

Aus der
Universitätsklinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer-
und Gesichtschirurgie

**Vergleichende Untersuchungen von Kiefer- und
Fibulaperiostzellen in einer 3D- Kultur**

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

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

**vorgelegt von
Yantren, Jonas Emin**

2026

Dekan: Professor Dr. S. Y. Brucker

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

2.Berichterstatter: Professor Dr. A. Daigeler

Tag der Disputation: 05.03.2026

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Knochentransplantate	1
1.1.1 Autologe Knochentransplantate	2
1.1.2 Alternative Knochenersatz-Materialien.....	4
1.2 Knochenheilung	6
1.3 Embryologischer Hintergrund	7
1.3.1 Entwicklung der Mandibula.....	7
1.3.2 Entwicklung der Fibula	9
1.4 Periost als Stammzellquelle	9
1.5 Stammzellen	10
1.6 Osteogene Differenzierung	15
1.7 Tissue Engineering	17
1.8 Zielsetzung	21
2 Methoden	22
2.1 Gewinnung des Periostes und Anlegen einer primären Kultur	22
2.2 Kryokonservierung	22
2.3 Kultivierung von hPDC	23
2.4 Besiedlung der Scaffolds und Start der osteogenen Differenzierung	23
2.5 Alkalische Phosphatase-Assay	25
2.5.1 Probenentnahme	25
2.5.2 Start der enzymatischen Reaktion	26
2.6 Echtzeit qPCR	26
2.6.1 Probenentnahme	27
2.6.2 Isolierung der RNA	27
2.6.3 cDNA-Synthese	27
2.6.4 RT-qPCR	28
2.6.5 Statistische Auswertung	28
2.7 Histologische Untersuchungen	28
2.7.1 Einbettung	29
2.7.2 Schnitte herstellen	29
2.7.3 Färbungen	29
2.7.4 Auswertung.....	30
2.8 Alizarin Quantifizierung	30
2.8.1 Färbung der Scaffolds	30
2.8.2 Quantifizierung	31
2.9 Proteom Profiler Array	31
2.10 Statistische Auswertung	32
3 Ergebnisse	33
3.1 Alizarin Quantifizierung	33

3.2 Mikroskopische Untersuchungen.....	37
3.3 ALP Assay.....	40
3.4 Genexpression.....	41
3.5 Proteom Profiler Array.....	48
4 Diskussion	54
4.1 Bewertung der Alizarin Quantifizierung	54
4.2 Bewertung der histologischen Ergebnisse.....	56
4.3 Bewertung des ALP Assay.....	60
4.4 Bewertung der Genexpression	60
4.5 Bewertung des Proteom Profiler	62
4.6 Bewertung des Differenzierungspotenzials	64
4.7 Kritische Bewertung der Arbeit	67
4.8 Ausblick und Fazit	70
5 Zusammenfassung.....	72
6 Literaturverzeichnis	73
7 Erklärung zum Eigenanteil.....	85

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Scaffolds mit Alizarin gefärbt	- 34 -
Abbildung 2	Scaffolds mit Alizarin gefärbt	- 35 -
Abbildung 3	Blank mit Alizarin gefärbt	- 35 -
Abbildung 4	Alizarinkonzentration nach 21 Tagen.....	- 36 -
Abbildung 5	Histologische Bilder Mandibula nach 21 Tagen.....	- 38 -
Abbildung 6	Histologische Bilder Fibula nach 21 Tagen.....	- 39 -
Abbildung 7	ALP-Konzentration an Tag 7 und Tag 14	- 41 -
Abbildung 8	Genexpression von ALP.	- 42 -
Abbildung 9	Genexpression von RUNX2.....	- 44 -
Abbildung 10	Genexpression von COL1A1	- 45 -
Abbildung 11	Genexpression von COL1A2	- 46 -
Abbildung 12	Genexpression von OCN.....	- 47 -
Abbildung 13	Proteom Profiler Ergebnisse 1	- 50 -
Abbildung 14	Proteom Profiler Ergebnisse 2	- 51 -
Abbildung 15	Proteom Profiler Ergebnisse 3.....	- 52 -
Abbildung 16	Proteom Profiler Ergebnisse 4.....	- 53 -

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Mediumszusammensetzung während der Kultivierung.....	- 25 -
Tabelle 2	Genübersicht	- 26 -

Abkürzungsverzeichnis

MKGC	Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie
ALP	alkalische Phosphatase
APP	engl.: Amyloid precursor protein
BM-SSCs	engl.: bone marrow skeletal stem cells
BMP	engl.: bone matrix protein
BTE	engl.: bone tissue engineering
CAD/CAM	engl.: computer aided design/ computer aided manufacturing
cDNA	Komplementäre DNA
COL1A1	Kollagen Typ I, alpha 1
COL1A2	Kollagen Typ I, alpha 2
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECM	extrazelluläre Matrix
ESCs	embryonale Stammzellen
FBS	Fetales Knochen Serum
FCS	Fetales Kälber Serum
FGF	engl.: fibroblast growth factor
HA	Hydroxylapatit
hPDCs	engl: human periosteal derived cells
hPL	Humanes Plättchen-Lysat
iPSCs	induziert pluripotente Stammzellen
KO-Gruppe	Kontrollgruppe
mM	Millimolar
MSCs	engl.: mesenchymal stem cells
OB-Gruppe	osteogene Gruppe
OCN	Osteocalcin
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PDCs	engl.: periosteal derived cells
RNA	Ribonukleinsäure
RT-qPCR	engl.: real time quantitative polymerase chain reaction
RUNX2	Runt-related-Transkriptionsfaktor 2
SSCs	engl.: skeletal stem cells
β-TCP	Beta-Tricalciumphosphat

TE	engl.: tissue engineering
TGF- β	engl.: transforming growth factor beta
TNAP	engl.: tissue-non-specific alkaline phosphatase
VEGF	engl.: vascular endothelial growth factor

1 Einleitung

Maxillofaziale Knochendefekte, die eine Rekonstruktion erfordern, können durch eine Vielzahl von Ursachen wie Tumoroperationen, Unfallfolgen, Knochenentzündungen, Kieferatrophien oder angeborene Entwicklungsstörungen entstehen. Die Notwendigkeit, diese Defekte durch den Einsatz eines geeigneten Knochenersatzmaterials zu heilen, ist von immenser Bedeutung, da die Lebensqualität der Patienten physisch und psychisch erheblich eingeschränkt sein kann. Deshalb gilt es, bei der Rekonstruktion der Patienten den Ansprüchen bezüglich Funktion und Ästhetik Genüge zu tun (Schrag et al., 2006).

Die regenerative Medizin bietet den Patientinnen und Patienten durch den Einsatz von Spendereigenzellen in Verbindung mit geeigneten Trägermaterialien neue Therapieoptionen, um kritische Knochendefekte zu therapieren.

Diese Dissertation widmet sich der Fragestellung, welche Stammzellen sich besonders gut für das Bone Tissue Engineering (BTE) eignen. Eine dreidimensionale Kultivierung humaner Zellen soll Aufschluss darüber geben, welcher embryonale Ursprung der Zellen sich am besten für BTE eignet.

1.1 Knochentransplantate

Bei der Behandlung kritischer Knochendefekten ist die Rekonstruktion des Defekts oft eine entscheidende Maßnahme, um die strukturelle Integrität des Knochens und damit seine physiologische Funktion wiederherzustellen. In diesem Zusammenhang spielen Knochenersatzmaterialien eine bedeutende Rolle, da sie dazu dienen, den verlorenen Knochen zu ersetzen oder zu unterstützen und somit die natürliche Heilung und Regeneration zu fördern.

Dabei ist die Auswahl des geeigneten Knochenersatzmaterials von entscheidender Bedeutung, da verschiedene Materialien unterschiedliche Eigenschaften und damit unterschiedliche Indikationen aufweisen. Bei der Entwicklung eines idealen Knochenersatzmaterials stehen neben der essenziellen Eigenschaft der Biokompatibilität, auch die Osteoinduktion und Osteokonduktivität im Fokus der aktuellen Forschung (Janicki & Schmidmaier, 2011).

Die Osteoinduktivität beschreibt dabei die Fähigkeit, die Knochenneubildung zu initiieren, indem sich undifferenzierte Stammzellen ansiedeln und sich zu reifen Osteoblasten entwickeln können. Außerdem soll eine Umgebung geschaffen werden, in der Wachstumsfaktoren zu den Zellen gelangen können, um die Knochenneubildung zu unterstützen. Dieser Prozess ist entscheidend für die erfolgreiche Integration von Transplantaten und Knochenersatzmaterialien, um eine effektive Regeneration von Knochengewebe zu ermöglichen. Durch die Aktivierung von zellulären und molekularen Mechanismen trägt die Osteoinduktivität wesentlich zur Stimulation und Regulation des natürlichen Knochenwachstums bei, was zu einer verbesserten Heilung und Funktion des Gewebes führt (Janicki & Schmidmaier, 2011; Miron & Zhang, 2012; Urist, 1965).

Die Osteokonduktivität hingegen ist die Fähigkeit, das Periost auf Distanz zu halten und es gleichzeitig zu unterstützen, als Träger für Wachstumsfaktoren und Bestandteile der Geweberekonstruktion zu fungieren. Darüber hinaus soll das Periost als Leitstruktur für die Neubildung von Knochen dienen. Diese Eigenschaft soll es ermöglichen, den Heilungsprozess zu fördern und die Strukturintegrität des betroffenen Gewebes zu erhalten (Cypher & Grossman, 1996; Janicki & Schmidmaier, 2011; LeGeros, 2002).

1.1.1 Autologe Knochentransplantate

In der Literatur wird das autologe Knochentransplantat als Goldstandard für den Knochenersatz beschrieben, da es derzeit noch kein vollständig ausgereiftes synthetisches Knochenersatzmaterial gibt, welches natürlichen Knochen 100 % gleichwertig ersetzen kann. Als autologes Knochentransplantat, bezeichnet man die Entnahme patienteneigenen Knochengewebes, welches aus einem Spenderbereich entnommen wird und in die Defektstelle implantiert wird. Autologe Knochentransplantate bieten eine natürliche Quelle von Knochengewebe, welche eine hohe Biokompatibilität, Osteoinduktivität und Osteokonduktivität aufweisen (Bauer & Muschler, 2000; Rupp et al., 2021).

Bei Rekonstruktionen eines Defektes, welcher größer als 12 cm ist, kann es nötig sein, vaskularisierte Knochentransplantate, anstatt der reinem kortikalem oder spongiossem Knochen zu verwenden (Gazdag et al., 1995).

Schon 1975 haben Taylor et al. erkannt, dass sich das vaskularisierte Fibulatransplantat als Ersatz für die Maxilla und die Mandibula eignet (Taylor et al., 1975). Seither hat sich dieser Eingriff zu einem der Standardverfahren in der rekonstruktiven Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie (MKGC) entwickelt (Schrag et al., 2006; Wei et al., 1986; Wei et al., 1994). Neben weiteren in der MKGC bekannten Eingriffen, wie zum Beispiel bei Mittelgesichtsrekonstruktionen, (Bernstein et al., 2024) wird die Eignung des vaskularisierten Fibulatransplantats in der Literatur auch für eine Vielzahl orthopädischer Rekonstruktionen erwähnt, welches die Wichtigkeit dieser Spenderquelle für die Chirurgie unterstreicht (Bibbo, 2021).

Jedoch gibt es eine begrenzte Verfügbarkeit der Fibula als Quelle für Rekonstruktionen. Als alternative Entnahmestelle für die Therapie von kritischen Knochendefekten stehen neben der Fibula die Scapula, das Ilium sowie der Radius zu Verfügung. Die Auswahl der Entnahmestelle hängt mit der Ausdehnung des Defektes zusammen. In der Literatur wird die Fibula bei einem ausgedehnten segmentalen Defekt empfohlen, während der Beckenkamm bei der Unterkiefer-Rekonstruktion bei einem ausgeprägten vertikalen Knochenbedarf geeigneter ist (Jaquiéry, 2013; Schrag et al., 2006).

Durch die Einführung von CAD/CAM (eng. computer aided design/ computer aided manufacturing) und des modernen 3D-Drucks in die Chirurgie ist es möglich, eine auf den Patienten abgestimmte Unterkiefer-Rekonstruktionsplatte zu designen, welche die Genauigkeiten bei der Wiederherstellungsoperation erhöht und damit das Ergebnis positiv beeinflusst (Naros et al., 2018).

Trotz des idealen autologen Knochentransplantats und einer digital geplanten Operation kann es bis zu 6-18 Monate nach der Operation dauern, bevor die abschließende prothetische Versorgung durchgeführt werden kann und der Patient rehabilitiert ist. Ein aktueller Ansatz, welcher in der Literatur diskutiert wird, ist das „Jaw in One Day“ Konzept, bei welchem die dentalen Implantate entweder in einer vorangegangenen Operation oder bei der Entnahme der Mandibula in das Fibulatransplantat inseriert werden, um im Anschluss an die Rekonstruktion die zeitnahe provisorische prothetische Versorgung durchzuführen (Levine et al., 2013; Patel et al., 2019; Pauchet et al., 2018).

Nun könnte man annehmen, dass es für Knochendefekte eine adäquate Therapie gäbe, nach der je nach Größe und Ausdehnung des Defektes die Auswahl des Entnahmeortes erfolgt. Aus der Literatur geht jedoch hervor, dass die Entnahme von einer größeren Menge an autologem Knochenmaterial mit einer Donormorbidität zwischen 8,6 % und 20,6 % einher geht, welche Komplikationen aufweist wie Langzeitschmerz, Wundheilungsstörungen, verlängerter Operationsdauer bis hin zur Fraktur der Spenderregion (Faour et al., 2011; Pollock et al., 2008). Auch ist die Entnahme eines extraoralen autologen Knochentransplantates in der Regel unter Vollnarkose durchzuführen, was meist mit einem stationären Krankenhausaufenthalt und anschließender Rehabilitationszeit einhergehen würde (Dahlin & Johansson, 2011; Vos et al., 2009).

Bei einem großem Knochen- und Weichteildefekt in der maxillofazialen Region ist trotz des Versuches der Rekonstruktion oftmals eine Restitutio ad integrum nicht möglich. Die Folgen sind meist nicht nur ästhetischer Art, sondern schränken den Patienten auch funktionell in seinem Alltag stark ein. Zu den ästhetischen Folgen gehören vor allem eine Asymmetrie des Gesichtes mit einer Retrusion des unteren Gesichtsdrittels. Je nach Ausdehnung und Region des Defektes kann zudem die Lippenästhetik des Patienten beeinträchtigt werden. Diese Komplikationen sind je nach Größe des Defektes stärker oder schwächer ausgeprägt. Vor allem, wenn die Resektion den Kondylus mit beinhaltet, kann es zu schwerwiegenden ästhetischen sowie funktionellen Problemen kommen. Zu den funktionellen Einschränkungen, unter denen der Patient leidet, gehören vor allem Probleme bei der Phonation und der Nahrungsaufnahme. Hinzu können ein verminderter Speichelfluss und ein inkompetenter Lippenschluss kommen, welche die sozialen Interaktionen der Patienten stark negativ beeinflussen können (Navarro Cuellar et al., 2014).

1.1.2 Alternative Knochenersatz-Materialien

In der aktuellen Forschung gibt es das Bestreben, Alternativen zu dem autologen Knochentransplantat zu finden, um die oben erörterten Probleme zu umgehen. Die heutzutage gängigen Knochenersatzmaterialien sind entweder allogene (menschlichen Ursprungs), xenogene (tierischen Ursprungs) oder alloplastische (synthetischen Ursprungs) Knochenersatzmaterialien. Wie auch die autologen Transplantate müssen diese Materialien spezifische Eigenschaften mit sich bringen,

um am Patienten Anwendung zu finden. Neben der Biokompatibilität sollten sie, wenn möglich wie bei allen Knochenersatzmaterialien osteokonduktive und osteoinduktive Eigenschaften aufweisen (Oryan et al., 2014). In der dentalen Implantologie zeigte sich, dass es auch möglich ist, diese Materialien mit autologem Knochen zu mischen und dass dieses Verfahren eine Knochenneubildung positiv beeinflussen kann. Auch ist bekannt, dass das häufig verwendete Geistlich BIO-OSS bei kleineren Knochendefekten durchaus mit dem autologen Goldstandard mithalten kann (Lutz et al., 2015). Diesbezüglich wurde deutlich, dass je größer der vorliegende Defekt war, das autologe Knochenransplantat immer effektiver war als seine Alternativen (Knöfler et al., 2016).

2018 wurden vom Statistischen Bundesamt insgesamt 99.863 komplexere chirurgische Eingriffe mit Knochenersatzmaterialien an den Extremitäten und im Becken dokumentiert, von denen 54.784 (55 %) Autografts, 23.838 (24 %) Biomaterialien und 21.241 (21 %) Allografts umfassten. Sowohl bei der Verwendung von Autografts als auch von Allografts wurden Spongiosaplastiken am häufigsten angewendet, der Anteil betrug jeweils in 77 % bzw. 79 % der Fälle. Bei den Biomaterialien wurden Keramiken (42 %) häufiger eingesetzt als Knochenzemente (37 %), während andere Biomaterialien einen Anteil von 21 % ausmachten (Rupp et al., 2021).

Aus diesen Zahlen geht hervor, dass Biomaterialien mit 24 % der verwendeten Materialien schon einen großen Anteil an den verwendeten Knochenersatzmaterialien ausmachen und somit einen bedeuteten Platz in der Chirurgie einnehmen. Die Integration von Keramiken, die sich durch eine ausgezeichnete Biokompatibilität und biomechanische Eigenschaften auszeichnen, deutet darauf hin, dass in der Forschung Fortschritte bei der Entwicklung von Knochenersatzmaterialien erzielt wurden und werden. Diese Entwicklungen haben das Potenzial, die Abhängigkeit von traditionellen Autografts zu verringern und innovative Ansätze zur Behandlung von Knochendefekten voranzutreiben (Dorozhkin, 2022).

1.2 Knochenheilung

Die Regeneration von Knochen ist ein komplexer und dynamischer Prozess, der eine Interaktion verschiedener Zelltypen und Signalwege erfordert. Der Ablauf der Knochenheilung kann in 4 Phasen unterteilt werden. Die aufeinanderfolgenden Phasen in der Knochenregeneration umfassen „Entzündung“, „Knorpelbildung und periostale Reaktion“, „Knorpelresorption und primäre Knochenbildung“ sowie „sekundäre Knochenbildung und Remodellierung“ (Ai-Aqi et al., 2008; Einhorn, 1998).

In der initialen Entzündungsphase entsteht ein Frakturhämatom, welches reich an Mediatoren ist, welche die Ansiedlung von Immunzellen wie neutrophile Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten bewirken. Diese Immunzellen spielen eine entscheidende Rolle bei der Entfernung von nekrotischem Gewebe, Regeneration des Gewebes sowie der Stimulierung der Angiogenese. Nach dieser anfänglichen entzündlichen Reaktion erfolgt die Rekrutierung von skelettalen Progenitorzellen aus dem Periost und die Bildung eines knorpeligen Kallus. Dieser wird dann durch spongiösen Knochen ersetzt und schließlich erfolgt der Umbau des unreifen Knochens zu reifem lamellärem Knochen (Einhorn, 1998; Roberts et al., 2015).

Anfänglich nahm man an, dass die Stammzellen, welche die Knochenneubildung initiieren, aus dem Knochenmark stammen müssten. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Progenitorzellen der Knochenheilung ihren Ursprung im Periost haben und von dort in das Gewebe einwandern und sich differenzieren (Xing et al., 2010). Diese Erkenntnisse lassen vermuten, dass Progenitorzellen aus dem Periost vielversprechende Kandidaten für das BTE (engl. bone tissue engineering) sind und sich somit für entsprechende Versuche eignen.

Stammzellen, welche aus dem Knochenmark stammen (engl. bone marrow mesenchymal stem cells, BM-MSCs), sind dennoch eine wichtige Komponente in der Knochenheilung, auch wenn sie nur indirekt an der Knochenneubildung beteiligt sind. MSCs setzen Mediatoren frei, welche zu den Proteinen des BMPs- (eng. Bone Matrix Protein), und, Wnts-Signalwegs, sowie der FGF-Familie (engl. Fibroblast Growth Faktor) gehören. Die genannten Mediatoren spielen in der Frakturheilung sowie der

Knochenneubildung eine wichtige Rolle (Ai-Aql et al., 2008; Bais et al., 2009; Caplan & Dennis, 2006; Chen et al., 2012). Besonders BMPs sind wichtige Proteine, welche eine Kaskade in Gang setzten, die zur Regulierung des Wachstums von Zellen, der Differenzierung in osteogene und chondrogenen Progenitorzellen, sowie die Angiogenese und Apoptose induzieren können und damit die Knochenregeneration maßgeblich beeinflussen (Tsiridis et al., 2007; Wozney et al., 1988).

1.3 Embryologischer Hintergrund

Die Wahl potenzieller Stammzellen aus Periostzellen der Fibula und der Mandibula für das BTE in dieser Dissertation beruht auf dem unterschiedlichen embryonalen Ursprung dieser beiden Knochen. Daraus resultieren auch die unterschiedlichen Osteogenese-Mechanismen. Diese selektive Auswahl wird durch die Absicht geleitet, den biologischen Ursprung der Zellen für die BTE-Forschung fundiert zu begründen, um somit eine zielgerichtete Entwicklung potenzieller therapeutischer Anwendungen zu ermöglichen.

1.3.1 Entwicklung der Mandibula

Die Mandibula ist einer der größten Knochen des Viszerokraniums beim Menschen und birgt eine Fülle von physiologischen Funktionen, die von essenzieller Bedeutung für die täglichen Lebensaktivitäten sind. Neben ihrer Schlüsselrolle bei der Nahrungsaufnahme und der Artikulation spielt die Mandibula auch eine bedeutende Rolle in der Gesichtsästhetik.

Die frühe embryonale Entwicklung des Gesichtsschädels beginnt in der 4. Woche und ist eng verbunden mit der Entwicklung der Zellen der Neuralleiste. Zellen der Neuralleiste wandern in den aus dem Mesenchym stammenden 1. Kiemenbogen, auch als Mandibularbogen beschrieben, ein und kondensieren dort (Moore et al., 2013). Dieser Prozess wird in der Literatur als Vorstufe der Mandibula und des Meckel'sche Knorpel beschrieben, welcher die Leitstruktur für die Unterkieferentwicklung bildet. Die distalen Enden des Meckel'schen Knorpel mineralisieren und entwickeln sich zur Unterkiefersymphyse, während die proximalen Enden sich krümmen und im späteren Verlauf der Embryonalentwicklung Vorstufen der Hammer- und Ambossknochen des Mittelohrs bilden (Chai et al., 2003; Ishizeki et al., 1999; Marcucio et al., 2015; Parada & Chai, 2015). Der Meckel'sche Knorpel

ist von einem Perichondrium umgeben, das aus faserigen mesenchymalen Zellen besteht und ihn von benachbarten osteogenen Zellen trennt. Oberflächlich des Meckel-Knorpels entsteht ohne chondrogene Vorstufe die Mandibula. Der Meckel'sche Knorpel dient dabei als eine Art Schablone, trägt aber selbst nicht zur Entwicklung der Mandibula bei. Gegen Ende des 6. Monats der embryonalen Entwicklung kann davon ausgegangen werden, dass die Mandibula vollständig ausgebildet ist, während sich der Meckel'sche Knorpel im Verlauf der Entwicklung zurückgebildet hat (Kjaer, 1975; Moore et al., 2013; Mulder et al., 2006; Parada & Chai, 2015; Richany et al., 1956; Roberts et al., 2015).

Dieser Prozess der direkten Knochenbildung wird als desmale Ossifikation beschrieben. Es bilden sich Verdichtungen von Mesenchymzellen, welche sich zu Osteoblasten entwickeln, ohne dass vorher Knorpelgewebe gebildet wurde. Die Osteoblasten bilden eine Matrix aus einer amorphen Interzellulärsubstanz, welche als Osteoid bezeichnet wird. Dieses unverkalkte Osteoid mineralisiert und entwickelt sich zum reifen Knochen (Moore et al., 2013). Dieser Prozess der direkten Ossifikation lässt sich neben der Mandibula noch in den Bereichen des übrigen Schädelskeletts, des Gesichtsskelette sowie bei der Entwicklung des Schlüsselbeins beobachten (Moore et al., 2013; Roberts et al., 2015).

In der Literatur ist allgemein anerkannt, dass die Mandibula eine hohe Remodellierungsrate aufweist, die durch kontinuierliche strukturelle Umformung und Anpassung gekennzeichnet ist. Als Remodeling bezeichnet man den Prozess der koordinierten Aktivität von Osteoklasten, die Knochen abbauen und Osteoblasten, die neuen Knochen bilden, um Schäden zu reparieren, das Knochengewebe zu erneuern und um physiologische Anpassungen an die Belastung und Umwelt zu ermöglichen (Eriksen, 1986). Dieser dynamische Prozess wird bei der Mandibula hauptsächlich von den mechanischen Belastungen beeinflusst, denen sie während der Kaufunktion ausgesetzt ist. Untersuchungen haben gezeigt, dass die Knochenneubildung und die Knochendichte in Bereichen mit stärkeren Kaukräften signifikant höher ist im Vergleich zu Regionen, die weniger intensiven Belastungen ausgesetzt sind (Enomoto et al., 2009; Inoue et al., 2019).

Aufgrund dieser Faktoren, der hohen Knochenumbaurate und die bei der Entwicklung direkt stattfindende Knochenneubildung lässt sich die Hypothese aufstellen, dass die Periostzellen der Mandibula die überlegene Stammzellquelle für den Einsatz im BTE in dieser Dissertation darstellen könnte.

1.3.2 Entwicklung der Fibula

Die Fibula, das Wadenbein, ist ein langer, schlanker Knochen im Unterschenkel. Sie gehört zu den langen Röhrenknochen und ihre Entwicklung beginnt ab der fünften embryonalen Woche. Es bilden sich mesenchymale Verdichtungen, welche sich ab der sechsten Woche zu hyalinem Knorpel entwickeln, der als Grundgerüst für die Entwicklung des Extremitätenskelettes dient. Bis zur zwölften Woche bilden sich die primären Knochenkerne der Diaphysen aus, welche als Ossifikationszentren gelten (Kronenberg, 2007; Moore et al., 2013). Die Epiphyse, oder Wachstumsfuge, befindet sich auf beiden Seiten des primären Ossifikationszentrums und ist für das längenorientierte Wachstum verantwortlich. Der Epiphysenknorpel, der sich zwischen den sekundären Ossifikationszentren und dem darüber liegenden Gelenkknorpel (Gelenk-Epiphysenknorpel-Komplex) befindet, ist für die Ausbildung der Form der Enden der langen Knochen verantwortlich. An beiden Stellen hypertrophieren die Chondrozyten unter dem Einfluss des Transkriptionsfaktor Sox9 und unter CARM1, so dass die Knorpelmatrix verkalkt. Osteoblasten wandern in die Knorpelmatrix ein und lagern Knochensubstanz an die verkalkte Knorpelmatrix an, welche anschließend zu reifen Knochen umgebaut wird. Dieser Prozess wird als enchondrale Ossifikation bezeichnet (Kronenberg, 2007; Moore et al., 2013; Ytrehus et al., 2007).

1.4 Periost als Stammzellquelle

Die Knochenoberfläche im menschlichen Organismus ist mit dem Periost, der Knochenhaut, bedeckt und dient als Leitstruktur sowie als Schnittstelle zwischen Knochen und seinem umgebenden Gewebe.

Für die Versuche in dieser Dissertation wurden Zellen des Periosts verwendet. Es ist daher wichtig zu verstehen, wie das Periost aufgebaut ist und welche Funktion es im Organismus übernimmt.

Bei histologischen Untersuchungen konnte das Periost in drei Zonen eingeteilt werden. Zone eins, welche auch als Stratum osteogenicum bezeichnet wird, zeigt eine dichte Anordnung von Osteoblasten, Osteoprogenitorzellen und Stammzellen.

Aus dieser Schicht wurden die hPDCs (engl. human periosteal derived cells) isoliert, die in den Versuchen dieser Dissertation verwendet wurden.

Die zweite Zone, die auch Stratum fibrosum genannt wird, präsentierte sich als transluzentere Region, welche von einem ausgedehnten Kapillarnetzwerk durchzogen ist. Diese Zone weist eine erhöhte Vaskularisierung auf und zeichnet sich durch eine geringere Zelldichte im Vergleich zu den benachbarten Zonen aus.

In der dritten Zone zeigt sich eine Anordnung von Zellen, die eng mit Kollagenfibrillen verflochten sind. Diese sogenannten Sharpey-Fasern zeigen eine auffallend starke Interaktion zwischen Zellen und extrazellulärer Matrix, wobei die Zellen inmitten der Kollagenfibrillen eingebettet sind (Allen et al., 2004; Hirashima et al., 2015; Jones & Boyde, 1974; Squier et al., 1990).

Wie bereits im vorherigen Abschnitt zur Knochenheilung erwähnt wurde, nimmt das Periost eine bedeutende Rolle in diesem Prozess ein, indem es Progenitorzellen für die Reparatur bereitstellt und somit einen wesentlichen Beitrag zur Regeneration von Knochendefekten leistet. Mehrere Untersuchungen konnten zeigen, dass eine intakte Periostschicht zu einer signifikant verbesserten Heilung führen kann (Kojimoto et al., 1988; Utvåg et al., 1996; Xing et al., 2010).

Die Identifizierung des Periosts als eine natürliche Quelle von Progenitorzellen für die Knochenheilung unterstreicht seine Bedeutung sowohl in der chirurgischen Praxis als auch im Bereich des Tissue Engineering. HPDC's stellen daher eine vielversprechende Stammzellquelle für die Entwicklung von Therapien zur Förderung der Knochenregeneration und -reparatur dar.

1.5 Stammzellen

Stammzellen sind unspezialisierte Zellen, die die Fähigkeit besitzen, sich in verschiedene spezialisierte Zelltypen zu differenzieren. Gleichzeitig können sie sich selbst erneuern, indem sie sich in identische Zellen teilen. Diese besondere Eigenschaft ermöglicht es Stammzellen, eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung, dem Wachstum und der Regeneration von Geweben im menschlichen Körper einzunehmen. Die Klassifizierung von Stammzellen erfolgt anhand ihres Potenzials zur Differenzierung. Hierbei werden totipotente, multipotente und unipotente Stammzellen unterschieden (Bragdon & Bahney, 2018).

Die totipotenten Stammzellen haben das Potenzial, jeden Zelltyp im Körper zu bilden. Totipotente Stammzellen können sowohl embryonale als auch extraembryonale Gewebe entwickeln, einschließlich der Plazenta.

Eine Entwicklungsstufe später stehen die pluripotenten Stammzellen. Diese Stammzellen können sich in jeden der drei Keimblatttypen (Ektoderm, Mesoderm und Entoderm) differenzieren. Pluripotente Stammzellen werden in der Literatur auch als embryonale Stammzellen (ESCs) bezeichnet (Bragdon & Bahney, 2018).

Neben dem natürlichen Weg der Entwicklung ist es möglich, pluripotente Stammzellen *in vitro* herzustellen. Dieser Prozess beinhaltet die Einführung spezifischer Gene und genetischer Faktoren in die adulten Zellen, wodurch sie in einen pluripotenten Zustand zurückversetzt werden. Man spricht in diesem Zusammenhang von induzierte pluripotente Stammzellen (iPSCs). Sie ermöglichen die Generierung pluripotenter Stammzellen ohne die Notwendigkeit Stammzellen aus Embryonen für die Forschung zu gewinnen. Die direkte Ableitung von iPSCs aus den somatischen Zellen eines Patienten erlaubt die Berücksichtigung individueller genetischer Profile und trägt somit zur Optimierung von Therapieansätzen bei.

Die Erzeugung von iPSCs wurde erstmals 2006 von Shinya Yamanaka und seinem Team erreicht und hat seither das Gebiet der regenerativen Medizin und Stammzellforschung revolutioniert (Takahashi & Yamanaka, 2006; Yu et al., 2009).

Multipotente und unipotente Stammzellen haben nur noch ein begrenztes Differenzierungspotenzial im Vergleich zu pluripotenten Zellen. Multipotente Stammzellen können sich in mehrere, aber nicht alle Zelltypen eines Gewebetyps differenzieren, während sich unipotente Stammzellen nur in einen bestimmten Zelltyp entwickeln können (Bragdon & Bahney, 2018).

In den letzten Jahrzehnten rückt die Stammzellenforschung in Verbindung mit der regenerativen Medizin vor allem im Bereich der Gewebezüchtung (engl. Tissue Engineering, TE) aus spendereigenen Zellen vermehrt in den Vordergrund. Das Prinzip des TE besteht darin, dass autologe Stammzellen in einer dreidimensionalen Matrix, dem Scaffold, kultiviert werden und sich durch bestimmte Signalmoleküle in die gewünschte Gewebsart, in diesem Falle Knochengewebe, differenzieren sollen, damit sie anschließend als Transplantat für den Defekt *in vivo* verwendet werden können (Payne et al., 2014). Die grundlegende Idee besteht darin, pluripotente Stammzellen, insbesondere iPSCs oder gewebsspezifische multipotente Stammzellen zu nutzen, um geschädigte oder fehlerhafte Gewebe durch

regenerative Therapieansätze zu rekonstruieren. Durch die direkte Ableitung dieser Zellen aus somatischen Zellen des Patienten wird nicht nur eine personalisierte, sondern auch eine genetisch angepasste Therapie ermöglicht.

Es konnte bereits in mehreren Studien gezeigt werden, dass die mit Stammzellen besiedelten Scaffolds bessere Heilungsergebnisse bei kritischen Knochendefekten im Tiermodell lieferten als Scaffolds ohne Zellen. Somit könnte diese Methode in Zukunft eine wirkliche Alternative zu den autologen Knochentransplantaten darstellen (Takeuchi et al., 2019; Zhang et al., 2016).

Diese Herangehensweise führt unweigerlich zur Frage, welche Art von Zellen und welche Entnahmestelle für das TE am besten geeignet sind. Die wohl am vielversprechendste Zellart hierfür stellen Stammzellen aus dem Knochengewebe (engl. skeletal stem cells, SSC) dar, welche sich unterteilen lassen in Stammzellen aus dem Knochenmark (engl. bone marrow skeletal stem cells, BM-SSCs) oder dem Periost (engl. periosteum derivate Cells, PDCs). Beide Zellarten gehören zu der Differenzierungsline der multipotenten mesenchymalen Stammzellen (engl. mesenchymal stem cells, MSCs). In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass in der aktuellen Literatur BM-SSCs und MSCs oft als Synonyme verwendet werden, weshalb sich in dieser Arbeit auf den Begriff MSCs beschränkt wird (Zhang et al., 2022).

MSCs wird das Potenzial zugeschrieben, sich trilinear differenzieren zu können. Diese Fähigkeit wurde schon 1991 von Caplan beschrieben. Die trilineare Differenzierung von Zellen bedeutet, dass sie sich durch einen exogenen Stimulus zu osteogenen, chondrogenen oder adipogenen Zelllinien differenzieren können (Caplan, 1991; Conrad & Huss, 2005; Dominici et al., 2006; Pittenger et al., 1999). Neben dem Knochenmark, als gebräuchlichste Entnahmestelle für MSCs kommen unter anderem die dentale Pulpa, Fettgewebe, Synovialis und Nabelschnurblut als Quelle infrage (Marolt et al., 2010).

In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass die Entnahme von PDCs einen großen Vorteil im Vergleich zu der Entnahme von MSCs bietet. Die PDCs können direkt bei der Resektions-OP entnommen werden durch Entfernen eines kleinen Teiles des Periostes. Für die Entnahme von MSCs hingegen ist eine Punktion des Knochenmarks erforderlich, welcher für den Patienten schmerzhafter ist und mit neurovaskulären Schäden oder einer Infektion einhergehen kann. (Bolte et al., 2019)

Es ist von Bedeutung zu klären, ob es Unterschiede im osteogenen Differenzierungspotenzial zwischen MSCs und PDCs gibt. Untersuchungen haben gezeigt, dass sich MSCs *in vivo* ohne einen exogenen Stimulus nur in chondrogene und osteogene Progenitorzellen entwickeln, was auf ein primäres Differenzierungsprogramm hindeutet, das sich auf die Entwicklung von Knochen und Knorpel spezialisiert hat (Chan et al., 2018; Zhang et al., 2022). Debnath et al. (2018) haben in einer Studie gezeigt, dass MSCs *in vivo* vorwiegend den Weg der enchondralen Ossifikation einschlagen und zuerst Knorpel bilden, bevor sie sich zu Osteoblasten differenzieren und Knochen bilden, wohingegen PDCs den Weg der desmalen Ossifikation wählen und direkt Knochengewebe bilden (Debnath et al., 2018).

In verschiedenen vergleichenden Studien zwischen PDCs und MSCs wurde festgestellt, dass PDCs *in vitro* ein potenziell höheres osteogenes Potenzial aufweisen, welches sich unter anderem durch eine vermehrte Mineralisierung der Zellen und eine höhere alkalische Phosphatase (ALP)-Aktivität zeigt. Auch konnte eine erhöhte Expressierung von BMP-2 sowie Osteocalcin (OCN) festgestellt werden. Des Weiteren wurde eine effektivere Regeneration von Frakturen durch den Einsatz von PDCs im Vergleich zu MSCs nachgewiesen (Chen et al., 2011; Duchamp de Lageneste et al., 2018; Park et al., 2012; Wu et al., 2023; Yoshimura et al., 2007). Basierend auf diesen Ergebnissen kann man zu dem Schluss gelangen, dass PDCs möglicherweise die zu bevorzugende Quelle für das BTE darstellen könnten, da sie durch ihre Präferenz zur desmalen Ossifikation und ihrem höheren osteogenen Potenzial gegenüber MSCs effizienter Knochen bilden könnten. Allerdings konnten Chen et al. (2015) nachweisen, dass eine Kombination aus MSCs und PDCs signifikant mehr mineralisierte Matrix in einem 3D Gerüst bilden konnten als die Zellarten allein (Chen et al., 2015). Damit ist klar, dass in diesem Bereich noch weitere und differenzierte Forschung erfolgen sollte, um weitere Evidenz für künftige Forschungsarbeiten gewinnen zu können.

Es besteht die Notwendigkeit zu klären, ob es einen Zusammenhang des osteogenen Potenzials und dem embryologischen Ursprung von Stammzellen gibt. Hierzu haben Ichikawa et al. (2015) PDCs mesenchymalen und neuralen Ursprungs untersucht und ist zu dem Schluss gekommen, dass die Zellen des neuralen

Ursprungs ein höheres Potenzial der Knochenneubildung sowie ein höheres regeneratives Potenzial haben als Stammzellen mesenchymalen Ursprungs (Ichikawa et al., 2015).

Eine weitere Studie, die die Hypothese stützt, dass Periostzellen neuralen Ursprungs denen mesenchymalen Ursprungs überlegen sind, zeigt die Arbeit von Iuchi et al. (2020). In dieser Studie untersuchten sie das Periost von Schädel-, Unterkiefer-, Radius- und Iliumknochen und stellten fest, dass das Periost des Radius und des Iliums hauptsächlich Mechanismen der chondralen Ossifikation veranlasste, während das Periost der Mandibula und des Craniums Knochen hauptsächlich durch den Prozess der desmalen Ossifikation bildet. Es zeigte sich in der Dicke des neu gebildeten Knochens, dass Mandibula und Craniumperiostzellen den Periostzellen mesenchymalen Ursprungs überlegen sind (Iuchi et al., 2020).

Die Ergebnisse der Studie von Leucht et al. (2008) deuten darauf hin, dass beim Heilungsprozess nach Transplantation von Unterkieferperiost in einen Knochendefekt am Schienbein ein direkter Ossifikationsprozess stattfindet. Im Gegensatz dazu zeigte sich, dass PDCs des Schienbeins, wenn sie in einen Unterkieferdefekt transplantiert werden, zunächst zu Chondrozyten differenzieren (Leucht et al., 2008).

Diese Beobachtungen legen nahe, dass das Periost der Mandibula als bevorzugte Quelle betrachtet werden könnte, da der Weg der desmalen Ossifikation den Zwischenschritt der Knorpelbildung umgeht und somit eine potenziell effektivere Regeneration eines Knochendefekts ermöglicht.

Eine weitere Stammzellquelle, deren Zugang vergleichsweise unkompliziert ist, deren Entnahme mit geringerer Morbidität einhergeht und die wie das das Mandibulaperiost neuralen Ursprungs ist, stellt die Zahnpulpa dar (Liu et al., 2011). Die Nutzung des Pulpagewebes als kontinuierliche Quelle für das BTE ist aufgrund seiner begrenzten Verfügbarkeit an Gewebe allerdings nicht geeignet (Gronthos et al., 2002). Bei Untersuchungen des osteogenen Potenzials der Zellen zeigte sich jedoch, dass die Pulpazellen in Bezug auf das osteogenen Potenzial von MSCs vergleichbare Resultate erzielen konnten (Ling-Ling et al., 2021; Liu et al., 2011). Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit von dentalen Pulpa-Stammzellen wird die Pulpa als

Stammzellquelle für das BTE als eher untergeordnet im Vergleich zum Periost angesehen.

Angesichts der beschriebenen Studienergebnisse bleibt die Frage nach der vielversprechendsten Quelle für das BTE unbeantwortet. Die vorliegenden Erkenntnisse liefern zwar wichtige Hinweise, jedoch bedarf es weiterer Studien, um die bestmögliche Quelle für das BTE zu identifizieren und eine fundierte Entscheidung hinsichtlich der Stammzelltherapie zu treffen. Diese Dissertation soll dazu beitragen, vorhandene Wissenslücken zu schließen, indem sie aussagekräftige Daten unter Verwendung von humanem Material in einer 3-D Kultur liefert und somit Aufschluss darüber gibt, welcher embryonale Ursprung der Zellen sich am besten für das BTE eignet.

1.6 Osteogene Differenzierung

Die osteogene Differenzierung von Stammzelle ist ein wichtiger und komplexer Prozess in der Knochenneubildung sowie der Frakturheilung und beinhaltet die Reifung von Osteoblasten und die Bildung einer Knochenmatrix. Damit dieser Prozess induziert wird, müssen bestimmte Faktoren vorliegen.

Einen wichtigen Faktor hierbei stellen die Proteine der Transforming growth factor beta Familie (TGF- β) dar, welche 1981 durch Roberts et al. entdeckt wurden (Roberts et al., 1981). Schon Urist erkannte 1965, dass in der Knochenmatrix Proteine vorhanden sein müssen, welche eine Knochenneubildung induzieren (Urist, 1965). Die Proteine der TGF- β Familie sind dafür bekannt, die Knorpelbildung bei der enchondralen Ossifikation sowie die Stimulation von Stammzellen zur osteogenen Differenzierung und der damit verbundenen Mineralisierung anzuregen. Darüber hinaus haben die Proteine auch Einfluss auf die Apoptose, regulieren das Immunsystem und nehmen Einfluss auf die Angiogenese (Heldin et al., 1997; Malhotra et al., 2013; Patil et al., 2011).

Wichtige Vertreter der TGF- β Familie sind die Bone Morphogenic Proteins (BMPs). Untersuchungen haben nachgewiesen, dass insbesondere BMP-9 und BMP-2 die Differenzierung von osteogenen Zellen fördern und die Knochenbildung unterstützen

können, indem sie die Regulation von Zellproliferation, Differenzierung und extrazellulärer Matrixsynthese, während der Osteogenese stimulieren (Eiraku et al., 2019; Tang et al., 2009). BMP-2 sowie BMP-7 werden darüber hinaus bereits in der klinischen Praxis zur Förderung der Frakturheilung eingesetzt, was die Wichtigkeit dieser Proteine für die regenerative Medizin unterstreicht (Begam et al., 2017; Friedlaender et al., 2001). Aber auch für die anderen Vertreter der BMPs konnte gezeigt werden, dass sie in geringem Maße osteogenes Potential besitzen. (Wu et al., 2024).

Damit sich MSCs und somit auch PDCs zu Osteoblasten entwickeln, werden in der Literatur zwei essenzielle Transkriptionsfaktoren genannt: Runx2 (Banerjee et al., 1996; Ducy et al., 1997) und Osterix (Nakashima et al., 2002). Bei Abwesenheit von Runx2 im Tierversuch bei Mäusen konnte keine Mineralisierung des Skeletts stattfinden. Auch wurde eine Abnahme der Genaktivität weiterer osteogener Gene wie Collagen1A1, Osteocalcin und Osteopoetin festgestellt (Ducy et al., 1997). Eine erhöhte Exprimierung von Runx2 geht mit einer erhöhten Osteoblastendifferenzierung und Knochenmineralisierung einher (Gaur et al., 2005).

Der Transkriptionsfaktor Osterix ist für die Differenzierung von Osteoblasten und somit für die Knochenbildung essenziell. Das Fehlen von Osterix führt zu einem Mangel an kortikalem Knochen und an Knochenbälkchen sowohl durch desmale als auch durch chondrale Ossifikation. Im Vergleich zu Runx2 -Nullmutanten gibt es jedoch wichtige Unterschiede im Phänotyp von Osterix-Nullmutanten. So zeigten sich eine normale Organisation der Knorpelwachstumsplatte als auch eine deutlichere Mineralisierung der hypertrophen Knorpelzone (Ducy et al., 1997; Nakashima et al., 2002).

Als wichtiger Marker der Osteogenese von Zellen wird in der Literatur das Enzym alkalische Phosphatase (ALP) oder genauer eines von vier Isoenymen, die Tissue-non-specific alkaline phosphatase (TNAP) genannt (Golub & Boesze-Battaglia, 2007). Es konnte gezeigt werden, dass bei der Inaktivierung dieses Enzyms durch Levamisole keine Mineralisierung von Zellen stattfinden konnte (Tenenbaum, 1987). Auch die Anwesenheit von extrazellulärem Pyrophosphat, welches in der Literatur als Inhibitor der Mineralisierung von Zellen genannt wird und von der ALP zu Phosphat hydrolysiert wird, zeigte die Bedeutung von ALP bei der Mineralisierung (Fleisch et

al., 1966; Hessle et al., 2002; Tenenbaum, 1987). Deutlich wird die Bedeutung von ALP vor allem bei der Betrachtung von ALP Knock-out Mäusen, welche in Abwesenheit von ALP an der Krankheit Hypophosphatie litten, was eine gestörte Knochenentwicklung zur Folge hat (Narisawa et al., 1997; Wennberg et al., 2000).

Für Zellen *in vitro* gilt die Exprimierung von ALP als ein früher Marker der Osteogenese. Es zeigt die Entwicklung von der Progenitorzelle zum Pre-Osteoblast an und der damit verbundenen Mineralisierung der extrazellulären Matrix (Hessle et al., 2002; Wennberg et al., 2000).

Als später wichtiger Marker für die osteogene Differenzierung ist Osteocalcin (OCN) bekannt. Die höchste Exprimierung von OCN wird erst zu einem späteren Zeitpunkt (Tag 14-21) in der Osteogenese von Zellen erwartet. Eine hohe Exprimierung von OCN geht dabei mit einer erhöhten Mineralisierung der Zellen sowie einer vermehrten Knochenneubildung einher (Hauschka et al., 1989).

Weitere für die Knochenentwicklung wichtige Faktoren stellen die Proteine Wingless/Int-1 (Reynolds et al., 2019), Sonic Hedgehog, (Dworkin et al., 2016) und der Fibroblasten-Wachstumsfaktor dar (Nie et al., 2006).

Für die Entwicklung neuer Materialien im Rahmen des BTE und um das osteogene Potenzial von Zellen bestimmen zu können, ist es essenziell, einerseits die biologischen Mechanismen der Ossifikation zu kennen und andererseits das Differenzierungspotenzial der Zellen anhand von Untersuchungen der osteogenen Marker zu bestimmen.

1.7 Tissue Engineering

Das Tissue-Engineering (TE) ist ein interdisziplinäres Feld, das die Forschung der Ingenieurwissenschaften, der Naturwissenschaften und der Stammzellforschung zur Entwicklung biologischer Ersatzmaterialien vereint, welche die Funktion besitzen, Gewebe wiederherzustellen, zu erhalten oder zu verbessern (Langer & Vacanti, 1993).

Das TE von Hartgewebe wird in der Literatur als Bone-Tissue-Engineering (BTE) bezeichnet. Bei der Entwicklung von geeigneten Materialien für das BTE soll ein dreidimensionales Gerüst, welches Scaffold genannt wird, geschaffen werden, das den natürlichen Knochen nachahmt und Heilungsprozess des Körpers unterstützt. Die Gewebezüchtung von Knochen erfordert ein erfolgreiches Zusammenspiel zwischen dem dreidimensionalen Gerüst, autologen Zellen des Patienten und osteoinduktiven Wachstumsfaktoren. Dabei soll die Förderung von Osteogenese und Angiogenese angestrebt werden, gepaart mit ausreichender mechanischer Stabilität, sowie einer Integration in das vorhandene Gewebe, um eine Lastübertragung zu ermöglichen. Dabei darf ein geeignetes Gerüst nicht toxisch sein und muss hoch biokompatibel sein, um nicht das Potenzial zu besitzen, eine immunologisch nachweisbare primäre oder sekundäre Fremdkörperreaktion hervorzurufen (Dorozhkin, 2022; Hench & Polak, 2002; Roddy et al., 2018; Turhani et al., 2007).

Schon 1976 stellten Köster et al. heraus, dass sich Calciumphosphate als Knochenersatzmaterialien und somit auch für BTE eignen. Er untersuchte histologisch die Bioverträglichkeit von verschiedenen Calciumphosphaten und fand dabei heraus, dass Calciumphosphate im Verhältnis 2:1 bis 4:1 bioverträglich sind, das Optimum aber bei dem Verhältnis 3:1, also Tricalciumphosphat (TCP) mit der Formel $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ liegen würde (Köster et al., 1976).

β -TCP gehört zu den Biokeramiken und damit zu den häufigsten Materialien, die als Knochenersatz verwendet werden. Seine strukturelle Ähnlichkeit zu der mineralischen extrazellulären Matrix des natürlichen Knochens macht es zu einer vielversprechenden Option im Bereich des BTE (Bohner et al., 2020).

In diversen Tiermodellen, darunter Studien an Hunden (Kondo et al., 2006) und Mäusen (Tsukanaka et al., 2015), konnte erfolgreich ein osteoinduktives Potenzial von β -TCP nachgewiesen werden. Diese Erkenntnisse verleihen β -TCP eine herausragende Position unter den verschiedenen Knochenersatzmaterialien und lassen die Keramik gegenüber anderen Materialien überlegen erscheinen (Tang et al., 2018).

Neben β -TCP wird auch Hydroxylapatit (HA) im BTE und der chirurgischen Praxis als eine alternative Biokeramik erachtet, die ähnliche Anwendung findet. Studien haben

gezeigt, dass sowohl TCP als auch HA eine hohe Biokompatibilität aufweisen, da sie gut mit dem umgebenden biologischen Gewebe interagieren, ohne eine unangemessene immunologische Reaktion hervorzurufen. Darüber hinaus besitzen beide Keramiken osteoinduktive und osteokonduktive Eigenschaften, indem sie als Gerüst für die Migration und das Wachstum von Knochenzellen dienen und die Knochenneubildung induzieren (Bohner et al., 2020; Wongwitwichot et al., 2010; Yuan et al., 1998). Diese Fähigkeiten sind entscheidend für den Erfolg von Knochenersatzmaterialien insbesondere im Kontext der Frakturheilung und der Regeneration von kritischen Knochendefekten. Durch die Kombination dieser Eigenschaften stellen TCP und HA vielversprechende Optionen für das BTE und die Knochenchirurgie dar.

Zusätzlich zu diesen Materialien werden in der Literatur für das BTE und als Knochenersatzmaterial auch Hydrogele, Polymere, Metalle und bioaktive Gläser genannt, welche aber nicht die Kombination von Eigenschaften wie TCP und HA aufweisen (Turnbull et al., 2018).

Neben der Wahl des geeigneten Materials ist es wichtig, die Konstruktion des Scaffolds ideal auf das Zellwachstum abzustimmen. Hierbei gilt es zu unterscheiden, ob es *in vivo* oder *in vitro* verschiedene Auswirkungen gibt. Als essenzielle Eigenschaft neben dem verwendenden Material und dessen Biokompatibilität gilt die Porosität solcher Gebilde (Dorozhkin, 2022). Es gilt dabei jeweils zu untersuchen, inwieweit die Proteinbiosynthese stattfinden kann und in welchem Maße die osteogene Differenzierung abläuft. Studien konnten dabei zeigen, dass bei einer höheren Porosität (>65%) *in vitro* mehr Proteinbiosynthese stattfinden kann als bei einer Porosität von 25 %; auf die osteogene Differenzierung hat dieser Prozess jedoch keinen Einfluss. *In vivo* hingegen zeigte sich, dass Scaffolds mit einer höheren Porosität eine bessere osteogene Differenzierung aufweisen (Kasten et al., 2008). Untersucht wurde neben der Makroporosität auch die Auswirkung der Mikroporosität von Scaffolds. Es konnte dabei gezeigt werden, dass mit größeren Mikroporositäten eine größerer Resorptionsrate einhergeht und mehr Calcium- und Phosphationen in Lösung gehen (Lapczynska et al., 2014). Einen positiven Effekt auf die Knochenneubildung konnte jedoch erst ab einer Mikroporosität von mehr als 32% nachgewiesen werden (Campion et al., 2011; Ghayor et al., 2020).

Es wird davon ausgegangen, dass nicht nur die Gesamtporosität, sondern auch die Größe der Poren sowie die Oberflächenstruktur eine wichtige Rolle bei der

Differenzierung der Zellen spielt (Kasten et al., 2008). Es konnte gezeigt werden, dass Poren zwischen 100–400 μm ideal für die Knochengeweberegeneration sind (Bloebaum et al., 1994; Karageorgiou & Kaplan, 2005).

Dabei gilt es allerdings zu beachten, dass bei einer höheren Porosität als auch bei größeren Poren die mechanischen Eigenschaften der Scaffolds verringert werden und somit ein Kompromiss zwischen diesen beiden Faktoren gefunden werden muss (Karageorgiou & Kaplan, 2005). In Studien wurde der Einfluss der Porosität auf die mechanischen Eigenschaften untersucht mit dem Ergebnis, dass eine erhöhte Porosität mit einer Abnahme des elastischen Moduls einhergeht. Das elastische Modul ist ein Maß für die Steifigkeit eines Materials und gibt an, wie gut es Belastungen widerstehen kann, ohne dauerhaft verformt zu werden. (Hollister, 2005; Zhang et al., 2004) Durch die Abnahme der Mikroporosität der Scaffolds durch dichte Sinterung des Materials kann eine höhere Stabilität erreicht werden (Paredes et al., 2024).

Eine Reduktion des elastischen Moduls in Bezug auf Knochenersatzmaterialien oder Biomaterialien weist darauf hin, dass das Material flexibler wird. Dieser Faktor kann sich in spezifischen Indikationen als Nachteil erweisen kann und ist daher stark von den individuellen Anforderungen und dem vorgesehenen Einsatzgebiet des Scaffolds abhängig. Eine ganzheitliche Betrachtung der biologischen Reaktion der Zellen in Verbindung mit der Stabilität des Scaffolds ist daher von großer Bedeutung.

1.8 Zielsetzung

Ziel dieser Dissertation ist die Prüfung, welcher Ossifikationsmechanismus, desmal oder enchondral, für BTE am geeignetsten ist und ob dementsprechend PDCs aus neuralem oder mesenchymalem Ursprung als Stammzellquelle zum Einsatz kommen sollten.

Bedingt durch den unterschiedlichen embryonalen Ursprung der Entnahmeorte wird erwartet, dass sich die biologischen Eigenschaften und das osteogene Differenzierungspotenzial der Periostzellen aus dem Mandibulaperiost und dem Fibulaperiost unterscheiden.

Angenommen wird, dass Mandibulaperiostzellen, aufgrund ihres neuralen Ursprungs ist und der höhere Remodelingrate der Mandibula, den Periostzellen der Fibula überlegen sind.

Frühere Untersuchungen in einer zwei-dimensionalen Kultur (Sorg, 2022) haben gezeigt, dass entgegen unseren Erwartungen und der aktuellen Studienlage auch Fibulaperiostzellen tendenziell ein höheres osteogenes Potenzial aufweisen können als Mandibulaperiostzellen. Die vorliegende Arbeit soll untersuchen, ob diese Ergebnisse in einer drei-dimensionalen-Kultur bestätigt werden können und ob sie ausreichend signifikant sind, um eine zusätzliche Zellentnahme an der Fibula für zukünftige Forschungen oder Therapien zu rechtfertigen.

Zu diesem Zweck werden Periostzellen der Mandibula und der Fibula von vier Patienten der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie in Tübingen über einen Zeitraum von 21 Tagen in einem Scaffold aus β -Tricalciumphosphat kultiviert und auf ihr osteogenes Potenzial hin untersucht.

Die Bedeutung dieser Arbeit liegt in der Identifizierung der optimalen Quelle für Periostzellen im BTE, was entscheidend für die Verbesserung der Knochendefektrekonstruktion und damit für die Patientenversorgung ist. Durch die Erforschung der zugrundeliegenden Mechanismen der Ossifikation und der osteogenen Aktivität dieser Zellen soll diese Arbeit dazu beitragen, wichtige Wissenslücken zu schließen und neue Erkenntnisse für die regenerative Medizin zu gewinnen.

2 Methoden

Bei der Auswahl der Patienten für dieses Projekt wurden nur Patienten ausgewählt, bei denen sowohl Mandibula- als auch Fibulaperiostzellen zur Verfügung standen, um die Donorvariation zu minimieren. Hierbei wurden Patienten (m/w/d) jeden Alters mit einbezogen, welche im Rahmen einer Mandibula-Rekonstruktion mittels Fibulatransplantat an der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums/der BG-Klinik Tübingen behandelt wurden und der Entnahme des Periostes zugestimmt hatten.

Patienten, die an der Studie teilnahmen, durften keine Kiefernekrosen oder Erkrankungen haben, die direkt die Knochenbildung oder -zusammensetzung beeinflussen, wie zum Beispiel Osteoporose oder Osteomalazie. Ebenso wurden Patienten ausgeschlossen, die Bisphosphonate oder ähnliche Medikamente, die in den Knochenstoffwechsel während ihrer Behandlung eingenommen hatten. Personen, die präoperativ eine Strahlentherapie erhielten, wurden ebenfalls nicht in die Studie aufgenommen.

Die Studie und die Verwendung von Zellen der Patienten wurde durch die Ethik-Kommission der Universität Tübingen geprüft und mit der Antragsnummer 6182017BO2 genehmigt.

2.1 Gewinnung des Periostes und Anlegen einer primären Kultur

Die Periostzellen zum Anlegen einer primären Zellkultur der vier Spender wurden im Rahmen ihrer Mandibula-Rekonstruktion entnommen. Hierfür wurde mit einem Raspatorium das umliegende Gewebe von der Knochenoberfläche gelöst und anschließend das Stratum osteogenicum des Periostes möglichst schonend entfernt. Anschließend wurden im Labor die hPDC`s isoliert und eine Primärkultur angelegt, welche als Passage 1 bezeichnet wurde.

2.2 Kryokonservierung

Bis zur Verwendung der hPDC`s in den Experimenten lagerten die Zellen in einem Stickstofftank. Hierzu werden die Zellen in der Konzentration $1 \cdot 10^6$ /ml in Cryo-SFM-Medium (PromoCell GmbH, Heidelberg) resuspendiert und dann je 1ml in

Kryoröhrchen überführt. Es erfolgte daraufhin die Lagerung über Nacht in einem „Cell Camper“ (neoLab Migge GmbH, Leonberg) bei -80 °C, bevor sie am nächsten Tag in den Stickstofftank überführt, wurden. Durch den Cell Camper erfolgt eine kontrollierte Abkühlung der Zellen (-1°C/min), sodass gewährleistet ist, dass die Zellen möglichst wenig Schaden durch den Einfrierprozess erleiden.

2.3 Kultivierung von hPDC

Um für alle verwendeten Zellen die gleichen Bedingungen zu schaffen und eine Vergleichbarkeit der Experimente sicherzustellen, wurden in der vorliegenden Arbeit stets für alle Experimente die gleichen Materialien und Methoden verwendet. Zu Beginn dieses Projektes mussten zuerst die eingefrorenen Zellen aufgetaut und vermehrt werden. Hierzu wurden die Zellen aus den Kryoröhrchen in ein 50 ml Falcon überführt und mit 10 ml Medium resuspendiert. Dem verwendeten Medium zur Isolation und Kultivierung wird humanes Plättchenlysate (hPL) beigefügt, welches das alternativ verwendete FCS/ FBS (Fetales Kälber Serum, Fetales Knochen Serum) ersetzt. Um das Grundmedium herzustellen, wurde DMEM/F12 (1:1) + GlutaMax (Gibco, ThermoFisher, Waltham) mit 10 % hPL (ZKT Tübingen) versetzt und anschließend 1 % Penicillin / Streptomycin und 1 % Amphotericin B hinzugegeben.

Anschließend wurde die Zellsuspension bei 1400 rpm und 8 °C für 7 min zentrifugiert und das Medium entfernt. Zur Kultivierung wurde das Zellpellet in 20 ml Medium resuspendiert und in eine 175 cm²-Flasche überführt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂. Nach 24h wurde ein erster Medienwechsel durchgeführt, um abgestorbene Zellen zu entfernen. Weitere Medienwechsel erfolgten alle zwei Tage zur Sicherstellung der Nährstoffversorgung und Förderung des Zellwachstums. Wenn die Zellen konfluent sind, werden sie auf die Scaffolds umgesiedelt.

2.4 Besiedlung der Scaffolds und Start der osteogenen Differenzierung

Zur Herstellung einer drei-dimensionalen-Kultur werden die Zellen auf einen β -Tricalciumphosphat Scaffold transferiert, welcher einen Durchmesser von 5 mm und eine Porengröße zwischen 50 und 500 μ m besitzt. Sterilisiert werden die Scaffolds mit 25 kGy Gamma Strahlung, um die Gefahr einer bakteriellen Kontamination zu

minimieren. Bevor die Besiedlung der Scaffolds mit hPDC beginnen konnte, mussten sie eine Stunde bei 37 °C und 5 % CO₂ im Inkubator mit Medium in einer 96 Well Platte inkubiert werden. In der Zwischenzeit wird das Medium aus den Zellkulturflaschen abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Durch die Zugabe von 3 ml Trypsin-EDTA („TrypLE“, ThermoFisher, Waltham) und einer Inkubationszeit von 5-7min bei 37 °C wurden die Zellen von der Flasche gelöst. Die Reaktion wird durch die Zugabe von 7 ml Medium gestoppt. Anschließend werden die Zellen in ein Falcon überführt. Es wird Tryptanbau im Verhältnis 1:1 mit einem kleinen Teil der Zellsuspension gemischt und in eine automatische Zählkammer (TC20 Automated Cell Counter, BIO-RAD Laboratories GmbH, Hercules) pipettiert. Nach dem Zählen wird die Zellsuspension auf eine Konzentration von 50000 Zellen / 50 µl mit Medium eingestellt. Diese Zellsuspension wird mittig auf den Scaffold pipettiert, wieder aufgenommen und erneut auf den Scaffold gegeben. Dieser Schritt wird 4-5 -mal wiederholt, um sicherzugehen, dass die Zellen sich im Scaffold ansiedeln. Ein Scaffold wird mit 50.000 Zellen besiedelt. Anschließend erfolgt eine 2-stündige Inkubationszeit im Brutschrank, bevor erneut 150 µl Medium pro Well dazugegeben werden. Am nächsten Tag werden die besiedelten Scaffolds auf neue 96-Well aus Polypropylen gesetzt und die Differenzierung wurde begonnen.

Zur Induktion der osteogenen Differenzierung wird das verwendete Grundmedium mit 0,1 M Vitamin C, 10 M β-Glycerophosphat und 4 µM Dexamethason versetzt. Der erste Tag an dem das osteogene Differenzierungsmedium verwendet wird, wird als Tag 0 definiert. Um den Grad der osteogenen Differenzierung zu untersuchen, erfolgen die Analysen an den Tagen 7, 14, und 21. Pro Scaffold werden 200µl Medium verwendet, welches im zweitägigen Rhythmus erneuert wird. Beim Wechsel des Mediums wird darauf geachtet, dass sich die Scaffolds in der Well Platte nicht umdrehen und was die Ergebnisse verfälschen könnte. Somit entstehen im Verlauf der Kultivierung eine Ober- und Unterseite der Scaffolds.

Tabelle 1- Medium Zusammensetzung während der Kultivierung

Grundmedium	DMEM/F12 (1:1) + GlutaMAX (gibco) + 10 % humanes Plättchenlysat + 1 % Penicillin/Streptomycin + 1 % Amphotericin
Osteogenes-Medium	Grundmedium + 0,1 % Vitamin C + 1 % β -Glycerophosphat + 0,04 % Dexamethason

2.5 Alkalische Phosphatase-Assay

Da die alkalische Phosphatase (ALP) als früher osteogener Marker bekannt ist, wird der Alkalische Phosphatase Assay an den Tagen 7 und 14 durchgeführt. Verwendet wird dafür das „SenosoLyte®pNPP Alkaline Phosphatase Assay Kit“ (Sigma-Aldrich, St.Louis), womit durch ein kolometrisches Verfahren die Konzentration von ALP in der Probe gemessen werden kann. Hierfür dient p-Nitrophenylphosphat (pNPP) als Detektor, welches sich durch Kontakt mit ALP gelb verfärbt. Gemessen wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 405nm mit einem Mikroplatten Leser (ELx 800, BioTek Instruments, Winooski).

2.5.1 Probenentnahme

Bevor die Alkalische Phosphatase Konzentration bestimmt wurde, muss das Enzym zuerst aus den Zellen extrahiert und isoliert werden. Dazu wird das Medium abgesaugt und die Scaffolds mit dem Assay Puffer aus dem Kit gewaschen. Anschließend werden je vier Scaffolds der gleichen Bedingung in ein mit Keramik-Kugeln und Lyse-Puffer gefüllte Tube überführt und inkubiert. Nach 10-minütiger Inkubationszeit werden die Scaffolds in einem Hochgeschwindigkeitshomogenisator, dem „FastPrep 24“ (MP Biomedicals) durch die KeramikKugeln bei 4 m/s für 1 min geschreddert. Es folgt eine weitere 10-minütige Inkubationszeit auf Eis in der die geschredderten Scaffold von Zeit zu Zeit gevortext werden. Um das Zelllysat aus den

Scaffoldresten und den Keramik-Kugeln zu isolieren, werden die die Tubes für 10 min bei 10.000 g abzentrifugiert und 500 µl des Überstandes in ein neues Tube überführt. Dieses wird erneut zentrifugiert und bei 2500 g für 2 min und 300 µl dieses Überstandes ein neues Eppi überführt. Bis zu dem Start der enzymatischen Reaktion wurden die Proben auf Eis gelagert und entweder 1:5 (Kontrollgruppe (KO)) oder 1:10 (osteogene Bedingung (OB)) verdünnt.

2.5.2 Start der enzymatischen Reaktion

Um die enzymatische Reaktion zu starten, werden 50 µl der Proben und der zuvor in den Konzentrationen 200/100/50/25/12,5/6,25/3,125/0 ng/ml vorbereiteten Standards in eine 96-Wellplatte pipettiert. Anschließend werden 50 µl des pNPP-Substrates hinzugegeben und für 30 min bei Raumtemperatur auf einer Rüttelplatte inkubiert. Nach Hinzugeben der Stopplösung wird die optische Dichte bei 405 nm gemessen.

2.6 Echtzeit qPCR

Mithilfe der quantitativen Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion oder engl. Real-time quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) wird die Genexpression in den Patientenzellen untersucht. Der Readout wird als relative Expression in Bezug auf die Expression von GAPDH des jeweiligen Patienten angegeben. Folgende Gene und die dadurch kodierten Gene sollen in der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

Tabelle 2 Untersuchte osteogene Gene.

Gen	Protein
<i>GAPDH</i>	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
<i>ALP</i>	Alkalische Phosphatase
<i>RUNX 2</i>	Runt-related Transkriptionsfaktor 2
<i>COL1A1</i>	Kollagen Typ 1, Alpha 1
<i>COL1A2</i>	Kollagen Typ 1, Alpha 2
<i>BGLAP/ OCN</i>	Osteocalcin

2.6.1 Probenentnahme

Zur Gewinnung der RNA wird in diesem Projekt das NucleoSpin®RNA XS Kit der Firma Macherey-Nagel verwendet. Bevor die Isolierung der RNA mit Hilfe des Kits starten kann, müssen zuerst die Scaffolds mit PBS gewaschen werden. Anschließend werden sie äquivalent zu dem ALP Assay in die mit Keramikugeln gefüllten Eppis überführt. In den Eppis befindet sich jeweils 12,5 µl TCEP und 625 µl des RA1 Puffer des Kits. Anschließend werden die Scaffolds bei 4 m/s geschreddert und auf Eis gelagert. Der Überstand wird in ein neues Eppi überführt und bei 1000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Die Proben werden bis zur Isolierung der RNA bei -80 °C eingefroren.

2.6.2 Isolierung der RNA

Um die RNA aus den Zellenproben zu isolieren, werden die Proben nach den Herstellerangaben des Kits weiterverarbeitet. Das Kit verwendet Membranen aus Kieselgel in den Säulchen, an denen die RNA bindet. Anschließend wird die Membran entsalzt und die DNA mit Hilfe der rDNase verdaut. Darauf folgt das Aufreinigen und Trocken der RNA, bevor die Elution der RNA mit 40 µl RNase freiem Wasser beginnen kann. Es folgte die photometrische Bestimmung der Konzentration der RNA durch den NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific, Waltham).

2.6.3 cDNA-Synthese

Bevor die Messung der Genexpression starten kann, ist es notwendig die RNA in cDNA (engl. Complementary DNA) zu transkribieren. Hierzu wird das SuperScript®VILO- Synthesekit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham) und das Luna Script®RT SuperMix Kit (New England BioLabs, Ipswich) nach Herstellerangaben verwendet. Um eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse herzustellen, wird bei allen Proben die verwendete RNA-Menge so gewählt, dass nach der cDNA-Synthese bei allen Proben die gleiche Konzentration an cDNA vorliegt.

2.6.4 RT-qPCR

Für die qPCR wird der Quantstudio 3 (Applied Biosystems by ThermoFisher Scientific, Waltham) verwendet. Wir haben uns in diesem Projekt für die qPCR nach der delta-delta-CT-Methode entschieden, um die Genexpression zu untersuchen. Hierfür wird eine für den Quantstudio 3 konzipierte 96 Well-Platte verwendet, in die jeweils pro Well 5 µl Luna qPCR Master Mix (New England BioLabs, Ipswich), 0,5 µl Primer für das jeweilige Gen, 3,5 µl Wasser und 1 µl bzw. 2 µl Probe hinein pipettiert werden. Nach dem Versiegeln der Wellplatte und anschließendem Vortexen und Zentrifugieren wird die Platte in den Quantstudio3 gestellt und die qPCR mit 40 Zyklen gestartet. Vor dem ersten Zyklus findet für eine Minute bei 95 °C die Enzymaktivierung statt, bevor die Denaturierung der cDNA, das anschließende Anlagern der Primer und die darauffolgende Elongation der cDNA den ersten Zyklus markieren. Gemessen wird die Konzentration der Geneexpression photometrisch.

2.6.5 Statistische Auswertung

Die Auswertung der qPCR wird nach der delta-delta-CT-Methode durchgeführt. Hierfür wird zuerst die relative Konzentration des zu analysierenden Genes in Bezug auf das Standardgen GAPDH bestimmt; delta-CT. Um eine Hoch- oder Runterregulation des Genes festzustellen wird der Mittelwert der Mandibula Kontrollgruppe von Tag 7 in Relation gesetzt, um delta-delta-CT zu erhalten. Anschließend wurde die Induktion durch $2^{(-\text{delta-delta-Ct})}$ bestimmt. Bei Proben bei denen keine Amplifizierung messbar war, wurden die Messwerte mit der maximalen Zyklusanzahl (40) ersetzt.

2.7 Histologische Untersuchungen

Für die histologischen Untersuchungen wurde das Verfahren der Einbettung der Scaffolds in Kunststoff gewählt. Als Einbettmittel der Wahl haben wir uns für Technovit®9100 (Kulzer Technik, Hanau), entschieden, einem Kunststoffeinhaltungssystem auf Basis von Methylmethacrylat, welches speziell für die Einbettung von mineralisierter Matrix entwickelt wurde. Die verwendeten Scaffolds werden 21 Tage lang kultiviert, mit PBS gewaschen, dann mit 4 %

Paraformaldehyd für 30 min fixiert und bei 4 °C im Kühlschrank bis zur Einbettung in PBS gelagert.

2.7.1 Einbettung

Bevor mit der Einbettung begonnen werden konnte, mussten die Scaffolds dehydriert werden. Dazu werden sie zuerst in destilliertem Wasser gewaschen und dann für je 15 min in Alkohol in aufsteigender Konzentration (70 %, 80 %, 96 %, zweimal 100 %, Xylen) gelegt und abschließend für 30 min in Xylen inkubiert. Zur Präinfiltration des Kunststoffes wurden die Scaffolds zweimal 2 Stunden in Aceton und anschließend über Nacht im Kühlschrank mit Stammlösung A des Technovit®Kits infiltriert. Am Tag darauf wird die Polymerisationslösung aus neun Teilen Stammlösung A und einem Teil Stammlösung B hergestellt. Die Scaffolds werden damit infiltriert und für 24 h im Kühlschrank aufbewahrt, damit diese Polymerisationslösung vollständig aushärten kann.

2.7.2 Schnitte herstellen

Die eingebetteten Scaffolds werden zuerst halbiert, um anschließend Schnitte aus der Mitte des Scaffolds zu bekommen. Mit dem Mikrotom (pfm Rotary 3006 EM; pfm medical AG) und einem Knochenmesser (SH35W Feather microtome blade HP TC; Feather Safety Razor Co.) werden 5 µm dicke Schnitte angefertigt. Als Schneideflüssigkeit wurde 30 %-iger Ethanol verwendet. Zur Stabilisierung der Schnitte wurden diese mit einem adhäsiven Band (Tesafilm, Beiersdorf AG) aufgenommen. Im Anschluss daran werden die hergestellten Schnitte entplastet, indem sie jeweils 10 min in Xylol und 2-Methoxyethylacetat und dann 2 min in Aceton gelagert werden, bevor sie mit destilliertem Wasser gewaschen werden.

2.7.3 Färbungen

Die entplasteten Schnitte werden in einer feuchten Färbekassette 10 min lang mit Alizarin Red S (Sigma-Aldrich, St. Louis) in der Konzentration 1:10000 gefärbt. Anschließend wird das ungebundene Alizarin mit destilliertem Wasser ausgewaschen. Als Kernfärbung haben wir uns für Hoechst (ThermoFisher) entschieden. Hierfür werden die Schnitte im Anschluss an die Alizarin Färbung 10

min mit dem Hoechst Farbstoff inkubiert und erneut die überschüssige Farbe mit destilliertem Wasser ausgewaschen. Nach dem Trocknen werden die gefärbten Schnitte mit Fluoromount G (Invitrogen, Thermo Fisher) und einem Deckgläschen eingedeckt.

Die Bilder wurden mit dem Zeiss Axio Observer z1 bei 20-facher Vergrößerung aufgenommen.

2.7.4 Auswertung

Es wurden jeweils 3 Bilder pro Scaffold aufgenommen. Es werden die zum Medium hin exponierten Bereiche, wie die Oberseite und insbesondere die obere Ecke des Scaffolds untersucht. Anschließend wurde der Fokus auf das Zentrum des Scaffolds gelegt, um zu untersuchen, wie sich die Zellen im Inneren des Scaffolds entwickeln.

2.8 Alizarin Quantifizierung

Um einen möglichen Unterschied in der Mineralisierung der Zellen festzustellen, wurde in Anlehnung an die Alizarin Quantifizierung in einer 2D-Kultur das Protokoll entsprechend verändert, damit es für dreidimensionale Strukturen verwendet werden kann.

2.8.1 Färbung der Scaffolds

Für die Quantifizierung wurden die Scaffolds 21 Tage lang kultiviert und dann äquivalent zu den Scaffolds für die histologischen Untersuchungen mit PBS gewaschen und mit 4 %-igem Paraformaldehyd fixiert. Gelagert wurden sie bei 4 °C in PBS im Kühlschrank.

Für diesen Versuch werden die fixierten Scaffolds in eine 24 Well-Platte transferiert und zuerst 2x mit PBS und abschließend mit destilliertem Wasser gewaschen. Daraufhin werden die Scaffolds für 30 min mit Alizarin Red S (Sigma Alrich, St. Louis) angefärbt und anschließend 4-x mit destilliertem Wasser gewaschen. Abschließend werden die Scaffolds noch 2-mal für je 15 Minuten auf einem Shaker gewaschen, um ungebundenes Alizarin zu entfernen. Die Scaffolds wurden anschließend 5 min in 100 %-igem kaltem Alkohol inkubiert, bevor sie bei

Raumtemperatur getrocknet werden. Am Folgetag werden die Bilder mit dem Leica Wild Makroskop M420 bei 1,25-facher Vergrößerung aufgenommen. Um einen Maßstab zu erhalten, wird als Hintergrund Millimeterpapier verwendet.

2.8.2 Quantifizierung

Um aus den gefärbten Scaffolds das gebundene Alizarin wieder zu lösen, werden die Scaffolds in einer 96 Wellplatte für 30 min in 200 µl 10 %-iger Essigsäure auf einem Shaker inkubiert. Anschließend werden die Scaffolds in Eppis überführt und erneut 180 µl 10 %-ige Essigsäure hinzugegeben. Es folgen daraufhin 30 min bei 85 °C im Thermocycler (Eppendorf) und 5 min Abkühlung auf Eis. Im Anschluss daran werden die Proben bei 20.000 g für 15 min zentrifugiert, damit sich die gelösten Scaffoldreste ablagern können. Bevor die Überstände, neutralisiert werden, werden Verdünnungen von je 1:3, 1:5, 1:10 (leerer Scaffold, Kontrollgruppe, Osteogene Gruppe) angesetzt, sodass am Ende 400 µl entstehen. Diese werden dann mit 150 µl 10 %-igem Ammoniumhydroxid neutralisiert.

Es werden mit dem zuvor verwendeten Alizarin Red S Färbelösung und einem Verdünnungspuffer 12 Standards hergestellt in der Konzentration 2 mM bis zu 0,97 µM absteigend. Von den Standards und den Proben wurden jeweils 100 µl in eine 96 Wellplatte pipettiert und die optische Dichte bei 405 nm bestimmt.

2.9 Proteom Profiler Array

Um die ins Medium abgegeben Proteine zu untersuchen, haben wir uns entschieden, einen Antikörper-Assay mit dem Mediumsüberstand an Tag 14 durchzuführen. Hierfür wird 48 Stunden davor ein Mediumswechsel durchgeführt, um zu gewährleisten, dass die Zellen genügend Zeit haben Proteine zu bilden und ins Medium abzugeben. An Tag 14 wird das Medium gesammelt und bis zur Versuchsdurchführung bei -80 °C gelagert.

Zum Detektieren der Proteinkonzentration wird der Proteom Profiler (Non-Hematopoietic Panel) der Firma R&D Systems verwendet. Hierzu werden als Erstes alle im Kit vorhanden Materialien inklusive der Membranen mit den Antikörpern gemäß Herstellerangaben vorbereitet. Die vorbereiteten Proben werden auf die Membranen pipettiert und über Nacht auf einem Laborschüttler im Kühlschrank inkubiert. Am nächsten Tag werden die Membranen mit dem im Kit vorhanden

Waschpuffer gewaschen und der Detektionsantikörper wird hinzugegeben, welcher 2h auf den Membranen verbleibt. Nach erneutem Waschen wird das im Kit vorhandene Streptavidin-HPR auf die Membranen pipettiert. Es folgt ein erneuter Waschschrift bevor der „Chemi Reagent Mix“ auf die Membranen gegeben wird. Dieses verbleibt dort für 1 min und der Überstand wird mit fusselfreiem Papier entfernt. Die Membranen werden in Röntgenkasseten mit einem Hemilumineszenzfilm gelegt, welcher nach 10 min äquivalent zu einem Röntgenfilm entwickelt wird. Der Film wird dann mit einem Scanner (Lexmark) eingescannt und die optische Dichte der Pixel bestimmt.

2.10 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Experimente erfolgte mithilfe der Software GraphPad Prism 8.3.0. Die Signifikanz der Ergebnisse wurde durch eine Two-way-ANOVA, also eine zweifache Varianzanalyse bestimmt. Als signifikant galten p- Werte $\leq 0,05$. Angegeben in den Graphen ist jeweils der Mittelwert mit der Standardabweichung. Die Auswertung der histologischen Bilder erfolgte rein deskriptiv.

3 Ergebnisse

Die Versuche in dieser Arbeit haben das Ziel, vergleichende Analysen von hPDCs neuralen und mesenchymalen Ursprungs durchzuführen, um die geeignetste Quelle für das BTE zu identifizieren.

Durch die Berücksichtigung der unterschiedlichen Ossifikationsmechanismen wird erwartet, dass sich das osteogene Differenzierungspotenzial der Periostzellen aus Mandibula und Fibula unterscheiden könnte. Basierend auf der Hypothese, dass in der Mandibula ein höheres Knochen-Remodeling sowie durch desmale Ossifikation direkte Knochenbildung stattfindet, wird davon ausgegangen, dass diese Zellen eine höhere osteogene Aktivität aufweisen und sich daher besser für das BTE eignen könnten.

Zu diesem Zweck wurden Periostzellen der Mandibula und der Fibula von vier Patienten des MKGC-Tübingens über einen Zeitraum von 21 Tagen in einem Scaffold aus β -Tricalciumphosphat kultiviert und auf ihr osteogenes Potenzial nach 7, 14 und 21 Tage hin untersucht.

3.1 Alizarin Quantifizierung

Der Farbstoff Alizarinrot besitzt eine hohe Affinität zu Calciumionen, da er mit ihnen Komplexe bildet. Dadurch kann nachgewiesen werden, ob Zellen eine mineralisierte Matrix gebildet haben. Diese Matrix erscheint bei Anfärbung in einem Rotton. Da der von uns verwendete Scaffold ebenfalls aus Calciumionen besteht, bindet dieser ebenfalls den Alizarinrot-Farbstoff. Durch den Vergleich mit gefärbten Scaffolds ohne Zellen, die als Blanks bezeichnet werden, lässt sich feststellen, inwieweit die Zellen eine mineralisierte Matrix auf dem Scaffold gebildet haben.

Das Ziel dieses Versuchs besteht darin, herauszufinden, ob die Zellen nach einer Kultivierungszeit von 21 Tagen eine mineralisierte Matrix gebildet haben. Die Bildung einer mineralisierten Matrix ist ein entscheidender Faktor in der Osteogenese von Zellen und essenziell für das BTE.

Die makroskopischen Bilder der Scaffolds zeigen, dass die Scaffolds, welche das osteogene Medium erhalten haben, eine dichte rote Färbung aufweisen verglichen mit den Blanks oder der Kontrollgruppe. Damit konnte bestätigt werden, dass die Zellen auf dem Scaffold eine mineralisierte Matrix bilden. Makroskopisch kann allerdings kein Unterschied zwischen den Scaffolds der Mandibulaperiostzellen und denen der Fibulaperiostzellen erkannt werden. Die Scaffolds der Kontrollgruppen weisen zudem auch partiell dunkelrot gefärbte Areale auf. Die Blanks zeigen eine hellere Färbung im Vergleich zur Kontrollgruppe.

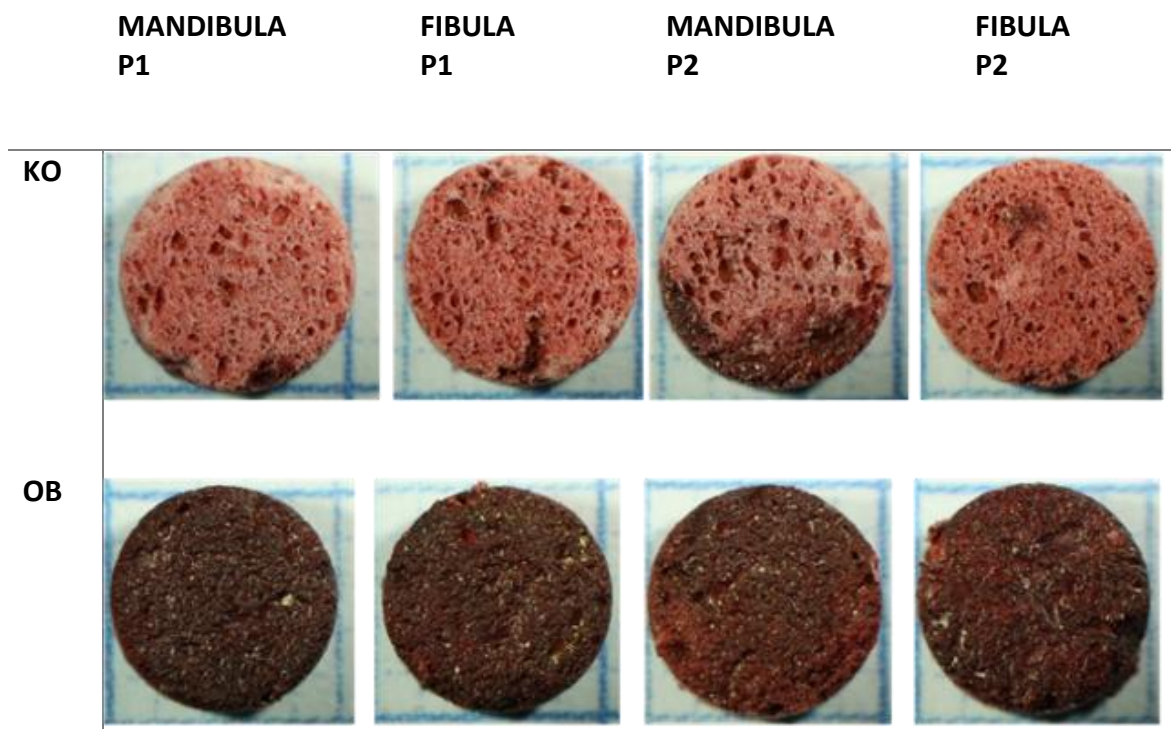


Abbildung 1 – Scaffolds mit Alizarin gefärbt

Scaffolds besiedelt mit hPDCs von zwei Patienten mit Alizarin gefärbt nach 21-tägiger Kultivierung. Die Scaffolds der oberen Reihe haben das Standardmedium (Kontrollgruppe) und die der unteren Reihe das osteogene Medium erhalten. Die Bilder wurden mit dem Leica Wild M420 Makroskop bei 1,25-facher Vergrößerung aufgenommen. Als Hintergrund wurde Millimeterpapier gewählt.

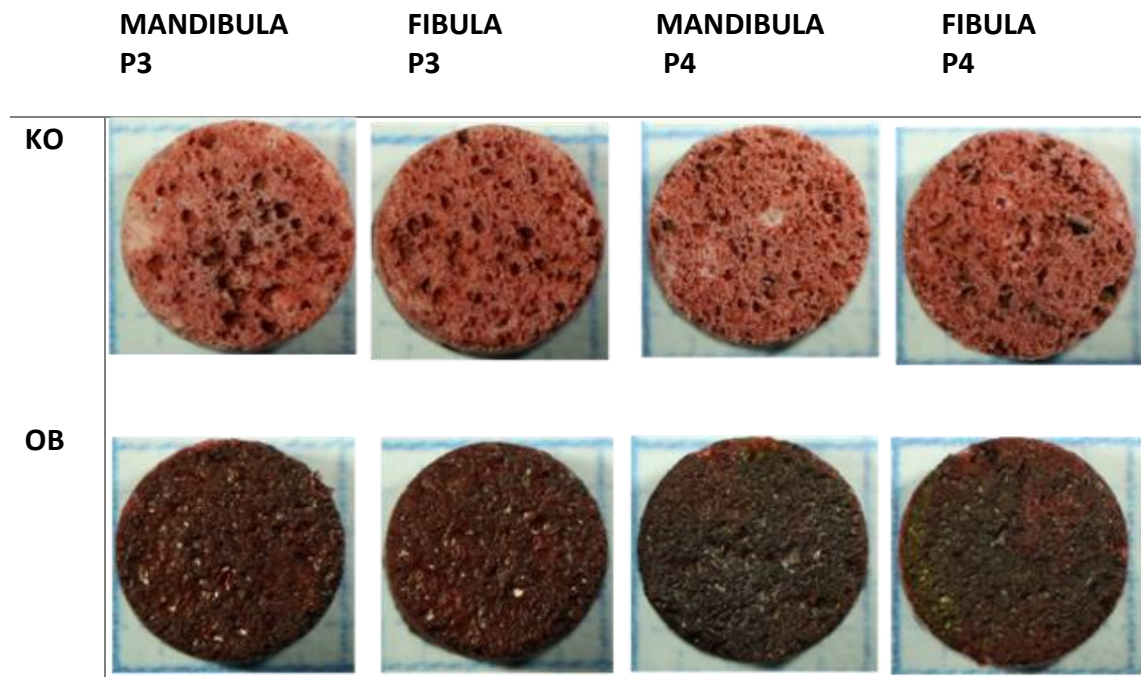


Abbildung 2 – Scaffolds mit Alizarin gefärbt

Scaffolds besiedelt mit hPDCs von zwei Patienten und mit Alizarin gefärbt nach 21-tägiger Kultivierung. Die Scaffolds der oberen Reihe haben das Standardmedium und die der unteren Reihe das osteogene Medium erhalten. Die Bilder wurden mit dem Leica Wild M420 Makroskop bei 1,25-facher Vergrößerung aufgenommen. Als Hintergrund wurde Millimeterpapier gewählt.

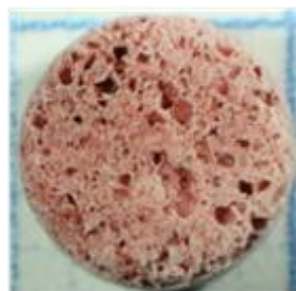


Abbildung 3- Blank mit Alizarin gefärbt

Scaffold nach 21-tägiger Kultivierung in Standardmedium ohne Zellen nach der Alizarinfärbung. Die Bilder wurden mit dem Leica Wild M420 Makroskop bei 1,25-facher Vergrößerung aufgenommen. Als Hintergrund wurde Millimeterpapier gewählt.

Im Anschluss an die makroskopische Untersuchung wurde das gebundene Alizarin gelöst und anschließend photometrisch gemessen. Der Mittelwert von dem im Blank gebundenen Alizarin (0,1645 mM; n=4) wurde von jedem Wert abgezogen, um den vom Scaffold gebundenen Anteil des Alizarins nicht zu berücksichtigen. Dadurch wurde ausschließlich der Wert des von den Zellen gebundenen Alizarins ermittelt. Die resultierenden Konzentrationen werden in Millimolar (mM) angegeben.

Die Ergebnisse zeigten, was bereits makroskopisch erkennbar war. Die Kontrollgruppen weisen im Vergleich zu der Gruppe, die das osteogenen Medium erhalten hat, eine signifikant geringere Alizarinkonzentration auf. Es wurde eine tendenziell höhere Konzentration bei den Zellen der osteogen differenzierten Fibula im Vergleich zu den osteogenen Mandibula Zellen festgestellt. Jedoch waren diese Unterschiede statistisch nicht signifikant.

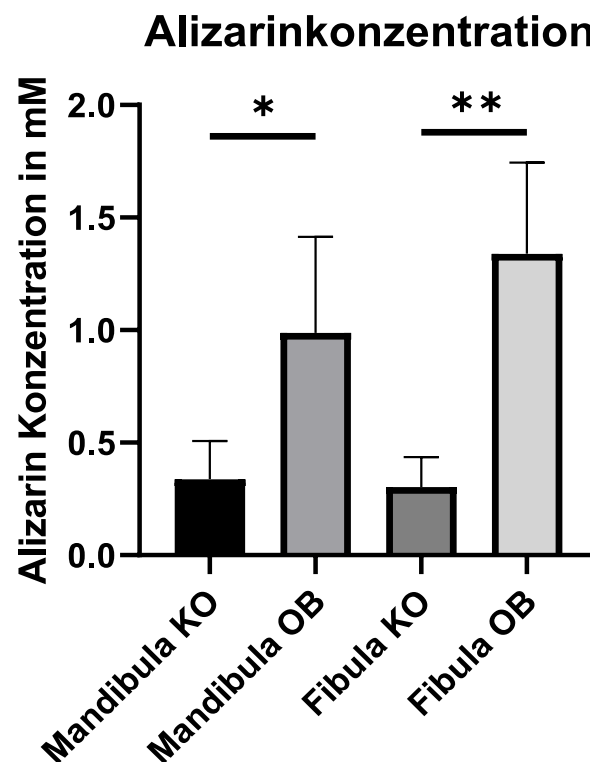


Abbildung 4 – Alizarinkonzentration nach 21 Tagen

Alizarin Konzentration angegeben in Millimolar. Die Untersuchung wurde nach 21-tägiger Kultivierung unter normalen (KO) und osteogenen (OB) Bedingungen durchgeführt. Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Die Signifikanz der Abweichungen wurde mittels zweifacher Varianzanalyse bestimmt (n=4, *p < 0.05, **p \leq 0.01).

3.2 Mikroskopische Untersuchungen

In der folgenden Analyse der mikroskopischen Ergebnisse lag der Fokus auf der Untersuchung der Zellverteilung innerhalb des Scaffolds sowie der Ausbildung einer mineralisierten Matrix. Es sollte untersucht werden, ob sich mikroskopisch ein Unterschied zwischen den Zellen der Mandibula und der Fibula feststellen lässt, um daraus Rückschlüsse auf die osteogenen Differenzierung und die Proliferation der Zellen zu ziehen.

Hierfür werden die Zellen in den Scaffolds 21 Tage lang kultiviert und dann fixiert. Anschließend werden die Scaffolds eingebettet in Kunststoff und in 8 µm dicke Schnitte geschnitten. Der Kunststoff wurde herausgelöst und die Schnitte wurden mit Hoechst und Alizarin gefärbt. Die Hoechst Färbung färbt die Zellkerne blau und das Alizarin Calciumionen, welche in der mineralisierten Matrix der Zellen vorkommen, rot. Die Bilder wurden von einer der oberen Ecken des Scaffolds (1. Reihe), im Bereich einer großen Pore (2. Reihe), und in der Mitte des Scaffolds (3. Reihe) aufgenommen.

Die Bilder der Mikroskopie Ergebnisse zeigen, dass die Zellen dazu tendieren, einen dichten Monolayer (weißer Pfeil in Abbildung 4) um den Scaffold herum zu bilden. Dieses Phänomen lässt sich unabhängig von der Kultivierungsbedingungen beobachten. Durch die histologischen Bilder erkennt man, dass sich vermehrt Zellen in Bereichen mit größeren Poren sowie in den Ecken des Scaffolds ansiedeln. Dies könnte möglicherweise Hinweise auf eine verbesserte Nährstoffversorgung in diesen Regionen geben und auf ein Defizit im Inneren des Scaffolds hindeuten.

Die Mineralisierung erkennt man vor allem am Monolayer der osteogen differenzierten Gruppen. Insbesondere im Bereich größerer Poren zeigt sich eine rot gefärbte Zellschicht, die auf eine Mineralisierung der Zellen hinweist. Vereinzelt erkennt man in den Kontrollgruppen in diesen Bereichen eine rötlichere Zellschicht. Direkt am Scaffold lässt sich keine Mineralisierung nachweisen, da diese sich mit der Rotfärbung des Scaffolds überschneidet. Es lässt sich kein Unterschied in der visuellen histologischen Untersuchung zwischen Mandibula- und Fibula-hPDCs nach 21 Tagen feststellen.

Mandibula KO

Mandibula OB

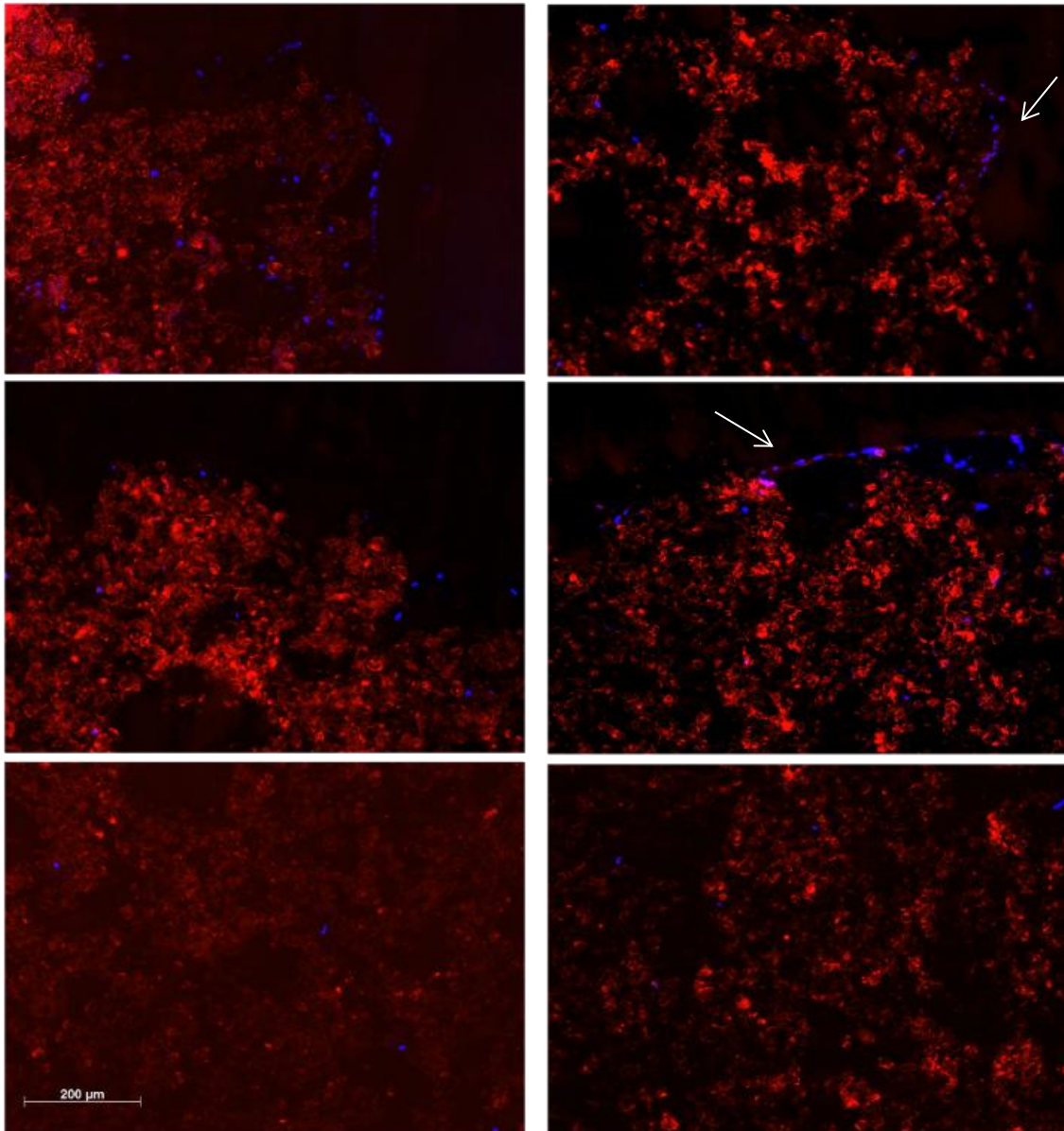


Abbildung 5 - Histologische Bilder Mandibula nach 21 Tagen

Scaffolds wurden 21 Tage lang kultiviert und dann eingebettet. Anschließend wurden die Calciumionen mit Alizarin (rot) und die Zellkerne mit Hoechst (blau) gefärbt. Die weißen Pfeile zeigen den gefärbten Monolayer den die Zellen um den Scaffold gebildet haben. Reihe 1: obere Ecke des Scaffold; Reihe 2: größere Pore auf der Oberseite des Scaffolds; Reihe 3: Mitte des Scaffolds

Fibula KO

Fibula OB

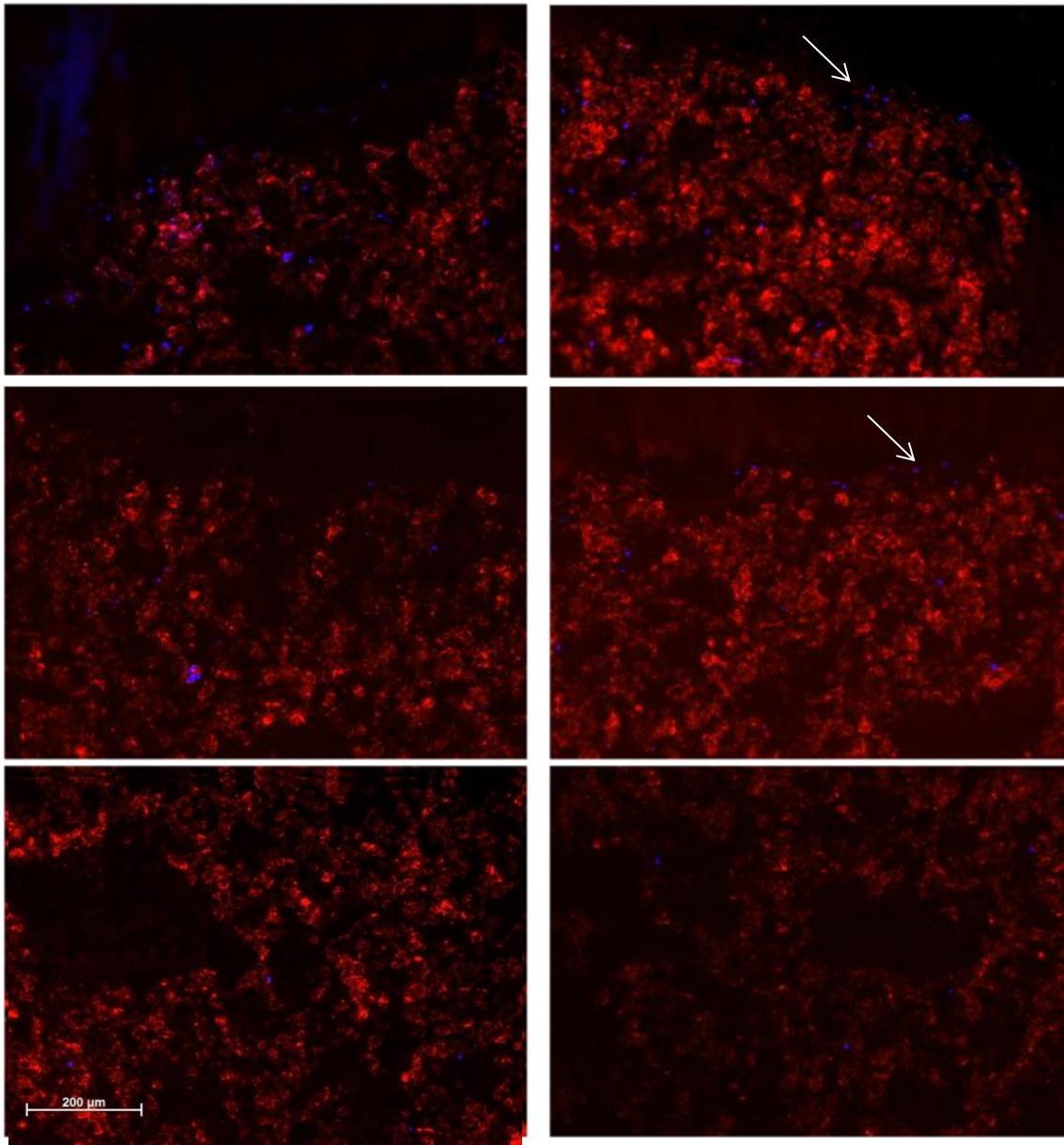


Abbildung 6 Histologische Bilder Fibula nach 21

Scaffolds wurden 21 Tage lang kultiviert und dann eingebettet. Anschließend wurden die Calciumionen mit Alizarin (rot) und die Zellkerne mit Hoechst (blau) gefärbt. Die weißen Pfeile zeigen den gefärbten Monolayer den die Zellen um den Scaffold gebildet haben Reihe 1: obere Ecke des Scaffold; Reihe 2: größere Pore auf der Oberseite des Scaffolds; Reihe 3: Mitte des Scaffolds

3.3 ALP Assay

Die Alkalische Phosphatase (ALP) spielt eine entscheidende Rolle bei der Untersuchung der Osteogenese, da sie als früher Marker für die Differenzierung von Osteoblasten fungiert. In unserer Untersuchung wurde die ALP-Aktivität an Tag 7 und Tag 14 nach Beginn der osteogenen Differenzierung gemessen, wobei die ALP-Konzentration in Relation zur Gesamtproteinkonzentration bestimmt wurde.

Abbildung 6 zeigt, dass am 7. Tag eine signifikant erhöhte Aktivität der Alkalischen Phosphatase bei den Zellen festgestellt wurde, die dem osteogenen Medium ausgesetzt waren, im Vergleich zu ihren jeweiligen Kontrollgruppen. Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen der Mandibula- und Fibula- Kontrollgruppen beobachtet. Es ist zu erkennen, dass die Zellen aus Fibula im Vergleich zu den Zellen der Mandibula tendenziell eine höhere Konzentration aufweisen, jedoch wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Die große Standardabweichung deutet darauf hin, dass eine beträchtliche Variation in Bezug auf die ALP-Konzentration zwischen den verschiedenen Spendern besteht.

Am 14. Tag zeigte sich keine Veränderung in der Kontrollgruppe im Vergleich zu den gemessenen Werten am 7. Tag. Die relative ALP-Konzentration stieg an Tag 14 bei den osteogen differenzierten Zellen im Vergleich zu Tag 7 an. Es wurde dabei festgestellt, dass die osteogenen Zellen eine signifikant höhere ALP-Aktivität aufwiesen als die Kontrollgruppe.

Beim Vergleich der osteogen differenzierten hPDCs der Mandibula mit denen der Fibula wurde ein signifikanter Unterschied ($p < 0.05$) in der ALP-Konzentration festgestellt. Die Fibula-hPDCs ($M = 1897.71$ ng/mg) wiesen im Vergleich zur Mandibula-hPDCs ($M = 1097.90$ ng/mg) eine 1.7-fach höhere Konzentration an Tag 14 auf.

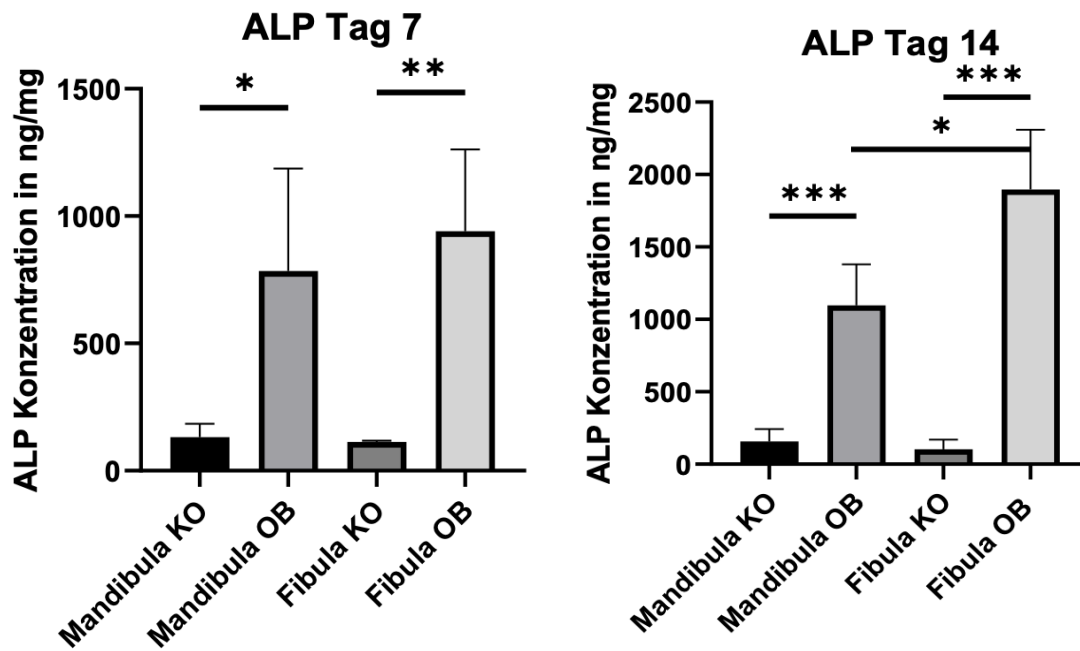


Abbildung 7 ALP-Konzentration an Tag 7 und Tag 14

Relative Konzentration der ALP (Alkalischen Phosphatase) in Bezug auf den Gesamtproteinanteil. Die Analyse wurde nach 7- und nach 14-tägiger Kultivierung unter normalen (KO) und osteogenen (OB) Bedingungen durchgeführt. Die Werte wurden in Bezug auf die Gesamtproteinkonzentration normiert und sind als Konzentration in ng/mg dargestellt. Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Die Signifikanz der Abweichungen wurde mittels zweifacher Varianzanalyse bestimmt ($n=4$, $*p < 0.05$, $**p \leq 0.01$, $***p \leq 0.001$).

3.4 Genexpression

Das Ziel der Genexpressionsuntersuchung besteht darin, Unterschiede in den molekularen Mechanismen der Osteogenese von Zellen zu identifizieren, um dadurch Einsichten in die Qualität und Quantität der osteogenen Prozesse zu gewinnen. Untersucht wurden wichtige Marker-Gene der Osteogenese wie *ALP*, *RunX2*, *OCN*, *Col1A1* und *Col1A2* nach 7- und 14-tägiger Kultivierungsdauer.

Hierfür wurden die Scaffolds mit den Zellen gemahlen und anschließend die RNA extrahiert. Diese wurde in cDNA umgeschrieben und anschließend mittels RT-qPCR untersucht und nach der delta-delta-CT-Methode ausgewertet. Als Ausgangswert haben wir uns für die Mandibula KO-Gruppe nach 7 Tagen entschieden. Hierbei steht

ein Wert kleiner als 1 für eine Herunterregulation des Gens und ein Wert größer als 1 für eine Hochregulation des Gens im Vergleich zu der Mandibula KO-Gruppe an Tag 7.

Bei der Analyse der *ALP*-Genexpression zeigt sich, dass die osteogene differenzierten Gruppen eine höhere *ALP*-Expression besitzen als ihre Kontrollgruppe am jeweiligen Untersuchungszeitpunkt. An Tag 7 ist die Genexpression der unter osteogenen Bedingungen kultivierten Mandibulazellen tendenziell kleiner als die der Fibula OB-Gruppe. An Tag 14 zeigt sich eine deutlich höhere Genexpression der Fibula OB-Zellen im Vergleich zur Mandibula, auch wenn keine Signifikanz festgestellt werden konnte.

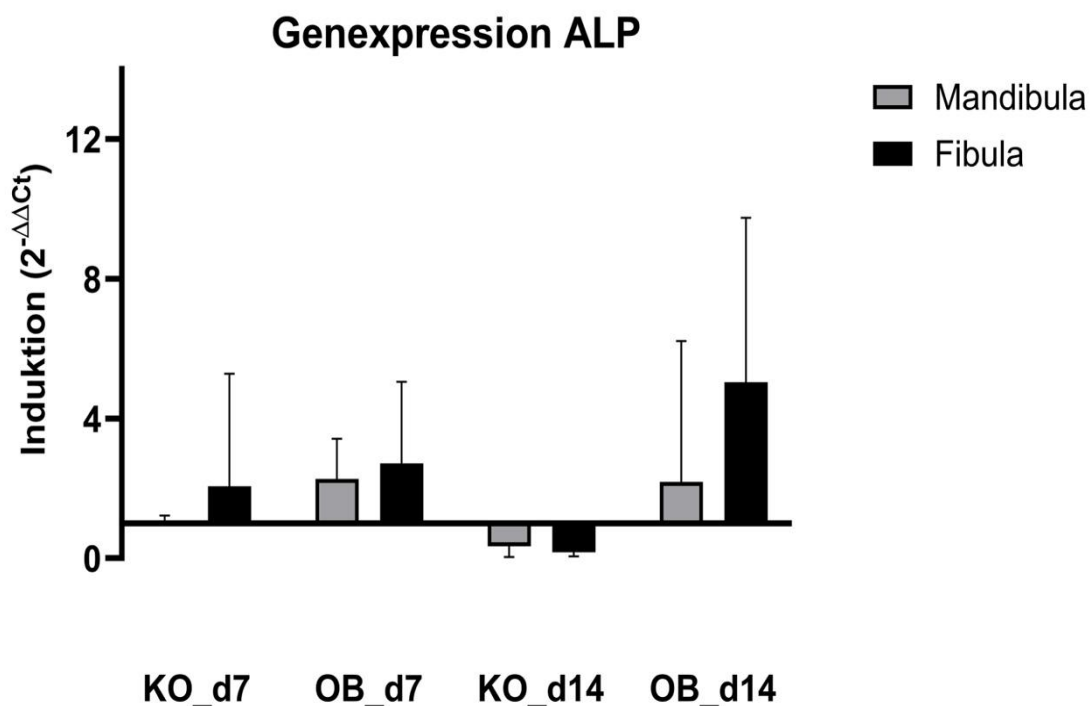


Abbildung 8 Genexpression von ALP.

Angegeben ist die Induktion ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) in Bezug auf die Mandibula KO-Gruppe an Tag 7. Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Die Signifikanz der Abweichungen wurde mittels zweifacher Varianzanalyse bestimmt ($n=4$, $*p < 0.05$, $**p \leq 0.01$).

Auffällig ist, dass die KO-Gruppe der Fibula an Tag 7 eine ähnlich hohe Expression aufweist, wie die Mandibula OB-Gruppe nach 14-tägiger Kultivierung. Damit geht einher, dass die Mandibula OB-Gruppe an Tag 7 und an Tag 14 annähernd die gleiche Genexpression besitzt. Das Ergebnis der *ALP*-Genexpression deckt sich wie erwartet mit dem des *ALP*-Assays, bei dem auch eine höhere *ALP*-Konzentration bei den Fibulaperiostzellen im Vergleich zu den Mandibulaperiostzellen festgestellt wurde.

Die Auswertung der Genexpression des Gens *RUNX 2* zeigt an jedem Tag und unter jeder Kultivierungsbedingung eine höhere Expression der Fibulaperiostzellen im Vergleich zu Mandibulaperiostzellen. Zu sehen ist, dass die KO-Gruppe der Mandibula eine gleich hohe Expression an Tag 7 aufweist, wie die OB-Gruppe. An Tag 7 weist die KO-Gruppe der Fibula die höchste Expression des Gens *RUNX2* auf, wobei diese vergleichbar mit der Expression unter osteogenen Bedingungen kultivierter Fibulaperiostzellen ist.

An Tag 14 der Versuchsreihe zeigt sich eine Veränderung in der Genexpression, die eine Differenzierung zwischen den Kontrollgruppen und den osteogen behandelten Mandibulaperiostzellen darstellt. Eine leichte Hochregulation der osteogen behandelten Mandibulaperiostzellen legt nahe, dass diese Zellen auf das osteogene Stimulationsmedium reagieren und ihre Genexpression entsprechend anpassen.

Besonders interessant ist die Beobachtung einer signifikant höheren Genexpression des *RUNX2*-Gens in den Fibula-Osteoblasten im Vergleich zu den Mandibula-Osteoblasten an Tag 14. Dieses Ergebnis weist auf eine potenziell verstärkte osteogene Differenzierung der Fibulaperiostzellen hin, die durch die hochregulierte Expression des *RUNX2*-Gens unterstützt wird.

Genexpression RUNX2

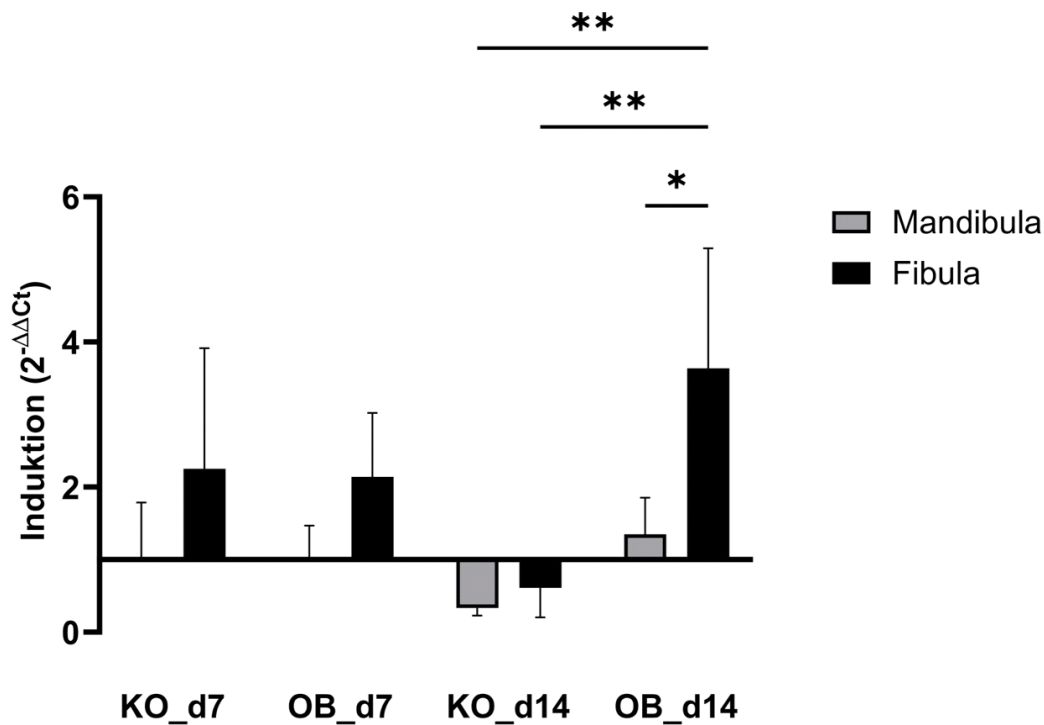


Abbildung 9 Genexpression von RUNX2

Angegeben ist die Induktion ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) in Bezug auf die Mandibula KO-Gruppe an Tag 7. Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Die Signifikanz der Abweichungen wurde mittels zweifacher Varianzanalyse bestimmt ($n=4$, $*p < 0.05$, $**p \leq 0.01$).

Die Auswertung der Genexpression von *Col1A1* (Kollagen-Typ-1-Alpha-1) ergab eine deutliche Herunterregulierung der osteogenen Gruppen beider hPDCs an Tag 7 im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Analog zur Genexpression von *RUNX 2* zeigt sich bei *Col1A1*, dass die Fibula KO-Gruppe an Tag 7 die höchste Genexpression aufweist. Auffällig ist hier die höhere Expression beider KO-Gruppen im Vergleich zu den OB-Gruppen.

An Tag 14 wurde eine Hochregulation von *COL1A1* bei den osteogen behandelten Fibula hPDCs im Vergleich zu den Mandibula-hPDCs beobachtet, sodass sich die Tendenz zeigt, dass die Fibula-hPDCs in der OB-Gruppe an Tag 14 den Mandibula-hPDCs überlegen waren.

Die hohe Standardabweichung zeigt, dass es zwischen den Patienten große Unterschiede in der Genexpression von *COL1A1* gab.

Generell wurde eine sehr hohe Expression des zu untersuchenden Gens beobachtet, was auf eine hohe Aktivität des *Col1A1*-Gens in beiden Zellarten und unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen hinweist.

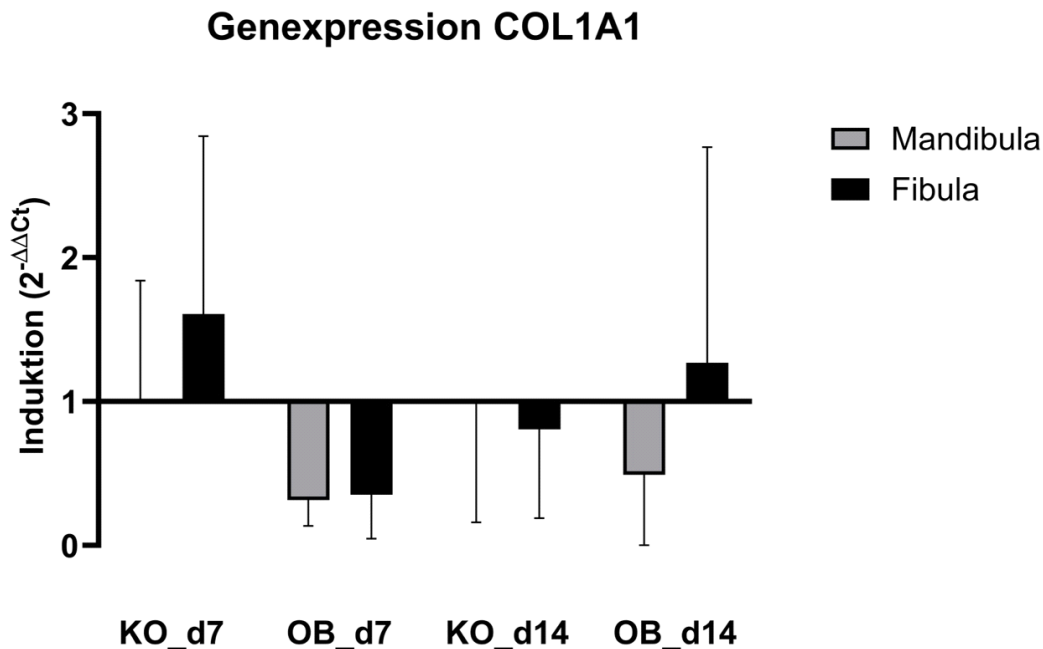


Abbildung 10 Genexpression von COL1A1
 Angegeben ist die Induktion ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) in Bezug auf die Mandibula KO-Gruppe an Tag 7. Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Die Signifikanz der Abweichungen wurde mittels zweifacher Varianzanalyse bestimmt ($n=4$, $*p < 0.05$, $**p \leq 0.01$).

Die Auswertung der Genexprimierung von *Col1A2* (Kollagen-Typ-I-Alpha 2) zeigt eine generelle Herunterregulation des Gens im Vergleich zu der Kontrollgruppe der Mandibula an Tag 7. Beim Vergleich der Mandibula- und Fibula- hPDCs fällt auf, dass an Tag 7 die Genexpression der osteogenen behandelten Mandibula-hPDCs weniger stark runterreguliert wurde wie bei den Fibula-hPDCs. An Tag 14 hingegen ist *COL1A2* bei den Fibula-hPDCs stärker expremiert als bei den Mandibula hPDCs. Auffällig ist vor allem die stärkere Herunterregulation der Gruppe, die das osteogene Medium erhalten haben im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Analog zu *COL1A1* wurde generell eine hohe Exprimierung im Vergleich zu *GAPDH* von *Col1A2* in allen Gruppen festgestellt.

Genexpression COL1A2

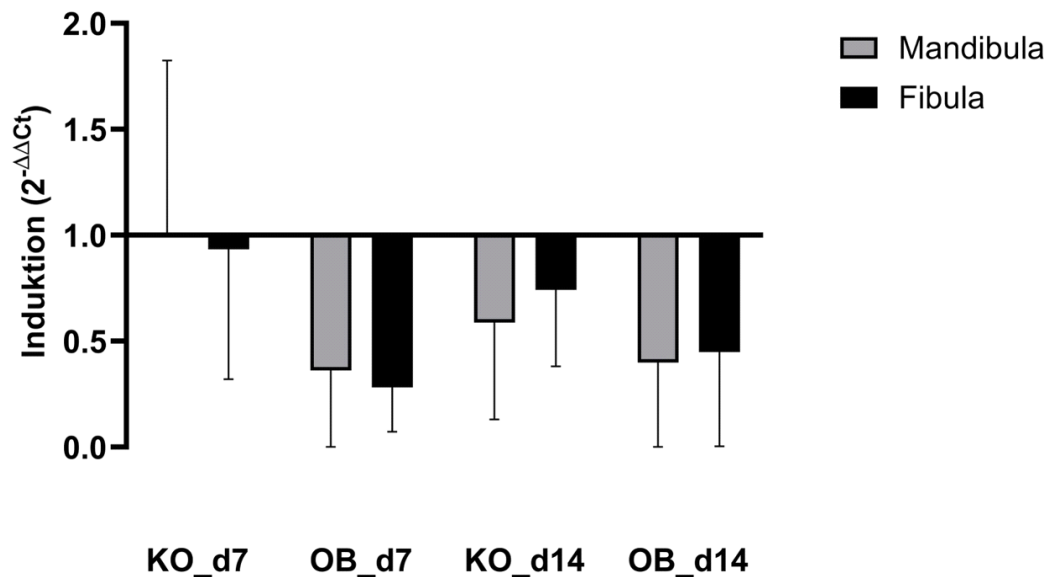


Abbildung 11 Genexpression von COL1A2

Angegeben ist die Induktion ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) in Bezug auf die Mandibula KO-Gruppe an Tag 7. Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Die Signifikanz der Abweichungen wurde mittels zweifacher Varianzanalyse bestimmt ($n=4$, $*p < 0.05$, $**p \leq 0.01$).

Die Genexpression von Osteocalcin (OCN; engl. "bone γ -carboxylglutamic acid-containing protein" oder "BGLAP") wurde als später Marker der Osteogenese von Zellen untersucht. Wie erwartet wurde an Tag 7 keine Genexpression festgestellt, da OCN als später Marker der Osteogenese betrachtet wird und eine Expression zu diesem Zeitpunkt folglich noch nicht erwartet wird.

An Tag 14 zeigte sich eine Genexpression von OCN bei allen osteogen differenzierten Gruppen, während nur einige Kontrollgruppen eine Expression aufwiesen. Im Vergleich zur Kontrollgruppe der Mandibula an Tag 14 zeigten die osteogen differenzierten Gruppen eine höhere Expression von OCN.

Für die osteogen induzierten Fibulaperiostzellen konnte hierbei eine tendenziell höhere Expression von OCN im Vergleich zu den Mandibulaperiostzellen festgestellt werden, jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant.

Die relative Expression im Vergleich zu *GAPDH* war deutlich geringer als die der anderen untersuchten Gene.

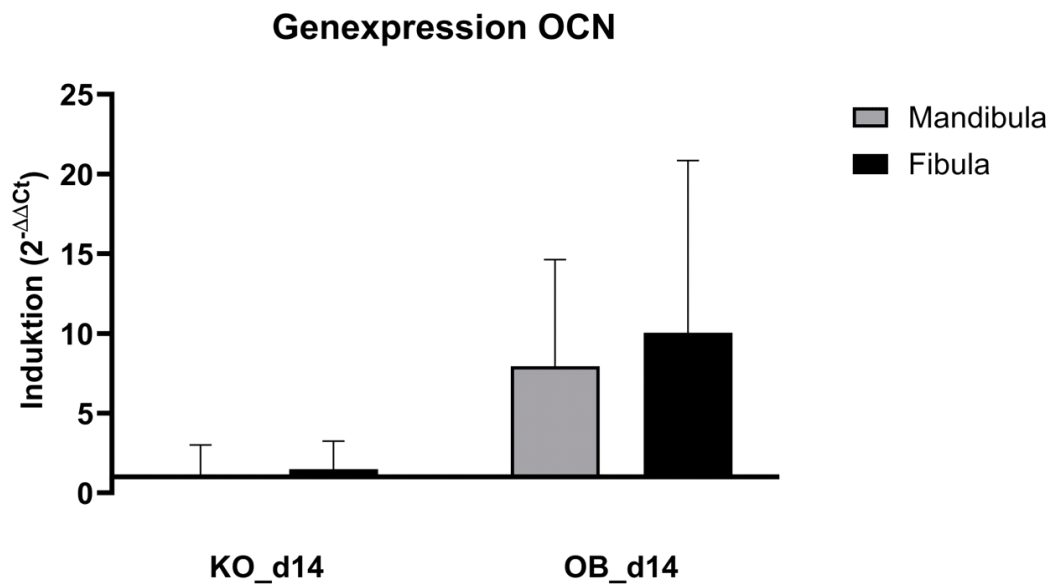


Abbildung 12 Genexpression von OCN
*Angegeben ist die Induktion ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) in Bezug auf die Mandibula KO-Gruppe an Tag 14. Die Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Die Signifikanz der Abweichungen wurde mittels zweifacher Varianzanalyse bestimmt ($n=4$, $*p < 0.05$, $**p \leq 0.01$).*

3.5 Proteom Profiler Array

Zur Detektion der Proteinkonzentration im Medium wurde der Proteom Profiler (Non-Hematopoietic Panel) von R&D Systems verwendet. Dieser Assay ermöglicht die simultane Detektion mehrerer Proteine im Mediumsüberstand. Die Verwendung dieses Panels ist von großer Bedeutung für das Tissue Engineering, da es Einblicke in die Proteinexpression und damit verbunden die interzelluläre Kommunikation gibt. Durch die Analyse der freigesetzten Proteine können wichtige Erkenntnisse darüber gewonnen werden, wie die Zellen auf das Knochenersatzmaterial reagieren und in welchem Stadium der Differenzierung sie sich befinden.

Um die von den Zellen ins Medium freigesetzten Proteine zu untersuchen, wurde der Antikörper-Assay mit dem Mediumsüberstand von Tag 14 durchgeführt. 48 Stunden vor diesem Zeitpunkt wurde ein Mediumswechsel durchgeführt, um sicherzustellen, dass alle Zellen dieselbe Zeit haben, um Proteine zu produzieren und ins Medium abzugeben.

Angegeben ist jeweils die relative Konzentration zu sogenannten Referenzproteinen auf den Membranen, um eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse untereinander zu schaffen.

Bei der Auswertung der Versuchsergebnisse fällt insbesondere auf, dass zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe mit osteogener Differenzierung keine signifikanten Unterschiede festgestellt wurden. Jedoch deuten Tendenzen darauf hin, dass eine vermehrte osteogene Differenzierung auf den Scaffolds, die mit dem osteogenen Medium behandelt wurden, zu beobachten ist. Diese Tendenz ist insbesondere bei der relativen Konzentration von Proteinen wie ADAM9, Amphiregulin, TIMP4 und Osteopontin zu erkennen. Die beobachteten Unterschiede in der Proteinexpression könnten auf eine verstärkte osteogene Differenzierung der Zellen hinweisen, die dem osteogenen Medium ausgesetzt waren.

Beim Vergleich zwischen den Zellen der Mandibula und der Fibula konnten keine signifikant unterschiedlichen Ergebnisse hinsichtlich der embryonalen Abstammung der hPDCs festgestellt werden. Weder die Kontrollgruppen noch die osteogen differenzierten Gruppen lieferten Ergebnisse, die auf eine vermehrte osteogene Differenzierung der Zellen hindeuten würden. Bei einigen Proteinen wie

Amphiregulin, CD36/Sr-B3, Integrin β 1/CD29, RECK und TIMP 4 scheint es eine leicht höhere Konzentration der Fibula-hPDCs zu geben. Jedoch ist zu erwähnen, dass die Mandibula-hPDCs bei anderen Proteinen wie Amyloid precursor protein (APP), CD40 Ligand/TNFD5, VEGF (engl. „Vascular Endothelial Growth Factor“) und HB-EGF eine höhere Konzentration gegenüber den Fibula-hPDCs zu haben scheinen.

Bei der Betrachtung des Proteins Thrombospondin 2, bei dem eine erhöhte Expression mit einer verminderten Osteoblastendifferenzierung einhergeht, fällt auf, dass die Fibula-hPDCs weniger Thrombospondin 2 exprimieren. Daher könnten die Fibula-hPDCs möglicherweise eine bessere Osteoblastendifferenzierung aufweisen als die Mandibula-hPDCs. Jedoch konnte keine Signifikanz festgestellt werden.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse daraufhin, dass es keine signifikanten Unterschiede in der Proteinexpression der Zellen aufgrund ihres unterschiedlichen embryonalen Ursprungs gibt.

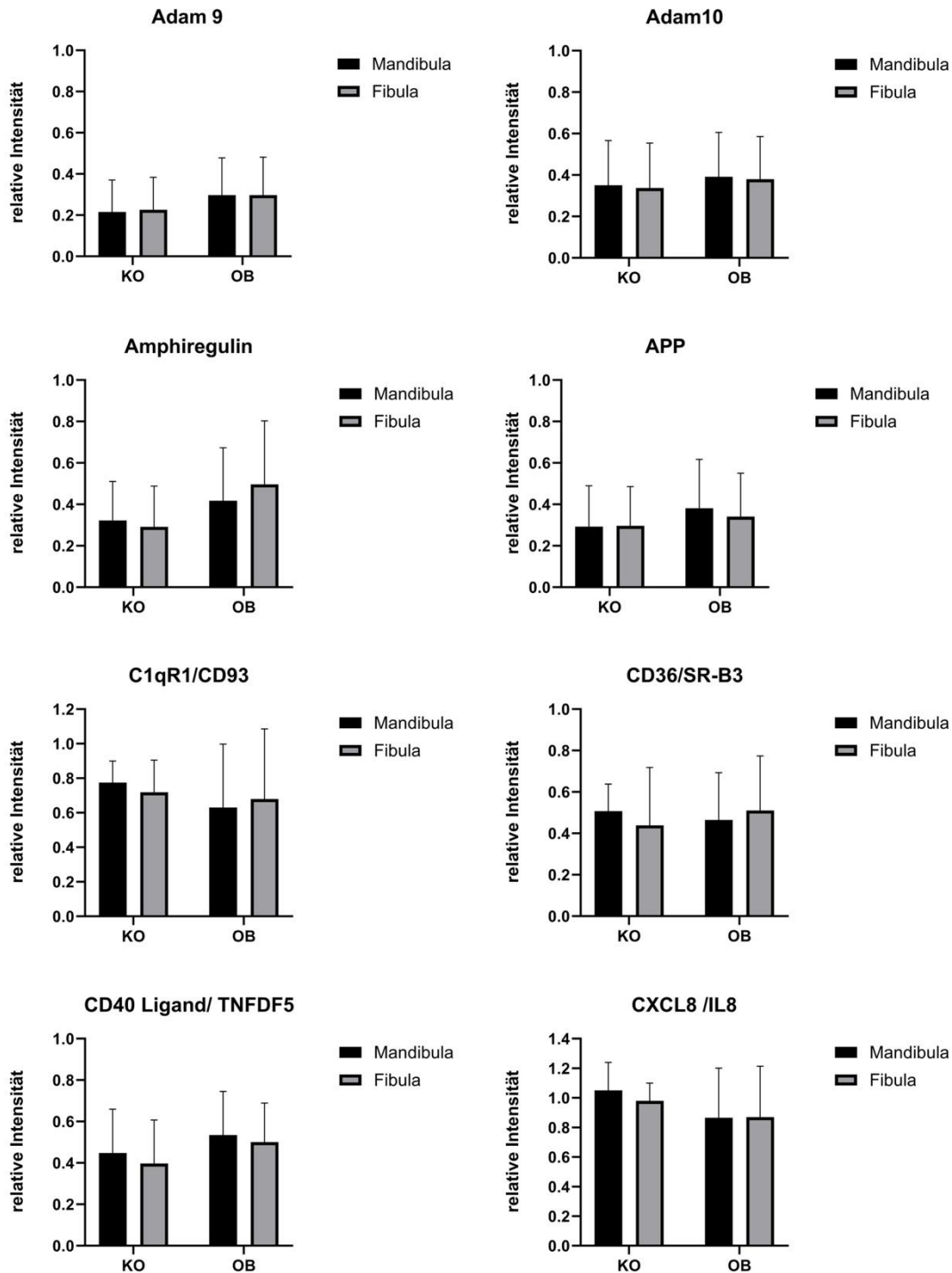


Abbildung 13 Proteom Profiler Ergebnisse 1
 Proteinkonzentration im Mediumsüberstand an Tag 14. Angeben ist die relative Intensität der Pixel-Dichte in Relation zu dem eines Standardproteins. Abgebildet ist der Mittelwert + Standardabweichung Die Signifikanz der Abweichungen wurde mittels zweifacher Varianzanalyse bestimmt ($n=6$, $*p < 0.05$, $**p \leq 0.01$).

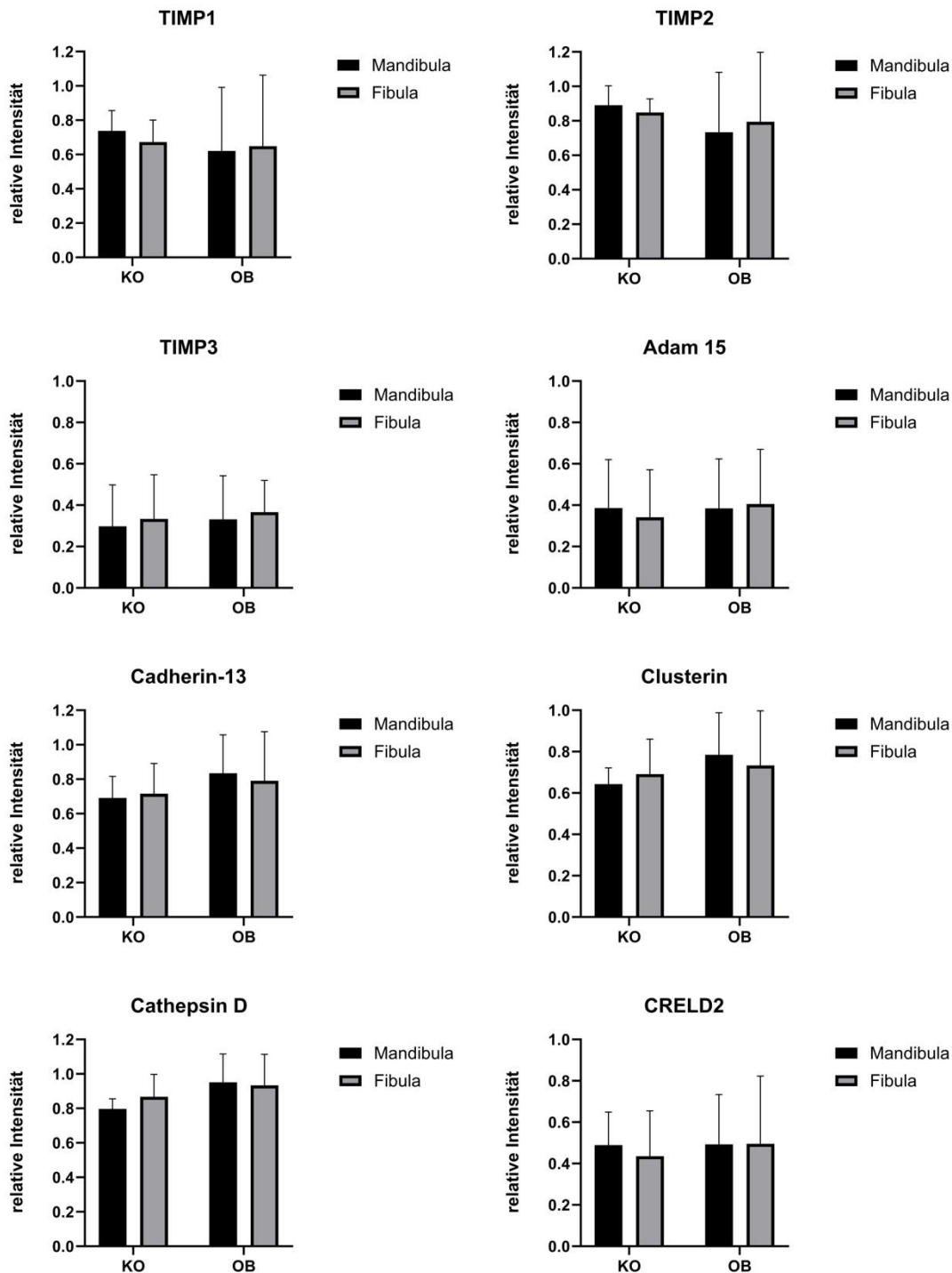


Abbildung 14 Proteom Profiler Ergebnisse 2
 Proteinkonzentration im Mediumsüberstand an Tag 14. Angeben ist die relative Intensität der Pixel-Dichte in Relation zu dem eines Standardproteins. Abgebildet ist der Mittelwert + Standardabweichung Die Signifikanz der Abweichungen wurde mittels zweifacher Varianzanalyse bestimmt ($n=6$, $*p < 0.05$, $**p \leq 0.01$).

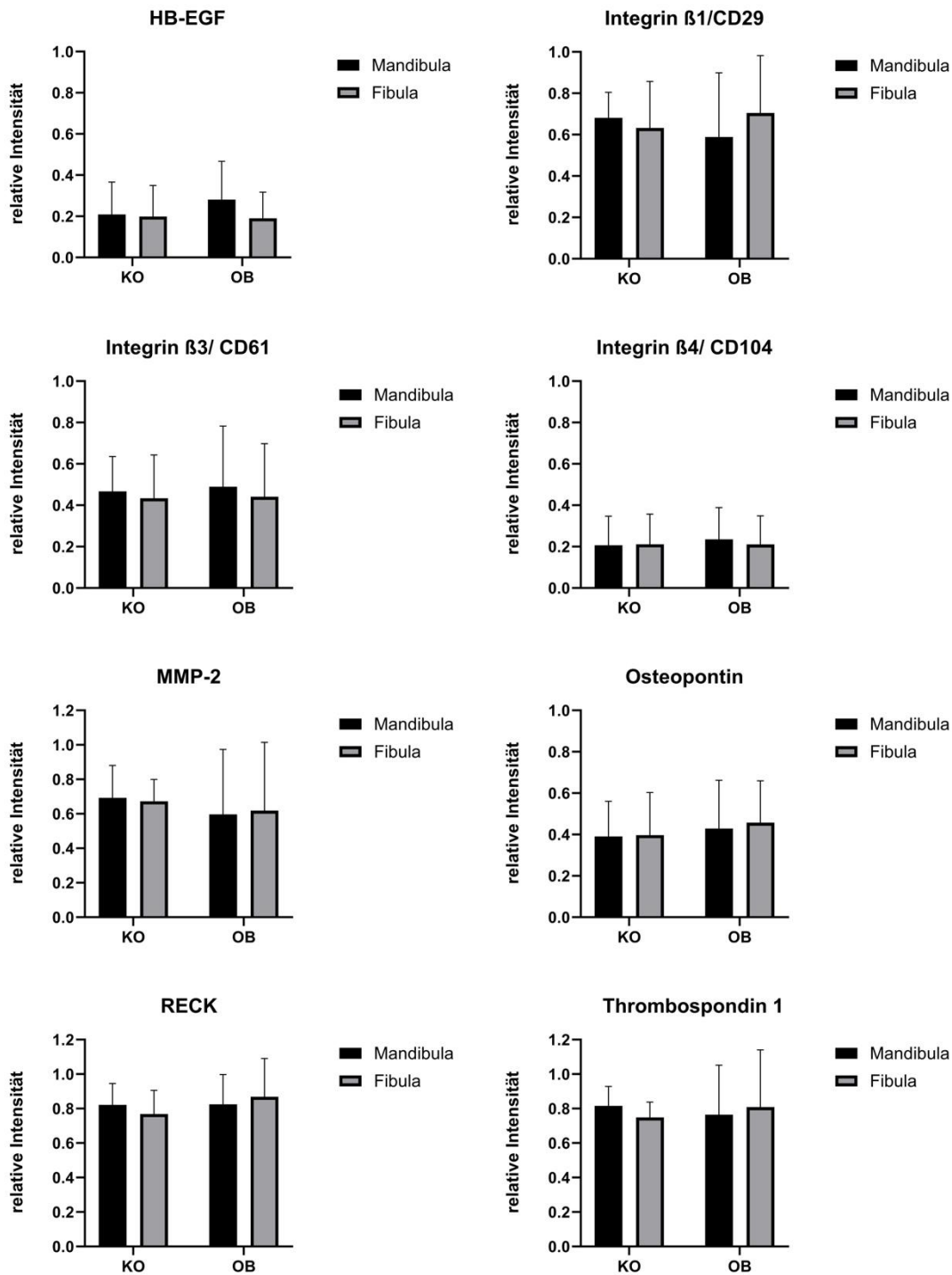


Abbildung 15 Proteom Profiler Ergebnisse 3

Proteinkonzentration im Mediumsüberstand an Tag 14. Angeben ist die relative Intensität der Pixel-Dichte in Relation zu dem eines Standardproteins. Abgebildet ist der Mittelwert + Standardabweichung. Die Signifikanz der Abweichungen wurde mittels zweifacher Varianzanalyse bestimmt ($n=6$, $*p < 0.05$, $**p \leq 0.01$).

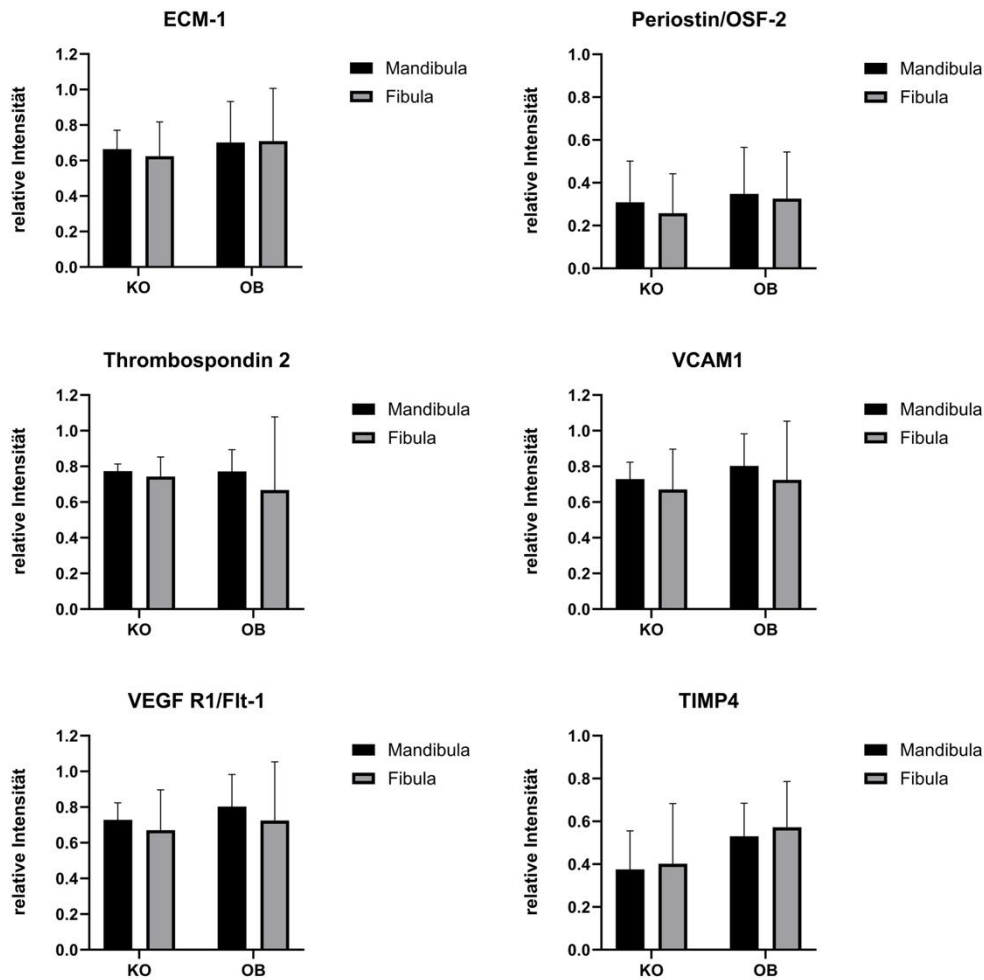


Abbildung 16 Proteom Profiler Ergebnisse 4
 Proteinkonzentration im Mediumsüberstand an Tag 14. Angeben ist die relative Intensität der Pixel-Dichte in Relation zu dem eines Standardproteins. Abgebildet ist der Mittelwert + Standardabweichung Die Signifikanz der Abweichungen wurde mittels zweifacher Varianzanalyse bestimmt ($n=6$, $*p < 0.05$, $**p \leq 0.01$).

4 Diskussion

Da die regenerative Medizin eine immer größere Rolle spielt, gewinnt das BTE in der Klinik zunehmend an Relevanz. Diese Behandlungsmethode verspricht eine spendereigene Lösung für die Behandlung von kritischen Knochenläsionen und Defekten, welche möglicherweise mit weniger invasiven Verfahren versorgt werden könnten. Die Möglichkeit, auf den Patienten angepasste Scaffolds herzustellen, die mit spendereigenen Zellen besiedelt sind, um eine strukturelle und funktionelle Wiederherstellung des Knochens zu ermöglichen, hat das Potenzial, die Patientenversorgung zu revolutionieren (Walmsley et al., 2016).

Ein entscheidender Faktor für den Erfolg des BTE ist die Auswahl der richtigen Stammzellquelle. Die Effizienz und Wirksamkeit der Knochenregenerate hängen in hohem Maße von deren Eigenschaften und deren osteogenem Potenzial ab. Daher ist es von immenser Bedeutung, den am besten geeigneten embryonalen Ursprung der Zellen zu identifizieren, um die Qualität und Effektivität des BTE in der klinischen Praxis und Forschung weiter zu steigern.

Genau dieser Fragestellung widmet sich diese Untersuchung, indem sie die Unterschiede der osteogenen Potenziale von zwei verschiedenen Zellquellen untersucht: Mandibula-hPDCs und Fibula-hPDCs. Diese beiden Zelltypen dienen als repräsentative Zellen für die desmale und chondrale Ossifikation und weisen unterschiedliche embryonale Abstammungen auf. Durch die systematische Untersuchung und den Vergleich dieser Zellen soll ein besseres Verständnis für ihre biologischen Eigenschaften und ihr Potenzial zur Knochenregeneration gewonnen werden.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Grundlagen für die Weiterentwicklung und Optimierung des BTE zu schaffen, um einen Beitrag zur regenerativen Medizin und Patientenversorgung zu leisten.

4.1 Bewertung der Alizarin Quantifizierung

Durch die Anwendung der Alizarin Red S-Färbung und die nachfolgende quantitative Analyse wurde die Matrixmineralisierung als ein charakteristisches Merkmal der

osteogenen Differenzierung untersucht. Ein Unterschied zwischen den Mandibula-hPDCs und den Fibula-hPDCs ist dabei allerdings makroskopisch nicht zu erkennen. Lediglich die quantitative Analyse zeigt, dass die Fibula-hPDCs tendenziell mehr mineralisierte extrazelluläre Matrix gebildet haben als die Mandibula-hPDCs im untersuchten Zeitraum. Dabei zeigt sich allerdings, dass bei den hPDCs, welche kein osteogenes Medium erhalten haben, auch ein gewisses Maß an Mineralisierung stattgefunden hat. Bei der Betrachtung der Scaffolds der Kontrollgruppe erkennt man, wenn auch in deutlich reduzierten Maßen, dunkelrot gefärbte Poren der Scaffolds. In der quantitativen Analyse zeigt sich, dass die Scaffolds der Kontrollgruppe mehr Alizarin gebunden haben als ein unbesiedelter Scaffold, womit bestätigt wird, dass Zellen eine mineralisierte Matrix gebildet haben.

Sowohl Alexander et al. (2009) als auch Sorg (2022) zeigten in ihren Versuchen, dass womöglich nicht alle hPDCs die Kapazität haben, zu mineralisieren. In beiden Untersuchungen waren es jeweils Mandibula hPDCs, welche sich nicht differenzieren und keine mineralisierte Matrix gebildet haben (Alexander et al., 2009; Sorg, 2022). In unseren Versuchen konnte dies nicht beobachtet werden.

Als Erklärung für die Bildung einer mineralisierten extrazellulären Matrix ohne den Erhalt vom osteogenen Medium lässt sich anführen, dass β -TCP selbst ein osteoinduktives Potenzial aufweist. Es gilt als belegt, dass β -TCP als Knochenersatzmaterial selbst in der Lage ist, die Knochenneubildung zu initiieren (Kondo et al., 2006; Tang et al., 2018; Tsukanaka et al., 2015).

Kondo et al. (2006) zeigten bei ihren Untersuchungen, dass sich ein unbesiedelter Scaffold aus β -TCP, welcher in einen Muskel eines Hund implantiert wurde, ohne Zutun von osteogenen Faktoren zu Knochengewebe entwickelte. Damit wurde bewiesen, dass β -TCP osteoinduktive Eigenschaften aufweist. Darüber hinaus stellten Kondo et al. (2006) fest, dass bei der Verwendung von β -TCP Knochen via desmaler Ossifikation gebildet wird (Kondo et al., 2006). Es ist daher anzunehmen, dass β -TCP die direkte Knochenbildung unterstützt, während der embryonale Ursprung der Zellen und das damit verbundene Priming für eine bestimmte Art der Osteogenese eine untergeordnete Rolle spielen könnte.

Die stattfindende Osteoinduktion auf dem Scaffold könnte auf eine von Calcium und Phosphat induzierte Differenzierung der Zellen zurückzuführen sein. Studien haben gezeigt, dass sowohl Calcium als auch Phosphat die Differenzierung von Ostoblasten und der damit verbundenen Mineralisierung der Zellen fördern (Honda et al., 2006; Julien et al., 2009; Khoshniat et al., 2011). Es wurde nachgewiesen, dass Zellen, in deren Umgebung eine erhöhte Calciumkonzentration vorliegt, in der Lage sind, osteoinduktive Zytokine wie BMP-2 zu sezernieren und somit die Osteoinduktion von hPDCs indirekt zu fördern (Honda et al., 2006).

Es bleibt jedoch zu klären, in welchem Ausmaß Scaffolds Calcium- und Phosphationen freisetzen. Sowohl Umrath et al. (2023), als auch schon Koerten et al. (1999) zeigten, dass Scaffolds aus β -TCP Scaffolds in Lösung gehen und dabei ihre Ionen an das Medium abgeben können (Koerten & van der Meulen, 1999; Umrath et al., 2023). Dies erhöht die extrazelluläre Konzentration von Calcium- und Phosphationen im Medium und würde die Osteoinduktion auf den Scaffolds der Kontrollgruppe erklären als auch die generelle Mineralisierung der Zellen fördern.

4.2 Bewertung der histologischen Ergebnisse

Die histologischen Ergebnisse mittels Fluoreszenzfärbung zeigen vor allem, dass die Zellen ungleich in dem Scaffold verteilt sind. In der Mitte des Scaffolds finden sich fast keine Zellen, während sich um den Scaffold ein Monolayer gebildet hat. Dabei ist es interessant zu beobachten, dass dies ubiquitär für alle Bedingungen gilt. Die Vermutung liegt nahe, dass es ein Versorgungsproblem mit Nährstoffen innerhalb des Scaffolds gibt oder dass die Zellen schon während des Vorgangs des Besiedelns nicht das Innere des Scaffolds erreichen.

Wie schon in Abschnitt 1.7, Tissue-Engineering, erwähnt, ist es wichtig für das BTE, eine ausreichende Versorgung der Zellen mit Nährstoffen und osteogenen Proteinen zu gewährleisten. Voraussetzung dafür ist, dass eine Permeabilität innerhalb des Scaffolds vorhanden ist und eine Diffusion stattfinden kann (Hollister, 2005). Bei der Auswertung der mikroskopischen Bilder zeigt sich deutlich, dass eine höhere Proliferationsrate bei den am Rand liegenden Zellen und an den Ecken des Scaffolds vorhanden ist als im Inneren der Scaffold, was die Vermutung unterstützt, dass eine Permeabilität des Scaffolds nicht ausreichend gegeben ist.

In der aktuellen Literatur werden für eine bessere Kultivierung der Zellen auf dem Scaffold aktuell vier verschiedene Wege diskutiert, welche zu einer verbesserten Versorgung der Zellen führen sollen (Nguyen et al., 2012).

- Über die Abgabe von Wachstumsfaktoren durch den Scaffold und die Art des verwendeten Materials soll eine Verbesserung geschaffen werden.
- Durch den 3-D Druck sollen Scaffolds mit Mikrokanälen gedruckt werden, welche das Gefäßsystem simulieren sollen.
- Bei Co-Kulturen werden Systeme werden verschiedener Zellarten nebeneinander kultiviert, um synergistische Effekte zu erzeugen.
- Dauerhaft fließende Kulturmedien, in denen die Scaffolds kultiviert werden, sollen dafür sorgen, dass Nährstoffe den Scaffold durchströmen. Aufgrund der entstehenden mechanischen Belastung auf die Zellen sollen die Proliferation und Differenzierung der Zellen zusätzlich gefördert werden.

Young et al. (2009) untersuchten dabei Wachstumsfaktoren, die auf die Oberfläche der Scaffolds aufgebracht werden, um die Zellen mit den nötigen Proteinen zu versorgen sowie die Angiogenese zu fördern. Im Fokus der aktuellen Forschung stehen Wachstumsfaktoren wie BMP2 alleine oder in Kombination mit VEGF. Nach der Implantation dieser Scaffolds, welche sowohl BMP-2 als auch VEGF enthielten, konnte die Mineraldichte innerhalb des neu gebildeten Knochens um 33 % erhöht werden verglichen zu einem Scaffold, der ausschließlich BMP-2 enthielt. Nach 12 Wochen wurde jedoch kein signifikanter Unterschied mehr zwischen den verschiedenen beschichteten Scaffolds festgestellt (Young et al., 2009).

Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Bereitstellung mehrerer Wachstumsfaktoren eine mögliche Strategie zur Verbesserung der Bildung von vaskularisiertem Knochengewebe darstellen kann. Eine weitere Idee ist es, Sauerstoff produzierende Scaffolds herzustellen, diese mit Zellen zu besiedeln und daraufhin zu implantieren. Durch diese Materialien soll das Überleben der Zellen gesichert werden, bis Gefäße von dem umliegenden Gewebe in den Scaffold einsproßen (Zhao et al., 2024).

Durch den modernen 3-D Druck ist es möglich, ein Scaffoldgerüst herzustellen, welches Mikrokanäle besitzt, die in Verbindung stehen und ein Netzwerk bilden, dass die Versorgung der Zellen sicherstellt. Kang et al. (2016) konnten eine erhöhte

Vaskularisierung und Knochenregeneration durch den Einsatz solcher Scaffolds nachweisen (Kang et al., 2016). Auch Holmes et al. (2016) bestätigten, dass durch die Verwendung von diesen spezifischen Scaffolds eine höhere Proliferationsrate sowie eine gesteigerte osteogene Differenzierung erzielt werden kann (Holmes et al., 2016).

In Co-Kulturen werden zwei unterschiedliche Arten von Zellen gleichzeitig kultiviert, um sich synergistische Effekte zunutze zu machen. Es konnte dabei gezeigt werden, dass bei humanen Osteoprogenitorenzellen eine erhöhte osteogene Differenzierung sowie eine vermehrte Expression von VEGF gemessen werden konnte, wenn sie zusammen mit menschlichen Nabelschnurvenen-Endothelzellen kultiviert wurden (Grellier et al., 2009).

Die Einwirkung mechanischer Kräfte auf Zellen fungiert als Form der physikalischen Signalgebung. Dieser Prozess kann die verschiedenen Zellfunktionen im Körper beeinflussen, darunter Migration, Proliferation und die Differenzierung von Zellen. *In vivo* ist bekannt, dass gezielte Belastung die Bildung von Knochengewebe fördert, während mangelnde Belastung zu Knochenabbau führen kann (Hsieh et al., 2001; Inoue et al., 2019; Nepal et al., 2023).

Auch *in vitro* konnte gezeigt werden, dass mechanische Belastung dafür sorgt, dass sich die osteogene Differenzierung verbessert und damit auch die Knochenneubildung beschleunigt wird. Die mechanische Kraft wird durch die Strömung des Mediums durch den Scaffold erzeugt (engl. fluid-stress). Zusätzlich zu der ausgeübten Kraft findet ein Flüssigkeitsfluss durch den gesamten Scaffold statt. Dies ermöglicht einen ausreichenden Nährstoff- und Abfallaustausch im Inneren des Scaffolds. Dadurch wird die Zellviabilität erhöht, die osteogene Differenzierung verbessert sowie eine homogene Verteilung der Zellen innerhalb des Scaffolds erreicht (Kapur et al., 2005; Liu et al., 2012; Wittkowske et al., 2016).

In der aktuellen Literatur ist nicht hinreichend belegt, ob der erhöhte Nährstoffaustausch durch das fließende Medium oder die daraus resultierende Belastung ausschlaggebend für die verbesserten Kultivierungsbedingungen ist. Mechanische Kräfte und Flüssigkeitsströmungen spielen allerdings zweifellos eine wichtige Rolle bei der Gewebekultivierung *in vitro*, insbesondere im Kontext des BTE.

Neben der Annahme des Versorgungsproblems innerhalb eines Scaffold, könnte ein weiteres Problem sein, dass die Zellen schon beim Besiedeln der Scaffolds sich nicht im Inneren des Scaffolds ansiedeln. In einem fließenden Modell konnte bei der Besiedlung der Scaffolds gezeigt werden, dass in der Besiedlungszeit von 30 Minuten die Zelldichte im Scaffold exponentiell zunimmt und danach ein Plateau erreicht wird (Olivares & Lacroix, 2012). Bis zu diesem Zeitpunkt wurden in der beschriebenen Versuchsreihe ca. 13 Zyklen durchlaufen, wohingegen in unseren Versuchen die Zellen nur 4 bis 5-mal auf den Scaffold pipettiert wurden. In diesem Zusammenhang wäre eine Untersuchung der Scaffolds interessant, welche die histologischen Ergebnisse unmittelbar nach der Besiedlung der Scaffolds bzw. in den ersten Tagen danach zeigt, um den Prozess der Besiedlung zu überprüfen und zu optimieren.

Eine homogenere Zellverteilung im Scaffold in Verbindung mit einer sichergestellten Versorgung der Zellen, kann die Qualität des TE verbessern sowie auch die Kulturzeiten, die für eine bestimmte Gewebeart benötigt wird, verringern (Wendt et al., 2006).

In unseren Versuchen ist die Mineralisierung der Zellen auf dem Scaffold nur in den Bereichen zu sehen, in denen die Zellen einen Monolayer gebildet haben und sich vom Scaffold-Gerüst abheben. Auch konnten keine größeren Mengen gebildeter mineralisierter extrazellulärer Matrix innerhalb des Scaffolds nachgewiesen werden.

In Versuchen mit Mäusen wurden β -TCP-Scaffolds nach 12 Wochen der Implantation histologisch untersucht. Hierbei wurde eine Knochenneubildung vor allem an der äußeren Oberfläche der implantierten Scaffolds beobachtet (Takahashi & Yamanaka, 2006). Diese Ergebnisse *in vivo* stimmen mit unseren Beobachtungen *in vitro* überein und bestätigen, dass die Zellen vor allem an der Oberfläche des Scaffolds differenzieren und eine mineralisierte Matrix bilden. Es wird auch gezeigt, dass selbst bei 12-wöchiger Implantierung keine vollständige Umwandlung von Knochenersatzmaterial in Knochen stattfindet (Takahashi & Yamanaka, 2006).

Angesichts der Tatsache, dass unsere Zellen über einen Zeitraum von 21 Tagen kultiviert wurden, stellt sich die Frage, wie sich die Ossifikation über einen längeren Zeitraum entwickeln würde und ob Unterschiede in der Ossifikation zwischen den hPDCs der Mandibula und der Fibula über längere Kultivierungszeiträume auftreten würden.

4.3 Bewertung des ALP Assay

Die ALP-Expression gilt in der Literatur als einer der frühen Marker der Osteogenese von Zellen (Golub & Boesze-Battaglia, 2007; Tenenbaum, 1987). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass zu beiden Untersuchungszeitpunkten die hPDCs der Fibula eine höhere Aktivität der ALP aufweisen im Vergleich zu den Mandibula hPDCs. Für die Kontrollgruppe konnte, wenn auch in signifikant geringem Ausmaß, eine ALP-Aktivität detektiert werden.

Wichtig in Betracht zu ziehen ist, dass dies nur eine Momentaufnahme der Aktivität ist und diese täglich variieren kann. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die hPDCs der Mandibula sich geringfügig langsamer als die hPDCs der Fibula entwickeln und somit an einem anderen Untersuchungszeitpunkt eine höhere Aktivität der ALP aufweisen würden als die Fibula-hPDCs. Damit einhergehen kann auch eine höhere Aktivität über einen längeren Zeitraum und somit eine höhere Gesamtaktivität. Die ALP dient *in vivo* der Bereitstellung von Phosphat, welches als Substrat für die Mineralisierung benötigt wird (Hessle et al., 2002; Wennberg et al., 2000).

Im Hinblick auf unsere Fragestellung kann durch diesen Versuch eine schnelle osteogene Differenzierung der Fibula-hPDCs angenommen werden, welche für das Periostzellen der Fibula als zu bevorzugende Stammzellquelle sprechen würde.

4.4 Bewertung der Genexpression

In unseren Versuchen wurde die Genexpression der osteogenen Marker *ALP*, *RUNX-2*, *COL1A1*, *COL1A2*, *OCN* an Tag 7 und Tag 14 mit der Intention untersucht, ein unterschiedliches osteogenes Differenzierungspotenzial der hPDCs nachweisen zu können.

Für *ALP* konnte analog zum ALP Assay eine höhere Genexpression für in den Fibulazellen im Vergleich zu den Mandibulazellen an beiden Untersuchungszeitpunkten festgestellt werden. Für das Gene *RUNX2* wurde dabei eine ca. 3,6-fach höhere Expression in den Fibula-hPDCs der osteogenen Gruppe an Tag 14 im Vergleich zu den Mandibula-hPDCs der Kontrollgruppe an Tag 7 festgestellt. Die Mandibula-hPDCs wiesen am selben Tag nur eine 1,3-fach höhere

Exprimierung auf. Auch für *COL1A1* und *OCN* konnte in dieser Arbeit in den Fibula-hPDCs an Tag 14 eine höhere Genexprimierung nachgewiesen werden, verglichen zu den Mandibula-hPDCs.

COL1 ist eines der Hauptbestandteile des menschlichen Knochens. Ein Defekt in den Genen *COL1A1* und *COL1A2* wird mit Osteogenesis imperfecta, einer Krankheit, welche mit einer gestörten Knochenentwicklung einhergeht, assoziiert (Rauch & Glorieux, 2004). In unseren Versuchen konnte eine höhere Expression bei der KO-Gruppe der Mandibula an Tag 7 nachgewiesen werden im Vergleich zu allen anderen Bedingungen und Zeitpunkten. Allerdings gilt es dabei zu beachten, dass es in Relation zu unserem Standard-Gen *GAPDH* eine hohe Exprimierung in allen Bedingungen gab im Vergleich zu den anderen untersuchten Genen.

COL1 gilt als früher Marker der Osteogenese von Zellen. Stein et al. (1993) konnten zeigen, dass die höchste Exprimierung von *COL1* an Tag 7 stattfindet (Stein & Lian, 1993). In einer Studie von Quarles et al. (1992) zeigt sich, dass die Zellen zuerst ein Grundgerüst aus *COL1* bilden, in das später die mineralisierte Matrix eingebracht wird (Quarles et al., 1992). Daher ist es auch nicht überraschend, dass an Tag 14 eine generelle Runterregulation stattfinden kann. Die Runterregulation an Tag 7 könnte auf eine maximale Expression vor unserm Untersuchungszeitpunkt hindeuten.

In unseren Versuchen wurde eine hohe Standardabweichung festgestellt, was auf eine erhebliche Variabilität in den Ergebnissen hinweist. Diese Varianz könnte auf unterschiedliche Geschwindigkeiten der Zelldifferenzierung der verschiedenen Patientenzellen auf dem Scaffold zurückzuführen sein. Die Genexpressionen der gemessenen osteogenen Marker unterliegen starken Schwankungen und können sich täglich ändern.

Eine präzise Analyse der Genexpression erfordert normalerweise eine ausreichend große Anzahl von Proben, um die Varianz zwischen den einzelnen Proben zu minimieren und statistisch signifikante Schlussfolgerungen zu ziehen. In dieser Untersuchung wurde jedoch eine begrenzte Anzahl von Proben verwendet, was es schwieriger macht, genaue Aussagen über die Genexpression der Zellen zu treffen. Diese Unterschiede in den Differenzierungsgeschwindigkeiten zwischen den

Spendern können zu einer erhöhten Varianz beitragen und die Interpretation der Ergebnisse erschweren.

Trotz dieser Einschränkungen bieten die beobachteten Trends in der Genexpression wertvolle Einblicke in die osteogene Differenzierungsfähigkeit der hPDCs.

In der aktuellen Literatur gilt es als bewiesen, dass Zellen mit einer höheren Expression der von uns untersuchten osteogenen Markergene *ALP*, *RUNX-2*, *COL1A*, *COL1A2* und *OCN* mit einer verstärkten Differenzierung, Reifung zu Osteoblasten, sowie einer verbesserten Fähigkeit zur Bildung einer mineralisierten Matrix einhergehen. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass diese Marker entscheidende Regulatoren des osteogenen Differenzierungsprozesses sind (Ducy et al., 1997; Hauschka et al., 1989; Nakashima et al., 2002; Narisawa et al., 1997; Stein & Lian, 1993; Tao et al., 2020; Wennberg et al., 2000).

Die Zusammenfassung der Ergebnisse der Genexpression legt daher nahe, dass die Fibula-hPDCs im Vergleich zu den Mandibula hPDCs eine überlegene Position einnehmen. Die erhöhte Expression der osteogenen Marker *ALP*, *RUNX-2*, *COL1* und *OCN* in den Fibula-hPDCs deutet darauf hin, dass diese Zellen ein größeres Potenzial zur Differenzierung in Osteoblasten und zur Bildung einer mineralisierten Matrix aufweisen. Diese Befunde zeigen, dass die Fibula als Stammzellquelle für das Knochengewebe eine vielversprechendere Option sein könnte als die Mandibula.

4.5 Bewertung des Proteom Profiler

In den durchgeführten Versuchen konnten keine signifikanten Konzentrationsunterschiede in den von den Zellen ins Medium sezernierten Proteinen an Tag 14 festgestellt werden. Es konnte auch keine einheitliche Tendenz gesehen werden, dass Fibula-hPDCs aufgrund ihrer Proteinexpression die zu bevorzugende Quelle für das BTE seien.

Fretwurst et al. (2022) untersuchten analog zu unseren Versuchen das Proteom von Zellen unterschiedlichen Ursprungs. Dabei untersuchte er den Alveolarknochen sowie den Beckenknochen. Der Beckenknochen ist ebenfalls mesenchymalen Ursprungs und wird wie das übrige menschliche Skelett durch chondrale Ossifikation

gebildet. Auch wenn es nicht der gleiche Knochen ist wie die Fibula, können diese Ergebnisse mit unseren Erhebungen verglichen werden. Fretwurst et al. (2022) konnten zeigen, dass die Alveolarknochenzellen deutlich mehr ECM-Proteine wie COL1 enthalten und auch mehr osteogene Proteine wie zum Beispiel ALP, Periostin, TIMP 2 und TIMP 3, als Zellen aus dem Beckenkamm (Fretwurst et al., 2022). In unseren Ergebnissen konnte dies nicht beobachtet werden. Die Ergebnisse von Mandibula und Fibula-hPDCs waren annähernd gleich. Dabei gilt es bei Fretwurst et al. (2022) jedoch zu beachten, dass die Zellen direkt aus dem Knochen entnommen wurden und ohne Kultivierung untersucht wurden.

In dieser Arbeit wurden erstmalig die Auswirkungen des unterschiedlichen embryonalen Ursprungs auf das Proteom der Zellen in einer 3D-Kultur für das BTE untersucht.

Amphiregulin gehört zu den osteogenen Proteinen, für die in den durchgeführten Versuchen Unterschiede zwischen Mandibula- und Fibula-hPDCs gemessen wurden. Berasain und Avila (2014) konnten zeigen, dass bei Mäusen, welche ein Amphiregulin-Defizit aufwiesen, weniger Knochenmasse gebildet wurde. (Berasain & Avila, 2014). Da in unseren Versuchen die Fibula-hPDCs tendenziell mehr Amphiregulin bildeten, könnte von einer besseren Eignung für das BTE ausgegangen werden.

Im Gegensatz dazu ist in unseren Versuchen eine verminderte Expressierung von Thrombospondin-2 in den hPDCs der Fibula zu beobachten verglichen zu Mandibula-hPDCs. Eine herabgesetzte Thrombospondin-Expressierung geht mit einer verminderten Differenzierung zu Osteoblasten sowie einer geringeren Knochenneubildung einher (Delany & Hankenson, 2009).

Als bewiesen gilt, dass APP eine vermehrte Knochenbildung verantwortlich ist. Die Ergebnisse unserer Untersuchung zeigen, dass APP tendenziell etwas mehr von den Mandibula-hPDCs verglichen mit Fibula-hPDCs exprimiert wurde (Pan et al., 2018).

Analog zu den Ergebnissen dieser Arbeit konnten auch von Khvorova et al. (2022) keine großen Unterschiede im Proteom derjenigen Zellen gefunden werden, welche ein osteogenes Medium erhalten haben im Vergleich zu Zellen, welche ein Standardmedium erhalten haben (Khvorova et al., 2022).

4.6 Bewertung des Differenzierungspotenzials

Das zentrale Ziel dieser Arbeit ist es, das osteogene Differenzierungspotenzial von hPDCs aus der Mandibula und der Fibula zu vergleichen. Diese Zelltypen werden als repräsentativ für unterschiedliche embryologische Ursprünge und der damit einhergehenden Ossifikationsmechanismen betrachtet.

Bisherige Forschungsergebnisse in der Literatur geben keine eindeutige Antwort auf die Fragestellung, welche Abstammung der Zellen für das BTE zu bevorzugen sei.

Leucht et al. (2008) haben Unterschiede in den Heilungsprozessen von Frakturen bei PDCs beobachtet, die auf den embryonalen Ursprung des lokalen Periostgewebes zurückzuführen sind. Die Untersuchung wurde an Mäusen durchgeführt, wobei das Periost des Unterkiefers in die Fibula und umgekehrt transplantiert wurde. Die Ergebnisse zeigten, dass beim Einsetzen der Heilung ein direkter Ossifikationsprozess festgestellt wurde, als das Unterkieferperiost in einen Defekt des Schienbeins transplantiert wurde. Im Gegensatz dazu differenzierten die Periostzellen des Schienbeins zuerst zu Chondrozyten, wenn sie in einen Unterkieferdefekt transplantiert wurden. Es wird angenommen, dass die Zellen eine inhärente Prädisposition haben, welche Art der Ossifikation sie durchlaufen (Leucht et al., 2008).

Eine weitere Studie von Iuchi et al. (2020) unterstützt diese Hypothese, indem sie das Periost von Schädel-, Unterkiefer-, Radius- und Iliumknochen untersuchten. Dabei stellten sie fest, dass das Periost des Radius und des Iliums hauptsächlich Mechanismen der chondralen Ossifikation auslöst, während das Periost der Mandibula und des Schädels hauptsächlich den Prozess der desmalen Ossifikation unterstützt (Iuchi et al., 2020).

Die hier beschriebenen Erkenntnisse legen nahe, dass der embryonale Ursprung der Zellen und deren Prädisposition für bestimmte Ossifikationsmechanismen einen signifikanten Einfluss auf das BTE haben. Dieses würde für die Mandibula als zu bevorzugende Quelle sprechen, da der Zwischenschritt der Knorpelbildung übergangen werden könnte und eine effektivere Regeneration möglich wäre.

Jedoch sind auch die Erkenntnisse aus der Arbeit von Debnath et al. (2018) zu berücksichtigen, die darauf hinweisen, dass periostale Zellen des Skeletts

möglicherweise keine signifikanten Unterschiede zu denen des Schädels aufweisen. Sie sind auch in der Lage, direkt Knochen bilden zu können, ohne vorher zu Chondrozyten zu differenzieren. Debnath et al. (2018) stellten die These auf, dass sich PDCs des Skelettes nicht von denen des Schädels unterscheiden seien (Debnath et al., 2018). Die vorliegende Arbeit stellt die Bedeutung des embryonalen Ursprungs der Zellen für das BTE infrage und deutet darauf hin, dass andere Faktoren, wie zum Beispiel die lokalen Gegebenheiten oder die Kultivierungsbedingungen, eine größere Rolle spielen könnten.

Park et al. (2012) hingegen zeigten, dass *in vitro* die Mineralisierung von Periostzellen der Mandibula denen der langen Röhrenknochen überlegen ist (Park et al., 2012). Auch Quarto et al. (2010) beschäftigten sich mit der Fragestellung, ob der embryonale Ursprung von Osteoblasten einen Unterschied für das BTE macht. Quarto et al. (2010) konnten zeigen, dass Osteoblasten neuralen Ursprungs ein erhöhtes osteogenes Potenzial aufweisen im Vergleich zu Osteoblasten mesodermalen Ursprungs, was durch eine verstärkte Aktivierung des Wnt-Signalwegs vermittelt wird. Dieser führt zu einer erhöhten Mineralisierung und Knochenneubildung sowohl *in vivo* als auch *in vitro* (Quarto et al., 2010).

Diese Ergebnisse unterstreichen die Relevanz des embryonalen Ursprungs bei der Wahl von Stammzellen für das BTE und der Knochenregeneration.

Dementsprechend gibt es auch widersprüchliche Studien, welche unsere anfänglich aufgestellte Hypothese der besseren Eignung von Stammzellen neuronalen Ursprungs widerlegen und damit die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen.

In einer Studie von Hsiao et al. (2018) wurde das osteogene Potenzial von Periostgewebe untersucht, das von Rippen-, Schädel-, Oberschenkelknochen und des Schienbeins entnommen wurde. Die Ergebnisse zeigten Variationen in der gebildeten Knochenstruktur und den osteogenen Markerproteinen zwischen dem Periostgewebe verschiedener Knochenquellen. Insbesondere wiesen in dieser Studie Periostzellen der Oberschenkel- und Schienbeinknochen, also Zellen mesenchymalen Ursprungs, eine überlegene Neubildung von Knochengewebe sowie eine erhöhte Expression von Osteocalcin und alkalischer Phosphatase gegenüber der Schädelknochenperiostzellen auf (Hsiao et al., 2018).

Auch Bilkay et al. (2008) stellten fest, dass das Periostgewebe der Tibia eine deutlich besser Knochenneubildungsrate aufweist als Periost des Kraniaums. Sie beobachteten eine erhöhte Expression von Osteocalcin sowie der alkalischen Phosphatase der Tibiaperiost im Vergleich zum Schädelperiost (Bilkay et al., 2008). Sorg (2022) führte Versuche mit hPDCs der Fibula und der Mandibula in einer 2-dimensionalen Kultur durch. Er untersuchte dabei das trilineare Potenzial der hPDCs. Dabei konnte er zeigen, dass sowohl die hPDCs der Fibula als auch der Mandibula in der Lage sind, sich sowohl adipogen, chondrogen und osteogen zu differenzieren. Interessanterweise deuteten die Ergebnisse darauf hin, dass die hPDCs der Fibula tendenziell besser für die osteogene Differenzierung geeignet sind. In seiner Studie konnten allerdings keine signifikanten Ergebnisse erzielt werden, die eine Überlegenheit von Periostzellen mesenchymalen Ursprungs belegen würden (Sorg, 2022).

Die hier diskutierten Ergebnisse aus der Literatur zeigen deutlich, dass auf der Suche nach der am besten geeigneten Quelle für das BTE noch weitere Forschung erforderlich ist. Ein Kritikpunkt in diesen hier aufgeführten Studien liegt vor allem darin, dass sie in einem Tiermodell durchgeführt wurden, was ihre Übertragbarkeit auf den menschlichen Organismus einschränken könnte. Nicht in allen Studien wurde Periost der Mandibula, sondern vorwiegend der Kalotte als Vertreter für neurale hPDCs entnommen. Wie oben schon erwähnt (vgl. 1.3.1 Entwicklung der Mandibula) hat die Mandibula eine herausragende Remodellierungsrate, verglichen zur Fibula, was einen Vorteil darstellen könnte.

Eine weitere Problematik dieser hier aufgeführten Studien ist, dass zum Teil Mischkulturen von Periostgewebe verwendet wurden und keine Reinkulturen aus osteogenen Progenitorzellen wie in unseren Versuchen. Dieses kann die Ergebnisse insofern beeinflussen, als dass die genaue zelluläre Zusammensetzung des Gewebes unbekannt bleibt. Diese potenziellen Störfaktoren wurden bei der Arbeit von Sorg (2022) eliminiert. Doch wurden die Versuche nur in einer 2-dimensionalen Kultur durchgeführt, was für die finale Anwendung im BTE nicht geeignet ist. Das Ziel sollte sein, *in vitro* Scaffolds mit Zellen zu kultivieren, welche anschließend implantiert werden können.

Die vorliegende Arbeit schließt eine wichtige Lücke in der aktuellen Forschung. Sie bestätigt die Ergebnisse der 2-dimensionalen Kultur und zeigt die *in vitro* Überlegenheit der hPDCs der Fibula im Vergleich zu denen der Mandibula-. Obwohl nur signifikante Ergebnisse bei der ALP-Aktivität und der *RUNX2* Expression erzielt wurden, deutet die Gesamtheit der Versuche darauf hin, dass die Fibula-hPDCs in unseren Versuchen für das BTE überlegen zu sein scheinen.

4.7 Kritische Bewertung der Arbeit

Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche sind mit keinem in der aktuellen Literatur durchgeführten Versuch zu vergleichen. In unseren Versuchen wurden ausschließlich PDCs des Menschen verwendet. Um die Ergebnisse unserer Studie zu verbessern und ihre Übertragbarkeit in die chirurgische Praxis zu ermöglichen, wurden nur Patienten mit einbezogen, bei denen sowohl Periost der Mandibula als Vertreter der desmalen Ossifikation als auch Periost der Fibula als Vertreter der chondralen Ossifikation gewonnen werden konnte. Dadurch konnte die Donorvariabilität verringert werden.

Zu beachten ist, dass die hier verwendeten hPDCs im Rahmen größerer Rekonstruktionsoperationen entnommen wurden, die die Resektion von Defekten der Mandibula und die Rekonstruktion unter Verwendung der Fibula umfassen. Hierbei variieren die effektiven Operationszeiten an der Fibula als auch an der Mandibula. Des Weiteren sollte bedacht werden, dass das Periost der Mandibula im Vergleich zur Fibula über einen längeren Zeitraum freigelegt wurde und somit Umweltfaktoren und insbesondere die Gefahr der Austrocknung bestand.

Weiterhin ist wichtig, dass das entnommene Periost der Mandibula aus einem Bereich stammt, der einem Knochendefekt benachbart ist. Selbst wenn das Periost der Mandibula aus einem Bereich entnommen wurde, der weit entfernt vom Defekt liegt und damit vermeintlich gesund ist, besteht die Möglichkeit, dass die Zellen durch den umliegenden Gewebeschaden beeinträchtigt wurden. Infolgedessen kann eine potenzielle Vorschädigung des Periostgewebes der Mandibula nicht vollständig ausgeschlossen werden. Trotz der vorsichtigen Entnahme und der Distanz unserer Proben zum Defekt besteht die Möglichkeit, dass eine solche Beeinträchtigung der

Zellen vorliegt, was mit einem verminderten Differenzierungspotenzial einhergehen könnte.

Eine kritische Analyse ist analog beim Scaffolddesign erforderlich. In dieser Arbeit wurde festgestellt, dass es Probleme mit der Versorgung der Zellen oder mit der Besiedelung der Scaffolds gibt, wie in der Bewertung der histologischen Ergebnisse beschrieben wurde (vgl. 4.2 Bewertung der histologischen Ergebnisse). Dies führt dazu, dass die Zellen nur an der Oberfläche oder in den randnahen Bereichen der Scaffolds proliferieren und differenzieren, jedoch nicht in das Innere der Scaffolds eindringen. Das hat zur Folge, dass sich im Inneren des Scaffolds keine mineralisierte ECM bilden kann, welche zu ausgereiftem Knochen umgebaut werden könnte.

In verschiedenen Studien wurde das osteoinduktive Potenzial von β -TCP nachgewiesen (Kondo et al., 2006; Tang et al., 2018; Tsukanaka et al., 2015). Diesbezüglich gilt es auch zu hinterfragen, inwiefern mit einem anderen Material, welches im Hinblick auf das BTE eingesetzt werden würde, andere Ergebnisse beim Differenzierungsverhalten von hPDCs unterschiedlichen embryonalen Ursprungs erhoben werden könnten.

Campion et al. (2011) sowie Coathup et al. (2012) konnten zeigen, dass durch die Zugabe von Silikat zu einer Calcium-Phosphat-Keramik die Osseinduktion verbessert wird (Campion et al., 2011; Coathup et al., 2012). Auch bei der Beigabe von Acetylsalicylsäure in einen Silikat- β -TCP Scaffold konnten Tao et al. (2020) verbesserte osteogene Eigenschaften feststellen. Sie konnten gegenüber einem ausschließlich aus β -TCP bestehenden Scaffold überlegende Heilungseffekte im Tiermodell darstellen sowie *in vitro* eine höhere Expression von osteogenen Markern wie *ALP*, *COL1*, *RUNX2* und *OCN* nachweisen, welche in Versuchen mit einer erhöhten Mineralisierung einhergingen (Tao et al., 2020). Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die chemische Zusammensetzung von Scaffolds einen entscheidenden Einfluss auf deren osteogenes Potenzial besitzt. Anorganische Substitutionen innerhalb der keramischen Matrix modulieren nicht nur die Expression osteogener Marker und die Mineralisationsdynamik, sondern bestimmen im Kontext

der kraniofazialen Defektrekonstruktion maßgeblich die Qualität der Regeneration sowie die funktionelle und ästhetische Integrität der rekonstruierten Strukturen.

Die hier aufgeführten Modifizierungen von β -TCP sind nur einige Beispiele für die sehr große Bandbreite an Materialien, welche im Bereich der Forschung des BTE zum Einsatz kommen. Es gilt dabei zu untersuchen, in welchem Ausmaß unterschiedliche Materialien das osteogene Potenzial von hPDCs verschiedener embryonaler Herkunft beeinflussen. Daher wäre es von großer Bedeutung, unsere Versuche analog mit diversen weiteren Materialien durchzuführen.

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist, dass der untersuchte Zeitraum zu kurz ist, damit sich vollständig ausgereiftes Knochengewebe bilden kann. Eine Verlängerung des Untersuchungszeitraums könnte eine signifikante Überlegenheit einer bestimmten Stammzellquelle für das BTE aufzeigen.

In dieser Arbeit wurde die Bedeutung von mechanischer Belastung auf hPDCs außer Acht gelassen. hPDCs reagieren auf mechanische Belastung mit einer gesteigerten Knochenneubildungsrate. Dieses konnte sowohl *in vivo* (Hsieh et al., 2001, Nepal et al., 2023, Inoue et al., 2019) als auch *in vitro* (Wittkowske et al., 2016, Liu et al., 2012) nachgewiesen werden. Es bleibt jedoch unklar, ob es dabei auch Unterschiede für Zellen mit unterschiedlichem embryonalem Ursprung gibt.

Aufgrund der genannten Limitationen dieser Dissertation kann die Frage nach dem optimalen embryonalen Ursprung für das BTE nicht vollständig beantwortet werden. Diese Arbeit kann aber als wegweisende Erstuntersuchung angesehen werden und einen wichtigen Beitrag zur Diskussion über die geeignetste Stammzellquelle für das BTE liefern.

4.8 Ausblick und Fazit

Die vorliegende Dissertation trägt maßgeblich zum Verständnis von Periostzellen der Mandibula und der Fibula als potenzielle Quellen für das Knochen-Tissue-Engineering bei. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Fibula tendenziell als bevorzugte Stammzellquelle für das BTE für rekonstruktive Zwecke betrachtet werden kann. Die Versuche zeigen bei der ALP-Aktivität und der RUNX2-Genexpression eine signifikante Überlegenheit der Fibula-hPDCs gegenüber den Mandibula-hPDCs.

Die Hypothese, dass die Mandibula aufgrund ihrer neuralen Abstammung, der desmalen Ossifikation und der höheren Remodellierungsrate immer als bevorzugte Quelle für das BTE angesehen werden sollte, wird durch die Ergebnisse dieser Arbeit nicht unterstützt. Vielmehr deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Fibula-hPDCs möglicherweise besser geeignet sind, um die Anforderungen des BTE zu erfüllen.

Es ist jedoch wichtig anzumerken, dass die Entscheidung für die Verwendung von Periostzellen der Fibula oder der Mandibula für das BTE von verschiedenen Faktoren abhängt. In unseren Versuchen wurden Mandibula-hPDCs genommen, welche aus einer Defektumgebung stammen und die Vergleichbarkeit der beiden Zellen dadurch beeinträchtigt sein könnte. Auch die Versuche von Alexander et al. (2009) und Sorg (2022), bei denen die Mandibula-hPDCs nicht mineralisiert sind, muss für die Entscheidung der zu verwendete Quelle für das BTE mit einbezogen werden (Alexander et al., 2009; Sorg, 2022).

Somit sollte das Fazit dieser Dissertation lauten, dass im Falle einer vorgeschädigten Mandibula oder wenn hPDCs der Mandibula nicht mineralisieren, auf Periostzellen der Fibula für das BTE ausgewichen werden kann.

Unsere Versuche zeigen bei kritischer Betrachtung, dass keine eindeutige Überlegenheit einer Stammzellquelle eines bestimmten embryonalen Ursprungs gegeben ist, um eine zweite Operationswunde eindeutig zu rechtfertigen, wenn eine Rekonstruktion der Mandibula ausschließlich mittels BTE geplant werden soll. Trotzdem liefern die Ergebnisse dieser Arbeit neue Erkenntnisse für die Entwicklung innovativer Therapieansätze zur Knochenregeneration und bilden somit die Grundlage für weitere Forschungsarbeiten auf diesem Gebiet.

Für zukünftige Arbeiten wird es von entscheidender Bedeutung sein, mit einem größeren Patientenkollektiv zu arbeiten. Dies würde es ermöglichen, eine evidenzbasierte Bewertung der potenziellen Unterschiede zwischen den verschiedenen embryonalen Ursprüngen von hPDCs vorzunehmen.

Darüber hinaus sollten zukünftige Studien den Einfluss verschiedener Faktoren wie mechanischer Belastung, die Verwendung unterschiedlicher Materialien für die Scaffolds und verschiedene Kulturbedingungen auf die Differenzierung und Funktion der hPDCs untersuchen. Ein tieferes Verständnis dieser Einflussfaktoren könnte dazu beitragen, die Entwicklung von individuell angepassten Therapien und Biomaterialien für das BTE weiter voranzutreiben.

Ein weiterer wichtiger Aspekt für zukünftige Forschungsarbeiten ist die Berücksichtigung einer längeren Kultivierungszeit, um die langfristigen Auswirkungen der Zellkultivierung auf das BTE zu untersuchen. Dies könnte dazu beitragen, wichtige Erkenntnisse für die Langzeitviabilität der Zellen sowie Effektivität im Hinblick auf die Abstammung von hPDCs zu erforschen.

Durch die Berücksichtigung der oben genannten Faktoren kann das Potenzial des BTE voll ausgeschöpft werden, um den Patienten die bestmögliche Behandlung mit der geringsten Morbidität anzubieten.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf die eingehende Analyse und den Vergleich des osteogenen Differenzierungspotenzials humaner Periostzellen (hPDCs) aus der Mandibula und der Fibula in einer 3D Kultur. Diese Zelltypen wurden als repräsentativ für Periostzellen unterschiedlichen embryonalen Ursprungs und damit einhergehender Ossifikationswege betrachtet. Das Hauptziel bestand darin, herauszufinden, welche Quelle von hPDCs sich am besten für die innovative Wege der Knochenregeneration eignet, insbesondere im Kontext des Tissue Engineerings.

Insgesamt sprechen unsere Ergebnisse für eine potenzielle Überlegenheit der Fibula-hPDCs gegenüber den Mandibula-hPDCs. Obwohl einige frühere Studien darauf hindeuteten, dass die Mandibula aufgrund ihres neuralen Ursprungs und der desmalen Ossifikation als bevorzugte Quelle für Periostzellen angesehen werden sollte, unterstützen die Ergebnisse dieser Arbeit diese Annahme nicht. Insbesondere zeigten die Fibula-hPDCs eine Tendenz zu einer verstärkten osteogenen Differenzierung und Genexpression von osteogenen Markern im Vergleich zu den Mandibula-hPDCs.

Als Schlussfolgerung bleibt festzuhalten, dass in Anbetracht der vielversprechenden Ergebnisse mit den Periostzellen der Fibula trotz des klinisch erhöhten Entnahmeaufwands weitere Forschungen mit dieser Zellquelle durchgeführt werden sollten, um die zugrunde liegenden Mechanismen und Signalwege besser zu verstehen, die die osteogene Differenzierung und Funktion von hPDCs beeinflussen. Angesichts der Komplexität der Knochenregeneration und der vielfältigen Einflussfaktoren des Tissue Engineerings ist es von entscheidender Bedeutung, mit weiteren Untersuchungen das BTE zu optimieren.

6 Literaturverzeichnis

- Ai-Aql, Z. S., Alagl, A. S., Graves, D. T., Gerstenfeld, L. C., & Einhorn, T. A. (2008). Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis. *J Dent Res*, 87(2), 107-118. <https://doi.org/10.1177/154405910808700215>
- Alexander, D., Schäfer, F., Munz, A., Friedrich, B., Klein, C., Hoffmann, J., Bühring, H.-J., & Reinert, S. (2009). LINGFR Induction During Osteogenesis of Human Jaw Periosteum-derived Cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 24(3-4), 283-290. <https://doi.org/10.1159/000233253>
- Allen, M. R., Hock, J. M., & Burr, D. B. (2004). Periosteum: biology, regulation, and response to osteoporosis therapies. *Bone*, 35(5), 1003-1012. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2004.07.014>
- Bais, M., McLean, J., Sebastiani, P., Young, M., Wigner, N., Smith, T., Kotton, D. N., Einhorn, T. A., & Gerstenfeld, L. C. (2009). Transcriptional analysis of fracture healing and the induction of embryonic stem cell-related genes. *PLoS One*, 4(5), e5393. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005393>
- Banerjee, C., Hiebert, S. W., Stein, J. L., Lian, J. B., & Stein, G. S. (1996). An AML-1 consensus sequence binds an osteoblast-specific complex and transcriptionally activates the osteocalcin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(10), 4968-4973. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.10.4968>
- Bauer, T. W., & Muschler, G. F. (2000). Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clin Orthop Relat Res*(371), 10-27.
- Begam, H., Nandi, S. K., Kundu, B., & Chanda, A. (2017). Strategies for delivering bone morphogenetic protein for bone healing. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 70(Pt 1), 856-869. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.09.074>
- Berasain, C., & Avila, M. A. (2014). Amphiregulin. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 28, 31-41. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.01.005>
- Bernstein, J. L., Reeve, G., Kutler, D. I., & Spector, J. A. (2024). Use of Banked Fibula for Improved Nasal Reconstruction Following Free Fibula Midface Reconstruction. *J Craniofac Surg*. <https://doi.org/10.1097/scs.00000000000009971>
- Bibbo, C. (2021). The Free Fibula Flap for Lower Extremity Reconstruction. *Clin Podiatr Med Surg*, 38(1), 117-130. <https://doi.org/10.1016/j.cpm.2020.09.007>
- Bilkay, U., Tokat, C., Helvacı, E., Ozek, C., Zekioglu, O., Onat, T., & Songur, E. (2008). Osteogenic Capacities of Tibial and Cranial Periosteum: A Biochemical and Histologic Study. *Journal of Craniofacial Surgery*, 19(2), 453-458. <https://doi.org/10.1097/SCS.0b013e318052fe3d>
- Bloebaum, R. D., Bachus, K. N., Momberger, N. G., & Hofmann, A. A. (1994). Mineral apposition rates of human cancellous bone at the interface of porous coated implants. *J Biomed Mater Res*, 28(5), 537-544. <https://doi.org/10.1002/jbm.820280503>
- Bohner, M., Santoni, B. L. G., & Döbelin, N. (2020). β -tricalcium phosphate for bone substitution: Synthesis and properties. *Acta Biomaterialia*, 113, 23-41. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.06.022>
- Bolte, J., Vater, C., Culla, A. C., Ahlfeld, T., Nowotny, J., Kasten, P., Disch, A. C., Goodman, S. B., Gelinsky, M., Stiehler, M., & Zwingenberger, S. (2019). Two-step stem cell therapy

- improves bone regeneration compared to concentrated bone marrow therapy. *J Orthop Res*, 37(6), 1318-1328. <https://doi.org/10.1002/jor.24215>
- Bragdon, B. C., & Bahney, C. S. (2018). Origin of Reparative Stem Cells in Fracture Healing. *Curr Osteoporos Rep*, 16(4), 490-503. <https://doi.org/10.1007/s11914-018-0458-4>
- Campion, C. R., Chander, C., Buckland, T., & Hing, K. (2011). Increasing strut porosity in silicate-substituted calcium-phosphate bone graft substitutes enhances osteogenesis. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 97(2), 245-254. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31807>
- Caplan, A. I. (1991). Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*, 9(5), 641-650. <https://doi.org/10.1002/jor.1100090504>
- Caplan, A. I., & Dennis, J. E. (2006). Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem*, 98(5), 1076-1084. <https://doi.org/10.1002/jcb.20886>
- Chai, Y., Ito, Y., & Han, J. (2003). TGF- β Signaling and its Functional Significance in Regulating the Fate of Cranial Neural Crest Cells. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 14(2), 78-88. <https://doi.org/10.1177/154411130301400202>
- Chan, C. K. F., Gulati, G. S., Sinha, R., Tompkins, J. V., Lopez, M., Carter, A. C., Ransom, R. C., Reinisch, A., Wearda, T., Murphy, M., Brewer, R. E., Koepke, L. S., Marecic, O., Manjunath, A., Seo, E. Y., Leavitt, T., Lu, W. J., Nguyen, A., Conley, S. D., . . . Longaker, M. T. (2018). Identification of the Human Skeletal Stem Cell. *Cell*, 175(1), 43-56.e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.029>
- Chen, D., Shen, H., He, Y., Chen, Y., Wang, Q., Lu, J., & Jiang, Y. (2015). Synergetic effects of hBMSCs and hPCs in osteogenic differentiation and their capacity in the repair of critical-sized femoral condyle defects. *Mol Med Rep*, 11(2), 1111-1119. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2883>
- Chen, D., Shen, H., Shao, J., Jiang, Y., Lu, J., He, Y., & Huang, C. (2011). Superior mineralization and neovascularization capacity of adult human metaphyseal periosteum-derived cells for skeletal tissue engineering applications. *Int J Mol Med*, 27(5), 707-713. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2011.634>
- Chen, G., Deng, C., & Li, Y. P. (2012). TGF- β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *Int J Biol Sci*, 8(2), 272-288. <https://doi.org/10.7150/ijbs.2929>
- Coathup, M. J., Hing, K. A., Samizadeh, S., Chan, O., Fang, Y. S., Campion, C., Buckland, T., & Blunn, G. W. (2012). Effect of increased strut porosity of calcium phosphate bone graft substitute biomaterials on osteoinduction. *J Biomed Mater Res A*, 100(6), 1550-1555. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34094>
- Conrad, C., & Huss, R. (2005). Adult stem cell lines in regenerative medicine and reconstructive surgery. *Journal of Surgical Research*, 124(2), 201-208. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2004.09.015>
- Cypher, T. J., & Grossman, J. P. (1996). Biological principles of bone graft healing. *The Journal of Foot and Ankle Surgery*, 35(5), 413-417. [https://doi.org/10.1016/S1067-2516\(96\)80061-5](https://doi.org/10.1016/S1067-2516(96)80061-5)
- Dahlin, C., & Johansson, A. (2011). Iliac crest autogenous bone graft versus alloplastic graft and guided bone regeneration in the reconstruction of atrophic maxillae: a 5-year retrospective study on cost-effectiveness and clinical outcome. *Clin Implant Dent Relat Res*, 13(4), 305-310. <https://doi.org/10.1111/j.1708-8208.2009.00221.x>
- Debnath, S., Yallowitz, A. R., McCormick, J., Lalani, S., Zhang, T., Xu, R., Li, N., Liu, Y., Yang, Y. S., Eiseman, M., Shim, J.-H., Hameed, M., Healey, J. H., Bostrom, M. P., Landau, D. A., & Greenblatt, M. B. (2018). Discovery of a periosteal stem cell mediating

- intramembranous bone formation. *Nature*, 562(7725), 133-139. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0554-8>
- Delany, A. M., & Hankenson, K. D. (2009). Thrombospondin-2 and SPARC/osteonectin are critical regulators of bone remodeling. *Journal of cell communication and signaling*, 3, 227-238.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., & Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315-317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Dorozhkin, S. V. (2022). Calcium Orthophosphate (CaPO₄)-Based Bioceramics: Preparation, Properties, and Applications. *Coatings*, 12(10), 1380. <https://www.mdpi.com/2079-6412/12/10/1380>
- Duchamp de Lageneste, O., Julien, A., Abou-Khalil, R., Frangi, G., Carvalho, C., Cagnard, N., Cordier, C., Conway, S. J., & Colnot, C. (2018). Periosteum contains skeletal stem cells with high bone regenerative potential controlled by Periostin. *Nat Commun*, 9(1), 773. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03124-z>
- Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A. L., & Karsenty, G. (1997). Osf2/Cbfa1: A Transcriptional Activator of Osteoblast Differentiation. *Cell*, 89(5), 747-754. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80257-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80257-3)
- Dworkin, S., Boglev, Y., Owens, H., & Goldie, S. J. (2016). The Role of Sonic Hedgehog in Craniofacial Patterning, Morphogenesis and Cranial Neural Crest Survival. *J Dev Biol*, 4(3). <https://doi.org/10.3390/jdb4030024>
- Einhorn, T. A. (1998). The Cell and Molecular Biology of Fracture Healing. *Clinical Orthopaedics and Related Research*[®], 355, S7-S21. https://journals.lww.com/clinorthop/fulltext/1998/10001/the_cell_and_molecular_biology_of_fracture_healing.3.aspx
- Eiraku, N., Chiba, N., Nakamura, T., Amir, M. S., Seong, C. H., Ohnishi, T., Kusuyama, J., Noguchi, K., & Matsuguchi, T. (2019). BMP9 directly induces rapid GSK3- β phosphorylation in a Wnt-independent manner through class I PI3K-Akt axis in osteoblasts. *Faseb j*, 33(11), 12124-12134. <https://doi.org/10.1096/fj.201900733RR>
- Enomoto, A., Watahiki, J., Yamaguchi, T., Irie, T., Tachikawa, T., & Maki, K. (2009). Effects of mastication on mandibular growth evaluated by microcomputed tomography. *European Journal of Orthodontics*, 32(1), 66-70. <https://doi.org/10.1093/ejo/cjp060>
- Eriksen, E. F. (1986). Normal and Pathological Remodeling of Human Trabecular Bone: Three Dimensional Reconstruction of the Remodeling Sequence in Normals and in Metabolic Bone Disease*. *Endocrine Reviews*, 7(4), 379-408. <https://doi.org/10.1210/edrv-7-4-379>
- Faour, O., Dimitriou, R., Cousins, C. A., & Giannoudis, P. V. (2011). The use of bone graft substitutes in large cancellous voids: Any specific needs? *Injury*, 42, S87-S90. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2011.06.020>
- Fleisch, H., Maerki, J., & Russell, R. G. G. (1966). Effect of Pyrophosphate on Dissolution of Hydroxyapatite and Its Possible Importance in Calcium Homeostasis. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 122(2), 317-320. <https://doi.org/10.3181/00379727-122-31123>
- Fretwurst, T., Tritschler, I., Rothweiler, R., Nahles, S., Altmann, B., Schilling, O., & Nelson, K. (2022). Proteomic profiling of human bone from different anatomical sites – A pilot

- study. *PROTEOMICS – Clinical Applications*, 16(5), 2100049. <https://doi.org/10.1002/prca.202100049>
- Friedlaender, G. E., Perry, C. R., Cole, J. D., Cook, S. D., Cierny, G., Muschler, G. F., Zych, G. A., Calhoun, J. H., LaForte, A. J., & Yin, S. (2001). Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunions: a prospective, randomized clinical trial comparing rhOP-1 with fresh bone autograft. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, 83(Pt 2), S151.
- Gaur, T., Lengner, C. J., Hovhannisyan, H., Bhat, R. A., Bodine, P. V. N., Komm, B. S., Javed, A., van Wijnen, A. J., Stein, J. L., Stein, G. S., & Lian, J. B. (2005). Canonical WNT Signaling Promotes Osteogenesis by Directly Stimulating Runx2 Gene Expression*. *Journal of Biological Chemistry*, 280(39), 33132-33140. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500608200>
- Gazdag, A. R., Lane, J. M., Glaser, D., & Forster, R. A. (1995). Alternatives to autogenous bone graft: efficacy and indications. *JAAOS-Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 3(1), 1-8.
- Ghayor, C., Chen, T. H., Bhattacharya, I., Özcan, M., & Weber, F. E. (2020). Microporosities in 3D-Printed Tricalcium-Phosphate-Based Bone Substitutes Enhance Osteoconduction and Affect Osteoclastic Resorption. *Int J Mol Sci*, 21(23). <https://doi.org/10.3390/ijms21239270>
- Golub, E. E., & Boesze-Battaglia, K. (2007). The role of alkaline phosphatase in mineralization. *Current Opinion in Orthopaedics*, 18(5), 444-448. <https://doi.org/10.1097/BCO.0b013e3282630851>
- Grellier, M., Granja, P. L., Fricain, J.-C., Bidarra, S. J., Renard, M., Bareille, R., Bourget, C., Amédée, J., & Barbosa, M. A. (2009). The effect of the co-immobilization of human osteoprogenitors and endothelial cells within alginate microspheres on mineralization in a bone defect. *Biomaterials*, 30(19), 3271-3278. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.02.033>
- Gronthos, S., Brahimi, J., Li, W., Fisher, L., Cherman, N., Boyde, A., DenBesten, P., Robey, P. G., & Shi, S. (2002). Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *Journal of Dental Research*, 81(8), 531-535.
- Hauschka, P. V., Lian, J. B., Cole, D., & Gundersen, C. M. (1989). Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiological reviews*, 69(3), 990-1047.
- Heldin, C. H., Miyazono, K., & ten Dijke, P. (1997). TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*, 390(6659), 465-471. <https://doi.org/10.1038/37284>
- Hench, L. L., & Polak, J. M. (2002). Third-Generation Biomedical Materials. *Science*, 295(5557), 1014-1017. <https://doi.org/doi:10.1126/science.1067404>
- Hessle, L., Johnson, K. A., Anderson, H. C., Narisawa, S., Sali, A., Goding, J. W., Terkeltaub, R., & Millán, J. L. (2002). Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(14), 9445-9449. <https://doi.org/doi:10.1073/pnas.142063399>
- Hirashima, S., Ohta, K., Kanazawa, T., Uemura, K., Togo, A., Yoshitomi, M., Okayama, S., Kusukawa, J., & Nakamura, K. (2015). Anchoring structure of the calvarial periosteum revealed by focused ion beam/scanning electron microscope tomography. *Sci Rep*, 5, 17511. <https://doi.org/10.1038/srep17511>

- Hollister, S. J. (2005). Porous scaffold design for tissue engineering. *Nature Materials*, 4(7), 518-524. <https://doi.org/10.1038/nmat1421>
- Holmes, B., Bulusu, K., Plesniak, M., & Zhang, L. G. (2016). A synergistic approach to the design, fabrication and evaluation of 3D printed micro and nano featured scaffolds for vascularized bone tissue repair. *Nanotechnology*, 27(6), 064001.
- Honda, Y., Anada, T., Kamakura, S., Nakamura, M., Sugawara, S., & Suzuki, O. (2006). Elevated extracellular calcium stimulates secretion of bone morphogenetic protein 2 by a macrophage cell line. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 345(3), 1155-1160. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.05.013>
- Hsiao, H.-Y., Yang, C.-Y., Liu, J.-W., Brey, E. M., & Cheng, M.-H. (2018). Periosteal osteogenic capacity depends on tissue source. *Tissue Engineering Part A*, 24(23-24), 1733-1741.
- Hsieh, Y. F., Robling, A. G., Ambrosius, W. T., Burr, D. B., & Turner, C. H. (2001). Mechanical loading of diaphyseal bone in vivo: the strain threshold for an osteogenic response varies with location. *J Bone Miner Res*, 16(12), 2291-2297. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2001.16.12.2291>
- Ichikawa, Y., Watahiki, J., Nampo, T., Nose, K., Yamamoto, G., Irie, T., Mishima, K., & Maki, K. (2015). Differences in the developmental origins of the periosteum may influence bone healing. *Journal of Periodontal Research*, 50(4), 468-478. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jre.12229>
- Inoue, M., Ono, T., Kameo, Y., Sasaki, F., Ono, T., Adachi, T., & Nakashima, T. (2019). Forceful mastication activates osteocytes and builds a stout jawbone. *Scientific Reports*, 9(1), 4404. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40463-3>
- Ishizeki, K., Saito, H., Shinagawa, T., Fujiwara, N., & Nawa, T. (1999). Histochemical and immunohistochemical analysis of the mechanism of calcification of Meckel's cartilage during mandible development in rodents. *J Anat*, 194 (Pt 2)(Pt 2), 265-277. <https://doi.org/10.1046/j.1469-7580.1999.19420265.x>
- Iuchi, T., Kusuhara, H., Ueda, Y., Morotomi, T., & Isogai, N. (2020). Influence of Periosteum Location on the Bone and Cartilage in Tissue-Engineered Phalanx. *The Journal of Hand Surgery*, 45(1), 62.e61-62.e10. <https://doi.org/10.1016/j.jhsa.2019.02.002>
- Janicki, P., & Schmidmaier, G. (2011). What should be the characteristics of the ideal bone graft substitute? Combining scaffolds with growth factors and/or stem cells. *Injury*, 42 Suppl 2, S77-81. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2011.06.014>
- Jaquiéry, C. (2013). Kieferrekonstruktion unter Verwendung von präformierten Fibulatransplantaten mit osseointegrierten dentalen Implantaten. *Face*, 2, 16-19.
- Jones, S. J., & Boyde, A. (1974). The organization and gross mineralization patterns of the collagen fibres in Sharpey fibre bone. *Cell Tissue Res*, 148(1), 83-96. <https://doi.org/10.1007/bf00224320>
- Julien, M., Khoshniat, S., Lacreusette, A., Gatius, M., Bozec, A., Wagner, E. F., Wittrant, Y., Masson, M., Weiss, P., Beck, L., Magne, D., & Guicheux, J. (2009). Phosphate-dependent regulation of MGP in osteoblasts: role of ERK1/2 and Fra-1. *J Bone Miner Res*, 24(11), 1856-1868. <https://doi.org/10.1359/jbmr.090508>
- Kang, H.-W., Lee, S. J., Ko, I. K., Kengla, C., Yoo, J. J., & Atala, A. (2016). A 3D bioprinting system to produce human-scale tissue constructs with structural integrity. *Nature Biotechnology*, 34(3), 312-319. <https://doi.org/10.1038/nbt.3413>
- Kapur, S., Mohan, S., Baylink, D. J., & Lau, K. H. (2005). Fluid shear stress synergizes with insulin-like growth factor-I (IGF-I) on osteoblast proliferation through integrin-dependent activation of IGF-I mitogenic signaling pathway. *J Biol Chem*, 280(20), 20163-20170. <https://doi.org/10.1074/jbc.M501460200>

- Karageorgiou, V., & Kaplan, D. (2005). Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*, 26(27), 5474-5491. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.02.002>
- Kasten, P., Beyen, I., Niemeyer, P., Luginbühl, R., Böhner, M., & Richter, W. (2008). Porosity and pore size of beta-tricalcium phosphate scaffold can influence protein production and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: an in vitro and in vivo study. *Acta Biomater*, 4(6), 1904-1915. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.05.017>
- Khoshniat, S., Bourguine, A., Julien, M., Petit, M., Pilet, P., Rouillon, T., Masson, M., Gatius, M., Weiss, P., Guicheux, J., & Beck, L. (2011). Phosphate-dependent stimulation of MGP and OPN expression in osteoblasts via the ERK1/2 pathway is modulated by calcium. *Bone*, 48(4), 894-902. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2010.12.002>
- Khvorova, I. A., Kostina, D. A., Zainullina, B. R., Fefilova, E. A., Gromova, E. S., Tikhilov, R. M., Bozhkova, S. A., Sereda, A. P., Karelkin, V. V., Malashicheva, A. B., & Lobov, A. A. (2022). Osteogenic Differentiation In Vitro of Human Osteoblasts Is Associated with Only Slight Shift in Their Proteomics Profile. *Cell and Tissue Biology*, 16(6), 540-546. <https://doi.org/10.1134/S1990519X22060025>
- Kjaer, I. (1975). Histochemical investigations on the symphysis menti in the human fetus related to fetal skeletal maturation in the hand and foot. *Acta Anat (Basel)*, 93(4), 606-633.
- Knöfler, W., Barth, T., Graul, R., & Krampe, D. (2016). Retrospective analysis of 10,000 implants from insertion up to 20 years—analysis of implantations using augmentative procedures. *International Journal of Implant Dentistry*, 2(1), 25. <https://doi.org/10.1186/s40729-016-0061-3>
- Koerten, H. K., & van der Meulen, J. (1999). Degradation of calcium phosphate ceramics. *Journal of Biomedical Materials Research*, 44(1), 78-86. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(199901\)44:1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(199901)44:1)
- Kojimoto, H., Yasui, N., Goto, T., Matsuda, S., & Shimomura, Y. (1988). Bone lengthening in rabbits by callus distraction. The role of periosteum and endosteum. *The Journal of Bone & Joint Surgery British Volume*, 70-B(4), 543-549. <https://doi.org/10.1302/0301-620x.70b4.3403595>
- Kondo, N., Ogose, A., Tokunaga, K., Umezu, H., Arai, K., Kudo, N., Hoshino, M., Inoue, H., Irie, H., & Kuroda, K. (2006). Osteoinduction with highly purified β -tricalcium phosphate in dog dorsal muscles and the proliferation of osteoclasts before heterotopic bone formation. *Biomaterials*, 27(25), 4419-4427.
- Köster, K., Karbe, E., Kramer, H., Heide, H., & König, R. (1976). Experimenteller Knochenersatz durch resorbierbare Calciumphosphat-Keramik. *Langenbecks Archiv für Chirurgie*, 341(2), 77-86. <https://doi.org/10.1007/BF01262779>
- Kronenberg, H. M. (2007). The Role of the Perichondrium in Fetal Bone Development. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1116(1), 59-64. <https://doi.org/10.1196/annals.1402.059>
- Langer, R., & Vacanti, J. P. (1993). Tissue engineering. *Science*, 260(5110), 920-926. <https://doi.org/10.1126/science.8493529>
- Lapczynska, H., Galea, L., Wüst, S., Böhner, M., Jerban, S., Sweedy, A., Doebelin, N., Van Garderen, N., Hofmann, S., & Baroud, G. (2014). Effect of grain size and microporosity on the in vivo behaviour of β -tricalcium phosphate scaffolds. *European Cells and Materials (ECM)*, 28, 299-319.
- LeGeros, R. Z. (2002). Properties of Osteoconductive Biomaterials: Calcium Phosphates. *Clinical Orthopaedics and Related Research*®, 395, 81-98.

- https://journals.lww.com/clinorthop/fulltext/2002/02000/properties_of_osteocductive_biomaterials_9.aspx
- Leucht, P., Kim, J.-B., Amasha, R., James, A. W., Girod, S., & Helms, J. A. (2008). Embryonic origin and Hox status determine progenitor cell fate during adult bone regeneration. *Development*, 135(17), 2845-2854. <https://doi.org/10.1242/dev.023788>
- Levine, J. P., Bae, J. S., Soares, M., Brecht, L. E., Saadeh, P. B., Ceradini, D. J., & Hirsch, D. L. (2013). Jaw in a day: total maxillofacial reconstruction using digital technology. *Plast Reconstr Surg*, 131(6), 1386-1391. <https://doi.org/10.1097/PRS.0b013e31828bd8d0>
- Ling-Ling, E., Li, C. J., Zhang, S., Ma, X. C., Xiao, R., & Liu, H. C. (2021). Effects of rhBMP-2 on Bone Formation Capacity of Rat Dental Stem/Progenitor Cells from Dental Follicle and Alveolar Bone Marrow. *Stem Cells Dev*, 30(8), 441-457. <https://doi.org/10.1089/scd.2020.0170>
- Liu, C., Abedian, R., Meister, R., Haasper, C., Hurschler, C., Krettek, C., von Lewinski, G., & Jagodzinski, M. (2012). Influence of perfusion and compression on the proliferation and differentiation of bone mesenchymal stromal cells seeded on polyurethane scaffolds. *Biomaterials*, 33(4), 1052-1064. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.10.041>
- Liu, H. C., E, L. L., Wang, D. S., Su, F., Wu, X., Shi, Z. P., Lv, Y., & Wang, J. Z. (2011). Reconstruction of alveolar bone defects using bone morphogenetic protein 2 mediated rabbit dental pulp stem cells seeded on nano-hydroxyapatite/collagen/poly(L-lactide). *Tissue Eng Part A*, 17(19-20), 2417-2433. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2010.0620>
- Lutz, R., Berger-Fink, S., Stockmann, P., Neukam, F. W., & Schlegel, K. A. (2015). Sinus floor augmentation with autogenous bone vs. a bovine-derived xenograft - a 5-year retrospective study. *Clin Oral Implants Res*, 26(6), 644-648. <https://doi.org/10.1111/clr.12352>
- Malhotra, A., Pelletier, M. H., Yu, Y., & Walsh, W. R. (2013). Can platelet-rich plasma (PRP) improve bone healing? A comparison between the theory and experimental outcomes. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*, 133(2), 153-165. <https://doi.org/10.1007/s00402-012-1641-1>
- Marcucio, R., Hallgrimsson, B., & Young, N. M. (2015). Facial Morphogenesis: Physical and Molecular Interactions Between the Brain and the Face. *Curr Top Dev Biol*, 115, 299-320. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2015.09.001>
- Marolt, D., Knezevic, M., & Vunjak-Novakovic, G. (2010). Bone tissue engineering with human stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 1(2), 10. <https://doi.org/10.1186/scrt10>
- Miron, R. J., & Zhang, Y. F. (2012). Osteoinduction: A Review of Old Concepts with New Standards. *Journal of Dental Research*, 91(8), 736-744. <https://doi.org/10.1177/0022034511435260>
- Moore, K., Persaud, T. V. N., Torchia, M. G., Viebahn, C., & Elsberger, S. (2013). *Embryologie: Entwicklungsstadien - Frühentwicklung - Organogenese - Klinik*. Elsevier Health Sciences Germany. <https://books.google.de/books?id=ORbyAAAAQBAJ>
- Mulder, L., Koolstra, J. H., de Jonge, H. W., & van Eijden, T. M. G. J. (2006). Architecture and mineralization of developing cortical and trabecular bone of the mandible. *Anatomy and Embryology*, 211(1), 71-78. <https://doi.org/10.1007/s00429-005-0054-0>
- Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Deng, J. M., Behringer, R. R., & de Crombrughe, B. (2002). The novel zinc finger-containing transcription factor osterix

- is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*, 108(1), 17-29. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00622-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00622-5)
- Narisawa, S., Fröhlander, N., & Millán, J. L. (1997). Inactivation of two mouse alkaline phosphatase genes and establishment of a model of infantile hypophosphatasia. *Developmental Dynamics*, 208(3), 432-446. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0177\(199703\)208:3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0177(199703)208:3)
- Naros, A., Weise, H., Tilsen, F., Hoefert, S., Naros, G., Krimmel, M., Reinert, S., & Polligkeit, J. (2018). Three-dimensional accuracy of mandibular reconstruction by patient-specific pre-bent reconstruction plates using an “in-house” 3D-printer. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 46(9), 1645-1651. <https://doi.org/10.1016/j.icms.2018.05.047>
- Navarro Cuellar, C., Caicoya, S. J. O., Acero Sanz, J. J., Navarro Cuellar, I., Muela, C. M., & Navarro Vila, C. (2014). Mandibular Reconstruction With Iliac Crest Free Flap, Nasolabial Flap, and Osseointegrated Implants. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 72(6), 1226.e1221-1226.e1215. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2014.02.031>
- Nepal, A. K., van Essen, H. W., de Jongh, R. T., van Schoor, N. M., Otten, R. H. J., Vanderschueren, D., Lips, P., & Bravenboer, N. (2023). Methodological aspects of in vivo axial loading in rodents: a systematic review. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 23(2), 236-262.
- Nguyen, L. H., Annabi, N., Nikkhah, M., Bae, H., Binan, L., Park, S., Kang, Y., Yang, Y., & Khademhosseini, A. (2012). Vascularized bone tissue engineering: approaches for potential improvement. *Tissue Eng Part B Rev*, 18(5), 363-382. <https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2012.0012>
- Nie, X., Luukko, K., & Kettunen, P. (2006). FGF signalling in craniofacial development and developmental disorders. *Oral Dis*, 12(2), 102-111. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2005.01176.x>
- Olivares, A. L., & Lacroix, D. (2012). Simulation of cell seeding within a three-dimensional porous scaffold: a fluid-particle analysis. *Tissue Engineering Part C: Methods*, 18(8), 624-631.
- Oryan, A., Alidadi, S., Moshiri, A., & Maffulli, N. (2014). Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, 9(1), 18. <https://doi.org/10.1186/1749-799X-9-18>
- Pan, J.-X., Tang, F., Xiong, F., Xiong, L., Zeng, P., Wang, B., Zhao, K., Guo, H., Shun, C., Xia, W.-F., Mei, L., & Xiong, W.-C. (2018). APP promotes osteoblast survival and bone formation by regulating mitochondrial function and preventing oxidative stress. *Cell Death & Disease*, 9(11), 1077. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-1123-7>
- Parada, C., & Chai, Y. (2015). Mandible and Tongue Development. *Curr Top Dev Biol*, 115, 31-58. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2015.07.023>
- Paredes, C., Roleček, J., & Miranda, P. (2024). Improving the strength of β -TCP scaffolds produced by Digital Light Processing using two-step sintering. *Journal of the European Ceramic Society*, 44(4), 2571-2580. <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2023.11.028>
- Park, J.-B., Bae, S.-S., Lee, P.-W., Lee, W., Park, Y.-H., Kim, H., Lee, K., & Kim, I. (2012). Comparison of stem cells derived from periosteum and bone marrow of jaw bone and long bone in rabbit models. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 9(4), 224-230. <https://doi.org/10.1007/s13770-012-0343-7>
- Patel, A., Harrison, P., Cheng, A., Bray, B., & Bell, R. B. (2019). Fibular Reconstruction of the Maxilla and Mandible with Immediate Implant-Supported Prosthetic Rehabilitation:

- Jaw in a Day. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*, 31(3), 369-386. <https://doi.org/10.1016/j.coms.2019.03.002>
- Patil, A. S., Sable, R. B., & Kothari, R. M. (2011). An update on transforming growth factor- β (TGF- β): Sources, types, functions and clinical applicability for cartilage/bone healing. *Journal of Cellular Physiology*, 226(12), 3094-3103. <https://doi.org/10.1002/jcp.22698>
- Pauchet, D., Pigot, J. L., Chabolle, F., & Bach, C. A. (2018). Prefabricated fibula free flap with dental implants for mandibular reconstruction. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis*, 135(4), 279-282. <https://doi.org/10.1016/j.anorl.2018.02.001>
- Payne, K. F. B., Balasundaram, I., Deb, S., Di Silvio, L., & Fan, K. F. M. (2014). Tissue engineering technology and its possible applications in oral and maxillofacial surgery. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 52(1), 7-15. <https://doi.org/10.1016/j.bjoms.2013.03.005>
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., & Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284(5411), 143-147. <https://doi.org/10.1126/science.284.5411.143>
- Pollock, R., Alcelik, I., Bhatia, C., Chuter, G., Lingutla, K., Budithi, C., & Krishna, M. (2008). Donor site morbidity following iliac crest bone harvesting for cervical fusion: a comparison between minimally invasive and open techniques. *European Spine Journal*, 17(6), 845-852. <https://doi.org/10.1007/s00586-008-0648-3>
- Quarles, L. D., Yohay, D. A., Lever, L. W., Caton, R., & Wenstrup, R. J. (1992). Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: An in vitro model of osteoblast development. *Journal of Bone and Mineral Research*, 7(6), 683-692. <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650070613>
- Quarto, N., Wan, D. C., Kwan, M. D., Panetta, N. J., Li, S., & Longaker, M. T. (2010). Origin matters: Differences in embryonic tissue origin and Wnt signaling determine the osteogenic potential and healing capacity of frontal and parietal calvarial bones. *Journal of Bone and Mineral Research*, 25(7), 1680-1694. <https://doi.org/10.1359/jbmr.091116>
- Rauch, F., & Glorieux, F. H. (2004). Osteogenesis imperfecta. *The Lancet*, 363(9418), 1377-1385. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16051-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16051-0)
- Reynolds, K., Kumari, P., Sepulveda Rincon, L., Gu, R., Ji, Y., Kumar, S., & Zhou, C. J. (2019). Wnt signaling in orofacial clefts: crosstalk, pathogenesis and models. *Dis Model Mech*, 12(2). <https://doi.org/10.1242/dmm.037051>
- Richany, S. F., Bast, T. H., & Anson, B. J. (1956). The development of the first branchial arch in man and the fate of Meckel's cartilage. *Q Bull Northwest Univ Med Sch*, 30(4), 331-355.
- Roberts, A. B., Anzano, M. A., Lamb, L. C., Smith, J. M., & Sporn, M. B. (1981). New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78(9), 5339-5343. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.9.5339>
- Roberts, S. J., van Gastel, N., Carmeliet, G., & Luyten, F. P. (2015). Uncovering the periosteum for skeletal regeneration: The stem cell that lies beneath. *Bone*, 70, 10-18. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2014.08.007>
- Roddy, E., DeBaun, M. R., Daoud-Gray, A., Yang, Y. P., & Gardner, M. J. (2018). Treatment of critical-sized bone defects: clinical and tissue engineering perspectives. *European*

- Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology*, 28(3), 351-362. <https://doi.org/10.1007/s00590-017-2063-0>
- Rupp, M., Kerschbaum, M., Klute, L., Frank, L., & Alt, V. (2021). [Bone transplantation or biomaterials? : An analysis of 99,863 surgical procedures in orthopedic and trauma surgery in Germany from 2018]. *Unfallchirurg*, 124(2), 146-152. <https://doi.org/10.1007/s00113-020-00861-z> (Knochen transplantation oder Biomaterial? : Eine Analyse von 99.863 Operationen in Orthopädie und Unfallchirurgie aus dem Jahr 2018 in Deutschland.)
- Schrag, C., Chang, Y.-M., Tsai, C.-Y., & Wei, F.-C. (2006). Complete rehabilitation of the mandible following segmental resection. *Journal of Surgical Oncology*, 94(6), 538-545. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jso.20491>
- Sorg, J. (2022). *Vergleich der in vitro Eigenschaften und des Differenzierungspotentials von humanen periostalen Progenitorzellen unterschiedlichen embryonalen Ursprungs* [Univ. Tübingen].
- Squier, C. A., Ghoneim, S., & Kremenak, C. R. (1990). Ultrastructure of the periosteum from membrane bone. *J Anat*, 171, 233-239.
- Stein, G. S., & Lian, J. B. (1993). Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocr Rev*, 14(4), 424-442. <https://doi.org/10.1210/edrv-14-4-424>
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4), 663-676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- Takeuchi, R., Katagiri, W., Endo, S., & Kobayashi, T. (2019). Exosomes from conditioned media of bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote bone regeneration by enhancing angiogenesis. *PLoS One*, 14(11), e0225472. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225472>
- Tang, N., Song, W. X., Luo, J., Luo, X., Chen, J., Sharff, K. A., Bi, Y., He, B. C., Huang, J. Y., Zhu, G. H., Su, Y. X., Jiang, W., Tang, M., He, Y., Wang, Y., Chen, L., Zuo, G. W., Shen, J., Pan, X., . . . He, T. C. (2009). BMP-9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal progenitors requires functional canonical Wnt/beta-catenin signalling. *J Cell Mol Med*, 13(8b), 2448-2464. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00569.x>
- Tang, Z., Li, X., Tan, Y., Fan, H., & Zhang, X. (2018). The material and biological characteristics of osteoinductive calcium phosphate ceramics. *Regen Biomater*, 5(1), 43-59. <https://doi.org/10.1093/rb/rbx024>
- Tao, Z.-S., Zhou, W.-S., Xu, H.-G., & Yang, M. (2020). Aspirin modified strontium-doped β -tricalcium phosphate can accelerate the healing of femoral metaphyseal defects in ovariectomized rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 132, 110911. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110911>
- Taylor, G. I., Miller, G. D., & Ham, F. J. (1975). The free vascularized bone graft. A clinical extension of microvascular techniques. *Plast Reconstr Surg*, 55(5), 533-544. <https://doi.org/10.1097/00006534-197505000-00002>
- Tenenbaum, H. C. (1987). Levamisole and inorganic pyrophosphate inhibit beta-glycerophosphate induced mineralization of bone formed in vitro. *Bone and mineral*, 3(1), 13-26. <http://europepmc.org/abstract/MED/2850049>

- Tsiridis, E., Upadhyay, N., & Giannoudis, P. (2007). Molecular aspects of fracture healing: Which are the important molecules? *Injury*, 38(1, Supplement), S11-S25. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2007.02.006>
- Tsukanaka, M., Fujibayashi, S., Otsuki, B., Takemoto, M., & Matsuda, S. (2015). Osteoinductive potential of highly purified porous β -TCP in mice. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 26(3), 132. <https://doi.org/10.1007/s10856-015-5469-4>
- Turhani, D., Weissenböck, M., Stein, E., Wanschitz, F., & Ewers, R. (2007). Exogenous Recombinant Human BMP-2 Has Little Initial Effects on Human Osteoblastic Cells Cultured on Collagen Type I Coated/Noncoated Hydroxyapatite Ceramic Granules. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 65, 485-493. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2005.12.065>
- Turnbull, G., Clarke, J., Picard, F., Riches, P., Jia, L., Han, F., Li, B., & Shu, W. (2018). 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering. *Bioactive Materials*, 3(3), 278-314. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.10.001>
- Umrath, F., Schmitt, L.-F., Kliesch, S.-M., Schille, C., Geis-Gerstorfer, J., Gurewitsch, E., Bahrini, K., Peters, F., Reinert, S., & Alexander, D. (2023). Mechanical and Functional Improvement of β -TCP Scaffolds for Use in Bone Tissue Engineering. *Journal of Functional Biomaterials*, 14(8), 427. <https://www.mdpi.com/2079-4983/14/8/427>
- Urist, M. R. (1965). Bone: Formation by Autoinduction. *Science*, 150(3698), 893-899. <https://doi.org/doi:10.1126/science.150.3698.893>
- Utvåg, S. E., Grundnes, O., & Reikeraos, O. (1996). Effects of Periosteal Stripping on Healing of Segmental Fractures in Rats. *Journal of Orthopaedic Trauma*, 10(4), 279-284. https://journals.lww.com/jorthotrauma/fulltext/1996/05000/effects_of_periosteal_stripping_on_healing_of.9.aspx
- Vos, M. D., Raghoobar, G. M., van der Wal, J. E., Kalk, W. W., & Vissink, A. (2009). Autogenous femoral head as grafting material for mandibular augmentation. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 38(12), 1320-1323. <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2009.09.002>
- Walmsley, G. G., Ransom, R. C., Zielins, E. R., Leavitt, T., Flacco, J. S., Hu, M. S., Lee, A. S., Longaker, M. T., & Wan, D. C. (2016). Stem Cells in Bone Regeneration. *Stem Cell Reviews and Reports*, 12(5), 524-529. <https://doi.org/10.1007/s12015-016-9665-5>
- Wei, F. C., Chen, H. C., Chuang, C. C., & Noordhoff, M. S. (1986). Fibular osteoseptocutaneous flap: anatomic study and clinical application. *Plast Reconstr Surg*, 78(2), 191-200. <https://doi.org/10.1097/00006534-198608000-00008>
- Wei, F. C., Seah, C. S., Tsai, Y. C., Liu, S. J., & Tsai, M. S. (1994). Fibula osteoseptocutaneous flap for reconstruction of composite mandibular defects. *Plast Reconstr Surg*, 93(2), 294-304; discussion 305-296.
- Wendt, D., Stroebel, S., Jakob, M., John, G. T., & Martin, I. (2006). Uniform tissues engineered by seeding and culturing cells in 3D scaffolds under perfusion at defined oxygen tensions. *Biorheology*, 43(3,4), 481-488.
- Wennberg, C., Hesse, L., Lundberg, P., Mauro, S., Narisawa, S., Lerner, U. H., & Millán, J. L. (2000). Functional Characterization of Osteoblasts and Osteoclasts from Alkaline Phosphatase Knockout Mice. *Journal of Bone and Mineral Research*, 15(10), 1879-1888. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2000.15.10.1879>
- Wittkowske, C., Reilly, G. C., Lacroix, D., & Perrault, C. M. (2016). In Vitro Bone Cell Models: Impact of Fluid Shear Stress on Bone Formation [Review]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2016.00087>

- Wongwitwichot, P., Kaewsrichan, J., Chua, K. H., & Ruszymah, B. H. (2010). Comparison of TCP and TCP/HA Hybrid Scaffolds for Osteoconductive Activity. *Open Biomed Eng J*, 4, 279-285. <https://doi.org/10.2174/1874120701004010279>
- Wozney, J. M., Rosen, V., Celeste, A. J., Mitsock, L. M., Whitters, M. J., Kriz, R. W., Hewick, R. M., & Wang, E. A. (1988). Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science*, 242(4885), 1528-1534. <https://doi.org/10.1126/science.3201241>
- Wu, H., Tan, J., Sun, D., Wang, X., Shen, J., Wang, S., Dai, Q., Wei, Z., Li, G., Lin, S., Luo, F., & Xie, Z. (2023). Discovery of multipotent progenitor cells from human induced membrane: Equivalent to periosteum-derived stem cells in bone regeneration. *J Orthop Translat*, 42, 82-93. <https://doi.org/10.1016/j.jot.2023.07.004>
- Wu, M., Wu, S., Chen, W., & Li, Y.-P. (2024). The roles and regulatory mechanisms of TGF- β and BMP signaling in bone and cartilage development, homeostasis and disease. *Cell Research*, 34(2), 101-123. <https://doi.org/10.1038/s41422-023-00918-9>
- Xing, Z., Lu, C., Hu, D., Miclau III, T., & Marcucio, R. S. (2010). Rejuvenation of the inflammatory system stimulates fracture repair in aged mice. *Journal of Orthopaedic Research*, 28(8), 1000-1006. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jor.21087>
- Yoshimura, H., Muneta, T., Nimura, A., Yokoyama, A., Koga, H., & Sekiya, I. (2007). Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *Cell and Tissue Research*, 327(3), 449-462. <https://doi.org/10.1007/s00441-006-0308-z>
- Young, S., Patel, Z. S., Kretlow, J. D., Murphy, M. B., Mountziaris, P. M., Baggett, L. S., Ueda, H., Tabata, Y., Jansen, J. A., & Wong, M. (2009). Dose effect of dual delivery of vascular endothelial growth factor and bone morphogenetic protein-2 on bone regeneration in a rat critical-size defect model. *Tissue Engineering Part A*, 15(9), 2347-2362.
- Ytrehus, B., Carlson, C. S., & Ekman, S. (2007). Etiology and Pathogenesis of Osteochondrosis. *Veterinary Pathology*, 44(4), 429-448. <https://doi.org/10.1354/vp.44-4-429>
- Yu, J., Hu, K., Smuga-Otto, K., Tian, S., Stewart, R., Slukvin, I. I., & Thomson, J. A. (2009). Human Induced Pluripotent Stem Cells Free of Vector and Transgene Sequences. *Science*, 324(5928), 797-801. <https://doi.org/doi:10.1126/science.1172482>
- Yuan, H., Yang, Z., Li, Y., Zhang, X., De Bruijn, J. D., & De Groot, K. (1998). Osteoinduction by calcium phosphate biomaterials. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 9(12), 723-726. <https://doi.org/10.1023/A:1008950902047>
- Zhang, J., Liu, X., Li, H., Chen, C., Hu, B., Niu, X., Li, Q., Zhao, B., Xie, Z., & Wang, Y. (2016). Exosomes/tricalcium phosphate combination scaffolds can enhance bone regeneration by activating the PI3K/Akt signaling pathway. *Stem Cell Research & Therapy*, 7(1), 136. <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0391-3>
- Zhang, K., Wang, Y., Hillmyer, M. A., & Francis, L. F. (2004). Processing and properties of porous poly(l-lactide)/bioactive glass composites. *Biomaterials*, 25(13), 2489-2500. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.09.033>
- Zhang, N., Hu, L., Cao, Z., Liu, X., & Pan, J. (2022). Periosteal Skeletal Stem Cells and Their Response to Bone Injury. *Front Cell Dev Biol*, 10, 812094. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.812094>
- Zhao, J., Zhou, C., Xiao, Y., Zhang, K., Zhang, Q., Xia, L., Jiang, B., Jiang, C., Ming, W., Zhang, H., Long, H., & Liang, W. (2024). Oxygen generating biomaterials at the forefront of regenerative medicine: advances in bone regeneration. *Front Bioeng Biotechnol*, 12, 1292171. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2024.1292171>

7 Erklärung zum Eigenanteil

Diese Arbeit wurde im Forschungslabor der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Tübingen unter Betreuung von Frau Prof. Dr. D. Alexander und Prof. Dr. Dr. S. Reinert durchgeführt.

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

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

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

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

Tübingen, den 20.10.2025

Jonas Yantren