

Aus der  
Universitätsklinik für Zahn- Mund- und Kieferheilkunde  
Klinik und Poliklinik für Mund- Kiefer- und Gesichtschirurgie

**Biomechanische Eigenschaften von Kieferperiostzellen  
versus  
mesenchymale Stammzellen, die aus pluripotenten Stammzellen  
differenziert wurden -  
Veränderungen in zellulärer Elastizität**

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

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

**vorgelegt von**

**Gaa, Lena Karin**

**2024**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professorin Dr. D. Alexander-Friedrich

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. M.-D. Ahrend

Tag der Disputation: 05.11.2024

**Meinen Eltern**

# Inhaltsverzeichnis

<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>II</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>III</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>V</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 KNOCHENTRANSPLANTATIONEN IN DER MUND-, KIEFER- UND GESICHTSCHIRURGIE (MKGC) .....	1
1.2 BONE TISSUE ENGINEERING (BTE) .....	4
1.3 STAMMZELLEN.....	5
1.3.1 <i>Mesenchymale Stammzellen</i> .....	5
1.3.2 <i>Mesenchymale Stammzellen, die aus induzierten, pluripotenten Stammzellen differenziert wurden (iMSCs)</i> .....	10
1.4 ZIELSETZUNG DER ARBEIT.....	12
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>13</b>
2.1 VERSUCHSAUFBAU .....	13
2.2 ZELLKULTUR .....	13
2.2.1 <i>Kultivierung der Zellen</i> .....	14
2.2.2 <i>Passage und Aussäen</i> .....	14
2.2.3 <i>Beschichtungen</i> .....	15
2.2.4 <i>Einfrieren der Zellen</i> .....	15
2.2.5 <i>Osteogene Differenzierung der Zellen</i> .....	16
2.3 ATOMIC FORCE MICROSCOPY - NANOINDENTATION .....	16
2.4 FÄRBUNGEN.....	20
2.4.1 <i>Fluoreszenzfärbungen</i> .....	20
2.4.2 <i>Alizarinfärbung und -quantifizierung</i> .....	21
2.5 TABELLEN ÜBER VERWENDETE MATERIALIEN .....	22
2.5.1 <i>Medien</i> .....	22
2.5.2 <i>Kultivierung der Zellen</i> .....	23
2.5.3 <i>AFM-Material</i> .....	23
2.5.4 <i>Färbungen, Quantifizierung</i> .....	23
2.5.5 <i>Verwendete Geräte und Softwares</i> .....	24
2.6 DATENAUSWERTUNG UND ERRECHNUNG DER STATISTISCHEN SIGNIFIKANZEN .....	25
<b>3 ERGEBNISSE .....</b>	<b>26</b>
3.1 AFM-ERGEBNISSE .....	26
3.1.1 <i>Elastizitätsmodul der CaP-Präzipitate</i> .....	26
3.1.2 <i>Elastizitätsmodul der Zellkörper von osteogen-induzierten Zellen</i> .....	35
3.1.3 <i>Elastizitätsmodul der Zellkörper von undifferenzierten Zellen (CO-Zellen)</i> .....	38
3.1.4 <i>Korrelationsanalysen der Kulturbedingungen</i> .....	42
3.1.5 <i>Auswirkungen der Plättchenlysat-Konzentration im Medium</i> .....	47
3.2 ALIZARINQUANTIFIZIERUNG.....	47
3.2.1 <i>Gesamt</i> .....	47
3.2.2 <i>Auswirkungen der Plättchenlysat-Konzentration im Medium</i> .....	52
3.3 ZUSAMMENHANG ZWISCHEN ELASTIZITÄT UND QUANTITÄT DER CAP-PRÄZIPITATE / ZELLELASTIZITÄT .....	53
3.4 LICHTMIKROSKOPISCHE BILDER VON UNDIFFERENZIIERTEN UND OSTEOGEN-DIFFERENZIIERTEN ZELLEN .....	56
3.4.1 <i>Lebend und undifferenziert</i> .....	56
3.4.2 <i>Fixiert, nach erfolgter Alizarinfärbung</i> .....	57
3.5 FLUORESZENZBILDER .....	65
<b>4 DISKUSSION .....</b>	<b>71</b>
4.1 UNTERSCHIEDE IN QUALITÄT UND QUANTITÄT DER KALZIUMPHOSPHATPRÄZIPITATE .....	71
4.1.1 <i>Biomechanische Eigenschaften der CaP-Präzipitate von JPCs vs. iMSCs – Vergleich des Zelltyps</i> . 71	

4.1.2	Biomechanische Eigenschaften der CaP-Präzipitate unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen – Vergleich der Effekte der Sauerstoffzufuhr .....	72
4.1.3	Biomechanische Eigenschaften der auf Laminin- und Gelatinebeschichtung gebildeten CaP-Präzipitate – Vergleich der Effekte der Plattenbeschichtungen.....	74
4.1.4	Vergleich und Korrelation von Qualität und Quantität der CaP-Präzipitate.....	74
4.2	BIOMECHANISCHE EIGENSCHAFTEN VON JPC'S UND iMSC'S IM VERLAUF DER OSTEOGENEN DIFFERENZIERUNG .....	75
4.3	DISKUSSION VON MATERIAL UND METHODEN .....	79
4.3.1	Limitationen der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente .....	79
4.3.2	Messung der Elastizitätsmoduln mit dem Rasterkraftmikroskop.....	81
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>84</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>86</b>
<b>7</b>	<b>ERKLÄRUNGEN ZUM EIGENANTEIL.....</b>	<b>90</b>
<b>8</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>91</b>

## TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Verwendete Medien.....	22
Tabelle 2: Materialien für Zellkultur .....	23
Tabelle 3: AFM-Material .....	23
Tabelle 4: Materialien für Färbungen .....	23
Tabelle 5: Verwendete Geräte.....	24
Tabelle 6: Deskriptive Statistik der Elastizitätsmoduln der gemessenen CaP-Präzipitate (Übersicht) .....	28
Tabelle 7: Prozentuale Darstellung der Zelltypen JPC und iMSC (E-Modul der CaP-Präzipitate).....	33
Tabelle 8: Deskriptive Statistik aller Elastizitätsmoduln der CaP-Präzipitate .....	34
Tabelle 9: Prozentuale Anteile der weicheren CaP-Elastizitätsmoduln (>-Zeichen) aufgeteilt nach Zelltyp, Inkubationsbedingung und Beschichtung.....	35
Tabelle 10: Deskriptive Statistik aller Elastizitätsmoduln der Zellkörper von osteogen-induzierten Zellen (OB-Zellen).....	38
Tabelle 11: Deskriptive Statistik aller Elastizitätsmoduln der Zellkörper von undifferenzierten Zellen (CO-Zellen) .....	41
Tabelle 12: Deskriptive Statistik der Elastizitätsmoduln von CO- und OB-Zellen.....	44
Tabelle 13: Deskriptive Statistik der gemessenen Kalziumkonzentrationen [mM] anhand der Alizarinfärbung (Übersicht).....	48
Tabelle 14: Prozentuale Darstellung der Zelltypen JPC und iMSC (Kalziumkonzentration). 50	
Tabelle 15: Deskriptive Statistik aller gemessenen Kalziumkonzentrationen [mM] anhand der Alizarinfärbung .....	51
Tabelle 16: Prozentuale Anteile der niedrigeren Alizarinkonzentrationen (>-Zeichen) aufgeteilt nach Zelltyp, Inkubationsbedingung und Beschichtung.....	52
Tabelle 17: Makroskopische Bilder der AFM-Platten mit unter Normoxie mineralisierenden Zellmonolayer.....	59
Tabelle 18: Makroskopische Bilder der AFM-Platten mit unter Hypoxie mineralisierenden Zellmonolayer.....	60

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<i>Abbildung 1: Skizze des Versuchsablaufs</i> .....	13
<i>Abbildung 2: Beispielbild für die Zellkulturen auf den AFM-Platten</i> .....	15
<i>Abbildung 3: Vorbereitung des Rasterkraftmikroskops</i> .....	17
<i>Abbildung 4: Skizzierte Funktionsweise des AFM</i> .....	18
<i>Abbildung 5: Beispiel einer Kraftkurve</i> .....	19
<i>Abbildung 6: Zellmonolayer unter dem AFM-Mikroskop</i> .....	20
<i>Abbildung 7: Elastizitätsmoduln der von den Zellen gebildeten Kalzium-Phosphat-Präzipitate in den osteogen stimulierten Proben</i> .....	27
<i>Abbildung 8: Elastizitätsmoduln der CaP-Präzipitate einzelner Patienten</i> .....	29
<i>Abbildung 9: E-Moduln einzelner Patienten in Hinblick auf Zelltyp und Inkubationsbedingung</i> .....	30
<i>Abbildung 10: E-Moduln einzelner Patienten in Hinblick auf Zelltyp, Inkubationsbedingung und Beschichtung</i> .....	31
<i>Abbildung 11: Elastizitätsmoduln der CaP-Präzipitate in verschiedenen Vergleichen</i> .....	33
<i>Abbildung 12: Vergleich aller Elastizitätsmoduln der CaP-Präzipitate</i> .....	34
<i>Abbildung 13: Elastizitätsmoduln der Zellkörper von osteogen-induzierten Zellen (OB-Zellen)</i> .....	36
<i>Abbildung 14: Elastizitätsmoduln der Zellkörper von osteogen-induzierten Zellen (OB-Zellen) – verschiedene Vergleiche</i> .....	37
<i>Abbildung 15: Vergleich aller Elastizitätsmoduln der Zellkörper von osteogen-induzierten Zellen (OB-Zellen)</i> .....	38
<i>Abbildung 16: Elastizitätsmoduln der Zellkörper von undifferenzierten Zellen (CO-Zellen)</i> .	39
<i>Abbildung 17: Elastizitätsmoduln der Zellkörper von undifferenzierten Zellen (CO-Zellen) – verschiedene Vergleiche</i> .....	40
<i>Abbildung 18: Vergleich aller Elastizitätsmoduln der Zellkörper von undifferenzierten Zellen (CO-Zellen)</i> .....	41
<i>Abbildung 19: Vergleich der Elastizitätsmoduln in logarithmischer Darstellung</i> .....	43
<i>Abbildung 20: Zellelastizitäten im Vergleich in Bezug auf Zelltyp und Inkubationsbedingung</i> .....	44
<i>Abbildung 21: Korrelation zwischen den E-Moduln der CaP-Präzipitate und OB-Zellen</i> ....	46
<i>Abbildung 22: Korrelation zwischen den E-Moduln der CO- und OB-Zellen</i> .....	46
<i>Abbildung 23: AFM-Messungen der Mineralisierungen-medienbezogene Unterschiede</i> .....	47
<i>Abbildung 24: Photometrische Quantifizierung der Zellmineralisierungen</i> .....	48
<i>Abbildung 25: Photometrische Quantifizierung der Mineralisierungen - patientenbezogene Unterschiede</i> .....	49
<i>Abbildung 26: Alizarinquantifizierung in verschiedenen Vergleichen</i> .....	50
<i>Abbildung 27: Vergleich aller anhand der Alizarinfärbung gemessenen Kalziumkonzentrationen [mM]</i> .....	51
<i>Abbildung 28: Photometrische Messung der Mineralisierungen – medienbezogene Unterschiede</i> .....	53
<i>Abbildung 29: Korrelation von E-Modul und Alizarinkonzentration der CaP-Präzipitate</i> .....	54
<i>Abbildung 30: Korrelation von E-Modul und Alizarinkonzentration der osteogen induzierten Zellen</i> .....	55
<i>Abbildung 31: Korrelation von E-Modul und Alizarinkonzentration der undifferenzierten Zellen</i> .....	56
<i>Abbildung 32: Zellen in der dritten Passage (P3) kurz vor dem Aussäen in die AFM-Schälchen</i> .....	56
<i>Abbildung 33: Anfängliche Mineralisierungen der Zellmonolayer</i> .....	57
<i>Abbildung 34: Wachsende Mineralisierungen der Zellmonolayer</i> .....	57

<i>Abbildung 35: Monolayer mit starker Mineralisierung</i> .....	58
<i>Abbildung 36: Monolayer mit maximaler Mineralisierung</i> .....	58
<i>Abbildung 37: Vergleich Zellmonolayer hPl-5- vs. hPl-10-Medium-Bedingungen</i> .....	61
<i>Abbildung 38: Im selben Versuchansatz mineralisierte und nicht mineralisierte Nachbarschälchen</i> .....	61
<i>Abbildung 39: Unterschied Passage und Medium</i> .....	62
<i>Abbildung 40: Undifferenzierte CO-Zellen: JPCs vs. iMSCs (Patient # 3)</i> .....	63
<i>Abbildung 41: Undifferenzierte CO-Zellen: JPC vs. iMSC (Patient # 2)</i> .....	63
<i>Abbildung 42: Nicht mineralisierte OB-Zellen im Vergleich mit undifferenzierten CO-Zellen</i> .....	64
<i>Abbildung 43: CO-Zellen unter hPl-5- vs. hPl-10-Supplementation</i> .....	64
<i>Abbildung 44: Undifferenzierte CO-Zellen: Normoxie vs. Hypoxie</i> .....	65
<i>Abbildung 45: Vergleich der ausgesäten Zelldichte</i> .....	65
<i>Abbildung 46: Fluoreszenzbilder von mineralisierten iMSC-Monolayern</i> .....	67
<i>Abbildung 47: Fluoreszenzbilder von mineralisierten JPC-Monolayern</i> .....	68
<i>Abbildung 48: Fluoreszenzbilder von undifferenzierten iMSCs/JPCs</i> .....	69
<i>Abbildung 49: F-Aktinfasern der Zytoskelette</i> .....	70
<i>Abbildung 50: Vollmineralisierte AFM-Platte mit 3D-Präzipitaten</i> .....	82

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AFM	Rasterkraftmikroskop, engl. atomic force microscope
BTE	Knochengewebe-Engineering, engl. bone tissue engineering
CaP	Kalzium-Phosphat
Pa	Pascal (physikalische Einheit)
CD	Unterscheidungsgruppen, engl. cluster of differentiation
CO-Zellen	Kontrollzellen
DNA	Desoxyribonukleinsäure, engl. deoxyribonucleic acid
E-Modul	Elastizitätsmodul
ECM	Extrazellulärmatrix
hPI	humanes Plättchenlysat
iMSC	Aus iPSCs differenzierte, MSC-ähnliche Zellen
iPSC	Induzierte pluripotente Stammzellen-ähnliche Zelle, engl. induced pluripotent stem cell-like cell
JPC	Kieferperiostzelle, engl. jaw periosteal cell
L521	Laminin 521
MRONJ	Medikamenten-assoziierte Osteonekrose des Kiefers, engl. Medication related osteonecrosis of the jaw
MSC	mesenchymale Stammzelle, engl. mesenchymal stem cell
OB-Zellen	osteoblastisch differenzierte Zellen
ORN	Osteoradionekrose
P	Passage
Pat.	Patient
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
Ph	Phasenkontrast
PRP	Plättchenreiches Plasma
RNA	Ribonukleinsäure, engl. ribonucleic acid

## Anmerkung zu dieser Doktorarbeit

Aus Gründen der besseren Lesbarkeit wurde in dieser Arbeit das generische Maskulinum verwendet, sofern nicht explizit anders beschrieben. Selbstverständlich sind damit sämtliche Geschlechter gemeint.

# **1 EINLEITUNG**

## **1.1 KNOCHENTRANSPLANTATIONEN IN DER MUND-, KIEFER- UND GESICHTSCHIRURGIE (MKGC)**

In einer immer älter werdenden Gesellschaft, zusätzlich kombiniert mit Bewegungsmangel und Fettleibigkeit, steigen die Zahlen von Patienten mit Knochendefekten immer weiter an (Amini et al., 2012). Der Bedarf an regenerativer Medizin wächst. Auch in der Mund-, Kiefer-Gesichtschirurgie (MKGC) kommt es leider immer wieder vor, dass Patienten Teile oder sogar ganze Gesichtsschädelknochen verlieren, was für die Patienten große funktionelle und ästhetische/soziale Probleme verursacht. Meist sind maligne Tumoren wie das Plattenepithelkarzinom die Ursache, da diese radikal und mit Sicherheitsabstand entfernt werden müssen. Besonders häufig betroffen ist dabei die Mandibula. Das liegt an der engen Beziehung zum Mundhöhlenepithel, das durch starke mechanische Belastungen und als Kontaktort zu kanzerogenen Stoffen, z. B. aus Tabak oder Alkohol, prädestiniert ist für Tumorerkrankungen. Weitere Ursachen für die Kieferknochendefekte, die eine Rekonstruktion nötig machen, können Erkrankungen des Knochens aufgrund von Bestrahlung (Osteoradionekrose, ORN) oder Nebenwirkungen von Medikamenten (Medikamenten-assoziierte Kiefernekrose, MRONJ), Entzündungen (z. B. Osteomyelitis), Traumata oder Zysten sein. Außerdem gibt es präprothetische Indikationen (z.B. Kieferatrophie), die einen Knochenersatz nötig machen. Des Weiteren sorgen angeborene Fehlbildungen (z. B. Kieferspalt) oder Entwicklungsstörungen (z. B. Treacher-Collins-Syndrom) für Bedarf an plastischen Konstruktionen zur Herstellung von funktionellen anatomischen Gegebenheiten. Hierfür gibt es verschiedene Möglichkeiten, die je nach Größe des Defekts zum Einsatz kommen.

Als Transplantate stehen autogene, allogene und xenogene Optionen sowie alloplastische Transplantate zur Verfügung. Heute ist der Goldstandard die autogene Knochentransplantation (früher autologe Transplantation). Der Vorteil liegt in der Fähigkeit zur Knocheninduktion und darin, dass keine Abstoßungsreaktion durch das Immunsystem auftritt, da Spender und Empfänger dieselbe Person sind. Dadurch haben diese Transplantate die größten Einheilungschancen und sind zudem resistenter gegen Resorption oder Wundinfektionen. Autologer Knochen beinhaltet alle Merkmale für eine suffiziente Knochenheilung: Das Knochengüst als Leitstruktur (Osteokonduktion), vitale Zellen (Osteogenese) und Wachstumsfaktoren (Osteoinduktion) (Rupp et al., 2021). Es wird zwischen

Kompaktatransplantaten, Spongiosatransplantaten und kombiniert kortikospongiösen Transplantaten unterschieden. Für größere Transplantate wird oft Fibula oder Skapula als „Ersatzteillager“ herangezogen, für kleinere Transplantate, beispielsweise periimplantär in der präprothetischen Chirurgie und Implantologie, eignen sich der Beckenkamm oder auch lokoregionale Bereiche wie retromolar im Ober- und Unterkiefer, die Kinnprominenz oder die Apertura piriformis (die paarige, birnenförmige Öffnung des Gesichtsschädels zur knöchernen Nasenhöhle) als Entnahmestelle. Skapula und Fibula weisen durch ihren Aufbau aus Kortikalis und Spongiosa eine ähnliche anatomische Architektur wie die Mandibula auf und sind bis zu einem gewissen Grad in ihrer Entnahmestelle verzichtbar. Weitere entfernte Spenderregionen können die Tabula externa der Schädelkalotte oder Rippen sein. Nachteile sind jedoch die aufwendigere und längere OP, bei der der Patient manchmal umgelagert werden muss, hohe Kosten, eine nicht zu vernachlässigende Resorption, sowie die zusätzliche Morbidität an der Entnahmestelle. Auch die generellen Risiken bei der Entnahme, wie z. B. eine Nervverletzung besonders bei intraoralen Spenderregionen, Blutung/Nachblutung, Schwellung und Entzündung, müssen erwähnt werden. Bei 10-30% der Patienten kommt es zu Komplikationen wie zu Funktionsstörungen, Schmerzen, Infektionen, Bewegungseinschränkungen, Gefühlsstörungen, Narbenbildung und subjektiven Empfindungen in Alltag und Beruf im Bereich der Spenderregion (Rupp et al., 2021, Meijer et al., 2008). Außerdem ist die Menge an Knochen, die entnommen wird, begrenzt und in 40% der Fälle stehen autogene Knochentransplantate nicht zur Verfügung (Schneider et al., 2010). Zu den Patientengruppen, bei denen eine autologe Knochenspende nicht möglich ist, zählen Säuglinge, immundefiziente sowie osteopore, d.h. über eine unphysiologisch geringe Knochendichte verfügende Patienten (Rees and Haddad, 2003).

Allogene Transplantate (früher homologe Transplantate) werden von einem Spender derselben Spezies, aber nicht desselben Individuums gewonnen, also von einem Menschen zum anderen Menschen übertragen. Durch die fremden Antigene des Transplantats werden zelluläre und humorale Immunreaktionen hervorgerufen, die man durch Konservierung des Transplantats oder Immunsuppression des Empfängers versucht, weitestgehend zu unterdrücken. Durch die Sterilisation und Verarbeitung geht die knocheninduktive Fähigkeit so gut wie vollständig verloren (Rupp et al., 2021, Schwenzer N, 2011). Obwohl seit den neunziger Jahren kein Fall mehr berichtet wurde, existiert dennoch die Gefahr einer Prion- oder Virusübertragung, wie Hepatitis oder HIV und auch bakterielle Kontaminationen stellen ein Problem von Allografts (allogene Transplantate) dar (Schwenzer N, 2011, Rupp et al., 2021). Früher bestehende Knochenbanken, in denen allogener Knochen tiefgefroren gelagert wurde, sind inzwischen

stark dezimiert und aufgrund guter anderer Möglichkeiten auch nicht mehr nötig. Der Rückgang hängt zusammen mit dem Aufkommen von bestimmten übertragbaren Viren- oder Prioninfektionen, wie z. B. HIV, BSE oder Creutzfeld-Jacob-Krankheit, die das Verwenden der allogenen Knochen nicht sicher machte (Schwenzer N, 2011).

Das Problem der Erkennung von Fremdmaterial durch das Immunsystem des Empfängers gilt auch für die dritte Möglichkeit, nämlich die der xenogenen Transplantate, bei welchen die Abstoßungsreaktionen unter Umständen sogar noch stärker verlaufen können. Xenogen bedeutet, dass das Transplantat einer fremden, tierischen Spezies entnommen wird. Die erhöhte Gefahr einer Abstoßungsreaktion ergibt sich daraus, dass sich das menschliche Immunsystem von dem der fremden Spezies stärker unterscheidet als von anderen Menschen. Das heißt, diese Knochenmaterialien sollten nur dann transplantiert werden, wenn eine Antigen- und Erregerfreiheit besteht. Hierfür muss der tierische Knochen von jeglichen Zellen und Weichgeweben befreit werden, sodass nur noch ein Knochengerüst übrigbleibt. Somit ist auch xenogener Knochenersatz nur osteokonduktiv, nicht aber osteoinduktiv. Beispiele für xenogene Transplantate sind Schweinehaut in der Verbrennungschirurgie oder Knochenersatzmaterialien wie BioOss in der MKGC (periimplantär, Parodontalchirurgie, Füllung von Knochendefekten). Die vierte Methode zur Knochen(re)konstruktion ist das Einbringen von künstlichem Fremdmaterial, sogenannte alloplastische Implantate. Es stehen resorbierbare (z. B. Trikalziumphosphate) und nicht, bzw. extrem langsam resorbierende Keramiken (z. B. Hydroxylapatit) zur Verfügung, sowie Metalle (z. B. Titan, oft als temporärer Ersatz) oder Kunststoffe. Bei diesen Stoffen ist in erster Linie nicht die Abstoßungsreaktion des Empfängers das Problem, sondern primäre oder sekundäre Entzündungen durch Infektionen. Dabei spielen vor allem auch sekundäre Entzündungen eine große Rolle und sind entscheidend für den Erfolg oder Misserfolg einer Implantation. Beispielsweise durch Perforationen kann es zu einer Infektion des Implantatbetts kommen und solche Implantate müssen in den meisten Fällen explantiert werden. Alloplastische Materialien sind ebenfalls nur osteokonduktiv und werden vor allem zur Auffüllung von Defekten wie z. B. bei Zysten verwendet oder sie werden für Augmentationen vor dentaler Implantation, in der Parodontalchirurgie, für Kiefergelenkprothesen oder zur Gesichtsrekonstruktion verwendet. Bei Letzterem kommen sie vor allem bei der Rekonstruktion von dünnen Knochenwänden wie dem Orbitaboden zum Einsatz.

Es gibt auch Ansätze, die autogene mit xenogenen Materialien vermischen, um die Vorteile zu kombinieren. Dazu zählt beispielsweise das „Kieler Sushi“, das sich Wachstumsfaktoren in Kombination mit partikulärem bovinen und ein wenig autogenem Knochen, stabilisiert durch

körpereigenes Fibrin, zunutze macht. Doch auch diese PRP-Methoden kommen an ihre Grenzen, wenn es um große oder vertikal hohe Transplantate geht (Zernial, 2/2020).

Vor allem in der Fehlbildungschirurgie bei Hypoplasien und Aplasien oder Verlagerungen von Ober- oder Unterkiefer kommen auch Methoden wie die Distraktionsosteogenese zum Einsatz, wo über eingebaute Schrauben langsam eine Vergrößerung des bestehenden Knochens erreicht wird. Allerdings ist hier der Indikationsbereich eher klein und unter anderem kann es durch die zwangsläufige Perforation der Schleimhaut zu Komplikationen kommen. Diese Methode besticht jedoch durch exzellent vaskularisierten Knochen und geringe Resorptionsraten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass für die verschiedenen Anforderungen in der MKGC gute Möglichkeiten zur Knochen(re)konstruktion bestehen, jedoch alle Methoden gewisse Nachteile aufweisen. Dazu gehören vor allem die relativ hohe Entnahmemorbidität und Resorptionsrate sowie das begrenzte Angebot bei der autogenen Transplantation, die Abstoßungsreaktionen und Infektionsgefahr bei allogenen und xenogenen Transplantationen, die fehlende Osteoinduktion bei allogenen, xenogenen und alloplastischen Transplantaten, und die sekundäre Infektionsgefahr bei alloplastischen Implantaten, die die Erfolgswahrscheinlichkeit vermindern.

## **1.2 BONE TISSUE ENGINEERING (BTE)**

Die oben genannten Probleme zu umgehen, ist das Ziel des Bone Tissue Engineering (dt. Knochengewebe-Engineering). Für dieses therapeutische Verfahren werden Patienten geeignete Stammzellen entnommen, die in vitro kultiviert werden. Diese Therapie ist möglich bei planbaren OPs, bei denen nicht sofort ein Transplantat verlangt wird. Auf die verschiedenen geeigneten Stammzellarten mit Vor- und Nachteilen wird unter Punkt 1.3 eingegangen. In vorangegangenen Arbeiten unseres Labors wurden Protokolle zur Extraktion der Stammzellen aus dem chirurgischen Exzizat, zur Kultivierung und Proliferation sowie zur osteogenen Differenzierung entwickelt. Durch die osteogene Differenzierung sind die Zellen dann in der Lage, eine mineralisierte extrazelluläre Matrix zu synthetisieren, die später zu Knochengewebe umgebaut werden soll. Die gezüchteten Osteoblasten werden auf 3D-Gerüste aus biomimetischen Materialien, wie beispielsweise Hydroxylapatit, gesetzt, welche den Patienten im Bereich der Knochendefekte implantiert werden sollen. Diese Gerüste werden durch eine Beschichtung aus Wachstumsfaktoren, wie z. B. dem Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP-2), biofunktionalisiert (Shen et al., 2016), sodass die osteogene Differenzierung durch das Protein induziert werden kann. In der Theorie bilden die Zellen dann in vivo Knochensubstanz entlang der Gerüste (Osteoinduktion), welche dann allmählich vom Körper resorbiert werden sollen

(Dai et al., 2020). Bisherige Studien, bei denen osteogen differenzierte Zellen in Patienten eingesetzt wurden, haben gezeigt, dass eine Osteoinduktion möglich ist, jedoch bisher noch besser ektopisch als orthotop funktioniert. Das liegt laut Meijer, G.J., et al vor allem an der unzureichenden Durchblutung im OP-Gebiet (Meijer et al., 2008). Aufgrund mannigfaltiger regulatorischer Hürden ist die klinische Anwendung des BTE in der MKGC heutzutage noch keine Routine. Zu den ungelösten Problemen zählen die Vaskularisierung und die sekundäre Atrophie, die leider nicht selten auftritt. Letzteres ist auch bei herkömmlichen Verfahren manchmal der Fall. Außerdem ist beim BTE eine Sofortrekonstruktion nicht immer möglich, da die Zellen des Patienten erst im Labor gezüchtet werden müssen.

## **1.3 STAMMZELLEN**

### **1.3.1 Mesenchymale Stammzellen**

Mesenchymale Stammzellen (MSCs) eignen sich besonders gut für das Tissue Engineering, da sie multipotent sind, d.h. in verschiedene mesodermale Gewebe differenzieren können, und immunmodulatorische Fähigkeiten besitzen (Schneider et al., 2010). Damit wird der natürliche Prozess der Knochenentstehung durch MSCs über Osteoprogenitorzellen imitiert. In den 1970er Jahren wurden diese Zellen durch Friedenstein entdeckt, der aus Knochenmark fibroblastenähnliche Zellen isolierte, die ein chondrogenes, adipogenes und osteogenes Potenzial hatten. Später wurden sie als Vorläufer von z. B. Osteoblasten identifiziert und „mesenchymale Stammzellen“ genannt (Friedenstein et al., 1970, Caplan, 1991). Die internationale Gesellschaft für zelluläre Therapie definiert humane mesenchymale Stammzellen über drei Kriterien: 1) Die Zellen müssen unter Standard-Kulturbedingungen plastikadhärent sein; 2) Sie müssen bestimmte Oberflächenmarker in einer definierten Menge exprimieren (>95%): CD105, CD73 und CD90 und negativ (<2%) für andere, hauptsächlich hämatopoietische Oberflächenmarker sein: CD45, CD34, CD14 oder CD11b, CD79alpha oder CD19 und HLA-DR; 3) MSCs müssen in vitro zur Differenzierung zu Osteoblasten, Chondroblasten und Adipozyten fähig sein (Dominici et al., 2006, Fitzsimmons et al., 2018). Bisher wurde noch kein spezifisches MSC-Epitop entdeckt, da die Zellen in verschiedenen Mikroumgebungen verschiedene Marker exprimieren oder wieder verlieren (Fitzsimmons et al., 2018). Im Körper kommen die Zellen in fast allen Geweben vor (z. B. Haut, Pankreas, Herz, Gehirn, Lunge, Niere, Fettgewebe, Knorpel und Sehnen (Fitzsimmons et al., 2018)) und sind in bisherigen Studien auch aus verschiedenen Regionen des Körpers entnommen worden. Dazu gehört das Knochenmark, Fettgewebe, die dentale Pulpa, mobilisiertes peripheres Blut sowie bei der Geburt gewonnenes Gewebe (Berebichez-Fridman and Montero-Olvera, 2018). Es wird

zwischen embryonalen und adulten mesenchymalen Stammzellen unterschieden. Erstere sind ethisch höchst umstritten und in Deutschland verboten, da sie nur durch die Zerstörung eines Embryos gewonnen werden können. Unter den adulten nehmen die perinatalen mesenchymalen Stammzellen eine spezielle Rolle ein, da diese besonders vital sind und leicht aus dem Nabelschnurgewebe gewonnen werden können, das nach einer Geburt sowieso verworfen werden würde (Schneider et al., 2010). Eine weitere wichtige Quelle für adulte MSCs ist das Knochenmark, das z. B. iliakal entnommen werden kann. Studien haben gezeigt, dass MSCs aus dem Knochenmark eine bessere Fähigkeit zur osteogenen Differenzierung auszeichnet als beispielsweise MSCs aus Fettgewebe (Li et al., 2015). Oral ist die zugänglichste Stammzellquelle das Kieferperiost. MSCs zeichnen sich durch die Fähigkeit zum Homing aus, das heißt sie können in verletztes Gewebe einwandern (Berebichez-Fridman and Montero-Olvera, 2018). Hier haben sie eine große Bandbreite an Aufgaben: Ein Teilaufgabengebiet besteht darin, durch Proliferation und Differenzierung als Ersatzreservoir für verletzte oder zerstörte Zellen zu dienen. Neben der Geweberegeneration durch Synthese einer neuen Extrazellulärmatrix sind MSCs zusätzlich hypoimmunogen und wirken durch parakrine Signale und Kommunikation über Zell-Zell-Kontakte immunsuppressiv und immunmodulierend. Tatsächlich zählt die Koordination von Heilungsprozessen sowie die Prävention von autoimmunen Prozessen nach einer Verletzung zu den Hauptaufgaben der MSCs (Fitzsimmons et al., 2018). Sowohl Teile des angeborenen als auch des erworbenen Immunsystems können durch die Wirkung von mesenchymalen Stammzellen supprimiert werden (He et al., 2021, Fitzsimmons et al., 2018), was einen Vorteil z. B. für die Einheilung von dentalen Implantaten bedeutet und das Problem allogener, xenogener und alloplastischer Knochenersatzmaterialien umgeht. So inhibieren MSCs beispielsweise die Reifung von antigenpräsentierenden dendritischen Zellen, haben einen unterdrückenden Einfluss auf T-Zell-Populationen und exprimieren komplementunterdrückende Faktoren (Dai et al., 2018). Derzeit existieren verschiedene Behandlungen in präklinischer oder klinischer Entwicklung. Dazu gehören MSC-Injektionen in das Myokard nach einem Infarkt, Behandlungen gegen die Graft versus Host Disease (GvHD) und gegen autoimmune Erkrankungen wie Morbus Crohn oder Typ-I-Diabetes (Fitzsimmons et al., 2018, Abdi et al., 2008). Weitere nützliche Eigenschaften für das Einheilen von Knochendefekten sind Antiapoptose, Antifibrose sowie Proangiogenese (Schneider et al., 2010). Die Aktivität von MSCs bewirkt eine Förderung der Aktivität von hämatopoietischen Progenitorzellen, was einen proangiogenetischen Effekt erzielt (Baker et al., 2015). Klinische Anwendungen, bei denen MSCs injiziert wurden, haben gezeigt, dass sowohl durch autogene als auch allogene MSCs keine signifikanten Assoziationen zwischen einer

Infusion und akuter Toxizität, Infektion, Organsystemkomplikationen, Malignität oder Tod herzustellen ist. Nichtsdestotrotz sind vor allem die Langzeitfolgen von solchen Therapien noch nicht ausreichend erforscht, da zellbasierte Therapien beispielsweise immunologische Komplikationen oder maligne Entartungen verursachen können (Lalu et al., 2012). Positiv lässt sich unter diesem Aspekt erwähnen, dass systemisch bzw. intravenös verabreichte MSCs nicht lange im Körper persistieren (Eggenhofer et al., 2012). Wie oben beschrieben, ist die Vielfältigkeit der Zellen einer ihrer größten Vorteile und es wurden schon Fälle beobachtet, bei denen die Zellen sich nicht nur adipogen, chondrogen und osteogen differenzieren ließen, sondern auch zu anderen Zelltypen transdifferenziert werden konnten, wie Tendozyten, Endothelzellen, Hepatozyten, Neurone und Muskelzellen von skelettalem, glattem und Herzmuskelgewebe (Youngstrom et al., 2016, Tataru et al., 2007, Galli et al., 2014, Fitzsimmons et al., 2018, Tran et al., 2012).

#### *1.3.1.1 Kieferperiostzellen (JPCs)*

Für die Oralchirurgie sind Kieferperiostzellen (engl. Jaw Periosteal Cells, JPCs) die am leichtesten zugängliche Stammzellquelle. Im Jahr 2004 wurde erstmals erfolgreich mit Kieferperiostzellen Bone Tissue Engineering betrieben (Schimming and Schmelzeisen, 2004). In der erwähnten Studie wurde bei 18 von 27 Patienten eine Knocheninduktion nach Sinuslift mit Implantieren von mandibulären JPCs in einem Ethisorb-Fleece nachgewiesen. Aufgrund ihrer einfachen Erreichbarkeit, der multipotenten Kapazität auf Einzelzell-Level (De Bari et al., 2006), vor allem ihrer hohen osteogenen Differenzierungskapazität und hohen Proliferationsraten erweisen sich mesenchymale Stammzellen, die aus dem Periost gewonnen werden, als vielversprechende Kandidaten für Mund-, Kiefer-, und Gesichtsrekonstruktionen (Danalache et al., 2019, Alexander et al., 2010). Für den Kieferbereich ist die Verwendung von Kieferperiostzellen besonders naheliegend, da sie relativ schmerzfrei und oft ohne zusätzlichen Entnahmeeingriff gewonnen werden können (beispielsweise, wenn sowieso kleinere oralchirurgische Operationen oder Probeentnahmen durchgeführt werden), ein hohes osteogenes Potenzial aufweisen und an die hohen mechanischen Belastungen des Kiefers gewöhnt sind (He et al., 2021). Der Unterkiefer ist als einziger beweglicher Gesichtsschädelknochen besonders mannigfaltigen Belastungen wie Torquekräften und sehr starken biomechanischen Kräften durch die Mastikation ausgesetzt und man geht davon aus, dass sich das positiv auf die Knochenbildung und die -stabilität auswirkt (Inoue et al., 2019). Einige Schädelknochen wie die Mandibula werden aus der Neuralleiste, also dem Ektoderm gebildet und nicht wie die meisten anderen Knochen aus dem Mesoderm. Das bedeutet, dass

die Stammzellen eine unterschiedliche embryologische Herkunft haben. Studien belegen, dass die Knochenregeneration und auch die biomechanischen Eigenschaften und Integration von Transplantaten mit mesenchymalen Stammzellen aus der Neuralleiste denen aus dem Mesoderm überlegen sind (Glaeser et al., 2021, Leucht et al., 2008). Der Einfluss des Periosts auf das Knochenwachstum wird auch durch die Periosteal-pull-Hypothese deutlich. Diese besagt, dass ein Zug auf das Periost eine Knochenapposition im betroffenen Gebiet verursacht. Dieser Effekt wird beispielsweise in der funktionellen Kieferorthopädie genutzt, um Dysgnathien im Kindes-/Jugendalter zu beheben. Ein Beispiel hierfür sind die Funktionsregler nach Fränkel, die sich zusätzlich zur formenden Kraft der Zunge auch die osteoinduktiven Eigenschaften des Periosts zunutze macht (Sotiriadou and Johnston, 1999, Fränkel, 1962).

Wie andere mesenchymale Stammzellen haben auch JPCs, sowohl undifferenzierte als auch kürzlich osteogen differenzierte, einen inhibierenden Effekt auf dendritische Zellen. JPCs unterdrücken proinflammatorische Zytokine und induzieren das anti-inflammatorische Interleukin-10 (Dai et al., 2018). Im Gegensatz zu Stammzellen aus dem Knochenmark, bei denen im Alter eher das adipogene Potenzial ausgeprägt ist, nimmt das osteogene Potenzial von Stammzellen aus dem Tibiaperiost mit zunehmendem Alter des Patienten nicht ab (De Bari et al., 2006, Huibregtse et al., 2000)

Jedoch sind nicht alle so gewonnenen Zellen zur osteogenen Differenzierung fähig. Eine Hürde bei der Entnahme der Zellen aus dem Kieferperiost stellt die Heterogenität der dort ansässigen Zellen dar. Neben den eigentlichen mesenchymalen Stammzellen wachsen in der in vitro Zellkultur hauptsächlich Gewebsfibroblasten und zu einem geringen Anteil auch Myozyten oder Adipozyten (Alexander et al., 2010). In der Literatur ist strittig, ob sich JPCs oder Knochenmarkstammzellen besser zum BTE eignen. Während Agata et al. beschreiben, dass JPCs schneller proliferieren und mehr neuen Knochen bilden (Agata et al., 2007), kommen Jaquier et al. zu dem Schluss, dass JPCs eine niedrigere Knochenbildungskapazität als vergleichbare Stammzellen aus dem Knochenmark besitzen (Jaquier et al., 2005).

### *1.3.1.2 Probleme beim BTE mit Stammzellen*

Trotz vielversprechender in vitro und in vivo Versuche gibt es noch einige Hürden, die im Umgang mit mesenchymalen Stammzellen bis zur routinemäßigen klinischen Anwendung überwunden werden müssen. Herausforderungen beim BTE können dadurch entstehen, dass bei einem Patienten der gewünschte Zelltypus nicht in einer ausreichenden Menge für eine autologe Transplantation gewonnen werden kann. Dies ist oft bei großen Knochendefekten und älteren Patienten der Fall, da bei Ersteren extrem hohe Zellzahlen benötigt werden und bei

Letzteren die Anzahl an MSCs im Gewebe abnimmt (Baker et al., 2015). Laut Umrath et al. mangelt es den Stammzellen der älteren Patienten oft sowohl an Quantität als auch an Qualität (Umrath et al., 2019). Sheyn et al. behaupten hingegen, dass sich die Häufigkeit der MSCs im Gewebe von älteren Patienten kaum verändert, wohl aber die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Funktionalität in der Geweberegeneration, und zwar in negativer Richtung (Sheyn et al., 2016). Somit können JPCs für kleinere autologe Transplantationen verwendet werden, jedoch ist eine andere Stammzellquelle bei größeren Defekten nötig (Umrath et al., 2020). Obwohl mesenchymale Stammzellen, wie unter Punkt 1.3.1 beschrieben, im Körper aus vielen verschiedenen Geweben gewonnen werden können, ist die Ausbeute meist dennoch gering. Das führt zu einem gigantischen Bedarf an Zellexpansion in vitro, welche stark vom Spenderalter und klinischer Vorgeschichte bzw. exogenen Faktoren, wie Bestrahlung bei Tumorpatienten, abhängt (Kornicka et al., 2018). Zu den Erkrankungen, die zu einer Verschlechterung der MSCs für das BTE führen, zählen beispielsweise der weit verbreitete Diabetes mellitus Typ 2 oder das metabolische Syndrom (Kornicka et al., 2018). Der Grund dafür könnte die stark erhöhte Kalorienzufuhr sein, die durch ständige inflammatorische Reize die MSCs ständig alarmiert (Kornicka et al., 2018). Meist sind die Patienten, die eine solche Therapie benötigen, höheren Alters oder multimorbide und die Suffizienz der MSCs für das BTE nimmt bei Selbigen im Vergleich zu jungen, gesunden Menschen ab (Fitzsimmons et al., 2018, Umrath et al., 2020). Durch eine replikative Seneszenz ist die in vitro Expansion von MSCs begrenzt (Tran et al., 2012). Dies liegt unter anderem an den verkürzten Telomeren bzw. niedriger Expression von Telomerasen, schlechterer Fähigkeit im Umgang mit oxidativem Stress bei gleichzeitig erhöhten intrazellulären ROS-Konzentrationen und weniger dynamischem Zytoskelettremodelling (Baker et al., 2015, Kornicka et al., 2018). Die Aktivierung des Seneszenz-Pathways korreliert meist mit Stressstimuli wie oxidativem Stress, Hitzeschock, Aktivierung von Onkogenen, DNA-Verletzungen, mitochondrialer Dysfunktion oder Chemotherapeutika (Kornicka et al., 2018, Lapasset et al., 2011, Umrath et al., 2020). Zusätzlich sinkt die Proliferationsrate sowie die Potenz, zu differenzieren, bei gleichzeitiger Steigerung der Neigung zur Apoptose sowie zur Autophagie (Kornicka et al., 2018). Umrath und Sheyn kommen zu dem Schluss, dass JPCs trotz ihres Potenzials, sich zu einem gewissen Grad selbst zu erneuern, nicht unendlich vermehrt werden können, da das osteogene Potenzial in höheren in vitro Passagen abnimmt und die Zellen bereits einer replikativen Seneszenz unterliegen (Umrath et al., 2019, Umrath et al., 2020, Sheyn et al., 2016). Ob Selbiges auch in vivo bei Patienten höheren Alters zutrifft, wird in der Literatur noch debattiert (Baker et al., 2015). Weiterhin ist die Heterogenität der JPCs sowie die hohe Spendervariabilität eine Hürde.

Von selbst gehen lediglich die enthaltenen Endothelzellen zugrunde, was am fehlenden geeigneten Medium liegt. Zwar ist es möglich, Zellen mit gewissen Markern zu extrahieren, beispielsweise durch fluoreszierend oder magnetisch aktivierter Zellsortierung (FACS, MACS), jedoch ist hierbei oft nur eine geringe Effizienz möglich und das bei zusätzlich hoher Zellmortalität (Alexander et al., 2010, Umrath et al., 2019). Außerdem wurde belegt, dass die immunologischen Funktionen der Stammzellen mit zunehmendem Spenderalter abnehmen, was auf ein eher entzündliches Milieu bei älteren Patienten hindeutet (Baker et al., 2015).

### 1.3.2 Mesenchymale Stammzellen, die aus induzierten, pluripotenten Stammzellen differenziert wurden (iMSCs)

All die oben genannten Probleme veranlassen die Wissenschaft, andere Stammzellquellen zu erforschen. Vielversprechend sind dabei sogenannte induzierte mesenchymale Stammzellen. Dafür wurden die JPCs zu pluripotenten Stammzellen (iPSCs), welche embryonalen Stammzellen entsprechen, rückprogrammiert. Die Reprogrammierung von humanen somatischen Zellen zu iPSCs ist erstmals 2007 gelungen, am gleichen Tag durch Takahashi et al. und James Thomsons Gruppe veröffentlicht (Takahashi et al., 2007, Yu et al., 2007). Lapasset ist es 2011 gelungen, auch aus Stammzellen von über 90-jährigen Spendern fähige iPSCs zu generieren (Lapasset et al., 2011). Diese sogenannten induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSCs) können zu jedem Zelltyp eines Körpers ausdifferenziert werden und die hohe Kapazität zur Selbsterneuerung ermöglicht eine Produktion von äußerst hohen Zellzahlen (Umrath et al., 2019). Manche Autoren sprechen sogar von einer unlimitierten Kapazität zur Selbsterneuerung und Differenzierungspotenzial (Umrath et al., 2020, Yu and Thomson, 2014, Sheyn et al., 2016). Daher sind sie in großen Mengen verfügbar. Es stehen verschiedene Verfahren zur Generierung von iPSCs zur Verfügung. Diese Methoden beinhalten Plasmide, Sendaiviren, Adenoviren, synthetische RNAs und Proteine (Yamanaka, 2012). Für das BTE empfiehlt sich die weitere Differenzierung der iPSCs zu iPSC-abgeleiteten mesenchymalen Stammzellen (iMSCs). Im Normalfall werden die iPSCs nämlich nicht direkt osteogen differenziert, da die Zwischenstufe der iMSCs gewisse Vorteile bietet: So können beispielsweise zur osteogenen Differenzierung dieselben Protokolle wie bei den MSCs herangezogen werden oder das Risiko der Entstehung von Teratomen kann stark gesenkt werden. Allerdings müssen hierfür die Selektionsmechanismen verbessert werden, sodass ausgeschlossen werden kann, dass einzelne iPSCs noch in den iMSCs bestehen geblieben sind. Ein Ansatz hierfür ist das Einführen eines Suizidgens für eventuelle iPSCs (Max-Planck-Gesellschaft, 2008). Für die MSC-ähnlichen Zellen gelten dieselben von der internationalen

Gesellschaft für zelluläre Therapie festgelegten Richtlinien wie für MSCs: Plastikadhärenz, Expression gewisser Oberflächenmarker und die trilineare Differenzierungspotenz. Durch das Verfahren der Differenzierung zu iMSCs könnten, verglichen mit direkt entnommenen Stammzellen, homogenere Osteoprogenitorzellpopulationen geschaffen werden, die unter Umständen zu einer Standardisierung eines Prozesses zur Herstellung für die klinische Verwendung dienen könnten (Umrath et al., 2019, Zhao et al., 2015). Außerdem wurden Zeichen einer Verjüngung bei iPSC-abstammenden MSCs beobachtet, wie z. B. längere Telomere, beschleunigte Proliferation (Sheyn et al., 2016) und eine Genexpression, die mit Verjüngung assoziiert ist (Umrath et al., 2020, Spitzhorn et al., 2019, Frobel et al., 2014, Lapasset et al., 2011). Durch eine erhöhte Telomeraseaktivität kann es zu einer erhöhten Proliferationskapazität kommen, wodurch die replikative Seneszenz der MSCs überwunden werden kann (Umrath et al., 2020). Jedoch wurde auch Gegenteiliges im Sinne einer niedrigeren Proliferationsrate, höherer Expression von Seneszenzmarkern und höherer SA- $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität der iMSCs gegenüber der JPCs gemessen, was eine frühe Seneszenz offenlegt. Dies könnte durch den zellulären Stress während des Differenzierungsprozesses ausgelöst werden (Umrath et al., 2020). Yamanaka vermutet anhand von einigen Studien, dass eine Art epigenetisches Gedächtnis (Methylierungen) in humanen pluripotenten Stammzellen vorliegt, weshalb als Grundlage für die iPSCs in unserem Fall JPCs verwendet werden sollten (Yamanaka, 2012, Frobel et al., 2014). Grundsätzlich sind wahrscheinlich fast alle somatischen Zellen in der Lage rückprogrammiert zu werden, allerdings überlappen sich die Eigenschaften von iPSCs und den entsprechenden embryonalen Stammzellen nicht vollständig (Yamanaka, 2012). Interindividuelle (donorspezifische) Methylierungen werden von MSCs zu iPSCs zu iMSCs weitergegeben, gewebespezifische und altersbezogene nicht (Frobel et al., 2014). Das heißt, dass iMSCs unabhängig vom Spenderalter mehr Charakteristiken mit fetalen MSCs als mit gealterten MSCs teilen (Spitzhorn et al., 2019).

Weiterhin wurde beobachtet, dass iMSCs die T-Zell-Proliferation nicht im selben Maße wie die ursprünglichen MSCs beeinträchtigen, obwohl die Genexpressionsprofile mehr oder weniger übereinstimmen (Frobel et al., 2014), was bedeutet, dass iMSCs eine schwächere immunregulatorische Aktivität zeigen.

Zur dirigierten Differenzierung der iPSCs zu iMSCs stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung: die Bildung von Embryoid Bodies oder die Inkubation der iPSCs mit Differenzierungsmedium, gefolgt von einer mehrfachen in vitro Passagierung (Umrath et al., 2019). Die Funktionalität der resultierenden Zellen wurde in verschiedenen Geweben bewiesen (Sheyn et al., 2016). Durch die Differenzierung mittels Embryoid Bodies wurden zwei

verschiedene iMSC-Populationen beobachtet, von welchen die eine eher stammzellähnlich verbleibt und für entsprechende Indikationen Anwendung finden kann. Die andere MSC-Population scheint aufgrund ihrer Genexpression und schnellen Proliferationsrate sehr gut geeignet zur osteogenen Differenzierung, da diese Zellen orthotop sehr effizient Knochen regenerieren können, dieselbe Fähigkeit aber nicht für ektopische Knochenbildung besitzen, im Gegensatz zu Knochenmark MSCs (Sheyn et al., 2016).

## **1.4 ZIELSETZUNG DER ARBEIT**

Die Schlüsselfunktion der MSCs für das Knochengewebe-Engineering ist die Produktion von mineralisierter Extrazellulärmatrix aus Kalzium-Phosphat-Präzipitaten. Unter idealen Bedingungen funktioniert das gut, doch im klinischen Einsatz bestehen Hürden, wie etwa eine hypoxische Umgebung im OP-Gebiet. Je effizienter also die osteogene Differenzierung der Stammzellen ist, desto funktionaler sind die BTE-Konstrukte.

In früheren Arbeiten des MKGC-Labors der Universität Tübingen wurde beobachtet, dass das Mineralisierungspotenzial der Zellen sowohl von dem Substrat als auch dem Plattenformat abhängen kann. Beispielsweise scheint das Mineralisierungspotenzial der MSCs auf einer Lamininbeschichtung höher zu sein als auf einer Gelatinebeschichtung, zumindest auf die Genexpression bezogen. Außerdem zeigten frühere Arbeiten teilweise auf AFM-Platten (englisch: atomic force microscope, deutsch: Rasterkraftmikroskop) eine fehlende Mineralisation, obwohl dieselben Zellen in der herkömmlichen 6-Well Platte mineralisierten.

Daher beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit der Untersuchung von Stammzellen verschiedener Kulturbedingungen und deren Mineralisierungspotenzial in Bezug auf die biomechanische Eigenschaften, wobei der hier gemessene Elastizitätsmodul ein wichtiges Element ist, und die Quantität der gebildeten Kalziumphosphat-Präzipitate. Hierfür wurden zwei verschiedene Zelltypen (JPCs und iMSCs) verwendet, die Zellen unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen inkubiert und Laminin- oder Gelatine-beschichtete Kulturplatten verwendet. Diese Variablen sollen nicht nur hinsichtlich der Präzipitatelastizität und -menge verglichen werden, sondern auch eventuelle Korrelationen zwischen der Elastizität der Zellen und der Präzipitate sowie auch Zusammenhänge zwischen Elastizität und Menge der Präzipitate aufgedeckt werden.

Diese Untersuchungen sollen optimale Kulturbedingungen identifizieren, die die knochenbildende Zellfunktionalität der in vitro kultivierten JPCs und iMSCs am besten unterstützen.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 VERSUCHSAUFBAU

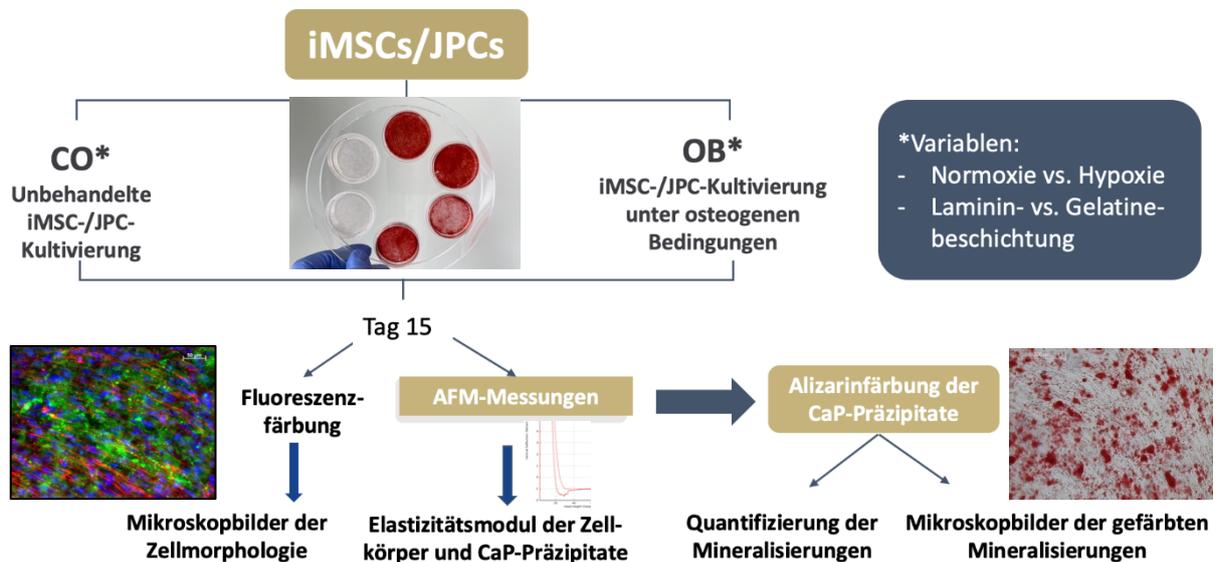


Abbildung 1: Skizze des Versuchsablaufs

Von je drei verschiedenen Spendern wurden die iMSCs und JPCs separat kultiviert. Die Zellen wurden zum Vergleich zu je 50 % auf Laminin- und Gelatine-beschichteten AFM-Platten ausgesät und eine Hälfte dann in den Normoxieinkubator gestellt und die andere Hälfte in den Hypoxieinkubator. Weiterhin wurden die Zellen unterteilt in eine unbehandelte Kontrollgruppe sowie unter osteogenen Bedingungen kultivierte Zellen. Nach einer Proliferations- und Differenzierungsphase von 15 Tagen wurde der Elastizitätsmodul von einem Teil der Zellen gemessen, um die mechanischen Eigenschaften der Zellen und ECM zu protokollieren. Hierbei wurde zwischen dem Zellkörper und den CaP-Präzipitate unterschieden. Dieselben Zellen wurden nach den AFM-Messungen fixiert und mit Alizarin eingefärbt, um die Zellmineralisationen quantifizierbar und makroskopisch sichtbar zu machen. Der Alizarin Gehalt der einzelnen Kulturplatten wurde photometrisch bestimmt, wodurch Aussagen zur Menge an kalzifizierter ECM getroffen werden konnten. Von den Messungen unberührte AFM-Platten wurden ebenfalls fixiert und mit Fluoreszenzfarbstoffen eingefärbt, um die Zellmorphologie zu analysieren und anhand von mikroskopischen Bildern festzuhalten.

### 2.2 ZELLKULTUR

Für diese Arbeit wurden JPCs und iMSCs von vier verschiedenen Spendern verwendet (M112, M113, M114 und M116), wobei für die AFM-Messungen M113 nicht verwendet werden konnte, da nicht genügend Zellen vorhanden waren. Die iMSCs wurden in vorangegangenen

Arbeiten aus JPCs (Ethikvotum 618/2017B02) über eine iPSC-Zwischenstufe gebildet und entweder direkt verwendet oder zur Lagerung eingefroren (Ethikvotum 074/2016B02). Folgende iMSCs kamen zum Einsatz: M112-iMSC-F07\_+SB, M114-iMSC-F03\_+SB, M116-iMSC-F40 (hierbei handelt es sich um laborinterne Eigennamen, die im Folgenden mit „Patient 1-3“ betitelt werden). Diese wurden in ihren Eigenschaften mit den JPCs derselben Patienten verglichen. Alle Zellen wurden mit dem Basismedium kultiviert und bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und > 90 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die verwendeten Medien sind in Tabelle 1 aufgeführt.

### 2.2.1 Kultivierung der Zellen

Die Zellen wurden aus dem Stickstofftank entnommen und kurz im 37 °C-warmen Wasserbad aufgetaut, sodass ein kleiner Eiskern in der Mitte übrigblieb. Der Inhalt des Cryoröhrchens wurde zentrifugiert (7 Minuten, 8 °C, 1400 rpm) und das Einfriermedium sodann gegen hPI-5-Medium (Basismedium (Thermofisher, UK) mit 5 %-igem Zusatz von humanem Plättchenlysat (ELAREM™ Perform-FD)) ausgetauscht. Die Zellen wurden anschließend in eine Kulturflasche mit 175 cm<sup>2</sup> Bodenfläche ausgesät. Bei schlecht anwachsenden Zellen wurde die Kulturflasche vorher mit 0,1 % Gelatine beschichtet, um das Anheften (die Adhäsion) zu erleichtern. Nach 24 h wurde ein Medienwechsel durchgeführt. Weitere Medienwechsel mit hPI-5 wurden alle zwei bis drei Tage durchgeführt (Montag, Mittwoch, Freitag), bis der Zellrasen konfluent wurde. An diesen Tagen wurde die Proliferation unter dem Lichtmikroskop (Leica, Deutschland) beobachtet.

### 2.2.2 Passage und Aussäen

Sobald mindestens 80 % Konfluenz in der Flasche erreicht war (meist nach ca. 3-6 Tagen, 21 % Sauerstoff) wurden die Zellen passagiert und in AFM-Platten (TPP, Schweiz) ausgesät. Hierfür wurden die Zellen mit PBS (Sigma-Aldrich; Lonza; beides USA) gewaschen und für 5-8 Minuten mit dem Trypsinersatz TrypLE (Thermofisher, UK) im Normoxieinkubator inkubiert. Die TrypLE-Aktivität, wodurch sich die Zellen vom Flaschenboden lösten, wurde durch hPI-5-Medium gestoppt. Zum Zählen der vorhandenen Zellen wurden 20 µl der Zellsuspension mit 20 µl Trypanblau (BIO-RAD, USA) gemischt, für zwei Minuten inkubiert und dann mithilfe der Zellzählmaschine TC-20 (BIO-RAD, USA) gezählt. Die Zählung wurde jeweils dreimal durchgeführt und aus den drei Werten wurde ein Mittelwert gebildet. Die vom Flaschenboden losgelösten Zellen wurden zentrifugiert, das Medium gegen hPI-10-Medium (Basismedium (Thermofisher, UK) mit 10 %-igem Zusatz von humanem Plättchenlysat (ELAREM™ Perform-FD)) getauscht und auf vorher beschichtete AFM-Platten ausgesät (40.000



abgesaugt. Die Zellen wurden in CryoSFM resuspendiert und auf Cryoröhrchen aufgeteilt. Diese wurden in der ersten Nacht bei -80 °C im grünen Camper gelagert, sodass die Zellen gleichmäßig runtergekühlt und eingefroren wurden, und wurden nach der Übernacht-Inkubation in den Stickstofftank überführt.

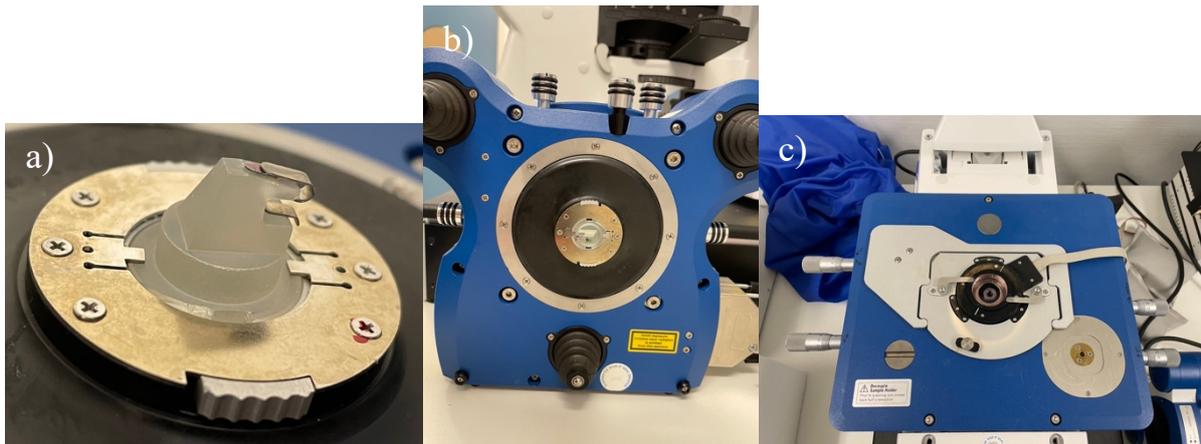
### 2.2.5 Osteogene Differenzierung der Zellen

24 Stunden nach der Aussaat in die AFM-Schälchen wurde die osteogene Differenzierung begonnen, sofern die Zellen gut angewachsen waren. Dies wurde unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Hierfür bekamen die OB-Schälchen das OB-Medium und die CO-Schälchen wurden weiterhin mit hPI-10-Medium (s. Tabelle 1) versorgt. Zur Herstellung des OB-Mediums wurde dem CO-Medium vor jedem Medienwechsel frisch drei Bestandteile zugegeben: 1 %  $\beta$ -Glycerophosphat (AppliChem, Darmstadt, Deutschland), 0,1 % L-Ascorbinsäure 2-Phosphat (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) und 0,01 % Dexamethason (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA). Alle 2-3 Tage fand eine visuelle Kontrolle durch das Lichtmikroskop sowie ein Medienwechsel statt (Montag, Mittwoch, Freitag). Leider kam es in manchen Platten unter hPI-10-Medium zu keiner Mineralisierung. Dabei handelt es sich um die unter 2.2.2 genannten Zellen: die in Hypoxie inkubierten JPCs der Patienten # 1, # 2 (nur Laminin), # 3 und den iMSCs des Patienten # 3 (26,9 % aller AFM-Messungen) und das unabhängig von der ausgesäten Menge an Zellen. Nach je drei gescheiterten hPI-10-Versuchen, gelang die Mineralisation in allen Schälchen auf Anhieb mit hPI-5 (nur 5 % statt 10 % humanes Plättchenlysat im Kulturmedium).

## 2.3 ATOMIC FORCE MICROSCOPY - NANOINDENTATION

Die Messung der Elastizitätsmoduln der Zellkörper und der gebildeten CaP-Präzipitate wurden an einem AFM-System (CellHesion200, Bruker, Billerica, Massachusetts, USA) durchgeführt, das auf ein invertiertes Lichtmikroskop (Carl Zeiss Microscopy, Deutschland) gesetzt war, sodass simultan zu den Messungen eine Visualisierung der Zellen möglich war. Dadurch konnten spezifische Bereiche der Kulturplatten festgelegt werden. Die meisten AFM-Messungen fanden an Tag 15 statt. In wenigen Fällen war das jedoch nicht möglich, weil die Schälchen zu diesem Zeitpunkt noch nicht mineralisiert waren. In diesen Fällen wurde auf Tag 16-20 ausgewichen. Vor allem die wenigen mit hPI-5 kultivierten Platten benötigten ein paar Tage länger zur Mineralisation. Soweit möglich, wurden die AFM-Messungen in Passage 4 durchgeführt. Leider erwies sich das für manche Zellen als zu niedrig, sodass 3 Gruppen (von insgesamt 24, die sich ergeben aus 3 Patienten zu je 2 Zelltypen (JPCs und iMSCs), 2

Inkubationsbedingungen (Normoxie und Hypoxie) und 2 Beschichtungen (Laminin und Gelatine)) in Passage 5 und 7 Gruppen in Passage 6 gemessen wurden. Am Tag der Messung wurde das Medium durch Leibovitzmedium (Pan Biotech, Deutschland) ersetzt. Die Messungen wurden mit einem Cantilever (=Ausleger) (Bruker Nano GmbH, Deutschland) mit einem Tip, der einen Durchmesser von 5  $\mu\text{m}$  aufwies, durchgeführt. Der Cantilever wurde mithilfe einer Pinzette auf einem Glasblock (JPK Instruments, Bruker, Berlin, Deutschland) durch eine Feder fixiert und dieser in den AFM-Kopf eingebracht.



*Abbildung 3: Vorbereitung des Rasterkraftmikroskops*

*a) Der Cantilever ist mit einer Metallfeder auf dem Glasblock befestigt. b) Der Glasblock wurde in den AFM-Kopf gespannt, Ansicht von unten. c) Das Zellkulturschälchen wurde in den Objektträger des Mikroskops gespannt und der Tisch ist bereit zur Aufnahme des AFM-Kopfs.*

Mit einem zellfreien Schälchen, das 2 ml Leibovitz-Medium enthielt und wie alle Schälchen auf 37 °C erhitzt wurde, wurden die Kalibrierungsmessungen durchgeführt. Als erstes wurde der Cantilever manuell bis unter den Spiegel des Mediums abgesenkt und dann der Laser so eingestellt, dass er auf die Spitze des Cantilevers zeigte, laterale und vertikale Durchbiegung null betrug und die Summe der Spannung mehr als 1 Volt betrug. Um dies zu erreichen, musste der Glasblock mit dem Cantilever in einem Winkel von ca. 5° eingespannt werden, was aber laut Hersteller keinen systematischen Fehler provoziert. Danach wurde eine Annäherung des Cantilevers zum Boden des Schälchens mit folgenden Parametern durchgeführt: IGain 5.0 Hz, Sollwert 5.0 und der Cantilever dann 100  $\mu\text{m}$  retrahiert.

Zur eigentlichen Kalibrierung mussten die Empfindlichkeit des Lichthebels [nm/V] und die Federkonstante des Cantilevers [N/m] bestimmt werden. Für Ersteres wurde eine Kraftkurve auf dem Schälchenboden produziert, welcher nicht eingedrückt werden kann und somit nur die Durchbiegung des Cantilevers darstellt. Auf eine rechtwinklige Form der Kurve wurde geachtet. Durch eine der steilsten Stelle der Kurve angepasste Linie erhielt man die Empfindlichkeit des Lichthebels und somit konnten die Deflektionen von Volt in Nanometer

konvertiert werden. Zur Bestimmung der Federkonstante wurde die Vibration des thermischen Wärmerauschens herangezogen, welche von der Federkonstante abhängig ist. Trotz der Angaben des Herstellers (0,2 N/m) variieren die Federkonstanten der Cantilever in kleinem Maße und mussten somit jedes Mal erneut bestimmt werden. Für den Sollwert wurde jedes Mal der in der allerersten Messung ermittelte Wert (9,864 nN) verwendet. Folgende Parameter wurden bei der Kalibrierung angewendet: Sollwert = 1,0 V, Zuglänge = 90  $\mu\text{m}$ , Z-Bewegung = konstante Geschwindigkeit, erweiterte Geschwindigkeit = 5  $\mu\text{m/s}$ , Kontaktzeit = 0 s, Verzögerungsmodus = konstante Kraft, Abtastfrequenz = 2000 Hz. Nach dieser Kalibrierungsprozedur konnte mit den Messungen der Zellen und ihrer mineralisierten Extrazellulärmatrix begonnen werden.

In den Zellmonoschichten wurde jede Messung dreimal wiederholt, um Fehler oder kleine Ungenauigkeiten des AFMs auszugleichen. Sowohl in den CO-Schälchen als auch in den OB-Schälchen wurden so von je 30 Zellen 90 Kraftkurven erstellt (Abb. 4 und 5). Außerdem wurden die Kalziumphosphat (CaP) -Präzipitate in jedem Schälchen 3x30 Mal gemessen. Die Messungen fanden mit den oben erwähnten Einstellungen und bei 37 °C im Schälchen statt. Mithilfe des Hertzmodells der Auswertesoftware (JPK-Instruments, Berlin, Deutschland)) wurde aus den Kraftkurven Elastizitätsmoduln (= Spannung pro Dehnung = Young's Modulus in Pa) errechnet.

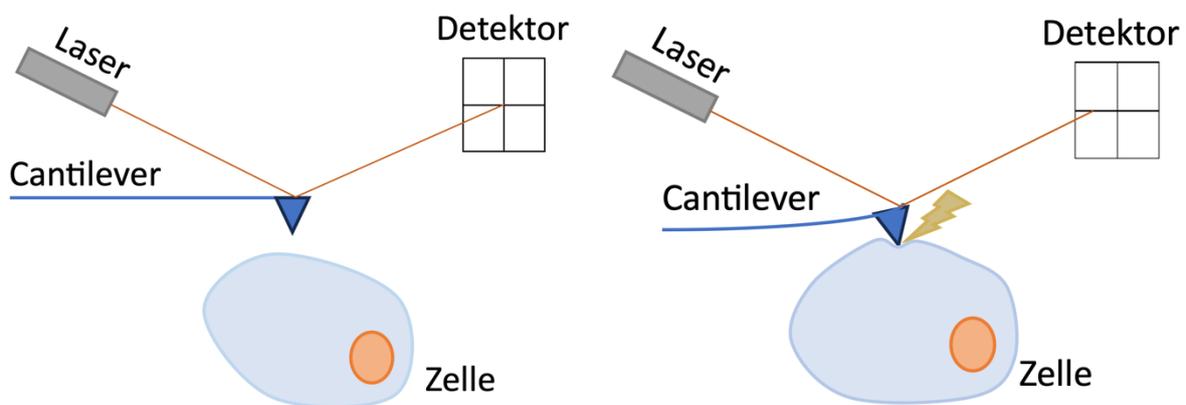


Abbildung 4: Skizzierte Funktionsweise des AFM

Schematische Darstellung des Cantilevers, wie er den Elastizitätsmodul einer Zelle misst. Der Cantilever fährt herab zur Zelle, bis er eine Triggerkraft von 9,864 nN (Sollwert) erreicht. Dabei komprimiert er die Zelle und verbiegt sich je nach E-Modul in unterschiedlichem Maß. Durch die Biegung ändert sich der Ausfallwinkel des Lasers, was mithilfe eines Detektors registriert wird. Diese Auslenkung wird in einem Kraftdiagramm dargestellt.

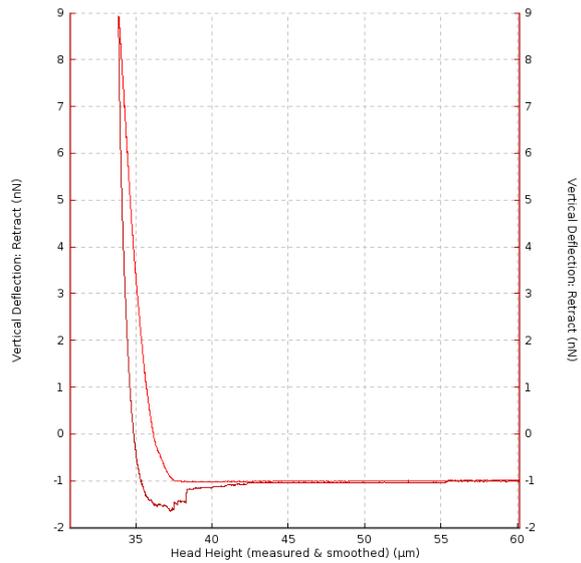


Abbildung 5: Beispiel einer Kraftkurve  
 Der Graph zeigt die Kraftkurve einer  
 Kontrollzelle. X-Achse: Höhe des  
 Cantilevers, Y-Achse: Auslenkungskraft,  
 hellrot: Hinunterbewegung des  
 Cantilevers, dunkelrot:  
 Aufwärtsbewegung des Cantilevers.

Abbildung 6 soll zeigen, wie die Monolayers unter dem Mikroskop aussahen, als die Messungen stattgefunden haben. Dabei ist der Cantilever nur in Bild D3 beispielhaft dargestellt.

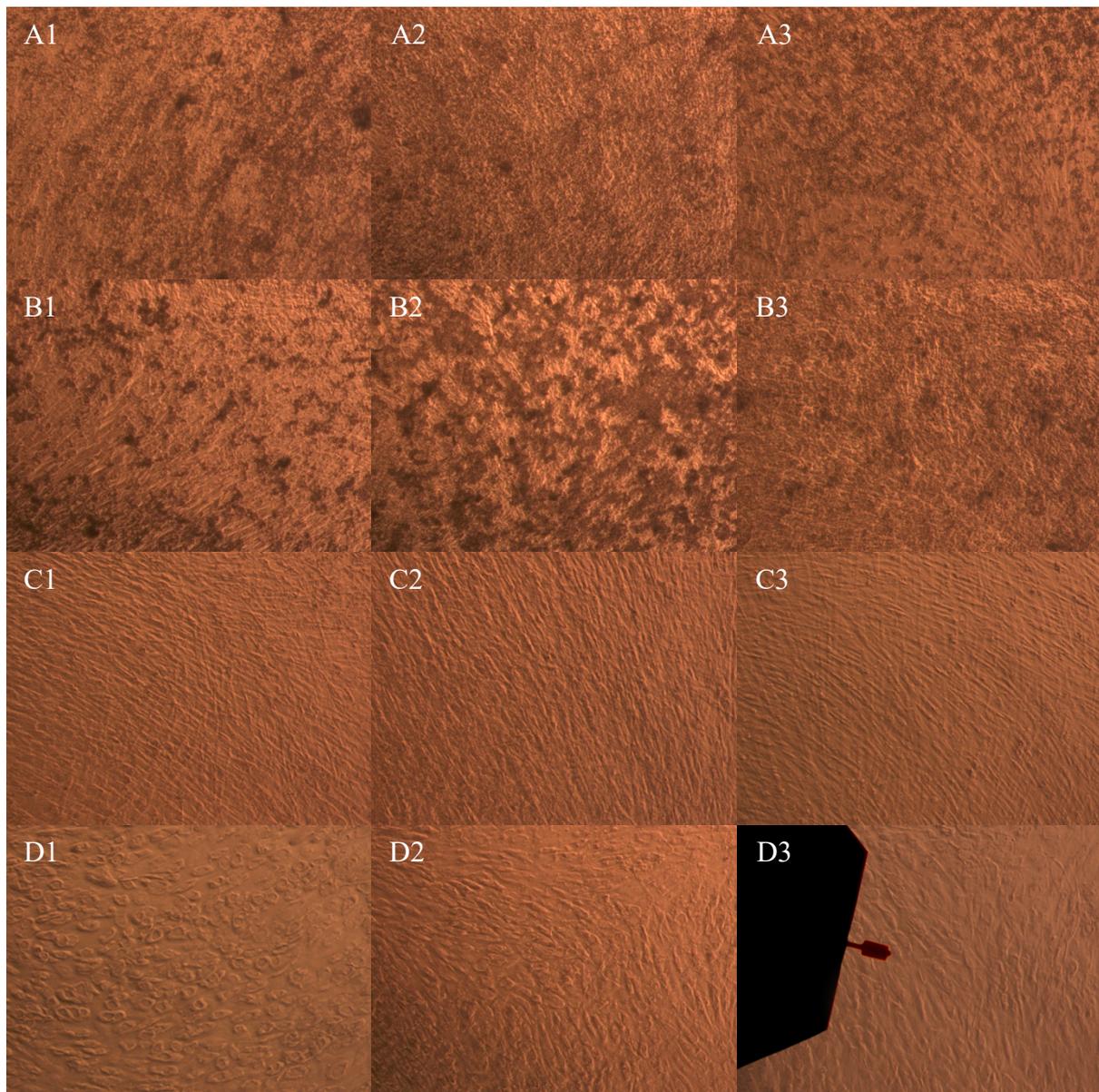


Abbildung 6: Zellmonolayer unter dem AFM-Mikroskop

A: iMSC OB, B: JPC OB, C: iMSC CO, D: JPC CO, 1-3: Patient # 1-3. A und B zeigen repräsentativ die dunklen, körnigen oder flächigen CaP-Präzipitate von iMSCs und JPCs von allen 3 Patienten. C und D zeigen die undifferenzierten CO-Zellen der 3 Patienten unter dem Mikroskop. Bild D3 zeigt beispielhaft den kleinen Cantilever an der Spitze eines Metallauslegers (schwarz im Bild).

## 2.4 FÄRBUNGEN

### 2.4.1 Fluoreszenzfärbungen

Nach den AFM-Messungen wurden die Zellen fixiert. Für die Fluoreszenzfärbungen wurde Fixierungspuffer (BioLegend, USA) ohne Methanol verwendet, um eine Zerstörung der Aktinfilamente zu verhindern. Danach wurden die Zellen mit einem Permeabilisationspuffer für 5 Minuten inkubiert, der aus PBS + 0,1 % Triton X-100 (AppliChem, Deutschland) bestand. Zur Färbung der Aktinfilamente kam 1:100 Phalloidin grün (PromoCell, Deutschland; BioLegend, USA) oder rot (Invitrogen, USA) zum Einsatz, 1:1000 DAPI/Hoechst (PromoCell,

Deutschland) zur Färbung der Zellkerne und 1:1000 Calcein (Sigma, USA) oder 1:100 Xylenolorange (Carl Roth GmbH+Co.KG, Deutschland) zur Färbung der CaP-Präzipitate. Nach 20-30 Minuten Inkubationszeit im Dunkeln wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Die Fotos wurden am Axio Observer Z1-Mikroskop (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Deutschland) mit 5-, 10- und 20-facher Vergrößerung aufgenommen. Für die 10- und 20-fache Vergrößerung wurde in den CO-Schälchen ein Phasenkontrast zur besseren Sichtbarmachung verwendet.

#### 2.4.2 Alizarinfärbung und -quantifizierung

Die Zellen für die Alizarinfärbung wurden mit 1 ml 4 %-igem Formaldehyd für 15 Minuten fixiert. Nach zwei Waschzyklen mit PBS wurden die Schälchen mit 1 ml Alizarin Red S (Carl Roth GmbH+Co.KG, Deutschland) 40 mM, pH 4,2 für 20 Minuten auf einem Schüttler gefärbt. 4x15 Minuten lang wurde das Alizarin mit 3 ml destilliertem Wasser ausgewaschen, sodass der Farbstoff nur noch mit den CaP Präzipitaten verbunden blieb und danach wurde 1 ml destilliertes H<sub>2</sub>O zur Fotografie in die Schälchen pipettiert. Daraufhin wurden lichtmikroskopische Bilder am inversen Labormikroskop der Firma Leica in 4-, 10- und 20-facher Vergrößerung durchgeführt. Auch hier wurde ein Phasenkontrast in den CO-Schälchen für die 10- und 20-fache Vergrößerung gewählt. Um die Zellen zu dehydrieren, wurden die Zellen für 2 Minuten mit 1 ml eiskaltem Ethanol behandelt.

Zur Quantifizierung der Präzipitate wurden die gefärbten Monolayer für 30 Minuten mit 10 %-iger Essigsäure auf einem Schüttler inkubiert, daraufhin wurde der Monolayer mit einem sterilen Spatel vorsichtig vom Boden abgelöst und der Inhalt eines Wells in ein 2 ml-Mikroreaktionsgefäß pipettiert. Diese wurden für 30 s stark gevortext und anschließend für 10 Minuten bei 85 °C erhitzt. Nachdem die Mikroreaktionsgefäße für mindestens 5 Minuten auf Eis gekühlt worden sind, wurden sie 15 Minuten lang bei 20.000 g zentrifugiert. Der Inhalt der Mikroreaktionsgefäße wurde danach mit der entsprechenden Menge NH<sub>4</sub>OH zu einem pH-Wert von 4,1-4,5 neutralisiert und für die Konzentrationsbestimmung 100 µl der Suspension in Duplikaten in eine 96-Well-Platte pipettiert. In der Zwischenzeit wurde eine Standardreihe mit einer Lösung aus 10 %-iger Essigsäure + 10 %-igem Ammoniumhydroxid mit einem pH-Wert entsprechend der Proben 4,1-4,5 sowie einem absteigenden Gehalt an Alizarin hergestellt. Die Molarität betrug 2 mM in Standard 1 und wurde bis Standard 11 jeweils halbiert. Auch von der Standardreihe wurden je 100 µl/Well in Duplikaten in die 96-Well Platte pipettiert. Des Weiteren wurden 2 Blanks ohne Alizarin dazugefügt. Die photometrischen Messungen zur Bestimmung des Alizaringehalts wurden bei 405 nm durchgeführt.

## 2.5 TABELLEN ÜBER VERWENDETE MATERIALIEN

### 2.5.1 Medien

Tabelle 1: Verwendete Medien

Medium	Bestandteile	Hersteller	Konzentration
hPI-5	DMEM/F-12 (1:1) (1X) +GlutaMAX™-I	Thermofisher, UK, REF.31331-028	93%
	Humanes Plättchenlysats (hPI)	ELAREM™ Perform-FD, Order No. PE21012	5%
	Amphotericin B	Sartorius, REF 03-028-1B	1%
	Penicillin/Streptomycin	Pen-Strep, Lonza, Basel Schweiz, Cat# DE17-602E	1%
hPI-10	DMEM/F-12 (1:1) (1X) +GlutaMAX™-I	Thermofisher, UK, REF.31331-028	88%
	Humanes Plättchenlysats (hPI)	ELAREM™ Perform-FD, Order No. PE21012	10%
	Amphotericin B	Sartorius, REF 03-028-1B	1%
	Penicillin/Streptomycin	Pen-Strep, Lonza, Basel Schweiz, Cat# DE17-602E	1%
Osteogenes Medium (OB- Medium)	hPI-10-Medium		100%
	β-Glycerophosphat	AppliChem, Darmstadt A2253 0100	1%
	L-Ascorbinsäure 2- Phosphat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, A8960	0,1%
	Dexamethason	Sigma-Aldrich, St.Louis, USA, D4902	0,04%
Leibovitz- Medium	Leibovitz' L-15 Medium w/o L-Glutamin, w/o NaHCO <sub>3</sub>	PAN BIOTECH™ Cat.No. P04-27055 Lot.No. 8770122	
Einfriermedium	Cryo-SFM	PromoCell, Heidelberg, Deutschland	

## 2.5.2 Kultivierung der Zellen

Tabelle 2: Materialien für Zellkultur

Materialbeschreibung	Hersteller	Land	Artikelnummer
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)	a) Sigma-Aldrich b) Lonza	a) USA b) USA	a) D8537 b) 17-512F
Gibco TrypLE™ Express (1X)	ThermoFisher	UK	12605
Trypan Blue Dye 0.40%	BIO-RAD	USA	1450013
Gibco rhLaminin-521 (100µg/mL)	BioLamina	Schweden	A29248
Gibco DPBS (1X) + CaCl <sub>2</sub> + MgCl <sub>2</sub>	ThermoFisher	UK	14040-091
Gelatine	Sigma-Aldrich	Deutschland	Lot # SLBN8199V

## 2.5.3 AFM-Material

Tabelle 3: AFM-Material

Materialbeschreibung	Hersteller	Land	Artikelnummer
Schälchen	TPP	Schweiz	93040
Leibovitzmedium	Pan Biotech	Deutschland	P04-27055
Cantilever	Bruker Nano GmbH	Deutschland	SAA-SPH-5UM
AFM-Glasblock für Messungen in Flüssigkeiten	JPK Instruments, Bruker	Deutschland	n. a.

## 2.5.4 Färbungen, Quantifizierung

Tabelle 4: Materialien für Färbungen

Materialbeschreibung	Hersteller	Land	Artikelnummer
Formaldehyd-Lösung 4,0% neutral gepuffert	Otto Fischar GmbH	Deutschland	PZN 02653025
Triton® X-100	AppliChem	Deutschland	A4975
Fixation buffer	BioLegend	USA	420801
Phalloidin green a) PromoFluor-488 Premium phalloidin (10nmole) 300 units PromoKine	a) PromoCell b) BioLegend	a) Germany b) USA	a) PK-PF488P-7-01 b) 424201

b) Flash Phalloidin™ Green 488, 300units			
Alexa Fluor 546 phalloidin A22283	Invitrogen	USA	787713
Xylenolorange Tetranatriumsalz	Carl Roth GmbH+Co.KG	Deutschland	2727.1
Calcein	Sigma	USA	C0875
Hoechst33342 Solution (10mg/ml), Promokine	PromoCell	Deutschland	PK-CA707-40046
Alizarin	Carl Roth GmbH+Co.KG	Deutschland	Art.-Nr. 0348.3

## 2.5.5 Verwendete Geräte und Softwares

Tabelle 5: Verwendete Geräte

Materialbeschreibung	Hersteller	Land	Seriennummer
TC20™ Automated Cell Counter	BIO-RAD	USA	508BR04326
AFM CellHesion 200	Bruker, MA	USA	H-04-0033
AxioObserver D1	Carl Zeiss Microscopy, Jena	Deutschland	3833000999 S-01-0194
Inverses Labormikroskop LEICA DM IL LED	Leica	Deutschland	Type 11090137001
Fluoreszenzmikroskop Observer. Z1	Zeiss	Deutschland	3834000156
Thermo Scientific™ Hera cell 150 Inkubator	fisher scientific	Deutschland	51032719
BIO-TEK ELx800 Absorbance Microplate Reader	BIOTEK Instruments Inc. (Agilent)	USA	197635
JPK data processing Software (Version 5.0.86)	JPK Instruments AG, Bruker	Deutschland	n. a.
SPSS Statistics Version 29.0.0.0 (241)	IBM	USA	n. a.

## **2.6 DATENAUSWERTUNG UND ERRECHNUNG DER STATISTISCHEN SIGNIFIKANZEN**

Die Datenauswertung der AFM-Daten wurde mit der Software JPK data processing (Version 5.0.86) durchgeführt, welche mit Hilfe des Hertz-fit-Moduls für sphärische Eindringkörper aus den Kraftkurven ein Elastizitätsmodul errechnete. Aus jedem Triplet der Messungen wurde ein Mittelwert gebildet, sodass  $n = 30$  war (für CaP-Präzipitate, OB-Zellen und CO-Zellen). Ausreißer wurden durch die doppelte Standardabweichung definiert und extrahiert. Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS (Version 29.0.0.0). Für die Auswertung der AFM-Daten sowie der Alizarindaten wurden der Mann-Whitney-U-Test und der Test nach Kruskal-Wallis durchgeführt sowie Boxplots erstellt. Die Boxen beinhalten 50 % der Daten (=Interquartilsabstand), die Antennen sind mit 1,5-fachem Interquartilsabstand (bzw. bis zum Maximalwert) definiert. Milde Ausreißer werden mit einem Punkt dargestellt, extreme Ausreißer (mehr als dreifacher Interquartilsabstand zur Box) werden mit einem Sternchen dargestellt. Für die Korrelationen wurden Signifikanzen mittels Pearson-Korrelation und Kendall-Tau-b berechnet. Falls nicht anders deklariert, wurde eine Korrelation dann als signifikant erachtet, sobald mit beiden Tests eine Signifikanz festgestellt werden konnte.

## 3 ERGEBNISSE

### 3.1 AFM-ERGEBNISSE

Bei der Auswertung der AFM-Ergebnisse geht es um Elastizitätsmoduln (= E-Modul, Young's Modulus) und hierbei werden die drei Zellkonditionen Kalzium-Phosphat-Präzipitate (im Folgenden „CaP-Präzipitate“), osteoblastisch-induzierte Zellen (OB-Zellen) und Kontrollzellen (CO-Zellen) unterschieden. Sie werden hier im Ergebnisteil erst getrennt betrachtet und unter Punkt 3.1.4 verglichen. Dafür wurden 2.160 der durchgeführten Messungen verwendet, wobei jede Messung einen Mittelwert aus 3 Messungen an derselben Stelle darstellt. Nach der Exklusion der Ausreißer wurden 682 Messungen der Kontrollgruppe, 709 Messungen der Präzipitate und 702 Messungen der osteoblastisch-differenzierten Zellen für die finale Analyse verwendet. Die drei Variablen: Zelltyp (JPC vs. iMSC), Inkubationsbedingung (Normoxie vs. Hypoxie) und Beschichtung (Laminin vs. Gelatine) wurden dabei ausgewertet und miteinander verglichen.

#### 3.1.1 Elastizitätsmodul der CaP-Präzipitate

Für die Messungen der CaP-Präzipitate in den OB-induzierten Proben ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Dies gilt sowohl für jeweils eine Gesamtgegenüberstellung der drei obengenannten Variablen (JPCs vs. iMSCs, Normoxie vs. Hypoxie und Laminin vs. Gelatine), als auch deren Unterteilung in Untergruppen:

- JPCs Normoxie vs. iMSCs Normoxie, JPCs Hypoxie vs. iMSCs Hypoxie, JPCs Laminin vs. iMSCs Laminin, JPCs Gelatine vs. iMSCs Gelatine
- Normoxie JPCs vs. Hypoxie JPCs, Normoxie iMSCs vs. Hypoxie iMSCs, Normoxie Laminin vs. Hypoxie Laminin, Normoxie Gelatine vs. Hypoxie Gelatine
- Laminin Normoxie vs. Gelatine Normoxie, Laminin Hypoxie, vs. Gelatine Hypoxie, Laminin JPCs vs. Gelatine JPCs, Laminin iMSCs vs. Gelatine iMSCs
- JPCs Normoxie Laminin vs. iMSCs Normoxie Laminin, JPCs Hypoxie Laminin vs. iMSCs Hypoxie Laminin, JPCs Normoxie Gelatine vs. iMSCs Normoxie Gelatine, JPCs Hypoxie Gelatine vs. iMSCs Hypoxie Gelatine
- Normoxie JPCs Laminin vs. Hypoxie JPCs Laminin, Normoxie iMSCs Laminin vs. Hypoxie iMSCs Laminin, Normoxie JPCs Gelatine vs. Hypoxie JPCs Gelatine, Normoxie iMSCs Gelatine vs. Hypoxie iMSCs Gelatine

- Laminin JPCs Normoxie vs. Gelatine JPCs Normoxie, Laminin iMSCs Normoxie vs. Gelatine iMSCs Normoxie, Laminin JPCs Hypoxie vs. Gelatine JPCs Hypoxie, Laminin iMSCs Hypoxie vs. Gelatine iMSCs Hypoxie

Es bestand eine Tendenz zu festeren CaP-Präzipitaten bei Normoxie im Vergleich zu Hypoxie (Median 12,6 kPa vs. 9,0 kPa, um 28,4 % reduziert), sowie eine zu vernachlässigende Tendenz zu härteren CaP-Präzipitaten jeweils bei den iMSCs im Vergleich zu den JPCs (Median 10,1 kPa vs. 9,0 kPa, um 11,3% reduziert) und bei Laminin im Vergleich zu Gelatine (Median 11,0 kPa vs. 9,3 kPa, um 16,2% reduziert) (Abb.7, Tabelle 6).

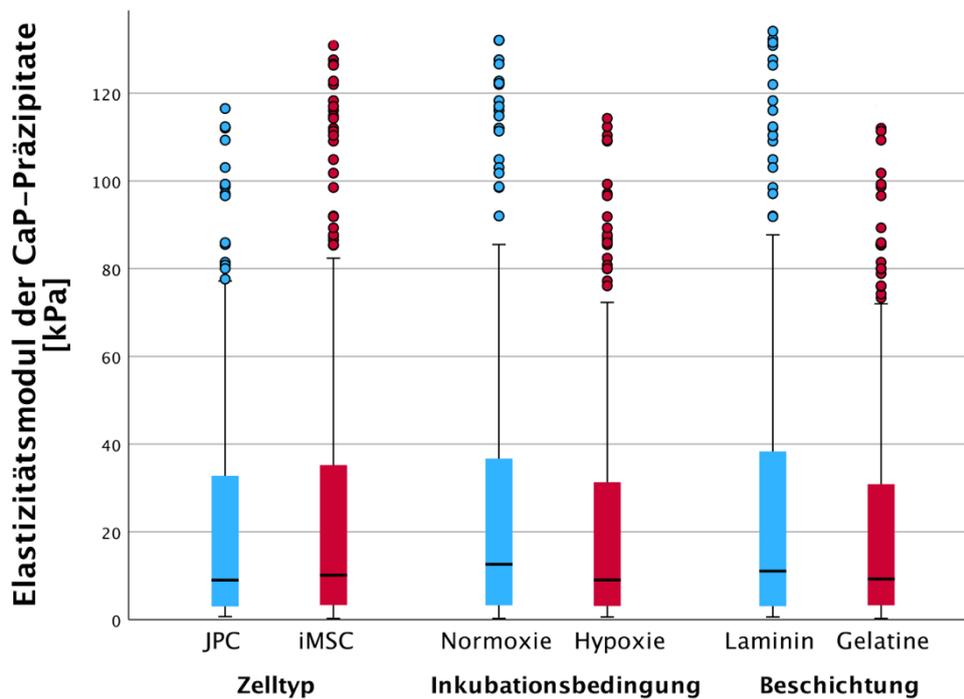


Abbildung 7: Elastizitätsmoduln der von den Zellen gebildeten Kalzium-Phosphat-Präzipitate in den osteogen stimulierten Proben

Die Zellen von 3 Patienten wurden 15 Tage osteogen differenziert und der E-Modul an Tag 15 gemessen. Zwischen den Vergleichsgruppen (JPC vs. iMSC; Normoxie vs. Hypoxie; Laminin vs. Gelatine) besteht kein signifikanter Unterschied.

$n(\text{Messpunkte/Boxplot}) = 355-356$  (jeder Punkt 3x gemessen). Extremwerte aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht graphisch dargestellt. E-Modul = Elastizitätsmodul [kPa], iMSCs = aus induzierten pluripotenten Stammzellen differenzierte mesenchymale Stammzellen, JPCs = Kieferperiostzellen.

	<b>Zelltyp</b>		<b>Inkubationsbedingung</b>		<b>Beschichtung</b>	
	JPC	iMSC	NORMOXIE	HYPOXIE	LAMININ	GELATINE
MEDIAN	9,0	10,1	12,6	9,0	11,0	9,3
MINIMUM	0,7	0,3	0,3	0,6	0,6	0,3
MAXIMUM	223,1	218,7	223,1	201,8	214,5	223,1
MITTELWERT	26,6	28,6	28,1	26,8	28,9	26,1
STABW.N	38,0	40,5	38,5	40,1	39,6	38,9

*Tabelle 6: Deskriptive Statistik der Elastizitätsmoduln der gemessenen CaP-Präzipitate (Übersicht)  
Dargestellt sind die E-Moduln der verschiedenen Zelltypen, Inkubationsbedingungen und Beschichtungen mit Median, Minimum, Maximum, Mittelwert und Standardabweichung (=STABW.N).  
Alle Werte sind in der Einheit Kilopascal [kPa].*

Es ist auffällig, wie gleichmäßig die Elastizität über die verschiedenen Kulturbedingungen/Eigenschaften verteilt ist. Signifikante Unterschiede fanden sich ausschließlich zwischen den einzelnen untersuchten Patientenzellen.

So waren bei Patient # 1 die iMSC-Präzipitate signifikant steifer als die Präzipitate der JPCs. Umgekehrt war der Sachverhalt bei Patient # 3 (Abb. 8). Auch die großen Unterschiede zwischen den einzelnen Patienten zeigt der Graph der Abbildung 8 beispielhaft. Bei den JPCs lagen bei Patient # 3 signifikant höhere Werte als bei Patient # 2 vor und in der Kategorie der iMSCs übertrafen die Werte des Patienten # 1 die von Patient # 3 auf signifikante Weise (beides Abb. 8). Innerhalb der Hypoxie waren die Präzipitate von Patient # 1 signifikant steifer als von Patient # 3 und wenn man nur die Lamininwerte ohne Gelatine betrachtet, so waren diese bei Patient # 1 signifikant steifer als bei Patient # 3 (beides nicht graphisch dargestellt). Dies zeigt, dass die Messwerte zwischen den einzelnen Patienten sich stark unterschieden.

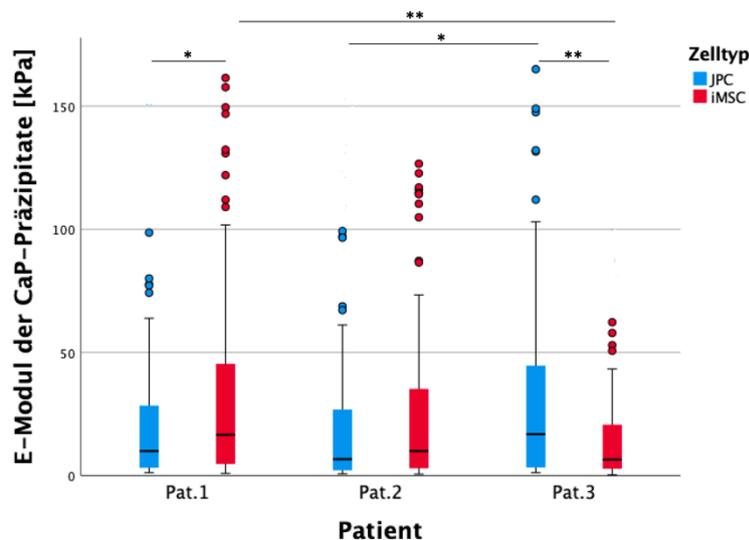


Abbildung 8: Elastizitätsmoduln der CaP-Präzipitate einzelner Patienten

Die Zellen von 3 Patienten wurden 15 Tage osteogen differenziert und der E-Modul an Tag 15 gemessen. In dieser Darstellung wurden sowohl die Inkubationsbedingungen als auch die Beschichtungen zusammengefügt und nicht einzeln verglichen. Vergleicht man die Elastizitätsmoduln der CaP-Präzipitate einzelner Patienten miteinander, so fallen sowohl zwischen als auch innerhalb einzelner Patienten signifikante Unterschiede auf.

$n(\text{Messpunkte/Boxplot}) = 117-129$  (jeder Punkt 3x gemessen). (\* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$ ). Extremwerte aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht graphisch dargestellt. CaP = Kalzium-Phosphat, E-Modul = Elastizitätsmodul, iMSCs = aus induzierten pluripotenten Stammzellen differenzierte mesenchymale Stammzellen, JPCs = Kieferperiostzellen.

Die folgenden Untersuchungen gehen weiter ins Detail. Abbildung 9 vergleicht die drei Patienten in Hinblick auf den Zelltypen und die Inkubationsbedingung, wobei nicht zwischen den Beschichtungen Laminin und Gelatine unterschieden wird. Links werden die E-Moduln der JPCs gezeigt. Von allen JPCs (linker Graph) erzeugte Patient # 3 unter Normoxiebedingungen die höchsten Werte und unterschied sich damit signifikant von Patient # 2 in Normoxie und Patient # 3 in Hypoxie. Außerdem produzierten die in Normoxie inkubierten Kieferperiostzellen (JPCs) des Patient # 1 signifikant festere CaP-Präzipitate als Patient # 2. Die rechte Abbildung zeigt die AFM-Werte der iMSCs der verschiedenen Patienten. Hier erzeugte Patient # 1 unter Hypoxiebedingungen die höchsten Werte und unterschied sich damit signifikant zu Patient # 2 und Patient # 3 in Hypoxie, sowie zu Patient # 1 in Normoxie. Im Gegensatz dazu erzeugten die iMSCs von Patient # 2 in Normoxie festere CaP-Präzipitate als in Hypoxie.

Ebenfalls fand ein Vergleich der Zelltypen in Normoxie und Hypoxie statt. Aus den Graphen der Abbildung 9 wird ersichtlich (jedoch aus Übersichtsgründen nicht durch Sternchen gekennzeichnet), dass die iMSCs des Patienten # 1 unter Hypoxie signifikant festere CaP-Präzipitate synthetisierten als die (hypoxisch gelagerten) Kieferperiostzellen (JPCs) desselben Patienten. Dasselbe gilt für die Zellen von Patient # 2 in Normoxie. Im Gegensatz dazu

produzierten die Kieferperiostzellen (JPCs) von Patient # 2 in Hypoxie und die von Patient # 3 in Normoxie signifikant festere CaP-Präzipitate als die vergleichbaren iMSCs.

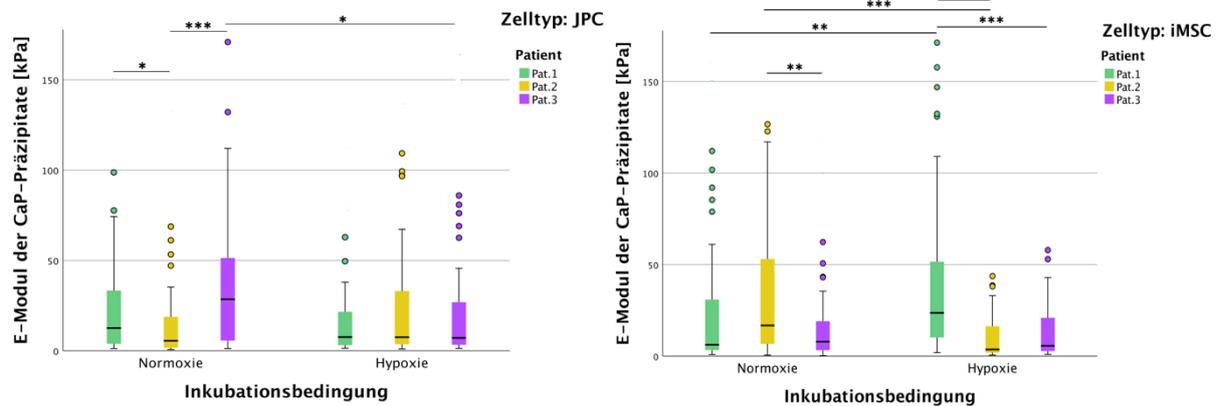


Abbildung 9: E-Moduln einzelner Patienten in Hinblick auf Zelltyp und Inkubationsbedingung. Die Zellen von 3 Patienten wurden 15 Tage osteogen differenziert und der E-Modul an Tag 15 gemessen. In dieser Darstellung wurden die Beschichtungen zusammengefügt und nicht einzeln verglichen. Vergleicht man die Elastizitätsmoduln der CaP-Präzipitate einzelner Patienten miteinander, so fallen sowohl zwischen als auch innerhalb einzelner Patienten signifikante Unterschiede auf. Sowohl bei den JPCs als auch den iMSCs wurden unter Normoxie und unter Hypoxie die einzelnen Patienten miteinander verglichen. Zusätzlich wurde für jeden Patienten Normoxie mit Hypoxie und JPCs mit iMSCs verglichen.

$n(\text{Messpunkte/Boxplot}) = 57-60$  (jeder Punkt 3x gemessen). (\* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$ ). Extremwerte aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht graphisch dargestellt. CaP = Kalzium-Phosphat, E-Modul = Elastizitätsmodul, iMSCs = aus induzierten pluripotenten Stammzellen differenzierte mesenchymale Stammzellen, JPCs = Kieferperiostzellen.

Abbildung 10 vergleicht ebenfalls wieder die Patienten, wobei dieses Mal zwischen Zelltyp, Inkubationsbedingung und Beschichtung unterschieden wird. Die beiden oberen Graphen zeigen JPCs, die unteren iMSCs; links sind die Werte der Laminin-beschichteten Platten, rechts der Gelatine-beschichteten Platten dargestellt.

Bei den Kieferperiostzellen (JPCs) auf Laminin gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patienten. Von allen JPCs auf Gelatine (rechter oberer Graph) erzeugten die Zellen des Patienten # 3 unter Normoxie die festesten CaP-Präzipitate. Diese waren signifikant fester als die Präzipitate der anderen beiden Patienten unter Normoxie und als die Präzipitate desselben Patienten unter Hypoxie. Von allen iMSCs auf Laminin (linker unterer Graph) erzeugten die Zellen des Patienten # 1 unter Hypoxie die festesten CaP-Präzipitate. Diese waren signifikant fester als die Präzipitate der anderen beiden Patienten unter Hypoxie und als die Präzipitate desselben Patienten unter Normoxie. Umgekehrt produzierten die iMSCs (auf Laminin) von Patient # 2 unter Normoxie signifikant höhere Werte als unter Hypoxie. Bei den iMSCs auf Gelatineböden (rechter unterer Graph) waren die AFM-Werte von Patient # 2 unter Normoxie sowohl signifikant höher als die von Patient # 3 als auch die desselben Patienten

unter Hypoxie. Die iMSCs des Patienten # 1 unter Hypoxie produzierten außerdem signifikant festere CaP-Präzipitate als die des Patienten # 2 unter denselben Bedingungen.

Ebenfalls fand ein Vergleich der Zelltypen (oberer mit unterem Graphen) und Beschichtungen (linker mit rechtem Graph) statt. Aus den Graphen der Abbildung 10 wird ersichtlich (jedoch aus Übersichtsgründen nicht durch Sternchen gekennzeichnet), dass die iMSCs unter 3 Bedingungen signifikant höhere AFM-Werte aufzeigen als die der JPCs. Das war der Fall für die Zellen des Patienten # 1 unter Hypoxie auf Laminin und die Zellen des Patienten # 2 unter Normoxie auf Laminin sowie Gelatine. Umgekehrt verhielt es sich bei den Zellen des Patienten # 3 unter Normoxie auf Gelatine, wo die Kieferperiostzellen (JPCs) den iMSCs überlegen waren. Bei den Beschichtungen ließen sich nur zwei signifikante Unterschiede feststellen: Bei den iMSCs unter Hypoxie von Patient # 1 waren die AFM-Werte der CaP-Präzipitate der Lamininplatten signifikant höher als die der Gelatineplatten. Demgegenüber waren die AFM-Werte der Gelatineplatten signifikant höher als die der Lamininplatten bei den JPCs unter Normoxie von Patient # 3.

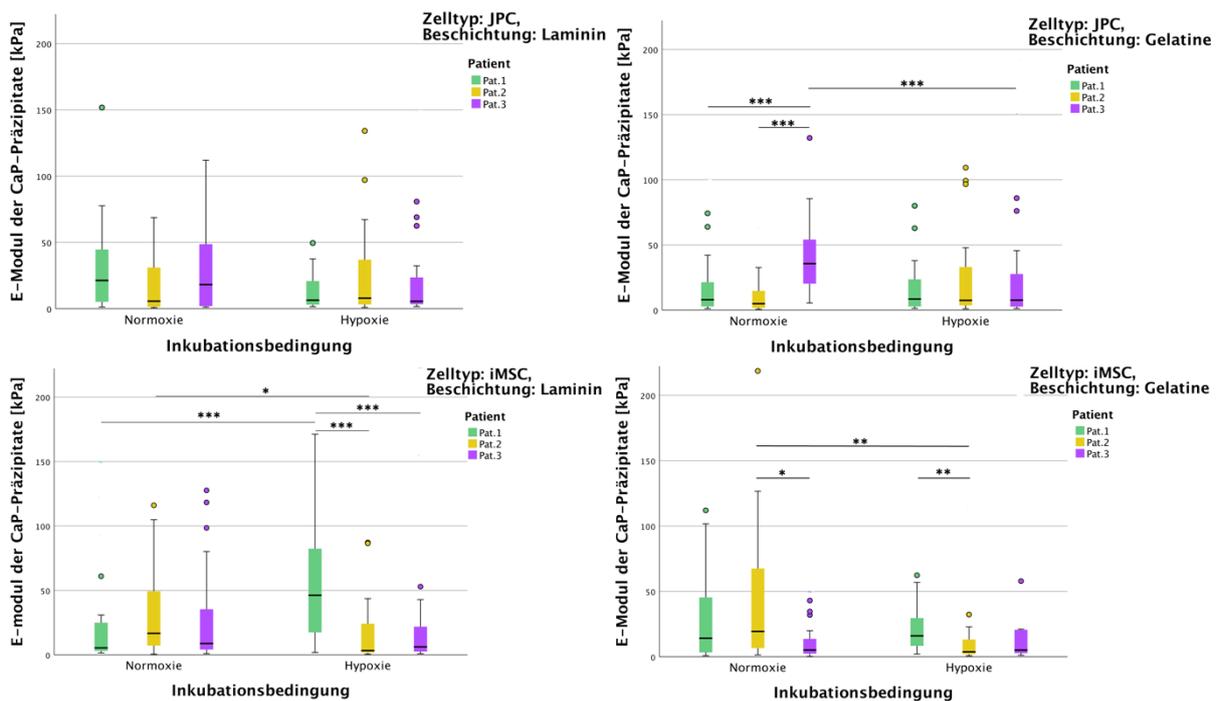


Abbildung 10: E-Moduln einzelner Patienten in Hinblick auf Zelltyp, Inkubationsbedingung und Beschichtung

Die Zellen von 3 Patienten wurden 15 Tage osteogen differenziert und der E-Modul an Tag 15 gemessen. Vergleicht man die Elastizitätsmoduln der CaP-Präzipitate einzelner Patienten miteinander, so fallen sowohl zwischen als auch innerhalb einzelner Patienten signifikante Unterschiede auf.

$n(\text{Messpunkte/Boxplot}) = 28-30$  (jeder Punkt 3x gemessen). (\* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$ ). Extremwerte aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht graphisch dargestellt. CaP = Kalzium-Phosphat, E-Modul = Elastizitätsmodul, iMSCs = aus induzierten pluripotenten Stammzellen differenzierte mesenchymale Stammzellen, JPCs = Kieferperiostzellen.

Wenn man die drei Patienten zusammenfasst, konnten wie oben erwähnt keine signifikanten Unterschiede zwischen den Elastizitätsmoduln der CaP-Präzipitate errechnet werden. Trotzdem sollen im Folgenden Vergleiche angestellt werden, um Tendenzen zu erkennen. Dafür wurde der Median gewählt, da er im Vergleich zum Mittelwert weniger extremwertanfällig ist und in den AFM-Messungen viele Extremwerte vorliegen.

Als Erstes wird im Folgenden jeweils eine Variable zusammengefasst - wobei Unterschiede zwischen den einzelnen Patienten außer Acht gelassen werden - und die Ergebnisse in Abbildung 11 graphisch dargestellt.

Als erstes werden die Beschichtungen zusammengefügt. Daraus ergibt sich eine Betrachtung der verschiedenen Zelltypen in verschiedenen Inkubationsbedingungen. Unter Hypoxie waren die CaP-Präzipitate der iMSCs (Median 10,1 kPa  $\pm$  41,0 kPa) fester als die der JPCs (Median 7,4 kPa  $\pm$  39,1 kPa), während unter Normoxie die CaP-Präzipitate der JPCs (Median 13,6 kPa  $\pm$  37,0 kPa) fester waren als die der iMSCs (Median 10,4 kPa  $\pm$  39,9 kPa). Dementsprechend waren die iMSC-Präzipitate in Norm- und Hypoxie so gut wie gleich steif (Median 10,4 kPa  $\pm$  39,9 kPa bzw. 10,1 kPa  $\pm$  41,0 kPa), während der Median der JPC-Präzipitate in Hypoxie (Median 7,4 kPa  $\pm$  39,1 kPa) nur noch knapp 55 % des Medians von Normoxie (Median 13,6 kPa  $\pm$  37,0 kPa) entsprach (Abb. 11, oben).

Nun werden die Inkubationsbedingungen zusammengefügt, um Zelltyp und Beschichtung zu analysieren. Zur Beschichtung lässt sich sagen, dass iMSCs und JPCs beide etwa gleiche E-Modul-Werte der CaP-Präzipitate auf Gelatineböden erzielten (Median 9,2 kPa  $\pm$  36,6 kPa bzw. 9,3 kPa  $\pm$  41,0 kPa). Die E-Modul-Werte für JPC Laminin lagen geringfügig darunter (Median 8,9 kPa  $\pm$  34,7 kPa) aber die iMSCs auf Lamininböden erzielten mehr höhere E-Moduln (Median 11,9 kPa  $\pm$  43,5 kPa) (Abb. 11, mittig).

Zuletzt werden die Zelltypen zusammengefügt, um Aussagen über Inkubationsbedingungen und Beschichtungen treffen zu können. Während die Beschichtung keine Rolle spielte für Normoxie oder Hypoxie (ähnliche Medianwerte), so waren die absoluten Werte unter Hypoxie- im Vergleich zu Normoxieinkubation um 12,9 % bei Laminin (Median von 12,0 kPa  $\pm$  38,0 kPa für Normoxie und 10,5 kPa  $\pm$  41,1 kPa für Hypoxie) und um 38,0 % bei Gelatine (Median von 13,0 kPa  $\pm$  38,9 kPa für Normoxie und 8,0 kPa  $\pm$  38,9 kPa für Hypoxie) reduziert (Abb. 11, unten).

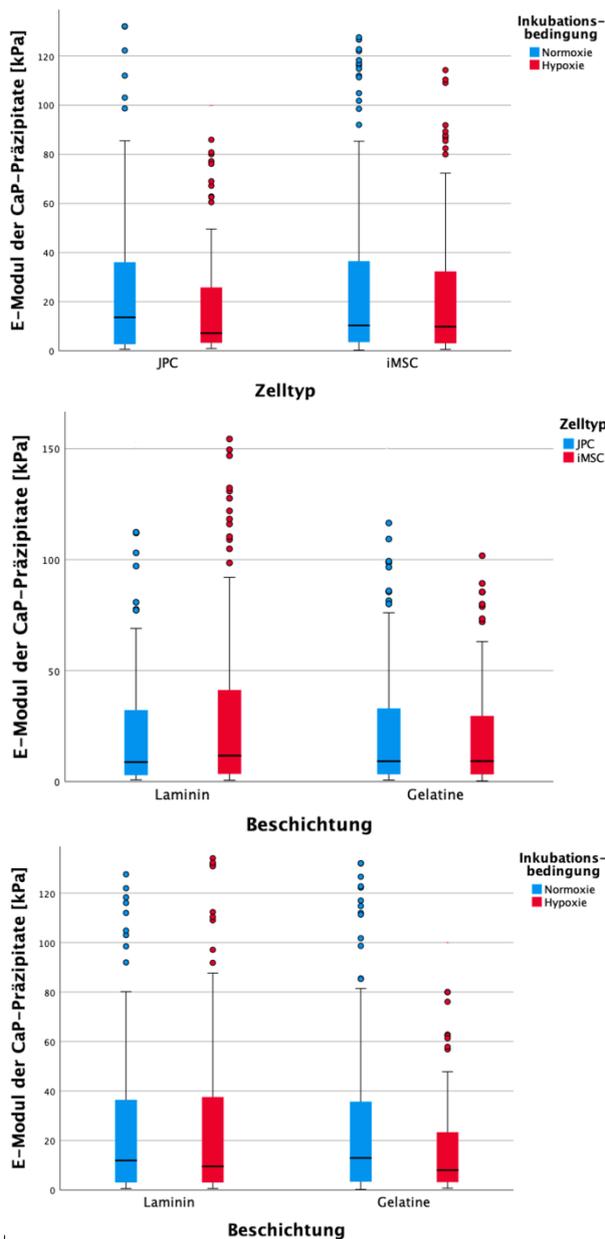


Abbildung 11: Elastizitätsmoduln der CaP-Präzipitate in verschiedenen Vergleichen  
 Die Zellen von 3 Patienten wurden 15 Tage osteogen differenziert und der E-Modul an Tag 15 gemessen. Der obere Graph zeigt einen deutlich höheren Median von JPC Normoxie verglichen mit JPC Hypoxie. Der mittlere Graph vergleicht JPCs mit iMSCs unter verschiedenen Bedingungen und zeigt, dass die iMSCs auf Laminin die festesten E-Moduln erzielten, Der untere Graph zeigt, dass die Beschichtung für Normoxie und Hypoxie irrelevant war, aber sowohl bei Laminin als auch bei Gelatine in Normoxie festere CaP-Präzipitate synthetisiert wurden.  $n(\text{Messpunkte/Boxplot}) = 177-179$  (jeder Punkt 3x gemessen). Keine Signifikanzen. Extremwerte aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht graphisch dargestellt. CaP = Kalzium-Phosphat, E-Modul = Elastizitätsmodul, iMSCs = aus induzierten pluripotenten Stammzellen differenzierte mesenchymale Stammzelle, JPCs = Kieferperiostzellen.

Tabelle 7 zeigt die wichtigen Vergleiche zwischen den Zelltypen JPC und iMSC in prozentualer Darstellung. Die Mediane wurden untereinander dividiert und der die festere CaP-Präzipitate produzierende Zelltyp jeweils farblich markiert. Zum Beispiel betrug unter Normoxie der Median der E-Moduln der CaP-Präzipitate der iMSCs nur 76,4% des Medians der JPCs.

	Zelltyp
<b>Gesamt</b>	iMSC > JPC (88,7 %)
Normoxie	JPC > iMSC (76,4 %)
Hypoxie	iMSC > JPC (73,7 %)
Laminin	iMSC > JPC (74,2 %)
Gelatine	JPC = iMSC*

Tabelle 7: Prozentuale Darstellung der Zelltypen JPC und iMSC (E-Modul der CaP-Präzipitate)  
 Vergleich der Zelltypen unter 5 verschiedenen Bedingungen: Gesamt, Normoxie, Hypoxie, Laminin, Gelatine. Die Prozentzahl beschreibt den Anteil des „schwächeren“ Zelltyps am „stärkeren“ (bunte Schrift). Unter 3 Bedingungen produzierten die iMSCs festere CaP-Präzipitate, unter einer Bedingung waren JPCs und iMSCs etwa ebenbürtig und unter einer Bedingung waren die JPCs überlegen. \*Bei > 95 % wurden die verglichenen Werte als gleich angesehen.

Vergleicht man alle Medianwerte - wobei die Unterschiede der Patienten wieder außer Acht gelassen wurden -, so wurden die festesten CaP-Präzipitate von JPCs im Normoxieinkubator gebildet, und zwar mit Laminin- und Gelatinebeschichtung gleichermaßen. Die niedrigsten Medianwerte zeigten sich bei den JPCs unter Hypoxie, wieder gleichermaßen für Gelatine und Laminin. Die iMSC-Mediane befanden sich dazwischen (Abb. 12, Tab. 8).

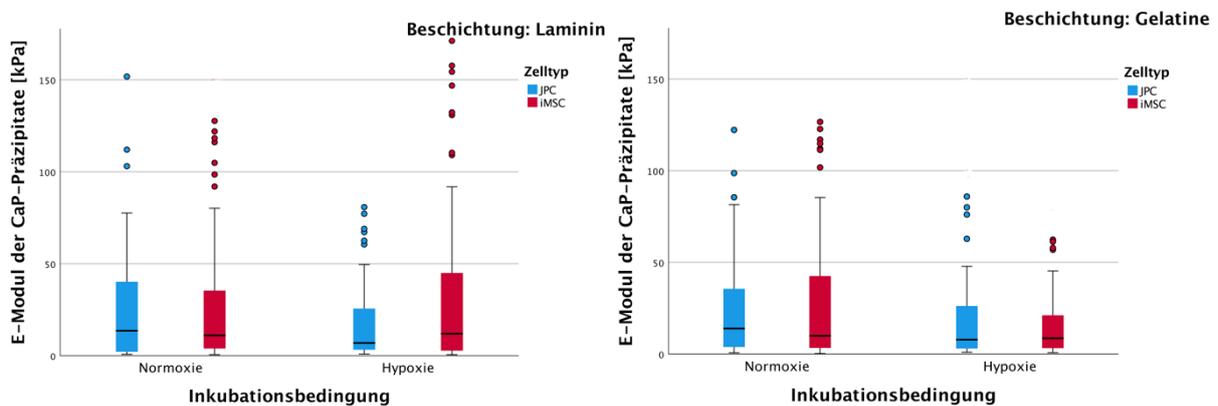


Abbildung 12: Vergleich aller Elastizitätsmoduln der CaP-Präzipitate

Die Zellen von 3 Patienten wurden 15 Tage osteogen differenziert und der E-Modul an Tag 15 gemessen. Die AFM-Werte wurden hier unterteilt in JPCs, iMSCs, Normoxie, Hypoxie, Laminin und Gelatine, wobei keine Signifikanzen, aber Tendenzen festgestellt werden konnten (s. Tab.8 und 9).

$n(\text{Messpunkte/Boxplot}) = 88-90$  (jeder Punkt 3x gemessen). (\* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$ ). Extremwerte aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht graphisch dargestellt. AFM = Rasterkraftmikroskop, CaP = Kalzium-Phosphat, E-Modul = Elastizitätsmodul, iMSCs = aus induzierten pluripotenten Stammzellen differenzierte mesenchymale Stammzellen, JPCs = Kieferperiostzellen.

	MEDIAN	MINIMUM	MAXIMUM	MITTELWERT	STANBW.N	ANZAHL
<b>JPC N G</b>	13,9	0,7	223,1	28,2	39,0	90
<b>JPC N L</b>	13,5	0,8	214,5	26,5	34,9	89
<b>iMSC H L</b>	12,0	0,6	190,5	35,5	45,9	89
<b>iMSC N L</b>	11,7	0,6	193,3	29,8	40,8	89
<b>iMSC N G</b>	10,0	0,2	218,7	28,0	38,9	88
<b>iMSC H G</b>	8,6	0,7	201,8	20,1	33,8	90
<b>JPC H G</b>	7,9	0,9	191,0	28,0	43,0	89
<b>JPC H L</b>	6,9	0,9	153,9	23,7	34,4	88

Tabelle 8: Deskriptive Statistik aller Elastizitätsmoduln der CaP-Präzipitate

Dargestellt sind die E-Moduln der CaP-Präzipitate, aufgeteilt nach Zelltypen, Inkubationsbedingungen und Beschichtungen mit Median, Minimum, Maximum, Mittelwert und Standardabweichung (=STABW.N). Alle Werte sind in der Einheit Kilopascal [kPa], sortiert nach absteigendem Median.

G = Gelatine, H = Hypoxie, iMSCs = aus induzierten pluripotenten Stammzellen differenzierte mesenchymale Stammzellen, JPCs = Kieferperiostzellen, L = Laminin, N = Normoxie.

Tabelle 9 soll für alle vorhandenen Bedingungen Tendenzen verdeutlichen und prozentual darstellen. Die jeweils bunt geschriebene Eigenschaft stellt die die festeren CaP-Präzipitate

produzierende Eigenschaft dar (wie oben erwähnt handelt es sich um Tendenzen und nicht um signifikante Unterschiede).

	<u>Zelltyp</u>	<u>Inkubationsbedingung</u>	<u>Beschichtung</u>
<b>Gesamt</b>	iMSC>JPC (88,7%)	Normoxie>Hypoxie (71,6%)	Laminin>Gelatine (83,8%)
No, La	JPC>iMSC (86,1%)	-	-
No, Ge	JPC>iMSC (71,4%)	-	-
Hy, La	iMSC>JPC (57,7%)	-	-
Hy, Ge	iMSC >JPC (91,7%)	-	-
JPC, No	-	-	Gelatine=Laminin
JPC, Hy	-	-	Gelatine>Laminin (87,7%)
iMSC, No	-	-	Laminin>Gelatine (85,4%)
iMSC, Hy	-	-	Laminin>Gelatine (71,7%)
La, JPC	-	Normoxie>Hypoxie (51,1%)	-
La, iMSC	-	Hypoxie=Normoxie	-
Ge, JPC	-	Normoxie>Hypoxie (56,6%)	-
Ge, iMSC	-	Normoxie>Hypoxie (86,4%)	-

Tabelle 9: Prozentuale Anteile der weicheren CaP-Elastizitätsmoduln (>-Zeichen) aufgeteilt nach Zelltyp, Inkubationsbedingung und Beschichtung

Deskriptive Statistik der Vergleiche der CaP E-Moduln, aufgeteilt nach den drei Variablen Zelltyp, Inkubationsbedingung und Beschichtung. Verglichen wurden die jeweiligen Medianwerte und der Anteil des jeweils niedrigeren am höheren E-Modul in Prozent dahinter geschrieben. Beispielsweise betrug der Median der JPCs nur 88,7 % des Medians der iMSCs. Unter Normoxie auf Laminin betrug der Median der iMSCs nur 86,1 % des Medians der JPCs. Das heißt, je kleiner die Prozentzahl, desto unterschiedlicher waren die Werte der beiden. \*Bei Werten von über 95% wurden die verglichenen E-Moduln als gleich angesehen.

Ge = Gelatine, Hy = Hypoxie, iMSCs = aus induzierten pluripotenten Stammzellen differenzierte mesenchymale Stammzellen, JPCs = Kieferperiostzellen, La = Laminin, No = Normoxie.

### 3.1.2 Elastizitätsmodul der Zellkörper von osteogen-induzierten Zellen

Vergleicht man den Zelltyp der osteoblastisch differenzierten Zellen miteinander, so waren die Zellkörper der JPCs signifikant fester als die der iMSCs (Abb. 13). Differenziert man weiter zwischen den Inkubationsbedingungen, so lag interessanterweise dasselbe für hypoxisch inkubierte Zellen vor, jedoch galt genau Gegenteiliges für normoxisch inkubierte Zellen (Abb. 14 links). Hier waren die iMSCs signifikant fester als die vergleichbaren JPCs. Auch bei den OB-Zellen sieht man wieder deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Patienten. So waren bei Patient # 1 und # 3 jeweils die JPCs signifikant fester als die iMSCs, jedoch verhielt es sich umgekehrt bei Patient # 2 (Abb. 14 rechts). Passend dazu waren die JPCs von Patient # 3

fester als die JPCs von Patient # 2 und umgekehrt die iMSCs von Patient # 2 fester als die iMSCs von Patient # 3 (Abb. 14 rechts).

Weiterhin zeigten die Messungen, dass die unter Hypoxie inkubierten OB-Zellen signifikant fester waren als die gleichen unter Normoxie inkubierten Zellen (Abb. 13). Dasselbe galt für die JPCs, während sich innerhalb der iMSCs bezüglich der Inkubationsbedingung keine signifikanten Unterschiede feststellen ließen. Außerdem waren die Zellkörper der Zellen von Patient # 2 und # 3 unter Hypoxie fester als unter Normoxie, während unter Normoxie die Zellkörper von Patient # 1 fester waren als die von Patient # 2 und # 3 (nicht graphisch dargestellt).

Zwischen den Beschichtungen Gelatine und Laminin bestand bei den OB-Zellen kein signifikanter Unterschied (Abb. 13).

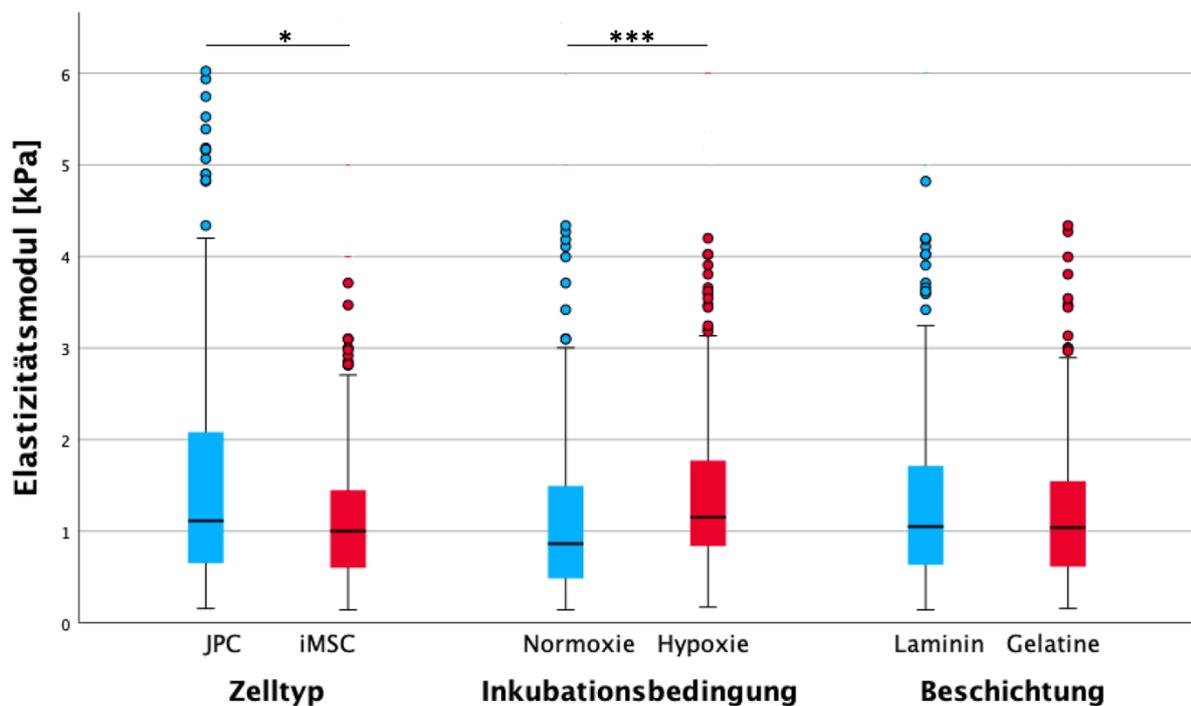


Abbildung 13: Elastizitätsmoduln der Zellkörper von osteogen-induzierten Zellen (OB-Zellen)  
 Die Zellen von 3 Patienten wurden 15 Tage osteogen differenziert und der E-Modul an Tag 15 gemessen. JPCs waren signifikant steifer als iMSCs, die in Hypoxie inkubierten Zellen waren signifikant steifer als die gleichen in Normoxie inkubierten Zellen. Kein signifikanter Unterschied konnte zwischen Zellen, die auf Laminin oder Gelatine kultiviert wurden, berechnet werden.  
 $n(\text{Messpunkte/Boxplot}) = 345-358$  (jeder Punkt 3x gemessen). (\* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$ ). Extremwerte aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht graphisch dargestellt. E-Modul = Elastizitätsmodul [kPa], iMSCs = aus induzierten pluripotenten Stammzellen differenzierte mesenchymale Stammzellen, JPCs = Kieferperiostzellen.

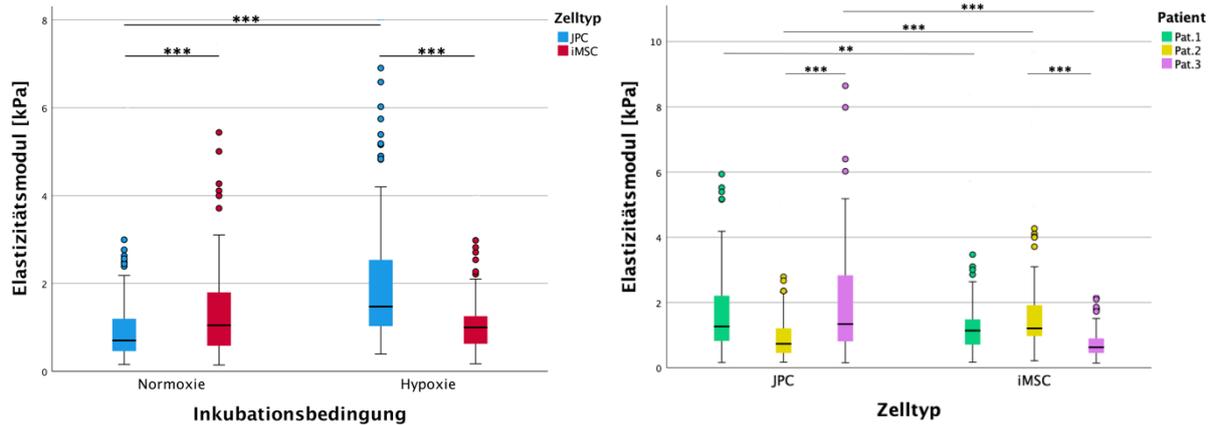


Abbildung 14: Elastizitätsmoduln der Zellkörper von osteogen-induzierten Zellen (OB-Zellen) – verschiedene Vergleiche

Die Zellen von 3 Patienten wurden 15 Tage osteogen differenziert und der E-Modul an Tag 15 gemessen. Links: Signifikante Unterschiede zwischen Zelltypen und Inkubationsbedingungen; Beschichtungen wurden zusammengefasst. Rechts: Signifikante Unterschiede zwischen den JPCs und iMSCs der einzelnen Patienten; Inkubationsbedingungen und Beschichtungen wurden zusammengefasst.  $n(\text{Messpunkte/Boxplot}) = 171-179$  (links),  $111-120$  (rechts) (jeder Punkt 3x gemessen). ( $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$ ). Extremwerte aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht graphisch dargestellt. E-Modul = Elastizitätsmodul [kPa], iMSCs = aus induzierten pluripotenten Stammzellen differenzierte mesenchymale Stammzellen, JPCs = Kieferperiostzellen.

Abbildung 15 zeigt die Boxplots der Untergruppen, wobei zwischen den einzelnen Bedingungen der Zelltypen, Inkubationsbedingungen und Beschichtungen unterschieden wird und somit nur die einzelnen Patientendaten zusammengefasst wurden. Auffällig ist, dass die JPCs unter Hypoxie auf Laminin und Gelatine gleichermaßen signifikant fester waren als die iMSCs. Umgekehrt waren die iMSCs unter Normoxie auf Laminin und Gelatine gleichermaßen signifikant fester als die JPCs. Passend dazu waren die JPCs unter Hypoxie signifikant fester als die JPCs unter Normoxie, gleichermaßen auf Laminin und Gelatine. Demgegenüber gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den iMSCs unter Normoxie und Hypoxie. Zur Beschichtung lässt sich sagen (Abb. 15 rechts vs. links), dass unter Hypoxie die JPCs auf Laminin signifikant fester waren als auf Gelatine und die iMSCs auf Gelatine signifikant fester waren als auf Laminin (beides nicht mit Sternchen gekennzeichnet).

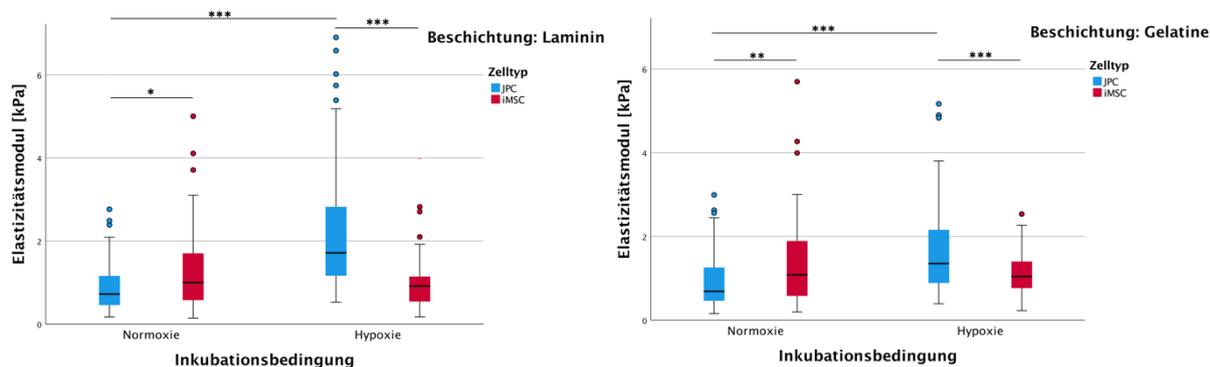


Abbildung 15: Vergleich aller Elastizitätsmoduln der Zellkörper von osteogen-induzierten Zellen (OB-Zellen)

Die Zellen von 3 Patienten wurden 15 Tage osteogen differenziert und der E-Modul an Tag 15 gemessen. Die AFM-Werte wurden hier unterteilt in JPCs, iMSCs, Normoxie, Hypoxie, Laminin und Gelatine. Vor allem die Zelltypen JPC und iMSC unterscheiden sich unter den verschiedenen Bedingungen stark.  $n(\text{Messpunkte/Boxplot}) = 83-90$  (jeder Punkt 3x gemessen). (\* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$ ). Extremwerte aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht graphisch dargestellt. AFM = Rasterkraftmikroskop, E-Modul = Elastizitätsmodul, iMSCs = aus induzierten pluripotenten Stammzellen differenzierte mesenchymale Stammzellen, JPCs = Kieferperiostzellen.

Tabelle 10 zeigt eine deskriptive Statistik der Gruppen aus Abbildung 15.

	MEDIAN	MINIMUM	MAXIMUM	MITTELWERT	STABW.N	ANZAHL
<b>JPC H L</b>	1715,0	523,0	10805,9	2299,0	1690,2	89
<b>JPC H G</b>	1352,5	393,8	7982,9	1710,5	1245,6	90
<b>IMSC N G</b>	1085,2	195,8	9285,0	2040,8	2378,6	83
<b>IMSC H G</b>	1025,3	362,4	3469,1	1099,5	499,3	89
<b>IMSC N L</b>	997,9	142,8	5436,8	1309,7	1020,8	88
<b>IMSC H L</b>	910,0	172,2	5072,4	1026,9	755,3	90
<b>JPC N L</b>	720,0	171,2	11063,5	1395,9	2069,8	89
<b>JPC N G</b>	688,7	156,5	12193	1320,7	1983,3	85

Tabelle 10: Deskriptive Statistik aller Elastizitätsmoduln der Zellkörper von osteogen-induzierten Zellen (OB-Zellen)

Dargestellt sind die E-Moduln der OB-Zellen, aufgeteilt nach Zelltypen, Inkubationsbedingungen und Beschichtungen mit Median, Minimum, Maximum, Mittelwert, Standardabweichung (=STABW.N) und Anzahl an Messpunkten (wobei jeder Punkt 3x gemessen wurde). Sortiert nach absteigendem Median. Alle Werte sind in der Einheit Pascal [Pa]. E-Modul = Elastizitätsmodul [Pa], G = Gelatine, H = Hypoxie iMSCs = aus induzierten pluripotenten Stammzellen differenzierte mesenchymale Stammzellen, JPCs = Kieferperiostzellen, L = Laminin, N = Normoxie.

### 3.1.3 Elastizitätsmodul der Zellkörper von undifferenzierten Zellen (CO-Zellen)

Interessanterweise verhält sich die Datenlage im Hinblick auf die Zelltypen bei den Kontrollzellen anders als bei den OB-Zellen. Bei den CO-Zellen waren nämlich die iMSCs signifikant fester als die JPCs (Abb. 16) und nicht andersherum wie unter Punkt 3.1.2. Dies gilt auch für die JPCs und iMSCs in Normoxie bzw. Hypoxie (Abb. 17 oben), auf Laminin bzw. Gelatine (Abb. 17 mittig), sowie bei allen drei Patienten (Abb. 17 unten).

Zwischen den Inkubationsbedingungen Normoxie und Hypoxie bestand bei den CO-Zellen kein signifikanter Unterschied (Abb. 16). Lediglich die Laminin-beschichteten Platten zeigten signifikant höhere Werte unter Hypoxie verglichen mit Normoxie (nicht graphisch dargestellt). Weitere signifikante Unterschiede ergaben sich wieder zwischen den einzelnen Patienten: Bei Patient # 1 waren die Normoxie-Zellen fester als die Hypoxie-Zellen und bei Patient # 2 verhielt es sich umgekehrt. Patient # 3 wies keinen signifikanten Unterschied auf. Außerdem waren unter Normoxie die Zellen (JPCs und iMSCs zusammengefasst) von Patient # 1 signifikant fester als die von Patient # 2 (nicht graphisch dargestellt).

Bei Betrachtung der Beschichtung ergaben die Messungen einen signifikanten Unterschied zwischen den festeren Zellen auf Laminin-beschichteten Platten im Vergleich zu den Zellen, die auf Gelatine-beschichteten Platten kultiviert wurden (Abb. 16). Dasselbe galt für JPCs (Abb. 17 mittig), Zellen unter Hypoxie und Zellen von Patient # 2 (beides nicht graphisch dargestellt). Außerdem waren die Zellen von Patient # 1 auf Laminin signifikant fester als die von Patient # 3 und die Zellen von Patient # 1 auf Gelatine signifikant fester als die von Patient # 2 (nicht graphisch dargestellt).

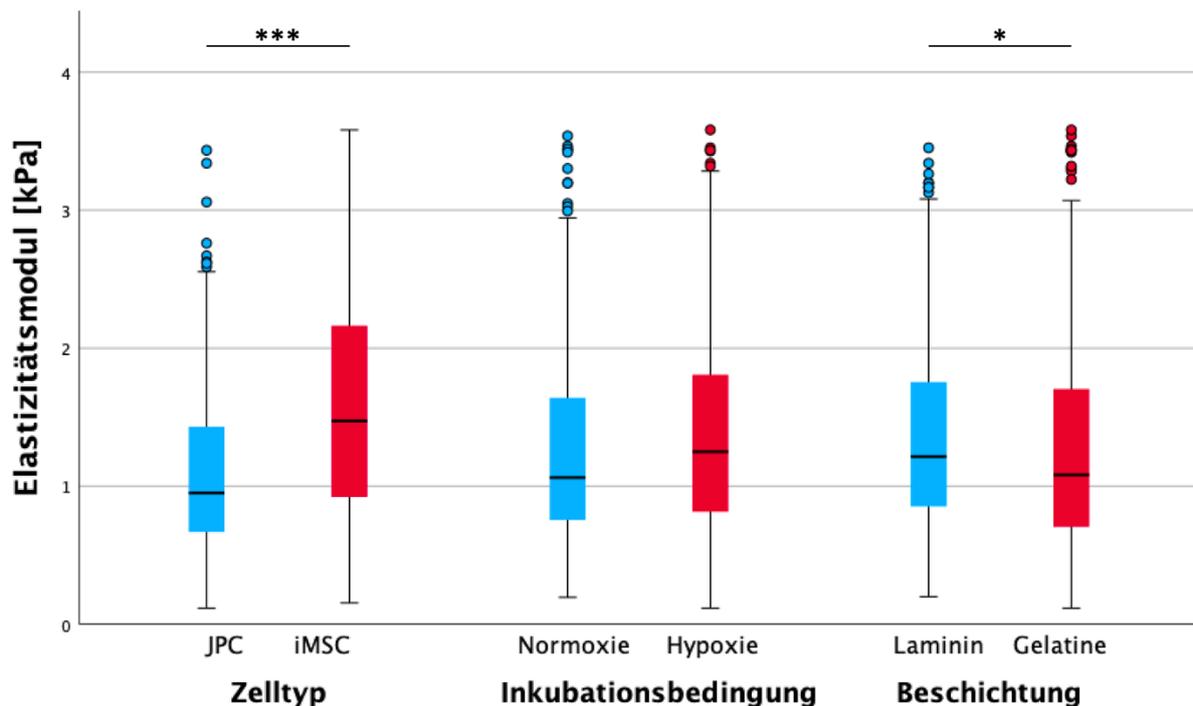


Abbildung 16: Elastizitätsmoduln der Zellkörper von undifferenzierten Zellen (CO-Zellen)  
 Die Zellen von 3 Patienten wurden 15 Tage osteogen differenziert und der E-Modul an Tag 15 gemessen. Die iMSCs waren signifikant steifer als JPCs, auf Laminin gewachsene Zellen waren signifikant steifer als auf Gelatine gewachsene, kein signifikanter Unterschied zwischen Normoxie und Hypoxie konnte errechnet werden.  
 $n(\text{Messpunkte/Boxplot}) = 324\text{-}358$  (jeder Punkt 3x gemessen). (\* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$ ). E-Modul = Elastizitätsmodul [kPa], iMSCs = aus induzierten pluripotenten Stammzellen differenzierte mesenchymale Stammzellen, JPCs = Kieferperiostzellen.

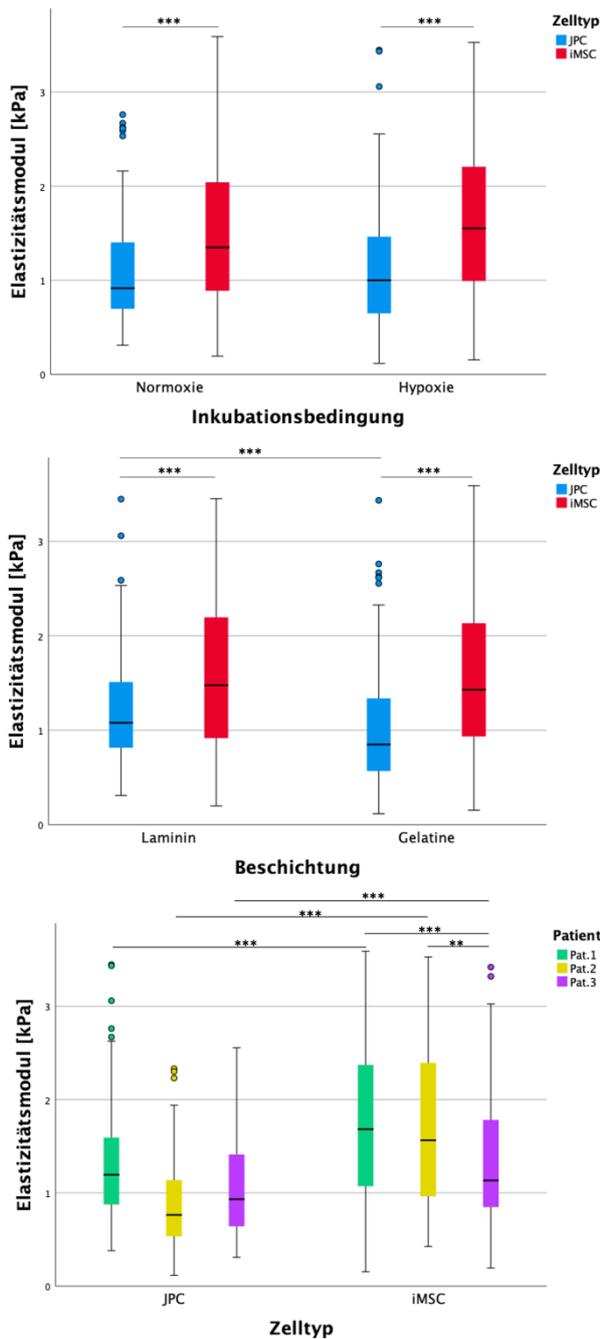


Abbildung 17: Elastizitätsmoduln der Zellkörper von undifferenzierten Zellen (CO-Zellen) – verschiedene Vergleiche Die Zellen von 3 Patienten wurden 15 Tage osteogen differenziert und der E-Modul an Tag 15 gemessen. Oben: Signifikante Unterschiede zwischen Zelltypen und Inkubationsbedingungen; Beschichtungen wurden zusammengefasst. Mitte: Signifikante Unterschiede zwischen Zelltypen und Beschichtungen; Inkubationsbedingungen wurden zusammengefasst. Unten: Signifikante Unterschiede zwischen den JPCs und iMSCs der einzelnen Patienten; Inkubationsbedingungen und Beschichtungen wurden zusammengefasst.  $n$ (Messpunkte/Boxplot) = 156-180 (oben), 160-180 (mittig), 99-120 (unten) (jeder Punkt 3x gemessen). (\* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$ ). E-Modul = Elastizitätsmodul [kPa], iMSCs = aus induzierten pluripotenten Stammzellen differenzierte mesenchymale Stammzellen, JPCs = Kieferperiostzellen.

Abbildung 18 zeigt die Boxplots der Untergruppen, wobei zwischen den einzelnen Bedingungen der Zelltypen, Inkubationsbedingungen und Beschichtungen unterschieden wird und somit nur die einzelnen Patientendaten zusammengefasst wurden.

Die iMSCs waren signifikant fester als die JPCs, und zwar in allen Untergruppen. Das galt für Normoxie Laminin und Gelatine, sowie für Hypoxie Laminin und Gelatine (Abb. 18).

Außerdem fielen signifikante Unterschiede zwischen den Inkubationsbedingungen auf, die - betrachtet auf das Gesamtergebnis- allerdings nicht ins Gewicht fielen. So waren die unter Hypoxie gemessenen Werte in der Gruppe „JPC Laminin“ signifikant fester als die gleichen Normoxie-Daten. Umgekehrt stellte es sich für die Gruppe „JPC-Gelatine“ dar (Abb. 18).

Zur Beschichtung (Abb. 18 rechts vs. links) lässt sich sagen, dass die JPCs unter Hypoxie auf Laminin signifikant steifer waren als auf Gelatine (nicht mit einem Sternchen gekennzeichnet). Ansonsten gab es hier keine signifikanten Unterschiede.

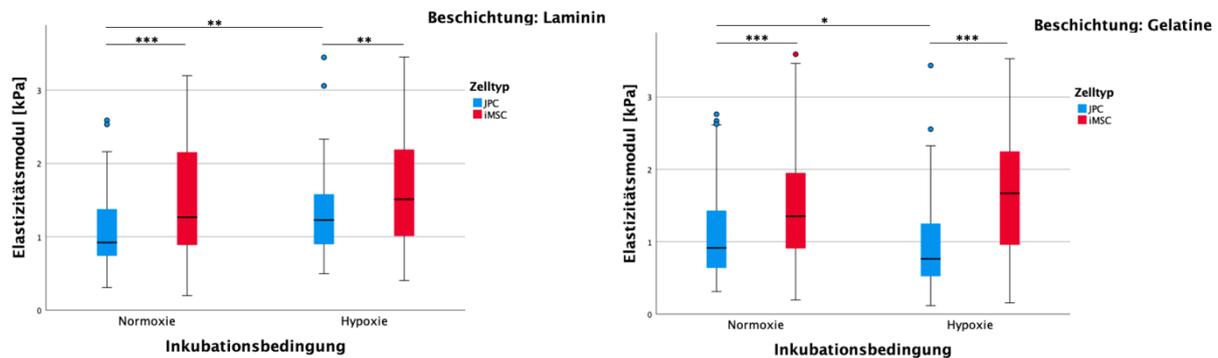


Abbildung 18: Vergleich aller Elastizitätsmoduln der Zellkörper von undifferenzierten Zellen (CO-Zellen)

Die Zellen von 3 Patienten wurden 15 Tage osteogen differenziert und der E-Modul an Tag 15 gemessen. Die AFM-Werte wurden hier unterteilt in JPCs, iMSCs, Normoxie, Hypoxie, Laminin und Gelatine. Vor allem die Zelltypen JPC und iMSC unterscheiden sich unter den verschiedenen Bedingungen stark.  $n$ (Messpunkte/Boxplot) = 77-90 (jeder Punkt 3x gemessen). (\* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$ ). AFM = Rasterkraftmikroskop, E-Modul = Elastizitätsmodul [kPa], iMSCs = aus induzierten pluripotenten Stammzellen differenzierte mesenchymale Stammzellen, JPCs = Kieferperiostzellen.

Tabelle 11 zeigt eine deskriptive Statistik der Gruppen aus Abbildung 18.

	MEDIAN	MINIMUM	MAXIMUM	MITTELWERT	STABW.N	ANZAHL
<b>IMSC H G</b>	1682,6	154,3	3581,8	1704,6	837,5	83
<b>IMSC H L</b>	1511,7	403,0	3451,6	1665,3	787,2	85
<b>IMSC N G</b>	1349,2	194,1	3538,0	1530,7	828,5	77
<b>IMSC N L</b>	1265,8	199,1	3197,9	1491,8	790,9	79
<b>JPC H L</b>	1228,5	497,1	3340,3	1301,8	545,7	88
<b>JPC N L</b>	922,6	308,7	2588,2	1074,0	483,2	90
<b>JPC N G</b>	914,4	311,7	2760,5	1078,8	585,2	90
<b>JPC H G</b>	761,7	116,6	3434,0	922,5	580,5	90

Tabelle 11: Deskriptive Statistik aller Elastizitätsmoduln der Zellkörper von undifferenzierten Zellen (CO-Zellen)

Dargestellt sind die E-Moduln, aufgeteilt in die verschiedenen Zelltypen (JPC und iMSC), Inkubationsbedingungen (N = Normoxie und H = Hypoxie) und Beschichtungen (L = Laminin und G = Gelatine) mit Median, Minimum, Maximum, Mittelwert, Standardabweichung (=STABW.N) und Anzahl an Messpunkten (wobei jeder Punkt 3x gemessen wurde). Sortiert nach absteigendem Median. Alle Werte sind in der Einheit Pascal [Pa]. E-Modul = Elastizitätsmodul [Pa], iMSCs = aus induzierten pluripotenten Stammzellen differenzierte mesenchymale Stammzellen, JPCs = Kieferperiostzellen.

### 3.1.4 Korrelationsanalysen der Kulturbedingungen

Vergleicht man die Elastizitätsmoduln zwischen den Zellkonditionen, so war, wie zu erwarten, ein signifikanter Unterschied zwischen Präzipitaten und OB-Zellen bzw. zwischen Präzipitaten und CO-Zellen vorhanden. Zwischen den E-Moduln der OB-Zellen und CO-Zellen lag kein signifikanter Unterschied vor. Interessanterweise bestand hier eine Differenz zwischen JPCs und iMSCs (Abb. 19). Betrachtet man nur die Kieferperiostzellen (JPCs), so waren die differenzierten OB-Zellen signifikant steifer als undifferenzierten CO-Zellen. Im direkten Vergleich traf dies beim Vergleich der Mittelwerte in 9 von 12 Fällen zu, die sich ergeben aus je 3 Patienten unter Normoxie/Laminin, Normoxie/Gelatine, Hypoxie/Laminin und Hypoxie/Gelatine. Zieht man die Mediane heran, so waren es 7 von 12 Fälle. Umgekehrt verhielt es sich bei den iMSCs (im direkten Vergleich in 10 von 12 Fällen, Mediane und Mittelwerte): Für die Gruppe der iMSCs waren die CO-Zellen signifikant steifer als die OB-Pendants (vgl. 3.1.2 und 3.1.3). Auch wenn man die Inkubationsbedingung in Betracht zieht und nur unter Normoxie inkubierte Zellen betrachtet, so waren die CO-Zellen signifikant steifer als die OB-Zellen (hier nicht graphisch dargestellt; im direkten Vergleich in 7 (Mittelwerte) bzw. 9 (Mediane) von 12 Fällen, die sich ergeben aus je 3 Patienten JPC/Laminin, JPC/Gelatine, iMSC/Laminin und iMSC/Gelatine). Bei den unter Hypoxie inkubierten Zellen (im direkten Vergleich 6x CO<OB zu 6x CO>OB), sowie in Bezug auf die Beschichtung oder auf die einzelnen Patienten, bestand kein signifikanter Unterschied zwischen OB-Zellen und CO-Zellen.

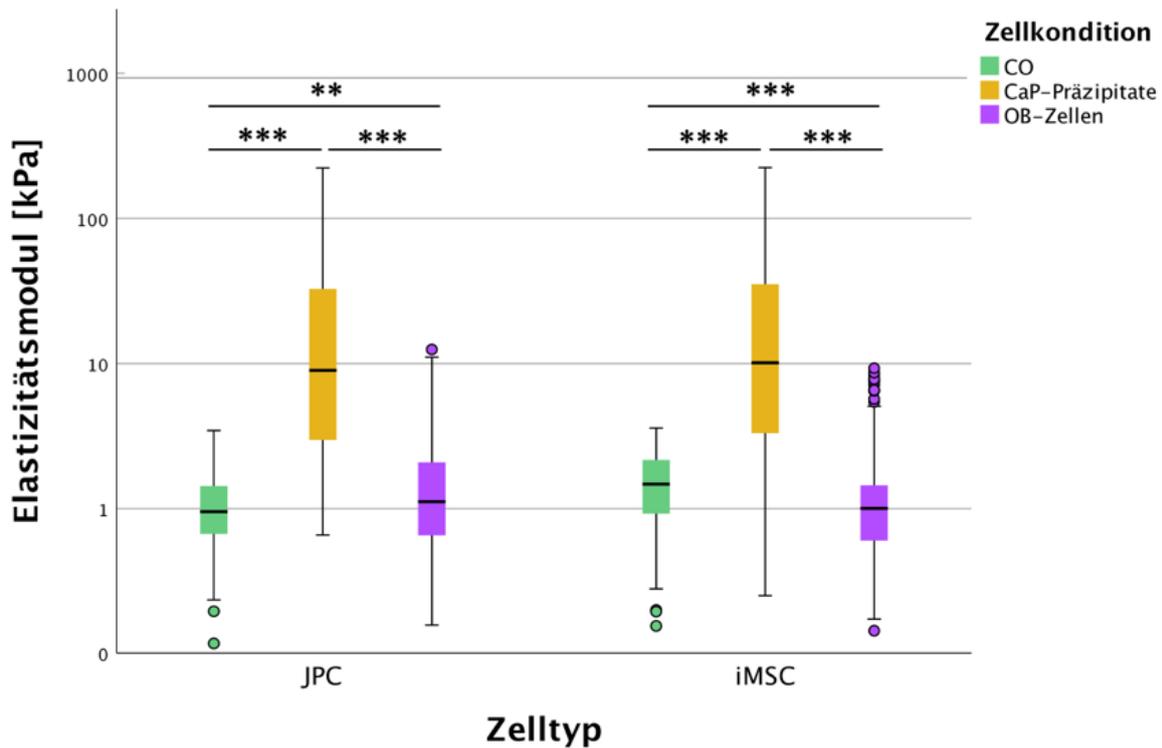


Abbildung 19: Vergleich der Elastizitätsmoduln in logarithmischer Darstellung

Die Zellen von 3 Patienten wurden 15 Tage osteogen differenziert und der E-Modul an Tag 15 gemessen. Die CaP-Präzipitate waren signifikant steifer als die Zellen. Bei den JPCs waren die OB-Zellen signifikant steifer als die CO-Zellen. Bei den iMSCs waren die CO-Zellen signifikant steifer als die OB-Zellen.

$n(\text{Messpunkte/Boxplot}) = 324\text{-}358$  (jeder Punkt 3x gemessen). ( $*p < 0,05$   $**p < 0,01$   $***p < 0,001$ ). - Modul = Elastizitätsmodul [kPa], CaP = Kalziumphosphat, CO = undifferenzierte Zellen iMSCs = aus induzierten pluripotenten Stammzellen differenzierte mesenchymale Stammzellen, JPCs = Kieferperiostzellen, OB = osteogen-induzierte Zellen.

Vergleicht man die Mediane, so waren nicht nur bei den iMSCs unter Normoxie (nicht signifikant, in 4 von 6 Fällen, die sich ergeben aus je 3 Patienten Laminin und Gelatine) und Hypoxie (signifikant,  $p < 0,001$ , in 6 von 6 Fällen) die CO-Zellen steifer als die OB-Zellen, sondern auch die CO-Zellen der JPCs in Normoxie tendenziell (nicht signifikant, in 5 von 6 Fällen) steifer als die OB-Zellen. Lediglich unter Hypoxie waren die CO-JPCs (signifikant,  $p < 0,001$ ) weicher als die OB-JPCs (Abb. 20, in 6 von 6 Fällen). Was den Median angeht, waren die OB-Zellen den CO-Zellen an Steifigkeit unterlegen, aber sie wiesen sehr viele Extremwerte auf, was bei den CO-Zellen nicht der Fall war (Tab. 12).

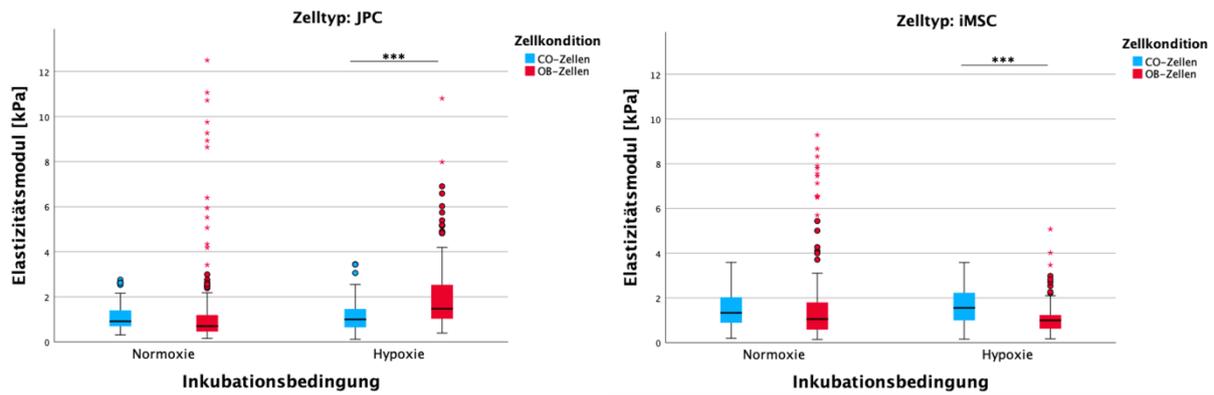


Abbildung 20: Zellelastizitäten im Vergleich in Bezug auf Zelltyp und Inkubationsbedingung. Die Zellen von 3 Patienten wurden 15 Tage osteogen differenziert und der E-Modul an Tag 15 gemessen. Die Werte der OB-Zellen waren deutlich breiter gestreut als die der CO-Zellen. Es gab ein paar sehr hohe Werte aber auch viele niedrige Werte, wie man anhand der mit Sternchen dargestellten Extremwerte gut erkennen kann. Bei den CO-Zellen waren die Werte in einem viel engeren Rahmen verteilt. Unter Hypoxie waren bei den JPCs die OB-Zellen signifikant steifer als die CO-Zellen (linker Graph). Unter Hypoxie waren bei den iMSCs die CO-Zellen signifikant steifer als die OB-Zellen (rechter Graph). Beschichtungen wurden zusammengefasst.  $n(\text{Messpunkte/Boxplot}) = 156-180$  (jeder Punkt 3x gemessen). (\* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$ ). E-Modul = Elastizitätsmodul [kPa], CO = undifferenzierte Zellen, iMSCs = aus induzierten pluripotenten Stammzellen differenzierte mesenchymale Stammzellen, JPCs = Kieferperiostzellen, OB = osteogen-induzierte Zellen.

	NORMOXIE	HYPOXIE
<b>CO IMSC</b>	1,333 ± 0,810 kPa	1,554 ± 0,813 kPa
<b>OB IMSC</b>	1,050 ± 1,848 kPa	0,992 ± 0,642 kPa
<b>CO JPC</b>	0,915 ± 0,537 kPa	1,000 ± 0,595 kPa
<b>OB JPC</b>	0,700 ± 2,028 kPa	1,474 ± 1,512 kPa

Tabelle 12: Deskriptive Statistik der Elastizitätsmoduln von CO- und OB-Zellen. Median und Standardabweichung von JPCs und iMSCs, unterteilt in Normoxie und Hypoxie. Die OB-JPCs in Normoxie waren die weichsten Zellen, während die CO-iMSCs in Hypoxie die steifsten Zellen waren. Die hohen Standardabweichungen der OB-Zellen zeigen eine breite Streuung der Werte. CO = undifferenzierte Zellen, iMSCs = aus induzierten pluripotenten Stammzellen differenzierte mesenchymale Stammzellen, JPCs = Kieferperiostzellen, OB = osteogen-induzierte Zellen.

Weiterhin existierte zwischen der Steifigkeit der OB-Zellen und der der CaP-Präzipitate eine signifikante Korrelation, das heißt je steifer die OB-Zellen, desto steifer die CaP-Präzipitate und umgekehrt. Das galt jedoch nur für die Berechnung mit Mittelwerten der jeweils 30 Messungen pro Bedingung, wo die Extremwerte stark ins Gewicht fallen (Abb. 21 oben links). Berechnet man die Korrelation zwischen OB-Zellen und CaP-Präzipitaten anhand der Mediane, so bestand kein signifikanter Zusammenhang, lediglich eine Tendenz in eine negative Proportionalität (Abb. 21 oben rechts). Betrachtet man die Zelltypen getrennt, so bestand bei den JPCs auch eine deutliche Tendenz zur negativen Korrelation, das bedeutet, je weicher die osteogen induzierten Zellen, desto fester deren produzierten CaP-Präzipitate (Abb. 21 unten links). Bei den iMSCs ließ sich kein Zusammenhang erkennen (Abb. 21 unten rechts). Eine

signifikante positive Korrelation konnte zwischen den E-Moduln der CaP-Präzipitate und OB-Zellkörper von JPCs unter Normoxie und auf Laminin festgestellt werden (nicht graphisch dargestellt). Alle anderen untersuchten Korrelationen zwischen CaP-Präzipitaten und OB-Zellen fielen nicht signifikant aus.

Bei Untersuchungen zur Korrelation zwischen den E-Moduln der Zellkörper von undifferenzierten CO- und osteogen differenzierten OB-Zellen konnte Folgendes errechnet werden: Zwischen den CO-iMSCs und den OB-iMSCs bestand unter Hypoxie eine positive Korrelation, das heißt je fester die CO-Zellen waren, desto fester waren auch die resultierenden OB-Zellen (Abb. 22). Dasselbe galt für die iMSCs des Patienten # 1 (nicht graphisch dargestellt). Alle weiteren untersuchten Korrelationen zwischen CO- und OB-Zellen fielen nicht signifikant aus.

Zwischen CaP-Präzipitaten und CO-Zellen bestanden mit Ausnahme der negativen Korrelation der JPCs von Patient # 3 (nicht graphisch dargestellt) keine statistisch relevante Korrelationen, und zwar weder für die Berechnung mit Mittelwerten noch mit Medianen.

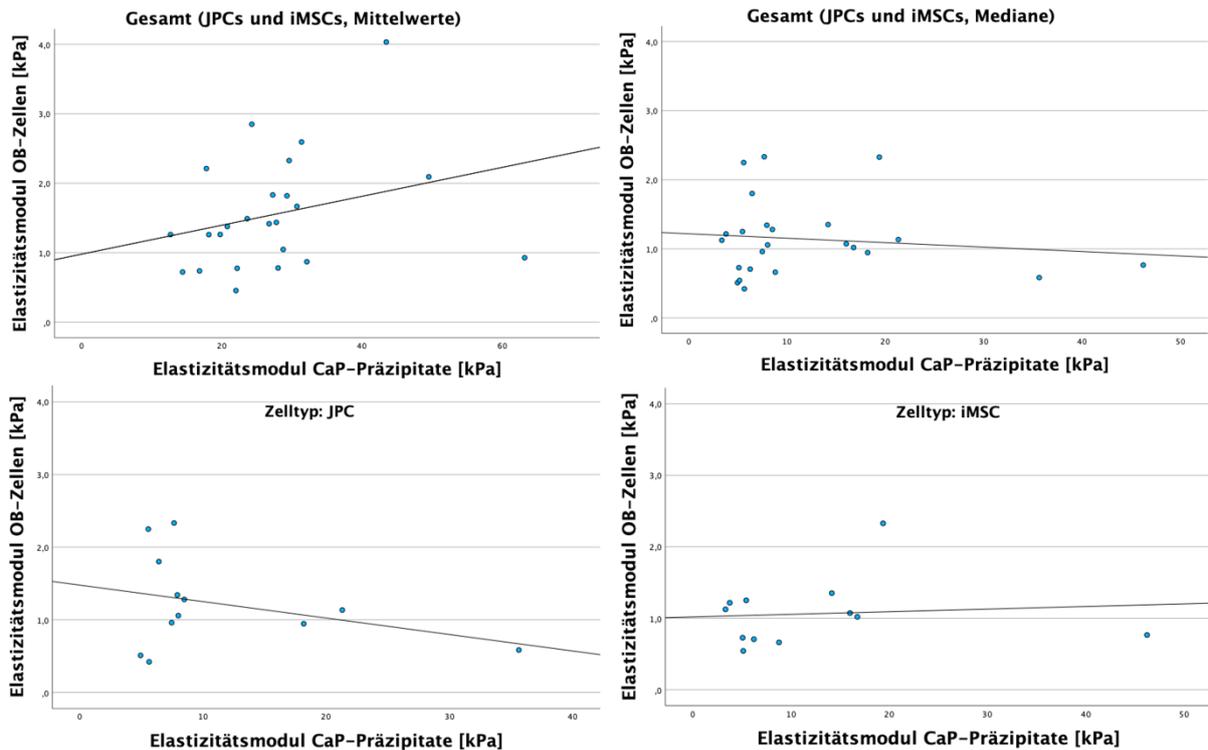


Abbildung 21: Korrelation zwischen den E-Moduln der CaP-Präzipitate und OB-Zellen

Die Zellen von 3 Patienten wurden 15 Tage osteogen differenziert und der E-Modul an Tag 15 gemessen. Oben: Gesamtvergleich der Daten. Links: Mit den Mittelwerten der AFM-Daten berechnet, bestand eine signifikante positive Korrelation zwischen OB-Zellen und CaP-Präzipitaten. Rechts: Mit den Medianen der AFM-Daten berechnet, bestand keine signifikante Korrelation, sondern nur eine Tendenz zur negativen Korrelation. Unten: Korrelation aufgeteilt in die Zelltypen, links: JPCs, rechts: iMSCs beides mit den Medianen der AFM-Daten berechnet, keine Signifikanz. Die Signifikanz wurde mittels Kendall-Tau-b berechnet,  $p = 0,033 < 0,05$  (links oben), Pearson-Korrelation nicht signifikant.  $n = 24$  oben, 12 unten (jeder Punkt 90x gemessen). (\* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$ ). E-Modul = Elastizitätsmodul [kPa], iMSCs = aus induzierten pluripotenten Stammzellen differenzierte mesenchymale Stammzellen, JPCs = Kieferperiostzellen.

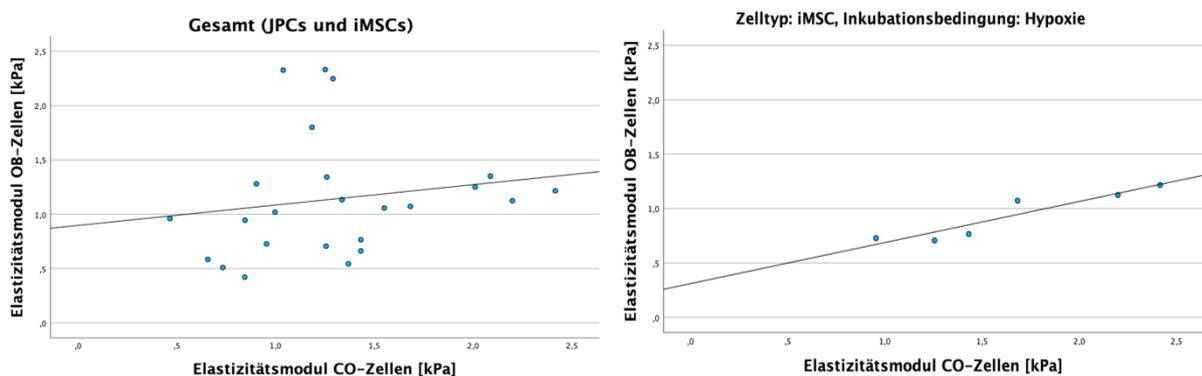


Abbildung 22: Korrelation zwischen den E-Moduln der CO- und OB-Zellen

Die Zellen von 3 Patienten wurden 15 Tage osteogen differenziert und der E-Modul an Tag 15 gemessen. Links: Gesamtvergleich der Daten, nicht signifikant. Rechts: iMSCs unter Hypoxie, je höher die E-Moduln der CO-Zellen, desto höher die E-Moduln der OB-Zellen, signifikante Korrelation. Die Signifikanz wurde mittels Kendall-Tau-b und Pearson-Korrelation berechnet:  $p = 0,015 < 0,05$  (Kendall-Tau-b),  $p = 0,006 < 0,01$  (Pearson), mit Medianen der AFM-Daten berechnet.  $n = 24$  links, 12 rechts (jeder Punkt 90x gemessen). (\* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$ ). E-Modul = Elastizitätsmodul [kPa], iMSCs = aus induzierten pluripotenten Stammzellen differenzierte mesenchymale Stammzellen, JPCs = Kieferperiostzellen.

### 3.1.5 Auswirkungen der Plättchenlysatz-Konzentration im Medium

Wie oben beschrieben, war manchmal selbst nach mehrmaligen Versuchen die osteogene Differenzierung von Zellen mit hPl-10-Medium nicht erfolgreich. Das galt für die JPCs aller drei Patienten (Pat. #2 nur Laminin) unter hypoxischen Bedingungen, sowie für die iMSCs eines Patienten, ebenfalls unter hypoxischen Bedingungen. Deshalb wurde in diesen Fällen hPl-5-Medium verwendet, da dies ausnahmslos immer zum Erfolg, sprich zur Zellmineralisierung, führte. Der Vergleich der Elastizitätsmoduln der CaP-Präzipitate, die in beiden Medien gebildet wurden, zeigte zwar eine Tendenz zu höheren Werten mit hPl-10-Medium, jedoch war diese nicht signifikant (Abb. 23).

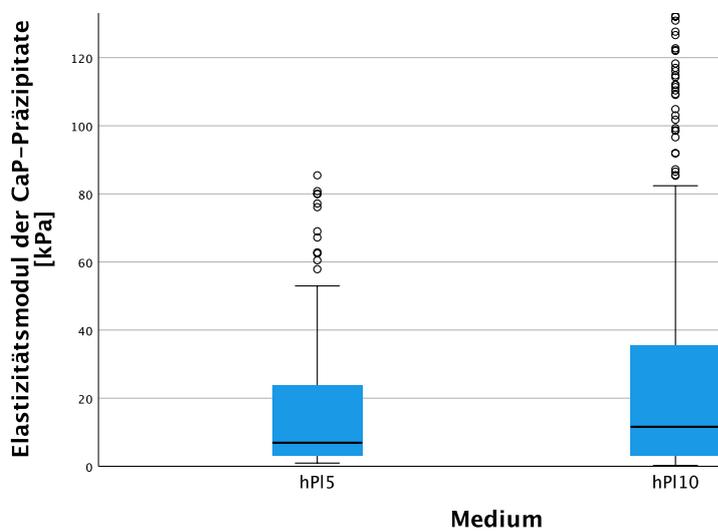


Abbildung 23: AFM-Messungen der Mineralisierungsmedienbezogene Unterschiede

Die Zellen von 3 Patienten wurden 15 Tage osteogen differenziert und der E-Modul an Tag 15 gemessen. Zwischen der hPl-5- ( $n = 206$ ) und der hPl-10-Medium Gruppe ( $n = 506$ ) bestand kein statistisch relevanter Unterschied. E-Modul = Elastizitätsmodul, hPl = humanes Plättchenlysatz.

## 3.2 ALIZARINQUANTIFIZIERUNG

In diesem Kapitel geht es nicht wie bisher um die CaP-Präzipitatsteifigkeit, sondern um die CaP-Präzipitatemenge, die die Zellen produzierten. Durch die Färbung der Kalziumphosphat-Präzipitate (CaP-Präzipitate) mit Alizarin und die photometrische Messung der Kalziumkonzentration konnte die CaP-Präzipitatemenge ermittelt werden. Für die Gesamtauswertung wurden insgesamt 54 Daten von 4 Patienten ausgewertet. Da in jedem Kulturansatz je zwei Kulturplatten mit Laminin und mit Gelatine zur osteogenen Differenzierung verwendet wurden (Abb. 2), wurde zur Auswertung jeweils der Mittelwert von beiden gebildet.

### 3.2.1 Gesamt

Signifikante Unterschiede zwischen den synthetisierten CaP-Präzipitatemengen bestanden nicht, da in Hypoxie viele Extremwerte gemessen wurden, obwohl sonst eher niedrige Werte

vorlagen. Es bestand eine starke Tendenz zu mehr CaP-Präzipitaten unter Normoxie im Vergleich zu Hypoxie (Median 2,82 mM bzw. 0,86 mM, Zunahme von 228 %), sowie eine Tendenz zu mehr CaP-Präzipitaten jeweils bei iMSC zu JPC (Median 2,19 mM bzw. 1,59 mM, Zunahme von 38 %) und bei Laminin zu Gelatine (Median 2,18 mM bzw. 1,62 mM, Zunahme von 35 %) (Abb. 24). Tabelle 13 zeigt eine deskriptive Statistik von Abbildung 24.

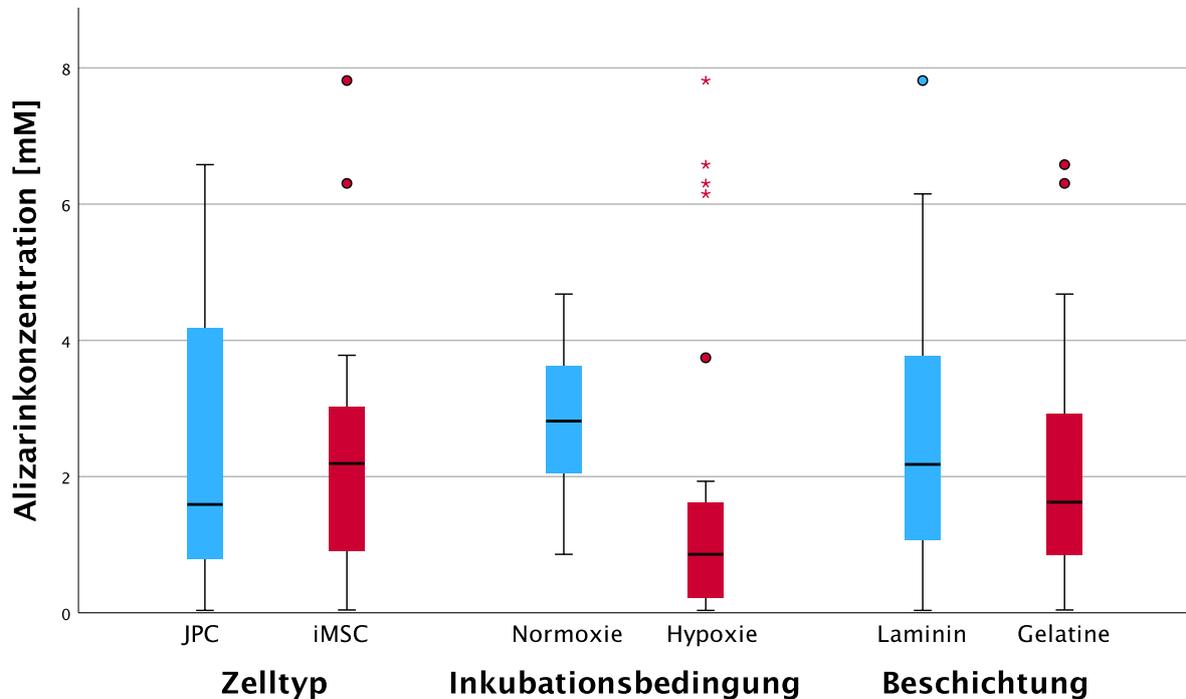


Abbildung 24: Photometrische Quantifizierung der Zellmineralisierungen

Die Zellen von 3 Patienten wurden 15 Tage lang osteogen differenziert, an Tag 15 fixiert und für die Alizarinquantifizierung eingefärbt. Zwischen den Vergleichsgruppen (JPC vs. iMSC; Normoxie vs. Hypoxie; Laminin vs. Gelatine) besteht kein signifikanter Unterschied.

$n(\text{Messwerte/Boxplot}) = 12-16$ , iMSCs = aus induzierten pluripotenten Stammzellen differenzierte mesenchymale Stammzellen, JPCs = Kieferperiostzellen.

	Zelltyp		Inkubationsbedingung		Beschichtung	
	JPC	IMSC	NORMOXIE	HYPOXIE	LAMININ	GELATINE
MEDIAN	1,59	2,19	2,82	0,86	2,18	1,62
MINIMUM	0,0345	0,042	0,86	0,0345	0,0345	0,042
MAXIMUM	6,58	7,82	4,68	7,82	7,82	6,58
MITTELWERT	2,35	2,28	2,82	1,77	2,51	2,13
STABW.N	1,91	1,74	1,08	2,26	1,88	1,75

Tabelle 13: Deskriptive Statistik der gemessenen Kalziumkonzentrationen [mM] anhand der Alizarinfärbung (Übersicht)

Dargestellt sind die Alizarinkonzentrationen der verschiedenen Zelltypen, Inkubationsbedingungen und Beschichtungen mit Median, Minimum, Maximum, Mittelwert und Standardabweichung (=STABW.N). Alle Werte sind in der Einheit Millimolar [mM].

Signifikanzen fielen lediglich innerhalb der Patienten oder beim Vergleich der Patienten auf. So produzierten die JPCs von Patient # 2 signifikant mehr mineralisierte ECM als die iMSCs

(Abb. 25) und bei Patient # 1 waren die Zellen unter Normoxie quantitativ signifikant produktiver als die gleichen Zellen unter Hypoxie (hier nicht graphisch dargestellt). Bei den JPCs konnten signifikant mehr Präzipitate bei Patient # 2 im Vergleich zu Patient # 1 gemessen werden und bei den iMSCs signifikant mehr bei Patient # 3 im Vergleich zu Patient # 4 (Abb. 25). Wenn man die Werte weiter aufteilt nach Zelltyp, Inkubationsbedingung und Beschichtung so gab es auch zwischen den Patienten keine weiteren signifikanten Unterschiede.

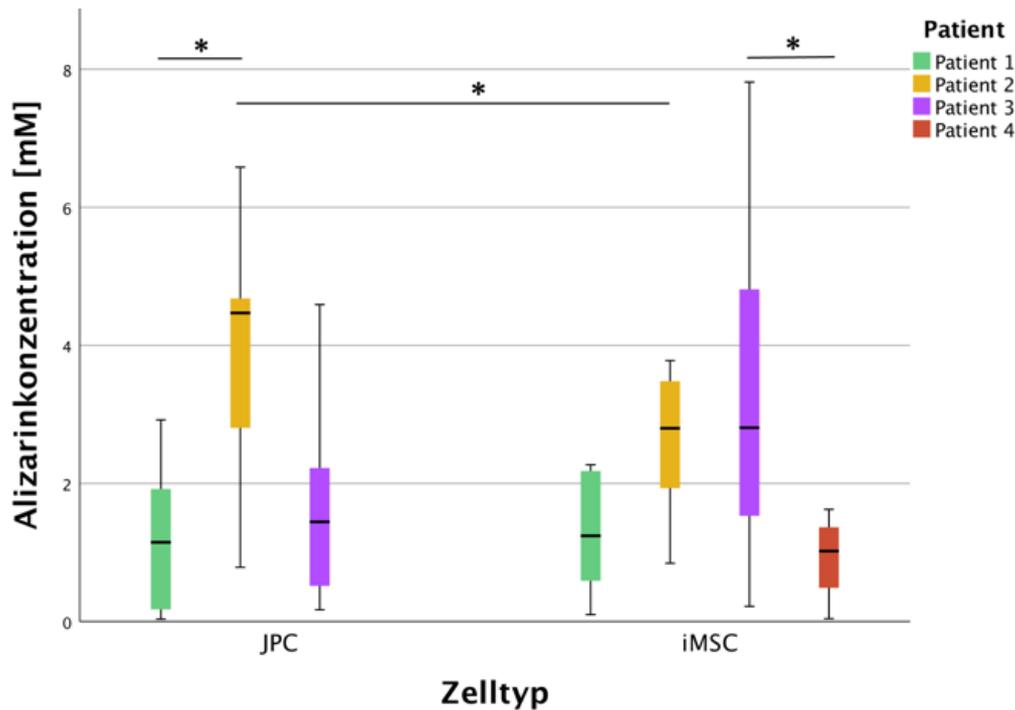


Abbildung 25: Photometrische Quantifizierung der Mineralisierungen - patientenbezogene Unterschiede

Die Zellen von 3 Patienten wurden 15 Tage lang osteogen differenziert, an Tag 15 fixiert und für die Alizarinquantifizierung eingefärbt. Dargestellt sind signifikante Unterschiede zwischen den JPCs und iMSCs der einzelnen Patienten.

$n(\text{Messwerte/Boxplot}) = 6-10$  (Pat. 1-3), = 4 (Pat. 4). Berechnet mit Kruskal-Wallis-Test. (\* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$ ). iMSCs = aus induzierten pluripotenten Stammzellen differenzierte mesenchymale Stammzellen, JPCs = Kieferperiostzellen.

Obwohl sich nur wenige signifikante Unterschiede zwischen den gemessenen Alizarinkonzentrationen ergaben, werden im Folgenden trotzdem wieder Vergleiche angestellt, um Tendenzen zu erkennen.

Unter Normoxie bildeten die JPCs (Median  $2,87 \text{ mM} \pm 1,33 \text{ mM}$ ) - fast vernachlässigbar - mehr CaP-Präzipitate als die iMSCs (Median  $2,70 \text{ mM} \pm 0,70 \text{ mM}$ ) und unter Hypoxie die iMSCs (Median  $0,90 \text{ mM} \pm 2,31 \text{ mM}$ ) etwas mehr als die JPCs (Median  $0,78 \pm 2,19 \text{ mM}$ ) (Tab. 14). Diese Daten zeigen auch, dass für beide Zelltypen die normoxischen Bedingungen bei Weitem geeigneter waren für das Mineralisierungspotenzial (Abb. 26, links).

Die Lamininbeschichtung führte im Vergleich zu Gelatine sowohl für die JPCs (Median 1,92 mM  $\pm$  1,97 mM zu 1,56 mM  $\pm$  1,84 mM) als auch für die iMSCs (Median 2,42 mM  $\pm$  1,79 mM zu 2,07 mM  $\pm$  1,65 mM) zu tendenziell höheren CaP-Präzipitaten. Die Daten zeigten auch, dass auf beiden Beschichtungen iMSCs mehr Mineralisierungen als JPCs bildeten (Abb. 26, rechts).

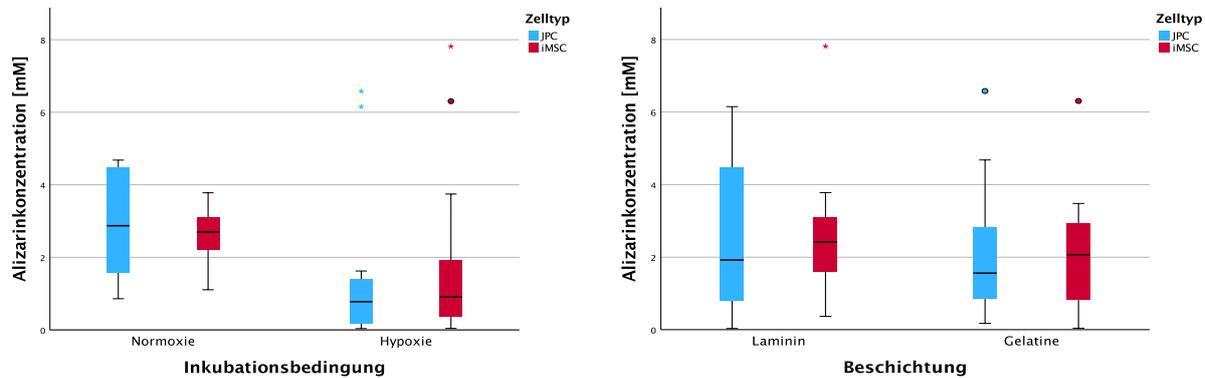


Abbildung 26: Alizarinquantifizierung in verschiedenen Vergleichen

Die Zellen von 3 Patienten wurden 15 Tage lang osteogen differenziert, an Tag 15 fixiert und für die Alizarinquantifizierung eingefärbt. Zwischen den Vergleichsgruppen besteht kein signifikanter Unterschied, doch es wird deutlich, dass für hohe Präzipitatenmengen die Normoxie der Hypoxie überlegen scheint. Links wurden die Beschichtungen Laminin und Gelatine zusammengefasst, rechts die Inkubationsbedingungen Normoxie und Hypoxie.

$n(\text{Messwerte/Boxplot}) = 12-14$ , iMSCs = aus induzierten pluripotenten Stammzellen differenzierte mesenchymale Stammzellen, JPCs = Kieferperiostzellen.

Tabelle 14 zeigt (wie Tabelle 7 für die E-Moduln der CaP-Präzipitate) die wichtigen Vergleiche zwischen den Zelltypen JPC und iMSC in prozentualer Darstellung. Die Mediane wurden untereinander dividiert und der die größeren Mengen CaP-Präzipitate produzierende Zelltyp jeweils farblich markiert. Zum Beispiel betrug unter Normoxie der Median der Menge der CaP-Präzipitate der iMSCs nur 94,1% des Medians der JPCs.

	Zelltyp
<b>Gesamt</b>	<b>iMSC &gt; JPC (72,6%)</b>
Normoxie	<b>JPC &gt; iMSC (94,1%)</b>
Hypoxie	<b>iMSC &gt; JPC (86,7%)</b>
Laminin	<b>iMSC &gt; JPC (79,3%)</b>
Gelatine	<b>iMSC &gt; JPC (75,4%)</b>

Tabelle 14: Prozentuale Darstellung der Zelltypen JPC und iMSC (Kalziumkonzentration)

Vergleich der Zelltypen unter 5 verschiedenen Bedingungen: Gesamt, Normoxie, Hypoxie, Laminin, Gelatine. Die Prozentzahl beschreibt den Anteil des „schwächeren“ Zelltyps am „stärkeren“ (bunte Schrift), was die Menge der Mineralisierungen betrifft. Unter 4 Bedingungen produzierten die iMSCs mehr CaP-Präzipitate, unter einer Bedingung waren die JPCs überlegen.

Geht man weiter ins Detail und betrachtet alle Eigenschaften separat, so wurden die höchsten Alizarinkonzentrationen von JPCs im Normoxieinkubator auf einer Lamininbeschichtung gebildet (Median 3,89 mM). Die niedrigsten Medianwerte zeigten sich bei den entsprechenden Hypoxiezellen (wieder JPCs auf Laminin) mit einem Median von 0,49 mM. Vergleicht man

alle Mittelwerte, so ergab sich ein ähnliches Bild (Tab. 15). IMSCs unter Normoxie (sowohl auf Laminin als auch auf Gelatine) und JPCs in Normoxie auf Gelatine zeichneten sich durch sehr ähnliche Lageparameter (Median, Mittelwert) aus. Auffällig ist, dass die höchsten Maximalwerte bei den Gruppen mit den niedrigsten Durchschnittswerten gemessen wurden: alle Schälchen unter Hypoxie. Die breite Streuung der Werte wird auch durch die hohen Standardabweichungen der Hypoxiewerte deutlich. (Tab. 15).

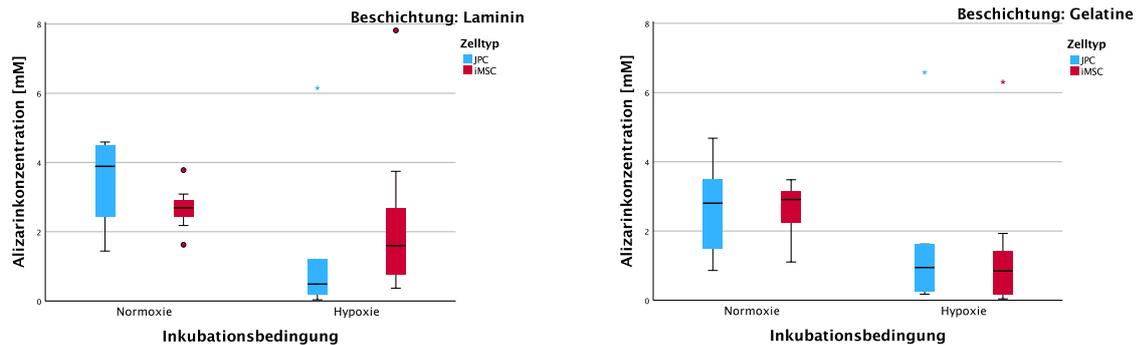


Abbildung 27: Vergleich aller anhand der Alizarinfärbung gemessenen Kalziumkonzentrationen [mM]. Die Zellen von 3 Patienten wurden 15 Tage lang osteogen differenziert, an Tag 15 fixiert und für die Alizarinquantifizierung eingefärbt. Die Werte wurden hier unterteilt in JPCs, iMSCs, Normoxie, Hypoxie, Laminin und Gelatine, wobei keine Signifikanzen, aber Tendenzen festgestellt werden konnten (s. Tab. 15 und 16).

$n(\text{Messwerte/Boxplot}) = 6-7$ . iMSCs = aus induzierten pluripotenten Stammzellen differenzierte mesenchymale Stammzellen, JPCs = Kieferperiostzellen.

	MEDIAN	MINIMUM	MAXIMUM	MITTELWERT	STABW.N	ANZAHL
<b>JPC N L</b>	3,89	1,44	4,59	3,39	1,21	7
<b>IMSC N G</b>	2,91	1,11	3,48	2,60	0,76	7
<b>JPC N G</b>	2,81	0,86	4,68	2,62	1,33	7
<b>IMSC N L</b>	2,69	1,62	3,78	2,68	0,63	7
<b>IMSC H L</b>	1,60	0,37	7,82	2,38	2,45	7
<b>JPC H G</b>	0,95	0,18	6,58	1,76	2,21	6
<b>IMSC H G</b>	0,85	0,04	6,31	1,47	2,06	7
<b>JPC H L</b>	0,49	0,03	6,15	1,42	2,15	6

Tabelle 15: Deskriptive Statistik aller gemessenen Kalziumkonzentrationen [mM] anhand der Alizarinfärbung

Dargestellt sind die Alizarinkonzentrationen, aufgeteilt nach Zelltypen, Inkubationsbedingungen und Beschichtungen mit Median, Minimum, Maximum, Mittelwert und Standardabweichung (=STABW.N). Alle Werte sind in der Einheit Millimolar [mM].

G = Gelatine, H = Hypoxie, iMSC = aus induzierten pluripotenten Stammzellen differenzierte mesenchymale Stammzellen, JPC = Kieferperiostzelle, L = Laminin, N = Normoxie.

Tabelle 16 soll für alle vorhandenen Bedingungen Tendenzen verdeutlichen und prozentual darstellen. Die jeweils bunt geschriebene Eigenschaft stellt die Eigenschaft dar, die von beiden die größeren Mengen an CaP-Präzipitate produzierte (wie oben erwähnt handelt es sich um Tendenzen und nicht um signifikante Unterschiede).

	<u>Zelltyp</u>	<u>Inkubationsbedingung</u>	<u>Beschichtung</u>
<b>Gesamt</b>	iMSC>JPC (72,6%)	Normoxie>Hypoxie (30,5%)	Laminin>Gelatine (74,3%)
No, La	JPC>iMSC (69,2%)	-	-
No, Ge	JPC=iMSC*	-	-
Hy, La	iMSC>JPC (30,6%)	-	-
Hy, Ge	JPC>iMSC (89,5%)	-	-
JPC, No	-	-	Laminin>Gelatine (72,2%)
JPC, Hy	-	-	Gelatine>Laminin (51,6%)
iMSC, No	-	-	Gelatine >Laminin (92,4%)
iMSC, Hy	-	-	Laminin>Gelatine (53,1%)
La, JPC	-	Normoxie>Hypoxie (12,6%)	-
La, iMSC	-	Normoxie>Hypoxie (59,5%)	-
Ge, JPC	-	Normoxie>Hypoxie (33,8%)	-
Ge, iMSC	-	Normoxie>Hypoxie (29,2%)	-

Tabelle 16: Prozentuale Anteile der niedrigeren Alizarinkonzentrationen (>-Zeichen) aufgeteilt nach Zelltyp, Inkubationsbedingung und Beschichtung

Deskriptive Statistik der Vergleiche der gemessenen Kalziumkonzentrationen [mM] anhand der Alizarinfärbung, aufgeteilt nach den drei Variablen Zelltyp, Inkubationsbedingung und Beschichtung. Verglichen wurden die jeweiligen Medianwerte und der Anteil der jeweils niedrigeren an der höheren Konzentration in Prozent dahinter geschrieben. Beispielsweise betrug die Kalziumkonzentration der JPCs nur 72,6% des Medians der iMSCs. Unter Normoxie und auf Laminin betrug der Median der iMSCs nur 69,2% des Medians der JPCs. Das heißt, je kleiner die Prozentzahl, desto unterschiedlicher waren die Werte der beiden. \*Bei Werten über 95% wurden die verglichenen Kalziumkonzentrationen als gleich angesehen.

Ge = Gelatine, Hy = Hypoxie, iMSC = aus induzierten pluripotenten Stammzellen differenzierte mesenchymale Stammzellen, JPC = Kieferperiostzelle, La = Laminin, No = Normoxie.

### 3.2.2 Auswirkungen der Plättchenlysats-Konzentration im Medium

In Bezug auf die Plättchenlysats-Supplementierung ergab sich bei der Alizarinquantifizierung ein signifikanter Unterschied zwischen hP1-5- und hP1-10-Medium bei den JPCs (Abb. 28) und bei Patient 1 (nicht graphisch dargestellt), jedoch nicht bei den iMSCs.

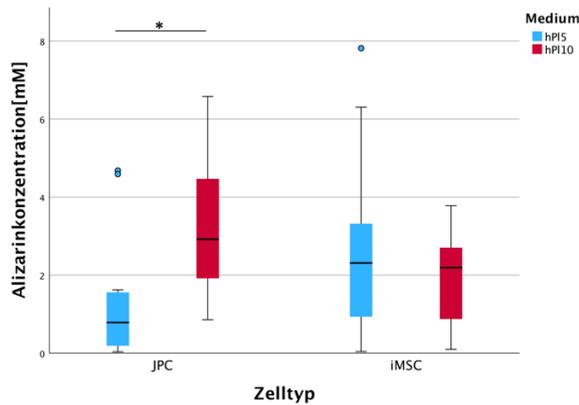


Abbildung 28: Photometrische Messung der Mineralisierungen – medienbezogene Unterschiede

Die Zellen von 3 Patienten wurden 15 Tage lang osteogen differenziert, an Tag 15 fixiert und für die Alizarinquantifizierung eingefärbt. Die mit hPI-10 kultivierten JPCs synthetisierten signifikant mehr CaP-Präzipitate als die mit hPI-5 kultivierten JPCs.

$n(\text{Messwerte/Boxplot}) = 13-14$ . Berechnet mit Kruskal-Wallis-Test. ( $*p < 0,05$   $**p < 0,01$   $***p < 0,001$ ). iMSCs = aus induzierten pluripotenten Stammzellen differenzierte mesenchymale Stammzellen, JPCs = Kieferperiostzellen.

### 3.3 ZUSAMMENHANG ZWISCHEN ELASTIZITÄT UND QUANTITÄT DER CaP-PRÄZIPITATE / ZELLELASTIZITÄT

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen Qualität (3.1) und Quantität (3.2) der CaP-Präzipitate herstellen zu können, wurden die Messwerte derselben Zellen gegeneinander aufgetragen. Aus einem Datensatz von 3 Patienten zu je 2 verschiedenen Zelltypen, Inkubationsbedingungen und Beschichtungen ergeben sich 24 AFM-Daten und 24 entsprechende Datenpunkte der Alizarinkonzentration. Da zu jedem einzelnen dieser 24 Versuchseigenschaften 30 AFM-Daten vorlagen (vgl. 2.3), mussten diese reduziert werden. Hierfür wurde einmal der jeweilige Mittelwert und einmal der jeweilige Median der jeweils 30 Messwerte, die für jeden Kulturansatz erhoben wurden, errechnet. Beim Mittelwert finden die Extremwerte Beachtung und beim Median nicht.

Es konnten insgesamt kaum signifikante Korrelationen zwischen Elastizitätsmodul der CaP-Präzipitate und deren Quantität festgestellt werden (Abb. 29 links). Eine solche bestand lediglich bei Patient 1 der JPCs bei der Berechnung mit dem Median (Abb. 29 rechts). Wenn die Werte weiter nach dem Zelltypen, der Inkubationsbedingung, der Beschichtung und dem Patienten aufgetrennt wurden, so gab es keine weiteren signifikanten Korrelationen.

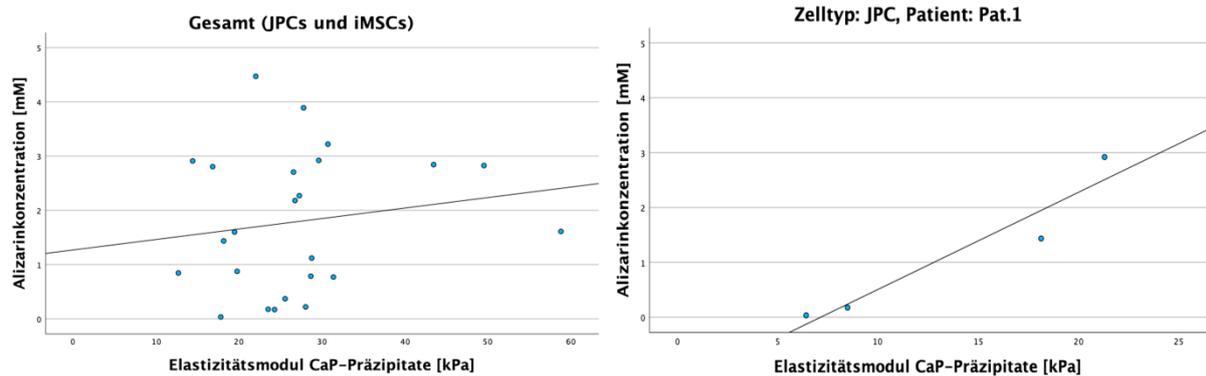


Abbildung 29: Korrelation von E-Modul und Alizarinkonzentration der CaP-Präzipitate

Die Zellen von 3 Patienten wurden 15 Tage lang osteogen differenziert, an Tag 15 wurden mittels AFM-Messungen die E-Moduln bestimmt, die Zellen fixiert und für die Alizarinquantifizierung eingefärbt. Der linke Graph zeigt die gesamten Werte (JPCs und iMSCs) der Kalziumkonzentrationen, aufgetragen gegen alle Elastizitätsmoduln der CaP-Präzipitate (hier Mittelwerte). Der resultierende Zusammenhang war weder bei Verwendung der Mediane noch bei Verwendung der Mittelwerte signifikant. Der einzige signifikante Zusammenhang konnte bei den JPCs des Patienten 1 festgestellt werden, rechter Graph (Mediane): Je fester die CaP-Präzipitate, desto höher die detektierte Alizarinkonzentration. Im rechten Graphen wurden Inkubationsbedingungen und Beschichtungen zusammengefasst, iMSCs wurden hier außenvorgelassen.

Die zweiseitige Signifikanz wurde mittels Kendall-Tau-b und Pearson-Korrelation berechnet, links (nicht signifikant)  $p = 0,246 > 0,05$  (Kendall-Tau-b),  $p = 0,453 > 0,05$  (Pearson); rechts  $p < 0,01$  (Kendall-Tau-b),  $p = 0,044 < 0,05$  (Pearson). AFM = Rasterkraftmikroskop, CaP = Kalziumphosphat, iMSCs = aus induzierten pluripotenten Stammzellen differenzierte mesenchymale Stammzellen, JPCs = Kieferperiostzellen.

Bei den osteogen-induzierten Zellen (OB-Zellen) offenbarte sich interessanterweise eine signifikante negative Korrelation zwischen E-Moduln und Alizarinkonzentrationen, bei Berechnung mit den Medianen (Abb. 30 links). Dieses Verhältnis der OB-Zellen bestand auch bei den gesamten JPCs (Abb. 30 rechts), bei den JPCs unter Normoxie und auf Laminin, bei den JPCs von Patient 1 und 2, sowie bei den iMSCs von Patient 3 (einzelne Patienten nicht graphisch dargestellt). Bei der Berechnung mit Mittelwerten der AFM-Daten lag eine ebenfalls signifikante negative Korrelation bei den JPCs von Patient 2 und 3 vor (ebenfalls nicht graphisch dargestellt). Alle anderen untersuchten Korrelationen fielen nicht signifikant aus.

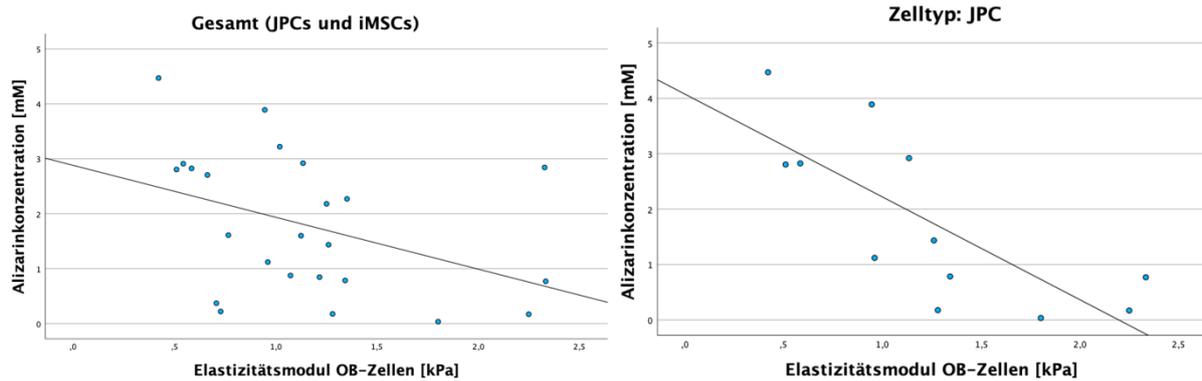


Abbildung 30: Korrelation von E-Modul und Alizarinkonzentration der osteogen induzierten Zellen  
 Die Zellen von 3 Patienten wurden 15 Tage lang osteogen differenziert, an Tag 15 wurden mittels AFM-Messungen die E-Moduln bestimmt, die Zellen fixiert und für die Alizarinquantifizierung eingefärbt. Der linke Graph zeigt die gesamten Werte (JPCs und iMSCs) der Kalziumkonzentrationen, aufgetragen gegen alle Elastizitätsmoduln der OB-Zellen (Mediane). Der resultierende Zusammenhang ist signifikant. Dieselbe signifikante Korrelation besteht bei den JPCs (Mediane). Im rechten Graphen wurden Inkubationsbedingungen und Beschichtungen zusammengefasst, iMSCs wurden hier außenvorgelassen. Die zweiseitige Signifikanz wurde mittels Kendall-Tau-b und Pearson-Korrelation berechnet, links  $p=0,013$  (Kendall-Tau-b),  $p=0,048$  (Pearson), rechts:  $p=0,004$  (Kendall-Tau-b und Pearson). AFM = Rasterkraftmikroskop, CaP = Kalziumphosphat, iMSCs = aus induzierten pluripotenten Stammzellen differenzierte mesenchymale Stammzellen, JPCs = Kieferperiostzellen.

Bei den undifferenzierten CO-Zellen zeigte sich (wie bei den CaP-Präzipitaten) keine signifikante Korrelation, wenn alle Kalzium-Konzentrationen gegen die entsprechenden Elastizitätsmoduln der Zellen aufgetragen wurden (Abb. 31 links). Doch auch bei den CO-Zellen bestand unter gewissen Bedingungen eine signifikante negative Korrelation zwischen den E-Moduln und Alizarinkonzentrationen. Dies galt für die Zellen unter Normoxie, iMSCs unter Normoxie, JPCs unter Normoxie auf Gelatine, iMSCs unter Normoxie auf Laminin (nicht graphisch dargestellt) und die iMSCs des Patienten 2 (mit Mittelwert und Median berechnet) (Abb. 31 rechts). Alle anderen untersuchten Korrelationen fielen nicht signifikant aus.

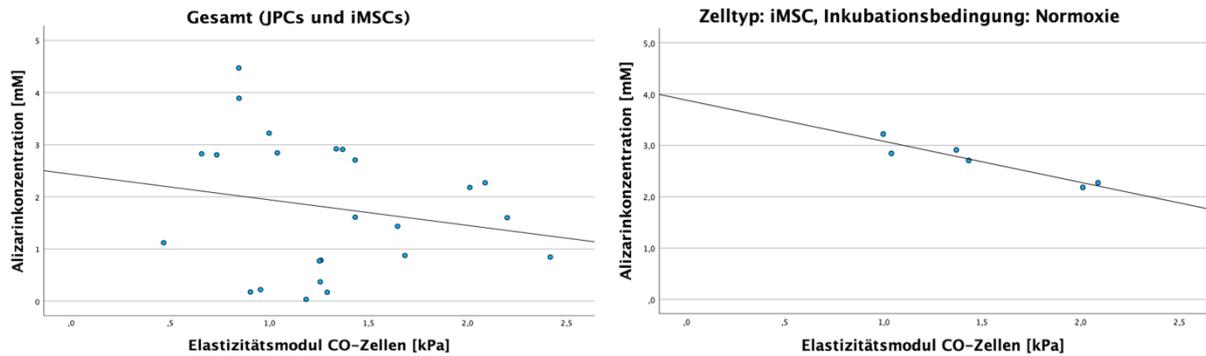


Abbildung 31: Korrelation von E-Modul und Alizarinkonzentration der undifferenzierten Zellen. Die Zellen von 3 Patienten wurden 15 Tage lang osteogen differenziert, an Tag 15 wurden mittels AFM-Messungen die E-Moduln bestimmt, die Zellen fixiert und für die Alizarinquantifizierung eingefärbt. Der linke Graph zeigt die gesamten Werte (JPCs und iMSCs) der Kalziumkonzentrationen, aufgetragen gegen alle Elastizitätsmoduln der CO-Zellen (Mediane). Der resultierende Zusammenhang ist nicht signifikant. Eine signifikante Korrelation besteht bei den iMSCs (hier Mediane) von Patient 2 (rechter Graph). Im rechten Graphen wurden Inkubationsbedingungen und Beschichtungen zusammengefasst, JPCs wurden hier außenvorgelassen. Die zweiseitige Signifikanz wurde mittels Kendall-Tau-b und Pearson-Korrelation berechnet, links (nicht signifikant)  $p=0,369 > 0,05$  (Kendall-Tau-b),  $p=0,487 > 0,05$  (Pearson), rechts:  $p < 0,01$  (Kendall-Tau-b),  $p=0,021 < 0,05$  (Pearson). AFM = Rasterkraftmikroskop, CaP = Kalziumphosphat, iMSCs = aus induzierten pluripotenten Stammzellen differenzierte mesenchymale Stammzellen, JPCs = Kieferperiostzellen.

### 3.4 LICHTMIKROSKOPISCHE BILDER VON UNDIFFERENZIIERTEN UND OSTEOGEN-DIFFERENZIIERTEN ZELLEN

#### 3.4.1 Lebend und undifferenziert

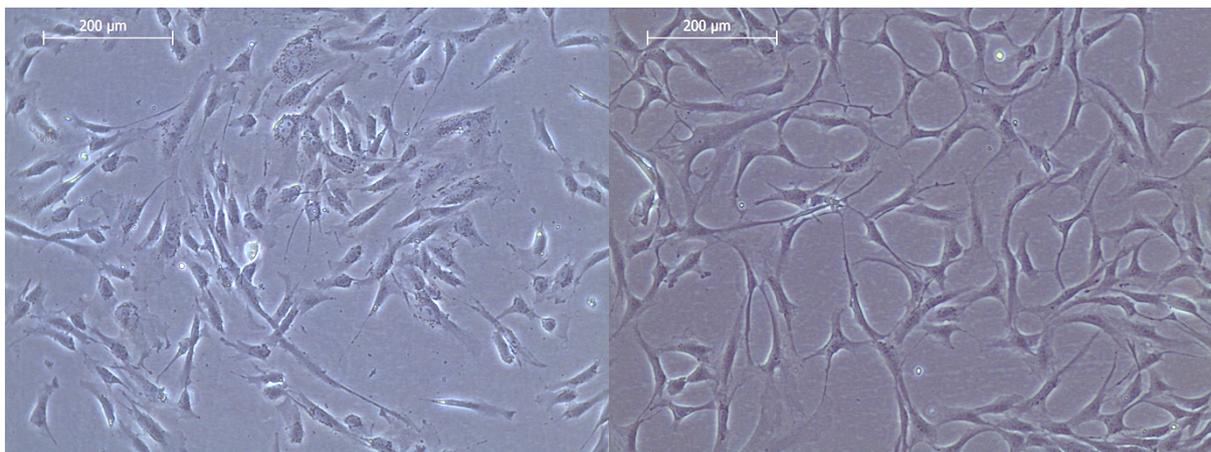
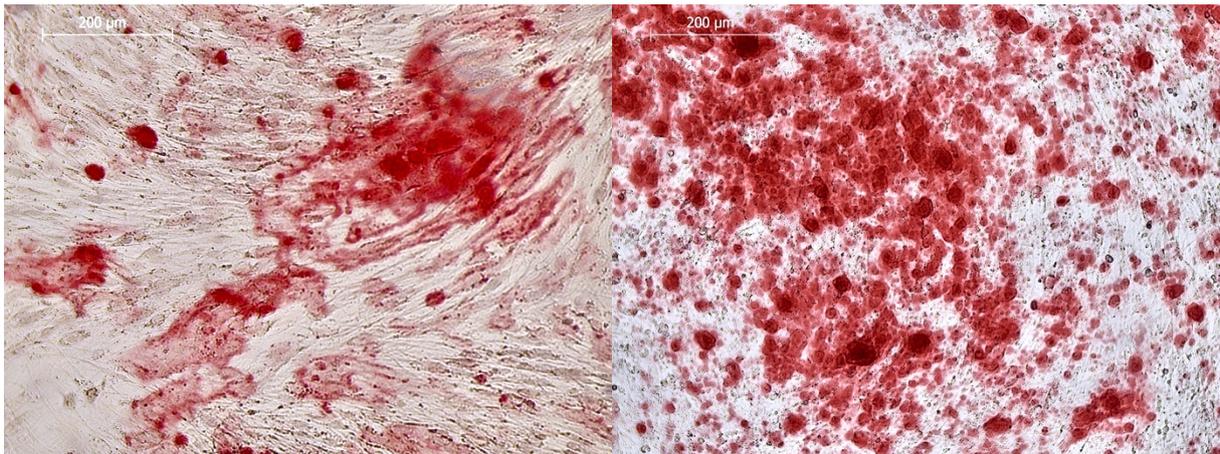


Abbildung 32: Zellen in der dritten Passage (P3) kurz vor dem Aussäen in die AFM-Schälchen. Links: iMSCs, rechts: JPCs. Repräsentative Hellfeldaufnahmen, 10x Vergrößerung mit Phasenkontrast, 200 µm Maßstabbalken. AFM = Rasterkraftmikroskop, iMSCs = aus induzierten pluripotenten Stammzellen differenzierte mesenchymale Stammzellen, JPCs = Kieferperiostzellen.

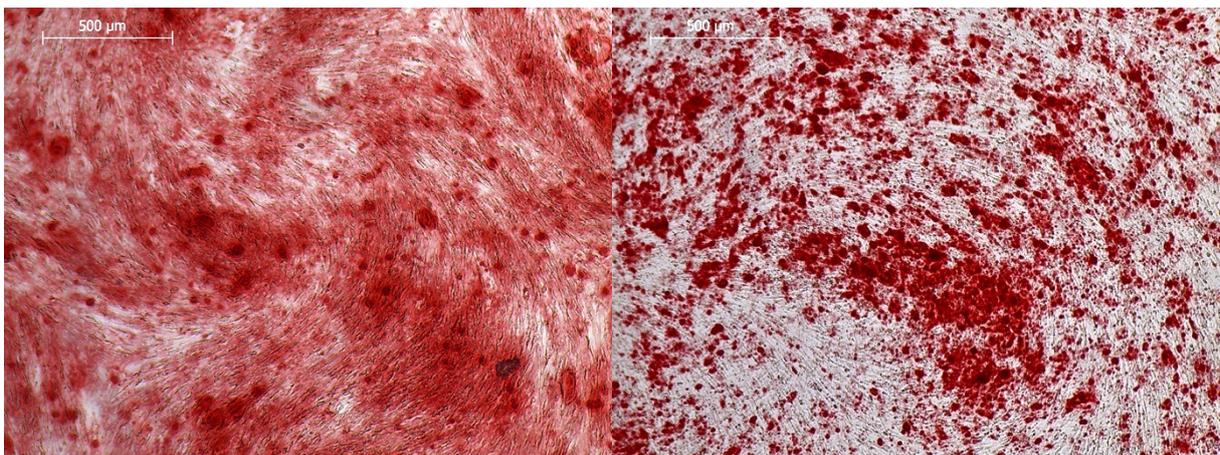
### 3.4.2 Fixiert, nach erfolgter Alizarinfärbung

#### 3.4.2.1 Kalziumphosphatpräzipitate

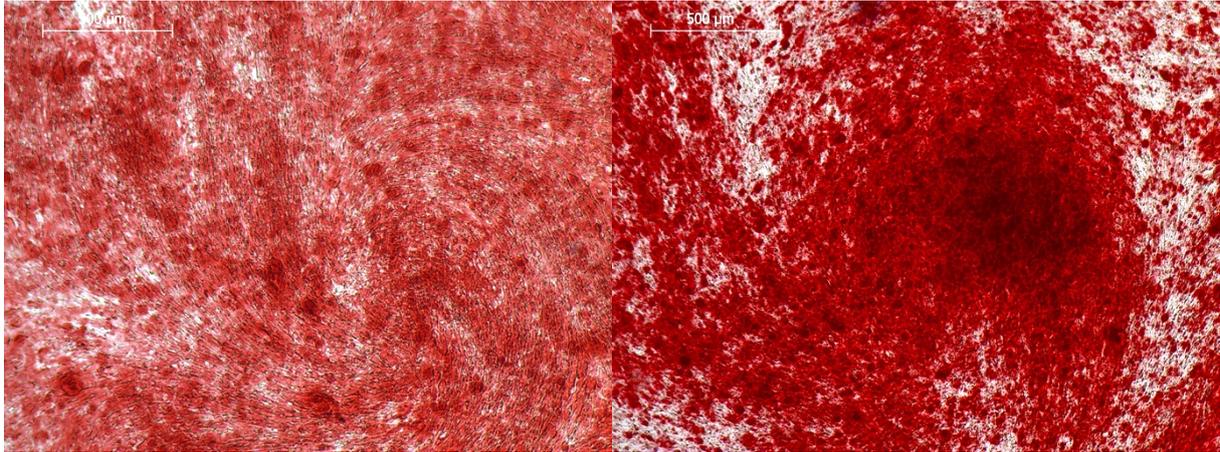
Im Folgenden sind auf der linken Seite Bilder von mineralisierten JPCs und rechts Bilder von etwa gleich weit mineralisierten iMSCs. Es fällt auf, dass sich die Mineralisierungen der JPCs vergleichsweise flächig ausbreiteten, während die Mineralisierungen der iMSCs eher körnig gestaltet waren. Die Mineralisierungen der Extrazellulärmatrix (ECM) sind durch die Alizarinfärbung rot eingefärbt.



*Abbildung 33: Anfängliche Mineralisierungen der Zellmonolayer*  
Beide Bilder von Monolayer unter Hypoxie auf Laminin in Passage 6 an Tag 16 mit hPl-5 differenziert.  
Links: JPC, rechts: iMSC. Repräsentative Hellfeldaufnahmen, 10x Vergrößerung, 200 µm Maßstabbalken. hPl = humanes Plättchenlysat, iMSCs = aus induzierten pluripotenten Stammzellen differenzierte mesenchymale Stammzellen, JPCs = Kieferperiostzellen.

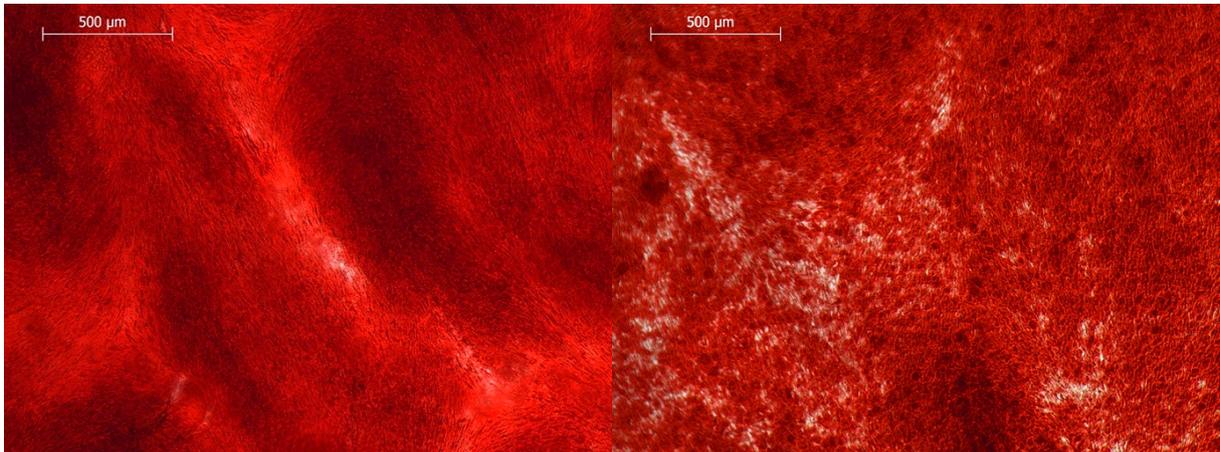


*Abbildung 34: Wachsende Mineralisierungen der Zellmonolayer*  
Beide Bilder von Monolayer unter Hypoxie auf Laminin in Passage 6 an Tag 15 mit hPl-5 differenziert.  
Links: JPCs; rechts: iMSCs. Repräsentative Hellfeldaufnahmen, 4x Vergrößerung, 500 µm Maßstabbalken. hPl = humanes Plättchenlysat, iMSCs = aus induzierten pluripotenten Stammzellen differenzierte mesenchymale Stammzellen, JPCs = Kieferperiostzellen.



*Abbildung 35: Monolayer mit starker Mineralisierung*

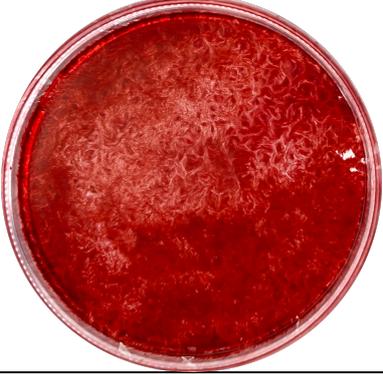
*Beide Bilder von Monolayer unter Hypoxie auf Gelatine an Tag 15 mit hPI 10 differenziert. Links: JPC, Passage 5, rechts: iMSC, Passage 4. Repräsentative Hellfeldaufnahmen, 4x Vergrößerung, 500 µm Maßstabsbalken. hPI = humanes Plättchenlysat, iMSCs = aus induzierten pluripotenten Stammzellen differenzierte mesenchymale Stammzellen, JPCs = Kieferperiostzellen.*



*Abbildung 36: Monolayer mit maximaler Mineralisierung*

*Beide Bilder von Monolayer unter Normoxie auf Laminin in Passage 4 an Tag 15. Links: JPC, rechts: iMSC. Repräsentative Hellfeldaufnahmen, 4x Vergrößerung, 500 µm Maßstabsbalken. iMSCs = aus induzierten pluripotenten Stammzellen differenzierte mesenchymale Stammzellen, JPCs = Kieferperiostzellen.*

Im Folgendem fällt weiterhin makroskopisch auf, dass die JPCs und iMSCs unter normoxischen Bedingungen (Tab. 17) mehr CaP-Präzipitate bildeten als unter Hypoxie (Tab. 18). Die vollmineralisierten Monolayers ähnelten sich makroskopisch sehr (Tab. 17). Demgegenüber ließen sich Unterschiede zwischen JPCs und iMSCs bei den weniger vollmineralisierten Monolayers erkennen: Die JPCs schienen unter Hypoxie eher flächigere, feinkörnigere Mineralstrukturen zu bilden, während die iMSCs eher grobkörnigere Mineralisierungen zu bilden schienen (Tab. 18).

JPC Pat.3 P6 Normoxie Gelatine hPI-10	JPC Pat.2 P5 Normoxie Gelatine hPI-10	JPC Pat.1 P6 Normoxie Gelatine hPI-10
		
iMSC Pat.3 P6 Normoxie Gelatine hPI-10	iMSC Pat.2 P4 Normoxie Gelatine hPI-10	iMSC Pat.1 P6 Normoxie Gelatine hPI-10
		

*Tabelle 17: Makroskopische Bilder der AFM-Platten mit unter Normoxie mineralisierenden Zellmonolayer*

*Obere Reihe: JPCs aller Patienten, untere Reihe: iMSCs aller Patienten. AFM = Rasterkraftmikroskop, hPI = humanes Plättchenlysate, iMSCs = aus induzierten pluripotenten Stammzellen differenzierte mesenchymale Stammzellen, JPCs = Kieferperiostzellen, P = Passage.*

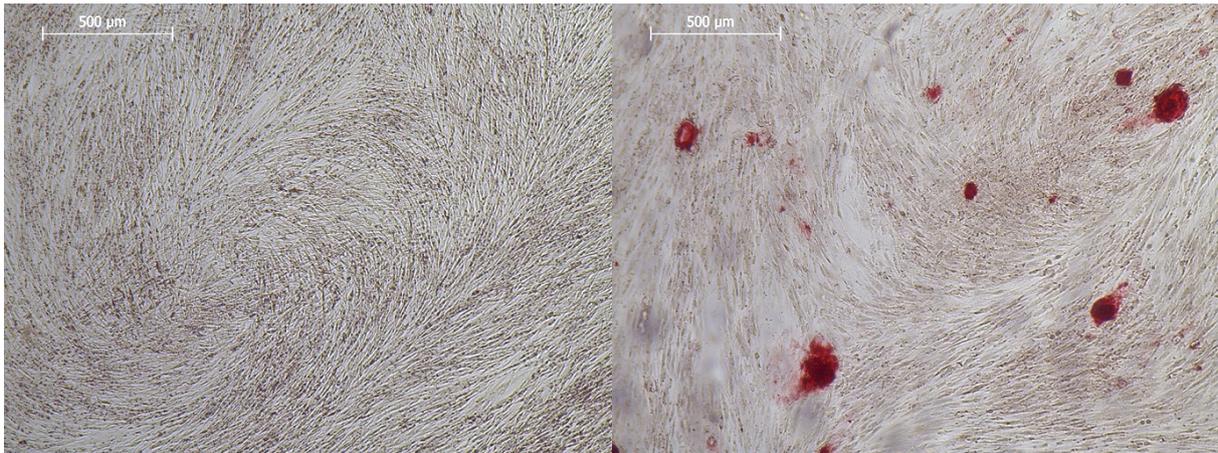
JPC Pat.3 P6 Hypoxie Gelatine 80.000 hPI-5	JPC Pat.2 P5 Hypoxie Gelatine 80.000 hPI-10	JPC Pat.1 P6 Hypoxie Gelatine 80.000 hPI-5
		
iMSC Pat.3 P6 Hypoxie Gelatine 80.000 hPI-5	iMSC Pat.2 P4 Hypoxie Gelatine 40.000 hPI-10	iMSC Pat.1 P6 Hypoxie Gelatine 80.000 hPI-10
		

*Tabelle 18: Makroskopische Bilder der AFM-Platten mit unter Hypoxie mineralisierenden Zellmonolayer*

*Obere Reihe: JPCs aller Patienten, untere Reihe: iMSCs aller Patienten. AFM = Rasterkraftmikroskop, hPI = humanes Plättchenlysat, iMSCs = aus induzierten pluripotenten Stammzellen differenzierte mesenchymale Stammzellen, JPCs = Kieferperiostzellen, P = Passage.*

### *3.4.2.2 Unmineralisierte OB-Zellen*

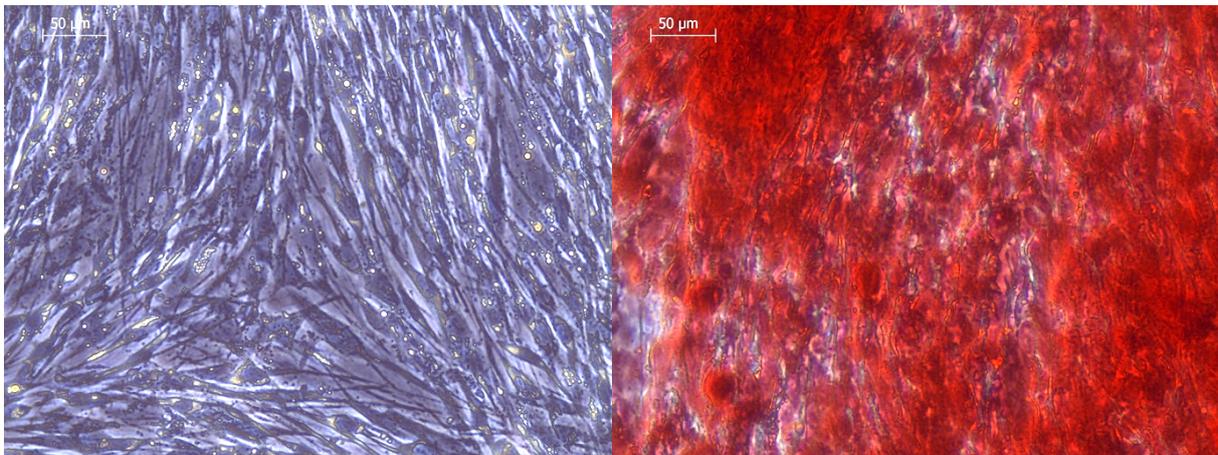
In diesem Kapitel werden nichtmineralisierte Zellrasen mit solchen verglichen, die Mineralisierungen gebildet haben. Die folgenden zwei Bilder zeigen den Unterschied zwischen hPI-5- und hPI-10-Medium unter Hypoxie.



*Abbildung 37: Vergleich Zellmonolayer hPI-5- vs. hPI-10-Medium-Bedingungen*

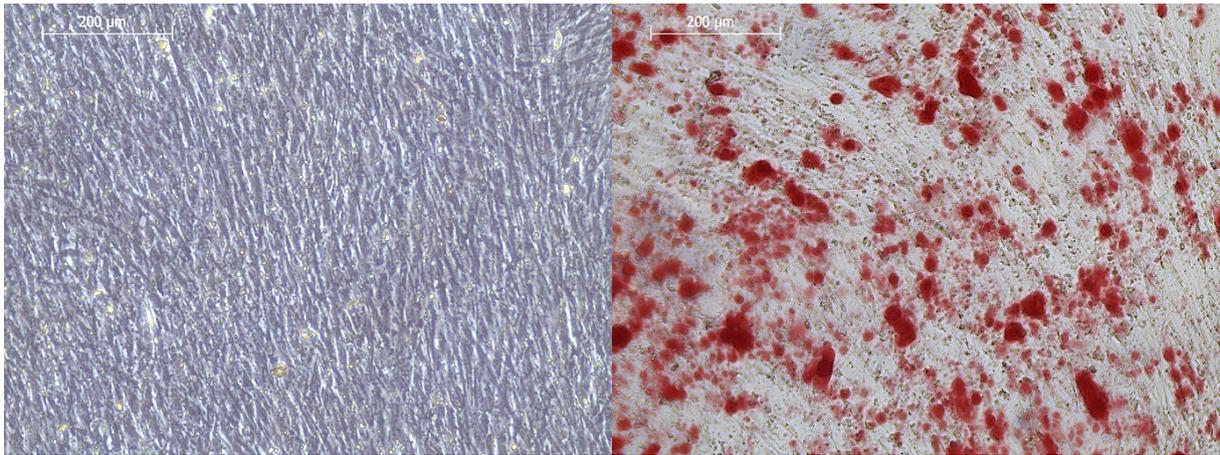
*Beide Bilder sind von JPCs (Patient # 3), Passage 6 unter Hypoxie auf Gelatine. Links: In 3 Versuchsansätzen der Kultivierung mit hPI-10 OB-Medium bildeten die Zellen dieses Patienten unter Hypoxie keine CaP-Präzipitate. Hier an Tag 21. Rechts: Dieselben Zellen des gleichen Patienten, kultiviert mit hPI-5 OB-Medium, bildeten nach 15 Tagen CaP-Präzipitate. Hellfeldaufnahmen, 4x Vergrößerung, 500 µm Maßstab balken. AFM = Rasterkraftmikroskop, CaP = Kalziumphosphat, hPI = humanes Plättchenlysat, JPCs = Kieferperiostzellen.*

Die nächsten zwei Bilder zeigen die scheinbare Willkür, mit der die Monolayer teilweise mineralisierten oder nicht mineralisierten.



*Abbildung 38: Im selben Versuchansatz mineralisierte und nicht mineralisierte Nachbarschälchen*

*Die mikroskopischen Bilder zeigen zwei verschiedene AFM-Schälchen im selben Versuch: JPCs unter Hypoxie auf Gelatine in Passage 5 mit hPI-10. Links: Trotz der Induktion mit OB-Medium nichtmineralisierende Zellen, hier an Tag 24; rechts: exakt derselbe Versuch und dieselben Zellen mineralisierten im zweiten Schälchen, hier an Tag 15. Hellfeldaufnahmen, 20x Vergrößerung mit Phasenkontrast, 50 µm Maßstab balken. AFM = Rasterkraftmikroskop, hPI = humanes Plättchenlysat; JPCs = Kieferperiostzellen.*

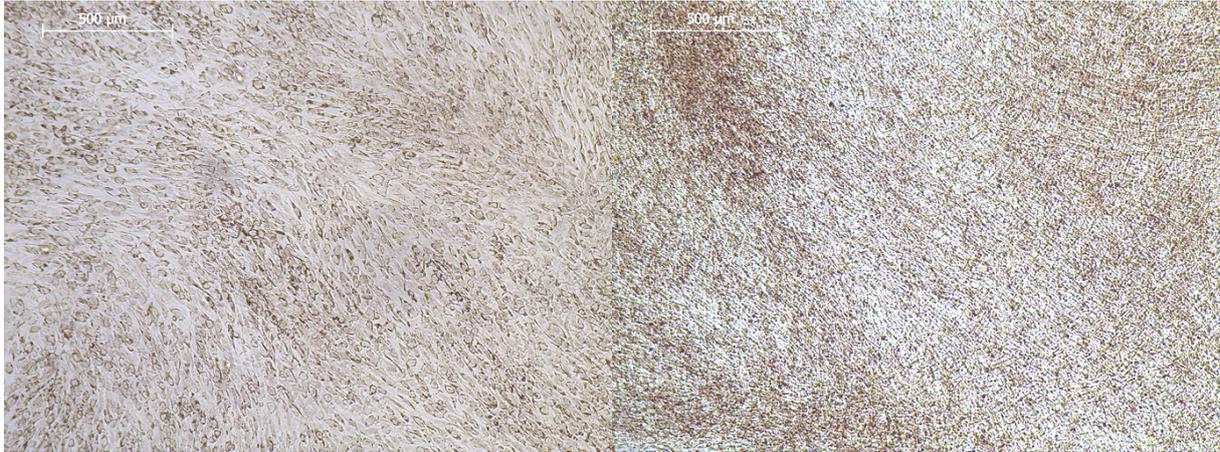


*Abbildung 39: Unterschied Passage und Medium*

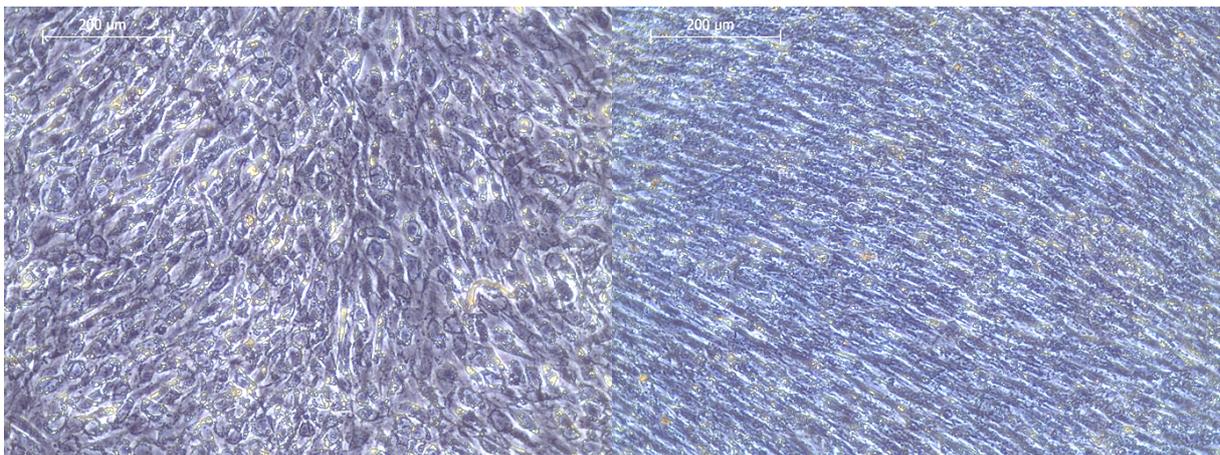
*Beide Bilder zeigen iMSCs von Patient 3 unter Hypoxie auf Gelatine. Links: Passage 4, hPl-10, nicht mineralisierende Zellen an Tag 24. Rechts: Passage 6, hPl-5, mineralisierende Zellen an Tag 16. Hellfeldaufnahmen, 10x Vergrößerung, 200 µm Maßstab balken, links mit Phasenkontrast. hPl = humanes Plättchenlysat, iMSCs = aus induzierten pluripotenten Stammzellen differenzierte mesenchymale Stammzellen.*

### *3.4.2.3 Undifferenzierte Kontrollzellen*

Bei den CO-Zellen fällt auf, dass die nicht osteogen induzierten JPCs nach 15 Tagen meist mehr oder weniger stark verfettet waren, was durch die lichtmikroskopisch erkennbaren Fettvakuolen sichtbar wurde. Das galt nicht für die iMSCs. Diese waren dafür nach 15 Tagen meist zu einem extrem dichten Rasen proliferiert; die Zellen schienen fast übereinander zu wachsen (3-dimensional). Die Abbildungen 40 und 41 zeigen die Unterschiede zwischen den JPCs und iMSCs (Patient # 2 und # 3). Bis auf den Zelltypen iMSC/JPC sind alle anderen Bedingungen gleich. Des Weiteren war bei den undifferenzierten Zellen auffällig, dass bei den iMSCs beim Medienwechsel stets sehr viele tote Zellen im Medium schwammen, während dies bei den JPCs nicht der Fall war.

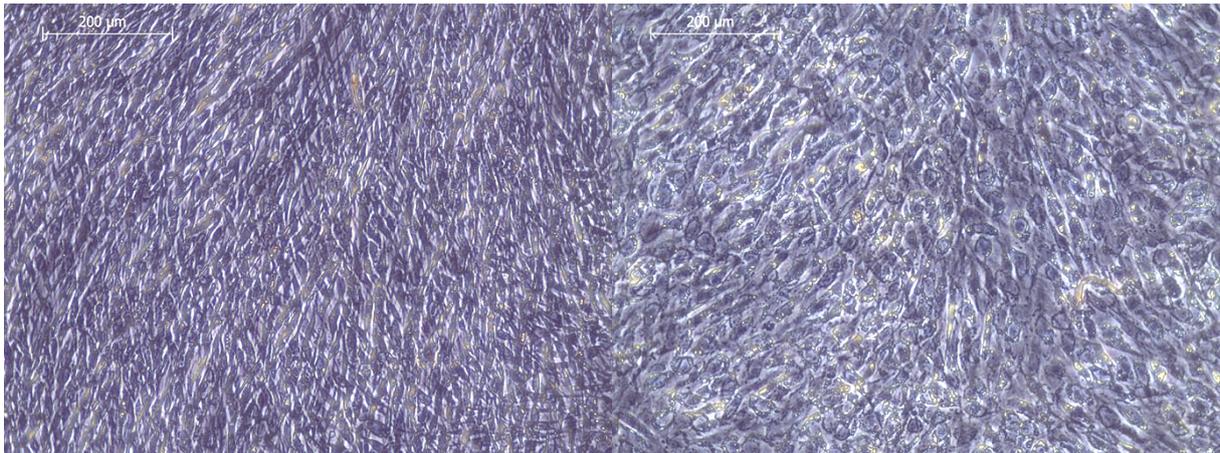


*Abbildung 40: Undifferenzierte CO-Zellen: JPCs vs. iMSCs (Patient # 3)*  
*Beide Bilder zeigen Zellen in Passage 4 von Patient # 3 unter Normoxie auf Laminin an Tag 15, hPl-10. Links: JPCs, verfettete CO-Zellen; rechts: iMSCs, sehr dichter CO-Zellrasen. Repräsentative Hellfeldaufnahmen, 4x Vergrößerung, 500 µm Maßstab balken. CO-Zellen = undifferenzierte Kontrollzellen, hPl = humanes Plättchenlysate, iMSCs = aus induzierten pluripotenten Stammzellen differenzierte mesenchymale Stammzellen, JPCs = Kieferperiostzellen.*



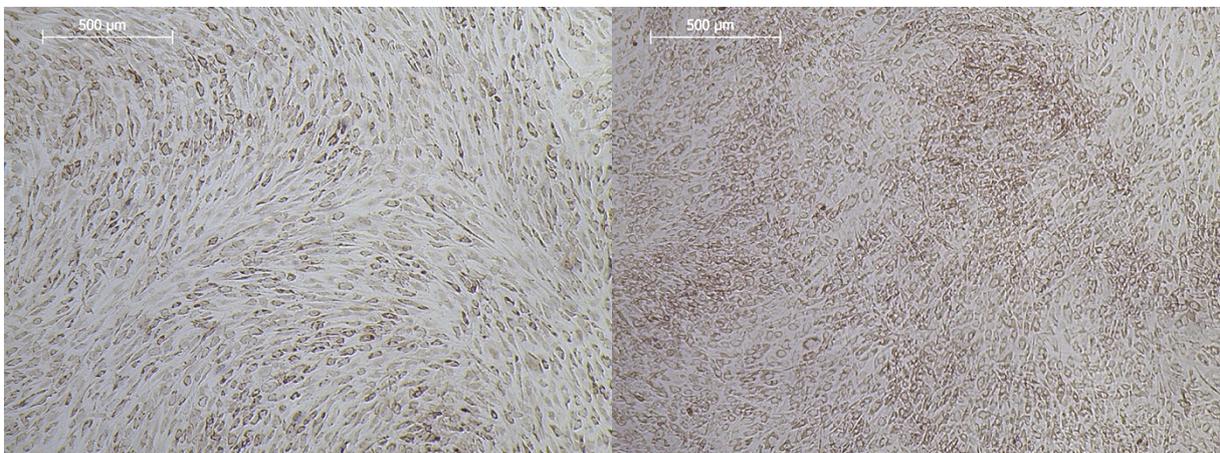
*Abbildung 41: Undifferenzierte CO-Zellen: JPC vs. iMSC (Patient # 2)*  
*Beide Bilder zeigen Zellen in Passage 5/4 von Patient # 2 unter Hypoxie auf Gelatine an Tag 15, hPl-10. Links: JPCs, verfettete CO-Zellen; rechts: iMSCs, sehr dichter CO-Zellrasen. Repräsentative Hellfeldaufnahmen, 10x Vergrößerung mit Phasenkontrast, 200 µm Maßstab balken. CO-Zellen = undifferenzierte Kontrollzellen, hPl = humanes Plättchenlysate, iMSCs = aus induzierten pluripotenten Stammzellen differenzierte mesenchymale Stammzellen, JPCs = Kieferperiostzellen.*

Interessanterweise verfetteten die OB-Zellen der JPCs nicht in dem Maße wie die CO-Zellen der JPCs. Das galt auch für den Fall, dass sie keine CaP-Präzipitate bildeten (Abb. 42):



*Abbildung 42: Nicht mineralisierte OB-Zellen im Vergleich mit undifferenzierten CO-Zellen*  
*Beide Bilder zeigen JPCs in Passage 5 von Patient # 2 unter Hypoxie auf Gelatine an Tag 24. Links: nicht mineralisierende OB-Zellen an Tag 24; rechts: verfettete CO-Zellen, bereits an Tag 15. Repräsentative Hellfeldaufnahmen, 10x Vergrößerung mit Phasenkontrast, 200 µm Maßstabbalken. CO-Zellen = undifferenzierte Kontrollzellen, JPCs = Kieferperiostzellen, OB-Zellen = osteogen differenzierte Zellen.*

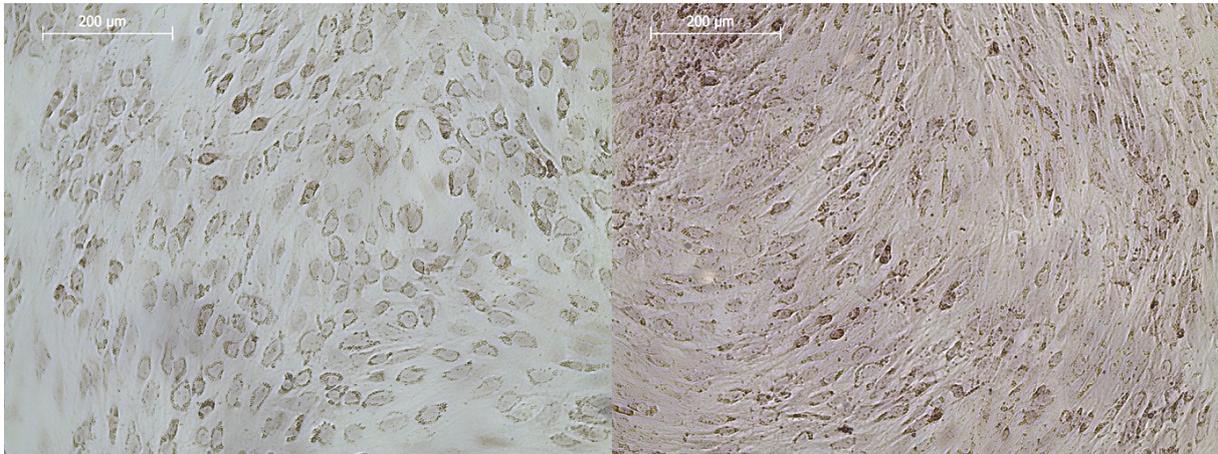
Vergleicht man die in hPI-10 kultivierten Zellen mit den in hPI-5 kultivierten Zellen, so waren die etwas langsamer wachsenden Letzteren meistens noch etwas geordneter als in den volleren hPI-10-Platten (Abb. 43). Bei der Verfettung der CO-Zellen der JPCs ließ sich kaum ein Unterschied zwischen den zwei Medien erkennen, bei genauem Hinsehen schienen die in hPI-10 kultivierten Zellen etwas mehr verfettet als dieselben in hPI-5 kultivierten Zellen (Abb. 43).



*Abbildung 43: CO-Zellen unter hPI-5- vs. hPI-10-Supplementation*  
*Beide Bilder zeigen CO-Zellen der JPCs, unter Hypoxie auf Laminin in Passage 6. Links: hPI-5, rechts: hPI-10. Die in hPI-5 kultivierten JPCs sind weniger eng, geordneter und leicht schlanker als die in hPI-10 kultivierten JPCs. Repräsentative Hellfeldaufnahmen, 4x Vergrößerung, 500 µm Maßstabbalken, rechts unten 10x Vergrößerung, 200 µm Messbalken. CO-Zellen = undifferenzierte Kontrollzellen, hPI = humanes Plättchenlysat, JPCs = Kieferperiostzellen.*

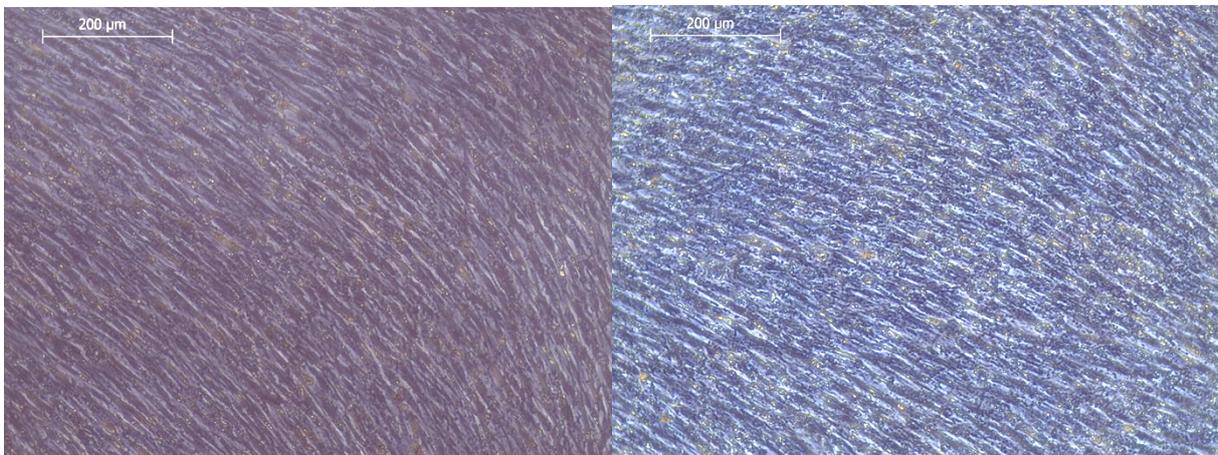
Vergleicht man die CO-Zellen in verschiedenen Inkubationsbedingungen, so waren die in Normoxie inkubierten Zellen nach 15 Tagen dichter als die in Hypoxie inkubierten Zellen,

obwohl unter Normoxie 40.000 Zellen/Well und unter Hypoxie doppelt so viele Zellen ausgesät wurden (Abb. 44).



*Abbildung 44: Undifferenzierte CO-Zellen: Normoxie vs. Hypoxie*  
Beide Bilder zeigen CO-JPCs mit Fettvakuolen von Patient # 2 auf Laminin in Passage 6 an Tag 15. Links: Hypoxie, 80.000 Zellen/Well ausgesät; rechts: Normoxie, 40.000 Zellen/Well ausgesät. Repräsentative Hellfeldaufnahmen, 10x Vergrößerung, 200 µm Maßstab balken. CO-Zellen = undifferenzierte Kontrollzellen, JPCs = Kieferperiostzellen

Rein makroskopisch machte die Zahl der ausgesäten Zellen keinen Unterschied aus (Abb. 45).



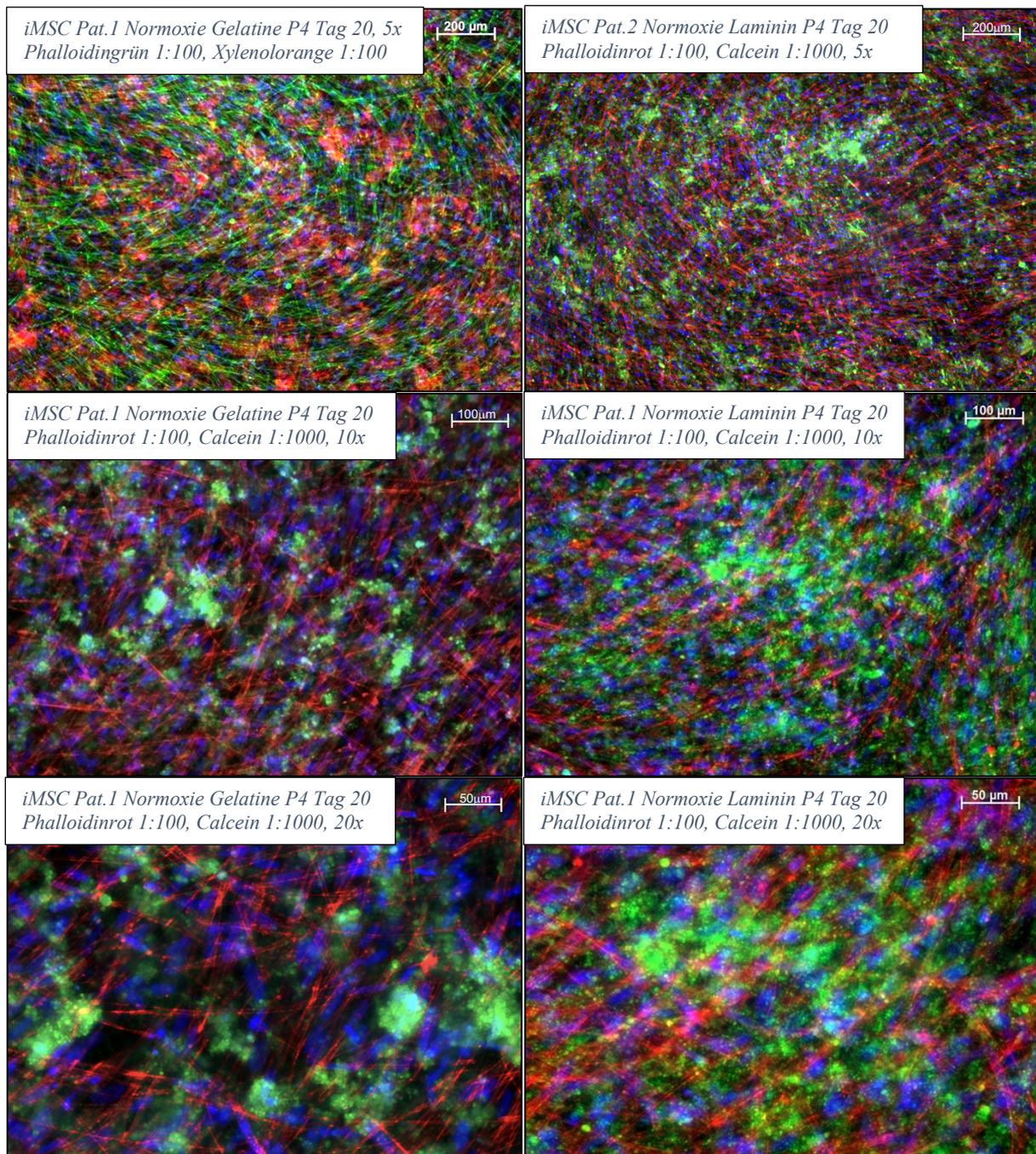
*Abbildung 45: Vergleich der ausgesäten Zelldichte*  
Beide Bilder zeigen iMSCs unter Hypoxie auf Gelatine an Tag 15. Links: 40.000 Zellen/Well ausgesät; rechts: 80.000 Zellen/Well ausgesät. Repräsentative Hellfeldaufnahmen, 10x Vergrößerung mit Phasenkontrast, 200 µm Maßstab balken. iMSCs = aus induzierten pluripotenten Stammzellen differenzierte mesenchymale Stammzellen.

### **3.5 FLUORESZENZBILDER**

Nun folgen die Bilder, die nach den Fluoreszenzfärbungen am Mikroskop aufgenommen wurden. Bis zu drei Einzelbilder wurden übereinandergelegt, um Präzipitate, Zellkerne und das Zytoskelett in einem Bild zu sehen. Die Zellkerne wurden immer mit 1:1000 DAPI/Hoechst gefärbt und sind blau dargestellt (in den einzelnen Bildbeschriftungen nicht mehr erwähnt). Die

Aktinfasern des Zytoskeletts wurden entweder mit Phalloidin grün oder Phalloidin rot (grüne, rote oder gelbe Darstellung) gefärbt. Die Kalziumphosphatpräzipitate wurden in wenigen Fällen mit Xylenolorange gefärbt (rote Darstellung, wolkiges Aussehen), meist aber mit Calcein eingefärbt (grüne Darstellung). Abbildung 46 zeigt mineralisierte iMSCs, Abbildung 47 zeigt mineralisierte JPCs, Abbildung 48 zeigt CO-Zellen und Abbildung 49 zeigt die F-Aktinfasern der Zytoskelette von CO- und OB-Zellen.

## 1. iMSCs



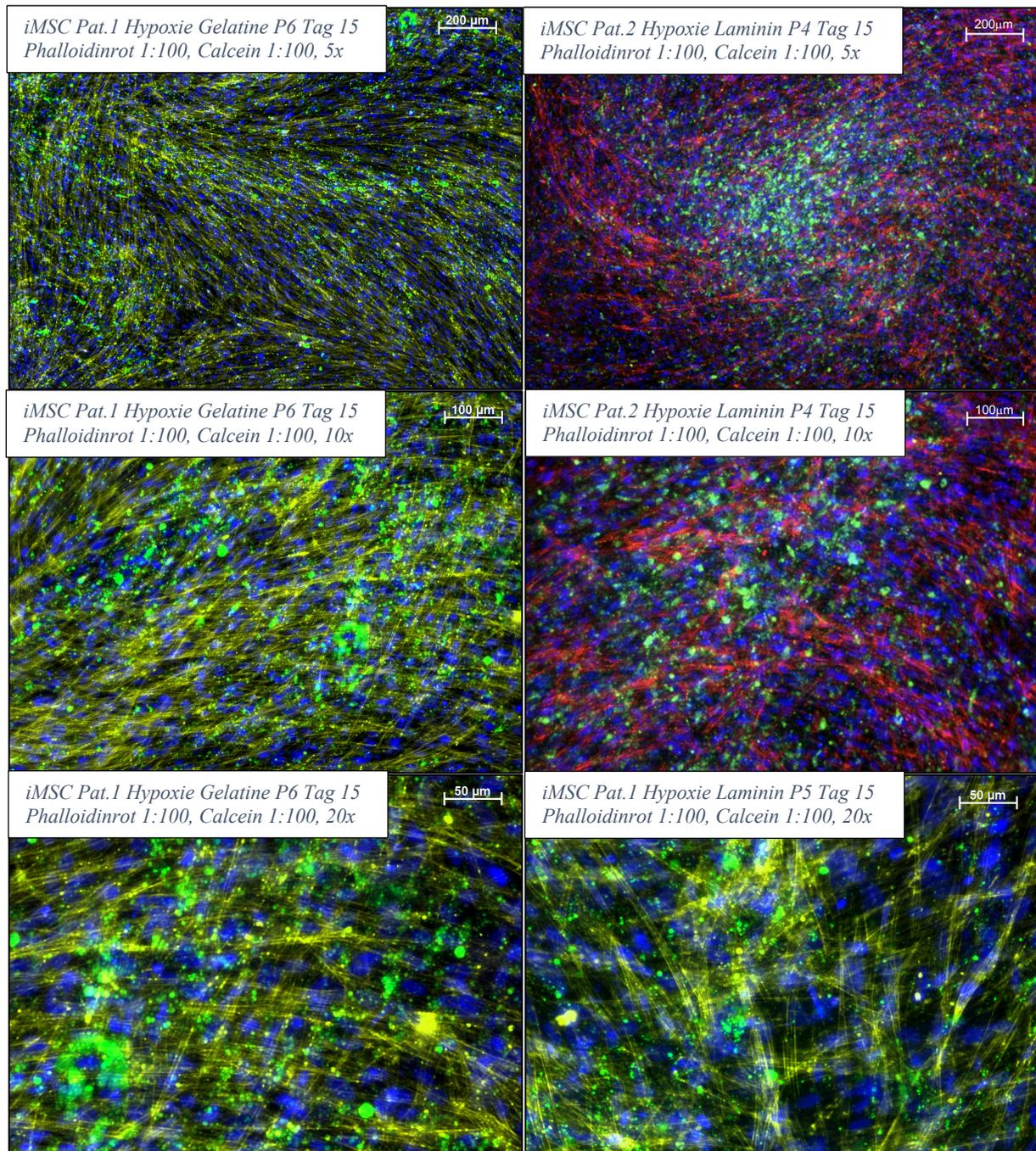


Abbildung 46: Fluoreszenzbilder von mineralisierten iMSC-Monolayern

Alle 12 Bilder zeigen iMSCs in 5-, 10- und 20-facher Vergrößerungen (200  $\mu\text{m}$ , 100  $\mu\text{m}$ , 50  $\mu\text{m}$  Maßstab Balken), links auf Gelatine, rechts auf Laminin, Reihe 1-6 unter Normoxie, Reihe 7-12 unter Hypoxie. Oben links sind die Aktinfasern grün und die CaP-Präzipitate rot; bei den iMSCs unter Hypoxie auf Gelatine und bei der 20-fachen Vergrößerung auf Laminin sind die Aktinfasern gelb und die CaP-Präzipitate grün, sonst sind die Aktinfasern rot und CaP-Präzipitate grün. Zellkerne sind auf allen Bildern blau. Besonders rechts in Reihe 1, 2 und 4 fällt auf, dass sich die mineralisierte Extrazellulärmatrix auf bestimmte Regionen konzentriert. CaP = Kalziumphosphat, iMSCs = aus induzierten pluripotenten Stammzellen differenzierte mesenchymale Stammzellen.

## 2. JPCs

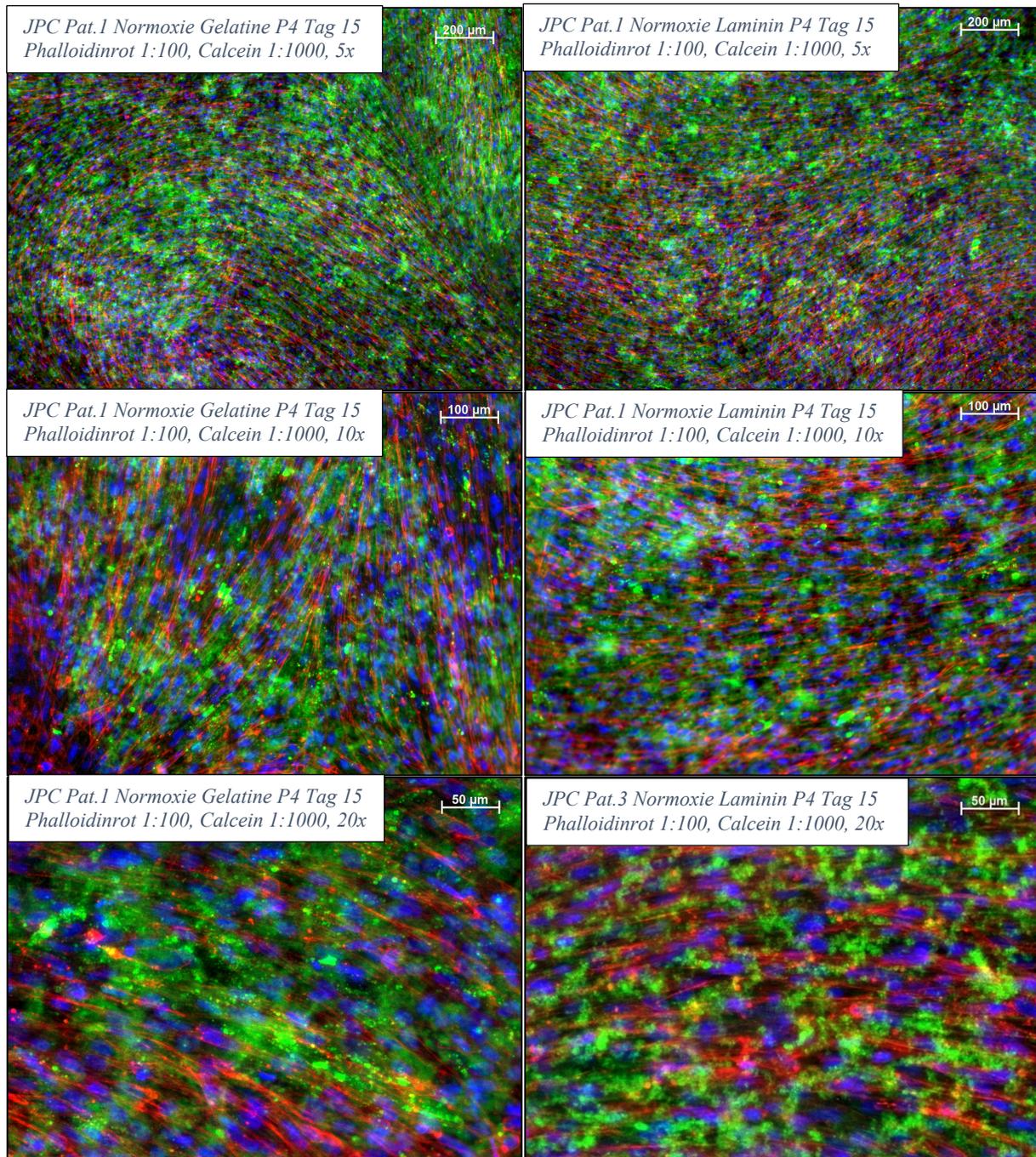


Abbildung 47: Fluoreszenzbilder von mineralisierten JPC-Monolayern

Alle 6 Bilder zeigen normoxisch inkubierte JPCs (hPI-10), links mit Gelatinebeschichtung, rechts mit Lamininbeschichtung, von oben nach unten in 5-, 10- und 20-facher Vergrößerung (200 µm, 100 µm, 50 µm Maßstab Balken). Rot sind die f-Aktinfasern des Zytoskeletts, blau die Zellkerne und die grünen „Wolken“ zeigen die mineralisierte Extrazellulärmatrix. Vor allem in 5-facher Vergrößerung fällt die feinkörnige Struktur und gleichmäßige Verteilung der CaP-Präzipitate auf. Leider konnten aufgrund der schlechten Mineralisierungsleistung der JPCs unter Hypoxie (mit hPI-10) keine qualitativ hochwertigen, vergleichbaren Fluoreszenzbilder erstellt werden, daher hier nur Bilder unter Normoxie. CaP = Kalziumphosphat, hPI = humanes Plättchenlysat, JPCs = Kieferperiostzellen, P = Passage.

### 3. Undifferenzierte CO-Zellen

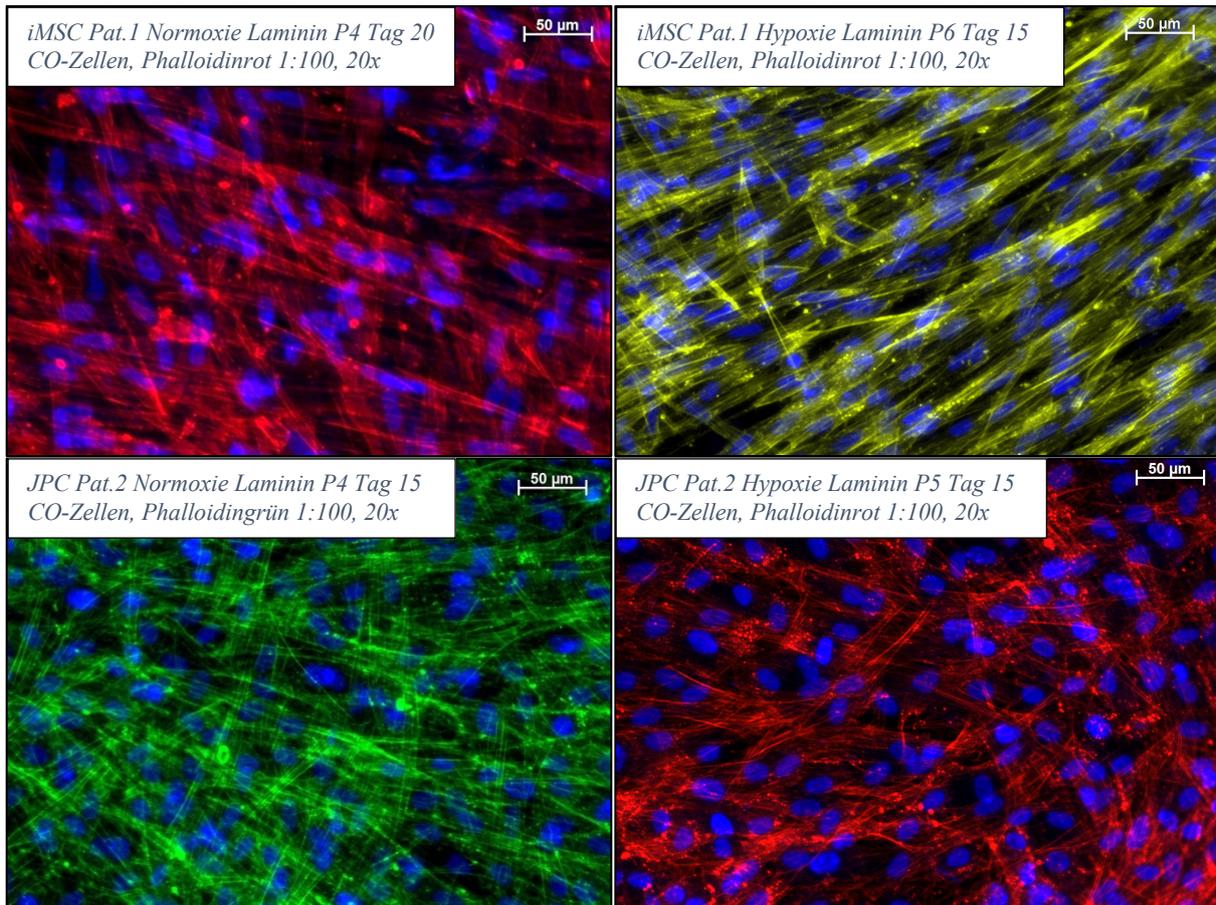


Abbildung 48: Fluoreszenzbilder von undifferenzierten iMSCs/JPCs

Obere Reihe iMSCs, untere Reihe JPCs; linke Spalte Normoxie, rechte Spalte Hypoxie. Die Zellkörper der iMSCs sind eher länglich mit weniger Quervernetzungen. Die JPCs scheinen stark quervernetzt zu sein. Die Zellkerne sind bei den iMSCs eher oval abgeflacht und bei den JPCs eher kugelig. F-Aktinfasern rot, gelb oder grün; Zellkerne blau. Vergrößerung 20x, 50 µm Maßstabbalken. iMSCs = aus induzierten pluripotenten Stammzellen differenzierte mesenchymale Stammzellen, JPCs = Kieferperiostzellen.

#### 4. F-Aktinfasern der Zytoskelette von CO- und OB-Zellen

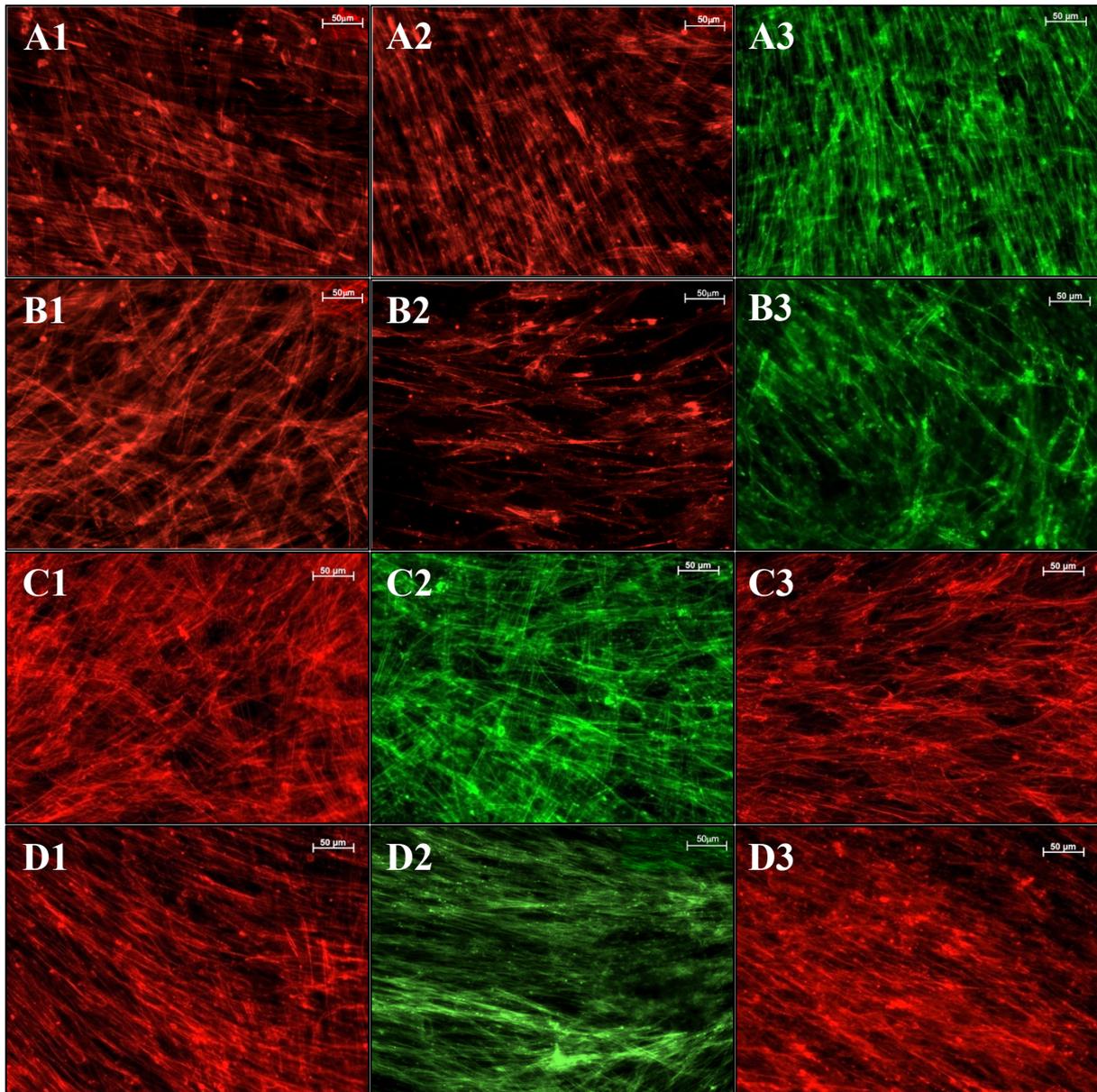


Abbildung 49: F-Aktinfasern der Zytoskelette

A: iMSC CO, B: iMSC OB, C: JPC CO, D: JPC OB, 1-3=Patient 1-3. Alle unter Normoxie auf Laminin. Bei den iMSCs sind vor allem die CO-Zellen als längliche schlanke Zellen gut erkennbar. Vor allem JPC Pat. 3 (C3) lässt breitere Zellkörper erkennen. Zwischen den Aktinfasern der CO- und der OB-Zellen ist kein nennbarer Unterschied festzustellen, wenn man außer Acht lässt, dass sich bei den OB-Zellen ein paar eingefärbte Verunreinigungen im Bild befinden. Färbung der Aktinfasern mit Phalloidin rot 1:100 (A1, A2, B1, B2, C1, C3, D1, D3) oder Phalloidin grün 1:100 (A3, B3, C2, D2). 20x Vergrößerung, Maßstabbalken 50 µm. CO-Zellen = undifferenzierte Kontrollzellen, iMSCs = aus induzierten pluripotenten Stammzellen differenzierte mesenchymale Stammzellen, JPCs = Kieferperiostzellen, OB = osteogen differenzierte Zellen.

## **4 DISKUSSION**

Regenerative Knochenrekonstruktionen gewinnen als schonende Alternative zur herkömmlichen Standardversorgung mit autologer Knochentransplantation immer mehr an Bedeutung. Diese Arbeit beschäftigt sich mit den biomechanischen Eigenschaften der im Labor gezüchteten Stammzellen und der von ihnen unter unterschiedlichen Zellkulturbedingungen gebildeten Knochenmatrix. Im Vordergrund steht der Vergleich zweier Stammzelltypen (JPCs und iMSCs, 4.1.1), verschiedener Mengen an Sauerstoffzufuhr (Normoxie und Hypoxie, 4.1.2) und zweier Beschichtungen der Kulturplatten (Laminin und Gelatine, 4.1.3). Nach der Diskussion der Quantität und Qualität der CaP-Präzipitate (4.1.4) werden die E-Moduln der osteoblastisch differenzierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollstammzellen diskutiert (4.2). Am Ende sollen die Methoden dieser Versuche erörtert werden (4.3).

### **4.1 UNTERSCHIEDE IN QUALITÄT UND QUANTITÄT DER KALZIUMPHOSPHATPRÄZIPITATE**

#### **4.1.1 Biomechanische Eigenschaften der CaP-Präzipitate von JPCs vs. iMSCs – Vergleich des Zelltyps**

Um die replikativen und alterungsbedingten Nachteile der Kieferperiostzellen zu umgehen, werden induzierte mesenchymale Stammzellen für Tissue Engineering Zwecke verwendet. Doch die Frage stellt sich, ob die generierten iMSCs über ein mindestens genauso gutes osteogenes Potenzial wie die originalen JPCs verfügen. Wenn alle Ergebnisse zusammengefasst werden, dann zeigte sich kein signifikanter Unterschied für den Elastizitätsmodul der mineralisierten ECM, jedoch eine Tendenz zu sogar höheren Elastizitätsmoduln der iMSC-Präzipitate im Vergleich zu den JPC-Präzipitaten (Abb. 7 und Tab. 6). JPCs synthetisierten nur unter Normoxie härtere CaP-Präzipitate als iMSCs; unter Hypoxie und auf Lamininböden waren die iMSCs den JPCs überlegen (Tab. 7). Auf Gelatineböden erreichten JPCs und iMSCs etwa gleiche Ergebnisse. Ein statistisch signifikanter Unterschied lag lediglich bei einzelnen Patienten oder zwischen einzelnen Patienten vor. Das zeigt, wie enorm die Varianz zwischen den Patienten war, denn die Unterschiede glichen sich im Gesamtvergleich aus.

Auch bei der Alizarinquantifizierung fällt auf, wie unterschiedlich die Quantität zwischen den einzelnen Patienten und auch wie groß die Differenzen von iMSCs und JPCs eines Patienten waren. Hier liegt eine breite Vielfalt vor. Aufgrund der häufigen Extremwerte bei sonst eher niedrigen Werten unter Hypoxie im Zusammenspiel mit einer eher geringen Datenmenge konnten kaum signifikante Unterschiede jenseits der Patientenunterschiede festgestellt werden.

Dennoch zeigen die Daten gewisse Trends: Die (nicht signifikanten) Tendenzen sind genau gleich wie beim Elastizitätsmodul der CaP-Präzipitate: iMSCs mineralisierten insgesamt stärker als JPCs und diese Überlegenheit galt auch unter Hypoxie und auf Laminin und Gelatine. Lediglich unter Normoxie mineralisierten die JPCs stärker als die iMSCs, was auch auf die Festigkeit der CaP-Präzipitate zutrifft (vgl. Tab. 7 und 14). Obwohl keine statistische signifikante Korrelation festgestellt werden konnte, so zeigen die Daten dennoch einen Zusammenhang zwischen dem E-Modul und der Menge der CaP-Präzipitate, was sich später auch für die Inkubationsbedingung und die Beschichtung bestätigen wird. Vergleicht man Tabelle 8 und Tabelle 15 (deskriptive Statistik aller E-Moduln und Kalziumkonzentrationen der CaP-Präzipitate), so zeigen sowohl die AFM-Messungen als auch die Alizarinquantifizierung ein höheres osteogenes Potenzial für die JPCs unter Normoxie, allerdings auch die niedrigsten Werte für die JPCs unter Hypoxie. Mit iMSCs konnten dagegen konstant gute Werte erzielt werden, vor allem in den AFM-Messungen. Besonders auf Laminin-beschichteten Platten, konnten die iMSCs unter Normoxie und auch unter Hypoxie harte Präzipitate hervorbringen. Auch Tabelle 9 zeigt den Trend, dass JPCs unter Normoxie (auf Laminin und Gelatine gleichermaßen) härtere CaP-Präzipitate bilden als iMSCs. Letztere wiederum bilden allerdings (ebenfalls auf Laminin und Gelatine gleichermaßen) die härteren CaP-Präzipitate unter der reelleren Inkubationsbedingung der Hypoxie.

#### 4.1.2 Biomechanische Eigenschaften der CaP-Präzipitate unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen – Vergleich der Effekte der Sauerstoffzufuhr

Unter idealen Bedingungen funktioniert das Knochen Gewebe Engineering gut, doch im klinischen Einsatz bestehen Hürden, wie etwa eine hypoxische Umgebung im OP-Gebiet. Das ist ein Problem, da ohne Sauerstoff nicht nur das Wachstum und die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Osteoblasten eingeschränkt ist, sondern auch die Matrixmineralisierung durch die Osteoblasten gehemmt ist (Hannah et al., 2021). Um die Versorgung aller Zellen mit Nährstoffen durch Diffusion zu gewährleisten, darf das BTE-Gerüst maximal einen Durchmesser von 100  $\mu\text{m}$  - 5 mm haben. Klinisch relevante Knochendefekte sind aber größer als das (Meijer et al., 2008). Das BTE wird meist für größere Defekte interessant, da Defekte von bis zu 2 cm von selbst heilen können und kleinere Defekte im oralchirurgischen Anwendungsbereich meist gut mit autologem und/oder xenogenem Ersatzmaterial gefüllt werden können. Aus den oben genannten Gründen müssen die Zellen unter hypoxischen Bedingungen bestehen und funktionieren können.

Die Zellen im Hypoxieinkubator zeigten mehrere Probleme. Erstens funktionierte das Anwachsen der ausgesäten Zellen manchmal schlechter als im Normoxieinkubator. Diesem Problem wurde entgangen, indem mehr Zellen ausgesät wurden. Außerdem mineralisierten die Zellen oft schlechter oder gar nicht, wenn sie nur bei 5% Sauerstoff kultiviert wurden. Verschiedenen Autoren nach senken hypoxische Bedingungen das Proliferations- (Holzwarth et al., 2010) und Differenzierungspotenzial von Stammzellen (van Esterik et al., 2017, Holzwarth et al., 2010, Huang et al., 2016). Letztere Studie besagt, Hypoxie sei gut für die Vermehrung von MSCs (Huang et al., 2016). Interessanterweise mineralisierten alle Zellmonolayer unter Hypoxie, wenn die Zellen mit hPI-5-Medium supplementiert wurden. Im Vergleich zu den hPI-10-supplementierten Zellen dauerte es meist 2-3 Tage länger, bis die ersten Mineralisierungen auftraten und diese wuchsen auch langsamer, aber in keinem einzigen Fall wurde eine fehlende Mineralisation unter hPI-5 Supplementierung beobachtet; auch nicht im Hypoxieinkubator (vgl. 4.3.1). Überraschenderweise wurde die höchste absolute Präzipitatenmenge von Zellen im Hypoxieinkubator erzielt, und zwar von iMSCs von Patient # 3 auf Laminin in Passage 4 an Tag 17 im hPI-5-Medium (8,24 mM) und fast genauso viel von JPCs von Patient # 2 in Passage 6 an Tag 15 im hPI-10-Medium (6,35 mM). Der höchste Normoxiewert lag 15-40% unter diesen Werten. Dies zeigt das hohe Mineralisierungspotenzial der iMSCs unter hypoxischen Bedingungen. Teilweise mineralisierten die Zellen gar nicht, aber wenn, konnten sie unter Hypoxie sehr rasch viele CaP-Präzipitate bilden. Dies wird auch durch die durchschnittlichen Werte der Alizarinquantifizierung deutlich, wo die hypoxisch den normoxisch kultivierten Zellen quantitativ stark unterlegen waren. Gemessen am Median waren die absoluten Werte um 41-87 % reduziert (s. Tab. 16). Trotzdem war der Unterschied nicht signifikant (abgesehen von Patient 1), da die Hypoxie einige hohe Extremwerte aufwies. Selbiges gilt auch für die Elastizitätsmoduln der CaP-Präzipitate, denn auch hier können durch die Unterschiede zwischen den einzelnen Patienten keine signifikanten Aussagen im Ganzen getroffen werden. Es steht jedoch fest, dass die CaP-Präzipitate sowohl gesamt als auch auf Gelatineböden (JPCs und iMSCs) und gebildet von den JPCs (Laminin und Gelatine) im Normoxieinkubator härter waren als die derselben Zellen unter Hypoxie. Nur bei den iMSCs auf Laminin wurden unter Normoxie und Hypoxie etwa gleichhohe Werte erzielt (s. Tab. 9). Betrachtet man die deskriptive Statistik aller Elastizitätsmoduln der CaP-Präzipitate und aller gemessenen Kalziumkonzentrationen in Kapitel 3.1.1 und 3.2.1 (Tab. 8, 15), so lieferte die Hypoxie sowohl in Bezug auf die AFM-Messungen der CaP-Präzipitate als auch bezüglich der Alizarinquantifizierung durchschnittlich schlechtere Resultate als unter Normoxie. Allerdings scheinen die iMSCs unter hypoxischen Bedingungen besser als die JPCs zu mineralisieren.

Weiterhin bleibt es zu erforschen, wie man reproduzierbar solch hohe Ergebnisse und Mineralisierungen (wie auf S. 73 genannt) unter Hypoxie erreichen kann. Dafür bietet es sich beispielsweise an, verschiedene hPI-Konzentrationen zu untersuchen.

#### 4.1.3 Biomechanische Eigenschaften der auf Laminin- und Gelatinebeschichtung gebildeten CaP-Präzipitate – Vergleich der Effekte der Plattenbeschichtungen

Eine frühere Studie im Rahmen einer Bachelorarbeit des MKG-Labors der Universität Tübingen zeigte eine höhere Expression von osteogene Markern, wenn die Zellen auf Lamininbeschichteten Platten kultiviert wurden. Es zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Präzipitatzmenge zwischen der Laminin- und Gelatine-Zellgruppe (Burgun, 2021). In der vorliegenden Arbeit sind im Großen und Ganzen keine signifikanten Unterschiede zwischen einer Laminin- und einer Gelatinebeschichtung zu beobachten, weder im Hinblick auf den Elastizitätsmodul noch auf die Menge der gebildeten CaP-Präzipitate. Im Folgenden werden daher die Tendenzen der Ergebnisse erörtert. Bei einem genaueren Blick auf die deskriptive Statistik aller Elastizitätsmoduln der CaP-Präzipitate und aller gemessenen Kalziumkonzentrationen in den Kapiteln 3.1.1 und 3.2.1 (Tab. 8 und 15) fällt Folgendes auf: Beim Vergleich von einzelnen Gruppen eignen sich Laminin und Gelatine in gleichem Maße für die Menge und Festigkeit der CaP-Präzipitate. Beispielsweise scheint sich Gelatine etwas besser zu eignen, was die JPCs in Hypoxie angeht, jedoch liegt für die iMSCs unter Hypoxie eine Tendenz zu festeren und größeren Mengen an CaP-Präzipitaten auf Laminin vor. In Bezug auf die AFM-Messungen der CaP-Präzipitate, scheint die Lamininbeschichtung sowohl in Normoxie als auch in Hypoxie für die iMSCs sich besser zu eignen. Gelatine scheint dafür sowohl für normoxische als auch hypoxische Bedingungen für die JPCs besser geeignet zu sein. Das ist aus meiner Sicht der wichtigste Unterschied zwischen beiden Beschichtungen, die ansonsten sehr austauschbar sind.

#### 4.1.4 Vergleich und Korrelation von Qualität und Quantität der CaP-Präzipitate

Signifikante Korrelationen zwischen E-Modul und Menge der CaP-Präzipitate konnten aufgrund von zahlreichen Ausreißern/Extremwerten kaum festgestellt werden. Eine Ausnahme bildeten die JPCs von Patient 1 (Abb. 29). Abgesehen von dieser fehlenden Proportionalität konnten jedoch andere Parallelen zwischen Qualität und Quantität der CaP-Präzipitate erkannt werden, wenn man die Ausreißer durch die Verwendung von statistisch stabileren

Medianwerten weniger stark gewichtet. Vergleicht man die Tabellen 9 und 16 miteinander, so fallen sofort einige Parallelen auf. Nicht nur sind fast immer dieselben Bedingungen/Eigenschaften begünstigt, sondern auch die Prozentzahlen ähneln sich. Werden beispielsweise die Zelltypen verglichen, so ergibt sich in der Gruppe „Hypoxie Laminin“ der größte Unterschied zwischen iMSCs und JPCs, wobei erstere hier mehr und festere CaP-Präzipitate mineralisierten. Bei Betrachtung der Inkubationsbedingungen sind sowohl bei den E-Moduln als auch der gemessenen Kalziumkonzentrationen die Werte unter Normoxie stets höher als unter Hypoxie. Bei beiden Messungen besteht der geringste Unterschied bei den iMSCs auf Laminin. Daraus lässt sich ableiten, dass die Konditionen, die eher härtere CaP-Präzipitate hervorbringen, gleichzeitig auch die Konditionen sind, die mengenmäßig eher mehr Präzipitate hervorbringen.

## **4.2 BIOMECHANISCHE EIGENSCHAFTEN VON JPC'S UND IMSC'S IM VERLAUF DER OSTEOGENEN DIFFERENZIERUNG**

Interessant ist, dass, umgekehrt wie bei den JPCs, die iMSCs mit der osteogenen Differenzierung an Festigkeit verlieren. Der Unterschied des E-Moduln zwischen CO-Zellen und OB-Zellen ist bei beiden Stammzelltypen statistisch signifikant. In der Literatur gibt es unterschiedliche Ansichten. Yen et al. kommen zu dem Ergebnis, dass mesenchymale Stammzellen während der osteogenen Differenzierung an Steifigkeit zulegen (Yen et al., 2020). Auf der anderen Seite kommen Titushkin und Cho zu ganz anderen Ergebnissen (Titushkin and Cho, 2007). Sie postulieren, dass humane mesenchymale Stammzellen (hMSC) mit  $3,2 \pm 1,4$  kPa steifer sind als voll differenzierte Osteoblasten mit  $1,7 \pm 1,0$  kPa. Weiterhin zeigen ihre ebenfalls mittels AFM gemessenen Ergebnisse eine Abnahme des Elastizitätsmoduln auf  $2,1 \pm 0,9$  kPa nach 10 Tagen osteogener Differenzierung der hMSCs (-34,4% im Vergleich zu dem Wert vor der Einleitung der Differenzierung). Das passt zu den in der vorliegenden Arbeit gemessenen Werten der iMSCs: CO-Zellen: Median =  $1,5 \pm 0,8$  kPa und die weniger festen Zellen nach 15 Tagen osteogener Differenzierung: Median =  $1,0 \pm 1,4$  kPa (-33,3% im Vergleich zu dem Wert vor der Differenzierung). Das Abnehmen des Elastizitätsmoduln des Zellkörpers im Laufe der osteogenen Differenzierung konnte bei den iMSCs in nahezu allen Fällen beobachtet werden (10 von 12 Fällen, die sich ergeben aus je 3 Patienten Normoxie/Laminin, Normoxie/Gelatine, Hypoxie/Laminin, Hypoxie/Gelatine). Diese Veränderung der biomechanischen Eigenschaften erklären Titushkin und Cho mit dem Zusammenspiel zwischen Zellmembran und Zytoskelett, genauer gesagt dem F-Aktin des Zytoskeletts. Demnach hätten mesenchymale Stammzellen einen Bedarf an idealer Adhäsion,

welche durch fokale Adhäsionen gewährleistet wird, die mit der Bildung starker, dicker Aktinstressfasern einhergeht und dadurch einen hohen E-Modul erzeugen. LeBlon et al. zeigen, dass die Dicke der Aktinfasern mit dem Elastizitätsmodul der Zelle korreliert (LeBlon et al., 2015). Titushkin und Cho geben als mögliche Erklärung an, dass eine gute Fähigkeit zur Adhäsion für Stammzellen essenziell sei, um durch Migration, Selbsterneuerung und Differenzierung ideal und schnell auf externe Reize reagieren zu können. Auf der anderen Seite, so die genannten Autoren, seien Osteoblasten vor allem vielen mechanischen Beanspruchungen ausgesetzt, die sie am besten durch eine elastische Verformbarkeit unbeschadet überstehen. Dafür hätten sie zwar optisch etwa die gleiche Menge an F-Aktin-Fasern in sich, diese seien jedoch zu einem sehr viel feineren Netz verwoben. Auf den Fluoreszenzbildern dieser Arbeit kann man leider einen solchen Unterschied zwischen den Aktinfasern der CO- und der OB-Zellen nicht mit Sicherheit erkennen (Abb. 49), denn dafür bräuchte es Bilder in höherer Vergrößerung, um einzelne Zellen besser erkennen zu können und Überlagerungen besser auseinanderhalten zu können. Nach dieser Theorie ist es auch stimmig, dass die undifferenzierten JPCs, anders als die iMSCs, schon als CO-Zellen relativ niedrige E-Moduln vorweisen (Median =  $0,95 \pm 0,6$  kPa). Sie sind als Stammzellen des am meisten kraftbeanspruchten Knochens (in dieser Studie wurden Zellen der Mandibula verwendet) hohen mechanischen Kräften ausgesetzt und haben sich deshalb womöglich schon als Stammzellen den Gegebenheiten durch niedrigere Elastizitätsmoduln angepasst. Andererseits war unter dem Mikroskop sichtbar, dass die Kontrollzellen der JPCs mit der Zeit immer mehr Fettvakuolen bildeten, was bei den iMSCs nicht der Fall war (Abb. 40, 41). Auch dadurch könnte der Unterschied zustande kommen, dass die CO-JPCs signifikant weicher waren als die CO-iMSCs. Zusätzlich waren die CO-Zellen der JPCs signifikant weicher als ihre OB-Zellen ( $1,1 \pm 1,8$  kPa). Dieses Verhältnis der weicheren CO-Zellen, die im Verlauf der osteogenen Differenzierung an Festigkeit zunahm, galt für 7 von 12 Patienten (JPCs von je 3 Patienten unter Normoxie/Laminin, Normoxie/Gelatine, Hypoxie/Laminin, Hypoxie/Gelatine). Leider ist hier nicht auszuschließen, dass bei den Messungen des E-Moduln versehentlich CaP-Präzipitate getroffen worden sind, wenn diese nicht hundertprozentig visuell von den Zellen unterschieden werden konnten, weil die Platten besonders dicht mineralisiert waren. Dies könnte vorrangig bei den JPCs passiert sein, da die Mineralisierungen hier feinkörniger und flächiger ausfallen als bei den iMSCs, wo sie sich eher auf einige Zentren auf dem Schälchen konzentrieren (vgl. 3.4.2.1). Die Analysen zur Proportionalität zwischen CO- und OB-Zellen zeigten lediglich eine statistisch signifikante positive Korrelation zwischen den iMSCs unter Hypoxie. Das bedeutet, dass nur unter diesen Bedingungen ein Zusammenhang zwischen festen CO- und OB-Zellen

hergestellt werden konnte. Spannend ist auch der Vergleich der iMSCs eines erst an Tag 20 gemessenen Patienten. Die CO-Zellen waren noch steifer als die CO-Zellen der anderen Patienten an Tag 15 und die OB-Zellen waren noch etwas weicher als die OB-Zellen der anderen Patienten an Tag 15. Das ist ein Hinweis darauf, dass die CO-iMSCs im Laufe der Kultivierung dazu tendieren immer fester zu werden, während die OB-iMSCs im Laufe der osteogenen Differenzierung immer weicher werden.

Beobachtungen beider Zelltypen unter dem Mikroskop im Verlauf der osteogenen Differenzierung haben gezeigt, dass die JPCs im Laufe der Kultivierung verfetteten, während dies bei den iMSCs nicht der Fall war (Abb. 39, 40). Dem gegenüber schwammen beim Medienwechsel der iMSCs stets viele tote Zellen im Medium, was bei den JPCs nicht der Fall war. Diese Beobachtungen könnten eine Schlussfolgerung zulassen, dass die iMSCs sich durch längere Kultivierung eher vermehren, während die JPCs durch frisches Medium eher zum Verfetten und weniger zum Proliferieren tendieren.

Nicht nur was den Zelltypen, sondern auch was die Inkubationsbedingung betrifft, gab es signifikante Unterschiede zwischen den Elastizitätsmoduln der undifferenzierten (CO) und osteogen differenzierten (OB) Zellen. Die OB-Zellen im Hypoxieinkubator waren signifikant steifer als die OB-Zellen aus dem Normoxieinkubator (Gesamt und bei Betrachtung der JPCs ohne iMSCs). Möglicherweise hängt das mit dem Sauerstoffstress zusammen, wodurch unter hypoxischen Bedingungen mehr Aktinstressfasern gebildet werden (Zieseniss, 2014). Unter Normoxie tendierten sowohl JPCs (in 5 von 6 Fällen, je 3 Patienten auf Laminin und Gelatine) als auch iMSCs (in 4 von 6 Fällen) zur Reduktion des Elastizitätsmoduln im Zuge der osteogenen Differenzierung. Dasselbe galt in signifikantem Maße für die iMSCs unter hypoxischen Bedingungen (in 6 von 6 Fällen). Eine Ausnahme bildeten die JPCs unter hypoxischer Bedingung, die während der Differenzierung signifikant steifer wurden (in 6 von 6 Fällen). Dennoch wurden sie nicht so steif wie die CO-iMSCs unter Hypoxie, welche die höchsten Elastizitätsmoduln zeigten. Die „weichsten“ Zellen waren die OB-JPCs in Normoxie (Tab. 12, Abb. 20). Es lässt sich also festhalten, dass folgende Bedingungen/Eigenschaften eher zur Erhöhung des E-Moduln der Zellen führen: undifferenzierte Zellen, iMSCs, Hypoxie. Konträr dazu führen osteogen differenzierte Zellen, JPCs und Normoxie eher zu niedrigen E-Moduln der Zellen.

Die Beschichtung nimmt so gut wie keinen Einfluss auf den Elastizitätsmodul der Zellen. Lediglich die CO-Zellen waren auf Laminin-beschichteten Platten signifikant steifer als auf Gelatine-beschichteten (Abb. 16). Besser et al. stellten fest, dass Zellen zu Laminin stabilere Bindungen herstellen als zu reinen Gelatinesubstraten (Besser et al., 2020). Dies spräche für

mehr fokale Adhäsionskontakte zu Laminin als zu Gelatine, wodurch zahlreichere dicke Aktinbündel gebildet werden. Unter hypoxischen Bedingungen waren die JPCs (CO- und OB-Zellen) auf Lamininbeschichtungen signifikant steifer und die iMSCs (OB-Zellen) auf Gelatinebeschichtungen (3.1.2, 3.1.3).

Im Folgenden werden die Korrelationen zwischen den biomechanischen Eigenschaften der Zellen und der von ihnen synthetisierten CaP-Präzipitate diskutiert. Interessanterweise bestand zwischen OB-Zellen und CaP-Präzipitaten eine signifikante Korrelation (wobei JPCs und iMSCs gesammelt betrachtet werden): Je steifer die OB-Zellen, desto steifer die von ihnen gebildeten CaP-Präzipitate und umgekehrt. Allerdings muss hier auch erwähnt werden, dass eventuelle Fehlmessungen vermutlich nicht vermeidbar waren, wenn in vollmineralisierten Schälchen Schwierigkeiten bestanden, die einzelnen Zellen zwischen den Mineralisierungen mit dem Cantilever des AFMs exakt zu treffen (siehe dazu 4.3.2). Daher könnten die vielen hohen Extremwerte der OB-Zellen kommen. Außerdem gilt diese Korrelation nur für die Berechnung mit den Mittelwerten der AFM-Daten. Zieht man den gegen Ausreißer resistenten Median heran, so bestand eine negative, aber nicht signifikante Korrelation. Das bedeutet, dass die Median-Daten eine Tendenz zur Schlussfolgerung zeigen: „je weicher die OB-Zellen, desto steifer die von ihnen gebildeten CaP-Präzipitate und umgekehrt“. Dasselbe lag auch für die JPCs bei separater Betrachtung von den iMSCs vor (Abb. 21). Zwischen dem E-Modul von CO-Zellen und deren CaP-Präzipitate konnte keine nennenswerte signifikante Korrelation festgestellt werden.

Im Folgenden werden die Korrelationen zwischen den biomechanischen Eigenschaften der Zellen und der von ihnen synthetisierten Mengen an CaP-Präzipitate diskutiert. Zwischen dem Elastizitätsmodul der OB-Zellen (gesamt und auch für JPCs ohne iMSCs) und der Alizarinkonzentration der von ihnen gebildeten Mineralisierungen bestand eine signifikante Korrelation (Abb. 30). Dieses Verhältnis war negativ proportional, das heißt, je weicher die OB-Zellen, desto mehr CaP-Präzipitate haben sie gebildet. Das spricht wieder für die oben genannte Theorie, dass voll differenzierte OB-Zellen elastischer sind als ihre undifferenzierten Vorgänger und je besser die Zellen differenziert sind, desto mehr mineralisierte ECM können sie bilden. Außerdem zeigt die Datenanalyse einen Trend zur negativen Korrelation zwischen undifferenzierten JPCs bzw. iMSCs und deren anhand der Kalziumkonzentrationen gemessenen Menge an CaP-Präzipitaten (Abb. 31). Das ist Ausdruck für ein tendenzielles Verhältnis: „je weicher die undifferenzierte Ausgangszelle, desto mehr CaP-Präzipitate produziert die aus ihr osteogen differenzierte Zelle.“

Hält man sich an die gegen Ausreißer resistenten und damit geeigneteren Mediane der AFM-Daten, so lässt sich zusammenfassen, dass weiche osteogen induzierte JPCs eher viele und feste CaP-Präzipitate und harte OB-Zellen eher wenige und weichere CaP-Präzipitate bilden. Über die osteogen induzierten iMSCs lassen die vorliegenden Daten keine solche Schlussfolgerung zu.

### **4.3 DISKUSSION VON MATERIAL UND METHODEN**

#### **4.3.1 Limitationen der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente**

Leider war es nicht möglich, alle Versuche mit exakt denselben Bedingungen durchzuführen. Die Problematik der verwendeten Methoden soll Gegenstand dieses Abschnitts sein.

Wie schon in Kapitel 4.1.2 erwähnt, wurde teilweise ein deutlich schlechteres Anwachsen der ausgesäten iMSCs im Hypoxieinkubator beobachtet. Um leere Wells zu vermeiden, wurden deshalb, abgesehen von den iMSCs von Patient 1, immer 80.000 statt 40.000 Zellen in die Schälchen für den Hypoxieinkubator ausgesät. Lichtmikroskopisch macht das an Tag 15 keinen Unterschied mehr (Abb. 45). Sofern zum Vergleich 40.000 und 80.000 Zellen ausgesät wurden (vgl. 2.2.2), bestand hinsichtlich des Mineralisierungspotenzials oft kein Unterschied oder die ersten Mineralisierungen tauchten bei den Platten mit der höheren Zelldichte (80.000 Zellen/Well) schon ein paar wenige Tage früher auf als bei den Platten mit geringerer Dichte. In einem Fall mineralisierte nur das Schälchen mit 80.000 ausgesäten Zellen.

Auch der Messtag war nicht immer genau derselbe. In einem Fall waren die CaP-Präzipitate erst an Tag 20 (iMSC Patient 1 Normoxie) so weit aufgetreten, dass gemessen werden konnte, in einem anderen an Tag 19 (JPC Patient 1 Hypoxie). Ansonsten konnte immer an Tag 15 oder 16 gemessen werden.

Eine weitere kleine Variation lag bei den verwendeten Passagen vor. In früheren Experimenten wurde herausgearbeitet, dass iMSCs erst ab gewissen Passagen ein Mineralisierungspotenzial aufweisen (Frick, 2020). Sofern Zellen in der vorliegenden Arbeit nicht mineralisierten, wurde eine höhere Passage verwendet (P5 oder P6 anstatt P4). In zwei Fällen bewirkte das eine Mineralisierung (iMSC Patient 1 Hypoxie und JPC Patient 2 Hypoxie Gelatine). In den meisten Fällen hatte die Passage keine Auswirkungen auf das Mineralisierungspotenzial der Zellen.

Was letztlich den Unterschied in Bezug auf das Mineralisierungspotenzial ausgemacht hat, war die Konzentration von humanem Plättchenlysat im Medium. Wie schon unter 4.1.2 erwähnt, waren einige mit hPI-10 (10 % humanes Plättchenlysat im Kulturmedium) supplementierte Zellkulturen nicht in der Lage unter Hypoxie zu mineralisieren, was unter hPI-5 (5 % hPI im Kulturmedium) Supplementierung nicht beobachtet wurde. Dabei handelt es sich um die unter

2.2.5 genannten Zellen: die in Hypoxie inkubierten JPCs der Patienten # 1, # 2 (nur Laminin), # 3 und den iMSCs des Patienten # 3 (26,9 % aller AFM-Messungen) und das unabhängig von der ausgesäten Zelldichte. Nach je drei gescheiterten hPI-10-Versuchen, gelang die Mineralisation in allen Schälchen auf Anrieb mit hPI-5. Im Vergleich zu den hPI-10-supplementierten Zellen dauerte es meist 2-3 Tage länger, bis die ersten Mineralisierungen auftraten und diese wuchsen dann auch langsamer. Das gilt für JPCs und iMSCs gleichermaßen. Während der Inkubationszeit erschien das Medium der hPI-5-Platten tendenziell basischer (farblich eher rosa) im Vergleich zum eher säurehaltigen Medium (farblich eher gelblich) hPI-10-Medium. Das spricht für ein schnelleres Zellwachstum im hPI-10-supplementierten Medium und vermutlich verfetteten die Zellen schneller als sie sich osteoblastisch differenzierten. Da die Versuche nicht dazu ausgelegt waren, die Unterschiede zwischen hPI-5- und hPI-10-Medium zu erforschen, lassen sich keine belastbaren Aussagen zu den Elastizitätsmoduln oder Präzipitatenmengen treffen. Außerdem wurden die verschiedenen Konzentrationen des humanen Plättchenlysats nur hinsichtlich der Kalziumpräzipitate nicht aber der Zellkörper ausgewertet. Fest steht jedoch, dass die höchsten Werte der Kalziumkonzentration gleichermaßen in beiden Medien detektiert wurden. Beim Vergleich der hPI-Konzentrationen im Medium konnte sowohl bei den E-Moduln als auch bei der Messung der Kalziumkonzentration zwar kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden, allerdings eine Tendenz zu höheren Werten im hPI-10 Medium im Vergleich zum hPI-5 Medium. Außerdem gab es einen signifikanten Unterschied der Alizarinkonzentration innerhalb der JPCs. Wie schon oben erwähnt, kann diese Studie nicht zur Feststellung einer geeigneten hPI-Konzentration im Medium dienen. Die Tendenz zu härteren und zahlreicheren Präzipitaten im hPI-10 Medium kann auch darauf zurückgeführt werden, dass nur unter schwierigen Bedingungen auf hPI-5 umgeschwenkt wurde bzw. werden musste. Erstens wurde nur unter Hypoxie, nicht aber unter Normoxie mit hPI-5 kultiviert (Hypoxie bewirkt im Vergleich zu Normoxie auch mit hPI-10 eine schwächere Mineralisierung der Extrazellulärmatrix) oder zweitens wurden vielleicht schwächere Zellen, die unter hPI-10 Bedingungen gar nicht differenziert sind, mit hPI-5 versorgt. Durch schlechtere Ausgangsbedingungen könnte so der vermeintliche Eindruck entstehen, die hPI-10 Mediumsupplementierung würde die JPCs und iMSCs zur Bildung von festeren und zahlreicheren CaP-Präzipitaten aktivieren. In der Literatur finden sich Empfehlungen von 1-10% hPI für die osteogene Differenzierung von MSCs (Karadjian et al., 2020, Azouna et al., 2012, Xia et al., 2011). Kadadjian et al. kommen zu dem Schluss, dass eine 1 %-ige im Vergleich zu einer 10 %-igen Konzentration sich nur negativ auf die Aktivität der alkalinen Phosphatase niederschlägt, nicht aber in der detektierten Kalziummenge (Karadjian et al.,

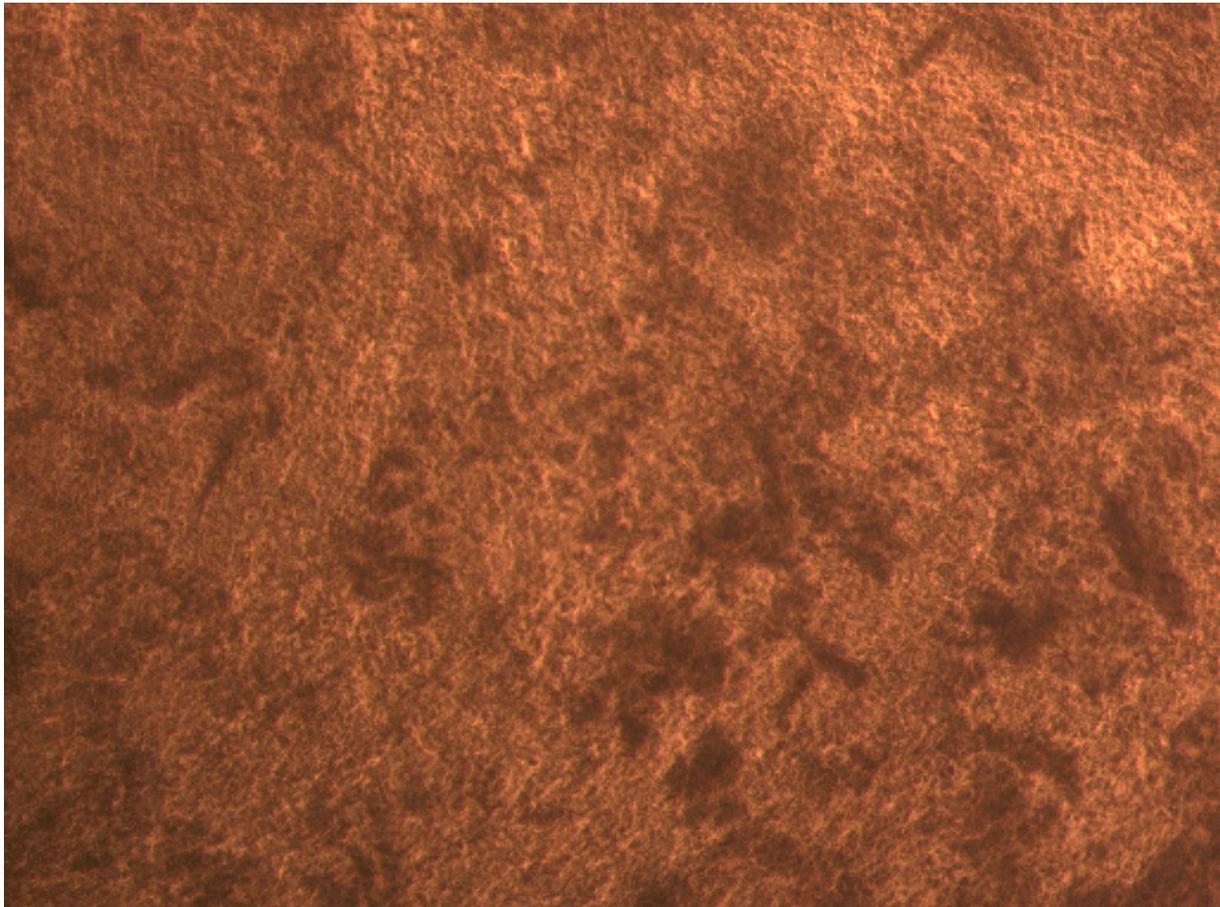
2020). Diese Studien wurden aber unter normoxischen Bedingungen durchgeführt und bisher gibt es leider noch keine Untersuchungen zum Thema hPI-Konzentration im Medium für MSCs unter hypoxischen Bedingungen.

#### 4.3.2 Messung der Elastizitätsmoduln mit dem Rasterkraftmikroskop

Die biomechanischen Eigenschaften spielen eine wichtige Rolle für den Zellmetabolismus, da sie Vorgänge wie Zellwachstum, Proliferation, Migration, Adhäsion und Differenzierung beeinflussen. Diese Zellfunktionen sind gewissermaßen sogar abhängig von den biomechanischen Eigenschaften einer Zelle (Titushkin and Cho, 2007). Um Zellen gezielt manipulieren zu können, ist es essenziell, das im Detail zu verstehen, da, auch andersherum, eine Zelle auf äußere mechanische Einflüsse mit einem Remodeling ihrer biomechanischen und biochemischen Eigenschaften antwortet (Titushkin and Cho, 2007). Eine besonders wichtige dieser biomechanischen Eigenschaften ist der Elastizitätsmodul, der in dieser Arbeit von zwei Populationen mesenchymaler Stammzellen (Kieferperiostzellen und iPSC-abgeleitete mesenchymale Stammzellen) und deren osteoblastisch induzierten Abkömmlinge mit dem Rasterkraftmikroskop (engl. AFM) gemessen wurde.

Der Elastizitätsmodul der JPCs und iMSCs lag in der vorliegenden Arbeit bei ca. 1 kPa (vgl. 3.1.2 und 3.1.3), der der CaP-Präzipitate bei ca. 10 kPa (vgl. 3.1.1). Letzteres liegt in etwa im physiologischen Bereich von organischen Geweben wie Muskeln oder Knochenmark (Jansen et al., 2015). Im Literaturvergleich liegen JPCs bzw. iMSCs bei ca. 0,8-9 kPa (Horimizu et al., 2013, Nikolaev et al., 2014, Danalache et al., 2019), osteogen differenzierte Zellen bei ca. 1,5-50 kPa (Danalache et al., 2019, Yourek et al., 2007, Takai et al., 2005). Die Unterschiede kommen wahrscheinlich nicht nur durch unterschiedliche Zelllinien sondern auch durch verschiedene Experimentbedingungen und Analysen zustande (Titushkin and Cho, 2007). Die Rasterkraftmikroskopie ist aufgrund der Visualisierung durch die Verbindung mit einem inversen Lichtmikroskop und dessen hoher Auflösung eine gut geeignete Methode zum Messen der Elastizitätsmoduln einzelner Zellen. Außerdem hat sie den Vorteil, die Zellen direkt in Flüssigkeit messen zu können, um Änderungen der Steifigkeit durch die Fixierung zu umgehen. Allerdings treten Schwierigkeiten auf, wenn man versucht die CaP-Präzipitate zu messen. Diese sind im Gegensatz zu dem zweidimensionalen Zellmonolayer ein dreidimensionales Konstrukt, vor allem je weiter die Mineralisierung fortschreitet und die Kristalle wachsen. Dies lässt sich aber im zweidimensionalen Bild des Mikroskops nicht gut erkennen, was ein störungsfreies Treffen von geraden und stabilen CaP-Präzipitaten mit der Spitze des Cantilevers stark erschwert (Abb. 50). Viele Messungen der Mineralisierungen sind so durch Ausschläge

des Cantilevers verrauscht und mussten von der Datenauswertung ausgeschlossen werden. In AFM-Schälchen mit besonders vielen Präzipitaten waren deshalb die Messungen besonders schwierig und harte Präzipitate unter Umständen schwer mit dem AFM zu messen. Zusätzlich war es in den vollmineralisierten Platten teilweise problematisch, einzelne OB-Zellen zwischen den vielen CaP-Präzipitaten genau zu treffen (Abb. 50). Um ausschließen zu können, dass CaP-Präzipitate touchiert werden, wenn eigentlich OB-Zellen gemessen werden sollen, könnte man in zukünftigen Experimenten die CaP-Präzipitate vorher mit einem Chelator wie EDTA auflösen. Dies würde das fehlerfreie sichere Treffen von osteogen differenzierten Zellen erleichtern. Als Chelatoren werden Moleküle bezeichnet, die mindestens ein freies Elektronenpaar besitzen, mit dem sie eine kovalente Bindung mit zwei- oder mehrwertigen (Metall)kationen wie  $\text{Ca}^{2+}$  eingehen können. Auf diese Weise können die Kalziumphosphat-Präzipitate zersetzt werden (Methode der Chelatzerersetzung, (Roeder et al., 2006)).



*Abbildung 50: Vollmineralisierte AFM-Platte mit 3D-Präzipitaten*  
*Repräsentatives Bild für eine vollmineralisierte Platte nach 15 Tagen osteogener Stimulation, die die Messungen am AFM erschwerten. Erstens sind kaum bis keine Zellen mehr erkennbar, die nicht von CaP-Präzipitaten bedeckt sind, und zweitens sieht man anhand der unscharfen dunkleren Präzipitatbereiche, dass die Mineralisierungen nicht nur zwei- sondern dreidimensional aus dem Plattenboden herausragen, sodass sie auch nicht mehr in einer Ebene scharf gestellt werden können. AFM = Rasterkraftmikroskop, CaP = Kalzium-Phosphat. 10x*

Weiterhin kam es besonders bei den OB-Zellen zu vielen Ausreißern (vermutliche Treffer auf CaP-Präzipitaten anstatt Zellen, konnten nicht ausgeschlossen werden) und auch die E-Moduln der CaP-Präzipitate zeichneten sich durch viele teilweise extreme Ausreißer aus, was die statistischen Analysen erschwerte. Um diese als tatsächliche Fehlmessungen zu entlarven oder sie als legitime Werte anzuerkennen, bräuchte es weitere Versuche mit höheren Fallzahlen. Aus zeitlichen Gründen und weil pro Messpunkt zur Ausgrenzung von Messfehlern dreimal gemessen wurde, konnten pro besiedelte Platte nicht mehr als je 30 verschiedene Zellen und CaP-Präzipitate gemessen werden. Die Auswahl der Messorte fand willkürlich aber nach bestem Wissen und Gewissen zufällig statt. Leider kam es immer wieder zu technischen Problemen, was verhinderte, dass gewisse Experimentbedingungen gemessen werden konnten. Das trifft beispielsweise auf die JPCs des Patienten 2 zu, dessen Zellen hinterher, also nach dem ersten Versuch, bei dem aufgrund von technischen Problemen keine Messungen durchgeführt werden konnten, in Hypoxie kaum noch mineralisierten und deshalb hier beispielsweise auf hPI-5 umgestiegen werden musste. Außerdem wurde bei vorangegangenen Studien beobachtet, dass Zellen teilweise auf AFM-Platten schlechter oder gar nicht mineralisierten, obwohl dieselben Zellen in der 6-Well-Platte mineralisierten (Danalache et al., 2019). Diesem Problem sollte durch die Laminin- und Gelatinebeschichtung der verwendeten AFM-Platten entgegengewirkt werden.

Trotz all dieser Widrigkeiten lässt sich dennoch festhalten, dass das AFM ein hervorragendes Messgerät für die biomechanischen Eigenschaften vor allem von lebenden Zellen darstellt.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel, biomechanische Eigenschaften von Kieferperiostzellen (JPCs) und iPSC-abgeleiteten mesenchymalen Stammzellen (iMSCs) zu charakterisieren, sowie ihre Dispositionen unter verschiedenen Bedingungen zu vergleichen. Dies zu verstehen ist ein essenzieller Bestandteil, um die Zellen für das Knochengewebe-Engineering gezielt und effizient einsetzen zu können. Ein besonders wichtiger Aspekt der biomechanischen Eigenschaften ist der Elastizitätsmodul, da Zellen je nach Umgebung mannigfaltigen Deformationen und Belastungen ausgesetzt sind und ihre zelluläre Integrität nicht verlieren dürfen.

Die oben genannten Zellen wurden auf verschiedenen Zellkulturplatten-Beschichtungen (Laminin, Gelatine) und unter verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen (5% - Hypoxie, 21% - Normoxie) kultiviert. Nach 15 Tagen osteogener Differenzierung wurde der Elastizitätsmodul sowohl der lebenden Zellen als auch der mineralisierten Matrix mittels Rasterkraftmikroskopie gemessen. Im Anschluss wurden die Zellen fixiert und mit Alizarin gefärbt, um die CaP-Präzipitate zu quantifizieren. Parallele Ansätze wurden für eine visuelle Analyse des Zytoskeletts fluoreszierend angefärbt.

Die durchgeführten AFM-Messungen zeigten, dass die E-Moduln der JPCs in Bezug auf die CaP-Präzipitate entweder maximale (unter Normoxie) oder minimale Werte (unter Hypoxie) hervorbringen können. iMSCs hingegen erzeugen in allen Bedingungen mittlere Präzipithärten. Da in der realen klinischen Anwendung eher hypoxische Bedingungen herrschen (van Esterik et al., 2017) und in vitalem Knochen ein Sauerstoffgehalt von < 1% bis 6 % als physiologisch angesehen wird (Johnson et al., 2017), scheinen in puncto hoher Elastizitätsmodul und großer Menge der CaP-Präzipitate anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, die iMSCs den JPCs überlegen zu sein.

Die untersuchten Beschichtungen Laminin und Gelatine haben einen geringen Einfluss auf das Zellmineralisationspotenzial. Es besteht jedoch eine Tendenz zu festeren CaP-Präzipitaten auf Lamininböden, wenn man iMSCs verwendet und auf Gelatineböden, wenn man JPCs verwendet.

Hypoxischer Stress verlangsamt die Zellproliferation so wie die Bildung von mineralisierter ECM. Die unter hypoxischen Bedingungen gebildeten Präzipitate wiesen insgesamt ein niedrigeres Elastizitätsmodul auf, verglichen mit denen, die unter Normoxie von den Zellen produziert wurden. Bezogen auf das verwendete Medium lässt sich sagen, dass in Normoxie eher das hPl-10-Medium aufgrund schnellerer Mineralisierung zu bevorzugen ist. Unter

Hypoxie schien in den Versuchen der vorliegenden Arbeit hPI-5-Medium eher besser geeignet zu sein, da dieses höhere Mineralisierungsquoten erzielte.

Insgesamt lässt sich sagen, dass das Rasterkraftmikroskop eine hervorragende Methode darstellt, um die Elastizitätsmoduln der Zellen zu messen. Um die Problemanfälligkeit gerade bei vollmineralisierten Zellmonolayern zu reduzieren, sollte zukünftig die Anzahl der Messungen erhöht und optimalerweise in einem voll automatisierten Modus durchgeführt werden, um den Zeitfaktor zu minimieren. Um die Zellmessungen weiter zu optimieren, könnte durch die Zugabe eines Chelators, die vorherige Auflösung der CaP Präzipitate in Betracht gezogen werden.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

- ABDI, R., FIORINA, P., ADRA, C. N., ATKINSON, M. & SAYEGH, M. H. 2008. Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells : A Potential Therapeutic Strategy for Type 1 Diabetes. *Diabetes*, 57, 1759-1767.
- AGATA, H., ASAHINA, I., YAMAZAKI, Y., UCHIDA, M., SHINOHARA, Y., HONDA, M. J., KAGAMI, H. & UEDA, M. 2007. Effective bone engineering with periosteum-derived cells. *J Dent Res*, 86, 79-83.
- 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. *Cell Physiol Biochem*, 26, 1073-80.
- AMINI, A. R., LAURENCIN, C. T. & NUKAVARAPU, S. P. 2012. Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Crit Rev Biomed Eng*, 40, 363-408.
- AZOUNA, N. B., JENHANI, F., REGAYA, Z., BERRAEIS, L., OTHMAN, T. B., DUCROCQ, E. & DOMENECH, J. 2012. Phenotypical and functional characteristics of mesenchymal stem cells from bone marrow: comparison of culture using different media supplemented with human platelet lysate or fetal bovine serum. *Stem Cell Research & Therapy*, 3, 6.
- BAKER, N., BOYETTE, L. B. & TUAN, R. S. 2015. Characterization of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in aging. *Bone*, 70, 37-47.
- BEREBICHEZ-FRIDMAN, R. & MONTERO-OLVERA, P. R. 2018. Sources and Clinical Applications of Mesenchymal Stem Cells: State-of-the-art review. *Sultan Qaboos Univ Med J*, 18, e264-e277.
- BESSER, R. R., BOWLES, A. C., ALASSAF, A., CARBONERO, D., CLAURE, I., JONES, E., REDA, J., WUBKER, L., BATCHELOR, W., ZIEBARTH, N., SILVERA, R., KHAN, A., MACIEL, R., SAPORTA, M. & AGARWAL, A. 2020. Enzymatically crosslinked gelatin-laminin hydrogels for applications in neuromuscular tissue engineering. *Biomater Sci*, 8, 591-606.
- BURGUN, C. 2021. Effekte von Zellkulturplatten-Beschichtungen auf das osteogene Potenzial von Kieferperiostzellen (JPCs) und induzierten mesenchymalen Stammzellen (iMSCs)
- CAPLAN, A. I. 1991. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*, 9, 641-50.
- DAI, J., ROTTAU, D., KOHLER, F., REINERT, S. & ALEXANDER, D. 2018. Effects of Jaw Periosteal Cells on Dendritic Cell Maturation. *Journal of Clinical Medicine*, 7, 312.
- DAI, J., UMRATH, F., REINERT, S. & ALEXANDER, D. 2020. Jaw Periosteal Cells Seeded in Beta-Tricalcium Phosphate Inhibit Dendritic Cell Maturation. *Biomolecules*, 10.
- DANALACHE, M., KLIESCH, S. M., MUNZ, M., NAROS, A., REINERT, S. & ALEXANDER, D. 2019. Quality Analysis of Minerals Formed by Jaw Periosteal Cells under Different Culture Conditions. *Int J Mol Sci*, 20.
- 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 Rheum*, 54, 1209-21.
- DOMINICI, M., LE BLANC, K., MUELLER, I., SLAPER-CORTENBACH, I., MARINI, F., KRAUSE, D., DEANS, R., KEATING, A., PROCKOP, D. & HORWITZ, E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8, 315-7.

- EGGENHOFER, E., BENSELER, V., KROEMER, A., POPP, F. C., GEISSLER, E. K., SCHLITT, H. J., BAAN, C. C., DAHLKE, M. H. & HOOGDUIJN, M. J. 2012. Mesenchymal stem cells are short-lived and do not migrate beyond the lungs after intravenous infusion. *Front Immunol*, 3, 297.
- FITZSIMMONS, R. E. B., MAZUREK, M. S., SOOS, A. & SIMMONS, C. A. 2018. Mesenchymal Stromal/Stem Cells in Regenerative Medicine and Tissue Engineering. *Stem Cells Int*, 2018, 8031718.
- FRÄNKEL, R. 1962. Funktionskieferorthopädie vom Mundvorhof aus mit „Funktionsreglern“. *Fortschritte der Kieferorthopädie*, 23, 459-480.
- FRICK, S.-L. 2020. Differenzierung von osteogenen Vorläuferzellen aus induzierten pluripotenten Stammzellen. Universität Tübingen.
- FRIEDENSTEIN, A. J., CHAILAKHJAN, R. K. & LALYKINA, K. S. 1970. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*, 3, 393-403.
- FROBEL, J., HEMEDA, H., LENZ, M., ABAGNALE, G., JOUSSEN, S., DENECKE, B., ŠARIĆ, T., ZENKE, M. & WAGNER, W. 2014. Epigenetic Rejuvenation of Mesenchymal Stromal Cells Derived from Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports*, 3, 414-422.
- GALLI, D., VITALE, M. & VACCAREZZA, M. 2014. Bone marrow-derived mesenchymal cell differentiation toward myogenic lineages: facts and perspectives. *Biomed Res Int*, 2014, 762695.
- GLAESER, J. D., BEHRENS, P., STEFANOVIC, T., SALEHI, K., PAPALAMPROU, A., TAWACKOLI, W., METZGER, M. F., EBERLEIN, S., NELSON, T., ARABI, Y., KIM, K., BALOH, R. H., BEN-DAVID, S., COHN-SCHWARTZ, D., RYU, R., BAE, H. W., GAZIT, Z. & SHEYN, D. 2021. Neural crest-derived mesenchymal progenitor cells enhance cranial allograft integration. *Stem Cells Transl Med*, 10, 797-809.
- HANNAH, S. S., MCFADDEN, S., MCNEILLY, A. & MCCLEAN, C. 2021. "Take My Bone Away?" Hypoxia and bone: A narrative review. *J Cell Physiol*, 236, 721-740.
- HE, F., UMRATH, F., REINERT, S. & ALEXANDER, D. 2021. Jaw Periosteum-Derived Mesenchymal Stem Cells Regulate THP-1-Derived Macrophage Polarization. *Int J Mol Sci*, 22.
- HOLZWARTH, C., VAEGLER, M., GIESEKE, F., PFISTER, S. M., HANDGRETINGER, R., KERST, G. & MÜLLER, I. 2010. Low physiologic oxygen tensions reduce proliferation and differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells. *BMC cell biology*, 11, 1-11.
- HORIMIZU, M., KAWASE, T., TANAKA, T., OKUDA, K., NAGATA, M., BURNS, D. M. & YOSHIE, H. 2013. Biomechanical evaluation by AFM of cultured human cell-multilayered periosteal sheets. *Micron*, 48, 1-10.
- HUANG, Y.-C., PAROLINI, O., DENG, L. & YU, B.-S. 2016. Should hypoxia preconditioning become the standardized procedure for bone marrow MSCs preparation for clinical use? *Stem Cells*, 34, 1992-1993.
- INOUE, M., ONO, T., KAMEO, Y., SASAKI, F., ONO, T., ADACHI, T. & NAKASHIMA, T. 2019. Forceful mastication activates osteocytes and builds a stout jawbone. *Sci Rep*, 9, 4404.
- JANSEN, L. E., BIRCH, N. P., SCHIFFMAN, J. D., CROSBY, A. J. & PEYTON, S. R. 2015. Mechanics of intact bone marrow. *J Mech Behav Biomed Mater*, 50, 299-307.
- JAQUIÉRY, C., SCHAEREN, S., FARHADI, J., MAINIL-VARLET, P., KUNZ, C., ZEILHOFER, H. F., HEBERER, M. & MARTIN, I. 2005. In vitro osteogenic differentiation and in vivo bone-forming capacity of human isogenic jaw periosteal cells and bone marrow stromal cells. *Ann Surg*, 242, 859-67, discussion 867-8.

- JOHNSON, R. W., SOWDER, M. E. & GIACCIA, A. J. 2017. Hypoxia and Bone Metastatic Disease. *Curr Osteoporos Rep*, 15, 231-238.
- KARADJIAN, M., SENGER, A.-S., ESSERS, C., WILKESMANN, S., HELLER, R., FELLEBERG, J., SIMON, R. & WESTHAUSER, F. 2020. Human Platelet Lysate Can Replace Fetal Calf Serum as a Protein Source to Promote Expansion and Osteogenic Differentiation of Human Bone-Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells. *Cells*, 9, 918.
- KORNICKA, K., HOUSTON, J. & MARYCZ, K. 2018. Dysfunction of Mesenchymal Stem Cells Isolated from Metabolic Syndrome and Type 2 Diabetic Patients as Result of Oxidative Stress and Autophagy may Limit Their Potential Therapeutic Use. *Stem Cell Rev Rep*, 14, 337-345.
- LALU, M. M., MCINTYRE, L., PUGLIESE, C., FERGUSON, D., WINSTON, B. W., MARSHALL, J. C., GRANTON, J. & STEWART, D. J. 2012. Safety of cell therapy with mesenchymal stromal cells (SafeCell): a systematic review and meta-analysis of clinical trials. *PLoS One*, 7, e47559.
- LAPASSET, L., MILHAVET, O., PRIEUR, A., BESNARD, E., BABLED, A., AÏT-HAMOU, N., LESCHIK, J., PELLESTOR, F., RAMIREZ, J. M., DE VOS, J., LEHMANN, S. & LEMAITRE, J. M. 2011. Rejuvenating senescent and centenarian human cells by reprogramming through the pluripotent state. *Genes Dev*, 25, 2248-53.
- LEBLON, C. E., CASEY, M. E., FODOR, C. R., ZHANG, T., ZHANG, X. & JEDLICKA, S. S. 2015. Correlation between in vitro expansion-related cell stiffening and differentiation potential of human mesenchymal stem cells. *Differentiation*, 90, 1-15.
- 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, 2845-54.
- LI, C. Y., WU, X. Y., TONG, J. B., YANG, X. X., ZHAO, J. L., ZHENG, Q. F., ZHAO, G. B. & MA, Z. J. 2015. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue under xeno-free conditions for cell therapy. *Stem Cell Res Ther*, 6, 55.
- MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT. 2008. *Was sind embryonale Stammzellen - und wie werden sie gewonnen?* <https://www.mpg.de/fragen-antworten-zu-embryonalen-stammzellen> [Online]. [Accessed 11.07.2023].
- MEIJER, G. J., DE BRUIJN, J. D., KOOLE, R. & VAN BLITTERSWIJK, C. A. 2008. Cell based bone tissue engineering in jaw defects. *Biomaterials*, 29, 3053-3061.
- NIKOLAEV, N. I., MULLER, T., WILLIAMS, D. J. & LIU, Y. 2014. Changes in the stiffness of human mesenchymal stem cells with the progress of cell death as measured by atomic force microscopy. *J Biomech*, 47, 625-30.
- REES, D. C. & HADDAD, F. S. 2003. Bone transplantation. *Hosp Med*, 64, 205-9.
- ROEDER, R. K., CONVERSE, G. L., LENG, H. & YUE, W. 2006. Kinetic Effects on Hydroxyapatite Whiskers Synthesized by the Chelate Decomposition Method. *Journal of the American Ceramic Society*, 89, 2096-2104.
- RUPP, M., KERSCHBAUM, M., KLUTE, L., FRANK, L. & ALT, V. 2021. Knochentransplantation oder Biomaterial?: Eine Analyse von 99.863 Operationen in Orthopädie und Unfallchirurgie aus dem Jahr 2018 in Deutschland. *Unfallchirurg*, 124, 245.
- SCHIMMING, R. & SCHMELZEISEN, R. 2004. Tissue-engineered bone for maxillary sinus augmentation. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 62, 724-729.
- SCHNEIDER, R., NEUSS, S., KNÜCHEL, R. & PEREZ-BOUZA, A. 2010. Mesenchymale Stammzellen für das „tissue engineering“ des Knochens. *Der Pathologe*, 31, 138-146.
- SCHWENZER N, E. M. 2011. *Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie*, Stuttgart, Georg Thieme Verlag.

- SHEN, X., ZHANG, Y., GU, Y., XU, Y., LIU, Y., LI, B. & CHEN, L. 2016. Sequential and sustained release of SDF-1 and BMP-2 from silk fibroin-nanohydroxyapatite scaffold for the enhancement of bone regeneration. *Biomaterials*, 106, 205-16.
- SHEYN, D., BEN-DAVID, S., SHAPIRO, G., DE MEL, S., BEZ, M., ORNELAS, L., SAHABIAN, A., SAREEN, D., DA, X., PELLED, G., TAWACKOLI, W., LIU, Z., GAZIT, D. & GAZIT, Z. 2016. Human Induced Pluripotent Stem Cells Differentiate Into Functional Mesenchymal Stem Cells and Repair Bone Defects. *Stem Cells Translational Medicine*, 5, 1447-1460.
- SOTIRIADOU, A. D. & JOHNSTON, L. E., JR. 1999. Expansion with vestibular shields: an experimental test of the periosteal-pull hypothesis. *Semin Orthod*, 5, 121-7.
- SPITZHORN, L.-S., MEGGES, M., WRUCK, W., RAHMAN, M. S., OTTE, J., DEGISTIRICI, Ö., MEISEL, R., SORG, R. V., OREFFO, R. O. C. & ADJAYE, J. 2019. Human iPSC-derived MSCs (iMSCs) from aged individuals acquire a rejuvenation signature. *Stem Cell Research & Therapy*, 10, 100.
- TAKAHASHI, K., TANABE, K., OHNUKI, M., NARITA, M., ICHISAKA, T., TOMODA, K. & YAMANAKA, S. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131, 861-72.
- TAKAI, E., COSTA, K. D., SHAHEEN, A., HUNG, C. T. & GUO, X. E. 2005. Osteoblast Elastic Modulus Measured by Atomic Force Microscopy Is Substrate Dependent. *Annals of Biomedical Engineering*, 33, 963-971.
- TATARD, V. M., D'IPPOLITO, G., DIABIRA, S., VALEYEV, A., HACKMAN, J., MCCARTHY, M., BOUCKENOOGHE, T., MENEI, P., MONTERO-MENEI, C. N. & SCHILLER, P. C. 2007. Neurotrophin-directed differentiation of human adult marrow stromal cells to dopaminergic-like neurons. *Bone*, 40, 360-73.
- TITUSHKIN, I. & CHO, M. 2007. Modulation of cellular mechanics during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Biophys J*, 93, 3693-702.
- TRAN, N. T., TRINH, Q. M., LEE, G. M. & HAN, Y. M. 2012. Efficient differentiation of human pluripotent stem cells into mesenchymal stem cells by modulating intracellular signaling pathways in a feeder/serum-free system. *Stem Cells Dev*, 21, 1165-75.
- UMRATH, F., STEINLE, H., WEBER, M., WENDEL, H. P., REINERT, S., ALEXANDER, D. & AVCI-ADALI, M. 2019. Generation of iPSCs from Jaw Periosteal Cells Using Self-Replicating RNA. *Int J Mol Sci*, 20.
- 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. *Int J Mol Sci*, 21.
- VAN ESTERIK, F. A., HOGERVORST, J., KOOLWIJK, P. & KLEIN-NULEND, J. 2017. Hypoxia Decreases Osteogenic Differentiation Potential but Enhances Vasculogenic Differentiation Potential of Human Adipose Stem Cells on Biphasic Calcium Phosphate Scaffolds in Fibrin Gels. *Journal of Stem Cells*, 12.
- XIA, W., LI, H., WANG, Z., XU, R., FU, Y., ZHANG, X., YE, X., HUANG, Y., XIANG, A. P. & YU, W. 2011. Human platelet lysate supports ex vivo expansion and enhances osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Cell biology international*, 35, 639-643.
- YAMANAKA, S. 2012. Induced pluripotent stem cells: past, present, and future. *Cell Stem Cell*, 10, 678-684.
- YEN, M.-H., CHEN, Y.-H., LIU, Y.-S. & LEE, O. K.-S. 2020. Alteration of Young's modulus in mesenchymal stromal cells during osteogenesis measured by atomic force microscopy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 526, 827-832.
- YOUNGSTROM, D. W., LADOW, J. E. & BARRETT, J. G. 2016. Tenogenesis of bone marrow-, adipose-, and tendon-derived stem cells in a dynamic bioreactor. *Connect Tissue Res*, 57, 454-465.

- YOUREK, G., HUSSAIN, M. A. & MAO, J. J. 2007. Cytoskeletal changes of mesenchymal stem cells during differentiation. *ASAIO journal (American Society for Artificial Internal Organs: 1992)*, 53, 219.
- YU, J. & THOMSON, J. A. 2014. Induced Pluripotent Stem Cells. In: LANZA, R., LANGER, R., VACANTI, J. (ed.) *Principles of Tissue Engineering*. Boston, MA, USA.
- YU, J., VODYANIK, M. A., SMUGA-OTTO, K., ANTOSIEWICZ-BOURGET, J., FRANE, J. L., TIAN, S., NIE, J., JONSDOTTIR, G. A., RUOTTI, V., STEWART, R., SLUKVIN, II & THOMSON, J. A. 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 318, 1917-20.
- ZERNIAL, D. M. O. 2/2020. Fallstudie: Vertikales Kieler Sushi. Grenzen respektieren. *Praktische Implantologie und Implantatprothetik (PIP)*.
- ZHAO, Q., GREGORY, C. A., LEE, R. H., REGER, R. L., QIN, L., HAI, B., PARK, M. S., YOON, N., CLOUGH, B., MCNEILL, E., PROCKOP, D. J. & LIU, F. 2015. MSCs derived from iPSCs with a modified protocol are tumor-tropic but have much less potential to promote tumors than bone marrow MSCs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112, 530-5.
- ZIESENISS, A. 2014. Hypoxia and the modulation of the actin cytoskeleton - emerging interrelations. *Hypoxia (Auckl)*, 2, 11-21.

## 7 ERKLÄRUNGEN ZUM EIGENANTEIL

Die Arbeit wurde in der Universitätsklinik für Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten, Tübingen unter der Betreuung von Frau Apl. Prof. Dr. Dorothea Alexander-Friedrich durchgeführt. Die Konzeption der Studie erfolgte durch Frau Apl. Prof. Dr. Dorothea Alexander-Friedrich, Leiterin des Forschungslabors. Die AFM-Messungen fanden im Zellbiologischen Forschungslabor der Universitätsklinik für Orthopädie, Tübingen statt und wurden durch Frau Dr. phil (PhD) Marina Danalache betreut.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Labormitglieder (Dr. Fang He und Dr. Sebastian Höflsauer) von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

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

---

Kempton, den 20.03.2024

## **8 DANKSAGUNG**

Ich möchte mich ganz herzlich bei meiner Doktormutter Prof. Dr. Dorothea Alexander-Friedrich bedanken, die mich in allen Fragen zu jeder Zeit gut betreut hat und mich stets motiviert hat, weiter zu machen. Danke!

Außerdem gilt ein großer Dank meiner Betreuerin Dr. Marina Danalache, die mich nie hängen ließ und immer den richtigen Rat zur Hand hatte.

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Felix Umrath, der immer ein offenes Ohr hatte, für die tolle Unterstützung und Ratschläge im Labor bedanken, sowie bei Herrn Dr. Sebastian Höflsauer für die Einweisung in die Welt der Rasterkraftmikroskopie.

Zu guter Letzt bedanke ich mich bei meinen Eltern Andrea und Christoph, meiner Schwester Julie und meinem Partner Dominik. Sie haben mir immer den Rücken gestärkt, an mich geglaubt und mir die Kraft gegeben, meine Ziele zu erreichen.