

Aus der Orthopädischen Klinik und Poliklinik
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Maximilian Rudert

In vitro Untersuchungen zur tenogenen Differenzierung von humanen
mesenchymalen Stammzellen in Kollagen I-Nanofaseraffolds für den
Sehnenersatz

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Ruth Broermann
aus München

Würzburg, März 2013

Referent: Prof. Dr. med. Ulrich Nöth, MHBA

Koreferent: Prof. Dr. Heike Walles

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 08.07.2014.

Die Promovendin ist Ärztin.

Meinen Eltern gewidmet

„It's not over until it's over“
Silvester Stallone in Rocky Balboa

Abkürzungsverzeichnis

ACL	anterior cruciate ligament; vorderes Kreuzband
bHLH	basic Helix-loop-Helix
BMP	Bone morphogenetic Protein
BSA	Bovines Serum Albumin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-Tri-Phosphat
CO ₂	Kohlendioxid
DAPI	4,6 Diamidino-2 phenylidol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDC	Ethyl dimethylaminopropylcarbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al	et altera
EtOH	Ethanol
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS	Fetales Kälberserum
G	Gauge
GAPDH	Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat- Dehydrogenase
HE	Hämatoxylin-Eosin
HFP	Hexafluor-Propanol
HMDI	Hexamethylendiisocyanat
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
IU	Internationale Einheit
NF	Nanofasern
NFS	Nanofaseraffold
NHS	N-Hydroxy-Succinid
kV	Kilovolt
MES	N-Morpholinoethansulfonsäure
MSZ	mesenchymale Stammzelle

MW	Mittelwert
N	Newton
NaCl	Natriumchlorid
NHS	N-Hydroxy-Succinid
mM	Millimol
nm	Nanometer
OT	Objekträger
PBS	Phosphat buffered saline
PCL	Poly- γ -caprolactone
PEO	Poly-ethylen-oxid
PFA	Paraformaldehyd
PGA	Polyglycol-Acid
PLLA	Poly-L-Acid
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RNA	Riboxynukleinsäure
rpm	Rotation pro min
RT	Reverse Transkriptase
SD	Standardabweichung
TGF	Transforming Growth Factor
μ A	Mikroampere

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Sehnenverletzung	1
1.2	Makro-/Mikroskopischer Aufbau von Sehnen	2
1.2.1	Extrazelluläre Matrix (EZM).....	3
1.2.2	Sehnenzellen (Tenozyten)	5
1.3	Tissue Engineering	6
1.4	Mesenchymale Stammzellen (MSZ)	7
1.4.1	Tenogene Differenzierung.....	9
1.5	Elektrospinning	9
1.6	Crosslinking	11
1.7	Fragestellung	12
2	MATERIAL UND METHODEN	14
2.1	Isolation und Aufreinigung von Kollagen I	14
2.2	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	14
2.3	Kollagen I-Elektrospinning	15
2.4	Rasterelektronenmikroskopie (REM)	17
2.4.1	Bestimmung von Faserdicke, Porengröße und Faserausrichtung	17
2.5	Bestimmung der Zugfestigkeit der Kollagen-NFS	19
2.6	Isolierung und Expansion mesenchymaler Stammzellen aus Knochenmark	20
2.7	Crosslinken	21
2.8	Zellkulturversuche mit MSZ	22

2.8.1	DNA-Gehalt.....	24
2.8.2	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	25
2.8.3	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure- Synthese (cDNA-Synthese) .	25
2.8.4	Gelelektrophorese.....	26
2.8.5	Semiquantitative Densitometrie	27
2.9	Histologie.....	28
2.9.1	Anfertigung der histologischen Schnitte.....	28
2.9.2	Histochemische Färbungen	29
2.9.3	Immunhistochemische Färbungen.....	31
2.10	Verwendete Lösungen und Ansätze	31
2.11	Verwendete Geräte und Materialien	36
3	ERGEBNISSE.....	38
3.1	Kollagen-Isolierung.....	38
3.2	Kollagen I-Elektrospinning.....	38
3.2.1	Nanofasermorphologie im REM	39
3.2.2	Porengröße	41
3.2.3	Ausrichtung der Nanofasern	41
3.2.4	Zugfestigkeit der Kollagen I-NFS	43
3.3	Crosslinken der Zellträger.....	44
3.4	Zellkulturversuche mit MSZ	45
3.4.1	Fluoreszenzmikroskopische Darstellung fokaler Adhäsionen und des Zytoskelettes.....	45
3.4.2	MSZ-Morphologie in Abhängigkeit vom Faserdurchmesser	46
3.4.3	MSZ-Morphologie in Abhängigkeit der Faserausrichtung	47

3.4.4	Abhängigkeit der Zellachsenorientierung vom Faserverlauf	48
3.4.5	DNA-Gehalt.....	51
3.4.6	Semiquantitative Densitometrie der tenogenen Markergenexpression ..	53
3.5	Histologie.....	56
4	DISKUSSION.....	58
4.1	Methodische Überlegungen.....	58
4.2	Elektrospinning von Kollagen I	59
4.3	Elektrospinning und rotierender Zylinder	60
4.4	Crosslinker	61
4.5	Zellmorphologie	61
4.6	Tenogene Differenzierung.....	62
4.7	Zukunftsperspektiven.....	64
5.	ZUSAMMENFASSUNG.....	66
6.	LITERATURVERZEICHNIS.....	68

1 Einleitung

1.1 Sehnenverletzung

Sehnenverletzungen gehören zu häufigsten Verletzungen in der Orthopädie und Unfallchirurgie. Die Inzidenz für Achillessehnenrupturen beläuft sich in Deutschland auf ca. 20.000 Verletzungen pro Jahr (Lill, 1996; Majewski et al., 2000). Therapiemöglichkeiten zur Behandlung von Band- und Sehnenverletzungen bestehen, in Abhängigkeit der verletzten Struktur, durch die Rekonstruktion mit einer primären Naht, biologischen Transplantaten wie Autografts (Transplantation innerhalb des identischen Individuums) oder Allografts (Transplantation zwischen nicht-identischen Individuen) und durch die Implantation von synthetisch hergestellten Materialien (Stecker und Parker, 1999).

Bei der Primärnaht werden die Rupturenden der Sehne angefrischt und durch spezielle Nahttechniken miteinander vernäht. Durch die mögliche Entstehung von biomechanisch insuffizientem Narbengewebe kann es trotz der primären Rekonstruktion zu erneuten Instabilitäten/Rupturen kommen (Strand, 2005; Weiler, 2002).

Bei substantiellen Sehnenrupturen ist eine primäre Naht durch das fehlende oder degenerativ veränderte Sehnengewebe oft nicht mehr möglich. In diesem Fall kann die Sehne oft nur durch die Verwendung einer autologen Sehne, z. B. Tibialis anterior-/Semitendinosus-/Gracilissehne, rekonstruiert werden (Laurencin und Freeman, 2005). Im angloamerikanischen Raum werden vermehrt Allografts zur Rekonstruktion eingesetzt. Autografts und Allografts können zu befriedigenden Ergebnissen bezüglich Belastbarkeit, Unterstützung der Zellproliferation und folglich des Gewebewachstums führen (Laurencin und Freeman, 2005). Jedoch weisen beide Methoden eine Reihe von Nachteilen auf: Autografts sind begrenzt verfügbar und können durch sekundäre Verletzungen zu Problemen und Schmerzen am Entnahmeort führen (donor site morbidity). Allografts stehen zwar nahezu unbegrenzt zur Verfügung stellen aber potenzielle Krankheitsüberträger dar und können ungewollte Immunreaktionen hervorrufen (Eichhorn et al., 2006).

Neue Therapieansätze zur Rekonstruktion von rupturierten Sehnen unter

Einsatz von azellulären biologischen und synthetischen Materialien zum Ersatz des rupturierten Sehngewebes und die Initiierung des Einwachsens von ortsständigem Gewebe zeigen erfolgsversprechende Ergebnisse. Erste Arbeiten hierzu veröffentlichte Dunn et al. (1997) mit Kollagen-PLA-Zellträgern für die Kreuzbandrekonstruktion beim Kaninchen.

1.2 Makro-/Mikroskopischer Aufbau von Sehnen

Eine Sehne ist die strangartige Fortsetzung der bindegewebigen Hüllsysteme des Muskels über die äußersten Enden der Muskelfaser hinaus. Sie verankert den Muskel am Knochen und vermittelt die mechanische Interaktion zwischen Skelettelementen und Muskeln und ermöglicht somit die Gelenkbewegung (Milz et al., 2009).

Die Extrazelluläre Matrix (EZM) von Sehnen besteht hauptsächlich aus parallel angeordneten Kollagen Typ I-Fasern. Daneben bilden Proteoglykane und Glykoproteine wichtige Strukturelemente der EZM. Die Zusammenlagerung mehrerer Kollagenfasern bildet ein Primärbündel und mehrere Primärbündel bilden jeweils ein Sekundärbündel oder Faszikel, welches vom Endotenon umhüllt wird. Das Endotenon bildet die Leitschiene für Gefäße, Nerven und Lymphbahnen und ermöglicht zusätzlich die Bewegung der Faszikel untereinander. Als letzte Schicht wird die gesamte Sehne vom Paratenon umhüllt (Abb.1) (Thermann et al., 2000).

Die Mikro- und Makrostruktur ermöglicht es Sehnen, die im Muskel erzeugte Kraft auf den Knochen bzw. das Skelett zu übertragen. Sehnen sind in verschiedenen Bewegungsphasen vor allem longitudinalen, aber auch transversalen Kräften ausgesetzt. Die architektonische Anordnung und Zusammensetzung der EZM bedingt die dreidimensionale Struktur der Sehenfaser und gewährleistet dadurch eine sehr hohe Zugstabilität und eine Kraftübertragung zwischen Muskel und Knochen (Hoffmann et al., 2006).

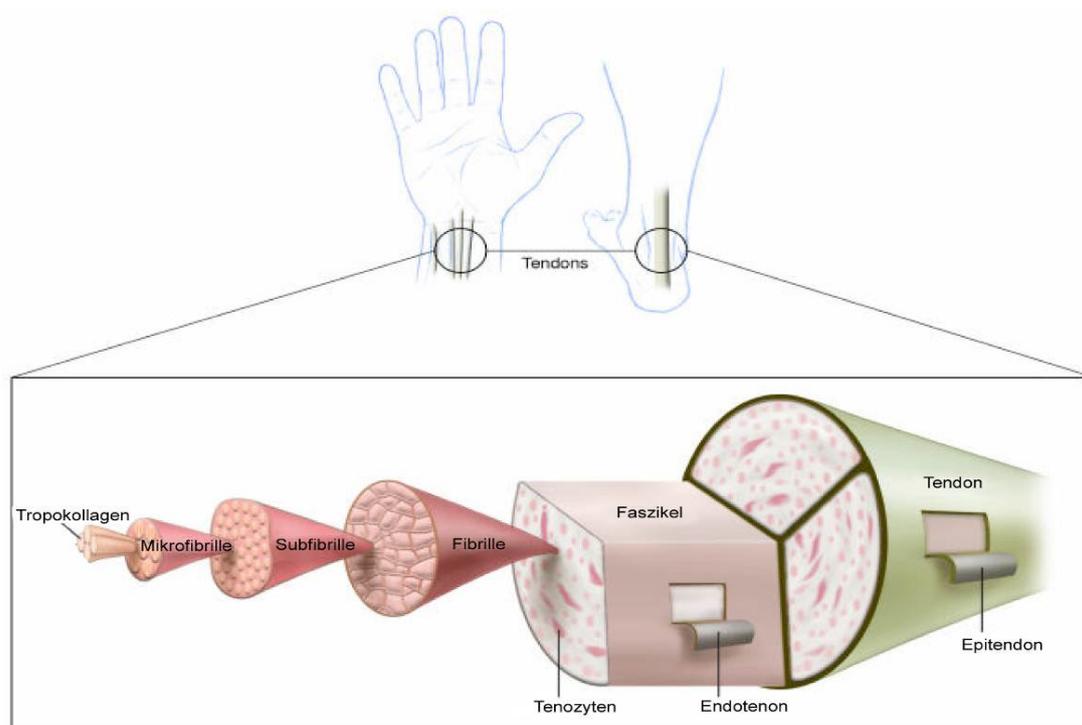


Abb. 1: Aufbau und Struktur von Sehnen und Bändern (modifiziert nach Towler und Gelberman, 2006).

1.2.1 Extrazelluläre Matrix (EZM)

Der Aufbau der EZM erfolgt aus Makromolekülen, die in drei Hauptklassen unterteilt werden können. Faserbildende Proteine, Proteoglykane und Adhäsionsproteine. Die Zusammensetzung ist gewebespezifisch und den funktionellen Anforderungen des Gewebes angepasst (Müller-Esterl, 2004).

Kollagen gehört zu den wichtigsten fibrösen Strukturproteinen des menschlichen Organismus (Müller-Esterl, 2004). Kollagen I wie auch Kollagen II, III, V und XI werden unter den bisher 29 entdeckten Kollagenen (Kühn, 1986; Mayne und Brewton, 1993; van der Rest und Garrone, 1991) den fibrillären Kollagenformen zugeteilt.

Kollagen I stellt das Hauptstrukturprotein von Bindegeweben dar und ist mit einem Anteil von 25% am Gesamtprotein das häufigste Protein im menschlichen Körper. Es bildet den Hauptbestandteil der EZM von Sehnen (60 bis 80% der Trockenmasse einer Sehne) (Hurle et al., 1989; Birk und Mayne, 1997; Niederreither et al., 1995). Daneben gibt es Kollagen III und V in

geringeren Anteilen. Kollagen I ist ein Heterotrimär mit einer tripelhelikalen Struktur (ca. 300 nm lang und 1,5 nm breit) aus zwei identischen $\alpha 1(I)$ - und einer $\alpha 2(I)$ -Untereinheit bestehend (Hulmes und Miller, 1979; Khor, 1997). Die einzelnen Kollagentrimäre lagern sich zusammen zu Mikrofibrillen und organisieren sich durch weitere repetitive Anlagerung zu Fibrillen.

Als weiterer Bestandteil der EZM macht Elastin ca. 1-2% der Sehntrockenmasse aus. Dieses Molekül verleiht der EZM des Sehngewebes seine Elastizität (Kannus, 2000; Müller-Esterl, 2004). Die Biosynthese von Elastin verläuft ähnlich wie bei Kollagen I über ein Vorläufermolekül, das Tropoelastin, welches wasserlöslich ist. Es ist aus einem Proteinnetzwerk aus Mikrofibrillen aufgebaut. Die einzelnen Mikrofibrillen bestehen wiederum überwiegend aus Fibrillin-1 und Fibrillin-2 (Mitieux und Weiss, 2005). Durch die verwobene und unstrukturierte Anordnung der Polypeptidmoleküle besteht ein gummiartiges elastisches Maschenwerk. Unter Zug wird es in ein geordnetes System vielfacher Länge seiner Ausgangslänge überführt und geht bei nachlassender Dehnung in seine ungeordnete Ausgangslage zurück. Elastin sorgt nicht wie Kollagen I für die mechanische Festigkeit sondern für die elastische Dehnungsfähigkeit des Gewebes (Scott, 2003; Müller-Esterl, 2004).

Proteoglykane und Glykoproteine sind Komponenten der EZM bestehend aus einem Proteinkern und einem Kohlenhydratanteil. Während die Proteoglykane einen kleineren Proteinanteil, dagegen einen voluminösen Glykosaminoglykananteil besitzen, bestehen Glykoproteine aus einem größeren Proteinkern mit sehr viel kürzeren Zuckerketten. Auf Grund ihres unterschiedlichen Molekülaufbaus nehmen sie unterschiedliche Funktionen in der EZM wahr (Müller-Esterl, 2004). Die Proteoglykane sind stark hydrophil, bei physiologischen pH überwiegend mit negativen Ladungen besetzt und binden über Kationen Wassermoleküle. Dies führt zur Ausbildung einer gelartigen Struktur mit großer Stabilität gegen Druckbelastungen. Glykoproteine hingegen besitzen adhäsive Eigenschaften und werden auch als „Klebe Proteine“ oder adhäsive Glykoproteine bezeichnet. Dementsprechend besitzen sie die

Fähigkeit makromolekulare Strukturen der EZM untereinander und ebenso mit anderen Zellen zu vernetzen. In Sehnen sind bisher u.a. die Glykoprotein Tenascin C, Fibronectin, Thrombospondin und Undulin beschrieben (Kannus, 2000).

Wobei besonders die Expression von Tenascin C häufig als tenogenes Markergen verwendet wird. Dieses Matrixmolekül zeichnet sich durch eine enorme Elastizität aus. Im Gegensatz zu den Proteoglykanen, die der EZM ihre Druckfestigkeit verleihen, kann Tenascin C extreme Zugbelastungen kompensieren (Müller-Esterl, 2004). Diese Eigenschaft erklärt sich durch die Fähigkeit sich unter Zugbelastung um ein Vielfaches ihrer Ruhelänge ohne Beeinflussung der Molekülstruktur auszudehnen. Tenascin C findet man in Sehnen und Bändern perizellulär wie auch um die Kollagenfasern angeordnet (Järvinen et al., 2000; Chiquet-Ehrismann und Tucker, 2004).

1.2.2 Sehnenzellen (Tenozyten)

Der zelluläre Anteil des Sehnengewebes wird aus Tenozyten und Tenoblasten gebildet. Sie bilden mit 95% den Hauptzellanteil der Sehne. Tenozyten werden als spezialisierte Fibroblasten angesehen und sind typischerweise in longitudinalen Reihen parallel zu den Kollagenfaserbündeln angeordnet (Milz et al., 2009). Tenozyten synthetisieren die Komponenten der EZM der Sehne. Sie sind für das Remodelling der Matrix und für die Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität verantwortlich (Benjamin und Ralphs, 2000; Kannus, 2000).

Sehnen stellen ein bradytrophes Gewebe mit geringer Zellularität dar. Dadurch bedingt kommt es zu Einschränkungen in der Neubildung des zugrunde gegangenen Gewebes und zu Defiziten der intrinsischen Heilung (Hoffmann et al., 2006). Als Ursache wird auch die unzureichende Blutversorgung diskutiert (Dahlgren et al., 2005). Intrakapsuläre Bänder, wie das vordere Kreuzband (ACL), weisen keine Spontanheilung auf. Die endogene Heilung von extrakapsulären Sehnen führt häufig zu insuffizientem Narbengewebe mit verminderter Reißfestigkeit (Dahlgren et al., 2005; Sharma und Maffulli, 2005). Die limitierte Heilung an Sehnen-Sehnen oder Sehnen-Knochenübergängen

und die dadurch bedingte Funktionseinschränkung ist u.a. durch die Ausbildung eines mechanisch insuffizienten Reparaturgewebes und ggf. durch fibröse Adhäsionen bedingt (Towler und Gellberman, 2006).

Diese limitierte Heilungstendenz bei konservativer oder operativer Therapie von Sehnen- oder Bandverletzungen kann langfristig zu einer dauerhaften Störung der Gelenkkinematik mit Funktionsverlust, Degeneration und Schmerzen führen (Bosch und Krettek, 2002).

1.3 Tissue Engineering

Tissue Engineering ist ein interdisziplinäres Forschungsgebiet, dass erstmals Ende der achtziger Jahre von Langer und Vacanti (1993) beschrieben wurde. Es kombiniert Prinzipien der Medizin, Natur- und Ingenieurwissenschaften mit dem Ziel, Gewebe oder Gewebeersatzsysteme zur Unterstützung oder Substitution von erkrankten und verletzten Geweben bzw. Organen zu entwickeln. Heutzutage hat sich das Tissue Engineering zu einer weitgehend selbstständigen Disziplin entwickelt, die sich mit der Rekonstruktion nahezu aller Gewebe des menschlichen Körpers befasst (Fuchs et al., 2001; Nöth et al., 2010a; Nöth et al., 2010b).

Therapieprinzipien des Tissue Engineering sind durch eine Trias von Faktoren charakterisiert:

1. **Trägermaterialien** (Scaffolds)
2. **Zellen** (primäre differenzierte Zellen oder Vorläuferzellen)
3. **Wachstumsfaktoren** oder andere (z. B. mechanische) Stimuli (Langer und Vacanti, 1993; Vacanti und Langer, 1999).

Die Scaffolds können sowohl aus natürlichen als auch synthetischen Polymeren hergestellt werden. Natürliche Materialien wie Kollagen, Fibrin oder Hyaluron ermöglichen die Herstellung von Scaffolds mit optimaler Biokompatibilität und Biodegradibilität, wohingegen die Scaffolds aus Materialien wie z. B.: Polyglycolic Acid (PGA), Polylactic Acid (PLA) und Poly- γ -caprolactone (PCL) eine höhere primäre Stabilität verleihen und mehr Möglichkeiten zur

Beeinflussung der Mikro- und Makrostruktur der Scaffolds bieten (Nöth et al., 2010b). Zu den verwendbaren Zellen gehören sowohl differenzierte primäre Zellen als auch Progenitorzellen, die sowohl autologer als auch allogener Herkunft oder genetisch modifiziert sein können. Dies ermöglicht die Implantation isolierter Zellen in einen Empfängerorganismus, den spezifischen Ersatz der notwendigen Zellfunktion und/oder eine gezielte Veränderung der Zellen vor Einbringung in das Empfängergewebe (Mayer et al., 2009).

Die Proliferation und Differenzierung von Zellen wird durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst, die für die Herstellung eines funktionellen Gewebe- oder Organkonstruktes hilfreich oder sogar Voraussetzung sind. Dazu gehören Wachstumsfaktoren, die spezifische Zellprozesse/-differenzierung induzieren können, oder physikalische Stimuli, wie Dehnung, Druck oder Änderung des O₂-Partialdruckes (Bosch, 2003; Nöth et al., 2010b).

Tissue Engineering bietet ein großes therapeutisches Potential für den Ersatz oder die Regeneration von defektem oder erkranktem Gewebe des muskuloskelettalen Systems (Laurencin et al., 1999; Huard et al., 2003).

Unsere Arbeitsgruppe konnte in bisherigen Arbeiten unter Verwendung von stammzellbesiedelten Kollagen I-Hydrogelen eine ligamentogene Differenzierung der Mesenchymale Stammzellen (MSZ) nachweisen, die unter mechanischer Belastung (zyklischer Dehnung) deutlich verstärkt war (Nöth et al., 2005). Auf Grund der geringen biomechanischen Primärstabilität der Kollagen I-Hydrogele sind diese aber für einen potentiellen Einsatz in vivo nicht geeignet. Aufgrund dieser Ergebnisse liegt ein Schwerpunkt in der Entwicklung biodegradierbarer Scaffolds für die Sehnenrekonstruktion, wobei diese unter Berücksichtigung der Zusammensetzung und Ultrastruktur der EZM entwickelt werden.

1.4 Mesenchymale Stammzellen (MSZ)

MSZ sind rein funktionell durch die biologischen Funktionen Proliferation, Selbsterneuerung und Differenzierung definiert (Odorico et al., 2001). MSZ sind in der Lage zur asymmetrischen Zellteilung, d.h. einerseits Teilung in eine Tochterzelle mit Stammzeleigenschaften und andererseits in eine Tochterzelle

mit multipotentem Differenzierungspotenzial.

Bei humanen MSZ handelt es sich um Zellen die in unterschiedliche mesenchymale Gewebe wie z. B. Knochen (Jaiswal et al., 1997), Knorpel (Johnstone et al., 1998), Sehnen (Caplan und Bruder, 2001), Muskeln (Wakitani et al., 1995) sowie Fett und Haut differenziert sein können (Pittenger et al., 1999) (Abb. 2). MSZ können aus unterschiedlichen Geweben gewonnen werden (Nöth et al., 2002a; Tuan et al., 2003) wie z. B. aus Knochenmark, (Caplan und Bruder, 2001; Nöth et al., 2002a), Periost und Fett (Liu et al., 2007). Die Gewinnung von MSZ aus Knochenmark ist die am besten untersuchte Methode und das praktikabelste Verfahren zur Gewinnung von MSZ in der klinischen Anwendung (Baksh et al., 2004).

Die Verwendung von autologen MSZ im zellbasierten Tissue Engineering hat den Vorteil, dass das Risiko einer Immunreaktion ausgeschlossen werden kann. Tiermodelle weisen darauf hin, dass auch allogene MSZ nicht als Fremdgewebe erkannt werden und somit Abstoßungsreaktionen ausbleiben (Caplan und Bruder, 2001).

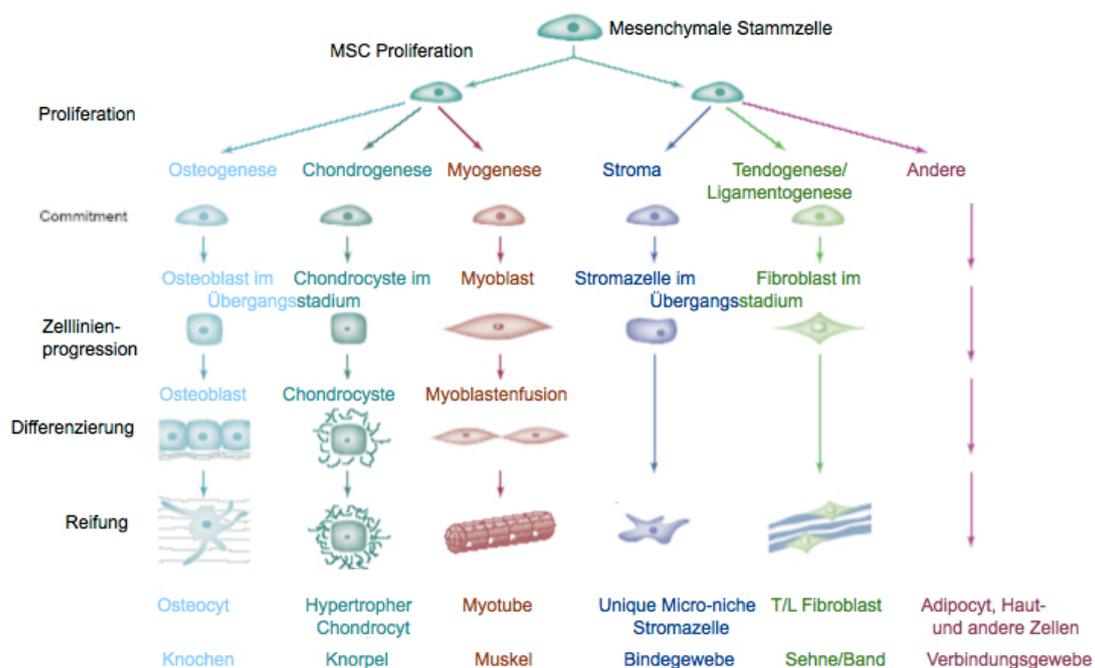


Abb. 2: Differenzierungswege MSZ in unterschiedliche Gewebe mesenchymalen Ursprungs (modifiziert nach Caplan, 2005).

1.4.1 Tenogene Differenzierung

Die tenogene Differenzierung beschreibt eine zeitabhängige Änderung der Morphologie und des Expressionsmusters der MSZ von einem undifferenzierten in einen differenzierten Tenozyten-ähnlichen Zelltyp. Die Induktion zur Differenzierung der MSZ zu Geweben des Bewegungsapparates, wie Sehnen und Bänder bedürfen der Einhaltung unterschiedlicher Parameter. Entscheidend für die *in vitro* Tenogenese sind Kulturbedingungen, Wachstumsfaktoren und physikalische Stimuli, wie z. B. mechanischer Stress (Helm et al., 2001).

Spezifische, molekularbiologische Marker für Sehnen und/oder Bänder sind bisher nicht beschrieben (Chuen et al., 2004; Tozer und Duprez, 2005). Begründet ist dieser Mangel an sehnenspezifischen Markern darin, dass die einzelnen Matrixkomponenten auch am Aufbau anderer Gewebe beteiligt sind.

Eine besondere Rolle spielt der Transkriptionsfaktor Skleraxis. Skleraxis wird in die Klasse B der basic Helix-loop-Helix (bHLH) Transkriptionsfaktoren eingegliedert, dessen frühe Expression die Vorläuferzellen von Sehnen und Ligamenten markiert (Schweitzer et al., 2001).

Da Skleraxis sowohl in Sehnenvorläuferzellen als auch in differenzierten Sehnen und Ligamenten exprimiert wird, ist dieser Transkriptionsfaktor als einer der wichtigsten Marker für die Sehnenentwicklung anzusehen (Schweitzer et al., 2001). Skleraxis wird in allen Bindegeweben exprimiert, die Muskelverbindungen synthetisieren (Schweitzer et al., 2001).

1.5 Elektrospinning

Elektrospinning ist eine Methode zur Herstellung von kontinuierlichen Fasern und nicht gewobener Fasermatten mit einem Faserdurchmesser im Nanometer bis Mikrometerbereich (Li et al., 2003). Elektrospinning wurde ursprünglich zur Herstellung ultradünner Polymerfasern in der Textilindustrie eingesetzt und gewinnt seit einigen Jahren in der Herstellung biomimetischer Zellträger an Bedeutung (Formhals, 1934). Nanofasern (NF) bzw. Nanofaseraffolds (NFS) weisen Charakteristika der EZM von nativen Geweben auf und unterstützen

biologische Vorgänge wie Zelladhäsion, Proliferation und Differenzierung (Mayer et al., 2009).

Der generelle Aufbau einer Elektrospinning-Einheit ist in Abb. 3 schematisch dargestellt. Der Aufbau setzt sich aus drei Hauptkomponenten zusammen: der Emittierelektrode (Stahlhohlnadel), der Kollektorplatte (Kupferplatte) und dem Generator eines elektrischen Potentials zwischen den genannten Komponenten (Li und Tuan, 2009).

Der Mechanismus des Elektrospinnens basiert auf einer komplexen elektro-physikalischen Aktivität zwischen einer Polymerlösung und der elektrostatischen Kraft. In diesem Prozess wird zwischen der Emittierelektrode und der Kollektorplatte ein elektrisches Feld mit Hochspannung durch einen Spannungsgeber angelegt (Li und Tuan, 2009).

Beim Herausfließen der Polymerlösung aus der Stahlhohlnadel bildet sich ein semisphärischer Tropfen an der Nadelspitze. Mit steigender Spannung kommt es zur konischen Verformung des Tropfens, sog. Taylor Cone (Taylor, 1969). Die Ladung auf der Oberfläche des Tropfens nimmt mit der Zeit zu. Sobald die Ladung auf der Oberfläche die Oberflächenspannung des Polymertropfens übersteigt kommt es zur Bildung eines Polymer-Jets der sich schnell auf die geerdete Kollektorplatte zubewegt (Taylor, 1964). Das Lösungsmittel im Polymer-Jet verdunstet auf seinem Weg zur Kollektorplatte durch die ansteigende Oberflächenspannung des Jets. Während der Passage des elektrischen Feldes ruft der Anstieg der Oberflächenspannung eine Instabilität im Polymer-Jet hervor. Zur Kompensation dieser Instabilität teilt sich der Jet geometrisch in viele immer kleinere Jets auf, so dass es zu einer exponentiellen Vergrößerung des Oberflächen-/Volumenverhältnisses kommt und folglich das Lösungsmittel verdunstet. Nach Verdunsten des Lösungsmittels lagern sich die NF Lage für Lage auf der Kollektorplatte an und bilden eine nicht-verwobene Nanofasermatte. Während des Elektrospinningprozesses wird die strukturelle Morphologie der NF sowohl durch extrinsische als auch intrinsische Faktoren beeinflusst (Doshi und Reneker, 1995). Zu den extrinsischen Faktoren gehören insbesondere die Raumtemperatur und die Luftfeuchtigkeit. Zu den intrinsischen Faktoren zählen die angelegte Spannung, der Abstand zwischen

Nadel und Kollektorplatte wie auch die Leitfähigkeit und Viskosität der Polymerlösung. Die Optimierung dieser Parameter führt zur Herstellung uniformer NF (Li und Tuan, 2009). Die Abb. 3 stellt den Aufbau der von uns verwendeten Elektrospinning-Apparatur schematisch dar.

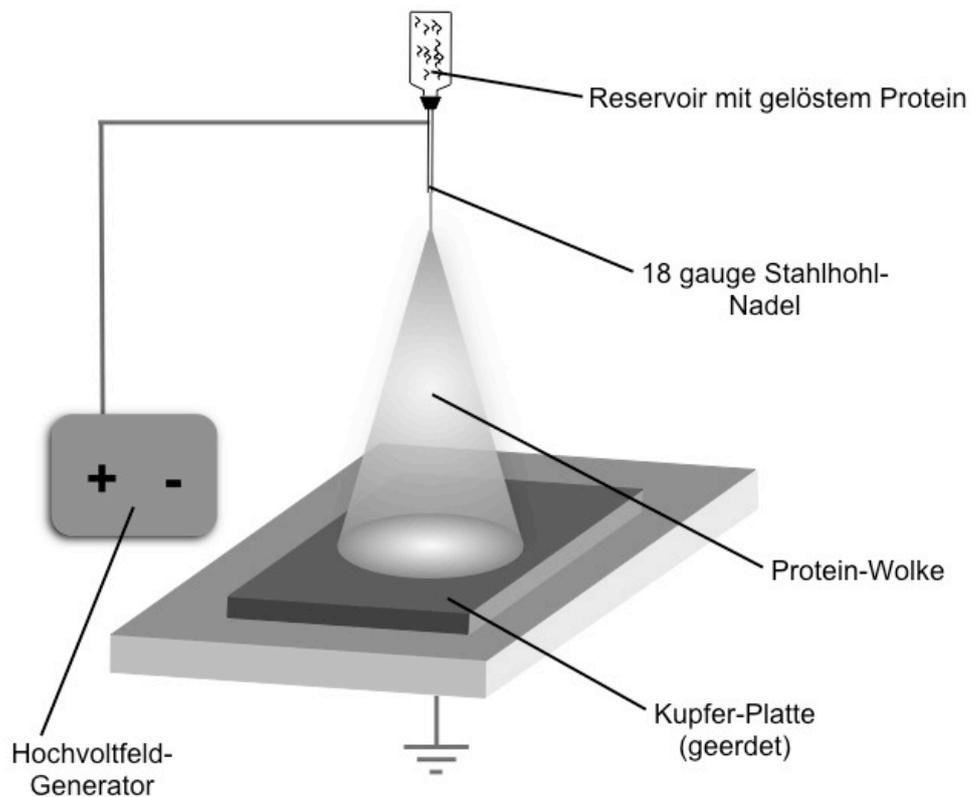


Abb. 3: Schematischer Aufbau einer Elektrospinning-Einheit.

1.6 Crosslinking

Aus Kollagen hergestellte Zellträger werden im Laufe der Zeit durch die Einwirkung von physiologisch im menschlichen Körper vorkommenden Enzymen, wie Proteasen oder Kollagenasen zersetzt. Das Ziel des Crosslinkings ist es, die biologische Stabilität der Scaffolds zu verbessern und damit einer rapiden Degradation des Scaffolds entgegen zu wirken. Glutaraldehyd behandelte Schweineherzklappen für den xenogenen Aortenklappenersatz am Menschen stellen ein Beispiel für den klinischen Einsatz solcher chemischen Crosslinker dar (Hoffmann et al., 2008). Zum

Crosslinking von biologischen Zellträgern wurden in der Literatur zahlreiche chemische Substanzen wie Genipin, N-Hydroxy-Succinid (NHS) und Hexamethylendiisocyanat (HMDI), Ethyldimethylaminopropylcarbodiimid (EDC), aber auch physikalische Methoden, wie Erhitzen oder Gefriertrocknung, beschrieben (Khor, 1997; Grabarek und Gergely, 1990). Alle angewendeten Methoden haben das Ziel neue zusätzliche chemische Bindungen zwischen den Kollagenmolekülen auszubilden. Es sollen irreversible und stabile intra- und intermolekulare chemische Bindungen zwischen den Kollagenmolekülen gebildet werden. Durch diese zusätzlichen Bindungen soll die biologische Degradation der Scaffolds verzögert werden, ohne jedoch die ursprüngliche Form und den ultra-strukturellen Aufbau des Zellträgers zu alterieren (Khor, 1997).

1.7 Fragestellung

Die operative Rekonstruktion substantieller Sehnenrupturen bedingt häufig den Einsatz autologer oder allogener Ersatzplastiken. Zur Vermeidung der potentiellen donor side morbidity oder anderer Risiken dieser Techniken stellt die Verfügbarkeit biomimetischer Scaffolds, die sich für den Einsatz im Rahmen von zellbasierten Strategien eignen, ein vielversprechender Ansatz dar. Adulte MSZ besitzen ein multipotentes Potential sich in Zelllinien unterschiedlicher mesenchymaler Gewebe, wie z. B. Sehnenzellen zu differenzieren. Sie sind eine klinisch gut verfügbare und vielversprechende Zellquelle für den Einsatz in der translationalen Forschung. Die Berücksichtigung der strukturellen Architektur und der biochemischen Zusammensetzung der EZM des Zielgewebes stellt unserer Ansicht nach eine entscheidende Einflussgröße bei der Herstellung von Scaffolds für MSZ-basierte Strategien im Tissue Engineering dar.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Herstellung biomimetischer NFS aus murinem Kollagen I durch Elektrospinning. Besonders sollte untersucht werden, wie sich ein rotierender Kollektor auf die Isotropie der entstehenden Fasern auswirkt. Hierbei sollte erforscht werden, in wieweit die Nachahmung der EZM des Zielgewebes (Sehne) mit parallel ausgerichteten Fasern einen

sinnhaften Ansatz in dem Designprozeß von Scaffolds für die Sehnenrekonstruktion darstellt. Die unterschiedlich hergestellten NFS wurden zunächst elektronenmikroskopisch charakterisiert, mechanisch getestet und anschließend bzgl. der vermittelten MSZ-Matrix Interaktion untersucht.

Die Verfügbarkeit biomimetischer Scaffolds, deren struktureller Aufbau der EZM von nativem Sehngewebe nachempfunden ist und durch diese Eigenschaften die Adhäsion, Proliferation und tenogene Differenzierung MSZ unterstützt, wäre eine viel versprechende Alternative derzeitiger Therapieverfahren zur Rekonstruktion substantieller Sehnendefekte.

2 Material und Methoden

2.1 Isolation und Aufreinigung von Kollagen I

Kollagen I wurde aus Rattenschwanzsehnen gesundheitsüberwachter Tiere (Charles River, Sulzfeld) nach dem folgendem Protokoll isoliert und aufgereinigt.

1. Enthäuten des Rattenschwanzes
2. Herauslösen der einzelnen Kollagen I-Fasern (Abb. 4)
3. Waschen in Phosphat buffered saline (PBS) für 5 min
4. 70% Isopropanol für 5 min
5. Lösen der Kollagen I-Fasern in 0,02 N Essigsäure für 48 h bei 4°C unter ständigem Rühren
6. Zentrifugieren (4000 Rotation pro min (rpm), 25 min, 25°C)
7. Dialyse des gelösten Kollagen I gegen 0,01 M Essigsäure
8. Lyophilisieren des Dialyseproduktes
9. Lagerung bei -80°C (Rajan et al., 2007)



Abb. 4: Kollagen I-Isolation. (A) Rattenschwanz, Rattenschwanz enthäutet und herausgelöste Kollagenfaser, (B) gewaschene Fasern, (C) getrocknetes Kollagen I nach Lyophilisierung.

2.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Überprüfung der Qualität des isolierten Kollagen I wurde eine SDS-PAGE durchgeführt. Hierbei wurde das eigens isolierte Kollagen I mit Gelatine und kommerziell erhältlichem Kollagen I verglichen. Die jeweiligen Proben wurden in 0,1% Essigsäure gelöst (Gelatine 0,25%, isoliertes Kollagen I 0,1%). Vor der Elektrophorese wurden die Proben für 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend auf Eis gekühlt, um eine Renaturierung zu verhindern.

SDS-PAGE Ladepuffer:

7,56 g Tris

36,06 g Glycin

2,5 g SDS

Aqua dest. auf 250 ml auffüllen.

Für die SDS-PAGE wurde ein 4-13%-iges Bis/Tris-Gradientengel (BioRAD Laboratories, GmbH München) verwendet.

Es wurden jeweils 15 µl der Proben aufgetragen. Die SDS-PAGE wurde bei 50 mA durchgeführt. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald die Lauffront den unteren Rand des Gels erreichte. Die jeweiligen Proteinbanden wurden mittels Coomassiefärbung angefärbt.

2.3 Kollagen I-Elektrospinning

Unter Verwendung der in Abb. 3 dargestellten Elektrospinning-Einheit wurden zunächst die grundlegenden extrinsischen und intrinsischen Faktoren für einen homogenen Elektrospinningprozeß erarbeitet.

Das isolierte Kollagen I wurde in Konzentrationen von 3-12% (w/v) in Hexafluorpropanol (HFP) (100%) gelöst. Die Kollagenlösung wurde in eine 10 ml Spritze (BD Discardit II, Becton Dickinson, Heidelberg) transferiert, diese mit einer Stahlhohlnadel (17 Gauge (G)) konnektiert und mit einem Abstand von 20 cm zwischen Hohlnadelspitze und Kollektorplatte fixiert. Durch Anlage eines Spannungspotentials (12-30 kV) zwischen Stahlhohlnadel und geerdeter Kupferplatte wurde der Elektrospinningprozeß gestartet.

Initial wurde das entstehende Elektrospinning-Produkt auf Glas-Objektträger (OT), die auf der Kollektorplatte positioniert wurden, elektrogenesponnen und mikroskopisch unter Durchlicht analysiert. Hierdurch konnten die Kollagenkonzentrationen unter denen ein kontinuierlicher Elektrospinning-Prozess mit homogener Faserbildung erreicht wurde eingegrenzt werden. In einem zweiten Schritt wurden jeweils 1 g Kollagen I in der entsprechenden Menge HFP gelöst und mit der in Abb. 5 dargestellten Einheit elektrogenesponnen. Die Rotationsgeschwindigkeit betrug dabei immer 0,3 m/s.

Aus den entstehenden Fasermatten wurden mit einer Stanze (Durchmesser 8 mm) jeweils 3 Scaffolds herausgelöst und diese elektronenmikroskopisch bzgl. des Faserdurchmessers und der Porengröße analysiert. Unter Verwendung einer 7%-igen Kollagen I-Lösung wurde die Auswirkung einer unterschiedlichen Rotationsgeschwindigkeit bzw. linearen Translation des rotierenden Metallzylinders als Kollektor untersucht. Dabei wurden Kollagenfasermatten bei Rotationsgeschwindigkeiten von 0,3 bis 17,3 m/s elektrogewoben. Jeweils 3 Scaffolds (Durchmesser 8 mm) der unterschiedlichen Bedingungen wurden elektronenmikroskopisch analysiert.

Um NFS auf OT herzustellen wurden diese direkt auf den Kollektor aufgelegt und gewoben. Die ausgerichteten Fasern wurden durch die Modifizierung der Spinningmaschine mit einem rotierenden Metallstab (Rotationsgeschwindigkeit min. 0 m/s bis max. 17,3 m/s), als Kathode erzeugt. Zur Aufnahme des Kollagenanofasernetzes wurden die OT oder die Alufolie direkt auf den rotierenden Stab geklebt.

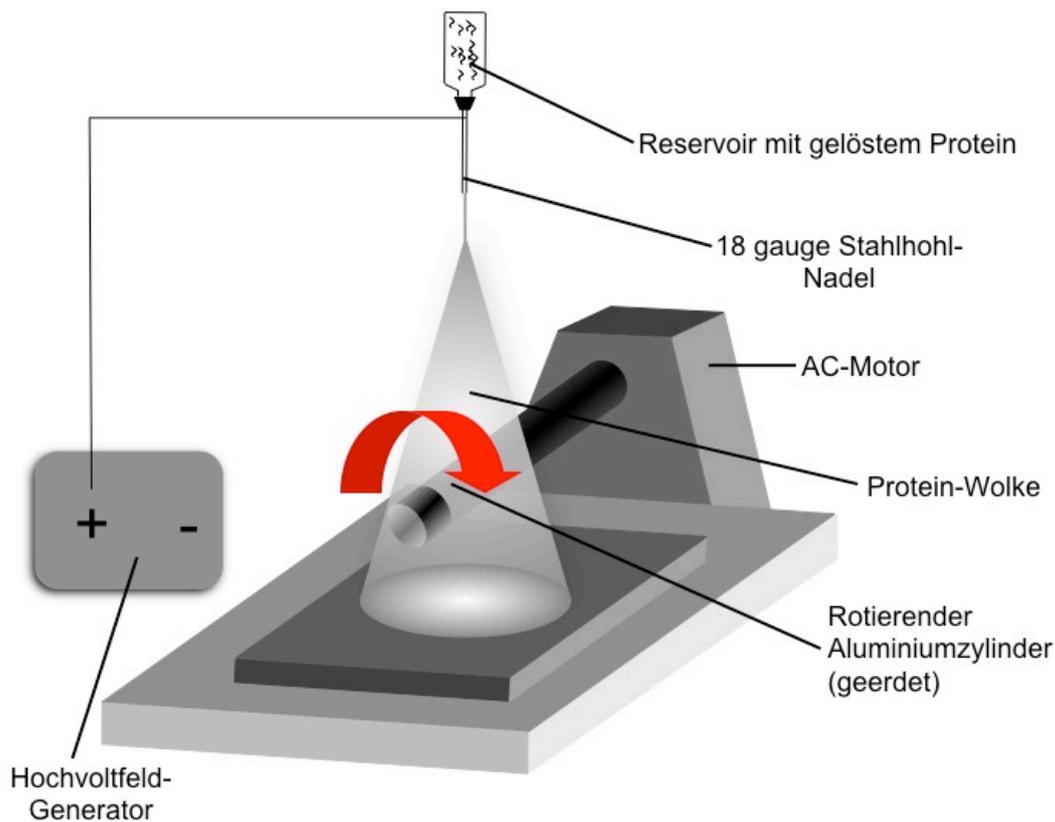


Abb. 5: Modifizierte Elektrosinning-Einheit. Verwendung eines rotierenden Metallzylinders mit stufenlos verstellbarer Rotationsgeschwindigkeit als Kollektorelektrode.

2.4 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Rasterelektronenmikroskop DSM 962, Zeiss, Deutschland) der Kollagen I-NFS wurden in Kooperation mit Herrn Prof. Dr. Georg Krohne (Leiter Zentrale Abteilung für Elektronenmikroskopie, Theodor-Boveri-Institut für Biowissenschaften, Biozentrum der Universität Würzburg) angefertigt.

Die unterschiedlichen Scaffolds wurden zunächst mit Goldpartikeln bedampft und anschließend REM-Aufnahmen mit 1.000 bis 10.000-facher Vergrößerung aufgenommen und digitalisiert.

2.4.1 Bestimmung von Faserdicke, Porengröße und Faserausrichtung

Die im Anschluss durchgeführte Analyse des Faserdurchmessers, der Porenfläche und der Kollagenfaserausrichtung in Abhängigkeit von der linearen

Translation wurde mit der Software Image J (Version 1.44, National Institute of Health, USA; <http://imagej.nih.gov/ij>) durchgeführt. Dabei wurden jeweils Bilder von 3 Scaffolds für jeden Parameter und pro Bild mind. 30 Messungen pro Parameter durchgeführt. Die digitalisierten REM-Bilder der unterschiedlichen Scaffolds wurden anhand des automatisch dokumentierten Maßstabes skaliert.

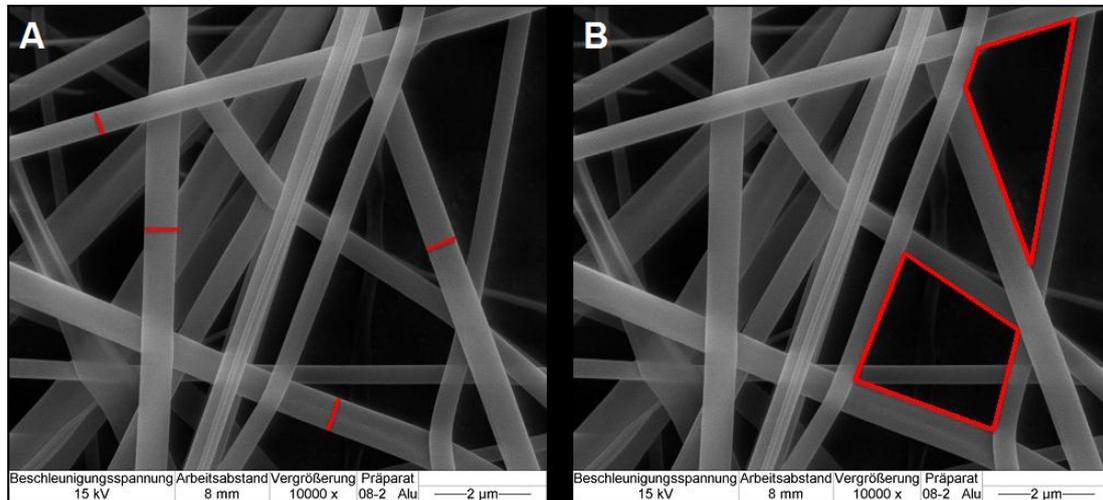


Abb. 6: Bestimmung des Faserdurchmessers und der Porenfläche. (A) Messung des Faserdurchmessers und der (B) Porenfläche, der Faserdurchmesser und die Porenfläche ist in rot eingezeichnet. Beispielhafte REM-Aufnahmen: Vergrößerung 10.000x, Skalierung = 2 µm.

Zur Bestimmung der Abweichung der Kollagenfasern von der Rotationsrichtung des rotierenden Metallzylinders wurde die Rotationsrichtung in das digitalisierte Bild eingezeichnet. Die Abweichung der Kollagenfasern wurde in Winkelgrad bestimmt, wobei die Winkelabweichung Werte zwischen $+90^\circ$ und -90° annehmen konnte (Abb. 7). Alle Daten wurden als Mittelwert (MW) mit der entsprechenden \pm Standardabweichung (SD) berechnet.

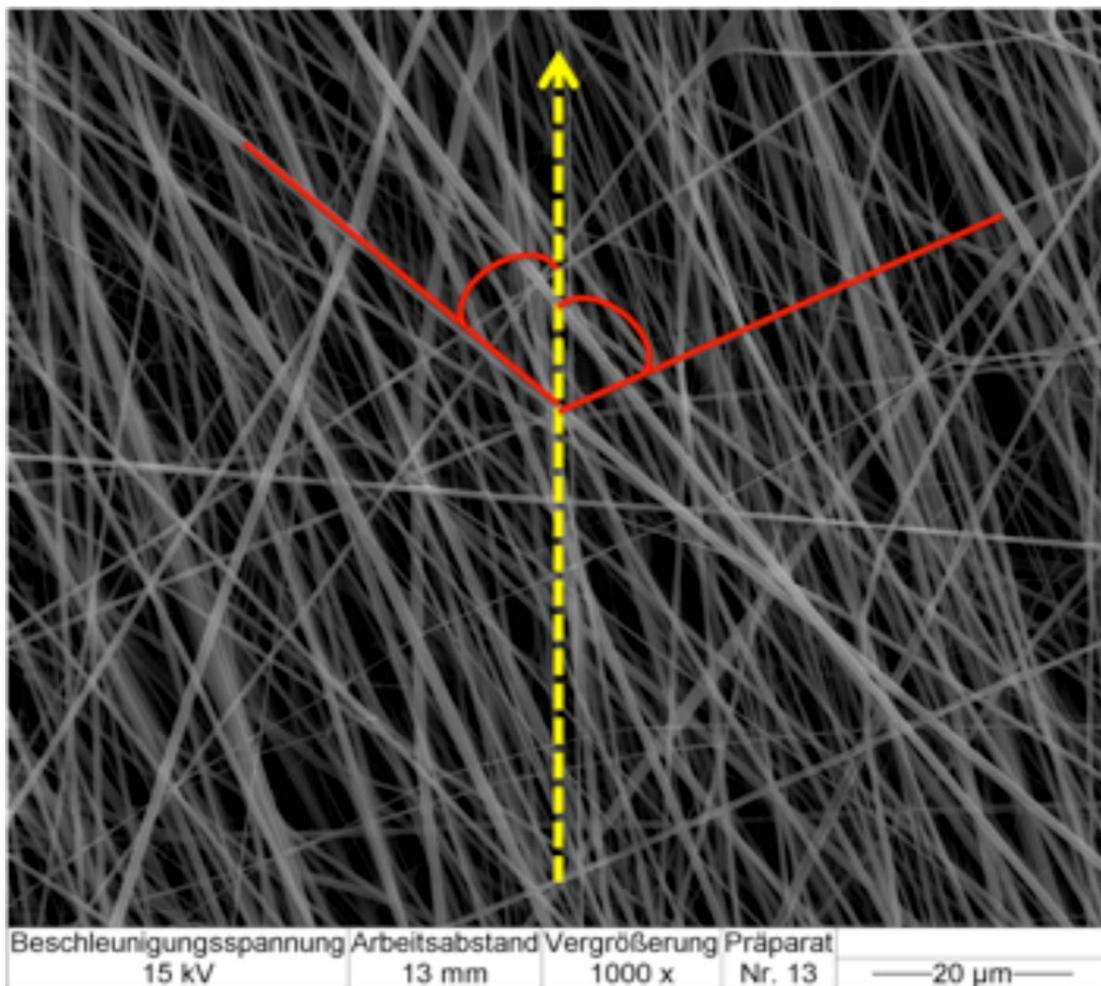


Abb. 7: Bestimmung der Faserausrichtung zur Rotationsrichtung. Messung der Abweichung des Faserverlaufes (rot) zur Richtung der Rotationsrichtung (gelber Pfeil) in Winkelgrad ($^{\circ}$). Beispielhafte REM-Aufnahmen: Vergrößerung 1.000x, Skalierung = 20 μm .

2.5 Bestimmung der Zugfestigkeit der Kollagen-NFS

Aus in HFP gelöstem Kollagen I (7%) wurden Fasermatten bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 0,3 m/s; 5,1 m/s und 9,8 m/s elektrogewoben. Aus den unterschiedlichen Fasermatten wurden jeweils 5 Streifen von 10 x 2 cm herausgeschnitten und zur Berechnung des Querschnittes die Dicke bestimmt. Anschließend wurden die NFS-Streifen in eine statische Prüfmaschine (Zwick ProLine mit 10 kN Maximalkraft) eingespannt und einem Zugversuch (0,5 mm/s) bis zum Bruch unterzogen. Die Zugfestigkeit (N/mm^2) wurde aus der maximal erreichten Zugkraft bezogen auf den ursprünglichen Querschnitt der Probe errechnet. Alle Daten wurden als Mittelwert mit

dazugehöriger \pm Standardabweichung berechnet und einer Varianzanalyse unterzogen. Anschließend wurden die Werte bei paralleler und perpendikulärer Zugversuchsrichtung für die unterschiedlichen Rotationsgeschwindigkeiten analysiert. Die statistische Signifikanz wurde unter Anwendung des Mann-Whitney Tests geprüft, wobei eine Wahrscheinlichkeit $< 0,05$ als statistisch signifikantes Ereignis angesehen wurde.

2.6 Isolierung und Expansion mesenchymaler Stammzellen aus Knochenmark

Aus bei der Implantation von Hüftgelenk-Totalendoprothesen anfallenden Femurköpfen wurde spongiöser Knochen gewonnen. Aus diesem wurde nach einem modifizierten Protokoll (Nöth et al., 2002a) MSZ isoliert und expandiert.

Mit einem scharfen Löffel wurde auf einem sterilen Tablett unter der Sicherheitswerkbank spongiöser Knochen aus dem Hüftkopf herausgelöst. Der herausgelöste spongiöse Knochen wurde in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen mit 20 ml Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM/HAM'S F12) gegeben und geschüttelt, um die Knochenmarkszellen von den Knochen trabekelstrukturen zu lösen. Dieser Vorgang wurde so lange mit frischem Medium wiederholt bis das Knochenmark gelblich-weiß erschien. Anschließend wurden die Zellen bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 10 ml Stammzellkulturmedium (DMEM/HAM'S F12 + 10% Fetales Kälberserum (FCS) + 1% Penicillin/Streptomycin + 0,1% Ascorbat-2-Phosphat) resuspendiert. Die Zellen wurden in eine 175 cm² Zellkulturflasche ausplattiert und im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Nach dem Ausplattieren der Knochenmarksuspension wurde das Zellkulturmedium nach drei Tagen gewechselt. Zu diesem Zeitpunkt waren lichtmikroskopisch bereits einige anhaftende Zellen bzw. colony-forming units (Abb. 8) zu erkennen.

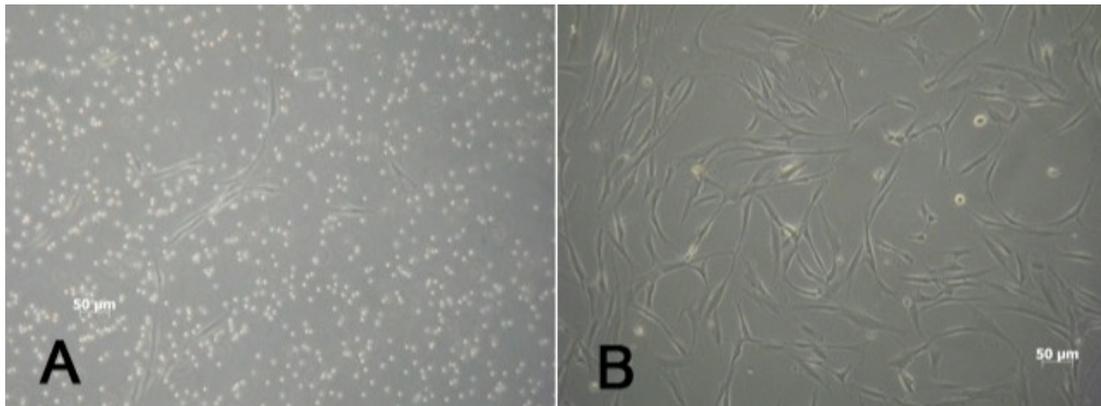


Abb. 8: Monolayerkultur MSZ. (A) Durchlichtmikroskopie an Tag 1 nach Ausplattieren der Zellen, (B) Durchlichtmikroskopie an Tag 7 nach Ausplattieren der Zellen, Vergrößerung 10x, Skalierung = 50 µm.

Nach etwa 10 bis 14 Tagen erreichten die Zellen eine ca. 80% Konfluenz. Die Zellen wurden anschließend mit 0,25% Trypsin mit 0,1% Ethylendiamintetraacetat (EDTA) abgelöst und im Verhältnis eins zu drei ausplattiert. Nach erneuter Expansion der Zellen bis zu einer 70 bis 80%-igen Konfluenz wurden die Zellen der Passage eins abgelöst und zur Besiedlung der NFS verwendet.

2.7 Crosslinken

Bei initialen Zellbesiedlungsversuchen mit MSZ zeigten sämtliche Kollagen I-NFS eine rapide Biodegradation im wässrigen Milieu. Aus diesem Grund wurden die im Folgenden aufgeführten Crosslinking-Verfahren zur Stabilisierung der Scaffolds durchgeführt. Die Auswirkung der unterschiedlichen Verfahren auf die Ultrastruktur der NFS wurde elektronenmikroskopisch erfasst.

HMDI

1. Herstellen einer 10%-igen HMDI-Lösung in Isopropanol (100%)
2. Crosslinken in einem Glasgefäß für 1h
3. viermaliges Waschen mit Isopropanol
4. Sterilisation in 70%-igem Ethanol für 3 x 20 min

EDC und NHS in N-Morpholinoethansulfonsäure-Puffer (MES-Puffer)

Dem Ansatz wurde für die Berechnung von PBS ein molekulares Gewicht von

73,85 g/mol und für MES von 195,2 g/mol zugrunde gelegt.

5,375 ml MES-Lösung (0,05 M) pH = 5,5 (Zeugolis et al., 2008a)

52,46 mg MES

5,375 ml Aqua dest.

86,5 mg EDC

20,75 mg NHS

1. Herstellen der Puffer-Crosslinkerlösung
2. Crosslinken für 1 h
3. Waschen mit PBS für 48 h mit mehrmaligem Phosphate buffered saline Wechsel (PBS-Wechsel) unter Lagerung auf der Schüttelplatte
4. Sterilisation in Ethanol (70%) für 3 x 20 min

Genipin

0,625%-ige Genipinlösung (Zeugolis et al., 2008a)

3,69 mg PBS

5 ml Aqua dest.

31,25 mg Genipin

1. Herstellen der Crosslinkerlösung
2. Crosslinken für 18 h
3. Waschen mit PBS für 48 h mit mehrmaligem PBS-Wechsel unter Lagerung auf der Schüttelplatte
4. Sterilisation in Ethanol (70%) für 3 x 20 min

2.8 Zellkulturversuche mit MSZ

Zur Darstellung der Zellmorphologie, des Zytoskelettes und der Zellausrichtung wurden zunächst Kollagennanofasern unterschiedlichen Durchmessers (5%, 7% und 9% Kollagen I in HFP) und unterschiedlich hoher Ausrichtung (0,3 m/s; 5,1 m/s und 9,8 m/s aus 7% Kollagen I in HFP) auf Glas-OT elektrogewoben. Hierzu wurden die OT auf dem rotierenden Metallzylinder befestigt und die Kollagenfasern für 1 min unter den oben genannten Bedingungen als dünne, den OT bedeckende Schicht aufgefangen. Nach der Stabilisierung mittels HMDI-Crosslinking und Sterilisation der Fasern wurden 4×10^4 MSZ in 200 μ l

Stammzellmedium resuspendiert und auf den jeweiligen OT aufgebracht. Nach einstündiger Inkubation der MSZ-besiedelten OT bei 37°C und 5% CO₂ wurden 12 ml Stammzellmedium pro OT hinzugegeben und diese für weitere 3 Tage inkubiert. Anschließend erfolgte die 3-fach Fluoreszenzfärbung des Zellkerns (4,6 Diamidino-2 phenylidol (DAPI)), der Aktinfilamente (anti-Aktin) und Vinculin (anti-Vinculin; siehe 2.9.3). Von den jeweiligen Nanofaser-beschichteten OT wurden an Tag 3 fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (Floureszenzmikroskop Zeiss Axioskop 2 MOT) erstellt und die digitalisierten Bilder bezüglich der Zellmorphologie und Zellausrichtung analysiert (Abb. 9).

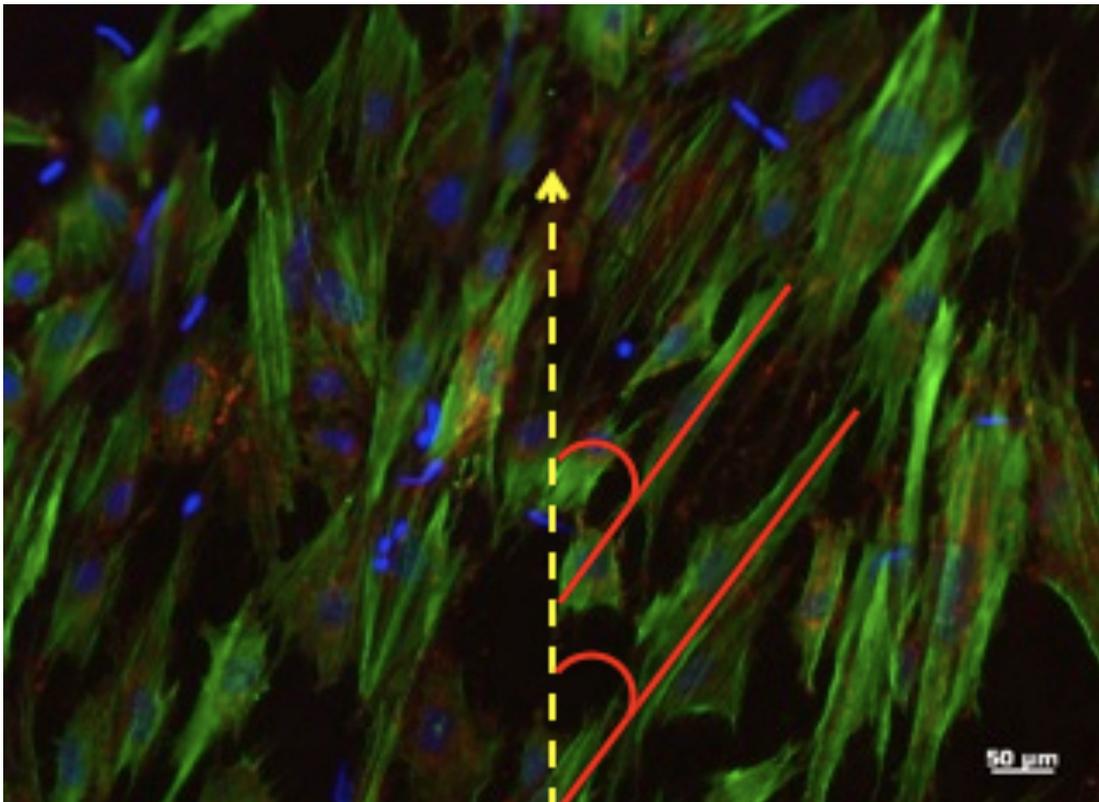


Abb. 9: Bestimmung der Zellausrichtung zur Rotationsrichtung. Messung der Abweichung des Zellachsenverlaufes (rot) zur Richtung der Rotationsrichtung (gelber Pfeil) in Winkelgrad (°). Beispielhafte REM-Aufnahmen: Vergrößerung 1.000x, Skalierung = 50 µm.

Unter den o.g. Bedingungen wurden ebenfalls Kollagen I-NFS (Durchmesser 8 mm, Dicke 0,5-0,8 mm) hergestellt. Diese wurden mit jeweils 1×10^5 MSZ besiedelt und für 21 Tage in Stammzellmedium bei (37°C, 5% CO₂) kultiviert. Zu definierten Zeitpunkten (Tag 1, 3, 7, 14 und 21) wurde der

Desoxyribonukleinsäure-Gehalt (DNA-Gehalt) und die Expression endogener Markergene untersucht. Histochemische Färbungen (H/E-, Picrosirius Rot- und Trichromfärbung nach Masson-Goldner) der MSZ-besiedelten NFS wurden nach Paraffineinbettung am Tag 21 angefertigt. Die entsprechenden Arbeitsschritte und Protokolle finden sich im Folgenden.

2.8.1 DNA-Gehalt

Die Bestimmung des DNA-Gehalts wurde mit dem Invitrogen Quant-iT dsDNABR, Assay Kit 2-1000 ng (Q32853, Invitrogen, Darmstadt) durchgeführt. Zu den Analysezeitpunkten (Tag 1, 3, 7 und 14) wurde jeweils der DNA-Gehalt von fünf Scaffolds nach deren Besiedlung mit $0,5 \times 10^5$ Zellen bestimmt. Die Bestimmung des DNA-Gehaltes erfolgte zum einen bei Scaffolds mit unterschiedlicher Faserdicke (5%, 7% und 9% Kollagen I in HFP) und im Vergleich von Scaffolds mit unterschiedlich hoher Ausrichtung (0,3 m/s; 5,1 m/s und 9,8 m/s aus 7% Kollagen I in HFP).

Der am Tag 1 ermittelte mittlere DNA-Gehalt wurde gleich eins gesetzt und die Veränderung des DNA-Gehalts an den folgenden Zeitpunkten (Tag 1, 3, 7 und 14) hierzu in Relation gesetzt.

Die zu untersuchenden Scaffolds wurden mit PBS gewaschen und anschließend über Nacht bei 37°C in 1 ml Papainverdauungslösung (10 µl Papain und 1000 µl Papain digestive Puffer pH = 6) inkubiert. Bis zur Messung wurden die Proben bei -20 °C gelagert. Die Messung erfolgte mit dem oben angegebenen Kit nach Herstellerangaben.

Die Daten der jeweiligen Kulturbedingung und des Zeitpunktes wurden als Mittelwert mit dazugehöriger \pm Standardabweichung berechnet und einer Varianzanalyse unterzogen. Anschließend wurden die Werte der unterschiedlichen Kulturbedingungen hinsichtlich des Faserdurchmessers und Faserausrichtung auf signifikante Unterschiede an den jeweiligen Tagen analysiert. Die statistische Signifikanz wurde unter Anwendung des Mann-Whitney Tests geprüft, wobei eine Wahrscheinlichkeit $< 0,05$ als statistisch signifikantes Ereignis angesehen wurde.

2.8.2 Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Von den unterschiedlichen NFS wurde zu den verschiedenen Analysezeitpunkten (Tag 1, 3, 7 und 14) das Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Jeder Zellträger wurde mit 400 µl Trizol behandelt und in ein Eppendorfgefäß überführt. Mit dem Tissuelyser wurde das Material für 2 min bei 50 Hz zerkleinert.

Anschließend wurde mit Trizol auf 1 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Es folgte die Zugabe von 200 µl Chloroform, das durch 10 s vortexen vollständig im Eppendorfgefäß vermischt wurde. Dann wurde 15 min auf Eis inkubiert. Durch zentrifugieren wurde eine Phasentrennung erreicht (10000 g, 30 min, 4°C). Die wässrige obere Phase, die Riboxynukleinsäure (RNA) enthält, wurde in frische Eppendorfgefäße überführt. Die weitere RNA-Aufbereitung erfolgte nach dem Protokoll des RNeasy MinElute cleanup.

2.8.3 Komplementäre Desoxyribonukleinsäure- Synthese (cDNA-Synthese)

Für die cDNA-Synthese wurde von den verschiedenen RNA-Proben ein Volumen von 1 µg RNA in autoklavierte Eppendorfgefäße (max. Volumen 13 µl) aliquotiert und diese mit High Pressure Liquid Chromatography-Wasser (HPLC-Wasser) auf ein Volumen von 11 µl aufgefüllt. Anschließend wurde 1 µl (1 µg/µl) Random Hexamer Primer hinzu pipettiert und für 5 min in einem Heizblock bei 70°C inkubiert, um die Sekundärstruktur der RNA aufzulösen.

Die Reaktion wurde durch das Überführen auf Eis für 5 min gestoppt. Es folgte die Zugabe von 8 µl Master-Mix pro Probe bestehend aus 4 µl 5 x Reaction buffer, 1 µl 10 mM Desoxyribonukleosid-Tri-Phosphat-Mix (dNTP-Mix), 2,75 µl HPLC-Wasser und 0,25 µl Reverse Transkriptase (200 U/µl) und die Inkubation des Reaktionsgemisches für 10 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde dieser in den Heizblock für 60 min bei 42°C überführt und eine weitere Inkubation eingeleitet. Im weiteren Versuchsverlauf wurde die Reverse Transkriptase durch Erhitzen auf 70°C für 10 min inaktiviert. Danach wurden jeweils 30 µl HPLC-Wasser hinzugegeben, um ein Endvolumen von 50 µl cDNA Suspension zu erreichen.

2.8.4 Gelelektrophorese

Die RT-PCR wurde mit einem Gesamtvolumen von 30 µl angesetzt. Die Reaktionskomponenten, die Reaktionsbedingungen und die verwendeten Primersequenzen für die Reaktionen sind in Tab. 1 aufgeführt. Alle Reaktionskomponenten wurden auf Eis pipettiert.

Das Housekeeping-Gen Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) diente als Ladekontrolle.

Die PCR-Ansätze und Reaktionen wurden nach folgendem Schema angesetzt bzw. durchgeführt:

Standardreaktionskomponenten für die Amplifikation mittels RT-PCR

22,5 µl HPLC-Wasser

1 µl cDNA

1 µl dNTP-Mix

3 µl 10 x PCR-Puffer (BIO-27036, Bioline GmbH, Luckenwalde)

0,5 µl Taq-Polymerase (BIO-21083, Bioline GmbH, Luckenwalde)

1 µl Primermix forward-Primer (125 pmol/µl in HPLC-Wasser)

1 µl Primermix reverse-Primer (125 pmol/µl in HPLC-Wasser)

Reaktionsbedingungen

- | | |
|-------------------------------------|---------------------------|
| 1. Initiale Denaturierung der DNA : | 94°C → 3 min |
| 2. Denaturierung: | 94°C → 1 min |
| 3. Annealingzyklus: | Ann T → 1 min |
| 4. Elongation: | 72°C → 1 min (Elongation) |
| 5. finale Elongation: | 72°C → 5 min |
| 6. Abkühlen: | 12°C → ∞ |

Die Punkte 2 bis 4 wurden je nach nachzuweisendem Gen 25 bis 35 mal (Tab. 1) durchgeführt. Bis zur Weiterverwendung wurden die Proben bei -20°C gelagert.

Verwendete Primer Sequenzen

Gen	Forward	Reverse	Zyklen	Größe	Quelle
Collagen I (alpha1- chain)	5'- CCACCAATCACC	5'- GGCACGGAAATT	30	470	Rich et al., 2008
	TGCGTACAGAAC	CCTCCGGTTGAT			
	-3'	-3'			
GAPDH	5'- GAGTCAACGG	5'- TTGATTTTGGGA	25	238	Rich et al., 2008
	ATTGGTCGT	GGGATCTCG			
	-3'	-3'			
Skleraxis	5'- CAGCGGCAC	5'- CGTTGCCCAG	35	163	Kuo et al., 2008
	ACGGCGAAC	GTGCGAGATG			
	-3'	-3'			
Tenascin C	5'- AGGGGGTCTT	5'- CATGGCTGTT	35	200	Lorenz et al., 2004
	CGACAGTTTT	GTTGCTATGG			
	-3'	-3'			
Elastin	5'- GGTGCGGTGGT	5'- GGGCCTTGAG	30	253	Bunda et al., 2006
	TCCTCAGCCTGG	ATACCCAGTG			
	-3'	-3'			

Tab. 1: PCR Primer Sequenzen, verwendete Gene, Zyklusanzahl, Größe und Quelle.

Zum Nachweis der PCR-Produkte wurde das Amplifikat in einem 2%-igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Als Laufpuffer diente 0,5-facher TBE-Puffer. Es wurden je 10 µl des RT-PCR-Ansatzes mit 1,5 µl DNA-Ladepuffer in eine Geltasche aufgetragen und bei 130 Volt aufgetrennt. Als Vergleichswert für die Basenpaarlänge der einzelnen DNA-Fragmente wurde ein 100 bp DNA-Marker verwendet. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programmes Mega-Capt.

2.8.5 Semiquantitative Densitometrie

Zur semiquantitativen Bestimmung der Genexpression wurde die kumulative Pixelhelligkeit der Elektrophoresebande des entsprechenden Gens jeder Scaffoldparameterbedingung zur Pixelhelligkeit der korrespondierenden PCR-Bande des Housekeeping-Gens (GAPDH) gesetzt und graphisch dargestellt. Hierzu wurde die Bio 1D/Capt MW Software (LTF Wasserburg) verwendet und

die MW der Expression (in x-facher Expression zu GAPDH) aus 3 Banden pro Bedingung berechnet. Die Daten wurden als Mittelwert mit dazugehöriger \pm Standardabweichung berechnet und einer Varianzanalyse unterzogen, hierbei dienten die nicht ausgerichteten NFS (n-al) als Kontrollgruppe. Die statistische Signifikanz wurde unter Anwendung des Mann-Whitney Tests geprüft, wobei eine Wahrscheinlichkeit $< 0,05$ als statistisch signifikantes Ereignis angesehen wurde.

2.9 Histologie

2.9.1 Anfertigung der histologischen Schnitte

Um Gewebeschnitten der mit Zellen besiedelten, ausgestanzten Scaffolds herzustellen, erfolgte eine Einbettung in Paraffin an den Tagen 1, 3, 7, 14 und 21.

1. Nach der Kultivierung 3 x in PBS waschen
2. Fixation in 4% Paraformaldehyd (PFA) über Nacht bei Raumtemperatur
3. Auswaschen der Fixierlösung mit Leitungswasser für 2h
4. Dehydratation in aufsteigender Alkoholreihe (50%, 70%, 95%, 100% Ethanol für je eine Stunde)
5. Waschvorgang in 1:1-Gemisch Alkohol/Amylacetat bei Raumtemperatur
6. Waschen für 30 min mit Alkohol/Amylacetat (1:1) bei 55-60°C
7. Inkubation im Heizblock bei 60°C mit Amylacetat für 2 x 30 min
8. Inkubation in Paraffin I
9. Inkubation in Paraffin II über Nacht im Wärmeschrank

Vor der Einbettung in Paraffin wurden die Scaffolds jeweils halbiert und aufrecht in die Einbettkassette gestellt, um vertikale Schnitte anfertigen zu können. Von den gehärteten Paraffinblöcken wurden Schnitte mit einer Dicke von 4 μ m hergestellt.

Entparaffinierung

1. Paraffinschnitten für 60 min in den Wärmeschrank bei 60°C
2. Entparaffinierung für 2 x 8 min in Xylol
3. Dehydrierung in absteigender Alkoholreihe 1 x 95% für je 2 min, 1 x 70% für 5 min, 1 x 50% für 5 min

Dieser Vorgang wurde allen folgenden immunhistochemischen Färbungen vorangestellt.

2.9.2 Histochemische Färbungen

Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE-Färbung)

1. Hämatoxylin 10 min
2. Spülen in Aqua dest. 2 x 3 min
3. 0,25% HCl/50% Ethanol 10 s
4. Spülen in Aqua dest. 3 min
5. Bläuen in Leitungswasser 10 min
6. 1%-ige Eosinlösung 20 s
7. Aqua dest. 2 x 3 min
8. 70% Ethanol 10 s
9. Dehydratisierung in 95% Ethanol 10 s
10. 100% Isopropanol 2 x 1 min
11. Xylol 2 x 5 min
12. Eindecken mit organischem Eindeckmittel Entellan

Picrosirius Red Färbung für Paraffinschnitte

1. Xylol 5 min
2. Xylol 5 min
3. 100% EtOH 1 min
5. 95% EtOH 1 min
6. 70% EtOH 1 min
7. 50% EtOH 1 min
8. 20% EtOH 1 min
9. Aqua dest. 2 x 2 min

- | | | |
|-----|---|-------|
| 10. | Picrosirius Red | 1 h |
| 11. | Acidified Water (3% Essigsäure, Aqua dest.) | 5 min |
| 12. | 95% EtOH | 1 min |
| 13. | 95% EtOH | 1 min |
| 14. | 100% EtOH | 1 min |
| 15. | 100% EtOH | 1 min |
| 16. | Xylol | 1 min |
| 17. | Xylol | |
| 18. | Eindecken mit Deckgläschen | |

Trichromfärbung nach Masson-Goldner

Färbung von Paraffinschnitten

1. Entparaffinieren mit absteigender Alkoholreihe bis zu 50%-igen Alkohol
2. Färbung mit Hämatoxin nach Weigert für 1-2 min
3. Spülen mit Aqua dest.
4. Spülen mit Leitungswasser für 10 min
5. Spülen mit Aqua dest.
6. Färben mit Ponceau-Säurefuchsin
7. Spülen mit 1%-iger Essigsäure
8. Differenzierung mit Wolframato-phosphorsäure-Orange G
9. Erneutes Spülen mit 1%-iger Essigsäure
10. Färbung mit Lichtgrün für 5 min
11. Spülen mit 1%-iger Essigsäure für 5 min
12. Spülen mit abs. Alkohol für 5 min
13. 2-3 mal spülen für jeweils 5 min in Xylol
14. Eindecken mit Entellan

2.9.3 Immunhistochemische Färbungen

Aktin/Vinculin/Dapi-Färbung

Vorbereitung der besiedelten OT-Zellträger

1. Waschen mit PBS für 10 min
2. Fixierung mit 4% PFA für 15 min
3. Waschen mit PBS für 10 min

In der feuchten Kammer

1. Überschichten der Zellen mit 100 µl primär Antikörper in entsprechender Verdünnung (1:500 Anti-Vinculin mit PBS 1% BSA)
2. Inkubation über Nacht in der feuchten Kammer bei 4°C
3. 3 x Waschen mit PBS für 10 min
4. Überschichten der Zellen mit 100 µl sekundär Antikörper in entsprechender Verdünnung (1:500 Dunkey anti-mouse Alexa 555 mit PBS 1% BSA) für 2 h bei 37°C
5. 3 x Waschen mit PBS für 10 min
6. Überschichten der Zellen mit sekundär Antikörper goat anti-mouse Alexa 488, Phalloidin (1:100) und DAPI (1:1000) in PBS mit 1% Bovines Serum Albumin (BSA) für 1 h bei Raumtemperatur
7. Waschen mit PBS für 10 min
8. Eindecken mit Immunmount

2.10 Verwendete Lösungen und Ansätze

Papain digest-Puffer pH = 6,0 (für 250 ml Lösung)

2,051 g Natriumacetat wasserfrei (0,1 M)

0,394 g L-Cystein HCL (0,01 M)

4,653 g EDTA (0,05 M)

mit NaOH auf pH = 6,0 einstellen

TBE-Puffer (Tris-Borate-EDTA)

108 g Trisbase (8382S012251, Merck, Darmstadt)

55 g Borsäure (K29935665204, Merck, Darmstadt)

40 ml EDTA 0,5 M (pH = 8,0) (03700, Fluka, Deisenhofen)

1l Aqua dest.

Tris-Puffer

6,057 g Trisbase (8382S012251, Merck, Darmstadt)

8,010 g NaCl (Natriumchlorid) (A 3597, 5000, Appli Chem, Darmstadt)

1 l Aqua dest. (pH = 7,4 einstellen)

Stammzellmedium

500 ml DMEM/F-12 (E 15-813, PAA, Linz)

50 ml FCS (A 15-101, PAA, Linz)

5 ml Penicillin/Streptomycin (50 IU Penicillin/ml, 50 µg Streptomycin/ml)

(P11-010, PAA, Linz) oder Antibiotic/Antimycotic-Lösung (100 x) (A 5955 Sigma, Deutschland)

600 µl L-Ascorbat-2-Phosphat (A-8960, Konz.: 50 µg/ml, Sigma, Steinheim)

Färbelösung für Hämatoxylin-Eosin Färbung

Hämalaun-Farbstoff nach Mayer

1 g Hämatoxylin (4302, Merck, Darmstadt) in 1000 ml Aqua dest. lösen

0,2 g NaJO₃ (S4007, Sigma, Steinheim)

50 g Kaliumaluminiumsulfat-Dodecahydrat

(A4396,1000, AppliChem, Darmstadt) nach Umrühren blauviolette Farbe

50 g Chloralhydrat (2425, Merck, Darmstadt)

1 g Zitronensäure (1.00244.1000, Merck, Darmstadt), nach Umrühren rotviolette Farbe

Eosin

0,1 g Eosin (15935, Merck, Darmstadt) in 100 ml Aqua dest. lösen

Coomassie-Färbelösung (10 x Stocklösung)

1 g Coomassie Blue 250R (3282625 GM)

500 ml 50% Methanol

100 ml 10% Essigsäure

400 ml 40% Aqua bidest ad.

Coomassie-Arbeitslösung

50 ml 10 x Stocklösung

50 ml Eisessig

250 ml Methanol

500 ml Aqua bidest ad.

Entfärbelösung

35 g Glycerin

50 ml Eisessig

50 ml Methanol

500 ml Aqua bidest ad.

Ponceau-Säurefuchsin-Lösung:

0,2 g Ponceau de Xylidine

0,1 g Säurefuchsin

300 ml Aqua dest.

0,6 ml Eisessig

kalt lösen und vor Gebrauch filtrieren.

Phosphorwolframsäure-Orange G:

3-5 g Phosphorwolframsäure in 100 ml Aqua dest. lösen

2 g Orange G dazugeben

Lichtgrün

0,1-0,2% wässrig mit Zusatz von 0,2 ml Eisessig

Hämatoxilin nach Weigert

Lösung A:

1 g Hämatoxylin in 100 ml 96% Ethanol (muss einige Tage reifen)

Lösung B:

4 ml 29% wässrige Eisendreichloridlösung + 1 ml 25% Salzsäure + 95 ml Aqua dest.

Beide Lösungen unmittelbar vor dem Benutzen zu gleichen Teilen mischen.

DNA Ladungs-Puffer (10 x)

3 ml Glycerol (30%), (Appli Chem, Darmstadt)

2 ml EDTA (0,1 M, pH = 8,0) (PAA, Linz)

1 ml SDS (Konz.: 0,1%) (Merck, Darmstadt)

5 mg Bromphenolblau (Konz.: 0,25%), (Merck, Darmstadt)

5 mg Xylene Cyanol (Konz.: 0,25%, Merck, Darmstadt)

4 ml Aqua dest.

Primäre Antikörper

Donkey anti-mouse IgG A 21202 (Alexa Fluor 488, Invitrogen, Darmstadt)

Donkey anti-mouse IgG A 31570 (Alexa Fluor 555, Invitrogen, Darmstadt)

Donkey anti-rabbit IgG A 21206 (Alexa Fluor 488, Invitrogen, Darmstadt)

Donkey anti-rabbit IgG A 21206 (Alexa Fluor 555, Invitrogen, Darmstadt)

Verwendete Chemikalien:

Agarose (840004, Biozym Scientific GmbH, Oldendorf)

Acrylamid 40% (A515-1, Carl Roth GmbH, Karlsruhe)

Bovines Serum Albumin (BSA 0,5%, A 1391 0100, AppliChem GmbH Darmstadt)

Collagenase (NB 4 Standard Grade, 17545, Sigma, Steinheim)

Collagen Typ I (from rat tail, C 7661, Sigma, Steinheim)

DNA Ladder Plus (100 bp, 25-2020, PEQLAB, Erlangen)

dNTP-Mix (100 mM, BIO-39026, Bioline GmbH, Luckenwalde)

Entellan (1.07961.0100, Merck, Darmstadt)

Essigsäure (6755.2, Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe)

Ethanol (9065.2, Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe)

Ethidiumbromid (Konz.: 1%, A1152.0100, Appli Chem, Darmstadt)

Flourescent Mounting Medium (2010-08, DAKO, Hamburg)

Formalin (A0823, 2500, Appli Chem, Darmstadt)

Glycerol Gelatine (Appli Chem, Darmstadt)

Glycergel (DAKO, Glostrup, Denmark)
Hämatoxylin-Lösung (4302, Merck, Darmstadt)
HPLC-Wasser (A 511.2, Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe)
1,1,3,3,3, Hexafluoro-2-propanol (Merck, Darmstadt)
Hexamethylendiisocyanat (Fluka, Buchs)
Marker (100 bp DNA-Leiter, Peqlab, Erlangen)
Mercaptoethanol (1.15433, Merck, Darmstadt)
Medium (L11, PAA Cell culture company, Pasching, Österreich)
N-Amylacetat (Merck, Darmstadt)
N-Hydroxy-succinid, 95% (Fluka, Buchs)
N-ethylcarbodiinidehydrochlorid (Fluka, Buchs)
N-(3-Dimethylaminopropyl) (Fluka, Buchs)
Paraffin (Sigma, Steinheim)
PBS (Phosphat Buffer Saline) Dulbecco 99,55 g/l Aqua bidest, (L182-50, Biochrom, Berlin)
PCR-Puffer (5 x Konzentrat) (BIO 27036, Bioline GmbH, Luckenwalde)
PCR-Puffer (M-MLV RT 5 x Buffer, M531A, Promega, Mannheim)
Polyethylenglykol (Fluka, Buchs)
PEO-Polyethylenoxide (A0268237, Acros Organics, Geel, Belgien)
Pepsin (S3002, 2 g/250 ml 0,2M HCL, DAKO, Glostrup, Denmark)
Random Primer (48190011, Invitrogen, Darmstadt)
Bioscript von BIOLINE (Nr. BIO-27036, Bioline GmbH, Luckenwalde)
Sodaminsodephylphosphat (8.17034.100, Merck, Darmstadt)
Temed (1.107320100 Merck, Darmstadt)
Mango Taq DNA Polymerase (1000 units, BIO-21083, Bioline GmbH, Luckenwalde)
Triton X 100 (Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe)
Tris (A 1086, 5000, Appli Chem, Darmstadt)
Trizol (A 15596-018, Invitrogen, Darmstadt)
Trypanblau (Konz.: 0,4%, T-8151, Sigma, Steinheim)
Trypsin/EDTA (0,5 g Trypsin/l, 0,2g EDTA/l, L11-004, PAA, Linz)
Trypsin (Immunhistochemie, S2012, 250µg/ml, DAKO, Glostrup, Denmark)

Xylol (1.08685.2500, Merck, Darmstadt)

Alle weiteren verwendeten Standardlaborchemikalien stammten von den Firmen Roth GmbH und Co (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen).

2.11 Verwendete Geräte und Materialien

Assay Cell Titer (96 Aqueous, Non Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega, Mannheim)

Biophotometer (6131, Eppendorf, Hamburg)

Brutschrank (Heraeus, Osterode)

Densitometer (LTF-Labortechnik, Wasserburg)

Dialysierschläuche (Visking Typ 36,32, Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe)

DNA Content (Invitrogen Quant-iT dsDNABR, Assay Kit 2-1000ng, Q32853, Invitrogen, Darmstadt)

Fluoreszenzmikroskop Zeiss Axioskop 2 MOT

Gel-Elektrophoresekammer-MIDI (Carl Roth GmbH und Co, Karlsruhe)

Gradientengel Ready Gel Precast 4-15% Tris HCL (BioRAD Laboratories GmbH, München)

Heizblock (Promega, Mannheim)

Inkubator für Zell- und Gewebekulturen (BB6060, Heraeus, Hanau)

Kulturplatten (anti-haft beschichtete Plates) (Greiner BIO ONE GmbH, Frickenhausen)

Lab cycler (Sensoquest, Göttingen)

Lichtmikroskop (Axiovert 25, Zeiss, Jena)

Mikrotom Leica (Leica, Solm)

Multicycler PTC 200 (Biozym, Hessisch Oldendorf)

PCR-Reaktionsgefäß (0,2 ml) (Hartenstein, Würzburg)

PCR-Cycler (MJ Research PTC-200 Peltier Thermal Multi Cycler, Biozym, Hessisch Oldendorf)

Pipettierhilfe (Accujet, Braun, Melsungen)

Rattenschwänze (Charles River Laboratories, Sulzfeld)

Rasterelektronenmikroskop DSM 962 (Zeiss, Jena)

Reaktionsgefäße (1,5 ml) (Eppendorf, Hamburg)
RNeasy® MinElute® Cleanup Kit (74204, Qiagen GmbH, Hilden)
Stanze (biopsy Punch, 8 mm, Miltex GmbH, Viernheim)
Schlittenmikrotom (Leitz, Oberkochen)
Sicherheitswerkbank Klasse II (HS 15, Heraeus, Osterode)
Tischzentrifuge (Labo fuge 440 R, Heraeus, Osterode)
Waage I (EW 6000-1M, Kern und Sohn GmbH, Allstadt)
Waage II (Scaltec SPOS , max 310 g, Scaltec Instruments, Heiligenstadt)
Waage III (Kern 770, max 220 g, Kern und Sohn GmbH, Allstadt)
Zellkulturflaschen (150 cm², Greiner BIO ONE GmbH, Frickenhausen)
Zentrifuge (biofuge pico, Heraeus, Hanau)
Zentrifugenröhrchen (15 und 50 ml, Sarstedt, Nürnberg)
Zwick ProLine mit 10 kN Maximalkraft (Zwick Roell, Ulm)

Software

Axio Vision, Version 4.6.3 (04/2007)
Bio Print mega (Vilber Lourmat, Eberhardzell)
Bio capt (Vilber Lourmat, Eberhardzell)
Image J (Version 1.44, National Institute of Health, USA; <http://imagej.nih.gov/ij>)

3 Ergebnisse

3.1 Kollagen-Isolierung

Die elektrophoretische Auftrennung des isolierten und aufgereinigten Kollagen I ergab ein aus Einzelbanden bestehendes Muster. Es zeigten sich Einzelbanden bei ca. 129 und 139 kDa, wobei die 139 kDa-Bande die $\alpha 1(I)$ -Untereinheit und die 129 kDa-Bande die $\alpha 2(I)$ -Untereinheit darstellt

(<http://www.protocolonline.org/biology-forums/posts/37546.html>). Damit wurde aufgezeigt, dass aus Rattenschwänzen selbst isoliertes Kollagen I in der gleichen Reinheit wie das kommerziell erworbene Kollagen I (Abb. 10) vorlag. Zum Vergleich wurde denaturiertes Kollagen (Gelatine) aufgetragen (Zeugolis, 2008b).

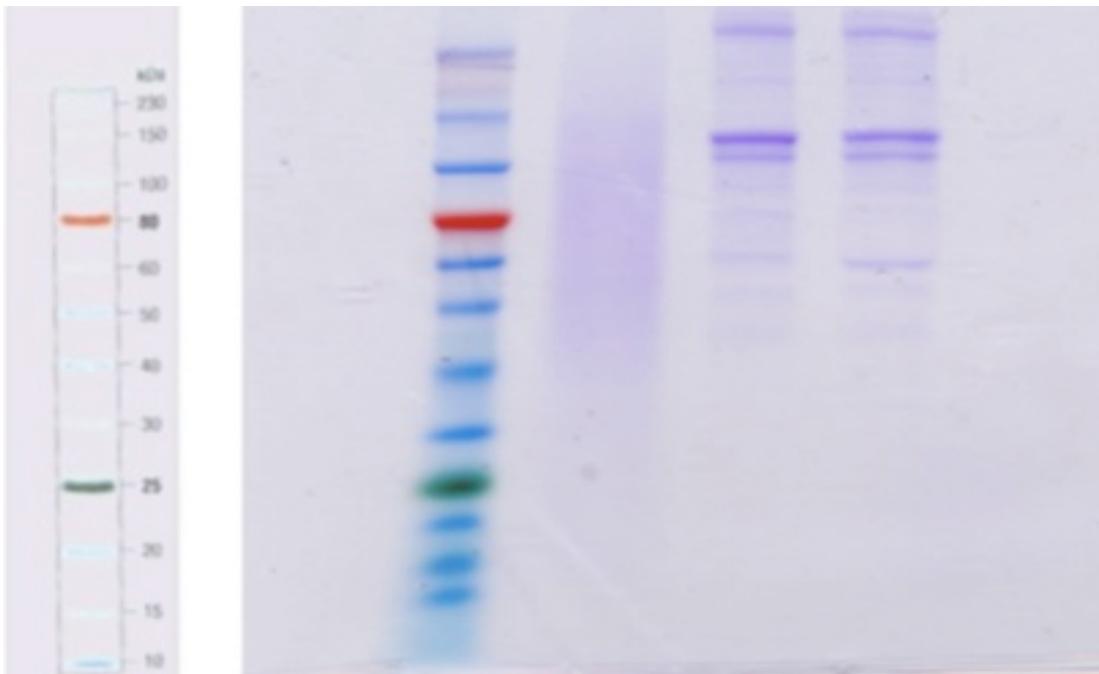


Abb. 10: SDS-Gelelektrophorese. SDS-Gelelektrophorese des Proteinmarker, Gelatine, selbstisoliertes Kollagen I, gekauftes aufgereinigtes Kollagen (von links nach rechts).

3.2 Kollagen I-Elektrospinning

Um die generellen Prozessparameter des Elektrospinnings zu eruiieren wurde zunächst Kollagen I in verschiedenen Konzentrationen (3-12%) in HFP (100%) gelöst und diese Lösung auf einen kontinuierlichen Elektrospinning-Prozess

bzw. Faserbildung mit der oben dargestellten Elektrospinning-Einheit (Abb. 3) hin untersucht. Der Abstand zwischen der Spitze der Stahlhohlnadel und der Kollektorplatte betrug dabei immer 20 cm, die angelegte Spannung variierte zwischen 14-32 kV.

Ein kontinuierlicher Elektrospinning-Prozess mit regelrechter Faserbildung konnte mit Kollagen I-Konzentrationen von 5-11% in HFP erreicht werden. Die Verwendung niedrigerer Konzentrationen führte zu einer unvollständigen Faserbildung ohne komplette Verdunstung des Lösungsmittels (HFP). Bei Verwendung höherer Konzentrationen über 11% war die Viskosität der Lösung zu hoch für einen kontinuierlichen Elektrospinningprozess bzw. eine regelmäßige Faserbildung.

3.2.1 Nanofasermorphologie im REM

Die REM-Aufnahmen der unterschiedlichen NFS zeigten eine Abhängigkeit des mittleren Faserdurchmessers I-Ausgangskonzentration. Mit steigender Kollagenkonzentration in der Ausgangslösung erhöhte sich der mittlere Faserdurchmesser. Es wurden mittlere Faserdurchmesser von 186 ± 69 nm (5% Kollagen I, Abb. 11A) bis 1913 ± 712 nm (11% Kollagen I, Abb. 11D) gemessen.

Ab einer Konzentration von 10% Kollagen I in HFP konnte das sog. ribbon pattern beobachtet werden, hierbei kommt es zu einer nicht gewünschten Abflachung und exponentiellen Zunahme des Durchmessers der elektrogesponnenen Kollagen I-Fasern. Die mittleren Faserdurchmesser in Abhängigkeit von der Ausgangskonzentration sind in Abb. 11E dargestellt.

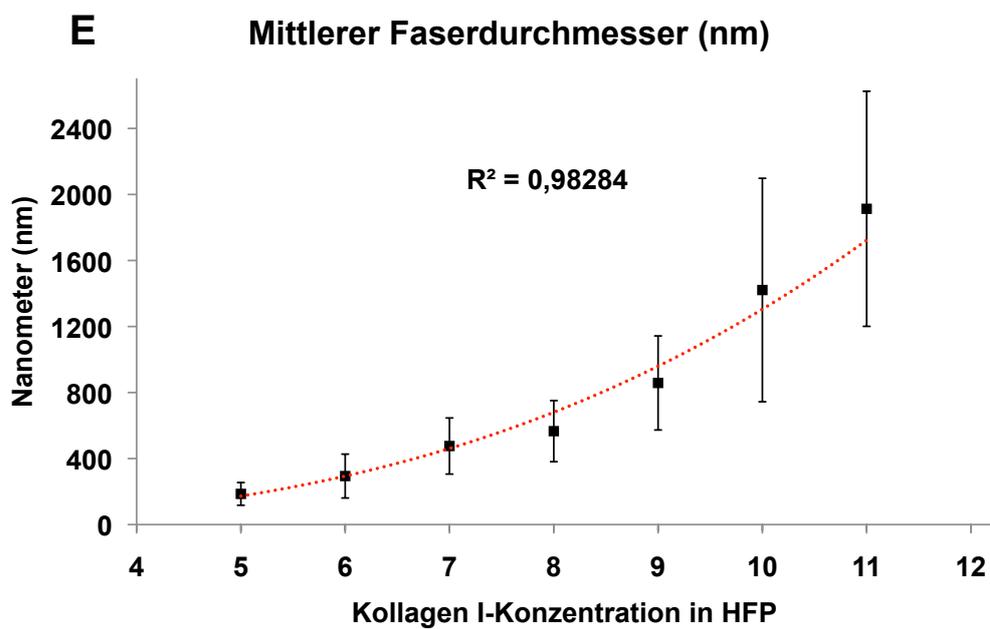
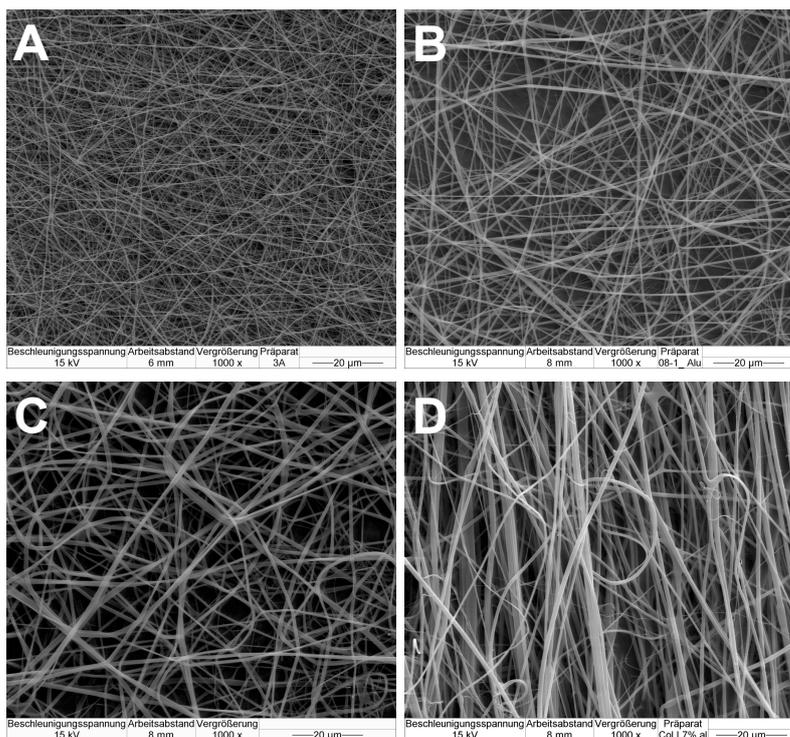


Abb. 11: REM-Aufnahmen von Kollagen I-NF verschiedener Ausgangskonzentrationen in HFP. (A) 5%, (B) 7%, (C) 9% und (D) 11%. Skalierung = 20 µm. (E) Graphische Darstellung des mittleren Kollagen I-Faserdurchmessers in Abhängigkeit von der Kollagen I-Ausgangskonzentration.

3.2.2 Porengröße

Es wurden NFS aus Polymerlösungen mit einer Konzentration von 5-11% Kollagen I mit HFP als Lösungsmittel hergestellt. Die Analyse der jeweiligen Porenfläche erfolgte durch Bestimmung auf den REM-Bildern mittels der Bildanalysesoftware Image J 1.44 (Abb. 6 und 12).

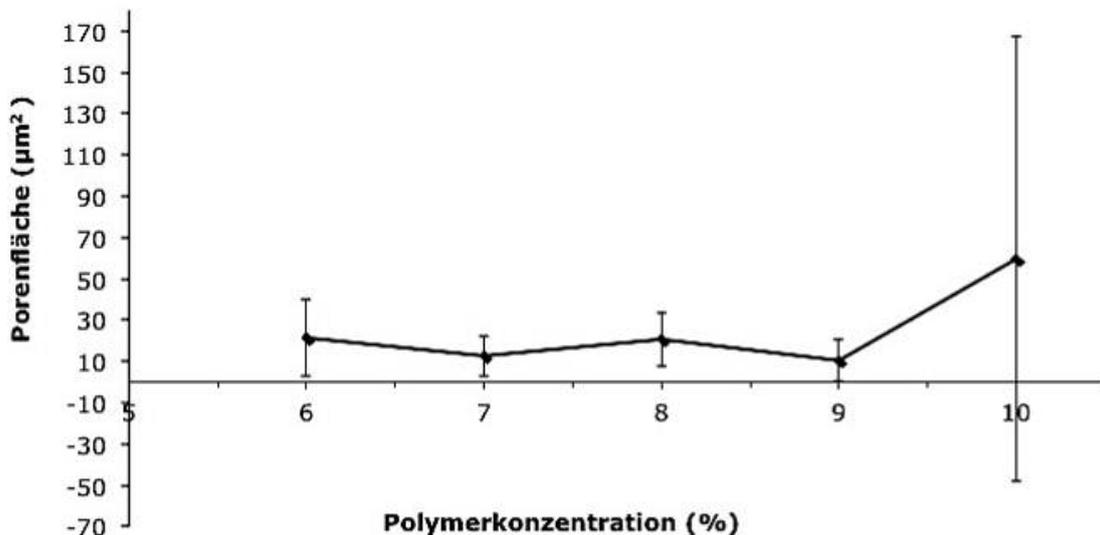


Abb. 12: Einfluss der Kollagen I-Konzentration auf die Porenfläche. Abhängigkeit der Porenfläche [μm^2] der NFS von der Kollagenkonzentration [%] der Ausgangslösung.

3.2.3 Ausrichtung der Nanofasern

Zur Evaluierung der Auswirkung eines rotierenden Kollektors auf die Ausrichtung der NF wurde Kollagen I (7% in HFP) bei linearen Translationsgeschwindigkeiten von 0,3-9,8 m/s elektrogewoben. Die Ausrichtung der entstehenden Fasern wurde elektronenmikroskopisch analysiert (Image J 1.44). Bei einer linearen Translation von 0,3 m/s wiesen 32,6% der Fasern eine Abweichung von -30° bis $+30^\circ$ von der Rotationsrichtung auf, die übrigen Fasern zeigten eine höhere Abweichung von der Rotationsrichtung. Mit zunehmender Rotationsgeschwindigkeit bzw. linearer Translation kam es zu einer entsprechend höheren Ausrichtung der NF. Bei 5,1 m/s wiesen 72,5% der Fasern eine Abweichung von -30° bis $+30^\circ$ auf und bei 9,8 m/s 92,1% (Abb. 13D, E und F).

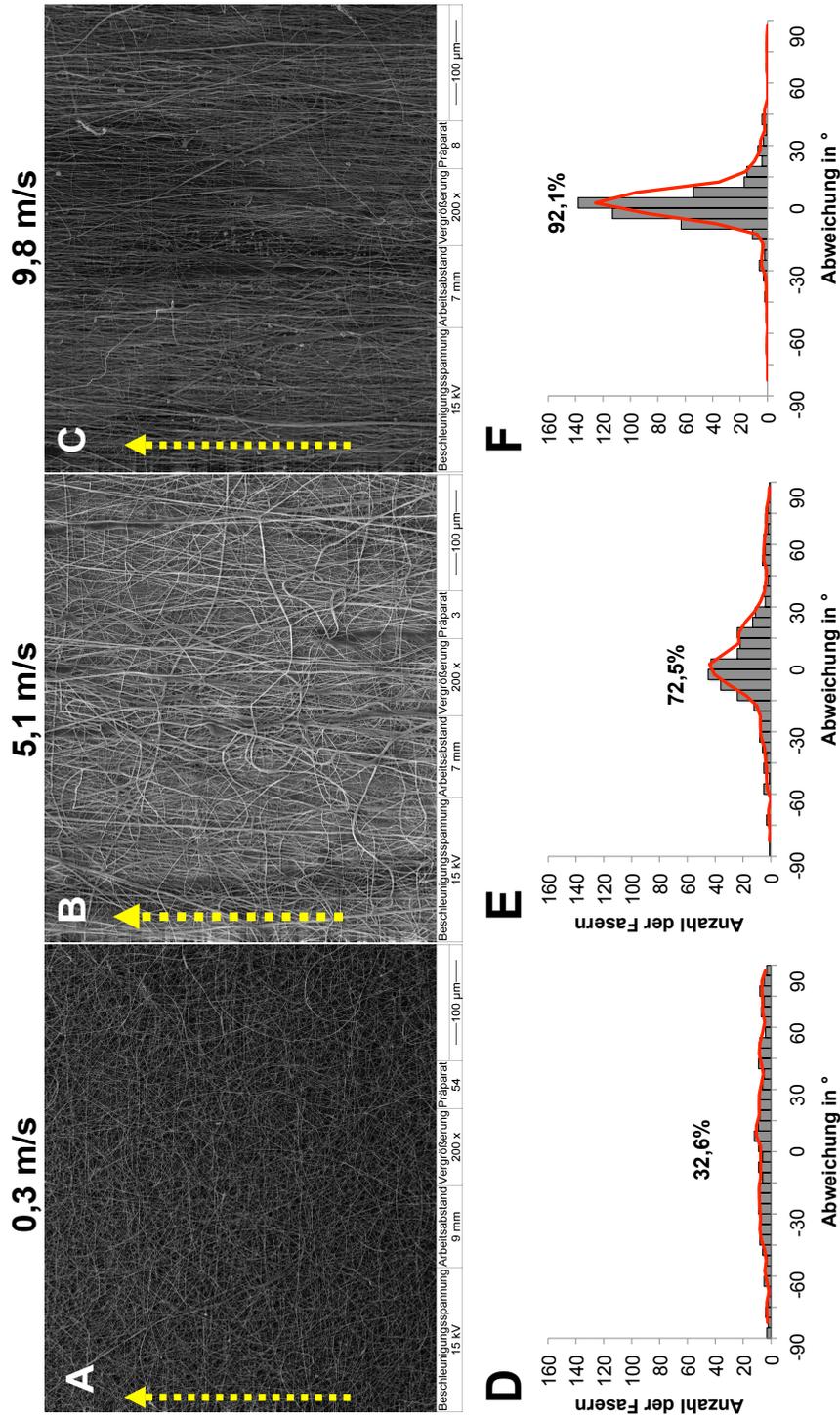


Abb. 13: Nanofaserausrichtung (Anisotropie) in Abhängigkeit von der linearen Translation. REM-Aufnahmen von Kollagen I-NFS bei einer linearen Translation von (A) 0,3, (B) 5,1 und (C) 9,8 m/s. Skalierung = 100 μm . Graphische Darstellung der Faserabweichungen von der Rotationsrichtung in Winkelgrad ($^{\circ}$) bei (D) 0,3, (E) 5,1 und (F) 9,8 m/s mit prozentualer Angabe der Fasern mit einem Abweichungswinkel von -30° bis $+30^{\circ}$.

3.2.4 Zugfestigkeit der Kollagen I-NFS

Mit unterschiedlich hoher linearer Translation (0,3, 5,1 oder 9,8 m/s) elektrogewebene Kollagen I-NFS wurden sowohl parallel als auch senkrecht zur Rotationsrichtung auf ihre Zugfestigkeit untersucht (Abb. 14). Dazu wurden jeweils 5 Proben der unterschiedlichen Kollagen I-NFS (50 x 10 x 0,5 mm) an den Enden jeweils in die Klemmvorrichtung der Prüfmaschine (Zwick ProLine mit 10 kN Maximalkraft) gespannt und mit einer Geschwindigkeit von 0,5 mm/s bis zum Zerreißen auseinandergezogen. Die dafür benötigte Kraft wurde digital aufgezeichnet und die maximal ausgeübte Kraft über den entsprechenden Querschnitt der NFS in die entsprechende Zugfestigkeit umgerechnet. Es wurden jeweils 5 NFS pro Gruppe und Bedingung getestet.

NFS die bei einer linearen Translation von 0,3 m/s hergestellt wurden wiesen eine Zugfestigkeit von $2,04 \pm 0,3$ MPa in paralleler und $2,06 \pm 0,27$ MPa in senkrechter Richtung auf. Bei einer linearen Translation von 5,1 m/s stieg die Zugfestigkeit in paralleler Richtung signifikant auf $2,67 \pm 0,34$ MPa und bei 9,8 m/s im Mittel auf $3,87 \pm 0,41$ MPa an (Abb. 14). Hingegen nahm die Zugfestigkeit in senkrechter Richtung ab, nicht signifikant bei 5,1 m/s auf $1,92 \pm 0,29$ MPa und signifikant auf $1,45 \pm 0,26$ MPa bei 9,8 m/s (Abb. 14). Die Zugfestigkeit der Kollagen I-NFS war abhängig von der linearen Translation bzw. dem Grad der Faserausrichtung. Mit steigender Faserausrichtung kam es zu einem Anstieg der Zugfestigkeit in paralleler Testrichtung und umgekehrt zu einer Verminderung der Zugfestigkeit in senkrechter Richtung.

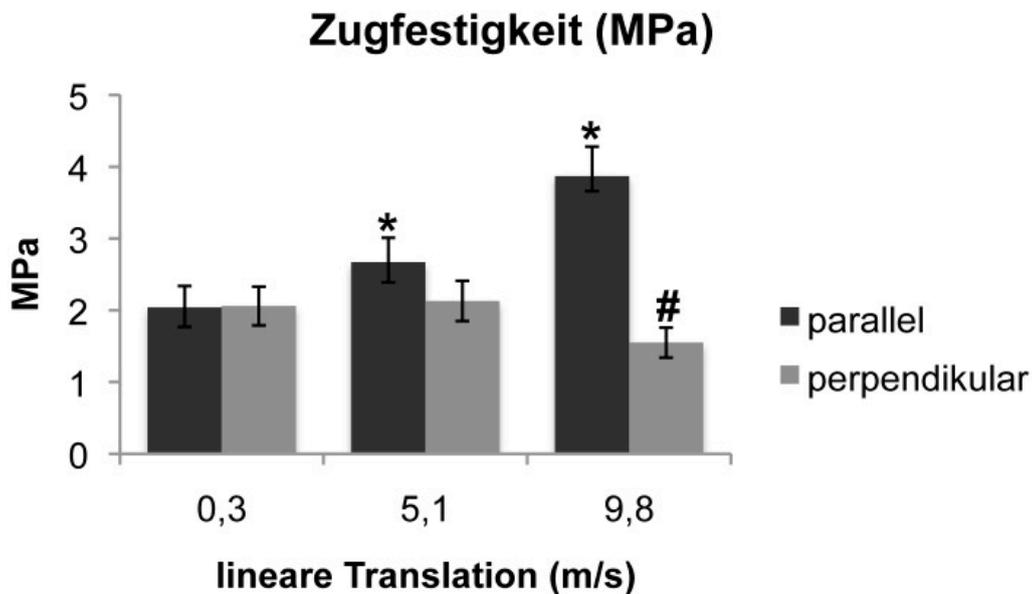


Abb. 14: Zugfestigkeit der Kollagen I-NFS bei unterschiedlich hoher linearer Translation in paralleler und perpendikulärer Testrichtung. Dargestellt sind die Mittelwerte ($n=5$) und die entsprechende Standardabweichung. * $p \leq 0,05$ im Vergleich zu der Zugfestigkeit 0,3 m/s parallel zur Rotationsrichtung; # $p \leq 0,05$ im Vergleich zu der Zugfestigkeit 0,3 m/s perpendikular zur Rotationsrichtung.

3.3 Crosslinken der Zellträger

Bei unbehandelten Kollagen I-NFS konnte initial der Verlust der strukturellen Integrität im wässrigen Milieu beobachtet werden. Daher war der Einsatz von chemischen Crosslinkern zur Verbesserung der strukturellen Integrität der NFS für Zellkulturversuche notwendig. Es wurden die chemischen Crosslinker HMDI (Abb. 15A), Carbodiimid (Abb. 15B) und Genipin (Abb. 15C) eingesetzt. Sowohl die Verwendung des Carbodiimids (Abb. 15B) als auch von Genipin (Abb. 15C) führte zu einem vollständigen Verlust der Faser- und Porenstruktur. Unter Einsatz von HMDI als Crosslinker konnte die Faserstruktur, wie in Abb. 15A dargestellt, vollständig erhalten werden. Für die weiteren Zellkulturversuche wurde daher HMDI als Crosslinker eingesetzt.

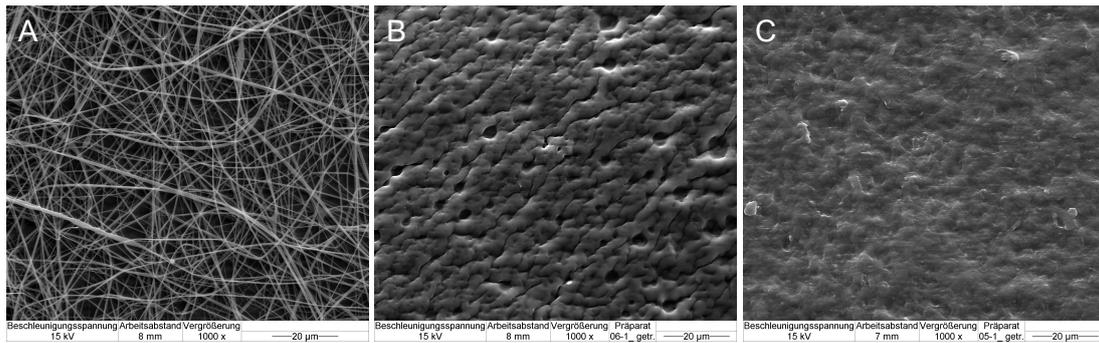


Abb. 15: Auswirkung verschiedener Crosslinker auf die Nanofasermorphologie (6% Kollagen I in HFP, 0,3 m/s Rotationsgeschwindigkeit). REM-Aufnahmen der Kollagen I-NFS nach Behandlung mit (A) HMDI, (B) Carbodiimid, (C) Genipin. Skalierung = 20 μm .

3.4 Zellkulturversuche mit MSZ

3.4.1 Fluoreszenzmikroskopische Darstellung fokaler Adhäsionen und des Zytoskelettes

Initiale Untersuchungen zur fluoreszenzmikroskopischen Darstellung der intrazellulären Aktinfilamente von Vinculin (Hauptstrukturprotein von Zell-Zell- und Zell-Extrazellulärmatrix-Kontakten) und des Zellkerns wurden an Monolayerkulturen von MSZ durchgeführt (Abb. 16A). Die Zellen zeigten eine polygonale, flächige Morphologie mit ungeordneten Aktinfilamenten (grün) und einer homogen über die Zellemembran verteilten Anfärbung der Vinculinkomplexe (rot). Auf OT elektrogenespinnene Kollagen I-NF wurden mit MSZ besiedelt und gleichermaßen gefärbt (Protokoll siehe 2.9.3). Hier zeigten die MSZ ebenfalls eine polygonale Morphologie mit jedoch eher geordneten Aktinfilamenten. Die Vinculinkomplexe konzentrieren sich im Gegensatz zur Monolayerkultur auf einige Kontaktstellen mit den NF (Abb. 16B).

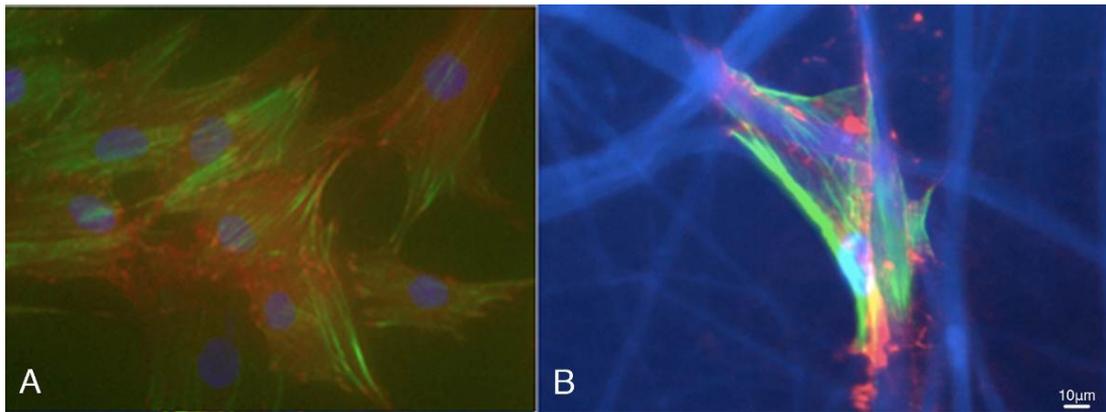


Abb. 16: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Aktinfilamente (grün), Vinculinkomplexe (rot) und des Zellkerns (blau) von MSZ. (A) Monolayerkultur und (B) auf Kollagen I-NFS (9% Kollagen in HFP, 0,3 m/s). (B) Bläuliche Autofluoreszenz der NF. Skalierung = 10 µm; Aktinfilamente (grün), Vinculinkomplexe (rot) und Zellkerns (blau).

3.4.2 MSZ-Morphologie in Abhängigkeit vom Faserdurchmesser

Um zu untersuchen, ob und in welchem Ausmaß der Durchmesser der NF einen Einfluss auf die Zellmorphologie hat, wurden Kollagen I-Fasern aus 5%-iger (186 ± 69 nm), 7%-iger (476 ± 170 nm) und 9%-iger (858 ± 285 nm) Kollagenlösung in einer dünnen Schicht auf Glas-OT elektrogenesponnen. Nach der Vernetzung mit HMDI wurden diese mit jeweils 1×10^4 MSZ besiedelt und für 3 Tage im Stammzell-Medium kultiviert (37°C , 5% CO_2). Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen für die unterschiedlichen Fasern eine sehr ähnliche Zellmorphologie (Abb. 17A, B und C), wobei Zellen auf Fasern generell größer erschienen (Abb. 17A, B, C). Eine systematische Auswertung der Zelldurchmesser wurde nicht durchgeführt.

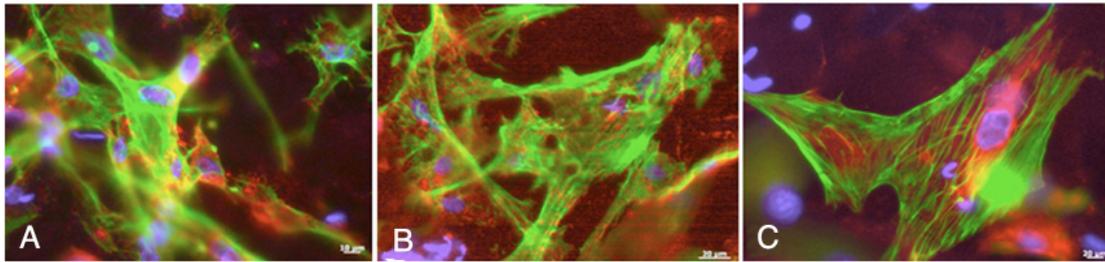


Abb. 17: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Aktinfilamente (grün), Vinculinkomplexe (rot) und des Zellkerns (blau) von MSZ auf Kollagenfasern mit unterschiedlichem Durchmesser. (A) 5%, (B) 7% und (C) 9% Kollagen I-Ausgangslösung (lineare Translation jeweils 0,3 m/s) Skalierung = 10 μm (A) und 20 μm (B, C).

3.4.3 MSZ-Morphologie in Abhängigkeit der Faserausrichtung

In analoger Weise der unter 3.4.2 genannten Technik wurde die Auswirkung unterschiedlich stark ausgerichteter NF auf die Morphologie von MSZ analysiert. Hierzu wurden aus einer 7%-igen Ausgangslösung Kollagen I-NF mit unterschiedlich hoher linearer Translation (0,3; 5,1 und 9,8 m/s) auf OT elektrogewoben und anschließend mit MSZ besiedelt. Nach dreitägiger Kultivierung im Stammzellmedium (37°C, 5% CO₂) zeigten die Zellen auf den nicht ausgerichteten Fasern (0,3 m/s; Abb. 18C, D) die oben bereits beschriebene polygonale Morphologie ohne erkennbare Ausrichtung. Mit höherer Ausrichtung der Kollagen I-NF kam es zu einer deutlichen Veränderung der Morphologie hin zu einem elongierten, fibroblastenartigen Zelltyp. Besonders auf den stark ausgerichteten Fasern (9,8 m/s) zeigten nahezu alle MSZ diese Morphologie mit hochgradig paralleler Ausrichtung der Zellen untereinander (Abb. 18A, B). Die Ausrichtung der Aktinfilamente erfolgt in Richtung der Zellachse. Somit konnte ein signifikanter Einfluss der Nanofaserausrichtung auf die Zellmorphologie und die Organisation des Zytoskelettes nachgewiesen werden.

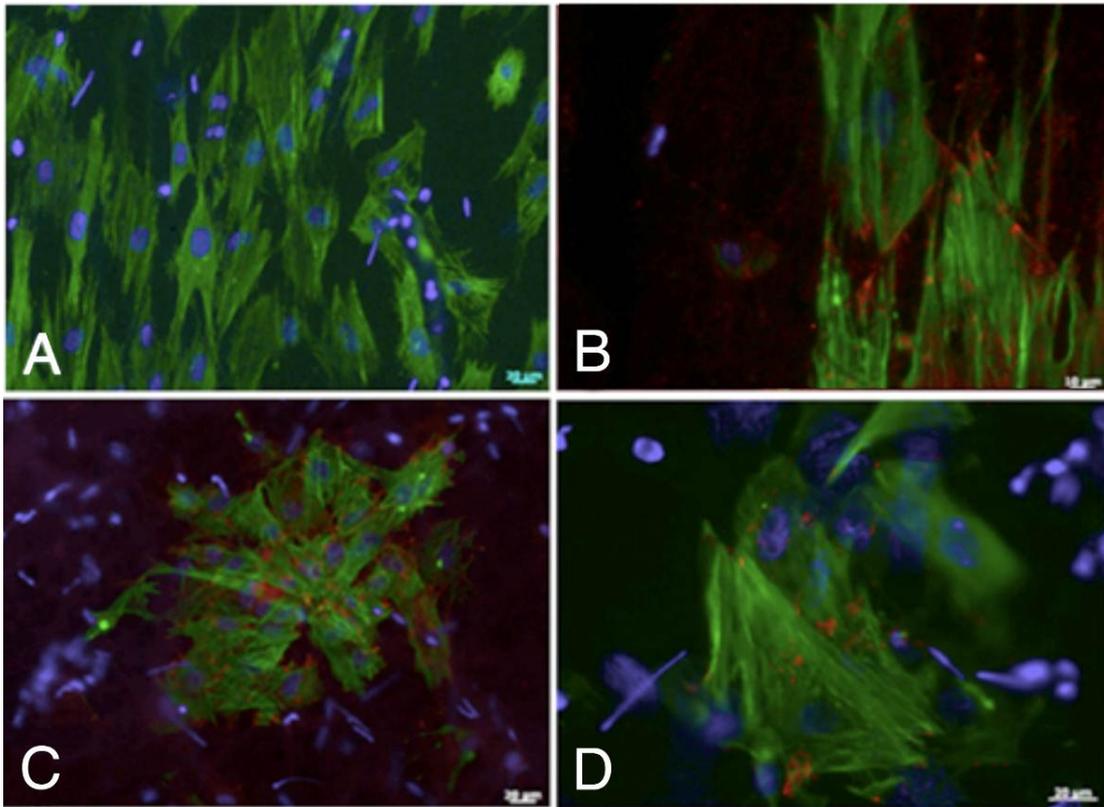


Abb. 18: Beispielhafte fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Aktinfilamente (grün), Vinculinkomplexe (rot) und des Zellkerns (blau) von MSZ auf Kollagen I-NF mit unterschiedlich hoher Ausrichtung. (A, B) Elongierte, fibroblastenartige MSZ-Morphologie mit stark ausgerichteten Aktinfilamenten (grün) auf ausgerichteten NF (9,8 m/s); (C, D) polygonaler Zelltyp mit fehlender Ausrichtung der Aktinfilamente auf nicht ausgerichteten Kollagen I-NF (0,3 m/s) (Skalierung = 10 μm (B) 20 μm (A, C, D)).

3.4.4 Abhängigkeit der Zellachsenausrichtung vom Faserverlauf

Um den Effekt der beobachteten Zellausrichtung zu quantifizieren wurde die Abweichung der MSZ-Zellachse von der Rotationsrichtung bestimmt. Anhand der Fluoreszenzaufnahmen von jeweils 3 mit Kollagen I-NF elektrobesponnenen OT bei 0,3, 5,1 und 9,8 m/s wurde die Rotationsrichtung eingezeichnet und die Abweichung der Zellachse von dieser in Winkelgraden bestimmt. Dabei wurden je Gruppe und OT 50-70 Zellachsen ausgemessen, die Abweichungen der Zellachse wurden in Stufen von 15° eingeteilt, wobei die Abweichung $+90^\circ$ bis -90° betragen konnte. Die Ergebnisse sind in Abb. 19 dargestellt. Auf den nicht ausgerichteten NF zeigten 38% der MSZ eine Abweichung der Zellachse von der Rotationsrichtung zwischen $+30^\circ$ bis -30° (Abb. 19A und D). Mit steigender linearer Translation während des

Herstellungsprozesses bzw. höherer Ausrichtung der NF kam es zu einer signifikanten Ausrichtung der Zellachse parallel zu den Fasern bzw. der Rotationsrichtung. Bei einer Rotationsgeschwindigkeit von 5,1 m/s lagen bereits 77% (Abb. 19B und E) und bei 9,8 m/s sogar 96% (Abb. 19C und F) der Zellachsen innerhalb eines Sektors von $+30^\circ$ bis -30° zur Rotationsachse vor. Es konnte gezeigt werden, dass der Grad der Nanofaserausrichtung einen entscheidenden Einfluss auf die Zellorientierung hat und eine gerichtete Zellorientierung positiv mit dem Grad der Faserausrichtung korreliert.

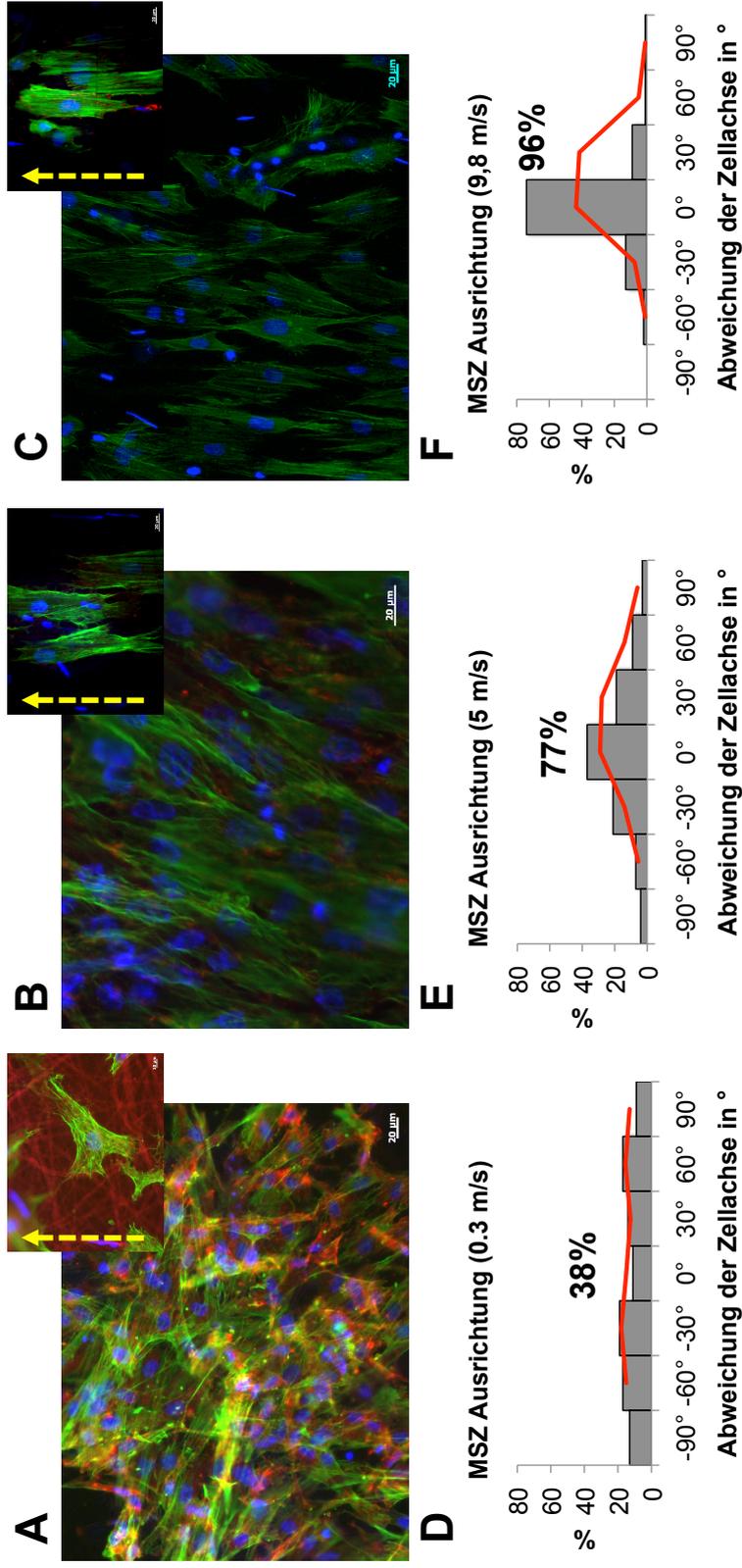


Abb. 19: Einfluss einer unterschiedlich hohen Kollagen I-Nanofaserausrichtung auf die Orientierung von MSZ. Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der MSZ-Morphologie auf Kollagen I-NF mit unterschiedlich hoher Ausrichtung, (A) 0,3 m/s, (B) 5,1 m/s und (C) 9,8 m/s. Skalierung = 20 μ m. (D-F) Graphische Auftragung der Abweichung der Zellachse von der Rotationsrichtung (gelber Pfeil) in Winkelgrad ($^{\circ}$) unter Angabe des Anteils der Zellen deren Achse in einem Sektor von $+30^{\circ}$ bis -30° zur Rotationsrichtung bzw. Faserverlauf liegt.

3.4.5 DNA-Gehalt

Kollagen I-NFS (8 x 0,5 mm) mit unterschiedlichem Faserdurchmesser (5%, 7% und 9% Kollagen I-Ausgangslösung bei 0,3 m/s) oder mit unterschiedlich hoher linearer Translation (0,3; 5,1 und 9,8 m/s bei 7% Kollagen I Ausgangslösung) wurden mit 1×10^5 MSZ/NFS besiedelt und für 21 Tage in Stammzellmedium kultiviert. Zu definierten Zeitpunkten (Tag 1, 3, 7, 14 und 21) wurde der Gehalt an doppelsträngiger DNA quantifiziert, um so die Proliferation der MSZ über die Zeit zu untersuchen. Die gemessene DNA-Menge an Tag 1 wurde jeweils gleich 1 gesetzt und die folgenden Werte hierzu in Relation gesetzt. Generell kam es auf allen Kollagen I-NFS zu einer Adhäsion und Proliferation der MSZ mit signifikanter Erhöhung des DNA-Gehaltes. Dabei konnte weder in Abhängigkeit von der Fasergröße noch der Faserausrichtung ein signifikanter Unterschied im DNA-Gehalt über die Zeit festgestellt werden (Abb. 20). Nach 21 Tagen Kultivierungsdauer kam es zu einer 2,58-fachen ($\pm 0,67$) Zunahme des DNA-Gehaltes auf NFS, die aus 5%-iger Kollagen I-Ausgangslösung elektrogesponnen wurden; bei Verwendung einer 7%-igen Ausgangslösung 2,46-fache ($\pm 0,59$) und bei 9%-iger 2,45-fache ($\pm 0,62$) Erhöhung im Vergleich zu Tag 1 (Abb. 20A). Analog zu diesen Ergebnissen nahm der DNA-Gehalt auf nicht ausgerichteten Kollagen I-NFS (7%-ige Ausgangslösung) bei 0,3 m/s um das 2,54-fache ($\pm 0,61$) zu. Die stärkere Ausrichtung der Kollagen I-NF hatte keinen signifikanten Effekt auf die Proliferation der MSZ; 5.1 m/s 2,41-fache ($\pm 0,49$) und 9,8 m/s 2,39-fache ($\pm 0,43$) (Abb. 20).

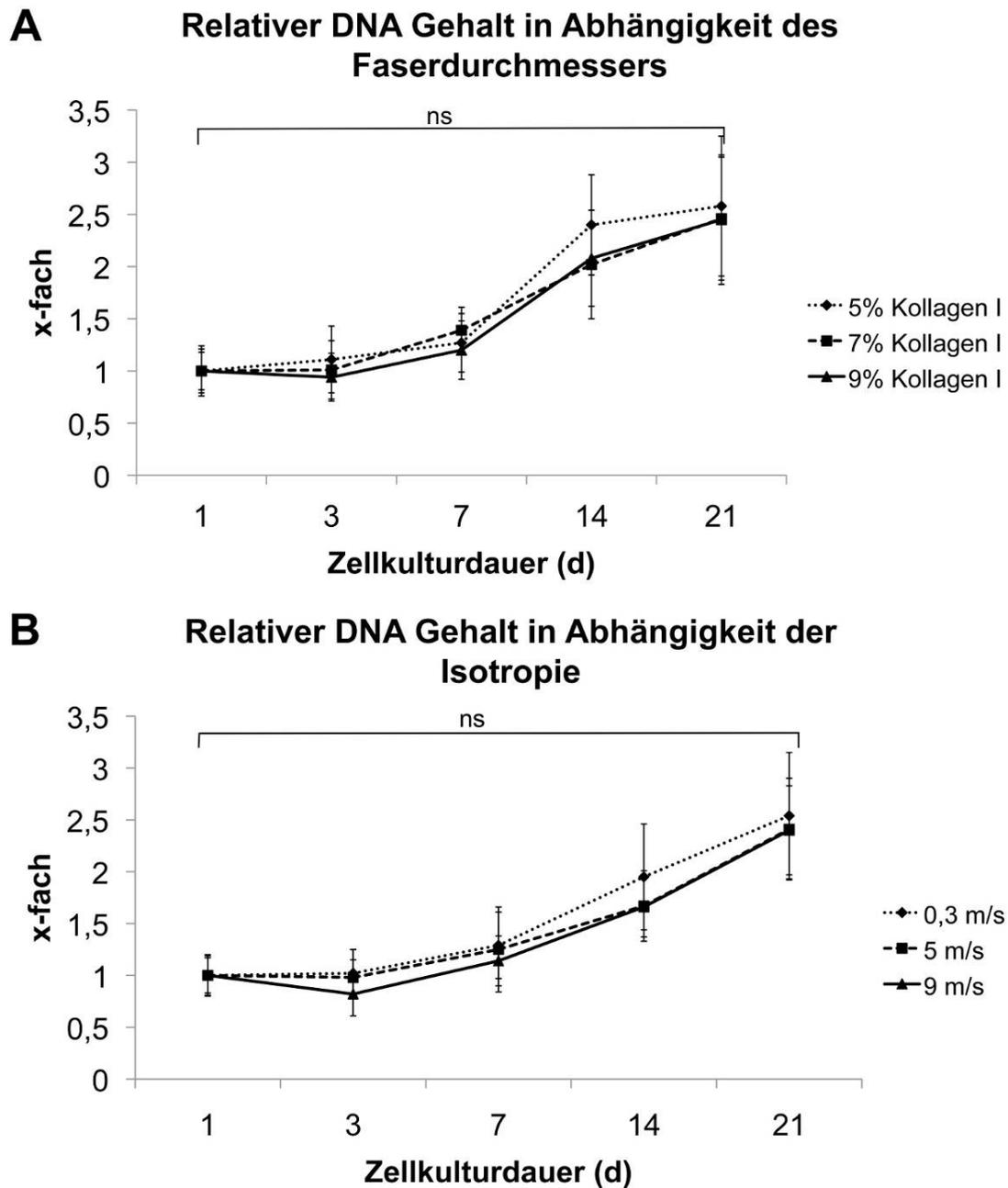


Abb. 20: Proliferation der MSZ an Hand des relativen DNA-Gehalts in Abhängigkeit des (A) Faserdurchmesser und (B) der Ausrichtung der Kollagen I-NF im Zeitverlauf (Tag 1, 3, 7, 14 und 21). Dargestellt ist der x-fache Wert des DNA-Gehaltes als relativer Wert im Vergleich zu Tag 1. Ns = nicht signifikant; 5% vs. 7% vs. 9% Kollagen I oder 0,3 m/s vs. 5,1 m/s vs. 9,8 m/s zum jeweiligen Tag der Zellkultur.

3.4.6 Semiquantitative Densitometrie der tenogenen Markergenexpression

MSZ-besiedelte (1×10^5 MSZ/NFS) Kollagen I-NFS ohne spezifische Faserausrichtung (7% Kollagen I bei 0,3 m/s, n-al) und mit hoher Faserausrichtung (7% Kollagen I bei 9,8 m/s, al) wurden für 21 Tage in Stammzellmedium kultiviert (37°C, 5% CO₂). Zu definierten Zeitpunkten wurde RNA isoliert und die Expression der tenogenen Markergene Scleraxis, Tenascin C, Elastin und Col I mittels RT-PCR analysiert. Die semiquantitative Auswertung erfolgte mittels Densitometrie (Bio Print Mega und Bio Cap Software). Die kumulative Pixelhelligkeit des RT-PCR Produktes von Markergen und Housekeeping-Gen (GAPDH) wurde zu jedem Zeitpunkt und für die entsprechende Bedingung (n-al versus al) gemittelt und in Relation gesetzt (Gen/GAPDH). Die relative Expression der o.g Gene in den MSZ vor der Besiedlung der NFS (Tag 0) wurde gleich 1 gesetzt und die Verlaufswerte in x-facher Expression angegeben.

Die Expression von Scleraxis (Abb. 21A) in MSZ auf al-NFS stieg bis zu Tag 7 signifikant auf das 2,76-fache ($\pm 0,44$) im Vergleich zu Tag 0 und fiel dann bis Tag 21 wieder nahezu auf den Ausgangswert ab (1,18-fach $\pm 0,39$). Im Gegensatz dazu zeigte sich in MSZ auf n-al-NFS keine signifikante Hochregulation von Scleraxis. Auch im Expressionsmuster von Tenascin C zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen nicht ausgerichteten und ausgerichteten NFS (Abb. 21B). Dabei erfolgte keine signifikante Veränderung der Expression auf nicht ausgerichteten NFS im Zeitverlauf. Wohingegen auf den ausgerichteten NFS eine 3,4-fache ($\pm 0,59$) Hochregulation von Tenascin C an Tag 3 beobachtet wurde. Anschließend fiel die Expression kontinuierlich auf den 2,02-fachen Wert ($\pm 0,37$) an Tag 21. Elastin wurde ebenfalls ab Tag 3 der Kultivierung auf den ausgerichteten NFS signifikant höher exprimiert als auf den nicht ausgerichteten NFS. An Tag 14 lag eine 3,9-fach ($\pm 0,61$) höhere Expression als im Vergleich zu Tag 0 vor (Abb. 21C). Auf nicht ausgerichteten NFS konnte nur an Tag 14 und 21 (1,68-fach $\pm 0,49$ bzw. 1,71-fach $\pm 0,38$) eine signifikant erhöhte Elastin-Expression gezeigt werden. Die Expression von Col I zeigte auf den ausgerichteten NFS ein ähnliches Expressionsmuster wie Elastin. Ab Tag 3 kam es zu einer signifikant höheren Expression als auf den

nicht ausgerichteten NFS, wobei ein kontinuierlicher Anstieg bis auf das 2,6-fache ($\pm 0,58$) an Tag 21 gezeigt werden konnte. Im Vergleich kam es auf nicht ausgerichteten NFS nicht zu einer signifikanten Veränderung der Col I-Expression im Vergleich zu Tag 0 (Abb. 21D).

Die Auswirkung unterschiedlicher Faserdurchmesser auf die Expression der genannten Gene wurde ebenfalls analysiert. Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied (Daten nicht abgebildet).

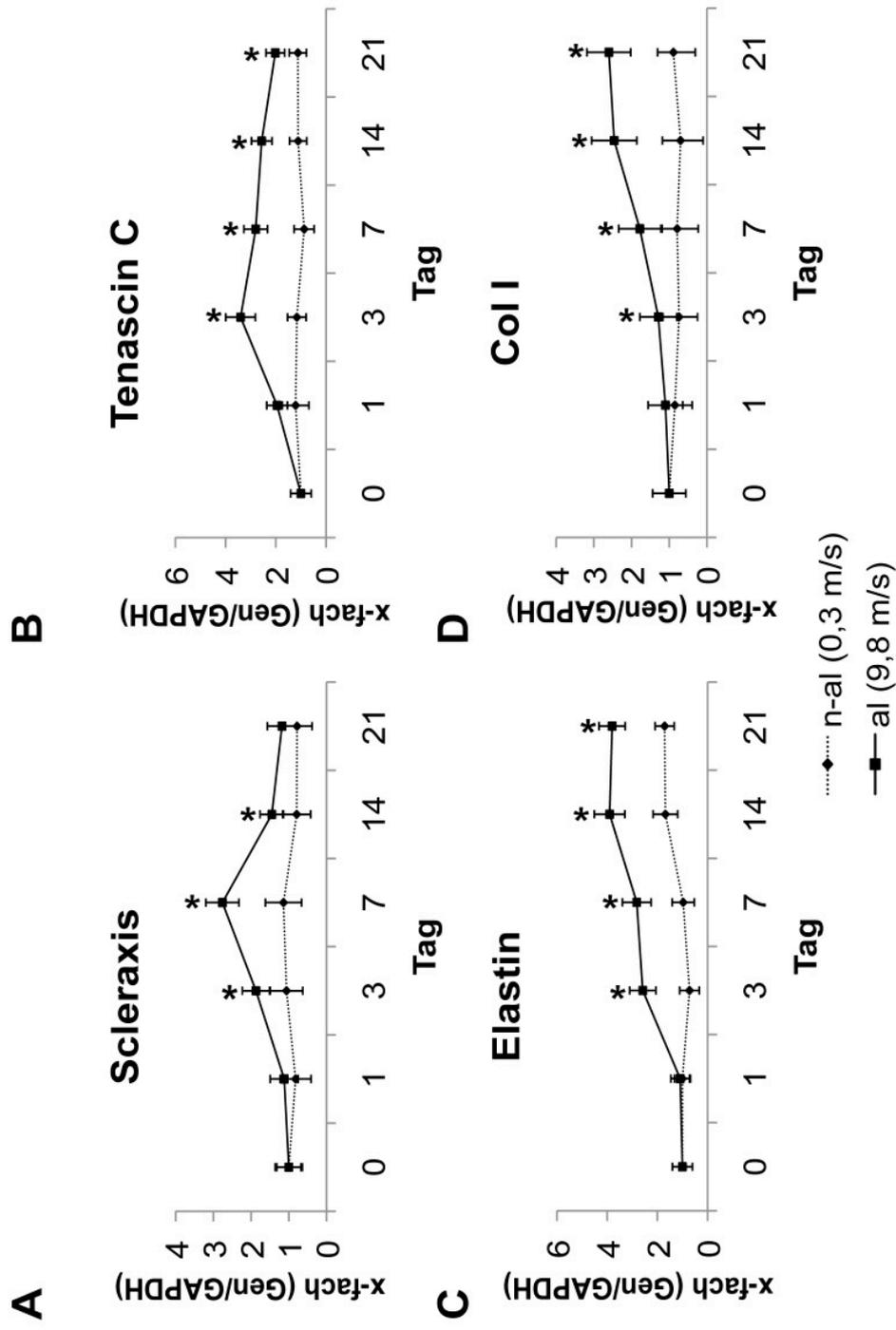


Abb. 21: Semiquantitative Densitometrie der tenogenen Markergenexpression in MSZ auf nicht ausgerichteten (n-al) und ausgerichteten (al) Kollagen I-NFS. Expressionsmuster (A) Scleraxis, (B) Tenascin C, (C) Elastin und (D) Col I aufgetragen als x-facher Wert der Expression um Vergleich zu Tag 0. * $p \leq 0,05$ Genexpression n-al (0,3 m/s) vs al (9,8 m/s) zum entsprechenden Tag der Zellkultur.

3.5 Histologie

Kollagen I-NFS (8 x 0,7 mm; 7%-ige Kollagen I-Ausgangslösung) wurden mit jeweils 2×10^5 MSZ besiedelt und für 21 Tage im Stammzellmedium kultiviert (37°C, 5% CO₂). Nach entsprechender Paraffineinbettung wurden 4 µm dicke Schnitte angefertigt und eine H/E-, Picrosirius Rot- oder Masson-Goldner Färbung durchgeführt.

Wie in Abb. 22A-C dargestellt, kam es zu einer vollständigen Infiltration der MSZ der ca. 500-800 µm dicken Scaffolds. Alle 3 Färbungen zeigen eine wellenförmige Faserstruktur mit teilweise paralleler Anordnung wie sie in nativem Sehngewebe vorliegt (Abb. 22). Interessanterweise zeigte sich eine homogene Infiltration der NFS durch die MSZ trotz der kritischen Porengröße von 25-100 µm. Die kollagene Natur des Trägermaterials wird durch die intensive Rotfärbung in der (Abb. 22E und F) Picrosirius Rot-Färbung demonstriert. Der Nachweis durch die MSZ neu synthetisierter EZM war mit diesen Färbungen nicht möglich.

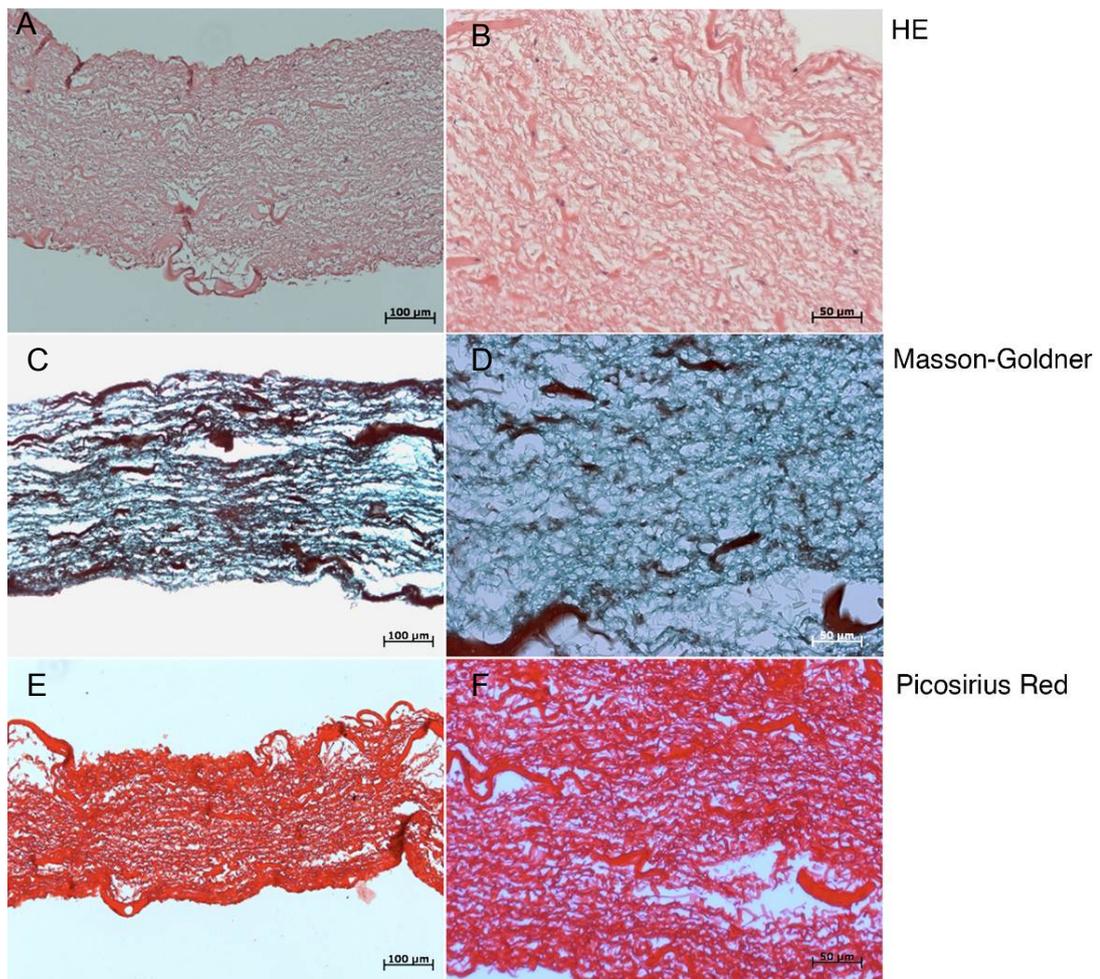


Abb. 22: Lichtmikroskopische Aufnahmen von MSZ besiedelten Kollagen I-NFS nach 21-tägiger Kultivierung in Stammzellmedium. (A, B); HE-Färbung (Maßstab (A) 100 μm und (B) 50 μm); (C,D); Masson-Goldner-Färbung (Maßstab (C) 100 μm und (D) 50 μm); (E, F); Picosirius Rot-Färbung (Maßstab (E) 100 μm und (F) 50 μm). In der (B) H/E- und der (F) Picosirius Rot-Färbung ist deutlich die wellenförmige Faserstruktur mit teilweise paralleler Anordnung zu erkennen. Ebenfalls zeigt sich eine homogene Infiltration der NFS (B, D, F) mit MSZ. Eine Matrixneosynthese durch die MSZ ist aufgrund der kollagenen Natur des Scaffold nicht sicher nachweisbar, allerdings zeigen sowohl die Picosirius Rot- und die Masson-Goldner Färbung das Vorliegen von Kollagen I deutlich.

4 Diskussion

4.1 Methodische Überlegungen

Zell-Matrix-Interaktionen regulieren entscheidende zelluläre Prozesse, wie Adhäsion, Proliferation und Differenzierung. Das Design von Zellträgern sollte sich daher an der Mikroarchitektur und biochemischen Zusammensetzung des Zielgewebes orientieren. In Vorarbeiten konnte die ligamentogene Differenzierung von MSZ in Kollagen I Hydrogelen gezeigt werden (Nöth et al., 2005). Die biomechanischen Eigenschaften des Hydrogels sind jedoch insuffizient für eine in vivo Anwendung. Eine unzureichende biomechanische Stabilität wurde auch schon durch andere Arbeitsgruppen beschrieben (Bourke et al., 2004; Sharma und Maffulli, 2005; Nöth et al., 2005; Laurencin und Freeman, 2005; Woo et al., 1997). Ziel unserer Arbeit war es biomimetische Scaffolds, die die Charakteristika der EZM von nativem Sehngewebe aufweisen herzustellen.

Elektrospinning ermöglicht die Herstellung von Scaffolds auf der Basis synthetischer oder natürlicher Polymere, welche die Dimensionen der EZM nativer Gewebe kopieren und damit physiologische Zellprozesse wie Adhäsion, Proliferation und Differenzierung unterstützen (Tuan et al., 2003; Li et al., 2002). Die Verwendung von NFS aus dem natürlichen Polymer Kollagen I als biomimetischer Zellträger, der die Architektur und biochemische Zusammensetzung der EZM von nativem Sehngewebe nachbildet, stellt eine erfolgsversprechende Alternative zu derzeitigen Strategien der Band- und Sehnenrekonstruktion dar (Sharma und Maffulli, 2005).

Für die Herstellung von NFS mittels Elektrospinning können sowohl natürliche Polymere wie Kollagen I, aber auch synthetische Polymere Poly-L-Acid (PLLA), PGA, PCL (Lee et al., 2004) oder Poly-ethylen-oxid (PEO) (Baker et al., 2008) als Ausgangsstoffe herangezogen werden.

Zur Herstellung der Scaffolds wurde Kollagen I, das aus Rattenschwänzen isoliert wurde, elektrogenesponnen. Es konnte gezeigt werden, das Kollagen I Tenozyten stimuliert ein Gewebe mit vergleichbaren Eigenschaften des

natürlichen Gewebes nachzubilden (Mayer et al., 2009). Kollagen I mit HFP als Lösungsmittel wurde bereits in anderen Arbeiten verwendet (Laar et al., 2009; Matthews et al., 2002; Rho et al., 2006).

Um die Mikroarchitektur der Scaffolds dem von Sehnen- oder Bandgewebe nachzuempfinden, wurde die Elektrospinningeinheit durch einen rotierenden Zylinder modifiziert und der Einfluss der Geschwindigkeit dieses rotierenden Kollektors auf die Faserausrichtung untersucht. Dabei beeinflusst der Grad der Faserausrichtung (Isotropie) die biomechanischen Eigenschaften, die Zellausrichtung und die ligamentogene Markergenexpression von MSZ (Nerurkar et al., 2007). Kollagen I-NFS mit hoher Faserausrichtung bieten hypothetisch die Möglichkeit einer Anwendung als zellfreies „off the shelf“ Produkt oder als Scaffold in Zell-basierten Verfahren zur Regeneration von Sehngewebe wie z.B. der Rotatorenmanschette.

Die Verwendung von MSZ zur Besiedlung der Scaffolds wurde unter dem Gesichtspunkt einer relativ einfachen Isolierung der MSZ durch eine Knochenmarkspunktion und dem multipotenten Differenzierungseigenschaften dieser Zellen begründet (Li et al., 2005).

Erste Zellkulturversuche mit elektrogesponnen Kollagen I-NFS zeigten eine rasche Biodegradibilität im wässrigen Milieu (Khor, 1997). Zur Erhöhung der Biostabilität wurden verschiedene Crosslinker (Quervernetzer) getestet. Das Ziel des Crosslinkings ist es, die biologische Stabilität der Scaffolds zu verbessern und damit einer rapiden Degradation des Scaffolds entgegen zu wirken (Khor, 2007).

4.2 Elektrospinning von Kollagen I

Neben der Wahl des Polymers und damit der Faserzusammensetzung spielt auch die Fasermorphologie eine entscheidende Rolle im Designprozess biomimetischer Scaffolds. Wichtige physiologische Prozesse der Zelladhäsion, -proliferation und -differenzierung werden durch Zell-Matrixinteraktionen gesteuert, wobei der Faserdurchmesser einen entscheidenden Einfluss auf die Zelle als responsives Element ausübt (Li et al., 2006).

Im ersten Schritt dieser Arbeit konnten mittels Elektrosponning von Kollagen I erfolgreich Fasern mit einem mittleren Durchmesser von 280 nm bis 1900 nm hergestellt werden. Analoge Ergebnisse lieferten schon Li et al., 2002; Buttafoco et al., 2006 und Matthews et al., 2002 unter Verwendung synthetischer und natürlicher Polymere. Die Kollagenfibrillen der EZM natürlicher Gewebe haben einen Durchmesser von 10 nm bis 500 nm in Abhängigkeit von der Spezies und dem Gewebetyp (Friess, 1998; Rho et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch Elektrosponnen von Kollagen I mit einer 5-8%-igen Kollagenlösung als Ausgangskonzentration Fasern mit einem Durchmesser natürlicher Kollagenfibrillen erzeugt werden können (Abb. 11). Dabei kam es mit steigender Ausgangskonzentration zu einem steigenden Faserdurchmesser. Die regulierbare Erhöhung des Faserdurchmessers durch die Verwendung höher konzentrierter Lösungen war begrenzt, da ab einer Polymer-Kollagen-I-Konzentration größer 11% das Phänomen des ribbon pattern (Abflachung der Fasern) auftrat.

4.3 Elektrosponning und rotierender Zylinder

Der Aufbau der EZM von Sehnen- und Bandgewebe weist eine hochgradige parallele Ausrichtung der Kollagenfasern und Tenozyten auf (Baker et al., 2008; Lynch et al., 2003; Setton et al., 1999). Es konnte gezeigt werden, dass sich die Ausrichtung der Kollagen I-NF proportional zur Rotationsgeschwindigkeit (lineare Translation) des Kollektors verhält. Dieses Phänomen konnte für weitere Polymere bereits durch andere Arbeitsgruppen gezeigt werden (Buttafoco et al., 2006; Baker et al., 2008; Laar et al., 2009; Li et al., 2007). In unseren Untersuchungen kam es bei einer linearen Translation von 9,8 m/s zu einer parallelen Anordnung der Kollagenfasern in > 90% (Abb. 13). Somit konnten Scaffolds hergestellt werden, die sowohl die biochemischen Aspekte als auch die ultrastrukturellen Charakteristika von nativem Sehngewebe nachahmen.

4.4 Crosslinker

Es zeigte sich, dass die Crosslinkerreagenzien, die eine wässrige Phase benötigen, (wie z. B. Genipin, Carbodiimide, Glutaraldehyd) bereits initial zu einer strukturellen Veränderung der Scaffolds führten (Abb. 15). Die Verwendung von HMDI, welches in 100% Isopropanol angewendet werden kann, zeigte keinerlei morphologische Veränderungen der NF in den Scaffolds. Die Porengröße und Porenfläche, ein wichtiger Parameter für die Zellinfiltration, zeigte im Gegensatz zum Faserdurchmesser keine signifikante Abhängigkeit von der Ausgangskonzentration (Abb. 12). Initiale Besiedlungsversuche zeigten eine gute Infiltration und Besiedlung der Kollagen I-NFS (Abb. 22). Im Gegensatz hierzu zeigten andere Arbeiten unter Verwendung synthetischer Polymere lediglich eine langsam über die Zeit zunehmende Infiltration des elektrogewebenen Scaffolds durch die Zellen bei vergleichbarer Porengröße (Baker et al., 2008; Boudroit et al., 2006). Dabei spielt neben der Porengröße unserer Ansicht nach auch die plastische Verformbarkeit des von uns verwendeten Kollagen I und die verwendete Zellquelle eine wichtige Rolle. Nach der Herstellung und biochemischen Bearbeitung der Scaffolds durch Crosslinking-Methoden wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die Ausrichtung der Kollagenfasern eine tenogene Differenzierung der verwendeten MSZ unterstützen.

4.5 Zellmorphologie

Die Architektur der NFS in Bezug auf die Porengröße und die Faserausrichtung ist nicht nur für die Zellbesiedlung, sondern auch für die Zelladhäsion, Migration und Proliferation von großer Bedeutung (Lee et al., 2004). In den angefertigten fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Zellträger konnte eine Abhängigkeit der Zellmorphologie von der Fasermorphologie gezeigt werden (Abb. 16, 17 und 18). Im natürlichen Sehngewebe sind die Tenozyten in paralleler Ausrichtung zu den Kollagenfasern als spezialisierte Fibroblasten angelagert (Milz et al., 2009). In den von uns durchgeführten Versuchen richteten sich die Zellen streng entlang der parallel angeordneten Fasern aus, wobei die MSZ eine schmale und langgestreckte Morphologie aufwies (Abb.

18). MSZ auf NFS ohne Faserausrichtung zeigten eine polygonale Morphologie mit Ausbildung mehrerer Zellausläufer und Bildung fokaler Adhäsionskomplexe im Bereich unterschiedlicher Kollagenfasern (Abb. 18). Eine parallele Zellausrichtung war hier nicht zu beobachten. Die Tendenz von Zellen sich nach einer von den NF vorgegebenen Richtung zu orientieren wurde auch für synthetische Polymere bereits beschrieben (Boudriot et al., 2006; Li et al., 2005; Baker et al., 2008; Yin et al., 2009). Li und Kollegen verglichen die Zellmorphologie von Chondrozyten auf NF (300 nm) und Mikrofasern (1,5 µm) ohne spezifische Faserausrichtung (Li et al., 2006). Dabei stellten sie fest, dass die Zellen auf NF (300 nm) rundlicher sind und eine desorganisierte Aktinzytoskelettstruktur aufweisen. Im Gegensatz dazu wurden bei der Kultivierung auf Mikrofasern (1,5 µm) längliche Zellen mit organisierter Zytoskelettstruktur beobachtet. Ein signifikanter Einfluss des Faserdurchmessers auf die Zellmorphologie und die Proliferation von humanen MSZ konnte in unseren Versuchen nicht beobachtet werden (Abb. 17). Wobei in der vorliegenden Arbeit Faserdurchmesser von ca. 200 nm bis ca. 800 nm miteinander verglichen wurden und so gegebenenfalls ein zu geringer struktureller Unterschied im Durchmesser bestand, um signifikante Auswirkungen auf die Zellmorphologie und -proliferation zu verursachen.

Auch die Ausbildung von Fokalkontakten ist an der Determinierung der Zellmorphologie beteiligt (Docheva et al., 2007). MSZ auf stark ausgerichteten NF wiesen nur vereinzelte Fokalkontakte im Bereich des langgestreckten Zellkörpers auf. Bei MSZ auf nicht ausgerichteten Fasern war eine diffuse Fokalkontaktbildung im Bereich der verschiedenen polygonalen Zellmorphologie zu beobachten (Abb. 18).

4.6 Tenogene Differenzierung

Die Differenzierung von MSZ zu Knochen-, Knorpel- und Fettzellen ist in den letzten zwei Dekaden ausführlich untersucht und publiziert worden (Pittenger et al., 1999; Chen et al., 2008). Hingegen ist die Differenzierung von MSZ in Sehnen- und Ligamentzellen weniger gut erforscht (Wolfman et al., 1997). Arbeiten der vergangenen Jahre auf dem Gebiet der Mechanobiologie konnten

einen positiven Einfluss unterschiedlicher physikalischer Stimuli, wie Kompression oder zyklischer Dehnung auf die Tenogenese und Ligamentogenese von MSZ nachweisen (Goulet et al., 1997; Awad et al., 1999; Young et al., 1998; Kuo et al., 2008). Vorangegangene Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten ebenfalls den positiven Einfluss zyklischer Dehnung während der Kultivierung auf die tenogene Differenzierung von MSZ in Kollagen I-Hydrogelen nachweisen (Nöth et al., 2005).

Für die Sehnenentwicklung gibt es keine ausschließlich Sehnen-spezifischen Genexpressionsfaktoren. In der vorliegenden Arbeit wurden zum Nachweis der tenogenen Differenzierung Skleraxis, Kollagen I, Elastin, und Tenascin C herangezogen (Hoffmann et al., 2006; Yin et al., 2009; Schweitzer et al., 2001). Skleraxis ist ein früher Transkriptionsfaktor, der von Zellen in Sehnen- und Bandgewebe in der Embryogenese exprimiert wird (Schweitzer et al., 2001; Yin et al., 2009). Kollagen I wird von Sehnenzellen exprimiert und ist zur Aufrechterhaltung der strukturellen Sehnenmatrix unabdingbar. Es ist nicht sehenspezifisch, aber hinweisend auf eine Sehnenzellendifferenzierung (Hoffmann et al., 2006). Elastin und Tenascin C sind Matrixproteine mit eingeschränkter Expression *in vivo*, die hauptsächlich an Stellen aktiven Umbaus gefunden werden können (Wenk et al., 2000; Midwood und Schwarzbauer, 2002).

In der vorliegenden Arbeit konnte die Expression vor allem in der frühen Phase der Kultivierung gezeigt werden. Dabei war die Expression von Elastin und Tenascin C in MSZ auf ausgerichteten NF signifikant höher als auf nicht ausgerichteten Fasern (Abb. 21).

Mittels RT-PCR konnte in dieser Arbeit ein signifikanter Einfluss der Nanofaserausrichtung auf die Regulation der Sehnen-spezifischen Markergenexpression über den Verlauf von 21 Tagen gezeigt werden. Diese Ergebnisse unterstützen die Daten von Yin et al. (2009). Diese Arbeitsgruppe konnte einen stimulierenden Einfluss ausgerichteter Polylaktid-NFS auf die tenogene Differenzierung fetaler Sehnenvorläuferzellen zeigen. Auf den Kollagen I-NFS zeigten humane MSZ eine frühere und signifikant höhere Expression früherer (Skleraxis und Tenascin C) und späterer (Col I und Elastin)

endogener Markergene. Histologische Untersuchungen konnten eine ausreichende Infiltration der NFS durch die MSZ zeigen (Abb. 22). Nach 21 Tagen waren die Zellen in einer fibrillären, bindegewebigen EZM angelagert. Aufgrund der bereits primären kollageneren Zusammensetzung der Zellträger konnte in den durchgeführten Färbungen (H/E, Picrosirius Rot, Masson-Goldner) jedoch nicht zwischen de novo synthetisierter EZM und Scaffoldmaterial unterschieden werden. Elektrogenesponnene Kollagen I-NFS mit paralleler Faseranordnung wiesen eine zu favorisierende biomechanische Zugfestigkeit und eine tenogene Induktion in humanen MSZ auf.

Die dargestellten Ergebnisse stärken die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen, die ebenfalls einen entscheidenden Einfluss des Mikromilieus und der Scaffoldstruktur auf die Differenzierung von Vorläuferzellen gezeigt haben (Yin et al., 2009; Mayer et al., 2009).

4.7 Zukunftsperspektiven

Intensive Forschung, die die Neubildung und Differenzierung von Sehnen- und Bandgewebe nachzuvollziehen versuchen, führen im Bereich des Tissue Engineering zu bedeutenden Fortschritten.

Die Herstellung biomimetischer Zellträger aus Kollagen I als zellbasierte Strategie in der Sehnen- und Bandrekonstruktion konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden. Hierbei scheint die Nanofaserausrichtung ein wichtiger Faktor in der tenogenen Differenzierung zu sein. Die biomechanische Stabilität der hergestellten Scaffolds war wesentlich höher als in den zuvor in der Arbeitsgruppe verwendeten Hydrogelen, aber noch deutlich geringer als natives Sehngewebe. Ebenso könnte sich der bei Kollagen I-Hydrogelen beschriebene positive Einfluss einer zyklischen Kultivierung erfolgsversprechend auf die Sehnen- und Bandentwicklung aus NFS auswirken. Es konnten vermehrt Wachstumsfaktoren, Marker und Gene nachgewiesen werden, die für die Sehnenentwicklung relativ spezifisch sind (Hoffmann et al., 2006; Schweitzer et al., 2001). Skleraxis, ein früher tenogener Marker, wurde schon von anderen Arbeitsgruppen im Sehngewebe erforscht und als Marker für die tenogene Differenzierung gesehen (Yin et al., 2009; Schweitzer et al.,

2001). Interessant könnte auch die Untersuchung des Einflusses von Wachstumsfaktoren sein, die MSZ durch die Transduktion mit adenoviralen Vektoren, die für die cDNA von Bone Morphogenetic Protein (BMP) 12 and BMP 13 codieren, in Richtung einer ligamentogenen Differenzierung bringen (Haddad-Weber et al., 2010).

5. Zusammenfassung

Bänder und Sehnen sind bradytrophe Gewebe die eine limitierte intrinsische Heilungskapazität aufweisen. Trotz einer primären Nahtrekonstruktion kann es zur Ausbildung eines mechanisch insuffizienten Narbengewebes kommen. Die Verwendung autologer oder allogener Sehnen-/Bandersatzplastiken bei Vorliegen substantieller Defekte bergen die Gefahr der donor site morbidity und antigener/allergischer Reaktionen.

Besonders das Tissue Engineering kann hier zur Entwicklung innovativer Therapieansätze beitragen. Die Verwendung autologer mesenchymaler Vorläuferzellen und biomimetischer Zellträger zu Generierung eines Sehnen-/Bandersatzes ex vivo ist eine vielversprechende Alternative.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Generierung von biomimetischen Zellträgern auf der Basis von Kollagen Typ I mittels Elektrosponning. Dabei orientierte sich das Scaffolddesign am Aufbau der EZM von nativem Band- und Sehngewebe. In einem zweiten Schritt wurde die Auswirkung unterschiedlicher Scaffoldarchitektur auf die tenogene Differenzierung von humanen MSZ untersucht. Hierzu wurden MSZ aus dem Knochenmark isoliert, amplifiziert, die Zellträger mit diesen Zellen besiedelt und für einen definierten Zeitraum (21 Tage) kultiviert.

Die Kollagen I-Ausgangskonzentration hatte entscheidenden Einfluss auf den Faserdurchmesser. Wobei unter Verwendung einer 5-8%-igen Kollagenlösung der Faserdurchmesser im Bereich von nativen Kollagenfasern in natürlichem Sehngewebe erzielt werden konnte. Unter Verwendung eines rotierenden Metallzylinders als Kollektor konnte mit steigender Rotationsgeschwindigkeit eine zunehmende parallele Faserausrichtung in den NFS erreicht werden. Ein Einfluss auf die Morphologie und die Proliferation der MSZ auf NFS mit unterschiedlicher Faserdicke zeigte sich nicht. Ausgerichtete Fasern führten zu einer signifikant parallelen Ausrichtung der MSZ mit langgezogenem schlanken Zellkörper, im Unterschied zu einer polygonalen MSZ-Morphologie auf nicht ausgerichteten NF.

Die tenogene Differenzierung der Zellen in den NFS wurde mittels RT-PCR-Analyse untersucht. Hierbei wurde die Expression der tendogenen Markergene

Tenascin C, Elastin, Kollagen I und Skleraxis bestimmt. Zusätzlich wurden immunfluoreszenz- und histochemische Färbungen durchgeführt, um die Infiltration der Zellen in die Zellträger und den Einfluss unterschiedlicher Faserparameter auf die Morphologie der MSZ nachzuweisen.

Unter Verwendung von ausgerichteten Kollagen I-NFS zeigte sich eine signifikant höhere tenogene Markergenexpression für Skleraxis und Tenascin C in der Frühphase und im weiteren Verlauf ebenfalls für Col I und Elastin im Vergleich zu nicht ausgerichteten NFS.

Elektrospinning von Kollagen I unter Verwendung eines rotierenden Kollektors ermöglicht die Herstellung biomimetischer NFS mit paralleler Faserausrichtung analog zu nativem Sehngewebe. Die so hergestellten NFS zeichnen sich im Vergleich zu nicht ausgerichteten NFS durch eine signifikant höher mechanische Zugfestigkeit und die Induktion einer tenogenen Markergenexpression in MSZ aus. Prinzipiell haben Kollagen I-NFS das Potential bestehende Therapiestrategien zu Rekonstruktion substantieller Sehnenrupturen im Rahmen Stammzell-basierter Ansätze zu unterstützen. Die generelle Eignung in vivo muss aber zunächst in adäquaten Großtiermodellen (z. B. Rotatorenmanschettendefekt im Schaf) überprüft werden.

Die vorliegende Arbeit zeigt die Bedeutung eines Zielgewebe-gerichteten Designs von Zellträgern für die Entwicklung innovativer Strategien im Tissue Engineering. Bei der Regeneration muskuloskelettaler Gewebe, wie dem Sehnenegewebe, spielen nicht nur strukturelle Aspekte sondern auch die biochemische Zusammensetzung des zu erneuernden Gewebes eine entscheidende Rolle, die bei der Scaffold-Herstellung zu berücksichtigen sind.

6. Literaturverzeichnis

Awad HA, Butler DL, Boivin GP, Smith FN, Malaviya P, Huibregtse B, Caplan AI (1999) Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon. *Tissue Eng.* 5: 267-277.

Baker MB, Gee AO, Metter RB, Nathan AS, Marklein RL, Burdick JA, Mauck RL (2008) The potential to improve cell infiltration in composite fiber-aligned electrospun Scaffolds by the selective removal of sacrificial fibers. *Biomaterials* 29: 2348-2358.

Baksh D, Song L, Tuan RS (2004) Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell and Mol Med.* 8: 301-316. Review.

Benjamin M, Ralphs JR (2000) The cell and development biology of tendons and ligaments. *International Review of Cytology* 196: 85-130.

Birk DE, Mayne R (1997) Localization of collagen types I, III and V during tendon development. Changes in collagen types I and III are correlated with changes in fibril diameter. *Euro J Cell Biol.* 72: 352-361.

Bosch U, Krettek C. (2002) Tissue Engineering of tendon and ligaments. A new challenge. *Unfallchirurg* 105: 88-94.

Boudriot U, Dersch R, Greiner A, Wendorff J (2006) Electrospinning Approaches Toward Scaffold Engineering- A Brief Overview. *Artif Organs* 30: 785-792.

Bourke SL, Kohn J, Dunn MG (2004) Preliminary development of a novel resorbable synthetic polymer fiber scaffold for anterior cruciate ligament reconstruction. *Tissue Eng.* 10: 43-52.

Bunda S, Kaviani N, Hinekt A (2006) Fluctuations of intracellular iron modulate elastin production. *J Biol Chem.* 8: 2341-2351.

Buttafoco L, Kolkman NG, Engbers-Buijtenhuijs P, Poot AA, Dijkstra P J, Vermes I, Feijen J (2006) Electrospinning of collagen and elastin for tissue engineering applications. *Biomaterials* 27: 724-734.

Caplan AI (2005) Mesenchymal Stem Cells: Cell-Based Reconstructive Therapy in Orthopedics. *Tissue Eng.* 11: 1198-1211.

Caplan AI, Bruder SP (2001) Mesenchymal stem cells: Building blocks for molecular medicine in the 21th century. *Trends Mol Med.* 7: 259-264.

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

Chuen FS, Chuk CY, Ping WY, Nar WW, Kim HL, Ming CK (2004) Immunohistochemical characterization of cells in adult human patellar tendons. *J Histochem Cytochem.* 52: 1151-1157.

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

Docheva D, Popov C, Mutschler W, Schieker M (2007) Human mesenchymal stem cells in contact with their environment: surface characteristics and the integrin system Stem Cell Review Series. *J Cell Mol Med.* 11: 21-38.

Doshi J, Reneker DH (1995) Electrospinning Process and Applications of Electrospun Fibers. *J Electrostat.* 35: 151-160.

Dunn MG, Bellincampi LD, Tria AJ Jr., Zawadsky JP (1997) Preliminary development of a collagen-PLA composite for ACL reconstruction. *J Appl Polym Sci.* 63: 1423-1428.

Eichhorn HJ, Birkner W (2006) Aktuelle Trends zur Rekonstruktion des vorderen Kreuzbandes. *Stiftung zur Förderung der Arthroskopie* 19: 5-19.

Formhals A (1934) Process and apparatus for preparing artificial threads. United States Patent Office. 1.9785.504.

Friess W (1998) Collagen-biomaterial for drug delivery, *Eur J Pharm Biopharm.* 45: 113-136.

Fuchs JR, Nasser BA, Vacanti, JP (2001) Tissue Engineering: A 21st Century Solution to Surgical Reconstruction. *Ann of Thorac Surg.* 72: 577-591.

Goulet F, Germain L, Rancourt D, Caron C, Normand A, Auger FA (1997) Tendons and ligaments. *Principles of Tissue engineering*, ed. Lanza RP, Langer R, Vacanti J 3: 909-919.

Grabarek Z, Gergely J (1990) Zero-length crosslinking procedure with the use of active esters. *Anal Biochem.* 185: 131-135.

Haddad-Weber M, Prager P, Kunz M, Seefried L, Jakob F, Murray M, Evans CH, Nöth U, Steinert AF (2010) BMP12 and BMP13 gene transfer induce ligamentogenic differentiation in mesenchymal progenitor and anterior cruciate ligament cells. *Cytotherapy* 12: 505-513.

Helm GA, Li JZ, Alden TD, Hudson SB, Beres EJ, Cunningham M, Mikkelsen MM, Pittman DD, Kerns KM, Kallmes DF (2001) A light and electron microscopic study of ectopic tendon and ligament formation induced by bone morphogenetic protein-13 adenoviral gene therapy. *J Neurosurg* 95: 298-307.

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

Hoffmann G, Lutter G, Cremer J (2008) Verbesserte Haltbarkeit von biologischen Herzklappen, *Deutsches Ärzteblatt* 105: 143-148. DOI: 10.3238/arztebl.2008.0143

Hsia HC, Schwarzbauer JE (2005) Meet the tenascins: multifunctional and mysterious. *The Journal of Biological Chemistry*, 280: 26641-26644.

Huard J, Cao B, Qu-Petersen Z (2003) Muscle-derived stem cells: Potential for muscle regeneration. *Birth Defects Res C Embryo Today: Reviews* 69: 230-237.

Hulmes DJ, Miller A (1979) Quasi hexagonal molecular packing in collagen fibrils. *Nature* 282: 878-880.

Hurle JM, Hinchliffe JR, Ros MA, Critchlow MA, Genis-Galvez JM (1989) The extracellular matrix architecture relating to myotendinous pattern formation in the distal part of the developing chick limbs: an ultrastructural, histochemical, and immunocytochemical analysis. *Cell Differ Dev* 27: 103-120.

Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP (1997) Osteogenic differentiation of purified, culture expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem.* 64: 295-312.

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

Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU (1998) In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res.* 238: 265-272.

Kannus P (2000) Structure of the tendon connective tissue. *Scand J Med Sci Sports* 10: 312-320.

Khor E (1997) Methods for treatment of collagenous tissues for bioprotheses. *Biomaterials* 18: 95-105.

Koob TJ (2002) Biomimetic approaches to tendon repair. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol: Molecular & Integrative Physiology* 133: 1171-1192.

Kühn K (1986) The collagen family-variations in the molecular and supermolecular structure. *Rheumatology, 10: Connective Tissue: Biological and Clinical Aspects*: 29–69.

Kuo CK, Tuan RS (2008) Mechanoactive tendogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: *Tissue eng Part A.* 14: 1615-1627.

Laar N, Köppl S, Wintermantel E (2009) Elektrospinning. In: Wintermantel E, Ha Suk-Woo, *Medizintechnik-Life Science Engineering*, Springer-Verlag, 5. Auflage 403-425.

Langer R, Vacanti JP (1993) Tissue engineering. *Science* 260: 920-926.

Laurencin CT, Ambrosio AMA, Borden MD, Cooper JA Jr. (1999) Tissue engineering: Orthopedic applications. *Annu Rev Biomed Eng.* 1: 19-46.

Laurencin CT, Freeman JW (2005) Ligament tissue engineering: An evolutionary materials science approach. *Biomaterials* 26: 7530-7536.

Lee CH, Shin HJ, Cho IH, Kang YM, Kim IA, Park KD, Shin JW (2004) Nanofiber alignment and direction of mechanical strain affect the ECM production of human ACL fibroblast. *Biomaterials* 26: 1261-1270.

Li WJ, Danielson KG, Alexander PG, Tuan RS (2003) Biological response of chondrocytes cultured in three-dimensional nanofibrous poly (epsilon caprolactone) Scaffolds. *J Biomed Mater Res Part A*, 67: 1105-1114.

Li WJ, Cooper JA Jr., Mauck RL, Tuan RS (2006) Fabrication and characterization of six electrospun poly(alpha-hydroxy ester)-based fibrous scaffolds for tissue engineering applications. *Acta Biomater.* 2: 377-385.

Li WJ, Tuli R, Huang X, Laquerriere P, Tuan RS (2005) Multilineage differentiation of human mesenchymal stem cells in a three-dimensional nanofibrous scaffold. *Biomaterials* 26: 5158-5166.

Li WJ, Laurencin CT, Cateson EJ, Tuan RS, Ko FK (2002) Electrospun nanofibrous structure: A novel Scaffold for tissue engineering. *J Biomed Mater Res* 4: 613-621.

Li WJ, Mauck RL, Cooper JA, Yuan X, Tuan RS (2007) Engineering controllable anisotropy in electrospun biodegradable nanofibrous scaffolds for musculoskeletal tissue engineering. *J Biomech.* 40: 1686-1693.

Li WJ, Tuan RS (2009) Fabrication and Application of Nanofibrous Scaffolds in Tissue Engineering, *Curr Protoc Cell Biol*, Unit-25.2.

Lill H (1996): Aktueller Stand der Behandlung von Achillessehnenrupturen. *Der Chirurg* 67: 1160-1165.

Liu TM, Martina M, Hutmacher DW, Hui JH (2007) Identification of common pathways mediating differentiation of bone marrow- and adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells into three mesenchymal lineages. *Stem Cells* 25: 750-760.

Lorenz H, Wenz W, Ivancic M, Steck E, Richter W (2004) Early and stable upregulation of collagen type II, collagen type I and YKL40 expression levels in cartilage during early experimental osteoarthritis occurs independent of joint location and histological grading. *Arthritis Res Ther.* 7: 156-165.

Luczak JA, Redick SD, Schwarzbauer JE (1998) A single cysteine, Cys-64, is essential for assembly of tenascin-C hexabrachions. *J Biol Chem.* 273: 2073-2077.

Lynch HA, Johannessen W, Wu JP, Jawa A, Elliott DM (2003) Effect of fiber orientation and strain rate on the nonlinear uniaxial tensile material properties of tendon. *J Biomech Eng.* 125: 726-731.

Majewski M, Rickert M, Steinbrück K (2000) Die frische Achillessehnenruptur: Eine prospektive Untersuchung zur Beurteilung verschiedener Therapiemöglichkeiten. *Der Orthopäde* 9: 670-676.

Matthews JA, Wnek GE, Simpson DG, Bowlin GL (2002) Electrospinning of collagen nanofibers. *Biomacromolecules* 2: 232-238.

Mayer J, Blum J, Wintermantel E (2009) Grundlagen des Tissue Engineering. In: Wintermantel E, Ha Suk-Woo, *Medizintechnik-Life Science Engineering*, Springer-Verlag, 5. Auflage: 373-386.

Mayne R, Brewton RG (1993) New members of the collagen superfamily. *Curr Opin Cell Biol.* 5: 883-890.

Midwood KS, Schwarzbauer JE (2002) Tenascin-C modulates matrix contraction via focal adhesion kinase- and Rho- mediated signaling pathways. *Mol Biol Cell* 13: 3601-3613.

Milz S, Ockert B, Putz R (2009) Tendozyten und extrazelluläre Matrix- Eine wechselseitige Beziehung, *Der Orthopäde* 38: 1071-1079.

Mithieux SM, Weiss AS (2005) Elastin. *Adv Protein Chem.* 70: 437-446.

Müller-Esterl W (2004) Die Elektrophorese analysiert Proteingemische quantitativ. *Biochemie, Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*, 1. Auflage 2004, Elsevier, 6.5, Kapitel 8: 124-133.

Nerurkar NL, Elliott DM, Mauck RL (2007) Mechanics of Oriented Electrospun Nanofibrous Scaffolds for Annulus Fibrosus Tissue Engineering. *J Orthop Res.*; 25(8):1018-28.

Niederreither K, D´Souza R, Metsäranta M, Eberspaecher H, Toman PD, Vuorio E, De Crombrughe B (1995) Coordinate patterns of expression of type I and III collagens during mouse development. *Matrix Biology* 14: 705-713.

Nöth U, Rackwitz L, Steinert AF, Tuan RS (2010a) Cell delivery therapeutics for musculoskeletal regeneration. *Adv Drug Deliv Rev.* 62: 765-783.

Nöth U, Rackwitz L, Steinert AF, Tuan RS (2010b) Principles of tissue engineering and cell- and gene-based therapy. In: Hochberg M, Silman AJ, Smolen JS, Weinblatt ME, Weisman MH, *Rheumatology*, 5th Edition: 163-168.

Nöth U, Schupp K, Heymer A, Kall S, Jakob F, Schütze N, Baumann B, Barthel T, Eulert J, Hendrich C (2005) Fabrication of anterior cruciate ligament constructs using mesenchymal stem cells embedded in collagen type I hydrogels. *Cytotherapy* 7: 447-455.

Odorico JS, Kaufman DS, Thompson JA (2001) Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem cells* 19: 193-204.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca S, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143-147.

Puxkandl R, Zizak I, Paris O, Keckes J, Tesch W, Bernstorff S, Purslow P, Fratzl P (2002) Viscoelastic properties of collagen: synchrotron radiation investigations and structural model. *Philosophical Transactions of the Royal Society London Biological Science* 357: 191-197.

Rajan N, Habermehl J, Coté MF, Doillon CJ, Mantovani D (2007) Preparation of ready-to-use, storable and reconstituted type I collagen from rat tail tendon for tissue engineering applications. *Nature Protocols* 1: 2753-2758.

Rho Kyong Su, Jeong Lim, Lee Gene, Byoung-Moo Seo, Yoon Jeong Park, Seong-Doo Hong, Sangho Roh, Jae Jin Cho, Won Ho Park, Byung-Moo Min (2006) Electrospinning of collagen nanofibers: Effects on the behaviour of normal human keratinocytes and early-stage wound healing. *Biomaterials* 27: 1452-1461.

Rich JT, Nolte JA, Myckatyn TM, Sandell LJ, McAlinden A (2008) Upregulation of Runx2 and Osterix during in vitro chondrogenesis of human adipose-derived stromal cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 372: 230-235.

Robinson PS, Lin TW, Reynolds PR, Derwin KA, Iozzo RV, Soslowsky LJ (2004) Strain-rate sensitive mechanical properties of tendon fascicles from mice with genetically engineered alterations in collagen and decorin. *J Biomech Eng* 126: 252-257.

Setton LA, Guilak F, Hsu EW, Vail TP (1999) Biomechanical factors in tissue engineered meniscal repair. *Clin Orthop Relat Res.* 367: 254-272.

Schweitzer R, Chyung JH, Murtaugh LC, Brent AE, Rosen V, Olson EN, Lassar A, Tabin CJ (2001) Analysis of the tendon cell fate using Scleraxis, a specific marker for tendons and ligaments. *Development* 128: 3855-3866.

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

Sharma P, Maffulli N, (2005) Tendon Injury and Tendinopathy: Healing and Repair. *J Bone Joint Surg Am.* 87: 187-202.

Stecker S, Parker R (1999) Graft selection in anterior cruciate ligament surgery autograft, allograft, and synthetic. *Operat Tech Ortho* 9: 248-255.

Strand T, Molster A, Hordvik M, Krukhaug Y (2005) Long-term follow-up after primary repair of the anterior cruciate ligament: clinical and radiological evaluation 15-23 years postoperatively. *Arch Orthop Trauma Surg.* 125: 217-221.

Taylor G (1969) Electrically driven jets. *Proc Roy Soc Lon. Series A* 313: 453-457.

Taylor G (1964) Disintegration of Water Drops in Electric Field. *Proc Roy Soc Lon, Series A* 280: 383-397.

Thermann H, Hüfner T, Tscherne H (2000) Achillessehnenruptur, *Der Orthopäde* 29: 235-250.

Towler DA, Gelberman RH (2006): The alchemy of tendon repair: a primer for the (S)mad scientist. *J Clin Invest.* 116: 863-866.

Tozer S, Duprez D (2005) Tendon and ligament: development, repair and disease. Birth Defects Res., Part C: C Embryo Today 75: 226-236.

Tuan RS, Boland G, Tuli R (200) Adult mesenchymal stem cells and cellbased tissue engineering. Arthritis Res Ther. 5: 32-45.

Vacanti JP, Langer R (1999) Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. The Lancet 354: 132-134.

van der Rest M, Garrone R (1991) Collagen family of proteins. FASEB J 5: 2814-2823.

Wakitani S, Saito T, Caplan AI (1995) Myogenic cells derived from rat bone marrowmesenchymal stem cells exposed to 5- azacytidine. Muscle Nerve 18: 1417-1426.

Weiler A (2002) Anatomische Hamstringsehnen Verankerung mit Interferenzschrauben beim Kreuzbandersatz. Habilitationsschrift, Humboldt-Universität zu Berlin.

Wenk MB, Midwood KS, Schwarzbauer JE (2000) Tenascin C suppresses Rho activation. J Cell Biol. 150: 913-920.

Wolfman NM, Hattersley G, Cox, Celeste A J, Nelson R, Yamaji N, Dube J L, Diblasio-Smith E, Nove J, Song JJ, Wozney J M, Rosen V (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 SL, Niyibizi C, Matyas J, Kavalkovich K, Weaver-Green C, Fox RJ (1997) Medial collateral knee ligament healing. Combined medial collateral and anterior cruciate ligament injuries studies in rabbits. *Acta Orthop Scand*. 68: 142-148.

Yin Z, Chen X, Chen JL, Shen WL, Hieu Nguyen TM, Gao L, Ouyang HW (2009) The regulation of tendon stem cell differentiation by the alignment of nanofibers. *Biomaterials* 31: 2163-2175.

Young RG, Butler DL, Weber W, Caplan AI, Gordon SL, Fink DJ (1998) Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. *J Orthop Res*. 16: 406-413.

Zeugolis DI, Paul GR, Attenburrow G (2008a) Cross- Linking of extruded collagen fibers-a biomimetic three-dimensional Scaffolds for tissue engineering applications, *J Biomed Mater Res A*. 98A: 895-908.

Zeugolis DI, Khew ST, Yew E, Ekaputra AK, Tong YW, Yung LY, Hutmacher DW, Sheppar C, Raghunath M (2008b) Electrospinning of pure collagen nano-fibres – Just an expensive way to make gelatin? *Biomaterials* 29: 2293-2305.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Oberarzt und Prof. Dr. Ulrich Nöth, für die Möglichkeit diese Dissertation in seinem Forschungsteam durchzuführen und für seine Mitwirkung an den strategischen Entscheidungen, die schließlich zum Gelingen führten.

Auch Herrn Dr. Lars Rackwitz, der mich in die Grundlagen der Laborarbeit einführte und mir die Begeisterung für den Themenbereich des Tissue Engineerings näher brachte möchte ich herzlich danken.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. Ralf Hallinger, der mir als Laborleiter in der Planung, Durchführung und Auswertung vieler Versuche verlässlich mit seiner Fachkompetenz zur Seite stand.

Hervorheben möchte ich auch den Einsatz der MTAs Christa Amrehn, Doris Hetzer und Heide Häfner. Sie haben durch ihren Arbeitseinsatz das Projekt erst ermöglicht.

Dank gilt auch dem gesamten Laborteam des wissenschaftlichen Labors des König-Ludwig-Hauses für die nicht endende Bereitschaft auf alle an sie herangetragenen Fragen eine Lösung zu finden.

Ebenso danken möchte ich der Abteilung für Elektronenmikroskopie am Theodor-Boveri Institut für Biowissenschaften von Herrn Professor Krohne für die Hilfe bei der Anfertigung der REM-Aufnahmen und Herrn Hümpfer vom Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin und Zahnmedizin, Universität Würzburg für die Unterstützung bei der Durchführung der Reißfestigkeitsteste.