

**Aus dem Institut für Biomedizinische Technologien  
Lehrstuhl für Angewandte Medizintechnik  
Lehr- und Forschungsgebiet TissueEngineering & Biomaterialien  
Leiter Univ.-Prof. Dr. med. S. Jockenhövel**

**Online-Marker der Gewebsentwicklung im Kardiovaskulären Tissue  
Engineering**

**Evaluierung von Tropoelastin als Online-Marker der  
Extrazellulärmatrix-Synthese im Kardiovaskulären  
Tissue Engineering**

Von der Medizinischen Fakultät  
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen  
zur Erlangung des akademischen Grades  
einer Doktorin der Medizin  
genehmigte Dissertation

vorgelegt von  
Duy Viet Anh Nguyen  
aus Viersen

Berichter:     Herr Universitätsprofessor  
                   Dr. med. Stefan Jockenhövel  
  
                   Frau Professorin  
                   Dr. med. Benita Hermanns-Sachweh

Tag der mündlichen Prüfung: 12. November 2013

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Grundlagen des Tissue Engineerings</b>	<b>2</b>
2.1.	Geschichte des Tissue Engineerings	3
2.2.	Definition des Begriffs Tissue Engineering	4
2.3.	Allgemeine Prinzipien des Tissue Engineerings	5
2.3.1.	Zellen im Tissue Engineering	6
2.3.2.	Scaffolds im Tissue Engineering	7
2.3.3.	Bioreaktoren im Tissue Engineering	8
<b>3.</b>	<b>Die Extrazelluläre Matrix (EZM)</b>	<b>10</b>
3.1.	Komponenten der EZM	10
3.1.1.	Kollagene	10
3.1.1.1.	Prokollagenbiosynthese	11
3.1.2.	Glykosaminoglykane und Proteoglykane	14
3.1.2.1.	Biosynthese von GAGs und Proteoglykanen	14
3.1.2.2.	Funktionen von GAGs und Proteoglykanen	15
3.1.3.	Nichtkollagene Glykoproteine	18
3.1.3.1.	Fibronektin	18
3.1.3.2.	Laminin	19
3.1.4.	Elastische Fasern	20
3.1.4.1.	Das Elastin-Gen	21
3.1.4.2.	Tropoelastin	21
3.1.4.3.	Tropoelastin-Biosynthese	22
3.1.4.4.	Regulation der Tropoelastin-Expression	23
3.1.4.5.	Zusammenlagerung zur Elastischen Faser	23
3.1.4.6.	Koazervation	25
3.2.	Bedeutung der EZM für das Tissue Engineering	26
3.3.	Quantitative und qualitative Erfassung der EZM-Bildung	26
<b>4.</b>	<b>Zielsetzung der Dissertation</b>	<b>29</b>
<b>5.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>31</b>
5.1.	Grundlagen für Zellkulturmedien	31
5.1.1.	Verwendetes Zellkulturmedium in der Proliferationsphase	31
5.1.2.	Bioreaktormedium in der Fibringel-Phase	32
5.2.	Zellkultur	32
5.2.1.	Anlage von Primärkulturen aus humanen Nabelschnurarterien	32
5.2.2.	Subkultivierung in Zellkulturflaschen	34
5.2.3.	Kryokonservierung der Myofibroblastenkulturen	35
5.3.	Nutzung von Fibringel als Scaffold	36
5.3.1.	Komponenten des Fibringels	37
5.4.	Herstellung der Fibringele	41

5.4.1.	Herstellung der Fibrinogen-Lösung	42
5.4.2.	Vorbereitung der zusätzlichen Fibringel-Komponenten	43
5.4.3.	Gießen der Fibringele	43
5.5.	Statische Kultivierung der Fibringele, Probenentnahme und -lagerung	44
5.6.	Messung des Elastingehalts mit dem Fastin™ Assay	45
5.6.1.	Vorbereitung der Fibringelproben und der Positivkontrolle	45
5.6.2.	Durchführung des Fastin™ Assays	46
5.7.	Messung der Reißfestigkeit der Fibringele mit dem Burst Strength-Test	48
5.8.	Histologische Analyse der Fibringele	48
5.8.1.	Herstellung fixierter Fibringele und Mikrotomschnitte	48
5.8.2.	Histologische Färbungen	49
5.8.2.1.	HE-Färbung	50
5.8.2.2	Immunhistologische Färbungen	50
5.9.	Statistische Auswertung	52
<b>6.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>53</b>
6.1.	Erstellung der Standardkurve zum Fastin™ Assay	53
6.2.	Tropoelastingehalt im Medium	54
6.3.	Elastingehalt im Fibringel	57
6.4.	Korrelation von Tropoelastin im Medium und Elastin im Fibringel	58
6.5.	Mechanische Reißfestigkeit der Fibringele	59
6.6.	Histologie und Immunhistologie	60
<b>7.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>65</b>
7.1.	Beurteilung des Tropoelastingehalts im Medium im Zusammenhang mit dem Elastingehalt im Fibringel	65
7.2.	Beurteilung der ermittelten mechanischen Reißfestigkeit der Fibringele	71
7.3.	Histologische und immunhistologische Analyse der Fibringele	71
7.4.	Bewertung des Fastin™ Assay	72
<b>8.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>74</b>
<b>9.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>76</b>
<b>10.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>77</b>
<b>11.</b>	<b>Anhang</b>	<b>78</b>
11.1	Messwerttabellen	78
11.1.1.	Tropoelastin-Konzentration im Medium	78
11.1.2.	$\alpha$ -Elastin-Konzentration im Fibringel	79
11.1.3.	Mechanische Reißfestigkeit der Fibringele	79
11.2	Eigene Publikation	80
<b>12.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>81</b>
<b>13.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>91</b>
<b>14.</b>	<b>Erklärung § 5 Abs. (1) zur Datenaufbewahrung</b>	<b>92</b>
<b>15.</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung gemäß § 5 Abs. (1) und § 10 Abs. (3) 12. der Promotionsordnung</b>	<b>93</b>

## **1. Einleitung**

Der Begriff Tissue Engineering beschreibt einen interdisziplinären Ansatz zur Verbesserung oder Wiederherstellung einer eingeschränkten Funktion bei Patienten mit pathologisch veränderten Geweben oder Organen. An diesem aufstrebenden, verhältnismäßig jungen Ansatz der Domäne der Regenerativen Medizin sind neben Ärzten auch Biologen, (Bio)Chemiker, Biotechnologen, Ingenieure, Materialwissenschaftler und viele andere beteiligt. Nur die erfolgreiche Zusammenarbeit zwischen diesen Disziplinen wahrt langfristig die Chance, bisher vorhandene Probleme verschiedener Art bezüglich der Implantation von synthetischen, medizinischen Unterstützungssystemen oder gar der Organtransplantation durch den Einsatz der Regenerativen Medizin zu überwinden, und in vielerlei Hinsicht zu einer Verbesserung der Lebensqualität des Patienten zu führen.

Ausgehend von einer Zellspende des späteren Empfängers wird in verschiedenen Schritten das zu ersetzende Gewebe oder Organ „tissue engineert“, um im Anschluss in den Patienten implantiert zu werden. Doch die Möglichkeiten zu untersuchen, inwieweit das tissue engineerte Gewebe ausgereift ist, um den richtigen Zeitpunkt zur Implantation festzulegen, sind begrenzt. Die Anfertigung von histologischen Präparaten beispielsweise hat immer zur Folge, den aktuellen Reifungsprozess zu stoppen, auch wenn das Gewebe womöglich noch nicht den benötigten Reifegrad erlangt hat.

Ganz entscheidend für die Reife eines Gewebes ist nicht nur der Zustand der Zellen, sondern vielmehr der Entwicklungsgrad der Extrazellulären Matrix (EZM), welche die Zellen umgibt und einen entscheidenden Beitrag zu Form, mechanischer Integrität und den biochemischen Eigenschaften des tissue engineerten Gewebes leistet.

Gegenstand dieser Dissertation ist es, das Potential von Tropoelastin als Zellkulturmedium-Marker für die Synthese von Elastin, einem der wesentlichen strukturgebenden Bestandteile der EZM im Kardiovaskulären Tissue Engineering, zu evaluieren. Dabei ist das Ziel, eine neue Möglichkeit zur nicht-destruktiven, „online“-Überwachung der EZM-Synthese aufzuzeigen, mit welcher der Reifegrad des entstehenden Konstrukts im Sinne einer beständigen Qualitätskontrolle ermittelt und der optimale Implantationszeitpunkt bestimmt werden kann.

## **2. Grundlagen des Tissue Engineerings**

Die therapeutischen Möglichkeiten in der Behandlung von erkrankten, beschädigten oder in anderer Art und Weise beeinträchtigten Geweben und Organen bei Patienten reichen von rekonstruktiven chirurgischen Verfahren, dem Einsatz von implantierbaren oder extrakorporalen medizinischen Unterstützungssystemen bis hin zum kompletten Ersatz eines Organs durch eine Organtransplantation. Das Ziel dabei ist es, die natürliche Funktion von Geweben und Organen zu erhalten, zu unterstützen oder wiederherzustellen. Trotz der vielen Verbesserungen und Fortschritte sowohl in den rekonstruktiven chirurgischen Verfahren als auch in der Anwendung von implantierbaren oder extrakorporalen medizinischen Unterstützungssystemen kann die Struktur und Funktion des natürlichen Gewebes bei einem Ersatz durch oben genannte Mittel nicht vollständig wiederhergestellt werden. Darüber hinaus birgt das Einbringen von Fremdmaterial in den menschlichen Organismus Risiken im Sinne einer erhöhten Abstoßungs-, Infektions- und Thrombosegefahr, sodass häufig eine lebenslange Einnahme von Immunsuppressiva und Antikoagulanzen notwendig wird. Allogene Gewebe- und Organtransplantationen stellen, nicht zuletzt aufgrund der Verbesserung chirurgischer Techniken und der Optimierung immunsupprimierender Behandlungsregime, eine Alternative zu den oben genannten Verfahren dar. Doch auch diese Therapieverfahren weisen eine bedeutende Limitation auf: In Zeiten einer alternden Gesellschaft steigt die Zahl der chronisch multimorbiden Patienten stetig an, sodass die Zahl der Patienten, die ein Transplantat benötigen, bei Weitem die Anzahl der zur Verfügung stehenden Spendegewebe/-organe übersteigt.

Eine Lösungsmöglichkeit zur Beseitigung des Gewebe- und Organmangels stellt der Bereich des Tissue Engineerings dar. Hier besteht grundsätzlich die Möglichkeit, beliebige Gewebe oder Organe aus Zellen des zukünftigen Empfängers herzustellen, die die Bedingungen eines idealen Transplantats erfüllen. Dazu zählen Biokompatibilität, mechanische Integrität, Langlebigkeit, Fähigkeit zum Wachstum und Resistenz gegenüber Infektionen.

## **2.1. Geschichte des Tissue Engineerings**

In den frühen Anfängen des Tissue Engineerings standen Zell- und Gewebekultur-basierte Ansätze im Vordergrund.

W.T. Green, ein Kinderorthopäde des Boston Children`s Hospital, führte Anfang der 1970er Jahre mehrere Versuche zur Generierung neuen Knorpelgewebes durch, indem er Knochen-Spiculae mit kultivierten Chondrozyten besiedelte. Obwohl dieses Experiment nicht zum gewünschten Erfolg führte, stellte Green ein theoretisches und praktisches Konzept auf, welches die Besiedelung von geeigneten Stützgerüsten, sogenannten Scaffolds, mit lebenden Zellen beschrieb.

Einige Jahre später wurde dieser Ansatz von J. Burke vom Massachusetts General Hospital und I. Yannos vom M.I.T. aufgegriffen mit dem Ziel, ein Hautsubstitut zur Deckung von Brandverletzungen durch die Kultivierung von dermalen Fibroblasten auf einem Kollagen-Scaffold herzustellen. Weitere Versuche, die man prospektiv bereits der neu aufstrebenden Domäne des Tissue Engineerings zurechnen konnte, thematisierten die Transferierung von mit Keratinozyten besiedelten Hautinseln durch Howard Green oder die Besiedelung eines Kollagen-Scaffolds mit Fibroblasten durch Eugene Bell.

Wahrscheinlich aber war der Schlüsselmoment für die Geburtsstunde dieses neuen Bereiches Mitte der 1980er Jahre die Idee der beiden eng miteinander kooperierenden Kollegen Joseph Vacanti vom Boston Children`s Hospital und Robert Langer vom M.I.T.: sie konzentrierten sich darauf Scaffolds zu produzieren, die auf das jeweilige Zielgewebe abgestimmt sind, um diese in einem zweiten Schritt mit geeigneten Zellen zu besiedeln. Dieser Ansatz hob sich also von den zuvor verfolgten Ansätzen ab, weil hier der Fokus nicht auf der Verwendung von verfügbaren, natürlich vorkommenden Scaffolds lag, deren physikalische und chemische Eigenschaften nicht mehr verändert werden konnten (Vacanti 2006).

Es dauerte nicht lange, bis sich Forschungsgruppen auf der ganzen Welt diesem vielversprechenden neuen Bereich des Tissue Engineerings anschlossen. Im Jahre 1994 wurde die Tissue Engineering Society (TES) von den Brüdern Charles und Joseph Vacanti in Boston gegründet, im Jahre 2000 als europäisches Korrelat dazu die European Tissue Engineering Society (ETES) von Stark und Horch in Freiberg.

In den letzten Jahren wurde die TES um den Bereich der Regenerativen Medizin erweitert, sodass sich der Name der Tissue Engineering Society (TES) in Tissue Engineering Regenerative Medicine International Society (TERMIS) änderte.

## **2.2. Definition des Begriffs Tissue Engineering**

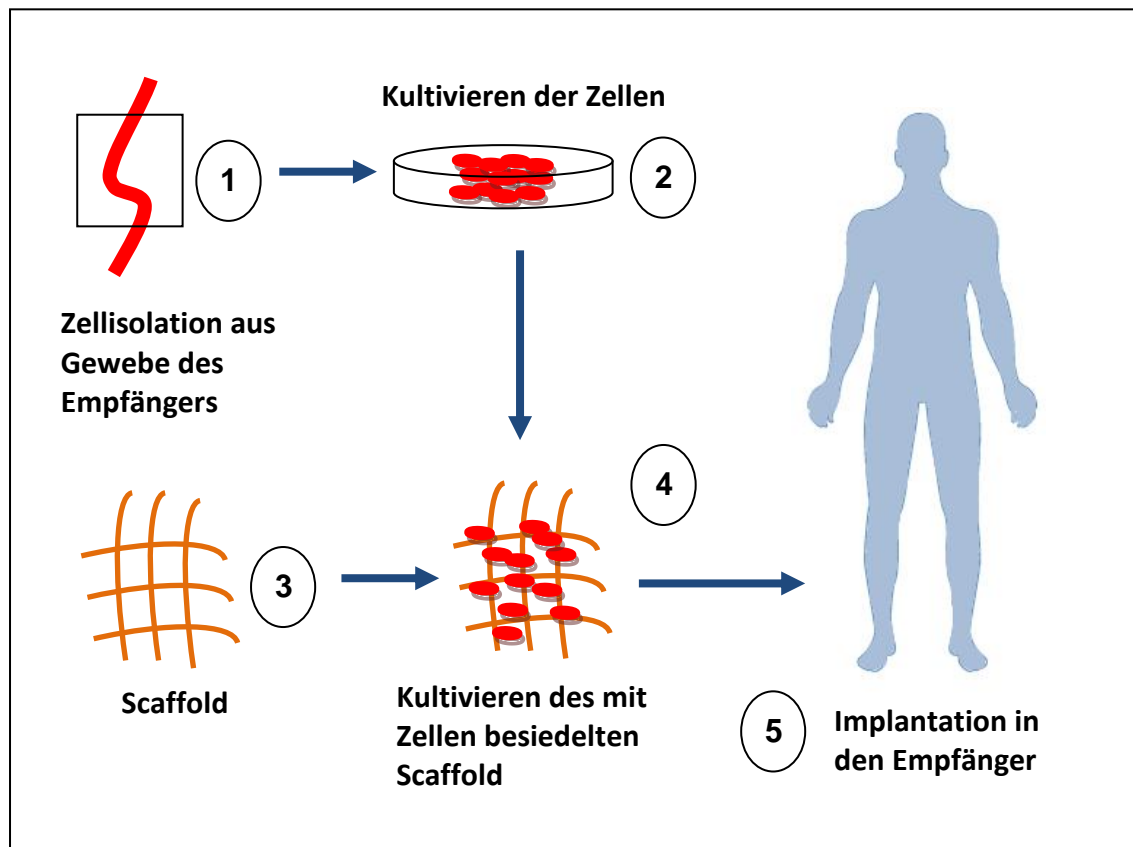
Der 1993 in dem Journal *Science* veröffentlichte Artikel der Dres. Joseph Vacanti und Robert Langer gibt eine bis heute gültige und meistzitierte Definition für die neue wissenschaftliche Domäne des Tissue Engineerings wieder:

„Tissue engineering is an interdisciplinary field that applies the principles of engineering and the life sciences towards the development of biological substitutes that restore, maintain, or improve tissue function“ (Langer & Vacanti 1993).

Das Tissue Engineering wird demnach als ein interdisziplinärer Ansatz zur Entwicklung biologischer Substitute zur Reparatur, Erhaltung und Wiederherstellung der Funktion von Geweben beschrieben.

### 2.3. Allgemeine Prinzipien des Tissue Engineerings

Das folgende Schema fasst im Wesentlichen die Prinzipien des Tissue Engineerings zusammen.



**Abbildung 1: Prinzipien des Tissue Engineerings**

Das Prinzip des Tissue Engineerings beginnt mit der Isolierung von vornehmlich körpereigenen (autologen) Zellen des zukünftigen Empfängers mit Hilfe einer Gewebsbiopsie (1). Durch die Verwendung von autologen Zellen wird das Risiko einer möglichen immunologischen Abstoßungsreaktion minimiert. Die gewonnenen Zellen werden üblicherweise unter definierten Bedingungen so lange kultiviert, bis die gewünschte Zellzahl und Zellpassage erreicht wird (2). Die Zellen werden dann auf den Scaffold übertragen, der aus unterschiedlichen Substanzen aufgebaut sein kann (3). Dieser mit vitalen Zellen besiedelte Scaffold wird in einem sogenannten Bioreaktor unter kontrollierten Wachstumsbedingungen kultiviert. Hierbei ist es möglich durch variable Stimuli den Wachstums- und Entwicklungsprozess zu beeinflussen (4). Das entstehende vitale biologische Konstrukt wird dann dem Empfänger, der in diesem Fall auch gleichzeitig Spender der Zellen gewesen ist, implantiert (5). Im optimalen Fall wird die Entwicklung des erstellten Konstrukts nun *in vivo* fortgesetzt. Dort unterliegt



es weiteren Reparatur- und Umbauprozessen des Körpers, sodass am Ende die Funktion des zu ersetzenden Gewebes vollständig übernommen werden kann.

### **2.3.1. Zellen im Tissue Engineering**

Für das Tissue Engineering kommen verschiedenste Zellquellen in Betracht. Zum einen muss unterschieden werden zwischen der Gewinnung von autologen Zellen aus dem Patienten und der Verwendung allogener Zellen eines Spenders gleicher oder xenogener Zellen eines Spenders einer anderen Spezies. Zwar kommen im Tissue Engineering insbesondere aufgrund der fehlenden Abstoßungsreaktion autologe Zellen zur Anwendung, jedoch stößt diese Methode häufig besonders dann an ihre Grenzen, wenn die Patienten bereits fortgeschrittenen Alters sind oder multiple Vorerkrankungen aufweisen (Heath 2000). Die Verwendung autologer Zellen ist dennoch die Methode der Wahl, denn allogene oder xenogene Zellen bergen zusätzlich neben dem Nachteil der eingeschränkten Verfügbarkeit Risiken, wie z.B. die Übertragung von Infektionen (Perico *et al.* 2002).

Neben der Unterscheidung der Zellen nach ihrem Spenderorganismus können diese des Weiteren nach dem Grad ihrer Differenzierung eingeteilt werden. Pluripotente Embryonale Stammzellen, die aus der Inneren Zellmasse (ICM) eines Embryos im Blastozystenstadium vor der Implantation gewonnen werden, erscheinen deshalb attraktiv, weil sie in der Lage sind, sich in Derivate aller drei Keimblätter (Endoderm, Mesoderm und Ektoderm) sowie in Zellen der Keimbahn zu differenzieren und *in vitro* im undifferenzierten Zustand unbegrenzt zur Proliferation angeregt werden können (Thomson *et al.* 1998). Trotz dieser hervorragenden Eigenschaften ist die Verwendung embryonaler Stammzellen nicht uneingeschränkt zu empfehlen, da in Versuchen mit Mäusen gezeigt wurde, dass undifferenzierte Stammzellen onkogenes Potential in sich bergen und zu Teratomen oder Teratokarzinomen heranreifen können (Solter & Gearhart 1999). Während Embryonale Stammzellen nur im frühen Embryonalstadium vorhanden sind, existieren multipotente Adulte Stammzellen im Organismus ab dem Zeitpunkt nach der Geburt ein Leben lang. Sie haben bereits einen gewissen Grad der Differenzierung erreicht, sind aber dennoch in der Lage, sich in mehrere verschiedene Zelltypen weiter zu differenzieren. Entgegen der Auffassung, dass Adulte Stammzellen nur in den Geweben zu finden sind, die eine hohe Teilungsfähigkeit besitzen, können sie in fast allen Organen identifiziert werden. Als wichtige Vertreter sind vor allem

Hämatopoetische Stammzellen und Mesenchymale Stammzellen zu nennen, welche aus dem Knochenmark oder aus Nabelschnurblut gewonnen werden können (Poulsom *et al.* 2002). Da Adulte Stammzellen aus dem Individuum entnommen werden können, welches auch letztendlich die Therapie benötigt und im Gegensatz zu Embryonalen Stammzellen sicherer einzustufen sind in Bezug auf die Kanzerogenität (Raff 2003), stellen sie neben unipotenten Zellen, die bereits regelhaft Verwendung finden, eine vielversprechende Quelle für die Nutzung im Tissue Engineering dar.

Eine weitere, aussichtsvolle Zellquelle stellen induzierte Pluripotente Stammzellen dar. Dabei handelt es sich um unipotente, somatische Zellen, die *in vitro* zu Pluripotenten Stammzellen durch Transfektion mit entsprechenden Pluripotenzgenen wie Oct4, Sox2, Klf4 und dem Proto-Onkogen cMyc über einen viralen Vektor umprogrammiert werden (Hochedlinger & Plath 2009). Die Vorstellung dieses Verfahrens durch Yamanaka *et al.* im Jahr 2007 zog natürlich auch die Aufmerksamkeit einiger Tissue Engineering-Arbeitsgruppen auf sich (Takahashi *et al.* 2007). Xie *et al.* erzielten beispielsweise bereits gute Ergebnisse bei der Herstellung von Blutgefäßen auf der Basis induzierter Pluripotenter Stammzellen (Xie *et al.* 2011). Jedoch erlaubt die gegenwärtige Studienlage noch keine klinischen Studien am Menschen, da Fragen nach der Sicherheit der umprogrammierten Zellen noch weitergehend geklärt werden müssen (Robbins *et al.* 2010).

### **2.3.2. Scaffolds im Tissue Engineering**

Als Scaffold oder auch Matrix wird im Tissue Engineering eine Struktur bezeichnet, welche als Wachstumsschiene für die Zellen den Prozess der Gewebsneubildung unterstützt. Die Anforderungen an einen idealen Scaffold sind hoch (Hutmacher 2001): Er sollte eine Oberfläche besitzen, auf der Zellen gut anhaften und wachsen können. Durch eine hohe Porosität sollten Zell-Zell-Kontakte, das Einwachsen der Zellen in das Innere des Scaffolds, die Vaskularisation und ausreichend Raum für die Bildung von neuer EZM gewährleistet sein. Der Scaffold selbst oder seine Abbauprodukte dürfen im Organismus weder inflammatorische noch toxische Reaktionen auslösen. Sein Abbau sollte regulierbar sein; im Idealfall sollte er im gleichen Maße abgebaut werden wie neues, vitales Gewebe entsteht. Darüber hinaus sollte die Möglichkeit bestehen, den Scaffold verschiedenförmig und -groß zu produzieren.

Als Scaffoldmaterialien eingesetzt werden neben Keramiken verschiedene synthetische Polymere, zu denen aliphatische Polyester wie Polyglycolic acid (PGA), Polylactic acid (PLLA), ihre Copolymere (zum Beispiel PLGA) und Polycaprolactone (PCL) gehören (Agrawal *et al.* 2000).

Auch natürlich vorkommende Polymere wie zum Beispiel Kollagen und Fibrin finden als Hydrogel-Scaffolds neben dezellularisierten Matrices im Tissue Engineering ihren Einsatz (Lee & Mooney 2001).

### **2.3.3. Bioreaktoren im Tissue Engineering**

Neben geeigneten Zellen und Scaffolds werden im Tissue Engineering Behälter benötigt, in denen die Kultivierung des Zell-Scaffold-Konstrukts stattfinden kann. Bioreaktoren werden im Allgemeinen definiert als Behältnisse, in denen biologische und/oder biochemische Prozesse unter streng kontrollierten Umgebungsbedingungen stattfinden können (Martin *et al.* 2004). Im Tissue Engineering werden Bioreaktoren dazu eingesetzt die physiologischen Konditionen im Organismus nachzuahmen um damit das Zell- und Gewebewachstum *in vitro* zu unterstützen. Die Parameter, die Einfluss auf die Gewebsentwicklung ausüben, umfassen unter anderem die Temperatur, den pH- Wert, mechanische Stimuli und biochemische Gradienten (Bilodeau & Mantovani 2006). Die Anpassung des Bioreaktors an das herzustellende Gewebe ist dabei von grundlegender Bedeutung (Griffith & Naughton 2002).



Abbildung 2: Kultivierung eines mit Zellen besiedelten Scaffolds im Bioreaktor

### **3. Die Extrazelluläre Matrix (EZM)**

Die EZM ist definiert als die Gesamtheit aller Makromoleküle, die sich zwischen den Zellen im sogenannten interzellulären Raum befindet. Sie setzt sich zusammen aus einer Reihe von Proteinen und Polysacchariden, die hauptsächlich von (Myo-) Fibroblasten, Chondroblasten, Osteoblasten, Endothelzellen und glatten Muskelzellen produziert werden. Weitere Bestandteile der EZM stellen Wasser und Elektrolyte dar. Sie unterliegt einem ständigen Remodeling-Prozess, an dem verschiedene Enzyme, unter anderem Serinproteasen und Mitglieder der Familie der Matrix-Metalloproteinasen, beteiligt sind. Dieser dynamische Auf- und Abbau der EZM, gesteuert durch mechanische und biologische Stimuli, reguliert die Zellproliferation, -differenzierung und -migration und bestimmt die strukturellen und funktionellen Eigenschaften verschiedener Gewebe.

In Bezug auf das Tissue Engineering ist es notwendig, grundlegende Kenntnisse in Bezug auf die einzelnen Komponenten der EZM, ihrer Zusammensetzung in den jeweiligen Geweben und der interzellulären Kommunikation zu besitzen.

#### **3.1. Komponenten der EZM**

Anhand ihrer Funktion werden die Matrixmoleküle in vier Hauptgruppen eingeteilt:

1. Kollagene
2. Glykosaminoglykane und Proteoglykane
3. nichtkollagene Glykoproteine
4. Elastische Fasern

##### **3.1.1. Kollagene**

Kollagene stellen quantitativ die wichtigsten Proteine der EZM dar und tragen durch die Ausbildung fibrillärer Strukturen wesentlich zur funktionellen Stabilität von Geweben wie z.B. Knochen, Knorpel, Haut und Sehnen bei. Sie machen etwa 30 Prozent der Gesamtmasse an Proteinen im menschlichen Körper aus.

Im kardiovaskulären System vermitteln sie vor allem die Zugfestigkeit und Stabilität der Arterien und Herzklappen gegenüber der mechanischen Beanspruchung durch den Herzzyklus. Lokalisiert in der Tunica adventitia der Gefäße, verhindern sie eine Zerreißung der Gefäße bei hohen Blutdrücken (Wagenseil & Mecham 2009). Als

Bestandteil der EZM von Herzklappen verhindern sie eine Distension der Herzklappensegel, die während der Diastole maximal gespannt sind (Mendelson & Schoen 2006).

Allen Kollagenen gemeinsam ist die Grundstruktur. Sie setzt sich aus drei linksgängigen Polypeptid-Ketten, sogenannten  $\alpha$ -Helices bzw.  $\alpha$ -Ketten zusammen, die umeinander gewunden eine rechtsgängige Tripelhelix ausbilden. Diese kann, abhängig von dem jeweiligen Kollagen-Typ, entweder homotrimer oder heterotrimer aufgebaut sein (Boot-Handford & Tuckwell 2003). Charakteristisch für die Primärstruktur der Kollagen- $\alpha$ -Helices ist das sich monoton wiederholende Triplet aus den Aminosäuren Glycin-X-Y, wobei die Position X üblicherweise durch Prolin und die Position Y üblicherweise durch Hydroxyprolin, eingenommen wird (van der Rest & Garrone 1991).

#### **3.1.1.1. Prokollagenbiosynthese**

Die Kollagenbiosynthese der fibrillären Kollagene beginnt mit der Transkription der für den jeweiligen Kollagentyp kodierenden Gene (siehe Abbildung 3). Dadurch entsteht eine funktionelle mRNA, welche durch Translation zur Ausbildung einer Präpro- $\alpha$ -Kette führt (1). Diese wiederum wird in den Innenraum des rauen Endoplasmatischen Retikulums (rER) aufgenommen (2), in welchem durch Abspaltung eines Signalpeptids (SP) die Pro- $\alpha$ -Kette entsteht (Burgeson & Nimni 1992). Im Anschluss beginnt noch im rER die Ausbildung des Prokollagens, indem die Propeptide am C-terminalen Ende der Pro- $\alpha$ -Ketten mit der Trimerisierung beginnen.

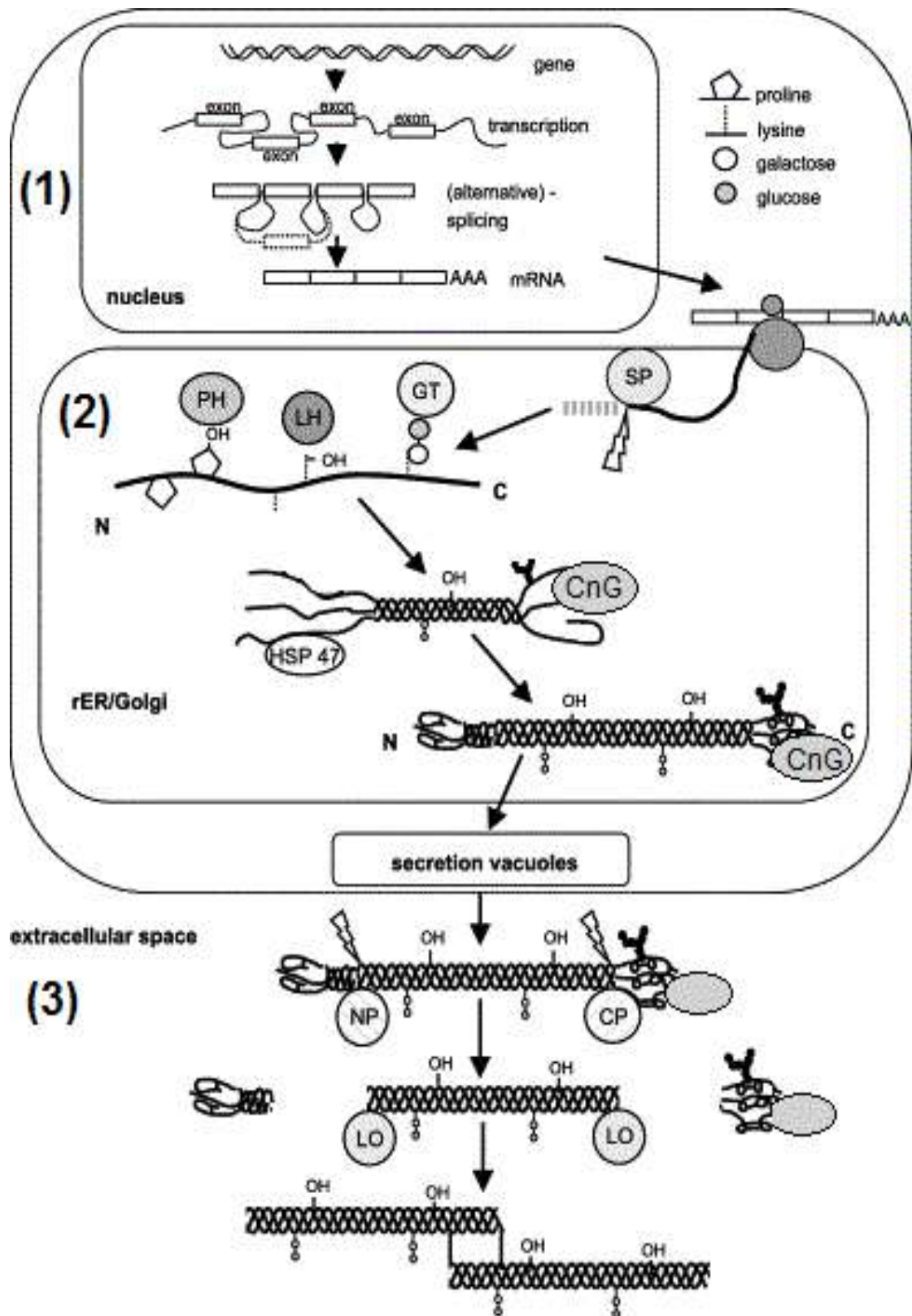
Die C-Propeptid-Domänen der Pro- $\alpha$ -Ketten sind nichtkollagene Domänen, die etwa 250 Aminosäuren umfassen. Sie spielen eine wichtige Rolle für die genaue Zusammenlagerung der für den jeweiligen Kollagentyp benötigten Prokollagen- $\alpha$ -Ketten und für die korrekte Ausbildung der Prokollagen-Tripelhelix.

Nach Assoziation der drei Pro- $\alpha$ -Ketten an der C-Propeptid-Domäne kommt es zur Ausbildung von stabilisierenden Disulfidbrückenbindungen auf der Gesamtlänge der drei Pro- $\alpha$ -Ketten mit Hilfe der Protein-Disulfid-Isomerase (Koivu 1987). Gleichzeitig beginnen die Tripelhelix-Regionen der Pro- $\alpha$ -Ketten, die bis zu 1000 Aminosäuren umfassen können, sich umeinander zu winden.

Durch die sogenannte Prolyl-4-Hydroxylase (PH) kommt es zur Hydroxylierung von etwa jedem dritten Prolin in der X-Position zu Hydroxyprolin. Dieser Vorgang erfolgt mit Hilfe des Kosubstrats  $\alpha$ -Ketoglutarat sowie der Kofaktoren  $\text{Fe}^{2+}$  und Vitamin C

(Myllyharju 2003). Der Schmelzpunkt und die Stabilität des entstehenden Prokollagen-Moleküls werden durch die Anzahl der hydroxylierten Proline bestimmt. Je mehr OH-Gruppen vorhanden sind, desto mehr Wasserstoffbrücken können sich ausbilden, desto höher ist der Schmelzpunkt und umso stabiler ist das Prokollagenmolekül (Berg & Prockop 1973, Burjanadze 2000, Colognato & Yurchenco 2000, Rosenbloom *et al.* 1973).

Die Lysine, die sich an manchen Stellen in der Y-Position anstelle des Hydroxyprolins befinden, werden durch Lysyl-Hydroxylasen (LH) hydroxyliert. Über diese OH-Gruppe können dann in der Folge durch Galaktosyl-Transferasen und Galaktosylhydroxyllysylglukosyl-Transferasen (GT) Galaktose- und Glukosereste O-glykosidisch an das Polypeptid gebunden werden. Zusätzlich werden am C-terminalen Propeptid N-glykosidische Verbindungen mit Zuckerresten geknüpft (CnG) (Harwood *et al.* 1975). Während der Synthese von Kollagen kommt dem Kollagen-spezifischen, ER-ständigen Chaperon HSP 47 (heat shock protein) eine entscheidende Bedeutung zu: es verhindert die intrazelluläre Degradation von Prokollagen und unterstützt den Transport des Proteins vom ER zum Golgi-Apparat zusammen mit dem Vesikel beschichtenden Protein COP II (Duden 2003, Koide & Nagata 2005). Transportiert werden die Prokollagen-Moleküle in sakkulären Strukturen, die direkt aus Anteilen der ER-Membran gebildet werden. Entlang von Mikrotubuli erfolgt anschließend die Wanderung Richtung cis-Golgi. Sobald Prokollagen-Bündel sich vom trans-Golgi-Apparat Richtung Plasmamembran in Bewegung setzen, bilden sie sogenannte sekretorische Vakuolen aus (Leblond 1989). Diese sekretorischen Vakuolen, auch Golgi-zu-Plasmamembran-Transport-Kompartimente (GPC) genannt, können mit der Plasmamembran fusionieren, um sogenannte Fibripositoren, Prokollagen-Fibrillen-enthaltende Plasmamembranerweiterungen, auszubilden (Canty *et al.* 2004). Mit dem Ende der intrazellulären Synthese des Prokollagens wird das Kollagenmonomer in den Extrazellularraum sezerniert. Dort erfolgt einer der wichtigsten Schritte in der Kollagenfibrillen-Formation, die Abspaltung der C- und N-terminalen Propeptide durch die Prokollagen-N- und C-Proteinasen, wodurch das Tropokollagen entsteht (3) (Leung *et al.* 1979). Anschließend erfolgt die spontane Zusammenlagerung der Tropokollagenmonomere zu Fibrillen an der Zelloberfläche, welche aufgrund hydrophober und elektrostatischer Wechselwirkungen in vier homologen, 67 nm langen Regionen, zu einer charakteristischen Querstreifung führt (Hulmes *et al.* 1989).



**Abbildung 3: Kollagenbiosynthese**, modifiziert nach Gelse K, Poschl E and Aigner T. Collagens--structure, function, and biosynthesis. Adv Drug Deliv Rev. 55:1531-46, 2003.



### **3.1.2. Glykosaminoglykane und Proteoglykane**

Glykosaminoglykane (GAGs) bestehen aus langen Kohlenhydratketten und stellen einen großen Anteil der EZM-Makromoleküle dar. Sie setzen sich aus einem sich wiederholenden Dissaccharid-Muster aus einer Uronsäure und einem Aminosucker zusammen, der zusätzlich noch sulfatiert sein kann.

Zu den vier Hauptgruppen der Glykosaminoglykane gehören Hyaluronsäure, Chondroitin-/ Dermatan-sulfat, Heparin / Heparan-sulfat und Keratan-sulfat (Hardingham & Fosang 1992, Sasisekharan *et al.* 2006).

GAGs kommen einerseits frei in der EZM von Geweben oder auch im Blut vor. Auf der anderen Seite können GAGs mit Ausnahme von Hyaluronsäure funktionelle Seitengruppen von Proteoglykanen bilden.

Letztere stellen eine sehr heterogene Gruppe von EZM-Komponenten dar und können aus einer Vielzahl von unterschiedlichen Kombinationen von GAGs und Proteinen aufgebaut sein. Sie bestehen aus einem kleinen Proteinkern („core protein“), an den glykosidisch GAG-Seitenketten geknüpft sind, die 95% des Moleküls ausmachen. Proteoglykane dürfen nicht mit Glykoproteinen verwechselt werden, welche hauptsächlich aus Protein und nur zu 5% aus Kohlenhydraten bestehen. Ein einzelnes Proteoglykan kann viele verschiedene GAGs tragen, die wiederum an unterschiedlichen Positionen Sulfatgruppen aufweisen können und so die Heterogenität dieser Gruppe weiter steigern. Ihre Größe ist sehr unterschiedlich - die Spannweite reicht von dem 40 kDa schweren Decorin aus der Gruppe der kleinen Leucin-reichen Proteoglykane bis hin zum über 3000 kDa schweren Aggrecan.

#### **3.1.2.1. Biosynthese von GAGs und Proteoglykanen**

Die Biosynthese der meisten GAGs beginnt im Golgi-Apparat. Dort werden an ein spezifisches Tetrasaccharid durch verschiedene Glykosyltransferasen Zucker angehängt. Durch das Verknüpfen von Iduron-, Glukuronsäuren oder Galaktose mit einem Glukos- oder einem Galaktosamin-Monozucker wird entschieden, welches GAG gebildet wird (Sugahara & Kitagawa 2000). Diese können dann entweder frei in die EZM sezerniert oder an ein Proteoglykan-Kernprotein geknüpft werden, welches dann

im Anschluss in sekretorische Vesikel verpackt und in Richtung der Plasmamembran transportiert wird und dort entweder in die EZM abgegeben oder in die Plasmamembran eingebaut wird.

Hyaluronsäure bildet hier eine Ausnahme: es wird als unsulfatiertes Polymer in der Nähe der Innenseite der Plasmamembran gebildet und dann in die EZM sezerniert (Vigetti *et al.* 2009).

### 3.1.2.2. Funktionen von GAGs und Proteoglykanen

Glykosaminoglykane haben vielfältige Funktionen. Eine Auswahl ist in der folgenden Tabelle 1 wiedergegeben.

#### Funktionen von GAGs

Kategorie	Funktion
Heparin	Beschleunigung der Inaktivierung von Thrombin (Desai <i>et al.</i> 1998)
Heparansulfat	Beeinflussung der Zellmigration, Bestandteil von Basalmembranen (Sasisekharan <i>et al.</i> 2002, Vlodavsky & Goldshmidt 2001)
Chondroitinsulfat	wichtige funktionelle Seitengruppe von Aggrecan, Puffereigenschaften
Dermatsulfat	Beeinflussung von Zellwachstum und Wundheilung durch Bindung an Fibroblastic Growth Factor (Sasisekharan <i>et al.</i> 2006)
Keratansulfat	Bildung eines dynamischen Puffers für die Hydratation der Kornea (Funderburgh 2000)
Hyaluronsäure	Bildung großer Netzwerke z.B. im Komplex mit Aggrecan, wichtig für die „Stoßdämpferfähigkeit“ des Gewebes, z.B. Knorpel, Förderung der Wundheilung

**Tabelle 1: Funktionen von GAGs**

Eine ihrer wichtigsten Aufgaben ist die Gewährleistung von Stabilität gegenüber mechanischen Belastungen. Durch die negativ geladenen Carboxyl- und Sulfatgruppen

vermögen die GAGs Kationen, wie z.B.  $\text{Na}^+$  zu binden. Das wiederum hat eine Wassereinlagerung in den GAGs zur Folge. Durch dieses wässrige Milieu wird extrazellulär eine schnelle Diffusion wasserlöslicher Stoffe ermöglicht. Je nach Art und Funktion des Gewebes bilden die GAGs unterschiedliche wässrige Gele.

Im Knorpel beispielsweise wird die Stoßdämpferwirkung durch Chondroitinsulfate gewährleistet, im Glaskörper des Auges hingegen spielt die Wassereinlagerung durch Keratansulfat und Hyaluronsäure eine wichtige Rolle.

Die wichtige Eigenschaft der GAGs als formgebende und -erhaltende Komponenten allein oder in Verbindung mit Proteoglykanen kann am einfachsten am Beispiel von Aggrecan erläutert werden.

Aggrecan gehört zu den großen Proteoglykanen und verfügt über Bindungsregionen für Chondroitin- und Keratansulfatseitengruppen. Es bildet zusammen mit anderen Aggrecan-Molekülen und Hyaluronsäure große Komplexe in der EZM (Roughley 2006). Diese Aggrecan-Hyaluron-Komplexe führen im Knorpel aber auch in anderen Geweben durch das Aufnehmen von Wasser zu einer Expansion der EZM, sodass mechanische Belastungen kompensiert und neue Räume für die Zellproliferation und -migration geschaffen werden.

Die folgende Tabelle 2 zeigt eine Übersicht über einige Vertreter aus der großen Familie der Proteoglykane und ihre Funktionen.

### Übersicht über einige Vertreter der Proteoglykane

Proteoglykan	Molmasse Protein- anteil	Anzahl der Kohlenhydrat- seitenketten	GAG	Vorkommen	Funktion
Perlecan	600 kDa	2-15	Heparansulfat	Basal- membran	Ausbildung eines Netzes mit Filter- funktion
Decorin	40 kDa	1	Chondroitin- sulfat oder Keratansulfat	weit verbreitet im Bindege- webe	bindet Typ-I- Kollagen (unterstützt Kollagenfaser- bildung) und TGFβ
Fibromodulin	42 kDa	4	Keratansulfat	weit verbreitet im Bindege- webe	bindet Typ-I- Kollagen (unterstützt Kollagenfaser- bildung)

**Tabelle 2: Übersicht über einige Vertreter der Proteoglykane;** modifiziert nach Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC. Biochemie & Pathobiochemie. 8. Auflage. Springer-Berlin Heidelberg 2006: 728

### **3.1.3. Nichtkollagene Glykoproteine**

Die nichtkollagenen Glykoproteine stellen einen kleinen, aber wichtigen Anteil der EZM dar. Ihre Hauptaufgabe besteht in der Förderung der Kontaktherstellung zwischen den Zellen und den einzelnen Komponenten in der EZM. Außerdem spielen sie eine Rolle bei der Zellproliferation, -differenzierung und -migration. Einige nichtkollagene Glykoproteine unterstützen die Produktion von anderen Komponenten der EZM, wie z.B. Emilin, Fibulin und die Mikrofibrillen-assoziierten Glykoproteine (MAGP-1 und -2), die entscheidend zur korrekten Zusammenstellung der Elastischen Faser beitragen (siehe Kapitel 3.1.4.5.).

#### **3.1.3.1. Fibronectin**

Einer der bekanntesten Vertreter der Glykoproteine der EZM ist das Fibronectin. Es ist als Glykoprotein mit einem hohen Molekulargewicht von etwa 440 kDa lokalisiert auf Zelloberflächen, in extrazellulären Flüssigkeiten, in Bindegeweben und Basalmembranen (Muro *et al.* 2003). Fibronectin beeinflusst u.a. die Differenzierung und Morphologie sowie die Adhäsion und Migration von Zellen (Kornblihtt *et al.* 1996). Des Weiteren spielt es eine entscheidende Rolle in der Embryogenese und besitzt sowohl eine wachstumsregulierende als auch gewebserhaltende Funktion (Ahumada *et al.* 1981). Es existiert einerseits eine lösliche Variante des Fibronectin, das von Makrophagen und Hepatozyten produziert wird, und andererseits ein unlösliches, fibrilläres Fibronectin, zu dessen Produzenten Fibroblasten, glatte Muskelzellen, Chondroblasten und Endothelzellen gehören (Hynes & Yamada 1982).

#### **Struktur und Funktion von Fibronectin**

Fibronectin besteht zu 5 % aus Kohlenhydraten, welche an Asparaginsäure-Reste gebunden sind. Die genaue Funktion der Kohlenhydrate ist nicht bekannt, jedoch existieren Hinweise dafür, dass die Kohlenhydrate spezifische Regionen des Fibronectins vor Proteolyse schützen (Olden *et al.* 1979). Sowohl lösliches als auch fibrilläres Fibronectin besteht als Heterodimer aus zwei ähnlich aufgebauten Polypeptidketten, welche C-terminal über Disulfidbrücken miteinander in Verbindung stehen (Kim *et al.* 1999).

Fibronectin verfügt über vier funktionale Domänen, die eine Interaktion mit einer Vielfalt an EZM-Komponenten ermöglichen.

Über eine sogenannte Kollagen-bindende Domäne erfolgt die Interaktion mit Kollagen oder Gelatin.

Eine weitere Domäne, die sogenannte Zell-bindende Domäne, enthält eine RGD-Sequenz, die aus den Aminosäuren Arginin, Glycin und Asparaginsäure besteht und als Bindungspartner für Zelloberflächen-Integrine dient (Robinson *et al.* 2003). Besonders diese Funktion ist interessant im Hinblick auf die Nutzbarmachung zur Aktivierung von Scaffold-Oberflächen.

Die Verbindung zu Heparin und in der Basalmembran lokalisierten Heparansulfaten wird durch die GAG-bindende Domäne vermittelt. Dadurch werden Organisationsprozesse in der EZM auf zelluläre Basis übertragen und z.B. die Proliferationsrate der Zellen gesteigert oder deren Migrationsaktivität erhöht (Gui *et al.* 2006).

In der Phase der frühen Wundheilung vermittelt die Fibrin-/ Faktor XIIIa-bindende Domäne die Quervernetzung von Fibronectin, Fibrin und Kollagen. So entsteht ein Netzwerk, in dem anschließend Fibroblasten adhären und die Wundheilung initiieren können (Grinnell *et al.* 1980).

### **3.1.3.2. Laminin**

Laminine tragen zum Aufbau von Basalmembranen bei, einer dünnen, spezialisierten Schicht Extrazellulärer Matrix, die sich unterhalb von Epithelverbänden befindet.

Sie stellen heterotrimere, ungleichmäßig glykosylierte Proteine dar, die aus drei verschiedenen Polypeptidketten,  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  aufgebaut sind, welche zentral über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Bisher sind fünf  $\alpha$ -, vier  $\beta$ - und drei  $\gamma$ - Ketten bekannt. Durch unterschiedliche Kombination der Polypeptidketten existieren mindestens 15 verschiedene Isoformen, welche organ- und entwicklungsspezifisch exprimiert werden (Aumailley *et al.* 2005). Während Laminin-1 vorwiegend in embryonalen Basalmembranen zu finden ist, ist Laminin-2 die überwiegende Form in Muskeln und peripheren Nerven und Laminin-4 vorherrschend in neuromuskulären Synapsen vorzufinden (Colognato & Yurchenco 2000).

In der Mehrzahl der Fälle verfügen Laminine über eine aus sechs Domänen bestehende, asymmetrisch-kreuzförmige Struktur, die die Fähigkeit besitzt an andere Zellmembran- oder Extrazellulärmatrix-Moleküle zu binden. Die  $\alpha$ -Kette verfügt über eine C-terminale, globuläre Domäne, die über eine RGD-Sequenz als Heparinbindungsstelle an die anderen Bestandteile der Basalmembran, nämlich Kollagen IV, das Heparansulfat Perlecan oder andere GAGs binden kann (Beck *et al.* 1990). Während des Prozesses der Basalmembranbildung polymerisieren Laminine über ihre N-terminale Domäne VI der kurzen Arme zu einem Netzwerk. Die Polymerisation ist Calcium-abhängig und wird von dem Protein Nidogen (auch bezeichnet als Entactin) als *linker*-Protein unterstützt, das Laminin an das Kollagen IV der Basalmembran knüpft (Fox *et al.* 1991).

Neben der Basalmembran-Organisation haben Laminine vielfältige andere Aufgaben, sie beeinflussen unter anderem Zelldifferenzierung, -morphologie, -motilität, die interzelluläre Kommunikation, Embryonalentwicklung und halten die Gewebeintegrität aufrecht.

#### **3.1.4. Elastische Fasern**

Im Folgenden soll das Protein Elastin genauer betrachtet werden, auf dem das Hauptaugenmerk dieser Dissertation liegt.

Elastische Fasern kommen gehäuft in der EZM derjenigen Gewebe vor, deren Funktion von einer reversiblen Dehnbarkeit abhängig ist, wie es zum Beispiel in der Lunge, in Arterien vom elastischen Typ, elastischen Bändern, im elastischen Knorpel, in Sehnen und der Haut der Fall ist. Sie machen dabei bis zu 50% der Masse elastischer Bänder, 30-50% des Trockengewichts größerer Blutgefäße, 3-7% des Lungenparenchyms, 4% von Sehnen und 2-3% der Haut aus (Wagenseil & Mecham 2009).

Es bestehen je nach Gewebe Unterschiede in der Konfiguration der elastischen Matrices. Während die Elastischen Fasern in Haut, Lunge und Ligamenten in feinen, netzwerkartigen Geflechten vorliegen, bilden sie konzentrische Lamellen in Blutgefäßen und ein wabenartiges Muster im elastischen Knorpel (Li *et al.* 1998, Pasquali-Ronchetti & Baccarani-Contrì 1997, Sanzone & Reith 1976). Elastische Fasern sind in der Lage, sich bei Zugkräften auf das zweieinhalb-fache ihrer Länge

auszudehnen und kehren automatisch wieder in ihre Ausgangslage zurück, sobald die auf sie wirkenden Kräfte nachlassen.

Ultrastrukturell sind Elastische Fasern aus zwei Komponenten aufgebaut: einem amorphen Kern aus quervernetztem Elastin, der 90% der Faser ausmacht und einem den Kern umgebenden fibrillären Mantel, bestehend aus 10-12 nm großen Mikrofibrillen (Mithieux & Weiss 2005).

#### **3.1.4.1. Das Elastin-Gen**

Humanes Elastin wird durch ein Elastin-Gen kodiert, welches auf Chromosom 7q11.1 - 21.1 lokalisiert ist und 34 Exons bzw. 45 Kilobasenpaare umfasst (Fazio *et al.* 1991). Bis heute sind mindestens 11 verschiedene Splicevarianten bekannt, die durch alternatives Splicen der Domänen 22, 23, 24, 26 A, 32 und 33 resultieren (Bashir *et al.* 1989).

#### **3.1.4.2. Tropoelastin**

Als lösliche Vorläuferstufe des Elastins wurde das EZM-Protein Tropoelastin mit einer Masse von etwa 70kD identifiziert (Rosenbloom *et al.* 1980). Mehrere Zellarten, darunter glatte Muskelzellen, Endothelzellen, Chondrozyten und Fibroblasten sind in der Lage, Tropoelastin zu synthetisieren (Uitto *et al.* 1991). Sobald Tropoelastinmonomere in den Extrazellularraum freigesetzt werden, werden sie umgehend mit Hilfe eines komplexen Quervernetzungsprozesses in unlösliches Elastin umgewandelt. Die Aminosäuresequenz von Tropoelastin beinhaltet abwechselnd hydrophobe und hydrophile Domänen. Während die hydrophoben Domänen sich durch ihren hohen Gehalt an nicht-polaren Aminosäureresten wie Glycin, Valin, Prolin und Leucin auszeichnen, besitzen die hydrophilen Domänen einen hohen Gehalt an Alanin und Lysin und sind darüber hinaus in Quervernetzungs-Prozesse eingebunden (Rosenbloom 1984).



### 3.1.4.3. Tropoelastin-Biosynthese

Die Biosynthese von Tropoelastin verläuft ähnlich wie die von Prokollagen. Nachdem die mRNA an der Oberfläche des rER translatiert worden ist, wird die wachsende Polypeptidkette in das Lumen des rER transloziert. Zuvor wird das N-terminale Signalpeptid abgespalten (Saunders & Grant 1985). Sobald die Translation beendet ist, wird das Tropoelastin-Molekül im Inneren des rER von einem 67kD Chaperon namens EBP (elastin binding protein) gebunden. EBP zeigt sich ähnlich wie eine enzymatisch inaktive Form der  $\beta$ -Galaktosidase (Privitera *et al.* 1998). Durch seine Bindung an zwei 61 und 55kD große integrale Membranproteine formt das EBP den Elastinrezeptor, welcher an der äußeren Zellmembran lokalisiert ist und Elastin-Zell-Interaktionen und Signaltransduktionskaskaden vermittelt. Das EBP besitzt drei Bindungsstellen, wobei es mit einer davon hydrophobe Sequenzen von Tropoelastin binden kann. Die anderen beiden Bindungsstellen binden zum einen an die Zelle selbst und zum anderen an Galaktose. EBP begleitet das Tropoelastin durch seinen gesamten sekretorischen Pfad und schützt es dadurch vor intrazellulärer Proteolyse bzw. extrazellulärer Degradation. Sobald der EBP-Tropoelastin-Komplex den Extrazellularraum erreicht hat, wirkt das EBP als ein wichtiger Mediator zwischen Tropoelastin und dem mikrofibrillären Scaffold (siehe Abbildung 4, (1)). Durch das Andocken mit seiner Lectin-Bindungsstelle an ein galaktosyliertes Protein, welches auf der Mikrofibrille lokalisiert ist, wird seine Bindungs-Affinität zum Tropoelastin gesenkt, sodass das Tropoelastin sich lösen und mit dem mikrofibrillären Scaffold assoziieren kann (Hinek & Rabinovitch 1994).

Posttranslational finden nur wenige Modifikationen von Tropoelastin statt, hauptsächlich werden bis zu 20 Prozent der Prolin-Reste mit Hilfe der Prolyl-Hydroxylase hydroxyliert. Diese Hydroxylierung scheint nicht unbedingt notwendig für die Synthese der Elastischen Fasern zu sein, da gezeigt werden konnte, dass eine Inhibition der Hydroxylierung keinen Einfluss auf die Tropoelastin-Sekretion hat. Eine übermäßige Hydroxylierung hingegen durch den Zusatz von Ascorbinsäure, einem Cofaktor der Prolyl-Hydroxylase, resultiert in einer verminderten Produktion von Tropoelastin *in vivo* (Wagenseil & Mecham 2009).

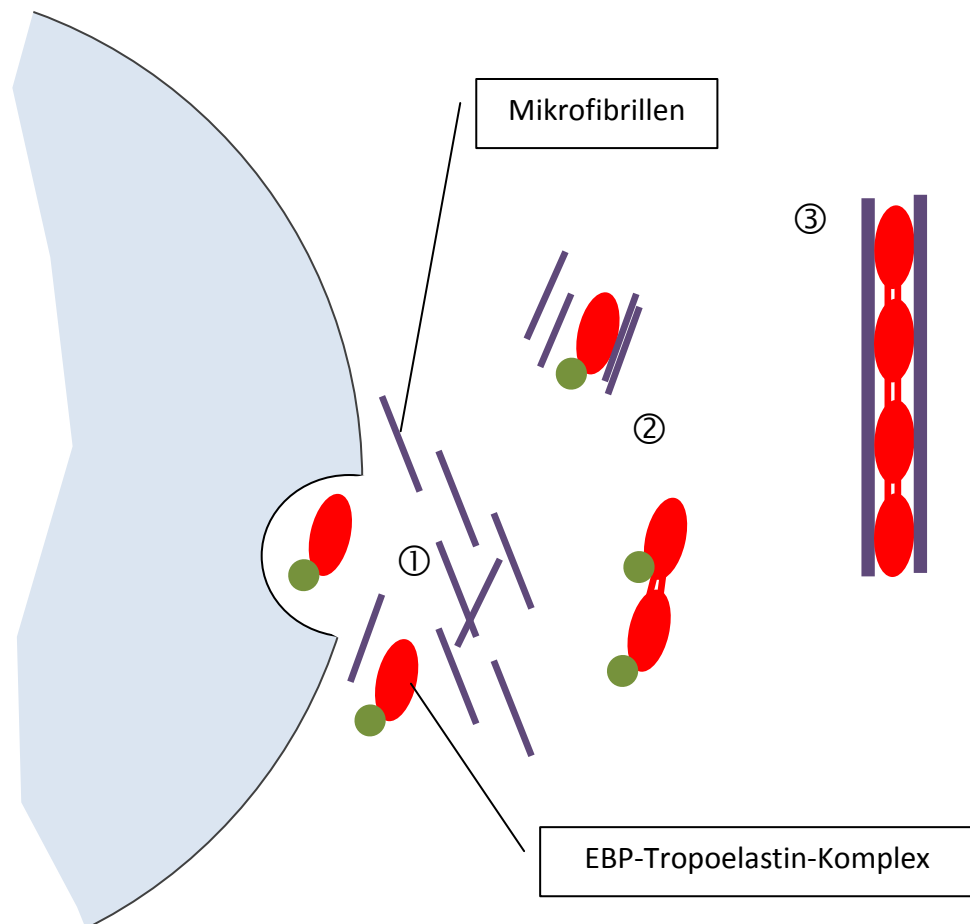
#### **3.1.4.4. Regulation der Tropoelastin-Expression**

Die stärkste Tropoelastin-mRNA-Expression und Elastogenese wird in der frühen Phase der Entwicklung beobachtet; im Erwachsenenalter ist ein rapider Abfall zu verzeichnen. Es existieren jedoch Mechanismen, die im Falle einer Verletzung die Elastin-Biosynthese erhöhen können um den neu aufgetretenen Bedarf zu decken (Rich *et al.* 2003). Die Tropoelastin-Expression kann dabei sowohl prä- als auch posttranskriptionell beeinflusst werden. Prätransskriptionelle Regulationsmechanismen umfassen die Herauf- und Herabregulierung der Elastin-Gen-Expression auf Promotor-Level und des Weiteren über untranslationierte Exon- und Intron-Regionen. Auf dem posttranskriptionalen Level spielt die mRNA-Stabilität eine wichtige Rolle. Beeinflussende Faktoren sind hierbei unter anderem Transforming Growth Factor  $\beta$ 1, Insulin-like Growth Factor-1, Vitamin D, Interleukin-1 $\beta$ , Basic Fibroblast Growth Factor, Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  und Interleukin-10 (Carreras *et al.* 2002, Conn *et al.* 1996, Kahari *et al.* 1992, Kucich *et al.* 1997, Mauviel *et al.* 1993, Pierce *et al.* 1992, Reitamo *et al.* 1994).

#### **3.1.4.5. Zusammenlagerung zur Elastischen Faser**

Die Elastische Faser wird an der Zelloberfläche gebildet, indem Tropoelastin-Monomere, die an die Zelloberfläche sezerniert wurden, entweder direkt auf die Mikrofibrillen, welche als Stützstrukturen die spätere Quervernetzung der Tropoelastinmonomere begünstigen (Kielty *et al.* 2002), übertragen werden, oder diese Monomere zuerst Aggregate formen (2), bevor sie auf den mikrofibrillären Scaffold übertragen werden (Kozel *et al.* 2006). Der Quervernetzungs-Prozess, welcher durch spezifische Mitglieder der Kupfer-abhängigen Lysyl-Oxidasen katalysiert wird, bezieht nahezu alle Lysin-Reste im Tropoelastin-Monomer ein (Lucero & Kagan 2006). Die  $\epsilon$ -Aminogruppen dieser Lysin-Reste werden oxidativ desaminiert, es entsteht das sogenannte  $\alpha$ -Aminoadipic- $\delta$ -Semialdehyd-Allysin, welches mit einem weiteren Allysin oder einer weiteren  $\epsilon$ -Aminogruppe reagiert um unter Kondensation bi-, tri- und tetrafunktionale Quervernetzungen zu bilden. Letztere führen zur Ausbildung von Desmosin und Isodesmosin, Aminosäure-Ringstrukturen, die charakteristisch sind für Elastin.

Die Quervernetzung (3) macht die Elastischen Fasern stabil und unlöslich und ist daher durchaus wichtig für die strukturelle und funktionelle Integrität des Elastins.



**Abbildung 4: Tropoelastin-Sekretion, Zusammenlagerung zur Elastischen Faser und Quervernetzung**

Die Mikrofibrillen bestehen aus einer Reihe von verschiedenen Proteinen. Die Hauptkomponente stellen Fibrilline dar, etwa 350kD große, Cystein-reiche Glykoproteine, von denen drei verschiedene Subtypen existieren: Fibrillin-1,-2 und -3 (Corson *et al.* 2004, Sakai *et al.* 1986, Zhang *et al.* 1994). Für die Zusammenstellung der Elastischen Faser spielen darüber hinaus zwei weitere Glykoproteine eine Rolle: MAGP-1 (Gibson *et al.* 1991) und MAGP-2 (Gibson *et al.* 1996). Diese kleinen Glykoproteine, die kovalent an die Mikrofibrillen gebunden sind, dienen als Brückenmoleküle zwischen Fibrillin und Tropoelastin mit ihrer Fähigkeit an beide zu

binden. Zusätzlich existieren in der Elastischen Faser noch viele weitere Komponenten, die in der Lage sind, an die Mikrofibrille, an Elastin oder an beide zu binden, als Beispiele zu nennen sind hier Fibuline (Roark *et al.* 1995) und Emilin (Bressan *et al.* 1993).

#### **3.1.4.6. Koazervation**

Tropoelastin befindet sich in Lösungen bis zu 20 °C in löslicher Form. Sobald die Temperatur allerdings ansteigt und physiologische Werte um 37 °C erreicht, beginnen die Tropoelastin-Monomere, auf der Basis von Interaktionen zwischen ihren hydrophoben Domänen, zu aggregieren. Dieser Prozess wird als Koazervation bezeichnet und ist durch das Herunterkühlen der Lösung wieder reversibel (Vrhovski & Weiss 1998).

Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen liegt in dem geordneten Arrangement der Wassermoleküle, die das Tropoelastin-Molekül, insbesondere die hydrophoben Regionen, umgeben, wodurch das Tropoelastin-Molekül in einer fixierten, ungefalteten Konfiguration gehalten wird. Mit einem Anstieg der Temperatur werden die Wasserstoff-Brückenbindungen unterbrochen und die nun frei beweglichen Tropoelastin-Monomere können über die Auto-Aggregation einen gefalteten Zustand einnehmen.

Obwohl die Ordnung auf dem Protein-Level ansteigt, nimmt insgesamt gesehen die Entropie zu durch die zunehmende Wassermolekül-„Unordnung“ (Urry 1995). Das Tropoelastin-Koazervat zeigt sich als eine trübe Suspension, bestehend aus 15 nm-großen Tropoelastin-Monomeren, die sich zu etwa 6 µm-großen, sphärischen Tröpfchen zusammenlagern. Wahrscheinlich dient die Koazervation der Konzentration und der Ausrichtung der Tropoelastinmonomere zur Vorbereitung auf die Quervernetzung durch die Lysyl-Oxidase (Clarke *et al.* 2006).

### **3.2. Bedeutung der EZM für das Tissue Engineering**

Lange herrschte die Meinung vor, dass die EZM als statische Einheit hauptsächlich zur Gewebestabilität beiträgt. Heute aber stellt sie sich als ein überaus komplexer Bestandteil von Geweben dar, der neben dem Beitrag zur Gewebestabilität einen Raum aufspannt, in dem Informations- und Signalübertragungen zwischen dem Inneren und dem Äußeren der Zellen sowie zwischen den Zellen selbst stattfinden können. Die EZM unterliegt einem ständigen Auf- und Abbauprozess und spielt eine wichtige Rolle bei der Homöostase eines Gewebes. Soll also ein bestimmtes Gewebe im Tissue Engineering hergestellt werden, so ist es von essenzieller Bedeutung, dass nicht nur die passende Zellquelle ausgewählt wird, sondern dass diese auch dazu stimuliert wird, eine EZM zu synthetisieren, die der des natürlichen Gewebes entspricht. Die Herausforderung im Tissue Engineering besteht also darin, zu verstehen, inwiefern die EZM-Formation durch verschiedene biochemische, strukturelle und mechanische Faktoren *in vivo* beeinflusst wird, um eine suffiziente EZM-Formation *in vitro* durch Nachahmung der physiologischen Bedingungen zu ermöglichen.

### **3.3. Quantitative und qualitative Erfassung der EZM-Bildung**

Im Herstellungsprozess eines Gewebes im Tissue Engineering ist eine der entscheidenden Fragen diejenige, wie weit das tissue engineerete Gewebe ausgereift ist. Da die Reife des Gewebes in engem Zusammenhang mit dem Fortschritt in der Formierung der EZM steht, kann eine qualitative und quantitative Erfassung der EZM über den Zustand des Gewebes Rückschlüsse liefern.

Methoden, die zum heutigen Zeitpunkt häufig zur quantitativen Messung der EZM angewandt werden, umfassen Nukleinsäure-Amplifikationsmethoden wie die Polymerase-Ketten-Reaktion, Immunoassays, radiometrische sowie photometrische Verfahren.

Des Weiteren kann mit Hilfe einer histologischen oder immunhistologischen Aufarbeitung eine Aussage über die Morphologie der EZM gemacht werden.

Alle oben genannten Verfahren, die in der Praxis bereits routinemäßig Anwendung finden, weisen den großen Nachteil auf, dass der Entwicklungsprozess des heranreifenden Gewebes gestoppt wird und dieses Gewebe, sofern es noch nicht den

Punkt erreicht hat, implantiert zu werden, nicht mehr unter Anpassung der Kultivierungsbedingungen an den aktuellen Entwicklungsgrad weiterkultiviert werden kann.

Eine Methode, die eingesetzt werden kann um während des Wachstumsprozesses Aussagen über die Morphologie der EZM machen zu können, ohne dass das Gewebe für die üblichen Schritte der Histologie aufbereitet werden muss, stellt die Multiphotonen-Mikroskopie dar.

Die Multiphotonen-Mikroskopie beschreibt eine Mikroskopie-Methode, bei der durch nicht-lineare, lichtbezogene Interaktionen, hochauflösende Bilder entstehen (Schenke-Layland *et al.* 2004).

Diese Methode ermöglicht es zwar, EZM-Strukturen im vitalen, heranwachsenden Gewebe zu beurteilen, jedoch ist sie aufgrund der dafür benötigten technischen Mittel sowohl kostspielig als auch impraktikabel in der täglichen Anwendung im Labor.

Eine andere, nicht-invasive Methode wurde kürzlich von Kreitz *et al.* entwickelt: Hierbei wurde das Potential eines Ultraschall-Monitorings für die quantitative Analyse des Kollagengehalts von mit Myofibroblasten kultivierten Fibringelen untersucht. Die Grauwerte der Ultraschallbilder der Fibringele wurden in Korrelation gesetzt mit dem korrespondierenden Hydroxyprolin-Gehalt, welcher wiederum einen quantitativen Marker für die Kollagensynthese darstellt (Kreitz *et al.* 2011). Auch wenn die Ergebnisse der Ultraschallmessung eine vielversprechende Korrelation zwischen dem Ultraschallsignal und dem Hydroxyprolin-Gehalt der untersuchten Fibringele zeigten, so erlaubt die Methode doch keine Differenzierung zwischen der Expression unterschiedlicher Kollagentypen. Desweiteren kann aufgrund der Ultraschallmessung keine Aussage über die Produktion anderer, wichtiger EZM-Bestandteile wie z.B. Elastin und GAGs getroffen werden – sie muss also um weitere Verfahren zur Bestimmung dieser ergänzt werden.

Auch Weinbaum *et al.* haben eine Methode zum Monitoring der Kollagen-I-Synthese entwickelt: Sie koppelten dazu den Promotor für Kollagen I mit dem Enzym Luciferase. So wurde bei jedem Ablesen der DNA für Kollagen I auch Luciferase produziert. Durch die Zugabe des entsprechenden Substrats Luciferin und einer anschließend mit geeigneten Kameras detektierten Lichtemission, konnte nicht-invasiv eine Aussage über die Kollagen I-Expression getroffen werden. Dazu korrelierten sie unter anderem den Kollagengehalt im Gewebe über die Bestimmung des Kollagen-Gewebe-Markers

Hydroxyprolin (Weinbaum *et al.* 2010). Auch diese Methode stellt einen interessanten Lösungsansatz bezüglich der Problematik des nicht-destruktiven Nachweises der EZM-Produktion dar. Sie hat aber den entscheidenden Nachteil, dass die Zellen vorher mit dem Luciferase-Kollagen I-Promoter transfeziert werden müssen. Ein unter diesen Bedingungen tissue engineeredes Konstrukt würde eventuell die Möglichkeit der nicht-invasiven Bestimmung der Kollagen I-Produktion bieten, könnte aber nach Abschluss des Reifungsprozesses nicht in einen Empfänger implantiert werden.

Wie man an den oben genannten, in neuerer Zeit veröffentlichten Arbeiten sehen kann, hat das Interesse an einer Methode zum „Online-Monitoring“ der EZM-Synthese im Tissue Engineering zugenommen. Es wird eine Messmethode benötigt, die es möglich macht, während des Wachstumsprozesses eines sich entwickelnden Gewebes eine Aussage über den Fortschritt der EZM-Produktion zu machen, ohne das Gewebe selbst dabei zu schädigen. Diese Methode sollte die oben genannten, standardmäßigen angewendeten Methoden ergänzen und auch im Sinne einer Qualitätskontrolle vor dem klinischen Einsatz des Implantats sicher, praktikabel und zu beliebigen Zeitpunkten anwendbar sein.

#### 4. Zielsetzung der Dissertation

In dieser Dissertation soll ein Messverfahren evaluiert werden, das die EZM-Bildung anhand des Gehalts an Elastin im Gewebe zukünftig indirekt *in vitro* quantifizieren kann, ohne dass das Gewebe untersucht werden muss. Als Untersuchungsmaterial kommt hierfür das das Gewebe umgebende Bioreaktormedium in Frage, da dieses bei einem Kultivierungsprozess in regelmäßigen zeitlichen Abständen erneuert wird und eine Untersuchung desselben keinen störenden Eingriff in die Entwicklung des sich noch im Tissue Engineering-Prozess befindenden Gewebes darstellt.

Das Augenmerk dieser Dissertation liegt dabei auf dem Gehalt des Proteins Tropoelastin im Bioreaktormedium, als löslicher Vorstufe des Elastins, welches im zeitlichen Verlauf mit dem Gehalt an Elastin im kultivierten Gewebe korreliert werden soll. Als zu untersuchende Gewebe dienen in diesem Falle Fibringele, in die humane Nabelschnur-Myofibroblasten eingebettet sind.

Doch warum ist das Wissen über die Elastinsynthese bzw. den Elastingehalt im entstehenden tissue engineernten Gewebe im Kardiovaskulären Tissue Engineering überhaupt von Interesse?

Betrachten wir dazu zwei Bereiche, in denen das Kardiovaskuläre Tissue Engineering in den letzten Jahren große Fortschritte gemacht hat: das Tissue Engineering von Herzklappen und das Tissue Engineering von Blutgefäßen.

Wie bereits zu Beginn des Kapitels erwähnt, ist ein grundlegendes Verständnis über die *in vivo*-Verhältnisse der EZM der jeweiligen Gewebe von Bedeutung.

In der EZM von Herzklappen spielt Elastin eine wichtige Rolle, weil es in der Systole die Fläche der Klappensegel minimiert, in dem sich die Elastischen Fasern wieder zusammenziehen, nachdem sie in der Diastole gedehnt worden sind (Mendelson & Schoen 2006). In der EZM von Gefäßen sind Elastische Fasern hauptsächlich in der Membrana elastica interna, einem von den glatten Muskelzellen der Tunica media gebildeten, zum Lumen des Gefäßes gerichteten Netzwerk, zu finden. Dieses fängt Druckschwankungen und insbesondere die auf die Gefäßwand wirkenden Scherkräfte auf und verteilt sie auf die in die Membrana elastica interna einstrahlenden



Kollagenfasern der Tunica adventitia. Auch in der Membrana elastica externa, die hauptsächlich in größeren Gefäßen zu finden ist, erfüllen Elastische Fasern diese Aufgabe und tragen damit wesentlich zu den mechanischen Eigenschaften der Blutgefäße bei (Wagenseil & Mecham 2009).

Im Kardiovaskulären Tissue Engineering ist es daher natürlich besonders wichtig, die Produktion Elastischer Fasern auch *in vitro* zu erzielen um Aspekte wie mechanische Integrität und physiologische Compliance der tissue engineerten Gewebe zu erreichen. Um die Elastin-Synthese „online“ zu überwachen, wäre es ideal einen Parameter zu identifizieren, der im Kulturmedium des tissue engineerten Gewebes nachweisbar ist und in irgendeiner Form Aufschluss über die Elastin-Synthese gibt- einen Parameter wie Tropoelastin. Die Vorstellung zum Vorhandensein einer löslichen Vorstufe in der Elastin-Biosynthese trat schon in den frühen 1960er Jahren auf, doch erst im Jahre 1968 gelang Smith *et al.* zum ersten Mal die Isolation von einem löslichen, Elastin-ähnlichen Molekül, welches in nachfolgenden Arbeiten als Tropoelastin identifiziert wurde (Sandberg *et al.* 1969, Smith *et al.* 1968). Diese Entdeckungen begünstigten weitere Forschungstätigkeiten im Bereich der Elastin-Biosynthese: einige Arbeitsgruppen begannen, vaskuläre Myofibroblasten, meist aus der Aorta gewonnen, zu kultivieren, die *in vitro*-Expression von Tropoelastin zu untersuchen (Sandberg *et al.* 1981, Uitto *et al.* 1976) und die Biosynthese beeinflussende Faktoren zu identifizieren (Johnson & Keeley 1990).

Auch im Bereich des Tissue Engineerings blieben diese Entwicklungen nicht unbemerkt. In einer Arbeit von Hoffmann-Kim *et al.* aus dem Jahre 2005 wurde das Potenzial verschiedener Myofibroblasten für das Tissue Engineering von Herzklappen evaluiert und dabei unter anderem auch ihre Fähigkeit, EZM-Komponenten wie Elastin zu synthetisieren, bewertet und Tropoelastin im Kulturmedium nachgewiesen (Hoffman-Kim *et al.* 2005).

Auf der Basis dieser Vorarbeiten liegt nun der Gedanke nahe, zu untersuchen, ob zwischen dem Tropoelastingehalt im Medium und dem Elastingehalt im Gewebe eine Korrelation besteht und so das im Medium gemessene Tropoelastin als „Online-Marker“ der EZM-Synthese im Kardiovaskulären Tissue Engineering verwendet werden kann.

## **5. Material und Methoden**

### **5.1. Grundlagen für Zellkulturmedien**

Für die Anzucht von Zellkulturen wird ein entsprechendes Kulturmedium benötigt, welches in seiner Zusammensetzung je nach Anforderung variiert. Allen Medien gemein ist aber ihre Grundzusammensetzung aus anorganischen Salzen, Aminosäuren, Vitaminen und anderen Komponenten.

Die Basis für ein Kulturmedium stellen Elektrolytlösungen dar, die zu einer Anpassung der Milieuverhältnisse extra- und intrazellulär führen und das Überleben der Zellen außerhalb des Organismus erst ermöglichen. Für den Proteinstoffwechsel der Zelle werden dem Kulturmedium Aminosäuren in der L-Isoform zugefügt, da sowohl im menschlichen als auch im tierischen Organismus nur die L-Isoform zur Proteinsynthese verwendet wird. Es konnte gezeigt werden, dass besonders dem L-Glutamin bei der Kultur von Säugetierzellen eine wichtige Bedeutung als Energiequelle zukommt (Zielke *et al.* 1984). Weitere benötigte Zusatzstoffe sind Vitamine und Nukleinsäuren für die DNA- und RNA-Synthese. Der Einsatz von Antibiotika und Antimykotika findet vor allem bei Primärkulturen Anwendung, da durch die Präparation aus dem Spender-Organismus keine hundertprozentige Sterilität gewährleistet ist.

Der pH-Wert des Kulturmediums sollte in einem Bereich zwischen 7,2 - 7,4 liegen. Eingesetzte Puffersubstanzen wie Natriumhydrogenkarbonat bewirken eine Aufrechterhaltung des Säure-Basen-Gleichgewichts.

Fetales Bovines Serum (FBS) oder Fetales Kalbsserum sind die mit Abstand am häufigsten eingesetzten Serumzusätze. Sie enthalten u.a. eine komplexe Mischung aus Proteinen, Hormonen und Wachstumsfaktoren, welche für das Zellwachstum und die -proliferation von entscheidender Bedeutung sind (Minuth 2003).

#### **5.1.1. Verwendetes Zellkulturmedium in der Proliferationsphase**

Nach der Isolation der humanen Myofibroblasten aus Nabelschnurarterien erfolgt die Kultivierung mit Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, invitrogen 21885-025), welchem 10 % FBS (PAA A15-151) und 1 % Antibiotikum-Antimykotikum-Lösung (PAA P11-002) zugegeben wird.

### **5.1.2. Bioreaktormedium in der Fibringel-Phase**

Sobald die benötigte Zellzahl in der gewünschten Passage vorhanden ist und die Zellen im Fibringel kultiviert werden können, wird das DMEM ohne den Farbindikator Phenolrot (invitrogen 11054-020) zur Kultivierung verwendet, da dieser vermutlich mit dem Fastin™ Assay der Firma Biocolor, der zum Elastin- bzw. Tropoelastinnachweis zum Einsatz kommt, interferiert. Dem Medium werden zusätzlich 5 % FBS, 1 % Antibiotikum-Antimykotikum-Lösung, 1 % GlutaMAX™ (invitrogen 35050), 888 µL Tranexamsäure (Cyclocapron 1000 mg / 10 ml, Pfizer, PZN 0523241) sowie 142,1 mg L-Ascorbat-2-phosphat (SIGMA A-8960) zugesetzt.

Das L-Ascorbat-2-phosphat wird in ca. 20 ml DMEM unter Lichtschutz gelöst und ebenso wie die Tranexamsäure nach Sterilfiltration durch einen Sterilfilter der Porengröße 0,22 µm (Millipore Millex® Syringe Filter 0,22 µm, Bedford, USA) dem sterilen DMEM zugegeben.

L-Ascorbat spielt eine wichtige Rolle bei der Kollagenbiosynthese als Enzym-Kofaktor für die Hydroxylasen. Ohne die Hydroxylierungen ist, wie bereits oben dargestellt, eine korrekte Faltung der Kollagen-Tripelhelix nicht möglich. Darüber hinaus stabilisiert L-Ascorbat die Procollagen-mRNA und steigert die Transkription der Prokollagen-Genabschnitte (Hata & Senoo 1989).

Die antifibrinolytisch wirkende Tranexamsäure (Trans-4-aminomethyl-cyclohexan-1-carboxylsäure [t-AMCA]) wird im Fibrin-basierten Tissue Engineering verwendet um einer zu schnellen Degradation des Fibrins entgegenzuwirken. Dabei bindet sie kompetitiv an die Lysin-Bindungsseite des Plasminogens, sodass dessen Aktivierung zu Plasmin nicht stattfinden kann (Cholewinski *et al.* 2009).

## **5.2. Zellkultur**

### **5.2.1. Anlage von Primärkulturen aus humanen Nabelschnurarterien**

Das für die Anlage der primären Zellkulturen verwendete Gewebe in Form einer humanen Nabelschnur entstammt aus dem Kreißsaal des Uniklinikums Aachen als anonymisierte Gewebeprobe. Diese Kooperation mit Herrn Prof. Neulen aus der Klinik für Gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin wurde durch die Ethikkommission des Uniklinikums Aachen genehmigt (Votum der Ethikkommission: #EK

2067). Nach Geburt und anschließender Entbindung wird die Nabelschnur in einen Behälter mit sterilem Transportpuffer überführt und in einem Kühlschrank bis zur Präparation bei 4 °C aufbewahrt.

#### **Zusammensetzung des Transport-Puffers**

<b>0,5 l Transport-Puffer (pH = 7,5)</b>	<b>Benötigte Chemikalien</b>
11,9 g	Hepes (SIGMA Aldrich H3784)
40 g	NaCl (SIGMA Aldrich S9625)
1,5 g	KCl (Merck 1.04936.0500)
10 g	Glucose (Merck 1.08337.0250)

**Tabelle 3: Zusammensetzung des Transport-Puffers**

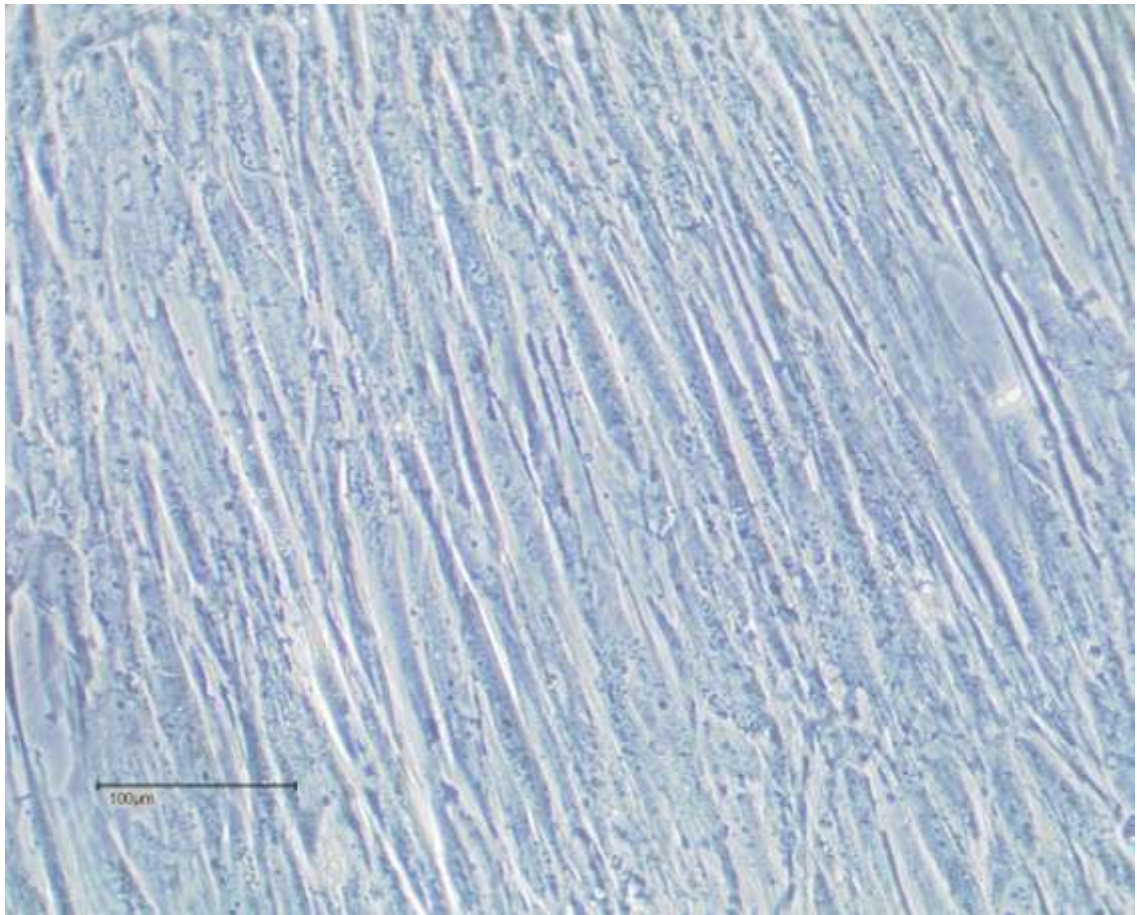
Die Präparation der Nabelschnur selbst erfolgt so bald wie möglich unter der Sicherheitswerkbank unter sterilen Bedingungen. Die Nabelschnur wird dabei in eine Petrischale überführt. Mit PBS angefeuchtete Mullkompressen verhindern ein Austrocknen des Gewebes. Mit einer 5 ml-Einmalspritze wird PBS aufgesogen und die beiden vorhandenen Nabelschnurarterien (Aa. umbilicales) werden drei- bis fünfmal durchgespült, um restliche Blutbestandteile zu entfernen. Mit Hilfe einer Chirurgischen und Anatomischen Pinzette sowie einer Schere werden nun die Nabelschnurarterien sowohl von dem sie umgebenden Bindegewebe als auch größtenteils von der Tunica adventitia befreit. Im Anschluss erfolgt die enzymatische Entfernung der Endothelzellen mittels 0,1 % Kollagenase (Sigma C0130). In einem nächsten Schritt werden die freipräparierten Nabelschnurarterien mit Skalpell in der Größen 11 und 23 in 2 - 3 mm breite Ringe geschnitten. In T-75-Zellkulturflaschen (Greiner 658175) werden nun 12 - 15 solcher Arterienringe mit Hilfe einer sterilen Pasteurpipette überführt und auf dem Boden der Zellkulturflasche verteilt. Für die Dauer von fünf Minuten werden die Arterienringe zum Antrocknen und damit zum Anhaften auf der Zellkulturflaschen-Oberfläche belassen, bevor sie mit 10 ml Primärkulturmedium vorsichtig eingedeckt werden.

Nach Zugabe des Mediums werden die Zellkulturflaschen im Inkubator (CB 150, Binder, Tuttlingen, Deutschland) bei einer Temperatur von 37 ° C, 5 % CO<sub>2</sub> und einer Luftfeuchtigkeit von 95 % kultiviert.

Das Aussprossen der ersten Zellen ist bereits nach wenigen Tagen zu beobachten; der erste Mediumwechsel erfolgt nach sieben Tagen. Nach spätestens 14 Tagen werden die Arterienringe mit Hilfe einer 10 ml fassenden serologischen Pipette mit breitem Auslauf entfernt um ein weiteres Wachstum der Zellen zu gewährleisten.

### **5.2.2. Subkultivierung in Zellkulturflaschen**

Trotz der Entfernung der Arterienringe findet die Proliferation der Zellen verstärkt an den Stellen des Zellkulturflaschenbodens statt, wo zu Beginn auch die Aussprossung stattgefunden hat. Durch das Überführen der Primärkultur in die Passage 1 kann dieses inhomogene Wachstum aufgehoben werden. Dafür wird das alte Medium zunächst durch Absaugung entfernt. Im Anschluss erfolgt ein Waschschriff mit 5 ml PBS-Puffer um u.a. restliches Medium und Detritus zu entfernen. Die Zellen werden nachfolgend mit 3 ml 0,25 % Trypsin-0,02% EDTA (Gibco 25200-056) und einer fünfminütigen Inkubationszeit bei 37 °C abgelöst. Die Zellablösung wird unter Einsatz des Phasenkontrastmikroskops kontrolliert und bei vollständiger Ablösung die proteolytische Spaltung der Adhärenzmoleküle der EZM durch die Zugabe von 7 ml serumhaltigen Mediums gestoppt. Nach mehrmaligem Abspülen des Zellkulturflaschenbodens wird die gewonnene Zellsuspension je nach gewünschtem Split-Verhältnis (1:2 bis 1:4) auf neue T-75-Zellkulturflaschen verteilt. In jede der Flaschen wird neues Medium nachgegeben, sodass insgesamt wieder 10 ml resultieren. Dieses Medium enthält keinen Antibiotikum-Antimykotikum-Zusatz mehr. Haben sich die Zellen so weit vermehrt, dass sie konfluent den Boden der Zellkulturflasche bedecken (siehe Abbildung 5), so wird der Passagierungsvorgang erneut durchgeführt und die Zellen bei der 2. Passage anstatt in T-75-Zellkulturflaschen in Triple Flasks (Nunclon 132913) mit einer Oberfläche von 500 cm<sup>2</sup> kultiviert um eine beschleunigte Zellvermehrung zu erreichen. Auf jede Triple Flask werden 60 ml Medium gegeben. Auch die Menge an PBS und Trypsin erhöhen sich entsprechend auf 25 ml und 20 ml für den kommenden Passagierungsvorgang.



**Abbildung 5: Myofibroblasten in P3 bedecken den Boden einer T75-Zellkulturflasche**

### **5.2.3. Kryokonservierung der Myofibroblastenkulturen**

Finden die Zellen nicht in absehbarer Zeit für einen Versuch Verwendung, so erfolgt eine Kryokonservierung der Zellen in der Passage 1 oder 2. Hierfür werden die Zellkulturflaschen wie bereits oben beschrieben mit Trypsin-EDTA behandelt und der Trypsinierungsprozess nach fünf Minuten Inkubationszeit und Kontrolle der Ablösung der Zellen unter dem Phasenkontrastmikroskop mit der Zugabe von Zellkulturmedium beendet. Die Zellsuspension wird bei 500 rpm für die Dauer von fünf Minuten zentrifugiert und das gewonnene Zellpellet in einer definierten Menge an Zellkulturmedium resuspendiert um die Zellzahl zu bestimmen. Im Anschluss an die Zellzahlbestimmung mittels des elektronischen Zellzahlbestimmungsgerätes CASY® (Cell Counter and Analyser System, Schärfe System, Reutlingen, Deutschland) werden die Zellen nochmals bei 500 rpm zentrifugiert und das Zellpellet in wenig Zellkulturmedium resuspendiert. Das Einfriermedium, welches in einem Verhältnis von 1:1 zu der Zellsuspension hinzugegeben wird, setzt sich aus 60 % DMEM, 20 % FBS und

20 % Dimethylsulfoxid (DMSO, SIGMA D2650) zusammen. DMSO wirkt als Kryoprotektiv und verhindert während der Gefrierphase eine intra- und extrazelluläre Eisbildung und schützt die Zelle vor der Dehydratation des Zytoplasmas. Die  $\sim 2,0 \times 10^6$  Zellen auf 1,5 ml Medium enthaltenden Kryoröhrchen (Greiner 8070176) werden zügig in einen Einfrierbehälter mit 2-Propanol überführt und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 12 Stunden gelagert. Nach diesem ersten Gefrierabschnitt werden die Kryoröhrchen bei  $-196^{\circ}\text{C}$  in den Flüssigstickstoffbehälter überführt und verbleiben dort bis zu ihrer Verwendung.

Das Auftauen der Kryoröhrchen erfolgt nach Entnahme aus dem Stickstofftank in einem  $37^{\circ}\text{C}$ -Wasserbad. Anschließend wird die Zellsuspension in ein 15 ml Falcon (BD Falcon™ 352097) überführt und mit reichlich Zellkulturmedium vermischt und dann bei 500 rpm für 5 min zentrifugiert. Danach wird das Zellpellet in Zellkulturmedium aufgelöst und nach gewünschter Zellzahl in T-75-Zellkulturflaschen überführt. Das Zellkulturmedium wird nach einer Ruhezeit von 12 h am nächsten Tag ausgewechselt.

### **5.3. Nutzung von Fibringel als Scaffold**

Schon im einleitenden Kapitel wurde die allgemeine Funktion eines Scaffolds als Stützstruktur im Tissue Engineering beschrieben, der als Leitschiene für das Zellwachstum besonders zu Beginn der Kultivierungsphase neuen Gewebes mechanische Stabilität verleiht und idealerweise im gleichen Maß von den Zellen resorbiert werden kann, wie das Gewebe aufgebaut wird, sodass am Ende ein vollständig autologes Konstrukt resultiert.

Hydrogele aus natürlich vorkommenden Polymeren wie Fibrin eignen sich sehr gut als Scaffolds für das Tissue Engineering von Weichgeweben. Sie weisen einen ähnlich hohen Wassergehalt wie diese Weichgewebe *in vivo* auf, besitzen entsprechend ähnliche mechanische Eigenschaften, sind biokompatibel und gewährleisten einen effizienten Transport von Nährstoffen und Stoffwechselprodukten (Ahmed *et al.* 2008). Eines der am häufigsten genutzten Hydrogele stellt das Fibringel dar, dessen Einsatz als dreidimensionale Matrix im Kardiovaskulären Tissue Engineering von Ye *et al.* im Jahre 2000 etabliert wurde.

Als Bestandteil des Blutes kann Fibrinogen aus dem späteren Empfänger des tissue engineered Gewebes selbst isoliert werden, sodass das Risiko einer Infektion oder

inflammatorischen Reaktion auf ein Minimum reduziert wird (Ye *et al.* 2000). Im Vergleich zu anderen verwendeten Scaffoldmaterialien kann im Fibringel eine gleichmäßige Verteilung der Zellen durch einen schnellen Polymerisationsprozess erreicht werden, der die Zellen in ihrer Position im entstehenden Gel fixiert (Swartz *et al.* 2005). Die Bedeutung einer dieser initialen gleichmäßigen Verteilung der Zellen für die EZM-Produktion konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden (Kim *et al.* 1998, Vunjak-Novakovic *et al.* 1998).

Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, das Fibringel in seiner noch flüssigen Phase in verschiedene dreidimensionale Formen zu bringen um es an die individuellen Anforderungen anzupassen (Jockenhoevel *et al.* 2001). Das Fibringel wird in der Kultivierung von im Medium enthaltenen Proteasen oder von den Zellen selbst enzymatisch abgebaut. Dabei entstehen keinerlei toxische Abbau- oder Zwischenprodukte. Dieser Prozess der Fibringel-Degradation, auch Fibrinolyse genannt, kann durch den Einsatz von Protease-Inhibitoren wie Aprotinin kontrolliert werden, welches durch seine Bindung an Plasmin die Fibrinolyse verhindert (Ye *et al.* 2000). In einer klinischen Studie von Mangano *et al.* im Jahre 2006 konnte gezeigt werden, dass Aprotinin mit einem erhöhten Risiko von gesundheitlichen Komplikationen, darunter Nieren- und Herzversagen, Herzinfarkt, Schlaganfall und Enzephalopathie assoziiert ist, sodass es seitdem nicht mehr für den klinischen Einsatz empfohlen wird (Mangano *et al.* 2006). Als eine sicherere Alternative etablierten Cholewinski *et al.* im Jahre 2009 die Tranexamsäure für das Fibrin-basierte Kardiovaskuläre Tissue Engineering (Cholewinski *et al.* 2009).

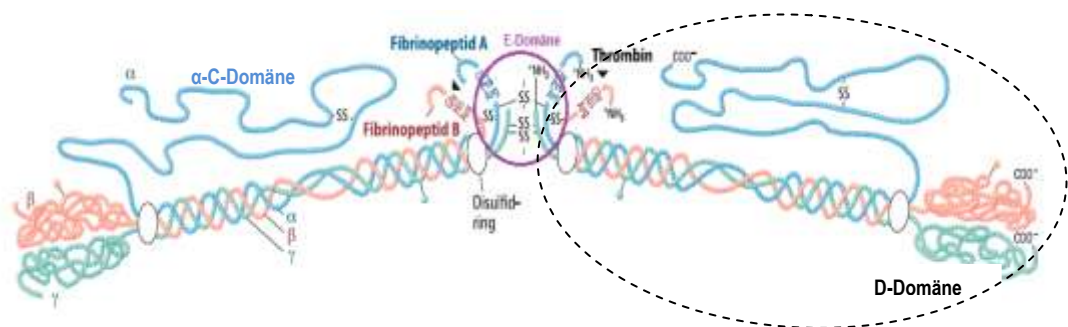
Tranexamsäure wird bereits seit Jahrzehnten in der Chirurgie appliziert um vor allem postoperative Blutverluste zu kontrollieren. Sie ist ein synthetisches Derivat der Aminosäure Lysin und übt ihren antifibrinolytischen Effekt aus durch die reversible Blockade von Lysin-Bindungsstellen an Plasminogen-Molekülen (Dunn & Goa 1999).

### **5.3.1. Komponenten des Fibringels**

Für die Herstellung von Fibringelen werden als Komponenten Fibrinogen, Thrombin, Calciumchlorid ( $\text{CaCl}_2$ ) und Tris-Buffered Saline (TBS) benötigt. Der Polymerisations-Prozess, der aus den flüssigen Einzelkomponenten das Fibringel entstehen lässt, stellt den finalen Schritt in der plasmatischen Blutgerinnungskaskade dar.



Fibrinogen stellt als Gerinnungsfaktor I das wesentliche Substrat in der Blutgerinnung dar und gehört mit einer Länge von 45 nm und einem Molekulargewicht von 340 kD zu den Glykoproteinen. Es ist in löslicher Form im Blutplasma lokalisiert, seine Konzentration beträgt dort 2 - 4 g/l. Das Fibrinogen-Molekül (siehe Abbildung 6) ist symmetrisch zusammengesetzt aus den beiden äußeren D-Domänen, die durch jeweils fünf Disulfidbrückenbindungen in der zentralen E-Domäne kovalent miteinander verknüpft sind. Nichtsymmetrische Disulfidbrückenbindungen bilden in dieser Region eine Disulfid-Ringstruktur aus. Jede der D-Domänen setzt sich aus den drei verschiedenen Polypeptidketten  $\text{A}\alpha$ ,  $\text{B}\beta$  und  $\gamma$  zusammen, welche aus 610, 461 und 411 Aminosäureresten bestehen. Die zentrale E-Domäne wird von den N-terminalen Bereichen aller sechs Polypeptidketten gebildet, während die beiden D-Domänen vor allem aus den hydrophoben C-terminalen Bereichen der  $\text{B}\beta$ -und  $\gamma$ -Polypeptidketten bestehen. Der hydrophile C-terminale Bereich der  $\text{A}\alpha$ -Kette, die sogenannte  $\alpha$ -C-Domäne, ist im Gegensatz zu den C-terminalen Bereichen der  $\text{B}\beta$ -und  $\gamma$ -Polypeptidkette frei beweglich, verlässt die D-Domäne und interagiert mit der E-Domäne.

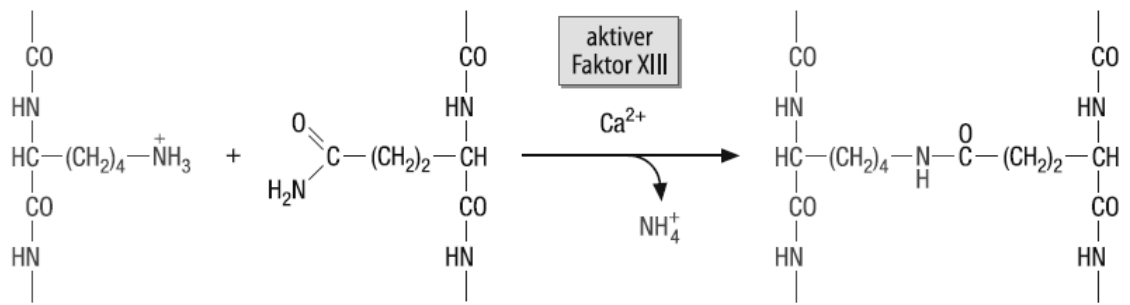


Außerdem sind diese  $\alpha$ -C-Domänen an der Polymerisation des Fibrinogens zu Fibrin beteiligt. Bei der Konversion von Fibrinogen zu Fibrin dissoziieren sie von der zentralen E-Domäne ab und stehen für intermolekulare Interaktionen zur Verfügung (Weisel & Medved 2001), wodurch unter anderem die Lateral-Assoziation der Fibrin-Fibrillen und damit auch die Ausbildung fibrillärer Fibrin-Netzwerke unterstützt wird (Collet *et al.* 2005). Darüber hinaus beinhalten die  $\alpha$ -C-Domänen RGD-Sequenzen, über die

zelluläre Interaktionen mit Fibrinogen bzw. Fibrin stattfinden können. Dies geschieht über die Bindung von Integrinen, transmembranären Zelladhäsionsmolekülen, an eben diese Sequenz (Mosesson 2005). Durch die Serinprotease Thrombin wird die Abspaltung der Fibrinopeptide A katalysiert. Bei den Fibrinopeptiden handelt es sich um N-terminal gelegene, 16 Aminosäuren-umfassende Abschnitte der Polypeptidketten  $A\alpha$ .

Dadurch wird die Polymerisationsregion  $E_A$ , die sich über die  $A\alpha$ - und  $B\beta$ -Polypeptidkette erstreckt, freigelegt und ist imstande, mit der komplementären Bindungsstelle  $D_A$  benachbarter Fibrinogen-Moleküle, die sich C-terminal auf der  $\gamma$ -Polypeptidkette befindet, zu assoziieren. Durch diese Assoziation entstehen doppelsträngige, sich umeinander windende Fibrin-Fibrillen.

Die Abspaltung der Fibrinopeptide B der  $B\beta$ -Polypeptidketten, die ebenfalls durch Thrombin katalysiert wird, geschieht langsamer als die der Fibrinopeptide A und legt die Polymerisationsstelle  $E_B$  frei, die mit der komplementären  $D_B$ -Bindungsstelle der  $B\beta$ -Polypeptidkette assoziiert um zu einer Lateralassoziation der Fibrin-Fibrillen zu führen, sodass schließlich ein dreidimensionales Fibrillen-Netzwerk resultiert. Alle zuvor stattfindenden Interaktionen sind von nicht-kovalenter Natur. Für eine ausreichende Stabilität des Fibrillen-Netzwerks bedarf es der Mithilfe des Faktors XIIIa, einer Transglutaminase. Diese wird durch Thrombin aktiviert und induziert in Abhängigkeit von Calcium die Ausbildung kovalenter Peptidbindungen zwischen Lysyl- und Glutaminylresten der  $A\alpha$ - und  $\gamma$ -Peptidketten (siehe Abbildung 7). Dadurch wird das Fibrin-Netzwerk mechanisch stabiler, weniger deformierbar und resistenter gegenüber der Lyse durch Plasmin (Lai *et al.* 1994).



**Abbildung 7: Quervernetzung der Fibrinogen-Moleküle durch F XIIIa**, Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC. Biochemie & Pathobiochemie. 8. Auflage. Springer - Berlin Heidelberg 2006: 984

Für die Herstellung des Fibringels wird kommerziell erhältliches humanes Fibrinogen-Lyophilisat der Firma (Sigma Aldrich F4883) verwendet.

### Thrombin

Die Serin-Protease Thrombin als Faktor IIa der Blutgerinnung entsteht durch die Aktivierung der Vorläuferstufe Prothrombin und besitzt eine strukturelle Ähnlichkeit zu Trypsin. Sie spielt eine zentrale Rolle im Polymerisationsprozess des Fibrinogens durch ihre Fähigkeit, die Fibrinopeptide A und B des Fibrinogens proteolytisch abzuspalten, sodass eine spontane Assoziation der dadurch freigewordenen Polymerisationsregionen stattfinden kann. Des Weiteren unterstützt Thrombin durch die Aktivierung von Faktor XIIIa wie bereits oben dargestellt die Ausbildung von stabilisierenden Peptidbindungen zwischen den Peptidketten des Fibrinogens.

### Calciumchlorid (CaCl<sub>2</sub>)

Bei der Blutgerinnung binden mehrere der oben aufgeführten Gerinnungsfaktoren im Verletzungsgebiet an Zellmembranen. Dabei vermitteln freie Calcium-Ionen die Bindung der Gerinnungsfaktoren an die Zellmembranen, indem sie die Fähigkeit besitzen, auf der einen Seite in Wechselwirkung mit den Phospholipiden zu treten und auf der anderen Seite von  $\gamma$ -Carboxyglutaminsäure-Gruppen der Gerinnungsfaktoren gebunden zu werden.

Calcium-Ionen unterstützen außerdem den Polymerisationsprozess des Fibrinogens insofern, als der Faktor XIII erst durch die Bindung von Calcium-Ionen an seinen Calcium-bindenden Domänen Asn<sup>436</sup>, Asp<sup>438</sup>, Ala<sup>457</sup>, Glu<sup>485</sup> und Glu<sup>490</sup> seine volle

Aktivität erlangt (Fox *et al.* 1999) um die Fibrinogenmonomere untereinander quer zu vernetzen, sodass eine ausreichende Stabilität im Fibrin-Fibrillen-Netzwerk erreicht wird (Lai *et al.* 1994). Des Weiteren wird eine verbesserte Polymerisation durch das Vorhandensein von Calcium-Ionen erreicht, indem die Wirkung von N-Acetylneuraminsäuren vermindert wird, die über Asparaginsäure gekoppelt an den Positionen B $\beta$ <sup>364</sup> und  $\gamma$ <sup>52</sup> des Fibrinogens lokalisiert sind und ansonsten zu einer Abstoßung der Fibrinogenmonomere untereinander führen würden (Dang *et al.* 1989). Um eine vollständige Polymerisation und Unlöslichkeit des Fibringels *in vitro* zu erreichen wird eine 50 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung verwendet.

#### **TBS (Tris buffered saline)-Puffer**

Tris-gepufferte Salzlösung wird bei der Herstellung von Fibringelen sowohl als Dialysierflüssigkeit für das gelöste Fibrinogen als auch zur Resuspension des gewonnenen Zellpellets aus den abtrypsinierten Zellkulturflaschen eingesetzt. Durch den beim Ansetzen der Tris-gepufferten Salzlösung eingestellten pH-Wert von 7,4 bei Raumtemperatur und der isoosmotischen Umgebung können die Zellen in der Salzlösung bis zum Gießen in das Fibringel verbleiben, ohne eine osmolare Schädigung zu erfahren. Für 4,5 l Puffer werden 19,62 g Tris HCl (SIGMA Aldrich T3253), 2,88 g Trisma Base (SIGMA Aldrich T6066), 36 g NaCl (SIGMA Aldrich S9625) und 0,9 g KCl (Merck 1.04936.0500) benötigt.

#### **5.4. Herstellung der Fibringele**

Die Fibringele werden in 24-Well-Platten (Greiner 662160) kultiviert. Da in diesem Versuch eine statische Kultivierung gewählt wird, sollte das Volumen der Gele so bemessen werden, dass zum einen der Diffusionsweg für die Nährstoffe aus dem Medium so kurz wie möglich ist und zum anderen aber die Fibringele noch eine ausreichende Stabilität gewährleisten, da sie als Scaffold, wie bereits oben erwähnt, den Zellen als Stützstruktur für die eigene EZM-Synthese dienen.

Aus eigenen Vorversuchen wurde zur Erfüllung oben genannter Eigenschaften eine Fibringel-Dicke von 2 mm ermittelt.

Hieraus ergibt sich ein Fibrinogen-Gesamtvolumen von 400 µl pro Well, welches sich wiederum zusammensetzt aus 200 µl Fibrinogen, 140 µl TBS mit Zellen bzw. ohne Zellen, 30 µl CaCl<sub>2</sub> sowie 30 µl Thrombin.

#### 5.4.1. Herstellung der Fibrinogen-Lösung

Zunächst wird unter Berücksichtigung einer gewissen Reserve die benötigte Menge an Fibrinogen-Lösung angesetzt.

Dafür wird das in lyophilisierter Form vorliegende Fibrinogenpulver in 6-Well-Platten (Greiner 657160) gelöst, in die jeweils 3 ml Reinstwasser (Direct-Q UV3, Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) gefüllt werden. Etwa 75 mg des Lyophilisats pro Well werden dann vorsichtig auf die Wasseroberfläche gegeben. Bevor der Deckel der 6-Well-Platte aufgelegt werden kann, sollte das Fibrinogen-Pulver bereits in das Reinstwasser diffundiert sein, da ansonsten aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen das Pulver von dem Deckel angezogen wird. Nach der vollständigen Auflösung des Fibrinogen-Pulvers nach etwa 1 - 2 Stunden wird die Fibrinogen-Lösung in einen Dialyseschlauch (Spectra / Por 1, MW Co 6000-8000, 32 mm breit, Novodirect, Kat. Nr. 10801) überführt und gegen 4 l TBS-Puffer über Nacht dialysiert. Im Anschluss an den Dialyse-Vorgang wird die Fibrinogen-Lösung sterilfiltriert und in einen sterilen Behälter überführt.

Die Konzentrationsbestimmung des Fibrinogens erfolgt photometrisch mithilfe des Spektralphotometers bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 280 \text{ nm}$  in einer Quarzküvette. Zur Verdünnung in einem Verhältnis von 1:20 wird TBS-Puffer verwendet. Die Konzentration des Fibrinogens (mg / ml) wird wie folgt berechnet (Nguyen 2006):

$$\text{Fibrinogenkonzentration (mg/ml)} = \frac{\text{Absorption bei 280nm}}{1,55} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

#### Formel 1: Berechnung der Fibrinogen-Konzentration

Die Konzentration wird mit sterilem TBS-Puffer auf 11,5 mg / ml eingestellt.

#### **5.4.2. Vorbereitung der zusätzlichen Fibringel-Komponenten**

Für die Herstellung des Fibringels wird im Gefrierschrank gelagertes steriles Thrombin in der benötigten Menge aufgetaut und 50 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung autoklaviert. Damit die Zellen, die in die Fibringele gegossen werden, nicht unnötigem Stress unterliegen, werden sie erst kurz vor dem eigentlichen Gießen der Fibringele in den Zellkulturflaschen abtrypsinisiert. Das durch fünfminütige Zentrifugation gewonnene Zellpellet wird in einer definierten Menge an Zellkulturmedium resuspendiert und die Zellzahl mithilfe des CASY® ermittelt. Je nachdem, welche Zellzahl pro ml Fibringel angestrebt wird, werden die Zellen in entsprechender Menge an TBS-Puffer resuspendiert.

Für die Durchführung dieser Studie wurden Myofibroblasten aus sechs verschiedenen Nabelschnüren isoliert und „gepoolt“. Zur Herstellung der Zellsuspension für das Fibringel wurden also zum Teil zuvor kryokonservierte Zelllinien verwendet, nachdem diese wie die „frischen“ Myofibroblasten in die Generation P3 überführt worden waren. Dieses Vorgehen wurde gewählt um Störeinflüsse durch etwaige Unterschiede zwischen den Zelllinien der verschiedenen Spender zu reduzieren.

#### **5.4.3. Gießen der Fibringele**

Das Gießen der Fibringele erfolgt mithilfe einer Spritzenvorrichtung der Firma Baxter (Baxter Healthcare Corporation, Unterschleißheim, Deutschland). Diese Spritzenvorrichtung bietet Platz für zwei 1 ml-Spritzen, die parallel eingesetzt werden können. Der Aufsatz dieses Systems wird auf die beiden Spitzen der Spritzen aufgesteckt und beinhaltet zwei separate Kanäle, die in einen gemeinsamen Endkanal münden. Diese Spritzenvorrichtung erleichtert und beschleunigt das Gießen der Fibringele und trägt darüber hinaus durch den gemeinsamen Endkanal zu einer guten Durchmischung der einzelnen Komponenten bei (siehe Abbildung 8).

In die eine 1 ml-Spritze wird die Mischung aus Thrombin,  $\text{CaCl}_2$  und TBS mit Zellen bzw. ohne Zellen, und in die andere 1 ml-Spritze Fibrinogen aufgezogen. Mit den Füllungen beider Spritzen können so fünf Gele zu je 400  $\mu\text{l}$  nacheinander gegossen werden. Vor dem Gießen des ersten Fibringels sollte darauf geachtet werden, dass sich keine



Luftbläschen mehr im Kanalsystem befinden, da diese ansonsten zu einer nachteiligen Inhomogenität im Fibringel führen können. Nach dem Gießen eines Fibringels wird die 24-Well-Platte vorsichtig geschwenkt um die homogene Verteilung der hineingegebenen Substanzen weiter zu unterstützen, bevor die Polymerisation innerhalb von 30 Sekunden zu einem festen Gel führt.

Die weitere, vollständige Polymerisation benötigt etwa 1 Stunde. Erst im Anschluss werden die Fibringele mit jeweils 2 ml Bioreaktormedium, dessen Zusammensetzung in Kapitel 5.1.2. erläutert wurde, eingedeckt.

**Abbildung 8: Spritzensystem**

### **5.5. Statische Kultivierung der Fibringele, Probenentnahme und -lagerung**

Die Kultivierung der Fibringele erfolgt statisch bei 37 °C, 5 %  $\text{CO}_2$  und 95 % Luftfeuchtigkeit für die Dauer von 24 Tagen.

Für die Untersuchung von Tropoelastin im Medium werden alle drei Tage, also an den Tagen 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 und 24 Proben aus vier unterschiedlichen, dafür vorgesehen Wells entnommen. Für die Untersuchung des Elastingehalts in den Fibringelen werden jeweils vier Fibringele zu den Zeitpunkten 3, 6, 12, 18 und 24 entnommen. Als Hintergrundwerte zu den Mediumproben dienen Proben des frischen

Mediums, welche bei jedem Mediumwechsel entnommen werden. Als Hintergrundwerte für die Fibringle dienen Fibringle ohne Zellen.

Alle Proben werden nach ihrer Entnahme in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt, in flüssigem Stickstoff Schock-gefrostet und im Gefrierschrank bei -80 °C bis zur Anwendung des Fastin™ Assays zur Bestimmung von Tropoelastin bzw. Elastin gelagert. Die entnommenen Fibringle werden, bevor sie Schock-gefrostet und gelagert werden, 2 x 15 min mit PBS gespült um überschüssiges Medium zu entfernen. Zu jedem Zeitpunkt, an dem die Fibringle als Proben entnommen werden, werden auch jeweils drei Fibringle für die histologische Aufbereitung und drei Fibringle für die Überprüfung der mechanischen Reißfestigkeit mit dem Burst Strength-Test entnommen.

## **5.6. Messung des Elastingehalts mit dem Fastin™ Assay**

Für die Messung des Tropoelastingehalts im Medium und Elastingehalts in den Fibringelen kommt der Fastin™ Assay der Firma Biocolor (Biocolor Ltd., Carrickfergus, Nordirland) zur Anwendung. Es handelt sich dabei um ein quantitatives, photometrisches Verfahren zum Nachweis von Elastin in Flüssigkeiten oder Gewebeextrakten. Der verwendete saure Farbstoff 5, 10, 15, 20-Tetraphenyl-21,23-Porphyrin Tetra-Sulfonat (TPPS) interagiert mit basischen und nicht-polaren Aminosäuresequenzen der Tropoelastin-Monomere und führt zu einem Farbumschlag der zu messenden Lösung. Dieser Effekt wurde schon vor ungefähr 40 Jahren durch Versuche von Winkelmann und Spicer beschrieben, die eine Ablagerung von TPPS in elastischen Geweben von Ratten beobachteten (Winkelmann 1962, Winkelmann & Spicer 1962).

Aufgrund der Absorptionsmessung des mitgelieferten Tropoelastin-Standards bekannter Konzentration (1 mg / ml) kann hinterher auf die Konzentration der gemessenen Medium-und Fibringelproben zurückgeschlossen werden.

### **5.6.1. Vorbereitung der Fibringelproben und der Positivkontrolle**

Während Tropoelastin in Aliquots der Mediumproben direkt mit dem Assay gemessen werden kann, müssen die Fibringelproben zunächst für die Messung vorbereitet werden, da in den Fibringelen Tropoelastin aufgrund des in 3.1.4.5 erläuterten



extrazellulären „Processing“ bereits in quervernetzter Form vorliegt. Auch in der als Positivkontrolle mitgeführten Nabelschnur ist davon auszugehen, dass Elastin nicht als lösliches Tropoelastin vorliegt, sondern in die EZM der Nabelschnur als elastische Faser eingebaut wurde.

Zur Extraktion von Elastin aus den Fibringelen bzw. des Nabelschnurstückchens, werden diese in kleine Falcons (BD Falcon™ 352097) überführt und für 1 h in 0,25 M Oxalsäure (SIGMA 241172) gekocht. Das Volumen der hinzugegeben Oxalsäure richtet sich dabei nach dem Feuchtgewicht des Gewebes, sodass das Verhältnis von Gewebe zu Oxalsäure 1 : 20 beträgt. Nach dem ersten Kochzyklus werden die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt und anschließend bei ca. 3000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird danach abpipettiert und erneut in kleine Falcons überführt. Die Extraktionsprozedur wird so lange wiederholt, bis das Fibringel völlig aufgelöst wurde. Erfahrungsgemäß werden zwei bis drei Kochzyklen zur Auflösung der Fibringle benötigt. Anschließend stehen die Proben, die nun fraktioniertes  $\alpha$ -Elastin<sup>1</sup> enthalten, für die Messung mit dem Fastin™ Assay zur Verfügung. Bis zur weiteren Verwendung kann eine sinnvolle Modifikation der Herstelleranweisungen zur Durchführung des Assays vorgenommen werden: aufgrund des in Kapitel 3.1.4.6. erklärten Vorgangs der Koazervation ist eine Abkühlung der Fibringelextrakte auf < 20°C empfehlenswert. Während der Abkühlungsphase kann der Assay auch unterbrochen und ggf. am nächsten Tag fortgesetzt werden.

#### **5.6.2. Durchführung des Fastin™ Assays**

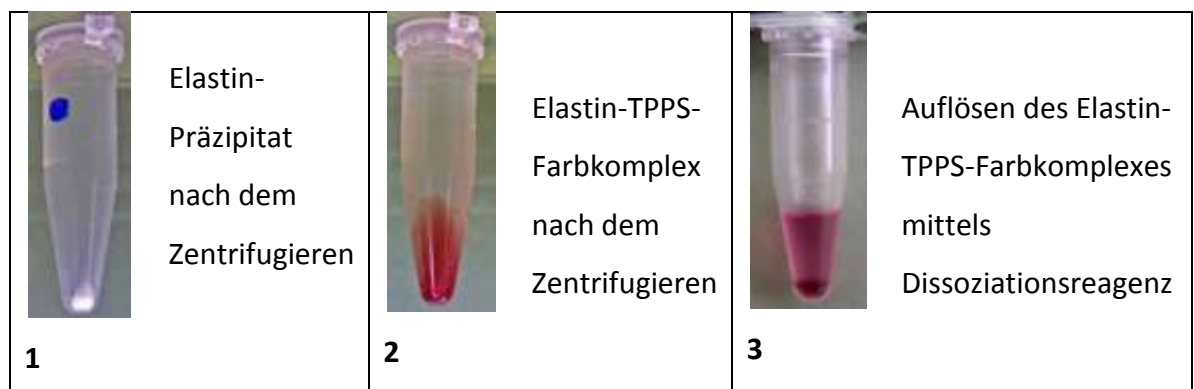
Nach erfolgter Extraktion von  $\alpha$ -Elastin aus den Fibringelen kann der Assay nun durchgeführt werden.

Die Mediumproben werden aus dem -80 °C-Gefrierschrank entnommen und bei Zimmertemperatur aufgetaut. Zunächst werden für die Leerwerte je 100  $\mu$ l Oxalsäure und PBS in Eppendorf-Gefäßen vorgelegt. Anschließend werden je 12,5  $\mu$ l, 25  $\mu$ l, 50  $\mu$ l und 100  $\mu$ l des Standards in Eppendorf-Gefäße gegeben. Aus den Mediumproben und Fibringel-bzw. Nabelschnurextrakten werden Aliquots von 50  $\mu$ l in Eppendorf-Gefäßen vorgelegt.

---

<sup>1</sup> Nach dem Kochen der Fibringle in Oxalsäure liegt Elastin in fraktionierter Form als sog.  $\alpha$ -Elastin vor.

Zu allen Eppendorf-Gefäßen wird anschließend ein äquivalentes Volumen an Tropoelastin-Präzipitationsreagenz hinzugegeben. Nach kurzem Durchmischen mittels eines Vortexers, wird nach 10 min eine vollständige Präzipitation erreicht. Dann werden die Eppendorf-Gefäße bei > 10.000 g für 10 min zentrifugiert, um das Präzipitat zu verdichten. Der Überstand wird vollständig aus den Gefäßen entfernt, in dem diese nach der Entleerung in ein Becherglas kräftig auf Papierhandtücher geklopft werden (siehe Abbildung 9.1). Anschließend wird in jedes Eppendorf-Gefäß 1 ml TPPS hinzugegeben und die Elastin-Präzipitate mit Hilfe des Vortexers aufgelöst. Die Proben werden dann für mindestens 90 min auf einem Shaker (Polymax 1040, Heidolph, Schwabach, Deutschland) in Bewegung gehalten um eine ausreichende Interaktion des Farbstoffs mit dem Substrat zu ermöglichen. Im Anschluss werden die Eppendorf-Gefäße erneut bei > 10.000 g für 10 min zentrifugiert. Wiederum wird der Überstand möglichst vollständig entfernt. Zurück bleibt in Tropoelastin enthaltenden Proben ein rötlich-braunes Pellet am Boden des Gefäßes (siehe Abbildung 9.2). Zu allen Eppendorf-Gefäßen werden anschließend 250 µl des Dissoziationsreagenz hinzugegeben (siehe Abbildung 9.3) und die Pellets wieder mit Hilfe des Vortexers aufgelöst. Sobald diese vollständig gelöst sind, werden 200 µl eines jeden Eppendorf-Gefäßes in eine 96-Well-Platte (Greiner 655180) überführt und anschließend mit dem Microplate Reader Tecan Infinite 200® (Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz) bei 513 nm gemessen.

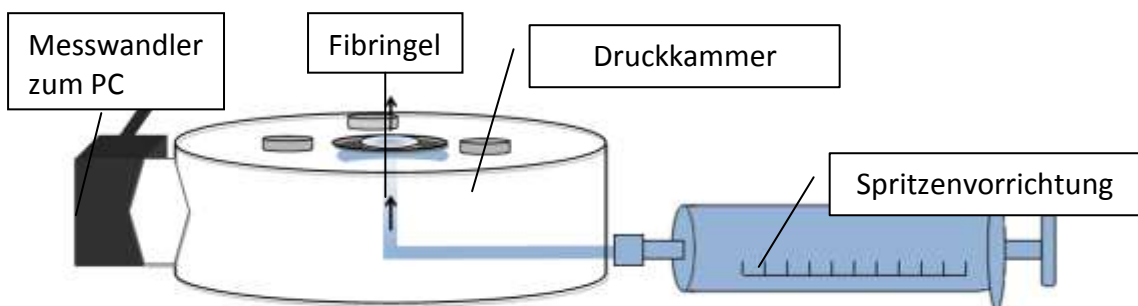


**Abbildung 9: Durchführung des Fastin™ Assays**, Fastin Manual. Biocolor Ltd. - Carrickfergus, Nordirland 2007: 2

Die Berechnung des Tropoelastingehalts in den Medium- bzw. des Elastingehalts in den Fibringelproben erfolgt nach Erstellung der Standardkurve. Die Ergebnisse werden erfasst und grafisch ausgewertet.

### 5.7. Messung der Reißfestigkeit der Fibringle mit dem Burst Strength-Test

Um die mechanische Reißfestigkeit der Fibringle zu beurteilen werden diese mit einer in unserer Arbeitsgruppe entwickelten Druckkammer gemessen. Dazu werden an jedem Tag der Fibringelentnahme je drei Fibringle in der Druckkammer platziert (siehe Abbildung 10). Über eine mit Reinstwasser gefüllte Spritze wird von unten Druck auf das Fibringel appliziert und das Reinstwasser durch das Fibringel filtriert, welches sich durch eine Öffnung in der Kammer nach oben wölbt. Wird die Filtrationskapazität des Fibringels überschritten, reißt es ein. Der zuvor gemessene maximale Druck entspricht dann der mechanischen Reißfestigkeit des Gels (Burst Strength).



**Abbildung 10: Messvorrichtung für den Burst Strength-Test**

### 5.8. Histologische Analyse der Fibringle

Die Analyse der Fibringle umfasst die konventionelle histologische Färbung in Form einer Hämatoxylin-Eosin-Doppelfärbung sowie die immunhistologische Darstellung von Elastin und Zellkernen.

#### 5.8.1. Herstellung fixierter Fibringle und Mikrotomschnitte

Für die Fixierung der Fibringle werden diese nach der Entnahme aus den Well-Platten in Einbettkassetten gelegt und zunächst für 2 Stunden in Carnoy-Fixativ fixiert. Carnoy-Fixativ als alkoholisches Fixiergemisch setzt sich zusammen aus 60 % Ethanol absolut (Merck 1.009.832.511), 30 % Chloroform (SIGMA C2432) und 10 % Eisessig (SIGMA A-6283) und dringt rasch in Gewebe ein.

Bevor die Präparate jedoch in Paraffin gegossen werden können, müssen sie zunächst in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert werden.

Dafür werden sie in einem Entwässerungsautomaten durch sukzessives Überführen in 60%, 80%, 90% und 100% Isopropanol-Lösungen (Isopropanol Merck 1.009.832.511) und 100% Xylol-Lösung (Sigma 296325) für je 1 h entwässert.

Im Anschluss werden die Präparate in reinem Paraffin (Paraffin-Pastillen Merck K29908058-237) über Nacht gelagert und werden am nächsten Morgen an einem Ausblock-Automaten (Leica GmbH, Wetzlar, Deutschland) in Paraffinblöcke gegossen.

Sobald der Paraffinblock erkaltet und ausgehärtet ist, werden 3,5 bzw. 5 µm dicke Schnitte mit Hilfe eines Schlittenmikrotoms angefertigt, die in einem 37° C warmen Wasserbad gestreckt und anschließend auf Objektträger (SuperFrost Plus Menzel GmbH & Co. KG J1800AMNZ) übertragen werden, wobei die glänzende Messerseite des Schnittes dem Objektträger zugewandt ist. Abschließend werden die Schnitte bei 37° C über Nacht getrocknet.

### **5.8.2. Histologische Färbungen**

Mithilfe histologischer Färbungen können intra- und interzelluläre Strukturen dargestellt werden, indem natürliche oder synthetische Farbstoffe als Spektralfarben ( $\lambda = 400 - 800 \text{ nm}$ ) detektiert werden.

Bevor jedoch eine histologische oder immunhistologische Färbung durchgeführt werden kann, müssen Paraffinschnitte am Tag der Färbung entparaffiniert werden.

Hierzu werden sie nacheinander

- 3 x 5 min in Xylol,
- 2 x 5 min in 100 % Ethanol,
- 1 x 5 min in 96 % Ethanol,
- 1 x 5 min in 80 % Ethanol
- 1 x 5 min in 70 % Ethanol überführt.

Nach Äquilibration in Aqua dest. kann die Färbung der Schnitte beginnen.

#### **5.8.2.1. HE-Färbung**

Die HE-Färbung ist eine Doppelfärbung mit Hämatoxylin und Eosin und dient zur Übersichtsfärbung eines Präparats. Bei Hämatoxylin handelt es sich um einen natürlichen Farbstoff, der zunächst zu Hämalaun aufbereitet werden muss, bevor er alle basophilen Strukturen, also z.B. Zellkerne und das rER blau-violett färbt (Hämalaun steht aber auch als Fertiglösung zur Verfügung). Eosin ist ein synthetischer Farbstoff, der alle eosinophilen Strukturen, also z.B. Zellplasma, rot färbt.

Das Vorgehen zur Färbung ist wie folgt:

1. Entparaffinieren wie in 4.8.2 beschrieben
2. Färbung der Zellkerne in Mayers Hämalaun (Fertiglösung; Merck 1.09249.0500) für 10 sek
3. Entfärben unter fließendem Leitungswasser, erst einzeln dann in einem Färbekasten nach Hellendahl für 7 min
4. Färbung des Cytoplasma in Eosin Y (Fertiglösung; Sigma HT110-2-16)
  - 1000 µl Eosin + 5 µl Eisessig (Glacial Acid) für 1 min
5. Entfärben unter fließendem Leitungswasser für 7 min
6. in 96 % und dann in 100 % Ethanol kurz schwenken
7. in 100 % Xylol kurz schwenken
8. Xylol kurz abdampfen lassen
9. mit dem Einschlussmittel Euparal (Roth 7356.1) eindecken und luftblasenfrei mit einem Deckglas abdecken

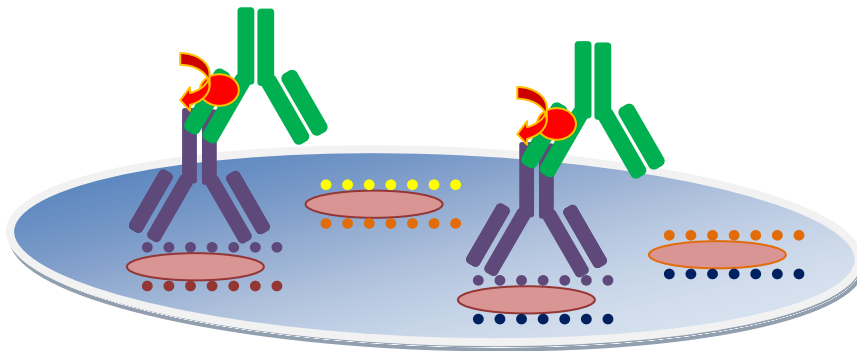
Die Auswertung der histologischen Präparate erfolgt mit dem Imager D1-Mikroskop (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Deutschland).

#### **5.8.2.2 Immunhistologische Färbungen**

Bei der immunhistologischen Färbung werden Antikörper gegen bestimmte Proteine eingesetzt um diese in einem Präparat sichtbar zu machen. Dabei macht man sich die Affinität eines Antikörpers gegen ein bestimmtes Epitop im Sinne einer Antigen-Antikörper-Reaktion zunutze. Idealerweise kommt es dabei zur Ausbildung einer starken spezifischen Bindung zwischen Antigen und Antikörper, wobei der Antikörper

mit einem Detektionssystem gekoppelt ist, der dessen Vorhandensein im Präparat sichtbar macht.

Man unterscheidet grundsätzlich zwischen einer direkten und einer indirekten Methode. Bei der direkten Methode wird das zu untersuchende Antigen mit einem Antikörper zusammengebracht, der entweder direkt mit einem fluoreszierenden Farbstoff oder mit einem Enzym, welches bei der Umsetzung eines Substrats zu einer Farbemission führt, gekoppelt ist. Man bezeichnet den Antikörper, der das Antigen bindet, als Primärantikörper. Bei der indirekten Methode wird durch die Bindung eines Sekundärantikörpers, der an ein Enzym gekoppelt und gegen den Primärantikörper gerichtet ist, eine Enzym-Substrat-Reaktion ausgelöst, durch die die Farbentstehung initiiert wird (siehe Abbildung 11).



**Abbildung 11: Indirekte Methode der Immunhistologie**

In dieser Arbeit kommt die indirekte Methode der immunhistologischen Färbung von Elastin zur Anwendung.

Die Beurteilung der Schnitte erfolgt mit dem Observer Z1-Fluoreszenzmikroskop (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Deutschland) bei einer Belichtungszeit von 300 ms.

### **Immunhistologische Färbung von Elastin**

Das Vorgehen zur immunhistologischen Färbung von Elastin ist wie folgt:

Alle Mengenangaben beziehen sich auf einen Schnitt.

1. Entparaffinieren wie in 4.8.2 beschrieben
2. Blocken unspezifischer Bindungsstellen für 1 h mit 100 µl des 0,1% Triton-Waschpuffers (Merck 648465), der 5% Normal Goat Serum (Dako X0907) enthält

3. Inkubation mit 100 µl des Primärantikörpers gegen Elastin für 1 h ( $\alpha$ -Elastin, Fitzgerald 20R-ER003, Host Rabbit) in der Verdünnung 1:50
4. Waschen in 0,1% Triton-Waschpuffer für 3 x 5 min
5. Inkubation mit 100 µl des Sekundärantikörpers für 1 h (Alexa Fluor 594 invitrogen, anti Rabbit) in der Verdünnung 1:400
6. Waschen in 0,1% Triton-Waschpuffer für 4 x 5 min
7. Färbung der Zellkerne mit 100 µl der DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid )-Lösung für 5 min
  - Herstellung aus 7,5 µl der DAPI-Socksolution, die auf 5 ml PBS verdünnt werden
8. Waschen in 0,1% Triton-Waschpuffer für 3 x 5 min
9. Eindecken mit Fluoreszenz Mounting Medium und Abdecken mit Deckglas

Die Schnitte dürfen während des gesamten Färbeprozesses nicht austrocknen und werden bis zur Aufnahme der Bilder lichtgeschützt in einem mit feuchten Tüchern ausgelegten, dunklen Behälter aufbewahrt.

### **Anfertigung von Negativkontrollen**

Das Vorgehen zur Anfertigung von Negativkontrollen ist wie in Kapitel 5.8.3.1. beschrieben, jedoch mit dem Unterschied, dass die Schnitte nicht mit dem Primärantikörper inkubiert und in einem separaten Gefäß gewaschen werden. Sie dienen dazu, die geeignete Belichtungszeit für die Positivkontrollen zu ermitteln.

## **5.9. Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der Messergebnisse erfolgt mit SAS® Vers. 9.1.3 SP4 (SAS Institute Inc, North Carolina, USA). Es werden die Tropoelastin-Konzentrationen in den Mediumproben bzw. der  $\alpha$ -Elastingehalt in den Fibringelen sowie die mechanische Reißfestigkeit der Fibringle aufeinanderfolgender Tage untersucht. Die beobachteten Zusammenhänge werden deskriptiv beschrieben. Eine Aussage zur statistischen Signifikanz der festgestellten Konzentrationsunterschiede in Form einer univariaten Varianzanalyse kann nicht getroffen werden, da durch Verwendung eines „Zellpools“ zur Besiedlung der Fibringle die Voraussetzungen zur Varianzanalyse nicht erfüllt sind.

## 6. Ergebnisse

Die Kultivierung der Fibringele wurde planmäßig durchgeführt und die entnommenen Medium- und Fibringelproben wie in Kapitel 5.5. beschrieben bis zur Durchführung des Fastin™ Assays gelagert. Die Zahl der zu untersuchenden Mediumproben und der entsprechenden Fibringele wurde auf  $n = 4$  für jeden Messzeitpunkt festgelegt. Substanzen wie PBS oder Oxalsäure, die zur Aufbereitung der Proben für die Messung verwendet wurden, sowie das zu jedem Mediumwechsel abgenommene, frische Medium wurden doppelt bestimmt. Für die Messung der mechanischen Reißfestigkeit, die zu jeder Gelentnahme durchgeführt wurde, standen jeweils drei Fibringele zur Verfügung.

### 6.1. Erstellung der Standardkurve zum Fastin™ Assay

Zur Bestimmung der Tropoelastin-Konzentration in den Mediumproben und der Elastin-Konzentration in den Fibringelproben wurde zunächst eine Standardkurve mit Hilfe des mitgelieferten  $\alpha$ -Elastin-Standards erstellt (siehe Abbildung 12). Die Ergebnisse dieser Messung sind in Tabelle 4 wiedergegeben. Von dem jeweiligen, sich aus der doppelten Messung ergebenden Mittelwert wird der Leerwert für PBS abgezogen, da diese zur Verdünnung des  $\alpha$ -Elastin-Standards hinzugegeben wurde.

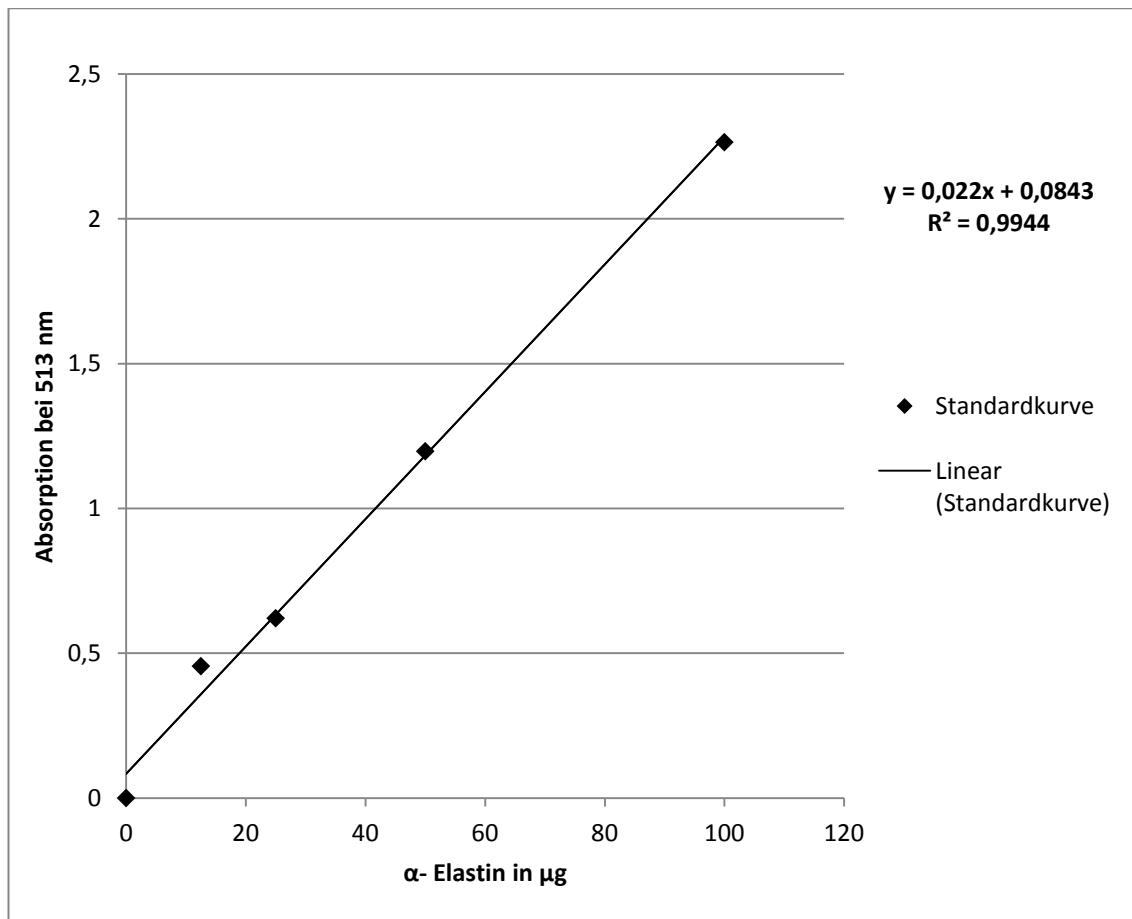
#### Absorption des $\alpha$ -Elastin-Standards

$\alpha$ -Elastin (1 mg / ml) in $\mu\text{g}$	Messung 1	Messung 2	Mittelwert	Leerwert PBS	korrigierter Messwert *)
0	0,0395	0,0438	0,04165	0,04085	0,0018
12,5	0,536	0,458	0,497	0,04085	0,416
25	0,709	0,6156	0,6623	0,04085	0,5736
50	1,3285	1,1492	1,23885	0,04085	1,1072

\*) korrigierter Messwert = Mittelwert-Leerwert PBS

**Tabelle 4: Absorption des  $\alpha$ -Elastin-Standards**





**Abbildung 12: Standardkurve des Fastin™ Assays**

Anhand des Absorptions-Konzentrations-Koeffizienten kann nun die Absorption in die entsprechende Elastin-Konzentration umgerechnet werden (siehe Formel 2). Das Bestimmtheitsmaß beträgt  $R^2 = 0,9944$ .

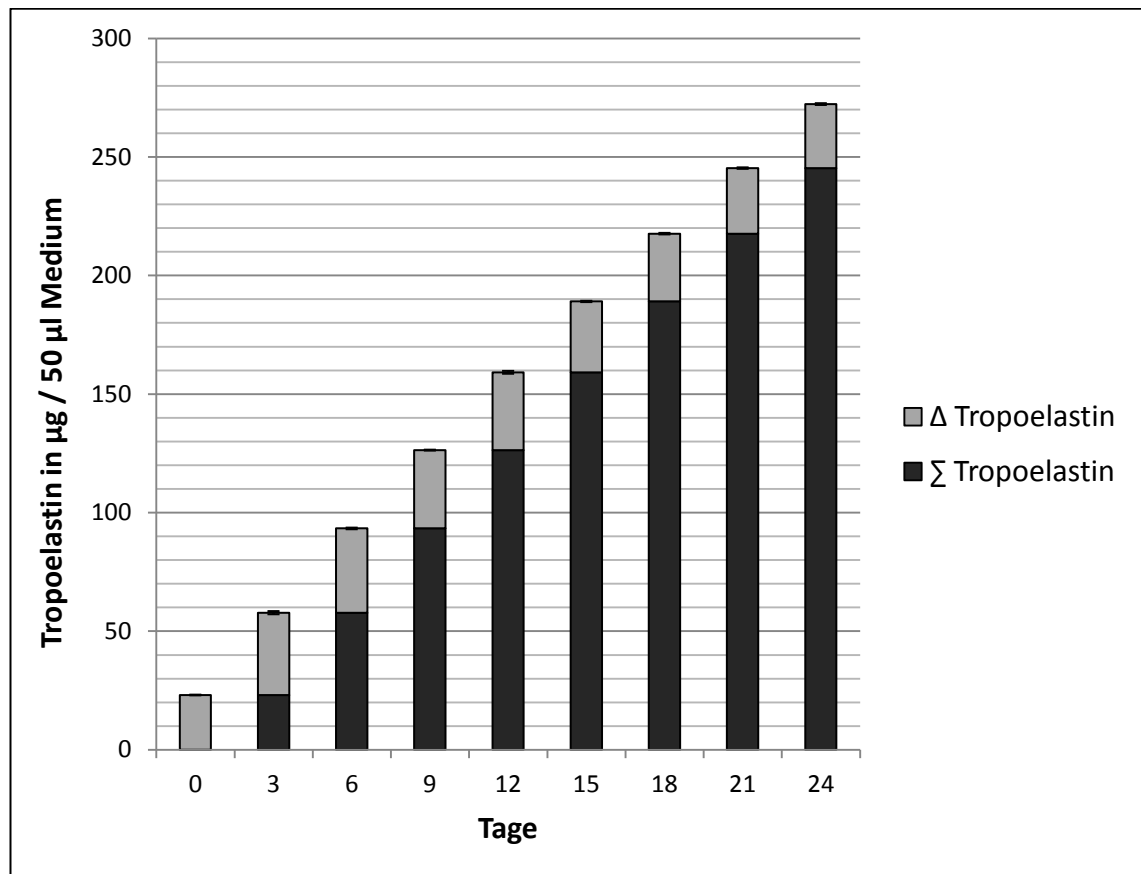
$$\text{Tropoelastin / } \alpha\text{-Elastin} - \text{Konzentration in } \mu\text{g} = \frac{\text{Absorption} - 0,0843}{0,022}$$

#### **Formel 2: Berechnung der Elastin-Konzentration**

##### **6.2. Tropoelastingehalt im Medium**

Die Mediumproben wurden, wie in Kapitel 5.6. beschrieben, mit dem Fastin™ Assay gemessen und die Absorptionen der Proben nach Formel 2 in entsprechende Werte in µg umgerechnet (siehe Tabelle 7, Kap. 11.1.).

Folgende Abbildung 13 zeigt den Verlauf des Tropoelastinergehalts im Medium über einen Zeitraum von 24 Tagen.



**Abbildung 13: Tropoelastin-Verlauf im Medium;** dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen

Aus der Abbildung sind zweierlei wichtige Informationen zu entnehmen. Offensichtlich nimmt die in dunkelgrau dargestellte kumulierte Menge an Tropoelastin ( $\Sigma$  Tropoelastin), welches im Medium nachweisbar ist, kontinuierlich zu.

Weiterhin ist aus der Grafik ersichtlich, dass die Tropoelastin-Sekretion in das umgebende Medium zwischen den aufeinanderfolgenden Messzeitpunkten ( $\Delta$  Tropoelastin = Sekretionszeitraum 3 Tage) ab Tag 6 des Kultivierungszeitraums kontinuierlich abnimmt.

Die folgende Tabelle 5 zeigt die absoluten Werte zur vorangegangenen Abbildung 13. Hellgrau unterlegt ist der Hintergrundwert (Leerwert) der Messung im Medium an Tag 0.

### Deskriptive Statistik der Mediumproben-Messung

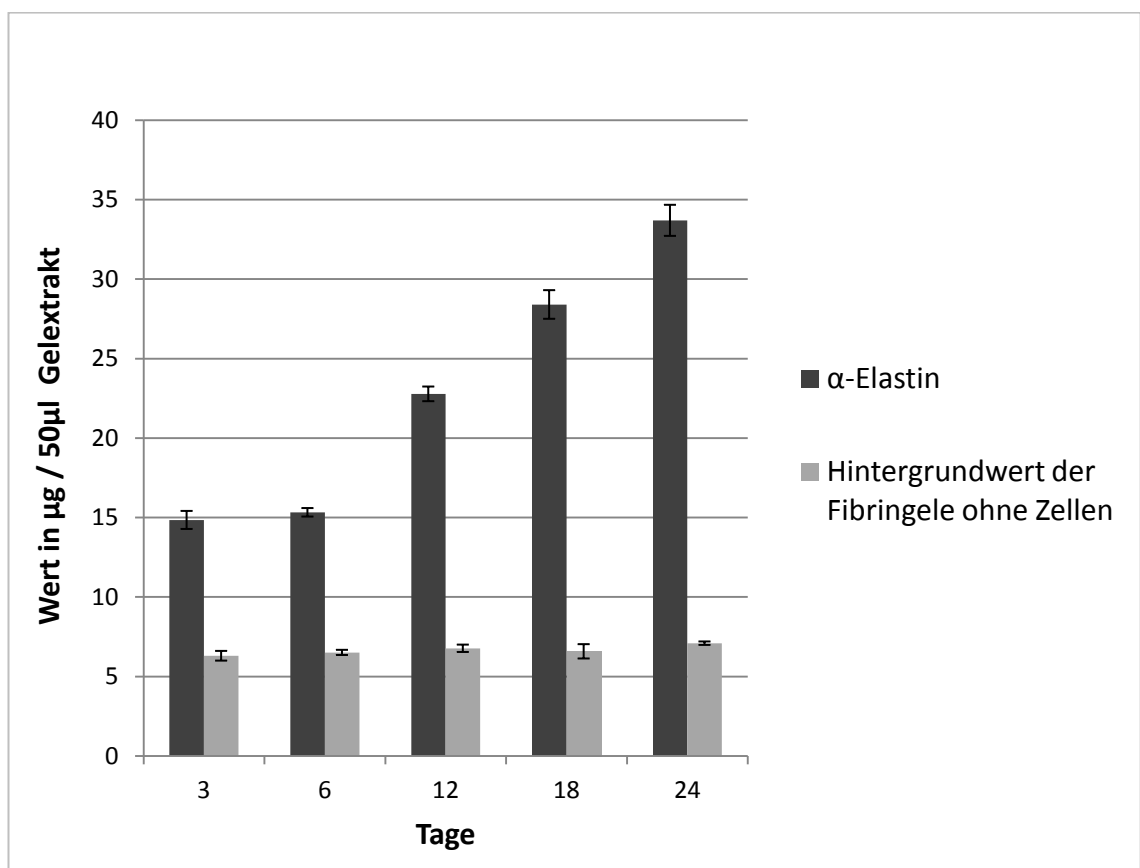
Tag	Mittelwert $\Delta$ Tropoelastin in $\mu\text{g}$ / 50 $\mu\text{l}$ Medium	SD	Mittelwert $\Sigma$ Tropoelastin in $\mu\text{g}$ / 50 $\mu\text{l}$ Medium
0	23,0977	0,1511	0
3	34,7091	0,6720	23,0977
6	35,5261	0,3392	57,8068
9	33,0318	0,1845	93,3329
12	32,8011	0,6005	126,3647
15	29,8795	0,2670	159,1658
18	28,5943	0,3168	189,0453
21	27,6477	0,3073	217,6396
24	26,9898	0,3789	245,2873

Tabelle 5: Deskriptive Statistik der Mediumproben-Messung

### 6.3. Elastingehalt im Fibringel

An den Tagen 3, 6, 12, 18 und 24 wurde der Elastingehalt im Fibringel bestimmt. Die Fibringele wurden wie in Kapitel 5.6.1. erläutert mit Oxalsäure vorbehandelt, um das unlösliche Elastin im Gel in lösliches, mit dem Fastin™ Assay detektierbares,  $\alpha$ -Elastin umzuwandeln. Nach den Empfehlungen des Herstellers wurden Aliquots von 50  $\mu$ l des Gelextrakts auf ihren Gehalt an  $\alpha$ -Elastin untersucht.

Es konnte über den Zeitraum von 24 Tagen eine stetige Zunahme des  $\alpha$ -Elastingehalts im Fibringel beobachtet werden, wie in nachfolgender Abbildung 14 dargestellt ist (für alle Messwerte Tabelle 8, Kap. 11.2.).



**Abbildung 14:  $\alpha$ -Elastin Gehalt im Fibringel;** dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen

Eine Übersicht über die deskriptive Statistik der Fibringel-Messung zeigt die folgende Tabelle 6 .

### Deskriptive Statistik der Fibringel-Messung

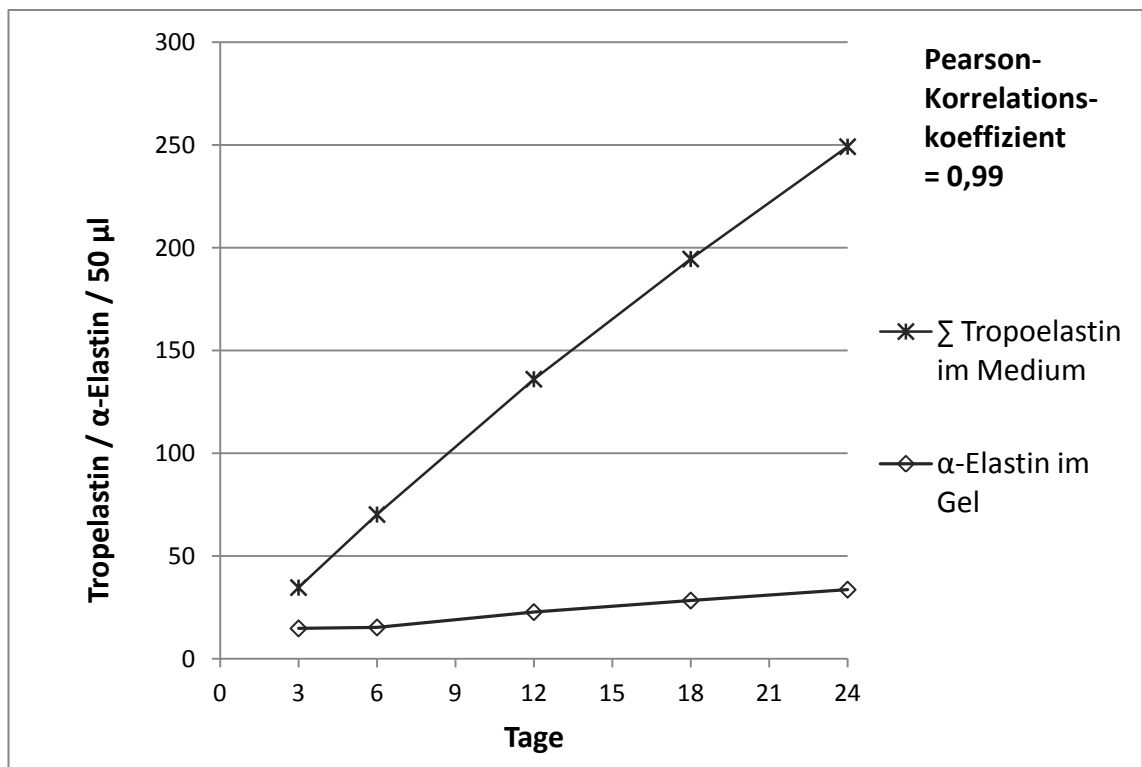
Tag	Mittelwert $\alpha$ -Elastin in $\mu\text{g} / 50 \mu\text{l}$	SD
3	14,8455	0,5667
6	15,3261	0,2676
12	22,7784	0,4603
18	28,4011	0,9012
24	33,6943	0,9781

**Tabelle 6: Deskriptive Statistik der Fibringel-Messung**

Der Hintergrundwert der Fibringele ohne Zellen ist wie auch der Hintergrundwert der Mediumproben weitestgehend konstant; er macht durchschnittlich bis zu 30 % der Messwerte der Fibringele mit Zellen aus (siehe Abbildung 14).

#### 6.4. Korrelation von Tropoelastin im Medium und Elastin im Fibringel

Betrachtet man nun den Verlauf des kumulativen Gehalts von Tropoelastin im Medium und den Elastingehalt im Fibringel über die Zeit, ergibt sich eine stark positive Korrelation mit einem Pearson-Korrelationskoeffizienten von 0,99 (siehe Abbildung 15).

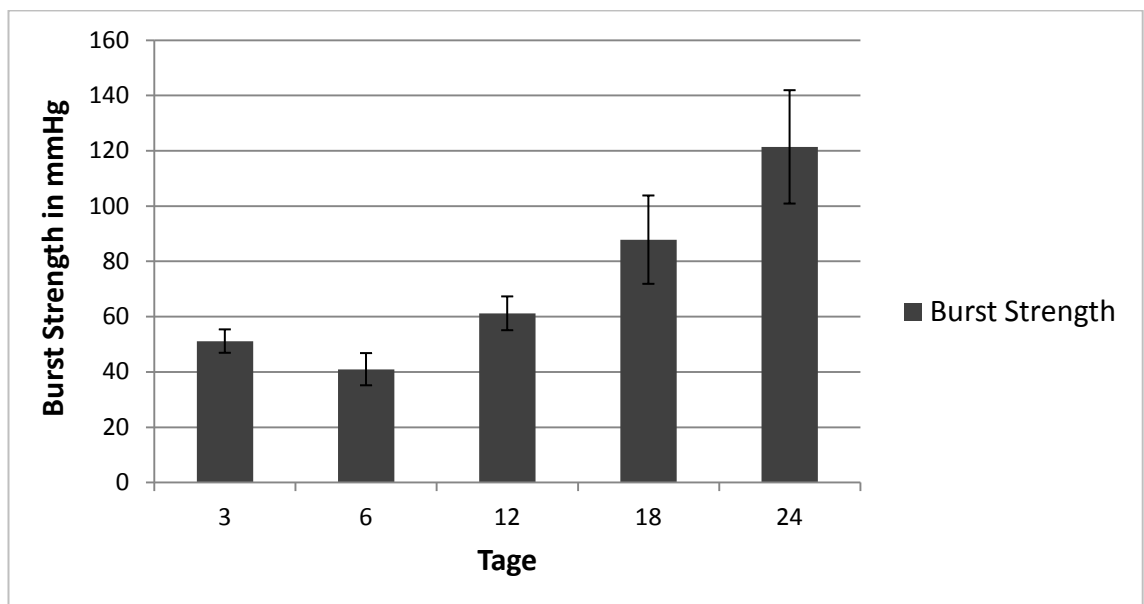


**Abbildung 15: Tropoelastin /  $\alpha$ -Elastin Korrelation**

## 6.5. Mechanische Reißfestigkeit der Fibringle

Die mechanische Reißfestigkeit der Fibringle wurde mit Hilfe des Burst Strength-Test ermittelt (siehe Kap. 11.1.3.,Tabelle 9).

Auch wenn in dieser Dissertation der Schwerpunkt auf der Quantifizierung der Elastin-Synthese liegt, sollte anhand eines etablierten Verfahrens wie dem Burst Strength-Test allgemein überprüft werden, ob eine Synthese von EZM-Komponenten im Fibringel über Gewichtsveränderungen hinaus zu Veränderungen der mechanischen Reißfestigkeit der Fibringle führt.



**Abbildung 16: Messung der mechanischen Reißfestigkeit der Fibringle**

Die mechanische Reißfestigkeit der Fibringle sinkt zwischen den Tagen 3 und 6 um ca. 20 %, nimmt aber anschließend kontinuierlich zu und beträgt am Ende mehr als das Doppelte des Ausgangswertes (siehe Abbildung 16).

## **6.6. Histologie und Immunhistologie**

Zur histologischen und immunhistologischen Betrachtung der Fibringle wurden diese wie in Kapitel 5.8. beschrieben aufbereitet und anschließend gefärbt.

### **HE-Färbung**

Von den HE-gefärbten Schnitten des Nabelschnurpräparats und der Fibringle der Tage 3, 6, 12, 18 und 24 wurden zum einen Übersichtsaufnahmen und Detailaufnahmen zur besseren Beurteilung der Zellmorphologie angefertigt (siehe Abbildung 17 und Abbildung 19).

Abbildung 19 zeigt einen Querschnitt der Nabelschnurarterie, die als Quelle für die in diesem Versuch verwendeten Myofibroblasten dient. Deutlich ist die konzentrische, längliche Ausrichtung der Myofibroblastenkerne und -zellkörper im Gefäß zu erkennen. Dagegen scheinen die Zellen im Anfangsstadium der Fbringel-Kultivierung an den Tagen 3 und 6 noch zum größten Teil abgerundet, vereinzelt und zufällig im Fbringel verteilt zu sein, wobei in diesem Zeitraum durchaus eine Vermehrung der Zellzahl zu beobachten ist. Ab dem 12. Tag deutet sich eine verstärkte Proliferation der Zellen vor allem in dem Bereich des Fbringels an, der dem Medium zugewandt ist. Dieser Trend verstärkt sich an den Tagen 18 und 24, sodass am 18. Tag bereits ein zusammenhängender Zellverband an der Oberfläche des Fbringels zu finden ist, der dieses zum Medium hin abgrenzt. Am 24. Tag scheint mindestens eine weitere Zellschicht hinzugekommen zu sein (siehe schwarze Pfeile in Abbildung 17). Mit zunehmender Zellzahl und vor allem in den Regionen erhöhter Zelldichte zeigen sich die Zellen nun länglich oval und ähneln den Myofibroblasten im Präparat der Nabelschnurarterie. Die Verteilung der Zellen im Fbringel ist nun eindeutig auf die dem Medium zugewandten Bereiche beschränkt. In den unteren Regionen des Fbringels finden sich viele abgeblasste Zellkerne, die hinweisend auf einen Untergang der Zellen sind (siehe gestrichelte, schwarze Pfeile in Abbildung 17).

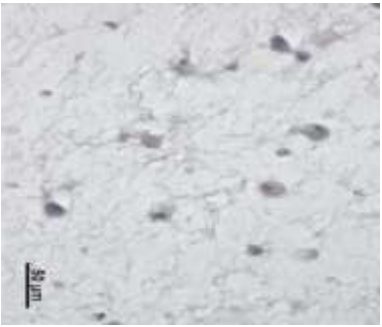
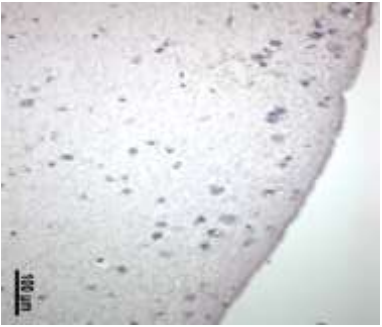
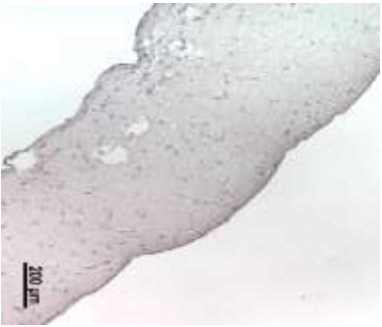
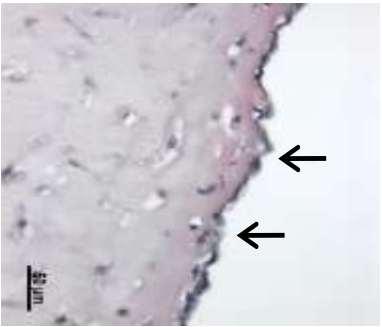
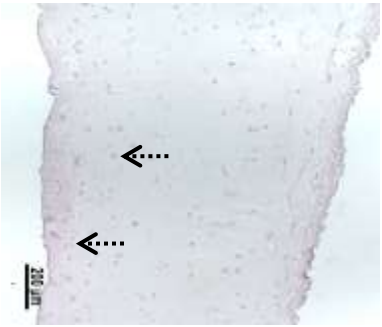

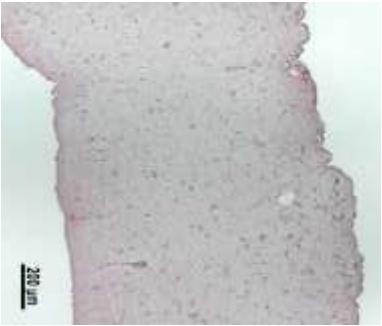
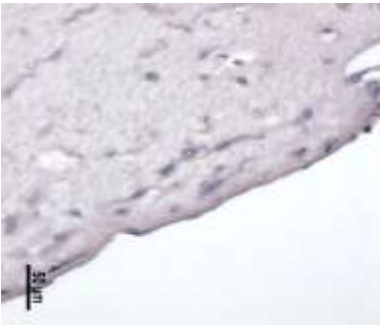
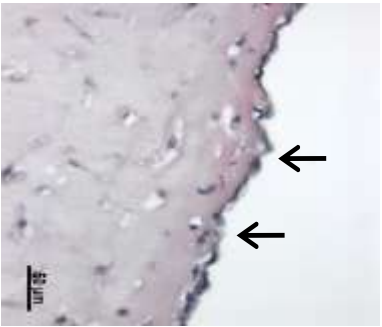
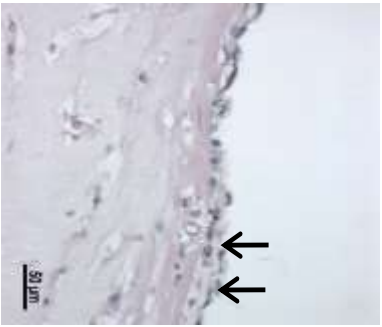
Gel Tag 3	Gel Tag 6	Gel Tag 12	Gel Tag 18	Gel Tag 24
				
				

Abbildung 17: HE-Färbung der Fibringele



### **Immunhistologische Färbung**

Zur Untersuchung der Elastin-Synthese der im Fibringel kultivierten vaskulären Myofibroblasten wurden Schnitte der Fibringle der entsprechenden Gelentnahmezeitpunkte sowie das Nabelschnurpräparat zunächst mit einem Antikörper gegen  $\alpha$ -Elastin (rote Fluoreszenz) gefärbt. Die Zellkerne kommen aufgrund der anschließenden DAPI-Färbung in blau zur Darstellung (siehe Abbildung 18 und Abbildung 19; oben: Färbung für  $\alpha$ -Elastin, unten: Negativkontrolle). Es wurde bei allen Präparaten eine Belichtungszeit von 300 ms für den roten Kanal gewählt, um eine Vergleichbarkeit der Färbungsintensität der Bilder untereinander zu gewährleisten.

Durch die kontrastreiche Färbung mit DAPI lässt sich die bereits in der Auswertung der HE-gefärbten Fibringel-Präparate beschriebene Veränderung der Zellverteilung im Gewebe noch einmal gut nachvollziehen. Die Färbung für  $\alpha$ -Elastin ergibt ein ubiquitäres Färbungsmuster im Fibringel, welches vom 3. bis zum 24. Tag stetig an Intensität zunimmt (siehe Abbildung 18). Dieses Ergebnis steht im Einklang zu dem mit dem Fastin™ Assay gemessenen Konzentrationsanstieg von  $\alpha$ -Elastin im Fibringel. Die Bildung elastischer Fasern kann nicht beobachtet werden.

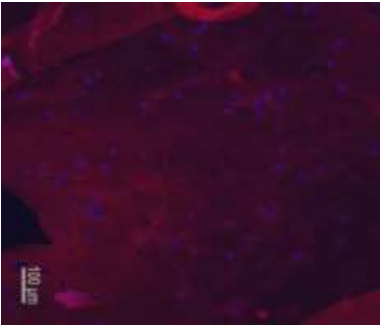
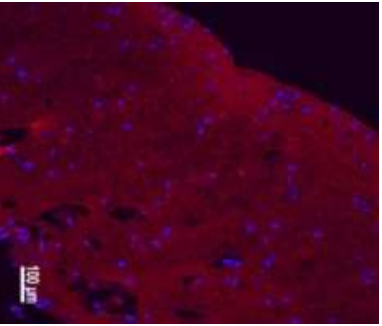
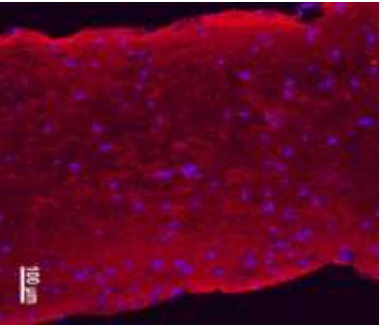
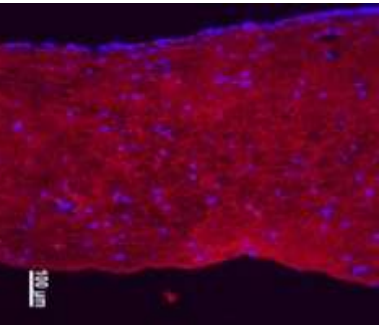
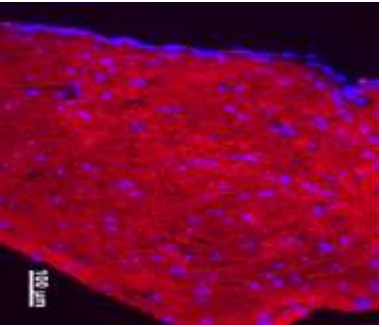
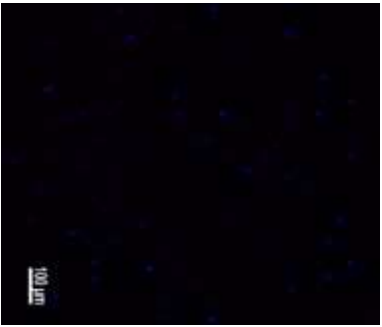
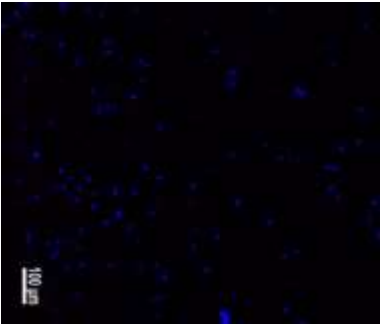
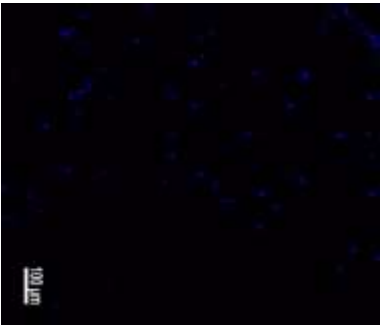
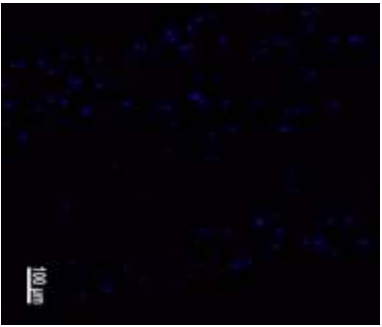
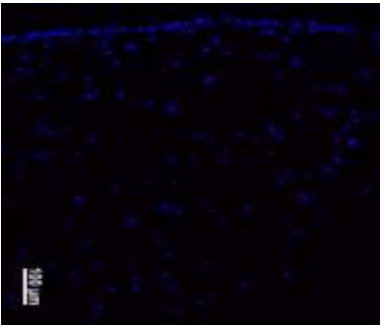

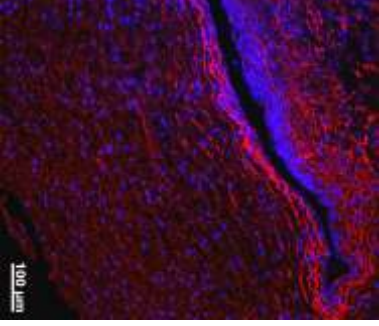
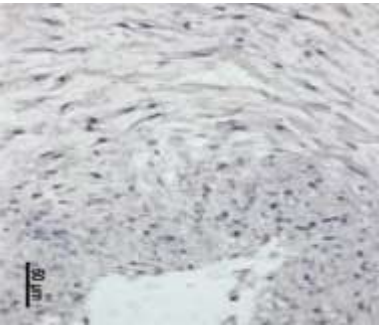
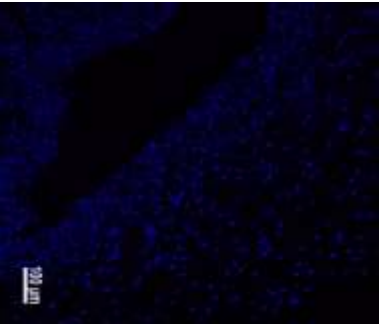
Gel Tag 3	Gel Tag 6	Gel Tag 12	Gel Tag 18	Gel Tag 24
				
				

Abbildung 18: Immunhistologische Färbung der Fibringele auf  $\alpha$ -Elastin, Belichtungszeit: 300 ms  
obere Reihe: Positivkontrolle, untere Reihe: Negativkontrolle

HE	Immunhistologie
	
	

**Abbildung 19: Färbungen der Nabelschnurarterie**

Die Färbung der Nabelschnurarterie zeigt die physiologische Verteilung von Elastin in der zwischen der Tunica intima und Tunica media gelegenen Lamina elastica interna. Eine Lamina elastica externa zwischen Tunica media und Tunica adventitia ist nicht abgrenzbar; Belichtungszeit der immunhistologischen Färbung 300 ms

## **7. Diskussion**

Die Entwicklung von verschiedenen Gewebe- und Organersatzsystemen mit den Methoden des Tissue Engineerings ist in den letzten Jahren weit vorangeschritten. In der Herstellung tissue engineerter Gewebe bezieht sich eine der grundlegenden Fragestellungen auf den Zeitpunkt des Reifegrads des Gewebes, an dem es in den Patienten implantiert werden kann.

Inwiefern ein tissue engineered Gewebe im Vergleich zum ursprünglichen Gewebe, welches ersetzt werden soll, ausgereift ist, hängt nicht nur von dem Zustand der Zellen ab, sondern vielmehr von der EZM, die von den Zellen produziert wird. Die EZM als Substanz, die die Zellen umgibt und einen Raum für Proliferation, Migration und interzelluläre Kommunikation eröffnet, bestimmt letztendlich die mechanischen und biochemischen Eigenschaften, die ein Gewebe ausmachen.

Das Ziel der vorliegenden Dissertation besteht darin eine Messmethode für das Kardiovaskuläre Tissue Engineering zu evaluieren, die es in Zukunft ermöglicht, eine Aussage über den Reifegrad der EZM tissue engineerter Gewebes zu machen ohne dieses Gewebe selbst untersuchen zu müssen. Anstelle dessen wurde als leicht zugängliches Untersuchungsmaterial Bioreaktormedium Myofibroblasten-besiedelter für 24 Tage statisch kultivierter Fibringele auf die Anwesenheit von Tropoelastin, der löslichen Vorstufe von Elastin, untersucht. In einem zweiten Schritt wurde die ermittelte Konzentration des Tropoelastingehalts im Medium mit dem Gehalt an unlöslichem Elastin im Gewebe korreliert.

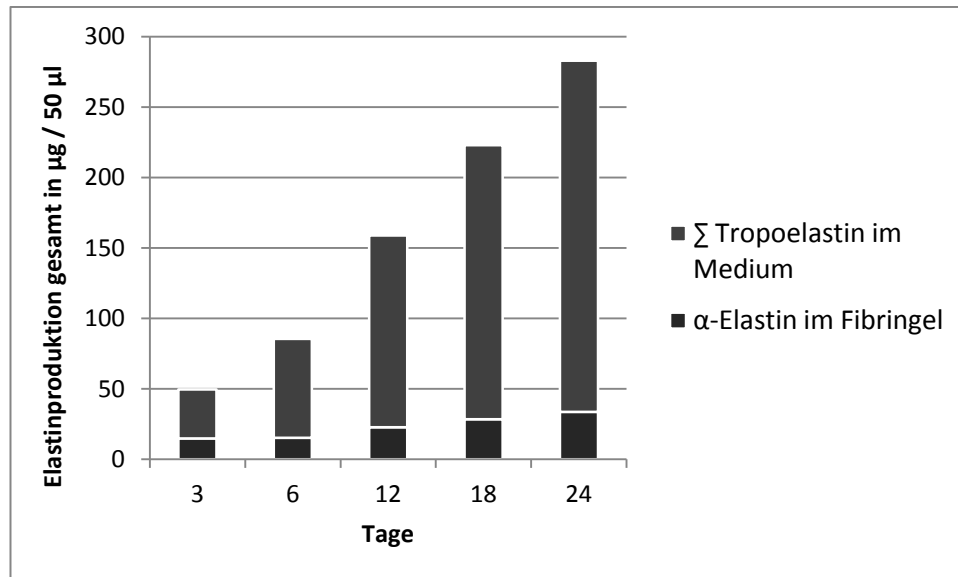
### **7.1. Beurteilung des Tropoelastingehalts im Medium im Zusammenhang mit dem Elastingehalt im Fibringel**

Nach Ablauf der 24-tägigen Kultivierungsphase wurden die gelagerten Mediumproben mit dem Fastin™ Assay auf ihren Tropoelastingehalt untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass Tropoelastin im Medium nachgewiesen werden kann.

Mit der Messung des Tropoelastingehalts in der jeweiligen Mediumprobe wird die sezernierte Menge an Tropoelastin innerhalb von drei Versuchstagen bestimmt, hier bezeichnet als  $\Delta$  Tropoelastin, da alle drei Tage das Medium durch frisches Medium ersetzt wird. Es kann durch die Konzentrationsbestimmung über die Zeit gezeigt werden, dass  $\Delta$  Tropoelastin im Verlauf geringer wird, während der kumulative

Tropoelastingehalt, hier als  $\Sigma$  Tropoelastin bezeichnet, genauso wie der Gehalt an  $\alpha$ -Elastin im Fibringel im Rahmen des Beobachtungszeitraums ansteigt.

Zunächst soll anhand folgender Abbildung 20 zunächst die gesamte Elastin-Produktion im Verlauf über die Kultivierungszeit von 24 Tagen analysiert werden.



**Abbildung 20: Elastinproduktion gesamt**

Bei der Betrachtung der Kurve fällt auf, dass die Gesamtproduktion an Elastin über den Beobachtungszeitraum kontinuierlich ansteigt.

Den Verlauf der Kurve des von den Myofibroblasten produzierten Elastins kann man in drei Phasen unterteilen, wobei die mutmaßliche dritte Phase im Kultivierungszeitraum von 24 Tagen nicht vollständig abgebildet ist.

Die erste Phase umfasst den Zeitraum von Tag 0 bis Tag 6. Hierbei fällt auf, dass bereits initial am 3. Tag ungefähr 50 µg Elastin insgesamt in den Proben aus Medium und Fibringel-Extrakt enthalten sind und die Menge bis zum 6. Tag kaum ansteigt, d.h. mit anderen Worten: nach 6 Tagen ist ungefähr die gleiche Menge an  $\alpha$ -Elastin im Fibringel vorhanden und die Sekretionsrate in das umgebende Medium hat sich gegenüber Tag 3 kaum verändert.

Die zweite Phase umfasst den Zeitraum ab Tag 6, in dem die Elastin-Produktion insgesamt kontinuierlich ansteigt. Der stärkste Anstieg ist von Tag 6 nach Tag 12 zu

beobachten, an den Folgetagen von Tag 12 nach Tag 18 bzw. von Tag 18 nach Tag 24 verringert sich dieser Anstieg.

Es ist stark anzunehmen, dass sich ab Tag 24 eine dritte Phase anschließt, in der die Elastin-Produktion ihr Maximum erreicht und dann von den Zellen herab reguliert wird, wobei diese Vermutung in Studien mit größerem Beobachtungszeitraum noch weitergehend untersucht werden muss. Im Rahmen dieses Beobachtungszeitraums ist gegen Ende lediglich ein Abnehmen der Sekretionsleistung  $\Delta$  Tropoelastin zu verzeichnen, es wird jedoch immer noch Tropoelastin sezerniert.

Doch worin sind die Unterschiede in der Sekretion begründet? Die Antwort muss mehrere Aspekte berücksichtigen. Zum einen spielt das Verhalten der Zellen selbst eine Rolle, die aus ihrer „gewohnten“ zweidimensionalen Umgebung in der Zellkulturflasche entrissen und in einen dreidimensionalen Raum in Form eines Fibringels eingebettet und fixiert werden. In der ersten Phase nach der Umsiedlung der Zellen steht die Proliferation im Vordergrund. Hinweise dafür ergeben sich auch aus der immunhistologischen Betrachtung der Fibringele von Tag 3 und Tag 6 in einer Zunahme der Zelldichte.

Mit dem Hinzukommen der dritten Dimension steht den Zellen ein größerer Raum zur Verfügung, der sowohl durch die Ausbildung interzellulärer Netzwerke als auch durch weitere Zellen ausgefüllt wird, wobei eine proliferationsfördernde Umgebung auch durch das Fibringel selbst gegeben ist. Ahmann *et al.* konnten zeigen, dass durch Fibrinolyse entstehende Fibrinspaltprodukte die Proliferation von vaskulären Myofibroblasten und auch die Synthese von EZM-Komponenten fördern (Ahmann *et al.* 2010).

Ein weiterer Grund für die anfängliche Stagnation der Elastinproduktion insgesamt ist vermutlich im extrazellulären „Processing“ des Tropoelastins begründet. Wie in Kapitel 3.1.4. erläutert sind Genexpression und extrazelluläres „Processing“ von Tropoelastin als wichtigem Schritt in der Zusammenlagerung zur Elastischen Faser von zahlreichen Faktoren abhängig.

Einige dieser Faktoren wie Vitamin D, Kupfer (Kothapalli & Ramamurthi 2009) oder Wachstumsfaktoren können den Kulturmedien zugesetzt werden und wirken entweder auf Promotor-Ebene oder als Kofaktoren für die an der Zusammenlagerung zur Elastischen Faser beteiligten Enzyme, während andere wie Glykosaminoglykane

dazu verwendet werden Scaffolds zu funktionalisieren. So konnte eine signifikante Hochregulierung der Kollagen- und Elastinproduktion durch Endothelzellen in Fibringelmatrizes beobachtet werden, in die Glykosaminoglykane und Wachstumsfaktoren eingebettet waren (Divya & Krishnan 2009). Das in dieser Versuchsreihe verwendete Medium enthielt keine spezifischen, die Elastinproduktion fördernden Zusätze, und auch das Fibringel selbst wurde nicht modifiziert. Die EZM kann also in Bezug auf Elastin nur soweit reifen, wie die in ihr enthaltenen Zellen die für das extrazelluläre „Processing“ des Tropoelastins benötigten Faktoren, wie zum Beispiel Glykosaminoglykane und Glykoproteine, selbst produzieren. Dabei unterstützen Glykosaminoglykane über Interaktionen ihrer negativ geladenen Seitenketten mit positiv geladenen Lysylgruppen der Tropoelastinmoleküle den Koazervationsprozess, der einen wichtigen Schritt zur Bildung der Elastischen Faser darstellt (Wu *et al.* 1999).

Diese Dissertation ist Teil des Projekts „Online-Marker der Gewebsentwicklung“. Zwei weitere Dissertationen beschäftigen sich mit den EZM-Komponenten Kollagen und sulfatierten Glykosaminoglykanen. Als Modell der beiden anderen Dissertationen dienten ebenfalls Fibringele, die mit denselben Zellpopulationen wie in dieser Dissertation verwendet, besiedelt und unter denselben Bedingungen kultiviert wurden. Die Ergebnisse der Dissertation von Michael Tümen mit der Untersuchung der Fibringele auf sulfatierte Glykosaminoglykane zeigen bis zum Tag 6 niedrige Konzentrationen an sulfatierten Glykosaminoglykanen im Fibringel. Ein Umstand also, der eine mögliche Erklärung für die initiale Stagnation der Elastinproduktion insgesamt bedeutet. Im weiteren Verlauf steigt parallel mit der Zunahme der Menge an sulfatierten Glykosaminoglykanen auch der Gehalt an produziertem Elastin im Fibringel.

An die Proliferationsphase der Zellen schließt sich zwischen Tag 6 und Tag 12 eine Sekretionsphase an. In dieser Phase sind die Zellen in einer größeren Zahl vorhanden und haben ein interzelluläres Kommunikations-Netzwerk im Fibringel etabliert, sodass nun die EZM-Synthese ihr volles Ausmaß erreichen kann.

Im Anschluss an diese Phase schließt sich vermutlich die Sättigungsphase an, in der die Gesamtproduktion an Elastin stagniert: die Konzentration im Fibringel steigt nicht mehr weiter an, während die Sekretionsleistung in das Medium innerhalb von drei Tagen immer weiter abnimmt, der kumulative Anteil der

Tropoelastin Gesamtproduktion aber natürlich weiter steigt, solange Tropoelastin sezerniert wird.

Die Herabregulierung der Elastogenese in Fibringelen nach vier Wochen konnte bereits von Ross *et al.* gezeigt werden und ist zwar grundsätzlich kohärent mit den Ergebnissen dieser Dissertation (Ross & Tranquillo 2003), jedoch konnte in dem Zeitraum von 24 Tagen der Zeitpunkt, an dem in Bezug auf die Elastinproduktion ein steady-state erreicht wird, nicht genau festgelegt werden. Bei erneuter Durchführung des Versuchs ist also eine Verlängerung des Beobachtungszeitraums mindestens um weitere zwölf Versuchstage anzustreben.

Um die Hauptfrage dieser Dissertation nach einem möglichen Zusammenhang zwischen dem Gehalt an Tropoelastin im Medium und  $\alpha$ -Elastin im Fibringel zu beantworten, muss also Folgendes berücksichtigt werden:

Während die gemessene Konzentration an sezerniertem Tropoelastin zwischen den Mediumwechseln kontinuierlich sinkt ( $\Delta$  Tropoelastin), steigt der Gehalt an quervernetztem, eingebautem Elastin im Fibringel kontinuierlich an, wobei zumindest in dem hier beobachteten Zeitraum die Gesamtsekretion von Tropoelastin ( $\Sigma$  Tropoelastin) und der Gehalt an  $\alpha$ -Elastin hochgradig korrelieren.

Diese Beobachtung lässt sich im Hinblick auf die Biosynthese von Elastin erklären: Bevor Elastin in die Zellen umgebende EZM eingebaut werden kann, wird es als lösliche Vorstufe von den Zellen als Tropoelastin in den Extrazellularraum sezerniert und tritt dann ungehindert in das Medium über. Dieser Prozess findet so lange statt, bis die Zellen damit beginnen, das sie umgebende Tropoelastin als unlösliches Elastin in die EZM einzubauen. Die Ergebnisse von Hoffmann-Kim *et al.* bestätigen diese Überlegung für die zweidimensionale Zellkultur. Die Arbeitsgruppe untersuchte Myofibroblasten auf ihr Potential zur EZM-Synthese und bestimmte unter anderem die Konzentration an Tropoelastin im Medium an den Tagen 7, 14, 21 und 28. Nach 7 Tagen hatte die Sekretion ihr stärkstes Ausmaß erreicht und fiel dann rapide ab. Dieser rasche Abfall der Tropoelastin-Sekretion könnte dadurch erklärt werden, dass in der zweidimensionalen Zellkultur der extrazelluläre Raum bedeutend schneller in Bezug auf Tropoelastin gesättigt ist als im dreidimensionalen Fibringel, da das lösliche Tropoelastin dort kaum zu einem Netzwerk oder gar einer Elastischen Faser



zusammengebaut werden kann und aufgrund einer negativen Rückkopplung die weitere Tropoelastin-Produktion gedrosselt wird (Hoffman-Kim *et al.* 2005).

Im Gegensatz zur zweidimensionalen Zellkultur besitzen die Zellen im Fibringel die Möglichkeit dreidimensionale, elastische Netzwerke auszubilden, sobald die für das extrazelluläre „Processing“ oben dargestellten, benötigten Faktoren vorhanden sind.

Dadurch lässt sich erklären, dass, solange die Zellen noch ein elastisches Netzwerk in der EZM aufbauen, keine Sättigungskinetik eintritt.

Das bedeutet also, dass die Beobachtungen von Hoffmann-Kim *et al.* nicht vollständig auf die Verhältnisse im Fibringel übertragen werden können: der Gehalt an Tropoelastin im Medium fällt ebenfalls über den Kultivierungszeitraum ab, was jedoch nicht dahingehend interpretiert werden darf, dass die Elastinproduktion insgesamt abnimmt. Diese steigt an, da der Gehalt an Elastin in den Gelen immer weiter zunimmt (siehe auch

Abbildung 14). Dies legt den Gedanken nahe, dass das sezernierte Tropoelastin von den Zellen prozessiert wird und als elastisches Netzwerk unlöslich in die EZM der Gele eingebaut wird.

Eine negative Rückkopplung wie in der zweidimensionalen Zellkultur findet erst spät statt, was darauf zurückgeführt werden kann, dass einerseits eine dritte Dimension zum Aufbau von EZM zur Verfügung steht und andererseits durch die Fibrinolyse neuer Raum geschaffen wird, der ausgefüllt werden kann.

## **7.2. Beurteilung der ermittelten mechanischen Reißfestigkeit der Fibringele**

Neben der Bestimmung des Gehalts an Tropoelastin im Medium und des  $\alpha$ -Elastingehalts im Fbringel wurden die Fbringele zu den jeweiligen Messzeitpunkten auf ihre mechanische Reißfestigkeit mit Hilfe des Burst Strength-Tests überprüft.

Bei der Betrachtung des Verlaufs der mechanischen Reißfestigkeit der Fbringele fällt auf, dass diese bis zum 6. Tag abnimmt, um dann kontinuierlich bis zum 24. Tag anzusteigen und auf das Doppelte des Ausgangswerts anzusteigen.

Die initiale Abnahme der Reißfestigkeit könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Myofibroblasten kurz nach ihrer Einbettung in die Fbringele mit der Fbrinolyse beginnen. Dieser Vorgang wird schon alleine dadurch beschleunigt, dass aufgrund der anfänglichen Proliferation der Zellen mehr „Fbringel-Konsumenten“ vorhanden sind. Durch die betriebene Fbrinolyse verlieren die Fbringele zunächst an Stabilität, da der Aufbau der EZM, wie bereits oben erläutert, noch nicht Schritt halten kann. Diese hier beobachtete initiale mechanische Instabilität von Fbringel-Scaffolds durch die einsetzende Fbrinolyse, ist ein bekanntes Phänomen, welches bereits vor einigen Jahren beschrieben worden ist (Jockenhoevel *et al.* 2001).

Zwischen Tag 6 und Tag 12 folgt nun ein Wendepunkt in Bezug auf die mechanische Reißfestigkeit: sie steigt auf Werte über dem Ausgangsniveau an und erreicht am Tag 24 fast doppelt so hohe Werte. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung stellt die gesteigerte Synthese extrazellulärer Matrixkomponenten dar, die die Stabilität fördern. Neben Elastin ist dies mutmaßlich zum großen Teil auf einen Anstieg des Kollagengehalts im Fbringel zurückzuführen.

## **7.3. Histologische und immunhistologische Analyse der Fbringele**

Die in den vorherigen beiden Kapiteln beschriebenen drei Phasen, die auf der Basis der Messungen der Fbringele mit dem Fastin™ Assay angenommen wurden, lassen sich zum Teil aus histologischer und immunhistologischer Sicht bestätigen. In der initialen Phase, also in den ersten sechs Tagen, ist eine verstärkte und noch ungerichtete Proliferation der Zellen zu beobachten. Es wird zwar grundsätzlich Elastin produziert, jedoch in geringem Ausmaß. In der zweiten Phase resultiert mit der beginnenden Umverteilung der Zellen bzw. der verstärkten Proliferation im oberen, an das Medium

angrenzenden Bereich, dort eine erhöhte Zelldichte, die es den Zellen erleichtert, interzelluläre Kontakte zu knüpfen und EZM aufzubauen.

Die zunehmende Intensität der Färbung bei gleicher Belichtungszeit bestätigt eine stetige Zunahme des  $\alpha$ -Elastingehalts im Fibringel korrespondierend zu den Ergebnissen des Fastin™ Assays. Es stellt sich die Frage, warum die Verteilung von  $\alpha$ -Elastin im Gewebe ubiquitär ist und in den immunhistologischen Färbungen auch Bereiche, in denen keine Zellkerne abgebildet sind, scheinbar  $\alpha$ -Elastin enthalten ist. Hierzu sind zwei Aspekte anzumerken: zum einen ist das nachgewiesene  $\alpha$ -Elastin Bestandteil der EZM und damit nicht an Zellgrenzen gebunden. Es kann in der Nähe von Zellen nachgewiesen werden, jedoch müssen die Zellkerne nicht unbedingt in der Schnittebene liegen und mit angefärbt worden sein. Zum anderen ist  $\alpha$ -Elastin auch nicht mit dem Vorhandensein vitaler Zellen verbunden, d.h. einmal in die EZM eingebautes Elastin ist auch dann noch vorhanden, wenn die Zellen untergegangen sind. Dies könnten Erklärungen dafür sein, dass auch in den mittleren und unteren Bereichen des Fibringels rot fluoreszierende Signale für den Nachweis von Elastin sichtbar sind, obwohl dort nur wenige Zellkerne nachweisbar sind.

Mit der deutlich erkennbaren Ausbildung eines Zellverbands am 18. Tag, der bis zum 24. Tag sogar bis zu zwei Schichten aufweist, haben die Zellen, wie bereits erwähnt, leichter die Möglichkeit, interzelluläre Netzwerke auszubilden.

Generell stellt sich die Synthese von Elastin *in vitro* schwierig dar, wie bereits in einem Review von Patel *et al.* gezeigt werden konnte (Patel *et al.* 2006). Dass in diesem Fall das nachgewiesene Elastin nicht in Form von Elastischen Fasern sichtbar ist, ist womöglich auf die Tatsache der fehlenden mechanischen Stimulation zurückzuführen.

#### **7.4. Bewertung des Fastin™ Assay**

Mit der Nutzung des Fastin™ Assays der Firma Biocolor zur Untersuchung von Fibringelen auf ihren Elastingehalt und von Kulturmedium auf seinen Tropoelastingehalt sollte evaluiert werden, ob auf der Basis des Gehalts an Tropoelastin im Medium zukünftig eine Aussage über den Gehalt an Elastin im Fibringel gemacht werden kann.

Die Verarbeitung aller Proben nahm trotz zügiger Durchführung der einzelnen Schritte des Assays mehr als doppelt so viel Zeit in Anspruch wie im Benutzermanual

angegeben. Um bessere zeitliche Rahmenbedingungen für den Assay zu schaffen, kann die Extraktion des Elastins aus den Fibringelen am Vortag der Assay-Durchführung vorgenommen und die Extrakte über Nacht im Kühlschrank gelagert werden, wie bereits in Kapitel 5.6.1. beschrieben wurde.

Die Bewertung des Fastin™ Assays soll sich aber nicht nur auf Aspekte der Assay-Durchführung beschränken, sondern die routinemäßige Anwendung im Bereich des Kardiovaskulären Tissue Engineerings überprüfen. Hierzu ist zunächst zu sagen, dass in der vorliegenden Arbeit die Menge an verwendetem Kulturmedium sehr gering war. Die Menge an Medium, mit der das Fibringel pro Well überschichtet wurde, betrug maximal 2 ml. In üblichen Bioreaktor-Systemen zum Tissue Engineering von Herzklappen oder Gefäßen wird jedoch eine weitaus größere Menge an Kulturmedium eingesetzt. Der Assay ist laut Herstellerangaben in der Lage, 5-70 µg Elastin in der jeweiligen Probe zu detektieren. Es ist also anhand des hier verwendeten Modells nicht abzuschätzen, ob in einem üblicherweise verwendeten Bioreaktorsystem der Gehalt an Tropoelastin im Medium die Nachweisgrenze des Assays überhaupt erreicht.

Eine weitere Einschränkung des Assays ergibt sich aus der Interferenz mit dem Medium-Zusatz FBS. Insbesondere was die Medium-Messung angeht, ist der Hintergrundwert des Mediums trotz reduziertem FBS-Anteil noch relativ hoch. Gerade in den Bereichen, in denen nur noch wenig Tropoelastin im Medium nachzuweisen ist, lässt der hohe Hintergrundwert des frisch hinzugegebenen Mediums keine klare Aussage zu, ob die Sekretion ins Medium vollständig eingestellt wurde. Als mögliche Alternative wurde kürzlich von Felka *et al.* eine serumfreie Kultivierungs-Methode vorgestellt. Hierbei handelt es sich um einen Mediumzusatz, der anstelle von FBS humane Plasma- und Plättchenextrakte enthält (Felka *et al.* 2010). Es ist dennoch auch bei der Kultivierung ohne tierische Serumzusätze nicht auszuschließen, dass Medium-Zusatzstoffe mit dem Farbstoff TPPS des Assays interagieren könnten.

Auch der üblicherweise in Kulturmedium enthaltene pH-Wert-Indikator Phenolrot stellt eine mögliche Interferenzquelle mit dem Farbstoff des Assays dar. Dieser Störfaktor kann allerdings durch den Gebrauch von Phenolrot-freiem Kulturmedium eliminiert werden, welches in dieser Dissertation auch verwendet wurde.

## **8. Zusammenfassung**

Diese Dissertation hat eine neue, nicht-destruktive Möglichkeit zur Überwachung und zur Qualitätskontrolle der EZM-Synthese von sich im Tissue Engineering Prozess befindenden Geweben und Organen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass der im Bioreaktormedium gemessene Gesamtgehalt an sezerniertem Tropoelastin mit dem Elastingehalt des sich entwickelnden Gewebes hervorragend korreliert (Pearson-Koeffizient von 0,99).

Darüber hinaus konnten Erkenntnisse anderer Arbeitsgruppen über den Verlauf der Elastinproduktion bzw. das Auftreten von Tropoelastin im Medium von zweidimensionalen Zellkulturen um die Gegebenheiten im dreidimensionalen Fibringel erweitert werden.

Auch wenn die hier gewonnenen Erkenntnisse dieser grundlegenden Arbeit noch nicht die gesamte Dynamik der Elastinsynthese erfasst haben, so ermutigen die Ergebnisse doch zu weiterer Forschungstätigkeit in diesem Bereich.

So sollte als nächstes von dem Modell der alleinigen statischen Kultivierung von Fibringelen Abstand genommen werden und der Versuch unternommen werden, Tropoelastin im Kulturmedium gängiger Bioreaktoren, wie sie z.B. für das Tissue Engineering einer Herzklappe oder eines Gefäßes verwendet werden, nachzuweisen. Unter dynamischen Kultivierungsbedingungen wäre es von besonderem Interesse, ob durch die mechanische Stimulation der Zellen gegenüber dem statisch kultivierten Fibringel eine quantitative Steigerung der Elastinsynthese zu beobachten wäre.

Im Grunde kann auch erst dann eine eindeutige Beurteilung des Fastin™ Assays der Firma Biocolor abgegeben werden, mit dem der Nachweis von Tropoelastin bzw. Elastin zwar grundsätzlich möglich war, der jedoch, wie bereits geschildert, einige Nachteile aufwies. Ein wesentlicher Nachteil des hier gewählten Ansatzes war die Verwendung eines Zellpools zur Besiedlung der Fibringle, wodurch die grundlegenden Voraussetzungen für eine statistische Überprüfung der Signifikanz der festgestellten Unterschiede mittels einer univariaten Varianzanalyse nicht gegeben waren. In künftigen Studien sollte also die Verwendung eines Zellpools vermieden werden. Inwiefern interindividuelle Unterschiede der Nabelschnurspender Störeinflüsse für die dann erhobenen Messwerte darstellen, wird sich zeigen. In jedem Fall kann die vorliegende Dissertation als Pilotstudie zur Einordnung künftiger Folgestudien dienen.

Abschließend bleibt zu sagen, dass eine umfassende Bewertung der EZM-Synthese nicht allein mit dem Nachweis von Tropoelastin erfolgen kann: die Produktion von sulfatieren Glykosaminoglykanen und Kollagenen ist ebenfalls von fundamentalem Interesse, da wie auch im Rahmen dieses Projekts der „Online-Marker der Gewebsentwicklung“ und des daraus resultierenden Artikels „Non-Destructive Analysis of Extracellular Matrix Development in Cardiovascular Tissue-Engineered Constructs“ gezeigt werden konnte, eine gegenseitige Beeinflussung der Synthese der EZM-Komponenten untereinander stattfindet.

## 9. Abkürzungsverzeichnis

CASY	Cell Counter and Analyser System
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EBP	elastin binding protein
EZM	Extrazelluläre Matrix
FBS	Fetales Bovines Serum
GAGs	Glykosaminoglykane
GPC	Golgi-zu-Plasmamembran-Transport-Kompartimente
HE	Hämatoxylin und Eosin
HSP 47	Heat shock protein 47
ICM	Innere Zellmasse eines Embryos
MAGP	Mikrofibrillen-assoziiertes Glykoprotein
MMP	Matrix-Metalloproteinase
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCL	Polycaprolactone
PGA	Polyglycolic acid
PLGA	Copolymere von Polyglycolic acid und Polylactic acid
PLLA	Polylactic acid
rER	raues Endoplasmatisches Retikulum
sGAGs	sulfatierte Glykosaminoglykane
TBS	Tris-Buffered Saline
TERMIS	Tissue Engineering Regenerative Medicine International Society
TES	Tissue Engineering Society
TPPS	5, 10, 15, 20-Tetraphenyl-21,23-Porphyrin Tetra-Sulfonat

## 10.     Abbildungsverzeichnis

Seite	Quelle
13	modifiziert nach Gelse, K., E. Poschl, and T. Aigner. Collagens--structure, function, and biosynthesis. Adv Drug Deliv Rev. 55:1531-46, 2003.
38	Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC. Biochemie & Pathobiochemie. 8. Auflage. Springer - Berlin Heidelberg 2006: 982
40	Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC. Biochemie & Pathobiochemie. 8. Auflage. Springer-Berlin Heidelberg 2006: 984
47	Fastin Manual. Biocolor Ltd. - Carrickfergus, Nordirland 2007: 2



## 11. Anhang

### 11.1 Messwerttabellen

#### 11.1.1. Tropoelastin-Konzentration im Medium

T a g	Mediumproben				Hintergrundwerte des frischen Mediums			
	Code	Messung en	Tropo- elastin in µg / 50 µl	Mittel- wert in µg / 50 µl	Messung 1	Messung 2	Mittel- wert	Mittel- wert in µg / 50 µl
0	M0	-	-	-	0,5938	0,5891	0,59145	23,0977
3	M3-B1	0,8274	33,8227	34,7091	0,6107	0,6088	0,60975	23,9295
	M3-B2	0,8563	35,1364					
	M3-B3	0,8602	35,3136					
	M3/24-B	0,8437	34,5636					
6	M6-C4	0,8562	35,1318	35,5261	0,5937	0,6061	0,5999	23,4818
	M6-C5	0,8713	35,8182					
	M6-C6	0,8709	35,8000					
	M6/24-C	0,8611	35,3545					
9	M9-B1	0,8123	33,1364	33,0318	0,6275	0,6316	0,62955	24,8295
	M9-B2	0,8091	32,9909					
	M9-B3	0,8047	32,7909					
	M9/24-B	0,8139	33,2091					
12	M12-C1	0,801	32,6227	32,8011	0,6254	0,6239	0,62465	24,6068
	M12-C2	0,7946	32,3318					
	M12-C3	0,7998	32,5682					
	M12/24-C	0,8243	33,6818					
15	M15-B4	0,7384	29,7773	29,8795	0,6331	0,62	0,62655	24,6932
	M15-B5	0,7466	30,1500					
	M15-B6	0,7441	30,0364					
	M15/24-B	0,7335	29,5545					
18	M18-C4	0,7191	28,9000	28,5943	0,6298	0,6324	0,6311	24,9000
	M18-C5	0,7086	28,4227					
	M18-C6	0,7173	28,8182					
	M18/24-C	0,7045	28,2364					
21	M21-B1	0,6858	27,3864	27,6477	0,6431	0,6543	0,6487	25,7000
	M21-B2	0,6875	27,4636					
	M21-B3	0,7009	28,0727					
	M21-B	0,692	27,6682					
24	M24-C1	0,6785	27,0545	26,9898	an diesem Tag wurde keine Mediumproben für den Hintergrundwert entnommen, da der Versuch planmäßig beendet wurde			
	M24-C2	0,6712	26,7227					
	M24-C3	0,6883	27,5000					
	M24-D	0,6703	26,6818					

**Tabelle 7: Messwerte der Mediumproben**

### 11.1.2. $\alpha$ -Elastin-Konzentration im Fibringel

T a g	Code	Fibringele mit Zellen			Hintergrundwert der Fibringele ohne Zellen		
		Messung 1	$\alpha$ -Elastin in $\mu\text{g} / 50 \mu\text{l}$	Mittelwert in $\mu\text{g}$	Messung 1	Wert in $\mu\text{g} / 50 \mu\text{l}$	Mittelwert in $\mu\text{g}$
3	G3-A1	0,4201	15,3091	14,8455	0,2211	6,2636	6,3000
	G3-A2	0,4176	15,1955		0,2293	6,6364	
	G3-A3	0,4094	14,8227		0,2240	6,3955	
	G3-BS	0,3925	14,0545		0,2132	5,9045	
6	G6-A4	0,4216	15,3773	15,3261	0,2283	6,5909	6,5114
	G6-A5	0,4135	15,0091		0,2249	6,4364	
	G6-A6	0,4277	15,6545		0,2225	6,3273	
	G6-BS	0,4191	15,2636		0,2305	6,6909	
12	G12-A1	0,5829	22,7091	22,7784	0,2279	6,5727	6,7705
	G12-A2	0,5926	23,1500		0,2364	6,9591	
	G12-A3	0,5915	23,1000		0,2369	6,9818	
	G12-BS	0,5707	22,1545		0,2278	6,5682	
18	G18-A4	0,7062	28,3136	28,4011	0,2383	7,0455	6,5795
	G18-A5	0,7184	28,8682		0,2277	6,5636	
	G18-A6	0,7267	29,2455		0,2315	6,7364	
	G18-BS	0,6812	27,1773		0,2147	5,9727	
24	G24-A1	0,8331	34,0818	33,6943	0,2360	6,9409	7,0920
	G24-A2	0,8409	34,4364		0,2415	7,1909	
	G24-A3	0,8314	34,0045		0,2393	7,0909	
	G24-BS	0,7929	32,2545		0,2405	7,1455	

**Tabelle 8: Messwerte der Fibringele**

### 11.1.3. Mechanische Reißfestigkeit der Fibringele

Tag	Fibringele mit Zellen				
	Messung 1	Messung 2	Messung 3	MW	SD
3	53,57	53,55	46,23	51,12	4,23
6	46,04	42,22	34,60	40,95	5,82
12	60,66	55,32	67,52	61,17	6,12
18	105,34	74,07	83,99	87,80	15,98
24	134,32	132,04	97,72	121,36	20,50

**Tabelle 9: Mechanische Reißfestigkeit der Fibringele**

## **11.2 Eigene Publikation**

„Non-Destructive Analysis of Extracellular Matrix Development in Cardiovascular Tissue-Engineered Constructs“, Tuemen M\*, Nguyen DV\*, Raffius J\*, Flanagan TC, Dietrich M, Frese J, Schmitz-Rode T, Jockenhoevel S, Ann Biomed Eng. 2013 Jan 11. [Epub ahead of print], DOI: 10.1007/s10439-012-0734-x

## 12. Literaturverzeichnis

Agrawal CM, McKinney JS, Lanctot D, Athanasiou KA. Effects of fluid flow on the in vitro degradation kinetics of biodegradable scaffolds for tissue engineering.

*Biomaterials*. 2000; 21: 2443-52.

Ahmann KA, Weinbaum JS, Johnson SL, Tranquillo RT. Fibrin Degradation Enhances Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Matrix Deposition in Fibrin-Based Tissue Constructs Fabricated In Vitro. *Tissue Eng Part A*. 2010.

Ahmed TA, Dare EV, Hincke M. Fibrin: A Versatile Scaffold for Tissue Engineering Applications. *Tissue Eng Part B Rev*. 2008.

Ahumada GG, Rennard SI, Figueroa AA, Silver MH. Cardiac fibronectin: developmental distribution and quantitative comparison of possible sites of synthesis. *J Mol Cell Cardiol*. 1981; 13: 667-78.

Aumailley M, Bruckner-Tuderman L, Carter WG, Deutzmann R, Edgar D, Ekblom P, et al. A simplified laminin nomenclature. *Matrix Biol*. 2005; 24: 326-32.

Bashir MM, Indik Z, Yeh H, Ornstein-Goldstein N, Rosenbloom JC, Abrams W, et al. Characterization of the complete human elastin gene. Delineation of unusual features in the 5'-flanking region. *J Biol Chem*. 1989; 264: 8887-91.

Beck K, Hunter I, Engel J. Structure and function of laminin: anatomy of a multidomain glycoprotein. *FASEB J*. 1990; 4: 148-60.

Berg RA, Prockop DJ. The thermal transition of a non-hydroxylated form of collagen. Evidence for a role for hydroxyproline in stabilizing the triple-helix of collagen. *Biochem Biophys Res Commun*. 1973; 52: 115-20.

Bilodeau K, Mantovani D. Bioreactors for tissue engineering: focus on mechanical constraints. A comparative review. *Tissue Eng*. 2006; 12: 2367-83.

Boot-Handford RP, Tuckwell DS. Fibrillar collagen: the key to vertebrate evolution? A tale of molecular incest. *Bioessays*. 2003; 25: 142-51.

Bressan GM, Daga-Gordini D, Colombatti A, Castellani I, Marigo V, Volpin D. Emilin, a component of elastic fibers preferentially located at the elastin-microfibrils interface. *J Cell Biol*. 1993; 121: 201-12.

Burgeson RE, Nimni ME. Collagen types. Molecular structure and tissue distribution. *Clin Orthop Relat Res*. 1992: 250-72.

Burjanadze TV. New analysis of the phylogenetic change of collagen thermostability. *Biopolymers*. 2000; 53: 523-8.

Canty EG, Lu Y, Meadows RS, Shaw MK, Holmes DF, Kadler KE. Coalignment of plasma membrane channels and protrusions (fibripositors) specifies the parallelism of tendon. *J Cell Biol*. 2004; 165: 553-63.

Carreras I, Rich CB, Panchenko MP, Foster JA. Basic fibroblast growth factor decreases elastin gene transcription in aortic smooth muscle cells. *J Cell Biochem*. 2002; 85: 592-600.

Cholewinski E, Dietrich M, Flanagan TC, Schmitz-Rode T, Jockenhoevel S. Tranexamic acid--an alternative to aprotinin in fibrin-based cardiovascular tissue engineering. *Tissue Eng Part A*. 2009; 15: 3645-53.

Clarke AW, Arnsperg EC, Mithieux SM, Korkmaz E, Braet F, Weiss AS. Tropoelastin massively associates during coacervation to form quantized protein spheres. *Biochemistry*. 2006; 45: 9989-96.

Collet JP, Moen JL, Veklich YI, Gorkun OV, Lord ST, Montalescot G, et al. The alphaC domains of fibrinogen affect the structure of the fibrin clot, its physical properties, and its susceptibility to fibrinolysis. *Blood*. 2005; 106: 3824-30.

Colognato H, Yurchenco PD. Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev Dyn*. 2000; 218: 213-34.

Conn KJ, Rich CB, Jensen DE, Fontanilla MR, Bashir MM, Rosenbloom J, et al. Insulin-like growth factor-I regulates transcription of the elastin gene through a putative retinoblastoma control element. A role for Sp3 acting as a repressor of elastin gene transcription. *J Biol Chem*. 1996; 271: 28853-60.

Corson GM, Charbonneau NL, Keene DR, Sakai LY. Differential expression of fibrillin-3 adds to microfibril variety in human and avian, but not rodent, connective tissues. *Genomics*. 2004; 83: 461-72.

Dang CV, Shin CK, Bell WR, Nagaswami C, Weisel JW. Fibrinogen sialic acid residues are low affinity calcium-binding sites that influence fibrin assembly. *J Biol Chem*. 1989; 264: 15104-8.

Desai UR, Petitou M, Bjork I, Olson ST. Mechanism of heparin activation of antithrombin. Role of individual residues of the pentasaccharide activating sequence in the recognition of native and activated states of antithrombin. *J Biol Chem*. 1998; 273: 7478-87.

Divya P, Krishnan LK. Glycosaminoglycans restrained in a fibrin matrix improve ECM remodelling by endothelial cells grown for vascular tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med*. 2009; 3: 377-88.

Duden R. ER-to-Golgi transport: COP I and COP II function (Review). *Mol Membr Biol*. 2003; 20: 197-207.

Dunn CJ, Goa KL. Tranexamic acid: a review of its use in surgery and other indications. *Drugs*. 1999; 57: 1005-32.

Fazio MJ, Mattei MG, Passage E, Chu ML, Black D, Solomon E, et al. Human elastin gene: new evidence for localization to the long arm of chromosome 7. *Am J Hum Genet*. 1991; 48: 696-703.

Felka T, Schafer R, De Zwart P, Aicher WK. Animal serum-free expansion and differentiation of human mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*. 2010; 12: 143-53.

Fox BA, Yee VC, Pedersen LC, Le Trong I, Bishop PD, Stenkamp RE, et al. Identification of the calcium binding site and a novel ytterbium site in blood coagulation factor XIII by x-ray crystallography. *J Biol Chem*. 1999; 274: 4917-23.

Fox JW, Mayer U, Nischt R, Aumailley M, Reinhardt D, Wiedemann H, et al. Recombinant nidogen consists of three globular domains and mediates binding of laminin to collagen type IV. *EMBO J*. 1991; 10: 3137-46.

Funderburgh JL. Keratan sulfate: structure, biosynthesis, and function. *Glycobiology*. 2000; 10: 951-8.

Gibson MA, Hatzinikolas G, Kumaratilake JS, Sandberg LB, Nicholl JK, Sutherland GR, et al. Further characterization of proteins associated with elastic fiber microfibrils including the molecular cloning of MAGP-2 (MP25). *J Biol Chem*. 1996; 271: 1096-103.

Gibson MA, Sandberg LB, Grosso LE, Cleary EG. Complementary DNA cloning establishes microfibril-associated glycoprotein (MAGP) to be a discrete component of the elastin-associated microfibrils. *J Biol Chem*. 1991; 266: 7596-601.

Griffith LG, Naughton G. Tissue engineering--current challenges and expanding opportunities. *Science*. 2002; 295: 1009-14.

Grinnell F, Feld M, Minter D. Fibroblast adhesion to fibrinogen and fibrin substrata: requirement for cold-insoluble globulin (plasma fibronectin). *Cell*. 1980; 19: 517-25.

Gui L, Wojciechowski K, Gildner CD, Nedelkovska H, Hocking DC. Identification of the heparin-binding determinants within fibronectin repeat III1: role in cell spreading and growth. *J Biol Chem*. 2006; 281: 34816-25.

Hardingham TE, Fosang AJ. Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J*. 1992; 6: 861-70.

Harwood R, Grant ME, Jackson DS. Studies on the glycosylation of hydroxylysine residues during collagen biosynthesis and the subcellular localization of collagen galactosyltransferase and collagen glucosyltransferase in tendon and cartilage cells. *Biochem J*. 1975; 152: 291-302.

Hata R, Senoo H. L-ascorbic acid 2-phosphate stimulates collagen accumulation, cell proliferation, and formation of a three-dimensional tissuelike substance by skin fibroblasts. *J Cell Physiol*. 1989; 138: 8-16.

Heath CA. Cells for tissue engineering. *Trends Biotechnol*. 2000; 18: 17-9.

Hinek A, Rabinovitch M. 67-kD elastin-binding protein is a protective "companion" of extracellular insoluble elastin and intracellular tropoelastin. *J Cell Biol*. 1994; 126: 563-74.

Hochedlinger K, Plath K. Epigenetic reprogramming and induced pluripotency. *Development*. 2009; 136: 509-23.

Hoffman-Kim D, Maish MS, Krueger PM, Lukoff H, Bert A, Hong T, et al. Comparison of three myofibroblast cell sources for the tissue engineering of cardiac valves. *Tissue Eng*. 2005; 11: 288-301.

Hulmes DJ, Kadler KE, Mould AP, Hojima Y, Holmes DF, Cummings C, et al. Pleomorphism in type I collagen fibrils produced by persistence of the procollagen N-propeptide. *J Mol Biol*. 1989; 210: 337-45.

Hutmacher DW. Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues--state of the art and future perspectives. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2001; 12: 107-24.

Hynes RO, Yamada KM. Fibronectins: multifunctional modular glycoproteins. *J Cell Biol*. 1982; 95: 369-77.

Jockenhoevel S, Zund G, Hoerstrup SP, Chalabi K, Sachweh JS, Demircan L, et al. Fibrin gel -- advantages of a new scaffold in cardiovascular tissue engineering. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2001; 19: 424-30.

Johnson DJ, Keeley FW. Factors affecting the production of insoluble elastin in aortic organ cultures. *Connect Tissue Res*. 1990; 24: 277-88.

Kahari VM, Chen YQ, Bashir MM, Rosenbloom J, Uitto J. Tumor necrosis factor-alpha down-regulates human elastin gene expression. Evidence for the role of AP-1 in the suppression of promoter activity. *J Biol Chem*. 1992; 267: 26134-41.

Kielty CM, Sherratt MJ, Shuttleworth CA. Elastic fibres. *J Cell Sci.* 2002; 115: 2817-28.

Kim BS, Putnam AJ, Kulik TJ, Mooney DJ. Optimizing seeding and culture methods to engineer smooth muscle tissue on biodegradable polymer matrices. *Biotechnol Bioeng.* 1998; 57: 46-54.

Kim H, Yoon CS, Rah B. Expression of extracellular matrix components fibronectin and laminin in the human fetal heart. *Cell Struct Funct.* 1999; 24: 19-26.

Koide T, Nagata K. Collagen Biosynthesis. *Collagen*2005. pp. 85-114.

Koivu J. Identification of disulfide bonds in carboxy-terminal propeptides of human type I procollagen. *FEBS Lett.* 1987; 212: 229-32.

Kornblihtt AR, Pesce CG, Alonso CR, Cramer P, Srebrow A, Werbajh S, et al. The fibronectin gene as a model for splicing and transcription studies. *FASEB J.* 1996; 10: 248-57.

Kothapalli CR, Ramamurthi A. Copper nanoparticle cues for biomimetic cellular assembly of crosslinked elastin fibers. *Acta Biomater.* 2009; 5: 541-53.

Kozel BA, Rongish BJ, Czirok A, Zach J, Little CD, Davis EC, et al. Elastic fiber formation: a dynamic view of extracellular matrix assembly using timer reporters. *J Cell Physiol.* 2006; 207: 87-96.

Kreitz S, Dohmen G, Hasken S, Schmitz-Rode T, Mela P, Jockenhoevel S. Nondestructive method to evaluate the collagen content of fibrin-based tissue engineered structures via ultrasound. *Tissue Eng Part C Methods.* 2011; 17: 1021-6.

Kucich U, Rosenbloom JC, Abrams WR, Bashir MM, Rosenbloom J. Stabilization of elastin mRNA by TGF-beta: initial characterization of signaling pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1997; 17: 10-6.

Lai TS, Achyuthan KE, Santiago MA, Greenberg GS. Carboxyl-terminal truncation of recombinant factor XIII A-chains. Characterization of minimum structural requirement for transglutaminase activity. *J Biol Chem.* 1994; 269: 24596-601.

Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science.* 1993; 260: 920-6.

Leblond CP. Synthesis and secretion of collagen by cells of connective tissue, bone, and dentin. *Anat Rec.* 1989; 224: 123-38.

Lee KY, Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering. *Chem Rev.* 2001; 101: 1869-79.

Leung MK, Fessler LI, Greenberg DB, Fessler JH. Separate amino and carboxyl procollagen peptidases in chick embryo tendon. *J Biol Chem.* 1979; 254: 224-32.



Li DY, Brooke B, Davis EC, Mecham RP, Sorensen LK, Boak BB, et al. Elastin is an essential determinant of arterial morphogenesis. *Nature*. 1998; 393: 276-80.

Lucero HA, Kagan HM. Lysyl oxidase: an oxidative enzyme and effector of cell function. *Cell Mol Life Sci*. 2006; 63: 2304-16.

Mangano DT, Tudor IC, Dietzel C. The risk associated with aprotinin in cardiac surgery. *N Engl J Med*. 2006; 354: 353-65.

Martin I, Wendt D, Heberer M. The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends Biotechnol*. 2004; 22: 80-6.

Mauviel A, Chen YQ, Kahari VM, Ledo I, Wu M, Rudnicka L, et al. Human recombinant interleukin-1 beta up-regulates elastin gene expression in dermal fibroblasts. Evidence for transcriptional regulation in vitro and in vivo. *J Biol Chem*. 1993; 268: 6520-4.

Mendelson K, Schoen FJ. Heart valve tissue engineering: concepts, approaches, progress, and challenges. *Ann Biomed Eng*. 2006; 34: 1799-819.

Minuth WW, Strehl, R., Schumacher, K. Zukunftstechnologie Tissue Engineering: Von der Zellbiologie zum künstlichen Gewebe. 1. ed. Weinheim: Wiley-VCH; 2003.

Mithieux SM, Weiss AS. Elastin. *Adv Protein Chem*. 2005; 70: 437-61.

Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost*. 2005; 3: 1894-904.

Muro AF, Chauhan AK, Gajovic S, Iaconcig A, Porro F, Stanta G, et al. Regulated splicing of the fibronectin EDA exon is essential for proper skin wound healing and normal lifespan. *J Cell Biol*. 2003; 162: 149-60.

Myllyharju J. Prolyl 4-hydroxylases, the key enzymes of collagen biosynthesis. *Matrix Biol*. 2003; 22: 15-24.

Nguyen CN. Dissertation. RWTH Aachen, Medizinische Fakultät. 2006.

Olden K, Pratt RM, Yamada KM. Role of carbohydrate in biological function of the adhesive glycoprotein fibronectin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979; 76: 3343-7.

Pasquali-Ronchetti I, Baccarani-Contrì M. Elastic fiber during development and aging. *Microsc Res Tech*. 1997; 38: 428-35.

Patel A, Fine B, Sandig M, Mequanint K. Elastin biosynthesis: The missing link in tissue-engineered blood vessels. *Cardiovasc Res*. 2006; 71: 40-9.

Perico N, Benigni A, Remuzzi G. Xenotransplantation in the 21st century. *Blood Purif*. 2002; 20: 45-54.

Pierce RA, Kolodziej ME, Parks WC. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 represses tropoelastin expression by a posttranscriptional mechanism. *J Biol Chem*. 1992; 267: 11593-9.

Poulsom R, Alison MR, Forbes SJ, Wright NA. Adult stem cell plasticity. *J Pathol*. 2002; 197: 441-56.

Privitera S, Prody CA, Callahan JW, Hinek A. The 67-kDa enzymatically inactive alternatively spliced variant of beta-galactosidase is identical to the elastin/laminin-binding protein. *J Biol Chem*. 1998; 273: 6319-26.

Raff M. Adult stem cell plasticity: fact or artifact? *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2003; 19: 1-22.

Reitamo S, Remitz A, Tamai K, Ledo I, Uitto J. Interleukin 10 up-regulates elastin gene expression in vivo and in vitro at the transcriptional level. *Biochem J*. 1994; 302 ( Pt 2): 331-3.

Rich CB, Carreras I, Lucey EC, Jaworski JA, Buczek-Thomas JA, Nugent MA, et al. Transcriptional regulation of pulmonary elastin gene expression in elastase-induced injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003; 285: L354-62.

Roark EF, Keene DR, Haudenschild CC, Godyna S, Little CD, Argraves WS. The association of human fibulin-1 with elastic fibers: an immunohistological, ultrastructural, and RNA study. *J Histochem Cytochem*. 1995; 43: 401-11.

Robbins RD, Prasain N, Maier BF, Yoder MC, Mirmira RG. Inducible pluripotent stem cells: not quite ready for prime time? *Current opinion in organ transplantation*. 2010; 15: 61-7.

Robinson EE, Zazzali KM, Corbett SA, Foty RA. Alpha5beta1 integrin mediates strong tissue cohesion. *J Cell Sci*. 2003; 116: 377-86.

Rosenbloom J. Elastin: relation of protein and gene structure to disease. *Lab Invest*. 1984; 51: 605-23.

Rosenbloom J, Harsch M, Cywinski A. Evidence that tropoelastin is the primary precursor in elastin biosynthesis. *J Biol Chem*. 1980; 255: 100-6.

Rosenbloom J, Harsch M, Jimenez S. Hydroxyproline content determines the denaturation temperature of chick tendon collagen. *Arch Biochem Biophys*. 1973; 158: 478-84.

Ross JJ, Tranquillo RT. ECM gene expression correlates with in vitro tissue growth and development in fibrin gel remodeled by neonatal smooth muscle cells. *Matrix Biol*. 2003; 22: 477-90.

Roughley PJ. The structure and function of cartilage proteoglycans. *Eur Cell Mater.* 2006; 12: 92-101.

Sakai LY, Keene DR, Engvall E. Fibrillin, a new 350-kD glycoprotein, is a component of extracellular microfibrils. *J Cell Biol.* 1986; 103: 2499-509.

Sandberg LB, Leslie JG, Oakes BW. In vitro studies of elastin metabolism. *Connect Tissue Res.* 1981; 8: 219-25.

Sandberg LB, Weissman N, Smith DW. The purification and partial characterization of a soluble elastin-like protein from copper-deficient porcine aorta. *Biochemistry.* 1969; 8: 2940-5.

Sanzone CF, Reith EJ. The development of the elastic cartilage of the mouse pinna. *Am J Anat.* 1976; 146: 31-71.

Sasisekharan R, Raman R, Prabhakar V. Glycomics approach to structure-function relationships of glycosaminoglycans. *Annu Rev Biomed Eng.* 2006; 8: 181-231.

Sasisekharan R, Shriver Z, Venkataraman G, Narayanasami U. Roles of heparan-sulphate glycosaminoglycans in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2: 521-8.

Saunders NA, Grant ME. The secretion of tropoelastin by chick-embryo artery cells. *Biochem J.* 1985; 230: 217-25.

Schenke-Layland K, Riemann I, Opitz F, Konig K, Halbhuber KJ, Stock UA. Comparative study of cellular and extracellular matrix composition of native and tissue engineered heart valves. *Matrix Biol.* 2004; 23: 113-25.

Smith DW, Weissman N, Carnes WH. Cardiovascular studies on copper deficient swine. XII. Partial purification of a soluble protein resembling elastin. *Biochem Biophys Res Commun.* 1968; 31: 309-15.

Solter D, Gearhart J. Putting stem cells to work. *Science.* 1999; 283: 1468-70.

Sugahara K, Kitagawa H. Recent advances in the study of the biosynthesis and functions of sulfated glycosaminoglycans. *Curr Opin Struct Biol.* 2000; 10: 518-27.

Swartz DD, Russell JA, Andreadis ST. Engineering of fibrin-based functional and implantable small-diameter blood vessels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005; 288: H1451-60.

Takahashi K, Okita K, Nakagawa M, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nature protocols.* 2007; 2: 3081-9.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998; 282: 1145-7.

Uitto J, Christiano AM, Kahari VM, Bashir MM, Rosenbloom J. Molecular biology and pathology of human elastin. *Biochem Soc Trans.* 1991; 19: 824-9.

Uitto J, Hoffmann HP, Prockop DJ. Synthesis of elastin and procollagen by cells from embryonic aorta. Differences in the role of hydroxyproline and the effects of proline analogs on the secretion of the two proteins. *Arch Biochem Biophys.* 1976; 173: 187-200.

Urry DW. Elastomeric proteins. 1995.

Vacanti CA. History of tissue engineering and a glimpse into its future. *Tissue Eng.* 2006; 12: 1137-42.

van der Rest M, Garrone R. Collagen family of proteins. *FASEB J.* 1991; 5: 2814-23.

Vigetti D, Genasetti A, Karousou E, Viola M, Clerici M, Bartolini B, et al. Modulation of hyaluronan synthase activity in cellular membrane fractions. *J Biol Chem.* 2009; 284: 30684-94.

Vlodavsky I, Goldshmidt O. Properties and function of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis. *Haemostasis.* 2001; 31 Suppl 1: 60-3.

Vrhovski B, Weiss AS. Biochemistry of tropoelastin. *Eur J Biochem.* 1998; 258: 1-18.

Vunjak-Novakovic G, Obradovic B, Martin I, Bursac PM, Langer R, Freed LE. Dynamic cell seeding of polymer scaffolds for cartilage tissue engineering. *Biotechnol Prog.* 1998; 14: 193-202.

Wagenseil JE, Mecham RP. Vascular extracellular matrix and arterial mechanics. *Physiol Rev.* 2009; 89: 957-89.

Weinbaum JS, Qi J, Tranquillo RT. Monitoring collagen transcription by vascular smooth muscle cells in fibrin-based tissue constructs. *Tissue Eng Part C Methods.* 2010; 16: 459-67.

Weisel JW, Medved L. The structure and function of the alpha C domains of fibrinogen. *Ann N Y Acad Sci.* 2001; 936: 312-27.

Winkelman J. The distribution of tetraphenylporphinesulfonate in the tumor-bearing rat. *Cancer Res.* 1962; 22: 589-96.

Winkelman J, Spicer SS. Staining with tetraphenyl-porphinesulfonate in vivo. *Stain Technol.* 1962; 37: 303-5.

Wu WJ, Vrhovski B, Weiss AS. Glycosaminoglycans mediate the coacervation of human tropoelastin through dominant charge interactions involving lysine side chains. *J Biol Chem.* 1999; 274: 21719-24.

Xie C, Hu J, Ma H, Zhang J, Chang LJ, Chen YE, et al. Three-dimensional growth of iPS cell-derived smooth muscle cells on nanofibrous scaffolds. *Biomaterials*. 2011; 32: 4369-75.

Ye Q, Zund G, Benedikt P, Jockenhoevel S, Hoerstrup SP, Sakyama S, et al. Fibrin gel as a three dimensional matrix in cardiovascular tissue engineering. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2000; 17: 587-91.

Zhang H, Apfelroth SD, Hu W, Davis EC, Sanguineti C, Bonadio J, et al. Structure and expression of fibrillin-2, a novel microfibrillar component preferentially located in elastic matrices. *J Cell Biol*. 1994; 124: 855-63.

Zielke HR, Zielke CL, Ozand PT. Glutamine: a major energy source for cultured mammalian cells. *Fed Proc*. 1984; 43: 121-5.

### **13. Danksagung**

Ich danke Frau Dipl.-Ing. (FH) J. Frese für die Einarbeitung in die Grundlagen der Zellkultur, Frau S. Koch für die Einarbeitung in die Grundlagen der Histologie und Herrn Dipl.-Math. L. Kennes für die Beratung zur statistischen Auswertung der erhobenen Messergebnisse.

**14. Erklärung § 5 Abs. (1) zur Datenaufbewahrung**

Hiermit erkläre ich, dass die dieser Dissertation zugrunde liegenden Originaldaten bei mir, ***Duy Viet Anh Nguyen, Talstraße 3, Viersen***, hinterlegt sind.

**15. Eidesstattliche Erklärung gemäß § 5 Abs. (1) und § 10 Abs. (3) 12. der Promotionsordnung**

Hiermit erkläre ich, **Frau Duy Viet Anh Nguyen**, an Eides statt, dass ich folgende in der von mir selbstständig erstellten Dissertation „Online-Marker der Gewebsentwicklung im Kardiovaskulären Tissue Engineering – Evaluierung von Tropoelastin als Online-Marker der Extrazellulärmatrix-Synthese im Kardiovaskulären Tissue Engineering“ dargestellten Ergebnisse erhoben habe:

Durchführung sämtlicher dargestellter Experimente, sowie deren statistische Auswertung.

Bei der Durchführung der Arbeit hatte ich folgende Hilfestellungen:

- A. Dipl.-Ing. (FH) J. Frese: Einarbeitung in die Grundlagen der Zellkultur
- B. Laborleitung S. Koch: Einarbeitung in die Grundlagen der Histologie
- C. Dipl.-Math. L. Kennes: Beratung zur statistischen Auswertung der erhobenen Messergebnisse

Duy Viet Anh Nguyen

Als Betreuer der obigen Dissertation bestätige ich die Angaben von Frau Duy Viet Anh Nguyen.

Univ.-Prof. Dr. med. Stefan Jockenhövel