMP-2 wurde in Pro- und aktivierter Form gefunden. Das Verhältnis aktiviertes Protein zu Zymogen variierte leicht und erreichte teilweise einen Wert von 1 (subjektive, optische Auswertung). Die Kultivierung in Anwesenheit von rhTGF-β1, rhPDGFbb, rhBMP13, Differenzierungsmedium oder Anti-β_1-Integrin führte zu vergleichbaren Resultaten. Es konnte beobachtet werden, dass die Banden aus Überständen von in Anwesenheit von Anti-β_1-Integrin kultivierten Konstrukten stets schwächer waren, als die der übrigen Ansätze (Abb. 62).

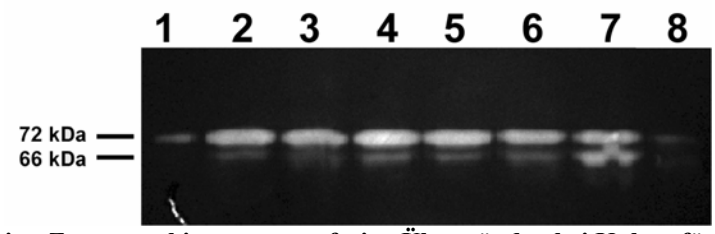


Abbildung 62: Gelatine-Zymographie von serumfreien Überständen bei Kultur für 24h.
Die Banden zeigen den Verdau der Gelatine durch das renaturierte 72kDa-MMP-2-Zymogen bzw. die 66kDa-aktivierte Form des MMP-2. Überstände aus Monolayer-Kultur (1) direkt vor Versuchsbeginn und nach Kultivierung für 14d in Basalmedium (2), Basalmedium+10ng/mL rhTGF-β1 (3), Basalmedium+10ng/mL rhPDGFbb (4), Basalmedium+10ng/mL rhBMP13 (5), osteogenem Differenzierungsmedium (6), adipogenem Differenzierungsmedium (7) und Basalmedium+10µg/mL Anti-β_1-Integrin (8).

Der serumfreie Überstand von MSZ, die für 14 Tage in PLLA-Konstrukten kultiviert wurden wurde ebenfalls mittels Gelatine-Zymographie analysiert. Es wurde Überstand aus Ansätzen in Basalmedium und bei Zugabe von rhTGF-β1, rhPDGFbb, rhBMP13, osteogenem oder adipogenem Differenzierungsmedium oder Anti-β_1-Integrin untersucht. MMP-9 konnte in keinem Fall detektiert werden. MMP-2 Zymogen wurde in allen Ansätzen nachgewiesen. Die Aktivierung des Proteins war durch Kultur in PLLA-Konstrukten jedoch nicht oder nur sehr schwach zu finden (Abb. 63).

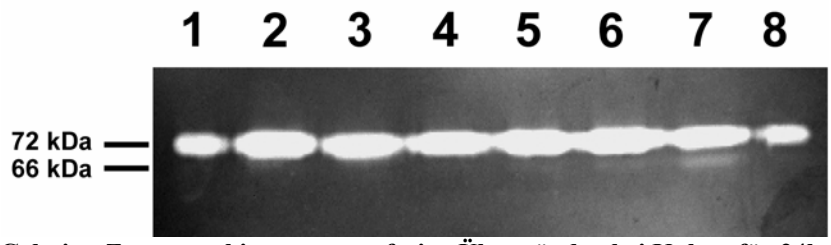


Abbildung 63: Gelatine-Zymographie von serumfreien Überständen bei Kultur für 24h.
Die Banden zeigen den Verdau der Gelatine durch das renaturierte 72kDa-MMP-2-Zymogen bzw. die 66kDa-aktivierte Form des MMP-2. Überstände aus Monolayer-Kultur (1) direkt vor Versuchsbeginn und nach Kultivierung auf PLLA-Konstrukten für 14d in Basalmedium (2), Basalmedium+10ng/mL rhTGF-β1 (3), Basalmedium+10ng/mL rhPDGFbb (4), Basalmedium+10ng/mL rhBMP13 (5), osteogenem Differenzierungsmedium (6), adipogenem Differenzierungsmedium (7) und Basalmedium+10µg/mL Anti-β_1-Integrin (8).

D Diskussion

Die Verknüpfung wissenschaftlicher Grundlagenforschung und klinischer Anwendung wird durch die Annäherung über zelltragende Modelle geschaffen. Diese Modelle müssen die dreidimensionale Komplexität eines Organs genügend genau beschreiben können und gleichzeitig die Möglichkeit eines systematischen, experimentellen Versuchsaufbaus bieten (Schmeichel u. Bissell 2003). In der vorliegenden Arbeit sollten innerhalb des „Kompetenznetzes Biomaterialien Baden-Württemberg“ die Reaktionen humaner multipotenter mesenchymaler Stromazellen (MSZ) im Kontakt mit verschiedenen Biomaterialien analysiert werden, um deren Eignung für das „Tissue Engineering“ von Sehnen- und Bandgewebe zu testen. Die Untersuchungen zur zellulären Interaktionen adulter Vorläuferzellen mit ihrer extrazellulären Matrix ist wichtig, um verschiedene zellbiologische Prozesse, wie z.B. Erhalt des Stammzellstatus, Differenzierungsbedingungen und dabei implizierte Signalwege, zu verstehen.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Biomaterialien untersucht und deren Eigenschaften im Zellkontakt beschrieben. Darüber hinaus wurden die Zellreaktionen sowohl auf die Materialien, als auch auf verschiedene lösliche Faktoren auf Transkriptions- und auf Translationsebene beschrieben, um einen Einblick in die zellbiologischen Vorgänge zu erhalten. Mit diesen Erkenntnissen wurde eine wichtige Grundlage für die Konstruktion funktioneller Ersatzgewebe geschaffen.

Der Umgang mit primären Spenderzellen liefert stets eine gewisse Daten-Bandbreite durch leicht unterschiedliches Verhalten der verschiedenen Zellen. Die für diese Arbeit durchgeführten Versuche wurden daher immer mindestens in sechs voneinander unabhängigen Experimenten mit den Zellen unterschiedlicher Spender durchgeführt.

1 Verhalten von Tenozyten in einem Kollagen-Hydrogel

Die Annäherung von Ergebnissen aus einem Experiment mit einem optimierten Modellsystem ist das Ziel für die Konstruktion eines Gewebeersatzes. Für diese Arbeit wurde als Modellsystem eine Kombination gewählt, bei der humane Tenozyten in einer Kollagen-Matrix kultiviert wurden. Dieses System enthält die Zielzellen als viable Komponente und eine Matrix, die als Annäherung an die Matrix von Sehnen und Bändern angesehen werden kann. Die Eigenschaften dieses Modells wurden in einem ersten Schritt untersucht. Die Untersuchungen erstreckten sich aber ausschließlich auf die Etablierung eines Modellsys-

tems, da die tatsächliche Verwendung von Tenozyten zum Gewebeersatz geschädigter Sehnen oder Bänder nicht angestrebt ist. Die Isolation dieser Zellen würde eine irreversible Schädigung am Entnahmeort zur Folge haben. Außerdem ist die Proliferation dieses Zelltyps problematisch, da die Kultivierung der Zellen bereits nach wenigen Passagen zu einer Dedifferenzierung führt. Eine solche Dedifferenzierung manifestiert sich unter anderem in einer Erhöhung des Kollagen Typ III zu Kollagen Typ I-Verhältnissen und einer signifikanten Verringerung der Decorin-Expression (Yao et al. 2006).

1.1 Gel-Kontraktion, Zell-Morphologie und -Proliferation

Humane Tenozyten wurden in einer Zellzahl von $3x10^5$/mL in ein Kollagen-Hydrogel eingebracht und über einen Zeitraum von zwei Wochen kultiviert. In dieser Zeit konnte beobachtet werden, dass das gesamte Konstrukt kontrahierte und an Volumen abnahm. Diese Art der Kontraktion wird von Tamariz und Grinnell als globaler Umbau der Kollagenmatrix beschrieben und deutlich von einem lokalen Umbau getrennt (Tamariz u. Grinell, 2002). Wie bereits durch zahlreiche Studien belegt, ist die Ausprägung einer solchen Kontraktion von mehreren Faktoren abhängig: Neben dem Zelltypus ist auch die Zellzahl und das mit Vorhandensein von Zellkontakten, Kollagenkonzentration und die FKS-Konzentration des Kultivierungsmediums entscheidend (Ehrlich et al 1989, Zhu et al. 2000, Juncosa-Melvin et al. 2006, Yamamoto et al. 2000). Jedoch zeigten Chen et al., dass kein linearer Zusammenhang zwischen Kontraktion und Kollagenkonzentration bestehen muss (Chen et al. 2006).

Ein Vergleich mit der Literatur lässt darauf schließen, dass einige dieser Parameter – besonders die Kollagenkonzentration im Hydrogel – durch die dadurch veränderte Variation der Adhäsionsmöglichkeit auch einen Einfluss auf die Zellmorphologie innerhalb der Präparate haben. Lamberti und Wezeman beschrieben Tenozyten in Kollagen-Gelen, die zunächst eine runde Zellmorphologie aufwiesen. Diese wurde noch bis zu sieben Tage nach der Aussaat im Gel beibehalten (Lamberti u. Wezeman 2002). Erst nach 21 Tagen fanden sie eine spindelförmige Morphologie, wie sie in etwa der in einer nativen Sehne entspricht. Diese Zellmorphologie konnten sie mit dem Beginn der Bündelung der kollagenen Fasern in Verbindung bringen. Die für die vorliegende Arbeit durchgeführten Versuche zeigen im Gegensatz dazu bei Verwendung einer höheren Kollagenkonzentration eine raschere Veränderung der Zellmorphologie. Bereits nach 24h zeigten die Zellen eine elongierte Zellform, was auf gute Adhäsion schließen lässt.

Die verbesserten Adhäsionsmöglichkeiten im Vergleich zu dem Modell von Lamberti und Wezeman können auch eine Erklärung für die Unterschiede im Proliferationsverhalten

darstellen. Mittels PCNA-Nachweis in gut der Hälfte der vorhandenen Zellen konnte eine hohe Proliferationsrate gezeigt werden. Die Auszählung der Zellen am Hämozytometer bei Lamberti und Wezeman ergab dagegen keine Zunahme der Zellzahl. Die Differenz kann sich jedoch auch aus der unterschiedlichen Methodik ergeben. Möglicherweise kann der Verdau vor der Auszählung bei Lamberti und Wezeman zu einem Zellverlust geführt haben.

1.2 Zell-Matrixproduktion

Die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix in Sehnen und Bändern gibt die optimale Zusammensetzung einer regenerierten Bio-Matrix vor. Es ist bekannt, dass die eher ovoiden Tenoblasten im Gegensatz zu den fusiformen Tenozyten eine größere Protein-Biosytheseleistung aufweisen (Chuen et al. 2004). Dagegen gibt es kaum Untersuchungen zum *in vitro* Verhalten einer Zellpopulation, die aus beiden Zelltypen besteht. Dieses Wissen ist für die Generierung eines Gewebe-Ersatzes, bei dem autologe Zellen die fehlende Matrix regenerieren sollen jedoch von entscheidender Bedeutung. In dem hier verwendeten Modellsystem wurden die Transkription und auch Translation einiger Matrixproteine untersucht.

Das dominierende Molekül in Sehnen und Bändern – Kollagen Typ I - wurde sowohl mittels „real time“ PCR als auch mit immunhistochemischen Methoden untersucht. Es konnte zunächst festgestellt werden, dass nach der Aussaat im Kollagen-Gel der Gehalt von *COL1A1* mRNA bereits nach 24h und dann konstant über den Versuchszeitraum von 14d im Vergleich zur zweidimensionalen Kultur auf ein Fünfzigstel des Ausgangswertes absinkt. Dieses Ergebnis korreliert mit den Ergebnissen von Lamberti und Wezeman, die in einem ähnlichen Modellsystem bei Tenozyten ebenfalls eine Verminderung der Kollagen Typ I-Expression fanden (Lamberti u. Wezeman, 2002). Sie konnten darüber hinaus zeigen, dass die Synthese nach der erneuten Isolation der Zellen und 2D-Kultivierung wieder auf den Ausgangswert reguliert wird. Des Weiteren konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Expression dieses Kollagens trotz deutlicher Verminderung noch als stark exprimiert gefunden werden kann. Eine immunhistochemische Färbung zeigt, dass intra- und perizellulär nach zweiwöchiger Kultivierung eine deutlich detektierbare Kollagen Typ I-Färbung gefunden werden kann. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Kollagen-Modellmatrix eine gute Annäherung an den nativen Zustand darstellt, da die in der experimentellen Situation der Zellkultur starke Matrixsynthese damit verringert werden kann. Gleichzeitig wird sie jedoch nicht vollständig unterbunden, bewirkt also keine Zellschädigung. Die Synthese der Kollagene Typ III, -V, -VI und -X, die in geringerem Anteil

vorhanden sind, scheint von den veränderten Kulturbedingungen unbeeinflusst, abgesehen von einer leichten Erhöhung der Kollagen Typ X-Synthese.

Einen weiteren wichtigen Bestandteil der extrazellulären Matrix bilden Proteoglykane und Glykoproteine. Sie sind sowohl für die Regulation des Kollagengerüstes, als auch für die Hydratisierung und die Bindung verschiedener Signalmoleküle verantwortlich. Im hier verwendeten Modellsystem wurde zunächst die Transkription und Translation von *tenascin-C* mittels „real time" PCR und immunhistochemischer Färbung betrachtet. Die Expression von Tenascin-C ging bei diesen Zellen leicht zurück und verblieb dann über den Kultivierungszeitraum von 14d konstant. Die Proteinfärbung war nicht sehr ausgeprägt und beschränkte sich hauptsächlich auf die Zellsomata. Der Zurückgang der Tenascin-C-Synthese kann mit der Einbringung der Zellen in das Kollagen-Gel analog zu den Verhältnissen bei Kollagen Typ I in Zusammenhang gebracht werden. Daneben wurde die Expression von Decorin, Fibromodulin, Biglycan, Versican, Lumican, Fibronektin-1 und Elastin untersucht. Jedoch zeigte sich keine mit semiquantitativer RT-PCR messbare Veränderung der Expression. Zusätzlich wurde der für die späte Sehnenentwicklung spezifische Marker Tenomodulin und sein Transkriptionsfaktor Scleraxis betrachtet. Tenomodulin ist ein Transmembranprotein vom Typ II mit C-terminaler antiangiogener Domäne (Shukunami et al. 2006). Tenozyten wiesen sowohl vor als auch nach Einbringung in ein Kollagen-Hydrogel nur eine sehr schwache Tenomodulin-Expression auf, Scleraxis war nicht in der semiquantitativen RT-PCR nachweisbar. Dies kann auf die *in vitro* vorhandenen Kulturbedingungen zurückgeführt werden: Shukunami et al. beschreiben eine deutliche Abschwächung der Scleraxis-Expression bei Tenozyten, die aus der nativen Sehne herausgelöst wurden (Shukunami et al. 2006). Des Weiteren ist zu diskutieren, dass zumindest für membrangebundene Proteoglykane bekannt ist, dass deren Synthese bei der Zellisolierung aus dem nativen Gewebe verringert wird, bei anschließender dreidimensionaler Kultur jedoch wieder vermehrt synthetisiert werden (Sawaguchi et al. 2006). Dieser Befund unterstreicht erneut die Wichtigkeit der 3D-Kultur für die Annäherung an native Bedingungen.

1.3 Zell-Matrix Interaktionen

Die Integrin-Expression in Sehnen und Bändern ist bisher nicht detailliert untersucht. Es ist bekannt, dass die β_1-Untereinheit von Tenozyten *in vivo* und *in vitro* exprimiert wird (Yamamoto et al. 2004, Sendzik et al. 2005). Yao et al. konnten nachweisen, dass sich das Expressionsniveau bei zweidimensionaler Kultur über mindestens 8 Passagen bei humanen Achilles-Tenozyten nicht ändert (Yao et al. 2006). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Integrin-Expressionsniveau von Tenozyten des vorderen Kreuzban-

des jedoch durch die Einbringung in ein 3D-Kollagen-Hydrogel beeinflusst wird. Die Veränderung erfolgte in allen untersuchten Fällen rasch und blieb über die gesamte Kultivierungsdauer von 14 Tagen konstant. Die für die Bindung an fibrilläres Kollagen verantwortliche Untereinheit α_2 wurde nach der Einbringung in das Kollagen-Gel leicht verstärkt exprimiert. Für die Untereinheiten α_1, α_3 und β_1 konnte dagegen eine Verringerung gefunden werden. Die Ergebnisse veranschaulichen eine Anpassung der Integrinrezeptor-Expression der Zellen an die vorhandene Matrix. Während in der zweidimensionalen Kultur viele Untereinheiten unspezifisch präsent sind, wird in der einheitlichen Kollagen-Matrix die dafür spezifische Untereinheit verstärkt. Die Abschwächung der Expression der zur Bindung des Heterodimers ebenfalls erforderlichen β_1-Untereinheit kann damit erklärt werden, dass diese Untereinheit zusätzlich mit vielen α-Untereinheiten Dimere bildet, deren Expression ebenfalls abgeschwächt wird.

1.4 Matrix-Umbau

Neben der Anheftung an die extrazelluläre Matrix findet eine Wechselwirkung von Zellen auch über aktiven Umbau dieser statt. Jones et al. konnten zeigen, dass mit unterschiedlichen normalen und pathologischen Zuständen von humanen Achilles-Sehnen ein unterschiedliches mRNA-Expressionsmuster von Matrixmetallopeptidasen einhergeht (Jones et al. 2006). Sie konnten zeigen, dass MMP-1 und -9, sowie TIMP-1 nach einer Ruptur verstärkt exprimiert werden, TIMP-2 jedoch schwächer als in einer gesunden Achillessehne. Deshalb stellt die Betrachtung dieser Moleküle einen wichtigen Aspekt bei der Konstruktion eines funktionellen Ersatzgewebes dar. Aus der Studie von Jones et al. geht hervor, dass in normalem Sehnengewebe ein Spektrum an *MMP*- und *TIMP*-mRNA exprimiert wird, was darauf hindeutet, dass ein geregeltes Gleichgewicht dieser Moleküle für die normale Aufrechterhaltung des Gewebes notwendig ist. In der Studie von Ritty und Herzog wurde dargestellt, dass die Veränderung der Kulturbedingungen die Expression von MMPs bei Kaninchen-Tenozyten beeinflusst (Ritty u. Herzog 2003). Darüber hinaus gibt es in der Literatur kaum Ergebnisse zur Expression von MMPs und TIMPs *in vitro*.

Für humane Kreuzband-Tenozyten konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass in der zweidimensionalen Kultur die hier untersuchten *MMP-1, -2, -9* und *-13* exprimiert wurden. Darüber hinaus war eine starke Expression von *TIMP-1* und *-2* in der semiquantitativen RT-PCR nachweisbar. Eine Einbringung und Kultur über bis zu 14 Tage in ein dreidimensionales Kollagen-Gel hatte eine Veränderung des Expressionsmusters zur Folge. *MMP-1* wurde relativ zur zweidimensionalen Kultur zunächst nach 24h vermindert exprimiert. Es folgte danach jedoch ein Anstieg der *MMP-1*-Expression auf etwa den drei-

fachen Ausgangswert nach 14d. Die Gelatinasen *MMP-2* und *-9* wurden durch die Kultivierung nicht beeinflusst. *MMP-13* wurde nach 14 Tagen verstärkt exprimiert. Eine solche Erhöhung der *MMP-13*-Expression findet man *in vivo* nach einer Ruptur von Sehnen (Jones et al. 2006), wo ebenfalls eine Veränderung der Matrixstruktur vorliegt. Die Expression von *TIMP1-* und *-2* hingegen reduziert. Diese Erkenntnisse lassen darauf schließen, dass die Anwesenheit der künstlichen kollagenen Matrix deren Ab- oder Umbau stimuliert und die eingebrachte Zellpopulation aktiv die angebotene Umgebung beeinflusst. Jedoch muss beachtet werden, dass die weitere Regulation auf Proteinebene hier nicht weiter verfolgt wurde.

2 Evaluierung des neuartigen PLLA-Zellträgers

Es gibt vielfältige Anforderungen an Biomaterialien, die neben grundlegenden Bedingungen vor allem anwendungsspezifisch zu formulieren sind. Für jeden Einsatzzweck müssen die Anforderungen genau definiert werden, damit eine bestmögliche Funktionalität gewährleistet werden kann. Für das interdisziplinäre Projekt zur Regeneration von Sehnen und Bändern im Rahmen des „Kompetenznetzes Biomaterialien Baden-Württemberg“ wurde vom Institut für Textil- und Verfahrenstechnik Denkendorf, ein Zellträger entwickelt. Die Anforderungen an dieses Material wurden zuvor wie folgt erarbeitet: Der Zellträger sollte sich in einem Bereich von mindestens 5 – 10% elastisch verformen können, da z. B. die Dehnung des vorderen Kreuzbandes *in vivo* im Bereich von 5% liegt. Die Zellen sollten bei Dehnung des Zellträgers nicht komprimiert werden. Dies sollte durch Kräuselung oder Texturierung der Fasern erreicht werden. Die Windungen der Fasern sollten dabei in einem Größenbereich liegen, der die Zellen die Dehnung erfahren lässt, was eine Texturierung mit kleineren Windungen nahe legte. Als Materialien kamen Poly(L-lactid) sowie Polylactid-co-glycolid 90/10 in Frage, da lange Degradationszeiten des Materials angestrebt wurden. Das L-Isomer des Polylaktids weist einige wünschenswerte Eigenschaften auf: Es handelt sich um ein biologisch inertes, biodegradierbares und biokompatibles Material, das seit Jahrzehnten für verschiedene Anwendungen in Form von Schrauben, Platten o.ä. Anwendung findet und 2004 auch in Form löslicher Partikel zur Injektion bei Lipoarthrophie bei HIV-Patienten zugelassen wurde (Simamora u. Chern 2006). Vom Projektpartner ITV wurde ein PLLA-Konstrukt entwickelt, das diesen Vorgaben entsprach. Dieser Zellträger wurde in Vorversuchen zunächst hinsichtlich seiner Biokompatibilität und Besiedelbarkeit getestet. Diese Vorversuche, die bereits publiziert sind, zeigten eine

hervorragende Biokompatibilität und Besiedelbarkeit dieses neuartigen, hoch-porösen Zellträgers aus texturierten PLLA-Fasern (Heckmann et al. 2006). Sowohl humane TZ, als auch humane MSZ konnten homogen auf den Träger aufgebracht werden und proliferierten gut. Sie bildeten dreidimensionale, die Fasern überspannende, Zell-Netzwerke. Die Windungen, die durch den Texturierungs-Prozess gebildet wurden, bildeten keine streng parallel liegenden Bündel, sondern erlaubten große freie Bereiche zwischen ihnen. Dadurch erhielt das Konstrukt eine hohe Porosität, die eine gleichmäßige Besiedlung ermöglichte und eine optimale Nährstoffversorgung durch das Kulturmedium erlaubte. Diese Struktur ermöglicht des Weiteren eine Weiterentwicklung des Konstruktes in Bezug auf das Einwachsen von Kapillaren und Geweberegeneration. Die PLLA-Fasern wurden mit Argin-Plasma behandelt, um eine bessere Hydrophilie und damit Benetzbarkeit zu erhalten (Zhu et al. 2005, Yamaguchi et al. 2004). Trotzdem stellte es sich als vorteilhaft heraus, wenn die Konstrukte vor der Besiedlung über Nacht in DMEM gelagert wurden. Diese Lagerung konnte vor allem kleinere überschüssige Partikel entfernen, die den Fasern anhafteten. Eine Konditionierung mit FKS-haltigem Medium erbrachte dagegen keine weiteren Vorteile bezüglich einer verbesserten Zelladhäsion und wurde deshalb nicht durchgeführt. Diese Ergebnisse bezüglich einer guten Biokompatibilität bestätigten auch Studien anderer Gruppen, die die Eigenschaften von PLLA-Matrices, teilweise bereits für den Einsatz zum „Tissue Engineering“ von Sehnen und Bändern untersuchten (Hasegawa et al. 1999, Laurencin u. Freeman 2005, Lu et al. 2005, Ouyang et al. 2005, Cooper et al. 2006). Hasegawa et al. kultivierten Ratten-MSZ auf PLLA-Konstrukten und konnten ein gutes Zellwachstum und Differenzierungsverhalten bei Gabe löslicher Supplemente zeigen.
Im Rahmen des Kompetenznetzwerkes sollte das PLLA-Konstrukt als Komponente eines modulär aufgebauten Biomaterials untersucht werden. Diese PLLA-Komponente könnte für weitere Studien mit einer Last-tragenden Komponente verstärkt werden und so als Zellträger dienen.

3 Einfluss der Matrix auf das Verhalten von MSZ

In der vorliegenden Arbeit lag der Schwerpunkt auf der genauen Beschreibung des Verhaltens von MSZ in dreidimensionalen Konstrukten und ihre Reaktion auf verschiedene Stimuli, um die optimalen Bedingungen für die Herstellung eines Gewebeersatzes von Sehnen und Bändern zu ermöglichen. Neben Zelladhäsion, Proliferation und Apoptose, stand

die Untersuchung von Matrix Auf- und Abbauenden Proteinen im Mittelpunkt der Arbeiten.

Für die in vitro Experimente wurden die Zellen auf zwei unterschiedlichen Materialien kultiviert. Die Verwendung eines Kollagen-Hydrogels erfolgte aufgrund der Tatsache, dass Kollagen Typ I die Hauptkomponente der Trockenmasse von Sehen und Bändern darstellt. Es wurde ein System der Firma ArsArthro gewählt, das bereits für den klinischen Einsatz zugelassen ist. Daneben wurde der oben beschriebene PLLA-Zellträger vom ITV Denkendorf verwendet.

Es wurde zunächst die Interaktion der Zellen mit den unterschiedlichen Matrices mit einem Hauptaugenmerk des Einflusses der β_1-Integrine untersucht. Für das Kollagen-Gel-System wurde der Einfluss der Kontraktion des Gels bzw. dessen statischer Aufspannung untersucht. Weiterhin wurde der Einfluss verschiedener löslicher Faktoren als Differenzierungsstimulus und auf die Matrixsynthese betrachtet.

Die so gewonnen Ergebnisse konnten in Relation zu den Ergebnissen aus den oben beschriebenen Tenozytenversuchen betrachtet werden, um eine Überprüfung der Zellreaktionen im Vergleich zu den Zielzellen zu erhalten.

3.1 Kultivierung, Zell-Morphologie und -Proliferation

Die hier untersuchten Zellträger wiesen prinzipielle Unterschiede in Struktur, Form und Materialbeschaffenheit auf. So wurde der Einfluss der angebotenen Matrix zum Einsatz im Gewebeersatz deutlich. Bei dem kollagenen Träger, der aus einem natürlichen Biomaterial bestand, wurden die Zellen vollständig von der Matrix eingeschlossen und interagierten mit dieser. Im Gegensatz dazu wiesen die synthetischen PLLA-Fasern eher eine Oberfläche auf, mit der die Zellen interagierten.

3.1.1 Gel-Kontraktion

Im Gegensatz zu den eher rigiden PLLA-Konstrukten, die nach der Zellbesiedlung ihre dreidimensionalen Struktur nicht veränderten, konnte in den frei flotierenden, zellbesiedelten Kollagen-Gelen gezeigt werden, dass eine Besiedlung mit Zellen eine kontinuierliche, deutliche Reduktion des Systemvolumens entsprechend den oben beschriebenen Tenozytenversuchen zur Folge hatte. Diese Reduktion des Konstruktvolumens war bei einer Besiedlung mit MSZ stärker als bei Tenozyten und kann analog zu bereits bekannten Ergebnissen mit Hautfibroblasten (Langholz et al. 1995, Ehrlich u. Rittenberg 2000), renale Fibroblasten (Kelynack et al. 2000), sowie Chrondrozyten (Galois et al. 2006) oder osteogene Zellininen (Riikonen et al 1995) betrachtet werden. Die Gel-Kontraktion war auch in

zweiseitig aufgespannten Kollagen-Gelen zu erkennen. Jedoch kann aufgrund der Ergebnisse von Grinnell et al. (Grinnell et al. 2003) angenommen werden, dass das hier ähnliche Verhalten auf unterschiedlichen Regulationsvorgängen beruhten, die hier nicht weiter verfolgt werden konnten.

Die im Vergleich zu anderen Gruppen beobachtete, eher langsam verlaufende Kontraktion könnte hauptsächlich darauf beruhen, dass für die vorliegende Arbeit sehr reines Rattenschwanzkollagen in vergleichsweise hohen Konzentrationen verwendet wurde.

An frei flotierenden MSZ-besiedelten Kollgagengelen konnte gezeigt werden, dass eine Blockierung der β_1-Integrine mit Hilfe eines Antikörpers die Kontraktion nahezu vollständig verhindert. Daraus lässt sich folgern, dass die Kontraktion zum überwiegenden Teil auf eine Kontraktion des Kollagens durch zelluläre, kollagenbindende β_1-Integrin-Rezeptoren bewirkt wird.

Daneben kann auch der Einfluss des Kollagen-Abbaus mittels MMPs diskutiert werden. Aus Arbeiten von Daniels et al. und Phillips et al. ist bekannt, dass die Inhibition von MMPs die Kontraktion zellbesiedelter Kollagen-Gele bei Fibroblasten verringert (Daniels et al. 2003, Phillips et al. 2003). Dieser Einfluss bietet eine Erklärung für die geringe Restkontraktion zellbesiedelter Kollagen-Gele bei Anwesenheit von 10µg/mL Anti-β_1-Integrin.

Es konnte kein Zusammenhang der Kontraktion zellbesiedelter Kollagen-Gele mit der Zugabe der Wachstumsfaktoren rhTGF-β1, rhPDGFbb oder rhBMP13 in der hier untersuchten Konzentration von je 10ng/mL Kulturmedium gefunden werden. Auch die Kultivierung in osteogenem Differenzierungsmedium beeinflusste die Kontraktion nicht. Adipogenes Differenzierungsmedium als Kulturlösung führte zu einer merklichen, aber nicht statistisch signifikanten Verringerung der Kontraktion, die weiter unten diskutiert werden soll (Punkt 3.1.2, S. 99). Diese Ergebnisse verdeutlichen die Wichtigkeit einer klaren Unterscheidung zwischen Vorläuferzellen und ausdifferenzierter Zelltypen, da andere Arbeitsgruppen zeigen konnten, dass die Kontraktionsfähigkeit verschiedener ausdifferenzierter Zelltypen, wie Endometrialzellen oder Fibroblasten, durch die Anwesenheit von TGF-β1 und PDGFbb beeinflusst wird (Grinnell 1999, Kagami et al. 1999, Tamariz und Grinnell 2002, Abe 2003, Kobayashi et al 2005, Kopp et al. 2005, Matsumoto et al 2005).

3.1.2 Zellmorphologie innerhalb der Konstrukte

Innerhalb beider Zellträgersysteme waren Zellen unterschiedlicher Morphologie erkennbar. Die Morphologie einer Zelle kommt u.a. durch eine unterschiedliche Adhäsionsmöglichkeit zustande, die sowohl durch die Rezeptorspezifität für verschiedene Biomaterialien, als

auch durch die unterschiedliche dimensionale Ausmessung der Substrate beeinflusst werden. Diese Aspekte haben über die Transduktion dieser Informationen in die Zelle mittels verschiedener Linker-Strukturen – in erster Linie Integrine - einen Einfluss auf die Zellreaktionen (Carragher u. Frame 2004).

Während für Fibroblasten die Ausbildung einer dendritischen Morphologie nach der Einbringung in ein kontrahierendes Kollagen-Gel beschrieben ist (Grinnell et al. 2003) und Chondrozyten eine eher runde Morphologie annehmen (Galois et al. 2006), zeigten MSZ bereits nach 24h und dann konstant über die gesamte Kultivierungsdauer von bis zu 14 Tagen eine elongierte Zellform, das auf eine korrekte Anheftung der Zellen an die angebotene Matrix schließen lies.

Obwohl Jäger et al. für Ratten-MSZ in zweidimensionalen Versuchen eine deutliche bessere Adhärenz auf Kollagenschichten im Vergleich zu PLLA-Folien fanden (Jäger et al. 2005), zeigten die in dieser Arbeit verwendeten, dreidimensionalen PLLA-Konstrukte eine sehr gute Zell-Adhärenz. Ein genauer Vergleich kann nicht vorgenommen werden, da durch den Einschluss der Zellen im Kollagen-Gel keine Zellverluste selbst bei mangelnder oder verzögerter Adhäsion zu erwarten sind. Die hier verwendete Methode zur Besiedlung der PLLA-Konstrukte, bei der die Zellsuspension in einem geringen Volumen aufgebracht und erst nach 8h das Kulturmedium zugegeben wurde, sorgte für eine homogene Besiedlung der Konstrukte. Die Zellen adhärierten gut und umspannten die Fasern oder bildeten faserüberspannende Netzwerke.

Die Zugabe von 10µg/mL Antikörper gegen die β_1-Integrin-Untereinheit, wodurch eine Interaktion mit der Kollagenmatrix verhindert wurde, resultierte in der zu erwartenden, veränderten Zellmorphologie. Die MSZ im Kollagen-Hydrogel erschienen rund und nicht in der Lage, einwandfrei an die Matrix zu binden. Diese Beobachtungen ließen darauf schließen, dass die Interaktion von MSZ mit extrazellulärem Kollagen über die gleichen Transmembran-Moleküle stattfindet, wie in differenzierten Zellen der mesenchymalen Linie, den β_1-Integrinen (Langholz et al., 1995; Levy et al., 2000; Siljander et al., 2004).

Im Vergleich mit einer PLLA-Kultur ohne Antikörpergabe bewirkte die Zugabe eines Antikörpers gegen β_1-Integrin zunächst keine Unterschiede in der Adhäsion und Zellmorphologie. Nach etwa 7 Tagen konnte jedoch gezeigt werden, dass die Zellen sich abrundeten und die Zellzahl im Konstrukt abnahm. Gleichzeitig fanden sich Zellen im Überstand. Dieses Phänomen konnte mit einer beginnenden Matrixproduktion interpretiert werden. Zunächst adhärierten die Zellen unspezifisch an den PLLA-Fasern, wohl vor allem über Fibronektin-Rezeptoren. Diese RGD-abhängige Bindung konnte für verschiedene Bioma-

terialien bereits gezeigt werden (Welle et al. 2006). Nachdem durch die Synthese extrazellulärer Matrixproteine und Kollagene auf die PLLA-Fasern abgelagert wurden, war durch die Blockierung der β_1-Integrine die Möglichkeit der Anheftung nicht mehr gegeben. Der Einschluss des synthetischen PLLA-Materials in eine kollagenäre Schicht kann analog zur Bildung einer fibrösen Kapsel betrachtet werden, wie er *in vivo* mehrfach beschrieben ist (Siamora u. Chern 2006). Diese Art der Anregung der Matrixproduktion ermöglicht einen raschen Aufbau einer autologen Matrix.

Die Zugabe von Wachstumsfaktoren änderte die Morphologie der MSZ im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen nicht. Dies lies vermuten, dass extern applizierte Wachstumsfaktoren das Integrin-Expressionsmuster nicht wesentlich beeinflussten. Auch die Kultivierung in osteogenem Differenzierungsmedium hatte keinen Einfluss auf die Zellmorphologie. Adipogenes Differenzierungsmedium bewirkte eine leicht veränderte Zellmorphologie. Die Zellen erschienen gut adhärent, zeigten jedoch einen etwas rundlicheren Zellkörper, der für (Prä-)Adipozyten charakteristisch ist (Novakofski 2004). Diese leichte Änderung in der Morphologie ist wahrscheinlich die Ursache für die oben beschriebene, abgeschwächte Kontraktion der Kollagen-Gelkonstrukte.

In statisch aufgespannten Kollagen-Gelen konnte neben der elongierten Zellform auch eine Ausrichtung der Zellen entlang der uniaxialen Spannung beobachtet werden. Diese Ausrichtung zeigte, dass die Zellen innerhalb des Kollagen-Gels die Spannungsrichung wahrnahmen.

Analog zu den Versuchen im Kollagen-Gel konnte kein Einfluss von Wachstumsfaktoren oder Differenzierungsmedien innerhalb von 2 Wochen auf die Zellmorphologie bei PLLA-Konstrukten gefunden werden.

3.1.3 Proliferation und Apoptose

Für die Beurteilung der Biokompatibilität von Zellträgermaterialien *in vitro* kann die Proliferationsfähigkeit der Zellen oder deren Apoptoseinduktion in Kontakt mit dem Biomaterial herangezogen werden. Die Abschätzung der Proliferation wurde in der vorliegenden Arbeit durch den Anteil PCNA-positiver Zellen vorgenommen. PCNA ist in verschiedene replikative aber auch reparative Prozesse involviert (Maga u. Hübscher 2003). Der Ubiquitinierungsgrad des Proteins entscheidet über die Affinität zu verschiedenen DNA-Polymerasen (Kannouche u. Lehmann 2003) und damit über die aktuelle Verwendung des Proteins auch in humanen Zellen (Kannouche et al. 2004). Die Unterscheidung zwischen den unterschiedlichen Zuständen konnte hier nicht vorgenommen werden. Die β_1-Integrin-

vermittelte Wechselwirkung von Zellen mit der EZM wurde bereits für einige Zelltypen als Überlebenssignal beschrieben. Daher wurde in dieser Arbeit die Proliferation untersucht und darüber hinaus zur Validierung der erhaltenen Ergebnisse die Apoptoserate beispielhaft mittels eines TUNEL-Tests nach zweiwöchiger Kultivierung von MSZ im Kollagen-Gel in An- und Abwesenheit des Anti-β_1-Integrins ermittelt (Heckmann et al. 2006). Die Bestimmung sowohl von Proliferation, als auch für Apoptose konnte durch einen Vergleich der Daten die Verlässlichkeit der Methoden bestätigen. Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass humane MSZ ein leicht unterschiedliches Verhalten im Vergleich zu voll ausdifferenzierten Zellen zeigen, wenn man Proliferation und Apoptose betrachtet. Es konnte eine geringe Grundrate des programmierten Zelltodes im Vergleich zu Fibroblasten gefunden werden, wie von Tian beschrieben (Tian et al. 2002). Die Zugabe des Antikörpers und die damit verhinderte Anheftungsmöglichkeit der Zellen erhöhte die Apoptoserate, wohingegen sie in dermalen Fibroblasten, die in frei flotierenden Kollagen-Gelen kultiviert wurden in Anwesenheit von Antikörpern gegen $\alpha_1\beta_1$ oder $\alpha_2\beta_1$ als verringert beschrieben ist (Niland et al. 2001). Hier spielen wohl unterschiedlich starke Auswirkungen der verringerten Anheftungsmöglichkeit einerseits und der Limitation der Nährstoffversorgung durch die Gel-Kontraktion andererseits eine Rolle. Die dazu korrespondierende Untersuchung der Proliferation über die Abschätzung durch die Anwesenheit von PCNA zeigte, dass MSZ in kontrahierenden Kollagen-Gelen eine höhere Rate PCNA-positiver Zellen aufweisen als MSZ, die in Anwesenheit des Antikörpers kultiviert wurden. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu denen für bovine Chondrozyten, deren Zellzahl in kontrahierenden Kollagen-Gelen abnimmt (Galois et al. 2006), oder humanen Hautfibroblasten, die in kontrahierenden Kollagen-Gelen apoptotisch werden (Fluck et al. 1998). Die geringere Durchschnittsrate PCNA-positiver Zellen bei Kollgen-Gelkonstrukten, die in Anwesenheit des Antikörpers kultiviert wurden, korrespondiert jedoch mit Ergebnissen von Defilippi et al. für endotheliale Zellen (Defilippi et al. 2005). Dort konnte gezeigt werden, dass die Matrix-Anheftung Vorraussetzung für den Fortschritt des Zellzyklus ist.

Der Vergleich der Proliferationsraten von MSZ, die in Anwesenheit von Wachstumsfaktoren kultiviert wurden mit den jeweiligen Kontrollansätzen ohne Wachstumsfaktor zeigte keinen Einfluss dieser löslichen Faktoren auf die PCNA-Synthese. Auch die Kultivierung in osteogenem Differenzierungsmedium beeinflusste die Proliferation nicht. Die Anwesenheit von adipogenem Differenzierungsmedium verursachte eine tendenziell niedrigere Proliferationsrate der Zellen. Diese verringerte Proliferationsrate ist für die beginnende adipogene Differenzierung beschrieben (Ailhaud et al. 1990) und kann auch als mögliche Ursa-

che für die leicht verringerte Kontraktionsrate der Kollagen-Gel-Konstrukte interpretiert werden.

Die Proliferationsrate wurde auch für Zellen bestimmt, die unter verschiedenen Kulturbedingungen auf PLLA-Matrices kultiviert wurden. Takata et al. konnten in einer Studie zeigen, dass die Proliferationsrate von Zellen in Kontakt mit Biomaterialien (unter anderem bovinem Kollagen Typ I und einem Polylaktid-Copolymer) unterschiedlich ist (Takata et al. 2001). Die in dieser Arbeit verwendeten Biomaterialien zeigten unter jeweils gleichen Kulturbedingungen jedoch nur geringe Auswirkungen auf die Proliferation von MSZ. Die Rate PCNA-positiver Zellen war in beiden Kultursystemen unter gleichen Kulturbedingungen vergleichbar. Es wurde eine Tendenz zu höheren Raten in Kollagen-Gelen im Vergleich zu PLLA-Konstrukten gefunden. Wie oben beschrieben, wurden die Zellen im Kollagen-Gel vollständig von der angebotenen Matrix umschlossen, was zu einer großen Anheftungsoberfläche führte. Auf den PLLA-Zellträgern entsprach die Anheftungsfläche eher der in zweidimensionaler Kultur. Da die Adhäsionsmöglichkeit, wie durch die Integrin-Antikörperversuche gezeigt, jedoch einen Einfluss auf die Proliferation hat, war dies ein Erklärungsansatz für die Beobachtungen.

3.2 Differenzierung der MSZ

Im Gegensatz zu vielen bisherigen Studien, in denen primäre humane Zellen in Kollagen-Gelen nur über relative kurze Zeitspannen von maximal einigen Tagen untersucht wurden, wurde in der vorliegenden Arbeit die Kultivierung über bis zu 14 Tage durchgeführt, um mögliche Effekte der verschiedenen Kultivierungsbedingungen auf die Differenzierung der MSZ zu betrachten.

Mizuno und Kuboki, sowie Salaszynk et al. berichten eine Induktion spontaner osteogener Differenzierung von MSZ, wenn sie im Kontakt mit einer Kollagen Typ I-Matrix kultiviert wurden (Mizuno u. Kuboki 2001, Salaszynk et al 2004). Phinney et al. konnten im Gegensatz dazu keine osteogene Differenzierung von Ratten-MSZ beobachten, die in Kollagen-beschichteten Kulturschalen kultiviert wurden (Phinney et al. 1999). Die letztere Beobachtung entsprach den Ergebnissen dieser Arbeit. Die Kultivierung von MSZ im Kollagen-Hydrogel induzierte keine spontane Differenzierung in die osteogene, chondrogene oder adipogene Richtung, soweit anhand der Überprüfung von je 2 typischen Markergenen beurteilt werden konnte. Es konnte im Gegenteil sogar eher eine Verminderung leicht exprimierter Differenzierungsmarker durch Kultivierung im Kollagen-Gel beobachtet werden. Die Diskrepanz zwischen den unterschiedlichen Ergebnissen der Arbeitsgruppen könnte sich aus der Verwendung unterschiedlicher Kollagen-Gelsysteme ergeben. Die Daten un-

terstützen die These von gewebeständigen Vorläuferzellen, wie sie bereits in trabekulärem Knochen (Tuli et al. 2003), Synovium (Fickert et al. 2003), Haut (Shih et al. 2005) oder Fett (Dicker et al. 2005) gefunden wurden. Die Reaktion dieser Zellen auf externe Differenzierungsfaktoren könnte jedoch durch Integrin-vermittelte Interaktionen vermittelt bzw. beeinflusst werden, wie für β_1-Integrin und osteogene Differenzierung bereits gezeigt (Gronthos et al. 2001).

Für die vorliegende Arbeit wurde hochreines Ratten-Kollagen verwendet und die verwendeten Kulturmedien enthielten nur hitzeinaktiviertes FKS. Bovines Kollagen könnte unterschiedliche Reaktionen auslösen, da die Unterschiede im Herkunftsgewebe unterschiedliche posttranslationale Modifizierungen wie die Lysyl-Hydroxylierung (Knott u. Bailey 1998) oder eventuelle Rückstände von Wachstumsfaktoren implizieren können. Die Kultivierung der Konstrukte in Anwesenheit von Wachstumsfaktoren oder Differenzierungsmedien belegten den Effekt einer Retention der Differenzierung weiter. Die Vermutung, dass die Auswahl der Kollagenquelle diesen Effekt hervorruft, wird durch die Befunde von Mauney et al. bestätigt, die ebenfalls MSZ auf Rattenkollagen kultivierten. Auch in ihren Ansätzen konnte weder eine Induktion der osteogenen, noch der adipogenen Differenzierung beobachtet werden (Mauney et al. 2004, Mauney et al. 2005, Mauney et al. 2006). Ähnliche Ergebnisse zur Unterdrückung einer spontanen Differenzierung werden auch für weitere Materialien, wie einer von Hilfszellen gebildeten EZM berichtet (Matsubara et al. 2004).

Für die synthetischen PLLA-Zellträger ergaben sich prinzipiell vergleichbare Ergebnisse. In einigen Ansätzen mit Zellen unterschiedlicher Spender gab es jedoch Donor-abhängige Reaktionen auf Genexpressionsebene zu beobachten. Es wurden verschiedene Marker (z.B. *ALP*, *Osteocalcin*, *CART1*, *LPL* oder *Leptin*) leicht induziert. Aufgrund der uneinheitlichen Reaktionen kann vermutet werden, dass die Verwendung des synthetischen Materials bedingt durch den genetischen Hintergrund der Spender diese uneinheitlichen Reaktionen evozierte. Außerdem spielt eventuell der unterschiedliche Differenzierungsgrad unterschiedlicher Subpopulationen des Zellkollektivs eine Rolle. Daneben kann auch der Einfluss der Rigidität der Matrix diskutiert werden. Wie Engler et al. berichten, spielt die Elastizität der Matrix bei der Differenzierung von MSZ eine große Rolle (Engler et al. 2006). Sie konnten nachweisen, dass die Elastizität der Mikroumgebung allein bereits spezifischer Differenzierungsstimulus ist, der vor allem bei der Stabilisierung des Differenzierungsvorganges über längere Zeiträume zum tragen kommt.

3.3 Zell-Matrixproduktion

Der Auf-, Ab- und Umbau der extrazellulären Matrix ist in gesundem Gewebe ein kontinuierlicher Prozess. Unter nicht-pathologischen Bedingungen ergibt sich daraus eine Homöstase, die auch eine Anpassung an unterschiedliche Gegebenheiten ermöglicht. So kann auf eine erhöhte oder verminderte Anforderung an Muskeln oder Sehnen mit der Reorganisation des Gewebes reagiert werden (Kjær et al. 2006).

3.1.4 Kollagene

Der Gewebeersatz durch *in vitro* hergestellte Konstrukte erforderte zunächst die Fähigkeit der verwendeten Zellen, eine funktionelle Matrix zu bilden. Deshalb wurde die Expression einer Reihe von Matrix-Proteinen, die man in nativen Sehnen und Bändern findet, in der dreidimensionalen Kultur untersucht. Sehen und Bänder bestehen hauptsächlich aus Kollagen, vom Typ I und –III. Zu einem geringeren Anteil kommen auch die Kollagene Typ V und –VI vor. An bestimmten, unter Druckbelastung stehenden Abschnitten, sowie in den Insertionsstellen am Knochen findet man darüber hinaus auch Kollagen Typ X. Es konnte nachgewiesen werden, dass MSZ die Kollagene Typ I, -III, -V und -VI exprimierten und sich deshalb für das „Tissue Engineering“ von Sehen und Bändern sehr gut eigneten.
Die Expression von Kollagen Typ I, als Haupt-Matrixbestandteil, wurde sowohl auf Transkriptionsebene mittels „real time“ PCR, als auch auf Translationsebene mit Hilfe immunhistochemischer Färbung untersucht. Wie sich zeigte, konnten zunächst keine Veränderungen der *COL1A1*-Expression gefunden werden, wenn MSZ in Kollagen-Hydrogele eingebracht wurden. Nach 14tägiger Kultivierung der MSZ in Kollagen-Gelen stieg die *COL1A1*-Expression leicht an. Hier zeigte sich eine zu Tenozyten unterschiedliche Reaktion, die – wie oben diskutiert – die Expression von Kollagen Typ I nach einer Einbringung in das Kollagen-Gel verringerten. Diese Unterschiede in der Expression von *COL1A1* konnten Ge et al. bereits in der zweidimensionalen Kultur beschreiben (Ge et al. 2005) und wurden also durch die 3D-Kultur noch verstärkt. Für Fibroblasten ist es bekannt, dass die Kollagensynthese über $\alpha_1\beta_1$-Integrine vermittelt wird (Langholz et al. 1995). Jedoch wurde in dieser Arbeit eine schnelle und starke Verminderung der Kollagen I-Synthese nach 48h Kultivierung von Hautfibroblasten in Kollagen-Gelen beschrieben. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die *COL1A1*-Expression von MSZ in Kollagen-Gelen nicht vermindert wird. Man konnte beobachten, dass sie im Vergleich zur 2D-Kultur sogar anstieg, was dem Verhalten von Chondrozyten in Kollagen-Gelen entsprach (Saldanha u. Grande, 2000). Diese Ergebnisse verdeutlichen die Wichtigkeit der im Vergleich zu anderen Stu-

dien langen Versuchsdauer. Dadurch konnten die längerfristigen Anpassungen der Zellen an die veränderten Bedingungen erfasst werden.

Die Kultivierung zellbesiedelter Kollagen-Gele in Anwesenheit des β_1-Integrin-Antikörpers führte dagegen zu einer verminderten *COL1A1*-Expression wobei Unterschiede einer *COL1A1*-Expression in den immunhistochemischen Färbungen nicht deutlich wurden. Das Expressionsniveau dieses Kollagens scheint hierfür zu hoch zu liegen, um histologische quantifizierbar zu sein. Eine weitere Rolle könnte eine Kreuzreaktion des hier verwendeten primären Antikörpers spielen, wodurch eine Unterscheidung zwischen tatsächlich endogen produziertem humanem Protein und bereits vorhandenem murinem Kollagen erschwert wurde.

Ein Einfluss von statischer Aufspannung der Gele, Wachstumsfaktoren oder Differenzierungsmedien auf die Kollagen-Typ Ia1-Synthese konnte nicht gefunden werden. Dieser Befund unterschied sich teilweise mit dem in der Literatur beschriebenen Einfluss von rhBMP13 auf Tenozyten-Kulturen. Eine Zugabe dieses Wachstumsfaktors stimulierte hier die Expression dieses Kollagens (Wong et al. 2005). Dies könnte darauf hindeuten, dass die Regulation der Kollagensynthese in mesenchymalen Zellen abhängig vom Differenzierungsgrad der Zellen ist.

Die Kollagen-Expression von MSZ auf synthetischen PLLA-Trägern ist bisher nicht beschrieben. Interessanterweise zeigten MSZ auf den synthetischen PLLA-Matrices einerseits Unterschiede, andererseits Analogien zu dem Verhalten in Kollagen-Hydrogelen. Nach der Aussaat verringerten MSZ ihre *COL1A1*-Expression auf etwa ein Sechstel der Expression in der 2D-Kultur. Diese Regulation erfolgte innerhalb der ersten 12h nach Aussaat und Medienzugabe und blieb dann über den Versuchszeitraum konstant. Saldanha und Grande konnten für Chondrozyten eine ähnliche Reaktion finden. Sie beobachteten zunächst einen leichten Anstieg der *COL1A1*-Expression, später jedoch ebenfalls eine Verminderung der mRNA-Expression (Saldanha u. Grande 2000). Analog zu den Versuchen im Kollagen-Gel konnte bei Kultur in Anwesenheit von 10µg/mL Anti-β_1-Integrin eine verstärkte Verringerung der Kollagen Typ I-Synthese gefunden werden. Dieser Unterschied zwischen den beiden Kultivierungsbedingungen war nach 48h statistisch signifikant ($p<0,05$) und verstärkte sich über die Zeit. Die Unterschiede wurden durch immunhistochemische Färbung insofern bestätigt, als dass bei Anwesenheit des Antikörpers lediglich eine intrazelluläre Kollagen I-Färbung erkennbar war. Bei Abwesenheit des Antikörpers wurden die Matrixmoleküle sezerniert. Die Anwesenheit der hier untersuchten Wachs-

tumsfaktoren oder Differenzierungsmedien hatte keinen durch „real time“ PCR und Immunhistochemische Färbung beurteilbaren Einfluss auf die Kollagen I-Synthese.
Die Kollagentypen II, -III, -V und -VI wurden mittels semi-quantitativer PCR untersucht. Dabei konnte für alle Ansätze keine Veränderung der Expression gefunden werden. *COL3A1, COL5a1* und *COL6a1* wurden konstant stark exprimiert, *COL2a1* konnte nicht nachgewiesen werden. Immunhistochemische Färbungen validierten diese Befunde analog zu den Ergebnissen von Juncosa-Melvin et al. (Juncosa-Melvin et al. 2006).
Kollagen Typ X ist vor allem ein Produkt von hypertrophen Chondrozyten. In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass humane MSZ Kollagen Typ X in einigen 2D-Kulturen exprimierten, obwohl eine Expression von Kollagen Typ II nicht gefunden werden konnte. Nach Einbringen und zweiwöchiger Kultur von MSZ in ein Kollagen-Hydrogel wurde die Expression dieses Proteins in allen Fällen induziert bzw. verstärkt. Wobei auch hier analog zur 2D-Kultur keine Induktion von *COL2a1* detektiert werden konnte. Dieser Befund entsprach denen von Mwale et al. und Pelttari et al., die in Mikromassenkulturen bei chondrogener Differenzierung ebenfalls teilweise eine Kollagen Typ X-Expression vor oder ohne die Expression von Typ II-Kollagen fanden. Dies stellt eine alleinige Funktion von Kollagen Typ X als Marker terminaler Chondrozytendifferenzierung in Frage (Mwale et al. 2006, Pelttari et al. 2006). Da Kollagen Typ X auf Proteinebene jedoch nicht nachgewiesen werden konnte, ist hierbei auch der Einfluss der translationalen Regulation zu diskutieren. Bei Kultivierung der Zellen in Anwesenheit des Anti-β_1-Integrins war die Induktion der Kollagen Typ X-mRNA-Expression deutlich schwächer. Sowohl rhTGFβ-1, rhPDGFbb, rhBMP13 oder osteogenes bzw. adipogenes Differenzierungsmedium beeinflussten die Expression von Kollagen Typ X im Kollagen-Gel nicht.
MSZ, die auf PLLA-Zellträgern kultiviert wurden, zeigten ein leicht unterschiedliches Verhalten. Die Induktion von *COL10a1* war deutlich schwächer. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Zugabe von 10ng/mL rhTGF-β1 zum Kulturmedium die *COL10a1* -Expression im Vergleich mit den anderen Kultivierungsbedingungen deutlich verstärkt. Die Induktion von Kollagen Typ X ist ein häufiger Befund bei chondrogener Differenzierung in Mikromassenkulturen von MSZ unter Verwendung von TGF-β als Differenzierungszusatz (Pelttari et al. 2006, Mello u. Tuan 2006). Die beobachtete Induktion von *COL10a1* auf mRNA-Ebene war bei Kultivierung von MSZ in PLLA-Konstrukten jedoch mit keiner in der immhunhistochemischen Färbung detektierbaren Deposition von Kollagen-Typ X-Protein verbunden. Die fehlende Translation von *COL10a1* und die zusätzliche Abwesenheit einer *COL2a1*-Expression deuteten darauf hin, dass MSZ auf PLLA-Matrices

auch in Anwesenheit von 10ng/mL rhTGF-β1 keine chondrogene Differenzierung beginnen. Darüber hinaus verdeutlichten diese Befunde die Wichtigkeit paralleler Untersuchungen von Gen- und Proteinexpression in Zellkulturstudien. Die Beobachtungen zur Kollagensynthese vor allem bei 3D-Kultivierung auf PLLA-Trägern sind so relevant, da Studien hierzu bisher fehlen. Die Komposition der extrazellulären Matrix ist aber von entscheidender Bedeutung für deren Funktionalität und dadurch die Möglichkeiten für die Eignung als Ersatzgewebe.

3.1.5 Nicht-kollagene Matrix-Moleküle

Proteoglykane und Glykoproteine vermitteln viele Interaktionen zwischen EZM-Komponenten und Wachstumsfaktoren (Bi et al. 2005, Sawaguchi et al. 2006) und sind daher wichtige Regulatoren verschiedener zellbiologischer Prozesse. Als Beispiel hierfür kann die Regulation des Kollagenfibrillen-Durchmessers durch Decorin genannt werden (Reed u. Iozzo 2002). Die Untersuchungen zu Proteoglykan-Expressionen bei MSZ beschränkten sich bisher hauptsächlich auf Untersuchungen bei chondrogener Differenzierung, da sie dort in sehr hohen Anteilen vorkommen (Douglas et al. 2006). Da Proteoglykane aber in fast allen Geweben und sehr stark in Sehen und Bändern exprimiert werden, wurden eine Reihe relevanter Vertreter untersucht.

Tenascin-C ist ein Matrix-Protein mit beschränkter Expression *in vivo*, das hautsächlich in sich entwickelnden Regionen oder an Stellen aktiven Umbaus bzw. in der Nähe von Verletzungsstellen gefunden werden kann (Wenk et al., 2000; Midwood u. Schwarzbauer, 2002). Es wird durch mechanische Belastung reguliert (Chiquet-Ehrisman u. Tucker 2004). Die starke Tenascin-C-Expression von MSZ in kontrahierenden Kollagen-Gelen deutet an, dass durch die mechanische Information in den Zellen ein aktiver Umbau der Matrix induziert wird. Diese Erklärung wird dadurch bestätigt, dass in Konstrukten, die in Anwesenheit von Anti-β_1-Integrin kultiviert wurden und somit keine mechanischen Reiz durch Veränderung der umgebenden Matrix erfahren, keine Veränderung der *tenascin-C*-Expression gefunden werden konnte.

Die Anwesenheit von rhTGFβ-1, rhPDGFbb, BMP13 oder osteogenes bzw. adipogenes Differenzierungsmedium hatte keinen Einfluss auf die *tenascin-C*-Expression, dh die tenascin-C-Expression wird nicht durch WTF moduliert.

Sarasa-Renedo and Chiquet beschrieben, dass Integrine eine Reihe interner Signalkaskaden direkt nach mechanischer Stimulation auslösen und dass das Expressionsniveau von *tenascin-C* direkt mit der Intensität des mechanischen Stimulus korreliert (Sarasa-Renedo u. Chiquet 2005). In einer weiteren Arbeit konnte der Mechanismus dieser Kaskade dem

RhoA/ROCK-Signalweg zugeordnet und gezeigt werden, dass das Aktin-Zytoskelett involviert ist (Sarasa-Renedo et al. 2006). Dieser Befund deckte sich sowohl mit den hier beschriebenen Versuchen mit Anti- β_1-Integrin, als auch damit, dass sogar eine Verminderung der mRNA-Expression gefunden werden konnte, wenn MSZ auf den relativ starren PLLA-Fasern kultiviert wurden. Die Anwesenheit von Anti- β_1-Integrin hatte in diesem Fall auch keinen Einfluss auf die *tenascin-C*-Expression, genauso wenig wie die Gabe von Wachstumsfaktoren oder Differenzierungsstimuli.

Wie bereits für Tenozyten diskutiert, stellt der Transkriptionsfaktor für Tenomodulin – Scleraxis – einen sehr frühen Marker von Sehnen dar (Schweitzer et al. 2001). Eine schwache Expression beider Proteine auf mRNA-Ebene konnte in wenigen Fällen vor Versuchbeginn detektiert werden. Die meisten MSZ exprimierten diese Proteine nicht. Eine Induktion fand durch die Kultivierungsbedingungen nicht statt. Das Fehlen dieser bisher nur wenig untersuchten Marker bedeutet jedoch lediglich, dass der Phänotyp einer embryonalen Sehnenvorstufe nicht erreicht wurde.

Eine Reihe weiterer Proteogklykane (Decorin, Fibromodulin, Biglykan Versikan, Lumikan, Fibronektin-1 und Elastin) konnten dagegen bereits in MSZ aus der zweidimensionalen Kultur gefunden werden, was mit den Befunden verschiedener Arbeitsgruppen korrelierte (Risbud et al. 2004, Cristino et al. 2005, Nöth et al. 2005). Die hier angewandten Kultivierungsbedingungen veränderten die Expressionrate dieser Moleküle nicht relevant.

3.4 Matrix-Anheftung über Integrine

Informationen der extrazellulären Matrix werden über verschiedene Transmembranrezeptoren in die Zellen vermittelt. Die wichtigste Gruppe dieser Moleküle bilden die Integrine, die sowohl Information über die extrazelluläre Matrix ins Zellinnere weitergeben können („outside-in signaling“), als auch die Matrix selbst aus der Zelle heraus beeinflussen („inside-out signaling“) (Ginsberg et al. 2005). Über eine Veränderung der Integrin-Präsentation auf der Zelloberfläche kann die Adhäsionsstärke oder auch die Spezifität für verschiedene Substrate gesteuert werden. Die Integrin-Dimere $\alpha_1\beta_1$ und $\alpha_2\beta_1$ stellen die Haupt-Kollagenrezeptoren dar, jedoch bindet die Kombination mit α_1 hauptsächlich das Kollagen-Monomer, jene mit α_2 darüber hinaus Kollagenfibrillen und ist für die Aufspreitung der Zellen auf diesen verantwortlich (Heino 2000, Jokinen et al. 2004).

Die Interaktion von Zellen mit der extrazellulären Matrix ist vor allem für Chondrozyten als Überlebenssignal zur Verhinderung von Apoptose beschrieben (Hirsch et al. 1997, Cao et al. 1999). Ihre Relevanz für MSZ wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht. Daneben wurde der Effekt von Wachstumsfaktoren auf die Integrin-Expression untersucht. Ein Ein-

fluss einiger Wachstumsfaktoren wie TGF-β1 oder PDGFbb auf die Integrin Expression ist für einige Zelltypen bereits beschrieben. Kagami et al. zeigten eine Erhöhung von $\alpha_1\beta_1$-Integrin bei mesangialen Rattenzellen, PDGFbb hatte dagegen keinen Einfluss (Kagami et al. 1999). Miller et al. fanden ebenfalls eine Erhöhung von $\alpha_1\beta_1$-Integrin durch TGF-β1 bei Ratten-Neuroblastomazellen (Miller at al. 2006). Dagegen erhöhte die Gabe von PDGFbb die Integrin β_1- und β_2-Präsenation in humanen Aorta-Zellen (Cai et al. 2004). Der Vergleich dieser Ergebnisse zeigt, dass Wachstumsfaktoren in unterschiedlichen Zellen unterschiedliche Einflüsse auf die Regulation der Integrin-Expression haben und deshalb für jeden Zelltyp genau betrachtet werden müssen.

In humanen MSZ konnte nach der Isolation und der 2D-Zellkultur die Integrin-Untereinheiten α_1, α_2, α_3 und β_1 beschrieben werden. Der Nachweis der α_3-Untereinheit konnte bei einer Studie von Gronthos et al. nicht erbracht werden (Gronthos et al. 2001). Dies resultierte vermutlich aus dem Umstand, dass diese Studie nur die STRO-1 positive Subfraktion untersuchte, in der vorliegenden Arbeit dagegen die gesamte Plastik-adhärente Population des Knochemarks verwendet wurde.

Nach Einbringung der MSZ in ein Kollagen-Gel konnte eine initiale Erhöhung des mRNA-Levels des *α_1-Integrins* detektiert werden, unabhängig von der An- oder Abwesenheit eines Antikörpers gegen Integrin β_1. Nach 14 Tagen war die Expression im Falle der Kultivierung ohne Antikörper weiter erhöht. Bei Anwesenheit des Antikörpers und damit fehlender Kontraktion sank die Transkriptionsrate auf das Niveau der zweidimensionalen Kultur ab. Die Zugabe von rhBMP13 oder die Kultivierung in osteogenem Differenzierungsmedium erhöhte die Expression des *α_1-Integrins* bei Abwesenheit des Antikörpers weiter, wobei die statische Aufspannung und Applikation einer uniaxialen Spannung erbrachte keine Veränderung der Expression bedingte.

Auf PLLA-Matrices kultivierte Zellen verminderten die Expression dieser an der Kollagenbindung beteiligten Untereinheit dagegen unter sämtlichen hier verwendeten Kultivierungsbedingungen jeweils auf ungefähr 1/10 des Ausgangswertes. Die Unterschiede des Expressionsniveaus zwischen den beiden Zellträgern waren unter fast allen Kultivierungsbedingungen statistisch signifikant ($p<0,05$) oder sogar hoch signifikant ($p<0,01$). Dieser Befund zeigte, dass die Anpassung der Integrin-Expression neben anderen bekannten Regulationsmechanismen wie Konformationsänderungen oder Rezeptor-„Clustering“ als Reaktion von Zellen auf ihre Umgebung erfolgt (Fernandez et al. 1998).

Die Expression der *Integrin α_2*-Untereinheit war abhängig vom verwendeten Zellträger. Während diese Komponente des Liganden für fibrilläres Kollagen bei Kultur im Kollagen-

Hydrogel unter allen Bedingungen, einschließlich der Blockierung der β_1-Untereinheit verstärkt exprimiert wurde, konnte in allen Versuchen mit PLLA als Zellträger eine Verminderte Expression gefunden werden. Solche Unterschiede der Anpassung sind – wie bei Yamada et al. diskutiert – nicht nur auf die molekulare Zusammensetzung des Zellträgers, sondern auch auf deren Rigidität und Struktur zurückzuführen (Yamada et al. 2003).

Für die in der vorliegenden Arbeit ebenfalls untersuchte Integrin-Untereinheit α_3 wurden ähnliche Effekte gefunden, wie sie für die α_1-Untereinheit beobachtet werden konnten. Die *Integrin α_3*-Expression wurde nicht von der Einbringung der Zellen in die kollagene Matrix beeinflusst, eine Aussaat in den PLLA-Träger bewirkte jedoch eine verminderte Expression unter allen Kultivierungsbedingungen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen für *Integrin α_1* waren die Unterschiede zwischen den Ergebnissen für die unterschiedlichen Zellträger jedoch nur bei Kultivierung in Anwesenheit von 10ng/mL rhBMP13 statistisch signifikant ($p<0,05$).

Für die Expression der β_1-Integrin Untereinheit konnten keine Regulationsvorgänge beobachtet werden. Diese Einheit kann mit vielen α-Untereinheiten dimerisieren und wird aufgrund dieser universellen Bedeutung nicht oder kaum messbar von den gewählten Kultiverungsbedingungen und experimentellen Ansätzen beeinflusst (Ivaska et al. 2000).

Diese Ergebnisse zeigten also, dass verschiedene Faktoren einen Einfluss auf die α Integrin-Expression nahmen. Die Eigenschaften der Matrix beeinflussten die Integrin-Expression stark, was sich vor allem in der Expression der α_2-Untereinheit ausprägte. Die Unterschiede wurden durch Anwesenheit von rhBMP13 weiter verstärkt. Zellen in Kollagen-Hydrogel verstärkten darüber hinaus die Expression der kollagenbindenen α_1-Unterheit in Anwesenheit dieses Wachstumsfaktors, wohingegen auf PLLA eine verminderte Expression zu erkennen war. Soweit bekannt, konnte ein Einfluss von rhBMP13 auf die Integrin-Expression bisher nicht aufgezeigt werden.

Die Befunde zeigten außerdem, dass β_1-Integrin eine zentrale Rolle in der Interaktion humaner MSZ mit endogenen oder exogenen Kollagen-Matrices spielt. Es ist an der Zelladhäsion an die fibrilläre Matrix beteiligt, die bei Blockierung dieser Untereinheit unterbunden wurde.

3.5 Matrix-Remodeling

Es gibt zahlreiche Belege für einen Zusammenhang von Adhäsionsmolekülen wie Integrinen und der Regulation der Reorganisation der extrazellulären Matrix über MMPs und deren Regulatoren, den TIMPs (Dumin et al. 2001, Ronziere et al. 2001, Lluri et al. 2006).

Veränderungen der Zellkulturbedingungen beeinflussen so nicht nur die Expression der Matrixmoleküle, sondern auch die Expression der Matrix-degradierenden Enzyme. In der vorliegenden Arbeit wurden die für den Kollagenabbau relevanten MMPs betrachtet, da sie die Haupt-Reorganisationsproteine in einer zum überwiegenden Teil aus Kollagen bestehenden Matrix darstellen sollten. Hierbei handelte es sich um die interstitiellen Kollagenasen A und B, welche als MMP-1 und MMP-13 bekannt sind, sowie die Gelatinasen A (MMP-2) und B (MMP-9), die die Abbauprodukte des Kollagens weiter degradieren. Darüber hinaus wurden die MMP-Inhibitoren TIMP-1 und -2 in die Untersuchungen einbezogen.

Es wurde bereits gezeigt, dass Pro-MMP-1 zumindest in humanen Keratinozyten und neuronalen Zellen mit Integrin $\alpha_2\beta_1$ kolokalisiert (Dumin et al. 2001, Conant et al. 2004). Für humane primäre Fibroblasten ist bekannt, dass die Induktion von *MMP-1* über $\alpha_2\beta_1$-Integrin stattfindet (Langholz et al. 1995). Diese Befunde sprechen dafür, dass die Adhäsion an eine Matrix auch dessen Um- oder Abbau organisiert.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Einbringung von MSZ in eine dreidimensionale Kollagenmatrix nach 24h bereits eine starke Erhöhung der *α_2-Integrin*s zur Folge hat und dieses hohe Expressionsniveau über mindestens 14 Tage erhalten bleibt. Dieses konnte für die *MMP-1*-Expression ebenso gezeigt werden. Im Gegensatz zur Kultivierung von MSZ in Kollagen-Gel, wurde das *α_2-Integrin* bei Kultivierung in den 3D-PLLA-Matrices leicht herunterreguliert. Analog verblieb die *MMP-1*-Expression etwa konstant. Es ergab sich über die Kultivierungsdauer von 2 Wochen keine Veränderung im Vergleich zur Expression aus der zweidimensionalen Kultur auf Zellkulturplastik. Diese Analogien konnten für alle Kultivierungsbedingungen bestätigt werden. Das ähnliche Expressionsmuster von *α_2-Integrin* und *MMP-1* bestätigt die oben beschriebenen Befunde anderer Gruppen zur Regulation von MMP-1 durch $\alpha_2\beta_1$-Integrin.

Ein ähnliches Verhalten zeigte sich für die Expression von *MMP-13*, das in einer Chondrozyten-Zelllinie als durch $\alpha_1\beta_1$-Integrin induziert beschrieben werden konnte (Ronziere et al. 2001). Während eine starke Induktion durch 3D-Kultur in Kollagen beobachtet wurde, war die Reaktion auf PLLA nur schwach. Es konnte angenommen werden, dass die Kollagenase-Expression durch Bindung an Kollagen induziert wurde. Die schwache Expression auf PLLA stellte sich dann als Reaktion auf von den Zellen gebildetes Kollagen dar und begann daher stark verzögert. Dieses Expressionsmuster entsprach wiederum vollständig dem Muster der Expression von *COLX*. Die Expression dieses Kollagens und von *MMP-13* wurde bereits von Manello et al. bei der endrochondralen Ossifikation in Zusammenhang

gebracht und als Differenzierungsgrad-abhängige Expression betrachtet (Manello et al. 2006).

In diesem Zusammenhang gilt es außerdem zu beachten, dass gerade hinsichtlich MMPs weitere Regulationsschritte auf Proteinebene vorhanden sind. MMPs werden zunächst als Zymogen synthetisiert, die aktive Form wird durch Abspaltung eines Propeptides gewonnen (Vincenti et al. 1996). Die Aktivierung von MMP-1 oder -13 konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden.

Die Betrachtung der Gelatinasen MMP-2 und -9 ergab sich zunächst keine Expression von *MMP-9* in allen Fällen. MMP-2 konnte mittels RT-PCR in allen Ansätzen als stark exprimiert nachgewiesen werden. Jedoch zeigte die Gelatine-Zymographie, im Gegensatz zum Zustand bei Kultur in Kollagen-Gel, keine oder kaum Aktivierung des MMP-2. Diese Unterschiede zeigen deutlich eine spezifische Reaktion der Zellen auf die Matrix.

Ein Zusammenhang zwischen Integrin- und TIMP-Expression konnte bisher noch nicht aufgezeigt werden. In den für diese Arbeit durchgeführten Versuchen, wurden die TIMPs -1 und -2 untersucht. Während eine leicht verminderte Expression von *TIMP-1* bei Kultivierung von MSZ in Anwesenheit von 10µg/mL Anti-Integrin-β1 auf beiden Zellträgern gefunden werden konnte, beeinflusste die Anwesenheit anderer löslicher Faktoren oder die Applikation einer uniaxialen Spannung die *TIMP-1*-Expression nicht. Die Expression von *TIMP-2* blieb unter allen Versuchsbedingungen durchweg stark exprimiert. Auch *in vivo* wird *TIMP-2* konstitutiv in allen Geweben exprimiert (Chirco et al. 2006).

Zusammenfassend ergaben die Ergebnisse eine weitere Beziehung: Die vermehrte Expression von Kollagen-degradierenden MMPs in Kollagen-Gelen kann in Zusammenhang mit der Gel-Kontraktion gebracht werden. Die Blockierung von β_1-Integrinen mittels Antikörper erbrachte eine nicht vollständige Inhibition der Kontraktion (Punkt 3.1.1, S. 97). Unter Einbeziehung der Ergebnisse von Phillips et al. die eine 12%ige Abschwächung der Gel-Kontraktion bei Anwesenheit eines Breitband-MMP-Inhibitors fanden, konnte die Rest-Kontraktion der mit dem Antikörper kultivierten Gele auf die Degradation durch MMPs zurückgeführt werden (Phillips et al. 2003). Schlussfolgernd könnte also ein Einfluss von sowohl Integrin-Interaktionen, als auch MMP-Degradation bei der globalen Matrix-Kontraktion diskutiert werden, wobei die Wirkung der Integrine einen größeren Anteil an diesem Vorgang ausmacht.

4 Fazit

In dieser Arbeit konnten zelluläre Antworten von multipotenten mesenchymalen Stromazellen in zwei unterschiedlichen 3D-Kultivierungssystemen und die Reaktion auf rhTGFβ-1, rhPDGFbb, rhBMP13 oder osteogenes bzw. adipogenes Differenzierungsmedium beschrieben werden.

Es wurden zwei unterschiedliche Kultivierungsmatrices miteinander verglichen. Es handelte sich um ein Typ I-Kollagen-Gel, welches die Zellen vollständig umschloss, einerseits und um eine Matrix aus texturierten PLLA-Fasern andererseits, die eine hohe Porosität aufwies. Beide Materialien zeigten gute Bio-Kompatibilität und eine gleichmäßige Zellbesiedlung.

Neben der Evaluierung der beiden Materialien wurden der Effekt drei in Sehnen oder Sehnenheilung beschriebener Wachstumsfaktoren - TGF-β1, PDGFbb und BMP13 – untersucht. Mit den gefundenen Ergebnissen konnte ein Einblick in die Relevanz sowohl von Matrix-Eigenschaften, als auch der Einfluss löslicher Faktoren für die Konstruktion eines Gewebeersatzes gewonnen werden. Hierbei gilt es jedoch, sich auch vor Augen zu halten, dass eine Kombination verschiedener Wachstumsfaktoren zur Sehnenheilung notwendig ist (Dahlgren et al. 2005), in einem weiteren Ansatz die Kombination hier gezeigter Ergebnisse also lohnenswert erscheint.

Es konnte gezeigt werden, dass die Auswahl des verwendeten Zellträgers einen entscheidenden Einfluss auf eine Vielzahl zellulärer Reaktionen nahm und dass diese Reaktionen von Wachstumsfaktoren moduliert wurden. Die teilweise unterschiedliche Wirkung der Wachstumsfaktoren könnte durch den Einfluss der Matrix, jedoch auch durch Unterschiede in der lokalen Verfügbarkeit der Wachstumsfaktoren evoziert sein. Die Struktur der Matrix spielte hier eine entscheidende Rolle hinsichtlich der Diffusion von Nährstoffen und Differenzierungsstimuli. Darüber hinaus könnte die Interaktion beider Faktoren – Matrix und Differenzierungsstimuli – eine wichtige Rolle spielen. Hierzu konnten Bi et al. zeigen, dass das Fehlen der Proteoglykane Decorin und Biglycan und das damit verbundene Fehlen der TGFβ-Sequestering eine verstärkte TGFβ-Signalkaskade auslöst, was wiederum bei MSZ zu einer erhöhten Apoptoserate führte (Bi et al. 2005). Die mögliche Bindung von Wachstumsfaktoren an die angebotene oder neu synthetisierte Matrix muss hierbei in Erwägung gezogen werden. In diesem Zusammenhang ist die Untersuchung von an eine Beschichtung gebundenen Wachstumsfaktoren, beispielsweise über die durch die Arbeitsgruppe von Prof. Möller im Rahmen des Kompetenznetzes Biomaterialien Baden-Württemberg erarbeiteten Stern-PEG-Schichten, sicher ein lohnender Ausblick für zukünftige Studien (Groll

et al. 2005). Abschließend kann die Wichtigkeit der vorliegenden neuen Ergebnisse auch deshalb unterstrichen werden, als das gezeigt werden konnte, dass MSZ teilweise ein zu ausdifferenzierten Zellen oder Zelllinien unterschiedliches Verhalten unter ansonsten gleichen Bedingungen zu aufwiesen. Da MSZ von vielen Gruppen als eine viel versprechende Zellquelle für die Geweberegeneration angesehen werden, ist es von entscheidender Bedeutung das Verhalten dieser Zellen genau zu kennen, um funktionelle Konstrukte für den Ersatz von Sehnen- oder Bandgewebe herstellen zu können.

E Zusammenfassung

Sehnen und Bänder sind essentieller Bestandteil des muskuloskeletalen Systems. Sie ermöglichen die Bewegung der Gelenke. Bei Rupturen des Kreuzbandes ist ein operativer Eingriff notwendig, da dort keine Spontanheilung auftritt. Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand deshalb darin, innerhalb des „Kompetenznetzes Biomaterialien Baden-Württemberg“ den Einsatz von humanen multipotenten mesenchymalen Stromazellen (MSZ) im Kontakt mit Biomaterialien beim Tissue Engineering von Sehnen- oder Bandgewebe zu evaluieren und eine gezielte Steuerung zum Phänotyp des Tenozyten (TZ) zu erreichen. MSZ sind TZ als Zellquelle vorzuziehen, da sie ohne Folgeschäden dem Patienten entnommen werden können.

Es wurde zunächst ein TZ-besiedeltes Kollagen Typ I-Gelsystem etabliert und charakterisiert, das als Referenzsystem diente. Das verwendete Kollagen-Gel ist bereits für medizinische Anwendungen zugelassen. Dieses System wurde mit zwei unterschiedlichen Ansätzen verglichen, bei denen MSZ als Zellquelle dienten. Diese Zellen wurden einerseits in dem oben genannten Kollagen-Gel, andererseits auf einem neuartigen Poly-L-Lactid-Konstrukt (PLLA) kultiviert. Hierbei wurde eine gezielte Steuerung der Zelldifferenzierung mit den Wachstumsfaktoren rhTGFβ-1, rhPDGF-bb und rhBMP13 untersucht. Als Vergleich dienten etablierte Differenzierungsmedien, die zur ostogenen bzw. adipogenen Differenzierung verwendet werden. Im Mittelpunkt der Untersuchungen standen Zelladhäsion, -proliferation, Matrix-Metabolismus und eine mögliche Steuerung der Differenzierung über biologische Faktoren. Die Charakterisierung der Zell-Matrix-Wechselwirkung wurde durch Inhibition der β_1-Integrine mit Hilfe eines Antikörpers durchgeführt. Die Beschreibung der Systeme erfolgte zunächst anhand makroskopischer und histologischer Beurteilung. Genexpressionsanalysen verschiedener Differenzierungsmarker, Matrixmoleküle, Matrix-degradierender Moleküle und Integrine wurden quantitativ durch relative Quantifizierung und semi-quantitativ durch RT-PCR durchgeführt. Einige Matrixmoleküle wurden zusätzlich immunhistochemisch untersucht. Die Proteinexpression und –aktivierung der Gelatinasen MMP-2 und -9 wurden mittels Gelatine-Zymographie beurteilt.

Es konnte gezeigt werden, dass die verwendeten Zellen im Kollagen-Gelsystem die Matrix kontinuierlich über einen Zeitraum von 14d kontrahierten. Die Kontraktion war bei MSZ stärker ausgeprägt als bei TZ und konnte durch Gabe von 10µg/ml Anti-β_1-Integrin nahezu vollständig unterbunden werden. Wachstumsfaktoren oder osteogenes Differenzierungsmedium beeinflussten die Kontraktion nicht, adipogenes Differenzierungsmedium führte

zu einer geringeren Kontraktion. Zellen in beiden Kultivierungssystemen wiesen eine fusiforme Zellmorphologie auf. Im PLLA-System ummantelten oder überspannten sie die Fasern. Gabe des Antikörpers führte zu einer rundlicheren Zellmorphologie, die im Kollagen-Gelsystem nach 24h, im PLLA-System nach 7d beobachtet wurde. Die Proliferationsraten waren in beiden Systemen vergleichbar und lagen bei 60-80%. Gabe des Antikörpers führte zu einer leicht verringerten Proliferation. Eine spontane Differenzierung in die ostogene, chondrogene oder adipogene Richtung wurde nicht detektiert. In beiden Systemen und von beiden Zelltypen wurde Kollagen Typ I stark exprimiert. Tenozyten verringerten die Expression im Kollagengel, bei MSZ wurde eine leichte Erhöhung detektiert, die von Anti-β_1-Integrin aufgehoben wurde. Im Kollagen-Gelsystem wurde Kollagen Typ X in TZ verstärkt und in MSZ induziert. In PLLA-Konstrukten war die Induktion von Kollagen Typ X schwächer, wurde aber durch Gabe von rhTGFβ-1 verstärkt. Während Kollagen Typ I immunhistochemisch in allen Ansätzen nachgewiesen werden konnte, lag die Proteinexpression von Kollagen Typ X unterhalb der Nachweisgrenze. Expression von Tenascin-C wurde bei MSZ als von der Matrix abhängig gefunden. Eine starke Erhöhung der Tenascin-C-Expression konnte in kontrahierenden Kollagen-Gelen gefunden werden, nicht jedoch bei Gabe von Anti-β_1-Integrin oder Kultivierung auf PLLA. Die Wechselwirkung mit der Matrix mittels Integrinen wurde untersucht. Während die Expression der sehr universellen β_1-Integrin-Untereinheit von keiner der Kultivierungsbedingungen beeinflusst wurde, wurde Integrin-α_2 durch Kultivierung im Kollagengel im Gegensatz zu PLLA stark erhöht. Matrix-Umbau durch MMPs wurde ebenfalls von der Matrix beeinflusst. Im Kollagen-Gel wurde MMP-1 erhöht, MMP-13 induziert. Die Aktivierung des stark exprimierten MMP-2 fand nur bei Kultivierung im Kollagen-Gel statt. MMP-9 wurde nicht nachgewiesen.

Diese Ergebnisse zeigen die Komplexität der Entwicklung eines Konstruktes für den Gewebeersatz auf. Es konnte dargestellt werden, dass die Auswahl der Matrix einen starken Einfluss auf die Zellreaktionen (vor allem Matrix-Synthese, -Umbau und Adhäsion) hat. Die Gabe der hier untersuchten Wachstumsfaktoren hatte dagegen lediglich einen modulierenden Effekt auf die hier untersuchten Parameter. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von MSZ bzw. TZ mit der Matrix mittels Integrinen ebenfalls einen Einfluss auf die Zellreaktion hat. Die Reaktion der ausdifferenzierten TZ stimmte teilweise mit der von MSZ überein, teilweise jedoch nicht. Ein Vergleich mit Daten aus der Literatur zeigt ebenfalls sowohl Übereinstimmungen als auch Differenzen. Dieser Befund verdeutlicht, dass eine Übertragung von Ergebnissen auf andere Zelltypen sogar der gleichen Spezies problematisch ist.

F Literaturverzeichnis

1. Abe M, Ho CH, Kamm KE, Grinnell F: Different molecular motors mediate platelet-derived growth factor and lysophosphatidic acid-stimulated floating collagen matrix contraction. J Biol Chem 278: 47707-47712 (2003)
2. Ailhaud G, Amri E, Bardon S, Barcellini-Couget S, Bertrand B, Catalioto RM, Dani C, Djian P, Doglio A, Forest C: The adipocyte: relationships between proliferation and adipose cell differentiation. Am Rev Respir Dis 142: S57-S59 (1990)
3. Altman GH, Horan RL, Lu HH, Moreau J, Martin I, Richmond JC, Kaplan DL: Silk matrix for tissue engineered anterior cruciate ligaments. Biomaterials 23: 4131-4141 (2002)
4. Awad HA, Boivin GP, Dressler MR, Smith FN, Young RG, Butler DL: Repair of patellar tendon injuries using a cell-collagen composite. J Orthop Res 21: 420-431 (2003)
5. Baker AH, Edwards DR, Murphy G: Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. J Cell Sci 115: 3719-3727 (2002)
6. Bi Y, Stuelten CH, Kilts T, Wadhwa S, Iozzo RV, Robey PG, Chen XD, Young MF: Extracellular matrix proteoglycans control the fate of bone marrow stromal cells. J Biol Chem 280: 30481-30489 (2005)
7. Bobacz K, Ullrich R, Amoyo L, Erlacher L, Smolen JS, Graninger WB: Stimulatory effects of distinct members of the bone morphogenetic protein family on ligament fibroblasts. Ann Rheum Dis 65: 169-177 (2006)
8. Bramono DS, Richmond JC, Weitzel PP, Kaplan DL, Altman GH: Matrix metalloproteinases and their clinical applications in orthopaedics. Clin Orthop Relat Res 428: 272-285 (2004)
9. Brent AE, Schweitzer R, Tabin CJ: A somitic compartment of tendon progenitors. Cell 113: 235-248 (2003)
10. Brent AE, Braun T, Tabin CJ: Genetic analysis of interactions between the somitic muscle, cartilage and tendon cell lineages during mouse development. Development 132: 15-28 (2005)
11. Cai Q, Lanting L, Natarajan R: Growth factors induce monocyte binding to vascular smooth muscle cells: implications for monocyte retention in atherosclerosis. Am J Physiol Cell Physiol 287: C707-C714 (2004)

12. Cao L, Lee V, Adams ME, Kiani C, Zhang Y, Hu W, Yang BB: beta-Integrin-collagen interaction reduces chondrocyte apoptosis. Matrix Biol 18: 343-355 (1999)
13. Carragher NO, Frame MC: Focal adhesion and actin dynamics: a place where kinases and proteases meet to promote invasion. Trends Cell Biol 14: 241-429 (2004)
14. Chao JT, Martinez-Lemus LA, Kaufman SJ, Meininger GA, Ramos KS, Wilson E: Modulation of alpha7-integrin-mediated adhesion and expression by platelet-derived growth factor in vascular smooth muscle cells. Am J Physiol Cell Physiol 290: C972-980 (2006)
15. Chiquet-Ehrismann R, Tucker RP: Connective tissues: signalling by tenascins. Int J Biochem Cell Biol 36:1085-1089 (2004)
16. Chen J, Altman GH, Karageorgiou V, Horan R, Collette A, Volloch V, Colabro T, Kaplan DL: Human bone marrow stromal cell and ligament fibroblast responses on RGD-modified silk fibers. J Biomed Mater Res A 67: 559-570 (2003)
17. Chen MY, Jeng L, Sun YL, Zhao CF, Zobitz ME, Moran SL, Amadio PC, An KN: Contraction of collagen gels seeded with tendon cells. Biorheology 43: 337-345 (2006)
18. Chirco R, Liu XW, Jung KK, Kim HR: Novel functions of TIMPs in cell signaling. Cancer Metastasis Rev 25: 99-113 (2006)
19. Chuen FS, Chuk CY, Ping WY, Nar WW, Kim HL, Ming CK: Immunohistochemical characterization of cells in adult human patellar tendons. J Histochem Cytochem 52: 1151-1157 (2004)
20. Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ: Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. Proc Natl Acad Sci U S A 98: 7841-7845 (2001)
21. Conant K, St Hillaire C, Nagase H, Visse R, Gary D, Haughey N, Anderson C, Turchan J, Nath A: Matrix metalloproteinase 1 interacts with neuronal integrins and stimulates dephosphorylation of Akt. J Biol Chem 279: 8056-8062 (2004)
22. Cooper JA Jr, Bailey LO, Carter JN, Castiglioni CE, Kofron MD, Ko FK, Laurencin CT: Evaluation of the anterior cruciate ligament, medial collateral ligament, achilles tendon and patellar tendon as cell sources for tissue-engineered ligament. Biomaterials 27: 2747-2754 (2006)
23. Cristino S, Grassi F, Toneguzzi S, Piacentini A, Grigolo B, Santi S, Riccio M, Tognana E, Facchini A, Lisignoli G: Analysis of mesenchymal stem cells grown on a

three-dimensional HYAFF 11-based prototype ligament scaffold. J Biomed Mater Res A 73: 275-283 (2005)

24. Dahlgren LA, Mohammed HO, Nixon AJ: Temporal expression of growth factors and matrix molecules in healing tendon lesions. J Orthop Res 23: 84-92 (2005)
25. Daniels JT, Cambrey AD, Occleston NL, Garrett Q, Tarnuzzer RW, Schultz GS, Khaw PT: Matrix metalloproteinase inhibition modulates fibroblast-mediated matrix contraction and collagen production in vitro. Invest Ophthalmol Vis Sci 44:1104-1110 (2003)
26. De Bari C, Dell'Accio F, Vanlauwe J, Eyckmans J, Khan IM, Archer CW, Jones EA, McGonagle D, Mitsiadis TA, Pitzalis C, Luyten FP: Mesenchymal multipotency of adult human periosteal cells demonstrated by single-cell lineage analysis. Arthritis Rheum 54: 1209-1221 (2006)
27. Defilippi P, Rosso A, Dentelli P, Calvi C, Garbarino G, Tarone G, Pegoraro L, Brizzi MF: {beta}1 Integrin and IL-3R coordinately regulate STAT5 activation and anchorage-dependent proliferation. J Cell Biol 168:1099-1108 (2005)
28. Dicker A, Le Blanc K, Astrom G, van Harmelen V, Gotherstrom C, Blomqvist L, Arner P, Ryden M: Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue. Exp Cell Res 308: 283-290 (2005)
29. Docheva D, Hunziker EB, Fassler R, Brandau O: Tenomodulin is necessary for tenocyte proliferation and tendon maturation. Mol Cell Biol 25: 699-705 (2005)
30. Doschak MR, Zernicke RF: Structure, function and adaptation of bone-tendon and bone-ligament complexes. J Musculoskelet Neuronal Interact 5: 35-40 (2005)
31. Douglas T, Heinemann S, Bierbaum S, Scharnweber D, Worch H: Fibrillogenesis of collagen types I, II, and III with small leucine-rich proteoglycans decorin and biglycan. Biomacromolecules 7: 2388-2393 (2006)
32. Dumin JA, Dickeson SK, Stricker TP, Bhattacharyya-Pakrasi M, Roby JD, Santoro SA, Parks WC: Pro-collagenase-1 (matrix metalloproteinase-1) binds the alpha(2)beta(1) integrin upon release from keratinocytes migrating on type I collagen. J Biol Chem 276: 29368-29374 (2001)
33. Dürselen L, Häfner M, Ignatius A, Kraft K, Hollstein E, Pokar S, Dauner M, Claes L, Friemert B: Biological response to a new composite polymer augmentation device used for cruciate ligament reconstruction. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 76: 265-272 (2006)

34. Ehrlich HP, Buttle DJ, Bernanke DH: Physiological variables affecting collagen lattice contraction by human dermal fibroblasts. Exp Mol Pathol 50: 220-229 (1989)
35. Ehrlich HP, Rittenberg T: Differences in the mechanism for high- versus moderate-density fibroblast-populated collagen lattice contraction. J Cell Physiol 185: 432-439 (2000)
36. Eliceiri BP: Integrin and growth factor receptor crosstalk. Circ Res 89: 1104-1110 (2001)
37. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE: Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. Cell126: 677-89 (2006)
38. Fenwick SA, Hazleman BL, Riley GP: The vasculature and its role in the damaged and healing tendon. Arthritis Res 4: 252-260 (2002)
39. Fernandez C, Clark K, Burrows L, Schofield NR, Humphries MJ: Regulation of the extracellular ligand binding activity of integrins. Front Biosci 3: d684-700 (1998)
40. Fickert S, Fiedler J, Brenner RE: Identification, quantification and isolation of mesenchymal progenitor cells from osteoarthritic synovium by fluorescence automated cell sorting. Osteoarthritis Cartilage 11: 790-800 (2003)
41. Fickert S, Fiedler J, Brenner RE: Identification of subpopulations with characteristics of mesenchymal progenitor cells from human osteoarthritic cartilage using triple staining for cell surface markers. Arthritis Res Ther 6: R422-432 (2004)
42. Fiedler J, Etzel N, Brenner RE: To go or not to go: Migration of human mesenchymal progenitor cells stimulated by isoforms of PDGF. J Cell Biochem 93: 990-998 (2004)
43. Fluck J, Querfeld C, Cremer A, Niland S, Krieg T, Sollberg S: Normal human primary fibroblasts undergo apoptosis in three-dimensional contractile collagen gels. J Invest Dermatol 110: 153-157 (1998)
44. Foos MJ, Hickox JR, Mansour PG, Slauterbeck JR, Hardy DM: Expression of matrix metalloprotease and tissue inhibitor of metalloprotease genes in human anterior cruciate ligament. J Orthop Res 19: 642-649 (2001)
45. Forslund C, Aspenberg P: Tendon healing stimulated by injected CDMP-2. Med Sci Sports Exerc 33: 685-687 (2001)
46. Forslund C, Aspenberg P: Improved healing of transected rabbit Achilles tendon after a single injection of cartilage-derived morphogenetic protein-2. Am J Sports Med 31: 555-559 (2003)

47. Forslund C, Rueger D, Aspenberg P: A comparative dose-response study of cartilage-derived morphogenetic protein (CDMP)-1, -2 and -3 for tendon healing in rats. J Orthop Res 21: 617-621 (2003)
48. Frank CB, Hart DA, Shrive NG: Molecular biology and biomechanics of normal and healing ligaments--a review. Osteoarthritis Cartilage 7: 130-140 (1999)
49. Friedenstein AJ, Deriglasova UF, Kulagina NN, Panasuk AF, Rudakowa SF, Luria EA, Ruadkow IA: Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. Exp Hematol 2: 83-92 (1974)
50. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN: Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. Exp Hematol 4: 267-274 (1976)
51. Fu SC, Wang W, Pau HM, Wong YP, Chan KM, Rolf CG: Increased expression of transforming growth factor-beta1 in patellar tendinosis. Clin Orthop Relat Res 400: 174-183 (2002)
52. Fu SC, Wong YP, Cheuk YC, Lee KM, Chan KM: TGF-beta1 reverses the effects of matrix anchorage on the gene expression of decorin and procollagen type I in tendon fibroblasts. Clin Orthop Relat Res 431: 226-232 (2005)
53. Galois L, Hutasse S, Cortial D, Rousseau CF, Grossin L, Ronziere MC, Herbage D, Freyria AM: Bovine chondrocyte behaviour in three-dimensional type I collagen gel in terms of gel contraction, proliferation and gene expression. Biomaterials 27: 79-90 (2006)
54. Garcia AJ: Get a grip: integrins in cell-biomaterial interactions. Biomaterials 26: 7525-7529 (2005)
55. Ge Z, Goh JC, Lee EH: Selection of cell source for ligament tissue engineering. Cell Transplant 14: 573-583 (2005)
56. Gelse K, Poschl E, Aigner T: Collagens--structure, function, and biosynthesis. Adv Drug Deliv Rev 55: 1531-1546 (2003)
57. Ginsberg MH, Partridge A, Shattil SJ: Integrin regulation. Curr Opin Cell Biol 17: 509-516 (2005)
58. Granjeiro JM, Oliveira RC, Bustos-Valenzuela JC, Sogayar MC, Taga R: Bone morphogenetic proteins: from structure to clinical use. Braz J Med Biol Res 38: 1463-1473 (2005)
59. Gregory CA, Prockop DJ, Spees JL: Non-hematopoietic bone marrow stem cells: molecular control of expansion and differentiation. Exp Cell Res 306: 330-335 (2005)

60. Grinnell F, Ho CH, Lin YC, Skuta G: Differences in the regulation of fibroblast contraction of floating versus stressed collagen matrices. J Biol Chem 274: 918-923 (1999)
61. Grinnell F, Ho CH, Tamariz E, Lee DJ, Skuta G: Dendritic fibroblasts in three-dimensional collagen matrices. Mol Biol Cell 14: 384-395 (2003)
62. Groll J, Fiedler J, Engelhard E, Ameringer T, Tugulu S, Klok HA, Brenner RE, Moeller M: A novel star PEG-derived surface coating for specific cell adhesion. J Biomed Mater Res A 74: 607-617 (2005)
63. Gronthos S, Simmons PJ, Graves SE, Robey PG: Integrin-mediated interactions between human bone marrow stromal precursor cells and the extracellular matrix. Bone 28: 174-181 (2001)
64. Harris MT, Butler DL, Boivin GP, Florer JB, Schantz EJ, Wenstrup RJ: Mesenchymal stem cells used for rabbit tendon repair can form ectopic bone and express alkaline phosphatase activity in constructs. J Orthop Res 22: 998-1003 (2004)
65. Hasegawa Y, Ohgushi H, Ishimura M, Habata T, Tamai S, Tomita N, Ikada Y: Marrow cell culture on poly-L-lactic acid fabrics. Clin Orthop Relat Res 358: 235-243 (1999)
66. Heckmann L, Fiedler J, Mattes T, Brenner RE: Mesenchymal progenitor cells communicate via alpha and beta integrins with a three-dimensional collagen type I matrix. Cells Tissues Organs 182: 143-154 (2006)
67. Heckmann L, Schlenker HJ, Fiedler J, Brenner R, Dauner M, Bergenthal G, Mattes T, Claes L, Ignatius A: Human mesenchymal progenitor cell responses to a novel textured poly(L-lactide) scaffold for ligament tissue engineering. J Biomed Mater Res B Appl Biomater (2006)
68. Heino J: The collagen receptor integrins have distinct ligand recognition and signaling functions. Matrix Biol 19: 319-323 (2000)
69. Herrington L, Wrapson C, Matthews M, Matthews H: Anterior cruciate ligament reconstruction, hamstring versus bone-patella tendon-bone grafts: a systematic literature review of outcome from surgery. Knee 12: 41-50 (2005)
70. Hirsch MS, Lunsford LE, Trinkaus-Randall V, Svoboda KK: Chondrocyte survival and differentiation in situ are integrin mediated. Dev Dyn 210: 249-263 (1997)
71. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A; the International Society for Cellular Therapy.

Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy 7: 393-395 (2005)

72. Hsia HC, Schwarzbauer JE: Meet the tenascins: multifunctional and mysterious. J Biol Chem 280: 26641-26644 (2005)
73. Hynes RO: Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. Cell 110: 673-687. (2002)
74. Iozzo RV, Murdoch AD: Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function. FASEB J 10: 598-614 (1996)
75. Ivaska J, Heino J: Adhesion receptors and cell invasion: mechanisms of integrin-guided degradation of extracellular matrix. Cell Mol Life Sci 57: 16-24 (2000)
76. Jäger M, Feser T, Denck H, Krauspe R: Proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells cultured onto three different polymers in vitro. Ann Biomed Eng 33: 1319-1332 (2005)
77. Järvinen TA, Kannus P, Järvinen TL, Jozsa L, Kalimo H, Järvinen M: Tenascin-C in the pathobiology and healing process of musculoskeletal tissue injury. Scand J Med Sci Sports 10: 376-382 (2000)
78. Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW: Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. Exp Hematol 32: 414-425 (2004)
79. Jepsen KJ, Wu F, Peragallo JH, Paul J, Roberts L, Ezura Y, Oldberg A, Birk DE, Chakravarti S: A syndrome of joint laxity and impaired tendon integrity in lumican- and fibromodulin-deficient mice. J Biol Chem 277: 35532-25540 (2002)
80. Jokinen J, Dadu E, Nykvist P, Kapyla J, White DJ, Ivaska J, Vehvilainen P, Reunanen H, Larjava H, Hakkinen L, Heino J: Integrin-mediated cell adhesion to type I collagen fibrils. J Biol Chem 279: 31956-31963 (2004)
81. Jones GC, Corps AN, Pennington CJ, Clark IM, Edwards DR, Bradley MM, Hazleman BL, Riley GP: Expression profiling of metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in normal and degenerate human achilles tendon. Arthritis Rheum 54: 832-842 (2006)
82. Jones JL, Walker RA: Integrins: a role as cell signalling molecules. Mol Pathol 52: 208-213 (1999)
83. Juliano RL, Reddig P, Alahari S, Edin M, Howe A, Aplin A: Integrin regulation of cell signalling and motility. Biochem Soc Trans 32: 443-446 (2004)

84. Juncosa-Melvin n, Boivin GP, Galloway MT, Gooch C, West JR, Butler DL: Effects of cell-to-collagen ratio in stem cell-seeded constructs for Achilles tendon repair. Tissue Eng 12: 681-689 (2006)
85. Kagami S, Kondo S, Loster K, Reutter W, Kuhara T, Yasutomo K, Kuroda Y: Alpha1beta1 integrin-mediated collagen matrix remodeling by rat mesangial cells is differentially regulated by transforming growth factor-beta and platelet-derived growth factor-BB. J Am Soc Nephrol 10: 779-789 (1999)
86. Kannouche PL, Lehmann AR: Ubiquitination of PCNA and the polymerase switch in human cells. Cell Cycle 3: 1011-1013 (2003)
87. Kannouche PL, Wing J, Lehmann AR: Interaction of human DNA polymerase eta with monoubiquitinated PCNA: a possible mechanism for the polymerase switch in response to DNA damage. Mol Cell 14: 491-500 (2004)
88. Kannus P: Structure of the tendon connective tissue. Scand J Med Sci Sports 10: 312-320 (2000)
89. Kardon G: Muscle and tendon morphogenesis in the avian hind limb. Development 125: 4019-4032 (1998)
90. Kelynack KJ, Hewitson TD, Nicholls KM, Darby IA, Becker GJ: Human renal fibroblast contraction of collagen I lattices is an integrin-mediated process. Nephrol Dial Transplant 15: 1766-1772 (2000)
91. Kjær M, Magnusson P, Krogsgaard M, Boysen Moller J, Olesen J, Heinemeier K, Hansen M, Haraldsson B, Koskinen S, Esmarck B, Langberg H: Extracellular matrix adaptation of tendon and skeletal muscle to exercise. J Anat 208: 445-450 (2006)
92. Knott L, Bailey AJ: Collagen cross-links in mineralizing tissues: a review of their chemistry, function, and clinical relevance. Bone 22: 181-187 (1998)
93. Kobayashi T, Liu X, Kim HJ, Kohyama T, Wen FQ, Abe S, Fang Q, Zhu YK, Spurzem JR, Bitterman P, Rennard SI: TGF-beta1 and serum both stimulate contraction but differentially affect apoptosis in 3D collagen gels. Respir Res 6 : 141 (2005)
94. Kopp J, Preis E, Said H, Hafemann B, Wickert L, Gressner AM, Pallua N, Dooley S: Abrogation of transforming growth factor-beta signaling by SMAD7 inhibits collagen gel contraction of human dermal fibroblasts. J Biol Chem 280: 21570-21576 (2005)
95. Kuo CK, Tuan RS: Tissue engineering with mesenchymal stem cells. IEEE Eng Med Biol Mag 22: 51-56. (2003)
96. Kydd AS, Achari Y, Lu T, Sciore P, Rattner JB, Hart DA: The healing rabbit medial collateral ligament of the knee responds to systemically administered glucocorticoids

differently than the uninjured tissues of the same joint or the uninjured MCL: a paradoxical shift in impact on specific mRNA levels and MMP-13 protein expression in injured tissues. Biochim Biophys Acta 1741: 289-299 (2005)

97. Lamberti PM, Wezeman FH: Biologic behavior of an in vitro hydrated collagen gel-human tenocyte tendon model. Clin Orthop Relat Res 397: 414-423 (2002)
98. Langer R: Tissue engineering. Mol Ther1: 12-15 (2000).
99. Langholz O, Röckel D, Mauch C, Kozlowska E, Bank I, Krieg T, Eckes B: Collagen and collagenase gene expression in three-dimensional collagen lattices are differentially regulated by alpha 1 beta 1 and alpha 2 beta 1 integrins. J Cell Biol 131: 1903-1915 (1995)
100. Laurencin CT, Freeman JW: Ligament tissue engineering: an evolutionary materials science approach. Biomaterials 26: 7530-7536 (2005)
101. Lee J, Harwood FL, Akeson WH, Amiel D: Growth factor expression in healing rabbit medial collateral and anterior cruciate ligaments. Iowa Orthop J 18: 19-25 (1998)
102. Levy L, Broad S, Diekmann D, Evans RD, Watt FM: beta1 integrins regulate keratinocyte adhesion and differentiation by distinct mechanisms. Mol Biol Cell 11: 453-466 (2000)
103. Lluri G, Langlois GD, McClellan B, Soloway PD, Jaworski DM: Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) regulates neuromuscular junction development via a beta1 integrin-mediated mechanism. J Neurobiol 66: 1365-1377 (2006)
104. Lu HH, Cooper JA Jr, Manuel S, Freeman JW, Attawia MA, Ko FK, Laurencin CT: Anterior cruciate ligament regeneration using braided biodegradable scaffolds: in vitro optimization studies. Biomaterials 26: 4805-4816 (2005)
105. Luczak JA, Redick SD, Schwarzbauer JE: A single cysteine, Cys-64, is essential for assembly of tenascin-C hexabrachions. J Biol Chem 273: 2073-2077 (1998)
106. Maga G, Hübscher U: Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. J Cell Sci 116: 3051-3060 (2003)
107. Mannello F, Tonti GA, Bagnara GP, Papa S: Role and function of matrix metalloproteinases in the differentiation and biological characterization of mesenchymal stem cells. Stem Cells 24: 475-481 (2006)
108. Matsubara T, Tsutsumi S, Pan H, Hiraoka H, Oda R, Nishimura M, Kawaguchi H, Nakamura K, Kato Y: A new technique to expand human mesenchymal stem cells using basement membrane extracellular matrix. Biochem Biophys Res Commun 313: 503-508 (2004)

109. Matsumoto H, Nasu K, Nishida M, Ito H, Bing S, Miyakawa I: Regulation of proliferation, motility, and contractility of human endometrial stromal cells by platelet-derived growth factor. J Clin Endocrinol Metab 90: 3560-3567 (2005)
110. Mauney JR, Kaplan DL, Volloch V: Matrix-mediated retention of osteogenic differentiation potential by human adult bone marrow stromal cells during ex vivo expansion. Biomaterials 25: 3233-3243 (2004)
111. Mauney JR, Volloch V, Kaplan DL: Matrix-mediated retention of adipogenic differentiation potential by human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells during ex vivo expansion. Biomaterials 26: 6167-6175 (2005)
112. Mauney JR, Kirker-Head C, Abrahamson L, Gronowicz G, Volloch V, Kaplan DL: Matrix-mediated retention of in vitro osteogenic differentiation potential and in vivo bone-forming capacity by human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells during ex vivo expansion. J Biomed Mater Res A 79: 464-475 (2006)
113. Mello MA, Tuan RS: Effects of TGF-beta1 and triiodothyronine on cartilage maturation: In vitro analysis using long-term high-density micromass cultures of chick embryonic limb mesenchymal cells. J Orthop Res 24: 2095-2105 (2006)
114. Midwood KS, Schwarzbauer JE: Tenascin-C modulates matrix contraction via focal adhesion kinase- and Rho-mediated signaling pathways. Mol Biol Cell 13: 3601-3613 (2002)
115. Miller MW, Mooney SM, Middleton FA: Transforming growth factor beta1 and ethanol affect transcription and translation of genes and proteins for cell adhesion molecules in B104 neuroblastoma cells. J Neurochem 97: 1182-1190 (2006)
116. Mithieux SM, Weiss AS: Elastin. Adv Protein Chem 70:437-461 (2005)
117. Mizuno M, Kuboki Y: Osteoblast-related gene expression of bone marrow cells during the osteoblastic differentiation induced by type I collagen. J Biochem (Tokyo) 29: 133-138 (2001)
118. Mwale F, Stachura D, Roughley P, Antoniou J. Limitations of using aggrecan and type X collagen as markers of chondrogenesis in mesenchymal stem cell differentiation. J Orthop Res 24: 1791-1798 (2006)
119. Nagase H, Woessner JF Jr: Matrix metalloproteinases. J Biol Chem 274: 21491-21494 (1999)
120. Niland S, Cremer A, Fluck J, Eble JA, Krieg T, Sollberg S: Contraction-dependent apoptosis of normal dermal fibroblasts. J Invest Dermatol 116: 686-692 (2001)

121. Nochi H, Sung JH, Lou J, Adkisson HD, Maloney WJ, Hruska KA: Adenovirus mediated BMP-13 gene transfer induces chondrogenic differentiation of murine mesenchymal progenitor cells. J Bone Miner Res 19: 111-122 (2004)
122. Nöth U, Schupp K, Heymer A, Kall S, Jakob F, Schutze N, Baumann B, Barthel T, Eulert J, Hendrich C: Anterior cruciate ligament constructs fabricated from human mesenchymal stem cells in a collagen type I hydrogel. Cytotherapy 7: 447-455 (2005)
123. Novakofski J: Adipogenesis: usefulness of in vitro and in vivo experimental models. J Anim Sci 82: 905-915 (2004)
124. Ouyang HW, Toh SL, Goh J, Tay TE, Moe K: Assembly of bone marrow stromal cell sheets with knitted poly (L-lactide) scaffold for engineering ligament analogs. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 75: 264-271 (2005)
125. Pelttari K, Winter A, Steck E, Goetzke K, Hennig T, Ochs BG, Aigner T, Richter W: Premature induction of hypertrophy during in vitro chondrogenesis of human mesenchymal stem cells correlates with calcification and vascular invasion after ectopic transplantation in SCID mice. Arthritis Rheum 54: 3254-3266 (2006)
126. Phillips JA, Vacanti CA, Bonassar LJ: Fibroblasts regulate contractile force independent of MMP activity in 3D-collagen. Biochem Biophys Res Commun 312: 725-732 (2003)
127. Phinney DG, Kopen G, Righter W, Webster S, Tremain N, Prockop DJ: Donor variation in the growth properties and osteogenic potential of human marrow stromal cells. J Cell Biochem 75: 424-436 (1999)
128. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 284: 143-147 (1999)
129. Pittenger MF, Vanguri P, Simonetti D, Young R: Adult mesenchymal stem cells: potential for muscle and tendon regeneration and use in gene therapy. J Musculoskelet Neuronal Interact 2: 309-320 (2002)
130. Rahaman MN, Mao JJ: Stem cell-based composite tissue constructs for regenerative medicine. Biotechnol Bioeng 91: 261-284 (2005)
131. Reed CC, Iozzo RV. The role of decorin in collagen fibrillogenesis and skin homeostasis. Glycoconj J 19: 249-55 (2002)
132. Riikonen T, Koivisto L, Vihinen P, Heino J: Transforming growth factor-beta regulates collagen gel contraction by increasing alpha 2 beta 1 integrin expression in osteogenic cells. J Biol Chem 270: 376-382 (1995)

133. Riley GP, Curry V, DeGroot J, van El B, Verzijl N, Hazleman BL, Bank RA: Matrix metalloproteinase activities and their relationship with collagen remodelling in tendon pathology. Matrix Biol 21: 185-195 (2002)
134. Risbud MV, Shapiro IM, Vaccaro AR, Albert TJ: Stem cell regeneration of the nucleus pulposus. Spine J 4: 348S-353S (2004)
135. Ritty TM, Herzog J: Tendon cells produce gelatinases in response to type I collagen attachment. J Orthop Res 21: 442-450 (2003)
136. Rolf CG, Fu BS, Pau A, Wang W, Chan B: Increased cell proliferation and associated expression of PDGFRbeta causing hypercellularity in patellar tendinosis. Rheumatology (Oxford) 40: 256-261 (2001)
137. Ronziere MC, Aubert-Foucher E, Gouttenoire J, Bernaud J, Herbage D, Mallein-Gerin F: Integrin alpha1beta1 mediates collagen induction of MMP-13 expression in MC615 chondrocytes. Biochim Biophys Acta 1746: 55-64 (2005)
138. Rosso F, Giordano A, Barbarisi M, Barbarisi A: From cell-ECM interactions to tissue engineering. J Cell Physiol 199: 174-180 (2004)
139. Rosso F, Marino G, Giordano A, Barbarisi M, Parmeggiani D, Barbarisi A: Smart materials as scaffolds for tissue engineering. J Cell Physiol 203: 465-470 (2005)
140. Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, Muneta T: Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. Arthritis Rheum 52: 2521-2529 (2005)
141. Salasznyk RM, Williams WA, Boskey A, Batorsky A, Plopper GE: Adhesion to Vitronectin and Collagen I Promotes Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. J Biomed Biotechno 2004: 24-34 (2004)
142. Saldanha V, Grande DA: Extracellular matrix protein gene expression of bovine chondrocytes cultured on resorbable scaffolds. Biomaterials 21: 2427-2431 (2000)
143. Sarasa-Renedo A, Chiquet M: Mechanical signals regulating extracellular matrix gene expression in fibroblasts. Scand J Med Sci Sports 15: 223-230 (2005)
144. Sarasa-Renedo A, Tunc-Civelek V, Chiquet M: Role of RhoA/ROCK-dependent actin contractility in the induction of tenascin-C by cyclic tensile strain. Exp Cell Res 312: 1361-1370 (2006)
145. Sawaguchi N, Majima T, Iwasaki N, Funakoshi T, Shimode K, Onodera T, Minami A: Extracellular matrix modulates expression of cell-surface proteoglycan genes in fibroblasts. Connect Tissue Res 47: 141-148 (2006)

146. Schmeichel KL, Bissell MJ: Modeling tissue-specific signaling and organ function in three dimensions. J Cell Sci 116: 2377-2388 (2003)
147. Schweitzer R, Chyung JH, Murtaugh LC, Brent AE, Rosen V, Olson EN, Lassar A, Tabin CJ: Analysis of the tendon cell fate using Scleraxis, a specific marker for tendons and ligaments. Development 128: 3855-3866 (2001)
148. Scott JE: Elasticity in extracellular matrix 'shape modules' of tendon, cartilage, etc. A sliding proteoglycan-filament model. J Physiol 553: 335-343 (2003)
149. Sekiya I, Larson BL, Smith JR, Pochampally R, Cui JG, Prockop DJ: Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. Stem Cells 20: 530-541 (2002)
150. Sendzik J, Shakibaei M, Schafer-Korting M, Stahlmann R: Fluoroquinolones cause changes in extracellular matrix, signalling proteins, metalloproteinases and caspase-3 in cultured human tendon cells. Toxicology 212: 24-36 (2005)
151. Shih DT, Lee DC, Chen SC, Tsai RY, Huang CT, Tsai CC, Shen EY, Chiu WT: Isolation and Characterization of Neurogenic Mesenchymal Stem Cells in Human Scalp Tissue. Stem Cells 23: 1012-1020 (2005)
152. Shukunami C, Takimoto A, Oro M, Hiraki Y: Scleraxis positively regulates the expression of tenomodulin, a differentiation marker of tenocytes. Dev Biol 298: 234-247 (2006)
153. Siljander PR, Hamaia S, Peachey AR, Slatter DA, Smethurst PA, Ouwehand WH, Knight CG, Farndale RW: Integrin activation state determines selectivity for novel recognition sites in fibrillar collagens. J Biol Chem 279: 47763-47772 (2004)
154. Simamora P, Chern W: Poly-L-lactic acid: an overview. J Drugs Dermatol 5: 436-440 (2006)
155. Sternlicht MD, Werb Z: How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. Annu Rev Cell Dev Biol 17: 463-516 (2001)
156. Stricker TP, Dumin JA, Dickeson SK, Chung L, Nagase H, Parks WC, Santoro SA: Structural analysis of the alpha(2) integrin I domain/procollagenase-1 (matrix metalloproteinase-1) interaction. J Biol Chem 276: 29375-29381 (2001)
157. Takata T, Wang HL, Miyauchi M: Attachment, proliferation and differentiation of periodontal ligament cells on various guided tissue regeneration membranes. J Periodontal Res 36: 322-327 (2001)
158. Tamariz E, Grinnell F: Modulation of fibroblast morphology and adhesion during collagen matrix remodeling. Mol Biol Cell 13: 3915-3929 (2002)

159. Thomas GJ, Nystrom ML, Marshall JF: Alphavbeta6 integrin in wound healing and cancer of the oral cavity. J Oral Pathol Med 35: 1-10 (2006)
160. Tian B, Lessan K, Kahm J, Kleidon J, Henke C: beta 1 integrin regulates fibroblast viability during collagen matrix contraction through a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/protein kinase B signaling pathway. J Biol Chem 277: 24667-24675 (2002)
161. Tillander B, Franzen L, Norlin R: Fibronectin, MMP-1 and histologic changes in rotator cuff disease. J Orthop Res 20: 1358-1364 (2002)
162. Towler DA, Gelberman RH: The alchemy of tendon repair: a primer for the (S)mad scientist. J Clin Invest 116: 863-866 (2006)
163. Tozer S, Duprez D: Tendon and ligament: development, repair and disease. Birth Defects Res C Embryo Today 75: 226-236 (2005)
164. Tsubone T, Moran SL, Amadio PC, Zhao C, An KN: Expression of growth factors in canine flexor tendon after laceration in vivo. Ann Plast Surg 53: 393-397 (2004)
165. Tuan RS, Boland G, Tuli R: Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. Arthritis Res Ther 5: 32-45 (2003)
166. Tuli R, Tuli S, Nandi S, Wang ML, Alexander PG, Haleem-Smith H, Hozack WJ, Manner PA, Danielson KG, Tuan RS: Characterization of multipotential mesenchymal progenitor cells derived from human trabecular bone. Stem Cells 21: 681-693 (2003)
167. Urist MR: Bone: formation by autoinduction. Science 150: 893-899 (1965)
168. Vincenti MP, White LA, Schroen DJ, Benbow U, Brinckerhoff CE: Regulating expression of the gene for matrix metalloproteinase-1 (collagenase): mechanisms that control enzyme activity, transcription, and mRNA stability. Crit Rev Eukaryot Gene Expr 6: 391-411 (1996)
169. Weiler A, Forster C, Hunt P, Falk R, Jung T, Unterhauser FN, Bergmann V, Schmidmaier G, Haas NP: The influence of locally applied platelet-derived growth factor-BB on free tendon graft remodeling after anterior cruciate ligament reconstruction. Am J Sports Med 32: 881-891 (2004)
170. Welle A, Chiumiento A, Barbucci R: Competitive protein adsorption on micro patterned polymeric biomaterials, and viscoelastic properties of tailor made extracellular matrices. Biomol Eng (2006)
171. Wenk MB, Midwood KS, Schwarzbauer JE: Tenascin-C suppresses Rho activation. J Cell Biol 150: 913-920 (2000)

172. Wolfman NM, Hattersley G, Cox K, Celeste AJ, Nelson R, Yamaji N, Dube JL, DiBlasio-Smith E, Nove J, Song JJ, Wozney JM, Rosen V: Ectopic induction of tendon and ligament in rats by growth and differentiation factors 5, 6, and 7, members of the TGF-beta gene family. J Clin Invest 100: 321-330 (1997)
173. Wong YP, Fu SC, Cheuk YC, Lee KM, Wong MW, Chan KM: Bone morphogenetic protein 13 stimulates cell proliferation and production of collagen in human patellar tendon fibroblasts. Acta Orthop 76: 421-427 (2005)
174. Woo SL, Abramowitch SD, Kilger R, Liang R: Biomechanics of knee ligaments: injury, healing, and repair. J Biomech 39: 1-20 (2006)
175. Yamada KM, Pankov R, Cukierman E: Dimensions and dynamics in integrin function. Braz J Med Biol Res 36: 959-966 (2003)
176. Yamaguchi M, Shinbo T, Kanamori T, Wang PC, Niwa M, Kawakami H, Nagaoka S, Hirakawa K, Kamiya M: Surface modification of poly(L: -lactic acid) affects initial cell attachment, cell morphology, and cell growth. J Artif Organs 7: 187-193 (2004)
177. Yamamoto T, Hartmann K, Eckes B, Krieg T: Mast cells enhance contraction of three-dimensional collagen lattices by fibroblasts by cell-cell interaction: role of stem cell factor/c-kit. Immunology 99: 435-439 (2000)
178. Yamamoto Z, Kanbara K, Nakajima M, Kinoshita M, Abe M: Effect of suture repair on expression of beta1 integrin subunit in wounded rat patellar tendon. J Orthop Sci 9: 613-618 (2004)
179. Yao L, Bestwick CS, Bestwick LA, Maffulli N, Aspden RM: Phenotypic drift in human tenocyte culture. Tissue Eng 12: 1843-1849 (2006)
180. Yoon JH, Halper J: Tendon proteoglycans: biochemistry and function. J Musculoskelet Neuronal Interact 5: 22-34 (2005)
181. Young BB, Gordon MK, Birk DE: Expression of type XIV collagen in developing chicken tendons: association with assembly and growth of collagen fibrils. Dev Dyn 217: 430-439 (2000)
182. Zhang G, Young BB, Birk DE: Differential expression of type XII collagen in developing chicken metatarsal tendons. J Anat 202: 411-420 (2003)
183. Zhang G, Young BB, Ezura Y, Favata M, Soslowsky LJ, Chakravarti S, Birk DE: Development of tendon structure and function: regulation of collagen fibrillogenesis. J Musculoskelet Neuronal Interact 5: 5-21 (2005)
184. Zheng T, Kang MJ, Crothers K, Zhu Z, Liu W, Lee CG, Rabach LA, Chapman HA, Homer RJ, Aldous D, De Sanctis GT, Underwood S, Graupe M, Flavell RA, Schmidt

JA, Elias JA: Role of cathepsin S-dependent epithelial cell apoptosis in IFN-gamma-induced alveolar remodeling and pulmonary emphysema. J Immunol 174: 8106-8115 (2005)

185. Zhu YK, Umino T, Liu XD, Wang HJ, Romberger DJ, Spurzem JR, Rennard SI: Effect of initial collagen concentration on fibroblast mediated contraction of collagen gels. Chest 117: 234S-235S (2000)
186. Zhu X, Chian KS, Chan-Park MB, Lee ST: Effect of argon-plasma treatment on proliferation of human-skin-derived fibroblast on chitosan membrane in vitro. J Biomed Mater Res A 73: 264-274 (2005)
187. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH: Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells.Mol Biol Cell 13: 4279-4295 (2002)

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Rolf Brenner, Leiter der Sektion Biochemie der Bindegewebs- und Gelenkskrankungen, danke ich für die Überlassung des interessanten und anwendungsbezogenen Themas, die Bereitstellung der Laborräume und die fortwährende Unterstützung und Diskussionsbereitschaft.

Herrn Dr. rer. nat. Jörg Fiedler möchte ich besonders für die gute Arbeitsatmosphäre sowie die tatkräftige und zu jedem Zeitpunkt gewährte Unterstützung während der Erstellung der Arbeit danken. Dies gilt nicht nur für die vielen praktischen Anregungen, sondern auch die Unterstützung bei der Erstellung von Postern und Manuskripten, sowie dem seelischen Beistand vor Kongress-Vorträgen.

Bei Frau Helga Joos möchte ich mich vor allem für die sehr angenehme Zusammenarbeit bedanken. Der stets interessante Gedankenaustausch brachte mir Motivation und den nötigen Blick über den Tellerrand.

Mein Dank gilt auch den technischen Assistenten der Arbeitsgruppe, insbesondere Frau Christiane Schulz und Herrn Giovanni Ravalli für die hervorragende und geduldige Einarbeitung und die besonders gute Zusammenarbeit.

Frau Claudia Neubrand danke ich für die unendlich freundliche und rasche Erledigung aller Büroarbeiten und Bestellungen, sowie die ständige Gesprächs- und Unterstützungsbereitschaft.

Ich danke Frau Prof. Dr. med. vet. Anita Ignatius vom Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik am Universitätsklinikum Ulm für die angenehme Kooperation und die stete und freundliche Diskussionsbereitschaft sowie die freundliche Übernahme der Zweitbegutachtung dieser Arbeit.

Bei Herrn Dr. biol. hum. Heiter-Julian Schlenker möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit, die interessanten Diskussionen und die gute Zusammenarbeit bedanken.

Schließlich gilt mein Dank meiner Familie und Jörg Hammermüller für die konstante moralische Unterstützung während dieser Arbeit.