

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

**Einflüsse von Dexamethason bei der osteogenen  
Differenzierung von periostalen Stammzellen**

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

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

**vorgelegt von**

**Pfeifer, Achim Christof Karl**

**2024**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. S. Reinert

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. A. Badke

Tag der Disputation: 15.10.2024

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis .....	VII
Tabellenverzeichnis .....	VIII
Abkürzungsverzeichnis .....	IX
1 Einleitung .....	1
1.1 Knochen .....	2
1.1.1 Aufbau .....	2
1.1.2 Funktion.....	3
1.1.3 Knochenentwicklung und Remodelling .....	3
1.1.4 Periost .....	4
1.2 Stammzellen .....	5
1.2.1 Embryonale Stammzellen .....	5
1.2.2 Adulte Stammzellen.....	6
1.3 Tissue Engineering.....	10
1.4 Zellkulturbedingungen .....	12
1.4.1 Humanes Plättchenlysat .....	12
1.4.2 Dexamethason .....	16
1.5 Fragestellung.....	20

2	Material und Methoden .....	22
2.1	Stammzellen kultivieren und differenzieren .....	22
2.2	Färbungen.....	26
2.2.1	Alizarin Rot Färbung .....	26
2.2.2	Alizarin Rot Quantifizierung .....	27
2.3	Genexpressionsanalyse .....	28
2.3.1	RNA-Extraktion.....	28
2.3.2	cDNA-Synthese .....	29
2.3.3	quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR).....	30
2.4	Proteom Profiler .....	33
2.5	Statistik.....	35
3	Ergebnisse .....	36
3.1	Osteogene Differenzierung mit und ohne Dexamethason.....	36
3.1.1	Makroskopische Mineralisierung der Kieferperiostzellen.....	36
3.1.2	Mikroskopische Mineralisierung der Kieferperiostzellen .....	38
3.1.3	Alizarin Rot Quantifizierung .....	39
3.1.4	Expression osteogener Markergene durch Kieferperiostzellen.....	40
3.1.5	Expression chondrogener und adipogener Markergene.....	42

3.2	Veränderungen der Zelladhäsion.....	44
3.2.1	Genexpression im Zusammenhang mit extrazellulärer Matrix.....	44
3.3	Einfluss von Dexamethason auf die parakrine Proteinsekretion von Kieferperiostzellen .....	46
3.3.1	Allgemeine Proteine.....	47
3.3.2	Nicht-hämatopoetische Proteine .....	48
4	Diskussion.....	50
4.1	Osteogene Differenzierung mit und ohne Dexamethason.....	51
4.2	Expression osteogener Markergene .....	52
4.3	Expression chondrogener und adipogener Markergene .....	53
4.4	Genexpression im Zusammenhang mit extrazellulärer Matrix.....	54
4.5	Einfluss von Dexamethason auf die parakrine Proteinsekretion von Kieferperiostzellen .....	56
4.6	Limitationen.....	58
5	Zusammenfassung.....	61
6	Literaturverzeichnis .....	63
7	Anhang .....	74
7.1	Publikation von Ergebnissen dieser Dissertation .....	74
7.2	Erklärungen zum Eigenanteil der Dissertationsschrift.....	75

7.3	Danksagung .....	76
-----	------------------	----

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Herstellungsprozesses von hPL .....	13
Abbildung 2: Belegung der 6-Well Platten mit den verschiedenen Medien.....	25
Abbildung 3: Mineralisation der Kieferperiostzellen, die in vitro mit und ohne Dexamethason differenziert wurden.....	37
Abbildung 4: Mikroskop-Bilder Patient 18.....	38
Abbildung 5: Alizarinquantifizierung von Kieferperiostzellen, die für 15 Tage mit KO, OB-D und OB+D kultiviert wurden.....	39
Abbildung 6: Expression der osteogenen Markergene von Kieferperiostzellen, die 15 Tage mit KO, OB-D und OB+D kultiviert wurden.....	41
Abbildung 7: Expression der chondrogenen (COL2A1, COMP, SOX9) und adipogenen Markergene (PPAR- $\gamma$ , LEP, LPL) von Kieferperiostzellen, die 15 Tage mit KO, OB-D und OB+D kultiviert wurden .....	43
Abbildung 8: Expression Extrazellulärer Matrix Proteine von Kieferperiostzellen, die 15 Tage lang mit KO, OB-D und OB+D kultiviert wurden .....	45
Abbildung 9: Parakrine Sekretion allgemeiner Proteine von Kieferperiostzellen, die 15 Tage mit KO, OB-D und OB+D kultiviert wurden.....	47
Abbildung 10: Parakrine Sekretion nicht-hämatopoetischer Proteine von Kieferperiostzellen, die 15 Tage mit KO, OB-D und OB+D kultiviert wurden .....	48

# Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bestandteile von hPL5 und hPL10 [% Vol.] .....	24
Tabelle 2: Bestandteile des Kontrollmediums und des Osteoblastenmediums mit und ohne Dexamethason, hPL (humanes Plättchenlysat).....	25
Tabelle 3: Osteogene Markergene, die mittels qPCR analysiert wurden .....	32
Tabelle 4: Chondrogene (COL2A1, COMP und SOX9) und adipogene (LEP, LPL, PPAR-y) Markergene, die mittels qPCR analysiert wurden.....	33
Tabelle 5: Markergene im Zusammenhang mit Extrazellulären Matrix Proteinen, die mittels qPCR analysiert wurden .....	33
Tabelle 6: Genexpression osteogener Marker durch Kieferperiostzellen, die mit KO, OB-D und OB+D kultiviert wurden.....	42
Tabelle 7: Expression chondrogener (COL2A1, COMP und SOX9) und adipogener (LEP, LPL, PPAR-y) Markergene von Kieferperiostzellen, die mit KO, OB-D und OB+D kultiviert wurden.....	44
Tabelle 8: Expression Extrazellulärer Matrix Proteine von Kieferperiostzellen, die 15 Tage lang mit KO, OB-D und OB+D kultiviert wurden .....	46
Tabelle 9. Parakrine Sekretion allgemeiner Proteine von Kieferperiostzellen, die 15 Tage mit KO, OB-D und OB+D kultiviert wurden.....	48
Tabelle 10: Parakrine Sekretion nicht-hämatopoetischer Proteine von Kieferperiostzellen, die 15 Tage mit KO, OB-D und OB+D kultiviert wurden .....	49

# Abkürzungsverzeichnis

A	Amphotericin
ALP	alkalische Phosphatase
ANOVA	Varianzanalyse (engl. Analysis of Variance)
BMPR-IB	Bone-Morphogenetic-Protein-Receptor-Type-1B
BSP	Bone Sialoprotein
CFX	Ciprofloxacin
COL1A1	Kollagen-Typ 1 $\alpha$ 1
COL1A2	Kollagen-Typ 1 $\alpha$ 2
COL2A1	Kollagen-Typ 2 $\alpha$ 1
COL7A1	Kollagen-Typ 7 $\alpha$ 1
COL8A1	Kollagen-Typ 8 $\alpha$ 1
COL10A1	Kollagen-Typ 10 $\alpha$ 1
COL11A1	Kollagen-Typ 11 $\alpha$ 1
COL12A1	Kollagen-Typ 12 $\alpha$ 1
COMP	Cartilage-Oligomeric-Matrix-Protein
EZM	Extrazellulärmatrix
FACS	Fluorescence-Activated-Cell-Sorting
FBS	Fetal-Bovine-Serum (fötales Rinderserum)
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )
G	Gentamicin
HIF1 $\alpha$	Hypoxie-induzierter Faktor 1 $\alpha$
hPL	humanes Plättchenlysate
iPSCs	induzierte pluripotente Stammzellen
KO	Kontrollmedium
LEP	Leptin
LPL	Lipoprotein Lipase
MCAM	Melanoma-Cell-Adhesion-Molecule
MMP	Matrix Metalloproteinase
MRONJ	medikamenten-assoziierte Kiefernekrosen
MSCA-1	Mesenchymal-Stem-Cell-Antigen-1
MSCs	mesenchymale Stammzellen
Notch-1	Neurogenic-Locus-Notch-Homolog-Protein-1

OB-D	Osteoblastenmedium ohne Dexamethason
OB+D	Osteoblastenmedium mit Dexamethason
OCN	Osteocalcin
OGN	Osteoglycin
OPG	Osteoprotegerin
OPN	Osteopontin
OSN	Osteonectin
OSX	Osterix
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl. phosphate-buffered saline)
PC	Platelet Concentrate
POSTN	Periostin
PPAR- $\gamma$	Peroxisome-Proliferator-Activated-Receptor $\gamma$
PTH	Parathormon
RANKL	Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. revolutions per minute)
RUNX2	Runt-Related-Transcription-Factor 2
s	Sekunden
SOX9	SRY-Box-Transcription-Factor 9
SPARC	Secreted-Protein-Acidic-And-Rich-In-Cysteine
TCF/LEF	T-Cell Factor/Lymphoid Enhancer Factor
TE	Tissue Engineering
TIMP1	Tissue-Inhibitor-Of-Metalloproteinase 1
TIMP2	Tissue-Inhibitor-Of-Metalloproteinase 2
TIMP3	Tissue-Inhibitor-Of-Metalloproteinase 3
TIMP4	Tissue-Inhibitor-Of-Metalloproteinase 4
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

# 1 Einleitung

Die Lebenserwartung unserer Gesellschaft ist seit dem 19. Jahrhundert stark angestiegen. Sie hat sich vom 19. Jahrhundert bis zum Jahr 2015 mehr als verdoppelt. Im Jahr 2015 lag die Lebenserwartung bei 78,4 Jahren bei Männern und 83,4 Jahren bei Frauen. Grund für die starke Erhöhung des Lebensalters ist hauptsächlich der medizinische Fortschritt sowie die Arzneimittelentwicklung. Außerdem sorgen Faktoren wie Hygiene, Bildung sowie Arbeits- und Lebensweise dafür, dass sich auch in Zukunft die Lebenserwartung weiter erhöht (Radtke, 2019).

Mit steigender Lebenserwartung erhöht sich allerdings auch das Risiko an einem Malignom zu erkranken. Die Oropharynxkarzinome zählen mit einer Inzidenz von 2,5 bei Männern und 0,6 bei Frauen zusammen mit den Mundhöhlenkarzinomen zu den sechshäufigsten Krebsarten des Menschen (Jansen et al., 2021, Warnakulasuriya, 2009). In der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie entstehen durch die Resektion von Tumoren, aber auch durch die ablativ Chirurgie im Rahmen der Behandlung von ausgedehnten Kieferosteomyelitiden, medikamenten-assoziierten Kiefernekrosen (MRONJ) oder infizierten Osteoradionekrosen häufig größere Knochendefekte. Die Rekonstruktion dieser Knochendefekte zur Wiederherstellung der Gesichtsästhetik als auch zur funktionellen Rehabilitation des Kauens, Schluckens und Sprechens stellt eine stetige Herausforderung in der rekonstruktiven Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie dar. Neben der weichgewebigen Rekonstruktion kann die knöchernen Rekonstruktion alloplastisch, d.h. mittels Rekonstruktionsplatte oder simultan mittels autologer Knochen transplantation erfolgen. Für die simultane knöchernen Rekonstruktion haben sich mehrere autologe mikrovaskuläre Lappen etabliert, z.B. aus dem Wadenbein (Fibula), dem Beckenkamm oder dem Schulterblatt (Scapula). Nachteil aller autologer Knochen transplantate ist die Hebmorbidity an der Entnahmestelle (engl. donor site morbidity). Deshalb beschäftigt sich die translationale Medizin mit der Entwicklung neuartiger Knochenkonstrukte mittel Tissue Engineering (TE) zur Rekonstruktion weitspanniger Knochendefekte. Eine der Herausforderungen besteht in der Gestaltung von Zellkulturbedingungen, die einen späteren Transfer des TE-Konstruktes in den Menschen erlauben.

## 1.1 Knochen

Der Knochen ist ein komplexes System, das in der Lage ist, sich selbst effektiv zu optimieren, um bestimmte Funktionen zu erfüllen. Knochen verfügt über wichtige mechanische Eigenschaften. Die besondere Steifigkeit, die Festigkeit und das gleichzeitig verhältnismäßig geringe Gewicht des Knochens sind das Ergebnis einer lebenslangen Reorganisation als Reaktion auf die vorherrschenden mechanischen und chemischen Reize. Der Prozess des Knochenumbaus ist für eine ordnungsgemäße Knochenfunktion unerlässlich. (Naili et al., 2011).

### 1.1.1 Aufbau

Makroskopisch wird Knochen in kortikaler und trabekulärer bzw. spongiöser Knochen eingeteilt. Kortikaler Knochen bildet die oberflächliche Schicht der Knochen. Die Kortikalis besteht aus dichtem kompaktem Gewebe, das von Blutgefäßen und Kanälchen durchdrungen wird. Diese umgeben die Osteozyten und ihre verbindenden zellulären Fortsätze. Trabekulärer Knochen hingegen liegt im Inneren des Knochens und besteht aus einem schwammartigen Netzwerk von dünnen Knochenbälkchen (Trabekeln), die vom Knochenmark umgeben sind. Die Trabekel sind nicht vaskularisiert, sodass die Versorgung der Osteozyten über Diffusion aus Knochenmarksgefäßen erfolgt. In ihrer zellulären und molekularen Zusammensetzung sind sich kortikaler und trabekulärer Knochen sehr ähnlich. In beiden Fällen handelt es sich um Lamellenknochen. Sie unterscheiden sich jedoch erheblich in ihrer Funktion und den mechanischen Eigenschaften (Grabowski, 2009).

Mikroskopisch setzt sich Knochen aus vier verschiedenen Zelltypen und der mineralisierten Extrazellulärmatrix (EZM) zusammen. Die mineralisierte Extrazellulärmatrix setzt sich im Wesentlichen aus Kollagenfibrillen und Hydroxylapatit-Kristallen zusammen. Zu den vier Knochenzelltypen zählen die Saumzellen („bone lining cells“), Osteoblasten, Osteozyten und die Osteoklasten.

Die Saumzellen sind der zelluläre Hauptbestandteil des Endosts. Sie bedecken sämtliche knöchernen Oberflächen und stellen zum Großteil ruhende Osteoblasten und Osteoblasten-Vorstufen (Osteoprogenitor-Zellen) dar (Amizuka et al., 2014). Saumzellen, Osteoblasten und Osteozyten sind miteinander verwandt, da sie alle aus

mesenchymalen Stammzellen entstehen. Osteoklasten hingegen entstehen aus hämatopoetischen Stammzellen. Osteoblasten sorgen für die Bildung der Knochenmatrix. Sie sezernieren Kollagen und leiten die Mineralisation ein, indem sie alkalische Phosphatase (ALP) und Matrixvesikel bilden. Die alkalische Phosphatase wird im Knochen zur Spaltung von Pyrophosphat in Phosphat benötigt. Phosphat dient zusammen mit Calcium zur Bildung des Knochenminerals Hydroxylapatit. Osteozyten sind terminal differenzierte Osteoblasten und haben mechanosensorische Fähigkeiten. Sie sind vollständig durch die mineralisierte extrazelluläre Matrix umgeben. Durch Sekretion von spezifischen Wirkstoffen steuern sie den Knochenumbau und verhindern übermäßigen Knochenaufbau. Osteozyten sind über ihre fingerförmigen Zellfortsätze sowohl untereinander als auch mit den umliegenden Saumzellen und Osteoblasten verbunden. Osteoklasten besitzen mehrere Zellkerne und haben die Aufgabe, mineralisierte Knochenmatrix abzubauen (Lüllmann-Rauch and Asan, 2019).

### **1.1.2 Funktion**

Knochen hat drei physiologische Hauptfunktionen. Die mechanischen Eigenschaften des Knochens bieten Schutzfunktion für empfindliche innere Organe und Stützfunktion bei Fortbewegung. Daneben dient Knochen als Kalzium und Phosphatspeicher im Körper und bietet dem Knochenmark eine Umgebung für die Entwicklung von hämatopoetischen Zellen (Grabowski, 2009).

Die druckfesten Hydroxylapatitkristalle lagern sich longitudinal an die zugfesten Kollagenfibrillen an. Durch diese besondere Bauweise der Extrazellulären Matrix, die dem Aufbau von Stahlbeton ähnelt, ist Knochen ausgesprochen biegefest (Lüllmann-Rauch and Asan, 2019).

### **1.1.3 Knochenentwicklung und Remodelling**

Die Knochenentwicklung (Osteogenese) beginnt in der Embryonalphase mit einer Verdickung des Mesenchyms. Für die weitere Knochenentstehung gibt es zwei Möglichkeiten. Bei der desmalen Osteogenese differenzieren sich die Mesenchymzellen direkt zu Osteoblasten, welche dann das Knochengewebe herstellen. Das Neurocranium und das Viscerocranium sind größtenteils Beispiele für die desmale Ossifikation. Bei der

chondralen Ossifikation hingegen entwickeln sich die Mesenchymzellen zunächst zu Chondroblasten, welche ein vorübergehendes Knorpelmodell des nachfolgenden Knochens bilden. Anschließend wird das Knorpelmodell Stück für Stück zu Knochen umgebaut. Die Schädelbasis und die meisten Knochen des Körpers entstehen chondral.

Aufgrund von Materialermüdung und Mikrotraumata ist ein ständiger Materialaustausch notwendig. Im Knochen kommt es lebenslang zu Umbau- bzw. Ausbesserungsarbeiten (Remodeling). Dabei werden bei Erwachsenen Patienten ungefähr 10% ihrer Knochenmasse pro Jahr ersetzt (Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil et al., 2006). Das Remodeling wird von Osteozyten durch Ausschüttung von RANKL und die Benachrichtigung der Saumzellen mittels ihrer Zellfortsätze eingeleitet. RANKL aktiviert die Osteoklasten. Beim Remodeling arbeiten Osteoklasten und Osteoblasten temporär und regional organisiert hintereinander (Lüllmann-Rauch and Asan, 2019).

#### **1.1.4 Periost**

Das Periost umhüllt den Großteil der äußeren kortikalen Knochenschicht und setzt sich aus zwei Schichten zusammen: Das Stratum fibrosum und das Stratum osteogenicum.

Das Stratum fibrosum bildet die äußere zellarme Schicht und besteht aus straffem Bindegewebe, Fibroblasten, kollagenen Fasern und elastischen Sharpey-Fasern. Die Sharpey-Fasern dienen der Befestigung des Periosts auf dem Knochen. Sie verlaufen durch das Stratum osteogenicum zum Knochen und sind in der Substantia corticalis verankert. Unter dem Stratum fibrosum liegt das Stratum osteogenicum, welches direkt an der Knochenoberfläche anliegt. Das Stratum osteogenicum enthält neben Nerven und Blutgefäßen auch mesenchymale Stammzellen (MSCs), Osteoprogenitor-Zellen, Osteoblasten und Osteoklasten. Osteoprogenitor-Zellen sind Osteoblasten-Vorstufen, die durch Festlegung auf die Osteoblastenlaufbahn von den mesenchymalen Stammzellen abstammen (Lüllmann-Rauch and Asan, 2019, Wang et al., 2017).

Progenitorzellen haben ähnliche aber potenziell stärker eingeschränkte Eigenschaften wie ihre ursprüngliche Stammzelle. Im Vergleich zu Stammzellen sind sie nicht mehr in der Lage sich selbst zu erneuern. Außerdem sind sie oft unipotent und können nur noch in einen Zelltyp differenzieren (Dulak et al., 2015). Durch die oberflächliche Lage auf

dem Knochen reagiert Periost besonders sensibel auf mechanische Reize. Dadurch induziert mechanische Belastung neue Knochenbildung aus dem Periost.

Periostale Stammzellen sind aufgrund der einfachen Gewinnung und ihres ausgeprägten Expansionspotenzials eine vielversprechende Zellquelle für das Tissue Engineering (Ferretti and Mattioli-Belmonte, 2014).

## **1.2 Stammzellen**

Stammzellen sind Zellen, die in der Lage sind, sich selbst zu kopieren und in spezialisierte Zelltypen und Gewebe auszdifferenzieren (Biswas and Hutchins, 2007). Durch die asymmetrische Zellteilung einer Stammzelle entsteht eine neue Stammzelle sowie eine differenzierungsfähige Zelle. Die neue Stammzelle hat die identischen Eigenschaften der Mutterzelle und dient der Aufrechterhaltung des Stammzellreservoirs. Die differenzierungsfähige Zelle kann sich zu spezialisierten somatischen Zellen entwickeln. Stammzellen lassen sich abhängig von ihrem Potential, sich in verschiedene Körperzellen zu differenzieren, in verschiedene Stammzelltypen untergliedern. Man unterscheidet totipotente, pluripotente und multipotente Stammzellen. Zu den totipotenten Stammzellen gehören lediglich befruchtete Eizellen bis zum 8-Zellstadium. In diesem frühen embryonalen Stadium haben die Stammzellen noch die Fähigkeit ein vollständiges Individuum zu bilden. Pluripotente Stammzellen sind in der Lage, Körperzellen aller drei Keimblätter (Ektoderm, Mesoderm und Entoderm) zu bilden. Hierzu gehören embryonale Stammzellen und induzierte pluripotente Stammzellen (iPSCs). Multipotente Stammzellen wie die adulten Stammzellen sind bereits so weit spezialisiert, dass sie lediglich bestimmte Zelltypen bilden können. Beispielsweise können Stammzellen der Haut die verschiedenen Hautzelltypen bilden, allerdings keine Nervenzellen oder Knochenzellen mehr.

### **1.2.1 Embryonale Stammzellen**

Als pluripotente Stammzellen sind embryonale Stammzellen in der Lage, in alle Körperzellen zu differenzieren. Außerdem lassen sie sich uneingeschränkt vermehren und sind damit eine sehr attraktive Spenderquelle für den Zellersatz. Allerdings kommen

embryonale Stammzellen nur in einer sehr frühen embryonalen Entwicklungsphase in der Blastozyste vor. Im adulten Körper sind sie nicht mehr verfügbar.

Für die Gewinnung von embryonalen Stammzellen werden überzählige Eizellen bei der künstlichen Befruchtung genutzt. Diese lässt man im Labor weiter teilen, sodass im weiteren Verlauf eine Blastozyste entsteht. Dabei enthält der innere Zellhaufen der Blastozyste die embryonalen Stammzellen. Diese können dann isoliert werden und haben die Fähigkeit, bei kontrollierten Bedingungen alle Zelltypen des menschlichen Körpers zu bilden (Biswas and Hutchins, 2007).

Allerdings ist die Gewinnung von humanen embryonalen Stammzellen in Deutschland nicht erlaubt, da dies aus ethischen Gründen als nicht vertretbar angesehen wird. Auch der Import von humanen embryonalen Stammzellen aus dem Ausland für Forschungszwecke ist verboten bzw. nur mit Sondergenehmigungen möglich.

## **1.2.2 Adulte Stammzellen**

Adulte Stammzellen existieren praktisch in jedem Gewebe des menschlichen Organismus. Als multipotente Stammzellen besitzen sie allerdings nur noch die Fähigkeit, die unterschiedlichen Zellen eines spezifischen Gewebes zu bilden. Bei Verletzungen, Erkrankungen oder durch den natürlichen Zelltod werden die adulten Stammzellen aktiviert, differenzieren zu neuen spezialisierten Körperzellen und ersetzen das geschädigte Gewebe. Durch ihr hohes Proliferationspotenzial und ihre regenerativen Eigenschaften haben sie das Potenzial, zukünftig vielfältige degenerative Erkrankungen zu behandeln (Cable et al., 2020).

Eine weit verbreitete Methode zur Gewinnung von adulten Stammzellen ist die Entnahme mittels Knochenmarkpunktion. Außerdem können Stammzellen beispielsweise durch die Injektion von Wachstumsfaktoren ins Blut gelockt werden und dann aus dem peripheren Blut gewonnen werden (Brown et al., 2019).

Die Forschung mit adulten Stammzellen, insbesondere des blutbildenden Systems, bietet vielfältige bereits heute etablierte Therapiemöglichkeiten. Bei Leukämiepatienten kann das blutbildende System komplett zerstört werden und dann durch Stammzellen

eines gesunden Spenders wieder aufgebaut werden (allogene Transplantation) (Bozdağ et al., 2018).

Adulte Stammzellen werden u.a. in hämatopoetische und mesenchymale Stammzellen untergliedert. Hämatopoetische Stammzellen befinden sich hauptsächlich im Knochenmark und sind für die Bildung von Blutzellen wie Erythrozyten, Leukozyten oder Thrombozyten verantwortlich. Im Folgenden wird nun speziell auf die mesenchymalen Stammzellen eingegangen.

Mesenchymale Stammzellen (MSCs) entstammen aus dem mesodermalen Keimblatt und sind in der Lage, sich zu den Zellen des mesenchymalen Gewebes (Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten) zu differenzieren. Deshalb sind für das Knochen-Tissue-Engineering insbesondere mesenchymale Stammzellen von Bedeutung. Sie können aus den verschiedensten Geweben im Körper isoliert werden wie beispielsweise aus dem Knochenmark, der Nabelschnur, dem Menstruationsblut oder dem Fettgewebe (Brown et al., 2019). Durch die multipotenten Eigenschaften, die einfache Gewinnung und zugleich beträchtliche Quantität an Stammzellen sind diese Quellen sehr nützlich für experimentelle und klinische Anwendungen. Die Verfahren zur Gewinnung und Verwendung mesenchymaler Stammzellen werden ständig erweitert, sodass es zunehmend auch möglich ist, sie aus anderen Geweben zu isolieren (Ding et al., 2011). Außerdem sind die ethischen und rechtlichen Regelungen bei mesenchymalen Stammzellen weniger problematisch als bei embryonalen Stammzellen.

Seit einigen Jahren ist bereits bekannt, dass MSCs vielfältige Einflüsse auf das Immunsystem haben. Sie regulieren viele Funktionen von angeborenen Immunzellen, wie die Antigenpräsentation von dendritischen Zellen, die Zytotoxizität von natürlichen Killerzellen und die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten. Außerdem hemmen MSCs die T-Zellproliferation und beeinträchtigen die Antikörperproduktion von B-Zellen. Nach der intravenösen Injektion von MSCs können sie sich in entzündeten Geweben ansiedeln und durch die Freisetzung von antiinflammatorischen und anti-apoptischen Substanzen einen wirksamen gewebeschützenden Effekt ausüben. Aufgrund dessen könnten MSCs auch zur Behandlung von immunvermittelten Erkrankungen wie z.B. Allergien zur Anwendung kommen (Uccelli et al., 2008).

In der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie sind besonders MSCs des Kieferperiosts eine vielversprechende Quelle für neue zellbasierte TE-Konstrukte. Bei vielen Operationen in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie können zeitgleich ohne weitere Gewebetraumatisierungen kleine Kieferperiostproben entnommen werden. Im Vergleich zu MSCs des Knochenmarks sind die Stammzellen des Kieferperiosts leichter zu erreichen und haben eine größere Proliferationsrate und Stammzellfähigkeit (engl. stemness) (Ceccarelli et al., 2016). Außerdem zeigen periostale Stammzellen von älteren Patienten vergleichbare Eigenschaften wie die von jüngeren Patienten. Dies hängt möglicherweise mit der Stabilität der Telomere zusammen. *In vitro* Untersuchungen haben ergeben, dass nach 24 Populationsverdopplungen die Telomerlänge und Telomerase-Aktivität ähnlich zu den elterlichen Beständen ist (Ferretti and Mattioli-Belmonte, 2014). Aufgrund der genannten Vorteile wurden in der vorliegenden Arbeit speziell periostale Stammzellen des Ober- und Unterkiefers verwendet.

#### **1.2.2.1 Osteogene Differenzierung von MSCs**

Die osteogene Differenzierung von MSCs *in vitro* ist heutzutage eine weit verbreitete Methode, um sowohl diverse physiologische und pathologische Knochenprozesse zu untersuchen als auch mittels TE Knochen herzustellen.

Da alle Zellen eines Organismus die gleiche genetische Ausstattung haben, gibt die Aktivität von bestimmten Genen (Genregulation) die Erscheinungsform einer Zelle an, d.h. sie bestimmt die Aufgabe der Zelle. Die Genregulation sorgt mithilfe von Transkriptionsfaktoren dafür, dass Proteine zum richtigen Zeitpunkt und in den passenden Zellen hergestellt werden können. Bei der Differenzierung von MSCs zu den verschiedenen Zellarten spielen neben den Transkriptionsfaktoren auch verschiedene Zytokine, Wachstumsfaktoren und extrazelluläre Matrixmoleküle eine wichtige Rolle (Almalki and Agrawal, 2016).

Die osteogene Differenzierung von MSCs wird durch eine Rangfolge von Transkriptionsfaktoren gesteuert, die in einer vorgegebenen zeitlichen Abfolge exprimiert werden. Die Festlegung auf die Knochenlinie wird zunächst durch die Expression des Transkriptionsfaktors RUNX2 gesteuert (Franceschi et al., 2007).

RUNX2 lenkt dann die mesenchymalen Progenitorzellen zu Präosteoblasten und inhibiert gleichzeitig die chondrogene und adipogene Zelllinie (Komori, 2006). Im weiteren Verlauf fördert RUNX2 die Expression der frühen osteogenen Marker ALP (Alkalische Phosphatase) (Green et al., 1990) und OSX (Osterix) sowie die Expression der späten osteogenen Marker COL1A1 (Kollagen-Typ 1 $\alpha$ 1), OPN (Osteopontin), BSP (Bone Sialoprotein) und OCN (Osteocalcin). Diese sequenzielle Hochregulierung führt dann zur Reifung der Osteoblasten und zur Ablagerung von mineralisierter EZM (Franceschi and Xiao, 2003).

Um die osteogene Differenzierung von MSCs *in vitro* anzuregen, wird die konfluente Einzelschichtkultur häufig mit 10% FBS (Fetal Bovine Serum) behandelt, das durch Ascorbinsäure (Vitamin C),  $\beta$ -Glycerophosphat und Dexamethason ergänzt wird (Chen et al., 2016, Hanna et al., 2018). Vitamin C dient der Sekretion von Kollagen 1,  $\beta$ -Glycerophosphat fungiert als Phosphatkomponente für die Kristallisation von Hydroxylapatit und Dexamethason wird verwendet, um die Expression von RUNX2 anzuregen (Langenbach and Handschel, 2013). Allerdings werden der Nutzen und die Wirkmechanismen der standardmäßigen Dexamethason-Substitution in der Fachwelt kontrovers diskutiert. Um die Einflüsse von Dexamethason bei der osteogenen Differenzierung periostaler Stammzellen zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit neben einem Kontrollmedium zwei spezielle Osteoblastenmedien verwendet (Osteoblastenmedium ohne Dexamethason (OB-D) und Osteoblastenmedium mit Dexamethason (OB+D)) (siehe Tabelle 2; Seite 25). Auf die Relevanz der Bestandteile hPL und Dexamethason wird in den entsprechenden Kapiteln (1.4.1 Humanes Plättchenlysate und 1.4.2 Dexamethason) näher eingegangen.

*In vivo* läuft die osteogene Differenzierung hingegen stets als Prozess ab, der in einer dreidimensionalen Nische stattfindet (Brunet et al., 2023). Die Nische beschreibt dabei nicht nur ihre Lage, sondern bezeichnet eine ganze Reihe von Faktoren, die auf die Zellen einwirken. Dazu gehören die räumliche Anordnung von verschiedenen Zelltypen relativ zueinander, die Interaktion von Zellen mit den extrazellulären Matrixproteinen und das interzelluläre Zusammenspiel, das sich durch ihre parakrine Aktivität ergibt. Aus diesem Grund sollten die Bedingungen bei der Kultivierung *in vitro* möglichst nah an den ursprünglichen Gegebenheiten der natürlichen Nische sein (Bryniarska et al., 2019).

## 1.3 Tissue Engineering

Knochen ist nach Blut das zweithäufigste transplantierte Gewebe (Van Heest and Swiontkowski, 1999). In der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie stellt die Behandlung von ausgedehnten, angeborenen und erworbenen Knochendefekten häufig eine große Herausforderung dar. Obwohl bereits vielfältige Rekonstruktionsmethoden mit autologen, allogenen und xenogenen Knochentransplanten zur Verfügung stehen, existieren weiterhin Limitationen wie beispielsweise die Hebemorbidity an der Entnahmestelle und inkonsistente Therapieergebnisse (Aghali, 2021). Außerdem werden die Rekonstruktionsziele wie die Wiederherstellung der ursprünglichen Form und Funktion häufig nicht vollständig erreicht (Costello et al., 2010). Deshalb sind weitere universelle Rekonstruktionsmethoden sehr gefragt und das Knochen Tissue Engineering (TE) beschäftigt sich bereits seit rund drei Jahrzehnten mit der Herstellung von Knochenkonstrukten *in vitro*.

Das TE wurde erstmals von Langer und Vacanti im Jahre 1993 definiert. Sie beschrieben es als Forschungsgebiet, das die Prinzipien der Biologie und des Ingenieurwesens anwendet, um funktionellen Ersatz für geschädigtes Gewebe zu entwickeln (Langer and Vacanti, 1993).

Zur Erzeugung von Knochen werden beim TE verschiedene Vorgänge und Abläufe angewendet. Zunächst werden körpereigene Zellen entnommen und *in vitro* kultiviert und vermehrt. Im Rahmen dieser Dissertation werden speziell diese Prozesse untersucht. Auf die weiteren Vorgänge wie das dreidimensionale Knochengestüt (Scaffold) und die anschließende Übertragung der Zellen in das Knochengestüt unter Verwendung verschiedener Wachstumsfaktoren sowie die mechanische Stimulation zur Stabilisierung des Knochengewebes und die anschließende Transplantation in den Körper (Al-Hijailan, 2019) wird in dieser Dissertation nicht weiter eingegangen. Die Abläufe beschreiben nur sehr rudimentär die in der Realität auftretende außerordentlich hohe Komplexität natürlicher Systeme. Diese weisen in der Realität eine vielschichtige Struktur mit anisotroper, inhomogener und gerichteter Anordnung der Zellen sowie der extrazellulären Matrix auf. Diese Gewebeorganisation mit hoher Strukturkomplexität ist häufig untrennbar mit der physiologischen Funktion verbunden. Beispielsweise

ermöglicht die zonale Organisation des Knorpels und des Knochens eine effektive Kraftübertragung über die osteochondrale Schnittstelle (Armstrong and Stevens, 2020).

Das TE hat seit Beginn bereits große Fortschritte gemacht. Beispielsweise wurden bereits flache, röhrenförmige und hohle nicht röhrenförmige Organstrukturen (z.B. die Trachea oder Blutgefäße) hergestellt und erfolgreich bei Patienten implantiert. Dafür wurde z.B. eine Luftröhre von einem verstorbenen Spender dezellularisiert und mit dem respiratorischen Epithel und den mesenchymalen Stromazellen des Empfängers besiedelt (Shafiee and Atala, 2017). Beim Knochen gibt es trotz umfangreicher Forschung zur osteogenen Differenzierung und zum Knochen-TE nur ein geringes Translationspotenzial der *in vitro* Ergebnisse auf *in vivo* Studien (Hulsart-Billström et al., 2016). Ein Hauptproblem sind dabei die Zellkulturbedingungen für die *in vitro* Untersuchungen. Deshalb müssen die Protokolle für die osteogene Differenzierung und die Untersuchungen von Knochen *in vitro* überdacht und weiter untersucht werden.

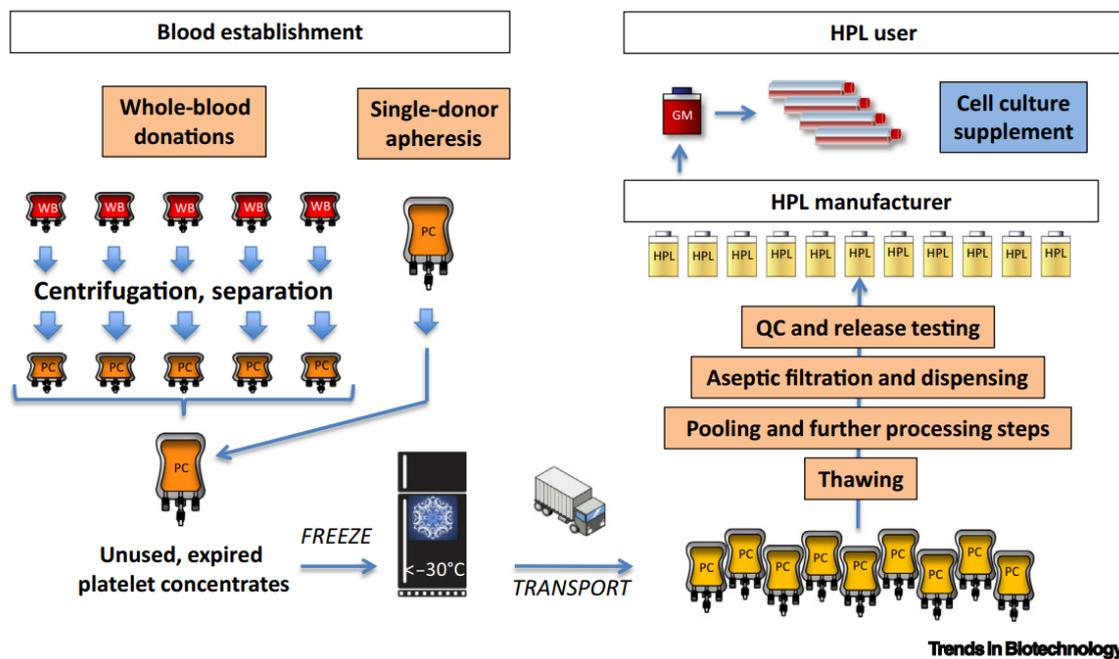
## 1.4 Zellkulturbedingungen

### 1.4.1 Humanes Plättchenlysat

Bei den Zellkulturbedingungen des Knochen-TEs spielt auch das verwendete Medium eine wichtige Rolle. Bisher wird für die Kultivierung von MSCs *in vitro* nach wie vor fetales Kälberserum (FBS) häufig verwendet, obwohl es im Vergleich zu humanem Plättchenlysat (hPL) einige gravierende Nachteile hat (Altaie et al., 2016). FBS birgt das potentielle Risiko der Übertragung verschiedener Krankheitserreger sowie der Xenotransplantation gegen Rinderantigene. Darüber hinaus ist der Herstellungsprozess von fetalem Kälberserum hinsichtlich des Tierschutzes ethisch bedenklich und von der europäischen Arzneimittelagentur (EMA) wird gefordert, dass tierische Rohstoffe für die Herstellung von Zelltherapeutika vermieden werden sollen (Oeller et al., 2021). Fetales Kälberserum wird aus dem Blut von Rinderföten gewonnen. Dazu werden die Rinder geschlachtet. Nach der Schlachtung des Muttertiers wird der Fötus entnommen, die Fruchtblase eröffnet und das Blut entnommen (Weber and Wagner, 2021).

Deshalb müssen für das Knochen-TE Serum-freie Kultur- und Differenzierungsbedingungen der MSCs *in vitro* etabliert werden, um zukünftig eine Genehmigung zur Anwendung in Patienten zu erhalten (Brauchle et al., 2017). Dafür bietet sich hPL als effektive Alternative an.

HPL wird bereits seit einigen Jahren als Ersatz für FBS erfolgreich bei der Ex-vivo-Expansion von MSCs verwendet (Henschler et al., 2019). Es ist ein zellfreies, protein- und wachstumsfaktorreiches biologisches Material, das meist aus humanen Plättchenkonzentraten (PC), die ursprünglich für die Transfusion bestimmt waren, produziert wird (Schallmoser et al., 2020). Plättchenkonzentrat kann entweder mit antikoagulierten Vollblutspenden (WB) oder mithilfe eines speziellen Thrombozytenentnahmeverfahrens namens Thrombozytapherese gewonnen werden (siehe Abbildung 1).



Trends in Biotechnology

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Herstellungsprozesses von hPL. WB (Whole Blood); PC (Platelet Concentrate); GM (Growth Medium); Quelle: (Schallmoser et al., 2020)

Die Vollblutspenden können aufgrund von Dichteunterschieden der Bestandteile durch Zentrifugation in Erythrozytenkonzentrat, das Buffy-Coat (Leukozyten & Thrombozyten) und Blutplasma aufgetrennt werden. Um die für Transfusionszwecke benötigte Thrombozytenzahl zu erhalten, werden von vier bis sechs Vollblutspenden die Erythrozyten und das Blutplasma entfernt. Aus den übrigbleibenden Buffy-Coat-Einheiten werden anschließend durch Filtration noch die Leukozyten entfernt, sodass ein hochkonzentriertes Plättchenkonzentrat entsteht. Im hergestellten Plättchenkonzentrat ist die Thrombozytenkonzentration um das Vier- bis Fünffache höher als im physiologischen Blutkreislauf (Schallmoser et al., 2020).

Im Gegensatz zur Gewinnung von Thrombozyten mittels Vollblutspenden wird bei der Thrombozytapherese nur ein Spender benötigt. Bei der Thrombozytapherese wird Blut in seine Bestandteile aufgetrennt und die Thrombozyten werden mit etwas Plasma entnommen. Die restlichen Blutbestandteile werden dem Spender reinfundiert (Schrezenmeier and Seifried, 2010).

Blutplättchen (Thrombozyten) speichern neben verschiedenen Gerinnungsfaktoren auch eine Reihe von bioaktiven Mediatoren in ihren alpha-Granula, einschließlich

verschiedener Chemokine und Wachstumsfaktoren (Burnouf et al., 2016). Um an die Wachstumsfaktoren der Thrombozytenkonzentrate zu gelangen, ist eine komplette Degranulation bzw. das Eröffnen der Granula notwendig. Dies wird meist durch Einfrier- und Auftauvorgänge erreicht.

Bei der Herstellung von hPL werden unbenutzte Plättchenkonzentrate bei Erreichen des Haltbarkeitsdatums eingefroren und zur humanen Plättchenlysate-Produktionsanlage transportiert (siehe Abbildung 1). Dort werden die Thrombozytenkonzentrate aufgetaut, vereinigt und weiterverarbeitet und in das endgültige hPL dosiert. Thrombozytenkonzentrate müssen negativ auf mikrobiologische Kontaminationen wie Bakterien und Pilze getestet werden (Schallmoser et al., 2020). Das in der vorliegenden Arbeit verwendete humane Plättchenlysate wurde im Institut für Transfusionsmedizin Tübingen mit der behördlichen Genehmigung nach §13 des Arzneimittelgesetzes vom Regierungspräsidium Tübingen hergestellt. Die verwendeten Thrombozytenkonzentrate wurden dort mittels Apherese gewonnen und das Plättchenlysate wurde durch mehrfache Einfrier- und Auftauprozesse hergestellt.

Das hPL wird anstelle von FBS als Ergänzung im Zellwachstumsmedium verwendet. In einer früheren Publikation wurde bereits gezeigt, dass die Verwendung von Serum-freiem Medium im Vergleich zu FBS bei der Kultivierung von Kieferperiostzellen die Proliferationsrate steigert und die Zellgröße verringert. Des Weiteren begünstigt das Serum-freie Medium eine frühere, aber schwächere Mineralisierung der Kieferperiostzellen (Alexander et al., 2013). Außerdem wird durch Kultivierung mit Serum-freiem Medium die Selektion einer Subpopulation mit MSCA-1 Oberflächenmarker gefördert, welche erhöhte osteogene Eigenschaften aufweist (Alexander et al., 2013). Mithilfe der Raman-Spektroskopie konnte unter Serum-freien Zellkulturbedingungen auch eine frühere Mineralisation der EZM mit besser Qualität gezeigt werden. Allerdings war dabei das Ausmaß der Mineralisierung nicht zufriedenstellend (Brauchle et al., 2017). Um speziell die Eignung von hPL für die osteogene Differenzierung von Kieferperiostzellen *in vitro* zu überprüfen, wurde das Proliferations- und Mineralisationspotenzial dieser Zellen mit hPL und FBS untersucht. Dabei konnte mit hPL, wie bei den vorherigen Untersuchungen mit Serum-freiem Medium, eine höhere Proliferation und geringere Zellgröße der Kieferperiostzellen festgestellt werden. Außerdem wurde auch mit hPL eine Zunahme der

mineralisierungsfähigen Osteoprogenitor-Zellen mit dem Oberflächenmarker MSCA-1 deutlich und das Mineralisationspotenzial der Kieferperiostzellen mit hPL-Kultivierung war der FBS-Kultivierung sogar deutlich überlegen (Wanner et al., 2017). In einer aktuellen Publikation wurde außerdem gezeigt, dass hPL im Vergleich zu FBS bei der osteogenen Differenzierung von Kieferperiostzellen auch die Mineralisierungsqualität in Bezug auf die biomechanische Zusammensetzung und die mechanischen Eigenschaften erhöht (Danalache et al., 2019). Durch die etablierte Serum-freie Zellkulturbedingungen der Kieferperiostzellen mit hPL sind die *in vitro* Bedingungen bereits deutlich näher an der natürlichen Situation *in vivo*. Allerdings stellt bei den Zellkulturbedingungen aktuell das synthetische Glukokortikoid Dexamethason ein mögliches Problem dar.

## 1.4.2 Dexamethason

Dexamethason wird zwar häufig benutzt um die osteogene Differenzierung von MSCs *in vitro* zu induzieren, birgt aber gleichzeitig auch die Gefahr, die terminale Osteoblastendifferenzierung zu hemmen (Rimando et al., 2016). Außerdem werden in der Literatur weitere widersprüchliche Auswirkungen von Dexamethason beschrieben (Della Bella et al., 2021). Da die genauen Mechanismen von Dexamethason bei der osteogenen Differenzierung von MSCs bis heute nicht genau verstanden sind (Rimando et al., 2016) und es möglicherweise auch weitere Nachteile mit sich bringt, müssen die Einflüsse und die Notwendigkeit von Dexamethason weiter erforscht werden.

Dexamethason ist ein synthetisches Glukokortikoid und gehört zur großen Gruppe der Steroidhormone bzw. Kortikosteroide (kurz Kortikoide).

Steroidhormone beruhen auf der Cholesterinstruktur und sind dadurch lipophil. Deshalb sind sie membranpermeabel und gelangen über einfache Diffusion ins Zytosol (Lang and Föller, 2019a). Sie wirken hauptsächlich über intrazelluläre Rezeptoren, die im Zytosol und größtenteils im Zellkern lokalisiert sind. Diese Rezeptoren beeinflussen nach Bindung an spezifische DNA-Sequenzen die Transkription bestimmter Gene. Dadurch regulieren sie die Synthese der betreffenden Proteine. Im Gegensatz zu Peptid- und Proteohormonen, die über membranständige Rezeptoren wirken und sich deshalb durch einen raschen Wirkeintritt auszeichnen, wirken Steroidhormone erst mit einer zeitlichen Verzögerung. Infolgedessen sind Steroidhormone hauptsächlich für die Vermittlung langanhaltender Effekte entscheidend.

### 1.4.2.1 Dexamethason *in vivo*

*In vivo* ist das therapeutische Einsatzgebiet von Dexamethason als Medikament durch seine antiinflammatorische und immunsuppressive Wirkung sehr umfangreich. Durch die entzündungshemmende Wirkung wird es häufig zur Behandlung von entzündlichen, nicht infektiösen Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis und Asthma eingesetzt. Außerdem wird es durch seine immunsuppressive Wirkung zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen wie systemischem Lupus erythematoses und Allergien verwendet. Des Weiteren wird es bei Organtransplantationen zur Verhinderung von Abstoßungsreaktionen eingesetzt (Lane, 2019). Daneben findet es Anwendung als

Substitutionstherapie bei endokrinen Krankheiten wie z.B. der Nebennierenrindeninsuffizienz (Morbus Addison) (Kurtz et al., 2014).

Glukokortikoide haben weitreichende Effekte in nahezu jedem Stoffwechselfvorgang, da jede Zelle des Körpers Glukokortikoidrezeptoren besitzt. Die Auswirkungen sind jeweils von der spezifischen Aufgabe der Zelle abhängig. Deshalb besteht bei Glukokortikoidtherapie häufig das Risiko von erheblichen Nebenwirkungen. Diese müssen vor dem Hintergrund meist schwerer Grundkrankheiten in Kauf genommen werden (Kurtz et al., 2014).

Glukokortikoide haben auch umfangreiche Einflüsse auf das Immunsystem. Bei medikamentöser Langzeitanwendung verringern Glukokortikoide die Antikörperproduktion (Kurtz et al., 2014). Außerdem reduzieren Glukokortikoide die Abwanderung der neutrophilen Granulozyten aus dem Blut und verringern die Entstehung anderer Immunzellen, wie eosinophile und basophile Granulozyten, Monozyten und T-Lymphozyten. Des Weiteren reduzieren sie die Entstehung bzw. die Freisetzung von Entzündungsvermittlern wie Prostaglandinen, Interleukinen, Lymphokinen, Histamin und Serotonin. Darüber hinaus hemmen Glukokortikoide die Zytokinese und das Wachstum sowie die Kollagensynthese und beeinträchtigen damit die Reparaturmechanismen bei Verletzungen und Entzündungen (Lang and Föller, 2019b).

Im Knochen verringern Glukokortikoide die Osteoblastenaktivität und unterstützen die Osteoklastenaktivität (Lang and Föller, 2019b). Dadurch kann die Dexamethason-Langzeittherapie zu einer schwerwiegenden Dexamethason-induzierten Osteoporose führen (Li et al., 2013, Weinstein, 2012). Die medikamentöse Therapie mit Glukokortikoiden ist die häufigste Ursache für sekundäre Osteoporose und die Hauptursache für nichttraumatische Osteonekrose (Weinstein, 2012). Bei der Osteoporose kommt es zu einem Knochenschwund, die Knochenmasse ist verringert und der Knochenmarkfettanteil erhöht. Dadurch besteht bei der Osteoporose ein erhöhtes Frakturrisiko (Li et al., 2013).

#### 1.4.2.2 Dexamethason *in vitro*

Dexamethason wird bereits seit 1985 *in vitro* verwendet, als Tenenbaum und Heersche beobachteten, dass die Dexamethason-Supplementierung die osteogene Differenzierung von Hühner-Periostzellen stimuliert (Tenenbaum and Heersche, 1985). Bis heute wird Dexamethason standardmäßig als Hilfsmittel in Zellkulturmedien verwendet, um die osteogene, chondrogene und adipogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu verbessern (Wang et al., 2012). Allerdings unterscheiden sich die Auswirkungen von Dexamethason *in vivo* stark von denjenigen *in vitro*. Trotz weitreichender Nebenwirkungen von Dexamethason bei der Langzeitanwendung *in vivo* (z.B. Dexamethason induzierte Osteoporose), wird es paradoxerweise *in vitro* verwendet, um die osteogene Differenzierung von MSCs zu induzieren. Dadurch besteht jedoch auch *in vitro* die Gefahr, dass Dexamethason verschiedene Nebenwirkungen verursacht und beispielsweise experimentelle Ergebnisse beeinflusst oder die osteogene Differenzierung von MSCs behindert.

Um die Funktion von Dexamethason bei der osteogenen Differenzierung von MSCs *in vitro* aufzuklären, wurden bereits mehrere Ansätze unternommen. Diese führten jedoch aufgrund von Unterschieden in den Differenzierungsbedingungen und des osteogenen Potenzials der Zellen zu widersprüchlichen Ergebnissen (Wang et al., 2012, Lian et al., 1997).

Beim Knochen-TE wird Dexamethason verwendet, um die osteogene Differenzierung von MSCs zu stimulieren. Dabei soll Dexamethason die Expression des Schlüsseltranskriptionsfaktors RUNX2 anregen (Langenbach and Handschel, 2013, Nakashima and de Crombrughe, 2003). RUNX2 wiederum fördert die Expression der frühen osteogenen Marker ALP (Alkalische Phosphatase), OSX (Osterix) sowie die späten osteogenen Marker COL1A1 (Kollagen-Typ 1 $\alpha$ 1), OPN (Osteopontin) BSP (Bone Sialoprotein) und OCN (Osteocalcin). Diese sequenzielle Hochregulierung von Transkriptionsfaktoren führt zur Reifung der Osteoblasten und zur Ablagerung von mineralisierter EZM (Franceschi and Xiao, 2003). Allerdings gibt es hier in der Fachwelt Unstimmigkeiten. Della Bella et al. beschreiben in einer aktuellen Publikation, dass Dexamethason die osteogene Differenzierung nicht durch eine erhöhte RUNX2-Expression, sondern durch eine Hemmung der SOX9-Expression induziert (Della Bella

et al., 2021). Außerdem scheint der genaue Mechanismus, wie Dexamethason die osteogene Differenzierung induziert, zellabhängig zu sein. Bei der osteogenen Differenzierung von Zellen aus Zahnfollikeln wurde beispielsweise berichtet, dass Dexamethason die Expression von anderen Transkriptionsfaktoren wie ZBTB16 erhöht, aber nicht RUNX2 (Felthaus et al., 2014).

Die Wirkung von Dexamethason auf die Differenzierung von MSCs hängt auch von der Dosis ab. Niedrig dosierte Glukokortikoide ( $10^{-9}$  -  $10^{-8}$  M) dienen häufig *in vitro* und *in vivo* als positiver Regulator der Knochenbildung (Li et al., 2013). Außerdem begünstigen niedrige Dosen von Dexamethason ( $10^{-10}$  -  $10^{-9}$  M) die Expansion von MSCs *in vitro* und reduzieren die Apoptose Gefahr (Wang et al., 2012).

Auch wenn Dexamethason für die osteogene Differenzierung und die Mineralisierungskompetenz von MSCs notwendig zu sein scheint, birgt es gleichzeitig das größte Risiko, die terminale Osteoblastendifferenzierung zu hemmen und die OCN-Expression zu unterdrücken (Rimando et al., 2016). Rimando et al. fanden kürzlich heraus, dass ein Glukokortikoidzezeptor-HDAC6 (Histone Deacetylase 6)-Komplex an der distalen und proximalen OCN-Promotorregion sitzt und bei der Differenzierung von Osteoblasten durch die Langzeitanwendung von Dexamethason die OCN-Transkription unterdrückt (Rimando et al., 2016). Außerdem erhöht sich bei hochdosiertem Dexamethason ( $10^{-6}$  -  $10^{-7}$  M) das adipogene Umwandlungspotential. Da Adipozyten und Osteoblasten beide aus den gleichen Vorläuferzellen und Stromazellen des Knochenmarks entstehen, liegt es nahe, dass Dexamethason die Differenzierung von Knochenmarksstromazellen in Richtung der Adipozyten verschiebt. Dies wurde bereits in Mäuseversuchen bestätigt. (Li et al., 2013). Des Weiteren steigern hohen Dosen von Dexamethason ( $10^{-6}$  -  $10^{-8}$  M) die Gefahr der Apoptose und verringern die immunsuppressive Wirkung von MSCs auf mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (Wang et al., 2012).

Die zugrunde liegenden Mechanismen dieser unterschiedlichen und paradoxen Wirkungen von Dexamethason während der osteogenen Differenzierung von MSCs sind bis heute immer noch weitgehend unbekannt (Rimando et al., 2016). Deshalb sollte die standardmäßige Dexamethason-Supplementierung *in vitro* kritisch evaluiert werden.

In einer aktuellen Publikation konnte gezeigt werden, dass Dexamethason für die osteogene Differenzierung von Kieferperiostzellen häufig nicht notwendig ist, wenn hPL anstatt von FBS verwendet wird. Bei etwa 80 % der analysierten Patienten war die Dexamethasonergänzung bei hPL-Kultivierung für eine starke Mineralisation nicht mehr erforderlich (Wanner et al., 2017).

## 1.5 Fragestellung

Trotz umfangreicher Forschung beim Knochen-TE ist das Translationspotential von *in vitro* Ergebnissen auf *in vivo* Studien sehr gering (Hulsart-Billström et al., 2016). Dabei stellen die Zellkulturbedingungen bei der osteogenen Differenzierung *in vitro* ein Hauptproblem dar und müssen deshalb weiter untersucht und verbessert werden.

Bisher wird nach wie vor häufig FBS als Medium zur Zellkultivierung *in vitro* verwendet, obwohl es im Vergleich zu hPL diverse Nachteile hat. Um zukünftig eine Genehmigung zur Anwendung im Patienten zu erhalten, sind außerdem Serum-freie Zellkultur- und Differenzierungsbedingungen unabdingbar (Brauchle et al., 2017). HPL hat sich bereits bei Expansion von MSCs als sehr gut geeignete xenogen-freie Alternative erwiesen (Schallmoser et al., 2020).

Allerdings stellt derzeit das synthetische Glukokortikoid Dexamethason ein Risiko bei der osteogenen Differenzierung von MSCs dar (Della Bella et al., 2021). Obwohl bei der Langzeittherapie von Dexamethason *in vivo* weitreichende Nebenwirkungen wie beispielsweise die Dexamethason-induzierte Osteoporose (Weinstein, 2012) bekannt sind, wird es paradoxerweise *in vitro* häufig verwendet, um die osteogene Differenzierung von MSCs zu induzieren (Langenbach and Handschel, 2013). Somit besteht auch *in vitro* das Risiko, dass Dexamethason diverse Nebenwirkungen verursacht und beispielsweise experimentelle Ergebnisse beeinflusst oder die osteogene Differenzierung von MSCs behindert. Um zukünftig die Risiken einer standardmäßigen Dexamethason-Supplementierung zu vermeiden, muss der Nutzen und die Notwendigkeit von Dexamethason *in vitro* kritisch hinterfragt und evaluiert werden. Kürzlich wurde gezeigt, dass Dexamethason für die Stimulierung der osteogenen Differenzierung von Osteoprogenitor-Zellen des Kieferperiosts nicht mehr benötigt wird, wenn humanes Plättchenlysat anstatt fetalem Kälberserum verwendet

wird (Wanner et al., 2017). Durch die Verwendung von hPL *in vitro* sind die Zellkulturbedingungen viel näher an der natürlichen Situation *in vivo*. Dadurch konnten die Unterschiede zwischen der osteogenen Differenzierung mit und ohne Dexamethason-Supplementierung untersucht werden. Das Ziel dieser Arbeit war es, die Einflüsse von Dexamethason auf die Mineralisationskapazität und Genexpression von Kieferperiostzellen zu untersuchen. Außerdem soll untersucht werden, wie Dexamethason die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix und die parakrine Sekretion von Kieferperiostzellen beeinflusst.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Stammzellen kultivieren und differenzieren

Für die vorliegende Arbeit wurden ausschließlich periostale Stammzellen verwendet. Die Verwendung periostaler Stammzellen bietet gegenüber anderen Stammzellquellen einige Vorteile. Bei vielen chirurgischen Eingriffen in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie gelangt man direkt an das Kieferperiost, sodass sich die Entnahme einer Periostprobe ohne weiteres Risiko leicht mit einer notwendigen Operation verknüpfen lässt. Für eine Zellkultur genügt bereits ein ca. 0,5 cm<sup>2</sup> großes Periostgewebe. Außerdem ist der operative Eingriff bei der Entnahme von periostalen Stammzellen mit deutlich weniger Risiken verbunden als bei der Stammzellgewinnung aus dem Knochenmark.

Vor einer anstehenden Operation wurden geeignete Patienten in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Universität Tübingen über die Möglichkeit einer Periostgewebespende aufgeklärt. Alle Patienten haben schriftlich in die Entnahme eingewilligt. Ein positives Votum der Ethikkommission der Universität Tübingen lag vor Studienbeginn vor (618/2017B02). Für die vorliegende Arbeit wurde ausschließlich Periostgewebe des Ober- und Unterkiefers verwendet. Nach der Entnahme des Periosts wurde dieses für den Transport in ein dicht verschraubbares Behältnis mit 0,9% physiologischer Kochsalzlösung gelegt und unverzüglich an das molekularbiologische Labor der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie Tübingen weitergeleitet. Dort wurde das Gewebe zügig unter sterilen Bedingungen (Sterilbank, Firma Thermo Electron LED GmbH, Typ MSC 1.8, Langensfeld, Deutschland) zu einer Primärkultur aufbereitet. Die Patientendaten wurden anonymisiert. Zunächst wurde das Gewebe in ein 15ml Falcon mit 5 ml PBS (Phosphate Buffered Saline (140 mM NaCl; 27 mM KCl; 7,2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 14,7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,0095 M (PO<sub>4</sub>)) Firma BioWhittaker, USA) gegeben und kräftig mit dem Vortex-Mixer (Firma neoLab Migge GmbH, Model: VM-300, Heidelberg, Deutschland) geschüttelt, um das Gewebe zu reinigen. Anschließend wurde das Periostgewebe in einen Petrischalendeckel gelegt. Mithilfe von zwei Einwegskalpellens wurde vorhandenes Blut aus dem Gewebe herausgestrichen. Danach wurde das Periost auf den Petrischalenboden gegeben und mit den Skalpellens in kleine Stücke zerkleinert. Diese wurden mit 5 ml PBS in ein 15 ml Falcon pipettiert und in der Zentrifuge (Firma

Eppendorf, Typ 5804 R, Hamburg, Deutschland) bei 1400 Umdrehungen/min und 8°C für 5 min zentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand abgesaugt und das Gewebepellet in 6 ml hPL10 (+ 0,1 % Vol. Gentamicin (G) + 0,1 % Vol. Ciprofloxacin (CFX)) aufgelöst (siehe Tabelle 1) und in eine 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche gegeben. Es wurde darauf geachtet, dass die Gewebestückchen gleichmäßig auf dem Flaschenboden verteilt waren. Die Zellkulturflasche wurde bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> eine Woche bewegungslos im Inkubator (Firma Thermo Electron LED GmbH, Typ HERA cell 150, Langenselbold, Deutschland) gelagert, damit die Zellen am Flaschenboden adhären können.

Nach 7 Tagen wurde vorsichtig unter dem Mikroskop (Leica Microsystems CMS GmbH, Typ 090-135.001, Wetzlar, Deutschland) überprüft, ob bereits Zellen aus dem Gewebe herausgewachsen sind und ggf. etwas Medium hinzugefügt, damit die Zellen nicht austrocknen. Sobald man unter dem Mikroskop eine ausreichende Konfluenz der Zellen (ca. 70-80%) beobachten konnte, wurden die Zellen in eine große 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche passagiert. Dafür wurde zunächst das alte Medium abgesaugt und 5ml PBS zur Reinigung hinzugefügt. Danach wurde das PBS abgesaugt und 1,5 ml TrypLE Express (Gibco™ TrypLE™ Express Enzym (1x), Phenolrot, Thermo Fischer Scientific) hinzugefügt und die Zellkulturflasche 5 bis 8 min im Inkubator inkubiert. Anschließend wurden 3,5 ml hPL10 (+ G + CFX) hinzugefügt und der Flascheninhalt in ein 50 ml Falcon pipettiert. Dieses wurde bei 1400 rpm 7 min bei 8°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 20 ml hPL10 (+ G + CFX) aufgelöst und in eine 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche pipettiert. Das Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt, bis die Zellkulturflasche konfluent war.

Das Medium wurde nun abgesaugt und der Zellrasen mit PBS gereinigt. Daraufhin wurde das PBS abgesaugt und 3 ml TrypLE Express hinzugefügt. Die Zellkulturflasche wurde für 5 bis 8 min im Inkubator inkubiert. Danach konnten die losgelösten Zellen mit 7 ml hPL 10 in ein 50 ml Falcon pipettiert werden.

Um die Zellen zu zählen, wurden 20 µl Trypanblau (BioRad, Hercules, CA, USA) mit 20 µl Zelllösung aus dem Falcon zusammen pipettiert, gut gemischt, und 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 20 µl der Mixtur in eine Zählkammer einer Zählplatte pipettiert und die Zellzahl mit dem Zell-Zählgerät (Bio-Rad Laboratories

GmbH, Modell TC20, Feldkirchen, Deutschland) dreimal gemessen. Daraus wurde die durchschnittliche Zellzahl berechnet.

Für die Differenzierungsversuche wurden die Zellen in 6-Well-Platten passagiert. In einem Well wurden jeweils 50.000 Zellen mit 2 ml hPL5 Medium pipettiert. Es wurden Zellen der zweiten bis dritten Passage verwendet. Zellen bis zur zweiten Passage wurden mit hPL10 (+G +CFX) kultiviert. Ab Passage drei wurde hPL5 Medium verwendet. Um die osteogene Differenzierung einzuleiten, wurde 24 Stunden nach der Aussaat das hPL5 Medium durch Osteoblastenmedium (OB-Medium) ersetzt. Um den Einfluss von Dexamethason auf die Mineralisationskapazität und Genexpression von Kieferperiostzellen zu untersuchen, wurden für die osteogene Differenzierung zwei verschiedene Osteoblastenmedien verwendet, einerseits ein OB-Medium mit Dexamethason (OB+D) und andererseits OB-Medium ohne Dexamethason (OB-D). Die Zusammensetzung der einzelnen Medien ist in Tabelle 2 aufgelistet. Zusätzlich zu den beiden Osteoblastenmedien wurde ein Kontrollmedium (KO) ohne osteogene Substanzen verwendet.

*Tabelle 1: Bestandteile von hPL5 und hPL10 [% Vol.]*

	<b>hPL5</b>	<b>hPL10</b>
<b>DMEM/F12</b> (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)	93%	88%
<b>hPL</b> (ZKT Tübingen GmbH)	5%	10%
<b>Penicillin-Streptomycin</b> (10000 U/ml) (Pen-Strep, Lonza, Basel, Schweiz)	1%	1%
<b>Amphotericin B</b> (250 µg/ml) (Biochrom, Berlin, Deutschland)	1%	1%

Tabelle 2: Bestandteile des Kontrollmediums und des Osteoblastenmediums mit und ohne Dexamethason, hPL (humanes Plättchenlysat)

	Kontrollmedium (KO)	Osteoblastenmedium ohne Dexamethason (OB-D)	Osteoblastenmedium mit Dexamethason (OB+D)
<b>hPL5</b>	100%	100%	100%
<b>β-Glycerophosphat</b> (AppliChem, Darmstadt, Deutschland)	-	10 mM	10 mM
<b>L-Ascorbinsäure 2-Phosphat</b> (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)	-	0,1 mM	0,1 mM
<b>Dexamethason</b> (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)	-	-	4 μM

Die Belegung der 6-Well-Platten ist in Abbildung 2 schematisch veranschaulicht.

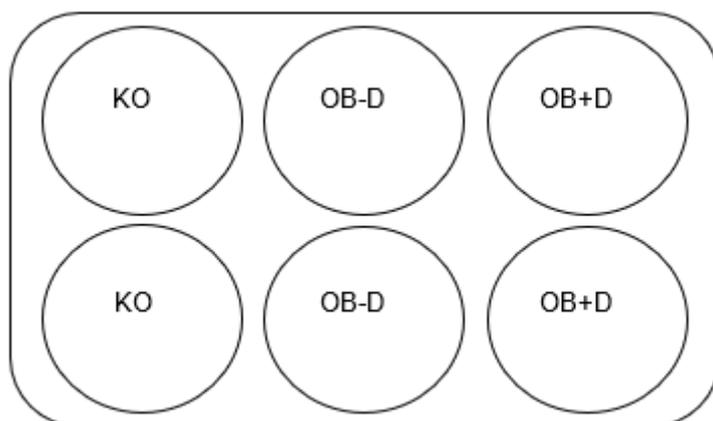


Abbildung 2: Belegung der 6-Well Platten mit den verschiedenen Medien.

Das Medium wurde montags, mittwochs und freitags gewechselt. An Tag 15 der osteogenen Differenzierung wurde jeweils von allen drei Kultivierungsbedingungen ein Proteinprobenüberstand von ca. 2 ml entnommen und der Zellrasen für die spätere RNA-Extraktion abgelöst. Die Proteinprobe wurde in ein 2ml Eppi pipettiert und bei -80 °C bis zur Proteinuntersuchung mit dem Proteomprofilerkit (R&D Systems, Minneapolis, USA)

aufbewahrt. Die Zellmonolayer wurden mit einem Zellschaber und jeweils 1 ml gekühltem PBS abgekratzt und in 2 ml Eppis pipettiert. Diese wurden 7 min bei 1400 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet in 350 µl RA1-Puffer + TCEP aufgenommen und gut gevortext. Das Zellysate wurde bis zur RNA-Extraktion im Gefrierschrank bei  $-80^{\circ}\text{C}$  (Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold, Deutschland) gelagert. Die unteren drei Wells in Abbildung 2 wurden für die Alizarin Färbung verwendet.

## **2.2 Färbungen**

### **2.2.1 Alizarin Rot Färbung**

Während der osteogenen Differenzierung von Kieferperiostzellen bilden sich Kalziumphosphatpräzipitate. Diese lassen sich mit Hilfe der Alizarin Rot-Färbung detektieren. Da Alizarin mit Metallsalzen farbige Komplexe bildet, ist diese Färbungsmethode ein geeigneter Mineralisierungsnachweis.

An Tag 15 der osteogenen Differenzierung wurde das Medium der unteren drei Wells zunächst abgesaugt. Anschließend wurde pro Well 1ml PBS zum Waschen hinzugefügt und wieder abgesaugt. Zum Fixieren der Zellen wurde jeweils 1ml Formaldehydlösung (4 %) pro Well hinzugefügt und 15 min unter dem Abzug (Laborbau Systeme Hemling GmbH & Co. KG, Typ TA1200, Ahaus, Deutschland) inkubiert. Daraufhin wurde erneut zweimal mit PBS gewaschen. Zum Lagern der Platten im Kühlschrank bei  $4^{\circ}\text{C}$  wurde pro Well 1ml PBS belassen und die Platten zum Schutz vor Austrocknung bzw. Kontamination mit Parafilm verschlossen.

Im weiteren Verlauf wurden die Platten mit destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend wurde pro Well jeweils 1 ml Alizarin Rot (40mM, pH 4,2, Sigma Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) hinzu pipettiert und die Platten für 20 min gefärbt. Danach wurde die Färbung viermal mit 3 ml destilliertem Wasser gewaschen und jeweils 15 min auf dem Schüttler (neoLab Migge GmbH, Typ SHAKER DRS-12, Heidelberg, Deutschland) inkubiert. Zum Mikroskopieren (Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Deutschland) wurde 1 ml destilliertes Wasser hinzugefügt.

Im Anschluss wurden die Zellen mit 1 ml eiskaltem 100% Ethanol zwei Minuten dehydriert, das Ethanol abgesaugt und die Platten ca. 10 min bei Raumtemperatur mit geöffnetem Deckel getrocknet. Damit lassen sich die Zellen über Monate bei Raumtemperatur lagern.

## **2.2.2 Alizarin Rot Quantifizierung**

Um die gebildeten Kalziumphosphat-Präzipitate zu quantifizieren, wurde das Alizarinrot aus dem Zellrasen herausgelöst und danach photometrisch ausgewertet.

Zunächst wurden 1920 µl 10%ige Essigsäure (Sigma Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) pro Well zum Farbstoff hinzu pipettiert und für 30 min auf einem Schüttler unter dem Abzug inkubiert.

Währenddessen wurde der Heizblock (Eppendorf, Thermomixer compact, Hamburg, Deutschland) auf 85°C vorgeheizt und eine Wanne Eis für das weitere Vorgehen bereitgestellt. Nun wurde eine Standardreihe mit 14 Standards (S1-S14) mit Alizarinkonzentrationen von 2mM bis 0,24 µM hergestellt. Hierfür wurde zunächst 0,5 ml ARS Dilution Buffer (ScienCell, Standard-Verdünnungslösung, unverdünnt) mit 4,5 ml destilliertem Wasser verdünnt. Für Standard eins (S1) wurden 475 µl der vorbereiteten ARS-Verdünnung mit 25 µl Alizarinrot in ein Eppi pipettiert und gevortext. Für die Standards S2 bis S14 wurden jeweils 250 µl der verdünnten ARS-Lösung in ein Eppi vorgelegt. Danach wurde von Standard eins 250 µl in das vorbereitete Eppi von Standard zwei pipettiert und gevortext. Für die weiteren Standards S3 bis S14 wurden ebenfalls jeweils 250 µl aus dem Standard mit der nächsthöheren Konzentration hinzugefügt und gevortext. Schließlich wurde die Standardreihe durch die Zugabe von jeweils 94 µl 10%iges Ammoniumhydroxid (NH<sub>4</sub>OH) bei allen 250 µl Standards neutralisiert.

Nach der abgelaufenen Inkubationszeit von 30 min der Wells mit Essigsäure wurde der Zellrasen vollständig mit einem sterilen Spatel abgelöst. Der Inhalt eines Wells wurde jeweils vollständig in ein frisches und beschriftetes Eppi pipettiert. Die Eppis wurden dann für ca. 30 s gevortext und im Anschluss für 10 min bei 85°C auf dem Heizblock erhitzt. Daraufhin wurden die Proben für 5 min auf Eis gestellt und danach für 15 min bei 20000 g zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde ein Überstand von 400 µl in ein

frisches und neu beschriftetes Eppi überführt und mit 150 µl 10%ige Ammoniumhydroxid neutralisiert und gevortext.

Für die Konzentrationsbestimmung wurden in Duplikaten jeweils 100 µl der Proben, der Standardreihe und des Blanks (ARS-Verdünnung) in eine 96 Well Platte pipettiert. Die Konzentrationen wurden bei einer Wellenlänge von 405 nm im Photometer (BioTek Instruments GmbH, Typ ELx800, Friedrichshall, Deutschland) gemessen.

## **2.3 Genexpressionsanalyse**

### **2.3.1 RNA-Extraktion**

Die RNA-Extraktion wurde mit dem NucleoSpin RNA Kit (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) durchgeführt.

Wie bereits in Kapitel „2.1 Stammzellen kultivieren und differenzieren“ beschrieben, wurde an Tag 15 der osteogenen Differenzierung der Zellrasen für die spätere RNA-Extraktion abgelöst. Nach den einzelnen Schritten der Zelllyse wurde das Zelllysat bis zur Fortsetzung der RNA-Extraktion bei – 80°C gelagert. Alle weiteren Schritte wurden zügig und unsteril unter dem Abzug mit den RNA-Pipetten (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Das Lysat wurde auf ein violette Säulchen gegeben und bei 11000 g für 30 s zentrifugiert. Dieser Schritt ist wichtig, um vorhandene Proteine zu entfernen. Das violette Säulchen wurde danach verworfen.

Anschließend erfolgten die Schritte zur Bindung der Nukleinsäuren an die Säulchen-Membran. Hierfür wurden 350 µl 70 % Ethylalkohol (EtOH) zugegeben und 20-mal mit einer Pipette auf und ab pipettiert. Dieser Schritt dient der Scherung der DNA und erhöht die RNA-Ausbeute. Das Lysat wurde in ein blaues NucleoSpinRNA Säulchen pipettiert und bei 11000 g für 30 s zentrifugiert. Danach wurde das Säulchen in ein frisches Collection Tube überführt.

Im weiteren Verlauf wurde die Membran entsalzen, indem 350 µl MDB-Puffer hinzugefügt wurden. Das Gemenge wurde dann bei 11000 g für 30 s zentrifugiert und der Durchfluss verworfen.

Für die DNA-Verdauung wurden pro Probe 95 µl rDNase Reaktionsmix frisch angesetzt. Dieser wurde auf die Membran pipettiert und 15 bis 20 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Zum Waschen und Trocknen wurden 200 µl RAW2-Puffer hinzugegeben und zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach abgelaufener Inkubationszeit wurde erneut bei 11000 g für 30 s zentrifugiert. Das Säulchen wurde in ein frisches Collection Tube überführt. Danach wurden 600 µl RA3-Puffer zugegeben und wie gewohnt bei 11000 g für 30 s zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Weiterhin wurden 250 µl RA3-Puffer zugegeben und bei 11000 g für 2 min zentrifugiert. Die Säulchen wurden in frische 1,5 ml Eppis überführt.

Im letzten Schritt, der Elution der DNA, wurden 50 µl RNase-freies Wasser auf das Säulchen pipettiert und zentrifugiert (11000 g, 30 s).

Bei den gewonnenen RNA-Proben wurden umgehend die Konzentrationen bestimmt (Qubit RNA HS/BR Assay Kit (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland)). Dafür wurden pro Probe 200 µl Working Solution aus 199 µl Qubit Buffer und 1 µl Qubit Reagent hergestellt. Anschließend wurden die Standards und Proben in 0,5 ml Assay Tubes pipettiert, gevortext und für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Standards wurden 190 µl Working Solution und 10 µl „Standard 1/2“ vermischt. Für die Proben wurden anfangs 199 µl Working Solution mit 1 µl RNA-Probe vermischt. In wenigen Fällen musste das RNA-Probenvolumen von 1 µl auf 10 µl erhöht werden, damit auch geringere Konzentrationen gemessen werden konnten. Dafür musste dann entsprechend die Working Solution von 199 µl auf 190 µl reduziert werden. Die Standards und Proben wurden jeweils dreimal gemessen (Life Technologies GmbH, Modell Qubit 3.0 Fluorometer, Darmstadt, Deutschland), woraus anschließend ein Mittelwert berechnet wurde. Die gewonnene RNA wurde im nächsten Schritt direkt für die cDNA-Synthese verwendet oder bei -80°C zwischengelagert.

### **2.3.2 cDNA-Synthese**

Für die cDNA-Synthese wurde das SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) verwendet. Zunächst wurde ein Master Mix auf Eis

angesetzt. Hierfür wurden pro Probe 4 µl 5X VILO Reaction Mix mit 2 µl 10X SuperScript Enzyme Mix in ein Eppi pipettiert und gevortext. Anschließend wurde für jede Probe ein Eppi beschriftet und auf Eis gestellt. Pro Probe wurde 1 µg RNA verwendet. Danach wurden die vorbereiteten Eppis mit jeweils 6 µl Master Mix befüllt und das entsprechende RNA-Volumen hinzugefügt. Das Volumen pro Eppi wurde dann mit PCR-grade H<sub>2</sub>O (Roche Light Cycler Fast Start DNA Master SYBR Green N, Roche Deutschland Holding GmbH) auf jeweils 20 µl aufgefüllt. Die Eppis wurden im Anschluss sanft vermischt und für 10 min bei 25 °C im Thermocycler (Eppendorf, Modell Mastercycler personal, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit folgte ein weiterer Inkubationsschritt für 60 min bei 42 °C. Danach wurde die Reaktion für 5 min bei 85°C beendet. Die gewonnene cDNA wurde bei -20°C im Gefrierschrank bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### **2.3.3 quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR)**

Die quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR) wird auch synonym als Real-Time PCR bezeichnet. Mit diesem biochemischen Verfahren lassen sich heutzutage kleinste Mengen DNA nachweisen und quantifizieren.

Die Polymerasekettenreaktion läuft in etwa 20 bis 40 Zyklen ab. Dabei beinhaltet ein Zyklus drei Schritte, die jeweils bei verschiedenen Temperaturen stattfinden. Im ersten Schritt kommt es zur Denaturierung der DNA. Die DNA wird dabei bei Temperaturen von 95°C in seine Einzelstränge aufgespalten. Im zweiten Schritt kommt es zur Anlagerung der Primer an die komplementäre DNA-Sequenz der Einzelstränge. Die Anlagerungstemperatur liegt hier bei etwa 40 bis 70 °C. Im dritten und letzten Schritt werden die Primer am freien 3'-OH Ende durch eine temperaturstabile DNA-Polymerase mittels Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) verlängert. Die Temperatur liegt dabei bei ca. 70°C.

Unter idealen Bedingungen kommt es pro Zyklus jeweils zur Verdopplung der beabsichtigten DNA-Sequenz. Somit kommt es zu einem exponentiellen Anstieg der Ziel-DNA (Rassow et al., 2015).

Mit Hilfe von Farbstoffen wie SYBR Green I können die PCR-Produkte quantifiziert werden. SYBR Green ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich in der DNA einlagert. Bei Anregung durch Lichtquellen kommt es zu einem Anstieg der Fluoreszenzemission. Das zunehmende Fluoreszenzsignal während der Reaktion korreliert proportional mit der Menge der amplifizierten DNA.

Bei der vorliegenden Arbeit wurde das LightCycler 1.5 (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) System verwendet. Damit lassen sich maximal 32 Proben vermessen, wovon vier für die Standards (GAPDH) und eine Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O) vorgesehen sind. Zunächst wurde die cDNA mit PCR-grade H<sub>2</sub>O im Verhältnis 1:10 verdünnt. Für die einzelnen PCR-Reaktionen wurden jeweils 14 µl PCR-grade H<sub>2</sub>O, 2 µl SybrGreen I Mastermix (Roche Applied Science, Mannheim, Germany), 2 µl Primer Zielgen (Firma Search LC, Heidelberg, Germany) und 2 µl cDNA in die LightCycler Kapillaren (Roche, Deutschland Holding GmbH) pipettiert. Die Kapillaren standen währenddessen in der Kühlhalterung, die zuvor im Kühlschrank auf 4°C gekühlt wurde. Anschließend wurden die Kapillaren 1 min bei 800 g zentrifugiert. Die Kapillaren wurden vorsichtig in das LightCycler Rondell gesteckt und von unten überprüft, ob in allen Kapillaren gleich viel Flüssigkeit ist. Die Ziel-DNA wurde gemäß folgendem Protokoll amplifiziert: Die qPCR begann mit einem Denaturierungsschritt bei 95°C für 10 min. Daraufhin folgte der Amplifikationsschritt mit 40 Zyklen. Jeder Zyklus bestand aus folgenden drei Schritten: 1. Erhitzung für 10 s auf 95°C, 2. Abkühlung für 10 s auf 68°C und 3. Erhitzung auf 72°C für 16 s. Die Temperaturveränderungsrate lag jeweils bei 20°C/s. Die anfängliche Annealing-Temperatur von 68°C wurde, stufenweise um 0,5°C pro Zyklus, auf 58°C reduziert. Die Untersuchung der Schmelzkurven der spezifischen PCR-Produkte erfolgte bei 58°C für 10s. Die Temperaturveränderungsrate betrug 0,1°C/s.

Um den Nutzen von Dexamethason bei der osteogenen Differenzierung von Kieferperiostzellen zu untersuchen, wurde zunächst die Expression verschiedener osteogener Markergene analysiert (Tabelle 3).

*Tabelle 3: Osteogene Markergene, die mittels qPCR analysiert wurden*

<b>Markergen (Abkürzung)</b>	<b>Bedeutung</b>
ALP	Alkalische Phosphatase
BSP2	Bone-Sialoprotein 2
COL1A1	Kollagen-Typ 1 $\alpha$ 1
OCN	Osteocalcin
OGN	Osteoglycin
OPG	Osteoprotegerin
OPN	Osteopontin
OSN	Osteonectin
OSX	Osterix
POSTN	Periostin
RUNX2	Runt-Related-Transcription-Factor 2

Dexamethason wird in der Literatur nicht nur als Induktor der osteogenen Differenzierung beschrieben (Langenbach and Handschel, 2013), sondern ist durch seinen pro-adipogenen Effekt auch als negativer Regulator der Osteogenese bekannt (Li et al., 2013). Da außerdem auch Einflüsse von Dexamethason auf adipogene und chondrogene Markergene beschrieben werden (Della Bella et al., 2021), wurden zusätzlich die in Tabelle 4 dargestellten Markergene der adipogenen und chondrogenen Differenzierung untersucht.

Tabelle 4: Chondrogene (COL2A1, COMP und SOX9) und adipogene (LEP, LPL, PPAR- $\gamma$ ) Markergene, die mittels qPCR analysiert wurden

Markergen (Abkürzung)	Bedeutung
COL2A1	Kollagen-Typ 2 $\alpha$ 1
COMP	Cartilage-Oligomeric-Matrix-Protein
LEP	Leptin
LPL	Lipoprotein Lipase
PPAR- $\gamma$	Peroxisome-Proliferator-Activated-Receptor $\gamma$
SOX9	SRY-Box-Transcription-Factor 9

Um den Effekt von Dexamethason auf die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix zu untersuchen, wurde außerdem die Expression der in Tabelle 5 dargestellten extrazellulären Matrix Proteine analysiert.

Tabelle 5: Markergene im Zusammenhang mit Extrazellulären Matrix Proteinen, die mittels qPCR analysiert wurden

Markergen (Abkürzung)	Bedeutung
COL1A1	Kollagen-Typ 1 $\alpha$ 1
COL1A2	Kollagen-Typ 1 $\alpha$ 2
COL2A1	Kollagen-Typ 2 $\alpha$ 1
COL7A1	Kollagen-Typ 7 $\alpha$ 1
COL8A1	Kollagen-Typ 8 $\alpha$ 1
COL10A1	Kollagen-Typ 10 $\alpha$ 1
COL11A1	Kollagen-Typ 11 $\alpha$ 1
COL12A1	Kollagen-Typ 12 $\alpha$ 1
TIMP4	Tissue-Inhibitor-Of-Metalloproteinase 4

Als Haushaltsgen wurde GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) (SearchLC, Heidelberg, Deutschland) verwendet, da es konstant exprimiert wird. Die Quantifizierung wurde durch das Expressionsverhältnis von Zielgen zu Haushaltsgen [1/GAPDH] bestimmt.

## 2.4 Proteom Profiler

Der Proteom Profiler (R&D Systems Human Cytokine Array Kit, Human Soluble Receptor Array Kit and Non-Hematopoietic Panel, Minneapolis, USA) ist eine schnelle

und sensitive Methode, um zeitgleich die Proteinexpressionswerte zwischen den Proben zu bestimmen. Mit Hilfe der nicht-hämatopoetischen Platten lassen sich 62 herkömmliche Proteine sowie 57 nicht-hämatopoetische Proteine in einer Probe detektieren. Das Zytokin-Array erlaubt die Bestimmung von 36 Zytokinen.

Das Prinzip des Proteom Profilers funktioniert wie folgt: Auf einer Nitrozellulosemembran sind Erfassungs- und Kontrollantikörper als Duplikate punktförmig platziert. Der Zellkulturüberstand wird verdünnt und über die Nitrozellulosemembran pipettiert. Während der Inkubationszeit über Nacht können so die im Zellkulturüberstand enthaltenen Proteine an die spezifischen Antikörper der Nitrozellulosemembran andocken. Anschließend werden die Membranen gewaschen, um ungebundenes Material zu entfernen. Danach folgt ein Inkubationsschritt mit spezifischen biotinylierten Nachweisantikörpern. Schließlich werden Streptavidin-HRP und ein Chemilumineszenzreagenz appliziert. Dadurch wird durch chemische Vorgänge an jedem belegten Erfassungspunkt der Nitrozellulosemembran Licht emittiert. Die Intensität der Lichtemission entspricht dabei der Menge an gebundenen Proteinen.

Die Versuchsdurchführung wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Membranen wurden für 1 h bei Raumtemperatur mit dem Array Buffer auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurde der Array Buffer entfernt und die Membranen mit 1,5 ml der vorbereiteten Proteinproben inkubiert. Diese Proteinproben wurden an Tag 15 der osteogenen Differenzierung jeweils von allen drei Kultivierungsbedingungen gewonnen und bis zur Proteinuntersuchung bei -80 °C gelagert (siehe Kapitel 2.1 Stammzellen kultivieren und differenzieren). Die Inkubation erfolgte bei 4°C über Nacht auf dem Schüttler. Nach mehreren Waschschritten wurden die Membranen mit 2 ml der verdünnten Streptavidin-HRP Lösung für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiteren drei Waschschrritten wurde jeweils 1 ml der vorbereiteten Chemilumineszenz Reagenzienmischung gleichmäßig auf die Membranen pipettiert. Anschließend wurde die Lumineszenz bei einer Expositionszeit der Röntgenfolien (GE Healthcare GmbH, Amersham Hyperfilm™ ECL, Solingen, Deutschland) von 10 min bestimmt. Die entwickelten Filme wurden gescannt und die Datenanalyse der positiven Signale wurde mit der ImageJ Software durchgeführt.

## 2.5 Statistik

Für die statistische Auswertung der Alizarin Rot Quantifizierung sowie für die Daten der Genexpression und der Proteinsekretion wurden die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler der Mittelwerte berechnet und mithilfe der Einfaktoriellen-ANOVA (p wurde mit dem Tukey post-hoc Test angepasst) und der Software GraphPad Prism5 verglichen. Ein p-Wert von  $\leq 0,05$  wurde als signifikant angesehen.

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Osteogene Differenzierung mit und ohne Dexamethason**

#### **3.1.1 Makroskopische Mineralisierung der Kieferperiostzellen**

Die Mineralisierungskapazität ist ein zentrales Merkmal der osteogenen Differenzierung von periostalen Stammzellen. Um die osteogene Differenzierung von Kieferperiostzellen zu vergleichen, wurden Zellen von 20 Patienten verwendet. Die Kieferperiostzellen wurden 15 Tage mit KO, OB-D und OB+D kultiviert. Die gebildeten Kalziumphosphatpräzipitate wurden mit der Alizarin Rot-Färbung nachgewiesen.

Vergleicht man die Färbungen der verschiedenen Patienten in Abbildung 3 miteinander, zeigen sich unabhängig von den verschiedenen Kultivierungsmethoden in Teilen deutliche subjektspezifische Unterschiede in der Mineralisierungskapazität der Zellen. Vergleicht man die Menge an Kalziumphosphatpräzipitaten aus den verschiedenen Kultivierungsmethoden innerhalb des gleichen Patienten, fallen die Unterschiede der Mineralisierung zwischen OB-D und OB+D im Wesentlichen deutlich geringer aus, wobei eine Tendenz zugunsten von OB-D erkennbar ist. Kieferperiostzellen, die mit KO-Medium kultiviert wurden, weisen bei allen Patienten keine Mineralisierung auf.

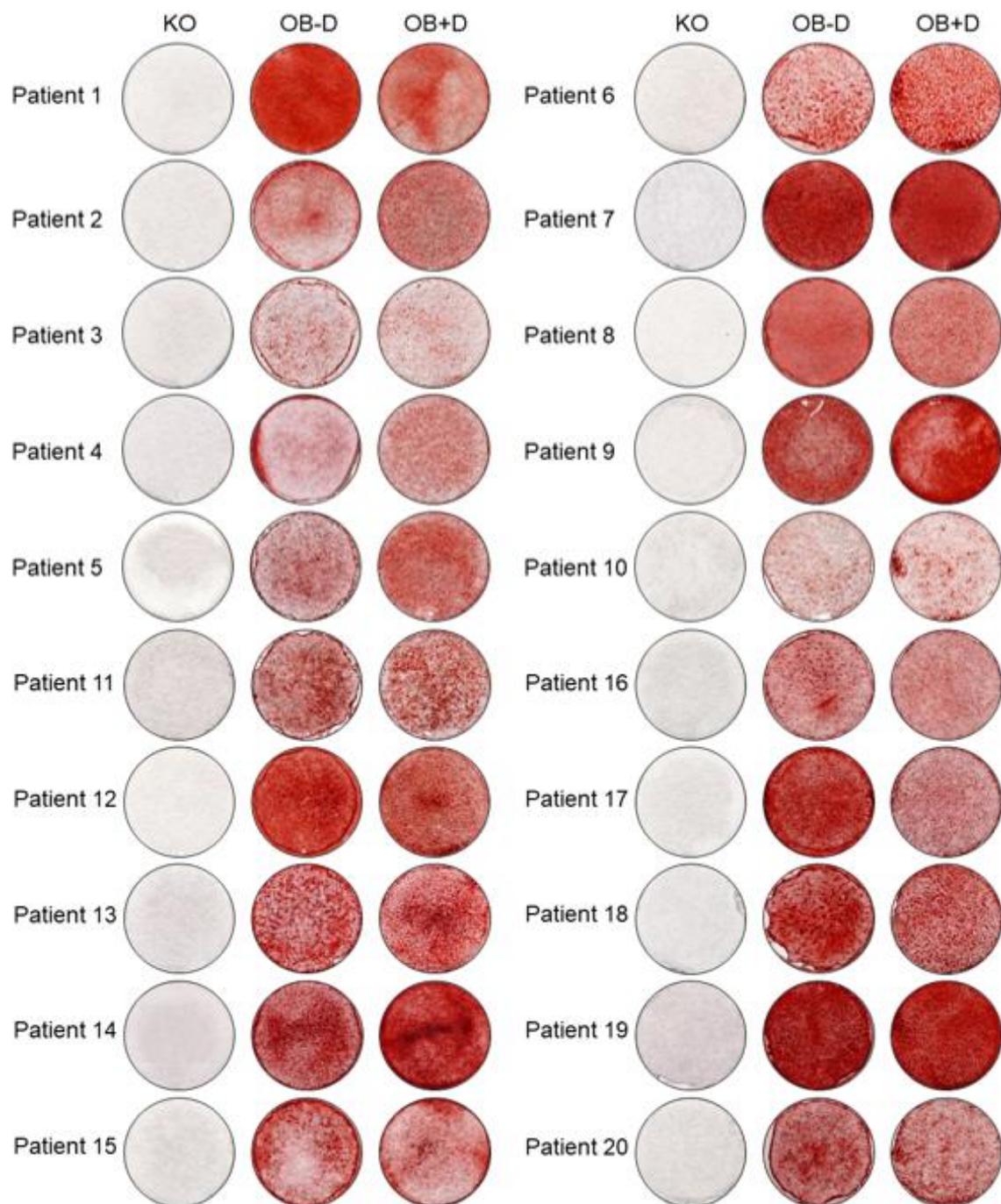


Abbildung 3: Mineralisation der Kieferperiostzellen, die *in vitro* mit und ohne Dexamethason differenziert wurden. Die Kieferperiostzellen wurden 15 Tage mit KO, OB-D und OB+D kultiviert. Die Kalziumphosphatpräzipitate wurden mit der Alizarin Rot-Färbung nachgewiesen.

### 3.1.2 Mikroskopische Mineralisierung der Kieferperiostzellen

Nach der Alizarin Rot Färbung wurde die Mineralisierung der Kieferperiostzellen auch mikroskopisch betrachtet und dokumentiert. Fotografiert wurden pro Well jeweils drei Bereiche, die eine starke, mittlere und leichte Färbung aufwiesen. In Abbildung 4 wird exemplarisch die Fotodokumentation von Patient 18 dargestellt. Wie bei der makroskopischen Betrachtung ist auch mikroskopisch mit KO keine Mineralisierung der Kieferperiostzellen sichtbar. Bei Kultivierung mit OB-D im Vergleich zu OB+D ist in Abbildung 4 in allen drei Regionen eine gleichmäßigere Mineralisierung durch die Rot gefärbten Kalziumphosphatpräzipitate ersichtlich.

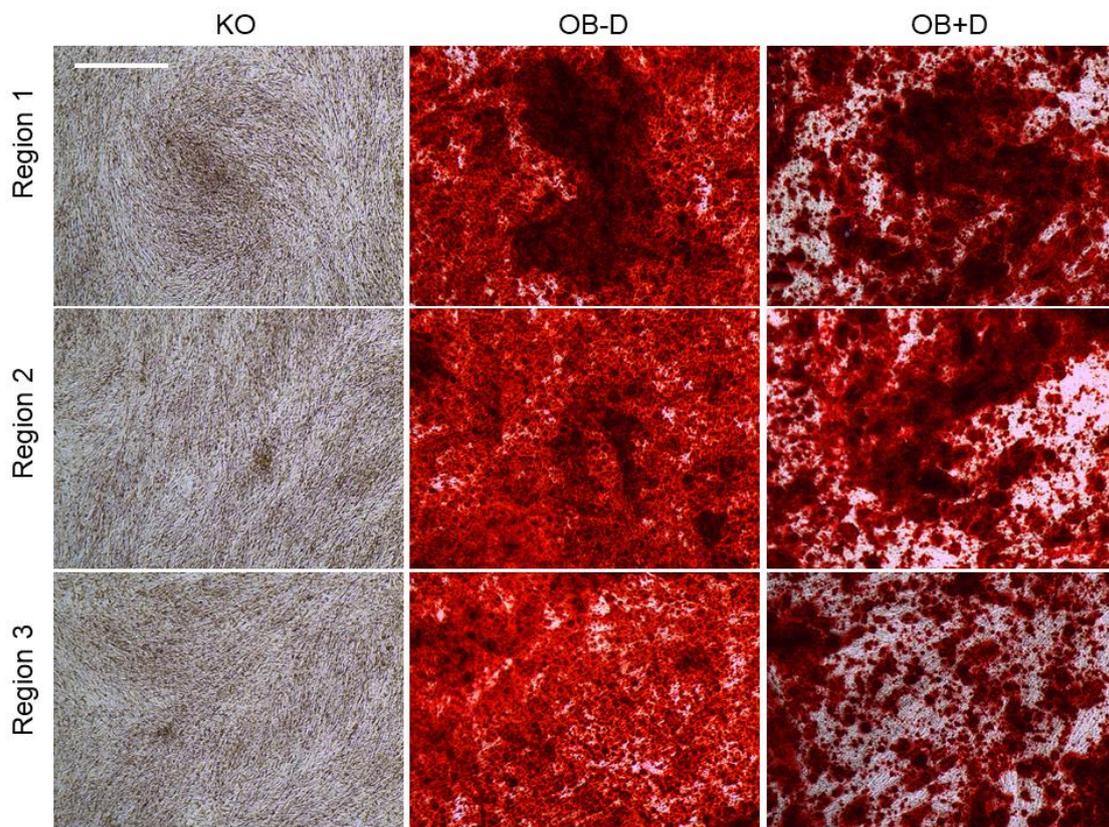


Abbildung 4: Mikroskop-Bilder Patient 18. Diese Abbildung zeigt exemplarisch die Mineralisation der Kieferperiostzellen, die *in vitro* mit OB-D und OB+D differenziert wurden. Die Kieferperiostzellen wurden 15 Tage mit KO, OB-D und OB+D kultiviert. Die Kalziumphosphatpräzipitate wurden mit der Alizarin Rot-Färbung nachgewiesen. Region 1 zeigt stark gefärbte Bereiche, Region 2 mittel gefärbte Bereiche und Region 3 schwach gefärbte Bereiche. Bei Patient 18 waren mit OB-D alle Bereiche ähnlich stark gefärbt. Die Bilder wurden bei 4x Vergrößerung aufgenommen (weiße Balkenlänge im Bild oben links entspricht 100  $\mu\text{m}$ ).

### 3.1.3 Alizarin Rot Quantifizierung

Nach der Alizarin Rot-Färbung wurden die Kalziumphosphatpräzipitate der ersten neun Patienten photometrisch quantifiziert, da diese bei der Auswertung als erstes zur Verfügung standen (Abbildung 5). Die Daten wurden mit der Einfaktoriellen-ANOVA verglichen. Hier wurde ein signifikanter Unterschied des Kultivierungsmediums (KO, OB-D, OB+D) auf die Mineralisierung der Kieferperiostzellen deutlich [ $F(2,8)=25,86$ ,  $p<0.0001$ ]. Der Vergleich mit dem Tukey Post-hoc-Test ergab, dass sowohl zwischen der KO- und der OB-D-Gruppe ( $p < 0.0001$ ), als auch zwischen der KO- und der OB+D-Gruppe ( $p < 0.0022$ ) ein signifikanter Unterschied besteht. Durch hohe Abweichungen der Mineralisation zwischen den verschiedenen Spenderzellen ergibt der Vergleich mit dem Post-hoc-Test keine statistische Signifikanz der Mineralisation zwischen OB-D und OB+D. Dadurch sind die Unterschiede der Bedingungen zwischen OB+D und OB-D nicht statistisch signifikant. Allerdings zeigten im Durchschnitt die Kieferperiostzellen, die mit OB-D kultiviert wurden eine höhere Mineralisation ( $2.54 \pm 0.46$  mM) als diejenigen, die mit OB+D ( $1.78 \pm 0.36$  mM) kultiviert wurden.

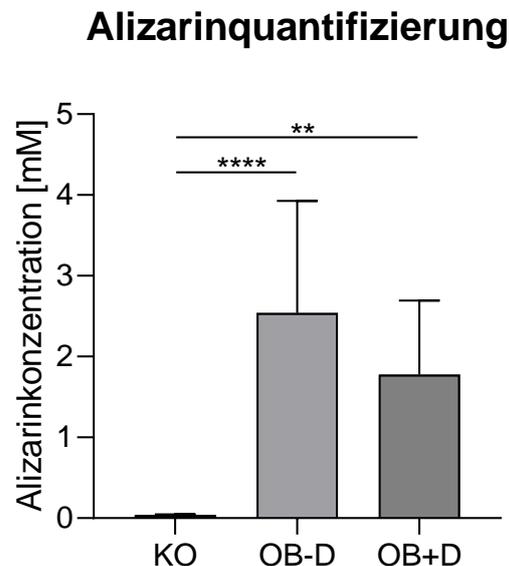


Abbildung 5: Alizarinquantifizierung von Kieferperiostzellen, die für 15 Tage mit KO, OB-D und OB+D kultiviert wurden. Die Kalziumphosphatpräzipitate wurden mit Alizarin Rot gefärbt. Der gebundene Farbstoff wurde gelöst und photometrisch quantifiziert. Die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler der Mittelwerte wurden berechnet und mithilfe der Einfaktoriellen-ANOVA verglichen ( $n=9$ ,  $**=p<0,01$ ,  $****=p<0,0001$ ). Abbildung modifiziert nach (Umrath et al., 2022).

Die Ergebnisse der Zellmineralisation deuten darauf hin, dass die Dexamethason-Ergänzung im osteogenen Medium keinen Mehrwert für die Mineralisation der Kieferperiostzellen bietet.

### **3.1.4 Expression osteogener Markergene durch Kieferperiostzellen**

Neben der Mineralisierungskapazität wurde mittels qPCR die Genexpression verschiedener osteogener Marker von den ersten sieben Patienten untersucht, da diese Daten als erstes für die Auswertung zur Verfügung standen (siehe Abbildung 6, Abbildung 7, Abbildung 8). Dadurch lassen sich die Einflüsse von Dexamethason bei der Differenzierung von Kieferperiostzellen auf Genebene veranschaulichen.

Bei der Expression von osteogenen Markergenen wird die Tendenz sichtbar, dass Kieferperiostzellen mit OB-D stärker osteogen differenzieren.

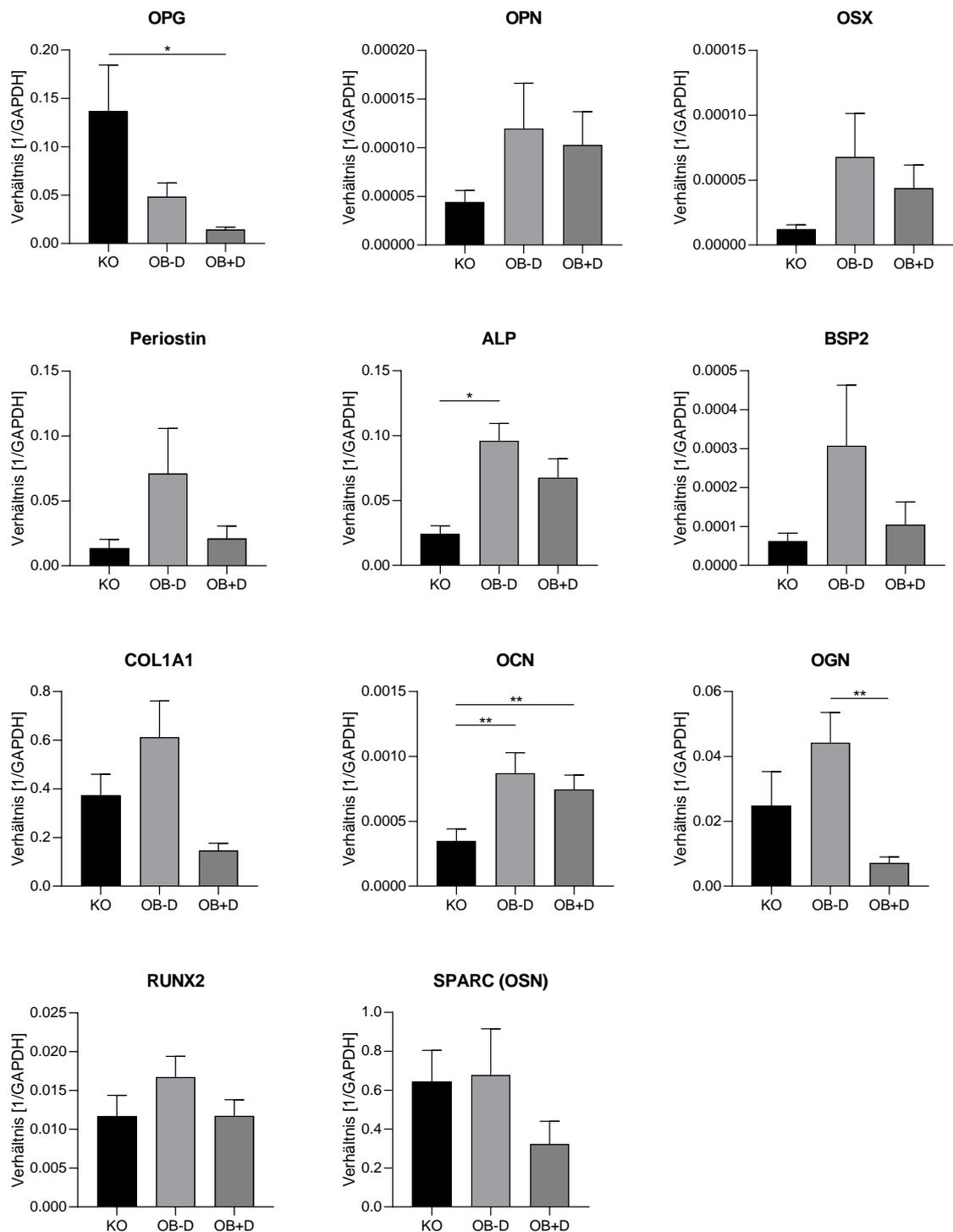


Abbildung 6: Expression der osteogenen Markergene von Kieferperiostzellen, die 15 Tage mit KO, OB-D und OB+D kultiviert wurden. Die errechneten Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler der Mittelwerte der mRNA Kopienzahlen wurden auf das Haushaltsgen GAPDH normalisiert und mithilfe der Einfaktoriellen-ANOVA und „Tuckey’s multiple comparison test“ verglichen ( $n=7$ ,  $*=p<0,05$ ,  $**=p<0,001$ ). Abbildung modifiziert nach (Umrath et al., 2022).

In Abbildung 6 und Tabelle 6 sieht man, dass die durchschnittliche Genexpression der Kieferperiostzellen, die mit OB-D kultiviert wurden, bei allen getesteten Genen höher ist. Mit Ausnahme von OGN [ $F(2,6)=7,37$ ,  $p=0,012$ ] gibt es jedoch, durch die großen Abweichungen zwischen den einzelnen Patienten, keine statistische Signifikanz zwischen der OB-D- und OB+D Gruppe ( $p=0,0074$ ).

Tabelle 6: Genexpression osteogener Marker durch Kieferperiostzellen, die mit KO, OB-D und OB+D kultiviert wurden. Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler der Mittelwerte der mRNA-Kopienzahl wurden auf das Haushaltsgen GAPDH ( $n=7$ ) bezogen. Tabelle modifiziert nach (Umrath et al., 2022).

Osteogener Marker	Verhältnis der durchschnittlichen Genexpression $\pm$ Standardfehler der Mittelwerte [1/GAPDH]		
	KO	OB-D	OB+D
OPG	1.37E-01 $\pm$ 4.78E-02	4.83E-02 $\pm$ 1.44E-02	1.42E-02 $\pm$ 2.68E-03
OPN	4.43E-05 $\pm$ 1.18E-05	1.20E-04 $\pm$ 4.63E-05	1.03E-04 $\pm$ 3.42E-05
OSX	1.21E-05 $\pm$ 3.42E-06	6.78E-05 $\pm$ 3.36E-05	4.37E-05 $\pm$ 1.80E-05
Periostin	1.32E-02 $\pm$ 7.22E-03	7.11E-02 $\pm$ 3.48E-02	2.09E-02 $\pm$ 9.75E-03
ALP	2.42E-02 $\pm$ 6.30E-03	9.61E-02 $\pm$ 1.34E-02	6.77E-02 $\pm$ 1.46E-02
BSP2	6.28E-05 $\pm$ 2.00E-05	3.08E-04 $\pm$ 1.56E-04	1.05E-04 $\pm$ 5.81E-05
COL1A1	3.75E-01 $\pm$ 8.54E-02	6.12E-01 $\pm$ 1.49E-01	1.46E-01 $\pm$ 3.05E-02
OCN	3.47E-04 $\pm$ 9.49E-05	8.71E-04 $\pm$ 1.59E-04	7.46E-04 $\pm$ 1.10E-04
OGN	2.48E-02 $\pm$ 1.05E-02	4.42E-02 $\pm$ 9.34E-03	7.18E-03 $\pm$ 1.83E-03
RUNX2	1.17E-02 $\pm$ 2.70E-03	1.67E-02 $\pm$ 2.67E-03	1.17E-02 $\pm$ 2.07E-03
SPARC (OSN)	6.44E-01 $\pm$ 1.60E-01	6.78E-01 $\pm$ 2.37E-01	3.23E-01 $\pm$ 1.17E-01

### 3.1.5 Expression chondrogener und adipogener Markergene

Dexamethason gilt durch seinen pro-adipogenen Effekt auch als negativer Regulator der Osteogenese. Da auch Einflüsse von Dexamethason auf adipogene und chondrogene Markergene beschrieben werden, wurde auch die Expression dieser Markergene mittels qPCR untersucht.

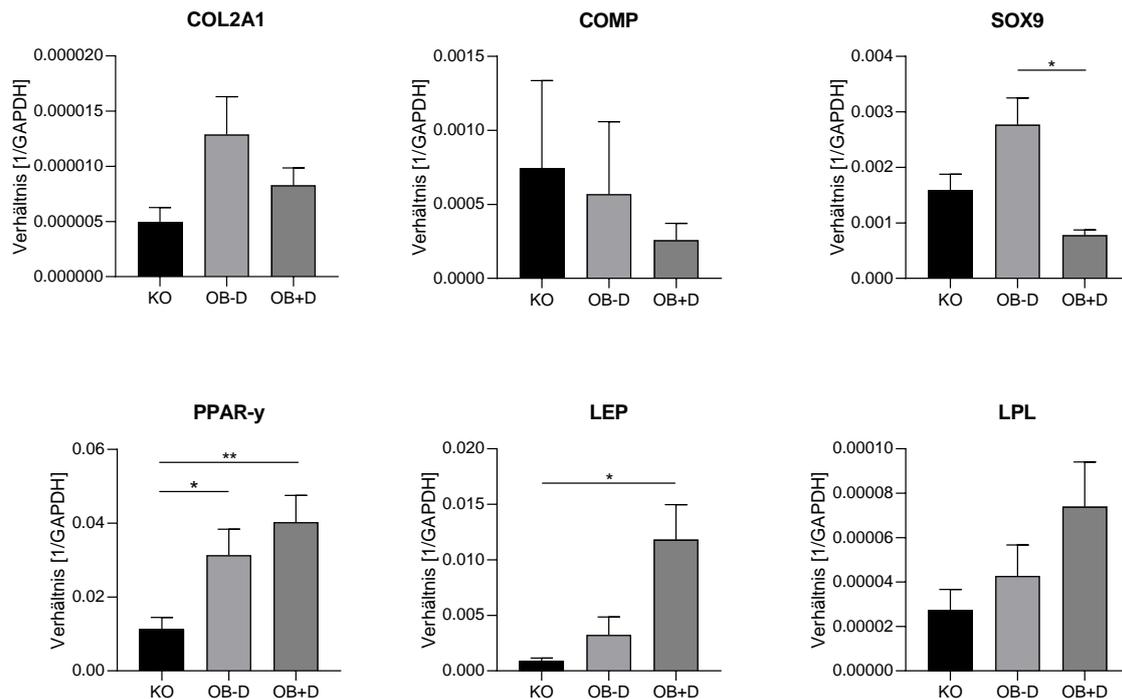


Abbildung 7: Expression der chondrogenen (COL2A1, COMP, SOX9) und adipogenen Markergene (PPAR- $\gamma$ , LEP, LPL) von Kieferperiostzellen, die 15 Tage mit KO, OB-D und OB+D kultiviert wurden. Die errechneten Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler der Mittelwerte der mRNA Kopienzahlen wurden auf das Haushaltsgen GAPDH normalisiert und mithilfe der Einfaktoriellen-ANOVA und „Tuckey’s multiple comparison test“ verglichen ( $n=7$ ,  $*=p<0,05$ ,  $**=p<0,01$ ). Abbildung modifiziert nach (Umrath et al., 2022).

In Abbildung 7 und Tabelle 7 sieht man, dass die Expression chondrogener Marker (COL2A1, COMP und SOX9) mit OB-D höher ist als mit OB+D. SOX9 gilt als Haupt-Transkriptionsfaktor während der Chondrogenese und wurde in der Gruppe ohne Dexamethason mehr als dreimal so stark exprimiert als in der Gruppe mit Dexamethason [ $F(2,6)=9,65$ ,  $p=0,006$ ]. Die stark erhöhte SOX9 Expression mit OB-D im Vergleich zu OB+D ist statistisch signifikant ( $p=0,0103$ ). Im Gegensatz dazu wurden die adipogenen Marker (PPAR- $\gamma$ , LEP und LPL) während der osteogenen Differenzierung mit OB+D höher exprimiert. Statistisch zeigt sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen OB-D und OB+D ( $p>0,05$ ).

Tabelle 7: Expression chondrogener (COL2A1, COMP und SOX9) und adipogener (LEP, LPL, PPAR-y) Markergene von Kieferperiostzellen, die mit KO, OB-D und OB+D kultiviert wurden. Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler der Mittelwerte der mRNA Kopienzahlen wurden auf das Haushaltsgen GAPDH normalisiert (n=7). Tabelle modifiziert nach (Umrath et al., 2022).

Verhältnis der durchschnittlichen Genexpression $\pm$ Standardfehler der Mittelwerte [1/GAPDH]			
	KO	OB-D	OB+D
COL2A1	4.90E-06 $\pm$ 1.30E-06	1.30E-05 $\pm$ 3.40E-06	8.30E-06 $\pm$ 1.60E-06
COMP	7.40E-04 $\pm$ 5.90E-04	5.70E-04 $\pm$ 4.90E-04	2.60E-04 $\pm$ 1.10E-04
SOX9	1.60E-03 $\pm$ 2.90E-04	2.80E-03 $\pm$ 4.80E-04	7.80E-04 $\pm$ 9.30E-05
PPAR-y	1.10E-02 $\pm$ 3.20E-03	3.10E-02 $\pm$ 7.00E-03	4.00E-02 $\pm$ 7.20E-03
LEP	9.10E-04 $\pm$ 2.40E-04	3.20E-03 $\pm$ 1.60E-03	1.20E-02 $\pm$ 3.20E-03
LPL	2.80E-05 $\pm$ 9.10E-06	4.30E-05 $\pm$ 1.40E-05	7.40E-05 $\pm$ 2.00E-05

## 3.2 Veränderungen der Zelladhäsion

Die Mineralisierungskapazität von Kieferperiostzellen, die mit OB-D kultiviert wurden, zeigt eine leichte Verbesserung im Vergleich zu Kultivierung mit OB+D. Bei der Zelladhäsion hingegen sieht man bei Kultivierung mit OB-D häufiger eine insuffiziente Zelladhäsion bzw. Ablösung des Zellrasens im Randbereich der Wells.

Unter OB-D-Bedingungen sieht man bei ungefähr der Hälfte aller Patienten Zellablösungen im Randbereich der Wells (Siehe Abbildung 3 Patient 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 11, 15, 18, 20). Wir führten diese Veränderung auf unterschiedliche Zusammensetzungen der extrazellulären Matrix zurück, sodass diese im Folgenden untersucht wurden.

### 3.2.1 Genexpression im Zusammenhang mit extrazellulärer Matrix

Die unterschiedliche Zelladhäsion während der osteogenen Differenzierung wird auch bei der Expression extrazellulärer Matrix Proteine ersichtlich (Abbildung 8 und Tabelle 8)

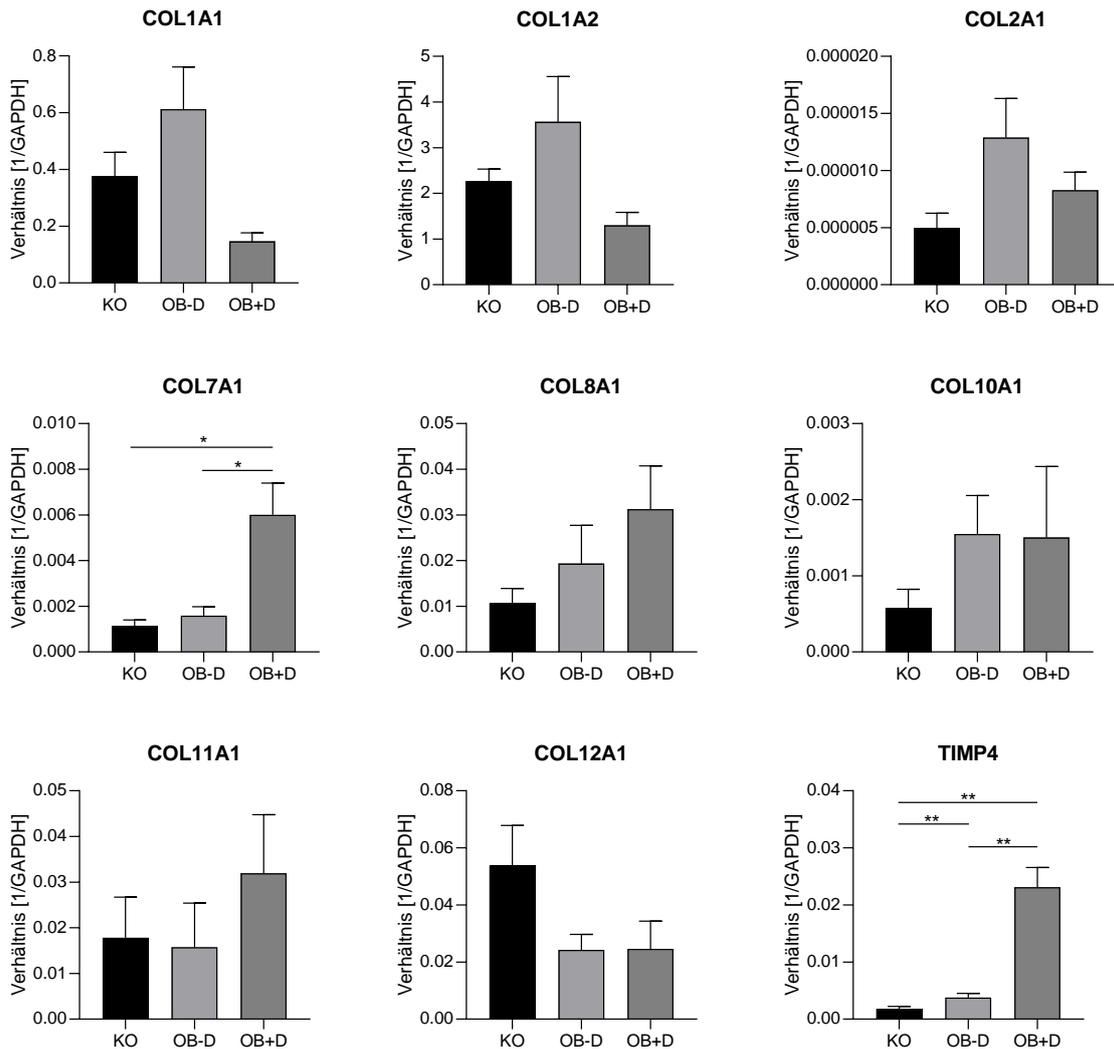


Abbildung 8: Expression Extrazellulärer Matrix Proteine von Kieferperiostzellen, die 15 Tage lang mit KO, OB-D und OB+D kultiviert wurden. Die errechneten Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler der Mittelwerte der mRNA Kopienzahlen wurden auf das Haushaltsgen GAPDH normalisiert und mithilfe der Einfaktoriellen-ANOVA und „Tuckey’s multiple comparison test“ verglichen ( $n=7$ ,  $*=p<0,05$ ,  $**=p<0,01$ ). Abbildung modifiziert nach (Umrath et al., 2022).

In Abbildung 8 sieht man, dass COL1A1, COL1A2 und COL2A1 mit OB-D stärker exprimiert wurde als mit KO und OB+D. COL7A1, COL8A1, COL11A1 und TIMP4 hingegen wurde mit OB+D stärker exprimiert. Die Expression von COL7A1 [ $F(2,6)=13,86$ ,  $p=0,007$ ] und TIMP4 [ $F(2,6)=42,67$ ,  $p=0,001$ ] ist mit OB+D im Vergleich zu OB-D statistisch signifikant erhöht (COL7A1:  $p=0,0208$ ; TIMP4:  $p=0,0017$ ).

Tabelle 8: Expression Extrazellulärer Matrix Proteine von Kieferperiostzellen, die 15 Tage lang mit KO, OB-D und OB+D kultiviert wurden. Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler der Mittelwerte der mRNA Kopienzahlen wurden auf das Haushaltsgen GAPDH normalisiert ( $n=7$ ). Tabelle modifiziert nach (Umrath et al., 2022).

	Verhältnis der durchschnittlichen Genexpression $\pm$ Standardfehler der Mittelwerte [1/GAPDH]		
	KO	OB-D	OB+D
<b>COL1A1</b>	3.75E-01 $\pm$ 8.54E-02	6.12E-01 $\pm$ 1.49E-01	1.46E-01 $\pm$ 3.05E-02
<b>COL1A2</b>	2.26E+00 $\pm$ 2.72E-01	3.56E+00 $\pm$ 9.96E-01	1.30E+00 $\pm$ 2.84E-01
<b>COL2A1</b>	4.93E-06 $\pm$ 1.34E-06	1.29E-05 $\pm$ 3.44E-06	8.27E-06 $\pm$ 1.58E-06
<b>COL7A1</b>	1.15E-03 $\pm$ 2.51E-04	1.60E-03 $\pm$ 3.88E-04	6.01E-03 $\pm$ 1.39E-03
<b>COL8A1</b>	1.07E-02 $\pm$ 3.26E-03	1.93E-02 $\pm$ 8.39E-03	3.13E-02 $\pm$ 9.48E-03
<b>COL10A1</b>	5.81E-04 $\pm$ 2.42E-04	1.55E-03 $\pm$ 5.07E-04	1.50E-03 $\pm$ 9.33E-04
<b>COL11A1</b>	1.78E-02 $\pm$ 8.91E-03	1.58E-02 $\pm$ 9.65E-03	3.19E-02 $\pm$ 1.28E-02
<b>COL12A1</b>	5.38E-02 $\pm$ 1.40E-02	2.43E-02 $\pm$ 5.42E-03	2.46E-02 $\pm$ 9.77E-03
<b>TIMP4</b>	1.80E-03 $\pm$ 4.24E-04	3.78E-03 $\pm$ 7.28E-04	2.31E-02 $\pm$ 3.44E-03

### 3.3 Einfluss von Dexamethason auf die parakrine Proteinsekretion von Kieferperiostzellen

Die Kieferperiostzellen wurden 15 Tage mit KO, OB-D und OB+D kultiviert. An Tag 15 der osteogenen Differenzierung wurde jeweils von allen drei Kultivierungsbedingungen ein Proteinprobenüberstand entnommen.

Mit Hilfe des Proteom Profilers wurde der Effekt von Dexamethason auf die parakrine Proteinsekretion von Kieferperiostzellen untersucht.

### 3.3.1 Allgemeine Proteine

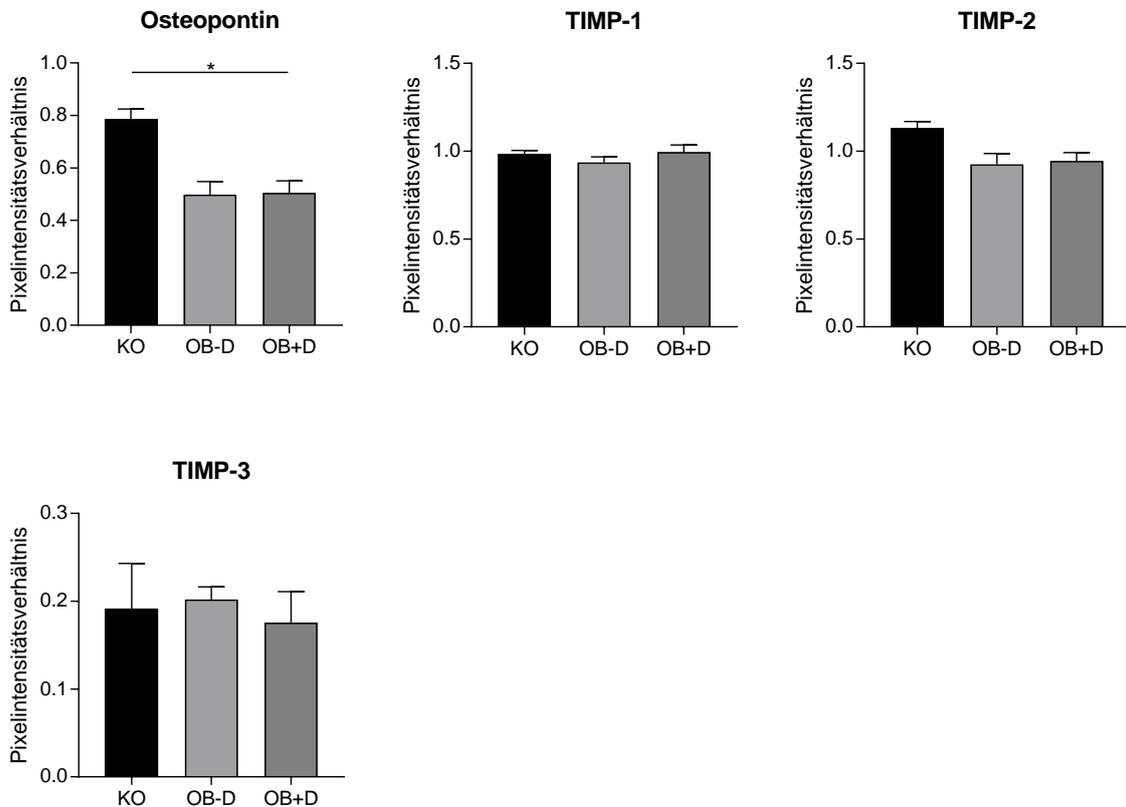


Abbildung 9: Parakrine Sekretion allgemeiner Proteine von Kieferperiostzellen, die 15 Tage mit KO, OB-D und OB+D kultiviert wurden. Es wurde die Proteinsekretion in den Überstand der Zellkulturmedien mittels Proteom Profiler untersucht. Die Pixelintensitäten der detektierten Signale wurden mit der ImageJ-Software analysiert. Die Mittelwerte des Pixelintensitätsverhältnisses  $\pm$  Standardfehler der Mittelwerte wurden durch Normalisierung auf die internen Kontrollen berechnet und mithilfe der Einfaktoriellen-ANOVA und „Tuckey’s multiple comparison test“ verglichen ( $n=3$ ,  $*=p<0,05$ ).

Osteopontin wurde mit OB-D und OB+D ähnlich sezerniert, allerdings deutlich geringer als mit KO [ $F(2,2)=32,14$ ,  $p=0,024$ ]. Die geringere Sekretion mit OB+D im Vergleich zu KO ist statistisch signifikant ( $p=0,0235$ ).

Bei TIMP-1 sind keine nennenswerten Unterschiede zwischen den drei Kulturbedingungen ersichtlich. TIMP-2 wurde sowohl mit OB-D als auch mit OB+D ähnlich sezerniert, jedoch geringer als mit KO. TIMP-3 wurde im Durchschnitt mit OB-D geringfügig häufiger sezerniert als mit KO und OB+D.

Tabelle 9. Parakrine Sekretion allgemeiner Proteine von Kieferperiostzellen, die 15 Tage mit KO, OB-D und OB+D kultiviert wurden. Die Mittelwerte des Pixelintensitätsverhältnisses  $\pm$  Standardfehler der Mittelwerte wurden durch Normalisierung auf die internen Kontrollen berechnet (n=3).

	Mittelwerte des Pixelintensitätsverhältnisses $\pm$ Standardfehler der Mittelwerte		
	KO	OB-D	OB+D
<b>Osteopontin</b>	7,85E-01 $\pm$ 3,88E-02	4,98E-01 $\pm$ 5,01E-02	5,04E-01 $\pm$ 4,61E-02
<b>TIMP-1</b>	9,83E-01 $\pm$ 2,18E-02	9,37E-01 $\pm$ 3,14E-02	9,94E-01 $\pm$ 4,09E-02
<b>TIMP-2</b>	1,13E+00 $\pm$ 3,76E-02	9,25E-01 $\pm$ 6,19E-02	9,44E-01 $\pm$ 4,75E-02
<b>TIMP-3</b>	1,91E-01 $\pm$ 5,18E-02	2,02E-01 $\pm$ 1,45E-02	1,76E-01 $\pm$ 3,53E-02

### 3.3.2 Nicht-hämatopoetische Proteine

Im nächsten Schritt wurde mit Hilfe des Proteom Profilers der Effekt von OB-D und OB+D im Vergleich zu KO auf die Expression nicht-hämatopoetischer Proteine untersucht.

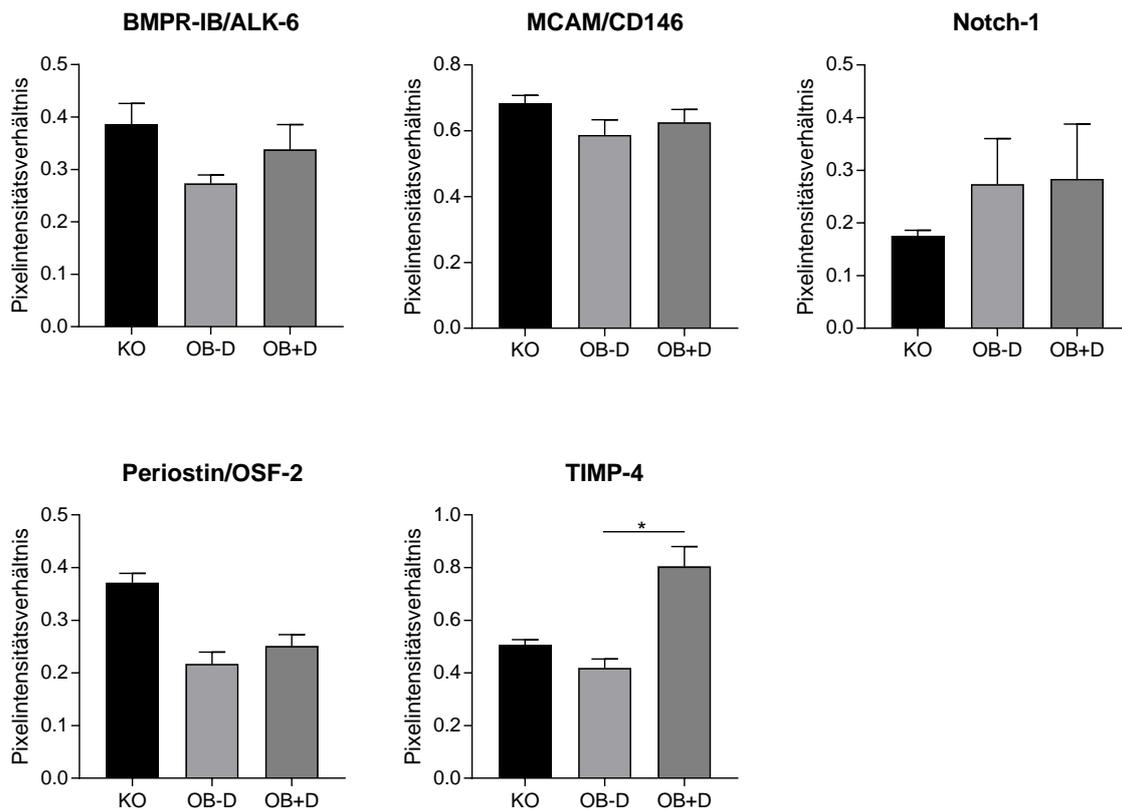


Abbildung 10: Parakrine Sekretion nicht-hämatopoetischer Proteine von Kieferperiostzellen, die 15 Tage mit KO, OB-D und OB+D kultiviert wurden. Es wurde die Proteinsekretion in den Überstand der Zellkulturmedien mittels Proteom Profiler untersucht. Die Pixelintensitäten der detektierten Signale wurden mit der ImageJ-

Software analysiert. Die Mittelwerte des Pixelintensitätsverhältnisses  $\pm$  Standardfehler der Mittelwerte wurden durch Normalisierung auf die internen Kontrollen berechnet und mithilfe der Einfaktoriellen-ANOVA und „Tuckey’s multiple comparison test“ verglichen ( $n=3$ ,  $*=p<0,05$ ).

BMPR-IB (Bone-Morphogenetic-Protein-Receptor-Type-1B) ist eine Serin/Threonin Kinase, welche unter anderem die Differenzierung von Chondrozyten und Osteoblasten positiv beeinflusst (Lavery et al., 2008). MCAM/CD146 und Periostin spielen unter anderem eine wichtige Rolle bei der Zelladhäsion (Ouhtit et al., 2009, Gillan et al., 2002). In Abbildung 10 sieht man, dass die Proteinsekretion von BMPR-IB, MCAM und Periostin durch OB-D und OB+D im Vergleich zu KO leicht, jedoch nicht signifikant, verringert ist. Die Zugabe von Dexamethason an OB steigert die BMPR-IB, Periostin und MCAM-Proteinlevel leicht, jedoch nicht signifikant. Notch-1 wurde sowohl mit OB-D als auch mit OB+D deutlich stärker sezerniert als mit KO, allerdings ohne statistische Signifikanz. TIMP-4 wird durch OB-D im Vergleich zu KO leicht verringert sezerniert. Mit OB+D hingegen ist die Sekretion von TIMP-4 deutlich erhöht [ $F(2,2)=31,3$ ,  $p=0,02$ ]. Die gesteigerte Proteinsekretion mit OB+D im Vergleich zu OB-D ist statistisch signifikant ( $p=0,048$ ).

Tabelle 10: Parakrine Sekretion nicht-hämatopoetischer Proteine von Kieferperiostzellen, die 15 Tage mit KO, OB-D und OB+D kultiviert wurden. Die Mittelwerte des Pixelintensitätsverhältnisses  $\pm$  Standardfehler der Mittelwerte wurden durch Normalisierung auf die internen Kontrollen berechnet ( $n=3$ ).

	Mittelwerte des Pixelintensitätsverhältnisses $\pm$ Standardfehler der Mittelwerte		
	KO	OB-D	OB+D
<b>BMPR-1B/ALK-6</b>	3,86E-01 $\pm$ 3,99E-02	2,73E-01 $\pm$ 1,60E-02	3,38E-01 $\pm$ 4,74E-02
<b>MCAM/CD146</b>	6,82E-01 $\pm$ 2,53E-02	5,87E-01 $\pm$ 4,62E-02	6,26E-01 $\pm$ 3,89E-02
<b>Notch-1</b>	1,76E-01 $\pm$ 1,06E-02	2,73E-01 $\pm$ 8,68E-02	2,84E-01 $\pm$ 1,04E-01
<b>Periostin/OSF-2</b>	3,72E-01 $\pm$ 1,77E-02	2,17E-01 $\pm$ 2,23E-02	2,51E-01 $\pm$ 2,15E-02
<b>TIMP-4</b>	5,05E-01 $\pm$ 2,06E-02	4,18E-01 $\pm$ 3,43E-02	8,04E-01 $\pm$ 7,60E-02

## 4 Diskussion

Um den hohen Bedarf an Knochentransplantaten in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie zu decken, werden bis dato autologe Knochentransplantate verwendet. Autologe Knochentransplantate gelten bis heute als Goldstandard zur Rekonstruktion größerer Knochendefekte, obwohl sie verschiedene Nachteile wie die Hebmorbidity mit sich bringen. Deshalb wird beim Knochen-TE bereits seit Jahrzehnten mittels mesenchymalen Stammzellen an alternativen Knochenkonstrukten zur Rekonstruktion von Knochendefekten geforscht. Allerdings ist das Translationspotenzial der *in-vitro* Ergebnisse zu *in-vivo* Studien beim Knochen-TE trotz umfangreicher Forschung sehr gering. Deshalb müssen die Protokolle der Zellkulturbedingungen weiter untersucht werden. Dabei stellt insbesondere das synthetische Glukokortikoid Dexamethason ein potenzielles Risiko dar.

Bereits 1985 wurde von Tenenbaum und Heersche beobachtet, dass die Dexamethason-Supplementierung die osteogene Differenzierung von Hühner-Periostzellen *in vitro* stimuliert (Tenenbaum and Heersche, 1985). Seitdem wird Dexamethason standardmäßig in Zellkulturmedien beigefügt, um die adipogene, chondrogene und osteogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen *in vitro* zu stimulieren (Robert et al., 2020). Allerdings unterscheiden sich die Auswirkungen von Dexamethason *in vivo* stark von denjenigen *in vitro*.

Während Dexamethason *in vitro* die Osteogenese induzieren soll, birgt die Glukokortikoidtherapie *in vivo* die Gefahr von schwerwiegenden Nebenwirkungen. Da Glukokortikoide über Glukokortikoidrezeptoren wirken, welche in jeder Körperzelle vorhanden sind, ist der gesamte Organismus von den Auswirkungen der Glukokortikoidtherapie betroffen. Es ist bereits bekannt, dass Glukokortikoide wie Dexamethason paradoxerweise bei Patienten mit Glukokortikoid Therapie zur Glukokortikoid induzierten Osteoporose mit Knochenverlust und erhöhtem Frakturrisiko führen (Lane, 2019). Dies deutet auch auf eine Reihe unerwünschter Nebenwirkungen von Dexamethason bei der osteogenen Differenzierung *in vitro* hin, welche die experimentellen Ergebnisse beeinflussen können. Da die Zellen in Zukunft auch *in vivo* zur Anwendung kommen sollen, ist jetzt schon die osteogene Differenzierung *in vitro* ohne Dexamethason wünschenswert.

Um zukünftig eine Genehmigung der Zellen für *in vivo* Studien zu bekommen, wurde bereits die Eignung von hPL als xenogen-freie Alternative zu FBS für die osteogene Differenzierung von Kieferperiostzellen *in vitro* überprüft. Dabei wurde beobachtet, dass mit hPL sowohl die Proliferationsrate der Kieferperiostzellen als auch die Anzahl der mineralisierungsfähigen Osteoprogenitor-Zellen mit dem Oberflächenmarker MSCA-1 zunimmt. Außerdem war mit hPL-Kultivierung das Mineralisationspotenzial der Kieferperiostzellen der FBS-Kultivierung überlegen und Dexamethason war häufig für eine starke Mineralisierung nicht notwendig, wenn hPL anstatt FBS verwendet wurde (Wanner et al., 2017). Aus diesem Grund konnten wir die osteogene Differenzierung mit und ohne Dexamethason bei verbesserten hPL-Zellkulturbedingungen vergleichen. In dieser Arbeit sollen die Einflüsse von Dexamethason auf die Mineralisationskapazität und Genexpression von Kieferperiostzellen untersucht werden. Außerdem sollen die Auswirkungen von Dexamethason auf die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix und die parakrine Sekretion von Kieferperiostzellen analysiert werden.

Durch die verschiedenen Versuche in dieser Arbeit wird ersichtlich, dass Dexamethason auch bei verbesserten hPL-Zellkulturbedingungen *in vitro* vielfältige Einflüsse auf das Verhalten periostaler Stammzellen hat. Die Dexamethason-Ergänzung zeigt *in vitro* Auswirkungen auf das Verhalten periostaler Stammzellen bei allen untersuchten Aspekten (Mineralisierungskapazität, Genexpression, Zusammensetzung der extrazellulären Matrix und parakrine Proteinsekretion).

## **4.1 Osteogene Differenzierung mit und ohne Dexamethason**

Da sich die Mineralisierungskapazität der Kieferperiostzellen zwischen den einzelnen Patienten teilweise deutlich unterscheidet, wurde eine größere Anzahl an Patientenzellen in die Studie einbezogen (siehe Abbildung 3).

Der genaue Grund für die Variabilität der Mineralisierungskapazität zwischen den Patienten ist unklar. Eventuell haben die unterschiedlichen Entnahmeregionen sowie die allgemeine gesundheitliche Situation der Patienten (z.B.: unbekannte Vorerkrankungen, Medikation und Immunsystem) Einflüsse auf die Mineralisierungskapazität. Denkbar sind auch Auswirkungen durch unterschiedliche Zustände bei der Entnahmeregion (z.B. Entzündungen oder vorherige Operationen) (Bilkay et al., 2008, Srisa-Art et al., 2009).

Auch das Patientenalter kann das Mineralisationspotenzial der Kieferperiostzellen beeinflussen. Auf der einen Seite sind Effekte des Patientenalters unwahrscheinlich, da periostale Stammzellen von älteren Patienten vergleichbare Eigenschaften mit denen von jüngeren Patienten haben (De Bari et al., 2006, Lim et al., 2005). Dies hängt möglicherweise mit der Stabilität der Telomere zusammen. *In vitro* Untersuchungen haben ergeben, dass nach 24 Populationsverdopplungen die Telomerlänge und Telomerase-Aktivität ähnlich zu den elterlichen Beständen ist (Ferretti and Mattioli-Belmonte, 2014). Auf der anderen Seite steigt wie bei allen Körperzellen auch bei Stammzellen mit zunehmendem Alter das Risiko von Genmutationen. Neben verschiedenen endogenen Faktoren (z.B. Replikationsfehler oder reaktiven Sauerstoffspezies) können auch exogene Faktoren (z.B. elektromagnetische Strahlung oder chemische Mutagene wie Kohlenwasserstoffe im Tabakrauch) Veränderungen der DNA-Struktur hervorrufen (Al Zouabi and Bardin, 2020).

Interessanterweise ist die Mineralisierungskapazität der Kieferperiostzellen ohne Dexamethason (OB-D) stärker als mit Dexamethason (OB+D) (siehe Abbildung 5). Dieses Ergebnis stimmt mit der Arbeit von Wanner et al. (2017) überein, wo Dexamethason bei vier von fünf Patienten für eine starke Mineralisation nicht notwendig war. Diese Ergebnisse wurden auch bei der Untersuchung der 11 osteogenen Markergene bestätigt (siehe Abbildung 6), wobei ohne Dexamethason (OB-D) die Expression bei allen osteogenen Markergenen höher ist als mit Dexamethason (OB+D). Dies wird besonders bei Periostin, BSP2, COL1A1, OGN und SPARC deutlich, wobei der Trend auch in geringerem Umfang bei allen anderen osteogenen Markergenen auffällt. Aufgrund der hohen Variabilität der Patienten müsste dieser Versuch mit mehr Patienten wiederholt werden, um diesen Trend zu bestätigen. Diese ersten Ergebnisse könnten darauf hindeuten, dass zukünftig auf die Dexamethason-Supplementierung bei der osteogenen Differenzierung mit hPL verzichtet werden kann.

## **4.2 Expression osteogener Markergene**

Bei der Expression osteogener Markergene wurde besonders OGN (Osteoglycin) bei Kultivierung mit OB-D im Vergleich zu OB+D statistisch signifikant erhöht exprimiert (Abbildung 6). OGN ist ein ubiquitär vorkommender Bestandteil der extrazellulären Matrix. Es ist an der Regulierung vieler biologischer Prozesse beteiligt. OGN bindet an

Kollagen und steigert die Kollagen-Quervernetzung. Außerdem erhöht OGN die Expression von ALP, Kollagen-1 und  $\beta$ -Catenin in Osteoblasten, was wiederum die Osteoblastendifferenzierung und Knochenentwicklung steigert (Deckx et al., 2016). Es wurde bereits beschrieben, dass OGN auch bei der senilen Osteoporose vermindert exprimiert wird (Chen et al., 2017) und dass die Dexamethason Langzeittherapie *in vivo* häufig zur Glukokortikoid induzierten Osteoporose führt (Li et al., 2013, Lane, 2019).

Einige der untersuchten osteogenen Markergene wurden durch die Dexamethason-Ergänzung (OB+D) im Vergleich zu KO sogar herunterreguliert (OPG, OGN, COL1A1, SPARC). Dies wird besonders bei OPG (Osteoprotegerin) deutlich, wobei hier die stark verminderte Expression mit OB+D im Vergleich zu KO auffällt. OPG ist ein Lockrezeptor für RANKL (Receptor-Activator-of-NF- $\kappa$ B-Ligand). Die Bindung von OPG an RANKL blockiert die Interaktion von RANKL mit seinem Rezeptor RANK. Dadurch hemmt OPG die Osteoklasten-Aktivierung und fördert die Osteoklasten-Apoptose (Luan et al., 2012).

### **4.3 Expression chondrogener und adipogener Markergene**

Bei der weiteren Untersuchung der chondrogenen und adipogenen Markergene während der osteogenen Differenzierung fällt auf, dass alle chondrogenen Markergene (COL2A1, COMP und SOX9) mit OB-D im Vergleich zu OB+D stärker exprimiert wurden (Abbildung 7). Besonders ausgeprägt ist dies bei der Expression von SOX9. SOX9 wurde in der Gruppe ohne Dexamethason mehr als dreimal so stark exprimiert als in der Gruppe mit Dexamethason. Die erhöhte Expression von SOX9 mit OB-D im Vergleich zu OB+D ist statistisch signifikant.

SOX9 ist ein Transkriptionsfaktor und spielt eine wichtige Rolle bei der chondrogenen Differenzierung und der Skelettentwicklung. Für die Differenzierung von Osteoblasten ist hingegen eine SOX9 Hemmung notwendig (Lefebvre et al., 2019). Auf der anderen Seite steht eine höhere Expression chondrogener Marker im Einklang mit der engen Verknüpfung von Chondrogenese und Osteogenese bei der chondralen Ossifikation. Neuere Studien haben gezeigt, dass die Chondrogenese und die Osteogenese ein kontinuierlicher biologischer Prozess sind. Dabei kommt es bei der chondralen Ossifikation postnatal zur direkten Umwandlung von Chondrozyten in Knochenzellen (Jing et al., 2017). Die erhöhte Expression chondrogener Marker ohne Dexamethason

deutet ferner darauf hin, dass chondrogene Differenzierungsprotokolle, die derzeit auch eine Dexamethason-Ergänzung beinhalten, ebenfalls durch das Weglassen von Dexamethason verbessert werden könnten.

Bei den adipogenen Markergenen (PPAR- $\gamma$ , LEP und LPL) hingegen ist die Expression mit OB+D im Vergleich zu OB-D erhöht (siehe Abbildung 7). Li et al. fanden in diesem Zusammenhang heraus, dass Dexamethason die osteogene Differenzierung von Stammzellen in Richtung Adipozyten verschiebt (Li et al., 2013, Lane, 2019). Die erhöhte Expression der adipogenen Markergene durch Dexamethason in Abbildung 7 deutet ebenfalls auf eine Verschiebung der Differenzierung in Richtung Adipozyten hin. Im Gegensatz zur chondrogenen Differenzierung ist die adipogene Differenzierung dafür bekannt, osteogenen Signalwegen entgegenzuwirken (Chen et al., 2016). Die adipogene und osteogene Differenzierung von MSCs wird von einer Vielzahl von Signalwegen reguliert, wobei die Signalkaskaden im Wesentlichen auf die zwei Schlüsseltranskriptionsfaktoren PPAR- $\gamma$  und Runx2 konvergieren (Tang and Lane, 2012). PPAR- $\gamma$  wird als Haupttranskriptionsfaktor der adipogenen Differenzierung (Lefterova et al., 2008) und Runx2 als Haupttranskriptionsfaktor der osteogenen Differenzierung angesehen (Langenbach and Handschel, 2013). Typischerweise geht die erhöhte Expression eines Transkriptionsfaktors mit einer Herunterregulierung des anderen einher (James, 2013). Folglich könnte die erhöhte Expression von adipogenen Markergenen durch Dexamethason die schwächere Mineralisierung und Expression osteogener Markergene erklären.

#### **4.4 Genexpression im Zusammenhang mit extrazellulärer Matrix**

Bei der osteogenen Differenzierung der Kieferperiostzellen ohne Dexamethason wurde bei etwa der Hälfte aller untersuchten Patientenzellen eine Ablösung des Zellrasens im Randbereich der Wells beobachtet (siehe Abbildung 3, Patient 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 11, 15, 18, 20). Bei der Kultivierung mit Dexamethason hingegen konnte eine Ablösung der Zellen im Randbereich bei keinem Patienten beobachtet werden.

Als mögliche Ursache für die unterschiedliche Zelladhäsion vermuteten wir eine Veränderung der extrazellulären Matrix durch Dexamethason. Diese Hypothese wurde durch die Analyse der Expression von Genen, die an der extrazellulären Matrix beteiligt

sind, überprüft. Dabei fällt auf, dass die Expression von COL1A1, COL1A2 und COL2A1 ohne Dexamethason höher ist als mit Dexamethason (siehe Abbildung 8). Die Kollagene sind eine große Proteinfamilie, die bisher über 20 verschiedene Kollagentypen umfasst. Sie sind das Hauptstrukturelement aller Bindegewebe und die am häufigsten vorkommenden Proteine in der extrazellulären Matrix. Kollagene dienen im Körper zum Großteil der Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität von Geweben (Gelse et al., 2003). Beim Knochen sind besonders COL1A1 und COL1A2 wichtig, da sie mit rund 90% den Großteil der organischen Knochenmatrix ausmachen (Clarke, 2008). Mit Dexamethason scheint die Expression von COL1A1, COL1A2 und COL2A1 runterreguliert. COL1A1, COL1A2 und COL2A1 sind der Hauptbestandteil von Kollagenfibrillen (Brodsky and Persikov, 2005) und spielen dadurch eine wichtige Rolle bei der Biegefestigkeit des Knochens. Deshalb deutet die erhöhte Expression von COL1A1, COL1A2 und COL2A1 ohne Dexamethason auf einen Benefit für die organische Knochenmatrix beim Knochen-TE. Im Gegensatz dazu wurden andere Kollagentypen (COL7A1, COL8A1 und COL11A1) durch Dexamethason hochreguliert. Besonders deutlich wird dies durch die statistische Signifikanz zwischen OB-D und OB+D bei COL7A1. COL7A1 ist die Hauptkomponente von Verankerungsfibrillen und befindet sich an der Grenzfläche zwischen Epithel und Mesenchym. Hier fungiert es in der Haut und Mundschleimhaut als wichtiges Adhäsionsprotein (Chung and Uitto, 2010). Bei der rezessiven dystrophischen Epidermolysis bullosa besteht durch Mutationen im COL7A1-Gen ein COL7A1 Mangel. Dadurch ist die Stabilität der Haut stark beeinträchtigt und es kommt zur wiederkehrenden Blasenbildung der Haut und Schleimhaut (Jacków et al., 2016, Chen et al., 2002). Dies könnte ein weiterer Grund für die verringerte Zelladhäsion der Kieferperiostzellen bei der osteogenen Differenzierung ohne Dexamethason darstellen.

COL11A1 wird neben vielen anderen Geweben auch im Knochen exprimiert. In einer aktuellen Studie wurde gezeigt, dass COL11A1 die Osteoblastenreifung beeinflusst. Die Osteoblastenreifung wurde durch COL11A1 gehemmt und in Abwesenheit von COL11A1 beschleunigt (Hafez et al., 2015). Bei der osteogenen Differenzierung der Kieferperiostzellen mit Dexamethason kam es zu einer Hochregulierung von COL11A1 (Abbildung 8). Dies deutet darauf hin, dass die Osteoblastenreifung durch Dexamethason gehemmt wird.

Neben den Auswirkungen von Dexamethason auf die Expression von verschiedenen Kollagenen wurden auch die TIMP4 Expression untersucht. TIMPs (Tissue inhibitors of metalloproteinases) sind natürliche Inhibitoren der Matrix Metalloproteinasen (MMPs), welche am Abbau der extrazellulären Matrix beteiligt sind. Dadurch haben sie wichtige regulatorische Einflüsse beim Umsatz der extrazellulären Matrix, beim Gewebeumbau und beim Zellverhalten. Außerdem modulieren sie die Angiogenese, die Zellproliferation und die Apoptose (Cabral-Pacheco et al., 2020). Die TIMP4 Expression der Kieferperiostzellen wurde durch Dexamethason statistisch signifikant hochreguliert (Abbildung 8). Die normale MMP-Aktivität ist wichtig beim Knochenumbau und beim Erhalt der Knochen- und Knorpelgesundheit. Die Hemmung des MMP-Gens hingegen kann den Knochenumbau beeinträchtigen und zu diversen Knochenpathologien (z.B. Osteolysen und Stoffwechselanomalien wie Wachstumsverzögerung) führen. Diese Einflüsse der MMPs werden durch TIMPs und diverse weitere Proteine beeinflusst (Hardy and Fernandez-Patron, 2020). Dies lässt darauf schließen, dass die erhöhte TIMP-4 Expression durch Dexamethason (Abbildung 8) vermehrt MMPs inhibiert und somit durch Dexamethason die Tendenz für die Entstehung von Knochenpathologien steigt.

#### **4.5 Einfluss von Dexamethason auf die parakrine Proteinsekretion von Kieferperiostzellen**

Bei weiteren Untersuchungen wurden neben den Einflüssen von Dexamethason auf die Genexpression mit Hilfe des Proteom Profilers auch die Auswirkungen von Dexamethason auf die parakrine Proteinsekretion untersucht. Dafür wurde von allen drei Kulturbedingungen (KO, OB-D und OB+D) an Tag 15 der osteogenen Differenzierung von Kieferperiostzellen eine Probe des Proteinüberstandes entnommen.

Die parakrine Proteinsekretion der Kieferperiostzellen von Osteopontin (OPN) und TIMP-2 ist sowohl mit OB-D als auch mit OB+D im Vergleich zu KO verringert. Zwischen OB-D und OB+D ist dabei kein Unterschied erkennbar. Es liegen Berichte vor, dass sowohl Osteopontin als auch TIMP-1 und TIMP-2 die Knochenresorption durch Osteoklasten stimulieren (Singh et al., 2018, Shibutani et al., 1999). Die Differenz zwischen KO und OB+D war bei OPN statistisch signifikant (Abbildung 9). OPN ist ein wichtiges nicht-kollagenes Knochenprotein, das fest an Hydroxylapatit bindet. Es bildet

einen wesentlichen Bestandteil der mineralisierten Knochenmatrix (Kaartinen et al., 1999). OPN wirkt als sezerniertes Protein und hat wichtige Einflüsse auf den Knochenmetabolismus. Es ist an der Proliferation, Migration und Adhäsion von MSCs, Osteoblasten und Osteoklasten beteiligt (Si et al., 2020). OPN trägt auch zum Knochenumbau bei, indem es die Osteoklastogenese und Osteoklastenaktivität fördert. Außerdem hat OPN eine regulatorische Wirkung auf das Wachstum von Hydroxylapatitkristallen und hemmt die Mineralisierung von Osteoblastenkulturen (Singh et al., 2018). Somit deutet die verringerte OPN-Sekretion sowohl mit als auch ohne Dexamethason (Abbildung 9) darauf hin, dass auch ohne Dexamethason im Hinblick auf die OPN-Wirkung keine negativen Auswirkungen auf den Knochenumbau und die Mineralisierung entstehen.

Bei der Untersuchung der nicht-hämatopoetischen Proteine ist die Sekretion von BMPR-IB, MCAM und Periostin mit OB-D und OB+D im Vergleich zur Kontrolle jeweils verringert, allerdings jeweils ohne statistische Signifikanz. Bei allen drei Proteinen ist die Sekretion mit OB-D jeweils geringfügig niedriger als mit OB+D (Abbildung 10).

Zu BMPR-IB (Bone-Morphogenetic-Protein-Receptor-Type-IB) gibt es bereits viele Studien, die darauf hinweisen, dass es neben weiteren BMP-Typ-I-Rezeptoren für die Signaltransduktion verantwortlich ist, um die Chondrogenese herbeizuführen (Kaps et al., 2004). Außerdem ist es auch an der Differenzierung von Osteoblasten und der Knochenbildung beteiligt (Lin et al., 2016). MCAM/CD146 (Melanoma-Cell-Adhesion-Molecule) und Periostin spielen unter anderem eine wichtige Rolle bei der Zelladhäsion (Ouhtit et al., 2009, Gillan et al., 2002). Dies könnte eine weitere Ursache für die teilweise insuffiziente Zelladhäsion der Kieferperiostzellen im Randbereich der Wells mit OB-D sein.

Bei der Untersuchung von Notch-1 war die Sekretion sowohl mit OB-D als auch mit OB+D im Vergleich zu KO erhöht. Notch-1 ist ein Rezeptor, der in vielen Organsystemen exprimiert wird. Die Notch-Rezeptoren 1-4 spielen eine wichtige Rolle bei der Entscheidung über das Zellschicksal, indem sie die Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose koordinieren. Im Knochen steuern Notch-Rezeptoren den Umbau und die Regeneration. Dafür besitzen sie wichtige Funktionen wie die Osteoblastendifferenzierung, Matrixmineralisierung und Osteoklastenrekrutierung (Ballhause et al., 2021). Somit deutet die vergleichbare Notch-1 Sekretion mit und ohne

Dexamethason darauf hin, dass bei der osteogenen Differenzierung der Kieferperiostzellen Dexamethason für die Osteoblastendifferenzierung und Matrixmineralisierung scheinbar keinen wesentlichen Vorteil bringt.

Das Ergebnis der parakrinen TIMP-4 Sekretion stimmt näherungsweise mit dem Ergebnis der TIMP-4 Expression in Abbildung 8 überein. Sowohl auf RNA-Ebene als auch auf Ebene der parakrinen Sekretion sind die TIMP-4 Ergebnisse mit OB+D im Vergleich zu OB-D statistisch signifikant erhöht. Dies suggeriert, dass Dexamethason über die TIMP-4-Induktion die MMP-Aktivität verringern und in weiterer Folge die Entstehung von diversen Knochenpathologien begünstigen kann (siehe 4.4 Genexpression im Zusammenhang mit extrazellulärer Matrix).

Bei der Untersuchung der parakrinen Sekretion wird der Trend deutlich, dass Dexamethason die Sekretion der untersuchten Proteine und deren Einflüsse auf den Knochenstoffwechsel nicht verbessert. Um die Tendenz dieser Ergebnisse zu bestätigen, müssen weitere Untersuchungen mit einer größeren Patientenzahl durchgeführt werden.

## **4.6 Limitationen**

Eine Einschränkung bei den qPCR-Untersuchungen in dieser Arbeit ist, dass Proteine auf RNA-Ebene und nicht auf Proteinebene untersucht wurden. Die mRNA enthält zwar die Information für die Synthese der Proteine, aber es kann bei der Umwandlung zu den Proteinen zu Abweichungen kommen. Bei der Proteinbiosynthese gelangt nach der Transkription und Prozessierung die mRNA vom Zellkern ins Zytoplasma. Dort wird die mRNA von den Ribosomen als Vorlage zur Synthese der Proteine genutzt (Translation). Die Translation kann durch verschiedene Hemmstoffe vermindert werden und durch Phosphorylierung oder Dephosphorylierung des Initiationsfaktors reguliert werden. Viele Proteine müssen während oder nach der Translation durch vielfältige biochemische Prozesse modifiziert werden (co- oder posttranslationale Modifikationen), damit sie eine Funktion ausführen können (Rassow et al., 2015). Insgesamt spielen bei der Funktionsfähigkeit eines Proteins eine Vielzahl an Einflüssen eine Rolle, wobei es auch noch einige unbekannte Mechanismen gibt, die für ein besseres Verständnis erforscht werden müssen. Zur Analyse der tatsächlich exprimierten Menge an funktionsfähigen

Proteinen müsste man die Proteine mittels Western Blot oder Immunfluoreszenz untersuchen.

Außerdem ist die Halbwertszeit der kodierenden RNA sehr kurz und liegt bei Eukaryonten zwischen 10 Minuten und 10 Stunden (Rassow et al., 2015). Dementsprechend kann es je nach Zeitpunkt der RNA-Extraktion zu erheblichen Abweichungen der gemessenen RNA-Menge kommen. Durch die ausgeprägten Schwankungen der Genexpression im zeitlichen Verlauf müsste man die Genexpression in engmaschigen zeitlichen Abständen analysieren.

Eine weitere Einschränkung wird bei der Betrachtung der Mineralisierungskapazität ersichtlich. Es besteht eine hohe Mineralisierungsvariabilität der Kieferperiostzellen von unterschiedlichen Patienten. Hinzu kommt, dass die isolierten Kieferperiostzellen der verschiedenen Patienten eine heterogene Population darstellen und nicht alle Kieferperiostzellen *in vitro* mineralisieren können. Außerdem können Einflüsse durch unbekannte Erkrankungen oder Genmutation nicht ausgeschlossen werden. Um ein gleichmäßigeres Mineralisierungspotenzial der Kieferperiostzellen zu erreichen, müssten *a priori* mithilfe von speziellen Markern die mineralisierungsfähigen Osteoprogenitor-Zellen aus der heterogenen Zellpopulation separiert werden. Mithilfe der FACS (Fluorescence-Activated-Cell-Sorting) -Analyse wurde bereits festgestellt, dass die Expression des Oberflächenmarkers MSCA-1 bei mineralisierungsfähigen Kieferperiostzellen höher ist als bei den nicht-mineralisierungsfähigen Kieferperiostzellen. Deshalb stellt die Zellfraktion mit MSCA-1 Oberflächenmarker wahrscheinlich die mineralisierungsfähigen Osteoprogenitor-Zellen dar (Alexander et al., 2010).

Das langfristige Ziel, Knochenkonstrukte mithilfe von Stammzellen *in vitro* herzustellen, die anschließend bei Patienten implantiert werden können, bedarf noch viele weitere Untersuchungen. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die aktuellen *in vitro* Differenzierungsprotokolle auf Basis von Dexamethason kein gutes Modell darstellen und weitere Forschung auf diesem Gebiet erforderlich ist. Durch die Untersuchungen in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei Verwendung von hPL Dexamethason für die osteogene Differenzierung von periostalen Stammzellen nicht benötigt wird. Die Mineralisierungskapazität der Kieferperiostzellen, die ohne Dexamethason differenziert

wurden, war im Vergleich zur Dexamethason-Supplementierung ebenbürtig und im Durchschnitt sogar leicht überlegen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Dexamethason auch *in vitro* weitreichende Auswirkungen auf die Genexpression, die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix sowie die parakrine Proteinsekretion von Kieferperiostzellen hat und Dexamethason häufig keinen Benefit bringt. Dadurch wird ersichtlich, wie Dexamethason die Ergebnisse von bisherigen *in vitro* Studien beeinflussen kann und dass die standardmäßige Dexamethason-Supplementierung bei *in vitro* Studien zukünftig kritischer evaluiert werden sollte.

## 5 Zusammenfassung

In der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie werden bis heute bei ausgedehnten Knochendefekten vorzugsweise autologe Knochentransplantate verwendet, obwohl diese mit diversen Nachteilen behaftet sind. Deshalb wird beim Bone Tissue Engineering bereits seit einigen Jahren mittels Stammzellen an alternativen Knochenkonstrukten geforscht. Als Stammzellquelle haben sich dafür periostale Stammzellen als besonders geeignet erwiesen. Zur osteogenen Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen wird standardmäßig Dexamethason verwendet. *In vivo* führen Glukokortikoide wie Dexamethason jedoch zu zahlreichen Nebenwirkungen. Um mögliche unerwünschte Nebenwirkungen von Dexamethason *in vitro* zu vermeiden und da die Zellen in Zukunft auch *in vivo* zur Anwendung kommen sollen, ist jetzt schon die osteogene Differenzierung ohne Dexamethason wünschenswert. Es wurde bereits gezeigt, dass Dexamethason für die osteogene Differenzierung periostaler Stammzellen nicht mehr benötigt wird, wenn humanes Plättchenlysat (hPL) anstatt fetalem Kälberserum (FCS) verwendet wird. Dadurch sind die Kulturbedingungen bereits viel näher an der natürlichen Situation *in vivo* und es konnte die osteogene Differenzierung mit und ohne Dexamethason verglichen werden. Das Ziel dieser Arbeit war, die Einflüsse von Dexamethason auf die Mineralisation, Genexpression und Zusammensetzung der extrazellulären Matrix sowie auf die parakrine Sekretion von Kieferperiostzellen zu untersuchen.

Die periostalen Stammzellen in dieser Arbeit wurden aus kleinen Kieferperioststücken von 20 Patienten isoliert und mit hPL-Medium kultiviert. Um die osteogene Differenzierung einzuleiten, wurden die Kieferperiostzellen für 15 Tage mit Osteoblastenmedium ohne Dexamethason (OB-D), Osteoblastenmedium mit Dexamethason (OB+D) und Kontrollmedium (KO) kultiviert. Zur Beurteilung der Mineralisierungskapazität erfolgte nach 15 Tagen die Alizarin Rot-Färbung und Quantifizierung. Mithilfe der qPCR wurde die Expression verschiedener Gene untersucht. Außerdem wurde die parakrine Proteinsekretion der Kieferperiostzellen mit dem Proteom Profiler analysiert.

Zusammenfassend liefert die Arbeit Belege dafür, dass die aktuellen Differenzierungsprotokolle *in vitro* auf Basis von Dexamethason kritisch evaluiert werden

sollten. Durch die Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die osteogene Differenzierung periostaler Stammzellen bei Verwendung von hPL nicht von Dexamethason abhängig ist. Die Ergebnisse zeigen, dass die Mineralisierungskapazität der Kieferperiostzellen, die ohne Dexamethason differenziert wurden, nicht verringert ist und stattdessen sogar die osteogene Differenzierung geringfügig verbessert wurde.

Außerdem wird ersichtlich, dass der Zusatz von Dexamethason bei der osteogenen Differenzierung periostaler Stammzellen weitreichende Einflüsse bei allen untersuchten Aspekten (Mineralisierungskapazität, Genexpression, Zusammensetzung der extrazellulären Matrix und parakrine Proteinsekretion) hat. Die erhöhte Expression der chondrogenen Markergene ohne Dexamethason und die vermehrte Expression der adipogenen Markergene mit Dexamethason weisen darauf hin, dass Dexamethason die osteogene Differenzierung negativ beeinflusst. Deshalb müssen die Auswirkungen von Dexamethason auf den Phänotyp und das Verhalten von Zellen bei der Bewertung der Ergebnisse von *in vitro* Studien berücksichtigt werden.

Da durch die Abwesenheit von Dexamethason keine negativen Auswirkungen beobachtet werden konnten, sollte die standardmäßige Dexamethasonergänzung bei der Zellkultivierung kritisch evaluiert und eine Kultivierung ohne Dexamethason in Betracht gezogen werden.

## 6 Literaturverzeichnis

AGHALI, A. 2021. Craniofacial Bone Tissue Engineering: Current Approaches and Potential Therapy. *Cells*, 10.

AL-HIJAILAN, R. 2019. *Establishment of endothelialized cardiac tissue using human induced pluripotent stem cells generated cardiomyocytes.*

AL ZOUABI, L. & BARDIN, A. J. 2020. Stem Cell DNA Damage and Genome Mutation in the Context of Aging and Cancer Initiation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 12.

ALEXANDER, D., RIEGER, M., KLEIN, C., ARDJOMANDI, N. & REINERT, S. 2013. Selection of osteoprogenitors from the jaw periosteum by a specific animal-free culture medium. *PLoS One*, 8, e81674.

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.

ALMALKI, S. G. & AGRAWAL, D. K. 2016. Key transcription factors in the differentiation of mesenchymal stem cells. *Differentiation*, 92, 41-51.

ALTAIE, A., OWSTON, H. & JONES, E. 2016. Use of platelet lysate for bone regeneration - are we ready for clinical translation? *World J Stem Cells*, 8, 47-55.

AMIZUKA, N., YAMAMOTO, T. & HASEGAWA, T. 2014. [Bone and Stem Cells. Cellular network in bone micro-environment - histological and ultrastructural aspects -]. *Clin Calcium*, 24, 475-85.

ARMSTRONG, J. P. K. & STEVENS, M. M. 2020. Using Remote Fields for Complex Tissue Engineering. *Trends Biotechnol*, 38, 254-263.

BALLHAUSE, T. M., JIANG, S., BARANOWSKY, A., BRANDT, S., MERTENS, P. R., FROSCH, K. H., YORGAN, T. & KELLER, J. 2021. Relevance of Notch Signaling for Bone Metabolism and Regeneration. *Int J Mol Sci*, 22.

BILKAY, U., TOKAT, C., HELVACI, E., OZEK, C., ZEKIOGLU, O., ONAT, T. & SONGUR, E. 2008. Osteogenic capacities of tibial and cranial periosteum: a biochemical and histologic study. *J Craniofac Surg*, 19, 453-8.

BISWAS, A. & HUTCHINS, R. 2007. Embryonic stem cells. *Stem Cells and Development*. *Stem Cells Dev*, 16, 213-222.

BOZDAĞ, S. C., YÜKSEL, M. K. & DEMIRER, T. 2018. Adult Stem Cells and Medicine. *Adv Exp Med Biol*, 1079, 17-36.

BRAUCHLE, E., CARVAJAL BERRIO, D., RIEGER, M., SCHENKE-LAYLAND, K., REINERT, S. & ALEXANDER, D. 2017. Raman Spectroscopic Analyses of Jaw Periosteal Cell Mineralization. *Stem Cells Int*, 2017, 1651376.

BRODSKY, B. & PERSIKOV, A. V. 2005. Molecular structure of the collagen triple helix. *Adv Protein Chem*, 70, 301-39.

BROWN, C., MCKEE, C., BAKSHI, S., WALKER, K., HAKMAN, E., HALASSY, S., SVINARICH, D., DODDS, R., GOVIND, C. K. & CHAUDHRY, G. R. 2019. Mesenchymal stem cells: Cell therapy and regeneration potential. *J Tissue Eng Regen Med*, 13, 1738-1755.

BRUNET, A., GOODELL, M. A. & RANDO, T. A. 2023. Ageing and rejuvenation of tissue stem cells and their niches. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 24, 45-62.

BRYNIARSKA, N., KUBIAK, A., ŁABĘDŹ-MASŁOWSKA, A. & ZUBA-SURMA, E. 2019. Impact of developmental origin, niche mechanics and oxygen availability on osteogenic differentiation capacity of mesenchymal stem/stromal cells. *Acta Biochim Pol*, 66, 491-498.

BURNOUF, T., STRUNK, D., KOH, M. B. & SCHALLMOSER, K. 2016. Human platelet lysate: Replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation? *Biomaterials*, 76, 371-87.

CABLE, J., FUCHS, E., WEISSMAN, I., JASPER, H., GLASS, D., RANDO, T. A., BLAU, H., DEBNATH, S., OLIVA, A., PARK, S., PASSEGUÉ, E., KIM, C. & KRASNOW, M. A. 2020. Adult stem cells and regenerative medicine-a symposium report. *Ann N Y Acad Sci*, 1462, 27-36.

CABRAL-PACHECO, G. A., GARZA-VELOZ, I., CASTRUITA-DE LA ROSA, C., RAMIREZ-ACUÑA, J. M., PEREZ-ROMERO, B. A., GUERRERO-RODRIGUEZ, J. F., MARTINEZ-AVILA, N. & MARTINEZ-FIERRO, M. L. 2020. The Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Diseases. *Int J Mol Sci*, 21.

CECCARELLI, G., GRAZIANO, A., BENEDETTI, L., IMBRIANI, M., ROMANO, F., FERRAROTTI, F., AIMETTI, M. & CUSELLA DE ANGELIS, G. M. 2016. Osteogenic Potential of Human Oral-Periosteal Cells (PCs) Isolated From Different Oral Origin: An In Vitro Study. *J Cell Physiol*, 231, 607-12.

CHEN, M., COSTA, F. K., LINDVAY, C. R., HAN, Y. P. & WOODLEY, D. T. 2002. The recombinant expression of full-length type VII collagen and characterization of molecular mechanisms underlying dystrophic epidermolysis bullosa. *J Biol Chem*, 277, 2118-24.

CHEN, Q., SHOU, P., ZHENG, C., JIANG, M., CAO, G., YANG, Q., CAO, J., XIE, N., VELLETRI, T., ZHANG, X., XU, C., ZHANG, L., YANG, H., HOU, J., WANG, Y. & SHI, Y. 2016. Fate decision of mesenchymal stem cells: adipocytes or osteoblasts? *Cell Death Differ*, 23, 1128-39.

CHEN, X., CHEN, J., XU, D., ZHAO, S., SONG, H. & PENG, Y. 2017. Effects of Osteoglycin (OGN) on treating senile osteoporosis by regulating MSCs. *BMC Musculoskelet Disord*, 18, 423.

CHUNG, H. J. & UITTO, J. 2010. Type VII collagen: the anchoring fibril protein at fault in dystrophic epidermolysis bullosa. *Dermatol Clin*, 28, 93-105.

CLARKE, B. 2008. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol*, 3 Suppl 3, S131-9.

COSTELLO, B. J., SHAH, G., KUMTA, P. & SFEIR, C. S. 2010. Regenerative medicine for craniomaxillofacial surgery. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*, 22, 33-42.

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.

DECKX, S., HEYMANS, S. & PAPAGEORGIOU, A. P. 2016. The diverse functions of osteoglycin: a deceitful dwarf, or a master regulator of disease? *Faseb j*, 30, 2651-61.

DELLA BELLA, E., BUETTI-DINH, A., LICANDRO, G., AHMAD, P., BASOLI, V., ALINI, M. & STODDART, M. J. 2021. Dexamethasone Induces Changes in Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stromal Cells via SOX9 and PPARG, but Not RUNX2. *Int J Mol Sci*, 22.

DING, D. C., SHYU, W. C. & LIN, S. Z. 2011. Mesenchymal stem cells. *Cell Transplant*, 20, 5-14.

DULAK, J., SZADE, K., SZADE, A., NOWAK, W. & JÓZKOWICZ, A. 2015. Adult stem cells: hopes and hypes of regenerative medicine. *Acta Biochim Pol*, 62, 329-37.

FELTHAUS, O., GOSAU, M., KLEIN, S., PRANTL, L., REICHERT, T. E., SCHMALZ, G. & MORSCZECK, C. 2014. Dexamethasone-related osteogenic differentiation of dental follicle cells depends on ZBTB16 but not Runx2. *Cell Tissue Res*, 357, 695-705.

FERNÁNDEZ-TRESGUERRES-HERNÁNDEZ-GIL, I., ALOBERA-GRACIA, M. A., DELCANTO-PINGARRÓN, M. & BLANCO-JEREZ, L. 2006. Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 11, E151-7.

FERRETTI, C. & MATTIOLI-BELMONTE, M. 2014. Periosteum derived stem cells for regenerative medicine proposals: Boosting current knowledge. *World J Stem Cells*, 6, 266-77.

FRANCESCHI, R. T., GE, C., XIAO, G., ROCA, H. & JIANG, D. 2007. Transcriptional regulation of osteoblasts. *Ann N Y Acad Sci*, 1116, 196-207.

FRANCESCHI, R. T. & XIAO, G. 2003. Regulation of the osteoblast-specific transcription factor, Runx2: responsiveness to multiple signal transduction pathways. *J Cell Biochem*, 88, 446-54.

GELSE, K., PÖSCHL, E. & AIGNER, T. 2003. Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev*, 55, 1531-46.

GILLAN, L., MATEI, D., FISHMAN, D. A., GERBIN, C. S., KARLAN, B. Y. & CHANG, D. D. 2002. Periostin secreted by epithelial ovarian carcinoma is a ligand for alpha(V)beta(3) and alpha(V)beta(5) integrins and promotes cell motility. *Cancer Res*, 62, 5358-64.

GRABOWSKI, P. 2009. Physiology of bone. *Endocr Dev*, 16, 32-48.

GREEN, E., TODD, B. & HEATH, D. 1990. Mechanism of glucocorticoid regulation of alkaline phosphatase gene expression in osteoblast-like cells. *Eur J Biochem*, 188, 147-53.

HAFEZ, A., SQUIRES, R., PEDRACINI, A., JOSHI, A., SEEGMILLER, R. E. & OXFORD, J. T. 2015. Col11a1 Regulates Bone Microarchitecture during Embryonic Development. *J Dev Biol*, 3, 158-176.

HANNA, H., MIR, L. M. & ANDRE, F. M. 2018. In vitro osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells generates cell layers with distinct properties. *Stem Cell Res Ther*, 9, 203.

HARDY, E. & FERNANDEZ-PATRON, C. 2020. Destroy to Rebuild: The Connection Between Bone Tissue Remodeling and Matrix Metalloproteinases. *Front Physiol*, 11, 47.

HENSCHLER, R., GABRIEL, C., SCHALLMOSER, K., BURNOUF, T. & KOH, M. B. C. 2019. Human platelet lysate current standards and future developments. *Transfusion*, 59, 1407-1413.

HULSART-BILLSTRÖM, G., DAWSON, J. I., HOFMANN, S., MÜLLER, R., STODDART, M. J., ALINI, M., REDL, H., EL HAJ, A., BROWN, R., SALIH, V., HILBORN, J., LARSSON, S. & OREFFO, R. O. 2016. A surprisingly poor correlation between in vitro and in vivo testing of biomaterials for bone regeneration: results of a multicentre analysis. *Eur Cell Mater*, 31, 312-22.

JACKÓW, J., TITEUX, M., PORTIER, S., CHARBONNIER, S., GANIER, C., GAUCHER, S. & HOVNANIAN, A. 2016. Gene-Corrected Fibroblast Therapy for Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa using a Self-Inactivating COL7A1 Retroviral Vector. *J Invest Dermatol*, 136, 1346-1354.

JAMES, A. W. 2013. Review of Signaling Pathways Governing MSC Osteogenic and Adipogenic Differentiation. *Scientifica (Cairo)*, 2013, 684736.

JANSEN, L., MORATIN, J., WALDMANN, A., ZAOU, K., HOLLECZEK, B., NENNECKE, A., PRITZKULEIT, R., PLINKERT, P. K., HOFFMANN, J. & ARNDT, V. 2021. [Oral and pharyngeal cancer: incidence, mortality, and survival in Germany]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 64, 941-950.

JING, Y., JING, J., YE, L., LIU, X., HARRIS, S. E., HINTON, R. J. & FENG, J. Q. 2017. Chondrogenesis and osteogenesis are one continuous developmental and lineage defined biological process. *Sci Rep*, 7, 10020.

KAARTINEN, M. T., PIRHONEN, A., LINNALA-KANKKUNEN, A. & MÄENPÄÄ, P. H. 1999. Cross-linking of osteopontin by tissue transglutaminase increases its collagen binding properties. *J Biol Chem*, 274, 1729-35.

KAPS, C., HOFFMANN, A., ZILBERMAN, Y., PELLER, G., HÄUPL, T., SITTINGER, M., BURMESTER, G., GAZIT, D. & GROSS, G. 2004. Distinct roles of BMP receptors Type IA and IB in osteo-/chondrogenic differentiation in mesenchymal progenitors (C3H10T1/2). *Biofactors*, 20, 71-84.

- KOMORI, T. 2006. Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *J Cell Biochem*, 99, 1233-9.
- KURTZ, A., PAPE, H.-C. & SILBERNAGL, S. 2014. *Physiologie*, Stuttgart, Thieme Verlag.
- LANE, N. E. 2019. Glucocorticoid-Induced Osteoporosis: New Insights into the Pathophysiology and Treatments. *Curr Osteoporos Rep*, 17, 1-7.
- LANG, F. & FÖLLER, M. 2019a. Allgemeine Endokrinologie. In: BRANDES, R., LANG, F. & SCHMIDT, R. F. (eds.) *Physiologie des Menschen*. 32. ed. Berlin: Springer Verlag.
- LANG, F. & FÖLLER, M. 2019b. Nebennierenrindenhormone. In: BRANDES, R., LANG, F. & SCHMIDT, R. F. (eds.) *Physiologie des Menschen*. 32. ed. Berlin: Springer Verlag.
- LANGENBACH, F. & HANDSCHEL, J. 2013. Effects of dexamethasone, ascorbic acid and beta-glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro. *Stem Cell Res Ther*, 4, 117.
- LANGER, R. & VACANTI, J. P. 1993. Tissue engineering. *Science*, 260, 920-6.
- LAVERY, K., SWAIN, P., FALB, D. & ALAOUI-ISMAILI, M. H. 2008. BMP-2/4 and BMP-6/7 differentially utilize cell surface receptors to induce osteoblastic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Biol Chem*, 283, 20948-58.
- LEFEBVRE, V., ANGELOZZI, M. & HASEEB, A. 2019. SOX9 in cartilage development and disease. *Curr Opin Cell Biol*, 61, 39-47.
- LEFTEROVA, M. I., ZHANG, Y., STEGER, D. J., SCHUPP, M., SCHUG, J., CRISTANCHO, A., FENG, D., ZHUO, D., STOECKERT, C. J., JR., LIU, X. S. & LAZAR, M. A. 2008. PPARgamma and C/EBP factors orchestrate adipocyte biology via adjacent binding on a genome-wide scale. *Genes Dev*, 22, 2941-52.

LI, J., ZHANG, N., HUANG, X., XU, J., FERNANDES, J. C., DAI, K. & ZHANG, X. 2013. Dexamethasone shifts bone marrow stromal cells from osteoblasts to adipocytes by C/EBPalpha promoter methylation. *Cell Death Dis*, 4, e832.

LIAN, J. B., SHALHOUB, V., ASLAM, F., FRENKEL, B., GREEN, J., HAMRAH, M., STEIN, G. S. & STEIN, J. L. 1997. Species-specific glucocorticoid and 1,25-dihydroxyvitamin D responsiveness in mouse MC3T3-E1 osteoblasts: dexamethasone inhibits osteoblast differentiation and vitamin D down-regulates osteocalcin gene expression. *Endocrinology*, 138, 2117-27.

LIM, S. M., CHOI, Y. S., SHIN, H. C., LEE, C. W. & KIM, D. I. 2005. Isolation of human periosteum-derived progenitor cells using immunophenotypes for chondrogenesis. *Biotechnol Lett*, 27, 607-11.

LIN, S., SVOBODA, K. K., FENG, J. Q. & JIANG, X. 2016. The biological function of type I receptors of bone morphogenetic protein in bone. *Bone Res*, 4, 16005.

LUAN, X., LU, Q., JIANG, Y., ZHANG, S., WANG, Q., YUAN, H., ZHAO, W., WANG, J. & WANG, X. 2012. Crystal structure of human RANKL complexed with its decoy receptor osteoprotegerin. *J Immunol*, 189, 245-52.

LÜLLMANN-RAUCH, R. & ASAN, E. 2019. *Taschenlehrbuch Histologie*, Stuttgart, Thieme Verlag.

NAILI, S., VAN RIETBERGEN, B., SANSALONE, V. & TAYLOR, D. 2011. Bone remodeling. *J Mech Behav Biomed Mater*, 4, 827-8.

NAKASHIMA, K. & DE CROMBRUGGHE, B. 2003. Transcriptional mechanisms in osteoblast differentiation and bone formation. *Trends Genet*, 19, 458-66.

OELLER, M., LANER-PLAMBERGER, S., KRISCH, L., ROHDE, E., STRUNK, D. & SCHALLMOSER, K. 2021. Human Platelet Lysate for Good Manufacturing Practice-Compliant Cell Production. *Int J Mol Sci*, 22.

OUHTIT, A., GAUR, R. L., ABD ELMAGEED, Z. Y., FERNANDO, A., THOUTA, R., TRAPPEY, A. K., ABDRAHMAN, M. E., EL-SAYYAD, H. I., RAO, P. & RAJ, M. G. 2009. Towards understanding the mode of action of the multifaceted cell adhesion receptor CD146. *Biochim Biophys Acta*, 1795, 130-6.

RADTKE, R. 2019. *Entwicklung der Lebenserwartung bei Geburt in Deutschland nach Geschlecht in den Jahren von 1950 bis 2060 (in Jahren)* [Online]. Available: <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/273406/umfrage/entwicklung-der-lebenserwartung-bei-geburt--in-deutschland-nach-geschlecht/> [Accessed 03.10.2019].

RASSOW, J., HAUSER, K., NETZKER, R. & DEUTZMANN, R. 2015. *Biochemie*, Stuttgart, Thieme Verlag.

RIMANDO, M. G., WU, H. H., LIU, Y. A., LEE, C. W., KUO, S. W., LO, Y. P., TSENG, K. F., LIU, Y. S. & LEE, O. K. 2016. Glucocorticoid receptor and Histone deacetylase 6 mediate the differential effect of dexamethasone during osteogenesis of mesenchymal stromal cells (MSCs). *Sci Rep*, 6, 37371.

ROBERT, A. W., MARCON, B. H., DALLAGIOVANNA, B. & SHIGUNOV, P. 2020. Adipogenesis, Osteogenesis, and Chondrogenesis of Human Mesenchymal Stem/Stromal Cells: A Comparative Transcriptome Approach. *Front Cell Dev Biol*, 8, 561.

SCHALLMOSER, K., HENSCHLER, R., GABRIEL, C., KOH, M. B. C. & BURNOUF, T. 2020. Production and Quality Requirements of Human Platelet Lysate: A Position Statement from the Working Party on Cellular Therapies of the International Society of Blood Transfusion. *Trends Biotechnol*, 38, 13-23.

SCHREZENMEIER, H. & SEIFRIED, E. 2010. Buffy-coat-derived pooled platelet concentrates and apheresis platelet concentrates: which product type should be preferred? *Vox Sang*, 99, 1-15.

SHAFIEE, A. & ATALA, A. 2017. Tissue Engineering: Toward a New Era of Medicine. *Annu Rev Med*, 68, 29-40.

SHIBUTANI, T., YAMASHITA, K., AOKI, T., IWAYAMA, Y., NISHIKAWA, T. & HAYAKAWA, T. 1999. Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1 and TIMP-2) stimulate osteoclastic bone resorption. *J Bone Miner Metab*, 17, 245-51.

SI, J., WANG, C., ZHANG, D., WANG, B. & ZHOU, Y. 2020. Osteopontin in Bone Metabolism and Bone Diseases. *Med Sci Monit*, 26, e919159.

SINGH, A., GILL, G., KAUR, H., AMHMED, M. & JAKHU, H. 2018. Role of osteopontin in bone remodeling and orthodontic tooth movement: a review. *Prog Orthod*, 19, 18.

SRISA-ART, M., BONZANI, I. C., WILLIAMS, A., STEVENS, M. M., DEMELLO, A. J. & EDEL, J. B. 2009. Identification of rare progenitor cells from human periosteal tissue using droplet microfluidics. *Analyst*, 134, 2239-45.

TANG, Q. Q. & LANE, M. D. 2012. Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. *Annu Rev Biochem*, 81, 715-36.

TENENBAUM, H. C. & HEERSCHKE, J. N. 1985. Dexamethasone stimulates osteogenesis in chick periosteum in vitro. *Endocrinology*, 117, 2211-7.

UCCELLI, A., MORETTA, L. & PISTOIA, V. 2008. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol*, 8, 726-36.

UMRATH, F., PFEIFER, A., CEN, W., DANALACHE, M., REINERT, S., ALEXANDER, D. & NAROS, A. 2022. How osteogenic is dexamethasone?-effect of the corticosteroid on the osteogenesis, extracellular matrix, and secretion of osteoclastogenic factors of jaw periosteum-derived mesenchymal stem/stromal cells. *Front Cell Dev Biol*, 10, 953516.

VAN HEEST, A. & SWIONTKOWSKI, M. 1999. Bone-graft substitutes. *Lancet*, 353 Suppl 1, Si28-9.

WANG, H., PANG, B., LI, Y., ZHU, D., PANG, T. & LIU, Y. 2012. Dexamethasone has variable effects on mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*, 14, 423-30.

WANG, T., ZHANG, X. & BIKLE, D. D. 2017. Osteogenic Differentiation of Periosteal Cells During Fracture Healing. *J Cell Physiol*, 232, 913-921.

WANNER, Y., UMRATH, F., WAIDMANN, M., REINERT, S. & ALEXANDER, D. 2017. Platelet Lysate: The Better Choice for Jaw Periosteal Cell Mineralization. *Stem Cells Int*, 2017, 8303959.

WARNAKULASURIYA, S. 2009. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol*, 45, 309-16.

WEBER, T. & WAGNER, K. 2021. Replacing fetal bovine serum (FBS) in research and testing. *Altex*, 38, 163-164.

WEINSTEIN, R. S. 2012. Glucocorticoid-induced osteoporosis and osteonecrosis. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 41, 595-611.

## **7 Anhang**

### **7.1 Publikation von Ergebnissen dieser Dissertation**

**How osteogenic is dexamethasone?-effect of the corticosteroid on the osteogenesis, extracellular matrix, and secretion of osteoclastogenic factors of jaw periosteum-derived mesenchymal stem/stromal cells**

Felix Umrath, Achim Pfeifer, Wanjing Cen, Marina Danalache, Siegmar Reinert, Dorothea Alexander, Andreas Naros

Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2022; 10: 953516.

## **7.2 Erklärungen zum Eigenanteil der Dissertationsschrift**

Die Arbeit wurde in der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Universitätsklinik Tübingen unter Betreuung von Prof. Dr. Dr. Siegmund Reinert durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Prof. Dr. Dorothea Alexander-Friedrich (wissenschaftliche Begleitperson), Dr. Dr. Andreas Naros (wissenschaftliche Begleitperson) und Dr. Felix Umrath (Mentor).

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Labormitglieder (Dr. Felix Umrath und Adelheid Munz) von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte, nach Instruktion und Unterstützung durch Dr. Felix Umrath, eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig nach Anleitung durch Dr. Dr. Andreas Naros verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 1. November 2024

[Unterschrift]

## 7.3 Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei Herr Prof. Dr. Dr. Siegm. Reinert bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit unter seiner Leitung durchzuführen.

Herr Dr. Dr. Andreas Naros danke ich besonders für die Themastellung, die hervorragende Betreuung und seine ständige Hilfsbereitschaft. Auch für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens möchte ich mich herzlich bedanken.

Besonderen Dank auch an Frau Prof. Dr. Dorothea Alexander-Friedrich und Herr Dr. Felix Umrath sowie die gesamte Arbeitsgruppe des Forschungslabors für die kollegiale Atmosphäre, viele wertvolle Anregungen und stete Hilfsbereitschaft, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei meiner Familie möchte ich mich ganz besonders herzlich bedanken für die uneingeschränkte und vielfältige Unterstützung während meines Studiums und der Fertigstellung dieser Arbeit.