

Universität Ulm
Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik
Direktor: Professor Doktor Lutz Claes

**Tissue Engineering von Bandersatz:
Einfluss mechanischer Reize auf humane mesenchymale
Progenitorzellen und humane Kreuzbandzellen**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie
der medizinischen Fakultät der Universität Ulm.

vorgelegt von
Heiter-Julian Schlenker
geboren in Baden-Baden (D)

Ulm 2006

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: PD Dr. Anita Ignatius

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Rolf Brenner

Tag der Promotion: 10.11.2006

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Das menschliche Kreuzband	2
1.1.1	Ontogenese	2
1.1.2	Anatomie.....	2
1.1.3	Zelluläre Bestandteile.....	4
1.1.4	Die Extrazelluläre Matrix.....	5
1.1.5	Funktion.....	7
1.1.6	Ruptur des Kreuzbandes	8
1.1.7	Bandersatz und Bandrekonstruktion.....	8
1.2	Tissue Engineering für den Bandersatz.....	11
1.2.1	Einsatz von fibroblastären Zellen	12
1.2.2	Einsatz von mesenchymalen Progenitorzellen.....	12
1.2.3	Trägermaterialien (artifizielle Matrices)	13
1.2.4	Applikation mechanischer Stimuli	15
1.3	Ziel der Arbeit	17
2	MATERIAL UND METHODEN.....	18
2.1	Zellen	18
2.1.1	Humane Mesenchymale Progenitorzellen.....	18
2.1.2	Humane primäre Kreuzbandzellen	18
2.2	Antikörper.....	18
2.3	Oligonukleotide (Primer).....	19
2.4	Zellkulturmedien.....	20
2.5	Lösungen	21
2.6	Chemikalien	22
2.7	Kits.....	23
2.8	Geräte	24
2.8.1	Stimulationsgerät.....	25
2.8.1.1	Zellstimulatorzubehör für Kollagen-Typ-I-Ring-Gele.....	26
2.8.1.2	Zellstimulatorzubehör für textile Konstrukte.....	27
2.9	Zellkultur	28
2.9.1	Gewinnung und Kultivierung humaner mesenchymaler Progenitorzellen	28
2.9.2	Isolation und Kultur humaner, primärer Kreuzbandzellen	29
2.9.3	Herstellung der Konstrukte für die mechanische Stimulation.....	30
2.9.3.1	Dreidimensionales Kollagen-Typ 1-Gel als Zellträger.....	30
2.9.3.2	Polylaktid-Fasern als Zellträger.....	30
2.10	Mechanische Stimulation.....	31
2.11	Nachweis der Genexpression auf mRNA-Ebene	32
2.11.1	Isolierung der mRNA aus Kollagengelen.....	33
2.11.2	Isolierung der mRNA aus Polylaktid-Scaffolds.....	34

2.11.3	cDNA-Synthese.....	34
2.11.4	Gelelektrophorese.....	35
2.11.5	Amplifikation der PCR-Produkte in Bakterien für RT-PCR Standardreihen.....	36
2.11.6	Klonierungsreaktion.....	37
2.11.7	Transformation.....	37
2.11.8	Herstellung der Agar-Platten und des LB-Mediums.....	37
2.11.9	Vorkultur der Bakterien.....	37
2.11.10	Überprüfung auf das enthaltene Insert.....	38
2.11.11	Fortsetzung der Bakterienzucht.....	38
2.11.12	Isolation der Plasmid-DNA aus größeren Volumen.....	38
2.11.13	Verdau der Plasmid-DNA.....	39
2.11.14	Standard-PCR.....	39
2.11.15	Polymerase-Ketten-Reaktion (real time-RT-PCR).....	39
2.12	Statistik.....	40
2.13	Morphologische Untersuchungsmethoden.....	41
2.13.1	Histologische Schnitte und Färbungen.....	41
2.13.2	Rasterelektronenmikroskopie.....	41
2.14	Immunhistologie.....	42
2.14.1	Charakterisierung der Zellen anhand der Epitope der Zellmembran.....	42
2.14.2	Proteinfärbung nach der ABC Methode.....	42
3	ERGEBNISSE.....	44
3.1	Vorversuche.....	44
3.1.1	Immunhistologische Charakterisierung der hMPC.....	44
3.1.2	Kollagen-Typ-I-Gel als Zellträger.....	44
3.1.2.1	Gelkontraktion.....	45
3.1.2.2	Rasterelektronenmikroskopie.....	46
3.1.2.3	histologische Schnitte und Färbungen.....	46
3.1.2.4	Zell-Proliferation.....	50
3.1.2.5	Genexpression.....	51
3.1.3	Polylactid-Scaffolds als Zellträger.....	54
3.1.3.1	Rasterelektronenmikroskopie.....	54
3.1.3.2	histologische Schnitte und Färbungen.....	56
3.1.3.3	Genexpression.....	57
3.2	Einfluss zyklischer, mechanischer Dehnung.....	61
3.2.1	Kollagen-Typ-I-Gel.....	61
3.2.1.1	Beeinflussung der Genexpression humaner, mesenchymaler Progenitorzellen.....	61
3.2.1.2	GDF5-Einfluss auf die Genexpression humaner, mesenchymaler Progenitorzellen.....	62
3.2.1.3	Langzeitdehnungseinfluss auf die Genexpression humaner, mesenchymaler Progenitorzellen.....	64
3.2.1.4	Beeinflussung der Genexpression humaner, primärer Kreuzbandzellen.....	65
3.2.1.5	Beeinflussung der Ausrichtung humaner, primärer Kreuzbandzellen und der Matrix.....	67

3.2.2	Polylaktid-Zellträger	70
3.2.2.1	Beeinflussung der Genexpression humaner, mesenchymaler Progenitorzellen	70
3.2.2.2	Beeinflussung der Genexpression humaner, primärer Kreuzbandzellen	71
4	DISKUSSION	76
4.1	Charakterisierung der Zellen	76
4.1.1	humane mesenchymale Progenitorzellen	76
4.1.2	humane Kreuzbandzellen	76
4.2	Eignung der Zellträger für das Tissue Engineering von Bandgewebe	77
4.2.1	Kollagen-Typ-I-Gele	77
4.2.2	Polylactid-Scaffolds	79
4.3	Einfluss mechanischer Reize.....	83
4.3.1	Kollagen-Typ-I-Gel.....	83
4.3.1.1	Beeinflussung von humanen mesenchymalen Progenitorzellen	83
4.3.1.2	Beeinflussung von humanen Kreuzbandzellen	85
4.3.2	Polylactid-Scaffolds	88
4.3.2.1	Beeinflussung von humanen mesenchymalen Progenitorzellen	88
4.3.2.2	Beeinflussung von humanen Kreuzbandzellen	89
5	ZUSAMMENFASSUNG	92
6	LITERATUR	94
7	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	103
8	TABELLENVERZEICHNIS.....	107
9	DANKSAGUNG	108

Abkürzungen

AP	Alkalische Phosphatase
bFGF	basic fibroblast growth factor
RUNX2	runt-related transcription factor 2
cDNA	complementary Desoxyribonucleic Acid
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
ECM	extracellular matrix
EDTA	Ethylendiamin Tetra Acidum Aceticum
EGF	endothelial growth factor
FBS	Fetal bovine serum
FCS	Fetal Calf Serum
FCS	Fetal calf serum
FEM	Finite Element Modelling
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GDF5	growth differentiation factor 5
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxilin-Eosin
Hz	Herz (Einheit der Frequenz)
KCl	Kaliumchlorid
LB	Luria Bertani
mRNA	messenger Ribonucleic Acid
N ₂	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
O ₂	Sauerstoff
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaktion
PGA	Polyglykolid
PLA	Polylactid
PLAGA	Polylactid-Glykolid (Co-Polymer)
PTFE	Poly-tetra-Flour-Ethan
TAE	Tetra Acidum Aceticum EDTA
TBS	Tris buffered Saline
TGF	transforming growth factor
UV	Ultraviolett

1 Einleitung

Die Ruptur des vorderen Kreuzbandes gehört zu den häufigsten Bandverletzungen beim Menschen. In den USA ist einer von 3000 Einwohnern von einer Kreuzbandruptur betroffen¹. Da das Kreuzband für die Funktionalität des Kniegelenks von entscheidender Bedeutung ist, sollte es ersetzt bzw. rekonstruiert werden, um eine Schädigung des Knies durch unphysiologische Belastungen zu verhindern. Werden keine Maßnahmen ergriffen, kann es zu vorzeitiger Arthrose und zum Einbau einer totalen Endoprothese kommen². Heutzutage wird das Kreuzband operativ rekonstruiert. Für die Rekonstruktion wird autogenes Gewebe verwendet. Dafür wird Sehngewebe der Gracilis- oder Semitendinosus-Sehne oder ein Teil der Patellarsehne mit endständigen Knochenblöcken eingesetzt. Diese Vorgehensweise führt meist zu befriedigenden Resultaten, ist jedoch mit einigen Problemen behaftet. Durch die Entnahme des Ersatzgewebes ist ein größerer operativer Eingriff nötig. Dies vergrößert die Wahrscheinlichkeit von Komplikationen. Zudem kommt es am Ort der Entnahme zu einer Verwundung des Gewebes. In den meisten Fällen heilt die Entnahmestelle narbig aus und bleibt dadurch funktionell insuffizient. Dieser Effekt wird als „*donor site morbidity*“ bezeichnet^{3 1 4}. Daher wird nach Lösungen gesucht, die Entnahme von Transplantat-gewebe überflüssig zu machen. Vielversprechend scheint hier das Tissue Engineering zu sein. Das Tissue Engineering kombiniert verschiedene wissenschaftliche Disziplinen wie Zellbiologie, Molekularbiologie, Chemie, verschiedene Materialwissenschaften und humanmedizinische Forschung miteinander. Dazu werden humane Zellen meist *in vitro* kultiviert und mit Trägermaterialien synthetischer oder biologischer Herkunft kombiniert. Das Ziel ist die Züchtung von implantationsfähigen Konstrukten, die dann letztlich zur Bildung von vitalen und funktionellen Ersatzgeweben führen sollen^{5 6 7}.

Für das Tissue Engineering von Bandgewebe werden drei Komponenten benötigt. Dabei handelt es sich um Zellen unterschiedlicher Differenzierung, Trägermaterial sowie geeignete biologische und physikalische Faktoren zur gezielten Steuerung der Zellen. Der Zelltyp muss zahlreiche Anforderungen erfüllen. Die Entnahme sollte einfach sein und beim Patienten einen kleinen Eingriff erfordern. Die Zellen müssen das Potential haben, die nötigen Proteine zu synthetisieren oder sich dahingehend zu differenzieren. Sehr wichtig ist auch die Handhabbarkeit der Zellen in der Zellkultur. Sie müssen einfach zu vermehren sein, um die große Zellzahl zu erreichen, die für die Besiedlung von Trägermaterialien nötig ist^{5,8-10}.

Die Trägermaterialien für die Zellen müssen ebenfalls den hohen Ansprüchen gerecht werden. Sie müssen biokompatibel sein. Die Oberfläche muss den Zellen die Anheftung ermöglichen.

Das Material muss biodegradierbar, das heißt im Organismus abbaubar sein, damit kein zusätzlicher Eingriff zur Revision nötig ist. Die mechanischen Eigenschaften müssen eine Kultivierung der Konstrukte *in vitro* sowie die Applikation von mechanischen Reizen und die Implantation ermöglichen^{11 6}.

Für den Schritt vom Zell-besiedelten zum funktionellen, implantationsfähigen Konstrukt wird versucht, die Entwicklung der Zellen in den Konstrukten zu steuern. Es werden dazu biologisch aktive Substanzen wie Differenzierungsfaktoren *in vitro* eingesetzt. Es ist auch möglich Differenzierungsfaktoren *in vivo* einzusetzen, um eine Heilung oder Erneuerung im Körper zu erreichen^{12 13 14 15}. Da man davon ausgeht, dass die histomorphologische Struktur der Gewebe und die molekulare Zusammensetzung der extrazellulären Matrix (ECM) direkt mit der lokalen physikalischen Beanspruchung in Zusammenhang stehen¹⁶, werden mechanische Reize appliziert, um die Zellen dazu anzuregen, die gewünschte extrazelluläre Matrix zu bilden^{17 18 8 19 20}.

1.1 Das menschliche Kreuzband

Das vordere Kreuzband zusammen mit dem hinteren Kreuzband, dem Innen- und Außenband und den Menisci sind die Stabilisatoren des Kniegelenkes. Das vordere Kreuzband ist selbst der wichtigste Stabilisator. Es ist ein circa 2 cm langes und etwa kleinfingerdickes Faserbündel, das im Kniegelenk vom Tibiakopf zum Femur zieht.

1.1.1 Ontogenese

Die Entwicklung des Knies im Embryo ist sehr gut untersucht. Die Kreuzbänder entwickeln sich aus dem *Synovialmesenchym* zwischen den embryonalen Femur- und Tibiaanlagen^{21 22}²³. Nach zehn Wochen Embryonalentwicklung grenzen sich die Kreuzbänder deutlich von dem umliegenden Gewebe ab²⁴. Sie bestehen aus zellreichem Bindegewebe, dessen Zellen schon in Zugrichtung orientiert sind. Die Femurkondylen und das Tibiaplateau können sich ohne die Führung der Kreuzbänder nicht korrekt entwickeln. Aber auch die Kreuzbänder passen sich in der fetalen Entwicklung der Belastungsart und Richtung an. Die Entstehung dieser komplexen Strukturen geschieht unter anderem durch den Einfluss der Kinematik im embryonalen Kniegelenk²⁵.

1.1.2 Anatomie

Das vordere Kreuzband steuert zusammen mit dem hinteren Kreuzband den Ablauf der Bewegung des Knies bei Flexion, Extension und in *postero-anteriorer* Richtung („Schubladentest“)^{26 27 28}. Das vordere Kreuzband ist ein Ligament, das sich zwischen *Femur*

und *Tibia* aufspannt. Es inseriert fächerförmig an der Innenfläche des *condylus lateralis ossis femoris* und verläuft nach *distal-antero-medial*, wo es wiederum in der *area intercondylaris tibiae* inseriert ².

Es ist von *Synovia* umgeben, welche vom *posterioeren Interkondylarbereich* ausgehend sowohl das vordere Kreuzband als auch das hintere Kreuzband umgibt. So gesehen liegen die Kreuzbänder zwar in der fibrösen Kapsel, jedoch außerhalb der Gelenkhöhle bzw. von dieser abgegrenzt durch die eigene synoviale Umhüllung. Der Bewegungsspielraum für die Kreuzbänder wird durch die *fossa intercondylaris* bestimmt. Diese ist eine Grube ohne Gelenkfläche zwischen der lateralen und der medialen Kondyle des Femur. Nach anterior verjüngt sich die *fossa intercondylaris* und endet an der *facies patellaris* ²⁹.

Das vordere Kreuzband selbst besteht aus zahlreichen Bündeln (Abbildung 1), die funktionelle Untergruppen des vorderen Kreuzbandes sind. Kein Bündel verhält sich über den gesamten Bewegungsbereich gesehen isometrisch. Für jeden Flexionswinkel des Kniegelenkes ist die Last unterschiedlich auf die Faserbündel verteilt ^{26 30}. Die Faserbündel bestehen vorwiegend aus Kollagen-Typ-I und werden von einem Netzwerk aus membranartigen Septen abgegrenzt, die reich an Fibronectin und Kollagen-Typ-III sind ³¹.

Eine Blutversorgung des vorderen Kreuzbandes selbst ist nur an den Insertionsarealen nachweisbar. Im mittleren Teil des Kreuzbandes gibt es einen avaskulären Bereich, bei dem man davon ausgeht, dass er wesentlich schlechter heilen kann ³². Jedoch ist die Synovialmembran, die das Kreuzband umhüllt, sehr gut durchblutet. Die *Synovia* gewährleistet die Ernährung des avaskulären Bereiches ^{33 34 35}.

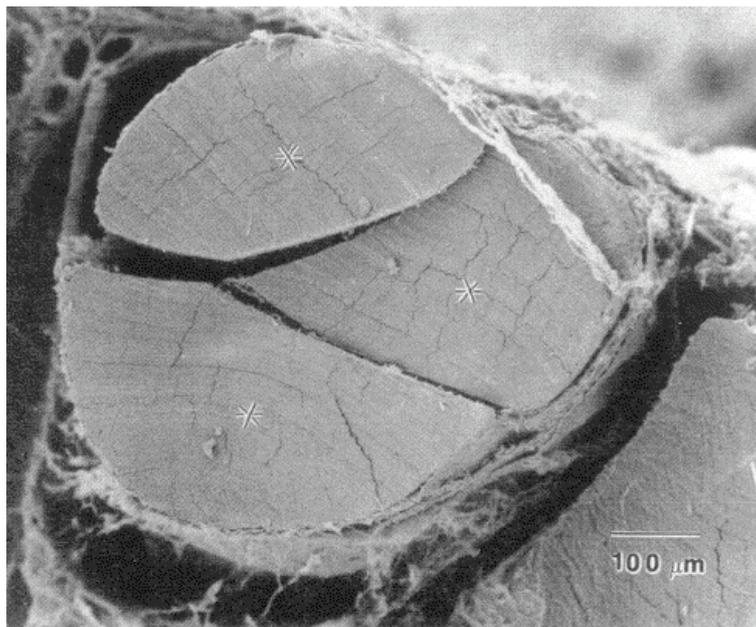


Abbildung 1: Bündelung (*) der Kollagenfasern zu funktionellen Untergruppen ³⁶

1.1.3 Zelluläre Bestandteile

Wie alle Gewebe besteht auch das Kreuzband aus verschiedenen unterschiedlich spezialisierten Zellen, einer extrazellulären Matrix und einer wässrigen Phase. Die verschiedenen Zellen gewährleisten Auf- und Umbau der Matrix. Die meisten Zellen im Kreuzbandgewebe gehören zur Familie der Fibrozyten (Abbildung 3). Daneben kommen auch Adipozyten, Neurone, Kraft- und Schmerzrezeptorzellen sowie Endothelzellen vor. Die Fibrozyten des dichten Bindegewebes dominieren zahlenmäßig und zeigen, anders als Zellen aus Sehnen und anderen Ligamenten, Merkmale wie sie für Fibrozyten im Faserknorpel typisch sind³⁷. Sie sind für Bildung und Erhalt der Kollagenmatrix verantwortlich. Die Zellen zwischen den dichten Kollagenfasern variieren in ihrer Form von ovoid bis fusiform. Die fusiformen Fibrozyten liegen einzeln oder in Gruppen dem dichten Kollagen an. Die ovoiden bis cuboiden Zellen erscheinen oft in Reihen angeordnet, die von einem feinen fibrösen Netz umgeben sind (Abbildung 2 und Abbildung 3). In diesen Bereichen finden sich verstärkt Glykosaminoglykane³². Die Adipozyten sind großvolumige Zellen, die sich als Fettkörper zwischen den Bündeln des Kreuzbandes und an den Insertionsarealen befinden können. Die Neurone haben freie Nervenendigungen im Kreuzband oder enervieren die Propriozeptoren. Die Endothelzellen sind extrem flache, folienartige Zellen der Blutgefäßwandungen.

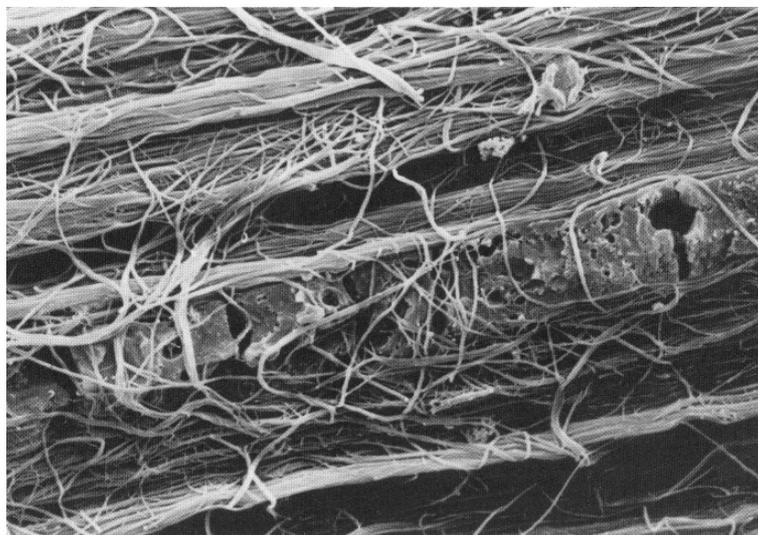


Abbildung 2: Aufgereichte Fibrozyten zwischen den Kollagenfibrillen³⁸

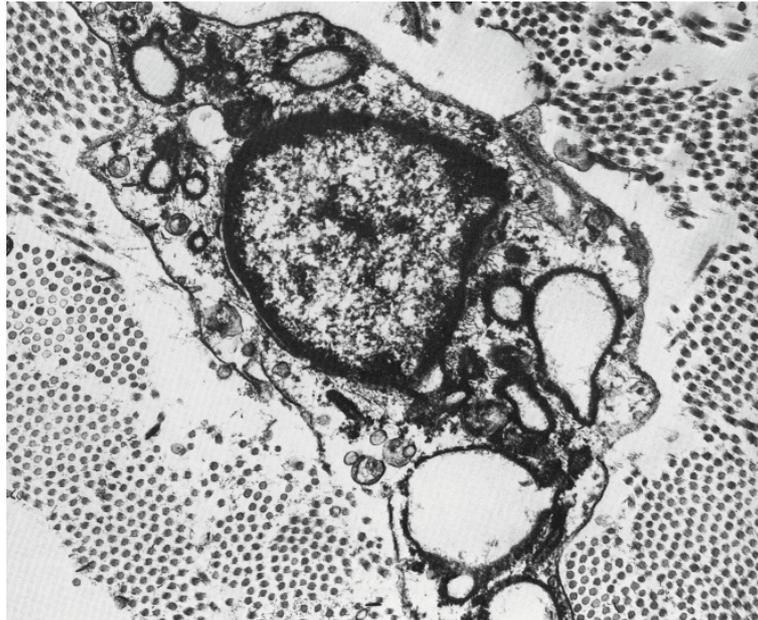


Abbildung 3: Fibrozyten eingebettet in Kollagenfaserbündel (Querschnitt) des Bandgewebes³⁸

1.1.4 Die Extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix erfüllt Stütz- und Organisationsfunktionen und ist Informations- und Wasserspeicher³⁹. Die wässrige Phase mit allen gelösten und suspendierten Bestandteilen ist für den Stoff- und Informationsaustausch sowie die mechanische Stabilität des Gewebes essentiell⁴⁰.

Die wichtigsten Bestandteile der extrazellulären Matrix sind, neben dem Wasser, die Makromoleküle Kollagen, Elastin, Glykoproteine und Proteoglykane. Die mechanischen Eigenschaften hängen von der Zusammensetzung der Matrix, der Organisation der Makromoleküle, der Interaktion der Matrixmoleküle untereinander und der umgebenden Flüssigkeit ab. Die genaue Zusammensetzung ist in jedem Bereich des Ligamentes verschieden und variiert zudem von Mensch zu Mensch. 90 % des Kollagens im vorderen Kreuzband ist Kollagen-Typ-I. Es besteht aus zwei identischen α 1-Ketten und einer α 2-Kette (Abbildung 4). Das Kollagen-Typ-III macht circa 10% des Kollagens im Ligament aus. Es besteht aus drei α 1-Ketten, befindet sich im Bindegewebe zwischen den Kollagen-Typ-I-Fibrillenbündeln und erlaubt durch seine viskoelastischen Eigenschaften die unterschiedliche Rekrutierung der Faserbündel²⁵. Der Elastinanteil im vorderen Kreuzband liegt unter 5%. Es bildet ein ineinander greifendes Netzwerk auf den Faszikeln. Seine elastischen Eigenschaften sind mit dafür verantwortlich, dass das Kollagen nach Belastung wieder seine gewellte Ruhestuktur einnimmt^{39 41}.

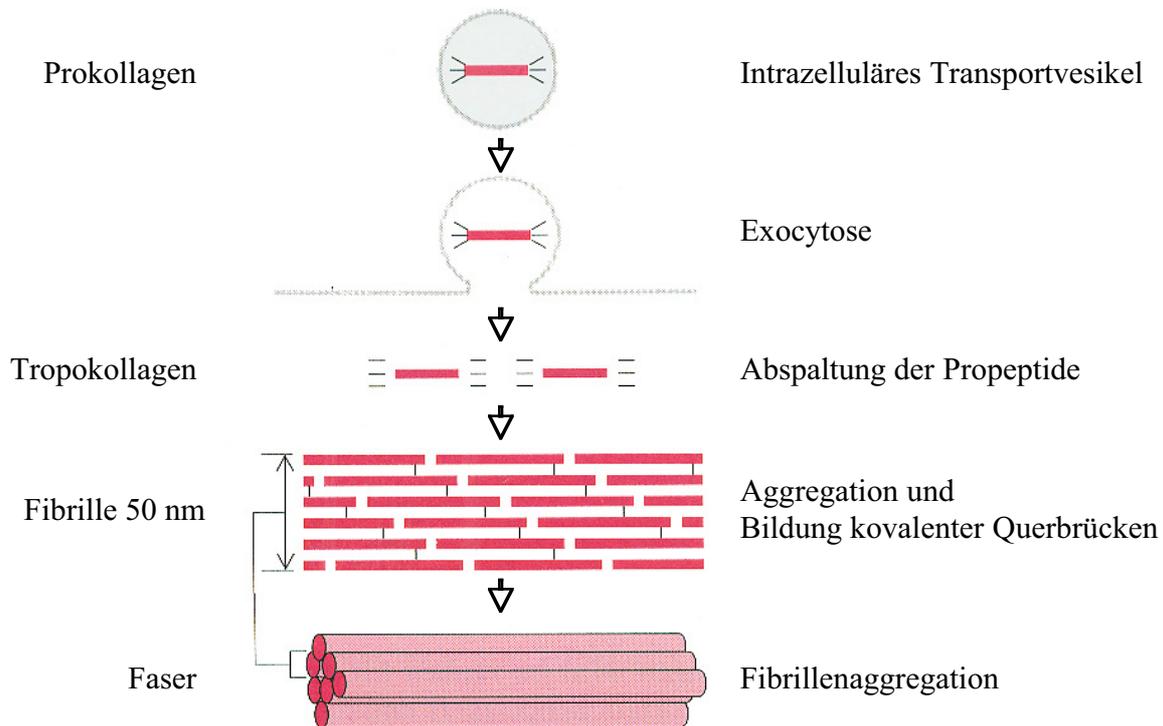


Abbildung 4: Aufbau der Kollagenfasern (nach M. E. Nimni, in M. Zern and L. Reid, Hgb. , Extracellular Matrix, Marcel Dekker, S. 121-148, 1993)

Die Proteoglykane (Mukopolysaccharide) sind den Glykoproteinen ähnlich, haben aber eine weitaus höhere Glykosilierung. Sie bestehen aus Proteinen, die an Polysaccharide gebunden sind. Diese Polysaccharide gehören zu den Glykosaminoglykanen. Diese tragen in wässriger Umgebung viele negative Ladungen. Ein Beispiel ist die Hyaluronsäure. Die Proteoglykane machen nur etwa 1% der Trockenmasse des vorderen Kreuzbandes aus ³⁹, sind jedoch besonders wichtig für die Organisation der Matrix und für die Wasserbindung im Gewebe (Gelbildner) ⁴². Wenn sie mit der Zellmembran verbunden sind, können sie entweder über Glykosyl-Phosphatidylinositol (GPI) an der Oberfläche der Plasmamembran verankert sein, oder an einem Trägerprotein, welches den Lipid Doppellayer durchspannt. So kann auch eine Verknüpfung mit dem Zytoskelett erfolgen ⁴³.

Die Glykoproteine, wie das Fibronectin, Integrin oder Laminin sind Proteine, die meist einige Mono- oder Oligosaccharide enthalten. Sie haben eine besondere Bedeutung bei der Interaktion der Ligamentzellen mit ihrer Umgebung bei Wachstum, Heilung und Umbau. Fibronectin ist für viele Zellfunktionen wichtig, besonders für die Zell-Matrix Adhäsion. Es besteht aus zwei Ketten, die über Disulfidbrücken verbunden sind, wird von Fibroblasten,

Myoblasten, Endothelien und anderen Zellen produziert und assoziiert mit Zelloberflächen, Basalmembranen sowie perizellulären Matrices. Spezielle Moleküldomänen binden an extrazelluläre Matrixmoleküle (u.a. Kollagen, Fibrin, Proteoglykane). Die Arginin-Glycin-Asparaginsäure-Domäne (RGD-Domäne) des Fibronektins bindet an die Integrine der Zellen⁴⁴. Die Zellen binden im Wesentlichen über Integrine an die Matrix. Diese verbinden die Makromoleküle der Matrix, wie z. B. das Fibronektin, mit dem Zytoskelett. Die Integrine sind eine große Familie von Zelloberflächen-Transmembran-Rezeptoren. Sie bestehen aus α - und β -Ketten die Heterodimere bilden, vermitteln den Kontakt zwischen den Zellen und der Matrix und auch Zell-Zell Kontakte und sind wichtig für Entwicklungsprozesse und Wundheilung⁴⁵. Die Integrine besitzen keine intrinsische enzymatische Aktivität, sind jedoch auch zur Initiation und Weiterleitung von mechanischen Signalen in der Lage, da sie mit einer Vielzahl von Proteinen sowohl über ihren transmembranären Bereich als auch über ihre zytoplasmatischen Schwänze interagieren⁴⁶. Die Makromoleküle der Matrix degradieren kontinuierlich und werden von den Zellen permanent neu synthetisiert. Die Degradation geschieht durch die MMP's (Matrixmetalloproteinasen), proteolytische Enzyme, die sezerniert, an die Zelloberfläche gebunden oder an Matrixmoleküle adsorbiert werden. Sie werden in drei Gruppen unterteilt:

- interstitielle Kollagenasen (die Kollagen-Typ I, II, III und V degradieren),
- Typ-IV Kollagenasen (degradiert Dreifachhelix-Kollagene vom Typ-IV, VI, VII, XI, Fibronektin und Elastin)
- Stromelysine (degradieren Proteoglycan-Proteine, Laminin, Fibronektin und Gelatin)^{47 48}

Die regulatorischen Gegenspieler der MMP's sind die TIMP's (tissue inhibitor of metalloproteases).

1.1.5 Funktion

Das vordere Kreuzband ist im Wesentlichen für zwei Aufgaben im Knie zuständig, die Kinematik und die Sensorik. Die Kinematik ergibt sich aus der geometrischen Anordnung der Kreuzbänder im Knie und ihrer Materialeigenschaften. Die Kreuzbänder bilden mit Tibia und Femur eine gekreuzte Viergelenkkette, welche die Roll-Gleit-Bewegung der Femurkondyle auf dem Tibiaplateau bestimmt. Die Bewegung des Knies wird durch die Kreuzbänder gesteuert und entspricht der Kontur der Femurkondyle⁴⁹. Zusätzlich verhindern die Kreuzbänder eine antero-posteriore Verschiebung der Tibia. In Extension stößt das vordere Kreuzband an den vorderen Rand der *fossa intercondylaris* und limitiert so die

Extensionsbewegung⁵⁰. Neben der passiven Stabilisierung ist das Kreuzband mit seinen Propriozeptoren (Mechanosensoren) auch an der aktiven, muskulären Stabilisierung beteiligt. Diese Mechanosensoren, wie *Vater-Paccini*-Körperchen, *Ruffini*-Körperchen und freie Nervenendigungen, sind in den Insertionsbereichen und in der *Subsynovialis* enthalten^{51 52}.

1.1.6 Ruptur des Kreuzbandes

Bei starken Beuge- oder Drehbewegungen, wie zum Beispiel bei Fußball- oder Skiunfällen, kommt es zu einem ungünstigen Hebelmechanismus, der von der Muskulatur nicht mehr gehalten werden kann, so dass das vordere Kreuzband reißt. Bei Riss des Kreuzbandes kommt es zur Ausbildung einer chronischen Instabilität des Kniegelenkes. Die Gelenk-Kinematik ändert sich und die übrigen Strukturen wie Ligamente, Menisci und Knorpel des Gelenkes werden zusätzlich belastet. Durch den Verlust des vorderen Kreuzbandes kommt es insbesondere bei unbewussten, muskulär nicht kontrollierten Bewegungen zum „*giving-way*“-Syndrom mit horizontalem Verschieben des Tibiaplateaus gegen die Femurkondyle. Dieses führt im Laufe der Zeit zur Auslockerung des Kapsel-Band-Apparates und damit zu einer komplexeren Knieinstabilität. Zusätzlich können Meniskusrisse und Knorpelschäden an den Oberschenkelkondylen entstehen. Um solche Folgeschäden zu vermeiden, sollte das Band rekonstruiert werden. Auf einige Methoden soll im Folgenden eingegangen werden.

1.1.7 Bandersatz und Bandrekonstruktion

Die achtziger Jahre waren geprägt von der Einführung verschiedener synthetischer Materialien zum Ersatz der Kreuzbänder. Die Anforderungen an die Materialien sind jedoch hoch. Dies gilt besonders für die mechanischen Eigenschaften. In einem kritischen Rückblick muss festgestellt werden, dass die Materialien zum Ersatz des vorderen Kreuzbandes nicht den Anforderungen gewachsen waren. Die Ersatzmaterialien konnten zwar gute Ergebnisse für einen kurzen Zeitraum nach der Rekonstruktion erzielen, haben aber bei Langzeitbeanspruchung versagt. Meist lag es an unzureichenden mechanischen Eigenschaften wie Abrieb, häufig auftretende Materialermüdungen oder auch schlechte Integration in das Knochengewebe^{53 54 55}. Synthetische Ersatzmaterialien wie Integraft®, Leads-Keio Ligament®, Stryker-Dacron®, Kennedy-LAD® oder Gore-Tex® haben keine, oder nur eine zeitlich beschränkte Zulassung durch die US-amerikanische Food and Drug Administration (FDA) erhalten können⁵⁶. Die nicht degradierbaren, synthetischen Bänder haben daher in der heutigen Praxis keine Bedeutung mehr und sind fast vollständig aus der klinischen Anwendung verschwunden^{57 58}. In Abbildung 5 sind einige synthetische Bandersatzmaterialien sowie ein bovines Allograft gezeigt.



Abbildung 5: von links nach rechts Carbon Fibre, DACRON™, Rindersehne, Gore®, Leeds-Keio®, Aramid™

Die Versuche rupturierte Kreuzbänder mit verschiedenen Nahttechniken zu rekonstruieren, um eine Regeneration zu erreichen, sind gescheitert. Die Regeneration führte lediglich zu einer mechanisch insuffizienten Narbenbildung⁵⁷. Von Cabaud et al. wurden Regenerationsversuche an Hunden und Primaten durchgeführt, welche zeigten, dass Nähen zuvor durchtrennter Bänder zwar eine Heilung bewirkt, diese aber nur maximal 62% der Festigkeit des gesunden Gewebes erreichen⁵⁹. Zudem muss für eine Naht die Ruptur sehr frisch sein. Die Degradation des rupturierten Gewebes führt schnell zu einer Schrumpfung und Auflockerung des Gewebes. Kreuzband-Patienten erscheinen aber meist erst lange Zeit nach einer Ruptur zur Behandlung in der Klinik⁶⁰.

Heute verwendet man zur Rekonstruktion des vorderen Kreuzbandes autogene Transplantate⁶¹. Bei den autogenen Transplantaten kommen das mittlere Drittel der Kniescheibensehne (Patellarsehne) sowie die *pes anserinus*-Sehnen (*Semitendinosus* und *Gracilis*) zur Anwendung⁶⁰. Bei der Verwendung der Patellarsehne wird aus dem mittleren Drittel der Kniescheibensehne ein ca. 1 cm breites Stück Sehne mit Knochengewebe aus den Insertionsarealen von Tibia und Patella entnommen. Vorteil der Verwendung dieser Kniescheibensehne ist die gute Fixationsmöglichkeit. Die anhängenden Knochenblöcke werden in den Bohrkanälen mit Interferenzschrauben aus Titan oder degradierbaren Materialien fixiert. Einbau und Fixation des Transplantates erfolgt meist rein arthroskopisch⁶². Die *Gracilis*- oder *Semitendinosus*-Sehnen werden über einen kleinen Hautschnitt am innenseitigen Schienbeinkopf entnommen und jeweils gedoppelt. Die primäre Reißkraft eines Quadruple-Hamstring-Transplantates (vierfach gelegten Sehnentransplantates) ist ungefähr

doppelt so hoch wie die Reißkraft des normalen menschlichen vorderen Kreuzbandes. Die Vorteile der Semitendinosus- und Gracilis-Transplantate sind, gegenüber der Patellarsehne, die geringere Komplikationsrate, die geringeren Schmerzen nach Entnahme der Sehnen und die nur kleine, kosmetisch günstige Hautnarbe⁶³. Weiterhin erreicht dieses Transplantat eher die Steifigkeit eines normalen vorderen Kreuzbandes. Bewegungseinschränkungen sind nachgewiesenermaßen seltener⁶⁴. Die maximale Reißkraft des Quadruple-Hamstring-Transplantats ist noch höher als die der Patellarsehne. Als Nachteil gilt das langsamere Einheilverhalten der Sehnen in die Knochenkanäle im Vergleich zur Patellarsehne^{65 66}. Die Knochenblöcke der Patellarsehne wachsen innerhalb von drei bis sechs Wochen ein, die Kniebeugesehnen brauchen dafür zehn bis zwölf Wochen^{67 68 69}.

Die Nachteile aller autogenen Transplantate liegen in der Qualität des Autografts und in der Schwächung des Gewebes am Entnahmeort. Die autogenen Ersatzgewebe haben nicht den oben beschriebenen mikroanatomischen Aufbau und unterscheiden sich sogar bezüglich Durchmesser und Verteilung der Kollagenfasern (Abbildung 6). Die Transplantate sind nicht innerviert und nicht vaskularisiert. Dadurch kommt es zu nekrotischen Erscheinungen und Mikrorupturen. Im Schafsmodell erreicht das Transplantat damit nach zwei Jahren nur 60% der mechanischen Eigenschaften eines gesunden Gewebes⁷⁰. Zudem werden durch die Entnahme von Gewebe aus der Patellar- oder Semitendinosus-Sehne diese dauerhaft geschwächt, da das sich dort bildende Narbengewebe ebenfalls nicht mehr die Struktur und Belastungsfähigkeit des ursprünglichen Gewebes besitzt. Häufig klagen Patienten über andauernde Schmerzen am Entnahmeort. Zu den Beschwerden nach einem operativen Eingriff am Kniegelenk gehört auch ein Verlust der Tiefensensibilität, der bei den Patienten zu einem Unsicherheitsgefühl beim Gehen und vermehrter Fallneigung führt³. Das intakte vordere Kreuzband ist für die Führung und Stabilisierung des Kniegelenks bestimmend. Die Ruptur des Bandes bedeutet eine gravierende Störung der normalen Kinematik. Auch nach aufwendigen Rekonstruktionen erreichen viele Kniegelenke nicht die volle Funktionalität wieder.

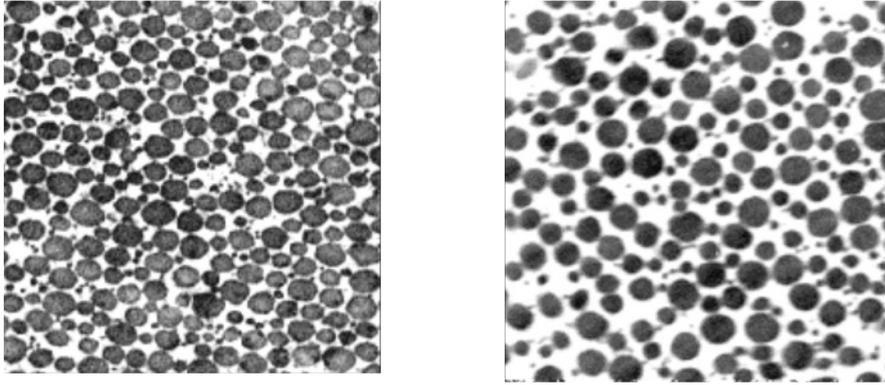


Abbildung 6:

Elektronenmikroskopische Bilder von Kollagenfibrillenquerschnitten (18000 x).

Links: Patellarsehne mit überwiegend großen Kollagenfibrillen und einer hohen numerischen Dichte.

Rechts: Vorderes Kreuzband mit typischer bimodaler Verteilung³⁸

1.2 Tissue Engineering für den Bandersatz

Das Tissue Engineering bezeichnet einen Forschungsbereich an der Schnittstelle zwischen Bio- und Materialwissenschaften. Ziel ist, menschliche Gewebe und Organe mittels biotechnologischer Methoden nachzubilden oder zumindest in ihrer Funktion nachzuahmen⁷¹. Die grundlegende Annahme dieser Forschung ist, dass die Morphologie und die Struktur der Bindegewebe nicht nur genetisch determiniert sind sondern auch Ausdruck eines postnatalen Anpassungsprozesses an die Beanspruchung ist. Die Idee der funktionellen Anpassung der Gewebe an den physiologischen Gebrauch existiert bereits seit Beginn der Evolutionstheorien von Darwin (1872) und Lamarck (1809)^{72 73 74 75}.

Es gibt grundsätzlich zwei verschiedene Ansätze für das Tissue engineering, *in vitro* und *in vivo*. *In vivo* werden Wachstums- und Differenzierungsfaktoren in das Zielgewebe eingebracht. Die regulatorischen Substanzen können direkt in das Gewebe eingebracht werden⁷⁶, z. B. über eine *drug delivery*-Substanz. Die Zellen im Patientengewebe können über Vektoren *in situ* genmanipuliert (transfiziert) werden, so dass dort die gewünschten Faktoren von den Zellen des Patienten produziert werden^{77 15 78}. Dem Patienten können ebenso Zellen entnommen, transfiziert und wieder reimplantiert werden⁷⁹. So konnte bereits durch den Einsatz der Differenzierungsfaktoren GDF 5, 6 und 7, Mitglieder der TGF- β Gen-Superfamilie, *in vivo* eine ektopische Neubildung von Band- oder Ligamentgewebe induziert werden¹².

Das Tissue engineering *in vitro* nutzt die Kultivierung von autogenen Zellen. Dazu werden verschiedene Kultursysteme verwendet, meistens jedoch dreidimensionale artifizielle Matrices^{7 80 81 82 83 8 84}. Durch die Kombination von Zellen und Matrix wird versucht, eine bestmögliche Anpassung der Konstrukte an die künftigen Anforderungen zu erreichen und diese dann zu implantieren⁸⁵. Von Fibrozyten mesenchymalen Ursprungs und mesenchymalen Progenitorzellen (MPC) ist bekannt, dass sie an der Bandheilung beteiligt sind^{86 87}. Daher werden für die Studien zum Tissue Engineering von Bandersatz meist diese Zelltypen verwendet. Fibrozyten werden auch Tenozyten genannt, wenn es sich um die Zellen von Sehnen und Bändern handelt. Sie gehören in die Familie der fibroblastären Zellen¹¹.

1.2.1 Einsatz von fibroblastären Zellen

Neben dem Einsatz von primären Zellen aus Sehnen und Bandgeweben werden auch nicht bandspezifische Fibrozyten^{88 89 8} und Zelllinien erforscht, weil dadurch die Verfügbarkeit großer Zellmengen erleichtert und Spendervariabilitäten vermindert werden. Dies limitiert jedoch die Übertragbarkeit der erzielten Ergebnisse. In dieser Studie wurden Zellen aus dem vorderen Kreuzband verwendet, um ein geeignetes Bezugssystem für den Vergleich der Zellreaktionen von Kreuzbandzellen und mesenchymalen Progenitorzellen zu haben. Für die Identifizierung von band-typischen Fibrozyten gibt es keine etablierten Systeme wie Oberflächenmarker oder exprimierte Gene, die eine spezifische Zuordnung ermöglichen. Es wird lediglich von einem band-typischen Phänotyp gesprochen, wenn Zellen die entsprechenden Martixproteine exprimieren^{90 14}.

1.2.2 Einsatz von mesenchymalen Progenitorzellen

Mesenchymale Progenitorzellen oder auch adulte Stammzellen sind besonders geeignet für das Tissue Engineering, weil ihre Entnahme nur eine minimale Beeinträchtigung für den Spender bedeutet. Die hMPC sind einfach zu vermehren, multipotent und können z. B. Kollagen, Proteoglykane, Zytokine, Gewebeenzyme und Wachstumsfaktoren synthetisieren⁹¹. Die hMPC haben somit Potential, eine Schlüsselrolle bei der Bildung von Bandgewebe einzunehmen^{86 67}. Die hMPC sind im Knochenmark und in einer Vielzahl anderer Gewebe lokalisiert^{90,92,93}. Eine von 100.000 Zellen, die im Knochenmark vorkommen, ist eine hMPC. Mit der Dichtegradientenzentrifugation können die hMPC aus Knochenmarksaspirat isoliert werden. Die hMPC werden in Kulturflaschen überführt und wachsen adhärent⁹⁴. Es entwickeln sich nach wenigen Tagen Kolonien, die jeweils von einer einzelnen Vorläuferzelle abstammen und als *colony forming unit fibroblasts* (CFU-F) bezeichnet werden^{95 96}. Die hMPC können, unter anderem durch Zugabe von Differenzierungsfaktoren, in

unterschiedliche mesenchymale Zelltypen wie Chondrozyten, Adipozyten, Osteoblasten, Myoblasten, Fibroblasten, Neuroblasten und andere differenzieren (Abbildung 7)⁸⁶⁻⁹⁰. hMPC können an dem Phänotyp-Ihrer Zelloberfläche, erkannt werden. hMPC-Marker sind unter anderem STRO1 (*stromal cell surface marker*)⁹⁷⁻⁹⁸, CD9, CD90, CD105 und CD166⁹⁰. Obwohl eine große Anzahl von Antikörpern für Zelloberflächenmoleküle zur Verfügung stehen, die zur Isolierung und Anreicherung der hMPC benutzt werden können, gibt es derzeit keine molekularen Marker, die eine eindeutige Identifizierung der hMPC zulassen^{90,94,99}.

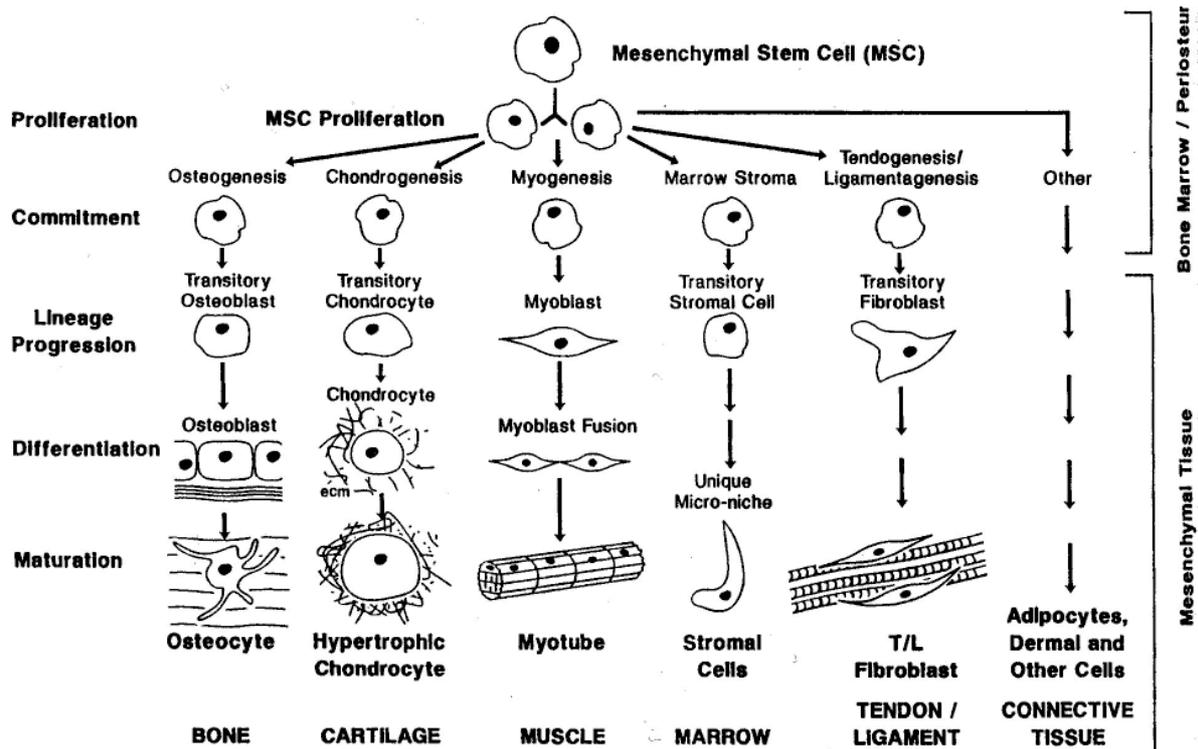


Abbildung 7: Differenzierungsmöglichkeiten für mesenchymale Progenitorzellen⁸⁶

1.2.3 Trägermaterialien (artifizielle Matrices)

Um Zellen *in vitro* für das Tissue Engineering zu kultivieren, bedarf es eines geeigneten Substrates. Für grundlegende Untersuchungen zum Verhalten der Zellen werden meist zweidimensionale Systeme wie Zellkulturplastik oder Silikonoberflächen eingesetzt⁸. Für Untersuchungen zum Tissue Engineering von Bandgewebe ist eine dreidimensionale Kultivierung aber unerlässlich. Hierfür werden Trägermaterialien gebraucht, die einerseits Anforderungen, wie in Kapitel 1.1.7 beschrieben, erfüllen und andererseits das Einbringen und Einwachsen von Zellen unterstützen. Die Anforderungen an die Trägermaterialien sind sehr vielseitig. Die einzusetzenden Biomaterialien müssen biokompatibel sein, eine geeignete Degradationskinetik aufweisen (*in vitro* und *in vivo*), eine hohe Porosität besitzen, mechanischer Belastung widerstehen und eingeleitete Dehnungen auf die eingebrachten

Zellen übertragen. Die häufigsten Matrixformen für dreidimensionale *in vitro*-Experimente sind Hydrogele, Schäume oder Fasern.

Die Materialien lassen sich nach ihrer Herkunft in zwei Gruppen untergliedern. Die biologischen Materialien, wie Kollagene, Fibrin, Alginat, Hyaluronsäure, Chitosan oder Seide werden entweder aus der Natur gewonnen, aufgereinigt und modifiziert, oder synthetisiert. Dazu gehören die Hydrogele aus Kollagen-Typ-I^{100 101}, Fibrin, Alginat¹⁰² oder Hyaluronsäure. In Kollagen-Typ-I-Hydrogelen konnten Fluck et al. zeigen, dass eine fehlende mechanische Stimulation zu Schrumpfung des Konstruktes und zur Apoptose der enthaltenen Fibroblasten führt. Unter vergleichbaren Bedingungen erreichten Cacou et al. durch eine zyklische Stimulation eine Zunahme der Steifigkeit der Konstrukte. Die Hydrogele sind wegen ihrer geringen Zugfestigkeit nur für die Grundlagenforschung oder Koapplikation mit festeren Matrices geeignet. Aus Polyhyaluronsäure^{103 82}, Chitosan¹⁰⁴ oder Seide^{6 11} werden Schäume und Fasern gefertigt. Durch Vergleich von Zell-besiedelter Chitosan und Chitosan-Hyaluronsäure Fasern konnten Funakoshi et al. Unterschiede in der Zellproliferation und der Kollagen-Typ-I-Produktion nachweisen¹⁰⁴. Für Konstrukte basierend auf Seidenfasern zeigten Altman et al. und Chen et al. in Versuchen mit humanen Stammzellen eine Eignung für das Tissue Engineering und die Verwendung als Bandersatz anhand der Materialeigenschaften sowie der Matrixproduktion der eingebrachten Zellen^{6 11}. Die Eignung für die Züchtung von Ligamentgewebe in Hyaluronsäurefaser-Konstrukten wurde von Critstino et al. und Rhodes et al. mit Stammzellen gezeigt^{103 82}. Allen biologischen Materialien gemeinsam sind die aufwendige Gewinnung und Limitierung bei Herstellung komplexer Strukturen und Geometrien, sowie die Gefahr der Verschleppung von Krankheitserregern und Immunogenen.

Die synthetischen Materialien sind meist Thermoplaste, die mit industriell üblichen Verfahrenstechniken die einfache Herstellung verschiedenster Schäume und Fasern ermöglichen. Die wichtigsten Vertreter sind die verschiedenen Polymilchsäuren^{105 106}. Durch unterschiedliche Abfolge und Anteile der Monomere lassen sich hier alle wichtigen Eigenschaften nahezu beliebig verändern. Lu et al. untersuchten die Eignung von verschiedenen Biomaterialien (PGA, PLA, PLAGA) für das Tissue Engineering von Kreuzbandersatz, und erzielten mit Fibronectin beschichtete PLA-Fasern das beste Ergebnis¹⁰⁶. Die Vielseitigkeit dieser synthetischen Materialien macht sie zu einem potenten Partner für das Tissue Engineering.

Alle erwähnten Matrices haben Nachteile, wie z. B. mangelnde mechanische Stabilität (z. B. Gele) oder mangelnde Porosität (z. B. Seide). Ein optimales Biomaterial als Zellträger für das Tissue Engineering von Bandgewebe, das alle Anforderungen erfüllt, gibt es bisher nicht.

1.2.4 Applikation mechanischer Stimuli

Wie bereits erwähnt ist der Einfluss einer mechanischen Stimulation wichtig für die embryonale Entwicklung der Kreuzbänder. Es liegt daher nahe, mechanische Einflüsse zur Steuerung der Zellen *in vitro* einzusetzen, um die Produktion und Reifung der Matrix positiv zu beeinflussen. Auch bei Heilungsprozessen von Bandgeweben wurde schon der positive Einfluss mechanischer Reize gezeigt^{81 107 108 85}. Es gilt nun herauszufinden, welcher Art (Amplitude, Frequenz, Richtung, Dauer) mechanische Reize sein müssen, um funktionellerer Konstrukte herzustellen. Es muss ebenfalls noch geklärt werden, welche Zellfunktionen durch mechanische Reize beeinflusst werden, und wie die zelluläre Informationsaufnahme und Weiterleitung geschieht. Zellen können mechanisch mit unterschiedlichen Prinzipien gereizt werden. Eine Dehnung des Zellkörpers kann durch Flüssigkeitsscherung oder hydrostatischen Druck direkt bewirkt werden. Der mechanische Stimulus kann aber auch durch Bewegung der umgebenden Matrix appliziert werden, da die Zellen über Adhäsionsproteinkomplexe mit der Matrix verknüpft sind.

Untersuchungen zur Wirkung mechanischer Reize können grundsätzlich in zwei- oder dreidimensionalen Kulturbedingungen durchgeführt werden.

In zweidimensionalen Versuchen an Fibroblasten oder Progenitorzellen konnte eine positive Modulation der Kollagene Typ-I und Typ-III sowie Fibronectin durch mechanische Belastung der Zellen erreicht werden^{8 109}.

Die zyklische mechanische Dehnung von Fibroblasten (2,5% bzw. 5%) in dreidimensionalen Kollagen-Typ-I-Gelen, zeigte die Bildung von zugorientierten, dicken Faserbündeln, welche Kollagen-Typ-I dominiert waren. Diese enthielten mehr Chondroitinsulfat als ohne Stimulus aber weniger als im nativen Gewebe¹⁰¹. Auch Arbeiten mit humanen und bovinen Stammzellen aus dem Knochenmark in dreidimensionalen Kollagen-Typ-I-Hydrogelen konnten durch die mechanische Stimulation eine vermehrte Ausrichtung der Zellen, höhere Zelldichte sowie eine höhere Kollagen-Typ-I, Kollagen-Typ-III, Tenascin-C und Fibronectin mRNA-Expression nachweisen. In besiedelten Seidenfaserkonstrukten konnten die Zellreaktionen auf eine mechanische Stimulation bestätigt werden. Untersuchungen an fetalen bovine Sehnen ergaben Zunahmen der Expressionen von Aggrecan, Biglycan, Versican, Kollagen-Typ-I und TGF- β in mechanisch stimulierten Sehnenproben, Decorin blieb jedoch

unverändert. Durch Zusatz von TGF- β 1 wurde die mRNA-Expression von TGF- β , Aggrecan und Biglycan erhöht, nicht jedoch Decorin¹¹⁰.

Zusammenfassend ergibt sich aus den oben genannten Arbeiten, dass durch den Einsatz mechanischer Reize die Expression einer extrazellulären Bandmatrix begünstigt werden kann. Dabei scheinen sowohl Progenitorzellen als auch reifere, fibroblastäre Zellen sensitiv für mechanische Reize zu sein. Untersuchungen in zweidimensionalen Systemen liefern zwar grundlegende Erkenntnisse, können aber nicht genutzt werden, um dreidimensionalen Bandgewebeersatz zu züchten. Hierfür werden auch dreidimensionale Kultursysteme benötigt. Die bisherigen Untersuchungen zum Einfluss mechanischer Belastung auf dreidimensional kultivierten Progenitorzellen oder Fibroblasten wurden meist unter wenig definierten mechanischen Bedingungen durchgeführt. Untersuchungen, die verschiedene Zelltypen und verschiedene Zellträgermaterialien unter definierten mechanischen Bedingungen vergleichen, fehlen bislang.

1.3 Ziel der Arbeit

Wie bereits beschrieben haben erste Arbeiten Hinweise dafür gefunden, dass mechanische Reize einen positiven, anabolen Effekt auf Zell-besiedelte Konstrukte für das Tissue Engineering haben können. Im Rahmen Kompetenznetzes für Biomaterialien des Landes Baden-Württemberg soll in dieser Untersuchung überprüft werden, ob diese Erkenntnisse auf das Tissue Engineering von Bandersatz in dreidimensionalen Kollagen-Typ-I-Gelen und Polylaktid-Faser-Konstrukten anwendbar sind. Es sollen dazu möglichst definierte mechanische Bedingungen geschaffen werden. Das Modellsystem soll es ermöglichen, den Einfluss von Zugdehnungen zu untersuchen. Die Versuche sollen erstmals vergleichend mit Zellen aus Biopsien des vorderen Kreuzbandes und hMPC durchgeführt werden. Zusätzlich sollen die Versuche auf neuartigen textilen Faserkonstrukten aus Polylaktid durchgeführt werden, die für das Tissue Engineering von Bandgewebe entwickelt werden.

Folgende Fragen sollen mittels dieser Studie beantwortet werden.

1. Können Zell-besiedelte Hydrogele aus Kollagen-Typ-I für die Applikation uniaxialer, mechanischer Reize und das Tissue Engineering von Bandersatz eingesetzt werden?
2. Welchen Einfluss haben uniaxiale, mechanische Reize auf humane Zellen in Kollagen-Typ-I-Hydrogelen?
 - a) Einfluss auf mesenchymale Progenitorzellen.
 - b) Einfluss auf Zellen aus dem vorderen Kreuzband.
4. Können Zell-besiedelte Konstrukte aus Polylaktid-Faser für die Applikation uniaxialer Reize und das Tissue Engineering von Bandersatz eingesetzt werden?
5. Welchen Einfluss haben uniaxiale, mechanische Reize auf humane Zellen in Polylaktid - Faser Konstrukten?
 - a) Einfluss auf mesenchymale Progenitorzellen.
 - b) Einfluss auf Zellen aus dem vorderen Kreuzband.

2 Material und Methoden

2.1 Zellen

2.1.1 Humane Mesenchymale Progenitorzellen

Humane Mesenchymale Progenitorzellen (hMPC) wurden aus Knochenmarksaspirat der Tibia isoliert (Abbildung 8). Die Entnahme des Knochenmarks erfolgte über Bohrlöcher in der Tibia bei Operationen zur Rekonstruktion des vorderen Kreuzbandes.

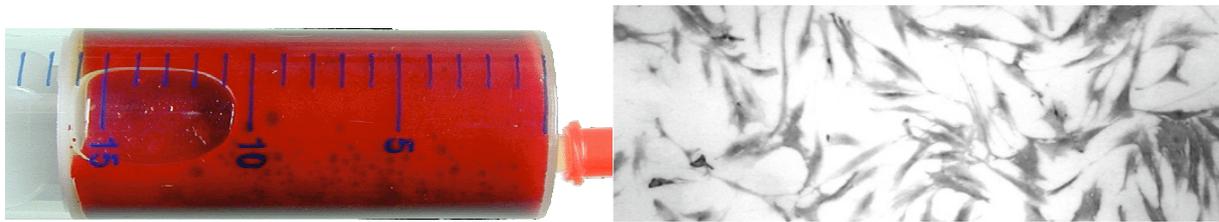


Abbildung 8: Knochenmarksaspirat aus der humanen Tibia (links) und isolierte hMPC auf Zellkulturplastik (rechts).

2.1.2 Humane primäre Kreuzbandzellen

Humane primäre Kreuzbandzellen (hACLZ) wurden aus reseziertem Gewebe des vorderen Kreuzbandes nach Kreuzbandruptur isoliert (Abbildung 9).



Abbildung 9: Fragmente eines humanen vorderen Kreuzbandes (links) und isolierte Zellen auf Zellkulturplastik (rechts)

2.2 Antikörper

Tabelle 1: Antikörper für die Charakterisierung von hMPC

CD9	DPC Biermann, Bad Nauheim
CD90-(Thy1)	DPC Biermann, Bad Nauheim
CD105-(Endoglin)	DPC Biermann, Bad Nauheim
CD166-(ALCAM)	DPC Biermann, Bad Nauheim
Stro-1	DPC Biermann, Bad Nauheim

2.3 Oligonukleotide (Primer)

Tabelle 2: Primersequenzen für PCR-Reaktion

Zielgen	Produktgröße	Nukleotidsequenzen
AP forward	224	5`-TCAGAAGCTCAACACCAACG-3`
AP reverse	224	5`-GTCAGGGACCTGGGCATT-3`
RUNX2 forward	205	5`-CTCTTCCCAAAGCCAGAGTG-3`
RUNX2 reverse	205	5`-CAGCGTCAACACCATCATTC-3`
Decorin forward	220	5`-AATTGAAAATGGGGCTTTCC-3`
Decorin reverse	220	5`-GCCATTGTCAACAGCAGAGA-3`
Fibronektin forward	165	5`-GAGAGAAGTGGGACCGTCAG-3`
Fibronektin reverse	165	5`-TGGCACCGAGATATTCCTTC-3`
GAPDH forward	224	5`-GAAGGTGAAGGTCCGAGTC-3`
GAPDH reverse	224	5`-GAAGATGGTGATGGGATTC-3`
Kollagen I forward	197	5`-TGACCTCAAGATGTGCCACT-3`
Kollagen I reverse	197	5`-ACCAGACATGCCTCTTGTC-3`
Kollagen II forward	162	5`-CGCACCTGCAGAGACCTGAA-3`
Kollagen II reverse	162	5`-TCTTCTTGGGAACGTTTGCTGG-3`
Kollagen III forward	173	5`-GGGAACAACCTTGATGGTGCT-3`
Kollagen III reverse	173	5`-CCTCCTTCAACAGCTTCCTG-3`
MMP1 forward	234	5`-ATGCTGAAACCCTGAAGGTG-3`
MMP1 reverse	234	5`-CTGCTTGACCCTCAGAGACC-3`
MMP2 forward	185	5`-AAGAACCAGATCACATACAGGATCA-3`
MMP2 reverse	185	5`-GTATCCATCGCCATGCTCC-3`
p53 forward	174	5`-ATTTACGCGCGGAGTATTTG-3`
p53 reverse	174	5`-CCAGTGTGATGATGGTGAGG-3`
smooth muscle actin forward	222	5`-TTCAATGTCCCAGCCATGTA-3`
smooth muscle actin reverse	222	5`-GAAGGAATAGCCACGCTCAG-3`
Tenascin-C forward	230	5`-TCAAGGCTGCTACGCCTTAT-3`
Tenascin-C reverse	230	5`-GTTCTGGGCTGCCTCTACTG-3`
TIMP1 forward	161	5`-AAGGCTCTGAAAAGGGCTTC-3`
TIMP1 reverse	161	5`-GAAAGATGGGAGTGGGAACA-3`
TIMP2 forward	223	5`-TGATCCACACACGTTGGTCT-3`
TIMP2 reverse	223	5`-TTTGAGTTGCTTGCAGGATG-3`

2.4 Zellkulturmedien

Tabelle 3: Medien für die Kultivierung humaner Zellen

Basalmedium mit Antibiotika		
	Endkonzentration	auf 100 ml DMEM
Penicillin/Streptomycin	100 U/ml, 100 µg/ml	1 ml
Fungizone	1,25 µg/ml	0,5 ml
L-Glutamin (Stammlösung, 200mM)	4 mM	1 ml Stammlösung
ACL-Medium: Proliferationsmedium für Zellen aus dem vorderen Kreuzband		
	Endkonzentration	auf 100 ml Basalmedium
FBS Biochrom S0113/0134G	10%	10 ml
hMPC-Medium: Proliferationsmedium für Zellen aus dem tibialen Knochenmark		
	Endkonzentration	auf 100 ml Basalmedium
FCS BioWhittaker (Cambrex)	10%	10 ml
Versuchsmedium für Zellen aus dem vorderen Kreuzband		
	Endkonzentration	auf 100 ml Basalmedium
FBS Biochrom S0113/0134G	2%	2 ml
Versuchsmedium für Zellen aus dem tibialen Knochenmark		
	Endkonzentration	auf 100 ml Basalmedium
FCS BioWhittaker (Cambrex)	2%	2 ml
GDF5-Versuchsmedium für Zellen aus dem tibialen Knochenmark		
	Endkonzentration	auf 100 ml Basalmedium
FCS BioWhittaker (Cambrex)	2%	2 ml
GDF-5 Stammlösung 10 ng/µl	10 ng/ml	100 µl
Medium für Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff		
	Endkonzentration	auf 100 ml Basalmedium
FCS BioWhittaker/Cambrex hMPC FBS Biochrom S0113/0134G (ACL)	20%	20 ml
DMSO	10%	10 ml
Medium für Gewebeverdau		
	Endkonzentration	auf 100 ml Basalmedium
Kollagenase P	3 mg/ml	300 mg
Protease	0,6 mg/ml	60 mg
Medium für Kollagengolverdau		
	Endkonzentration	auf 100 ml Basalmedium
Kollagenase 1A	6000 Units/ml	600.000 Units

Table 4: Medien zur Kultivierung von Bakterien

Bezeichnung	Konzentration in Aqua bidest. LB-Medium/LB-Agar
Bactotrypton	1%
Select Yeast Extract	0,5%
NaCl	1%
Ampicillin	50 μ g/ml
Select Agar	- /1,5%

2.5 Lösungen

Table 5: verwendete Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
50x TAE	242 g Tris 57,1 l Essigsäure 100 ml 5,5 M EDTA Lösung, pH 8,0 auf 1 l H ₂ O auffüllen
Kollagenaselösung	0,25% Kollagenase IA in PBS steril filtriert
Lysispuffer	Puffer RLT 1% 2-Mercaptoethanol
Puffer P1	50 mM Tris/HCl (pH 8,0) 10 mM EDTA 100 mg/ml RNase A
Puffer P2 (Lysis-Puffer)	200 mM NaOH 1% SDS
Puffer P3	3 M Kaliumacetat (pH 5,5)
Puffer QBT	750 mM NaCl 50 mM MOPS (pH 7,0) 15% Isopropanol (v/v) 0,15% Triton X-100 (v/v)
Puffer QC	1 M NaCl 50 mM MOPS (pH 7,0) 15% Isopropanol (v/v)
Puffer QF	50 mM Tris/HCl (pH 8,5) 5% Isopropanol
Puffer QN	50 mM Tris/Hcl (pH 8,5) 5% Isopropanol
RLT-Lysepuffer	RLT-Puffer (Sigma) 1 μ l/ml Mercaptoethanol
Salzlösung	5 M NaCl 0,4 M KCl
TAE-Puffer (50x)	242 g Tris 57,1 ml Essigsäure 100 ml EDTA-Lösung (5,5 M) Aqua dest. ad 1000 ml
TBS	0,05 M Tris-HCL, pH 7,6 0,15 M NaCl
Trypsin-Lösung	0,05% Trypsin; 0,02% EDTA
Türks-Lösung	10 g/l Essigsäure 0,1 g/l Gentianaviolettlösung

2.6 Chemikalien

Tabelle 6: eingesetzte Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller/Vertrieb	Ort
β-Glycerophosphat	Sigma	Deisenhofen (D)
2-Mercaptoethanol	Fluka	Buchs (CH)
2x Trypsin	Biochrom	Berlin (D)
3-Isobutyl-1-methylxanthin	Sigma	Deisenhofen (D)
Agarose	Invitrogen	Karlsruhe (D)
Alzarin red	Sigma	Deisenhofen (D)
Ameisensäure	Merck	Darmstadt (D)
Amphotericin B	Gibco BRL	Karlsruhe (D)
Ampicillin	Sigma	Deisenhofen (D)
Ascorbinsäure (Vitamin C)	Merck	Darmstadt (D)
Bactotryptan	Gibco BRL	Karlsruhe (D)
Basenleiter (100 bp)	Gibco BRL	Karlsruhe (D)
DMEM F0415	Biochrom	Berlin (D)
DMSO	Serva	Heidelberg (D)
DNase	Sigma	Deisenhofen (D)
EcoRI + Puffer	Gibco BRL	Karlsruhe (D)
EDTA	Merck	Darmstadt (D)
Eisessig	Merck	Darmstadt (D)
Eosin (gelblich)	Merck	Darmstadt (D)
Ethanol absolut	Merck	Darmstadt (D)
Ethanol vergällt	Merck	Darmstadt (D)
Ethidiumbromid	Serva	Heidelberg (D)
FBS Biochrom / Charge: 0134G Nr.: S0113 (Kälberserum, fötales)	Biochrom	Berlin (D)
FCS (Kälberserum, fötales) Charge 1SB002 Nr.: DE14-801F	BioWhittaker (Cambrex)	Verviers (Belgien)
Ficoll 1.077Histopaque	Sigma	Deisenhofen (D)
Fluorescein	Sigma	Deisenhofen (D)
Formaldehyd	Merck	Darmstadt (D)
Fungizone	Gibco BRL	Karlsruhe (D)
Glutamin	Biochrom	Berlin (D)
Glutaraldehyd	Sigma	Deisenhofen (D)
HCl	Merck	Darmstadt (D)
Hefeextrakt	Gibco BRL	Karlsruhe (D)
Isoton	Coulter EuroDiagnostic	Krefeld (D)
KCl	Merck	Darmstadt (D)
Kollagenase 1A	Sigma	Deisenhofen (D)
Kollagenase P	Roche Diagnostics	Mannheim (D)
Kollagengel Typ-I (6 mg/ml)	ArsArthro AG	Esslingen (D)
Ladepuffer (6x)	Sigma	Deisenhofen (D)
L-Glutamin	Biochrom	Berlin (D)
Mayers Hämalaun	Merck	Darmstadt (D)
Merckoglas	Merck	Darmstadt (D)
Methanol	Merck	Darmstadt (D)
NaCl	Riedel-de Haen	Seelze (D)
NaOH	Merck	Darmstadt (D)
Natriumpyruvat	Sigma	Deisenhofen (D)
Natriumtetraborat	Sigma	Deisenhofen (D)
NcoI + Puffer	Invitrogen	Karlsruhe (D)
Neutralisationslösung für	ArsArthro AG	Esslingen (D)

Bezeichnung	Hersteller/Vertrieb	Ort
Kollagengel		
nichtessentielle Aminosäuren	Sigma	Deisenhofen (D)
PBS	PAA Laboratories	Pasching (A)
Penicillin/Streptomycin	Gibco BRL	Karlsruhe (D)
Pepton	Gibco BRL	Karlsruhe (D)
Protease	Sigma	Deisenhofen (D)
Ribonuclease Inhibitor	Sigma	Deisenhofen (D)
RNase-Free Dnase Set (50)	Quiagen	Hilden
Select Agar	Gibco BRL	Karlsruhe (D)
Select Yeast Extract	Gibco BRL	Karlsruhe (D)
Silikon ELM4641A	Wacker	München (D)
Silikonvernetzer ELM4641B	Wacker	München (D)
SspI + Puffer	Invitrogen	Karlsruhe (D)
Tris	Merck	Darmstadt (D)
Triton X-100	Merck	Darmstadt (D)
Trypan Blau	Sigma	Deisenhofen (D)
Trypsin EDTA (10x)	Biochrom	Berlin (D)
Xylol	Serva	Heidelberg (D)

2.7 Kits

Tabelle 7: eingesetzte Kits für molekularbiologische Arbeiten

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller/Vertrieb	Ort
Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix	real time-RT-PCR	Stratagene	Amsterdam (NL)
HotStarTaq Master Mix Kit (250)	PCR	Quiagen	Hilden (D)
Omniscript RT Kit (50)	cDNA-Synthese	Quiagen	Hilden (D)
Platinum Sybr Green Supermix	real time-RT-PCR	Invitrogen	Karlsruhe (D)
Qiafilter Plasmid Midi Kit (25)	Klonierung	Quiagen	Hilden (D)
RNase Free DNase Set (50)	RNA-Isolierung	Quiagen	Hilden (D)
RNeasy Mini Kit (50) mit Quia Shredder (50)	RNA-Isolierung	Quiagen	Hilden (D)
TOPO TA Cloning Kit	Klonierung	Invitrogen	Karlsruhe (D)
Vector Red Alkaline Phosphatase Substrate Kit I	Immunfärbung	Vector Laboratories	Wertheim-Bettingen (D)

2.8 Geräte

Tabelle 8: eingesetzte Geräte

Bezeichnung	Modellbezeichnung	Hersteller	Ort
Bildverarbeitungssystem		Soft Imaging System	Münster
Brutschrank 1	Hera Cell 240	Heraeus	Hanau (D)
Coulter Counter	Z2	Counter Electronics	Krefeld (D)
Digitale Kamera	Coolpix 950	Nikon	Düsseldorf (D)
Digitalkamera	IX70	Olympus	Hamburg
DNA-Workstation	UV Cleaner UVC/T-AR	Kisker	Steinfurt (D)
Feinwaage 1	Analytic AC 1205	Sartorius	Göttingen (D)
Feinwaage 2	EW 600-2M	Kern	Albstadt (D)
Geldokumentationsgerät	75S03227	Biorad	München (D)
Gelelektrophoresekammer	Horizon11-14	Life Technologies GmbH	Karlsruhe (D)
Heizblock	Thermomixer 5436	Eppendorf	Hamburg (D)
I-Cycler	Optical Module	Biorad	München (D)
Laminar Flow 1	HA 2448 CS	Heraeus	Hanau (D)
Laminar Flow 2	HB 2460	Holten	Allerød (DK)
Laminar Flow 3	HS 1212	Heraeus	Hanau (D)
Magnetrührer 1	RCT basic	IKA Labortechnik	Staufen (D)
Magnetrührer 2	MR 2002	Heidolph	Schwabach (D)
Mikroskop 1	IX 70	Olympus	Hamburg (D)
Mikroskop 2	Axiophot 451887	Zeiss	Oberkochen (D)
PCR-Gerät	Robocycler 96 Gradient Combo	Stratagene	Amsterdam (NL)
Photometer	Spektralphotometer Ultrospec Plus	Pharmacia LKB	Freiburg (D)
Pipetboy	Pipetus-akku	Hirschmann	Langfeld (D)
Pipetten	diverse	Eppendorf	Hamburg (D)
Pumpe	ISM938	Ismatec	Wertheim-Mondfeld (D)
Rasterelektronenmikroskop	DSM 962	Zeiss	Oberkochen (D)
Wärmeschüttler	SM-30	EB Labortechnik	Hechingen (D)
Wasserbad	1012	GFL	Burgwedel (D)
Zellstimulator		Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik	Ulm (D)
Zentrifuge 1	5417R	Eppendorf	Hamburg (D)
Zentrifuge 2	Unicon FR	Herolab	Wiesloch (D)

2.8.1 Stimulationsgerät

Für die Applikation von zyklischen Dehnungsreizen mit den Amplituden von 0,3% bis 16% und 1 bis 4 Hz wurde in unserer Arbeitsgruppe ein Zellstimulationsgerät (Abbildung 10) entwickelt¹¹¹. In diesem Gerät können Silikonreizkammern oder Zell-besiedelte Konstrukte eingespannt und mittels eines Exzenters gedehnt werden. Über Verankerungsnoppen in den Silikonreizkammern wurden die Dehnungen auf die Konstrukte übertragen. Für die Stimulation von ringförmigen Konstrukten wurden für die vorliegende Arbeit einige Modifikationen von Form und Material vorgenommen. Die Dehnung erfolgte motorgesteuert, wobei sowohl die Frequenz (über die Motorgeschwindigkeit) als auch die Dehnungsamplitude (über die Exzenterform) eingestellt werden konnten. Für die Applikation von niedrigen Dehnungsfrequenzen wurde ein zusätzliches Getriebe entworfen und integriert, wodurch nun auch von 0,01 bis 0,2 Hz ermöglicht wurden. Es wurden Exzenter mit 2,5%, 5%, 8% verwendet. Eine Exzenter-bedingte Dehnung der Silikonschale von 8% entspricht einer Dehnung des Kollagengel-Konstruktes um 5%. Der Umrechnungsfaktor beträgt für die Kollagen-Typ-I-Hydrogele 0,625. Für den Aufbau zur Stimulation textiler Konstrukte wurde das Stimulationsgerät modifiziert (Abbildung 10), hier bewirkt der Einsatz eines 2,5% Exzenters eine Dehnung des Konstruktes um 5%. Der Umrechnungsfaktor von Exzentrizität auf Konstruktdehnung beträgt für die PLA Konstrukte zwei.

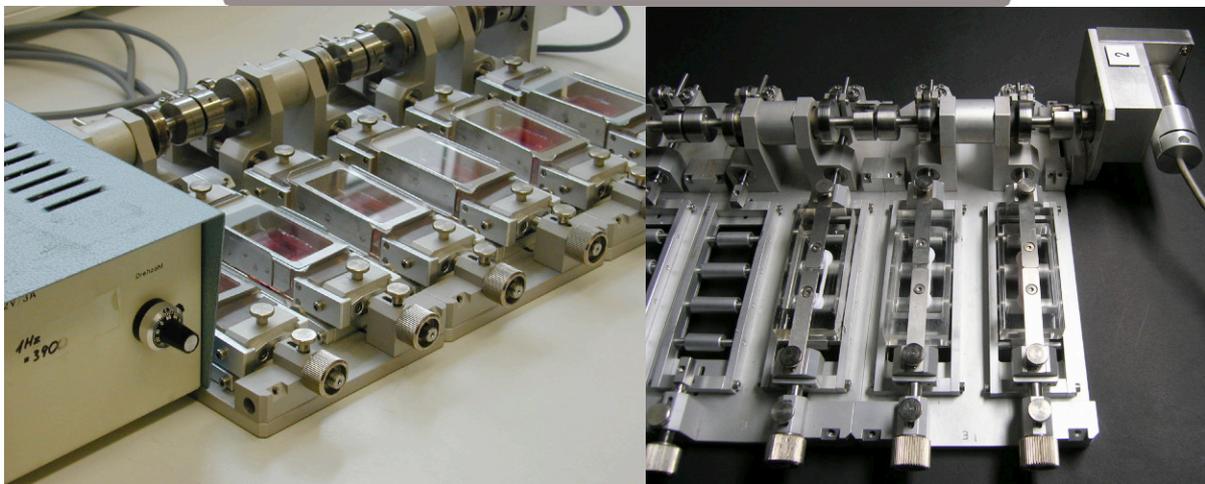
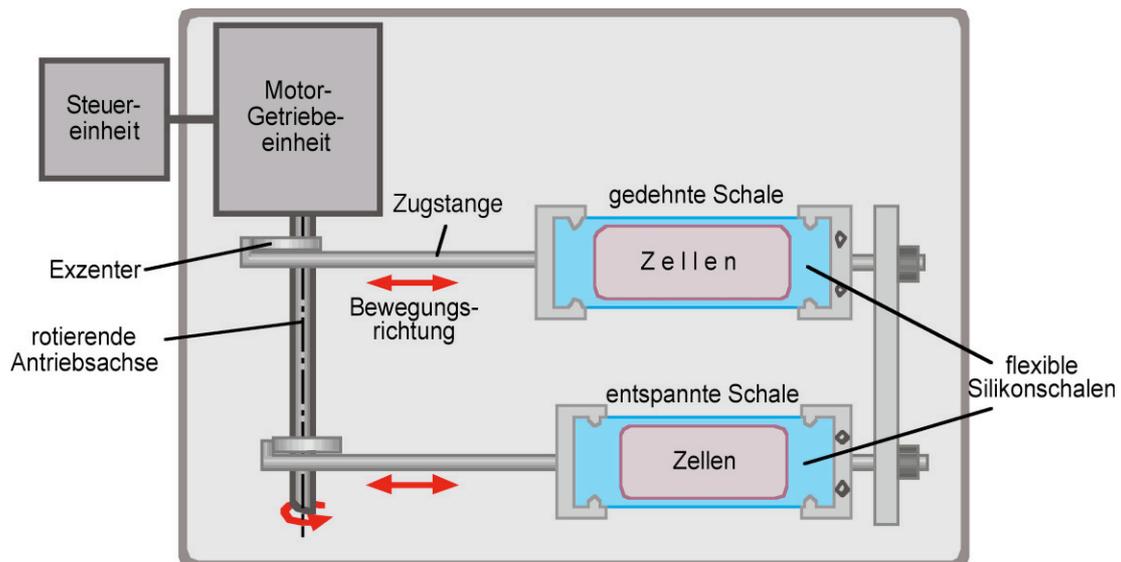


Abbildung 10: Applikationsprinzip für uniaxiale Dehnung (oben)
Aufbau zur Dehnung von Silikon-Reizkammern (links unten)
Aufbau zur Dehnung von textilen Konstrukten (rechts unten)

2.8.1.1 Zellstimulatorzubehör für Kollagen-Typ-I-Ring-Gele

Für die Untersuchung des Einflusses von Zugspannungen auf bandförmige Konstrukte wurde die Herstellung von bandförmigen, längsovalen Kollagen-Typ-I-Gelen entwickelt. Dazu wurden spezielle Reizkammern mit Verankerungsnoppen aus Silikon gefertigt. Für die Herstellung der Gel-Konstrukte wurde eine Gussform, bestehend aus zwei Formteilen (PTFE oder Acrylglas) und der Reizkammer entwickelt (Abbildung 11).

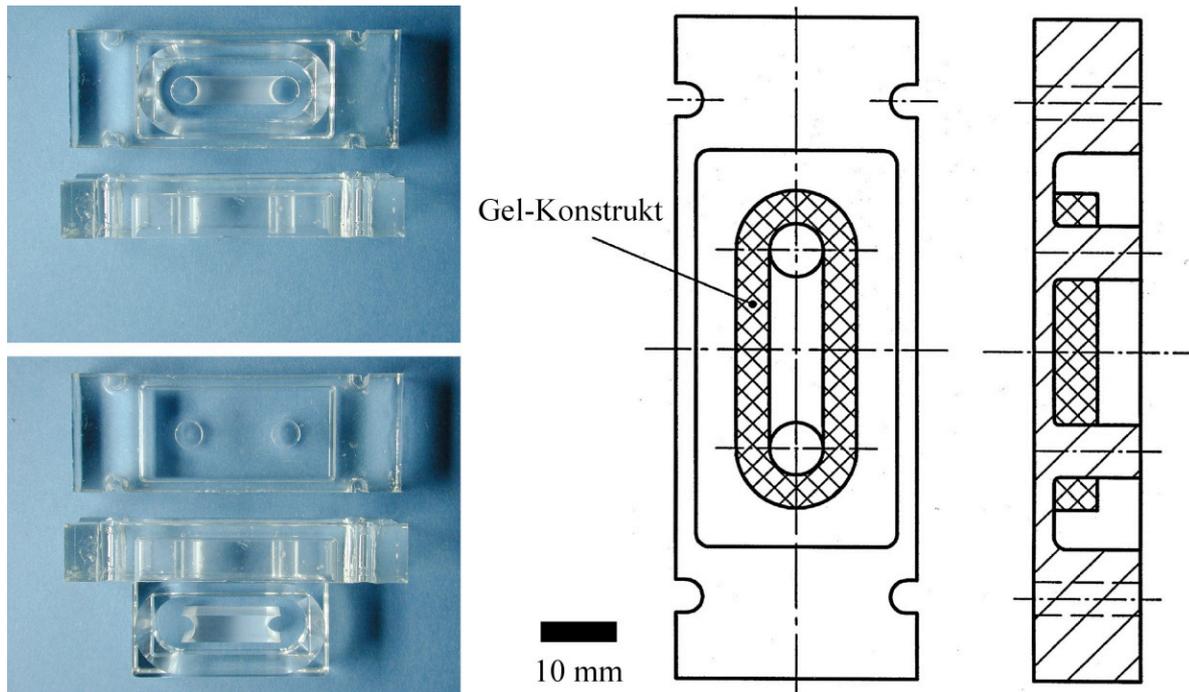


Abbildung 11: Silikonreizkammer mit eingesetzten Formteilen als Gussformen für Kollagen-Typ-I-Gel (links oben)

2.8.1.2 Zellstimulatorzubehör für textile Konstrukte

Für die Applikation größerer Kräfte wurden spezielle Verankerungen (Abbildung 12) entwickelt, so dass die Dehnungen nicht mehr über die Silikonreizkammern vermittelt wurden, sondern direkt von dem Exzenter des Gerätes auf das Konstrukt. Dadurch konnten mit dem bestehenden Zellstimulator Zugkräfte bis 30 N und Dehnungen bis 16% pro Konstrukt ermöglicht werden.



Abbildung 12: Konstruktverankerungen für die Dehnung von textilen Konstrukten (PLA-Scaffolds)

2.9 Zellkultur

2.9.1 Gewinnung und Kultivierung humaner mesenchymaler Progenitorzellen

Knochenmark wurde bei Operationen zum Ersatz des vorderen Kreuzbandes aus der proximalen Tibia intraoperativ steril mit heparinisierten Spritzen entnommen (Abbildung 13) und innerhalb von 1 h aufgearbeitet. Die Entnahme wurde von der Ethikkommission der Universität Ulm bewilligt (Antrag Nr. 187/2002). Die Spender wurden über alle Vorgänge aufgeklärt und erteilten ihr Einverständnis.

Die Methode der Isolation von hMPC wurde, ausgehend von der Methode von Haynesworth et al. in unserem Institut abgewandelt wie folgt⁹⁴. Das Knochenmark wurde soweit wie möglich resuspendiert. 10 µl Knochenmark wurden mit Türks-Lösung 1:10 verdünnt und in der Neubauerkammer gezählt, um die Qualität des Knochenmarks zu beurteilen. Wenn im Aspirat mehr als 10×10^6 mononukleäre Zellen/ml vorhanden waren, wurde das Knochenmark 1:1 mit PBS verdünnt. Es wurden 2-5 ml Knochenmarkslösung vorsichtig im 15 ml Zentrifugenröhrchen über 5ml Ficoll geschichtet. Die Dichtegradientenzentrifugation erfolgte für 30 min bei 600 g und 20 °C mit deaktivierter Bremse. Nach der Zentrifugation wurde die obere Fettschicht vorsichtig abgesaugt. Der sichtbare Zellring (Interphase) wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen. In der Interphase sind die mononukleären „light density“ Zellen enthalten (nur etwa 0,1% der „light density“ Zellen sind hMPC's). Ficollrest und Pellet wurden verworfen. Die Interphasen von allen Ficoll-Röhrchen wurden in einem 15 ml-Tube vereinigt. Die Zellen wurden durch Zugabe von mindestens 2-3 Volumen PBS und Zentrifugation für 10 min bei 1000 rpm gewaschen. Die resuspendierten Zellen wurden gezählt und mit einer Zelldichte von 80000-160000 Zellen/cm² in eine 12,5 cm² Zellkulturflasche mit hMPC-Medium ausgesät. 48 Stunden nach der Aussaat wurde das hMPC-Medium gewechselt. Die Expansionskultur erfolgte in 175 mm² Zellkulturflaschen. Das Medium wurde zweimal pro Woche gewechselt. Nach 14 Tagen wurden meist Colony Forming Units erkennbar. Es wurde sorgfältig die Proliferation der Zellen überprüft, um eine längere Konfluenz der Zellen und damit eine nicht erwünschte spontane Differenzierung der hMPC zu vermeiden. Nach Erreichen einer 80%-igen Konfluenz wurden die Zellen unter Verwendung von Trypsin/EDTA (2 ml/75 cm² bzw. 5 ml/200 cm²) abgelöst und die Zell-Trypsin-Suspension mit dem jeweils doppelten Volumen hMPC-Medium versetzt. Nach durchschnittlich dreimaligem Passagieren war die Vermehrung der Zellen so weit fortgeschritten, dass für Versuche ausreichend Zellen zur Verfügung standen. Die

Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe des Coulter Counters Z1 in Vierfachbestimmung. Für Versuche nicht benötigte Zellen wurden von der Zellsuspension abgenommen und wie folgt kryokonserviert. Die Zellen wurden zentrifugiert und in 1,8 ml Einfriermedium resuspendiert, umgehend bei -80°C eingefroren und im Anschluss bald möglichst in flüssigen Stickstoff überführt.

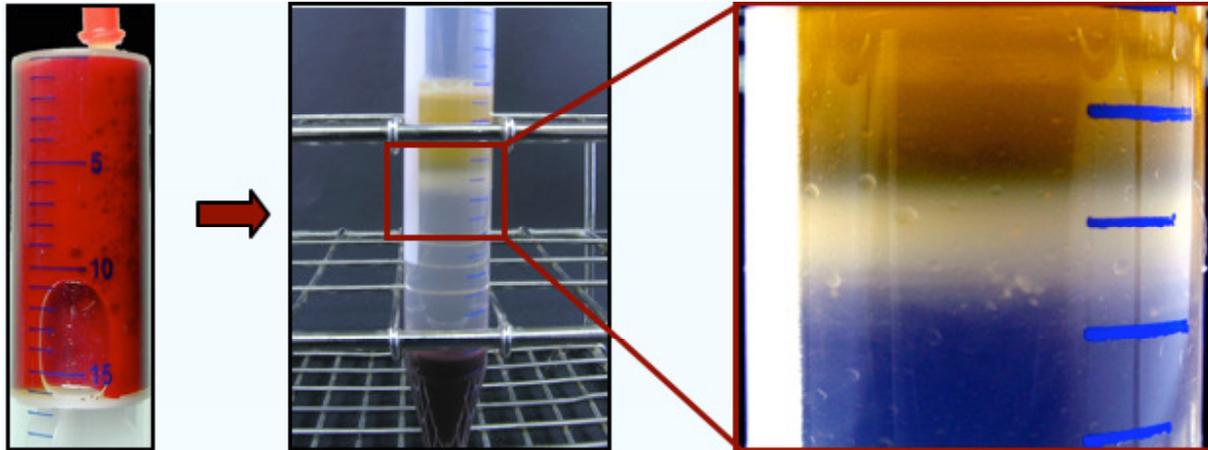


Abbildung 13: Aufreinigung des Knochenmarkspirates (links) durch Dichtegradientenzentrifugation (Histopaque). Die milchig trübe Interphase (rechts) enthält die Progenitorzellen.

2.9.2 Isolation und Kultur humaner, primärer Kreuzbandzellen

Das Kreuzbandgewebe (Abbildung 9) wurde bei Operationen zur Kreuzbandrekonstruktion entnommen. Die Weitergabe des Gewebes an unser Institut wurde von der Ethikkommission der Universität Ulm bewilligt (Antrag Nr. 152/2003). Die Spender wurden über alle Vorgänge aufgeklärt und erteilten ihr Einverständnis.

Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen ausgeführt. Das Bandgewebe wurde von sonstigen Geweben gereinigt und wenn nötig mit der Schere in Fragmente < 2 mm zerteilt. In 20 ml Gewebeverdaumedium (steril filtriert mit Porengröße $0,2 \mu\text{m}$) wurde das Gewebe unter Agitation bei 37°C inkubiert (60 min). Nach Auflösung des Gewebes wurde die Zellsuspension bei 950 Umdrehungen ca. 7 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 20 ml sterilem PBS resuspendiert, gewaschen und unter gleichen Bedingungen erneut zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in Proliferationsmedium resuspendiert und mit einer Dichte von 200 Zellen/ cm^2 in Zellkulturflaschen ausgesät. Wichtig war hierbei der Mediumwechsel am folgenden Tag, um apoptotische Zellen und Reste des Verdauprozesses zu entfernen. Die Expansionskultur erfolgte in 175 mm^2 Zellkulturflaschen mit zwei Medienwechseln pro Woche. Nach Erreichen einer 80%-igen Konfluenz wurden die Zellen unter Verwendung von Trypsin/EDTA ($2 \text{ ml}/75 \text{ cm}^2$ bzw. $5 \text{ ml}/200 \text{ cm}^2$) abgelöst und die Zell-Trypsin-Suspension mit dem jeweils doppelten Volumen Proliferationsmedium versetzt.

Nach durchschnittlich dreifachem Passagieren war die Vermehrung der Zellen so weit fortgeschritten, dass für Versuche ausreichend Zellen zur Verfügung standen. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe des Coulter Counters Z1. Für Versuche nicht benötigte Zellen wurden von der Zellsuspension abgenommen und wie folgt kryokonserviert. Die Zellen wurden zentrifugiert und in 1,8 ml Einfriermedium, umgehend bei -80°C eingefroren und im Anschluss bald möglichst in flüssigen Stickstoff überführt.

2.9.3 Herstellung der Konstrukte für die mechanische Stimulation

2.9.3.1 Dreidimensionales Kollagen-Typ 1-Gel als Zellträger

Um zyklische Dehnung applizieren zu können, wurden die expandierten Zellen in ein dreidimensionales Kollagen-Typ-I-Gel eingesät. Da das Gel ein Zweikomponentensystem darstellte, das erst nach Mischen der beiden Anteile (Kollagengel/Neutralisationslösung) polymerisierte und somit aushärtete, konnte es in den erstellten Gussformen ausgegossen werden. Dazu wurden die Zellen mit einer Trypsin-Behandlung aus den Zellkulturflaschen abgelöst und im CoulterCounterZ1 gezählt. Die 450.000 Zellen, die pro Konstrukt (Endvolumen 3 ml) enthalten sein sollten, wurden in 1,5 ml Neutralisationslösung bei Zimmertemperatur resuspendiert. Die Suspension wurde so portioniert, dass immer sechs Gele auf einmal gegossen werden konnten. Es wurden also 9 ml Zellsuspension in einem 45 ml Zentrifugenröhrchen vorgelegt, mit 9 ml kaltem (4°C) Kollagen-Gel mit einer sterilen Pipette (25 ml) zugegeben (Verhältnis 1:1), durch mehrmaliges schnelles Auf- und Abpipettieren in Kombination mit leichtem Rühren untergemischt und zügig in Formen verteilt, bevor die Gelatinierung einsetzte. Die Konstrukte wurden 30 min im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Es wurden 2 ml Nährmedium zugegeben, nach 24 Stunden die Gießformen entnommen und 5 ml Nährmedium in jede Reizkammer zugefügt. Die so hergestellten Gele wurden darauf in den Versuchen eingesetzt. 48 Stunden nach der Aussaat wurden die ersten Reizzyklen appliziert.

2.9.3.2 Polylaktid-Fasern als Zellträger

Das Polylaktid (PLA)-Polymer wurde am ITV (Denkendorf) ausgesponnen. Es wurde durch thermoplastische Extrusion bei $180\text{--}220^{\circ}\text{C}$ erzeugt und zu einem 40-Filament Garn verstreckt. Jedes Filament hatte einen Durchmesser von $11\ \mu\text{m}$ (1,2 dtex). Die Filamente wurden texturiert, um eine Kräuselung mit ca. $100\ \mu\text{m}$ Weite zu erreichen. Das Garn wurde lose zu einem 79fachen Garn gewunden (3-4 mm Durchmesser). Die Faserbündel wurden zu doppelsträngigen Konstrukten mit 30 mm verschweißt. Es wurde eine Porosität von 90-95% erzeugt. Der Restmonomergehalt betrug weniger als 25 ppm. Die fertigen Konstrukte wurden

mit Argonplasma behandelt und anschließend plasmasterilisiert. Die inhärente Viskosität des PLA betrug 1,28 dl/g. Aus vorhergehenden Experimenten wird daher eine Degradations-Halbwertszeit von sechs Monaten erwartet¹⁰⁵.

Für die Herstellung Zell-besiedelter Biomaterialien aus PLA-Fasern wurden die Faserkonstrukte (Abbildung 12 und Abbildung 14) über Nacht in Proliferationsmedium vorkonditioniert. Das Medium wurde abgesaugt bis die Konstrukte nicht mehr rosa, sondern weiß erschienen. Die nahezu trockenen Konstrukte wurden in den Silikonreizkammern aufgespannt, 9×10^5 Zellen in je 400 μ l Proliferationsmedium resuspendiert und auf je ein Bandkonstrukt gleichmäßig aufgebracht. Dann wurden die Reizkammern für 4 h über Kopf im Brutschrank aufbewahrt, so dass die Zellen nicht auf den Schalenboden sinken konnten. Nach 4 h wurden die Reizkammern gewendet und nach acht Stunden wurden 5 ml Nährmedium pro Kammer zugegeben. Die so besiedelten Konstrukte wurden in den Versuchen eingesetzt.



Abbildung 14: texturierter, zu einem Ring verknötet und verschweisster PLA-Zellträger ohne Zellen

2.10 Mechanische Stimulation

Die Konstrukte wurden in Silikonschalen (Kollagengele) oder über spezielle PTFE/Metallaufhängungen (PLA-Fasern) im Stimulationsgerät verankert. Die Applikation zyklischer uniaxialer Dehnung erfolgte mit maximal sechs Ansätzen gleichzeitig mittels rotierenden Exzentern. Das Stimulationsgerät wurde auf 37°C vorgewärmt und die Konstrukte eingespannt und mit einer sterilen Abdeckung versehen. Für die Dauer des Versuches verblieben Proben und Gerät im jeweiligen Brutschrank. Die Reizkammern/Konstrukte wurden vor jeder Stimulation vorgespannt und danach wieder entspannt. Die einzelnen Versuche unterschieden sich in Dehnungsamplitude, Frequenz,

Dauer des Stimulationsintervalles, Zelltyp, Trägermaterial und den Abbruchzeitpunkten. In Abbildung 15 ist schematisch die Zusammensetzung der Einflussgrößen dargestellt.

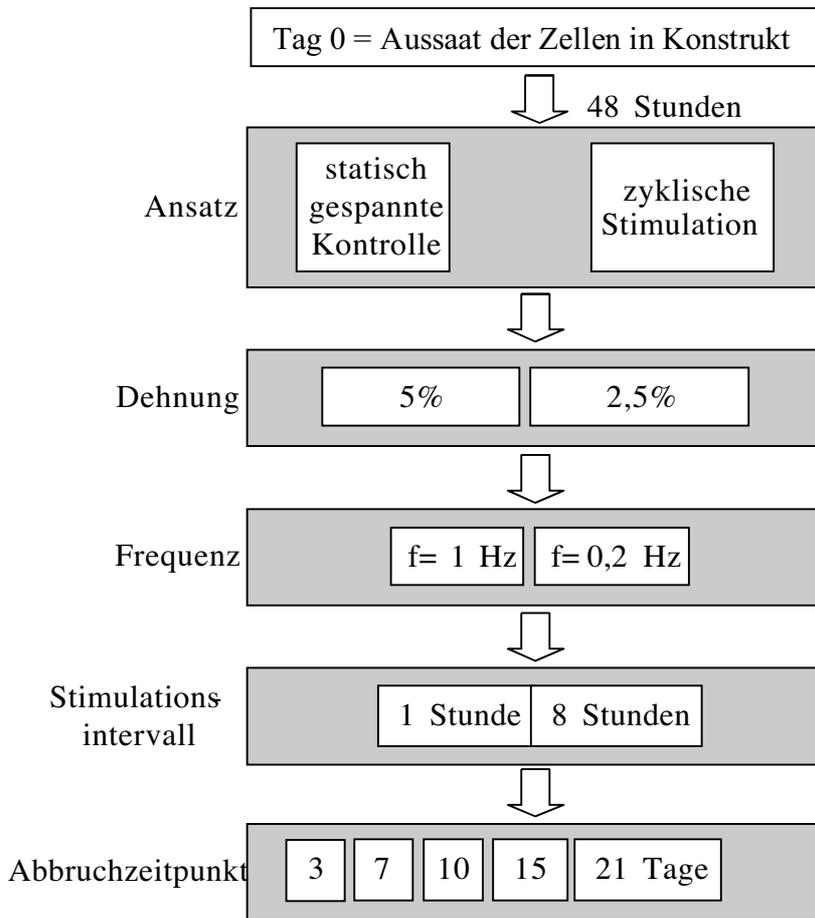


Abbildung 15: Schema der Dehnungsversuche

Die Intervallstimulation mit einer Frequenz von 1 Hz wurde als Äquivalent zur physiologischen Belastung durch den Gang gewählt. Um den Einfluss einer geringeren Frequenz zu untersuchen, wurden Versuche mit 0,2 Hz mit einer Intervalldauer von acht Stunden durchgeführt. Um den Einfluss der Dehnungsamplitude in den neuen Modellsystemen beurteilen zu können, wurden Dehnungen von 2,5% und 5% ausgetestet. An den Abbruchzeitpunkten wurden unmittelbar nach Stimulationsende die Zellen lysiert.

2.11 Nachweis der Genexpression auf mRNA-Ebene

Die Zellen haben auf mechanische Stimulation unter Umständen mit einer veränderten Transkription von Genen reagiert. Um dies zu messen, wurde die mRNA isoliert. Für die Isolation von mRNA wurden die Konstrukte unverzüglich nach dem Ende der Stimulation mit Lysepuffer versetzt und aufgearbeitet. Die Isolierung erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit (Quiagen, Hilden) nach Handbuch des Herstellers. Die isolierte und quantifizierte mRNA

wurde durch eine c-DNA Synthese nach Angaben des Herstellers (Omniscript, Qiagen, Hilden) umgeschrieben.

Für den Nachweis der Expression bestimmter Gene, beispielsweise für Matrixproteine, wurden für jedes Gen spezifische Oligonukleotide (Primer) auf der Basis publizierter Sequenzen mit Hilfe des NCBI Entrez Search System entworfen und getestet. Diese Primer wurden in der Standard-PCR oder der realtime-PCR eingesetzt, um die Stärke der Expression eines Zielgenes zu bestimmen.

Die gemessene Expression wurde entweder mit der Standard-PCR semiquantitativ als IOD auf den Expressionswert von GAPDH bezogen, oder in der real time-RT-PCR mit einer Eichgeraden (Standardreihe) des PCR-Produktes quantifiziert und dann ebenfalls auf GAPDH bezogen. Zur Quantifizierung der amplifizierten Zielsequenzen mit Hilfe der real time-RT-PCR bedurfte es Standards aller Amplifikationsprodukte, die über den Weg des Klonierens zur Verfügung stehen. Unter Verwendung des Klonierungskits TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, Karlsruhe) konnte die cDNA der mittels PCR amplifizierten Zielgene in den pCR4-TOPO-Vektor eingebaut werden. Über ein im Plasmid eingebautes Ampicillin-Resistenz-Gen konnten diejenigen Bakterien selektiert werden, bei denen die Plasmid-Aufnahme (Klonierung) erfolgreich verlaufen war. Durch Vermehrung eines positiven Klons und darauf folgende Isolation der Plasmid-cDNA stand nach produktüberprüfender Sequenzanalyse und Linearisierung ein Standard für die anschließenden quantitativen Auswertungen zur Verfügung.

2.11.1 Isolierung der mRNA aus Kollagengelen

Die Ringe wurden mit der Schere in Innen- und Außenbereiche getrennt. Nur in dem geraden Bereich zwischen den Verankerungen konnte der isolierte Einfluss von Zugdehnungen angenommen werden. Außenbereiche, die um die Verankerungen herum führten, haben ebenso Druckspannungen erfahren und wurden exemplarisch getrennt aufgearbeitet und ausgewertet. Die Gelfragmente wurden zweimal mit 5 ml PBS gewaschen, so trocken wie möglich mit 3 ml Lysepuffer bei -173°C schockgefroren und bei -80°C bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert. Die Aufarbeitung erfolgte mit dem Qiagen RNeasy-Minikit. Das Protokoll des Herstellers wurde modifiziert, um die gesamte mRNA direkt aus dem Kollagenkonstrukt isolieren zu können.

Die folgende Methode wurde für 3 ml Lysatvolumen optimiert. 3 ml des homogenisierten Lysates wurden mit 5700 μl RNase freies Wasser, 150 μl Proteaselösung (24 mg/ml) und 150 μl Kollagenase 1A-Lösung (80 mg/ml) versetzt. Nach einer Inkubation bei 37°C für 10 min

wurde der Ansatz für 3 min bei 10000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und 0,5 Volumen reinstes Ethanol zur klaren Lösung gegeben und gemischt. Die gesamte Lösung wurde durch eine RNeasy-Affinitäts-Säule gesaugt. Danach wurde die Säule mit 350 µl RW1-Puffer gewaschen, 80 µl DNase auf die Säule gegeben und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden nacheinander 350 µl RW1-Puffer, zweimal 500 µl RPE-Puffer durch die Säule gesaugt und diese anschließend 2 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Die trockene Säule wurde in ein RNase freies Sammelgefäß gestellt und die RNA mit 30 µl H₂O eluiert. Die so isolierte RNA wurde bei -80 °C gelagert und für die cDNA-Synthese eingesetzt. Die Quantifizierung der RNA erfolgte über die Bestimmung der Absorption bei 260 und 280 nm und die Abschätzung der Reinheit bei 260 / 280 nm im Photometer.

2.11.2 Isolierung der mRNA aus Polylaktid-Scaffolds

Die Konstrukte wurden zweimal mit 5 ml PBS gewaschen. Die Flüssigkeit wurde behutsam aus den Fasern mit einer sterilen Glaspipette abgesaugt und die Innenbereiche mit einer Schere herausgetrennt und in eine Qia-Schreddersäule überführt. Es wurden 350 µl Lysepuffer auf die Fasern aufgetropft, abzentrifugiert bzw. homogenisiert (1500x, 2 min), erneut aufgetropft und abzentrifugiert. Aus dem so gewonnenen Lysat wurde gemäß der Herstelleranweisung des Qiagen RNeasy-Minikits die gesamte mRNA isoliert.

Das Lysat wurde in ein neues Gefäß überführt und 1 Volumen 70% Ethanol zur klaren Lösung gegeben und gemischt. Die gesamte Lösung wurde durch eine RNeasy-Affinitäts-Säule gesaugt. Danach wurde die Säule mit 350 µl RW1-Puffer gewaschen, 80 µl DNase auf die Säule gegeben und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden nacheinander 350 µl RW1-Puffer, zweimal 500 µl RPE-Puffer durch die Säule gesaugt und diese anschließend 2 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Die trockene Säule wurde in ein RNase freies Sammelgefäß gestellt und die RNA mit 30 µl H₂O eluiert. Die so isolierte RNA wurde bei -80 °C gelagert und für die c-DNA Synthese eingesetzt. Die Quantifizierung der RNA erfolgte über die Bestimmung der Absorption bei 260 und 280 nm und die Abschätzung der Reinheit bei 260 / 280 nm im Photometer.

2.11.3 cDNA-Synthese

Zur Untersuchung der Expression von Genen mittels PCR wird die mRNA als Matrize für die Synthese einer complementary-DNA (cDNA) benutzt, da diese gegenüber einem Abbau in Lösung wesentlich stabiler ist als die mRNA. Für die Synthese wird das Enzym Reverse Transkriptase benötigt, welches ursprünglich aus Retroviren isoliert wurde. Dieses Enzym

besitzt eine RNA-abhängige DNA-Polymeraseaktivität. Bei der Synthese lagert sich ein nur aus Thyminbasen bestehender Primer (Oligo-dT-Primer) an das Polyadenylierungsende der mRNA an und wurde durch die reverse Transkriptase verlängert.

Es wurde eine cDNA Synthese mit dem Omniscript-Kit nach Angaben des Herstellers durchgeführt (Qiagen, Hilden). Für die Reaktion wurde ein 20 µl-Ansatz pipettiert. Zuerst wurde die RNA-Lösung (1 mg) mit Wasser entsprechend für den 20 µl-Ansatz auf ein Volumen von 12 µl aufgefüllt und dann 5 min bei 65 °C im PCR Gerät denaturiert. Zum Reaktionsansatz wurden 2 µl Reaktionspuffer (10 fach), 2 µl dNTPs (5 mM), 1 µl RNase Inhibitor (10 U/µl; Sigma: 40 U/ml), 1 µl Oligo-dT-Primer (0,1 mM), 1 µl Random-Hexamer-Primer (1 mM) und 1 µl Omniscript (4 U) pipettiert und sorgfältig gemischt. Die cDNA Synthese erfolgte im PCR Gerät (Robocycler 96 gradient Combo, StratageneAmsterdam, Niederlande) erst 60 min bei 37 °C, dann 60 min bei 42 °C.

2.11.4 Gelelektrophorese

Allgemein wird die elektrophoretische Auftrennung von Nucleinsäuren für die Analyse von linearen DNA-Fragmenten bzw. superhelikaler Plasmid-DNA und zur präparativen Isolierung von DNA Fragmenten verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurde die Gel-Elektrophorese genutzt, um die bei der Standard-PCR und real time-RT-PCR erhaltenen Produkte auf ihre Reinheit zu überprüfen bzw. mittels der IOD-Messung zu quantifizieren. Die Überprüfung der PCR-Produkte durch Gel-Elektrophorese zeigt, wie spezifisch die Reaktion abläuft. Beim Erhalt mehrerer Banden müssen entweder das PCR-Produkt aufgereinigt oder die PCR-Bedingungen optimiert werden. Für die PCR-Produkte, deren Größe zwischen 200 bp und 300 bp lag, wurde ein 1,5%iges Agarose-Gel hergestellt. Dafür wurden 1,5 g Agarose abgewogen und mit 100 µl TAE in der Mikrowelle für 2 min aufgeköcht bis die Agarose gelöst war. Nach Abkühlen der Agarose-Lösung wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,1 mg/ml zugegeben. Die Agarose wurde dann nach Einsetzen des gewünschten Gel-Kamms in den Gelschlitten gegossen. Nach vollständigem Gelieren wurde der Gelschlitten mit dem Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt und das Gel mit Elektrophoresepuffer bedeckt. Die Proben wurden mit dem Gel-Lade-Puffer (6 fach) gemischt und nach vorsichtigem Auftragen von 10 µl Probenvolumen in die Geltaschen bei Elektrophoresebedingungen von ca. 85 V für 1 h aufgetrennt. Die DNA Banden konnten unter UV-Licht mit dem Geldokumentationsgerät (Gel Doc 2000, Biorad, München) sichtbar gemacht werden.

2.11.5 Amplifikation der PCR-Produkte in Bakterien für RT-PCR

Standardreihen

Mit Hilfe eines Klonierungskits (TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen, Karlsruhe) wurde die cDNA der einzelnen Zielgene, die mit Hilfe spezifischer Primerpaare durch PCR amplifiziert wurde in einen Plasmid-Vektor (pCR4-TOPO) eingefügt (kloniert). Die isolierte Plasmid-Vektor-DNA kann dann, nach Überprüfung auf das enthaltene Insert, als Standard verwendet werden. Das Plasmid, in das das spezifische Amplifikationsprodukt kloniert wurde, enthält ein Ampicillin-Resistenzgen. Nach Aufnahme des Plasmides in Bakterien (Transformation der Bakterien in sogenannte „positive Klone“) wurden diese gegen Ampicillin resistent und konnten dann auf einem ampicillinhaltigen Nährboden von negativen Klonen, die das Plasmid nicht aufgenommen hatten, unterschieden werden. Die Plasmid-DNA der positiven Klone wurde nach ihrer Vermehrung und Isolation durch Restriktions- und Sequenzanalyse auf den Einbau des Amplifikationsproduktes hin kontrolliert. Der Originalklon mit dem Insert wurde nach Vermehrung als Plasmid-DNA-Standard für die real time-RT-PCR verwendet. Dazu wurde das Plasmid noch durch ein spezifisches Restriktionsenzym, das das enthaltene Insert nicht schneidet, linearisiert. Ausgangspunkt der Klonierungsreaktion war die Amplifikation des jeweiligen Gens durch Polymerase Kettenreaktion unter Einsatz des PCR-Kits HotStarTaq Master Mix Kit nach Herstellerangaben (Quiagen, Hilden):

Für die PCR wurde 1 μ l eines adäquaten unverdünnten cDNA-Mixes mit 10 μ l HotStarTaq Master Mix, 2 μ l Primermix (1:10) und 7 μ l Wasser vermischt und einer Polymerase Kettenreaktion unterworfen. Um Größe und Reinheit des PCR-Produkts und damit den Spezifitätsgrad der abgelaufenen Reaktion vor weiteren Arbeitsgängen überprüfen zu können, wurde die Probe einer elektrophoretischen Auftrennung in einem 2%-igen Ethidiumbromidhaltigem Agarosegel unterzogen. Die PCR-Produkte wurden vor dem Auftragen mit 4 μ l Ladepuffer (6x) vermischt, Aliquots à 10 μ l neben einer 100bp-Leiter zweifach aufgetragen und anschließend bei 85 V getrennt. Mit Hilfe von UV-Licht waren die Banden im Geldokumentationsgerät sichtbar, Größe und Reinheit des Produkts wurden überprüft, bevor das DNA-Fragment aus dem Agarosegel ausgeschnitten wurde. Durch Zugabe von 300 μ l QG Puffer pro 100 mg Gel und Inkubation bei 50°C (10 min) wurden die Gele aufgelöst und anschließend mit einem Volumenteil Isopropanol (100%) versetzt. Die Lösung wurde auf eine Quiaquick-Säule aufgetragen und zunächst mit QG Puffer (500 μ l, 10000x, 1 min), dann mit PE Puffer (750 μ l, 5 min Inkubation bei RT) (zweimal 10000x, 1 min) gespült, bevor die cDNA mit 30 μ l Wasser nach einminütiger Inkubation eluiert wurde (10000x, 1 min).

2.11.6 Klonierungsreaktion

Danach wurde die Klonierungsreaktion durchgeführt. Für jeden Ansatz wurde 1 μ l TOPO-Vektor (pCR 4 -TOPO), 1 μ l PCR-Produkt, 1 μ l Salzlösung und 2 μ l steriles H₂O zu einem Reaktionsansatz zusammenpipettiert und vorsichtig gemischt. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur. Für die sich anschließende Transformation wurde der Reaktionsansatz auf Eis gestellt oder über Nacht bei –20 °C gelagert.

2.11.7 Transformation

Der Klonierungsansatz wurde nun mit dem Bakterienstamm zur Transformation gemischt. Dafür wurde der kompetente E. coli Bakterienstamm (Top10 one shot chemical competent E. coli) vorsichtig auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 2 μ l des Klonierungsansatzes zu dem Bakterienstamm und vorsichtigem Mischen wurde der Reaktionsansatz für 30-45 s bei 42 °C im Heizblock inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend sofort auf Eis überführt und 250 μ l SOC-Medium zugegeben. Der Ansatz wurde dann bei 37 °C und horizontalem Schütteln bei 200 rpm im Schüttler 1 h inkubiert. 50 μ l der transformierten Bakterien wurden anschließend auf vorgewärmten LB-Platten mit Ampicillin mit einem sterilen Drigalskispatel ausplattiert. Die Ansätze wurden im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

2.11.8 Herstellung der Agar-Platten und des LB-Mediums

Für die Herstellung des LB-Mediums wurden 10 g Bactotrypton, 5 g Hefeextrakt und 10 g NaCl mit 1 l destilliertes Wasser (pH 7,0) gemischt und autoklaviert. Für die Herstellung der Agarplatten wurden zu dem gleichen Ansatz noch 15 g Bacto-Agar zugegeben und der Ansatz ebenfalls autoklaviert. Nach Abkühlen des Mediums wurde das Antibiotikum (50 μ g/ml) zur selektiven Anreicherung der Ampicillin-resistenten Bakterienklone zugegeben.

Der Agar wurde in sterilen Petrischalen gegossen und anschließend zum Trocknen unter der Sterilwerkbank mit halb geöffnetem Deckel 1 Stunde stehen gelassen. Die Platten konnten danach zugedeckt, umgekehrt, in Plastiktüten verpackt im Kühlschrank gelagert werden.

2.11.9 Vorkultur der Bakterien

Um Klone der erfolgreich transformierten Bakterien zu vermehren, wurde von jeder Platte ein Klon vermehrt. Dafür wurde ein steriles Röhrchen mit 5 ml LB-Medium (Kapitel 2.11.8) gefüllt und in der entsprechenden Endkonzentration von 50 μ g/ml Ampicillin zugegeben. Mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze wurde je eine Kolonie von der LB-Platte in ein Röhrchen

mit LB-Medium überführt. Die Kulturen wurden bei 37°C unter Schütteln bei 250 rpm über Nacht inkubiert.

2.11.10 Überprüfung auf das enthaltene Insert

Um die erfolgreiche Klonierung zu überprüfen, wurde mittels der spezifischen Primerpaare eine PCR (Kapitel 2.11.14) mit 1 µl Bakteriensuspension durchgeführt und in einem Agarose-Gel aufgetrennt.

2.11.11 Fortsetzung der Bakterienzucht

Mit erfolgreich klonierten Vorkulturen wurden 50 ml LB-Medium in einem Erlenmeyerkolben mit Schikane angeimpft. Die Ansätze wurden bei 37 °C und 250 rpm im Wärmeschüttler für 12-16 Stunden inkubiert. Aus diesen Bakterien wurde dann am nächsten Tag die Plasmid-DNA isoliert.

2.11.12 Isolation der Plasmid-DNA aus größeren Volumen

Die Plasmid-Präparation wurde mit Hilfe eines Kits (Plasmid Midi Kit, Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Kulturen wurden im 50 ml Tube bei 4 °C 15 min lang bei 10.000 x g abzentrifugiert und der Überstand dekantiert. Anschließend wurde das Pellet in 4 ml Puffer P1 vollständig resuspendiert. Zur Lyse der Zellen wurden 4 ml Puffer P2 zugegeben und durch mehrmaliges Umdrehen des Tubes der Ansatz gemischt. Danach wurde der Ansatz bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert. Zur Neutralisierung des Reaktionsansatzes wurden 4 ml Puffer P3 zugegeben und das Lysat sofort vorsichtig gemischt. Dieses Lysat wurde dann in Filtereinheiten pipettiert und bei Raumtemperatur für 10 min inkubiert. Nach Filtrieren der Ansätze wurde das Filtrat auf die Qiafilter-Tip-100-Säule, die zuvor mit 4 ml Puffer QBT äquilibriert wurde, pipettiert. Die Säulen, an die die Plasmid DNA gebunden hatte, wurden zweimal mit 10 ml Puffer QC gewaschen. Anschließend wurde die DNA mit 5 ml Puffer QF in ein 15 ml - Tube eluiert. Das Präzipitieren der DNA erfolgt dann mit 3,5 ml (0,7 Volumen) Isopropanol bei Raumtemperatur. Nach kurzem Mischen wurde der Ansatz bei 15.000 g für 30 min bei 4 °C abzentrifugiert und das Pellet mit 2 ml 70%igem Ethanol gewaschen. Erneut wurde mit 15.000 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet für 10 min luftgetrocknet und dann in einem geeignetem Volumen eines Puffers (z.B. 10 mM Tris-HCl pH 8,5) oder in H₂O aufgenommen. Um die DNA zu quantifizieren wurde eine geeignete Verdünnung im Photometer bei 260 nm (A_{260}) gemessen. Für jeden Ansatz wurde sowohl eine DNA-Sequenzierung in Auftrag gegeben (MWG AG Biotech), als auch eine PCR mit

geschnittenem und ungeschnittenem Plasmid durchgeführt, um das Produkt auf Größe und Reinheit zu überprüfen. Zusätzlich wurde die Funktionalität der Standards für real time-RT-PCR im iCycler überprüft.

2.11.13 Verdau der Plasmid-DNA

Um das Plasmid für die Standardreihe in der real time-RT-PCR einzusetzen, muss das Plasmid linearisiert werden. Das geschieht mit Restriktionsenzymen, die mittels bestimmter Erkennungssequenzen die DNA schneiden. Die Restriktionsenzyme wurden so ausgewählt, dass die Schnittstelle im Plasmid und nicht Insert liegt. Für den Restriktionsansatz wurden bis zu 10 μ g Plasmid-DNA mit 1 μ l Enzym (10 U / μ l), und 5 μ l Reaktionspuffer (10 fach) gemischt und mit H₂O auf 50 μ l Endvolumen aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde für 1 h bei 37 °C im Heizblock inkubiert. Von dem Ansatz wurden Verdünnungen bis 10⁸ fach erstellt und bei -20 °C gelagert. Diese Verdünnungsreihe diente dann als Standardreihe.

2.11.14 Standard-PCR

Für die Amplifikation spezifischer Gene wurde die Polymerase Kettenreaktion (HotStarTaq Master Mix Kit, Quiagen, Hilden) durchgeführt. Die amplifizierten Zielgene können z.B für Klonierungsreaktionen weiter verwendet werden. Für die PCR wurde nach Angaben des Herstellers 1 μ l (10 –100 ng) DNA, 5 μ l PCR-Puffer (10 fach), 0,5 μ l dNTPs (50 mM), 1 mM Primer und Polymerase (1 U/ μ l) zusammenpipettiert. Der Ansatz wurde mit H₂O auf 20 μ l aufgefüllt. Die Ansätze wurden durch Schnippen gemischt, kurz abzentrifugiert und zur Amplifikation für 32 Zyklen in das PCR-Gerät gestellt. Es wurde das folgende Thermoprotokoll verwendet: Initiale Enzymaktivierung von 14 min bei 95 °C, Denaturierung von 1 min bei 94 °C, *Annealing* von 45 s bei 60 °C, Extension 1 min bei 72 °C und eine finale Extension für 20 min bei 72 °C. Anschließend wurden Aliquots (10 μ l) der erhaltenen PCR-Produkte nach Anleitung auf das vorbereitete 2%ige Agarose Gel aufgetragen und bei 85 V aufgetrennt.

2.11.15 Polymerase-Ketten-Reaktion (real time-RT-PCR)

Die Besonderheit der real time-RT-PCR liegt in der Möglichkeit, die Menge des amplifizierten Produkts in Echtzeit zu verfolgen und dessen Zunahme über einen DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff (SYBR Green) zu messen. Die absolute Quantifizierung erfolgte mit Hilfe der klonierten Standards (2.11.5), die zusammen mit den zu untersuchenden Proben amplifiziert wurden. Um die Konzentration der Ziel-DNA in den Proben bestimmen

zu können, wurden diese stets auf das Housekeeping-Gen GAPDH (Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) normiert.

Für die Auswertung mittels real time-RT-PCR wurde die cDNA mit Wasser 1:10 verdünnt eingesetzt. Nach Angaben des Herstellers wurde der Platinum Sybr Green Supermix (Invitrogen, Karlsruhe) für die Herstellung des Reaktionsansatzes (25 μ l/Well) verwendet. Dazu wurde entsprechend der Anzahl an Wells (+ 10%) ein Mix aus Platinum Sybr Green Mix (12,5 μ l/Well), Fluorescein 1 μ M (0,25 μ l/Well), Wasser (8,25 μ l/Well) und Primer-Mix (2 μ l/Well) hergestellt. Der Primer-Mix wurde für jede Messung nach dem Schema 1 μ l forward Primer + 1 μ l reverse Primer + 18 μ l Wasser in der jeweils benötigten Menge frisch hergestellt. Nach Mischen der Lösung wurden 23 μ l des Mixes pro Well vorgelegt und um 2 μ l Versuchs-cDNA, Standard-cDNA oder Wasser ergänzt, wobei alle Proben in Doppelbestimmung aufgetragen wurden. Für die real time-RT-PCR im i-Cycler wurde das UFB-Thermoprotokoll eingesetzt (Tabelle 9).

Tabelle 9: UFB Thermoprotokoll der real time-RT-PCR

Schritt	Zyklenzahl	Temperatur	Dauer
1		95°C	2 min
2	38	90°C 60°C	30 s 50 s
3		95°C	1 min
4		60°C	1 min
5	76	60°C	8 s
6		15°C	Ende

2.12 Statistik

Zur statistischen Auswertung wurde der Wilcoxon-Vorzeichen-Rangsummen-Test verwendet. Grundsätzlich wurde die mittels real time-RT-PCR ermittelte Expression ausgewählter Gene auf die Expression des Housekeeping-Gens GAPDH normiert. Um die Genexpression von stimulierten Ansätzen und Kontrollansätzen vergleichen zu können, wurde die Differenz zwischen den Genexpressionen von Stimulationen und Kontrollen berechnet und mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rangsummen-Tests bewertet. Die Nullhypothese nahm den Wert Null an, d. h. falls kein Unterschied in der Genexpression von stimulierten Ansätzen und Kontrollansätzen vorhanden war, wäre eine Differenz von Null zu erwarten gewesen. Im Falle einer stimulationsbedingten Hemmung der Expression wurden Werte kleiner Null, im Falle einer Erhöhung der Expression Werte größer Null ermittelt. Wurde die für die Durchführung des Wilcoxon-Vorzeichen-Rangsummen-Tests erforderliche Mindestanzahl von fünf Versuchen nicht erreicht, so wurde auf eine statistische Auswertung verzichtet und die

Messwerte mittels einer Median-Minimum-Maximum-Darstellung gezeigt. Bei orientierenden Versuchen wurden teilweise die Ergebnisse einzelner Spender als Absolutwerte gezeigt. Bei Versuchen mit sechs oder mehr Spendern wurde zur Darstellung der Ergebnisse der *box-plot* gewählt. Der *box-plot* zeigt den größten und den kleinsten Messwert (als senkrechte Linie), das Vertrauensintervall (als Box) und den Median (als waagrechten Balken).

2.13 Morphologische Untersuchungsmethoden

2.13.1 Histologische Schnitte und Färbungen

Die Zell-besiedelten Konstrukte wurden hierzu in Formalin 4% fixiert und über einen Alkoholgradienten entwässert (Ethanol 70% 1x, 80% 1x, 90% 1x, 100% 3x, Xylol 2x für jeweils 2 h). Nach Einbettung in Paraffin (53°C, 3 h) konnten Dünnschnitte angefertigt werden, die anschließend folgenden Färbeprozess durchliefen. Vor der Anfärbung war es nötig, mittels Hitze (37°C/10 h oder 70°C/15 min) und anschließenden Waschgängen das Paraffin zu entfernen. Zum Waschen wurden die Proben zunächst zweimal für je 5 min in Xylol gebracht, bevor sie eine absteigende Alkoholreihe durchliefen (Ethanol 100% 2x, 96% 2x, 70% 1x für je 5 min). Die Proben wurden mit destilliertem Wasser gewaschen, mit Mayers Hämalaun im Dunkeln inkubiert (5 min) und anschließend unter fließendes Leitungswasser gehalten (10 min), wodurch die Blaufärbung zustande kam. Um die Reaktion zu beenden, wurden die Proben in destilliertes Wasser eingebracht (5 min), so dass die Inkubation mit Eosin 0,5% folgen konnte (5 min im Dunkeln). Die Schnitte wurden erneut mit destilliertem Wasser gewaschen, über einen aufsteigenden Alkoholgradienten entwässert (Ethanol 70% 1x, 96% 1x, 100% 2x, Xylol 2x für je 5 min) und versiegelt (Merckoglas).

2.13.2 Rasterelektronenmikroskopie

Bei der Rasterelektronenmikroskopie (REM) wurde mittels einer beheizten Kathode ein Elektronenstrahl erzeugt, der Punkt für Punkt über die Probenoberfläche geführt wurde. Die von diesen Punkten gestreuten Elektronen wurden von einem Detektor gesammelt und das so entstehende Signal auf einer Bildröhre abgebildet. Die Proben wurden in 2,5% Glutaraldehyd, 0,1 M Phosphatpuffer und 1% Saccharose bei pH 7 für ca. 12h fixiert und dann dreimal für 5 min in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe (30%, 50%, 70% und 90% Ethanol für je 30 min, je nach Größe des Konstruktes auch länger) entwässert. Schließlich wurden sie in 100% Ethanol dreimal 30 min eingelegt. Danach erfolgte die kritische Punkt Trocknung bei 37 °C und 75 Bar. Nachdem die Proben getrocknet waren, wurden diese mit einer 20 nm Goldpalladium-Schicht bedampft um die

Probenoberfläche leitfähig zu machen. Die Präparate wurden dann mit dem Elektronenmikroskop (DSM 962, Zeiss, Oberkochen) betrachtet und dokumentiert.

2.14 Immunhistologie

2.14.1 Charakterisierung der Zellen anhand der Epitope der Zellmembran

Durch den Nachweis bestimmter Oberflächenmarker (Tabelle 1) wurden die aus dem Knochenmark isolierten hMPC charakterisiert. Um die Oberflächenmarker nachzuweisen, wurde ein *Vector Red Alkaline Phosphatase Substrate Kit I* verwendet. Die isolierten hMPC der Spender wurden in Stichproben charakterisiert. Die hMPC wurden für den Nachweis der Oberflächenmarker für 24 h auf Objektträgern kultiviert und mit PBS gewaschen und anschließend 10 min mit $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ kaltem Methanol fixiert. Anschließend wurden die Proben dreimal mit PBS gewaschen. Zwei Stellen für die Negativkontrolle und den zu untersuchenden Oberflächenmarker wurden mit einem Fettstift umkreist. Dort wurden 150 ml Primärantikörper (Verdünnung nach Angaben des Herstellers) aufgetragen und 60 min in der feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit TBS gewaschen. Nun wurden 150 ml Sekundärantikörper aufgetropft und 30 min in der feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurde wieder dreimal mit TBS gewaschen. Danach wurde das Chromogen Konjugat nach Angaben des Herstellers hergestellt. 150 ml dieses Chromogenansatzes wurden auf die markierten Stellen gegeben und 20 min unter dem Mikroskop inkubiert, um die Reaktion zu verfolgen. Die positiven Zellen färbten sich rötlich. Anschließend wurde wieder dreimal mit TBS gespült. Bei schlechten Kontrasten wurde eine Gegenfärbung mit Methylgrün durchgeführt. Dazu wurden die Objektträger 3 min in ein Behältnis mit Methylgrün getaucht und anschließend zweimal mit 100%igem Ethanol, zweimal mit 95% igem Ethanol und zuletzt zweimal mit Xylol gewaschen. Die Objektträger wurden anschließend zum Trocknen hochkant auf eine Serviette getupft bis keine Feuchtigkeit mehr vorhanden war. Anschließend wurden die Objektträger mit Merckoglas und Deckglas konserviert.

2.14.2 Proteinfärbung nach der ABC Methode

Die Proben wurden wie folgt fixiert, geschnitten, gefärbt und ausgewertet.

Die Proben der Kollagen-Typ-I-Gel-Konstrukte wurden in Methanol fixiert (erst 70% dann 100%), danach in einer Zucker-Lösung inkubiert (5% Saccharose in PBS). Das Schneiden der Proben wurde bei -20°C in einem Kryostaten durchgeführt und $10\mu\text{m}$ dicke Schnitte erzeugt.

Die Schnitte wurden auf Objektträger platziert und die anzufärbenden Bereiche mit Dakostift umrandet. Nach einer Rehydrierung in PBS+Tween (0,1% Tween 20, 3x5min waschen) wurden einige Schnitte mit Chondroitinase behandelt, um die Antigen-Epitope freizulegen (bei Proben für: Kollagen-Typ-I, Typ-III, Versican, Tenascin, Decorin.). Für den Nachweis der Proteine pro-Kollagen-Typ-I, Kollagen-Typ-IV, Fibronectin, Stro1, OSF2, Kontrolle erfolgte keine Chondroitinase Behandlung. Der Waschschrift wurde wiederholt und die Schnitte in Pferdeserum (60min, RT) inkubiert (Blockierung unspezifischer Ig-Bindungsstellen mit Pferdeserum, da der biotinylierte Sekundärantikörper aus dem Pferd stammt). Nach diesem Schritt wurde nicht gespült. Es wurden darauf die Färbereaktionen durchgeführt (Tabelle 10), wobei nach jedem Schritt ein Waschschrift von 3x5min in PBS/Tween folgt:

Tabelle 10: Ablauf des Proteinnachweises mit Antikörpermarkierung

1.	Zugabe des Primärantikörper, Inkubation 30min bei RT
2.	Inkubation mit biotinyliertem sekundären Antikörper (Vectastain ABC Kit Elite, 30min, RT).
3.	Inkubation 30 min RT mit frisch angesetzte Streptavidin-Biotin Komplex (Vectastain ABC Kit Elite)
4.	Inkubation mit Substrat-Chromogen-Lösung bis gewünschte Farbintensität erreicht war (hier DAB Färbung)

Die Präparate wurden mit DPX-Mountant (Fluka 44581) versiegelt. Für die Aufnahmen wurden repräsentative Ausschnitte mit dem Lichtmikroskop (Zeiss Axiophot) und der Axiovision LE Software dokumentiert.

3 Ergebnisse

3.1 Vorversuche

3.1.1 Immunhistologische Charakterisierung der hMPC

Um die Qualität und Reinheit der isolierten hMPC zu überprüfen wurden die hMPC auf ihre Progenitor-typischen Oberflächenantigene hin analysiert. Wir konnten in regelmäßigen Stichproben verifizieren, dass die kultivierten hMPC für die Oberflächenantigene CD9, CD90, CD105, CD166 und Stro-1 positiv waren.

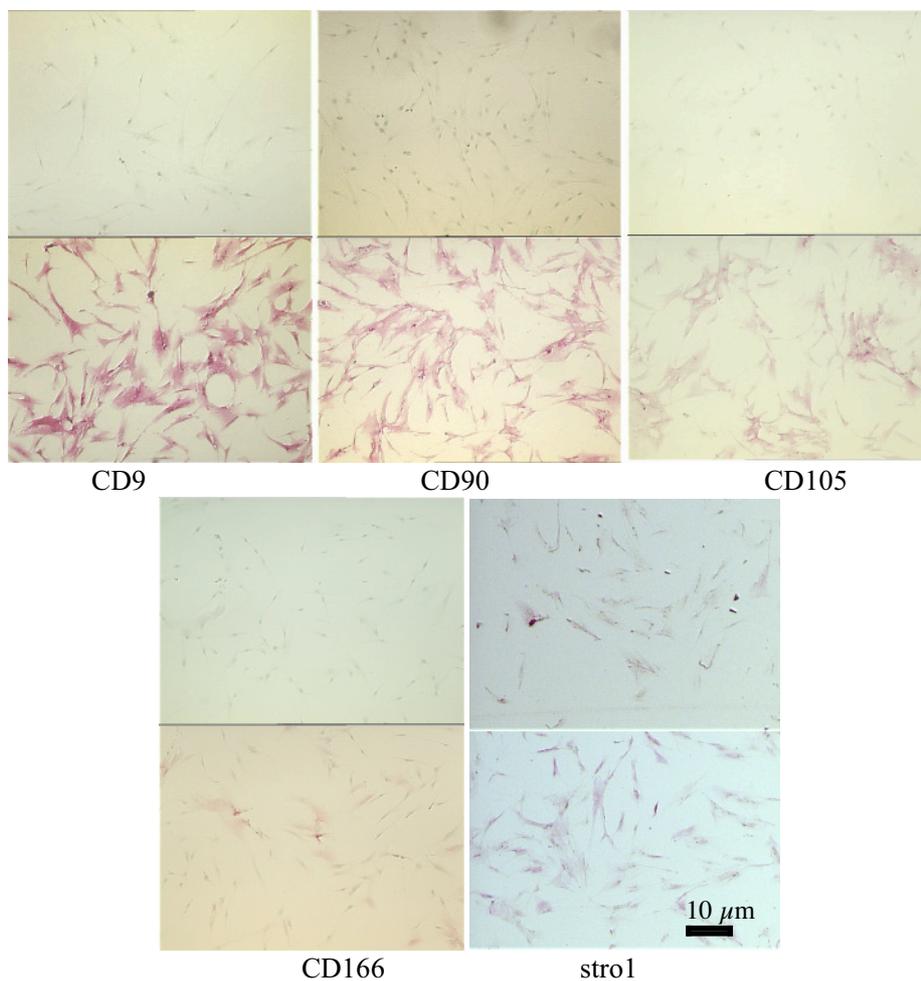


Abbildung 16: Markierung hMPC-typischer Oberflächenantigene mit monoklonalen Antikörpern an isolierten hMPC auf Glasobjektträgern

3.1.2 Kollagen-Typ-I-Gel als Zelltäger

Um die Beeinflussung von hAACL und hMPC in Kollagen-Typ-I-Gelen durch die Applikation uniaxialer Dehnungen zu untersuchen, wurde eine neue, ringförmige Konstrukt-Geometrie entwickelt (Abbildung 17). Für die Beurteilung der Eignung der neuen Geometrie

und der Kollagen-Typ-I-Matrix wurden morphologische, zellbiologische sowie molekularbiologische Analysen durchgeführt. Die neuen Ring-Gele wurden mit Gelen in 6-well-Platten und den bereits in unserer Arbeitsgruppe etablierten Rechteck-Gele verglichen, um negative Beeinflussungen durch die neue Ring-Geometrie auszuschließen.

3.1.2.1 Gelkontraktion

Bei der Kultivierung der hMPC- und hAFLC-besiedelten Kollagen-Typ-I-Gele konnte eine Kontraktion mit einem erheblichen Volumenverlust beobachtet werden. Die unverankerten Gele, wie 6-well-Geometrie oder freischwimmende Ring-Gele, zeigten die stärksten Schrumpfungen (Abbildung 17, links oben und rechts unten). Die Kontraktion bewirkte eine Verdichtung der Matrix hauptsächlich in den Rand- und Verankerungsbereichen. Die Rechteck-Gele zeigten eine starke Einschnürung quer zur Verankerungsrichtung sowie eine starke Kondensation um die Verankerungsnoppen und in den Randbereichen (Abbildung 17, unten links). Durch die Zell-bedingte Kontraktion wurden in den Rechteck-Geometrien multidirektionale statische Spannungen in den Konstrukten aufgebaut. In der Ring-Geometrie konnte sich die statische Spannung zwischen den Verankerungen nur uniaxial entlang des linearen Abschnittes aufbauen. Auch in den Ring-Gelen konnte eine verstärkte Kondensation der Matrix um die Verankerungsnoppen gefunden werden. In dem linearen Abschnitt zwischen den Verankerungen war die Kondensation jedoch immer homogen (Abbildung 17, oben rechts).

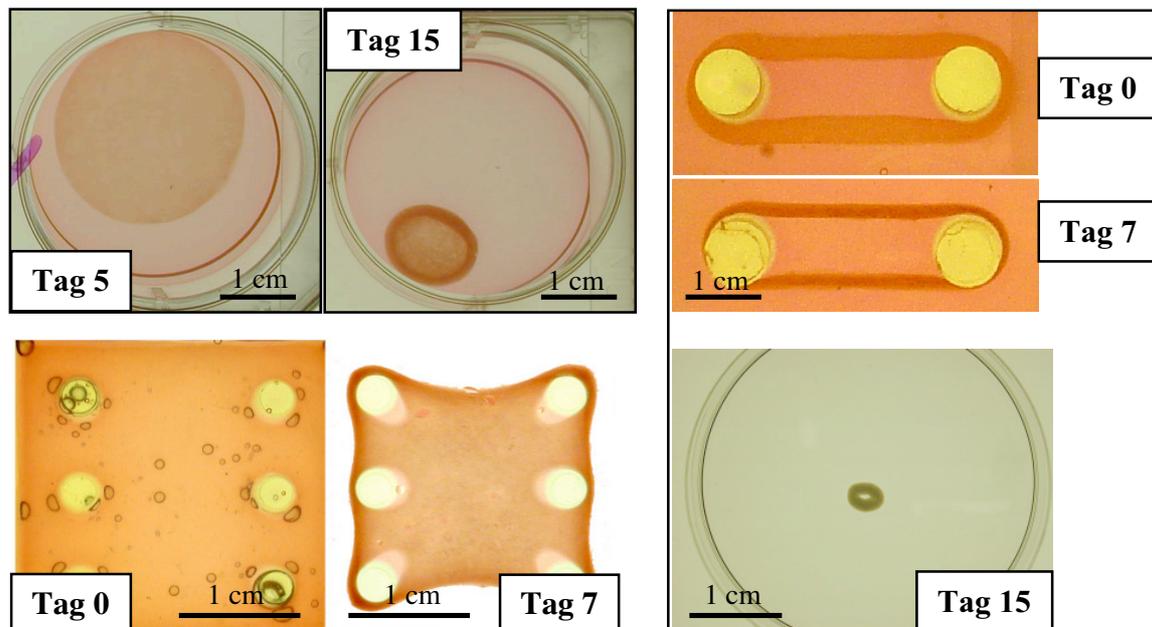


Abbildung 17: Zellbedingte Kontraktion der Kollagen-Gel-Geometrien. 6-well (links oben); Rechteck-Gel (links unten); Ringe (rechts), freischwimmender Ring in 6-well (rechts unten)

3.1.2.2 Rasterelektronenmikroskopie

Die morphologische Untersuchung mittels Rasterelektronenmikroskopie zeigte eine gute Integration beider Zelltypen in die Gel-Matrix. Die Zellen hatten eine flache Morphologie. In den verschiedenen Zell-Gel-Konstrukt-Geometrien konnten keine Unterschiede der Zell-Morphologie nach Besiedlung mit hMPC oder hACLIC nachgewiesen werden. Auf den Oberflächen der Konstrukte bildeten beide Zelltypen einen dichten, flächigen Bewuchs. Häufig konnte eine geschlossene Zellschicht gefunden werden, welche die Konstrukte vollständig umgab (Abbildung 18).

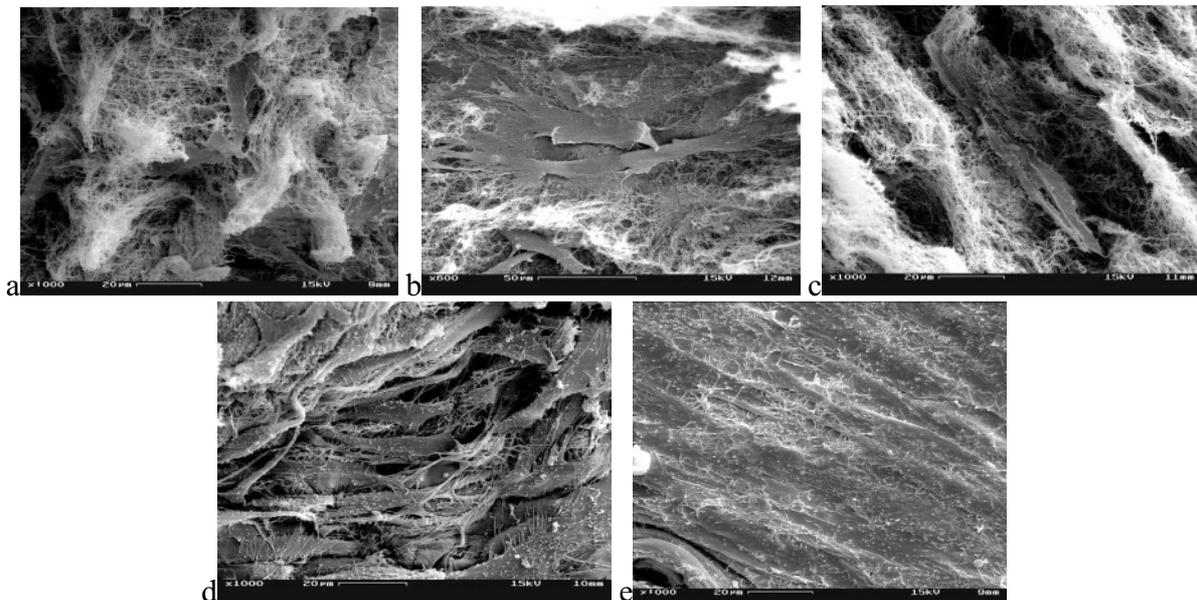


Abbildung 18: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme Zell-besiedelter Kollagen-Typ-I-Gele mit verschiedenen Konstrukt-Geometrien und Zelltypen (hMPC, a-c; hACLIC, d-e). 6-well, Gel-Inneres (a); Rechteck-Gel, Gel-Inneres (b); Ring, Gel-Inneres (c); Rechteck-Gel, Gel-Oberfläche (d); Ring, Gel-Oberfläche (e)

3.1.2.3 histologische Schnitte und Färbungen

Um die Verteilung der Zellen zu prüfen, wurden HE-gefärbte Parafinschnitte lichtmikroskopisch ausgewertet. Unabhängig von der Konstruktgeometrie waren die Zellen homogen verteilt. Es wurde eine inhomogene Dichte der Matrix gezeigt (Abbildung 19). Vor allem in frisch hergestellten Konstrukten war erkennbar, dass die überwiegend lose Packung der Kollagen-Fibrillen von deutlich dichteren Arealen durchsetzt war. Die Organisation der Matrix nach längerer Kultivierung war meist dichter, da die Matrix durch die eingebetteten Zellen kontrahiert und verdichtet wurde (Abbildung 19 a; Abbildung 17). Auch in den histologischen Schnitten konnte eine Zellschicht an der Oberfläche der Gele nachgewiesen werden (Abbildung 19 c).

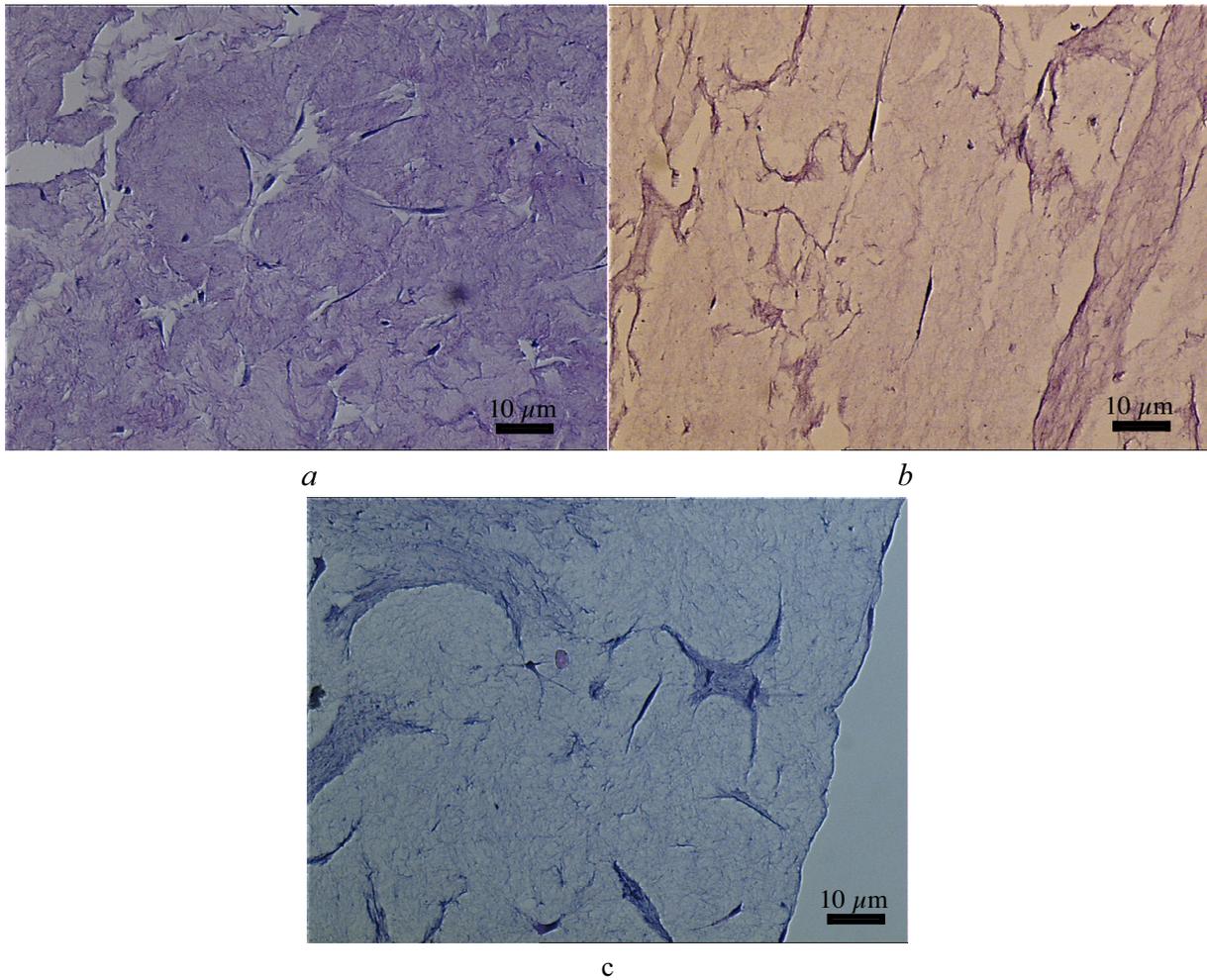


Abbildung 19: HE-Färbungen von hACLc-besiedelten Kollagen-Typ-I-Gelen (Paraffinschnitte). 6-well-Geometrie (a); Rechteck-Geometrie (b); Ring-Geometrie (c)

Um die Genexpression der hMPC ergänzend zur mRNA-Analyse auf Proteinebene zu untersuchen, wurden Gefrier-Schnitte besiedelter Ring-Gele nach 21 Tage unter statischen Kulturbedingungen mit Antikörpern gegen Pro-Kollagen-Typ-I, Kollagen-Typ-I, Kollagen-Typ-III, Fibronectin, Decorin, Tenascin-C markiert. Diese Arbeiten erfolgten in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Herrn PD. Dr. med. S. Milz am AO-Institut in Davos (Schweiz).

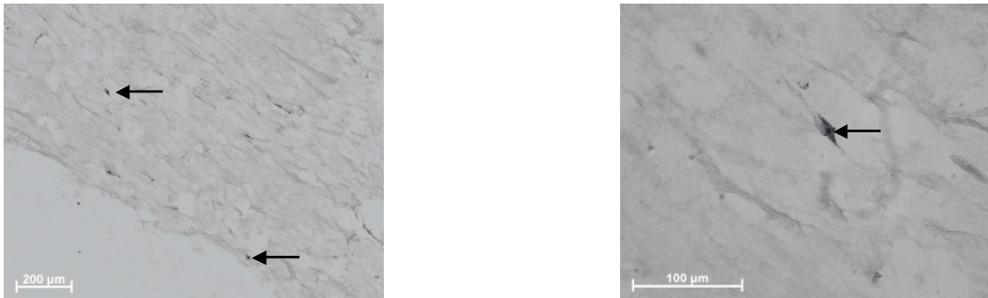


Abbildung 20: Pro-Kollagen-Typ-I; Antikörpermarkierung nach 21 Tagen statischer Kultur von Kollagen-Typ-I-Gelen in Ring-Geometrie. Die Pfeile weisen auf gefärbte Zellen.

Das Pro-Kollagen-Typ-I ist eine Vorstufe des Kollagen-Typ-I. Es wird exozytiert und extrazellulär prozessiert. Es gab extrazellulär kein und intrazellulär sehr vereinzelt Pro-Kollagen-Typ-I (siehe Abbildung 20).

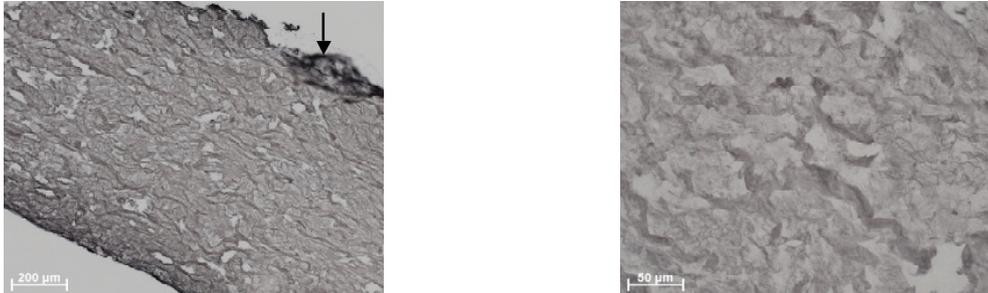


Abbildung 21: Kollagen-Typ-I; Antikörpermarkierung nach 21 Tagen statischer Kultur von Kollagen-Typ-I-Gelen in Ring-Geometrie. Die Gel-Oberfläche ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Das Kollagen-Typ-I Protein war sehr stark extrazellulär vertreten. Besonders deutlich war der Nachweis nahe der Oberfläche der Gele (siehe Abbildung 21).



Abbildung 22: Kollagen-Typ-III; Antikörpermarkierung nach 21 Tagen statischer Kultur von Kollagen-Typ-I-Gelen in Ring-Geometrie. Die Pfeile weisen auf positiv markierte Bereiche.

Kollagen-Typ-III ist das wichtigste Faserkollagen in Haut, dichtem Bindegewebe und vaskulärem Gewebe. Wir konnten vereinzelt intrazellulär und epizellulär starke Färbungen nachweisen. Nur wenige Zellen zeigten eine positive Kollagen-Typ-III Färbung. Diese waren oft in Reihen oder Gruppen zu finden (siehe Abbildung 22).

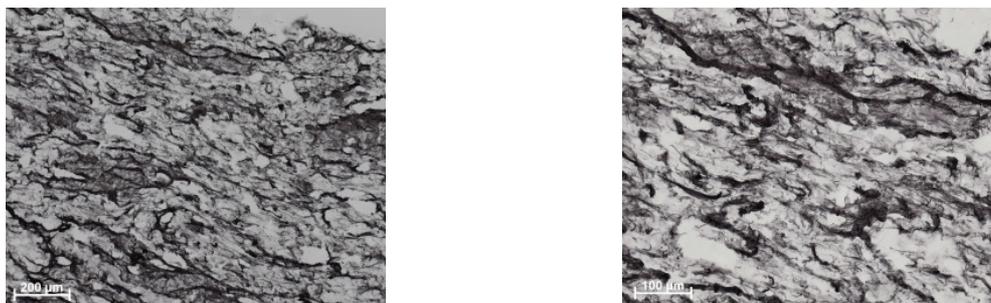


Abbildung 23: Fibronectin; Antikörpermarkierung nach 21 Tagen statischer Kultur von Kollagen-Typ-I-Gelen in Ring-Geometrie.

Fibronectin ist ein weit verbreitetes Glykoprotein, kommt in der ECM und Körperflüssigkeiten vor und vermittelt Matrix und Zelladhäsion. Es wurde eine sehr starke Färbung in den gesamten Konstrukten gefunden (Abbildung 23).

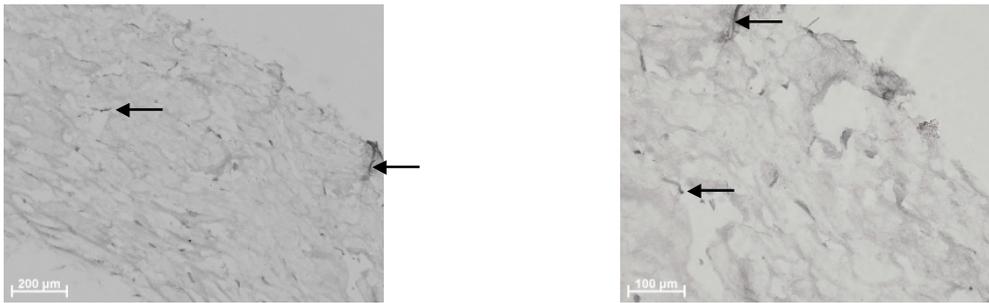


Abbildung 24: Decorin; Antikörpermarkierung nach 21 Tagen statischer Kultur von Kollagen-Typ-I-Gelen in Ring-Geometrie. Die Pfeile weisen auf schwach positiv markierte Bereiche.

Decorin ist in Knochen, Sehne, Haut, Aorta und Cornea verbreitet. Es ist meist assoziiert mit Kollagen-Fibrillen und bindet Kollagen-Typ-I. Es kann die Fibrillogenese von Kollagen-Typ-I und Kollagen-Typ-II hemmen, und TGF β binden. Die Färbung ergab ein sehr schwach positives Signal intra- und epizellulär (Abbildung 24).

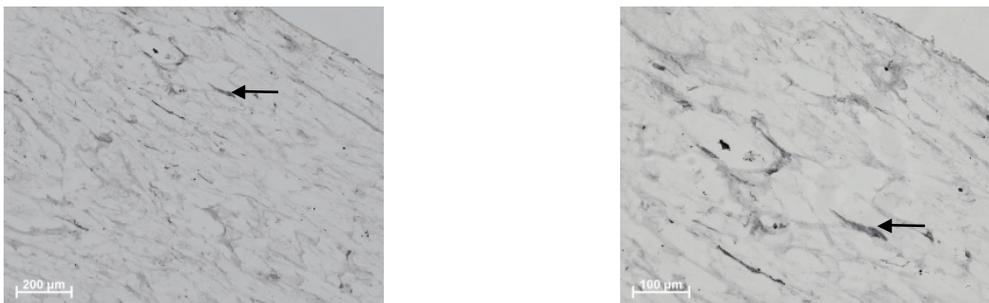


Abbildung 25: Tenascin-C; Antikörpermarkierung nach 21 Tagen statischer Kultur von Kollagen-Typ-I-Gelen in Ring-Geometrie. Die Pfeile weisen auf positiv markierte Bereiche.

Tenascin-C ist ein extrazelluläres Matrixglykoprotein. Es wird in vielen Geweben und Organen während der Entwicklung transient exprimiert. Es spielt eine wichtige Rolle in Zell-Matrix-Organisation und Modulation von Differenzierungs- und Wachstumsprozessen. Wir fanden in den Gelen eine schwache Färbung des Tenascin-C (Abbildung 25).

3.1.2.4 Zell-Proliferation

Für die Beurteilung des Einflusses von Matrix und Geometrie auf den Zellstoffwechsel wurden die Viabilität, die Proliferation und die Expression des Apoptosegens P53 bei einigen hACLC-Spendern exemplarisch überprüft. Die hMPC in Kollagen-Typ-I-Gelen wurden diesbezüglich in vorherigen Arbeiten bereits untersucht¹¹². Für die Viabilität der hACLC wurden Werte zwischen 70% und 85% lebende Zellen in Rechteck-Gelen und zwischen 80% und 95% in Ring-Gelen ermittelt. Das Apoptosegen P53 wurde nur sehr schwach exprimiert

und konnte in vielen Versuchansätzen nicht nachgewiesen werden. Der Vergleich der hACLIC-besiedelten Kollagen-Typ-I-Gele ergab über 21 Tage hinweg eine konstante Zellzahl in 6-well-Kontrollen und Rechteck-Gele (Abbildung 26). In den Ring-Geometrien stieg die Zellzahl zu Beginn leicht an, und blieb dann konstant (Abbildung 26 unten).

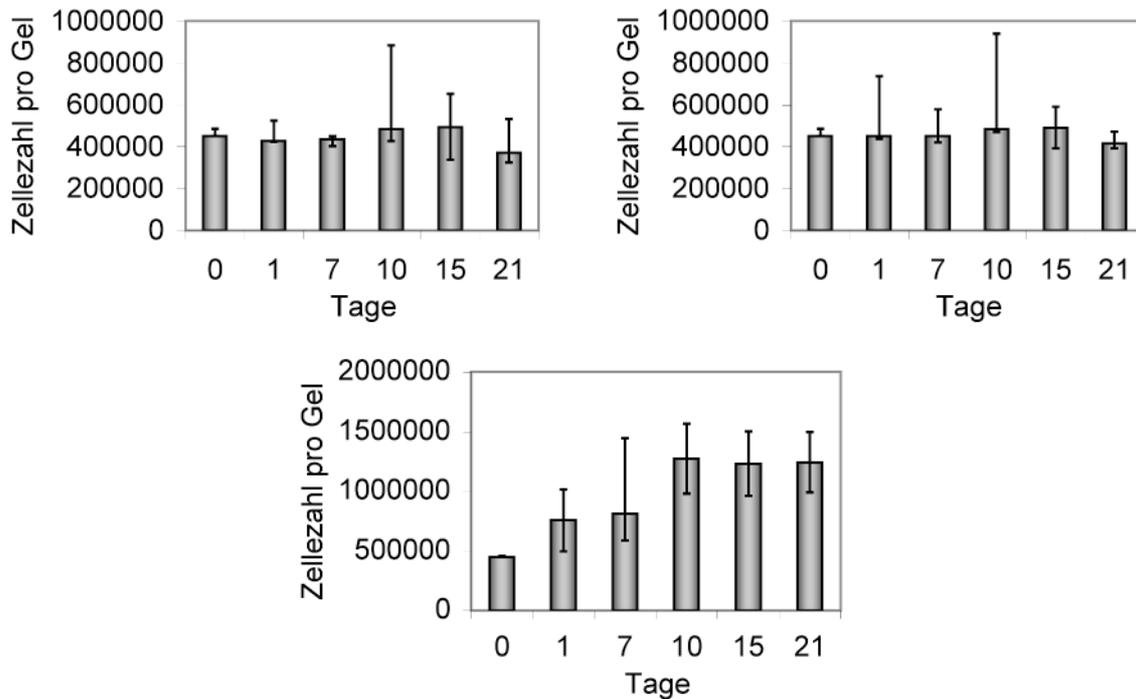


Abbildung 26: Proliferation der hACLIC ($n=3$) in Kollagen-Gele mit Rechteck-Geometrie (links oben), 6-well-Geometrie (rechts oben) und Ring-Geometrie (unten). Median-Min.-Max.-Darstellung der Zellzahl pro Gel-Konstrukt.

3.1.2.5 Genexpression

6-well-Geometrie und Rechteckgeometrie

Um den Einfluss der Matrix und der Konstrukt-Geometrie auf die Genexpression zu beurteilen, wurde eine Analyse des mRNA-Expressions-Profiles in Kollagen-Typ-I-Gele durchgeführt. Hier wird exemplarisch das Expressionsprofil von hACLIC gezeigt. Die Eignung der Kollagen-Typ-I-Gele in 6-well-Geometrie für die Kultivierung von hMPC wurde bereits zuvor in unserer Arbeitsgruppe gezeigt¹¹². In der 6-well-Geometrie zeigten die hACLIC ein hohes Expressionsniveau für die Gene Kollagen-Typ-I und Fibronectin, sowie ein niedriges Niveau für Kollagen-Typ-III und Tenascin-C. Bei allen Genen zeigte sich ein Expressionsmaximum in dem Zeitraum 7-10 Tage nach der Aussaat (Abbildung 27). In Rechteck-Geometrien war das mRNA-Expressions-Profil ähnlich (nicht dargestellt).

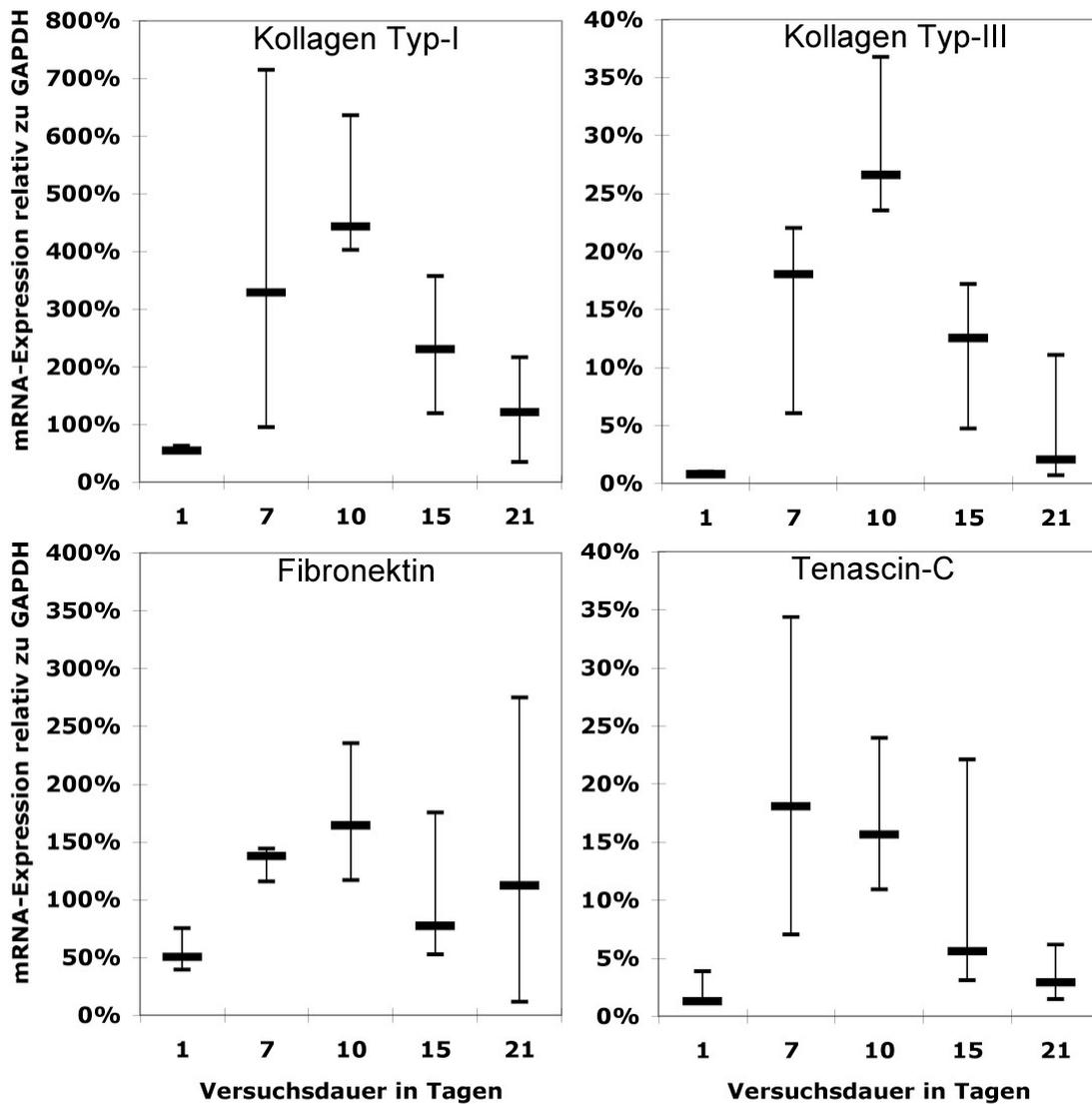


Abbildung 27: Gen-Expression bandtypischer Proteine durch hACLC (n=3) in Kollagen-Typ-I-Gelen mit 6-well-Geometrie. Median-Min.-Max.-Darstellung der relativen mRNA-Expression (GAPDH-Normierung)

Ring-Geometrie

Die Analyse des mRNA-Expressions-Profiles von hACLC dreier Spender in Kollagen-Typ-I-Gelen mit Ring-Geometrie zeigte ein hohes Expressionsniveau für die Gene Kollagen-Typ-I, Typ-III, Tenascin-C, Decorin und Fibronectin, sowie ein niedriges Niveau für MMP1, Osteocalzin und alkalische Phosphatase (AP) (Abbildung 28). Die Markergene für osteogenes Gewebe, Osteocalzin und AP, wurden von den hACLC exprimiert. Sie waren jedoch deutlich schwächer als die Markergene für das Bandgewebe exprimiert. Die Expressionsniveaus aller untersuchten Gene waren über den Zeitraum von 21 Tagen nahezu konstant.

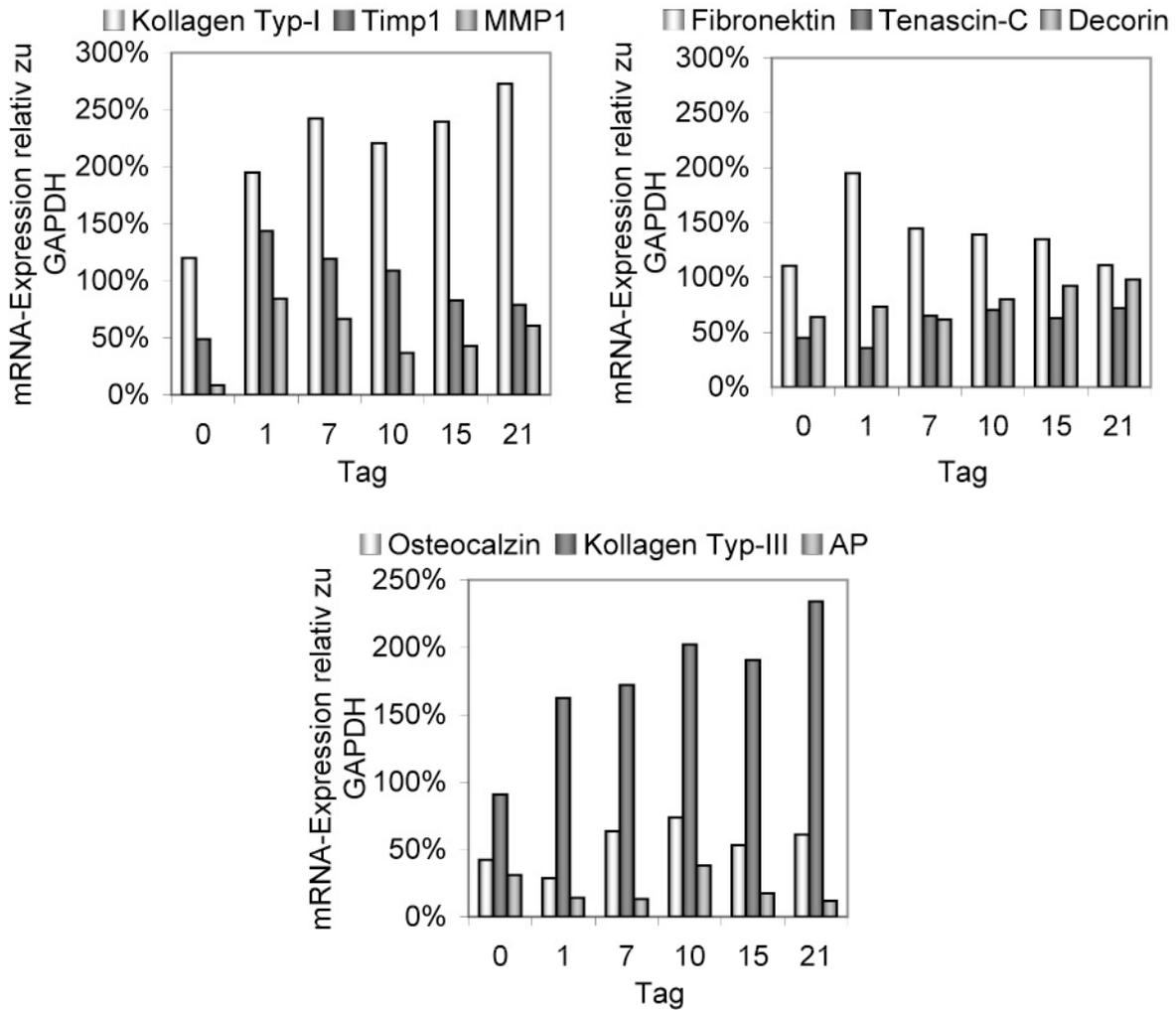


Abbildung 28: Gen-Expression band- und knochentypischer Proteine durch hACLIC in Kollagen-Typ-I Ring-Gelen. Die Daten dreier Spender wurden mit Standard-PCR und integrierter optischer Dichte der DNA-Banden im Agarosegel bestimmt. Dargestellt sind die mRNA-Expressionen (GAPDH-normiert) eines Spenders über einen Zeitraum von max. 21 Tagen.

3.1.3 Polylactid-Scaffolds als Zellträger

Um die Eignung der texturierten PLA-Konstrukte als Zellträger für das Tissue Engineering von Bandersatz zu prüfen wurde sowohl die Interaktion von hMPC als auch von hALCL mit den Konstrukten untersucht. Die Charakterisierung erfolgte mit histologischen Methoden, Raster-Elektronenmikroskopie und Analyse der mRNA-Expression.

Die Zell-Besiedlung der Scaffolds war nicht möglich, wenn die Fasern nicht nach der Herstellung eine zusätzliche Plasma-Behandlung erhalten hatten. Die Proben waren ohne diese stark hydrophob und konnten die Zellsuspension nicht aufnehmen. Die Vorkonditionierung mit FCS-haltigem Medium zeigte im Vergleich zu FCS freiem Medium oder unkonditionierten Proben keine Verbesserung der Besiedlungseigenschaften. Unter dem Lichtmikroskop konnten bereits in der ersten Woche nach der Besiedlung kleine hMPC-beziehungsweise hALCL-Zellkluster gefunden werden, die sich zwischen den Fasern oder in den Faserwindungen aufspannten (Abbildung 29).

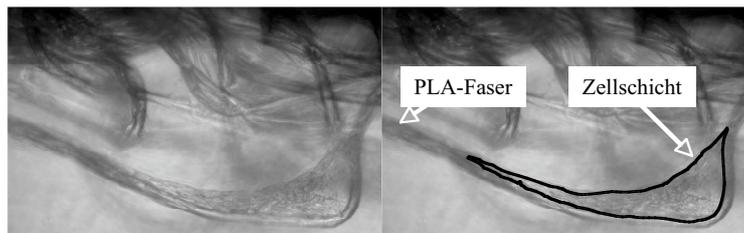


Abbildung 29: Lichtmikroskopische Aufnahme eines aufgespannten hMPC-Zelllayers auf PLA-Faser 7 Tage nach Besiedlung.

3.1.3.1 Rasterelektronenmikroskopie

hMPC

Die elektronenmikroskopische Betrachtung der hMPC-besiedelten Konstrukte zeigte eine homogene Verteilung der hMPC innerhalb des gesamten Konstruktes. An den Oberflächen der Konstrukte konnten auffällige Anhäufungen von hMPC gefunden werden, die eine folienartige Umhüllung der gesamten Konstrukte bildeten (Abbildung 30). Auch im Inneren der Konstrukte überspannten die hMPC sowohl einzeln, als auch in Gruppen Distanzen von über 100 μm . In hoher Vergrößerung wurde eine sehr gute Adhärenz der Zellen an den Oberflächen der textilen Fasern erkennbar. Die Fasern waren größtenteils von Zellen ummantelt. Es konnten keine abgerundeten apoptotischen hMPC gezeigt werden. Die hMPC zeigten ein flächiges Aussehen mit zum Teil zahlreichen kurzen Ausläufern.

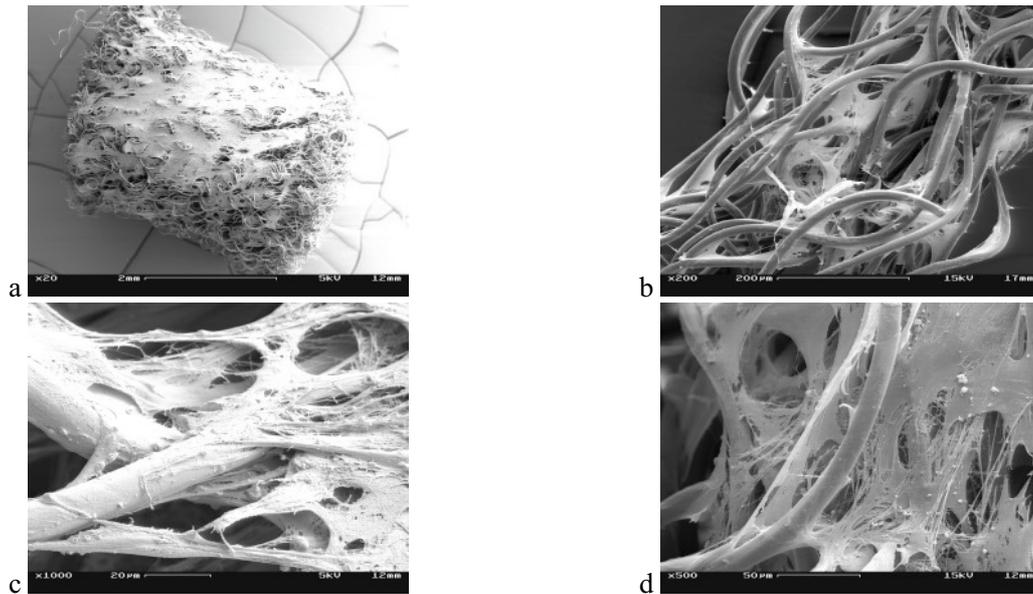


Abbildung 30: Rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahmen 15 Tage nach Besiedlung mit hMPC (a, c: Oberflächenaufnahmen; b, d: Aufnahme aus dem Inneren).

hACLCLC

Die elektronenmikroskopische Betrachtung der hACLCLC-besiedelten Konstrukte nach 24 Stunden zeigte eine homogene Verteilung der hACLCLC innerhalb des gesamten Konstruktes. An den Oberflächen der Konstrukte konnten auch nach 21 Tagen (nicht dargestellt) keine auffälligen Anhäufungen von hACLCLC gefunden werden. Im Inneren der Konstrukte überspannten die hACLCLC Distanzen von über 150 μm . In hoher Vergrößerung wurde eine sehr gute Adhärenz der Zellen an den Oberflächen der textilen Fasern erkennbar. Die Fasern waren größtenteils von Zellen ummantelt. Die hACLCLC zeigten ein Fibroblasten-typisches Aussehen mit langen Zellausläufern und schlanken Zellkörpern (Abbildung 31).

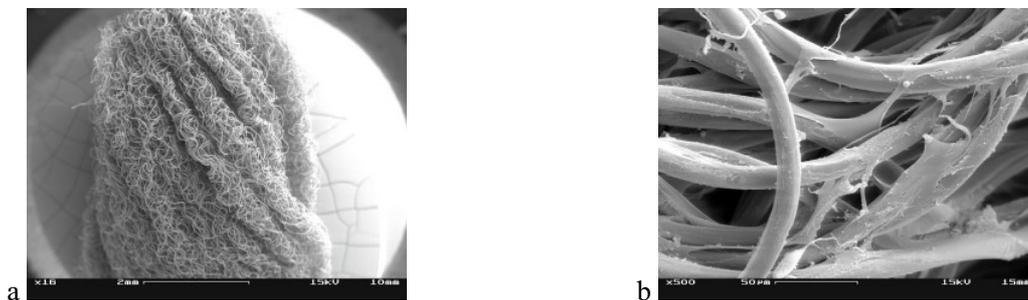


Abbildung 31: REM-Aufnahmen von PLA-Konstrukten 24 Stunden nach hACLCLC-Besiedlung. Oberfläche (a); Inneres (b)

3.1.3.2 histologische Schnitte und Färbungen

hMPC

In den histologischen Schnitten der Konstrukte wurde die hohe Porosität der Konstrukte deutlich. Es bestätigte sich die gleichmäßige Besiedlung der Konstrukte mit hMPC in den HE-Färbungen nach 15 und 28 Tagen (Abbildung 32). Immunhistologisch konnten die Proteine Kollagen-Typ-I und Typ-III sowie Tenascin-C nachgewiesen werden (in Kooperation mit L. Heckmann in der Orthopädischen Universitätsklinik mit Querschnittgelähmtenzentrum am Rehabilitationskrankenhaus Ulm, Sektion Biochemie der Gelenks- und Bindegewebserkrankungen). Die anhaltende Proliferation der hMPC konnte durch den Nachweis von PCNA gezeigt werden (Abbildung 32 f).

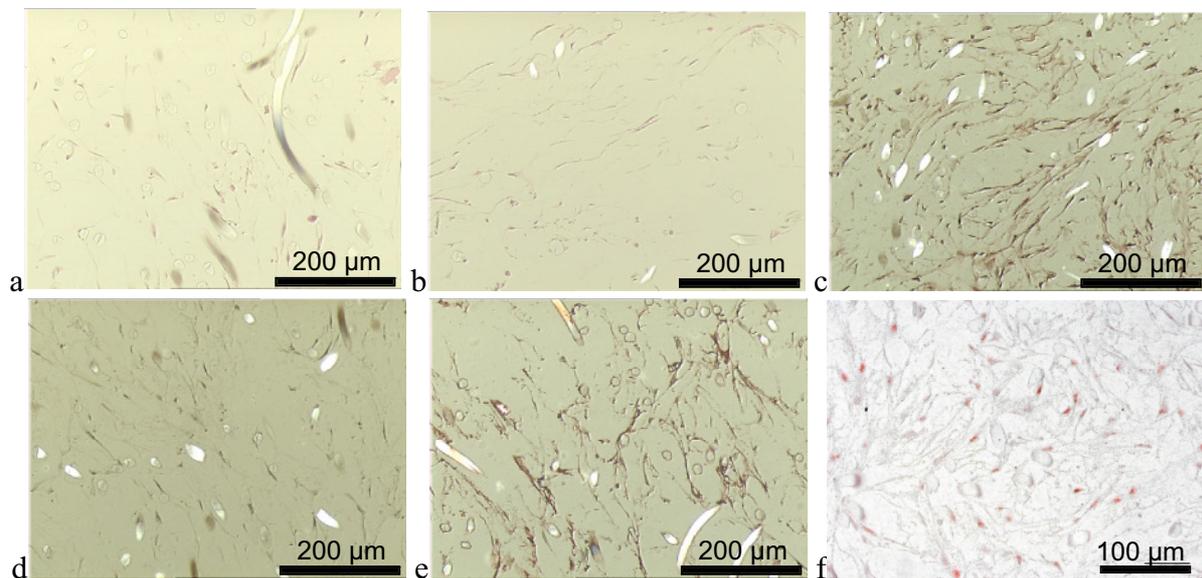


Abbildung 32: Paraffinhistologie an hMPC-besiedelten PLA-Fasern. HE-Färbung Tag 15 (a) und 28 (b); Immunfärbung Tag 15, Kollagen-Typ-I (c) und Typ-III (d); Immunfärbung Tag 15, Tenascin-C (e) und PCNA (f)

hACLCLC

Die HE-Färbung zeigte schon 24 Stunden nach der Besiedlung mit hACLCLC eine gleichmäßige Verteilung der hACLCLC. Die hACLCLC adhärten gut an den textilen PLA-Fasern. An quer geschnittenen Fasern wurde eine Umhüllung nahezu aller Fasern durch hACLCLC deutlich (Abbildung 33). In immunhistologischen Färbungen von Kollagen-Typ-I konnte das Protein im Bereich der hACLCLC 21 Tage nach der Besiedlung nachgewiesen werden (Abbildung 34).

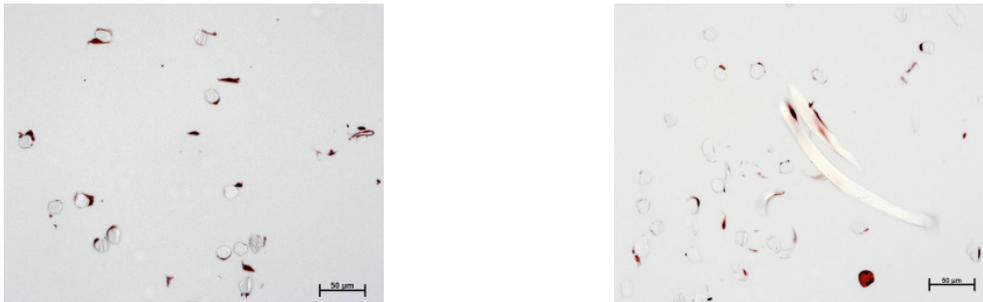


Abbildung 33: HE-Färbung von hACLCLC auf PLA-Fasern, 24 Std. nach der Besiedlung.

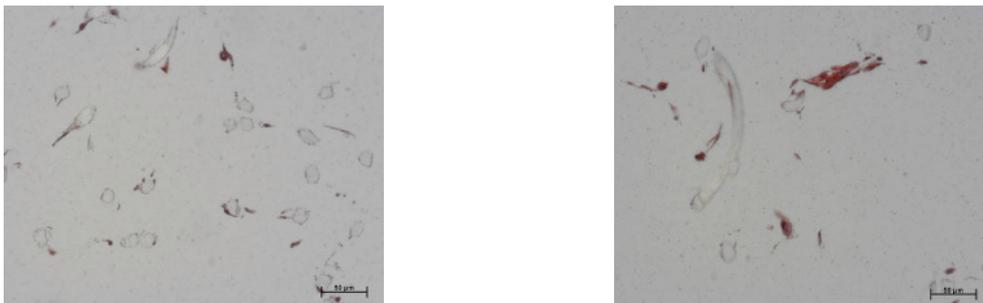


Abbildung 34: Kollagen-Typ-I-Immunfärbung von hACLCLC auf PLA-Fasern, 21 Tage nach der Besiedlung.

3.1.3.3 Genexpression

hMPC

Die Expression der verschiedenen Zielgene, welche für das Kreuzbandgewebe als typisch betrachtet werden, wurden in den hMPC besiedelten PLA-Konstrukten an Tag 3 und Tag 15 untersucht (Kollagen-Typ-I, Typ-III, Tenascin-C, Fibronectin, Decorin, *smooth muscle actin*, MMP1, MMP2, TIMP1, TIMP2). Vergleicht man die Expressionen von Tag 3 und 15 des Versuches mit den Werten vor dem Versuchsbeginn, so fand sich für alle Zielgene keine oder eine positive Beeinflussung (Abbildung 35 und Abbildung 36).

Kollagen-Typ-I wurde stark exprimiert und zeigte einen Anstieg von 199% an Tag 3 und 136% an Tag 15. Kollagen-Typ-III wurde wesentlich schwächer exprimiert. Tenascin-C wurde an Tag 3 um 160% und an Tag 15 um 391% ($p=0,031$) gesteigert. Fibronectin war seit der Besiedlung um ca. 110% für die Dauer des Versuches erhöht. Decorin spielt eine wichtige Rolle bei der Matrixorganisation und wurde nach 15 Tagen um 187% erhöht exprimiert.

smooth muscle actin als Bestandteil des Zytoskeletts war zum Tag 3 noch unbeeinflusst, wurde nach 15 Tagen um 121% tendenziell erhöht (Abbildung 35).

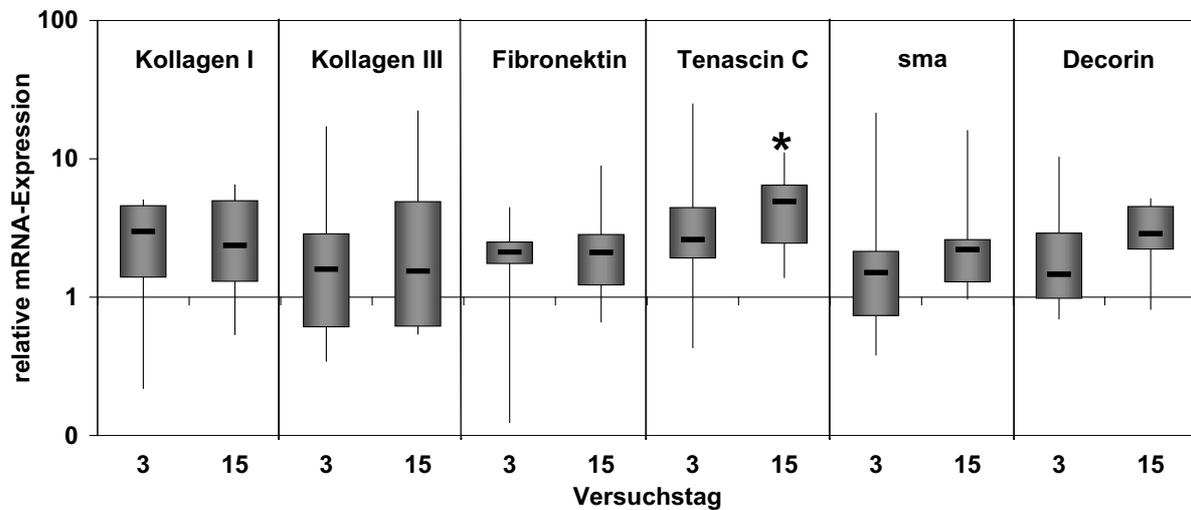


Abbildung 35: Genexpression der Matrix-Strukturproteine von hMPC (900.000Zellen/Konstrukt; n=7) nach 3 und 15 Tagen in PLA-Faser-Konstrukten. Logarithmische Boxplot-Darstellung des Vielfachen der mRNA-Expression (GAPDH-Normierung) bezogen auf Tag Null. Der Wert 1 repräsentiert die Expression an Tag Null. * $p < 0.05$ Wilcoxon-signed-ranked-Test.

Die proteolytischen Enzyme für den Umbau der Kollagenmatrix und deren Inhibitoren wurden teilweise stark beeinflusst (Abbildung 36). MMP1 war zum Tag 3 unbeeinflusst, wurde aber nach 15 Tagen um 560% ($p=0,031$) erhöht, MMP2 jedoch blieb unverändert. Die Inhibitoren wurden ebenfalls positiv beeinflusst. TIMP1 wurde am Tag 3 um 200% ($p=0,031$) und an Tag 15 um 168% ($p=0,031$) gesteigert. TIPM2 erhöhte sich nach 15 Tagen um 150% ($p=0,031$). Die Genexpression der osteogenen Marker CBFA1(4% Tag 3, 7% Tag 15) und AP (7% Tag 3, 54% Tag 15) wurden nicht beeinflusst.

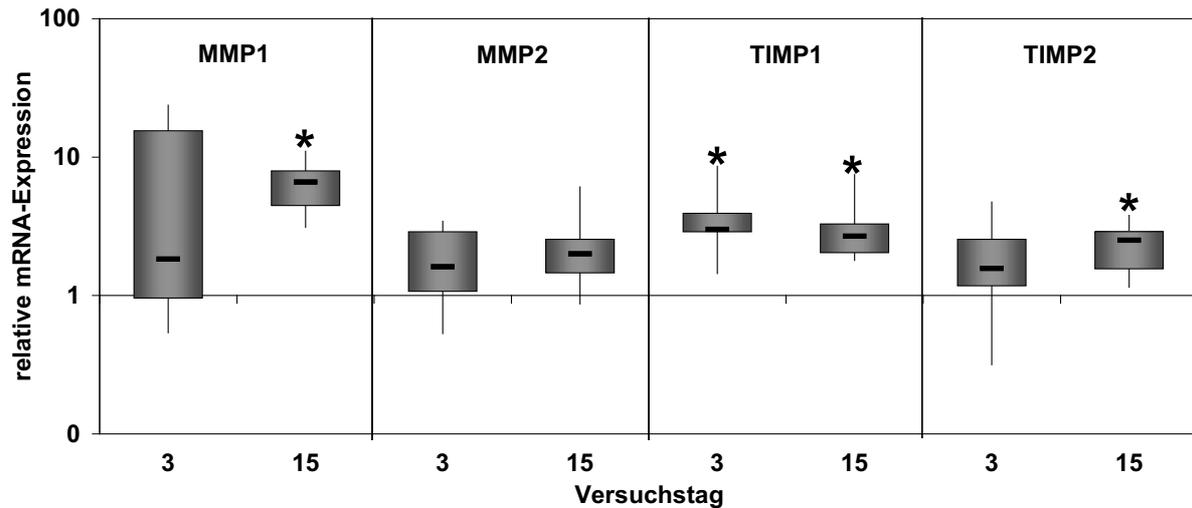


Abbildung 36: Genexpression der Matrix-Umbauproteine von hMPC (900.000Zellen/Konstrukt; $n=7$) nach 3 und 15 Tagen in PLA-Faser-Konstrukten. Logarithmische Boxplot-Darstellung des Vielfachen der mRNA-Expression (GAPDH-Normierung) bezogen auf Tag Null. Der Wert 1 repräsentiert die Expression an Tag Null. $*p<0.05$ Wilcoxon-signed-ranked-Test.

hACLC

Die Expression der verschiedenen Zielgene, welche für das Kreuzbandgewebe als typisch betrachtet werden, wurden in den hACLC besiedelten PLA-Konstrukten an Tag 15 untersucht (Kollagen-Typ-I, Typ-III, Tenascin-C, Fibronectin, Decorin, MMP1, MMP2, TIMP1, TIMP2, *smooth muscle actin*). Vergleicht man die Expressionen von Tag 15 des Versuches mit den Werten vor dem Versuchsbeginn, so findet sich für alle Zielgene keine oder eine positive Beeinflussung (Abbildung 37).

Kollagen-Typ-I wurde bei allen sechs Spendern sehr schwach exprimiert und zeigte einen geringen Anstieg von 49%. Kollagen-Typ-III wurde ebenfalls schwach exprimiert und stieg nach 15 Tagen nicht an. Fibronectin war nach 15 Tagen nur leicht (15% $p=0,062$) erhöht. Das *smooth muscle actin* als Bestandteil des Zytoskeletts wurde nach 15 Tagen um 124% ($p=0,062$) erhöht.

Die proteolytischen Enzyme für den Umbau der Kollagenmatrix und deren Inhibitoren wurden teilweise verändert exprimiert. MMP1 war an Tag 15 um 394% ($p=0,031$), MMP2 jedoch nur um 60% ($p=0,031$) erhöht. Die Inhibitoren TIMP1 und TIMP2 wurden nicht beeinflusst (Abbildung 37).

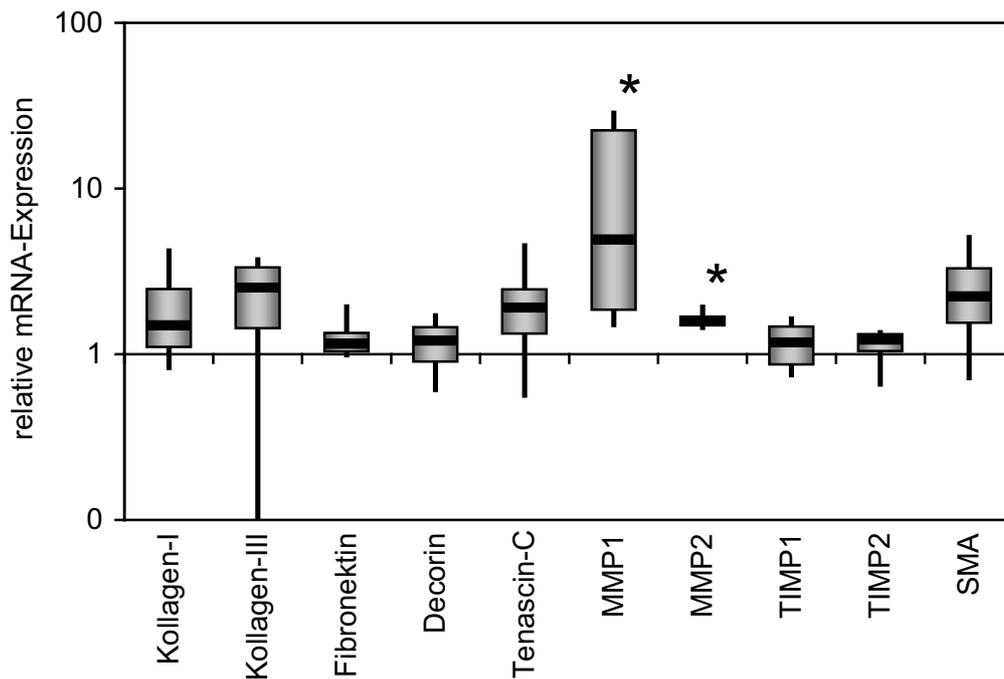


Abbildung 37: Genexpression von hACL (900.000 Zellen/Konstrukt; n=6) nach 15 Tagen in PLA-Faser-Konstrukten. Logarithmische Boxplot-Darstellung des Vielfachen der mRNA-Expression (GAPDH-Normierung) bezogen auf Tag Null. Der Wert 1 repräsentiert die Expression an Tag Null. * $p < 0.05$ Wilcoxon-signed-ranked-Test.

Zusammenfassung:

Kollagen-Typ-I-Gel als Zellträger

Die Zellen in Gelen mit Ring-Geometrie waren über den gesamten Untersuchungszeitraum vital, proliferierten und exprimierten die Ligament-typischen Proteine.

PLA-Faser als Zellträger

Die Besiedlung zeigte sowohl in Raster Elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abbildung 30, Abbildung 31) als auch in gefärbten histologischen Schnitten (Abbildung 32, Abbildung 33) eine gleichmäßige Verteilung der hMPC und hACL im gesamten Scaffold. Beide Zelltypen waren über längere Zeiträume hinweg vital und adhärten sehr gut an den Fasern. Sowohl hMPC als auch hACL zeigten umhüllten die Fasern und bildeten Zellausläufer zu benachbarten Fasern oder Zellen (Abbildung 30 bis Abbildung 33).

3.2 Einfluss zyklischer, mechanischer Dehnung

Es wurden Untersuchungen zum Einfluss zyklischer, uniaxialer Dehnung auf hMPC und hAACL in bandförmigen Kollagen-Typ-I Matrices oder texturierten, textilen PLA-Faser-Konstrukten durchgeführt.

3.2.1 Kollagen-Typ-I-Gel

Um den Einfluss mechanischer Reize zu untersuchen, wurden umfangreiche Untersuchungen an hMPC- und hAACL-besiedelten Gel-Konstrukten durchgeführt. Der Einfluss auf die Zell-Gel-Konstrukte wurde morphologisch und molekularbiologisch untersucht. Der Einfluss auf Genexpression wurde schwerpunktmäßig bei hMPC-Besiedlung untersucht, da dieser Zelltyp im Tissue Engineering eingesetzt werden soll.

3.2.1.1 Beeinflussung der Genexpression humaner, mesenchymaler Progenitorzellen

Zur Untersuchung des Einflusses zyklischer, uniaxialer, mechanischer Reize auf hMPC in Kollagen-Typ-I Ring-Gelen wurden die Konstrukte über die Versuchsdauer von 21 Tagen für eine Stunde pro Tag mechanisch stimuliert (1 Hz, 5% Dehnung). Weder die Matrix-Strukturproteine noch die Remodelingproteine wurden in ihrer mRNA-Expression signifikant (n=7) beeinflusst (Abbildung 38). Die mRNA-Expressionen der Gene Fibronectin, Decorin, Tenascin-C, MMP1, MMP2, TIMP2 und *smooth muscle actin*, wurden nur bei einzelnen Spendern durch die mechanische Stimulation stark erhöht. Die Variationen der stimulationsbedingten mRNA-Expressions-Änderungen der untersuchten Spender (z. B. Tenascin-C 63% bis 827%) ließen jedoch keine statistisch abgesicherte Aussage über eine Beeinflussung der hMPC durch die mechanische Stimulation zu.

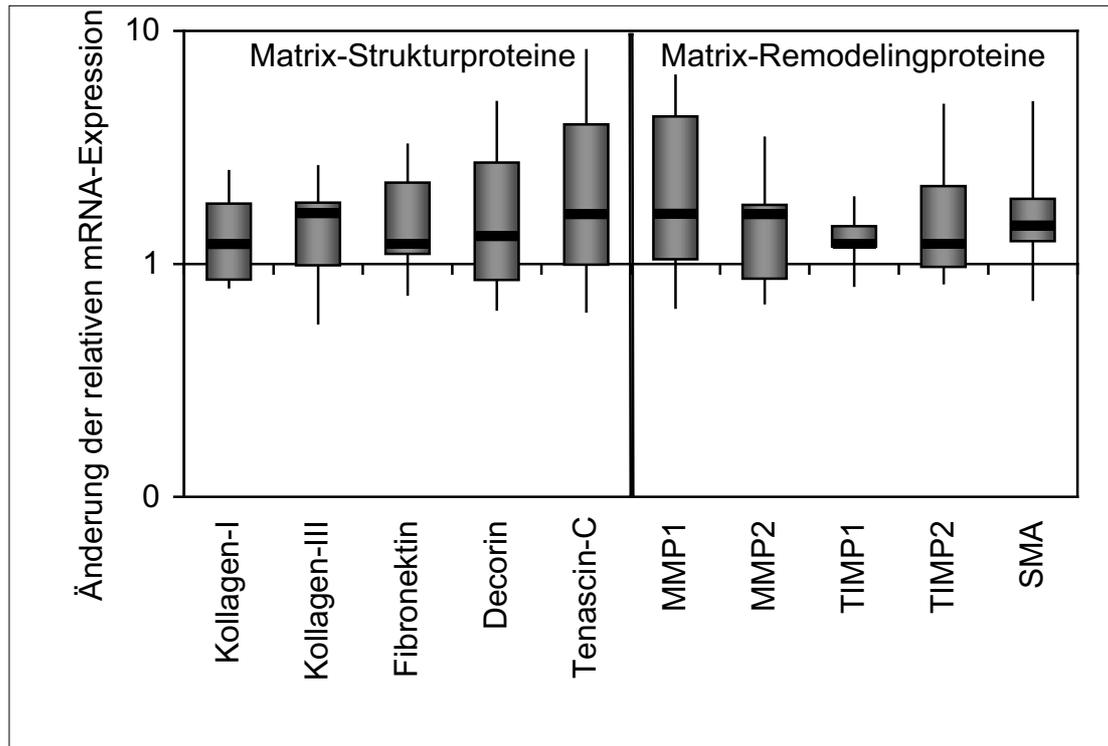


Abbildung 38: Einfluss zyklischer Dehnung (1 Hz*1 Std./Tag; 5% Amplitude; n=7) auf die Genexpression von hMPC in Kollagen-Typ-I Ring-Gelen an Tag 21
Logarithmische Boxplot-Darstellung der mRNA-Expressions-Änderung (GAPDH-Normierung) stimulierter Ring-Gele bezogen auf unstimulierte Ring-Gel-Kontrollen. Der Wert 1 repräsentiert die Kontrollen.

3.2.1.2 GDF5-Einfluss auf die Genexpression humaner, mesenchymaler Progenitorzellen

Im Rahmen eines orientierenden Versuches wurde unter den oben beschriebenen Versuchsbedingungen bei drei Spendern der Einfluss des Wachstumsfaktors GDF5 auf die mechanisch induzierte Änderung der mRNA-Expression nach 21 Tagen in hMPC untersucht. Es konnte bei Applikation mechanischer Dehnungen eine geringe Erhöhung der Expression von Kollagen-Typ-I und Typ-III und Decorin gemessen werden (Abbildung 39). Die Änderungen lagen, jedoch ebenfalls im Bereich des Vertrauensintervalls des Versuches ohne GDF5-Einfluss (Abbildung 38).

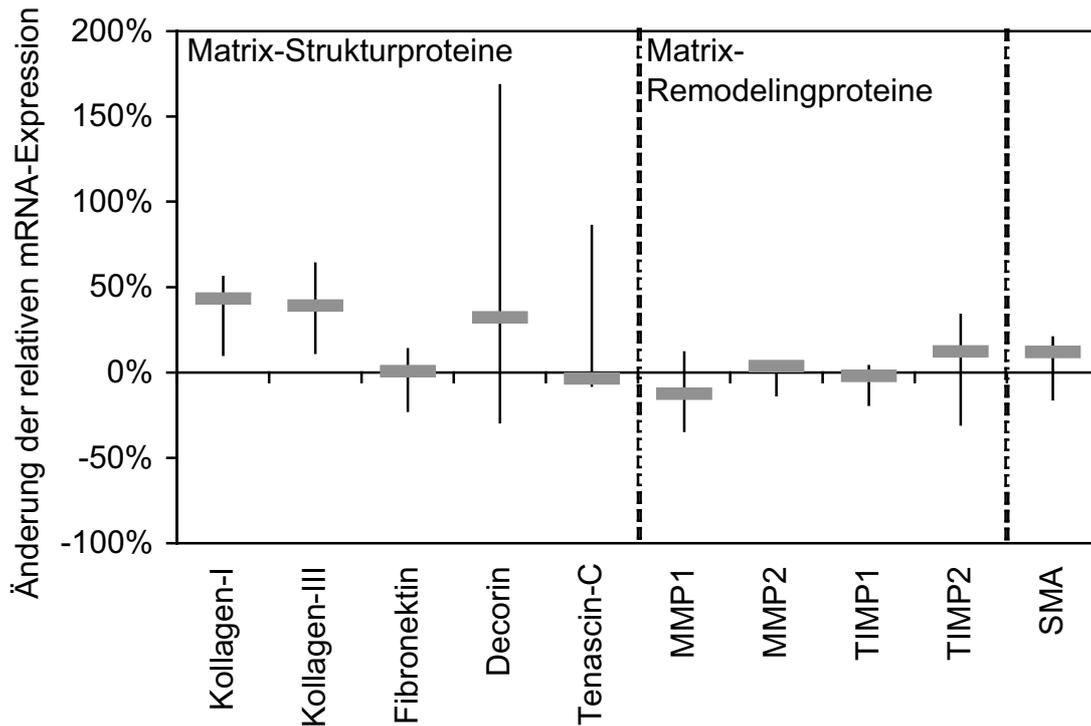


Abbildung 39: Einfluss zyklischer Dehnung (1 Hz*1 Std./Tag; 5% Amplitude; n=3) bei GDF5-Gabe auf die Genexpression von hMPC in Kollagen-Typ-I Ring-Gelen an Tag 21. Median-Min.-Max.-Darstellung der mRNA-Expressions-Änderung (GAPDH-Normierung) stimulierter Ring-Gele bezogen auf unstimulierte Ring-Gele. Der Wert 0 repräsentiert die unstimulierten Kontrollen.

Auch nach 7 Tagen wurden keine Hinweise auf einen Einfluss von GDF5 auf den Stimulationseffekt in hMPC gemessen (Abbildung 40). Der Einfluss allein der zyklischen Dehnung nach nur 7 Tagen Stimulation zeigte keine Abweichung von den nach 21 Tagen erhobenen Werten.

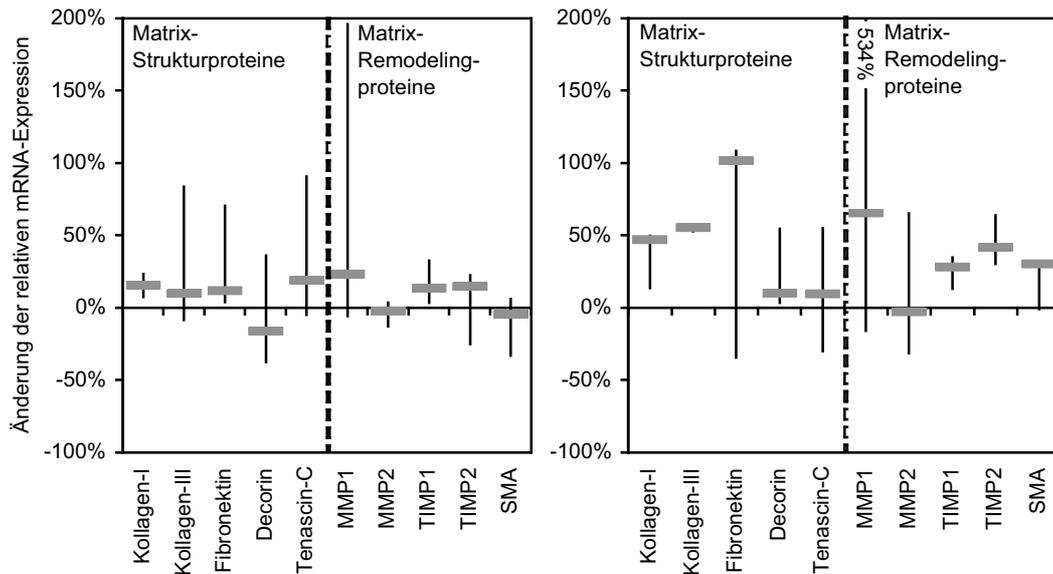


Abbildung 40: Einfluss zyklischer Dehnung (1 Hz*1 Std./Tag; 5% Amplitude; n=3) mit (rechts) und ohne (links) GDF5-Gabe auf die Genexpression von hMPC in Kollagen-Typ-I Ring-Gelen an Tag 7. Median-Min.-Max.-Darstellung der mRNA-Expressions-Änderung (GAPDH-Normierung) stimulierter Ring-Gele bezogen auf unstimulierte Ring-Gele. Der Wert 0 repräsentiert die Kontrollen.

3.2.1.3 Langzeitdehnungseinfluss auf die Genexpression humaner, mesenchymaler Progenitorzellen

Um den Einfluss der Dauer der täglichen mechanischen Stimulation zu überprüfen wurden Versuche mit einer Langzeit-Stimulation durchgeführt. Im Gegensatz zu den Versuchen mit kürzerer, täglicher Applikationsdauer wurden hier für acht Stunden 5% Dehnung mit 0,2 Hz appliziert. Auch hier fanden sich keine signifikanten Effekte. Die Langzeitstimulation hatte einen tendenziell erniedrigenden Einfluss auf die Genexpression von Kollagen-Typ-I, Typ-III und Fibronektin. Die Expression von Tenascin-C wurde tendenziell erhöht und Decorin und MMP1 nicht beeinflusst.

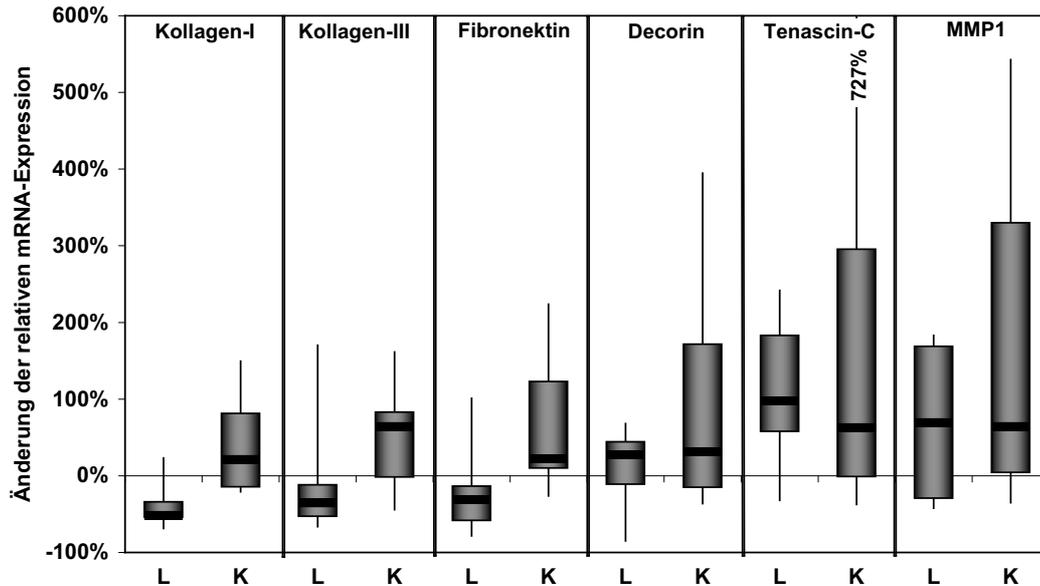


Abbildung 41: Einfluss einer niederfrequenten Langzeit-Dehnung (L= 0,2 Hz*8 Std./Tag; 5% Amplitude; n=6) auf die Genexpression von hMPC in Kollagen-Typ-I Ring-Gelen an Tag 15 im Vergleich mit der Kurzzeit-Dehnung (K= 1 Hz*1 Std./Tag; 5% Amplitude; n=7) an Tag 21. Boxplot-Darstellung der mRNA-Expressions-Änderung (GAPDH-Normierung) stimulierter Ring-Gele bezogen auf unstimulierte Ring-Gele. Der Wert 0 repräsentiert die Kontrollen.

3.2.1.4 Beeinflussung der Genexpression humaner, primärer Kreuzbandzellen

Nachdem in den Vorversuchen die Möglichkeit der Kultivierung von hACLIC in Kollagen-Typ-I-Gel-Matrices gezeigt werden konnte, wurde der Einfluss der zyklischen, uniaxialen Dehnung auf die hACLIC untersucht. Orientierende Versuche an drei Spendern zeigten keine deutlichen Expressions-Änderungen durch die mechanische Stimulation. Es konnten Tendenzen für eine Erhöhung der Tenascin-C-Expression an den Tagen 1, 10, 15 und 21 gefunden werden (Abbildung 42). Die Genexpression nach 21 Tagen Stimulation zeigte bei allen Genen eine deutlichere tendenzielle Steigerung als an den Tagen 7 bis 15. Die Schwankungen in den stimulationsbedingten Expressions-Änderungen der drei Spender waren jedoch bei allen Genen sehr groß (Abbildung 42).

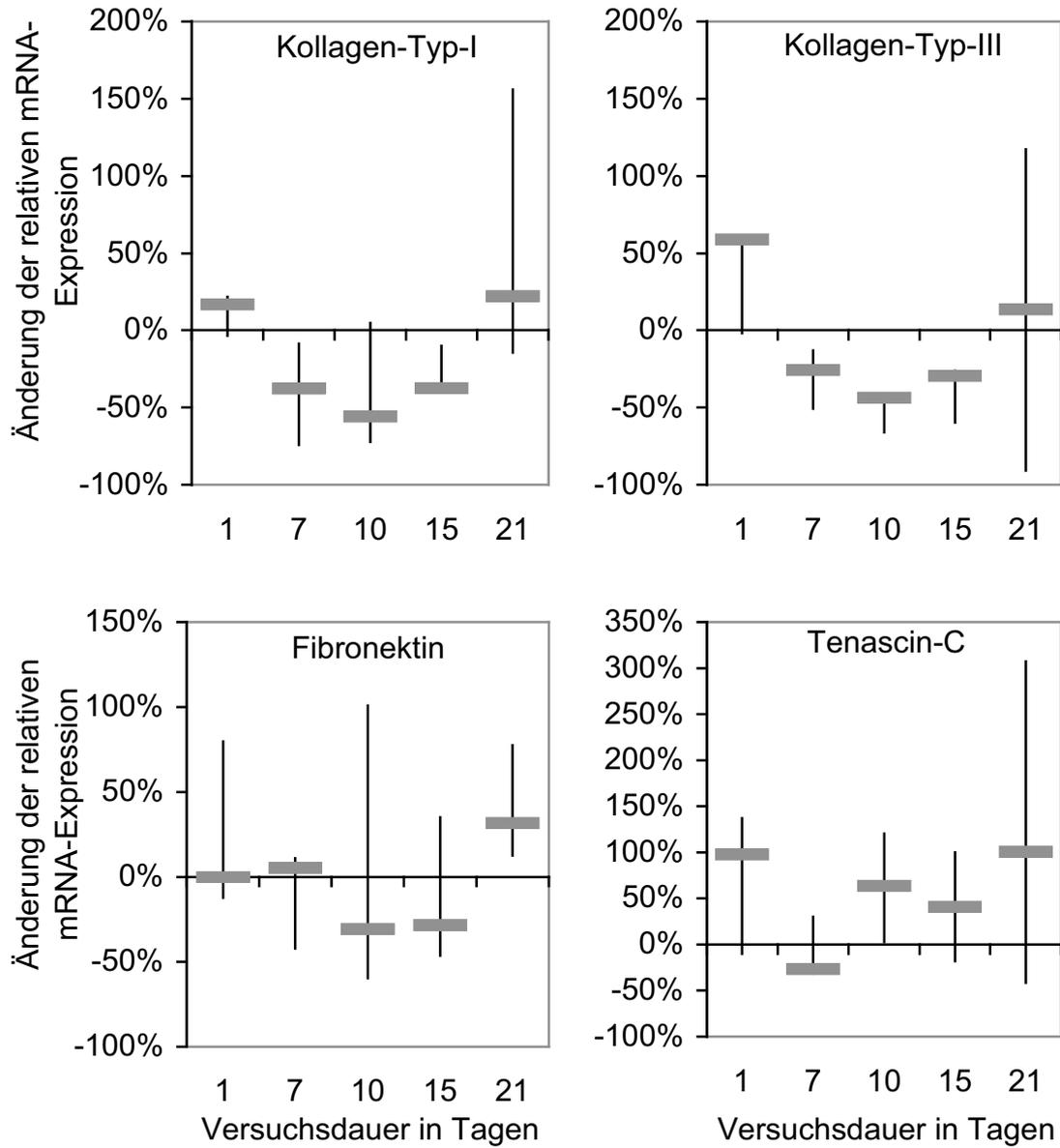


Abbildung 42: Einfluss zyklischer Dehnung auf die Genexpression von hA₁CLC in Kollagen-Typ-I-Gelen (1 Hz*1 Std./Tag; Amplitude=5%; n=3). Median-Min.-Max.-Darstellung der mRNA-Expressions-Änderung (GAPDH-Normierung) stimulierter Ring-Gele bezogen auf unstimulierte Ring-Gele. Der Wert 0 repräsentiert die Kontrollen.

3.2.1.5 Beeinflussung der Ausrichtung humaner, primärer Kreuzbandzellen und der Matrix

In HE-Färbungen von histologischen Schnitten hACLCLC-besiedelter Kollagen-Typ-I-Gele konnte bei den Gelen mit Rechteckgeometrie eine stärkere und frühere Ausrichtung von Matrix und Zellen bei den stimulierten Proben als bei den unstimulierten Kontrollen (nicht dargestellt) beobachtet werden. Die Konstrukte in Ring-Geometrie zeigten nach 7 Tagen keine oder nur eine schwache Ausrichtung der Matrix. Die hACLCLC waren jedoch in Richtung der Zugspannung (Dehnungsrichtung) ausgerichtet (Abbildung 43 a, b). Nach 21 Tagen Stimulation konnte jedoch eine deutliche Ausrichtung der Matrix und der hACLCLC gefunden werden. Die Kollagenfasern waren stark kondensiert und wiesen teilweise die charakteristische Ondulation der Kollagenfasern auf (Abbildung 43 c, d).

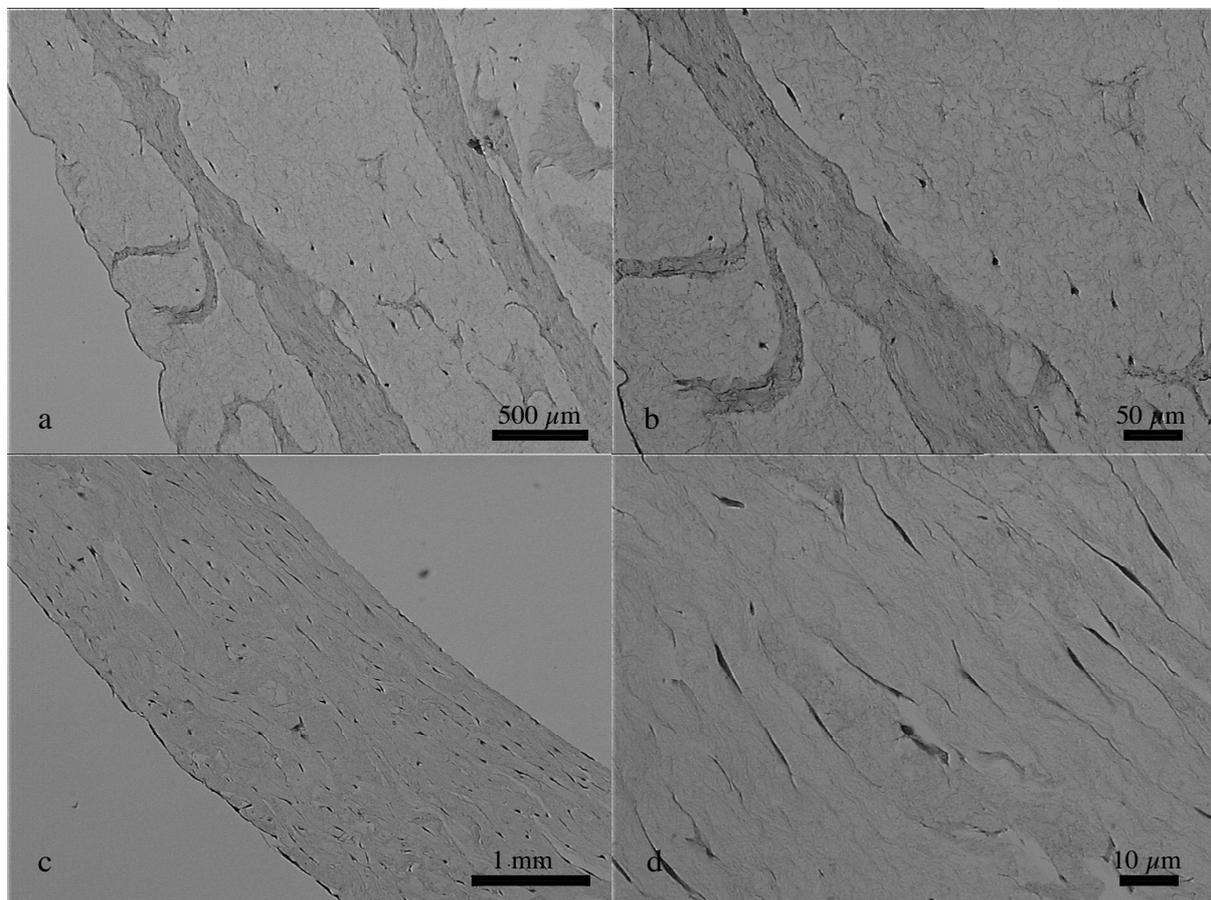


Abbildung 43: HE-Färbungen an Paraffin-Schnitten von hACLCLC besiedeten Kollagen-Typ-I-Gele. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen zeigen die Kollagen-Matrix mit den enthaltenen hACLCLC. Ring-Gel-Geometrie nach 7 Tagen (a, b); Ring-Gel-Geometrie nach 21 Tagen (c, d)

Die Rasterelektronenmikroskopische Untersuchung von hACLC-besiedelten Kollagen-Typ-I-Gelen zeigte Unterschiede in der räumlichen Orientierung der Matrix und der hACLC sowohl auf den Oberflächen als auch im Inneren der Gele (Abbildung 44). In Gelen, die weder statische noch zyklische mechanische Belastungen erfahren hatten, konnte keine einheitliche Orientierung der hACLC gefunden werden. Die hACLC bildeten an den Oberflächen der Gele einen dichten Zelllayer in dem die hACLC sich meist parallel zueinander anordneten. Diese Bereiche mit paralleler Zellanordnung hatten jedoch keine einheitliche Orientierung. Im Inneren der gänzlich unbelasteten Gele konnte keine Ausrichtung der Matrix nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wiesen die zyklisch gedehnten Ring-Gele an den Oberflächen stets streng in Dehnungsrichtung ausgerichtete Zellen auf (Abbildung 44, oben). Im Inneren der stimulierten Ring-Gele konnte ebenso die Ausrichtung hACLC und zudem der Kollagen-Matrix in Dehnungsrichtung gezeigt werden (Abbildung 44, unten).

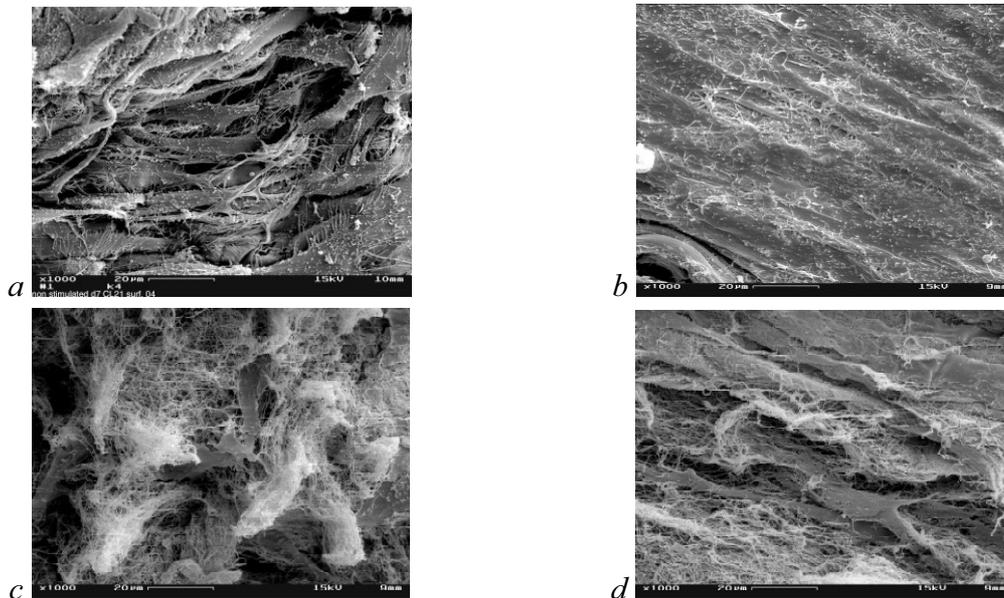


Abbildung 44: Rasterelektronenmikroskopischer Vergleich 7 Tage nach hACLC-Besiedlung von Kollagen-Typ-I-Gelen in Ring-Geometrie (Stimulation) und 6-well-Geometrie (Kontrolle). Unstimulierte Kontrolle (a, c) und mit uniaxialer, zyklischer Dehnung stimulierte Proben (b, d); Aufnahmen der Gel-Oberflächen (a, b) sowie des Gel-Inneren (c, d)

In zufälligen Stichproben der hACLC-Ausrichtung auf der Oberfläche jeweils eines unstimulierten und eines stimulierten Gels konnte gezeigt werden, dass die hACLC auf der unstimulierten Probe relativ zu den angrenzenden Zellen eine parallele Anordnung hatten. Die Richtung dieser Anordnungen variierte jedoch in den verschiedenen Stichproben (Abbildung 45).

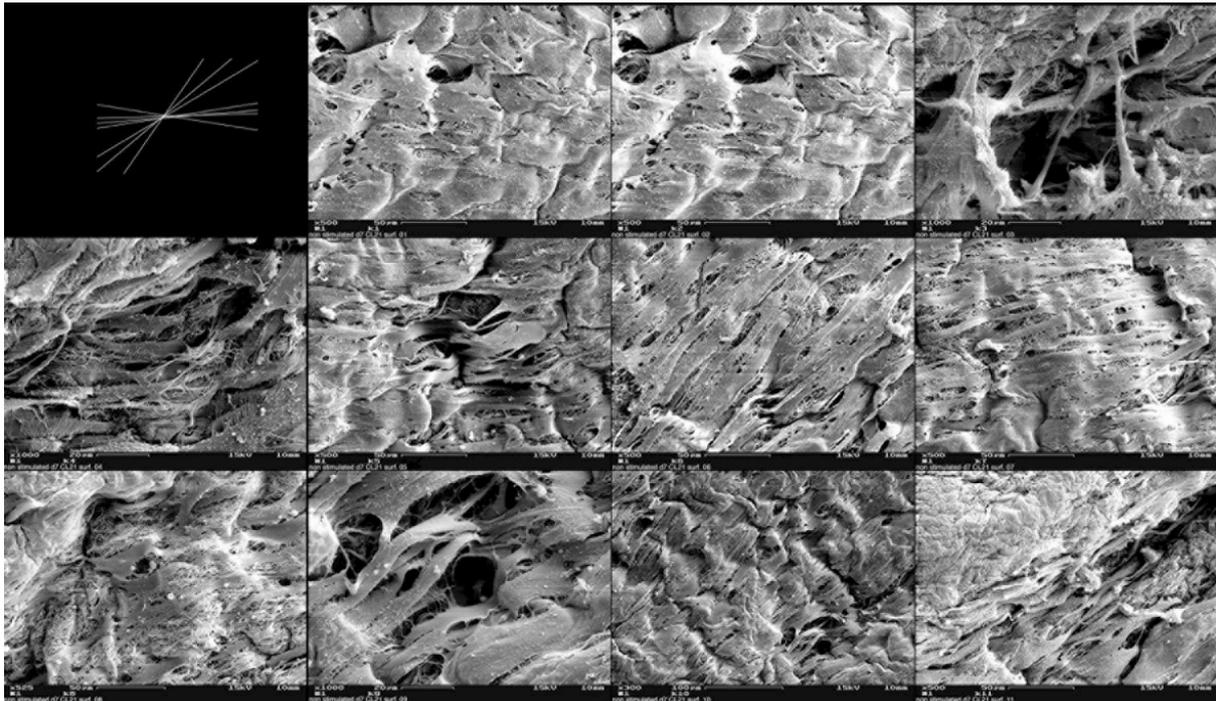


Abbildung 45: Rasterelektronenmikroskopischer Vergleich der Orientierung von hACLCL auf der Oberfläche eines Kollagen-Typ-I-Gels ohne mechanische Belastung. Die Aufnahmebereiche wurden zufällig ausgewählt. Die Ausrichtung des REM-Präparates ist bei allen Aufnahmen identisch. Die mittlere Orientierung der hACLCL je Aufnahme ist als Geradenschar dargestellt (links oben)

In zufälligen Stichproben der hACLCL-Ausrichtung auf der Oberfläche des stimulierten Gels konnte gezeigt werden, dass die hACLCL auf der stimulierten Probe relativ zu den angrenzenden Zellen eine parallele Anordnung hatten. Die Richtung der Anordnungen war im gesamten linearen Ring-Gel jedoch nahezu identisch (Abbildung 46).

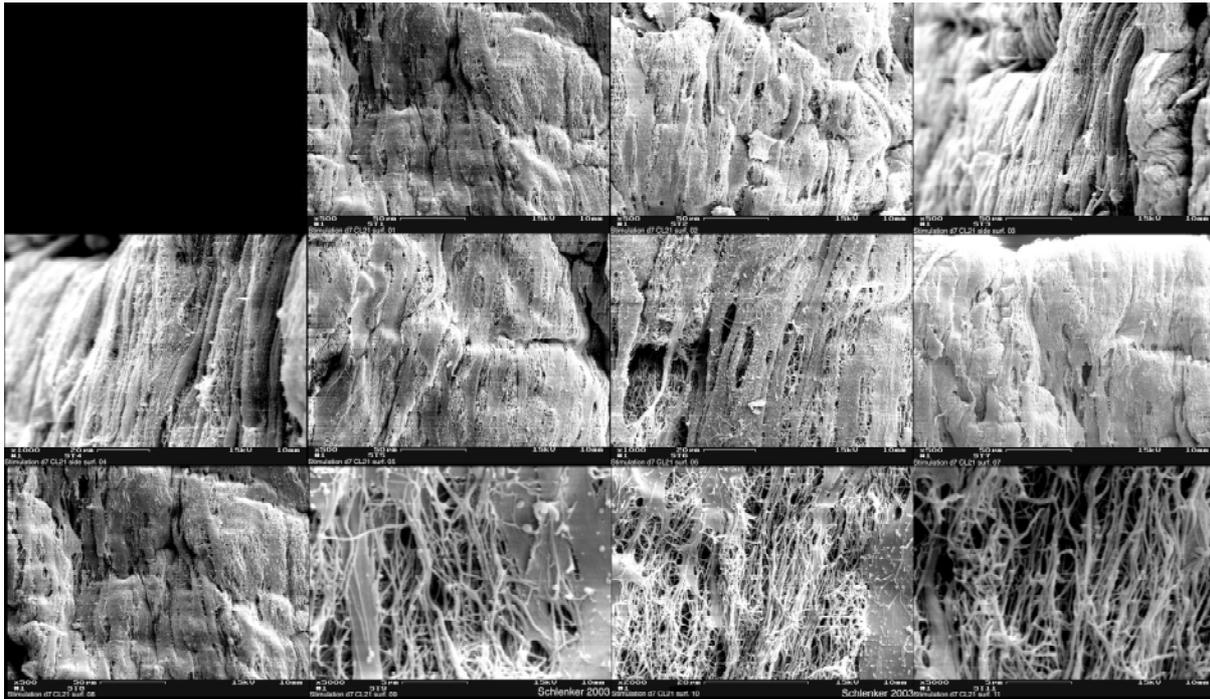


Abbildung 46: Rasterelektronenmikroskopischer Vergleich der Orientierung von hAFLC auf der Oberfläche eines stimulierten Kollagen-Typ-I-Gels. Die Aufnahmebereiche wurden zufällig ausgewählt. Die Ausrichtung des REM-Präparates ist bei allen Aufnahmen identisch.

3.2.2 Polylaktid-Zellträger

Um den möglichen Einsatz von textilen, texturierten PLA-Fasern als Zellträger für die Applikation von Zugdehnungen zu beurteilen, wurden umfangreichen Untersuchungen an hMPC- und hAFLC-besiedelten Konstrukten durchgeführt. Der Einfluss der mechanischen Stimulation auf die Genexpression beider Zelltypen in den Konstrukten wurde mit *real time*-RT-PCR untersucht.

3.2.2.1 Beeinflussung der Genexpression humaner, mesenchymaler Progenitorzellen

Die Stimulation der MPC besiedelten PLA Faser Konstrukte zeigt nach 15 Tagen teilweise große Wirkung auf Gene wie Tenascin-C, Kollagen-Typ 3, Fibronectin und MMP1. Die Variation der Spender abhängigen Reaktion ist jedoch so stark, dass hier nur deskriptiv auf die teilweise großen Effekte hingewiesen werden kann, ohne jedoch ein von einem statistisch soliden Wert zu sprechen. Das *smooth muscle actin* (72%) und TIMP2 (30%) jedoch wurden signifikant ($p=0.031$) herunterreguliert (Abbildung 47).

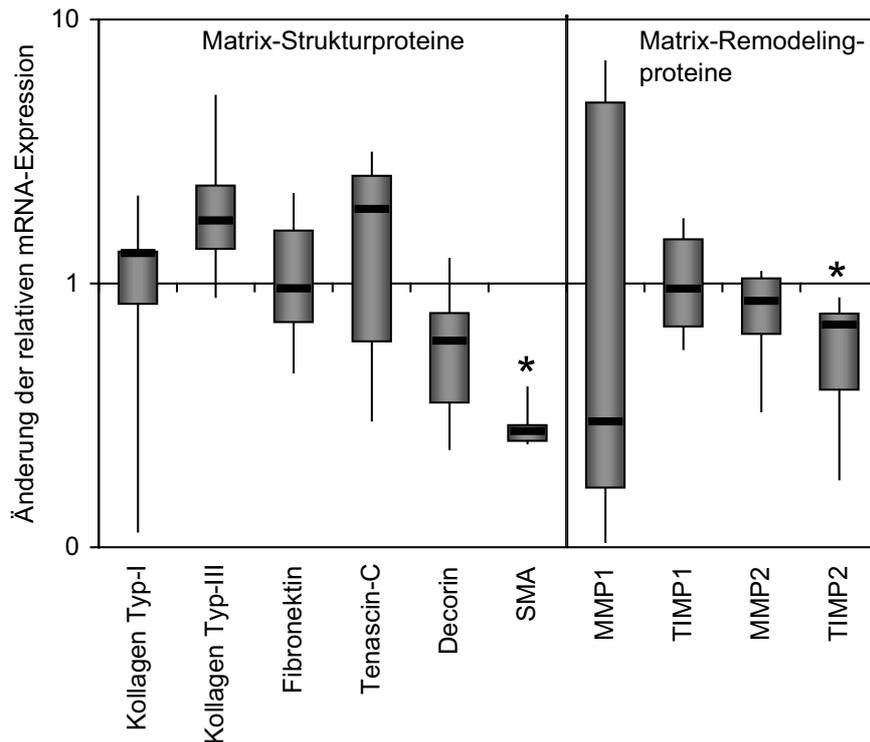


Abbildung 47: Einfluss zyklischer, uniaxialer Dehnung (1 Hz*1 Std./Tag; Amplitude 5%; n=6) auf die relative Genexpression (GAPDH-Normierung) von hMPC (900.000 Zellen/Konstrukt) in textilen PLA-Fasern nach 15 Tagen. Logarithmische Boxplot-Darstellung stimulierter Konstrukte bezogen auf unstimulierte Kontrollen. Der Wert 1 repräsentiert die Kontrollen. * $p < 0.05$ Wilcoxon-signed-ranked-Test.

3.2.2.2 Beeinflussung der Genexpression humaner, primärer Kreuzbandzellen

Die Expressionen der verschiedenen Zielgene, wurden in den mit Kreuzbandzellen besiedelten PLA-Konstrukten an Tag 15 untersucht (Kollagen-Typ-I – Typ-III, Tenascin-C, Fibronektin, Decorin, *smooth muscle actin*, MMP1, MMP2, TIMP1, TIMP2). Die Stimulation mit 5% Dehnung bewirkt bei den meisten untersuchten Genen eine zum Teil starke Veränderung. Kollagen-Typ-I wurde stark exprimiert und zeigt einen Anstieg von 163% ($p=0,031$) durch die mechanische Belastung. Kollagen-Typ-III wurde um 431% ($p=0,031$) erhöht exprimiert. Tenascin-C wurde um 340% ($p=0,031$) gesteigert. Fibronektin war durch die Stimulation um 337% ($p=0,031$) erhöht. Decorin wurde leicht (-48%) erniedrigt exprimiert. Das *smooth muscle actin* wurde um 75% ($p=0,031$) erniedrigt (Abbildung 48).

Die proteolytischen Enzyme für den Umbau der Kollagenmatrix und deren Inhibitoren wurden in ihrer Genexpression nicht moduliert. MMP1 und MMP2 wurden durch den mechanischen Stimulus nicht verändert. Die Inhibitoren TIMP1 (+25%) und TIMP2 (-44%) wurden ebenfalls nicht signifikant beeinflusst (Abbildung 48).

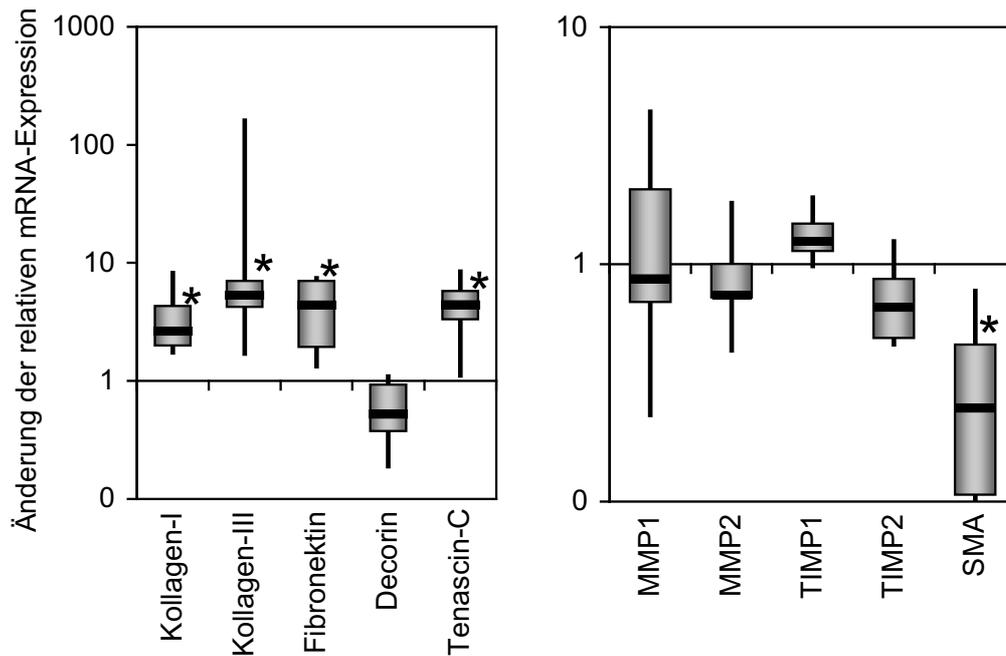


Abbildung 48: Einfluss zyklischer, uniaxialer Dehnung (1 Hz*1 Std./Tag; 5% Amplitude; n=6) auf die relative Genexpression (GAPDH-Normierung) von hACL C (900.000 Zellen/Konstrukt) in textilen PLA-Fasern nach 15 Tagen. Logarithmische Boxplot-Darstellung stimulierter Konstrukte bezogen auf unstimulierte Kontrollen. Der Wert 1 repräsentiert die Kontrollen. * $p < 0,05$ Wilcoxon-signed-ranked-Test

Die Stimulation mit 2% Dehnung bewirkt ebenfalls bei den meisten untersuchten Genen eine Veränderung. Kollagen-Typ-I zeigte einen Anstieg von 65%. Kollagen-Typ-III wurde um 221% ($p=0,031$) erhöht exprimiert. Tenascin-C wurde um 250% ($p=0,031$) gesteigert. Fibronectin wurde durch die Stimulation nicht beeinflusst. Decorin wurde leicht (-29%; $p=0,031$) erniedrigt exprimiert. Das *smooth muscle actin* wurde um 51% ($p=0,031$) erniedrigt (Abbildung 49).

Die proteolytischen Enzyme für den Umbau der Kollagenmatrix und deren Inhibitoren wurden teilweise in ihrer Genexpression moduliert. MMP1 wurde durch den mechanischen Stimulus nicht verändert, MMP2 jedoch wurde um -20% ($p=0,031$) leicht erniedrigt exprimiert. TIMP1 (+21%) und TIMP2 (-11%) wurden nicht beeinflusst (Abbildung 49).

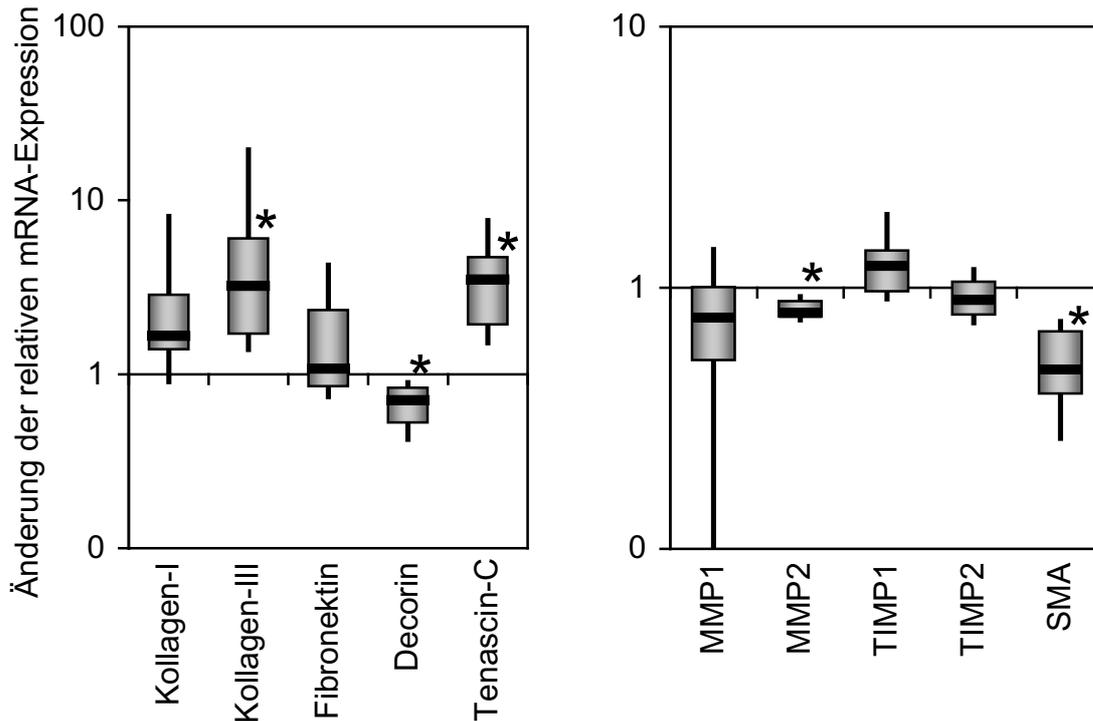


Abbildung 49: Einfluss zyklischer, uniaxialer Dehnung (1 Hz*1 Std./Tag; 2% Amplitude; n=6) auf die relative Genexpression (GAPDH-Normierung) von hACL (900.000 Zellen/Konstrukt) in textilen PLA-Fasern nach 15 Tagen. Logarithmische Boxplot-Darstellung stimulierter Konstrukte bezogen auf unstimulierte Kontrollen. Der Wert 1 repräsentiert die Kontrollen. * $p < 0.05$ Wilcoxon-signed-ranked-Test

Einfluss der Dehnungsamplitude

Der direkte Vergleich der beiden Amplituden zeigte eine signifikante ($p=0,031$) Abhängigkeit der Fibronektin-Expressions-Änderung von der applizierten Dehnungsamplitude. Die Expression wurde durch die 5% Dehnung um 329% stärker erhöht als nach 2% Dehnung. Hinweise auf eine Amplitudenabhängigkeit fanden sich als starke Tendenzen auch bei den Genen Kollagen-Typ-I und Typ-III ($p=0,062$) (Abbildung 50).

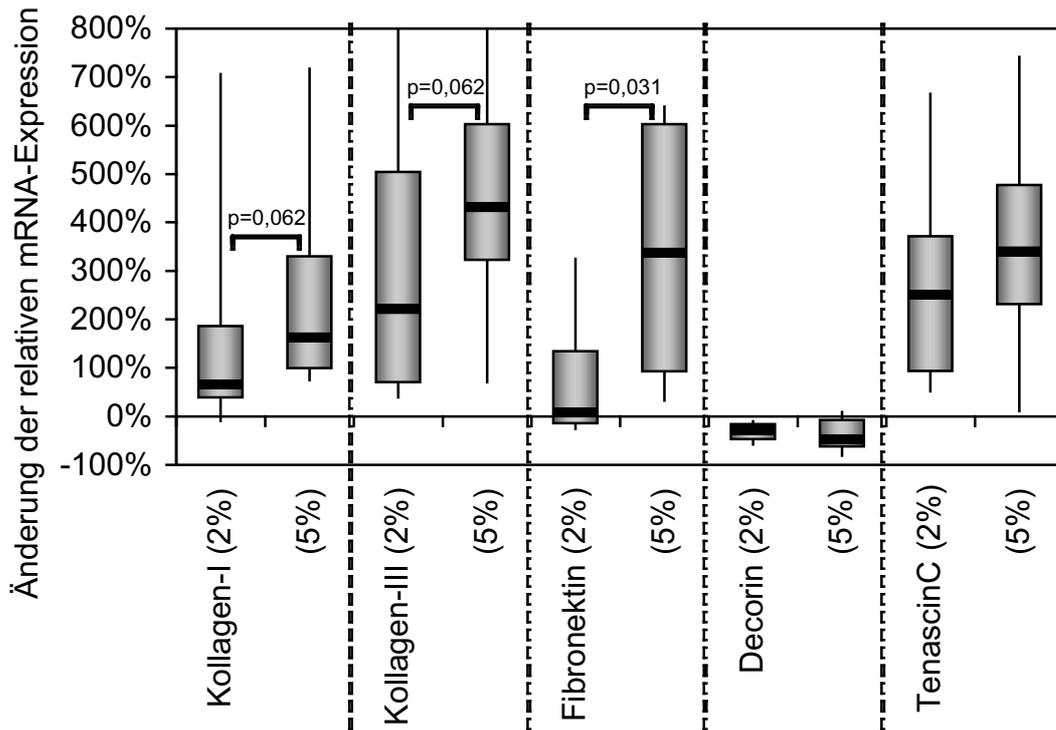


Abbildung 50: Amplitudeneinfluss (2% und 5%) bei zyklischer, uniaxialer Dehnung (1 Hz*1 Std./Tag; n=6) auf die relative Genexpression (GAPDH-Normierung) Matrix-Strukturproteine von hAFLC (900.000 Zellen/Konstrukt) in textilen PLA-Fasern nach 15 Tagen. Boxplot-Darstellung stimulierter Konstrukte bezogen auf unstimulierte Kontrollen. Der Wert 0 repräsentiert die Kontrollen. Wilcoxon-signed-ranked-Test

Bei den proteolytischen Enzymen und deren Inhibitoren konnte der Amplitudeneinfluss nicht gezeigt werden. Das *smooth muscle actin* wurde durch die Applikation von 5% Dehnung um 29% stärker, jedoch nicht signifikant ($p=0,062$), erniedrigt exprimiert (Abbildung 51).

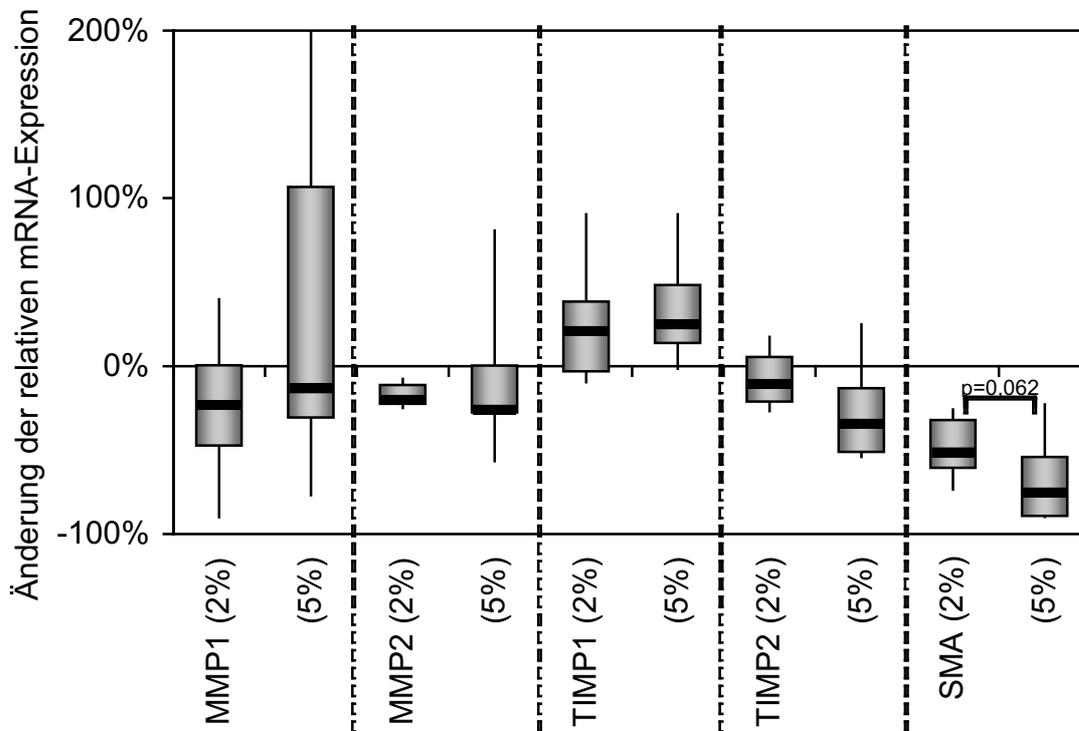


Abbildung 51: Amplitudeneinfluss (2% und 5%) nach zyklischer, uniaxialer Dehnung (1 Hz*1 Std./Tag; n=6) auf die relative Genexpression (GAPDH-Normierung) der Matrix-Remodelingproteine von hAFLC (900.000 Zellen/Konstrukt) in textilen PLA-Fasern nach 15 Tagen. Boxplot-Darstellung stimulierter Konstrukte bezogen auf unstimulierte Kontrollen. Der Wert 0 repräsentiert die Kontrollen. Wilcoxon-signed-ranked-Test

Zusammenfassung:

Die Genexpression der hAFLC zeigte bei vielen Genen eine zum Teil starke Beeinflussung durch die Applikation zyklischer Dehnungsreize. Die untersuchten Gene aus der Familie der Matrix-Strukturproteine wurden überwiegend in ihrem Expressionsniveau erhöht. Die Gene des Matrix-Remodelings wurden nicht beeinflusst (Abbildung 48 und Abbildung 49). Der Vergleich von 2% und 5% Dehnungsamplitude zeigte eine Amplitudenabhängigkeit der Dehnungseffekte (Abbildung 50 und Abbildung 51).

4 Diskussion

4.1 Charakterisierung der Zellen

4.1.1 humane mesenchymale Progenitorzellen

Die hMPC wurden in Stichproben vor ihrem Einsatz in den Versuchen mittels verschiedener Oberflächenantigene (CD9, CD90, CD44, CD105, CD166, Stro1) als mesenchymale Progenitorzellen identifiziert. Die Zuordnung erfolgte nach dem aktuellen Wissensstand. Diese Identifizierung ist jedoch nicht eindeutig. Zum einen konnten wir eine gewisse Heterogenität bezüglich des Differenzierungsstatus der einzelnen Zellpopulationen finden, wie sie unter diesen Kulturbedingungen auch schon in der Literatur beschrieben wurde⁹⁸. Zum anderen gibt es bisher keine absolut eindeutigen hMPC-Oberflächenantigene. Die hMPC-Marker können zum Teil auch auf Zellen anderer Differenzierungsrichtungen nachgewiesen werden. Dies konnte auch in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden¹¹³. Das Oberflächenantigen Stro1 erwies sich als der am besten geeignete Marker^{114 115 20}. Insgesamt ist daher davon auszugehen, dass die in den Versuchen eingesetzten hMPC bezüglich ihres Differenzierungszustandes variierten.

Moreau et al. und weitere Forschergruppen zeigten die Expression zahlreicher Ligament spezifischer Gene ebenfalls durch MPC^{14 17 116}. Wir konnten die Expression der charakteristischen Ligamentproteine auch in den hMPC nachweisen. Im Vergleich mit den Expressionsniveaus der hACLCLC war eine stärkere Grundexpression der MMP's und des Kollagen-Typ-I zu beobachten.

4.1.2 humane Kreuzbandzellen

Eine Identifizierung der hACLCLC mittels Oberflächenantigenen war nicht möglich. Aktuell sind keine Fibroblasten-spezifischen Oberflächenantigene bekannt. Die hACLCLC wiesen jedoch das typische mRNA-Expressionsprofil auf, wie es aus der Literatur für Fibroblasten bekannt ist^{25 5 109 39}. In zahlreichen Studien wurde für Fibroblasten in kollagenen Matrices die Protein- und Genexpressionen von Kollagen-Typ-I, Typ-III, Tenascin, Fibronectin, MMP1, MMP2, TIMP1, TIMP2 und *smooth muscle actin* gezeigt^{117 118 119 120 121}. Einige als osteogene Marker bekannte Gene, wie Osteokalzin (OC) und alkalische Phosphatase (AP), konnten ebenfalls von uns in Stichproben in hACLCLC nachgewiesen werden. Die Expression osteogener Marker wurde z. B. von Murakami et al. für Fibroblasten des Zahnhalteapparates nachgewiesen, sie

fanden Subpopulationen, die AP- und gleichzeitig OC-positiv waren^{122 123 124}. Eine mögliche Heterogenität der hACL-Populationen ist somit nicht auszuschließen.

4.2 Eignung der Zellträger für das Tissue Engineering von Bandgewebe

4.2.1 Kollagen-Typ-I-Gele

Durch die Prüfung der Kollagen-Typ-I Matrix hinsichtlich ihrer Eignung für das Tissue Engineering von Bandgewebe konnten wir übereinstimmend mit anderen Studien ebenfalls gute Eigenschaften dieser artifiziellen Kollagen-Typ-I Matrix bezüglich Handhabung, Zellviabilität, Morphologie, Genexpression nachweisen^{107 125 17}. Das Gel ließ sich gut mit den hMPC und hACLc besiedeln und in den gewünschten Geometrien kultivieren. Die Kultivierung der Zellen war in der Gel-Matrix auch über 24 Tage hinaus möglich. In Arbeiten aus unserer Gruppe konnte bereits die Eignung der Kollagen-Typ-I-Gel-Matrix für die Kultivierung von humanen Bandscheibenzellen¹²⁶ und hMPC¹¹² gezeigt werden, was wir in den Vorversuchen zu dieser Studie bezüglich hMPC und hACLc bestätigen konnten. In unseren Versuchen wählten wir eine Ring-Geometrie. Diese ermöglichte es, die Gele so aufzuspannen, dass in den geraden Bereichen zwischen den Aufhängungen ausschließlich uniaxiale Zugspannungen auftreten konnten. Ein weiterer Vorteil dieser Geometrie war der gute Stoffaustausch durch die extrem kurzen Diffusionswege. Eine Limitierung der Geometrie war das Auftreten von Druckbelastungen in den Bereichen um die Verankerungen herum. Diese Druckspannungen konnten einerseits durch die Kontraktion der Gele oder durch die Dehnungsexperimente auftreten. Um einen Druckeinfluss in unseren Ergebnissen zu vermeiden, wurden die Verankerungsbereiche abgetrennt und gingen nicht in die Analysen mit ein. In Stichproben untersuchten wir jedoch die Änderung der mRNA-Expression bei Auswertung der gesamten Konstrukte und konnten keinen deutlichen Einfluss der Verankerungsbereiche auf die Reaktion zeigen (Ergebnisse nicht dargestellt).

Nach der Kultivierung von hMPC oder hACLc in der Kollagen-Typ-I Matrix konnte die unterschiedliche Morphologie, wie es aus der Kultivierung auf Plastikoberflächen bekannt ist, nicht mehr nachgewiesen werden. Wie auch von Garvin et al. beschrieben nahmen die Zellen in der fibrillären Matrix eine eher bipolare Morphologie an. Wenn die Gele statisch aufgespannt waren, konnten von uns ebenso die von Garvin et al. beschriebene Ausrichtung und die Organisation beider Zelltypen und der Matrix in rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen gezeigt werden, die dem Aufbau im Sehnen- und Ligamentgewebe entsprach¹²⁷. Die Kontraktion der Matrix durch die Zellen führte zu wesentlichen Veränderungen der anfangs lockeren, inhomogenen und unorientierten Matrix. Die auffällige Bildung eines Zell-

Layers an der Oberfläche der Kollagen-Typ-I-Gele, die wir mit hMPC oder hACLCL fanden, wurde von Garvin et al. als Epitendon-ähnlicher Zell-Layer gewertet¹²⁷.

Die Kontraktion der Kollagen-Typ-I-Gele durch hMPC und hACLCL ist sowohl für hMPC als auch für Fibroblasten beschrieben^{84 128 81 129 130 107}. Seliktar et al. konnten durch humane Hautfibroblasten und verschiedene glatte Muskelzellen eine Kontraktion der Gel-Matrix auf weniger als 30% des Ausgangsvolumens zeigen¹³¹. Die hMPC bewirkten in unseren Versuchen eine stärkere und frühere Kontraktion als die hACLCL. Das kann durch die stärkere Proliferation der hMPC in den Gelen erklärt werden, da von Awad et al. gezeigt wurde, dass die Kontraktion abhängig von der Zelldichte in den Konstrukten war¹⁰⁷. Eastwood et al. schlossen aus ihren Versuchen, dass die Zellen in Kollagen-Matrices sich in Richtung der größten mechanischen Belastung ausrichteten, und dabei auf extrem feine mechanische Einflüsse reagierten¹³². Awad et al. und Phillips et al. kamen zu dem Schluss, dass durch die dynamischen Veränderungen der Matrix ein fibroblastärer Zelltyp beziehungsweise die fibroblastäre Differenzierung von hMPC gefördert werden kann^{107 119}.

Bezüglich der Viabilität und Proliferation von humanen Bandscheibenzellen und hMPC wurden Kollagen-Typ-I-Gele in Rechteck-Geometrie bereits charakterisiert^{126 112}. In unseren Vorversuchen wurde zusätzlich das Proliferationsverhalten von hACLCL in Rechteck-Gelen sowie der neuen Ring-Geometrie untersucht. Die Viabilität war mit durchschnittlich 80% auch über 21 Tage hinweg gut. Auffallend war die bessere Viabilität und Proliferation in der Ring-Geometrie. In den Rechteck-Gelen konnte keine und in den Ring-Gelen eine geringfügige Zunahme der Zellzahl gefunden werden. Verglichen mit der Vermehrung in Zellkulturflaschen (2D) bedeutete das eine geringere Proliferation. Mio et al. zeigten, dass Fibroblasten in 3-D-Kollagen-Gel-Kultivierung nur leicht, oder nicht auf Wachstumsstimulation durch FCS, PDGF und Insulin reagieren¹³⁰. Die tendenziell bessere Proliferation der Zellen in der Ring-Geometrie wurde möglicherweise durch die bessere Nährstoff- und damit auch FCS-Versorgung verursacht. Wegen einer geringen Dicke der Ring-Gele (2 bis 4 mm) und des relativ großen Volumens (7 ml) des Nährmediums war von einer besseren Versorgung der Zellen mit Medium auszugehen.

Aufgrund der extrem geringen Kräfte, derer es bedurfte um die Kollagen-Gele zu dehnen ($F < 0,05$ N bei 5% Dehnung) oder zu zerreißen (0,18 bis 0,25 N) konnten wir die Materialeigenschaften der Gel-Konstrukte mit unserem Kraftaufnehmer nur im Rahmen orientierender Versuche bestimmen (Daten nicht dargestellt). Die viskoelastischen Eigenschaften der Gel-Ringe konnten nicht bestimmt werden. In der Literatur wurden jedoch die viskoelastischen Eigenschaften vergleichbarer Materialien beschrieben^{133 134 135}. Krishnan

et al. zeigten, dass trotz der viskoelastischen Eigenschaften von Kollagen-Typ-I-Gel-Konstrukten die Materialeigenschaften bei Applikation zyklischer Dehnungen stabil gehalten werden konnten¹³⁶. Hierfür war vermutlich die Zell vermittelte Gel-Kontraktion verantwortlich, die eine Längenzunahme nach Dehnung wieder kompensierte.

Da wir nur sehr kleine Kräfte und physiologische Dehnungen von maximal 5% applizierten, gingen wir davon aus, dass die Zell-Gel-Konstrukte über die Versuchsdauer hinweg keine negativen Veränderungen erfahren würden. Wir konnten jedoch auch in unseren Versuchen beobachten, dass es zu plastischen Verformungen der gedehnten Gel-Konstrukte kam. Diese Materialeigenschaften der Kollagen-Typ-I-Gele stellen eine deutliche Limitierung für den Einsatz im Tissue Engineering und *in vivo* dar. Besser geeignet wäre hierfür eine stabilere Matrix, welche die guten Eigenschaften der Kollagen-Gele bezüglich der Zellbesiedlung mit besseren mechanischen Eigenschaften (Elastizität, hohe Reißkraft bei geringem Bauteil-Modul) vereint. Im Folgenden wurde ein solcher Zellträger, basierend auf Polylaktid entwickelt und untersucht.

Für die Beurteilung des Kollagen-Typ-I-Geles und der verschiedenen Geometrien untersuchten wir die Genexpressionen der hA₁CLC in den Kollagen-Typ-I-Gel-Konstrukten. Wir fanden mit Rechteck und 6-well-Geometrie eine Expression der Matrix-Struktur-Proteine, wie sie aus der Literatur bekannt waren^{137 138 117 139 140}. Das Kollagen-Typ-I und Fibronectin wurde stark exprimiert, wohingegen das Kollagen-Typ-III und Tenascin-C schwach exprimiert wurden. Die schwächere Expression des Kollagen-Typ-III im Vergleich zu Typ-I gilt als charakteristisch für das Ligamentgewebe.

Auch in den Ring-Geometrien fanden wir eine Gruppe Gene mit hohem und eine Gruppe mit niedrigem Expressionsniveau. Das Fibronectin und die Kollagene waren stark exprimiert. Die Kollagene Typ-I und Typ-III waren annähernd gleich stark exprimiert (2 bis 2,5fach GAPDH). Diese hohe Kollagen-Typ-III Expression ist ungewöhnlich und wird sonst im Zusammenhang mit heilenden oder embryonalen Bandgewebe gesehen³¹.

4.2.2 Polyactid-Scaffolds

Die PLA-Faser-Konstrukte, die in dieser Studie eingesetzt wurden, sind als Zellträger in einer modularen Ligamentprothese konzipiert. Wegen seiner relativ geringen Zugfestigkeit muss dieser PLA-Zellträger bei der Implantation mit einem Lastträger kombiniert werden^{105 141}. Die Untersuchung der Eigenschaften hMPC-besiedelter PLA-Konstrukte zeigt deren hervorragenden Eignung als Zellträger für das Tissue Engineering von Bandersatz. Zell-Faser-Interaktion, Porosität, Proliferation, Viabilität, Genexpression und mechanische

Eigenschaften machen deutlich, dass dieser PLA-Zellträger ein geeignetes Kultursystem für das Tissue Engineering ist. Die hervorragenden Eigenschaften bezüglich der Besiedlung und der Verteilung der Zellen wurden durch die spezielle Plasma-Behandlung ermöglicht, welche die hydrophilen Eigenschaften der PLA-Fasern und andere Biomaterialoberflächen signifikant erhöhen kann^{142 143}.

Die hMPC wurden zur Besiedlung der PLA-Fasern eingesetzt, weil sie Vorteile boten bezüglich der späteren Anwendung im Tissue Engineering. Die hMPC können mit einem relativ einfachen und kleinen Eingriff dem Patienten entnommen, aufgereinigt und vermehrt werden. Zudem konnte bereits die Fähigkeit der hMPC gezeigt werden, unter anderem Zellpopulationen zu bilden, die fibroblastäre Eigenschaften zeigten^{14 90 17}.

Mit den texturierten Fasern konnte eine Porosität von über 90% bei einer Porengröße von 100-200 µm erreicht werden. Diese Eigenschaften wurden als günstig für Besiedlung, Kultivierung und Geweberegeneration beschrieben¹⁴⁴. Da jede der gekräuselten Fasern das Konstrukt kontinuierlich durchspannte und das gesamte Konstrukt im Bereich bis 5% Dehnung linear elastisch war, war gesichert, dass bei einer Verformung des Konstruktes eine gleichmäßige Dehnungsverteilung erreicht wurde. Wegen der exzellenten Integration und Adhäsion der Zellen konnte durch eine Dehnung des Konstruktes so eine mechanische Dehnung auf die Zellen übertragen werden. Es wurde gezeigt, dass die Applikation solcher mechanischer Dehnungen eine Differenzierung der hMPC in die fibroblastäre Richtung begünstigen konnte^{17 18}.

Unsere guten Ergebnisse wurden durch die Ergebnisse anderer *in vitro*-Studien bestätigt^{145 116 146 147 144}. Hasegawa et al. konnten MPC aus Ratten auf PLA-Fasern kultivieren und mit osteogenen Medienzusätzen Hinweise auf eine fibroblastäre und osteoblastäre Beeinflussung nachweisen¹⁴⁵. Auch Ouyang et al. konnten die guten Eigenschaften von PLA-Fasern mit MPC aus Schweinen zeigen. Die Matrixproteine Kollagen-Typ-I, Typ-III und Tenascin konnten immunhistologisch in den Konstrukten nach vier Wochen nachgewiesen werden¹¹⁶. Cooper et al. sowie Lu et al. konnten ebenfalls eine gute Adhäsion und Proliferation von primären ACLC aus Kaninchen in hochgradig porösen ($\approx 67\%$) PLA-Faser-Konstrukten aufzeigen^{146 106}.

Der immunhistologische deutliche Nachweis von PCNA, auch im Zentrum der besiedelten Konstrukte, wies auf eine hohe Proliferationsaktivität der hMPC dort hin¹⁴⁸. Das deutet auf eine sehr gute Ernährung und einen guten Stoffaustausch hin. Auch die schwache beziehungsweise oft nicht messbare mRNA-Expression des Apoptose-Markers P53¹⁴⁹, deutete auf das eher seltene Auftreten des gesteuerten Zelltodes. Dies bestätigte sich ebenso

im Ergebnis der TUNEL-Färbung. Die Anzahl der TUNEL positiven Zellen entsprach dem, was auch in Kollagen-Typ-I-Konstrukten gezeigt wurde¹⁵⁰.

Es sind keine Gene bekannt, deren Expression ausschließlich dem Ligamentgewebe zuzuordnen wären. Wie es auch in vergleichbaren Arbeiten üblich war, haben wir die Differenzierung der hMPC in die fibroblastäre Entwicklungsrichtung an der Expression von Genen typischer Ligament-Matrix-Proteine (zum Beispiel Kollagen-Typ-I, Typ-III, Tenascin-C) und der fehlenden Expression osteogener oder chondrogener Markergene gemessen^{17 14}.

Das Kollagen-Typ-I, das Last tragende Protein der Ligament-Matrix, wurde nach 15 Tagen zwei bis dreifach erhöht exprimiert, das Kollagen-Typ-III blieb jedoch konstant auf einem niedrigeren Niveau. Der Nachweis der beiden Kollagene auf Proteinebene (Antikörpermarkierung) zeigte ebenfalls einen geringeren Gehalt an Kollagen-Typ-III, was auch als typisch für humanes Ligamentgewebe beschrieben wurde^{151 39}.

Auch die Expression von Fibronectin und Decorin, wichtige Proteine für die Matrix-Organisation und Zelladhäsion^{152 39} war leicht erhöht. Für das Decorin wurde gezeigt, dass es die Migration und die Expression von *smooth muscle actin* steigern kann. Daher wird dem Decorin eine wichtige Rolle bei der Heilung und dem Umbau des Band- und Ligamentgewebes zugeschrieben¹⁵³. Das Tenascin-C ist ein Ligament-Protein das die Zelladhäsion und die Matrixelastizität beeinflusst¹⁵⁴. Es wurde nach 15 Tagen signifikant fünffach erhöht exprimiert und auch der Nachweis des Proteins mittels Antikörpermarkierung zeigte ein starkes Signal. Das Vorhandensein von Tenascin-C ist typisch für mechanisch stark belastetes oder heilendes Bandewebe und kann auch als Indikator für den Umbau einer bandartigen Matrix gesehen werden^{154 155}. Der signifikante Anstieg von Tenascin-C, der leichte Anstieg des Decorins und der Nachweis des Kollagen-Typ-III können als Hinweis für eine beginnende Organisation einer Extrazellulären Matrix mit Ligament-typischen Eigenschaften gedeutet werden. Diese Interpretation wurde durch die Bestimmung der Matrix Metalloproteinasen gestärkt. Diese werden zum Beispiel von Fibroblasten während Matrix-Umbau und Migration exprimiert¹²¹. Die Expression von MMP1, einer Kollagenase, war signifikant erhöht. Auch die Expression des Inhibitors TIMP1 wurde durch die Kultivierung in den PLA-Fasern leicht erhöht. Auch dies deutet darauf hin, dass die hMPC bezüglich Matrix-Produktion und Matrixumbau in den PLA-Fasern aktiv sind.

Um einen Vergleich mit Zellen, die weitestgehend den Zellen des Kreuzbandgewebes entsprechen, anstellen zu können, wurde analog zu den obigen Untersuchungen auch die Interaktion von hACLIC mit den PLA-Fasern durchgeführt. Auch mit hACLIC konnten wir die guten Ergebnisse der hMPC-Besiedlungen bestätigen. Der neuartige PLA-Zellträger zeigte

auch mit hACLCLC bezüglich Adhäsion, Besiedlung, Proliferation, Viabilität und Langzeitkultivierung dieselben guten Eigenschaften wie wir sie schon nach der Besiedlung mit hMPC zeigen konnten. Cooper et al. zeigten für die Besiedlung von PLA-Geflechtes, dass ACLCLC auch in direktem Vergleich mit Fibroblasten anderen Ursprungs vergleichbar gute Eigenschaften haben wie in unserer Untersuchung¹⁵⁶.

Auch der Vergleich der mRNA-Expression von hACLCLC mit hMPC nach 15 Tagen zeigte Übereinstimmungen. Die Gene Fibronectin, Tenascin-C, smooth muscle actin, MMP1 und MMP2, welche in hMPC signifikant oder tendenziell erhöht exprimiert wurden, wurde ebenso von hACLCLC in den PLA-Konstrukten erhöht exprimiert. Das Expressionsniveau in Relation zur GAPDH-Expression war bei den hMPC höher als bei hACLCLC (nicht dargestellt). Das niedrigere Expressionsniveau ausdifferenzierter Fibroblasten aus dem ACL und dem medialem Seitenband konnte auch Ge et al. feststellen¹⁵⁷. Der Anstieg der Expression von MMP1 konnte in hACLCLC ebenfalls nachgewiesen werden. Dies kann in Zusammenhang mit der Neubildung einer biologischen extrazellulären Matrix stehen. Da sich jedoch in den histologischen Untersuchungen der hACLCLC-besiedelten Konstrukte diese Neubildung nur in geringem Maße zeigte, kann die Erhöhung der MMP1-Expression auch durch eine zunehmende Bindung von $\alpha 2$ - $\beta 1$ -Integrin erklärt werden¹³⁸. Die Bindung von $\alpha 2$ - $\beta 1$ -Integrin kann an sekretiertes Fibronectin und weitere Adhäsionsproteine erfolgen, die die Oberfläche der PLA-Fasern mit der Zeit möglicherweise zunehmend funktionalisierten⁴⁶.

Schlussfolgerung:

Kollagen-Typ-I-Gel ist eine geeignete artifizielle Matrix für die Herstellung dreidimensionaler Konstrukte. Die Gel-Matrix ermöglichte die Besiedlung und Kultivierung von hMPC oder hACLCLC für das Tissue Engineering. Die schlechten mechanischen Eigenschaften der Gel-Matrix und die aktive, dynamische Veränderung durch die Zellen stellten deren Einsatzmöglichkeit für biomechanische Versuche oder den *in vivo*-Einsatz jedoch in Frage. Die von uns vorgestellte PLA-Matrix ist hierfür klar vorzuziehen. Die Ergebnisse zeigten, dass der untersuchte PLA-Zellträger die dreidimensionale Kultivierung der hMPC, die gleichmäßige Besiedlung, einen fibroblastären Phänotyp und die Produktion einer ligamentartigen Matrix unterstützte. Auch die Interaktion der weiter differenzierten hACLCLC mit den PLA-Faser-Konstrukten zeigte im Vergleich zu den hMPC ähnliche Reaktionen. Dieses PLA-Scaffold ist sehr gut geeignet für das Tissue Engineering mit mechanischen Reizen und auch für die *in vivo*-Applikation als Zell-tragender Teil einer modularen Prothese.

4.3 Einfluss mechanischer Reize

Wie einleitend dargestellt, können mechanische Einflüsse das Verhalten und die Entwicklung von Zellen und Geweben beeinflussen. Für das Tissue Engineering von Bandgewebe sollte daher die Applikation mechanischer Reize genutzt werden, um Zellen wie hACLC oder hMPC zu stimulieren, eine Bandmatrix *de novo* zu bilden. Wegen der wichtigen Rolle der mechanischen Belastung für die Bildung von Bandgewebe während der Embryonalentwicklung ist es wahrscheinlich, dass dieser auch beim Tissue Engineering eine Schlüsselrolle zukommt. Ein weiterer Nutzen der mechanischen Steuerung von Zellen könnte darin liegen, dass man weitgehend auf eine biochemische Steuerung durch Wachstumsfaktoren verzichten könnte, welche kostspielig sind und nach einer Implantation am Patienten ungewünschte Auswirkungen auch auf andere Gewebe haben könnten.

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zum Einfluss von Dehnungsreizen auf hMPC oder hACLC in bandförmigen Kollagen-Typ-I Matrices und PLA-Faser-Konstrukten durchgeführt. Der von uns entwickelte Versuchsaufbau erlaubte die Applikation von uniaxialer Dehnung. Durch unsere Ring-Geometrie konnten wir auf den Einsatz zusätzlicher Ankermaterialien wie Korallen- oder Knochen-Blöcke, wie sie zum Beispiel in den Arbeiten von Langlier et al. oder Altman et al. eingesetzt wurden, verzichten^{84 17}.

Die Besiedlungsdichte und das Stimulationsprotokoll wurden nach den Erfahrungen anderer Studien, sowie eigener Vorarbeiten zum Tissue Engineering gewählt.

4.3.1 Kollagen-Typ-I-Gel

4.3.1.1 Beeinflussung von humanen mesenchymalen Progenitorzellen

Die mechanische Beeinflussung der Genexpression von hMPC war unser Hauptanliegen, da diese sich bereits als besonders geeignet für das Tissue Engineering erwiesen haben^{157 90 81}.

Die Expressionen der Matrix-Strukturproteine Kollagen-Typ-I und Typ-III, Fibronectin, Decorin und Tenascin-C, so wie der Matrix-Remodelingproteine MMP1, -2 und TIMP1, -2 wurden in den hMPC durch die täglich einstündige Applikation von 5% Dehnung über 21 Tage hinweg nicht signifikant beeinflusst. In Widerspruch zu unseren Ergebnissen konnten Altman et al. mit mesenchymalen Progenitorzellen in Kollagen-Gel eine Steigerung der Kollagen-Typ-I, Typ-III, Fibronectin und Tenascin-C Expression nach mechanischer Stimulation zeigen¹⁷. Dieser Widerspruch kann durch vier Abweichungen in der Studie von Altman et al. erklärt werden, die Zellquelle, das Stimulationsdesign, die Gabe von Wachstumsfaktoren und die höhere Zelldichte. Altman et al. verwendeten zum Teil bovine

MPC von sehr jungen Tieren, vermehrten diese unter Gabe von FGF2, dehnten diese mit niederfrequenter, uniaxialer Dehnung und Torsion und benutzten etwa die doppelte Zelldichte. Hinzu kommt noch der Einsatz poröser mineralischer Ankermaterialien welche sich auf erhöhend auf die Steifigkeit des Konstruktes auswirken können^{158 127}.

Dass das Stimulationsdesign wesentlich die Ergebnisse beeinflussen kann, konnte auch in anderen Studien gezeigt werden. Hsieh et al. zeigten durch Dehnung von ganzen ACL (Ratte), dass die Kollagen-Typ-I-Expression sowohl erhöht (1 Std. Stimulation) als auch erniedrigt (2 Std. Stimulation) werden kann¹⁰⁹. Kaspar et al. zeigten eine Abhängigkeit der Zellreaktion von der Dauer und der Frequenz des mechanischen Reizes bei osteoblastären Zellen¹⁵⁹. Möglicherweise waren unsere gewählten Versuchsparameter für die hMPC nicht in einem geeigneten Bereich. Das könnte sowohl die großen Streuungen als auch die teilweise entgegengesetzten Ergebnisse einzelner Spender erklären. Um diesen Aspekt zu ergründen war es notwendig ein weiteres Stimulationsdesign zu testen, worauf später eingegangen werden soll.

Die Möglichkeit, dass die verwendeten hMPC nicht homogen waren, könnte ebenfalls zu der großen Streuung und damit der nicht signifikanten Reaktion nach mechanischer Stimulation geführt haben. Um dies zu überprüfen müssen die hMPC in ihrem Differenzierungszustand vereinheitlicht werden. Dies kann durch den Einsatz gleichartiger Zellen (MPC-Zelllinie) oder die Zugabe biologischer Faktoren erreicht werden¹⁶⁰. Der Einsatz einer Zelllinie schließt sich für das Tissue Engineering aus, weil diese nicht dem Patienten implantiert werden können. Die Synchronisation mittels Wachstumsfaktoren, wie sie auch von Altman et al. und Moreau et al. eingesetzt wurden, sind hierfür besser geeignet (siehe Kapitel 3.2.1.2)^{17 14}.

Mauck et al. schlossen aus ihren Versuchen an Chondrozyten, dass mechanische Reize und Wachstumsfaktoren synergistisch wirken¹⁶¹. Von den Mitgliedern der TGF- β Gen-Familie und besonders dem GDF5 ist bekannt, dass sie die Heilung und Bildung von dichtem Bindegewebe beeinflussen^{162 160 12}. Daher führten wir orientierend (n=3) Stimulationsversuche mit Zugabe von GDF5 zum Medium durch. Nach sieben und 21 Tagen Versuch mit täglicher Kurzzeitstimulation konnten wir eine leichte Zunahme der mRNA-Expressionen von Kollagen-Typ-I und Typ-III und Decorin messen. Diese Expressionsänderungen lagen jedoch im Bereich der Vertrauensintervalle der Kurzzeitstimulation ohne Wachstumsfaktor-Gabe. Der Zusatz von GDF5 verstärkte die Expressionsänderung der Gene TIMP1, TIMP2, *smooth muscle actin*, Fibronectin, Kollagen-Typ-I und Typ-III leicht und schien damit den fibroblastären Phänotyp zu unterstützen. Es wurde von Koch et al. gezeigt, dass GDF5 die Differenzierung von MPC in die fibroblastäre und osteogene

Entwicklungsrichtung beeinflusst. Allerdings zeigten sich auch unter GDF5-Zusatz keine mechanischen Effekte. Da sich durch diese Synchronisierung und Steuerung der hMPC keine Veränderung in unseren Ergebnissen erzielen ließ, lag so der Schluss nahe, dass die mechanischen Parameter unserer Studie (Geometrie, Materialeigenschaften, Frequenz, Amplitude, Dauer) für die starke Streuung und die geringe Reaktion der Zellen verantwortlich sein könnten ¹⁶⁰.

Die abweichenden Ergebnisse der Studie von Altman et al. mit MPC in Kollagen-Typ-I-Gelen, welche eine Erhöhung der mRNA-Expressionen von Tenascin-C, Kollagen-Typ-I und Typ-III durch eine niederfrequente Dauerstimulation gezeigt haben, haben uns bewegt ein weiteres Stimulationsdesign zu testen ¹⁷. Ein Stimulationsdesign mit niederfrequenter Langzeit-Dehnung (0,2 Hz; 5%; 8 Std./Tag; 15 Tage) sollte zeigen, ob eine andere Antwort der hMPC auf mRNA-Expressionsebene zu erreichen wäre. Die Langzeitstimulation der Zell-Gel-Konstrukte bewirkte jedoch ebenfalls keine deutliche Expressionssteigerung der Ligament-typischen Gene. Die Genexpression von Kollagen-Typ-I, Typ-III und Fibronectin wurde erniedrigt. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den Ergebnissen von Altman et al. ¹⁷. Eine Erklärung hierfür können auch hier die Abweichungen in den Versuchen von Altman et al. sein. Die abweichende Zellquelle (junge Kälber), die Verwendung des Wachstumsfaktors bFGF (*basic fibroblast growth factor*) und eines anderen Serums ¹⁶³ während der Proliferation kann Unterschiede in der Mechanosensitivität beziehungsweise der Differenzierung der MPC bewirken. Für das bFGF konnten Skutek et al. bereits einen Zusammenhang zwischen mechanischer Stimulation und Sekretionsintensität in Fibroblasten zeigen ¹⁶⁴. Es ist denkbar, dass die von Altman et al. verwendeten MPC durch Alter, Herkunft, Serum und FGF-Beeinflussung so stark von unseren hMPC verschieden waren, dass wir keine Vergleichbarkeit mit unseren Versuchsbedingungen erreichen konnten. Für eine Klärung der Frage, ob die hMPC nicht mechanosensitiv waren, oder ob die mechanischen Eigenschaften des Kollagen-Typ-I-Gels eine Zellreaktion zum Teil verhinderten, wurden die Versuche mit hACLIC wiederholt.

4.3.1.2 Beeinflussung von humanen Kreuzbandzellen

Nachdem die mechanische Dehnung von hMPC-Gel-Konstrukten nicht die erwarteten Reaktionen bewirkte wurden orientierende Dehnungs-Experimente mit hACLIC durchgeführt. Einige Arbeiten in der Literatur über die Reaktion von Fibroblasten verschiedener Herkunft deuten darauf hin, dass Fibroblasten in Kollagen-Gelen auf mechanische Dehnung mit gesteigerter Matrixorganisation und Neusynthese reagieren. Mudera et al. zeigten, dass Fibroblasten in Kollagen-Gelen auf uniaxiale Dehnung mit einer gesteigerten MMP1, 2 und 3

Expression reagieren. Die Protease Inhibitoren TIMP1 und 2 wurden nicht beeinflusst¹⁶⁵. He et al. konnten zeigen, dass nach mechanischer Stimulation ein bis zu 20facher Anstieg der zytoplasmatischen Konzentration an zyklischem AMP (cAMP) und auch ein Anstieg der Proteinkinase A in Fibroblasten auftritt. Die Reaktion auf den mechanischen Reiz war abhängig vom Einstrom von Kalziumionen. Das zeigte, dass mechanische Reize einen grundlegenden Einfluss auf die Physiologie der Fibroblasten haben¹⁶⁶. Berry et al. zeigten, dass Fibroblasten-Kollagen-Gel-Konstrukte, die mit 10 % Dehnung stimuliert wurden, verstärkt Kollagen-Typ-I exprimierten. Gleichzeitig nahm die Matrixstabilität zu¹³⁷. Bezüglich der Mechanosensitivität und Orientierung der Fibroblasten konnten Garvin et al. zeigen, dass die Zellen auf einen Dehnungsreiz im Gel mit einer Zellorientierung reagieren, die dem mechanischen Reiz entsprach¹²⁷. Es wurde also bereits gezeigt, dass Fibroblasten in Kollagen-Typ-I-Gelen auf mechanische Reize reagieren und eine Optimierung der Matrix dadurch möglich ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch die Genexpression der hAACL durch die Applikation von 5% Dehnung (1 Std./Tag; 1 Hz) bezüglich der Ligament-typischen Gene nicht signifikant verändert. Die Schwankungen waren wie in den vorangegangenen Versuchen mit hMPC-Besiedlung sehr groß. Die hAACL wurden aus resiziertem Gewebe isoliert, bei dem es nicht mehr möglich war, die Verwendung von synovialen oder adipösem Gewebe auszuschließen. Eine Charakterisierung der hAACL mittels Oberflächenantigenen wie bei den hMPC war nicht möglich, da keine spezifischen Marker bekannt sind, um Bandfibrozyten von anderen Zellen klar abzugrenzen. Eine besonders große Streuung konnte bei den Expressionsniveaus der Gene MMP1, Tenascin-C und Decorin beobachtet werden. So war Tenascin-C bei einem Spender bis zu 3-fach exprimiert. Die mögliche Expressionserhöhung des Tenascin-C in mechanisch stimulierten Kollagen-Gelen wurde von Chiquet-Ehrismann et al. gezeigt, konnte von uns jedoch nur bei zwei von drei Spendern gezeigt werden¹¹⁷.

Die sowohl in der Literatur als auch in unseren Vorversuchen beobachtete Kontraktion der Kollagen-Typ-I-Gele durch Fibroblasten konnten wir ebenfalls bei den Konstrukten beobachten, die mechanisch gedehnt wurden¹³². Nach 21 Tagen war die Kollagenmatrix stark kontrahiert, verdichtet und die enthaltenen Fibroblasten zeigten die typische stark elongierte, bipolare Morphologie wie sie auch in den Studien von Eastwood et al. und Garvin et al. gezeigt wurde^{132 127}. Die Auswertung der REM-Aufnahmen bestätigte die Orientierung der hAACL in Richtung der Zugspannungen. In unbelasteten Kollagen-Gelen waren zwar direkt nebeneinander liegende hAACL parallel ausgerichtet, bezogen auf das gesamte Konstrukt konnte jedoch keine einheitliche Orientierung der hAACL gefunden werden. Eastwood et al.

konnten in REM-Aufnahmen ebenfalls die parallele Ausrichtung benachbarter Zellen zeigen¹³². Die Variation in der Zell-Orientierung in den unbelasteten Kontrollen beruhte nach den Erkenntnissen von Schwarz et al. darauf, dass durch die kreisrunde Geometrie der Kontroll-Gele und die fehlende mechanische Stimulation kein gerichteter mechanischer Einfluss auf die Zellen wirkte¹⁶⁷.

Schlussfolgerung:

Die Applikation von zyklischen uniaxialen Dehnungen auf hMPC- oder hACLC-besiedelte Kollagen-Typ-I-Gele mit bandartiger Ring-Geometrie bewirkte eine beschleunigte zellbedingte Matrixkontraktion. Die Analyse der mRNA-Expression zeigte, dass die Applikation mechanischer Dehnungen auf hMPC oder hACLC in Kollagen-Gel-Ringen keinen signifikanten Einfluss hatte. Beide Zelltypen wurden zwar zum Teil deutlich in der Expression der untersuchten Gene beeinflusst, aber diese Änderungen wiesen meist eine so große Varianz auf, dass keine signifikanten Änderungen nachweisbar waren. Eine Erklärung für die starke Schwankung in den Ergebnissen können die interindividuellen Unterschiede der verschiedenen Spender und die Heterogenität der Kulturen sein. Nach Vergleichen mit Studien anderer Forschergruppen hatten wir drei mögliche Ursachen für unsere abweichenden Ergebnisse und die starken Streuungen der Zellreaktionen geprüft:

1. Heterogenität in der Differenzierung der hMPC:

Die Synchronisation der hMPC durch den Zusatz von GDF5 zu den hMPC-besiedelten Gelen führte jedoch nicht zu einer mechanisch induzierten Expressionserhöhung der untersuchten Zielgene.

2. Ungünstige Frequenz und Amplitude der Stimulation:

Die Änderung des Stimulationsdesigns führte jedoch nicht zum Erfolg.

3. Mangelnde Mechanosensitivität der hMPC:

Der Einsatz von hACLC-besiedelten Gelen bestätigte jedoch die Ergebnisse der hMPC weitgehend.

Damit konnten wir schlussfolgern, dass in unseren Versuchen keine, beziehungsweise eine ungenügende, mechanische Dehnung der Zellen erfolgte. Die schlechten mechanischen Eigenschaften (Viskoelastizität) der eingesetzten unvernetzten Kollagen-Typ-I-Gele können durch ihre Dämpfungseigenschaften und das hohe Verlustmodul dazu geführt haben, dass die applizierte Dehnung kompensiert wurde^{158 167 135 136}. Im Folgenden wurde daher ein Zellträger mit elastischen Eigenschaften eingesetzt.

4.3.2 Polylactid-Scaffolds

Wir konnten eingangs bereits die hervorragenden Eigenschaften des texturierten PLA-Trägermaterials für die Kultivierung von hMPC und hACLC zeigen. Der Scaffold wurde als Zellträger konzipiert und war für den Einsatz von Dehnungen bis 5% elastisch verformbar. Der Scaffold eignet sich damit nicht nur für die Kultivierung von hMPC oder hACLC sondern auch für die Applikation von mechanischen Stimuli. Im Folgenden wurden besiedelte PLA-Konstrukte mit 2% oder 5% Dehnung stimuliert. Das Ziel war es, den möglichen Nutzen der mechanischen Stimulation von Zell-besiedelten PLA-Zellträgern für die *in vitro*-Generierung optimierter Implantate zu erforschen.

4.3.2.1 Beeinflussung von humanen mesenchymalen Progenitorzellen

Die Applikation von 5% Dehnung auf die hMPC bewirkte eine signifikante Erniedrigung der Expressionen von *smooth muscle actin* und TIMP2. Tendenzielle Änderungen der Gen-Expressionen konnten wir für Kollagen-Typ-III (Erhöhung) und Decorin (Erniedrigung) zeigen.

Die fibroblastäre Differenzierung von MPC zu Fibroblasten kann mit einer Erhöhung der Expressionen von Kollagen-Typ-I und Typ-III, Tenascin-C, *smooth muscle actin*, Fibronectin, Elastin und Vimentin belegt werden¹⁶⁸. Durch die Applikation der mechanischen Stimuli konnten wir keine Expressionserhöhungen dieser Gene finden. Das ist möglicherweise ein Hinweis darauf, dass der mechanische Reiz die hMPC nicht fibroblastär differenzierte. Die tendenzielle Kollagen-Typ-III Expressionserhöhung kann jedoch als Beginn einer fibroblastären Differenzierung gewertet werden, da Makisalo et al. in heilendem Bandgewebe (*in vivo*) wenig Kollagen-Typ-I aber viel Kollagen-Typ-III fanden und dies dem frühen Stadium des Heilungsprozesses zuschrieben³¹. Park et al. kamen zu dem Schluss, dass die mechanische Stimulation alleine nicht für eine vollständige Differenzierung von MPC ausreicht¹⁶⁹. Übertragen auf unsere Untersuchungsergebnisse könnte das bedeuten, dass die von uns eingesetzten hMPC durch den mechanischen Stimulus möglicherweise begannen fibroblastär zu differenzieren. Der mechanische Reiz und die PLA-Matrix reichte jedoch nicht aus diese Differenzierungsrichtung fortzuführen und abzuschließen.

Die Erniedrigung von *smooth muscle actin* war deutlich. Park et al. konnten zeigen, dass in equiaxial gedehnten Proben, in welchen Fibroblasten keine mechanischen Anreize hatten sich zu orientieren¹⁶⁷, die *smooth muscle actin*-Expression reduziert war. Wohingegen uniaxial gedehnte Fibroblasten *smooth muscle actin* verstärkt exprimierten, jedoch nur so lange, bis sie sich in 90° zur Dehnungsrichtung neu orientiert hatten^{169 170}. Wurde den hMPC dieses „Ausweichen“ bei acht bis zehn Prozent Dehnung unter zweidimensionalen Bedingungen

durch Richtungsgebende Oberflächen (sog. microgrooves) nicht ermöglicht, so blieb die *smooth muscle actin*-Expression erhöht¹⁷¹. Die verringerte Expression des *smooth muscle actin* nach 15 Tagen mit Dehnungsreizen in unseren Konstrukten deutet darauf hin, dass die hMPC in den gedehnten Proben eine fixe Orientierung eingenommen haben, die der Dehnungsverteilung entsprach, so dass das Zytoskelett weniger stark neu orientiert wurde als in den ungedehnten Proben. In Versuchen zum Einfluss hydrostatischen Druckes sowie von Scherkräften zeigten Kobayashi et al. eine Erhöhung der *smooth muscle actin*-Expression in MPC²⁰. Da diese mechanischen Reize nicht gerichtet sind, könnte die Umorganisation des Zytoskelettes induziert sein. Tufvesson et al. konnten zeigen, dass mit dem Vorhandensein von Decorin auch die Expression von *smooth muscle actin* einhergeht und beide Proteine auch für die Motilität der Zelle relevant sind¹⁵³. Das kann erklären, warum die Expression von Decorin tendenziell erniedrigt war. Auch Robbins et al. konnten nach uniaxialer Dehnung von bovinen Sehnen zeigen, dass die Fibrozyten zwar mit einem verändertem Expressionsmuster reagierten, die Decorin-Expression blieb jedoch unbeeinflusst¹¹⁰.

Die Gen-Expressionen der Kollagenase-1 (MMP1) und der Gelatinase-A (MMP2) sowie deren Inhibitoren, TIMP1 und TIMP2 wurden nach uniaxialer Dehnung unverändert exprimiert. Diese Proteine spielen u. a. eine Rolle bei der Zellmigration durch dichte Extrazelluläre Matrix. Die Erniedrigung der *smooth muscle actin*-Expression deutete darauf hin, dass durch die mechanische Dehnung die Migration jedoch verringert wurde. Damit konnte auch die Matrix umbauende Aktivität der hMPC verringert werden¹²¹. Hinzu kommt das weitgehende Fehlen einer dichten biologischen Matrix, welche einen enzymatischen Umbau induzieren könnte.

4.3.2.2 Beeinflussung von humanen Kreuzbandzellen

Die Applikation uniaxialer mechanischer Dehnungen von 2% und 5% bewirkte in hACL C eine deutliche Änderung des Expressionsprofils. Im Gegensatz zu den Reaktionen der hMPC wurden die Gene der meisten Matrix-Strukturproteine in ihrem Expressionsniveau signifikant erhöht. Die Steigerung der Expressionen von Kollagen-Typ-I und Typ-III, Tenascin-C und Fibronectin nach mechanischer Stimulation zeigt deutlich den positiven Einfluss der mechanischen Stimulation hinsichtlich Matrixproduktion und Differenzierung. Bestätigt werden unsere Ergebnisse auch durch die aktuelle Arbeit von Lee et al.⁸⁹. Die Autoren fanden nach Applikation von mechanischen Reizen auf humane Ligament-Zellen in Nanofaseraffolds ebenfalls eine Steigerung der Kollagen Biosynthese⁸⁹. Auch in Arbeiten unter zweidimensionalen Kulturbedingungen konnte von Bosch et al. eine Erhöhung der Kollagen-Typ-I und Typ-III sowie Fibronectin nach mechanischer Stimulation nachweisen⁸.

Die Expressionserhöhung des Tenascin-C durch mechanische Stimulation wurde von Chiquet-Ehrismann in Kollagen-Gelen mit Fibroblasten gezeigt¹¹⁷. Diese stimulationsbedingte Expressions-Änderung konnten wir ebenfalls mit hACL in unserem Scaffold zeigen.

Die Gene des Matrix-Remodelling wurden wenig beeinflusst. Die Expressionsminderung der Gene MMP2, TIMP2, Decorin und *smooth muscle actin* bestätigte die Ergebnisse der mechanischen Dehnung der hMPC in den PLA-Konstrukten. Yamaoka et al. untersuchten die Reaktion scleraler Fibroblasten auf zyklische Dehnung unter zweidimensionalen Kulturbedingungen und zeigten eine Erniedrigung von TIMP1 und keine Veränderungen bei den Proteinen TIMP2, MMP1 und MMP2¹⁷². Diese Ergebnisse stützen unsere Befunde. Bezüglich des Matrix-Remodelling sind zweidimensionale Arbeiten vermutlich besser mit unseren Versuchen vergleichbar, als dreidimensionale Arbeiten in Kollagen-Typ-I-Gelen, weil alleine die Anwesenheit einer kollagenen Matrix bereits die Expression dieser Gene beeinflussen kann, wie Helary et al. zeigen konnten¹²¹.

Der Vergleich der Reaktion der hACL auf 2% und 5% Dehnung zeigte eine signifikante Amplitudenabhängigkeit der Expressions-Änderungen von Fibronectin, sowie deutliche Tendenzen hierfür bei *smooth muscle actin*, TIMP2, Kollagen-Typ-I und Typ-III. In anderen Untersuchungen zur mechanischen Beeinflussung konnten mit verschiedenen Dehnungsamplituden ebenfalls Expressionserhöhungen einiger von uns untersuchter Gene gezeigt werden^{173 170 174 137 175}. Lavagnino et al. konnten in Rattenschwanz-Sehnen eine Abhängigkeit der Expressions-Änderung des MMP1 von der Dehnungsamplitude (3% versus 6%) feststellen¹⁷³. Auch Tanaka et al. konnten mit Osteoblasten eine Abhängigkeit der Expressions-Änderungen typischer Matrix-Gene von der Dehnungsamplitude finden¹⁷⁶. Kanda et al. zeigten dies zudem für verschiedenen Zelltypen gleichzeitig (glatte Muskelzellen, Endothelzellen, Fibroblasten) eine Amplitudenabhängigkeit der Zellantworten nach mechanischer Stimulation¹⁷⁷.

Die hACL reagierten in unseren Versuchen auf den mechanischen Reiz stärker mit einer erhöhten Expression der Matrix-Struktur-Proteine als die zuvor untersuchten hMPC. Das bestätigte unsere Interpretation, dass der mechanische Stimulus für hMPC kein genügender Differenzierungsreiz ist¹⁶⁹. Wie einleitend gezeigt, ist bekannt, dass MPC *in vitro* mechanosensitiv sind¹⁷⁸. Weyets et al. zeigten, dass die Reaktion osteoblastärer Zellen auf mechanische Reize von ihrem Differenzierungsgrad abhängt¹⁷⁹. Es ist daher möglich, dass MPC weniger sensitiv sind als ausdifferenzierte hACL, die einem mechanisch stark belasteten Gewebe entstammen.

Schlussfolgerungen:

Die Reaktion primärer hMPC in PLA-Scaffolds nach der Applikation zyklischer, uniaxialer Dehnung, deutet darauf hin, dass eine Differenzierung in die fibroblastäre Richtung durch den mechanischen Stimulus gefördert wird. Die nur tendenziellen Reaktionen, besonders der Matrix-Struktur-Proteine (Kollagen-Typ-I und Typ-III, Decorin, Tenascin-C, Fibronectin) machen jedoch deutlich, dass der mechanische Reiz alleine nicht genügt um eine fibroblastäre Differenzierung der hMPC zu bewirken. Die hACLC reagierten auf die mechanische Stimulation mit einer deutlichen Expressions-Erhöhung der Matrix-Struktur-Proteine (Kollagen-Typ-I und Typ-III, Tenascin-C, Fibronectin). Die Reaktion der hACLC zeigte zusätzlich eine zum Teil signifikante Korrelation mit der Größe der Dehnungsamplitude. Diese Ergebnisse zeigen, dass die von uns applizierten Dehnungsreize einen positiven, anabolen Einfluss auf die Matrix-Neusynthese von ausdifferenzierten, fibroblastären Zellen hatten.

Sowohl der neue PLA-Zellträger, als auch die mechanische Stimulation haben sich also in unserer Studie als nützlich für das Tissue Engineering von *in vitro* optimiertem Bandersatz erwiesen.

5 Zusammenfassung

In dieser Studie wurde der Einfluss zyklischer, uniaxialer Dehnung auf humane mesenchymale Progenitorzellen (hMPC) und humane Kreuzbandzellen (hACLC) in Kombination mit einer Hydrogel-Matrix (Kollagen-Typ-I) und einer synthetischen, textilen Polylaktid-Matrix (PLA) untersucht.

Das Kollagen-Typ-I-Gel erwies sich als geeignete artifizielle Matrix für die Herstellung dreidimensionaler Konstrukte. Die Gel-Matrix ermöglichte die Besiedlung und Kultivierung von hMPC oder hACLC. Die schlechten mechanischen Eigenschaften der Gel-Matrix und die aktive, dynamische Veränderung durch die Zellen stellten deren Einsatzmöglichkeit für biomechanische Versuche oder den *in vivo*-Einsatz in Frage. Die von uns vorgestellte PLA-Matrix ist hierfür klar vorzuziehen. Die Ergebnisse zeigten, dass der untersuchte PLA-Zellträger die dreidimensionale Kultivierung der hMPC, die gleichmäßige Besiedlung, einen fibroblastären Phänotyp und die Produktion einer ligamentartigen Matrix unterstützte.

Die Applikation mechanischer Reize auf hMPC- oder hACLC-besiedelte Kollagen-Typ-I-Gele mit bandartiger Ring-Geometrie bewirkte eine beschleunigte Zell-bedingte Matrixkontraktion. Die Stimulation zeigte keinen Einfluss auf die mRNA-Expression Ligament-spezifischer Gene. Eine mögliche Erklärung wäre, dass keine geeignete mechanische Dehnung der Zellen erfolgte. Bei beiden Zelltypen zeigten einzelne Spender Expressionsänderungen. Diese Änderungen waren jedoch nicht signifikant. Eine Erklärung für die starke Schwankung der Ergebnisse können die interindividuellen Unterschiede der verschiedenen Spender und die Heterogenität der Zellpopulationen sein. Die viskoelastischen Eigenschaften der eingesetzten unvernetzten Kollagen-Typ-I-Gele könnten durch ihre Dämpfungseigenschaften und das hohe Verlustmodul dazu geführt haben, dass die applizierte Dehnung kompensiert wurden. Um dieses Problem auszuschließen sollte ein Zellträger mit elastischen Eigenschaften verwendet werden.

In PLA-Scaffolds reagierten primäre hMPC ebenfalls nicht auf Dehnung. Die nur tendenziellen Reaktionen, besonders der Matrix-Struktur-Proteine (Kollagen-Typ-I und Typ-III, Decorin, Tenascin-C, Fibronectin) könnten darauf hinweisen, dass der mechanische Reiz alleine möglicherweise nicht genügt um eine fibroblastäre Differenzierung der hMPC zu bewirken. Mit der signifikanten Expressions-Erniedrigung des smooth muscle actin nach Dehnung konnten wir verifizieren, dass die hMPC in dem Scaffold einen Dehnungsreiz erfuhren.

Die hAFLC reagierten auf die mechanische Stimulation mit einer deutlichen Expressions-Erhöpfung der Matrix-Struktur-Proteine (Kollagen-Typ-I und Typ-III, Tenascin-C, Fibronectin) Diese Ergebnisse zeigen, dass die von uns applizierten Dehnungsreize einen positiven, anabolen Einfluss auf die Matrix-Neusynthese von ausdifferenzierten, fibroblastären Zellen hatten.

Der PLA-Zellträger und die mechanische Stimulation haben sich in der vorliegenden Studie als geeignet für das Tissue Engineering von *in vitro* optimiertem Bandergewebe erwiesen.

6 Literatur

1. Fu FH, Bennett CH, Lattermann C, Ma CB. Current trends in anterior cruciate ligament reconstruction. Part 1: Biology and biomechanics of reconstruction. *Am J Sports Med* 1999;27(6):821-30.
2. Odensten M, Gillquist J. Functional anatomy of the anterior cruciate ligament and a rationale for reconstruction. *J Bone Joint Surg Am* 1985;67(2):257-62.
3. Corry IS, Webb JM, Clingeleffer AJ, Pinczewski LA. Arthroscopic reconstruction of the anterior cruciate ligament. A comparison of patellar tendon autograft and four-strand hamstring tendon autograft. *Am J Sports Med* 1999;27(4):444-54.
4. Fu FH, Bennett CH, Ma CB, Menetrey J, Lattermann C. Current trends in anterior cruciate ligament reconstruction. Part II. Operative procedures and clinical correlations. *Am J Sports Med* 2000;28(1):124-30.
5. Bosch U, Krettek C. [Tissue engineering of tendons and ligaments. A new challenge]. *Unfallchirurg* 2002;105(2):88-94.
6. Altman GH, Horan RL, Lu HH, Moreau J, Martin I, Richmond JC, Kaplan DL. Silk matrix for tissue engineered anterior cruciate ligaments. *Biomaterials* 2002;23(20):4131-41.
7. Goh JC, Ouyang HW, Toh SL, Lee EH. Tissue engineering techniques in tendon and ligament replacement. *Med J Malaysia* 2004;59 Suppl B:47-8.
8. Bosch U, Zeichen J, Skutek M, Albers I, van Griensven M, Gassler N. [Effect of cyclical stretch on matrix synthesis of human patellar tendon cells]. *Unfallchirurg* 2002;105(5):437-42.
9. Butler DL, Noyes FR, Grood ES. Ligamentous restraints to anterior-posterior drawer in the human knee. A biomechanical study. *J Bone Joint Surg Am* 1980;62(2):259-70.
10. Butler DL, Awad HA. Perspectives on cell and collagen composites for tendon repair. *Clin Orthop* 1999(367 Suppl):S324-32.
11. Chen J, Altman GH, Karageorgiou V, Horan R, Collette A, Volloch V, Colabro T, Kaplan DL. Human bone marrow stromal cell and ligament fibroblast responses on RGD-modified silk fibers. *J Biomed Mater Res A* 2003;67(2):559-70.
12. Wolfman NM, Hattersley G, Cox K, Celeste AJ, Nelson R, Yamaji N, Dube JL, DiBlasio-Smith E, Nove J, Song JJ and others. 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* 1997;100(2):321-30.
13. Chiquet M, Sarasa-Renedo A, Tunc-Civelek V. Induction of tenascin-C by cyclic tensile strain versus growth factors: distinct contributions by Rho/ROCK and MAPK signaling pathways. *Biochim Biophys Acta* 2004;1693(3):193-204.
14. Moreau JE, Chen J, Bramono DS, Volloch V, Chernoff H, Vunjak-Novakovic G, Richmond JC, Kaplan DL, Altman GH. Growth factor induced fibroblast differentiation from human bone marrow stromal cells in vitro. *J Orthop Res* 2005;23(1):164-74.
15. Nakamura N, Shino K, Natsuume T, Horibe S, Matsumoto N, Kaneda Y, Ochi T. Early biological effect of in vivo gene transfer of platelet-derived growth factor (PDGF)-B into healing patellar ligament. *Gene Ther* 1998;5(9):1165-70.
16. Benjamin M, Evans EJ, Copp L. The histology of tendon attachments to bone in man. *J Anat* 1986;149:89-100.
17. Altman GH, Horan RL, Martin I, Farhadi J, Stark PR, Volloch V, Richmond JC, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL. Cell differentiation by mechanical stress. *Faseb J* 2002;16(2):270-2.
18. Altman GH, Lu HH, Horan RL, Calabro T, Ryder D, Kaplan DL, Stark P, Martin I, Richmond JC, Vunjak-Novakovic G. Advanced bioreactor with controlled application of multi-dimensional strain for tissue engineering. *J Biomech Eng* 2002;124(6):742-9.
19. Katsumi A, Naoe T, Matsushita T, Kaibuchi K, Schwartz MA. Integrin activation and matrix binding mediate cellular responses to mechanical stretch. *J Biol Chem* 2005;280(17):16546-9.
20. Kobayashi N, Yasu T, Ueba H, Sata M, Hashimoto S, Kuroki M, Saito M, Kawakami M. Mechanical stress promotes the expression of smooth muscle-like properties in marrow stromal cells. *Exp Hematol* 2004;32(12):1238-45.
21. Tillmann K. Partial and total replacement of the knee. *Scand J Rheumatol* 1974;3(2):63.

22. Gray DJ, Gardner E. Prenatal development of the human knee and superior tibiofibular joints. *Am J Anat* 1950;86(2):235-87.
23. McDermott L. Development of the human knee joint. *Arch Surg* 1943;49:705-719.
24. Gardner E, O'Rahilly R. The early development of the knee joint in staged human embryos. *J Anat* 1968;102(2):289-99.
25. Petersen W, Tillmann B. [Anatomy and function of the anterior cruciate ligament]. *Orthopade* 2002;31(8):710-8.
26. Amis AA, Dawkins GP. Functional anatomy of the anterior cruciate ligament. Fibre bundle actions related to ligament replacements and injuries. *J Bone Joint Surg Br* 1991;73(2):260-7.
27. Arnoczky SP. Anatomy of the anterior cruciate ligament. *Clin Orthop* 1983(172):19-25.
28. Brantigan O. The mechanics of the ligament and discs of the knee joint. 1941; *J bone joint surgery*(23a):44-66.
29. Kopsch R. 7 Untere Extremität; Knie. In: Tillmann BT, G.; Zilles, K., editor. *Anatomie des Menschen; Lehrbuch und Atlas*. Stuttgart; New-York : Thieme: Leonhardt, H.; 1987. p 562-566.
30. Fuss FK. Anatomy of the cruciate ligaments and their function in extension and flexion of the human knee joint. *Am J Anat* 1989;184(2):165-76.
31. Makisalo SE, Paavolainen PP, Lehto M, Skutnabb K, Slatis P. Collagen types I and III and fibronectin in healing anterior cruciate ligament after reconstruction with carbon fibre. *Injury* 1989;20(2):72-6.
32. Clark JM, Sidles JA. The interrelation of fiber bundles in the anterior cruciate ligament. *J Orthop Res* 1990;8(2):180-8.
33. Yahia LH, Drouin G. Microscopical investigation of canine anterior cruciate ligament and patellar tendon: collagen fascicle morphology and architecture. *J Orthop Res* 1989;7(2):243-51.
34. Arnoczky SP. Blood supply to the anterior cruciate ligament and supporting structures. *Orthop Clin North Am* 1985;16(1):15-28.
35. Scapinelli R. Studies on the vasculature of the human knee joint. *Acta Anat (Basel)* 1968;70(3):305-31.
36. Silver FH, Freeman JW, Seehra GP. Collagen self-assembly and the development of tendon mechanical properties. *J Biomech* 2003;36(10):1529-53.
37. Lyon RM, Akeson WH, Amiel D, Kitabayashi LR, Woo SL. Ultrastructural differences between the cells of the medial collateral and the anterior cruciate ligaments. *Clin Orthop Relat Res* 1991(272):279-86.
38. Jackson DW. *The Anterior Cruciate Ligament: current and future concepts*. New York: Raven Press; 1993. 451 p.
39. Amiel D, Frank C, Harwood F, Fronck J, Akeson W. Tendons and ligaments: a morphological and biochemical comparison. *J Orthop Res* 1984;1(3):257-65.
40. Frank CB, Hart DA, Shrive NG. Molecular biology and biomechanics of normal and healing ligaments--a review. *Osteoarthritis Cartilage* 1999;7(1):130-40.
41. Burgeson RE, Nimni ME. Collagen types. Molecular structure and tissue distribution. *Clin Orthop* 1992(282):250-72.
42. Schwartz N. Biosynthesis and regulation of expression of proteoglycans. *Front Biosci* 2000;5:D649-55.
43. Tumova S, Woods A, Couchman JR. Heparan sulfate proteoglycans on the cell surface: versatile coordinators of cellular functions. *Int J Biochem Cell Biol* 2000;32(3):269-88.
44. Iozzo RV, Murdoch AD. Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function. *Faseb J* 1996;10(5):598-614.
45. Arora PD, Narani N, McCulloch CA. The compliance of collagen gels regulates transforming growth factor-beta induction of alpha-smooth muscle actin in fibroblasts. *Am J Pathol* 1999;154(3):871-82.
46. van der Flier A, Sonnenberg A. Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res* 2001;305(3):285-98.
47. Aznavoorian S, Murphy AN, Stetler-Stevenson WG, Liotta LA. Molecular aspects of tumor cell invasion and metastasis. *Cancer* 1993;71(4):1368-83.

48. Stetler-Stevenson WG, Aznavoorian S, Liotta LA. Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu Rev Cell Biol* 1993;9:541-73.
49. Menschik A. [Mechanics of the knee-joint. 1 (author's transl)]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 1974;112(3):481-95.
50. Markolf KL, Mensch JS, Amstutz HC. Stiffness and laxity of the knee--the contributions of the supporting structures. A quantitative in vitro study. *J Bone Joint Surg Am* 1976;58(5):583-94.
51. Fromm B, Kummer W. Nerve supply of anterior cruciate ligaments and of cryopreserved anterior cruciate ligament allografts: a new method for the differentiation of the nervous tissues. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 1994;2(2):118-22.
52. Halata Z, Haus J. The ultrastructure of sensory nerve endings in human anterior cruciate ligament. *Anat Embryol (Berl)* 1989;179(5):415-21.
53. Kock HJ, Sturmer KM, Letsch R, Schmit-Neuerburg KP. Interface and biocompatibility of polyethylene terephthalate knee ligament prostheses. A histological and ultrastructural device retrieval analysis in failed synthetic implants used for surgical repair of anterior cruciate ligaments. *Arch Orthop Trauma Surg* 1994;114(1):1-7.
54. Bercovy M, Goutallier D, Voisin MC, Geiger D, Blanquaert D, Gaudichet A, Patte D. Carbon-PGLA prostheses for ligament reconstruction. Experimental basis and short-term results in man. *Clin Orthop Relat Res* 1985(196):159-68.
55. Guidoin MF, Marois Y, Bejui J, Poddevin N, King MW, Guidoin R. Analysis of retrieved polymer fiber based replacements for the ACL. *Biomaterials* 2000;21(23):2461-74.
56. Silver FH, Tria AJ, Zawadsky JP, Dunn MG. Anterior cruciate ligament replacement: a review. *J Long Term Eff Med Implants* 1991;1(2):135-54.
57. Durselen L, Dauner M, Hierlemann H, Planck H, Claes LE, Ignatius A. Resorbable polymer fibers for ligament augmentation. *J Biomed Mater Res* 2001;58(6):666-72.
58. Dürselen L, Claes L, Ignatius A, Rübenacker S. Comparative animal study of three ligament prostheses for the replacement of the anterior cruciate and medial collateral ligament. *Biomaterials* 1996;17(10):977-982.
59. Cabaud HE, Rodkey WG, Feagin JA. Experimental studies of acute anterior cruciate ligament injury and repair. *Am J Sports Med* 1979;7(1):18-22.
60. Richter M, Bosch U, Wippermann B, Hofmann A, Krettek C. Comparison of surgical repair or reconstruction of the cruciate ligaments versus nonsurgical treatment in patients with traumatic knee dislocations. *Am J Sports Med* 2002;30(5):718-27.
61. Kuster M, Blatter G, Hauswirth L, Neuer W, Wood GA. [The anterior cruciate ligament, an important structure of the knee joint]. *Schweiz Rundsch Med Prax* 1995;84(5):134-9.
62. Weiler A, Scheffler S, Hoher J. [Transplant selection for primary replacement of the anterior cruciate ligament]. *Orthopade* 2002;31(8):731-40.
63. Miller SL, Gladstone JN. Graft selection in anterior cruciate ligament reconstruction. *Orthop Clin North Am* 2002;33(4):675-83.
64. Aglietti P, Giron F, Buzzi R, Biddau F, Sasso F. Anterior cruciate ligament reconstruction: bone-patellar tendon-bone compared with double semitendinosus and gracilis tendon grafts. A prospective, randomized clinical trial. *J Bone Joint Surg Am* 2004;86-A(10):2143-55.
65. Song EK, Rowe SM, Chung JY, Moon ES, Lee KB. Failure of osteointegration of hamstring tendon autograft after anterior cruciate ligament reconstruction. *Arthroscopy* 2004;20(4):424-8.
66. Boni DM, Herriott GE. Hamstring tendon graft for anterior cruciate ligament reconstruction. *Aorn J* 2002;76(4):610-5, 617-9, 621-4; quiz 625-8.
67. Roos H, Karlsson J. Anterior cruciate ligament instability and reconstruction. Review of current trends in treatment. *Scand J Med Sci Sports* 1998;8(6):426-31.
68. Kuechle DK, Pearson SE, Beach WR, Freeman EL, Pawlowski DF, Whipple TL, Caspari Dagger RB, Meyers JF. Allograft anterior cruciate ligament reconstruction in patients over 40 years of age. *Arthroscopy* 2002;18(8):845-53.
69. Lanzetta A, Garotta L, Vizzarda M. [The recent history of substitution procedures for the anterior cruciate ligament]. *Int Orthop* 1995;19(2):127-33.

70. Bosch U, Kasperczyk WJ, Oestern HJ, Tscherne H. [Healing phases in autogenous posterior cruciate ligament replacement. A decision aid for after-care. A biomechanical and histologic study]. *Unfallchirurg* 1990;93(5):187-96.
71. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993;260(5110):920-6.
72. Wolff J. *Das Gesetz der Transformation der Knochen*. Hirschwald, Leipzig 1892.
73. Kummer B. Grundlagen der Pauwels-Theorie der funktionellen Anpassung des Knochens. *Orthopäde* 1995;24(5):387-93.
74. Pauwels F. Eine neue Theorie über den Einfluß mechanischer Reize auf die Differenzierung der Stützgewebe. Translated as "A new theory concerning the influence of mechanical stimuli on the differentiation of supporting tissue." In: Mquet, P., Furlong, R. (Eds.), *Biomechanics of the Locomotor Apparatus*, Springer, Berlin, 1980, pp. 375-407. *Z Anat Entwicklungsgeschichte* 1960;121:478-515.
75. Huiskes R, Weinans H. Adaptive bone remodeling theory applied to prosthetic design analysis. *J Biomech* 1987;20:1135-1150.
76. Nagumo A, Yasuda K, Numazaki H, Azuma H, Tanabe Y, Kikuchi S, Harata S, Tohyama H. Effects of separate application of three growth factors (TGF-beta1, EGF, and PDGF-BB) on mechanical properties of the in situ frozen-thawed anterior cruciate ligament. *Clin Biomech (Bristol, Avon)* 2005;20(3):283-90.
77. Menetrey J, Kasemkijwattana C, Day CS, Bosch P, Fu FH, Moreland MS, Huard J. Direct, fibroblast- and myoblast-mediated gene transfer to the anterior cruciate ligament. *Tissue Eng* 1999;5(5):435-42.
78. Pascher A, Steinert AF, Palmer GD, Betz O, Gouze JN, Gouze E, Pilapil C, Ghivizzani SC, Evans CH, Murray MM. Enhanced repair of the anterior cruciate ligament by in situ gene transfer: evaluation in an in vitro model. *Mol Ther* 2004;10(2):327-36.
79. Bandara G, Robbins PD, Georgescu HI, Mueller GM, Glorioso JC, Evans CH. Gene transfer to synoviocytes: prospects for gene treatment of arthritis. *DNA Cell Biol* 1992;11(3):227-31.
80. Tranquillo RT. Self-organization of tissue-equivalents: the nature and role of contact guidance. *Biochem Soc Symp* 1999;65:27-42.
81. Young RG, Butler DL, Weber W, Caplan AI, Gordon SL, Fink DJ. Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. *J Orthop Res* 1998;16(4):406-13.
82. Rhodes NP, Srivastava JK, Smith RF, Longinotti C. Metabolic and histological analysis of mesenchymal stem cells grown in 3-D hyaluronan-based scaffolds. *J Mater Sci Mater Med* 2004;15(4):391-5.
83. Shi Y, Vesely I. Characterization of statically loaded tissue-engineered mitral valve chordae tendineae. *J Biomed Mater Res A* 2004;69(1):26-39.
84. Langelier E, Rancourt D, Bouchard S, Lord C, Stevens PP, Germain L, Auger FA. Cyclic traction machine for long-term culture of fibroblast-populated collagen gels. *Ann Biomed Eng* 1999;27(1):67-72.
85. Harris MT, Butler DL, Boivin GP, Florer JB, Schantz EJ, Wenstrup RJ. Mesenchymal stem cells used for rabbit tendon repair can form ectopic bone and express alkaline phosphatase activity in constructs. *J Orthop Res* 2004;22(5):998-1003.
86. Caplan AI. The mesengenic process. *Clin Plast Surg* 1994;21(3):429-35.
87. Ross R, Everett NB, Tyler R. Wound healing and collagen formation. VI. The origin of the wound fibroblast studied in parabiosis. *J Cell Biol* 1970;44(3):645-54.
88. Dunn MG, Liesch JB, Tiku ML, Zawadsky JP. Development of fibroblast-seeded ligament analogs for ACL reconstruction. *J Biomed Mater Res* 1995;29(11):1363-71.
89. Lee CH, Shin HJ, Cho IH, Kang YM, Kim IA, Park KD, Shin JW. Nanofiber alignment and direction of mechanical strain affect the ECM production of human ACL fibroblast. *Biomaterials* 2005;26(11):1261-70.
90. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284(5411):143-7.
91. Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, Moorman M, Gerson SL. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J Cell Physiol* 1998;176(1):57-66.
92. Friedenstein AJ. Precursor cells of mechanocytes. *Int Rev Cytol* 1976;47:327-59.

93. Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* 2000;28(8):875-84.
94. Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone* 1992;13(1):69-80.
95. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 1970;3(4):393-403.
96. Fibbe WE. Mesenchymal stem cells. A potential source for skeletal repair. *Ann Rheum Dis* 2002;61 Suppl 2:ii29-31.
97. Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortessidis A, Simmons PJ. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci* 2003;116(Pt 9):1827-35.
98. Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(14):7841-5.
99. Barry FP, Boynton RE, Haynesworth S, Murphy JM, Zaia J. The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD105). *Biochem Biophys Res Commun* 1999;265(1):134-9.
100. Fluck J, Querfeld C, Cremer A, Niland S, Krieg T, Sollberg S. Normal human primary fibroblasts undergo apoptosis in three-dimensional contractile collagen gels. *J Invest Dermatol* 1998;110(2):153-7.
101. Cacou C, Palmer D, Lee DA, Bader DL, Shelton JC. A system for monitoring the response of uniaxial strain on cell seeded collagen gels. *Med Eng Phys* 2000;22(5):327-33.
102. Park Y, Sugimoto M, Watrin A, Chiquet M, Hunziker EB. BMP-2 induces the expression of chondrocyte-specific genes in bovine synovium-derived progenitor cells cultured in three-dimensional alginate hydrogel. *Osteoarthritis Cartilage* 2005;13(6):527-36.
103. Cristino S, Grassi F, Toneguzzi S, Piacentini A, Grigolo B, Santi S, Riccio M, Tognana E, Facchini A, Lisignoli G. Analysis of mesenchymal stem cells grown on a three-dimensional HYAFF 11-based prototype ligament scaffold. *J Biomed Mater Res A* 2005;73(3):275-83.
104. Funakoshi T, Majima T, Iwasaki N, Yamane S, Masuko T, Minami A, Harada K, Tamura H, Tokura S, Nishimura S. Novel chitosan-based hyaluronan hybrid polymer fibers as a scaffold in ligament tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* 2005;74(3):338-46.
105. Durselen L, Dauner M, Hierlemann H, Planck H, Ignatius A, Claes LE. Control of material stiffness during degradation for constructs made of absorbable polymer fibers. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2003;67(2):697-701.
106. Lu HH, Cooper JA, Jr., Manuel S, Freeman JW, Attawia MA, Ko FK, Laurencin CT. Anterior cruciate ligament regeneration using braided biodegradable scaffolds: in vitro optimization studies. *Biomaterials* 2005;26(23):4805-16.
107. Awad HA, Butler DL, Harris MT, Ibrahim RE, Wu Y, Young RG, Kadiyala S, Boivin GP. In vitro characterization of mesenchymal stem cell-seeded collagen scaffolds for tendon repair: effects of initial seeding density on contraction kinetics. *J Biomed Mater Res* 2000;51(2):233-40.
108. Juncosa N, West JR, Galloway MT, Boivin GP, Butler DL. In vivo forces used to develop design parameters for tissue engineered implants for rabbit patellar tendon repair. *J Biomech* 2003;36(4):483-8.
109. Hsieh AH, Sah RL, Paul Sung KL. Biomechanical regulation of type I collagen gene expression in ACLs in organ culture. *J Orthop Res* 2002;20(2):325-31.
110. Robbins JR, Evanko SP, Vogel KG. Mechanical loading and TGF-beta regulate proteoglycan synthesis in tendon. *Arch Biochem Biophys* 1997;342(2):203-11.
111. Neidlinger-Wilke C, Wilke HJ, Claes L. Cyclic stretching of human osteoblasts affects proliferation and metabolism: a new experimental method and its application. *J Orthop Res* 1994;12(1):70-8.
112. Ignatius A, Blessing H, Liedert A, Kaspar D, Kreja L, Friemert B, Claes L. [Effects of mechanical strain on human osteoblastic precursor cells in type I collagen matrices]. *Orthopade* 2004;33(12):1386-93.

113. Kreja L, Thiel A, Schlenker H, Liedert A, Kaspar D, Claes L, Ignatius A. Kultivierung von mesenchymalen Progenitorzellen für das Tissue Engineering: Einfluss von FCS auf die Proliferation und Genexpression DGBM. Berlin: Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik, Helmholtzstraße 14, 89081 Ulm; 2005.
114. Simmons PJ, Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood* 1991;78(1):55-62.
115. Dennis JE, Carbillet JP, Caplan AI, Charbord P. The STRO-1+ marrow cell population is multipotential. *Cells Tissues Organs* 2002;170(2-3):73-82.
116. Ouyang HW, Toh SL, Goh J, Tay TE, Moe K. Assembly of bone marrow stromal cell sheets with knitted poly (L-lactide) scaffold for engineering ligament analogs. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2005;75(2):264-71.
117. Chiquet-Ehrismann R, Tannheimer M, Koch M, Brunner A, Spring J, Martin D, Baumgartner S, Chiquet M. Tenascin-C expression by fibroblasts is elevated in stressed collagen gels. *J Cell Biol* 1994;127(6 Pt 2):2093-101.
118. Evans CE, Trail IA. Fibroblast-like cells from tendons differ from skin fibroblasts in their ability to form three-dimensional structures in vitro. *J Hand Surg [Br]* 1998;23(5):633-41.
119. Phillips JA, Vacanti CA, Bonassar LJ. Fibroblasts regulate contractile force independent of MMP activity in 3D-collagen. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;312(3):725-32.
120. Brown RA, Sethi KK, Gwanmesia I, Raemdonck D, Eastwood M, Mudera V. Enhanced fibroblast contraction of 3D collagen lattices and integrin expression by TGF-beta1 and -beta3: mechanoregulatory growth factors? *Exp Cell Res* 2002;274(2):310-22.
121. Helary C, Foucault-Bertaud A, Godeau G, Coulomb B, Guille MM. Fibroblast populated dense collagen matrices: cell migration, cell density and metalloproteinases expression. *Biomaterials* 2005;26(13):1533-43.
122. Murakami Y, Kojima T, Nagasawa T, Kobayashi H, Ishikawa I. Novel isolation of alkaline phosphatase-positive subpopulation from periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontol* 2003;74(6):780-6.
123. Sawa Y, Yamaoka Y, Kuroshima S, Yoshida S. Reduction of alkaline phosphatase activity in aged human osteogenic periodontal ligament fibroblasts exhibiting short telomeres. *Cell Tissue Res* 2004;315(3):331-7.
124. Murata H, Tanaka H, Taguchi T, Shiigi E, Mizokami H, Sugiyama T, Kawai S. Dexamethasone induces human spinal ligament derived cells toward osteogenic differentiation. *J Cell Biochem* 2004;92(4):715-22.
125. Abraham LC, Vorrasi J, Kaplan DL. Impact of collagen structure on matrix trafficking by human fibroblasts. *J Biomed Mater Res A* 2004;70(1):39-48.
126. Neidlinger-Wilke C, Wurtz K, Liedert A, Schmidt C, Borm W, Ignatius A, Wilke HJ, Claes L. A three-dimensional collagen matrix as a suitable culture system for the comparison of cyclic strain and hydrostatic pressure effects on intervertebral disc cells. *J Neurosurg Spine* 2005;2(4):457-65.
127. Garvin J, Qi J, Maloney M, Banes AJ. Novel system for engineering bioartificial tendons and application of mechanical load. *Tissue Eng* 2003;9(5):967-79.
128. Grenier G, Remy-Zolghadri M, Larouche D, Gauvin R, Baker K, Bergeron F, Dupuis D, Langelier E, Rancourt D, Auger FA and others. Tissue reorganization in response to mechanical load increases functionality. *Tissue Eng* 2005;11(1-2):90-100.
129. Zhu YK, Umino T, Liu XD, Wang HJ, Romberger DJ, Spurzem JR, Rennard SI. Contraction of fibroblast-containing collagen gels: initial collagen concentration regulates the degree of contraction and cell survival. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2001;37(1):10-6.
130. Mio T, Adachi Y, Romberger DJ, Ertl RF, Rennard SI. Regulation of fibroblast proliferation in three-dimensional collagen gel matrix. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1996;32(7):427-33.
131. Seliktar D, Nerem RM, Galis ZS. Mechanical strain-stimulated remodeling of tissue-engineered blood vessel constructs. *Tissue Eng* 2003;9(4):657-66.
132. Eastwood M, Mudera VC, McGrouther DA, Brown RA. Effect of precise mechanical loading on fibroblast populated collagen lattices: morphological changes. *Cell Motil Cytoskeleton* 1998;40(1):13-21.
133. Hsu S, Jamieson AM, Blackwell J. Viscoelastic studies of extracellular matrix interactions in a model native collagen gel system. *Biorheology* 1994;31(1):21-36.

134. Forgacs G, Newman SA, Hinner B, Maier CW, Sackmann E. Assembly of collagen matrices as a phase transition revealed by structural and rheologic studies. *Biophys J* 2003;84(2 Pt 1):1272-80.
135. Parsons JW, Cogger RN. A new device for measuring the viscoelastic properties of hydrated matrix gels. *J Biomech Eng* 2002;124(2):145-54.
136. Krishnan L, Weiss JA, Wessman MD, Hoying JB. Design and application of a test system for viscoelastic characterization of collagen gels. *Tissue Eng* 2004;10(1-2):241-52.
137. Berry CC, Shelton JC, Bader DL, Lee DA. Influence of external uniaxial cyclic strain on oriented fibroblast-seeded collagen gels. *Tissue Eng* 2003;9(4):613-24.
138. Langholz O, Rockel D, Mauch C, Kozłowska E, Bank I, Krieg T, Eckes B. Collagen and collagenase gene expression in three-dimensional collagen lattices are differentially regulated by alpha 1 beta 1 and alpha 2 beta 1 integrins. *J Cell Biol* 1995;131(6 Pt 2):1903-15.
139. Otsuka K, Pitaru S, Overall CM, Aubin JE, Sodek J. Biochemical comparison of fibroblast populations from different periodontal tissues: characterization of matrix protein and collagenolytic enzyme synthesis. *Biochem Cell Biol* 1988;66(3):167-76.
140. Maatta A, Penttinen RP. A fibroblast protein binds the 3'-untranslated region of pro-alpha 1(I) collagen mRNA. *Biochem J* 1993;295 (Pt 3):691-8.
141. Durselen L, Hafner M, Ignatius A, Kraft K, Hollstein E, Pokar S, Dauner M, Claes L, Friemert B. Biological response to a new composite polymer augmentation device used for cruciate ligament reconstruction. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2006;76B(2):265-272.
142. Yamaguchi M, Shinbo T, Kanamori T, Wang PC, Niwa M, Kawakami H, Nagaoka S, Hirakawa K, Kamiya M. Surface modification of poly(L: -lactic acid) affects initial cell attachment, cell morphology, and cell growth. *J Artif Organs* 2004;7(4):187-93.
143. Zhu X, Chian KS, Chan-Park MB, Lee ST. Effect of argon-plasma treatment on proliferation of human-skin-derived fibroblast on chitosan membrane in vitro. *J Biomed Mater Res A* 2005;73(3):264-74.
144. Laurencin CT, Freeman JW. Ligament tissue engineering: an evolutionary materials science approach. *Biomaterials* 2005;26(36):7530-6.
145. Hasegawa Y, Ohgushi H, Ishimura M, Habata T, Tamai S, Tomita N, Ikada Y. Marrow cell culture on poly-L-lactic acid fabrics. *Clin Orthop Relat Res* 1999(358):235-43.
146. Cooper JA, Lu HH, Ko FK, Freeman JW, Laurencin CT. Fiber-based tissue-engineered scaffold for ligament replacement: design considerations and in vitro evaluation. *Biomaterials* 2005;26(13):1523-32.
147. Lin TW, Cardenas L, Soslowsky LJ. Tendon properties in interleukin-4 and interleukin-6 knockout mice. *J Biomech* 2005;38(1):99-105.
148. Kohler T, Profs F, Brand-Saberi B. PCNA in situ hybridization: a novel and reliable tool for detection of dynamic changes in proliferative activity. *Histochem Cell Biol* 2005;123(3):315-27.
149. Artandi SE, Attardi LD. Pathways connecting telomeres and p53 in senescence, apoptosis, and cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;331(3):881-90.
150. Kumpers P, Potzl W, Heusner T, Steinbeck J, Szuwart T. Cellularity and apoptosis after radiofrequency-induced shrinkage of collagenous tissue: assessment of postoperative immobilization using an in vivo rabbit model. *Acta Orthop* 2005;76(4):487-95.
151. Amiel D, Billings E, Akeson W. Ligament structure, chemistry and physiology. In: Daniel D, Akeson W, O'Conner J, editors. *Knee Ligaments: structure, funktion, injury and repair*. New York: Raven Press; 1990.
152. Yoon JH, Halper J. Tendon proteoglycans: biochemistry and function. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2005;5(1):22-34.
153. Tufvesson E, Westergren-Thorsson G. Biglycan and decorin induce morphological and cytoskeletal changes involving signalling by the small GTPases RhoA and Rac1 resulting in lung fibroblast migration. *J Cell Sci* 2003;116(Pt 23):4857-64.
154. Jarvinen TA, Kannus P, Jarvinen TL, Jozsa L, Kalimo H, Jarvinen M. Tenascin-C in the pathobiology and healing process of musculoskeletal tissue injury. *Scand J Med Sci Sports* 2000;10(6):376-82.
155. Midwood KS, Schwarzbauer JE. Tenascin-C modulates matrix contraction via focal adhesion kinase- and Rho-mediated signaling pathways. *Mol Biol Cell* 2002;13(10):3601-13.

156. Cooper JA, Jr., Bailey LO, Carter JN, Castiglioni CE, Kofron MD, Ko FK, Laurencin CT. Evaluation of the anterior cruciate ligament, medial collateral ligament, achilles tendon and patellar tendon as cell sources for tissue-engineered ligament. *Biomaterials* 2006;27(13):2747-2754.
157. Ge Z, Goh JC, Lee EH. Selection of cell source for ligament tissue engineering. *Cell Transplant* 2005;14(8):573-83.
158. Bischofs IB, Schwarz US. Cell organization in soft media due to active mechanosensing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(16):9274-9.
159. Kaspar D, Seidl W, Neidlinger-Wilke C, Beck A, Claes L, Ignatius A. Proliferation of human-derived osteoblast-like cells depends on the cycle number and frequency of uniaxial strain. *J Biomech* 2002;35(7):873-80.
160. Koch H, Jadlowiec JA, Fu FH, Nonn J, Merk HR, Hollinger JO, Campbell PG. [The effect of growth/differentiation factor-5 (GDF-5) on genotype and phenotype in human adult mesenchymal stem cells]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 2004;142(2):248-53.
161. Mauck RL, Nicoll SB, Seyhan SL, Ateshian GA, Hung CT. Synergistic action of growth factors and dynamic loading for articular cartilage tissue engineering. *Tissue Eng* 2003;9(4):597-611.
162. Aspenberg P, Forslund C. Enhanced tendon healing with GDF 5 and 6. *Acta Orthop Scand* 1999;70(1):51-4.
163. Caterson EJ, Nesti LJ, Danielson KG, Tuan RS. Human marrow-derived mesenchymal progenitor cells: isolation, culture expansion, and analysis of differentiation. *Mol Biotechnol* 2002;20(3):245-56.
164. Skutek M, van Griensven M, Zeichen J, Brauer N, Bosch U. Cyclic mechanical stretching modulates secretion pattern of growth factors in human tendon fibroblasts. *Eur J Appl Physiol* 2001;86(1):48-52.
165. Mudera VC, Pleass R, Eastwood M, Tarnuzzer R, Schultz G, Khaw P, McGrouther DA, Brown RA. Molecular responses of human dermal fibroblasts to dual cues: contact guidance and mechanical load. *Cell Motil Cytoskeleton* 2000;45(1):1-9.
166. He Y, Grinnell F. Stress relaxation of fibroblasts activates a cyclic AMP signaling pathway. *J Cell Biol* 1994;126(2):457-64.
167. Schwarz US, Bischofs IB. Physical determinants of cell organization in soft media. *Med Eng Phys* 2005;27(9):763-72.
168. Hankemeier S, Keus M, Zeichen J, Jagodzinski M, Barkhausen T, Bosch U, Krettek C, Van Griensven M. Modulation of proliferation and differentiation of human bone marrow stromal cells by fibroblast growth factor 2: potential implications for tissue engineering of tendons and ligaments. *Tissue Eng* 2005;11(1-2):41-9.
169. Park JS, Chu JS, Cheng C, Chen F, Chen D, Li S. Differential effects of equiaxial and uniaxial strain on mesenchymal stem cells. *Biotechnol Bioeng* 2004;88(3):359-68.
170. Hamilton DW, Maul TM, Vorp DA. Characterization of the response of bone marrow-derived progenitor cells to cyclic strain: implications for vascular tissue-engineering applications. *Tissue Eng* 2004;10(3-4):361-9.
171. Wang JH, Yang G, Li Z, Shen W. Fibroblast responses to cyclic mechanical stretching depend on cell orientation to the stretching direction. *J Biomech* 2004;37(4):573-6.
172. Yamaoka A, Matsuo T, Shiraga F, Ohtsuki H. TIMP-1 production by human scleral fibroblast decreases in response to cyclic mechanical stretching. *Ophthalmic Res* 2001;33(2):98-101.
173. Lavagnino M, Arnoczky SP, Tian T, Vaupel Z. Effect of amplitude and frequency of cyclic tensile strain on the inhibition of MMP-1 mRNA expression in tendon cells: an in vitro study. *Connect Tissue Res* 2003;44(3-4):181-7.
174. Petersen W, Varoga D, Zantop T, Hassenpflug J, Mentlein R, Pufe T. Cyclic strain influences the expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) and the hypoxia inducible factor 1 alpha (HIF-1alpha) in tendon fibroblasts. *J Orthop Res* 2004;22(4):847-53.
175. Cheng GC, Briggs WH, Gerson DS, Libby P, Grodzinsky AJ, Gray ML, Lee RT. Mechanical strain tightly controls fibroblast growth factor-2 release from cultured human vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1997;80(1):28-36.
176. Tanaka SM, Li J, Duncan RL, Yokota H, Burr DB, Turner CH. Effects of broad frequency vibration on cultured osteoblasts. *J Biomech* 2003;36(1):73-80.

177. Kanda K, Matsuda T. Behavior of arterial wall cells cultured on periodically stretched substrates. *Cell Transplant* 1993;2(6):475-84.
178. Thomas GP, el Haj AJ. Bone marrow stromal cells are load responsive in vitro. *Calcif Tissue Int* 1996;58(2):101-8.
179. Weyts FA, Bosmans B, Niesing R, van Leeuwen JP, Weinans H. Mechanical control of human osteoblast apoptosis and proliferation in relation to differentiation. *Calcif Tissue Int* 2003;72(4):505-12.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Bündelung (*) der Kollagenfasern zu funktionellen Untergruppen ³⁶	3
Abbildung 2: Aufgereichte Fibrozyten zwischen den Kollagenfibrillen ³⁸	4
Abbildung 3: Fibrozyten eingebettet in Kollagenfaserbündel (Querschnitt) des Bandgewebes ³⁸	5
Abbildung 4: Aufbau der Kollagenfasern (nach M. E. Nimni, in M. Zern and L. Reid, Hgb. , Extracellular Matrix, Marcel Dekker, S. 121-148, 1993).....	6
Abbildung 5: von links nach rechts Carbon Fibre, DACRON™, Rindersehne, Gore®, Leeds-Keio®, Aramid™ ...	9
Abbildung 6: Elektronenmikroskopische Bilder von Kollagenfibrillenquerschnitten (18000 x).....	11
Abbildung 7: Differenzierungsmöglichkeiten für mesenchymale Progenitorzellen ⁸⁶	13
Abbildung 8: Knochenmarksaspirat aus der humanen Tibia (links) und isolierte hMPC auf Zellkulturplastik (rechts).....	18
Abbildung 9: Fragmente eines humanes vorderen Kreuzbandes (links) und isolierte Zellen auf Zellkulturplastik (rechts).....	18
Abbildung 10: Applikationsprinzip für uniaxiale Dehnung (oben) Aufbau zur Dehnung von Silikon-Reizkammern (links unten) Aufbau zur Dehnung von textilen Konstrukten (rechts unten)	26
Abbildung 11: Silikonreizkammer mit eingesetzten Formteilen als Gussformen für Kollagen-Typ-I-Gel (links oben).....	27
Abbildung 12: Konstruktverankerungen für die Dehnung von textilen Konstrukten (PLA-Scaffolds).....	27
Abbildung 13: Aufreinigung des Knochenmarkaspirates (links) durch Dichtegradientenzentrifugation (Histopaque). Die milchig trübe Interphase (rechts) enthält die Progenitorzellen.	29
Abbildung 14: texturierter, zu einem Ring verknotet und verschweisster PLA-Zellträger ohne Zellen.....	31
Abbildung 15: Schema der Dehnungsversuche	32
Abbildung 16: Markierung hMPC-typischer Oberflächenantigene mit monoklonalen Antikörpern an isolierten hMPC auf Glasobjektträgern.....	44
Abbildung 17: Zellbedingte Kontraktion der Kollagen-Gel-Geometrien. 6-well (links oben); Rechteck-Gel (links unten); Ringe (rechts), freischwimmender Ring in 6-well (rechts unten)	45
Abbildung 18: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme Zell-besiedelter Kollagen-Typ-I-Gele mit verschiedenen Konstrukt-Geometrien und Zelltypen (hMPC, a-c; hACLc, d-e). 6-well, Gel-Inneres (a); Rechteck-Gel, Gel-Inneres (b); Ring, Gel-Inneres (c); Rechteck-Gel, Gel-Oberfläche (d); Ring, Gel-Oberfläche (e).....	46
Abbildung 19: HE-Färbungen von hACLc-besiedelten Kollagen-Typ-I-Gelen (Paraffinschnitte). 6-well-Geometrie (a); Rechteck-Geometrie (b); Ring-Geometrie (c)	47
Abbildung 20: Pro-Kollagen-Typ-I; Antikörpermarkierung nach 21 Tagen statischer Kultur von Kollagen-Typ-I-Gelen in Ring-Geometrie. Die Pfeile weisen auf gefärbte Zellen.	48
Abbildung 21: Kollagen-Typ-I; Antikörpermarkierung nach 21 Tagen statischer Kultur von Kollagen-Typ-I-Gelen in Ring-Geometrie. Die Gel-Oberfläche ist mit einem Pfeil gekennzeichnet.	48
Abbildung 22: Kollagen-Typ-III; Antikörpermarkierung nach 21 Tagen statischer Kultur von Kollagen-Typ-I-Gelen in Ring-Geometrie. Die Pfeile weisen auf positiv markierte Bereiche.	49
Abbildung 23: Fibronectin; Antikörpermarkierung nach 21 Tagen statischer Kultur von Kollagen-Typ-I-Gelen in Ring-Geometrie.....	49

Abbildung 24: Decorin; Antikörpermarkierung nach 21 Tagen statischer Kultur von Kollagen-Typ-I-Gelen in Ring-Geometrie. Die Pfeile weisen auf schwach positiv markierte Bereiche.....	50
Abbildung 25: Tenascin-C; Antikörpermarkierung nach 21 Tagen statischer Kultur von Kollagen-Typ-I-Gelen in Ring-Geometrie. Die Pfeile weisen auf positiv markierte Bereiche.....	50
Abbildung 26: Proliferation der hACLCLC (n=3) in Kollagen-Gelen mit Rechteck-Geometrie (links oben), 6-well-Geometrie (rechts oben) und Ring-Geometrie (unten). Median-Min.-Max.-Darstellung der Zellzahl pro Gel-Konstrukt.....	51
Abbildung 27: Gen-Expression bandtypischer Proteine durch hACLCLC (n=3) in Kollagen-Typ-I-Gelen mit 6-well-Geometrie. Median-Min.-Max.-Darstellung der relativen mRNA-Expression (GAPDH-Normierung)	52
Abbildung 28: Gen-Expression band- und knochentypischer Proteine durch hACLCLC in Kollagen-Typ-I Ring-Gelen. Die Daten dreier Spender wurden mit Standard-PCR und integrierter optischer Dichte der DNA-Banden im Agarosegel bestimmt. Dargestellt sind die mRNA-Expressionen (GAPDH-normiert) eines Spenders über einen Zeitraum von max. 21 Tagen.	53
Abbildung 29: Lichtmikroskopische Aufnahme eines aufgespannten hMPC-Zelllayers auf PLA-Faser 7 Tage nach Besiedlung.....	54
Abbildung 30: Rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahmen 15 Tage nach Besiedlung mit hMPC (a, c: Oberflächenaufnahmen; b, d: Aufnahme aus dem Inneren).....	55
Abbildung 31: REM-Aufnahmen von PLA-Konstrukten 24 Stunden nach hACLCLC-Besiedlung. Oberfläche (a); Inneres (b)	55
Abbildung 32: Paraffinhistologie an hMPC-besiedelten PLA-Fasern. HE-Färbung Tag 15 (a) und 28 (b); Immunfärbung Tag 15, Kollagen-Typ-I (c) und Typ-III (d); Immunfärbung Tag 15, Tenascin-C (e) und PCNA (f)	56
Abbildung 33: HE-Färbung von hACLCLC auf PLA-Fasern, 24 Std. nach der Besiedlung.....	57
Abbildung 34: Kollagen-Typ-I-Immunfärbung von hACLCLC auf PLA-Fasern, 21 Tage nach der Besiedlung.....	57
Abbildung 35: Genexpression der Matrix-Strukturproteine von hMPC (900.000Zellen/Konstrukt; n=7) nach 3 und 15 Tagen in PLA-Faser-Konstrukten. Logarithmische Boxplot-Darstellung des Vielfachen der mRNA-Expression (GAPDH-Normierung) bezogen auf Tag Null. Der Wert 1 repräsentiert die Expression an Tag Null. *p<0.05 Wilcoxon-signed-ranked-Test.	58
Abbildung 36: Genexpression der Matrix-Umbauproteine von hMPC (900.000Zellen/Konstrukt; n=7) nach 3 und 15 Tagen in PLA-Faser-Konstrukten. Logarithmische Boxplot-Darstellung des Vielfachen der mRNA-Expression (GAPDH-Normierung) bezogen auf Tag Null. Der Wert 1 repräsentiert die Expression an Tag Null. *p<0.05 Wilcoxon-signed-ranked-Test.	59
Abbildung 37: Genexpression von hACLCLC (900.000Zellen/Konstrukt; n=6) nach 15 Tagen in PLA-Faser-Konstrukten. Logarithmische Boxplot-Darstellung des Vielfachen der mRNA-Expression (GAPDH-Normierung) bezogen auf Tag Null. Der Wert 1 repräsentiert die Expression an Tag Null. *p<0.05 Wilcoxon-signed-ranked-Test.	60
Abbildung 38: Einfluss zyklischer Dehnung (1 Hz*1 Std./Tag; 5% Amplitude; n=7) auf die Genexpression von hMPC in Kollagen-Typ-I Ring-Gelen an Tag 21 Logarithmische Boxplot-Darstellung der mRNA-Expressions-Änderung (GAPDH-Normierung) stimulierter Ring-Gele bezogen auf unstimulierte Ring-Gel-Kontrollen. Der Wert 1 repräsentiert die Kontrollen.....	62

Abbildung 39: Einfluss zyklischer Dehnung (1 Hz*1 Std./Tag; 5% Amplitude; n=3) bei GDF5-Gabe auf die Genexpression von hMPC in Kollagen-Typ-I Ring-Gelen an Tag 21. Median-Min.-Max.-Darstellung der mRNA-Expressions-Änderung (GAPDH-Normierung) stimulierter Ring-Gele bezogen auf unstimulierte Ring-Gele. Der Wert 0 repräsentiert die unstimulierten Kontrollen..... 63

Abbildung 40: Einfluss zyklischer Dehnung (1 Hz*1 Std./Tag; 5% Amplitude; n=3) mit (rechts) und ohne (links) GDF5-Gabe auf die Genexpression von hMPC in Kollagen-Typ-I Ring-Gelen an Tag 7. Median-Min.-Max.-Darstellung der mRNA-Expressions-Änderung (GAPDH-Normierung) stimulierter Ring-Gele bezogen auf unstimulierte Ring-Gele. Der Wert 0 repräsentiert die Kontrollen..... 64

Abbildung 41: Einfluss einer niederfrequenten Langzeit-Dehnung (L= 0,2 Hz*8 Std./Tag; 5% Amplitude; n=6) auf die Genexpression von hMPC in Kollagen-Typ-I Ring-Gelen an Tag 15 im Vergleich mit der Kurzzeit-Dehnung (K= 1 Hz*1 Std./Tag; 5% Amplitude; n=7) an Tag 21 Boxplot-Darstellung der mRNA-Expressions-Änderung (GAPDH-Normierung) stimulierter Ring-Gele bezogen auf unstimulierte Ring-Gele. Der Wert 0 repräsentiert die Kontrollen..... 65

Abbildung 42: Einfluss zyklischer Dehnung auf die Genexpression von hACLCL in Kollagen-Typ-I-Gelen (1 Hz*1 Std./Tag; Amplitude=5%; n=3). Median-Min.-Max.-Darstellung der mRNA-Expressions-Änderung (GAPDH-Normierung) stimulierter Ring-Gele bezogen auf unstimulierte Ring-Gele. Der Wert 0 repräsentiert die Kontrollen. 66

Abbildung 43: HE-Färbungen an Paraffin-Schnitten von hACLCL besiedeten Kollagen-Typ-I-Gelen. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen zeigen die Kollagen-Matrix mit den enthaltenen hACLCL. Ring-Gel-Geometrie nach 7 Tagen (a, b); Ring-Gel-Geometrie nach 21 Tagen (c, d) 67

Abbildung 44: Rasterelektronenmikroskopischer Vergleich 7 Tage nach hACLCL-Besiedlung von Kollagen-Typ-I-Gelen in Ring-Geometrie (Stimulation) und 6-well-Geometrie (Kontrolle). Unstimulierte Kontrolle (a, c) und mit uniaxialer, zyklischer Dehnung stimulierte Proben (b, d); Aufnahmen der Gel-Oberflächen (a, b) sowie des Gel-Inneren (c, d)..... 68

Abbildung 45: Rasterelektronenmikroskopischer Vergleich der Orientierung von hACLCL auf der Oberfläche eines Kollagen-Typ-I-Gels ohne mechanische Belastung. Die Aufnahmebereiche wurden zufällig ausgewählt. Die Ausrichtung des REM-Präparates ist bei allen Aufnahmen identisch. Die mittlere Orientierung der hACLCL je Aufnahme ist als Geradenschar dargestellt (links oben)..... 69

Abbildung 46: Rasterelektronenmikroskopischer Vergleich der Orientierung von hACLCL auf der Oberfläche eines stimulierten Kollagen-Typ-I-Gels. Die Aufnahmebereiche wurden zufällig ausgewählt. Die Ausrichtung des REM-Präparates ist bei allen Aufnahmen identisch. 70

Abbildung 47: Einfluss zyklischer, uniaxialer Dehnung (1 Hz*1 Std./Tag; Amplitude 5%; n=6) auf die relative Genexpression (GAPDH-Normierung) von hMPC (900.000 Zellen/Konstrukt) in textilen PLA-Fasern nach 15 Tagen. Logarithmische Boxplot-Darstellung stimulierter Konstrukte bezogen auf unstimulierte Kontrollen. Der Wert 1 repräsentiert die Kontrollen. *p<0.05 Wilcoxon-signed-ranked-Test..... 71

Abbildung 48: Einfluss zyklischer, uniaxialer Dehnung (1 Hz*1 Std./Tag; 5% Amplitude; n=6) auf die relative Genexpression (GAPDH-Normierung) von hACLCL (900.000 Zellen/Konstrukt) in textilen PLA-Fasern nach 15 Tagen. Logarithmische Boxplot-Darstellung stimulierter Konstrukte bezogen auf unstimulierte Kontrollen. Der Wert 1 repräsentiert die Kontrollen. *p<0.05 Wilcoxon-signed-ranked-Test..... 72

Abbildung 49: Einfluss zyklischer, uniaxialer Dehnung (1 Hz*1 Std./Tag; 2% Amplitude; n=6) auf die relative Genexpression (GAPDH-Normierung) von hACLCL (900.000 Zellen/Konstrukt) in textilen PLA-Fasern

nach 15 Tagen. Logarithmische Boxplot-Darstellung stimulierter Konstrukte bezogen auf unstimulierte Kontrollen. Der Wert 1 repräsentiert die Kontrollen. * $p < 0.05$ Wilcoxon-signed-ranked-Test..... 73

Abbildung 50: Amplitudeneinfluss (2% und 5%) bei zyklischer, uniaxialer Dehnung (1 Hz*1 Std./Tag; n=6) auf die relative Genexpression (GAPDH-Normierung) Matrix-Strukturproteine von hAFLC (900.000 Zellen/Konstrukt) in textilen PLA-Fasern nach 15 Tagen. Boxplot-Darstellung stimulierter Konstrukte bezogen auf unstimulierte Kontrollen. Der Wert 0 repräsentiert die Kontrollen. Wilcoxon-signed-ranked-Test 74

Abbildung 51: Amplitudeneinfluss (2% und 5%) nach zyklischer, uniaxialer Dehnung (1 Hz*1 Std./Tag; n=6) auf die relative Genexpression (GAPDH-Normierung) der Matrix-Remodelingproteine von hAFLC (900.000 Zellen/Konstrukt) in textilen PLA-Fasern nach 15 Tagen. Boxplot-Darstellung stimulierter Konstrukte bezogen auf unstimulierte Kontrollen. Der Wert 0 repräsentiert die Kontrollen. Wilcoxon-signed-ranked-Test..... 75

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Antikörper für die Charakterisierung von hMPC.....	18
Tabelle 2: Primersequenzen für PCR-Reaktion.....	19
Tabelle 3: Medien für die Kultivierung humaner Zellen.....	20
Tabelle 4: Medien zur Kultivierung von Bakterien.....	21
Tabelle 5: verwendete Lösungen.....	21
Tabelle 6: eingesetzte Chemikalien.....	22
Tabelle 7: eingesetzte Kits für molekularbiologische Arbeiten.....	23
Tabelle 8: eingesetzte Geräte.....	24
Tabelle 9: UFB Thermoprotokoll der real time-RT-PCR.....	40
Tabelle 10: Ablauf des Proteinnachweises mit Antikörpermarkierung.....	43

9 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik der Universität Ulm (Leiter Professor. Dr. Lutz Claes) durchgeführt.

Herrn Professor. Dr. Lutz Claes danke ich für die Möglichkeit und Mittel meine Arbeit am Institut in einem außergewöhnlich interdisziplinären Umfeld durchzuführen.

Frau Professor Dr. Anita Ignatius möchte ich für die Überlassung des Themas und die Führung der Zellgruppe danken. Mit ihrem großen Engagement war sie maßgeblich am Gelingen der Arbeit beteiligt. Des Weiteren möchte ich mich besonders für den wissenschaftlichen Meinungs austausch, die Zeit und Hingabe beim Korrekturlesen bedanken.

Die Arbeit an humanen mesenchymalen Progenitorzellen und Kreuzbandzellen war nur durch die engagierte Unterstützung von klinischer Seite möglich. Mein besonderer Dank geht deswegen an die Mitarbeiter der Chirurgischen Abteilung des Bundeswehr-Krankenhauses in Ulm. Namentlich danken möchte ich PD. Dr. med. Benedikt Friemert und Dr. Gerolf Bergenthal für ihr Engagement die Studie zu unterstützen.

Ich danke den Kooperationspartnern des Kompetenznetzes Biomaterialien für die Zusammenarbeit und dem Land Baden Württemberg für die Förderung der Studie. Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Herrn Professor Rolf Brenner (Orthopädische Universitätsklinik mit Querschnittgelähmtenzentrum am Rehabilitationskrankenhaus Ulm - Sektion Biochemie der Gelenks- und Bindegewebserkrankungen) danke ich für die gute Zusammenarbeit im Rahmen des Kompetenznetzes Biomaterialien. Mein besonderer Dank gilt hier Frau Leslie Heckmann nicht nur für ihre stets hervorragende Kooperation, sondern ebenso für ihre Freundschaft. Den Mitarbeitern des Institutes für Textil- und Verfahrenstechnik in Denkendorf, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr.-Ing. Heinrich Planck danke ich für die Kooperation im Rahmen des Kompetenznetzes und die Bereitstellung des Polylactidscaffolds. Dem Unternehmen ArsArthro AG danke ich für die sehr großzügige Überlassung der Kollagen-Typ-I-Gel-Matrix für einen wichtigen Teil meiner Studie.

Allen Wissenschaftlern der Zellgruppe, mit denen ich die letzten drei Jahre arbeiten durfte, danke ich für ihre stets freundliche und hilfsbereite Zusammenarbeit. Frau Dr. Ludwika Kreja danke ich für ihren fachlichen Rat, ihre Unterstützung und ihre Herzlichkeit.

Vielen Dank auch allen Doktoranden und Praktikanten des Institutes für die stets freundschaftliche und inspirierende Zusammenarbeit. Mein besonderer Dank geht an Frau Dipl. Biol. Angela Thiel und Frau Dr. Hum. Biol. Karin Würtz. Angela Thiel war mir stets ein sehr wertvoller und herzlicher Gesprächspartner auf allen Gebieten der Wissenschaft und des

Lebens. Karin Würtz danke ich für die Freundschaft die sich aus der guten Zusammenarbeit entwickelt hat.

Ein großes Dankeschön geht an die technischen Assistenten in der Zellgruppe, die stets ein sehr gutes und freundschaftliches Arbeitsklima im Labor nährten. Mein besonderer Dank gebührt hier Frau Uschi Maile, Frau Simone Knolly und Frau Daniela Kuschel für die Freundschaft die daraus entstanden ist. Ihnen wünsche ich mit ihren Familien viel Freude in der Zukunft.

Auch allen übrigen Mitarbeitern des Instituts für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik danke ich für ihre Hilfsbereitschaft während der letzten drei Jahre. Herrn Herbert Schmitt zudem für die zuverlässige Umsetzung und Konstruktion meiner Modifikationswünsche. Herrn Frank Heuer und Familie danke ich für die besondere Freundschaft und die stete Hilfsbereitschaft. Ich wünsche ihm und seiner Familie, dass ihre Träume für die Zukunft von der Realität noch übertroffen werden mögen.

I like to thank Misses Bettina Willie for being very fond and a friend to me. I wish her luck, self-fulfillment, health and a prosperous life in the USA.

Herrn Dr.-Ing. Ulrich Witzel (Ruhr-Uni-Bochum) danke ich besonders, dass er mir mit seiner herausragenden Lehre das Tor zur Biomechanik schon vor meiner Diplomarbeit geöffnet hat. Ich verdanke ihm eine Grundlegende Weichenstellung für mein Leben.

Mein abschließender Dank geht an meine Familie und meine Freunde. Deren Liebe, Vertrauen und Unterstützung war mir immer eine großartige Hilfe. Danke Ingo, dass ich deinen Mac benutzen durfte. Er war eine große Hilfe. Ich danke meiner künftigen Frau, Karin Wilhelm, für die Liebe, Geduld und Ausdauer mit der sie stets an meiner Seite steht. Ich danke meinen Eltern für ihre wundervolle moralische Unterstützung und ihre vorbildliche Fürsorge.

Herzlichen Dank