

**Untersuchungen zur Differenzierung equiner, adipogener,  
mesenchymaler Stammzellen zu Tenozyten**

**Inaugural-Dissertation**  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Sinja Viktoria Guth

Aus dem Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und -Embryologie der  
Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Prof. Dr. Dr. S. Arnhold

## **Untersuchungen zur Differenzierung equiner, adipogener, mesenchymaler Stammzellen zu Tenozyten**

**Inaugural-Dissertation**  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

Sinja Viktoria Guth  
Tierärztin aus Dieburg

Gießen 2013

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: \_\_\_\_\_

Gutachter:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Tag der Disputation: \_\_\_\_\_

Gewidmet meinem Vater  
Dr. Egbert Karl Anton Guth

---

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>9</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>13</b>
<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>15</b>
1.1. Verletzungen der Sehnen beim Pferd .....	15
1.2. Aufbau einer Sehne .....	17
1.3. Sehnenheilung .....	19
1.4. Stammzellen .....	20
1.5. Growth and differentiation factors (GDFs) 5, 6 und 7 .....	22
<b>2. LITERATURÜBERSICHT UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT</b> .....	<b>23</b>
2.1. Literaturübersicht .....	23
2.2. Zielsetzung .....	25
<b>3. MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>27</b>
3.1. Zellkultur .....	27
3.1.1. Isolation der Stammzellen aus Fettgewebe .....	27
3.1.2. Kultivierung der Zellen .....	28
3.1.3. Versuchszellgruppen .....	30
3.2. Stammzellnachweis .....	30
3.2.1. Chondrogene Differenzierung .....	30
3.2.2. Osteogene Differenzierung .....	32
3.2.3. Adipogene Differenzierung .....	33
3.2.4. Nachweis von Stammzellmarkern .....	34

---

<b>3.3.</b>	<b>Tenogene Differenzierung im Pellet mit GDF5, GDF6 und GDF7 .....</b>	<b>34</b>
3.3.1.	Rekonstitution von GDF5, GDF6 und GDF7 .....	35
3.3.2.	Differenzierungsmedium .....	36
3.3.3.	Anfertigen der Pellets .....	37
3.3.4.	Kultivierungsschema.....	37
<b>3.4.</b>	<b>Kollagengel.....</b>	<b>38</b>
<b>3.5.</b>	<b>Vitalitätsuntersuchungen der Zellen im Kollagengel .....</b>	<b>38</b>
3.5.1.	Auswanderungsversuch .....	38
3.5.2.	Prozentzahl der lebenden Zellen .....	38
3.5.3.	Entwicklung der Gesamtzellzahl .....	39
<b>3.6.</b>	<b>Tenogene Differenzierung im Kollagengel mit GDF5, GDF6 und mechanischer Stimulation .....</b>	<b>39</b>
3.6.1.	Dehnungsapparatur .....	40
3.6.2.	Befestigung des Gels.....	41
3.6.3.	Differenzierungsmedium .....	42
3.6.4.	Versuchsablauf.....	42
<b>3.7.</b>	<b>Histologische Färbungen.....</b>	<b>45</b>
3.7.1.	Hämatoxilin-Eosin-Färbung an Kryostatschnitten .....	45
3.7.2.	Hämatoxilin-Eosin-Färbung an Paraffinschnitten .....	45
3.7.3.	Hämatoxilin-Eosin-Färbung an Zellen im Well .....	46
3.7.4.	Alcianblau-Färbung an Paraffinschnitten .....	46
3.7.5.	Oil-Red-O-Färbung an Zellen im Well.....	47
3.7.6.	Von-Kossa-Färbung an Zellen im Well .....	48
3.7.7.	Trichromfärbung nach Cason an Paraffinschnitten.....	49
3.7.8.	Färbung nach Pasini modifiziert nach Walter an Paraffinschnitten .....	50
<b>3.8.</b>	<b>Immunhistochemie.....</b>	<b>51</b>
<b>3.9.</b>	<b>Elektronenmikroskopie .....</b>	<b>55</b>
3.9.1.	Fixierung .....	55

---

3.9.2.	Einbettung.....	56
3.9.3.	Semidünnschnitte .....	56
3.9.4.	Ultradünnschnitte & Elektronenmikroskopie .....	57
<b>3.10.</b>	<b>Untersuchungen auf mRNA-Ebene .....</b>	<b>57</b>
3.10.1.	Gewinnung von copyDNA.....	57
3.10.2.	Polymerasekettenreaktion (PCR – Polymerase Chain Reaction) .....	62
<b>3.11.</b>	<b>Real-Time PCR .....</b>	<b>64</b>
<b>3.12.</b>	<b>Statistische Auswertungen.....</b>	<b>68</b>
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>69</b>
<b>4.1.</b>	<b>Stammzellnachweis .....</b>	<b>69</b>
4.1.1.	Plastikadhärenz und Morphologie.....	69
4.1.2.	Pluripotenz.....	70
4.1.3.	Nachweis von Stammzellmarkern.....	75
<b>4.2.</b>	<b>Tenogene Differenzierung in der Pelletkultur .....</b>	<b>76</b>
4.2.1.	HE-Färbung .....	76
4.2.2.	Immunhistochemie Kollagen I und Kollagen III .....	78
4.2.3.	Ultrastrukturelle Betrachtung mit Hilfe des Elektronenmikroskops.....	79
4.2.4.	RT-PCR für Tenomodulin und Kollagen II .....	81
4.2.5.	Quantitative Real-Time PCR.....	81
<b>4.3.</b>	<b>Tenogene Differenzierung im Kollagengel .....</b>	<b>83</b>
4.3.1.	Vitalitätsuntersuchung der Zellen im Gel .....	83
4.3.2.	HE-Färbung der Kollagengele .....	86
4.3.3.	Färbungen nach Cason und Pasini.....	88
4.3.4.	Immunhistochemie mit Antikörper für Kollagen III.....	93
4.3.5.	Ultrastrukturelle Betrachtung mit dem Elektronenmikroskop .....	95
4.3.6.	RT-PCR für Tenomodulin und Kollagen II .....	97
4.3.7.	Quantitative Real-Time PCR.....	97

4.4.	Pelletkultur - Kollagenkultur: Werte der qPCR im Vergleich .....	99
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>101</b>
5.1.	Kritik der Methode .....	101
5.2.	Diskussion der Ergebnisse .....	107
5.2.1.	Nachweis des Stammzellcharakters .....	107
5.2.2.	Tenogene Differenzierung in einer Pelletkultur .....	108
5.2.3.	Tenogene Differenzierung in einer Kollagenmatrix .....	111
5.3.	Ausblick .....	114
<b>6.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>116</b>
<b>7.</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>120</b>
<b>8.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>123</b>
<b>9.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>134</b>
9.1.	Übersicht der verwendeten Primer .....	134
9.2.	Daten der RealTime PCR- tabellarisch .....	135
9.3.	Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien.....	139
9.3.1.	Gebrauchsmaterialien.....	139
9.3.2.	Chemikalien .....	140
9.3.3.	Verbrauchsmaterialien .....	146
9.4.	Geräte .....	148
9.5.	Software und Internet.....	153
<b>10.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>154</b>
<b>11.</b>	<b>ERKLÄRUNG .....</b>	<b>155</b>

## Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
Å	Angström, physikalische Längeneinheit
AA	Antibiotic/Antimycotic
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin Peroxidase-Komplex
AcOH	Essigsäure
Adipo	Adipogen
AEC	3-Amino-9-Ethyl-Carbazol
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
Aqua bidest	Aqua bidestillata
Aqua dest	Aqua destillata
BMP	Bone morphogenetic protein
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
ca.	Circa
CD90	Cluster of differentiation 90
CD105	Cluster of differentiation 105
CDMP	Cartilage derived morphogenetic protein
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
chondro	Chondrogen
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Col 1	Kollagen I
Col 2	Kollagen II
Col 3	Kollagen III

COMP	Cartilage oligomeric matrix protein
d.h.	Das heißt
Diff	Differenzierung
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Ribonukleosidtriphosphat
evtl.	Eventuell
Fa.	Firma
FBS	Foetal Bovine Serum
g	Gramm
g	Physikalische Größe für Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDF	Growth and differentiation factor
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxilin-Eosin-Färbung
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IHC	Immunhistochemie
Ig	Immunglobulin
ITS	Insulin-transferrin-sodium selenite Supplement
kb	Kilobasen
M	Molar
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minuten
mind.	Mindestens
Mio.	Million
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter

mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
mRNS	Messenger-Ribonukleinsäure
µg	Mikrogramm
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer
µl	Mikroliter
NaCl	Natriumchlorid
Nanog	Eigenname
ng	Nanogramm
NK	Negativkontrolle
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
Oct4	Octamer binding transcription factor 4
OsO <sub>4</sub>	Osmiumtetroxid
osteo	Osteogen
OT	Objektträger
PBS	Phosphate buffered substrate
PCR	Polymerase chain reaction
Pfd	Pferd
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen
PhProt	Phosphoprotein
PK	Positivkontrolle
ppar γ 2	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor γ 2
PS	Penicillin/Streptomycin
rev	Reverse
RNA	Ribonukleinsäure
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	Rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Chain Reaction
Scl	Scleraxis
sec	Sekunden

TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TGF $\beta$	Transforming growth factor $\beta$
TM	Tenomodulin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units
V	Volt
WP	Waschpuffer
ZG-Serum	Ziegen-Serum

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Sehnenaufbau-Übersicht, modifiziert nach Józsa L., Kannus P. ....	17
Abbildung 2: Aufbau einer Kollagenfaser, modifiziert nach Sigma Aldrich.....	18
Abbildung 3: Multipotenz adulter mesenchymaler Stammzellen, modifiziert nach Grassel, Ahmed.....	21
Abbildung 4: Bioreaktor .....	40
Abbildung 5: Gele im Bioreaktor während des Medienwechsels .....	44
Abbildung 6: Programm der Real-Time PCR.....	65
Abbildung 7: Verdünnungsreihe für Gapdh.....	66
Abbildung 8: Verdünnungsreihe für Scleraxis.....	67
Abbildung 9: Phasenkontrastaufnahme Stammzellen .....	69
Abbildung 10: HE-Färbung Stammzellen.....	70
Abbildung 11: adipogene Differenzierung.....	71
Abbildung 12: mRNA Expression von ppar $\gamma$ 2.....	71
Abbildung 13: osteogene Differenzierung.....	72
Abbildung 14: mRNA Expression von Phosphoprotein.....	73
Abbildung 15: chondrogene Differenzierung im Pellet.....	74
Abbildung 16: mRNA Expression von Kollagen II .....	74
Abbildung 17: mRNA Expression von CD90 und Oct4 .....	75
Abbildung 18: mRNA Expression von CD105 und Nanog .....	76

Abbildung 19: Übersicht HE-Färbung, tenogene Diff. im Pellet, Paraffinschnitte.....	77
Abbildung 20: Immunhistochemie für Kollagen I und Kollagen III, tenogene Diff. im Pellet, Kryostatschnitte .....	78
Abbildung 21: Elektronenmikroskopische Aufnahme, tenogene Diff. im Pellet, Negativkontrolle.....	79
Abbildung 22: Elektronenmikroskopische Aufnahme, tenogene Diff. im Pellet, GDF7 .....	80
Abbildung 23: Quantitative Real Time PCR – tenogene Diff. im Pellet .....	82
Abbildung 24: Prozentualer Anteil lebender Zellen im Gel.....	84
Abbildung 25: Entwicklung der Anzahl lebender Zellen im Gel.....	85
Abbildung 26: HE-Färbung der Zellen im Kollagengel.....	87
Abbildung 27: Cason-Färbung des Gelkonstrukts .....	89
Abbildung 28: Pasini-Färbung der Zellen im Gel .....	91
Abbildung 29: Immunhistochemie Kollagen III Gelkonstrukt .....	94
Abbildung 30: Elektronenmikroskopische Aufnahme, Gelkonstrukt 3. Tag.....	95
Abbildung 31: Elektronenmikroskopische Aufnahme, tenogene Differenzierung im Gelkonstrukt .....	96
Abbildung 32: Quantitative Real Time PCR – tenogene Diff. im Kollagengel .....	98
Abbildung 33: Quantitative Real Time PCR – Vergleich Kollagengel- Pelletkultur..	100

# 1. Einleitung

## 1.1. Verletzungen der Sehnen beim Pferd

Orthopädische Erkrankungen des Pferdes spielen im Bereich des Sport- und auch des Freizeitreitens eine wichtige Rolle. Die resultierenden Lahmheiten führen oft zu langen Trainingsausfällen oder dazu, dass ein Pferd gänzlich nicht mehr geritten werden kann.

Werden im Weiteren speziell die Verletzungen des Sehnen- und Bandapparates betrachtet, fällt auf, dass die meisten Erkrankungen nicht allein durch einen traumatischen Unfall entstehen, sondern vielmehr die Folge von chronischem, mechanischem Stress und Überbelastung sind (Stashak 1989; Dowling et al. 2000). Durch ständige Fehlbelastungen auf Grund von biomechanischen Einschränkungen oder Besonderheiten der Nutzungsweise des Pferdes entstehen permanent Mikrotraumen, die im Laufe der Zeit durch Summation zur Sehnenenerkrankung führen können.

Die natürliche Gewichtsverteilung des Pferdes liegt zu 40 % auf der Hinterhand und zu 60% auf der Vorhand (Stashak 1989). Durch die Nutzung als Reitpferd kommt eine zusätzliche Belastung der Gliedmaßen hinzu. Das Gewicht des Reiters sollte idealerweise über dem Schwerpunkt des Pferdes ruhen, und somit gleichmäßig nach vorne und hinten verteilt werden. Jedoch entsteht oft im Zusammenhang mit der Art und Weise des Reitens eine stärkere Belastung im Bereich der Vorhand. Dem entsprechend treten mehr Sehnenbeschäden an den Vordergliedmaßen auf. Meistens liegen die betroffenen Areale im mittleren Bereich der Sehne (Wilmink et al. 1992) und betreffen zentrales Gewebe der Sehne stärker als peripheres Gewebe (Pool and Meagher 1990; Marr et al. 1993; Birch et al. 1998).

Je nach Sportart, in der die Pferde eingesetzt werden, sind verschiedene Sehnen prädisponiert für Verletzungen. Das biomechanische Stressmaximum liegt jeweils in anderen Bereichen. Beim Renn- und Springsport leidet vermehrt die oberflächliche Beugesehne (Birch et al. 1998; Williams et al. 2001), bei Zugpferden eher die tiefe

Beugesehne (Sonnichsen 1975) und bei Trabern mehr der Fesselträger (Fackelman 1973; Stashak 1989).

Symptomatisch zeigen sich Erkrankungen verschiedener Schweregrade. Das Spektrum reicht von einer leichten Tendinitis oder Tendosynovitis, über eine schwere, chronische Tendinitis, Core lesions, bis hin zu totalen Sehnenrupturen.

Das therapeutische Ziel ist klar definiert: die normale mechanische Belastbarkeit zurückgewinnen. Es gilt die Entzündungsreaktion so gering wie möglich zu halten, da es sonst zu weiterer Schädigung von Kollagenfibrillen kommt, und den Heilungsprozess nicht zu stören. Man erreicht das durch Kühlung, Druck- oder Castverbände, nichtsteriodale Entzündungshemmer und initiale Ruhigstellung (Stashak 2003). Frühzeitige passive Bewegung hilft bei der Ausrichtung des Reparaturgewebes und die Einhaltung eines strengen Bewegungsplanes ist unerlässlich (Dyson 2004).

Die Regenerationsfähigkeit des Sehnengewebes ist allerdings stark beschränkt. Es wird bei normalem Heilungsverlauf nur eine Art Narbengewebe gebildet, welches eine deutlich geringere mechanische Belastbarkeit aufweist (Fortier and Smith 2008). Durch den Einsatz von Stammzellen zur Sehnenheilung sind schon deutlich bessere Resultate erzielt worden. Das von den implantierten Stammzellen mitgestaltete Reparaturgewebe hat zu deutlich weniger Rückfällen geführt und wesentlich mehr Pferde sind wieder in den Sport zurückgekehrt (Smith et al. 2003).

Der Ansatz dieser Arbeit ist es zum einen den Heilungsprozess der Sehne weiter zu verbessern, indem zu Tenoblasten vordifferenzierte Stammzellen für die Implantation verwendet werden. Somit wird wertvolle Zeit in der Reparaturphase eingespart, um im Idealfall gleichwertiges Sehnengewebe statt Narbengewebe zu erhalten.

Zum anderen werden neue Möglichkeiten erschlossen. Gelingt es Tenoblasten aus Stammzellen zu differenzieren, steht der Weg zum Tissue Engineering einer artifiziellen Sehne offen. Um dorthin zu gelangen, ist es notwendig das Differenzierungspotential equiner, adipogener, mesenchymaler Stammzellen zu Tenoblasten zu erforschen.

## 1.2. Aufbau einer Sehne

Sehnen gehören zu den Binde- und Stützgeweben. Sie stellen die Verbindung zwischen Muskel und Knochen dar. Ihre Aufgabe ist es die Kräfte, die bei der Muskelkontraktion entstehen auf den Knochen zu übertragen und somit gerichtete Bewegung zu ermöglichen. Dafür benötigen sie ein hohes Maß an Zugfestigkeit, etwas Elastizität und Gleitfähigkeit im peritendinösen Gewebe (Auer and Stick 1999). Der hierarchische Aufbau der Sehnen liefert die dafür nötigen Voraussetzungen. Wird ein Sehnenstrang im Querschnitt betrachtet, wird deutlich, dass er aus vielen miteinander verbundenen Fasern aufgebaut ist. Dabei bilden mehrere Kollagenfibrillen zusammen eine Kollagenfaser. Viele Kollagenfasern werden von Endotendineum umhüllt und bilden ein Primärbündel. Mehrere Primärbündel werden von Peritendineum zu Sekundärbündeln zusammengefasst und mehrere Sekundärbündel bilden zusammen ein Tertiärbündel. Diese werden vom Epitendineum als Sehnenstrang zusammengehalten. (Abbildung 1).

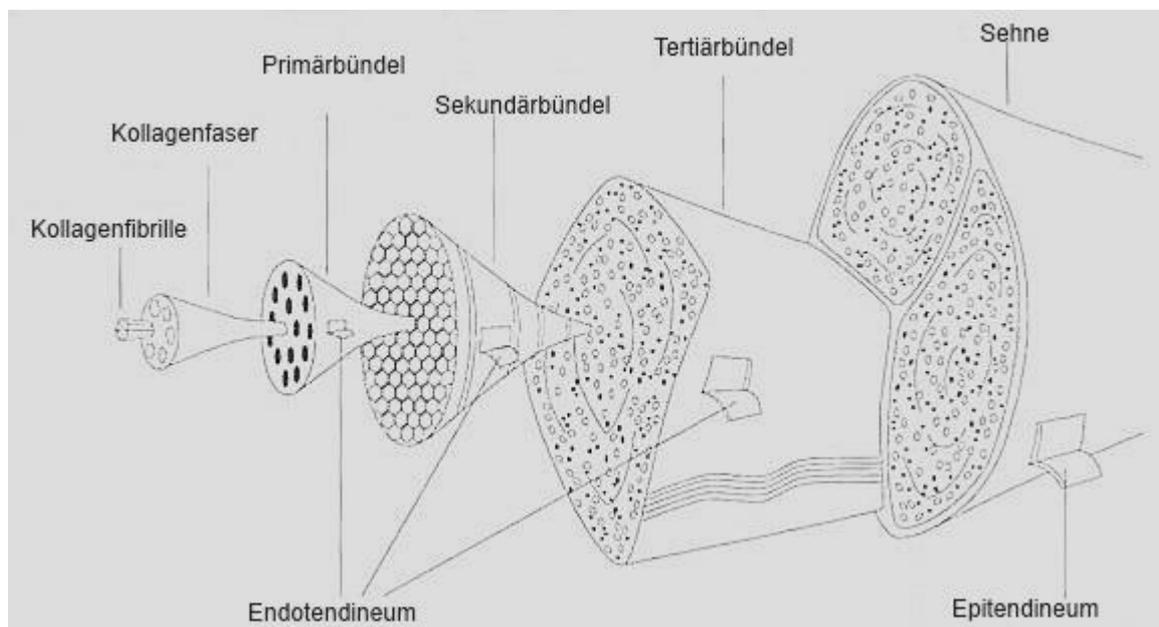
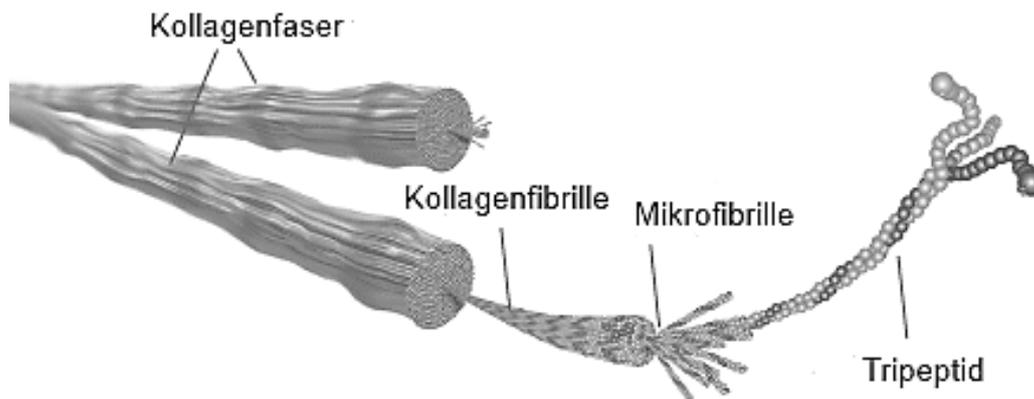


Abbildung 1: Sehnenaufbau-Übersicht, modifiziert nach Józsa L., Kannus P.

Der bisher kleinste erwähnte Baustein, die Kollagenfibrille, ist ihrerseits wiederum aus Mikrofibrillen aufgebaut. Mikrofibrillen bestehen aus drei Tropokollagenmolekülen, die helixförmig miteinander verbunden sind (Abbildung 2).



**Abbildung 2: Aufbau einer Kollagenfaser, modifiziert nach Sigma Aldrich**

Das Kollagen wird zuerst als Preprokollagen in das raue Endoplasmatische Retikulum (rER) hinein synthetisiert. Nach einigen biochemischen Modifikationen entsteht dort das Prokollagen. Dieses lagert sich als Tripeptid zusammen, wird zum Golgi-Apparat transportiert und über Exozytose aus der Zelle abgegeben. Das Prokollagen wird zum Tropokollagen, woraufhin eine Bildung der Mikrofibrillen spontan erfolgen kann. Welcher Kollagentyp vorliegt hängt von der Peptidkomposition in der Dreierhelix ab. Es gibt über zwanzig verschiedene Kollagentypen, wobei für die Sehnenmatrix einige von größerer Bedeutung sind. Die Hauptbestandteile der Sehne sind Kollagen Typ I, welches über 90% der Trockensubstanz ausmacht, und Kollagen Typ 3 (O'Brien 1992). Weitere Bestandteile sind Elastin, Kollagen Typ V und Glycosaminoglycane. Für die enorme Zugfestigkeit einer Sehne sind vor allem die Querverbindungen zwischen den Kollagenfasern verantwortlich. Für das Herstellen der Querverbindungen ist Vitamin C als Co-Faktor essentiell (Kumar et al. 2003).

Das den Sehnenstrang zusammenhaltende Bindegewebe, das Endo-, Peri- und Epitendineum, beinhaltet im äußeren Bereich noch einige Nervenfasern, Blut- und

Lymphgefäße. Die Tenozyten liegen innerhalb der Kollagenfaserbündel und erscheinen im Querschnitt sternförmig, da sie sehr viele Zellfortsätze ausbilden. Im Längsschnitt wird ihr langegestrecktes Erscheinungsbild und ihre Anordnung entlang des Faserverlaufs deutlich (Junqueira and Carneiro 2005).

### 1.3. Sehnenheilung

Der Heilungsprozess einer verletzten Sehne vollzieht sich hauptsächlich in drei Abschnitten. Zuerst gibt es eine inflammatorische Phase, danach eine reparative Phase und anschließend eine Phase des Remodelings.

Die inflammatorische Phase beginnt innerhalb von 24 Stunden nach der Verletzung mit der Einwanderung von Zellen, vor allem Fibroblasten. Diese stammen aus dem peritendinösen Gewebe, wie beispielsweise Sehnenscheiden, Periost oder lockerem Bindegewebe. Zusätzlich wird die Proliferation der Fibroblasten und auch der Endothelzellen zur Bildung neuer, feinsten Blutgefäße angeregt (Möller et al. 2000). Weiterhin kommt es während des Heilungsprozesses zum Einwachsen von Nervenfasern, die zum Teil eine steuernde Aufgabe übernehmen können (Ackermann et al. 2009).

Die Beteiligung der sehneneigenen Zellen ist hier noch von untergeordneter Wichtigkeit (Möller et al. 2000). Der Defekt in der Sehne wird innerhalb von drei bis fünf Tagen mit Granulationsgewebe aufgefüllt, Gewebetrümmer werden phagozytiert. Zwar ist nun die Verletzung im Sehnengewebe verschlossen, jedoch liegt nur eine ganz geringe Belastbarkeit vor.

Ab dem fünften Tag etwa beginnen die immigrierten Zellen mit der Kollagenneosynthese. Der Kollagenanteil im Granulationsgewebe nimmt nun kontinuierlich zu. Die neugebildeten Kollagenfasern sind zwar noch nicht entlang des Sehnenverlaufs ausgerichtet, geben aber doch schon eine bessere Stabilität. Ab der vierten Woche kommt es zu einer vermehrten Proliferation der intrinsischen Fibroblasten vor allem aus dem Endotenon, die im weiteren Verlauf die wichtigste Aufgabe bei der Synthese und Resorption von Kollagen übernehmen (Möller et al.

2000). Die reparative Phase dauert insgesamt ca. zwei bis drei Monate an. Es kommt dabei langsam zu einer Ausrichtung der Kollagenfasern in Zugrichtung. Allerdings ist zu beachten, dass in dieser Phase vor allem Kollagen Typ 3 produziert wird und die Kollagenfasern einen wesentlich dünneren Durchmesser haben (Möller et al. 2000). Es schließt sich die Phase des Remodelings an. Sie kann durchaus bis zu 14 Monate dauern. Selbst nach dieser Zeit kann noch eine erhöhte Produktion von Kollagen Typ 3 im Vergleich zum normalen Gewebe nachgewiesen werden (Williams et al. 1984). Die eingesprossenen Gefäße und ein Großteil der eingewanderten Zellen bilden sich zurück, jedoch verbleibt das Gewebe hyperzellulär. Mit der wiedereinsetzenden Belastung der Extremität erfolgt eine zunehmende Ausrichtung der Kollagenfasern entlang dem Verlauf der Zugbelastung. Die Festigkeit des neuen Sehngewebes wird durch vermehrte Bildung von Querverbindungen gesteigert (Möller et al. 2000). Auch kommt es zu einer geringgradigen Verschiebung vom Kollagen Typ 3 zu Kollagen Typ I Fasern (Parry et al. 1978). Kollagen Typ 3 ist im Vergleich zu Typ I weniger stabil und bildet weniger Quervernetzungen aus (Jozsa et al. 1984). Nach Lapiere et al. (1977) steht die Konzentration an Kollagen Typ 3 in einem umgedreht proportionalen Verhältnis zur mechanischen Belastbarkeit der verheilten Sehne. Die Aktivitäten der Zellen bei der Wundheilung sind in hohem Maße durch Wachstumsfaktoren reguliert. Dazu gehören unter anderem basic fibroblast growth factor (bFGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), platelet-derived growth factor (PDGF), transforming growth factor  $\beta$  (TGF  $\beta$ ), Metalloproteinasen und viele weitere (Kumar et al. 2003).

#### 1.4. Stammzellen

Stammzellen sind Körperzellen, die noch keine Differenzierung in ein bestimmtes Gewebe erfahren haben. Zu Beginn der Embryonalentwicklung liegen ausschließlich totipotente, frühembryonale Stammzellen vor. Sie können zu jeder beliebigen

Körperzelle differenzieren. Im weiteren Verlauf nimmt dieses Potential ab. Die adulte Stammzelle nach der Geburt besitzt nunmehr noch eine Multipotenz.

Adulte Stammzellen kommen in jedem Körpergewebe vor. Sie sind noch nicht ausdifferenziert und haben die Aufgabe bei Bedarf, wie etwa bei einer Verletzung, gewebespezifische Zellen nachzuliefern (Caplan 2005). Sie haben die Fähigkeit durch asymmetrische Zellteilung neue Stammzellen oder zur Ausdifferenzierung bestimmte Tochterzellen hervorzubringen (Morrison et al. 1997). Entscheidend für die Entwicklungsrichtung der Tochterzellen ist dabei das sie umgebende biologische Milieu.

Mesenchymale, adulte Stammzellen können zum Beispiel aus Knochenmark, Nabelschnurblut oder Fettgewebe gewonnen werden. Sie haben das Potential in eine Reihe von Gewebszellen zu differenzieren, wie unter anderem Fettzellen, Knorpelzellen, Knochenzellen oder Sehnenzellen (Abbildung 3).

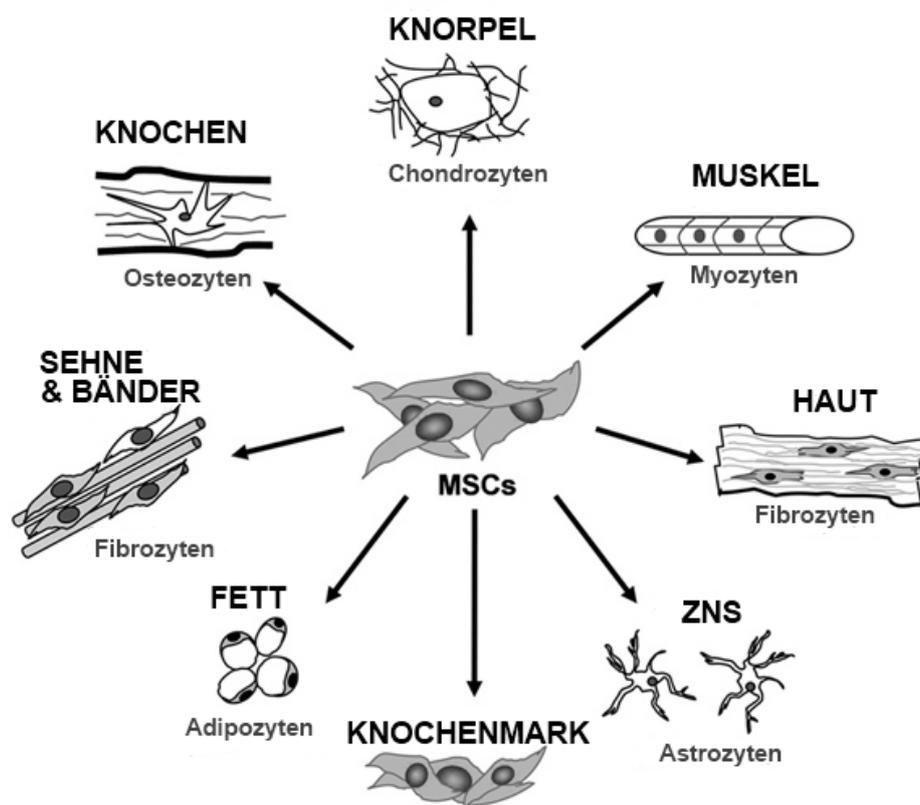


Abbildung 3: Multipotenz adulter mesenchymaler Stammzellen, modifiziert nach Grassel, Ahmed

## 1.5. Growth and differentiation factors (GDFs) 5, 6 und 7

GDF5, 6 und 7 gehören zur TGF  $\beta$  (transforming growth factor–beta) Superfamilie. Synonym werden die Bezeichnungen Bone morphogenetic protein (BMP) 14, 13 und 12 oder Cartilage-derived morphogenetic protein 1, 2 und 3 verwendet. Alle Proteine dieser TGF- $\beta$ -Superfamilie haben eine ähnliche Faltung und haben als gemeinsames Strukturmotiv einen Zystein-Knoten, der zur Bildung von Disulfidbrücken führt.

GDFs gehören zu den Zytokinen und liegen in Form von Homo- oder Heterodimeren vor. Als Ligand binden sie an Transmembranrezeptoren Typ I und Typ II der TGF- $\beta$ -Rezeptorfamilie. Dies führt zur Aktivierung und Komplexbildung von SMAD-Transkriptionsfaktoren. Dieser Komplex an Transkriptionsfaktoren wandert in den Zellkern ein und führt dort zur Transkription spezifischer Gene.

Wie bei Herpin et al. (2004) beschrieben, spielen BMPs und GDFs eine wichtige Rolle für die morphologische Entwicklung vieler Gewebe, vor allem auch bei der embryonalen Entwicklung des Muskel-, Sehen- und Skelettsystems. Ihre Wirkungen sind sehr spezifisch und lokal begrenzt. Außerdem werden sie durch inhibierende Wachstumsfaktoren streng reguliert.

## 2. Literaturübersicht und Zielsetzung der Arbeit

### 2.1. Literaturübersicht

Seit geraumer Zeit werden mesenchymale, aus dem Knochenmark gewonnene Stammzellen zur Therapie von Sehnenverletzungen bei Pferden mit Erfolg eingesetzt (Smith 2008; Richardson et al. 2007). Die injizierten Zellen verbleiben zum größten Teil in der Läsion und bei autologen Zellen erfolgt keine Reaktion des Immunsystems auf die Zellen (Guest et al. 2008).

Zunehmend steigt das Interesse an mesenchymalen Stammzellen, die aus dem Fettgewebe isoliert werden. Ihre Gewinnung ist technisch einfacher und bedeutet einen deutlich ungefährlicheren chirurgischen Eingriff für den Patienten als die Gewinnung von Knochenmark. Versuche zur Charakterisierung und zum Nachweis ihres Differenzierungspotentials sind erfolgreich durchgeführt worden (Vidal et al. 2007; Mambelli et al. 2009). Bei einem in vivo Versuch ist bereits eine verbesserte Struktur des Regenerationsgewebes der Sehne von Pferden nachgewiesen worden (Nixon et al. 2008). Auch nach einer Kryokonservierung eignen sich adipogene Stammzellen für den therapeutischen Einsatz (Colleoni et al. 2009).

Die Verwendung von Kollagenmatrix, die mit mesenchymalen Stammzellen besiedelt worden ist, ergibt eine deutliche Verbesserung in der Struktur und biomechanischen Belastbarkeit von Sehnen und ist besonders bei größeren Sehndefekten geeignet (Young et al. 1998). Es sind mechanische Systeme in der Entwicklung, die bald eine gezielte Injektion von Kollagenmatrix zusammen mit Stammzellen in einen Defekt ermöglichen können, ohne dass eine Operation von Nöten wäre (Fa. Amedrix, Esslingen). Die Kollagenmatrix ist nicht nur als Trägermaterial bei größeren Defekten nützlich, sondern eignet sich auch hervorragend um in vitro mechanische Stimulation auf die darin enthaltenen Stammzellen zu übertragen (Ignatius et al. 2004).

Vor allem am Ende der zweiten und in der dritten Heilungsphase scheint die mechanische Stimulation wichtig für die Differenzierung der Zellen zu Tenozyten zu sein (Eliasson et al. 2009). Dabei ist darauf zu achten, dass die Stimulation nicht zu

stark ist (Zhang and Wang 2009). Auch die Frequenz und die Dauer der Dehnungsintervalle muss berücksichtigt werden. Bei humanen Stammzellen in einem Kollagengel mit acht-stündiger Dehnungsphase und sechzehn-stündiger Ruhepause sind gute Erfolge erzielt worden (Kall et al. 2004).

Ein weiterer Ansatz ist die Untersuchung der adipogenen, mesenchymalen Pferdestammzellen in einer dichten 3D-Kultur. Im Vergleich zu einer 2D-Kultur können bei Tenozyten in der 3D-Kultur Expressionslevel erreicht werden, die näher an dem Expressionsmuster von normalem Sehngewebe liegen (Stoll et al. 2009; De Wreede and Ralphs 2009). Ebenso können Tenozyten in einer 3D-Kultur über zwei Wochen überleben, behalten ihre spindelförmige Zellgestalt und produzieren Extrazellulärmatrix mit Kollagen I-Fibrillen (Schulze-Tanzil et al. 2004).

Es gibt für Tenozyten in der Forschung keinen einzelnen spezifischen Marker, sondern es wird das Expressionsverhalten der Zellen anhand einer Übersicht über verschiedene sehmentypische Proteine beurteilt. Auch das Ausschließen von Proteinen, die hauptsächlich in anderen Geweben vorkommen, wie beispielsweise in Knochen oder Knorpel, gehört mit zur Charakterisierung von Tenoblasten oder Tenozyten. Als wichtige Gene sind hier Kollagen I, Kollagen III, Tenomodulin, Tenascin C, Scleraxis, Decorin, Fibronectin und Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP) zu nennen (Stoll et al. 2009; Taylor et al. 2009). Es können geringe Unterschiede im Expressionsverhalten der Zellen zwischen den einzelnen Passagen auftreten (Almarza et al. 2008).

Seit Wolfman et al. 1997 gezeigt haben, dass durch die ektopische Injektion von GDF5, GDF6 oder GDF7 bei Nagetieren sehnen- oder bandähnliches Gewebe an den Injektionsstellen entstanden ist, nehmen sich immer mehr Forschungsgruppen diesen Wachstumsfaktoren an. Sehnenzellen, die durch Gentransfer die Fähigkeit zur BMP12 Produktion erhalten haben, zeigen eine erhöhte Kollagenproduktion und führen zu einer besseren mechanischen Stabilität des Reparaturgewebes (Lou et al. 2000). Knochenmarksstammzellen differenzieren zu Tenozyten, nachdem eine Transfektion mit BMP 12 stattgefunden hat (Wang et al. 2005). Bei Studien zu Proliferation und Expression von alkalischer Phosphatase bei Rattenzellen durch GDF7 sind keine Unterschiede in den verschiedenen Dosierungsgruppen gefunden worden, so dass vermutet wird, dass das Sättigungslevel für GDF7 unter 40 ng/ml

Medium liegt (Furuya et al. 1999). Humane Knochenmarkszellen steigern ihre Produktion von Kollagen I, Kollagen III und Scleraxis sowohl durch zyklische Dehnung als auch durch Zugabe von GDF5 (Frang et al. 2008). In einer klinischen Studie von Aspenberg und Forslund (1999) hat sich herausgestellt, dass bei Ratten die Heilung der Achillessehne besser nach der Implantation eines Kollagenschwammes mit GDF5 oder GDF6 verläuft, als nach der Implantation eines Kollagenschwamms ohne Wachstumsfaktoren. Ein ähnlicher Versuchsaufbau hat gezeigt, dass bei Kaninchen die Sehnenheilung signifikant verbessert wird, wenn statt einem reinen Kollagenschwamm, ein Kollagenschwamm mit mesenchymalen Stammzellen eingesetzt wird (Juncosa-Melvin et al. 2006). Werden durchtrennte Sehnen von Ratten mit Nahtmaterial, das mit GDF5 versetzt worden ist, vernäht, zeigen diese Sehnen nach drei Wochen eine deutlich bessere Heilungsrate im Vergleich zu den mit normalem Nahtmaterial vernähten Sehnen (Dines et al. 2007). Auch wenn GDF5, GDF6 oder GDF7 in einen zuvor artifiziell gesetzten Sehndefekt injiziert werden, kann eine signifikante, dosisabhängige Verbesserung von Stärke und Belastbarkeit bei allen drei Wachstumsfaktoren festgestellt werden. Unterschiede zwischen den einzelnen Wachstumsfaktoren können nicht festgestellt werden (Forslund et al. 2003).

### 2.2. Zielsetzung

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit ist es equine, adipogene, mesenchymale Stammzellen sowohl in einer 3D-Pelletkultur als auch in einer 3D-Kollagenmatrix auf ihr tenogenes Differenzierungspotential hin zu untersuchen.

Dazu werden Zellen von Pferden unterschiedlichen Alters und unterschiedlichen Geschlechts ausgewählt. Für die Versuche werden immer adipogene Stammzellen aus der Kruppenregion der Passage 3 verwendet.

Der Effekt der Wachstumsfaktoren GDF5, GDF6 und GDF7 auf die Zellen in beiden Kulturformen wird untersucht. Hierfür werden histologische und

immunhistochemische Färbungen eingesetzt. Außerdem finden Analysen mittels PCR und Real Time – PCR statt.

Zusätzlich werden bei der Kultivierung in einer Kollagenmatrix die Auswirkungen der zyklischen Dehnung, alleine und in Kombination mit den Wachstumsfaktoren, erforscht.

Bisher ist der Verlauf der Heilung von Sehnenverletzungen im klinischen Alltag oft unzufrieden stellend. Es dauert oft lange bis sich eine belastbare Substanz an Sehngewebe entwickelt hat. Dieses Gewebe ist meist durch narbigen Charakter geprägt und zeigt weniger Elastizität als gesundes Sehngewebe. Es birgt die Gefahr der Wiederverletzung oft kurz unter- oder oberhalb des alten Verletzungsbereichs. Auch passiert es häufig, dass bei zu früher Belastung der verletzte und in langsamer Verheilung befindliche Bereich erneut geschädigt wird.

Es wird in der Praxis bereits versucht die Heilungsfähigkeit des Sehngewebes durch die lokale Injektion von undifferenzierten Stammzellen oder einer Mischung aus Stammzellen und anderen Gewebszellen zu verbessern und zu beschleunigen.

Würde es nun gelingen aus Stammzellen bereits vordifferenzierte Tenoblasten zu gewinnen, könnte das eine immense Verbesserung sowohl des zeitlichen Verlaufs als auch des entstehenden, neuen Sehngewebes bedeuten.

### 3. MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1. Zellkultur

##### 3.1.1. Isolation der Stammzellen aus Fettgewebe

Die Entnahme des Fettgewebes erfolgt an frisch geschlachteten (< 0,5 Stunden), enthäuteten Pferden im Schlachthof in Gießen. In der Kruppenregion der Pferde, leicht dorsolateral vom Schweifansatz, wird mit einem sterilen Skalpell und einer sterilen Pinzette die oberste Schicht Fett abgetragen und anschließend etwa 40 ml Fettgewebe pro Pferd entnommen. Das Fettgewebe wird gekühlt in einer Styroporbox in sterilen Falcon-Röhrchen in PBS direkt ins Labor transportiert.

Die Weiterverarbeitung findet unmittelbar im Anschluss unter der Sterilbank im Zellkulturlabor statt. In je ein 50 ml-Falcon-Röhrchen werden 20 ml Fettgewebe gefüllt, 20 ml PBS zugegeben und gut vermischt. Die Röhrchen werden 5 min bei 260g zentrifugiert. Das gereinigte Fettgewebe schwimmt oben, die Erythrozyten sammeln sich am Boden des Röhrchens im PBS und werden zusammen mit der Flüssigkeit mit einer Einmalpipette abpipettiert. Bis zur zufriedenstellenden Reinigung der Probe wird dieses Vorgehen 3-5 Mal wiederholt. Während dieser Zeit wird die Verdauungslösung vorbereitet. Pro ml Fett werden 1 ml Verdauungslösung benötigt. Diese wird in folgendem Verhältnis hergestellt:

1 ml PBS

10 mg BSA

1 mg Collagenase I

Die beiden festen Substanzen werden mit einem Spatel aus dem Vorratsgefäß entnommen und auf der Laborwaage in einem Becherglas bzw. auf einem Stück Aluminiumfolie abgewogen. PBS wird zugegeben. Zum Lösen der festen Substanzen wird das Becherglas bei Raumtemperatur auf einen Magnetrührer bei mittlerer

Geschwindigkeit gestellt. Anschließend wird die Verdauungslösung mit einer Eimalspritze aufgezogen und durch einen Sterilfilter filtriert.

Zu den 20 ml Fettgewebe werden 20 ml Verdauungslösung in das Flacon-Röhrchen gegeben. Die fertige Mischung aus Fettgewebe und Verdauungslösung wird zur Inkubation in einem Röhrchengestell auf einem Rüttler (ca. 200 UpM) bei 37°C in den Wärmeschrank für maximal 60 min gestellt.

Der Fortschritt des Verdauungsvorgangs wird alle 15 min, später alle 5-10 min kontrolliert. Wenn das Gewebe eine schleimige Konsistenz erreicht hat, wird es erneut bei 260g für 5 min zentrifugiert. Das sich bildende Pellet wird am Boden des Röhrchens mit einer Glaspipette abgesaugt. Hierin sind die durch die Verdauung aus dem Gewebeverband heraus gelösten Stammzellen enthalten. Diese Zellsuspension wird durch einen Filter in ein neues 50 ml-Flacon-Röhrchen überführt. Durch den Filter wird außerdem die gleiche Menge an PBS zugegeben. Es folgt ein weiterer Zentrifugationsschritt für 5 min bei 260g. Der Überstand wird von oben abpipettiert und das Pellet wird in 1 ml PBS resuspendiert. Nach gleichmäßiger Durchmischung werden davon 10 µl zur Zellzählung in einer Neubauer Zählkammer entnommen.

### **3.1.2. Kultivierung der Zellen**

Im Anschluss an die Bestimmung der Zellzahl werden die Zellen mit einer Dichte von 2000 Zellen pro cm<sup>2</sup> ausgesät. Sämtliche Arbeiten im Zusammenhang mit den lebenden, kultivierten Zellen werden im Zellkulturlabor unter sterilen Bedingungen unter einer Laborbank durchgeführt. Die Zellkulturflaschen werden mit Medium befüllt, kleine Flaschen (25 cm<sup>2</sup>) mit 7 ml Medium, große Flaschen (75 cm<sup>2</sup>) mit 15 ml Medium. Das Medium setzt sich wie folgt zusammen:

89 % DMEM Low Glucose

10 % FBS

1 % A/A alternativ P/S

Das benötigte Volumen der Zellsuspension wird dazu pipettiert, die Flasche wird geschlossen, horizontal ausgerichtet und in sanften Achter-Bewegungen

geschwenkt, um die Zellen möglichst gleichmäßig zu verteilen. Konzentration und Verteilung der Zellen werden unter dem Mikroskop nochmals kontrolliert. Die Zellkulturflaschen werden mit der Bezeichnung des Pferdes, der Passagenummer, dem Datum, der Besatzdichte und dem verwendeten Medium beschriftet. Sie werden unverzüglich in den Brutschrank verbracht. Es herrschen eine Temperatur von 37°C und ein CO<sub>2</sub> - Volumenanteil von 5%. Der O<sub>2</sub> - Volumenanteil beträgt 21%. Es wird dafür Sorge getragen, dass ein Gasaustausch mit dem Inneren der Zellkulturflasche entweder durch luftdurchlässige Deckel mit Filter oder durch leichtes Andrehen der Deckel möglich ist.

Die Stammzellen adhären innerhalb von 24 bis 48 Stunden am Plastikboden der Zellkulturflasche, strecken sich und fangen an sich zu vermehren. Alle anderen Zellen wie Fibrozyten, Endothelzellen oder Adipozyten bleiben in Lösung und werden mit dem ersten Mediumwechsel entfernt.

Der Wechsel des Mediums mit Reinigung der Zellkultur erfolgt am zweiten Tag, danach alle zwei bis drei Tage. Dabei wird das alte Medium abgesaugt und die Zellen werden für drei Minuten mit PBS zum Waschen inkubiert. Selbiges wird danach ebenfalls wieder abpipettiert und frisches Medium in ausreichender Menge zugegeben. Das PBS und das zuvor angesetzte Medium werden vorher im Wasserbad auf 37°C vorgewärmt. Zu beachten ist, dass dabei möglichst zügig gearbeitet wird und direkte Berührung der Zellen mit der Pipette oder dem Flüssigkeitsstrahl vermieden wird, um den Stress für die Zellen durch Umgebungswechsel und mechanische Belastung möglichst gering zu halten. Einmal angesetztes Medium sollte nicht länger als zwei Wochen Gebrauch finden.

Die Zellen werden jeden Tag, spätestens bei jedem Mediumwechsel, einer mikroskopischen Beurteilung auf Morphologie, Unversehrtheit und Bewuchsdichte unterzogen.

### 3.1.3. Versuchszellgruppen

Für die in dieser Arbeit beschriebenen und analysierten Versuche werden die Zellen von sechs verschiedenen Pferden herangezogen. Die Pferde waren gesund und wurden nur zum Zwecke der Fleischgewinnung geschlachtet.

Der Altersdurchschnitt der Pferde liegt bei 8,2 Jahren. Im Einzelnen handelt es sich um einen 3-jährigen Hengst (Pfd 05/09), eine 4-jährige Stute (Pfd 07/09), eine 7-jährige Stute (Pfd 72/09), eine 10-jährige Stute (Pfd 06/09), einen 10-jährigen Wallach (Pfd 71/09) und einen 15-jährigen Wallach (Pfd 11/09).

Alle verwendeten Zelllinien zeigen die erforderlichen Stammzeleigenschaften (siehe Kapitel Stammzellnachweis4.1).

## 3.2. Stammzellnachweis

### 3.2.1. Chondrogene Differenzierung

#### Differenzierungsmedium

Zur Aktivierung der Zellen, sich in Richtung Chondrozyten zu differenzieren, benötigen sie ein spezielles Umfeld. Diese Umgebung wird bestmöglich mit dem die Zellen versorgenden Medium und durch die Kultivierungsform nachgeahmt. 15 ml des Differenzierungsmediums enthalten:

13.198,5 µl	DMEM low glucose
150 µl	AA
1,5 µl	0,1 µM Dexamethason
150 µl	ITS (1:100)
500 µl	100 µg/ml Natriumpyruvat
500 µl	50 µg/ml Ascorbinsäure-2-Phosphat
500 µl	40 µg/ml Prolin

Natriumpyruvat, Ascorbinsäure-2-phosphat und Prolin werden mit DMEM zur entsprechenden Konzentration gemischt und steril filtriert. Zusammen mit den anderen Inhaltsstoffen werden sie zum Basisdifferenzierungsmedium vermischt. Es darf nicht länger als maximal eine Woche verwendet werden. Das letztendliche Differenzierungsmedium muss immer frisch in gerade benötigter Menge angesetzt werden und enthält zusätzlich:

1  $\mu$ l TGF- $\beta$  pro 100  $\mu$ l Medium

### **Anfertigen der Pellets**

Da Stammzellen besser in die chondrogene Richtung im 3D-Zellverband als in einer Monolayer-Kultur differenzieren, werden als Kultivierungsform Pellets à 0,5 Mio. Zellen gewählt.

Die vorkultivierten Zellen werden mit PBS gewaschen und mit Accutase abgelöst. Sie werden in einer Neubauer Zählkammer gezählt und das benötigte Volumen an Zellsuspension für 0,5 Mio. Zellen wird berechnet.

In 15 ml-Falcon-Röhrchen mit trichterförmigem Boden wird ein halber Milliliter Medium vorgelegt und die Zellsuspension zugefügt.

Anschließend werden die Röhrchen für 5 min bei 800 rpm zentrifugiert, was zur Bildung der Pellets führt. Die Deckel der Röhrchen werden leicht angedreht und die Röhrchen mit den Pellets in einem Röhrchengestell in den Brutschrank bei 37°C, 21% O<sub>2</sub> - Volumenanteil und 5% CO<sub>2</sub> - Volumenanteil gestellt.

### **Kultivierungsschema**

Es werden pro Pferd zwanzig Pellets geformt, d.h. es werden 10 Mio. Zellen der Passage 2 benötigt. Im Pellet handelt es sich dann um Passage 3.

Zehn Pellets bilden die Positivkontrolle, zehn die Negativkontrolle. Jeweils fünf davon gehen in die histologische Untersuchung und die anderen fünf sind zur Untersuchung der RNA bestimmt. Die Positivkontrolle erhält durchgehend vom ersten Tag an Differenzierungsmedium, die Negativkontrolle normales Kultivierungsmedium (siehe Kapitel 3.1.2.).

Am ersten Tag erfolgt die Pelletformung. Die Pellets verbleiben für drei Tage möglichst erschütterungsfrei im Brutschrank zur Stabilisierung der Form.

Am dritten Tag wird erstmals das Medium gewechselt, jedoch ohne Waschschrift. Dabei werden die Pellets der Positivkontrolle mit Hilfe einer 1000µl-Pipette in Wells einer 24er-Well-Platte umgesetzt. Je fünf Pellets kommen zusammen in ein Well und werden mit 1 ml Differenzierungsmedium bedeckt. Die Pellets der Negativkontrolle verbleiben in den Röhrchen, um ein Auseinanderfallen der Pellets zu vermeiden. Sie erhalten jeweils 0,5 ml frisches Kultivierungsmedium bestehend aus DMEM low glucose, 10% FBS und 1% P/S. Weitere Medienwechsel werden alle zwei bis drei Tage bis zum Versuchsende am 21. Tag durchgeführt. Festhaftende Pellets werden dabei vorsichtig mit der Pipette freigespült. Am Ende werden die Pellets für die jeweiligen Untersuchungen fixiert.

### 3.2.2. Osteogene Differenzierung

#### Differenzierungsmedium

Auch im Falle der osteogenen Differenzierung können die für Zellen notwendigen Reize über das Medium zugefügt werden. 15 ml des Differenzierungsmediums enthalten:

11.668,5 µl	DMEM low glucose
1.500 µl	FBS
150 µl	P/S
1,5 µl	Dexamethason
1.500 µl	β-Glycerolphosphat (21,6 mg/ml)
180 µl	Ascorbinsäure-2-phosphat (1,5 mg/ml)

#### Kultivierungsschema

Für die osteogene Differenzierung werden zunächst ausreichend Zellen in der Passage 2 angezchtet. Die Zellen werden bei Erreichen einer Dichte von 80% abgelöst und in 24er-Well-Platten übersiedelt. Die Dichte beträgt hierbei ca. 1500 bis

2000 Zellen pro cm<sup>2</sup>. Die Zellen im Versuch haben nun die Passagezahl 3. Sie erhalten ab sofort nur noch 500 µl Differenzierungsmedium pro Well. Das Medium wird jeden zweiten bis dritten Tag gewechselt und die Zellen werden mit PBS gewaschen.

Einige Wells dienen als Negativkontrolle und erhalten normales Kultivierungsmedium aus DMEM low glucose, 10% FBS und 1% P/S.

Am 21. Tag wird der Versuch beendet, die Zellen werden fixiert und nach Von Kossa angefärbt.

### 3.2.3. Adipogene Differenzierung

#### Differenzierungsmedium

Um die Differenzierung der Stammzellen zu Adipozyten herbeizuführen wurde folgendes Medium verwendet: (Angaben für 15 ml)

13.260 µl	DMEM low glucose
1.500 µl	FBS
150 µl	P/S
15 µl	Dexamethason
75 µl	ITS

Die oben aufgeführten Bestandteile werden zu einem Grundmedium vermischt, das eine Woche lang benutzt werden kann. In einem zweiten Schritt werden Indomethacin und IBMX zugesetzt. Die Zugabe erfolgt direkt in die Zellkultur in der 24er-Well-Platte.

Indomethacin	3,6 µl in 500 µl adipogenes Medium
IBMX	5,5 µl in 500 µl adipogenes Medium

### **Kultivierungsschema**

Es erfolgt ebenfalls ein Ansatz der Zellen in der Passage 3 in einer 24er-Well-Platte. Die Dichte beträgt 1500-2000 Zellen pro cm<sup>2</sup>. Pro Well werden 500 µl adipogenes Medium zugegeben. Ein Mediumwechsel mit Waschen der Zellen wird alle zwei bis drei Tage durchgeführt. Auch hier wird ein Teil der Wells als Negativkontrolle mitgeführt und erhält Kultivierungsmedium aus DMEM low glucose, 10% FBS und 1% P/S.

Nach zwei Wochen werden die Zellen fixiert und mit Hilfe der Oil-Red-O-Färbung histologisch untersucht.

#### **3.2.4. Nachweis von Stammzellmarkern**

Neben der Adhärenz an Plastik und den Differenzierungen zu adipogenen, osteogenen und chondrogenen Zellverbänden dient als weiterer Indikator für die tatsächliche Identität der Zellen als Stammzellen der Nachweis verschiedener Marker auf mRNA-Ebene.

In diesem Fall werden dafür der Transkriptionsfaktor „Octamer binding transcription factor 4“, im weiteren Oct4 genannt, der Transkriptionsfaktor Nanog und die Oberflächenproteine CD90 und CD105, auch als Endoglin bezeichnet, herangezogen.

Das Vorhandensein der mRNA für oben benannte Proteine in den Zellen ist kein abschließender Beweis, jedoch ein starkes Indiz für ihre Stammzellidentität. Die Erläuterung der Methodik zur mRNA-Gewinnung und Analyse erfolgt in Kapitel 3.10.

### **3.3. Tenogene Differenzierung im Pellet mit GDF5, GDF6 und GDF7**

Um die Zellen in Richtung Tenoblasten oder Tenozyten zu differenzieren, werden die Wachstumsfaktoren GDF5, GDF6 und GDF7 verwendet.

Sie sind ebenfalls bekannt unter den Bezeichnungen CDMP, cartilage derived morphogenetic protein-1, -2 und -3 oder unter BMP, bone morphogenetic protein 14, 13 und 12.

Die Wachstumsfaktoren werden als rekombinantes Protein, lyophilisiert von Fa. Biochrom oder Fa. R&D Systems bezogen.

### **3.3.1. Rekonstitution von GDF5, GDF6 und GDF7**

#### **Growth Differentiation Factor 5**

50 µg humanes, rekombinantes GDF5 werden von der Fa. Biochrom als lyophilisiertes Protein in einem Glasröhrchen geliefert. Dieses wird zunächst kurz anzentrifugiert. Anschließend wird mit 20 mM AcOH zusammen mit 0,1% BSA als Trägerprotein wieder eine Lösung hergestellt.

Die Konzentration des GDF5 darf im ersten Schritt nicht weniger als 100 µg/ml betragen. Später kann es weiter auf die benötigte Konzentration verdünnt werden. Die Stammlösung für diese Arbeit hat eine Konzentration von 10 µg/ml. Die Aufbewahrung erfolgt bei -22°C, aufgeteilt in mehrere Aliquots, um häufiges Auftauen und wieder Einfrieren zu vermeiden.

#### **Growth Differentiation Factor 6**

Es handelt sich dabei um 50 µg humanes, rekombinantes GDF6 der Fa. Biochrom, geliefert in einem Glasröhrchen. Zuerst erfolgt eine kurze Zentrifugation. Anschließend werden 50 µg BSA pro 1 µg GDF-Protein in Aqua bidest gelöst bis zu einer Konzentration von 0,1 bis 1,0 mg BSA/ml. Das ergibt in diesem Fall 2,5 mg BSA in 2,5 ml Aqua bidest. Der Ansatz wird steril filtriert und das GDF6 darin gelöst.

Nun wird PBS mit Hilfe von 100%iger Essigsäure mit einem pH-Meter auf pH 4,5 eingestellt und davon werden 2,5 ml steril filtriert und zu der GDF6-Lösung zugegeben. Somit erhält man eine Konzentration von 10 µg/ml GDF6. Die Aufbewahrung erfolgt in Aliquots bei -22°C.

### Growth Differentiation Factor 7

Hier wird der rekombinante GDF7 der Maus verwendet. 10 µg lyophilisiert werden davon in einem Glasröhrchen von der Fa. R& D Systems geliefert.

Die Rekonstitution erfolgt mit 4 mM HCl zusammen mit 0,1% BSA zu einer Konzentration von 100 µg/ml. Man erhält 100 µl Stammlösung, welche ebenfalls in Aliquots bei -22°C gelagert wird. Ihre Haltbarkeit beträgt allerdings nur drei Monate.

#### 3.3.2. Differenzierungsmedium

Für die Differenzierung wird ein spezielles Medium hergestellt. Das Medium enthält DMEM, FBS, P/S, Prolin und Ascorbinsäure. Prolin ist ein wichtiger und häufiger Aminosäurebaustein im Kollagen. Die Aminosäuresequenz kann in der internationalen Datenbank unter [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed) eingesehen werden. Ascorbinsäure ist ein wichtiger Kofaktor bei der Kollagensynthese.

So werden die Voraussetzungen geschaffen, dass die Zellen die Möglichkeit haben, auf eine eventuelle Stimulation durch die GDFs mit einer Kollagensynthese reagieren zu können.

15 ml des Differenzierungsmediums enthalten:

DMEM low glucose	12.350 µl
10% FBS	1.500 µl
1% P/S	150 µl
Prolin	500 µl (1,5 mg auf 1 ml DMEM low glucose)
Ascorbinsäure-2-phosphat	500 µl (1,2 mg auf 1 ml DMEM low glucose)

DMEM, FBS und P/S bilden zusammen mit Prolin und Ascorbinsäure das Basismedium.

Um das spezielle Differenzierungsmedium für die einzelnen Versuchsgruppen zu erhalten, werden jeweils 80 ng/ml GDF5, GDF6 oder GDF7 unmittelbar vor Benutzung dem Basismedium zugefügt.

Die Negativkontrolle erhält die gleiche Menge Basismedium bestehend aus DMEM low glucose + 10% FBS + 1% P/S, Prolin und Ascorbinsäure.

### **3.3.3. Anfertigen der Pellets**

Um den Zellen eine dreidimensionale Umgebung ähnlich wie im Sehngewebe zu bieten, wird für die tenogene Differenzierung mit Pellets gearbeitet.

Dazu werden 96-Well-Real-Time-PCR-Platten verwendet. Jedes Well der Platte wird mit 100 µl Medium und mit 250.000 Zellen bestückt. Anschließend wird die Platte mit der dazugehörigen Folie verschlossen, um Verdunstung und Kontaminationen entgegen zu wirken. Zur Ermöglichung des Gasaustausches wird die Folie über jedem Well 3-4 Mal mit einer sterilen Kanüle durchstoßen.

Die Pellets formen sich von selbst durch Gravitation nach etwa 24-36 Stunden.

### **3.3.4. Kultivierungsschema**

Der Versuch ist auf 21 Tage angelegt. Am ersten Tag erfolgt die Belegung der Wells. Pro Pferd werden fünf Gruppen gebildet:

1. Gruppe: je 100 µl Differenzierungsmedium mit GDF5 (80ng/ml)
2. Gruppe: je 100 µl Differenzierungsmedium mit GDF6 (80ng/ml)
3. Gruppe: je 100 µl Differenzierungsmedium mit GDF7 (80ng/ml)
4. Gruppe: je 100 µl Basismedium (Negativkontrolle =NK)

Der Wechsel des Mediums und der Folie erfolgt jeden dritten Tag. Dabei wird das alte Medium bis auf einen marginalen Rest mit einer 100 µl-Pipette abgesaugt und neues Medium hinzugegeben. Das Medium wird frisch angesetzt, gut vermischt und dann auf die Wells aufgeteilt.

### 3.4. Kollagengel

Zur Herstellung einer mehr an die natürliche Situation einer Sehnenzelle angepassten Umgebung wurde ein Kollagengel verwendet. Dieses Gel ermöglicht den darin verteilten Zellen sich frei in alle drei Dimensionen zu entwickeln, längere Fortsätze auszubilden und ihre äußere Form frei zu gestalten (siehe Kapitel 4.3).

Es handelt sich dabei um ein Kollagen-I-Gel, welches von der Firma Amedrix, Esslingen, freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde. Um dem Gel mehr Stabilität und Zugfestigkeit zu verleihen wird es zusätzlich verdichtet.

### 3.5. Vitalitätsuntersuchungen der Zellen im Kollagengel

Bei der Arbeit mit einem dreidimensionalen Trägermaterial, hier dem Kollagengel, ist es wichtig sicher zu stellen, dass den Zellen eine Umgebung geboten wird, die für ihr Wachstum und ihre Vermehrung geeignet ist.

#### 3.5.1. Auswanderungsversuch

Hierfür wird getestet, ob es den Zellen möglich ist, ihre Morphologie in dem Gel zu verändern. Dazu wird ein Auswanderungsversuch angelegt. Drei verschiedene, komprimierte Gele werden in Kultur genommen. Jeweils am 1., 5., 7., 9. und 14. Tag werden drei kleine Stücke pro Gel unter sterilen Bedingungen abgetrennt und in Wells einer 24er-Well-Platte gegeben sowie mit neuem Medium versorgt. Nach zwei Tagen wird unter dem Mikroskop kontrolliert, ob Zellen aus dem Gelstück ausgewandert und auf dem Boden des Wells festgewachsen sind.

#### 3.5.2. Prozentzahl der lebenden Zellen

Zur Untersuchung der Vitalität der Zellen wird eine Trypanblau-Färbung durchgeführt. Die Zellen werden zunächst durch eine Verdauung mit Collagenase aus dem Gel

gelöst. Dabei wird dasselbe Verfahren wie bei der Fettverdauung angewandt (siehe Kapitel 3.1.1.). Die so zurückgewonnenen Zellen werden einer Trypanblau-Färbung unterzogen und in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. Ziel ist es das prozentuale Verhältnis von lebenden zu toten Zellen zu ermitteln.

Für die Färbung wird das gewonnene Zellpellet mit 20 µl Aqua dest resuspendiert und anschließend werden 80 µl Trypanblau hinzugegeben. Nach 30 bis max. 60 sec wird die Neubauer Zählkammer befüllt und die Zählung begonnen. Der Zeitraum darf nicht länger gewählt werden, da der Farbstoff sonst auch in die lebenden Zellen eindringt.

### **3.5.3. Entwicklung der Gesamtzellzahl**

Die Rückgewinnung der Zellen erfolgt ebenfalls über die Verdauung mit Collagenase. Allerdings ist es hier wichtig die genaue Menge des eingesetzten Gels zu kennen. Es wird jeweils genau 1 g Gel abgewogen und die Anzahl der darin enthaltenen Zellen gezählt.

## **3.6. Tenogene Differenzierung im Kollagen-Gel mit GDF5, GDF6 und mechanischer Stimulation**

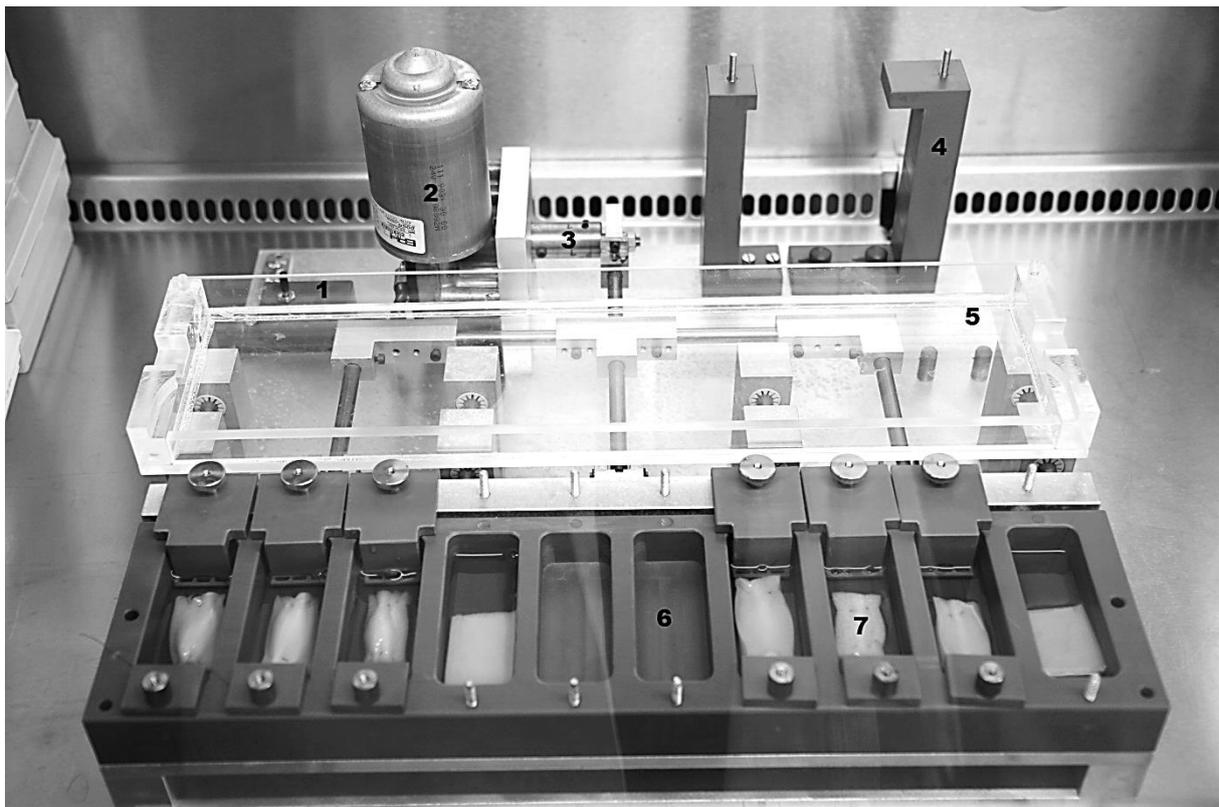
In diesem Versuchsaufbau werden drei weitere Komponenten im Vergleich zur Pelletkultur mit einbezogen: eine Trägersubstanz mit dreidimensionalem Raum, ein weiterer Abstand zwischen den Zellen und die mechanische Stimulation.

Die Zellen erhalten im Kollagen-Gel verglichen mit der 3D-Kultur im Pellet sehr viel mehr Raum zur Ausdehnung. Dafür liegen sie deutlich weiter voneinander entfernt, was zu weniger direkten Zellkontakten führt.

Die mechanische Stimulation dient als Simulation des natürlichen Habitats von Tenozyten, welche bei jedem Schritt eines Lebewesens einer Dehnung entlang des Faserverlaufs der Sehne ausgesetzt sind. Die Extension beträgt maximal 4-5% der Länge der jeweiligen Sehne.

### 3.6.1. Dehnungsapparatur

Zur Verwirklichung des Vorhabens wurde in Zusammenarbeit mit der Werkstatt des Institutes für Physiologie am Fachbereich für Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen ein spezieller Bioreaktor entwickelt (Abbildung 4).



**Abbildung 4: Bioreaktor**

Bioreaktor zur Übertragung mechanischer Stimulation auf die mit Stammzellen versetzten Kollagengele während der Kultivierung im Brutschrank 1: manueller An-/ Ausschalter 2: Motorblock 3: Extender 4: Halterung zum Anknüpfen der vernähten Gelstücke 5: Kunststoffdeckel 6: Gelkammern im Kunststoffblock 7: befestigte Kollagengelstücke in Medium

Der Bioreaktor besteht aus einer Grundplatte aus Aluminium, die an die Innenmaße des Brutschranks angepasst ist. Darauf befestigt ist ein Schalter (oben links im Bild) zum manuellen Ein- und Ausschalten. Rechts daneben folgt der Motorblock mit angekoppeltem Extender (Zylinder aus Messing), welcher die Hubweite bestimmt.

Durch Austausch des Extenders kann zwischen einer Amplitude von 3 mm, 4 mm oder 5 mm gewählt werden.

Im rechten oberen Bereich der Grundplatte befindet sich eine Halterung, die das Befestigen der Gele erleichtert.

Die Kraftübertragung erfolgt über eine Art Dreizack aus Messingstäben in der Mitte der Platte. Dieser setzt an einer beweglichen Aluminiumschiene an. Zur weiteren Stabilisierung und zur Gewährleistung der Gleichmäßigkeit der Bewegung sind vier Messingstäbe in diese eingelassen, welche auf Kugellagern aus Plastik geführt werden.

In den grauen Kunststoffblock sind zehn gleich geformte Kammern eingefräßt. Dort hinein reichen je zwei Plastikarme, an denen das Gel befestigt ist. Die eine Reihe der Arme (im Bild ganz vorne) ist stationär, die andere Reihe ist an der beweglichen Metallschiene befestigt. So wird gewährleistet, dass in allen Kammern die gleiche Bewegung erfolgt.

Die Frequenz der Dehnungsbewegung wird durch einen Adapter geregelt. Über das Austauschen eines Voltsteckers (5V bis 24V) kann die Frequenz von 17 Dehnungszyklen bis zu 80 Zyklen pro Minute reguliert werden.

Mit Hilfe einer Zeitschaltuhr kann ein individuelles Programm von Dehnungs- und Ruhephasen eingestellt werden.

Um die Verdunstung des Mediums und eine Kontamination der Proben zu vermeiden ist der Kunststoffblock mit den Kammern für Medium und Gele mit einer Abdeckung aus durchsichtigem Plastik versehen (im Bild aufgeklappt).

### **3.6.2. Befestigung des Gels**

Das Gel wird an beiden Rändern mit einer 3-0 Monocryl Nadel-Faden-Kombination mit runder Nadel und doppelter U-Naht vernäht. Die Enden der Fäden werden jeweils 3-4 cm lang gelassen. An diesen Fäden wird das Gelstück hochgehoben und zur Befestigungsvorrichtung auf der Platte gebracht. So kann das Gel leichter mit einem dreifachen chirurgischen Knoten befestigt und gespannt werden. Dieser Arbeitsschritt muss immer von ein und derselben Person durchgeführt werden, um bestmöglich auf die Gleichmäßigkeit der Befestigung achten zu können.

### 3.6.3. Differenzierungsmedium

Das Basismedium für die Gele besteht aus: (Angabe für 15 ml)

DMEM low glucose	12.350 µl
15% FBS	1.500 µl
1% A/A	150 µl
Prolin	500 µl (1,5 mg auf 1 ml DMEM low glucose)
Ascorbin	500 µl (1,2 mg auf 1 ml DMEM low glucose)

Die Unterschiede zur Pelletkultur bestehen lediglich in einer 5%igen Erhöhung des FBS um den Diffusionsweg durch das Gel auszugleichen und in einer Umstellung von reinem P/S auf A/A, da sich die Gelkulturen als besonders anfällig für Kontamination durch Pilze erwiesen haben.

Zum Basismedium werden analog zu den Pelletversuchen 80 ng/ml GDF5 oder GDF6 zugesetzt um die Differenzierungsmedien zu erhalten.

### 3.6.4. Versuchsablauf

Ein Versuchsdurchlauf kann gleichzeitig mit Zellen von zwei Pferden durchgeführt werden. Der Versuch beginnt mit dem Ablösen und Versenden der notwendigen Zellanzahl an die Firma Amedrix.

Es werden pro Pferd ca. 30 Mio. Zellen der Passage 2 angezüchtet, abgelöst und in Transportmedium gekühlt über Nacht versendet. Bei der Firma Amedrix werden die Zellen gleichmäßig in das Kollagengel eingebracht und das Gelkonstrukt wird im Anschluss, um eine bessere Festigkeit zu erhalten, einfach komprimiert. Die so mit Zellen versetzten Gele mit Maßen von 20 cm x 2,5 cm x 0,4 cm werden wiederum über Nacht zurückgesendet.

Am folgenden Tag werden die Gele direkt in den Bioreaktor eingespannt. Es werden direkt Proben zurückbehalten und zur histologischen Untersuchung fixiert.

Pro Pferd werden vier Kammern mit gleich großen Gelstücken in dem Bioreaktor belegt. Es gibt folgende Versuchsgruppen:

Gruppe 1: Das Gelstück bleibt ohne mechanische Stimulation und erhält Basismedium (= NK, nicht gedehnt)

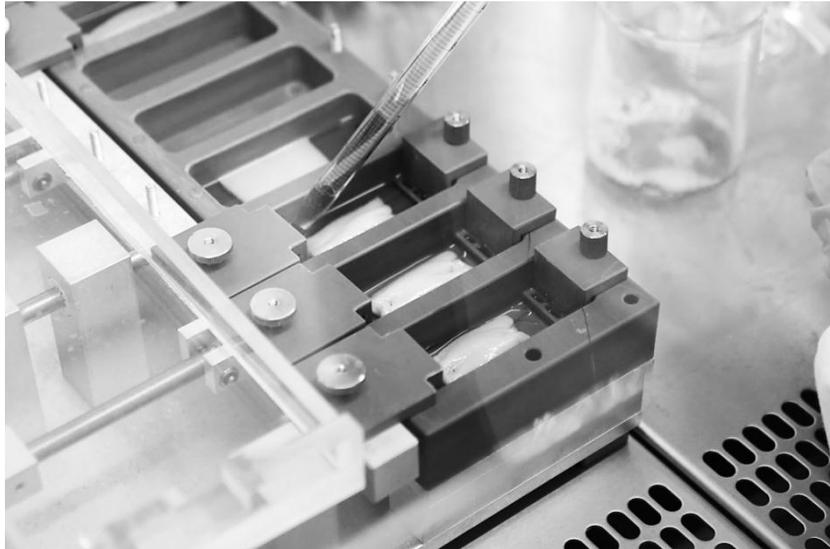
Gruppe 2: Das Gelstück wird vernäht und befestigt, es wird mechanisch stimuliert und erhält ebenfalls Basismedium (= NK!, gedehnt)

Gruppe 2 ist wichtig um eventuelle Effekte, die allein auf der mechanischen Stimulation beruhen können, zu erkennen.

Gruppe 3: Das Gelstück erfährt mechanische Stimulation und dem Basismedium wird GDF5 (80 ng/ml) zugesetzt

Gruppe 4: Das Gelstück erfährt mechanische Stimulation und dem Basismedium wird GDF6 (80 ng/ml) zugesetzt

Pro Reaktorkammer werden 10 ml Medium eingesetzt. Der Mediumwechsel (Abbildung 5) erfolgt jeden dritten Tag. Dabei werden die Gelkonstrukte jeweils mit 10-15 ml PBS gewaschen.



**Abbildung 5: Gele im Bioreaktor während des Medienwechsels**

Unter der Sterilbank im Zellkulturlabor erfolgt alle 2-3 Tage ein vollständiger Mediumwechsel mit Waschschrift für jede einzelne Gelkammer. Die Flüssigkeiten werden mit steriler Glaspipette ausgetauscht, die Gele verbleiben unangetastet in ihrer Kammer.

Der Versuch läuft über eine Dauer von 18 Tagen. Während dieser Zeit befindet sich der Bioreaktor im Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 21% O<sub>2</sub>. Mittels einer Zeitschaltuhr wird das Programm der mechanischen Stimulation kontrolliert: Die Gelkonstrukte werden einer vierstündigen Dehnungsphase ausgesetzt, an welche sich eine achtstündige Ruhepause anschließt. Somit beläuft es sich pro Tag auf eine Gesamtdehnungsdauer von acht Stunden.

Die Dehnungsamplitude beträgt 3 mm, die Frequenz ist auf 30 Zyklen pro Minute eingestellt.

### 3.7. Histologische Färbungen

#### 3.7.1. Hämatoxilin-Eosin-Färbung an Kryostatschnitten

Für die Färbung mit Hämatoxilin und Eosin, weiterhin mit HE bezeichnet, müssen die frischen Kryostatschnitte für zehn Minuten bei Raumtemperatur luftgetrocknet werden. Bei der Färbung selbst wird folgendermaßen vorgegangen:

10 min	Kryostatschnitte trocknen, (RT)
1 min	Hämatoxilin
1-2 min	Leitungswasser
20 sec	Eosin
1-2 min	Leitungswasser

Eindecken mit Kaiser's Gelatine

#### 3.7.2. Hämatoxilin-Eosin-Färbung an Paraffinschnitten

Bei der HE-Färbung von Paraffinschnitten sind drei Arbeitsphasen notwendig:

##### Entparaffinieren:

10 min	Xylol I
10 min	Xylol II
5 min	100%iges Ethanol
5 min	96%iges Ethanol
5 min	70%iges Ethanol
5 min	50%iges Ethanol
5 min	Aqua dest.

##### Färben:

30-60 sec	Hämatoxilin
-----------	-------------

10 min	lauwarmem Leitungswasser (Bläuen)
5 min	Eosin

Entwässern:

20 sec	70%iges Ethanol
20 sec	80%iges Ethanol
2 min	96%iges Ethanol
2 min	100%iges Ethanol
10 min	Xylol I
10 min	Xylol II

Eindecken mit Vitro-Clud

### 3.7.3. Hämatoxin-Eosin-Färbung an Zellen im Well

2x 1 min	PBS
10 min	Methanol => Fixierung (1 ml pro 24er-Well, -20°C)
1 min	Aqua dest
1 min	Hämatoxin
1 min	Aqua dest
5 min	Eosin
1 min	Aqua dest

Eindecken mit Kaiser`s Gelatine

### 3.7.4. Alcianblau-Färbung an Paraffinschnitten

Die Alcianblau-Färbung wird zur Färbung der chondrogenen Differenzierung angewendet. Das Alcianblau färbt dabei die knorpelartige Interzellulärsubstanz an, während das Kernechtrot als Gegenfärbung für die Darstellung der Kerne dient.

Zuerst ist es notwendig die Schnitte zu entparaffinieren. Es folgt die eigentliche Färbung, zum Abschluss eine aufsteigende Alkoholreihe zur Entwässerung und das Eindeckeln zur Fixierung. Die einzelnen Schritte sind hier aufgelistet:

Entparaffinieren:

5 min	Xylol I
5 min	Xylol II
3 min	100%iges Ethanol
3 min	96%iges Ethanol
3 min	70%iges Ethanol
3 min	50%iges Ethanol
3 min	Aqua dest

Färben:

30 min	Alcianblau (dunkel)
5 min	Kernechtrot

Entwässern:

10 sec	70%iges Ethanol
2 min	80%iges Ethanol
2 min	96%iges Ethanol
2 min	100%iges Ethanol
5 min	Xylol I
5 min	Xylol II

Eindecken mit Vitro-Clud

### 3.7.5. Oil-Red-O-Färbung an Zellen im Well

Die Oil-Red-O-Färbung wird zur Untersuchung der adipogenen Differenzierung der Zellen angewendet. Intrazelluläre Lipidtröpfchen färben sich dabei intensiv rot. Hämatoxin wird zur Gegenfärbung der Kerne verwendet. Folgender Färbeablauf wird eingehalten:

2x 5 min	PBS
10 min	PFA 4%ig => Fixierung
3x 5 min	0,1M PBS
2 min	Aqua dest
15 min	Oil-Red-O Gebrauchslösung (dunkel)
3x 5 min	Aqua dest
15 sec	Hämatoxilin
5-10 min	Leitungswasser
1 min	Aqua dest

Eindecken mit Kaiser`s Gelatine

### 3.7.6. Von-Kossa-Färbung an Zellen im Well

Die Von-Kossa-Färbung dient dem Nachweis der Calciumeinlagerung. Das Silbernitrat lässt dabei die Calciumeinlagerungen tief dunkelbraun bis schwarz erscheinen, das Kernechtrot wird zur Gegenfärbung der Kerne verwendet.

Es muss ausschließlich mit Aqua bidest gearbeitet werden, da sonst auch Kalk aus dem Leitungswasser ausgefällt wird. Es wird folgender Ablauf eingehalten:

2x 1min	500 µl Aqua bidest
10 min	4%iges Formalin => Fixierung
2x 5 min	Aqua bidest
30 min	500 µl 5%ige Silbernitratlösung (frisch filtriert)
2x 5 min	Aqua bidest
5-7 min	12 Tropfen 5%iger Natrium-Carbonat- Formaldehydlösung (frisch filtriert)
2x 5 min	Aqua bidest
30 sec	500 µl Farmers Reducer
2x 5 min	Aqua bidest
3-5 min	500 µl Kernechtrot(frisch filtriert)
2x 5 min	Aqua bidest

Silbernitratlösung:

5 g Silbernitrat auf 100 ml Aqua bidest auflösen

Natrium-Carbonat-Formaldehydlösung:

5 g Natrium-Carbonat in 25 ml 35-40%igem Formaldehyd (filtriert) und 75 ml Aqua bidest lösen

Farmers Reducer:

10%iges Na-Thiosulfat: 0,5 g Natrium-Thiosulfat-pentahydrat in 5 ml Aqua bidest

10%ige Formaldehydlösung: 5 ml 35-40%iges Formaldehyd auf 5 ml Aqua bidest

⇒ 5 ml der Na-Thiosulfat-Lösung mit 0,25 ml der Formaldehydlösung mischen

### 3.7.7. Trichromfärbung nach Cason an Paraffinschnitten

Nach dieser Färbung stellen sich kollagenes und retikuläres Bindegewebe dunkelblau, saure Mukosubstanzen blau dar. Erythrozyten, Muskelgewebe und Chromatin bewegen sich in den Bereichen orange, rot bis bräunlich.

Entparaffinieren:

5 min	Xylol I
5 min	Xylol II
3 min	100%iges Ethanol
3 min	96%iges Ethanol
3 min	70%iges Ethanol
3 min	50%iges Ethanol
3 min	Aqua dest

Färben:

5 min	Cason`s Färbelösung
2min	Leitungswasser
5 min	Kernechtrot

Entwässern:

10 sec	70%iges Ethanol
2 min	80%iges Ethanol
2 min	96%iges Ethanol
2 min	100%iges Ethanol
5 min	Xylol I
5 min	Xylol II

Cason`s Färbelösung:

200 ml Aqua dest

+ 1 g Phosphorwolframsäure

+ 2 g Orange G

+ 1 g Anilinblau, wasserlöslich

+ 3 g Säurefuchsin; (Lösung vor Benutzung einmal filtrieren)

### 3.7.8. Färbung nach Pasini modifiziert nach Walter an Paraffinschnitten

Bei dieser Färbung stellen sich kollagene Fasern intensiv blau dar und das Zytoplasma bis in die feinsten Ausläufer karmoisinrot.

Entparaffinieren:

5 min	Xylol I
5 min	Xylol II
3 min	100%iges Ethanol
3 min	96%iges Ethanol
3 min	70%iges Ethanol
3 min	50%iges Ethanol
3 min	Aqua dest

Beizen:

1-2 h	dicke Schnitte, 12-24 h	dünne Schnitte
-------	-------------------------	----------------

2x 3 min    Aqua dest

Färben: Pasini-Farbgemisch

5-60 min    dicke Schnitte, 12-24 h    dünne Schnitte

5 min        Leitungswasser

5-10 min    96%iges Ethanol

Entwässern:

5min        Xylol I

5 min        Xylol II

Eindecken mit Vitro-Clud

Pasini-Farbgemisch:

1 g Wasserblau in 100 ml Aqua dest

1 g Orcein in 50 ml Ethanol 70%ig + 5 ml Eisessig +20 ml Glycerin

Vermischen beider Lösungen (=> Unnas Wasserblau-Orcein-Gemisch)

30 ml davon zu 30 ml 2%igem Eosin in 50%igem Ethanol

+ 4 ml in Wasser gesättigtem Säurefuchsin + 25 ml Glyzerin

### 3.8. Immunhistochemie

Bei der Immunhistochemie werden bestimmte Epitope als antigene Determinanten mit Hilfe von Antikörpern spezifisch dargestellt. Bei diesen antigenen Determinanten handelt es sich um Proteine.

Antikörper spielen im Körper eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr. Die für die Immunhistochemie verwendeten Antikörper gehören zur Klasse der Gammaglobuline. Sie bestehen aus zwei Proteinabschnitten, dem y-förmigen Fab-Fragment, welches spezifisch an das Antigen bindet, und dem Fc-Fragment, welches spezifisch für die Antikörpergruppe und das Wirtstier ist.

Der Primärantikörper bindet mit seinem Fab-Fragment spezifisch an das zu untersuchende Antigen, in diesem Fall Kollagen I oder Kollagen III, und der Sekundärantikörper bindet spezifisch an das Fc-Fragment des Primärantikörpers.

Verwendete Primärantikörper:

- 1) Anti Collagen I, Rabbit anti-human (Fa. Biomex) Verdünnung 1:100
- 2) Anti Collagen III, Rabbit anti-human/mouse/rat (Fa. Abcam) Verdünnung 1:100

Verwendeter Sekundärantikörper:

Goat anti-rabbit, Dako E0432, biotinyliert, Verdünnung 1:100

Es findet die Avidin-Biotin-Peroxidase(ABC)-Methode Anwendung. An den Sekundärantikörper ist Biotin gebunden, er ist somit biotinyliert. Avidin hat eine sehr hohe Affinität zu Biotin, so dass beides zusammen zum Bindeglied zwischen Sekundärantikörper und Peroxidase wird.

Im nächsten Schritt kann durch die Zugabe des AEC-Substratkits eine Anfärbung dieser inzwischen mehrschichtigen Komplexe erreicht werden. AEC ist ein Chromogen, welches sich in Verbindung mit Peroxid und gebundener Peroxidase rot färbt.

Für die immunhistochemische Färbung wird folgendes Protokoll angewendet:

1.Tag:

- Objektträger mit PK + NK auswählen
- Schnitte entwässern:

10 min	Xylol I
10 min	Xylol II
10 min	Xylol III
5 min	100%iges Ethanol
5 min	96%iges Ethanol

- 5 min 70%iges Ethanol
- 5 min 50%iges Ethanol
- 5 min Aqua dest

(Kryostatschnitte ohne Entwässerungsschritte)

- 2 x 5 min WP
- 5 min H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in WP
- 2x 5 min WP
- OT abtrocknen
- Schnitte mit Dako-Cytomation Stift umkreisen
- In Feuchtkammer legen
- ZG-Serum-Mix zugeben bis Kreise gefüllt sind
- 20 min bei RT einwirken lassen
- OT abtrocknen
- AK-Mix auf PK und 1% BSA auf NK aufbringen

=> über Nacht im Kühlschrank bei 4°C einwirken lassen

## 2.Tag:

- 3x 5 min WP
- OT abtrocknen, in Feuchtkammer legen
- Sekundär-AK-Mix auf PK und NK auftragen bis Kreise gefüllt sind
- 30 min bei RT einwirken lassen
- 2x 5 min WP
- OT abtrocknen
- 1 Tropfen ABC-Lösung auftropfen pro Kreis
- 30 min in Feuchtkammer bei RT
- 2 x 5 min WP
- OT abtrocknen, in Feuchtkammer legen
- ACE-Mix auf Kreise aufteilen

Alle paar Minuten wird unter einem Mikroskop unter dem Abzug das Voranschreiten der Färbung kontrolliert. Bei genügender Intensität kann der Färbvorgang beendet werden.

- AEC-Mix abkippen, abspülen
- 2x 5 min Aqua dest

Hier: evtl. Gegenfärben mit Hämatoxin

- OT abtrocknen
- 5 sec Hämatoxin
- In Leitungswasser schwenken
- 3x 5 min Leitungswasser

Eindecken mit Kaiser`s Gelatine

Es schließt sich eine Übersicht über die Zusammensetzung der bei der Immunhistologie verwendeten Mischungen und Lösungen an:

Waschpuffer (=WP):

100 ml 10xTris-HCl-Puffer-Stammlösung werden in einem Becherglas mit Magnet bei 300-400 rpm auf einen Magnetrührer gestellt. Nach und nach werden 900 ml Aqua bidest und 250 µl TritonX zugeben. Das Rühren erfolgt solange, bis das gesamte TritonX vollständig in Lösung ist.

Tris-HCl-Puffer-Stammlösung:

60,5 g Tris-Base werden in 850-900 ml Aqua bidest gelöst. Anschließend wird der pH-Wert auf 7,6 mit konzentrierter HCl eingestellt. Es wird auf ein Volumen von 1000 ml mit Aqua bidest aufgefüllt und 90 g NaCl werden darin gelöst.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in WP:

6 ml 30%iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> werden mit 54 ml WP in einem Messzylinder angesetzt.

#### ZG-Serum-Mix:

1 Teil ZG-Serum wird mit 4 Teilen 1%igem BSA vermischt. Das BSA ist in WP gelöst. Das benötigte Volumen pro Schnitt beträgt ca. 50 µl.

#### AK-Mix:

1 Teil Primär-AK und 99 Teile 1%iges BSA werden vermischt. Das BSA ist in WP gelöst. Das benötigte Volumen pro Schnitt beträgt ca. 50 µl.

#### Sekundär-AK-Mix:

In einem ersten Eppendorfgefäß wird die Basislösung aus 1Teil ZG-Serum und 8 Teilen 1%igem BSA, in WP gelöst, angesetzt.

In einem 2. Eppendorfgefäß werden 1 Teil Sekundär-AK mit 99 Teilen Basislösung gemischt. Das benötigte Volumen pro Schnitt beträgt ca. 50 µl.

#### AEC-Mix:

Beim Ansetzen des ACE-Mixes muss unter dem Abzug gearbeitet werden. Die Dämpfe sind giftig. Es wird mit den Lösungen des Kits gearbeitet. 300 µl Substratpuffer werden mit 1 Tropfen Farbstoff vermischt.

### 3.9. Elektronenmikroskopie

Zur genaueren morphologischen Betrachtung der Zellpellets und der Gelkonstrukte wird die ultrastrukturelle Untersuchung mittels eines Elektronenmikroskops herangezogen.

#### 3.9.1. Fixierung

Die Gewebeproben müssen hierfür einer speziellen Fixierung unterzogen werden:

- 3 h YellowFix für Pellets

- 5h YellowFix für Gelstücke (ca. 0,1x 0,2x 0,5 mm)
- 3x 10min Waschen mit 0,1 M Na-Cacodylatpuffer [pH 7,2]
- 12-20h Na-Cacodylatpuffer bei 4°C im Kühlschrank
- 2-3 h Nachfixierung mit 1%igem OsO<sub>4</sub>
- 3x 10 min Waschen mit 0,1 M Na-Cacodylatpuffer
- Lagerung im Na-Cacodylatpuffer bei 4°C im Kühlschrank bis zur weiteren Einbettung

#### YellowFix:

Die YellowFix-Stammlösung besteht aus 2%igem Paraformaldehyd, 0,1 M Natrium-Cacodylatpuffer [pH 7,2] und 0,02%iger Picrinsäure. Unmittelbar vor der Anwendung wird sie mit 8%igem Glutaraldehyd versetzt. Beispielweise werden 9,2 ml YellowFix mit 0,8 ml Glutaraldehyd gemischt.

#### 1%iges OsO<sub>4</sub>:

Die Stammlösung aus 2%igem OsO<sub>4</sub> wird kurz vor der Benutzung 1:1 mit 0,2 M Na-Cacodylatpuffer zur Gebrauchslösung verdünnt.

### **3.9.2. Einbettung**

Es folgt eine manuell durchgeführte Entwässerung der Proben indem sie in einer aufsteigenden Alkoholreihe behandelt werden.

Anschließend werden die Proben sorgfältig in einer Hartgummischablone platziert und mit Epon umhüllt. Bis zur vollständigen Aushärtung verbleiben sie unter dem Abzug.

### **3.9.3. Semidünnschnitte**

Mit dem Ultracut werden zunächst Semidünnschnitte mit einer Dicke von 1 µm angefertigt. Diese Schnitte werden mit einer 2%igen Toluidinblau-Bora-Mischung angefärbt. Sie geben einen ersten Überblick über das Präparat und dienen der Orientierung zur Auswahl der interessanten Region für die Ultradünnschnitte.

### 3.9.4. Ultradünnschnitte & Elektronenmikroskopie

Die Ultradünnschnitte werden ebenfalls mit dem Ultracut geschnitten. Ihre Dicke beträgt nur noch etwa 800-1000 Å. Sie werden auf mit Kollodiumfolie bedeckte Kupfernetzchen aufgezogen. Die Kontrastierung erfolgt mit 10%igem alkoholischen Uranylacetat und 1%igem Bleicitrat.

Die Schnitte werden mit Hilfe des Elektronenmikroskops EM 109 der Firma Zeiss ausgewertet und photographiert.

## 3.10. Untersuchungen auf mRNA-Ebene

Eine weitere, wichtige Untersuchungsmethode beruht auf der Analyse der mRNA (messenger ribonucleic acid). Sie beantwortet die Frage, welche Proteine die Zelle zum Untersuchungszeitpunkt herstellen kann. Eine lebende, eukaryotische Zelle ist immer aktiv mit Stoffwechselfvorgängen beschäftigt. Dabei verbleibt die eigentliche DNA im Zellkern und ist durch die Kernmembran vom Zytoplasma getrennt. Durch innere und äußere Stimuli erhält die Zelle die Information, welche Genomabschnitte gerade gebraucht werden. Es wird eine Kopie der DNA dieser Genomabschnitte erstellt, die mRNA. Dieser Vorgang wird als Transkription bezeichnet. Die mRNA wandert durch Poren der Kernmembran ins Zytoplasma und wird dort von den Zellorganellen in das entsprechende Protein übertragen, was als Translation bezeichnet wird. Eine Analyse der mRNA ergibt einen Überblick über die Proteinproduktion in der Zelle.

### 3.10.1. Gewinnung von copyDNA

#### RNA-Extraktion mit TRIzol®

Zur Vorbereitung wird die Kühlzentrifuge eingeschaltet, damit sie auf die benötigte Temperatur von 4°C herunterkühlen kann. Der Arbeitsplatz wird mit 70%igem Ethanol und RNase-Away gründlich gereinigt, um eine Verunreinigung der Proben

durch Fremd-RNA zu vermeiden. Anschließend werden Thermowannen mit Eis bereitgestellt. Es wird immer auf Eis und unter dem Abzug gearbeitet.

Alle Mengen beziehen sich auf 500 µl TRIzol®:

- Proben auf Eis aus dem -80°C-Kühlschrank bzw. dem Stickstofftank holen
- Zerkleinern der Proben:
  1. Zellen: in der Hand auftauen;  
5 min bei maximaler Geschwindigkeit aufschütteln
  2. Gewebe oder Pellets: 3-5 min bei 60 Hz im Tissue Lyser zerkleinern.  
Stahlkugeln mit einem Durchmesser von 5 mm verwenden
- Anzentrifugieren der Eppendorfgefäße in der Kühlzentrifuge
- Eppendorfgefäße kühl halten im Eis
- 100 µl Chloroform (gelagert bei -20°C) zugeben, kurz aufschütteln
- 5 min Eppendorfgefäße direkt ins Eis stellen
- 15 min bei 12 000 rpm und 4°C zentrifugieren
- 1,7 ml-Eppendorfgefäße beschriften
- Überstand vorsichtig mit 100 µl-Pipette abnehmen und in das neue, beschriftete Eppendorfgefäß geben
- Chloroform-Schritt wiederholen, falls Überstand nicht klar ist
- Gleiche Menge Isopropanol (bei -20°C gelagert) zum Überstand zugeben (= RNA-Fällung)

Mind. 30 min oder über Nacht im -20°C-Kühlschrank inkubieren

- Nach der Inkubation Proben kurz aufschütteln
- 10 min bei 12 000 rpm und 4°C zentrifugieren.
- Überstand auf Eis unter dem Abzug abpipettieren.
- 500 µl 70%iges Ethanol in sterilem Aqua bidest (bei -20°C gelagert) zugeben
- Proben kurz aufschütteln
- 10 min direkt ins Eis stellen
- 10 min bei 1400 rpm und 4°C zentrifugieren

- Überstand vollständig abpipettieren
- 10 -15 min Eppendorfgesäß mit Pellet bei 37°C offen in den Wärmeschrank stellen
- Mit 10-50 µl (je nach Pelletgröße) Aqua bidest resuspendieren, kurz aufschütteln, kurz anzentrifugieren
- 5-10 min bei 65°C ins Wasserbad, kurz aufschütteln, kurz anzentrifugieren

### Messung der RNA-Konzentration

- Photometer auf Betriebsbereitschaft prüfen
- Am Photometer die gewünschten Messoptionen einstellen:  
Taste: „RNA“  
Taste: „Dilution“: 001 µl + 0069 µl
- Küvette mit 69 µl Tris-HCl füllen
- Prüfen ob Messkanal frei und ohne Luftblasen ist
- Küvette einsetzen, Taste „Blanken“ drücken
- 1 µl RNA-Lösung zugeben, gut vermischen
- Taste „Sample“ => eigentliche Messung

Nun werden die Messwerte für die RNA-Konzentration und die Werte der Ratio von 260 nm zu 280 nm in eine Tabelle eintragen. Idealerweise sollte die Ratio zwischen 1,7 und 2,1 liegen. Es wird eine RNA-Konzentration von 200 ng/µl angestrebt.

Liegt die gemessene Konzentration höher, muss die RNA nach folgender Formel verdünnt werden:

$$X \text{ (zu entnehmende RNA-Menge)} = 200 \text{ ng} \times 30 \text{ µl} / \text{gemessene RNA-Konzentration}$$

Die Formel kann je nach gewünschter Konzentration oder gewünschtem Endvolumen angepasst werden.

Nach der Berechnung der Verdünnung werden für die eingestellte RNA neue Eppendorfgesäße beschriftet. Das berechnete Volumen an RNA-Lösung und Aqua bidest wird zugegeben und gut vermischt.

An dieser Stelle kann die RNA im Stickstofftank gelagert werden oder es schließt sich die DNA-Verdauung und Umschreibung in copyDNA (= cDNA) an.

### **DNase-Verdauung**

Um sicher zu gehen, dass später bei der Untersuchung auf bestimmte Gene nur diejenigen detektiert werden, die ursprünglich als mRNA vorlagen, muss der Schritt der DNA-Verdauung stattfinden.

Zur Vorbereitung werden der Thermocycler und die Tischzentrifuge eingeschaltet, eine Eiswanne wird bereitgestellt und der Arbeitsplatz wird sorgfältig gereinigt. Die Zutaten werden aus dem Gefrierschrank zum Auftauen ins Eis gestellt. Es werden ein Eppendorfgefäß für den Verdauungs-Mix und pro Probe je ein PCR-Tube beschriftet. Die benötigten Mengen werden berechnet, wobei es sich empfiehlt etwas Verlust durch das Pipettieren einzukalkulieren. Ein Ansatz enthält in folgender Menge:

1 µl	MgCl <sub>2</sub> (10 mM)
1 µl	DNase-Puffer (500 mM)
1 µl	DNase (10 U/µl)
0,25 µl	RNase-Inhibitor (40 U/µl)

Nun werden pro Eppendorfgefäß 3,25 µl DNA-Verdauungs-Mix und 6,65 µl RNA-Lösung zusammen pipettiert. Die Eppendorfgefäße werden kurz anzentrifugiert und in den Thermocycler gestellt. Die Proben durchlaufen folgendes Programm:

37°C für 10 min

75°C für 5 min

4°C bis zur Weiterverarbeitung

### **Umschreibung in cDNA**

Es schließt sich direkt die Umschreibung in cDNA an, da für die Analyse durch Primer DNA-Moleküle benötigt werden. Um zu überprüfen, ob die Verdauung der

DNA vollständig ist, werden zwei Ansätze vorbereitet. Zum einen ein Ansatz, bei dem ReverseTranskriptase (=RT) zugegeben wird, welche die RNA in cDNA umschreibt, und ein Ansatz ohne dieses Enzym. Wurde die vorhandene DNA vollständig verdaut und keine neue cDNA produziert, darf später bei der Kontrolle durch den Primer für einen Housekeeper keine Bande sichtbar werden.

Zur Vorbereitung werden die Zutaten zum Auftauen ins Eis gestellt, die Eppendorfgefäße für den RT- und den -RT-Ansatz beschriftet und die nötigen Volumina berechnet.

Ein Ansatz enthält jeweils:

2 µl	MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
1 µl	PCR-Puffer
4 µl	dNTPs (10 mM)
0,5 µl	Random Hexamers
0,5 µl	RNase-Inhibitor (20 U/µl)
0,5 µl	Reverse Transkriptase bzw. Aqua bidest.

Es werden 8,5 µl des RT-Mixes bzw. des -RT-Mixes und 1,5 µl der DNase behandelten RNA zusammen in ein PCR-Tube gegeben, kurz an zentrifugiert und in den Thermocycler gestellt. Das RT-Programm läuft folgendermaßen ab:

8 min	bei 21°C
15 min	bei 42°C
5 min	bei 99°C
5 min	bei 5°C

Danach kühlt die Maschine auf 4°C herunter bis die Proben entnommen werden. Das entstandene Produkt ist die gewünschte cDNA. Dies kann bei -20°C gelagert werden.

Eine tabellarische Übersicht der verwendeten Primer befindet sich im Anhang.

### 3.10.2. Polymerasekettenreaktion (PCR – Polymerase Chain Reaction)

Zur Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen wird die Methode der PCR genutzt. Der Reaktionsansatz enthält die cDNA, den forward Primer und den reverse Primer für das gesuchte Gen, die vier Desoxynukleotide (dNTPs) zur Synthese des neuen DNA-Stranges, die DNA-Polymerase und einen PCR-Puffer, der  $Mg^{2+}$ -Ionen als Ko-Faktor enthält.

Das PCR-Programm besteht aus drei Schritten: einem Denaturierungsschritt, einem Annealingschritt und einem Elongationsschritt.

Denaturierung: Durch kurzzeitiges Erhitzen der Lösung auf 92-95°C werden die beiden Stränge der cDNA getrennt.

Annealing: Die Lösung wird auf Annealingtemperatur herunter gekühlt. Diese Temperatur ist bestimmt durch die verwendeten Primer und beträgt im Fall dieser Arbeit immer 60°C. Die Primer können bei dieser Temperatur mit jeweils einem Einzelstrang der cDNA hybridisieren. Da die Primer im großen Überschuss zugegeben werden, erfolgt praktisch keine Rückbildung des Doppelstranges aus den beiden Einzelsträngen.

Elongation: Nach Erhitzen der Lösung auf optimale Reaktionstemperatur der Taq-Polymerase (72°C) kommt es durch die Polymerase zur Verlängerung beider Primer in 5'-3'-Richtung. Die Folge ist die Replikation beider Zielstränge.

Diese drei Schritte werden in mehreren Zyklen wiederholt, wobei die jeweils im vorherigen Schritt neu entstandenen DNA-Stränge ebenfalls als Template dienen. Somit kommt es zu einer exponentiellen Amplifikation der DNA ( $2^n$ -fache Vermehrung,  $n$  = Anzahl der Reaktionszyklen).

Die Reaktion der PCR läuft in einem Thermocycler ab. Das genaue Programm lautet wie folgt:

- 1) 10 min bei 95°C
  - 2) 1 min bei 94°C
  - 3) 1 min bei 60°C
  - 4) 1,3 min bei 72°C
  - 5) 10 min bei 72°C
- goto 1) für n= x-Mal
- 6) 4°C = Pause

Es werden jeweils 35-40 Zyklen durchlaufen. Am Ende verbleiben die Proben bis zur Entnahme aus dem Cyclor bei 4°C.

Der PCR-Lösungsmix für den Ansatz von 10 µl Mix mit 2,5 µl cDNA setzt sich zusammen aus:

- |           |                           |
|-----------|---------------------------|
| 1 µl      | MgCl <sub>2</sub> (25 mM) |
| 2 µl      | PCR-Puffer                |
| 0,5 µl    | Primer forward            |
| 0,5 µl    | Primer reverse            |
| 15,875 µl | Aqua bidest               |
| 0,125 µl  | GOLD Amplitag Polymerase  |

+2,5 µl cDNA

Als Produkt entsteht eine riesige Menge des DNA-Stranges, der sich zwischen dem forward Primer und dem reverse Primer auf dem Zielgen befindet. Die verbleibenden Reste an cDNA, Nukleotiden und Primer sind zu vernachlässigen.

### 3.11. Real-Time PCR

#### Vorbereitungen

Um die Expression der sehnenrelevanten Gene durch die adipogenen Stammzellen zu quantifizieren wird die Methode der Real-Time PCR (= qPCR) verwendet. Die Primer für die qPCR durchlaufen ebenfalls zuerst einen Primertest. Im Anschluss daran muss zusätzlich eine Verdünnungsreihe mit einer qPCR durchgeführt werden, um zu ermitteln, ob der Primer auch bei geringen cDNA Konzentrationen zuverlässig arbeitet und eine regelmäßige Schmelzkurve zeigt.

#### Erstellung der cDNA-Verdünnungsreihe:

Tube 1) 1,8 µl cDNA + 16,2 µl steriles Aqua bidest (1:10) gut mischen.

Tube 2) 1,8 µl cDNA aus 1) + 16,2 µl steriles Aqua bidest (1:100) gut mischen.

Tube 3) 1,8 µl cDNA aus 2) + 16,2 µl steriles Aqua bidest (1:1000) gut mischen.

Tube 4) 1,8 µl cDNA aus 3) + 16,2 µl steriles Aqua bidest (1:10000) gut mischen.

#### Erstellung des Mastermixes:

10 µl	iQ Sybr®Green Supermix
0,6 µl	Primer, forward
0,6 µl	Primer, reverse
6,8 µl	steriles Aqua bidest
18 µl	Gesamtvolumen

Pro Well werden vorsichtig je 18 µl des Mastermixes und 2 µl der gewünschten cDNA zusammen pipettiert. Es ist auf höchste Sauberkeit zu achten. Die Platte wird sorgfältig mit einer dafür angefertigten, selbstklebenden Folie mit Hilfe eines Plastikschiebers verschlossen.

### Belegungsplan & Protokoll:

Die Belegung der Real-Time-PCR-Platte erfolgt jeweils à drei Wells von einer Gruppe. Somit gibt es drei Wells mit der ersten Verdünnung, drei Wells mit der zweiten Verdünnung usw. und drei Wells mit einer Negativkontrolle, bei der die cDNA durch Aqua bidest ersetzt wird (=NTC: negative template control).

Der Real-Time-PCR-Cycler wird auf folgendes Programm eingestellt (Abbildung 6: Programm der Real-Time PCR)

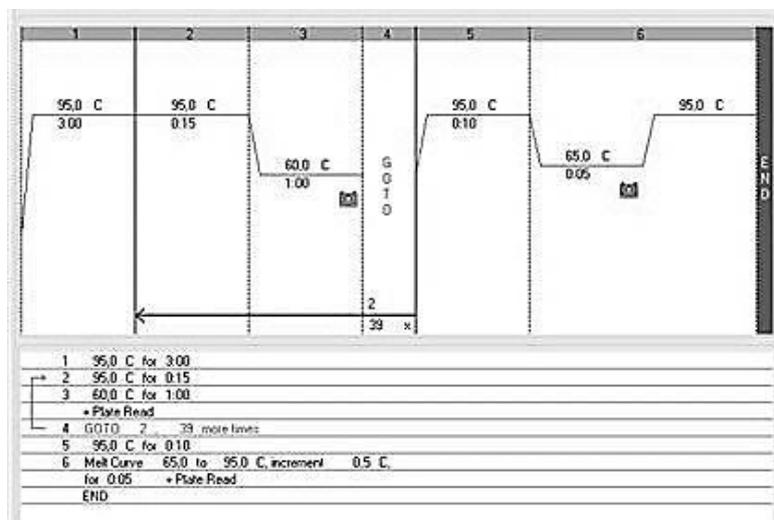


Abbildung 6: Programm der Real-Time PCR

**Schritt 1:** Erhitzen auf 95°C in 3 min; **Schritt 2:** 95°C für 15 sec; **Schritt 3:** 60°C für 1 min ; Ablesen der Platte; **Schritt 4:** Wiederholen von Schritt 1-3 39 mal; **Schritt 5:** Erhitzen auf 95°C in 10 sec; **Schritt 6:** Bestimmen der Schmelzkurve

Zur Detektion und Auswertung wird die CFX™Manager Software verwendet.

Primer, die für die Auswertung der Versuche genutzt werden, zeigen klare Laufprotokolle ohne größere Schwankungen innerhalb einer Verdünnungsstufe.

Sie weisen eine geeignete Effizienz auf, die anhand der Amplifikationsgerade errechnet wird, und haben eine einzelne, spezifische Schmelzkurve (Abbildung 7).

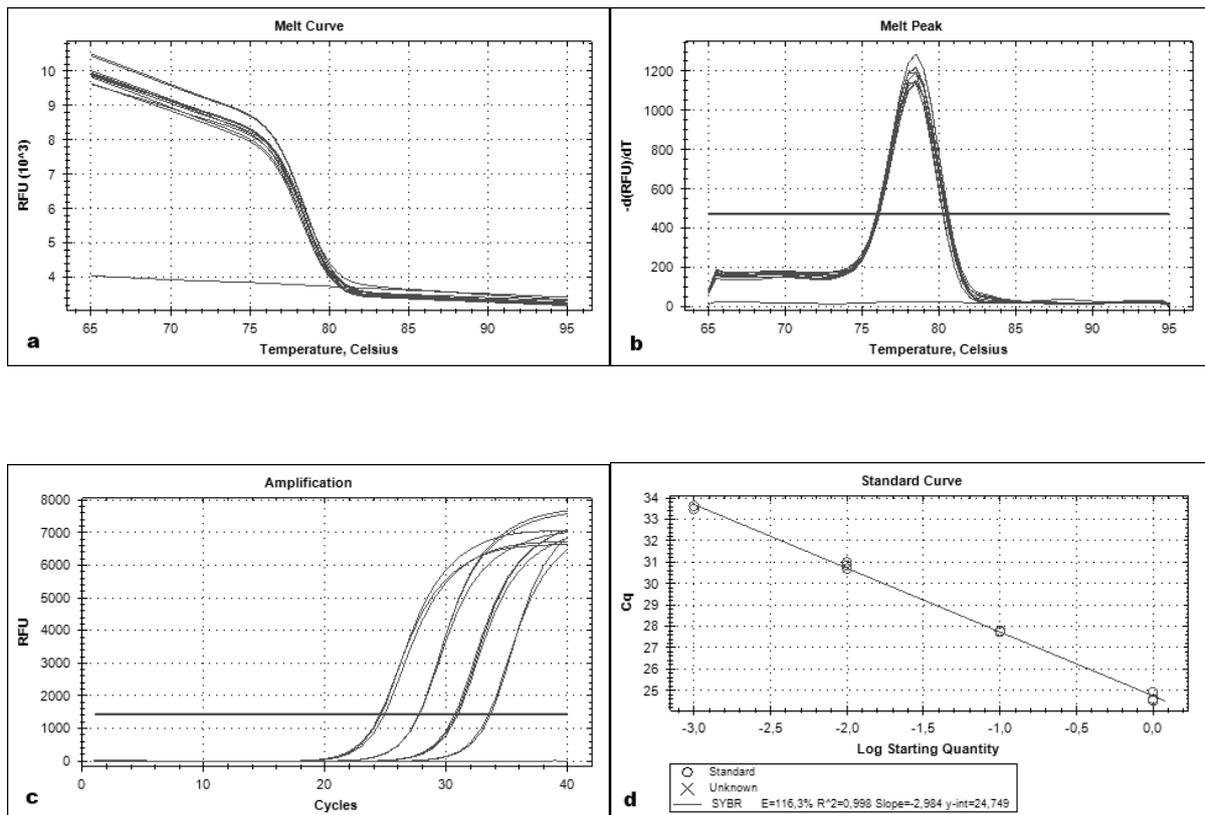


Abbildung 7: Verdünnungsreihe für Gapdh

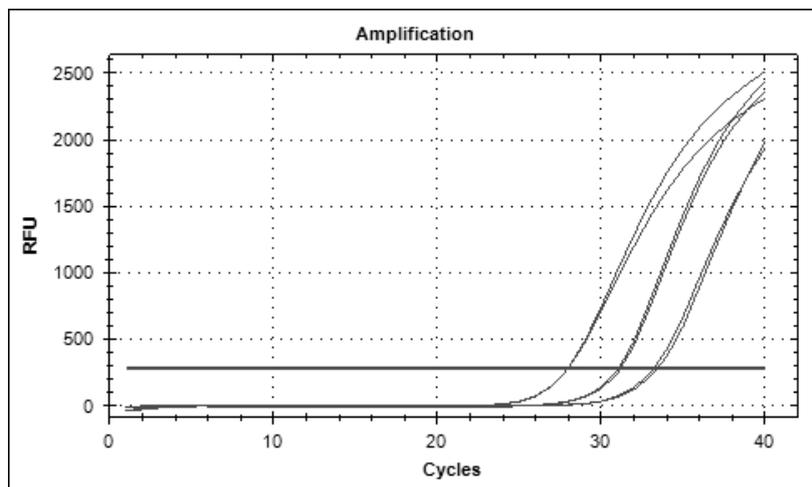
- a) Schmelzkurve 1: y-Achse RFU (=relative fluorescence units), x-Achse: Temperatur;
- b) Schmelzkurve 2: y-Achse  $-d(\text{RFU})/dT$  ( $T = \text{Zeit}$ ), x-Achse: Temperatur; beide Darstellungen der Schmelzkurve zeigen den Anforderungen entsprechend ein gleichmäßiges Bild
- c) Amplifikation der Verdünnungsreihe für Gapdh; y-Achse: RFU, x-Achse: Anzahl der Zyklen
- d) Standardkurve; y-Achse: Amplifikationszyklus, x-Achse: Log der Ausgangsmenge

### Versuchsaufbau zum Genexpressionsvergleich

Es werden jeweils die einzelnen Versuchsgruppen sowohl der Pelletversuche als auch der Kollagenmatrixversuche untereinander verglichen. Dabei dient die Negativkontrolle als Referenzwert. Die cDNA-Proben werden auf Kollagen I, Kollagen III und COMP getestet. Als Housekeeper wird GAPDH verwendet.

Pro Primerpaar und Gen werden jeweils drei biologische Replikate angelegt, d.h. es werden jeweils drei Wells der Platte mit der gleichen Kombination belegt. Zusätzlich werden pro Primer drei NTCs (= negative template control) mitgeführt, um eine Reaktion des Primers mit sich selbst erkennen zu können.

Im Verlauf der Versuchsauswertung stellte sich heraus, dass die Menge an nachweisbarer mRNA für Scleraxis oft nicht im Bereich der zuverlässigen Aussagekraft des Primers lag. Die Detektionsgrenze lag oft über dem 31. Zyklus, so dass die Daten nicht ausgewertet werden konnten. Leider ist dieser Missstand erst nach den Versuchen bei der Auswertung zu Tage getreten. Aber in der Folgearbeit wird man bemüht sein, einen Primer zu finden, der auch in höheren Bereichen zuverlässig arbeitet, da die Menge an mRNA für Scleraxis in den Versuchsgruppen gering bleibt (Abbildung 8).



**Abbildung 8: Verdünnungsreihe für Scleraxis**

Verdünnungsreihe beim Primertest für Scleraxis. Die vierte Verdünnung lieferte leider keine zuverlässigen Ergebnisse, so dass sichere Aussagen nur bis zu einem  $C(t)$ -Wert von 31 getroffen werden können. Im Verlauf der Auswertung stellte sich jedoch heraus, dass viele Werte größer als 31 waren, so dass sie leider nicht ausgewertet werden konnten.

### 3.12. Statistische Auswertungen

Die Datenhaltung und -auswertung im Rahmen der Ergebnispräsentation erfolgt auf den Rechnern im lokalen Rechnernetzwerk (LAN) der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. Die statistischen Auswertungen werden unter Verwendung des Statistikprogrammpakets BMDP/Dynamic, Release 7.0, (DIXON, 1993) durchgeführt. Bei der statistischen Auswertung liegt der Schwerpunkt darauf herauszufinden, ob sich über die Zellen der verschiedenen Pferde hinweg innerhalb einer Gruppe mit Behandlung durch einen Wachstumsfaktor ein Unterschied auf cDNA-Ebene feststellen lässt. Beispielsweise ist eine Fragestellung: „Produzieren diejenigen Stammzellen, die mit GDF5 behandelt werden, signifikant mehr Kollagen I als diejenigen, die nur Basismedium erhalten?“

Dazu werden die Zahlen aus der CFX™Manager Software in einen Datensatz eingearbeitet. Diese Zahlen sind bereits die Mittelwerte der biologischen Replikate, am Housekeeper ausgerichtet und im Verhältnis zur Negativkontrolle dargestellt ( $\Delta\Delta C(t)$ -Methode).

Mit diesen Werten wird zuerst eine einfaktorielle Varianzanalyse durchgeführt, an die sich ein Dunnett-Test anschließt.

## 4. ERGEBNISSE

### 4.1. Stammzellnachweis

#### 4.1.1. Plastikadhärenz und Morphologie

Der Nachweis, dass es sich bei den verwendeten Zellen um Stammzellen handelt, wird durch die Untersuchung verschiedener Aspekte erbracht. Es sind alle Pferdezellkulturen analysiert worden, wovon im Weiteren jeweils einige Beispiele gezeigt werden.

Zunächst ist die Adhäsionsfähigkeit der Zellen an Plastik zu nennen. Diese ermöglicht ihre Kultivierung in Zellkulturflaschen. Die Stammzellkulturen zeigen eine typische Morphologie. Die Zellen erscheinen meist spindelförmig, mit zwei oder mehr Elongationen und einem runden, zentral gelegenen Kern (Abbildung 9 und Abbildung 10).

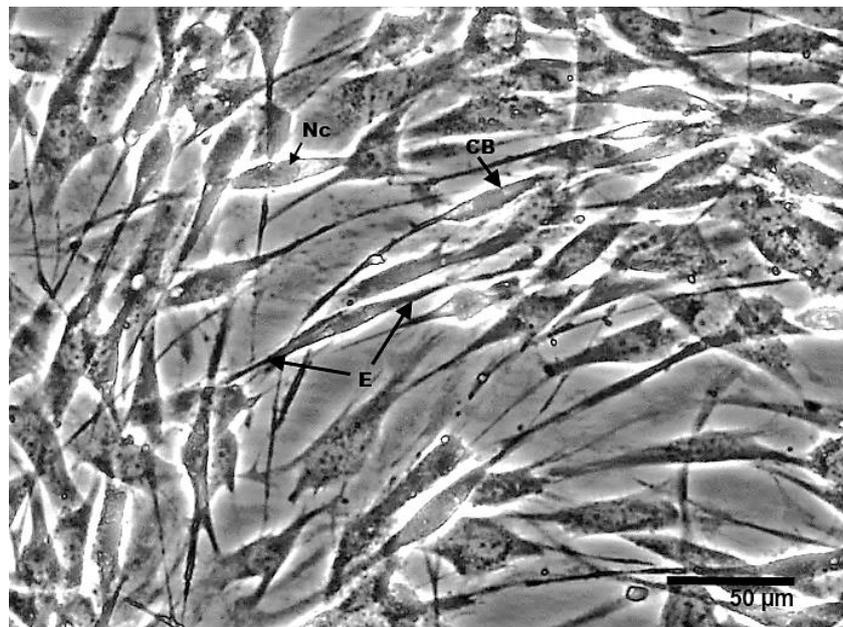
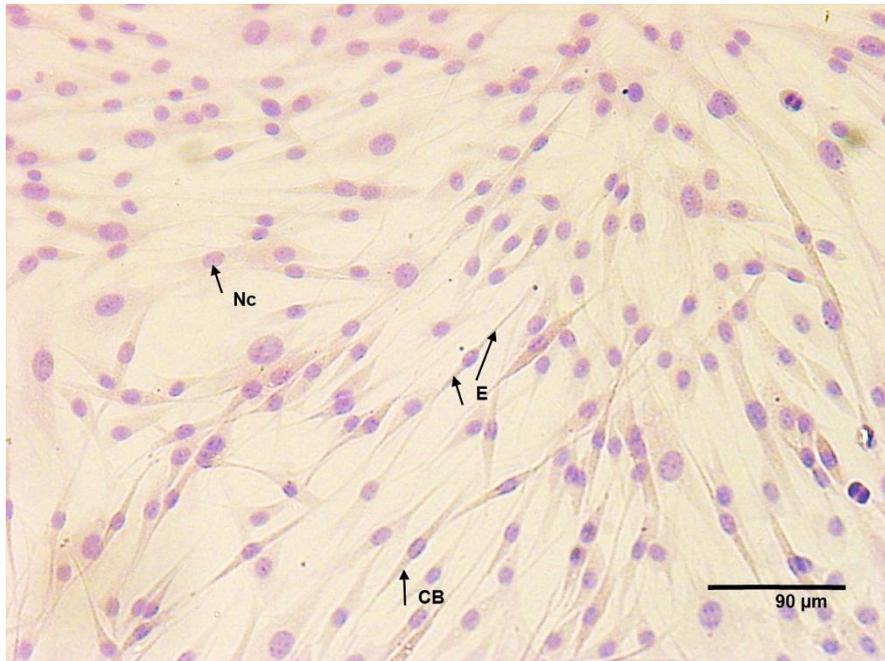


Abbildung 9: Phasenkontrastaufnahme Stammzellen

Phasenkontrastmikroskopie Stammzellen, Pferd 71/09, Passage 2, Dichte 85%; Nc: zentraler, runder Zellkern, CB: lang gestreckter Zellkörper, E: Elongationen



**Abbildung 10: HE-Färbung Stammzellen**

HE-Färbung Stammzellen, Pferd 72/09, Passage 2, Dichte 80%, Methanol fixiert. Nc: zentraler Zellkern; CB: spindelförmiger Zellkörper, E: Elongationen, meist zwei oder mehr pro Zelle

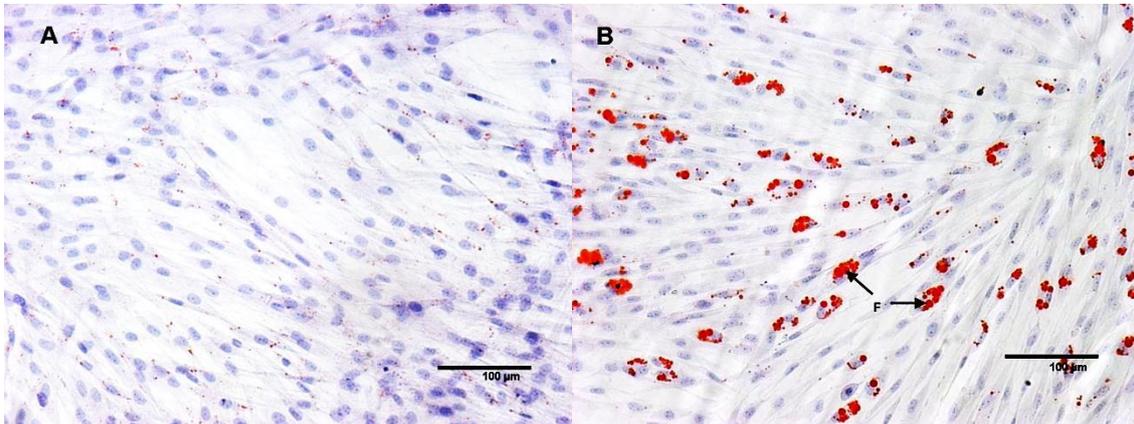
Ein weiteres wichtiges Kriterium für die Stammzellidentität ist die Pluripotenz der Zellen. Pluripotenz ist das Potenzial einer Stammzelle sich in Zellen verschiedener Gewebe zu differenzieren.

#### 4.1.2. Pluripotenz

##### **Adipogene Differenzierung**

Bei der Differenzierung von Stammzellen zu Adipozyten entstehen Fettvakuolen im Zytoplasma, welche sich mit der Oil-Red-O-Färbung darstellen lassen. Auch das Erscheinungsbild der Zelle verändert sich. Je mehr Fettvakuolen sich in einer Zelle

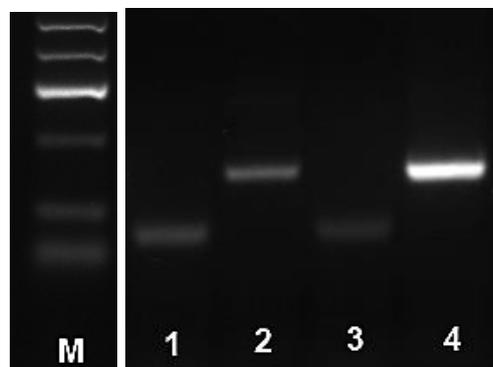
befinden, desto mehr rundet sich der Zellkörper ab. In der unbehandelten Negativkontrolle sind dagegen kaum Fettvakuolen zu erkennen (Abbildung 11).



**Abbildung 11: adipogene Differenzierung**

Adipogene Differenzierung, Passage 3, Pferd 05/09, Oli-Red-O-Färbung. **A:** Negativkontrolle: kleinste Rotfärbungen vereinzelt zu sehen; **B:** deutliche, rotgefärbte Fettvakuolen (**F**) im Zytoplasma zu erkennen

Ferner erhöht sich die Expression der für den Fettstoffwechsel wichtigen Gene. Die Untersuchung der mRNA-Expression für *ppar γ 2* zeigt bereits in der RT-PCR eine deutlich stärkere Bande bei den mit adipogenem Differenzierungsmedium behandelten Zellen als bei den unbehandelten Zellen (Abbildung 12).

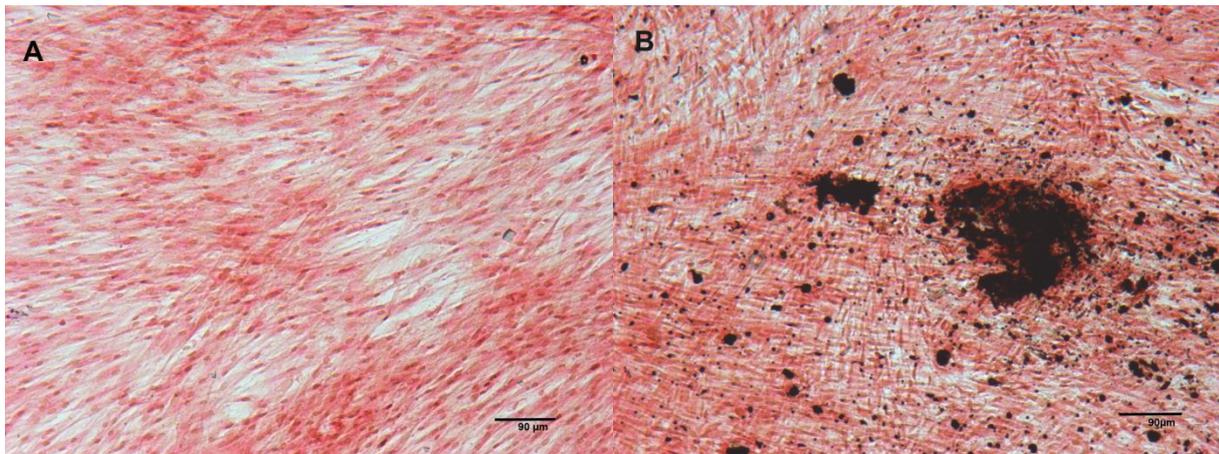


**Abbildung 12: mRNA Expression von *pparγ2***

Darstellung der mRNA-Expression von ppar  $\gamma$  2 bei der adipogenen Differenzierung mit Hilfe der RT-PCR, Pferd 05/09. (M) 50bp-Marker, (1) Negativkontrolle Gapdh, (2) Negativkontrolle ppar  $\gamma$  2, (3) Positivkontrolle Gapdh, (4) Positivkontrolle ppar  $\gamma$  2. Gapdh hat eine Produktlänge von 62 bp, ppar $\gamma$ 2 hat eine Produktlänge von 180 bp.

### Osteogene Differenzierung

Bei der osteogenen Differenzierung entstehen Differenzierungsknötchen und Calcium wird in die Extrazellulärmatrix eingelagert. Dies kann mit Hilfe der Von-Kossa-Färbung nachgewiesen werden. Die Calciumeinlagerungen erscheinen als dunkelbraune bis schwarze Verfärbungen. In der Negativkontrolle, die kein Differenzierungsmedium erhalten hat, bleibt die Zellkultur unverändert (Abbildung 13).

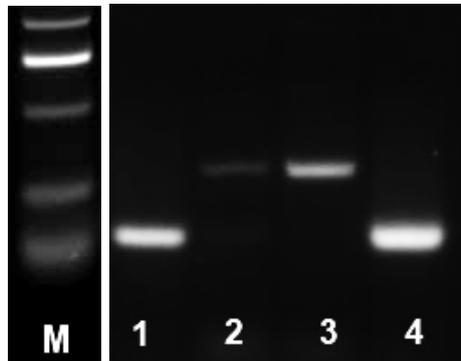


**Abbildung 13: osteogene Differenzierung**

Osteogene Differenzierung, Passage 3, Pferd 06/09, Von-Kossa-Färbung; **A:** Negativkontrolle – keine Veränderung in der Zellkultur; **B:** Positivkontrolle – schwarze Verfärbungen im Bereich der Differenzierungszentren, die als knötchenförmige Zellanhäufungen auffallen.

Bei der RT-PCR werden die Banden der Zellen ohne Differenzierungsmedium mit denen der Zellen in Differenzierungsmedium verglichen. Es zeigt sich ein Unterschied für den verwendeten Knochenmarker Phosphoprotein. In der Positivkontrolle kann eine deutliche Expression nachgewiesen werden, während

hingegen bei der Negativkontrolle nur eine basale Expression nachgewiesen werden kann (Abbildung 14).

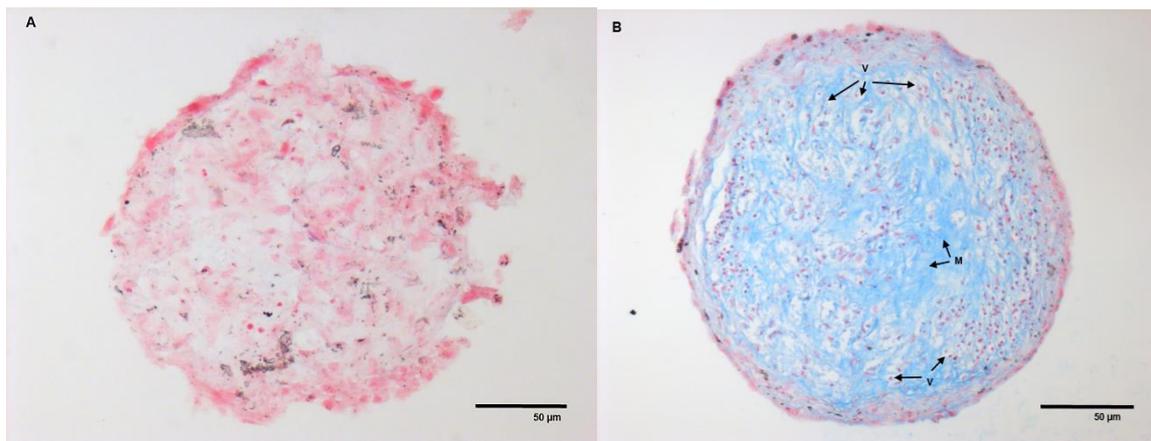


**Abbildung 14: mRNA Expression von Phosphoprotein**

Darstellung der mRNA-Expression von Phosphoprotein bei der osteogenen Differenzierung mit Hilfe der RT-PCR, Pferd 06/09. (**M**) 50bp-Marker, (**1**) Negativkontrolle Gapdh, (**2**) Negativkontrolle Phosphoprotein, (**3**) Positivkontrolle Phosphoprotein, (**4**) Positivkontrolle Gapdh; Gapdh hat eine Produktlänge von 62 bp, Phosphoprotein hat eine Produktlänge von 133 bp.

### Chondrogene Differenzierung

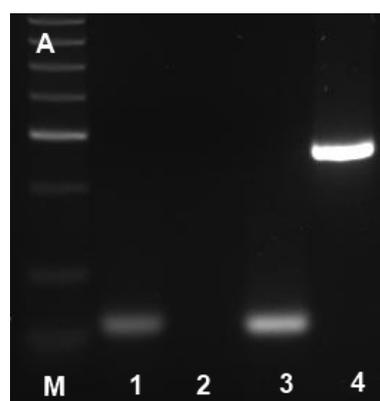
Hier zeigt sich bei der histologischen Betrachtung sowohl eine Produktion von Extrazellulärmatrix aus Kollagen und sauren Mukosubstanzen, welche auf Grund der Alzianblau Färbung bläulich erscheinen, als auch eine strukturelle Veränderung der Pellets. Die Zellkerne vereinzeln sich und es entstehen Lakunen (Abbildung 15 B). Die Pellets, die kein Differenzierungsmedium erhalten haben, zeigen keinerlei Blaufärbung und auch keine Lakunenbildung (Abbildung 15 A).



**Abbildung 15: chondrogene Differenzierung im Pellet**

Chondrogene Differenzierung in der Pelletkultur, Pferd 11/09, Passage 3, Alcian Blau Färbung, Paraffinschnitte; **A:** Negativkontrolle, keine Färbung der Extrazellulärmatrix erkennbar; **B:** deutliche Blaufärbung der Extrazellulärmatrix (M) und beginnende Lakunenbildung (V)

Auf mRNA-Ebene erfolgt eine Untersuchung auf Kollagen II-Expression. Native Stammzellen zeigen hier keinerlei Genexpression, ebenso wenig wie die Pellets aus der Negativkontrolle der chondrogenen Differenzierung. Bei den differenzierten Zellen ergeben sich von Pferd zu Pferd unterschiedlich starke Banden in der RT-PCR (Abbildung 16).



**Abbildung 16: mRNA Expression von Kollagen II**

Darstellung der mRNA-Expression von Kollagen II bei der chondrogenen Differenzierung mit Hilfe der RT-PCR, Pferd 11/09: starke Expression von Kollagen II; (**M**) 50bp-Marker, (**1**) Gapdh Negativkontrolle; (**2**) Kollagen II Negativkontrolle – keine Bande erkennbar (**3**) Gapdh Positivkontrolle;

(4) Kollagen II Positivkontrolle. Die Produktlänge von Gapdh entspricht 62 bp, die Produktlänge von Kollagen II beträgt 274bp.

#### 4.1.3. Nachweis von Stammzellmarkern

Bisher ist noch kein einzelner spezifischer Marker für Stammzellen bekannt. Deshalb erfolgt die Charakterisierung über mehrere, verschiedene Marker, deren Nachweis ein starkes Indiz für die Stammzellidentität darstellt. In dieser Arbeit wurden dafür CD90, Oct4, CD105 und Nanog ausgewählt (Abbildung 17 und Abbildung 18).

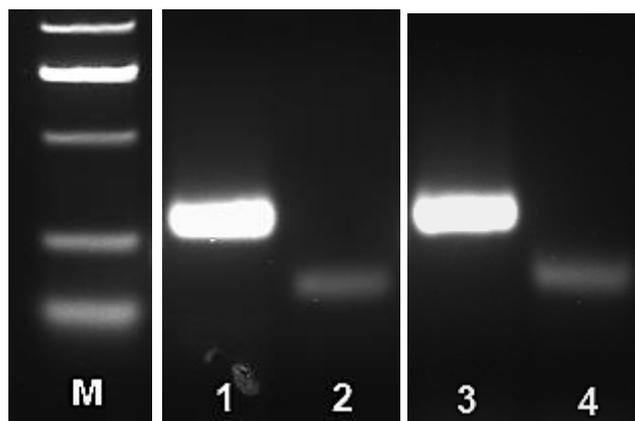


Abbildung 17: mRNA Expression von CD90 und Oct4

Darstellung der mRNA Expression von CD90 und Oct4 mit Hilfe der RT-PCR, Pferd 06/09 (1+2) und Pferd 11/09 (3-4). (M) 50bp-Marker, (1+3) CD90, Produktlänge entspricht 113 bp, (2+4) Oct4, Produktlänge entspricht 70 bp.

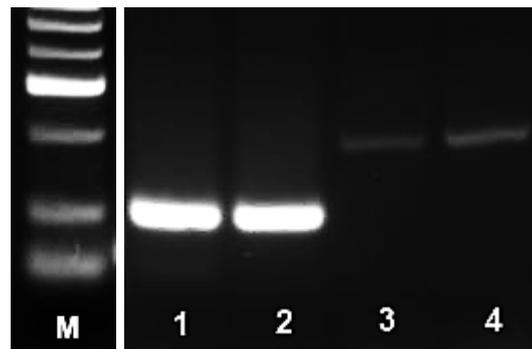


Abbildung 18: mRNA Expression von CD105 und Nanog

Darstellung der mRNA Expression von CD 105 und Nanog an adipogenen Stammzellen. (M) 50bp-Marker, Pferd 06/09 und Pferd 11/09. (1+2) CD105, 108 bp, (3+4) Nanog, 197 bp

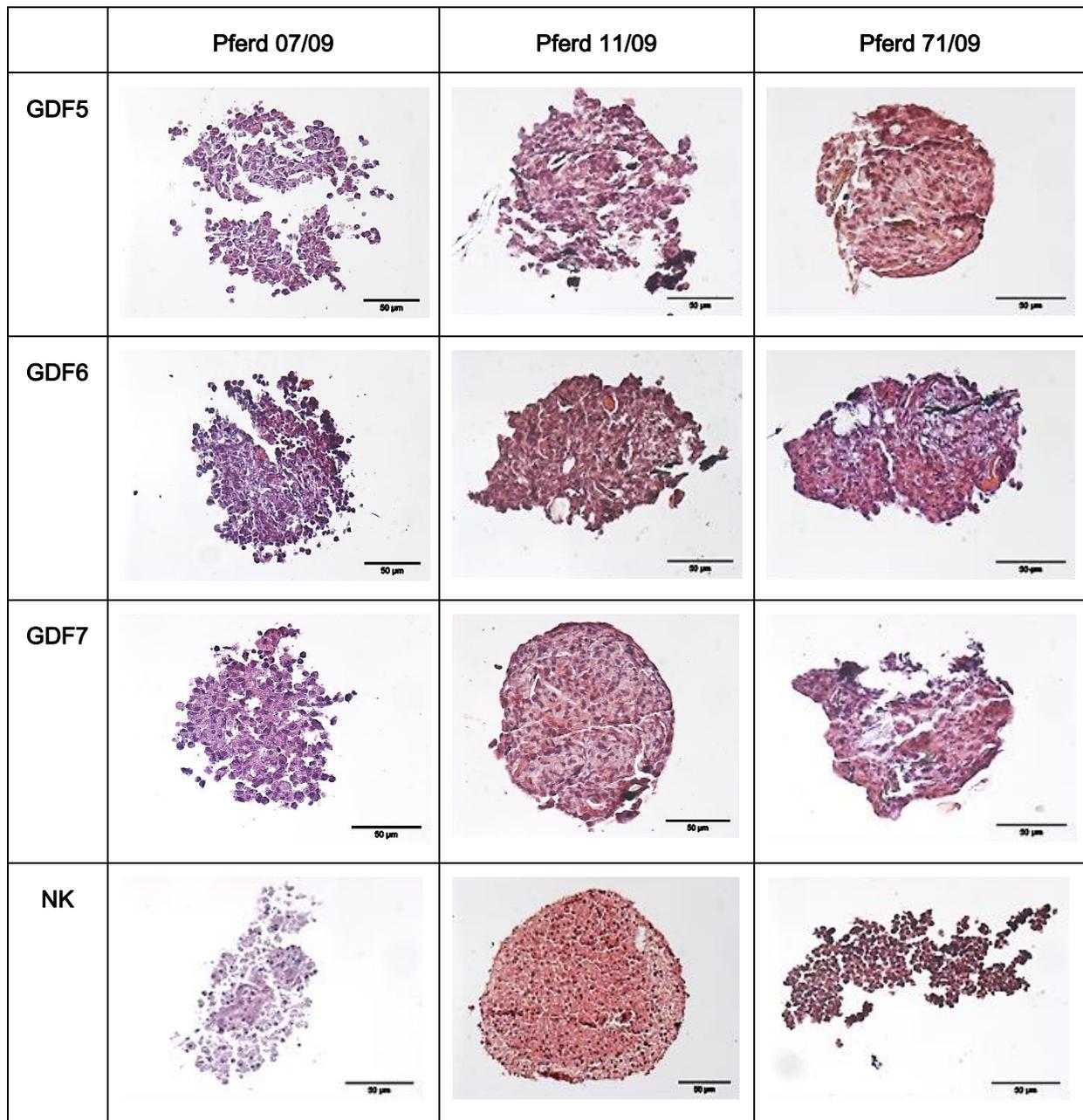
## 4.2. Tenogene Differenzierung in der Pelletkultur

Die equinen, adipogenen Stammzellen werden in Form von Pellets kultiviert und erhalten tenogenes Differenzierungsmedium (siehe Kapitel 3.3). Im Folgenden werden die Ergebnisse der einzelnen Untersuchungsmethoden zur Kontrolle des Differenzierungserfolgs geschildert.

### 4.2.1. HE-Färbung

Die Darstellung eines Gewebeschnitts mit einer HE-Färbung hat den Zweck der morphologischen Strukturbeurteilung. Es zeigt sich, dass das Erscheinungsbild der Pellets im Querschnitt sehr unterschiedlich ist. Es bestehen immer geringgradige individuelle Unterschiede zwischen den einzelnen Pferdezellkulturen. Zusätzlich weisen die sehr kleinen Pellets eine starke Fragilität auf. Es können durch die Verwirbelungen beim Medienwechsel und vor allem später bei der Fixierung, Einbettung und der Anfertigung der histologischen Schnitte starke Schäden am Pellet entstehen. In den Bildern fällt das durch die ausgefranzte, äußere Abgrenzung und Zusammenhangstrennungen innerhalb der Pellets auf (Abbildung 19).

Innerhalb der Versuchsgruppen lassen sich keine klaren Tendenzen erkennen.

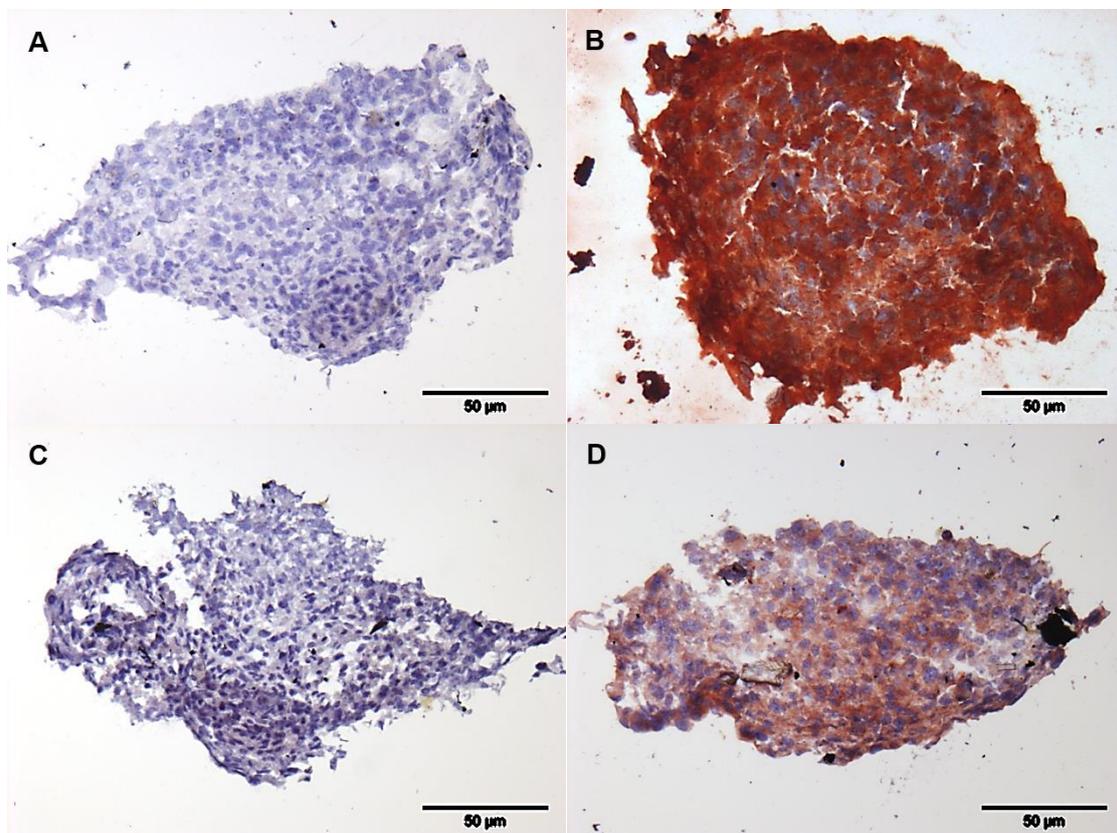


**Abbildung 19: Übersicht HE-Färbung, tenogene Diff. im Pellet, Paraffinschnitte**

HE-Färbung der tenogenen Differenzierung im Pellet: Eine Spalte beinhaltet jeweils die Bilder eines Pferdes innerhalb der verschiedenen Versuchsgruppen. Eine Zeile zeigt die Bilder einer Versuchsgruppe von drei verschiedenen Pferden. Die Übersicht verdeutlicht wie stark die individuellen Unterschiede im Erscheinungsbild der Pellets nach Fixierung und Schnittherstellung sein können.

#### 4.2.2. Immunhistochemie Kollagen I und Kollagen III

Bei der immunhistochemischen Untersuchung der Pellets kann im Kryostatschnitt sowohl die Expression von Kollagen I als auch von Kollagen III nachgewiesen werden. Dabei ist anzumerken, dass die Färbung bei Kollagen I deutlich intensiver ist als die Färbung bei Kollagen III (Abbildung 20). Zwischen den Positivkontrollen für Kollagen I bzw. Kollagen III der einzelnen Versuchsgruppen können jedoch keine Unterschiede in Bezug auf die Färbeintensitäten festgestellt werden.



**Abbildung 20: Immunhistochemie für Kollagen I und Kollagen III, tenogene Diff. im Pellet, Kryostatschnitte**

Immunhistologie mit Antikörpern gegen Kollagen I (A+B) und gegen Kollagen III (C+D), tenogene Differenzierung im Pellet, Pferd 11/09, GDF 6, Kryostatschnitte. Bei den Negativkontrollen (A+C) ist keinerlei Rotfärbung zu erkennen. Bei den Positivkontrollen zeigt sich für Kollagen I (B) eine deutlichere Rötung als für Kollagen III (D).

### 4.2.3. Ultrastrukturelle Betrachtung mit Hilfe des Elektronenmikroskops

Die elektronenmikroskopische Untersuchung zeigt, dass die Pellets, die Basismedium erhalten haben, eher kugelige Zellen zeigen, die nur wenige Kontakte zueinander auszubilden scheinen. Das Konstrukt wirkt lose. Zwischen den Zellen ist nur wenig Extrazellulärsubstanz zu erkennen (Abbildung 21).

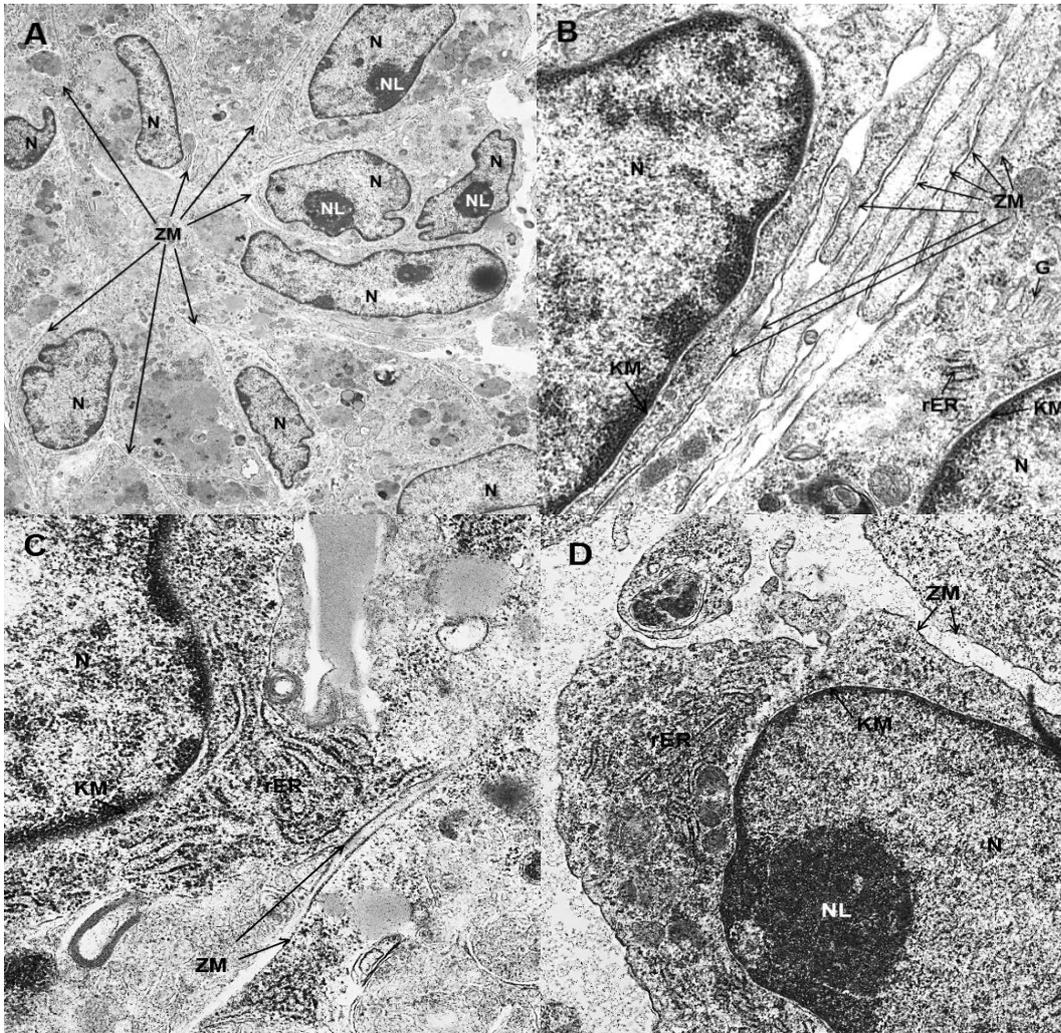


**Abbildung 21: Elektronenmikroskopische Aufnahme, tenogene Diff. im Pellet, Negativkontrolle**

Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Pellets der Negativkontrolle, tenogene Differenzierung, Pferd 71/09. Zentral im Bild: Querschnitt einer Zelle, weitere Anschnitte von Zellen am Bildrand. N= Nukleus, NL = Nukleolus. Die Zellen haben verhältnismäßig wenig Zytoplasma, Zellfortsätze sind nicht zu erkennen, der Abstand zwischen den Zellen ist weit und es ist wenig Extrazellulärsubstanz zwischen den Zellen sichtbar. Vergrößerung 5050-fach

Die Pellets der Versuchsgruppen mit Basismedium unter Zugabe von GDF5, GDF6 oder GDF7 zeigen einen deutlich festeren Zellverband. Ausläufer der Zellen scheinen sie netzartig miteinander zu verbinden und den Zellverband zu stabilisieren (Abbildung 22 A+B). Unterschiede zwischen den Gruppen mit GDF5, 6 oder 7 zeichnen sich nicht erkennbar ab. Extrazellulärmatrix ist auch hier kaum zu erkennen. Dennoch zeigen die Zellen Hinweise auf eine gewisse

Stoffwechselaktivität, was anhand des gut erkennbaren, rauen Endoplasmatischen Retikulum (= rER) abgeleitet werden kann (Abbildung 22 C+D).



**Abbildung 22: Elektronenmikroskopische Aufnahme, tenogene Diff. im Pellet, GDF7**

Elektronenmikroskopische Aufnahmen eines Pellets der tenogenen Differenzierung mit GDF7, Pferd 71/09. N= Nukleus, NL= Nukleolus, KM= Kernmembran, ZM= Zellmembran, G= Golgi Apparat, rER= raues Endoplasmatisches Retikulum. (A): Der Zellverband ist sehr dicht, es bleibt kaum Raum zwischen den Zellen. (B): Zellausläufer scheinen sich geflechtartig miteinander um die Zellen herum zu verbinden. (C +D): Das deutlich erkennbare, raue Endoplasmatische Retikulum deutet auf Stoffwechselaktivität der Zellen hin. Vergrößerung: A 5050-fach; B, C, D 7060-fach

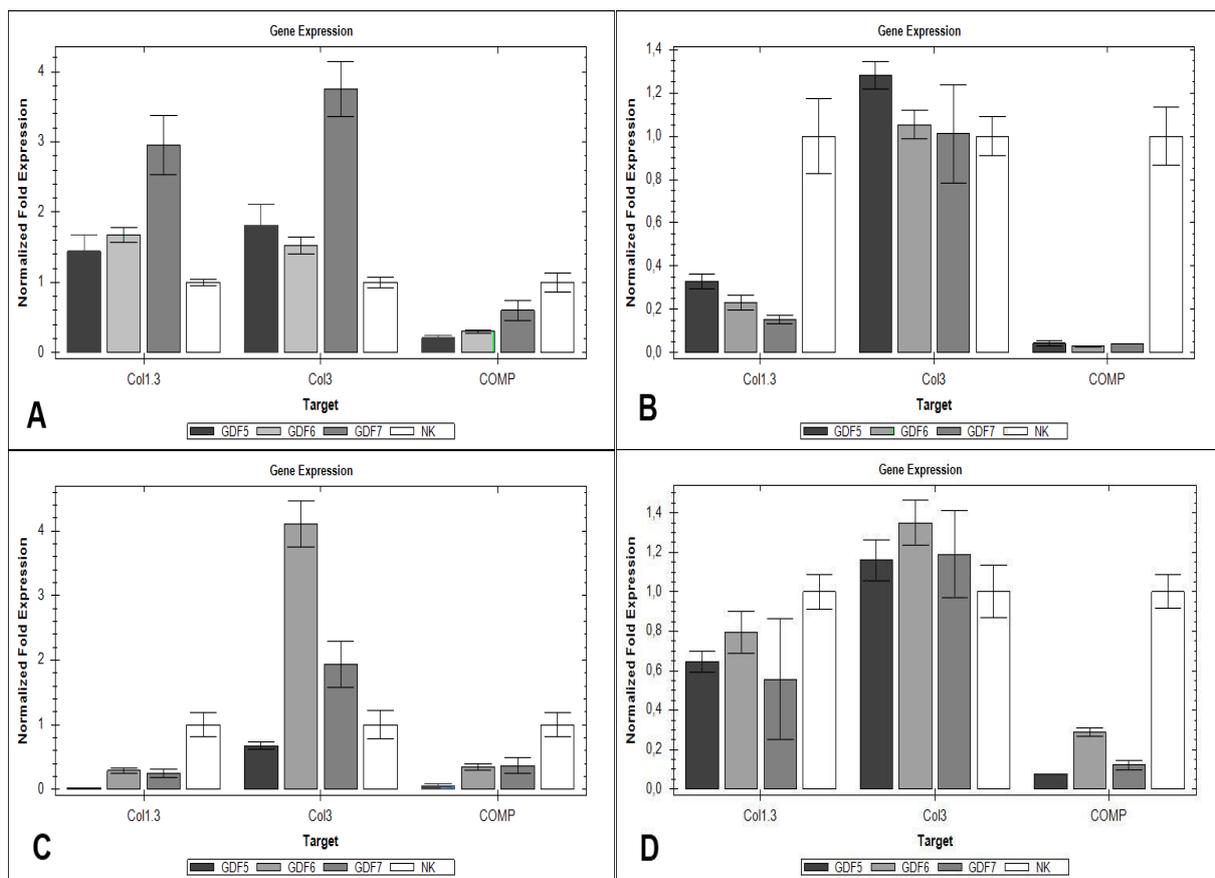
#### 4.2.4. RT-PCR für Tenomodulin und Kollagen II

Die qualitative Analyse der cDNA bezüglich der Expression von Tenomodulin und Kollagen II erbringt ein einheitliches Ergebnis für alle Versuche. Weder das Vorhandensein von Tenomodulin noch von Kollagen II kann bei irgendeiner der Versuchsgruppen nachgewiesen werden.

#### 4.2.5. Quantitative Real-Time PCR

Die quantitative Analyse der cDNA zeigt folgende Ergebnisse: Wie in Abbildung 23 zu sehen, ist mit einer Ausnahme die Genexpression bei der tenogenen Differenzierung im Pellet für Kollagen I bei allen Pferden im Vergleich zur Negativkontrolle herunter reguliert. Für Kollagen III zeigt sich bei den meisten Versuchsgruppen eine vermehrte Produktion. Diese Tendenzen bei der mRNA-Expression für beide Kollagene bleiben jedoch statistisch nicht signifikant.

Die Expression für COMP bleibt in allen Fällen deutlich niedriger im Vergleich zur Negativkontrolle. Dieses Ergebnis ist signifikant mit  $p < 0,05$ .



**Abbildung 23: Quantitative Real Time PCR – tenogene Diff. im Pellet**

Darstellung der Genexpression der tenogenen Differenzierung im Pellet als Balkendiagramm relativ zur Negativkontrolle (NK- weißer Balken: = 1). (A): Pferd 06/09, (B): Pferd 11/09, (C): Pferd 71/09, (D): Pferd 72/09. Die Menge an nachweisbarer mRNA für COMP bleibt bei den Versuchsgruppen immer hinter der Menge bei der Negativkontrolle zurück. Ebenso verhält es sich mit Kollagen I mit der Ausnahme des Pferdes 06/09 (A). Die mRNA für Kollagen III wird in den Versuchsgruppen immer stärker exprimiert als bei der Negativkontrolle. (Ausnahme: GDF5 bei Pferd 71/09 (C) ).

### 4.3. Tenogene Differenzierung im Kollagengel

Die equinen, adipogenen Stammzellen werden innerhalb einer Kollagenmatrix kultiviert und erhalten tenogenes Differenzierungsmedium (siehe Kapitel 3.6).

#### 4.3.1. Vitalitätsuntersuchung der Zellen im Gel

##### **Auswanderungsrate**

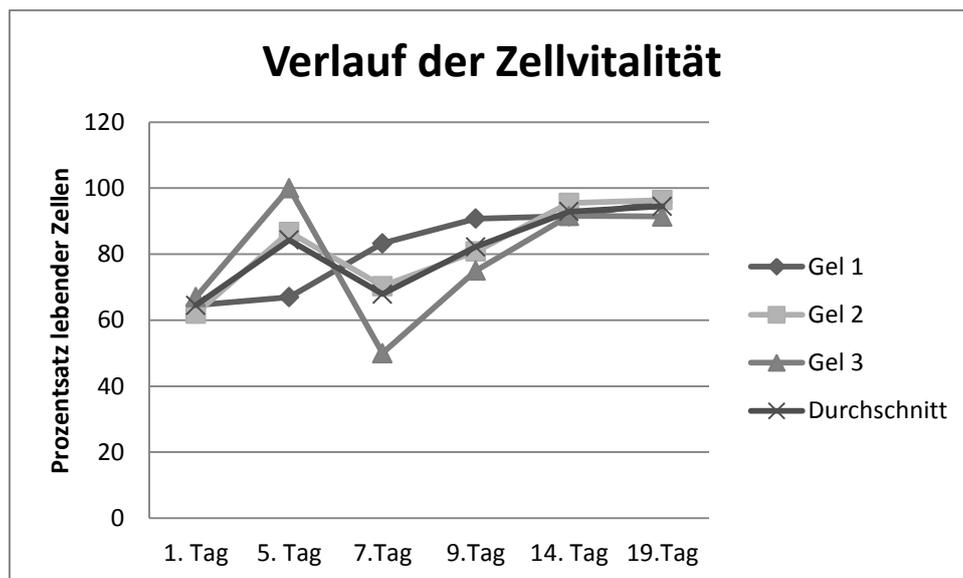
Es stellt sich heraus, dass das Kollagengel der Firma Amedrix eine sehr gute Matrix für die equinen Stammzellen ist. Die Auswanderung der Zellen wird zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht (1., 5., 7., 9., 14.Tag).

Zu jedem untersuchten Zeitpunkt und aus jedem Gelstück wandern Zellen aus dem Gel aus und siedeln sich auf dem Boden der Wells an. Somit haben sie entsprechend die Möglichkeit ihre Form und ihre Lokalisation im Gel zu verändern. Da aus jeder der drei Proben pro Gelkonstrukt und Untersuchungszeitpunkt Zellen ausgewandert sind, erreichen alle Gele eine 100%ige Auswanderungsrate.

##### **Zellvitalität**

Der prozentuale Anteil der lebenden Zellen ist zu Beginn der Untersuchungen relativ gering.

Er liegt bei ca. 65%. Nach einer Woche beginnt sich die Zellpopulation jedoch zu erholen und der Prozentsatz der lebenden Zellen pendelt sich bei 95% ein (Abbildung 24).



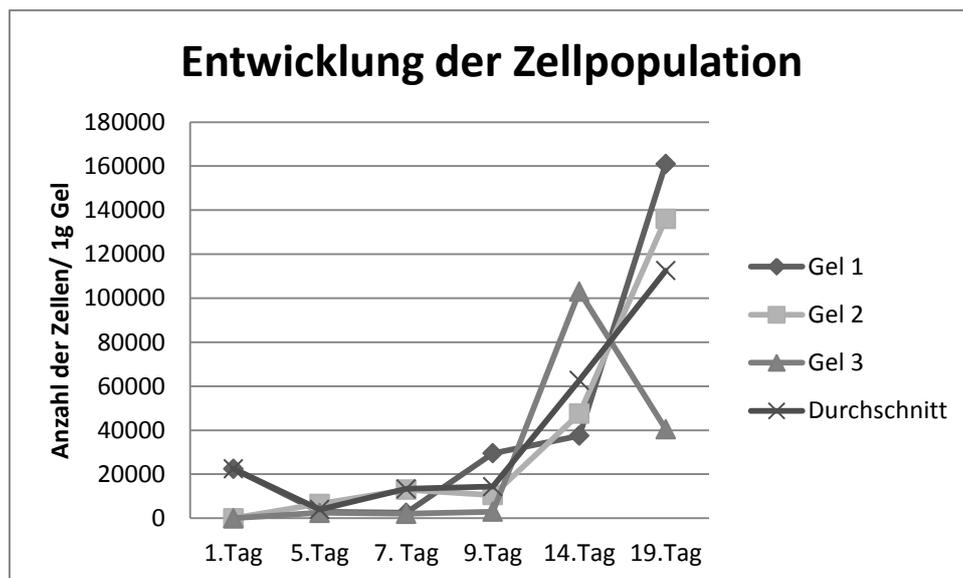
**Abbildung 24: Prozentualer Anteil lebender Zellen im Gel**

Diagramm zum Verlauf der Zellvitalität innerhalb der Gelkonstrukte. X-Achse: Untersuchungstag, Y-Achse: Prozentsatz lebender Zellen. Am 1.Tag bei Anlieferung der Gelkonstrukte liegt die Durchschnittliche Vitalität bei 65%, sie steigert sich im Verlauf von zwei Wochen auf 95%.

### Zellpopulation

Ähnlich verhält es sich mit der Zellzahl. Die absolute Zellzahl ist zu Beginn niedrig und liegt unter der zu erwartenden Zellzahl, wenn man berücksichtigt, dass ca. 30 Mio Zellen pro Pferd versendet worden sind. Der Transport und die Verarbeitung zu dem komprimierten Gel sind sehr belastend für die Zellen. Es ist daher sinnvoll mit dieser sehr hohen Ausgangszellzahl von 30 Mio Zellen pro Pferd zu beginnen.

Nach einer Woche ist jedoch eine zunehmende Erholung der Population zu verzeichnen (Abbildung 25).



**Abbildung 25: Entwicklung der Anzahl lebender Zellen im Gel**

Diagramm zur Entwicklung der absoluten Anzahl lebender Zellen im Gelkonstrukt. X-Achse: Untersuchungszeitpunkt, Y-Achse: Anzahl lebender Zellen in 1g Gel. In der ersten Woche bleibt die Vermehrungsaktivität der Zellen verhalten, jedoch steigt die Populationsgröße ab der zweiten Woche kontinuierlich an.

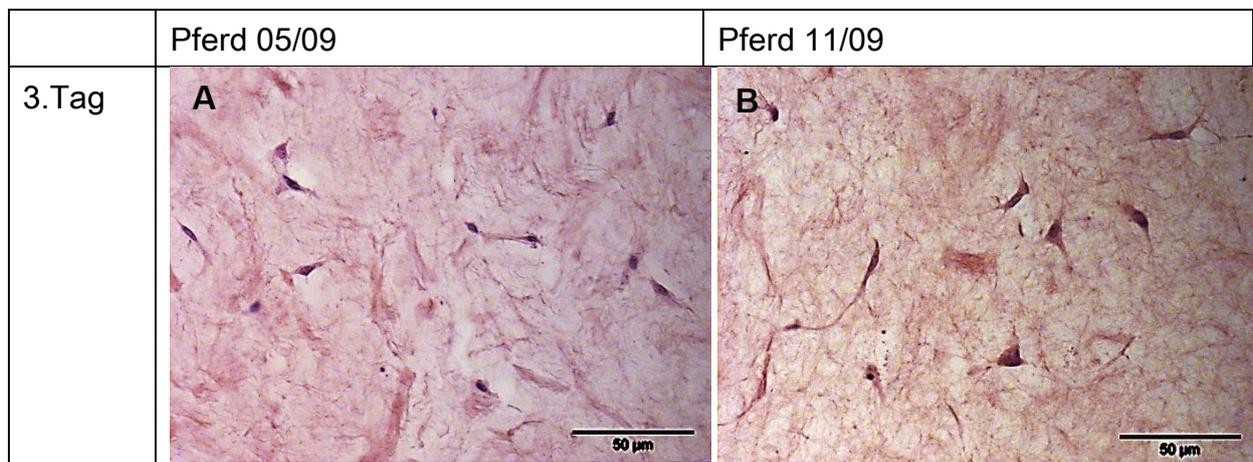
### 4.3.2. HE-Färbung der Kollagengele

In der HE-Färbung zeigen sich die Verteilung der Zellen im Gel und die Struktur des Gels. Es werden Paraffinschnitte der Gelkonstrukte am dritten Tag direkt nach der Rücklieferung und am Versuchsende von allen vier Versuchsgruppen angefertigt.

Auf den Bildern von Tag drei ist deutlich eine gleichmäßige Verteilung der Zellen im Gel und eine lose, ungeordnete Struktur der Grundsubstanz des Gels zu erkennen (Abbildung 26 A+B).

Bei dem Vergleich mit den Bildern der Versuchsgruppen GDF5, GDF6 und der gedehnten NK, fällt auf, dass die Grundsubstanz deutlich in Zugrichtung ausgerichtet ist und die Zellen einen langen, dünnen Zellkern haben. Das Zytoplasma ist langgestreckt und scheint reduziert zu sein (Abbildung 26 C-H).

In der Negativkontrolle, die nicht gedehnt wurde, bleibt die ursprüngliche Zellmorphologie erhalten. Die Zellen scheinen aktiv das sie umgebende Gel umzugestalten. Die Strukturlinien des Gels führen radiär von den Zellen weg (Abbildung 26 I+J).



	Pferd 05/09	Pferd 11/09
GDF5	<p><b>C</b></p>	<p><b>D</b></p>
GDF6	<p><b>E</b></p>	<p><b>F</b></p>
NK, gedehnt	<p><b>G</b></p>	<p><b>H</b></p>
NK, nicht gedehnt	<p><b>I</b></p>	<p><b>J</b></p>

Abbildung 26: HE-Färbung der Zellen im Kollagengel

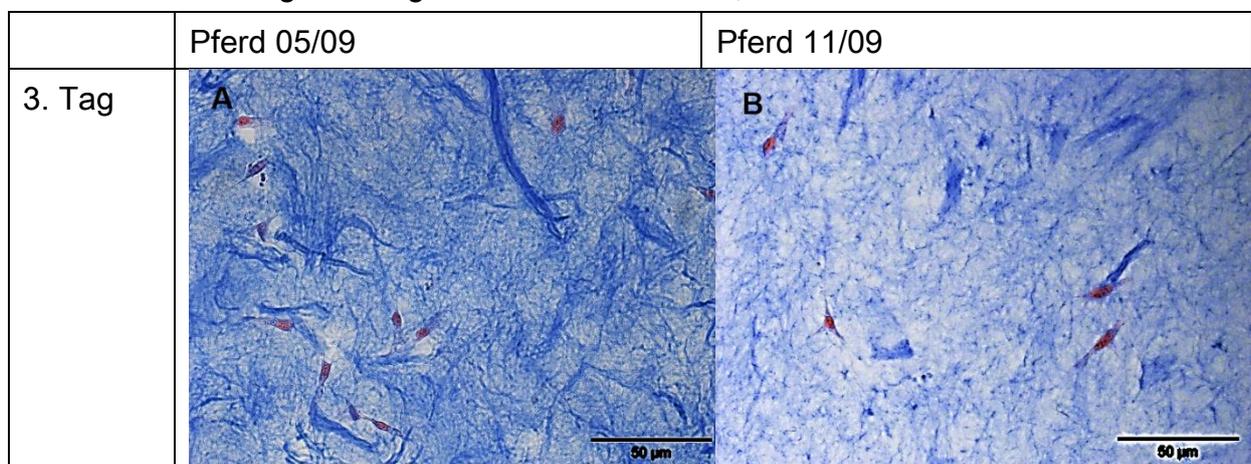
Strukturbeurteilung der Zellen im Gelkonstrukt durch HE-Färbung. Spalte 1 zeigt Pferd 05/09, Spalte 2 zeigt Pferd 11/09. (A+B) 3. Tag: Die Zellen sind klein und lose in der Gelmatrix verteilt. (C+D): Die Zellen wurden unter Zugabe von GDF5 mechanisch gedehnt. (E+F): Die Zellen wurden unter Zugabe von GDF6 mechanisch gedehnt. Sie bilden Kontakte zueinander aus und liegen zum Teil in Gruppen zusammen und sind streng in Längsrichtung ausgerichtet (C+D+E+F). Die Zellen in G/H/I/J haben keinen Differenzierungsfaktor erhalten. (G+H): Die Zellen sind ebenfalls nach Dehnung in Längsrichtung orientiert, jedoch eher klein und vereinzelt. (I+J): Die Zellen bilden Vernetzungen miteinander und strukturieren die Gelmatrix um sich herum radiär um.

### 4.3.3. Färbungen nach Cason und Pasini

Zur besseren Verdeutlichung der Gelstrukturen dient die Färbung nach Cason. Sie zeigt das Kollagen des Gelkonstrukts in leuchtendem Blau. Die im vorangegangenen Kapitel beschriebenen Auffälligkeiten treten besonders zu Tage.

Bei den Zellen der Versuchsgruppen GDF5 mit Dehnung, GDF6 mit Dehnung und den Zellen der NK mit Dehnung richtet sich die Grundsubstanz des Gels entlang der mechanischen Stimulation aus. Die Zellkerne werden lang und dünn und orientieren sich ebenfalls entlang der Zugrichtung (Abbildung 27 C - H). Für die Versuchsgruppe mit GDF6 sind einmal der Querschnitt zur Zugrichtung und einmal der Längsschnitt dargestellt.

Besonders beim Vergleich der Bilder von Tag drei mit der nicht gedehnten NK, ist erkennbar wie deutlich die Zellen das sie umgebende Gel umstrukturieren (Abbildung 27 A+B, I+J). Zum Beginn ist die Gelsubstanz eher ungeordnet und bei Versuchsende zeigen sich geordnete dunkelblaue, fibrilläre Strukturen.



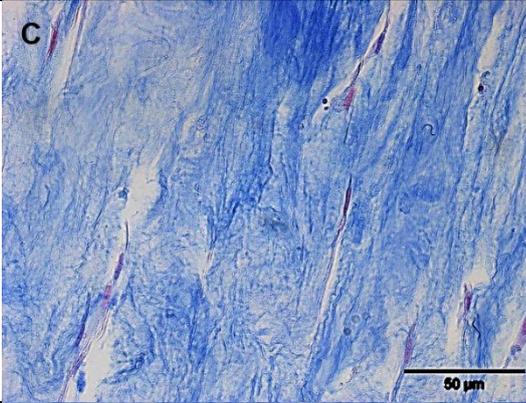
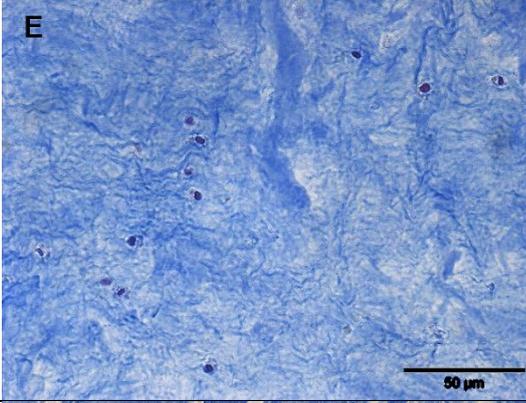
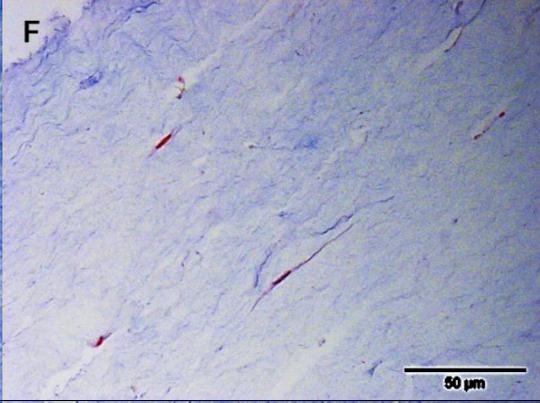
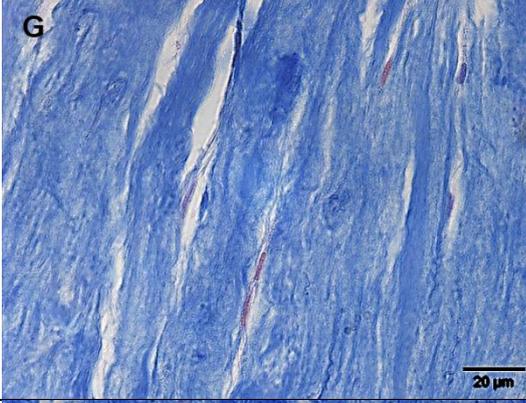
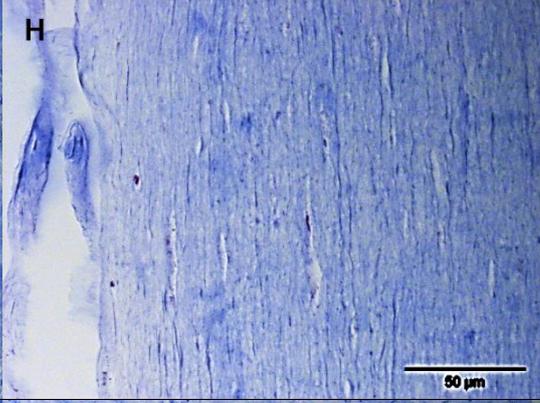
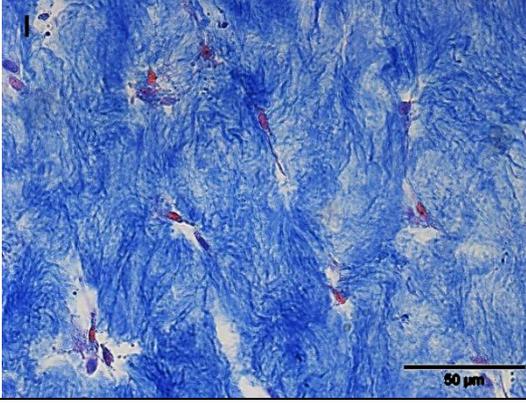
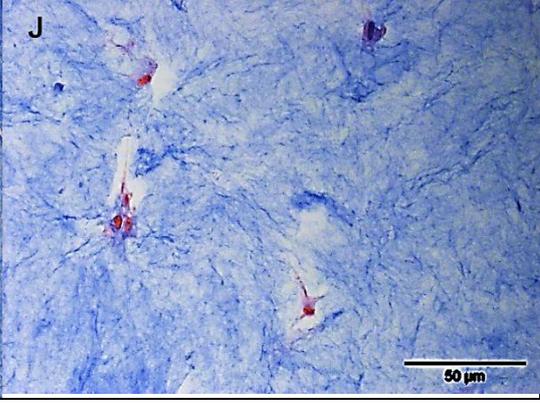
	Pferd 05/09	Pferd 11/09
GDF5	 <p>C</p>	 <p>D</p>
GDF6	 <p>E</p>	 <p>F</p>
NK, gedehnt	 <p>G</p>	 <p>H</p>
NK, nicht gedehnt	 <p>I</p>	 <p>J</p>

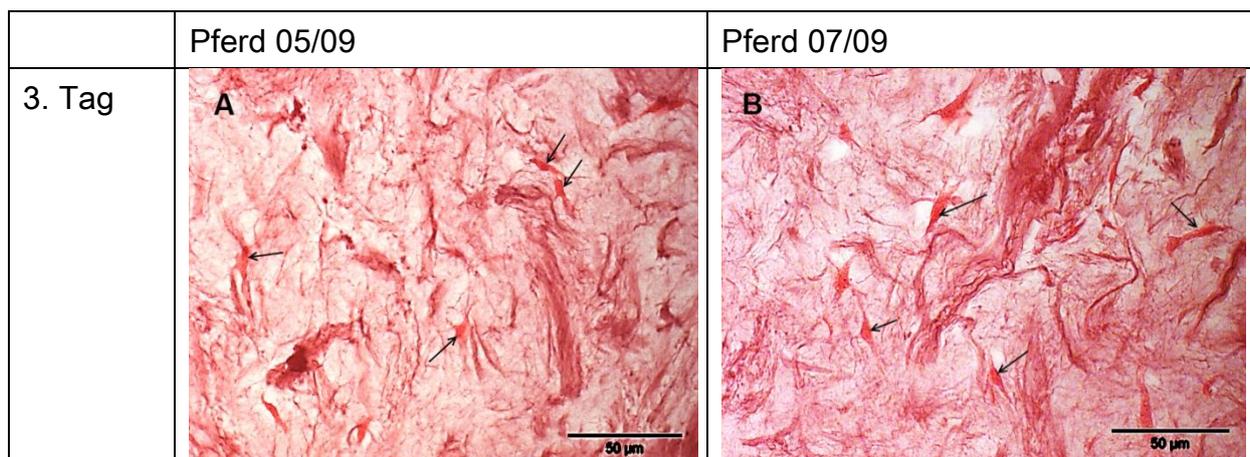
Abbildung 27: Cason-Färbung des Gelkonstrukts

Darstellung der Gelstruktur durch Cason-Färbung. Spalte 1: Pferd 05/09, Spalte 2: Pferd 11/09. (A+B): Tag 3, ungeordnete, wenig dichte Gelstruktur mit einzelnen Zellen. (C+D): mechanische Dehnung und GDF5- haltiges Medium. Ausrichtung von Gelsubstanz und Zellen in Zugrichtung, ( E- Querschnitt, + F): mechanische Dehnung und GDF6-haltiges Medium, Ausrichtung von Gelsubstanz und Zellen in Zugrichtung. Vor allem im Querschnitt ist zu erkennen, dass alle Zellkerne klein und punktförmig erscheinen. (G+H): Basismedium und mechanische Dehnung. Ausrichtung des Gels in Längsrichtung, Zellen zum Teil schwierig zu erkennen. (I+J): Basismedium ,keine mechanische Stimulation. Aktivität der Zellen besonders deutlich an der radiären Umstrukturierung der Gelsubstanz zu erkennen.

Die Färbung Pasini modifiziert nach Walter stellt besonders die Zytoplasmaausläufer leuchtend rot dar. Die Färbung der Gelsubstanz zeigt sich eher rot-bläulich als ganz blau, was auf die Variablen bei der Anmischung und Nutzung des Farbgemischs zurückzuführen ist.

Bei den Bildern der Versuchsgruppen GDF5, GDF6 und der gedehnten NK ist zu erkennen, wie sich das Zytoplasma in die Länge streckt und sich ein dünner, schmaler Zellkörper bildet (Pfeile). Auch die Zellfortsätze verlaufen weitestgehend in Zugrichtung (Abbildung 28 C - H).

Bei der nicht gedehnten NK ist in der Detailvergrößerung zu erkennen, dass sich eine Art Muster um die Zellen herum bildet (Abbildung 28 J). In den Bildern von Tag drei kann eine noch unveränderte Kollagenmatrix detektiert werden (Abbildung 28 A+B).



	Pferd 05/09	Pferd 07/09
GDF5	<p><b>C</b></p>	<p><b>D</b></p>
GDF6	<p><b>E</b></p>	<p><b>F</b></p>
NK, gedehnt	<p><b>G</b></p>	<p><b>H</b></p>
NK, nicht gedehnt	<p><b>I</b></p>	<p><b>J</b></p>

Abbildung 28: Pasini-Färbung der Zellen im Gel

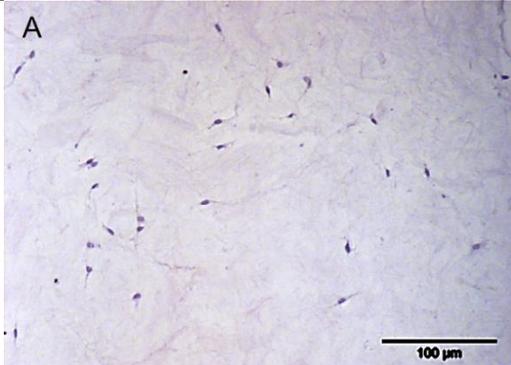
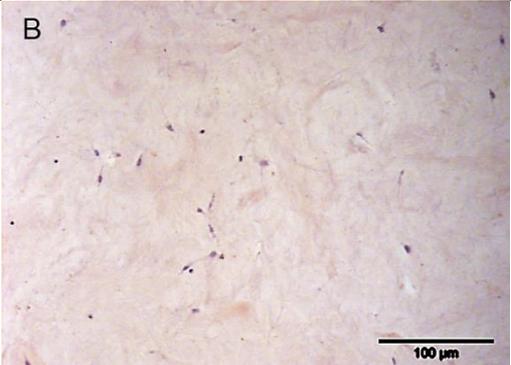
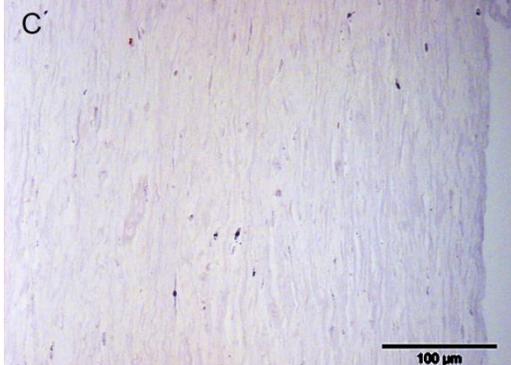
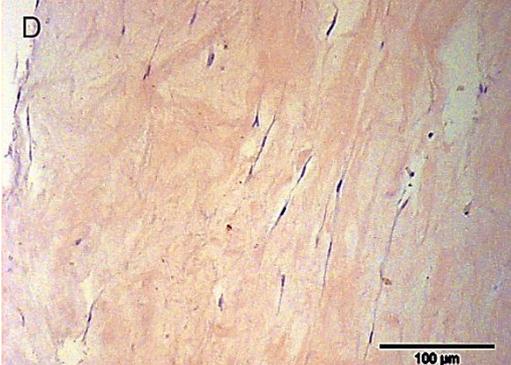
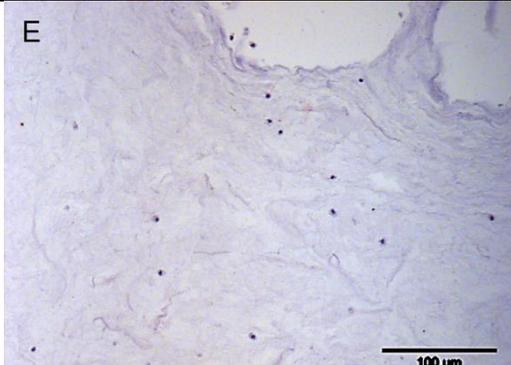
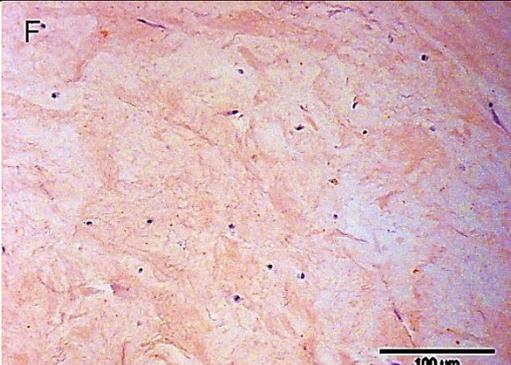
Darstellung des Zytoplasmas der Zellen im Gel mit Pasini-Färbung. Spalte 1: Pferd 05/09, Spalte 2: Pferd 07/09. Die Zytoplasmaausläufer sind mit Pfeilen gekennzeichnet (←). (A+B): Tag 3: Zellen sind lose in der Gelsubstanz verteilt, Zellfortsätze sind wenig zu erkennen. (C+D): mechanische Dehnung und GDF5-haltiges Medium. (E+F): mechanische Dehnung und GDF6-haltiges Medium. (G+H): Basismedium und mechanische Dehnung. Die Zellen zeigen ganz langgestreckte feine Zellausläufer, die in Zugrichtung orientiert sind. In lockeren Bereichen des Konstrukts (C+H) sind sie sehr gut zu erkennen, in sehr dichten Bereichen (D+E+F+G) nur schwach darstellbar. (I+J): Basismedium ohne mechanische Stimulation. Die Zellen zeigen eine Vernetzung über ihre Zellausläufer und eine Umstrukturierung der Gelgrundsubstanz. Zur Veranschaulichung des entstehenden Musters in größerem Maßstab dargestellt (J).

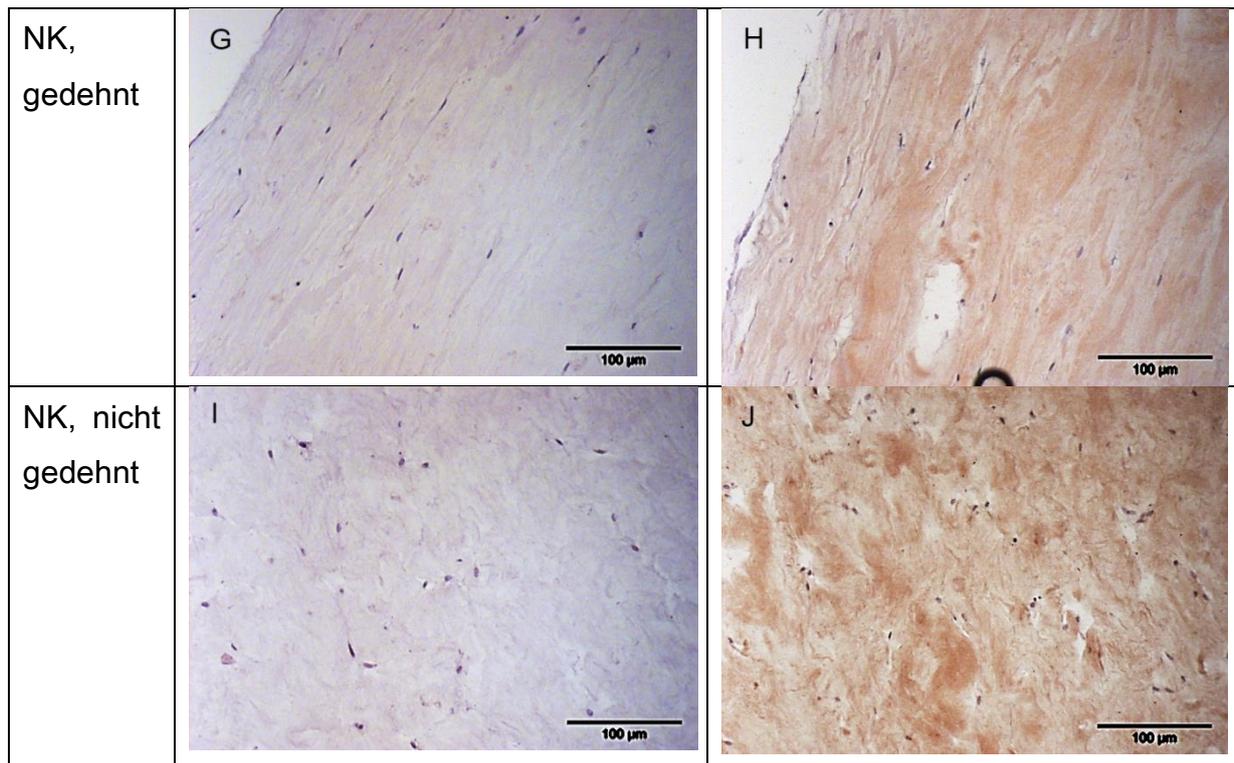
Bei der Kultivierung der Zellen im Kollagengel fallen weiterhin folgende Besonderheiten auf: Zu Beginn hat das Gel eine eher wässrige, brüchige Konsistenz. Es kann sehr leicht mit einem Nadelhalter oder zwischen zwei Fingern zerdrückt werden, so dass eine Zusammenhangstrennung erfolgt. Während des Kultivierungszeitraums erhält das Gel eine gewisse Elastizität. Es bilden sich auf Grund des Vernähens vor allem im Bereich der beiden kurzen Enden Wellen im Gel, die elastisch sind. Sie sind verstreichbar, aber sie kehren direkt wieder in ihre ursprüngliche Form zurück. Das Gel ist insgesamt sehr viel druck- und zugfester. Ebenfalls auf die Art des Vernähens zurückzuführen ist, dass sich innerhalb des Gels Bereiche mit unterschiedlich starker Zugbelastung befinden. Dies wird vor allem bei der histologischen Untersuchung der Gelstruktur deutlich. Ferner muss ein sehr wichtiger Aspekt hervorgehoben werden, nämlich dass die Zellen bei gutem Wachstum nach etwa 12-14 Tagen anfangen das Gel zu kontrahieren. Die Kontraktion ist ein starker Hinweis auf die Aktivität der Zellen, da sie bei unbesiedelten Gelen nicht erfolgt. Auf welche Prozesse diese Kontraktion genau zurückzuführen ist, kann noch nicht erklärt werden.

#### 4.3.4. Immunhistochemie mit Antikörper für Kollagen III

Die immunhistochemische Färbung mit dem Kollagen III -Antikörper zeigt eine deutliche Zunahme der Färbintensität von Versuchsbeginn im Vergleich zu Versuchsende (Abbildung 29).

Bei den Paraffinschnitten der gedehnten Gele ist eine strukturelle Längsausrichtung zu erkennen. Eine Färbung mit dem Kollagen I-Antikörper wurde nicht durchgeführt, da die Matrixgrundsubstanz zum großen Teil aus Kollagen I besteht.

Pferd 05/09	Negativkontrolle	Positivkontrolle
3. Tag		
GDF5		
GDF6		



**Abbildung 29: Immunhistochemie Kollagen III Gelkonstrukt**

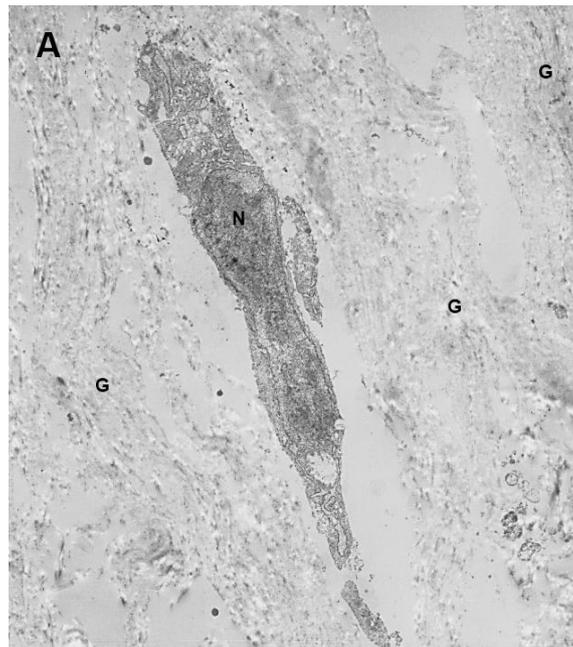
Darstellung der Kollagen-III-Produktion der Zellen während des Versuchszeitraumes; Pferd 05/09. Die Bilder A, C, E, G und I zeigen jeweils die Negativkontrolle der Immunhistochemischen Färbung. Die Bilder B, D, F, H und J zeigen jeweils die Positivkontrollen. Es ist ein deutlicher Unterschied zwischen dem 3.Tag (B) und dem Versuchsende (D, F, H, J) zu erkennen. Die Rotfärbung und damit die Menge an nachweisbarem Kollagen III ist bei Versuchsende sehr viel stärker. (E+F: Querschnitt)

#### 4.3.5. Ultrastrukturelle Betrachtung mit dem Elektronenmikroskop

Durch die elektronenmikroskopische Untersuchung können die Kollagenfasern in der Kollagenmatrix dargestellt werden und es kann überprüft werden, ob sie sich in Zugrichtung ausrichten.

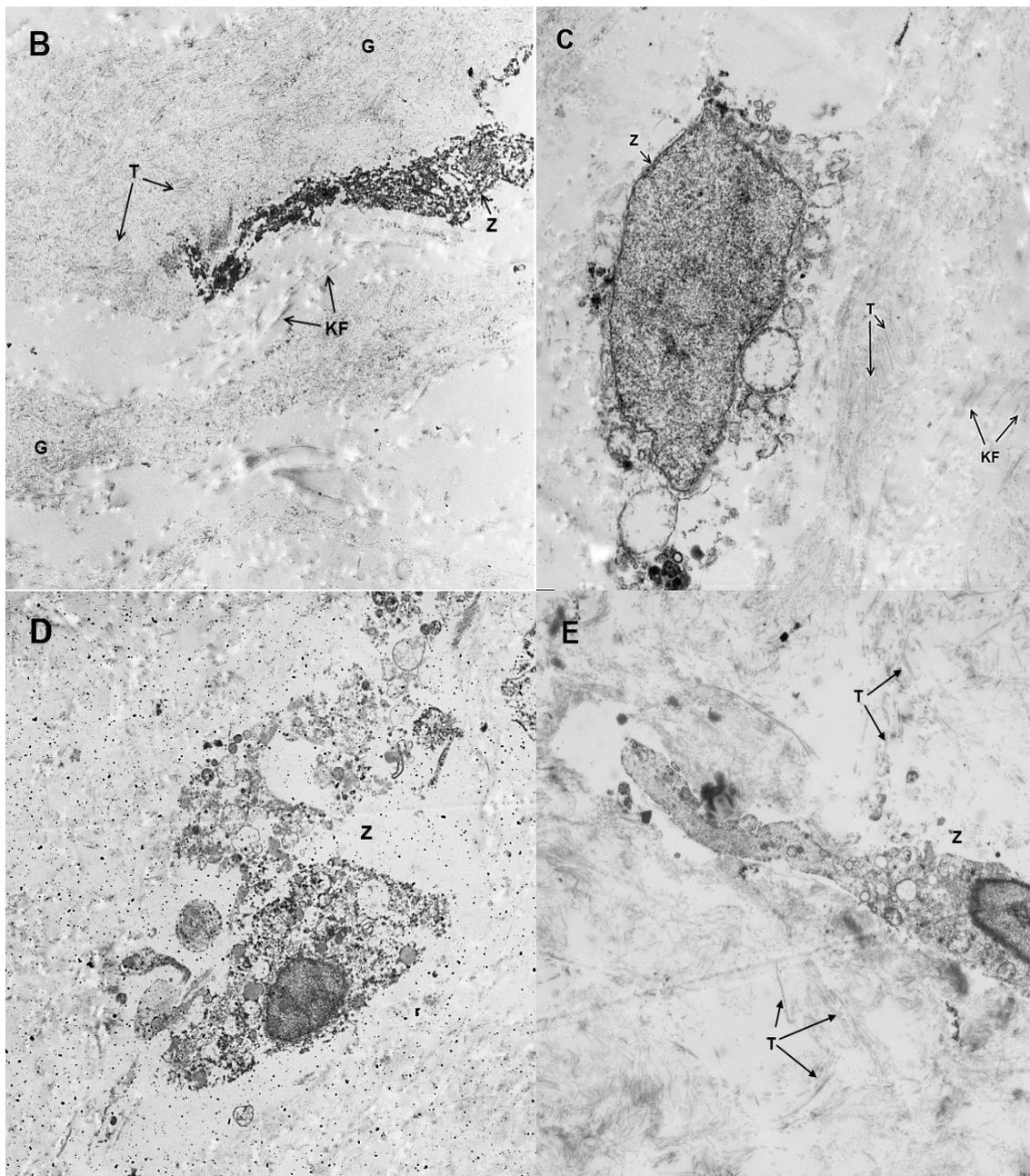
Bei Versuchsende sind in den Gelen im Vergleich zu Tag drei teilweise vermehrt fibrilläre Strukturen um einzelne Zellen herum zu erkennen (Abbildung 30 und Abbildung 31). Allerdings muss bedacht werden, dass bereits von Anfang an kollagene Strukturen im Gel vorhanden sind, da es sich um Gelkonstrukte aus Kollagen I handelt.

Die Zellen wirken außerdem degeneriert. Die Gelstücke sind vor der Fixierung für die elektronenmikroskopische Untersuchung kryokonserviert gewesen.



**Abbildung 30: Elektronenmikroskopische Aufnahme, Gelkonstrukt 3. Tag**

Die Aufnahme zeigt eine Zelle des Pferdes 05/09 im Gelkonstrukt am 3.Tag unmittelbar nach Rücklieferung zu Versuchsbeginn. N= Nukleus, G= Gelgrundsubstanz. Vergrößerung: 3500-fach.



**Abbildung 31: Elektronenmikroskopische Aufnahme, tenogene Differenzierung im Gelkonstrukt**

Darstellung der Gelkonstrukte nach Ablauf der Versuchszeit, Pferd 05/09. Z= Zellreste, G= Gelgrundsubstanz, T= Tropokollagenmikrofibrillen, KF= Kollagenfibrillen. Die Zellen erscheinen in allen Aufnahmen degeneriert und zum Teil in Auflösung begriffen. Die Gele der Versuchsgruppen mit GDF5 (B), GDF6 (C) und der nicht gedehnten Negativkontrolle (E) zeigen Hinweise auf eine beginnende Kollagenbildung. Bei der gedehnten Negativkontrolle ist wenig Struktur um die Zellen herum zu erkennen (D). Vergrößerung: B: 7060-fach, C/D/E: 5050-fach,

#### 4.3.6. RT-PCR für Tenomodulin und Kollagen II

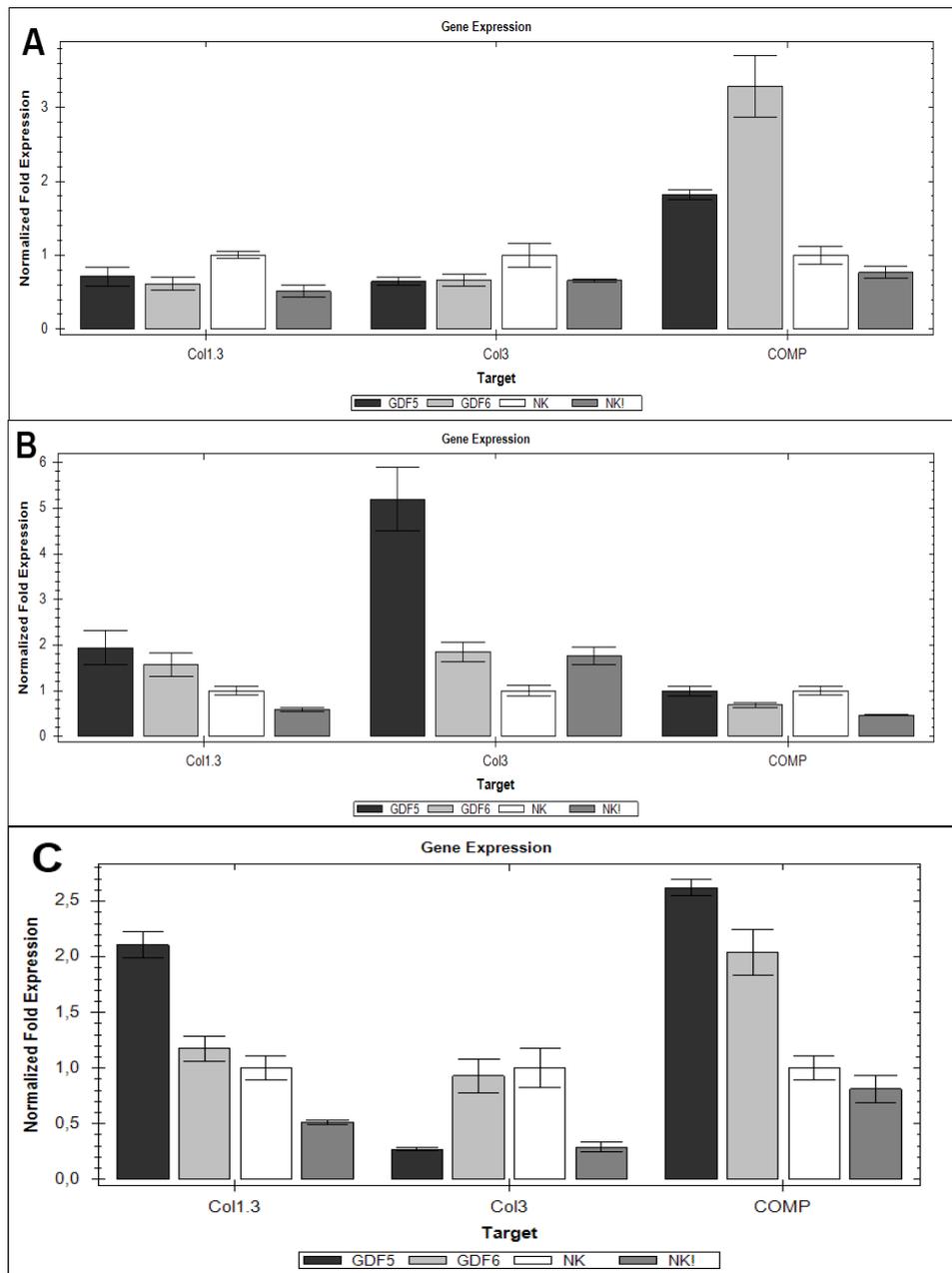
Auch bei den Gelkonstrukten zeigt die qualitative Analyse der cDNA auf Tenomodulin und Kollagen II nach dem Versuchsabschluss ein negatives Ergebnis. Es konnte weder eine Expression für Kollagen II noch für Tenomodulin bei einer der Versuchsgruppen nachgewiesen werden.

#### 4.3.7. Quantitative Real-Time PCR

Bei der quantitativen Analyse der cDNA zeigen sich hingegen interessante Hinweise. Zwischen den einzelnen Individuen gibt es deutliche Unterschiede (Abbildung 32). Die Zellen verschiedener Pferde reagieren jeweils etwas anders auf die Versuchsbedingungen. Dennoch lassen sich Tendenzen erkennen. Die Produktion von Kollagen I wird bei zwei Pferden durch Dehnung und Zugabe eines Wachstumsfaktors gesteigert (B+C). Bei den Zellen eines Pferdes ist die Kollagen I Synthese geringer als in den Zellen der nicht gedehnten Negativkontrolle (A). Bei Kollagen III zeigen nur die Zellen eines Pferdes eine gesteigerte Produktion (B) und die Zellen von zwei Pferden haben im Vergleich zur Negativkontrolle eine reduzierte Produktion (A+C).

Bei der Betrachtung von COMP findet sich das gleiche Bild. Zwei Pferde übertreffen die Negativkontrolle (A+C) und nur ein Pferd bleibt dahinter zurück (B). Die Tendenzen einer vermehrten Kollagen I und COMP Produktion bei den Versuchsgruppen mit Wachstumsfaktor und mechanischer Stimulation verbleiben jedoch statistisch nicht signifikant mit  $p > 0,05$ .

Auffällig ist weiterhin, dass die gesamte Produktionsleistung der gedehnten Kontrollgruppe mit einer einzigen Ausnahme für Kollagen III hinter der ungedehnten Negativkontrolle zurückbleibt.



**Abbildung 32: Quantitative Real Time PCR – tenogene Diff. im Kollagenel**

Darstellung der Genexpression der tenogenen Differenzierung im Kollagenel als Balkendiagramm relativ zur ungedehnten Negativkontrolle (NK- weißer Balken). Der dunkelgraue Balken (= NK!) zeigt eine Kontrollgruppe mit Dehnung und ohne GDFs. Die Gruppen GDF5 und GDF6 erhalten jeweils diesen Wachstumsfaktor und mechanische Dehnung. (A): Pferd 05/09, (B): Pferd 07/09, (C): Pferd 11/09. Die Menge an nachweisbarer mRNA für Kollagen I (B+C) und für COMP (A+B) übertrifft in jeweils zwei Fällen die Negativkontrolle deutlich. Die mRNA für Kollagen III wird hingegen nur einmal stärker exprimiert in den Versuchsgruppen als bei der Negativkontrolle (B).

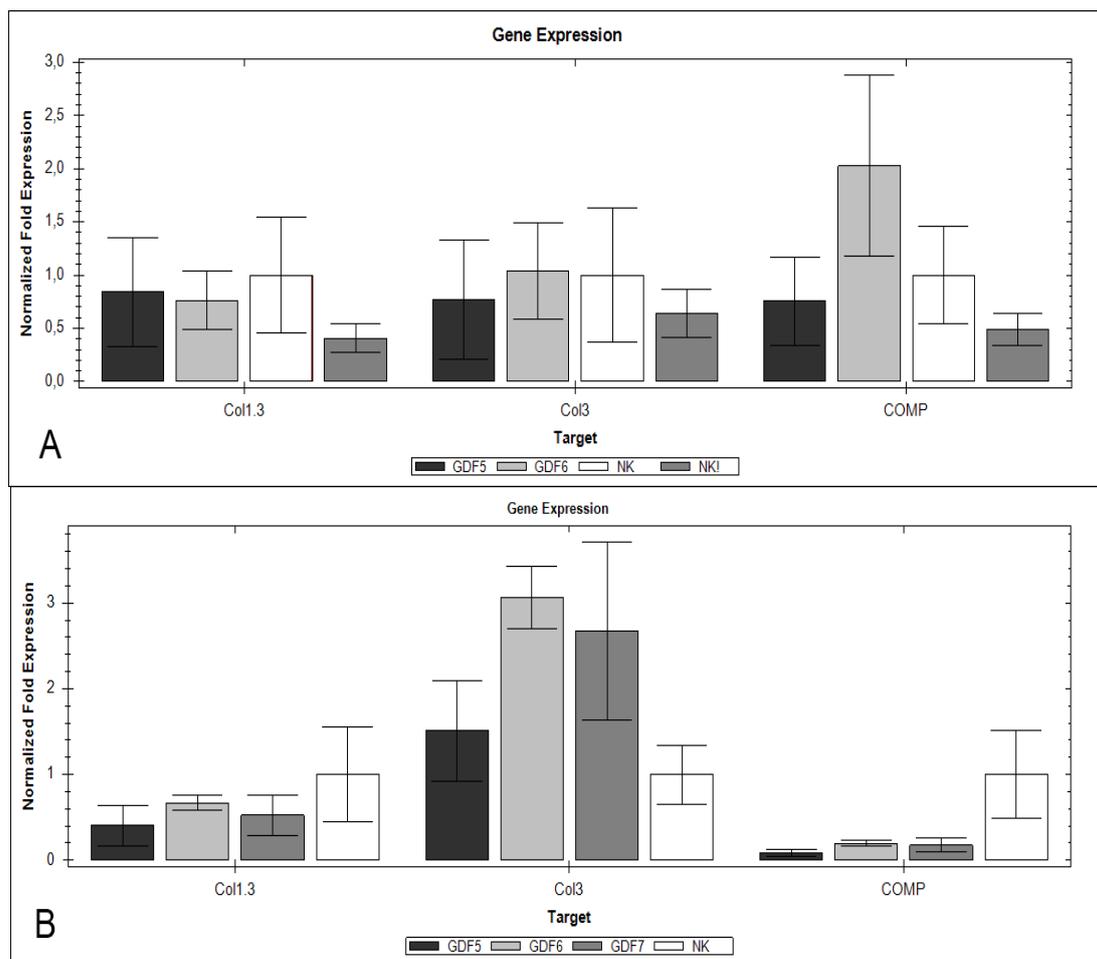
#### 4.4. Pelletkultur - Kollagengelkultur: Werte der qPCR im Vergleich

Der Vergleich der Zielgene zeigt Unterschiede zwischen den Kultivierungsformen Kollagengelmatrix und Zellpellet. Die folgenden Diagramme sind eine Zusammenführung der Werte aller Pferde innerhalb der Versuchsgruppen der jeweiligen Kultivierungsform.

Es ist zu erkennen, dass bei der Kultivierung im Kollagengel die Produktion von mRNA für Kollagen I und Kollagen III in etwa auf dem Niveau der ungedehnten Negativkontrolle liegt. Die Menge an mRNA für COMP übersteigt vor allem bei der Versuchsgruppe mit GDF6 deutlich das Level der ungedehnten Negativkontrolle (Abbildung 33 A). Auch fällt auf, dass bei der Negativkontrolle mit Dehnung ohne Zugabe eines Wachstumsfaktors die mRNA Produktion geringer ist als bei der ungedehnten Negativkontrolle. Dies trifft für alle drei untersuchten Gene zu.

Bei der Kultivierung im Pellet bleibt die Produktion von Kollagen I in den Versuchsgruppen hinter der Produktionsmenge in der Negativkontrolle zurück. Sehr stark fällt die Minderproduktion von COMP in der Pelletkultur bei den Versuchsgruppen auf ( $p < 0,05$ ). Außerdem zeigt sich eine erhöhte Produktion von Kollagen III (Abbildung 33 B).

Die Übersichten stellen Tendenzen der beiden Kultivierungsformen dar.



**Abbildung 33: Quantitative Real Time PCR – Vergleich Kollagen- Pelletkultur**

Darstellung der Genexpression der tenogenen Differenzierung im Kollagen- und in der Pelletkultur als Balkendiagramm relativ zur Negativkontrolle (NK- weißer Balken). (A) Kollagenkultur: Zusammenfassung aller Pferde innerhalb einer Versuchsgruppe für ein Zielgen. Bei Kollagen I und Kollagen III wird im Schnitt etwa das Niveau der ungedehnten Negativkontrolle erreicht, bei COMP zum Teil deutlich überschritten. (B) Pelletkultur: Zusammenfassung aller Pferde innerhalb einer Versuchsgruppe für ein Zielgen. Die Menge an Kollagen III ist deutlich gesteigert im Vergleich zur Negativkontrolle, die Menge an Kollagen I und vor allem an COMP ist stark erniedrigt.

## 5. DISKUSSION

Um Erkenntnisse über das Differenzierungspotential von equinen, adipogenen, mesenchymalen Stammzellen zu erlangen, werden diese Zellen sowohl als Zellpellet als auch in einer Kollagengelmatrix kultiviert. Es wird der Einfluss von Wachstumsfaktoren und von mechanischer Belastung analysiert.

### 5.1. Kritik der Methode

Auswahl der Zellen: Bei dieser Arbeit kommen adipogene Stammzellen zum Einsatz. Sie werden in der Kruppenregion oberhalb der Schweifrübe aus dem Unterhautfettgewebe isoliert. Die in den Versuchen verwendeten Zellen stammen von für die Lebensmittelgewinnung geschlachteten Pferden, die frei von systemischen Erkrankungen gewesen sind. Die Zellen werden gekühlt und in PBS unmittelbar ins Labor transportiert. Die Stammzellen werden durch enzymatische Verdauung aus dem Gewebeverband gelöst und kultiviert. Dies entspricht einem sehr direkten und schnellen Verarbeitungsweg, so dass es als schonend für die Zellen bezeichnet werden kann.

Der Entnahmeort ist der inzwischen in einigen Pferdekliniken bereits gängigen Praxis angepasst. Für das Pferd ist die Entnahme von Fettgewebe sehr viel risikoärmer im Vergleich zur Entnahme von Knochenmarksstammzellen. Es bleibt meist nur eine kosmetisch relevante Narbe zurück. Auch für den Tierarzt ist der Eingriff sicherer durchzuführen als eine Punktion des Sternums.

Es ist zu erwarten, dass adipogene Stammzellen die hauptsächlich in der Praxis genutzten Stammzellen werden. Darum richtet sich das Augenmerk dieser Studie auf sie. Bei einer in vivo Studie in den USA wurde gezeigt, dass die lokale Injektion von aus dem Fettgewebe gewonnene Zellen bei kollagenase-induzierten Sehnenläsionen zu einem verbessertem Heilungsprozess führt (Dahlgren 2009). Eine weitere klinische Studie hat deutliche Verbesserungen der Struktur der Sehnen bei der

ultrasonographischen Untersuchung nach dem Einsatz von Fettstammzellen gezeigt (Leppänen et al. 2009). Ebenso ist durch die Weiterverfolgung von Patienten gezeigt worden, dass auch langfristig eine verbesserte Belastbarkeit der Sehnen erhalten bleibt (Leppänen et al. 2009). In der humanmedizinischen Forschung herrscht auch zunehmendes Interesse an Stammzellen aus dem Fettgewebe. In einer Studie sind Tenozyten, Fibroblasten der Sehnenscheide, Knochenmarkstammzellen und Fettstammzellen bezüglich ihres Potentials für Tissue Engineering von Sehnen verglichen worden und alle Zelltypen für geeignet erachtet worden (Kryger et al. 2007). Eine weitere Studie betont, dass adipogene, mesenchymale Stammzellen eine ausgezeichnete Grundlage für Forschungen im Bereich des Tissue Engineering von Sehnen darstellen (Uysal and Mizuno 2009). Öfters werden die robusten Eigenschaften und die sehr gute Proliferation der adipogenen Stammzellen in Kultur auch nach Kryokonservierung beschrieben, was auch durch diese Arbeit bestätigt werden kann. Dies wurde aktuell untermauert durch eine Studie von Burk et al. (2013) aus Leipzig, in der equine Stammzellen aus verschiedenen Geweben bezüglich ihrer Eigenschaften verglichen werden. Es zeigte sich hier, dass aus Fettgewebe verhältnismäßig viele Stammzellen isoliert werden konnten, die zu einer guten Proliferationsrate aufweisen und zum anderen eine stärkere Expression von Kollagen 1A2 haben im Vergleich zu Stammzellen aus Knochenmark oder Nabelschnurgewebe.

Kultivierung als Pellet: Durch Stoll et al. ist eine 2D-Monolayerkultur aus Tenozyten mit einer 3D-Pelletkultur und einer normalen Sehne verglichen worden (Stoll et al. 2009). Sie haben herausgefunden, dass die Genexpression für Kollagen I, Decorin, COMP und Aggrecan in der 3D-Kultur deutlich näher an dem Expressionsprofil einer normalen Sehne liegt. Auch bei der histologischen Untersuchung der Pellets zeigt sich eine sehnenähnliche Struktur. Die chondrogene Kultivierung erfolgt routinemäßig sehr viel besser im Pellet als in der 2D-Kultur. Bei der osteogenen Differenzierung, bei der ebenfalls viel Extrazellulärschubstanz gebildet wird, formen die Zellen sogar eigenständig Differenzierungsknötchen. Aus diesen Gründen wird in dieser Arbeit die Analyse einer Pelletkultur miteinbezogen. Da sehr viele Pellets auf engem Raum untergebracht werden müssen, erfolgt die Kultivierung in einer 96 Well-

Platte. Im täglichen Handling stellt sich das als sehr geeignetes Verfahren heraus. Jedoch zeigt sich bei der Auswertung, dass in den Wells nur wenig Platz für das Wachstum der Pellets ist, so dass die Pellets sehr klein geblieben sind. Dies bereitet große Mühen bei der RNA-Gewinnung und bei der Präparation für die Histologie. Die sehr kleinen Pellets haben oft wenig Stabilität und sind häufig in ihrer Struktur angegriffen. Ferner lagern sie kaum Extrazellulärmatrix ein. Ob Kollagenbestandteile der Extrazellulärmatrix ins Medium abgegeben worden sind, ist nicht untersucht worden.

Es muss außerdem angemerkt werden, dass die Kulturform im Pellet eine Endstation darstellt. Die Zellen sind in dieser Form nicht mehr für den klinischen Einsatz geeignet. Diese Kultivierungsform dient ausschließlich der Grundlagenforschung.

Kultivierung im Kollagengel: Die Kultivierung der Zellen in einer Kollagen I –Gelmatrix bringt zwei wichtige Aspekte mit sich. Zum einen bietet sie den Zellen einen dreidimensionalen Raum aus Kollagengrundsubstanz, in dem sie sich frei bewegen können und in dem sie nicht dicht gedrängt aufeinandersitzen. Das ist eine Situation, die der im Sehngewebe sehr ähnlich ist.

Zum anderen wird es durch das Kollagengel möglich, mechanische Stimulation auf die Zellen zu übertragen. Anfängliche Versuche, die Zellen direkt auf dehnbarem Silikon zu kultivieren, sind daran gescheitert, dass sich die Zellen durch die zyklische Dehnung auch bei minimaler Einstellung nach geraumer Zeit von ihrer Unterlage abgelöst haben. Das Gießen des mit Zellen versetzten Gels in diese Silikonschalen funktionierte zunächst sehr gut, jedoch hat sich herausgestellt, dass die Zellen das Gel nach ein bis zwei Wochen sehr stark kontrahieren und sich das gesamte Gel dadurch von der Unterlage ablöst.

Inspiziert durch die Arbeit von Ignatius et al. aus 2004 ist ein Bioreaktor entwickelt worden, in dem die Gelkonstrukte direkt eingespannt und gedehnt werden können. Hierfür ist ein zumindest einfach komprimiertes Gel notwendig, das von vornherein deutlich mehr Festigkeit mitbringt, und mit Hilfe von Nahtmaterial befestigt werden kann. Dazu ist der Versandt, die Verarbeitung durch die Firma Amedrix und der Rückversandt notwendig. Bei dieser Prozedur gehen sehr viele Zellen zu Grunde, so dass mit einer sehr großen Ausgangszellzahl von ca. 30 Mio. Zellen pro Gel

gearbeitet werden muss. Es dauert eine Woche bis sich die Population davon erholt und die Zellen wieder eine Vitalitätsrate von 90% erreichen. Für eine spätere Anwendung in der Praxis wird es zukünftig möglich sein, das flüssige Kollagen zeitgleich mit den Zellen in einer Mischspritze der Firma Amedrix in die Sehnenlesion zu injizieren. Das flüssige Kollagen härtet bei Körpertemperatur zum Gel aus und könnte die Zellen vor Ort fixieren.

Dehnungsprotokoll: In der Literatur gibt es eine Mannigfaltigkeit an Protokollen zur Übertragung mechanischer Reize auf Zellen. Dabei variieren die Faktoren Frequenz, Dehnungsamplitude, Dauer der Dehnungs- und Ruhephasen und die Dauer des Experiments im Gesamten. Ignatius et al. (2004) nutzen 1% Dehnung, 1Hz und 1800 Belastungszyklen (= 30 Minuten) in 21 Tagen. Kall et al. (2004) verwenden 1 cm Dehnungsstrecke bei 19 cm Gesamtlänge des Konstrukts, das entspricht etwas mehr als 5%, 1Hz und 8 Stunden Dehnung mit 16 Stunden Pause pro Tag über insgesamt ebenfalls 21 Tage. Van Griensven et al. (2005) setzen eine Dehnung von 5%, 1Hz und eine Dehnungsdauer von 15 Minuten, 30 Minuten und 8 Stunden an drei Tagen ein. Angelidis et al. (2010) bevorzugen 1 Hz und 1,25 N Dehnungsstärke für 5 Tage am Stück. Daraus ist zu erkennen, dass es kein einheitliches, etabliertes Vorgehen gibt und somit die Ergebnisse der einzelnen Gruppen nicht gut vergleichbar sind.

Für diese Arbeit wird ein Protokoll mit 0,5 Hz, 3 mm Dehnung bei 6 cm Gesamtlänge -was 5% entspricht- und 4 Stunden Dehnung im Wechsel mit 8 Stunden Pause über 18 Tage verwendet. Es besteht aus in der Literatur beschriebenen Elementen und berücksichtigt die Bedingungen in der Praxis. Ein Pferd kann während der Rehabilitationsphase oft nur zweimal am Tag von seinem Besitzer bewegt werden, meist auch nur für einen kürzeren Zeitraum als das hier verwendete Zeitintervall. Die Frequenz der Fußung eines Pferdes liegt im Schritt jedoch deutlich unter 1 Hz. Die 5% Dehnung sind hierbei zwar mit den anderen Arbeiten vergleichbar, allerdings gilt der Bereich von 1-3% Dehnungsstrecke als physiologisch (Wirth and Carls 2000). Die Dehnungsstrecke ist also im Grenzbereich angesetzt und sollte bei Folgeversuchen kleiner gewählt oder auch gestaffelt untersucht werden.

Auswahl der Zielgene: An vorderster Stelle steht Kollagen I, welches mit über 90 % der Trockensubstanz einer normalen Sehne den Hauptbestandteil ausmacht. Danach

folgt Kollagen III, welches das zweitwichtigste Kollagen in der Sehnenmatrix darstellt. Diese beiden Kollagene im Vergleich zu betrachten ist besonders interessant, da es bei der Sehnenheilung zu einer Verschiebung ihrer Produktion kommt. Es wird deutlich mehr Kollagen III gebildet, welches zur Ausbildung von dünneren Fibrillen führt, weniger Quervernetzungen ausbildet und somit eine geringere Zugstabilität aufweist (Möller et al. 2000). COMP ist ein weiterer, nicht kollagener Matrixbestandteil. Es wird ausgewählt als ein Vertreter der nur in geringem Anteil vorkommenden Matrixkomponenten, die aber durchaus zur Stabilität der Sehnen beitragen (Smith et al. 1997). Scleraxis ist ein Transkriptionsfaktor, der bei der Neubildung von Sehnen eine wichtige Rolle spielt. Schweitzer et al. haben bereits 2001 an Hühnerembryonen durch in situ Hybridisierung gezeigt, dass die Expression von Scleraxis die Gewebsbereiche markiert, die später als Verbindung von Knochen und Muskel dienen. In einer Folgearbeit ist gezeigt worden, dass Scleraxis in allen Vorläuferzellen von Sehngewebe exprimiert wird und dass massive Schädigungen und Fehlbildungen bei Mäusen mit Null-Mutation für Scleraxis auftreten (Murchison et al. 2007). Tenomodulin ist ein Transmembranglycoprotein, das vor allem in Sehnen, Bändern und im Auge exprimiert wird. Scleraxis reguliert die Expression von Tenomodulin in Tenozyten deutlich nach oben und es wird davon ausgegangen, dass Tenomodulin ein später Marker für die Sehnendifferenzierung ist (Shukunami et al. 2006). Tenomodulin ist notwendig für die Proliferation von Tenozyten und wird benötigt für die Reifung der Kollagenfibrillen (Docheva et al. 2005). In einer neueren Arbeit ist gezeigt worden, dass Tenomodulin und Thrombospondin-4 die höchste Selektivität für Sehngewebe haben (Jelinsky et al. 2010). Die Analyse von Kollagen II als Marker für Knorpelgewebe wird miteinbezogen, um eine Differenzierung in die chondrogene Richtung auszuschließen. Sowohl Kollagen II als auch Tenomodulin können durch die verwendeten Primerpaare in ihren Ursprungsgeweben Knorpel und Sehne nachgewiesen werden. In den Vorbereitungen zu dieser Arbeit ist festgestellt worden, dass beide Gene jedoch nicht in den adipogenen Stammzellen des Pferdes exprimiert werden, so dass diesbezüglich eine qualitative Analyse ausreichend ist. Die untersuchten Zielgene Kollagen I, Kollagen II, Kollagen III, COMP, Scleraxis und Tenomodulin stellen eine sinnvolle Auswahl aus den relevanten Genen dar.

Wachstumsfaktoren: Wolfman et al. haben 1997 gezeigt, dass durch ektopische, subkutane Implantation von einigen Mikrogramm GDF5, GDF6 oder GDF7 bei Ratten die Bildung von sehnen- und ligamentähnlichen Geweben hervorgerufen wird. Dieser Befund gibt Anlass zu weiteren Untersuchungen in diese Richtung. Zellen, die durch Gentransfer GDF7 produzieren, und in Muskeln von Mäusen injiziert werden, führen zu sehnen- und knorpelähnlicher Gewebsbildung (Lou et al. 1999). BMP12 (= GDF7) wird bei gesunden, humanen Patellarsehnen nur auf aktiven Tenoblasten und auf perivaskulären, mesenchymalen Zellen nachgewiesen, nicht aber auf interstitiellen Tenozyten (Fu et al. 2002). Daraus wird geschlossen, dass BMP12 eine Rolle in der frühen Regenerationsphase von Sehngewebe haben kann (Fu et al. 2002).

Bei Knochenmarkstammzellen des Pferdes wird in einer 2D-Kultur nach Zugabe von 50 ng/ml Medium des BMP 12 die Produktion von Tenomodulin nachgewiesen (Violini et al. 2009). Allerdings gibt es auch einige Arbeiten, die zeigen, dass aus Fettgewebe gewonnene Zellen durch eine Behandlung mit GDF5 in die chondrogene oder osteogene Richtung differenzieren können (Liu et al. 2009; Zeng et al. 2006; Shen et al. 2006, Zeng et al. 2006; Merino et al. 1999). Die verschiedenen BMPs und GDF5, 6 und 7, als eine ihrer Untergruppen, sind in hohem Maße voneinander abhängig. Yeh et al. (2008) zeigen eine Regulation durch BMP 7 und Mikic et al. (2007) zeigen die Abhängigkeiten von GDF5, 6 und 7 untereinander. Auch andere Wachstumsfaktoren können Einfluss auf tenogene Fibroblasten haben. An caninen Zellen ist festgestellt worden, dass platelet-derived growth factor B und basic fibroblast growth factor die Proliferation und Kollagenproduktion der Zellen steigern (Thomopoulos et al. 2004). Um die Aktivitäten von Wachstumsfaktoren besser zu verstehen, sind operierte Sehnen von Hühnern auf sechs verschiedene Wachstumsfaktoren zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht worden. Dabei sind unterschiedlich starke und zum Teil wechselnde Konzentrationen für connective tissue growth factor, transforming growth factor beta, vascular endothelial growth factor, insulin like growth factor 1, platelet derived growth factor B und basic fibroblast growth factor gefunden worden (Chen et al. 2008). Bei zwei weiteren Arbeiten werden die Expressionslevel von unter anderem GDF5, GDF6 und GDF7 im zeitlichen Verlauf in Sehnenreparationsgewebe beobachtet. Alle beobachteten

Wachstumsfaktoren verhalten sich unterschiedlich und verändern ihre Expression im Laufe der Zeit (Eliasson et al. 2008; Loisselle et al. 2009). Viele Aspekte über die genaue Funktion der einzelnen Wachstumsfaktoren, von ihrem Zusammenspiel oder ihrer Bedeutung bei einzelnen Tierarten, Geweben und Stammzellen liegen noch im Unklaren. Somit muss eine Auswahl getroffen werden um einen Aspekt zum Gesamtbild beizutragen. Dafür werden bei dieser Arbeit GDF5, GDF6 und GDF7 ausgewählt. Geprüft wird der Effekt auf adipogene, mesenchymale equine Stammzellen, einzeln und in einer Konzentration von 80 ng/ml Medium.

## 5.2. Diskussion der Ergebnisse

### 5.2.1. Nachweis des Stammzellcharakters

Es wird der Nachweis geführt, dass es sich bei den aus dem Fettgewebe der Kruppenregion der Pferde isolierten Zellen um Stammzellen handelt.

Die isolierten und in Zellkulturflaschen kultivierten Zellen adhärten sehr gut auf der Kunststoffoberfläche. Sie proliferieren gut in einem Medium aus DMEM, 10% FBS und 1% PS. Auch nach Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff behalten sie ihre fibroblastenartige Morphologie und ihr Differenzierungspotential in verschiedene Zelllinien bei. Es wird eine adipogene Differenzierung, eine osteogene Differenzierung und eine chondrogene Differenzierung durchgeführt. Bei der histologischen Untersuchung durch Oil-Red-O, Von-Kossa und Alzianblau kann jeweils ein positives Ergebnis der Differenzierung gezeigt werden. Zusätzlich wird der Erfolg der Differenzierungen durch eine Untersuchung auf mRNA Ebene untermauert. Bei der Analyse der cDNA durch RT-PCR auf ppar $\gamma$  2, Phosphoprotein und Kollagen II können diese Zielgene eindeutig detektiert werden. Den aus dem Fettgewebe gewonnenen Zellen kann also ein weites Differenzierungspotential bestätigt werden, ein Resultat, das mit Mambelli et al. (2009) übereinstimmt. Des Weiteren kann durch RT-PCR das Vorhandensein von CD90, CD105, Nanog und Oct4 als typische Stammzellmarker bei allen Zelllinien nachgewiesen werden. Bei den

gewonnenen, adipogenen Zellen handelt es sich somit um mesenchymale Stammzellen.

### 5.2.2. Tenogene Differenzierung in einer Pelletkultur

Morphologie: Die HE-Färbung zeigt eindrücklich, dass sowohl der Durchmesser der Pellets sehr klein ist, als auch dass Struktur und Zellverband der Pellets zum Teil sehr angegriffen sind. Trotz sehr sorgfältigen Umgangs während der Medienwechsel scheint die Kultivierung der Zellen in einer 96-Well-Platte ungeeignet zu sein. Die Zellen formen darin zwar Pellets, aber diese Pellets erreichen auch beim Einsatz von höheren Zellzahlen nur eine geringe Größe, da anscheinend in der Spitze der Wells nicht genügend Raum vorhanden ist. Diese kleinen Pellets sind viel angreifbarer durch Verwirbelungen beim Medienwechsel. Zudem zeigt sich vor allem auch in den EM-Bildern, dass die Zellen, zwar einen engen Zellverbund aufbauen können, aber dass sie trotzdem nur sehr wenig erkennbare Extrazellulärsubstanz bilden. Dies kann ein Grund für die Fragilität der Pellets sein.

Es ergibt sich eine derartige Varianz im Erscheinungsbild der Pellets, dass es kaum möglich ist eine Tendenz zwischen den Versuchsgruppen zu erkennen. Während der Medienwechsel erscheinen die Pellets, die Basismedium und GDF7 erhalten haben, etwas größer und robuster. Die Pellets der Negativkontrolle zeigen sich wesentlich fragiler. Falls weitere Versuche unter Verwendung von Pellets unternommen werden sollten, muss auf ein größeres Volumen der Pellets geachtet werden. Insgesamt sprechen die in dieser Arbeit erhobenen Befunde aber dafür, dass eine Kultivierung im Pellet für eine tenogene Differenzierung nicht unbedingt geeignet ist.

Immunhistochemie: Bei der immunhistochemischen Untersuchung mit den Antikörpern gegen Kollagen I und Kollagen III bestehen ebenfalls Schwierigkeiten auf Grund der Variationsbreite der Morphologie der Pellets. Zwischen den Versuchsgruppen lassen sich keine einheitlichen Tendenzen erkennen. Zusätzlich stellt es sich heraus, dass die Pellets bei einer Fixierung in Formalin und Paraffin keinerlei positives Ergebnis zeigen. Möglicherweise werden durch den Prozess der Fixierung die Kollagenbestandteile zu stark denaturiert. Bei der immunhistologischen

Färbung an Kryostatschnitten der Pellets kann allerdings eine spezifische Färbung für Kollagen I und Kollagen III nachgewiesen werden. Somit scheinen die Zellen beide Kollagentypen zu produzieren. Die Färbung für Kollagen I fällt sehr viel stärker aus als für Kollagen III. Unterschiede in den Versuchsgruppen sind allerdings nicht feststellbar. Dieses Ergebnis scheint ein wenig im Widerspruch zu den Werten der Real-Time PCR zu stehen. Dort scheint zum Zeitpunkt der Untersuchung, also am 21. Tag bei Versuchsende, die Produktion von mRNA für Kollagen I schwächer zu sein als für Kollagen III. Eine Erklärungsmöglichkeit wäre, dass entweder weniger mRNA für Kollagen III tatsächlich zu Protein translatiert wird oder die Produktionsmenge sich im Laufe der Zeit verändert. Außerdem kann es sein, dass die Zellen von vorneherein mehr Kollagen I synthetisieren und deswegen weniger neue mRNA exprimiert wird.

mRNA Untersuchungen: Bei der qualitativen Analyse der cDNA für Kollagen II und Tenomodulin stellt sich heraus, dass beide Zielgene nicht nachweisbar sind. Zum Zeitpunkt der mRNA Extraktion ist nicht ausreichend mRNA für Kollagen II und für Tenomodulin in den Zellen vorhanden, um sie darstellen zu können. Beide Gene werden aktuell nicht transkribiert. Das bedeutet zum einen, dass keine Differenzierung in Richtung Knorpelgewebe stattfindet, was der Zielsetzung entspricht, da eine tenogene Differenzierung angestrebt ist. Allerdings gibt es durch den fehlenden Nachweis von Tenomodulin auch keinen Hinweis auf eine fortgeschrittene Differenzierung der Stammzellen zu Tenozyten (Docheva et al. 2004, Violini et al. 2009).

Bei der quantitativen Untersuchung durch eine Real-Time PCR für Kollagen I, Kollagen III und COMP zeigt sich, dass es zwischen den Zellen der einzelnen Pferde große individuelle Unterschiede gibt. Trotzdem ergibt sich ein stimmiges Gesamtbild. Bei allen untersuchten Pferden ist die Produktion von Kollagen III bei den Versuchsgruppen mit GDF5, GDF6 und GDF7 im Vergleich zur Negativkontrolle geringgradig erhöht. Die Produktion von Kollagen I - mit einer Ausnahme-, und von COMP ist deutlich nach unten reguliert im Vergleich zur Negativkontrolle. Für COMP ist die geringere Produktion statistisch signifikant mit  $p < 0,05$ .

Dies ist ein Ergebnis, welches für das Ziel der Sehnenregeneration ungeeignet ist. Die vor allem relevante Expression von Kollagen I und COMP sollten durch die Zugabe der Wachstumsfaktoren erhöht werden und die Produktion von Kollagen III sollte zwar vorhanden sein, aber hinter der Produktion von Kollagen I zurückstehen. Zudem ist die Gesamtproduktion von mRNA für Kollagen in den Pellets im Vergleich zur Produktionsleistung der Zellen in den Kollagengelen tendenziell deutlich geringer. Dies deutet darauf hin, dass die Kultivierung der Zellen im Pellet Nachteile für ihre Stoffwechsellkapazität beinhaltet. Sie scheinen keine Reserven dafür zu haben auch Substanzen produzieren zu können, die nicht für das reine Überleben der Zellen benötigt werden und für die Extrazellulärmatrix verwendet werden können.

Gesamtbild Pellets: Die Kultivierung der adipogenen, mesenchymalen Stammzellen in Pelletform erfolgt routinemäßig für die chondrogene Differenzierung wie beispielsweise bei Ronzière et al. (2010) beschrieben. Die Pelletkultur für die tenogene Differenzierung zu nutzen ist ein neuer Ansatz, zu dem es kaum Vergleichsarbeiten gibt. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass durch die Zugabe der Wachstumsfaktoren in der Pelletkultur eher gegenteilige Effekte erwirkt werden. Die Zellen produzieren weniger COMP und auch die Produktion von Kollagen I bleibt hinter den Erwartungen zurück. Dafür ist die relative Expression von Kollagen III erhöht, was bei der Narbenbildung vor allem ein Grund für die geringere Elastizität des Gewebes darstellt.

Bei einer erneuten Überprüfung der tenogenen Differenzierung in einer Pelletkultur sollte, wie bereits erwähnt, darauf geachtet werden, dass eine ausreichende Pelletgröße erzielt wird. Weiterhin können verschiedene Konzentrationen der Wachstumsfaktoren Einsatz finden und es sollten mehrere Messzeitpunkte für die cDNA-Analyse festgelegt werden. Es wäre sinnvoll eine größere Anzahl von Pferden einzusetzen und eventuell eine Kombination der Wachstumsfaktoren zu erwägen. Jedoch scheint diese Kultivierungsform insgesamt wenig aussichtsreich.

### 5.2.3. Tenogene Differenzierung in einer Kollagengelmatrix

Morphologie: Bei der histologischen Untersuchung zeigen sich interessante Befunde. Sowohl in der HE-Färbung als auch bei der Cason-Färbung und der Pasini-Färbung modifiziert nach Walter, zeigt sich ein einheitliches Bild. Die Zellen in den Gelen, die eine mechanische Stimulation erhalten haben, richten sich streng entlang der Zugrichtung aus. Dabei ist zu bemerken, dass diese Ausrichtung sowohl die Grundmatrix des Kollagengels als auch die Zellkörper, die Zellfortsätze und sogar die Zellkerne betrifft. Die Zellen verfügen nach Stimulation über einen langgestreckten, dünnen Zellkern und über wenig, langgestrecktes Zytoplasma. Sie gleichen morphologisch Tenozyten. Bei der nicht gedehnten Kontrollgruppe behalten die Zellen ihre eher rundlichen, größeren Zellkerne und bilden sehr gut erkennbare Zellfortsätze aus, die in alle Richtungen streben. Sie strukturieren die Matrix in ihrem Umfeld neu, so dass um die Zellen herum ein strahlenförmiges, radiäres Muster entsteht. Die Faserbildung und -vernetzung in der Extrazellulärmatrix unterliegt biochemischen Gesetzmäßigkeiten, ihre Umstrukturierung wird jedoch oft durch von den Zellen abgegebene Matrix-Metalloproteasen bestimmt. Dies verdeutlicht somit die Aktivität der Zellen in der Gelsubstanz.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen die Zellen in einem eher schlechten Zustand. In jeder Abbildung sind Faseranteile vorhanden, da diese von Beginn an in den Gelen vorhanden sind. Es sind möglicherweise Hinweise auf eine vermehrte Anreicherung von Fibrillen und Mikrofibrillen um die Zellen herum zu erkennen, ein wirklicher Nachweis selbiger ist jedoch nicht möglich gewesen. Das mag zum einen dadurch begründet sein, dass die Gelproben vor der Fixierung für das TEM tiefgefroren bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert gewesen sind. Zum anderen kann es aber auch ein Hinweis darauf sein, dass die Dehnung eventuell zu stark ist und dadurch die Bildung der Fibrillen gestört wird. Orientiert an Van Griensven et al. (2005) und Kall et al. (2004) ist eine Dehnungsamplitude von 5% gewählt worden, jedoch weisen Wirth und Carls (2000) darauf hin, dass eine Dehnung von 1-3 % physiologisch ist.

Immunhistochemie: Die immunhistochemische Untersuchung wird mit einem Antikörper gegen Kollagen III durchgeführt, da die Gelgrundsubstanz bereits

Kollagen I enthält. Es zeigt sich eine deutliche Steigerung der Färbeintensität vom Versuchsbeginn am ersten Tag bis zum Versuchsende am 18.Tag. Das bedeutet, dass durch die Zellen in dieser Zeit Kollagen III produziert wird und in die umliegende Matrix eingearbeitet wird. Ein Analogieschluss zur Produktion von Kollagen I ist unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Real-Time PCR sinnvoll, da dort eine vergleichbar hohe Expression für die beiden Kollagene zu finden war.

mRNA Untersuchungen: Die qualitativen Untersuchungen durch eine RT-PCR bezüglich Kollagen II und Tenomodulin liefern das gleiche Ergebnis wie bei der Pelletkultur. Kollagen II ist bei keiner der Versuchsgruppen nachweisbar. Dies bedeutet, dass es keinen Hinweis auf eine chondrogene Differenzierung der Stammzellen gibt. Allerdings ist eine Expression von Tenomodulin ebenfalls nicht nachweisbar.

Eine Differenzierung in osteogener Richtung, wie sie durch GDF5 oder GDF6 ausgelöst werden kann (Zeng et al. 2006; Aspenberg 2007), ist nicht untersucht. In der Arbeit von Violini et al. (2009) wird gezeigt, dass bei Knochenmarksstammzellen des Pferdes in einer 2D-Kultur nach Zugabe von GDF7 (= BMP 12) Tenomodulin nachgewiesen werden kann. Bei der Kultivierung von equinen, adipogenen Stammzellen in Pelletform kann dies nicht nachvollzogen werden, die Überprüfung im Kollagengel steht noch aus, da hier ausschließlich GDF5 und GDF6 eingesetzt worden sind.

Bei der quantitativen Analyse durch eine Real-Time PCR für die Zielgene Kollagen I, Kollagen III und COMP treten verschiedene Aspekte zu Tage. Die Produktion von Kollagen I und Kollagen III scheint auf Ebene der mRNA fast gleich stark zu sein. Sie liegt im Bereich des Housekeepers Gapdh oder darüber. Die relative Menge an cDNA für Kollagen I und Kollagen III im Vergleich zum Housekeeper ist tendenziell deutlich höher als in der Pelletkultur. Möglicherweise trägt zu der stärkeren mRNA Expression für Kollagen im Gel bei, dass die einzelnen Zelle weiter auseinanderliegen und weniger direkte Zell-Zell-Kontakte bestehen, so dass die Notwendigkeit für eine Extrazellulärmatrrix besteht.

Außerdem scheint die Produktion der Kollagene durch die Zugabe der Wachstumsfaktoren stabilisiert zu werden, da die Versuchsgruppe, die ausschließlich

mechanische Stimulation erhalten hat, eher weniger davon produziert als die Negativkontrolle. Die Variationen der mRNA Expression für die Kollagene bleiben jedoch statistisch nicht signifikant ( $p > 0,05$ ).

Auf COMP scheint die Kultivierungsform im Gel positive Auswirkungen zu haben. Die Produktion ist hier deutlich höher im Vergleich mit der Produktion an spezifischer mRNA in der Pelletkultur. Dieser Unterschied erreicht mit  $p > 0,05$  keine statistische Signifikanz.

Gesamtbild Gel: Die Kultivierung der equinen, adipogenen Stammzellen in einer Kollagenmatrix erscheint vielversprechend. Die morphologische Struktur von Zellen und Gewebe entspricht bei Versuchsende den Erwartungen. Die Matrix zeigt eine gerichtete, faserähnliche Struktur und die Zellen weisen eine tenozytenartige Gestalt auf. Sie erscheinen langgestreckt, mit dünnem, zentralen Zellkern und schmalen Zellkörper und sind untereinander mit feinsten Zytoplasmaausläufern verbunden. Ferner beweisen die Zellen rege Aktivität in der Gelmatrix. Sie verändern Lage und Form, bilden Zellausläufer und Zell-Zell-Kontakte, produzieren Kollagen, strukturieren die sie umgebende Matrix konzentrisch um die Zelle herum um und können aus ihr auswandern. Darüber hinaus kontrahieren sie nach ca. 10-14 Tagen die Matrix so, dass mit bloßem Auge ein Größenunterschied erkennbar ist. Für die Zellen scheint diese Umgebung sehr passend zu sein. Die Zellen haben bei Zugabe von GDF5 oder GDF6 genug Kapazität um eine Menge an mRNA für die Kollagenbiosynthese zu produzieren, die dem Niveau des Housekeepers entspricht. Das Verhältnis von Kollagen I zu Kollagen III ist deutlich besser als bei der Kultivierung im Pellet. Ebenso wird im Gelkonstrukt im Vergleich deutlich mehr COMP produziert. Somit entspricht das Genexpressionsmuster in etwa den Erwartungen. Allerdings ist erwartet worden, dass die Produktion von Kollagen I noch deutlicher wäre.

Die Ergebnisse des Dehnungsprotokolls müssen gesondert betrachtet werden. Die alleinige Dehnung in dieser Intensität scheint eher kontraproduktiv für die mRNA Produktion zu sein. Eventuell ist die Mechanosensitivität der Zellen, die vor allem durch die Spannung der Plasmamembran über Ionenkanäle und über Integrine vermittelt wird, größer als angenommen. Allerdings erbringt vor allem die Dehnung die gewünschte morphologische Struktur von Matrix und Zellen.

In einer Folgearbeit wäre es sinnvoll Dehnungsprotokolle zu untersuchen, die eher im unteren Bereich der physiologischen Dehnungsamplitude einer Sehne liegen, um eventuelle Schädigungen der frisch gebildeten Fibrillen ausschließen zu können. Weiterhin sollten die Gele nach der Herstellung etwa eine Woche Erholungszeit bekommen, bevor die Phase der mechanischen Stimulation beginnt. Einbettung und Fixierung für die elektronenmikroskopische Untersuchung sollten direkt mit den frischen Präparaten erfolgen.

Ebenso sollte die Kombination der Wachstumsfaktoren und verschiedene Untersuchungszeitpunkte in Betracht gezogen werden (Eliasson et al. 2008; Loisele et al. 2008).

### 5.3. Ausblick

Retrospektiv betrachtet, sind vor allem die Versuche mit Zellen im Kollagengel ein lohnender Ansatz. Das Gelkonstrukt imitiert die Begebenheiten in einem Sehnenkallus und durch das Gel kann indirekt ein mechanischer Reiz auf die Zellen übertragen werden. Die morphologischen Ergebnisse zeigen sehr gute Resultate. Angelidis et al. 2010 weisen ebenfalls positive Effekte der zyklischen Dehnung auf die mechanische Belastbarkeit ihrer Konstrukte nach. In dieser Arbeit ist nicht speziell die mechanische Belastbarkeit der Gelkonstrukte geprüft worden, sondern die Auswirkungen der zyklischen Dehnung auf die Genexpression. Jedoch ist durchaus festzustellen, dass die Gelkonstrukte bei Versuchsende deutlich stabiler und elastischer sind, als bei Versuchsbeginn.

Es gibt mehrere Arbeiten, die den positiven Effekt von GDFs bei der Sehnenheilung auf die mechanische Belastbarkeit des Reparaturgewebes nachweisen (Aspenberg 2007; Tashiro et al. 2006), allerdings arbeiten diese Gruppen in vivo an Mäusen, Ratten und Kaninchen. Das bedeutet im Gegensatz zu diesem Versuchsaufbau, bei dem die Wirkung der einzelnen, isolierten Wachstumsfaktoren untersucht wird, dass der Einfluss aller weiteren Gewebefaktoren zusätzlich noch besteht. Wie schon Kumar et al. (2003) beschreiben, sind bei der Wundheilung von Bindegewebe eine

enorme Anzahl verschiedener Gewebefaktoren beteiligt, die sich zum großen Teil gegenseitig beeinflussen.

Es ist gezeigt worden, dass im Kallus einer heilenden Sehne die Expressionslevel von GDF5, GDF6, GDF7, Scleraxis, Kollagen I, Kollagen III und einigen weiteren relevanten Genen allein innerhalb der ersten 28 Tage deutlichen Schwankungen unterliegen (Eliasson et al. 2008; Loiselle et al. 2008). Insgesamt ergibt sich das Bild einer enormen Komplexität an Zusammenspiel und gegenseitiger Regulation diverser Wachstumsfaktoren, auch in zeitlicher Abstimmung. Dies ist bei der Interpretation der Ergebnisse zu beachten. In dieser Arbeit zeigt sich, dass ein einzelner Wachstumsfaktor bei dieser Versuchsanordnung und Anzahl der Proben nicht allein den durchschlagenden Effekt auf die Genexpression hat. Jedoch kann bei COMP vor allem unter Verwendung von GDF6 ein deutlicher Effekt verzeichnet werden. Ferner ist durch die immunhistochemische Färbung eine deutliche Zunahme von Kollagen III im Verlauf der Versuche zu erkennen. In zukünftigen Arbeiten sollte ein Versuch der Färbung mit Kollagen I unternommen werden. Die histologischen Färbungen zeigen eindrucksvoll den strukturierenden Effekt, den die Zellen auf ihr Umfeld haben, so dass davon ausgegangen werden kann, dass der Versuchsaufbau unter Verwendung des Kollagengels ein richtiger Ansatz ist, mit dem weitergehende Untersuchungen durchgeführt werden können.

Um die genaue Funktion der Wachstumsfaktoren im Gesamtzusammenhang des Prozesses der Sehnenheilung aufzuklären, ist die Untersuchung von Gewebe eines Sehnenkallus zu verschiedenen Zeitpunkten für die Expression vieler Wachstumsfaktoren, vor allem der GDFs, anzustreben. Sie kann Aufschluss über die zeitliche Abfolge und eventuelle Zusammenhänge der einzelnen Wachstumsfaktoren bieten. Weiterhin kann in Folgearbeiten die Expression der Zielgene Kollagen I, Kollagen III, COMP und Scleraxis im Kollagengel zu verschiedenen Zeitpunkten der Zellentwicklung analysiert werden. Auch die Kombination der Wachstumsfaktoren könnte sich positiv auf die Produktivität der Zellen auswirken und synergetische Effekte bewirken. Es sollte der Wachstumsfaktor GDF7 und Kombinationen der Wachstumsfaktoren berücksichtigt werden.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

### *Untersuchungen zur Differenzierung equiner, adipogener, mesenchymaler Stammzellen zu Tenozyten*

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es Informationen über das Differenzierungspotential von adipogenen, mesenchymalen Stammzellen des Pferdes zu Tenozyten zu gewinnen.

Methoden: Fettstammzellen von sechs Pferden unterschiedlichen Geschlechts und unterschiedlichen Alters werden in Kultur genommen. Die Versuche werden nach einer vorangegangenen Konservierung der Zellen in Stickstoff in Passage 3 durchgeführt. Bei den Versuchen bilden jeweils 250.000 Zellen ein Pellet. Die Pellets werden drei Wochen lang mit einem Basismedium aus DMEM, 10% FBS, 1% PS, Ascorbinsäuren und Prolin versorgt, dem jeweils GDF5, GDF6 oder GDF7 in einer Konzentration von 80 ng/ml Medium zugesetzt werden. Bei der Kollagenmatrix als Trägersubstanz werden pro Pferd 30 Mio. Zellen eingesetzt. Sie erhalten das gleiche Basismedium und werden ebenfalls mit GDF5 und GDF6 in einer Konzentration von 80 ng/ml Medium behandelt. Hinzu kommt außer bei der Kontrollgruppe der Aspekt der zyklischen Dehnung. Die Zellen in den Kollagengelen werden zweimal à vier Stunden pro Tag mit einer Frequenz von 30 Zyklen pro Minute und einer Amplitude von 3 mm gedehnt. Die Versuchsdauer beträgt ebenfalls drei Wochen.

Die Zellkonstrukte werden morphologisch durch Histologie und Elektronenmikroskopie untersucht. Es werden Analysen mit immunhistochemischen Methoden mit Antikörpern gegen Kollagen I und Kollagen III durchgeführt. Die cDNA wird qualitativ durch RT-PCR auf Tenomodulin und Kollagen II untersucht. Ferner wird eine quantitative Real-Time PCR durchgeführt für Kollagen I, Kollagen III und COMP.

Ergebnisse: Bei der Untersuchung der Zellen in den verschiedenen Kultivierungsformen ergeben sich folgende Befunde:

Stammzellcharakter: Die aus dem Fettgewebe der Kruppenregion gewonnenen equinen, mesenchymalen Stammzellen zeigen Stammzellcharakter. Auch nach Konservierung in Stickstoff differenzieren sie in die chondrogene, osteogene und adipogene Richtung. Der Erfolg der Differenzierung wird durch histologische Färbungen mit Alzianblau, Von-Kossa und Oli-Red-O dargestellt. Zusätzlich werden durch RT-PCR Kollagen II, Phosphoprotein und ppar  $\gamma$  2 nachgewiesen. Besonders hervorzuheben ist der Nachweis von CD90, CD105, Nanog und Oct4 als spezielle Stammzellmarker durch RT-PCR bei allen untersuchten Zelllinien.

Tenogene Differenzierung – Pelletkultur: Hierbei wird der Effekt durch die Zugabe von GDF5, GDF6 bzw. GDF7 in einer Konzentration von 80 ng/ml Medium untersucht. Bei der strukturellen Betrachtung durch eine HE-Färbung können keine reproduzierbaren Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen gefunden werden. Es besteht eine große Varianz im Erscheinungsbild der Pellets. Bei der Immunhistochemie mit Antikörpern gegen Kollagen I und Kollagen III können beide Proteine im Pellet nachgewiesen werden, jedoch sind keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen zu ermitteln. Die RT-PCR für Kollagen II und Tenomodulin ist negativ. Bei der Real-Time PCR für Kollagen I, Kollagen III und COMP zeigt sich ein einheitliches Bild mit kleineren individuellen Unterschieden. Außer bei Kollagen III, das hochreguliert erscheint, sind die übrigen zwei untersuchten Gene im Vergleich zur Negativkontrolle herunterreguliert. Dies ist für COMP statistisch signifikant mit  $p < 0,05$ . Die elektronenmikroskopischen Bilder der Pellets zeigen keine deutlich erkennbare Extrazellulärsubstanz.

Tenogene Differenzierung – Kollagengel: Die Kollagenmatrix dient zur Simulierung der dreidimensionalen Begebenheiten in der Sehne und zur Übertragung einer uniaxialen, mechanischen Stimulation von 30 Zyklen pro Minute, 3 mm Amplitude, bei einem Intervall von vier Stunden Dehnung und acht Stunden Pause auf die darin enthaltenen Zellen. Zusätzlich werden bei zwei Gruppen GDF5 bzw. GDF6 in einer Konzentration von 80 ng/ml Medium zugegeben. Bei der histologischen Untersuchung durch HE-Färbung, Pasini-Färbung modifiziert nach Walter und

Cason-Färbung zeigt sich eine deutliche Längsausrichtung der Kollagengrundsubstanz, des Zytoplasmas und der Zellkerne. Das Zytoplasma ist fein verzweigt mit vielen Zellausläufern, die Zellkerne sind spindelförmig. Bei der nicht gedehnten Kontrollgruppe kann eine Umstrukturierung der Gelsubstanz durch die Zellen dargestellt werden. Die Immunhistochemie mit Kollagen III zeigt eine zunehmende Färbung von Beginn des Versuchs bis zum Versuchsende nach drei Wochen. Die RT-PCR für Kollagen II und Tenomodulin ist negativ. Bei der Real-Time PCR zeigt sich in den Gruppen mit mechanischer Stimulation und Zugabe von GDF5 oder GDF6 für Kollagen I und Kollagen III eine Produktionsleistung in etwa auf dem Niveau des Housekeepers. Die Produktion von COMP scheint besonders durch GDF6 angeregt werden zu können. Die mRNA Produktion in der gedehnten Kontrollgruppe ist geringer als in der nicht gedehnten Negativkontrolle. Diese Auffälligkeiten sind als Tendenz zu verstehen, sie erreichen keine statistische Signifikanz mit  $p > 0,05$ .

Durch die elektronenmikroskopischen Aufnahmen lassen sich Hinweise auf Vorläuferstadien von Kollagenfibrillen darstellen.

Schlussfolgerungen: Fettstammzellen des Pferdes zeigen eindeutig Stammzellcharakter und sind geeignet zur Differenzierung in verschiedene Zellrichtungen. Sie sind widerstandsfähig, einfach zu gewinnen und robust im Handling. Die gewählte Kultivierungsform im Pellet scheint für die tenogene Differenzierung in dieser Form weniger geeignet zu sein. Die Zellen hatten Probleme einen geordneten Verband zu bilden und zeigten in der Real-Time PCR keine Ergebnisse, die auf eine Differenzierung zu Tenocyten hätten schließen lassen können. Die Kultivierungsform im Kollagengel der Firma Amedrix erscheint dagegen vielversprechender. Die Zellen vermehren sich gut, verändern Lage und Form, strukturieren die Grundsubstanz um und scheinen Mikrofibrillen zu bilden. Durch die Zugabe von GDF5 und GDF6 kann das Expressionslevel von Kollagen I und Kollagen III während des Dehnungsexperiments stabil gehalten werden, die Produktion von COMP kann sogar durch GDF6 etwas gesteigert werden. Diese Erscheinungen erreichen jedoch keine statistische Signifikanz. Die Festigkeit und

Elastizität der Gelmatrix nimmt im Laufe des Versuchszeitraums deutlich zu und in der histologischen Untersuchung können sehnenzellähnliche Morphologien der Zellen detektiert werden. Eine Differenzierung in die chondrogene Richtung kann ausgeschlossen werden, da kein Kollagen II nachweisbar ist. Allerdings kann auch kein Tenomodulin nachgewiesen werden, was ein sehr starker Hinweis für eine abschließende Differenzierung zu Tenozyten gewesen wäre.

Nach Etablierung des Versuchsaufbaus können in weiteren Untersuchungen mit verschiedenen Dehnungsprotokollen und einer Kombination der Wachstumsfaktoren zukünftig differenziertere Daten erhoben werden.

## 7. SUMMARY

### *Investigation about the differentiation of equine ASC into tenocytes*

The objective of this study was to gain information about the potential of equine adipogene mesenchymal stem cells to differentiate into tenocytes.

Methods: Adipose tissue derived stem cells were cultured from six horses of different gender and age. The experiments were carried out after cryoconservation with passage three. 250.000 cells built one pellet. The pellets were nourished for three weeks with basic medium containing DMEM, 10% FBS, 1% PS, ascorbic acid and prolin, which was supplemented with either GDF5, GDF6 or GDF7 in a concentration of 80 ng/ml medium. Into the collagen matrix as a carrier substance 30 mio cells of one horse were incorporated. Those constructs were treated with the same basic medium, which was also supplemented with GDF5 or GDF6 in a concentration of 80 ng/ml. In addition the influence of mechanical strain was investigated in comparison to the control group. The cells inside of the collagen matrix were stretched twice a day for exactly four hours. The frequency was 30 cycles per minute, the amplitude 3 mm. The duration of the experiment added up to three weeks.

The cell constructs were analyzed in regard to their morphology using histology and transmission electron microscopy. Immunohistochemistry with antibodies against collagen I and collagen III was performed. cDNA was qualitatively examined for Tenomodulin and collagen II by RT-PCR. Also a quantitative Real-Time PCR was carried out for the quantitative analysis for collagen I, collagen III and COMP.

Results: During the observation of the cells with the different methods of cultivation the following findings could be documented:

Stem cell identity: The equine mesenchymal cells gained from the fat tissue of the croup region did have a stem cell character. Even after the conservation in liquid

nitrogen they differentiated into the chondrogenic, osteogenic and adipogenic lineage. The success of the differentiation was shown by histological staining with Alcian Blue, Von-Kossa and Oil-Red-O. Additionally collagen II, Phosphoprotein and ppar $\gamma$  2 was detected by RT-PCR. Especially it has to be mentioned that the expression of CD90, CD105, Nanog and Oct4 as special stem cell markers was successfully proven by RT-PCR in all examined cell lines.

Tenogenic differentiation- pellet culture: Here the effect of the supplementation of GDF5, GDF6 and GDF7 in a concentration of 80 ng/ml medium was observed. During the structural analysis with HE staining there weren't any changes observable in between the experimental groups. But there was a big variety of the appearance of the pellets in general. The immunohistochemical staining proved both, collagen I and collagen III inside the pellets, but there were no differences detected in between the groups. The RT-PCR for collagen II and Tenomodulin was negative. The Real-Time PCR for collagen I, collagen III and COMP showed an almost uniform picture with little individual differences. Beside collagen III, which was up regulated a little, the other two analyzed genes were down regulated compared to the negative control. For COMP this was a statistical significant result with  $p < 0,05$ . The pictures of the electron microscopy showed no clearly detectible intercellular matrix.

Tenogenic differentiation- collagen gel: The collagen matrix imitated the three dimensional structure of a tendon and was used for the transmission of the uniaxial mechanical stimulation. There were 30 cycles per minute, an amplitude of 3 mm and an interval of four hours of stretching period in rotation with eight hours of rest. Additionally two groups were supplemented with either GDF5 or GDF6 in a concentration of 80 ng/ml medium. The histological analyses with HE staining, Pasini staining modified by Walter and Cason staining revealed an obvious longitudinal orientation of the collagen matrix, of the cytoplasm and of the cell nuclei. The cytoplasm had fine branches and a lot of elongations, the cell nuclei were spindle-shaped. The control group which remained unstretched showed a rearrangement of the collagen matrix. The intensity of the immunohistochemical staining with collagen III antibody was increasing during the duration of the experiment. The RT-PCR for collagen II and Tenomodulin was negative. At the quantitative level using Real-Time PCR the most considerable changes were detected for the groups with mechanical

stretching with simultaneous supplementation of GDF5 or GDF6. The production of collagen I and collagen III could be stabilized at the level of the house keeping gen. Especially GDF6 seemed to up regulate the production of COMP. The mRNA production of the stretched control group was generally lower than of the unstretched control group. Those changings reached no statistical significance with  $p > 0,05$ .

Conclusions: Adipogen tissue derived stem cells of the horse clearly showed stem cell properties and were suitable for differentiation into various cell lineages. These cells were robust, easy to withdraw and uncomplicated during the handling. The first method of cultivation in cell pellets seemed to be not very suitable for the tenogene differentiation. The cells had problems with keeping a regular united cell structure and did not reveal any specific results in the Real-Time PCR. In contrast the innovative method of cultivating the cells in the collagen matrix from the Amedrix Company seemed to be a promising approach. The cells proliferated within the collagen gel matrix, changed their position and surface and rearranged the matrix. Because of the add-on of GDF5 and GDF6 the level of Expression for collagen I and collage 3 could be stabilized. The expression of COMP was higher under GDF6 even if those results were not statistically significant. The firmness and elasticity of the collagen matrix increased during the experiment and the morphology of the cells was very tendon-cell like.

Additional experiments with cells from more different horses could be carried out in order to try out different stretching protocols and a combination of the growth factors.

## 8. LITERATURVERZEICHNIS

Ackermann PW, Salo PT, Hart DA: "Neuronal pathways in tendon healing." *Front. Biosci* 2009; 14: 5165–5187

Almarza AJ, Augustine SM, Woo SLY: "Changes in gene expression of matrix constituents with respect to passage of ligament and tendon fibroblasts." *Ann Biomed Eng* 2008 Dec; 36(12): 1927-1933

Angelidis IK, Thorfinn J, Connolly ID, Lindsey D, Pham HM, Chang J: "Tissue engineering of flexor tendons: the effect of a tissue bioreactor on adipoderived stem cell-seeded and fibroblast-seeded tendon constructs." *J Hand Surg Am.* 2010 Sep; 35(9): 1466-72

Aspenberg P: "Stimulation of tendon repair: mechanical loading, GDFs and platelets. A mini-review." *Int Orthop.* 2007 Dec; 31(6): 783-9

Aspenberg P, Forslund C: "Enhanced tendon healing with GDF5 and 6." *Acta Orthop Scand.* 1999 Feb; 70(1): 51-4

Auer JA, Stick JA: "Equine Surgery." Saunders Elsevier, Pennsylvania, 2<sup>nd</sup> Edition, 1999

Birch HL, Bailey AJ, Goodship AE: "Macroscopic 'degeneration' of equine superficial digital flexor tendon is accompanied by a change in extracellular matrix composition." *Equine Vet J* 1998; 30(6): 534-539

Burk J, Ribitsch I, Gittel C, Juelke H, Kasper C, Staszyc C, Brehm W: "Growth and differentiation characteristics of equine mesenchymal stromal cells derived from different sources." *Vet J.* 2013 Jan; 195(1):98-106

Caplan AI: "Mesenchymal Stem Cells: Cell-Based Reconstructive Therapy in Orthopedics." *Tissue Engineering* 2005; 11: 1198-1211

Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A: "Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells." *Cell* 2003; 113(5): 643–655

Chen CH, Cao Y, Wu YF, Bais AJ, Gao JS, Tang JB: "Tendon healing in vivo: gene expression and production of multiple growth factors in early tendon healing period." *J Hand Surg Am.* 2008 Dec; 33(10): 1834-42

Colleoni S, Bottani E, Tessaro I, Mari G, Merlo B, Romagnoli N, Spadari A, Galli C, Lazzari G: "Isolation, growth and differentiation of equine mesenchymal stem cells: effect of donor, source, amount of tissue and supplementation with basic fibroblast growth factor." *Vet. Res. Commun* 2009; 33(8): 811-21

Dahlgren LA.: "Fat-derived mesenchymal stem cells for equine tendon repair." *Regen. Med.* 2009; 4(6), (Suppl. 2) p14 Vet OC06

De Wreede R, Ralphs JR: "Deposition of collagenous matrices by tendon fibroblasts in vitro: a comparison of fibroblast behavior in pellet cultures and a novel three-dimensional long term scaffoldless culture system." *Tissue Eng Part A.* 2009 Sep; 15(9): 2707-15

Dines JS; Weber L, Razzano P, Prajapati R, Timmer M, Bowman S, Bonasser L, Dines DM, Grande DP: "The effect of growth differentiation factor-5-coated sutures on tendon repair in a rat model." *J Shoulder Elbow Surg* 2007; 16 (5 Suppl); S215-21

Docheva D, Hunziker EB, Fässler R, Brandau O: "Tenomodulin is necessary for tenocyte proliferation and tendon maturation." *Mol Cell Biol.* 2005 Jan; 25(2): 699-705

Dowling BA., Dart AJ, Hodgson DR, Smith RK: "Superficial digital flexor tendonitis in the horse." *Equine Vet J* 2000; 32(5): 369-378

Dyson SJ: "Medical management of superficial digital flexor tendonitis: a comparative study in 219 horses (1992-2000)." *Equine Vet J* 2004; 36(5): 415-419

Eliasson P, Andersson T, Aspenberg P: "Rat Achilles tendon healing: mechanical loading and gene expression." *J. Appl. Physiol.* 2009 Aug; 107(2): 399-407

Eliasson P, Fahlgren A, Aspenberg P: "Mechanical load and BMP signaling during tendon repair: a role for follistatin?" *Clin Orthop Relat Res.* 2008 Jul; 466(7): 1592-7

Fackelman GE: "The nature of tendon damage and its repair." *Equine Vet J* 1973; 5(4): 141-149

Fortier LA, Smith RK: "Regenerative medicine for tendinous and ligamentous injuries of sport horses." *Vet Clin North Am Equine Pract* 2008; 24(1): 191-201

Fargn E, Urdaneta AR, Barba D, Esmende S, McAllister DR: "The effects of GDF-5 and uniaxial strain on mesenchymal stem cells in 3-D culture." *Clin. Orthop. Relat. Res* 2008; 466(8): 1930–1937

Forslund C, Rueger D, Aspenberg P: "A comparative dose response study of cartilage-derived morphogenetic protein (CDMP)-1, -2 and -3 for tendon healing in rats." *Journal of orthopaedic research* 2003, 21(4): 617-621

Fu SC, Wong YP, Chan BP, Pau HM, Cheuk YC, Lee KM, Chan KM: "The roles of bone morphogenetic protein (BMP) 12 in stimulating the proliferation and matrix production of human patellar tendon fibroblasts." *Life Sci.* 2003 May 16; 72(26):2965-74

Furuya K, Nifuji A, Rosen V, Noda M: "Effects of GDF7/BMP 12 on Proliferation and Alkaline Phosphatase Expression in Rat Osteoblastic Osteosarcoma ROS17/2.8 Cells." *Journal of Cellular Biochemistry* 1999; 72: 177-180

Grassel S, Ahmed N: "Influence of cellular microenvironment and paracrine signals on chondrogenic differentiation." *Frontiers in Bioscience* 2009; 12: 4946-56

Guest DJ, Smith MR, Allen WR: "Monitoring the fate of autologous and allogenic mesenchymal progenitor cells injected into the superficial digital flexor tendon of horses: preliminary study." *Equine Vet J.* 2008 Mar; 40(2):178-81

Herpin A, Lelong C, Favrel P: "Transforming growth factor-beta-related proteins: an ancestral and widespread superfamily of cytokines in metazoans". *Dev. Comp. Immunol* 2004; 28: 461–485

Ignatius A, Blessing H, Liedert A, Kaspar D, Kreja L, Friemert B, Claes L: "Effekte mechanischer Reize auf humane osteoblastäre Zellen in einer dreidimensionalen Kollagen-Typ-I-Matrix." *Orthopädie* 2004; 33: 1386-1393

Jelinsky SA, Archambault J, Li L, Seeherman H: "Tendon-selective genes identified from rat and human musculoskeletal tissues." *J Orthop Res.* 2010 Mar; 28(3): 289-97

Jozsua L, Kannus P, Reffy A, Demel Z: "Fine structural alterations of collagen fibers in degenerative tendinopathy." *Arch Orthop Trauma Surg* 1984; 103: 47-51

Juncosa-Melvin N, Boivin GP, Gooch C, Galloway MT, West JR, Dunn MG, Butler DL: "The effect of autologous mesenchymal stem cells on the biomechanics and histology of gel-collagen sponge constructs used for rabbit patellar tendon repair." *Tissue Eng* 2006 Feb; 12(2): 369-79

Junqueira L, Carneiro J: "Histologie." Springer Verlag, Berlin, 6. Auflage, 2005

Kall S, Nöth U, Reimers K, Choi CYU, Muehlberger T, Allmeling C, Jahn S, Heymer A, Vogt PM: "Herstellung von Sehnenkonstrukten aus humanen mesenchymalen Stammzellen und einem Kollagen Typ I Gel." *Handchir Mikrochir Plast Chir* 2004; 36(4): 205–211

Kryger GS, Chong AKS, Costa M, Pham H, Bates SJ, Chang J: "A comparison of tenocytes and mesenchymal stem cells for use in flexor tendon tissue engineering." *J Hand Surg Am* 2007; 32(5): 597-605

Kumar V, Abbas AK, Fausto N: "Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease." Saunders Elsevier, Philadelphia, 8th Edition, 2003

Lapiere CH, Nusgen B, Pierard GE: "Interaction between collagen I and III in conditioning bundles organization." *Conn Tiss Res* 1977; 5: 1-29

Leppänen M, Heikkilä P, Katiskalahti T, Tulamo RM: "Follow-up of recovery of equine tendon & ligament injuries 18-24 month after treatment with enriched autologous adipose-derived mesenchymal stem cells: a clinical study." *Regen. Med.* 2009; 4(6), (Suppl.2) p21-22 *Vet OC18*

Leppänen M, Miettinen S, Mäkinen S, Wilpola P, Katiskalahti T, Heikkilä P, Tulamo RM: "Management of equine tendon & ligament injuries with expanded autologous adipose-derived mesenchymal stem cells: a clinical study." *Regen. Med.* 2009; 4(6), (Suppl. 2) p21 *Vet OC17*

Liu Z, Jia C, Han C: "Experimental study on chondrogenic differentiation of rabbit adipose-derived stem cells treated with growth differentiation factor 5." *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi.* 2009 Apr; 23(4): 483-9

Loiselle AE, Bragdon GA, Jacobson JA, Hasslund S, Cortes ZE, Schwarz EM, Mitten DJ, Awad HA, O'Keefe RJ: "Remodeling of murine intrasynovial tendon adhesions

following injury: MMP and neotendon gene expression." J Orthop Res. 2009 Jun; 27(6): 833-40

Lou J, Tu Y, Burns M, Silva MJ, Manske P: "BMP-12 gene transfer augmentation of lacerated tendon repair." Journal of Orthopaedic Research 2001; 19: 1199-1202

Lou J, Tu Y, Ludwig FJ, Zhang J, Manske PR: "Effect of bone morphogenetic protein-12 gene transfer on mesenchymal progenitor cells." Clin Orthop Relat Res. 1999 Dec; (369): 333-9

Mambelli LI, Santos EJ, Frazão PJ, Chaparro MB, Kerkis A, Zoppa AL, Kerkis I: "Characterization of equine adipose tissue-derived progenitor cells before and after cryopreservation." Tissue Eng Part C Methods. 2009 Mar; 15(1): 87-94

Marr CM, Love S, Boyd JS, McKellar Q: "Factors affecting the clinical outcome of injuries to the superficial digital flexor tendon in National Hunt and point-to-point racehorses." Vet Rec 1993; 132(19): 476-479

Merino R, Macias D, Gañan Y, Economides AN, Wang X, Wu Q, Stahl N, Sampath KT, Varona P, Hurler JM: "Expression and function of Gdf-5 during digit skeletogenesis in the embryonic chick leg bud." Dev Biol. 1999 Feb 1; 206(1): 33-45

Mikic B, Entwistle R, Rossmeier K, Bierwert L: "Effect of GDF-7 deficiency on tail tendon phenotype in mice." J Orthop Res. 2008 Jun; 26(6): 834-9

Möller HD, Evans CH, Maffulli N: " Aktuelle Aspekte der Sehnenheilung." Orthopädie, Springer Verlag 2000; 29: 182-187

Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ: "Regulatory mechanisms in stem cell biology." Cell 1997; 88: 287-298

Murchison ND, Price BA, Conner DA, Keene DR, Olson EN, Tabin CJ, Schweitzer R: "Regulation of tendon differentiation by scleraxis distinguishes force-transmitting tendons from muscle-anchoring tendons." *Development*. 2007 Jul; 134(14): 2697-708

Nixon A, Dahlgren L, Haupt JL, Yeager A., Ward DL: "Effect of adipose-derived nucleated cell fractions on tendon repair in horses with collagenase-induced tendinitis" *Am J Vet Res* 2008; 69: 928-937

O'Brien M: "Functional anatomy and physiology of tendons." *Clin Sports Med* 1992; 11(3): 505-520

Parry DAD, Barnes GRG, Craig AS: "A comparison of the size distribution of collagen fibrils in connective tissues as a function of age and a possible relationship between fibril size distribution and mechanical properties." *Proc Roy Soc London* 1978; 203: 305-321

Pool RR, Meagher DM: "Pathologic findings and pathogenesis of racetrack injuries." *Vet Clin North Am Equine Pract* 1990; 6(1): 1-30

Richardson LE, Dudhia J, Clegg PD, Smith R: "Stem cells in veterinary medicine--attempts at regenerating equine tendon after injury." *Trends Biotechnol* 2007; 25(9): 409-416

Ronzière MC, Perrier E, Mallein-Gerin F, Freyria AM: "Chondrogenic potential of bone marrow- and adipose tissue-derived adult human mesenchymal stem cells." *Biomed Mater Eng*. 2010 Jan 1; 20(3): 145-58

Schöler HR, Balling R, Hatzopoulos AK, Suzuki N, Gruss P: "Octamer binding proteins confer transcriptional activity in early mouse embryogenesis." *EMBO J* 1989; 8(9): 2551-2557

Schulze-Tanzil G, Mobasheri A, Clegg PD, Sendzik J, John T, Shakibaei M: "Cultivation of human tenocytes in high-density culture." *Histochem. Cell Biol* 2004; 122(3): 219–228

Schweitzer R, Chyung JH, Murtaugh LC, Brent AE, Rosen V, Olson EN, Lassar A, Tabin CJ: "Analysis of the tendon cell fate using Scleraxis, a specific marker for tendons and ligaments." *Development*. 2001 Oct; 128(19): 3855-66

Shen FH, Zeng Q, Lv Q, Choi L, Balian G, Li X, Laurencin CT: "Osteogenic differentiation of adipose-derived stromal cells treated with GDF-5 cultured on a novel three-dimensional sintered microsphere matrix." *Spine J*. 2006 Nov-Dec; 6(6): 615-23

Shukunami C, Takimoto A, Oro M, Hiraki Y: "Scleraxis positively regulates the expression of tenomodulin, a differentiation marker of tenocytes." *Dev Biol*. 2006 Oct 1; 298(1): 234-47

Smith RK: "Mesenchymal stem cell therapy for equine tendinopathy." *Disabil Rehabil* 2008; 30(20-22): 1752-8

Smith RK, Korda M, Blunn GW, Goodship AE: "Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment." *Equine Vet J* 2003; 35(1): 99-102

Smith RK, Zunino L, Webbon PM, Heinegård D: "The distribution of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in tendon and its variation with tendon site, age and load." *Matrix Biol*. 1997 Nov; 16(5): 255-71

Sonnichsen HV: "Tendinitis of the horse. Definition, therapy and prognosis." *Tierarztl Prax* 1975; 3(3): 315-322

Stashak TS: "Management of lacerations and avulsion injuries of the foot and pastern region and hoof wall cracks." *Vet Clin North Am Equine Pract* 1989; 5(1): 195-220

Stashak TS: "Adams` Lahmheit bei Pferden", Verlag M. & H. Schaper, Alfeld-Hannover, 4.Auflage, 2003

Stoll C, Rosen C, Endres M, Kaps C, John T, Kohl B, Ertel W, Schulze-Tanzil G: "Extracellular matrix expression in 2D and 3D cultured tenocytes compared to native tendon tissue" 104th Annual Meeting of the Anatomical Society, 27.-30.3.2009 Antwerp, Belgium, Poster no. P32

Taylor SE, Vaughan-Thomas A, Clements DN, Pinchbeck G, Macrory LC, Smith RKW, Clegg PD: "Gene expression markers of tendon fibroblasts in normal and diseased tissue compared to monolayer and three dimensional culture systems." BMC Musculoskelet Disord. 2009 Feb 26; 10: 27

Thomopoulos S, Harwood FL, Silva MJ, Amiel D, Gelberman RH: "Effect of several growth factors on canine flexor tendon fibroblast proliferation and collagen synthesis in vitro." J Hand Surg Am. 2005 May; 30(3): 441-7

Uysal AC, Mizuno H: "Tendon regeneration and repair with adipose derived stem cells." Curr Stem Cell Res Ther 2010; 5(2): 161-167

Van Griensven M, Diederichs S, Kasper C: "Mechanical strain of bone marrow stromal cells induces proliferation and differentiation into osteoblast-like cells." Topics in Tissue Engineering 2005; Volume 2. Chapter 12

Vidal MA, Kilroy GE, Lopez MJ, Johnson JR, Moore RM, Gimble JM: "Characterization of equine adipose tissue-derived stromal cells: adipogenic and osteogenic capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells." Vet Surg. 2007 Oct; 36(7): 613-22

Violini S, Ramelli P, Pisani LF, Gorni C, Mariani P: "Horse bone marrow mesenchymal stem cells express embryo stem cell markers and show the ability for

tenogenic differentiation by in vitro exposure to BMP-12." *BMC Cell Biol.* 2009 Apr 22; 10: 29

Wang QW, Chen ZL, Piao YJ: "Mesenchymal Stem Cells Differentiate into Tenocytes by Bone Morphogenetic Protein (BMP) 12 Gene Transfer." *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2005; Vol. 100, No.4, 418-422

Williams RB, Harkins LS, Hammond CJ, Wood JL: "Racehorse injuries, clinical problems and fatalities recorded on British racecourses from flat racing and National Hunt racing during 1996, 1997 and 1998." *Equine Vet J* 2001; 33(5): 478-486

Williams IF, McCullagh KG, Silver IA: "The distribution of type I and Type III collagens and fibronectin in the healing equine tendon." *Conn Tiss Res* 1984; 12: 211-227

Wilmink J, Wilson AM, Goodship AE: "Functional significance of the morphology and micromechanics of collagen fibres in relation to partial rupture of the superficial digital flexor tendon in racehorses." *Res Vet Sci* 1992; 53(3): 354-359

Wirth CJ, Carls J: "Pathologie der akuten und chronischen Sehnenverletzung." *Orthopädie* 2000; 29: 174-181

Wolfman NM, Hattersley G, Cox K, Celeste AJ, Nelson R, Yamaji N, Dube JL, DiBlasio-Smith E, Nove J, Song JJ, Wozney JM, Rosen V: "Ectopic induction of tendon and ligament in rats by growth and differentiation factors 5, 6, and 7, members of the TGF-beta gene family." *J. Clin. Invest* 1997; 100: 321-330

Yeh LC, Tsai AD, Lee JC: "Bone morphogenetic protein-7 regulates differentially the mRNA expression of bone morphogenetic proteins and their receptors in rat achilles and patellar tendon cell cultures." *J Cell Biochem.* 2008 Aug 15; 104(6): 2107-22

Young RG, Butler DL, Weber W, Caplan AI, Gordon SL, Fink DJ: "Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair." *J. Orthop. Res* 1998; 16(4): 406–413

Zeng Q, Li X, Beck G, Balian G, Shen FH: "Growth and differentiation factor-5 (GDF-5) stimulates osteogenic differentiation and increases vascular endothelial growth factor (VEGF) levels in fat-derived stromal cells in vitro." *Bone*. 2007 Feb; 40(2): 374-81

Zeng Q, Li X, Choi L, Beck G, Balian G, Shen FH: "Recombinant growth/differentiation factor-5 stimulates osteogenic differentiation of fat-derived stromal cells in vitro." *Connect Tissue Res*. 2006; 47(5): 264-70

Zhang J, Wang JHC: "Mechanobiological Response of Tendon Stem Cells: Implications of Tendon Homeostasis and Pathogenesis of Tendinopathy." Wiley Periodicals, Inc. *J Orthop Res* 2009; DOI 10.1002/jor.21046

## 9. ANHANG

### 9.1. Übersicht der verwendeten Primer

Primer	Produkt länge	For Sequenz	Rev Sequenz	Tier	Position	Locus
COL 1 A1	69 bp	GCCTCGGA GGAAACTT TGC	GCACGGAAA TTCCAGCAGA T	Pfd	461-529	XM_001499586
COL 2 A1	274 bp	GGTCCCA GAACATCA CCAC	GTCCACACCA AATTCCTGCT CAG	Pfd,	3946. 4239	- NM_001081764
COL 3 A1	83 bp	ATCTGGTG CTAATGGT GCTCCTG	GTGCTCCTG GCTCTCCTT GG	Pfd	1254 -1336	XM_001917620
CD90	113 bp	CCCGTGGG CAGAAGGT GAC	TCAGGCTGAA CTCATACTGG ATGG	Pfd	50-163	XM_001503225
COMP	96 bp	GCAGGACT CAGACAGC GATGG	GGCACCAGG CGGCAGTTG	Pfd	1362-1457	NM_001081856
GAPDH	62 bp	GCGTGAAC CACGAGAA ATATGA	GGTGGTGCA GGAGGCATT	Pfd	395-456	NM_001163856
PPAR $\gamma$ 2	180 bp	GTCTCATAA CGCCATCA GGTTTG	GCCCTCGCC TTCGCTTTG	Pfd	516-695	XM_001492411
PHPROT	133 bp	TTGGGACA GCCGTGGG AAGG	CACATCGGAA TGCTCACTGG TCTC	Pfd	564-696	XM_001496152
SCL	60 bp	ACGCCAG CCCAAACA G	TCCTTGCTCA ACTTTCTCTG GTT	Pfd	549-572	NM_001105150

TM	178 bp	ACGAGCAG TGGGTGGT CCCTCAAG	GCGGCGGCA GTAGCGGTT GC	Pfd	656-834	NM_001081822
OCT4	70 bp	GGGCAATC TGGCTGAT CTG	AGAGGCAAC CTGGAGAAC ATG	Pfd+ Hd	724-793	AB 086363
CD105	108 bp	CCGCCGCA CTGTGGTA CATCTAC	TGTGGTTGGT GCTACTGCTC TCTG	Pfd	1829-1936	XM_001500078
Nanog	197 bp	CAGTGTC CTCAGGCT CAGCAACT AC	GCTTGGGAG CACCAGGTCT GACTGTTC	Pfd	492-689	XM_001498808

## 9.2. Daten der RealTime PCR- tabellarisch

Pferd 05/09 Gel

Target	Sample	Wells	Mean Cq	Cq SD	Expression	Expression SD
Col1.3	GDF5	3	21,26	0,26333	0,78001	0,14485
Col1.3	GDF6	2	21,08	0,14174	0,65114	0,09817
Col1.3	NK	2	19,66	0,03129	1,00000	0,05175
Col1.3	NK!	3	20,27	0,24257	0,50097	0,08397
Col3	GDF5	3	21,55	0,11013	0,65144	0,05839
Col3	GDF6	3	21,12	0,10252	0,65737	0,09035
Col3	NK	3	19,81	0,21798	1,00000	0,16783
Col3	NK!	3	20,06	0,04563	0,63190	0,02159
COMP	GDF5	3	29,71	0,01759	1,96837	0,07809
COMP	GDF6	3	28,46	0,10439	3,61153	0,49754
COMP	NK	3	29,47	0,15943	1,00000	0,12573
COMP	NK!	3	29,50	0,14730	0,74503	0,08037
GAPDH	GDF5	3	22,66	0,04864		
GAPDH	GDF6	3	22,27	0,14863		
GAPDH	NK	3	21,55	0,06095		
GAPDH	NK!	3	21,20	0,00707		

## Pferd 07/09 Gel

Target	Sample	Wells	Mean Cq	Cq SD	Expression	Expression SD
Col1.3	GDF5	3	23,04	0,22030	1,34049	0,26500
Col1.3	GDF6	3	27,42	0,20665	1,51077	0,25890
Col1.3	NK	1	28,55	0,00000	1,00000	0,10960
Col1.3	NK!	2	24,97	0,09691	0,41374	0,02950
Col3	GDF5	3	22,51	0,10053	5,00337	0,73282
Col3	GDF6	3	28,08	0,11054	1,89816	0,23762
Col3	NK	3	29,44	0,08742	1,00000	0,12722
Col3	NK!	3	24,28	0,15445	1,59367	0,18609
COMP	GDF5	1	31,59	0,00000	0,82714	0,10440
COMP	GDF6	1	36,20	0,00000	0,65875	0,06248
COMP	NK	1	36,13	0,00000	1,00000	0,10960
COMP	NK!	3	32,90	0,04269	0,37391	0,01486
GAPDH	GDF5	3	23,05	0,16360		
GAPDH	GDF6	3	27,12	0,12294		
GAPDH	NK	3	27,60	0,14206		
GAPDH	NK!	3	23,26	0,03185		

## Pferd 11/09 Gel

Target	Sample	Wells	Mean Cq	Cq SD	Expression	Expression SD
Col1.3	GDF5	2	22,48	0,07855	2,23667	0,12133
Col1.3	GDF6	3	22,24	0,08510	1,14382	0,11821
Col1.3	NK	3	22,79	0,13031	1,00000	0,10871
Col1.3	NK!	1	23,77	0,00000	0,51634	0,02006
Col3	GDF5	3	25,07	0,08381	0,25525	0,01581
Col3	GDF6	3	22,21	0,20517	0,91530	0,15911
Col3	NK	3	22,42	0,23758	1,00000	0,18588
Col3	NK!	3	24,22	0,23310	0,26870	0,04745
COMP	GDF5	3	31,31	0,04056	2,85032	0,08456
COMP	GDF6	3	30,59	0,09623	2,09203	0,23087
COMP	NK	2	31,93	0,12994	1,00000	0,11292
COMP	NK!	3	32,25	0,20810	0,80460	0,12639
GAPDH	GDF5	1	23,84	0,00000		
GAPDH	GDF6	3	22,76	0,11018		
GAPDH	NK	3	23,08	0,07904		
GAPDH	NK!	3	23,10	0,05036		

## Pferd 06/09 Pellet

Target	Sample	Wells	Mean Cq	Cq SD	Expression	Expression SD
Col1.3	GDF5	3	21,46	0,18232	1,36384	0,22583
Col1.3	GDF6	3	21,40	0,09233	1,60445	0,10379
Col1.3	GDF7	3	25,17	0,19857	4,07966	0,58801
Col1.3	NK	3	22,69	0,02091	1,00000	0,04780
Col3	GDF5	3	22,09	0,18818	1,84436	0,32424
Col3	GDF6	3	22,51	0,11457	1,53620	0,13115
Col3	GDF7	3	25,79	0,13680	4,67403	0,51602
Col3	NK	3	23,65	0,08913	1,00000	0,08010
COMP	GDF5	3	30,93	0,21393	0,18587	0,03529
COMP	GDF6	3	30,54	0,10550	0,27920	0,02176
COMP	GDF7	3	34,15	0,33096	0,68780	0,16926
COMP	NK	3	29,37	0,19091	1,00000	0,14688
GAPDH	GDF5	3	20,37	0,13938		
GAPDH	GDF6	3	20,53	0,01409		
GAPDH	GDF7	2	25,12	0,05748		
GAPDH	NK	3	21,07	0,05905		

## Pferd 11/09 Pellet

Target	Sample	Wells	Mean Cq	Cq SD	Expression	Expression SD
Col1.3	GDF5	3	28,13	0,14478	0,48934	0,05074
Col1.3	GDF6	3	25,39	0,19001	0,26340	0,03926
Col1.3	GDF7	3	28,05	0,17668	0,20849	0,02562
Col1.3	NK	3	21,73	0,21847	1,00000	0,17600
Col3	GDF5	2	27,14	0,06140	1,52121	0,08066
Col3	GDF6	1	24,16	0,00000	1,11130	0,07855
Col3	GDF7	2	26,30	0,32236	1,13863	0,27179
Col3	NK	2	22,69	0,05113	1,00000	0,09816
COMP	GDF5	2	36,08	0,44951	0,04468	0,01474
COMP	GDF6	3	33,45	0,12630	0,02466	0,00287
COMP	GDF7	2	35,01	0,01425	0,03954	0,00071
COMP	NK	2	26,77	0,15347	1,00000	0,14424
GAPDH	GDF5	2	26,52	0,03554		
GAPDH	GDF6	3	23,26	0,09162		
GAPDH	GDF7	3	25,34	0,01900		
GAPDH	NK	3	21,72	0,11743		

## Pferd 71/09 Pellet

Target	Sample	Wells	Mean Cq	Cq SD	Expression	Expression SD
Col1.3	GDF5	3	29,25	0,01102	0,01975	0,00129
Col1.3	GDF6	3	25,91	0,22148	0,27691	0,04481
Col1.3	GDF7	3	26,73	0,37977	0,24904	0,06670
Col1.3	NK	1	24,72	0,00000	1,00000	0,20129
Col3	GDF5	3	26,49	0,10592	0,63744	0,06483
Col3	GDF6	3	24,32	0,10488	4,42100	0,41465
Col3	GDF7	2	26,00	0,25177	2,02042	0,39165
Col3	NK	3	26,96	0,16529	1,00000	0,23546
COMP	GDF5	2	34,37	0,66551	0,04791	0,02353
COMP	GDF6	2	32,25	0,20473	0,31473	0,04997
COMP	GDF7	2	32,75	0,47903	0,34663	0,12290
COMP	NK	2	31,30	0,06153	1,00000	0,20626
GAPDH	GDF5	3	23,69	0,08416		
GAPDH	GDF6	3	24,13	0,06845		
GAPDH	GDF7	3	24,72	0,07042		
GAPDH	NK	3	24,73	0,26091		

## Pferd 72/09 Pellet

Target	Sample	Wells	Mean Cq	Cq SD	Expression	Expression SD
Col1.3	GDF5	2	26,87	0,11867	0,70138	0,05748
Col1.3	GDF6	3	24,88	0,19320	0,75018	0,10151
Col1.3	GDF7	4	25,58	0,75283	0,53289	0,29516
Col1.3	NK	3	25,28	0,12847	1,00000	0,08873
Col3	GDF5	3	26,37	0,12758	1,20894	0,11399
Col3	GDF6	3	24,45	0,11779	1,34537	0,12095
Col3	GDF7	3	24,82	0,10672	1,18318	0,24442
Col3	NK	3	25,61	0,19242	1,00000	0,14221
COMP	GDF5	2	33,98	0,02454	0,06926	0,00124
COMP	GDF6	3	30,38	0,10673	0,26125	0,02122
COMP	GDF7	2	31,80	0,13725	0,10655	0,02298
COMP	NK	3	29,31	0,12212	1,00000	0,08932
GAPDH	GDF5	1	24,36	0,00000		
GAPDH	GDF6	2	22,66	0,02909		
GAPDH	GDF7	3	22,84	0,24748		
GAPDH	NK	1	23,39	0,00000		

### 9.3. Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien

#### 9.3.1. Gebrauchsmaterialien

chirurgische Pinzetten	Hammacher GmbH, Solingen, Deutschland
Eiswannen	Magic Touch Ice Wares, N.Y., USA
Elektrophoresekammern	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Freezing Container	NALGENE®Labware, Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dänemark
Glasgefäße	Schott AG, Mainz, Deutschland
Glaspipetten	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co.KG, Eberstadt, Deutschland
Messzylinder aus Glas	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co.KG, Eberstadt, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen , Deutschland
Pipetten	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Pipettus	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co.KG, Eberstadt, Deutschland
Röhrchengestelle	Brand GmbH + Co KG, Wertheim, Deutschland

Schutzschild Oberon Company, New Bedford, USA

Thermohandschuhe Tempshield, Inc. , Maine, USA

### 9.3.2. Chemikalien

50 bp DNA –Marker Biozym Scientific GmbH, Hessisch-

Oldendorf, Deutschland

AA, Antibiotic/ Antimycotic PAA Laboratories GmbH, Pasching,  
Österreich

ABC-Elite Kit Standard Vector Laboratories, Burlingame, England

Accutase PAA Laboratories GmbH, Pasching,  
Österreich

AEC Peroxidase Substratkit BioLogo, Kronshagen, Deutschland

Agarose Biotline, Luckenwalde, Deutschland

Alzianblau Chroma-Gesellschaft Schmid GmbH& Co,  
Stuttgart, Deutschland

a-MEM PAA Laboratories GmbH, Pasching,  
Österreich

AmpliTaq Gold DNA Polymerase Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

Anilinblau Chroma-Gesellschaft Schmid GmbH& Co,  
Stuttgart, Deutschland

Antikörper Kollagen I Biomex, Dorset, England

---

Antikörper Kollagen III	Abcam, Cambridge, England
Ascorbinsäure-2-phosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
$\beta$ -Glycerolphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Bleicitrat (Ultrastain II)	Fa. Leica-Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Borax	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Chloroform	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Collagenase I	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
DMEM low glucose	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
DMSO	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
DNase I, RNase-frei	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
DNase-Puffer	Roche Diagnostics, Indianapolis, USA
dNTP Mix (2 mM)	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Eisenalaun (Ammonium Eisen III sulfat)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Eisessig	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Eosin (Instant Eosin Aqueous)	Shandon, Frankfurt, Deutschland
Epon	Serva, Heidelberg, Deutschland

---

Ethanol, vergällt	Schmitt, Dillenburg, Deutschland
Ethanol, rein	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
FBS	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Formalin	Carl Roth GmbH+ Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Glutaraldehyd	Leica-Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Glycerin	Carl Roth GmbH+ Co KG, Karlsruhe, Deutschland Carl Roth GmbH+ Co KG, Karlsruhe, Deutschland
Hämatoxylin (Instant Hematoxylin)	Shandon, Frankfurt, Deutschland
HCl	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
IBMX	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Indomethacin	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Isopropanol/Isopropylalkohol	Carl Roth GmbH+ Co KG, Karlsruhe, Deutschland
ITS	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Kaiser's Gelatine	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Kernechtrot	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid für PCR, 25 mM	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA

---

Methanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumpyruvat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Natrium-Cacodylat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Oil Red O	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Orange G	Chroma-Gesellschaft Schmid GmbH & Co, Stuttgart, Deutschland
Orcerin	Chroma-Gesellschaft Schmid GmbH & Co, Stuttgart, Deutschland
Osmiumtetraoxid( $\text{OsO}_4$ )	Leica-Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Paraffin	Vogel, Gießen, Deutschland
Paraformaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
PBS	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
PBS (Phosphate buffered saline)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
PCR-Puffer Gold (10x)	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Phosphorwolframsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Pikrinsäurelösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Prolin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim,

---

	Deutschland
PS	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Random Hexamers, 50 mM	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Reverse Transkriptase MultiScribe®	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
RNase-Away® Reagent	Molecular BioProducts, San Diego, CA
RNase-Inhibitor (40 U/µl)	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
RNase-Inhibitor (20 U/µl)	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Säurefuchsin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Sekundärantikörper	DAKO Cytomation, Glostrup, Dänemark (Ziege-anti-Kaninchen, biotinyliert)
Sprühdesinfektion	Laboratorium Dr. Deppe, Kempen, Deutschland
Sterilium für die Hände	Bode Chemie, Hamburg, Deutschland
Sybr®Green	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
TGF- β	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Tissue Tek®	Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland

---

Tris-HCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Triton-X 100	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
TRIzol®	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Toluidinblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
Uranylacetat (Ultrastain I)	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Vitro-Clud	Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Wasserblau	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Xylol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ziegenserum	Linaris, Wertheim-Bettingen, Deutschland

### 9.3.3. Verbrauchsmaterialien

DAKO-Pen	DAKO Cytomation, Glostrup, Dänemark
Deckgläschen, verschiedene Größen	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Einfrierröhrchen, 1,5ml Schraubdeckel	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Einmalhandschuhe rotiprotect-NITRIL	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Einmalpipetten Cellstar®	Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Einmalspritzen, verschiedene Größen	B. Braun AG, Melsungen, Deutschland
Eppendorf Tubes, verschiedene Größen	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Faden, 3-0 Monocryl Ethicon	Johnson & Johnson GmbH, Neuss, Deutschland
Falcon-Röhrchen, 50ml und 15ml	SPL Lifesciences, Pocheon City, Süd Korea
Kanülen	B. Braun AG, Melsungen, Deutschland
Klingen für Mikrotom A 35	Feather, Osaka, Japan

---

Kollodiumfolie	Plano, Wetzlar, Deutschland
Kupfernetzchen	Plano, Wetzlar, Deutschland
Objektträger Superfrost®Plus	Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Objektträger SuperFrost	Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Parafilm	American National Can, Menasha, USA
PCR-Tubes	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pipettenspitzen, gestopft /ungestopft	Axygen, Inc., Union City, California, USA
Plastikpetrischale Cellstar®T	Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Skalpellklingen	Bayha GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Stahlkugelchen, Tissue Lyser 5mm	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Sterilfilter	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Stift für Zellkultur, Nalgene®Lab Marker	NALGENE®Labware, Thermo

---

	Fisher Scientific, Roskilde, Dänemark
UVette® (Einmalküvetten)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zellfilter Zellkultur, BD Falcon	BD Bioscience Discovery Labware, Bedford, USA
Zellkultur, 24-Wellplatten	Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturflaschen	Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

#### 9.4. Geräte

AC-DC Adapter SPS 2407	Conrad Elektronik SE, Hirschau, Deutschland
Autoklav	MAGV, Rabenau-Londorf, Deutschland
Bio Photometer	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland

---

Bioreaktor	Institut für Physiologie , JLU Gießen, Fachbereich Veterinärmedizin, Deutschland
Brutschrank Hera Cell 150	Thermo Fischer Scientific GmbH, Bremen, Deutschland
CFX96™ Real-Time System	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Einbettgerät Leica EG 1160	Leica, Solms, Deutschland
Eismaschine AF 10	Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, Irland
Elektrophoresegerät Power Pac tm Basic	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Elektronenmikroskop EM 109	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Entwässerungsgerät Leica TP 1050	Leica, Solms, Deutschland
Feuchte Kammer	Kreatech Diagnostics, Amsterdam, Niederlande
Gefriermikrotom Kryostat 2800 Frigocut-E	Reichert-Jung, Nussloch, Deutschland
Gefrierschrank, -20°C	Liebherr, Kempten, Deutschland
Gefrierschrank, -80°C	

---

Heizplatte Heidolph MR3003	MAGV, Rabenau-Londorf, Deutschland
Kühlschrank	Liebherr, Kempten, Deutschland
Kühlzentrifuge Mikro 220R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Laborwaage PB 3002-S Delta Range®	Mettler, Toledo, Spanien
Laborwaage Discovery	Ohaus, Bad Hersfeld, Deutschland
Lichtmikroskop Leica DM LB	Leica, Solms, Deutschland
Magnetrührer IkaMAG®RET	Janke&Kunkel GmbH & Co KG, Staufen, Deutschland
Mikroskop Olympus BH-2	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Mikroskop Type 090-135.006	Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Deutschland
Mikroskop Axiophot	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Mikrotom MICROM HM 400	Microm International GmbH, Walldorf, Deutschland
Mikrowelle Privileg 8520	Electrolux Hausgeräte Vertriebs GmbH, Nürnberg, Deutschland

---

pH-Elektrode SenTix 41	WTW GmbH, Weilheim, Deutschland
Rüttler Polymax 1040	Heidolph, Kelheim, Deutschland
Schlittenmikrotom Leica SM 2000 R	Leica, Solms, Deutschland
Schüttler IKA-Vibrax-VXR	IKA-Werke, Staufen, Deutschland
Sterilbank HERAsafe	Heraeus über MAGV, Rabenau-Londorf, Deutschland
Sterilisator Heraeus	MAGV, Rabenau-Londorf, Deutschland
Stickstofftank Locator JR. Plus	Thermo Fischer Scientific GmbH, Bremen, Deutschland
Thermocycler DANN Engine®	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Tissue Lyser LT	Qiagen, Hilden, Deutschland
Transilluminator UVsolo	Biometra®, Göttingen, Deutschland
Trockenschrank	Memmert, Schwabach, Deutschland
Ultracut	Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Deutschland

---

Vortexer REAX control	MAGV, Rabenau-Londorf, Deutschland
Wasserbad	Memmert, Schwabach, Deutschland
Wasserbad Paraffinschnitte Typ 1052	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
Wipptisch WT16	Biometra®, Göttingen, Deutschland
Zeitschaltuhr HBT 100	Brennenstuhl GmbH & Co KG, Tübingen, Deutschland
Zentrifuge Heraeus Megafuge 11R	Thermo Fischer Scientific GmbH, Bremen, Deutschland
Zentrifuge MIKRO 120	Hettich über MAGV GmbH, Rabenau-Londorf, Deutschland
Zentrifuge MIKRO 22R	Hettich über MAGV GmbH, Rabenau-Londorf, Deutschland

## 9.5. Software und Internet

BioEdit 7.0 sequence alignment editor	Tom Hall, Ibis Therapeutics, CA, USA
BeaconDesigner™	Premier Biosoft International, Palo Alto, CA, USA
CFX96™ Manager Software Version 1.6	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
OligoExplorer 1.5	Gene Link, Hawthorne, NY, USA
AnalySIS	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Mikrosoft Office 2010	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland
<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed">www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed</a>	
<a href="http://www.google.de">www.google.de</a>	
<a href="http://www.sigmaaldrich.com">www.sigmaaldrich.com</a>	
<a href="http://www.wikipedia.de">www.wikipedia.de</a>	

## 10. Danksagung

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Dr. Arnhold für die Überlassung und Anleitung dieses interessanten Themas. Ebenso danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Materialien.

Mein Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe für interessante Gespräche, Anregungen, Einarbeitung und gegenseitige Hilfe. Besonders möchte ich Frau Sigrid Kettner danken für ihre Hilfe bei der Elektronenmikroskopie.

Ebenso vielen Dank an alle Mitarbeiter des Instituts für Anatomie-, Histologie- und Embryologie.

Vielen herzlichen Dank an alle Doktoranden des Instituts für die Hilfsbereitschaft und die freundschaftliche Atmosphäre. Ganz besonderen Dank an Frau Christine Reich für ihre unermüdliche Geduld, ihre enorme Kompetenz und Hilfsbereitschaft.

Ich möchte der Firma Amedrix danken für die reibungslose Zusammenarbeit und vor allem für die Bereitstellung der Kollagenmatrix.

Ein großes Dankeschön geht an den Schlachthof in Gießen und an Herrn Simon für die Hilfe bei der Probengewinnung.

Mein Dank gilt auch besonders Herrn Gerd Herber, Werkstattleiter des Instituts für Physiologie, ohne den die Entwicklung und der Bau des Bioreaktors nicht möglich gewesen wären.

Vielen lieben Dank an meinen Vater für die emotionale und finanzielle Unterstützung, an meine Freunde und an Merhan.

## 11. Erklärung

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe.

Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten 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.

Schöllkrippen, den 09.12.2012