

Einfluss des Rho/ROCK-Signalweges auf die TGF- β 3-induzierte tenogene Differenzierung von mesenchymalen Stromazellen

Inauguraldissertation

eingereicht im Fachbereich Veterinärmedizin

in Erfüllung der Anforderungen

zur Erlangung des akademischen Grades eines Ph.D.

der Fachbereiche Veterinärmedizin und Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Michaela Lena Katharina, Melzer

aus Fürth

Gießen, 2024

Aus der Klinik für Pferde (Chirurgie, Orthopädie) mit
Lehrschmiede
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

1. Gutachter und Mitglied der Prüfungskommission: Prof. Dr. Janina Burk
2. Gutachter und Mitglied der Prüfungskommission: PD Dr. Uta Delling

Weitere Mitglieder der Prüfungskommission:

Prof. Dr. Eveline Baumgart-Vogt

Prof. Dr. Ralph Schermuly

Tag der Disputation: 20.01.2025

Meiner Familie gewidmet

**Diese Arbeit wurde durch ein Promotionsstipendium der
Studienstiftung des deutschen Volkes unterstützt.**

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf welches direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

Gießen, der

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	I
Glossar	III
1 Einleitung.....	1
2 Literaturübersicht.....	3
2.1 Therapeutische Anwendung von MSC bei Tendinopathien.....	3
2.1.1 Pferdemedizin.....	4
2.1.2 Humanmedizin.....	5
2.2 Wirkmechanismen mesenchymaler Stromazellen in der Sehnenheilung	7
2.2.1 Immunmodulation	7
2.2.2 Synthese und Remodelling von extrazellulärer Matrix	9
2.2.3 Förderung der Angiogenese	11
2.2.4 Tenogene Differenzierung	13
2.3 Auslöser der tenogenen Differenzierung	15
2.3.1 Extrazelluläre Matrix	15
2.3.2 Mechanische Stimuli.....	17
2.3.3 Co-Kultivierung	18
2.3.4 Wachstumsfaktoren	19
2.3.5 Kombiniertes Einsatz tenogener Stimuli.....	22
2.4 Signaltransduktion in der Sehne.....	23
2.4.1 TGF- β Signalweg.....	23
2.4.2 Rho/ROCK-Signalweg	28
2.4.3 Interaktion des TGF- β /Smad-Weges mit anderen Signalwegen.....	30
3 Zielsetzung und Hypothesen	32
4 Publikationen	33
4.1 Publikation 1	33
4.2 Publikation 2.....	46
5 Diskussion	63
5.1 Reflexion der verwendeten Methoden.....	63
5.2 Reflexion der Ergebnisse	70
5.2.1 Beeinflussung der TGF- β -induzierten tenogenen Differenzierung durch extrazelluläre Matrix und ROCK-Hemmung	70

Inhaltsverzeichnis

5.2.2 Signaltransduktion des TGF- β /Smad-Signalweges unter Beeinflussung der extrazellulären Matrix und ROCK-Hemmung	74
5.2.3 Vergleich der Genexpression in humanen und equinen MSC nach TGF- β -Stimulation und ROCK-Hemmung	76
6 Schlussfolgerung und Ausblick	79
7 Zusammenfassung	81
8 Summary	83
9 Literaturverzeichnis	85
10 Danksagung	120

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
<	kleiner als
>	größer als
µM	Mikromol
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
ALK	Activin-Receptor-like Kinase
ATMP	Advanced Therapy Medicinal Product
ATR	Achilles Tendon Total Rupture Score
BMP	Bone Morphogenic Protein
Breg	Regulatorische B-Zelle
ca.	circa
CD	Cluster of Differentiation
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
COX	Cyclooxygenase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dEZM	Dezellularisierte extrazelluläre Matrix
EMA	European Medicines Agency
ERK1/2	Extrazelluläre signal-regulierte Kinase 1/2
EZM	Extrazelluläre Matrix
FAK	Fokale Adhäsionskinase
FGF	Fibroblast Growth Factor
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GDF	Growth Differentiation Factor
h	Stunden
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
IDO	Indolamin-2,3, Dioxygenase
IgG	Immunoglobulin G
IL	Interleukin
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
kPa	Kilopascal
MAPK	p38-mitogen-activated Protein Kinase

Abkürzungsverzeichnis

MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein 1
MMP	Matrixmetalloproteinase
MPa	Megapascal
MRT	Magnetresonanztomographie
MSC	mesenchymale Stromazelle
BMSC	aus Knochenmark gewonnene MSC
AMSC	aus Fettgewebe gewonnene MSC
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1
PET	Polyethylenterephthalat
PGE2	Prostaglandin E2
ROCK 1/2	Rho-assoziierte Proteinkinase
TGF- β 1/3	Transforming Growth Factor beta 1/3
TGFBR1/2	Transforming Growth Factor beta Receptor 1/2
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

Glossar

- Scaffold** Als Scaffold werden Gerüstsubstanzen bezeichnet, die den Zellen eine 3D-Struktur bieten und die Bildung von Gewebe durch die darin ausgesäten Zellen begünstigen. Diese können aus unterschiedlichen biologischen und natürlichen Materialien bestehen.
- Tissue Engineering** Auch Gewebezücht oder Gewebeskultur genannt, ist es der Überbegriff für die künstliche Herstellung biologischer Gewebe durch die gerichtete Kultivierung von Zellen, um damit kranke Gewebe bei einem Patienten zu ersetzen oder zu regenerieren.
- Priming** Der Begriff „Priming“ ist in der Zellbiologie weit verbreitet und steht grundsätzlich für die funktionelle Verstärkung einer bestimmten Zellfunktion durch Zytokine. In Bezug auf MSC wird dieser Begriff häufig verwendet, wenn diese auf eine bestimmte Funktion oder eine linienspezifische Differenzierung durch Stimulanzen vorbereitet werden.

1 Einleitung

Orthopädische Erkrankungen des muskuloskelettalen Systems treten sowohl in der Human- wie auch in der Veterinärmedizin weltweit häufig auf und stellen eine immense medizinische Herausforderung dar. Trotz der erheblichen Fortschritte in der medizinischen Forschung und Therapie sind die aktuellen Behandlungsmöglichkeiten dieser Erkrankungen immer noch begrenzt. Konventionelle Therapien umfassen meist nur eine Schmerzlinderung und keine Förderung der Geweberegeneration oder Beseitigung der Krankheitsursache. Regenerative Therapien hingegen haben zum Ziel die Struktur und Funktion von Geweben oder Organen wiederherzustellen, die aufgrund von degenerativen Erkrankungen oder durch akute Traumata beschädigt wurden. In den letzten 15 Jahren haben regenerative Therapieansätze besonders bei Tendinopathien für Pferd und Mensch an Bedeutung gewonnen. Aufgrund der begrenzten Regenerationsfähigkeit des Sehngewebes kommt es bei der Abheilung von Sehnenläsionen zur Bildung von fibroblastenreichen Narbengewebe. Dieses hat nicht die gleiche biomechanische Qualität wie gesundes Sehngewebe, wodurch die Belastbarkeit reduziert und das Risiko für eine erneute Verletzungen deutlich erhöht wird. Verschiedene klinische Studien haben gezeigt, dass Therapien mit autologen Blutprodukten oder mesenchymalen Stromazellen (MSC) den Heilungsverlauf verbessern und die Rezidivrate im Vergleich zu konservativen Therapien signifikant senken (Godwin et al. 2012).

Die Wirkmechanismen der MSC im Rahmen der tenogenen Regeneration sind vielfältig, wobei die Immunmodulation sich zunehmend als besonders bedeutsam herauskristallisiert. Bei vielen Erkrankungen ist die Entzündungsreaktion verantwortlich für das Voranschreiten der Gewebedegeneration und für die Entstehung von Schmerz. Die antiinflammatorischen Fähigkeiten der MSC wurden *in vitro* und *in vivo* durch Schmerzlinderung und Senkung von Entzündungsmarkern nachgewiesen (Burk et al. 2023, Russo et al. 2022). Weitere Wirkmechanismen wie der Ersatz von Sehngewebe durch tenogene Differenzierung oder Matrixmodulation sind schwieriger *in vitro* oder *in vivo* nachzuweisen. Während bei akuten Verletzungen, in denen die Entzündungsreaktion im Vordergrund steht, gute Behandlungserfolge erzielt werden können, gibt es bisher kaum Daten, die eine Wirkung der MSC bei chronischen Sehnenenerkrankungen, mit Narbengewebe und einer gestörten Sehnenmatrix im Fokus, nachweisen können (Burk 2019). MSC stehen demnach vor unterschiedlichen

Einleitung

Herausforderungen in Abhängigkeit vom Erkrankungszustand. Eine erfolgreiche tenogene Differenzierung von MSC ist für Tissue-Engineering-Ansätze essenziell und könnte neben der anfänglichen Immunmodulation und der Unterstützung von M2-Makrophagen eine wichtige Rolle für die Langzeitwirkung einer MSC-basierten Zelltherapie spielen (Shen et al. 2016, Manning et al. 2015). Allerdings scheint die tenogene Differenzierung von mehreren externen Faktoren abzuhängen, deren Zusammenspiel noch weitgehend unklar ist.

Zu den berichteten tenogenen Faktoren gehören die extrazelluläre Sehnenmatrix (EZM), Dehnungsreize, sowie Wachstumsfaktoren, insbesondere der Wachstumsfaktor Transforming Growth Factor β (TGF- β). TGF- β ist einer der am besten erforschten Wachstumsfaktoren und hat sich als zuverlässiger Auslöser der tenogenen Differenzierung etabliert (Barsby & Guest 2013). Zur intrazellulären Signalweiterleitung verwendet TGF- β den gut erforschten kanonischen Smad2/3 Signalweg. Die EZM kann die tenogene Differenzierung sowohl durch ihre Struktur als auch durch ihre biochemischen Komponenten beeinflussen (Burk et al. 2016a, Popielarczyk et al. 2017). In einer Studie förderten EZM-Scaffolds mit parallel ausgerichteten Fasern die tenogene Differenzierung, während sie die osteogene Induktion im Vergleich zu zufällig ausgerichteten Faserscaffolds inhibierten (Kishore et al. 2012). In Einklang damit zeigte eine aus Sehngewebe gewonnene harnstoffextrahierte EZM-Lösung eine tenogene Wirkung auf MSC (Yang et al. 2013). Als Vermittler der mechanisch induzierten tenogenen Differenzierung wurde der Rho/Rho-assoziierte Proteinkinase (ROCK)-Signalweg, der durch Integrine aktiviert wird, identifiziert. Seine Hemmung durch den ROCK-Inhibitor Y-27632 verhinderte die durch mechanische Stimulation (Xu B. et al. 2012) oder Gerüsttopografie (Maharam et al. 2015) ausgelöste tenogene Differenzierung.

Aufgrund der unabhängig voneinander berichteten positiven Auswirkungen auf die tenogene Differenzierung könnten synergistische Effekte des mechanisch induzierten Rho/ROCK- und TGF- β 3-induzierten Smad2/3-Signalwegs erwartet werden. Allerdings deuten andere Studien auf ein komplexes Wechselspiel zwischen Sehnenmatrix und MSC hin, wobei die Fähigkeiten zur tenogenen Differenzierung und zur Matrixmodulation negativ beeinflusst werden können (Doll et al. 2021, Roth et al. 2018, Burk et al. 2022).

Diese Arbeit wird sich mit dem Zusammenspiel des Rho/ROCK-Signalweges und der TGF- β 3-induzierten Smad-2/3-Aktivierung im Kontext der frühen tenogenen Differenzierung von MSC beschäftigen. Sowohl der Rho/ROCK-Signalweg als auch TGF- β 3 haben bereits separat wichtige Rollen bei der MSC-Differenzierung gezeigt und ihre kombinierte Untersuchung kann wichtige Erkenntnisse über das Wechselspiel von mechanischen und biochemischen Reizen liefern. Dies trägt möglicherweise dazu bei, die Wirkmechanismen und Einschränkungen der Therapie besser zu verstehen und neue Ansätze im Bereich des Tissue Engineerings zu entwickeln.

2 Literaturübersicht

2.1 Therapeutische Anwendung von MSC bei Tendinopathien

Sehnen halten aufgrund ihrer Struktur und ihrer biomechanischen Eigenschaften unterschiedlichen Belastungen stand, dennoch können rasche Veränderungen oder eine übermäßige Zunahme der auf die Sehnen einwirkenden Belastungskräfte Mikrotraumata verursachen und zu Sehnenenerkrankungen und -läsionen führen. Die Behandlung solcher Verletzungen mit konservativen Therapieansätzen führt häufig nicht zur vollständigen Heilung und stellt weltweit eine große medizinische Herausforderung dar. Ein Schlüsselement bei Tendinopathien ist die entstehende Entzündung des Sehngewebes, welche hauptverantwortlich für die klinischen Symptome ist. Der anhaltende Entzündungszustand führt zu einer Störung der Homöostase des physiologischen Sehngewebes und verursacht häufig irreversible Veränderungen der Architektur und Mechanik der nativen EZM der Sehne.

Die bisherigen konservativen Therapieansätze zielen hauptsächlich darauf ab, Schmerzen zu lindern und die Heilung durch Schonung zu unterstützen. Bei Menschen wird häufig eine chirurgische Therapie bevorzugt, insbesondere wenn konservative Therapieansätze versagt haben. Auch beim Pferd gibt es chirurgische Therapieoptionen, welche jedoch meist weniger erfolgversprechend sind als beim Menschen. Die MSC-Therapie hingegen bietet einen vielversprechenden Ansatz, der nicht nur die Symptome lindert, sondern auch regenerative Effekte im Sehngewebe hervorrufen kann.

2.1.1 Pferdemedizin

In der Pferdemedizin war eine erste Beschreibung der MSC-Therapie in einem Fallbericht von Smith et al. 2003 wegweisend. Hier wurde erstmals eine erfolgreiche Behandlung mit in vitro kultivierten MSC, die aus Knochenmark gewonnen wurden (BMSC), in einem Fallbericht beschrieben (Smith et al. 2003). Seitdem haben zahlreiche klinische Studien die Wirkung der MSC in der Behandlung von Sehnenerkrankungen untersucht. Hierbei hat sich die MSC-Injektion als sichere Therapiemethode bewiesen. Abgesehen von gelegentlichen Schwellungen nach Injektion wurden keine schwerwiegenden Nebenwirkungen, wie Knochen- oder Tumorbildung berichtet (Godwin et al. 2012, Burk et al. 2011, Del Bue et al. 2008, Smith et al. 2013, Depuydt et al. 2021). Eine Studie mit 113 Rennpferden, die einen natürlichen Sehnen Schaden erlitten hatten, zeigte vielversprechende Ergebnisse. Nach einer Behandlung mit BMSC konnten 98,2% der Pferde erfolgreich in den Rennsport zurückkehren, und die Rezidivrate war mit 27,4% nur halb so hoch wie die der Tiere, die eine konservative Therapie erhielten (Godwin et al. 2012). Diese Ergebnisse bestätigten vorherige Studienresultate, die eine Erfolgsrate von 80-90% und eine verringerte Rezidivrate belegen (Smith 2008, Burk et al. 2011). Neben den klinischen Erfolgen wurde auch eine Verbesserung histologischer Parameter festgestellt. MSC-therapierte Pferde wiesen 6 Monate nach Behandlung eine reduzierte Sehnensteifheit, eine bessere Faserorganisation und einen geringeren Glykosaminoglykan-Gehalt auf. Demzufolge entsprach das Sehngewebe von MSC-therapierten Pferden eher einer gesunden Sehnenmatrix als das der unbehandelten Kontrollgruppe (Smith et al. 2013, Schnabel et al. 2009).

Obwohl viele Studien eine positive Entwicklung der MSC-Therapie zeigen, muss bei der Bewertung der Aussagekraft der Studien berücksichtigt werden, dass es den Studien häufig an Signifikanz, einer großen Tieranzahl oder an entsprechenden Kontrollen und einer Randomisierung mangelt. Zudem gibt es auch Studien, die keinen Erfolg der MSC-Therapie nachweisen konnten (Geburek et al. 2017, Ahrberg et al. 2018). Als Ursache hierfür ist eine Varianz des Studiendesigns, der Auswahlkriterien für Probanden mit natürlichen Sehnenläsionen und der Durchführung der Studien, sowie der Zellressourcen anzunehmen. Zu den Variablen des MSC-Behandlungsprotokolls gehören die Zelldosis, der Verabreichungsweg (lokal oder systemisch), die Anzahl der Verabreichungen (einmalig oder mehrfach), die Herkunft

der Zellen (Knochenmark oder Fettgewebe) oder der Zellspender (autolog oder allogenen).

Zur Lösung dieser Problematik und Verbesserung der Evidenzlage der MSC-Therapie gibt es vermehrt Bemühungen in der Forschung das Studiendesign und die Behandlungsmethoden zu harmonisieren und Studien mit höherem Evidenzlevel durchzuführen. In diesem Rahmen wurden kürzlich zwei randomisierte, kontrollierte und verblindete Studien durchgeführt. In einer Pilotstudie mit 14 Pferden war die Lahmheit in der MSC-behandelten Gruppe nach 6 Monaten signifikant geringer als in der Kontrollgruppe. Des Weiteren konnte auch hier eine geringere Rezidivrate bei MSC-behandelten Tieren festgestellt werden (Burk et al. 2023). Eine weitere Feldstudie mit 100 Pferden zeigt ähnlich vielversprechende Ergebnisse. Die MSC-behandelte Gruppe wies nach 8 Wochen eine geringere Lahmheit, sowie eine verbesserte Faserausrichtung und eine reduzierte Läsionsgröße im Vergleich zur Kontrollgruppe auf (Carlier et al. 2023).

Die aktuelle Studienlage ist somit ausreichend, um MSC-basierte Behandlungen in der Praxis einzusetzen. Es liegen jedoch innerhalb der EU noch keine konkreten gesetzlichen Regelungen vor, die die Handhabung stammzellbasierter Produkte in der Veterinärmedizin ausreichend regelt. In der aktuellen EU-Verordnung 2019/6 wurden Stammzellprodukte, die durch industrielle Prozesse hergestellt werden, als neuartige Therapien definiert und benötigen vor Inverkehrbringen eine Zulassung. Autologe MSC dürfen jedoch weiterhin individuell durch den Tierarzt gewonnen, hauseigen isoliert, angezüchtet und appliziert werden. Sollte eine hauseigene Herstellung nicht möglich sein, kann alternativ ein zugelassenes allogenes MSC-Produkt eingesetzt werden.

2.1.2 Humanmedizin

In der Humanmedizin leiden zahlreiche Sportler, wie Basketball-, Fußball- und Volleyballspieler, aufgrund von Überlastung an chronischen Tendinopathien. Hierbei ist am häufigsten die Achillessehne, Patellarsehne oder die Rotatorenmanschette betroffen. Fallstudien konnten nachweisen, dass die Zelltherapie ein vielversprechendes Potential im Bereich der Sehnenregeneration aufweist (Stein et al. 2015, Usuelli et al. 2018, Jo et al. 2018). Dennoch gibt es für die Behandlung von Sehnenenerkrankungen im Humanbereich nur eine begrenzte Anzahl an verfügbaren

Studien, wobei dies hauptsächlich Fallstudien und nur vereinzelt Studien mit mittlerem Evidenzlevel sind. Den meisten Studien mangelt es in der Regel an einer unbehandelten oder Placebo-behandelten Kontrollgruppe und wie auch in der Pferdemedizin liegt eine starke Heterogenität der Studienparameter vor, wodurch die Vergleichbarkeit einschränkt wird. Die verfügbaren Studien zeigen jedoch, dass auch beim Menschen die Anwendung von autologen MSC sicher ist und kaum Nebenwirkungen auftreten (Hurd et al. 2020). In einer kürzlich veröffentlichten randomisierten und kontrollierten Studie wurden 20 Probanden mit einer Verletzung der Rotatorenmanschette entweder aus Fettgewebe gewonnene MSC(AMSC) oder ein Glukokortikoid injiziert. Im Vergleich wies die MSC-behandelte Gruppe eine verbesserte Schulterfunktion und eine geringere Schmerzbewertung nach 24 und 52 Wochen auf (Hurd et al. 2020). Eine Studie über 27 Patienten mit Achillessehnenruptur, welche die Wirkung von konzentriertem Knochenmarkaspirat untersuchte, zeigte, dass 92% der Patienten bereits 6 Monate nach der Behandlung wieder ihre ursprüngliche Sportart aufnehmen konnten und bis Ende der Nachverfolgung (90 Monate post OP) keine wiederholte Ruptur der Sehne auftrat. Die abschließende Einschätzung mittels ATR-Score ergab, dass keine Sehne unter einem Wert von 8 Punkten lag und somit eine gute Funktionsfähigkeit aufwies (Stein et al. 2015). Darüber hinaus wurde bei einer Behandlung von chronischen Patellarsehnenerkrankungen festgestellt, dass die Therapie mit BMSC neben der Verbesserung klinischer Symptome auch zu einer im MRT sichtbaren signifikanten Verbesserung der Sehnenstruktur geführt hat (Rodas et al. 2021). Mit dieser Studie konnte erstmals auch beim Menschen eine strukturelle Verbesserung des Sehngewebes nach MSC-Therapie nachgewiesen werden.

Trotz dieser erfolgsversprechenden Ergebnisse ist die Studienlage nicht ausreichend, um MSC für die Behandlung von Sehnenerkrankungen standardmäßig anzuwenden. Die EMA stuft humane MSC-basierte Produkte als Arzneimittel für neuartige Therapien (ATMP) ein, welche durch die Verordnung 1394/2007 geregelt werden. Grundsätzlich bedürfen Produkte einer Zulassung, bevor sie in Verkehr gebracht werden dürfen. Ähnlich wie in der Veterinärmedizin gibt es auch hier die sogenannte Krankenhausausnahme („hospital exemption“), die in der EU-Verordnung 1394/2007 festgeschrieben und durch den §4b des Arzneimittelgesetzes auf nationaler Ebene an weitere Richtlinien gebunden ist. Diese berechtigt Ärzte nicht-routinemäßig Arzneimittel, die ATMPs sind, herzustellen und anzuwenden, sofern sie eine

Herstellungserlaubnis für Arzneimittel innehaben (Paul-Ehrlich-Institut: Arzneimittel für neuartige Therapien, Regulatorische Anforderungen und praktische Hinweise). Zum Schutz des Patienten sind strenge hygienische Richtlinien zur Herstellung von humanen Stammzellprodukten vorgeschrieben. Dennoch werden MSC-Produkte speziell zur Therapie von Sehnenkrankungen beim Menschen immer noch wesentlich seltener angewendet als beim Pferd.

2.2 Wirkmechanismen mesenchymaler Stromazellen in der Sehnenheilung

MSC sind vielversprechende Kandidaten für die Behandlung von Sehnenkrankungen, da sie sich in Tenozyten-ähnliche Zelltypen differenzieren, die extrazelluläre Matrix modulieren und die Immunreaktion regulieren können (Jiang et al. 2023). Dennoch variieren die Ergebnisse bezüglich ihrer Effektivität in klinischen Studien immer noch stark. Während viele Studien ermutigende Erfolge bei MSC-Therapien zeigen, können einige Studien keine therapeutische Wirksamkeit von MSC nachweisen (Ahrberg et al. 2018, Geburek et al. 2017). Es ist daher ein tieferes Verständnis für die biologischen Eigenschaften von MSC und ihrer Interaktionen im Zielgewebe notwendig, um ihr Potenzial für die therapeutische Anwendung bei Sehnenkrankungen zu optimieren. Im Folgenden werden die verschiedenen Wirkmechanismen der MSC näher erläutert.

2.2.1 Immunmodulation

Die Entzündungsreaktion spielt eine zentrale Rolle in der Pathogenese von Sehnenkrankungen. Ihre Hauptakteure sind Makrophagen, die das Gewebe infiltrieren und durch die Sekretion von Zytokinen ein proinflammatorisches Milieu entstehen lassen (Millar et al. 2010). Infolgedessen entwickeln Tenozyten sich in Richtung eines aktivierten entzündlichen Phänotyps. In diesem Zustand verändert sich die Expression ihrer Oberflächenmarker und Zytokine wie Interleukin(IL)-6, IL-1 β und das Monocyte Chemoattractant Protein(MCP)-1 (Al-Sadi et al. 2011, Stolk et al. 2017, Garcia-Melchor et al. 2021) werden sezerniert, wodurch die Tenozyten wiederum zur Aktivierung von Lymphozyten und Makrophagen beitragen (Garcia-Melchor et al. 2021, Stolk et al. 2017). Darüber hinaus fördern die aktivierten Tenozyten die Degeneration der Sehnenmatrix, indem sie vermehrt matrixabbauende Enzyme wie Matrixmetalloproteinase(MMP)-1 und MMP-3 produzieren und das Kollagen I/Kollagen

III Verhältnis zu Gunsten des Kollagen III verschieben (John et al. 2010, Garcia-Melchor et al. 2021, Behzad et al. 2013). In einem Tri-Kultur-System von Tenozyten, Makrophagen und MSC exprimierten Tenozyten weniger proinflammatorische Moleküle, wie den Tumornekrosefaktor- α , IL-1 β und Cyclooxygenase(COX)-2, und weniger matrixdegenerierende MMPs in der Anwesenheit von MSC als bei einer alleinigen Co-Kultur mit Makrophagen (Manning et al. 2015). Des Weiteren bewirkten die MSC einen Shift von M1- zu M2-Makrophagen (Manning et al. 2015). Demzufolge können MSC durch ihre immunmodulatorischen Eigenschaften den entzündlichen Veränderungen im Rahmen einer Sehnenerkrankung entgegenwirken.

Die immunmodulatorische Wirkung der MSC erfolgt durch direkten Zell-Zell-Kontakt oder durch die Ausschüttung von Signalmolekülen (Di Nicola et al. 2002). Beispielsweise unterdrücken MSC die Aktivierung und Vermehrung von T-Zellen durch die Expression verschiedener inhibierender Faktoren, wie das humane Leukozyten-Antigen G5, Prostaglandin E2 (PGE2) und Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) (Haddad & Saldanha-Araujo 2014, Meisel et al. 2004, Selmani et al. 2008, Mbongue et al. 2015). Außerdem können sie die Apoptose aktivierter T-Zellen durch Fas-Fas-Ligandenbindung auslösen und die Differenzierung von regulatorischen T-Zellen und T-Helfer-2-Zellen fördern (Akiyama et al. 2012). B-Zellen werden ebenfalls durch MSC in ihrer Proliferation, Aktivierung und Antikörperproduktion gehemmt und zur Differenzierung in regulatorische B-Zellen (Breg) stimuliert (Corcione et al. 2006, Chen et al. 2019). Diese Breg-Zellen hemmen die Sekretion proinflammatorischer Zytokine und die Proliferation von T-Zellen über den IL-10-abhängigen Signalweg (Chen et al. 2019).

Bei der Regulation von Makrophagen spielt das PGE2 eine zentrale Rolle. Mithilfe des PGE2, welches durch die COX-2-abhängige Prostaglandin-E-Synthase produziert wird, können MSC einen Shift der Makrophagen in Richtung eines entzündungshemmenden M2-Phänotyps induzieren und die Bildung eines proinflammatorischen M1-Phänotyps hemmen (Vasandan et al. 2016, Shen et al. 2016, Park et al. 2018). Diese Wirkung wurde in einer Studie, in der die PGE2-Produktion der MSC durch einen COX-2 Knock-Down gehemmt wurde, bestätigt. Die MSC waren dadurch nicht mehr in der Lage die Wirkung von M1-Makrophagen abzuschwächen und eine Polarisation zu M2-Makrophagen herbeizuführen (Vasandan et al. 2016). Weitere von MSC produzierte Faktoren, die in der

Makrophagenpolarisation wichtig sind, sind TGF- β ,IDO und das Tumornekrosefaktor stimulierte Gen 6 (Choi et al. 2011, Zhao et al. 2020).

Insgesamt können die MSC mit einer Vielzahl an Immunzellen kommunizieren und diese entsprechend dem Milieu regulieren (Russo et al. 2022). Diese Fähigkeit wurde nicht nur in vitro, sondern auch in vivo nachgewiesen. In einer experimentellen Hundestudie wurden 16 Hunde mit AMSC behandelt. Alle Tiere zeigten 14 Tage postoperativ eine deutliche Steigerung der M2-Makrophagen und der antiinflammatorischen Zytokine, sowie eine geringere Infiltration durch mononukleäre Zellen (Gelbermann et al. 2017). Eine weitere Studie in Hunden bestätigte diese Ergebnisse und wies zusätzlich eine unterstützende Wirkung auf die Genexpression tenogener Marker auf (Shen et al. 2016). Allerdings zeigten Studien auch, dass Immunzellen ebenfalls in der Lage sind die Differenzierung von MSC negativ zu beeinflussen (Brandt et al. 2018). Nichtsdestotrotz sind MSC durch ihre immunmodulatorischen Fähigkeiten eine vielversprechende Therapieoption für Tendinopathien und viele weitere entzündungsbasierte Erkrankungen.

2.2.2 Synthese und Remodelling von extrazellulärer Matrix

Bei einer Sehnenkrankung liegt eine Störung der Zusammensetzung und Stabilität der EZM vor. Es kommt zu einem Ungleichgewicht der Umbauvorgänge und damit einhergehenden degenerativen und fibrotischen Veränderungen der EZM. Diese begünstigen das Entstehen von akuten klinisch sichtbaren Sehnenläsionen. Die dadurch ausgelöste Entzündungsreaktion und vermehrte Ausschüttung von TGF- β 1 führt zu einer Rekrutierung und Aktivierung von Myofibroblasten. Diese produzieren vermehrt Kollagen I und beeinflussen das Expressions- und Aktivitätslevel verschiedener MMPs und deren Inhibitoren (TIMPs), was schließlich zu Fibrose führen kann (Weiskirchen et al. 2019, Newby 2016). Das fibrotische Gewebe ist jedoch unelastischer als das gesunde Sehngewebe und kann nicht der gleichen Zugbelastung standhalten. Die Belastbarkeit der Sehne wird verringert und es besteht ein erhöhtes Risiko von erneuten Verletzungen.

MSC können die Qualität des Reparationsgewebes steigern und die Bildung von Narbengewebe reduzieren (Wu et al. 2015, Cai et al. 2018, Smith et al. 2013). In In-vivo-Studien wurde dies anhand der Verbesserung von histologischen und biomechanischen Eigenschaften des Sehngewebes nachgewiesen (Cai et al. 2018,

Smith et al. 2013). In einem chirurgisch induzierten Tendinopathie-Kaninchen-Modell wurden die Versuchstiere mit BMSC-besiedelten oder unbesiedelten PET-Scaffolds behandelt. Zwölf Wochen nach der Behandlung stellte man einen erhöhten Kollagen I und III Gehalt, sowie eine gesteigerte Belastbarkeit und Gewebssteifigkeit der mit BMSC behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe fest (Cai et al. 2018). In einer weiteren Studie mit natürlich entstandenen Tendinopathien beim Pferd zeigte die mit BMSC behandelte Gruppe in der histologischen Untersuchung eine deutliche Verbesserung der Faserorganisation und des Crimp Pattern. Auch die Parameter Vaskularität, DNA- und Zellgehalt sanken zurück auf den physiologischen Ausgangswert und waren signifikant niedriger als bei der Kontrollgruppe (Smith et al. 2013).

Bisher sind die genauen Wirkmechanismen der MSC in diesem Zusammenhang noch nicht endgültig erforscht. In vitro-Studien haben nachgewiesen, dass MSC sowohl direkt durch Matrixproduktion und -umbau als auch indirekt durch Protektion und Stimulation der Tenozyten wirken können. Unter hypoxischen Bedingungen kultivierte MSC zeigten eine gesteigerte Expression von Kollagen I, Kollagen III, Decorin und Tenomodulin (Chen et al. 2020). Während die Produktion von Kollagenen direkt zum Aufbau von neuem Sehngewebe beiträgt, kann Decorin den Durchmesser der Kollagenfasern regulieren (Hwang & Halper 2021) und Tenomodulin die Sehnenreifung fördern, indem es den Kollagen-I-Gehalt reguliert und den Kollagenumbau fördert (Dex et al. 2016). Diese Ergebnisse wurden durch die Anwendung der hypoxisch kultivierten MSC in einem Kaninchen-Tendinopathie-Modell bestätigt, das eine signifikante Verbesserung der Kollagenstruktur und der mechanischen Belastbarkeit zeigte (Chen et al. 2020). Des Weiteren steuern MSC die Matrixmodellierung durch die Produktion und Aktivierung von MMPs und TIMPs, die die extrazelluläre Matrix auf-, ab- und umbauen. Tenogene Stimuli, wie das Bone Morphogenic Protein(BMP)-12 oder Sehnenmatrixproteine, fördern die Expression von MMPs (Yang et al. 2013, Zarychta-Wiśniewska et al. 2017), was besonders bei chronischen Läsionen von großer Bedeutung sein kann.

Ähnliche modulatorische Effekte werden bei der Co-Kultivierung von MSC und Tenozyten beobachtet. Tenozyten steigerten in der Anwesenheit von MSC ihre Expression von EZM-Genen, insbesondere Kollagen I und Tenascin-C, und regulierten für den EZM-Umbau relevante Gene, wie MMP1, MMP2, MMP3 und TIMP1

zeitpunktabhängig. Darüber hinaus wurde die Ablagerung von Kollagen I beschleunigt und gegenüber der Produktion von Kollagen III begünstigt, was bereits nach 7 Tagen zu einem verbesserten COL1/COL3-Verhältnis führte (Costa-Almeida et al. 2018). Der positive Einfluss der Co-Kultur wurde durch eine In-vivo-Studie bestätigt, in der die Implantation eines Scaffolds mit co-kultivierten Tenozyten und MSC eine deutlich bessere Wirkung erzielte als Scaffolds mit nur einer Zellkomponente (Wu et al. 2016). MSC tragen somit aktiv zum Umbau des Sehngewebes bei.

Dennoch ist zu beachten, dass diese Regulationen zeit- und kontextabhängig sind. Studien zeigten, dass die Expression von Matrixproteinen und MMPs durch fibrotisch veränderte EZM reduziert werden kann (Burk et al. 2022, Doll et al. 2021). Das Wechselspiel zwischen MSC und der Sehnenmatrix ist demnach ein komplexer Prozess und es besteht die Notwendigkeit, die genauen Signalwege und Interaktionen zwischen MSC und der Sehnenmatrix weiter zu entschlüsseln.

2.2.3 Förderung der Angiogenese

Sehnen haben physiologisch eine geringere Vaskularisierung als andere Gewebe. Einige Sehnen, wie die Achilles-, Quadrizeps- und Supraspinatussehne, besitzen zusätzlich Bereiche mit noch weiter reduzierter bis keiner Vaskularisierung (Stein et al. 2000, Adler et al. 2008, Petersen et al. 1999). In diesen hypovaskulären Bereichen kommt es häufiger zu degenerativen Veränderungen und Rupturen als in anderen (Yepes et al. 2008). Aufgrund dessen vermutet man, dass die Hypovaskularität der Sehne die Entstehung von degenerativen Veränderungen begünstigt und die Heilung maßgeblich beeinträchtigen kann (Petersen et al. 2005, Korntner et al. 2019). Nach einer akuten Sehnenverletzung kommt es vorübergehend zu einer vermehrten Ausschüttung des Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) (Boyer et al. 2001, Petersen et al. 2003). Dieser steigert die Angiogenese und fördert dadurch die intrinsischen und extrinsischen Heilungsmechanismen. Eine Studie an Beugesehnen von Hunden zeigte eine Zunahme der Gefäßlänge und -dichte ab Tag 3 postoperativ, die am Tag 17 ihren Höhepunkt erreichte und danach bis Tag 28 deutlich abnahm (Gelberman et al. 1991). Die Neovaskularisierung ist demnach ein wesentlicher Bestandteil der Sehnenheilung. Durch die vermehrte Durchblutung wird die Versorgung mit Sauerstoff, Energie und Wachstumsfaktoren, sowie der Abtransport von Stoffwechselprodukten gefördert. MSC unterstützen die Angiogenese und können hierdurch möglicherweise das durch die Hypovaskularität bestehende Defizit der

Sehnen ausgleichen. Im Allgemeinen kann die Steigerung der Angiogenese die Heilung verbessern und die Narbenbildung reduzieren (Tao et al. 2016, Huang et al. 2020). Zahlreiche Studien belegen den proangiogenetischen Effekt von MSC bei Behandlung ischämischer Erkrankungen, wie Schlaganfällen, Myokardinfarkten oder peripheren Gefäßerkrankungen (Ulpiano et al. 2021, Tang et al. 2006, Huang et al. 2019, Kinnaird et al. 2004). In einem Mausmodell mit Ischämie der hinteren Gliedmaße wurde die Durchblutung des Hinterbeins durch MSC signifikant verbessert, Gewebeschäden verringert und die Funktion der Gliedmaße gesteigert (Kinnaird et al. 2004). Auch bei Patienten mit Myokardinfarkt wurde die ventrikuläre Funktion durch MSC-Applikation erheblich verbessert (Hare et al. 2009), was mit einer gesteigerten Induktion von Myogenese und Angiogenese in Verbindung steht (Dai et al. 2005, Tang et al. 2006).

Ihren proangiogenetischen Effekt erzielen MSC durch die Förderung der Gefäßbildung, der Proliferation, Migration und Invasion von Endothelzellen und das Rekrutieren von endothelialen Vorläuferzellen (Duffy et al. 2009, Kinnaird et al. 2004, Kwon et al. 2014). In einer direkten Co-Kultur mit Endothelzellen erhöhten MSC ebenfalls die Persistenz bereits bestehender Blutgefäße, was darauf hindeutet, dass MSC nicht nur die Gefäßbildung fördern, sondern auch eine aktive Rolle bei der Stabilisierung und Reifung neu gebildeter Gefäße spielen (Duffy et al. 2009). MSC vermitteln ihre Wirkung hauptsächlich parakrin und produzieren hierfür eine Vielzahl an proangiogenetischen Faktoren, wie VEGF, MCP-1, Hepatocyte Growth Factor, Placental Growth Factor, Stromal cell-derived Factor-1 und Angiopoietin-1 (Kwon et al. 2014, Bronckaers et al. 2014). Besonders VEGF-A hat sich als potenter Faktor herausgestellt. Es fördert die Angiogenese, indem es die Proliferation und Migration von vaskulären Endothelzellen steigert und das Homing von perivaskulären Zellen begünstigt (Grunewald et al. 2006, Molloy et al. 2003, Tao et al. 2016). Bei einer akuten Achillessehnenverletzung bei Ratten verbesserte eine lokale Applikation von VEGF-111 die Zugfestigkeit und mechanische Stabilität der Sehnen nach 15 bzw. 30 Tagen (Kaux et al. 2014).

Die Förderung und Bedeutung der Angiogenese bei Sehnenerkrankungen wird jedoch kontrovers diskutiert. Denn trotz vielversprechender Ergebnisse bestehen auch einige negative Effekte. Während der Neovaskularisierung kommt es zum Beispiel zum Abbau der extrazellulären Matrix und damit zu einem Stabilitätsverlust (Sahin et al.

2012, Liu et al. 2021). Darüber hinaus wirkt sich eine anhaltende gesteigerte Vaskularisierung negativ auf den Langzeit-Effekt aus und wird mit der Entstehung von chronischen Sehnenerkrankungen assoziiert (Liu et al. 2021, Petersen et al. 2005, Korntner et al. 2019). In humanen degenerierten Achillessehnen und Rotatorenmanschetten wurde eine Hypervaskularität und erhöhte VEGF-Konzentrationen im Vergleich zu gesunden Sehnen nachgewiesen (Pufe et al. 2001, Lakemeier et al. 2010). Vermutlich wird dadurch das Einwachsen von Nervenfasern und die Anreicherung von Glutamatrezeptoren, wichtige Vermittler für das Schmerzempfinden, begünstigt (Alfredson & Lorentzon 2002, Schizas et al. 2012). In einer Studie mit 41 Patienten wurde die Schmerzhaftigkeit chronischer Achillessehnenenerkrankungen mit einer Hypervaskularisierung der veränderten Bereiche assoziiert (Ohberg et al. 2001). Diese Theorie wird durch den wirksamen Einsatz von Sklerosierungsmitteln, wie Polidocanol, unterstützt. Durch mehrfache Injektion mit Polidocanol konnte der Schmerz bei chronischen Achillessehnenenerkrankungen signifikant gesenkt werden (Alfredson & Ohberg 2005, Lind et al. 2006). Das Wissen über den angiogenen Effekt von MSC im Rahmen von Sehnentherapien ist bisher noch begrenzt. In zwei experimentellen Studien stellte man bei MSC-therapierten Pferden eine vorübergehende Erhöhung der Sehnenvaskularisierung fest (Ahrberg et al. 2018, Conze et al. 2014). Jedoch konnten hier die beschriebenen positiven Auswirkungen einer transienten Steigerung der Vaskularisierung nicht nachgewiesen werden, da keine signifikante Verbesserung bei den mit MSC behandelten Pferden verglichen zur Kontrollgruppe gezeigt wurde. Demnach ist weitere Forschung notwendig, um den angiogenen Effekt der MSC während der Sehnenheilung, insbesondere in vivo, besser zu verstehen und mögliche negative Nebeneffekte, wie Stabilitätsverlust und anhaltende Hypervaskularisierung, zu verhindern.

2.2.4 Tenogene Differenzierung

Zu Beginn der Stammzellforschung im Bereich der Tendinopathien vermutete man, dass MSC ihre die Hauptwirkung durch die Ansiedelung und den Ersatz geschädigter Tenozyten vermitteln. Diese Annahme wurde durch den Einsatz von durch MSC sekretierten Wachstumsfaktoren und zellfreien Therapeutika, die einen ähnlichen positiven klinischen Effekt bewirkten, widerlegt (Romero et al. 2017). Dennoch weisen Studien daraufhin, dass die tenogene Differenzierung hinsichtlich der Langzeitwirkung

von MSC eine wichtige Rolle spielt. Einige Studien zur Verteilung applizierter MSC zeigen, dass eine intraläsionale Applikation der MSC zur Behandlung von Sehnenläsionen am vielversprechendsten ist (Becerra et al. 2013, Sole et al. 2013). In einer Studie mit 13 Pferden konnten nach 24 Stunden noch 24% der injizierten MSC in der Läsion lokalisiert werden (Becerra et al. 2013). Bei einer intravenösen Applikation hingegen werden die MSC im Lungengewebe abgefangen und bei intraarterieller Injektion gelangt nur ein Bruchteil der Zellen durch „Homing“ in die Läsion (Becerra et al. 2013, Sole et al. 2013). Die intravaskulären Applikationen bergen zudem ein erhöhtes Thromboserisiko bei Mensch und Pferd (Sole et al. 2013, Jung et al. 2013, Wu Z. et al. 2017). Eine Langzeitstudie bei Pferden wies darüber hinaus auch nach 24 Wochen noch injizierte MSC in der Sehnenläsion nach. Diese Ergebnisse legen nahe, dass ein Teil der injizierten MSC in der Läsion verbleibt und eine langfristige Wirkung begünstigt (Burk et al. 2016b). Eine tenogene Differenzierung der verbleibenden Zellen wurde in vivo bisher jedoch noch nicht bewiesen. Zudem stellt das entzündliche Milieu, welches bei Sehnenverletzungen vorherrschend ist, eine weitere Hürde dar. Entzündliche Faktoren, wie IL-1 β und IL-6, können die tenogene Differenzierung von MSC beeinträchtigen (Brandt et al. 2018, Chen et al. 2018, Zhang et al. 2015). Um dieses Problem zu umgehen, verfolgen Forscher den Ansatz MSC vor der Behandlung tenogen zu primen. Das Priming von MSC zeigt bereits in anderen Bereichen, wie der Immunmodulation, eine Verbesserung der Funktion, des Überlebens und des therapeutischen Effektes (Noronha et al. 2019). Auch in zwei klinischen Studien zur Behandlung von Sehnenläsionen beim Pferd wurden tenogen-induzierte Zellen sicher und mit therapeutischem Erfolg angewendet (Vandenberghe et al. 2015, Beerts et al. 2017). Es konnte jedoch noch nicht geklärt werden, ob die tenogen-induzierten Zellen eine verbesserte Wirkung gegenüber undifferenzierten MSC aufweisen. Um den Beitrag der tenogenen Differenzierung zur klinischen Effektivität der MSC besser zu verstehen, sind daher weitere Studien notwendig.

Die Fähigkeit der MSC, sich in tenozyten-ähnliche Zellen zu differenzieren, wurde in verschiedenen In-vitro-Studien nachgewiesen. Da es jedoch bis heute an einem eindeutigen Marker zur Identifizierung tenogen-differenzierter Zellen fehlt, wird eine Kombination von verschiedenen Genen herangezogen, um eine Differenzierung nachzuweisen. Skleraxis, Mohawk und Early Growth Response-1 sind häufig verwendete Sehnenmarker, da sie während der embryonalen Tenogenese exprimiert werden (Havis et al. 2014, Delgado et al. 2018). Zusätzlich wird die Expression der

Matrixproteine Kollagen I, Kollagen III, Tenascin-C und Tenomodulin zur Beurteilung einer erfolgreichen Differenzierung herangezogen. Die tenogene Differenzierung kann durch viele verschiedene Faktoren, wie Wachstumsfaktoren, Co-Kultivierung, Scaffolds und mechanische Stimulation ausgelöst werden. Diese werden im folgenden Kapitel näher erläutert.

2.3 Auslöser der tenogenen Differenzierung

2.3.1 Extrazelluläre Matrix

Bei Sehnen ist die extrazelluläre Matrix entscheidend für die Belastbarkeit. Diese besteht hauptsächlich aus Kollagenen und Proteoglykanen. Erstere ordnen sich parallel zu streng hierarchischen Faserbündeln an, wodurch sie der Sehne ihre Zugfestigkeit und Stabilität verleihen. Die Proteoglykane sind für die Viskoelastizität der Sehnen verantwortlich und in Abhängigkeit der speziellen Funktion der Sehne nehmen sie einen entsprechenden Anteil an der Gesamtmatrix ein. Die EZM ist ein entscheidender Faktor für die Differenzierung von MSC. In einem Vergleich von Scaffolds, gewonnen aus Knochen- oder Sehngewebe, wurde gezeigt, dass die aus Knochen gewonnenen Scaffolds die osteogene Differenzierung förderten, während die Sehnen-Scaffolds die tenogene Differenzierung induzierten und die osteogene hemmten (Yin et al. 2013). Die Wirkung der EZM wird durch ihre unterschiedlichen biophysikalischen, biochemischen und biomechanischen Eigenschaften bestimmt. Kommen MSC mit der EZM in Kontakt, entstehen fokale Verbindungen, um das Zytoskelett der MSC durch Integrine an die EZM zu binden. Anschließend können die Signale der Umgebung wahrgenommen und in biochemische Signale umgewandelt werden, die das Zellverhalten maßgeblich beeinflussen (Huveneers & Danen 2009, Yi et al. 2022).

Dezellularisiertes Sehngewebe verkörpert am natürlichsten das native Sehngewebe. Studien zeigen, dass Sehngewebe sowohl durch seine rein biochemische Proteinzusammensetzung (Yang et al. 2013) als auch durch seine Struktur die tenogene Differenzierung von MSC fördern kann (Burk et al. 2016a). Eine Kultivierung von AMSC auf einer urea-extrahierter Sehnenmatrix erhöhte die Expression von sehnenbezogenen Genen (SCX, TNC, TNMD), während es parallel die Expression von osteogenen Genen (RUNX2, ALP, OCN) reduzierte (Yang et al. 2013). Dies bestätigt die Ergebnisse der Knochen/Sehnen-Vergleichsstudie, dass

natives Sehngewebe nicht nur die tenogene Differenzierung gezielt fördert, sondern gleichzeitig auch die osteogene Differenzierung hemmt (Yin et al. 2013).

Jedoch ist die Verfügbarkeit und Standardisierbarkeit natürlicher Sehnscaffolds begrenzt. Aufgrund dessen wurden verschiedene Biomaterialien und Herstellungsmethoden entwickelt, um die EZM nachzuahmen. Dabei können natürliche und synthetische Scaffolds unterschieden werden, welche sich wiederum in strukturierte und nicht-strukturierte Scaffolds unterteilen lassen. Natürliche Scaffolds haben den Vorteil, dass sie biogen sind und somit realitätsnah agieren. Der biologische Ursprung ist jedoch auch ein Nachteil, da durch den meist tierischen Ursprung eine Kontaminationsgefahr besteht und besonders bei dezellularisiertem Geweben die biomechanischen und biochemischen Einflussfaktoren variabel, nicht vollständig bekannt und nur sehr eingeschränkt kontrollierbar sind. Hier haben künstliche Scaffolds den Vorteil, dass ihre Eigenschaften, wie Porosität, Faserdicke/-ausrichtung, Substratzusammensetzung und Steifigkeit besser kontrolliert werden können. Häufig eingesetzte Materialien für die Herstellung von Sehnscaffolds sind synthetische Polymere, wie Polylactide, Polycaprolacton, Polyhydroxyessigsäure und Polylactid-co-Glycolid, oder auch tierische Kollagene, darunter vor allem Kollagen I.

Die Verwendung von Kollagen I als Matrixkomponente im Scaffold ist naheliegend, da die Sehnenmatrix zu über 90% aus Kollagen I besteht. Frühere Studien belegen, dass die Kultivierung von MSC auf Kollagengelen zu einer signifikanten Erhöhung tenogener Marker führt (Sharma et al. 2010, Kuo & Tuan 2008). Bei einem kombinierten Einsatz von Tenozyten und einem Kollagengel zur Behandlung von Sehnendefekten beim Schaf zeigte die behandelte Gruppe eine deutlich bessere Faserstruktur und -orientierung, sowie eine verbesserte Belastbarkeit (Roßbach et al. 2020). Der tenogene Effekt des Kollagens kann durch weitere Modifikationen, wie die parallele Ausrichtung der Kollagenfibrillen, noch weiter verstärkt werden (Kishore et al. 2012). Die parallele Faserausrichtung ahmt die hierarchische Sehnenstruktur nach, verbessert die Anhaftung der Zellen und fördert eine vermehrt elongierte, tenozyten-ähnliche Morphologie. Zusätzlich orientieren sich die Zellen sowie deren neugebildete Kollagenfasern entlang der Faserrichtung des Scaffolds (Yin et al. 2010). In einer Vergleichsstudie mit parallel- und ungerichteten Scaffolds wurde gezeigt, dass parallel ausgerichtete Scaffolds sowohl die Expression von Sehnenmarkern erhöhten als auch die von osteogenen Markern inhibierten (Xu et al. 2021, Kishore et al. 2012).

Interessanterweise konnte diese Entwicklung auch in einem osteogenen Differenzierungsmedium beobachtet werden (Yin et al. 2010). Im Gegensatz hierzu steht jedoch eine andere Studie, in der die osteogene Differenzierung durch parallel ausgerichtete Fasern ebenfalls gefördert wurde (Cristofaro et al. 2018). Daraus ist zu schließen, dass die Faserausrichtung einen förderlichen, aber nicht exklusiv tenogenen Effekt hat und eine Kombination mit weiteren Komponenten über die Differenzierung der MSC entscheidet.

Ein weiterer Einflussfaktor ist die Steifigkeit der Scaffolds. Die Sehne hat durch ihre streng hierarchische Anordnung von Kollagenfasern eine sehr hohe natürliche Steife von 136-820 MPa (Padhi & Nain 2020). Als logische Konsequenz ist zu vermuten, dass Scaffolds mit physiologisch hoher Steifigkeit notwendig sind für eine erfolgreiche tenogene Differenzierung. Bei einer Untersuchung von Tenozyten wurde jedoch festgestellt, dass ihre Kollagen- und Skleraxis-Expression unabhängig von der Gewebesteifigkeit ist (Patel et al. 2018). Dennoch unterstützen einige Studien die Vermutung, dass die tenogene Differenzierung auf Scaffolds mit einer hohen Steifigkeit (>10 MPa) gefördert wird (Islam et al. 2017). Allerdings gibt es auch gegenteilige Studien, die zeigen, dass steife Scaffolds (24,09 kPa; 149,53 kPa) durch eine verstärkte Fokale Ädhäsionskinase (FAK) und extrazelluläre signal-regulierte Kinase 1/2 (ERK1/2) Signalwegaktivierung die tenogene Differenzierung hemmen (Liu et al. 2018, Sheng et al. 2023). Bei diesen Ergebnissen ist jedoch zu beachten, dass die Studien alle mit unterschiedlichen, sich nicht überschneidenden Graden an Steifigkeiten arbeiteten, die nicht annähernd der physiologischen Steifigkeit einer Sehne entsprechen und nur im Verhältnis als weich, mittel und steif eingeordnet wurden. Demnach sind diese Ergebnisse nur eingeschränkt vergleichbar und keine endgültige Aussage treffbar.

2.3.2 Mechanische Stimuli

Mechanische Stimulation ist ein wichtiger Bestandteil der Sehnenfunktion und ihrer Regeneration. Die natürlichste Form ist die zyklische Dehnung, welche die Sehne unter In-vivo-Bedingungen erfährt. Studien zeigen, dass zyklische Dehnung die Sehnenregeneration fördert, indem es die Aktivität, Proliferation und Migration von Zellen steigert und die Matrixmodulation reguliert (Engebretson et al. 2018, Lee et al. 2010, Abousleiman et al. 2009). Tenozyten erhöhen als Reaktion auf Dehnungsreize ihre Kollagen-I-Synthese (Huisman et al. 2014) und auch bei MSC wird die tenogene

Differenzierung in Form von gesteigerter Skleraxis-Expression und vermehrter Matrixproteinsynthese gefördert (Chen et al. 2008, Kuo & Tuan 2008, Rinoldi et al. 2019). In einem Tissue Engineering Ansatz wurden BMSC auf dezellularisiertem Nabelschnurgewebe angesiedelt und über zwei Wochen zyklisch gedehnt. Die stimulierte Gruppe zeigte eine verbesserte Zugfestigkeit und Steifigkeit des Sehnenkonstruktes im Vergleich zur Kontrollgruppe. In histologischen Untersuchungen wurden zudem parallel ausgerichtete Kollagenfasern und spindelförmige Zellen, die eine große Ähnlichkeit zu einer nativen Sehnenmorphologie aufwiesen, festgestellt (Abousleiman et al. 2009). Folglich führen die Zellveränderungen zu verbesserten biomechanischen Eigenschaften der Sehne, wie einer erhöhten Faserstärke, einem größeren Sehrendurchmesser und weniger Adhäsionen (Wang et al. 2008, Xu et al. 2014).

Der Einfluss von mechanischen Stimuli auf die Zellen wird durch verschiedene Faktoren, wie Intensität, Dauer und Frequenz bestimmt (Engebretson et al. 2018). In Vergleichsstudien konnte gezeigt werden, dass eine moderate zyklische Dehnung (ca. 4%) zur Steigerung der Expression von ausschließlich tenogenen Genen in MSC und Tenozyten führte (Zhang & Wang 2013, Zhang et al. 2020). Eine intensive Dehnung (ca. 8%) hingegen erhöhte ebenfalls die Expression chondrogener Gene und rief im In-vivo-Modell morphologische Veränderungen hervor, die mit einer chondrogenen Differenzierung in Verbindung gebracht werden können (Zhang et al. 2020). Im Gegensatz hierzu stehen Studien, die durch intensive Dehnung eine verbesserte tenogene Differenzierung gezeigt haben (Chen et al. 2008, Rinoldi et al. 2019). Neben der zyklischen Dehnung können auch andere mechanische Stimuli wie Stoßwellen (Leone et al. 2016) und pulsierende magnetische Felder (Tomás et al. 2019) zur Induktion der Differenzierung von MSC verwendet werden. Für die tenogene Differenzierung sind diese alternativen Stimulationsarten jedoch noch nicht ausreichend untersucht.

2.3.3 Co-Kultivierung

Die Co-Kultivierung von MSC mit anderen Zelltypen kann signifikante Auswirkungen auf ihre tenogene Differenzierung haben. Durch Interaktion mit anderen Zellen, wie Tenozyten oder Fibroblasten, wird die Proliferation von MSC, sowie deren Expression von tenogenen Markern und Matrixproteine hochreguliert. Dies zeigte sich in einem direkten Co-Kultivierungssystem von tenogenen Progenitorzellen und BMSC, in

welchem ein 1:1 Verhältnis die stärkste Steigerung der Skleraxis-, Tenomodulin- und Kollagen-I-Expression erzielte (Wu et al. 2016). Auch in Kombination mit Fibroblasten und reifen Tenozyten konnten entsprechende Genexpressionssteigerungen und eine vermehrte Matrixproduktion nachgewiesen werden (Schneider et al. 2011, Wu S. et al. 2017, Canseco et al. 2012). In einer ersten In-vivo-Studie bei Ratten wurde zudem eine verbesserte mechanische Belastbarkeit nach Sehnenverletzung durch den Einsatz von co-kultivierten BMSC festgestellt (Wu et al. 2016). Die Signale zwischen den Zellen werden durch humorale Faktoren und direkten Zell-Zell-Kontakt übertragen. Ein Vergleich von verschiedenen Co-Kultivierungssystemen zeigte, dass die indirekte und direkte Co-Kultur sowie die reine Kultivierung von MSC in Tenozyten-konditioniertem Medium eine förderliche Wirkung auf die tenogene Differenzierung der MSC hat (Schneider et al. 2011, Kraus et al. 2013). Hierbei kam es zu einer signifikanten Steigerung von Tenomodulin in allen drei Kulturmodellen, während die Hochregulation von Skleraxis nur bei direkter Co-Kultivierung signifikant war. Folglich scheint sich der Einfluss von Tenozyten auf MSC zu erhöhen, sofern ein direkter Zell-Zell-Kontakt besteht. Dies bestätigt sich durch Immunfluoreszenz-Färbungen, in denen gezeigt wurde, dass Tenozyten und MSC intensive interzelluläre Kontakte ausbilden und aktiv Vesikel austauschen (Schneider et al. 2011). Die Kommunikation zwischen den Zellen basiert auf Gegenseitigkeit, denn bei gemeinsamer Kultivierung beeinflussen MSC auch Tenozyten positiv, die darauf ihre Proliferation, ihre Kollagen-I-Produktion sowie die Expression weiterer Matrixproteine steigern (Veronesi et al. 2015, Long et al. 2018).

Die tenogene Differenzierung kann jedoch nicht nur durch Tenozyten unterstützt, sondern auch durch Immunzellen behindert werden. In einer Co-Kultivierung von MSC und Leukozyten wurde die Proliferation und die Skleraxis-Expression der MSC deutlich reduziert (Brandt et al. 2018). Ähnliche Effekte wurden durch die Hinzugabe von proinflammatorischen Zytokinen bewirkt. Infolgedessen ist zu vermuten, dass Leukozyten oder auch andere Immunzellen die Differenzierung von MSC negativ beeinflussen können.

2.3.4 Wachstumsfaktoren

Die tenogene Differenzierung von MSC ist ein komplexer Prozess, der durch verschiedene Wachstumsfaktoren reguliert werden kann. Eine Schlüsselrolle spielt hierbei die TGF- β Familie, zu der sowohl das TGF- β als auch die Growth Differentiation

Factors (GDF) gehören. Ebenso tragen der Fibroblast Growth Factor (FGF), Insulin-like Growth Factor-1 und VEGF zur Regulation der tenogenen Differenzierung bei.

Insbesondere TGF- β ist ein intensiv erforschter tenogener Faktor. Studien demonstrieren seine enorme Bedeutung für die embryonale Entwicklung des Sehngewebes, sowie die embryonale und adulte Sehnenheilung (Havis et al. 2014, Kuo et al. 2008, Kaji et al. 2020). Wird der TGF- β Signalweg während der embryonalen Entwicklung blockiert, kommt es zur Reduktion sehnenpezifischer Genexpression und zu unzureichender Ausbildung von Sehngewebe (Havis et al. 2014, Pryce et al. 2009). Des Weiteren zeigt sich TGF- β im Rahmen der neonatalen Sehnenregeneration als entscheidend für die funktionelle Wiederherstellung des Sehngewebes und die Rekrutierung von Tenozyten, während die Proliferation unbeeinflusst bleibt (Kaji et al. 2020).

Es gibt drei verschiedene Isoformen, TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF- β 3, die während der Sehnenentwicklung in verschiedenen zeitlich-räumlichen Verteilungsmustern exprimiert werden. In einem Hühnerembryomodell wurden TGF- β 2 und β 3 an Tag 14 am stärksten exprimiert, während TGF- β 1 bis Tag 13 nicht nachweisbar war, danach bis Tag 16 aber stark anstieg (Kuo et al. 2008). Ein ähnlicher und dennoch gegensätzlich verlaufender Verteilungseffekt wurde auch bei der adulten Sehnenheilung festgestellt. In der frühen Phase der Sehnenheilung kam es zu einer deutlichen Hochregulation der TGF- β 1-Expression, welche danach allmählich wieder abnahm. In den späteren Phasen stieg die TGF- β 3-Expression an und blieb erhöht (Juneja et al. 2013). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Isoformen unterschiedliche Rollen in der Sehnenentwicklung und -heilung haben. Dies wird auch durch Ergebnisse einer Studie in Mäuseembryos bestätigt. Hier führte eine TGF- β 2^{-/-} Depletion zu einem Verlust der Strecksehnen mit normal ausgebildeten Beugesehnen, während eine TGF- β 3^{-/-} Depletion die Entwicklung des Sehngewebes nicht störte. Kombinierte man beide Depletionen, führte das zu einer dramatischen phänotypischen Änderung der Embryonen, bei denen es zu einem vollständigen Verlust der Strecksehnen und einer Beeinträchtigung der Beugesehnen kam (Pryce et al. 2009).

In-vitro-Studien haben gezeigt, dass TGF- β eine starke tenogene Wirkung auf die MSC hat, indem es die Expression von Sehnenmarkern, wie Skleraxis und Mohawk, erhöht und die Kollagensynthese steigert (Roth et al. 2018, Barsby & Guest 2013). Insbesondere TGF- β 3 hat sich als zuverlässiger Stimulator zur Erhöhung der

Skleraxis-Expression erwiesen. Eine In-vivo-Applikation von TGF- β 3 in verletztes Sehngewebe verbesserte die Sehnenreparatur und stärkte die histologischen und biomechanischen Eigenschaften der Sehne (Han et al. 2020).

Abgesehen von seinen positiven Effekten wird TGF- β jedoch auch mit der Förderung von fibrotischer Narbenbildung in verschiedenen Geweben in Verbindung gebracht (Katzel et al. 2011). Hierbei steigert insbesondere TGF- β 1 die Myofibroblastenaktivität, die Synthese von Kollagenen, die Reduktion von Kollagenabbau und die Kontraktilität der Fibroblasten (Campbell et al. 2004, Ask et al. 2008, Border & Noble 1994). Während TGF- β 1 starke profibrotische Eigenschaften besitzt, sind die Ergebnisse für TGF- β 3 uneindeutig. Eine Überexpressionsstudie zeigte, dass TGF- β 3 ebenfalls eine initiale profibrotische Reaktion durch Aktivierung der Myofibroblasten auslöst, welche in ihrer Intensität und Dauer jedoch wesentlich schwächer ausgeprägt ist als bei TGF- β 1 (Ask et al. 2008). Eine weitere Studie weist darauf hin, dass TGF- β 3 sogar eine antifibrotische Wirkung hat (Chan et al. 2008). Aufgrund dieser Ergebnisse und der besseren tenogenen Wirkung wird in Studien vermehrt TGF- β 3 als Supplement verwendet.

Neben TGF- β spielen auch andere Wachstumsfaktoren eine Rolle bei der tenogenen Differenzierung. FGF ist beispielsweise ein Hauptbestandteil von plättchenreichem Plasma, das nachweislich eine positive Wirkung auf die Sehnenheilung hat. FGF2 steigert die Matrixproduktion und verstärkt die Expression von Skleraxis in BMSC (Hankemeier et al. 2005, Reed & Johnson 2014). Bei der Behandlung von verletztem Sehngewebe mit FGF2 stellte man zudem fest, dass die Skleraxis- und Tenomodulin-Expression gesteigert und die biomechanischen Eigenschaften der Sehne verbessert wurden (Tokunaga et al. 2015).

Die GDFs, auch Bone Morphogenic Proteins genannt, spielen ebenfalls eine Rolle bei der Sehnenheilung. Ähnlich wie bei TGF- β wurden diese in bestimmten Heilungsphasen der Sehne festgestellt werden (Eliasson et al. 2008). GDF-5/BMP-14 zeigte in einer Studie eine dosisabhängige Expressionssteigerung tenogener Marker in BMSC und erreichte mit einer Konzentration von 100 ng/ml eine signifikante Hochregulation von Kollagen I und Tenomodulin auf Proteinebene (Ciardulli et al. 2020). Auch GDF-7/BMP-12 kann nachweislich die tenogene Differenzierung der MSC induzieren und die Sehnenheilung unterstützen (Shen et al. 2013, Lee et al. 2011). Eine In-vivo-Studie zeigte, dass die Implantation von BMP-12/GDF-7 die Heilung von

verletzten Rotatorenmanschetten förderte (Ide et al. 2017). Dementgegen stehen jedoch zahlreiche Studien, die keinen Effekt von BMP-12 bei alleiniger Anwendung nachwiesen (Roth et al. 2018, Perucca et al. 2019), was die Rolle der BMPs in Rahmen der tenogenen Differenzierung in Frage stellt.

Dennoch eignen sich TGF- β und andere Wachstumsfaktoren gut zur Induktion der tenogenen Differenzierung von MSC und durch gezielte Anwendung können innovative Ansätze zur Verbesserung der Sehnenheilung und zur Entwicklung von Geweberegenerationsstrategien vorangetrieben werden.

2.3.5 Kombiniertes Einsatz tenogener Stimuli

Die Kombination mehrerer Einzelfaktoren zur Induktion der tenogenen Differenzierung von MSC bietet eine vielversprechende Strategie für die Verbesserung der Geweberegeneration und des Tissue Engineerings. Faktoren derselben Kategorie, wie Scaffolds und mechanische Reize, werden häufig gemeinsam verwendet, da sie aufeinander aufbauen. Insbesondere die Kombination von parallel ausgerichteten Faserscaffolds mit zyklischer Dehnung erwies sich als äußerst wirkungsvoll. Mehrere Studien zeigten einen synergistischen Effekt mit verstärkter Hochregulation der tenogenen Marker (Burk et al. 2016a, Rinoldi et al. 2019, Kuo & Tuan 2008). Auch verschiedene Wachstumsfaktoren wurden kombiniert, um die tenogene Differenzierung zu fördern. Einige Studien beschreiben eine synergistische Wirkung von TGF- β und BMP-12/14 in Verbindung mit anderen Wachstumsfaktoren (Shojaee et al. 2022, Yin et al. 2016, Bottagisio et al. 2017). Der Einsatz des Connective Tissue Growth Factor (CTGF) im Anschluss an TGF- β 1 oder BMP-12 führte beispielsweise zu einer zusätzlichen Steigerung der Skleraxis-Expression (Yin et al. 2016, Xu et al. 2018). Ähnliche Ergebnisse zeigte die Verwendung von BMP-Antagonisten, Gremlin 2 und Sclerostin, nach TGF- β 3 Stimulation, wodurch die tenogene Markerexpression gesteigert und die osteogene Differenzierung gehemmt wurde (Shojaee et al. 2022).

Eine weitere Strategie umfasst die Kombination von Scaffolds mit Wachstumsfaktoren. Wichtig hierbei ist zu beachten, dass MSC hochgradig kontextabhängig agieren und somit die EZM einen wesentlichen Einfluss auf die zelluläre Interaktion mit Wachstumsfaktoren hat (Vermeulen et al. 2020, Burk et al. 2022). Ein ergänzender Effekt wurde bei der Verwendung von löslicher EZM-Matrix und Mikro-Topografie zusammen mit TGF- β beobachtet (Yang et al. 2017, Vermeulen et al. 2020). Allerdings

zeigen manche Kombinationen keinen Mehrwert zur Steigerung der tenogenen Differenzierung oder sogar negative Effekte. Eine Studie von Kishore et al. (2012) ergab, dass BMP-12 zusätzlich zur Kultivierung auf einem parallel ausgerichteten Scaffold keine fördernde Wirkung auf die tenogene Markerexpression hatte. In einer weiteren Studie, in der auf einem natürlichen Sehnen-Scaffold kultivierte MSC mit TGF- β 3 behandelt wurden, wurde sogar eine verringerte Reaktion von Skleraxis auf die TGF- β 3 Stimulation festgestellt (Roth et al. 2018). Die unterschiedlichen Ergebnisse dieser Studien verdeutlichen die Komplexität der Interaktion zwischen den verschiedenen Faktoren und legen nahe, dass es eine Verbindung zwischen den mechano-sensitiven Signalwegen und denen der Wachstumsfaktoren geben muss. Dies bestätigt eine kürzliche Studie, in welcher die durch EZM-Extrakt induzierte tenogene Differenzierung sowohl Integrin- als auch TGF- β /Smad-Signalweg abhängig vermittelt wurde (Wang et al. 2020). Ansonsten ist über die bei kombiniertem Einsatz von Wachstumsfaktoren und EZM zugrunde liegenden Signalmechanismen bisher wenig bekannt.

2.4 Signaltransduktion in der Sehne

2.4.1 TGF- β Signalweg

Der TGF- β -Signalweg wurde als einer der wichtigsten Signalwege in der Sehne identifiziert (Havis et al. 2016, Pryce et al. 2009, Kuo et al. 2008). Durch seine zentrale Funktion in zellulären Prozessen, sowie der Regulation von Genen, die für die Synthese von Matrixkomponenten verantwortlich sind, beeinflusst er maßgeblich die Entwicklung, Homöostase und Regeneration des Sehngewebes. Werden einzelne Komponenten des Signalweges gehemmt oder verändert, kommt es zu Beeinträchtigungen der Sehnenstruktur und -funktion (Havis et al. 2016, Pryce et al. 2009). So zeigte eine Studie an Mäuseembryos, dass es durch eine Doppel-Depletion von TGF- β 2^{-/-} und TGF- β 3^{-/-} zu einem Verlust der Sehnenstruktur und der Skleraxis-Expression kommt (Pryce et al. 2009).

Die TGF- β Familie umfasst neben den drei TGF- β Varianten zahlreiche weitere Liganden, wie zum Beispiel BMPs oder Inhibin/Activin-Polypeptide (Derynck & Budi 2019). Alle binden an einen Rezeptorkomplex, der sich aus dem Typ I und Typ II Rezeptor zusammenfügt. Die Rezeptortypen sind Transmembrankinasen und weisen strukturelle Ähnlichkeiten auf. Sie verfügen über eine glykosylierte, disulfidreiche Ektodomäne, eine Transmembranregion, eine kurze Juxtamembransequenz und

Literaturübersicht

zytoplasmatische Serin/Threonin-Kinasen, die bis zu 11 Subdomänen haben (Derynck & Budi 2019). Zusätzlich verfügt der Typ I Rezeptor über eine Glycerin-Serin-reiche Sequenz, die GS-Domäne, welche durch den Typ II Rezeptor nach Ligandenbindung phosphoryliert wird. Im Ruhezustand liegen die Rezeptortypen als Monomere, Homodimere und Heterodimere vor. Durch die Ligandenbindung kommt es zur Bildung eines heteromeren Rezeptorkomplexes mit 4 Rezeptoren, der in der Regel zwei Typ I und zwei Typ II Rezeptoren enthält. Bisher wurden im Säugetiergenom fünf Typ II und sieben Typ I Rezeptoren identifiziert (Heldin & Moustakas 2016). Durch deren Variationen in Verbindung mit unterschiedlichen Ektodomänen können die verschiedenen Liganden der TGF- β Familie selektiv und spezifisch gebunden und differenzierte Signalkaskaden aktiviert werden. Dies zeigt sich unter anderem in der Bindungsaffinität der unterschiedlichen Liganden. Beispielsweise binden TGF- β 1 und - β 3 mit hoher Affinität an Typ II Rezeptoren, während BMPs eine hohe Affinität für Typ I Rezeptoren zeigen. TGF- β 2 wiederum benötigt beide Rezeptortypen, um eine ausreichende Bindungsaffinität auszubilden (Derynck & Budi 2019). In Abhängigkeit von den gebundenen Rezeptortypen werden durch die Ligandenbindung unterschiedliche Smad-abhängige und Smad-unabhängige Signalwege aktiviert.

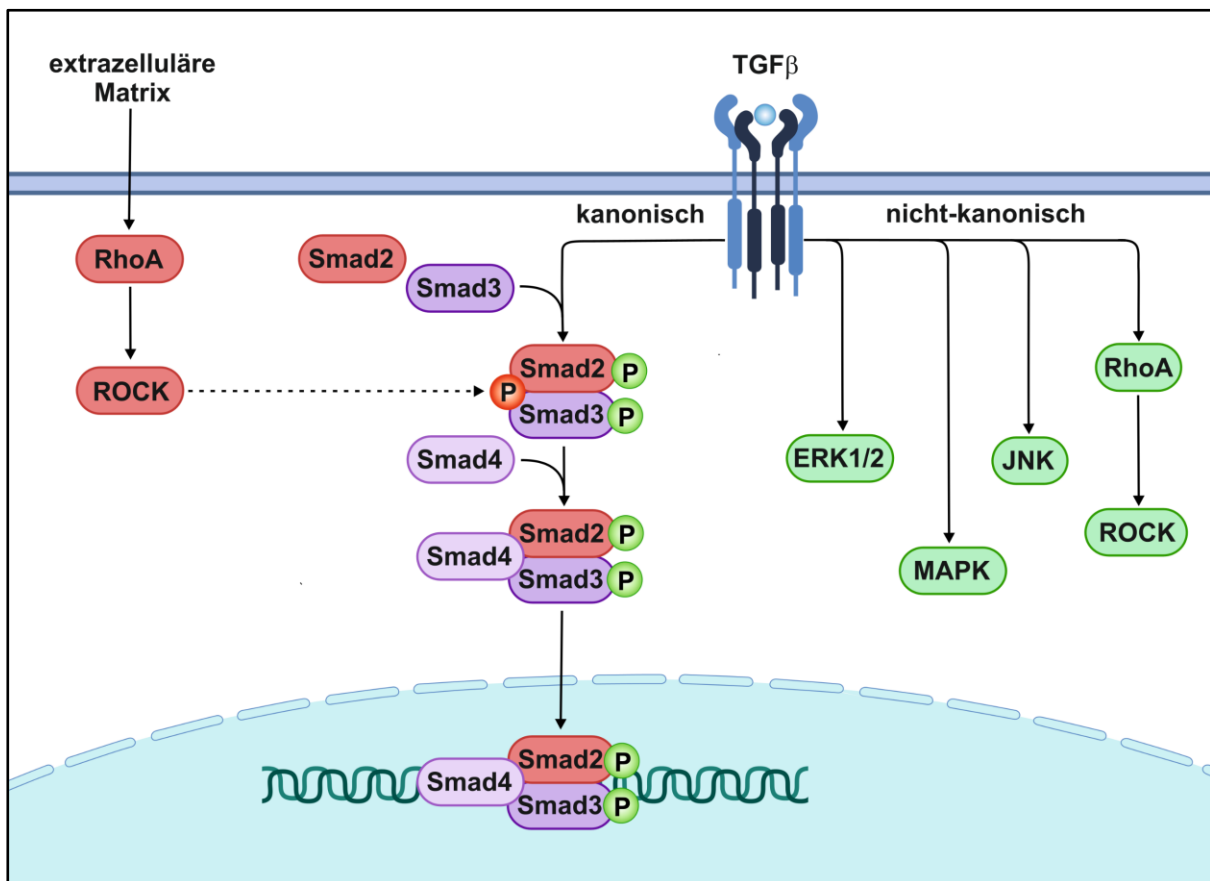


Abbildung 1: kanonischer und nicht-kanonischer TGF- β -Signalweg

2.4.1.1 Smad-unabhängig

Beim nicht-kanonischen Signalweg kann TGF- β Smad-unabhängig unterschiedliche Kinasen, wie die p38-mitogen-activated Protein Kinase (MAPK), die c-Jun-N-terminale-Kinase und ERK aktivieren (Derynck & Zhang 2003). Diese Kinasen haben hauptsächlich eine regulierende Wirkung auf den TGF- β -Signalweg, indem sie durch Phosphorylierung der Linker-Region die Smad-Proteine beeinflussen. Neben diesem regulierenden Effekt können die Kinasen jedoch auch Smad-unabhängig agieren. Diese Signalwege sind bezüglich ihrer Bedeutung und Wirkung für die Sehnenregeneration kaum charakterisiert, werden jedoch eher mit negativen Folgen assoziiert. Eine Studie mit TGF- β -beladenen Exosomen zeigte, dass TGF- β neben Smad2/3 auch ERK1/2 phosphorylierte und somit die Proliferation und Migration von Tenozyten förderte (Li et al. 2021). Jedoch wird ERK1/2 auch mit vermehrter Sehnenadhäsion und Fibrose in Verbindung gebracht (Morita et al. 2019). Ähnlich wird in Tenozyten durch den p38/c-Jun-N-terminale Kinase(JNK) Signalweg die Produktion von MMP-13 gesteigert (Chao et al. 2011). Eine erhöhte MMP-13 Konzentration liegt meist bei akuten Sehnenverletzungen vor und wird mit anhaltend hohem Niveau bei chronifizierten Schäden nachgewiesen (Clegg et al. 2007). Es wird ebenfalls vermutet, dass TGF- β den NF- κ B-Signalweg, einen klassischer Signalweg für Entzündungsreaktionen, aktivieren kann (Jiang et al. 2023).

2.4.1.2 Smad-abhängig

Smad-Proteine sind die Schlüsselfaktoren des TGF- β -Signalweges und werden in Abhängigkeit von ihrer Funktion in drei Kategorien eingeteilt: rezeptorregulierte Smads (R-Smads), hierzu gehören Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 und Smad8, die inhibierenden Smads (I-Smad), Smad6 und Smad7, und außerdem das Co-Smad4 (Brown et al. 2007). Die R-Smad, sowie Smad4, bestehen aus einer stark konservierten carboxy-terminalen MH2- und n-terminalen MH1-Domäne, die über eine variable intermediäre Verbindungsregion, die Linker-Region, miteinander verbunden sind. Die MH2-Domäne ist für die Rezeptor-Smad-Interaktion, die Bildung des Heterokomplexes mit dem Co-Smad4 und die Transaktivierung von Zielgenen verantwortlich, während die MH1-Domäne eine entscheidende Rolle bei dem nukleärem Import, der DNA-Bindung und der Regulierung der Gentranskription einnimmt (Brown et al. 2007).

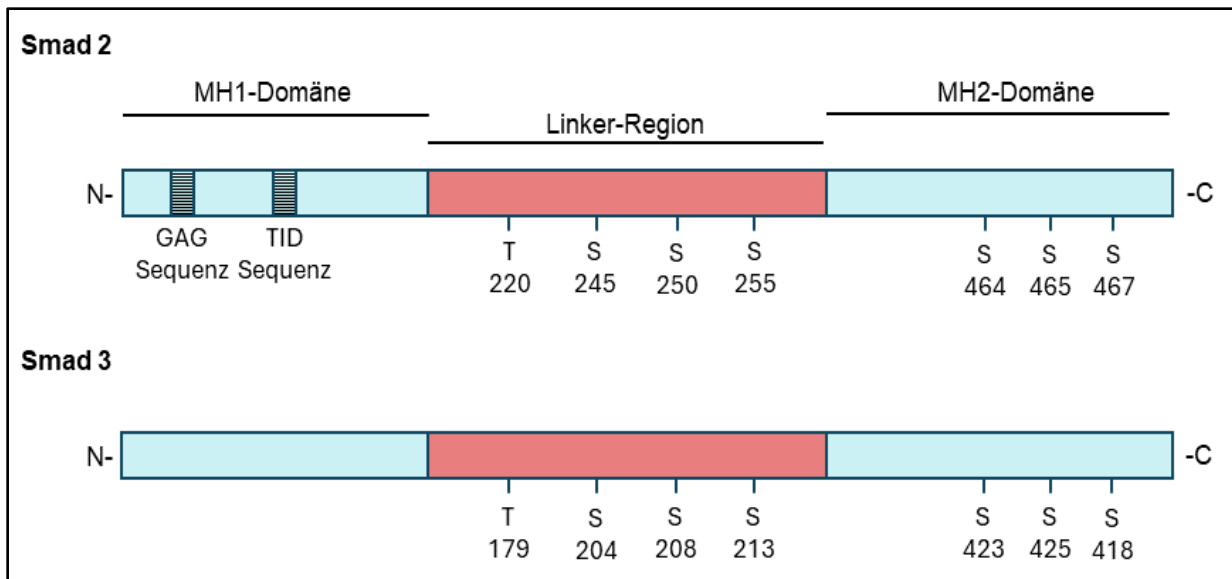


Abbildung 2: Struktur von Smad2 und 3

Die I-Smads besitzen keine MH1-Domäne und ihnen fehlt somit auch die Transkriptionsaktivierungsfunktion. Stattdessen inhibieren sie den TGF- β -Signalweg, um eine zeitlich und räumlich begrenzte Feinregulierung der Signaltransduktion zu ermöglichen (Derynck & Budi 2019). Sie vermitteln ihre hemmende Wirkung, indem sie mit den R-Smads um die Bindungsstellen der Rezeptoren und des Co-Smad4 konkurrieren sowie Rezeptorkomplexe für den Abbau markieren (Brown et al. 2007). R-Smads werden bei Ligandenbindung an den Rezeptor in ihrer carboxy-terminalen Region phosphoryliert, bilden als Homodimer einen Komplex mit dem Co-Smad4, translozieren in den Zellkern und induzieren die Gentranskription mit anderen Co-Regulatoren. Welche R-Smads durch den Rezeptor aktiviert werden, ist abhängig von der am Rezeptor gebundenen Activin-Receptor-like Kinase (ALK). TGF- β 3 signalisiert beispielsweise hauptsächlich über die ALK5, die Smad2/3 phosphoryliert. Wohingegen BMP-12 bevorzugt Rezeptoren mit der ALK3 und 6 aktiviert, die wiederum Smad1, 5 und 8 phosphorylieren (Derynck & Zhang 2003, Wagner 2007). Smad2 und Smad3 sind für den TGF- β -vermittelten Signalweg am wichtigsten. Sie weisen eine Aminosäurehomologie von 66% und 94% der MH1- bzw. MH2-Domäne auf (Kamoto et al. 2013). Der größere Unterschied in der MH1-Domäne entsteht durch zwei Sequenzen, die GAG und TID-Sequenz, die nur bei Smad2 vorkommen. Letztere ist ein ca. 30-Aminosäuren langer Serin- und Threonin-reicher Rest, der Smad2 daran hindert direkt an die DNA zu binden (Dennler et al. 1999). Dementsprechend sind Smad2 und Smad3 weder strukturell noch biologisch redundant, sondern haben beide ihre eigene spezielle Funktion. In einer Studie an Axolotln stellte sich Smad2 als

essenziell für die Gliedmaßenregeneration heraus und eine Hemmung führte zum Ausbleiben der zellulären Proliferation und der Blastombildung. Wenn Smad3 hingegen gehemmt wurde, beeinflusste dies nicht das Regenerationspotential der Tiere (Denis et al. 2016). Eine weitere Studie belegte, dass eine Smad3^{-/-} Depletion lebensfähige Tiere mit einer verkürzten Lebensdauer und massiven Immunsystemdefekten hervorbringt, während eine Smad2^{-/-} Depletion in der frühen Embryonalphase letal ist (Berthet et al. 2013, Heyer et al. 1999). In weiteren Studien erwies sich Smad3 als ein essenzieller Faktor für die Sehnenentwicklung und tenogene Differenzierung. So ist Smad3 nachweislich an der Regulation von Skleraxis und weiterer Sehnenmarker beteiligt (Berthet et al. 2013, Lorda-Diez et al. 2009). Zudem zeigten Smad3^{-/-}-Mäuse eine reduzierte embryonale Sehnenbildung, was zu einer verschlechterten Faserstruktur und einer geringeren Belastbarkeit der Sehne im Vergleich zu Wildmäusen führte (Berthet et al. 2013). Im Gegensatz dazu brachte eine andere Studie die Smad3-Signalübertragung mit Fibrose in Verbindung und zeigte eine geringere Narbenbildung während der Sehnenheilung bei Smad3^{-/-}-Mäusen, allerdings auch auf Kosten einer geringeren Sehnenheilung (Katzel et al. 2011). Ähnlich unterschiedliche Ergebnisse wurden auch bei anderen Differenzierungswegen beobachtet. Während der Chondrozyten-Differenzierung bindet Smad3 an Sox9, um die chondrogene Genexpression zu fördern (Furumatsu et al. 2005), und im Knochen bindet Smad3 den osteogenen Transkriptionsfaktor Runx2, um eine TGF- β -vermittelte Hemmung der Osteoblastendifferenzierung zu bewirken (Alliston et al. 2001). Auch konnte im Sehngewebe eine Interaktion von Smad3 und Skleraxis nachgewiesen werden (Berthet et al. 2013). Wie sich diese jedoch auswirkt, ist bisher unklar.

Die Aktivität von Smad2 und Smad3 wird durch Phosphorylierungen der carboxy-terminalen Region und der Linker-Region bestimmt. Die carboxy-terminale Region ist als die aktivierende Region bekannt und wird im Rahmen des kanonischen TGF- β -Signalweges durch die rezeptorgebundenen ALKs an den Serin-Resten 464, 465 und 467 des Smad2 und den Serin-Resten 423, 425 und 418 des Smad3 phosphoryliert. Die Linker-Region kann infolge des nicht-kanonischen TGF- β -Signalweges oder unabhängig davon durch mehrere Kinasen phosphoryliert werden, darunter MAPK, ERK, JNK, p38 und ROCK (Kamoto et al. 2013). Die wichtigsten Phosphorylierungsstellen der Linker-Region sind die Serin-Reste 245, 250, 255 und der Threonin-Rest 220 des Smad2, sowie die Serin-Reste 204, 208, 213 und der Threonin-Rest 179 des Smad3 (Kamoto et al. 2013). Die unterschiedlichen Funktionen

der Linker-Region sind bis heute nicht abschließend geklärt. Bisher wurde ihr hauptsächlich die hemmend-regulierende Funktion des TGF- β -Signalweges zugeschrieben, indem sie die Stabilität, Aktivität und den Kerntransport der Smads beeinflusst. Neuere Studien zeigen jedoch, dass die Linker-Phosphorylierung kontextabhängig auch eine verstärkende Wirkung haben oder Teil eines separaten Signalweges sein kann (Kamoto et al. 2020). So wurde in mit IL-1 β stimulierten humanen MSC gezeigt, dass IL-1 β Smad2 unabhängig von der carboxy-terminalen Region in der Linker-Region phosphoryliert und dies zu einer Änderung der Genexpression führt (Van den Akker et al. 2017). Am deutlichsten wird die Unabhängigkeit des Smad-Linker-Signalweges in einem Versuch mit Keratinozyten demonstriert. Thrombin aktivierte hier die Plasminogen-Aktivator-Inhibitor(PAI)-1-Expression durch eine Epidermal Growth Factor Receptor-Transaktivierung, wodurch anschließend ERK1/2-vermittelt die Linker-Region des Smad2 phosphoryliert wurde. Der carboxy-terminale Bereich hingegen blieb bei der Stimulation mit Thrombin unverändert, demnach wurde der TGF- β -Rezeptor nicht transaktiviert und seine Inhibition durch SB431542 hatte keinen Einfluss auf die Thrombin-induzierte PAI-1-Expression (Talati et al. 2018).

2.4.2 Rho/ROCK-Signalweg

Der Rho/ROCK-Signalweg spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulierung vieler zellulärer Funktionen. Eines der wichtigsten Targets von ROCK ist die Regulierung der Myosin-Leichtkettenphosphatase und einer Reihe anderer Phosphokinasen und Zytoskelett-bindender Proteine (Riento & Ridley 2003). Auf diese Weise steuert Rho/ROCK die Kontraktion des Zytoskeletts, die für viele grundlegende zelluläre Prozesse, einschließlich Apoptose, Migration, Proliferation und Differenzierung, von wesentlicher Bedeutung ist (Riento & Ridley 2003).

ROCK ist eine Serin/Threonin-Kinase mit zwei Subtypen, dem ROCK1 und ROCK2. Beide bestehen aus einer n-terminalen katalytischen Domäne, einer ventralen coiled-coil-Domäne und einer c-terminalen PH-Domäne mit Rho-Bindungsstelle (Amano et al. 2010). Die letztere Domäne ist für die negativ-hemmende Regulation verantwortlich. Hier kann die kleine GTPase Rho nach Aktivierung durch Integrin-Membranrezeptoren binden, wodurch deren hemmende Wirkung aufgehoben wird. ROCK1 und ROCK2 weisen strukturelle und biologische Unterschiede auf. Während ROCK1 entscheidend für die Formation von Stressfasern ist, scheint ROCK2

hauptsächlich für die Steuerung der Phagozytose und Zellkontraktion, die beide die Myosin-Leichtketten-Phosphorylierung benötigen, verantwortlich zu sein (Amano et al. 2010). Aufgrund der zentralen Bedeutung in der Zytoskelett-Organisation spielt Rho/ROCK eine wichtige Rolle bei der Erkennung mechanischer Stimuli und der Auslösung der MSC-Differenzierung. So kann Rho/ROCK beispielsweise durch Wahrnehmung der Steifigkeit der Matrix die osteogene Differenzierung von MSC vermitteln (Shih et al. 2011). Es reguliert auch die durch EZM oder mechanische Dehnung induzierte tenogene Differenzierung (Maharam et al. 2015, Xu B. et al. 2012) und kann ein negativer Regulator für die chondrogene und adipogene Differenzierung sein (Arnsdorf et al. 2009). Kommt es zu Veränderungen in der Aktivität von Rho/ROCK, führt dies zu einer Reorganisation des Zytoskeletts, was für die Wahrnehmung mechanischer Stimuli und die Steuerung der MSC-Differenzierung wesentlich ist.

Es gibt es mehrere niedermolekulare ROCK-Inhibitoren, die einen Verlust an Aktinfasern und eine Zerstörung des Zytoskeletts bewirken (Ishizaki et al. 2000). Allerdings wurde in mehreren Studien festgestellt, dass je nach Zelltyp, Hemmstärke der Inhibitoren und Co-Faktoren die Inhibition unterschiedlich auf die Zellen wirkt. So kann die vollständige Ausschaltung des ROCK-Proteins durch Gen-Knockout oder potente Rho/ROCK-Inhibitoren die zelluläre Seneszenz fördern und die Proliferation einschränken (Kümper et al. 2016), aber eine partielle Hemmung durch den kompetitiven ROCK-inhibitor Y-27632 sich positiv auf die Lebensfähigkeit und Proliferation von Zellen auswirken (Claassen et al. 2009). Auch bei Betrachtung der Differenzierung zeigte sich eine unterschiedliche Auswirkung der ROCK-Inhibition. Während eine Inhibition die durch extrazelluläre Matrix und mechanische Reize ausgelöste Differenzierung hemmt (Maharam et al. 2015, Xu B. et al. 2012, Kang et al. 2020, Li et al. 2020), fördert es die durch parakrine Faktoren induzierte Differenzierung (Kamishibahara et al. 2016, Li Z. et al. 2015). Darüber hinaus deuten Studien, in denen die chondrogene Differenzierung in Abhängigkeit des Zellkulturmodells gefördert oder gehemmt wurde, auf eine zusätzliche kontextabhängige Wirkung der ROCK-Inhibitoren hin (Woods & Beier 2006, Gegg & Yang 2020).

Diese Ergebnisse sprechen für eine unterschiedliche Rolle des Rho/ROCK-Signalweges im Rahmen von mechanisch oder parakrin ausgelöster Differenzierung.

Bisher gibt es keine Studien, die die Rolle von Rho/ROCK im Zusammenhang mit der TGF- β -induzierten tenogenen Differenzierung untersuchen. Jedoch gibt es Studien, die eine Interaktion von Rho/ROCK mit dem TGF- β Signalweg nachwiesen. Hierauf wird im folgenden Kapitel näher eingegangen.

2.4.3 Interaktion des TGF- β /Smad-Weges mit anderen Signalwegen

Die Interaktion des TGF- β -Signalweges mit anderen Signalwegen ist ein wichtiges Element der Regulation zellulärer Prozesse, einschließlich der tenogenen Differenzierung. Besonders hervorzuheben ist die Wechselwirkungen des TGF- β /Smad-Signalweges mit EZM-aktivierten Signalwegen, da die Wirkmechanismen von MSC hochgradig kontextabhängig agieren (Burk et al. 2022). Im Zusammenhang mit muskuloskelettalen Erkrankungen, bei den es in der Regel zu einer pathologischen Veränderung der EZM kommt, spielt eine Anpassung der MSC an das erkrankte Gewebe möglicherweise eine entscheidende Rolle für den Therapieerfolg.

Eine Form der Interaktion besteht in der Transaktivierung des TGF- β Rezeptors. Für verschiedene Agonisten G-Protein-gekoppelter Rezeptoren, wie das Endothelin-1, oder Integrin Agonisten, wie mechanische Reize und EZM-Proteine, wurde gezeigt, dass sie den kanonischen TGF- β -Signalweg durch Transaktivierung des Rezeptors aktivieren können (Maeda et al. 2011, Wang et al. 2020, Dayati et al. 2018). So führte eine Stimulierung von Tenozyten mit Scherkräften zu einer carboxy-terminalen Phosphorylierung und Kerntranslokation von Smad2, welche durch die Inhibition des TGF- β -Rezeptor 1 mittels SD208 aufgehoben wurde (Maeda et al. 2011). Ähnliche Ergebnisse zeigte eine Studie mit urea-extrahierter Sehnenmatrix, die durch die Bindung von Integrinen den TGF- β -Rezeptor aktivierte. Hier wurde die tenogene Wirkung der Sehnenmatrix ebenfalls durch die Hemmung des TGF- β -Rezeptors reduziert. Darüber hinaus wurde in dieser Studie nachgewiesen, dass die Interaktion zwischen Integrinen und TGF- β Rezeptoren wechselseitig ist (Wang et al. 2020).

Ein weiterer Mechanismus ist die Regulation der Phosphorylierung von Smad2/3, insbesondere in der Linker-Region. Es ist bekannt, dass verschiedene Kinasen, wie ERK1/2, MAPK und Rho/ROCK, die Linker-Region der Smads phosphorylieren können (Kamoto et al. 2013). Trotz dieser Erkenntnisse gibt es jedoch nur begrenzte Untersuchungen zur Regulation der Smad-Linker-Phosphorylierung in MSC. Eine Studie mit MSC zeigte, dass IL-1 β die Linker-Region von Smad2 modifizierte, ohne

die c-terminale Phosphorylierung zu beeinflussen. Diese Modifikation führte zu einer Verzögerung der TGF- β -induzierten Genexpression und wurde vermutlich durch die TGF- β -aktivierte Kinase 1 vermittelt (Van den Akker et al. 2017).

Aufgrund der ausgeprägten Mechanosensitivität der MSC und der darin zentralen Rolle des Rho/ROCK-Signalweges wurde auch dessen Einfluss auf den TGF- β -Signalweg untersucht. Im Rahmen einer TGF- β 1-induzierten chondrogenen Differenzierung von MSC aus synovialen Gewebe wurde gezeigt, dass die Inhibition von ROCK die c-terminale Phosphorylierung von Smad reduzierte (Xu T. et al. 2012). Einen gegenteiligen Effekt stellte eine Studie in glatten Gefäßmuskelzellen fest, in welchen die ROCK-Hemmung zu einer Steigerung der Smad3-Phosphorylierung führte (Rodríguez-Vita et al. 2008). In Brustkrebszellen wiederum wurde eine direkte Phosphorylierung der Smad3 Serin-Reste 203 und 207 durch Rho/ROCK nachgewiesen (Kamaraju & Roberts 2005). Allerdings wurden auch Studien durchgeführt, die keine direkte Beeinflussung der Smad-Phosphorylierung durch Rho/ROCK feststellten. Zum Beispiel wies eine Studie mit glatten Muskelzellen nach, dass Rho/ROCK keinen Einfluss auf die Smad-Phosphorylierung hatte (Chen et al. 2006). Insgesamt ist die Rolle von Rho/ROCK in Bezug auf den TGF- β -Signalweg bisher nur unzureichend geklärt. Weitere Forschung ist erforderlich, um die Mechanismen der Interaktion zwischen diesen beiden Signalwegen besser zu verstehen.

3 Zielsetzung und Hypothesen

Um die Behandlung und den Therapieerfolg von Sehnenerkrankungen zu verbessern, muss das Verständnis über die Interaktion verschiedener Wirkmechanismen und das Verhalten der MSC nach Transplantation in das erkrankte Sehngewebe erweitert werden. Der Rho/ROCK und TGF- β -Signalweg haben sich unabhängig voneinander als essenziell für die tenogene Differenzierung erwiesen. Jedoch lassen widersprüchliche Ergebnisse in der Literatur ebenfalls eine kontextabhängige Rolle des Rho/ROCK-Signalweges in der tenogenen Differenzierung vermuten. Ziel dieser Arbeit ist es daher, das Zusammenspiel zwischen dem Rho/ROCK-Signalweg und dem TGF- β -induzierten Smad2/3-Signalweg im Rahmen der frühen tenogenen Differenzierung zu untersuchen. Ein Schwerpunkt wird hier auf die Linker-Phosphorylierung des Smad2/3 als mögliche Interaktionsstelle zwischen den beiden Signalwegen gesetzt. Des Weiteren soll durch unterschiedliche Scaffolds der Einfluss der extrazellulären Matrix näher beleuchtet werden.

Hypothesen:

1. TGF- β 3 aktiviert den Smad2/3-Signalweg durch carboxy-terminale Phosphorylierung und induziert damit die tenogene Differenzierung.
2. Die Rho/ROCK-Aktivität beeinflusst den TGF- β 3-induzierten Smad2/3-Signalweg und damit die tenogene Differenzierung.
3. Mensch und Pferd weisen eine vergleichbare Signaltransduktion und Genexpression nach Stimulation mit TGF- β 3 und Rho/ROCK Inhibitor Y-27632 auf.
4. Rho/ROCK übt seinen Einfluss auf den Smad2/3-Signalweg durch Linker-Phosphorylierung des Smad2 und 3 aus.
5. Die extrazelluläre Matrix in Form eines Scaffolds aktiviert verstärkt den Rho/ROCK-Signalweg und nimmt dadurch Einfluss auf den Smad2/3-Signalweg.

4 Publikationen

4.1 Publikation 1

Rho/ROCK-Inhibition fördert TGF- β 3-induzierte tenogene Differenzierung in mesenchymalen Stromazellen

Michaela Melzer¹, Susanna Schubert², Joachim Geyer³, Simon Mueller³, Sabine Niebert¹, Janina Burk¹

¹Equine Clinic (Surgery, Orthopedics), Faculty of Veterinary Medicine, Justus Liebig University, 35392 Gießen, Germany

²Saxon Incubator for Clinical Translation, University of Leipzig, 04103 Leipzig, Germany



³Biomedical Research Center Seltersberg (BFS), Institute of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, Justus Liebig University Giessen, 35392, Giessen, Germany

Referenz:

Melzer, M., Schubert, S., Müller, S. F., Geyer, J., Hagen, A., Niebert, S., & Burk, J. (2021). Rho/ROCK Inhibition Promotes TGF- β 3-Induced Tenogenic Differentiation in Mesenchymal Stromal Cells. *Stem cells international*, 2021, 8284690. DOI:<https://doi.org/10.1155/2021/8284690>

Research Article

Rho/ROCK Inhibition Promotes TGF- β 3-Induced Tenogenic Differentiation in Mesenchymal Stromal Cells

Michaela Melzer ¹, Susanna Schubert,^{2,3} Simon Franz Müller,⁴ Joachim Geyer,⁴ Alina Hagen,¹ Sabine Niebert,¹ and Janina Burk ¹

¹Equine Clinic (Surgery, Orthopedics), Faculty of Veterinary Medicine, Justus-Liebig-University Giessen, 35392 Giessen, Germany

²Saxon Incubator for Clinical Translation, University of Leipzig, 04103 Leipzig, Germany

³Institute of Human Genetics, University of Leipzig Hospitals and Clinics, 04103 Leipzig, Germany

⁴Biomedical Research Center Seltersberg (BFS), Institute of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, Justus-Liebig-University Giessen, 35392 Giessen, Germany

Correspondence should be addressed to Janina Burk; janina.burk@vetmed.uni-giessen.de

Received 21 May 2021; Accepted 4 September 2021; Published 8 October 2021

Academic Editor: Nicholas R. Forsyth

Copyright © 2021 Michaela Melzer et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Mesenchymal stromal cells (MSC) represent a promising therapeutic tool for tendon regeneration. Their tenogenic differentiation is crucial for tissue engineering approaches and may support their beneficial effects after cell transplantation *in vivo*. The transforming growth factor (TGF)- β , signalling via intracellular Smad molecules, is a potent paracrine mediator of tenogenic induction. Moreover, scaffold topography or tendon matrix components induced tenogenesis via activation of the Rho/ROCK cascade, which, however, is also involved in pathological adaptations in extracellular matrix pathologies. The aim of this study was to investigate the interplay of Rho/ROCK and TGF- β 3/Smad signalling in tenogenic differentiation in both human and equine MSC. Primary equine and human MSC isolated from adipose tissue were cultured as monolayers or on tendon-derived decellularized scaffolds to evaluate the influence of the ROCK inhibitor Y-27632 on TGF- β 3-induced tenogenic differentiation. The MSC were incubated with and without TGF- β 3 (10 ng/ml), Y-27632 (10 μ M), or both. On day 1 and day 3, the signalling pathway of TGF- β and the actin cytoskeleton were visualized by Smad 2/3 and phalloidin staining, and gene expression of signalling molecules and tendon markers was assessed. ROCK inhibition was confirmed by disruption of the actin cytoskeleton. Activation of Smad 2/3 with nuclear translocation was evident upon TGF- β 3 stimulation. Interestingly, this effect was most pronounced with additional ROCK inhibition in both species ($p < 0.05$ in equine MSC). In line with that, the tendon marker scleraxis showed the strongest upregulation when TGF- β 3 and ROCK inhibition were combined ($p < 0.05$ in human MSC). The regulation pattern of tendon extracellular matrix components and the signalling molecules TGF- β 3 and Smad 8 showed differences between human and equine MSC. The obtained results showed that ROCK inhibition promotes the TGF- β 3/Smad 2/3 axis, with possible implications for future MSC priming regimes in tendon therapy.

1. Introduction

Tendon injuries are frequently occurring diseases in horses and humans [1–4]. Due to their hypocellular, hypovascular nature, tendons have only an insufficient spontaneous regeneration capability [5, 6]. As a result, conventional therapies are usually very protracted and associated with a high rate of reinjury. Therefore, tissue engineering and cell therapies are promising options. Several equine studies have already found evidence for positive effects of multi-

potent mesenchymal stromal cells (MSC) on tendon healing [7–9], but the full potential of this approach has yet to be understood and exploited. Successful tenogenic differentiation of MSC is crucial for tissue engineering approaches and may play an important role with respect to long-term effects of MSC-based cell therapies, along with initial immunomodulation and support of M2 macrophages [10, 11]. However, tenogenic differentiation appears to depend on several external factors, and their interplay is still widely unclear.

Reported tenogenic factors include the extracellular tendon matrix (ECM) as well as growth factors, particularly transforming growth factor (TGF)- β . TGF- β is one of the most extensively researched growth factors and is well established as a reliable inducer for tenogenic differentiation [12–14]. The canonical signalling pathway of TGF- β involves downstream Smad molecules. TGF- β binding to the TGF- β family receptor, a serine/threonine kinase cell surface receptor, results in direct carboxy-terminal phosphorylation of Smad 2 and 3. These build a complex with co-Smads, translocate into the nucleus, and induce gene transcription together with other coregulators [15, 16].

Regarding the ECM, it has been shown that both its structure and biochemical components play an important role in tenogenic differentiation [17–19]. Not only did scaffolds with aligned fibers promote tenogenic differentiation but also they inhibited osteogenic induction compared to randomly oriented fiber scaffolds [17]. Furthermore, tendon-derived urea-extracted ECM solution exerted tenogenic effects on MSC [18]. The Rho/ROCK pathway, which is activated by integrins and responsible for cytoskeleton maintenance, was proposed to mediate mechanically induced tenogenic differentiation, as its inhibition using the ROCK inhibitor Y-27632 prevented tenogenic differentiation triggered by mechanical stimulation [20] or scaffold topography [21].

Based on their independently reported positive effects on tenogenic differentiation, synergistic effects of Rho/ROCK and TGF- β 3-induced Smad 2/3 signalling might be expected, possibly depending on the microenvironment responsible for Rho/ROCK activation. Decellularized tendon matrix used as a scaffold favorably mimics the tendon microenvironment, as both the tendon ECM architecture and its biochemical composition are represented. However, in previous experiments with equine MSC, we observed an upregulation of the tendon marker scleraxis upon TGF- β 3 stimulation only in monolayer cultures, but not in decellularized tendon scaffold cultures [22], warranting clarification of the underlying mechanisms. Furthermore, the implication of Rho/ROCK in fibrotic maladaptations [23] makes it crucial to further elucidate its role in tendon regeneration.

The aim of this study was to investigate the interplay between the Rho/ROCK pathway and Smad 2/3 activation by TGF- β 3 in the context of early tenogenic differentiation, using human as well as equine MSC in monolayer and tendon scaffold cultures in the presence of TGF- β 3 and/or the ROCK inhibitor Y-27632.

2. Materials and Methods

2.1. MSC Isolation and Culture. Human subcutaneous adipose tissue was obtained from 3 healthy human donors (age: 32–48 years; female) after liposuction for cosmetic reasons. All human samples were collected with informed consent of the donors and approval by the ethics committee of the Medical Faculty, University of Leipzig (096/17-ek). Equine subcutaneous adipose tissue was harvested from the supragluteal region from 3 healthy Standardbred horses (age: 5–9 years; male) within the framework of an unrelated previous study as approved by the respective local authority

(Landesdirektion Leipzig, TV34/13). All donors were unrelated to each other.

Primary MSC were isolated by collagenase digestion (0.8 mg/ml collagenase type I) for 2–4 h at 37°C with permanent shaking. Isolated cells were then seeded and expanded in their respective standard culture medium and cryopreserved at passage 1 or 2. Human MSC were cultured in alpha Minimum Essential Medium (MEM Alpha Medium+Gluta-MAX™, Gibco®), supplemented with 2.5% human platelet lysate (PL BioScience GmbH, Aachen, Germany), 1% penicillin-streptomycin, 0.1% gentamycin, and 1 U/ml heparin (PL BioScience GmbH). Equine MSC were cultured in low-glucose (1 g/l) Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco®), supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco®), 1% penicillin-streptomycin, and 0.1% gentamycin. Collagenase, media, and supplements were purchased from Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Germany) unless stated otherwise.

All MSC were characterized by differentiation assays and flow cytometry as recommended by the International Society for Cell and Gene Therapy [24]. Briefly, differentiation was performed using the StemPro™ Differentiation Kits (Thermo Fisher Scientific GmbH) and evaluated qualitatively based on standard staining (Oil Red O, von Kossa, and Alcian blue for adipogenic, osteogenic, and chondrogenic differentiation, respectively). Chondrogenic differentiation was only evaluated in equine MSC due to limited human MSC cell numbers. Surface antigen staining and flow cytometry were performed as described previously for human [25] and equine [26] MSC. Additionally, the effect of the ROCK inhibitor Y-27632 on human and equine MSC was tested in preliminary experiments.

2.2. Scaffold Preparation. Equine tendon tissue was harvested from the superficial digital flexor tendon of limbs obtained at an abattoir. After storage at -80°C, tendons were decellularized with freeze-thaw cycles according to a previously published protocol [27] and stored in a sterile bag at -80°C until use. To adapt the scaffold size, tendons were first cut manually to a size of 10 mm × 10 mm, then placed in a cryostat CM 3050 S (Leica Microsystems AG, Wetzlar, Germany) with a working temperature of -20°C, and sliced to 300 μ m thick scaffolds.

2.3. Cell Culture Experiments. MSC from each individual donor at passage 2 or 3 were used to repeat all experiments ($n = 3$ biological replicates for each species). Monolayer cells were seeded with a density of 3,000 cells/cm² on standard cell culture plates. Tendon scaffolds were placed in 24-well plates with an ultralow attachment surface (Corning® Costar®, Corning GmbH, Kaiserslautern, Germany) and prewarmed for 10 min at 37°C. Next, 300,000 cells/30 μ l/cm² were distributed on each scaffold and allowed to attach for 6 h. Thereafter, 1 ml standard culture medium was added, and seeded scaffolds were incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. After 3 days of cultivation, medium was changed and monolayers as well as seeded scaffolds were stimulated with 10 ng/ml TGF- β 3 (R&D Systems®, Minneapolis, MN, USA), 10 μ M Y-27632 (Tocris, Bioscience, Bristol, UK), or both. For the last one, cells were preincubated with

Y-27632 for 2 h before adding TGF- β 3. On days 1 and 3 after stimulation, tenogenic differentiation and the Smad 2/3 signalling pathway were assessed based on gene expression and fluorescence microscopy.

2.4. Real Time RT-PCR. Gene expression of the signalling molecules Smad 3, Smad 8, and TGF- β 3, the tenogenic differentiation marker scleraxis, and the tendon extracellular matrix components collagen 1A2, collagen 3A1, and tenascin-C was analysed by real-time PCR. GAPDH was used as a reference gene. Total RNA of monolayer cells was isolated using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) with additional DNase digestion (Qiagen) according to instructions of manufacturers. Frozen MSC-seeded tendon scaffolds were homogenized with the Tissue Lyser II (Qiagen). After complete homogenization with proteinase k at 55°C (Qiagen), total RNA was isolated with the RNeasy Mini Kit. RNA was then converted to cDNA using the Reverse Transcriptase RevertAid H Minus (Thermo Fisher Scientific GmbH). 1 μ g cDNA was mixed with primers (Tables 1 and 2) and iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Germany), and real-time PCR was performed using a 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific) for the human samples and a qTower³G (Analytik Jena GmbH, Jena, Germany) for the equine samples. For relative quantification, gene expression ratios were calculated with the Pfaffl method, using additional monolayer day 0 samples as controls for normalization.

2.5. Immunofluorescence Staining. To visualize the effect of Y-27632 on the actin cytoskeleton as well as potential translocation of Smad 2/3 to the nucleus, the monolayer groups were stained with phalloidin and an anti-Smad 2/3 antibody. First, cells were fixed with 4% formaldehyde (Carl Roth® GmbH, Karlsruhe, Germany) for 10 min, and blocking solution (PBS+1% BSA (Carl Roth®)+0.3% Triton-X100 (Carl Roth®)+10% goat serum (Sigma-Aldrich GmbH, München, Germany)) was added for 1 h at room temperature. Next, the primary antibody (anti-Smad 2/3, 5678S, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) was diluted to 1:125 in PBS+1% BSA+0.3% Triton-X100 and incubated overnight at 4°C. A secondary anti rabbit antibody (Alexa Fluor 488 F(ab)' fragment of anti-rabbit antibody, 1:1000, Thermo Fisher Scientific GmbH) was then added for 1 h protected from light. Finally, cells were incubated with phalloidin (Dylight 554, 13054S, 1:200, Cell Signaling Technology) and DAPI (1:1000, Carl Roth®) for 20 min. Between each step, cells were washed with PBS three times for 5 min.

2.6. Microscopy and Image Analyses. Directly after staining, two images were obtained from each replicate at standardized settings using a Keyence HS All-In-One Fluorescence Microscope (Keyence, Osaka, Japan) for human cells and a Leica DMI6000 B (Leica Microsystems) for equine cells. For image quantification, FIJI ImageJ was used. Two images per replicate were used for quantification. First, an individual background subtraction was performed for each image. Then, cells were segmented into the cytoplasm and nucleus

based on DAPI and phalloidin staining to create region of interest (ROI) masks. The ROI masks were used to measure mean intensity values of Smad 2/3 staining in the whole cell, as well as in the nuclei and cytoplasm separately. Total Smad 2/3 staining in the whole cell was normalized to DAPI staining to investigate the amount of Smad 2/3 present in each cell, and the Smad 2/3 nucleus to cytoplasm ratio was calculated to quantify nuclear translocation of the molecule.

2.7. Statistics. Statistical analysis was performed using IBM SPSS Statistics 26 software (IBM Deutschland GmbH, Ehningen, Germany). Biological replicates were considered separate cases, while data from technical repetitions were averaged before further analysis. As data were not normally distributed, nonparametric Friedman tests with Bonferroni-adjusted post hoc tests were used. Differences were considered significant at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. MSC Characterization. MSC were capable of differentiation into adipocytes, osteoblasts, and chondrocytes. Human MSC were positive for CD29 (97.8–99.8%), CD73 (22.6–98.3%), CD90 (90.2–98.9%), and CD105 (46.7–97.7%) and widely negative for CD14 (0.3–1.1%), CD34 (2.1–5.4%), CD45 (0.6–4.7%), CD79 α (0.1–2.1%), and MHCII (0.0–0.2%). Representative images and histograms are shown in Supplementary file 1. Equine MSC were positive for CD29 (40.2–55.5%), CD44 (83.0–93.1%), CD90 (64.7–84.4%), and CD14 (62.3–86.7%) and largely negative for CD34 (0.6–3.0%), CD45 (0.4–1.3%), CD79 α (5.6–11.7%), MHCII (0.3–1.1%), CD73 (0.41–1.4%), and CD105 (0.1–1.0%). Representative images and histograms are shown in a previous publication [26]. When testing the ROCK inhibitor Y-27632, a concentration of 10 μ M was effective in disrupting the actin cytoskeleton and had no adverse effect on MSC viability, although a slight effect on proliferation was observed until day 3 ($p > 0.05$).

3.2. MSC Signalling. Inhibition of the Rho/ROCK signalling pathway with Y-27632 was confirmed by a loss of actin fiber organization, resulting in reduced fine drawing in phalloidin staining (Figures 1 and 2).

As expected, stimulation with TGF- β 3 led to nuclear translocation of the signalling molecule Smad 2/3. Furthermore, the highest nucleus to cytoplasm ratios were obtained with TGF- β 3 combined with ROCK inhibition by Y-27632, in human MSC on both days and in equine MSC on day 3 ($p < 0.05$ compared to control for equine MSC) (Figures 1 and 2).

Gene expression of Smad 3 was downregulated in the presence of TGF- β 3 or TGF- β 3 and Y-27632 in both human and equine MSC. This trend was observed in monolayers as well as scaffold cultures, but differences were only significant for the monolayer cultures ($p < 0.05$ for human MSC, TGF- β 3 vs. control group on day 3, and for equine MSC, TGF- β 3 and Y-27632 group vs. Y-27632 group on days 1 and 3) and weak in equine scaffold cultures (Figure 3). However, Smad 3 downregulation was not reflected on protein level within

TABLE 1: Human primers for real-time PCR.

Gene	Primer sequence	Accession	PCR product (bp)
GAPDH	For: CCACTCCTCCACCTTTGACG Rev: CCCTGTTGCTGTAGCCAAATTC	NM_001256799.1	101
Collagen 1A2	For: CAAGGACAAGAAACACGTCTGG Rev: GTTGGGTAGCCATTTCCCTTGG	NM_000089.3	101
Collagen 3A1	For: TGAATATCGAACACGCAAGGC Rev: AAAGCAAACAGGGCCAACG	NM_000090.3	109
Scleraxis	For: GCGACGGCGAGAACACC Rev: TCCTTGCTCAACTTTCTCTGGTT	NM_001080514.1	73
Tenascin-C	For: CTCTGGAAGACACCGTTGGC Rev: GAAGTGGTGTTCCTTGGAAGCTG	NM_002160.3	101
Smad 3	For: GGTCTGCGTGAATCCCTACC Rev: TTATGTGCTGGGGACATCGG	NM_005902.3	294
Smad 8	For: CCTGTAGATGCCACAGCTGATA Rev: GGGAGGAAGCCTGGAATGTC	NM_001127217.2	151
TGF- β 3	For: AGCGCTATATCGGTGGCAAG Rev: TCATCCTCATTGTCCACGCC	NM_003239.4	226

TABLE 2: Equine primers for real-time PCR.

Gene	Primer sequence	Accession	PCR product (bp)
GAPDH	For: TGGAGAAAGCTGCCAAATACG Rev: GGCCTTTCTCCTTCTCTTGC	NM_001163856.1	309
Collagen 1A2	For: CAACCGGAGATAGAGGACCA Rev: CAGGTCCTTGGAACCTTGA	XM_001492939.1	243
Collagen 3A1	For: AGGGGACCTGGTTACTGCTT Rev: TCTCTGGGTTGGGACAGTCT	XM_001917620.2	216
Scleraxis	For: TACCTGGGTTTTCTTCTGGTCACT Rev: TATCAAAGACACAAGATGCCAGC	NM_001105150.1	51
Tenascin-C	For: TGAATATGGAATTGGAGTGTCTGC Rev: GGAGTTCTCCACACCAGAGTC	XM_023628743.1	147
Smad 3	For: GCTGTGTGAGTTCGCCTTCA Rev: CGGGGATGGAATGGCTGTAG	XM_023654980.1	164
Smad 8	For: AGCCTCCGTGCTCTGCATT Rev: CCCAACTCGGTTGTTAGTTCAT	AB106117.1	200
TGF- β 3	For: TGCCCCAAAGGAATCACCTC Rev: GCGTTGTTTGGCGATATGCT	XM_001492687.6	89

the investigated time period, as total Smad 2/3 staining remained widely constant (Figures 1 and 2). Interestingly, while humans and horses showed a similar regulation of Smad 3, there were species differences in the regulation of Smad 8 and TGF- β 3. In human MSC, Smad 8 expression was increased in the presence of TGF- β 3, which was again more pronounced in monolayers ($p < 0.05$ for TGF- β 3 vs. Y-27632 group on day 3), while equine MSC showed a contrary trend (Figure 3). TGF- β 3 expression increased in the TGF- β 3 group and in the TGF- β 3 and Y-27632 group, but only in equine monolayer MSC ($p < 0.05$ for TGF- β 3 and Y-27632 group vs. Y-27632 group on day 1). In equine scaffold cultures or human monolayer and scaffold cultures, this effect could not be confirmed or even tended to be reversed (Figure 3).

3.3. *MSC Tenogenesis*. The tendon marker scleraxis was upregulated in the presence of TGF- β 3. This was reinforced with additional ROCK inhibition by Y-27632, which was particularly pronounced in human MSC ($p < 0.05$ compared to control in monolayer and scaffold cultures on day 1). The expression pattern of the extracellular matrix components differed between human and equine MSC. In human MSC, there were hardly any differences and high variability in the expression of tenascin-C and the collagens 1A2 and 3A1. Equine MSC showed an increased expression of tenascin-C in the TGF- β 3 as well as in the TGF- β 3 and Y-27632 groups, yet this was not repeatable in all donors and therefore not significant. Furthermore, the equine cells downregulated collagen 1A2 when TGF- β 3 and Y-27632 were combined ($p < 0.05$ for TGF- β 3 vs. TGF- β 3 and Y-

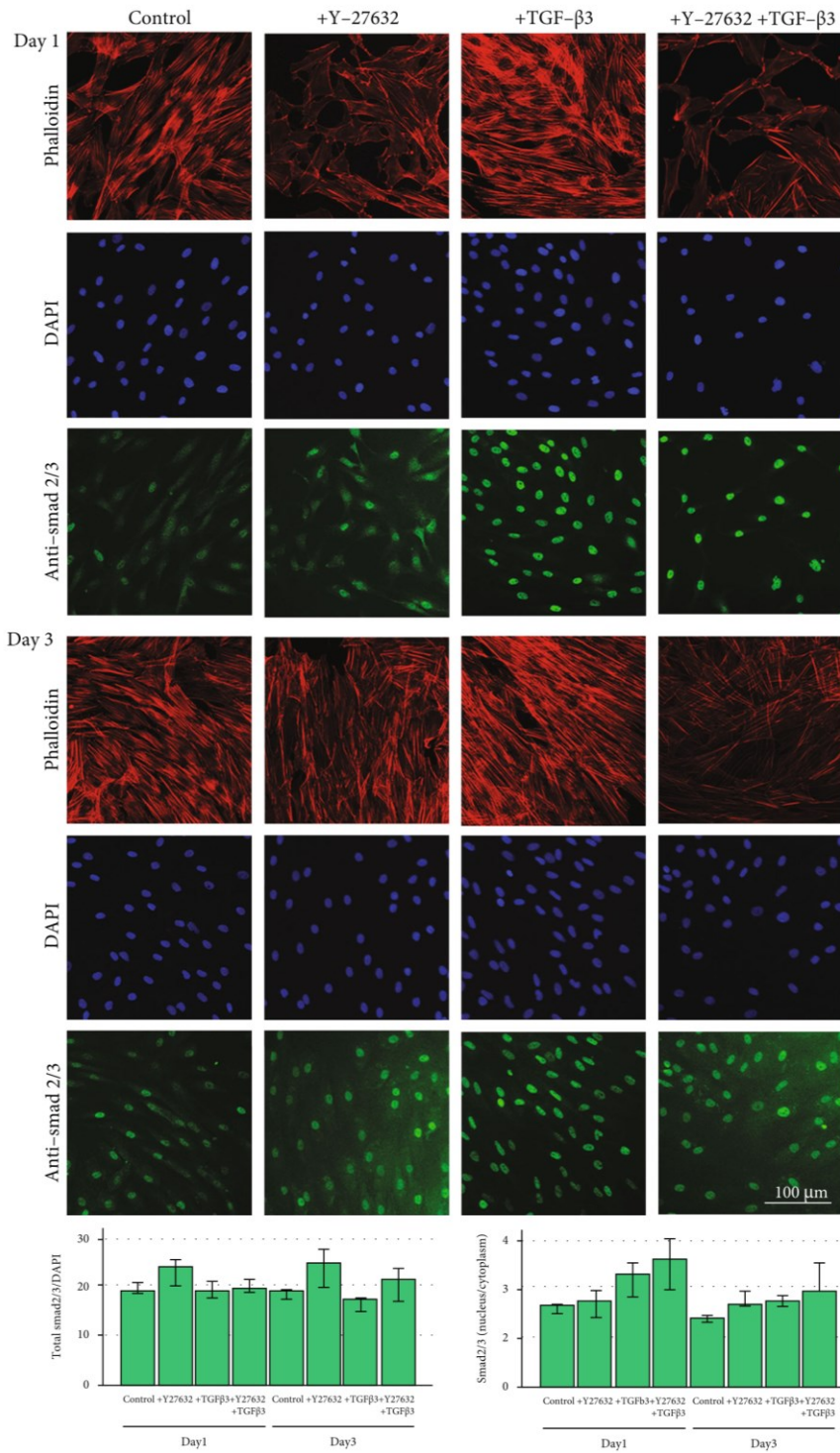


FIGURE 1: Fluorescence microscopy in human monolayer MSC. Cells were incubated with 10 ng/ml TGF-β3 and/or 10 μM ROCK inhibitor Y-27632 and analysed at days 1 and 3. Representative images show phalloidin staining of the actin cytoskeleton, which is disrupted upon ROCK inhibition, nuclear staining with DAPI, and Smad 2/3 immunostaining with nuclear translocation upon TGF-β3 and TGF-β3 plus Y-27632 stimulation. Differences between groups are more clearly visible on day 1. The graphs represent the data from quantitative image analyses in cells from 3 donors, indicating a relatively constant amount of total Smad 2/3 (left) and nuclear translocation upon incubation with TGF-β3 and Y-27632 (right). Bars represent the median values and error bars the 95% confidence intervals.

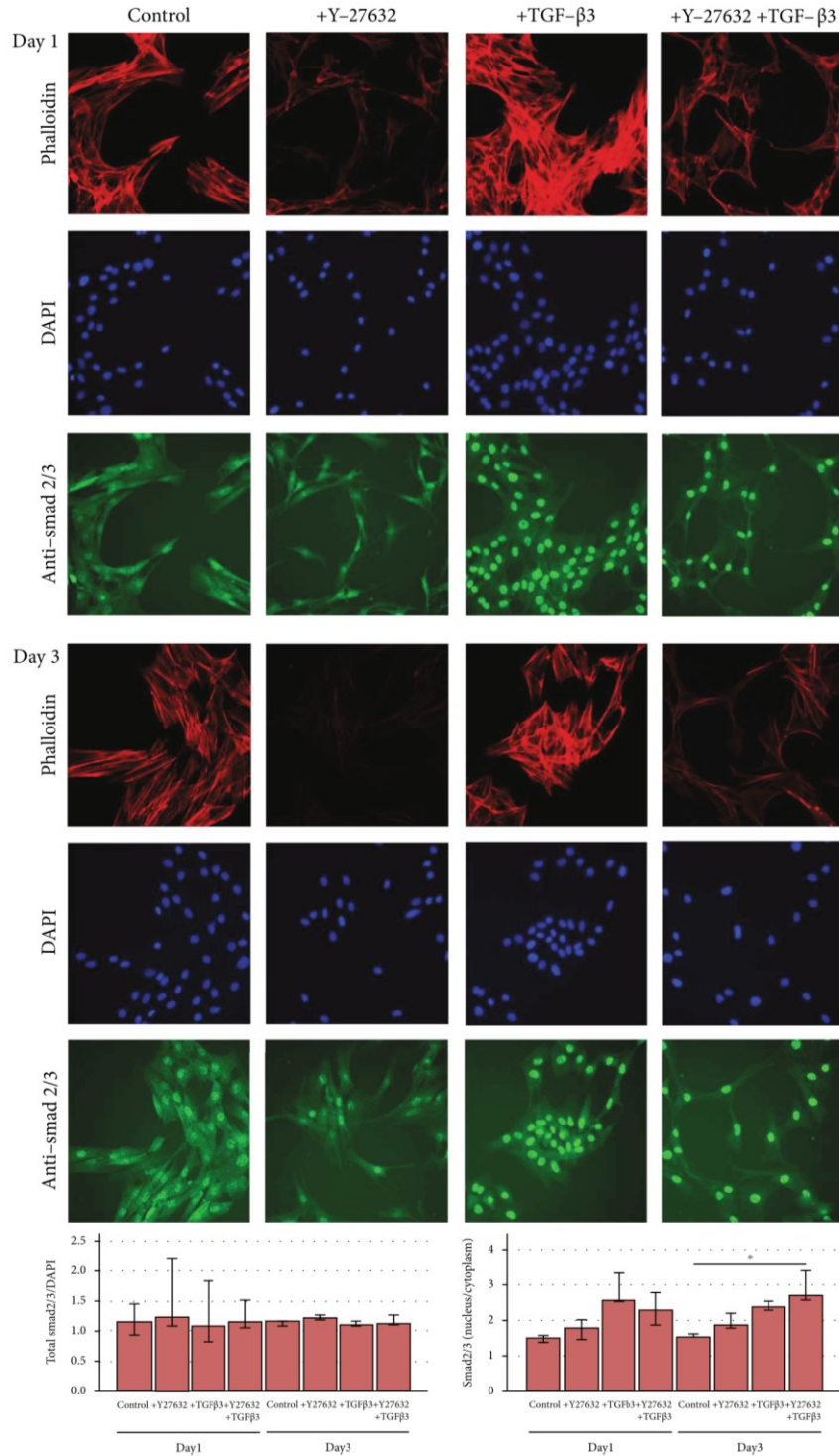


FIGURE 2: Fluorescence microscopy in equine monolayer MSC. Cells were incubated with 10 ng/ml TGF-β3 and/or 10 μM ROCK inhibitor Y-27632 and analysed at days 1 and 3. Representative images show phalloidin staining of the actin cytoskeleton, which is disrupted upon ROCK inhibition, nuclear staining with DAPI, and Smad 2/3 immunostaining with nuclear translocation upon TGF-β3 and TGF-β3 plus Y-27632 stimulation. Differences between groups are clearly visible on days 1 and 3. The graphs represent the data from quantitative image analyses in cells from 3 donors, indicating a constant amount of total Smad 2/3 (left) and nuclear translocation upon incubation with TGF-β3 and Y-27632 (right). Bars represent the median values, error bars represent the 95% confidence intervals, and the asterisk marks a difference between the indicated groups with $p < 0.05$.

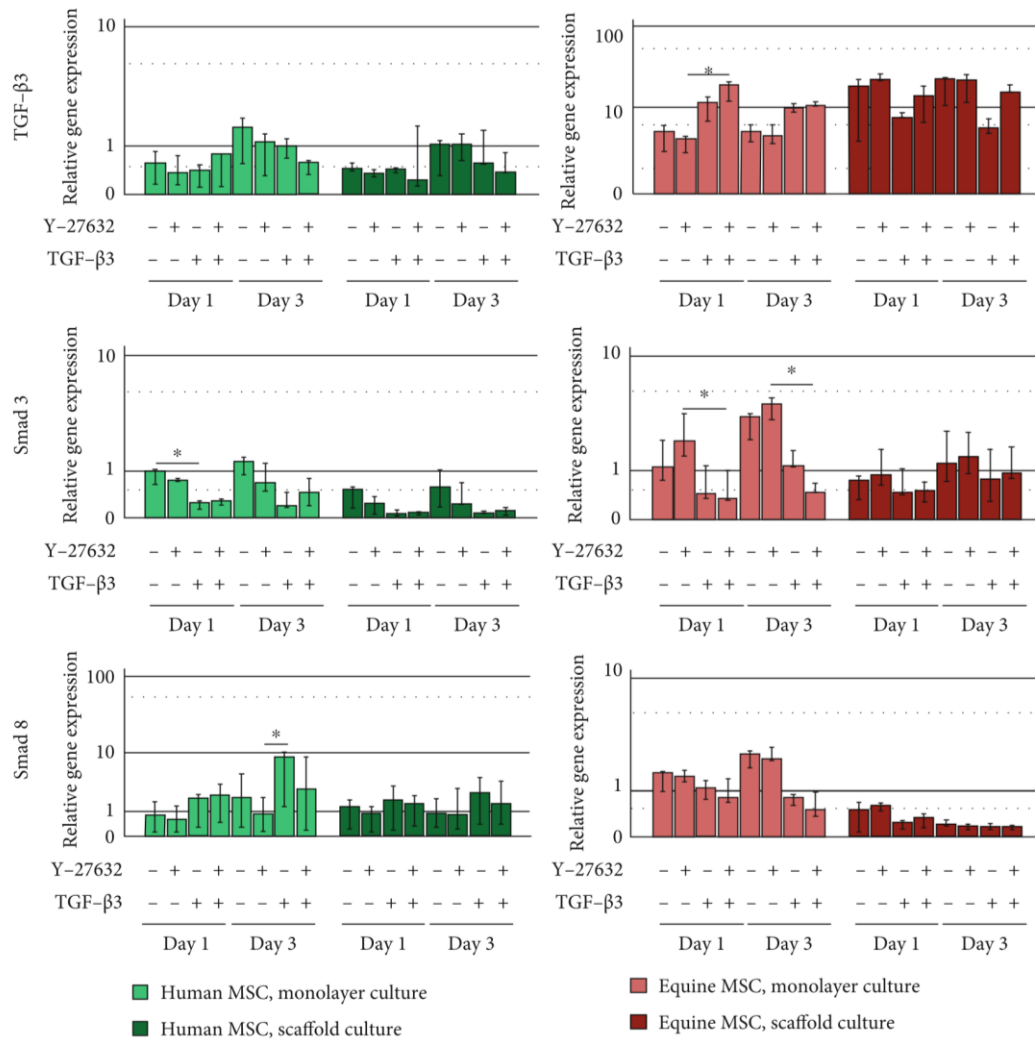


FIGURE 3: Gene expression of signalling molecules in human and equine MSC. Cells were cultured as monolayers or on decellularized tendon scaffolds and incubated with 10 ng/ml TGF-β3 and/or 10 μM ROCK inhibitor Y-27632 and analysed at days 1 and 3. Bars represent the median values, error bars represent the 95% confidence intervals, and asterisks mark differences between the indicated groups with $p < 0.05$.

27632 group on day 1 in monolayers) but tended to upregulate collagen 3A1 (Figure 4).

4. Discussion

In this study, we investigated the crosstalk between the Rho/ROCK and TGF-β/Smad signalling pathways in the context of early tenogenic differentiation in MSC. Although synergistic effects of ROCK activity and TGF-β3 stimulation on tenogenesis might have been expected, we made the interesting observation that contrary to this assumption, inhibition of ROCK promoted TGF-β3-induced Smad 2/3 activity as well as tenogenic induction. This finding may have important implications for tissue engineering strategies and the local MSC transplantation in tendons.

The mechanisms of action of MSC are highly context-sensitive [28, 29], which include their adaptation to the local

extracellular environment. This adaptation can enhance the cellular potency, as observed after targeted priming of MSC [30], but it could also compromise therapeutic mechanisms and success. In the context of musculoskeletal and connective tissue disease, possible MSC adaptations to the ECM could play a central role, particularly if the ECM is already pathologically altered being typical of tendon disease. In this context, Rho/ROCK signalling is of particular interest, as it is related to focal adhesion/integrin activation by the local ECM environment and thereby mediates mechanical stimuli from the extracellular space [31]. In this line, the Rho kinases have been identified as key players in fostering fibrotic disease [23]. Against this background, ECM and Rho/ROCK signalling may also play a role in the possible pathological adaptations of MSC to their environment.

With regard to tendon regeneration, however, Rho/ROCK signalling has so far been considered supportive, as it

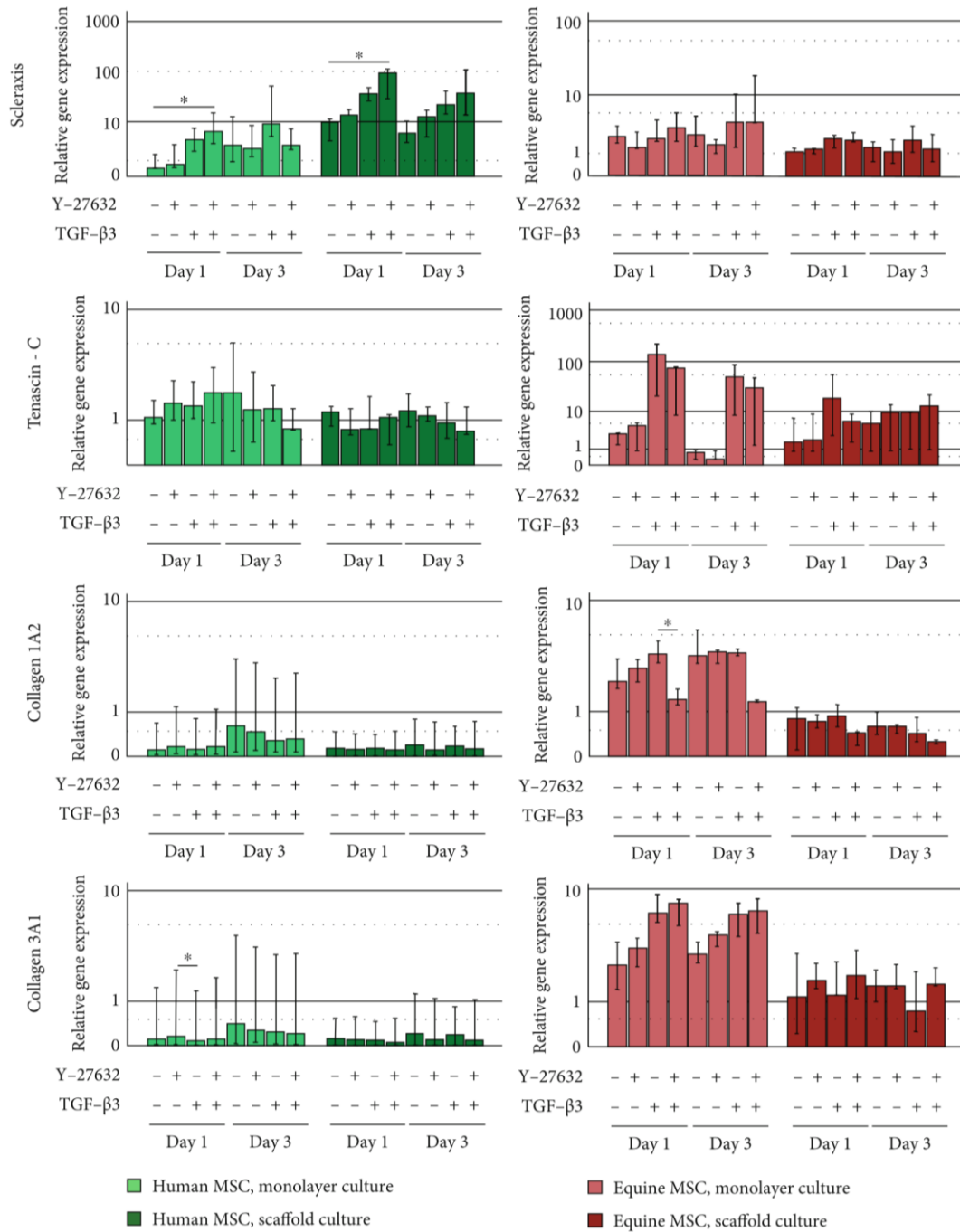


FIGURE 4: Gene expression of the tendon marker and extracellular matrix molecules in human and equine MSC. Cells were cultured as monolayers or on decellularized tendon scaffolds and incubated with 10 ng/ml TGF- β 3 and/or 10 μ M ROCK inhibitor Y-27632 and analysed at days 1 and 3. Bars represent the median values, error bars represent the 95% confidence intervals, and asterisk mark differences between the indicated groups with $p < 0.05$.

was described to be essential for tenogenic differentiation induced by scaffold topography [21] and mechanical stretching [20]. In these studies, ROCK inhibition resulted in decreased expression of tendon markers and less pronounced tenocyte-like morphology of MSC [20, 21]. Indicating a connection between mechanobiology, Rho/ROCK, and

the well-described tenogenic effect of TGF- β , more recently, ECM extract-induced tenogenic differentiation was shown to be mediated via integrin as well as TGF- β /Smad pathways [32]. Furthermore, synergistic effects of ROCK activation by surface topography and TGF- β 2 on Smad phosphorylation and tenogenic differentiation were reported [33], which is

consistent with similar synergistic effects observed in contexts such as chondrogenic [34] or lung fibroblast differentiation [35]. Yet, none of these studies investigated the combined effect of actual ECM and TGF- β , and when combining decellularized tendon ECM scaffolds with TGF- β 3 to promote tenogenic differentiation in equine MSC, there was no convincing evidence for a stringent synergistic tenogenic effect of the tendon ECM and TGF- β 3 [22].

Therefore, we aimed to further investigate the role of ROCK in the context of TGF- β 3-induced tenogenic differentiation, including experiments in tendon scaffold culture. The scaffold chosen for this study has been established, characterized, and used in several previous studies [19, 22, 26, 28, 36, 37]. As it consists of native decellularized tendon tissue, it combines the two most important influencing factors of the ECM, topography and matrix components, and represents the closest possible approximation to the environment of native tendon tissue. Furthermore, we included two clinically relevant species, humans and horses, to detect potential species-related differences. The central finding of the current study is that we observed similar and supportive effects of ROCK inhibition on TGF- β 3-induced Smad 2/3 activation and upregulation of the tendon marker scleraxis in both species. Furthermore, at least in human MSC, the fold change in scleraxis expression upon TGF- β 3 and Y-27632 stimulation compared to the unstimulated control was much higher in the scaffold than in the monolayer culture. This might be due to stronger basal ROCK activation in the scaffold environment, entailing a stronger effect of its inhibition, yet this was not quantified in the current study. In this context, it should also be noted that ROCK inhibition alone did not reverse the higher scleraxis expression in scaffold-cultured human MSC. Thus, contrary to previous studies with artificial scaffolds [21, 33], the tenogenic stimulus provided by the native tendon scaffold appeared to be independent of Rho/ROCK signalling. Overall, our results imply that Rho/ROCK activity does not promote but rather counteract TGF- β 3-induced tenogenic differentiation.

While this appears surprising against the background of previous studies on tenogenic signalling, our findings are in agreement with others who observed reinforcement of the TGF- β pathway with increased Smad 3 phosphorylation when using Y-27632 for ROCK inhibition [38]. There are different plausible explanations for these results. First, cellular tension, which is regulated by Rho/ROCK, regulates the localization and multimerization of the TGF- β receptor components. Specifically, ROCK inhibition was demonstrated to drive the receptor multimerization required for TGF- β downstream effects [39], which could be responsible for the reinforced TGF- β 3 effects observed with ROCK inhibition in the current study. Secondly, ROCK is known to directly interact with the Smad 2/3 molecules and capable of phosphorylating the inhibitory linker region of these Smads, thereby inhibiting Smad activity [16, 40]. Thus, again the Smads 2 and 3 appear as possible key molecules in the crosstalk between ECM and TGF- β downstream signalling, with their activation or inhibition occurring through phosphorylation at different molecular sites. Finally, with regard to the tenogenic effects of the tendon ECM which appeared to be independent of Rho/R-

OCK, direct interactions between integrins and TGF- β receptors [41] as well as with the ECM, TGF- β , and its binding proteins [42] need to be considered.

We also observed some inconsistencies between human and equine MSC. In human monolayer MSC, qualitative evaluation of the cytoskeleton suggested that ROCK inhibition had already decreased until day 3, with possible implications for the quantitative day 3 results in these cells. Equine MSC showed overall less scleraxis upregulation, and in contrast to human MSC, the tendon scaffold did not increase but reduce the expression of all investigated tendon markers. Furthermore, the compensation and feedback mechanisms of human and equine MSC appeared to be different. While both species downregulated Smad 3 in the presence of TGF- β 3, human MSC upregulated Smad 8 in turn, suggesting activation of this alternative pathway, and equine MSC upregulated TGF- β 3, suggesting activation of a positive feedback loop. In addition, there were species differences in ECM gene expression. Most remarkably in the context of the current study, equine MSC but not human MSC downregulated collagen 1A2 when TGF- β 3 stimulation was combined with ROCK inhibition.

While providing the first evidence for an inhibitory role of ROCK in tenogenic Smad 2/3 activation, the current study is limited by the number of donors included and the lack of further quantitative analysis on protein level; thus, it cannot clarify all questions it raised. Further studies are necessary to confirm our findings, to unveil more details of the intracellular signalling crosstalk, and to understand the observed species differences. Last not least, experiments with a longer follow-up are required to investigate if tenogenic differentiation would mature with or without continuous ROCK inhibition.

5. Conclusions

The current results support the hypothesis that Rho/ROCK inhibition promotes the TGF- β 3/Smad 2/3 pathway in the context of tendon regeneration, while tenogenic effects of native tendon ECM are preserved. These findings provide new insight into a possible regulatory mechanism affecting tenogenic differentiation and make the Rho/ROCK pathway an interesting therapeutic target. Given that future studies will deliver promising long-term results and unveil more details on this mechanism, this could be useful to improve the therapeutic use of MSC, as ROCK-targeting priming regimes might promote overall tenogenic differentiation *in vivo* and prevent MSC maladaptations to pathologically altered ECM.

Data Availability

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

Conflicts of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

The authors acknowledge Dr. Aline Hillmann, Dr. Carolin Horstmeier, and Dr. Christiane Schnabel (all University of Leipzig, Germany) for their help with equine MSC isolation and characterization. This work was funded by the German Research Foundation (BU3110/1-2) and the German Academic Scholarship Foundation.

Supplementary Materials

Supplementary file 1: human MSC characterization. Upper panel: representative images of Oil Red O staining (left) and von Kossa staining (right), showing adipogenic or osteogenic differentiation, respectively. Lower panel: representative histograms for surface antigen expression analysed by flow cytometry; antibody staining and analyses were performed as detailed in Schubert et al. (doi:10.1002/cyto.a.23240). The histograms display the relative number of events versus mean fluorescence intensity; blue represents Fixable E-Fluor® 780-stained MSC and red the MSC stained with the respective monoclonal antibody. For intracellular CD79 α staining, an additional isotype control staining (yellow) was used to determine the percentage of positive cells. (*Supplementary Materials*)

References

- [1] R. A. E. Clayton and C. M. Court-Brown, "The epidemiology of musculoskeletal tendinous and ligamentous injuries," *Injury*, vol. 39, no. 12, pp. 1338–1344, 2008.
- [2] N. J. Lemme, N. Y. Li, S. F. DeFroda, J. Kleiner, and B. D. Owens, "Epidemiology of Achilles tendon ruptures in the United States: athletic and nonathletic injuries from 2012 to 2016," *Orthopaedic journal of sports medicine*, vol. 6, no. 11, p. 2325967118808238, 2018.
- [3] Y. Kasashima, T. Takahashi, R. K. W. Smith et al., "Prevalence of superficial digital flexor tendonitis and suspensory desmitis in Japanese thoroughbred flat racehorses in 1999," *Equine Veterinary Journal*, vol. 36, no. 4, pp. 346–350, 2004.
- [4] M. Trump, *A retrospective study of the prevalence of injuries to the suspensory ligament, digital flexor tendons and associated structures in a nonracehorse referral-hospital population*, University of Zurich, Hoboken, NJ, 2014.
- [5] R. L. Stanley, R. A. Fleck, D. L. Becker, A. E. Goodship, J. R. Ralphs, and J. C. Patterson-Kane, "Gap junction protein expression and cellularity: comparison of immature and adult equine digital tendons," *Journal of Anatomy*, vol. 211, no. 3, pp. 325–334, 2007.
- [6] N. L. Leong, J. L. Kator, T. L. Clemens, A. James, M. Enamoto-Iwamoto, and J. Jiang, "Tendon and ligament healing and current approaches to tendon and ligament regeneration," *Journal of orthopaedic research official publication of the Orthopaedic Research Society*, vol. 38, no. 1, pp. 7–12, 2020.
- [7] S. Pacini, S. Spinabella, L. Trombi et al., "Suspension of bone marrow-derived undifferentiated mesenchymal stromal cells for repair of superficial digital flexor tendon in race horses," *Tissue Engineering*, vol. 13, no. 12, pp. 2949–2955, 2007.
- [8] E. E. Godwin, N. J. Young, J. Dudhia, I. C. Beamish, and R. K. W. Smith, "Implantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells demonstrates improved outcome in horses with overstrain injury of the superficial digital flexor tendon," *Equine Veterinary Journal*, vol. 44, no. 1, pp. 25–32, 2012.
- [9] R. K. W. Smith, N. J. Werling, S. G. Dakin, R. Alam, A. E. Goodship, and J. Dudhia, "Beneficial effects of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells in naturally occurring tendinopathy," *PloS one*, vol. 8, no. 9, p. e75697, 2013.
- [10] C. N. Manning, C. Martel, S. E. Sakiyama-Elbert et al., "Adipose-derived mesenchymal stromal cells modulate tendon fibroblast responses to macrophage-induced inflammation in vitro," *Stem Cell Research & Therapy*, vol. 6, no. 1, p. 74, 2015.
- [11] H. Shen, I. Korpakakis, N. Havlioglu et al., "The effect of mesenchymal stromal cell sheets on the inflammatory stage of flexor tendon healing," *Stem Cell Research & Therapy*, vol. 7, no. 1, p. 144, 2016.
- [12] T. Barsby and D. Guest, "Transforming growth factor beta3 promotes tendon differentiation of equine embryo-derived stem cells," *Tissue Engineering. Part A*, vol. 19, no. 19-20, pp. 2156–2165, 2013.
- [13] T. Maeda, T. Sakabe, A. Sunaga et al., "Conversion of mechanical force into TGF- β -mediated biochemical signals," *Current biology CB*, vol. 21, no. 11, pp. 933–941, 2011.
- [14] Y.-J. Zhang, X. Chen, G. Li et al., "Concise review: stem cell fate guided by bioactive molecules for tendon regeneration," *Stem Cells Translational Medicine*, vol. 7, no. 5, pp. 404–414, 2018.
- [15] A. Nakao, T. Imamura, S. Souchelnytskyi et al., "TGF-beta receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4," *The EMBO Journal*, vol. 16, no. 17, pp. 5353–5362, 1997.
- [16] M. L. Burch, W. Zheng, and P. J. Little, "Smad linker region phosphorylation in the regulation of extracellular matrix synthesis," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 68, no. 1, pp. 97–107, 2011.
- [17] V. Kishore, W. Bullock, X. Sun, W. S. van Dyke, and O. Akkus, "Tenogenic differentiation of human MSCs induced by the topography of electrochemically aligned collagen threads," *Biomaterials*, vol. 33, no. 7, pp. 2137–2144, 2012.
- [18] G. Yang, B. B. Rothrauff, H. Lin, R. Gottardi, P. G. Alexander, and R. S. Tuan, "Enhancement of tenogenic differentiation of human adipose stem cells by tendon-derived extracellular matrix," *Biomaterials*, vol. 34, no. 37, pp. 9295–9306, 2013.
- [19] J. Burk, A. Plenge, W. Brehm et al., "Induction of tenogenic differentiation mediated by extracellular tendon matrix and short-term cyclic stretching," *Stem cells international*, vol. 7342379, 2016.
- [20] B. Xu, G. Song, Y. Ju, X. Li, Y. Song, and S. Watanabe, "RhoA/ROCK, cytoskeletal dynamics, and focal adhesion kinase are required for mechanical stretch-induced tenogenic differentiation of human mesenchymal stem cells," *Journal of Cellular Physiology*, vol. 227, no. 6, pp. 2722–2729, 2012.
- [21] E. Maharam, M. Yaport, N. L. Villanueva et al., "Rho/Rock signal transduction pathway is required for MSC tenogenic differentiation," *Bone research*, vol. 3, no. 1, p. 15015, 2015.
- [22] S. P. Roth, S. Schubert, P. Scheibe, C. Groß, W. Brehm, and J. Burk, "Growth factor-mediated tenogenic induction of multipotent mesenchymal stromal cells is altered by the microenvironment of tendon matrix," *Cell Transplantation*, vol. 27, no. 10, pp. 1434–1450, 2018.
- [23] R. S. Knipe, A. M. Tager, and J. K. Liao, "The rho kinases: critical mediators of multiple profibrotic processes and rational

- targets for new therapies for pulmonary fibrosis," *Pharmacological Reviews*, vol. 67, no. 1, pp. 103–117, 2015.
- [24] M. Dominici, K. le Blanc, I. Mueller et al., "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement," *Cytotherapy*, vol. 8, no. 4, pp. 315–317, 2006.
- [25] S. Schubert, W. Brehm, A. Hillmann, and J. Burk, "Serum-free human MSC medium supports consistency in human but not in equine adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cell culture," *Cytometry Part A*, vol. 93, no. 1, pp. 60–72, 2018.
- [26] A. Hagen, H. Lehmann, S. Aurich et al., "Scalable production of equine platelet lysate for multipotent mesenchymal stromal cell culture," *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 8, p. 613621, 2020.
- [27] J. Burk, I. Erbe, D. Berner et al., "Freeze-thaw cycles enhance decellularization of large tendons," *Tissue engineering Part C, Methods*, vol. 20, no. 4, pp. 276–284, 2014.
- [28] L. Brandt, S. Schubert, P. Scheibe et al., "Tenogenic properties of mesenchymal progenitor cells are compromised in an inflammatory environment," *International journal of molecular sciences*, vol. 19, no. 9, p. 2549, 2018.
- [29] A. Hillmann, F. Paebst, W. Brehm et al., "A novel direct co-culture assay analyzed by multicolor flow cytometry reveals context- and cell type-specific immunomodulatory effects of equine mesenchymal stromal cells," *PloS one*, vol. 14, no. 6, p. e0218949, 2019.
- [30] N. D. C. Noronha, A. Mizukami, C. Calíari-Oliveira et al., "Correction to: priming approaches to improve the efficacy of mesenchymal stromal cell-based therapies," *Stem Cell Research & Therapy*, vol. 10, no. 1, p. 132, 2019.
- [31] S. Huvneers and E. H. J. Danen, "Adhesion signaling - cross-talk between integrins, Src, and rho," *Journal of Cell Science*, vol. 122, no. 8, pp. 1059–1069, 2009.
- [32] D. Wang, C. C. M. Pun, S. Huang et al., "Tendon-derived extracellular matrix induces mesenchymal stem cell tenogenesis via an integrin/transforming growth factor- β crosstalk-mediated mechanism," *FASEB Journal*, vol. 34, no. 6, pp. 8172–8186, 2020.
- [33] S. Vermeulen, N. Roumans, F. Honig et al., "Mechanotransduction is a context-dependent activator of TGF- β signaling in mesenchymal stem cells," *Biomaterials*, vol. 259, p. 120331, 2020.
- [34] T. Xu, M. Wu, J. Feng, X. Lin, and Z. Gu, "RhoA/rho kinase signaling regulates transforming growth factor- β 1-induced chondrogenesis and actin organization of synovium-derived mesenchymal stem cells through interaction with the Smad pathway," *International Journal of Molecular Medicine*, vol. 30, no. 5, pp. 1119–1125, 2012.
- [35] H. Ji, H. TANG, H. LIN et al., "Rho/Rock cross-talks with transforming growth factor- β /Smad pathway participates in lung fibroblast-myofibroblast differentiation," *Biomedical Reports*, vol. 2, no. 6, pp. 787–792, 2014.
- [36] S. P. Roth, S. M. Glauche, A. Plenge, I. Erbe, S. Heller, and J. Burk, "Automated freeze-thaw cycles for decellularization of tendon tissue - a pilot study," *BMC biotechnology*, vol. 17, no. 1, p. 13, 2017.
- [37] S. P. Roth, W. Brehm, C. Groß, P. Scheibe, S. Schubert, and J. Burk, "Transforming growth factor beta 3-loaded decellularized equine tendon matrix for orthopedic tissue engineering," *International journal of molecular sciences*, vol. 20, no. 21, p. 5474, 2019.
- [38] J. Rodríguez-Vita, E. Sánchez-Galán, B. Santamaría et al., "Essential role of TGF-beta/Smad pathway on statin dependent vascular smooth muscle cell regulation," *PloS one*, vol. 3, no. 12, p. e3959, 2008.
- [39] J. P. Rys, C. C. DuFort, D. A. Monteiro et al., "Discrete spatial organization of TGF β receptors couples receptor multimerization and signaling to cellular tension," *eLife*, vol. 4, article e09300, 2015.
- [40] A. K. Kamaraju and A. B. Roberts, "Role of rho/ROCK and p38 MAP kinase pathways in transforming growth factor-beta-mediated Smad-dependent growth inhibition of human breast carcinoma cells in vivo," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 2, pp. 1024–1036, 2005.
- [41] J. S. Munger and D. Sheppard, "Cross talk among TGF- β signaling pathways, integrins, and the extracellular matrix," *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, vol. 3, no. 11, p. a005017, 2011.
- [42] B. Hinz, "The extracellular matrix and transforming growth factor- β 1: tale of a strained relationship," *Matrix biology journal of the International Society for Matrix Biology*, vol. 47, pp. 54–65, 2015.

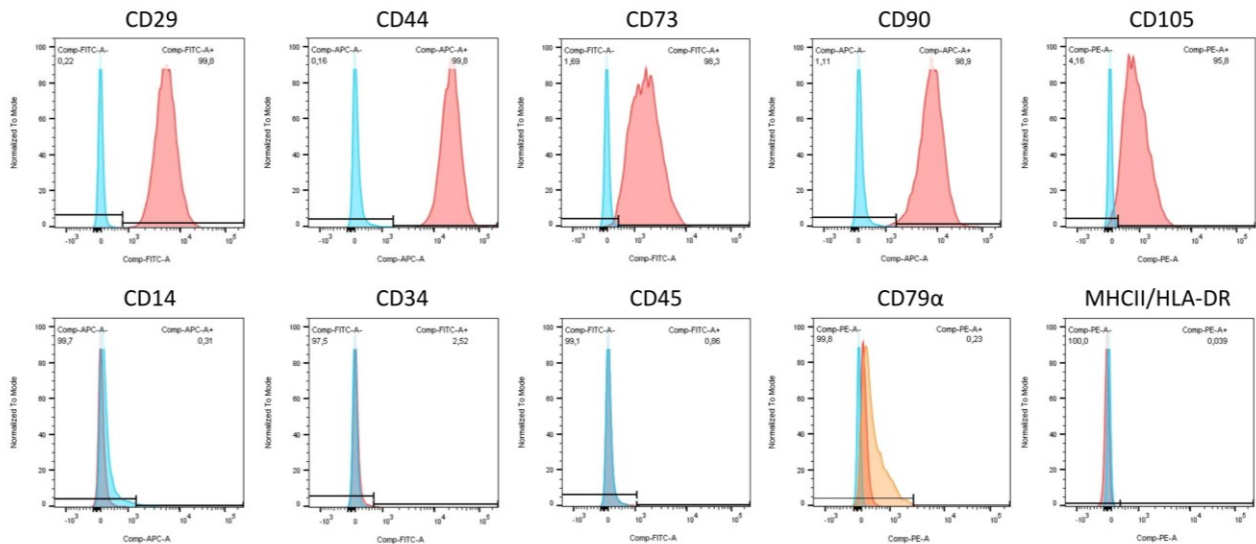
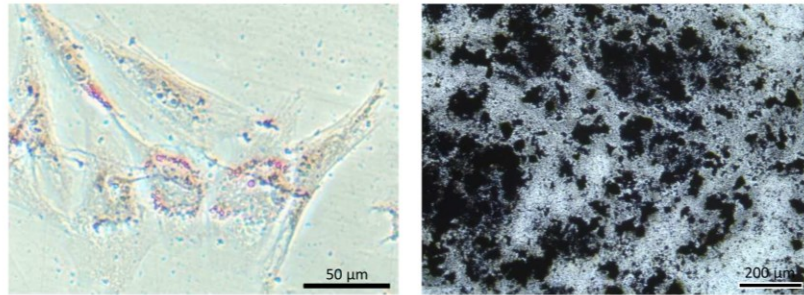
Supplementary file 1: Human MSC characterization

Upper panel:

Representative images of Oil Red O staining (left) and von Kossa staining (right), showing adipogenic or osteogenic differentiation, respectively.

Lower panel:

Representative histograms for surface antigen expression analyzed by flow cytometry; antibody stainings and analyses were performed as detailed in Schubert et al., 2018 (doi: [10.1002/cyto.a.23240](https://doi.org/10.1002/cyto.a.23240)). The histograms display the relative number of events versus mean fluorescence intensity; blue represents Fixable E-Fluor® 780-stained MSC, red the MSC stained with the respective monoclonal antibody. For intracellular CD79 α staining, an additional isotype control staining (yellow) was used to determine the percentage of positive cells.



4.2 Publikation 2

Differenziale Smad2/3-Linker Phosphorylierung ist ein Crosstalk Mechanismus von Rho/ROCK und der kanonischen TGF- β 3-Signalgebung bei der tenogenen Differenzierung

Michaela Melzer¹, Sabine Niebert², Manuela Heimann³, Franziska Ullm^{4,5}, Tilo Pompe⁴, Georgios Scheiner-Bobis⁶, Janina Burk^{2*}

¹Equine Clinic (Surgery, Orthopedics), Faculty of Veterinary Medicine, Justus Liebig University, 35392 Giessen, Germany

²Institute of Physiology, Pathophysiology and Biophysics, University of Veterinary Medicine Vienna, Vienna, Austria

³Institute of Anatomy, Histology and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, Justus-Liebig-University, 35392 Giessen, Germany

⁴Institute of Biochemistry, Faculty of Life Science, Leipzig University, 04103 Leipzig, Germany

⁵FILK Freiberg Institute GmbH, 09599 Freiberg, Germany

⁶Institute of Biochemistry and Endocrinology, Faculty of Veterinary Medicine, Justus Liebig University, 35392 Giessen, Germany

Referenz:

Melzer, M., Niebert, S., Heimann, M., Ullm, F., Pompe, T., Scheiner-Bobis, G., & Burk, J. (2024). Differential Smad2/3 linker phosphorylation is a crosstalk mechanism of Rho/ROCK and canonical TGF- β 3 signaling in tenogenic differentiation. *Scientific reports*, 14(1), 10393. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-60717-z>

OPEN Differential Smad2/3 linker phosphorylation is a crosstalk mechanism of Rho/ROCK and canonical TGF- β 3 signaling in tenogenic differentiation

Michaela Melzer¹, Sabine Niebert², Manuela Heimann³, Franziska Ullm^{4,5}, Tilo Pompe⁴, Georgios Scheiner-Bobis⁶ & Janina Burk^{2✉}

The transforming growth factor (TGF)- β 3 is a well-known inducer for tenogenic differentiation, signaling via the Smad2/3 pathway. Furthermore, other factors like extracellular matrix or mechanical force can induce tenogenic differentiation and possibly alter the response to TGF- β 3 by signaling via the Rho/ROCK pathway. The aim of this study was to investigate the interplay of Rho/ROCK and TGF- β 3/Smad signaling in tenogenic differentiation, with the Smad2/3 molecule hypothesized as a possible interface. Cultured as monolayers or on collagen I matrices, mesenchymal stromal cells (MSC) were treated with the ROCK inhibitor Y-27632 (10 μ M), TGF- β 3 (10 ng/ml) or both combined. Control cells were cultured accordingly, without Y-27632 and/or without TGF- β 3. At different time points, MSC were analyzed by real-time RT-PCR, immunofluorescence, and Western blot. Cultivation of MSC on collagen matrices and ROCK inhibition supported tenogenic differentiation and fostered the effect of TGF- β 3. The phosphorylation of the linker region of Smad2 was reduced by cultivation on collagen matrices, but not by ROCK inhibition. The latter, however, led to increased phosphorylation of the linker region of Smad3. In conclusion, collagen matrices and the Rho/ROCK signaling pathway influence the TGF- β 3/Smad2/3 pathway by regulating different phosphorylation sites of the Smad linker region.

Keywords Tenogenic differentiation, Mesenchymal stem cells, Linker phosphorylation, Smad

Tendon injuries are a frequently occurring problem in athletes but also in the general population. Tendons, such as the rotator cuff, Achilles tendon and patellar tendon are predisposed for injuries, as those are often subject to continuous overload. Once injured, tendons have a limited healing capacity due to their hypocellular and hypovascular nature. Therefore, scar formation and calcification often occur during tendon healing. The scar tissue has a lower stretch and load capacity resulting in weak spots at the junction between scar tissue and healthy tendon tissue, thereby increasing the risk of re-injury. Consequently, the focus of regenerative therapies is on improving tendon healing and preventing scarring.

Mesenchymal stromal cells (MSC) cannot only modulate the inflammatory response in tendon injuries, but also produce and remodel new functional tendon tissue. Accordingly, MSC support surrounding cells by releasing soluble factors, as well as contribute to the formation of tendon matrix themselves through tenogenic differentiation, matrix synthesis and remodeling. This effect is of crucial interest for the long-term efficacy of MSC therapies and their use in chronic tendon lesions. When MSC are applied into tendon lesions, they are subjected to many different stimuli exerted by soluble factors as well as matrix components and structures. All these components

¹Equine Clinic (Surgery, Orthopedics), Faculty of Veterinary Medicine, Justus-Liebig-University, 35392 Giessen, Germany. ²Institute of Physiology, Pathophysiology and Biophysics, University of Veterinary Medicine Vienna, Vienna, Austria. ³Institute of Anatomy, Histology and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, Justus-Liebig-University, 35392 Giessen, Germany. ⁴Institute of Biochemistry, Faculty of Life Science, Leipzig University, 04103 Leipzig, Germany. ⁵FILK Freiberg Institute GmbH, 09599 Freiberg, Germany. ⁶Institute of Biochemistry and Endocrinology, Faculty of Veterinary Medicine, Justus-Liebig-University, 35392 Giessen, Germany. ✉email: janina.burk@vetmeduni.ac.at

can affect tenogenic differentiation and thereby alter the treatment outcome. Thus, it is important to have a better understanding of the different stimuli, their signaling pathways and their interaction with each other.

Transforming growth factor (TGF)- β 3 plays an important role in tendon healing and is highly expressed in the late phase of remodeling. Additionally, it is a reliable inducer of tenogenic differentiation in MSC and can reduce scar formation during tendon healing¹⁻³. After binding to its receptor, TGF- β 3 mediates its signal either canonically via the Smad2/3 pathway or non-canonically via several serine/threonine kinases. The Smad2/3 pathway appears to be the main pathway for mediating TGF- β 3 signaling in tenogenic differentiation⁴. However, studies have also shown that the effect of TGF- β can be altered by other soluble factors and matrix components^{5,6}. The latter, represented by decellularized tendon matrix, also promoted tenogenic differentiation on their own^{7,8}. In this context, the Rho/ROCK pathway, typically known for conveying biomechanical stimuli and regulating the cytoskeleton, has been shown to be essential⁹. Inhibition of ROCK resulted in a reduction or failure of tenogenic differentiation induced by scaffold topography or mechanical stretching^{9,10}. However, this trend appears to be reversed when biochemical factors are used to induce MSC differentiation¹¹⁻¹³. In line with this, we have previously shown that ROCK inhibition promotes TGF- β 3-induced tenogenic differentiation¹³. The underlying signaling mechanisms for this synergistic effect have been only partially identified so far.

The signaling molecules Smad2 and 3 are a possible interface between the canonical TGF- β and the Rho/ROCK signaling pathway. Smad2 and 3 consist of a highly conserved MH1-domain, a conserved carboxy-terminal region (MH2-domain) and a non-conserved linker region¹⁴. The carboxy-terminal region has two important phosphorylation sites, the Ser⁴⁶⁵/Ser⁴⁶⁷ in Smad2 and Ser⁴²³/Ser⁴²⁵ in Smad3. The linker region of Smad2/3 has at least four major sites for phosphorylation, the Ser²⁴⁵, Ser²⁵⁰, Ser²⁵⁵ and Thr²²⁰ in Smad2 and the Ser²⁰⁴, Ser²⁰⁸, Ser²¹³ and Thr¹⁷⁹ in Smad3¹⁴. Upon TGF- β 3 binding to its receptor, carboxy-terminal phosphorylation activates Smad2/3, whereupon it forms a complex with Smad4 and migrates to the nucleus to modulate gene expression and initiate tenogenic differentiation. Additional phosphorylation in the linker region has an important regulatory effect on the stability, activity, and nuclear transport of Smads^{15,16}. The linker region can be phosphorylated by several kinases, such as MAPKs, ERK, JNK, and ROCK¹⁷.

Such a regulatory linker phosphorylation could explain the effect of ROCK inhibition on TGF- β 3-induced tenogenic differentiation. The aim of this study was to further investigate the TGF- β 3/Smad2/3 signaling pathway with respect to Smad2/3 phosphorylation during tenogenic differentiation and to determine whether extracellular matrix stimuli and the Rho/ROCK signaling pathway affect the TGF- β 3/Smad2/3 signaling axis via linker phosphorylation of Smad2/3.

Results

MSC characterization

MSC were tested for their surface marker profile and their potential of trilineage differentiation. MSC from all donors were capable of differentiation into adipocytes, osteoblasts and chondrocytes (Supplementary Fig. 1). MSC were positive for CD29, CD44, CD73, CD90 and CD105 and largely negative for CD14, CD34, CD45, CD79a and HLA-DR.

Tenogenic differentiation

Tenogenic differentiation was assessed based on gene expression of selected markers, such as collagen I and III (COL1A2 and COL3A1), tenascin-C (TNC) and scleraxis (SCX). Additionally, gene expression of collagen II (COL2A1) and sox9 (SOX9) was analyzed to ensure the absence of chondrogenic differentiation.

Culture of MSC on collagen matrix increased the expression of the extracellular matrix genes COL1A2, COL3A1 and TNC as compared to monolayer culture. While this was not significant between the control groups, the effect was promoted and reached significance between several relevant experimental groups when the ROCK inhibitor Y27623 had been added ($p < 0.05$). TGF- β 3 showed overall less effect on the extracellular matrix gene expression but tended to downregulate COL3A1 ($p < 0.05$ for monolayer + Y-27632 vs. monolayer + TGF- β 3 + Y-27632 after 24 h). However, TGF- β 3 strongly upregulated the tenogenic transcription factor SCX, both in the monolayer cultures and the cultures on collagen matrix. This was significant when combining TGF- β 3 with ROCK inhibition using Y-27632 ($p < 0.01$ after 12 h for both monolayer and collagen matrix cultures; $p < 0.05$ for monolayer culture after 24 h). This upregulation was subject to donor-dependent differences. Two donors moderately upregulated SCX, while the remaining donors showed a strong upregulation. In addition, culture on collagen matrix further promoted SCX upregulation by TGF- β 3 and Y-27632 ($p < 0.05$ compared to the monolayer controls). Data are shown in Fig. 1. Staining of scleraxis on protein level showed that Y-27632 and TGF- β 3 were both capable of increasing nuclear translocation of scleraxis (Fig. 2). Inhibition of the Rho/ROCK pathway by Y-27632 was confirmed by a loss of actin fiber organization, resulting in reduced fine drawing in phalloidin staining (Fig. 2).

The transcription factor SOX9 showed a similar regulation as SCX. However, COL2A1 was only expressed at negligible levels as compared to COL1A2 and COL3A1, demonstrating a low risk of chondrogenic differentiation during the period analyzed (Supplementary Fig. 2).

TGF- β 3/Smad axis

To investigate the canonical TGF- β 3 signaling pathway in response to TGF- β 3, ROCK inhibition with Y-27632 and collagen matrix as support, gene expression of signaling pathway components was analyzed and the different phosphorylation sites of Smad molecules were assessed by Western blotting.

The presence of TGF- β 3 or Y-27632 alone did not alter cellular TGFB3 gene expression. When TGF- β 3 and Y-27632 were combined, TGFB3 expression tended to be upregulated, which was enhanced in cultures on collagen matrix ($p < 0.01$ for collagen matrix culture with Y-27632 or TGF- β 3 + Y-27632 vs. monolayer control).

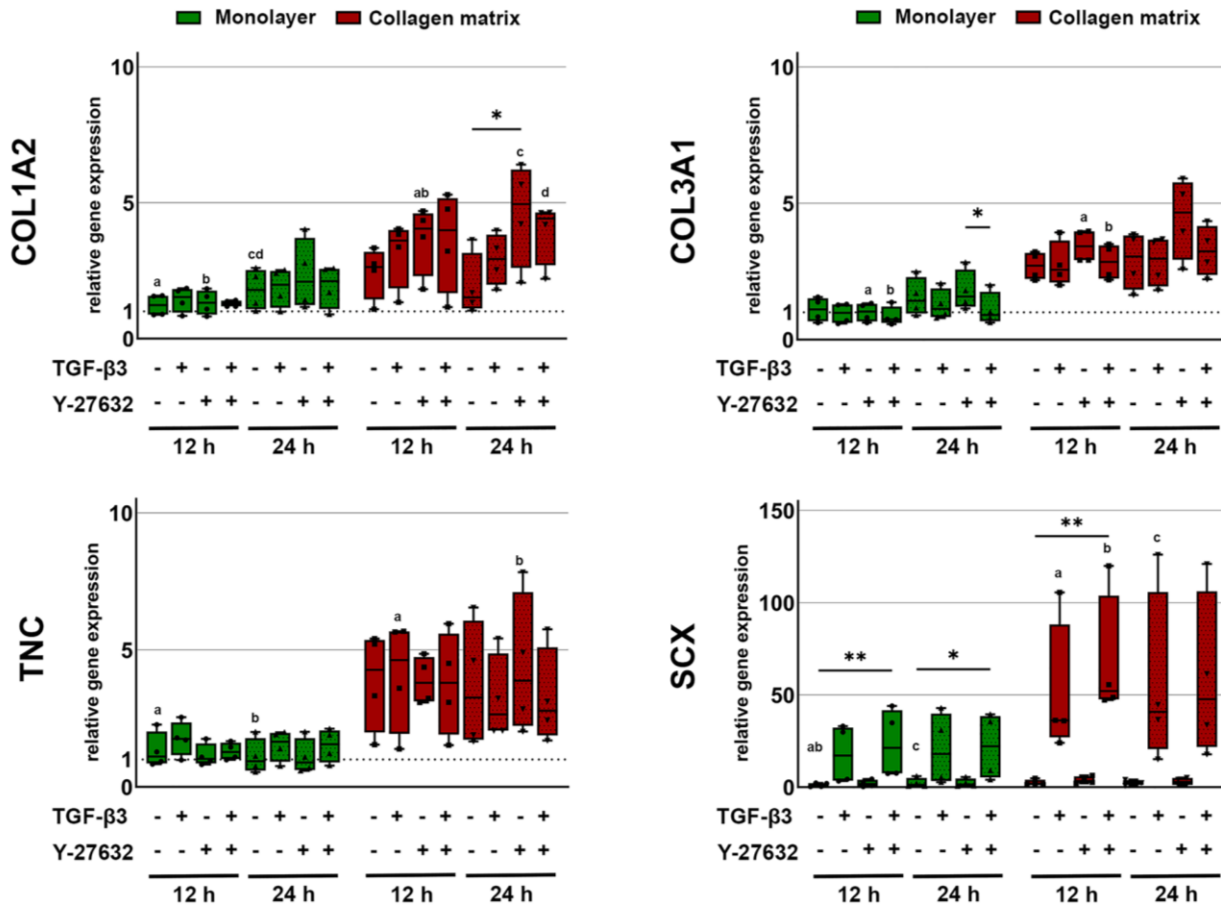


Figure 1. Gene expression of tenogenic markers. Cells cultured as monolayer or on collagen matrix were incubated with 10 ng/ml TGF-β3 and/or 10 μM Y-27632 for 12 h and 24 h. Box plots represent the median values and error bars the minimum to maximum interval. Asterisks mark differences between the stimulation groups with $p < 0.05$. Letters mark differences with $p < 0.05$ between collagen matrix and monolayer within same stimulation groups or in comparison to monolayer control (n=4).

The expression of the receptor TGFBR1 was higher in the presence of the ROCK inhibitor Y-27632 than with TGF-β3 alone or TGF-β3 + Y-27632 combined ($p < 0.01$ for TGF-β3 + Y-27632 vs. Y-27632 in monolayer culture and $p < 0.01$ for TGF-β3 vs. Y-27632 in collagen matrix culture). In this line, TGF-β3 showed a tendency to downregulate TGFBR1, while upregulating TGFBR2 ($p < 0.05$ for TGF-β3 + Y-27632 in collagen matrix culture vs. collagen matrix or monolayer controls). Overall, the changes in TGFBR1 and TGFBR2 gene expression were rather moderate but supported by culture on collagen matrix (Fig. 3).

Gene expression analysis of Smad molecules revealed an upregulation of SMAD3 and SMAD2 expression in the presence of Y-27632, particularly in collagen matrix cultures. For SMAD2, differences were moderate and only significant for the Y-27632 group on collagen matrix compared to the monolayer control ($p < 0.01$ for Y-27632 in collagen matrix culture vs. monolayer control). The situation was different for SMAD3, where an additional downregulation by TGF-β3 was seen, indicating that TGF-β3 is responsible for the regulation of SMAD3 but not SMAD2. The differential regulation of SMAD3 expression by Y-27632 and TGF-β3 resulted in significant differences between the Y-27632 group and the TGF-β3 or TGF-β3 + Y-27632 groups ($p < 0.01$ for Y-27632 vs. TGF-β3 + Y-27632 in monolayer culture and $p < 0.01$ for Y-27632 vs. TGF-β3 on collagen matrix) (Fig. 4).

Western blot analysis demonstrated that the canonical TGF-β3 signaling pathway was activated by TGF-β3 in both monolayer and collagen matrix culture, with carboxy-terminal phosphorylation at Ser^{465/467} of Smad2. ROCK inhibition had no major effect on TGF-β3-induced carboxy-terminal phosphorylation (Fig. 4).

Examining the linker region (Ser^{245/250/255}) phosphorylation of Smad2, there was a reduction in phosphorylation in cultures on collagen matrix compared to monolayer culture. TGF-β3 appeared to have no effect on linker phosphorylation. In a subset of donors, both after 12 h and 24 h, the Y-27632 and TGF-β3 + Y-27632 groups cultured on collagen matrix showed a reduced Smad2 linker phosphorylation and those cultured as monolayers showed an increased phosphorylation. Smad3 linker phosphorylation at Ser²⁰⁴ was also increased by ROCK inhibition with Y-27632 in most donors in monolayer culture (Fig. 5). An additional evaluation of Smad2 linker phosphorylation shortly after ROCK inhibition with Y-27632, before TGF-β3 stimulation, again revealed a reduction of linker phosphorylation in collagen matrix cultures, but with no effect of Y-27632 (Fig. 5).

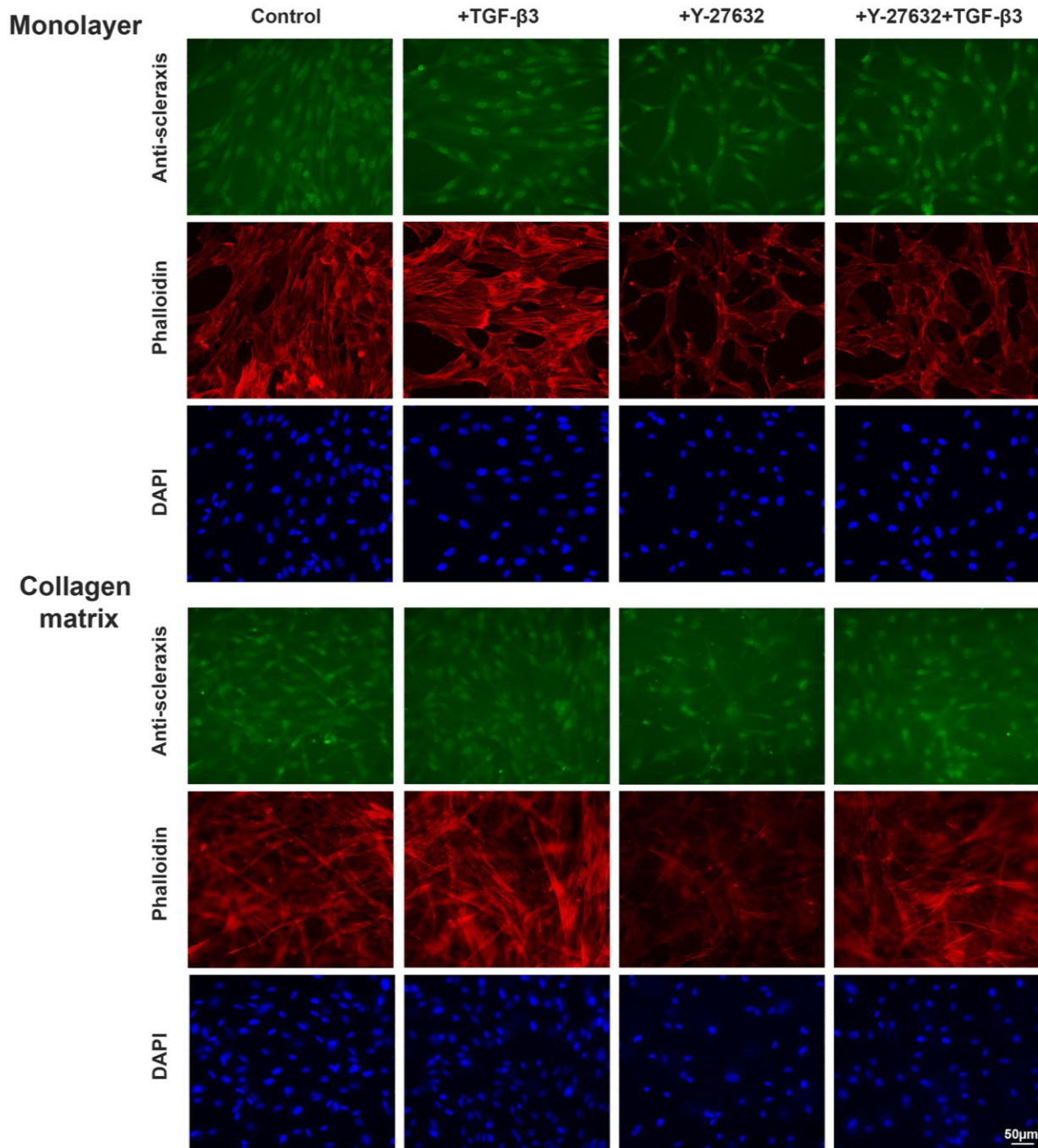


Figure 2. Fluorescence microscopy of MSC as monolayer or on collagen matrix. Cells were incubated with 10 ng/ml TGF- β 3 and/or 10 μ M Y-27632 and analyzed at 24 h and 72 h. Representative images show scleraxis immunostaining (24 h), phalloidin staining of the actin cytoskeleton and nuclear staining with DAPI (scalebar 50 μ m).

Integrin- β 1/ROCK axis

To investigate whether the CD29/integrin- β 1 receptor was involved in modulating ROCK signaling in response to culture on collagen matrix, its gene expression was analyzed for all treatment groups, and a ROCK activity assay was performed in wildtype and integrin- β 1^{-/-} cells cultured in monolayers or on collagen matrix (Fig. 6).

Cultivation on collagen matrix alone did not cause a significant upregulation of ITGB1. However, culture on collagen matrix supported the upregulation of ITGB1 by TGF- β 3 and TGF- β 3 + Y-27632 ($p < 0.01$ for TGF- β 3 and TGF- β 3 + Y-27632 on collagen matrix vs. monolayer control).

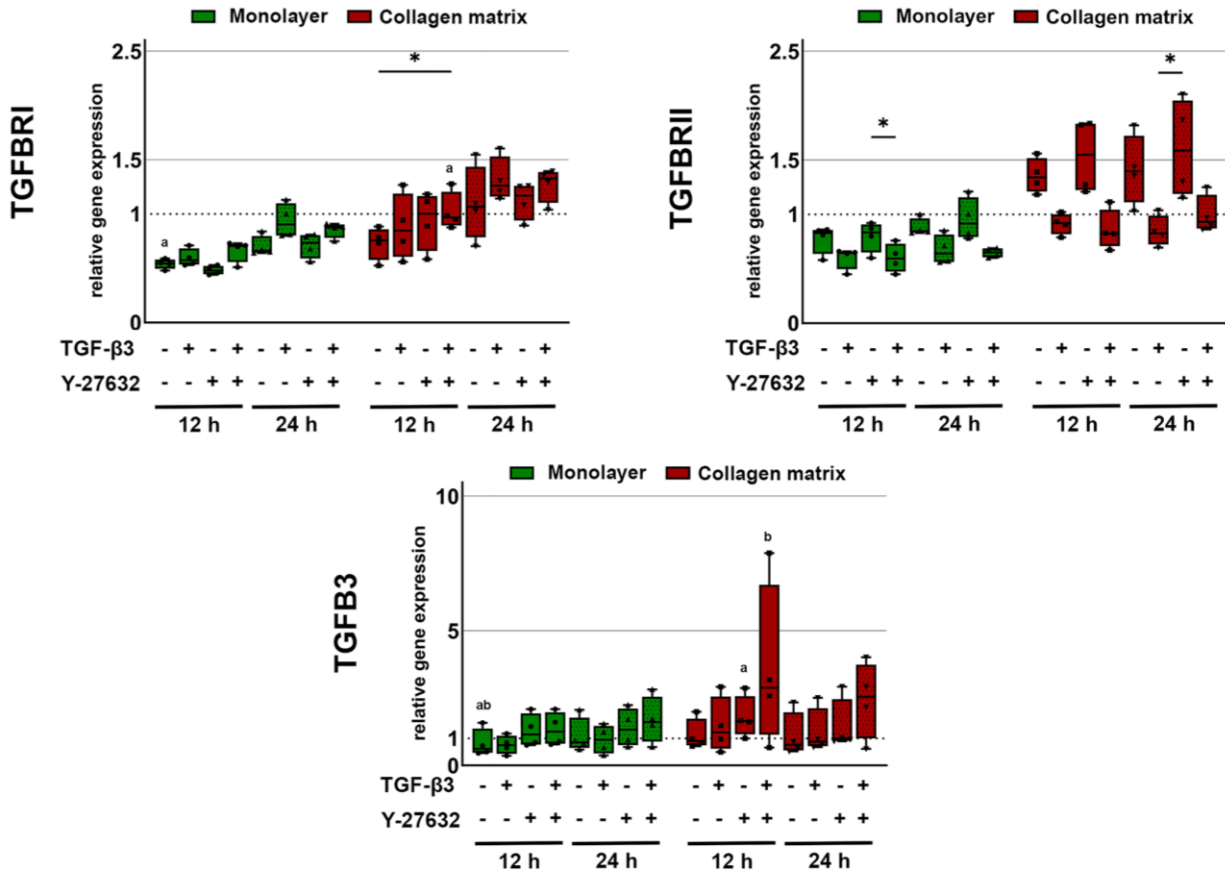


Figure 3. Gene expression of TGFB3 and its receptors. Cells cultured as monolayer or on collagen matrix were incubated with 10 ng/ml TGF-β3 and/or 10 μM Y-27632 for 12 h and 24 h. Box plots represent the median values and error bars the minimum to maximum interval. Asterisks mark differences between the stimulation groups with $p < 0.05$. Letters mark differences with $p < 0.05$ between collagen matrix and monolayer within same stimulation groups or in comparison to monolayer control ($n = 4$).

In the integrin-β1^{-/-} cells, Western blot and immunofluorescence confirmed the absence of integrin-β1 protein expression (Supplementary Fig. 3). Culturing the wildtype cells on collagen matrix had no measurable effect on ROCK activity compared to monolayer culture. Furthermore, integrin-β1^{-/-} cells showed little difference compared with the wildtype. Only after 48 h of cultivation on collagen matrix, there was a significant increase in ROCK activity in the integrin-β1^{-/-} cells compared with the wildtype ($p < 0.05$ for integrin-β1^{-/-} vs. wildtype on collagen matrix). However, this increase was transient and no longer detectable after 72 h. After 72 h of cultivation, there was a significant decrease in ROCK activity in all cultures.

Discussion

Recently, we had shown that ROCK inhibition promotes TGF-β3-induced tenogenic differentiation in MSC, with an increased Smad2/3 nuclear localization¹³ demonstrating activation of canonical TGF-β3 downstream signaling. Previous studies in other contexts already demonstrated cross talk between Rho/ROCK and the TGF-β/Smad pathway and the capability of ROCK to induce phosphorylation of the linker region of Smad molecules, thus regulating their activity^{18,19}. The regulatory effect of Smad linker phosphorylation can be inhibitory or reinforcing, depending on the linker phosphorylation site and context²⁰. Therefore, here we aimed to explore the signaling crosstalk downstream the tenogenic induction by collagen matrix and TGF-β3, focusing on the contribution of the integrin/Rho/ROCK axis and the Smad2/3 molecules as putative interface integrating activating and inhibiting stimuli.

In this study, both cultivation on collagen matrix and ROCK inhibition supported TGF-β-induced tenogenic differentiation as expected. In addition, ROCK inhibition increased the production of extracellular matrix proteins especially in MSC cultured on collagen matrix. The Smad2/3 molecules were confirmed to play an important role in these processes. Cultivation on collagen matrix reduced Smad2 linker phosphorylation. ROCK inhibition also reduced Smad2 linker phosphorylation, but only in cultures on collagen matrix and with variability between donors, while it increased Smad2 and Smad3 linker phosphorylation in monolayer cultures. TGF-β3 induced carboxy-terminal phosphorylation was consistent between donors and not affected by either component.

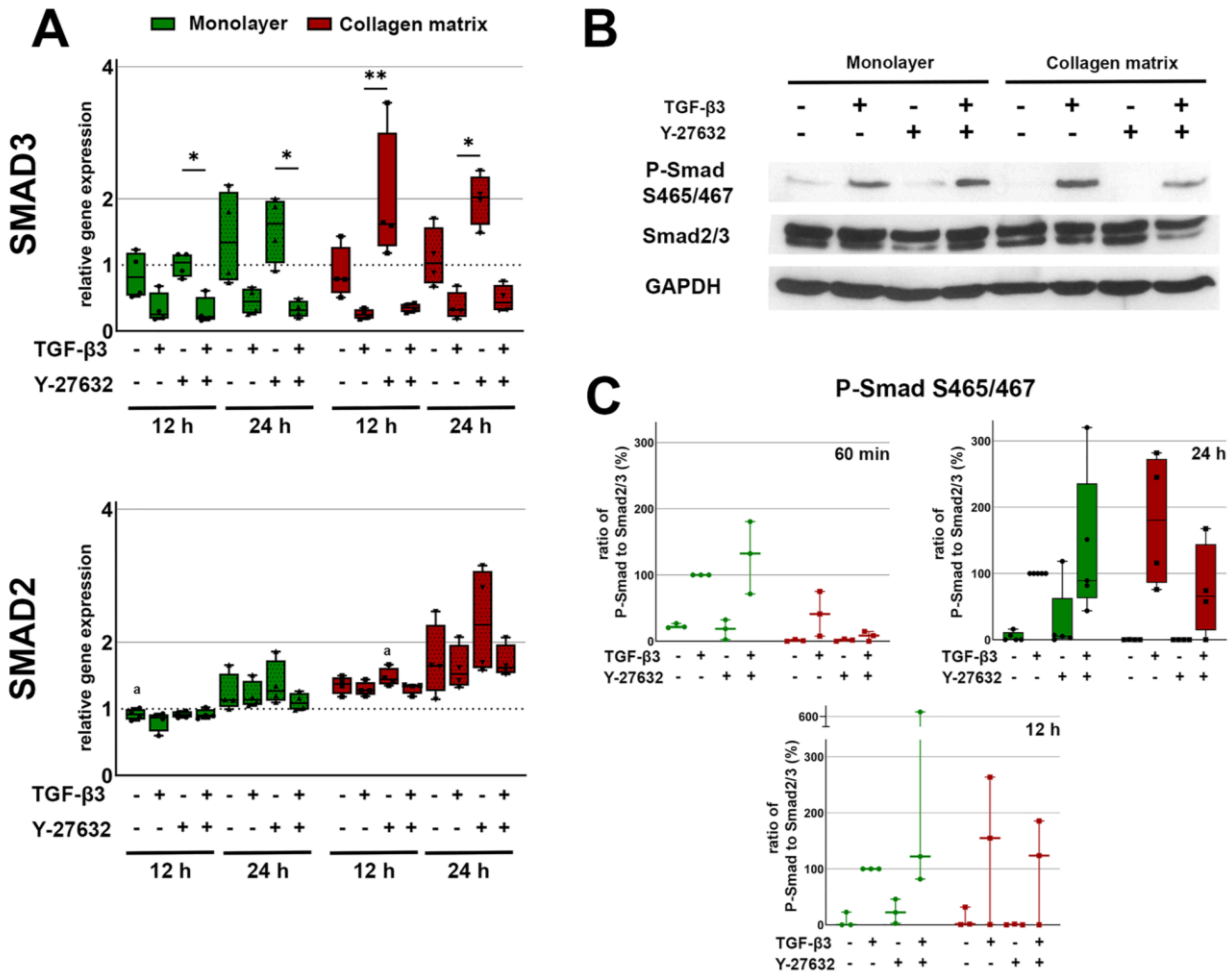


Figure 4. Gene expression and Western blot of Smad2/3. Cells cultured as monolayer or on collagen matrix were incubated with 10 ng/ml TGF- β 3 and/or 10 μ M Y-27632. (A) Box plots represent the relative gene expression of Smad2/3. Asterisks mark differences between the stimulation groups with $p < 0.05$. Letters mark differences with $p < 0.05$ between collagen matrix and monolayer within same stimulation groups or in comparison to monolayer control (n = 4). (B) Representative western blot result of carboxy-terminal phosphorylation at Ser^{465/467} after 24 h stimulation. (C) Quantitative analysis of carboxy-terminal phosphorylation at Ser^{465/467} at 60 min, 12 h (n = 3) and 24 h (n = 5). Box plots represent the ratio of P-Smad to Smad2/3 and dots the values of the different donors.

The TGF- β and Rho/ROCK signaling pathways play an important role in the regenerative potential of MSC and their adaptation to their extracellular environment. TGF- β is a well-established trigger of tenogenic differentiation and its release is upregulated during tendon healing²¹. The Smad signaling pathway is the canonical transduction pathway downstream of TGF- β receptors, resulting in nuclear translocation of a Smad complex to modulate gene expression²². However, MSC act in a highly context-dependent manner and can alter their TGF- β response depending on other environmental stimuli²³. Therefore, it is necessary to understand the crosstalk between Smad and other, especially mechanosensitive, signaling pathways. Here, Rho/ROCK signaling is of particular interest as it is related to the activation of focal adhesions/integrins by the local ECM environment, thereby mediating mechanical stimuli from the extracellular space²⁴. Regarding tendon regeneration, the Rho/ROCK pathway has been considered essential for signal transduction through stretch- and topography-induced tenogenesis^{9,10}. Inhibition of Rho/ROCK in human bone marrow-derived MSC subjected to stretching reduced the expression of tenogenic markers and the cells showed a less pronounced tenocyte-like morphology¹⁰. Contrarily, in the current study, ROCK inhibition promoted TGF- β 3-induced tenogenic differentiation. This supportive effect on tenogenic differentiation had already been demonstrated in our previous study in human and equine MSC¹³ and is consistent with other studies that also show a positive effect of ROCK inhibition on paracrine-induced differentiation. In this line, ROCK inhibition promoted the differentiation of MSC into keratinocyte-like cells and increased SOX9 expression during chondrogenic differentiation^{12,25}. This suggests that Rho/ROCK has a differential impact on tenogenic differentiation depending on the context. The increase in SOX9 expression as result of TGF- β 3 and Y-27632 combination could indicate a favoring of chondrogenic differentiation as well.

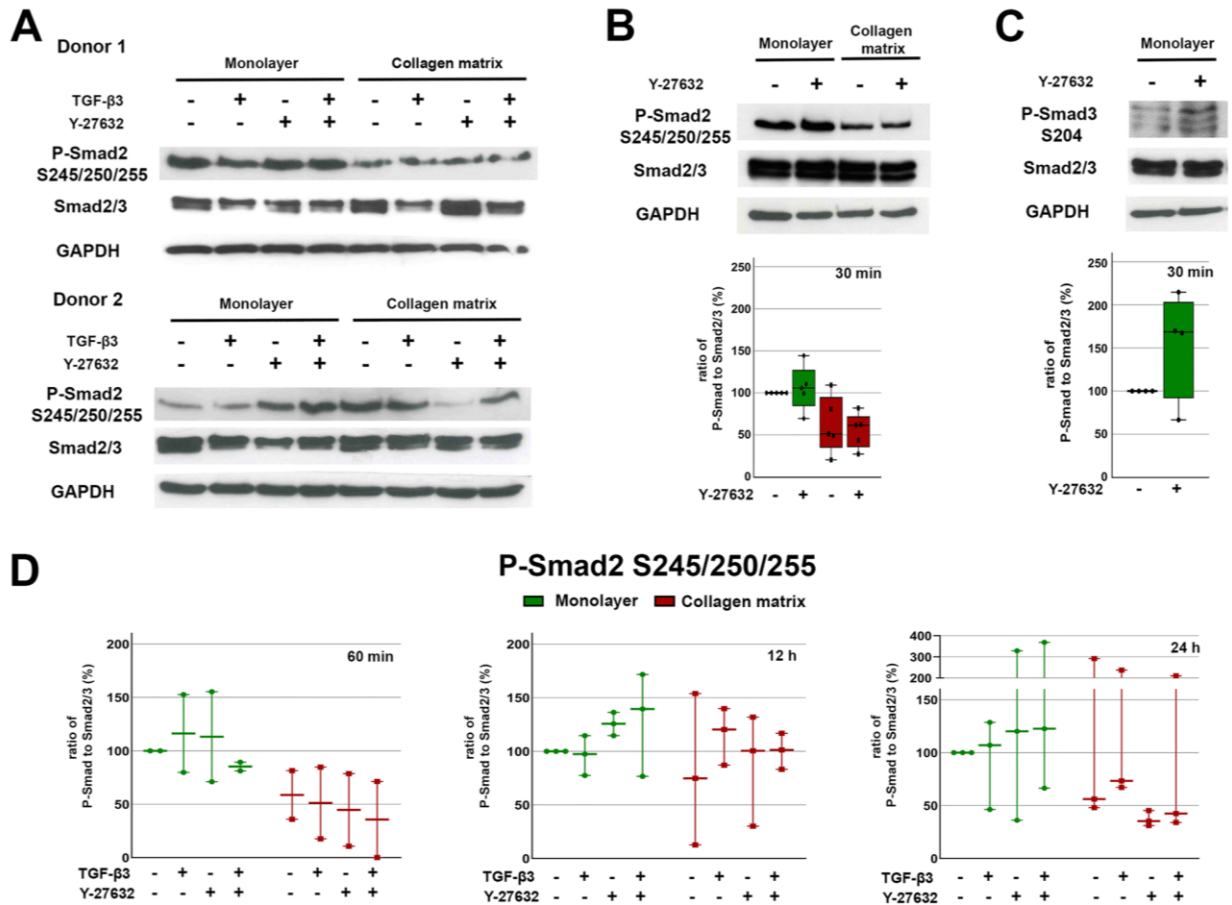


Figure 5. Western blot results of Smad2/3 linker phosphorylation. Cells cultured as monolayer or on collagen matrix were incubated with 10 ng/ml TGF-β3 and/or 10 μM Y-27632. Representative Western blot result of linker phosphorylation at Ser^{245/250/255} of Smad2 after 24 h (A) and 30 min (B) stimulation and at Ser²⁰⁴ of Smad3 after 30 min stimulation (C). Quantitative analysis of linker phosphorylation at Ser^{245/250/255} (B; n = 5; D: n = 3) and Ser²⁰⁴ (C, n = 4). Box plots represent the ratio of P-Smad to Smad2/3 and dots the values of the different donors.

However, since collagen 2A1 expression is very low, it would be necessary to further investigate the biological relevance of these results in a suitable experimental setup.

With respect to the mechanisms of ROCK in the presence of TGF-β, a study in human breast cancer cells showed that Rho/ROCK is able to phosphorylate the linker region of Smad3 and thereby alter the effect of TGF-β without affecting carboxy-terminal phosphorylation. Specifically, in the breast cancer cells, ROCK inhibition decreased S204 linker phosphorylation¹⁹. In contrast, we observed an increase in Smad3 S204 linker phosphorylation upon ROCK inhibition in monolayer cultures. In this line, data from a study in mesenchymal cells demonstrated that phosphorylation of S204 is critical for Smad3-mediated COL1A2 promoter activity²⁶. Therefore, this particular linker phosphorylation could explain the promoting effect of ROCK inhibition on TGF-β action, as well as the tenogenic effect that the inhibitor alone exerts on matrix protein gene expression.

The key role of Smad3 in tenogenesis was already demonstrated in previous studies with Smad3^{-/-} mice models. Smad3 was found to bind to mohawk and scleraxis, thereby presumably influencing differentiation²⁷. The Smad3^{-/-} mice exhibited reduced embryonic tendon formation, resulting in poorer fiber structure and lower tendon loading capacity compared to wild type mice²⁷. In contrast, another study associated Smad3 signaling with fibrosis and demonstrated reduced scarring during tendon healing in Smad3^{-/-} mice, yet at the expense of reduced tendon healing²⁸. Similarly, different results were observed with other differentiation lineages. During chondrocyte differentiation, Smad3 binds to Sox9 to promote chondrogenic gene expression²⁹ and in bone Smad3 binds the osteogenic transcription factor Runx2 to cause TGF-β-mediated inhibition of osteoblast differentiation³⁰. The influence on Smad3 linker phosphorylation by combination of ROCK inhibition and TGF-β3 stimulation or cultivation on collagen matrix were not investigated here. The latter, as well as other linker phosphorylation sites of Smad3 should be investigated in future studies to better understand the relevance of Smad3 in the crosstalk between ROCK and TGF-β.

Regarding the effect of collagen matrix, Smad2 linker phosphorylation could be an additional switch, as it was overall reduced in collagen cultures. In contrast to the reinforcing Smad3 linker phosphorylation discussed above, Smad2 linker phosphorylation rather exerts inhibitory effects, which would then be diminished with

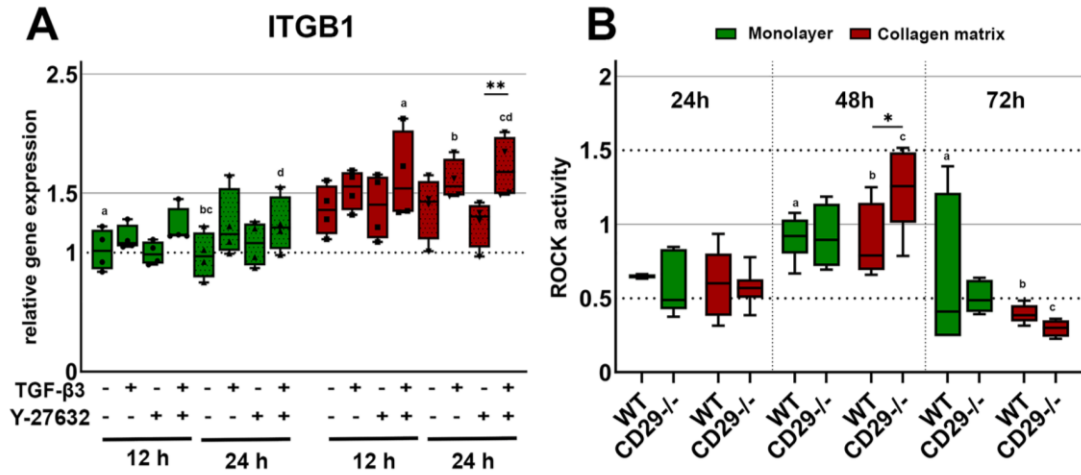


Figure 6. Gene expression of ITGB1 (A) and ROCK activity assay (B). (A) Cells cultured as monolayer or on collagen matrix were incubated with 10 ng/ml TGF- β 3 and/ or 10 μ M Y-27632. Box plots represent the relative gene expression of ITGB1. Asterisks mark differences between the stimulation groups with $p < 0.05$. Letters mark differences with $p < 0.05$ between collagen matrix and monolayer within same stimulation groups or in comparison to monolayer control ($n = 4$). (B) wild type (WT) and CD29^{-/-} cells were cultured as monolayer or on collagen matrix and analyzed after 24, 48 and 72 h. Box plots represents the ROCK activity. Asterisks mark differences between the WT and CD29^{-/-} with $p < 0.05$ and letters differences between the different timepoints sharing the same letter with $p < 0.05$ ($n = 3$).

less phosphorylation. The use of collagen I matrix as support is common practice as over 90% of the tendon matrix consists of collagen I. In addition, collagen I gels are well-established for promoting differentiation and thus allow comparability to previous results. The positive effect of collagen gels has been repeatedly proven^{31,32} and their effect could be further improved by aligning the collagen fibrils³³. A similar synergistic effect has been described for embryonic stem cells when combining collagen and TGF- β ³⁴. Integrin- β 1 is an important mediator for binding to collagen I and can regulate the Rho/ROCK signaling pathway through its integrin-linked kinase³⁵. Previous studies demonstrated an increase in ROCK activity on a 3D collagen matrix³⁶. In tumor cells, this regulation was shown to be integrin- β 1 dependent³⁷. Yet contrary to expectations, no increase of ROCK activity by cultivation on collagen matrix or decrease by integrin- β 1 knockout could be detected in the current study. These results suggest that collagen does not or only partially mediate its tenogenic effect via the integrin- β 1/Rho/ROCK pathway. However, the different stiffness of the respective cell culture substrates will likely have influenced the activation of other signaling cascades. Tissue culture plastics have a much higher stiffness of 1×10^7 kPa in comparison to collagen matrices, which can be reconstituted in the range of 10 Pa to 50 kPa³⁸⁻⁴⁰. On stiff scaffolds, MSCs showed reduced tenogenic differentiation and increased activation of the FAK-ERK1/2 signaling pathway compared to softer scaffolds^{41,42}. The former could be significantly improved by inhibiting ERK1/2^{42,43}. Consequently, low stiffness, like collagen matrices used in this study, promotes tenogenic differentiation by reducing the activity of the ERK1/2 pathway, which is able to regulate phosphorylation of the linker region of Smad2^{44,45}. In parallel, ROCK activity is also increased with increasing stiffness and has positive feedback on ERK1/2. While on soft matrix, ROCK inhibition led to a complete inactivation of ERK1/2, on stiff matrix, there was only a slight reduction⁴⁶, indicating a stiffness-related interaction of both pathways. These regulatory differences would explain the different regulation of linker phosphorylation by ROCK inhibition in monolayers and on collagen matrix.

In summary, cultivation on collagen matrix and ROCK inhibition promote TGF- β -induced tenogenic differentiation in human MSC, and our results support the hypothesis that differential linker phosphorylation of Smad2/3 molecules represent the underlying mechanisms. These findings provide a deeper insight into the interplay between the signaling cascades of the extracellular matrix and soluble growth factors. Future studies should shed more light on the contribution of the ERK pathway in the crosstalk of the TGF- β /Smad and Rho/ROCK axes in response to extracellular matrix components.

Methods

MSC isolation and characterization

Human adipose-derived mesenchymal stromal cells were isolated from five healthy donors (female, mean \pm SD age, 29.6 ± 4.9 years). The subcutaneous adipose tissue was obtained during cosmetic surgeries. All samples were collected after informed consent of the donors and approval by the ethics committee of the Medical Faculty, University of Leipzig (096/17 – ek). All procedures were performed in accordance with relevant guidelines. Isolation was performed as described previously⁴⁷. In brief, the adipose tissue was minced and digested with 0.8 mg/ml collagenase I (Gibco®, Thermo Fisher Scientific GmbH). The recovered cells were seeded in cell culture flasks, detached when 70% confluence was reached and stored frozen until further use. The MSC were analyzed for their three-lineage differentiation and surface marker expression as recommended by the International Society for Cell and Gene Therapy⁴⁸. Surface antigen staining and flow cytometry were performed as previously described

(Supplementary Table 1)⁴⁷. Differentiation was performed using StemPro™ differentiation kits (Thermo Fisher Scientific GmbH) and qualitatively assessed using standard stains (Oil Red O, von Kossa and Alcian Blue for adipogenic, osteogenic and chondrogenic differentiation, respectively).

Collagen I matrix reconstitution

Collagen I matrices were reconstituted on 13-, 20-, and 32-mm glass coverslips coated with 0.14% w/w poly(styrene-*alt*-maleic anhydride) (PSMA; MW 30,000 g/mol; Sigma-Aldrich) according to an established protocol^{39,40}. Briefly, rat-tail collagen I (Cultrex® rat collagen I, R&D Systems™) was diluted with 0.2 M acetic acid and 250 mM phosphate buffer to a 2.5 mg/ml collagen I working solution (pH 7.5). All reagents were handled on ice. Total volumes of 40 µl, 95 µl and 400 µl of collagen I solution were applied to the coverslips and the coated coverslips were incubated at 37 °C and humidity for 75 min to complete fibril formation, resulting in collagen matrix layers of approx. 400 µm thickness and roughly 100 Pa elastic modulus. Afterwards, collagen matrices were transferred to well plates and washed twice with phosphate-buffered saline (PBS). Before cell seeding, collagen matrices were equilibrated with the cell culture medium for 1 h.

Cell culture and stimulation

For experiments, cells were cultured in alpha Minimum Essential Medium (MEM Alpha Medium, Capricorn Scientific GmbH), supplemented with 2.5% human platelet lysate (PL BioScience GmbH), 1% penicillin–streptomycin (Pan-Biotech GmbH), 2 mM L-glutamine (Capricorn Scientific GmbH) and 1 U/ml heparin (PL BioScience GmbH). Cells were seeded at a density of 3000 cells/cm² on plastic culture dishes and at a density of 30,000 cells/cm² on collagen I matrices. After three days of cultivation, cells were stimulated with 10 ng/ml TGF-β3 (R&D Systems®), 10 µM Y-27632 (Tocris), or both. For the combined treatment, cells were first stimulated with Y-27632 for 2 h and then TGF-β3 was added. Cells were stimulated up to 72 h, during which analyses were performed at different time points (30 min, 60 min, 12 h, 24 h, 72 h).

Western blot

Collagen I matrices were digested with 5 mg/ml collagenase I (Gibco®) for 10 min at 37 °C and monolayer cells were detached with trypsin (Gibco®) for 5 min at 37 °C. Harvested cells were lysed for 5 min at 4 °C in RIPA lysis buffer containing 0.1% SDS, 1% Igepal-CA630, 0.5% Na-Deoxycholate and 1mM EDTA supplemented with proteinase and phosphatase inhibitors (cOmplete™ mini proteinase inhibitor cocktail and PhosStop™, Roche). Protein lysates were then centrifuged for 10 min at 14,000 rpm to remove cell debris. The protein concentration of lysates was determined using a BCA protein assay (Pierce™ rapid gold BCA protein assay, Thermo Fisher Scientific GmbH) using bovine albumin as standard. Prior to use, protein lysates were mixed with loading buffer (Rotiload®, Roth) and denatured at 95 °C for 3 min. The same amount of protein for each sample was loaded on a 10% SDS gel and separated by electrophoresis. Samples were transferred to a PVDF membrane by semi-dry blotting (0.5 V for 30 min). After blocking with 5% milk or BSA, depending on the respective antibody, in a Tris–buffered saline 0.5% Tween (TBST) solution overnight at 4 °C, membranes were stained with antibodies against total-smad 2/3 (1:1000, D7G7, #8685, Cell Signaling Technology), p-smad2 S245/250/255 (1:1000, #3104, Cell Signaling Technology), p-smad S465/467 (1:1000, E8F3R, #18338, Cell Signaling Technology) or p-smad3 S204 (1:500, A24906, Bioworld Technology) for 1 h. Then membranes were washed with TBST three times, incubated with an anti-rabbit HRP-conjugated secondary antibody (1:200, #7074, Cell Signaling Technology) for 1 h and washed again four times. Samples were then visualized using an in-house prepared ECL substrate (0.1 M Tris buffer with 90 mM p-coumaric-acid, 250 mM luminol and H₂O₂). The chemiluminescence signal was detected on X-ray films. After stripping of the previously used antibodies with stripping buffer (200 mM glycine pH 2.5, 0.05% Tween 20) two times for 20 min, the membranes were restained with GAPDH antibody (1:8000, A85377) to ensure that equal amounts of protein had been loaded. For quantification, blots were analyzed with GelAnalyzer 19.1. Phospho-smad expression was normalized to total-smad2/3 expression. For a better presentation of the results, the Western blot images were cropped to the relevant sections.

Gene expression

Gene expression of surface markers, signaling molecules, tenogenic differentiation markers and tendon extracellular matrix components was analyzed by real-time RT-PCR. GAPDH and HPRT1 were used as reference genes. Monolayer cells were directly lysed in RLT buffer supplemented with 1% β-mercaptoethanol. Cells on collagen I matrices were harvested by digestion with 5 mg/ml collagenase I (Gibco®) for 10 min at 37 °C followed by cell lysis. Total RNA was isolated using the RNeasy Mini Kit (Qiagen) including on-column DNase digestion (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. RNA was then converted to cDNA using the RevertAid RT Kit (Thermo Fisher Scientific GmbH). Real-time PCR was performed on the qTower³G (Analytik Jena GmbH) Real-time PCR-System using the iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories GmbH). 1 µl cDNA (corresponding to 33 ng RNA) was used per reaction. Primer sequences are shown in Table 1. For relative quantification, gene expression ratios were calculated according to the Pfaffl method⁴⁹. The geomean of the housekeeping genes was used as reference gene and an additional monolayer day 0 sample as control for normalization.

Immunofluorescence staining

Immunofluorescence staining was performed to examine scleraxis expression and localization under different stimulations. Cells were washed with PBS three times and fixed with 4% formaldehyde (Carl Roth®) for 10 min. Cells were permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS for 30 min, blocked with 10% donkey serum + 1% BSA in PBS for 30 min and incubated with anti-scleraxis antibody (1:100, ab58655, Abcam) overnight at 4 °C. Subsequently, cells were incubated with donkey anti-rabbit IgG secondary antibody (FITC, 406403, BioLegend) for 1

Gene	Primer sequence	Accession number	PCR product (bp)
GAPDH	For: CCACTCCTCCACCTTTGACG Rev: CCCTGTTGCTGTAGCCAAATTC	NM_001256799.1	101
HPRT1	For: TGC TGA GGA TTT GGA AAG GGT Rev: GGG CTA CAA TGT GAT GGC CT	NM_000194.3	110
COL1A2	For: CAAGGACAAGAAACACGTCTGG Rev: GTTGGGTAGCCATTTCCTTGG	NM_000089.3	101
COL3A1	For: TGAATATCGAACACGCAAGGC Rev: AAAGCAAACAGGGCCAACG	NM_000090.3	109
COL2A1	For: TCA CGT ACA CTG CCC TGA AG Rev: CGT GAG GTC TTC TGT GAC CG	NM_001844.4	91
TNC	For: CTCTGGAAGACACCGTTGGC Rev: GAAGTGGTGTTCCTTGAAGCTG	NM_002160.3	101
SCX	For: GCGACGGCGAGAACACC Rev: TCCTTGCTCAACTTTCTCTGGTT	NM_001080514.1	73
SOX9	For: GAG GAA GTC GGT GAA GAA CGG Rev: CCT CTC GCT TCA GGT CAG C	NM_000346.4	233
SMAD3	For: GGTCTGCGTGAATCCCTACC Rev: TTAITGTGCTGGGACATCGG	NM_005902.3	294
SMAD2	For: TCA AGG CAA TTG AAA ACT GCG AA Rev: GTT AGG ATC TCG GTG TGT CGG	NM_005901.6	136
TGFB 3	For: AGCGCTATATCGGTGGCAAG Rev: TCATCCTCATTGTCCACGCC	NM_003239.4	226
TGFBR1	For: ACG TTC GTG GTT CCG TGA G Rev: GAC ACC AAC CAG AGC TGA GTC	NM_004612.4	123
TGFBR2	For: TCC TTC AAG CAG ACC GAT GTC Rev: TTG GAA CCA AAT GGA GGC TCA	NM_001024847.2	110
ITGB1	For: AGT GAA TGG GAA CAA CGA GGT Rev: CAA TTC CAG CAA CCA CAC CAG	NM_002211.4	104

Table 1. Primer sequences.

h. To visualize the nuclei and the cytoskeleton, cells were stained with DAPI (1:1000, Carl Roth*) and Phalloidin (Dylight 554, 13054S, 1:200, Cell Signaling Technology) for 20 min. Between each step, cells were washed with PBS three times for 5 min. Images of stained samples were taken each with the same standardized settings on the Leica DMI6000 B microscope (Leica Microsystems).

Construction of CD29 knockout cells

MSC from an additional donor (female, 35 years) were used to construct CD29 knockout cells. Cells were cultured in mesenchymal stromal cell growth medium 2 (PromoCell) and 1% penicillin–streptomycin. Targets were designed for the gene sequence of ITGB1 with the webtool chop-chop and cloned into a pSpCas9(BB)-2A-Puro (px459) vector with puromycin and ampicillin resistance. The plasmid was transformed into competent bacteria, expanded and isolated with midi-EF isolation kit (Macherey–Nagel) according to manufacturer's instructions. In parallel, cells were seeded and cultured until a confluence of 70% to 80% was reached. Then, cells were washed and detached with trypsin. 15 µg of isolated plasmid was transfected into 2 million cells via electroporation using the Invitrogen™ Neon™ Transfection System (Thermo Fisher) according to the manufacturer instruction (1400 V, 20 ms, 2 pulses). The transfected cells were cultured on a 100 mm plate in culture medium without antibiotics for 24 h and another 24 h with 1% penicillin–streptomycin. Then, cells were detached, diluted at a ratio of 1:3 and cultured in culture medium with 2 µg/ml puromycin for 5 days. After further 1–2 weeks of cultivation, clones were isolated and assessed for CD29 expression by immunofluorescence and Western blot. Additionally, the target region of the ITGB1 gene of negatively tested clones was sequenced at Microsynth SeqLab GmbH. The sequenced data was compared to the wild type gene sequence of ITGB1 (NM_002211.4).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using IBM SPSS Statistics 28 software (IBM Deutschland GmbH, Ehningen, Germany). As data were not normally distributed, non-parametric Friedman tests with Bonferroni-adjusted post-hoc tests were used. Differences were considered significant at $p < 0.05$. Relative gene expression was evaluated for significance regarding various aspects. Firstly, the different stimulation groups were compared with each other within one culture condition (monolayer or collagen). Significances found here are marked with asterisks in the graphs. Secondly, the stimulation groups on collagen were compared with the correlating stimulation group on monolayer to investigate the effect of culture and finally a comparison was made between monolayer control and the different stimulations on collagen matrix. Graphs were designed with GraphPad Prism 9.4.1 (GraphPad Software, San Diego, US).

Data availability

The original contributions presented in the study are included in the article, further inquiries can be directed to the corresponding author.

Received: 29 August 2023; Accepted: 26 April 2024

Published online: 06 May 2024

References

- Campbell, B. H., Agarwal, C. & Wang, J.H.-C. TGF-beta1, TGF-beta3, and PGE(2) regulate contraction of human patellar tendon fibroblasts. *Biomech. Model. Mechanobiol.* **2**(4), 239–245. <https://doi.org/10.1007/s10237-004-0041-z> (2004).
- Juneja, S. C., Schwarz, E. M., O'Keefe, R. J. & Awad, H. A. Cellular and molecular factors in flexor tendon repair and adhesions: A histological and gene expression analysis. *Connect. Tissue Res.* **54**(3), 218–226. <https://doi.org/10.3109/03008207.2013.787418> (2013).
- Shah, M., Foreman, D. M. & Ferguson, M. W. Neutralisation of TGF-beta 1 and TGF-beta 2 or exogenous addition of TGF-beta 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring. *J. Cell Sci.* **108**(Pt 3), 985–1002. <https://doi.org/10.1242/jcs.108.3.985> (1995).
- Maeda, T. *et al.* Conversion of mechanical force into TGF- β -mediated biochemical signals. *Curr. Biol. CB* **21**(11), 933–941. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.04.007> (2011).
- Roth, S. P. *et al.* Growth factor-mediated tenogenic induction of multipotent mesenchymal stromal cells is altered by the micro-environment of tendon matrix. *Cell Transpl.* **27**(10), 1434–1450. <https://doi.org/10.1177/0963689718792203> (2018).
- Xu, T., Wu, M., Feng, J., Lin, X. & Gu, Z. RhoA/Rho kinase signaling regulates transforming growth factor- β -induced chondrogenesis and actin organization of synovium-derived mesenchymal stem cells through interaction with the Smad pathway. *Int. J. Mol. Med.* **30**(5), 1119–1125. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2012.1107> (2012).
- Doll, C. U., Niebert, S. & Burk, J. Mesenchymal stromal cells adapt to chronic tendon disease environment with an initial reduction in matrix remodeling. *Int. J. Mol. Sci.* **22**(23), 12798. <https://doi.org/10.3390/ijms222312798> (2021).
- Burk, J. *et al.* Induction of tenogenic differentiation mediated by extracellular tendon matrix and short-term cyclic stretching. *Stem Cells Int.* <https://doi.org/10.1155/2016/7342379> (2016).
- Maharam, E. *et al.* Rho/Rock signal transduction pathway is required for MSC tenogenic differentiation. *Bone Res.* **3**, 15015. <https://doi.org/10.1038/boneres.2015.15> (2015).
- Xu, B. *et al.* RhoA/ROCK, cytoskeletal dynamics, and focal adhesion kinase are required for mechanical stretch-induced tenogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J. Cell. Physiol.* **227**(6), 2722–2729. <https://doi.org/10.1002/jcp.23016> (2012).
- Hong, S., Lee, J. Y., Hwang, C., Shin, J. H. & Park, Y. Inhibition of rho-associated protein kinase increases the angiogenic potential of mesenchymal stem cell aggregates via paracrine effects. *Tissue Eng. Part A* **22**(3–4), 233–243. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2015.0289> (2016).
- Li, Z. *et al.* Rho kinase inhibitor Y-27632 promotes the differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells into keratinocyte-like cells in xeno-free conditioned medium. *Stem Cell Res. Ther.* **6**(1), 17. <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0008-2> (2015).
- Melzer, M. *et al.* Rho/ROCK inhibition promotes TGF- β 3-induced tenogenic differentiation in mesenchymal stromal cells. *Stem Cells Int.* **2021**, 8284690. <https://doi.org/10.1155/2021/8284690> (2021).
- Rezaei, H. B., Kamato, D., Ansari, G., Osman, N. & Little, P. J. Cell biology of Smad2/3 linker region phosphorylation in vascular smooth muscle. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **39**(8), 661–667. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.2011.05592.x> (2012).
- Kretzschmar, M., Doody, J., Timokhina, I. & Massagué, J. A mechanism of repression of TGFbeta1/ Smad signaling by oncogenic Ras. *Genes Development* **13**(7), 804–816. <https://doi.org/10.1101/gad.13.7.804> (1999).
- Matsuzaki, K. Smad phosphoisoform signaling specificity: The right place at the right time. *Carcinogenesis* **32**(11), 1578–1588. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgr172> (2011).
- Kamato, D. *et al.* Smad linker region phosphorylation is a signalling pathway in its own right and not only a modulator of canonical TGF- β signalling. *Cell. Mol. Life Sci.* **77**(2), 243–251. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03266-3> (2020).
- Ji, H. *et al.* Rho/Rock cross-talks with transforming growth factor- β /Smad pathway participates in lung fibroblast-myofibroblast differentiation. *Biomed. Rep.* **2**(6), 787–792. <https://doi.org/10.3892/br.2014.323> (2014).
- Kamaraju, A. K. & Roberts, A. B. Role of Rho/ROCK and p38 MAP kinase pathways in transforming growth factor-beta-mediated Smad-dependent growth inhibition of human breast carcinoma cells in vivo. *J. Biol. Chem.* **280**(2), 1024–1036. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403960200> (2005).
- Kamato, D. & Little, P. J. Smad2 linker region phosphorylation is an autonomous cell signalling pathway: Implications for multiple disease pathologies. *Biomed. Pharmacother.* **124**, 109854. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.109854> (2020).
- Li, Y. *et al.* Transforming growth factor- β signalling pathway in tendon healing. *Growth Factors (Chur, Switzerland)* **40**(3–4), 98–107. <https://doi.org/10.1080/08977194.2022.2082294> (2022).
- Brown, K. A., Pietenpol, J. A. & Moses, H. L. A tale of two proteins: Differential roles and regulation of Smad2 and Smad3 in TGF-beta signaling. *J. Cell. Biochem.* **101**(1), 9–33. <https://doi.org/10.1002/jcb.21255> (2007).
- Roth, S. P., Burk, J., Brehm, W. & Troillet, A. MSC in tendon and joint disease: The context-sensitive link between targets and therapeutic mechanisms. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **10**, 855095. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.855095> (2022).
- Huveneers, S. & Danen, E. H. J. Adhesion signalling—Crosstalk between integrins, Src and Rho. *J. Cell Sci.* **122**(Pt 8), 1059–1069. <https://doi.org/10.1242/jcs.039446> (2009).
- Woods, A., Wang, G. & Beier, F. RhoA/ROCK signaling regulates Sox9 expression and actin organization during chondrogenesis. *J. Biol. Chem.* **280**(12), 11626–11634. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409158200> (2005).
- Browne, J. A., Liu, X., Schnaper, H. W. & Hayashida, T. Serine-204 in the linker region of Smad3 mediates the collagen-I response to TGF- β in a cell phenotype-specific manner. *Exp. Cell Res.* **319**(19), 2928–2937. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.07.013> (2013).
- Berthet, E. *et al.* Smad3 binds Scleraxis and Mohawk and regulates tendon matrix organization. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* **31**(9), 1475–1483. <https://doi.org/10.1002/jor.22382> (2013).
- Katzel, E. B. *et al.* Impact of Smad3 loss of function on scarring and adhesion formation during tendon healing. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* **29**(5), 684–693. <https://doi.org/10.1002/jor.21235> (2011).
- Furumatsu, T., Tsuda, M., Taniguchi, N., Tajima, Y. & Asahara, H. Smad3 induces chondrogenesis through the activation of SOX9 via CREB-binding protein/p300 recruitment. *J. Biol. Chem.* **280**(9), 8343–8350. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413913200> (2005).
- Alliston, T., Choy, L., Ducy, P., Karsenty, G. & Derynck, R. TGF-beta-induced repression of CBFA1 by Smad3 decreases cbfa1 and osteocalcin expression and inhibits osteoblast differentiation. *EMBO J.* **20**(9), 2254–2272. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.9.2254> (2001).
- Sharma, R. I. & Snedeker, J. G. Biochemical and biomechanical gradients for directed bone marrow stromal cell differentiation toward tendon and bone. *Biomaterials* **31**(30), 7695–7704. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.06.046> (2010).
- Kuo, C. K. & Tuan, R. S. Mechanoactive tenogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng. Part A* **14**(10), 1615–1627. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2006.0415> (2008).

33. Kishore, V., Bullock, W., Sun, X., van Dyke, W. S. & Akkus, O. Tenogenic differentiation of human MSCs induced by the topography of electrochemically aligned collagen threads. *Biomaterials* **33**(7), 2137–2144. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.11.066> (2012).
34. Barsby, T., Bavin, E. P. & Guest, D. J. Three-dimensional culture and transforming growth factor beta3 synergistically promote tenogenic differentiation of equine embryo-derived stem cells. *Tissue Eng. Part A* **20**(19–20), 2604–2613. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2013.0457> (2014).
35. Khyrul, W. A. K. M., LaLonde, D. P., Brown, M. C., Levinson, H. & Turner, C. E. The integrin-linked kinase regulates cell morphology and motility in a rho-associated kinase-dependent manner. *J. Biol. Chem.* **279**(52), 54131–54139. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410051200> (2004).
36. Hong, H., McCullough, C. M. & Stegemann, J. P. The role of ERK signaling in protein hydrogel remodeling by vascular smooth muscle cells. *Biomaterials* **28**(26), 3824–3833. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.05.007> (2007).
37. Peng, Y. *et al.* ROCK isoforms differentially modulate cancer cell motility by mechanosensing the substrate stiffness. *Acta Biomaterialia* **88**, 86–101. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.02.015> (2019).
38. Yi, B., Xu, Q. & Liu, W. An overview of substrate stiffness guided cellular response and its applications in tissue regeneration. *Bioactive Mater.* **15**, 82–102. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.12.005> (2022).
39. Franke, K. *et al.* Topologically defined composites of collagen types I and V as in vitro cell culture scaffolds. *Acta Biomaterialia* **10**(6), 2693–2702 (2014).
40. Vogel, S. *et al.* Remodeling of three-dimensional collagen I matrices by human bone marrow stromal cells during osteogenic differentiation in vitro. *ACS Appl. Bio Mater.* **3**(10), 6967–6978 (2020).
41. Sheng, R., *et al.* Material Stiffness in Cooperation with Macrophage Paracrine Signals Determines the Tenogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Advanced science (Weinheim, Baden-Wuerttemberg, Germany)*, e2206814. <https://doi.org/10.1002/adv.202206814> (2023).
42. Liu, C. *et al.* Matrix stiffness regulates the differentiation of tendon-derived stem cells through FAK-ERK1/2 activation. *Exp. Cell Res.* **373**(1–2), 62–70. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2018.08.023> (2018).
43. Hou, Y. *et al.* Nonwoven-based gelatin/polycaprolactone membrane loaded with ERK inhibitor U0126 for treatment of tendon defects. *Stem Cell Res. Ther.* **13**(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02679-x> (2022).
44. Burch, M. L., Zheng, W. & Little, P. J. Smad linker region phosphorylation in the regulation of extracellular matrix synthesis. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **68**(1), 97–107. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0514-4> (2011).
45. Hough, C., Radu, M. & Doré, J. J. E. Tgf-beta induced Erk phosphorylation of smad linker region regulates smad signaling. *PLoS One* **7**(8), e42513. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042513> (2012).
46. Shih, Y.-R.V., Tseng, K.-F., Lai, H.-Y., Lin, C.-H. & Lee, O. K. Matrix stiffness regulation of integrin-mediated mechanotransduction during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J. Bone Miner. Res.* **26**(4), 730–738. <https://doi.org/10.1002/jbmr.278> (2011).
47. Schubert, S., Brehm, W., Hillmann, A., Burk, J. (2018) Serum-free human MSC medium supports consistency in human but not in equine adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cell culture. *Cytometry Part A J. Int. Soc. Analyt. Cytol.* **93**(1), 60–72. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23240>.
48. Dominici, M., *et al.* (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. **8**(4), 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>.
49. Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**(9), e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45> (2001).

Acknowledgements

The Authors acknowledge Prof. Dr. Geyer, Institute of Pharmacology and Toxicology, Justus-Liebig-University, for providing the microscope.

Author contributions

MM created the study design, conducted the study, performed the statistical analysis, and wrote the first draft of the manuscript. JB and SN contributed to the conception and design of the study and wrote parts of the manuscript. GSB and MH supported the development, conduction, and evaluation of Western blot analysis (GSB) and knockout cells (MH). TP and FU provided the technique of collagen matrix production. All authors contributed to revising the manuscript, reading and approving the submitted version.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-024-60717-z>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to J.B.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

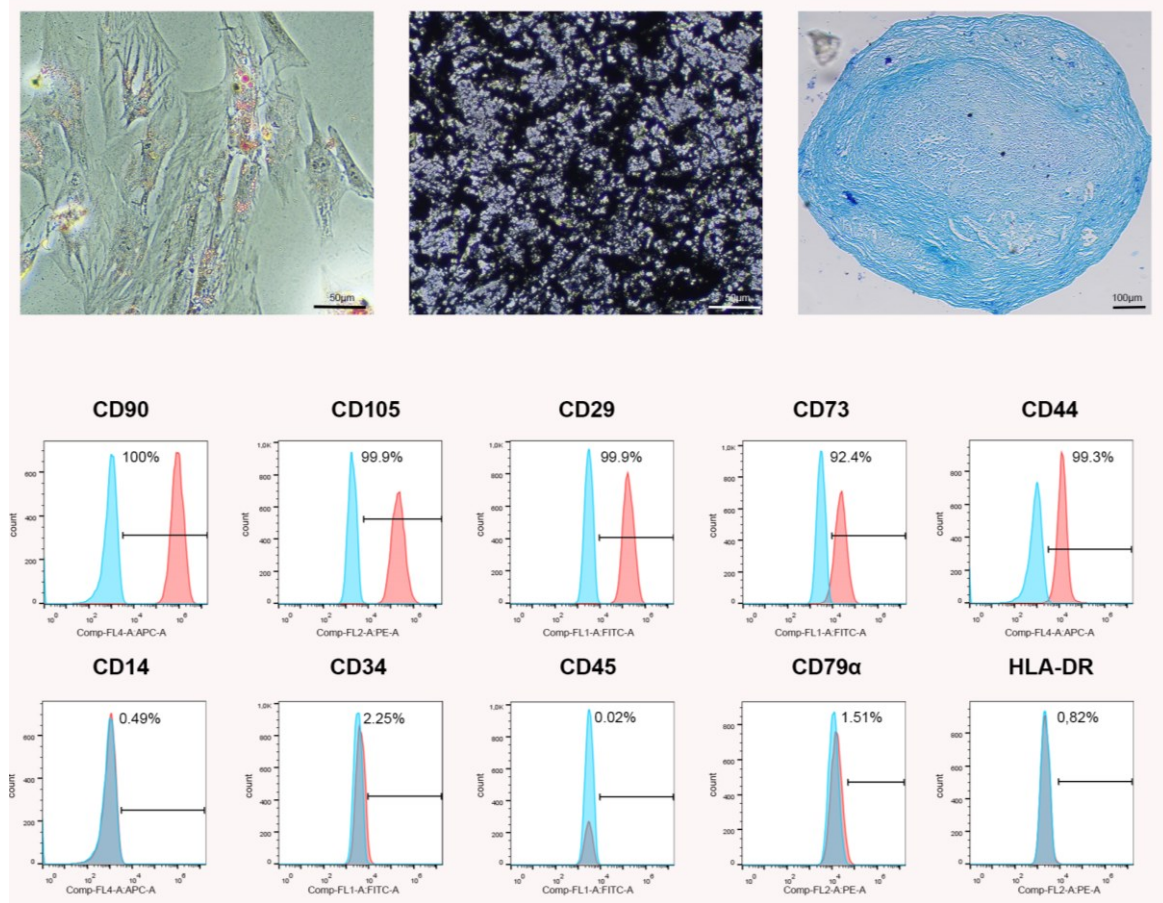
Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

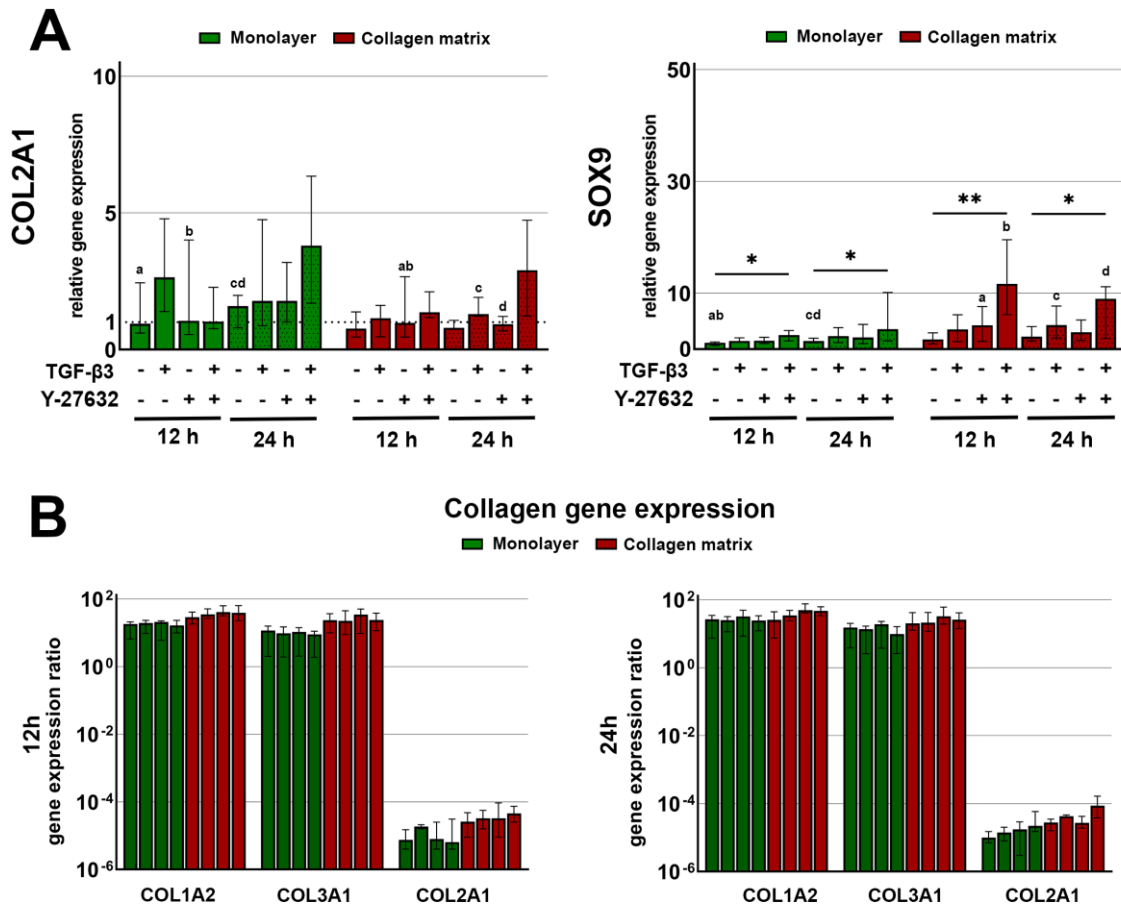
© The Author(s) 2024

Supplementary Material



Supplementary Figure 1

Trilineage differentiation and surface marker expression. Representative images show adipogenic, osteogenic and chondrogenic differentiation after oil red O, von Kossa and Alcian blue staining, respectively. The histograms display the surface antigen expression as determined by flow cytometry in a representative sample (blue: isotype control; red: respective antibody staining).



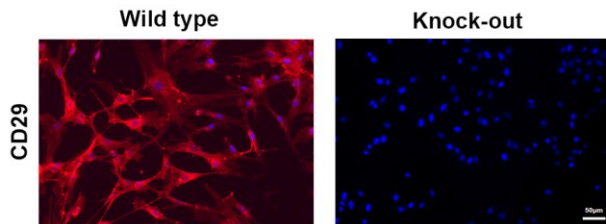
Supplementary Figure 2

Gene expression of the chondrogenic markers COL2A1 and SOX9 (A). Cells cultured on monolayer or collagen matrix were incubated with 10 ng/ml TGF- β 3 and/or 10 μ M Y-27632 for 12 h and 24 h. Asterisks mark differences between the stimulation groups with $p < 0.05$. Letters mark differences with $p < 0.05$ between collagen matrix and monolayer within same stimulation groups or in comparison to monolayer control ($n = 4$). (B) Gene expression ratios of COL1A2, COL3A1 and COL2A1, demonstrating the negligible expression levels of COL2A1 as compared to the other collagen types. For the gene expression ratio, the target gene was normalized to the correlating housekeeping genes to allow comparability of the expression levels between the different genes. The groups have the following order control, TGF- β 3, Y-27632, TGF- β 3 + Y-27632.

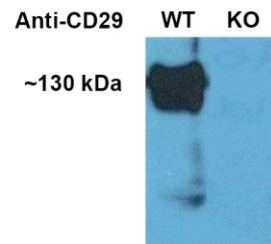
Sequencing data

```
ITGB1-WT   AAATCATGTGGAGAATGTATACAAGCAGGGCCAAA- - TTGTGGGTGGTGCACAAATTCAG
ITGB1-KO.1 AAATCATGTGGAGAATGTATACAAGCAGGGCCAAAATTGTGGGTGGCGCACAAATTCAG
ITGB1-KO.2 AAATCATGTGGAGAATGTATACAAGCAGGGCCAAAATTGTGGGTGGTGCACAAATTCAG
ITGB1-KO.3 AAATCATGTGGAGAATGTATACAAGCAGGGCCAAAATTGTGGGTGGTGCACAAATTCAG
```

Immunofluorescence



Western Blot



Supplementary Figure 3

CD29^{-/-} knockout cells. The knockout of CD29 was tested by gene sequencing, immunofluorescence and western blot. Representative images and target sequences of the cell clone chosen for the experiments.

Publikationen

Antigen	Clone	Reactivity	Species	Isotype	Company	Dilution	Fluorophore
CD90	5E10	human	mouse	IgG1	BD	1:100	APC
CD105	SN6	human	mouse	IgG1	Serotec	1:50	PE
CD73	606112	human	mouse	IgG2b	R&D	1:40	Alexa488
CD44	IM7	rat	rat	IgG2b	BD	1:400	APC
CD29	TS2/16	human	mouse	IgG1	Biolegend	1:100	Alexa488
CD45	F10-89-4	human	mouse	IgG2a	Serotec	1:400	Alexa488
CD34	43A1	human	mouse	IgG3	Santa Cruz	1:100	FITC
CD14	134620	human	mouse	IgG1	R&D	1:100	APC
CD79 α	HM57	human	mouse	IgG1	Serotec	1:10	PE
HLA-DR	L243	human	mouse	IgG2a	Biolegend	1:25	-
	sec. ab	mouse	rabbit		Serotec	1:25	PE

Supplementary Table 1

Monoclonal antibodies used for immunophenotyping.

5 Diskussion

5.1 Reflexion der verwendeten Methoden

In der ersten Studie wurde der Einfluss des Rho/ROCK-Signalweges auf die TGF- β 3-induzierte tenogene Differenzierung bei humanen und equinen MSC identifiziert und verglichen. Anschließend wurden in der zweiten Studie Smad2 und 3 als mögliche Interaktionsstellen zwischen den beiden Signalwegen näher beleuchtet und deren Phosphorylierungsstellen untersucht. Für den ersten Teil der Arbeit wurde ein equines Sehnenläsionsmodell verwendet. Obwohl das Pferd aufgrund von hohen Haltung- und Fütterungskosten zu den kostspieligsten Versuchstieren zählt, wird es häufig als präklinisches Modell für die humane Forschung im Bereich orthopädischer Erkrankungen, insbesondere für Gelenks- und Sehnenerkrankungen, verwendet (Ribitsch et al. 2020). Hintergrund hierfür ist die hohe Ähnlichkeit in der Pathophysiologie von Sehnen- und Gelenkerkrankungen, sowie der biomechanischen Eigenschaften und der zellulären Strukturen zwischen Pferd und Menschen. Die oberflächliche Beugesehne des Pferdes entspricht funktionell der menschlichen Achillessehne. Beide spielen eine Schlüsselrolle im Energiespeichersystem bei Hochgeschwindigkeitsübungen und können trainings- und altersbedingte Mikroschäden aufweisen, die bei anstrengenden Aktivitäten zu Rissen führen können (Patterson-Kane et al. 2012). Auch für die Osteoarthritis-Forschung ist das Pferd ein geeignetes Modell, da die Dicke seines Knie-Knorpels der des Menschen sehr ähnlich ist (McCoy 2015). Demnach ist es von besonderer Bedeutung die Funktionen und Wirkungen von MSC punktuell zwischen den Spezies zu vergleichen. Zeigt man hierbei, dass Reaktionen und Funktionen von MSC speziesübergreifend ähnlich sind, verbessert dies die Translation von Erkenntnissen zwischen den Spezies. Konkret lässt die in der ersten Studie festgestellte vergleichbare Reaktion der equinen und humanen MSC vermuten, dass die in der zweiten Studie beobachtete Regulation des Smad2/3 in humanen MSC teilweise auf equine MSC übertragen werden kann.

Die für die Zellkultur verwendeten MSC wurden aus subkutanem Fettgewebe gewonnen, welches zusammen mit Knochenmark die am häufigsten verwendete MSC-Ressource für die klinische Anwendung ist. Allerdings hat das Fettgewebe einige Vorteile: Es ist gute verfügbar, kann minimalinvasiv gewonnen werden und erzielt eine hohe Zellausbeute (Li C. et al. 2015). Die Auswahl der verwendeten Spender erfolgte nach Alter der Probanden und deren Verfügbarkeit, da Studien in verschiedenen

Spezies zeigten, dass das Alter der wichtigste Faktor für die Funktion der Zellen und die Vergleichbarkeit von Spendern ist. In diesen Studien wurden MSC auf ihre Oberflächenmarker, Funktionalität, sowie Proliferations- und Differenzierungsfähigkeit in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht bei Menschen, Mäusen und Schweinen untersucht (Katsara et al. 2011, Fossett et al. 2012, Ock et al. 2016). Es wurde nachgewiesen, dass sich ein steigendes Alter des Spenders negativ auf die isolierten MSC auswirkt. So wurde bei MSC von alten Spendern eine verminderte Wachstumsrate sowie ein reduziertes osteogenes und chondrogenes Potenzial von AMSC nachgewiesen (Choudhery et al. 2014). Um den negativen Effekt höheren Alters und dadurch mögliche Unterschiede zu vermeiden wurden sowohl für die humanen MSC als auch die equinen MSC Spender mittleren Alters ausgewählt. Weitere Studien zum Geschlechtervergleich lassen vermuten, dass das Geschlecht keinen signifikanten Einfluss auf die Funktion und Differenzierungsfähigkeit der MSC hat (Fossett et al. 2012, Ock et al. 2016).

In beiden Studien wurde die übliche Monolayer-Kultivierung auf einer Plastikoberfläche mit einem 3D-Zellkulturmodell verglichen. Ziel dieses Vergleiches war es den Einfluss der extrazellulären Matrix, mit ihrer 3D-Struktur, der Faserausrichtung und der Matrixproteinzusammensetzung, auf den TGF- β -Signalweg der MSC zu untersuchen und den Rho/ROCK-Signalweg als möglichen Vermittler dieser Interaktion zu identifizieren. Die Monolayer-Kultur diente hierbei als Vergleichskontrolle. Diese ist eine weitverbreitete Methode, um MSC zu isolieren und für spätere therapeutische Zwecke zu vermehren, da sie einfach, kostengünstig und leicht zu handhaben ist (Mizukami & Swiech 2018). Allerdings weist diese Methode einige Nachteile auf, da die Zellen maßgeblich durch ihre Umgebung beeinflusst werden. In 2D-Kultur gezüchtete MSC zeigen häufig eine veränderte Zellmorphologie, die wiederum viele zelluläre Prozesse, darunter Zellproliferation, Differenzierung, Apoptose sowie Gen- und Proteinexpression beeinflusst (Yin et al. 2020, He et al. 2020). Infolgedessen verhalten sich in 2D-Kultur gezüchtete MSC möglicherweise nicht so, wie sie sich in vivo verhalten würden, da das Zellkulturmodell die Mikroumgebung nicht angemessen nachahmt. Aufgrund dessen spielt die Auswahl der verwendeten 3D-Zellkultur-Modelle eine entscheidende Rolle. Derzeit werden mehrere Scaffolds, die synthetisch, biologisch oder biosynthetisch sind, im Tissue Engineering verwendet (Ning et al. 2023). Um zuverlässige Aussagen über den Einfluss der natürlichen Sehne auf MSC machen zu können, sollten die in vitro verwendeten Scaffolds die biomechanischen

und biochemischen Eigenschaften der nativen Gewebestruktur nachahmen. Hierfür sollte ein Sehnenscaffold spezifische biologische Eigenschaften, wie einen hohen Kollagen-I-Gehalt, eine hierarchische Faserstruktur, eine gute Zellanhaftung sowie angemessene mechanische Eigenschaften besitzen. Für die erste Studie wurde ein equines dezellularisiertes Sehnenscaffold ausgewählt, welches bereits in mehreren früheren Studien entwickelt und charakterisiert wurde (Burk et al. 2016a, Brandt et al. 2018, Roth et al. 2017). Die Verwendung eines vollständigen dezellularisierten EZM-Gerüsts (dEZM) wird als beste Option für die Reproduktion der Mikroumgebung des Sehengewebes angesehen, da die ursprünglichen biochemischen und biomechanischen Gewebeeigenschaften größtenteils erhalten bleiben (Youngstrom et al. 2013, Ning et al. 2015, Pridgen et al. 2011). Synthetische Scaffolds im Gegenzug konnten die native Sehnenmatrix bisher nur teilweise nachahmen. Die Auswirkungen verdeutlichte eine In-vitro-Studie, in der die Zugabe von Sehnen-EZM zu einem Hydrogel die tenogene Differenzierung von AMSC im Vergleich zu einem Hydrogel ohne EZM steigerte (Yang et al. 2013). Die dEZM fördert das Zellwachstum, die Gewebekonstruktion und unterstützt die Regeneration (Farnebo et al. 2014). Ein weiterer Vorteil sind die sogenannten Memorymoleküle, die in der dEZM enthalten sind und die gewünschte Differenzierungsrichtung fördern. So zeigten MSC auf einer aus Sehnen Gewebe gewonnenen dEZM eine deutlich bessere tenogene Differenzierung im Vergleich zu MSC auf einer aus Knochen oder Hautgewebe gewonnenen dEZM (Yin et al. 2013). Im Einklang mit diesen Ergebnissen erwies sich das dezellularisierte Sehnenscaffold in zahlreichen weiteren Studien als ein geeignetes Modell für die Untersuchung der tenogenen Differenzierung von equinen (Durgam et al. 2012, Burk et al. 2016a, Roth et al. 2019), humanen (Yin et al. 2013, Wang et al. 2020, Rao et al. 2022) und murinen MSC (Ning et al. 2015). Auch als Sehnenersatz für In-vivo-Anwendungen steht die dEZM im Fokus der Forschung, da sie neben ihren funktionellen Vorteilen auch eine sehr gute Biokompatibilität und geringe Immunogenität besitzt (Luo et al. 2023, De Castilho et al. 2024). Ein Nachteil dieses Kulturmodells ist jedoch die mangelnde Standardisierbarkeit, da die Qualität und Komposition der Scaffolds stets spenderabhängig ist. Hinzu kommt, dass in der vorliegenden Arbeit equine Sehnenscaffolds sowohl für humane als auch equine MSC verwendet wurden. Fraglich hierbei bleibt, ob dies zu einer besseren Vergleichbarkeit aufgrund eines gleichartigen Scaffolds oder zu funktionellen Unterschieden führte, da die humanen MSC im Gegensatz zu equinen MSC auf xenogenen Sehnenscaffolds

angesiedelt wurden. Die Frage, ob die Xenogenität des biologischen Scaffoldmaterials einen entscheidenden Einfluss hat, stellt sich auch für die in der zweiten Studie verwendete Kollagenmatrix, da hierfür Kollagen I aus Rattenschwänzen genutzt wurde.

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Moleküle, aus denen die EZM besteht, bei Säugetieren sehr stark konserviert sind (Constantinou and Jimenez 1991). Nichtsdestotrotz zeigen Studien ebenfalls, dass es durchaus biochemische Unterschiede zwischen den Spezies gibt (Baltazar et al. 2022), die einen Einfluss auf die EZM-Zell-Interaktion haben können. Einige Studien haben angestrebt die Zellreaktion zwischen allogenen und xenogenen Scaffolds zu vergleichen (Ali et al. 2022, Armour et al. 2006, Johnson et al. 2014, Azab und Youssef 2021). In einer Studie mit humanen und porcinen azellulären Scaffolds proliferierten humane Fibroblasten besser auf dem porcinen Scaffold, zeigten dafür jedoch eine schlechtere Infiltration des Scaffolds als auf humanem Gewebe (Armour et al. 2006). Bei einem Vergleich von Kollagen-Hydrogelen hingegen reagierten die Zellen auf murinem und humanen Kollagen ähnlich auf eine Behandlung mit Chemotherapeutika und wiesen eine vergleichbare Proliferations- und Vitalitätsrate auf (Baltazar et al. 2022). Allerdings war dies abhängig davon, mit welchem humanen Kollagen ein Vergleich gezogen wurde. Abhängig von der Ressource des humanen Kollagens konnten auch hier Unterschiede festgestellt werden. So verhielten sich Zellen auf Kollagen, das aus Rattenschwänzen extrahiert wurde, ähnlich zu Zellen auf humanem dermale Kollagen, zeigten aber deutliche Unterschiede zu Zellen auf humanem plazentarem Kollagen (Baltazar et al. 2022). Leider existieren bisher keine Studien, die die Auswirkungen von allogenen und xenogenen Scaffolds auf die MSC-Differenzierung untersuchen.

Neben dem wissenschaftlichen Nutzen müssen bei der Verwendung von humanem Gewebe Probleme wie ethische Bedenken, die begrenzte Verfügbarkeit und das Risiko der Krankheitsübertragung bei In-vivo-Anwendungen mit Vorsicht betrachtet werden. Darüber hinaus würde die Qualität der Sehnenmatrix einer weitaus höheren Spendervariabilität durch das Alter des Spenders, die anatomische Lage und die Belastungsgeschichte unterliegen. Bereits in Tieren konnte gezeigt werden, dass die Gewebe-EZM der gleichen Tierart je nach Alter und Geschlecht Unterschiede aufweist. Das Alter des Gewebespenders beeinflusst nicht nur die mechanischen Eigenschaften der EZM, sondern auch, was noch wichtiger ist, die Zusammensetzung

der enthaltenen Proteine (Tottey et al. 2011, Silva et al. 2016, Smith et al. 2017). Beispielsweise wurde festgestellt, dass der Gehalt an Kollagen, Elastin, Glykosaminoglykanen (Wang et al. 2019) und Wachstumsfaktoren (Tottey et al. 2011) mit dem Alter abnimmt, während die Anzahl an Quervernetzungen im Alter zunimmt (Tottey et al. 2011). Die Verwendung von Tieren als Gewebsressource hat daher mehrere Vorteile und die xenogene EZM-Scaffolds werden vermehrt in der Forschung und klinischen Anwendung eingesetzt. Durch kontrollierte Züchtung, Haltung und Tötung der Tiere können Einflussfaktoren wie Genetik, Gesundheit und Alter der Spender besser kontrolliert werden. Hierbei werden Gewebe von Schweinen, Ratten und Rindern aufgrund ihrer guten Verfügbarkeit am häufigsten für die Herstellung von dEZM verwendet (Isaeva et al. 2022). Allerdings können auch Pferde, Schafe, Kaninchen und Hunde als Spendertiere in Betracht gezogen werden (Lovati et al. 2016). Die endgültige Tierart, die das Gewebe für das xenogene Scaffold liefert, sollte anhand der experimentellen oder klinischen Fragestellung entschieden werden. Die Verwendung der equinen oberflächlichen Beugesehne als Scaffold hat wie bereits erwähnt den Vorteil, dass sie der humanen Achillessehne in ihren strukturellen und funktionellen Eigenschaften am ähnlichsten ist (Patterson-Kane et al. 2012). Hinzukommt, dass die equinen Sehnen eine angemessene Größe haben, aus Schlachtabfällen gewonnen werden und für spätere In-vivo-Anwendungen ein geringes Risiko zur Übertragung von Zoonosen aufweisen. Darüber hinaus können die Erkenntnisse und Entwicklung eines aus Pferden gewonnenen Gewebeersatzes auch bei der Rekonstruktion von Sehnenverletzungen bei Pferden eingesetzt werden und somit sowohl für die veterinärmedizinische als auch die humanmedizinische Forschung von Nutzen sein. Jedoch kann die Möglichkeit, dass es zu Unterschieden zwischen Kulturen von humanen MSC auf equinen und humanen Gewebe kommt, aktuell aufgrund der Studienlage nicht ausgeschlossen werden.

Die in der zweiten Studie verwendete Kollagenmatrix wurde von der Arbeitsgruppe unter Prof. Tilo Pompe, Universität Leipzig, entwickelt und charakterisiert (Franke et al. 2014, Vogel et al. 2020). Durch Einstellung der Kollagenkonzentration, der Phosphatpufferzusammensetzung und der Fibrillierungszeit konnte die Steifigkeit, Porengröße und Fibrillendicke bestimmt werden, wodurch eine gute Standardisierung möglich war. Ziel der zweiten Studie war es den TGF- β /Smad2/3-Signalweg und dessen Interaktion mit dem Rho/Rock-Signalweg auf Proteinebene näher zu beleuchten und die Smad2 und 3 Phosphorylierungsstellen zu untersuchen. Hierfür

stellt die Kollagenmatrix ein geeignetes Zellkulturmodell dar, da es die notwendige Schlichtheit für die Methodik und wichtige Aspekte zur Nachahmung der nativen Sehnenmatrix mitbringt. Kollagen I ist der Hauptbestandteil der Sehnenmatrix und somit der wichtigste biochemische EZM-Faktor. In anderen Studien wurde bereits gezeigt, dass die Kollagenmatrix ein zuverlässiges Modell zur Untersuchung der tenogenen Differenzierung ist (Sharma et al. 2010, Kuo & Tuan 2008, Kishore et al. 2012). In all diesen Studien wurde ebenfalls xenogenes Kollagen zur Herstellung der Matrix verwendet. Aufgrund der ähnlichen Ergebnisse dieser Studien und einer Studie, die eine Analogie der Zellfunktion auf humanem und murinem Kollagen nachwies (Baltazar et al. 2022), kann davon ausgegangen werden, dass auch die Ergebnisse dieser Studie übertragbar sind. Das Auftreten von geringen Unterschieden kann jedoch nicht komplett ausgeschlossen werden. Zudem unterliegt die Verwendung der Kollagenmatrix zur Untersuchung der tenogenen Differenzierung auch einigen Limitationen. Verglichen zur natürlichen Sehnenmatrix fehlt es an einer parallel ausgerichteten Faserstruktur, einer heterogenen Proteinzusammensetzung, der adäquaten Steifigkeit und anderen biomechanischen Eigenschaften. Diese Limitationen könnten in künftigen Studien, insbesondere wenn zusätzliche Signalwege, wie der FAK/ERK1/2-Signalweg, mit untersucht werden sollen, durch biochemische Methoden zur Beeinflussung der Steifigkeit, Faserdicke und Faserausrichtung überwunden werden.

TGF- β 3 ist ein zuverlässiger Auslöser der tenogenen Differenzierung (Roth et al. 2018, Barsby & Guest 2013), dessen positiver Effekt in zahlreichen Studien gezeigt wurde. Im Vergleich zu TGF- β 1 und 2 weist TGF- β 3 eine bessere tenogene Wirkung und ein geringeres Risiko für Fibrose auf (Chan et al. 2008, Ask et al. 2008). Im Gegensatz zu TGF- β 1, dem eine starke profibrotische Eigenschaft zugesprochen wird, weisen Studien mit TGF- β 3 eher auf eine antifibrotische Wirkung hin (Chan et al. 2008). Aufgrund dieser Ergebnisse und der besseren tenogenen Wirkung fiel die Wahl in der vorliegenden Studie auf TGF- β 3. Die Konzentration von 10 ng/ml wurde basierend auf früheren Studien der Arbeitsgruppe ausgewählt (Roth et al. 2018).

Y-27632 ist ein in der Literatur gut beschriebener ROCK-Inhibitor. Er konkurriert mit ATP um seine Bindungsstelle und verursacht so eine reversible kompetitive Hemmung der ROCK-Aktivität. Infolgedessen kommt es nachweislich zu einer Reduzierung der Myosin-Leichtketten-Phosphorylierung und der Stressfaser-Formation (Ishizaki et al.

2000, Narumiya et al. 2000). Daher stellen die Färbung des Aktinzytoskeletts mittels Phalloidin und die Messung der phosphorylierten Myosin-Leichtketten mittels Western Blot Analyse geeignete Methoden zum Nachweis der Wirksamkeit des Inhibitors dar. Zur Bestimmung einer geeigneten Konzentration wurde die verfügbare Literatur herangezogen und basierend hierauf eigene Voruntersuchungen durch die Arbeitsgruppe durchgeführt. In der Literatur wurden Konzentrationen von 5 μM , 10 μM und 20 μM am häufigsten für Experimente mit Stammzellen verwendet (Bueno et al. 2010, Maharam et al. 2015, Xu B. et al. 2012, Odusanya 2022). Hierbei wurden signifikante Auswirkungen meist ab 10 μM erreicht und höhere Konzentrationen von 20 μM führten gelegentlich zu einer Reduzierung der gewünschten Zellreaktionen (Lamas et al. 2015, Claassen et al. 2009, Gauthaman et al. 2010). In den innerhalb der Arbeitsgruppe durchgeführten eigenen Vorversuchen mit verschiedenen Konzentrationen (5 μM , 10 μM , 20 μM) erwies sich eine Konzentration von 10 μM als effektiv, da sie zu einer Zerstörung des Zytoskeletts führte und diese für bis zu 72 Stunden aufrechterhielt, ohne einen signifikanten Einfluss auf die Proliferation zu haben. Da einige Studien Y-27632 als proliferationsfördernd für embryonale und mesenchymale Stammzellen beschreiben (Claassen et al. 2009, Gauthaman et al. 2010), wurde in einer eigenen unabhängigen Studie der Einfluss von 10 μM Y-27632 auf equine AMSC und BMSC hinsichtlich ihrer Proliferation nochmals untersucht. Diese Studie bestätigte den in den Vorversuchen beobachteten nicht signifikanten Einfluss auf die Proliferation (Melzer et al. 2023). Auch andere Studien, die den Rho/ROCK-Signalweg im Zusammenhang mit der Differenzierung von MSC untersucht haben, verwendeten eine Konzentration von 10 μM (Maharam et al. 2015, Xu B. et al. 2012). Unterschiedliche Ergebnisse aufgrund verschiedener Inhibitor Konzentrationen können somit ausgeschlossen werden.

Allerdings deutete die qualitative Auswertung des Zytoskeletts in der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass es bei humanen MSC nach 72 Stunden bereits zu einer beginnenden Reorganisation des Zytoskeletts kam und demzufolge die ROCK-Hemmung anscheinend bereits nachließ, während bei equinen MSC die Zerstörung des Zytoskeletts hingegen noch deutlich sichtbar war. Dies spricht in erster Linie für eine spezies-bedingte unterschiedlich schnelle Verstoffwechslung des Y-27632, die die Ergebnisse insbesondere nach 72 Stunden beeinflussen und die Vergleichbarkeit einschränken könnte. Dass die Pharmakodynamik von Y-27632 temperatur- und konzentrationsabhängig ist, wurde bereits in Zelllinien nachgewiesen (Ishizaki et al.

2000, Narumiya et al. 2000). Zu einer spezies-abhängigen Pharmakodynamik gibt es jedoch bisher keine Erkenntnisse. Daher sollte dieser Aspekt für künftige Studien berücksichtigt werden und eine zeitliche Überwachung der Y-27632-Wirksamkeit immer parallel zur Erhebung der Zielparameter erfolgen.

5.2 Reflexion der Ergebnisse

5.2.1 Beeinflussung der TGF- β -induzierten tenogenen Differenzierung durch extrazelluläre Matrix und ROCK-Hemmung

Die vorliegende Arbeit untersuchte die Wechselwirkung zwischen dem Rho/ROCK- und dem TGF- β /Smad-Signalweg im Zusammenhang mit der frühen tenogenen Differenzierung in MSC. Wie zu erwarten konnte gezeigt werden, dass die Kultivierung der MSC auf 3D-Scaffolds, sei es ein natürliches Sehnen-scaffold oder eine Kollagen-I-Matrix, die tenogene Differenzierung förderte. Obwohl diese Ergebnisse einen synergistischen Effekt der ROCK-Aktivität und TGF- β 3-Stimulation auf die Tenogenese erwarten ließen, wurde interessanterweise beobachtet, dass entgegen dieser Annahme die Hemmung von ROCK die TGF- β 3-induzierte tenogene Differenzierung förderte.

Der TGF- β - und der Rho/ROCK-Signalweg spielen eine wichtige Rolle für das Regenerationspotenzial von MSC und ihre Anpassung an die Umgebung und in anderen Zusammenhängen wurde eine Wechselwirkung zwischen den beiden Signalwegen bereits nachgewiesen (Ji et al. 2014, Kamaraju & Roberts 2005). Die in der vorliegenden Arbeit festgestellte tenogene Wirkung von TGF- β 3 zeigte sich auch in anderen Studien. So wurde in equinen embryonalen und adulten MSC nachgewiesen, dass TGF- β 3 die Expression von Sehnenmarkern, wie Skleraxis und Mohawk, erhöhte und die Kollagensynthese steigerte (Roth et al. 2018, Barsby & Guest 2013). Hierbei ist der Smad-Signalweg der am häufigsten genutzte Signalweg von TGF- β . Die Aktivierung dieses Weges wurde durch die carboxy-terminale Phosphorylierung und eine Kerntranslokation des Smad2/3 während der Induktion der tenogenen Differenzierung in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen. Dass diese Aktivierung im Zusammenhang mit der tenogenen Wirkung steht, belegte die ebenso gesteigerte Kerntranslokation von Skleraxis nach TGF- β 3-Stimulation. Diese Ergebnisse werden durch andere Studien, die ebenfalls die carboxy-terminale Smad Aktivierung mit gesteigerter Tenogenese in Verbindung bringen, bestätigt (Lorda-Diez et al. 2009, Li et al. 2022, Havis et al. 2016).

Auch die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene tenogene Wirkung der 3D-Scaffolds hat sich als reproduzierbar zu anderen Studien gezeigt (Burk et al. 2016a, Sharma et al. 2010, Kuo & Tuan 2008), ebenso wie der synergistische Effekt bei Kombination von Scaffold und TGF- β (Barsby et al. 2014, Yang et al. 2017). Allerdings war dieser Effekt auf dem dezellularisierten Sehnen-scaffold nur als Tendenz sichtbar, wie es auch bereits eine früheren Studie mit demselben Sehnenmodell zeigte (Roth et al. 2018). Verschiedene Studien und auch die vorliegende Arbeit wiesen eigentlich einen deutlichen synergistischen Effekt von TGF- β mit den einzelnen Komponenten einer EZM, wie Kollagen I (Barsby et al. 2014), gelöster tenogener EZM (Yang et al. 2017) oder Faserstruktur nach (Leung et al. 2013). Demnach muss es eine bisher noch ungeklärte Komponente oder ein Zusammenspiel geben, welche für die reduzierte Synergie verantwortlich sind. Schließlich agieren MSC in hohem Maße kontextabhängig (Brandt et al. 2018, Hillmann et al. 2019, Roth et al. 2022), wodurch sie sich an die lokale extrazelluläre Umgebung anpassen.

Hierbei spielt der Rho/ROCK-Signalweg eine wichtige Rolle, da er topographische und mechanische Reize aus dem extrazellulären Raum erkennt und übermittelt, indem er mittels fokaler Adhäsionen und Integrinen mit der lokalen EZM verbunden ist (Huvencers & Danen 2009). Im Hinblick auf die tenogene Differenzierung wurde der Rho/ROCK-Signalweg bisher als essenziell angesehen (Maharam et al. 2015, Xu B. et al. 2012). Bei der dehnungs- und topographisch-induzierten Tenogenese reduzierte die Hemmung von Rho/ROCK bei humanen BMSC die Expression von tenogenen Markern und die Zellen zeigten eine weniger ausgeprägte Tenozyten-ähnliche Morphologie (Xu B. et al. 2012). Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Beide 3D-Scaffolds zeigten eine vergleichbare tenogene Wirkung in Form von Steigerung der Skleraxis-Expression, die nicht durch eine ROCK-Inhibition aufgehoben wurde. Ganz im Gegenteil wurden sogar Hinweise für eine weitere Förderung der Tenogenese nach ROCK-Hemmung durch gesteigerte Produktion von extrazellulären Matrixproteinen, insbesondere bei humanen MSC, die auf der Kollagenmatrix kultiviert wurden, nachgewiesen. Dieser Effekt könnte im Zusammenhang mit der durch ROCK-Hemmung induzierten verstärkten Kerntranslokation von Skleraxis stehen. Eine mögliche Erklärung für die widersprüchliche Regulierung infolge der ROCK-Hemmung könnte in der Auswahl der verwendeten Scaffolds liegen. Die früheren Studien verwendeten ausschließlich künstliche Scaffolds, die keine natürlichen EZM-Komponenten enthielten (Xu B. et al.

2012, Maharam et al. 2015, Vermeulen et al. 2020), wohingegen die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Scaffolds aus biologischen Sehnenkomponenten, insbesondere Kollagen I, bestanden. Demnach scheint der tenogene Stimulus durch das native Sehnengerüst und die Kollagenmatrix in der vorliegenden Arbeit nicht oder nur teilweise Rho/ROCK-vermittelt zu sein. Dies wurde durch die Beobachtung, dass in der Kollagenmatrix keine erhöhte ROCK-Aktivität gefunden wurde, bestärkt.

Auch bezüglich der TGF- β -vermittelten tenogenen Differenzierung gibt es unterschiedliche Ergebnisse über die Rolle des Rho/ROCK-Signalweges. Bei einer Kombination von TGF- β 2 und Mikro-Topografie wurden synergistische Effekte auf die Skleraxis-Expression nachgewiesen, die durch ROCK-Hemmung verloren gingen (Vermeulen et al. 2020). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit weiteren Studien, in denen ein ähnlich förderlicher Effekt der ROCK-Aktivität auf die TGF- β -Wirkung im Rahmen der chondrogenen oder Lungenfibroblasten-Differenzierung beobachtet wurde (Xu T. et al. 2012, Ji et al. 2014). Konträr hierzu stehen jedoch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, in welcher eine Verstärkung der Smad2/3-Aktivierung und eine wiederholte Unterstützung der Hochregulierung des Sehnenmarkers Skleraxis in Folge von TGF- β -Stimulation kombiniert mit ROCK-Inhibition gezeigt wurde. Demnach scheint die Rho/ROCK-Aktivität die TGF- β 3-induzierte tenogene Differenzierung nicht zu fördern, sondern ihr eher entgegenzuwirken. Obwohl dies vor dem Hintergrund früherer Studien zur tenogenen Differenzierung überraschend erscheint, stimmen die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit mit denen anderer Forscher überein, die ebenfalls einen positiven Effekt der ROCK-Hemmung auf parakrin-induzierte Differenzierungen zeigten. Bei ROCK-Hemmung wurde eine Verstärkung des TGF- β -Signalwegs mit erhöhter Smad-3-Phosphorylierung beobachtet (Rodríguez-Vita et al. 2008), die Differenzierung von MSC in Keratinozyten-ähnlichen Zellen gefördert (Li Z. et al. 2015) und die SOX9-Expression während der chondrogenen Differenzierung erhöht (Woods et al. 2005). Eine Erhöhung der SOX9-Expression wurde auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit als Ergebnis der Kombination von TGF- β 3 und Y-27632 nachgewiesen und könnte auf eine Begünstigung der chondrogenen Differenzierung hindeuten. Da die Expression von Kollagen2A1 jedoch in der hier vorliegenden Studie auf einem geringfügig niedrigen Niveau war, wird davon ausgegangen, dass die biologische Relevanz vernachlässigbar ist.

Eine weitere Beobachtung in der vorliegenden Arbeit war eine stärkere Steigerung der Skleraxis-Expression nach TGF- β 3- und Y-27632-Stimulation bei den humanen MSC in beiden Scaffold-Kulturmodellen verglichen zur Monolayerkultur, welche allerdings auf dem Sehnenscaffold stärker ausgeprägt war als in der Kollagen-Matrix. Da der Rho/ROCK-Signalweg als zentraler Vermittler der EZM-Signale beschrieben wird (Huveneers & Danen 2009), wurde auf Basis dieses in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisses zunächst eine stärkere basale ROCK-Aktivierung in der Scaffold-Umgebung vermutet, die eine stärkere Wirkung der ROCK-Hemmung zur Folge gehabt hätte. Ein solcher Anstieg in der ROCK-Aktivität wurde jedoch nicht quantitativ nachgewiesen, was abweichend zu einer anderen Studie ist, die eine Zunahme der ROCK-Aktivität auf Kollagen feststellte (Peng et al. 2019). Jedoch wurde die ROCK-Aktivität nur auf der Kollagenmatrix untersucht und es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die ROCK-Aktivität sich in den verschiedenen Scaffolds beispielsweise aufgrund der Gewebesteifigkeit unterschiedlich verhält. Die Steifigkeiten der verwendeten Scaffolds wurde nicht gemessen und eine steigende ROCK-Aktivität bei steigender Gewebesteifigkeit bereits nachgewiesen (Peng et al. 2019).

Integrin- β 1 ist ein wichtiger Vermittler für die Bindung an Kollagen I und seine Regulierung des Rho/ROCK-Signalwegs erfolgt über Integrin-verknüpfte Kinasen (Khyrul et al. 2004). Studien zeigten, dass die Zunahme der ROCK-Aktivität auf einer 3D-Kollagenmatrix in Tumorzellen Integrin- β 1-abhängig war (Hong et al. 2007, Peng et al. 2019). Aufgrund dessen wurde für die vorliegende Arbeit ein Integrin-1 β -Knockout Klon entwickelt und dieser im Vergleich zur Wildtyp-Zelle auf seine ROCK-Aktivität untersucht. Entgegen den Erwartungen konnte hierbei jedoch keine Verringerung der ROCK-Aktivität durch Integrin- β 1-Knockout nachgewiesen werden. Demnach scheint die ROCK-Aktivität in MSC nicht Integrin- β 1 abhängig zu sein. Jedoch wurden bei den Knockout Untersuchungen nur MSC eines Spenders verwendet, was die Aussagekraft der Ergebnisse limitiert. Um das Wissen über die ROCK-Aktivität und die Rolle der Integrine in Verbindung mit 3D-Scaffolds zu vertiefen, sind weitere Untersuchungen notwendig.

5.2.2 Signaltransduktion des TGF- β /Smad-Signalweges unter Beeinflussung der extrazellulären Matrix und ROCK-Hemmung

Der kanonische TGF- β -Signalweg ist in der Literatur häufig beschrieben und wurde durch die carboxy-terminale Phosphorylierung und die Translokalisierung von Smad2/3 in den Zellkern in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen. Frühere Studien in anderen Zusammenhängen haben zudem eine Wechselwirkung zwischen Rho/ROCK und dem TGF- β /Smad-Signalweg sowie die Fähigkeit von ROCK, die Linker-Region von Smads zu phosphorylieren und somit deren Aktivität zu regulieren, gezeigt (Ji et al. 2014, Kamaraju & Roberts 2005). Daher beleuchtet die vorliegende Arbeit die Signaltransduktionswege der TGF- β /Smad- und der Rho/ROCK-Achse näher, um die nachgewiesenen Genregulationen besser zu verstehen. Es wurde eine Beeinflussung der Linker-Phosphorylierung des Smad2 durch die Kollagenmatrix und des Smad3 durch ROCK-Hemmung festgestellt, wobei beides nur in einem Teil der Spender beobachtet wurde. Die TGF- β -induzierte carboxy-terminale Phosphorylierung wurde von keiner dieser beiden Komponenten beeinflusst.

Die TGF- β -Stimulation zeigte eine Herunterregulierung der TGFBRII-, nicht aber der TGFBR- und der TGF- β -Expression. Folglich scheint es ein negatives Feedbacksystem zugeben, welches die Wirkung von TGF- β begrenzt. Dies wird durch Ergebnisse anderer Studien unterstützt, die ergaben, dass nur der TGF- β RII eine hohe Affinität zu TGF- β hat, während der TGF- β RI die nachgeschaltete Signalgebung nur nach der Bildung eines heteromeren Komplexes zwischen TGF- β und TGF- β RII unterstützt (Derynck & Budi 2019). Eine negative Feedbackregulation zeigte sich ebenfalls bei der Smad3-Genexpression, was für Smad3 als Hauptakteur der TGF- β -Signalübertragung spricht. Die Schlüsselrolle von Smad3 bei der Tenogenese wurde bereits in früheren Studien in Smad3^{-/-}-Mausmodellen nachgewiesen. Hier bindet Smad3 an Mohawk und Skleraxis und beeinflusst dadurch vermutlich die Differenzierung (Berthet et al. 2013). Die Smad3^{-/-}-Mäuse wiesen eine reduzierte embryonale Sehnenbildung auf, was zu einer schlechteren Faserstruktur und einer geringeren Belastbarkeit der Sehne im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen führte (Berthet et al. 2013). Im Gegensatz dazu brachte eine andere Studie die Smad3-Signalübertragung mit Fibrose in Verbindung und zeigte eine geringere Narbenbildung während der Sehnenheilung bei Smad3^{-/-}-Mäusen, allerdings auf Kosten einer insgesamt verminderten Sehnenheilung (Katzel et al. 2011). Ähnlich unterschiedliche Ergebnisse wurden auch bei anderen Differenzierungsrichtungen beobachtet.

Während der Chondrozytendifferenzierung band Smad3 an Sox9 und förderte somit die chondrogene Genexpression (Furumatsu et al. 2005), wohingegen es im Knochen den osteogenen Transkriptionsfaktor Runx2 band und eine TGF- β -vermittelte Hemmung der Osteoblastendifferenzierung bewirkte (Alliston et al. 2001). Die zentrale Rolle des Smad3 wird durch die Beobachtung, dass Rho/ROCK die Linker-Region von Smad3 phosphorylieren und dadurch die Wirkung von TGF- β verändern kann, bestärkt. In Burstkrebszellen verringerte die ROCK-Hemmung die S204-Linkerphosphorylierung (Kamaraju & Roberts 2005), ohne die carboxy-terminale Phosphorylierung zu beeinflussen. Im Gegensatz dazu wurde in der vorliegenden Arbeit eine Zunahme der S204-Linker-Phosphorylierung von Smad3 nach ROCK-Hemmung in Monolayerkulturen beobachtet. In diesem Zusammenhang haben Daten aus einer weiteren Studie an mesenchymalen Zellen gezeigt, dass die Phosphorylierung des Serinrests 204 für die Smad3-vermittelte COL1A2-Promotoraktivität entscheidend ist (Browne et al. 2013). Daher könnte diese spezielle Linker-Phosphorylierung die fördernde Wirkung der ROCK-Hemmung auf die TGF- β -Wirkung sowie den tenogenen Effekt erklären, den der Inhibitor allein auf die Genexpression des Matrixproteins ausübt. Jedoch ist zu beachten, dass die Zunahme der Smad3-Linkerphosphorylierung nur in auf Monolayern kultivierten MSC ohne TGF- β -Einfluss nachgewiesen wurde. Der Einfluss dieser Phosphorylierung auf den aktiven TGF- β /Smad-Signalweg müsste in folgenden Studien bestätigt werden.

Des Weiteren wurden Hinweise auf einen alternativen, ROCK-unabhängigen Wirkmechanismus für die Vermittlung der tenogenen Wirkung der Kollagenmatrix gefunden. Die Western-Blot Analysen ergaben eine Reduzierung der Smad2-Linker-Phosphorylierung bei Kultivierung auf der Kollagenmatrix in einem Teil der Spender. Hierbei könnte die Smad2-Linker-Phosphorylierung, wie häufig beschrieben, einen hemmenden Effekt ausüben, der durch die Reduzierung aufgehoben wird. Diese Regulierung wurde größtenteils nicht durch die Hemmung der ROCK-Aktivität beeinflusst. Jedoch konnte bei zwei Spendern ein paradoxer Einfluss auf die Smad2-Linker-Phosphorylierung festgestellt werden. Bei beiden führte die ROCK-Hemmung in auf Monolayer kultivierten MSC zu einer Steigerung und in auf Kollagen kultivierten MSC zu einer weiteren Reduzierung der Smad2-Linker-Phosphorylierung. Für diese widersprüchliche Regulierung könnte die unterschiedliche Steifigkeit der jeweiligen Zellkultursubstrate verantwortlich sein. Kunststoffe für Zellkulturen haben eine wesentlich höhere Steifigkeit von 1×10^7 kPa im Vergleich zu Kollagenmatrizen, die

im Bereich von 10 Pa bis 50 kPa rekonstituiert werden können (Yi et al. 2022, Franke et al. 2014, Vogel et al. 2020). In einigen Studien zeigten MSC auf steifen Scaffolds eine geringere tenogene Differenzierung und eine erhöhte Aktivierung des FAK-ERK1/2-Signalwegs im Vergleich zu MSC auf weicheren Scaffolds (Sheng et al. 2023, Liu et al. 2018). Diese verminderte Differenzierung konnte wiederum durch Hemmung von ERK1/2 deutlich verbessert werden (Liu et al. 2018, Hou et al. 2022). Folglich ist eine geringe Steifigkeit, wie die der verwendeten Kollagenmatrix, förderlich für die tenogene Differenzierung, indem sie eine geringere Aktivität des ERK1/2-Signalwegs aufweist, der die Phosphorylierung der Smad2-Linker-Region regulieren kann (Burch et al. 2011, Hough et al. 2012). Parallel zur ERK1/2-Aktivität steigt auch die ROCK-Aktivität mit zunehmender Steifigkeit, welche ebenfalls positive Rückkopplung auf ERK1/2 hat. Eine weitere Studie zeigte, dass die ROCK-Hemmung auf weicher Matrix zu einer vollständigen Inaktivierung von ERK1/2 führte, während es auf steifer Matrix nur zu einer geringfügigen Verringerung kam (Shih et al. 2011). Demzufolge scheint es eine steifigkeitsbedingte Interaktion der beiden Signalwege zu geben, welche die abweichende Regulierung der Linker-Phosphorylierung durch ROCK-Inhibition in Monolayern und auf Kollagenmatrix erklären könnte.

In weiteren Studien sollte das Zusammenspiel des FAK-ERK1/2-, des Rho/ROCK-Signalwegs und der Smad-Phosphorylierung in Bezug auf die Steifigkeit von Scaffoldmaterialien weiter untersucht werden. Auch der Einfluss auf die Smad3-Linkerphosphorylierung durch die Kombination von ROCK-Inhibition und TGF- β 3-Stimulation oder Kultivierung auf Kollagenmatrix ist von besonderem Interesse. Letztere sowie andere Linker-Phosphorylierungsstellen von Smad3 könnten weitere Aufschlüsse über die Rolle von Smad3 im Crosstalk zwischen ROCK und TGF- β geben.

5.2.3 Vergleich der Genexpression in humanen und equinen MSC nach TGF- β -Stimulation und ROCK-Hemmung

Da das Pferd ein sinnvolles und häufig genutztes präklinisches Modell für die Forschung der Sehnenregeneration ist (Ribitsch et al. 2020), ist es wichtig die Vergleichbarkeit der zellulären Grundlagen für die spätere Translation von Tierversuchen zu überprüfen. In diesem Zusammenhang liegen sowohl Ergebnisse für ein vergleichbares Proliferations- und Differenzierungspotential (Hillmann et al. 2016), aber auch für unterschiedliche funktionelle Eigenschaften vor (Hillman et al. 2016,

Schubert et al. 2018, Schwarz et al. 2012, Heino et al. 2012). Ähnlich hierzu verhielten sich die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. Die nachgewiesene tenogene Wirkung von TGF- β und die Aktivierung des TGF- β /Smad2/3-Signalweg wurde ebenfalls in anderen Studien in den verschiedenen Spezies Pferd (Barsby et al. 2013, Roth et al. 2019), Mensch (Donderwinkel et al. 2023), Huhn (Lorda-Diez et al. 2009), Maus und Ratte (Kaji et al. 2020, Yin et al. 2016) nachgewiesen. Folglich ist der TGF- β -Signalweg gut konserviert und speziesübergreifend ähnlich. Jedoch wurden wie bei vorherigen Studien auch einige speziesabhängige Unterschiede im Differenzierungspotential (Schwarz et al. 2012, Heino et al. 2012) und in der Genexpression tenogener Marker (Hillman et al. 2016) beobachtet. Beide Spezies zeigten eine Steigerung der Skleraxis-Expression, die in equinen MSC jedoch geringer ausfiel. Zudem erhöhte das Sehengerüst bei equinen MSC nicht die Expression aller untersuchten Sehnenmarker im Gegensatz zu humanen MSC, sondern reduzierte sie. Dass der tenogene Effekt in equinen MSC durch das equine dezellularisierte Sehnen-scaffold nur gering ausfällt, wurde bereits in früheren Studien beobachtet (Burk et al. 2016a, Roth et al. 2019). Dennoch stehen diese Ergebnisse im Gegensatz zu anderen Studien, die eine Steigerung der tenogenen Marker durch Kultivierung mit Matrixkomponenten gezeigt haben (Barsby et al. 2014, Yang et al. 2013), wobei diese auch andere Scaffolds verwendeten. In einer weiteren Studie wurde eine signifikante Steigerung der Skleraxis-Expression equiner MSC erst nach 21 Tagen auf einem Sehnen-scaffold festgestellt (Doll et al. 2021). Demnach könnte die Hochregulierung der tenogenen Marker in Abhängigkeit des Sehnenmodells zeitlich versetzt eintreten. Die unterschiedliche Reaktion der MSC auf die Kultivierung auf dem Sehnen-scaffold lässt neben dem gut konservierten TGF- β -Signalweg weitere voneinander abweichende Teilprozesse in beiden Spezies vermuten. Dies wird auch durch die beobachteten unterschiedlichen Kompensations- und Rückkopplungsmechanismen von humanen und equinen MSC bekräftigt. Während beide Spezies die Smad3-Expression in Anwesenheit von TGF- β 3 herunterregulierten, steigerten humane MSC im Gegenzug die Smad8-Expression, während sie bei equinen MSC herunterreguliert wurde. Folglich scheint in beiden Spezies die zentrale Rolle des Smad3 für den TGF- β -Signalwegs verankert zu sein und die humanen MSC zusätzlich den Smad8-Signalweg als alternativen Kompensationsmechanismus zu verwenden. Eine ähnliche Regulation der Smad8-Expression wurde auch in einer weiteren Studie in equinen MSC beobachtet, in der die Smad8-Expression durch TGF- β gesenkt wurde (Roth et

al. 2018). Zudem zeigten equine MSC eine widersprüchliche TGF- β 3-Regulation in Reaktion auf TGF- β -Stimulation. Während auf dem Monolayer die TGF- β -Expression hochreguliert wurde, wurde sie auf dem Scaffold herunterreguliert. Folglich scheint die Kultivierung auf dem equinen Sehnenscaffold die TGF- β -Wirkung durch ein negatives Feedback zu begrenzen, was die niedrigere Expression mancher tenogener Marker auf dem Scaffold gegenüber dem Monolayer in dieser und anderen Studien erklären würde (Burk et al. 2016a, Roth et al. 2019).

6 Schlussfolgerung und Ausblick

Diese Arbeit beleuchtet den Einfluss des Rho/ROCK-Signalweges auf die TGF- β 3-induzierte tenogene Differenzierung von MSC und die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen. Beide eingeschlossenen Studien bestätigten die Hypothese 1, dass TGF- β den Smad2/3-Signalweg durch carboxy-terminale Phosphorylierung aktiviert und die tenogene Differenzierung induziert. Diese Wirkung wurde durch ROCK-Inhibition verstärkt, was durch eine erhöhte Skleraxis-Expression und eine vermehrte Kerntranslokation des Smad2/3 nachgewiesen wurde. Somit bestätigte sich auch die Hypothese 2, nämlich dass die Rho/ROCK Aktivität den TGF- β 3-induzierten Smad2/3-Signalweg und damit die tenogene Differenzierung beeinflusst. Bezüglich der hierbei zugrundeliegenden Mechanismen belegte die zweite eingeschlossene Studie die Hypothese 4, dass Rho/ROCK den TGF- β -Signalweg mittels Linker-Phosphorylierung beeinflusst, allerdings nur teilweise. Eine direkte Beeinflussung der Smad2-Linker-Phosphorylierung in Folge der ROCK-Inhibition konnte nicht gezeigt werden und auch die Smad3 Linker-Phosphorylierung wurde bisher nur auf der Monolayerkultur und alleiniger ROCK-Inhibition, ohne Einfluss von TGF- β , nachgewiesen. Diese Arbeit bietet hierdurch zwar einen ersten Einblick über die Modulation der Smad-Linker-Region durch Rho/ROCK, jedoch konnte der Einfluss von Rho/ROCK auf die Linker-Phosphorylierung von Smad2 und 3 nicht vollständig geklärt werden. Aufgrund dessen werden weitere Studien benötigt, um die Interaktion zwischen ROCK und Smad2 und 3 im Rahmen der tenogenen Differenzierung weiter zu erforschen.

Der Einfluss der EZM zeigte sich bei humanen MSC als förderlich für die tenogene Differenzierung. Diese Wirkung war jedoch nicht, wie in der Hypothese 5 angenommen, Rho/ROCK-vermittelt, da es zu keiner Beeinflussung der Scaffold-Wirkung durch ROCK-Hemmung kam und auch keine gesteigerte ROCK-Aktivität auf der Kollagenmatrix nachgewiesen werden konnte. Stattdessen scheint die EZM über einen Alternativweg ebenfalls die Linker-Phosphorylierung des Smad2 zu beeinflussen, was die Bedeutung der Zell-Matrix-Interaktionen in der Regulation der tenogenen Differenzierung unterstreicht. Eine Untersuchung des FAK/ERK1/2-Signalweges ist aufgrund der beobachteten Ergebnisse und einschlägiger Literatur für weitere Studien zu empfehlen.

Zudem wurde bei dem Vergleich von humanen und equinen MSC in der ersten Studie die Hypothese einer vergleichbaren Signaltransduktion bewiesen, die eines vergleichbaren Genexpressionsmuster jedoch widerlegt (Hypothese 3). Beide Spezies zeigten eine ähnliche Reaktion auf TGF- β 3 und den ROCK-Inhibitor Y-27632. Insbesondere die Ergebnisse hinsichtlich der TGF- β /Smad2/3-Achse deuten durch die gesteigerte Smad2/3 Kerntranslokation und Steigerung der Skleraxis-Expression auf eine konservierte Signaltransduktion hin. Trotz dieser vergleichbaren Regulation konnten Unterschiede im Genexpressionsmuster der extrazellulären Matrixkomponenten und der Signalmoleküle TGF- β 3 und Smad8 zwischen humanen und equinen MSC beobachtet werden. Die Ergebnisse unterstreichen, wie wichtig es ist, bei der Entwicklung von Strategien zur Sehnenregeneration speziesspezifische Unterschiede in der Regulation von sehnenbezogenen Genen und Signalwegen zu berücksichtigen.

Insgesamt tragen die Ergebnisse dieser Arbeit erheblich zum Verständnis der molekularen Mechanismen bei, die der tenogenen Differenzierung zugrunde liegen, und lassen erkennen, dass die gezielte Modulation des Rho/ROCK- und TGF- β 3-Signalwegs eine vielversprechende Strategie für zukünftige Tissue-Engineering-Ansätze und die Optimierung von MSC-basierten Therapien zur Behandlung von Sehnenverletzungen ist. Zukünftige Forschungsarbeiten sollten sich auf die Langzeitwirkung und die Translation in In-vivo-Modelle konzentrieren, da das ROCK-gerichtete Priming die tenogene Differenzierung in vivo fördern und Fehlanpassungen von MSC an pathologisch veränderte EZM verhindern könnte. Die Erkenntnisse könnten folglich zur Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze führen, die die Heilung von Sehnenverletzungen sowohl bei Menschen als auch bei Tieren verbessern.

7 Zusammenfassung

Michaela Melzer

Einfluss des Rho/ROCK-Signalweges auf die TGF- β 3-induzierte tenogene Differenzierung von mesenchymalen Stromazellen

Schlüsselwörter: mesenchymale Stromazellen, TGF- β , Rho/ROCK, Smad, Crosstalk

Zusammenfassung

Mesenchymale Stromazellen (MSC) sind ein vielversprechendes therapeutisches Mittel zur Behandlung von Sehnenerkrankungen. Ihre tenogene Differenzierung ist für Tissue-Engineering-Ansätze von entscheidender Bedeutung und kann ihre positive Wirkung nach Zelltransplantation in vivo unterstützen. Der transformierende Wachstumsfaktor (TGF)- β , der über intrazelluläre Smad-Moleküle signalisiert, ist ein potenter parakriner Mediator der tenogenen Differenzierung. Darüber hinaus induzieren die extrazelluläre Matrix oder zyklische Dehnung die Tenogenese über die Aktivierung des Rho/ROCK-Signalweges, der jedoch auch an fehlerhaften Anpassungen bei Pathologien der extrazellulären Matrix beteiligt ist. Demnach ist die Rolle des Rho/ROCK-Signalwegs noch nicht vollständig geklärt. Es wird angenommen, dass die Rho/ROCK-Aktivität die Phosphorylierung von Smad2/3 und damit die tenogene Differenzierung beeinflusst. Diese Arbeit zielt darauf ab, die Beeinflussung der TGF- β -induzierten tenogenen Differenzierung durch Rho/ROCK besser zu verstehen und die dem zugrunde liegenden molekularen Mechanismen zu beleuchten. Insbesondere Smad2/3 wird als mögliche Schnittstelle des Crosstalk zwischen den beiden Signalkaskaden betrachtet. Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit ist der Vergleich der klinisch wichtigen Spezies Pferd und Mensch, um eine Grundlage für eine spätere Translation der Ergebnisse experimenteller In-vitro- und In-vivo-Studien zu schaffen.

In der ersten Studie wurden MSC aus humanem und equinem Fettgewebe isoliert und als Monolayer oder auf dezellularisierten Sehnenscaffolds kultiviert, um den Einfluss des ROCK-Inhibitors Y-27632 auf die TGF- β 3-induzierte tenogene Differenzierung zu untersuchen. Die MSC wurden mit und ohne TGF- β 3 (10 ng/ml), Y-27632 (10 μ M) oder beiden Reagenzien inkubiert. An Tag 1 und 3 Tag wurden der TGF- β -Signalweg und das Aktinzytoskelett durch Smad2/3- und Phalloidin-Färbung visualisiert und die

Zusammenfassung

Genexpression von Signalmolekülen und Sehnenmarkern untersucht. In der zweiten Studie wurden ausschließlich humane MSC verwendet und das Sehnenscaffold durch eine Kollagen-I-Matrix ersetzt. Die Stimulation mit TGF- β und Y-27632, sowie die Kontrolle der Wirksamkeit des ROCK-Inhibitors mittels Phalloidin-Färbung erfolgten analog zur ersten Studie. Die Genexpression von tenogenen Markern und einem erweiterten Set an Signalmolekülen wurden ebenfalls am Tag 1 und 3 nach Stimulation analysiert. Zusätzlich erfolgte die Analyse der Phosphorylierungsstellen des Smad2 und Smad3 mittels Western Blot zu verschiedenen Zeitpunkten nach Stimulation.

Die Ergebnisse zeigen, dass TGF- β 3 den Smad2/3-Signalweg durch carboxyterminale Phosphorylierung aktiviert, die Smad2/3-Kerntranslokation induziert und schließlich die Genexpression tenogener Marker steigert. Die Hemmung des Rho/ROCK-Signalwegs durch Y-27632 verstärkte die TGF- β 3-induzierte Smad2/3-Kerntranslokation zusätzlich ($p < 0,05$ bei equinen MSC) und führte zu einer weiteren Erhöhung der Expression von Skleraxis ($p < 0,05$ bei humanen MSC). Die ROCK-Hemmung wurde in beiden Studien durch eine Zerstörung des Aktinzytoskeletts bestätigt. In der zweiten Studie wurde nachgewiesen, dass die ROCK-Hemmung die Smad2-Linker-Phosphorylierung nicht beeinflusste, jedoch zeigten Monolayerexperimente Hinweise auf eine mögliche Phosphorylierung der Linkerregion von Smad3. Auch die Kultivierung der MSC auf dem Sehnenscaffold und der Kollagenmatrix förderte die Wirkung von TGF- β 3. Hierbei wurde eine Reduktion der Smad2-Linker-Phosphorylierung durch die Kultivierung auf Kollagenmatrizen, aber nicht durch ROCK-Inhibition festgestellt. Dementsprechend scheint die Scaffold-Wirkung entgegen der bisherigen Annahme nicht vollständig Rho/ROCK vermittelt zu sein. Dies wird durch die Ergebnisse, die keine gesteigerte ROCK-Aktivität auf der Kollagenmatrix nachwiesen, unterstützt. Darüber hinaus zeigte die Arbeit, dass humane und equine MSC ähnlich auf die kombinierte Behandlung mit TGF- β 3 und Y-27632 reagieren, was auf eine konservierte Signaltransduktion hindeutet. Jedoch wiesen die Regulierungsmuster der Signalmoleküle TGF- β 3 und Smad8 Unterschiede zwischen humanen und equinen MSC auf. Zusammengefasst können die Kultivierung auf Scaffolds und der Rho/ROCK-Signalweg den TGF β 3/Smad2/3-Signalweg beeinflussen, indem sie verschiedene Phosphorylierungsstellen der Smad-Linker-Region regulieren. Folglich scheint die Rho/ROCK-Inhibition eine vielversprechende Strategie darzustellen, um die TGF- β 3-induzierte tenogene Differenzierung von MSCs zu fördern.

8 Summary

Michaela Melzer

Influence of the Rho/ROCK signalling pathway on TGF- β -induced tenogenic differentiation of mesenchymal stromal cells

Keywords: mesenchymal stromal cells, Rho/ROCK, Smad, crosstalk

Mesenchymal stromal cells (MSCs) are a promising therapeutic tool for tendon repair. Their tenogenic differentiation is crucial for tissue engineering approaches and can support their positive effect after cell transplantation *in vivo*. Transforming growth factor (TGF)- β , signalling via intracellular Smad molecules, is a potent paracrine mediator of tenogenic differentiation. In addition, the extracellular matrix or cyclic stretching induce tenogenesis via activation of the Rho/ROCK signalling pathway, which is also involved in maladaptations in extracellular matrix pathologies. Thus, the role of the Rho/ROCK signalling pathway is not yet fully understood. It is assumed that Rho/ROCK activity influences the linker phosphorylation of Smad2/3 and thereby tenogenic differentiation. This work aims to better understand the influence of Rho/ROCK on TGF- β -induced tenogenic differentiation and to clarify the underlying molecular mechanisms. In particular, the Smad2/3 molecule is considered as a possible interface of crosstalk between the two signalling cascades. In addition, the comparison of the clinically important species horse and human was addressed to create a basis for translation of results from experimental *in vitro* and *in vivo* studies.

In the first study, MSC were isolated from human and equine adipose tissue and cultured as monolayers or on a decellularized tendon scaffold to investigate the effect of the ROCK inhibitor Y-27632 on TGF- β -induced tenogenic differentiation. MSC were incubated with and without TGF- β (10 ng/ml), Y-27632 (10 μ M) or both. On day 1 and 3, the TGF- β signalling pathway and the actin cytoskeleton were visualised by Smad2/3 and phalloidin staining and the gene expression of signalling molecules and tendon markers was examined. In the second study, only human MSCs were used and the tendon scaffold was replaced by a collagen I matrix. The stimulation with TGF- β and Y-27632, as well as the control of the effectiveness of the ROCK inhibitor by phalloidin staining were carried out in line with the first study. The gene expression of tenogenic markers and an extended set of signalling molecules were also analysed on

Summary

day 1 and 3 after stimulation. In addition, the phosphorylation sites of the Smad2 and Smad3 were analysed by Western blot at different time points after stimulation.

The results show that TGF- β 3 activates the Smad2/3 signalling pathway by carboxy-terminal phosphorylation, induces nuclear translocalisation and increases the gene expression of tenogenic markers. Inhibition of the Rho/ROCK pathway by Y-27632 further enhanced TGF- β 3-induced Smad2/3 nuclear translocalisation ($p < 0.05$ in equine MSC) and led to a further increase in the expression of scleraxis ($p < 0.05$ in human MSC). ROCK inhibition was confirmed in both studies by disruption of the actin cytoskeleton. The second study demonstrated that ROCK inhibition did not affect Smad2 linker phosphorylation, but monolayer experiments showed evidence of a phosphorylation of the linker region of Smad3. Culturing the MSCs on the tendon scaffold and collagen matrix also promoted the effect of TGF- β 3, showing a reduction in Smad2 linker phosphorylation by culturing on collagen matrices but not by ROCK inhibition. Accordingly, the scaffold effect does not appear to be fully Rho/ROCK mediated, contrary to previous assumptions. This is supported by the results, which did not show increased ROCK activity on the collagen matrix. The work also showed that human and equine MSC responded similarly to combined treatment with TGF- β 3 and Y-27632, indicating conserved signal transduction. However, the regulatory patterns of TGF- β 3 and Smad8 showed differences between human and equine MSC.

Taken together, cultivation on scaffolds and the Rho/ROCK signalling pathway support the TGF β 3/Smad2/3 signalling pathway by regulating different phosphorylation sites of the Smad linker region. Consequently, Rho/ROCK inhibition appears to be a promising strategy to promote TGF- β 3-induced tenogenic differentiation of MSC.

9 Literaturverzeichnis

- Abousleiman R.I., Reyes Y., McFetridge P. und Sikavitsas V. (2009) Tendon tissue engineering using cell-seeded umbilical veins cultured in a mechanical stimulator. *Tissue engineering. Part A*. **15(4)**, 787–795. DOI:10.1089/ten.tea.2008.0102.
- Adler R.S., Fealy S., Rudzki J.R., Kadrmas W., Verma N.N., Pearle A., Lyman S. und Warren R.F. (2008) Rotator cuff in asymptomatic volunteers: contrast-enhanced US depiction of intratendinous and peritendinous vascularity. *Radiology*. **248(3)**, 954–961. DOI:10.1148/radiol.2483071400.
- Ahrberg A.B., Horstmeier C., Berner D., Brehm W., Gittel C., Hillmann A., Josten C., Rossi G., Schubert S., Winter K. und Burk J. (2018) Effects of mesenchymal stromal cells versus serum on tendon healing in a controlled experimental trial in an equine model. *BMC Musculoskeletal Disorders*. **19(1)**, 230. DOI:10.1186/s12891-018-2163-y.
- Akiyama K., Chen C., Wang D., Xu X., Qu C., Yamaza T., Cai T., Chen W., Sun L. und Shi S. (2012) Mesenchymal-stem-cell-induced immunoregulation involves FAS-ligand-/FAS-mediated T cell apoptosis. *Cell Stem Cell*. **10(5)**, 544–555. DOI:10.1016/j.stem.2012.03.007.
- Alfredson H. und Lorentzon R. (2002) Chronic tendon pain: no signs of chemical inflammation but high concentrations of the neurotransmitter glutamate. Implications for treatment? *Current drug targets*. **3(1)**, 43–54. DOI:10.2174/1389450023348028.
- Alfredson H. und Ohberg L. (2005) Sclerosing injections to areas of neo-vascularisation reduce pain in chronic Achilles tendinopathy: a double-blind randomised controlled trial. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy official journal of the ESSKA*. **13(4)**, 338–344. DOI:10.1007/s00167-004-0585-6.
- Ali S.M., Patrawalla N.Y., Kajave N.S., Brown A.B. und Kishore V. (2022) Species-Based Differences in Mechanical Properties, Cytocompatibility, and Printability of Methacrylated Collagen Hydrogels. *Biomacromolecules*. **23(12)**:5137-5147. DOI: 10.1021/acs.biomac.2c00985.
- Alliston T., Choy L., Ducey P., Karsenty G. und Derynck R. (2001) TGF-beta-induced repression of CBFA1 by Smad3 decreases cbfa1 and osteocalcin

- expression and inhibits osteoblast differentiation. *The EMBO journal*. **20(9)**, 2254–2272. DOI:10.1093/emboj/20.9.2254.
- Al-Sadi O., Schulze-Tanzil G., Kohl B., Lohan A., Lemke M., Ertel W. und John T. (2011) Tenocytes, pro-inflammatory cytokines and leukocytes: a relationship? *Muscles, Ligaments and Tendons Journal*. **1(3)**, 68–76.
- Amano M., Nakayama M. und Kaibuchi K. (2010) Rho-kinase/ROCK: A key regulator of the cytoskeleton and cell polarity. *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)*. **67(9)**, 545–554. DOI:10.1002/cm.20472.
- Ask K., Bonniaud P., Maass K., Eickelberg O., Margetts P.J., Warburton D., Groffen J., Gauldie J. und Kolb M. (2008) Progressive pulmonary fibrosis is mediated by TGF-beta isoform 1 but not TGF-beta3. *The international journal of biochemistry & cell biology*. **40(3)**, 484–495. DOI:10.1016/j.biocel.2007.08.016.
- Armour A., Fish J., Woodhouse K. und Semple J. (2006) A Comparison of Human and Porcine Acellularized Dermis: Interactions with Human Fibroblasts In Vitro. *Plastic and Reconstructive Surgery*. **117(3)**:p 845-856, DOI: 10.1097/01.prs.0000204567.28952.9d
- Arnsdorf E.J., Tummala P., Kwon R.Y. und Jacobs C.R. (2009). Mechanically induced osteogenic differentiation--the role of RhoA, ROCKII and cytoskeletal dynamics. *Journal of cell science*. **122(Pt.4)**, 546–553. DOI:10.1242/jcs.036293
- Azab E. und Youssef A.R. (2021) Biocompatibility Evaluation of Human and Porcine Acellular Dermal Matrix on Human Primary Gingival Fibroblasts: In Vitro Comparative Study. *Eur J Dent*. **15(3)**:563-567. DOI:10.1055/s-0041-1727551.
- Baltazar T., Kajave N.S., Rodriguez M., Chakraborty S., Jiang B., Skardal A., Kishore V., Pober, J.S. und Albanna M.Z. (2022). Native human collagen type I provides a viable physiologically relevant alternative to xenogeneic sources for tissue engineering applications: A comparative in vitro and in vivo study. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*. **110(10)**, 2323–2337. DOI:10.1002/jbm.b.35080
- Barsby T. und Guest D. (2013) Transforming growth factor beta3 promotes tendon differentiation of equine embryo-derived stem cells. *Tissue engineering. Part A* **19(19-20)**, 2156–2165. DOI: 10.1089/ten.TEA.2012.0372.

- Barsby T., Bavin E.P. und Guest D.J. (2014) Three-dimensional culture and transforming growth factor beta3 synergistically promote tenogenic differentiation of equine embryo-derived stem cells. *Tissue engineering, Part A*. **20(19-20)**, 2604–2613. DOI:10.1089/ten.TEA.2013.0457.
- Becerra P., Valdés Vázquez M.A., Dudhia J., Fiske-Jackson A.R., Neves F., Hartman N.G. und Smith R.K.W. (2013) Distribution of injected technetium(99m)-labeled mesenchymal stem cells in horses with naturally occurring tendinopathy. *Journal of orthopaedic research official publication of the Orthopaedic Research Society*. **31(7)**, 1096–1102. DOI:10.1002/jor.22338.
- Beerts C., Suls M., Broeckx S.Y., Seys B., Vandenberghe A., Declercq J., Duchateau L., Vidal M.A. und Spaas J.H. (2017) Tenogenically Induced Allogeneic Peripheral Blood Mesenchymal Stem Cells in Allogeneic Platelet-Rich Plasma: 2-Year Follow-up after Tendon or Ligament Treatment in Horses. *Frontiers in veterinary science*. **4**, 158. DOI:10.3389/fvets.2017.00158.
- Behzad H., Sharma A., Mousavizadeh R., Lu A. und Scott A. (2013) Mast cells exert pro-inflammatory effects of relevance to the pathophysiology of tendinopathy. *Arthritis research & therapy*. **15(6)**, R184. DOI:10.1186/ar4374.
- Berthet E., Chen C., Butcher K., Schneider R.A., Alliston T. und Amirtharajah M. (2013) Smad3 binds Scleraxis and Mohawk and regulates tendon matrix organization. *J Orthop Res*. **31(9)**:1475-83. DOI: 10.1002/jor.22382.
- Border W.A. und Noble N.A. (1994) Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *The New England journal of medicine*. **331(19)**, 1286–1292. DOI:10.1056/NEJM199411103311907.
- Bottagisio M., Lopa S., Granata V., Talò G., Bazzocchi C., Moretti M. und Lovati A.B. (2017) Different combinations of growth factors for the tenogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in monolayer culture and in fibrin-based three-dimensional constructs. *Differentiation; research in biological diversity*. **95**, 44–53. DOI:10.1016/j.diff.2017.03.001.
- Boyer M.I., Watson J.T., Lou J., Manske P.R., Gelberman R.H. und Cai S.R. (2001) Quantitative variation in vascular endothelial growth factor mRNA expression during early flexor tendon healing: an investigation in a canine model. *Journal of orthopaedic research official publication of the Orthopaedic Research Society*. **19(5)**, 869–872. DOI:10.1016/S0736-0266(01)00017-1.

- Brandt L., Schubert S., Scheibe P., Brehm W., Franzen J., Gross C. und Burk J. (2018) Tenogenic Properties of Mesenchymal Progenitor Cells Are Compromised in an Inflammatory Environment. *International journal of molecular sciences*. **19(9)**. DOI:10.3390/ijms19092549.
- Bronckaers A., Hilkens P., Martens W., Gervois P., Ratajczak J., Struys T. und Lambrichts I. (2014) Mesenchymal stem/stromal cells as a pharmacological and therapeutic approach to accelerate angiogenesis. *Pharmacology & therapeutics*. **143(2)**, 181–196. DOI:10.1016/j.pharmthera.2014.02.013.
- Brown K.A., Pietenpol J.A. und Moses H.L. (2007) A tale of two proteins: differential roles and regulation of Smad2 and Smad3 in TGF-beta signaling. *Journal of cellular biochemistry*. **101(1)**, 9–33. DOI:10.1002/jcb.21255.
- Browne J.A., Liu X., Schnaper H.W. und Hayashida T. (2013) Serine-204 in the linker region of Smad3 mediates the collagen-I response to TGF- β in a cell phenotype-specific manner. *Experimental cell research*. **319(19)**, 2928–2937. DOI:10.1016/j.yexcr.2013.07.013.
- Bueno C., Montes R. und Menendez P. (2010) The ROCK inhibitor Y-27632 negatively affects the expansion/survival of both fresh and cryopreserved cord blood-derived CD34+ hematopoietic progenitor cells: Y-27632 negatively affects the expansion/survival of CD34+HSPCs. *Stem cell reviews and reports*. **6(2)**, 215–223. DOI:10.1007/s12015-010-9118-5.
- Burch M.L., Zheng W. und Little P.J. (2011) Smad linker region phosphorylation in the regulation of extracellular matrix synthesis. *Cellular and molecular life sciences CMLS*. **68(1)**, 97–107. DOI:10.1007/s00018-010-0514-4.
- Burk J. und Brehm W. (2011) Stammzellentherapie von Sehnenverletzungen – klinische Ergebnisse von 98 Fällen. *Pferdeheilkunde*. **27**, 153-161.
- Burk J., Erbe I., Berner D., Kacza J., Kasper C., Pfeiffer B., Winter K. und Brehm W. (2014) Freeze-thaw cycles enhance decellularization of large tendons. *Tissue engineering, Part C, Methods*. **20(4)**, 276–284. DOI:10.1089/ten.TEC.2012.0760.
- Burk J., Plenge A., Brehm W., Heller S., Pfeiffer B. und Kasper C. (2016a) Induction of Tenogenic Differentiation Mediated by Extracellular Tendon Matrix and Short-Term Cyclic Stretching. *Stem cells international*. **2016**, 7342379. DOI:10.1155/2016/7342379.

- Burk J., Berner D., Brehm W., Hillmann A., Horstmeier C., Josten C., Paebst F., Rossi G., Schubert S. und Ahrberg A.B. (2016b) Long-Term Cell Tracking Following Local Injection of Mesenchymal Stromal Cells in the Equine Model of Induced Tendon Disease. *Cell transplantation*. **25(12)**, 2199–2211. DOI:10.3727/096368916X692104.
- Burk, J. (2019). Mechanisms of Action of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells in Tendon Disease. *Tendons*.
- Burk J., Sassmann A., Kasper C., Nimptsch A. und Schubert S. (2022) Extracellular Matrix Synthesis and Remodeling by Mesenchymal Stromal Cells Is Context-Sensitive. *International journal of molecular sciences*. **23(3)**. DOI:10.3390/ijms23031758.
- Burk J., Wittenberg-Voges L., Schubert S., Horstmeier C., Brehm W. und Geburek F. (2023) Treatment of Naturally Occurring Tendon Disease with Allogeneic Multipotent Mesenchymal Stromal Cells: A Randomized, Controlled, Triple-Blinded Pilot Study in Horses. *Cells*. **12(21)**. DOI:10.3390/cells12212513.
- Cai J., Yang Y., Ai C., Jin W., Sheng D., Chen J. und Chen S. (2018) Bone Marrow Stem Cells-Seeded Polyethylene Terephthalate Scaffold in Repair and Regeneration of Rabbit Achilles Tendon. *Artificial organs*. **42(11)**, 1086–1094. DOI:10.1111/aor.13298.
- Campbell B.H., Agarwal C. und Wang J.H.-C. (2004) TGF-beta1, TGF-beta3, and PGE(2) regulate contraction of human patellar tendon fibroblasts. *Biomechanics and modeling in mechanobiology*. **2(4)**, 239–245. DOI:10.1007/s10237-004-0041-z.
- Canseco J.A., Kojima K., Penvose A.R., Ross J.D., Obokata H., Gomoll A.H. und Vacanti C.A. (2012) Effect on ligament marker expression by direct-contact co-culture of mesenchymal stem cells and anterior cruciate ligament cells. *Tissue engineering, Part A*. **18(23-24)**, 2549–2558. DOI:10.1089/ten.TEA.2012.0030.
- Carlier S., Depuydt E., Suls M., Bocqué C., Thys J., Vandenberghe A., Martens A., Saunders J., Hellmann K., Braun G., Beerts C. und Spaas J.H. (2023) Equine allogeneic tenogenic primed mesenchymal stem cells: A clinical field study in horses suffering from naturally occurring superficial digital flexor tendon and suspensory ligament injuries. *Equine veterinary journal*. DOI:10.1111/evj.14008.

- Chan K.-M., Fu S.-C., Wong Y.-P., Hui W.-C., Cheuk Y.-C. und Wong M.W.-N. (2008) Expression of transforming growth factor beta isoforms and their roles in tendon healing. *Wound repair and regeneration official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*. **16(3)**, 399–407. DOI:10.1111/j.1524-475X.2008.00379.x.
- Chao Y.-H., Tsuang Y.-H., Sun J.-S., Cheng C.-K. und Chen M.-H. (2011) The cross-talk between transforming growth factor-beta1 and ultrasound stimulation during mechanotransduction of rat tenocytes. *Connective tissue research*. **52(4)**, 313–321. DOI:10.3109/03008207.2010.525673.
- Chen G., Zhang W., Zhang K., Wang S., Gao Y., Gu J., He L., Li W., Zhang C., Zhang W., Li M., Hao Q. und Zhang Y. (2020) Hypoxia-Induced Mesenchymal Stem Cells Exhibit Stronger Tenogenic Differentiation Capacities and Promote Patellar Tendon Repair in Rabbits. *Stem cells international*. **2020**, 8822609. DOI:10.1155/2020/8822609.
- Chen S., Crawford M., Day R.M., Briones V.R., Leader J.E., Jose P.A. und Lechleider R.J. (2006) RhoA modulates Smad signaling during transforming growth factor-beta-induced smooth muscle differentiation. *The Journal of biological chemistry*. **281(3)**, 1765–1770. DOI:10.1074/jbc.M507771200.
- Chen S., Deng G., Li K., Zheng H., Wang G., Yu B. und Zhang K. (2018) Interleukin-6 Promotes Proliferation but Inhibits Tenogenic Differentiation via the Janus Kinase/Signal Transducers and Activators of Transcription 3 (JAK/STAT3) Pathway in Tendon-Derived Stem Cells. *Medical Science Monitor International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*. **24**, 1567–1573. DOI:10.12659/MSM.908802.
- Chen X., Cai C., Xu D., Liu Q., Zheng S., Liu L., Li G., Zhang X., Li X., Ma Y., Huang L., Chen J., Shi J., Du X., Xia W., Xiang A.P. und Peng Y. (2019) Human Mesenchymal Stem Cell-Treated Regulatory CD23+CD43+ B Cells Alleviate Intestinal Inflammation. *Theranostics*. **9(16)**, 4633–4647. DOI:10.7150/thno.32260.
- Chen Y.-J., Huang C.-H., Lee I.-C., Lee Y.-T., Chen M.-H. und Young T.-H. (2008) Effects of cyclic mechanical stretching on the mRNA expression of tendon/ligament-related and osteoblast-specific genes in human mesenchymal stem cells. *Connective tissue research*. **49(1)**, 7–14. DOI:10.1080/03008200701818561.

- Choi H., Lee R.H., Bazhanov N., Oh J.Y. und Prockop D.J. (2011) Anti-inflammatory protein TSG-6 secreted by activated MSCs attenuates zymosan-induced mouse peritonitis by decreasing TLR2/NF- κ B signaling in resident macrophages. *Blood* **118**(2), 330–338. DOI:10.1182/blood-2010-12-327353.
- Choudhery M.S., Badowski M., Muise A., Pierce J. und Harris D.T. (2014) Donor age negatively impacts adipose tissue-derived mesenchymal stem cell expansion and differentiation. *Journal of translational medicine*. **12**, DOI:8.10.1186/1479-5876-12-8.
- Ciardulli M.C., Marino L., Lamparelli E.P., Guida M., Forsyth N.R., Selleri C., Della Porta G. und Maffulli N. (2020) Dose-Response Tendon-Specific Markers Induction by Growth Differentiation Factor-5 in Human Bone Marrow and Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells. *International journal of molecular sciences*. **21**(16). DOI:10.3390/ijms21165905.
- Claassen D.A., Desler M.M. und Rizzino A. (2009) ROCK inhibition enhances the recovery and growth of cryopreserved human embryonic stem cells and human induced pluripotent stem cells. *Molecular reproduction and development*. **76**(8), 722–732. DOI:10.1002/mrd.21021.
- Clegg P.D., Strassburg S. und Smith R.K. (2007) Cell phenotypic variation in normal and damaged tendons. *International journal of experimental pathology*. **88**(4), 227–235. DOI:10.1111/j.1365-2613.2007.00549.x.
- Constantinou C.D. und Jimenez S.A. (1991). Structure of cDNAs encoding the triple-helical domain of murine alpha 2 (VI) collagen chain and comparison to human and chick homologues. Use of polymerase chain reaction and partially degenerate oligonucleotide for generation of novel cDNA clones. *Matrix*. **11**(1), 1–9. DOI:10.1016/s0934-8832(11)80221-0
- Conze P., van Schie H.T.M., van Weeren R., Staszuk C., Conrad S., Skutella T., Hopster K., Rohn K., Stadler P. und Geburek F. (2014) Effect of autologous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on neovascularization of artificial equine tendon lesions. *Regenerative medicine*. **9**(6), 743–757. DOI:10.2217/rme.14.55.
- Corcione A., Benvenuto F., Ferretti E., Giunti D., Cappiello V., Cazzanti F., Risso M., Gualandi F., Mancardi G.L., Pistoia V. und Uccelli A. (2006) Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*. **107**(1), 367–372. DOI:10.1182/blood-2005-07-2657.

- Costa-Almeida R., Calejo I., Reis R.L. und Gomes M.E. (2018) Crosstalk between adipose stem cells and tendon cells reveals a temporal regulation of tenogenesis by matrix deposition and remodeling. *Journal of cellular physiology*. **233(7)**, 5383–5395. DOI:10.1002/jcp.26363.
- Cristofaro F., Gigli M., Bloise N., Chen H., Bruni G., Munari A., Moroni L., Lotti N. und Visai L. (2018) Influence of the nanofiber chemistry and orientation of biodegradable poly(butylene succinate)-based scaffolds on osteoblast differentiation for bone tissue regeneration. *Nanoscale*. **10(18)**, 8689–8703. DOI:10.1039/C8NR00677F.
- Dai W., Hale S.L., Martin B.J., Kuang J.-Q., Dow J.S., Wold L.E. und Kloner R.A. (2005) Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in postinfarcted rat myocardium: short- and long-term effects. *Circulation*. **112(2)**, 214–223. DOI:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.527937.
- Dayati P., Rezaei H.B., Sharifat N., Kamato D. und Little P.J. (2018) G protein coupled receptors can transduce signals through carboxy terminal and linker region phosphorylation of Smad transcription factors. *Life sciences*. **199**, 10–15. DOI:10.1016/j.lfs.2018.03.004.
- De Castilho T., Rosa G.D.S., Stievani F.C., Apolônio E.V.P., Pfeifer J.P.H., Altheman V.G., Paliologo V., Santos N.J.D., Fonseca-Alves C.E. und Alves A.L.G. (2024) Biocompatibility of hydrogel derived from equine tendon extracellular matrix in horses subcutaneous tissue. *Front Bioeng Biotechnol*. **11**:1296743. DOI: 10.3389/fbioe.2023.1296743.
- Del Bue M., Riccò S., Ramoni R., Conti V., Gnudi G. und Grolli S. (2008) Equine adipose-tissue derived mesenchymal stem cells and platelet concentrates: their association in vitro and in vivo. *Veterinary research communications*. **32 Suppl 1**, S51-5. DOI:10.1007/s11259-008-9093-3.
- Delgado Caceres M., Pfeifer C.G. und Docheva D. (2018) Understanding Tendons: Lessons from Transgenic Mouse Models. *Stem cells and development*. **27(17)**, 1161–1174. DOI:10.1089/scd.2018.0121.
- Denis J.-F., Sader F., Gatien S., Villiard É., Philip A. und Roy S. (2016) Activation of Smad2 but not Smad3 is required to mediate TGF- β signaling during axolotl limb regeneration. *Development (Cambridge, England)*. **143(19)**, 3481–3490. DOI:10.1242/dev.131466.

- Dennler S., Huet S. und Gauthier J.M. (1999) A short amino-acid sequence in MH1 domain is responsible for functional differences between Smad2 and Smad3. *Oncogene*. **18(8)**, 1643–1648. DOI:10.1038/sj.onc.1202729.
- Depuydt E., Broeckx S.Y., van Hecke L., Chiers K., van Brantegem L., van Schie H., Beerts C., Spaas J.H., Pille F. und Martens A. (2021) The Evaluation of Equine Allogeneic Tenogenic Primed Mesenchymal Stem Cells in a Surgically Induced Superficial Digital Flexor Tendon Lesion Model. *Front. Vet. Sci.* **8**, 641441. DOI:10.3389/fvets.2021.641441.
- Derynck R. und Budi E.H. (2019) Specificity, versatility, and control of TGF- β family signaling. *Science signaling*. **12(570)**. 10.1126/scisignal.aav5183.
- Derynck R. und Zhang Y.E. (2003) Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*. **425(6958)**, 577–584. DOI:10.1038/nature02006.
- Dex S., Lin D., Shukunami C. und Docheva D. (2016) Tenogenic modulating insider factor: Systematic assessment on the functions of tenomodulin gene. *Gene*. **587(1)**, 1–17. DOI:10.1016/j.gene.2016.04.051.
- Di Nicola M., Carlo-Stella C., Magni M., Milanese M., Longoni P.D., Matteucci P., Grisanti S. und Gianni A.M. (2002) Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*. **99(10)**, 3838–3843. DOI:10.1182/blood.v99.10.3838.
- Doll C.U., Niebert S. und Burk J. (2021) Mesenchymal Stromal Cells Adapt to Chronic Tendon Disease Environment with an Initial Reduction in Matrix Remodeling. *International journal of molecular sciences*. **22(23)**, 12798. DOI:10.3390/ijms222312798.
- Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D. und Horwitz E. (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. **8(4)**, 315–317. DOI:10.1080/14653240600855905.
- Donderwinkel I., Tuan R.S., Cameron N.R. und Frith J.E. (2023) A systematic investigation of the effects of TGF- β 3 and mechanical stimulation on tenogenic differentiation of mesenchymal stromal cells in a poly(ethylene glycol)/gelatin-based hydrogel. *J Orthop Translat*. **43**:1-13. DOI: 10.1016/j.jot.2023.09.006.

- Duffy G.P., Ahsan T., O'Brien T., Barry F. und Nerem R.M. (2009) Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote angiogenic processes in a time- and dose-dependent manner in vitro. *Tissue engineering Part A*. **15(9)**, 2459–2470. DOI:10.1089/ten.TEA.2008.0341.
- Durgam S.S., Stewart A.A., Pondenis H.C., Gutierrez-Nibeyro S.M., Evans R.B. und Stewart M.C. (2012). Comparison of equine tendon- and bone marrow-derived cells cultured on tendon matrix with or without insulin-like growth factor-I supplementation. *American journal of veterinary research*. **73(1)**, 153–161. DOI:10.2460/ajvr.73.1.153
- Eliasson P., Fahlgren A. und Aspenberg P. (2008) Mechanical load and BMP signaling during tendon repair: a role for follistatin? *Clinical orthopaedics and related research*. **466(7)**, 1592–1597. DOI:10.1007/s11999-008-0253-0.
- Engbretson B., Mussett Z.R. und Sikavitsas V.I. (2018) The effects of varying frequency and duration of mechanical stimulation on a tissue-engineered tendon construct. *Connective tissue research*. **59(2)**, 167–177. DOI:10.1080/03008207.2017.1324431.
- Farnebo S., Woon C.Y., Schmitt T., Joubert L.M., Kim M., Pham H. und Chang J. (2014). Design and characterization of an injectable tendon hydrogel: a novel scaffold for guided tissue regeneration in the musculoskeletal system. *Tissue engineering, Part A*. **20(9-10)**, 1550–1561. DOI:10.1089/ten.TEA.2013.0207
- Fossett E., Khan W.S., Longo U.G. und Smitham P.J. (2012) Effect of age and gender on cell proliferation and cell surface characterization of synovial fat pad derived mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research official publication of the Orthopaedic Research Society*. **30(7)**, 1013–1018. DOI:10.1002/jor.22057.
- Franke K., Sapudom J., Kalbitzer L., Anderegg U. und Pompe T. (2014) Topologically defined composites of collagen types I and V as in vitro cell culture scaffolds. *Acta biomaterialia*. **10(6)**, 2693–2702. DOI:10.1016/j.actbio.2014.02.036.
- Furumatsu T., Tsuda M., Taniguchi N., Tajima Y. und Asahara H. (2005) Smad3 induces chondrogenesis through the activation of SOX9 via CREB-binding protein/p300 recruitment. *Journal of Biological Chemistry*. **280(9)**, 8343–8350. DOI:10.1074/jbc.M413913200.

- Garcia-Melchor E., Cafaro G., MacDonald L., Crowe L.A.N., Sood S., McLean M., Fazzi U.G., McInnes I.B., Akbar M. und Millar N.L. (2021) Novel self-amplificatory loop between T cells and tenocytes as a driver of chronicity in tendon disease. *Annals of the rheumatic diseases*. **80(8)**, 1075–1085. DOI:10.1136/annrheumdis-2020-219335.
- Gauthaman K., Fong C.-Y. und Bongso A. (2010) Effect of ROCK inhibitor Y-27632 on normal and variant human embryonic stem cells (hESCs) in vitro: its benefits in hESC expansion. *Stem cell reviews and reports*. **6(1)**, 86–95. DOI:10.1007/s12015-009-9107-8.
- Geburek F., Roggel F., van Schie H.T.M., Beineke A., Estrada R., Weber K., Hellige M., Rohn K., Jagodzinski M., Welke B., Hurschler C., Conrad S., Skutella T., van de Lest C., van Weeren R. und Stadler P.M. (2017) Effect of single intralesional treatment of surgically induced equine superficial digital flexor tendon core lesions with adipose-derived mesenchymal stromal cells: a controlled experimental trial. *Stem Cell Research & Therapy*. **8(1)**, 129. DOI:10.1186/s13287-017-0564-8.
- Gegg C. und Yang F. (2020) The Effects of ROCK Inhibition on Mesenchymal Stem Cell Chondrogenesis Are Culture Model Dependent. *Tissue engineering. Part A*. **26(3-4)**, 130–139. DOI:10.1089/ten.TEA.2019.0068.
- Gelberman R.H., Khabie V. und Cahill C.J. (1991) The revascularization of healing flexor tendons in the digital sheath. A vascular injection study in dogs. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*. **73(6)**, 868–881.
- Gelberman R.H., Linderman S.W., Jayaram R., Dikina A.D., Sakiyama-Elbert S., Alsberg E., Thomopoulos S. und Shen H. (2017) Combined Administration of ASCs and BMP-12 Promotes an M2 Macrophage Phenotype and Enhances Tendon Healing. *Clinical orthopaedics and related research*. **475(9)**, 2318–2331. DOI:10.1007/s11999-017-5369-7.
- Godwin E.E., Young N.J., Dudhia J., Beamish I.C. und Smith R.K.W. (2012) Implantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells demonstrates improved outcome in horses with overstrain injury of the superficial digital flexor tendon. *Equine veterinary journal*. **44(1)**, 25–32. DOI:10.1111/j.2042-3306.2011.00363.x.
- Grunewald M., Avraham I., Dor Y., Bachar-Lustig E., Itin A., Jung S., Chimenti S., Landsman L., Abramovitch R. und Keshet E. (2006) VEGF-induced adult

- neovascularization: recruitment, retention, and role of accessory cells. *Cell*. **124(1)**, 175–189. DOI:10.1016/j.cell.2005.10.036.
- Haddad R. und Saldanha-Araujo F. (2014) Mechanisms of T-cell immunosuppression by mesenchymal stromal cells: what do we know so far? *BioMed Research International*. **2014**, 216806. DOI:10.1155/2014/216806.
- Han B., Jones I.A., Yang Z., Fang W. und Vangsness C.T. (2020) Repair of Rotator Cuff Tendon Defects in Aged Rats Using a Growth Factor Injectable Gel Scaffold. *Arthroscopy the journal of arthroscopic & related surgery official publication of the Arthroscopy Association of North America and the International Arthroscopy Association*. **36(3)**, 629–637. DOI:10.1016/j.arthro.2019.09.015.
- Hankemeier S., Keus M., Zeichen J., Jagodzinski M., Barkhausen T., Bosch U., Krettek C. und van Griensven M. (2005) 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 engineering*. **11(1-2)**, 41–49. DOI:10.1089/ten.2005.11.41.
- Hare J.M., Traverse J.H., Henry T.D., Dib N., Strumpf R.K., Schulman S.P., Gerstenblith G., DeMaria A.N., Denktas A.E., Gammon R.S., Hermiller J.B., Reisman M.A., Schaer G.L. und Sherman W. (2009) A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*. **54(24)**, 2277–2286. DOI:10.1016/j.jacc.2009.06.055.
- Havis E., Bonnin M.-A., Esteves de Lima J., Charvet B., Millet C. und Duprez D. (2016) TGF β and FGF promote tendon progenitor fate and act downstream of muscle contraction to regulate tendon differentiation during chick limb development. *Development (Cambridge, England)*. **143(20)**, 3839–3851. DOI:10.1242/dev.136242.
- Havis E., Bonnin M.-A., Olivera-Martinez I., Nazaret N., Ruggiu M., Weibel J., Durand C., Guerquin M.-J., Bonod-Bidaud C., Ruggiero F., Schweitzer R. und Duprez D. (2014) Transcriptomic analysis of mouse limb tendon cells during development. *Development (Cambridge, England)*. **141(19)**, 3683–3696. DOI:10.1242/dev.108654.

- He Q., Liao Y., Zhang J., Yao X., Zhou W., Hong Y. und Ouyang H. (2020). "All-in-One" Gel System for Whole Procedure of Stem-Cell Amplification and Tissue Engineering. *Small*. **16(16)**, e1906539. DOI:10.1002/smll.201906539
- Heino T. J., Alm J. J., Moritz N. und Aro H. T. (2012) Comparison of the osteogenic capacity of minipig and human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* **30(7)**:1019-1025
- Heldin C.-H. und Moustakas A. (2016) Signaling Receptors for TGF- β Family Members. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. **8(8)**. DOI:10.1101/cshperspect.a022053.
- Heyer J., Escalante-Alcalde D., Lia M., Boettinger E., Edelman W., Stewart C.L. und Kucherlapati R. (1999) Postgastrulation Smad2-deficient embryos show defects in embryo turning and anterior morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **96(22)**, 12595–12600. DOI:10.1073/pnas.96.22.12595.
- Hillmann A., Ahrberg A.B., Brehm W., Heller S., Josten C., Paebst F. und Burk J. (2016) Comparative Characterization of Human and Equine Mesenchymal Stromal Cells: A Basis for Translational Studies in the Equine Model. *Cell transplantation*. **25(1)**, 109–124. 10.3727/096368915X687822.
- Hillmann A., Paebst F., Brehm W., Piehler D., Schubert S., Tárnok A. und Burk J. (2019) A novel direct co-culture assay analyzed by multicolor flow cytometry reveals context- and cell type-specific immunomodulatory effects of equine mesenchymal stromal cells. *PloS one*. **14(6)**, e0218949. DOI:10.1371/journal.pone.0218949.
- Hong H., McCullough C.M. und Stegemann J.P. (2007) The role of ERK signaling in protein hydrogel remodeling by vascular smooth muscle cells. *Biomaterials*. **28(26)**, 3824–3833. DOI:10.1016/j.biomaterials.2007.05.007.
- Hou Y., Zhou B., Ni M., Wang M., Ding L., Li Y., Liu Y., Zhang W., Li G., Wang J. und Xu L. (2022) Nonwoven-based gelatin/polycaprolactone membrane loaded with ERK inhibitor U0126 for treatment of tendon defects. *Stem Cell Research Therapy*. **13(1)**, 5. DOI:10.1186/s13287-021-02679-x.
- Hough C., Radu M. und Doré J.J.E. (2012) Tgf-beta induced Erk phosphorylation of smad linker region regulates smad signaling. *PloS one*. **7(8)**, e42513. DOI:10.1371/journal.pone.0042513.

- Huang P., Wang L., Li Q., Xu J., Xu J., Xiong Y., Chen G., Qian H., Jin C., Yu Y., Liu J., Qian L. und Yang Y. (2019) Combinatorial treatment of acute myocardial infarction using stem cells and their derived exosomes resulted in improved heart performance. *Stem Cell Research Therapy*. **10(1)**, 300. DOI:10.1186/s13287-019-1353-3.
- Huang Y., He B., Wang L., Yuan B., Shu H., Zhang F. und Sun L. (2020) Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes promote rotator cuff tendon-bone healing by promoting angiogenesis and regulating M1 macrophages in rats. *Stem Cell Research Therapy*. **11(1)**, 496. DOI:10.1186/s13287-020-02005-x.
- Huisman E., Lu A., McCormack R.G. und Scott A. (2014) Enhanced collagen type I synthesis by human tenocytes subjected to periodic in vitro mechanical stimulation. *BMC Musculoskeletal Disorders*. **15**, 386. DOI:10.1186/1471-2474-15-386.
- Hurd J.L., Facile T.R., Weiss J., Hayes M., Hayes M., Furia J.P., Maffulli N., Winnier G.E., Alt C., Schmitz C., Alt E.U. und Lundeen M. (2020) Safety and efficacy of treating symptomatic, partial-thickness rotator cuff tears with fresh, uncultured, unmodified, autologous adipose-derived regenerative cells (UA-ADRCs) isolated at the point of care: a prospective, randomized, controlled first-in-human pilot study. *Journal of orthopaedic surgery and research*. **15(1)**, 122. DOI:10.1186/s13018-020-01631-8.
- Huveneers S. und Danen E.H.J. (2009) Adhesion signaling - crosstalk between integrins, Src and Rho. *Journal of cell science*. **122(Pt 8)**, 1059–1069. DOI:10.1242/jcs.039446.
- Hwang C.T. und Halper J. (2021) Proteoglycans and Diseases of Soft Tissues. *Advances in experimental medicine and biology*. **1348**, 127–138. DOI:10.1007/978-3-030-80614-9_5.
- Ide J., Mochizuki Y., van Noort A., Ochi H., Sridharan S., Itoi E. und Greiner S. (2017) Local rhBMP-12 on an Absorbable Collagen Sponge as an Adjuvant Therapy for Rotator Cuff Repair-A Phase 1, Randomized, Standard of Care Control, Multicenter Study: Part 2-A Pilot Study of Functional Recovery and Structural Outcomes. *Orthopaedic journal of sports medicine*. **5(9)**, DOI:10.1177/2325967117726740.

- Isaeva E.V., Beketov E.E., Arguchinskaya N.V., Ivanov S.A., Shegay P.V. und Kaprin A.D. (2022) Decellularized Extracellular Matrix for Tissue Engineering. *Sovrem Tekhnologii Med.* **14(3)**:57-68. DOI: 10.17691/stm2022.14.3.07.
- Ishizaki T., Uehata M., Tamechika I., Keel J., Nonomura K., Maekawa M. und Narumiya S. (2000) Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of rho-associated kinases. *Molecular pharmacology.* **57(5)**, 976–983.
- Islam A., Mbimba T., Younesi M. und Akkus O. (2017) Effects of substrate stiffness on the tenoinduction of human mesenchymal stem cells. *Acta biomaterialia.* **58**, 244–253. DOI:10.1016/j.actbio.2017.05.058.
- Ji H., Tang H., Lin H., Mao J., Gao L., Liu J. und Wu T. (2014). Rho/Rock cross-talks with transforming growth factor- β /Smad pathway participates in lung fibroblast-myofibroblast differentiation. *Biomedical reports.* **2(6)**, 787–792. <https://doi.org/10.3892/br.2014.323>
- Jiang L., Liu T., Lyu K., Chen Y., Lu J., Wang X., Long L. und Li S. (2023) Inflammation-related signaling pathways in tendinopathy. *Open life sciences.* **18(1)**. DOI:10.1515/biol-2022-0729.
- Jo C.H., Chai J.W., Jeong E.C., Oh S., Kim P.S., Yoon J.Y. und Yoon K.S. (2018) Intratendinous Injection of Autologous Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Rotator Cuff Disease: A First-In-Human Trial. *Stem cells (Dayton, Ohio).* **36(9)**, 1441–1450. DOI:10.1002/stem.2855.
- John T., Lodka D., Kohl B., Ertel W., Jammrath J., Conrad C., Stoll C., Busch C. und Schulze-Tanzil G. (2010) Effect of pro-inflammatory and immunoregulatory cytokines on human tenocytes. *Journal of orthopaedic research official publication of the Orthopaedic Research Society.* **28(8)**, 1071–1077. DOI:10.1002/jor.21079.
- Johnson T.D., Dequach J.A., Gaetani R., Ungerleider J., Elhag D., Nigam V., Behfar. A und Christman K.L. (2014) Human versus porcine tissue sourcing for an injectable myocardial matrix hydrogel. *Biomater Sci.* **2014**:60283D. DOI:10.1039/C3BM60283D.
- Juneja S.C., Schwarz E.M., O'Keefe R.J. und Awad H.A. (2013) Cellular and molecular factors in flexor tendon repair and adhesions: a histological and gene expression analysis. *Connective tissue research.* **54(3)**, 218–226. DOI:10.3109/03008207.2013.787418.

- Jung J.W., Kwon M., Choi J.C., Shin J.W., Park I.W., Choi B.W. und Kim J.Y. (2013) Familial occurrence of pulmonary embolism after intravenous, adipose tissue-derived stem cell therapy. *Yonsei medical journal*. **54(5)**, 1293–1296. DOI:10.3349/ymj.2013.54.5.1293.
- Kaji D.A., Howell K.L., Balic Z., Hubmacher D. und Huang A.H. (2020) Tgf β signaling is required for tenocyte recruitment and functional neonatal tendon regeneration. *eLife*. **9**. DOI:10.7554/eLife.51779.
- Kamaraju A.K. und Roberts A.B. (2005) Role of Rho/ROCK and p38 MAP kinase pathways in transforming growth factor-beta-mediated Smad-dependent growth inhibition of human breast carcinoma cells in vivo. *The Journal of biological chemistry*. **280(2)**, 1024–1036. DOI:10.1074/jbc.M403960200.
- Kamoto D., Burch M.L., Piva T.J., Rezaei H.B., Rostam M.A., Xu S., Zheng W., Little P.J. und Osman N. (2013) Transforming growth factor- β signalling: role and consequences of Smad linker region phosphorylation. *Cellular signalling*. **25(10)**, 2017–2024. DOI:10.1016/j.cellsig.2013.06.001.
- Kamoto D., Do B.H., Osman N., Ross B.P., Mohamed R., Xu S. und Little P.J. (2020) Smad linker region phosphorylation is a signalling pathway in its own right and not only a modulator of canonical TGF- β signalling. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **77(2)**, 243–251. DOI:10.1007/s00018-019-03266-3.
- Kamishibahara Y., Kawaguchi H. und Shimizu N. (2016) Rho kinase inhibitor Y-27632 promotes neuronal differentiation in mouse embryonic stem cells via phosphatidylinositol 3-kinase. *Neuroscience letters*. **615**, 44–49. DOI:10.1016/j.neulet.2016.01.022.
- Kang P.H., Schaffer D.V. und Kumar S. (2020) Angiomotin links ROCK and YAP signaling in mechanosensitive differentiation of neural stem cells. *Molecular biology of the cell*. **31(5)**, 386–396. DOI:10.1091/mbc.E19-11-0602.
- Katsara O., Mahaira L.G., Iliopoulou E.G., Moustaki A., Antsaklis A., Loutradis D., Stefanidis K., Baxevanis C.N., Papamichail M. und Perez S.A. (2011) Effects of donor age, gender, and in vitro cellular aging on the phenotypic, functional, and molecular characteristics of mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem cells and development*. **20(9)**, 1549–1561. DOI:10.1089/scd.2010.0280.

- Katzel E.B., Wolenski M., Loiselle A.E., Basile P., Flick L.M., Langstein H.N., Hilton M.J., Awad H.A., Hammert W.C. und O'Keefe R.J. (2011) Impact of Smad3 loss of function on scarring and adhesion formation during tendon healing. *Journal of orthopaedic research official publication of the Orthopaedic Research Society*. **29(5)**, 684–693. DOI:10.1002/jor.21235.
- Kaux J.-F., Janssen L., Drion P., Nusgens B., Libertiaux V., Pascon F., Heyeres A., Hoffmann A., Lambert C., Le Goff C., Denoël V., Defraigne J.-O., Rickert M., Crielaard J.-M. und Colige A. (2014) Vascular Endothelial Growth Factor-111 (VEGF-111) and tendon healing: preliminary results in a rat model of tendon injury. *Muscles, Ligaments and Tendons Journal*. **4(1)**, 24–28.
- Khyrul W.A.K.M., LaLonde D.P., Brown M.C., Levinson H. und Turner C.E. (2004) The integrin-linked kinase regulates cell morphology and motility in a rho-associated kinase-dependent manner. *Journal of Biological Chemistry*. **279(52)**, 54131–54139. DOI:10.1074/jbc.M410051200.
- Kinnaird T., Stabile E., Burnett M.S., Shou M., Lee C.W., Barr S., Fuchs S. und Epstein S.E. (2004) Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation*. **109(12)**, 1543–1549. DOI:10.1161/01.CIR.0000124062.31102.57.
- Kishore V., Bullock W., Sun X., van Dyke W.S. und Akkus O. (2012) Tenogenic differentiation of human MSCs induced by the topography of electrochemically aligned collagen threads. *Biomaterials*. **33(7)**, 2137–2144. DOI:10.1016/j.biomaterials.2011.11.066.
- Knipe R.S., Tager A.M. und Liao J.K. (2015) The Rho kinases: critical mediators of multiple profibrotic processes and rational targets for new therapies for pulmonary fibrosis. *Pharmacological Reviews*. **67(1)**, 103–117. DOI:10.1124/pr.114.009381.
- Korntner S., Lehner C., Gehwolf R., Wagner A., Grütz M., Kunkel N., Tempfer H. und Traweger A. (2019) Limiting angiogenesis to modulate scar formation. *Advanced drug delivery reviews*. **146**, 170–189. DOI:10.1016/j.addr.2018.02.010.
- Kouroupis D. und Correa D. (2021) Increased Mesenchymal Stem Cell Functionalization in Three-Dimensional Manufacturing Settings for Enhanced Therapeutic Applications. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. **9**, 621748. DOI:10.3389/fbioe.2021.621748.

- Kraus A., Woon C., Raghavan S., Megerle K., Pham H. und Chang J. (2013) Co-culture of human adipose-derived stem cells with tenocytes increases proliferation and induces differentiation into a tenogenic lineage. *Plastic and reconstructive surgery*. **132(5)**, 754e-766e. DOI:10.1097/PRS.0b013e3182a48b46.
- Kümper S., Mardakheh F.K., McCarthy A., Yeo M., Stamp G.W., Paul A., Worboys J., Sadok A., Jørgensen C., Guichard S. und Marshall C.J. (2016) Rho-associated kinase (ROCK) function is essential for cell cycle progression, senescence and tumorigenesis. *eLife*. **5**, e12994. DOI:10.7554/eLife.12203.
- Kuo C.K., Petersen B.C. und Tuan R.S. (2008) Spatiotemporal protein distribution of TGF-betas, their receptors, and extracellular matrix molecules during embryonic tendon development. *Developmental dynamics an official publication of the American Association of Anatomists*. **237(5)**, 1477–1489. DOI:10.1002/dvdy.21547.
- Kuo C.K. und Tuan R.S. (2008) Mechanoactive tenogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Tissue engineering, Part A*. **14(10)**, 1615–1627. DOI:10.1089/ten.tea.2006.0415.
- Kwon H.M., Hur S.-M., Park K.-Y., Kim C.-K., Kim Y.-M., Kim H.-S., Shin H.-C., Won M.-H., Ha K.-S., Kwon Y.-G., Lee D.H. und Kim Y.-M. (2014) Multiple paracrine factors secreted by mesenchymal stem cells contribute to angiogenesis. *Vascular pharmacology*. **63(1)**, 19–28. DOI:10.1016/j.vph.2014.06.004.
- Lakemeier S., Reichelt J.J.A., Patzer T., Fuchs-Winkelmann S., Paletta J.R.J. und Schofer M.D. (2010) The association between retraction of the torn rotator cuff and increasing expression of hypoxia inducible factor 1 α and vascular endothelial growth factor expression: an immunohistological study. *BMC Musculoskeletal Disorders*. **11**, 230. DOI:10.1186/1471-2474-11-230.
- Lamas N.J., Serra S.C., Salgado A.J. und Sousa N. (2015) Failure of Y-27632 to improve the culture of adult human adipose-derived stem cells. *Stem Cells and Cloning Advances and Applications*. **8**, 15–26. DOI:10.2147/SCCAA.S66597.
- Lee J.Y., Zhou Z., Taub P.J., Ramcharan M., Li Y., Akinbiyi T., Maharam E.R., Leong D.J., Laudier D.M., Ruike T., Torina P.J., Zaidi M., Majeska R.J., Schaffler M.B., Flatow E.L. und Sun H.B. (2011) BMP-12 treatment of adult

- mesenchymal stem cells in vitro augments tendon-like tissue formation and defect repair in vivo. *PloS one*. **6(3)**, e17531. DOI:10.1371/journal.pone.0017531.
- Lee J., Guarino V., Gloria A., Ambrosio L., Tae G., Kim Y.H., Jung Y., Kim S.-H. und Kim S.H. (2010) Regeneration of Achilles' tendon: the role of dynamic stimulation for enhanced cell proliferation and mechanical properties. *Journal of biomaterials science. Polymer edition*. **21(8-9)**, 1173–1190. DOI:10.1163/092050609X12471222313524.
- Leone L., Raffa S., Vetrano M., Ranieri D., Malisan F., Scrofani C., Vulpiani M.C., Ferretti A., Torrisi M.R. und Visco V. (2016) Extracorporeal Shock Wave Treatment (ESWT) enhances the in vitro-induced differentiation of human tendon-derived stem/progenitor cells (hTSPCs). *Oncotarget*. **7(6)**, 6410–6423. DOI:10.18632/oncotarget.7064.
- Leung M.C., Jana S., Tsao C.T., und Zhang M. (2013) Tenogenic differentiation of human bone marrow stem cells via a combinatory effect of aligned chitosan-poly-caprolactone nanofibers and TGF- β 3. *Journal of materials chemistry B*. **1(47)**, 6516-6524
- Li C., Wu X., Tong J., Yang X., Zhao J., Zheng Q., Zhao G. und Ma Z. (2015) Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue under xeno-free conditions for cell therapy. *Stem Cell Research Therapy*. **6(1)**, 55. DOI:10.1186/s13287-015-0066-5.
- Li M., Jia J., Li S., Cui B., Huang J., Guo Z., Ma K., Wang L. und Cui C. (2021) Exosomes derived from tendon stem cells promote cell proliferation and migration through the TGF β signal pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **536**, 88–94. DOI:10.1016/j.bbrc.2020.12.057.
- Li W., Zhao J., Wang J., Sun L., Xu H., Sun W., Pan Y., Wang H. und Zhang W.-B. (2020) ROCK-TAZ signaling axis regulates mechanical tension-induced osteogenic differentiation of rat cranial sagittal suture mesenchymal stem cells. *Journal of cellular physiology*. **235(9)**, 5972–5984. DOI:10.1002/jcp.29522.
- Li Y., Liu X., Liu X., Peng Y., Zhu B., Guo S., Wang C., Wang D. und Li S. (2022) Transforming growth factor- β signalling pathway in tendon healing. *Growth factors (Chur, Switzerland)*. **40(3-4)**, 98–107. DOI: 10.1080/08977194.2022.2082294.

- Li Z., Han S., Wang X., Han F., Zhu X., Zheng Z., Wang H., Zhou Q., Wang Y., Su L., Shi J., Tang C. und Hu D. (2015) Rho kinase inhibitor Y-27632 promotes the differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells into keratinocyte-like cells in xeno-free conditioned medium. *Stem Cell Res Ther* **6(1)**, 17. DOI:10.1186/s13287-015-0008-2.
- Lind B., Ohberg L. und Alfredson H. (2006) Sclerosing polidocanol injections in mid-portion Achilles tendinosis: remaining good clinical results and decreased tendon thickness at 2-year follow-up. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy official journal of the ESSKA*. **14(12)**, 1327–1332. DOI:10.1007/s00167-006-0161-3.
- Liu C., Luo J.-W., Liang T., Lin L.-X., Luo Z.-P., Zhuang Y.-Q. und Sun Y.-L. (2018) Matrix stiffness regulates the differentiation of tendon-derived stem cells through FAK-ERK1/2 activation. *Experimental cell research*. **373(1-2)**, 62–70. DOI:10.1016/j.yexcr.2018.08.023.
- Liu X., Zhu B., Li Y., Liu X., Guo S., Wang C., Li S. und Wang D. (2021) The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Tendon Healing. *Frontiers in physiology*. **12**. DOI:10.3389/fphys.2021.766080.
- Long C., Wang Z., Legrand A., Chattopadhyay A., Chang J. und Fox P.M. (2018) Tendon Tissue Engineering: Mechanism and Effects of Human Tenocyte Coculture With Adipose-Derived Stem Cells. *The Journal of hand surgery*. **43(2)**, 183.e1-183.e9. DOI:10.1016/j.jhsa.2017.07.031.
- Lorda-Diez C.I., Montero J.A., Martinez-Cue C., Garcia-Porrero J.A. und Hurle J.M. (2009) Transforming growth factors beta coordinate cartilage and tendon differentiation in the developing limb mesenchyme. *J. Biol. Chem*. **284(43)**, 29988–29996. DOI:10.1074/jbc.M109.014811.
- Lovati A. B., Bottagisio M. und Moretti M. (2016). Decellularized and Engineered Tendons as Biological Substitutes: A Critical Review. *Stem cells international*. **2016**:7276150. <https://doi.org/10.1155/2016/7276150>
- Luo R., Hu R., Xu J., Yu P., Wu X., Zhe M., Liu M., Xing F., Xiang Z., Zhou C., Fan Y. und Zhang X. (2023). Decellularized extracellular matrix as a promising biomaterial for musculoskeletal tissue regeneration. *Nanotechnology Reviews*. **12(1)**, 20230151. DOI:10.1515/ntrev-2023-0151
- Maeda T., Sakabe T., Sunaga A., Sakai K., Rivera A.L., Keene D.R., Sasaki T., Stavnezer E., Iannotti J., Schweitzer R., Ilic D., Baskaran H. und Sakai T.

- (2011) Conversion of mechanical force into TGF- β -mediated biochemical signals. *Current biology CB*. **21(11)**, 933–941. DOI:10.1016/j.cub.2011.04.007.
- Maharam E., Yaport M., Villanueva N.L., Akinyibi T., Laudier D., He Z., Leong D.J. und Sun H.B. (2015) Rho/Rock signal transduction pathway is required for MSC tenogenic differentiation. *Bone research*. **3**. DOI:10.1038/boneres.2015.15.
- Manning C.N., Martel C., Sakiyama-Elbert S.E., Silva M.J., Shah S., Gelberman R.H. und Thomopoulos S. (2015) Adipose-derived mesenchymal stromal cells modulate tendon fibroblast responses to macrophage-induced inflammation in vitro. *Stem Cell Research & Therapy*. **6**, 74. DOI:10.1186/s13287-015-0059-4.
- Mbongue J.C., Nicholas D.A., Torrez T.W., Kim N.-S., Firek A.F. und Langridge W.H.R. (2015) The Role of Indoleamine 2, 3-Dioxygenase in Immune Suppression and Autoimmunity. *Vaccines*. **3(3)**, 703–729. DOI:10.3390/vaccines3030703.
- McCoy A.M. (2015) Animal Models of Osteoarthritis: Comparisons and Key Considerations. *Veterinary pathology*. **52(5)**, 803–818. DOI:10.1177/0300985815588611.
- Meisel R., Zibert A., Laryea M., Göbel U., Däubener W. und Dilloo D. (2004) Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood*. **103(12)**, 4619–4621. DOI:10.1182/blood-2003-11-3909.
- Melzer M., Burk J., Guest D.J. und Dudhia J. (2023) Influence of Rho/ROCK inhibitor Y-27632 on proliferation of equine mesenchymal stromal cells. *Front. Vet. Sci*. **10**. DOI:10.3389/fvets.2023.1154987.
- Millar N.L., Hueber A.J., Reilly J.H., Xu Y., Fazzi U.G., Murrell G.A.C. und McInnes I.B. (2010) Inflammation is present in early human tendinopathy. *The American journal of sports medicine*. **38(10)**, 2085–2091. DOI:10.1177/0363546510372613.
- Mizukami A. und Swiech K. (2018) Mesenchymal Stromal Cells: From Discovery to Manufacturing and Commercialization. *Stem cells international*. **2018**: 4083921. DOI:10.1155/2018/4083921.

- Molloy T., Wang Y. und Murrell G. (2003) The roles of growth factors in tendon and ligament healing. *Sports medicine (Auckland, N.Z.)*. **33(5)**, 381–394. DOI:10.2165/00007256-200333050-00004.
- Morita W., Snelling S.J.B., Wheway K., Watkins B., Appleton L., Carr A.J. und Dakin S.G. (2019) ERK1/2 drives IL-1 β -induced expression of TGF- β 1 and BMP-2 in torn tendons. *Scientific reports*. **9(1)**. DOI:10.1038/s41598-019-55387-1.
- Narumiya S., Ishizaki T. und Ufhata M. (2000) Use and properties of ROCK-specific inhibitor Y-27632, in: Regulators and Effectors of Small GTPases - Part D: Rho Family, *Elsevier*. pp. 273–284.
- Newby A.C. (2016) Metalloproteinase production from macrophages - a perfect storm leading to atherosclerotic plaque rupture and myocardial infarction. *Experimental physiology*. **101(11)**, 1327–1337. DOI:10.1113/EP085567.
- Ning L.J., Zhang Y.J., Zhang Y., Qing Q., Jiang Y.L., Yang J.L., Luo J.C. und Qin T.W. (2015) The utilization of decellularized tendon slices to provide an inductive microenvironment for the proliferation and tenogenic differentiation of stem cells. *Biomaterials*. **52**:539-50. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2015.02.061.
- Ning C., Li P., Gao C., Fu L., Liao Z., Tian G., Yin H., Li M., Sui X., Yuan Z., Liu S. und Guo Q. (2023) Recent advances in tendon tissue engineering strategy. *Front Bioeng Biotechnol*. **11**,1115312. DOI: 10.3389/fbioe.2023.1115312.
- Noronha N.d.C., Mizukami A., Caliári-Oliveira C., Cominal J.G., Rocha J.L.M., Covas D.T., Swiech K. und Malmegrim K.C.R. (2019) Priming approaches to improve the efficacy of mesenchymal stromal cell-based therapies. *Stem Cell Research Therapy*. **10(1)**, 131. DOI:10.1186/s13287-019-1224-y.
- Ock S.-A., Lee Y.-M., Park J.-S., Shivakumar S.B., Moon S.-W., Sung N.-J., Lee W.-J., Jang S.-J., Park J.-M., Lee S.-C., Lee S.-L. und Rho G.-J. (2016) Evaluation of phenotypic, functional and molecular characteristics of porcine mesenchymal stromal/stem cells depending on donor age, gender and tissue source. *The Journal of veterinary medical science*. **78(6)**, 987–995. DOI:10.1292/jvms.15-0596.
- Odusanya R. (2022). Investigating the effects of Rho-associated kinase (ROCK) inhibitor Y-27632 on Mesenchymal Stem Cell (MSC) proliferation and functionality during culture. *Thesis for: BSc Biomedical Science, Aston University*, DOI:10.13140/RG.2.2.11920.69125

- Ohberg L., Lorentzon R. und Alfredson H. (2001) Neovascularisation in Achilles tendons with painful tendinosis but not in normal tendons: an ultrasonographic investigation. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy of official journal of the ESSKA*. **9(4)**, 233–238. DOI:10.1007/s001670000189.
- Padhi A. und Nain A.S. (2020) ECM in Differentiation: A Review of Matrix Structure, Composition and Mechanical Properties. *Annals of biomedical engineering*. **48(3)**, 1071–1089. DOI:10.1007/s10439-019-02337-7.
- Park H.J., Kim J., Saima F.T., Rhee K.-J., Hwang S., Kim M.Y., Baik S.K., Eom Y.W. und Kim H.-S. (2018) Adipose-derived stem cells ameliorate colitis by suppression of inflammasome formation and regulation of M1-macrophage population through prostaglandin E2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **498(4)**, 988–995. DOI:10.1016/j.bbrc.2018.03.096.
- Patel D., Sharma S., Screen H.R.C. und Bryant S.J. (2018) Effects of cell adhesion motif, fiber stiffness, and cyclic strain on tenocyte gene expression in a tendon mimetic fiber composite hydrogel. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **499(3)**, 642–647. DOI:10.1016/j.bbrc.2018.03.203.
- Patterson-Kane J.C., Becker D.L. und Rich T. (2012) The pathogenesis of tendon microdamage in athletes: the horse as a natural model for basic cellular research. *Journal of comparative pathology*. **147(2-3)**, 227–247. DOI:10.1016/j.jcpa.2012.05.010.
- Peng Y., Chen Z., Chen Y., Li S., Jiang Y., Yang H., Wu C., You F., Zheng C., Zhu J., Tan Y., Qin X. und Liu Y. (2019) ROCK isoforms differentially modulate cancer cell motility by mechanosensing the substrate stiffness. *Acta biomaterialia*. **88**, 86–101. DOI:10.1016/j.actbio.2019.02.015.
- Perucca Orfei C., Viganò M., Pearson J.R., Colombini A., Luca P. de, Ragni E., Santos-Ruiz L. und Girolamo L. (2019) In Vitro Induction of Tendon-Specific Markers in Tendon Cells, Adipose- and Bone Marrow-Derived Stem Cells is Dependent on TGF β 3, BMP-12 and Ascorbic Acid Stimulation. *International journal of molecular sciences*. **20(1)**. DOI:10.3390/ijms20010149.
- Petersen W., Pufe T., Pfrommer S. und Tillmann B. (2005) Überlastungsschäden der Achillessehne: Die Bedeutung von Blutgefäßversorgung und Angiogenese. *Der Orthopäde*. **34(6)**, 533–542. DOI:10.1007/s00132-005-0808-7.

- Petersen W., Stein V. und Tillmann B. (1999) Blutgefäßversorgung der Quadrizepssehne. *Der Unfallchirurg*. **102(7)**, 543–547. DOI:10.1007/s001130050448.
- Petersen W., Pufe T., Unterhauser F., Zantop T., Mentlein R. und Weiler A. (2003) The splice variants 120 and 164 of the angiogenic peptide vascular endothelial cell growth factor (VEGF) are expressed during Achilles tendon healing. *Archives of orthopaedic and trauma surgery*. **123(9)**, 475–480. DOI:10.1007/s00402-003-0490-3.
- Pfaffl M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*. **29(9)**, e45. DOI:10.1093/nar/29.9.e45.
- Popielarczyk T., Nain A. und Barrett J. (2017) Aligned Nanofiber Topography Directs the Tenogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Applied Sciences*. **7(1)**, 59. DOI:10.3390/app7010059.
- Pridgen B.C., Woon C.Y., Kim M., Thorfinn J., Lindsey D., Pham H., und Chang J. (2011). Flexor tendon tissue engineering: acellularization of human flexor tendons with preservation of biomechanical properties and biocompatibility. *Tissue engineering, Part C, Methods*. **17(8)**, 819–828. DOI:10.1089/ten.tec.2010.0457
- Pryce B.A., Watson S.S., Murchison N.D., Staverosky J.A., Dünker N. und Schweitzer R. (2009) Recruitment and maintenance of tendon progenitors by TGF-beta signaling are essential for tendon formation. *Development (Cambridge, England)*. **136(8)**, 1351–1361. DOI:10.1242/dev.027342.
- Pufe T., Petersen W., Tillmann B. und Mentlein R. (2001) The angiogenic peptide vascular endothelial growth factor is expressed in foetal and ruptured tendons. *Virchows Archiv an international journal of pathology*. **439(4)**, 579–585. DOI:10.1007/s004280100422.
- Rao Y., Zhu C., Suen H.C., Huang S., Liao J., Ker D.F.E., Tuan R.S. und Wang D. (2022). Tenogenic induction of human adipose-derived stem cells by soluble tendon extracellular matrix: composition and transcriptomic analyses. *Stem cell research & therapy*. **13(1)**, 380. DOI:10.1186/s13287-022-03038-0
- Reed S.A. und Johnson S.E. (2014) Expression of scleraxis and tenascin C in equine adipose and umbilical cord blood derived stem cells is dependent upon substrata and FGF supplementation. *Cytotechnology*. **66(1)**, 27–35. DOI:10.1007/s10616-012-9533-3.

- Ribitsch I., Baptista P.M., Lange-Consiglio A., Melotti L., Patruno M., Jenner F., Schnabl-Feichter E., Dutton L.C., Connolly D.J., van Steenbeek F.G., Dudhia J. und Penning L.C. (2020) Large Animal Models in Regenerative Medicine and Tissue Engineering: To Do or Not to Do. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. **8**, 972. DOI:10.3389/fbioe.2020.00972.
- Riento K. und Ridley A.J. (2003) Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nature reviews. Molecular cell biology*. **4(6)**, 446–456. DOI:10.1038/nrm1128.
- Rinoldi C., Costantini M., Kijeńska-Gawrońska E., Testa S., Fornetti E., Heljak M., Ćwiklińska M., Buda R., Baldi J., Cannata S., Guzowski J., Gargioli C., Khademhosseini A. und Swieszkowski W. (2019) Tendon Tissue Engineering: Effects of Mechanical and Biochemical Stimulation on Stem Cell Alignment on Cell-Laden Hydrogel Yarns. *Advanced healthcare materials*. **8(7)**, e1801218. DOI:10.1002/adhm.201801218.
- Rodas G., Soler-Rich R., Rius-Tarruella J., Alomar X., Balias R., Orozco L., Masci L. und Maffulli N. (2021) Effect of Autologous Expanded Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells or Leukocyte-Poor Platelet-Rich Plasma in Chronic Patellar Tendinopathy (With Gap 3 mm): Preliminary Outcomes After 6 Months of a Double-Blind, Randomized, Prospective Study. *The American journal of sports medicine*. **49(6)**, 1492–1504. DOI:10.1177/0363546521998725.
- Rodríguez-Vita J., Sánchez-Galán E., Santamaría B., Sánchez-López E., Rodrigues-Díez R., Blanco-Colio L.M., Egido J., Ortiz A. und Ruiz-Ortega M. (2008) Essential role of TGF-beta/Smad pathway on statin dependent vascular smooth muscle cell regulation. *PloS one*. **3(12)**, e3959. DOI:10.1371/journal.pone.0003959.
- Romero A., Barrachina L., Ranera B., Remacha A.R., Moreno B., Blas I. de, Sanz A., Vázquez F.J., Vitoria A., Junquera C., Zaragoza P. und Rodellar C. (2017) Comparison of autologous bone marrow and adipose tissue derived mesenchymal stem cells, and platelet rich plasma, for treating surgically induced lesions of the equine superficial digital flexor tendon. *Veterinary journal (London, England 1997)*. **224**, 76–84. DOI:10.1016/j.tvjl.2017.04.005.
- Roßbach B.P., Gülecüyüz M.F., Kempfert L., Pietschmann M.F., Ullmann T., Ficklscherer A., Niethammer T.R., Zhang A., Klar R.M. und Müller P.E. (2020)

- Rotator Cuff Repair With Autologous Tenocytes and Biodegradable Collagen Scaffold: A Histological and Biomechanical Study in Sheep. *The American journal of sports medicine*. **48(2)**, 450–459. DOI:10.1177/0363546519892580.
- Roth S.P., Glauche S.M., Plenge A., Erbe I., Heller S. und Burk J. (2017) Automated freeze-thaw cycles for decellularization of tendon tissue - a pilot study. *BMC biotechnology*. **17(1)**, 13. DOI:10.1186/s12896-017-0329-6.
- Roth S.P., Schubert S., Scheibe P., Groß C., Brehm W. und Burk J. (2018) Growth Factor-Mediated Tenogenic Induction of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells Is Altered by the Microenvironment of Tendon Matrix. *Cell transplantation*. **27(10)**, 1434–1450. DOI:10.1177/0963689718792203.
- Roth S.P., Brehm W., Groß C., Scheibe P., Schubert S. und Burk J. (2019) Transforming Growth Factor Beta 3-Loaded Decellularized Equine Tendon Matrix for Orthopedic Tissue Engineering. *International journal of molecular sciences*. **20(21)**. DOI:10.3390/ijms20215474.
- Roth S.P., Burk J., Brehm W. und Troillet A. (2022) MSC in Tendon and Joint Disease: The Context-Sensitive Link Between Targets and Therapeutic Mechanisms. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. **10**, 855095. DOI:10.3389/fbioe.2022.855095.
- Russo V., El Khatib M., Prencipe G., Citeroni M.R., Faydaver M., Mauro A., Berardinelli P., Cerveró-Varona A., Haidar-Montes A.A., Turriani M., Di Giacinto O., Raspa M., Scavizzi F., Bonaventura F., Stöckl J. und Barboni B. (2022) Tendon Immune Regeneration: Insights on the Synergetic Role of Stem and Immune Cells during Tendon Regeneration. *Cells*. **11(3)**. DOI:10.3390/cells11030434.
- Sahin H., Tholema N., Petersen W., Raschke M.J. und Stange R. (2012) Impaired biomechanical properties correlate with neoangiogenesis as well as VEGF and MMP-3 expression during rat patellar tendon healing. *Journal of orthopaedic research official publication of the Orthopaedic Research Society*. **30(12)**, 1952–1957. DOI:10.1002/jor.22147.
- Schizas N., Weiss R., Lian O., Frihagen F., Bahr R. und Ackermann P.W. (2012) Glutamate receptors in tendinopathic patients. *Journal of orthopaedic research official publication of the Orthopaedic Research Society*. **30(9)**, 1447–1452. DOI:10.1002/jor.22094.

- Schnabel L.V., Lynch M.E., van der Meulen M.C.H., Yeager A.E., Kornatowski M.A. und Nixon A.J. (2009) Mesenchymal stem cells and insulin-like growth factor-I gene-enhanced mesenchymal stem cells improve structural aspects of healing in equine flexor digitorum superficialis tendons. *Journal of orthopaedic research official publication of the Orthopaedic Research Society*. **27(10)**, 1392–1398. DOI:10.1002/jor.20887.
- Schneider P.R.A., Buhrmann C., Mobasheri A., Matis U. und Shakibaei M. (2011) Three-dimensional high-density co-culture with primary tenocytes induces tenogenic differentiation in mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research official publication of the Orthopaedic Research Society*. **29(9)**, 1351–1360. DOI:10.1002/jor.21400.
- Schubert S., Brehm W., Hillmann A. und Burk J. (2018) Serum-free human MSC medium supports consistency in human but not in equine adipose-derived multipotent mesenchymal stromal cell culture. *Cytometry A*. **93(1)**:60-72. DOI: 10.1002/cyto.a.23240.
- Schwarz C., Leicht U., Rothe C., Drosse I., Luibl V., Röcken M., und Schieker M. (2012) Effects of different media on proliferation and differentiation capacity of canine, equine and porcine adipose derived stem cells. *Research in veterinary science*. **93(1)**, 457–462. DOI:10.1016/j.rvsc.2011.08.010
- Selmani Z., Naji A., Zidi I., Favier B., Gaiffe E., Obert L., Borg C., Saas P., Tiberghien P., Rouas-Freiss N., Carosella E.D. und Deschaseaux F. (2008) Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. **26(1)**, 212–222. DOI:10.1634/stemcells.2007-0554.
- Sharma R.I. und Snedeker J.G. (2010) Biochemical and biomechanical gradients for directed bone marrow stromal cell differentiation toward tendon and bone. *Biomaterials*. **31(30)**, 7695–7704. DOI:10.1016/j.biomaterials.2010.06.046.
- Shen H., Gelberman R.H., Silva M.J., Sakiyama-Elbert S.E. und Thomopoulos S. (2013) BMP12 induces tenogenic differentiation of adipose-derived stromal cells. *PloS one*. **8(10)**, e77613. DOI:10.1371/journal.pone.0077613.
- Shen H., Korpakakis I., Havlioglu N., Linderman S.W., Sakiyama-Elbert S.E., Erickson I.E., Zarembinski T., Silva M.J., Gelberman R.H. und Thomopoulos S. (2016) The effect of mesenchymal stromal cell sheets on the inflammatory

- stage of flexor tendon healing. *Stem Cell Research & Therapy*. **7(1)**, 144. DOI:10.1186/s13287-016-0406-0.
- Sheng R., Liu J., Zhang W., Luo Y., Chen Z., Chi J., Mo Q., Wang M., Sun Y., Liu C., Zhang Y., Zhu Y., Kuang B., Yan C., Liu H., Backman L.J. und Chen J. (2023) Material Stiffness in Cooperation with Macrophage Paracrine Signals Determines the Tenogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Advanced science (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Germany)*. e2206814. DOI:10.1002/advs.202206814.
- Shih Y.-R.V., Tseng K.-F., Lai H.-Y., Lin C.-H. und Lee O.K. (2011) Matrix stiffness regulation of integrin-mediated mechanotransduction during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Journal of bone and mineral research the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. **26(4)**, 730–738. DOI:10.1002/jbmr.278.
- Shojaee A., Ejeian F., Parham A. und Nasr Esfahani M.H. (2022). Optimizing Tenogenic Differentiation of Equine Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells (eq-ASC) Using TGFB3 Along with BMP Antagonists. *Cell journal*. **24(7)**, 370–379. <https://doi.org/10.22074/cellj.2022.7892>
- Silva A.C., Rodrigues S.C., Caldeira J., Nunes A.M., Sampaio-Pinto V., Resende T.P., Oliveira M.J., Barbosa M.A., Thorsteinsdóttir S., Nascimento D.S. und Pinto-do-Ó P. (2016) Three-dimensional scaffolds of fetal decellularized hearts exhibit enhanced potential to support cardiac cells in comparison to the adult. *Biomaterials*. **104**:52-64. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2016.06.062.
- Smith C.A., Board T.N., Rooney P., Eagle M.J., Richardson S.M. und Hoyland J.A. (2017) Human decellularized bone scaffolds from aged donors show improved osteoinductive capacity compared to young donor bone. *PLoS One*. **12(5)**:e0177416. DOI: 10.1371/journal.pone.0177416.
- Smith R.K.W., Korda M., Blunn G.W., und Goodship A.E. (2003). Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment. *Equine veterinary journal*. **35(1)**, 99–102. DOI: <https://doi.org/10.2746/04251640377546738>

- Smith R.K.W. Mesenchymal stem cell therapy for equine tendinopathy. (2008) *Disability and rehabilitation*. **30(20-22)**, 1752–1758. DOI:10.1080/09638280701788241.
- Smith R.K.W., Werling N.J., Dakin S.G., Alam R., Goodship A.E. und Dudhia J. (2013) Beneficial effects of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells in naturally occurring tendinopathy. *PloS one*. **8(9)**, e75697. DOI:10.1371/journal.pone.0075697.
- Sole A., Spriet M., Padgett K.A., Vaughan B., Galuppo L.D., Borjesson D.L., Wisner E.R. und Vidal M.A. (2013) Distribution and persistence of technetium-99 hexamethyl propylene amine oxime-labelled bone marrow-derived mesenchymal stem cells in experimentally induced tendon lesions after intratendinous injection and regional perfusion of the equine distal limb. *Equine veterinary journal*. **45(6)**, 726–731. DOI:10.1111/evj.12063.
- Stein B.E., Stroh D.A. und Schon L.C. (2015) Outcomes of acute Achilles tendon rupture repair with bone marrow aspirate concentrate augmentation. *International orthopaedics*. **39(5)**, 901–905. DOI:10.1007/s00264-015-2725-7.
- Stein V., Laprell H., Tinnemeyer S. und Petersen W. (2000) Quantitative assessment of intravascular volume of the human Achilles tendon. *Acta orthopaedica Scandinavica*. **71(1)**, 60–63. DOI:10.1080/00016470052943919.
- Stolk M., Klatter-Schulz F., Schmock A., Minkwitz S., Wildemann B. und Seifert M. (2017) New insights into tenocyte-immune cell interplay in an in vitro model of inflammation. *Scientific reports*. **7(1)**, 9801. DOI:10.1038/s41598-017-09875-x.
- Talati N., Kamato D., Piva T.J., Little P.J. und Osman N. (2018) Thrombin promotes PAI-1 expression and migration in keratinocytes via ERK dependent Smad linker region phosphorylation. *Cellular signalling*. **47**, 37–43. DOI:10.1016/j.cellsig.2018.03.009.
- Tang J., Xie Q., Pan G., Wang J. und Wang M. (2006) Mesenchymal stem cells participate in angiogenesis and improve heart function in rat model of myocardial ischemia with reperfusion. *European journal of cardio-thoracic surgery official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*. **30(2)**, 353–361. DOI:10.1016/j.ejcts.2006.02.070.

- Tao H., Han Z., Han Z.C. und Li Z. (2016) Proangiogenic Features of Mesenchymal Stem Cells and Their Therapeutic Applications. *Stem cells international*. **2016**, 1314709. DOI:10.1155/2016/1314709.
- Tibbitt M.W. und Anseth K.S. (2009) Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. *Biotechnology and bioengineering*. **103(4)**, 655–663. DOI:10.1002/bit.22361.
- Tokunaga T., Shukunami C., Okamoto N., Taniwaki T., Oka K., Sakamoto H., Ide J., Mizuta H. und Hiraki Y. (2015) FGF-2 Stimulates the Growth of Tenogenic Progenitor Cells to Facilitate the Generation of Tenomodulin-Positive Tenocytes in a Rat Rotator Cuff Healing Model. *The American journal of sports medicine*. **43(10)**, 2411–2422. DOI:10.1177/0363546515597488.
- Tomás A.R., Gonçalves A.I., Paz E., Freitas P., Domingues R.M.A. und Gomes M.E. (2019) Magneto-mechanical actuation of magnetic responsive fibrous scaffolds boosts tenogenesis of human adipose stem cells. *Nanoscale*. **11(39)**, 18255–18271. DOI:10.1039/c9nr04355a.
- Totter S., Johnson S.A., Crapo P.M., Reing J.E., Zhang L., Jiang H., Medberry C.J., Reines B. und Badylak S.F. (2011) The effect of source animal age upon extracellular matrix scaffold properties. *Biomaterials*. **32(1)**:128-36. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.09.006.
- Ulpiano C., da Silva C.L. und Monteiro G.A. (2021) Mesenchymal Stromal Cells (MSCs): A Promising Tool for Cell-Based Angiogenic Therapy. *Current gene therapy*. **21(5)**, 382–405. DOI:10.2174/1566523221666210917114353.
- Usuelli F.G., Grassi M., Maccario C., Vigano' M., Lanfranchi L., Alfieri Montrasio U. und Girolamo L. de (2018) Intratendinous adipose-derived stromal vascular fraction (SVF) injection provides a safe, efficacious treatment for Achilles tendinopathy: results of a randomized controlled clinical trial at a 6-month follow-up. *Knee surgery, sports traumatology, arthroscopy official journal of the ESSKA*. **26(7)**, 2000–2010. DOI:10.1007/s00167-017-4479-9.
- van den Akker G.G., van Beuningen H.M., Vitters E.L., Koenders M.I., van de Loo F.A., van Lent P.L., Blaney Davidson E.N. und van der Kraan P.M. (2017) Interleukin 1 β -induced SMAD2/3 linker modifications are TAK1 dependent and delay TGF β signaling in primary human mesenchymal stem cells. *Cellular signalling*. **40**, 190–199. DOI:10.1016/j.cellsig.2017.09.010.

- Vandenberghe A., Broeckx S.Y., Beerts C., Seys B., Zimmerman M., Verweire I., Suls M. und Spaas J.H. (2015) Tenogenically Induced Allogeneic Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Proximal Suspensory Ligament Desmitis in a Horse. *Frontiers in veterinary science*. **2**, 49. DOI:10.3389/fvets.2015.00049.
- Vasandan A.B., Jahnavi S., Shashank C., Prasad P., Kumar A. und Prasanna S.J. (2016) Human Mesenchymal stem cells program macrophage plasticity by altering their metabolic status via a PGE2-dependent mechanism. *Scientific reports*. **6**. DOI:10.1038/srep38308.
- Vermeulen S., Roumans N., Honig F., Carlier A., Hebels D.G.A.J., Eren A.D., Dijke P. ten, Vasilevich A. und Boer J. de (2020) Mechanotransduction is a context-dependent activator of TGF- β signaling in mesenchymal stem cells. *Biomaterials*. **259**. DOI:10.1016/j.biomaterials.2020.120331.
- Veronesi F., Torricelli P., Della Bella E., Pagani S. und Fini M. (2015) In vitro mutual interaction between tenocytes and adipose-derived mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*. **17(2)**, 215–223. DOI:10.1016/j.jcyt.2014.10.006.
- Vogel S., Ullm F., Damaris Müller C., Pompe T. und Hempel U. (2020) Remodeling of Three-Dimensional Collagen I Matrices by Human Bone Marrow Stromal Cells during Osteogenic Differentiation In Vitro. *ACS applied biomaterials*. **3(10)**, 6967–6978. DOI:10.1021/acsabm.0c00856.
- Wagner T.U. (2007) Bone morphogenetic protein signaling in stem cells--one signal, many consequences. *The FEBS journal*. **274(12)**, 2968–2976. DOI:10.1111/j.1742-4658.2007.05839.x.
- Wang B., Liu W., Zhang Y., Jiang Y., Zhang W.J., Zhou G., Cui L. und Cao Y. (2008) Engineering of extensor tendon complex by an ex vivo approach. *Biomaterials*. **29(20)**, 2954–2961. DOI:10.1016/j.biomaterials.2008.03.038.
- Wang Z., Long D.W., Huang Y., Chen W.C.W., Kim K., und Wang Y. (2019). Decellularized neonatal cardiac extracellular matrix prevents widespread ventricular remodeling in adult mammals after myocardial infarction. *Acta biomaterialia*. **87**, 140–151. DOI:10.1016/j.actbio.2019.01.062
- Wang D., Pun C.C.M., Huang S., Tang T.C.M., Ho K.K.W., Rothrauff B.B., Yung P.S.H., Blocki A.M., Ker E.D.F. und Tuan R. S. (2020). Tendon-derived extracellular matrix induces mesenchymal stem cell tenogenesis via an integrin/transforming growth factor- β crosstalk-mediated mechanism. *FASEB*

- journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* **34(6)**, 8172–8186. DOI:10.1096/fj.201902377RR
- Weiskirchen R., Weiskirchen S. und Tacke F. (2019) Organ and tissue fibrosis: Molecular signals, cellular mechanisms and translational implications. *Molecular aspects of medicine.* **65**, 2–15. DOI:10.1016/j.mam.2018.06.003.
- Woods A., Wang G. und Beier F. (2005) RhoA/ROCK signaling regulates Sox9 expression and actin organization during chondrogenesis. *Journal of Biological Chemistry.* **280(12)**, 11626–11634. DOI:10.1074/jbc.M409158200.
- Woods A. und Beier F. (2006) RhoA/ROCK signaling regulates chondrogenesis in a context-dependent manner. *Journal of Biological Chemistry.* **281(19)**, 13134–13140. DOI:10.1074/jbc.M509433200.
- Wu S., Wang Y., Streubel P.N. und Duan B. (2017) Living nanofiber yarn-based woven biotextiles for tendon tissue engineering using cell tri-culture and mechanical stimulation. *Acta biomaterialia.* **62**, 102–115. DOI:10.1016/j.actbio.2017.08.043.
- Wu T., Liu Y., Wang B., Sun Y., Xu J., Yuk-Wai L.W., Xu L., Zhang J. und Li G. (2016) The Use of Cocultured Mesenchymal Stem Cells with Tendon-Derived Stem Cells as a Better Cell Source for Tendon Repair. *Tissue engineering, Part A.* **22(19-20)**, 1229–1240. DOI:10.1089/ten.TEA.2016.0248.
- Wu Y., Peng Y., Gao D., Feng C., Yuan X., Li H., Wang Y., Yang L., Huang S. und Fu X. (2015) Mesenchymal stem cells suppress fibroblast proliferation and reduce skin fibrosis through a TGF- β 3-dependent activation. *The international journal of lower extremity wounds.* **14(1)**, 50–62. DOI:10.1177/1534734614568373.
- Wu Z., Zhang S., Zhou L., Cai J., Tan J., Gao X., Zeng Z. und Li D. (2017) Thromboembolism Induced by Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Infusion: A Report of Two Cases and Literature Review. *Transplantation proceedings.* **49(7)**, 1656–1658. DOI:10.1016/j.transproceed.2017.03.078.
- Xu B., Song G., Ju Y., Li X., Song Y. und Watanabe S. (2012) RhoA/ROCK, cytoskeletal dynamics, and focal adhesion kinase are required for mechanical stretch-induced tenogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Journal of cellular physiology.* **227(6)**, 2722–2729. DOI:10.1002/jcp.23016.
- Xu K., Sun Y., Kh Al-Ani M., Wang C., Sha Y., Sung K. P., Dong N., Qiu X., und Yang L. (2018). Synergistic promoting effects of bone morphogenetic protein

- 12/connective tissue growth factor on functional differentiation of tendon derived stem cells and patellar tendon window defect regeneration. *Journal of biomechanics*. **66**, 95–102. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2017.11.004>
- Xu T., Wu M., Feng J., Lin X. und Gu Z. (2012) RhoA/Rho kinase signaling regulates transforming growth factor- β 1-induced chondrogenesis and actin organization of synovium-derived mesenchymal stem cells through interaction with the Smad pathway. *International journal of molecular medicine*. **30(5)**, 1119–1125. DOI:10.3892/ijmm.2012.1107.
- Xu Y., Dong S., Zhou Q., Mo X., Song L., Hou T., Wu J., Li S., Li Y., Li P., Gan Y. und Xu J. (2014) The effect of mechanical stimulation on the maturation of TDSCs-poly(L-lactide-co-e-caprolactone)/collagen scaffold constructs for tendon tissue engineering. *Biomaterials*. **35(9)**, 2760–2772. DOI:10.1016/j.biomaterials.2013.12.042.
- Xu Y., Yin H., Chu J., Eglin D., Serra T. und Docheva D. (2021) An anisotropic nanocomposite hydrogel guides aligned orientation and enhances tenogenesis of human tendon stem/progenitor cells. *Biomaterials science*. **9(4)**, 1237–1245. DOI:10.1039/d0bm01127d.
- Yang G., Rothrauff B.B., Lin H., Gottardi R., Alexander P.G. und Tuan R.S. (2013) Enhancement of tenogenic differentiation of human adipose stem cells by tendon-derived extracellular matrix. *Biomaterials*. **34(37)**, 9295–9306. DOI:10.1016/j.biomaterials.2013.08.054.
- Yang G., Rothrauff B.B., Lin H., Yu S. und Tuan R.S. (2017) Tendon-Derived Extracellular Matrix Enhances Transforming Growth Factor- β 3-Induced Tenogenic Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells. *Tissue engineering, Part A*. **23(3-4)**, 166–176. DOI:10.1089/ten.TEA.2015.0498.
- Yepes H., Tang M., Morris S.F. und Stanish W.D. (2008) Relationship between hypovascular zones and patterns of ruptures of the quadriceps tendon. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*. **90(10)**, 2135–2141. DOI:10.2106/JBJS.G.01200.
- Yi B., Xu Q. und Liu W. (2022) An overview of substrate stiffness guided cellular response and its applications in tissue regeneration. *Bioactive Materials*. **15**, 82–102. DOI:10.1016/j.bioactmat.2021.12.005.

- Yin, Q., Xu, N., Xu, D., Dong, M., Shi, X., Wang, Y., Hao, Z., Zhu, S., Zhao, D., Jin, H., & Liu, W. (2020). Comparison of senescence-related changes between three- and two-dimensional cultured adipose-derived mesenchymal stem cells. *Stem cell research & therapy*. **11(1)**, 226. DOI:10.1186/s13287-020-01744-1
- Yin Z., Chen X., Chen J.L., Shen W.L., Hieu Nguyen T.M., Gao L. und Ouyang H.W. (2010) The regulation of tendon stem cell differentiation by the alignment of nanofibers. *Biomaterials*. **31(8)**, 2163–2175. DOI:10.1016/j.biomaterials.2009.11.083.
- Yin Z., Chen X., Zhu T., Hu J.-J., Song H.-X., Shen W.-L., Jiang L., Heng B.C., Ji J. und Ouyang H.-W. (2013) The effect of decellularized matrices on human tendon stem/progenitor cell differentiation and tendon repair. *Acta biomaterialia*. **9(12)**, 9317–9329. DOI:10.1016/j.actbio.2013.07.022.
- Yin Z., Guo J., Wu T.Y., Chen X., Xu L.L., Lin S.E., Sun Y.X., Chan K.M., Ouyang H. und Li G. (2016). Stepwise Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Augments Tendon-Like Tissue Formation and Defect Repair In Vivo. *Stem cells translational medicine*. **5(8)**, 1106–1116. DOI:https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0215
- Youngstrom D.W., Barrett J.G., Jose R.R. und Kaplan D.L. (2013). Functional characterization of detergent-decellularized equine tendon extracellular matrix for tissue engineering applications. *PloS one*. **8(5)**, e64151. DOI:10.1371/journal.pone.0064151
- Zarychta-Wiśniewska W., Burdzinska A., Kulesza A., Gala K., Kaleta B., Zielniok K., Siennicka K., Sabat M. und Paczek L. (2017) Bmp-12 activates tenogenic pathway in human adipose stem cells and affects their immunomodulatory and secretory properties. *BMC Cell Biology*. **18(1)**, 13. DOI:10.1186/s12860-017-0129-9.
- Zhang J. und Wang J.H.-C. (2013) The effects of mechanical loading on tendons--an in vivo and in vitro model study. *PloS one*. **8(8)**, e71740. DOI:10.1371/journal.pone.0071740.
- Zhang K., Asai S., Yu B. und Enomoto-Iwamoto M. (2015) IL-1 β irreversibly inhibits tenogenic differentiation and alters metabolism in injured tendon-derived progenitor cells in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **463(4)**, 667–672. DOI:10.1016/j.bbrc.2015.05.122.

Literaturverzeichnis

Zhang J., Nie D., Williamson K., McDowell A., Hogan M.V. und Wang J.H.-C. (2020) Moderate and intensive mechanical loading differentially modulate the phenotype of tendon stem/progenitor cells in vivo. *PloS one*. **15(12)**, e0242640. DOI:10.1371/journal.pone.0242640.

Zhao X., Zhao Y., Sun X., Xing Y., Wang X. und Yang Q. (2020) Immunomodulation of MSCs and MSC-Derived Extracellular Vesicles in Osteoarthritis. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. **8**. DOI:10.3389/fbioe.2020.575057.

Broschüre:

Paul-Ehrlich-Institut (2012): Arzneimittel für neuartige Therapien ATMP – Advanced Therapy Medicinal Products // Regulatorische Anforderungen und praktische Hinweise

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen herzlich bedanken, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation auf unterschiedlichste Art und Weise unterstützt haben:

Ein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Prof. Dr. Janina Burk, die mir die Dissertation ermöglichte und mich motivierte über meine eigenen Erwartungen hinauszuwachsen. Sie stand mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite und unterstützte meine Vorhaben ins Ausland zu gehen und einen internationalen PhD-Titel zu erlangen.

Meinen ehemaligen Kolleginnen Carla Doll, Alina Hagen, Dea Kukaj, Julia Möllerberndt, Hannelore Falkenstein und Dr. Sabine Niebert möchte ich danken. Sie haben mich stets mit ihrem Fachwissen, tatkräftiger Unterstützung im Labor und guten Backrezepten, sowie aufmunternden Gesprächen unterstützt. Besonders erwähnen möchte ich hier Alina Hagen, mit der ich viele schöne, aber auch sehr lange Stunden im Labor verbracht habe. Sie ist nicht nur eine kompetente Kollegin, mit der ich über viele Aspekte der regenerativen Medizin diskutieren konnte, sondern auch eine gute Freundin geworden.

Für die Bereitstellung eines geeigneten Fluoreszenzmikroskop und entsprechender Beratung möchte ich mich bei Prof. Dr. Joachim Geyer und Simon Franz Müller bedanken. Simon Franz Müller hat mich in neue Dimensionen der immunfluoroskopischen Auswertung eingeführt und mir maßgeblich geholfen die Qualität meiner Ergebnisse zu verbessern.

Ebenfalls möchte ich Prof. Dr. Tilo Pompe und seiner Mitarbeiterin Franziska Ullm danken, da sie mir die Verwendung ihrer gut etablierten Kollagen-3D-Matrix beigebracht und mich für all meine Versuche mit den notwendigen Materialien versorgt haben.

Prof. Dr. Scheiner-Bobis und den Mitarbeitern des veterinär-biochemischen Instituts danke ich für den Zugang zu ihren Laboren sowie die fachliche Beratung bei der Entwicklung und Durchführung meiner Western Blot Analysen.

Dem veterinär-anatomischen Institut, insbesondere Manuela Heimann, möchte ich für die Unterstützung bei der Entwicklung der verwendeten Knockout-Zellen danken.

Danksagung

Vielen Dank auch an die deutsche Studienstiftung, die mich finanziell mit einem Promotionsstipendium unterstützte. Dem international Giessen Graduate Centre for the Life Sciences danke ich ebenfalls für die Finanzierung meines Auslandsaufenthaltes in London.

Georg Hofer danke ich für die Erstellung der ansprechenden Übersichtsgraphik über den TGF- β -Signalweg.

Mein aufrichtiger Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, die mir während der gesamten Reise stets zur Seite standen. Ihre unermüdliche Unterstützung, ihr offenes Ohr für meine Sorgen und ihr aufbauender Zuspruch haben maßgeblich zu meinem Erfolg beigetragen. Ohne ihre ständige Ermunterung und ihr Verständnis wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Vielen Dank dafür!