

Aus der  
Universitätsklinik für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde  
Tübingen

Abteilung Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und  
Gesichtschirurgie

**Vergleich der in vitro Eigenschaften und des  
Differenzierungspotentials von humanen periostalen  
Progenitorzellen unterschiedlichen embryonalen  
Ursprungs**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Zahnheilkunde**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Sorg, Jonas**

**2022**

Dekan: Professor Dr. Bernd Pichler

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. S. Reinert

2. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. S. Ehnert

Tag der Disputation: 08.11.2022

## **Widmung**

Ich widme diese Dissertation meiner Familie, insbesondere natürlich meinen Eltern und meiner Schwester.

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>VII</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>VIII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>IX</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Das Periost	2
1.1.1 Anatomischer und histologischer Aufbau	2
1.1.2 Knochenbildung	3
1.1.3 Frakturheilung	4
1.2 Orale Pathologien	6
1.3 Tissue Engineering	9
1.3.1 Praktische Anwendung von Periostzellen im Tissue Engineering	10
1.4 Mesenchymale Stamm-/Stromazellen (MSCs)	12
1.4.1 MSCs unterschiedlichen Ursprungs und ihre Eigenschaften	14
1.4.2 PDCs unterschiedlicher Lokalisation und ihre Eigenschaften	17
1.5 Ziel der Studie	20
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>22</b>
2.1 Patientenkollektiv	22
2.2 Periost-Gewinnung	23
2.3 Isolation der humanen PDCs	23
2.4 Kultivierung der humanen PDCs	24
2.5 Charakterisierung der CD-Profile der hPDCs mittels Durchflusszytometrie	26
2.6 Seneszenz Assay der hPDCs mit Durchflusszytometrie	28
2.7 Proliferations-Assay	29
2.7.1 Proliferations-Assay mittels Ez4u	29
2.7.2 Proliferations-Assay mittels BioRad TC20	30
2.8 Induzierte adipogene, chondrogene und osteogene Differenzierung	30
2.8.1 In vitro Zell Differenzierung	31
2.8.1.1 <i>Adipogene Differenzierung</i>	31
2.8.1.2 <i>Chondrogene Differenzierung</i>	31

2.8.1.3	<i>Osteogene Differenzierung</i>	32
2.8.2	Analyse des Differenzierungspotentials	33
2.8.2.1	<i>adipogene Differenzierung: Ölrot O</i>	33
2.8.2.2	<i>chondrogene Differenzierung</i>	34
2.8.2.2.1	<i>Toluidinblau mikroskopisch (qualitative Analyse)</i>	34
2.8.2.2.2	<i>Glukosaminoglykane-Bestimmung mittels direktem spektrophotometrischen Mikroassay</i>	34
2.8.2.2.3	<i>Pellet-Durchmesser</i>	36
2.8.2.3	<i>osteogene Differenzierung: Alizarinrot</i>	36
2.8.3	Quantitative Analyse der Genexpressionen	37
2.8.3.1	<i>Entnahme des Zellmaterials</i>	37
2.8.3.2	<i>RNA-Extraktion</i>	38
2.8.3.3	<i>cDNA-Synthese</i>	39
2.8.3.4	<i>Real-Time-Quantitative-Polymerase-Chain-Reaction (RT-qPCR)</i>	40
2.9	Datenmanagement und Analyse	41
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>43</b>
3.1	Patientenkollektiv	43
3.2	Nachweis der CD-Profile der hPDCs mittels Durchflusszytometrie	44
3.3	Nachweis der Seneszenz der hPDCs mittels Durchflusszytometrie	50
3.4	Nachweis des Proliferations-Verhaltens der hPDCs	52
3.4.1	Nachweis des Proliferations-Verhaltens mittels Ez4u	53
3.4.2	Bestimmung der Anzahl von Zellen mittels des Zellzählgerätes TC20	55
3.5	Nachweis des Induzierten Differenzierungspotentials der hPDCs	57
3.5.1	Nachweis der adipogene Differenzierung	57
3.5.2	Nachweis der chondrogenen Differenzierung	61
3.5.3	Nachweis der osteogenen Differenzierung	66
3.6	Nachweis der Genexpressionen	70
3.6.1	Nachweis der Genexpression adipogener Marker	70
3.6.2	Nachweis der Genexpression chondrogener Marker	73
3.6.3	Nachweis der Genexpression osteogener Marker	77
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>81</b>
4.1	Bewertung der CD-Profile der hPDCs	81

4.1.1	Bewertung der untersuchten Oberflächenmarker _____	81
4.1.2	Bewertung der immunologischen Oberflächenmarker _____	83
4.2	Bewertung des Seneszenz-Assays _____	86
4.3	Bewertung des Proliferations-Verhaltens _____	87
4.4	Bewertung des induzierten Differenzierungspotentials der hPDCs ____	89
4.4.1	Bewertung der adipogenen Differenzierung _____	94
4.4.2	Bewertung der chondrogenen Differenzierung _____	97
4.4.3	Bewertung der osteogenen Differenzierung _____	102
4.5	Kritische Beurteilung _____	110
4.6	Ausblick _____	115
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung _____</b>	<b>118</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis: _____</b>	<b>121</b>
<b>7</b>	<b>Erklärung zum Eigenanteil _____</b>	<b>1</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung _____</b>	<b>2</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 – Durchflusszytometrische Expression der Oberflächenmarker CD45, 73, 90, 105.....	44
Abbildung 2 – Durchflusszytometrische Expression weiterer Oberflächenmarker: CD29, MSCA-1, CD146 .....	45
Abbildung 3 – Durchflusszytometrische Expression der immunrelevanten Oberflächenmarker .....	47
Abbildung 4 – Durchflusszytometrische Messung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität .....	50
Abbildung 5 – Nachweis der metabolischen Aktivität mittels des Proliferations- Assays Ez4u .....	53
Abbildung 6 – Zellzählung mittels TC20 .....	55
Abbildung 7 – Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der Ölrot O-Färbung .....	57
Abbildung 8 – Quantifizierung der Ölrot-Färbung [mM] .....	58
Abbildung 9 – Repräsentative mikroskopische Aufnahme der Ölrot O-Färbung .....	59
Abbildung 10 – Übersicht Toluidinblau-Färbung.....	61
Abbildung 11 – Quantifizierung des GAG-Gehalts .....	62
Abbildung 12 – Messung der Pellet-Größen an Tag 21 nach chondrogener Differenzierung [mm].....	64
Abbildung 13 – Repräsentative mikroskopische Aufnahme der Alizarinfärbung .....	66
Abbildung 14 – Repräsentative Übersichtsbilder der Alizarin-Färbung .....	67
Abbildung 15 – Alizarinquantifizierung [mM].....	68
Abbildung 16 – Quantifizierung der Genexpression adipogener Marker .....	70
Abbildung 17 – Quantifizierung der Genexpression chondrogener Marker .....	73
Abbildung 18 – Quantifizierung der Genexpression osteogener Marker .....	77

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 – Übersicht der verwendeten Donoren für Unterkiefer- und Fibula- Periostzellen _____	43
Tabelle 2 – Durchflusszytometrische Expression der MSC-spezifischen Oberflächenantigene _____	46
Tabelle 3 – Durchflusszytometrische Expression der immunrelevanten Oberflächenmarker _____	49
Tabelle 4 – Messung der $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität _____	50
Tabelle 5 – Nachweis der metabolischen Aktivität mittels des Proliferations- Assay Ez4u _____	54
Tabelle 6 – Zellzählung mittels TC20 _____	56
Tabelle 7 – Quantifizierung der Ölrot O -Färbung _____	59
Tabelle 8 – Quantifizierung des GAG-Gehalts _____	64
Tabelle 9 – Quantifizierung der Pellet-Größen [mm] _____	65
Tabelle 10 – Alizarinquantifizierung _____	69
Tabelle 11 – Quantifizierung der Genexpression adipogener Marker _____	72
Tabelle 12 – Quantifizierung der Genexpression chondrogener Marker _____	76
Tabelle 13 – Quantifizierung der Genexpression osteogener Marker _____	80



## Abkürzungsverzeichnis

ALP	Alkalischen Phosphatase
AM	Adipogene Differenzierungsmedium
APC	Allophycocyanin
BCA	engl. Bicinchoninic Acid
BRONJ	Bisphosphonat-assoziierten Osteonekrosen
BM-MSCs	engl. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells
BMP-2	eng. Bone Morphogenetic Protein 2
CAD/CAM	engl. Computer-Aided-Design/Computer-Aided-Manufacturing
CD	engl. Cluster of Differentiation
cDNA	engl. Complementary DNA
COMP	engl. Cartilage Oligomeric Matrix Protein
CM	Chondrogene Differenzierungsmedium
DMMB	1,9-Dimethyl-Methylen-Blau
EZM	Extrazellulärmatrix
FACS	engl. Fluorescent Activated Cell Sorter
FCS/FBS	fetales Kälberserum
GAG	Glukosaminoglykane
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
hPDCs	humane periostale Progenitorzellen; engl. human Periosteum-derived-Cells
hPL	humanes Plättchen-Lysat
Kol	Kollagen

LPL	Lipoproteinlipase
MDB	engl. Membran Desalting Buffer
MFI	engl. Median Fluorescence Index
MHC	engl. Major Histocompatibility Complex
MKG	Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie
MKG-C	Mund- Kiefer- Gesichtschirurgen
MSCA-1	engl. Mesenchymal Stem Cell Antigen 1
MSCs	Mesenchymale Stamm-/Stromazellen
OCN	Osteocalcin
OM	Osteogene Differenzierungsmedium
ORN	Osteoradionekrosen
PE	Phycoerythrin
PBS	engl. Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor
PSI	engl. Patient Specific Implant
RAP	Ras Proximal
rpm	engl. rounds per minute
RT-qPCR	engl. Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction
Runx2	engl. runt-related transcription factor 2
Sox-9	engl. Sex Determining Region Y-Box9
T(x)	Tag(x) (z.Bsp. Tag1 = T1)
TCEP	Tris(2-chlorethyl)phosphat

TE

engl. Tissue-Engineering

TERM

engl. Tissue Engineering and Regenerative Medicine

## 1 Einleitung

Alle Knochen im menschlichen Körper werden von einer dünnen Gewebeschicht, der Knochenhaut bedeckt. Die Knochenhaut, auch Periost genannt, übernimmt hierbei wesentliche nutritive und regenerative Aufgaben.

Die Fähigkeit des Periosts zur Knochenbildung, das sogenannte osteogene Potential, wurde zum ersten Mal 1742 von Henri-Louis Duhamel du Monceau beschrieben (Duhamel, 1742). Seine Ergebnisse konnten später durch Louis Xavier Ollier bestätigt werden. Ollier belegte, dass die Unversehrtheit des Periosts eine Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Knochenheilung darstellt (Ollier, 1867).

Das Periost hat in den letzten Jahrzehnten zunehmend Aufmerksamkeit als vielversprechende Zellquelle für Knochenregeneration und Gewebezüchtung im Gebiet des *Tissue-Engineerings* (*TE*) erlangt. Das Expandieren von Zellkulturen *in vitro* stellt in vielen Fällen eine Grundvoraussetzung für *TE* dar. Um gezielt Gewebe züchten zu können, müssen dem Patienten in einem vorausgehenden Eingriff geeignete Zellen, sogenannte mesenchymale Vorläuferzellen (Progenitorzellen) entnommen werden. Die aktuell etablierteste Methode ist eine Isolierung aus dem Knochenmark, wofür jedoch ein relativ invasiver Eingriff notwendig ist. Demgegenüber können Progenitorzellen alternativ aus dem Periost gewonnen werden. Die Zugänglichkeit des Periosts stellt sich als deutlich einfacher und risikoärmer dar. Im Rahmen der meisten oralchirurgischen Eingriffe, wie beispielsweise einer Weisheitszahn-Extraktion, wird das Periost freigelegt und Periostproben können komplikationslos entnommen werden. Aus diesen Proben können wiederum die benötigten Progenitorzellen isoliert werden, die im allgemeinen als *hPDCs* (*engl. human periosteum-derived cells*) bezeichnet werden. Ihre hohe Proliferationsrate und ihre vergleichsweise einfache Gewinnung bieten einen Vorteil gegenüber anderen Ursprungsgeweben, wie beispielsweise dem angesprochenen Knochenmark. In welchem Ausmaß jedoch konkret die Entnahmestelle des Periostes und seine embryonale Herkunft die

Funktionen und Eigenschaften der gewonnenen *hPDCs* beeinflusst, ist bis dato weitestgehend ungeklärt (Roberts et al., 2015).

In der vorliegenden Dissertation sollen die *in vitro* Eigenschaften und das Differenzierungspotential von humanen periostalen Progenitorzellen chondralen und intramembranösen Ursprungs verglichen werden. Hierfür wurden im Rahmen von Unterkieferrekonstruktionen mittels freiem Fibulalappen, Periostproben sowohl des Unterkiefers als auch des Wadenbeins (Fibula) derselben Patienten entnommen.

## **1.1 Das Periost**

### **1.1.1 Anatomischer und histologischer Aufbau**

Die Knochenhaut, auch Periost genannt, ist eine dünne bindegewebige Schicht, welche die Oberfläche von Knochen bedeckt. Eine Ausnahme stellen hierbei die Gelenkoberflächen dar, die mit einer Synovialmembran oder mit Knorpelgewebe ausgekleidet sind. Beim Periost handelt es sich um eine stark vaskularisierte zweischichtige Membran. Die äußere Schicht wird als *Stratum fibrosum* bezeichnet. Sie sichert als kollagen- und elastinreiche Bindegewebsschicht die Verbindung zur Kortikalis (*Substantia compacta*) des Knochens. Das *Stratum fibrosum* beeinflusst die Regulation des Molekülaustauschs zwischen Knochen und Muskeln (Evans et al., 2013). Die innere Schicht wird als *Kambium* oder *Stratum osteogenicum* bezeichnet. Innerhalb des *Kambiums* verlaufen Nerven- und Blutgefäße, die 70-80% der Blutversorgung der *Kortikalis* übernehmen (Chanavaz, 1995). Des Weiteren enthält das *Kambium* Osteoblasten, Fibroblasten, endotheliale Perizyten (Diaz-Flores et al., 1992) und Vorläuferzellen (Progenitorzellen), die entscheidend zur Homöostase, embryologischer Entwicklung und Frakturheilung des Knochens beitragen (Bragdon & Bahney, 2018). Die genaue Zellkomposition und die Dicke des Periosts variieren je nach Alter und Knochenregion zwischen 70 und 150 µm (Fan et al., 2008; Hsiao et al., 2018). Funktionell dient das Periost zudem als mechanischer Ansatz für Sehnen, Bänder und Muskeln (Roberts et al., 2015).

### **1.1.2 Knochenbildung**

Bei der embryonalen Knochenbildung werden zwei Formen unterschieden, die intramembranöse und die chondrale Ossifikation. Die intramembranöse Ossifikation wird auch als desmale oder direkte Ossifikation bezeichnet. Während der intramembranösen Ossifikation verdichten sich mesenchymale Stamm-/Progenitorzellen und differenzieren zu Osteoprogenitorzellen. Aus ihnen gehen die Osteoblasten als reife, knochenbildende Zellen hervor. Im Verlauf dieses Prozesses verbleiben undifferenzierte Progenitorzellen an der Peripherie des Knochens und bilden das Periost (Roberts et al., 2015). Rekrutierte Osteoblasten erweitern den Knochen durch appositionelles Wachstum (Ochareon & Herring, 2011). Diese Form der direkten Ossifikation ist im menschlichen Körper nur im Bereich des Achsenskeletts zu finden. Hierzu gehört die Entwicklung des Schlüsselbeins, der Schädelknochen und der Knochen des Gesichtsschädels, zu denen auch der Unterkiefer gezählt wird (Roberts et al., 2015). Embryonal gehen diese Knochen aus der Neuralleiste hervor. Bei der Entstehung des Unterkiefers bildet sich vorerst der sogenannte Meckel-Knorpel, der als Leitstruktur für die weitere Entwicklung des Unterkiefers dient. Hierbei findet im Gegensatz zur chondralen Ossifikation *keine Umwandlung* der Knorpelvorlage statt. Der Unterkiefer bildet sich lediglich *in Anlehnung* an den Meckel-Knorpel durch direkte Ossifikation.

Der im Menschen überwiegend vorherrschende Prozess der Knochenentwicklung ist die chondrale Ossifikation. Sie findet bei der Bildung des Extremitätenskeletts statt, das embryonal aus dem Mesoderm hervorgeht. Hierzu zählen alle Röhrenknochen wie beispielsweise Femur, Tibia und Fibula. Die chondrale Ossifikation wird auch als indirekte Ossifikation bezeichnet. Initial wird im Zuge der Knochenbildung eine Art knorpelhaltige Leitstruktur gebildet, die im weiteren Verlauf durch Knochen ersetzt wird. Im Detail betrachtet, verdichten sich während der Entwicklung mesenchymale Stamm-/ Progenitorzellen. Im äußeren Anteil der Leitstruktur verbleiben undifferenzierte Zellen und bilden das sogenannte Perichondrium. Im inneren Anteil der Leitstruktur differenzieren die Progenitorzellen zu Chondrozyten. Die Chondrozyten proliferieren und das knorpelartige Gewebe wächst. Im Zentrum des Gewebes stagniert die

Proliferation der Chondrozyten (Roberts et al., 2015). Sie vergrößern, werden hypertroph und mineralisieren ihre Umgebungsmatrix durch Anregung von Chondroklasten und Osteoprogenitorzellen (Kronenberg, 2003). Angrenzende perichondrale Zellen werden dazu angeregt mineralisierten Knochen zu bilden. In diesem Zuge findet eine Umwandlung des Perichondriums zu Periost statt.

Das Periost dient im weiteren Verlauf als für die Knochenentwicklung essenzielle Quelle von Osteoprogenitorzellen. Sie bilden innerhalb der knorpelartigen Leitstruktur das primäre Ossifikationszentrum (Maes et al., 2010). Die Auswirkungen des embryologischen Ursprungs auf reife, adulte *hPDCs* und ihre Eigenschaften wird in dieser Dissertation herausgearbeitet.

### **1.1.3 Frakturheilung**

Betrachtet man den fundamentalen Prozess der Frakturheilung, wird die Bedeutung des Periosts und seiner ansässigen Stammzellen offensichtlich und lässt deren variable Eigenschaften erkennen.

Innerhalb des muskuloskelettalen Systems stellt die Knochenheilung eine einzigartige Form der Regeneration dar, bei der das neproduzierte Knochengewebe in Form und Funktion von seinem Ursprungsgewebe nicht zu unterscheiden ist (Bragdon & Bahney, 2018). Die Frakturheilung beinhaltet dabei die koordinierte Aktivierung überwiegend vom Periost ausgehender Stammzellen, die zu Chondrozyten und Osteoblasten differenzieren. Es wird zunächst ein weicher, knorpelhaltiger Kallus gebildet, der im weiteren Verlauf zu hartem Knochen-Kallus modelliert wird. In einer Erstreaktion auf die Fraktur reagieren die Progenitorzellen durch Hochregulation von Genen, die mit Proliferation und der Steuerung der osteogenen und chondrogenen Differenzierung assoziiert sind (Bais et al., 2009). Wang *et al.* 2017 formulieren, dass Periostzellen ansässig an den distalen Rand der periostalen Reaktion direkt zu Osteoblasten differenzieren. In das bei der Fraktur entstandene Hämatom migrieren Periostzellen, die zu Chondrozyten differenzieren und übergangsweise den weichen Kallus bilden. Diese unterschiedliche Differenzierung der Stammzellen ist unter anderem auf Mechanosensitivität und die unterschiedliche Stabilität der Mikroumgebung zurückzuführen (Bragdon & Bahney, 2018).

Letztendlich erfüllt das Periost während der Frakturheilung die Bereitstellung chondrogener sowie osteogener Zellen und bewirkt unmittelbar chondrale und intramembranöse Knochenbildung (Wang et al., 2017). Diese Bildung von Knorpel- und Knochengewebe gilt als Grundvoraussetzung für diverse Techniken im Bereich des *Tissue-Engineerings*.

Die ebenfalls aus dem Periost stammenden endothelialen Perizyten tragen signifikant zur Neovaskularisierung des entstandenen Kallus bei (Diaz-Flores et al., 1992). Vaskuläre Gewebseinschübe erscheinen essenziell für den Differenzierungsprozess und den Eintritt von Osteoklasten. Osteoklasten sind körpereigene Zellen, die für den Abbau und die Resorption von Knochengewebe zuständig sind. Die Osteoklasten leiten im weiteren Verlauf die Remodellierung des entstandenen Kallus zu reifem Knochen ein (Wang et al., 2017).

Colnot 2009 und Bragdon 2018 bestätigten die wichtige Rolle des Periosts während des Frakturheilungsprozesses als Ursprung von Progenitorzellen sowie deren osteogenes und chondrogenes Differenzierungspotential (Bragdon & Bahney, 2018; Colnot, 2009). Stammzellen des Periosts sind in allen Phasen der Knochenregeneration beteiligt und nehmen eine kritische Rolle bei der erfolgreichen Ausheilung ein. Mehrere Tierstudien haben bewiesen, dass die Entfernung des Periosts drastische Auswirkungen auf die Knochenheilung zur Folge hat. Zellmarkierungsexperimente haben gezeigt, dass sich bis zu 90% des Knorpels und Gewebeknochens im frühen Kallus aus dem Periost entwickeln (Ozaki et al., 2000; Zhang et al., 2005).

Die weitverbreitete Annahme, mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark (*BM-MSCs*, engl. *Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells*) seien die primäre Zellquelle für Knochenheilung, ist widerlegt. Es wurde ausdrücklich experimentell nachgewiesen, dass Progenitorzellen des Periosts als Hauptquelle für die Bildung des Frakturkallus zu identifizieren sind (Bragdon & Bahney, 2018).

Dies deutet bereits die zu vermutenden Vorteile der *hPDCs* gegenüber der aktuell noch weitverbreiteten Anwendung von *BM-MSCs* im Bereich des *Tissue-Engineerings* (*TE*) an und unterstreicht die Dringlichkeit, durch weitere Forschung die *hPDCs* genauestens zu untersuchen.



## 1.2 Orale Pathologien

Viele orale Pathologien wie benigne oder maligne Tumore, Osteomyelitis, Osteoradionekrosen (ORM), Bisphosphonat-assoziierten Osteonekrosen (BRONJ), aber auch traumatisch bedingte Verletzungen und in selteneren Fällen infektiöse Zustände benötigen im Zuge der Therapie eine chirurgische Kontinuitätsresektion des Unterkiefers (Naros et al., 2018). Die notwendigen Eingriffe ziehen eine primäre oder sekundäre Rekonstruktion des knöchernen und weichgewebigen Defektes nach sich (Kumar et al., 2016). Die funktionelle und ästhetische Rekonstruktion der Defekte stellt eine enorme Herausforderung für die Mund- Kiefer- Gesichtschirurgen (MKG-C) dar.

Die Zielsetzung bei der Unterkieferrekonstruktion besteht darin die Nahrungsaufnahme und Artikulationsfähigkeit bestmöglich wiederherzustellen und durch obstruktionsfreie Atemwege die Ausübung diverser Freizeitaktivitäten zu ermöglichen. (Kumar et al., 2016). Hierfür müssen nach Lin *et al.* (2011) idealerweise die Kontinuität, die Höhe des Alveolarknochens, die gebogene Form und Ausdehnung des Unterkiefers sowie die Gesichtskonturen erfolgreich rekonstruiert werden (Lin et al., 2011). Eine ansprechende ästhetische Lösung beeinflusst hierbei entscheidend die Lebensqualität der Patienten (Schrag et al., 2006).

Für die Unterkieferrekonstruktion stehen dem Operateur diverse Möglichkeiten zur Verfügung. Im Sinne einer alloplastischen Rekonstruktion können konventionelle Rekonstruktionsplatten aus Titan zur Überbrückung des knöchernen Defektes verwendet werden. Der weichgewebige Defekt kann dabei lokal mittels Dehnungsplastik oder mit Hilfe eines Spalthauttransplantats gedeckt werden. Ferner finden bei größeren weichgewebigen Defekten gestielte (z.B. Pectoralis-lappen) oder freie (myo-) kutane Lappen (z.B. freier Radialis-lappen, freier Oberarm-lappen oder freier anterolateraler Oberschenkel-lappen) Anwendung. Die Möglichkeiten einer knöchernen Rekonstruktion bestehen in Abhängigkeit der Defektgröße in freien Knochentransplantate (z.B. autologer Beckenkamm) oder in verschiedenen freien mikrovaskulären osteo-(myo-) kutanen Lappen, z.B. dem Scapula-/Parascapular-lappen. Hierzu zählt auch der häufig verwendete, autologe, freie mikrovaskuläre Fibulalappen (Kumar et al.,

2016). Seine Anwendung wurde erstmalig von Hidalgo im Jahre 1989 beschrieben (Hidalgo, 1989). Die Reanastomosierung der freien mikrovaskulären osteo-(myo)kutanen Lappen erfolgt an den Gefäßen der Halsgefäßscheide. Es ist dabei möglich Transplantate mit über 20 cm Länge zu entnehmen. Durch individuell angepasste Osteotomien kann zudem eine möglichst ideale Transplantatform konstruiert werden (Yamamoto et al., 2018).

Die Verwendung von digitalem *Virtual Surgical Planning* optimiert das Verfahren zusätzlich (Weitz et al., 2018). Hierbei ermöglicht die Verwendung computerbasierter 3D Modelle eine präoperative virtuelle Planung und die Anfertigung patientenspezifischer Sägeschablonen und Osteosyntheseplatten (*PSI, engl. Patient Specific Implant*). Die beschleunigte Anpassung des Transplantats verringert Ischämie- und Operationszeiten (Kaariainen et al., 2016). Mikrochirurgisch reanastomosierte Fibulalappen zeigen niedrige Infektions- und hohe Erfolgsraten und werden oftmals als erste Wahl zur Unterkieferrekonstruktion empfohlen (Cordeiro et al., 1999; Yamamoto et al., 2018).

Obwohl die freien vaskularisierten, autologen Transplantate als eine der erfolgversprechendsten Lösungen beispielsweise bei der Behandlung von ORN gelten (Rice et al., 2015), besteht ein allgegenwärtiges Risiko postoperativ auftretender Komplikationen. Hierzu zählen Knochenresorptionen, Wunddehiszenzen und Nekrosen, sowie nicht zufriedenstellende funktionelle und ästhetische Operationsergebnisse bis hin zum Lappenverlust (Rommel et al., 2018). Als weitere Nachteile können potenziell anhaltende Schmerzen, Nervenverletzungen und kosmetische Schäden an der Entnahmestelle (*engl. donor site morbidity*) aufgeführt werden (Goulet et al., 1997). Zudem ist die Verwendung autologer Gewebetransplantate durch begrenzt zur Verfügung stehendes Material und durch die unweigerliche Schwächung des Knochens an der Entnahmestelle limitiert. Auch der Zustand des Zielgebietes kann durch beispielsweise eine vorhergegangene Strahlentherapie eine Einschränkung der möglichen Operationstechniken bedeuten (Yamamoto et al., 2018). In jedem Fall ist für die adäquate Rekonstruktion des Unterkiefers eine große Menge an gesundem Gewebe, einschließlich Knochen-, Muskel- und Hautgewebe

notwendig (Rommel et al., 2018). Allografts, das heißt körperfremde Transplantate, sind von Knochenbanken bereits verfügbar. Ihre Komplikationsrate ist jedoch durch das Risiko der Übertragung von Infektionskrankheiten, Transplantatversagen oder Graft-versus-Host-Reaktionen hoch (Ferrara & Reddy, 2006; Lietman et al., 2000).

In diesem Zuge wird die zwingende Notwendigkeit der Weiterentwicklung moderner Techniken, wie des *Tissue-Engineerings (TE)*, deutlich. Aufgrund der alternden Gesellschaft kann von einer Zunahme an benötigten Knochenrekonstruktionen des Unterkiefers ausgegangen werden. Bei gleichzeitig steigendem Anteil multimorbider Patienten wird hierbei in vielen Fällen die Verwendung autologer Knochentransplantate nicht realisierbar sein. Die eingeschränkte Verfügbarkeit passender autologer Transplantate, die merkliche Morbidität an der Entnahmestelle der Knochentransplantate (Lenze et al., 2017) und der gleichzeitig hohe Bedarf an Knochengewebe treiben die Entwicklung von *Tissue-Engineering* stetig voran. Geeignete Stamm- und Progenitorzellen sind zur Entwicklung von *TE*-Konstrukten von elementarer Bedeutung. *hPDCs* haben das Potential diesen Fortschritt entscheidend zu prägen und erscheinen dabei als sehr vielversprechende Option in diversen Eigenschaften anderen Stammzellen als überlegen.

### 1.3 Tissue Engineering

Das Feld des *Tissue-Engineering and Regenerative Medicine (TERM)* keimte in den letzten Jahrzehnten auf. Die Bezeichnung als „Regenerative Medizin“ fand 1992 in einer Publikation von Kaiser *et al.* (1992) erstmals Anwendung. Sie beschreibt einen Teil der Medizin mit dem Ziel fehlerhafte Organsysteme zu regenerieren (Kaiser, 1992). Es handelt sich um ein interdisziplinäres Fach, das Prinzipien des Ingenieurwesens, der Material- und Biowissenschaften kombiniert und die Entwicklung von Behandlungsstrategien sowie den Einsatz von biologischen Ersatzstoffen entscheidend vorantreibt (Kumar et al., 2016).

Fortschritte in diesem Feld erweisen sich als nützlich bei der Behandlung neurologischer, kardiovaskulärer, metabolischer, onkologischer und orthopädischer Krankheiten. Der Hintergrundgedanke basiert auf den ursprünglichen Aufgabengebieten der jeweilig verwendeten Zellen hinsichtlich Gewebeentwicklung und Homöostase (Ferretti, 2014). Heutzutage ist die Behandlung von Knorpel- und Knochendefekten mit körpereigenem (autologem) Material eine aktuell angewandte klinische Methodik. Zur Isolation gewebespezifischer Zellen muss eine Entnahme an unversehrten Körperteilen stattfinden, was unweigerlich zu neuen Gewebsdefekten führt. Um diese Verletzungen zu umgehen, werden häufig sogenannte Mesenchymale Stammzellen (*MSCs*; siehe 1.4 Mesenchymale Stamm-/Stromazellen (*MSCs*)) oder andere Progenitorzellen, wie beispielsweise *hPDCs*, *in vitro* gezüchtet und bilden das gewünschte Gewebe nach (Sakaguchi et al., 2005). Durch die Verwendung *CAD/CAM* (engl. *Computer-Aided-Design/Computer-Aided-Manufacturing*) basierter, individualisierter *Scaffolds* kann hierbei sogar die dreidimensionale Wachstumsform kontrolliert werden (Kumar et al., 2016).

Im Allgemeinen werden für *TE* drei Komponenten benötigt: Die zu verwendenden Zellen müssen den gewünschten Phänotypen oder alternativ das Potential zur gewünschten Differenzierung aufweisen. Des Weiteren wird eine Art *Scaffold* oder Matrix benötigt, die die Zellen am jeweiligen Transplantationsort binden können. Als letztes ist die Produktion bioaktiver Faktoren essenziell für die Gewebsbildung und -erhaltung. Das Multidifferenzierungspotential, die Produktion bioaktiver Faktoren und die Möglichkeit Perioost als einheitliches

Gewebe zu transplantieren und somit eine Art natürliche Matrix zu generieren, qualifiziert das Periost zur Verwendung bei *TE*-Techniken (O'Driscoll & Fitzsimmons, 2001).

### **1.3.1 Praktische Anwendung von Periostzellen im Tissue Engineering**

Die praktische Anwendung von Periostzellen zu *TE*-Zwecken zeigten Nakahara *et al.* bereits 1991 (Nakahara *et al.*, 1991). Im Wesentlichen bezog sich ihre Anwendung auf die Regeneration bei Knochen- und Knorpeldefekten.

Zur Verbesserung der Knochenregeneration konnten speziell Periostzellen bei einigen experimentellen Versuchen bereits erfolgreich verwendet werden. Gerade bei der Versorgung von sogenannten *kritischen Knochendefekten* zeigten sich positive Auswirkungen durch das Einbringen von Periostzellen (Roberts *et al.*, 2015). Als kritische Knochendefekte werden Kontinuitätsunterbrechungen bezeichnet, die ohne Intervention aufgrund ihrer Größe nicht spontan oder nur unvollständig ausheilen können (Niehues *et al.*, 2009).

Als konkretes Beispiel für die Knochenregeneration kann die Arbeit von Vacanti *et al.* (2001) aufgeführt werden. Vacanti *et al.* (2001) ersetzen die distale Phalanx eines Daumens bei einem 36-jährigen Patienten. Hierfür wurden Periostzellen auf ein Hydroxylapatit-*Scaffold* aufgebracht und in den Defekt implantiert. Die Funktionalität konnte erfolgreich wiederhergestellt werden, jedoch verblieb der Anteil an ausreichend mineralisiertem Knochen nach diesem Eingriff mit 5% gering (Vacanti *et al.*, 2001).

Andere Studien zur Knochenregeneration lieferten erfolgversprechendere Ergebnisse. Beispielsweise finden Progenitorzellen des Periosts im Zuge von Sinuslift-Operationen bereits erfolgreich Anwendung. Eine Sinuslift-Operation hat zum Ziel, bei zu geringem Knochenangebot im Oberkiefer durch Einbringen von Knochenersatzmaterial das Knochenangebot zu erhöhen (*Augmentation*). Dadurch kann die notwendige Knochensubstanz für eine Implantation zur Befestigung eines geplanten Zahnersatzes generiert werden. Im Laufe des Eingriffs wird die sogenannte Schneider'sche-Membran der Kieferhöhle nach kranial verlagert und das Knochenersatzmaterial kann eingebracht werden. In

modernen Verfahren werden hierbei geeignete Zellen nach ihrer Isolierung auf 3D *Scaffolds* expandiert und bei simultaner Implantation als Knochenersatzmaterial eingebracht (Trautvetter et al., 2011). Durch die Verwendung von Periostzellen kann eine erhebliche Menge menschlichen Knochens innerhalb von 3-4 Monaten nach Transplantation generiert werden (Schimming & Schmelzeisen, 2004; Schmelzeisen et al., 2003).

Wie bereits beschrieben, kann als weitere Anwendung von Periostgewebe im Bereich des *TE* die Knorpelregeneration aufgeführt werden. O'Driscoll und Fitzsimmons zeigten bereits 2001 die praktische Anwendbarkeit von Periosttransplantaten zur Knorpelregeneration in verletzten Gelenken (O'Driscoll & Fitzsimmons, 2001).

Als Grundvoraussetzung gilt das chondrogene Potential des Periosts, das sowohl *in vitro* als auch *in vivo* ausführlich dokumentiert wurde (De Bari et al., 2001; Ringe et al., 2008). Des Weiteren wurden die Auswirkungen des Alters und diverser Entnahmestellen des Periosts auf dessen chondrogenes Potential untersucht (Gallay et al., 1994; Malizos & Papatheodorou, 2005; O'Driscoll et al., 1986).

Es stellte sich heraus, dass sich das Alter der Patienten entscheidend auf das chondrogene Potential auswirkt. Mit zunehmendem Alter zeigt sich sowohl die Qualität als auch die Quantität von neugebildetem Knorpelgewebe als reduziert (O'Driscoll et al., 1986). Als mögliche Ursache konnte eine verringerte Anzahl chondrogener Vorläuferzellen in der Kambiumschicht älterer Patienten identifiziert werden (Malizos & Papatheodorou, 2005).

Gallay *et al.* (1994) untersuchten das Periost diverser Knochen auf deren chondrogenes Potential. Sie entnahmen Periost des Schädelknochens, Schulterblatts, Iliums und der Tibia. Sie entdeckten dabei große Differenzen und vermuteten, analog zu den Ergebnissen von Malizos & Papatheodorou (2005), einen direkten Zusammenhang mit der absoluten Zellanzahl im Kambium. Des Weiteren stellten sich bereits leichte Differenzen im chondrogenen Potential bei unterschiedlichen Entnahmeorten an der Tibia heraus (Gallay et al., 1994).

Inwiefern die embryonale Herkunft des Periosts das chondrogene Potential beeinflusst, soll in der vorliegenden Arbeit näher betrachtet werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass umfangreiche Studienergebnisse das klinische potential periostaler Progenitorzellen bezüglich Knochen- und Knorpelregenerationstherapien demonstrieren. *hPDCs* gewinnen in vielen aktuellen Belangen des *Tissue-Engineerings* an Relevanz. Ihre Vorteile gegenüber anderen Stammzellen werden im nachfolgenden Kapitel genauer herausgearbeitet. Die optimale Entnahmestelle der *hPDCs* und inwieweit deren embryonalen Ursprung die Möglichkeiten der Nutzung beeinflusst, ist insbesondere auf diesem Gebiet ausschlaggebend.

#### **1.4 Mesenchymale Stamm-/Stromazellen (MSCs)**

Stammzellen werden im Allgemeinen darüber definiert, zum einen die Fähigkeit zu besitzen in diverse spezialisierte Zelltypen zu differenzieren und zum anderen zur Selbsterneuerung fähig zu sein. Letzteres beinhaltet, dass ein Teil der Nachkommen in undifferenziertem Zustand verbleiben. Eine Klassifizierung kann dabei über das unterschiedliche Differenzierungspotential der Stammzellen erfolgen. Man unterscheidet *totipotente*, *multipotente* und *unipotente* Stammzellen (Bragdon & Bahney, 2018).

*Totipotente* Stammzellen können jegliche Art von Zellen eines Lebewesens einschließlich extraembryonalen Gewebes bilden, wie beispielsweise die Plazenta. Hierzu zählen die Zygote und frühe Blastomere.

*Pluripotente* Stammzellen werden auch als embryonale Stammzellen bezeichnet. Sie können embryonales Gewebe aller drei Keimblätter (d.h. Entoderm, Mesoderm und Ektoderm) bilden und aus dem Inneren der Blastozysten isoliert werden (Bragdon & Bahney, 2018). Durch genetische Reprogrammierung ist es heutzutage ebenfalls möglich, aus reifen somatischen Zellen induzierte *pluripotente* Stammzellen experimentell zu erzeugen (Okita et al., 2007; Umrath et al., 2020).

Sofern Stammzellen die Fähigkeit verloren haben alle Arten von Zelltypen zu bilden, werden sie als *multipotent* bezeichnet. Aus ihnen gehen ausschließlich ähnliche Nachfolgerzellen hervor, beispielsweise Zellen eines bestimmten Organs. Diese gewebespezifischen Stammzellen werden auch als reife oder somatische Stammzellen bezeichnet. Sie befinden sich in spezialisierten Nischen und behalten ihre Eigenschaften durch Interaktionen mit der Mikroumgebung. Sie tragen zu lokaler Homöostase und Verletzungsreaktion bei (Bragdon & Bahney, 2018).

Zu den *multipotenten* reifen Stammzellen des muskuloskelettalen Systems zählen die ausführlich charakterisierten *hämatopoetischen* Stammzellen als Ursprung aller Blutzellen und die *Bone marrow stromal cells (BM-MSCs)*, die auch als mesenchymale Stammzellen (*MSCs*) bezeichnet werden. Die von uns untersuchten *hPDCs* werden ebenfalls den *multipotenten* Stammzellen zugeordnet.

*Unipotent* Stammzellen sind hingegen neben der Fähigkeit zur Selbsterneuerung ausschließlich in der Lage einen bestimmten Zelltyp zu bilden. Es ist generell anzumerken, dass in vielen Fällen bei fehlenden experimentellen Beweisen zur Selbsterneuerung auf die Terminierung als Progenitorzellen zurückgegriffen werden sollte (Bragdon & Bahney, 2018).

Im Jahre 2006 publizierte die *International Society of Cellular Therapy* einen minimalen Anforderungskatalog für *multipotente MSCs*, wobei sie den Begriff „mesenchymale Stromazellen“ als passende Terminologie auffassten. In diesem Anforderungskatalog ist festgehalten, dass Zellen eine Adhärenz auf Plastik und ein nachweislich *multipotentes* Differenzierungspotential *in vitro* zu Osteoblasten (osteogene Differenzierung), Adipozyten (adipogene Differenzierung) und Chondrozyten (chondrogene Differenzierung) besitzen müssen.

Zusätzlich ist die Expression spezifischer Oberflächenantigene notwendig, um als *multipotente MSCs* definiert zu werden. Die Zellen müssen mit mehr als 95% positiv auf *Cluster of Differentiation (CD)* 105, 73, 90 und mit weniger als 2% positiven Werten, negativ auf CD45, 35, 14, 79alpha und HLA-DR getestet werden (Dominici et al., 2006).



#### **1.4.1 MSCs unterschiedlichen Ursprungs und ihre Eigenschaften**

Mehrere Studien haben bereits die minimalen Anforderungen der *International Society of Cellular Therapy* an PDCs zur Deklaration als Stammzellen festgestellt (Ceccarelli et al., 2016; Lohberger et al., 2013; Radtke et al., 2013; Vozzi et al., 2016). Die Differenzierung in multiple Abstammungslinien wurde für die PDCs sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachgewiesen (De Bari et al., 2006). Neben der Differenzierung zu Osteoblasten und der Bildung knorpelartigen Gewebes, haben die PDCs die Fähigkeit Fettvakuolen auszubilden bei gleichzeitiger Expression typischer adipogener Marker Gene (De Bari et al., 2006; Ringe et al., 2008).

Es ist wichtig an dieser Stelle festzuhalten, dass aus weit mehr Geweben als nur dem Periost stammzellenähnliche Progenitorzellen isoliert werden können. Die aus dem Knochenmark stammenden *BM-MSCs* werden am häufigsten verwendet. Progenitorzellen, die *in vitro* ein vergleichbares Differenzierungspotential aufweisen, konnten unter anderem aus Fett-, (Zuk et al., 2002) Muskel- (Gharaibeh et al., 2008) und Periostgewebe (De Bari et al., 2006), sowie von Zellen der Synovia (De Bari et al., 2001; Yoshimura et al., 2007) und des Pulpagewebes (Lohberger et al., 2013) erfolgreich gewonnen werden. Zudem demonstrierten Crisan *et al.* (2009) eine ähnliche Expression von MSC Oberflächenmarkern an Perizyten und bewies deren Multipotenz *in vitro*. Perizyten befinden sich an der Außenoberfläche von Blutgefäßen (Crisan et al., 2009).

Es ist von großer Bedeutung, welche der Zellpopulationen idealerweise für die Verwendung bei *Tissue-Engineering* geeignet ist. Sowohl die Komplexität der Entnahme als auch ihre Fähigkeit zur Gewebekonstruktion *in vivo* und *in vitro* ist hierbei für die Entscheidungsfindung ausschlaggebend (Roberts et al., 2015).

Das Pulpagewebe ist wie das Unterkieferperiost eine potenzielle Quelle für Stammzellen der Neuralleiste. Der Zugang ist verhältnismäßig einfach und die Morbidität gering (Liu et al., 2011). Jedoch ist eine kontinuierliche Versorgung mit Pulpagewebe aufgrund der limitierten Menge nicht möglich und die MSCs der Pulpa demonstrierten eine geringere osteogene Kapazität (Lohberger et al.,

2013; Park et al., 2012). Somit wird das Pulpagewebe für eine Anwendung im Bereich des *TE* vorerst nicht berücksichtigt.

Als weitere vielversprechende Zellmaterialquellen zeigten sich das Periost, die Synovia und das Knochenmark. Deren Eigenschaften werden im folgenden Abschnitt verglichen.

Das Periost erscheint als leicht zugänglich bei gleichzeitig guter Expansionsfähigkeit *ex vivo*, was die Eignung der *PDCs* für *TE* unterstreicht (Chen et al., 2011). Zellen des Periosts und der Synovia zeigen im Vergleich zu *BM-MSCs* die höchste Dichte an Stamm-/Progenitorzellen. Sakaguchi *et al.* (2005) konnten dies experimentell beweisen, indem sie Zellen unterschiedlicher Gewebearten bei geringer Dichte aussäten. Die Fähigkeit *in vitro* Kolonien zu bilden überragte bei Zellen des Periosts und der Synovia signifikant (Sakaguchi et al., 2005). Es ist anzumerken, dass der hohe Anteil an nicht-adhärenenten hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark zu diesen Ergebnissen beitragen könnte (Roberts et al., 2015). Der prozentuale Anteil an *BM-MSCs* im Knochenmark beläuft sich auf gerade einmal 0,001-0,01 % und nimmt mit zunehmendem Alter weiter ab (Mueller & Glowacki, 2001).

Alle publizierten Vergleichsstudien bezüglich der Proliferationsraten mesenchymaler Progenitorzellen ergaben ebenfalls ein signifikant schlechteres Ergebnis bei den *BM-MSCs* gegenüber der *PDCs* und Synovialzellen. Speziesübergreifend wurden Versuche an Menschen-, Mäuse-, Pferde- und Rattenzellen durchgeführt (Radtko et al., 2013; Sakaguchi et al., 2005; Van Gastel et al., 2012; Yoshimura et al., 2007). Eine hohe Proliferationsaktivität der Zellen gilt als eine allgemeingültige Voraussetzung für die erfolgreiche Gewebezüchtung, da die *in vitro* Zellexpansion einen grundlegenden Bestandteil der Technik darstellt (Roberts et al., 2015).

Die Bildung speziell von Knochengewebe ist ein weiterer zentraler Bestandteil des Knochen *TE* und wird vor allem in Zukunft eine noch entscheidendere Rolle einnehmen (siehe 1.2 Orale Pathologien). Sakaguchi *et al.* (2005) erkannten die überlegene osteogene Differenzierung der Periost-, Knochenmark- und Synovialzellen im Vergleich zu Zellen des Muskel- und Fettgewebes, spekulierte

jedoch nicht welcher Ursprung der ideale für osteogene Differenzierung ist (Sakaguchi et al., 2005).

Die aktuelle Literatur liefert keine eindeutigen Ergebnisse bezüglich der osteogenen Kapazität (Chen et al., 2011; Hayashi et al., 2008; Radtke et al., 2013; Yoshimura et al., 2007). Hayashi *et al.* (2008) untersuchten das osteogene Potential von Ratten-*MSCs* und erkannten dabei eine niedrigere osteogene Kapazität von *PDCs* im Vergleich zu *BM-MSCs*. Die experimentelle Forschungsarbeit von Radtke *et al.* (2013) an Pferde-*MSCs* ergab ein vergleichbares osteogenes Potential der *BM-MSCs* und *PDCs*. Yoshimura *et al.* (2007) befassten sich mit von Ratten stammenden *MSCs*. Ihre Ergebnisse wiederum lieferten Erkenntnisse hinsichtlich einer Überlegenheit von *PDCs* gegenüber *BM-MSCs* in Bezug auf das osteogene Differenzierungspotential. Diese These wird durch die Arbeiten von Chen *et al.* (2011) und Stich *et al.* (2017) unterstützt. Chen *et al.* (2011) zeigten eine bessere osteogene Induktion von Periostzellen in Monolayer-Kulturen im Vergleich zu *BM-MSCs*, was sich in einer dichteren Mineralisation widerspiegelte. Die Periostzellen exprimierten höhere mRNA-Level von BMP-2 (*eng. Bone Morphogenetic Protein 2*), *Osteopontin* und *Osteocalcin* (Chen et al., 2011). In Forschungsarbeiten von Stich *et al.* (2017) zeigten 100% der *hPDC*-Kolonien osteogenes Potential, während einige der heterogenen *BM-MSCs*-Kolonien keine osteogene Differenzierung zeigten. Es wurde analog zu unserer Studie eine Mediumsupplementierung mittels 10% humanem Plättchen-Lysat (*hPL*) verwendet.

Des Weiteren haben einige Studien gezeigt, dass *PDCs* der Tibia ihr osteogenes Potential auch bei steigendem Alter der Donoren beibehalten (De Bari et al., 2001, 2006). Im Gegensatz dazu nimmt das osteogene Potential bei *BM-MSCs* mit zunehmendem Alter ab (D'Ippolito et al., 1999; Huibregtse et al., 2000). Somit erscheint zusammenfassend ein überlegenes osteogenes Potential der *PDCs* gegenüber den *BM-MSCs* möglich.

Als ein weiterer Vorteil der *PDCs* gegenüber anderen *MSC*-Quellen kann aufgeführt werden, dass *PDCs in vivo* zu einer besseren Neovaskularisation führen, was die Reifung von infiltrierenden Osteoblasten und somit die

Regeneration von Knochen entscheidend beschleunigt (Chen et al., 2011; Yu et al., 2009). Dies ist letztendlich auf eine adäquate Sauerstoff- und Nährstoffversorgung zurückzuführen, die die direkte Bildung mineralisierter Matrix fördert (Karageorgiou & Kaplan, 2005). Die Erkenntnis, dass *PDCs* einen Perizyten-artigen Phänotypen annehmen, wenn sie gemeinsam mit Endothelzellen implantiert werden, kann als möglicher Grund für diese Eigenschaft aufgeführt werden (Van Gestel et al., 2012).

Alles in allem lässt sich festhalten, dass die Überlegenheit der *PDCs* weitgehend erfasst zu sein scheint. Betrachtet man die osteogene Differenzierung, Proliferationsaktivität, Zugänglichkeit und Verfügbarkeit sowie die positive Wirkung bezüglich Neovaskularisierung, sind *PDCs* anderen *MSC*-Quellen, vor allem den aktuell noch am häufigsten verwendeten *BM-MSCs*, überlegen und sollten als Mittel der Wahl für *TE*-Zwecke in Betracht gezogen werden.

#### **1.4.2 *PDCs unterschiedlicher Lokalisation und ihre Eigenschaften***

*hPDCs* können potentiell aus dem Periostgewebe jedes menschlichen Knochens gewonnen werden. Einige Entnahmestellen zeigen sich hierbei aufgrund ihrer Lokalisation und anatomisch bedingten Zugänglichkeit als geeigneter. Deutlich ausschlaggebender erscheint jedoch, in welchem Ausmaß die Funktionen und Eigenschaften der gewonnenen *hPDCs* durch den jeweiligen Ort der Periost-Entnahme beeinflusst werden. Dieser Sachverhalt erscheint bis dato nur unzureichend erforscht (Roberts et al., 2015).

Einige Studienergebnisse legen bereits nahe, dass eine Präferenz bezüglich eines Ossifikationsweges in Abhängigkeit zu den jeweiligen Entnahmeorten auch nach *ex-vivo* Zellexpansion bestehen bleibt (Fujii et al., 2006; Iuchi et al., 2020; Van Gestel et al., 2014).

Van Gestel *et al.* (2014) expandierten diesbezüglich Periostzellen aus den Röhrenknochen Femur und Tibia von Mäusen. Bei der anschließenden Differenzierung erfolgte eindeutig *chondrale* Ossifikation, was mit der embryonalen Entwicklung der Röhrenknochen übereinstimmt. Dahingegen wurde bei einem identischen Versuchsaufbau mit *BM-MSCs* ausschließlich *intramembranöse* Ossifikation nachgewiesen. Als Schlussfolgerung lässt sich

daraus bereits ein intrinsischer Unterschied zwischen Zellen verschiedenen Ursprungs vermuten (Van Gastel et al., 2014).

Die Veröffentlichung von Fujii *et al.* (2006) untermauert diese Hypothese. Fujii *et al.* (2006) transplantierten Periost der Tibia und der Calvaria in die suprahyoidale Muskulatur von Ratten. Das Periost der Tibia bildete dort ektopischen Knochen über *chondrale und intramembranöse* Ossifikation. Das Periost der Calvaria hingegen zeigte entsprechend seines embryonalen Ursprungs ausschließlich *intramembranöse* Ossifikation.

Erst kürzlich konnten diese Ergebnisse durch Arbeiten von Iuchi *et al.* (2020) erneut bestätigt werden. Bei der Untersuchung von Krania-, Unterkiefer-, Radius- und Iliumperiost forcierte das Periost der Röhrenknochen (Radius, Ilium) hauptsächlich *chondrale* Ossifikation, während das Periost der kraniofazialen Region den Knochen über den Prozess der *intramembranösen* Ossifikation bildete (Iuchi et al., 2020). Die Ossifikationswege stimmen mit der embryonalen Entwicklung überein. Es ist also anzunehmen, dass in Folge der embryonalen Knochenbildung *hPDCs* intramembranösen Ursprungs - analog zu den Ergebnissen von van Gastel *et al.* (2014) und Fujii *et al.* (2006) - eine Präferenz zu direkter/intramembranöser Ossifikation beibehalten.

Neuere Erkenntnisse legten zudem nahe, dass *hPDCs* des Unterkiefers auf Grund ihres embryonalen Ursprungs in der Neuralleiste überlegene Eigenschaften gegenüber *hPDCs* mesodermalen Ursprungs (z.B. Fibula) aufweisen (Donos et al., 2005; Ichikawa et al., 2015; Leucht et al., 2008; Park et al., 2012; Quarto et al., 2010).

Als weitere potenziell begünstigend wirkenden Eigenschaften speziell des Unterkiefers können seine einzigartige Resorptions- und Remodellierungsrate aufgeführt werden. Es wurde eine doppelt so hohe Resorptionsrate bei eingebrachten Beckenkammtransplantaten im Verhältnis zu eingebrachtem kranialem Knochen nachgewiesen (Donos et al., 2005). Zudem ist bereits seit längerem bekannt, dass der Unterkieferknochen eine deutlich schnellere Remodellierung durchläuft als andere Knochen (Huja et al., 2006). Einer der

wichtigsten hierfür verantwortlichen Wachstumsreize ist die mechanische Belastung des Unterkiefers während der Mastikation (Inoue et al., 2019).

Andere durchgeführte Studien widersprechen diesen durchaus als kontrovers zu betrachtenden Erkenntnissen bezüglich der Überlegenheit der *hPDCs* mit Ursprung in der Neuralleiste. Ihre Ergebnisse suggerieren eine Überlegenheit der *hPDCs* mesodermalen Ursprungs (Bilkay et al., 2008; Fujii et al., 2006; Hsiao et al., 2018; Iuchi et al., 2020; Matsushima et al., 2011; Uddströmer, 1978). Es ist jedoch anzumerken, dass es sich bei diesen Studien ausschließlich um *in vivo* durchgeführte Tierstudien an Ratten / Mäusen / Kaninchen handelt. Zudem wurde nur in den Studien von Matsushima *et al.* (2011) und Iuchi *et al.* (2020) der Unterkiefer als Entnahmestelle in Betracht gezogen.

Hinsichtlich der Gesamtheit an beschriebenen Veröffentlichungen und Studienergebnissen zeigt sich die Sachlage bezüglich einer optimalen Quelle für *hPDCs* als nicht eindeutig. Weitere Studien sind nötig, um die zugrundeliegenden Mechanismen im Detail zu erforschen. Unsere Studie liefert aussagekräftige Daten mit *menschlichem* Material, die vorhandene Wissenslücken füllen und gleichzeitig die Charakterisierung der *hPDCs* beider embryonaler Ursprünge vorantreiben kann.

## 1.5 Ziel der Studie

Neuere Untersuchungen deuten überlegene Eigenschaften von periostalen Progenitorzellen (*PDCs*) des Unterkiefers gegenüber *PDCs* mesodermalen Ursprungs an. Zudem sollen *PDCs* unterschiedlichen Ursprungs eine intrinsische Präferenz bezüglich eines Ossifikationsweges aufweisen.

Ziel der vorliegenden Studie ist der Vergleich der *in vitro* Eigenschaften sowie des Differenzierungspotentials von humanen periostalen Progenitorzellen (*hPDCs*) unterschiedlichen embryonalen Ursprungs. Dabei wird auf bisher einzigartige Weise auf *hPDCs* des Unterkiefers (Neuralleiste, theoretisch resultierend in intramembranöser Ossifikation) und der Fibula (Mesoderm, theoretisch resultierend in chondraler Ossifikation) desselben Spenders (Donors) zurückgegriffen. Die hierdurch minimierte Donorvariation wirkt sich positiv auf die Verlässlichkeit der erhobenen Daten aus.

Es wird angenommen, dass der unterschiedliche embryonale Ursprung des Periosts einen direkten Einfluss auf das Verhalten und/oder auf das Differenzierungspotential der *hPDCs in vitro* zeigt. Im Rahmen dieser Studie sollen Oberflächenantigene, Seneszenz und Proliferationsraten von *hPDCs* der Fibula und des Unterkiefers miteinander verglichen werden. Die Differenzierung der *hPDCs* zu Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten soll induziert und sowohl qualitativ als auch quantitativ ausgewertet und zwischen den 2 Zelltypen verglichen werden.

Zur Ermittlung der optimalen Zellpopulation für *TE* ist es von enormer Bedeutung detaillierte Einblicke in die Mechanismen der präferierten Differenzierungswege von *hPDCs* zu erlangen. Es wird angenommen, dass aufgrund der intrinsischen Tendenz zu intramembranöser Ossifikation und der einzigartig hohen Knochenremodellierungsrate des Unterkiefers, die *hPDCs* des Unterkiefers eine Zellpopulation mit tendenziell ausgeprägteren osteogenen und proliferativen Eigenschaften darstellt. Dies würde wiederum *hPDCs* des Unterkiefers als eine erfolgversprechende Zellquelle für *TERM* qualifizieren. Unsere Studie kann somit klinische Strategien, die auf die Verwendung von Periost zur Gewebezüchtung zurückgreifen, entscheidend leiten. Speziell die Verwendung gezüchteter

Knochen-Transplantate soll durch die vorliegende Forschungsarbeit gefördert werden. Unsere Resultate können die Verbesserung und Weiterentwicklung von *TE* vorantreiben und dabei zukünftig klinische Entscheidungsfindungen beeinflussen.



## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Patientenkollektiv**

Zur Minimierung der Donor Variation ist es von fundamentaler Bedeutung, sowohl das Unterkiefer- als auch das Fibula-Periost aus demselben Spender (Donor) zu gewinnen. Dies war uns im Rahmen von Mund-Kiefer-Gesichtschirurgischen Eingriffen zur Unterkieferrekonstruktion möglich. Berücksichtigt wurden hierbei alle Patienten (m/w/d) unabhängig des Alters, die eine primäre oder sekundäre Unterkieferrekonstruktion mittels freiem mikrovaskulärem osteomyokutanem Fibulalappen (siehe 1.2 orale Pathologien) benötigten und dabei in der Abteilung der Mund- Kiefer- und Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Tübingen operiert wurden.

Ausgeschlossen wurden Patienten mit Kiefernekrosen und systemischen Erkrankungen mit direktem Einfluss auf Knochenbildung oder Knochenzusammensetzung, wie beispielsweise Osteoporose. Des Weiteren wurden Patienten ausgeschlossen, die im Rahmen der Therapie Bisphosphonate und/oder ähnliche knochenwirksame Medikamente eingenommen, beziehungsweise präoperativ eine Strahlentherapie durchlaufen haben.

Die Periost-Gewinnung erfolgte nach ausführlicher präoperativer Aufklärung der Patienten sowie deren schriftlicher Einwilligung, die ohne Angabe von Gründen jederzeit widerrufen werden kann.

Die Studie wurde durch die Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität Tübingen geprüft und genehmigt (618/2017/B02). Zudem erfolgte eine Drittmittelförderung (Antragsteller: Dr.med. Andreas Naros) durch die AO Foundation (AOCMFS-19-07N).

## 2.2 Periost-Gewinnung

Das Periost, sowohl des Unterkiefers als auch der Fibula, wurde vom selben Patienten im Rahmen oben genannter rekonstruktiver Eingriffe durch die verantwortlichen Mund- Kiefer- Gesichts- Chirurgen der Universität Tübingen gewonnen. Benötigt wurden Periost Proben von maximal 1x1cm Größe. Zur Verbesserung der Zellqualität ist eine möglichst schonende Gewinnung des Periosts entscheidend.

Um Periostgewebe vom menschlichen Knochen zu separieren, wird in der Regel ein Raspatorium verwendet. Es handelt sich hierbei um eine Art gekrümmten Meißel. Die Integrität des Periosts wird beibehalten, indem die Sharpey-Fasern und somit die Verbindung zur Knochenoberfläche gelöst werden (Chang & Knothe Tate, 2012). Die für die Knochenbildung und -heilung wichtigen Progenitorzellen befinden sich in der inneren Kambium-Schicht des Periosts. Die Verwendung einer Pinzette oder Skalpell kann das Kambium zerstören oder die Gewebeprobe kontaminieren (Brownlow et al., 2000). Die gewonnen Proben wurden steril in NaCl gelagert und schnellstmöglich zur Weiterverarbeitung in das Labor versendet.

Die zusätzliche Gewebeentnahme am Unterkiefer und an der Fibula birgt für die Patienten keine zusätzlichen Risiken. Darüber hinaus werden weder der Heilungsprozess noch die Einheilung des Transplantates beeinträchtigt.

## 2.3 Isolation der humanen PDCs

Die *hPDCs* können entweder durch enzymatische Verdauung oder spontane Adhäsion auf Plastikoberflächen aus dem entnommenen Periostgewebe isoliert werden. Beim Verfahren der spontanen Adhäsion adhären initial diverse Zelltypen. Es proliferieren allerdings ausschließlich Fibroblast-ähnliche *MSCs*. Nach einem Zeitraum von circa einer Woche werden während des Medienwechsels bei Medienentnahme die verbliebenen Nicht-*MSC*-Zellen automatisch entfernt und die *hPDCs* verbleiben im Zellkulturgefäß (Gardner et al., 2015). Die Verwendung von Kollagenasen zur enzymatischen Verdauung verläuft zwar deutlich schneller, jedoch sind die Auswirkungen der Kollagenasen

nicht gut erforscht. Bei dem Verfahren der spontanen Adhäsion aus dem Ursprungsgewebe behalten Zellen ihre Physiologie bei ohne Artefakte zu produzieren (Hutmacher & Sittinger, 2003). Aus diesen Gründen entschieden wir uns für das Isolationsverfahren durch spontane Adhäsion, um eine möglichst fehlerfreie Analyse der Gewebeproben erzielen zu können.

Nach Eingang des intraoperativ gewonnenen Periosts im Labor erfolgte umgehend die Weiterverarbeitung der Proben. Alle Arbeitsprozesse innerhalb des Labors finden unter möglichst reinen Bedingungen statt, um eine Kontamination des zu untersuchenden Materials zu verhindern. Zunächst erfolgte *ex-vivo* die mechanische Zerkleinerung der Proben durch die Zuhilfenahme von Skalpellern in ca. 1 mm<sup>2</sup> große Stücke. Anschließend wurden die Proben in 5 ml *PBS* (*engl. Phosphate Buffered Saline*) aufgenommen und über einen Zeitraum von 5 Minuten, bei einer Temperatur von 8°C und einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 1400 rpm (*engl. rounds per minute*) zentrifugiert.

Innerhalb unserer Versuchsreihen wurde für die Zentrifugation das Modell Centrifuge 5804 R der Firma Eppendorf verwendet.

Anschließend wurde der Überstand entfernt. Das entstandene *Pellet* wurde in 5 ml Medium (*DMEM/F12* + 10% *hPL* + 10 µl/ml Penicillin/Streptomycin + 10 µl/ml Amphotericin + 1 µl/ml Ciprofloxacin + 1 µl/ml Gentamicin) aufgenommen und in eine T175 Zellkulturflasche der Firma Cellstar überführt. Sie diente in unseren Experimenten als Standardflasche mit einem Fassungsvermögen von 550 ml bei einer Fläche von 175 cm<sup>2</sup>.

#### **2.4 Kultivierung der humanen PDCs**

Die Wahl des Basalmediums ist von großer Bedeutung für die Erhaltung der *MSC* Charakteristika und der Multipotenz. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Kultivierung mit *DMEM-F12* als Medium, die Stammzellenfähigkeiten und das Differenzierungspotential über 25 Subkultur-Passagen hinweg beibehalten werden können (Pal et al., 2009). *DMEM-F12* wurde als passendes Basalmedium von uns verwendet. Als weiteren Zusatz wurde 10% humanes

Plättchen-Lysat (*hPL*) hinzugefügt, das für seine fördernde Wirkung auf *in vitro*-Expansion von *BM-MSCs* bekannt ist (Schallmoser et al., 2007). *HPL* ersetzt das alternativ verwendete *FCS/FBS* (fetales Kälberserum) und umgeht damit die Problematik von Kontamination und/oder die Auslösung von Immunreaktionen. Wanner et al. (2017) entdeckten eine signifikant höhere Populationsdopplungsrate, metabolische Aktivität, höheres Mineralisierungspotential und einen Anstieg an *MSCA-1*- (*engl. Mesenchymal Stem Cell Antigen 1*) positiven Zellen (Wanner et al., 2017). *MSCA-1*-positive Zellen werden mit Osteoprogenitorzellen in *hPDC*-Zellpopulationen des Unterkiefers assoziiert und könnten eine Erklärung für das detektierte höhere osteogene Potential der *hPDCs* des Unterkiefers liefern (Alexander et al., 2010). Fiorentini et al. (2011) zeigten, dass die Zugabe von Dexamethason eine Mineralisierung durch *BM-MSCs* sicherstellt (Fiorentini et al., 2011). Offensichtlich enthält 10% *hPL* natürliche Kortikosteroide, beziehungsweise es kann die Wirkung des Kortikosteroids Dexamethason nachahmen (Wanner et al., 2017). Innerhalb der Versuchsreihe zu osteogener Differenzierung entschieden wir uns für eine Durchführung mit Dexamethason, um die Vergleichbarkeit zu bereits bestehenden Daten zu ermöglichen. Die Verwendung von  $\beta$ -Glycerophosphat dient in beiden Medien als Quelle für Phosphat und erscheint somit essentiell für die Mineralisierung von *hPDCs* (Wanner et al., 2017).

Die von uns im Allgemeinen verwendeten Zellkulturbedingungen wurden durch einen Inkubator (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) sichergestellt. Als Kulturmedium wurde das Basalmedium *DMEM/F12* mit 10% *hPL*, 10  $\mu$ l/ml Penicillin/Streptomycin und 10  $\mu$ l/ml Amphotericin versetzt und wird im Folgenden als „Medium“ bezeichnet. Der Medienwechsel fand jeden zweiten Tag statt.

Das *hPL* wurde vom Zentrum für klinische Transfusionsmedizin Tübingen bezogen.

Im Allgemeinen wurde mit folgenden Zelldichten ausgesät:

Kulturgefäß	T175 Flasche	T75 Flasche	6-Well	12-Well
Fläche (cm <sup>2</sup> )	175	75	9,6	3,9
Medium (ml)	20	10	2	1
Zellen	1*10 <sup>6</sup>	5*10 <sup>5</sup>	4*10 <sup>4</sup>	2*10 <sup>4</sup>

Das Passagieren/Ablösen der Zellen wurde durch das hochreine, nicht tierische TryLE Express erreicht. Es handelt sich hierbei um ein rekombinantes, zellablösendes Enzym. Passagiert wurde hierbei grundsätzlich bei (nahezu) vollständiger Konfluenz der jeweiligen Flaschen. Bei den von uns verwendeten T175 Flaschen entspricht dies einer Zelldichte von circa 57 000 Zellen pro cm<sup>2</sup>. Ausgesät wurden die jeweiligen Zellen mit einer Dichte von 5.700 Zellen pro cm<sup>2</sup> in mehreren T175 Flaschen. Durch das Passagieren konnten ausreichend Zellen in den Passagen 1,2 und 3 für alle folgenden Experimente kryokonserviert werden. Für die Kryokonservierung wurden die Zellen - analog zum Passagieren - abgelöst und mithilfe des BioRad TC20 gezählt. Im Anschluss wurden 1\*10<sup>6</sup> hPDCs auf 2 ml Einfriermedium Cryo-SFM der Firma PromoCell suspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Die Kryoröhrchen wurden anschließend für 1 Stunde bei -25°C, dann für 24 Stunden bei -80°C und letztendlich zur langfristigen Aufbewahrung in Tanks mit flüssigem Stickstoff gelagert.

## 2.5 Charakterisierung der CD-Profile der hPDCs mittels Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie wird ein hochentwickeltes Gerät zur Messung multipler physikalischer Eigenschaften einzelner Zellen verwendet, wie beispielsweise deren Größe und exprimierte Oberflächenantigene. Die Funktionsweise beruht auf der Analyse von Lichtstreuungen, die durch Färbungen oder monoklonale Antikörper gegen extra-/intrazelluläre Moleküle hervorgerufen werden können (Adan et al., 2017). *Fluorescent activated cell sorter (FACS)* sind Durchflusszytometer, die fluoreszent markierte Zellen

innerhalb einer gemischten Zellpopulation herausfiltern können (Wilkerson, 2012).

Innerhalb unserer Forschungsstudie wurden die *hPDCs* der Fibula und des Unterkiefers auf diverse Oberflächenantigene getestet. Es wurden wie oben beschrieben, die MSC-spezifischen Oberflächenantigene CD45, CD73, CD90, CD105 und HLA-DR untersucht, um die Stammzellencharakteristik der isolierten *hPDCs* zu beweisen (siehe 1.4 Mesenchymale Stamm-/Stromazellen (MSCs)). Des Weiteren wurde die Expression von *MSCA-1* genauer untersucht, das in direktem Zusammenhang mit dem osteogenen Differenzierungspotential steht (Alexander et al., 2010).

Für die Untersuchung der Oberflächenantigene mithilfe der Durchflusszytometrie wurden die in Passage 3 in T75 Flaschen kultivierten *hPDCs* mit *PBS* gewaschen, abgelöst und in Medium resuspendiert. Für jede zu untersuchende Probe wurden  $1 \times 10^5$  lebende Zellen in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und bei 300 x g für 5 Minuten abzentrifugiert. Im Anschluss wurde das Zellmaterial erneut mit 1 ml *FACS-Puffer* gewaschen, bei 300 x g für 5 Minuten abzentrifugiert und für 15 Minuten in 500  $\mu$ l 4%-Formaldehyd inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 300 x g für 5 Minuten wurde das Formaldehyd abgenommen, das Zellmaterial erneut mit *FACS-Puffer* gewaschen und in 300  $\mu$ l *FACS-Puffer* bei 4°C gelagert.

Zur Durchführung der Durchflusszytometrie wurden die Proben bei 300 x g für 5 Minuten zentrifugiert und anschließend in 1:10 verdünntem Gammunex (enthält humanes Immunglobulin A) resuspendiert. Für jede zu untersuchende Probe wurden 20  $\mu$ l der Zellsuspension gemeinsam mit 90  $\mu$ l *FACS-Puffer* in ein *FACS*-Röhrchen pipettiert und mit humanen Immunglobulinen für 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Hierbei handelte es sich um die mit den Fluoreszenz-Farbstoffen PE- (Phycoerythrin) oder APC- (Allophycocyanin) markierten Antikörper CD29, CD45, CD73, CD90, CD105, CD146, *MSCA-1*, um wie oben beschrieben die Stammzellen-Charakteristik der *hPDCs* nach der *International Society of Cellular Therapy* zu beweisen. Anschließend wurden die Proben dreifach mit je 200  $\mu$ l

FACS-Puffer gewaschen und die Durchflusszytometrie am Guava EasyCyte 6HT-2L Gerät der Firma Millipore durchgeführt.

In einem weiteren Telexperiment wurden die Proben auf die potentiell exprimierten immunrelevanten Oberflächenmarker HLA-ABC, HLA-DR, RAP-1, CD80, CD83 und CD86 untersucht.

Hierfür wurden die *hPDCs* in 6-Well Platten ausgesät und über eine Dauer von 7 Tagen mit Interferon behandelt. Pro ml Medium wurden hierfür 1 µl Interferon-γ hinzugefügt. Zusätzlich wurde eine Kontrollgruppe ohne Interferon-Zugabe simuliert.

Interferon-γ wurde ursprünglich als Makrophagen-Aktivierungs-Faktor bezeichnet und bewirkt unter anderem die Hochregulierung Antigen-präsentierender Prozesse. (Schroder et al., 2004) Des Weiteren wird die Bildung von *MHC-2* (engl. *Major Histocompatibility Complex*) induziert und die Zellfunktionen der B-Zellen reguliert. (Boehm et al., 1997) Durch die Inkubation mit Interferon-γ konnte somit das Verhalten der *hPDCs* im Zuge einer Immunreaktion beobachtet werden.

## **2.6 Seneszenz Assay der *hPDCs* mit Durchflusszytometrie**

Die *hPDCs* des Unterkiefers und der Fibula wurden im Zuge eines Seneszenz-Assays auf ihr Verhalten bezüglich höherer Passagen und ihrer Stabilität in Kultur untersucht. Die Seneszenz beschreibt hierbei eine Zunahme degenerativen Verhaltens der Zellen, welches im Laufe des voranschreitenden Alters der Zellen auftritt. Je geringer die Seneszenz, desto stabiler stellen sich die Zellen in Kultur dar. Für *TE*-Anwendungen ist eine Kulturstabilität von großer Bedeutung.

Zur Erstellung dieses Seneszenz Assays wurden die *hPDCs* der Donoren sowohl in Passage 4 als auch in Passage 5 verwendet. Die *hPDCs* wurden mit einer Dichte von  $5 \times 10^5$  in je ein Well einer 12-Well-Platte ausgesät und für 48 Stunden im Brutschrank inkubiert (siehe 2.3 Isolation der humanen *PDCs*). Daraufhin wurde das Medium entfernt, erneut 500 µl frisches Medium appliziert und mit 1,5 µl Senescence Dye versetzt. Nach einstündiger Inkubation im Inkubator wurden

die Zellkulturen mit 1 ml Wasch Puffer zweimalig gewaschen. Der Zellrasen wurde wie bereits beschrieben mit 100 µl Trypsin abgelöst (siehe 2.3 Isolation der humanen PDCs). Im Anschluss wurde das Trypsin durch Zugabe von 0,7 ml *hPL10* abgestoppt, in ein *FACS*-Röhrchen überführt und der Überstand abzentrifugiert. Das *Zellpellet* wurde anschließend in 200 µl Wasch Puffer resuspendiert und unmittelbar via Durchflusszytometrie analysiert.

Zusätzlich wurde eine unbehandelte Kontrollgruppe untersucht.

## **2.7 Proliferations-Assay**

Ein Proliferations-Assay gibt eine direkte Auskunft über die Anzahl an sich aktiv teilenden Zellen innerhalb einer Zellpopulation in Kultur. Da die Proliferationsrate einen äußerst entscheidenden Faktor für mögliche Nutzung der *hPDCs* in TE-Techniken darstellt, wurden 2 verschiedene Methoden zur Durchführung des Proliferations-Assays angewandt. Während der Proliferations-Assay mittels Ez4u über die gemessene mitochondriale Aktivität auf die Proliferationskapazität schließen lässt, kann mithilfe des BioRad TC20 die absolute Anzahl lebender Zellen innerhalb einer Probe bestimmt werden. Beide Methoden sind aussagekräftig und können in Kombination eine genaue Bewertung der Proliferation der von uns untersuchten *hPDCs* liefern.

### **2.7.1 Proliferations-Assay mittels Ez4u**

Die Funktionsweise des Ez4u- Assays beruht auf die Reduzierung von gelblichem Tetrazoliumsalz zu seinem rötlichen Derivat Formazan durch die Mitochondrienaktivität. Da die Mitochondrien nur wenige Minuten nach dem Zelltod metabolisch aktiv sind, ist dies eine geeignete Methode, um zwischen lebenden und toten Zellen zu unterscheiden. Je größer die Anzahl an lebenden Zellen innerhalb einer Probe, desto höher ist der Anteil an umgewandelten Formazan. Diese Farbkomponenten können über die Messung der Absorptionsrate mithilfe eines ELISA-Lesegerätes bestimmt werden.

In unserem Experiment wurden hierfür in Passage 4 die *hPDCs* mit einer Dichte von 1300 Zellen/Well auf einer 96-Well-Platte ausgesät und unter



Standardbedingungen (Medium, Inkubator) kultiviert. An 4 aufeinanderfolgenden Tagen wurden je Donor und Probe der Fibula/ des Unterkiefers 5 Wells gemessen. Hierfür wurde das vorhandene Medium abgenommen und je Well 200 µl *hPL10* und 20 µl Ez4u Lösung hinzugefügt. Es fand eine Inkubation über 3 Stunden im Inkubator statt.

Im Anschluss wurden jeweils 150 µl in eine neue 96-Well-Platte transferiert. Die restlichen Wells wurden mit als Leerwert dienender Ez4u-Lösung befüllt. Die Absorption wurde mithilfe des ELISA-Lesegerätes bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

### **2.7.2 Proliferations-Assay mittels BioRad TC20**

Bio-Rad TC20 ist ein Gerät zur Zellzählung von Säugetierzellen. Per Autofokus kann die absolute Anzahl vorhandener Zellen innerhalb einer Probe erkannt werden. Durch die Verwendung von Trypanblau kann zusätzlich eine Beurteilung der Lebensfähigkeit der Zellen erfolgen und die Anzahl toter Zellen vom Gesamtergebnis exkludiert werden.

In Passage 4 wurden die *hPDCs* mit einer Dichte von  $2 \times 10^5$ / Well in 12-Well-Platten ausgesät und kultiviert. An 4 aufeinanderfolgenden Tagen (T1,2,3,4) wurden die Zellzahlen gemessen. Hierfür wurde das vorhandene Medium abgesaugt, das entsprechende Well mit 1 ml *PBS* gewaschen und mit 100 µl Trypsin der Zellrasen abgelöst. Im Anschluss wurde das Trypsin durch Zugabe von 0,7 ml *hPL10* abgestoppt. Das Zellmaterial wurde aus 3 Wells je Donor kumuliert. Es wurden 20 µl der jeweiligen Zellsuspension mit 20 µl Trypanblau in einer 96-Well-Platte vermengt. Über eine Zählkammer konnte die Zellkonzentration pro Milliliter mithilfe des BioRad TC20 bestimmt werden.

## **2.8 Induzierte adipogene, chondrogene und osteogene Differenzierung**

Das zentrale Ziel dieser Studie ist es, das Differenzierungspotential der *hPDCs* von Unterkiefer und Fibula - respektiv für ihren embryologischen Ursprung - hinsichtlich osteogener, chondrogener und adipogener Differenzierung zu untersuchen und zu vergleichen.

## **2.8.1 In vitro Zell Differenzierung**

### *2.8.1.1 Adipogene Differenzierung*

Für die adipogene Differenzierung wurden in Passage 3  $5 \times 10^4$  *hPDCs* pro Well in eine 12-Well-Platte ausgesät. Nach nächtlicher Adhäsion wurden die Überstände abgenommen und das adipogene Differenzierungsmedium (*AM*) appliziert. Dieses beinhaltete neben dem von uns verwendeten Standardmedium 1  $\mu\text{M}$  Dexamethason, 0,2 mM Indomethacin, 10  $\mu\text{g/ml}$  Insulin, 0,5 mM 3-Isobutylxanthin. Die Versuchsreihe dauerte 15 Tage an. Im Gegensatz zu den Versuchsreihen zur osteogenen und chondrogenen Differenzierung war bei der adipogenen Differenzierung bereits nach 15 Tagen das Maximum an produzierten Fettvakuolen nahezu erreicht. Eine Fortführung des Experiments scheint daher kaum weitere Veränderungen zu erbringen.

Zur qualitativen Analyse fand eine Färbung an Tag 15 mit Ölrot O statt, die mikroskopisch beurteilt und fotodokumentiert wurde. (siehe 2.8.2.1 adipogene Differenzierung: Ölrot O). Anschließend wurde die Ölrot O-Färbung photometrisch quantifiziert. Zur weiteren quantitativen Analyse wurde Zellmaterial an den Tagen 5, 10 und 15 entnommen (siehe 2.8.3 Quantitative Analyse der Genexpressionen).

### *2.8.1.2 Chondrogene Differenzierung*

Für die chondrogene Differenzierung wurden in Passage 3  $2,5 \times 10^5$  *hPDCs* pro Well in eine V-Bottom-96-Well-Polypropylen-Platte ausgesät und zentrifugiert. Nach 24 Stunden wurde die Beweglichkeit der *Pellets* sichergestellt und das chondrogene Differenzierungsmedium (*CM*) (1 $\mu\text{M}$  Vitamin C, 0,1  $\mu\text{M}$  Dexamethason und 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1, 1% IST+ Premix) appliziert. Als Grundmedium wurde in diesem Fall *DMEM/F12 High Glucose* (4,5 g/l) verwendet. Die Versuchsreihe dauerte 21 Tage an.

Zur qualitativen Analyse fand eine Färbung der Mikrotom-Schnitte der *Pellets* an Tag 21 mit Toluidinblau statt, die mikroskopisch beurteilt und fotodokumentiert wurde. (siehe 2.8.2.2.1 Toluidinblau mikroskopisch (qualitative Analyse)). Zur Quantifizierung wurden die Glukosaminoglykane (*GAG*) mittels Dimethylenblau

angefärbt und photometrisch quantifiziert (siehe 2.8.2.2.2 Glukosaminoglykane-Bestimmung mittels direktem spektrophotometrischen Mikroassay).

Zusätzlich wurde eine Messung der Durchschnittsgrößen der entstandenen *Pellets* durchgeführt (siehe 2.8.2.2.3. Pellet-Durchmesser). Zur weiteren quantitativen Analyse wurde Zellmaterial an den Tagen 7,14, 21 entnommen (siehe 2.8.3 Quantitative Analyse der Genexpressionen).

### 2.8.1.3 Osteogene Differenzierung

Für die osteogene Differenzierung wurden in Passage 3  $5 \times 10^4$  *hPDCs* pro Well auf einer 6-Well-Platte ausgesät. Nach nächtlicher Adhäsion wurden die Überstände abgenommen und das osteogene Differenzierungsmedium (*OM*) appliziert. Dieses beinhaltete neben dem von uns verwendeten Standardmedium noch 0,1 mM Vitamin C, 10 M  $\beta$ -Glycerophosphat, 4  $\mu$ M Dexamethason. Die Versuchsreihe dauerte 21 Tage an.

Zur qualitativen Analyse fand eine Färbung an Tag 21 mit Alizarinrot statt, die mikroskopisch beurteilt und fotodokumentiert wurde (siehe 2.8.2.3 osteogene Differenzierung: Alizarinrot). Anschließend wurde die Alizarinfärbung photometrisch quantifiziert.

Zur weiteren quantitativen Analyse der Genexpressionen wurde Zellmaterial an den Tagen 7,14, 21 entnommen (siehe 2.8.3 Quantitative Analyse der Genexpressionen).

Zudem erfolgte im Rahmen der osteogenen Differenzierung in einer zweiten Versuchsreihe der Alizarin-Färbung ein zusätzliches Coating der Platten mit Gelatine, um eine ideale Quantifizierung der Alizarin-Färbung zu gewährleisten. Bisher unveröffentlichte Daten unserer Forschungsgruppe implizieren bessere Ergebnisse bei einem vorangegangenen Coating der Wells. Hierbei wurde je Well 1ml 0,1%-Gelatine in ein Well der 6-Well-Platten appliziert und bei 37°C über einen Zeitraum von 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Gelatine abgenommen und die Zellkulturen wie oben beschrieben ausgesät und kultiviert.

Zur quantitativen Analyse fand eine Färbung an Tag 21 mit Alizarinrot statt.

## **2.8.2 Analyse des Differenzierungspotentials**

Um Unterschiede im Differenzierungspotential zwischen den *hPDCs* des Unterkiefers und der Fibula nachweisen zu können, ist eine qualitative und quantitative Analyse notwendig. Mithilfe der qualitativen Methoden ist es uns lediglich möglich zu beweisen, dass die *hPDCs* erfolgreich zu Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten differenziert sind. Diesen Beweis lieferten die jeweiligen Färbungen in Kombination mit mikroskopischer Betrachtung und Fotodokumentation. Inwieweit sich die *hPDCs* des Unterkiefers und der Fibula tatsächlich unterscheiden wurde über quantitative Analysen ermittelt. Hierzu zählte beispielsweise der Nachweis unterschiedlich starker Färbungen.

### *2.8.2.1 adipogene Differenzierung: Ölrot O*

Die Färbungen der adipogenen Versuchsreihe fand an den Tagen 5, 10 und 15 nach initialer Zugabe des Differenzierungsmediums statt. Die Zellrasen wurden nach zweimaligem Waschen mit je 1 ml *PBS*, mit 500 µl 4% Formaldehyd über einen Zeitraum von 15 Minuten fixiert und abermals zweimal mit je 1 ml *PBS* gewaschen. Anschließend wurden die Platten mit 250 µl Ölrot O Working Solution für 15 Minuten bedeckt. Daraufhin wurden die Wells viermalig mit 1 ml Aqua gewaschen.

Zur qualitativen Untersuchung wurden die gefärbten Platten mikroskopisch untersucht und photographisch festgehalten.

Zur Quantifizierung wurde die Farbe mittels 500 µl Isopropanol aus den Zellen herausgelöst. Die photometrische Konzentrationsbestimmung fand bei 405 nm statt.

Bestandteile der filtrierten Stock Solution waren 0,5 g Ölrot O auf 100 ml Isopropanol. Die Ölrot O Working Solution setzte sich aus 6 Anteilen Stock Solution und 4 ml destilliertem Wasser zusammen.

## 2.8.2.2 chondrogene Differenzierung

### 2.8.2.2.1 Toluidinblau mikroskopisch (qualitative Analyse)

Die Färbung der chondrogenen Versuchsreihe fand zum Zeitpunkt Tag 21 nach initialer Zugabe des Differenzierungsmediums statt. Die *Pellet*-Kulturen wurden mit 200 µl *PBS* je Well gewaschen. Im Anschluss wurden jeweils 4 *Pellets* eines Donors in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und in 4% Formaldehyd für 30 Minuten inkubiert. Daraufhin wurden die Proben zweimalig mit 300 µl Aqua gewaschen und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 80%, 90%, 95%, 100% und Xylen) dehydriert. Die *Pellets* wurden in Paraffin eingebettet und mithilfe eines Mikrotoms wurden 5 µm Schnitte angefertigt. Das Paraffin wurde in einem Wärmeschrank bei 60° C und zusätzlich durch Xylen vollständig abgelöst. Die Schnittbilder wurden für 8 Minuten mit Toluidinblau gefärbt und in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 95%, 90%, 80%, 70%, Xylen) rehydriert. Die Färbung der Proben wurde mikroskopisch beurteilt und festgehalten. Es handelt sich hierbei um eine rein qualitative Methodik. Die Quantifizierung der chondrogenen Differenzierung erfolgte durch eine Bestimmung der Glukosaminoglykane. (siehe 2.8.2.2.2 Glukosaminoglykane mittels direktem spektrophotometrischen Mikroassay).

### 2.8.2.2.2 Glukosaminoglykane-Bestimmung mittels direktem spektrophotometrischen Mikroassay

Glukosaminoglykane, wie beispielsweise Chondroitinsulfat, sind typische Bestandteile von Knorpelgewebe. Um die Knorpelbildung der *hPDCs* quantitativ vergleichen zu können, wurden die sulfathaltigen Glukosaminoglykane mittels Dimethylenblau-Färbung zur histochemischen Quantifizierung identifiziert und gemessen.

Bei der Spektrophotometrie werden mithilfe elektromagnetischer Photometer die Intensität von Lichtstrahlen bei unterschiedlichen Wellenlängen gemessen. Je nach Farbintensität des Dimethylenblaus und der daraus resultierenden unterschiedlichen Reflexion der Lichtwellen, kann auf die Menge produzierter sulfathaltiger Glukosaminoglykane und somit den Erfolg der chondrogenen Differenzierung geschlossen werden.

In unserem Experiment wurden hierfür 3 *Pellets* nach 21-tägiger chondrogener Differenzierung (s.o.) in einem 1 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gesammelt und in 250 µl Proteinkinase K über einen Zeitraum von 16 Stunden bei einer Temperatur von 56°C verdaut. Im Anschluss wurden die Proben bei -20°C gelagert.

Zur Herstellung einer Standard-Verdünnungsreihe wurde eine Stock-Lösung mit 1mg/ml Chondroitinsulfat angesetzt. Diese wurde mit destilliertem Wasser verdünnt, sodass eine entsprechende Konzentration von 2,5/ 1,25/ 0,625/ 0,3125/ 0,0156/ 0,078 µg Chondroitinsulfat/Well erzielt wurde. Nach Zugabe von 200 µl *DMMB* (1,9-Dimethyl-Methylen-Blau) konnte sie als Standardkurve für diesen Versuch gemessen werden.

Zur photometrischen Bestimmung wurde in jedes Well einer 96-Well-Platte 200 µl *DMMB* und 20 µl je zu untersuchender Probe transferiert. Es fand eine dreifach-Bestimmung der Absorption bei 535 nm statt.

Zur Beurteilung der Ergebnisse wurden die gemessenen GAG-Mengen in Relation zur Anzahl der *Pellets* (GAG/Pellet), der Menge vorhandener DNA (GAG/DNA) und anteilig an der Gesamtproteinmasse (GAG/Protein) betrachtet.

Mittels Qubit wurde die DNA-Konzentration in den jeweiligen Proben bestimmt. Hierfür wurde eine Qubit Working-solution bestehend aus 199 µl Qubit Buffer und 1 µl Qubit Reagent angesetzt. In ein 500 µl – Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden 190 µl Qubit Working-solution und 10 µl der jeweiligen Probe pipettiert, gevortext und für 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend fand die Messung der Proben im Qubit Fluorometer der Firma Life Technologies statt.

Die Proteinkonzentration der Proben wurde mittels eines *BCA-Assays* (*engl. Bicinchoninic acid*) festgestellt. Hierfür wurde eine Albumin-Standardreihe S1-S7 hergestellt. Ihre Albumin-Konzentrationen betragen 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625; 0,03125 und 0,015625 mg/ml. Als Leerwert (negative Probe) diente der *PBS-Puffer* der Proteinkinase K. Anschließend wurde die *BCA Working Reagent* (*WR*) vorbereitet, indem 5,5 ml *BCA Reagent A* mit 110 µl *BCA Reagent B* vermischt wurden. Für die photometrische Messung wurden 25 µl der Standards, der

Leerwerte und der Proben in eine 96-Well Platte pipettiert. Je Well wurden 200 µl des *Working Reagents* hinzugefügt und die Platte für 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

Die photometrische Bestimmung fand bei einer Wellenlänge von 550 nm statt.

#### 2.8.2.2.3 *Pellet-Durchmesser*

In einer Studie von Sakaguchi *et al.* (2005) wurde über einen Zusammenhang von *Pellet*-Durchmesser, produzierter extrazellulärer chondrogener Matrix und somit dem chondrogenen Differenzierungspotentials von *MSCs* berichtet (Sakaguchi *et al.*, 2005). Wir beobachteten im Laufe unseres Versuches ebenfalls eine makroskopisch feststellbare Differenz in den *Pellet*-Größen und entschieden uns diesen Zusammenhang für die *hPDCs* zu untersuchen.

Um die durchschnittlichen *Pellet*-Größen zu bestimmen, wurden 3-6 *Pellets* je Donor und Bedingung (Standardmedium/ chondrogenes Medium) nach 21-tägiger Differenzierung bei 1,25-facher Vergrößerung mikroskopisch untersucht und als reproduzierbares Lichtbild festgehalten. Mittels der Software *ImageJ* wurden je *Pellet* an 3 verschiedenen Stellen der Durchmesser bestimmt. Anhand des vorhandenen Maßstabes konnte der durchschnittliche Mittelwert berechnet werden.

#### 2.8.2.3 *osteogene Differenzierung: Alizarinrot*

Die Zellen und die fortschreitende Mineralisierung wurden täglich mikroskopisch beurteilt und regelmäßig fotodokumentiert. Die initiale Kalzifizierung konnte hierbei durch Verschattungen innerhalb des Zellrasens erkannt werden. Diese Verschattungen entstehen durch die Blockierung des Lichtstrahls an den mineralisierten Anteilen. Am Tag 21 führten wir die Alizarinrot Färbungen durch. Hierfür wurde der Zellrasen bei Raumtemperatur für 15 Minuten mit 4%-Formaldehyd fixiert, zweimal mit *PBS* und einmal mit destilliertem Wasser gewaschen. Pro Well wurde 1 ml Alizarinrot S 40 mM mit einem pH-Wert von 4,2 für 20 Minuten appliziert und anschließend viermalig je 15 Minuten mit Aqua

(destilliertem Wasser) gewaschen. Während des Färbe- und Waschvorgangs befanden sich die Kultivierungsgefäße auf einem Rüttler.

Für die qualitative Beurteilung der osteogenen Differenzierung wurden die gefärbten 6-Well-Platten mikroskopisch untersucht und fotografisch festgehalten. Zusätzlich fand ein Scan der Platten im Fotolabor der Zahnklinik Tübingen statt.

Zur Quantifizierung der Alizarinrot Färbung wurden die Wells mit Ethanol dehydriert, getrocknet und die Färbung durch Zugabe von 10% Essigsäure für weitere 30 Minuten abgelöst. Mit einem Spatel fand die vollständige Ablösung des Zellrasens statt. Die Proben wurden für 10 Minuten bei 85°C erhitzt. Nach Abkühlung und Zentrifugation wurden die Proben mit einer entsprechenden Menge Ammoniumhydroxid neutralisiert. Für 400 µl verwendeten Überstand wurde 150 µl 10% NH<sub>4</sub>OH benötigt.

Die photometrische Konzentrationsbestimmung fand daraufhin bei 405 nm statt. Bei dem verwendeten Modell handelte es sich um den ELx800 der Firma Bio-Tek. Im Allgemeinen wird bei der Photometrie/Lichtmessung die Konzentration einer gelösten Substanz bestimmt, indem ihre Lichtabsorption gemessen wird.

### **2.8.3 Quantitative Analyse der Genexpressionen**

#### *2.8.3.1 Entnahme des Zellmaterials*

In der osteogenen Versuchsreihe wurde an den Tagen 7,14,21 nach Zugabe des Differenzierungsmediums das Zellmaterial aus jeweils einem Well der 6-Well-Platten entnommen. Hierfür wurde das Medium abgesaugt und das Well mit 2 ml PBS gespült. Anschließend wurde 1 ml PBS auf das Well appliziert und der Zellrasen mithilfe eines Zellschabers mechanisch abgelöst. Mit einer Pipette wurde das Zellmaterial in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 5 Minuten bei 8°C und 350 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und nach Zugabe von 350 µl RA1-Puffer und 7 µl TCEP (Tris(2-chlorethyl)phosphat) konnten die Proben bei - 80°C gelagert werden.



In der adipogenen Versuchsreihe wurde an den Tagen 5,10,15 nach Zugabe des Differenzierungsmediums das Zellmaterial aus jeweils einem Well der 12-Well-Platten entnommen. Hierfür wurde das Medium abgesaugt und das Well mit 1 ml *PBS* gespült. Anschließend wurden 0,5 ml *PBS* auf das Well appliziert und der Zellrasen mithilfe eines Zellschabers abgelöst. Mit einer Pipette wurde das Zellmaterial in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 5 Minuten bei 8°C und 350 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und nach Zugabe von 350 µl *RA1*-Puffer und 7 µl *TCEP* konnten die Proben bei -80°C gelagert werden.

In der chondrogenen Versuchsreihe wurde an den Tagen 7,14,21 nach Zugabe des Differenzierungsmediums das Zellmaterial aus jeweils 4 Wells der 96-Well-Platten entnommen. Hierfür wurde das Medium abgesaugt und die Wells mit 200 µl *PBS* gespült. Anschließend wurde erneut 200 µl *PBS* auf die Wells appliziert und die Zellpellets mit einer Pipette in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die *Pellets* sammelten sich am Boden des Röhrchens und der Überstand wurde mithilfe einer Pipette entnommen. Nach Zugabe von 350 µl *RA1*-Puffer und 7 µl *TCEP* konnten die Proben bei -80°C gelagert werden

#### 2.8.3.2 *RNA-Extraktion*

Die Isolation der RNA aus dem entnommenen Zellmaterial wurde mithilfe des NucleoSpin RNA Kits (Mackerey-Nagel) durchgeführt.

Aufgrund der hohen Zellzahlen, der produzierten Extrazellulärmatrix und daraus resultierenden Widerstandsfähigkeit wurden die chondrogenen Proben sowie einige der osteogenen Proben der Tage 14 und 21 vorbehandelt. Das entsprechende Zellmaterial im *RA1*-Puffer wurde hierfür in Granulat enthaltende *Lysing Matrix* Röhrchen überführt und eine Minute lang im FastPrep-24 der Firma MP lysiert. Anschließend konnte mit allen Proben wie folgt verfahren werden.

In die Eppendorf-Reaktionsgefäße mit den entnommenen Proben (siehe 2.8.3.1. Entnahme des Zellmaterials) wurde 350 µl 70%-Ethanol hinzugegeben und, um eine Scherung der DNA zu erzielen, mehrmals auf und ab pipettiert. Das Lysat wurde in ein blaues *NucleoSpinRNA*-Säulchen gegeben. Nach Zentrifugation bei 1100 x g für 30s wurde das Lysat in ein frisches *Collection* Röhrchen überführt

und zur Entsalzung die Membran mit 350 µl *MDB* (engl. *Membran Desalting Buffer*) versetzt. Eine erneute Zentrifugation bei 1100 x g für 30s wurde durchgeführt. Der Durchfluss wurde verworfen.

Um die DNA zu verdauen, wurde je Probe 90 µl *rDNAse reaction buffer* und 10 µl *rDNAse* auf die Membran gegeben und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 200 µl *RAW-2*-Puffer hinzugefügt, für 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und 30 Sekunden lang bei 11000 x g zentrifugiert. Das Säulchen wurde in ein frisches *Collection* Röhrchen überführt.

Nach Zugabe von 600 µl *RA3*-Puffer und Zentrifugation für 30s bei 11000 x g wurde erneut 250 µl *RA3*-Puffer hinzugefügt und über eine Dauer von 2 Minuten bei 11000 x g zentrifugiert. Das Säulchen wurde in ein frisches 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 40 µl RNase-freiem Wasser versetzt. Nach dreiminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde eine erneute Zentrifugation bei 11000 x g für 30 Sekunden durchgeführt. Die RNA-Konzentration wurde im direkten Anschluss mithilfe des Nanodrop-One der Firma Thermo bestimmt und die Proben bei -80°C gelagert.

#### 2.8.3.3 *cDNA-Synthese*

Um Einzelstrang-cDNA (engl. *Complementary DNA*) zu synthetisieren wurde das SuperScript VILO der Firma Invitrogen verwendet.

Für jede umzuschreibende Probe wurde in ein Röhrchen 4 µl *5X VILO Reaction Mix* und 2 µl *10X SuperScript Enzyme Mix* pipettiert. Anschließend wurde eine 500 ng äquivalente Menge RNA den Proben hinzugefügt und das Gesamtvolumen im Reaktionsgefäß durch Zugabe einer entsprechenden Menge *DECP* (diethylpyrocarbonat-) behandelten Wassers auf 20 µl erweitert. Im Mastercycler personal der Firma Eppendorf wurden die Proben zu Beginn für 10 Minuten bei 25°C, anschließend über einen Zeitraum von 60 Minuten bei einer Temperatur von 45°C und zum Abschluss der Reaktion 5 Minuten bei 85°C inkubiert.

Die produzierte cDNA wurde bei -20°C eingelagert.

#### 2.8.3.4 Real-Time-Quantitative-Polymerase-Chain-Reaction (RT-qPCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*PCR*) bietet die Möglichkeit DNA *in vitro* zu replizieren und zu vervielfältigen. Mithilfe von Fluoreszenz-Messungen kann die zu untersuchende DNA auf entsprechende Gensequenzen untersucht und quantifiziert werden. Anwendung findet die *PCR* in Laboratorien, die unter anderem Erb- und Viruserkrankungen untersuchen oder Abstammungsgutachten erstellen.

Zur Untersuchung der relevanten Zielgene durch die *Real-Time-PCR* wurde in unserem Fall der LightCycler 1.5 der Firma Roche und Primer-Ansätze der Firma Search-LC verwendet. Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (*GAPDH*) fungierte als endogene Kontrolle. Jeder Durchgang umfasste 40 Zyklen der *Real-Time-PCR*.

Bei jedem Durchgang wurde eine Standard-Verdünnungsreihe benötigt. In die Kapillaren der Standard 1-4 und des Leerwertes wurden jeweils 10 µl eines Standard-Mastermix pipettiert. Dieser setzte sich aus 6 µl Wasser, 2 µl Primermix (*GAPDH*) und 2 µl Sybr Green Fast Mix (10 µl 1a in ein Eppendorf-Gefäß mit 1b vermengt) zusammen.

Standard-Verdünnungsreihe:

Standard 1	Standard 2	Standard 3	Standard 4	Standard 5
	18 µl Standard-Stabilizer	18 µl Standard-Stabilizer	18 µl Standard-Stabilizer	
10 µl rot pur	+2 µl rot pur	+2 µl Standard 2	+ 2 µl Standard 3	10 µl H <sub>2</sub> O

Es werden je Standard 10 µl des Standards in eine Kapillare mit 10 µl Standard-Mastermix pipettiert.

Die synthetisierte cDNA wurde nach dem Umschreiben mit RNase/DNase-freiem Wasser verdünnt, sodass ein Verdünnungsfaktor von 1:5 erzielt werden konnte. Hierfür wurde bis zu 80 µl Wasser beigemischt.

Zu je 2 µl der cDNA-Probe wurden 14 µl Wasser, 2 µl des SybrGreen Fast Mix (der Firma Roche) und 2 µl des jeweiligen Primer Zielgens in eine Kapillare

pipettiert. Die Kapillaren wurden anschließend bei einer Geschwindigkeit von 3000 rpm für 1 Minute zentrifugiert.

Als Zielgene für die adipogene Versuchsreihe wurden *Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor- $\gamma$*  (*Ppar- $\gamma$* ), *Lipoproteinlipase* (*LPL*) und *Leptin* ausgewählt.

Als Zielgene für die chondrogene Versuchsreihe wurden *COMP* (engl. *Cartilage Oligomeric Matrix Protein*), *Kollagen 2* (*Kol2*), *Kollagen 10* (*Kol10*) und *Sox-9* (engl. *Sex Determining Region Y-Box9*) untersucht.

Als Zielgene für die osteogene Versuchsreihe wurden *Runx2* (engl. *runt-related transcription factor 2*), *Osterix* (*OSX*), *Alkalischen Phosphatase* (*ALP*), *Kollagen 1* (*Kol1*), *Osteocalcin* (*OCN*), *Sox-9* und *Hox-11* betrachtet.

Für jede Probe wurde eine Normierung der Kopienzahl entsprechend des gemessenen *GAPDH*s-Standards durchgeführt. (Kopienzahl genetischer Marker/ Kopienzahl *GAPDH*).

Anschließend wurden diese normierten Ergebnisse der adipogen/chondrogen/osteogen induzierten Proben in Relation zu den normierten Ergebnissen der Proben ihrer entsprechenden Kontrollgruppen gesetzt: die sogenannte Induktion der Genexpression (Normierte Kopienzahlen adipogen/chondrogen/osteogen induzierter Proben/Normierte Kopienzahlen Kontrollgruppen).

## **2.9 Datenmanagement und Analyse**

Die Rohdaten wurden erfasst und in Excel dokumentiert. In separaten Excel-sheets konnten die Daten interpretiert werden. Die statistische Analyse wurde mithilfe der Software GraphPad Prism 8.1.0 durchgeführt. Ein p-Wert von  $\leq 0.05$  wurde als statistisch signifikant eingestuft. Die *in vitro* Daten wurden als Durchschnittswerte mit entsprechender Standardabweichung präsentiert.

Für die Analyse der immunrelevanten Oberflächenmarker (*FACS*) und *RT-qPCR* Ergebnisse sowie der Alizarin- und Ölrot O-Quantifizierung wurden die Durchschnittswerte unter Einbezug der Standardabweichungen kalkuliert und

mittels *Two-Way ANOVA* (p angepasst durch *Tukey's multiple comparison test*) verglichen. Für die Analyse der restlichen *FACS*-Ergebnisse ( $\beta$ -Gal, MSC-Oberflächenmarker), des *GAG/DNA*-, *GAG/Protein*- und *GAG/Pellet*-Assays, sowie der *Proliferationsassays* (TC20, Ez4u) wurde sowohl ein *unpaired t-Test*, als auch eine *One-Way-ANOVA* (p angepasst durch *Tukey's multiple comparison test*) verwendet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Patientenkollektiv

Im Rahmen unserer Studie wurden insgesamt 4 Spender (Donoren) eingeschlossen, bei deren operativen Eingriff im Rahmen primärer oder sekundärer Rekonstruktionen des Unterkiefers sowohl Periostzellen des Unterkiefers als auch des Wadenbeins (Fibula) entnommen werden konnten (siehe Tabelle 1). Es wurden keine Donoren ausgeschlossen. Hierbei handelte es sich um ausschließlich männliche Patienten (m=4; w=0). Das Alter betrug im Median 66,25 Jahre (Spannweite von 58 bis 80 Jahren). Zwei der Patienten erhielten eine primäre Unterkieferrekonstruktion bei vorliegendem Plattenepithel-Karzinom des Oropharynx. Ein Patient erhielt ebenfalls eine primäre Unterkieferrekonstruktion jedoch auf Grund eines Ameloblastoms. Ein Patient erhielt eine sekundäre Unterkieferrekonstruktion nach auftretendem Rezidiv eines Plattenepithel-Karzinoms des Oropharynx.

*Tabelle 1 – Übersicht der verwendeten Donoren für Unterkiefer- und Fibula-Periostzellen*

	Donor 1	Donor 2	Donor 3	Donor4
Geschlecht	M	M	M	M
Alter [Jahren]	59	58	68	80
Pathologie	Plattenepithel- karzinom	Plattenepithel- karzinom- Rezidiv	Ameloblastom	Plattenepithel- karzinom
Rekonstruktion	Primär	Sekundär	Primär	Primär

### 3.2 Nachweis der CD-Profile der hPDCs mittels Durchflusszytometrie

Mithilfe durchflusszytometrischer Messungen wurden die hPDCs sowohl der Fibula als auch des Unterkiefers auf die oben beschriebenen Oberflächenmarker untersucht und verglichen.

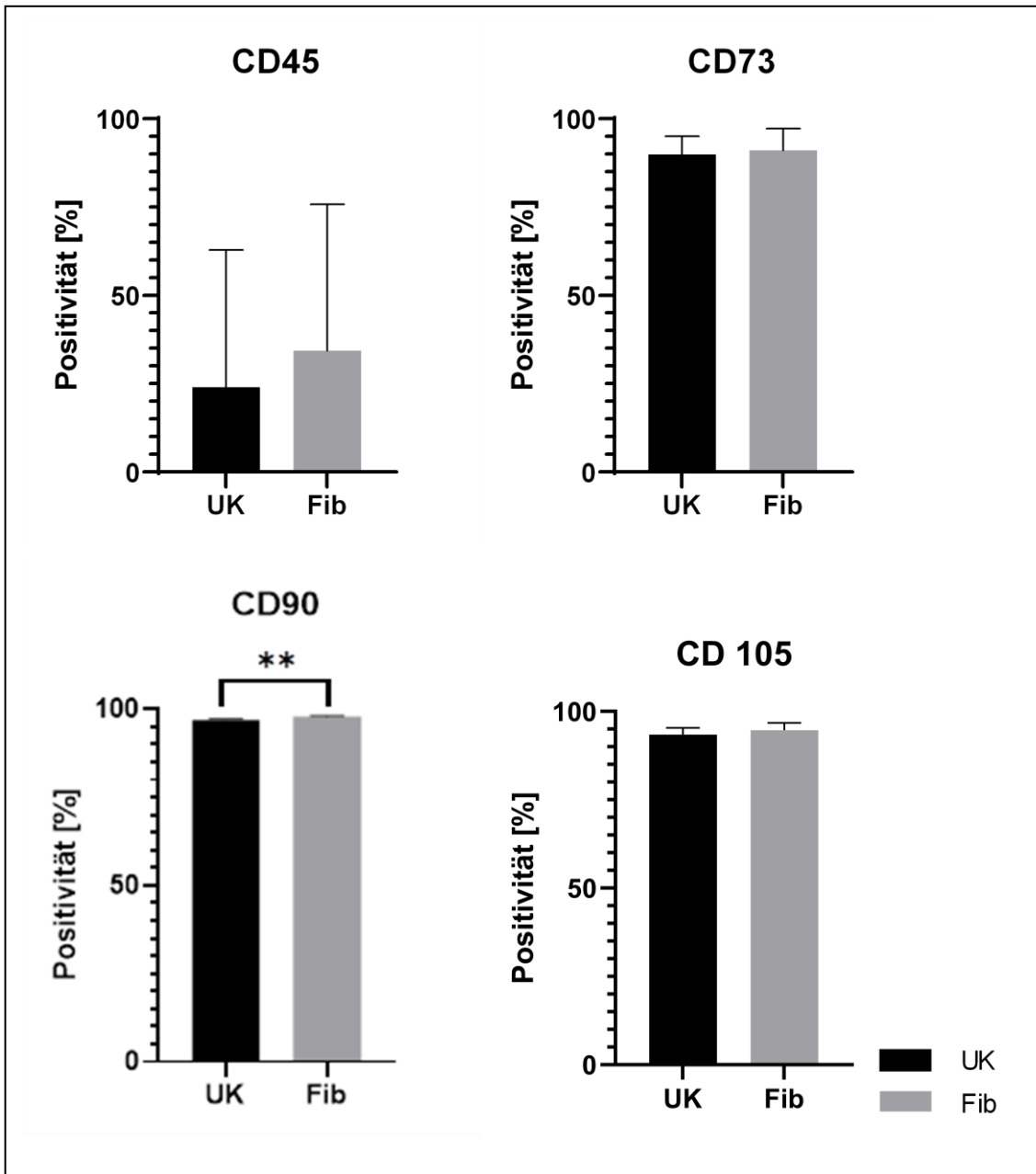


Abbildung 1 – Durchflusszytometrische Expression der Oberflächenmarker CD45, 73, 90, 105 für die Stammzellencharakteristik festgelegt durch die International Society of Cellular Therapy. UK = Unterkiefer; Fib = Fibula  
\*\* Signifikanz  $p=0,0015$

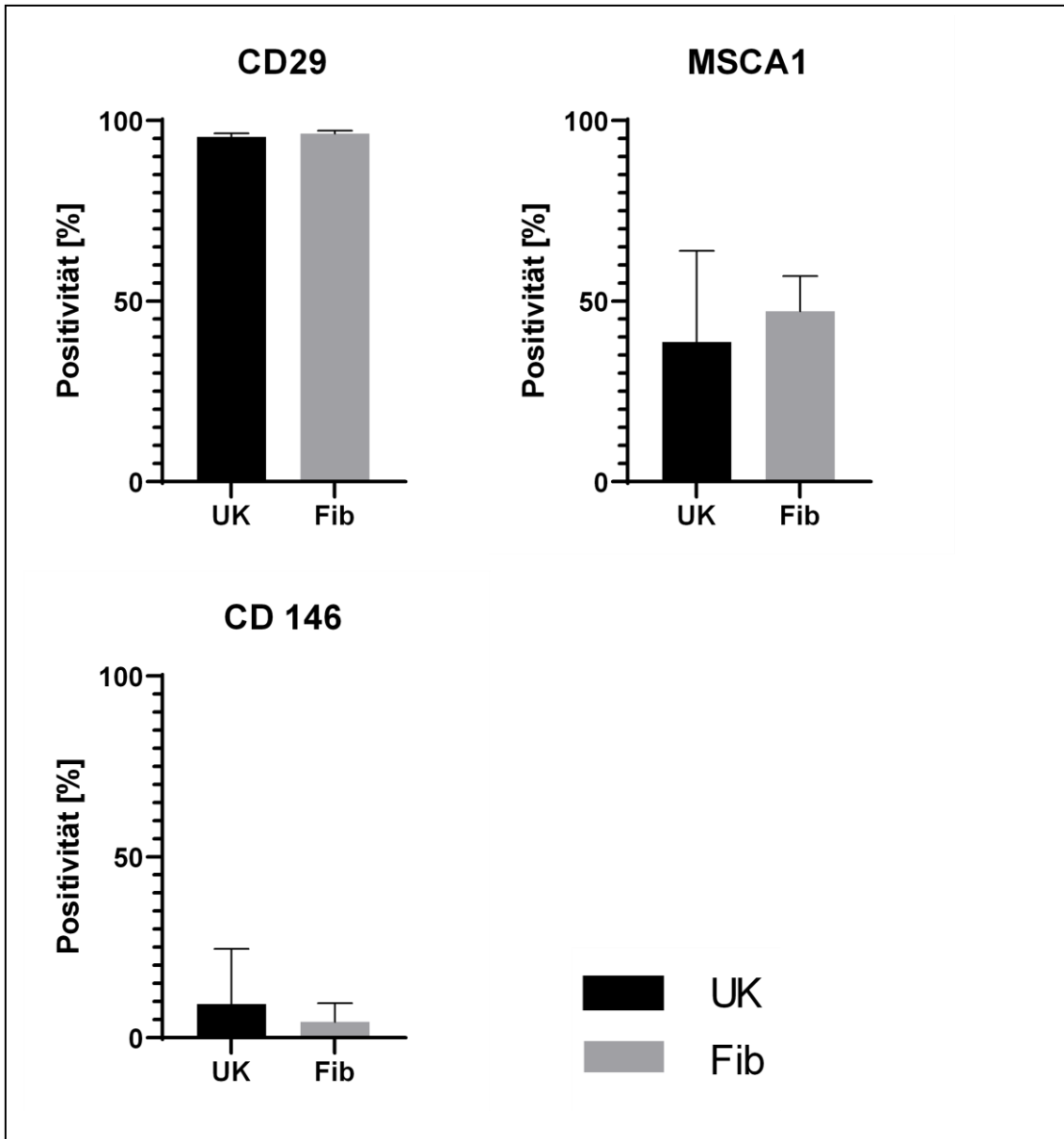


Abbildung 2 – Durchflusszytometrische Expression weiterer Oberflächenmarker: CD29, MSCA-1, CD146  
 UK = Unterkiefer; Fib = Fibula

Die Expressionen von CD29, CD73, CD90 und CD105 stellten sich mit einem Anteil von >89% positiver Zellen für *hPDCs* beider Ursprünge als eindeutig positiv dar. Tendenziell exprimierten die *hPDCs* der Fibula für diese *Cluster of Differentiation (CD)* einen geringfügig höheren Anteil positiver Zellen (siehe Tabelle 2). Statistische Signifikanz ergibt sich jedoch lediglich für CD90 (UK  $97,08 \pm 0,19$ , Fib  $97,94 \pm 0,25$ ,  $p=0,0015$ ).



Bei der Untersuchung der CD45, MSCA-1 und CD146 stellten sich größere Unterschiede heraus, jedoch ohne statistisch signifikante Unterschiede bei zeitgleich höherer Standardabweichung (siehe Tabelle 2) zu erreichen.

Die Expression des CD45 ergab einen Anteil von ca. 20% positiver *hPDCs* des Unterkiefers im Vergleich zu ca. 30% positiver *hPDCs* der Fibula.

Auch die Expression des MSCA-1 Oberflächenmarkers stellte sich mit einem Anteil von etwa 39% bei *hPDCs* des Unterkiefers als rund 8% geringer heraus. Die positive Expression lag bei den *hPDCs* der Fibula bei etwa 47%.

Eine sehr schwache bis nahezu gegen Null gehende CD146-Expression wurde bei allen *hPDCs* detektiert. Im Durchschnitt wurde eine Expression bei *hPDCs* des Unterkiefers von <10%, die der Fibula von <5% detektiert.

Die detaillierten Ergebnisse der Expression der MSC-spezifischen Oberflächenantigene sind in Tabelle 2 dargestellt.

*Tabelle 2 – Durchflusszytometrische Expression der MSC-spezifischen Oberflächenantigene  
Mittelwerte [%] ± Standardabweichung, statistische Berechnung des p-Wertes  
UK = Unterkiefer; Fib = Fibula*

	CD29	CD45	CD73	CD90	CD105	CD146	MSCA-1
UK [%]	95,46 ± 1,11	23,94 ± 38,93	89,86 ± 5,16	97,08 ± 0,19	93,49 ± 1,91	9,30 ± 15,2	38,74 ± 25,19
Fib [%]	96,46 ± 0,80	34,29 ± 41,50	91,05 ± 6,24	97,94 ± 0,25	94,71 ± 2,06	4,346 ± 5,19	47,24 ± 9,72
p-Wert	0,20	0,73	0,78	<b>** 0,0015</b>	0,42	0,56	0,55

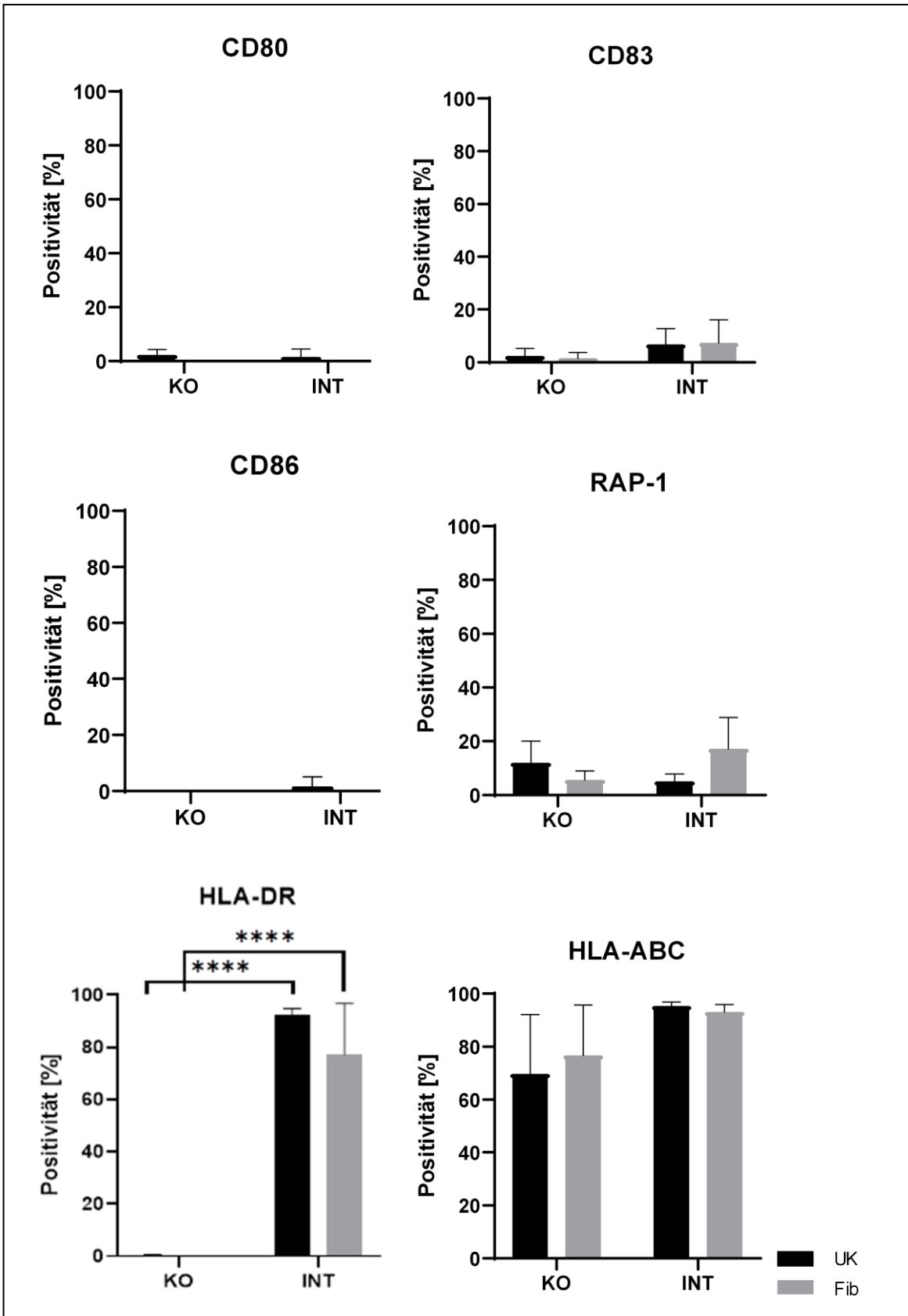


Abbildung 3 – Durchflusszytometrische Expression der immunrelevanten Oberflächenmarker CD80, CD83, CD86, RAP-1, HLA-ABC, HLA-DR;

UK = Unterkiefer; Fib = Fibula; INT = Interferon- $\gamma$ ; KO = Kontrollgruppe;

\*\*\*\* Signifikanz  $p < 0,0001$

Die Untersuchung der immunologisch relevanten Oberflächenmarker nach 7-tägiger Behandlung der *hPDCs* mit Interferon (*INT*) ergab folgende Ergebnisse:

Eine Expression von CD80 und CD86 war sowohl für die Kontrollgruppe (*KO*) als auch die pro-inflammatorisch induzierten *hPDCs* (*INT* = Interferon- $\gamma$ ) praktisch nicht detektierbar und zeigten somit keine Expression.

Einen dezenten Anstieg an CD83-positiven *hPDCs* war sowohl bei *hPDCs* des Unterkiefers als auch der Fibula zu erkennen. Im Vergleich zur Kontrollgruppe (<3%) zeigten die *hPDCs* des Unterkiefers und der Fibula mit bis zu 9% einen dezenten, aber vergleichbaren Anstieg.

Die Untersuchung des RAP-1 Oberflächenmarkers ergab bei Unterkiefer-*hPDCs* einen höheren Anteil positiver Zellen in der Kontrollgruppe (12,0%) im Verhältnis zur stimulierten Gruppe (5,0%). Dahingegen stieg der Anteil positiver Fibula-*hPDCs* unter Interferon-Einfluss von 6% (*KO*) auf 17% (*INT*) an.

Eine offensichtlichere Zunahme war bei der Betrachtung der HLA-ABC Oberflächenmarker zu erkennen. Sowohl bei *hPDCs* des Unterkiefers (*KO* 70% versus *INT* 95%), als auch bei *hPDCs* der Fibula (*KO* 77% versus *INT* 93%) stieg der Anteil positiver Zellen nach 7-tägiger Interferon-Behandlung deutlich an.

Die statistische Untersuchung der Oberflächenmarker ergab lediglich für HLA-DR eine statistische Signifikanz. Sowohl die Unterkiefer-*hPDCs* als auch die *hPDCs* der Fibula zeigten einen signifikanten Anstieg (*UK KO*  $0,2 \pm 0,39$  versus *UK INT*  $92,65 \pm 2,16$ ,  $p < 0,0001$ ; *Fib KO*  $0 \pm 0$  versus *Fib INT*  $77,21 \pm 19,52$ ,  $p < 0,0001$ ) der inflammatorisch-induzierten *hPDCs* im Vergleich zur Kontrollgruppe (siehe Tabelle 3). Die Kontrollgruppen stellten sich als negativ dar. Unter Interferoneinfluss nahm der Anteil HLA-DR-positiver Zellen der Fibula auf ca. 75% zu. *hPDCs* des Unterkiefers zeigten mit 90% positiven Zellen im Vergleich zu *hPDCs* der Fibula einen 15% höheren Anteil.

Die detaillierten Ergebnisse der Expression der immunrelevanten Oberflächenantigene sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3 – Durchflusszytometrische Expression der immunrelevanten Oberflächenmarker  
Mittelwert [%] ± Standardabweichung.  
UK = Unterkiefer; Fib = Fibula; INT = Interferon-γ; KO = Kontrollgruppe

	CD80	CD83	CD86	RAP-1	HLA-ABC	HLA-DR
UK KO	2,27 ± 2,02	2,35 ± 2,94	0 ± 0	11,98 ± 8,10	69,69 ± 22,41	0,20 ± 0,39
UK INT	1,52 ± 3,04	6,80 ± 5,97	1,69 ± 3,38	5,01 ± 2,82	95,41 ± 1,52	92,65 ± 2,16
p-Wert	0,93	0,68	0,51	0,57	0,12	**** <0,0001
Fib KO	0 ± 0	1,56 ± 2,11	0 ± 0	5,66 ± 3,27	76,69 ± 19,08	0 ± 0
Fib INT	0 ± 0	7,37 ± 8,78	0 ± 0	17,09 ± 11,71	93,08 ± 2,81	77,21 ± 19,52
p-Wert	>0,99	0,49	>0,99	0,19	0,43	**** <0,0001

Zusammenfassend zeigten die *hPDCs* des Unterkiefers und der Fibula keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Expression der untersuchten Oberflächenmarker. Sowohl bei Betrachtung der Stammzellenmarker, als auch der immunrelevanten Oberflächenmarker nach 7-tägiger Interferonbehandlung waren nur leichte Tendenzen feststellbar.

Den deutlichsten Unterschied ergab die Untersuchung der HLA-DR positiven *hPDCs* mit einem 15% höheren Anteil bei Unterkiefer-*hPDCs*. Des Weiteren zeigte sich die Expression der CD45 und *MSCA-1* Oberflächenmarker bei *hPDCs* der Fibula mit einem etwa 10% höherem Anteil positiver Zellen. Als kontrovers ist die gegenläufige Entwicklung der RAP-1 Expression zu betrachten.

### 3.3 Nachweis der Seneszenz der hPDCs mittels Durchflusszytometrie

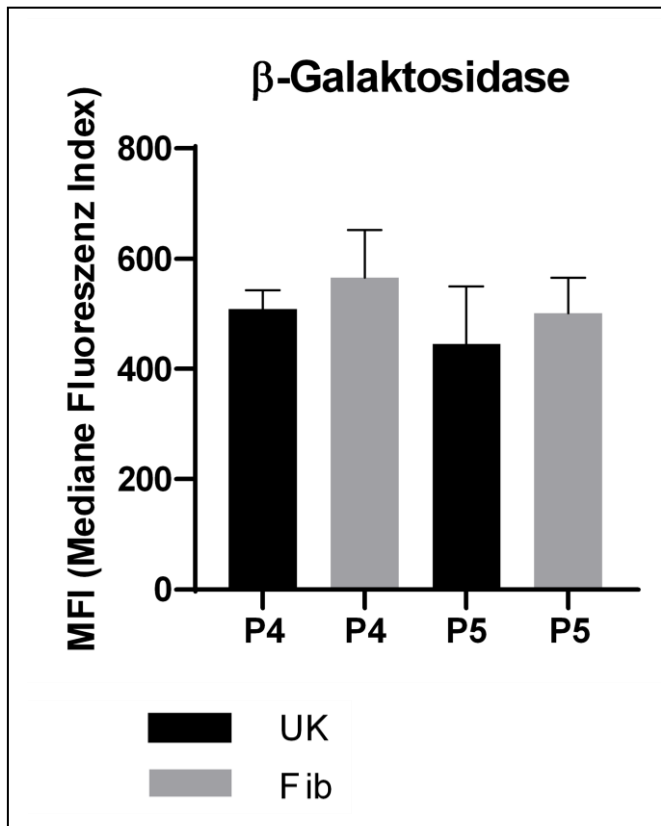


Abbildung 4 – Durchflusszytometrische Messung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in Passage P4 & P5; Medianer Fluoreszenz Index (MFI) UK = Unterkiefer; Fib = Fibula

Im Zuge des Seneszenz-Assays wurden die *hPDCs* des Unterkiefers und der Fibula mittels Durchflusszytometrie auf ihre Seneszenz in den Passagen 4 und 5 untersucht. Der gemessene Mediane Fluoreszenz Index (*MFI engl. Median Fluorescence Index*) ist hierbei in direkter Korrelation mit der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität und somit der Seneszenz der untersuchten *hPDCs* anzusehen.

Abbildung 4 zeigt die Messung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der *hPDCs*. In Passage 4

zeigte sich der *MFI* der Fibula-*hPDCs* mit einer Größe von >550 höher als bei den *hPDCs* des Unterkiefers mit ca. 500.

In Passage 5 wiesen die *hPDCs* im Allgemeinen einen geringeren *MFI* als in Passage 4 auf. Der *MFI* der Fibula-*hPDCs* betrug ca. 500, der *MFI* der Unterkiefer-*hPDCs* ca. 450. Ein signifikanter Unterschied war nicht erkennbar. (Tabelle 4).

Tabelle 4 – Messung der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität in Passage P4 & P5 in *MFI* (Mittelwert des *MFI*  $\pm$  Standardabweichung)

	P4	P5
Unterkiefer	508,5 $\pm$ 34,54	445,8 $\pm$ 103,7
Fibula	565,60 $\pm$ 86,44	500,80 $\pm$ 63,93
p-Wert	0,72	0,74

Bezüglich der verschiedenen Ursprünge der *hPDCs* lässt sich zusammenfassend Folgendes festhalten:

Sowohl in Passage 4 als auch in Passage 5 wiesen die *hPDCs* der Fibula im Vergleich zu den *hPDCs* des Unterkiefers lediglich eine geringfügig höhere Fluoreszenz auf.

Die statistische Analyse konnte keine statistisch signifikanten Unterschiede feststellen ( $p \geq 0,05$ ).

### **3.4 Nachweis des Proliferations-Verhaltens der hPDCs**

Ein Proliferations-Assay gibt eine direkte Auskunft über die Anzahl sich aktiv teilender Zellen innerhalb einer Zellpopulation in Kultur. Da die Proliferationsrate einen äußerst entscheidenden Faktor für eine Nutzung der *hPDCs* in *TE*-Techniken darstellt, wurden 2 verschiedene Methoden zur Durchführung der Proliferations-Analyse angewandt. Während der Proliferations-Assay mittels Ez4u über mitochondriale (metabolische) Aktivität auf die Proliferationskapazität schließt, kann mithilfe des Zellzählgerätes BioRad TC20 die absolute Anzahl lebender Zellen innerhalb einer Probe bestimmt werden. Beide Methoden sind aussagekräftig und können in Kombination eine genaue Bewertung der Proliferation der von uns untersuchten *hPDCs* liefern.

Mithilfe der Proliferations-Assays wurde das Proliferationsverhalten der in Passage 4 kultivierten Fibula- und Unterkiefer-*hPDCs* über die Anzahl sich aktiv teilender Zellen verglichen. Die Messungen fanden an 4 aufeinanderfolgenden Tagen (T1,2,3,4) statt.

### 3.4.1 Nachweis des Proliferations-Verhaltens mittels Ez4u

Der Proliferations-Assay mittels Ez4u schloss über die Messung mitochondrialer Aktivität auf die jeweilige Proliferationskapazität.

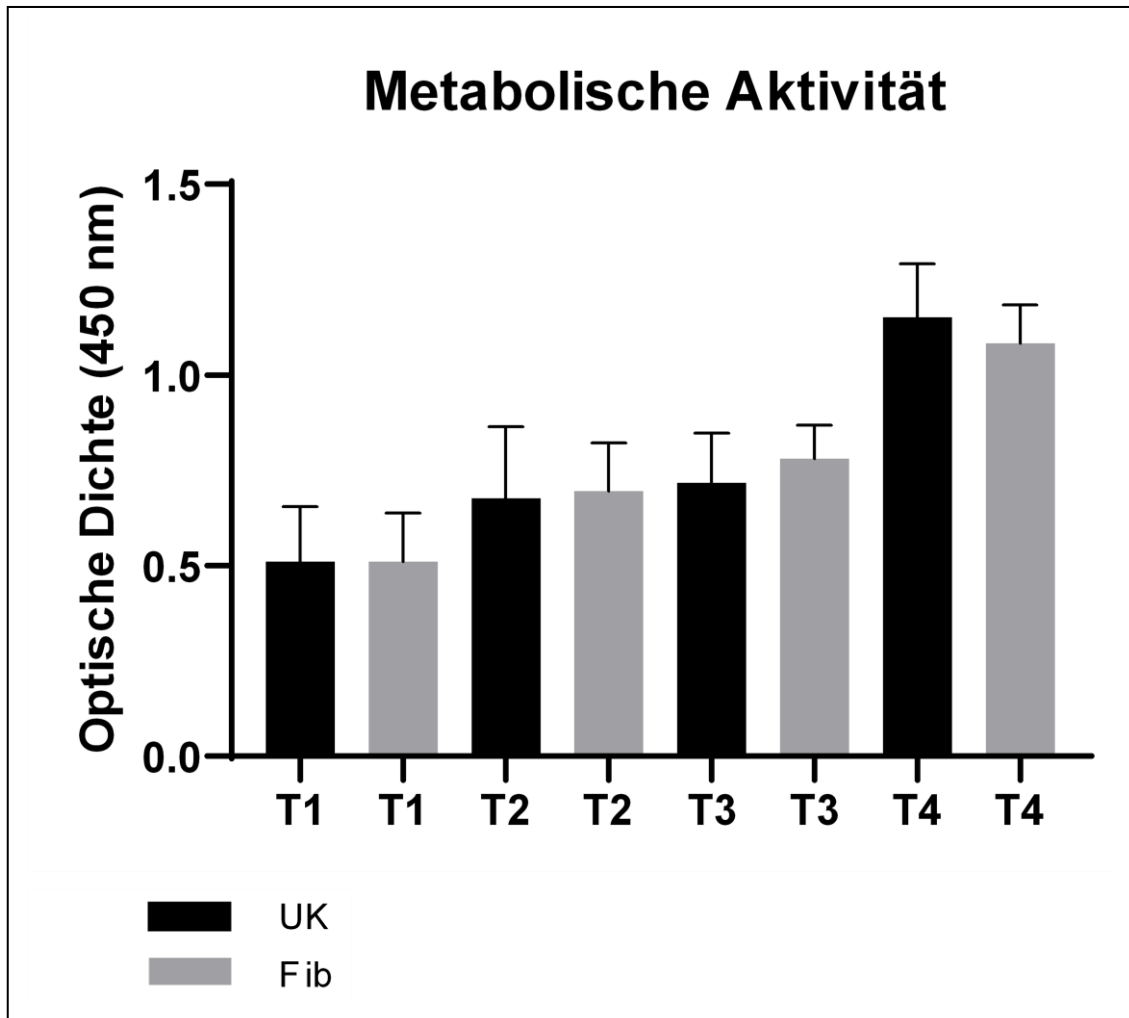


Abbildung 5 – Nachweis der metabolischen Aktivität mittels des Proliferations-Assays Ez4u (Optische Dichte - Absorption bei 450 nm) an den Untersuchungstagen T1-T4  
UK = Unterkiefer; Fib = Fibula

An Tag 1 konnte kein Unterschied bezüglich der optischen Dichte zwischen *hPDCs* des Unterkiefers und der Fibula detektiert werden. Sie lag bei beiden Gruppen bei ca. 0,5.

An Tag 2 ist eine Zunahme der Absorption auf ca. 0,65 erkennbar. Die Absorption der *hPDCs* beider Ursprünge stellte sich jedoch - analog zu den Messungen an



Tag 1 - als nahezu identisch heraus. Tendenziell wiesen die Fibula-*hPDCs* eine etwas höhere Absorption auf.

Dieser Trend verstärkte sich an Tag 3. Die *hPDCs* der Fibula zeigten eine Absorption von ca. 0,8, während die Unterkiefer-*hPDCs* eine Absorption von ca. 0,7 aufwiesen.

An Tag 4 nahm die Absorption für alle untersuchten *hPDCs* stark zu. Die Absorption der Fibula-*hPDCs* zeigte sich mit einem Wert von über 1,0. Die Unterkiefer-*hPDCs* wiesen sogar eine Absorption von knapp 1,2 auf. Dies entspricht im Vergleich zu Tag 3 einer Zunahme von über 60%.

*Tabelle 5 – Nachweis der metabolischen Aktivität mittels des Proliferations-Assay Ez4u (Absorption bei 450 nm an den Untersuchungstagen T1-T4; Mittelwert der Absorption ± Standardabweichung)*

	T1	T2	T3	T4
Unterkiefer	0,51 ± 0,14	0,67 ± 0,19	0,72 ± 0,13	1,15 ± 0,14
Fibula	0,51 ± 0,13	0,70 ± 0,13	0,78 ± 0,09	1,08 ± 0,10
p-Werte	>0,99	>0,99	>0,99	>0,99

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Proliferationskapazität wie erwartet mit zunehmenden Tagen anstieg. Interessanterweise zeigten die *hPDCs* des Unterkiefers zwischen Tag 3 und 4 eine enorme Zunahme an metabolischer bzw. Proliferationsaktivität. Dahingegen wiesen die *hPDCs* der Fibula über den beobachteten Zeitraum eine konstantere Zunahme der Proliferationsaktivität auf (Tabelle 5).

Die statistische Analyse konnte keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den zwei Zelltypen feststellen ( $p \geq 0,05$ ).

### 3.4.2 Bestimmung der Anzahl von Zellen mittels des Zellzählgerätes TC20

Die Zellzählung wurde mittels BioRad TC20 durchgeführt und die absolute Anzahl lebender Zellen bestimmt.

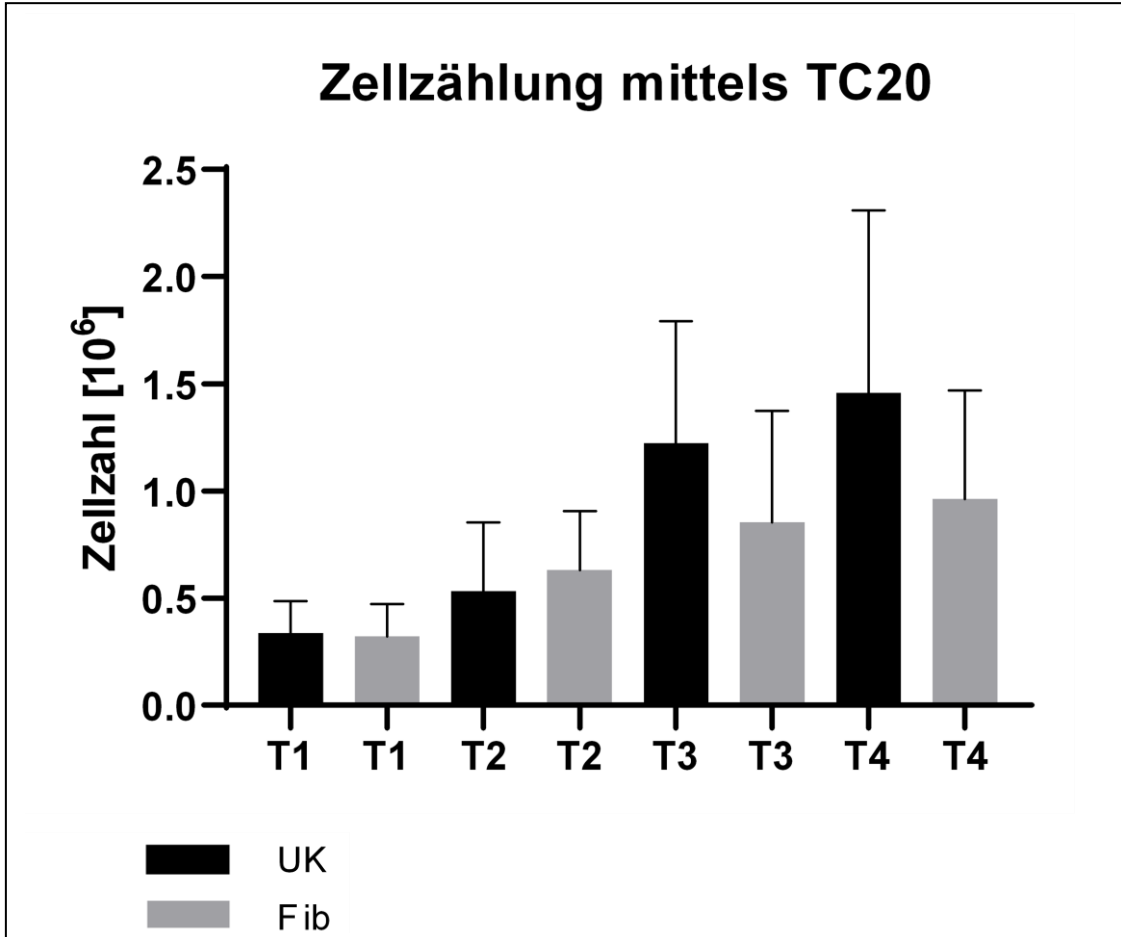


Abbildung 6 – Zellzählung mittels TC20  
Zellzahl [10<sup>6</sup>] an den untersuchten Tagen T1-T4  
UK = Unterkiefer; Fib = Fibula

Die detaillierten Zellzahlen sind in Tabelle 6 dargestellt. Auffallend ist an Tag 3 eine tendenziell höhere Proliferationskapazität der Unterkiefer-*hPDCs*. Die Unterkiefer-*hPDCs* zeigen einen Zuwachs von >100% auf  $1,2 \cdot 10^6$  Zellen. Die Anzahl an Fibula-*hPDCs* belief sich auf eine Gesamtzellzahl von  $0,8 \cdot 10^6$ .

Die Zellzahlen an Tag 4 bestätigten diese Tendenz. Für die *hPDCs* des Unterkiefers wurde eine absolute Zellzahl von  $1,5 \cdot 10^6$  gemessen. Die Gesamtzellzahl der Fibula-*hPDCs* belief sich auf knapp  $1 \cdot 10^6$  Zellen.

Tabelle 6 – Zellzählung mittels TC20  
 Zellzahl [ $10^6$ ] an den Untersuchungstagen T1-T4; Mittelwert der absoluten Zellzahl  $\pm$  Standardabweichung

	T1	T2	T3	T4
Unterkiefer	0,34 $\pm$ 0,15	0,53 $\pm$ 0,32	1,22 $\pm$ 0,57	1,46 $\pm$ 0,85
Fibula	0,32 $\pm$ 0,15	0,63 $\pm$ 0,27	0,85 $\pm$ 0,52	0,96 $\pm$ 0,50
p-Werte	>0,99	>0,99	0,95	0,81

Auch bei der Betrachtung der Zellzählung mittels BioRad TC20 zeigte sich eine konstante Zunahme der Zellzahlen unabhängig des Ursprungsgewebes der *hPDCs*. Analog zu dem durchgeführten Proliferations-Assay mittels Ez4u konnte an Tag 4 eine höhere Zellzahl bestimmt werden, die auf eine höhere Proliferationskapazität der Unterkiefer-*hPDCs* Rückschlüsse geben kann. Im Gegensatz zu dem Proliferations-Assay mittels Ez4u wurde diese Tendenz hier bereits an Tag 3 detektiert.

Die statistische Analyse konnte keine statistisch signifikanten Unterschiede feststellen ( $p \geq 0,05$ ).

### 3.5 Nachweis des induzierten Differenzierungspotentials der hPDCs

#### 3.5.1 Nachweis der adipogenen Differenzierung

Die Färbungen der adipogenen Versuchsreihe fanden an den Tagen 5, 10 und 15 mittels Ölrot O statt und wurden fotodokumentiert. Anschließend wurde die Ölrot O-Färbung photometrisch quantifiziert.

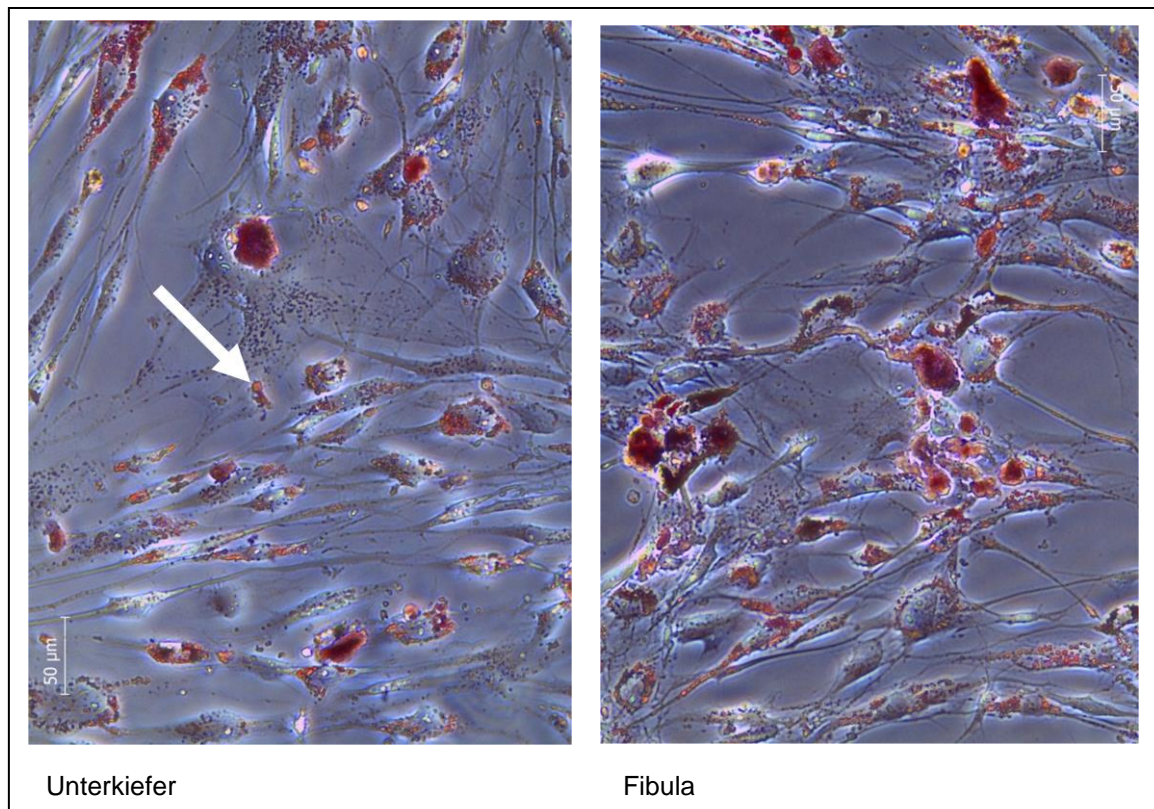


Abbildung 7 – Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der Ölrot O-Färbung an Untersuchungstag T15 der adipogenen Induktion in 20x-Vergrößerung; weißer Pfeil: zeigt auf eine rotgefärbte Fettvakuole

Bei allen Donoren waren, unabhängig des embryonalen Ursprungs der hPDCs, Fettvakuolen angefärbt sichtbar. Somit konnte nach qualitativer Beurteilung die Differenzierung zu Adipozyten sowohl bei allen Zellkulturen des Unterkiefers als auch der Fibula als erfolgreich angesehen werden. Soweit differenzierbar, unterschieden sie sich lediglich geringfügig in Größe und Anzahl der Vakuolen (siehe Abbildung 7). Dies spiegelte sich in der Quantifizierung über die Absorption wider (Abbildung 8). Mithilfe der Standardreihe konnte die absolute Konzentration an Ölrot O in mM errechnet werden (Tabelle 7).

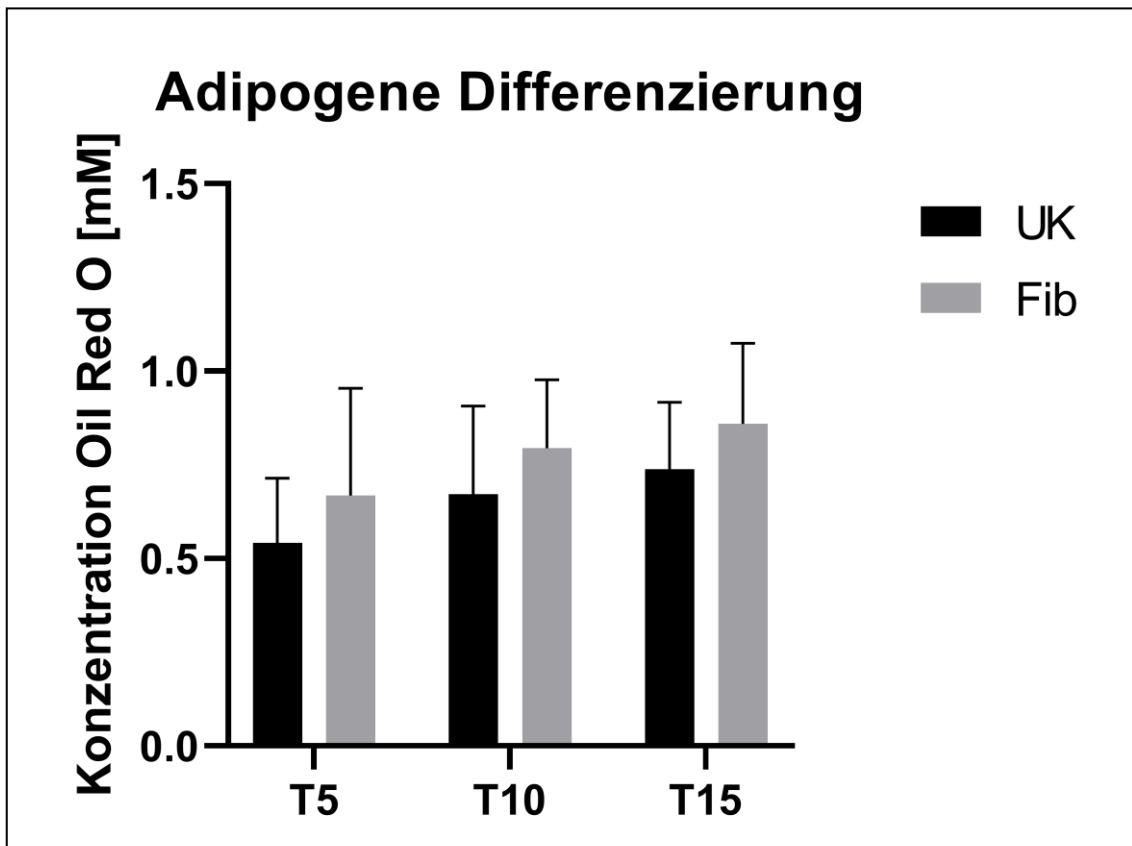


Abbildung 8 – Quantifizierung der Ölrot-Färbung [mM] an den Tagen T5, T10, T15 nach adipogener Induktion  
 UK = Unterkiefer; Fib = Fibula

Wie erwartet stieg die Absorption mit zunehmender Versuchsdauer an, was eine konstante Zunahme der Anzahl und Größe der Fettvakuolen bestätigte. Die *hPDCs* des Unterkiefers zeigten eine detektierte Ölrot Konzentration von ca. 0,5 mM (T5), 0,7 mM (T10) und 0,75 mM (T15). Bei den *hPDCs* der Fibula war eine Konzentration von ca. 0,7 mM (T5), 0,8 mM (T10) und knapp 0,9 mM (T15) detektierbar.

Somit war an allen untersuchten Tagen (T5,10,15) eine höhere Ölrot Konzentration bei den *hPDCs* der Fibula im Vergleich zu denen des Unterkiefers messbar.

Die statistische Analyse zeigte jedoch erneut keine statistisch signifikanten Unterschiede ( $p \geq 0,05$ ).

Tabelle 7 – Quantifizierung der Ölrot O -Färbung  
 Mittelwert Ölrot Konzentration [mM]  $\pm$  Standardabweichung. AM = Adipogenes Differenzierungsmedium;  
 KO = Kontrollgruppe; an den Untersuchungstagen T5, T10, T15

	T5	T10	T15
Unterkiefer AM	0,54 $\pm$ 0,17	0,67 $\pm$ 0,24	0,74 $\pm$ 0,18
Fibula AM	0,67 $\pm$ 0,29	0,79 $\pm$ 0,18	0,86 $\pm$ 0,21
P-Werte	0,71	0,73	0,7
Unterkiefer KO	0,88 $\pm$ 0,16	0,98 $\pm$ 0,15	0,92 $\pm$ 0,16
Fibula KO	0,97 $\pm$ 0,10	1,16 $\pm$ 0,08	1,09 $\pm$ 0,21

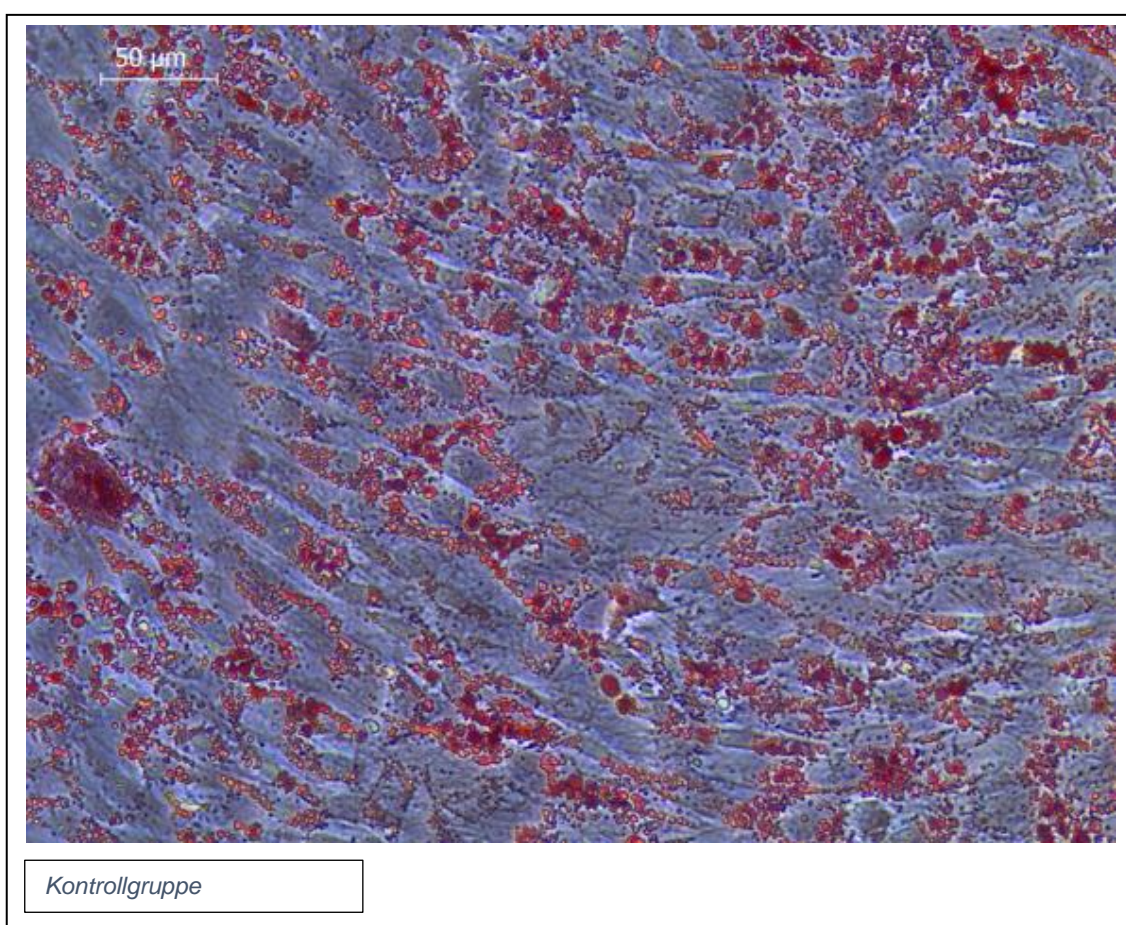


Abbildung 9 – Repräsentative mikroskopische Aufnahme der Ölrot O-Färbung  
 an Untersuchungstag T15 der unstimulierten Kontrollgruppe in 20x-Vergrößerung

Bei Betrachtung der Kontrollgruppen war ebenfalls ein Nachweis gebildeter Fettvakuolen durch die Ölrot O-Färbung zu beobachten (siehe Abbildung 9). In der Quantifizierung schlug sich diese sogar in einer höheren Absorption und Ölrot

O Konzentration nieder (siehe Tabelle 7). Die mikroskopische Beurteilung zeigte Fettvakuolen, die in ihrer Größe denen der adipogen-induzierten *hPDCs* unterlegen waren. Als möglichen Grund für die höhere Absorption konnte eine höhere Anzahl und Dichte der Fettvakuolen identifiziert werden.

### 3.5.2 Nachweis der chondrogenen Differenzierung

Die Färbung der chondrogenen Versuchsreihe fand an Tag 21 mittels Toluidinblau statt und wurde mikroskopisch fotodokumentiert. Des Weiteren wurde eine Quantifizierung des Glukosaminoglykan-Gehalts durch eine Dimethylen-Färbung durchgeführt.

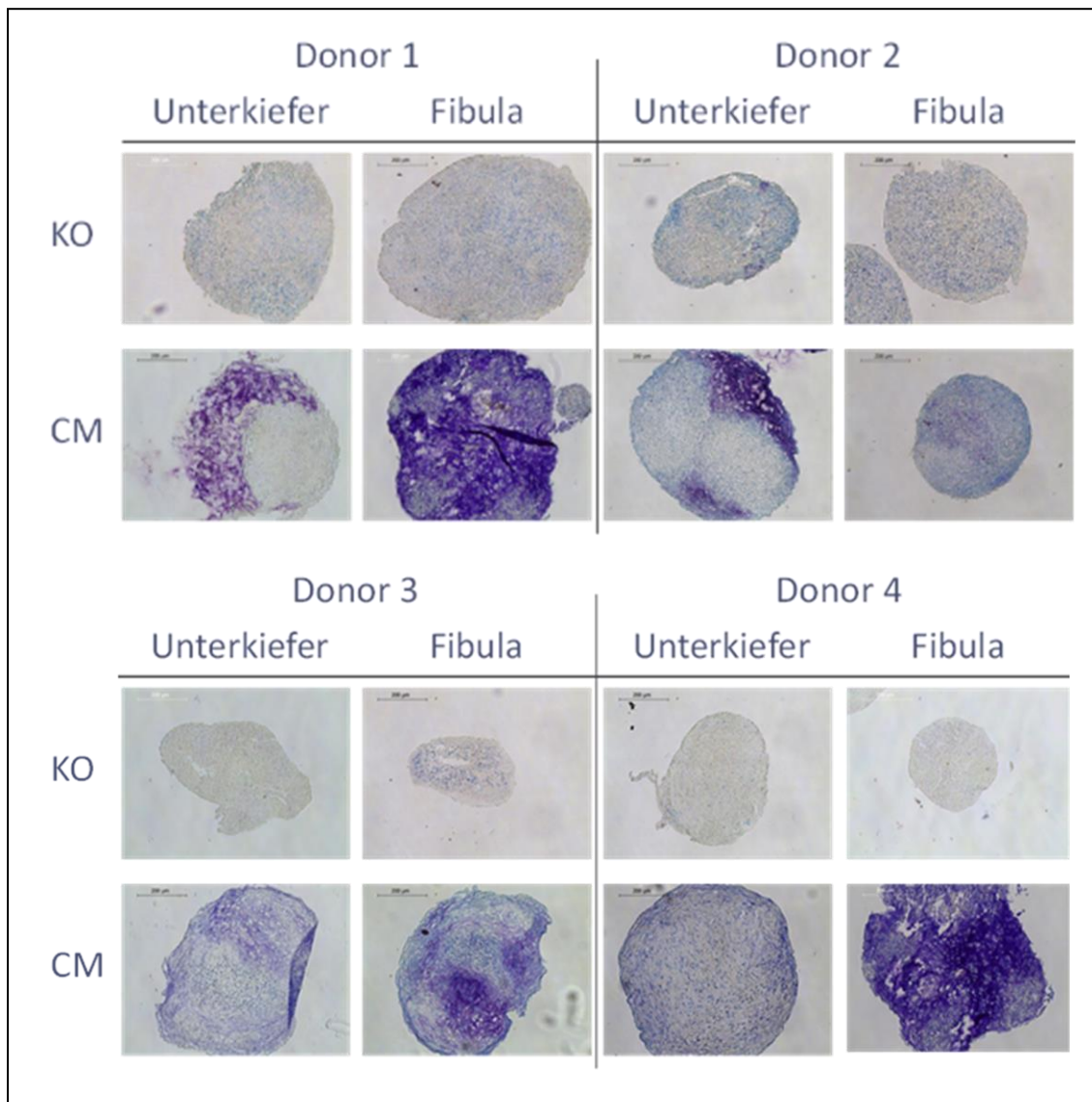


Abbildung 10 – Übersicht Toluidinblau-Färbung.  
Abgebildet ist die Färbung der unbehandelten Kontrollgruppen (KO) und chondrogen induzierten Zellkulturen (CM) an Tag 21 der chondrogenen Differenzierung (Donor 1-4)

Die Toluidine-Färbung weist durch seine blau bis lila erscheinende Farbe Proteoglykane und Glukosaminoglykane nach. In Abbildung 10 ist somit ein



qualitativer Nachweis der erfolgreichen chondrogenen Differenzierung bei allen Donoren unabhängig des embryonalen Ursprungs erkennbar. Die *Pellets* der Kontrollgruppe (KO) zeigten keine Färbung und sind somit als negativ zu betrachten.

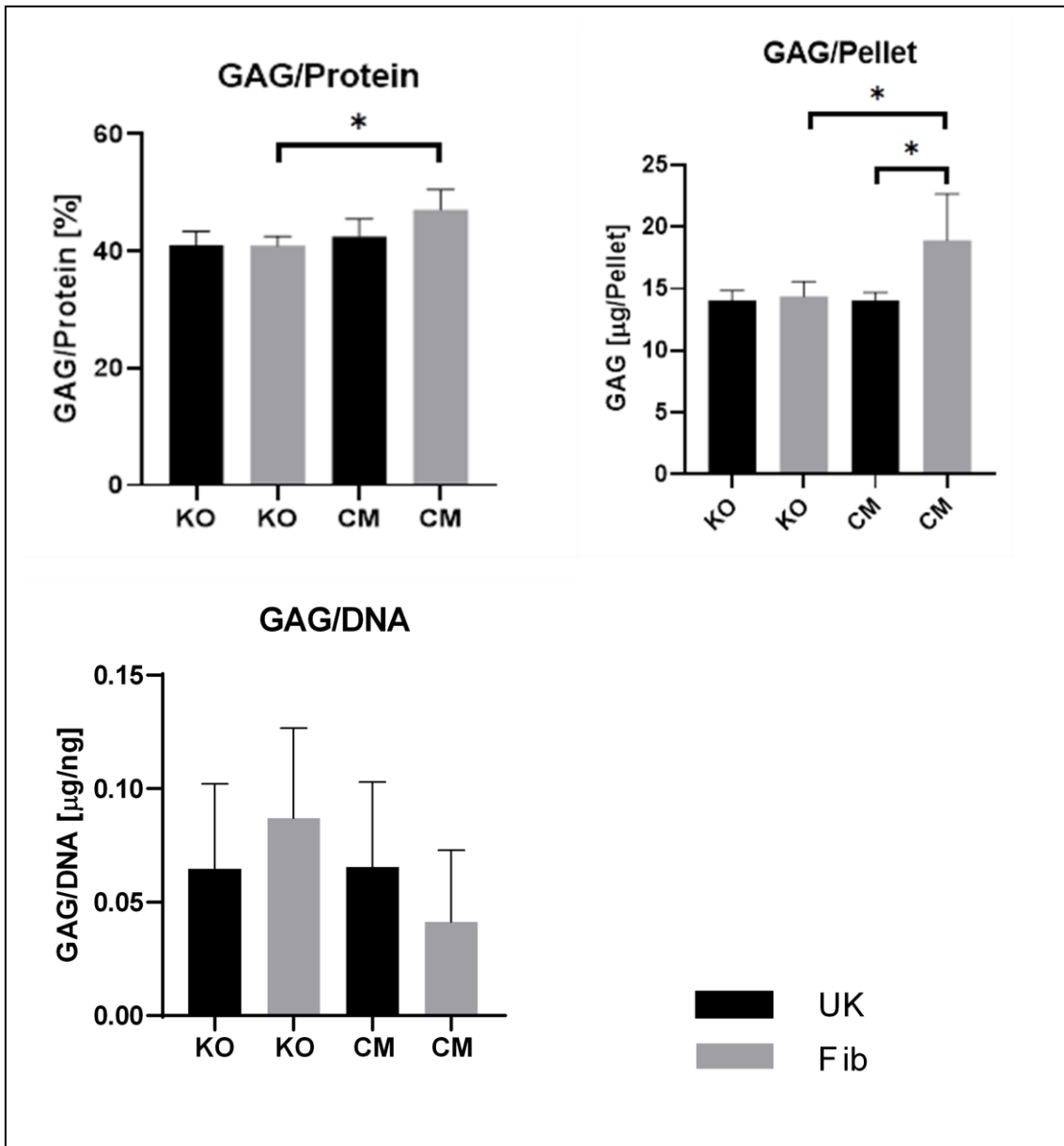


Abbildung 11 – Quantifizierung des GAG-Gehalts in Relation zum Gesamtprotein (GAG/Protein [%]), in Relation zum Pellet (GAG/Pellet) und in Relation zum DNA-Gehalt (GAG/DNA [µg/ng]) an Tag 21 nach chondrogener Induktion  
 CM = Chondrogenes Differenzierungsmedium; KO = Kontrollgruppe  
 UK = Unterkiefer; Fib = Fibula; \* = Signifikanz  $p \leq 0,05$

Es zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen den chondrogenen *Pellets* der Fibula- und Unterkiefer-*hPDCs* bei qualitativer mikroskopischer Betrachtung der Mikrotom-Schnitte. Bei Donor 2 ist eine stärkere Färbung bei den *hPDCs* des Unterkiefers erkennbar. Bei den restlichen Donoren zeigte sich, insbesondere bei den Donoren 1 und 4, eine deutlich stärkere Toluidine-Färbung der Fibula-*hPDCs* im Vergleich zu den Unterkiefer-*hPDCs*. Diese Tendenz zur überlegenen chondrogenen Differenzierung der Fibula-*hPDCs* bestätigte sich teilweise bei der quantitativen Untersuchung des GAG-Gehalts der jeweiligen Proben. Gemessen wurde der GAG-Anteil in Relation zur Gesamtmasse an DNA und Proteinen, sowie zusätzlich pro *Pellet*.

Die Messungen der prozentualen GAG-Anteile an der gesamten Proteinmasse und deren statistische Auswertung ergaben 47,1% ( $\pm 3,4$ ) für chondrogen induzierte Fibula-*hPDCs*, der sich gegenüber der Kontrollgruppe (41,0%  $\pm 1,6$ ) als signifikant höher ( $p=0,03$ ) darstellte. Die chondrogen induzierten Unterkiefer-*hPDCs* zeigten sich mit einem Anteil von 42,5% ( $\pm 3,0$ ) leicht erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe (41%  $\pm 2,4$ ), jedoch deutlich niedriger als die jeweiligen *hPDCs* der Fibula.

Bei Betrachtung der Ergebnisse für die durchschnittliche GAG-Menge pro *Pellet* war sogar eine signifikant höhere ( $p=0,02$ ) GAG-Menge für die chondrogen induzierten Fibula-*hPDCs* (18,9  $\mu\text{g}/\text{Pellet}$ ) im Verhältnis zu den Unterkiefer-*hPDCs* (14,1  $\mu\text{g}/\text{Pellet}$ ) detektierbar (*UK CM* 14,1  $\pm 0,6$ , *Fib CM* 18,9  $\pm 3,75$ ,  $p = 0,02$ ).

Lediglich die Ergebnisse der GAG-Konzentration umgerechnet auf die jeweilige DNA-Konzentration der Proben ergaben ein kontroverses Bild. Die Kontrollgruppe der Fibula-*hPDCs* zeigte sich mit ca. 0,087  $\mu\text{g}/\text{ng}$  GAG/DNA als deutlich größer im Vergleich zu den chondrogen induzierten Fibula-*hPDCs* (0,041  $\mu\text{g}/\text{ng}$  GAG/DNA). Die chondrogen induzierten *hPDCs* des Unterkiefers stellten sich mit 0,066  $\mu\text{g}/\text{ng}$  GAG/DNA im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 0,065  $\mu\text{g}/\text{ng}$  GAG/DNA als minimal erhöht dar. Die durchgeführte statistische Analyse konnte keine Signifikanzen berechnen ( $p \geq 0,05$ ).

Tabelle 8 – Quantifizierung des GAG-Gehalts  
in Relation zum Gesamtprotein (GAG/Protein [%]), in Relation zum Pellet (GAG/Pellet) und in Relation  
zum DNA-Gehalt (GAG/DNA [ $\mu\text{g}/\text{ng}$ ]) an Tag T21 nach chondrogener Induktion;  
Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung  
CM = Chondrogenes Differenzierungsmedium; KO = Kontrollgruppe; \* = Signifikanz  $p \leq 0,05$

	GAG/Protein [%]	GAG [ $\mu\text{g}$ ] /Pellet	GAG/DNA [ $\mu\text{g}/\text{ng}$ ]
Unterkiefer KO	41,0 $\pm 2,4$	14,07 $\pm 0,8$	0,065 $\pm 0,037$
Unterkiefer CM	42,5 $\pm 3,01$	14,1 $\pm 0,6$	0,065 $\pm 0,037$
p-Wert	0,85	>0,99	>0,99
Fibula KO	41,0 $\pm 1,56$	14,37 $\pm 1,21$	0,087 $\pm 0,04$
Fibula CM	47,1 $\pm 3,42$	18,9 $\pm 3,75$	0,041 $\pm 0,031$
p-Wert	<b>* 0,031</b>	<b>* 0,036</b>	0,34

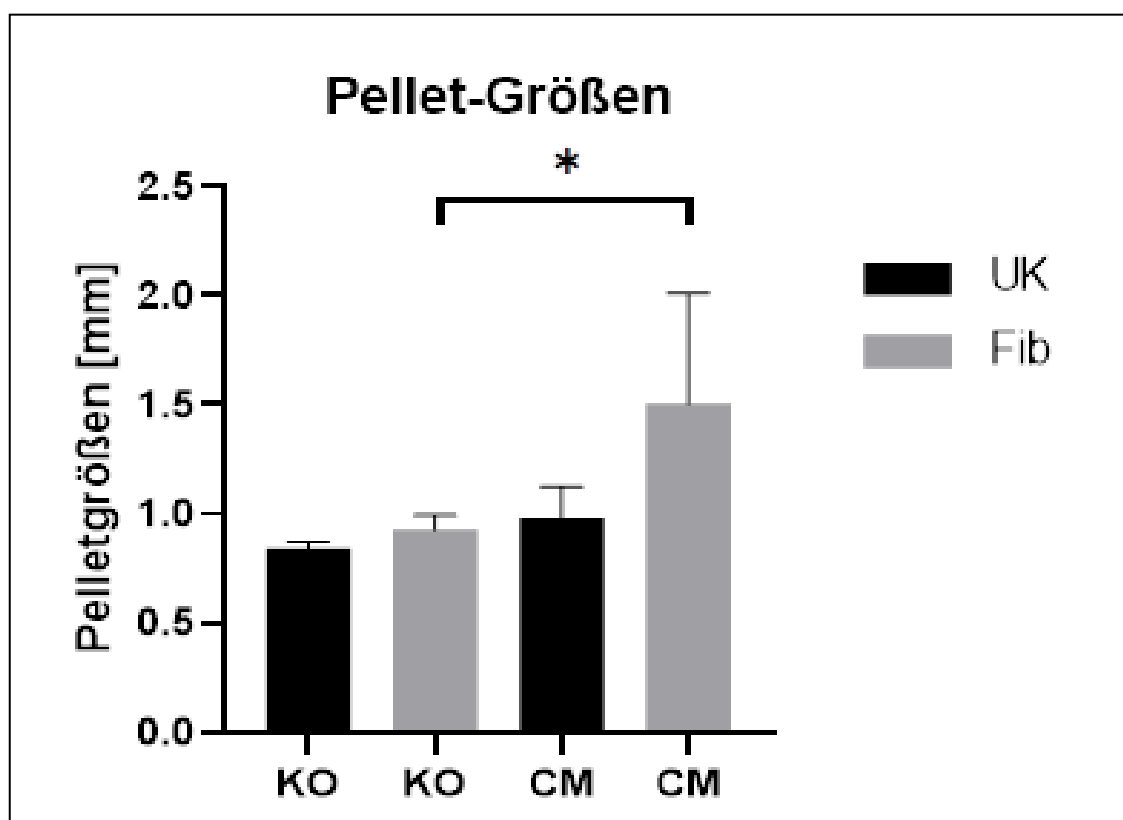


Abbildung 12 – Messung der Pellet-Größen an Tag 21 nach chondrogener Differenzierung [mm]  
CM = Chondrogenes Differenzierungsmedium; KO = Kontrollgruppe  
UK = Unterkiefer; Fib = Fibula; \* = Signifikanz  $p \leq 0,05$

Wir vermuteten einen Zusammenhang zwischen bereits makroskopisch festgestellten Größenunterschieden der chondrogenen *Pellets* und der

erfolgreichen chondrogenen Differenzierung. Aus diesem Grund errechneten wir die durchschnittliche *Pellet*-Größe je Donor und Bedingung (Abbildung 12).

Die bei der Quantifizierung festgestellte tendenziell überlegene chondrogene Kapazität der Fibula-*hPDCs* spiegelte sich in der Größe der chondrogenen *Pellets* wider. Die *Pellets* der Fibula-*hPDCs* zeigten sich mit einer durchschnittlichen Größe von ca. 1,5 mm als signifikant größer ( $p=0,042$ ) im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe (0,92 mm). Die *Pellets* der Unterkiefer-*hPDCs* nahmen im Zuge der chondrogenen Differenzierung im Schnitt von 0,84 mm (Kontrollgruppe) auf 0,98 mm zu, stellten sich jedoch als deutlich kleiner im Vergleich zu den Fibula-*hPDCs* dar (Tabelle 9). Statistische Signifikanz ergab sich lediglich für die *Pellet*größen der Fibula-*hPDCs* im Vergleich zu der Fibula-Kontrollgruppe (*Fib KO*  $0,93 \pm 0,07$  versus *Fib CM*  $1,50 \pm 0,51$ ,  $p = 0,042$ )

*Tabelle 9 – Quantifizierung der Pellet-Größen [mm]  
an Tag T21 nach chondrogener Induktion;  
Mittelwert [mm]  $\pm$  Standardabweichung  
CM = Chondrogenes Differenzierungsmedium; KO = Kontrollgruppe; \* = Signifikanz  $p \leq 0,05$*

	KO	CM	p-Wert
Unterkiefer	0,84 $\pm 0,03$	0,98 $\pm 0,14$	0,88
Fibula	0,93 $\pm 0,07$	1,50 $\pm 0,51$	<b>* 0,042</b>
p-Wert	0,97	0,07	

### 3.5.3 Nachweis der osteogenen Differenzierung

Die Färbung der osteogenen Versuchsreihe fand an Tag 21 mittels Alizarinrot statt und wurde fotodokumentiert. Anschließend wurde die Alizarin-Färbung photometrisch quantifiziert.

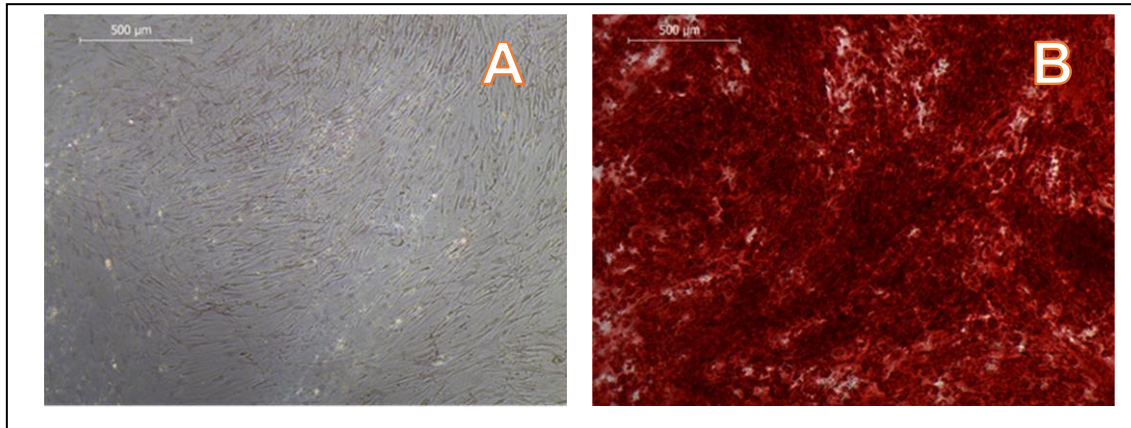


Abbildung 13 – Repräsentative mikroskopische Aufnahme der Alizarinfärbung an Tag 21 nach osteogener Induktion in 4x-Vergrößerung (A: Kontrollgruppe, B: osteogen induzierte Zellgruppe)

Bei der osteogenen Differenzierung zeigte sich ebenfalls ein deutlicher Unterschied zwischen den *hPDCs* mesenchymalen und intramembranösen Ursprungs. Die *hPDCs* der Fibula wiesen bei allen untersuchten Donoren bereits an Tag 14 äußerst starke Kalzifizierungen auf, die mikroskopisch eindeutig festgestellt werden konnten. Im Gegensatz dazu reagierte der überwiegende Teil an Unterkiefer-*hPDCs* auf die osteogene Induktion erst im späteren Verlauf und zeigte dabei, soweit qualitativ beurteilbar, ein geringeres Ausmaß.

Bei den Donoren 1 & 3 konnten keine Kalziumphosphat-Präzipitate durch die Alizarin-Färbung detektiert werden. Bei den betroffenen Zellkulturen waren keine sichtbaren Unterschiede zu den jeweiligen Kontrollgruppen erkennbar.

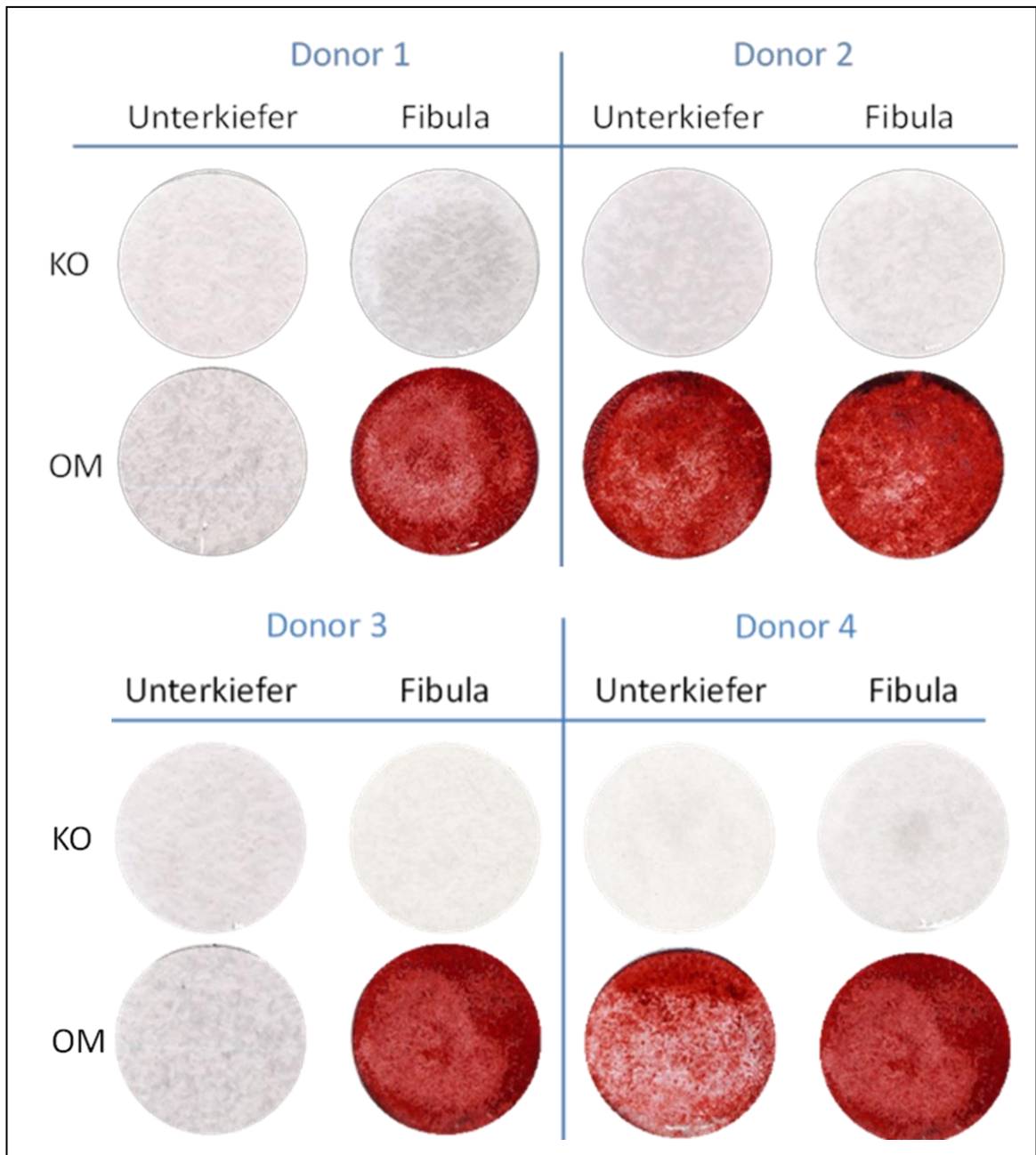


Abbildung 14 – Repräsentative Übersichtsbilder der Alizarin-Färbung  
 Abgebildet ist die Färbung der unstimulierten Kontrollgruppen und osteogen induzierten Zellkulturen (Donor 1-4) an Tag 21;  
 OM = Osteogenes Differenzierungsmedium; KO = Kontrollgruppe

Die Quantifizierung der Alizarinrot-Färbung bestätigte die qualitativen Beobachtungen:

Mithilfe der Standardkurve konnte über die gemessenen Absorptionswerte die Konzentration des Alizarin-Farbstoffs errechnet werden. Es ergab sich für die untersuchten Fibula-*hPDCs* eine durchschnittliche Konzentration von 4,7 mM. Die durchschnittliche Konzentration der Unterkiefer-*hPDCs* stellte sich mit 1,4 mM als signifikant geringer ( $p < 0,001$ ) dar.

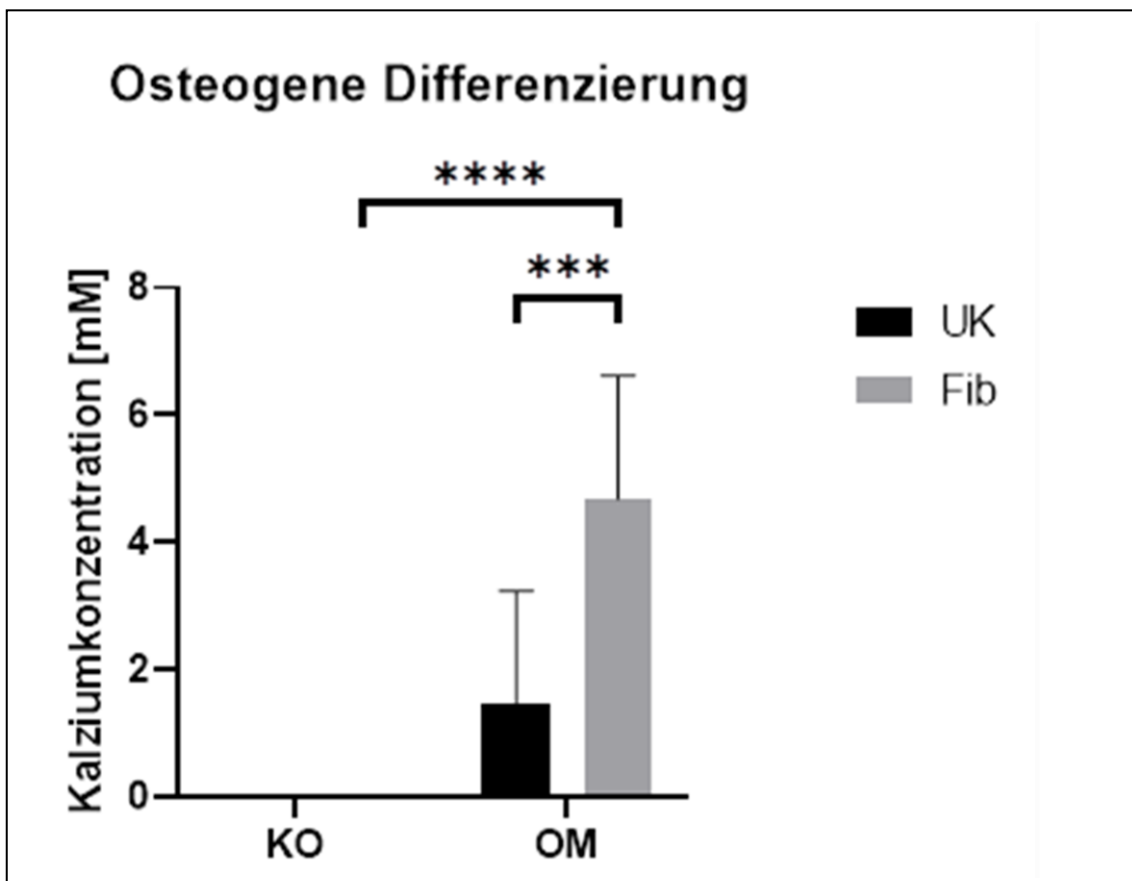


Abbildung 15 – Alizarinquantifizierung [mM]  
 An Tag 21 nach osteogener Differenzierung  
 OM = Osteogenes Differenzierungsmedium; KO = Kontrollgruppe  
 UK = Unterkiefer; Fib = Fibula; \*\*\*\* = Signifikanz  $p < 0,0001$ ; \*\*\* = Signifikanz  $p$  zwischen  $0,001 - 0,0001$

Die statistische Auswertung wurde mittels *Two-way ANOVA* durchgeführt. Es zeigte sich lediglich eine statistisch relevante Signifikanz bei dem Vergleich der osteogen induzierten Fibula-*hPDCs* zu den osteogen induzierten Unterkiefer-*hPDCs*, sowie zur Fibula-Kontrollgruppe (Fib OB  $4,68 \pm 1,94$  versus UK OB  $1,44 \pm 1,80$ ,  $p = 0,0002$ ; Fib OB  $4,68 \pm 1,94$  versus Fib KO  $0,01 \pm 0,01$ ,  $p < 0,0001$ ).

Tabelle 10 – Alizarinquantifizierung

Mittelwert Kalziumkonzentration [mM]  $\pm$  Standardabweichung an Tag 21 nach osteogener Differenzierung  
 OM = Osteogenes Differenzierungsmedium; KO = Kontrollgruppe; \* = Signifikanz  $p \leq 0,05$

	KO	OB	p-Werte
Unterkiefer	0,01 $\pm$ 0,01	1,44 $\pm$ 1,80	0,16
Fibula	0,01 $\pm$ 0,01	4,68 $\pm$ 1,94	**** <b>&lt;0,0001</b>
p-Werte	>0,99	*** <b>0,0002</b>	

Wie erwartet konnte bei Betrachtung der Kontrollgruppen weder qualitativ noch quantitativ eine positive Alizarinfärbung nachgewiesen werden.



### 3.6 Nachweis der Genexpressionen

#### 3.6.1 Nachweis der Genexpression adipogener Marker

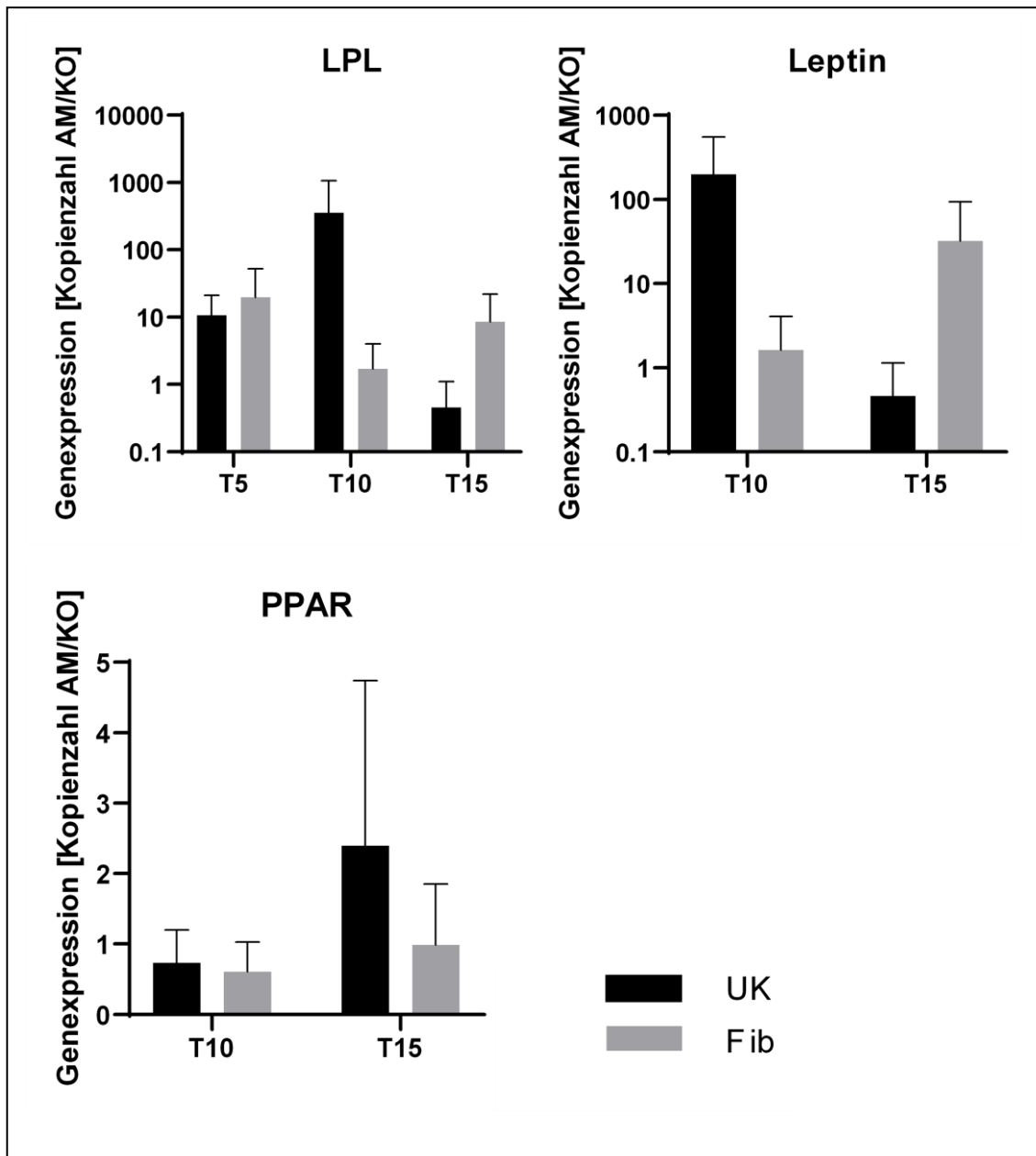


Abbildung 16 – Quantifizierung der Genexpression adipogener Marker (LPL, Leptin, PPAR)

AM = Adipogenes Differenzierungsmedium; KO = Kontrollgruppe

UK = Unterkiefer; Fib = Fibula; T = Untersuchungstag

Berechnung der jeweiligen Ergebnisse:

1. Normierung der Kopienzahlen (Kopienzahl genetischer Marker / Kopienzahl GAPDH)

2. Induktion der Genexpression (Normierte Kopienzahlen AM / KO)

[Angabe in Kopienzahlen AM/KO]

Die Quantifizierung der adipogenen Genexpression fand an den Tagen 5, 10 und 15 nach erfolgter adipogener Induktion mittels *RT-qPCR* statt. Die jeweiligen Proben der 4 Donoren wurden auf die Gene *LPL*, *Leptin* und *PPAR* getestet.

Für jede Probe wurde eine Normierung der Kopienzahl entsprechend des gemessenen *GAPDH*s-Standards durchgeführt. (Kopienzahl genetischer Marker/ Kopienzahl *GAPDH*).

Anschließend wurden die normierten Ergebnisse der adipogen induzierten Proben in Relation zu den normierten Ergebnissen der Proben ihrer entsprechenden Kontrollgruppen gesetzt: die sogenannte Induktion der Genexpression (Normierte Kopienzahlen adipogen induzierter Proben/Normierte Kopienzahlen Kontrollgruppen).

*LPL* gilt als allgemeiner Marker für die adipogene Genexpression und wurde an allen Untersuchungstagen (T5,10,15) betrachtet.

Die induzierten *hPDCs* des Unterkiefers zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe an Tag 5 eine 11-fach höhere Expression, die an Tag 10 deutlich auf eine 356-fach höhere Expression anstieg. An Tag 15 wiederum zeigte sich die Expression niedriger als in der jeweiligen Kontrollgruppe.

Die Induktion der Genexpression von *LPL* zeigte sich bei den *hPDCs* der Fibula an Tag 5 20-fach, an Tag 10 2-fach und an Tag 15 wiederum 8,5-fach im Vergleich zur Fibula-Kontrollgruppe induziert.

Sowohl *Leptin* als auch *PPAR* gelten als späte Marker der adipogenen Genexpression und wurden somit an den Untersuchungstagen 10 und 15 betrachtet.

Bei der Betrachtung der Genexpression von *Leptin* zeigten sich die Unterkiefer-*hPDCs* an Tag 10 im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe um das 199-fache induziert, während die Fibula-*hPDCs* lediglich eine geringe Induktion um das ca. 1,6-fache im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe aufwiesen. An Tag 15 stellte sich ein gegenteiliges Bild dar. Die Genexpression zeigte sich bei den Fibula-*hPDCs* 32-mal höher, während die Expression der Unterkiefer-*hPDCs* geringer als in der jeweiligen Kontrollgruppe ausfiel.

Die Untersuchung der *PPAR*-Genexpression zeigte sich in den Kontrollgruppen als höher für die Proben der Fibula-*hPDCs* an Tag 10 und 15, sowie für die Proben der Unterkiefer-*hPDCs* an Tag 10. Lediglich an Tag 15 wurde bei den Unterkiefer-*hPDCs* eine 2,4-fach höhere Expression als in der jeweiligen Kontrollgruppe gemessen.

Die statistische Analyse zeigte jedoch zwischen den jeweiligen Gruppen bzw. Untersuchungszeitpunkten keine statistisch signifikanten Unterschiede ( $p \geq 0,05$ ).

*Tabelle 11 – Quantifizierung der Genexpression adipogener Marker (LPL, Leptin, PPAR- $\gamma$ )*  
*AM = Adipogenes Differenzierungsmedium; KO = Kontrollgruppe; T = Untersuchungstag*  
*\* = Signifikanz  $p \leq 0,05$*   
*Berechnung der jeweiligen Ergebnisse:*  
*1. Normierung der Kopienzahlen (Kopienzahl genetischer Marker / Kopienzahl GAPDH)*  
*2. Induktion der Genexpression (Normierte Kopienzahlen AM / KO)*  
*[Angabe in Kopienzahlen AM/KO] Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung*

	LPL	Leptin	PPAR
Unterkiefer T5	10,66 $\pm$ 10,57	-	-
Fibula T5	19,65 $\pm$ 32,50	-	-
p-Werte	>0,99		
Unterkiefer T10	356,17 $\pm$ 708,07	198,52 $\pm$ 352,18	0,73 $\pm$ 0,47
Fibula T10	1,71 $\pm$ 2,33	1,62 $\pm$ 2,47	0,61 $\pm$ 0,42
p-Werte	0,53	0,44	>0,99
Unterkiefer T15	0,45 $\pm$ 0,65	0,46 $\pm$ 0,69	2,40 $\pm$ 2,35
Fibula T15	8,53 $\pm$ 13,56	31,89 $\pm$ 62,57	0,99 $\pm$ 0,86
p-Werte	>0,99	>0,99	0,44

Zusammenfassend zeigten die *hPDCs* des Unterkiefers und der Fibula keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Genexpression der untersuchten adipogenen Marker. Es waren lediglich Tendenzen feststellbar.

### 3.6.2 Nachweis der Genexpression chondrogener Marker

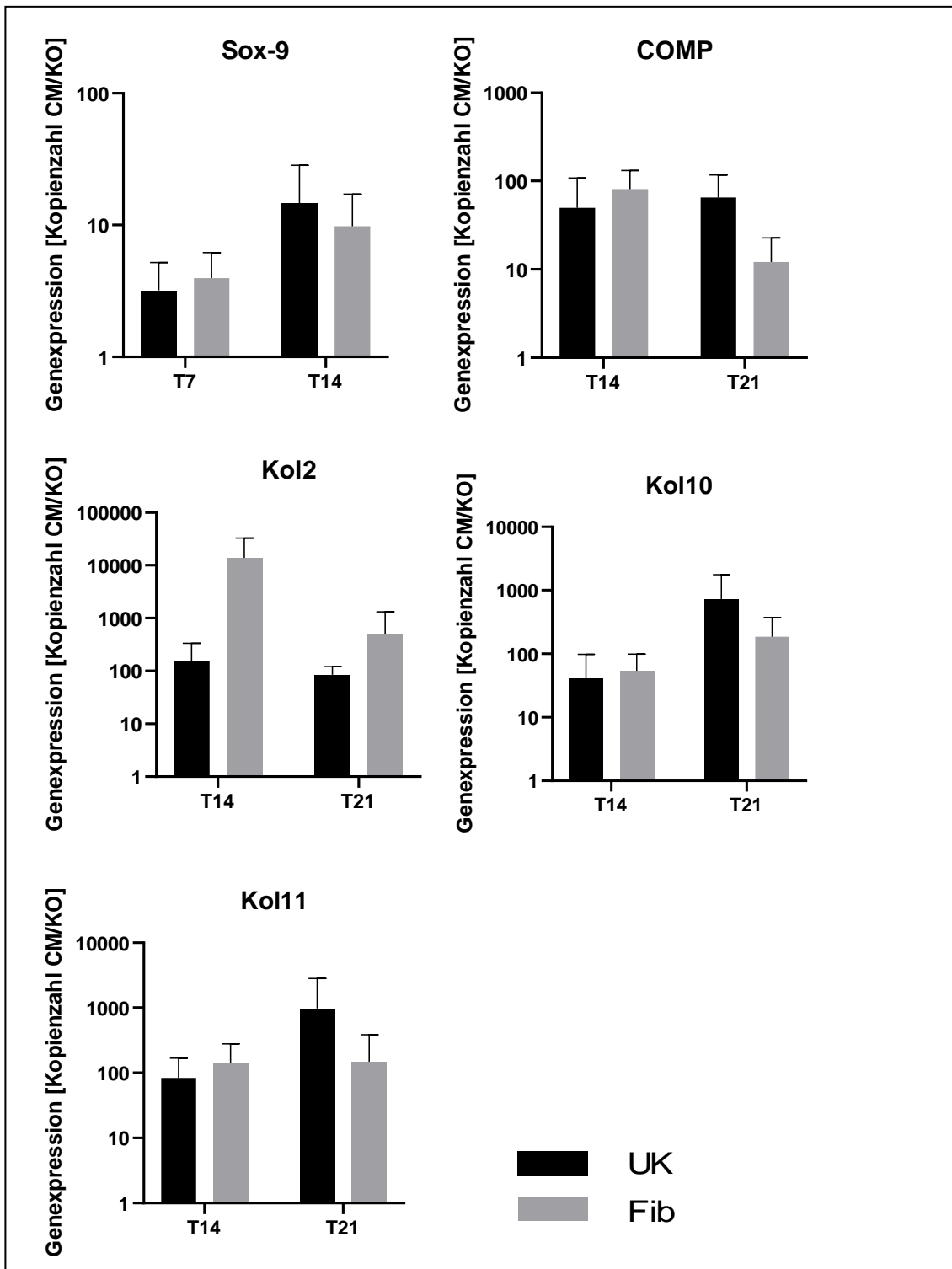


Abbildung 17 – Quantifizierung der Genexpression chondrogener Marker

(Sox-9, COMP, Kol2, Kol10, Kol11)

CM = Chondrogenes Differenzierungsmedium; KO = Kontrollgruppe

UK = Unterkiefer; Fib = Fibula; T = Untersuchungstag

Berechnung der jeweiligen Ergebnisse:

1. Normierung der Kopienzahlen (Kopienzahl genetischer Marker / Kopienzahl GAPDH)

2. Induktion der Genexpression (Normierte Kopienzahlen CM / KO)

[Angabe in Kopienzahlen CM/KO]

Die Quantifizierung der chondrogenen Genexpression fand an den Tagen 7, 14 und 21 nach erfolgter chondrogener Induktion mittels *RT-qPCR* statt. Die jeweiligen Proben wurden auf die Gene *Sox-9*, *COMP*, *Kol2*, *Kol10* und *Kol11* getestet.

Für jede Probe wurde eine Normierung der Kopienzahl entsprechend des gemessenen *GAPDH*s-Standards durchgeführt. (Kopienzahl genetischer Marker/ Kopienzahl *GAPDH*).

Anschließend wurden diese normierten Ergebnisse der chondrogen induzierten Proben in Relation zu den normierten Ergebnissen der Proben ihrer entsprechenden Kontrollgruppen gesetzt: die sogenannte Induktion der Genexpression (Normierte Kopienzahlen chondrogen induzierter Proben/Normierte Kopienzahlen Kontrollgruppen).

*Sox-9* ist hierbei ein früher Marker chondrogener Differenzierung und wurde an den Tagen 7 und 14 analysiert. Die anderen Gene gelten als späte Marker chondrogener Differenzierung. Somit wurde die Induktion ihrer Expression an den Tagen 14 und 21 untersucht.

Die Genexpression von *Sox-9* stellte sich an Tag 7 für *hPDCs* des Unterkiefers um einen mit den *hPDCs* der Fibula vergleichbaren Faktor induziert dar (siehe Tabelle 12). An Tag 14 zeigte sich die Expression bei den Unterkiefer-*hPDCs* um das 15-fache, die der Fibula-*hPDCs* um das 10-fache erhöht im Vergleich zu den jeweiligen unbehandelten Kontrollgruppen.

Für die Genexpression von *COMP* (engl. *Cartilage Oligomeric Matrix Protein*) stellte sich generell eine relativ hohe Induktion dar.

Die untersuchte Expression bei den Unterkiefer-*hPDCs* zeigte an Tag 14 eine 50-fach, an Tag 21 eine 65-fach höhere Induktion als die Kontrollgruppe der Unterkiefer-*hPDCs*. Die *hPDCs* der Fibula wiesen einen entgegengesetzten Trend auf. An Tag 14 zeigte sich die Expression 81-fach, an Tag 21 12-fach induziert im Vergleich zu ihren zugehörigen Kontrollgruppen.

Die Genexpression von *Kollagen 2* zeigte sich bei den chondrogen-induzierten Proben als deutlich erhöht. Für Unterkiefer-*hPDCs* wurde eine 151,5-fach (Tag

14) und eine 84,8-fach (Tag 21) höhere Expression als in den jeweiligen Kontrollgruppen gemessen. Die Expression der Fibula-*hPDCs* zeigte sich an Tag 14 sogar um den Faktor 13900 und an Tag 21 um den Faktor 497 im Vergleich zu den dazugehörigen Kontrollgruppen erhöht.

Die Genexpression von *Kollagen 10* stellte sich ebenfalls deutlich induziert im Verhältnis zu den jeweiligen Kontrollgruppen dar. Bei den *hPDCs* des Unterkiefers zeigte sich die Genexpression an Tag 14 41,1-mal höher als die jeweilige Kontrollgruppe, an Tag 21 sogar 732-mal höher als die jeweilige Kontrollgruppe. Die der Fibula-*hPDCs* zeigte einen ähnlichen Trend. Die Genexpression stellte sich an Tag 14 54-fach, an Tag 21 185-fach höher induziert als die jeweilige Kontrollgruppe dar.

Bei der Untersuchung der Genexpression von Kollagen11 wurde bei den Unterkiefer-*hPDCs* an Tag 14 eine 83,5-fach höhere Expression in den induzierten Proben im Verhältnis zu der jeweiligen Kontrollgruppe gemessen, die an Tag 21 auf das 978-fache anstieg. Bei den Fibula-*hPDCs* zeigte sich mit einer Erhöhung um das 141-fache (Tag 14) und um das 148-fache (Tag 21) an beiden Untersuchungstagen eine vergleichbar erhöhte Expression.

Die statistische Analyse erbrachte keine signifikanten Unterschiede ( $p \geq 0,05$ ).

Tabelle 12 – Quantifizierung der Genexpression chondrogener Marker  
(Sox-9, COMP, Kol2, Kol10, Kol11)

CM = Chondrogenes Differenzierungsmedium; KO = Kontrollgruppe; T = Untersuchungstag

\* = Signifikanz  $p \leq 0,05$

Berechnung der jeweiligen Ergebnisse:

1. Normierung der Kopienzahlen (Kopienzahl genetischer Marker / Kopienzahl GAPDH)

2. Induktion der Genexpression (Normierte Kopienzahlen CM / KO)

[Angabe in Kopienzahlen CM/KO] Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung

	Sox-9	COMP	Kol2	Kol10	Kol11
Unterkiefer T7	3,19 $\pm$ 2,00	-	-	-	-
Fibula T7	3,95 $\pm$ 2,22	-	-	-	-
p-Werte	>0,99				
Unterkiefer T14	14,67 $\pm$ 13,72	49,78 $\pm$ 58,67	151,51 $\pm$ 183,35	41,09 $\pm$ 57,07	83,52 $\pm$ 84,33
Fibula T14	9,81 $\pm$ 7,32	80,89 $\pm$ 50,85	13901,02 $\pm$ 19273,69	53,98 $\pm$ 44,63	141,19 $\pm$ 138,29
p-Werte	0,82	0,79	0,36	>0,99	>0,99
Unterkiefer T21	-	65,28 $\pm$ 52,07	84,80 $\pm$ 36,11	732,11 $\pm$ 1037,06	977,85 $\pm$ 1850,84
Fibula T21	-	12,12 $\pm$ 10,57	497,29 $\pm$ 817,99	185,25 $\pm$ 186,95	148,36 $\pm$ 235,51
p-Werte		0,42	>0,99	0,43	0,61

Zusammenfassend war für die *hPDCs* des Unterkiefers und der Fibula bei Betrachtung der chondrogenen Marker meist eine deutlich höhere Genexpression im Vergleich zur untersuchten unstimulierten Kontrollgruppe detektierbar. Es stellten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede der Genexpression bezüglich *hPDCs* des Unterkiefers und der Fibula heraus. Es waren lediglich leichte Tendenzen feststellbar.

### 3.6.3 Nachweis der Genexpression osteogener Marker

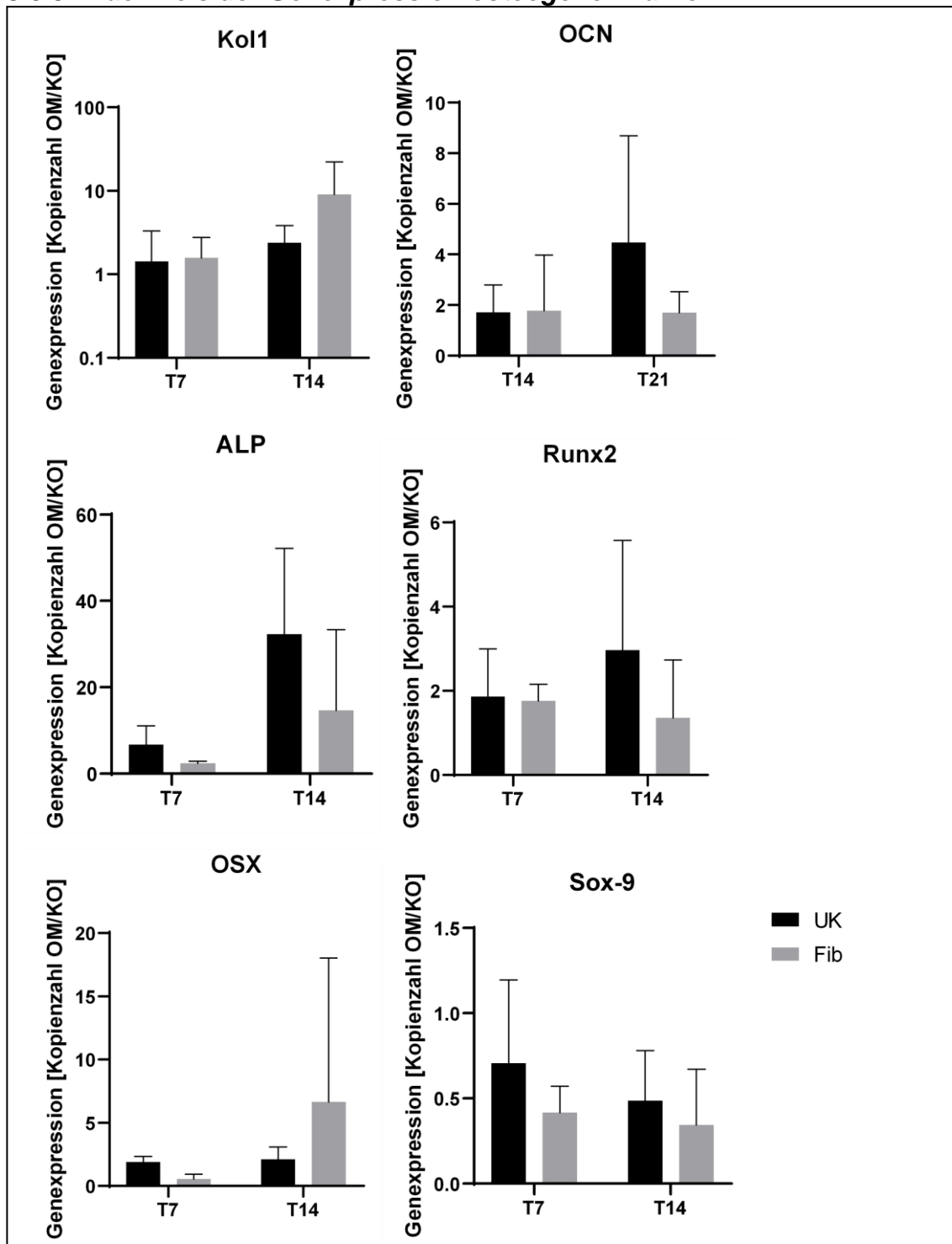


Abbildung 18 – Quantifizierung der Genexpression osteogener Marker (Kol1, OCN, ALP, Runx2, OSX, Sox-9)

OM = Osteogenes Differenzierungsmedium; KO = Kontrollgruppe

UK = Unterkiefer; Fib = Fibula; T = Untersuchungstag

Berechnung der jeweiligen Ergebnisse:

1. Normierung der Kopienzahlen (Kopienzahl genetischer Marker / Kopienzahl GAPDH)

2. Induktion der Genexpression (Normierte Kopienzahlen OM / KO)

[Angabe in Kopienzahlen OM/KO]



Die Quantifizierung der osteogenen Genexpression fand an den Tagen 7, 14 und 21 nach erfolgter osteogener Induktion mittels *RT-qPCR* statt. Die jeweiligen Proben wurden auf die Gene *Kol1*, *Osteocalcin (OCN)*, *ALP*, *Runx2*, *Osterix (OSX)*, *Sox-9* und *Hox-11* getestet.

Für jede Probe wurde eine Normierung der Kopienzahl entsprechend des gemessenen *GAPDH*s-Standards durchgeführt. (Kopienzahl genetischer Marker/ Kopienzahl *GAPDH*).

Anschließend wurden diese normierten Ergebnisse der osteogen induzierten Proben in Relation zu den normierten Ergebnissen der Proben ihrer entsprechenden Kontrollgruppen gesetzt: die sogenannte Induktion der Genexpression (Normierte Kopienzahlen osteogen induzierter Proben/Normierte Kopienzahlen Kontrollgruppen).

*Osteocalcin* ist hierbei ein später Marker osteogener Differenzierung und wurde an den Tagen 14 und 21 betrachtet. Alle weiteren Gene gelten als frühe Marker osteogener Differenzierung. Somit wurden ihre Expressionen an den Tagen 7 und 14 untersucht.

Für die *hPDCs* des Unterkiefers und der Fibula zeigte sich die Genexpression von *Kol1* an Tag 7 ähnlich hochreguliert (UK 1,4; Fibula 1,6). An Tag 14 steigerte sich die Genexpression im Verhältnis zu den Kontrollgruppen. Die Unterkiefer-*hPDCs* zeigten eine 2,4-fach höhere, die Fibula-*hPDCs* eine 9-fach höhere Expression als die jeweiligen Kontrollgruppen.

Die *ALP*-Expression stellte sich ebenfalls mit einer Zunahme an Tag 14 dar. Die Expression der Unterkiefer-*hPDCs* zeigte an Tag 7 eine um das 6,7-fach induzierte, an Tag 14 eine um das 32,3-fach induzierte Genexpression im Vergleich zu ihren jeweiligen Kontrollgruppen. Die Expression der untersuchten Fibula-*hPDCs* zeigte sich an Tag 7 2,4-mal höher, an Tag 14 14,7-mal höher als die jeweilige Kontrollgruppe.

Für die Genexpression von *Osteocalcin* wurde sowohl bei *hPDCs* der Fibula als auch des Unterkiefers eine beinahe konstant erhöhte Genexpression gemessen, die bei den differenzierten Proben ca. um das 1,7-fach höher lag als bei den

Kontrollgruppen. Lediglich an Tag 21 zeigte sich die Expression der Unterkiefer-*hPDCs* um den Faktor 4,5 erhöht.

Die Betrachtung der Genexpression von *Osterix* zeigte für die *hPDCs* des Unterkiefers nur eine minimale Zunahme bei den differenzierten Proben im Vergleich zu den Kontrollgruppen. An Tag 7 war eine Zunahme um den Faktor 1,9, an Tag 14 um 2,1 messbar. Die Genexpression der Fibula-*hPDCs* lag an Tag 7 sogar unterhalb der Werte der jeweiligen Kontrollgruppe, während sich an Tag 14 die Expression 6,6-fach induziert zu ihrer Kontrollgruppe darstellte.

Die Genexpression von *Runx2* zeigte sich für die osteogen differenzierten Proben der Unterkiefer-*hPDCs* an Tag 7 um das 1,9-fache, an Tag 14 um das 3-fache erhöht. Die Betrachtung der Fibula-*hPDCs* im Verhältnis zur Kontrollgruppe zeigte eine 1,8-mal höhere Expression an Tag 7 und eine 1,4-mal höhere Expression an Tag 14.

Bei der Betrachtung der Genexpression von *Sox-9* wiesen sowohl die *hPDCs* des Unterkiefers als auch der Fibula an beiden Untersuchungszeitpunkten eine niedrigere Expression als die jeweilige Kontrollgruppe auf.

Die statistische Analyse der *PCR*-Daten erbrachte keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen ( $p \geq 0,05$ ).

Tabelle 13 – Quantifizierung der Genexpression osteogener Marker  
(Kol1, ALP, OCN, OSX, Runx2, Sox9)  
OM = Osteogenes Differenzierungsmedium; KO = Kontrollgruppe; T = Untersuchungstag  
\* = Signifikanz  $p \leq 0,05$

Berechnung der jeweiligen Ergebnisse:

1. Normierung der Kopienzahlen (Kopienzahl genetischer Marker / Kopienzahl GAPDH)

2. Induktion der Genexpression (Normierte Kopienzahlen OM / KO)

[Angabe in Kopienzahlen OM/KO] Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung

	Kol1	ALP	OCN	OSX	Runx2	Sox9
Unterkiefer T7	1,43 $\pm 1,88$	6,72 $\pm 4,38$	-	1,88 $\pm 0,47$	1,86 $\pm 1,13$	0,71 $\pm 0,49$
Fibula T7	1,57 $\pm 1,19$	2,36 $\pm 0,59$	-	0,54 $\pm 0,39$	1,76 $\pm 0,40$	0,42 $\pm 0,16$
p-Werte	>0,99	0,97		0,99	>0,99	0,63
Unterkiefer T14	2,37 $\pm 1,46$	32,31 $\pm 19,85$	1,71 $\pm 1,09$	2,08 $\pm 1,00$	2,96 $\pm 2,61$	0,49 $\pm 0,30$
Fibula T14	9,02 $\pm 13,24$	14,70 $\pm 18,67$	1,77 $\pm 2,20$	6,64 $\pm 11,40$	1,35 $\pm 1,38$	0,34 $\pm 0,33$
p-Werte	0,53	0,32	>0,99	0,68	0,51	0,93
Unterkiefer T21	-	-	4,46 $\pm 4,22$	-	-	-
Fibula T21	-	-	1,70 $\pm 0,83$	-	-	-
p-Werte			0,42			

Zusammenfassend war für die *hPDCs* des Unterkiefers und der Fibula bei der Betrachtung der osteogenen Marker meist eine deutlich erhöhte Genexpression in den osteogen differenzierten Proben an Tag 14 im Vergleich zu den jeweils untersuchten unstimulierten Kontrollgruppen detektierbar. An Tag 7 zeigte sich diese Erhöhung nur geringfügig. Generell wiesen die untersuchten Proben deutlich schwächer ausgeprägte Erhöhungen der Genexpressionen auf als beispielsweise in der chondrogenen Versuchsreihe. Für Sox-9 wurde sogar konstant eine höhere Expression in den Kontrollgruppen gemessen.

Es stellten sich keine signifikanten Unterschiede der osteogenen Genexpression bezüglich *hPDCs* des Unterkiefers oder der Fibula heraus. Es waren lediglich leichte Tendenzen feststellbar.

## 4 Diskussion

Im Rahmen unserer Studie konnte anhand der untersuchten Oberflächenmarker gezeigt werden, dass die von uns verwendeten *hPDCs* größtenteils die Kriterien der Stammzellencharakteristik von *MSCs* erfüllen. Des Weiteren zeigten sich die *hPDCs* unabhängig ihres Ursprungs hinsichtlich der Expression von Oberflächenmarker immunologisch in vergleichbarer Weise induzierbar.

Bei Betrachtung sowohl des Seneszenz-, als auch des Proliferations-Assays stellten sich die *hPDCs* des Unterkiefers mit überlegenen Eigenschaften dar.

Unsere Forschungsergebnisse bestätigen mithilfe der entsprechenden Färbungen und Genexpressionuntersuchungen eine erfolgreiche adipogene, chondrogene und osteogene Differenzierung der *hPDCs* des Unterkiefers und der Fibula. Die qualitativen Beobachtungen und die quantitativen Auswertungen implizieren ein tendenziell überlegenes adipogenes, chondrogenes und osteogenes Potential der Fibula-*hPDCs*.

### 4.1 Bewertung der CD-Profile der *hPDCs*

#### 4.1.1 Bewertung der untersuchten Oberflächenmarker

Innerhalb unserer Forschungsstudie wurden die *hPDCs* der Fibula und des Unterkiefers auf diverse Oberflächenantigene getestet. Es wurden unter anderem MSC-spezifische Oberflächenantigene untersucht, um die Stammzellencharakteristik der isolierten *hPDCs* nachzuweisen. Laut des minimalen Anforderungskatalogs der *International Society of Cellular Therapy* müssen die *hPDCs* mit mehr als 95% positiv auf die von uns untersuchten CD73, CD90 und CD105 und mit weniger als 2% positiven auf CD45 und HLA-DR getestet werden, um die Stammzellencharakteristik von *MSCs* zu erfüllen.

Die *hPDCs* des Unterkiefers und der Fibula exprimieren die Oberflächenantigene CD73, CD90 und CD105 mit einem Anteil von <89%, was sich zwar als eindeutig positiv darstellt, jedoch nicht die minimalen Anforderungen für *MSCs* erfüllt. Die Expression von CD45 beträgt zwischen 20 und 30% und ist somit ebenfalls nicht

im Einklang mit dem minimalen Anforderungskatalog. Lediglich HLA-DR konnte mit weniger als 2% als eindeutig negativ nachgewiesen werden.

Es gilt jedoch zu bedenken, dass es sich bei den von uns verwendeten *hPDCs* um eine Mischpopulation verschiedener Zelltypen handelt. Es ist nicht eindeutig kontrollier- und nachvollziehbar aus welchen Zelltypen sich eine Zellkultur entwickelt (Alexander et al., 2013, 2010; Hutmacher & Sitterling, 2003; Stich et al., 2017). Als Beweis für eine potenzielle Mischpopulation können die untersuchten Oberflächenmarker CD45 und CD146 aufgeführt werden. CD45 gilt als Marker hämatopoetischer Stammzellen und wurde bei einem Anteil von 20-30% der Zellen detektiert. CD146 wird mit Perizyten assoziiert und wurde bei bis zu 10% der untersuchten *hPDCs* nachgewiesen.

Zusammenfassend wird der minimale Anforderungskatalog der *International Society of Cellular Therapy* an die erforderlichen *MSC*-Oberflächenmarker nur teilweise erfüllt. Dies ist auf die nachgewiesene Mischpopulation zurückzuführen ist. Ähnliche Ergebnisse hinsichtlich unterschiedlicher Subpopulationen bei *hPDCs* erzielten Y.-S. Choi et al. (2008) (Y.-S. Choi et al., 2008). Der Nachweis der Stammzellencharakteristik wird dennoch als erfolgreich angenommen. Dies wird durch die Expression des Oberflächenmarkers CD29 unterstrichen. CD29 gilt als weiterer *MSC*-Marker, der gemeinsam mit CD73 die Migration von *MSCs* beeinflusst (Ode et al., 2011). Seine Expression ist mit >95% ebenfalls als eindeutig positiv zu bewerten und korreliert mit den erforderlichen Stammzellenmarkern.

Des Weiteren konnte entsprechend der *erweiterten Anforderungen für MSCs* sowohl die Adhärenz auf Plastik, als auch das multipotente Differenzierungspotential (siehe 3.5 Nachweis des Induzierten Differenzierungspotentials der *hPDCs*) eindeutig nachgewiesen werden. Die Stammzellencharakteristik der von uns verwendeten *hPDCs* erscheint bewiesen. Deutliche Unterschiede zwischen *hPDCs* des Unterkiefers und der Fibula waren nicht erkennbar.

Als weiterer allgemeiner Oberflächenmarker wurde die Expression von *MSCA-1* untersucht. *MSCA-1*-positive Zellen werden mit Osteoprogenitorzellen in

Kieferperiostzellpopulationen assoziiert. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass Zellpopulationen mit einem höheren Anteil *MSCA-1*-positiver Zellen ein höheres osteogenes Potential aufweisen (Alexander et al., 2010). Die untersuchten Fibula-*hPDCs* zeigten einen 10% höheren Anteil positiver Zellen gegenüber den *hPDCs* des Unterkiefers. Dieser Umstand kann als eine mögliche Erklärung für die signifikant stärker verlaufene osteogene Differenzierung der Fibula-*hPDCs* (siehe 3.5.3 Nachweis der osteogenen Differenzierung) aufgeführt werden.

CD105 ist ein Rezeptor der TGF- $\beta$ -Familie, der speziell mit chondrogener Differenzierung assoziiert wird (Y.-S. Choi et al., 2008). Es wurde eine etwas höhere Expression von CD105 bei den *hPDCs* der Fibula festgestellt. Dies steht im Einklang mit dem detektierten höheren chondrogenen Potential der Fibula-*hPDCs* (siehe 3.5.2 Nachweis der chondrogenen Differenzierung).

#### **4.1.2 Bewertung der immunologischen Oberflächenmarker**

In einem weiteren Telexperiment wurden immunologisch relevante Oberflächenmarker der *hPDCs* nach 7-tägiger pro-inflammatorischer Interferon-Behandlung untersucht.

Die von uns untersuchten Oberflächenantigene HLA-A, HLA-B, HLA-C (HLA-ABC) repräsentieren Moleküle des *Major Histocompatibility Complex* (engl. *MHC*) der Klasse 1. HLA-DR repräsentiert Moleküle der *MHC* Klasse 2 (Neefjes et al., 2011). Diese *MHCs* sind Glykoproteine, die in die Membran von Zellen integriert sind (Cresswell, 1994). Ihre Hauptfunktion besteht in der Aktivierung des Immunsystems durch die Präsentation von Antigenen an der Zelloberfläche (Braciale et al., 1987).

Unsere Ergebnisse zeigten in Folge der simulierten inflammatorischen Reaktion einen deutlichen Anstieg der Expression von *MHC* 1 auf ca. 95% der *hPDCs*. Die Kontrollgruppen wiesen einen Anteil von ca. 70% auf, was aufgrund der allgemeinen Expression bei allen kernhaltigen Zellen durchaus zu erwarten war (Neefjes et al., 2011).

Die Moleküle der *MHC* Klasse 2 werden primär von speziellen Antigen-präsentierenden Zellen exprimiert. Hierzu zählen Makrophagen, B-Zellen und dendritische Zellen. Im Wesentlichen präsentieren diese Zellen extrazelluläre Partikel, die über Endozytose in die Zellen aufgenommen wurden und verstärken durch eine Aktivierung von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen die Immunantwort (Cresswell, 1994; Neefjes et al., 2011).

Unsere Untersuchungen zeigten eine enorme Zunahme des Anteils HLA-DR positiver Zellen unter Interferoneinfluss. Während sich die Kontrollgruppen als praktisch negativ darstellten, exprimierten nach 7-tägiger Interferonbehandlung 90% der Unterkiefer-*hPDCs* und 75% der Fibula-*hPDCs* *MHC* 2. Es lässt sich somit vermuten, dass sich unter Interferoneinfluss antigenpräsentierende Zellen entwickelt haben.

Um die Identität dieser antigenpräsentierenden Zellen potenziell ermitteln zu können, wurden die co-stimulatorischen Oberflächenmarker CD80, CD83 und CD86 untersucht. In Forschungsarbeiten von Dilioglou *et al.* (2003) stellten sich speziell *dendritische Zellen* ab dem zweiten Tag der Kultivierung als positiv für CD80, CD83, CD86, und HLA-DR dar. Es ist jedoch anzumerken, dass hierbei mit unserer Methodik nicht vergleichbare Kultivierungsbedingungen verwendet wurden.

In unseren Ergebnissen war eine Expression der co-stimulatorischen Marker CD80 und CD86 sowohl für die Kontrollgruppe als auch die inflammatorisch induzierten *hPDCs* praktisch nicht detektierbar und sind somit als negativ zu betrachten. Auch die Untersuchung des co-stimulatorischen Markers CD83 konnte sowohl bei *hPDCs* des Unterkiefers als auch der Fibula nur einen sehr dezenten Anstieg der Expression auf <8% feststellen.

In einem weiteren Teil des Experiments wurde der Ras Proximal (*RAP*)-1 Oberflächenmarker untersucht. *RAP*-1 ist eine kleine GTPase, die gehäuft an Zellverbindungen auftritt und Prozesse der Zelladhäsion beeinflusst (Rasmussen et al., 2018). Funktional sind Auswirkungen auf die durch Integrine/Cadherine modulierte Zelladhäsion und eine indirekte Beeinflussung der Immunreaktion bekannt (Bos, 2005; Caron et al., 2000).

Entsprechend ist eine Zunahme der RAP-1 Expression unter Interferoneinfluss anzunehmen. Unsere Ergebnisse zeigten jedoch nur eine geringe Zunahme bei *hPDCs* der Fibula. Die *hPDCs* des Unterkiefers exprimierten unter Interferoneinfluss sogar einen geringeren Anteil *RAP-1*. Diese gegenläufige Entwicklung ist als kontrovers zu betrachten. Aufgrund der generell sehr niedrigen Expression von <20% kann aus den erhobenen Daten keine eindeutige Aussage formuliert werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass mittels Interferon-Behandlung durchaus eine inflammatorische Reaktion simuliert werden konnte, die sich konkret in der Expression von Oberflächenmarker widerspiegelte.

Die erhöhte HLADR-Expression lässt vermuten, dass die Periostzellen antigenpräsentierende Eigenschaften aufweisen. Jedoch zeigten sich die untersuchten co-stimulatorischen Marker als negativ. Die *hPDCs* sind somit nicht in der Lage eine T-Zell Antwort zu aktivieren.

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Unterkiefer- und Fibula-*hPDCs*.

Die Untersuchung der immunologischen Reaktion besitzt bezüglich *TE* folgende Bedeutung: Im Allgemeinen wird bei der Wiederherstellung von Gewebedefekten geeignetes Material transplantiert. Wie bereits beschrieben kann dieses Gewebe aus verschiedenen Quellen stammen (siehe 1.2. Orale Pathologien). Es können körperfremde/künstliche (*alloplastische*) und körpereigene (*autogene*) Gewebe verwendet werden. Des Weiteren können Gewebe derselben Spezies (*allogen*) oder auch Gewebe einer anderen Spezies (*xenogen*) Anwendung finden.

Bei allen Transplantationstechniken besteht jedoch das Risiko eines Transplantatverlusts. Lediglich bei autogenen Transplantaten besteht eher keine Gefahr von Abstoßungsreaktionen. Somit findet idealerweise die Verwendung autogenen Materials Anwendung. Bei Patienten, denen aufgrund ihrer körperlichen Gegebenheiten kein geeignetes Spendermaterial oder auch keine für Gewebezüchtung geeignete Stammzellen entnommen werden können, ist die Anwendung allogener Gewebe eine Möglichkeit. Gerade bei der für uns



relevanten potenziellen Anwendung von allogenen, durch *TE* gezüchteten Transplantaten kann eine durch nicht kompatible Oberflächenmarker und Antigene ausgelöste Immunreaktion letztendlich eine Abstoßung des Transplantats verursachen. Speziell die Kompatibilität der *MHC*-Oberflächenmarker nimmt dabei eine tragende Rolle ein.

Für die Gewebezüchtung bei Anwendung allogener Stammzellen und eine anschließend erfolgreiche Transplantation ist somit eine möglichst gering ausfallende immunologische Reaktion notwendig, um das Risiko einer Abstoßungsreaktion zu minimieren. Diesbezüglich konnten keine relevanten Unterschiede zwischen den *hPDCs* des Unterkiefers und der Fibula detektiert werden. Beide Stammzellenquellen scheinen sich in Bezug auf eine zu erwartende Immunreaktion nicht bedeutend zu unterscheiden.

#### **4.2 Bewertung des Seneszenz-Assays**

Seneszenz definiert das Einstellen von Zellwachstum nach einer gewissen Anzahl an Zellteilungen und somit letztendlich die Stabilität der Zellen in Kultur. *hPDCs* behalten im Allgemeinen ihre Lebensfähigkeit in Kultur über viele Subkulturen oder Passagen hinweg bei. Forschungsergebnisse von De Bari, Dell'Accio & Luyten (2001) implizieren, dass sich ihre Wachstumskurve über einen Zeitraum von 30 Populationsverdopplungen als linear darstellt. Zeichen von Seneszenz konnten erst nach 80 Populationsverdopplungen festgestellt werden (De Bari et al., 2001). Beide Umstände beweisen eindeutig die bei *hPDCs* verhältnismäßig lang ausgeprägten Telomere, die zur Stabilität der *hPDCs* in Kultur beitragen (De Bari et al., 2006). Hier zeigt sich ein weiterer offensichtlicher Vorteil der *PDCs* gegenüber *BM-MSCs*, die bereits in deutlich niedrigeren Passagen verringerte Lebensspannen, Telomerverkürzungen und Seneszenz aufweisen (Stenderup et al., 2003; Stolzing et al., 2008). Vozzi et al. (2016) bestätigten die Stabilität der *hPDC*-Subkulturen. Trotz Abnahme der Proliferationsrate behielten die *hPDCs* ihre metabolische Aktivität nahezu konstant bei. Des Weiteren können *hPDCs* auch noch in hohen Passagen mineralisiertes Gewebe bilden (Ball et al., 2011; Vozzi et al., 2016).

Um herauszufinden inwiefern sich die embryonale Herkunft der *hPDCs* auf ihre Seneszenz auswirkt, führten wir in unserer Forschungsarbeit einen Seneszenz-Assay durch und verglichen die Seneszenz der *hPDCs* von Fibula und Unterkiefer in den Passagen 4 und 5.

Sowohl in Passage 4 als auch in Passage 5 wiesen die *hPDCs* der Fibula im Vergleich zu den *hPDCs* des Unterkiefers eine geringfügig höhere Fluoreszenzintensität auf. Dies ist auf eine erhöhte  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität zurückzuführen und lässt wiederum auf ein tendenziell höheres Seneszenzniveau der Fibula-*hPDCs* schließen. Die *hPDCs* des Unterkiefers stellten sich somit als weniger seneszent und folglich als weniger anfällig für einen Wachstumsstopp in höheren Passagen dar. Ein konstanteres Wachstum ist zu vermuten. Jedoch ist anzumerken, dass in diesem Telexperiment keine signifikanten Unterschiede festzustellen waren und sich die Unterkiefer-*hPDCs* nur als tendenziell überlegen darstellten.

Entgegen der Erwartungen nahm die Seneszenz von Passage 4 zu 5 in unserem Versuchsaufbau ab. Aufgrund der beschriebenen Stabilität der *hPDCs* in Kultur sind allerdings deutliche Unterschiede innerhalb dicht aufeinanderfolgender Passagen - wie in unserem Versuchsaufbau - nicht zu erwarten. Diese kleinen Schwankungen sind vermutlich auf minimale Schwankungen in den Zellkulturbedingungen (z.B. Inkubationszeiten) zurückzuführen.

### **4.3 Bewertung des Proliferations-Verhaltens**

Eine hohe Proliferationsrate gilt als allgemeingültige Voraussetzung für erfolgreiche Gewebezüchtung, da die *in vitro* Zellexpansion einen grundlegenden Bestandteil der *TE*-Techniken darstellt (Roberts et al., 2015). Zur Veranschaulichung: Für die Generierung von Knochengewebe mit einem Volumen von 1 cm<sup>3</sup> werden bis zu 70 Millionen Osteoblasten benötigt (Muschler & Midura, 2002). Aus diesem Grund wurde im Zuge unserer Versuchsaufbauten ebenfalls ein Proliferations-Assay durchgeführt.

Generell zeigten unsere Versuchsdaten für beide Proliferations-Assays mit fortschreitender Zeit eine stetige Zunahme des Proliferationsverhaltens, was die Verlässlichkeit des erhobenen Datensatzes unterstreicht.

Die Ergebnisse beider Methoden zeigten mit zunehmender Versuchsdauer eine überlegene Proliferationskapazität der Unterkiefer-*hPDCs*. Speziell an den Tagen 3 und 4 überragte die absolute Zellzahl der Unterkiefer-*hPDCs* die der Fibula-*hPDCs* deutlich. Bei der Betrachtung des Ez4u-Assays war dieser Unterschied ebenfalls sichtbar, wenn auch weniger stark ausgeprägt. Der durchgeführte Proliferations-Assay mittels Ez4u ließ über die gemessene mitochondriale Aktivität auf das Proliferationsverhalten der *hPDCs* schließen. Diese kann durch Faktoren wie die Anzahl/Dichte der Mitochondrien oder auch durch die metabolische Aktivität der Zellen beeinflusst worden sein. Durch das TC20 Gerät wurde die absolute Zellzahl detektiert. Die dabei erkennbaren deutlicheren Unterschiede sind somit als repräsentativer zu betrachten.

Unsere Hypothese einer überlegenen Proliferationskapazität der *hPDCs* des Unterkiefers erscheint in der Tendenz bewiesen. Sie steht damit im Einklang mit den gemessenen überlegenen proliferativen Eigenschaften der von Park *et al.* (2012) untersuchten Unterkiefer-*PDCs*. Weder in den Datensätzen von Park *et al.* (2012) noch in unseren konnten jedoch Signifikanzen zwischen *PDCs* mesodermalen Ursprungs und Ursprungs in der Neuralleiste festgestellt werden.

#### 4.4 Bewertung des induzierten Differenzierungspotentials der hPDCs

Der zentrale Fokus dieser Studie liegt auf der Untersuchung und dem Vergleich des Differenzierungspotential der *hPDCs* von Unterkiefer und Fibula - repräsentativ für ihren embryologischen Ursprung - hinsichtlich osteogener, chondrogener und adipogener Differenzierung. Die aktuelle Literatur liefert diesbezüglich keine eindeutige Aussage. Einige Publikationen deuten überlegene Eigenschaften von *hPDCs* aus Geweben der Neuralleiste an (Donos et al., 2005; Ichikawa et al., 2015; Leucht et al., 2008; Park et al., 2012; Quarto et al., 2010). Andere Publikationen schlossen aufgrund ihrer Forschungsarbeiten auf ein überlegenes Potential von *hPDCs* mesodermalen Ursprungs (Bilkay et al., 2008; Fujii et al., 2006; Hsiao et al., 2018; Iuchi et al., 2020; Matsushima et al., 2011; Uddströmer, 1978).

Bereits im Frakturheilungsprozess sind Unterschiede je nach embryonalem Ursprung des lokalen Periostgewebes erkennbar. Leucht *et al.* (2008) zeigten Unterschiede der Heilungsprozesse von Unterkiefer- und Schienbeinperiost bei der Untersuchung von Mäusen auf. Sie transplantierten Unterkieferperiost in einen Knochendefekt der Tibia und konnten im Zuge der Heilung direkte Ossifikation feststellen. Umgekehrt dazu differenzierten die *PDCs* der Tibia zu Chondrozyten, wenn sie in einen Unterkieferdefekt transplantiert wurden. Als Fazit formulierten die Autoren, dass Knochen unterschiedlichen embryonalen Ursprungs eine spezifische Stammzellpopulation besitzen müssen, die die Regeneration verletzten Knochengewebes relevant beeinflusst. *PDCs* der Neuralleiste erschienen dabei *in vivo* robusteren Knochen zu bilden (Leucht et al., 2008).

Diese überlegenen Eigenschaften der *hPDCs* aus Geweben der Neuralleiste bestätigten Forschungsarbeiten von Ichikawa *et al.* (2015). Sie verglichen das Knochenbildungspotential von Mausperiost-Proben des Iliums, Femurs, Ober- und Unterkiefers. Nach der Entnahme wurden die Proben an kranialen Knochendefekten der Mäuse replantiert, die den Mäusen im Voraus chirurgisch beigefügt wurden. Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich über 5 Wochen. Mithilfe eines Micro-CTs und histologisch- sowie histochemischen Untersuchungsmethoden wurde das Knochenbildungspotential beurteilt. Des

Weiteren wurden spezifische Genexpressionen untersucht. Sie schlussfolgerten aufgrund ihrer Ergebnisse, dass Knochen und Periost viele Eigenschaften der Neuralleiste beibehalten. Dies ermögliche im Vergleich zu Geweben des Mesoderms, schnellere, extensivere und physiologischere Reparaturen frontaler und parietaler Knochen. Ichikawa *et al.* (2015) priesen Unterkieferperiost als das womöglich optimale Material zur Herstellung von Knochentransplantaten aufgrund der überlegenen Heilungseigenschaften an (Ichikawa et al., 2015).

Quarto *et al.* (2010) untersuchten ebenfalls das Knochenbildungspotential in Mäusen. In einem ähnlichen Teil der Studie wurde *in vivo* das Heilungspotential an artifiziell zugefügten kranialen Knochendefekten der Mäuse beobachtet. Ein weiterer Teil der Studie befasste sich mit den *in vitro* Eigenschaften isolierter Osteoblasten und deren osteogenem Differenzierungspotential. Unter anderem wurde die Aktivität der Alkalischen Phosphatase gemessen, ein Mineralisierungs-Assay mittels Alizarinrot durchgeführt, sowie die Genexpression untersucht. Die Studienergebnisse bewiesen das vergleichsweise höhere osteogene Differenzierungspotential des Schädelknochens, der embryonal ebenfalls von der Neuralleiste abstammt (Quarto et al., 2010).

Park *et al.* (2012) verglichen verschiedene Entnahmestellen unter anderem auf adipogene, chondrogene und osteogene Differenzierung. Sie untersuchten *in vitro* Kaninchenzellen stammend von Unterkieferperiost, Unterkieferknochenmark, Schienbeinperiost und Schienbeinknochenmark. Die *hPDCs* des Unterkiefers wiesen dabei die höchste Proliferationsrate, das höchste osteogene Potential und ein überlegenes chondrogenes Potential auf. Abschließend empfahlen sie analog zu Leucht *et al.* (2008) die Verwendung von *hPDCs* des Unterkiefers als erste Wahl bei möglichen Anwendungen im kraniofazialen Bereich. (Park et al., 2012)

Lohberger *et al.* (2013) führten bereits Versuchsreihen durch, die mit unserem Versuchsaufbau vergleichbar sind Sie isolierten mesenchymale Stroma- und Progenitorzellen der posterioren Maxilla, der Linea obliqua, der Zahnpulpa sowie des Unterkieferperiosts. Sie untersuchten die Zellen auf Oberflächenantigene mittels Durchflusszytometrie und auf ein induzierbares Differenzierungspotential

bezüglich adipogener, chondrogener und osteogener Differenzierung. Die Langzeitexpansion zeigte ein tendenziell höheres Wachstumspotential des Unterkiefers, während die chondrogene Differenzierung des Unterkiefers verhältnismäßig schlechter ausfiel. Alles in allem war jedoch kein signifikanter Unterschied der Gewebe bezüglich der betrachteten Parameter erkennbar (Lohberger et al., 2013). Daraus lässt sich ableiten, dass die von uns durchgeführte Studie durchaus für *orale Entnahmestellen im Allgemeinen* repräsentative Ergebnisse liefert.

An dieser Stelle ist festzuhalten, dass einige Studien durchaus widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich einer Überlegenheit von *hPDCs* mit Ursprung in der Neuralleiste ermittelt haben.

Beispielsweise verglichen Hsiao *et al.* (2018) das Periost von Rippe, Calvaria, Femur und Tibia innerhalb einer *in vivo* Studie. Es wurden entnommene Periostgewebe mit synthetisierten *Scaffolds* in Ratten implantiert. Dabei wurden höhere *Osteocalcin* und *Alkalin-Phosphatase* Level sowie eine bessere Knochenregeneration bei Femur- und Tibiaperiost beobachtet. Beide sind mesodermalen Ursprungs.

Mehrere Forschungsgruppen befassten sich mit Periost der Tibia und der Calvaria (Bilkay et al., 2008; Fujii et al., 2006; Uddströmer, 1978). Alle konstatierten dem Tibiaperiost in Anbetracht ihrer Forschungsergebnisse ein höheres osteogenes Potential als dem aus der Neuralleiste stammenden Periost der Calvaria. Uddströmer *et al.* (1978) beobachtete sogar ein siebenfach höheres Potential des Tibiaperiosts.

Iuchi *et al.* (2020) und Matsushima *et al.* (2011) entnahmen in einem beinahe identischen Versuchsaufbau Kälber-Periost des Kraniums, Unterkiefers, Radius sowie des Iliums. Sie transplantierten diese auf *Scaffolds* subkutan in den dorsalen Bereich von Mäusepfoten. Es wurde ein potenzieller Einfluss der Periostquelle auf die Knochen und Knorpelbildung untersucht. Es erfolgten makroskopische, radiologische und histochemische Beurteilungen der Versuchsergebnisse.

Die Beobachtungen von Iuchi *et al.* (2020) bestätigten erneut die intrinsische Veranlagung des Röhrenknochenperiosts zur chondralen Ossifikation und die gleichzeitige Veranlagung des Periosts der kraniofazialen Region zu intramembranöser Ossifikation. Iuchi *et al.* (2020) beobachteten eine überlegene Knochenbildung und Chondrozyten-Reifung speziell bei dem transplantierten Radius-Periost (Iuchi *et al.*, 2020). Bei der Forschungsarbeit von Matsushima *et al.* (2011) zeigte sich die Knochen- und Knorpelbildung des Krania-Periosts am stärksten, die des Unterkiefer-Periosts am schwächsten (Matsushima *et al.*, 2011).

Beide Studienergebnisse zeigten somit lediglich eine Abhängigkeit des Differenzierungspotentials hinsichtlich der Entnahmekategorie. Aus den Versuchsergebnissen konnte kein allgemeingültiger Zusammenhang des Differenzierungspotentials in Bezug auf eine detektierte intramembranöse/chondrale Ossifikation abgeleitet werden. Weder die Periostproben resultierend in intramembranöser Ossifikation, noch die Periostproben resultierend in chondraler Ossifikation wiesen einen allgemeingültigen Vorteil auf.

Nichtsdestotrotz ist anzumerken, dass es sich bei diesen Studien ausschließlich um *in vivo* durchgeführte Tierstudien an Ratten/Kaninchen/Mäusen handelt und nur die Studien von Iuchi *et al.* (2020) und Matsushima *et al.* (2011) den Unterkiefer als Entnahmestelle in Betracht zogen. Daher ist der Vergleich mit unserem Versuchsaufbau nur unter Vorbehalt möglich. Des Weiteren wurde im Gegensatz zu unserer Versuchsdurchführung ausschließlich das Periostgewebe in seiner Gesamtheit entnommen und untersucht. Es fand keine Unterscheidung der gewebespezifischen Zellen und auch keine Isolation von *hPDCs* statt. Die Versuche wurden mit einer unseparierten Mischpopulation aus beiden Schichten des Periostgewebes durchgeführt. Resultierend lassen sich die Ergebnisse der oben genannten Studien nur bedingt mit den von uns untersuchten, durch Plastik-Adhärenz weitestgehend spezifisch isolierten *hPDCs* vergleichen.

Zudem ist anzunehmen, dass sich die Eigenschaften der jeweiligen spezie-individuellen Gewebe (Maus, Kaninchen, Kalb) im Vergleich zu menschlichen

Proben unterscheiden. Auch innergewebliche Zustände wie Blut- und Nährstoffversorgung oder auch auftretende Immunreaktionen und deren Einfluss sind *in vivo* deutlich schwerer bis nahezu gar nicht kontrollierbar. Beispielsweise wurde in der Studie von Bilkay *et al.* (2008) das kraniale Periost und Tibiaperiost an verschiedenen Stellen reimplantiert. Da das Tibiaperiost an einer Körperstelle mit höherer mechanischer Belastung transplantiert wurde, ist ein bestehender Vorteil gegenüber dem kranialen Periost nicht auszuschließen. Eine belastete Umgebung fördert durch den auftretenden mechanischen Stress die osteogene Kapazität (Romana & Masquelet, 1990). In unserer *in vitro* Studie hingegen ist eine Eliminierung potenzieller Störfaktoren durch einheitliche Versuchsdurchführungen weitestgehend gegeben und die erzielten Ergebnisse repräsentativ.



#### **4.4.1 Bewertung der adipogenen Differenzierung**

Die qualitative Beurteilung konnte bei allen Zellkulturen sowohl der Unterkiefer-*hPDCs* als auch der Fibula-*hPDCs* eine erfolgreiche adipogene Differenzierung nachweisen. Unabhängig des embryonalen Ursprungs konnte die Bildung von Fettvakuolen durch die verwendete Ölrot O-Färbung eindeutig bestätigt werden. Bezüglich der Bewertung einer potenziellen Überlegenheit von *hPDCs* des Unterkiefers/Fibula konnten rein qualitativ keine deutlichen Unterschiede ausgemacht werden.

Die anschließend erfolgte Quantifizierung der Ölrot O-Färbung zeigte an allen Untersuchungstagen eine höhere, jedoch nicht signifikant höhere Konzentration des Ölrot Farbstoffs bei den Fibula-*hPDCs*. Die *hPDCs* der Fibula wiesen somit ein *tendenziell höheres adipogenes Potential* auf als die *hPDCs* des Unterkiefers.

Park *et al.* (2012) verglichen ebenfalls verschiedene Entnahmestellen unter anderem auf ihr Potential zur adipogenen Differenzierung. Dabei stellten sich im Gegensatz zu unseren Ergebnissen die *PDCs* des Unterkiefers tendenziell leicht überlegen dar. In beiden Versuchsreihen sind jedoch keine signifikanten Unterschiede festzustellen, sodass die geringen Abweichungen unter Umständen auf die Unterschiede der angewandten Methodik (Startpunkt und Zeitraum der adipogenen Differenzierung, Zelldichte, adipogenes Medium, etc...) zurückzuführen sind.

Wie bereits beschrieben (siehe 3.5.1 Nachweis der adipogenen Differenzierung) wurden die Ergebnisse der Kontrollgruppen bei der adipogenen Differenzierung nicht weiter berücksichtigt. In Bezug auf die Quantifizierung wiesen die Kontrollgruppen höhere Absorptionswerte und Konzentrationen von Ölrot O auf. Die mikroskopische Betrachtung der Zellkulturen zeigte in den Kontrollgruppen ausgebildete Fettvakuolen, die in ihrer Größe denen der adipogen-induzierten *hPDCs* unterlegen waren. Jedoch überragte ihre Anzahl und Dichte.

Als mögliche Erklärung ist aufzuführen, dass mit den von uns gewählten Kulturbedingungen, insbesondere mit dem von uns gewähltem Kontrollmedium, offensichtlich eine adipogene Differenzierung stattgefunden haben muss. Die adipogene Kontrollgruppe zeigte sich somit im Gegensatz zu den chondrogenen

und osteogenen Kontrollgruppen *nicht* als negativ. Aus diesem Grund erschien der Vergleich von adipogen induzierten Proben und der Proben der Kontrollgruppen als nicht repräsentativ und wurde daher nicht in die Auswertung eingeschlossen.

Mithilfe der *RT-qPCR* wurden die für die adipogene Differenzierung charakteristischen Gene *LPL*, *Leptin* und *PPAR* untersucht.

Die Lipoproteinlipase (*LPL*) nimmt eine zentrale Rolle im Fettstoffwechsel bei der Verarbeitung ungesättigter Fettsäuren ein (Mead et al., 2002). *LPL* gilt dabei als genereller Marker adipogener Differenzierung (Ambele et al., 2016).

*Leptin* wird ebenfalls überwiegend in Zellen des Fettgewebes (Adipozyten) exprimiert. *Leptin* gilt als später Marker der Adipozytendifferenzierung und stellt einen charakteristischen Phänotypen reifer Adipozyten dar (Ambele et al., 2016).

Die Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (*PPARs*) werden unter anderem in Fettgeweben exprimiert. Eine Aktivierung von *PPAR* resultiert in einer Differenzierung von Präadipozyten zu reifen Adipozyten (Ferré, 2004). Somit ist *PPAR* analog zu *Leptin* den späten Marker adipogener Differenzierung zuzuordnen (Ambele et al., 2016).

Unsere Ergebnisse lieferten keine signifikanten Unterschiede der untersuchten Genexpressionen zwischen den *hPDCs* des Unterkiefers und der Fibula. Die vorhandene erhöhte Genexpression im Vergleich zu den Kontrollgruppen unterstreicht den durch die Ölrot-Färbung (siehe 3.5.1 Nachweis der adipogenen Differenzierung) bereits eindeutig nachgewiesenen Erfolg der adipogenen Differenzierung. Tendenziell erscheinen die *hPDCs* des Unterkiefers die von uns untersuchten adipogenen Gene früher zu exprimieren als die entsprechenden *hPDCs* der Fibula. Dies deutet auf eine schneller verlaufene adipogene Differenzierung hin. Die mikroskopischen Untersuchungen während des Versuchsverlaufs konnten diese Vermutung jedoch nicht bestätigen. Es zeigten sich in der Mikroskopie keine erkennbaren Hinweise auf eine frühere adipogene Differenzierung der Unterkiefer-*hPDCs*. Eine mikroskopische Beurteilung der ausgebildeten Fettvakuolen ist jedoch ohne eine Anfärbung limitiert.

Es ist als kontrovers zu betrachten, dass die *hPDCs* des Unterkiefers an Tag 15 eine geringere Genexpression als die Kontrollgruppen für *LPL* und *Leptin* zeigten. *PPAR* zeigte sich sogar für fast alle Werte mit einer geringeren Expression als die adipogen induzierten Proben. Eine mögliche Erklärung hierfür stellen wiederum die Kontrollgruppen dar, die wie bereits erwähnt ebenfalls eine erfolgreiche adipogene Differenzierung durchliefen.

Hinsichtlich der aktuellen Literatur gibt es keine weiteren Veröffentlichungen, die das adipogene Differenzierungspotential von *hPDCs* mit Ursprung in der Neuralleiste und *hPDCs* mesodermalen Ursprungs verglichen haben.

Lediglich eine gesteigerte Expression der adipogenen Gene *PPAR*, *LPL* und *Leptin* wurde bei *PDCs* nach erfolgter adipogener Induktion bereits bewiesen (Y.-S. Choi et al., 2008) und deckt sich mit unseren Ergebnissen.

#### **4.4.2 Bewertung der chondrogenen Differenzierung**

Ein qualitativer Nachweis der erfolgreichen chondrogenen Differenzierung erfolgte durch die durchgeführte Toluidine-Färbung. Unabhängig des embryonalen Ursprungs wurden die Glukosaminoglykane (*GAG*) als Bestandteile der chondrogenen Extrazellulärmatrix (*EZM*) positiv angefärbt. Es war bei allen Donoren ein deutlicher Unterschied zu den negativ gefärbten Kontrollgruppen erkennbar. Die chondrogenen *Pellets* der Fibula-*hPDCs* erschienen im Vergleich zu den *Pellets* der Unterkiefer-*hPDCs* etwas prominenter gefärbt. Gleichzeitig beobachteten wir bereits makroskopisch eine stärkere Größenzunahme bei den *Pellets* der chondrogen induzierten Fibula-*hPDCs*. Dies konnte bei anschließenden Messungen der *Pellet*-Größen quantifiziert werden.

Des Weiteren wurde der *GAG*-Gehalt der *Pellets* untersucht. Standardmäßig wird der *GAG*-Gehalt in der Literatur im Verhältnis zur gemessenen DNA-Menge dargestellt (*GAG/DNA*). Im Gegensatz zu diversen anderen Studien (Garcia et al., 2016; Solorio et al., 2010) korrelierten unsere makroskopischen Beobachtungen hinsichtlich der chondrogenen Differenzierung nicht mit den gemessenen *GAG/DNA*-Relationen. Am höchsten zeigte sich das *GAG/DNA*-Verhältnis bei der Fibula-Kontrollgruppe, gefolgt von der Unterkiefer-Kontrollgruppe und der chondrogen induzierten Proben der Unterkiefer-*hPDCs*. Die chondrogen induzierten Fibula-*hPDCs* zeigten sogar das niedrigste *GAG/DNA*-Verhältnis, obwohl die absolute Menge an gemessenem *GAG* bei den chondrogen induzierten Fibula-*hPDCs* am höchsten ausfiel.

In unserer Versuchsreihe schien die gemessene Menge an DNA somit einen unverhältnismäßig hohen ausschlaggebenden Faktor darzustellen. Es zeigte sich, dass die erfolgreich chondrogen differenzierten Zellen den Erwartungen entsprechend eine hohe Menge an *GAG* produzierten. Gleichzeitig aber wiesen sie eine übermäßige Menge an DNA auf. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen zeigten sich in den Vergleichsstudien die DNA-Mengen sowohl in den Kontrollgruppen als auch den differenzierten Proben beinahe konstant (Garcia et al., 2016; Solorio et al., 2010). Die Versuchsreihe von C. H. Zheng & Levenston (2015) erfasste ebenfalls Schwankungen bei den gemessenen DNA-

Konzentrationen. Sie führten ihre GAG-Werte u.a. je Probe, je *Pellet* und als Anteil an der Gesamtmasse auf (Zheng & Levenston, 2015).

Um eine mit unseren Beobachtungen übereinstimmende Darstellungsweise der GAG-Messungen wählen zu können, entschieden wir uns dazu den GAG-Anteil an der Gesamtproteinmasse und die GAG-Menge pro *Pellet* zu untersuchen.

Der GAG-Anteil an der Gesamtproteinmasse zeigte sich bei den *hPDCs* der Fibula deutlich erhöht im Vergleich zu den Unterkiefer-*hPDCs*. Bei Betrachtung der durchschnittlichen GAG-Menge pro *Pellet* konnten sogar *signifikant* höhere Werte bei den chondrogen induzierten Fibula-*hPDCs* festgestellt werden. Diese Ergebnisse korrelierten mit unseren Beobachtungen hinsichtlich einer ausgeprägteren chondrogenen Differenzierung der Fibula-*hPDCs*.

Zusammenfassend zeigten die induzierten *hPDCs* eine erfolgreiche chondrogene Differenzierung. Die Quantifizierungen der *Pellet*-Größen, des GAG/Protein- und GAG/*Pellet*-Gehaltes bestätigten analog zu den qualitativen Beobachtungen ein *überlegenes chondrogenes Potential der Fibula-hPDCs*. Lediglich der GAG/DNA Index korreliert nicht mit unseren sonstigen Ergebnissen. Y.-S. Choi *et al.* (2008) implizieren einen Zusammenhang zwischen einer Expression des Oberflächenmarkers CD105 und dem chondrogenen Potential von *hPDCs* (Y.-S. Choi *et al.*, 2008). Im Einklang mit ihrer Hypothese konnten wir eine höhere Expression des CD105 bei den Fibula-*hPDCs* feststellen.

Hinsichtlich unserer Bewertung der chondrogenen Differenzierung stimmen die Ergebnisse größtenteils mit Publikationen der aktuellen Literatur überein. Bei Versuchsreihen von Park *et al.* (2012) überragte Analog zu unseren Ergebnissen das chondrogene Potential der *PDCs* mesodermalen Ursprungs.

Iuchi *et al.* (2020) und Matsushima *et al.* (2011) bestätigen diese Erkenntnis. Es gilt allerdings zu bedenken, dass in dem gewählten Versuchsaufbau keine chondrogene Differenzierung explizit induziert wurde. Die eingebrachten Proben wurden ihrem natürlichen Ossifikationsweg überlassen. Somit erscheint die festgestellte erhöhte Anzahl reifer Chondrozyten bei den Röhrenknochen als nicht verwunderlich.

In der Versuchsreihe von Lohberger *et al.* (2013) zeigte sich das chondrogene Potential der Unterkiefer-*hPDCs* als unterlegen im Vergleich zu den verwendeten Proben des Oberkiefers und der Zahnpulpa. Lohberger *et al.* (2013) führten diese Erkenntnis ebenfalls auf die intrinsische Veranlagung des Unterkiefers bezüglich intramembranöser Ossifikation zurück.

Mithilfe der *RT-qPCR* wurden die für die chondrogene Differenzierung charakteristischen Gene *Sox-9*, *COMP*, *Kol2*, *Kol10* und *Kol11* untersucht.

Das *Sox-9* (*engl. Sex Determining Region Y-Box9*) wird speziell in chondrogenen Progenitorzellen und reifen Chondrozyten exprimiert. Es aktiviert die Bildung weiterer Proteine der chondrogenen Extrazellulärmatrix (*EZM*), die die Grundlage für eine erfolgreiche Bildung von Knorpelgewebe darstellen, wie *Kollagen 2* und *COMP* (Trowe *et al.*, 2010). Aus diesem Grund gilt *Sox-9* als ein früher Marker chondrogener Differenzierung (Yi *et al.*, 2018).

Das *Cartilage Oligomeric Matrix Protein* (*COMP*) ist ein Glykoprotein der *EZM* von Knorpel, Sehnen und Ligamenten und zählt zu den spät exprimierten chondrogenen Markern (Briggs & Chapman, 2002; Yi *et al.*, 2018).

Wir untersuchten ebenfalls die Expression von *Kollagen 2*, das analog zu *COMP* den späten Markern chondrogener Differenzierung zugeordnet wird. Im Wesentlichen wird *Kollagen 2* zur Ausbildung der *EZM* synthetisiert und bildet den strukturellen Hauptbestandteil von Knorpelgewebe (Goessler *et al.*, 2004).

An Tag 14 zeigte sich eine deutlich erhöhte Expression von *Sox-9* und analog dazu eine erhöhte Expression von *COMP* und *Kol2* in den chondrogen-induzierten *hPDCs*. *Sox-9* scheint, wie in der Literatur beschrieben, die Expression der beiden *EZM*-Proteine zu fördern. Für *COMP* an Tag 14, sowie für *Kol2* an beiden Untersuchungstagen wurde eine höhere Genexpression bei den chondrogen differenzierten *hPDCs* der Fibula in Relation zur Genexpression in den Kontrollgruppen gemessen. Dies impliziert eine stärker ausgeprägte Bildung chondrogener *EZM* bei den kultivierten Fibula-*hPDCs* und korreliert direkt mit den gemessenen, signifikant größeren *Pellets* (siehe 3.5.2 Nachweis der chondrogenen Differenzierung). Auch in der Forschungsarbeit von Matsushima

*et al.* (2011) zeigte sich die *Kol2*-Expression in den Proben des Unterkieferperiosts sowohl an den Messpunkten nach 10-wöchiger, als auch 20-wöchiger Transplantation als geringer und steht somit im Einklang mit der von uns detektierten geringeren *Kol2*-Expression der Unterkiefer-*hPDCs* (Matsushima *et al.*, 2011).

Das untersuchte *Kollagen 11* gilt als Marker für die Dedifferenzierung von Chondrozyten und ist in diesem Zusammenhang als später Marker in kultivierten Chondrozyten detektierbar. Goessler *et al.* (2004) formulierten einen Zusammenhang zwischen der Hochregulierung von *Kollagen 11* bei einer gleichzeitigen Deregulation von *Kollagen 2* (Goessler *et al.*, 2004). Unsere Ergebnisse konnten diese Hypothese bestätigen. Die erhöhte Genexpression von *Kol11* an Tag 21 resultierte in einer verringerten Genexpression des *Kol2*-Gens an Tag 21 im Verhältnis zu den erhobenen Werten an Tag 14.

Kollagen des Typs 10 gilt als charakteristisch für hypertrophe Chondrozyten. Hypertrophie wird dem späten Stadium der Differenzierung zugeordnet. Somit kann *Kollagen 10* ebenfalls als später Marker für chondrogene Differenzierung betrachtet werden (Goessler *et al.*, 2004). Unsere Ergebnisse bestätigten eine erhöhte Expression an Tag 21. Des Weiteren untersuchten Nehrlich & Teegen (2012) einen Zusammenhang zwischen dem Glukosaminoglykangehalt und der Hypertrophie von *MSCs*. Sie beschrieben eine Abnahme des GAG-Gehalts in hypertroph induzierten Chondrozyten (Nehrlich & Teegen, 2012). Die *Kol10* Genexpression im Verhältnis zu den Kontrollgruppen zeigte sich in unseren erhobenen Daten speziell an Tag 21 bei den *hPDCs* des Unterkiefers deutlich höher als bei den *hPDCs* der Fibula. Vermutlich entwickelten sich die Unterkiefer-*hPDCs* vermehrt zu *hypertrophen* Chondrozyten. Die Ergebnisse unserer GAG/Protein- und GAG/Pellet- Quantifizierung bestätigen den potenziell durch die Hypertrophie verringerten GAG-Gehalt der Unterkiefer-*hPDCs*.

Die qualitative mikroskopische Betrachtung der Mikrotom-Schnitte konnte allerdings das vermutete Auftreten hypertropher Chondrozyten nicht eindeutig bestätigen. Zum Nachweis einer Hypertrophie ist eine Dimethylenblau-Färbung, analog zu der angewandten Methodik von Nehrlich & Teegen (2012), deutlich

besser geeignet als die von uns verwendete Toluidine-Färbung. Das Toluidinblau färbte die GAG-haltige EZM an und ermöglichte somit den verlässlichen Nachweis einer erfolgreichen chondrogenen Differenzierung. Sie erfüllte somit die Anforderungen an den Hauptfokus unserer Arbeit, erschwerte jedoch gleichzeitig die Beurteilung der tatsächlichen Zellgrößen.

Zusammenfassend bestätigt der erhobene Datensatz größtenteils die in der aktuellen Literatur publizierten Beobachtungen (Iuchi et al., 2020; Lohberger et al., 2013; Matsushima et al., 2011; Park et al., 2012). Als kritisch sind jedoch die aufgetretenen, teilweise großen Standardabweichungen der untersuchten Gene zu betrachten. Resultierend konnten lediglich tendenzielle und keine signifikanten Unterschiede zwischen *hPDCs* des Unterkiefers und der Fibula bezüglich chondrogener Genexpression festgestellt werden.

Nichtsdestotrotz konnte sowohl bei den *hPDCs* des Unterkiefers als auch der Fibula für alle untersuchten Gene eine deutlich erhöhte Expression in den chondrogen induzierten Proben im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen festgestellt werden. Diese induzierte Genexpression bestätigt eine erfolgreiche Differenzierung der *hPDCs* zu Chondrozyten. Sie unterstreicht den positiven Nachweis Knorpel-spezifischer Glukosaminoglykane mittels Toluidine Färbung (siehe 3.5.2 Nachweis der chondrogenen Differenzierung).

Speziell für *Kollagen 2* zeigten die Fibula-*hPDCs* eine im Vergleich zu den Unterkiefer-*hPDCs* enorm gesteigerte Induktion der Genexpression. Kollagen 2 gilt als Hauptbestandteil chondrogener EZM und repräsentiert potenziell die größte Aussagekraft für eine erfolgreiche chondrogene Differenzierung. Des Weiteren zeigten Unterkiefer-*hPDCs* eine erhöhte Induktion des *Kol10*-Gens, das mit Hypertrophie und einem verringerten GAG-Gehalt assoziiert ist. Diese Vermutungen korrelieren mit den Beobachtungen und Quantifizierungen der chondrogen differenzierten *hPDCs*, die ein erhöhtes chondrogenes Potential der Fibula-*hPDCs* implizieren (siehe 3.5.2 Nachweis der chondrogenen Differenzierung; *GAG/Protein*, *GAG/Pellet*, *Pellet-Größe*).

Zusammenfassend lässt sich somit ein überlegenes chondrogenes Potential der Fibula-*hPDCs* bestätigen.



#### **4.4.3 Bewertung der osteogenen Differenzierung**

Die qualitative Betrachtung der Alizarin-Färbung zeigte eine deutliche Unterlegenheit der Unterkiefer-*hPDCs*. Für 2 der 4 Donoren war kein Unterschied in den Alizarin-Färbungen der Kontrollgruppen und den osteogen induzierten *hPDCs* des Unterkiefers ersichtlich. Eine osteogene Differenzierung dieser *hPDCs* konnte somit durch die Alizarin-Färbung nicht dargestellt werden. Eine Wiederholung der Färbung der Wells zeigte keine anderen Ergebnisse. Auch in einem durchgeführten Zweitversuch mit vorangegangenem Gelatine-Coating der Wells konnten über die Alizarin-Färbung bei den Donoren 1 und 3 keine Präzipitate in den osteogen-induzierten Zellkulturen der Unterkiefer-*hPDCs* mithilfe des Alizarins nachgewiesen werden. Über die gesamte Versuchsdauer hinweg zeigten sich keine Anzeichen für eine mögliche Kontamination oder das Auftreten anderer Störfaktoren, wie beispielsweise ein Ablösen der Zelladhäsion in den entsprechenden Wells, die die osteogene Differenzierung negativ beeinflusst haben könnten. Alle *hPDC*-Kulturen zeigten ein gesundes Wachstum.

Es bleibt letztlich unklar, weshalb bei den Donoren 1 und 3 eine Quantifizierung der osteogenen Differenzierung mittels Alizarin-Färbung nicht möglich war. Bei der Untersuchung der MSC-Charakteristika und der MSC-spezifischen Oberflächenmarker konnten jedenfalls keine deutlichen Unterschiede bei den Unterkiefer-*hPDCs* der Donoren 1 und 3 im Vergleich zu den restlichen Proben festgestellt werden. Lediglich für *MSCA-1* zeigten 16,92% der Unterkiefer-*hPDCs* von Donor 1 eine positive Expression, was deutlich unterhalb des Durchschnitts der restlichen Donoren lag (38,74%). Da Zellpopulationen mit einem niedrigeren Anteil *MSCA-1*-positiver Zellen ein niedrigeres osteogenes Potential aufweisen, stellt dies eine mögliche Erklärung für die schlechtere osteogene Differenzierung der Unterkiefer-*hPDCs*, insbesondere des ersten Donoren, dar (Alexander et al., 2010). Oberbauer *et al.* (2016) untersuchten Stammzellen des Fettgewebes hinsichtlich ihres chondrogenen Differenzierungspotentials. Bei der Betrachtung von 9 Donoren zeigten 5 eine gute chondrogene Differenzierung, während die Zellen von 4 Donoren keine entsprechende chondrogene Differenzierung zeigten. Von diesen wiederum bildeten Zellen von 3 Donoren *Pellets*, deren Durchmesser denen der 5 anderen Donoren deutlich unterlegen waren.

Oberbauer *et al.* (2016) entwickelten einen kurzen Screening-Test auf Basis von Luciferasen zur Kategorisierung der Donoren hinsichtlich ihres chondrogenen Differenzierungspotentials (Oberbauer *et al.*, 2016). Eine ähnliche Methodik zur Vorabuntersuchung des osteogenen Differenzierungspotentials potenzieller Donoren wäre vorteilhaft. Bei Betrachtung der Ergebnisse sowohl der chondrogenen Differenzierung als auch der adipogenen Differenzierung ließen sich jedoch keine deutlichen Unterschiede zwischen den Unterkiefer-*hPDCs* der Donoren 1 und 3 zu denen der Donoren 2 und 4 erkennen.

Nichtsdestotrotz erschienen die Präzipitate der mineralisierten Extrazellulärmatrix (*EZM*) unabhängig der untersuchten Donoren bei allen Fibula-*hPDCs* vergleichsweise stärker durch Alizarin angefärbt.

Die Quantifizierung der Alizarin-Färbung konnte diese qualitativen Beobachtungen bestätigen. Es zeigte sich eine signifikant höhere Alizarin - Konzentration bei den *hPDCs* der Fibula im Vergleich zu den *hPDCs* des Unterkiefers. Das osteogene Potential der von uns untersuchten Fibula-*hPDCs* ist als überlegen zu betrachten. Diese Schlussfolgerung korreliert mit dem gemessenen höheren Anteil *MSCA-1*-positiver Zellen in den Kulturen der Fibula-*hPDCs*. Wie bereits beschrieben (siehe 4.1.1 Bewertung der allgemeinen Oberflächenmarker), scheint die *MSCA-1* Expression einen möglichen Indikator für das osteogene Differenzierungspotential der Kieferperiostzellen darzustellen (Alexander *et al.*, 2010).

Es gilt jedoch zu beachten, dass das Unterkiefer-Periost und somit auch die *hPDCs* des Unterkiefers gegenüber denen der Fibula in unserem Versuchsaufbau aufgrund mehrerer Faktoren benachteiligt erscheinen, die im weiteren Verlauf genauer erörtert werden (siehe 4.5 Kritische Beurteilung): Das gewonnene Unterkiefer-Periost lag in direkter Nachbarschaft zu einer pathologischen Veränderung, die einen invasiven Eingriff erforderte. Bei einem der Donoren war sogar ein Zweiteingriff notwendig und somit wurde die Periostentnahme in potenziell vernarbtem Gebiet durchgeführt. In diesem Zuge war das Unterkiefer-Periostgewebe zwangsweise einer längeren Operationszeit ausgesetzt als das Periost der Fibula. Zudem ist Periost des Unterkiefers im

Gegensatz zum Fibula-Periost über die Lebenszeit hinweg unweigerlich dem direkten Kontakt zu oralen Noxen, wie beispielsweise Nikotin und Alkohol, ausgesetzt.

Mithilfe der *RT-qPCR* wurden die für osteogene Differenzierung charakteristischen Gene *Kol1*, *Osteocalcin* (*OCN*), *ALP*, *Runx2*, *Osterix* (*OSX*), *Sox-9* und *Hox11* untersucht.

Die osteogene Differenzierung von Stammzellen kann *in vitro* in 3 Phasen unterteilt werden. Man unterscheidet die Proliferationsphase, die Bildung der *EZM* und abschließend die Mineralisation der gebildeten *EZM*. Jeder Phase können individuell charakteristische Genmarker zugeordnet werden (Birmingham et al., 2012). Die Produktion von *Kol1* wird zu den Anfangsereignissen während der osteogenen Differenzierung gezählt, gefolgt von der Expression von *ALP* und *OCN* (Tamura et al., 2001). Abschließend findet die Mineralisierung der gebildeten *EZM* statt (Stein & Lian, 1993).

*Kol1* gilt als früher Marker der Osteogenese. Exprimiert wird das Gen ausschließlich in Osteoblasten, Odontoblasten und Fibroblasten (Rossert et al., 2000). Funktional gilt *Kol1* als Voraussetzung für eine erfolgreiche Differenzierung von Osteoblasten (Franceschi et al., 1994).

Unsere Untersuchungen konnten generell eine nachweisbar höhere *Kol1*-Genexpression in den osteogen differenzierten *hPDCs* feststellen. Speziell an Tag 14 zeigten die *hPDCs* der Fibula eine deutlich höher induzierte Expression des *Kol1*-Gens im Vergleich zu den *hPDCs* des Unterkiefers. Dieser Umstand steht im Einklang mit der gemessenen signifikanten Überlegenheit der Fibula-*hPDCs* bei der Alizarin-Quantifizierung. Matsushima *et al.* (2011) untersuchten die Genexpression von *Kol1* nach 10- und 20-wöchiger Transplantation. Dabei zeigten die Unterkiefer-Periostproben nach 10 Wochen die vergleichsweise höchste, nach 20 Wochen die niedrigste Expression. Nur die Ergebnisse der Messungen nach 20 Wochen korrelieren mit unseren Ergebnissen.

Als ein weiteres Protein der osteogenen *EZM* wurde *Osteocalcin* (*OCN*) untersucht. *Osteocalcin* stellt das am häufigsten in der *EZM* von Knochen

vorkommende, nicht-kollagenöse Protein dar. Es wird ausschließlich von *reifen* Osteoblasten und Osteozyten produziert und gilt somit als später Indikator der osteogenen Differenzierung.

Auch für *OCN* konnte eine konstant höhere Genexpression in den osteogen induzierten *hPDCs* im Vergleich zu den Kontrollgruppen nachgewiesen werden. An Tag 21 wurde eine höher induzierte Genexpression bei den *hPDCs* des Unterkiefers festgestellt. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen der Alizarin-Quantifizierung. Offensichtlich hat bei den Unterkiefer-*hPDCs* trotz der schwächeren Ergebnisse der Alizarin-Färbung eine gute osteogene Differenzierung stattgefunden. Insbesondere da *OCN* als einer der verlässlichsten Marker für Knochenbildung gilt (Karsenty, 1998). Hypothetisch ist nicht auszuschließen, dass die Färbung speziell der Unterkiefer-*hPDCs* der Donoren 1 und 3 zu einem späteren Zeitpunkt positiv ausgefallen wären.

Es ist jedoch anzumerken, dass trotz seiner hohen Bindungsaffinität zu mineralisierter osteogener *EZM*, die tatsächliche Funktion des *OCNs* kontrovers diskutiert wird. Einige Veröffentlichungen beschrieben bereits, keinen Einfluss des *OCNs* auf die Mineralisierung erkennen zu können. (Karsenty, 1998; Murshed et al., 2004). Analog zu diesen Studienergebnissen konnten auch wir keinen direkten Zusammenhang zwischen der *OCN*-Induktion und der Mineralisierung feststellen.

Als ein weiterer früher Marker der Osteogenese wurde die Expression der *Alkalischen Phosphatase (ALP)* untersucht. Das Enzym erfüllt eine kritische Rolle bei der Bildung von Hartgeweben, wie beispielsweise bei der anfänglichen Kalzifizierung von Knochengewebe (Turksen & Aubin, 1991). Mit fortschreitender Mineralisierung des Knochens verringert sich die Expression des *ALPs* zunehmend (Vimalraj, 2020). Regulierend wirken u.a. die Transkriptionsfaktoren *Runx2* und *Osterix* (Salazar et al., 2016).

Die untersuchten *hPDCs* zeigten an Tag 14 eine deutliche induzierte Expression von *ALP* in den osteogen differenzierten Proben. Die gemessene Induktion der Unterkiefer-*hPDCs* zeigte sich hierbei mehr als doppelt so hoch wie die Induktion der jeweiligen Fibula-*hPDCs*. Dies korreliert ebenfalls entgegen o.g. Alizarin-

Quantifizierung mit den Ergebnissen der *OCN*-Genexpression und unterstreicht die erfolgreiche osteogene Differenzierung der Unterkiefer-*hPDCs*.

*Runx2* (engl. runt-related transcription factor 2) gilt als Hauptregulator osteogener Differenzierung. Gemeinsam mit *Osterix* zählt *Runx2* zu den Transkriptionsfaktoren, die für die Expression von *ALP* als essenziell gelten. Des Weiteren ist *ALP* notwendig für die Differenzierung von Osteoblasten und Chondrozyten und somit für den gesamten Prozess der Knochenbildung. Speziell *Osterix* wird in Osteoblasten sowohl während der chondralen als auch der intramembranösen Bildung von Knochen exprimiert. Zeitlich folgt *Osterix* in direktem Anschluss auf *Runx2* (Nakashima et al., 2002). Beide Transkriptionsfaktoren gelten als frühe Marker der osteogenen Differenzierung.

An Tag 14 zeigte sich die Genexpression von *Osterix* bei den *hPDCs* der Fibula deutlich stärker induziert im Vergleich zu den *hPDCs* des Unterkiefers. Demgegenüber zeigte sich bei der Untersuchung von *Runx2* an Tag 14 eine mehr als doppelt so hohe Induktion bei den Unterkiefer-*hPDCs* im Vergleich zu den Fibula-*hPDCs*. Nur die induzierte Genexpression von *Osterix* korreliert mit der beobachteten und quantifizierten Mineralisierung. Insgesamt deutete die Genexpression von *OCN*, *ALP*, *Sox-9* und *Runx2* auf eine bessere osteogene Differenzierung der Unterkiefer-*hPDCs* hin und das obwohl bei 50% der Donoren keine Differenzierung durch die Alizarinfärbung bei den *hPDCs* des Unterkiefers nachgewiesen werden konnte.

Quarto et al. (2011) untersuchten den prozentualen Anstieg der Genexpression von *Osteocalcin*, *ALP* und *Runx2* nach erfolgter osteogener Differenzierung. Die *PDCs* mesodermalen Ursprungs zeigten im Gegensatz zu unseren Messungen eine vorzeitige Erhöhung der *Osteocalcin* Expression und generell eine gesteigerte *ALP* Expression. Unter Umständen zeigten unsere Fibula-*hPDCs* ebenfalls eine frühzeitige Erhöhung der *Osteocalcin* Expression. Eine Auswertung des späten Markers osteogener Differenzierung beispielsweise an Tag 7 ist zukünftig in Betracht zu ziehen.

Hinsichtlich der Expression von *Runx2* stellten sich die jeweilig verwendeten Periostproben mesodermalen Ursprungs sowohl bei den Forschungsarbeiten

von Quarto *et al.* (2011) als auch von Matsushima *et al.* (2011) im Gegensatz zu unseren Ergebnissen als überlegen dar. Ihre Untersuchungsmethoden unterscheiden sich jedoch grundlegend von unseren (Untersuchungszeitraum, Proben, *PCR*, Entnahmestellen, *in-vivo* Versuchsaufbau).

Wie bereits beschrieben (siehe 4.4.2 Bewertung der chondrogenen Differenzierung) wird das *Sox-9* (*engl. Sex Determining Region Y-Box9*) speziell in chondrogenen Progenitorzellen und reifen Chondrozyten exprimiert. Des Weiteren gilt *Sox-9* als ein entscheidender Faktor für die *in vitro* Differenzierung menschlicher *MSCs* zu Osteoblasten und kann als ein verlässlicher Marker in der frühen Phase osteogener Differenzierung betrachtet werden (Loebel *et al.*, 2015).

Hinsichtlich der beiden Ossifikationswege entdeckten Loebel *et al.* (2015) folgenden Zusammenhang. Speziell beim Prozess der *endochondralen* Knochenbildung zeigte sich eine Zunahme der *Sox-9* Expression, was die Entwicklung chondrogener/osteogener Progenitorzellen entscheidend beeinflusst (Zhou *et al.*, 2006). Eine Abnahme der *Sox-9* Expression konnte demgegenüber im Zuge der *intramembranösen* Ossifikation festgestellt werden. Analog zu den Ergebnissen von Loebel *et al.* (2015) detektierten wir eine Abnahme der induzierten Genexpression von *Sox-9* in den osteogen differenzierten *hPDCs* an Tag 14 im Vergleich zu den Messwerten an Tag 7.

Des Weiteren verglichen Ichikawa *et al.* (2015) die *Sox-9* Expression von Periostproben mesodermalen Ursprungs (Femur, Ilium) mit Periostproben des Unterkiefers und zeigten eine höhere Zunahme der Expression für die Unterkieferproben. Analog zeigen unsere Ergebnisse eine höhere Expression für *Sox-9* in *hPDCs* des Unterkiefers als die entsprechenden *hPDCs* der Fibula.

Loebel *et al.* (2015) formulierten die Hypothese, dass das *Runx2/Sox-9* Verhältnis einen frühen Indikator zur aussagekräftigen Beurteilung der osteogenen Kapazität humaner *MSCs* darstellen kann (Loebel *et al.*, 2015). An Tag 7 errechnete sich für unsere Daten ein *Runx2/Sox-9* Index von 2,62 für die *hPDCs* des Unterkiefers und ein Wert von 4,19 für die *hPDCs* der Fibula. Dieser beinahe doppelt so hohe Index der Fibula-*hPDCs* korreliert direkt mit der

festgestellten signifikant höheren Mineralisierung. Unsere Studienergebnisse scheinen somit die Hypothese von Loebel *et al.* (2015) zu bestätigen.

Als weiteres charakteristisch osteogenes Gen wurde die Expression von *Hox11* untersucht. Hox-Gene übernehmen als Transkriptionsfaktoren wichtige Funktionen in der Bildung des Achsenskeletts und der Extremitäten, wie beispielsweise der Fibula (Boulet & Capecchi, 2004). In den Knochen eines Erwachsenen wird *Hox11* ausschließlich von MSCs des Knochenmarks und des Periosts exprimiert (Rux *et al.*, 2016).

Die von uns durchgeführte *qPCR* konnte in keiner der untersuchten Proben eine Expression von *Hox11* nachweisen. Offensichtlich exprimierten die verwendeten *hPDCs* *Hox11* zu schwach, um mit unserer Methodik nachgewiesen werden zu können. In unserer Forschungsgruppe wurde zum ersten Mal versucht eine *Hox11*-Expression zu detektieren. Unter Umständen ist eine Anpassung der gewählten *qPCR*-Methodik notwendig. Leucht *et al.* (2008) verwendeten Materialien anderer Hersteller und untersuchten die *PCR*-Produkte mittels 2% Agarose-Gels auf die notwendige Spezifität und die zu erwartende Größe.

Ausgenommen *Sox-9* und *Hox11* konnte generell für fast alle in osteogenem Medium kultivierten *hPDCs* eine höhere Expression osteogener Gene im Verhältnis zu den jeweiligen Kontrollgruppen festgestellt werden. Dies unterstreicht die erfolgreiche Differenzierung der *hPDCs* zu Osteoblasten. Jedoch stehen nur die beobachtete erhöhte Induktion von *Kol1* und *Osterix* in einem direkten Zusammenhang mit den gemessenen höheren Werten der Alizarinquantifizierung der Fibula-*hPDCs*. Für die Gene *OCN*, *ALP* und *Runx2* ergaben sich höhere Induktionswerte bei den Unterkiefer-*hPDCs*.

Des Weiteren konnten hinsichtlich der Genexpression keine deutlichen Unterschiede zwischen den Unterkiefer-*hPDCs* der mit Alizarin gut gefärbten Donoren 2 & 4 und den schlecht gefärbten Donoren 1 & 3 festgestellt werden. Dies beweist eine erfolgreiche osteogene Differenzierung aller osteogen induzierter Unterkiefer-Kulturen. Es ist zu vermuten, dass eine Kultivierungszeit über den von uns gewählten Beobachtungszeitraum von 21 Tagen hinaus in einer nachweisbaren Mineralisierung der Unterkiefer-*hPDCs* der Donoren 1 und

3 resultieren würde. Beispielsweise wählten Loebel *et al.* (Loebel *et al.*, 2015) einen Untersuchungszeitraum bis an Tag 28.

Zudem lieferten unsere Ergebnisse Hinweise auf das Potential des *Runx2/Sox-9* Verhältnisses zur Vorhersage der Mineralisierungskapazität.

Generell konnten keine signifikanten Unterschiede in der osteogenen Genexpression zwischen *hPDCs* des Unterkiefers und der Fibula festgestellt werden.

Betrachtet man die osteogene Differenzierung bezüglich einer mittels Alizarin-Färbung nachweisbaren Ausbildung von Präzipitaten, so stellten sich die Fibula-*hPDCs* - repräsentativ für *hPDCs* mesodermalen Ursprungs – als überlegen dar.

Dieses Ergebnis ist somit als Bestätigung der Studien von Bilkay *et al.* (2008), Fujii *et al.* (2006), Hsiao *et al.* (2018), Iuchi *et al.* (2020), Matsushima *et al.* (2011) und Uddströmer (1978) anzusehen.

In Bezug auf die osteogenen Marker (d.h. *OCN*, *ALP*, *Runx2*) zeigten jedoch die Unterkiefer-*hPDCs* überlegene Tendenzen. Bisherige Publikationen fokussierten hauptsächlich die qualitative und quantitative Beurteilung einer Ossifikation. Nur die Forschungsarbeiten von Matsushima *et al.* (2012), Quarto *et al.* (2009), und Ichikawa *et al.* (2015) untersuchten eine vergleichbare Auswahl an osteogenen Genen. Diesbezüglich sind somit weitere Untersuchungen erforderlich.

Wie bereits beschrieben (siehe 4.4 Bewertung des Induzierten Differenzierungspotentials der *hPDCs*) gilt es zu bedenken, dass es sich bei diesen Vergleichsstudien um grundlegend unterschiedliche Versuchsaufbauten und -durchführungen handelt. Von den verwendeten Spezies-individuellen Gewebe und der Differenzierung zwischen *in vivo* und *in vitro* Experimenten, über die Entnahme des zu untersuchenden Gewebes bis hin zu den gewählten Auswertungsmethoden unterscheiden sich die Studien untereinander und von unserer hier aufgeführten Forschungsarbeit. Speziell hinsichtlich der von uns verwendeten *humanen* Periostproben fehlen jegliche Vergleichsstudien.



#### 4.5 Kritische Beurteilung

Bezüglich der von uns ursprünglich formulierten Hypothesen kann folgendes resümiert werden:

*Der embryonale Ursprung des Periostgewebes resultiert in unmittelbaren Unterschieden bezüglich in vitro Eigenschaften und Differenzierungspotential der hPDCs*

1. *hPDCs* des Unterkiefers entspringen der Neuralleiste und zeigen eine intramembranöse Ossifikation in der embryonalen Entwicklung:

→ *Unterkiefer-hPDCs zeigen ein höheres osteogenes Potential in vitro.*

→ *Hypothese 1 konnte anhand der Quantifizierung der Zellmineralisierung nicht bestätigt werden, wobei die Ergebnisse der osteogenen Genexpressionen darauf hindeuten*

2. *hPDCs* der Fibula, entspringt dem Mesoderm und zeigen eine chondrale Ossifikation in der embryonalen Entwicklung:

→ *Fibula-hPDCs zeigen ein höheres chondrogenes Potential in vitro.*

→ *Hypothese 2 konnte bestätigt werden*

3. Der Unterkieferknochen weist auf Grund der mechanischen Belastung während der Mastikation eine vergleichsweise hohe Knochenremodellierungsrate auf:

→ *Unterkiefer-hPDCs zeigen höhere Proliferationsraten in vitro.*

→ *Hypothese 3 konnte bestätigt werden.*

Als zentrales Ziel der hier vorliegenden Studie galt der Vergleich der *in vitro* Eigenschaften, darunter des Differenzierungspotentials, von *hPDCs*. Verglichen wurden *hPDCs* unterschiedlichen embryonalen Ursprungs. *hPDCs* des Unterkiefers wurden stellvertretend für Zellen der Neuralleiste, *hPDCs* der Fibula stellvertretend für Zellen des Mesoderms untersucht.

Unser Versuchsaufbau unterscheidet sich entscheidend von der beschriebenen aktuellen Literatur. Bei einem Großteil der themenverwandten Publikationen handelt es sich um *in vivo* durchgeführte Tierstudien (Bilkay et al., 2008; Donos

et al., 2005; Fujii et al., 2006; Hsiao et al., 2018; Ichikawa et al., 2015; Iuchi et al., 2020; Leucht et al., 2008; Matsushima et al., 2011; Uddströmer, 1978). Lediglich in wenigen Studien wurde der Unterkiefer als Entnahmestelle in Betracht gezogen (Iuchi et al., 2020; Matsushima et al., 2011). Die individuellen Eigenschaften der untersuchten Spezies und den jeweiligen Knochengeweben beeinflussen die erhobenen Ergebnisse. Ein Vergleich mit unserer Versuchsdurchführung ist dadurch nur eingeschränkt möglich. Durch die einheitliche Durchführung der Studie *in vitro* konnten potenziell beeinflussende Faktoren, wie die Blut- und Nährstoffversorgung oder auch auftretende Immunreaktionen ausgeschlossen werden. Zudem konnten Einwirkungen spezies-individueller Eigenschaften durch die Verwendung ausschließlich menschlicher (humaner) *PDCs* verhindert werden.

Es gibt keine Forschungsarbeit, in der das Differenzierungspotential des Periosts bei menschlichen Proben bezüglich des embryonalen Ursprungs verglichen wurde. Bisherige Studien befassten sich ausschließlich mit tierischen Geweben. Als ein weiterer Vorteil unserer Studie kann die minimierte Donorvariation aufgeführt werden. Die isolierten *hPDCs* sowohl des Unterkiefers als auch der Fibula stammten aus ein und demselben Donor, was die Verlässlichkeit der erhobenen Daten erheblich verbessert. Im Zuge eines operativen Eingriffs zur Unterkieferrekonstruktion mittels Fibula-Transplantat konnten die jeweiligen Periostproben entnommen werden.

Des Weiteren wurde das Differenzierungspotential der *hPDCs* hinsichtlich ihres adipogenen, chondrogenen *und* osteogenen Potentials beurteilt, wohingegen in den meisten Publikationen der Fokus lediglich auf dem osteogenen Differenzierungswege lag (Bilkay et al., 2008; Donos et al., 2005; Fujii et al., 2006; Hsiao et al., 2018; Ichikawa et al., 2015; Leucht et al., 2008; Quarto et al., 2010; Uddströmer, 1978). Zudem fand die Auswertung der induzierten Zellkulturen sowohl mittels *qualitativen* als auch *quantitativen* Analysen statt.

Somit ist unsere Forschungsarbeit auf diesem Gebiet als Vorreiter anzusehen. Weitere Studien speziell mit humanen *PDCs* zur kritischen Auseinandersetzung mit unseren Ergebnissen sind anzustreben.

Es gilt jedoch zu bedenken, dass Einflüsse des jeweiligen Gewebezustands, aus denen die Periostproben unmittelbar entnommen wurden, auf die Eigenschaften der isolierten *hPDCs* nicht auszuschließen sind. Das verwendete Periost des Unterkiefers wurde aus einem vorbelasteten Operationsgebiet entnommen. Der Eingriff fand bei allen Donoren im Zuge von Erkrankungen mit Beteiligung des Unterkiefers statt (Plattenepithel-Karzinom, Plattenepithel-Karzinom-Rezidiv, Ameloblastom). Zwar wurden die Periostproben des Unterkiefers ausschließlich aus distanten und gesunden Kieferabschnitten entnommen, dennoch kann ein negativer Einfluss der in unmittelbarer Nachbarschaft gelegenen Pathologie, z.B. durch Narbenbildung oder chronische Entzündungsmediatoren, auf die Qualität der gewonnenen *hPDCs* nicht vollständig ausgeschlossen werden. Speziell bei einer sekundären Rekonstruktion des Unterkiefer-Defekts hat sich in Folge des Ersteingriffs Narbengewebe auch im Bereich des Periosts gebildet. Narbengewebe stellt lediglich einen Ersatz für das zu Verlust gegangene Ursprungsgewebe dar, was unweigerlich einen Funktionsverlust zur Folge hat.

Demgegenüber wurden die Periostproben der Fibula aus praktisch vollständig gesundem Gewebe entnommen, das sich zur Rekonstruktion des Unterkiefer-Defekts eignete. Des Weiteren ist nicht zu vernachlässigen, dass der Unterkiefer über die Lebensdauer hinweg mit oralen Noxen in Kontakt gerät. In diesem Zuge sind v.a. Nikotin und Alkohol zu nennen, die beide über eine hohe Schleimhautgängigkeit verfügen. Das Periost im Unterkiefer ist diesen Noxen somit direkt ausgesetzt, während das Periost der Fibula praktisch keinen direkten Kontakt aufweist. Eine negative Beeinflussung der Eigenschaften ist zu vermuten. Das Fibulagewebe ist somit dem Unterkiefergewebe bezüglich seiner physiologischen Integrität überlegen. Gleichzeitig stellt dies jedoch für die klinische Anwendung der *hPDCs* einen großen Nachteil dar. Das Unterkieferperiost ist in seiner Zugänglichkeit der Fibula weit überlegen und es kann weitestgehend auf eine zusätzliche Morbidität (*engl. donor site morbidity*) verzichtet werden kann.

Als ein weiterer Einflussfaktor auf die Qualität des von uns verwendeten Periosts ist die Operationsdauer aufzuführen. Gerade bei Operationen mit primärer/sekundärer Rekonstruktion des Unterkiefers handelt es sich in der

Regel um komplizierte mehrstündige Eingriffe, bei denen das Periost nach Darstellung des Operationsgebietes freiliegt. Eine dadurch zunehmende Austrocknung des Periosts wirkt sich unweigerlich negativ auf dessen Eigenschaften und auf die Eigenschaften der anschließend isolierten *hPDCs* aus. Der überwiegende Teil der Eingriffszeit bei den von uns verwendeten Donoren belief sich dabei auf die Entfernung der Pathologie im Unterkiefer, sodass ein erhöhtes Risiko speziell der Austrocknung für das Periost des Unterkiefers im Vergleich zum Periost der Fibula besteht.

Diese Umstände können eine potenzielle Ursache für die detektierten überlegenen Eigenschaften der Fibula-*hPDCs* hinsichtlich des Differenzierungspotentials darstellen.

Als ein weiterer kritischer Gesichtspunkt kann die Problematik der Mischpopulation aufgeführt werden. Es kann nicht mit vollständiger Sicherheit der exakte Ursprung der aus den Periostproben isolierten Zelltypen nachgewiesen werden. Diese Problematik unterschiedlicher Subpopulationen konnte in anderen Studien ebenfalls festgestellt werden (Y.-S. Choi et al., 2008). Es ist in dieser Hinsicht keine genaue Kontrolle der Zusammensetzung der Zellpopulationen und Auswirkungen auf deren Eigenschaften in den Kulturen möglich. Beispielsweise wurde der mit Perizyten assoziierte Oberflächenmarker CD146 bei 10% der untersuchten Zellen detektiert. CD45 gilt als ein Marker hämatopoetischer Stammzellen und wurde sogar bei einem Anteil von 20-30% der Zellen nachgewiesen. Es handelt sich bei den in unserem Versuchsaufbau verwendeten Zellkulturen somit nicht um reine *hPDC*-Kulturen, wobei sich keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen gezeigt haben. Ein Einfluss hämatopoetischer Zellen, Perizyten und eventuell weiterer Zelltypen auf die Eigenschaften der Zellkulturen ist zu vermuten.

Bezüglich der Genexpressionen ist folgendes zu beobachten:

Gene weisen während der osteogenen Differenzierung *in vitro* keine konstante Expression auf. Die Expression nimmt in der Regel bis zu einem bestimmten Maximum an Tag x zu, um danach wiederum abzufallen oder zeigen einen welligen Verlauf. Für die untersuchten Gene sind je nach Charakteristik und

Funktion während der frühen beziehungsweise späten Phase der osteogenen Differenzierung die Maxima der Expression zu erwarten. Idealerweise kann die Expression an diesen Maxima untersucht und innerhalb der Donoren repräsentativ verglichen werden. Da die Genexpressionen allerdings gewissen Schwankungen unterliegen (welliger Verlauf), kann nicht gewährleistet werden, dass die allgemeingültigen Untersuchungs-Zeitpunkte an Tag 7/14/21 die jeweiligen Höhepunkte der Expression bei jedem Donor tatsächlich darstellen.

Beispielsweise gilt *ALP* als ein früher Marker osteogener Differenzierung mit einer zu vermutenden maximalen Expression ca. am 7. Tag der Kultivierung. Es ist allerdings nicht unwahrscheinlich, dass einige *hPDC*-Kulturen eine maximale *ALP*-Expression bereits an Tag 5 oder 6, beziehungsweise erst an Tag 8 oder 9 aufweisen.

Die Auswirkungen individueller patientenabhängiger Faktoren sind entscheidend. Diesem Umstand kann nur über engere Untersuchungszeiträume entgegengewirkt werden. Die in der Literatur gängigen Untersuchungszeiträume an Tag 7,14 und 21 gelten als wissenschaftlich anerkannt (M. H. Choi et al., 2011).

#### 4.6 Ausblick

In zukünftigen Forschungsarbeiten sollte versucht werden, die Problematik der Mischpopulation einzugrenzen. Beispielsweise könnten Zellkulturen aus einzelnen *hPDCs* gezüchtet werden. Die entstehende homogene Zellkultur besteht anschließend aus einem einzelnen Zelltyp, der nach genauer Untersuchung der Oberflächenmarker eindeutig der jeweiligen Zellpopulation zugeordnet werden kann. Allerdings sind nachteilig enorm viele Zellteilungen notwendig, um eine für die Forschungsarbeit verwertbare Anzahl an *hPDCs* zu generieren (Y.-S. Choi et al., 2008). Die daraus resultierende hohe Zell-Seneszenz wirkt sich unweigerlich negativ auf die Eigenschaften der *hPDCs* aus. Dieses Verfahren ist somit für eine mit unserem Versuchsaufbau vergleichbare Studie nicht praktikabel.

Zudem sollten sich insbesondere für einen repräsentativen Vergleich der Unterkiefer- und der Fibula-*hPDCs* beide Entnahmeorte ohne pathologische Vorerkrankungen in der direkten Nachbarschaft darstellen, wodurch sich allerdings unweigerlich die Donorvariation erhöht. Des Weiteren wäre eine repräsentativere Abbildung des Bevölkerungsschnittes bei den Donoren wünschenswert.

Um eine präzisere Untersuchung der Genexpressionen erzielen zu können, sind potenziell enger gewählte Messpunkte angeraten.

In Bezug auf die Seneszenz wurden in unserer Studie nur die Passagen 4 und 5 betrachtet. Forschungsergebnisse von De Bari, Dell'Accio & Luyten (2001) implizieren, dass sich deutliche Anzeichen von Seneszenz in *hPDC*-Kulturen erst ab 80 Verdoppelungen der Zellpopulation erkennen lassen (De Bari et al., 2001). Somit wäre ein Vergleich in höheren Passagen durchaus interessant.

Des Weiteren lieferte die Untersuchung der Kol10-Induktion einen Hinweis auf die Entwicklung der Unterkiefer-*hPDCs* zu hypertrophen Chondrozyten, was mit der gemessenen verringerten GAG-Menge korreliert. Eine Beurteilung der vermuteten Hypertrophie kann in zukünftigen Arbeiten idealerweise über eine Dimethylenblau-Färbung der mikroskopischen Schnitte erfolgen.

Speziell in Bezug auf das festgestellte erhöhte chondrogene Potential der Fibula-*hPDCs* formulierten Autoren bereits einen möglichen Zusammenhang mit der vorhandenen absoluten Zellanzahl in der Kambium-Schicht des Periosts (Gallay et al., 1994). Diese Hypothese und ein potenzieller Zusammenhang mit dem allgemeinen Differenzierungspotential sind in zukünftigen Studien zu überprüfen.

Zudem implizieren unsere Ergebnisse, dass das *Runx2/Sox-9* Verhältnis in der Tendenz durchaus einen frühen Indikator zur aussagekräftigen Beurteilung der osteogenen Kapazität der *hPDCs* darstellen kann. Auch diese Hypothese sollte in zukünftigen Studien erneut und an einer höheren Patientenzahl überprüft werden.

Hinsichtlich einer Verwendung der *hPDCs* in Bezug auf *TERM* stellten sich die *hPDCs* sowohl des Unterkiefers als auch der Fibula als geeignet dar. Die *hPDCs* beider embryonaler Ursprünge erfüllen allgemein die notwendigen Anforderungen an zu verwendende Stammzellen hinsichtlich Differenzierungspotential, Stabilität in Kultur, Proliferationsfähigkeit, Produktion bioaktiver Stoffe und die Möglichkeit einer Verwendung in Kombination mit *Scaffolds*. Die *hPDCs* mesodermalen Ursprungs zeigten generell ein höheres Differenzierungspotential hinsichtlich Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten. Klinisch relevant sind v.a. das chondrogene und osteogene Differenzierungspotential, die sich beide bei den *hPDCs* mesodermalen Ursprungs teilweise signifikant höher zeigten.

Interessanterweise wiesen die *hPDCs* mit Ursprung aus der Neuralleiste ein höheres Proliferationsverhalten bei einer gleichzeitig niedrigeren Seneszenz auf. Da grundsätzlich im Zuge der klinisch relevanten Gewebezüchtung eine enorm hohe Anzahl an Zellen benötigt wird, sind speziell die Proliferationsfähigkeit und die Kulturstabilität entscheidende Faktoren.

Bezüglich klinischer Anwendbarkeit ist des Weiteren eine Untersuchung der Biokompatibilität von *in vitro* entwickelten Geweben essenziell für die Verhinderung von Immunreaktionen und möglicher Transplantatabstoßungen.

Wie bereits beschrieben (siehe 4.1.2 Bewertung der immunologischen Oberflächenmarker) ist die Anwendung von aus allogenen Stammzellen gezüchtetem Gewebe eine Möglichkeit, Gewebsdefekte bei Patienten zu ersetzen, denen aufgrund ihrer körperlichen Gegebenheiten weder geeignetes Spendermaterial noch für *TE* geeignete Stammzellen entnommen werden können. Die immunregulatorischen Eigenschaften isolierter *hPDCs* sollten in diesem Kontext zwingend weiter untersucht werden.

Zusammenfassend zeigten sich die *hPDCs* beider embryonaler Ursprünge als geeignet für die Anwendung bei aktuellen *TE*-Techniken. Die *hPDCs* mit Ursprung in der Neuralleiste zeigten bessere proliferative Fähigkeiten bei Anzeichen für eine höhere Stabilität in Kultur. Die *hPDCs* mesodermalen Ursprungs zeigten wiederum überlegenes Differenzierungspotential.

Es ist von entscheidender Bedeutung, die ideale Zellquelle mit den optimalen Eigenschaften für die Verwendung sowohl *in vivo* als auch *in vitro* zu identifizieren. Hierfür sollten in zukünftigen Forschungsarbeiten u.a. weitere Entnahmestellen des Periosts untersucht und verglichen werden. Gerade bei geringfügigen Unterschieden bezüglich der Eigenschaften sollte letztlich die Zugänglichkeit des jeweiligen Entnahmeorts hinsichtlich potenziell auftretender Komplikationen die Entscheidung nach der optimalen Zellquelle ausschlaggebend prägen.



## 5 Zusammenfassung

Es wurden bereits diverse Forschungsarbeiten mit Fokus auf die Untersuchung von periostalen Progenitorzellen (*PDCs*) unterschiedlicher embryonaler Ursprünge durchgeführt. Es gilt dabei, *PDCs* mit embryonalem Ursprung in der Neuralleiste gegenüber *PDCs* mesodermalen Ursprungs zu vergleichen. Einige Studien lieferten erste Hinweise auf potenziell überlegene Eigenschaften von *PDCs* der Neuralleiste, während andere Versuchsergebnisse eine Überlegenheit von *PDCs* mesodermalen Ursprungs implizieren. Diesbezüglich kann die aktuelle Literatur keine eindeutige Aussage formulieren.

Als Ziel der hier vorliegenden Dissertation galt der Vergleich der *in vitro* Eigenschaften und des Differenzierungspotentials von humanen *PDCs* des Unterkiefers (intrinsische Veranlagung zu intramembranöser Ossifikation) und der Fibula (intrinsische Veranlagung zu chondraler Ossifikation). Dabei konnten im Zuge eines operativen Eingriffs zur Unterkiefer-Rekonstruktion mittels osteomyokutanem Fibulalappen die benötigten Periostproben aus demselben Donor gewonnen werden. Hierdurch konnte die Donorvariation minimiert und die Verlässlichkeit der erhobenen Datensätze gestärkt werden.

Innerhalb unserer Forschungsarbeit wurden die *hPDCs* bezüglich Oberflächenantigene, Seneszenz und Proliferationsverhalten untersucht. Des Weiteren wurde das adipogene, chondrogene und osteogene Differenzierungspotential der *hPDCs* mittels qualitativer als auch quantitativer Methoden beurteilt und ausgewertet. In diesem Zuge fand eine Bestimmung der Expression relevanter Gene an verschiedenen Zeitpunkten statt.

Durch die Untersuchung *MSC*-spezifischer Oberflächenmarker und weiterer festgelegter Oberflächenmarker entsprechend dem offiziellen Anforderungskatalog zur Identifikation von Stammzellen, konnte zunächst die Stammzellencharakteristik der von uns isolierten *hPDCs* sowohl des Unterkiefers als auch der Fibula bestätigt werden.

Zudem wurden im Zuge dieser Versuchsreihe immunrelevante Oberflächenmarker untersucht. Hierzu wurde eine inflammatorische Reaktion durch eine Kultivierung der *hPDCs* mit Interferon provoziert. Es konnte eine

gesteigerte Expression entsprechender Oberflächenmarker nachgewiesen werden. Die erhöhte HLADR-Expression lässt vermuten, dass die Periostzellen antigenpräsentierende Eigenschaften aufweisen. Die untersuchten co-stimulatorischen Marker zeigten sich jedoch negativ. Die *hPDCs* sind somit nicht in der Lage eine T-Zell Antwort zu aktivieren. Deutliche Unterschiede in der Ausprägung waren nicht festzustellen.

Der Hauptfokus unserer Arbeit galt dem Differenzierungspotential der *hPDCs*. Die *hPDCs* konnten unabhängig ihres embryonalen Ursprungs erfolgreich zu Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten differenziert werden. Die erfolgte Differenzierung konnte zudem durch eine nachweislich gesteigerte Expression der charakteristischen Gene im Verhältnis zur untersuchten Kontrollgruppe unterstrichen werden.

Die *hPDCs* der Fibula wiesen ein tendenziell höheres *adipogenes* Potential auf. Ein höheres *chondrogenes* Potential konnte ebenfalls sowohl nach qualitativer als auch quantitativer Beurteilung bei den *hPDCs* der Fibula festgestellt werden. Teilweise zeigte sich das chondrogene Potential der Fibula-*hPDCs* signifikant überlegen. Analog hierzu stellte sich das *osteogene* Potential der Fibula *hPDCs* hinsichtlich der qualitativen als auch quantitativen Untersuchung der Alizarin-Färbung ebenfalls als überlegen dar. Betrachtet man jedoch die osteogene Genexpressionen, zeigen sich erhöhte Expressionen für die Unterkiefer-*hPDCs*. Zudem besitzen die Unterkiefer-*hPDCs* überlegene Eigenschaften in Bezug auf Proliferationskapazität und Seneszenz-Verhalten.

Ein potenzieller Einfluss des jeweiligen Gewebezustands am operativen Entnahmeort des Periosts auf die Eigenschaften der *in vitro* isolierten *hPDCs* kann nicht ausgeschlossen werden. Insbesondere das Unterkiefer-Periost wird unter Umständen präoperativ durch orale Noxen, intraoperativ durch eine übermäßige Freilegungszeit und letztendlich durch die Entnahme aus einem vorbelastetem Operationsgebiet nachteilig beeinflusst. Das Fibula-Periost hingegen stammte aus einer praktisch als komplett gesund anzusehenden Entnahmestelle.

Abschließend zeigen sich sowohl die *hPDCs* mesodermalen Ursprungs als auch mit Ursprung in der Neuralleiste für *TE*-Techniken geeignet. Sie erfüllen die Grundvoraussetzungen hinsichtlich Differenzierungspotential, weisen gute proliferative Eigenschaften auf und zeigen mit einer verhältnismäßig niedrigen Seneszenz eine hohe Stabilität in Kultur. Hinsichtlich einer Entscheidung über eine optimale Zellquelle sollten in zukünftigen Forschungsarbeiten weitere Entnahmestellen untersucht sowie weitere Aspekte wie beispielsweise das Differenzierungspotential und Proliferationsverhalten der *hPDCs* in 3D-Kulturen betrachtet werden.

## 6 Literaturverzeichnis:

- Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., & Nalbant, A. (2017). Flow cytometry: basic principles and applications. In *Critical Reviews in Biotechnology* (Vol. 37, Issue 2, pp. 163–176). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1128876>
- Alexander, D., Rieger, M., Klein, C., Ardjomandi, N., & Reinert, S. (2013). Selection of osteoprogenitors from the jaw periosteum by a specific animal-free culture medium. *PLoS ONE*, 8(12), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081674>
- Alexander, D., Schäfer, F., Olbrich, M., Friedrich, B., Bühring, H. J., Hoffmann, J., & Reinert, S. (2010). MSCA-1/TNAP selection of human jaw periosteal cells improves their mineralization capacity. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 26(6), 1073–1080. <https://doi.org/10.1159/000323985>
- Ambele, M. A., Dessels, C., Durandt, C., & Pepper, M. S. (2016). Genome-wide analysis of gene expression during adipogenesis in human adipose-derived stromal cells reveals novel patterns of gene expression during adipocyte differentiation. *Stem Cell Research*, 16(3), 725–734. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2016.04.011>
- Bais, M., McLean, J., Sebastiani, P., Young, M., Wigner, N., Smith, T., Kotton, D. N., Einhorn, T. A., & Gerstenfeld, L. C. (2009). Transcriptional Analysis of Fracture Healing and the Induction of Embryonic Stem Cell-Related Genes. *PLoS ONE*, 4(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005393>
- Ball, M. D., Bonzani, I. C., Bovis, M. J., Williams, A., & Stevens, M. M. (2011). Human periosteum is a source of cells for orthopaedic tissue engineering: A pilot study. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 469(11), 3085–3093. <https://doi.org/10.1007/s11999-011-1895-x>
- Bilkay, U., Tokat, C., Helvaci, E., Ozek, C., Zekioglu, O., Onat, T., & Songur, E. (2008). Osteogenic capacities of tibial and cranial periosteum: A biochemical and histologic study. *Journal of Craniofacial Surgery*, 19(2), 453–458. <https://doi.org/10.1097/SCS.0b013e318052fe3d>
- Birmingham, E., Niebur, G. L., Mchugh, P. E., Shaw, G., Barry, F. P., & McNamara, L. M. (2012). Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is regulated by osteocyte and osteoblast cells in a simplified bone niche. *European Cells and Materials*, 23, 13–27. <https://doi.org/10.22203/eCM.v023a02>
- Boehm, U., Klamp, T., Groot, M., & Howard, J. C. (1997). Cellular responses to interferon- $\gamma$ . In *Annual Review of Immunology* (Vol. 15, pp. 749–795). Annu Rev Immunol. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.15.1.749>
- Bos, J. L. (2005). Linking Rap to cell adhesion. In *Current Opinion in Cell Biology* (Vol. 17, Issue 2, pp. 123–128). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2005.02.009>
- Boulet, A. M., & Capecchi, M. R. (2004). Multiple roles of Hoxa11 and Hoxd11

- in the formation of the mammalian forelimb zeugopod. *Development*, 131(2), 299–309. <https://doi.org/10.1242/dev.00936>
- Braciale, T. J., Morrison, L. A., Sweetser, M. T., Sambrook, J., Gething, M. -J, & Braciale, V. L. (1987). Antigen Presentation Pathways to Class I and Class II MHC-Restricted T Lymphocytes. *Immunological Reviews*, 98(1), 95–114. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.1987.tb00521.x>
- Bragdon, B. C., & Bahney, C. S. (2018). Origin of Reparative Stem Cells in Fracture Healing. *Current Osteoporosis Reports*, 16(4), 490–503. <https://doi.org/10.1007/s11914-018-0458-4>
- Briggs, M. D., & Chapman, K. L. (2002). Pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia: Mutation review, molecular interactions, and genotype to phenotype correlations. In *Human Mutation* (Vol. 19, Issue 5, pp. 465–478). <https://doi.org/10.1002/humu.10066>
- Brownlow, H. C., Reed, A., Joyner, C., & Simpson, A. H. R. W. (2000). Anatomical effects of periosteal elevation. *Journal of Orthopaedic Research*, 18(3), 500–502. <https://doi.org/10.1002/jor.1100180325>
- Caron, E., Self, A. J., & Hall, A. (2000). The GTPase rap1 controls functional activation of macrophage integrin  $\alpha$ M $\beta$ 2 by LPS and other inflammatory mediators. *Current Biology*, 10(16), 974–978. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00641-2](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00641-2)
- Ceccarelli, G., Graziano, A., Benedetti, L., Imbriani, M., Romano, F., Ferrarotti, F., Aimetti, M., & Cusella De Angelis, G. M. (2016). Osteogenic Potential of Human Oral-Periosteal Cells (PCs) Isolated From Different Oral Origin: An In Vitro Study. *Journal of Cellular Physiology*, 231(3), 607–612. <https://doi.org/10.1002/jcp.25104>
- Chanavaz, M. (1995). Anatomy and histophysiology of the periosteum: quantification of the periosteal blood supply to the adjacent bone with <sup>85</sup>Sr and gamma spectrometry. *The Journal of Oral Implantology*.
- Chang, H., & Knothe Tate, M. L. (2012). Concise Review: The Periosteum: Tapping into a Reservoir of Clinically Useful Progenitor Cells. *STEM CELLS Translational Medicine*, 1(6), 480–491. <https://doi.org/10.5966/sctm.2011-0056>
- Chen, D., Shen, H., Shao, J., Jiang, Y., Lu, J., He, Y., & Huang, C. (2011). Superior mineralization and neovascularization capacity of adult human metaphyseal periosteum-derived cells for skeletal tissue engineering applications. *International Journal of Molecular Medicine*, 27(5), 707–713. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2011.634>
- Choi, M. H., Noh, W. C., Park, J. W., Lee, J. M., & Suh, J. Y. (2011). Gene expression pattern during osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells in vitro. *Journal of Periodontal and Implant Science*, 41(4), 167–175. <https://doi.org/10.5051/jpis.2011.41.4.167>
- Choi, Y.-S., Lim, S.-M., & Kim, C.-S. (2008). Multipotency and growth

- characteristic of periosteum-derived progenitor cells for chondrogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation Cell therapy View project. *Article in Biotechnology Letters*, 30(4), 593–601. <https://doi.org/10.1007/s10529-007-9584-2>
- Colnot, C. (2009). Skeletal cell fate decisions within periosteum and bone marrow during bone regeneration. *Journal of Bone and Mineral Research*, 24(2), 274–282. <https://doi.org/10.1359/jbmr.081003>
- Cordeiro, P. G., Disa, J. J., Hidalgo, D. A., & Hu, Q. Y. (1999). Reconstruction of the mandible with osseous free flaps: A 10-year experience with 150 consecutive patients. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 104(5), 1314–1320. <https://doi.org/10.1097/00006534-199910000-00011>
- Cresswell, P. (1994). Assembly, Transport, and Function of MHC Class II Molecules. *Annual Review of Immunology*, 12(1), 259–291. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.12.040194.001355>
- Crisan, M., Chen, C. W., Corselli, M., Andriolo, G., Lazzari, L., & Péault, B. (2009). Perivascular multipotent progenitor cells in human organs. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1176, 118–123. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04967.x>
- D'Ippolito, G., Schiller, P. C., Ricordi, C., Roos, B. A., & Howard, G. A. (1999). Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *Journal of Bone and Mineral Research*, 14(7), 1115–1122. <https://doi.org/10.1359/jbmr.1999.14.7.1115>
- De Bari, C., Dell'Accio, F., & Luyten, F. P. (2001). Human periosteum-derived cells maintain phenotypic stability and chondrogenic potential throughout expansion regardless of donor age. *Arthritis and Rheumatism*, 44(1), 85–95. [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200101\)44:1<85::AID-ANR12>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200101)44:1<85::AID-ANR12>3.0.CO;2-6)
- De Bari, C., Dell'Accio, F., Vanlauwe, J., Eyckmans, J., Khan, I. M., Archer, C. W., Jones, E. A., McGonagle, D., Mitsiadis, T. A., Pitzalis, C., & Luyten, F. P. (2006). Mesenchymal multipotency of adult human periosteal cells demonstrated by single-cell lineage analysis. *Arthritis and Rheumatism*, 54(4), 1209–1221. <https://doi.org/10.1002/art.21753>
- Diaz-Flores, L., Gutierrez, R., & Varela, H. (1992). Behavior of postcapillary venule pericytes during postnatal angiogenesis. *Journal of Morphology*, 213(1), 33–45. <https://doi.org/10.1002/jmor.1052130105>
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J., & Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Donos, N., Kostopoulos, L., Tonetti, M., & Karring, T. (2005). Long-term stability of autogenous bone grafts following combined application with guided bone

- regeneration. *Clinical Oral Implants Research*, 16(2), 133–139.  
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2004.01104.x>
- Duhamel, H.-L.-M. (1742). Sur le developpement et la crue des os des animaux. *Mem. Acad. Roy Des Sciences. Paris*, 55:354.
- Evans, S. F., Parent, J. B., Lasko, C. E., Zhen, X., Knothe, U. R., Lemaire, T., & Knothe Tate, M. L. (2013). Periosteum, bone's "smart" bounding membrane, exhibits direction-dependent permeability. *Journal of Bone and Mineral Research*, 28(3), 608–617. <https://doi.org/10.1002/jbmr.1777>
- Fan, W., Crawford, R., & Xiao, Y. (2008). Structural and cellular differences between metaphyseal and diaphyseal periosteum in different aged rats. *Bone*, 42(1), 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2007.08.048>
- Ferrara, J. L. M., & Reddy, P. (2006). Pathophysiology of graft-versus-host disease. *Seminars in Hematology*, 43(1), 3–10.  
<https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2005.09.001>
- Ferré, P. (2004). The Biology of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: Relationship with Lipid Metabolism and Insulin Sensitivity. *Diabetes*, 53(SUPPL. 1), S43–S50. <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.2007.s43>
- Ferretti, C. (2014). Periosteum derived stem cells for regenerative medicine proposals: Boosting current knowledge. *World Journal of Stem Cells*, 6(3), 266. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v6.i3.266>
- Fiorentini, E., Granchi, D., Leonardi, E., Baldini, N., & Ciapetti, G. (2011). Effects of osteogenic differentiation inducers on in vitro expanded adult mesenchymal stromal cells. *International Journal of Artificial Organs*, 34(10), 998–1011. <https://doi.org/10.5301/ijao.5000001>
- Franceschi, R. T., Iyer, B. S., & Cui, Y. (1994). Effects of ascorbic acid on collagen matrix formation and osteoblast differentiation in murine MC3T3-E1 cells. *Journal of Bone and Mineral Research*, 9(6), 843–854.  
<https://doi.org/10.1002/jbmr.5650090610>
- Fujii, T., Ueno, T., Kagawa, T., Sakata, Y., & Sugahara, T. (2006). Comparison of bone formation ingrafted periosteum harvested from tibia and calvaria. *Microscopy Research and Technique*, 69(7), 580–584.  
<https://doi.org/10.1002/jemt.20274>
- Gallay, S. H., Miura, Y., Commisso, C. N., Fitzsimmons, J. S., & O'Driscoll, S. W. (1994). Relationship of donor site to chondrogenic potential of periosteum in vitro. *Journal of Orthopaedic Research*, 12(4), 515–525.  
<https://doi.org/10.1002/jor.1100120408>
- Garcia, J., Mennan, C., McCarthy, H. S., Roberts, S., Richardson, J. B., & Wright, K. T. (2016). Chondrogenic Potency Analyses of Donor-Matched Chondrocytes and Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow, Infrapatellar Fat Pad, and Subcutaneous Fat. *Stem Cells International*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/6969726>

- Gardner, O. F. W., Alini, M., & Stoddart, M. J. (2015). Mesenchymal stem cells derived from human bone marrow. *Methods in Molecular Biology*, 1340, 41–52. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2938-2\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2938-2_3)
- Gharaibeh, B., Lu, A., Tebbets, J., Zheng, B., Feduska, J., Crisan, M., Péault, B., Cummins, J., & Huard, J. (2008). Isolation of a slowly adhering cell fraction containing stem cells from murine skeletal muscle by the preplate technique. *Nature Protocols*, 3(9), 1501–1509. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.142>
- Goessler, U. R., Bugert, P., Bieback, K., Baisch, A., Sadick, H., Verse, T., Klüter, H., Hörmann, K., & Riedel, F. (2004). Expression of collagen and fiber-associated proteins in human septal cartilage during in vitro dedifferentiation. *International Journal of Molecular Medicine*, 14(6), 1015–1022. <https://doi.org/10.3892/ijmm.14.6.1015>
- Goulet, J. A., Senunas, L. E., DeSilva, G. L., & Greenfield, M. L. V. H. (1997). Autogenous iliac crest bone graft: Complications and functional assessment. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 339, 76–81. <https://doi.org/10.1097/00003086-199706000-00011>
- Hayashi, O., Katsube, Y., Hirose, M., Ohgushi, H., & Ito, H. (2008). Comparison of osteogenic ability of rat mesenchymal stem cells from bone marrow, periosteum, and adipose tissue. *Calcified Tissue International*, 82(3), 238–247. <https://doi.org/10.1007/s00223-008-9112-y>
- Hidalgo, D. A. (1989). Fibula free flap: A new method of mandible reconstruction. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 84(1), 71–79. <https://doi.org/10.1097/00006534-198907000-00014>
- Hsiao, H. Y., Yang, C. Y., Liu, J. W., Brey, E. M., & Cheng, M. H. (2018). Periosteal osteogenic capacity depends on tissue source. *Tissue Engineering - Part A*, 24(23–24), 1733–1741. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2018.0009>
- Hu, W., Zhang, W., Li, F., Guo, F., & Chen, A. (2014). Bortezomib prevents the expression of MMP-13 and the degradation of collagen type 2 in human chondrocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 452(3), 526–530. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.08.102>
- Huibregtse, B. A., Johnstone, B., Goldberg, V. M., & Caplan, A. I. (2000). Effect of age and sampling site on the chondro-osteogenic potential of rabbit marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Journal of Orthopaedic Research*, 18(1), 18–24. <https://doi.org/10.1002/jor.1100180104>
- Huja, S. S., Fernandez, S. A., Hill, K. J., & Li, Y. (2006). Remodeling dynamics in the alveolar process in skeletally mature dogs. *Anatomical Record - Part A Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*, 288(12), 1243–1249. <https://doi.org/10.1002/ar.a.20396>
- Hutmacher, D. W., & Sitterling, M. (2003). Periosteal cells in bone tissue engineering. In *Tissue Engineering* (Vol. 9, Issue SUPPL. 1). Mary Ann



Liebert Inc. <https://doi.org/10.1089/10763270360696978>

- Ichikawa, Y., Watahiki, J., Nampo, T., Nose, K., Yamamoto, G., Irie, T., Mishima, K., & Maki, K. (2015). Differences in the developmental origins of the periosteum may influence bone healing. *Journal of Periodontal Research*, *50*(4), 468–478. <https://doi.org/10.1111/jre.12229>
- Inoue, M., Ono, T., Kameo, Y., Sasaki, F., Ono, T., Adachi, T., & Nakashima, T. (2019). Forceful mastication activates osteocytes and builds a stout jawbone. *Scientific Reports*, *9*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40463-3>
- Iuchi, T., Kusuhara, H., Ueda, Y., Morotomi, T., & Isogai, N. (2020). Influence of Periosteum Location on the Bone and Cartilage in Tissue-Engineered Phalanx. *Journal of Hand Surgery*, *45*(1), 62.e1-62.e10. <https://doi.org/10.1016/j.jhsa.2019.02.002>
- Kaariainen, M., Kuuskeri, M., Gremoutis, G., Kuokkanen, H., Miettinen, A., & Laranne, J. (2016). Utilization of Three-Dimensional Computer-Aided Preoperative Virtual Planning and Manufacturing in Maxillary and Mandibular Reconstruction with a Microvascular Fibula Flap. *Journal of Reconstructive Microsurgery*, *32*(2), 137–141. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1563396>
- Kaiser, L. R. (1992). The future of multihospital systems. In *Topics in Health Care Financing* (Vol. 18, Issue 4, pp. 32–45). Top Health Care Financ.
- Karageorgiou, V., & Kaplan, D. (2005). Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. In *Biomaterials* (Vol. 26, Issue 27, pp. 5474–5491). Elsevier BV. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.02.002>
- Karsenty, G. (1998). Transcriptional regulation of osteoblast differentiation during development. In *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* (Vol. 3). Front Biosci. <https://doi.org/10.2741/A326>
- Kronenberg, H. M. (2003). Developmental regulation of the growth plate. In *Nature* (Vol. 423, Issue 6937, pp. 332–336). <https://doi.org/10.1038/nature01657>
- Kumar, B. P., Venkatesh, V., Kumar, K. A. J., Yadav, B. Y., & Mohan, S. R. (2016). Mandibular Reconstruction: Overview. In *Journal of Maxillofacial and Oral Surgery* (Vol. 15, Issue 4, pp. 425–441). Springer. <https://doi.org/10.1007/s12663-015-0766-5>
- Lenze, U., Pohlig, F., Knebel, C., Lenze, F., Harrasser, N., Mühlhofer, H., Toepfer, A., Rechl, H., & von Eisenhart-Rothe, R. (2017). Die autologe Fibulatransplantation zur Rekonstruktion knöcherner Defekte. *Orthopade*, *46*(8), 648–655. <https://doi.org/10.1007/s00132-017-3442-2>
- Leucht, P., Kim, J. B., Amasha, R., James, A. W., Girod, S., & Helms, J. A. (2008). Embryonic origin and Hox status determine progenitor cell fate during adult bone regeneration. *Development*, *135*(17), 2845–2854. <https://doi.org/10.1242/dev.023788>

- Lietman, S. A., Tomford, W. W., Gebhardt, M. C., Springfieldand, D. S., & Mankin, H. J. (2000). Complications of irradiated allografts in orthopaedic tumor surgery. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 375, 214–217. <https://doi.org/10.1097/00003086-200006000-00026>
- Lin, P.-Y., Lin, K. C., & Jeng, S.-F. (2011). Oromandibular Reconstruction: The History, Operative Options and Strategies, and Our Experience. *ISRN Surgery*, 2011, 1–10. <https://doi.org/10.5402/2011/824251>
- Liu, H. C., E, L. L., Wang, D. S., Su, F., Wu, X., Shi, Z. P., Lv, Y., & Wang, J. Z. (2011). Reconstruction of alveolar bone defects using bone morphogenetic protein 2 mediated rabbit dental pulp stem cells seeded on nano-hydroxyapatite/collagen/ poly(l-lactide). *Tissue Engineering - Part A*, 17(19–20), 2417–2433. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2010.0620>
- Loebel, C., Czekanska, E. M., Bruderer, M., Salzmann, G., Alini, M., & Stoddart, M. J. (2015). In vitro osteogenic potential of human mesenchymal stem cells is predicted by Runx2/Sox9 ratio. *Tissue Engineering - Part A*, 21(1–2), 115–123. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2014.0096>
- Lohberger, B., Payer, M., Rinner, B., Kaltenecker, H., Wolf, E., Schallmoser, K., Strunk, D., Rohde, E., Berghold, A., Pekovits, K., Wildburger, A., Leithner, A., Windhager, R., & Jakse, N. (2013). Tri-lineage potential of intraoral tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 41(2), 110–118. <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2012.06.001>
- Maes, C., Kobayashi, T., Selig, M. K., Torrekens, S., Roth, S. I., Mackem, S., Carmeliet, G., & Kronenberg, H. M. (2010). Osteoblast precursors, but not mature osteoblasts, move into developing and fractured bones along with invading blood vessels. *Developmental Cell*, 19(2), 329–344. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.07.010>
- Malizos, K. N., & Papatheodorou, L. K. (2005). The healing potential of the periosteum molecular aspects. In *Injury: Vol. 36 Suppl 3*. Injury. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2005.07.030>
- Matsushima, S., Isogai, N., Jacquet, R., Lowder, E., Tokui, T., & Landis, W. J. (2011). The nature and role of periosteum in bone and cartilage regeneration. *Cells Tissues Organs*, 194(2–4), 320–325. <https://doi.org/10.1159/000324642>
- Mead, J. R., Irvine, S. A., & Ramji, D. P. (2002). Lipoprotein lipase: Structure, function, regulation, and role in disease. In *Journal of Molecular Medicine* (Vol. 80, Issue 12, pp. 753–769). <https://doi.org/10.1007/s00109-002-0384-9>
- Mueller, S. M., & Glowacki, J. (2001). Age-related decline in the osteogenic potential of human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges. *Journal of Cellular Biochemistry*, 82(4), 583–590. <https://doi.org/10.1002/jcb.1174>
- Murshed, M., Schinke, T., McKee, M. D., & Karsenty, G. (2004). Extracellular

- matrix mineralization is regulated locally; different roles of two gla-containing proteins. *Journal of Cell Biology*, 165(5), 625–630. <https://doi.org/10.1083/jcb.200402046>
- Muschler, G. F., & Midura, R. J. (2002). Connective tissue progenitors: Practical concepts for clinical applications. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 395, 66–80. <https://doi.org/10.1097/00003086-200202000-00008>
- Nakahara, H., Goldberg, V. M., & Caplan, A. I. (1991). Culture-expanded human periosteal-derived cells exhibit osteochondral potential in vivo. *Journal of Orthopaedic Research*, 9(4), 465–476. <https://doi.org/10.1002/jor.1100090402>
- Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Deng, J. M., Behringer, R. R., & De Crombrughe, B. (2002). The novel zinc finger-containing transcription factor Osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*, 108(1), 17–29. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00622-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00622-5)
- Naros, A., Weise, H., Tilsen, F., Hoefert, S., Naros, G., Krimmel, M., Reinert, S., & Polligkeit, J. (2018). Three-dimensional accuracy of mandibular reconstruction by patient-specific pre-bent reconstruction plates using an “in-house” 3D-printer. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 46(9), 1645–1651. <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2018.05.047>
- Neefjes, J., Jongasma, M. L. M., Paul, P., & Bakke, O. (2011). Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 11, Issue 12, pp. 823–836). <https://doi.org/10.1038/nri3084>
- Nehrlich, M., & Teegen, E. M. (2012). *Hypertrophie chondrogen differenzierender mesenchymaler Stammzellen im dreidimensionalen System*. <https://doi.org/10.5283/epub.27826>
- Niehues, S., Ruehe, B., Nelson, K., & Lemke, A. (2009). CT-Analyse der Knochenregeneration und des „critical size defects“ am Tiermodell. *RöFo - Fortschritte Auf Dem Gebiet Der Röntgenstrahlen Und Der Bildgebenden Verfahren*, 181(S 01), VO223\_5. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1221385>
- O'Driscoll, S. W., & Fitzsimmons, J. S. (2001). The role of periosteum in cartilage repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 391 SUPPL. <https://doi.org/10.1097/00003086-200110001-00019>
- O'Driscoll, S. W., Keeley, F. W., & Salter, R. B. (1986). The chondrogenic potential of free autogenous periosteal grafts for biological resurfacing of major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. An experimental investigation in the rabbit. *Journal of Bone and Joint Surgery - Series A*, 68(7), 1017–1035. <https://doi.org/10.2106/00004623-198668070-00008>
- Oberbauer, E., Steffenhagen, C., Feichtinger, G., Hildner, F., Hacobian, A.,

- Danzer, M., Gabriel, C., Redl, H., & Wolbank, S. (2016). A Luciferase-Based Quick Potency Assay to Predict Chondrogenic Differentiation. *Tissue Engineering - Part C: Methods*, 22(5), 487–495. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2015.0435>
- Ochareon, P., & Herring, S. W. (2011). Cell replication in craniofacial periosteum: appositional vs. resorptive sites. *Journal of Anatomy*, 218(3), 285–297. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2010.01336.x>
- Ode, A., Kopf, J., Kurtz, A., Schmidt-Bleek, Katharina, Schrade, Petra, Kolar, P., Georg, Kasper, & Ode, A., Kurtz, A., Schmidt-Bleek, K., Lehmann, F., & Duda, D. W. (2011). CD73 and CD29 concurrently mediate the mechanically induced decrease of migratory capacity of mesenchymal stromal cells. In *eprints.qut.edu.au*. <http://www.ecmjournal.org/journal/papers/vol022/vol022a03.php>
- Okita, K., Ichisaka, T., & Yamanaka, S. (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*, 448(7151), 313–317. <https://doi.org/10.1038/nature05934>
- Ollier, L. X. (1867). Traité expérimental et clinique de la régénération des os et de la production artificielle du tissu osseux. In *Victor Masson*.
- Ozaki, A., Tsunoda, M., Kinoshita, S., & Saura, R. (2000). Role of fracture hematoma and periosteum during fracture healing in rats: Interaction of fracture hematoma and the periosteum in the initial step of the healing process. *Journal of Orthopaedic Science*, 5(1), 64–70. <https://doi.org/10.1007/s007760050010>
- Pal, R., Hanwate, M., Jan, M., & Totey, S. (2009). Phenotypic and functional comparison of optimum culture conditions for upscaling of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 3(3), 163–174. <https://doi.org/10.1002/term.143>
- Park, J. B., Bae, S. S., Lee, P. W., Lee, W., Park, Y. H., Kim, H., Lee, K. H., & Kim, I. S. (2012). Comparison of stem cells derived from periosteum and bone marrow of jaw bone and long bone in rabbit models. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 9(4), 224–230. <https://doi.org/10.1007/s13770-012-0343-7>
- Quarto, N., Wan, D. C., Kwan, M. D., Panetta, N. J., Li, S., & Longaker, M. T. (2010). Origin matters: Differences in embryonic tissue origin and Wnt signaling determine the osteogenic potential and healing capacity of frontal and parietal calvarial bones. *Journal of Bone and Mineral Research*, 25(7), 1680–1694. <https://doi.org/10.1359/jbmr.091116>
- Radtke, C. L., Nino-Fong, R., Esparza Gonzalez, B. P., Stryhn, H., & Mcduffee, L. A. (2013). Characterization and osteogenic potential of equine muscle tissue- and periosteal tissue- derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow- and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *American Journal of Veterinary Research*, 74(5), 790–800. <https://doi.org/10.2460/ajvr.74.5.790>

- Rasmussen, N. R., Dickinson, D. J., & Reiner, D. J. (2018). Ras-dependent cell fate decisions are reinforced by the RAP-1 small GTPase in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*, *210*(4), 1339–1354. <https://doi.org/10.1534/genetics.118.301601>
- Rice, N., Polyzois, I., Ekanayake, K., Omer, O., & Stassen, L. F. A. (2015). The management of osteoradionecrosis of the jaws - A review. In *Surgeon* (Vol. 13, Issue 2, pp. 101–109). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.surge.2014.07.003>
- Ringe, J., Leinhase, I., Stich, S., Loch, A., Neumann, K., Haisch, A., Häupl, T., Manz, R., Kaps, C., & Sittinger, M. (2008). Human mastoid periosteum-derived stem cells: Promising candidates for skeletal tissue engineering. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, *2*(2–3), 136–146. <https://doi.org/10.1002/term.75>
- Roberts, S. J., van Gastel, N., Carmeliet, G., & Luyten, F. P. (2015). Uncovering the periosteum for skeletal regeneration: The stem cell that lies beneath. *Bone*, *70*, 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2014.08.007>
- Romana, M. C., & Masquelet, A. C. (1990). Vascularized periosteum associated with cancellous bone graft: An experimental study. *Plastic and Reconstructive Surgery*, *85*(4), 587–592. <https://doi.org/10.1097/00006534-199004000-00014>
- Rommel, N., Kesting, M. R., Rohleder, N. H., Wolff, K. D., & Weitz, J. (2018). Surgical management of severe osteoradionecrosis of the mandibular bone by using double free flap reconstruction. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, *46*(1), 148–154. <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2017.09.025>
- Rosert, J., Terraz, C., & Dupont, S. (2000). Regulation of type I collagen genes expression. *Nephrology Dialysis Transplantation*, *15*(SUPPL. 6), 66–68. [https://doi.org/10.1093/ndt/15.suppl\\_6.66](https://doi.org/10.1093/ndt/15.suppl_6.66)
- Rux, D. R., Song, J. Y., Swinehart, I. T., Pineault, K. M., Schlientz, A. J., Trulik, K. G., Goldstein, S. A., Kozloff, K. M., Lucas, D., & Wellik, D. M. (2016). Regionally Restricted Hox Function in Adult Bone Marrow Multipotent Mesenchymal Stem/Stromal Cells. *Developmental Cell*, *39*(6), 653–666. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.11.008>
- Sakaguchi, Y., Sekiya, I., Yagishita, K., & Muneta, T. (2005). Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: Superiority of synovium as a cell source. *Arthritis and Rheumatism*, *52*(8), 2521–2529. <https://doi.org/10.1002/art.21212>
- Salazar, V. S., Gamer, L. W., & Rosen, V. (2016). BMP signalling in skeletal development, disease and repair. In *Nature Reviews Endocrinology* (Vol. 12, Issue 4, pp. 203–221). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2016.12>
- Schallmoser, K., Bartmann, C., Rohde, E., Reinisch, A., Kashofer, K., Stadlmeyer, E., Drexler, C., Lanzer, G., Linkesch, W., & Strunk, D. (2007).

- Human platelet lysate can replace fetal bovine serum for clinical-scale expansion of functional mesenchymal stromal cells. *Transfusion*, 47(8), 1436–1446. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2007.01220.x>
- Schimming, R., & Schmelzeisen, R. (2004). Tissue-engineered bone for maxillary sinus augmentation. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 62(6), 724–729. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2004.01.009>
- Schmelzeisen, R., Schimming, R., & Sitter, M. (2003). Making bone: Implant insertion into tissue-engineered bone for maxillary sinus floor augmentation - A preliminary report. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 31(1), 34–39. [https://doi.org/10.1016/S1010-5182\(02\)00163-4](https://doi.org/10.1016/S1010-5182(02)00163-4)
- Schrag, C., Chang, Y. M., Tsai, C. Y., & Wei, F. C. (2006). Complete rehabilitation of the mandible following segmental resection. *Journal of Surgical Oncology*, 94(6), 538–545. <https://doi.org/10.1002/jso.20491>
- Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T., & Hume, D. A. (2004). Interferon- $\gamma$ : an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of Leukocyte Biology*, 75(2), 163–189. <https://doi.org/10.1189/jlb.0603252>
- Solorio, L. D., Fu, A. S., Hernández-Irizarry, R., & Alsberg, E. (2010). Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cell aggregates via controlled release of TGF- $\beta$ 1 from incorporated polymer microspheres. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 92(3), 1139–1144. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32440>
- Stein, G. S., & Lian, J. B. (1993). Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocrine Reviews*, 14(4), 424–442. <https://doi.org/10.1210/edrv-14-4-424>
- Stenderup, K., Justesen, J., Clausen, C., & Kassem, M. (2003). Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone*, 33(6), 919–926. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2003.07.005>
- Stich, S., Loch, A., Park, S. J., Häupl, T., Ringe, J., & Sitter, M. (2017). Characterization of single cell derived cultures of periosteal progenitor cells to ensure the cell quality for clinical application. *PLoS ONE*, 12(5), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178560>
- Stolzing, A., Jones, E., McGonagle, D., & Scutt, A. (2008). Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: Consequences for cell therapies. *Mechanisms of Ageing and Development*, 129(3), 163–173. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2007.12.002>
- Tamura, Y., Takeuchi, Y., Suzawa, M., Fukumoto, S., Kato, M., Miyazono, K., & Fujita, T. (2001). Focal adhesion kinase activity is required for bone morphogenetic protein - Smad1 signaling and osteoblastic differentiation in murine MC3T3-E1 cells. *Journal of Bone and Mineral Research*, 16(10), 1772–1779. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2001.16.10.1772>

- Trautvetter, W., Kaps, C., Schmelzeisen, R., Sauerbier, S., & Sittinger, M. (2011). Tissue-engineered polymer-based periosteal bone grafts for maxillary sinus augmentation: Five-year clinical results. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, *69*(11), 2753–2762. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2011.02.096>
- Trowe, M. O., Shah, S., Petry, M., Airik, R., Schuster-Gossler, K., Kist, R., & Kispert, A. (2010). Loss of Sox9 in the periotic mesenchyme affects mesenchymal expansion and differentiation, and epithelial morphogenesis during cochlea development in the mouse. *Developmental Biology*, *342*(1), 51–62. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.03.014>
- Turksen, K., & Aubin, J. E. (1991). Positive and negative immunoselection for enrichment of two classes of osteoprogenitor cells. *Journal of Cell Biology*, *114*(2), 373–384. <https://doi.org/10.1083/jcb.114.2.373>
- Uddströmer, L. (1978). The osteogenic capacity of tubular and membranous bone periosteum: A qualitative and quantitative experimental study in growing rabbits. *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery and Hand Surgery*, *12*(3), 195–205. <https://doi.org/10.3109/02844317809012995>
- Umrath, F., Weber, M., Reinert, S., Wendel, H.-P., Avci-Adali, M., & Alexander, D. (2020). iPSC-Derived MSCs Versus Originating Jaw Periosteal Cells: Comparison of Resulting Phenotype and Stem Cell Potential. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(2), 587. <https://doi.org/10.3390/ijms21020587>
- Vacanti, C. A., Bonassar, L. J., Vacanti, M. P., & Shufflebarger, J. (2001). Replacement of an avulsed phalanx with tissue-engineered bone. *New England Journal of Medicine*, *344*(20), 1511–1514. <https://doi.org/10.1056/NEJM200105173442004>
- Van Gastel, N., Stegen, S., Stockmans, I., Moermans, K., Schrooten, J., Graf, D., Luyten, F. P., & Carmeliet, G. (2014). Expansion of murine periosteal progenitor cells with fibroblast growth factor 2 reveals an intrinsic endochondral ossification program mediated by bone morphogenetic protein 2. *Stem Cells*, *32*(9), 2407–2418. <https://doi.org/10.1002/stem.1783>
- Van Gastel, N., Torrekens, S., Roberts, S. J., Moermans, K., Schrooten, J., Carmeliet, P., Luttun, A., Luyten, F. P., & Carmeliet, G. (2012). Engineering vascularized bone: Osteogenic and proangiogenic potential of murine periosteal cells. *Stem Cells*, *30*(11), 2460–2471. <https://doi.org/10.1002/stem.1210>
- Vimalraj, S. (2020). Alkaline phosphatase: Structure, expression and its function in bone mineralization. In *Gene* (Vol. 754, p. 144855). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144855>
- Vozzi, G., Lucarini, G., Dicarlo, M., Andreoni, C., Salvolini, E., Ferretti, C., & Mattioli-Belmonte, M. (2016). In vitro lifespan and senescent behaviour of human periosteal derived stem cells. *Bone*, *88*, 1–12.

<https://doi.org/10.1016/j.bone.2016.04.013>

- Wang, T., Zhang, X., & Bikle, D. D. (2017). Osteogenic Differentiation of Periosteal Cells During Fracture Healing. In *Journal of Cellular Physiology* (Vol. 232, Issue 5, pp. 913–921). Wiley-Liss Inc. <https://doi.org/10.1002/jcp.25641>
- Wanner, Y., Umrath, F., Waidmann, M., Reinert, S., & Alexander, D. (2017). Platelet lysate: The better choice for jaw periosteal cell mineralization. *Stem Cells International*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/8303959>
- Weitz, J., Wolff, K. D., Kesting, M. R., & Nobis, C. P. (2018). Development of a novel resection and cutting guide for mandibular reconstruction using free fibula flap. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 46(11), 1975–1978. <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2018.09.007>
- Wilkerson, M. J. (2012). Principles and Applications of Flow Cytometry and Cell Sorting in Companion Animal Medicine. In *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice* (Vol. 42, Issue 1, pp. 53–71). Vet Clin North Am Small Anim Pract. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2011.09.012>
- Yamamoto, N., Morikawa, T., Yakushiji, T., & Shibahara, T. (2018). Mandibular Reconstruction with Free Vascularized Fibular Graft. *The Bulletin of Tokyo Dental College*, 59(4), 299–311. <https://doi.org/10.2209/tdcpublication.2017-0025>
- Yi, S. W., Kim, H. J., Oh, H. J., Shin, H., Lee, J. S., Park, J. S., & Park, K. H. (2018). Gene expression profiling of chondrogenic differentiation by dexamethasone-conjugated polyethyleneimine with SOX trio genes in stem cells. *Stem Cell Research and Therapy*, 9(1), 341. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0998-7>
- Yoshimura, H., Muneta, T., Nimura, A., Yokoyama, A., Koga, H., & Sekiya, I. (2007). Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *Cell and Tissue Research*, 327(3), 449–462. <https://doi.org/haya>
- Yu, H., VandeVord, P. J., Mao, L., Matthew, H. W., Wooley, P. H., & Yang, S. Y. (2009). Improved tissue-engineered bone regeneration by endothelial cell mediated vascularization. *Biomaterials*, 30(4), 508–517. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.09.047>
- Zhang, X., Xie, C., Lin, A. S. P., Ito, H., Awad, H., Lieberman, J. R., Rubery, P. T., Schwarz, E. M., O’Keefe, R. J., & Guldberg, R. E. (2005). Periosteal progenitor cell fate in segmental cortical bone graft transplantations: Implications for functional tissue engineering. *Journal of Bone and Mineral Research*, 20(12), 2124–2137. <https://doi.org/10.1359/JBMR.050806>
- Zheng, C. H., & Levenston, M. E. (2015). *Fact versus artifact: Avoiding erroneous estimates of sulfated glucosaminoglycan content using the dimethylmethylene blue colorimetric assay for tissue-engineered constructs*. <https://doi.org/10.22203/eCM.v029a17>



Zhou, G., Zheng, Q., Engin, F., Munivez, E., Chen, Y., Sebald, E., Krakow, D., & Lee, B. (2006). Dominance of SOX9 function over RUNX2 during skeletogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(50), 19004–19009. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605170103>

Zuk, P. A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D. A., Huang, J. I., Mizuno, H., Alfonso, Z. C., Fraser, J. K., Benhaim, P., & Hedrick, M. H. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular Biology of the Cell*, *13*(12), 4279–4295. <https://doi.org/10.1091/mbc.E02-02-0105>

## 7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde an der Universitätsklinik der Eberhard-Karls-Universität Tübingen unter Betreuung von *Prof. Dr. Dr. S. Reinert* durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch *Dr. Andreas Naros* in Zusammenarbeit mit Frau *Prof. Dr. Alexander* und *Dr. Felix Umrath*.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung und mit Unterstützung speziell durch *Dr. Felix Umrath* und *Inka Schumacher* selbständig und in Eigenregie von mir durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung von *Dr. Felix Umrath* ebenfalls durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

## 8 Danksagung

Ich bedanke mich zuallererst bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Dr. **Reinert** für die erfolgreiche Begleitung meiner Dissertation.

Des Weiteren gilt mein besonderer Dank Dr. Andreas **Naros**, der die grundlegenden Ideen dieser Forschungsarbeit entwickelte und meine – anfangs durchaus unbeholfenen – Schreibversuche wie versprochen äußerst zügig und sehr umfangreich korrigierte. Es ist mir durchaus bewusst, dass das alles andere als selbstverständlich ist. Vielen lieben dank dir dafür!

Den Großteil meiner Arbeitszeit habe ich jedoch nicht vor dem Schreibtisch, sondern im *MKG*-Labor der Universitätsklinik Tübingen unter der kompetenten und sehr sympathischen Leitung von Prof. Dr. **Alexander** verbracht. Die allzeit freundliche Arbeitsatmosphäre und die wie selbstverständlich wirkende Unterstützung, die ich von allen Mitarbeitern erfahren durfte, haben mich und meine Doktorarbeit entscheidend geprägt und vorangebracht. An dieser Stelle ist v.a. mein Labor-Betreuer Dr. Felix **Umrath** hervorzuheben, den ich wortwörtlich zu gefühlt jeder Tages- und Nachtzeit um-Rath fragen konnte. Dir verdanke ich die konkrete Planung der Ausführbarkeit in wirklich *allen* Bereichen meines Projektes, die entscheidende Hilfe bei der Auswertung der erhobenen Daten und zu guter Letzt die allzeit netten, (teilweise) fachlichen Unterhaltungen und Diskussionen.

Ein weiterer spezieller Dank gilt **Inka Schumacher**, die sich, wenn nötig, im Labor bereitwillig und aufopferungsvoll um meine Zellen und Projekte gekümmert hat.

Selbstverständlich spreche ich an dieser Stelle auch noch meine besondere Dankbarkeit den ganzen Menschen aus, die sich in dieser Phase meines Lebens mit mir beschäftigt haben und somit wenn auch eher indirekten Einfluss auf meine Dissertation hatten: Meine Familie, meine Freunde - die ich nicht nur aus Datenschutzrechtlichen Gründen hier nicht aufzählen möchte - und natürlich meine meist bessere Hälfte Sarah.