

Aus der Anatomischen Anstalt der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorstand: Prof. Dr. med. J. Waschke

**Tenogenes Potential caniner
mesenchymaler Stammzellen in
einem High-Density Ko-Kultur
System**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Philipp Rupert Anton Schneider
aus
Heidelberg
2012

.....

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Professor Dr. Mehdi Shakibaei

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Wolfgang Bäcker
Professor Dr. Ralf Sodian

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: -----

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 26.04.2012

..... I

INHALTSVERZEICHNIS.....I

Abkürzungen.....V

1. EINLEITUNG

1.1. Aufbau des Sehnengewebes.....1

1.1.1. Sehnenzellen – Tenozyten und Tenoblasten

1.1.2. Extrazelluläre Matrixkomponenten der Sehne

1.1.2.1. Die kollagenen Bestandteile der EZM

1.1.2.2. Proteoglykane und Glykoproteine

1.1.3. EZM und Tenozyten Interaktion

1.1.4. Signalübertragung im Sehnengewebe

1.2. Mesenchymale Stammzellen (MSZ).....10

1.2.1. Was sind MSZ

1.2.2. Vorkommen von MSZ

1.2.3. Charakterisierung der MSZ

1.2.4. MSZ und Tissue Engineering

1.3. Integrine (extrazelluläre Matrix-Rezeptoren).....14

1.3.1. Struktur und Funktion der Integrine

1.3.2. Regulation der Integrinfunktionen

1.3.3. Integrine und Tendon

1.3.4. Remodelling der EZM durch MatrixMetalloProteinase

1.4. Wachstumsfaktoren.....17

1.4.1. Wachstumsfaktoren im Tendon

1.4.2. IGF-1

1.4.3. TGF- β 1

1.4.4. BMP-12

1.4.5. PDGF-bb

2. FRAGESTELLUNG DER ARBEIT.....20

3. MATERIAL UND METHODEN.....22

3.1. Materialien.....	22
3.1.1. Spender (Gewinnung der Zellen)	
3.1.2. Reagenzien	
3.1.3. Antikörper	
3.1.3.1. Primär Antikörper	
3.1.3.2. Sekundär Antikörper	
3.1.4. Wachstumsfaktoren	
3.1.5. Geräte und Verbrauchsmaterialien	
3.2. Methoden.....	25
3.2.1. Gewinnung und Isolierung der Tenozyten	
3.2.1.1. Tenozyten in Monolayer	
3.2.1.2. High-Density Kultur (HD)	
3.2.2. Isolierung der MSZ aus dem Fettgewebe	
3.2.3. Die <i>in vitro</i> Differenzierung MSZ	
3.2.3.1. Adipogenese	
3.2.3.2. Osteogenese	
3.2.3.3. Chondrogenese	
3.2.4. Ko-Kulturen aus primären Tenozyten und MSZ	
3.2.4.1. Monolayer Ko-Kulturen	
3.2.4.2. HD Ko-Kulturen	
3.2.5. PKH-Membranfärbungen	
3.2.5.1. In Monolayer Kultur	
3.2.5.2. In HD Kultur	
3.2.6. Western Blot Analyse	
3.2.7. Densitometrie	
3.2.8. Elektronenmikroskopische Untersuchungen	
3.2.9. Immunelektronenmikroskopie	
3.2.10. Immunfluoreszenz	
3.2.11. Endozytose / Exozytose Assay	
3.2.12. Kultivierung von MSZ in HD Kultur mit Überstand von primären Tenozyten aus Monolayer-Kulturen	
3.2.13. Kryokonservierung von HD Kulturen für Immunfluoreszenz	

4. <u>ERGEBNISSE</u>	34
4.1. Kultivierung der MSZ in Monolayer-Kultur	34
4.1.1. Morphologie LM	
4.2. Kultivierung der Tenozyten in Monolayer-Kultur	35
4.2.1. Morphologie LM/EM	
4.3. Charakterisierung der MSZ	35
4.3.1. Nachweis stammzellspezifischer Marker auf MSZ mit IF	
4.3.2. Differenzierung MSZ	
4.3.2.1. Adipogenese	
4.3.2.2. Osteogenese	
4.3.2.3. Chondrogenese	
4.4. Charakterisierung der Tenozyten	41
4.4.1. Charakterisierung der Tenozyten in HD-Kultur, Morphologie TEM	
4.4.2. Nachweis Tendon spezifischer Marker auf Tenozyten mit IF	
4.4.3. Proteinexpression Tenozyten (HD Kulturen)	
4.5. Behandlung der Tenozyten mit Wachstumsfaktoren	44
4.5.1. IGF-1, TGF- β 1, BMP-12 und PDGF-BB	
4.5.1.1.1. Auswirkungen auf die Proteinexpression	
4.6. Behandlung der MSZ mit Wachstumsfaktoren	50
4.6.1. Auswirkung auf die Ultrastruktur und EZM (TEM)	
4.6.2. Auswirkungen auf die Proteinexpression	
4.7. Ko-Kultur aus MSZ und primären Tenozyten in HD-Kulturen in verschieden Mischverhältnissen	60
4.7.1. Auswirkung auf die Ultrastruktur und EZM (TEM)	
4.7.2. Auswirkungen auf die Proteinexpression	
4.7.3. PKH Färbung Ko-Kultur aus MSZ und Tenozyten in HD-Kultur	
4.7.4. PKH Färbung Ko-Kultur aus MSZ und Tenozyten in Monolayer	
4.8. Endo-/Exozytose Assay	72
4.9. Supernatant Versuch	74

5. <u>DISKUSSION</u>	77
5.1. Kultivierung und Differenzierung der MSZ.....	78
5.2. Kultivierung der Tenozyten in ML und HD-Kultur.....	80
5.3. Auswirkung verschiedener Wachstumsfaktoren auf die Tenogenese.....	81
5.3.1. In Tenozyten	
5.3.2. In MSZ	
5.3.3. Diskrepanz zwischen Proteinexpression und Ultrastruktur	
5.4. Effekte der Ko-Kultur auf die Tenogenese.....	85
5.5. Zell-Zell-Interaktion (PKH-Versuche).....	89
5.6. Endo-/Exozytose Versuche.....	90
5.7. Supernatant Versuch.....	90
5.8. Mögliche Anwendung der mit Wachstumsfaktoren und Ko-Kultur gewonnenen Zellen für Tissue Engineering.....	91
6. <u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	93
7. <u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	95
8. <u>DANKSAGUNG</u>	115
9. <u>LEBENS LAUF</u>	116
10. <u>EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN</u>	118

Abkürzungen

Abb	Abbildung
ALP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxidsulfat
Aqua dest.	Demineralisiertes Wasser
AS	Aminosäure
BMP	bone morphogenic protein
BSA	Bovines Serum-Albumin
bzw	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
ca	circa
cm	Zentimeter
Da	Dalton
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles`-Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EZM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
FCS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
h	Stunden
HD	High-Density
IF	Immunfluoreszenz
IGF	Insulin Like Growth Factor
IU	international units
l	Liter
LM	Lichtmikroskopie
kDa	Kilodalton
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromol
M	Mol
min	Minuten
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
MSZ	Mesenchymale Stammzellen
NBT	Nitrotetrazoliumblausäurechlorid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
Rpm	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur

s	Sekunden
SDS	Natrium Dodecylsulfat
sog.	so genannte
Tab	Tabelle
TeM	Tenomodulin
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TGF	Transforming Growth Factor
T	Tenozyten

1. EINLEITUNG

1.1. Aufbau des Sehngewebes

Sehngewebe ist ein hochstrukturiertes Bindegewebe und ein essentieller Bestandteil des muskuloskeletalen Systems (Kannus, 2000). Die Funktion der Sehne besteht darin, die Verbindung zwischen knöchernen Strukturen und der Muskulatur herzustellen (Doschak and Zernicke, 2005). Sie gewährleistet Stabilität und ermöglicht Bewegungen. Aufgrund ihrer hochorganisierten Architektur hält eine Sehne hohen Belastungen stand und ermöglicht unter Zugkräften ein leichtes Gleiten der beteiligten Strukturen um die von der Muskelkontraktion generierte Kraft an die Knochen zu übermitteln. Da sie sich an die jeweils vorliegenden Beanspruchungen adaptiert, ist die spezifische, Morphologie einer Sehne stark variabel und von ihrer anatomischen Lokalisation abhängig (Frank et al., 1999). An der sog. ‚myotendinous junction‘ findet sich die Verbindung zwischen Muskel und Sehne während die fibröse oder fibrocartilaginäre Verbindung zwischen Sehne und Knochen ‚osteotendinous junction‘ genannt wird (Doschak and Zernicke, 2005). Die musklotendinöse Insertionsstelle besteht zum größten Teil aus Kollagenfasern und Tenozyten, die in einer hochstrukturierten Extrazelluläre Matrix (EZM) eingebettet sind (Dykyj and Jules, 1991).

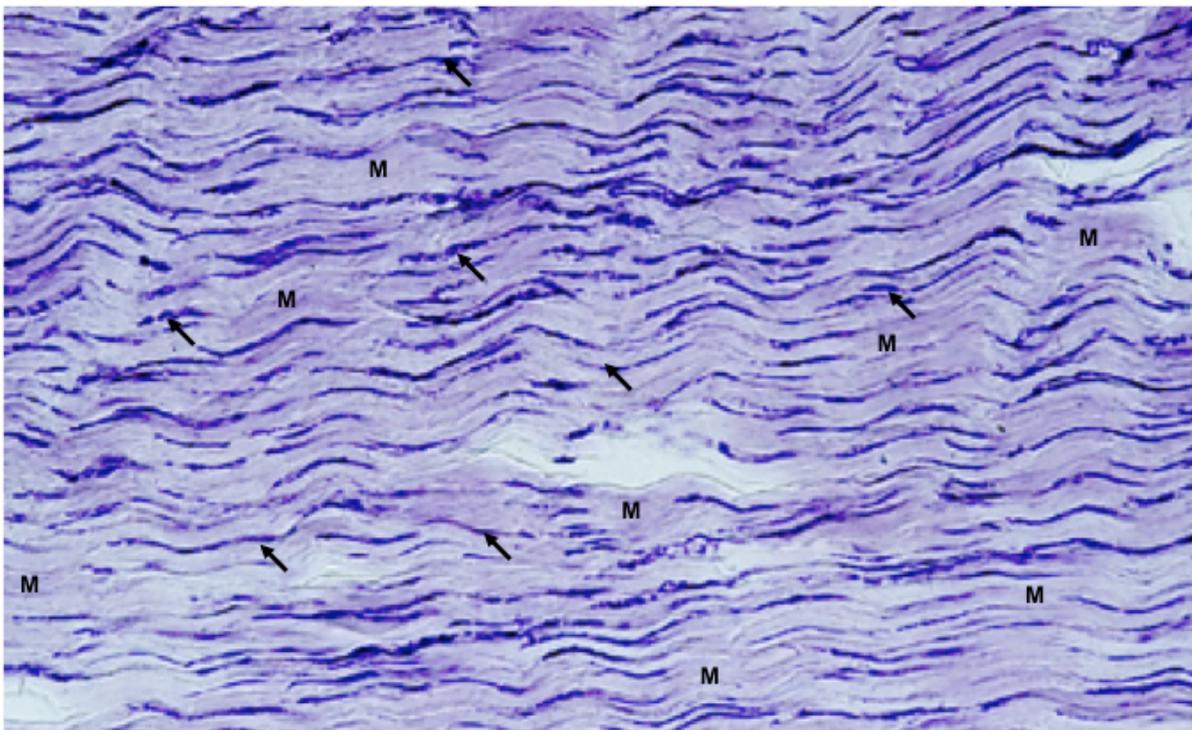


Abb. 1: Lichtmikroskopische Aufnahme von Sehngewebe mit Toluidinblau Färbung. Die wellenförmige Struktur, die Sehnen *in vivo* aufweisen ist deutlich erkennbar. In die hauptsächlich aus Kollagen Typ I bestehende EZM (M) sind längliche Tenozyten und Tenoblasten (Pfeile) eingebettet. Vergrößerung: 150x.

Die einzelnen Sehnen werden von weichen und fibrinösen Bindegewebsstrukturen ummantelt, welche die durch Bewegung entstehende Reibung minimieren und die Sehne somit schützen (Kannus, 2000). Da es sich bei Sehngewebe um ein bradytrophes, schlecht vaskularisiertes Gewebe handelt, werden seine Zellen hauptsächlich mittels Diffusion aus dem umliegenden Synovialgewebe mit Nährstoffen versorgt (Fenwick et al., 2002).

1.1.1. Sehnenzellen – Tenozyten und Tenoblasten

Native Sehnen und Bänder sind ein zellarmes und bradytrophes Bindegewebe und bestehen aus speziellen Fibroblasten, den Tenozyten, eingebettet in von ihnen produzierte EZM. Das Verhältnis von Zellen und Matrix nimmt im humanen Sehngewebe mit zunehmendem Alter physiologischer Weise ab (Chuen et al., 2004). Nur durch ein Trauma oder einen pathologischen Vorgang wird dieses Verhältnis wieder gesteigert (Frank et al., 1999). Die Matrix produzierenden Zellen der Sehne sind die Tenozyten und die Tenoblasten. Mit 90-95% bilden Tenozyten den größten Anteil aller Zellen im Sehngewebe. Sie besitzen ein typisch lang gezogenes, spindelförmiges Aussehen, liegen überwiegend einzeln im Gewebe und besitzen charakteristische lang gestreckte Zellfortsätze (Pseudopodien), welche den Zell-Zell bzw. Zell-Matrix Kontakt ermöglichen (Benjamin and Ralphs, 2000; Chuen et al., 2004; Woo et al., 2006). Diese Morphologie der Tenozyten ist von besonderer Bedeutung, da durch sie trotz wachsender Mengen EZM während der Entwicklung, der Kontakt zwischen den Zellen gewährleistet wird und ein kommunizierendes Netzwerk entsteht. Der Informationsaustausch erfolgt dabei über sog. ‚gap-junctions‘ welche direkte Verbindungen und Informationsaustausch zwischen einzelnen Zellen gewährleisten (Ralphs et al., 1998).

Tenozyten variieren in ihrer Größe zwischen 80 und 300µm, wobei ihr Zellkern oft oval und länglich ist. Tenoblasten hingegen haben eine ovoide Form und sind Cluster-förmig im Gewebe eingelagert. Juveniles Sehngewebe, ist durch das Vorkommen vieler Tenoblasten gekennzeichnet, die eine noch höhere Stoffwechselaktivität als adulte Tenozyten aufweisen (Kannus, 2000). Auf ultrastruktureller Ebene sieht man sowohl bei Tenozyten als auch bei Tenoblasten viele aktive Zellorganellen, wie z.B. ein sehr ausgeprägtes raues endoplasmatisches Retikulum, einen gut entwickelten Golgi-Apparat, viele Ribosomen sowie zahlreiche

Mitochondrien, die die hohe metabolische Aktivität widerspiegeln (Schulze-Tanzil et al., 2004a).

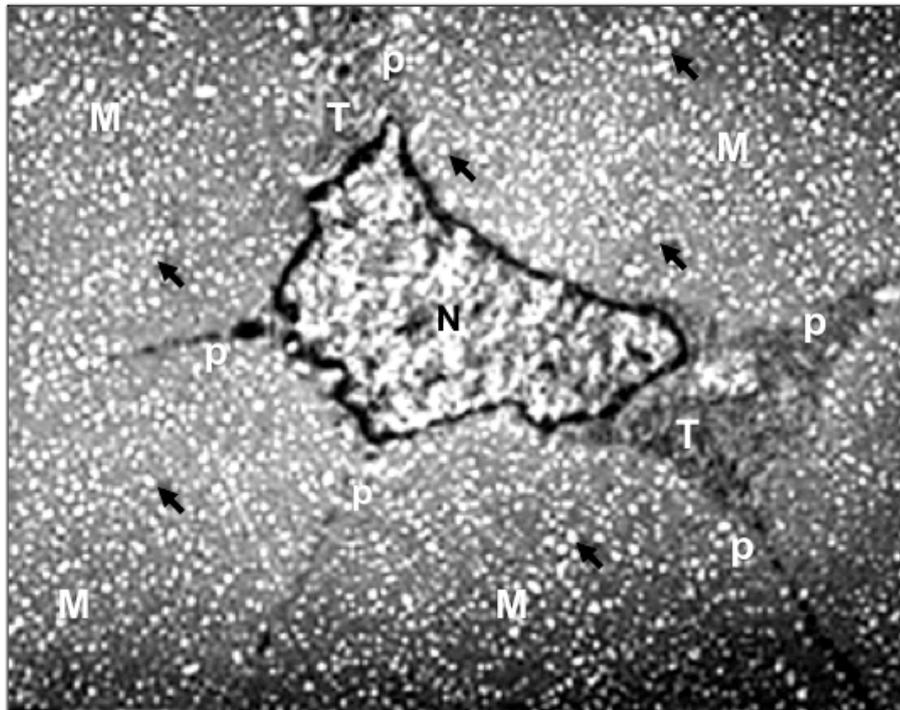


Abb.2: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Sehngewebe. Ein Tenozyt (T) mit prominentem Nukleus (N) ist in eine hauptsächlich aus Kollagen bestehende EZM (M) eingebettet. Ausgeprägte Pseudopodien (p) gewährleisten Zell-Matrix Interaktion und Kommunikation. Einzelne Kollagenfasern (Pfeile) sind erkennbar. Vergrößerung: 3000x

1.1.2. Extrazelluläre Matrixkomponenten der Sehne

Um den mechanischen und biologischen Anforderungen ihrer Umgebung gerecht zu werden, produzieren die Tenozyten eine für Sehngewebe charakteristische, hochstrukturierte und funktionell angepasste sehnenpezifische EZM. Einerseits stellt die EZM die Grundlage für Proliferation, Differenzierung und Migration für die in ihr eingelagerten Zellen dar (Kuo and Tuan, 2003), andererseits ermöglichen die Zellen ihrerseits durch ihre Aktivität eine fortlaufende, dynamische Restrukturierung der EZM. Die Produktion einer gewebsspezifischen EZM ist somit maßgeblich verantwortlich für Gewebsmorphologie, Entwicklung und adäquate Funktion einer Sehne (Rosso et al., 2004). Die genaue Zusammensetzung der EZM im Sehngewebe, variiert stark, je nach spezifischer Anpassung und Belastung. Die wichtigsten Komponenten hierbei, sind Kollagenfasern, Proteoglykane (PG's) und Glykoproteine (GP's) (Milz et al., 2009).

1.1.2.1. Die kollagenen Bestandteile der EZM

Zwischen 70-80% des Trockengewichtes des Sehnengewebes besteht aus Kollagen. Damit ist Kollagen der Hauptbaustein der EZM in der Sehne (Calve et al., 2004). Kollagene werden von reifen Tenozyten produziert und bilden die grundlegende strukturelle Einheit des Sehnengewebes. Die einzelnen Kollagen Polypeptide bilden Triple-Helices die sich selbstständig zu Kollagen Fibrillen organisieren, welche wiederum durch intermolekulare Querverbindungen untereinander vernetzt sind (Kuhn, 1969; Tkocz and Kuhn, 1969).

Das häufigste Kollagen im Sehnengewebe ist Kollagen Typ I mit einem Anteil von über 70% am Trockengewicht. Das zweithäufigste Kollagen mit ca. 8% ist Kollagen Typ III. Es kommt vor allem im Epi- und Endotendon vor. Nach einer Verletzung wird es verstärkt in der frühen Heilungsphase des Gewebes exprimiert und seine Produktion nimmt während den späteren Phasen ab (Buckwalter and Hunziker, 1996; Woo et al., 2000). Generell nimmt der Durchmesser der Kollagenfasern während des Heilungsprozesses ab, was zu einer verminderten Zugbelastbarkeit und einem Stabilitätsverlust führt (Ehrlich et al., 2005; Jarvinen et al., 2004).

Kollagen Typ V ist ein kleineres Kollagen, es verbindet die anderen Kollagentypen untereinander und reguliert damit den Aufbau der fibrillären Struktur des Gewebes (Wenstrup et al., 2004). Neben Kollagen Typ XX welches ebenfalls zu geringen Anteilen in Sehnen und Bändern vorkommt, wurden zumindest im Huhn, die Kollagene Typ XII und XIV beschrieben (Gelse et al., 2003; Young et al., 2000; Zhang et al., 2003).

Kollagene werden intrazellulär in einer löslichen Form, dem Tropokollagen synthetisiert. Um die nachfolgende Exozytose zu ermöglichen, werden die Tropokollagene am endoplasmatischen Retikulum an bestimmten Prolin- und Lysinresten hydroxyliert. Vom C-terminalen Ende ausgehend, kommt es danach zur Bindung der Triple-Helix. Nach der Exozytose wird das C-terminale Ende enzymatisch abgespalten und es kommt zur Polymerisation der Kollagene, durch intermolekulare Querverbindungen an Lysin- und Hydroxylysinresten. Diese Aggregate aus unlöslichen Kollagenmolekülen bilden Mikrofibrillen die sich ihrerseits zu einzelnen Kollagenfibrillen zusammenfügen. Einzelne Kollagenfibrillen lassen sich mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) darstellen und haben einen Durchmesser von 100-500nm (Zhang et al., 2005). Aus ihnen entstehenden die

Kollagenfasern welche lichtmikroskopisch erkennbar sind und die von dem weichen, bindegewebigen Endotenon ummantelt werden (Kastelic et al., 1978). (Abb. 3). Mit ihren mechanischen Eigenschaften sind die Kollagenfasern für die charakteristische sinusoide Wellenform, die mikroskopisch im Sehngewebe zu sehen ist und eine Dehnbarkeit von 1-3% ermöglicht, verantwortlich (Butler et al., 1984; Raspanti et al., 2005). Mehrere Kollagenfasern bilden gemeinsam ein Subfaszikel, welche wiederum in primäre, sekundäre und tertiäre Faszikel unterteilt werden. Die einzelnen Einheiten der Subfaszikel sind jeweils von einer weiteren Schicht Endotenon umschlossen. Die tertiären Faszikel haben einen Durchmesser von 1000-3000 μ m der jedoch in direkter Weise mit der Größe der entsprechenden Sehnen korreliert. Die Sehnen per se besteht aus solchen tertiären Faszikeln, welche als Einheit von einer Bindegewebsschicht, dem Epitenon, begrenzt werden (Kannus, 2000). Die vaskulären, lymphatischen und neuronalen Leitungsbahnen, welche die Tenozyten versorgen, verlaufen innerhalb des Endotenons während das die Faszikel umgebende Epitenon Blutgefäße und Bahnen für die Lymphgefäße und Nerven bereitstellt (Ochiai et al., 1979). Das Paratenon ist eine weitere Bindegewebsstruktur durch welche die Blutgefäße in die Sehnen gelangen und Endo- und Epitenon versorgen.

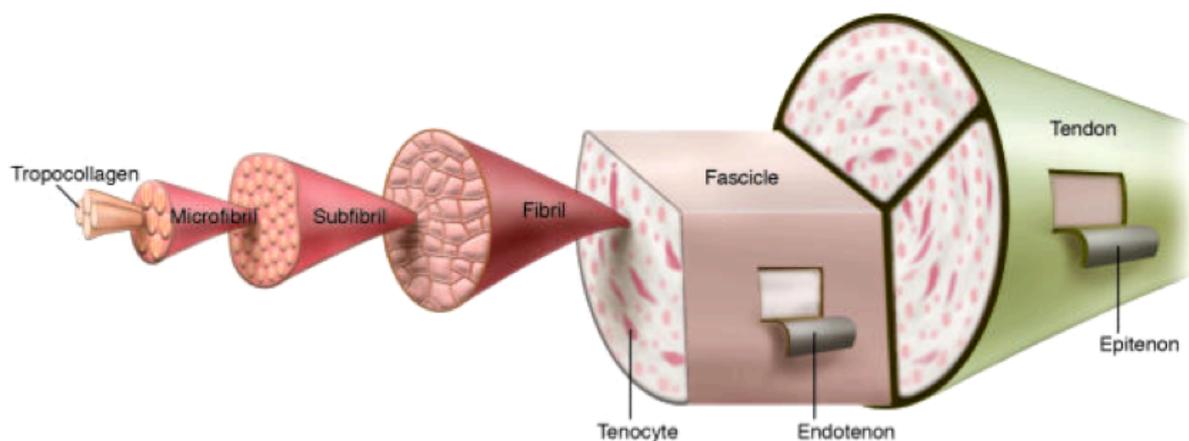


Abb.3: Schematische Darstellung des Aufbaus und der Struktur von Sehnen.
Aus Towler und Gelbermann, 2006.

1.1.2.2. Proteoglykane und Glykoproteine

Den zweitgrößten Anteil an EZM-Bestandteilen bilden die Proteoglykane (PGs). Sie bestehen aus einem Kernprotein, welches durch Bindungen mit diversen Glykosaminoglykanketten modifiziert werden kann. Man kann zwei Gruppen von PGs unterscheiden. Zum einen die ‚SLURPS‘ (small leucin-rich proteoglycans) welches relativ kleine Leucin-reiche PG's sind. Zu dieser Gruppe gehören Decorin, Fibromodulin, Biglycan, Lumikan und Epiphycan. Sie besitzen die Eigenschaften Wachstumsfaktoren zu binden und mit anderen Matrixmolekülen in Interaktion zu treten (Iozzo and Murdoch, 1996; Yoon and Halper, 2005). Zum anderen die modular aufgebauten PG's wie Aggrecan, Neurocan, Versican, Brevican, Perlecan, Agrin und Testican (Rees et al., 2009). Auf Grund ihrer negativen Ladung und Hydrophilität haben PG's und Glykosaminoglykane eine hohe Wasserbindungskapazität. 55% des Gesamtgewichtes einer Sehne besteht aus Wasser und liegt überwiegend in PGs gebunden an der EZM vor. Das so angelagerte Wasser ermöglicht ein wechselseitiges Gleiten der Kollagenfibrillen und ist auch für den zellulären Austausch und Stoffwechsel von großer Bedeutung (Franchi et al., 2007).

Dem in der Sehne am häufigsten vorkommenden PG Decorin kommt bei der Wasserbindungskapazität in der Sehne eine entscheidende Rolle zu (Rahaman and Mao, 2005). Decorin kann an die meisten Kollagen Typen binden und somit den Durchmesser der Fibrillen regulieren. Durch diese Eigenschaft hat Decorin große Bedeutung für die Zellentwicklung und das Wachstum. Seine Hochregulation während der Heilungsphase in rupturiertem Bändergewebe bestätigt und unterstreicht seine wichtige Rolle in der Bildung einer adäquaten EZM (Kydd et al., 2005). Decorin und Biglycan besitzen beide die Möglichkeit transforming growth factor β (TGF- β) zu binden und können somit maßgeblichen Einfluss auf Proliferation und Differenzierung des Gewebes nehmen (Yoon and Halper, 2005). Anders als Decorin wird Biglycan jedoch nur in der Frühphase der Wundheilung hochreguliert (Kydd et al., 2005).

Fibromodulin kann, wie Decorin, die Kollagene Typ I und II binden. Dies geschieht jedoch an einer anderen Stelle der Moleküle. Das führt dazu, dass Fibromodulin die Bildung von größeren und reiferen Kollagenfibrillen induziert (Yoon and Halper,

2005). Knockout-Versuche konnten zeigen, dass Fibromodulin eine wichtige Rolle für die Ausbildung, die Steifigkeit und den Erhalt der Integrität des Sehnengewebes spielt (Jepsen et al., 2002).

Das Transmembran-Glykoprotein Tenomodulin (37kDa) kommt nur in Sehnen, Bändern und dem Auge vor und seine Expression wird von dem Transkriptionsfaktor Scleraxis reguliert (Shukunami et al., 2006). Sein Verlust führt zu einer herabgesetzten Tenozytenproliferation mit verminderter Tenozytendichte und einer abnormen Kollagenfibrillen Produktion mit erhöhten fibrillären Durchmessern (Docheva et al., 2005). Es ist deshalb ein wichtiger Marker für die Tenogenese (Jelinsky et al., 2010).

Die mechanische Beanspruchung, welcher eine Sehne ausgesetzt ist, wirkt sich direkt auf die Expression der verschiedenen PGs aus. So induzieren die auf die Sehnen wirkenden Zugkräfte die Produktion des kleinen Moleküls Decorin (37kDa) wohingegen Kompression die Produktion des größeren, hydrophileren Aggrecans (46kDa) bewirkt. Im Bereich der Sehnenmitte findet man deshalb ein Verhältnis von 90%:10% zwischen kleineren und größeren PGs während sich dieses, in Bereichen in denen das Gewebe auch Druckkräften ausgesetzt ist, bis hin zu einem Verhältnis von 1:1 verschieben kann (Yoon and Halper, 2005).

Ähnlich wie die PG's bestehen die Glykoproteine aus einem glykolisierten Kernprotein nur ist der Grad der Glykosilierung bei ihnen geringer. Die adhäsiven Glykoproteine besitzen die Eigenschaft Markomoleküle oder Zellen untereinander zu binden. Im Sehngewebe finden sich im wesentlichen adhäsive GPs wie Fibronectin, Tenascin-C, Thrombospondin und Undulin (Kannus, 2000).

Fibronectin (450kDa) kommt auf der Zelloberfläche und in der EZM vor und spielt eine wichtige Rolle in der Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktion indem es an Fibronectin- und Kollagenrezeptoren an der Zelloberfläche binden kann (Kannus et al., 1998). Dadurch beeinflusst Fibronectin den Aufbau des Zytoskelettes und die Zellmigration und kann die Adhäsion verschiedener Komponenten induzieren. In nekrotisierendem oder frisch rupturiertem Sehnengewebe konnte eine deutliche verstärkte Expression von Fibronectin nachgewiesen werden (Tillander et al., 2002).

Das hexamere Multidomain-Glykoprotein Tenascin-C ist ein Protein mit elastischen Eigenschaften und der Eigenschaft sich unter mechanischer Belastung um ein Vielfaches auszudehnen (Hsia and Schwarzbauer, 2005). Physiologisch ist es an Orten mit hoher mechanischer Beanspruchung lokalisiert, im Sehngewebe liegt es sowohl an kollagene Fasern angelagert, als auch perizellulär vor (Jarvinen et al., 2000). Die durch Di-Sulfid-Brücken verbundenen Untereinheiten werden durch die von Integrinen (EZM-Rezeptoren) übertragene mechanische Beanspruchung reguliert (Chiquet-Ehrismann and Tucker, 2004).

Elastische Bestandteile wie das Elastin machen 1-2% des Trockengewichts der Sehne aus (Kannus, 2000) und können in Bändern zu einem noch höheren Anteil vorkommen (Mithieux and Weiss, 2005). Elastin ist ein unlösliches Polymer welches aus einem löslichen Vorläufermolekül dem Tropoelastin synthetisiert wird. Die Elastinfasern verlaufen in der EZM parallel zu den Kollagenfasern des Gewebes. Neben ihrer Fähigkeit sich unter Spannung auf die doppelte Länge auszudehnen, sind sie für die Rückstellkraft des Gewebes verantwortlich (Scott, 2003).

1.1.3. EZM und Tenozyten Interaktion

Die EZM Produktion kann von den Tenozyten als Reaktion auf extrazelluläre Stimuli entsprechend angepasst werden. Eine wichtige Rolle bei diesem Prozess wird den ‚gap junctions‘ zugeschrieben. Diese sind interzelluläre Verbindungen, über die Kommunikation und Stoffaustausch stattfindet (McNeilly et al., 1996). Die zwei verschiedenen Arten dieser ‚gap junctions‘ die für die Homoeostase der Sehne entscheidend sind, werden durch das Vorkommen verschiedener Connexine definiert. So wird über ‚gap junctions‘ vom Connexin-32 Typ die Kollagensynthese gesteigert, während Connexin-43 ‚gap junctions‘ diese hemmen (Waggett et al., 2006). Hierbei ist Connexin-32 in Richtung der Zugbeanspruchung angelegt, während Connexin-43 ubiquitär im Sehngewebe exprimiert wird. Dieses Prinzip ermöglicht es auf erhöhte Zugbeanspruchung mit erhöhter Matrixproduktion zu reagieren.

Eine wesentliche Rolle bei der Interaktion zwischen Zellen und EZM spielen auch spezifische EZM-Rezeptoren, wie die unter 1.3 genauer beschriebenen Integrine. Von besonderer Bedeutung im Sehngewebe ist hierbei β 1-Integrin, welches unter anderem den Ras-Mitogen-Activated-Protein-Kinase (MAPK) Signaltransduktions-

weg aktivieren und so Proliferation, Differenzierung und Überleben der Zellen steuern kann (Giancotti and Ruoslahti, 1999; van der Flier and Sonnenberg, 2001). Die initiale Bindung der Integrine an ihre EZM Liganden leitet deren Aktivierung ein und führt zur Bildung eines fokalen Adhäsionskomplexes (Burrige and Chrzanowska-Wodnicka, 1996). Diese wiederum führen zur Bildung bzw. Rekrutierung verschiedener Signalmediatoren wie Protein Kinasen (FAK (Fokale Adhäsionskinase), ILK (Integrin-linked Kinase), Src (Tyrosinkinase), Adaptorproteinen (Shc (src homologous collagen like), Grb-2, Crk und kleinen GPTasen (Rho, Ras (Rat sarcoma Proto-Onkogen)), die den MAPK Signalweg entweder direkt oder mit Hilfe von Wachstumsfaktorrezeptoren induzieren können (Giancotti, 1997; Shakibaei et al., 1999; Wary et al., 1996).

1.1.4. Signalübertragung im Sehnengewebe

Die EZM-Zell Interaktion ist von zentraler Bedeutung für das Überleben der Tenozyten sowie für die Homoeostase des Gewebes. Dem in dieser Arbeit untersuchte Ras-MAPKinase Signalweg kommt hierbei eine besondere Bedeutung zu. Kollagene binden an den Integrinrezeptor der wiederum mit dem IGF-Rezeptor assoziiert ist und es kommt zur Komplexbildung mit Shc, einem Adapter-Protein, welches ursprünglich als Proto-Onkogen identifiziert wurde (Ravichandran, 2001; Shakibaei et al., 1999). Es konnte gezeigt werden, dass Shc mit den $\beta 1$ -, $\alpha 1$ - und $\alpha 5$ -Integrinuntereinheiten assoziiert und somit Signale aus dem Extrazellularraum weiterleitet, welche durch IGF-1 noch verstärkt werden (Shakibaei et al., 1999). Shc wird an FAK gebunden und leitet entweder alleine oder synergistisch mit Grb-2 die weitere Signalkaskade ein (Schlaepfer et al., 1998). Es kommt zur Komplexbildung zwischen Shc/Grb-2/Erk und zur endgültigen Aktivierung der MAPKinasen (Shakibaei et al., 1999). Die Enzyme, welche diese Signalkaskade vermitteln, sind MAPKinase (MAPK), MAPKinase-Kinase (MAPKK) und MAPKinase-Kinase-Kinase (MAPKKK). Die MAPKinasen werden durch Phosphorylierung von Tyrosin- und Threoninresten aktiviert und können in den Zellkern translozieren wo sie wiederum verschiedene Transkriptionsfaktoren aktivieren (Shaw and Saxton, 2003). So können extrazelluläre Signale innerhalb kurzer Zeit zu einer veränderten Genexpression führen. Die Genprodukte der hieran beteiligten sog. ‚immediate early genes‘ (IEGs) sind u.a. Transkriptionsfaktoren der fos- und jun-Familien, welche weitere Gene

aktivieren oder selbst Effektorproteine, die den gewünschten Effekt vermitteln (Murphy and Blenis, 2006).

Besonders die MAPKinasen p44 (Erk1) und p42 (Erk2) sind an der Vermittlung von intrazellulären Signalprozessen beteiligt und bilden sog. ‚Schlüssel-Kinasen‘. Die ‚mitogen activated protein kinase / Erk kinases 1/2‘ (MEK1/2) phosphorylieren Erk1/2 und regulieren dadurch deren Aktivität. Aktiviertes Erk gelangt in den Zellkern und reguliert dort ebenfalls die Aktivität verschiedener Transkriptionsfaktoren (Kanbe et al., 2009; Shakibaei et al., 2006).

Es wurde berichtet, dass die Ausübung von Scheer- oder Zugkräften auf Herzmuskel-, glatte Muskel- und Endothelialzellen zu einer Aktivierung des MAPK Signalweges führt (Sadoshima and Izumo, 1997; Shyy and Chien, 1997; Takahashi and Berk, 1996). Da Sehengewebe kontinuierlich diesen Kräften ausgesetzt ist, hat der MAPK Pathway auch hier eine entscheidende Bedeutung (Chiquet, 1999). Wie entscheidend dieser Signalweg für die Vitalität eines Zellverbandes ist, zeigt sich darin, dass seine Inhibition mit Apoptose und Gewebsuntergang einhergeht (Shakibaei et al., 2001; Yang et al., 1997).

1.2. Mesenchymale Stammzellen (MSZ)

1.2.1. Was sind MSZ

Stammzellen sind nichtspezialisierte Vorläuferzellen, welche in nahezu allen Organen und Gewebstypen identifiziert werden konnten. So konnten sie unter anderem aus zirkulierendem Blut, Knochenmark, Muskelgewebe, Fettgewebe, Pankreas, Haut, Nervensystem und anderen Geweben isoliert werden (Alexanian and Sieber-Blum, 2003; Bottai et al., 2003; Cancedda et al., 2003; Caplan, 1991; Till and McCulloch, 1980; Wickham et al., 2003; Williams et al., 1999; Zuk et al., 2001). Im Gegensatz zu embryonalen oder fetalen Stammzellen, sind MSZ pluripotent und können zu verschiedenen Zelllinien differenziert werden, jedoch nicht zu vollständigen Organen, Organsystemen oder Organismen (Pittenger et al., 1999). Diese gewebsständigen oder zirkulierenden Vorläuferzellen gewährleisten Regeneration und Erhalt der Gewebe und Organe, die sie ursprünglich gebildet haben.

In den 60er Jahren beschrieben Friedenstein und Kollegen eine Population adulter Zellen im Knochenmark, die sich *in vitro* zu Osteoblasten differenzieren ließen (Friedenstein et al., 1966). In den 70er Jahren definierte die gleiche Gruppe die

Zellen als klonale Zellen aus dem Knochenmark mit der Fähigkeit an Plastik zu adhären und sich durch Zugabe bestimmter Stoffe *in vitro* zu Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten zu differenzieren (Friedenstein et al., 1974; Friedenstein et al., 1976). Die Zellpopulation mesenchymaler Vorläuferzellen, die heute nach einem international anerkannten Protokoll mittels Dichtegradienten-Zentrifugation und Plastikadhärenz isoliert wird, benutzen vielen wissenschaftliche Gruppen teils jedoch unter verschiedenen Bezeichnungen (Gregory et al., 2005; Pittenger et al., 2002; Pittenger et al., 1999). Die Begriffe ‚Mesenchymale Stammzellen‘, ‚Mesenchymale Vorläuferzellen‘ und ‚Knochenmark-Stromazellen‘ bezeichnen jedoch alle die gleiche Zellpopulation. Da diese aber eine heterogene Population mit mindesten drei Untergruppen sind und die für Stammzellen charakteristische asymmetrische Teilung nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden konnte, wird von der ‚International Society of Cellular Therapy‘ der Begriff ‚Multipotente Mesenchymale Stromazellen‘ (MSZ) favorisiert (Horwitz et al., 2005; Javazon et al., 2004; Sekiya et al., 2002). Aus verschiedenen Geweben und Species gewonnene MSZ konnten unter entsprechenden Kulturbedingungen zu Adipozyten, Chondrozyten, Osteoblasten, Muskel- und Periodontalgewebe, Hepatozyten im Endoderm und neuronalen Zellen im Ektoderm differenziert werden (Brazelton et al., 2000; Caplan, 1991, 2007; Carlberg et al., 2001; Chamberlain et al., 2007; Conget and Minguell, 1999; Csaki et al., 2007; Fortier et al., 1998; Kramer et al., 2004; Krampera et al., 2007; Majumdar et al., 2000; Otto and Rao, 2004; Pittenger et al., 1999; Short et al., 2003; Yoon et al., 2005).

Die Verwendung von MSZ im Tissue Engineering hat mehrere Vorteile. So sind adulte MSZ leicht verfügbar, können dem Patienten direkt entnommen werden und ihre Verwendung zieht weder eine sekundäre Schädigung an der Entnahmestelle, noch kontroverse ethnische Diskussionen nach sich (Tuan et al., 2003). Im Vergleich zu der Arbeit mit embryonalen Stammzellen ist außerdem das Risiko Neoplasien zu entwickeln deutlich geringer.

1.2.2. Vorkommen von MSZ

MSZ finden sich in einer Vielzahl von Geweben. So konnten sie aus dem Knochenmark, Synovium, Knorpel, Fettgewebe, Periost, Nabelschnurblut, Milz, Thymus, Herzmuskel, Plazenta, Dermis, Endothel der Blutgefäße und periphärem Blut isoliert werden (Bieback et al., 2004; Brooke et al., 2009; Caplan et al., 1997;

Crisan et al., 2008; De Bari et al., 2006; Dicker et al., 2005; Fickert et al., 2003, 2004; Friedenstein et al., 1987; Giovannini et al., 2008; Huss et al., 2000; Kern et al., 2006; Koerner et al., 2006; Kogler et al., 2004; Krampera et al., 2007; Poloni et al., 2008; Riekstina et al., 2009; Sakaguchi et al., 2005; Ukai et al., 2007; Zuk et al., 2002; Zvaifler et al., 2000). Heute nimmt man an, dass sich in jedem Gewebe mesenchymale Vorläuferzellen befinden.

Die am weitesten verbreitete Methode MSZ zu gewinnen ist ihre Isolation aus dem Knochenmark (KM). Das Knochenmark wird dabei aspiriert und anschließend antikoaguliert. Über Zentrifugation mit einem Dichtmedium wie Ficoll oder Percoll wird die Fraktion der mononukleären Zellen abgetrennt und unter Zellkulturbedingungen kultiviert (Caplan, 1991). MSZ machen dabei 2-3% der mononukleären Zellen im KM aus. Aus dem KM isolierte Zellen haben *in vitro* eine Fibroblasten-artige Morphologie: lange, spindelförmige Zellen, breite, flachere Zellen, sowie kleinere, schnell proliferierende Zellen (Colter et al., 2001).

Eine weitere gute Möglichkeit zur MSZ Isolierung bietet die Gewinnung aus Fettgewebe und sowohl im Menschen als auch im Tiermodell ist die Entnahme von Fett zum Beispiel durch „Liposuction“ eine gute Alternative zur wesentlich invasiveren KM-Punktion (Yamamoto et al., 2007; Zuk et al., 2001).

1.2.3. Charakterisierung der MSZ

Die ‚International Society for Cellular Therapy‘ definiert in einem Positionspapier Minimalkriterien, die erfüllt sein müssen, damit Zellen als mesenchymale Stromazellen klassifiziert werden können (Dominici et al., 2006). Wie oben erwähnt, definieren sich MSZ hauptsächlich über ihre Adhäsionsfähigkeit in Monolayer Zellkultur und ihr Differenzierungspotential zu Knochen, Knorpel und Fett. Außerdem sollten sie die molekularen Marker CD105, CD73 und CD90 exprimieren und gleichzeitig negativ für die Marker haematopoetischer Zelllinien wie z. B. CD45 und CD34 sein (Csaki et al., 2007; Dominici et al., 2006).

1.2.4. MSZ und Tissue Engineering

Das Tissue Engineering hat sich in den letzten Jahren als ein relativ neues Forschungsgebiet mit wachsender Geschwindigkeit entwickelt. Das Ziel hierbei ist mit Hilfe biowissenschaftlicher Methoden *in vitro* Konstrukte herzustellen, welche Organ- oder Gewebefunktionen ersetzen, verbessern oder wieder herstellen können

(Langer, 2000). Dies scheint ein vielversprechender Ansatz zu sein um klinisch problematische Krankheitsbilder bzw. Gewebsdefekte zu heilen.

Sehnenverletzungen durch Mikro- oder Makrotraumen durch Sport- oder Alltagsverletzungen, antibiotische Chinolonbehandlungen oder anderer Genese sind in der klinischen Behandlung besonders anspruchsvoll (Bosch, 2000; Hankemeier et al., 2007; Sendzik et al., 2005; Shakibaei and Stahlmann, 2001, 2003). Dies ist durch die bradytrophen Eigenschaften der Sehne bedingt, die nur eingeschränkt regenerationsfähig ist und sehr langsam heilt (Ahmed et al., 1998; Moller et al., 2000; Schulze-Tanzil et al., 2004a). Ähnlich wie bei Knorpel und Knochendefekten, werden zur Sehnenrekonstruktion auto- und allogene Transplantate benutzt, die jedoch teils unbefriedigende Resultate liefern (Frank et al., 1999; Herrington et al., 2005; Woo et al., 2006). Bei Autografts sind hauptsächlich Gewebsnekrosen am Entnahmeort (donor site morbidity) und die daraus resultierende Muskelschwäche problematisch (Kartus et al., 2001; Seo et al., 2009). Bei frischen oder kryokonservierten Allografts stehen Probleme wie Abstoßungsreaktionen, Immunoinkompatibilität, Übertragung von Erregern und mangelnde Durchblutung des Implantats im Vordergrund (Getgood and Bollen, 2010). Auch azelluläre synthetische Prothesen, die in den 80er Jahren favorisiert wurden und anfänglich gute Ergebnisse zeigten, konnten über längere Zeit nicht den natürlichen mechanischen Anforderungen gerecht werden (Laurencin and Freeman, 2005).

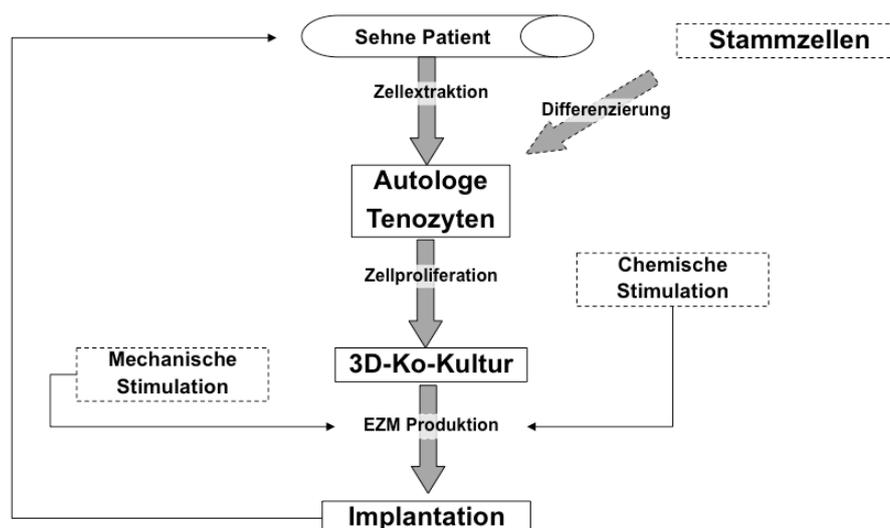


Abb.4: Schematische Darstellung der Strategien des *in vitro* Tendon Tissue Engineering. Nach Bagnaninchi et al., 2006.

Andere Ansätze benutzen biologisch abbaubare und verträgliche synthetische Trägerstrukturen auf die Tenozyten oder MSZ aufgebracht werden (Krampera et al., 2006; Rosso et al., 2005) (Abb. 4). Die bereits unter 1.2 erläuterten Eigenschaften der MSZ machen sie zu idealen Zellen für das Tissue Engineering. Ihre Pluripotenz prädestiniert sie im Besonderen um bindegewebige Strukturen zu erzeugen. Außerdem sind sie mit relativ geringem Aufwand in ausreichender Zahl zu gewinnen und *in vitro* expandierbar ohne ihr Differenzierungspotential zu verlieren (Caplan and Goldberg, 1999; Pittenger, 2008). Ein weiterer Vorteil ist, dass sie als adulte Vorläuferzellen auch beim erwachsenen Patienten stets verfügbar sind und direkt entnommen werden können (Tuan et al., 2003).

1.3. Integrine (extrazelluläre Matrix-Rezeptoren)

1.3.1. Struktur und Funktion der Integrine

Die Adhäsion zwischen Zellen und Zellen bzw. Zellen und EZM spielt eine entscheidende Rolle bei der Zellproliferation und Differenzierung. Die Integrine, welche diese Adhäsionsvorgänge vermitteln, sind transmembranäre, heterodimere Glykoproteine, die sich aus nicht kovalent gebundenen α - und β -Untereinheiten zusammensetzen (Garcia, 2005; Rosso et al., 2004) (Abb. 5). Tamkun prägte den Begriff ‚Integrin‘, welcher sich auf die integrative Funktion dieser Zellmembranrezeptoren mit EZM Bestandteilen und Teilen des Zytoskelettes der Zelle bezieht (Tamkun et al., 1986). Die Kombination aus α - und β -Untereinheit ist maßgeblich für die Ligandenspezifität des jeweiligen α/β -Dimeres. Momentan sind 18 α - und 8 β -Untereinheiten beschrieben, die untereinander insgesamt 24 Heterodimere bilden können (Hynes, 2002; Thomas et al., 2006). Die Integrine kommen in den unterschiedlichsten Zellen vor und können mit verschiedenen EZM Komponenten Bindungen eingehen wobei die jeweiligen Matrixmoleküle wiederum Bindungsstellen für verschiedene Integrine aufweisen können (Hynes, 1992). Die bidirektionalen Signalkaskaden, die dies ermöglichen, sind daher vielfältig. Xiong et al. stellten 2001 erstmalig mittels Röntgenstrukturanalyse ein Integrinmolekül, den $\alpha_v\beta_3$ -Integrinrezeptor, dar (Xiong et al., 2001). Die einzelnen Monomere bestehen jeweils aus einer großen extrazellulären Domäne, die mit Liganden interagiert, einer transmembranären Domäne, die in der Zellmembran verankert ist und einer

intrazellulären Domäne, welche wiederum mit zytoplasmatischen Strukturen interagiert. Die α -Monomere der Integrine haben ein Molekulargewicht zwischen 150 und 200kDa und setzen sich aus 1000 – 1150 Aminosäuren zusammen, das Molekulargewicht der β -Monomere (außer β_4) liegt zwischen 90 und 110kDa und sie bestehen aus 730 – 800 Aminosäureresten (Shimaoka et al., 2002). Die verschiedenen Integrine haben spezifische Funktionen obwohl sie oft die gleichen Liganden binden. Dies liegt darin begründet, dass die Liganden an unterschiedlichen Bindungsstellen und mit unterschiedlicher Affinität an das entsprechende Integrin binden (Jones and Walker, 1999).

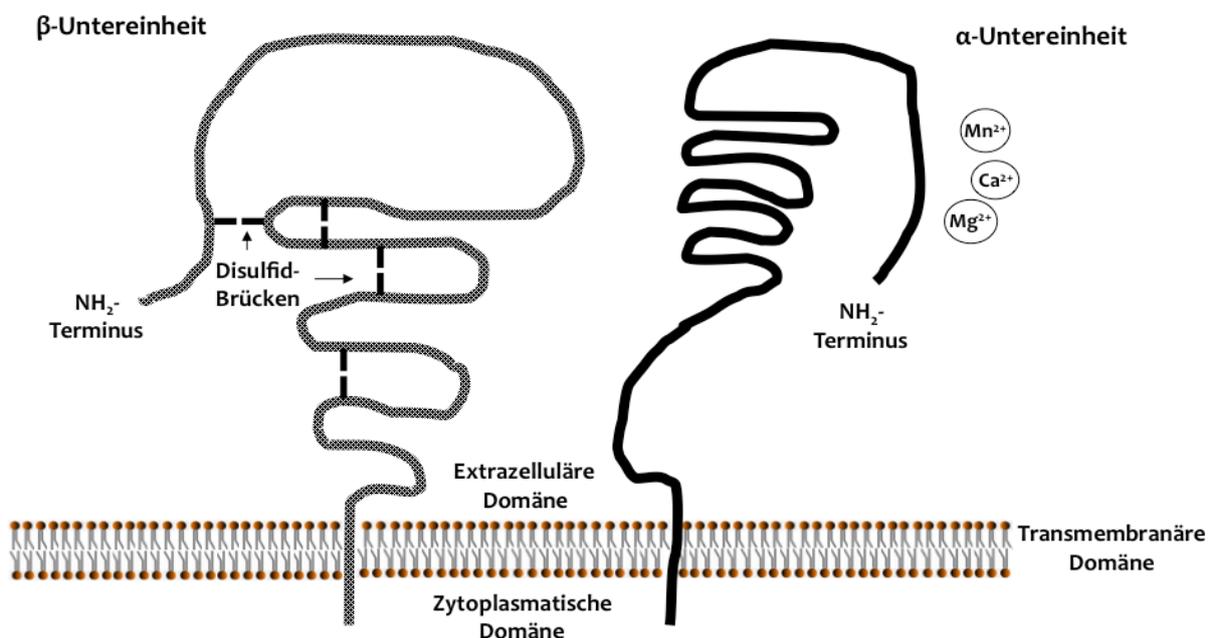


Abb.5: Schematische Darstellung eines Integrinrezeptors mit seinen Untereinheiten.

1.3.2. Regulation der Integrinfunktionen

Als spezifische Transmembranrezeptoren vermitteln Integrine den Informationsfluss zwischen Zellen und EZM und haben entscheidenden Einfluss auf Proliferation, Funktion, Stoffwechsel und Differenzierung der Zellen (Lin and Bissell, 1993). Die Integrin vermittelte und modifizierte Adhäsion spielt außerdem bei der Migration und Verankerung der Zellen sowie bei der Verarbeitung von extrazellulären Stimuli und ihrer Umsetzung durch die Zelle eine Schlüsselrolle (Juliano et al., 2004; Otey et al., 1990). Die Bindung eines Liganden führt zur Annäherung verschiedener Integrine an

das Aktin-Zytoskelett und zur Bindung von fokalen Adhäsionskomplexen. Zusammen steuern sie den Informationsfluss zwischen EZM und dem intrazellulären Raum (Garcia, 2005). Eine Vielzahl von intrazellulären Signalkaskaden ist an diesen Prozessen beteiligt. Eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der Integrine spielt die Phosphorylierung bestimmter Target Proteine (Clark and Brugge, 1995). Es wurde mehrfach gezeigt, dass hierbei besonders die Src-Kinase-Familie, die Serin-Threonin-Kinase Proteinkinase C (PKC), die Mitogen-activated-Kinase (MAPKinase), die Tyrosin-Kinase FAK (fokale Adhäsionskinase) und die Integrin-linked Kinase (ILK) (Lafrenie and Yamada, 1996) eine besondere Rolle spielen. Phosphoryliert werden zum einen Enzyme wie die Src-Kinasen oder FAK, zum anderen Zytoskelettmoleküle wie α -Aktinin, Talin, Paxillin, Vincullin oder Tensin, aber auch die Integrine selbst (Volberg et al., 2001). Eine entscheidende Rolle bei der Rezeptorfunktion spielt auch die Bindung von bivalenten Kationen (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+}) an die α -Untereinheit der Integrine (Ivaska and Heino, 2000; van der Flier and Sonnenberg, 2001). Trotz ihrer Fähigkeit unabhängig von anderen Rezeptoren Signale zu übermitteln, kann die Signalkaskade durch Wechselwirkung mit Wachstumsfaktoren noch um ein Vielfaches komplexer sein und eine entsprechende Feinmodulation ermöglichen (Eliceiri, 2001). Im Rückschluss bedeutet dies, dass die von Wachstumsfaktoren vermittelten Effekte teils auch von einer Adhäsion zwischen den Zellen und der Matrix abhängig sein können.

1.3.3. Integrine und Tendon

Aufgrund ihrer vielfältigen Wirkweisen spielen die meisten Integrine eine wichtige Rolle im Sehngewebe. Eine wesentliche Rolle spielen hierbei die Rezeptoren für Kollagen Typ I, die Untergruppe der β 1-Integrine und im Besonderen die Integrine α 1 β 1 und α 2 β 1, welche die wichtigsten Oberflächenrezeptoren für die Bindung von Kollagenen in der Sehne darstellen (Tulla et al., 2001). Während α 1 β 1-Integrin vorwiegend nicht-fibrilläres Kollagen bindet, wird fibrilläres Kollagen (z.B. Typ I) bevorzugt durch α 2 β 1 Integrin gebunden.

Stimuliert man Integrine mechanisch direkt an der Zelloberfläche, werden intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert (Schmidt et al., 1998). Mechanische Stimulation des Gewebes führt über β 1-Integrin zur Aktivierung des MAPK Signalweges (Lal et al., 2007). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass MMP-13

vermitteltes Matrix-Remodelling durch α 1- und α 2-Integrininhibition vermindert und durch β 1-Integrin Aktivierung verstärkt werden kann (Ravanti et al., 1999).

1.3.4. Remodelling der EZM durch MatrixMetalloProteinasen (MMPs)

Die EZM im Tendon wird aktiv und kontinuierlich von Tenozyten auf-, um- und abgebaut. Eine tragende Rolle kommt hierbei den MMPs und ihren Inhibitoren, den Tissue Inhibitors of Matrixmetalloproteinasen (TIMPs) zu. Beim Menschen sind 22 MMPs und 4 TIMPs beschrieben, deren Expression in unterschiedlichen Gewebetypen variiert (Bramono et al., 2004; Nagase and Woessner, 1999; Sternlicht and Werb, 2001). Die Organisation und Reorganisation der Matrix muss genauestens reguliert werden. Die MMP Konzentration in normalen Zellen ist gering, wird aber durch entsprechende Stimuli wie Zytokine, Wachstumsfaktoren oder Interaktionen mit der EZM hochreguliert (Bramono et al., 2004). MMP-1, welches vor allem die Kollagene Typ III und I abbaut, wird nach einem Trauma vermehrt gebildet und beispielsweise in rupturiertem Sehngewebe 1000-fach mehr exprimiert als in gesundem Gewebe (Jones et al., 2006; Riley et al., 2002). Eine wichtige Rolle bei der Regulation der MMPs spielt ihre Interaktion mit Wachstumsfaktoren, welche die MMP Produktion induzieren bzw. inhibieren können während die MMPs gleichzeitig durch Matrixremodelling in der Matrix vorliegende Wachstumsfaktoren freisetzen können (Nagase and Woessner, 1999).

1.4. Wachstumsfaktoren

1.4.1. Wachstumsfaktoren im Tendon

Wachstumsfaktoren (engl. Growth Factors ‚GFs‘) sind Proteine die von verschiedensten Zellen produziert und sezerniert werden und autokrin oder parakrin wichtige Signale für die Proliferation, Differenzierung und die Homöostase eines Gewebsverbandes oder einzelner Zellen liefern. Wachstumsfaktoren können ihre Wirkung direkt entfalten oder im intrazellulären Raum bzw. der EZM gespeichert werden und erst zeitversetzt zu ihrer Sekretion einen Effekt bewirken. Aktuell werden Wachstumsfaktoren im Tissue Engineering hauptsächlich dazu verwendet, Zellen, z.B. Stammzellen, in bestimmte Zellarten zu differenzieren. So werden beispielsweise bestimmte Wachstumsfaktoren verschiedenen

Differenzierungsmedien zugegeben um den gewünschten Effekt zu erzielen. Für die tenogene Differenzierung ist die Datenlage dünn und die bisherigen Versuche eine Tenogenese zu bewirken, bleiben größten Teils experimentell. Einige der Wachstumsfaktoren für die in der Literatur ein Effekt auf das tenogene Potential beschrieben wurde, sollen in dieser Arbeit zur Verwendung kommen.

1.4.2. IGF-1

Insulin-Like Growth Factor-1 (IGF-1) auch bekannt als Somatomedin C stimuliert die Produktion von Kollagenen und anderen Matrixkomponenten in Sehnen und Bändern in Dosis-abhängiger Weise (Abrahamsson, 1991; Abrahamsson and Lohmander, 1996; Abrahamsson et al., 1991). Bei Sehnenverletzungen wird die IGF-1 Produktion hoch reguliert was Tenozyten zur Proliferation und zur Migration an die Verletzungsstelle anregt (Kurtz et al., 1999; Tsuzaki et al., 2000). Die Heilung wird dadurch verbessert bzw. beschleunigt (Chen et al., 2008). Sowohl die Struktur des Regenerationsgewebes als auch seine biomechanischen Eigenschaften ließen sich durch IGF-1 verbessern (Dines et al., 2007). Schnabel und Kollegen konnten zeigen, dass MSZ in denen das IGF-1 Gen hochreguliert wurde, nach Injektion in verletztes Sehnengewebe zu einem signifikant besseren histologischen Ergebnis führten (Schnabel et al., 2009). Es wurde auch gezeigt, dass mechanische Beanspruchung der Sehne zu einer verstärkten Expression von IGF-1 führt (Scott et al., 2007).

1.4.3. TGF- β 1

Transforming Growth Factor β ist ebenfalls von großer Bedeutung für Proliferation und Matrixproduktion im Sehnengewebe. Aus der TGF- β Superfamilie wurden bis jetzt drei für Säugetiere relevante Isoformen (TGF- β 1-3) identifiziert.

Besonders TGF- β 1 spielt im Sehnengewebe eine entscheidende Rolle bei der Produktion verschiedener Komponenten der EZM (Dahlgren et al., 2005; Klein et al., 2002). *In vitro* fördert TGF- β 1 die Zellproliferation, Regeneration, Migration und hat Einfluss auf verschiedene Wundheilungsprozesse (Chang et al., 1997; Kashiwagi et al., 2004). Beim Heilungsprozess der Sehne in unterschiedlichen Lokalisationen konnte TGF- β 1 im Gewebe nachgewiesen werden (Dahlgren et al., 2005; Lee et al., 1998; Tsubone et al., 2004). Es wurde außerdem gezeigt dass TGF- β bei

Verletzungen des Sehnen- und Bandapparates verstärkt exprimiert wird (Sakai et al., 2001).

1.4.4. BMP-12

Bone Morphogenic Protein-12 (BMP-12) das auch als growth differentiation factor-7 (GDF-7) oder cartilage derived morphogenetic protein-3 (CDMP-3) bekannt ist, gehört auch zur TGF- β Superfamilie. BMP-12 induziert bei ektopischer Applikation die Bildung von Sehnen-ähnlichem Gewebe (Wolfman et al., 1997). Außerdem reguliert BMP-12 die Synthese von EZM Komponenten und den Kollagenen Typ I und III (Wang et al., 2005). Es wurde außerdem gezeigt, dass GDF 5, 6 und 7 in ähnlichem Maße einen positiven Effekt auf die Sehnenheilung haben (Forslund and Aspenberg, 2001, 2002). In Kombination mit anderen Stimuli wie mechanischer Beanspruchung konnte zudem die Bildung von sehnenartigem Gewebe beobachtet werden (Forslund et al., 2003). Durch Zusatz von rekombinantem BMP-12 zu Sehnenabrissmodellen konnte eine Zunahme in Stärke und Steifheit des Regenerationsgewebes von 300% bewirkt werden (Seeherman et al., 2008). Außerdem zeigten Violini und Mitarbeiter, dass MSZ nach *in vitro* Behandlung mit BMP-12 ein gewisses tenogenes Potential aufweisen (Violini et al., 2009).

1.4.5. PDGF

Platelet Derived Growth Factor (PDGF) induziert die Expression anderer Wachstumsfaktoren wie IGF-1 und stimuliert die Synthese von Kollagen und anderen EZM Bestandteilen *in vitro* (Aspenberg and Virchenko, 2004; Stein, 1985; Wang et al., 2004; Yoshikawa and Abrahamsson, 2001). Eine beschleunigte EZM Synthese und verbesserte Heilungsprozesse konnten nach PDGF Gentransfer auch *in vivo* nachgewiesen werden (Nakamura et al., 1998). Die Isoform PDGF-bb kann nach einer Ruptur im ganzen Sehnenngewebe nachgewiesen werden und Zellen für die Wundheilung rekrutieren indem sie z. B. auf MSZ stark chemotaktisch wirkt (Fiedler et al., 2004; Tsubone et al., 2004). Costa und Kollegen konnten zeigen, dass PDGF-bb verschiedene Zellpopulationen im Sehnenngewebe zur Proliferation anregt und verstärkte Proteinsynthese bewirkte (Costa et al., 2006).

2. FRAGESTELLUNG DER ARBEIT

Traumatische Verletzungen und andere entzündliche Erkrankungen von Sehnen sind eine wesentliche Ursache eingeschränkter Beweglichkeit des Bewegungsapparates und münden sehr oft in Tendinopathie. Die Behandlung von lang anhaltenden Tendinopathien (Veränderungen der Sehnen infolge von Mikrotraumen, Alterungsprozessen, mangelnder Belastung und Überbelastung) ist oft frustrierend da Sehngewebe infolge seiner schlechten Vaskularisierung sehr bradytroph und nur gering regenerationsfähig ist. Der Sehnenüberlastungsschaden ist eine der häufigsten Ursachen für Bewegungsausfälle und Sportverletzungen. Verschiedene klinische und experimentelle Versuche wurden unternommen, um die Heilung von Sehnen zu ermöglichen und zu verbessern.

So kommt seit einigen Jahren die autologe Tenozyten Transplantation zum Einsatz. Während der Expansionsphase der Tenozyten in der Monolayer Kultur kommt es zunächst zu phänotypischen Veränderungen der Zellen. Sie nehmen eine Fibroblasten ähnliche Gestalt an und produzieren untypische extrazelluläre Matrixbestandteile. Diese Dedifferenzierungsprozesse resultieren in Zellen, die nicht in der Lage sind, einen bestehenden Sehndefekt funktionell befriedigend zu ersetzen. Sie haben ihr tenogenes Potential verloren.

Es muss also nach Möglichkeiten gesucht werden, eine ausreichende Anzahl an Tenozyten *in vitro* zu gewinnen, das tenogene Potential dieser Zellen aufrecht zu erhalten und somit Material zu gewinnen, welches im Rahmen der Transplantation Sehndefekte adäquat und funktionell decken kann. Die Verwendung von MSZ in der Geweberegeneration und im *Tissue Engineering* ist wünschenswert, realistisch und bereits weit verbreitet. Stammzellen müssen nach einer Verletzung Signale erhalten, welche dazu führen, dass sie in das betroffene Gewebe migrieren, dort proliferieren und schließlich differenzieren.

Die Kombination von MSZ mit primär isolierten Tenozyten ist neu und unerprobt. Jeder einzelne Schritt braucht umfangreiche Kenntnis über die zellbiologischen und materialtechnischen Grundlagen. Die Kombination beider Zellarten wirft neue Fragen über Zelldifferenzierung, Zellmigration, Stoffwechselleistung und Stoffaustausch, also über die wechselseitige Beeinflussung der Zellen auf. Viele Fragen sind an Einzelschritten weder studierbar noch vorhersehbar, sondern zeigen sich erst nach Ko-Kultivierung der Zellen. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Ko-Kultur exemplarisch untersucht.

Folgende Fragen wurden im Hinblick auf die Bedeutung der MSZ in der Sehnengeweberegeneration im Allgemeinen und ihrem möglichen Einsatz im *Tissue Engineering* von Sehnengewebe im Speziellen formuliert:

1. Welchen Einfluss haben IGF-1, TGF- β 1, BMP-12 und PDGF-bb auf das Differenzierungspotential von MSZ zu Tenozyten?
2. Welchen Einfluss haben IGF-1, TGF- β 1, BMP-12 und PDGF-bb auf den MAPKinase-Signalübertragungsweg während der Tenogenese *in vitro*?
3. Können die primär isolierten Tenozyten in einem drei dimensional Kulturmodell (Tenozyten & MSZ), in den MSZ Tenogenese induzieren?
4. Haben verschiedene MSZ/Tenozyten Mischungsverhältnisse (100%MSZ 90/10, 70/30, 50/50, 100%Tenozyten) einen qualitativen Einfluss während der Tenogenese?
5. Ist dieser Vorgang ohne die Zugabe von Wachstumsfaktoren möglich?
6. Existiert ein intensiver Zell-Zell-Kontakt oder ein Austausch zwischen Tenozyten und MSZ?
7. Kann eine Tenogenese bei MSZ alleine durch Zugabe von Überstand aus der Tenozyten-Monolayer-Kultur induziert werden?

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Materialien

3.1.1. Spender

Das Fettgewebe zur Isolation der caninen mesenchymalen Stammzellen (MSZ) und das Sehngewebe zur Gewinnung der caninen primären Tenozyten, konnten in enger Kooperation mit Frau Prof. Dr. U. Matis aus der Tierchirurgischen Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität, München an frisch euthanasierten Hunden entnommen werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde Gewebe aus Tieren im Alter von 2 bis 12 Jahren gewonnen. Für die Ko-Kultur Experimente wurden jeweils Zellen aus dem selben Tier verwendet.

3.1.2. Reagenzien & Verbrauchsmaterialien

2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München, Germany
30% Acrylamid / Bis Solution 37,5:1 (2,6%C)	Bio-Rad, München, Germany
Ammoniumpersulfat	Bio-Rad, München, Germany
BC Assay Kit	Uptima Interchim, Montlucon, Frankreich
BCIP/NBT Solution	Uptima Interchim, Montlucon, Frankreich
Bromphenol Blau	Sigma-Aldrich, München, Germany
Butanol	Fluka, Buchs, Schweiz
Cryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden, Germany
Dexamethason	Sigma-Aldrich, München, Germany
Dimethylsulfoxid, getrocknet, max.0,05%H ₂ O	Merck, Darmstadt, Germany
Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat (Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O)	Roth, Karlsruhe, Germany
Dulbecco's Modified Eagle's Medium	Biochrom, Berlin, Germany
Epon	Plano, Wetzlar, Germany
Eppendorf ep T.I.P.S., versch. Größen	Eppendorf, Hamburg, Germany
Ethanol (96%)	Merck, Darmstadt, Germany
Fetales Kälberserum	Biochrom, Berlin, Germany
Gel-Blotting Nitrocellulose Papier	Schleicher & Schuell, Dassel, Germany
Glukose	Merck, Darmstadt, Germany
Glutaraldehyd	Merck, Darmstadt, Germany
Glycerol 87%	Sigma-Aldrich, München, Germany
Glycin	Sigma-Aldrich, München, Germany
Ham's F-12 Medium	Biochrom, Berlin, Germany
Hank's Salt Solution	Biochrom, Berlin, Germany
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Germany
Kaleidoskope prestained standards	Bio-Rad, München, Germany
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Roth, Karlsruhe, Germany
Kupfernetze	Schmied-Laborbedarf, Germany
Leupeptin	Sigma-Aldrich, München, Germany
L-Glutamin (200mM)	Biochrom, Berlin, Germany
Magnesiumchlorid (MgCl ₂) min. 99%	Sigma-Aldrich, München, Germany
MEM-Amino Acids (50x) ohne L-Glutamin	Biochrom, Berlin, Germany
Methanol	Merck, Darmstadt, Germany
Natriumchlorid (NaCl) min. 99,5%	Sigma-Aldrich, München, Germany
Natronlauge (NaOH)	Merck, Darmstadt, Germany
Nunc EasyFlask, 25, 75 & 175 cm ³	Nunc, Wiesbaden, Germany
Nunclon Zellkulturschalen 8,8 & 21,5 cm ²	Nunc, Wiesbaden, Germany
Osmiumtetroxid (OsO ₄)	Plano, Wetzlar, Germany
Parafilm	American National Can Neenah, WC, USA

Paraformaldehyd
 Pasteur Pipetten
 PBS Dulbecco (1x) mit Ca²⁺, Mg²⁺
 Penicillin/Streptomycin 10000U/10000µg/ml
 Pepstatin
 Phenylmethylsulfonylfluorid
 Polyethylenbecher
 Reagenzgläser
 Reaktionsgefäße
 Rundfilter
 Salzsäure (HCl)
 Skim Milk Powder
 Sodium dodecyl sulfat
 Styrol
 TEMED
 Trispuffer Hydrochlorid (Tris-HCl)
 Triton X 100
 Trypsin/EDTA Solution in PBS 0,05%/0,02%
 (w/v) ohne Ca²⁺, Mg²⁺
 Tween 20
 Vitamin C
 Zell Schaber (steril)

Merck, Darmstadt, Germany
 Brand, Wertheim, Germany
 Biochrom, Berlin, Germany
 Biochrom, Berlin, Germany
 Roche Diagnostics, Mannheim, Germany
 Sigma-Aldrich, München, Germany
 Plano, Wetzlar, Germany
 Hecht-Assistent, Sondheim, Germany
 Brand, Wertheim, Germany
 Schleicher und Schuell, Dassel, Germany
 Merck, Darmstadt, Germany
 Fluka, Buchs, Schweiz
 Bio-Rad, München, Germany
 Merck, Darmstadt, Germany
 Bio-Rad, München, Germany
 Sigma-Aldrich, München, Germany
 Sigma-Aldrich, München, Germany
 Biochrom, Berlin, Germany

 Bio-Rad, München, Germany
 Sigma-Aldrich, München, Germany
 Nunc, Wiesbaden, Germany

3.1.3. Antikörper

3.1.3.1. Primär-Antikörper

Anti- Kollagen Typ I (PAB 749)	Millipore GmbH, Schwalbach, Germany
Anti- Kollagen Typ III (PAB 750)	Millipore GmbH, Schwalbach, Germany
Anti- β1-Integrin (MAB 1965)	Millipore GmbH, Schwalbach, Germany
Anti- Laminin (PAK 1953)	Millipore GmbH, Schwalbach, Germany
Anti- Cartilage-specific proteoglycans (MAB2015)	Millipore GmbH, Schwalbach, Germany
Anti- Osteocalcin (PAB1857)	Millipore GmbH, Schwalbach, Germany.
Anti- β-Aktin (A4700)	Millipore GmbH, Schwalbach, Germany
Anti- Adiponectin (ACRP302-S)	Millipore GmbH, Schwalbach, Germany
Anti- Decorin	Millipore GmbH, Schwalbach, Germany
Anti- ERK 1/2 (610032)	BD Biosciences, Belgium
Anti- Shc (610082)	BD Biosciences, Belgium
Anti- Caspase 3 (AF835)	R&D Systems, Abingdon, UK
Anti- Tenomodulin N-14 (sc-49325)	Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA
Anti- Tenomodulin C-20 (sc-49324)	Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA
Anti- Scleraxis (ab58655)	Abcam Antibodies, Cambridge, UK
Anti- CD105 (BM2221)	Acris, Hiddenhausen, Germany
Anti- CD90 (BM2343)	Acris, Hiddenhausen, Germany
Anti- CD45 (SM3025)	Acris, Hiddenhausen, Germany
Anti- CD34 (SM1095)	Acris, Hiddenhausen, Germany

3.1.3.2. Sekundär- Antikörper

Sheep anti-rabbit (alk. Phosph.) IgG	Millipore GmbH, Schwalbach, Germany
Sheep anti-mouse (alk. Phosph.) IgG	Millipore GmbH, Schwalbach, Germany
Mouse anti-goat (alk. Phosph.) IgG	Dianova, Hamburg, Germany
Rabbit anti-goat (Rhodamin Red) IgG	Dianova, Hamburg, Germany
Rabbit anti-goat (FITC) IgG	Dianova, Hamburg, Germany
Immunogold GAR (Gold gekoppelt 5nm)	Amersham, Braunschweig, Germany
Immunogold GAR (Gold gekoppelt 10nm)	Amersham, Braunschweig, Germany

3.1.4. Wachstumsfaktoren

Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1)	Acris, Hiddenhausen, Germany
Transforming Growth Factor β 1 (TGF- β 1)	Acris, Hiddenhausen, Germany
Bone Morphogenic Protein 12 (BMP-12)	Acris, Hiddenhausen, Germany
Platelet Derived Growth Factor BB (PDGF-bb)	Acris, Hiddenhausen, Germany

3.1.5. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Accu Jet (Pipettierhilfe)	Brand, Wertheim, Germany
Analysenwaage	Mettler, Giessen, Germany
Autoklav Systec V95	Systec, Wettenberg, Germany
Blotting-Einheiten	Bio-Rad, München, Germany
Calibrated Densitometer GS-800	Bio-Rad, München, Germany
Cryo Freezing Container	Nalgene, New York, USA
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen, Germany
Elektrophorese-Einheiten	Bio-Rad, München, Germany
ELISA Reader 680	Bio-Rad, München, Germany
Inkubator	Labotec, Göttingen, Germany
Inkubator	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Kühlschränke	Liebherr, Ochsenhausen, Germany
Lichtmikroskop	Zeiss, Jena, Germany
Magnetrührer	Heidolph GmbH, Schwabach, Germany
Magnetrührer Variomag Mono	Thermo Corp., Langenselbold, Germany
Neubauer-Zählkammer	Zeiss, Jena, Germany
Phasenkontrastmikroskop Axiovert 40CFL	Zeiss, Jena, Germany
Research Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Germany
Schüttler	Sartorius, Göttingen, Germany
Stickstofftank	Thermo Corp., Langenselbold, Germany
Tiefkühlschrank -80°C VX 570E	Thermo Corp., Langenselbold, Germany
Tischzentrifuge Mikro 200R	Hettich, Tuttlingen, Germany
Transmissionselektronenmikroskop (EM-10)	Zeiss, Jena, Germany
Transmissionselektronenmikroskop (EM-900)	Zeiss, Jena, Germany
Wärmeschrank Stabilitherm	Thermo Ind. SAS, Chateau Gontiere, France
Wasserbad	GFL, Burgwedel, Germany
Zellkulturbench Hera Safe	Thermo Corp., Langenselbold, Germany
Zentrifuge Rotana 460R	Hettich, Tuttlingen, Germany

3.2. Methoden

3.2.1. Gewinnung und Isolierung der primären Tenozyten

3.2.1.1. Tenozyten in Monolayer

Sehnengewebe wurde von frisch euthanasierten Caninen aus der Achillessehne unter sterilen Bedingungen entnommen und in Transportmedium (Ham'sF12/DMEM) überführt. Im Zellkulturlabor folgten Spülgänge mit Hanks Salz-Lösung. Die Sehnenstücke wurden mittels Skalpell zerkleinert (2 – 5 mm große Stückchen) und alles Bindegewebe wurde sorgfältig entfernt. Anschließend wurde erneut mehrfach gespült. Die Sehnenstückchen wurden dann in eine mit normalem Zellkulturmedium (Hams-F12/DMEM 1:1, 10% FCS, 1% Partricin Lösung, 1% Penicillin/Streptomycin Lösung (10000IU/10000IU), 75µg/ml Ascorbinsäure, 1% essentielle Aminosäuren und 1% Glutamin) gefüllte Petrischale überführt und unter Standardbedingungen (5% CO₂, 37°C) inkubiert.

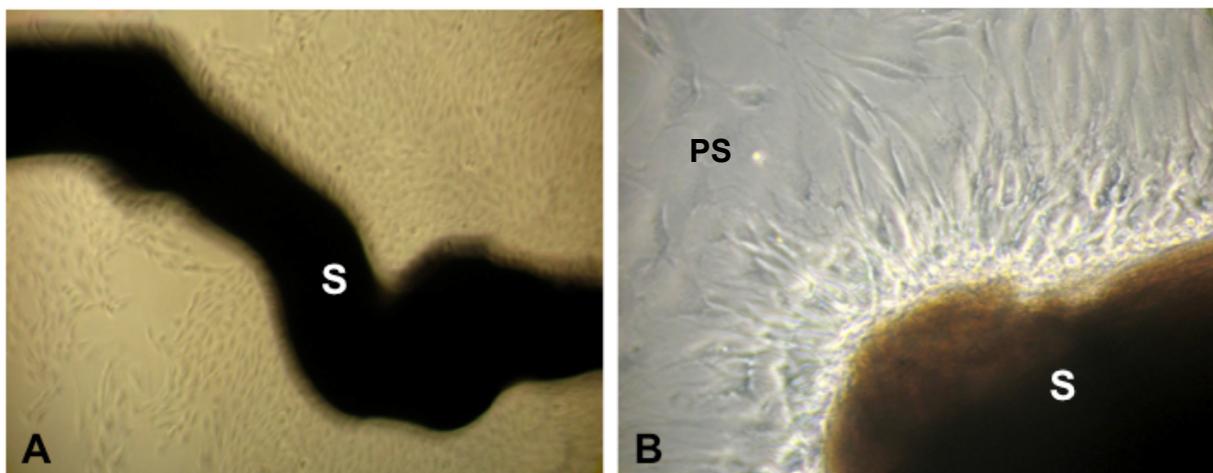


Abb. 6: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von aus einem Sehnenstückchen (S) in eine Petrischale (PS) auswandernder Tenozyten. Vergrößerung: A: 30x; B: 60x.

Nach mehreren Tagen fingen die Tenozyten an aus dem Gewebe auszuwandern und adhärten am Boden der PS wo sie weiter proliferierten. (Abb. 6). Sobald eine ausreichende Zelldichte erreicht war, wurde das Sehnenstück in eine neue PS umgesetzt, die Petrischale mit Hanks Salz-Lösung gespült, die Zellen mit Trypsin abgelöst und nach Zentrifugation in Zellkulturflaschen überführt. Hier wurden bis zu einer 70-80% Konfluenz kultiviert. Insgesamt wurden die für die Experimente gewonnenen und verwendeten Tenozyten 3 mal passagiert (P3) und für spätere Verwendungszwecke mit DMSO 10% in FCS kryokonserviert.

3.2.1.2. High-Density Kultur (HD-Kultur)

Für die HD-Kultur (Abb. 7) wird auf eine sterile Stahlnetzbrücke ein Filter aus Nitrozellulosepapier aufgelegt. Beides wird in einer kleinen Petrischale platziert die mit dem gewünschten Medium gefüllt wird. Anschließend werden 7-8 μ l Zellsuspension mit je ca. 1 Mio. Zellen auf den Filter an der Medium-Luft Grenze pipettiert und unter Standardbedingungen inkubiert. Die Zellen werden bei dieser Methode durch Diffusion an der Medium-Filter Grenze mit Mediumbestandteilen versorgt. Nach ca. 24h kondensieren die Zellen und bilden eine 3D-HD-Kultur.

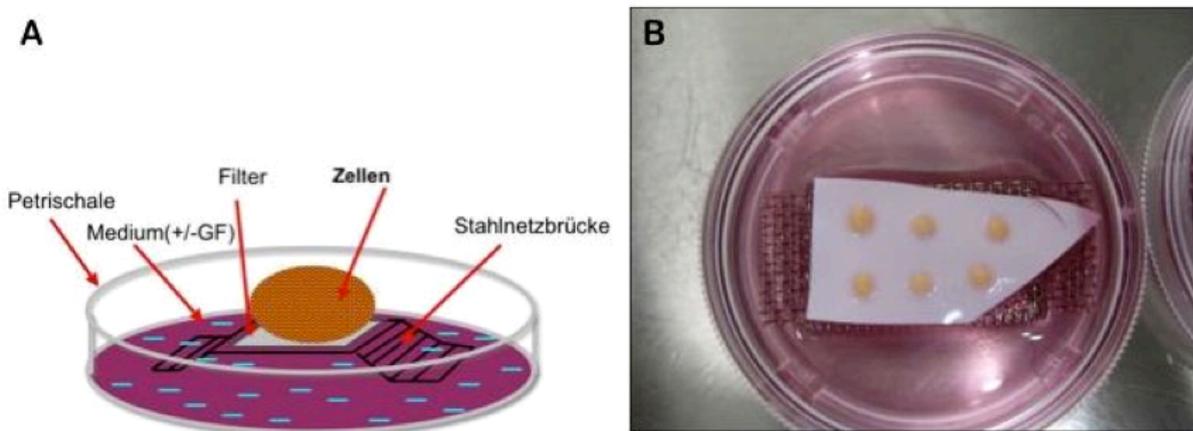


Abb.7 : Schematische Darstellung des High-Desnsity Massenkulturmodells (A).
(B) Photographie von High-Density Kulturen in Petrischale mit Medium (Lupenvergrößerung).

Die hohe Zelldichte ermöglicht in diesem Kulturmodell einen intensiven Zell-Zell Kontakt und bietet die Möglichkeit *in vivo* ähnliche organoide Strukturen auszubilden. Die HD-Kulturen wurden mit oder ohne Wachstumsfaktoren für 14 Tage inkubiert.

3.2.2. Isolierung der MSZ aus dem Fettgewebe

Das Fettgewebe wurde zeitnah euthanasierten Hunden aus dem Unterhautfettgewebe entnommen und in Transportmedium überführt. Im Zellkulturlabor wurde das Fettgewebe zunächst zerkleinert und dann für 1-2 h bei 37°C im Wasserbad mit Kollagenase verdaut. Anschließend wurde die Zellmasse durch einen Zellstrainer mit 75 μ m Porengröße pipettiert. Die resultierende Zellsuspension wurde nach Zentrifugation mit 12 ml Standardzellkulturmedium in eine T75 Zellkulturflasche ausgesät und unter Standardbedingungen inkubiert. Nach 4 Tagen wurden die nicht adhärerten Zellen mit Hanks Salz-Lösung abgespült und

verworfen. Die adhärennten Zellen wurden weiter inkubiert und expandiert. Die erste Passage erfolgte sobald sich 4-5 konfluente Kolonien gebildet hatten. Das Medium wurde alle 3 Tage gewechselt und die Zellen wurden passagiert sobald sie 60-70% konfluent waren. Die gewonnenen Zellen wurden entweder sofort für Experimente verwendet oder für eine spätere Nutzung kryokonserviert.

3.2.3. Die *in vitro* Differenzierung MSZ

3.2.3.1. Adipogenese

Die adipogene Differenzierung der MSZ zu Adipozyten wurde im Monolayer auf six-well-plates durchgeführt wie bei Pittenger et al. 1999 beschrieben (Pittenger et al., 1999). Hierfür wurden 20,000 Zellen pro well ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Dann wurden die Zellen über 72 h mit adipogenem Induktionsmedium inkubiert, bestehend aus DMEM Basismedium, 10% FCS, Penicillin/Streptomycin Lösung (10000 IU/10000 IU/100ml), 1 μ M Dexamethason, 0,2 mM Indomethacin, 0,1 mg/ml Insulin und 1mM 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX). Im Anschluss wurden die Zellen wiederum für 24h mit adipogenem Erhaltungsmedium inkubiert, bestehend aus DMEM Basismedium, 10% FCS, Penicillin/Streptomycin Lösung (10000 IU/10000 IU/100ml) und 0,1 mg/ml Insulin. Dieser Behandlungszyklus wurde 4x wiederholt und im Anschluss wurden die Zellen abermals für eine Woche mit adipogenem Erhaltungsmedium behandelt. Die Zellen für die Negativkontrolle wurden in normalem Zellkulturmedium mit 10% FCS inkubiert.

Der histologische Nachweis von gebildeten Fettvakuolen innerhalb der Adipozyten wurde mittels Oil-Red-O Färbung erbracht. Hierfür wurden die Kulturen mit eiskaltem 3% Formalin fixiert, 2 min. mit eiskaltem 50% Ethanol gespült, für 20 min. mit 0,2% Oil Red O Lösung inkubiert und anschließend mit Leitungswasser gespült. Die Monolayer- und HD-Kulturen wurden mittels Lichtmikroskop (Leica) oder TEM (Zeiss, EM900) analysiert und die Bilder digital gespeichert.

3.2.3.2. Osteogenese

Die osteogene Differenzierung der MSZ zu Osteoblasten wurde sowohl in Monolayer auf six-well-plates (Pittenger et al., 1999), als auch in HD-Kultur durchgeführt (Csaki et al., 2009). Für die Monolayer-Kultur wurden 20,000 Zellen pro well ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Die HD-Kultur wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Die Kulturen wurden über 2 Wochen mit osteogenem Differenzierungsmedium

kultiviert, welches alle 3 Tage erneuert wurde und wie folgt zusammengesetzt war: DMEM Basismedium, 10% FCS, Penicillin/Streptomycin Lösung (10000 IU/10000 IU/100ml), 10^{-7} M Dexamethason, 10mM β -Glycerophosphat und 50 μ M Ascorbat-2-Phosphat. Die Negativkontrollen wurden mit normalem Zellkulturmedium und 10% FCS inkubiert.

Der histologische Nachweis der mineralisierten Matrixeinlagerungen in den Osteoblastenkulturen wurde mittels von Kossa Färbung erbracht. Die Kulturen wurden hierfür für 10 min. mit Methanol fixiert, 3x mit Aqua dest. gespült, für 1 h im Dunkeln mit Silbernitrat Lösung inkubiert, wieder mit Aqua dest. gespült, für 5 min. mit Pyrogallischer Säure (1,2,3-Trihydroxybenzene) inkubiert, nochmals mit Aqua dest. gespült und mit 5% Natrium-Thiosulfat Lösung fixiert. Die Zellkerne wurden mit 0,1% Nuclear-fast-red Lösung gegengefärbt.

Die Monolayer- und HD-Kulturen wurden mittels Lichtmikroskop (Leica) bzw. TEM (Zeiss, EM900) analysiert und die Bilder digital gespeichert.

3.2.3.3. **Chondrogenese**

Die chondrogene Differenzierung der MSZ zu Chondrozyten wurde in HD-Kultur durchgeführt (Pittenger et al., 1999). Die Kulturen wurden über 14 Tage mit chondrogenem Differenzierungsmedium behandelt. Es enthielt DMEM Basismedium, D-(+)-Glukose 0,35g/100ml, ITS+1 Mediumzusatz (10 μ g/ml Insulin, 5,5 μ g/ml Transferrin, 5ng/ml Selenium, 0,5 mg/ml bovines Albumin, 4,7 μ g/ml Linolsäure, 0,1 mM Ascorbat-2-Phosphat, 10^{-7} M Dexamethason und Penicillin/Streptomycin Lösung (10000 IU/10000 IU/100ml). Dem Differenzierungsmedium wurden vor jedem Mediumwechsel 10 ng/ml frisches hTGF- β 1 zugefügt. Die Negativkontrollen wurden mit normalem Zellkulturmedium und 10% FCS behandelt.

Zum histologischen Nachweis von Knorpel-spezifischen Proteoglykanen (CSPG) wurden die HD-Kulturen in Tissue-Tek eingebettet, mit flüssigem Stickstoff kryokonserviert und bei -80°C gelagert. Anschließend wurden mittels Kryomikrotom 5-7 μ m dicke Schnitte angefertigt welche auf Superfrost plus Objektträger aufgebracht, bei Raumluft getrocknet und für 20s mit Aceton fixiert wurden. Anschließend wurde für 2 h eine Färbung mit Alcianblau (0,05% Alcianblau in 3% Essigsäure (pH 1,5) plus 0,3 M MgCl₂) durchgeführt um die extrazellulären CSPGs anzufärben.

Die HD-Kulturen wurden mittels Lichtmikroskop (Leica) und TEM (Zeiss, EM900) analysiert und die Bilder digital gespeichert.

3.2.4. Ko-Kulturen aus primären Tenozyten und MSZ

3.2.4.1. Monolayer Ko-Kultur

Die Monolayer Ko-Kulturen wurden auf runden Deckglasplättchen durchgeführt, welche in einer kleinen Petrischale liegend inkubiert wurden. Die Tenozyten und MSZ wurden dafür im Verhältnis 50%/50% gemischt und ausgesät. Ca. 2500 Zellen wurden pro Glasplättchen verwendet. Die Zellen wurden mit normalem Zellkulturmedium mit 10% FCS unter Standardbedingungen für 1, 2 und 5 Tage inkubiert.

3.2.4.2. HD-Ko-Kultur

Die HD-Ko-Kulturen wurden wie oben beschrieben hergestellt. Für die Ko-Kulturen wurden MSZ und primäre Tenozyten im Verhältnis 90:10, 70:30 und 50:50 gemischt und mit oder ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren (je 5ng/ml IGF-1/TGF- β 1) über 14 Tage inkubiert.

3.2.5. PKH-Membranfärbungen

3.2.5.1. In Monolayer Kultur

Verwendet wurde ein ‚PKH Membran Labeling Kit‘ (Sigma). MSZ wurden mit dem fluoreszierenden Membran Farbstoff PKH26 rot markiert, Tenozyten mit PKH67 grün. Hierfür wurden jeweils 1 Mio. Zellen in Suspension 3x mit PBS gespült um FCS Reste zu entfernen. Danach wurden die Zellen im 200 μ l ‚diluent C‘ resuspendiert und mit 1 μ l des PKH Farbstoffes versetzt und durchmischt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min. wurde die Reaktion mit 400 μ l FCS abgeblockt. Die so markierten Zellen wurden in ein neues Tube überführt und 3x mit normalem Zellkultur Medium gespült. Die erfolgreiche Anfärbung wurde Fluoreszenzmikroskopisch evaluiert und die Zellen anschließend in Monolayer ausgesät und unter normalen Zellkulturbedingungen kultiviert.

3.2.5.2. In HD-Kultur

Das PKH Membran Labeling der MSZ und Tenozyten wurde wie oben für Monolayer beschrieben durchgeführt. Die gefärbten Zellen wurden im Anschluss im Verhältnis 50/50% in Suspension gemischt und anschließend wurden HD-Kulturen, wie oben beschrieben, hergestellt. Nach 14 Tagen Kultivierung mit normalem Zellkultur Medium wurden die Proben kryofixiert, bei -80°C gelagert, später mittels Kryotom 5-7 μm Schnitte angefertigt und unter dem Immunfluoreszenzmikroskop analysiert. Die Bilder wurden digital gespeichert.

3.2.6. Western Blot Analyse

Die Proben wurden mit HANKS gespült und anschließend mit Lysismix (Lysispuffer, PMSF und Pepstatin) für 30 min. auf Eis lysiert. Nach jeweils 15 min. wurde mit einer Pipette homogenisiert. Das Lysat wurde im Anschluss in ein Eppendorf-Tube überführt und für 30 min. bei 4°C zentrifugiert. Der so gewonnene Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Tube überführt und bei -80°C eingefroren, das Pellet wurde verworfen.

Im Anschluss folgte die Proteinbestimmung mittels „Bicinchonic Acid System“ wobei BSA als Standard verwendet wurde. Das Zellysate wurde daraufhin für 10 min. mit 2-Mercaptoethanol auf einem Heizblock bei 95°C reduziert. Im Anschluss wurden die Proben auf eine gleiche Gesamtproteinkonzentration eingestellt (500ng/ml).

Die Proben wurden im Anschluss auf 5-12% SDS-Polyacrylamidgelen und einem 4%igen Sammelgel erst 15 min. bei 80V, dann 60 min. bei 120V, elektrophoretisch aufgetrennt. Danach wurden die Proben mittels Transblot-Elektrophorese-Apparatur (Bio-Rad, München, Germany) für 1h bei 120V auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Zum Blocken von unspezifischen Bindungen wurden die Membranen nach dem Transfer für 2h bei RT auf einem Schüttler mit Blocking-Buffer behandelt. Nach dem Blocking wurde mit dem jeweiligen Primärantikörper über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Am nächsten Morgen wurde der Primärantikörper durch 3-maliges 10-minütiges Spülen mit Blocking-Buffer entfernt und die Membranen für 1,5h bei RT auf einem Schüttler mit adäquatem Sekundärantikörper inkubiert. Dieser wurde anschließend wiederum durch 3-maliges, je 10-minütiges Spülen mit 0,1M Tris-Buffer entfernt. Im Anschluss folgte der Nachweis der spezifischen Epitop-Antikörper-Bindungen durch Entwickeln mit BCIP/NBT (5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl-Phosphat/Nitro-Blue-Tetrazolium) Solution als Substrate für die Alkaline-Phosphatase gekoppelten Sekundärantikörper im abgedunkelten Milieu.

3.2.7. Densitometrie

Computergestützt erfolgte die semi-quantitative Auswertung der Immunoblottingergebnisse mittels Densitometrie durch Ausmessung der Intensität der von dem entsprechenden Antikörper markierten Proteinbanden auf der Membran (Quantity one, Bio-Rad, München, Germany).

3.2.8. Transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Untersuchungen

Die zuvor mit PBS gespülten Zellen im Monolayer wurden zur Fixation 30 min. mit Karnovsky Lösung bedeckt und anschließend mit einem sterilen Cell-Scraper abgeschabt. Die so gewonnene Suspension wurde bei 5000rpm für 5 min. zentrifugiert. Das Zellpellet wurde im nächsten Schritt mit 1%iger Osmiumtetroxid (OsO_4)-Lösung in Phosphatpuffer fixiert und im Anschluss mittels aufsteigender Alkoholreihe entwässert. Im Folgenden wurden die Proben in Epon eingebettet und mit einem Ultramikrotom (Ultracut E, Reichert, Heidelberg) geschnitten. Danach wurden die Schnitte mit 2%igem Uranylacetat und Bleicitrat nachkontrastiert und mit TEM (Zeiss, EM900) analysiert.

Die Zellen in HD-Kultur wurden als Ganzes mit Karnovsky fixiert und des Weiteren wie oben beschrieben behandelt.

3.2.9. Immunelektronenmikroskopie

Die entnommenen Zellen im Monolayer wurden 2 x 3 min. mit PBS gespült und anschließend für 30 min. mit jeweils 4 ml Paraformaldehyd 3% und Glutaraldehyd 0,25% bedeckt um sie zu fixieren. Danach wurden die Zellen mit einem sterilen Zell-Schaber abgelöst, in Eppendorftubes überführt und für 5 min bei 5000rpm zentrifugiert. Nach einem erneuten Spülgang mit PBS wurden die Proben in 200 μl PBS suspendiert und abermals zentrifugiert. Die Pellets wurden im Anschluss mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Die Einbettung der Proben erfolgte im ersten Schritt mit einer Behandlung der Zellpellets mit 50%/50% LR White/Ethanol welches nach 24h und 2-maligem Wechseln des Gemisches durch 100% LR White ersetzt wurde. Danach wurden die Pellets in neue Tubes überführt, auf Eis gelagert und mit LR White unter Zugabe eines Accelerators eingebettet. Die jetzt polymerisierten Proben wurden über Nacht im Kühlschrank gelagert und am

nächsten Tag entnommen und getrocknet um im nächsten Schritt ultradünn geschnitten zu werden. Die Schnitte wurden wie folgt weiter behandelt:

- (1) 1% BSA bei RT für 30 min.;
- (2) testikuläre Chondroitinase (500 U/ml) für 5 min. zur Freilegung der Epitope;
- (3) PBS1% / BSA 0,5% / Tween20 für 5 min. bei RT;
- (4) Primärantikörper (1:50 in PBS1% / BSA0,5% / Tween20 über Nacht bei 4°C;
- (5) Spülen mit PBS1% / BSA0,5% / Tween20 für 5 min. bei RT;
- (6) Sekundärantikörper (1:50 in PBS1% / BSA0,5% / Tween20) für 30 min. bei RT;
- (7) Spülen, danach 5 min. bei RT;
- (8) Kontrastierung mit 1% tannic acid für 20 min. bei RT, mit Osmium für 10 min. bei RT und mit 2% Uranylacetat für 30 min. bei RT

Nach erneutem Spülen wurden die Schnitte schließlich unter TEM (Zeiss, EM900) untersucht.

Die Zellen in HD-Kultur wurden als Ganzes entnommen und des Weiteren wie oben beschrieben behandelt.

3.2.10. Immunfluoreszenz

Die entnommenen Zellen wurden 3 x mit PBS gespült und im Anschluss für 30 min. mit Methanol fixiert und erneut mit PBS gespült. Als nächstes wurden die unspezifischen Bindungen mit 1%igem PBS/BSA blockiert. Die Primärantikörper wurden im Verhältnis 1:30 – 1:50 mit 1%igem PBS/BSA versetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurde 3x mit PBS gespült und anschließend mit Sekundärantikörper (1:50 mit 1%igem PBS/BSA) für 1h im Dunkeln inkubiert. Nach erneutem 3-maligem Spülen mit PBS wurden die Proben an einem Fluoreszenzmikroskop (Leica) untersucht.

3.2.11. Endozytose / Exozytose Assay

Um einen eventuell stattfindenden, aktiven Stoffaustausch zwischen den Zellen via Endozytose- und Exozytosevorgänge nachzuweisen, wurde mittels Immunogold konjugierten Sekundärantikörpern, die dem Kulturmedium hinzugefügt wurden, ein Endozytose-/ Exozytose Assay durchgeführt. Je 500.000 MSZ und primäre

Tenozyten wurden in Zellkulturmedium suspendiert. MSZ wurden mit 10nm Goldpartikel konjugierten Sekundärantikörpern für 10 min. auf dem Schüttler inkubiert und im Anschluss 3 x 5 min. mit PBS/BSA gespült. Primäre Tenozyten wurden mit 5nm Goldpartikel konjugierten Sekundärantikörpern für 10 min. auf dem Schüttler inkubiert und im Anschluss 3 x 5 min. mit PBS/BSA gespült. MSZ und primäre Tenozyten wurden im Anschluss im Verhältnis 1:1 wieder suspendiert und in Ko-Kultur gebracht und für 24 bzw. 48h inkubiert. Die entnommenen HD-Kulturen wurden mittels TEM evaluiert.

3.2.12. Kultivierung von MSZ in HD-Kultur mit Überstand von primären Tenozyten aus Monolayer-Kulturen

Um die aktiven Interaktionen und den Stoffaustausch zwischen MSZ und primären Tenozyten genauer analysieren und darstellen zu können, haben wir HD-Kulturen aus 100% MSZ mit dem Überstand von 100% primären Tenozyten aus Monolayer-Kultur über 14 Tage kultiviert. Das Medium wurde alle 2 Tage gewechselt.

Zusätzlich wurden HD-Kulturen aus 100% MSZ oder 100% primären Tenozyten und HD-Ko-Kulturen aus MSZ und Tenozyten im Verhältnis 1:1, als Kontrollversuche ebenfalls über einen Zeitraum von 14 Tagen kultiviert. Diese Kulturen wurden jeweils mit normalem Medium bzw. mit Zusatz von je 5ng/ml IGF-1/TGF- β 1 inkubiert. Alle HD-Kulturen wurden mittels TEM evaluiert.

3.2.13. Kryokonservierung von HD-Kulturen für Immunfluoreszenzuntersuchungen

Die entnommenen Proben wurden kurz gespült und nachfolgend in kleine, mit Tissue-Tek gefüllte Aluminium-Cups überführt, mittels Stickstoff kryofixiert und dann bei -80°C gelagert. Für histologische und immunhistologische Untersuchungen wurden 5-7 μ m dicke Schnitte angefertigt und Lichtmikroskopisch ausgewertet.

4. ERGEBNISSE

In der vorliegenden Arbeit wurde das tenogene Potential caniner MSZ in einem Ko-Kulturmodell untersucht. Um zu gewährleisten dass tatsächlich mit MSZ und

primären Tenozyten gearbeitet wird und um die angemessene Evaluation der Ergebnisse des Hauptteils zu gewährleisten, wurden die entsprechenden Zelltypen morphologisch und immunhistochemisch charakterisiert.

4.1. Kultivierung der MSZ in Monolayer-Kultur

4.1.1. Morphologie - Lichtmikroskopie

Die im Monolayer kultivierten MSZ waren phasenkontrastmikroskopisch polymorph, spindelförmig und fibroblastenartig (Abb. 8). Sie hatten teils plumpe, teils feine Pseudopodien und einen sternförmigen Charakter mit teils großen, gedrungenen Zellkörpern und prominenten, granulierten Nuklei.

Die Zellen suchten aktiv interzellulären Kontakt und Koloniebildung konnte nach 3-5 Tagen in Kultur beobachtet werden.

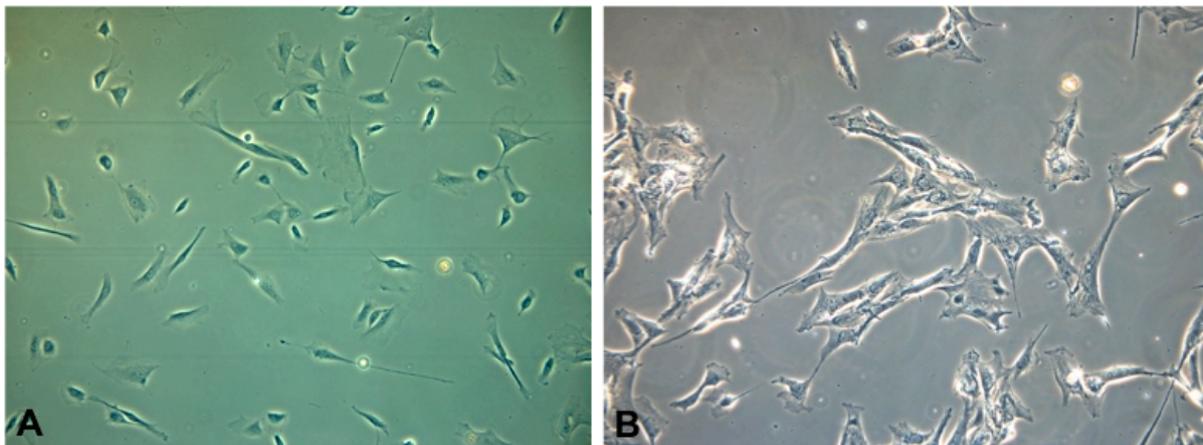


Abb. 8: Phasenkontrastmikroskopische Darstellung der MSZ im Monolayer nach 2 Tagen (A) und nach 7 Tagen in Kultur (B). Vergrößerung: 80x.

4.2. Kultivierung der Tenozyten in Monolayer-Kultur

4.2.1. Morphologie - LM/TEM

Die primär isolierten Tenozyten zeigten im Monolayer eine lang gestreckte und spindel- oder sternförmige Morphologie mit lang gezogenen Zellkerne. Die entspricht der typischen Sehnenzellmorphologie.

Zusätzlich bildeten die Zellen lange zytoplasmatische Pseudopodien aus welche sich teils netzwerkartig verzweigten und interzelluläre Kontakte herstellten (Abb. 9). Dies unterstreicht die Vitalität der verwendeten Tenozyten.

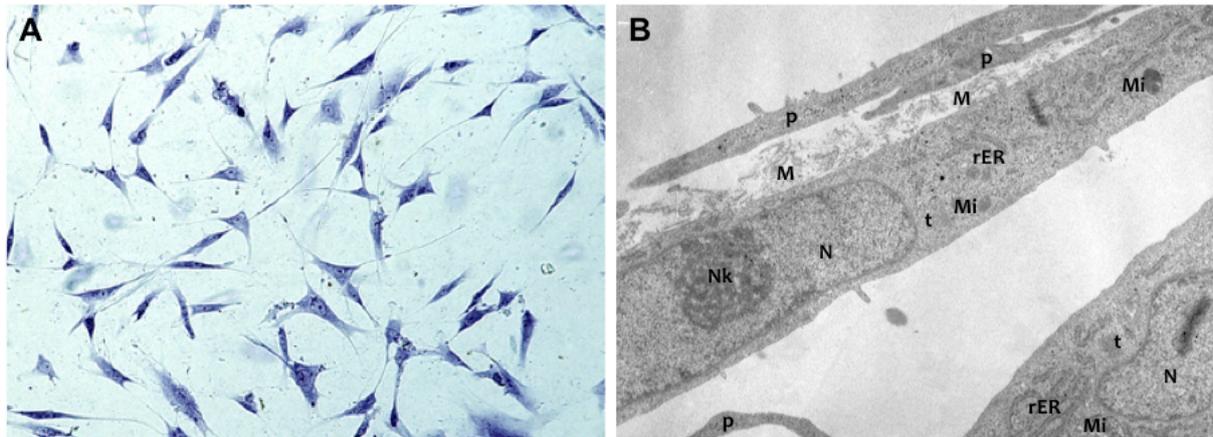


Abb.9 Lichtmikroskopische Aufnahme mit Toluidinblau behandelter Tenozyten (A). Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von in ML gezüchteter Tenozyten (t) (B). Nukleus (N) und Nukleolus (Nk) sind deutlich zu erkennen und raues endoplasmatisches Retikulum (rER) und Mitochondrien (Mi) weisen auf stoffwechselaktive Zellen hin, die EZM (M) produzieren. Lange Pseudopodien (p) suchen aktiven Kontakt zu benachbarten Zellen und EZM. Vergrößerung: A: 80x; B: 10.000x.

Im TEM zeigten die primären Tenozyten eine typisch spindelartige Form mit einem großen ovalen Nukleus und im Zytoplasma zahlreiche Zellorganellen (Abb.9). Über die Pseudopodien vermittelte Zell-Zell Kontakte konnten ebenfalls dargestellt werden (gap-junctions).

4.3. Charakterisierung der MSZ

4.3.1. Nachweis Stammzell spezifischer Marker auf MSZ mit IF

Mittels Immunfluoreszenz wurden MSZ-spezifische Marker auf den isolierten MSZ markiert und durch Immunfluoreszenzmikroskopie dargestellt. Die im Monolayer kultivierten Zellen zeigten sich durchweg stark positiv für die Marker CD105⁺ und

CD90⁺ und negativ für die hämatopoetischen Stammzellmarker CD34⁻ und CD45⁻ (Abb. 10).

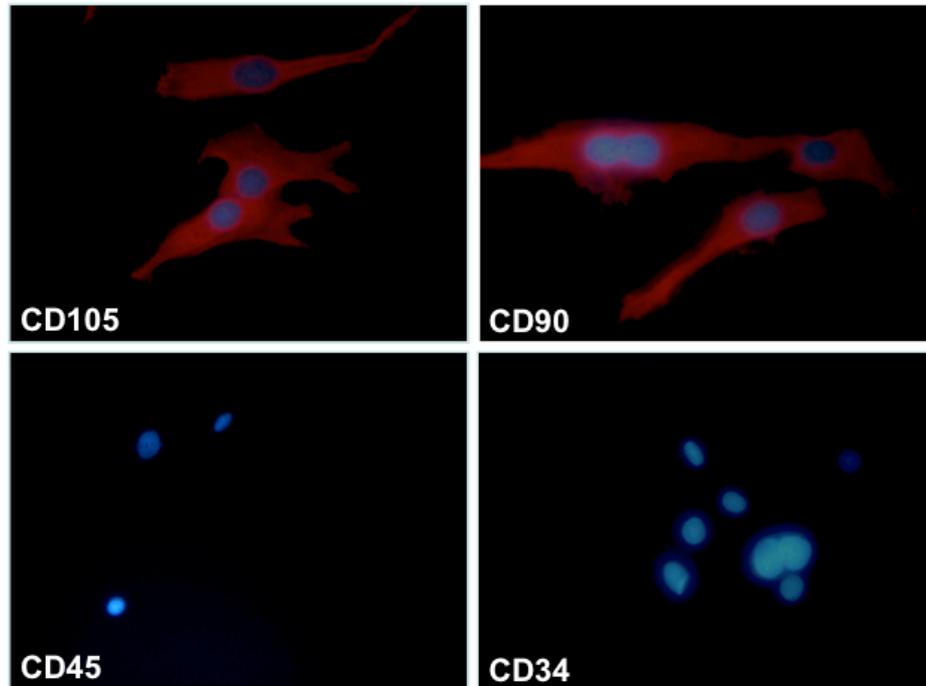


Abb. 10: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung der MSZ-spezifischen Marker CD105, CD90 und der haematopoetischen Marker CD45, CD34 auf MSZ. Vergrößerung: 60x

4.3.2. Differenzierung MSZ

Eine international anerkannte Methode um nachzuweisen, dass es sich bei einer isolierten Zellpopulation tatsächlich um MSZ handelt, ist ihre Differenzierung zu verschiedenen Zelltypen. Diese wird durch Zusatz von in der Literatur genau definierten Induktionsprotokollen für Adipogenese, Chondrogenese und Osteogenese erreicht. Das Differenzierungspotential der isolierten caninen MSZ wurde entsprechend untersucht.

4.3.2.1. Adipogenese

MSZ die mit adipogenem Induktionsmedium im Monolayer kultiviert wurden, zeigten im Phasenkontrastmikroskop deutlich mehr Zellvakuolen als die Kontrollkulturen. Durch Oil-Red-O Färbung konnte gezeigt werden dass diese Vakuolen neutrale

Fette enthalten. Dieser Nachweis gelang in 80-90% der induzierten Zellen. In den Kontrollen hingegen ließ sich kein Fett nachweisen (Abb. 11).

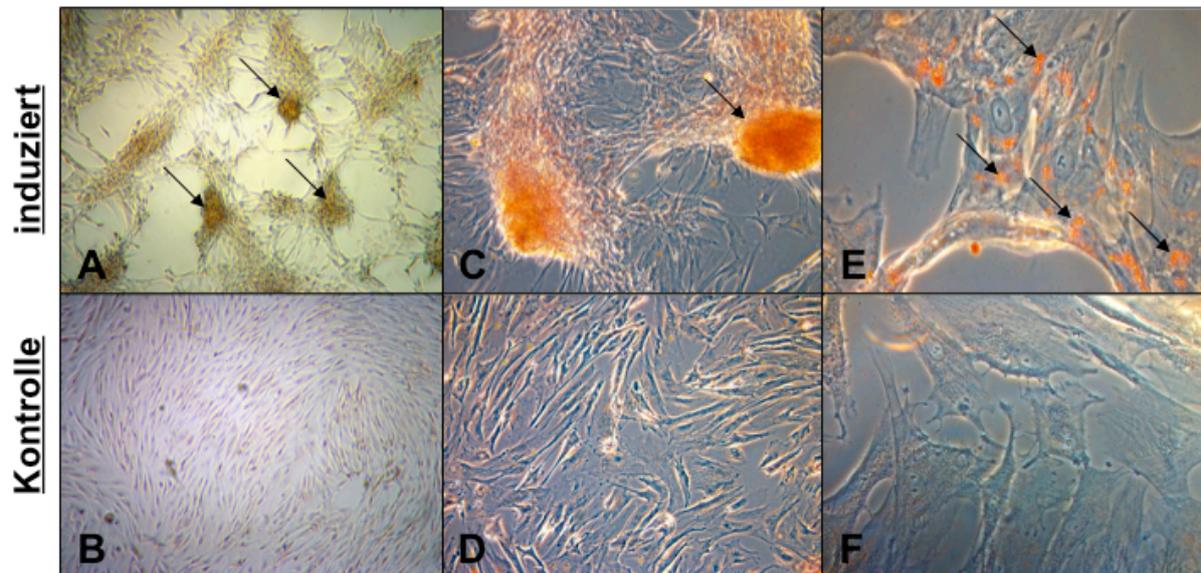


Abb. 11: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von mit adipogenem Induktionsmedium behandelten MSZ (induziert) und mit normalem Medium inkubierten MSZ (Kontrolle) mit Oil Red O Färbung. Lipidvakuolen sind in den induzierten MSZ deutlich zu erkennen (Pfeile). Vergrößerung: A-B: 5x; C-D: 10x; E-F: 40x.

Um die morphologischen Eigenschaften der neu gebildeten Adipozyten genauer zu analysieren, wurden sie mittels TEM untersucht. Innerhalb der Zellen konnten große Einlagerungen von Lipid-Tröpfchen dargestellt werden (Abb.12).

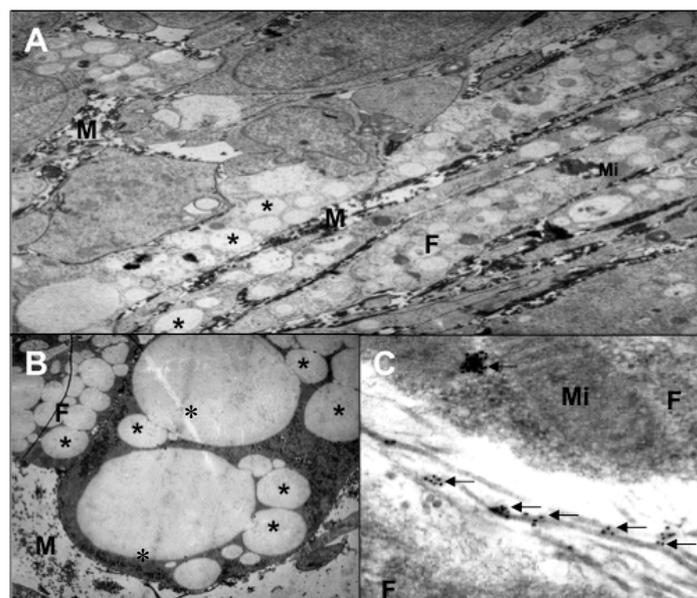


Abb.12: **(A)-(B)** Elektronenmikroskopische Aufnahmen adipogen induzierter MSZ. Die Bildung von Fettzellen (F) mit zahlreichen Lipid Vakuolen (*) ist deutlich erkennbar. Die Adipozyten (F) produzieren Matrix Komponenten (M) und zeigen stoffwechselaktive Zellorganellen wie Mitochondrien (Mi). **(C)** Immunogoldmarkierung von Adiponectin (Pfeile) zeigt Anlagerungen in der EZM. Vergrößerung: A: 2.500x; B: 5000x; C: 20.000x.

Nach 23-tägiger Inkubation mit adipogenem Induktionsmedium konnte mittels TEM nachgewiesen werden, dass nahezu 100% der behandelten MSZ einen adipogenen Phänotyp hatten. Die Zellorganellen dieser Adipozyten, insbesondere die Mitochondrien, waren weit entwickelt und ausgeprägt, was auf eine hohe Stoffwechselaktivität hindeutete. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Adipozyten in einer gut strukturierten EZM eingebettet waren.

4.3.2.2. Osteogenese

Die MSZ wurden für drei Wochen mit osteogenem Induktionsmedium in Monolayer kultiviert (Abb. 13). Mit der Behandlung wurde begonnen nachdem die Zellen Konfluenz erreicht hatten. Nach der osteogenen Induktion änderte sich der Phänotyp der Zellen von einem fibroblastenartigen hin zu einem polygonalen Aussehen. Außerdem war die Bildung kleiner Knötchen zu beobachten. Zur Evaluation mineralischer Einlagerungen wurde von Kossa Färbung verwendet und mineralische Bestandteile innerhalb der neu gebildeten Matrix konnten positiv angefärbt werden. Die Kontrollen behielten ihren fibroblastenähnliche Morphologie und waren negativ für von Kossa Färbung.

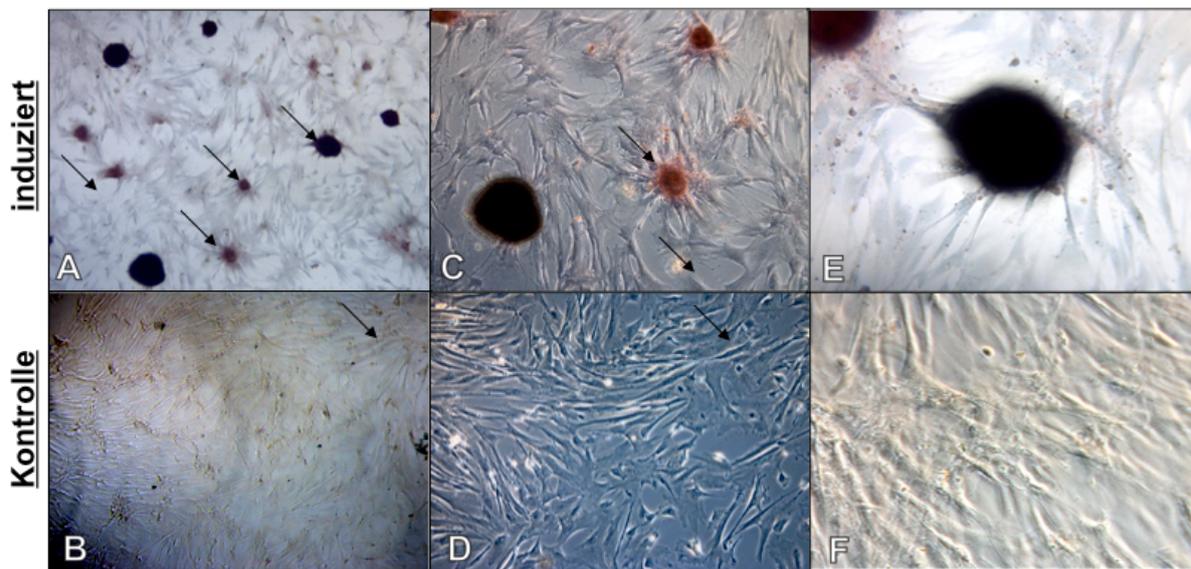


Abb. 13: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von mit osteogenem Induktionsmedium behandelten MSZ (induziert) und mit normalem Medium inkubierten MSZ (Kontrolle) mit von Kossa Färbung. Mineralische Einlagerungen sind in den induzierten MSZ deutlich zu erkennen (Pfeile). Vergrößerung: A-B: 5x; C-D: 10x; E-F: 20x.

Die TEM Analyse der osteogen differenzierten MSZ HD-Kultur zeigte vitale, sehr stoffwechselaktive Zellen mit einem hohen Euchromatin Anteil im Nukleus, vielen

Zellorganellen wie Mitochondrien, rauem ER und Golgi-Apparat und zahlreichen Zellfortsätzen. Innerhalb einer organisierten EZM konnten eine Vielzahl dicker Fibrillen dargestellt werden (Abb. 14).

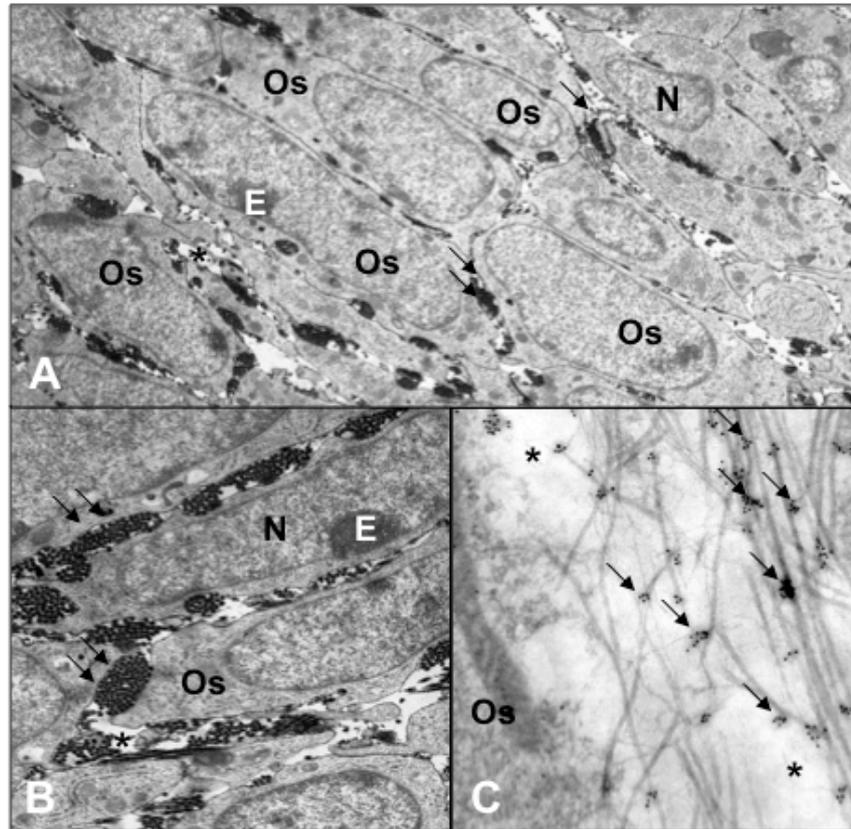


Abb. 14: **(A)-(B)** Elektronenmikroskopische Aufnahmen osteogen induzierter MSZ. Die gebildeten Osteoblasten (Os) zeigen hohe Konzentrationen von Euchromatin (E) im Nukleus (N) und zahlreiche Zellorganellen (Mitochondrien, raues ER, Golgi Apparat). Die Zellen produzieren dicke Matrixfibrillen (Pfeile) und lagern diese im extrazellulären Raum an (*). **(C)** Immunogoldmarkierung von Osteocalcin zeigt Anlagerung an große Kollagen Typ I Fibrillen (Pfeile). Vergrößerung: A: 2.500x; B: 5000x; C: 20.000x.

4.3.2.3. Chondrogenese

Für die chondrogene Differenzierung der MSZ mussten den *in vivo* Verhältnissen ähnliche Kulturbedingungen geschaffen werden. Als adäquates Kulturmodell wurden HD-Kulturen eingesetzt. Die mit chondrogenem Induktionsmedium behandelten Zellen, zeigten bereits nach einem Tag einen runderen, knötchenartigen Phänotyp während die Kontrollen sich weiterhin mit typischer MSZ Morphologie präsentierten. Die nach 14 Tagen Kultivierung durchgeführte Alcianblau Färbung zeigte einen

hohen Anteil knorpelspezifischer Proteoglykane in den induzierten Kulturen (Abb. 15). Die Kontrollen ließen sich mit Alcianblau nicht markieren.

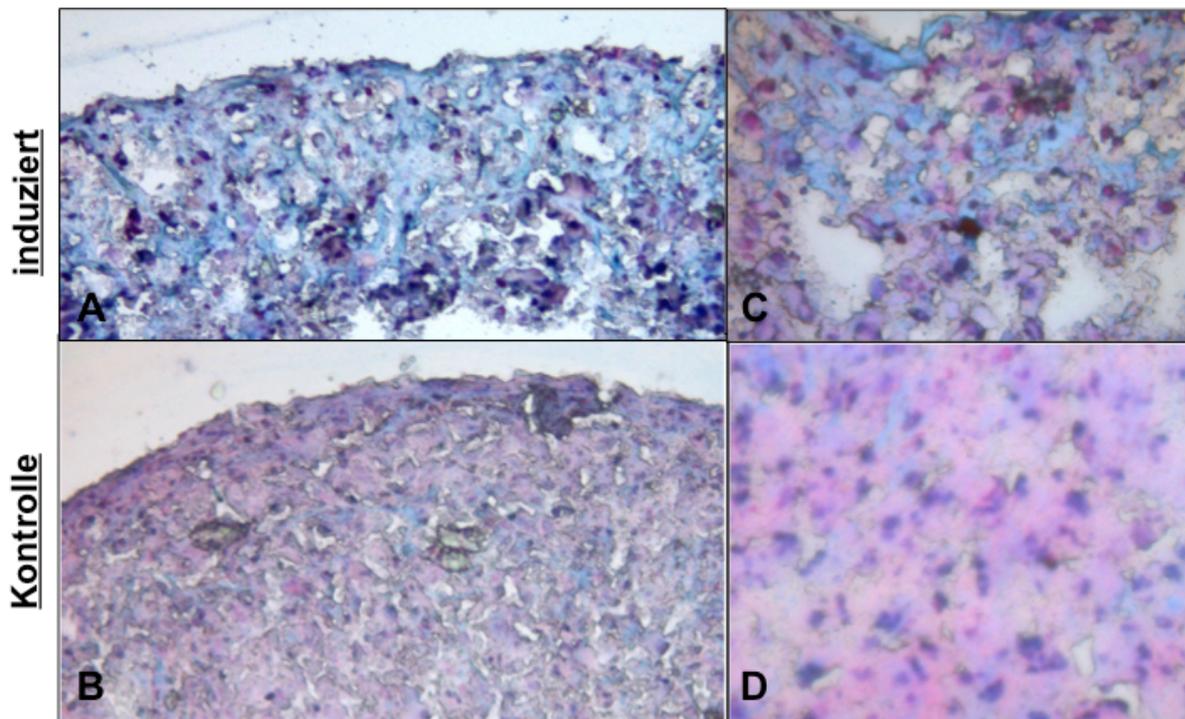


Abb. 15: Lichtmikroskopische Aufnahmen von mit chondrogenem Induktionsmedium behandelten MSZ (induziert) und mit normalem Medium inkubierten MSZ (Kontrolle) mit Alcian Blau Färbung. Knorpelspezifische Proteoglykane sind in den induzierten MSZ durch deutliche Blaufärbung zu erkennen. Vergrößerung: A-B: 10x; C-D: 20x.

Die TEM Aufnahmen der mit chondrogenem Differenzierungsmedium behandelten Zellen zeigten eine chondrozytenartige Morphologie mit runden oder ovalen Zellen (Abb.16). In inneren und mittigen Lagen der Schnitte ließen sich knorpelknötchenartige Strukturen darstellen, die von einigen fibroblastenartigen Zellschichten umgeben waren, ähnlich dem Perichondrium *in vivo*. Zwischen den neu gebildeten Chondrozyten lagerten sich sehr dünne, hoch strukturierte EZM Fibrillen an. Die Matrix, die in den äußeren Bereichen zwischen den fibroblastenartigen Zellen gebildet wurde, war im Gegensatz dazu dicker und dichter (Abb. 16). Die immunelektronenmikroskopische Proteoglykan Markierung zeigte deutliche Akkumulation von Kollagenfibrillen innerhalb der Matrix.

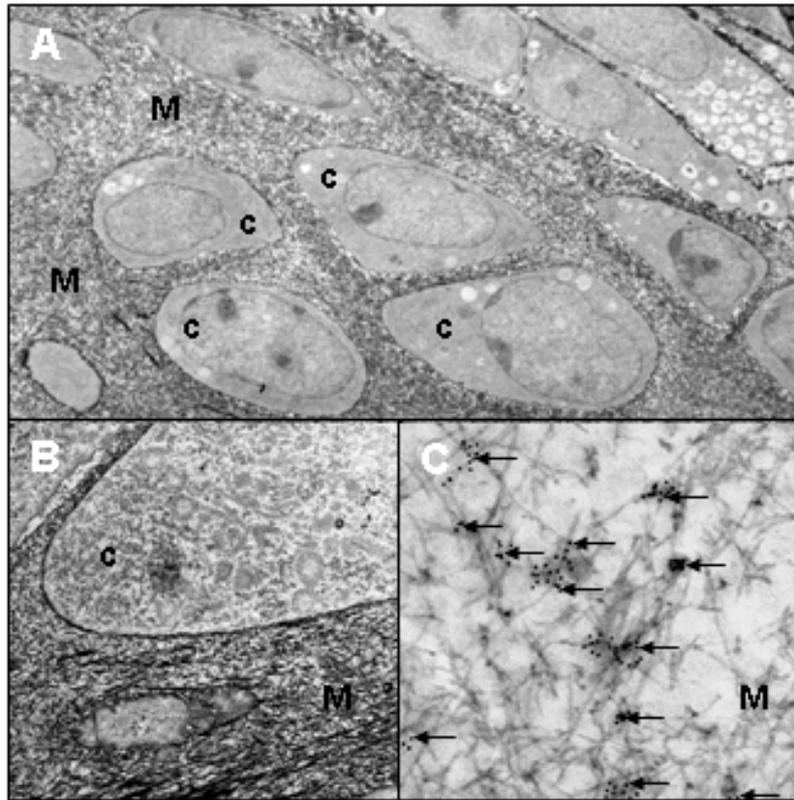


Abb. 16: **(A)+(B)** Elektronenmikroskopische Aufnahmen chondrogen induzierter MSZ in HD-Kultur. Die runden oder ovalen Chondrozyten (c) umgibt ein Netzwerk aus extrazellulären Matrixfibrillen (M). Die Zellen zeigen gut entwickelte Zellorganellen und sind von einer Schicht flacher, fibroblasten-artiger Zellen umgeben, ähnlich dem Perichondrium *in vivo*. **(C)** Immunogoldmarkierung von Knorpel-spezifischem Proteoglycan (Pfeile) zeigt deutliche haufenartige Anlagerungen an Kollagenfibrillen innerhalb der Matrix. Vergrößerung: A: 2.500x; B: 5000x; C: 20.000x.

4.4. Charakterisierung der Tenozyten

4.4.1. Charakterisierung der Tenozyten in HD-Kultur, Morphologie TEM

Die in HD-Kulturen kultivierten unbehandelten primären Tenozyten zeigten im TEM einen geschlossenen Zellverband aus vitalen, spindelförmigen Tenozyten, die interzelluläre Kontakte ausbildeten sowie aktiv EZM produzierten. Die Organellen wie raues endoplasmatisches Retikulum (rER), Mitochondrien oder der Golgi-Apparat waren gut entwickelt und wiesen auf eine hohe Syntheseaktivität und Vitalität der kultivierten Tenozyten hin. Die Produktion von reichlich fibrillären Matrixkomponenten die sowohl extra- als auch intrazellulär nachgewiesen werden konnten, unterstrich die Syntheseleistung der Zellen (Abb. 17).

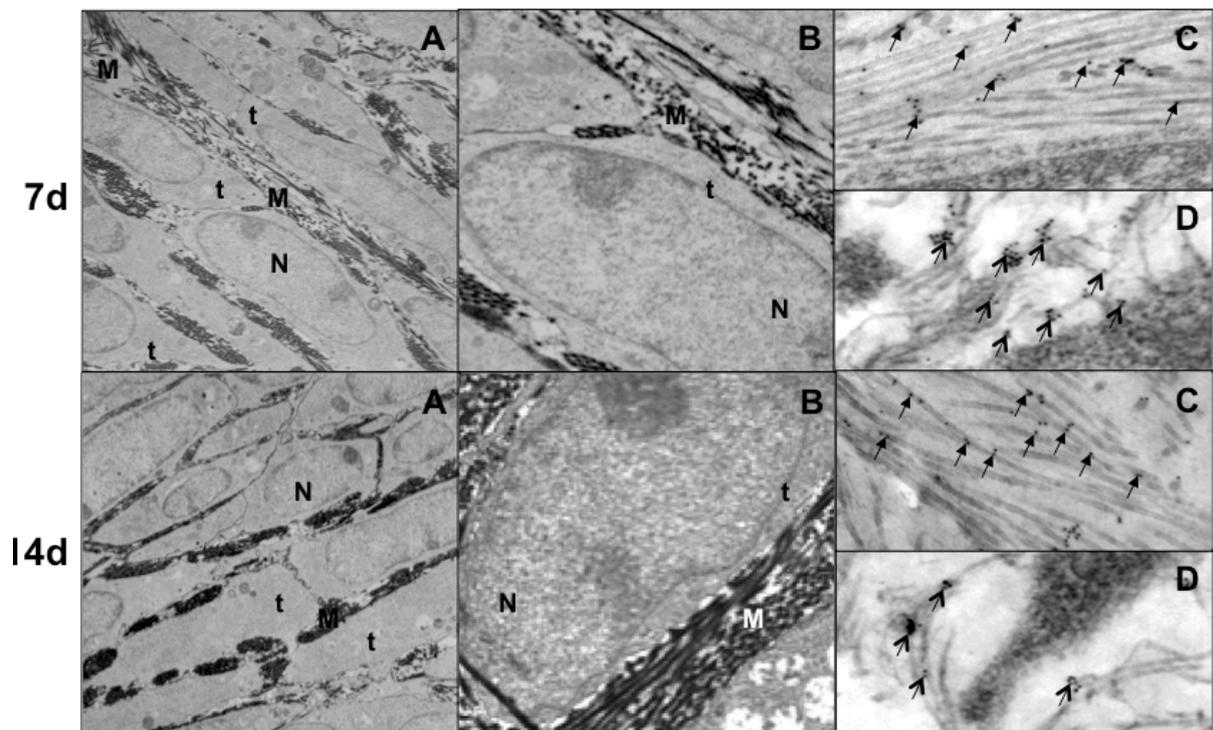


Abb. 17: Elektronenmikroskopische Aufnahmen caniner Tenozyten (t) in HD-Kultur nach 7 und 14 Tagen. Geschlossener Zellverband mit vitalen Nuklei (N), Zytoplasma und EZM (M) (A;B). Immunelektronenmikroskopisch ließen sich Kollagen Typ I (C) und Tenomodulin (D) in allen Kulturen nachweisen. Vergrößerung: A: 2.500x; B: 5000x; C-D: 20.000x.
Vergrößerung: A:2.500x; B:5.000x; C-D:20.000x.

Immunelektronenmikroskopisch ließen sich sowohl nach 7 als auch nach 14 Tagen, der Sehnenmarker Tenomodulin und Kollagen Typ I in den HD-Kulturen nachweisen. Das goldmarkierte Kollagen Typ I lag hierbei an den Fibrillen innerhalb der EZM angelagert vor, während Tenomodulin clusterförmig gebunden ebenfalls innerhalb der Matrix nachgewiesen wurde.

4.4.2. Nachweis Tendon spezifischer Marker auf Tenozyten mit IF

Zum Nachweis sehrentypischer Marker auf den verwendeten primären Tenozyten wurde eine Immunfluoreszenzanalyse durchgeführt.

Alle analysierten HD-Kulturen waren positiv für die Kollagene Typ I und Typ III sowie für β 1-Integrin und den sehnen-spezifischen Marker Tenomodulin. Dies belegte, dass die isolierte Zellpopulation eine Reihe wichtiger Sehnenmarker exprimiert und es sich bei den Zellen um typische primäre Tenozyten handelte (Abb. 18).

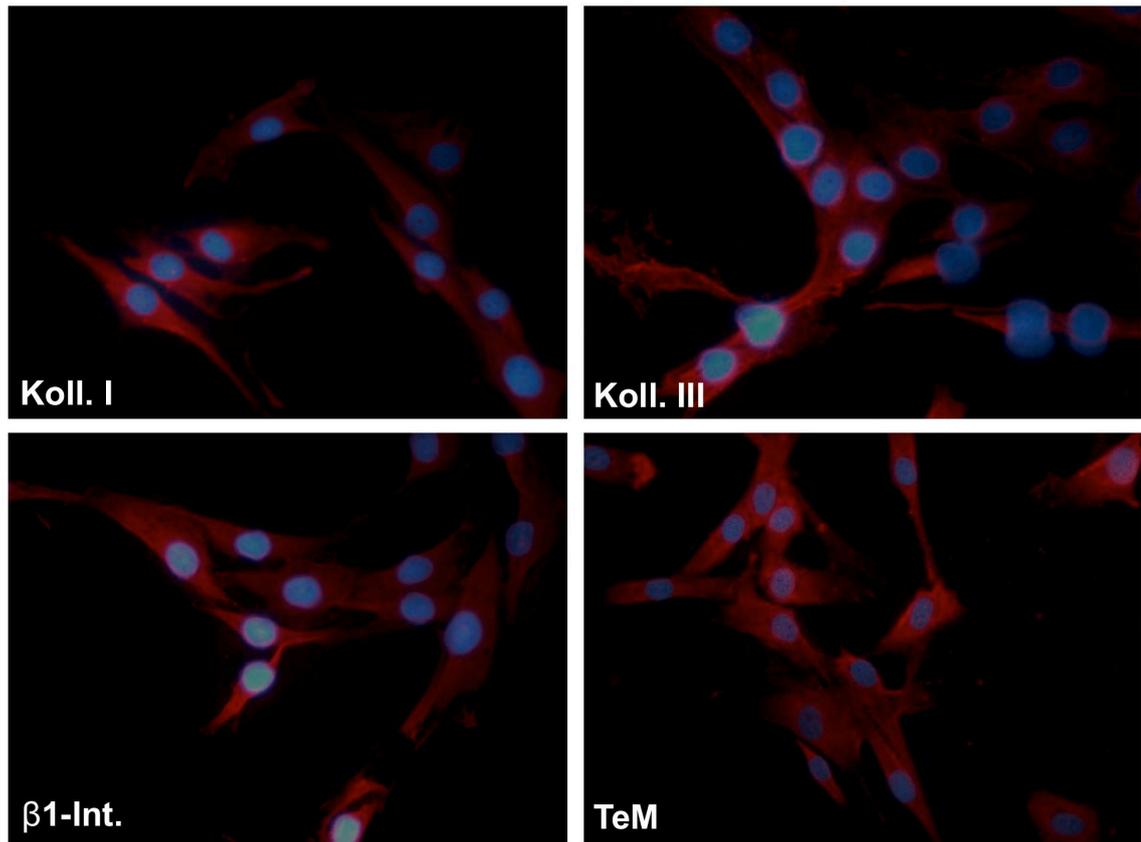


Abb. 18: Immunfluoreszenzanalyse der sehnen-typischen Marker Kollagen Typ I, Kollagen Typ III, β 1-Integrin (β 1-Int.) und Tenomodulin (TeM) auf Tenozyten im Monolayer.
Vergrößerung: 40x

4.4.3. Proteinexpression Tenozyten (HD-Kulturen)

Um die Tenozyten auch auf der Proteinebene genauer zu charakterisieren wurde eine SDS-Page Analyse durchgeführt. Die Zellen wurden hierfür jeweils nach 1, 7 und 14 Tagen entnommen und die Proteinexpression untersucht. Die für Sehngewebe essentiellen Kollagene Typ I und III wurden in allen Kulturen exprimiert. Für Kollagen Typ I konnte eine zunehmende Produktion festgestellt werden, während die Kollagen Typ III Expression über 14d weitestgehend gleich blieb. Gleiches traf auch für das Membranprotein Laminin, das Adhäsions- und Signaltransduktionsmolekül β 1-Integrin und die Signaltransduktionsmoleküle Shc und ERK1/2 sowie das Transmembranprotein Tenomodulin zu. (Abb. 19) Die Darstellung der Proteinexpression in Tenozyten Reinkultur erlaubte es die im Anschluss durchgeführten Versuche mit Mischkulturen und die Zugabe von GFs besser zu evaluieren (Abb. 19).

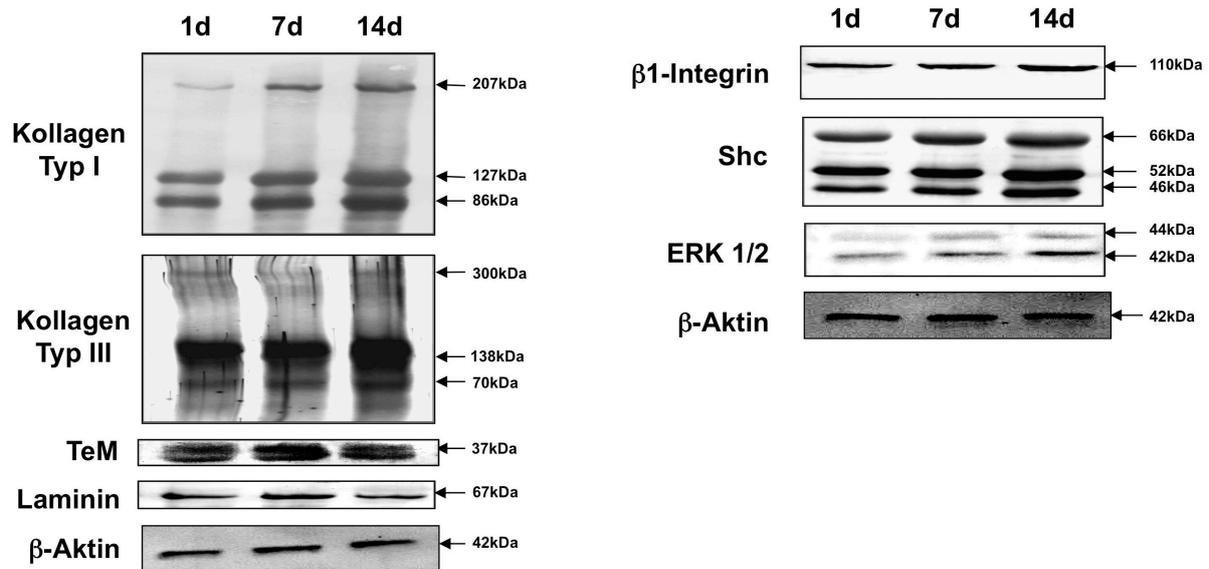


Abb. 19: Westernblot Analyse caniner Tenozyten nach Kultivierung mit normalem Medium in HD-Kultur für 1, 7 und 14 Tage. Deutliche Expression sehnenpezifischer Proteine nach 1, 7 und 14 Tagen.

4.5. Behandlung der Tenozyten mit Wachstumsfaktoren

4.5.1. IGF-1, TGF- β 1, BMP-12 und PDGF-bb

Um die Vorgänge der Tenogenese genauer zu verstehen und zur Prüfung möglicher Verbesserungsmöglichkeiten wurden die Tenozyten in HD-Kultur mit den Wachstumsfaktoren IGF-1, TGF- β 1, BMP-12, PDGF-bb (je 10ng/ml) und einer Kombination aus IGF-1 und TGF- β 1 (je 5ng/ml) behandelt. Für diese Wachstumsfaktoren wurden sowohl proliferations- als auch regenerationsfördernde Eigenschaften im Sehnenewebe beschrieben (Roshan et al. 2008). Weiterhin sollte geprüft werden, ob die ultrastrukturelle Qualität des entstehenden Gewebes durch Zugabe von Wachstumsfaktoren signifikant verbessert werden kann. Die HD-Kulturen wurden jeweils über 14 Tage kultiviert und Entnahmen erfolgten nach 7 bzw. 14 Tagen.

4.5.1.1. Auswirkungen auf die Proteinexpression

Das extrazelluläre Matrixprotein Kollagen Typ I wurde in den mit IGF-1, TGF- β 1, BMP-12, PDGF-bb (je 10ng/ml) und mit einer Kombination aus IGF-1 und TGF- β 1 (je 5ng/ml) behandelten Kulturen auf etwa gleichem Niveau exprimiert, wobei die Expression nach 14 Tagen Kultivierung höher war als nach 7 Tagen in Kultur (Abb.

20). Die stärkste Proteinproduktion konnte in den Kulturen beobachtet werden, die mit einer Kombination aus IGF-1 und TGF- β 1 (je 5ng/ml) behandelt wurden. Die Kollagen Typ I Produktion der mit BMP-12 und PDGF-bb behandelten HD-Kulturen lag sowohl nach 7 als auch nach 14 Tagen unter der der Kontrollgruppe aus 100% unbehandelten Tenozyten. Die einzeln mit IGF-1 bzw. TGF- β 1 behandelten HD-Kulturen zeigten eine Kollagen Typ I Expression auf dem Niveau der Kontrollen. Die Synthese des housekeeping Proteins β -Aktin unbeeinflusst.

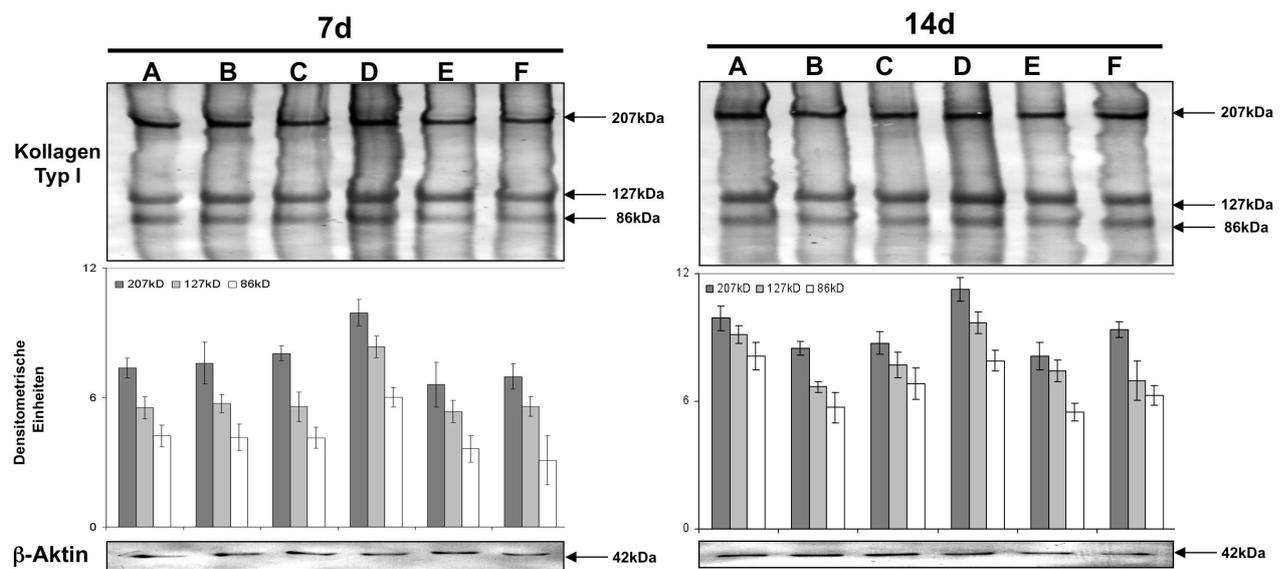


Abb. 20: Westernblot Analyse für Kollagen Typ I caniner Tenozyten in HD-Kultur nach Kultivierung mit: (A) nor. Med.; (B) IGF-1; (C) TGF- β 1; (D) IGF-1/TGF- β 1; (E) BMP-12; (F) PDGF-bb.

Kollagen Typ III wurde ebenfalls in allen HD-Kulturen exprimiert (Abb. 21). Seine Konzentration war in allen Fällen nach 7 Tagen deutlich höher als nach 14 Tagen. Der bereits für Kollagen Typ I beobachtete Effekt einer verstärkten Expression in der mit IGF-1 und TGF- β 1 behandelten HD-Kultur zeigte sich auch für Kollagen Typ III. Allerdings nur nach 7 Tagen Kultivierung. Nach 14 Tagen in Kultur bewegte sich die Kollagen Typ III Produktion in allen HD-Kulturen auf einem etwa gleichen Niveau. Die Produktion des housekeeping Proteins β -Aktin blieb von den Wachstumsfaktoren unbeeinflusst.

Eine wichtige Rolle bei der Matrixentstehung im Bindegewebe spielt das Protein Decorin. Es bindet an Kollagen Typ I Fibrillen und ist somit auch in der Sehne von Bedeutung und ein geeigneter Marker für Sehnengewebe. Die Decorinsynthese

variierte nicht stark zwischen den einzelnen HD-Kulturen und das Protein wurde nach 7 und 14 Tagen auf etwa gleichem Niveau exprimiert (Abb. 22).

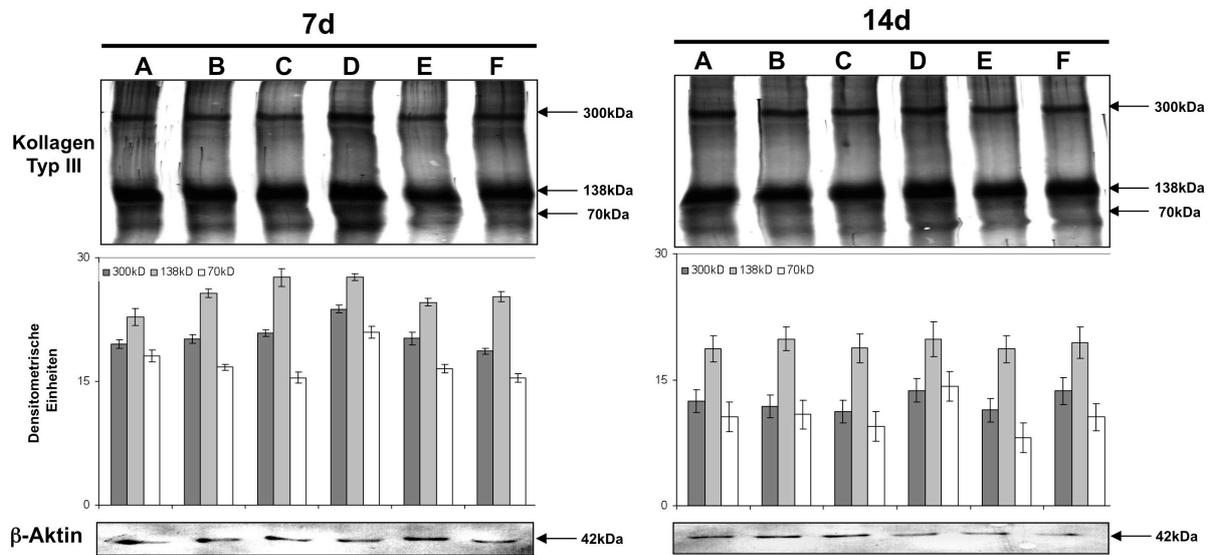


Abb. 21: Westernblot Analyse für Kollagen Typ III caniner Tenozyten in HD-Kultur nach Kultivierung mit: (A) nor. Med.; (B) IGF-1; (C) TGF- β 1; (D) IGF-1/TGF- β 1; (E) BMP-12; (F) PDGF-bb.

Anders als auf die Kollagene Typ I und III die nach Behandlung mit IGF-1 und TGF- β 1 leicht verstärkt exprimiert wurden, schien die Behandlung mit dieser Kombination nach 7 Tagen einen leicht dämpfenden Einfluss auf die Decorinsynthese zu haben. Dieser Effekt kehrte sich nach 14 Tagen um wobei die Decorinproduktion zu diesem Zeitpunkt in der IGF-1/TGF- β 1 Gruppe am höchsten war. Nach 7-tägiger Kultivierung war die Decorinproduktion in der BMP-12 Gruppe am höchsten, nach 14 Tagen bewegte sie sich wiederum auf Kontrollniveau. Die Expression des housekeeping Proteins β -Aktin blieb unverändert.

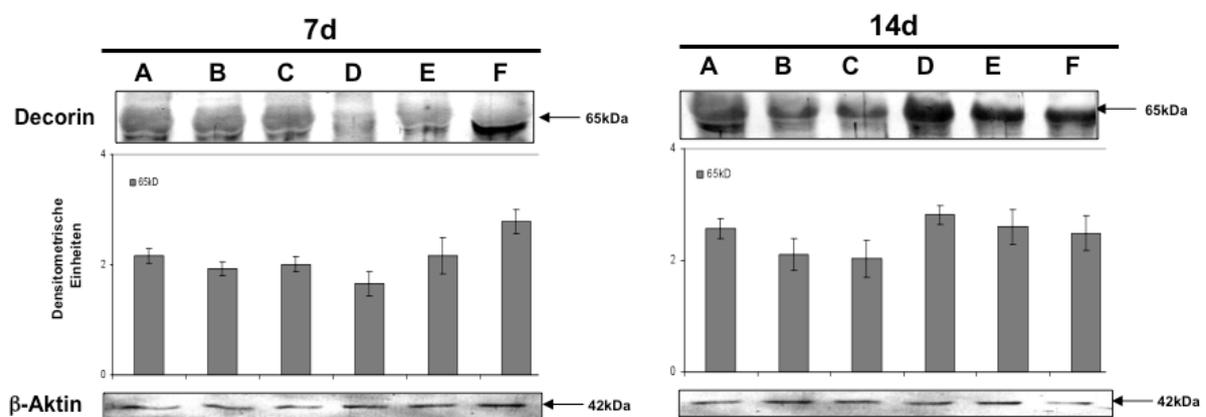


Abb. 22: Westernblot Analyse für Decorin caniner Tenozyten in HD-Kultur nach Kultivierung mit: (A) nor. Med.; (B) IGF-1; (C) TGF- β 1; (D) IGF-1/TGF- β 1; (E) BMP-12; (F) PDGF-bb.

Einer der wichtigsten Sehnenmarker ist das Protein Tenomodulin (TeM) da es fast ausschließlich im Sehnen Gewebe exprimiert wird. Die TeM Synthese in den Kontrollkulturen war nach 7 Tagen höher als die in den mit Wachstumsfaktoren behandelten Kulturen (Abb. 23). Nach 14 Tagen sank die Expression in der Kontrolle leicht. Die mit PDGF-bb inkubierten HD-Kulturen produzierten nach 14 Tagen deutlich mehr TeM als nach 7 Tagen und als alle anderen Gruppen. Alle behandelten HD-Kulturen synthetisierten nach 7 Tagen Kultivierung weniger TeM als die Kontrollkulturen wohingegen die TeM Produktion in allen behandelten Kulturen nach 14 Tagen über der in der Kontrolle lag. Die Synthese des housekeeping Proteins β -Aktin blieb unverändert.

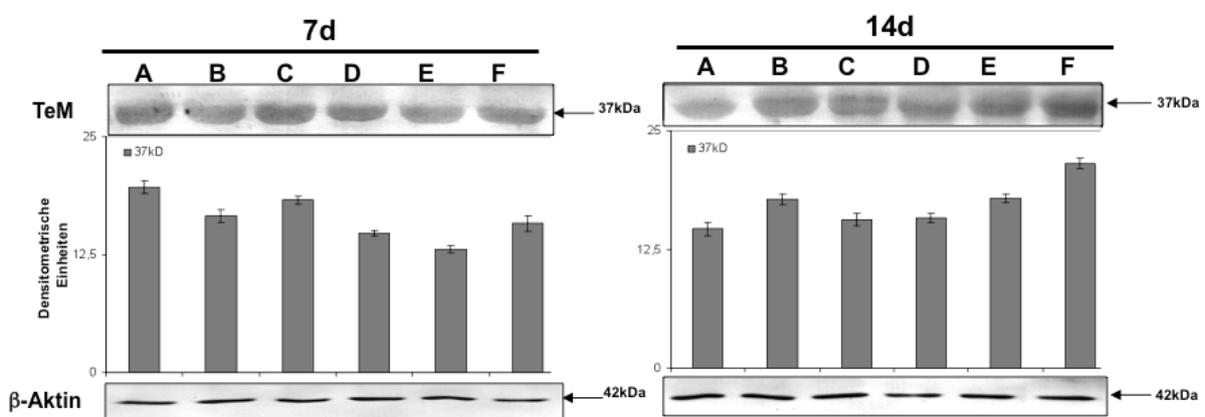


Abb. 23: Westernblot Analyse für Tenomodulin caniner Tenozyten in HD-Kultur nach Kultivierung mit: (A) nor. Med.; (B) IGF-1; (C) TGF- β 1; (D) IGF-1/TGF- β 1; (E) BMP-12; (F) PDGF-bb.

Das Signalmolekül β 1-Integrin, mit seiner engen funktionellen Beziehung zu Kollagen Typ I spielt im Sehnen Gewebe ebenfalls eine wichtige Rolle. Die Expression von β 1-Integrin befand sich nach 7-tägiger Inkubation in allen Gruppen auf etwa dem gleichen Niveau wobei seine Synthese in der mit IGF-1/TGF- β 1 behandelten Kultur sowohl nach 7, als auch nach 14 Tagen im Vergleich mit den anderen HD-Kulturen mit leicht erhöht war (Abb. 24). In den mit individuellem IGF-1 und TGF- β 1 inkubierten HD-Kulturen sank die β 1-Integrin Produktion nach 14 Tagen im Vergleich zu 7 Tagen deutlich ab. Sowohl in der Kontrollgruppe als auch in den übrigen Kulturen blieb die Synthese jedoch stabil. Die Expression des housekeeping Proteins β -Aktin blieb unverändert.

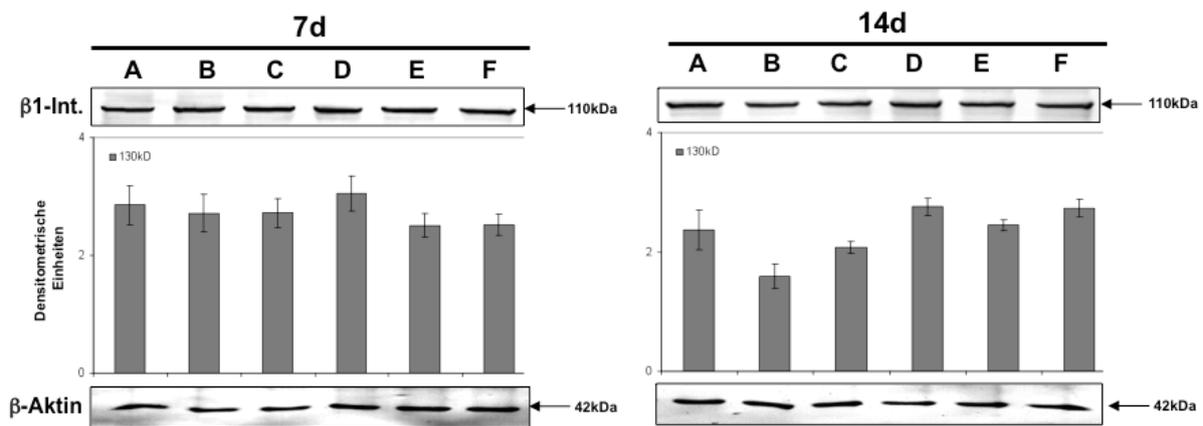


Abb. 24: Westernblot Analyse für β 1-Integrin caniner Tenozyten in HD-Kultur nach Kultivierung mit: (A) nor. Med.; (B) IGF-1; (C) TGF- β 1; (D) IGF-1/TGF- β 1; (E) BMP-12; (F) PDGF-bb.

Der MAPKinase Signalübertragungsweg ist für eine geordnete Proliferation und eine Aufrechterhaltung des Zellphänotyps von entscheidender Wichtigkeit. Das Adapterprotein Shc sowie die Signalmoleküle ERK 1/2 sind Schlüsselproteine dieser Signalkaskade. Shc nimmt hierbei eine wichtige Rolle als intrazellulärer Signalvermittler ein. Nach 7-tägiger Kultivierung der Kontrolle und der mit Wachstumsfaktoren behandelten HD-Kulturen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression von Shc (Abb. 25). Alle HD-Kulturen enthielten ungefähr die gleiche Menge des Proteins. Nach 14 Tagen in Kultur war die Shc Synthese in der Kontrollprobe deutlich gestiegen. Im Vergleich zur Shc Synthese die nach 7 Tagen nachweisbar war, stieg der Shc Gehalt in den behandelten Kulturen nach 14 Tagen ebenfalls leicht an. Sie alle bewegten sich jedoch auf einem etwa gleich hohem Niveau unterhalb dem der Kontrolle. Expression und Synthese des housekeeping Proteins β -Aktin blieb in allen HD-Kulturen unverändert. Die Konzentration der ebenfalls am MAPKinase pathway beteiligten Proteine ERK 1/2 wurde nach 14 Tagen in Kultur bei allen mit Wachstumsfaktoren behandelten HD-Kulturen herunter reguliert (Abb. 26). Die Konzentration beider Isoformen (44kDa und 42kDa) lag hierbei in den behandelten Kulturen deutlich unter der in der Kontrollprobe.

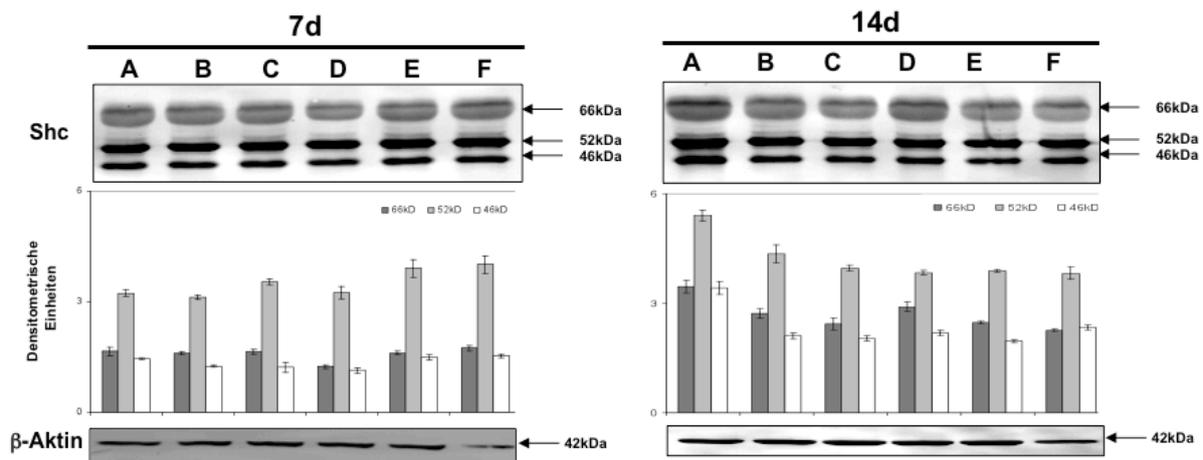


Abb. 25: Westernblot Analyse für Shc caniner Tenozyten in HD-Kultur nach Kultivierung mit: (A) nor. Med.; (B) IGF-1; (C) TGF- β 1; (D) IGF-1/TGF- β 1; (E) BMP-12; (F) PDGF-bb.

Hierbei zeigten die Behandlungen mit IGF-1, TGF- β 1, IGF-1/TGF- β 1, BMP-12 und PDGF-bb einen in dieser Reihenfolge steigenden expressionshemmenden Effekt. Nach 7-tägiger Behandlung waren die Werte einander ähnlicher wobei sie auf dem Niveau der Kontrolle lagen. Diese wiederum war im Vergleich zum ERK 1/2 Gehalt nach 14 Tagen jedoch auch deutlich niedriger. Die Konzentration des housekeeping Proteins β -Aktin blieb in allen HD-Kulturen unverändert.

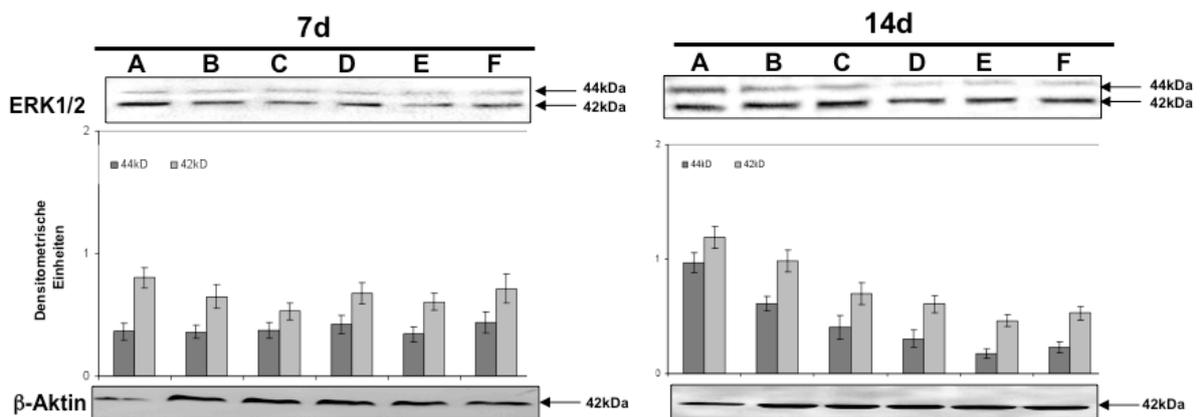


Abb. 26: Westernblot Analyse für ERK1/2 caniner Tenozyten in HD-Kultur nach Kultivierung mit: (A) nor. Med.; (B) IGF-1; (C) TGF- β 1; (D) IGF-1/TGF- β 1; (E) BMP-12; (F) PDGF-bb.

Insgesamt zeigte die Westernblotanalyse keine signifikanten Unterschiede bei der Proteinexpression in den mit Wachstumsfaktoren behandelten Tenozytenkulturen. Alle analysierten Proteine wurden ähnlich hoch wie in der unbehandelten Kontrolle

exprimiert. Deutliche Unterschiede ließen sich nur im Vergleich zwischen den nach 7 Tagen entnommenen und den nach 14 Tagen entnommenen Kulturen feststellen.

4.6. Behandlung der MSZ mit Wachstumsfaktoren

MSZ können, wie oben erläutert, *in vitro* durch Zugabe bestimmter Induktionsmedien zu verschiedenen Bindegewebszellen wie Adipozyten, Chondrozyten oder Osteoblasten differenziert werden (Csaki et al., 2007; Pittenger et al., 1999). Die hierfür benötigten Induktionsmedien enthalten zumeist Wachstumsfaktoren, welche eine gezielte Proliferation und Differenzierung induzieren und aufrechterhalten. Ein international einheitlich anerkanntes Induktionsmedium um in MSZ Tenogenese zu induzieren, ist bis dato nicht beschrieben. Wohl aber gibt es einzelne Berichte, die darauf hin weisen dass unter gewissen Umständen eine verstärkte Proliferation und Differenzierung hin zu sehnenartigen Gewebstrukturen bzw. erhöhte Heilungseigenschaften in MSZ induziert werden können (James et al., 2008). Eine Auswahl der Wachstumsfaktoren, für die die genannten, anabolen Effekte beschrieben wurden, kam im Folgenden Experiment zum Einsatz. Hierbei wurden canine MSZ in HD-Kulturen mit den Wachstumsfaktoren IGF-1, TGF- β 1, BMP-12, und PDGF-bb alleine in einer Konzentration von je 10ng/ml, oder mit einer Kombination aus IGF-1 und TGF- β 1 zu je 5ng/ml behandelt. Ziel dieser Untersuchungen war festzustellen ob und inwiefern diese Wachstumsfaktoren einen Einfluss auf Tenogenese canine MSZ haben. Als Kontrollen wurden HD-Kulturen aus 100% Tenozyten und 100% MSZ angefertigt. Die Kultivierung erfolgte über einen Zeitraum von 14 Tagen und HD-Kulturen wurden nach 7 und 14 Tagen gewonnen. Die Auswertung erfolgte durch TEM zur Bewertung der Ultrastruktur und durch SDS-Page zur Analyse der Proteinsynthese.

4.6.1. Auswirkung auf die Ultrastruktur und EZM (TEM)

Da die EZM im Sehnenewebe für Funktionalität und Integrität von entscheidender Bedeutung ist und diese nur auf ultrastruktureller Ebene zufrieden stellend analysiert und bewertet werden kann, wurden die HD-Kulturen mittels TEM evaluiert. Die ultrastrukturelle Auswertung der HD-Kulturen ergab folgendes Bild:

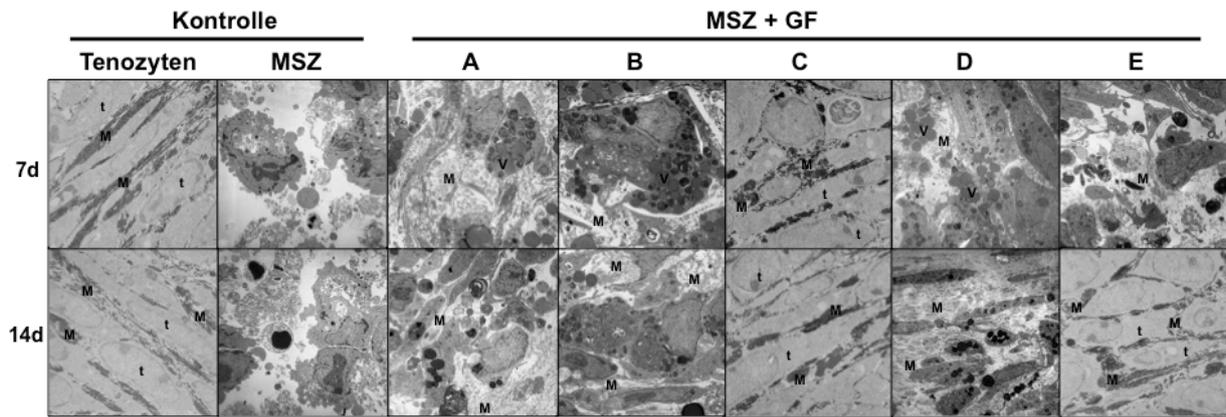


Abb. 27: Elektronenmikroskopische Analyse caniner MSZ und Tenozyten in HD-Kultur nach 7 und 14 Tagen. Kultivierung mit: Kontrollen: nor. Med.; (A): IGF-1; (B): TGF- β 1; (C): IGF-1/TGF- β 1; (D): PDGF-bb; (E): BMP-12. Teils vitale, teils deformierte Nuklei, strukturierte und unstrukturierte EZM Komponenten (M) und Vesikel/Vakuolen (V) sind in einigen Bildern erkennbar. Die mit IGF-1/TGF- β 1 behandelten MSZ (C) ähneln der 100% Tenozytenkultur. Die mit BMP-12 behandelten MSZ nach einer Inkubationsdauer von 14 Tagen ebenfalls. Tenozyten (t). Vergrößerung: 2.500x

In der Kontrolle aus 100% Tenozyten zeigte sich nach 7- und 14-tägiger Kultivierung ein ähnliches, uniformes Bild. Wie die TEM Aufnahmen zeigen, bildeten die Tenozyten einen geschlossenen Zellverband mit zahlreichen interzellulären Kontakten aus. Im Interzellulärraum war extensive Matrixproduktion zu beobachten und die Zellen zeigten ein hohes Maß an Stoffwechselaktivität. Darauf wiesen die zahlreich vorhandenen Zellorganellen wie Mitochondrien, raues endoplasmatisches Retikulum, prominente, euchromatin-reiche Nuklei und die Menge der von den Zellen produzierten und sezernierten Matrixkomponenten hin. Außerdem war die typisch längliche und spindelförmige Morphologie der Tenozyten deutlich zu erkennen. (Abb. 27: Tenozyten)

In der HD-Kultur aus unbehandelten 100% MSZ hingegen ließ sich kein geschlossener Zellverband erkennen. Zu sehen waren nur vereinzelt vitale Zellen mit teils intakten, teils deformierten Nuklei. Die Zellen zeigten deutliche Apoptosezeichen wie Einschnürungen der Plasmamembran, ‚apoptotic bodies‘ und frei liegende Zellorganellen von abgestorbenen Zellen. (Abb. 27: MSZ).

In der mit 10ng/ml IGF-1 behandelten Kultur ließen sich durch TEM neben einigen vitalen, auch viele deformierte Zellen erkennen. Diese bildeten keinen geschlossenen Zellverband aus und wiesen zum Teil ebenfalls Apoptosemerkmale auf.

Der interzelluläre Raum war ausgeprägt und ein gewisses Maß an Matrixproduktion war erkennbar, diese war jedoch unstrukturiert und hatte keinerlei Organisation. Vereinzelt waren in den Zellen Vakuolen oder Vesikel zu erkennen. (Abb. 27: A).

Die mit TGF- β 1 behandelten HD-Kulturen zeigten ein ähnliches Bild (Abb. 27: B). Auch hier waren Apoptosezeichen in teils vitalen, teils deformierten Zellen auszumachen, die wiederum eine unstrukturierte und ungeordnete EZM produzierten. Die Übersichtsaufnahmen der mit IGF-1 oder TGF- β 1 alleine behandelten HD-Kulturen glichen eher denen der 100% MSZ Kultur als der 100% Tenozyten Kontrolle wobei apoptotische und degenerativ veränderte Zellen weit häufiger waren als gesunde und vitale Zellen. Eine gewisser anabolischer Effekt konnte nichts desto trotz beobachtet werden.

Die Behandlung der HD-Kulturen mit einer Kombination aus IGF-1 und TGF- β 1 (je 5ng/ml) hatte deutlich andere Auswirkungen (Abb. 27: C). Hier waren im TEM sowohl nach 7, als auch nach 14 Tagen ausschließlich vitale Zellen zu sehen, die enge interzelluläre Kontakte ausgebildet hatten und einen uniform geschlossenen Zellverband bildeten. Die Zellen synthetisierten eine strukturiert aussehende EZM, welche im Interzellularraum deutlich erkennbar war und diesen fast ganz ausfüllte. Morphologisch entsprachen viele der vorgefundenen Zellen einem typischen Tenozyten indem sie einen spindelförmigen, lang gezogenen Zellkörper mit langen Pseudopodien hatten. Außerdem zeigten die analysierten Zellen einen hoch entwickelten, voll ausgeprägten Proteinsynthesapparat mit zahlreich vorhandenen Zellorganellen. Ein potentieller Synergismus zwischen IGF-1 und TGF- β 1 könnte für die beobachteten Effekte verantwortlich sein, da diese im Gegensatz zu den mit IGF-1 oder TGF- β 1 alleine behandelten Kulturen stehen.

HD-MSZ-Kulturen die mit 10ng/ml PDGF-bb behandelt wurden, zeigten wiederum viele deformierte Zellen neben wenigen die ein vitales Bild boten. Die Zellen bildeten keinen geschlossenen Verband und interzelluläre Kontakte waren nicht so zahlreich wie in der mit IGF-1/TGF- β 1 behandelten Gruppe. Es konnte Matrixproduktion festgestellt werden und die Zellen bildeten zahlreiche Vakuolen oder Vesikel aus. Die Proteinsynthese, zu erkennen an den entsprechenden Zellorganellen und an den sezernierten Proteinen im extrazellulären Raum, war höher als bei den alleine mit IGF-1 und TGF- β 1 inkubierten Kulturen. Doch auch hier machte die EZM einen ungeordneten, unstrukturierten Eindruck (Abb. 27: D).

Die TEM Aufnahmen der mit BMP-12 (10ng/ml) behandelten MSZ HD-Kulturen zeigten nach 7 und nach 14 Tagen große Differenzen. So waren die Zellen nach 7-tägiger Kultivierung zwar noch größtenteils vital, zeigten sich aber unstrukturiert und teils auch mit beginnenden Deformationen. Matrixproduktion war vorhanden aber diese machte einen unorganisierten Eindruck und füllte die teils größeren interzellulären Räume nicht vollständig aus. Nach 14 Tagen entsprach das Bild zunehmend dem der 100% Tenozyten Kontrolle. Es war ein geschlossener Zellverband aus morphologisch typischen tenozyten-artigen Zellen zu sehen, welche eine strukturiert anmaßende EZM produzierten. Der Matrixsaum füllte große Teile des perzellulären Raums und interzellulären Kontakte waren ausgeprägt und zahlreich.

Der beschriebene Versuch ergab zwar gewisse Hinweise auf, von den Wachstumsfaktoren induzierte, Zellproliferation und Matrixsynthese, über Qualität und Eigenschaften dieser *in vitro* hergestellten Gewebe ließ sich aber durch die alleinige elektronenmikroskopische Analyse keine endgültige Aussage treffen. Deshalb wurde im nächsten experimentellen Schritt die Proteinsynthese der jeweiligen Kulturen analysiert.

4.6.2. Auswirkungen auf die Proteinexpression

Um die oben beschriebenen Effekte der Wachstumsfaktoren auf die MSZ in HD-Kulturen auch auf Proteinebene zu untersuchen, wurde im Folgenden die Proteinexpression bestimmter sehnenspezifischer Proteine, wichtiger Signalübertragungsmoleküle und EZM Komponenten analysiert.

Die Westernblotanalyse der mit verschiedenen Wachstumsfaktoren behandelten HD-Kulturen für die wichtigen Matrixkomponenten Kollagen Typ I und Kollagen Typ III zeigte eine konstante Expression beider Proteine in der 100% Tenozyten Kontrolle. Beide Kollagene wurden nach 7 und nach 14 Tagen Kultivierung auf etwa gleichem Niveau exprimiert. (Abb. 28: A). In der 100% MSZ Kultur hingegen ließ sich zu keinem Zeitpunkt Kollagen Typ I oder Kollagen Typ III nachweisen. (Abb. 28: B). Das Gleiche galt für die mit IGF-1 und TGF- β 1 alleine inkubierten Kulturen. Auch in diesen HD-Kulturen war keines der beiden Kollagene nachweisbar. (Abb. 28: C, D). Die Kombination von IGF-1/TGF- β 1 (je 5ng/ml) hatte, wie schon im TEM gezeigt einen anderen Effekt auf die Kulturen. Kollagen Typ I wurde nach 7-tägiger

Kultivierung in den Kulturen exprimiert, jedoch zu einem geringeren Maße als in der 100% Tenozyten Kultur. Nach 14 Tagen stieg die Kollagen Typ I Expression deutlich und erreichte in etwa das Niveau der Tenozyten Kontrolle. Die IGF-1/TGF- β 1 Behandlung hatte ebenfalls ähnliche Effekte auf die Expression von Kollagen Typ III. Auch hier war bereits nach 7 Tagen Kollagen Typ III Expression nachweisbar, welche sich nach 14 Tagen jedoch nur noch leicht steigerte und zu keinem Zeitpunkt das absolute Niveau der Tenozyten Kontrolle erreichte. (Abb. 28: E). Für die mit PDGF-bb bzw. mit BMP-12 behandelten Kulturen zeigte sich bei der Kollagenexpression ein ähnliches Bild. Beide Gruppen zeigten nach 7 und nach 14 Tagen marginale Expression der entsprechenden Kollagene wobei zwischen der PDGF-bb Gruppe und der BMP-12 Gruppe keine signifikanten Unterschiede feststellbar waren. (Abb. 28: F,G). Die Synthese des housekeeping Proteins β -Aktin blieb jeweils unbeeinflusst.

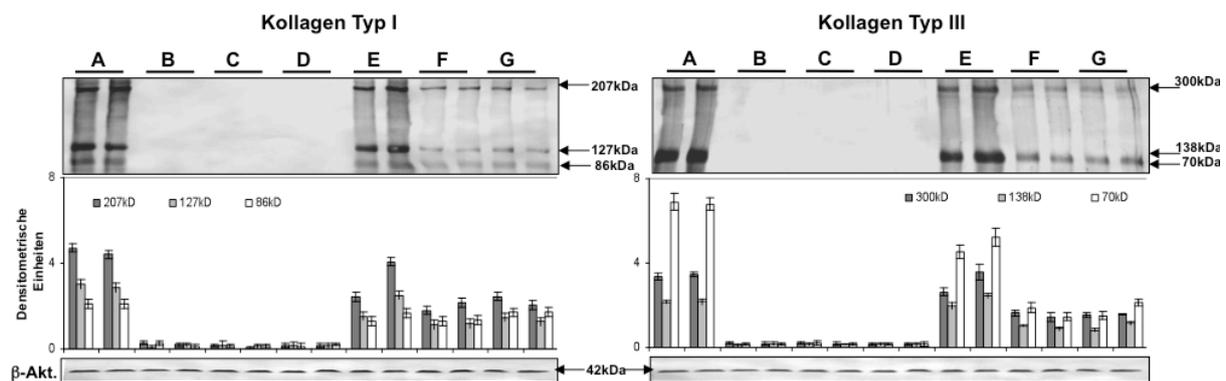
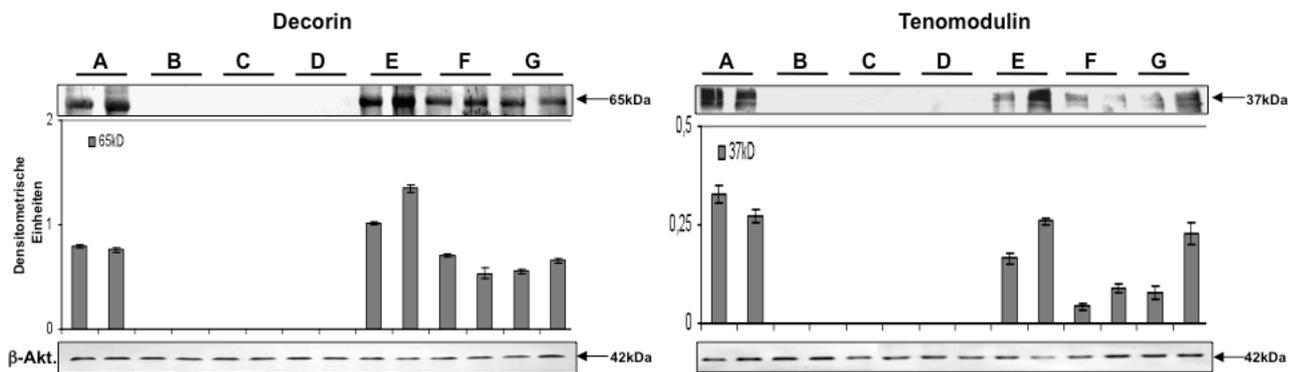


Abb. 28: Westernblot Analyse der Proteine Kollagen Typ I und Typ III in caninen MSZ und Tenozyten in HD-Kultur nach je nach 7 Tagen (1. Bande) und 14 Tagen (2. Bande). Kultivierung mit: (A) Tenozyten: nor. Med.; (B) MSZ: nor. Med.; C-G: MSZ mit jeweils; (C) IGF-1; (D) TGF- β 1; (E) IGF-1/TGF- β 1; (F) PDGF-bb; (G) BMP-12.

Die Matrixproteine Decorin und der Sehnenmarker Tenomodulin (TeM) wurden ausschließlich in den HD-Kulturen exprimiert, in denen zuvor auch eine Kollagen Typ I und III Produktion nachgewiesen werden konnte (Abb. 29). In der Positivkontrolle aus 100% Tenozyten war die Decorinsynthese nach 7 und 14 Tagen gleich stark ausgeprägt. (Abb. 29: A)



bb. 29: Westernblot Analyse der Proteine Decorin und Tenomodulin in caninen MSZ und Tenozyten in HD-Kultur nach je 7 Tagen (1. Bande) und 14 Tagen (2. Bande). Kultivierung mit: (A) Tenozyten: nor. Med.; (B) MSZ: nor. Med.; C-G: MSZ mit jeweils; (C) IGF-1; (D) TGF- β 1; (E) IGF-1/TGF- β 1; (F) PDGF-bb; (G) BMP-12.

Die 100% MSZ Kultur und die mit IGF-1 und TGF- β 1 behandelten Kulturen zeigten keinerlei Decorinproduktion (Abb. 29: B, C, D).

Die mit IGF-1/TGF- β 1 behandelten HD-Kulturen zeigten sowohl nach 7, als auch nach 14 Tagen eine Decorinsynthese die über der der Tenozyten Positivkontrolle lag, wobei sie nach 14 Tagen, im Vergleich zu 7 Tagen, nochmals stark anstieg (Abb. 29: E).

Die beiden mit BMP-12 und PDGF-bb behandelten HD-Kulturen wiesen nach 7 und 14 Tagen eine Decorin-Konzentration vergleichbar mit der der Positivkontrolle auf (Abb. 29: F, G). Die Konzentration des housekeeping Proteins β -Aktin blieb unbeeinflusst.

Die TeM-Konzentration in der Positivkontrolle aus 100% Tenozyten war im Vergleich zu allen anderen mit Wachstumsfaktoren behandelten MSZ-Kulturen am höchsten. Nach 7 Tagen lag eine starke Expression vor und nach 14 Tagen in Kultur kam es zu einem leichten Abfall der TeM-Konzentration. In den Kulturen aus 100% unbehandelten MSZ und den alleine mit IGF-1 und TGF- β 1 behandelten MSZ ließ sich keine TeM Synthese nachweisen (Abb. 29: B, C, D).

Die mit IGF-1/TGF- β 1 in Kombination inkubierten HD-Kulturen zeigten nach 7 Tagen eine TeM-Konzentration auf etwa halbem Niveau der Tenozytenkontrolle. Nach 14 Tagen zeigte sich ein Konzentrationsanstieg von TeM auf das Niveau der Positivkontrolle (Abb. 29: E).

Die mit PDGF-bb behandelten HD-Kulturen synthetisierten nach 7 und 14 Tagen nur sehr geringe Mengen Tenomodulin (Abb. 29: F).

Gleiches gilt für die BMP-12 Gruppe, in der nach 7 Tagen kaum TeM-Expression feststellbar war. Nach 14-tägiger Kultivierung kam es in dieser Gruppe zu einem starken Anstieg der TeM-Produktion, die beinahe das Level der Tenozyten Positivkontrolle erreichte (Abb. 29: G). Die auch auf ultrastruktureller Ebene sichtbaren Veränderungen der Kulturen nach 14 Tagen Behandlung mit BMP-12 war somit auch auf Proteinebene im Sinne eines deutlichen Anstiegs des Markerproteins Tenomodulin erkennbar. Die Konzentration des housekeeping Proteins β -Aktin wurde nicht beeinflusst.

Weiterhin wurde die Expression des Proteins β 1-Integrin untersucht. Die Proteinanalyse von β 1-Integrin spiegelte die bisherigen Ergebnisse wieder. Auch β 1-Integrin wurde in der Positivkontrolle aus 100% Tenozyten, sowohl nach 7, als auch nach 14 Tagen, auf gleich hohem Niveau synthetisiert (Abb. 30: A).

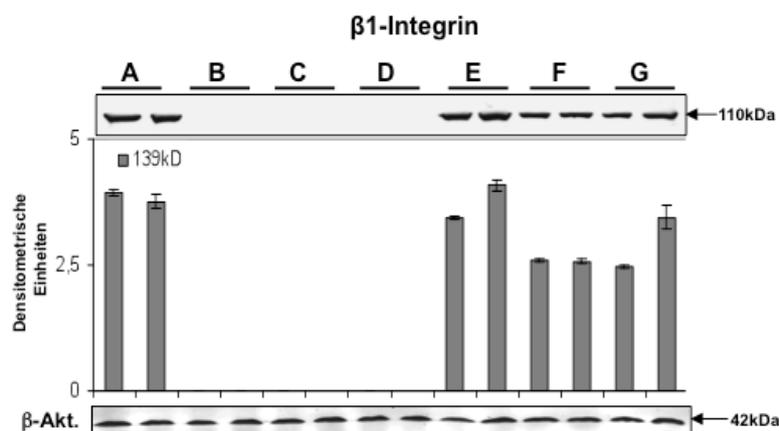


Abb. 30: Westernblot Analyse der Proteine β 1-Integrin in caninen MSZ und Tenozyten in HD-Kultur nach je nach 7 Tagen (1. Bande) und 14 Tagen (2. Bande).

Kultivierung mit: (A) Tenozyten: nor. Med.; (B) MSZ: nor. Med.; C-G: MSZ mit jeweils; (C) IGF-1; (D) TGF- β 1; (E) IGF-1/TGF- β 1; (F) PDGF-bb; (G) BMP-12.

Keinerlei β 1-Integrin-Synthese war wiederum in den Kulturen aus 100% unbehandelter MSZ, mit IGF-1 behandelten MSZ und mit TGF- β 1 behandelten MSZ nachzuweisen (Abb. 30: B, C, D). Die Behandlung der MSZ mit IGF-1/TGF- β 1 hatte zur Folge, dass nach 7 Tagen β 1-Integrin auf dem Niveau der Positivkontrolle produziert wurde. Nach 14 Tagen Kultivierung, kam es nochmals zu einem leichten Anstieg (Abb. 30: E). Auch in den mit PDGF-bb inkubierten HD-Kulturen war β 1-

Integrin Synthese nachweisbar, allerdings auf einem deutlich niedrigerem Niveau als in der Kontrolle aus 100% Tenozyten (Abb. 30: F). Auf dem selben Niveau wurde β 1-Integrin in den für 7 Tage mit BMP-12 behandelten HD-Kulturen exprimiert. Nach 14 Tagen in Kultur stieg die β 1-Integrin-Synthese auf das Niveau der Positivkontrolle an. (Abb. 30: G). Die Synthese des housekeeping Proteins β -Aktin wurde nicht beeinflusst.

Die Analyse der am MAPKinase Signalübertragungsweg beteiligten Proteine Shc und ERK 1/2 ergab ein den bisher beobachteten Expressionsmustern sehr ähnliches Bild.

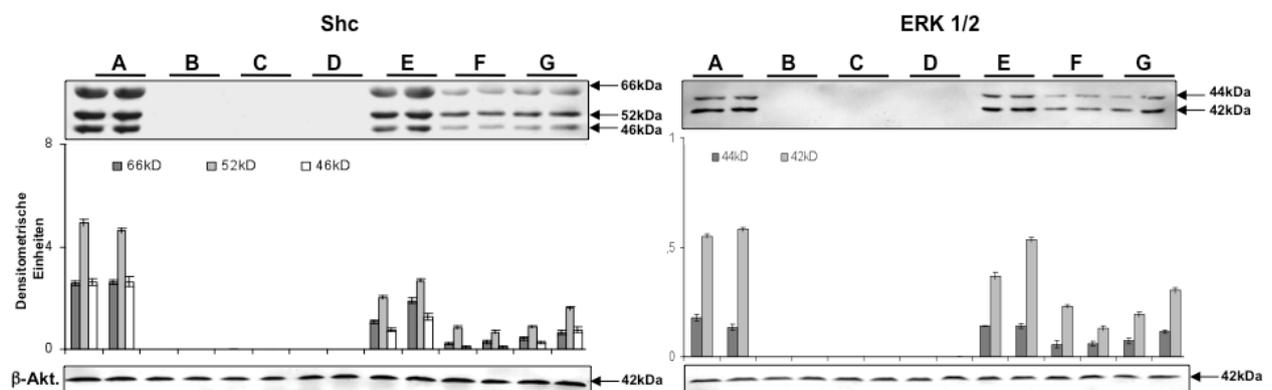


Abb. 31: Westernblot Analyse der Proteine Shc und ERK 1/2 in caninen MSZ und Tenozyten in HD-Kultur nach je 7 Tagen (1. Bande) und 14 Tagen (2. Bande). Kultivierung mit: (A) Tenozyten: nor. Med.; (B) MSZ: nor. Med.; C-G: MSZ mit jeweils; (C) IGF-1; (D) TGF- β 1; (E) IGF-1/TGF- β 1; (F) PDGF-bb; (G) BMP-12.

Das Adaptorprotein Shc, welches neben seiner Rolle im MAPKinase Pathway auch am Anfang zahlreicher anderer Signalkaskaden steht, wurde in der Positivkontrolle aus 100% Tenozyten nach 7 und nach 14 Tagen auf gleich hohem Niveau exprimiert. In den Kulturen aus 100% MSZ, den mit IGF-1 behandelten Kulturen und den mit TGF- β 1 behandelten HD-Kulturen war hingegen keine Shc Produktion festzustellen (Abb. 31: B-D). Die mit IGF-1/TGF- β 1 HD-Kulturen synthetisierten Shc sowohl nach 7, als auch nach 14 Tagen, jedoch in sehr deutlich niedrigeren Konzentrationen als die Positivkontrollen (Abb. 31: E). In der für 7 und 14 Tage mit PDGF-bb inkubierten HD-Kultur und in den für 7 Tage mit BMP-12 kultivierten HD-Kulturen ließen sich jeweils nur Spuren des Proteins detektieren. In der BMP-12

Gruppe kam es hierbei nach 14-tägiger Inkubationsdauer zu einem leichten Konzentrationsanstieg (Abb. 31: F, G). Die Synthese des housekeeping Proteins β -Aktin blieb unbeeinflusst.

Wie bereits erwähnt, spielt die MAPKinase ERK 1/2 bei Differenzierungs- und Proliferationsvorgängen eine wichtige Rolle. Sie wird durch Phosphorylierung aktiviert und führt somit zu einer weiteren downstream Aktivierung des MAPKinase Signalweges. In den HD-Kulturen aus 100% Sehnenzellen lag bereits nach 7 Tagen eine deutliche ERK 1/2 Expression vor. Diese blieb nach 14 Tagen auf gleichem Niveau konstant (Abb. 31: A). Wie schon bei den oben analysierten Proteinen war bei den unbehandelten MSZ und den mit IGF-1 bzw. TGF- β 1 behandelten MSZ keine ERK 1/2 Synthese feststellbar (Abb. 31: B, C, D). Nach Stimulation der MSZ mit der Kombination aus IGF-1/TGF- β 1 wurde eine ERK 1/2-Expression bereits nach 7 Tagen beobachtet. Diese lag jedoch etwas unter der Konzentration die in der Positivkontrolle gemessen wurde. Nach 14-tägiger Behandlung mit IGF-1/TGF- β 1, konnte eine ERK-Konzentration festgestellt werden die der der Positivkontrolle entsprach (Abb. 31: E). ERK 1/2 wurde nach 7 und nach 14 Tagen auch in den mit PDGF-bb behandelten HD-Kulturen nachgewiesen, jedoch in deutlich geringerer Konzentration als in der Positivkontrolle und den mit IGF-1/ TGF- β 1 behandelten HD-Kulturen. Außerdem ging die ERK-Konzentration nach 14 Tagen leicht zurück (Abb. 31: F). Die mit BMP-12 behandelten HD-Kulturen exprimierten nach 7 Tagen ERK 1/2 auf dem Niveau der mit PDGF-bb behandelten HD-Kulturen, allerdings war in dieser Gruppe nach 14-tägiger Behandlung ein deutlicher Anstieg der ERK-Synthese zu beobachten (Abb. 31: G). Die Expression des housekeeping Proteins β -Aktin wurde nicht beeinflusst.

Das Protein Caspase-3 ist eine Cysteinprotease, die zur Familie der ‚cysteinylasspartate specific proteases‘ (caspases) gehört. Die sequentielle Aktivierung dieser Caspasen spielt eine entscheidende Rolle bei der Induktion von Apoptose (Harrington et al., 2008). Sie liegen als Proenzyme vor, die durch proteolytische Spaltung in die aktive Form des Enzyms überführt werden (Wyllie, 1997). Caspase-3 wird außerdem zu den sog. Effektor-Caspasen gezählt (u.a. Caspase-3, 6, 7), welche selbst zelluläre Proteine, wie das am Cytoskelettaufbau beteiligte Aktin oder Lamin, spalten. Ihnen vorgeschaltet sind die sog. Initiator-Caspasen (u.a. Caspase

8, 9), welche die pro-enzymatischen Formen der Effektor-Caspasen spalten und somit aktivieren (Boatright and Salvesen, 2003). Die aktive Form der Caspase-3, deren Expression in den HD-Kulturen auch in dieser Arbeit im Folgenden analysiert wurde, eignet sich daher gut als Marker für apoptotische Zellen und spiegelt somit auch die Vitalität der Kulturen wieder (Porter and Janicke, 1999). Die Westernblotanalyse der aktiven Form der Caspase-3 ergänzte die vorangegangenen Ergebnisse eindrucksvoll (Abb. 32).

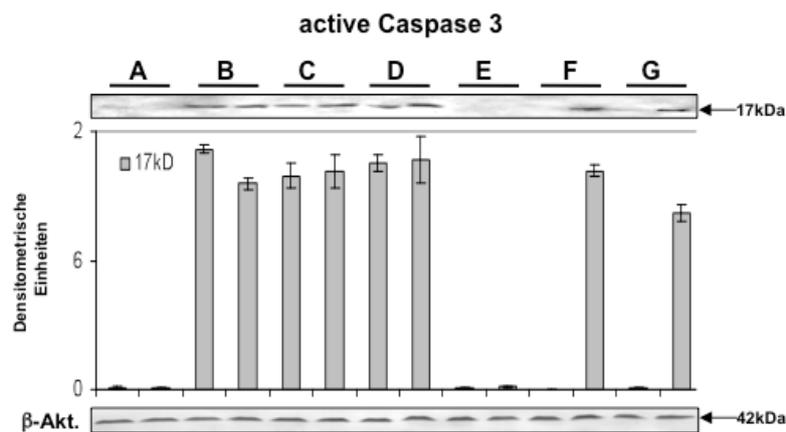


Abb. 32: Westernblot Analyse der Proteine active Caspase-3 in caninen MSZ und Tenozyten in HD-Kultur nach je nach 7 Tagen (1. Bande) und 14 Tagen (2. Bande). Kultivierung mit: (A) Tenozyten: nor. Med.; (B) MSZ: nor. Med.; C-G: MSZ mit jeweils; (C) IGF-1; (D) TGF-β1; (E) IGF-1/TGF-β1; (F) PDGF-bb; (G) BMP-12.

So war in den HD-Kulturen die zuvor für die meisten der analysierten Proteine die höchste Syntheseaktivität zeigten, die 100% Tenozyten Kultur und die mit der Kombination aus IGF-1/TGF-β1 behandelten MSZ Kulturen, keine Caspase-3 Aktivität nachweisbar (Abb. 32: A, E). Es befanden sich demnach keine, oder nur sehr wenige apoptotische Zellen in diesen Kulturen. Die HD-Kulturen aus unbehandelten MSZ und mit IGF-1 oder TGF-β1 alleine behandelten MSZ, in denen keine oder nur vernachlässigbare Konzentrationen aller analysierten Proteine vorhanden waren, zeigten hingegen eine sehr deutliche Expression von aktiver Caspase-3 (Abb. 32: B, C, D). Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Mehrzahl der Zellen in diesen Kulturen apoptotisch sind. In der PDGF-bb und der BMP-12 Gruppe, wurde aktive Caspase-3 wiederum nur nach 14-tägiger, jedoch nicht nach 7-tägiger

Behandlung exprimiert (Abb. 32: F, G). Die Expression des housekeeping Proteins β -Aktin wurde nicht beeinflusst.

4.7. Ko-Kultur aus mesenchymalen Stammzellen und primären Tenozyten in HD-Kulturen in verschiedenen Mischverhältnissen

Im nächsten Schritt dieser Arbeit, wurde das tenogene Potential von primären Tenozyten auf MSZ in einem HD-Ko-Kultur System evaluiert. Hierfür wurden die MSZ, die primären Tenozyten (Ten) als Kontrollen und die Ko-Kulturen in den Mischverhältnissen 90:10 MSZ/Ten, 70:30 MSZ/Ten und 50:50 MSZ/Ten, in HD-Kulturen überführt und über einen Zeitraum von 14 Tagen mit normalem Zellkulturmedium kultiviert. Um die entstandene Ultrastruktur der Zellen in 3D-HD-Kultur und die Bildung von extrazellulärer Matrix zu analysieren, wurden die HD-Kulturen mittels TEM (Zeiss, EM900) ausgewertet.

4.7.1. Auswirkung auf die Ultrastruktur und EZM (TEM)

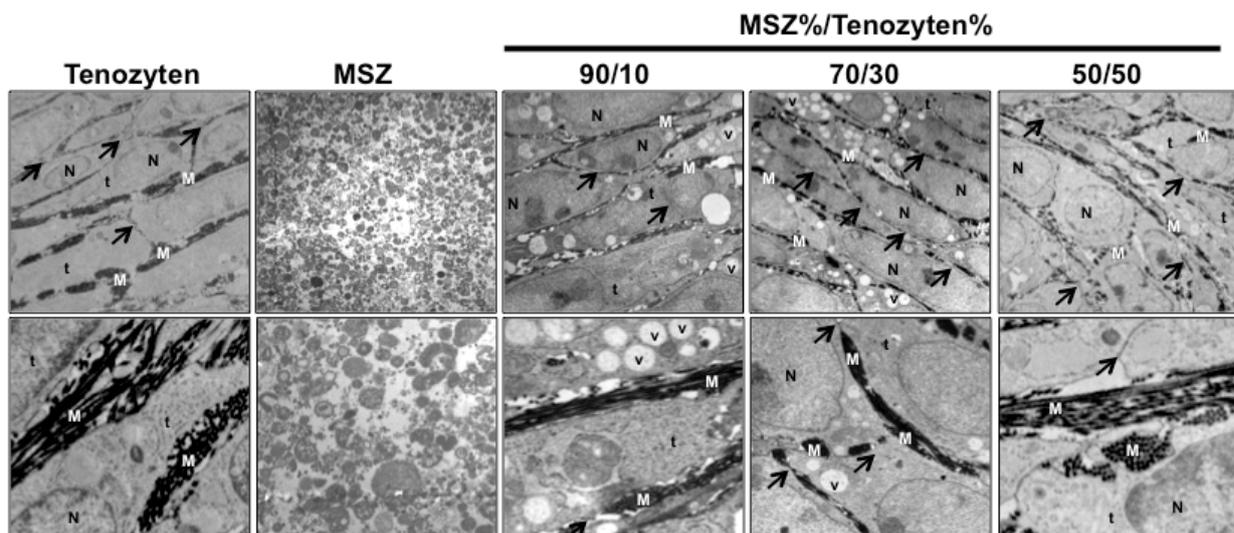


Abb. 33: Elektronenmikroskopische Analyse caniner MSZ/Tenozyten in HD-Kultur und Ko-Kultur nach 14 Tagen. Kultivierung mit: Kontrollen, nor. Med. Tenozyten (t). Teils vitale, teils deformierte Nuklei (N), strukturierte und unstrukturierte EZM Komponenten (M) und Vesikel/Vakuolen (V) sind in einigen Bildern erkennbar. Enge Zell-Zell Kontakte zeigen sich in der 100% Tenozytenkultur und in allen Ko-Kulturen (Pfeile). Die 100% MSZ-Kultur zeigt deutliche Apoptosezeichen und frei liegende Zellorganellen. Vergrößerung: obere Reihe: 2.000x; untere Reihe: 5.000x.

Nach 14-tägiger Kultivierung war in den TEM Aufnahmen der Kontrolle aus 100% primären Tenozyten ein geschlossener Zellverband mit zahlreichen, ausgeprägten Zell-Zell Kontakten und extensiver Matrixproduktion sichtbar. In höherer Vergrößerung konnten einzelne, dicke Matrixfibrillen im Interzellulärraum abgebildet werden. Die Zellen zeigten eine typische Tenozytenmorphologie mit elongierten, spindelförmigen Zellkörpern und langen, dünnen Pseudopodien. Die Tenozyten hatten einen funktionierenden Proteinsyntheseapparat mit prominenten, euchromatin-reichen Nuklei, zahlreich vorhandenen Mitochondrien, ausgeprägtem rauen endoplasmatischen Retikulum (rER) und zahlreichen Golgi Apparaten. Diese vitalen, äußerst stoffwechselaktiven Zellen produzierten in großem Umfang eine hochstrukturierte, gut organisierte EZM (Abb. 33: Tenozyten). In der Kultur aus unbehandelten MSZ war ein grundlegend anderes Bild sichtbar. Die Zellen waren apoptotisch mit deformierten Nuklei und es war kein geschlossener Zellverband erkennbar. Weiterhin waren einzelne, frei liegende Zellorganellen, Plasmamembran- ('membrane blebbing') und Zellkerneinschnürungen ('apoptotic bodies') und Zelltrümmer weitere Hinweise auf vermehrt gesteigerte Apoptose (Abb. 33: MSZ).

Im Gegenteil dazu zeigten die TEM Aufnahmen der Ko-Kulturen aus MSZ und Tenozyten, in allen Mischverhältnissen, ein morphologisches Bild, welches dem der Kultur aus 100% Tenozyten ähnelte. In den Übersichtsaufnahmen war in allen Kulturen ein geschlossener Verband aus vitalen Zellen erkennbar, die typische morphologische Charakteristika von Tenozyten aufwiesen: voll ausgebildete Zellorganellen wie zahlreiche Mitochondrien, rER, Golgi Apparate und Nuklei, die einen hohen Euchromatin Gehalt aufwiesen. In einigen Zellen der Ko-Kulturen waren Vesikel oder Vakuolen auszumachen, was wiederum auf aktiven Stoffwechsel und Zell-Zell Kommunikation hindeutete. Die in den interzellulären Raum sezernierten Matrixbestandteile bestanden überwiegend aus dicken, gut organisiert und geordneten Fibrillen. Es ließen sich mittels TEM keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Mischverhältnissen der einzelnen Ko-Kulturen nachweisen.

Um noch eingehender die Zusammensetzung der im TEM nachgewiesenen, neu gebildeten EZM in den Ko-Kulturen zu analysieren wurden des Weiteren immunoelektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt und die HD-Ko-Kulturen mit Antikörpern gegen Kollagen Typ I und Tenomodulin markiert.

Immunelektronenmikroskopisch zeigte sich in den 90:10 MSZ/T, 70:30 MSZ/T und 50:50 MSZ/T Ko-Kulturen folgendes Bild:

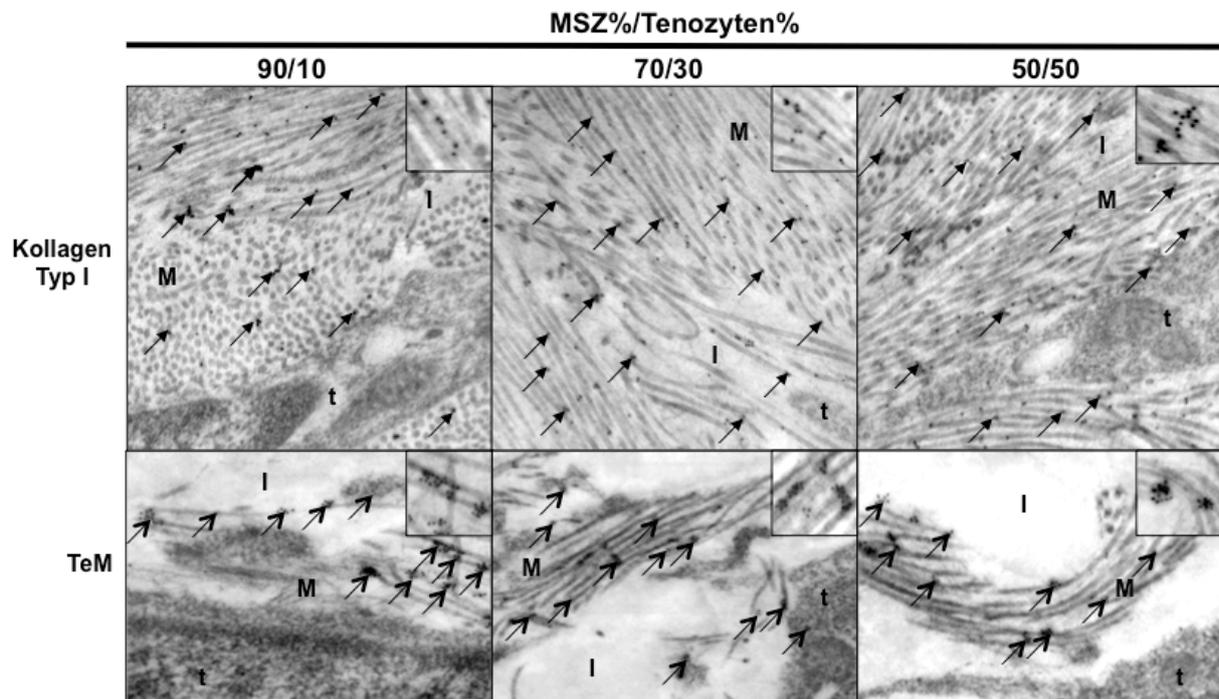


Abb. 34: Immunelektronenmikroskopische Analyse caniner MSZ/Tenozyten in Ko-Kultur nach 14 Tagen. In allen Ko-Kulturen sind Kollagen Typ I (dicke Pfeile) und Tenomodulin (schmale Pfeile) nachweisbar. Einzelne Goldpartikel sind erkennbar (Insets). Die im Interzellularraum (I) zwischen den Tenozyten (t) angelagerte EZM (M) ist hochstrukturiert und weist typische Sehnencharakteristika auf. Vergrößerung: 15.000x.

Die immunelektronenmikroskopische Analyse von Kollagen Typ I ergab eine deutliche Markierung in allen untersuchten Kulturen. Die Goldpartikel waren direkt an die dicken Fibrillen angelagert und gleichmäßig an den Fibrillen verteilt und lagen einzeln vor. Die Ultrastruktur des fibrillären Matrixnetzwerkes weist außerdem typische Sehnencharakteristika auf. So konnte beispielsweise die klassische Wellenform der Kollagenfibrillen dargestellt werden. Die Immunogoldmarkierung für den sehrentypischen Marker TeM war für die Validität der Ergebnisse von großer Wichtigkeit. Goldmarkiertes Tenomodulin konnte ebenfalls in allen untersuchten Ko-Kulturen nachgewiesen werden. Da Tenomodulin ein Proteoglykan ist lag es anders als Kollagen Typ I, cluster-förmig zwischen dem Netzwerk aus Kollagenfibrillen vor (Abb. 34). Auch TeM wurde deutlich in allen Ko-Kulturen nachgewiesen, was Hinweise auf eine stattgefundenene Tenogenese gab.

4.7.2. Auswirkungen auf die Proteinexpression

Um die ultrastrukturellen und immunomorphologischen Ergebnisse zu bestätigen und um die neu gebildete EZM genauer zu quantifizieren und tenogene Signalkaskaden zu analysieren, wurde im nächsten Schritt die Proteinexpression mittels SDS-PAGE untersucht. Für die Westernblotanalyse wurden die HD-Kulturen aus MSZ, Tenozyten und die verschiedenen Ko-Kulturen zum Einen mit normalem Medium und zum Anderen jeweils mit der Kombination aus den Wachstumsfaktoren IGF-1 und TGF- β 1 (je 5ng/ml) inkubiert. Ziel hierbei war festzustellen, ob diese Wachstumsfaktoren, die in den vorangegangenen Experimenten den größten positiven Effekt auf Tenozyten und MSZ hatten, auch die Effekte der Ko-Kultur zwischen MSZ und Tenozyten beeinflussen und/oder verstärken können. Die HD-Kulturen wurden jeweils nach 7 und 14 Tagen genommen und analysiert.

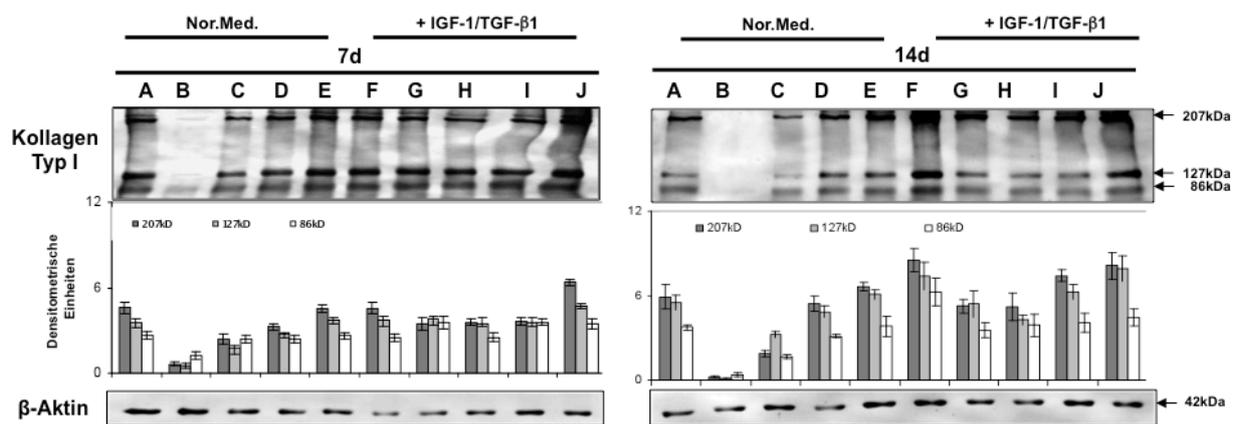


Abb. 35: Westernblot Analyse von Kollagen Typ I in Ko-Kulturen caniner MSZ/Tenozyten in HD-Kultur nach 7 und 14 Tagen Kultivierung. (A/F) 100% Tenozyten; (B/G) 100% MSZ; (C/H) 90/10; (D/I) 70/30; (E/J) 50/50; (F-J) kultiviert mit je 5ng/ml IGF-1/TGF- β 1.

Kollagen Typ I wurde in allen analysierten Kulturen mit Ausnahme der aus 100% unbehandelter MSZ exprimiert (Abb. 35). Generell war die Konzentration sowohl in den unbehandelten Kulturen, als auch in den mit IGF-1/TGF- β 1 behandelten Kulturen nach 7 Tagen deutlich geringer als nach 14 Tagen. Auffällig war außerdem, dass die Kollagen Typ I Expression in behandelten und unbehandelten Tenozyten nach 7 Tagen keine signifikanten Unterschiede aufwies, wohingegen sie nach 14 Tagen in der mit IGF-1/TGF- β 1 behandelten Probe höher lag als in der unbehandelten (Abb. 35: A, F). Außerdem zeigte sich in den unbehandelten Ko-

Kulturen eine Steigerung der Konzentration mit dem steigenden Gehalt von Tenozyten in der Ko-Kultur (Abb. 35: C, D, E). So war die Kollagen Typ I Synthese in der unbehandelten 50:50 MSZ/Tenozyten Ko-Kultur am höchsten (Abb. 35: E). Dieser Trend war in den unbehandelten HD-Kulturen auch nach 14 Tagen feststellbar, nicht jedoch in den mit Wachstumsfaktoren behandelten Ko-Kulturen (Abb. 35: C, D, E). Hier war die Kollagen Typ I Expression nach 7 und nach 14 Tagen in den 90:10 und 70:30 Ko-Kulturen auf etwa gleichem Niveau, in der 50:50 Ko-Kultur lag sie etwas höher (Abb. 35: H, I, J). Kollagen Typ I Synthese war auch in den mit IGF-1/TGF- β 1 behandelten MSZ nachweisbar. Sie lag nach 7 und nach 14 Tagen etwa auf dem jeweiligen Niveau der unbehandelten Ko-Kultur mit dem MSZ/Tenozytenverhältniss 70:30 (Abb. 35: D, G). Die Synthese des housekeeping Proteins β -Aktin blieb jeweils unbeeinflusst.

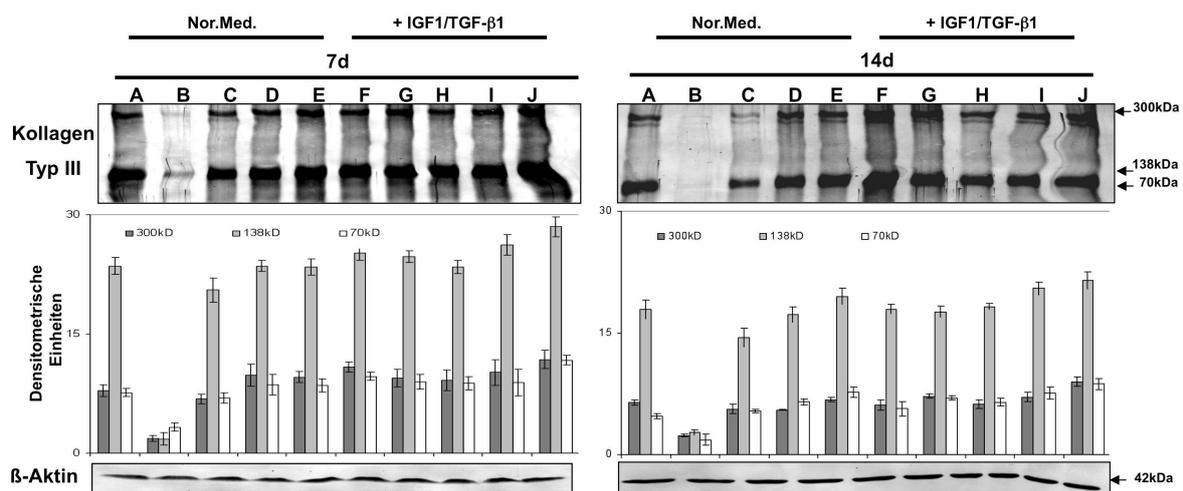


Abb. 36: Westernblot Analyse von Kollagen Typ III in Ko-Kulturen caniner MSZ/Tenozyten in HD-Kultur nach 7 und 14 Tagen Kultivierung. (A/F) 100% Tenozyten; (B/G) 100% MSZ; (C/H) 90/10; (D/I) 70/30; (E/J) 50/50; (F-J) kultiviert mit je 5ng/ml IGF-1/TGF- β 1.

Die Kollagen Typ III Synthese lag in der Positivkontrolle aus 100% Tenozyten nach 7-tägiger Kultivierung höher als nach 14 Tagen in Kultur und war insgesamt in den Tenozyten konstant stark (Abb. 36: A). Die unbehandelten MSZ Kulturen wiesen nach 7 und 14 Tagen jeweils nur Spuren von Kollagen Typ III auf (Abb. 36: B). Eine Steigerung des Kollagen Typ III Gehalts konnte, wie schon für Kollagen Typ I, mit steigendem prozentualem Anteil der Tenozyten an den unbehandelten Ko-Kulturen nach 7 und 14 Tagen beobachtet werde (Abb. 36: C, D, E). Zwischen behandelten

und unbehandelten Tenozyten HD-Kulturen war zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied bei der Kollagen Typ III Synthese auszumachen (Abb. 36: A, F). Ebenso waren keine Kollagen Typ III Konzentrationsunterscheide zwischen behandelten und unbehandelten Ko-Kulturen feststellbar (Abb. 36: C-E, H-J). Eine leichte Steigerung des Kollagen Typ III Gehalts mit dem Anteil der an den Ko-Kulturen beteiligten Tenozyten, konnte aber auch bei den mit IGF-1/TGF- β 1 Ko-Kulturen beobachtet werde (Abb. 36: H, I, J). Die mit der Kombination aus IGF-1/TGF- β 1 inkubierten MSZ exprimierten sowohl nach 7, als auch nach 14 Tagen, Kollagen Typ III auf dem Niveau der jeweiligen unbehandelten Tenozytenkontrolle (Abb. 36: A, F). Die Synthese des housekeeping Proteins β -Aktin wurde nicht beeinflusst.

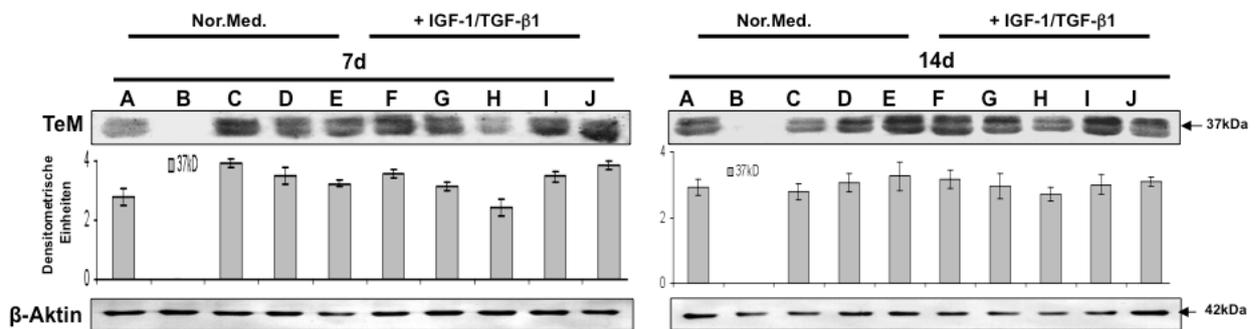


Abb. 37: Westernblot Analyse von Tenomodulin in Ko-Kulturen caniner MSZ/Tenozyten in HD-Kultur nach 7 und 14 Tagen Kultivierung. (A/F) 100% Tenozyten; (B/G) 100% MSZ; (C/H) 90/10; (D/I) 70/30; (E/J) 50/50; (F-J) kultiviert mit je 5ng/ml IGF-1/TGF- β 1.

Des Weiteren wurde die Produktion des sehmentypischen Proteoglykans TeM untersucht. TeM wurde in den unbehandelten Tenozyten sowohl nach 7, als auch nach 14 Tagen erwartungsgemäß exprimiert. Die Expression nach 14 Tagen, lag leicht über der nach 7 Tagen nachgewiesen (Abb. 37: A). In den unbehandelten MSZ fand zu keinem Zeitpunkt TeM Synthese statt (Abb. 37: B). Die unbehandelten Ko-Kulturen zeigten nach 7 Tagen alle TeM Synthese wobei diese in der im Verhältnis 90:10 MSZ/Tenozyten gemischten Ko-Kultur am höchsten war. Die TeM Synthese nahm mit steigendem prozentualen Anteil der Tenozyten in den Ko-Kulturen ab. Sie lag in der 70:30 Ko-Kultur leicht höher als in der Positivkontrolle und in der 50:50 Ko-Kultur auf etwa dem selben Niveau wie in der Positivkontrolle (Abb. 37: C, D, E). Ein umgekehrtes Bild zeigte sich in den unbehandelten, für 14 Tage kultivierten Ko-Kulturen. Hier lag die TeM Konzentration in der 90:10 Ko-Kultur auf

dem Niveau der Kontrolle und stieg mit steigendem Tenozytenanteil in den Ko-Kulturen weiter an (Abb. 37: C, D, E). In den mit IGF-1/TGF- β 1 behandelten Tenozyten zeigte sich nach 7 und 14 Tagen eine TeM Expression, die keine signifikanten Unterschiede zur Positivkontrolle aufwies (Abb. 37: F). Die mit Wachstumsfaktoren behandelten MSZ zeigten TeM Expression auf etwa demselben Niveau (Abb. 37: G). Die behandelten Ko-Kulturen zeigten ein anderes Expressionmuster als die unbehandelten. So war die TeM Synthese in der behandelten 90:10 Ko-Kultur, nach 7 Tagen, deutlich geringer als in der Unbehandelten (Abb. 37: C, H). In den für 7 Tage mit IGF-1/TGF- β 1 behandelten Ko-Kulturen nahm die TeM Expression dann mit steigendem Tenozytengehalt zu und erreichte in der 50:50 Ko-Kultur die höchste Konzentration (Abb. 37: H, I, J). Nach 14-tägiger Kultivierung der verschiedenen Ko-Kulturen mit Wachstumsfaktoren zeigte sich ein ähnliches Bild. Die TeM Konzentration war in der 90:10 Ko-Kultur am geringsten und stieg von der 70:30 zur 50:50 Ko-Kultur jeweils leicht an. Allerdings waren hier die Konzentrationsdifferenzen verschwindend gering (Abb. 37: H, I, J). Die Konzentration des housekeeping Proteins β -Aktin wurde nicht beeinflusst.

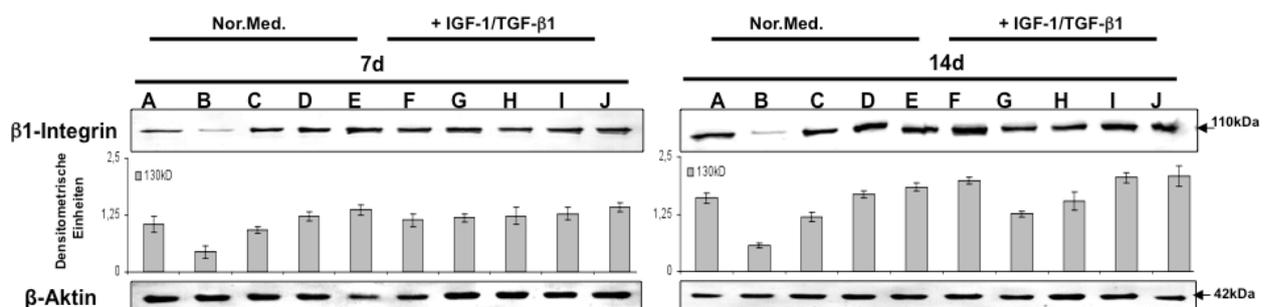


Abb. 38: Westernblot Analyse von β 1-Integrin in Ko-Kulturen caniner MSZ/Tenozyten in HD-Kultur nach 7 und 14 Tagen Kultivierung. (A/F) 100% Tenozyten; (B/G) 100% MSZ; (C/H) 90/10; (D/I) 70/30; (E/J) 50/50; (F-J) kultiviert mit je 5ng/ml IGF-1/TGF- β 1.

Die Westernblotanalyse von β 1-Integrin zeigte eine deutliche Expression des Proteins in den unbehandelten Tenozyten Kulturen, welche nach 14 Tagen deutlich höher lag als nach 7-tägiger Kultivierung (Abb. 38: A). In den unbehandelten MSZ waren hingegen jeweils nur verschwindend geringe Spuren von β 1-Integrin nachweisbar (Abb. 38: B). In den unbehandelten Ko-Kulturen in verschiedenen

Mischverhältnissen zeigte sich ein Anstieg der $\beta 1$ -Integrin Konzentration mit steigendem Anteil von Tenozyten an der Ko-Kultur. Sowohl nach 7, als auch nach 14 Tagen erreichte die jeweilige 50:50 Ko-Kultur das $\beta 1$ -Integrin Expressionsniveau der jeweiligen Positivkontrolle. Die $\beta 1$ -Integrin Konzentration lag in allen unbehandelten Ko-Kulturen nach 14 Tagen jeweils höher als nach 7 Tagen (Abb. 38: C, D, E). Alle mit IGF-1/TGF- $\beta 1$ behandelten Kulturen und Ko-Kulturen exprimierten nach 7-tägiger Kultivierung ähnlich hohe Mengen $\beta 1$ -Integrin (Abb. 38: F-J). Nach 14 Tagen ließ sich in den behandelten Ko-Kulturen wiederum ein Anstieg der $\beta 1$ -Integrin Konzentration nachweisen, der mit dem steigenden Tenozytengehalt der Ko-Kulturen einher ging (Abb. 38: H,I,J). Die behandelten Tenozyten zeigten nach 14 Tagen eine leicht erhöhte $\beta 1$ -Integrin Synthese im Vergleich zur Positivkontrolle, die behandelten MSZ exprimierten $\beta 1$ -Integrin auf dem Niveau der unbehandelten 90:10 Ko-Kultur (Abb. 38: F, G). Die Expression des housekeeping Proteins β -Aktin blieb unbeeinflusst.

Des Weiteren wurde das am MAPKinase Pathway beteiligte Signalprotein Shc untersucht.

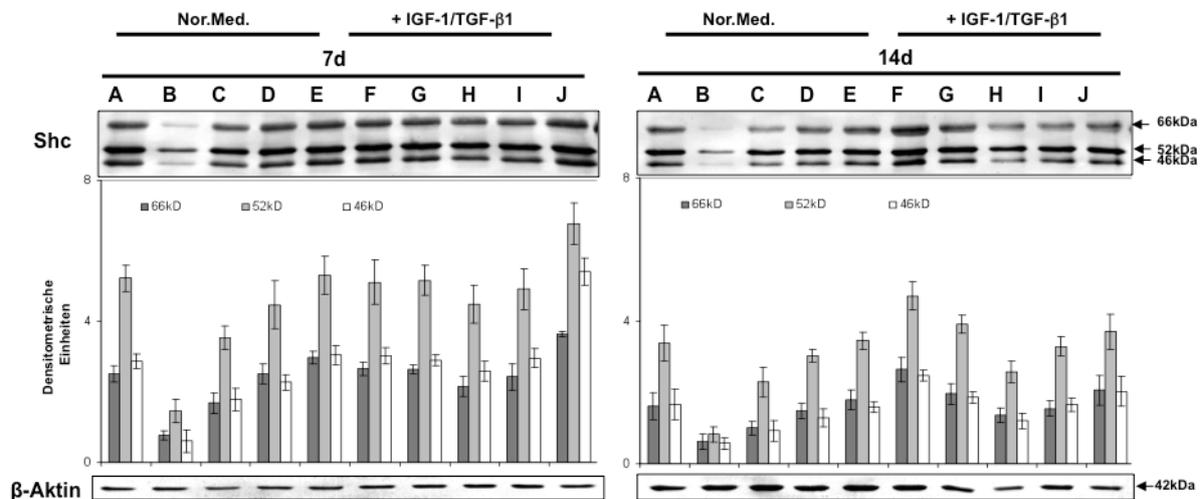


Abb. 39: Westernblot Analyse von Shc in Ko-Kulturen caniner MSZ/Tenozyten in HD-Kultur nach 7 und 14 Tagen Kultivierung. (A/F) 100% Tenozyten; (B/G) 100% MSZ; (C/H) 90/10; (D/I) 70/30; (E/J) 50/50; (F-J) kultiviert mit je 5ng/ml IGF-1/TGF- $\beta 1$.

Nach 7 Tagen Inkubation mit normalem Medium war eine deutliche Shc Expression in den Tenozyten Kulturen nachweisbar, die nach 14 Tagen deutlich absank (Abb. 39: A). In der Kultur aus unbehandelten MSZ waren nach 7 und 14 Tagen jeweils nur

Spuren von Shc nachweisbar, was Hinweise darauf gab, dass wenigstens einige, noch stoffwechselaktive Zellen in den Kulturen vorhanden waren (Abb. 39: B). In den diversen unbehandelten Ko-Kulturen wurde Shc zu beiden Entnahmezeitpunkten stark exprimiert. Wie schon bei einigen der anderen analysierten Proteine stieg die Shc Synthese mit dem Gehalt der Tenozyten in der jeweiligen Ko-Kultur. Die Shc Konzentration lag hierbei in allen Ko-Kulturen nach 7 Tagen jeweils höher, als in der entsprechenden Ko-Kultur nach 14-tägiger Kultivierung (Abb. 39: C, D, E). Die mit den Wachstumsfaktoren IGF-1/TGF- β 1 behandelten Tenozyten exprimierten nach 7-tägiger Kultivierung Shc im gleichen Ausmaß wie die unbehandelten Tenozyten. Nach 14 Tagen synthetisierte die behandelte Kultur jedoch deutlich mehr Shc als die Kontrolle (Abb. 39: F). Die behandelten MSZ exprimierten nach 7 Tagen in Kultur äquivalente Shc Mengen wie die behandelten und unbehandelten Tenozyten. Nach 14-tägiger Inkubation mit IGF-1/TGF- β 1 lag die Shc Expression auf dem Niveau der Positivkontrolle aus unbehandelten Tenozyten (Abb. 39: G). Im direkten Vergleich zwischen den über 7 Tage kultivierten Ko-Kulturen zeigte sich, dass die verschiedenen behandelten und unbehandelten Ko-Kulturen jeweils etwa gleich viel Shc produzierten. Lediglich in der behandelten 50:50 Ko-Kultur war die Shc Expression leicht erhöht. Auch bei den behandelten, nach 14 Tagen in Kultur ausgewerteten Ko-Kulturen, ließen sich keine signifikanten Unterschiede in der Shc Synthese zu den unbehandelten Ko-Kulturen feststellen (Abb. 39: H, I, J). Die Konzentration des housekeeping Proteins β -Aktin wurde nicht beeinflusst.

Neben Shc, spielen auch die Isoformen des Proteins ERK eine entscheidende Rolle im MAPKinase Signalübertragungsweg. In den unbehandelten Tenozyten Kulturen lag die ERK 1/2 Synthese nach 7-tägiger Kultivierung deutlich höher als nach 14 Tagen (Abb. 40: A). In den unbehandelten MSZ Kulturen ließ sich zu keinem Zeitpunkt eine ERK 1/2 Synthese feststellen (Abb. 40: B). Die unbehandelten Ko-Kulturen in den verschiedenen Mischverhältnissen zeigten hingegen, zu beiden Entnahmezeitpunkten, alle eine deutliche ERK1/2 Expression. Insbesondere die 44kDa Isoform wurde nach 7-tägiger Inkubation nicht so stark exprimiert wie die 42kDa Isoform des Proteins. In den jeweiligen Ko-Kulturen im Verhältnis 90:10, wurden beide Isoformen gleich stark exprimiert (Abb. 40: C, D, E). Im Gegensatz hierzu, wurde in den Ko-Kulturen im Verhältnis 70:30 und 50:50 jeweils die 42kDa Isoform verstärkt exprimiert während sich die Gesamtkonzentration von ERK 1/2 mit

dem Anteil der Tenozyten an der Ko-Kultur steigerte (Abb. 40: D, E). Bei den mit Wachstumsfaktoren behandelten Ko-Kulturen war nach 7 Tagen die gleiche Steigerung, proportional zum Tenozytengehalt der jeweiligen Ko-Kultur, der ERK 1/2 Expression erkennbar (Abb. 40: H, I, J).

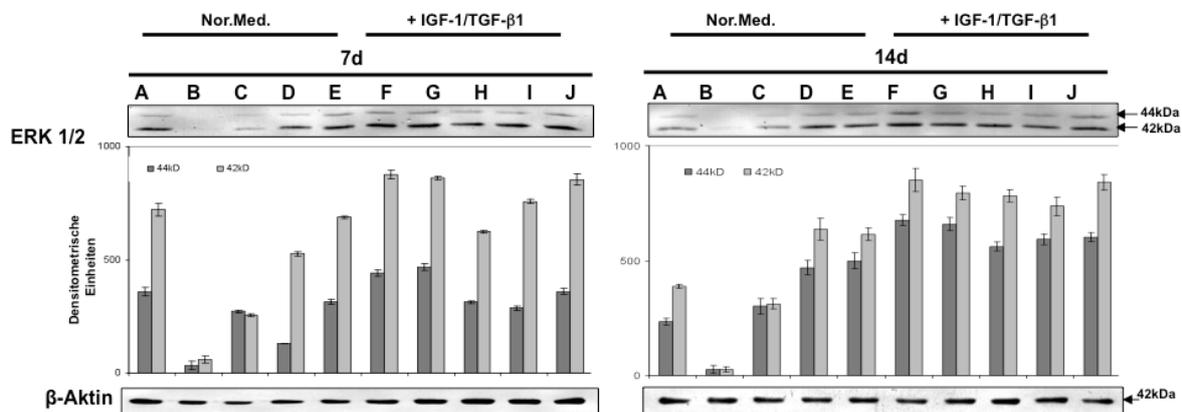


Abb. 40: Westernblot Analyse von ERK 1/2 in Ko-Kulturen caniner MSZ/Tenozyten in HD-Kultur nach 7 und 14 Tagen Kultivierung. (A/F) 100% Tenozyten; (B/G) 100% MSZ; (C/H) 90/10; (D/I) 70/30; (E/J) 50/50; (F-J) kultiviert mit je 5ng/ml IGF-1/TGF-β1.

Nach 14 Tagen blieb diese jedoch aus und alle behandelten Ko-Kulturen synthetisierten ERK 1/2 auf dem gleichen Niveau wie auch die behandelten Tenozyten und MSZ. Die ERK Synthese lag hierbei in allen mit IGF-1/TGFβ1 behandelten Kulturen auf gleichem Niveau, etwa doppelt so hoch, wie in der unbehandelten Tenozytenkontrolle (Abb. 40: F-J). Die Expression des housekeeping Proteins β-Aktin blieb unbeeinflusst.

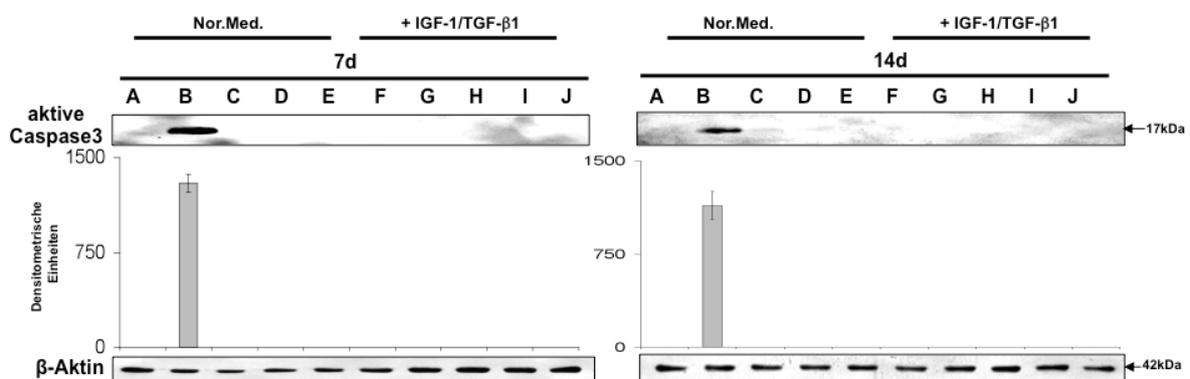


Abb. 41: Westernblot Analyse von aktiver Caspase-3 (17kDa Fragment) in Ko-Kulturen caniner MSZ/Tenozyten in HD-Kultur nach 7 und 14 Tagen Kultivierung. (A/F) 100% Tenozyten; (B/G) 100% MSZ; (C/H) 90/10; (D/I) 70/30; (E/J) 50/50; (F-J) kultiviert mit je 5ng/ml IGF-1/TGF-β1.

Um das Ausmaß möglicher Apoptose in den einzelnen Kulturen zu untersuchen wurde die Schlüssel-Caspase-3 untersucht. Aktive Caspase-3 war in den Tenozyten Kontrollen nicht nachweisbar (Abb. 41: A). Im Gegensatz dazu wurde aktive Caspase-3 in den unbehandelten MSZ-Kulturen deutlich exprimiert. In den unbehandelten MSZ lag die aktive Caspase-3 Konzentration nach 7-tägiger Kultivierung etwas höher als nach 14-tägiger Kulturdauer (Abb. 41: B). So war ein Großteil der sich in dieser Kultur befindlichen Zellen apoptotisch, während die Zellen in den übrigen Kulturen zum größten Teil vital waren oder zumindest keine Apoptosezeichen zeigten. Alle übrigen Kulturen zeigten keine aktive Caspase-3 Expression (Abb. 41: C-J).

Die Proteinexpressionsanalysen der behandelten und unbehandelten Ko-Kulturen zeigten deutlich, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen den analysierten HD-Kulturen feststellbar waren. Die Wachstumsfaktorkombination aus IGF-1/TGF β 1 hatte somit nur geringfügigen Einfluss auf Zellproliferation und Synthese der analysierten Proteine. Außerdem wurde deutlich gezeigt dass in den unbehandelten Ko-Kulturen eine Proteinsynthese erreicht wurde, die vergleichbar mit der der Tenozytenkontrolle war. Die Konzentration der analysierten Proteine korrelierte hierbei nur geringfügig mit dem Tenozytengehalt der Ko-Kulturen. So konnte für viele Proteine gezeigt werden, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Mischverhältnissen von MSZ und Tenozyten bestanden.

4.7.3. PKH Färbung Ko-Kultur aus MSZ und Tenozyten in HD-Kultur

Um die Verteilung der Tenozyten und MSZ innerhalb der HD-Ko-Kulturen zu analysieren und auszuschließen, dass insbesondere die TEM Bilder nur eine bestimmte Zellpopulation widerspiegeln, wurden die Zellen mit fluoreszierendem PKH Membranfarbstoff behandelt und anschließend in HD-Kultur gebracht. MSZ wurden mit rotem PKH Farbstoff (PKH26) behandelt, Tenozyten mit grünem PKH Farbstoff (PKH67). Der PKH Farbstoff ermöglicht es die Membran vitaler Zellen anzufärben, in Kultur zu bringen und ihre Verteilung zu verfolgen. Die HD-Kulturen wurden für 7 und 14 Tage inkubiert. Die Analyse der HD-Kulturen zeigte, dass sowohl nach 7, als auch nach 14 Tagen, beide Zelltypen gleichmäßig über die gesamte HD-Kultur verteilt vorlagen. Es war keine Anhäufung eines Zelltypes in bestimmten Regionen der Kultur feststellbar (Abb. 42).

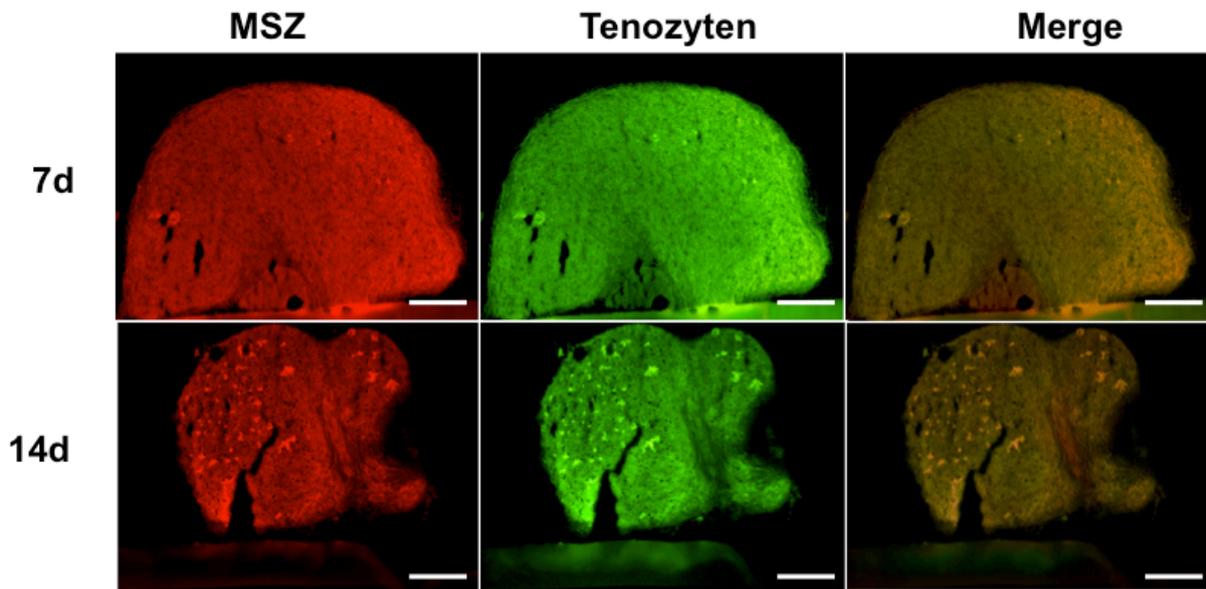


Abb. 42: HD-Kulturen mit PKH-Färbung behandelt zur Analyse der Verteilung der verschiedenen Zellpopulationen. Es zeigt sich eine gleichmäßige Verteilung beider Zelltypen über die gesamte HD-Kultur. Vergrößerung: 20x, Balken:15 μm

4.7.4. PKH Färbung Ko-Kultur aus MSZ und Tenozyten in Monolayer

Um die Effekte, die in den vorherigen Experimenten beschrieben wurden genauer zu erklären und die für Differenzierungsvorgänge äußerst wichtigen Zell-Zell Interaktionen darstellen zu können, wurden im Folgenden Ko-Kulturen aus 50%MSZ und 50% primären Tenozyten mit fluoreszierendem PKH Membranfarbstoff behandelt und im Monolayer über mehrere Tage kultiviert. MSZ wurden, wie schon im vorherigen Versuch rot (PKH26), Tenozyten grün (PKH67) markiert.

Nach 1-tägiger Kultivierung zeigen die Übersichtsaufnahmen eine gleichmäßige Verteilung der verschiedenen Zelltypen (Abb. 43: a, b). Es bildeten sich erste Zell-Zell Kontakte aus und die Zellen bildeten lange Pseudopodien um aktiv mit Zellen vom anderen Typ in Kontakt zu treten. Nach 2-tägiger Inkubation waren weiterhin aktive interzelluläre Kontakte vorhanden und die Tenozyten zeigten die für diesen Zelltyp typische Entwicklung ausgedehnter, langer Pseudopodien mit denen sie aktiv den Kontakt zu MSZ suchten (Abb. 43: c, d). Die intensiven Zell-Zell Kontakte konnten auch nach 4 Tagen in Kultur beobachtet werden (Abb. 43: e, f) und blieben bis zum Ende der Kultivierung nach 7 Tagen bestehen (Abb. 43: g, h). Außerdem konnte ein Stoffaustausch zwischen den verschiedenen Zelltypen beobachtet werden. So wurden Vesikel gebildet und aktiv ausgetauscht (Abb. 43: e, f, h). Zum

Beispiel waren rote Vesikel, die den MSZ entstammen, in grünen Tenozyten nachweisbar (Abb. 43: Insets e, f, g) und Vesikel, die Teile der Plasmamembran der grün gefärbten Tenozyten enthielten, waren in rot gefärbten MSZ zu sehen (Abb.43: Inset f).

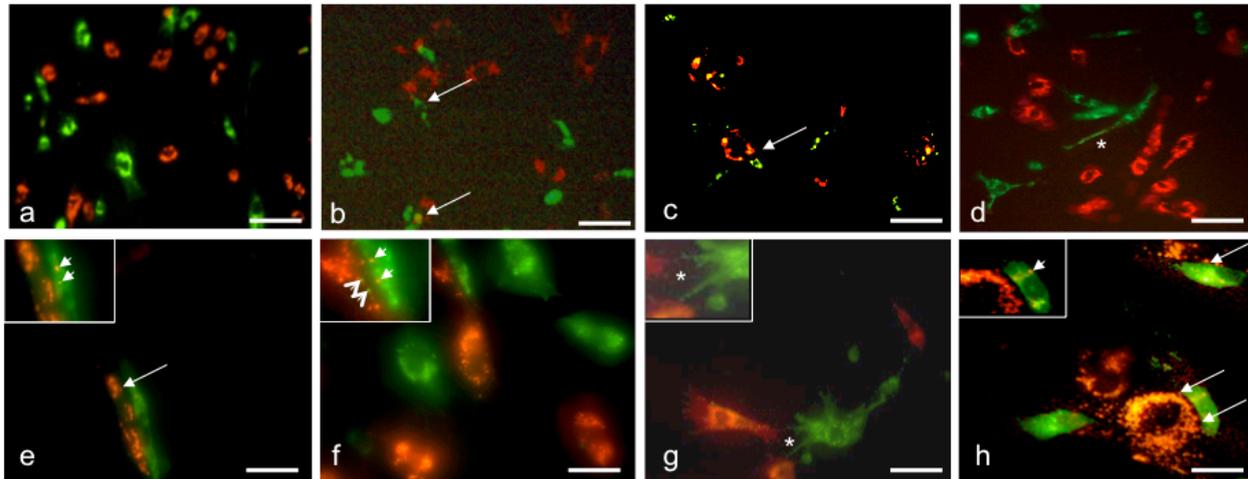


Abb. 43: Ko-Kultur aus 50% MSZ (rot) und 50% Tenozyten (grün) mit PKH-Färbung. **a** Monolayer Ko-Kultur. Nach einem bzw. zwei Tagen in Kultur konnten interzelluläre Kontakte (Pfeile) und Zell-Zell Kommunikation beobachtet werden (**b-d**). Diese verstärkten sich nach 4 Tagen (**e-f**) und blieben bis zum Ende der Inkubation (7d) erhalten (**g-h**). Die Zellen suchten aktiv den interzellulären Kontakt (*) und tauschten Vesikel aus (Insets). Rote Vesikel sind in grünen Zellen erkennbar (dicke weiße Pfeilspitzen) und grüne Vesikel in roten Zellen (dünne weiße Pfeilspitzen). Vergrößerung: a-c: 100x, Balken 60 μm ; d-h: 200x, Balken 30 μm .

4.8. Endo-/Exozytose Assay

Da die vorherigen Ergebnisse aus dem Monolayer PKH Versuch klare Hinweise auf einen aktiven interzellulären Stoffaustausch gaben, es allerdings mittels der PKH Färbemethode nicht möglich war diesen genauer zu erklären bzw. zu charakterisieren, wurde im Folgenden ein Endozytose/Exozytose Assay durchgeführt. In den mit PKH gefärbten Zellen konnten Vesikel des jeweils anderen Zelltyps festgestellt werden. Wo sich diese Vesikel genau befanden, intrazellulär, membrangebunden oder extrazellulär, konnte jedoch nicht mit Sicherheit nachgewiesen werden. Um diesbezüglich eine Aussage treffen zu können, wurden die verschiedenen Zelltypen mit goldgekoppelten Sekundärantikörpern unterschiedlicher Größe inkubiert. Tenozyten und MSZ wurden hierfür jeweils getrennt in Suspension gebracht und für 10 min. mit den entsprechenden

Antikörpern inkubiert. Tenozyten mit 5nm großen Goldpartikeln, MSZ mit 10 nm großen Goldpartikeln.

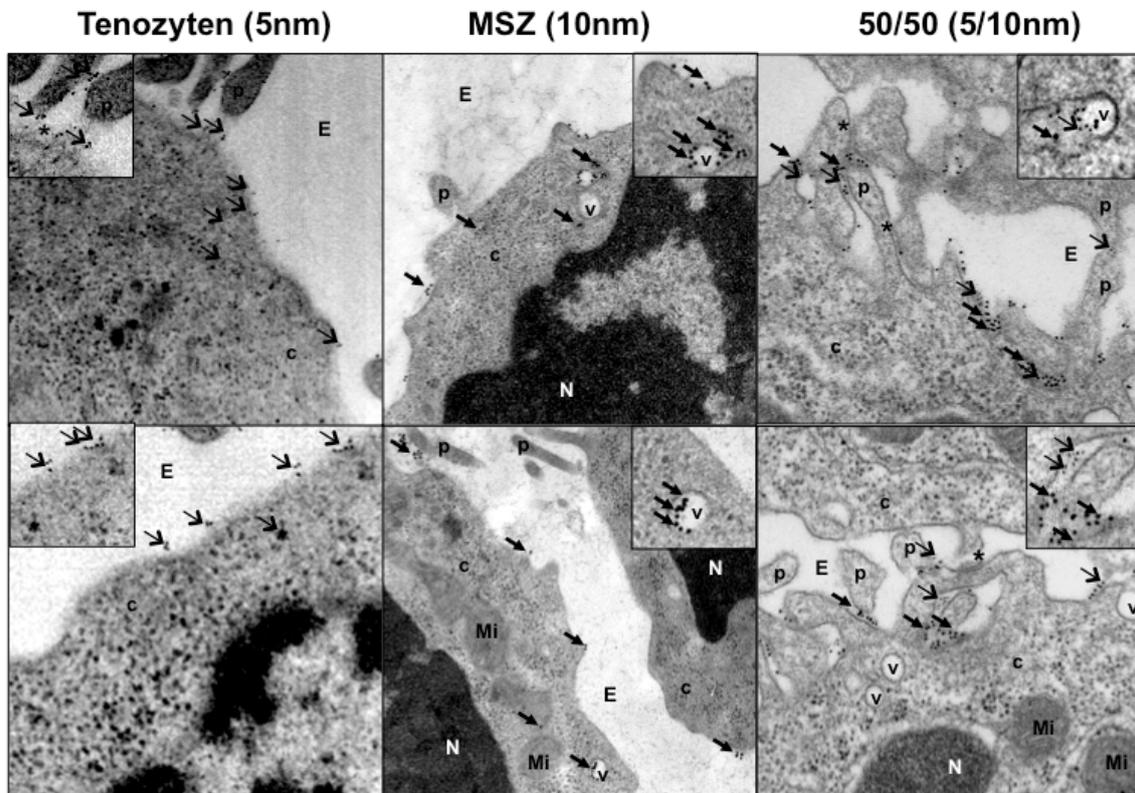


Abb. 44: Immunelektronenmikroskopische Aufnahmen von mit 5nm Goldpartikeln inkubierten primären Tenozyten (dünner Pfeil) und mit 10nm Goldpartikel inkubierten MSZ (dicker Pfeil) nach 48h Inkubation. In der Ko-Kultur aus 50% Tenozyten und 50% MSZ sind deutlich 5nm und 10nm Goldpartikel innerhalb der selben Zelle zu erkennen. Extrazellulärer Raum (E), Nukleus (N), Mitochondrien (Mi), Pseudopodien (p), Vakuolen (v), Zell-Zell Kontakte (*). Vergrößerung: 20.000x.

Die immunelektronenmikroskopische Analyse zeigte deutlich, dass die Zellen die jeweiligen Goldpartikel mittels Endozytose aufgenommen hatten (Abb. 44). So waren, sowohl im Zytoplasma der Tenozyten als auch an ihre Membran gebundene 5nm Goldpartikel zu sehen (Abb. 44: Tenozyten). Auch in den Aufnahmen der MSZ waren intrazellulär gelegene und membrangebundene 10nm Goldpartikel sichtbar (Abb. 44: MSZ). Nach mehrmaligem Spülen wurden Tenozyten und MSZ wiederum in Suspension in eine 50%/50% Ko-Kultur überführt und für weitere 48h inkubiert. Die immunelektronenmikroskopischen Bilder der Ko-Kultur zeigen deutlich Goldpartikel beider Größen (5nm und 10nm) innerhalb der jeweils abgebildeten Zellen (Abb. 44: 50/50). Der aktive Stoffaustausch, der hiermit belegt wurde,

geschah zum Teil durch die Produktion von Vesikeln, zum Teil durch direkte Endozytose- und Exozytosevorgänge. So waren, besonders an Stellen, an denen aktiver Zell-Zell Kontakt über Pseudopodien oder Membrankontakte beobachtet werden konnte, Anhäufungen verschiedener Goldpartikel zu sehen. Auch innerhalb von Aus- oder Einstülpungen der Plasmamembran lagen diese gehäuft vor.

4.9. Supernatant Versuch

Die vorangegangenen Versuche, insbesondere die PKH Ko-Kulturen und der Endozytose/Exozytose Assay zeigten, dass zwischen Tenozyten und MSZ eine intensive interzelluläre Kommunikation mit aktivem Stoffaustausch zwischen den Zellen stattfindet. Im folgenden Versuch sollte nun festgestellt werden, ob die von den Tenozyten sezernierten Stoffe alleine einen ausreichenden Stimulus darstellen um die MSZ zur Tenogenese anzuregen. Hierfür wurden HD-Kulturen aus 100% MSZ mit dem Überstand aus Tenozytenmonolayerkulturen für 7 oder 14 Tagen inkubiert. Als Positivkontrollen wurden Tenozyten und MSZ mit normalem Medium kultiviert, MSZ mit einer Kombination aus IGF-1/TGF- β 1 (je 5ng/ml) oder HD-Ko-Kulturen aus 50% Tenozyten und 50% MSZ. Die HD-Kulturen wurden mittels TEM, Immunelektronenmikroskopie und SDS-PAGE ausgewertet.

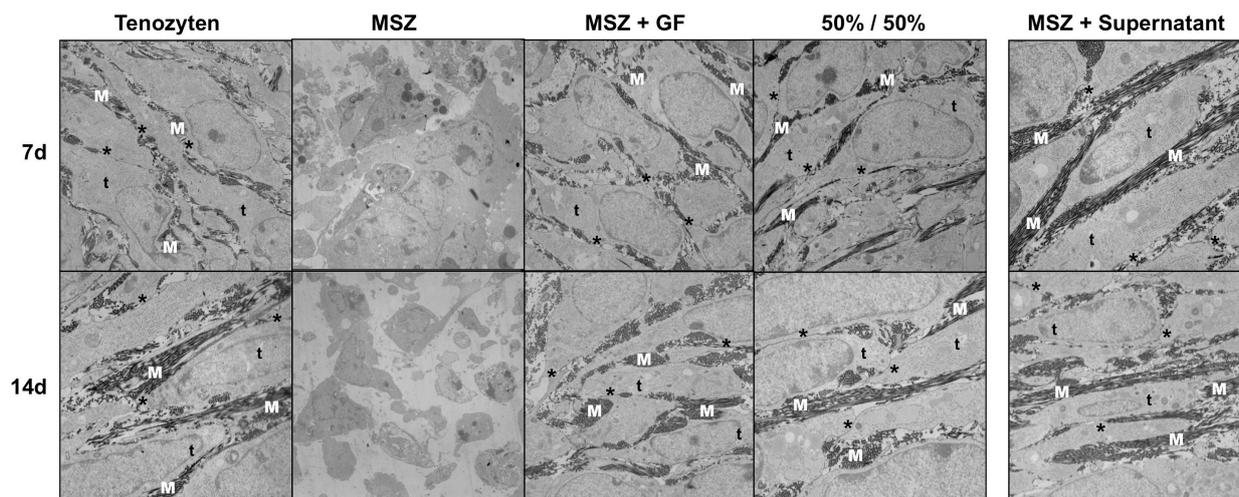


Abb.45: Elektronenmikroskopische Analyse caniner MSZ/Tenozyten in HD-Kultur und Ko-Kultur nach 7 und 14 Tagen. Überstand von Monolayer Sehnenzellkulturen führt bei MSZ HD-Kulturen zu tenogener Matrixproduktion. Strukturierte EZM Produktion (M) der Tenozyten (t) und enge Zell-Zell Kontakte (*) sind (außer 100% MSZ) in allen Kulturen erkennbar. Vergrößerung: 2.000x.

In der Kontrolle aus 100% Tenozyten war nach 7 und 14 Tagen ein geschlossener Zellverband aus vitalen Zellen nachweisbar. Die Zellen zeigten eine typische Tenozytenmorphologie mit lang gezogenen Zellkörpern und ausgeprägte, spindelförmige Pseudopodien. Es waren zahlreiche interzelluläre Kontakte zu erkennen und die Zellen produzierten eine hochstrukturierte EZM (Abb. 45). Die 100% MSZ Kontrolle zeigte einzelne Zellen die deutliche Apoptosezeichen aufwiesen. So waren nach 7 und 14 Tagen, keine interzellulären Kontakte und kein geschlossener Zellverband erkennbar (Abb. 45). In den mit den Wachstumsfaktoren IGF-1/TGF- β 1 behandelten MSZ HD-Kulturen und der Ko-Kultur aus MSZ und Tenozyten im Verhältnis 50:50 war, wie auch unter 4.6 bzw. 4.7 beschrieben, ein der 100% Tenozytenkultur sehr ähnliches Bild zu erkennen. Sowohl nach 7, als auch nach 14 Tagen, waren vitale Zellen die enge Zell-Zell Kontakte ausgebildet hatten und eine gut organisierte EZM produzierten nachweisbar (Abb. 45). In den HD-Kulturen, die mit dem Überstand aus im Monolayer kultivierten Tenozyten inkubiert wurden, war deutliche Matrixproduktion nachweisbar. Weiterhin waren die Zellen spindelförmig mit langen Zellfortsätzen und bildeten einen zusammenhängenden Zellverband. Die Zellen waren sehr stoffwechselaktiv und verfügten über einen ausgeprägten Proteinsyntheseapparat bestehend aus großen Mengen rER, zahlreichen Mitochondrien und prominenten, euchromatinreichen Nuklei. Die Supernatant Kultur ähnelte somit deutlich der 100% Tenozytenkultur. Dieses Bild zeigte sich sowohl nach 7-tägiger, als auch nach 14-tägiger Kultivierung (Abb. 45).

Um die neu gebildete EZM genauer zu klassifizieren und auf ultrastruktureller Ebene sehnentypische Matrixkomponenten wie Kollagen Typ I und den Sehnenmarker Tenomodulin nachzuweisen, wurden die HD-Kulturen im Folgenden immunmarkiert und mittels TEM ausgewertet. Hierfür wurden die Kulturen nach 14-tägiger Inkubation ausgewertet. Auf eine Immunmarkierung für die entsprechenden Proteine in der Negativkontrolle aus 100% unbehandelten MSZ wurde verzichtet, da hier keine Expression von EZM Molekülen zu erwarten war. Sowohl Kollagen Typ I als auch Tenomodulin, ließen sich in den Kontrollen aus 100% Tenozyten, mit IGF-1/TGF- β 1 behandelten MSZ und der 50:50 Ko-Kultur jeweils deutlich nachweisen. Die Kollagen Typ I Moleküle lagen dabei gleichmäßig auf den Kollagenfibrillen verteilt vor. Die Tenomodulin Moleküle dagegen haufenweise zwischen den Kollagenfibrillen gebündelt (Abb.46). Einzelne Goldpartikel die an Epitope auf den

jeweiligen Proteinen gebunden hatten, waren in höheren Vergrößerungen deutlich erkennbar (Abb. 46: Insets).

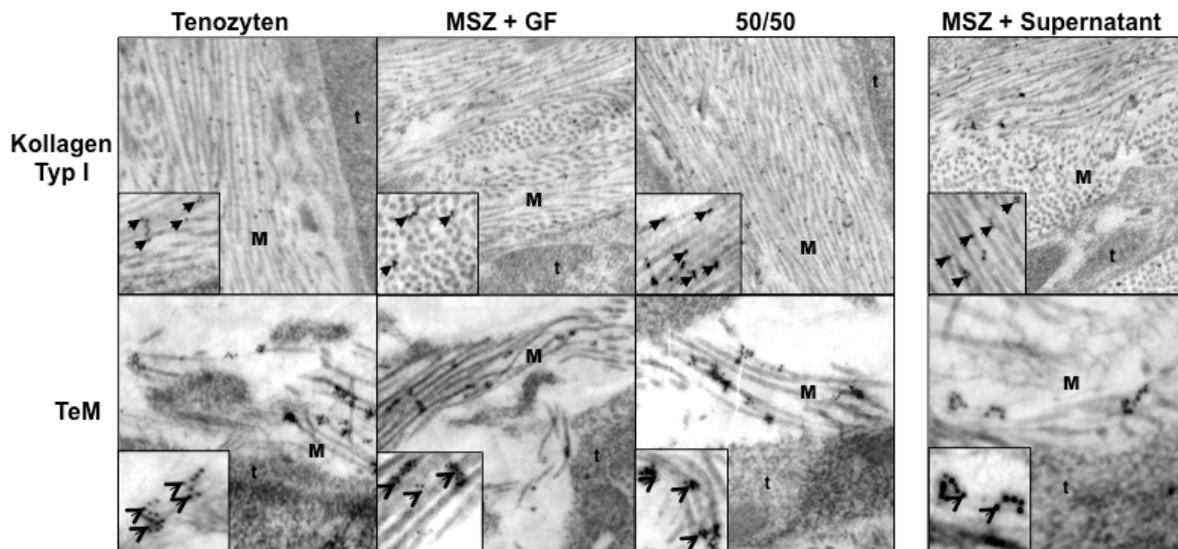


Abb. 46: Immunelektronenmikroskopische Analyse caniner MSZ/Tenozyten in HD-Kultur und Ko-Kultur nach 14 Tagen. Strukturierte EZM Produktion (M) der Tenozyten (t) und enge Zell-Zell Kontakte (*) sind in allen Kulturen erkennbar. Insets: Immunelektronenmikroskopische Aufnahmen von immunmarkiertem Kollagen Typ I (a) (dicker Pfeil) und Tenomodulin (b) (dünner Pfeil). Vergrößerung: 15.000x.

In den MSZ, die mit dem Überstand aus im Monolayer gezüchteten Tenozyten behandelt wurden, war in der immunelektronenmikroskopischen Analyse ebenfalls eine deutliche Markierung für Kollagen Typ I und für Tenomodulin nachweisbar. Auch hier waren die mit Goldpartikeln markierten Kollagen Typ I Moleküle zahlreich und lagen gleichmäßig auf den Kollagenfibrillen vor. Die Tenomodulin Moleküle hingegen ließen sich wie in den Kontrollen, clusterförmig innerhalb der Matrix nachweisen (Abb. 46).

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass Tenozyten lösliche Stoffe/Faktoren ins Medium sezernieren, welche bei den MSZ in HD-Kultur Tenogenese induzieren können.

5. DISKUSSION

Mehr als 30 Millionen Sehnen- und Ligamentverletzungen werden jährlich weltweit gemeldet (Maffulli et al., 2003). Sie sind damit sehr häufig und stellen die Medizin vor große therapeutische Herausforderungen. Da es sich bei Sehnen um bradytrophes, schlecht durchblutetes Gewebe handelt, sind die intrinsischen Regenerationsfähigkeiten begrenzt. Daher können auch schon wiederholte Überbeanspruchung und wiederkehrende kleinere, klinisch unauffällige Verletzungen zu bleibenden Schäden im Sehngewebe führen. Kommt es in der Folge zu einer höhergradigen Überdehnung, kann das vorgeschädigte Gewebe komplett reißen.

Die Therapiemöglichkeiten sind begrenzt. Klinisch relevant und praktikabel sind heute die Sehnennaht, die Sehnenverlagerung und Sehmentransplantate wie Autografts, Xenografts und synthetische Prothesen (Jackson et al., 1992; Olson et al., 1988; Sabiston et al., 1990). Diese Methoden haben jedoch nur eingeschränkte Therapieerfolge nachzuweisen (Goh et al., 2003). Dies ist hauptsächlich durch die Bildung von fibrösem Narbengewebe während der Heilung bedingt, welches dem nativen Sehngewebe funktionell und qualitativ unterlegen ist (Favata et al., 2006). Neben den augenscheinlichen Vorteilen des ‚Goldstandards‘ Autograft Therapie, wie geringen immunologischen Komplikationen und schneller Integration in den Gewebsverband, hat ihre Verwendung auch einige Nachteile. Dazu gehören die längere Operationsdauer durch den zusätzlichen Zeitbedarf zur Gewinnung des Grafts, der Funktionsverlust an der Entnahmestelle des Sehmentransplantates und die begrenzte Verfügbarkeit von verwendbarem Gewebe. Außerdem wurde schon früh gezeigt, dass sich auch im Vergleich zur natürlichen Heilung, das durch Autograft-Therapie gebildete Neotendon von dem ursprünglichen, unverletzten Gewebe in seinen mechanischen und morphologischen Eigenschaften stark unterscheidet (Salamon et al., 1970).

Bei der Verwendung von Allografts, stehen Probleme wie immunologische Reaktionen, Krankheitsübertragungen und nicht zuletzt die mangelnde Spenderverfügbarkeit im Vordergrund (Getgood and Bollen, 2010). Prothesen und Scaffolds aus verschiedensten, biologisch abbaubaren und nicht abbaubaren Materialien wie Polyester, Polyethylen, Teflon, Gore-tex und zahlreiche Andere zum Sehnersatz haben ebenfalls zu keinem Zeitpunkt befriedigende Outcomes geliefert (Chen et al., 2009; Gonzalez, 1959; Goodship et al., 1980; Grau, 1958). Die Ursache für die beschriebenen Probleme besteht hauptsächlich in einer

insuffizienten, unstrukturierten und schlecht integrierten EZM die während des Regenerationsprozesses gebildet wird (Reddy et al., 1999; Sharma and Maffulli, 2005b). Ursache hierfür ist wiederum ein fehlerhaftes, unzureichendes Matrix Remodelling, welches in der letzten Phase des Heilungsprozesses stattfindet (Sharma and Maffulli, 2005a).

Tendon Tissue Engineering ist ein vielversprechender neuer Ansatz, der die Möglichkeit bietet die Gewebsheilung im Vergleich zu den oben beschriebenen, klassischen Methoden qualitativ zu verbessern und zu beschleunigen und dadurch weniger Komplikationen und Funktionseinschränkungen zu verursachen. Ziel der interdisziplinären Ansätze des Tissue Engineering (TE) ist es hierbei im Gegensatz zum Austausch oder Ersatz der Sehne, eine vollständige Regeneration, also Restitutio ad integrum, zu erreichen. Die Hauptkomponenten die im TE zum Einsatz kommen, sind die entsprechenden Zellen, Biomaterialien oder Scaffolds, welche an der Stelle des Defekts eingebracht und integriert werden, und Zytokine oder sonstige Biomoleküle, welche die jeweils gewünschten biologischen Effekte vermitteln (Yin et al., 2010).

Vor diesem Hintergrund war es daher Ziel der vorliegenden Arbeit Zellen und Wachstumsfaktoren zu identifizieren und zu charakterisieren, die sich für neue, erfolgsversprechende Ansätze im Tissue Engineering nutzen lassen.

5.1. Kultivierung und Differenzierung der MSZ

Ein Zelltyp mit dem im Tissue Engineering intensiv gearbeitet wird, sind die MSZ. Für die vorliegende Arbeit wurden MSZ aus dem Fettgewebe von Hunden isoliert und mittels Immunfluoreszenzmikroskopie und Behandlung mit verschiedenen Differenzierungsmedien charakterisiert.

Im ersten Schritt der Charakterisierung konnte gezeigt werden, dass die isolierten Zellen MSZ Marker CD 105⁺ und CD 90⁺ exprimierten, während die haematopoetischen Stammzellmarker CD 45⁻ und CD 34⁻ negativ waren. Dies ist eine der Voraussetzungen, die erfüllt sein müssen um sicherzustellen, dass es sich tatsächlich um MSZ handelt (Csaki et al., 2007; Dominici et al., 2006; Mageed et al., 2007; Mareddy et al., 2007). Ein weiteres essentielles Merkmal ist die Fähigkeit der MSZ sich unter adäquaten Kulturbedingungen zu verschiedenen Zelllinien differenzieren zu lassen (Dominici et al., 2006; Pittenger et al., 1999). In dieser Arbeit wurde die Differenzierung zu Adipozyten, Osteoblasten und Chondrozyten

jeweils mittels, Lichtmikroskopie, TEM und Immunelektronenmikroskopie nachgewiesen.

Es konnte hierbei gezeigt werden, dass mit adipogenem Induktionsmedium behandelte, aus caninem Fettgewebe isolierte MSZ, charakteristische Eigenschaften von Adipozyten entwickelten. So konnten mikroskopisch mittels Oil Red O Färbung Lipideinlagerungen innerhalb der Zellen dargestellt werden, die dann im TEM eindeutig bestätigt wurden. Außerdem konnten Mitochondrien vom Lamina cristae Typ und eine strukturierte, fein fibrilläre EZM nachgewiesen werden. Mittels Immunogoldmarkierung konnte des Weiteren auch das adipozyten-spezifische Protein Adiponectin nachgewiesen werden (D'Andrea et al., 2008). Diese Ergebnisse verifizieren eindeutig, dass sich die MSZ unter den verwendeten Kulturbedingungen zu Adipozyten differenziert hatten.

Die osteogene Differenzierung wurde lichtmikroskopisch mit von Kossa Färbung nachgewiesen. Es ließen sich hierbei mineralisierte Knötchen in den differenzierten Osteoblasten darstellen. Die TEM Analyse der Ultrastruktur zeigte rundliche Zellen mit zahlreichen Organellen, die eine aus dickeren Fibrillen bestehende, hochstrukturierte EZM synthetisierten. Eine weitere Bestätigung für stattgefundene Osteogenese gab die Immunmarkierung des Proteins Osteocalzin, welches mittels IEM nachgewiesen wurde und das ein Osteoblasten-spezifischer Marker ist (Ducy, 2000; Ducy et al., 2000).

Chondrogenese wurde im ersten Schritt durch Alcianblau Färbung des ‚cartilage specific proteoglycans‘ (CSPG) in den mit chondrogenem Induktionsmedium behandelten MSZ HD-Kulturen nachgewiesen. Ultrastrukturell konnte gezeigt werden, dass der Zellphänotyp rundlicher wurde und sich Knorpelknötchen gebildet hatten. Die neu differenzierten Chondrozyten zeigten hohe Euchromatin Anteile im Nukleus und eine Anhäufung verschiedener Zellorganellen, was als Hinweis auf äußerst aktive Proteinsynthese gilt. Diese gesteigerte Syntheseleistung der Zellen spiegelte sich in der Produktion einer aus feinen, dünnen Fibrillen bestehenden EZM ab, in welche die Zellen eingebettet waren. Die Knorpelknötchen waren außerdem von einer Schicht flacherer, fibroblasten-artiger Zellen umgeben, die innerhalb einer aus dickeren Fibrillen bestehenden EZM lagen. Diese Strukturen entsprechen dem Perichondrium wie es *in vivo* zu finden ist. Immunelektronenmikroskopisch ließ sich des weiteren CSPG innerhalb der Matrix nachweisen, was ein weiterer Hinweis auf stattgefundene Chondrogenese war (Boatright and Salvesen, 2003).

5.2. Kultivierung der Tenozyten in Monolayer- und HD-Kultur

Die für diese Arbeit verwendeten primären Tenozyten wurden zunächst eingehend charakterisiert um zu gewährleisten, dass es sich bei den für die Versuche verwendeten Zellen um vitale, die typischen Merkmale aufweisende Tenozyten handelt. Des Weiteren war eine eingehende Charakterisierung wichtig um sicherzustellen, dass es sich bei den isolierten Zellen tatsächlich um Tenozyten handelt und um valide Kontrollen zu erhalten.

Mittels Immunfluoreszenz konnten in den primären Tenozyten Kollagen Typ I und III, die mit Abstand häufigsten Kollagene im Sehngewebe, nachgewiesen werden (Calve et al., 2004). Des Weiteren waren alle Zellen positiv für β 1-Integrin und Tenomodulin, zwei weitere wichtige Sehnenmarker (Docheva et al., 2005; Shukunami et al., 2005). Die TEM Analyse von HD-Kulturen aus primären Tenozyten zeigte, dass die Zellen in diesem Kulturmodell einen geschlossenen Zellverband ausbildeten und Matrix in den interzellulären Raum sezerniert wurde. Außerdem waren ausgeprägte interzelluläre Kontakte erkennbar, die teils punktuell, teils großflächig angelegt waren.

Ein hoher Euchromatingehalt im Nukleus ist Hinweis auf einen gesteigerten Zellmetabolismus (Schulze-Tanzil et al., 2004a). Die Zellkerne unserer Kulturen zeigten einen auffallend hohen Anteil von Euchromatin, was Hinweis auf gesteigerte Proteinsyntheseleistungen in den analysierten HD-Kulturen war. Immunelektronenmikroskopisch ließen sich auch die Proteine Kollagen Typ I und Tenomodulin nachweisen. Diese Proteine werden ebenfalls von vielen wissenschaftlichen Arbeitsgruppen als Sehnenmarker verwendet (Docheva et al., 2005; Schulze-Tanzil et al., 2004a; Shukunami et al., 2005). Die Westernblotanalyse der entsprechenden HD-Kulturen zeigte über den gesamten Kultivierungszeitraum eine deutliche Synthese von Kollagen Typ I und III sowie Laminin, Tenomodulin, β 1-Integrin und den Signalmolekülen ERK1/2 und das Adaptorprotein Shc. Es ist bekannt, dass der MAPKinase pathway die zelluläre Proliferation und Differenzierung verschiedener Zelltypen beeinflusst (Chiquet, 1999; Shakibaei and Merker, 1999; Shakibaei et al., 2001; Shakibaei and Stahlmann, 2001). Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Aktivierung des MAPKinase pathways auch im Sehngewebe einen entscheidenden Einfluss auf Vitalität und Proliferationsfähigkeit der Zellen zu haben scheint. Die Westernblots der

analysierten Proteine zeigten eine gewisse Synthesesteigerung nach 7 und 14 Tagen. Dies ist auf die Zellproliferation innerhalb der Kulturen und somit die steigende Matrixproduktion zurückzuführen.

5.3. Auswirkung verschiedener Wachstumsfaktoren auf die Tenogenese

5.3.1. In Tenozyten (HD-Kulturen)

Im folgenden Teil der Arbeit sollte analysiert werden, ob durch die Behandlung mit verschiedenen Wachstumsfaktoren die Tenogenese beeinflusst werden kann und welche Auswirkungen diese Behandlung auf Proteinexpression und Qualität des entstehenden Zellverbandes hatte.

Die Wachstumsfaktoren IGF-1, TGF- β 1, IGF-1/TGF- β 1 in Kombination, PDGF-bb und BMP-12 wurden ausgewählt, weil für sie jeweils positive Einflüsse auf Proliferation, Funktion und Differenzierung im Sehngewebe beschrieben wurden (Abrahamsson and Lohmander, 1996; Costa et al., 2006; Dahlgren et al., 2005; Fiedler et al., 2004; Klein et al., 2002; Tsuzaki et al., 2000; Wang et al., 2005; Wolfman et al., 1997).

Bei der Behandlung von Tenozyten in HD-Kultur mit diesen Wachstumsfaktoren ließen sich bei der Proteinexpression jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den unbehandelten Tenozyten und den behandelten Tenozyten nachweisen. Die Proteinexpression von Decorin, Tenomodulin, β 1-Integrin sowie ERK1/2 und das Adaptorprotein Shc in den nativen Sehnenkulturen entsprach weitestgehend der der mit Wachstumsfaktoren behandelten Kulturen. Die Expression von Kollagen Typ I war sowohl in den behandelten als auch in den unbehandelten Tenozyten nach 14 Tagen deutlich höher als nach 7 Tagen. Für Kollagen Typ III traf das Gegenteil zu, wobei die Konzentration nach 14 Tagen in Kultur wieder leicht unter dem Niveau der für 7 Tage kultivierten Kulturen lag. Dies entspricht dem normalen Expressionsmuster in kultiviertem Tendon, wobei in frühen Stadien der Proliferation mehr Kollagen Typ III produziert wird und im Verlauf die Kollagen Typ I Produktion zunimmt, während die Kollagen Typ III Synthese gleichzeitig herunter reguliert wird (Liu et al., 1995). In den mit der Kombination aus IGF-1/TGF- β 1 behandelten HD-Kulturen, konnte eine verstärkte Expression der Matrixmoleküle Kollagen Typ I und III und von β 1-Integrin beobachtet werden. Dies ist darauf zurückzuführen, dass beide Wachstumsfaktoren die EZM Produktion positiv beeinflussen (Abrahamsson, 1991; Abrahamsson and Lohmander, 1996;

Kashiwagi et al., 2004). Für die anderen analysierten Proteine konnte dieser Effekt nicht nachgewiesen werden. Durch die Westernblotanalyse konnten wir zeigen, dass durch Behandlung der Tenozyten mit Wachstumsfaktoren keine signifikanten Verbesserungen der Tenogenese auf Proteinebene bewirkt werden konnte. Lediglich eine leichte Zunahme der Matrixproduktion in mit IGF-1 und TGF- β 1 behandelten Kulturen konnte belegt werden. Obwohl die Wachstumsfaktoren keinen entscheidenden Einfluss auf die Tenogenese per se zu haben scheinen, konnte durch die vorliegenden Ergebnisse doch gezeigt werden, dass das ‚Microenvironment‘ des verwendeten Kulturmodells durchaus die Voraussetzungen bietet um Tenogenese zu ermöglichen und zu fördern. So ist bekannt, dass dreidimensionale Kultursysteme sich stabilisierend auf den Phänotyp von Tenozyten auswirken und intensivere Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktionen ermöglichen als Monolayerkulturen (Schulze-Tanzil et al., 2004a). Auch für Chondrozyten sind ähnliche Effekte beschrieben (Shakibaei et al., 1993). Das verwendete Kulturmodell spiegelt also die *in vivo* Bedingungen deutlich besser wieder als Monolayerkulturen und kann somit die Differenzierung und Proliferation der Zellen fördern.

5.3.2. In MSZ (HD-Kulturen)

Wie oben mehrfach erläutert, besitzen MSZ die Kapazität sich zu mehreren Zelllinien differenzieren zu lassen (Csaki et al., 2007; Pittenger et al., 1999). Dies geschieht über genauestens definierte Induktionsmedien, die oft einen Cocktail von verschiedenen Wachstumsfaktoren und anderen anabolen Biomolekülen beinhalten (Pittenger et al., 1999). Für die Differenzierung von MSZ zu Tenozyten allerdings ist in der Literatur kein solches Induktionsmedium beschrieben (Pittenger et al., 2002). Es existieren lediglich einzelne Berichte über gewisse positiv proliferative Effekte, die über die Wachstumsfaktoren IGF-1, TGF- β 1, PDGF-bb und BMP-12 auf MSZ vermittelt werden (Fiedler et al., 2004; James et al., 2008; Lou et al., 1999; Schnabel et al., 2009; Violini et al., 2009; Wang et al., 2005). In dieser Arbeit wurde der Effekt dieser Wachstumsfaktoren auf die Ultrastruktur und die Proteinexpression caniner MSZ analysiert.

Die TEM Aufnahmen der mit je 10ng/ml IGF-1, TGF- β 1, PDGF-bb, BMP-12 oder einer Kombination aus IGF-1/TGF- β 1 (je 5ng/ml) behandelten MSZ Kulturen, zeigten eine ungeordnete Proliferation und teils apoptotische, teils fibroblastenartige Zellen die eine höchst unstrukturierte Matrix produzierten. Diese Ergebnisse stehen im

Einklang mit Berichten von gesteigerter Matrixproduktion in MSZ durch die verwendeten Wachstumsfaktoren, die jedoch nicht ultrastrukturell analysiert wurden (Schnabel et al., 2009; Violini et al., 2009; Wang et al., 2005). Im Gegensatz hierzu, konnten wir nachweisen, dass in den mit einer Kombination aus IGF-1 und TGF- β 1 behandelten MSZ ein morphologisches Bild zu sehen war, welches sehr der Kontrolle aus 100% Tenozyten ähnelte. Hinter diesen Ergebnissen vermuten wir synergistische Effekte, die erst durch die Kombination der beiden Wachstumsfaktoren ihre Wirkung entfalten können. Als Ursache für diese beobachteten additiven Effekte von IGF-1 und TGF- β 1 kommen mehrere Erklärungen in Frage. So ist beispielsweise bekannt, dass TGF- β 1 die Expression von IGF-1 Rezeptoren fördert (Tsukazaki et al., 1994). Außerdem könnte die Kombination zweier Wachstumsfaktoren Signalkaskaden aktivieren, welche durch den alleinigen Einsatz eines Wachstumsfaktors nicht aktiviert werden würden, was wiederum ursächlich für additive Effekte auf Zelldifferenzierung und Proliferation sein könnte (Yaeger et al., 1997).

Die mit BMP-12 behandelten MSZ zeigten nach 7-tägiger Inkubation ein sehr ähnliches Bild wie die übrigen mit einfachen Wachstumsfaktoren behandelten Kulturen. Interessanter Weise konnten wir nach 14 Tagen jedoch eine Morphologie darstellen, die wiederum sehr an die unbehandelte Tenozytenkontrolle erinnerte. In der Tat konnten auch Violini und Kollegen zeigen, dass BMP-12, zumindest in MSZ aus dem Pferd, ein tenogenes Potential besitzt (Violini et al., 2009). Die vorliegenden Ergebnisse belegen, dass BMP-12 auch in unserem Kulturmodell gewisse tenogene Effekte auf canine MSZ zu haben scheint. Möglicher Weise wird aber eine längere Inkubationszeit benötigt um dieses Potential auszuschöpfen. Die TEM Analyse der HD-Kulturen verifizierte, dass sich durch den Einsatz von Wachstumsfaktoren in allen behandelten Kulturen, ein gewisses Maß an Zellproliferation induzieren ließ. Diese war zumeist jedoch ungeordnet und unspezifisch, was wiederum durch die Spezifität der verschiedenen Wachstumsfaktoren begründet scheint.

Bei der Behandlung der MSZ in HD-Kultur mit den Wachstumsfaktoren IGF-1, TGF- β 1, PDGF-bb und BMP-12 zeigte sich auf Proteinebene, dass in den Kulturen in denen schon die TEM Analyse eine unorganisierte Matrixproduktion und Zeichen des Zelluntergangs offenbarte, viele Proteine gar nicht oder nur in verschwindend geringen Konzentrationen exprimiert wurden. In den mit IGF-1/TGF- β 1 behandelten

MSZ wurden außerdem alle anderen analysierten Proteine im Vergleich zu den mit anderen Wachstumsfaktoren behandelten Kulturen, am stärksten exprimiert.

Ein wichtiger Marker für apoptotische Zellen ist aktive Caspase-3 (Sendzik et al., 2005). Die Expression von aktiver Caspase-3 gab auch in dieser Arbeit weitere wichtige Hinweise für die Interpretation der TEM Ergebnisse. So konnten wir interessanterweise hohe Konzentrationen von aktiver Caspase-3 in genau den Kulturen nachgewiesen, die auf ultrastruktureller Ebene durch ungeordnete Matrixproduktion und teils apoptotische Zellen auffielen. Somit konnten wir sowohl ultrastrukturell als auch auf Proteinebene bestätigen, dass in den entsprechenden Kulturen Apoptose stattgefunden hat. Interessanter Weise boten die mit PDGF-bb und BMP-12 behandelten Kulturen ein gänzlich anderes Bild. Hier war eine aktive Caspase-3 Synthese erst nach 14 Tagen nachweisbar. Ursächlich hierfür könnte eine nach 7 Tagen zwar noch ungeordnet erscheinende, aber dennoch keine Apoptose auslösende Zellproliferation sein, während der erst nach 14-tägiger Inkubation pro-apoptotische Signalkaskaden in Gang gesetzt wurden. Somit sind diese Ergebnisse hinsichtlich der Qualität der beobachteten Tenogenese von entscheidender Bedeutung. Sie belegen, dass lediglich in den mit IGF-1/TGF- β 1 behandelten MSZ die Qualität der elektronenmikroskopisch nachgewiesenen Tenogenese ausreichend war um keine Apoptose zu induzieren und ein der 100% Tenozytenkontrolle qualitative ähnliches Niveau zu erreichen. Ein weiterer wichtiger Hinweis auf Tenogenese konnte durch den Nachweis von Tenomodulin in den mit IGF-1/TGF- β 1 behandelten Kulturen erbracht werden (Shukunami et al., 2005). Die Tenomodulin Expression lag hier nach 14 Tagen in Kultur fast auf dem Niveau der Positivkontrollen.

5.3.3. Diskrepanz zwischen Proteinexpression und Ultrastruktur

Die unterschiedlichen Einflüsse der verschiedenen Wachstumsfaktoren lassen sich durch ihre Spezifität erklären. So zeigte sich, dass die Wachstumsfaktoren IGF-1 und TGF- β 1 für sich alleine keine Effekte auf die behandelten Zellen hatten bzw. nicht in der Lage waren eine gezielte Differenzierung zu vermitteln. Ihre Kombination jedoch, zeigte deutliche Anzeichen für verstärkte Matrixproduktion und elektronenmikroskopisch ein, der 100% Tenozytenkultur sehr ähnliches morphologisches Erscheinungsbild.

Gleiches traf für die über 14 Tage mit BMP-12 behandelten MSZ zu. Erst die Proteinanalyse von aktiver Caspase-3 ließ Aussagen über die Qualität der im TEM dargestellten Tenogenese in diesen beiden Kulturen zu, die sich morphologisch nicht hätten differenzieren lassen (Sendzik et al., 2010). Eine mögliche Erklärung für die gesehenen Effekte ist die Aktivierung des MAPKinase pathways, die auf Proteinebene durch Expression der Proteine ERK1/2 und Shc in den entsprechenden Kulturen nachgewiesen werden konnte, am eindrucklichsten in den mit IGF-1/TGF- β 1 behandelten Kulturen, welche wiederum die qualitativ hochwertigste Tenogenese zeigten. Es ist bekannt dass IGF-1 die durch Shc induzierten, über den MAPKinase Signalweg vermittelten Effekte noch verstärkt (Shakibaei et al., 1999). Dies könnte einer der Gründe für die tenogenen Effekte der Wachstumsfaktorenkombination IGF-1/TGF- β 1 sein.

5.4. Effekte der Ko-Kultur auf die Tenogenese

Ein vielversprechender Ansatz die Differenzierung von Stammzellen zu einem gewünschten Zelltyp zu erreichen scheint die Ko-Kultivierung mit einer anderen Zellpopulation zu sein. Adulte Vorläuferzellen aus dem Hippocampus einer Ratte zeigten beispielsweise nach Ko-Kultivierung mit Astrozyten eine neuronentypische Morphologie (Recknor et al., 2006). Zirkulierende endotheliale Vorläuferzellen in Ko-Kultur mit neonatalen Kardiomyozyten können zu kardiomyogenen Zellen differenzieren und embryonale Stammzellen, die mit Hepatozyten ko-kultiviert wurden, zeigten ein deutlich gesteigertes chondrogenes Differenzierungspotential (Koyanagi et al., 2005a; Koyanagi et al., 2005b; Lee et al., 2008).

Auch für MSZ scheinen diese Beobachtungen zuzutreffen. So gibt es zahlreiche Berichte, dass schon die alleinige Zugabe von MSZ auf einen Sehnengewebsdefekt, die Heilung und Proliferation beschleunigt (Awad et al., 2003; Juncosa-Melvin et al., 2005; Juncosa-Melvin et al., 2006; Ouyang et al., 2004; Ouyang et al., 2003). Mehrere Berichte weisen darauf hin, dass direkter Zell-Zell Kontakt mit ausdifferenzierten Zellen entscheidend für die Differenzierung von MSZ sein könnte (Alexanian and Sieber-Blum, 2003; Ball et al., 2004; Csaki et al., 2009; Plotnikov et al., 2008; Richardson et al., 2006). So konnten Csaki et al. beispielsweise zeigen, dass die Ko-Kultur aus MSZ und primären Osteoblasten, osteogene Effekte auf die MSZ hatte und diese sich zu Osteoblasten differenzieren ließen (Csaki et al., 2009).

Hierfür war zum einen intensiver Zell-Zell Kontakt zwischen den verschiedenen Zelltypen und zum anderen der Austausch löslicher Faktoren verantwortlich.

Interessanterweise zeigten aber auch andere Arbeiten, dass direkter interzellulärer Kontakt für die entsprechende Differenzierung nicht zwingend notwendig ist (Gerstenfeld et al., 2003; Gerstenfeld et al., 2002). Luo et al. wiesen nach, dass die indirekte Ko-Kultur zwischen aus Knochenmark isolierten MSZ und Tenozyten ohne direkte Zell-Zell Kontakte die Expression von sehnentypischen Genen fördert (Luo et al., 2009). Dies wird von Luo et al. auf einen löslichen Faktor, der aber nicht genauer beschrieben wurde, zurückgeführt der von den Tenozyten ins Medium sezerniert wird und die beschriebenen Effekte vermittelt. Es ist auch bekannt, dass Osteozyten alleine durch lösliche Stoffe, die ins Medium abgegeben werden, Osteogenese in MSZ fördern können (Csaki et al., 2009; Heino et al., 2004). Shimode et al. berichteten einen umgekehrten Mechanismus (Shimode et al., 2007). Sie konnten zeigen, dass Medium in dem humane Knochenmarks MSZ kultiviert wurden, proliferationsfördernde Effekte auf Fibroblasten hatte. Auch diese Beobachtungen wurden einem löslichen Faktor zugeschrieben der in diesem Fall von den MSZ sezerniert wurde (Shimode et al., 2007). Ähnliches wurde auch von MSZ und neuronalen Stammzellen berichtet (Lou et al., 2003). Der Charakter dieser Interaktionen und die genauen Mechanismen, die ihnen zugrunde liegen, werden allerdings noch nicht vollständig verstanden und müssen eingehender untersucht werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde das tenogene Induktionspotential von primären Tenozyten auf MSZ im Monolayer und in HD-Ko-Kultur analysiert um ein besseres Verständnis der Mechanismen zu erlangen, welche der tenogenen Differenzierung von MSZ zugrunde liegen. So konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal, deutlich gezeigt werden, dass die Ko-Kultur aus MSZ und primären Tenozyten eine tenogene Differenzierung der MSZ auslöst. Dies zeigte sich sowohl auf ultrastruktureller Ebene durch eine typische Tenozytenmorphologie in den untersuchten Ko-Kulturen, als auch auf Proteinebene. In den Ko-Kulturen wurde außerdem ein Proteinexpressionsmuster nachgewiesen, welches überwiegend dem der 100% Tenozytenkulturen glich. Signifikante Unterschiede konnten weder zwischen unterschiedlichen Mischverhältnissen zwischen MSZ und primären Tenozyten, noch zwischen unbehandelten und mit IGF-1/TGF- β 1 behandelten Ko-Kulturen festgestellt

werden. Insbesondere die Expression von $\beta 1$ -Integrin spielt eine entscheidende Rolle in der Zell-Matrix Interaktion und ist essentiell für die Erhaltung des Zell Phänotyps von verschiedenen Geweben (Schulze-Tanzil et al., 2001; Shakibaei, 1995, 1998; Shakibaei et al., 1997). Außerdem ist bekannt, dass die Integrine $\alpha 2/\beta 1$ und $\alpha 1/\beta 1$ die Kollagen Typ I Synthese positiv beeinflussen (Riikonen et al., 1995; Shakibaei, 1995). Dass hohe Konzentrationen von $\beta 1$ -Integrin in allen Ko-Kulturen nachgewiesen werden konnten, beweist die aktive Zell-Zell bzw. Zell-Matrix Kommunikation, die in diesem Ko-Kulturesystem stattfindet. Die $\beta 1$ -Integrin Konzentration in den Ko-Kulturen stieg leicht mit dem Anteil der in der Ko-Kultur enthaltenen Tenozyten und war in der 50%/50% Ko-Kultur, wo sie sogar über der der Positivkontrolle lag am höchsten. Dies weist auf eine besonders intensive Interaktion der Zellen mit der neu gebildeten Matrix hin.

Ein wichtiger Signalübertragungsweg der Differenzierung und Proliferation reguliert, ist der MAPKinase pathway (Shakibaei et al., 2001). Es wurde gezeigt, dass seine Aktivierung die Proliferation von verschiedenen Zelltypen wie neuronalen Zellen, T-Zellen, Adipozyten und Muskelzellen fördert (Gredinger et al., 1998; Lowy and Willumsen, 1993). Außerdem spielt der MAPKinase pathway eine wichtige Rolle bei der Chondrogenese (Schulze-Tanzil et al., 2004b; Shakibaei et al., 2001; Shakibaei et al., 2006). Auch konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von ERK 1/2, einem upstream Molekül im MAPKinase pathway, mit osteogener Differenzierung von MSZ einher geht (Jaiswal et al., 2000).

Das Adaptorprotein Shc reguliert und moduliert die Einflüsse von Integrinen und epidermalemem Wachstumsfaktor auf den MAPKinase pathway (Wary et al., 1996). Hierbei vermitteln die beiden Shc Isoformen von 52 kDa und 44 kDa eine Aktivierung von ERK 1/2, während die 66 kDa Isoform die ERK Aktivierung antagonisiert (Smith et al., 2006). In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass ERK 1/2 und Shc in allen Ko-Kulturen im Vergleich zur unbehandelten MSZ Kontrolle heraufreguliert wurden. Die ERK 1/2 und Shc Konzentrationen stiegen jeweils mit dem Anteil an primären Tenozyten in den Ko-Kulturen und erreichten in den 50%/50% Ko-Kulturen das Niveau der Positivkontrollen bzw. übertrafen es. Hierbei war jeweils die Expression der 52 kDa Isoform von Shc, im Vergleich zu den beiden anderen Isoformen, besonders hoch. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Aktivierung des MAPKinase pathways durch Ko-Kultivierung von MSZ und primären

Tenozyten ausgelöst werden kann und dass diese die Differenzierung von MSZ zu Tenozyten fördert.

Neben dem typischen Proteinexpressionsmuster und der charakteristischen Ultrastruktur konnten in allen Ko-Kulturen durch Immunelektronenmikroskopie die Proteine Kollagen Typ I und Tenomodulin in hoher Konzentration nachgewiesen werden (Docheva et al., 2005; Schulze-Tanzil et al., 2004a; Shukunami et al., 2005). Diese Ergebnisse geben klare Hinweise darauf, dass in dem verwendeten 3D HD-Ko-Kulturmodell die Bedingungen gegeben sind, die Tenogenese ermöglichen bzw. begünstigen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Qualität der beobachteten Tenogenese in vielen Kriterien der einer 100% Tenozytenkultur entspricht. Daraus lässt sich ableiten, dass ein dreidimensionales ‚Microenvironment‘, wie das in dieser Arbeit verwendete HD-Kulturmodell, ideale Bedingungen bietet um tenogene Differenzierung von MSZ zu erreichen. Alleine die Kultivierung mit geringen Anteilen von primären Tenozyten an der Ko-Kultur (10%) scheint hierbei schon ein ausreichender Stimulus zu sein. Noch ausgeprägter war die tenogene Differenzierung in den Ko-Kulturen mit 30% bzw. 50% Tenozytenanteil. Es ist bekannt, dass die Differenzierung von MSZ zu Chondrozyten durch HD-Kultursysteme gefördert wird (Denker et al., 1999). Das verwendete HD-Kulturmodell bietet den Zellen die Möglichkeit in einem dreidimensionalen, den *in vivo* Verhältnissen ähnlichem Microenvironment zu wachsen und über ausgeprägte Kommunikation einen bestimmten Phänotyp auszubilden. So wurde ebenfalls berichtet, dass in Monolayerkultur dedifferenzierte Tenozyten, die in HD-Kultur überführt wurden, sich zumindest teilweise redifferenzieren ließen (Stoll et al., 2010). Eine wichtige Rolle bei der Differenzierungsfähigkeit der MSZ, scheint auch das Gewebe aus welchem die MSZ isoliert werden zu spielen. So wurde gezeigt, dass aus Synovium oder Fettgewebe isolierte MSZ sich besser zu Adipozyten differenzieren lassen, während aus Knochenmark oder Periostium isolierte MSZ Eigenschaften aufweisen, die eine Osteogenese begünstigen (Sakaguchi et al., 2005). Die hier gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass MSZ aus dem Fettgewebe dazu geeignet sind, sich in den verwendeten Kulturbedingungen durch Ko-Kultivierung in HD-Kultur mit primären Tenozyten zu morphologisch typischem, bestimmte tenozyten-typische Proteine exprimierendem Gewebe differenzieren zu lassen.

5.5. Zell-Zell-Interaktion (PKH-Versuche)

Im Rahmen dieser Arbeit konnte mittels PKH Membranfärbung nachgewiesen werden, dass MSZ und primäre Tenozyten im Monolayer aktiv den Zell-Zell Kontakt suchten und dadurch die Proliferation der MSZ induziert wurde. So konnten breitflächige Zell-Zell Kontakte dargestellt werden, die durch eine äußerst dynamische Pseudopodienbildung induziert und ermöglicht wurden. Außerdem war es möglich den Austausch von Vesikeln zwischen den verschiedenen Zelltypen darzustellen. Andere Monolayer Ko-Kulturstudien beschrieben ähnliche Effekte. So zeigten verschiedene Studien, dass durch die Ko-Kultur aus MSZ und Osteozyten im Monolayer eine gewisses Maß an Osteogenese erreicht werden kann (Csaki et al., 2009; Kim et al., 2003). Diese war jedoch weniger stark ausgeprägt als in den Osteoblasten Reinkulturen. Kim et al. verwendeten allerdings Zellen von verschiedenen Spezies (Ratte und Kaninchen), was inhibierende Effekte gehabt haben könnte. Außerdem entsprechen die Kulturverhältnisse einer *in vitro* Monolayer Kultur bei weitem nicht den Verhältnissen des Gewebes *in vivo*. Ein dreidimensionales HD-Kulturmodell, wie es für diese Arbeit verwendet wurde, scheint den Ansprüchen auf möglichst realistische Nachahmung der *in vivo* Bedingungen daher viel eher gerecht zu werden. Durch PKH Färbungen, die in diesem HD-Ko-Kulturmodell durchgeführt wurden, konnte deutlich nachweisen werden, dass sich die verschiedenen Zelltypen gleichmäßig homogen über die gesamte HD-Kultur verteilten und keine Häufungen bestimmter Zellen beobachtet wurden. Außerdem konnte so ausgeschlossen werden, dass einzelne Zellen abstarben und so ein fälschliches Bild entstanden wäre.

Die vorliegenden Ergebnisse im Monolayer zeigen deutliche, aktive interzelluläre Kommunikation und Stoffaustausch. Allerdings konnte mit der PKH Färbung nicht zufriedenstellend geklärt werden, wo die nachgewiesenen Vesikel des jeweils anderen Zelltypes lokalisiert waren. So könnten sie sowohl innerhalb der entsprechenden Zelle, als auch auf der Plasmamembran vorgelegen haben. Diese Limitation der PKH Methode machte einen Endozytose/Exozytose Assay im Elektronenmikroskop notwendig um die beobachteten Vorgänge auf ultrastruktureller Ebene eingehender zu analysieren.

5.6. Endo-/Exozytose Versuche

Die Endozytose/Exozytose ist eine der wichtigsten Möglichkeiten des interzellulären Informationsaustauschs (Mukherjee et al., 1997). Durch einen Endozytose/Exozytose Assay konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass zwischen primären Tenozyten und MSZ tatsächlich Stoffaustausch über das Kulturmedium, interzelluläre Kontakte und Vesikelbildung stattfindet. Die verwendeten Goldpartikel verschiedener Größe (5nm, 10nm), die innerhalb einer Zelle dargestellt werden konnten, belegen dies deutlich. Auffällig war außerdem, dass Goldpartikel gehäuft an Stellen zu finden waren, die in räumlicher Nähe zu Pseudopodien lagen oder an denen direkte Zell-Zell Kontakte beobachtet wurden. Ob ein löslicher oder fester Faktor letztendlich für die beobachteten Differenzierungsvorgänge verantwortlich ist, konnte durch den geschilderten Versuchsaufbau nicht abschließend geklärt werden. Deshalb wurden als abschließender Versuch MSZ mit dem Überstand von Tenozyten behandelt.

5.7. Supernatant Versuch

Den letzten Beweis dafür, dass die MSZ in HD-Kultur von den primären Tenozyten durch einen löslichen Faktor zur tenogenen Differenzierung stimuliert wurden, konnten durch einen Supernatant Versuch erbracht werden. Die alleine mit dem Überstand von im Monolayer gezüchteten primären Tenozyten behandelten MSZ wiesen sowohl in der Ultrastruktur als auch in der Proteinexpression deutliche Ähnlichkeit zur Tenozyten Reinkultur auf. Außerdem konnten immunelektronenmikroskopisch die Proteine Kollagen Typ I und Tenomodulin in hohen Konzentrationen in den mit Tenozytenüberstand behandelten Kulturen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse beweisen, dass die beobachtete tenogene Differenzierung von MSZ, zumindest zu großen Teilen, über einen löslichen Faktor vermittelt wird. Ähnliche Ergebnisse konnten für mit dem Supernatant von Osteozyten kultivierten MSZ nachgewiesen werden (Csaki et al., 2009). Fan et al. führten einen indirekten Ko-Kultur Versuch mit MSZ und Fibroblasten aus dem anterioren Kreuzband durch und konnten ebenfalls die verstärkte Expression der sehmentypischen Proteine Kollagen Typ I und III sowie Tenascin-C nachweisen (Fan et al., 2008). Allerdings wurden hierbei weder die sehmentypischen Proteine TeM und Scleraxis, noch die Ultrastruktur der gezüchteten Zellen analysiert (Fan et al., 2008). Wie die Ergebnisse dieser Studie zeigten, ist jedoch gerade der direkte

Vergleich zwischen Ultrastruktur und Proteinexpression von entscheidender Bedeutung für die Validierung der Differenzierungsvorgänge, da die Berücksichtigung nur einer dieser Komponenten zu falschen Schlussfolgerungen führen könnte. Eine weitere indirekte Ko-Kultur Studie von Luo und Kollegen zeigte ebenfalls eine Hochregulierung bestimmter Genprodukte (Luo et al., 2009). In dieser Studie wurden jedoch lediglich mRNA Analysen von Kollagen I und III, Tenascin-C und Scleraxis durchgeführt, was wiederum zu einer einseitigen Darstellung der Ergebnisse führte, die bei Weitem nicht alle wichtigen Charakteristika zeigte (Luo et al., 2009). Eine valide und umfassende Evaluation von neugebildetem Sehngewebe sollte daher immer mehrere Parameter beinhalten, da die molekularen Marker für ausdifferenziertes Sehngewebe auch in anderen Binde- oder Muskuloskeletalgeweben vorkommen (Hoffmann et al., 2006; Jelinsky et al., 2010). Zu diesen Parametern könnten die Zellmorphologie, Ultrastruktur, Matrixproteinexpression (Kollagen Typ I und III, Tenascin-C, TeM und Elastin) sowie strukturelle und funktionelle Analysen gehören (Yin et al., 2010). In der vorliegenden Arbeit wurde jeweils ein Großteil der genannten Komponenten evaluiert. Damit erhöht sich die Aussagekraft und Bedeutung der gewonnenen Ergebnisse.

5.8. Mögliche Anwendung der mit Wachstumsfaktoren behandelten und in Ko-Kultur gebrachten Zellen für das Tissue Engineering

Aufgrund der begrenzten intrinsischen Regenerationsfähigkeit der Sehne *in vivo* stellen Sehnenverletzungen die Medizin vor große Herausforderungen (Butler et al., 2004; Kannus, 2000). Die heutigen ‚Goldstandards‘ in der Therapie der Sehnenverletzungen wie Allografts, Autografts, Xenografts und Prothesen sind aufgrund ihrer unbefriedigenden biomechanischen Eigenschaften unzureichend für eine effektive und dauerhafte Behandlung (Goh et al., 2003; Kuo et al., 2010). Aus diesem Grund wird intensiv nach Möglichkeiten geforscht, durch Tissue Engineering *in vitro* Methoden zu entwickeln, die eine verbesserte Heilung und Regenerationsgewebe mit funktionell besseren Eigenschaften gewährleisten können (Kuo et al., 2010). Ziel dieser Arbeit war es mit den Komponenten MSZ, primären Tenozyten und Wachstumsfaktoren, neue Erkenntnisse und Konzepte für das Sehnen Tissue Engineering zu gewinnen. Da die Gewinnung von Tenozyten schwierig und mit Funktionseinschränkungen an der Entnahmestelle verbunden ist und oft nur unzureichende Zellzahlen gewonnen werden können, mit deren Hilfe es

nicht möglich ist größere Defekte adäquat zu decken, wird nach einer anderen Quelle für Zellen gesucht, die tenogene Induktion gewährleisten können (Bi et al., 2007; Violini et al., 2009). Wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, können MSZ aus dem Fettgewebe gering invasiv entnommen werden und tenogenes Potential entfalten.

Wie seit Kurzem bekannt ist, existiert auch im Sehngewebe des Menschen, der Ratte, der Maus und des Kaninchens eine Zellpopulation von gewebständigen Vorläuferzellen (Bi et al., 2007). Diese konnten *in vivo* dazu angeregt werden sehnenartiges Gewebe zu bilden (Bi et al., 2007). Auch diese Zellpopulation könnte eine wichtige Rolle in zukünftigen Bemühungen im Sehnen Tissue Engineering spielen.

Die in dieser Arbeit präsentierten *in vitro* Effekte von Wachstumsfaktoren und Ko-Kultur auf MSZ geben wichtige Erkenntnisse für die Weiterentwicklung des Sehnen Tissue Engineering und könnten in Zukunft Anwendung finden um Sehnen Defekte effizienter zu versorgen als dies mit den heutigen Methoden möglich ist. Allerdings werden hierfür noch weitere Studien benötigt um die gewonnenen Erkenntnisse auch auf *in vivo* Modelle zu übertragen und letztlich am Patienten anwenden zu können.

6. Zusammenfassung

Sehnenverletzungen stellen aufgrund der begrenzten intrinsischen Regenerationsfähigkeit des Sehngewebes *in vivo* und mit einer weltweiten Inzidenz von 30 Millionen pro Jahr ein erhebliches klinisches Problem dar (Butler et al., 2004; Kannus, 2000; Maffulli et al., 2003). Die heutigen Goldstandards der Therapie wie Allografts, Autografts, Xenografts und Prothesen liefern bisher unbefriedigende Resultate (Goh et al., 2003; Kuo et al., 2010). Hauptursache für das limitierte Regenerationspotential der Sehne ist die geringe Proliferationsfähigkeit der Tenozyten und eine schlechte Vaskularisierung, die nach einem Trauma zu fibröser Narbenbildung und eingeschränkter Funktionalität führt (Favata et al., 2006). Neuere Ansätze durch Tendon Tissue Engineering *in vitro* funktionell bessere Resultate zu erzielen, benutzen als Hauptkomponenten Tenozyten und verschiedene Wachstumsfaktoren (Kuo et al., 2010). Da die Gewinnung von Tenozyten durch Biopsien jedoch mit limitierter Verfügbarkeit und Funktionseinschränkungen an der Entnahmestelle einher geht, wäre eine alternative Zellpopulation mit tenogenem Induktionspotential wünschenswert um größere Defekte adäquat zu behandeln (Violini et al., 2009; Zuk et al., 2002). Mesenchymale Stammzellen (MSZ) bieten eine solche Option, da sie pluripotent sind und mit geringem Aufwand z.B. aus dem Fettgewebe in großen Mengen gewonnen werden können (Buhrmann et al., 2010; Yamamoto et al., 2007; Zuk et al., 2002).

Ziel dieser Arbeit war es daher, das Induktionspotential von primären Tenozyten und verschiedenen Wachstumsfaktoren auf MSZ in einem dreidimensionalen Ko-Kultursystem zu untersuchen, um genauere Einblicke in den Prozess der tenogenen Differenzierung von MSZ zu erlangen.

Im ersten Schritt der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass canine MSZ aus dem Fettgewebe sich zu Adipozyten, Osteoblasten und Chondrozyten differenzieren ließen indem sie in einem dreidimensionalen Kultursystem mit den entsprechenden Differenzierungsmedien inkubiert wurden. Im nächsten Schritt wurden die MSZ mit verschiedenen Wachstumsfaktoren behandelt. Obwohl nach dieser Behandlung der MSZ mit Wachstumsfaktoren generelle proliferationssteigernde Effekte beobachtet werden konnten, war keine geordnete EZM Anlagerung feststellbar. Außerdem zeigten die Zellen keine typische

Tenozytenmorphologie. Lediglich die Kombination aus IGF-1/TGF- β 1 begünstigte die Tenogenese und inhibierte eine Induktion von Apoptose. Außerdem wurde hier eine tenogene Matrix gebildet, welche die sehnentypischen Matrixkomponenten Kollagen Typ I und III, Decorin und Tenomodulin enthielt. Interessanter Weise zeigte eine Behandlung der MSZ mit BMP-12 nach 14 Tagen einen ähnlich positiven Effekt. Allerdings konnte in diesen Kulturen im Gegensatz zu den mit IGF-1/TGF- β 1 behandelten, Apoptoseinduktion nachgewiesen werden.

Tenogene Stimulation der MSZ konnte neben der Behandlung mit IGF-1/TGF- β 1 auch durch Ko-Kultivierung der MSZ mit primären Tenozyten erreicht werden. Hierbei genügte bereits ein 10% Anteil von Tenozyten an der Ko-Kultur um eine Tenogenese einzuleiten, die der in 100% Tenozytenkulturen ähnlich war. Diese tenogene Induktion in den Ko-Kulturen wurde durch eine aktive Kommunikation zwischen den verschiedenen Zellen über Pseudopodienbildung, enge Zell-Zell Kontakte und den Austausch von Vesikeln vermittelt. Der Austausch von Vesikeln bzw. löslichen Faktoren über das Medium scheint eine entscheidende Rolle bei der Tenogenese zu spielen. Interessanter Weise konnte des Weiteren gezeigt werden, dass Tenogenese in MSZ auch induziert werden konnte, indem sie mit dem Überstand aus einer Monolayer Tenozytenkultur inkubiert wurden. Hierbei konnte neben einer typischen Tenozytenmorphologie auch ein sehnentypisches Proteinexpressionsmuster bei den mit Tenozytenüberstand behandelten MSZ nachgewiesen werden. Der immunelektronenmikroskopische Nachweis der Proteine Tenomodulin und Kollagen Typ I untermauerten diese Ergebnisse.

Die hier präsentierten *in vitro* Effekte von Wachstumsfaktoren und Ko-Kultur auf MSZ und Tenozyten sind wichtige Erkenntnisse für die Weiterentwicklung des Sehnen Tissue Engineering und könnten Anwendung in zukünftigen Bemühungen finden, Sehnendefekte effizienter zu versorgen als dies mit den heutigen Methoden möglich ist.

7. Literaturverzeichnis

- Abrahamsson, S.O. (1991). Matrix metabolism and healing in the flexor tendon. Experimental studies on rabbit tendon. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg Suppl* 23, 1-51.
- Abrahamsson, S.O., and Lohmander, S. (1996). Differential effects of insulin-like growth factor-I on matrix and DNA synthesis in various regions and types of rabbit tendons. *J Orthop Res* 14, 370-376.
- Abrahamsson, S.O., Lundborg, G., and Lohmander, L.S. (1991). Long-term explant culture of rabbit flexor tendon: effects of recombinant human insulin-like growth factor-I and serum on matrix metabolism. *J Orthop Res* 9, 503-515.
- Ahmed, I.M., Lagopoulos, M., McConnell, P., Soames, R.W., and Sefton, G.K. (1998). Blood supply of the Achilles tendon. *J Orthop Res* 16, 591-596.
- Alexanian, A.R., and Sieber-Blum, M. (2003). Differentiating adult hippocampal stem cells into neural crest derivatives. *Neuroscience* 118, 1-5.
- Aspenberg, P., and Virchenko, O. (2004). Platelet concentrate injection improves Achilles tendon repair in rats. *Acta Orthop Scand* 75, 93-99.
- Awad, H.A., Boivin, G.P., Dressler, M.R., Smith, F.N., Young, R.G., and Butler, D.L. (2003). Repair of patellar tendon injuries using a cell-collagen composite. *J Orthop Res* 21, 420-431.
- Ball, S.G., Shuttleworth, A.C., and Kielty, C.M. (2004). Direct cell contact influences bone marrow mesenchymal stem cell fate. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 714-727.
- Benjamin, M., and Ralphs, J.R. (2000). The cell and developmental biology of tendons and ligaments. *Int Rev Cytol* 196, 85-130.
- Bi, Y., Ehrichiou, D., Kilts, T.M., Inkson, C.A., Embree, M.C., Sonoyama, W., Li, L., Leet, A.I., Seo, B.M., Zhang, L., *et al.* (2007). Identification of tendon stem/progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche. *Nat Med* 13, 1219-1227.
- Bieback, K., Kern, S., Kluter, H., and Eichler, H. (2004). Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells* 22, 625-634.
- Boatright, K.M., and Salvesen, G.S. (2003). Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* 15, 725-731.
- Bosch, U. (2000). [Tendon injuries: on the threshold of a new era]. *Orthopade* 29, 173.
- Bottai, D., Fiocco, R., Gelain, F., Defilippis, L., Galli, R., Gritti, A., and Vescovi, L.A. (2003). Neural stem cells in the adult nervous system. *J Hematother Stem Cell Res* 12, 655-670.

- Bramono, D.S., Richmond, J.C., Weitzel, P.P., Kaplan, D.L., and Altman, G.H. (2004). Matrix metalloproteinases and their clinical applications in orthopaedics. *Clin Orthop Relat Res*, 272-285.
- Brazelton, T.R., Rossi, F.M., Keshet, G.I., and Blau, H.M. (2000). From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 290, 1775-1779.
- Brooke, G., Rossetti, T., Pelekanos, R., Ilic, N., Murray, P., Hancock, S., Antonenas, V., Huang, G., Gottlieb, D., Bradstock, K., *et al.* (2009). Manufacturing of human placenta-derived mesenchymal stem cells for clinical trials. *Br J Haematol* 144, 571-579.
- Buckwalter, J.A., and Hunziker, E.B. (1996). Orthopaedics. Healing of bones, cartilages, tendons, and ligaments: a new era. *Lancet* 348 *Suppl* 2, s1118.
- Buhrmann, C., Mobasher, A., Matis, U., and Shakibaei, M. (2010). Curcumin mediated suppression of nuclear factor-kappaB promotes chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells in a high-density co-culture microenvironment. *Arthritis Res Ther* 12, R127.
- Burrige, K., and Chrzanowska-Wodnicka, M. (1996). Focal adhesions, contractility, and signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12, 463-518.
- Butler, D.L., Grood, E.S., Noyes, F.R., Zernicke, R.F., and Brackett, K. (1984). Effects of structure and strain measurement technique on the material properties of young human tendons and fascia. *J Biomech* 17, 579-596.
- Butler, D.L., Juncosa, N., and Dressler, M.R. (2004). Functional efficacy of tendon repair processes. *Annu Rev Biomed Eng* 6, 303-329.
- Calve, S., Dennis, R.G., Kosnik, P.E., 2nd, Baar, K., Grosh, K., and Arruda, E.M. (2004). Engineering of functional tendon. *Tissue Eng* 10, 755-761.
- Cancedda, R., Dozin, B., Giannoni, P., and Quarto, R. (2003). Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. *Matrix Biol* 22, 81-91.
- Caplan, A.I. (1991). Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 9, 641-650.
- Caplan, A.I. (2007). Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol* 213, 341-347.
- Caplan, A.I., Elyaderani, M., Mochizuki, Y., Wakitani, S., and Goldberg, V.M. (1997). Principles of cartilage repair and regeneration. *Clin Orthop Relat Res*, 254-269.
- Caplan, A.I., and Goldberg, V.M. (1999). Principles of tissue engineered regeneration of skeletal tissues. *Clin Orthop Relat Res*, S12-16.
- Carlberg, A.L., Pucci, B., Rallapalli, R., Tuan, R.S., and Hall, D.J. (2001). Efficient chondrogenic differentiation of mesenchymal cells in micromass culture by retroviral gene transfer of BMP-2. *Differentiation* 67, 128-138.

Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B., and Middleton, J. (2007). Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 25, 2739-2749.

Chang, J., Most, D., Stelnicki, E., Siebert, J.W., Longaker, M.T., Hui, K., and Lineaweaver, W.C. (1997). Gene expression of transforming growth factor beta-1 in rabbit zone II flexor tendon wound healing: evidence for dual mechanisms of repair. *Plast Reconstr Surg* 100, 937-944.

Chen, C.H., Cao, Y., Wu, Y.F., Bais, A.J., Gao, J.S., and Tang, J.B. (2008). Tendon healing in vivo: gene expression and production of multiple growth factors in early tendon healing period. *J Hand Surg Am* 33, 1834-1842.

Chen, J., Xu, J., Wang, A., and Zheng, M. (2009). Scaffolds for tendon and ligament repair: review of the efficacy of commercial products. *Expert Rev Med Devices* 6, 61-73.

Chiquet, M. (1999). Regulation of extracellular matrix gene expression by mechanical stress. *Matrix Biol* 18, 417-426.

Chiquet-Ehrismann, R., and Tucker, R.P. (2004). Connective tissues: signalling by tenascins. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 1085-1089.

Chuen, F.S., Chuk, C.Y., Ping, W.Y., Nar, W.W., Kim, H.L., and Ming, C.K. (2004). Immunohistochemical characterization of cells in adult human patellar tendons. *J Histochem Cytochem* 52, 1151-1157.

Clark, E.A., and Brugge, J.S. (1995). Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* 268, 233-239.

Colter, D.C., Sekiya, I., and Prockop, D.J. (2001). 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.

Conget, P.A., and Minguell, J.J. (1999). Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol* 181, 67-73.

Costa, M.A., Wu, C., Pham, B.V., Chong, A.K., Pham, H.M., and Chang, J. (2006). Tissue engineering of flexor tendons: optimization of tenocyte proliferation using growth factor supplementation. *Tissue Eng* 12, 1937-1943.

Crisan, M., Yap, S., Casteilla, L., Chen, C.W., Corselli, M., Park, T.S., Andriolo, G., Sun, B., Zheng, B., Zhang, L., *et al.* (2008). A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* 3, 301-313.

Csaki, C., Matis, U., Mobasheri, A., and Shakibaei, M. (2009). Co-culture of canine mesenchymal stem cells with primary bone-derived osteoblasts promotes osteogenic differentiation. *Histochem Cell Biol* 131, 251-266.

Csaki, C., Matis, U., Mobasheri, A., Ye, H., and Shakibaei, M. (2007). Chondrogenesis, osteogenesis and adipogenesis of canine mesenchymal stem

cells: a biochemical, morphological and ultrastructural study. *Histochem Cell Biol* 128, 507-520.

D'Andrea, F., De Francesco, F., Ferraro, G.A., Desiderio, V., Tirino, V., De Rosa, A., and Papaccio, G. (2008). Large-scale production of human adipose tissue from stem cells: a new tool for regenerative medicine and tissue banking. *Tissue Eng Part C Methods* 14, 233-242.

Dahlgren, L.A., Mohammed, H.O., and Nixon, A.J. (2005). Temporal expression of growth factors and matrix molecules in healing tendon lesions. *J Orthop Res* 23, 84-92.

De Bari, C., Dell'Accio, F., Vanlauwe, J., Eyckmans, J., Khan, I.M., Archer, C.W., Jones, E.A., McGonagle, D., Mitsiadis, T.A., Pitzalis, C., *et al.* (2006). Mesenchymal multipotency of adult human periosteal cells demonstrated by single-cell lineage analysis. *Arthritis Rheum* 54, 1209-1221.

Denker, A.E., Haas, A.R., Nicoll, S.B., and Tuan, R.S. (1999). Chondrogenic differentiation of murine C3H10T1/2 multipotential mesenchymal cells: I. Stimulation by bone morphogenetic protein-2 in high-density micromass cultures. *Differentiation* 64, 67-76.

Dicker, A., Le Blanc, K., Astrom, G., van Harmelen, V., Gotherstrom, C., Blomqvist, L., Arner, P., and Ryden, M. (2005). Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue. *Exp Cell Res* 308, 283-290.

Dines, J.S., Grande, D.A., and Dines, D.M. (2007). Tissue engineering and rotator cuff tendon healing. *J Shoulder Elbow Surg* 16, S204-207.

Docheva, D., Hunziker, E.B., Fassler, R., and Brandau, O. (2005). Tenomodulin is necessary for tenocyte proliferation and tendon maturation. *Mol Cell Biol* 25, 699-705.

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., and Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315-317.

Doschak, M.R., and Zernicke, R.F. (2005). Structure, function and adaptation of bone-tendon and bone-ligament complexes. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 5, 35-40.

Ducy, P. (2000). *Cbfa1*: a molecular switch in osteoblast biology. *Dev Dyn* 219, 461-471.

Ducy, P., Schinke, T., and Karsenty, G. (2000). The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science* 289, 1501-1504.

Dykyj, D., and Jules, K.T. (1991). The clinical anatomy of tendons. *J Am Podiatr Med Assoc* 81, 358-365.

Ehrlich, H.P., Lambert, P.A., Siggers, G.C., Myers, R.L., and Hauck, R.M. (2005). Dynamic changes appearing in collagen fibers during intrinsic tendon repair. *Ann Plast Surg* 54, 201-206.

Eliceiri, B.P. (2001). Integrin and growth factor receptor crosstalk. *Circ Res* 89, 1104-1110.

Fan, H., Liu, H., Toh, S.L., and Goh, J.C. (2008). Enhanced differentiation of mesenchymal stem cells co-cultured with ligament fibroblasts on gelatin/silk fibroin hybrid scaffold. *Biomaterials* 29, 1017-1027.

Favata, M., Beredjiklian, P.K., Zgonis, M.H., Beason, D.P., Crombleholme, T.M., Jawad, A.F., and Soslowky, L.J. (2006). Regenerative properties of fetal sheep tendon are not adversely affected by transplantation into an adult environment. *J Orthop Res* 24, 2124-2132.

Fenwick, S.A., Hazleman, B.L., and Riley, G.P. (2002). The vasculature and its role in the damaged and healing tendon. *Arthritis Res* 4, 252-260.

Fickert, S., Fiedler, J., and Brenner, R.E. (2003). Identification, quantification and isolation of mesenchymal progenitor cells from osteoarthritic synovium by fluorescence automated cell sorting. *Osteoarthritis Cartilage* 11, 790-800.

Fickert, S., Fiedler, J., and Brenner, R.E. (2004). 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.

Fiedler, J., Etzel, N., and Brenner, R.E. (2004). To go or not to go: Migration of human mesenchymal progenitor cells stimulated by isoforms of PDGF. *J Cell Biochem* 93, 990-998.

Forslund, C., and Aspenberg, P. (2001). Tendon healing stimulated by injected CDMP-2. *Med Sci Sports Exerc* 33, 685-687.

Forslund, C., and Aspenberg, P. (2002). CDMP-2 induces bone or tendon-like tissue depending on mechanical stimulation. *J Orthop Res* 20, 1170-1174.

Forslund, C., Rueger, D., and Aspenberg, P. (2003). 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.

Fortier, L.A., Nixon, A.J., Williams, J., and Cable, C.S. (1998). Isolation and chondrocytic differentiation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Am J Vet Res* 59, 1182-1187.

Franchi, M., Trire, A., Quaranta, M., Orsini, E., and Ottani, V. (2007). Collagen structure of tendon relates to function. *ScientificWorldJournal* 7, 404-420.

Frank, C.B., Hart, D.A., and Shrive, N.G. (1999). Molecular biology and biomechanics of normal and healing ligaments--a review. *Osteoarthritis Cartilage* 7, 130-140.

Friedenstein, A.J., Chailakhyan, R.K., and Gerasimov, U.V. (1987). Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet* 20, 263-272.

Friedenstein, A.J., Deriglasova, U.F., Kulagina, N.N., Panasuk, A.F., Rudakowa, S.F., Luria, E.A., and Ruadkow, I.A. (1974). Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol* 2, 83-92.

Friedenstein, A.J., Gorskaja, J.F., and Kulagina, N.N. (1976). Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 4, 267-274.

Friedenstein, A.J., Piatetzky, S., II, and Petrakova, K.V. (1966). Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* 16, 381-390.

Garcia, A.J. (2005). Get a grip: integrins in cell-biomaterial interactions. *Biomaterials* 26, 7525-7529.

Gelse, K., Poschl, E., and Aigner, T. (2003). Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev* 55, 1531-1546.

Gerstenfeld, L.C., Barnes, G.L., Shea, C.M., and Einhorn, T.A. (2003). Osteogenic differentiation is selectively promoted by morphogenetic signals from chondrocytes and synergized by a nutrient rich growth environment. *Connect Tissue Res* 44 *Suppl* 1, 85-91.

Gerstenfeld, L.C., Cruceta, J., Shea, C.M., Sampath, K., Barnes, G.L., and Einhorn, T.A. (2002). Chondrocytes provide morphogenic signals that selectively induce osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J Bone Miner Res* 17, 221-230.

Getgood, A., and Bollen, S. (2010). What tissue bankers should know about the use of allograft tendons and cartilage in orthopaedics. *Cell Tissue Bank* 11, 87-97.

Giancotti, F.G. (1997). Integrin signaling: specificity and control of cell survival and cell cycle progression. *Curr Opin Cell Biol* 9, 691-700.

Giancotti, F.G., and Ruoslahti, E. (1999). Integrin signaling. *Science* 285, 1028-1032.

Giovannini, S., Brehm, W., Mainil-Varlet, P., and Nestic, D. (2008). Multilineage differentiation potential of equine blood-derived fibroblast-like cells. *Differentiation* 76, 118-129.

Goh, J.C., Ouyang, H.W., Teoh, S.H., Chan, C.K., and Lee, E.H. (2003). Tissue-engineering approach to the repair and regeneration of tendons and ligaments. *Tissue Eng* 9 *Suppl* 1, S31-44.

Gonzalez, R.I. (1959). Experimental use of teflon in tendon surgery. *Plast Reconstr Surg Transplant Bull* 23, 535-539.

Goodship, A.E., Brown, P.N., Yeats, J.J., Jenkins, D.H., and Silver, I.A. (1980). An assessment of filamentous carbon fibre for the treatment of tendon injury in the horse. *Vet Rec* 106, 217-221.

Grau, H.R. (1958). The artificial tendon: an experimental study. *Plast Reconstr Surg Transplant Bull* 22, 562-566.

Gredinger, E., Gerber, A.N., Tamir, Y., Tapscott, S.J., and Bengal, E. (1998). Mitogen-activated protein kinase pathway is involved in the differentiation of muscle cells. *J Biol Chem* 273, 10436-10444.

Gregory, C.A., Prockop, D.J., and Spees, J.L. (2005). Non-hematopoietic bone marrow stem cells: molecular control of expansion and differentiation. *Exp Cell Res* 306, 330-335.

Hankemeier, S., van Griensven, M., Ezechieli, M., Barkhausen, T., Austin, M., Jagodzinski, M., Meller, R., Bosch, U., Krettek, C., and Zeichen, J. (2007). Tissue engineering of tendons and ligaments by human bone marrow stromal cells in a liquid fibrin matrix in immunodeficient rats: results of a histologic study. *Arch Orthop Trauma Surg* 127, 815-821.

Harrington, H.A., Ho, K.L., Ghosh, S., and Tung, K.C. (2008). Construction and analysis of a modular model of caspase activation in apoptosis. *Theor Biol Med Model* 5, 26.

Heino, T.J., Hentunen, T.A., and Vaananen, H.K. (2004). Conditioned medium from osteocytes stimulates the proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells and their differentiation into osteoblasts. *Exp Cell Res* 294, 458-468.

Herrington, L., Wrapson, C., Matthews, M., and Matthews, H. (2005). Anterior cruciate ligament reconstruction, hamstring versus bone-patella tendon-bone grafts: a systematic literature review of outcome from surgery. *Knee* 12, 41-50.

Hoffmann, A., Pelled, G., Turgeman, G., Eberle, P., Zilberman, Y., Shinar, H., Keinan-Adamsky, K., Winkel, A., Shahab, S., Navon, G., *et al.* (2006). Neotendon formation induced by manipulation of the Smad8 signalling pathway in mesenchymal stem cells. *J Clin Invest* 116, 940-952.

Horwitz, E.M., Le Blanc, K., Dominici, M., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F.C., Deans, R.J., Krause, D.S., and Keating, A. (2005). Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 7, 393-395.

Hsia, H.C., and Schwarzbauer, J.E. (2005). Meet the tenascins: multifunctional and mysterious. *J Biol Chem* 280, 26641-26644.

Huss, R., Lange, C., Weissinger, E.M., Kolb, H.J., and Thalmeier, K. (2000). Evidence of peripheral blood-derived, plastic-adherent CD34(-/low) hematopoietic stem cell clones with mesenchymal stem cell characteristics. *Stem Cells* 18, 252-260.

Hynes, R.O. (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69, 11-25.

Hynes, R.O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110, 673-687.

Iozzo, R.V., and Murdoch, A.D. (1996). 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.

Ivaska, J., and Heino, J. (2000). Adhesion receptors and cell invasion: mechanisms of integrin-guided degradation of extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci* 57, 16-24.

Jackson, D.W., Simon, T.M., Kurzweil, P.R., and Rosen, M.A. (1992). Survival of cells after intra-articular transplantation of fresh allografts of the patellar and anterior cruciate ligaments. DNA-probe analysis in a goat model. *J Bone Joint Surg Am* 74, 112-118.

Jaiswal, R.K., Jaiswal, N., Bruder, S.P., Mbalaviele, G., Marshak, D.R., and Pittenger, M.F. (2000). Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 275, 9645-9652.

James, R., Kesturu, G., Balian, G., and Chhabra, A.B. (2008). Tendon: biology, biomechanics, repair, growth factors, and evolving treatment options. *J Hand Surg Am* 33, 102-112.

Jarvinen, T.A., Jarvinen, T.L., Kannus, P., Jozsa, L., and Jarvinen, M. (2004). Collagen fibres of the spontaneously ruptured human tendons display decreased thickness and crimp angle. *J Orthop Res* 22, 1303-1309.

Jarvinen, T.A., Kannus, P., Jarvinen, T.L., Jozsa, L., Kalimo, H., and Jarvinen, M. (2000). Tenascin-C in the pathobiology and healing process of musculoskeletal tissue injury. *Scand J Med Sci Sports* 10, 376-382.

Javazon, E.H., Beggs, K.J., and Flake, A.W. (2004). Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exp Hematol* 32, 414-425.

Jelinsky, S.A., Archambault, J., Li, L., and Seeherman, H. (2010). Tendon-selective genes identified from rat and human musculoskeletal tissues. *J Orthop Res* 28, 289-297.

Jepsen, K.J., Wu, F., Peragallo, J.H., Paul, J., Roberts, L., Ezura, Y., Oldberg, A., Birk, D.E., and Chakravarti, S. (2002). A syndrome of joint laxity and impaired tendon integrity in lumican- and fibromodulin-deficient mice. *J Biol Chem* 277, 35532-35540.

Jones, G.C., Corps, A.N., Pennington, C.J., Clark, I.M., Edwards, D.R., Bradley, M.M., Hazleman, B.L., and Riley, G.P. (2006). Expression profiling of metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in normal and degenerate human achilles tendon. *Arthritis Rheum* 54, 832-842.

- Jones, J.L., and Walker, R.A. (1999). Integrins: a role as cell signalling molecules. *Mol Pathol* 52, 208-213.
- Juliano, R.L., Reddig, P., Alahari, S., Edin, M., Howe, A., and Aplin, A. (2004). Integrin regulation of cell signalling and motility. *Biochem Soc Trans* 32, 443-446.
- Juncosa-Melvin, N., Boivin, G.P., Galloway, M.T., Gooch, C., West, J.R., Sklenka, A.M., and Butler, D.L. (2005). Effects of cell-to-collagen ratio in mesenchymal stem cell-seeded implants on tendon repair biomechanics and histology. *Tissue Eng* 11, 448-457.
- Juncosa-Melvin, N., Shearn, J.T., Boivin, G.P., Gooch, C., Galloway, M.T., West, J.R., Nirmalanandhan, V.S., Bradica, G., and Butler, D.L. (2006). Effects of mechanical stimulation on the biomechanics and histology of stem cell-collagen sponge constructs for rabbit patellar tendon repair. *Tissue Eng* 12, 2291-2300.
- Kanbe, K., Inoue, K., Inoue, Y., and Chen, Q. (2009). Inducement of mitogen-activated protein kinases in frozen shoulders. *J Orthop Sci* 14, 56-61.
- Kannus, P. (2000). Structure of the tendon connective tissue. *Scand J Med Sci Sports* 10, 312-320.
- Kannus, P., Jozsa, L., Jarvinen, T.A., Jarvinen, T.L., Kvist, M., Natri, A., and Jarvinen, M. (1998). Location and distribution of non-collagenous matrix proteins in musculoskeletal tissues of rat. *Histochem J* 30, 799-810.
- Kartus, J., Movin, T., and Karlsson, J. (2001). Donor-site morbidity and anterior knee problems after anterior cruciate ligament reconstruction using autografts. *Arthroscopy* 17, 971-980.
- Kashiwagi, K., Mochizuki, Y., Yasunaga, Y., Ishida, O., Deie, M., and Ochi, M. (2004). Effects of transforming growth factor-beta 1 on the early stages of healing of the Achilles tendon in a rat model. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 38, 193-197.
- Kastelic, J., Galeski, A., and Baer, E. (1978). The multicomposite structure of tendon. *Connect Tissue Res* 6, 11-23.
- Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Kluter, H., and Bieback, K. (2006). Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 24, 1294-1301.
- Kim, H., Lee, J.H., and Suh, H. (2003). Interaction of mesenchymal stem cells and osteoblasts for in vitro osteogenesis. *Yonsei Med J* 44, 187-197.
- Klein, M.B., Yalamanchi, N., Pham, H., Longaker, M.T., and Chang, J. (2002). Flexor tendon healing in vitro: effects of TGF-beta on tendon cell collagen production. *J Hand Surg Am* 27, 615-620.
- Koerner, J., Nestic, D., Romero, J.D., Brehm, W., Mainil-Varlet, P., and Grogan, S.P. (2006). Equine peripheral blood-derived progenitors in comparison to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24, 1613-1619.

Kogler, G., Sensken, S., Airey, J.A., Trapp, T., Muschen, M., Feldhahn, N., Liedtke, S., Sorg, R.V., Fischer, J., Rosenbaum, C., *et al.* (2004). A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med* 200, 123-135.

Koyanagi, M., Haendeler, J., Badorff, C., Brandes, R.P., Hoffmann, J., Pandur, P., Zeiher, A.M., Kuhl, M., and Dimmeler, S. (2005a). Non-canonical Wnt signaling enhances differentiation of human circulating progenitor cells to cardiomyogenic cells. *J Biol Chem* 280, 16838-16842.

Koyanagi, M., Urbich, C., Chavakis, E., Hoffmann, J., Rupp, S., Badorff, C., Zeiher, A.M., Starzinski-Powitz, A., Haendeler, J., and Dimmeler, S. (2005b). Differentiation of circulating endothelial progenitor cells to a cardiomyogenic phenotype depends on E-cadherin. *FEBS Lett* 579, 6060-6066.

Kramer, P.R., Nares, S., Kramer, S.F., Grogan, D., and Kaiser, M. (2004). Mesenchymal stem cells acquire characteristics of cells in the periodontal ligament in vitro. *J Dent Res* 83, 27-34.

Krampera, M., Marconi, S., Pasini, A., Galie, M., Rigotti, G., Mosna, F., Tinelli, M., Lovato, L., Anghileri, E., Andreini, A., *et al.* (2007). Induction of neural-like differentiation in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, fat, spleen and thymus. *Bone* 40, 382-390.

Krampera, M., Pizzolo, G., Aprili, G., and Franchini, M. (2006). Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair. *Bone* 39, 678-683.

Kuhn, K. (1969). The structure of collagen. *Essays Biochem* 5, 59-87.

Kuo, C.K., Marturano, J.E., and Tuan, R.S. (2010). Novel strategies in tendon and ligament tissue engineering: Advanced biomaterials and regeneration motifs. *Sports Med Arthrosc Rehabil Ther Technol* 2, 20.

Kuo, C.K., and Tuan, R.S. (2003). Tissue engineering with mesenchymal stem cells. *IEEE Eng Med Biol Mag* 22, 51-56.

Kurtz, C.A., Loebig, T.G., Anderson, D.D., DeMeo, P.J., and Campbell, P.G. (1999). Insulin-like growth factor I accelerates functional recovery from Achilles tendon injury in a rat model. *Am J Sports Med* 27, 363-369.

Kydd, A.S., Achari, Y., Lu, T., Sciore, P., Rattner, J.B., and Hart, D.A. (2005). 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.

Lafrenie, R.M., and Yamada, K.M. (1996). Integrin-dependent signal transduction. *J Cell Biochem* 61, 543-553.

Lal, H., Verma, S.K., Smith, M., Guleria, R.S., Lu, G., Foster, D.M., and Dostal, D.E. (2007). Stretch-induced MAP kinase activation in cardiac myocytes: differential

regulation through beta1-integrin and focal adhesion kinase. *J Mol Cell Cardiol* 43, 137-147.

Langer, R. (2000). Tissue engineering. *Mol Ther* 1, 12-15.

Laurencin, C.T., and Freeman, J.W. (2005). Ligament tissue engineering: an evolutionary materials science approach. *Biomaterials* 26, 7530-7536.

Lee, H.J., Yu, C., Chansakul, T., Varghese, S., Hwang, N.S., and Elisseeff, J.H. (2008). Enhanced chondrogenic differentiation of embryonic stem cells by coculture with hepatic cells. *Stem Cells Dev* 17, 555-563.

Lee, J., Harwood, F.L., Akeson, W.H., and Amiel, D. (1998). Growth factor expression in healing rabbit medial collateral and anterior cruciate ligaments. *Iowa Orthop J* 18, 19-25.

Lin, C.Q., and Bissell, M.J. (1993). Multi-faceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix. *FASEB J* 7, 737-743.

Liu, S.H., Yang, R.S., al-Shaikh, R., and Lane, J.M. (1995). Collagen in tendon, ligament, and bone healing. A current review. *Clin Orthop Relat Res*, 265-278.

Lou, J., Tu, Y., Ludwig, F.J., Zhang, J., and Manske, P.R. (1999). Effect of bone morphogenetic protein-12 gene transfer on mesenchymal progenitor cells. *Clin Orthop Relat Res*, 333-339.

Lou, S., Gu, P., Chen, F., He, C., Wang, M., and Lu, C. (2003). The effect of bone marrow stromal cells on neuronal differentiation of mesencephalic neural stem cells in Sprague-Dawley rats. *Brain Res* 968, 114-121.

Lowy, D.R., and Willumsen, B.M. (1993). Function and regulation of ras. *Annu Rev Biochem* 62, 851-891.

Luo, Q., Song, G., Song, Y., Xu, B., Qin, J., and Shi, Y. (2009). Indirect co-culture with tenocytes promotes proliferation and mRNA expression of tendon/ligament related genes in rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Cytotechnology* 61, 1-10.

Maffulli, N., Wong, J., and Almekinders, L.C. (2003). Types and epidemiology of tendinopathy. *Clin Sports Med* 22, 675-692.

Mageed, A.S., Pietryga, D.W., DeHeer, D.H., and West, R.A. (2007). Isolation of large numbers of mesenchymal stem cells from the washings of bone marrow collection bags: characterization of fresh mesenchymal stem cells. *Transplantation* 83, 1019-1026.

Majumdar, M.K., Banks, V., Peluso, D.P., and Morris, E.A. (2000). Isolation, characterization, and chondrogenic potential of human bone marrow-derived multipotential stromal cells. *J Cell Physiol* 185, 98-106.

Mareddy, S., Crawford, R., Brooke, G., and Xiao, Y. (2007). Clonal isolation and characterization of bone marrow stromal cells from patients with osteoarthritis. *Tissue Eng* 13, 819-829.

- McNeilly, C.M., Banes, A.J., Benjamin, M., and Ralphs, J.R. (1996). Tendon cells in vivo form a three dimensional network of cell processes linked by gap junctions. *J Anat* 189 (Pt 3), 593-600.
- Milz, S., Ockert, B., and Putz, R. (2009). [Tenocytes and the extracellular matrix : a reciprocal relationship]. *Orthopade* 38, 1071-1079.
- Mithieux, S.M., and Weiss, A.S. (2005). Elastin. *Adv Protein Chem* 70, 437-461.
- Moller, H.D., Evans, C.H., and Maffulli, N. (2000). [Current aspects of tendon healing]. *Orthopade* 29, 182-187.
- Mukherjee, S., Ghosh, R.N., and Maxfield, F.R. (1997). Endocytosis. *Physiol Rev* 77, 759-803.
- Murphy, L.O., and Blenis, J. (2006). MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends Biochem Sci* 31, 268-275.
- Nagase, H., and Woessner, J.F., Jr. (1999). Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 274, 21491-21494.
- Nakamura, N., Shino, K., Natsuume, T., Horibe, S., Matsumoto, N., Kaneda, Y., and Ochi, T. (1998). Early biological effect of in vivo gene transfer of platelet-derived growth factor (PDGF)-B into healing patellar ligament. *Gene Ther* 5, 1165-1170.
- Ochiai, N., Matsui, T., Miyaji, N., Merklin, R.J., and Hunter, J.M. (1979). Vascular anatomy of flexor tendons. I. Vincular system and blood supply of the profundus tendon in the digital sheath. *J Hand Surg Am* 4, 321-330.
- Olson, E.J., Kang, J.D., Fu, F.H., Georgescu, H.I., Mason, G.C., and Evans, C.H. (1988). The biochemical and histological effects of artificial ligament wear particles: in vitro and in vivo studies. *Am J Sports Med* 16, 558-570.
- Otey, C.A., Pavalko, F.M., and Burrige, K. (1990). An interaction between alpha-actinin and the beta 1 integrin subunit in vitro. *J Cell Biol* 111, 721-729.
- Otto, W.R., and Rao, J. (2004). Tomorrow's skeleton staff: mesenchymal stem cells and the repair of bone and cartilage. *Cell Prolif* 37, 97-110.
- Ouyang, H.W., Goh, J.C., and Lee, E.H. (2004). Viability of allogeneic bone marrow stromal cells following local delivery into patella tendon in rabbit model. *Cell Transplant* 13, 649-657.
- Ouyang, H.W., Goh, J.C., Thambyah, A., Teoh, S.H., and Lee, E.H. (2003). Knitted poly-lactide-co-glycolide scaffold loaded with bone marrow stromal cells in repair and regeneration of rabbit Achilles tendon. *Tissue Eng* 9, 431-439.
- Pittenger, M., Vanguri, P., Simonetti, D., and Young, R. (2002). Adult mesenchymal stem cells: potential for muscle and tendon regeneration and use in gene therapy. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2, 309-320.

Pittenger, M.F. (2008). Mesenchymal stem cells from adult bone marrow. *Methods Mol Biol* 449, 27-44.

Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., and Marshak, D.R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143-147.

Plotnikov, E.Y., Khryapenkova, T.G., Vasileva, A.K., Marey, M.V., Galkina, S.I., Isaev, N.K., Sheval, E.V., Polyakov, V.Y., Sukhikh, G.T., and Zorov, D.B. (2008). Cell-to-cell cross-talk between mesenchymal stem cells and cardiomyocytes in co-culture. *J Cell Mol Med* 12, 1622-1631.

Poloni, A., Rosini, V., Mondini, E., Maurizi, G., Mancini, S., Discepoli, G., Biasio, S., Battaglini, G., Berardinelli, E., Serrani, F., *et al.* (2008). Characterization and expansion of mesenchymal progenitor cells from first-trimester chorionic villi of human placenta. *Cytotherapy* 10, 690-697.

Porter, A.G., and Janicke, R.U. (1999). Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ* 6, 99-104.

Rahaman, M.N., and Mao, J.J. (2005). Stem cell-based composite tissue constructs for regenerative medicine. *Biotechnol Bioeng* 91, 261-284.

Ralphs, J.R., Benjamin, M., Waggett, A.D., Russell, D.C., Messner, K., and Gao, J. (1998). Regional differences in cell shape and gap junction expression in rat Achilles tendon: relation to fibrocartilage differentiation. *J Anat* 193 (Pt 2), 215-222.

Raspanti, M., Manelli, A., Franchi, M., and Ruggeri, A. (2005). The 3D structure of crimps in the rat Achilles tendon. *Matrix Biol* 24, 503-507.

Ravanti, L., Heino, J., Lopez-Otin, C., and Kahari, V.M. (1999). Induction of collagenase-3 (MMP-13) expression in human skin fibroblasts by three-dimensional collagen is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 274, 2446-2455.

Ravichandran, K.S. (2001). Signaling via Shc family adapter proteins. *Oncogene* 20, 6322-6330.

Recknor, J.B., Sakaguchi, D.S., and Mallapragada, S.K. (2006). Directed growth and selective differentiation of neural progenitor cells on micropatterned polymer substrates. *Biomaterials* 27, 4098-4108.

Reddy, G.K., Stehno-Bittel, L., and Enwemeka, C.S. (1999). Matrix remodeling in healing rabbit Achilles tendon. *Wound Repair Regen* 7, 518-527.

Rees, S.G., Dent, C.M., and Caterson, B. (2009). Metabolism of proteoglycans in tendon. *Scand J Med Sci Sports* 19, 470-478.

Richardson, S.M., Walker, R.V., Parker, S., Rhodes, N.P., Hunt, J.A., Freemont, A.J., and Hoyland, J.A. (2006). Intervertebral disc cell-mediated mesenchymal stem cell differentiation. *Stem Cells* 24, 707-716.

- Riekstina, U., Cakstina, I., Parfejevs, V., Hoogduijn, M., Jankovskis, G., Muiznieks, I., Muceniece, R., and Ancans, J. (2009). Embryonic stem cell marker expression pattern in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, heart and dermis. *Stem Cell Rev* 5, 378-386.
- Riikonen, T., Westermarck, J., Koivisto, L., Broberg, A., Kahari, V.M., and Heino, J. (1995). Integrin alpha 2 beta 1 is a positive regulator of collagenase (MMP-1) and collagen alpha 1(I) gene expression. *J Biol Chem* 270, 13548-13552.
- Riley, G.P., Curry, V., DeGroot, J., van El, B., Verzijl, N., Hazleman, B.L., and Bank, R.A. (2002). Matrix metalloproteinase activities and their relationship with collagen remodelling in tendon pathology. *Matrix Biol* 21, 185-195.
- Rosso, F., Giordano, A., Barbarisi, M., and Barbarisi, A. (2004). From cell-ECM interactions to tissue engineering. *J Cell Physiol* 199, 174-180.
- Rosso, F., Marino, G., Giordano, A., Barbarisi, M., Parmeggiani, D., and Barbarisi, A. (2005). Smart materials as scaffolds for tissue engineering. *J Cell Physiol* 203, 465-470.
- Sabiston, P., Frank, C., Lam, T., and Shrive, N. (1990). Allograft ligament transplantation. A morphological and biochemical evaluation of a medial collateral ligament complex in a rabbit model. *Am J Sports Med* 18, 160-168.
- Sadoshima, J., and Izumo, S. (1997). The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. *Annu Rev Physiol* 59, 551-571.
- Sakaguchi, Y., Sekiya, I., Yagishita, K., and Muneta, T. (2005). Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum* 52, 2521-2529.
- Sakai, H., Fujita, K., Sakai, Y., and Mizuno, K. (2001). Immunolocalization of cytokines and growth factors in subacromial bursa of rotator cuff tear patients. *Kobe J Med Sci* 47, 25-34.
- Salamon, A., Hamori, J., Deak, G., and Mayer, F. (1970). Submicroscopic investigation of autogenous tendon grafts. *Acta Morphol Acad Sci Hung* 18, 23-42.
- Schlaepfer, D.D., Jones, K.C., and Hunter, T. (1998). Multiple Grb2-mediated integrin-stimulated signaling pathways to ERK2/mitogen-activated protein kinase: summation of both c-Src- and focal adhesion kinase-initiated tyrosine phosphorylation events. *Mol Cell Biol* 18, 2571-2585.
- Schmidt, C., Pommerenke, H., Durr, F., Nebe, B., and Rychly, J. (1998). Mechanical stressing of integrin receptors induces enhanced tyrosine phosphorylation of cytoskeletally anchored proteins. *J Biol Chem* 273, 5081-5085.
- Schnabel, L.V., Lynch, M.E., van der Meulen, M.C., Yeager, A.E., Kornatowski, M.A., and Nixon, A.J. (2009). Mesenchymal stem cells and insulin-like growth factor-I gene-enhanced mesenchymal stem cells improve structural aspects of healing in equine flexor digitorum superficialis tendons. *J Orthop Res* 27, 1392-1398.

Schulze-Tanzil, G., de Souza, P., Merker, H.J., and Shakibaei, M. (2001). Co-localization of integrins and matrix metalloproteinases in the extracellular matrix of chondrocyte cultures. *Histol Histopathol* 16, 1081-1089.

Schulze-Tanzil, G., Mobasheri, A., Clegg, P.D., Sendzik, J., John, T., and Shakibaei, M. (2004a). Cultivation of human tenocytes in high-density culture. *Histochem Cell Biol* 122, 219-228.

Schulze-Tanzil, G., Mobasheri, A., de Souza, P., John, T., and Shakibaei, M. (2004b). Loss of chondrogenic potential in dedifferentiated chondrocytes correlates with deficient Shc-Erk interaction and apoptosis. *Osteoarthritis Cartilage* 12, 448-458.

Scott, A., Cook, J.L., Hart, D.A., Walker, D.C., Duronio, V., and Khan, K.M. (2007). Tenocyte responses to mechanical loading in vivo: a role for local insulin-like growth factor 1 signaling in early tendinosis in rats. *Arthritis Rheum* 56, 871-881.

Scott, J.E. (2003). Elasticity in extracellular matrix 'shape modules' of tendon, cartilage, etc. A sliding proteoglycan-filament model. *J Physiol* 553, 335-343.

Seeherman, H.J., Archambault, J.M., Rodeo, S.A., Turner, A.S., Zekas, L., D'Augusta, D., Li, X.J., Smith, E., and Wozney, J.M. (2008). rhBMP-12 accelerates healing of rotator cuff repairs in a sheep model. *J Bone Joint Surg Am* 90, 2206-2219.

Sekiya, I., Larson, B.L., Smith, J.R., Pochampally, R., Cui, J.G., and Prockop, D.J. (2002). 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.

Sendzik, J., Shakibaei, M., Schafer-Korting, M., Lode, H., and Stahlmann, R. (2010). Synergistic effects of dexamethasone and quinolones on human-derived tendon cells. *Int J Antimicrob Agents* 35, 366-374.

Sendzik, J., Shakibaei, M., Schafer-Korting, M., and Stahlmann, R. (2005). Fluoroquinolones cause changes in extracellular matrix, signalling proteins, metalloproteinases and caspase-3 in cultured human tendon cells. *Toxicology* 212, 24-36.

Seo, J.G., Yoo, J.C., Moon, Y.W., Chang, M.J., Kwon, J.W., Kim, J.H., and Kim, M.H. (2009). Ankle morbidity after autogenous Achilles tendon harvesting for anterior cruciate ligament reconstruction. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 17, 631-638.

Shakibaei, M. (1995). Integrin expression on epiphyseal mouse chondrocytes in monolayer culture. *Histol Histopathol* 10, 339-349.

Shakibaei, M. (1998). Inhibition of chondrogenesis by integrin antibody in vitro. *Exp Cell Res* 240, 95-106.

Shakibaei, M., De Souza, P., and Merker, H.J. (1997). Integrin expression and collagen type II implicated in maintenance of chondrocyte shape in monolayer culture: an immunomorphological study. *Cell Biol Int* 21, 115-125.

- Shakibaei, M., John, T., De Souza, P., Rahmanzadeh, R., and Merker, H.J. (1999). Signal transduction by beta1 integrin receptors in human chondrocytes in vitro: collaboration with the insulin-like growth factor-I receptor. *Biochem J* 342 Pt 3, 615-623.
- Shakibaei, M., and Merker, H.J. (1999). Beta1-integrins in the cartilage matrix. *Cell Tissue Res* 296, 565-573.
- Shakibaei, M., Schroter-Kermani, C., and Merker, H.J. (1993). Matrix changes during long-term cultivation of cartilage (organoid or high-density cultures). *Histol Histopathol* 8, 463-470.
- Shakibaei, M., Schulze-Tanzil, G., de Souza, P., John, T., Rahmanzadeh, M., Rahmanzadeh, R., and Merker, H.J. (2001). Inhibition of mitogen-activated protein kinase kinase induces apoptosis of human chondrocytes. *J Biol Chem* 276, 13289-13294.
- Shakibaei, M., Seifarth, C., John, T., Rahmanzadeh, M., and Mobasheri, A. (2006). Igf-I extends the chondrogenic potential of human articular chondrocytes in vitro: molecular association between Sox9 and Erk1/2. *Biochem Pharmacol* 72, 1382-1395.
- Shakibaei, M., and Stahlmann, R. (2001). Ultrastructure of Achilles tendon from rats after treatment with fleroxacin. *Arch Toxicol* 75, 97-102.
- Shakibaei, M., and Stahlmann, R. (2003). Ultrastructural changes induced by the des-F(6)-quinolone garenoxacin (BMS-284756) and two fluoroquinolones in Achilles tendon from immature rats. *Arch Toxicol* 77, 521-526.
- Sharma, P., and Maffulli, N. (2005a). Basic biology of tendon injury and healing. *Surgeon* 3, 309-316.
- Sharma, P., and Maffulli, N. (2005b). Tendon injury and tendinopathy: healing and repair. *J Bone Joint Surg Am* 87, 187-202.
- Shaw, P.E., and Saxton, J. (2003). Ternary complex factors: prime nuclear targets for mitogen-activated protein kinases. *Int J Biochem Cell Biol* 35, 1210-1226.
- Shimaoka, M., Takagi, J., and Springer, T.A. (2002). Conformational regulation of integrin structure and function. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 31, 485-516.
- Shimode, K., Iwasaki, N., Majima, T., Funakoshi, T., Sawaguchi, N., Onodera, T., and Minami, A. (2007). Bone marrow stromal cells act as feeder cells for tendon fibroblasts through soluble factors. *Tissue Eng* 13, 333-341.
- Short, B., Brouard, N., Occhiodoro-Scott, T., Ramakrishnan, A., and Simmons, P.J. (2003). Mesenchymal stem cells. *Arch Med Res* 34, 565-571.
- Shukunami, C., Oshima, Y., and Hiraki, Y. (2005). Chondromodulin-I and tenomodulin: a new class of tissue-specific angiogenesis inhibitors found in hypovascular connective tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 333, 299-307.

Shukunami, C., Takimoto, A., Oro, M., and Hiraki, Y. (2006). Scleraxis positively regulates the expression of tenomodulin, a differentiation marker of tenocytes. *Dev Biol* 298, 234-247.

Shyy, J.Y., and Chien, S. (1997). Role of integrins in cellular responses to mechanical stress and adhesion. *Curr Opin Cell Biol* 9, 707-713.

Smith, S.M., Crowe, D.L., and Lee, M.K. (2006). beta1 integrins modulate p66ShcA expression and EGF-induced MAP kinase activation in fetal lung cells. *Biochem Biophys Res Commun* 342, 909-918.

Stein, L.E. (1985). Effects of serum, fibroblast growth factor, and platelet-derived growth factor on explants of rat tail tendon: a morphological study. *Acta Anat (Basel)* 123, 247-252.

Sternlicht, M.D., and Werb, Z. (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17, 463-516.

Stoll, C., John, T., Endres, M., Rosen, C., Kaps, C., Kohl, B., Sittinger, M., Ertel, W., and Schulze-Tanzil, G. (2010). Extracellular matrix expression of human tenocytes in three-dimensional air-liquid and PLGA cultures compared with tendon tissue: implications for tendon tissue engineering. *J Orthop Res* 28, 1170-1177.

Takahashi, M., and Berk, B.C. (1996). Mitogen-activated protein kinase (ERK1/2) activation by shear stress and adhesion in endothelial cells. Essential role for a herbimycin-sensitive kinase. *J Clin Invest* 98, 2623-2631.

Tamkun, J.W., DeSimone, D.W., Fonda, D., Patel, R.S., Buck, C., Horwitz, A.F., and Hynes, R.O. (1986). Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin. *Cell* 46, 271-282.

Thomas, G.J., Nystrom, M.L., and Marshall, J.F. (2006). Alphavbeta6 integrin in wound healing and cancer of the oral cavity. *J Oral Pathol Med* 35, 1-10.

Till, J.E., and McCulloch, E.A. (1980). Hemopoietic stem cell differentiation. *Biochim Biophys Acta* 605, 431-459.

Tillander, B., Franzen, L., and Norlin, R. (2002). Fibronectin, MMP-1 and histologic changes in rotator cuff disease. *J Orthop Res* 20, 1358-1364.

Tkocz, C., and Kuhn, K. (1969). The formation of triple-helical collagen molecules from alpha-1 or alpha-2 polypeptide chains. *Eur J Biochem* 7, 454-462.

Tsubone, T., Moran, S.L., Amadio, P.C., Zhao, C., and An, K.N. (2004). Expression of growth factors in canine flexor tendon after laceration in vivo. *Ann Plast Surg* 53, 393-397.

Tsukazaki, T., Usa, T., Matsumoto, T., Enomoto, H., Ohtsuru, A., Namba, H., Iwasaki, K., and Yamashita, S. (1994). Effect of transforming growth factor-beta on the insulin-like growth factor-I autocrine/paracrine axis in cultured rat articular chondrocytes. *Exp Cell Res* 215, 9-16.

- Tsuzaki, M., Brigman, B.E., Yamamoto, J., Lawrence, W.T., Simmons, J.G., Mohapatra, N.K., Lund, P.K., Van Wyk, J., Hannafin, J.A., Bhargava, M.M., *et al.* (2000). Insulin-like growth factor-I is expressed by avian flexor tendon cells. *J Orthop Res* 18, 546-556.
- Tuan, R.S., Boland, G., and Tuli, R. (2003). Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Res Ther* 5, 32-45.
- Tulla, M., Pentikainen, O.T., Viitasalo, T., Kapyla, J., Impola, U., Nykvist, P., Nissinen, L., Johnson, M.S., and Heino, J. (2001). Selective binding of collagen subtypes by integrin alpha 1I, alpha 2I, and alpha 10I domains. *J Biol Chem* 276, 48206-48212.
- Ukai, R., Honmou, O., Harada, K., Houkin, K., Hamada, H., and Kocsis, J.D. (2007). Mesenchymal stem cells derived from peripheral blood protects against ischemia. *J Neurotrauma* 24, 508-520.
- van der Flier, A., and Sonnenberg, A. (2001). Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res* 305, 285-298.
- Violini, S., Ramelli, P., Pisani, L.F., Gorni, C., and Mariani, P. (2009). Horse bone marrow mesenchymal stem cells express embryo stem cell markers and show the ability for tenogenic differentiation by in vitro exposure to BMP-12. *BMC Cell Biol* 10, 29.
- Volberg, T., Romer, L., Zamir, E., and Geiger, B. (2001). pp60(c-src) and related tyrosine kinases: a role in the assembly and reorganization of matrix adhesions. *J Cell Sci* 114, 2279-2289.
- Waggett, A.D., Benjamin, M., and Ralphs, J.R. (2006). Connexin 32 and 43 gap junctions differentially modulate tenocyte response to cyclic mechanical load. *Eur J Cell Biol* 85, 1145-1154.
- Wang, Q.W., Chen, Z.L., and Piao, Y.J. (2005). Mesenchymal stem cells differentiate into tenocytes by bone morphogenetic protein (BMP) 12 gene transfer. *J Biosci Bioeng* 100, 418-422.
- Wang, X.T., Liu, P.Y., and Tang, J.B. (2004). Tendon healing in vitro: genetic modification of tenocytes with exogenous PDGF gene and promotion of collagen gene expression. *J Hand Surg Am* 29, 884-890.
- Wary, K.K., Mainiero, F., Isakoff, S.J., Marcantonio, E.E., and Giancotti, F.G. (1996). The adaptor protein Shc couples a class of integrins to the control of cell cycle progression. *Cell* 87, 733-743.
- Wenstrup, R.J., Florer, J.B., Brunskill, E.W., Bell, S.M., Chervoneva, I., and Birk, D.E. (2004). Type V collagen controls the initiation of collagen fibril assembly. *J Biol Chem* 279, 53331-53337.
- Wickham, M.Q., Erickson, G.R., Gimble, J.M., Vail, T.P., and Guilak, F. (2003). Multipotent stromal cells derived from the infrapatellar fat pad of the knee. *Clin Orthop Relat Res*, 196-212.

- Williams, J.T., Southerland, S.S., Souza, J., Calcutt, A.F., and Cartledge, R.G. (1999). Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes. *Am Surg* 65, 22-26.
- Wolfman, N.M., Hattersley, G., Cox, K., Celeste, A.J., Nelson, R., Yamaji, N., Dube, J.L., DiBlasio-Smith, E., Nove, J., Song, J.J., *et al.* (1997). 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.
- Woo, S.L., Abramowitch, S.D., Kilger, R., and Liang, R. (2006). Biomechanics of knee ligaments: injury, healing, and repair. *J Biomech* 39, 1-20.
- Woo, S.L., Debski, R.E., Zeminski, J., Abramowitch, S.D., Saw, S.S., and Fenwick, J.A. (2000). Injury and repair of ligaments and tendons. *Annu Rev Biomed Eng* 2, 83-118.
- Wyllie, A.H. (1997). Apoptosis: an overview. *Br Med Bull* 53, 451-465.
- Xiong, J.P., Stehle, T., Diefenbach, B., Zhang, R., Dunker, R., Scott, D.L., Joachimiak, A., Goodman, S.L., and Arnaout, M.A. (2001). Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3. *Science* 294, 339-345.
- Yaeger, P.C., Masi, T.L., de Ortiz, J.L., Binette, F., Tubo, R., and McPherson, J.M. (1997). Synergistic action of transforming growth factor-beta and insulin-like growth factor-I induces expression of type II collagen and aggrecan genes in adult human articular chondrocytes. *Exp Cell Res* 237, 318-325.
- Yamamoto, N., Akamatsu, H., Hasegawa, S., Yamada, T., Nakata, S., Ohkuma, M., Miyachi, E., Marunouchi, T., and Matsunaga, K. (2007). Isolation of multipotent stem cells from mouse adipose tissue. *J Dermatol Sci* 48, 43-52.
- Yang, C., Li, S.W., Helminen, H.J., Khillan, J.S., Bao, Y., and Prockop, D.J. (1997). Apoptosis of chondrocytes in transgenic mice lacking collagen II. *Exp Cell Res* 235, 370-373.
- Yin, Z., Chen, X., Chen, J.L., and Ouyang, H.W. (2010). Stem cells for tendon tissue engineering and regeneration. *Expert Opin Biol Ther* 10, 689-700.
- Yoon, J.H., and Halper, J. (2005). Tendon proteoglycans: biochemistry and function. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 5, 22-34.
- Yoon, Y.S., Lee, N., and Scadova, H. (2005). Myocardial regeneration with bone-marrow-derived stem cells. *Biol Cell* 97, 253-263.
- Yoshikawa, Y., and Abrahamsson, S.O. (2001). Dose-related cellular effects of platelet-derived growth factor-BB differ in various types of rabbit tendons in vitro. *Acta Orthop Scand* 72, 287-292.
- Young, B.B., Gordon, M.K., and Birk, D.E. (2000). Expression of type XIV collagen in developing chicken tendons: association with assembly and growth of collagen fibrils. *Dev Dyn* 217, 430-439.

Zhang, G., Young, B.B., and Birk, D.E. (2003). Differential expression of type XII collagen in developing chicken metatarsal tendons. *J Anat* 202, 411-420.

Zhang, G., Young, B.B., Ezura, Y., Favata, M., Soslowsky, L.J., Chakravarti, S., and Birk, D.E. (2005). Development of tendon structure and function: regulation of collagen fibrillogenesis. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 5, 5-21.

Zuk, P.A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D.A., Huang, J.I., Mizuno, H., Alfonso, Z.C., Fraser, J.K., Benhaim, P., and Hedrick, M.H. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 13, 4279-4295.

Zuk, P.A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J.W., Katz, A.J., Benhaim, P., Lorenz, H.P., and Hedrick, M.H. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7, 211-228.

Zvaifler, N.J., Marinova-Mutafchieva, L., Adams, G., Edwards, C.J., Moss, J., Burger, J.A., and Maini, R.N. (2000). Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res* 2, 477-488.

8. Danksagung

Zuerst möchte ich mich herzlichst bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. vet. Mehdi Shakibaei für die Überlassung des Themas bedanken. Seine ständige Erreichbarkeit, intensive Betreuung und wissenschaftliche Förderung suchen ihresgleichen. Die fast 3-jährige Zusammenarbeit war für mich sowohl akademisch als auch persönlich eine große Bereicherung.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe Shakibaei, insbesondere bei Frau Dr. med. vet. Buhrmann. Ihre kompetente und freundliche Hilfestellung hat maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ich danke Frau Prof. Dr. med. vet. Ulrike Matis für meine freundliche Aufnahme in der Tierchirurgischen Klinik der LMU und die Bereitstellung des Spendermaterials.

Von Herzen danke ich meinen Eltern, die mir mit zuverlässiger, großzügiger und immer verständnisvoller Unterstützung und Förderung meinen Weg bis heute ermöglicht haben. Ich werde ihre liebevolle Fürsorge nicht vergessen.

Außerdem möchte ich meinen Brüdern Carl Christoph und David danken, die mir immer mit Geduld, Motivation und moralischer Unterstützung zur Seite gestanden haben.

Nicht zuletzt herzlichen Dank an Vanessa, die mir während der gesamten Dissertation eine unersetzliche Begleiterin war.

Dankbar bin ich auch allen meinen guten Freunden für Rat und Tat zur rechten Zeit.

9. Eigene Veröffentlichungen

Publikationen (Original Papers)

1. **Schneider PRA**, Buhrmann C, Mobasheri A, Matis U, Shakibaei M.
Three-dimensional high-density co-culture with primary tenocytes induces tenogenic differentiation in mesenchymal stem cells.
J Orthop Res.; 2011 Sep;29(9):1351-60.
2. Csaki C, **Schneider PRA**, Shakibaei M.
Mesenchymal stem cells as a potential pool for cartilage tissue engineering.
Ann Anat.;190:395-412. Review.

Vorträge

1. Tenogenes Potential caniner mesenchymaler Stammzellen in einem 3-D Massenkulturmodell
Abschlussymposium Förderung für Forschung und Lehre der LMU
Herrsching, Mai 2009
2. Das 3-D Massenkulturmodell
Methodenkolloquium, Molekularmedizin, Förderung für Forschung und Lehre der LMU
München, Februar 2008

Poster

Schneider PRA, C. Buhrmann, A. Mobasheri, F. Busch, U. Matis, M. Shakibaei.
Co-culture of Mesenchymal Stem Cells with Primary Tendon-derived Tenocytes promotes Tenogenic Differentiation *in vitro*
Arbeitstagung Anatomische Gesellschaft Würzburg 28-30 Sept. 2011