

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

**Differenzierung von osteogenen Vorläuferzellen aus
induzierten pluripotenten Stammzellen**

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

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

vorgelegt von

Frick, Sarah-Lena

2021

Dekan: Professor Dr. B. Pichler
1. Berichterstatter: Professorin Dr. D. Alexander-Friedrich
2. Berichterstatter: Professorin Dr. D. Wolff

Tag der Disputation: 16.06.2021

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	III	
Tabellenverzeichnis.....	IV	
Abkürzungsverzeichnis	V	
1	Einleitung	1
1.1	Die Notwendigkeit von Knochentransplantaten in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie.....	1
1.2	Knochen-Tissue Engineering (BTE).....	2
1.2.1	Mesenchymale Stammzellen (MSCs)	2
1.2.1.1	Kieferperiostzellen	3
1.2.1.2	Limitierungen von MSCs	4
1.2.2	Pluripotente Stammzellen	5
1.2.3	Induzierte pluripotente Stammzellen (iPSCs).....	6
1.2.3.1	RNA-basierte Reprogrammierungsvektoren.....	7
1.2.3.1.1	Sendai Virus.....	8
1.2.3.1.2	Synthetische mRNA	8
1.2.3.1.3	Selbst-replizierende RNA (srRNA)	9
1.2.4	Aus iPSCs differenzierte MSC-ähnliche Zellen (iMSCs)	10
1.2.4.1	MSC-Differenzierung in vivo.....	11
1.2.4.2	In vitro Differenzierungsmethoden.....	11
1.2.4.3	Probleme und Lösungsansätze	13
1.2.4.4	TGF- β -Inhibitor SB431542 (SB)	14
1.3	Fragestellung und Zielsetzung	16
2	Material und Methoden.....	17
2.1	Versuchsaufbau	17
2.2	Medien und Pufferlösungen	19
2.3	Zellkultur.....	20
2.4	Kultivierung von iPSCs.....	20
2.5	Differenzierung von iPSCs zu iMSCs	21
2.6	Zellzählung.....	22
2.7	Osteogene Differenzierung von iMSCs	22
2.7.1	Zellkultur der osteogenen Differenzierung.....	22
2.7.2	Mineralisierungsnachweis der osteogen induzierten iMSCs mithilfe der Alizarin Rot Färbung	23
2.7.3	Quantifizierung der Kalziumphosphatpräzipitate	24
2.8	Seneszenz-Assay (Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase-Aktivität)	24
2.9	Durchflusszytometrie.....	25
2.9.1	Expression von iPSC- und MSC-Oberflächenmarkern.....	25
2.10	Analyse der Genexpression	26
2.10.1	RNA-Extraktion	26

2.10.2	Synthese der cDNA.....	27
2.10.3	Analyse der Genexpression mittels quantitativer PCR.....	28
2.10.4	Bestimmung der Anzahl der CD105 ⁺ -Zellen.....	31
2.11	Statistik.....	31
3	Ergebnisse	33
3.1	Morphologie differenzierender Zellen +/- SB.....	33
3.2	Expression von Oberflächenmarkern während der iMSC-Differenzierung.....	38
3.3	Genexpression während der iMSC-Differenzierung.....	49
3.4	Osteogene Differenzierung von iMSCs	55
3.4.1	Mineralisierung.....	55
3.4.2	Genexpression osteogen stimulierter iMSCs	59
3.4.3	Dissoziation von iMSCs während der osteogenen Differenzierung	62
3.5	Expression von Seneszenzmarkern bei iMSCs.....	64
4	Diskussion.....	70
4.1	Methodik.....	70
4.1.1	Verbesserung der Differenzierungseffizienz durch schonenderes Ausplattieren	70
4.1.2	Verbesserung der Differenzierungseffizienz durch Kontrolle der Zelldichte.....	71
4.2	Differenzierung mit und ohne SB431542 (SB)	72
4.2.1	Auswirkungen von SB auf die Differenzierungseffizienz	73
4.2.2	Differenzierungsdauer bis zum Einsatz der iMSCs als osteogene Vorläuferzellen	74
4.2.3	Auswirkungen der Differenzierungseffizienz auf die Expression von Seneszenzmarkern	76
4.3	Fazit	78
5	Zusammenfassung.....	80
6	Literaturverzeichnis:	83
7	Erklärung zum Eigenanteil	92
8	Danksagung.....	93

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus	17
Abbildung 2: Zellkonglomerat nach dem Passagieren von iPSCs mittels Zellschaber.....	34
Abbildung 3: Morphologie während der iMSC-Differenzierung ohne SB (-SB). 35	
Abbildung 4: Morphologie während der iMSC-Differenzierung mit SB (+SB) ...	36
Abbildung 5: Einrollen von Kolonierändern +SB Zellen	36
Abbildung 6: Einrollen von Zelllayer bei +SB Zellen.....	37
Abbildung 7: Morphologie während der iMSC-Differenzierung +/- SB im Vergleich	38
Abbildung 8 : CD105 Expression von iPSCs und iMSCs	39
Abbildung 9: CD73 Expression von iPSCs und iMSCs	40
Abbildung 10: CD29 Expression von iPSCs und iMSCs	41
Abbildung 11: CD44 Expression von iPSCs und iMSCs	42
Abbildung 12: CD90 Expression von iPSCs und iMSCs	43
Abbildung 13: Tra-1-60 Expression von iPSCs und iMSCs.....	44
Abbildung 14: Tra-1-81 Expression von iPSCs und iMSCs.....	45
Abbildung 15: CD324 Expression von iPSCs und iMSCs	46
Abbildung 16: CD326 Expression von iPSCs und iMSCs	47
Abbildung 17: SSEA-4 Expression von iPSCs und iMSCs.....	48
Abbildung 18: CD44 Expression von iPSCs, JPCs und iMSCs.....	49
Abbildung 19: CD73 Expression von iPSCs, JPCs und iMSCs.....	50
Abbildung 20: NANOG Expression von iPSCs, JPCs und iMSCs.....	51
Abbildung 21: NANOG Expression von iPSCs, JPCs und iMSCs.....	51
Abbildung 22: OCT4 Expression von iPSCs, JPCs und iMSCs.....	52
Abbildung 23: OCT4 Expression von iPSCs, JPCs und iMSCs.....	53
Abbildung 24: TERT Expression von iPSCs, JPCs und iMSCs.....	54
Abbildung 25: TERT Expression von iPSCs, JPCs und iMSCs.....	54
Abbildung 26: Mineralisierung von +/- SB differenzierter Zellen verschiedener Passagen. Zellen der Passagen 2-4 wurden 21 Tage lang in osteogenem Medium (OB) inkubiert.....	55
Abbildung 27: Mikroskopaufnahmen der Mineralisierung von +/- SB differenzierter Zellen eines Patienten in Passage 3 (M114- iMSCs_F02_P3).....	57
Abbildung 28: Mineralisierung von mit SB differenzierter Zellen eines Patienten über verschiedene Passagen.....	57
Abbildung 29: Mineralisierung von iMSCs verschiedener Passagen.....	58
Abbildung 30: ALP Expression von iMSCs verschiedener Passagen	59
Abbildung 31: OCN-Expression von iMSCs verschiedener Passagen	60
Abbildung 32: RUNX2 Expression von iMSCs verschiedener Passagen	61

Abbildung 33: Repräsentativer Plattenscan der Mineralisierung von +SB differenzierten Zellen.....	62
Abbildung 34: Repräsentativer Plattenscan der Mineralisierung von +SB und -SB differenzierten Zellen.....	63
Abbildung 35: Anteil abgelöster Wells während der osteogenen Differenzierung. -/+ SB differenzierte Zellen der Passagen 2-4 wurden in osteogenem Medium kultiviert, wobei sich teilweise die Zellmonolayer von der Zellkulturplatte löste	63
Abbildung 36: Seneszente Zellen unter den +/- SB differenzierten iMSCs in P0	65
Abbildung 37: SA- β -Gal-Expression von iPSCs, JPCs, iMSCs „alt“ und iMSCs +SB und -SB	66
Abbildung 38: P16 ^{INK4a} -Expression von iPSCs, JPCs, iMSCs „alt“ und iMSCs +SB und -SB	67
Abbildung 39: P21 ^{Cip1} -Expression von iPSCs, JPCs, iMSCs „alt“ und iMSCs +SB und -SB	68

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der Fragestellung, Zielparameter und Experimente mit Verweis auf die entsprechenden Abschnitte.....	17
Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Zelllinien und der Wiederholungen der iMSC-Differenzierung	18
Tabelle 3: Medien und Pufferlösungen.....	19
Tabelle 4: Liste der verwendeten Antikörper	26
Tabelle 5: Thermocycler Programm für die cDNA-Synthese.....	28
Tabelle 6: PCR-Mix der GAPDH-Standards.....	29
Tabelle 7: PCR-Mix für Proben.....	29
Tabelle 8: qPCR-Programm	30
Tabelle 9: Verwendete Primer (SearchLC, Heidelberg, Deutschland).....	30
Tabelle 10: Mineralisierung von -/+ SB differenzierten Zellen verschiedener Passagen	56
Tabelle 11: Anteil abgelöster Wells während der osteogenen Differenzierung	64

Abkürzungsverzeichnis

+SB	Zellen mit SB
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer
ALK	Activin Receptor-like Kinase
ALP	Alkalische Phosphatase
ANOVA	Varianzanalyse, engl. analysis of variance
APC	Allophycocyanin
ARS	Alizarin Rot Färbung, engl. Alizarin Red Stain
BMP	bone morphogenetic protein
BR	broad range
BSA	Bovines Serumalbumin
BTE	Knochen-Tissue Engineering, engl. bone tissue engineering
CDK	cyclin dependent kinase
cDNA	Komplementäre DNA, engl. complimentary DNA
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
d	Tag
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure, engl. deoxyribonucleic acid
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
DTT	Dithiothreitol
E8	Essential8
EBs	Embryoidbodies
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
ESCs	Embryonale Stammzellen, engl. embryonic stemcells
EtOH	Ethanol
FACS	fluorescence activated cell sorting
FBS	Fötale Kälberserum, engl. fetal bovine serum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GvHD	graft versus host disease
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HLA	humanes Leukozytenantigen
hPL	humanes Thrombozyten- / Plättchenlysat
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie
IgG	Immunglobulin
iMSCs	aus iPSCs differenzierte MSC-ähnliche Zellen

iPSCs	induziert pluripotente Stammzellen, engl. induced pluripotent stemcells
ISCT	International Society for Cell & Gene Therapy
JPCs	Kieferperiostzellen, engl. jaw periosteal cells
KO	Kontrolle
MACS	magnetic activated cell sorting
MDB	Membrane Desalting Buffer
MFI	Median Fluoreszenz Index
min	Minute
MKGC	Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	messenger RNA
MSC	Mesenchymale Stammzelle, engl. mesenchymal stemcell
MSCA-1	mesenchymal stem cells antigen 1
n	Probenanzahl
ng	Nanogramm
NH ₄ OH	Ammoniumhydroxid
nm	Nanometer
nsP	nonstructural protein
OB	Osteoblasten Medium
OB-D	OB-Medium ohne Dexamethason
OCN	Osteocalcin
P	Passage
p	Signifikanzwert, engl. probabilitas
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion, engl. polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
Pen-Strep	Penicillin-Streptomycin
pH	potentia Hydrogenii
qPCR	quantitative PCR
rDNase	rekombinante DNase
REA	recombinant antibody
RNA	Ribonukleinsäure, engl. ribonucleic acid
ROCK	Rho Kinase
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute, engl. rounds per minute
RUNX2	Runt-related transcription factor 2
s	Sekunde
S	Standard
S2	Sicherheitsstufe 2
SA-β-Gal	Seneszenz-assoziierte β-Galactosidase

SB	TGF- β Inhibitor SB431542
-SB	Zellen ohne SB
SFM	Serumfreies Medium
SMAD	small mothers against decapentaplegic
srRNA	selbst-replizierende RNA
SSEA	stage-specific embryonic antigen
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TERT	Telomerase Reverse Transkriptase
TGF- β	transforming growth factor β
ü.N.	über Nacht
VEE	venezuelan equine encephalitis
VTN	Vitronectin
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung

1 Einleitung

1.1 Die Notwendigkeit von Knochentransplantaten in der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie

In der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie (MKGC) können große Knochendefekte durch die Resektion von Tumoren, durch die Resektion von Zysten oder durch Traumata entstehen. Weiterhin können angeborene Defekte, Osteomyelitis, präprothetische Chirurgie, die Zahnimplantatchirurgie oder die Dysgnathiechirurgie den Einsatz von Knochentransplantaten oder -implantaten erforderlich machen.

Bislang ist der Goldstandard die autologe Knochentransplantation. Hierfür wird dem Patienten körpereigener Knochen (autolog) transplantiert. Autologe Knochentransplantate können durch das Ausbleiben einer immunologischen Abstoßungsreaktion besser einheilen. Außerdem können kleine Knochendefekte durch freie und große Defekte mit mikrochirurgischen Knochentransplantaten ersetzt werden (Schwenzer and Ehrenfeld, 2010, Bacher, 2011). In der MKGC können autologe Knochentransplantate, je nach Größe des zu ersetzenden Knochenstücks, operationsnah, aus intraoralen Knochenquellen, oder operationsfern, von extraoral aus dem Beckenkamm, der Fibula, der Scapula oder der Tibia, gewonnen werden (Sakkas et al., 2017, Elsalanty and Genecov, 2009, Atil et al., 2016). Ein Nachteil autologer Knochentransplantate ist, dass die Rekonstruktion des Kiefers durch ein zu geringes Knochenangebot beschränkt sein kann. Zudem muss das Risiko möglicher Komplikationen wie eine Infektion, Blutungen, Schmerzen, Narbenbildung sowie weiterer Wundheilungsstörungen abgewogen werden (Younger EM, 1989, Misch, 2015, Ebraheim et al., 2001). Daher sind multimorbide, immunsupprimierte oder sehr junge Patienten nicht für eine autologe Transplantation geeignet.

Im Knochen-Tissue Engineering (engl.: Bone Tissue Engineering, BTE) werden Alternativen zum autologen Knochentransplantat entwickelt, um in Zukunft die Patientenversorgung in der MKGC zu verbessern.

1.2 Knochen-Tissue Engineering (BTE)

Das BTE befasst sich mit der in vitro Herstellung von Knochengewebe. Hierfür werden Stammzellen, Biomaterialien und Wachstumsfaktoren kombiniert, um Implantate für die Knochenregeneration herzustellen.

Als Zellquelle dienen meist autologe mesenchymale Stammzellen (MSCs). MSCs können selbst zu Osteoblasten differenzieren und tragen zudem, durch die Sekretion parakriner Faktoren, zur Geweberegeneration bei (Baraniak and McDevitt, 2010). Scaffolds (Gerüste) aus Biomaterialien wie z.B. Hydroxylapatit verleihen den Konstrukten Stabilität und werden mit den isolierten Zellen besiedelt (Amini et al., 2012). Durch die Beschichtung der Scaffolds mit Wachstumsfaktoren können die Konstrukte biofunktionalisiert werden. Ein Wachstumsfaktor wie das Bone Morphogenic Protein 2 (BMP-2) kann die osteogene Differenzierung induzieren (Shen et al., 2016). Des Weiteren kann hierdurch das sogenannte „Homing“ von Stammzellen (Chen et al., 2015, Shen et al., 2016, Schantz et al., 2007) und die Vaskularisierung (Lee et al., 2008) verbessert werden.

1.2.1 Mesenchymale Stammzellen (MSCs)

Mesenchymale Stammzellen (MSCs) oder multipotente Stromazellen sind in vielen Körpergeweben zu finden und gehören zu den adulten Stammzellen.

MSCs können aus Fett, Knochenmark, Nabelschnurblut, Periost und aus vielen weiteren Geweben isoliert werden (Erices et al., 2000, Amini et al., 2012, Egusa et al., 2012).

Um MSCs von anderen Zelltypen abzugrenzen, definierte die International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT) folgende Minimalkriterien zur Identifizierung von MSCs (Dominici et al., 2006):

1. Plastikadhärentes Wachstum in vitro
2. Die Fähigkeit in adipogene, chondrogene und osteogene Zellen zu differenzieren
3. Die Expression folgender Oberflächenantigene:
 - Positive Marker: CD73, CD90, CD105
 - Negative Marker: CD11b, CD19, CD34, CD45, CD79, HLA-DR

Aufgrund ihres Differenzierungspotenzials zu Zellen des Bindegewebes sind MSCs die wichtigste Stammzellquelle für die Anwendungen im Tissue Engineering (DFG, 2006).

Neben ihrem Differenzierungspotential besitzen MSCs weitere therapeutisch nutzbare Eigenschaften. Sie sind beispielsweise in der Lage in verletztes oder entzündetes Gewebe einzuwandern („Homing“) (Zachar et al., 2016). Intravenös verabreicht, können sie so zur Geweberegeneration beitragen (Ullah et al., 2019).

Durch die Ausschüttung parakriner Faktoren stimulieren sie Zellen in der Umgebung. So werden z.B. umliegende Endothelzellen zur Angiogenese angeregt (Pankajakshan and Agrawal, 2014).

Eine wichtige Eigenschaft von MSCs ist zudem die Beeinflussung von Entzündungs- und Immunreaktionen. Dabei können MSCs antiinflammatorische Faktoren ausschütten und inhibierend auf Zellen des Immunsystems wirken (Weiss and Dahlke, 2019, Regmi et al., 2019). Dies macht man sich bei der Behandlung der akuten Graft-versus-Host-Disease (GvHD) nach allogenen Stammzelltransplantationen zunutze (Sato et al., 2010).

1.2.1.1 Kieferperiostzellen

In der Zahnmedizin und MKGC sind vor allem die Regeneration von Knochen- und Weichgewebe von Bedeutung. Hier sind besonders MSCs aus dem Kieferperiost eine interessante Zellquelle. Kieferperiostzellen (engl. jaw periosteal cells, JPCs) stellen für den Operateur die nächstliegende und am leichtesten zugängliche Stammzellquelle dar. JPCs besitzen ein sehr hohes osteogenes Differenzierungspotential und eignen sich daher sehr gut für die Knochenregeneration (Agata et al., 2007, Alexander et al., 2009, Alexander et al., 2010, Zhu et al., 2006, Lee et al., 2017, Jaquiery et al., 2005).

Der Einfluss des Kieferperiosts auf das Knochenwachstum zeigt sich auch bei der kieferorthopädischen Behandlung von Wachstumsanomalien und Fehlstellungen des Kiefers. Schon 1973 wurde von Donnelly die sogenannte „periosteal-pull hypothesis“ erwähnt. Diese besagt, dass es durch die Applikation von Zugspannung auf das Periost zur Knochenapposition im Bereich der Zugspannung komme (Donnelly MW, 1973). Ein Beispiel für eine

so wirkende kieferorthopädische Apparatur wurde von Rolf Fränkel entwickelt. Mit dem Funktionsregler Typ III nach Fränkel wird das Kieferwachstum gelenkt und somit kann die mandibuläre Prognathie kieferorthopädisch behandelt werden. Hierbei wird durch ein bukkales Schild und Lippenpelotten Zugspannung auf die Schleimhaut ausgeübt, was sich auf das darunterliegende Periost überträgt. Somit kommt es zur Knochenapposition im Oberkiefer und zur Anregung des Knochenwachstums im Mittelgesicht (Fränkel, 1962).

Zudem geht man davon aus, dass die, durch die Mastikation hervorgerufene, hohe Belastung auf den Kieferknochen die Knochenstabilität und das Knochenwachstum positiv beeinflusst (Inoue et al., 2019).

Neben der stetigen hohen Belastung durch den Kauvorgang, weist die Stammzellnische des Kieferperiosts weitere Besonderheiten im Vergleich zum Periost von Röhrenknochen auf (Leucht et al., 2008). Im Gegensatz zu Röhrenknochen, welche aus dem Mesoderm entstehen, entstehen Kiefer- und Gesichtsschädelknochen aus der Neuralleiste, d.h. aus dem Ektoderm (Leucht et al., 2008). Auch wirken Medikamente, wie z.B. Bisphosphonate, unterschiedlich auf Röhren- und Kieferknochen (Knight et al., 2010).

1.2.1.2 Limitierungen von MSCs

Trotz der vielversprechenden Forschungsergebnisse und einer großen Anzahl klinischer Einsatzgebiete, ist die Verwendung von mesenchymalen Stammzellen noch keine Selbstverständlichkeit. Aufgrund der komplizierten Zulassungsverfahren ist aktuell nur ein einziges somatisches Zelltherapeutikum mit MSCs in Deutschland zugelassen (Paul-Ehrlich-Institut, 2020). Dabei handelt es sich um Alofisel, ein Präparat zur Behandlung von Analfisteln in Folge von Morbus Crohn (Sheridan, 2018).

Ein Hindernis für den klinischen Einsatz stellt nicht nur die Zulassung dar, sondern auch die Qualität und die Quantität der Zellen, die patientenspezifisch stark schwanken kann. Die Verwendbarkeit der MSCs im BTE hängt von ihrem Differenzierungspotential ab. Dieses wird unter anderem durch das Patientenalter und die Entnahmestelle beeinflusst (D'Ippolito et al., 1999, De Bari et al., 2001). Die gewonnenen Zellen können außerdem durch Fibroblasten verunreinigt sein, welche nicht aus der Probe isoliert werden können (Pereira et

al., 2011). Weiterhin kann die Qualität der Zellen durch exogene Faktoren, wie z.B. bei Tumorpatienten die Bestrahlungsdosis, beeinflusst werden (Squillaro et al., 2018).

Die Indikation für das BTE ist mitunter die Rekonstruktion großer Knochendefekte. Jedoch müsste man hierfür eine gewisse Quantität an Zellen generieren, welche nur durch eine dementsprechend große Gewebeprobe und einer Vervielfältigung der Zellen durch häufiges Passagieren möglich wäre. Jedoch führt häufiges Passagieren zum Rückgang des Differenzierungspotenzials und ist limitiert durch die auftretende replikative Seneszenz (Vitorelli and Passos, 2017, Yang et al., 2018).

Weiterhin wird mit zunehmendem Alter des Patienten die Anzahl der MSCs im Gewebe geringer (Baker et al., 2015). Auch nimmt die Proliferationsrate und die Expression von immunmodulatorischen Faktoren ab (Turinetto et al., 2016).

Um qualitative Probleme und quantitative Beschränkungen der MSCs zu überwinden, wird im Labor der MKGC Tübingen versucht, induzierte pluripotente Stammzellen (iPSCs) als alternative Stammzellquelle für das BTE zu erschließen (Umrath et al., 2019).

1.2.2 Pluripotente Stammzellen

Im Menschen existieren pluripotente Stammzellen nur in einem sehr kurzen Zeitraum zu Beginn der Embryonalentwicklung. Sie können an Tag 4-5 nach der Befruchtung der Eizelle aus der inneren Zellmasse der Blastozyste isoliert werden. Diese embryonalen Stammzellen (ESCs) sind pluripotente Zellen und können sich in jede Zelle der drei Keimblätter weiter entwickeln (James et al., 2005). Sie besitzen die Fähigkeit der Selbsterneuerung und proliferieren in vitro unbegrenzt ohne zu differenzieren (Lemoli et al., 2005, Thomson et al., 1998, Amit et al., 2000).

Für die regenerative Medizin sind ESCs sehr interessant, weil sie sich in jede Zelle differenzieren lassen (James et al., 2005) und somit theoretisch jedes Gewebe regenerieren können. Durch gezielte Gabe von Wachstumsfaktoren kann die Differenzierung zu Zellen der drei Keimblätter initiiert werden. Im Gegensatz zu adulten Stammzellen, könnten bei ESCs relativ einfach gentherapeutische Modifikationen durchgeführt werden (DFG, 2006). Die

Forschung mit embryonalen Stammzellen ist jedoch durch das „Gesetz zur Sicherstellung des Embryonenschutzes im Zusammenhang mit Einfuhr und Verwendung menschlicher embryonaler Stammzellen“ (Stammzellgesetz-StZG, BGBl.I, vom Juni 2002) und dem „Gesetz zum Schutz von Embryonen“ (Embryonenschutzgesetz-ESchG, BGBl.I, von 1990 mit Zusatz von 2011) stark reglementiert. Die Erstellung von Zelllinien aus embryonalen Stammzellen ist in Deutschland verboten, da durch die Entnahme von ESCs aus der inneren Zellmasse der Blastozyste der Embryo zerstört wird (DFG, 2002, DFG, 2006). Deshalb ist in Deutschland die therapeutische Verwendung von ESCs nicht möglich und die Forschung daher stark eingeschränkt (DFG, 2006). Durch die Entwicklung von Methoden zur Herstellung pluripotenter Stammzellen aus somatischen Zellen, kann diese Problematik jedoch umgangen werden.

1.2.3 Induzierte pluripotente Stammzellen (iPSCs)

Induzierte pluripotente Stammzellen (iPSCs) gleichen in ihren Eigenschaften ESCs (Takahashi et al., 2007). Ihre Herstellung gelang erstmals im Jahre 2006 durch S. Yamanaka und K. Takahashi. Durch die Transduktion von vier Transkriptionsfaktoren (OCT4, SOX2, KLF4, cMYC) mithilfe eines retroviralen Vektors, wurde so erstmals die Reprogrammierung somatischer Mäusefibroblasten zu iPSCs erreicht (Takahashi and Yamanaka, 2006). Ein Jahr später wurde diese Methode erstmalig erfolgreich an humanen Zellen angewendet (Takahashi et al., 2007). Durch die Yamanaka-Faktoren werden Pluripotenz-assoziierte Gene hoch- und somatische Gene herunterreguliert, was zur Änderung epigenetischer Markierungen und letztendlich zur Entstehung pluripotenter Stammzellen führt (Nashun et al., 2015, Soufi et al., 2012). Humane iPSCs zeigen, wie auch humane ESCs, charakteristisch die Oberflächenmarker SSEA-4 (stage-specific embryonic antigen-4), TRA-1-60 (Podocalyxin), TRA-1-81 (Podocalyxin), CD324 (E-Cadherin) und CD326 (EpCAM). Außerdem exprimieren sie u.a. die Markergene NANOG (Nanog Homeobox), OCT4 (Octamer binding transcription factor 4) und TERT (Telomerase Reverse Transcriptase) (Zhao et al., 2012, Takahashi et al., 2007). Da bei der Reprogrammierung keine Embryonen zerstört werden, unterliegt die Forschung mit den iPSCs nicht dem Embryonenschutzgesetz. Der klinische

Einsatz von iPSCs wurde 2014 erstmals bei einer Studie mit altersbedingten Makuladegenerationen (Mandai et al., 2017) getestet, wonach weitere Anwendungen bei der Therapie von GvHD, Parkinson und Herzinfarkt folgten (Bragança et al., 2019).

Für einen sicheren klinischen Einsatz der iPSCs wurden von der „Global Alliance for iPSC Therapies“ mehrere kritische Qualitätsattribute festgelegt. Diese umfassen die genetische Stabilität und die Überlebensfähigkeit der Zellen, den Nachweis ihrer Pluripotenz (Expression typischer Oberflächenmarker und Markergene) und ihrer Differenzierungsfähigkeit in die drei Keimblätter sowie die Überprüfung ihrer Identität, der mikrobiologischen Keimfreiheit und der Abwesenheit von Endotoxinen (Sullivan et al., 2018).

Um mögliche Kontaminationen mit xenogenen Pathogenen oder Immunreaktionen auf Rückstände xenogener Medienbestandteile zu verhindern, wurden die in dieser Arbeit verwendeten iPSCs unter xenogen-freien Bedingungen, mithilfe von humanem Thrombozytenlysat (hPL), hergestellt (Wanner et al., 2017, Burnouf et al., 2016).

Um die genetische Integrität der iPSCs zu gewährleisten, muss die Reprogrammierung mit einem Reprogrammierungsvektor durchgeführt werden, welcher eine genetische Veränderung der iPSCs ausschließt und kein tumorigenes Risiko birgt (Sullivan et al., 2018). Daher wurden die hier verwendeten iPSCs durch eine sichere RNA-basierte Reprogrammierungsmethode hergestellt.

1.2.3.1 RNA-basierte Reprogrammierungsvektoren

Die Reprogrammierung kann mit unterschiedlichen Vektoren durchgeführt werden. Ursprünglich wurde ein retroviraler Vektor verwendet (Okita et al., 2007, Takahashi and Yamanaka, 2006). Die RNA des Vektors wird intrazellulär in DNA umgeschrieben. Die DNA wird an einem zufälligen Ort ins Genom integriert und kann dadurch Onkogene aktivieren oder Tumorsuppressorgene deaktivieren. Hierdurch kommt es zur Transformation der Zelle. Das Reprogrammierungsgen cMYC ist selbst ein Onkogen, welches nach der abgeschlossenen Reprogrammierung nicht in der Zelle verbleiben sollte (Okita et al., 2007, Yu et al., 2009).

Auch nicht-integrative DNA-basierte Vektoren, wie z.B. Adenoviren oder Plasmide, können durch DNA-Reparaturmechanismen der Zellen zufällig ins Genom integriert werden (Mitani and Kubo, 2002, Würtele et al., 2003). Für eine möglichst sichere Reprogrammierung sollte daher möglichst auf DNA-basierte Vektoren verzichtet werden.

1.2.3.1.1 Sendai Virus

Ein häufig verwendeter nicht-integrativer Vektor ist der Sendai-Virus. Dieser RNA-Virus bildet keine DNA-Zwischenstufen und integriert nicht ins Genom. Die Vorteile dieser Methodik sind die einfache Durchführung der Reprogrammierung, eine kostengünstige Verwendung und eine gute Transfektionseffizienz (Schlaeger et al., 2015). Nachteilig hierbei ist jedoch die potenzielle Infektionsgefahr, ein hierfür benötigtes Labor mit der biologischen Sicherheitsstufe S2 und die Persistenz von Virus-RNA in der Zelle (Fusaki et al., 2009).

1.2.3.1.2 Synthetische mRNA

Die Reprogrammierung mithilfe von synthetisch hergestellter mRNA ist eine sichere Methode, da die mRNA nicht ins Wirtsgenom integriert und der Vektor in den Zellen vollständig abgebaut wird. Hierin liegt ihr größter Nachteil. Diese Methode ist nicht nur wegen der täglichen Transfektion zeitaufwendig, sondern die Zellen reagieren auch auf die wiederholte Zugabe mit zellulärem Stress, was zu einer antiviralen Immunantwort und schließlich zum Zelltod führt. Um die Immunantwort zu verringern, können Nukleoside ausgetauscht werden (Drews et al., 2012, Angel and Yanik, 2010, Nallagatla et al., 2011). Zudem kann die Immunantwort der Zelle durch ein weiteres Modifizieren der mRNA mit einer 5'Cap- und Poly-A-Schwanz-Struktur reduziert werden (Goldstrohm and Wickens, 2008, Grudzien-Nogalska et al., 2007). Eine Modifikation mit einem 5'-Cap-Analogon, wie zum Beispiel dem Anti-Reverse-Cap-Analogon, verlängert das Überleben der mRNA und erhöht dadurch die Translationseffizienz (Steinle et al., 2017). Nicht gecappte RNA oder gar doppelsträngige RNA würde eine Immunantwort auslösen. Deshalb müssen diese Verunreinigungen durch Aufreinigung mittels eines Hochleistungs-

Flüssigkeitschromatographen (HPLC) beseitigt werden (Steinle et al., 2017). Außerdem kann die Interferon-abhängige Immunantwort der Zelle durch die Zugabe des Interferon- γ -Inhibitors B18R unterdrückt werden (Warren et al., 2010).

1.2.3.1.3 Selbst-replizierende RNA (srRNA)

Um die Nachteile der synthetischen mRNA zu verbessern, wurde die Reprogrammierung durch Yoshioka et al. abermals weiter entwickelt. Um die täglich wiederholende Transfektion zu umgehen und den zellulären Stress zu minimieren, wurde eine synthetische polycistronische selbst-replizierende RNA (srRNA) entwickelt. Diese basiert auf Sequenzen des venezuelanischen Pferdeenzephalomyelitisvirus (venezuelan equine encephalitis (VEE)). Diese RNA codiert zum einen für die Gene nsP1 bis nsP4 (nonstructural protein 1-4) und zum anderen für die Reprogrammierungsfaktoren OSKM. Die Gene nsP1-4 kodieren für Sequenzen des VEE-Virus und werden für die Selbst-Replikation der RNA benötigt, sodass für die Reprogrammierung nur eine einmalige Transfektion nötig ist. Die Gene, welche für die Hüllproteine des VEE-Virus kodieren, wurden entfernt und durch die Yamanaka-Faktoren ersetzt. Zusätzlich wurde ein Puromycin-Resistenzgen eingefügt, welches eine Antibiotikaselektion der transfizierten Zellen ermöglicht (Yoshioka et al., 2013).

Auch bei der Transfektion mit der srRNA ist die Inhibierung der interferon-abhängigen Immunantwort unerlässlich, weshalb auch hier der Interferon- γ Inhibitor B18R während der Reprogrammierung hinzugefügt werden muss. Ist die Reprogrammierung abgeschlossen, führt das Weglassen des Interferon-Inhibitors zum raschen Abbau der srRNA. So gelingt die Herstellung von rückstandsfreien iPSCs (Yoshioka et al., 2013).

Zur Herstellung der in dieser Arbeit eingesetzten iPSCs wurde die Methode von Yoshioka optimiert. Hierfür wurde dem Vektor zusätzlich ein GFP-Gen (green fluorescent protein) hinzugefügt, um ein live-Monitoring während der Transfektion zu ermöglichen (Umrath et al., 2019).

1.2.4 Aus iPSCs differenzierte MSC-ähnliche Zellen (iMSCs)

Der direkte Einsatz undifferenzierter iPSCs am Patienten birgt das Risiko von Tumoren, da iPSCs in vivo Teratome bilden können. Daher ist es sicherer die iPSCs zunächst in vitro in den benötigten Zelltyp zu differenzieren. Für das BTE können iPSCs zu MSC ähnlichen Zellen, sog. iMSCs differenziert werden. Die iMSCs könnten dann analog zu adulten MSCs, ohne das Risiko der Teratombildung, eingesetzt werden.

Die iMSCs sollen dieselben Eigenschaften wie MSCs besitzen und die Minimalkriterien für MSCs nach den Angaben der ISCT erfüllen (Dominici et al., 2006). Diese beinhalten die Expression typischer Oberflächenmarker, plastikadhärentes Wachstum, sowie die Fähigkeit zur chondrogenen, adipogenen und osteogenen Differenzierung (Hynes et al., 2014).

Durch die Entwicklung von iMSCs als alternative Stammzellquelle wäre es möglich, Limitierungen von MSCs, z.B. die Bereitstellung großer Zellmengen, zu umgehen. Einen klinischen Einsatz könnten iMSCs in denselben Anwendungsgebieten wie MSCs finden (Sabapathy and Kumar, 2016).

iMSCs erfüllen die Minimalkriterien für MSCs, besitzen darüber hinaus jedoch weitere Eigenschaften, die sich von adulten MSCs unterscheiden. So scheinen die Zellen durch die Reprogrammierung eine Verjüngung zu erfahren, denn die aus iPSCs generierten iMSCs zeigen verlängerte Telomere, eine beschleunigte Proliferation und eine mit Verjüngung assoziierte Genexpression (Lapasset et al., 2011, Spitzhorn et al., 2019). Durch die Verlängerung der Telomere kann das Eintreten der replikativen Seneszenz verzögert werden. Auch scheinen die iMSCs gegenüber den MSCs eine sich unterscheidende immunmodulatorische Regulation zu haben. Dies wurde nach der Gabe von Interferon- γ beobachtet, wobei die iMSCs im Gegensatz zu den MSCs eine geringere Expression des Oberflächenantigens HLA-II zeigten (Umrath et al., 2020).

Die Hypothese eines somatischen Gedächtnisses der iPSCs besagt, dass iPSCs durch unvollständige Löschung somatischer epigenetischer Markierungen bevorzugt in den Ursprungszelltyp zurück differenzieren können. Verschiedene Publikationen konnten dieses somatische Gedächtnis nachweisen ((Ohi et al., 2011), reviewed in (Yamanaka, 2012), reviewed in

(Vaskova et al., 2013), reviewed in (Khoo et al., 2020)). Laut dieser Theorie wäre es sinnvoll, wie in dieser Arbeit durchgeführt, iPSCs aus Zellen des Zielgewebes zu generieren, um die Differenzierung in den gewünschten Zelltyp zu erleichtern.

1.2.4.1 MSC-Differenzierung in vivo

Im menschlichen Körper existieren pluripotente Stammzellen nur für wenige Tage zu Beginn der Embryonalentwicklung, bevor sie zu Zellen der drei Keimblätter differenzieren. Kommen pluripotente Stammzellen erst später zur Differenzierung, kann es zur Bildung von Teratomen führen, welche häufig sogar Haut, Haare, Zähne und anderes Gewebe enthalten (Nelakanti et al., 2015, Peterson et al., 2012).

Mesenchym bezeichnet embryonales Bindegewebe, welches hauptsächlich aus extrazellulärer Matrix und mesenchymalen Stammzellen besteht (Collins and Billett, 1995). Aus ihm werden später das Bindegewebe, Knochen, Knorpel, Blut- und Lymphgefäße, das blutbildende System, glatte Muskulatur, Herzmuskulatur sowie die Niere gebildet (Gilbert, 2010). Der überwiegende Teil des Mesenchyms ist mesodermalen Ursprungs (Gilbert, 2010). Nur Stütz- und Bindegewebe des Gesichtsschädels werden aus dem Mesenchym der Neuralleiste gebildet (Gilbert, 2010). MSCs aus dem Kieferperiost stammen daher aus dem Ektoderm.

Adulte MSCs überdauern in Stammzellnischen in verschiedensten Geweben des Körpers und erfüllen wichtige Aufgaben bei der Geweberegeneration, der Wundheilung und anderen Prozessen (Pittenger et al., 2019).

1.2.4.2 In vitro Differenzierungsmethoden

In vitro können pluripotente Stammzellen unter geeigneten Bedingungen theoretisch unendlich lange in diesem undifferenzierten Zustand gehalten werden. Durch äußere Einflüsse kann dieser sehr instabile Zustand jedoch leicht gestört werden. Solche Störungen führen zur spontanen Differenzierung der Zellen in zufällige Zelltypen der drei Keimblätter. In vitro können iMSCs durch unterschiedliche Differenzierungsmethoden gewonnen werden. Auch hier kann entweder der Differenzierungsweg über das Mesoderm oder über die

Neuralleiste gegangen werden (Eto et al., 2018). Aufgrund des einfacheren Differenzierungsprotokolls wird jedoch meist der Weg über das Mesoderm gewählt (Fukuta et al., 2014). Hierfür existiert eine große Bandbreite an Differenzierungsprotokollen, jedoch wird in den meisten Fällen die Neigung der iPSCs zur spontanen Differenzierung ausgenutzt. Hierfür wird die ungerichtete Differenzierung durch Änderungen der Kultivierungsbedingungen angeregt. Durch spezielle Kultivierungsbedingungen oder Medienzusätze wird dabei versucht die Differenzierung in die mesodermale Richtung zu beeinflussen. Die entstandenen iMSCs werden dann anhand ihrer Eigenschaften (z.B. Plastikadhärenz) aus einer gemischten Population spontan differenzierter Zellen selektiert. MSC-ähnliche Zellen können zudem durch FACS (fluorescence activated cell sorting) oder MACS (magnetic activated cell sorting) selektiert werden (Lian et al., 2010).

Die Differenzierung der iPSCs kann z.B. durch die Herstellung von Embryoidbodies (EBs) induziert werden, und anschließend aus EBs herauswachsende Zellen selektiert werden (Hwang et al., 2008, Deyle et al., 2012).

Die Differenzierung kann durch die Zugabe von FBS-haltigem Medium (Giuliani et al., 2011) oder die gezielte Zugabe von Wachstumsfaktoren (Lian et al., 2010) induziert werden. Alternativ zu FBS (Liu et al., 2012) kann auch humanes Plättchenlysat (hPL) (Luzzani et al., 2015) verwendet werden.

Für die iMSC Generierung können Differenzierungsmedien entweder direkt auf iPSC-Kolonien gegeben werden oder sie kann durch die spontane Differenzierung der Zellen, durch das Vereinzeln von iPSCs, induziert werden (Hynes et al., 2014, Luzzani et al., 2015). Weitere Forscher zeigten eine gute Differenzierungseffizienz der iMSCs durch die Kultivierung auf mit Gelatine-beschichteten-Platten (Lian et al., 2010) oder auf einer mit Kollagen Typ I-beschichteten Matrix (Liu et al., 2012).

Durch die Zugabe von Wachstumsfaktoren oder Signaling-Inhibitoren kann die Effizienz der mesodermalen Differenzierung verbessert werden. Beispielsweise konnte durch die Zugabe des TGF- β -Inhibitors (engl. transforming growth factor

β) SB431542 (SB) eine Verbesserung der Differenzierungseffizienz erreicht werden (Chen et al., 2012).

1.2.4.3 Probleme und Lösungsansätze

In den bisherigen Vorarbeiten zu dieser Arbeit konnten zwar funktionelle iMSCs hergestellt werden, jedoch zeigten die Zellen schon in frühen Passagen Anzeichen von Seneszenz (Umrath et al., 2020, Umrath et al., 2019). Die Seneszenz ist ein Zustand, in welchem sich die Zelle im sogenannten Zellzyklus-Arrest befinden und sie sich nicht weiter teilen kann (Kuilman et al., 2010). Bei der Messung der Zellproliferationsrate und der mitochondrialen Aktivität zeigten die iMSCs gegenüber den JPCs schlechtere Werte (Umrath et al., 2020). Die Überprüfung der Seneszenz-assoziierten β-Galaktosidase (SA-β-Gal) und die mit der Seneszenz assoziierten Markergene P16^{INK4a} und P21^{CIP1} ergaben für die iMSCs höhere Expressionslevels als für die ursprünglichen MSCs aus dem Kieferperiost (Umrath et al., 2020). Eine replikative Seneszenz wurde jedoch durch die gemessene Verlängerung der Telomere ausgeschlossen, da die Verkürzung der Telomere die Ursache der replikativen Seneszenz ist (Umrath et al., 2020).

Eine mögliche Ursache der Seneszenz könnte der von Jun und Lau beschriebene Zusammenhang sein, bei welchem zellulärer Stress aufgrund von Gewebeverletzungen beobachtet wurde. Hierbei kam es zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), dadurch zur Aktivierung des P16^{INK4a} Signalwegs und zur vermehrten Expression des Seneszenz-Markergens P16^{INK4a} (Jun and Lau, 2010, McHugh and Gil, 2018). Dieser Zusammenhang könnte auf die Reaktion der iPSCs übertragen werden, welche die Zellen bei der Initiierung der Differenzierung durch Vereinzelung zeigten. Dabei wurde, während des Ausplattierens der iPSCs, ein massenhaftes Sterben beobachtet. Das Vereinzeln von iPSCs führt ohne die Zugabe von ROCK-Inhibitor (Rho Kinase Inhibitor) unweigerlich zum Zelltod (Watanabe et al., 2007). Hierbei kommt es zur Überaktivierung des Myosins (Ohgushi et al., 2010). Folglich verformt sich das Zellskelett (Clark et al., 2007), woraufhin das so genannte „blebbing“ (Sebbagh et al., 2001) und das Einleiten der mitochondrialen Apoptose folgt (Ohgushi et al., 2010). Durch die Zugabe eines ROCK-Inhibitors

kann die Apoptose nach Vereinzeln verhindert werden (Watanabe et al., 2007). Trotzdem bedeutet eine Vereinzeln Stress für die Zellen, welche somit Seneszenz induzieren könnte.

Durch schonenderes Passagieren der iPSCs kann der Stress in Passage 0 (P0) reduziert werden. In Vorarbeiten zeigte sich, dass durch die Verwendung eines Zellschabers die Zahl sterbender Zellen reduziert und gleichzeitig durch die mechanische Stimulation die Differenzierung induziert werden konnte. Daher wurde diese Methode auch in der vorliegenden Arbeit eingesetzt.

Wie in P0 wurde auch nach dem Passagieren der Zellen auf unbeschichtete Platten in P1 ein Zellsterben beobachtet. Da iMSCs normalerweise problemlos passagiert werden können, starben dabei vermutlich viele Zellen, bei welchen die Differenzierung zu iMSCs noch nicht weit genug fortgeschritten war. Ein Anhaltspunkt dafür war die Beobachtung, dass die Ausbeute an differenzierten iMSCs durch eine Verlängerung der Kultivierungszeit der iPSCs verbessert werden konnte. Hierfür wurden die iPSCs zehn Tage lang bis zur Überkonfluenz kultiviert und erst dann für die Initiierung der Differenzierung passagiert (Umrath et al., 2020). Dabei führte vermutlich die hohe Zelldichte zur spontanen Differenzierung der iPSCs. Daher sollte in dieser Arbeit getestet werden, ob eine Erhöhung der Differenzierungseffizienz durch die Zugabe des TGF- β -Inhibitors SB431542 zu einer Reduktion des Zellsterbens und der Seneszenz führt.

1.2.4.4 TGF- β -Inhibitor SB431542 (SB)

Die TGF- β -Superfamilie (engl. transforming growth factor) wird in die TGF- β -Familie, die BMPs (engl. bone morphogenetic proteins) und die Aktivine unterteilt. Sie haben vielfältige Funktionen, u.a. bei der Selbsterneuerung embryonaler Stammzellen, der Gastrulation, der Differenzierung oder der Organmorphogenese (Weiss and Attisano, 2013).

TGF- β ist ein Zytokin aus dieser Familie und wirkt in vivo auf die Follikelreifung, die Immunsuppression, die Regeneration, die Bindegewebsproduktion, die Zellproliferation und die Zelldifferenzierung ein (Rassow, 2006).

Im TGF- β -Signalweg binden diese Zytokine an verschiedene extrazelluläre Rezeptoren auf der Zellmembran und aktivieren dadurch unterschiedliche

intrazelluläre Proteine der SMAD-Gruppe (engl. small mothers against decapentaplegic). Dadurch kommt es zur Transkription entscheidender Gene (Shi and Massague, 2003) und somit zur Inhibierung oder Beschleunigung von Prozessen.

Zu den extrazellulären Rezeptoren Typ I gehören die ALK (engl.: Activin Receptor-like Kinase) 1-7. ALK 1,2,3 und 6 werden durch die BMPs aktiviert und bewirken intrazellulär eine Aktivierung der SMAD 1/5 Faktoren.

In humanen embryonalen Stammzellen (ESCs) wird TGF- β gebildet, um ihren undifferenzierten Zustand und ihre pluripotenten Eigenschaften zu erhalten (James et al., 2005). Dadurch werden die Rezeptoren ALK 4,5 und 7 aktiviert, die zum Signalweg über SMAD 2/3 führt. Die Pluripotenz wird erhalten durch die Hemmung des Signalwegs der SMAD 1/5 Komponenten und der Aktivierung des Signalwegs der SMAD 2/3 (James et al., 2005, Inman et al., 2002). Wenn die ESCs differenzieren sollen, ändert sich dieser Prozess, sodass der Signalweg über SMAD 1/5 aktiviert wird (James et al., 2005, Inman et al., 2002).

SB431542 (SB) ist ein selektiver Inhibitor des Activin- und TGF- β -Signalwegs. Es hemmt spezifisch die Phosphorylierung des TGF- β -Rezeptors ALK5. Durch ihre Ähnlichkeit zu ALK5 werden die Rezeptoren ALK4 (Activin) und ALK7 (Nodal) ebenfalls inhibiert (Inman et al., 2002). Durch die Inhibierung der Rezeptoren wird die Selbsterneuerung der iPSCs gehemmt und die Differenzierung induziert. SB hat dabei keine Auswirkungen auf den BMP-Signalweg, was bedeutet, dass die Rezeptoren ALK 1,2,3 und 6 nicht gehemmt werden und die BMP-vermittelte Differenzierung der Zellen nicht gehemmt wird (Inman et al., 2002).

Chen et al. (2012) zeigten eine Verbesserung der iMSC-Differenzierung, durch die Verwendung von SB ohne die Verwendung von Feeder-Zellen oder einer Differenzierungsinitiierung durch Embryoidbody-Bildung. Hierbei wurde sogar, verglichen mit der Differenzierung ohne SB, eine schnellere Differenzierung beobachtet (Chen et al., 2012).

Devito et al. (2019) konnten mit der Zugabe von SB eine Verbesserung der Differenzierungseffizienz erreichen. Dabei beobachteten sie während der

Differenzierung ohne SB seneszente Zellen, wohingegen mit SB keine seneszenten Zellen auftraten (Devito et al., 2019).

1.3 Fragestellung und Zielsetzung

Da die iMSCs in bisherigen Versuchen eine niedrige Differenzierungseffizienz und früh Anzeichen von Seneszenz zeigten, sollte in dieser Arbeit für die Herstellung der iMSCs eine neue Methode entwickelt, getestet und folgende Fragestellungen beantwortet werden.

1. Kann die Effizienz der iMSC-Differenzierung durch schonenderes Ausplattieren verbessert werden?
2. Kann die Effizienz der iMSC-Differenzierung durch die Zugabe des TGF- β -Inhibitors SB431542 verbessert werden?
3. Wie lange müssen die iMSCs differenziert werden, um als osteogene Vorläuferzellen eingesetzt werden zu können?
4. Bewirkt eine Verbesserung der Differenzierungseffizienz eine Reduktion der Expression von Seneszenzmarkern?

2 Material und Methoden

2.1 Versuchsaufbau

Um die in Abschnitt 1.3 definierten Fragestellungen zu beantworten, wurden folgende Zielparameter festgelegt, welche durch die aufgeführten Experimente analysiert werden sollten (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Übersicht der Fragestellung, Zielparameter und Experimente mit Verweis auf die entsprechenden Abschnitte

Fragestellung	Zielparameter	Experimente	Abschnitt
Verbesserung der Differenzierungseffizienz durch Zellschaber und Zugabe von SB	Anstieg der iMSC-Marker und Rückgang der iPSC-Marker Expression	Durchflusszytometrie (FACS)	2.9
		qPCR	2.10
Reifung osteogener Vorläuferzellen	Genexpression osteogener Marker	qPCR	2.10
	Mineralisierung	Alizarinfärbung und Alizarinquantifizierung	2.7
Reduktion der Expression von Seneszenzmarkern	SA- β -Gal-Expression	SA- β -Gal-Assay und Durchflusszytometrie	2.8
	Expression von P16 und P21	qPCR	2.10

Der zeitliche Ablauf und die durchzuführenden Experimente sind schematisch in Abbildung 1 dargestellt.

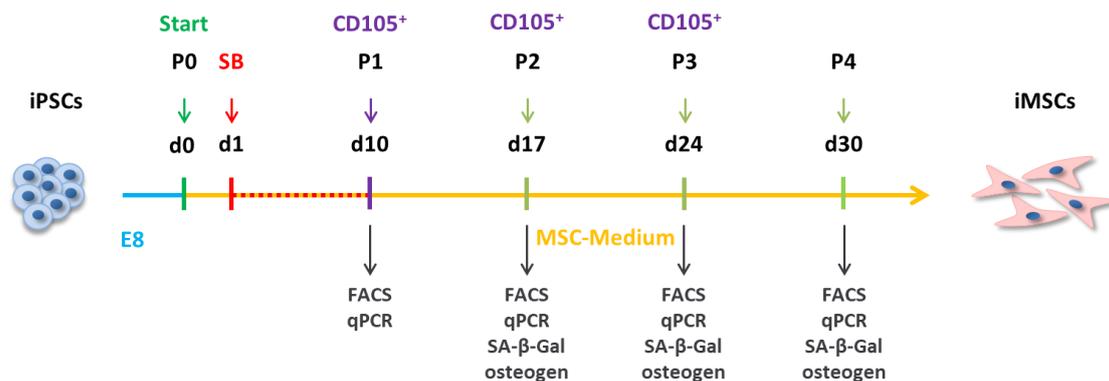


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Übersicht des Differenzierungsprotokolls von iPSCs zu iMSCs über vier Passagen hinweg mit den am Ende jeder Passage durchgeführten Experimenten (FACS = Durchflusszytometrie, qPCR = quantitative PCR, SA- β -Gal = SA- β -Gal-Assay, osteogen = osteogene Differenzierung).

In den Versuchen wurden die folgenden Zelllinien verwendet (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Zelllinien und der Wiederholungen der iMSC-Differenzierung. Verwendete iPSC-Linien und Angaben der Wiederholungen der vollständigen iMSC-Differenzierung bis P3 und der osteogenen Differenzierung bis P4.

iPSC-Linien	Wiederholungen
M112-iPSC-F07	2
M113-iPSC-F03	3
M114-iPSC-F02 und M114-iPSC-F03	3

2.2 Medien und Pufferlösungen

Tabelle 3: Medien und Pufferlösungen

Medium/Puffer	Bestandteile	Hersteller	Konzentration
Essential8-Medium (E8)	E8-Basalmedium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	96 %
	E8 Supplement	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	2 %
	Amphotericin B (250 µg/ml)	Biochrom, Berlin, Deutschland	1 %
	Penicillin-Streptomycin (10000 U/ml)	Pen-Strep, Lonza, Basel, Schweiz	1 %
hPL5	DMEM/F12	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	93 %
	humanes Plättchenlysats (hPL)	ZKT Tübingen GmbH	5 %
	Amphotericin B (250 µg/ml)	Biochrom, Berlin, Deutschland	1 %
	Penicillin-Streptomycin (10000 U/ml)	Pen-Strep, Lonza, Basel, Schweiz	1 %
hPL10	DMEM/F12	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	88 %
	humanes Plättchenlysats (hPL)	ZKT Tübingen GmbH	10%
	Amphotericin B (250 µg/ml)	Biochrom, Berlin, Deutschland	1 %
	Penicillin-Streptomycin (10000 U/ml)	Pen-Strep, Lonza, Basel, Schweiz	1 %
Osteogenes Medium (OB-Medium)	hPL10-Medium		100 %
	L-Ascorbinsäure 2-Phosphat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	0,1 mM
	β-Glycerophosphat	AppliChem, Darmstadt, Deutschland	10 mM
	Dexamethason	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	4 µM
CryoSFM Einfriermedium	CryoSFM	PromoCell, Heidelberg, Deutschland	100 %
FACS-Puffer	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS) ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	99,8 %
	Natriumazid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	0,1 %
	Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA	0,1 %

2.3 Zellkultur

In dieser Arbeit wurden Kieferperiostzellen von drei verschiedenen Spendern verwendet. Das Kieferperiost wurde unter schriftlichem Einverständnis der Patienten bei Routineeingriffen entnommen und Kieferperiostzellen isoliert (Ethikvotum: 074/2016BO2). Die Kieferperiostzellen wurden in einer vorhergehenden Arbeit mittels eines selbst-replizierenden RNA-Vektors zu iPSCs reprogrammiert (Umrath et al., 2019). In dieser Arbeit wurden für die Herstellung von iMSCs die iPSC-Linien M112-iPSC-F07, M112-iPSC-F03, M113-iPSC-F03, M114-iPSC-F02 und M114-iPSC-F03 verwendet. Eigenschaften der iMSCs wurden mit den originalen JPCs, derselben Spender, verglichen. Alle verwendeten Zellen wurden in Inkubatoren bei 37 °C, 5 % CO₂ und >90 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die verwendeten Medien und Puffer sind in Tabelle 3 aufgeführt.

2.4 Kultivierung von iPSCs

Die oben genannten kryokonservierten iPSC-Linien wurden im Wasserbad (37 °C) aufgetaut und in Vitronectin (VTN)-beschichteten 6-Well Platten mit 2 ml E8-Medium (siehe Tabelle 3) mit 10 µM Y27632 ROCK-Inhibitor (Selleck Chemicals LLC, Houston, TX, USA) ausgesät. Zuvor wurde jeweils ein Well einer 6-Well-Platte für 1 h mit 1 ml PBS + 5 µg/ml VTN beschichtet und das Coating vor der Verwendung abgesaugt. 24 h nach dem Auftauen wurde der ROCK-Inhibitor durch einen Medienwechsel entfernt. Täglich wurde das Wachstum der Zellen mikroskopisch kontrolliert und das Medium gewechselt (2 ml E8-Medium/Well).

Zum Passagieren wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1 ml PBS + 0,5 mM EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) 2-4 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zeigten die Kolonien ein Abrunden und eine Vereinzellung, wurde das EDTA abgesaugt und die Zellen mithilfe einer 5 ml Pipette durch vorsichtiges Aufspritzen des E8-Mediums abgelöst. Die Zellsuspension wurde, je nach Konfluenz, 1:2 oder 1:3 gesplittet und in VTN-beschichtete Platten mit E8-Medium + 10 µM Y27632 passagiert. Am nächsten Tag wurde das Medium durch E8-Medium ohne Y27632 ersetzt.

2.5 Differenzierung von iPSCs zu iMSCs

Die iPSCs wurden mehrfach passagiert bis sie in runden klar begrenzten Kolonien wuchsen und eine circa 80 %ige Konfluenz aufwiesen. An d0 der iMSC-Differenzierung wurde die Morphologie der Zellen mikroskopisch dokumentiert (4x) (Leica, Wetzlar, Germany) und die Zellen anschließend schonend, mithilfe eines Zellschabers („Scraper“-Methode), abgelöst.

Pro iPSC-Well wurde eine T75-Zellkulturflasche für 1 h mit 7,5 ml PBS + 5 µg/ml VTN beschichtet und anschließend 8 ml hPL5-Medium (siehe Tabelle 3) mit 10 µM Y27632 pro Flasche vorgelegt. Zum Ablösen der iPSCs wurden die Wells mit 2 ml PBS gespült und 2 ml hPL5 + 0,1 % Y27632 hinzugegeben. Mit einem Zellschaber wurden die iPSC-Kolonien vollständig von der Platte gelöst und die gelösten iPSC-Koloniefragmente mit einer 2 ml Pipette in die vorbereitete T75-Flasche überführt (Passage 0, P0). Zum Vergleich der iMSC-Differenzierung mit und ohne TGF-β-Inhibitor (+SB und -SB) SB431542 (SB, SelleckChem, München, Deutschland) wurden pro iPSC-Linie jeweils zwei Wells passagiert.

An d1 wurde die Adhäsion der iPSC-Koloniefragmente mikroskopisch dokumentiert (4x). Bei beiden Zellkulturflaschen der gleichen Zelllinie wurde, je nach Anhaftung der Konglomerate, der ROCK-Inhibitor nach 24 h oder 48 h durch einen Medienwechsel mit hPL5-Medium entfernt. Einer Zellkulturflasche pro Zelllinie wurde an d1 zusätzlich das SB mit der Konzentration von 10 µM hinzugefügt (+SB).

Die Differenzierung der iMSCs in P0 wurde an d1, 3, 7 und 10 mikroskopisch dokumentiert. Das Medium (hPL5) wurde an den Wochentagen Montag, Mittwoch und Freitag gewechselt, wobei der Gruppe +SB jeweils 10 µM SB zugegeben wurde. Der TGF-β-Inhibitor wurde nur in P0 appliziert. Eine mikroskopische Kontrolle fand täglich statt. An d10 wurde die Zugabe von SB beendet und beide Flaschen (+/- SB) zur Selektion differenzierter Zellen in unbeschichtete T75-Flaschen passagiert.

Um die Zelldichte besser zu kontrollieren, wurden die Zellen zunächst gezählt (siehe Abschnitt 2.6) und zudem die Anzahl der CD105⁺-Zellen in jeder Passage mittels Durchflusszytometrie bestimmt (siehe Abschnitt 2.9).

Anschließend wurden $1 \cdot 10^6$ CD105⁺-Zellen mit 10 ml hPL5-Medium in eine unbeschichtete T75-Flasche gesät. Zusätzlich wurden $4 \cdot 10^5$ Zellen für die Durchflusszytometrie (siehe Abschnitt 2.9.1) und $5 \cdot 10^5$ Zellen für die Extraktion von RNA (siehe Abschnitt 2.10.1) abgenommen.

Die weiteren Passagen P1-3 wurden bei 80-100 %iger Konfluenz der Zellkulturflasche durchgeführt. Dabei wurden je $1 \cdot 10^6$ CD105⁺-Zellen in eine unbeschichtete T175-Flasche mit 20 ml hPL5-Medium ohne SB passagiert. Ab P1 wurden zudem in jeder Passage 4-6 Wells einer 6-Well Platte mit je $5 \cdot 10^4$ Zellen und je 2 ml MSC-Medium (hPL5) für die osteogene Differenzierung ausgesät (siehe Abschnitt 2.7.1). Weiterhin wurden pro passagierter Zellkulturflasche in jeder Passage 2 Wells einer 12-Well-Platte mit je $5 \cdot 10^4$ Zellen in 1 ml MSC-Medium für den Seneszenz-Assay (siehe Abschnitt 2.8) ausgesät. Nicht verwendete Zellen wurden eingefroren. Hierfür wurde die verbliebene Zellsuspension abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und in CryoSFM (PromoCell, Heidelberg, Deutschland) resuspendiert. Je 1 ml Zellsuspension ($1 \cdot 10^6$ Zellen) wurde in ein CryoVial pipettiert und 1 h bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ und anschließend ü.N. bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren. Zur Langzeitlagerung wurden die Zellen in den flüssigen Stickstofftank überführt.

2.6 Zellzählung

Zur Zellzählung wurde das Zellzählgerät TC20 (BioRad, Hercules, CA, USA) und das zugehörige Cell Counting Kit (BioRad, Hercules, CA, USA) verwendet. 20 μl Trypanblau (BioRad, Hercules, CA, USA) wurden in ein Well einer 96-Well-Platte vorgelegt und 20 μl Zellsuspension dazu gegeben. Die Suspension wurde gemischt, in eine Zählkammer gegeben und zur automatischen Zählung in das Zellzählgerät TC20 gesteckt. Die Zählung wurde mindestens dreimal wiederholt und der Mittelwert aus den Werten gebildet.

2.7 Osteogene Differenzierung von iMSCs

2.7.1 Zellkultur der osteogenen Differenzierung

Für die osteogene Differenzierung wurden $5 \cdot 10^4$ Zellen mit je 2 ml MSC-Medium pro Well in einer 6-Well-Platte ausgesät. Am nächsten Tag (d0) wurde ein Medienwechsel mit Kontrollmedium (KO, hPL10) und OB-Medium (siehe

Tabelle 3) durchgeführt. Eine Hälfte der Zellkulturplatte wurde mit KO-Medium und die andere Hälfte mit OB-Medium kultiviert. Ein Medienwechsel wurde alle 2-3 Tage an den Wochentagen Montag, Mittwoch und Freitag durchgeführt. An d15 der osteogenen Differenzierung wurden die Zellen, je ein Well der KO- und der OB-Gruppe, zur Isolation von RNA für die Genexpressionsanalyse mithilfe eines Zellschabers abgelöst und in 350 µl RA1-Puffer (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) + 20 µM TCEP (tris(2-carboxyethyl)phosphine, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) bei -80 °C eingefroren (siehe Abschnitt 2.10). An d21 wurden alle verbliebenen Wells für die Färbung mit Alizarin Rot fixiert. Hierfür wurde mit je 2 ml/Well PBS gewaschen und mit je 1 ml Formaldehyd (4 %) für 15 min fixiert. Anschließend wurde die Formaldehydlösung mit der Pipette abgenommen und fachgerecht entsorgt. Dann wurden die Wells zweimal mit je 2 ml PBS gespült. Das zweite Mal PBS wurde auf den fixierten Zellen belassen, die Platte mit Parafilm versiegelt und bis zur Färbung bei 2-4 °C aufbewahrt.

2.7.2 Mineralisierungsnachweis der osteogen induzierten iMSCs mithilfe der Alizarin Rot Färbung

Nach der Fixierung aller osteogen differenzierten Platten, wurden die Zelllayer mit Alizarin Rot (Sigma Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) gefärbt. Hierfür wurden alle Wells mit je 2 ml destilliertem Wasser (ddH₂O) gewaschen. Anschließend wurden die Zelllayer mit 1 ml/Well Alizarinlösung (40 mM, pH 4.2) 20 min lang auf einem Schüttler gefärbt. Daraufhin wurde das Alizarin abpipettiert, in den Sondermüll entsorgt und die Wells viermal mit je 2 ml/Well ddH₂O für je 15 min auf dem Schüttler gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift, wurden erneut 2 ml ddH₂O auf die Wells gegeben und die Ergebnisse mikroskopisch dokumentiert (Leica, Wetzlar, Germany). Nach der Dokumentation wurde das ddH₂O abpipettiert und 1 ml/Well eiskaltes 100 %iges Ethanol (EtOH) 2 min lang auf dem Zelllayer belassen. Anschließend wurde das EtOH abgesaugt und die Platte bis zur vollständigen Trocknung offen stehen gelassen. Die gesammelten Platten wurden in das Fotolabor der ZZMK gegeben, wo die Platten mit und ohne Deckel gescannt wurden.

2.7.3 Quantifizierung der Kalziumphosphatpräzipitate

Für die Quantifizierung der osteogenen Differenzierung wurden die, mit Alizarin Rot gefärbten, Kalziumphosphatpräzipitate mithilfe von Essigsäure aus dem Zelllayer herausgelöst und die Alizarin-Konzentration der Proben photometrisch gemessen.

Dazu wurden in jedes Well 1920 µl 10 %ige Essigsäure (Sigma Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) gegeben und auf dem Schüttler für 30 min inkubiert. Dann wurde der Zelllayer mit einem Zellschaber von der Zellkulturplatte gelöst und die Probe in ein Eppendorf-Tube überführt. Die Proben wurden für 30 s gevortext, 15 min bei 85 °C auf dem Thermomixer Heizblock (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) erhitzt und anschließend für 5 min auf Eis abgekühlt.

Um Zellbestandteile zu entfernen wurden die Proben 15 min bei 20.000 x g zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren der Proben wurden 400 µl des Überstands in ein neues Eppendorf-Tube überführt und mit 150 µl 10 %iger NH₄OH-Lösung neutralisiert. Anschließend wurden je 100 µl der Proben in Duplikaten in eine klare 96-Well-Platte gegeben. Zur Bestimmung der Konzentration wurde zudem eine Standardreihe hergestellt (S1-14). In Standard 1 (S1, 2 mM) wurden 475 µl ARS-Puffer (ScienCell, Standard Verdünnungslösung, unverdünnt) und 25 µl Alizarin Rot Färbelösung gegeben. Nach dem Vortexen, wurden 250 µl von S1 nach S2 pipettiert und 1:2 mit ARS-Puffer verdünnt. Anschließend wurden 250 µl von S2 nach S3 pipettiert und erneut 1:2 mit ARS-Puffer verdünnt. Hiermit wurde fortgefahren bis S14, aus welchem 250 µl abgenommen und verworfen wurden. S1-S14 wurden mit je 94 µl 10 %iger NH₄OH-Lösung neutralisiert. Jeweils 100 µl der Standardreihe wurde in Duplikaten in die 96-Well-Platte zu den Proben gegeben. Als Blanks dienten 2 Wells mit je 100 µl ARS-Puffer. Direkt folgend wurde die Platte bei 405 nm mit dem Elx800 Photometer (Bio Tek Germany, Deutschland) ausgelesen.

2.8 Seneszenz-Assay (Seneszenz-assoziierte β-Galaktosidase-Aktivität)

Um die zelluläre Seneszenz zu messen, wurde die Aktivität der Seneszenz-assoziierten β-Galaktosidase (SA-β-Gal) in den iMSCs gemessen. Hierfür

wurden nach jeder Passage pro Probe $5 \cdot 10^4$ Zellen in jeweils 2 Wells einer 12-Well-Platte eingesät, 48 h lang in hPL5-Medium kultiviert und anschließend die SA- β -Gal Aktivität mithilfe des Senescence Assay Kits (Abcam, Cambridge, UK) nach Herstellerangaben gemessen. Dabei wird durch die SA- β -Gal Aktivität ein Substrat zu einem fluoreszenten Farbstoff umgesetzt, welcher in den Zellen mittels Durchflusszytometrie detektiert werden kann. Für die Durchführung wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 0,5 ml hPL5-Medium + 1,5 μ l Seneszenz-Dye im Inkubator inkubiert. Als Negativkontrolle (KO) wurde ein Well mit 0,5 ml hPL5-Medium inkubiert. Nach 45 min wurden mit dem Fluoreszenz-Mikroskop (Axio Observer.Z1 Mikroskop und AxioVision 4.8.2 Software, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) Aufnahmen beider Wells angefertigt. Nach 1 h wurden beide Wells zweimal mit Wash Buffer (im Kit enthalten) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit je 200 μ l/Well TrypLE Express (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 5 min bei 37 °C von der Zellkulturplatte gelöst und mit 300 μ l hPL5-Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein FACS-Tube überführt und abzentrifugiert (300 x g, 3 min). Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 200 μ l FACS-Puffer resuspendiert. Daraufhin wurde die Durchflusszytometrie mit dem Guava EasyCyte 6HT-2L Durchflusszytometer (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) durchgeführt. Die Auswertung geschah mittels der Guava Soft Software (guava InCyte, Merck- Millipore, USA).

2.9 Durchflusszytometrie

2.9.1 Expression von iPSC- und MSC-Oberflächenmarkern

Zur Analyse der Expression wichtiger iPSC- und MSC-Oberflächenmarker während der iMSC-Differenzierung wurden die Zellen nach jeder Passage mit spezifischen Antikörpern gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Dazu wurden pro Zellkulturflasche $4 \cdot 10^5$ Zellen (8 Proben à $5 \cdot 10^4$ Zellen) in ein FACS-Tube überführt, abzentrifugiert (300 x g, 3 min), mit 160 μ l (8 x 20 μ l) FACS-Puffer + 10 % Gamunex resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 240 μ l (8 x 30 μ l) FACS-Puffer hinzugegeben, gemischt und je 50 μ l Zellsuspension in 8 Wells einer 96-U-Bottom-Zellkulturplatte

gegeben. Daraufhin wurden die jeweiligen Antikörper pipettiert (Volumen siehe Tabelle 4) und die Zellen im Dunkeln 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 150 µl/Well eiskalter FACS-Puffer hinzugefügt, die Zellkulturplatte abzentrifugiert (350 x g, 5 min), der Überstand ausgeschlagen und die Zellen erneut mit 200 µl/Well FACS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellpellets in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert und in FACS-Tubes überführt. Die Proben wurden daraufhin sofort mithilfe des Guava EasyCyte 6HT-2L Durchflusszytometers (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) analysiert. Die Auswertung erfolgte mithilfe der Guava Soft Software (guava InCyte, Merck-Milipore, USA).

Tabelle 4: Liste der verwendeten Antikörper; * Biolegend, **Miltenyi, *** BD Bioscience

Probennr.	Antikörper PE	Menge [µl]	Antikörper APC	Menge [µl]
1	Ungefärbt (KO)	-	Ungefärbt (KO)	-
2	Tra-1-60 (REA)	5**/1**	CD90 (IgG1)	5*
3	Tra-1-81 (REA)	5**/1**	CD73 (IgG1)	5*
4	SSEA4 (REA)	5**	CD105 (IgG1)	5*
5	CD44 (IgG1)	20*/5*	CD324 (IgG1)	5*
6	CD29 (IgG1)	20*/5*	CD326 (IgG2a*, IgG1**)	5*/1**
7	REA-PE	5**	IgG2a-APC	5*
8	IgG1-PE	5***	IgG1-APC	5*

2.10 Analyse der Genexpression

2.10.1 RNA-Extraktion

Um den Fortschritt der Differenzierung der iMSCs auf Genebene zu überprüfen, wurden am Ende jeder Passage Zellen für die RNA-Extraktion gewonnen. Hierfür wurden aus jeder Zellkulturflasche $5 \cdot 10^5$ Zellen entnommen und in ein 1,5 ml Eppendorf-Tube gegeben. Das Medium wurde abzentrifugiert (300 x g, 3 min), der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 350 µl RA1-Puffer und 7 µl 1M TCEP oder 7 µl 1M DTT (Dithiothreitol, Sigma Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) resuspendiert und bei -80 °C eingefroren. Dieses Verfahren wurde ebenso für iPSCs Proben als auch für Proben für den Mineralisierungsnachweis (OB und KO) verwendet. Die RNA-Extraktion wurde

mit dem NucleoSpin RNA Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) nach Gebrauchsanweisung durchgeführt.

Zuerst wurden die Proben auf Eis aufgetaut. Zell-Lysate von Proben der osteogenen Differenzierung (KO und OB) wurden jeweils komplett auf ein violettes Säulchen gegeben und zentrifugiert. Ab hier wurde mit allen Proben gleich verfahren. Den Proben wurden 350 µl EtOH (70 %ig) zugefügt. Um durch Scherung der DNA eine erhöhte RNA-Ausbeute zu erlangen, wurde das Zelllysate mehrmals auf- und ab pipettiert. Das Zelllysate wurde komplett auf ein blaues NucleoSpin RNA Säulchen gegeben, zentrifugiert (11.000 x g, 30 s) und das Säulchen in ein neues Tube überführt. Um die Membran zu entsalzen, wurden daraufhin 350 µl MDB-Puffer (im Kit enthalten) auf die Membran gegeben. Nach der Zentrifugation (11.000 x g, 30 s) wurde der Durchfluss verworfen. Für den DNA-Verdau wurden 95 µl rDNase Reaktionsmix (frisch angesetzt) hinzugegeben und für 20 min inkubiert. Weiter ging es mit der Waschung der RNA. Hierfür wurde mit 200 µl RAW2-Puffer (im Kit enthalten) für 2 min inkubiert und danach zentrifugiert (11.000 x g, 30 s). Das Säulchen wurde abermals in ein frisches Tube überführt. Dann wurden 600 µl RA3-Puffer (im Kit enthalten) hinzugegeben und zentrifugiert (11.000 x g, 30 s), der Durchfluss wurde verworfen und erneut mit 250 µl RA3-Puffer gewaschen. Durch eine Zentrifugation (11.000 x g, 2 min) wurde das Säulchen getrocknet und in ein neues Eppendorf-Tube überführt. Anschließend wurde die RNA mit 40 µl RNase-freiem Wasser (im Kit enthalten) eluiert.

Um die Konzentration der Probe zu messen, wurde für jede Probe eine Working Solution mit dem Qubit RNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) vorbereitet. Diese setzte sich aus 199 µl RNA-Puffer (Qubit RNA BR Buffer) und 1 µl RNA-Reagent (Qubit RNA BR) zusammen. 199 µl Working Solution wurden mit 1 µl RNA-Probe gemischt und die Konzentration mit dem Qubit-Fluorimeter (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) gemessen. Die Proben wurden bis zur cDNA-Synthese bei -80 °C gelagert.

2.10.2 Synthese der cDNA

Um die Genexpressionsanalysen durchführen zu können, muss die aus den Zellen gewonnene RNA zunächst in cDNA (engl. complementary DNA)

umgeschrieben werden. Das benötigte Volumen für 500 ng RNA wurde mit der folgenden Formel ermittelt.

$$\frac{500 \text{ ng}}{\text{Konzentration } C \left[\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \right]} = \text{benötigtes Volumen } V \text{ } [\mu\text{l}]$$

Wenn das benötigte Volumen V über 14 μl lag, wurde mit einer RNA-Menge von 100 ng gerechnet.

$$\frac{100 \text{ ng}}{\text{Konzentration } C \left[\frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \right]} = \text{benötigtes Volumen } V \text{ } [\mu\text{l}]$$

Bei einer RNA-Konzentration über 100 ng/ μl musste die cDNA nach der Synthese verdünnt werden. Bei einer Konzentration bis 100 ng/ μl wurde sie nicht verdünnt.

Für die cDNA-Synthese wurde mit dem SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) nach Gebrauchsanweisung verfahren. Für eine Probe wurden zuerst 4 μl 5X VILO Reaction Mix (im Kit enthalten) mit 2 μl 10X SuperScript Enzyme Mix (im Kit enthalten) vorgelegt, dann wurde die RNA-Probe im berechneten Volumen dazugegeben. Zuletzt wurde das Volumen mit PCR-grade H₂O (Roche Light Cycler Fast Start DNA Master SYBR Green N, Roche Deutschland Holding GmbH) auf insgesamt 20 μl aufgefüllt. Anschließend wurde die cDNA im Thermocycler (Mastercycler personal, Eppendorf, Deutschland) synthetisiert (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Thermocycler Programm für die cDNA-Synthese

Temperatur	Zeit
25 °C	10 min
42 °C	60 min
85 °C	5 min
4 °C	hold

Nach Beendigung des Programms wurde die Probe entweder mit PCR-grade H₂O verdünnt (RNA-Mengen > 100 ng) oder sofort bei -20 °C gelagert.

2.10.3 Analyse der Genexpression mittels quantitativer PCR

Bei der quantitativen PCR (qPCR) wird während der PCR die Quantität der vervielfältigten DNA gemessen. Dies wird mit dem Fluoreszenz-Farbstoff SYBR

Green (Roche Deutschland Holding GmbH) erreicht, welcher sich an die vervielfältigte doppelsträngige DNA anlagert. Durch die Messung der Fluoreszenz kann in jedem Zyklus die Quantität der DNA aufgezeichnet werden. Aufgrund der, für die zu untersuchenden Gene spezifisch ausgewählten Primer, kann die Quantität einzelner, in cDNA umgeschriebener, Transkripte gemessen und somit die Expression einzelner Gene ermittelt werden.

Für die qPCR wurde ein LightCycler 1.5 (Roche, Deutschland Holding GmbH), sowie LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche, Deutschland Holding GmbH), LightCycler Kapillaren (Roche, Deutschland Holding GmbH), und kommerzielle Primerkits der Firma SearchLC (Heidelberg, Deutschland) (siehe Tabelle 9) verwendet. Zur Herstellung der GAPDH(Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase)-Standards wurde GAPDH-cDNA mit bekannter Kopienzahl und für die Verdünnungsreihe Standard Stabilizer aus dem GAPDH Primerkit (SearchLC, Heidelberg, Deutschland) verwendet (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6: PCR-Mix der GAPDH-Standards.

PCR-Mix Standards	
H ₂ O (PCR-grade)	6 µl
Primer (GAPDH)	2 µl
SybrGreen Fast Mix	2 µl
Standardmix Gesamt	10 µl
Standard 1	10 µl
Standard 2 (1:10)	
Standard 3 (1:100)	
Standard 4 (1:1000)	
Standard 5 (H ₂ O)	

Die PCR-Proben wurden wie in Tabelle 7 vorbereitet, in LightCycler Glaskapillaren pipettiert und 1 min bei 3000 rpm zentrifugiert.

Tabelle 7: PCR-Mix für Proben

PCR-Mix Proben	
H ₂ O (PCR-grade)	14 µl
Primer Zielgen	2 µl
SybrGreen Fast Mix	2 µl
cDNA	2 µl

Es wurde eine „touchdown“ PCR mit 40 Zyklen durchgeführt, bei der die Annealingtemperatur in jedem Zyklus um 0,5 °C, von 68 °C auf 58 °C gesenkt wurde (siehe Tabelle 8). Die spezifische Bindung der Primer wurde durch eine Schmelzkurvenanalyse überprüft.

Tabelle 8: qPCR-Programm

PCR-Programm			
Phase	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
Denaturierung	95 °C	60s	
Denaturierung	95 °C	10s	} x 40
Annealing	68-58 °C -0,5 °C/Zyklus	10s	
Elongation	72 °C	16s	
Schmelzkurve			
Denaturierung	95 °C	0s	
Annealing	58 °C	10s	
Denaturierung	95 °C	10s	
Programmende	40 °C		

Die verwendeten Primer sind in Tabelle 9 aufgelistet.

Tabelle 9: Verwendete Primer (SearchLC, Heidelberg, Deutschland)

Primer
GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase)
ALP (Alkalische Phosphatase)
OCN (Osteocalcin)
RUNX2 (Runt-related transcription factor)
OCT4 (Oktamer-bindender Transkriptionsfaktor)
NANOG
CD44
CD73 (5´- Nukleotidase)
TERT (Telomerase Reverse Transkriptase)
P16 ^{INK4a} (CDK-Inhibitor 2A)
P21 ^{Cip1} (CDK-Inhibitor 1)

Das konstitutiv exprimierte Haushaltsgen GAPDH (SearchLC, Heidelberg, Deutschland) wird in allen Zellen vergleichbar exprimiert, weshalb es bei allen Proben als Referenzgen ebenfalls quantifiziert wurde. Hierfür wurde die Kopienzahl der GAPDH-Transkripte anhand einer Standardreihe (siehe Tabelle

6) bestimmt und die Kopienzahl des Zielgens im Verhältnis zur GAPDH-Expression der Probe angegeben.

2.10.4 Bestimmung der Anzahl der CD105⁺-Zellen

Der CD105 Oberflächenmarker wird von allen MSCs exprimiert. Bei der iMSC-Differenzierung diente dieser Marker der Bestimmung der Anzahl bereits differenzierter Zellen und dadurch der genaueren Steuerung der Zelldichte, insbesondere in frühen Passagen.

Dazu wurden in Duplikaten je $5 \cdot 10^4$ Zellen in FACS-Tubes überführt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (300 x g, 3 min), der Überstand abgesaugt, die Zellen in 50 µl FACS-Puffer (siehe Tabelle 3) + 4 % Gamunex (Grifols Deutschland GmbH, Frankfurt, Deutschland) resuspendiert und 5 µl der anti-CD105-APC Antikörper (siehe Tabelle 4) zugesetzt. Als Kontrolle wurde eine ungefärbte Probe verwendet. Nach einer Inkubationszeit von 15 min auf Eis, wurden beiden Proben zweimal mit je 200 µl FACS-Puffer gewaschen. Die Proben wurden abzentrifugiert (300 x g, 3 min), das Zellpellet in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert und die Probe sofort mit dem Guava EasyCyte 6HT-2L Durchflusszytometer (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) analysiert. Die Auswertung geschah mithilfe der Guava Soft Software (guava InCyte, Merck-Milipore, USA). Für die Berechnung der Anzahl der CD105⁺-Zellen wurde, anhand der Negativkontrolle, ein Gate mit CD105⁺-Zellen definiert und der Anteil [%] der CD105⁺-Zellen bestimmt. Davon wurde der Wert der Negativkontrolle subtrahiert. Für die Berechnung wurde die, durch die Zellzählung (siehe Abschnitt 2.6) erhaltenen, Zellzahlen mit dem Anteil der CD105⁺-Zellen multipliziert.

2.11 Statistik

Für die Auswertung der Oberflächenmarkerexpression wurden die Mittelwerte \pm Standardabweichung der MFIs (Median Fluoreszenz Index) und der Anteile positiver Zellen berechnet und mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) und Tukey-Test verglichen.

Zur Auswertung der SA- β -Gal-Expression wurden die Mittelwerte \pm Standardabweichung der MFIs (Median Fluoreszenz Index) berechnet und mittels einfaktorieller ANOVA und Tukey-Test verglichen.

Die Genexpressionsdaten der iMSC-Differenzierung wurden auf das Haushaltsgen GAPDH normiert. Induktionswerte wurden durch Normierung auf die Genexpressionswerte der iPSCs berechnet. Mittelwerte von Expressions- und Induktionswerten \pm Standardabweichung wurden mittels einfaktorieller ANOVA und Tukey-Test verglichen.

Die Genexpression der osteogen stimulierten iMSCs wurden ebenfalls auf das Haushaltsgen GAPDH normiert und die Mittelwerte \pm Standardabweichung mittels zweifaktorieller ANOVA und Tukey-Test verglichen.

Für die Auswertung der Daten der Alizarinquantifizierung wurden die Mittelwerte \pm Standardabweichung der Kalziumkonzentrationen berechnet und mittels zweifaktorieller ANOVA und Tukey-Test verglichen.

Für die statistische Auswertung wurden die Software GraphPad Prism 8.3.0 verwendet. Ein p-Wert von $\leq 0,05$ wurde als signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

In früheren Arbeiten zur Differenzierung von iMSCs wurden vermehrt seneszente Zellen beobachtet, welche vermutlich durch Stress während der Differenzierung entstanden. Daher wurde in dieser Arbeit eine schonendere Methode zur Initiierung der mesenchymalen Differenzierung durch Ablösen der Zellen mittels Zellschaber (Scraper-Methode), anstatt der Vereinzelung der Zellen mittels Accutase, angewendet. Um eine höhere Differenzierungseffizienz zu erreichen, wurden die iMSCs zudem mit dem TGF- β Inhibitor SB431542 (SB) inkubiert. Um die Wirksamkeit von SB zu testen, wurden iMSCs in P0 über 10 Tage +/- SB differenziert. Anschließend wurde die Expression von MSC-Markern, die osteogene Differenzierung, sowie die Expression von Seneszenz-Markern in verschiedenen Passagen verglichen.

3.1 Morphologie differenzierender Zellen +/- SB

Die morphologischen Unterschiede der Zellen während der Differenzierung in P0 +/- SB wurden mikroskopisch dokumentiert. Die typische Morphologie der iPSC-Kolonien vor dem Ablösen (siehe Abbildung 3, d0) zeigte dicht gepackte Zellen mit klar abgegrenzten Kolonierändern. An d0 wurden die Zellen mithilfe eines Zellschabers abgelöst und in eine VTN-beschichtete Zellkulturflasche überführt (Scraper-Methode). Durch das schonende mechanische Ablösen mittels Zellschaber hafteten die Zellen in kleinen Kolonien am Zellkulturflaschenboden an (siehe Abbildung 2, links).

In manchen Fällen wurde beobachtet, dass nur wenige iPSC-Kolonien nach dem Ausplattieren in P0 an der Zellkulturflasche hafteten und sich stattdessen große schwimmende Zellkonglomerate bildeten (siehe Abbildung 2, rechts). Diese wurden an d2 beim Medienwechsel entfernt. Die Entstehung dieser Konglomerate könnte durch eine unzureichende Vereinzelung der iPSCs durch die Scraper-Methode zu erklären sein, da kleinere Kolonien in der Regel weniger zur Bildung von Sphäroiden neigen.

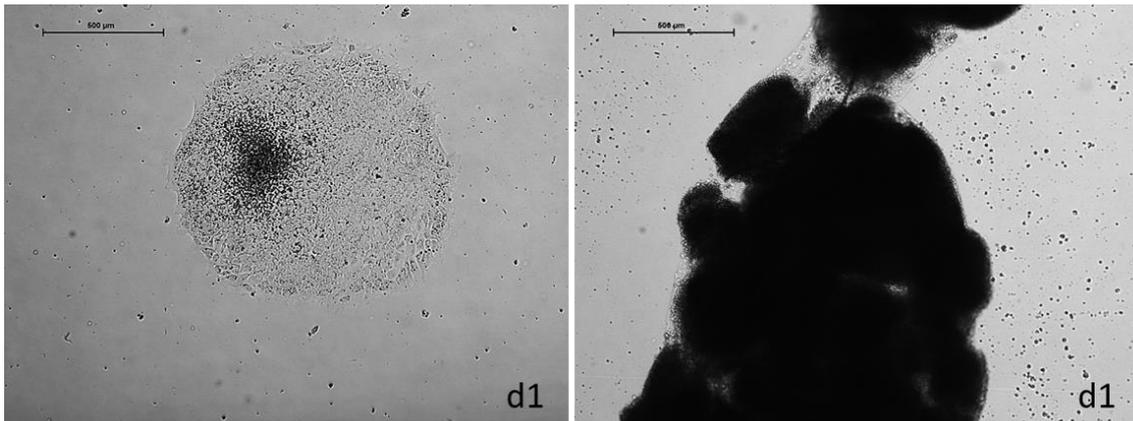


Abbildung 2: Zellkonglomerat nach dem Passagieren von iPSCs mittels Zellschaber. Repräsentative Hellfeldaufnahmen (4x Vergrößerung, Maßstabsbalken = 500 µm) von iPSCs an d1 (P0). Links: Die Konglomerate adhären, Rechts: die Konglomerate adhären nicht an der Zellkulturflasche und schwimmen im Zellkulturmedium.

An d1 (siehe Abbildung 3) zeigten sich bei den -SB Proben abgerundete Kolonien, wobei die Zellen aufgelockert erschienen, auseinanderstrebten und eine pflastersteinartige Morphologie ohne klar begrenzte Ränder hatten. An d3 (siehe Abbildung 3) zeigten die Kolonien, ausgehend vom eng gepackten Zentrum, eine Zellschicht mit kugelig abgerundeten Zellen. Begrenzt wurden die Kolonien durch einen verdichteten Bereich spindelförmiger Zellen. An d5 (siehe Abbildung 3) zeigten sich, ausgehend von der Verdichtung, spindelförmige Zellen, die zirkulär um die Kolonien wuchsen. An d7 (siehe Abbildung 3) verlor sich bei vielen Kolonien die bisherige Struktur und die meisten Zellen zeigten eine spindelförmige Morphologie. An d10 (siehe Abbildung 3) zeigte die Mehrheit der Zellen eine MSC-artige, spindelförmige Morphologie. Die Zellen wurden an d10 passagiert.

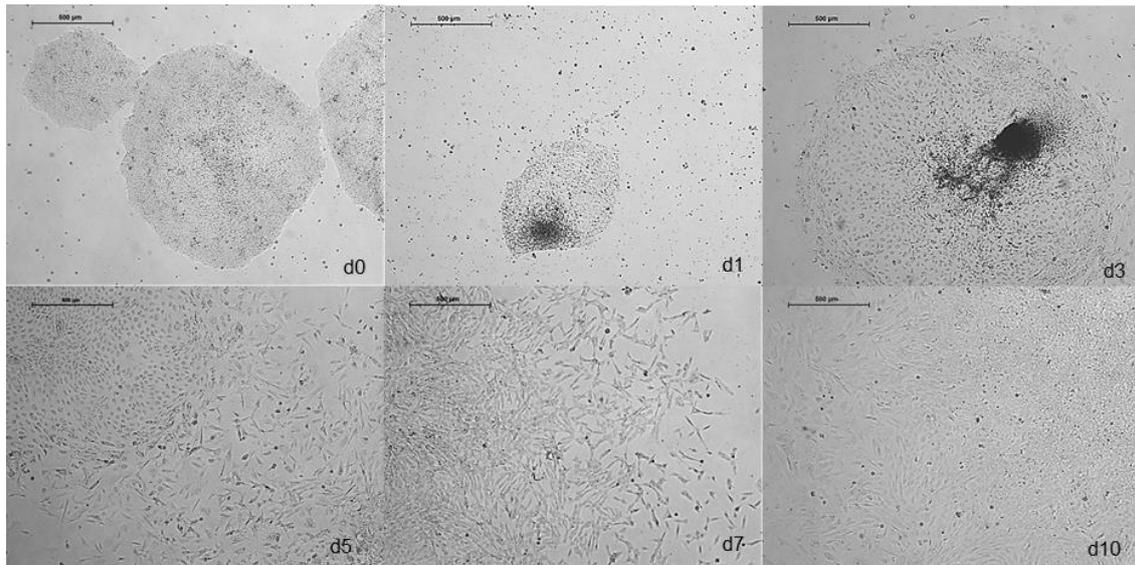


Abbildung 3: Morphologie während der iMSC-Differenzierung ohne SB (-SB). Repräsentative Hellfeldaufnahmen (4x Vergrößerung, Maßstabsbalken = 500 µm) von undifferenzierten iPSCs an d0 und differenzierenden Zellen an verschiedenen Tagen (d1, d3, d5, d7 und d10) der mesenchymalen Differenzierung (P0)

+SB Zellen zeigten, ausgehend von den mechanisch gelösten iPSCs in P0 bis d3, eine ähnliche Morphologie wie die -SB Zellen (siehe Abbildung 4). Bei der Differenzierung +SB entstanden jedoch bereits ab d3 mehr spindelförmige Zellen im Vergleich zu den Zellen -SB. Auch bildeten die Kolonien oftmals keinen verdichteten wallförmigen Rand, sondern einen fließenden Übergang von abgerundeten zu spindelförmigen Zellen. An d5 (siehe Abbildung 4) zeigten bereits deutlich mehr Zellen eine MSC-ähnliche Morphologie im Vergleich zur Differenzierung -SB. Verglichen mit -SB Zellen waren +SB Zellen an d5 kompakter und an ihren Enden spitziger, sowie an d10 kleiner (siehe Abbildung 4).

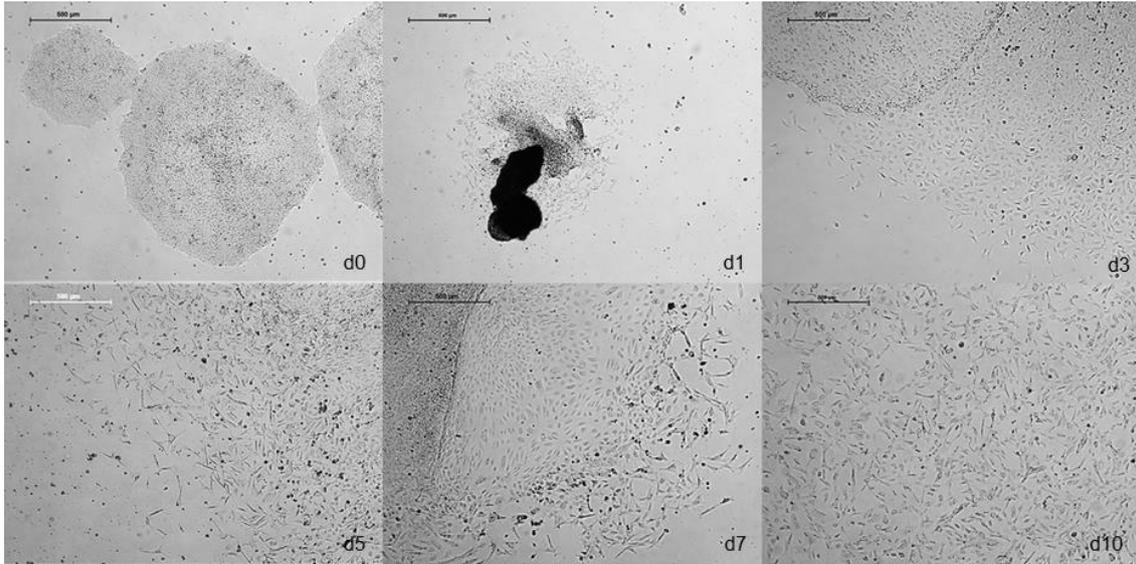


Abbildung 4: Morphologie während der iMSC-Differenzierung mit SB (+SB). Repräsentative Hellfeldaufnahmen (4x Vergrößerung, Maßstabsbalken = 500 µm) von undifferenzierten iPSCs an d0 und differenzierenden Zellen an verschiedenen Tagen (d1, d3, d5, d7 und d10) der mesenchymalen Differenzierung (P0)

Bei der Differenzierung +SB konnte ab d5 beobachtet werden, dass bereits differenzierte Zellen mit spindelförmiger Morphologie abstarben und sich ihre Anzahl verringerte. Dies zeigte sich zum einen durch ein Abkugeln und Ablösen der Zellen aus dem Zellverband, sowie vieler toter Zellen im Medium (siehe Abbildung 4; d5 und d7). Zum anderen rollten sich die Kolonieränder auf und es wuchsen keine differenzierten Zellen mehr heraus (siehe Abbildung 5).

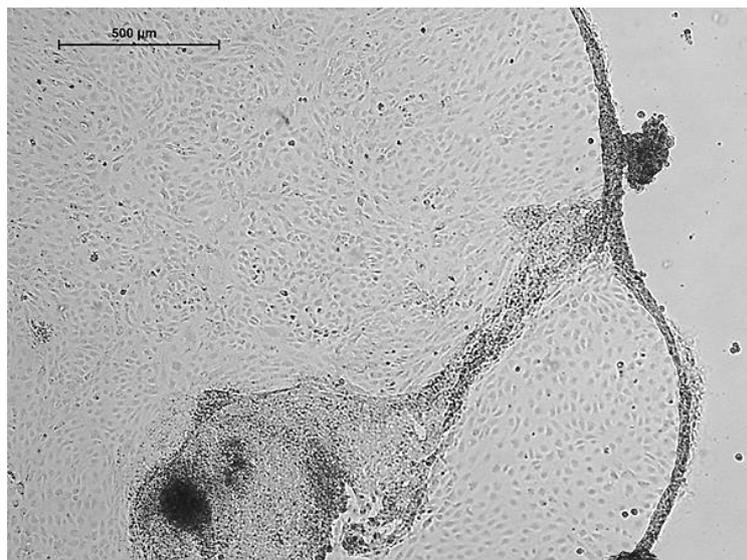


Abbildung 5: Einrollen von Kolonierändern +SB Zellen. Repräsentative Hellfeldaufnahme (4x Vergrößerung, Maßstabsbalken = 500 µm) von differenzierenden +SB Zellen an d5 (P0). Zellsterben ausgehend vom Zellkolonierand.

Auch zeigten Kolonien ein, vom Inneren der Kolonie ausgehendes, Zellsterben (siehe Abbildung 6).

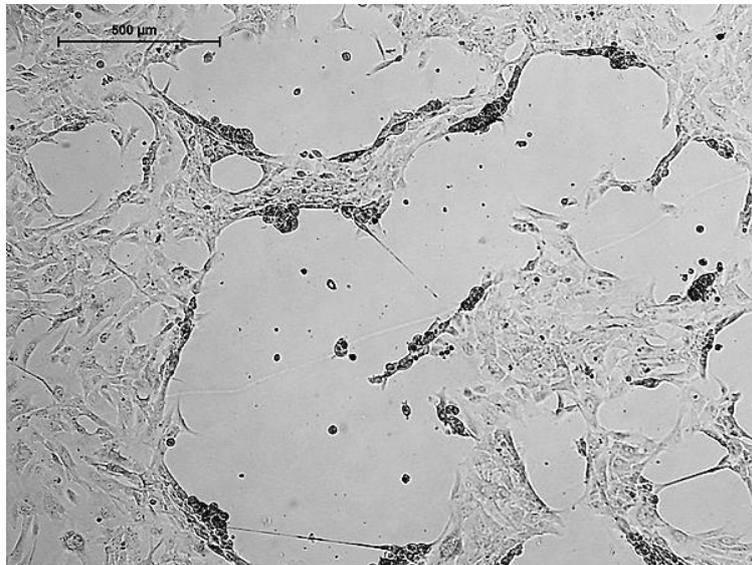


Abbildung 6: Einrollen von Zelllayer bei +SB Zellen. Repräsentative Hellfeldaufnahme (4x Vergrößerung, Maßstabsbalken = 500 μm) von differenzierenden +SB Zellen d10 (P0). Zellsterben ausgehend vom Inneren der Zellkolonie.

Das in P0 der +SB Zellen beobachtete Absterben spindelförmiger Zellen konnte in späteren Passagen nach Beendigung der SB-Gabe nicht mehr beobachtet werden. Daher ist davon auszugehen, dass das Absterben der Zellen eine direkte Folge der SB-Gabe ist.

Nachdem die iMSCs zehn Tage mit +/-SB in P0 kultiviert wurden, wurden die Zellen passagiert. Dabei wurden die Zellen in unbeschichtete Flaschen überführt, um differenzierte Zellen anhand ihrer Plastikadhärenz zu selektieren. Da die Zelldichte bei der Differenzierung ein kritischer Faktor ist, wurde die Anzahl differenzierter Zellen anhand der CD105-Expression bestimmt und pro Flasche $5 \cdot 10^5$ CD105⁺-Zellen eingesät. Dadurch konnten unterschiedliche Differenzierungsgrade der Kulturen, welche u.a. durch unterschiedliche Koloniegrößen in P0 unvermeidbar sind, relativ gut ausgeglichen werden.

In den weiteren Passagen wurde kein SB mehr hinzugegeben. Die Zellen zeigten ab P1 eine MSC-typische spindelförmige Morphologie, welche in P2 und P3 für +SB und -SB differenzierte Zellen keine visuellen Unterschiede aufwies (siehe Abbildung 7).

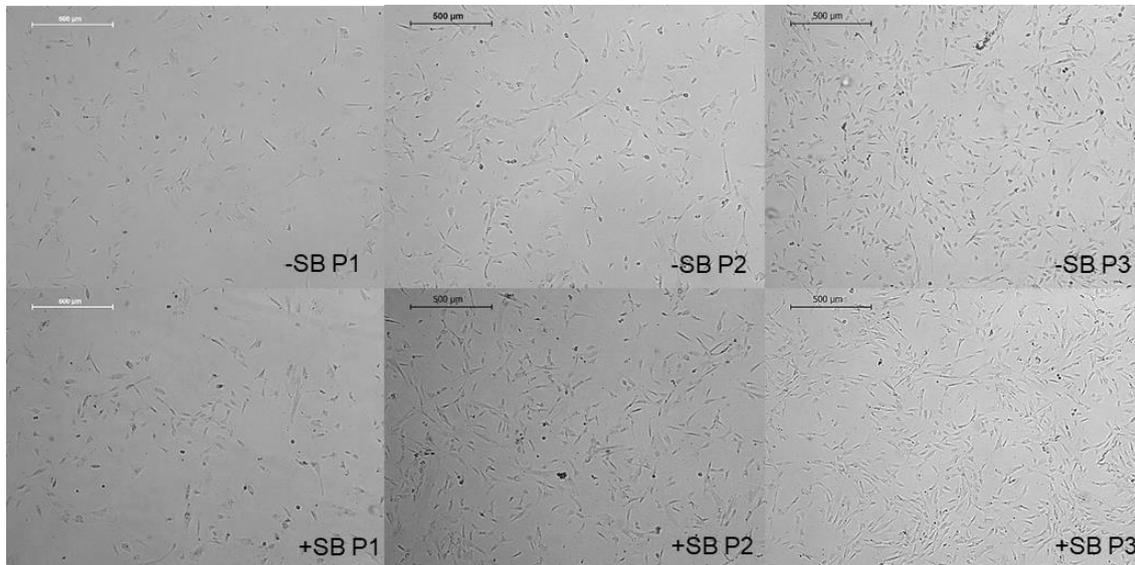


Abbildung 7: Morphologie während der iMSC-Differenzierung +/- SB im Vergleich. Repräsentative Hellfeldaufnahmen (4x Vergrößerung, Maßstabsbalken = 500 µm) von differenzierenden Zellen an d3 der mesenchymalen Differenzierung (P1-3).

3.2 Expression von Oberflächenmarkern während der iMSC-Differenzierung

Zur Untersuchung der Differenzierungseffizienz +/- SB wurde die Expression von spezifischen iPSC- und MSC-Oberflächenmarkern mittels Durchflusszytometrie untersucht. Um einen zeitlichen Verlauf der Differenzierung zu untersuchen, wurden die Zellen jeweils am Ende der vier aufeinanderfolgenden Passagen P0 - P3 analysiert. Dabei wurde einerseits die Fluoreszenzintensität (Median Fluoreszenz Index, MFI) und andererseits der, mithilfe der Isotypenkontrollen definierte, Anteil positiv gefärbter Zellen analysiert.

Der CD105 (Endoglin) Oberflächenmarker wird in allen MSCs exprimiert.

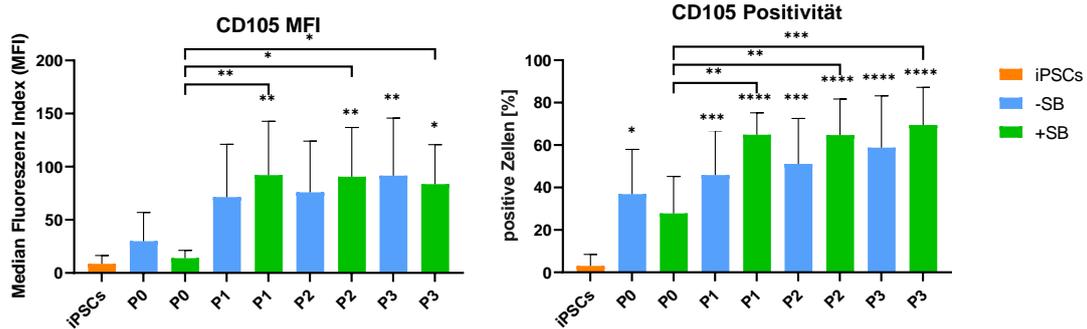


Abbildung 8 : CD105 Expression von iPSCs und iMSCs. Median Fluoreszenz Index (MFI) Werte, sowie prozentuale Anteile CD105 positiver Zellen von iPSCs (orange) und -SB (blau) sowie +SB (grün) differenzierter iMSCs verschiedener Passagen. Mittelwerte der Anteile CD105 positiver Zellen und der MFIs wurden mittels one-way ANOVA verglichen ($n \geq 7$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; Sternchen ohne Balken beziehen sich auf die Werte der iPSCs).

Die Durchflusszytometrie zeigt eine sehr geringe CD105-Expression der iPSCs, welche während der iMSC-Differenzierung +/- SB deutlich induziert wird (siehe Abbildung 8). Die MFI-Werte zeigen gegenüber den iPSCs ($8,52 \pm 7,96$) eine signifikante Steigerung differenzierender +SB Zellen in P1 ($92,11 \pm 50,56$; $p < 0,01$), +SB Zellen in P2 ($90,65 \pm 46,34$; $p < 0,01$), -SB Zellen in P3 ($91,64 \pm 54,08$; $p < 0,01$) und +SB Zellen in P3 ($83,61 \pm 37,10$; $p < 0,05$). Während der Differenzierung -SB, zeigen die Zellen über die Passagen hinweg eine stetig steigende Expression von CD105 von $29,99 \pm 26,99$ in P0 auf $91,64 \pm 54,08$ in P3. Im Gegensatz dazu ist die CD105-Expression bei der Differenzierung +SB ab P1 nahezu konstant mit signifikanten Steigerungen gegenüber den iPSCs von P0 ($13,87 \pm 7,36$) nach P1 ($92,11 \pm 50,56$; $p < 0,01$), von P0 nach P2 ($90,65 \pm 46,34$; $p < 0,05$) und von P0 nach P3 ($83,61 \pm 37,10$; $p < 0,05$). Vergleicht man die MFI-Werte von Zellen -SB und +SB innerhalb einer Passage, zeigt sich für +SB ein früheres Erreichen des Expressionsmaximums, jedoch ohne statistische Signifikanz.

Der Anteil CD105 positiver Zellen zeigt während der Differenzierung einen ähnlichen Verlauf wie die MFI-Werte. Die iPSCs zeigen bei der Messung der CD105 positiven Zellen mit $3,08 \pm 5,36$ % eine sehr geringe Expression. In den differenzierenden Zellen ist der Anteil positiver -SB Zellen hierzu signifikant gesteigert in P0 ($36,86 \pm 21,08$ %; $p < 0,05$), in P1 -SB ($45,84 \pm 20,97$ %; $p < 0,001$) und +SB ($64,89 \pm 10,30$ %; $p < 0,0001$), in P2 -SB ($51,11 \pm 21,41$ %; $p < 0,001$) und +SB ($64,73 \pm 17,02$ %; $p < 0,0001$) sowie in P3 für -SB ($58,82 \pm$

24,42 %) und +SB (69,42 ± 17,83 %; p < 0,0001). Die Zellen -SB zeigen über die Passagen einen kontinuierlichen Anstieg. Die Zellen +SB zeigen einen signifikanten Anstieg von P0 (27,80 ± 17,38 %) nach P1 (64,89 ± 10,30 %; p < 0,01), von P0 nach P2 (64,73 ± 17,02 %; p < 0,01) und von P0 nach P3 (69,42 ± 17,83 %; p < 0,001). Der Anteil positiver Zellen bleibt in P1, P2 und P3 konstant. Vergleicht man -SB und +SB innerhalb einer Passage zeigen auch hier die +SB Zellen ein früheres Erreichen des Expressionsmaximums.

Die 5'-Nukleotidase, repräsentiert durch CD73, ist ein Oberflächenmarker, welcher auf MSCs ebenfalls exprimiert wird.

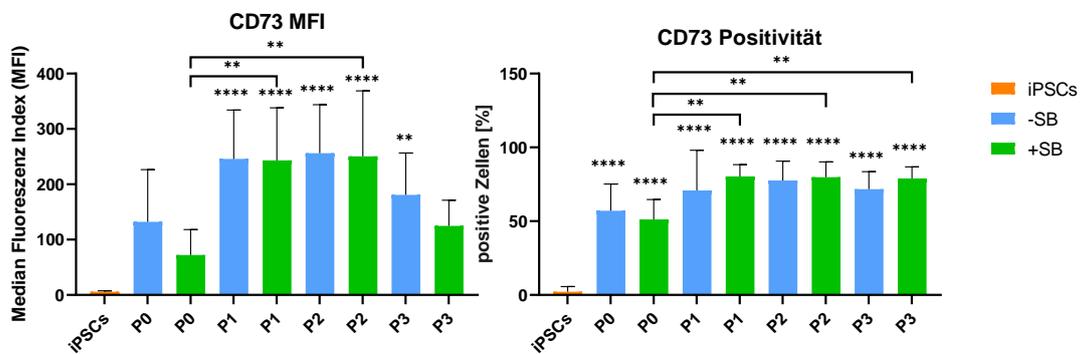


Abbildung 9: CD73 Expression von iPSCs und iMSCs. Median Fluoreszenz Index (MFI) Werte, sowie prozentuale Anteile CD73 positiver Zellen von iPSCs (orange) und -SB (blau) sowie +SB (grün) differenzierter iMSCs verschiedener Passagen. Mittelwerte der Anteile CD73 positiver Zellen und der MFIs wurden mittels one-way ANOVA verglichen (n ≥ 7, ** p < 0,01, **** p < 0,0001; Sternchen ohne Balken beziehen sich auf die Werte der iPSCs).

Wie erwartet zeigen die MFI-Werte der iPSCs eine geringe Expression von CD73. Eine Zunahme der CD73-Expression während der iMSC-Differenzierung wurde beobachtet (siehe Abbildung 9). Die MFI-Werte zeigen gegenüber iPSCs (5,75 ± 1,78) eine signifikante Expressionssteigerung der differenzierenden -SB (245,80 ± 88,21) und +SB Zellen (243,32 ± 94,84; p < 0,0001) in P1 sowie der -SB (301,08 ± 157,92) und +SB (250,39 ± 118,41; p < 0,0001) Zellen in P2. Die -SB Zellen in P3 zeigen ebenso eine signifikante Steigerung gegenüber den iPSCs (180,78 ± 75,75; p < 0,01). Bei der Differenzierung -SB zeigen die Zellen in P0 eine deutliche Steigerung der CD73-Expression gegenüber den iPSCs von 5,75 ± 1,78 auf 132,05 ± 94,41. Von P0 nach P1 steigert sich der Wert nochmals deutlich auf 245,80 ± 88,21. Von P1 nach P2 erhöht sich die

Expression leicht ($301,08 \pm 157,92$) und sinkt von P2 nach P3 wieder etwas ab auf $180,78 \pm 75,75$.

Bei der Differenzierung +SB zeigen die Zellen von P0 ($72,23 \pm 46,10$) nach P1 ($243,32 \pm 94,84$) eine signifikante Steigerung ($p < 0,01$) der CD73-Expression. Von P1 nach P2 bleibt der Wert ungefähr gleich ($250,39 \pm 118,41$) und sinkt von P2 nach P3 ($124,80 \pm 46,20$) ab. Signifikant ist auch die Steigerung von P0 auf P2 ($p < 0,01$). Vergleicht man die Differenzierung -SB und +SB innerhalb einer Passage, zeigt -SB in P0 und P3 eine höhere Expression, jedoch ohne statistische Signifikanz.

Der Anteil CD73⁺ Zellen ist mit $2,15 \pm 3,54$ % in den iPSCs wie erwartet sehr gering. Dagegen ist der Anteil während der Differenzierung -SB und +SB in allen Passagen signifikant gesteigert ($p < 0,0001$). Die CD73 Expression nimmt von P0 nach P1 weiter zu. In P1, P2 und P3 bleiben die Werte ungefähr gleich hoch. Die Steigerung der Expression ist bei +SB Zellen von P0 ($51,25 \pm 13,49$ %) nach P1 ($80,35 \pm 7,98$ %; $p < 0,01$), von P0 nach P2 ($79,84 \pm 10,40$ %; $p < 0,01$) und von P0 nach P3 ($78,95 \pm 7,84$ %; $p < 0,01$) signifikant. Vergleicht man -SB und +SB Zellen innerhalb einer Passage zeigen +SB Zellen in P1, P2 und P3 eine höher Anzahl an CD73⁺ Zellen als -SB Zellen.

Integrin β -1 (CD29) ist ein Oberflächenprotein und ein Zelladhäsionsmolekül, welches auf MSCs ebenfalls exprimiert wird.

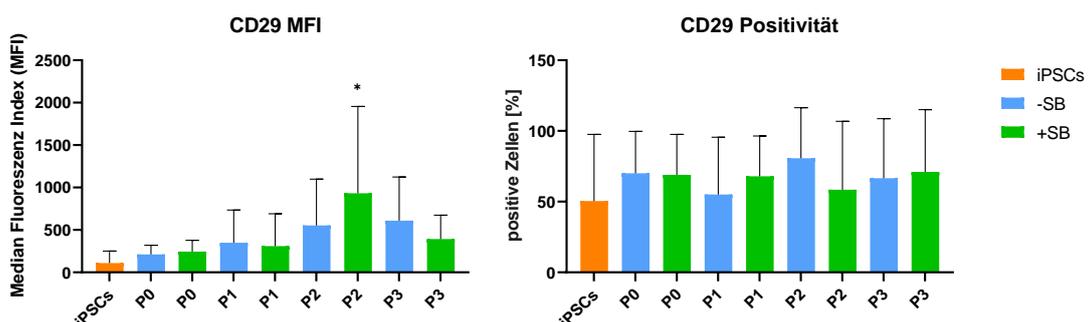


Abbildung 10: CD29 Expression von iPSCs und iMSCs. Median Fluoreszenz Index (MFI) Werte, sowie prozentuale Anteile CD29 positiver Zellen von iPSCs (orange) und -SB (blau) sowie +SB (grün) differenzierter iMSCs verschiedener Passagen. Mittelwerte der Anteile CD29 positiver Zellen und der MFIs wurden mittels one-way ANOVA verglichen ($n \geq 7$, $* p < 0,05$; Sternchen ohne Balken beziehen sich auf die Werte der iPSCs).

Bei der Differenzierung -SB zeigt der MFI für CD29 eine konstante Steigerung bis P3 (siehe Abbildung 10). Die +SB Zellen zeigen von P2 nach P3 einen

Abfall des MFI. Hierbei ist zu bemerken, dass die Expression in P2 (MFI 932,33 \pm 1022,50) verglichen mit derjenigen der iPSCs (MFI 109,68 \pm 142,11) signifikant ($p < 0,05$) höher ist. Jedoch ist eine hohe Standardabweichung zu erkennen, vermutlich durch einen Ausreißer bedingt. Ein signifikanter Unterschied zwischen -SB und +SB konnte nicht errechnet werden.

Die Messung der CD29 positiven Zellen über die Passagen P0 - P3 zeigt für die -SB Zellen einen schwankenden Verlauf, wobei das Expressionsmaximum in P2 (80,75 \pm 35,74 %) erreicht wird. In den iPSCs ist der Wert am geringsten, jedoch mit 50,43 \pm 47,19 % bereits sehr hoch. Der Anteil CD29 positiver +SB Zellen ist mit Werten zwischen 58,40 \pm 48,42 % und 71,12 \pm 44,00 % ab P0 nahezu konstant. Vergleicht man -SB und +SB Zellen innerhalb einer Passage zeigen +SB Zellen in P0, P1 und P3 eine höhere Expression, jedoch ohne statistische Signifikanz.

CD44 ist ein Oberflächenrezeptor für Hyaluronsäure und ist somit für die Bildung von Zellkontakten zuständig. CD44 wird auf MSCs im Normalfall stark exprimiert.

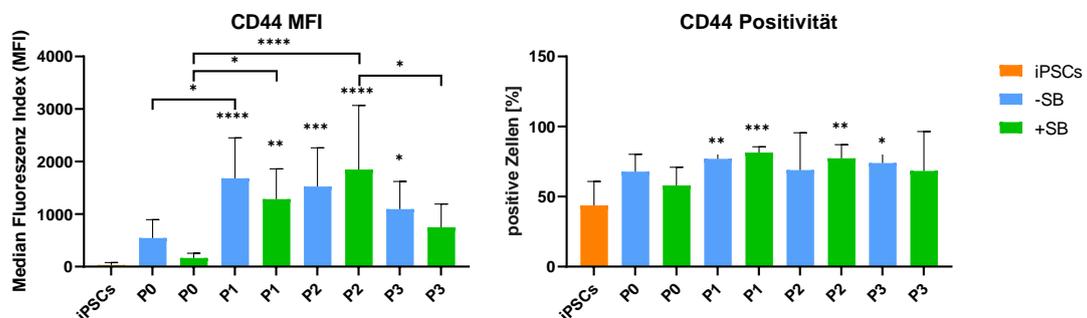


Abbildung 11: CD44 Expression von iPSCs und iMSCs. Median Fluoreszenz Index (MFI) Werte, sowie prozentuale Anteile CD44 positiver Zellen von iPSCs (orange) und -SB (blau) sowie +SB (grün) differenzierter iMSCs verschiedener Passagen. Mittelwerte der Anteile CD44 positiver Zellen und der MFIs wurden mittels one-way ANOVA verglichen ($n \geq 7$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; Sternchen ohne Balken beziehen sich auf die Werte der iPSCs).

Die MFI-Werte der CD44 Expression zeigen wie erwartet eine geringe Expression in den iPSCs (32,29 \pm 46,03) und eine Steigerung der Expression während der iMSC-Differenzierung (siehe Abbildung 11). Die -SB Zellen zeigen von P0 (543,65 \pm 351,52) nach P1 (1680,55 \pm 770,92) einen signifikanten Anstieg ($p < 0,05$) der CD44 Expression, welche von P1 nach P2 (2033,00 \pm

1670,58) nahezu konstant bleibt und in P3 (1093,91 ± 526,65) wieder abfällt. Verglichen mit den iPSCs ist die CD44 Expression in P1 ($p < 0,0001$), in P2 ($p < 0,001$) und P3 ($p < 0,05$) signifikant gesteigert.

Die +SB Zellen zeigen von P0 (164,47 ± 91,34) nach P1 (1284,38 ± 578,92) eine signifikante Steigerung ($p < 0,05$) der CD44 Expression. Die Expression steigt von P1 nach P2 (1848,93 ± 1217,90) nochmals deutlich an und sinkt wieder von P2 nach P3 (747,53 ± 443,03) signifikant ($p < 0,05$). Gegenüber den iPSCs (32,29 ± 46,03) ist die Expression signifikant gesteigert in P1 ($p < 0,01$) und in P2 ($p < 0,001$). Signifikant gesteigert ist auch die Expression von P0 nach P2 ($p < 0,0001$). Vergleicht man -SB und +SB Zellen innerhalb einer Passage, zeigt -SB in P0, P1 und P3 eine höhere Expression als +SB.

Der Anteil positiver Zellen ist wie erwartet bei den iPSCs (43,67 ± 17,18 %) am geringsten. Die Entwicklung der Zellen während der Differenzierung gegenüber den iPSCs zeigt eine signifikante Steigerung in P1 für -SB (76,98 ± 3,64 %; $p < 0,01$) und +SB (81,48 ± 4,11 %; $p < 0,001$) Zellen, als auch in P2 für +SB Zellen (77,32 ± 9,75 %; $p < 0,01$) und in P3 für -SB Zellen (73,98 ± 6,64 %; $p < 0,05$). Die +SB Zellen zeigen in P1 und in P2 gegenüber -SB Zellen eine geringfügig höhere Expression, jedoch ohne statistische Signifikanz.

Thy-1-Membran-Glykoprotein (CD90) ist ein Immunglobulin-Oberflächenrezeptor, der sowohl auf pluripotenten Stammzellen als auch auf MSCs exprimiert wird.

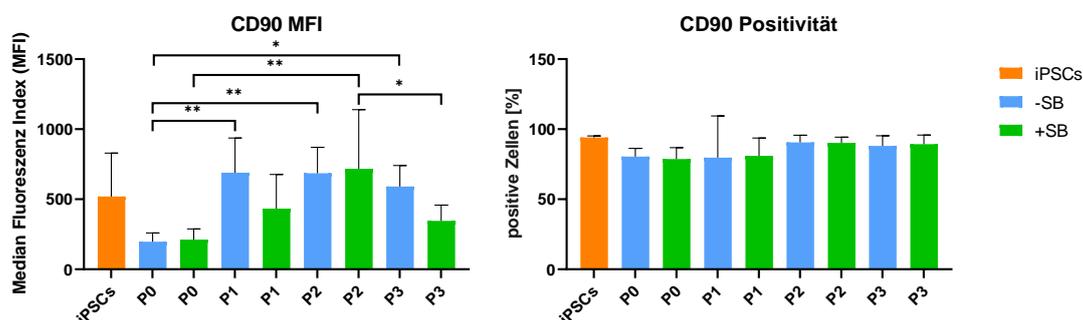


Abbildung 12: CD90 Expression von iPSCs und iMSCs. Median Fluoreszenz Index (MFI) Werte, sowie prozentuale Anteile CD90 positiver Zellen von iPSCs (orange) und -SB (blau) sowie +SB (grün) differenzierter iMSCs verschiedener Passagen. Mittelwerte der Anteile CD90 positiver Zellen und der MFIs wurden mittels one-way ANOVA verglichen ($n \geq 7$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; Sternchen ohne Balken beziehen sich auf die Werte der iPSCs).

Die MFI-Daten zeigen für die iPSCs ($519,46 \pm 309,71$) eine sehr hohe Expression von CD90 (siehe Abbildung 12). Es treten keine signifikanten Unterschiede zwischen den iPSCs und den iMSCs auf. Bei der Differenzierung +/-SB nimmt die CD90 Expression in P0 deutlich ab. Die -SB Zellen zeigen eine starke Zunahme der CD90 Expression von P0 ($196,86 \pm 63,14$) nach P1 ($689,50 \pm 246,89$; $p < 0,01$) welche bis P3 ($590,03 \pm 150,50$) relativ konstant bleibt. Die +SB Zellen zeigen eine langsamere Steigerung der Expression, welche erst in P2 ($716,36 \pm 423,62$) ihr Maximum erreicht und im Vergleich zu P0 ($211,66 \pm 76,81$) signifikant ist ($p < 0,01$). Von P2 nach P3 ($345,10 \pm 113,15$) fällt die Expression signifikant ab ($p < 0,05$). Vergleicht man -SB und +SB zeigt sich eine langsamere Steigerung der CD90 Expression und einen stärkeren Abfall in P3 bei Zellen +SB, jedoch ohne statistische Signifikanz.

Bei der Betrachtung der CD90 positiven Zellen ist dieser Anteil bei den iPSCs und differenzierten Zellen über alle Passagen nahezu konstant. Es gibt keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Der Oberflächenmarker Tra-1-60 (Podocalyxin) wird von pluripotenten Stammzellen exprimiert und ist ein typischer iPSC-Marker.

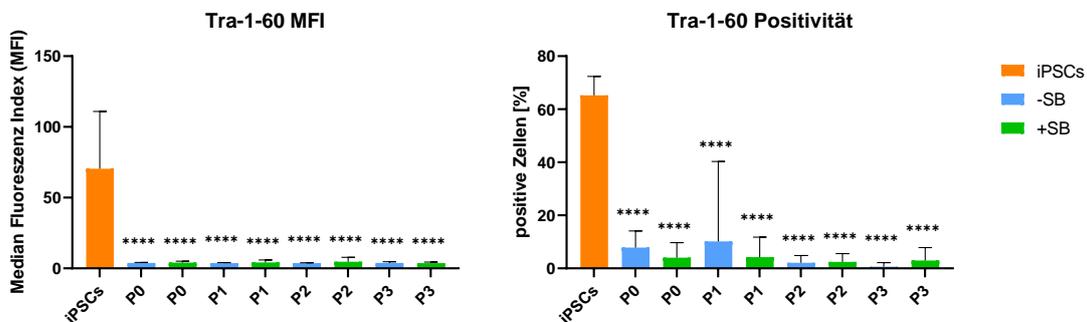


Abbildung 13: Tra-1-60 Expression von iPSCs und iMSCs. Median Fluoreszenz Index (MFI) Werte, sowie prozentuale Anteile Tra-1- positiver Zellen von iPSCs (orange) und -SB (blau) sowie +SB (grün) differenzierter iMSCs verschiedener Passagen. Mittelwerte der Anteile Tra-1-60 positiver Zellen und der MFIs wurden mittels one-way ANOVA verglichen ($n \geq 7$, **** $p < 0,0001$; Sternchen ohne Balken beziehen sich auf die Werte der iPSCs).

Der MFI zeigt eine starke Expression von Tra-1-60 in den iPSCs ($70,45 \pm 40,43$) (siehe Abbildung 13). Ein signifikanter Rückgang ($p < 0,0001$) der Expression ist während der Differenzierung von -SB ($3,82 \pm 0,43$) und +SB Zellen ($4,06 \pm 0,97$) nach P0 zu sehen. Auch ist der Unterschied zu allen

anderen Passagen signifikant ($p < 0,0001$). Während der Differenzierung -SB und +SB bleibt der MFI für Tra-1-60 in allen Passagen konstant auf sehr niedrigen Levels ($3,65 \pm 0,47$ bis $4,66 \pm 3,13$).

Der Anteil Tra-1-60 positiver Zellen beträgt bei den iPSCs $65,20 \pm 7,15$ %. Dieser Wert fällt während der Differenzierung und bleibt in allen späteren Passagen mit Werten zwischen $0,62 \pm 1,55$ % und $10,14 \pm 30,16$ % signifikant ($p < 0,0001$) niedriger. Die -SB Zellen zeigen von P0 ($7,83 \pm 6,27$ %) nach P1 ($10,14 \pm 30,16$ %) einen leichten Anstieg, hierbei zeigt jedoch der Wert für P1 eine auffällig hohe Standardabweichung. Von P1 nach P2 ($2,09 \pm 2,72$ %) und von P2 nach P3 ($0,62 \pm 1,55$ %) sinken die Werte. Die +SB Zellen zeigen ab P0 ($4,04 \pm 5,66$ %) konstant niedrige Expressionswerte zwischen $4,24 \pm 7,51$ % und $2,45 \pm 3,14$ %. Vergleicht man -SB und +SB innerhalb einer Passage zeigen +SB Zellen in allen Passagen geringere Werte als -SB Zellen.

Der Tra-1-81 (Podocalyxin) Oberflächenmarker wird von pluripotenten Stammzellen exprimiert und ist ebenfalls ein typischer iPSC-Marker.

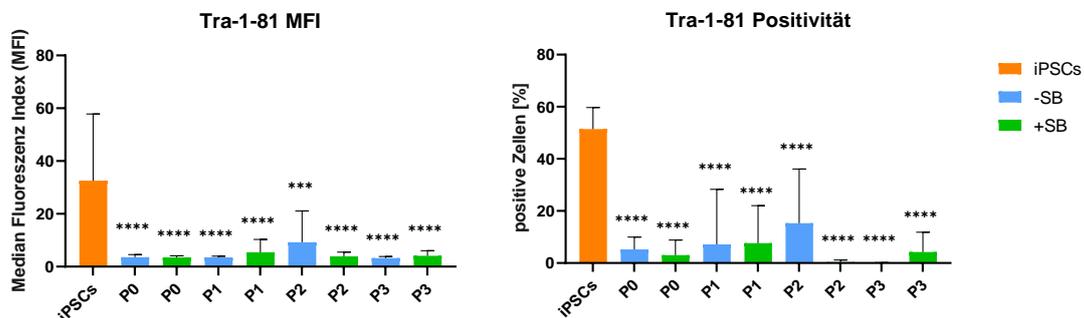


Abbildung 14: Tra-1-81 Expression von iPSCs und iMSCs. Median Fluoreszenz Index (MFI) Werte, sowie prozentuale Anteile Tra-1- positiver Zellen von iPSCs (orange) und -SB (blau) sowie +SB (grün) differenzierter iMSCs verschiedener Passagen. Mittelwerte der Anteile Tra-1-81 positiver Zellen und der MFIs wurden mittels one-way ANOVA verglichen ($n \geq 7$, ** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; Sternchen ohne Balken beziehen sich auf die Werte der iPSCs).

Die Tra-1-81 MFI-Werte zeigen wie erwartet hohe Levels in den iPSCs (siehe Abbildung 14). Diese sind, gegenüber der Levels in den iPSCs ($32,55 \pm 25,29$), während der iMSC-Differenzierung in allen Passagen konstant signifikant niedriger ($p < 0,0001$; Ausnahme P2 -SB $p < 0,001$). Vergleicht man -SB und +SB Zellen innerhalb einer Passage, zeigen lediglich -SB Zellen in P2 eine

etwas höhere Expression ($10,72 \pm 11,97$) und eine höhere Standardabweichung, jedoch ohne statistische Signifikanz.

Der Anteil Tra-1-81 positiver Zellen beträgt in den iPSCs $51,45 \pm 8,26$ %. Der Rückgang der Tra-1-81⁺ Zellen, gegenüber den iPSCs, ist während der iMSC-Differenzierung in allen Passagen signifikant ($p < 0,0001$). Dabei ist der Anteil positiver Zellen, außer in -SB Zellen der P2 ($15,33 \pm 20,80$ %), konstant niedrig ($0,04 \pm 0,10$ % bis $7,61 \pm 14,45$ %). Eine höhere Standardabweichung ist für -SB Zellen in P1 ($7,16 \pm 21,16$ %) und P2 zu erkennen. Vergleicht man -SB und +SB Zellen über die Passagen, zeigen +SB Zellen bis P2 geringere Expressionswerte als -SB Zellen.

E-Cadherin (CD324) ist ein Adhäsionsprotein auf der Zelloberfläche von Epithelzellen, wird aber auch von pluripotenten Stammzellen exprimiert. Da iPSCs während der iMSC-Differenzierung eine epithelial-mesenchymale Transition (EMT) machen, bei der sich die Expression von E-Cadherin ändert, ist CD324 ein interessanter Marker um die iMSC-Differenzierung zu analysieren.

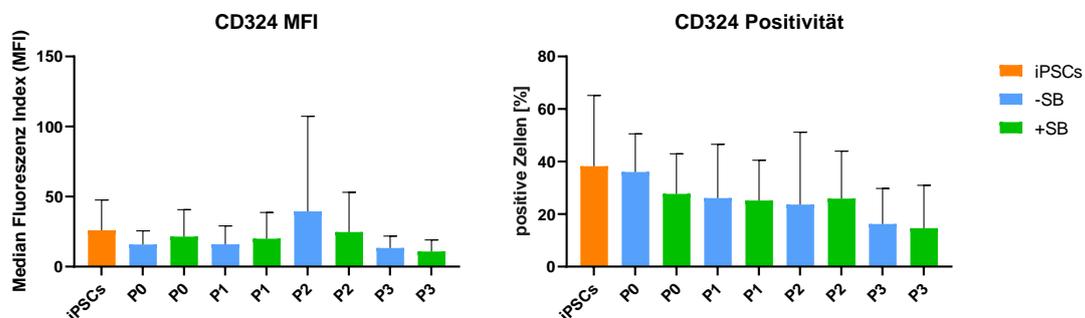


Abbildung 15: CD324 Expression von iPSCs und iMSCs. Median Fluoreszenz Index (MFI) Werte, sowie prozentuale Anteile positiver Zellen von iPSCs (orange) und -SB (blau) sowie +SB (grün) differenzierter iMSCs verschiedener Passagen. Mittelwerte der Anteile CD324 positiver Zellen und der MFIs wurden mittels one-way ANOVA verglichen ($n \geq 7$).

Die MFI-Werte zeigen keine signifikanten Unterschiede zwischen der CD324 Expression auf den iPSCs ($25,99 \pm 21,61$) und auf differenzierten Zellen ($10,79 \pm 8,33$ bis $42,64 \pm 64,20$) (siehe Abbildung 15). Die Entwicklung ist schwankend und lässt keine Tendenz erkennen.

Bei der Betrachtung der CD324 positiven Zellen ist der Anteil bei den iPSCs ($38,22 \pm 26,95$ %) am höchsten und sinkt während der Differenzierung

kontinuierlich ab. Jedoch gibt es ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Der Oberflächenmarker CD326 (EpCAM) ist ein Zelladhäsionsmolekül und wird, ähnlich wie CD324, sowohl von Epithelzellen als auch von pluripotenten Stammzellen exprimiert. CD326 dient ebenfalls als Nachweis der EMT während der iMSC-Differenzierung.

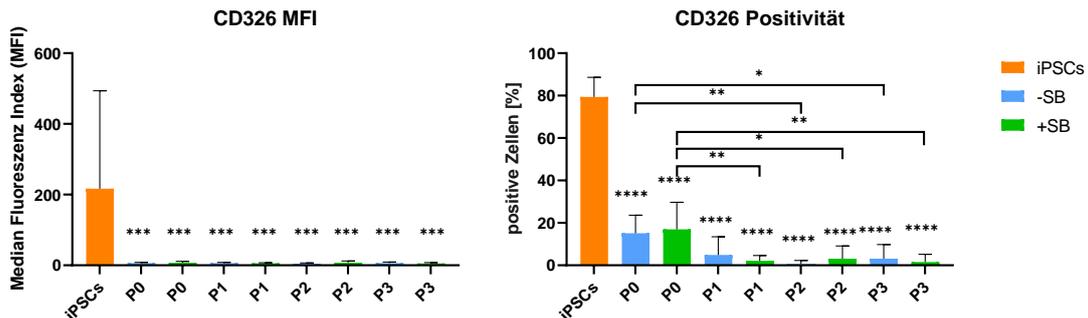


Abbildung 16: CD326 Expression von iPSCs und iMSCs. Median Fluoreszenz Index (MFI) Werte, sowie prozentuale Anteile CD326 positiver Zellen von iPSCs (orange) und -SB (blau) sowie +SB (grün) differenzierter iMSCs verschiedener Passagen. Mittelwerte der Anteile CD326 positiver Zellen und der MFIs wurden mittels one-way ANOVA verglichen ($n \geq 7$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; Sternchen ohne Balken beziehen sich auf die Werte der iPSCs).

Die iPSCs zeigen eine starke Expression von CD326 (MFI $216,65 \pm 277,11$), welche während der iMSC-Differenzierung in allen Passagen signifikant niedriger ist ($p < 0,001$) (siehe Abbildung 16).

Bei der Messung des Anteils der CD326 positiven Zellen, zeigen die iPSCs mit $79,41 \pm 9,21$ % den höchsten Anteil. Im Gegensatz dazu werden in allen Passagen der iMSC-Differenzierung mit Werten zwischen $16,93 \pm 12,80$ % und $0,64 \pm 1,68$ % signifikant weniger ($p < 0,0001$) CD326⁺ Zellen detektiert. Der Anteil CD326⁺ Zellen sinkt nach P0 abermals deutlich von $15,17 \pm 8,50$ % (-SB) bzw. $16,93 \pm 12,80$ % (+SB) auf Werte zwischen $0,64 \pm 1,68$ % (-SB) und $3,14 \pm 6,01$ % (+SB) in P2 sowie auf Werte zwischen $3,16 \pm 6,66$ % (-SB) und $1,52 \pm 3,70$ % (+SB) in P3. Signifikante Unterschiede ergeben sich dabei für -SB Zellen von P0 ($15,17 \pm 8,50$ %) nach P2 ($0,64 \pm 1,68$ %; $p < 0,01$) und von P0 nach P3 ($3,16 \pm 6,66$ %; $p < 0,05$). Die +SB Zellen zeigen von P0 ($16,93 \pm 12,80$ %) nach P1 ($2,16 \pm 2,45$ %; $p < 0,01$), von P0 nach P2 ($3,14 \pm 6,01$ %; p

< 0,05) sowie von P0 nach P3 ($1,52 \pm 3,70 \%$; $p < 0,01$) eine signifikante Abnahme positiver Zellen.

Deutliche Unterschiede zwischen -SB und +SB Zellen innerhalb einer Passage sind nicht zu erkennen.

Der SSEA-4 (stage-specific embryonic antigen-4) Oberflächenmarker wird von pluripotenten Stammzellen exprimiert.

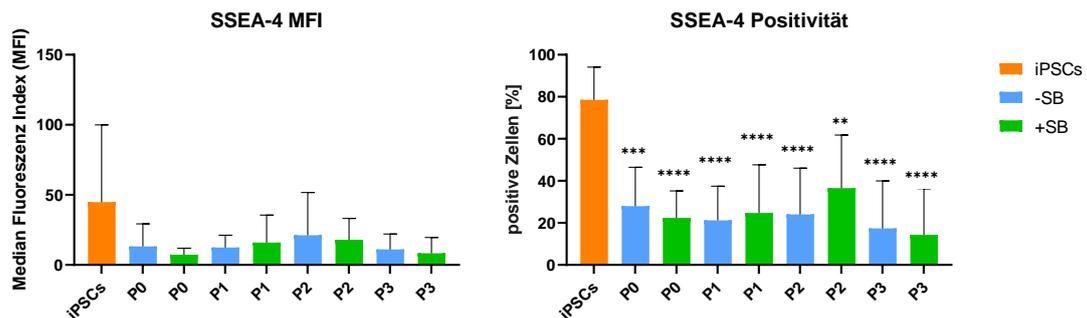


Abbildung 17: SSEA-4 Expression von iPSCs und iMSCs. Median Fluoreszenz Index (MFI) Werte, sowie prozentuale Anteile SSEA-4 positiver Zellen von iPSCs (orange) und -SB (blau) sowie +SB (grün) differenzierter iMSCs verschiedener Passagen. Mittelwerte der Anteile SSEA-4 positiver Zellen und der MFIs wurden mittels one-way ANOVA verglichen ($n \geq 7$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; Sternchen ohne Balken beziehen sich auf die Werte der iPSCs).

Die iPSCs (MFI $44,85 \pm 55,10$) zeigen wie erwartet eine höhere Expression von SSEA-4 als die differenzierten Zellen, wobei die Unterschiede der Expression nicht signifikant sind (siehe Abbildung 17). Die Standardabweichung für die iPSC-Gruppe war relativ hoch. Während der iMSC-Differenzierung zeigen sowohl -SB als auch +SB Zellen eine konstant niedrige SSEA-4 Expression, welche zwischenzeitlich in P2 für -SB (MFI $24,98 \pm 30,74$) und +SB Zellen (MFI $17,90 \pm 15,28$) geringfügig zunimmt. Vergleicht man -SB und +SB Zellen innerhalb einer Passage ergeben sich keine relevanten Unterschiede.

Der Anteil SSEA-4 positiver Zellen ist mit $78,57 \pm 15,53 \%$ wie erwartet in den iPSCs am höchsten, wogegen der Anteil während der iMSC-Differenzierung in allen Passagen mit Werten zwischen $36,55 \pm 25,23 \%$ und $14,27 \pm 22,04 \%$ signifikant niedriger liegt ($p < 0,01$). Der Anteil positiver Zellen bleibt während der Differenzierung -SB und +SB nahezu konstant und sinkt in P3 leicht ab. Eine Ausnahme davon stellt der etwas erhöhte Wert in P2 der +SB Zellen ($36,55 \pm 25,23 \%$) dar. Vergleicht man -SB und +SB Zellen innerhalb einer Passage, ergeben sich keine relevanten Unterschiede.

3.3 Genexpression während der iMSC-Differenzierung

Weiterhin wurden die Unterschiede zwischen iPSCs und differenzierenden -SB und +SB Zellen auf Genebene untersucht. Zum Vergleich wurden zudem die ursprünglichen Kieferperiostzellen (JPCs) untersucht. Um die Änderung der Genexpression während der iMSC-Differenzierung nachzuvollziehen, wurde die Expression typischer iPSC-Markergene (NANOG, OCT4 und TERT) und MSC-Markergene (CD44 und CD73) analysiert. Die Genexpression ist im Folgenden zum einen als absolute Kopienzahl, normiert auf das Housekeeping Gen GAPDH, und zum anderen als Induktionswert, im Verhältnis zur Expression in den iPSCs, aufgetragen.

CD44 ist ein Gen, welches von MSCs exprimiert wird.

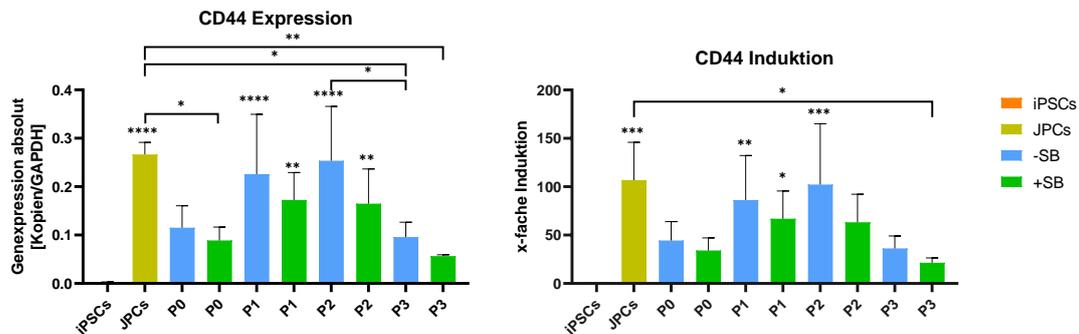


Abbildung 18: CD44 Expression von iPSCs, JPCs und iMSCs. Die Genexpression von iPSCs (orange), JPCs (ocker) und iMSCs +SB (grün) und -SB (blau) verschiedener Passagen (P0-P3) wurde mittels qPCR quantifiziert. Die absolute Genexpression wurde auf das „housekeeping Gen“ GAPDH normiert. Die x-fache Induktion wurde im Verhältnis zu iPSCs berechnet. Mittelwerte wurden mittels one-way ANOVA verglichen ($n \geq 3$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; Sternchen ohne Balken beziehen sich auf die Werte der iPSCs).

Die iPSCs zeigen mit einer Ratio von $2,06 \cdot 10^{-3} \pm 9,87 \cdot 10^{-4}$ Kopien/GAPDH eine sehr niedrige Expression von CD44, wogegen die originalen JPCs eine $106,7 \pm 39,14$ -fach stärkere Expression aufweisen ($p < 0,0001$) (siehe Abbildung 18). Verglichen mit der Expression in den iPSCs wird, während der iMSC-Differenzierung, die CD44-Expression deutlich hochreguliert. Hierbei zeigen -SB Zellen, im Verhältnis zur Expression in den iPSCs, in P0 eine $44,44 \pm 19,48$ -fach hochregulierte CD44 Expression, welche weiter zunimmt und in P2 mit dem Faktor $102,2 \pm 62,94$ ein Maximum erreicht ($p < 0,001$). Die +SB Zellen zeigen, im Verhältnis zur Expression in den iPSCs, in P0 eine $34,17 \pm 12,98$ -fach hochregulierte CD44 Expression, welche ebenfalls weiter zunimmt. Bereits

in P1 (66,97 ± 28,64-fach) erreicht die Induktion ein Maximum (p < 0,01) und in P2 (63,27 ± 28,94-fach) bleibt sie relativ konstant. In P3 geht die Induktion sowohl bei -SB Zellen (36,24 ± 12,87-fach) als auch der +SB Zellen (21,48 ± 4,92-fach) deutlich zurück. Vergleicht man die Expression in -SB und +SB Zellen innerhalb einer Passage, zeigen -SB Zellen in allen Passagen eine etwas höhere CD44 Expression.

Im Vergleich mit den ursprünglichen JPCs (2,66 · 10⁻¹ ± 2,52 · 10⁻² Kopien/GAPDH) erreichen die -SB Zellen in P1 und P2 mit einer Ratio von 2,26 · 10⁻¹ ± 1,24 · 10⁻¹ Kopien/GAPDH bzw. 2,54 · 10⁻¹ ± 1,12 · 10⁻¹ Kopien/GAPDH ein ähnliches Expressionsniveau. Die +SB Zellen bleiben mit maximal 1,72 · 10⁻¹ ± 5,69 · 10⁻² Kopien/GAPDH (P1) deutlich darunter. In P3 zeigen Zellen -SB (9,58 · 10⁻² ± 3,08 · 10⁻² Kopien/GAPDH; p < 0,05) und +SB (5,66 · 10⁻² ± 2,51 · 10⁻³ Kopien/GAPDH; p < 0,01) signifikant niedrigere Expressionswerte als die JPCs.

Das Gen CD73 (5'-Nukleotidase) ist ein MSC-Markergen.

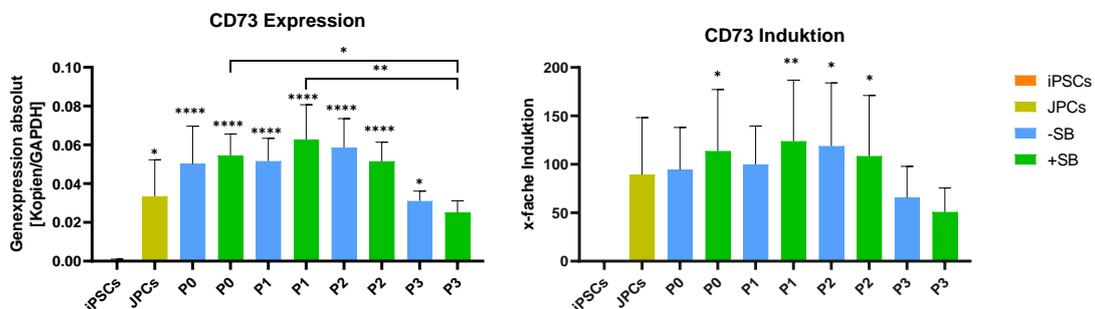


Abbildung 19: CD73 Expression von iPSCs, JPCs und iMSCs. Die Genexpression von iPSCs (orange), JPCs (ocker) und iMSCs +SB (grün) und -SB (blau) verschiedener Passagen (P0-P3) wurde mittels qPCR quantifiziert. Die absolute Genexpression wurde auf das „housekeeping Gen“ GAPDH normiert. Die x-fache Induktion wurde im Verhältnis zu iPSCs berechnet. Mittelwerte wurden mittels one-way ANOVA verglichen (n ≥ 3, * p < 0,05, ** p < 0,01, **** p < 0,0001; Sternchen ohne Balken beziehen sich auf die Werte der iPSCs).

In iPSCs war annähernd keine CD73-Expression nachweisbar (5,03 · 10⁻⁴ ± 5,05 · 10⁻⁴ Kopien/GAPDH), dagegen zeigt sich die Expression in den JPCs (3,35 · 10⁻² ± 1,89 · 10⁻² Kopien/GAPDH) um den Faktor 89,43 ± 58,88 höher (siehe Abbildung 19). Während der iMSC-Differenzierung wird die CD73-

Expression in -SB und +SB Zellen stark hochreguliert und übersteigt in den Passagen P0-P2 vorübergehend die Werte der JPCs. Ein Maximum wird für -SB Zellen in P2 ($5,87 \cdot 10^{-2} \pm 1,48 \cdot 10^{-2}$ Kopien/GAPDH) und bei +SB Zellen bereits in P1 ($6,28 \cdot 10^{-2} \pm 1,80 \cdot 10^{-2}$ Kopien/GAPDH) erreicht. In P3 sinkt die CD73 Expression erneut und liegt mit $3,11 \cdot 10^{-2} \pm 5,11 \cdot 10^{-3}$ Kopien/GAPDH bei -SB Zellen und $2,50 \cdot 10^{-2} \pm 6,10 \cdot 10^{-3}$ Kopien/GAPDH bei +SB Zellen unterhalb des Expressionsniveaus der JPCs. Vergleicht man die CD73-Expression von -SB und +SB Zellen innerhalb der Passagen, ergibt sich kein relevanter Unterschied. Die Expression scheint im zeitlichen Verlauf für +SB Zellen tendenziell früher abzulaufen als bei -SB Zellen.

NANOG (Homöoboxprotein) ist ein Markergen für pluripotente Stammzellen.

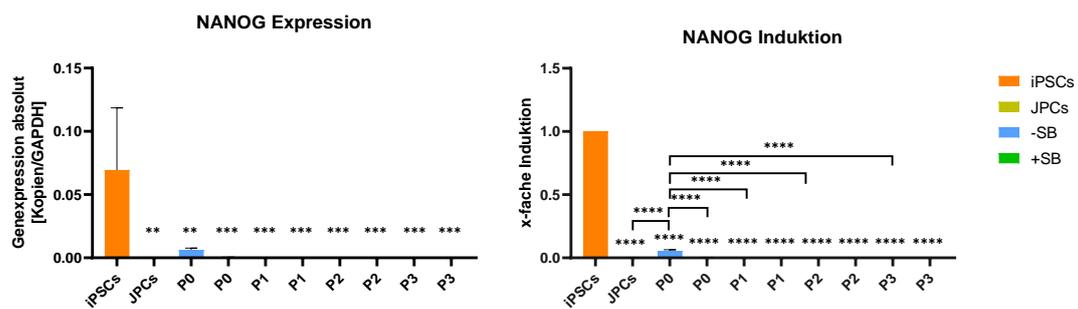


Abbildung 20: NANOG Expression von iPSCs, JPCs und iMSCs. Die Genexpression von iPSCs (orange), JPCs (ocker) und iMSCs +SB (grün) und -SB (blau) verschiedener Passagen (P0-P3) wurde mittels qPCR quantifiziert. Die absolute Genexpression wurde auf das „housekeeping Gen“ GAPDH normiert. Die x-fache Induktion wurde im Verhältnis zu iPSCs berechnet. Mittelwerte wurden mittels one-way ANOVA verglichen ($n \geq 3$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; Sternchen ohne Balken beziehen sich auf die Werte der iPSCs).

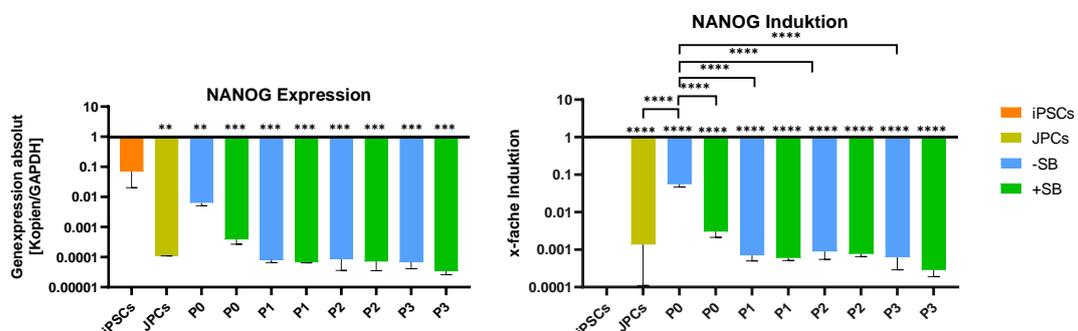


Abbildung 21: NANOG Expression von iPSCs, JPCs und iMSCs. Die Genexpression von iPSCs (orange), JPCs (ocker) und iMSCs +SB (grün) und -SB (blau) verschiedener Passagen (P0-P3) wurde mittels qPCR quantifiziert. Die absolute Genexpression wurde auf das „housekeeping Gen“ GAPDH normiert. Die x-fache Induktion wurde im Verhältnis zu iPSCs berechnet. Mittelwerte wurden mittels one-way ANOVA

verglichen und logarithmisch aufgetragen ($n \geq 3$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; Sternchen ohne Balken beziehen sich auf die Werte der iPSCs).

Der Pluripotenz-Marker NANOG wird von den iPSCs ($6,95 \cdot 10^{-2} \pm 4,92 \cdot 10^{-2}$ Kopien/GAPDH) stark exprimiert. Dieser Marker wird in den JPCs ($1,10 \cdot 10^{-4} \pm 1,20 \cdot 10^{-4}$ Kopien/GAPDH; $p < 0,01$) und während der iMSC-Differenzierung in P0 bei -SB ($6,37 \cdot 10^{-3} \pm 1,27 \cdot 10^{-3}$ Kopien/GAPDH; $p < 0,01$) und +SB Zellen ($3,85 \cdot 10^{-4} \pm 1,17 \cdot 10^{-4}$ Kopien/GAPDH; $p < 0,001$), sowie in den Passagen P1, P2 und P3 ($p < 0,001$) im Vergleich zu den iPSCs signifikant geringer exprimiert (siehe Abbildung 20, Abbildung 21). Die -SB Zellen zeigen in P0 ein geringes Expressionsniveaus. In P1 ($7,97 \cdot 10^{-5} \pm 1,38 \cdot 10^{-5}$ Kopien/GAPDH), P2 ($8,42 \cdot 10^{-5} \pm 4,81 \cdot 10^{-5}$ Kopien/GAPDH) und P3 ($6,80 \cdot 10^{-5} \pm 2,73 \cdot 10^{-5}$ Kopien/GAPDH) ist die Expression auf ein Minimum gefallen. Die +SB Zellen zeigen schon ab P0 ($3,85 \cdot 10^{-4} \pm 1,17 \cdot 10^{-4}$ Kopien/GAPDH) kaum messbare Werte. Vergleicht man die -SB und +SB Zellen, zeigen die +SB Zellen eine frühere Herunterregulierung als die -SB Zellen. Im Vergleich zu den JPCs wird mehr NANOG ausschließlich von Zellen -SB in P0 exprimiert.

OCT4 (Oktamer-bindender Transkriptionsfaktor) ist ein Markergen, welches von pluripotenten Stammzellen exprimiert wird.

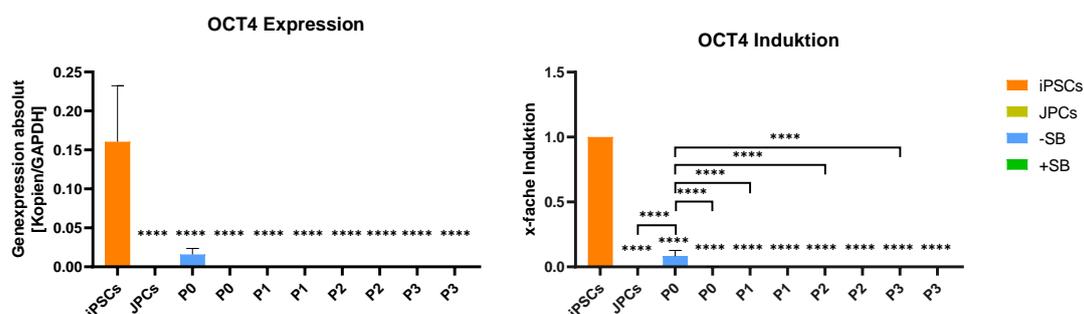


Abbildung 22: OCT4 Expression von iPSCs, JPCs und iMSCs. Die Genexpression von iPSCs (orange), JPCs (ocker) und iMSCs +SB (grün) und -SB (blau) verschiedener Passagen (P0-P3) wurde mittels qPCR quantifiziert. Die absolute Genexpression wurde auf das „housekeeping Gen“ GAPDH normiert. Die x-fache Induktion wurde im Verhältnis zu iPSCs berechnet. Mittelwerte wurden mittels one-way ANOVA verglichen ($n \geq 3$, **** $p < 0,0001$, Sternchen ohne Balken beziehen sich auf die Werte der iPSCs).

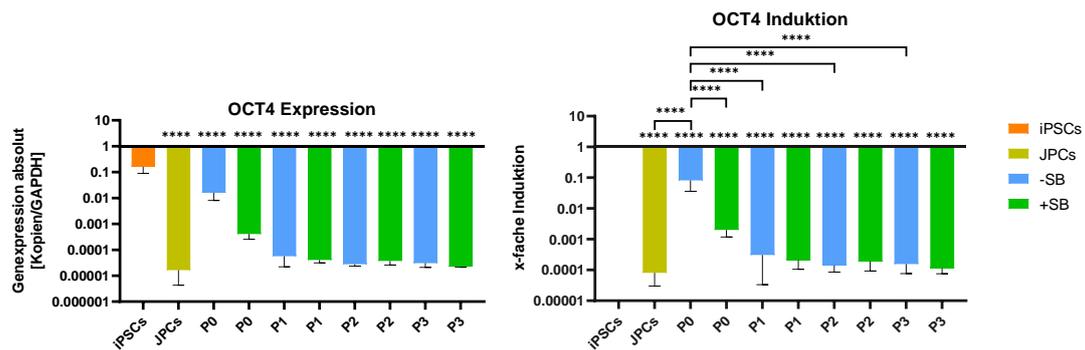


Abbildung 23: OCT4 Expression von iPSCs, JPCs und iMSCs. Die Genexpression von iPSCs (orange), JPCs (ocker) und iMSCs +SB (grün) und -SB (blau) verschiedener Passagen (P0-P3) wurde mittels qPCR quantifiziert. Die absolute Genexpression wurde auf das „housekeeping Gen“ GAPDH normiert. Die x-fache Induktion wurde im Verhältnis zu iPSCs berechnet. Mittelwerte wurden mittels one-way ANOVA verglichen und logarithmisch aufgetragen ($n \geq 3$, **** $p < 0,0001$, Sternchen ohne Balken beziehen sich auf die Werte der iPSCs).

OCT4 wird in iPSCs stark exprimiert ($1,61 \cdot 10^{-1} \pm 7,19 \cdot 10^{-2}$ Kopien/GAPDH). Im Vergleich dazu ist die Expression in den JPCs signifikant herunterreguliert ($1,64 \cdot 10^{-5} \pm 1,21 \cdot 10^{-5}$ Kopien/GAPDH; $p < 0,0001$) (siehe Abbildung 22, Abbildung 23). Während der iMSC-Differenzierung zeigen -SB und +SB Zellen in allen Passagen eine signifikante Herunterregulierung der OCT4-Expression ($p < 0,0001$). Ausschließlich -SB Zellen zeigen in P0 ($1,59 \cdot 10^{-2} \pm 7,85 \cdot 10^{-3}$ Kopien/GAPDH) eine etwas höhere Expression als die JPCs und die Zellen der späteren Passagen.

Vergleicht man die OCT4-Expression in -SB und +SB Zellen innerhalb der Passagen und im Verhältnis zur Expression der iPSCs, zeigen +SB Zellen in P0 eine signifikant stärkere Herunterregulierung ($2,01 \cdot 10^{-3} \pm 8,26 \cdot 10^{-4}$ fach; $p < 0,0001$) gegenüber -SB Zellen ($8,18 \cdot 10^{-2} \pm 4,57 \cdot 10^{-2}$ fach) und somit eine frühere Herunterregulierung der Expression.

TERT codiert für den Proteinanteil der Telomerase, welche in pluripotenten Stammzellen stark exprimiert wird.

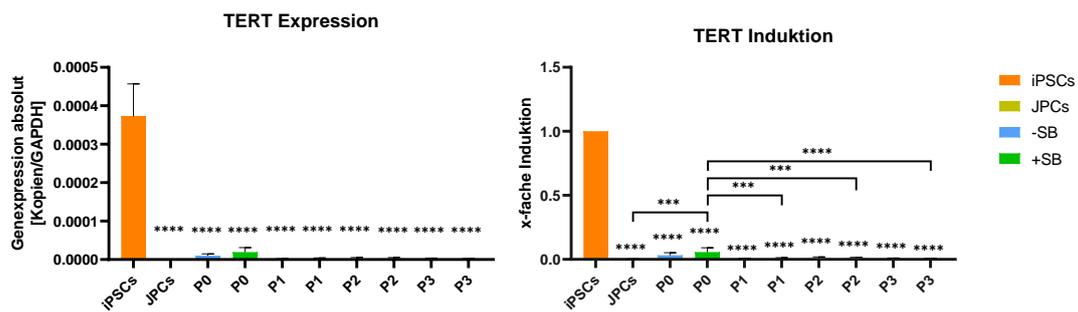


Abbildung 24: TERT Expression von iPSCs, JPCs und iMSCs. Die Genexpression von iPSCs (orange), JPCs (ocker) und iMSCs +SB (grün) und -SB (blau) verschiedener Passagen (P0-P3) wurde mittels qPCR quantifiziert. Die absolute Genexpression wurde auf das „housekeeping Gen“ GAPDH normiert. Die x-fache Induktion wurde im Verhältnis zu iPSCs berechnet. Mittelwerte wurden mittels one-way ANOVA verglichen ($n \geq 3$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, Sternchen ohne Balken beziehen sich auf die Werte der iPSCs).

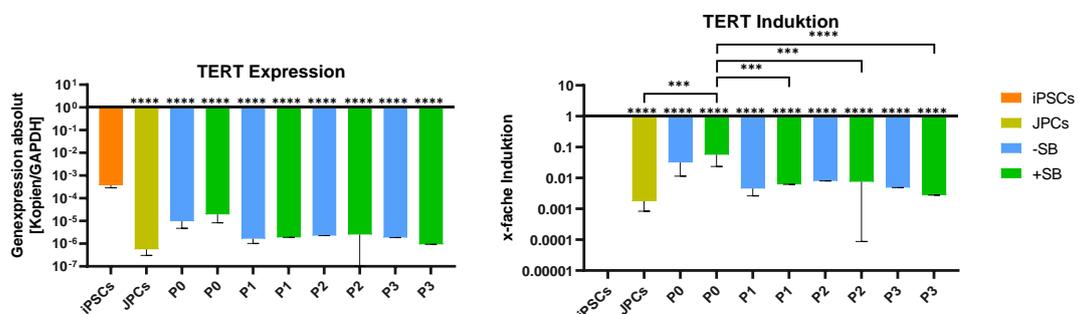


Abbildung 25: TERT Expression von iPSCs, JPCs und iMSCs. Die Genexpression von iPSCs (orange), JPCs (ocker) und iMSCs +SB (grün) und -SB (blau) verschiedener Passagen (P0-P3) wurde mittels qPCR quantifiziert. Die absolute Genexpression wurde auf das „housekeeping Gen“ GAPDH normiert. Die x-fache Induktion wurde im Verhältnis zu iPSCs berechnet. Mittelwerte wurden mittels one-way ANOVA verglichen und logarithmisch aufgetragen ($n \geq 3$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, Sternchen ohne Balken beziehen sich auf die Werte der iPSCs).

Die iPSCs zeigen eine hohe TERT-Expression ($3,72 \cdot 10^{-4} \pm 8,45 \cdot 10^{-5}$ Kopien/GAPDH), wohingegen in JPCs signifikant weniger TERT exprimiert wird ($5,65 \cdot 10^{-7} \pm 2,61 \cdot 10^{-7}$ Kopien/GAPDH; $p < 0,0001$) (siehe Abbildung 24, Abbildung 25). Während der iMSC-Differenzierung wird die TERT-Expression in allen Passagen signifikant herunterreguliert ($p < 0,0001$). Die Zellen zeigen in P0 noch eine geringe TERT-Expression, welche bei +SB Zellen ($1,96 \cdot 10^{-5} \pm 1,13 \cdot 10^{-5}$ Kopien/GAPDH) höher ist als in -SB Zellen (Ratio von $9,82 \cdot 10^{-6} \pm 5,06 \cdot 10^{-6}$ Kopien/GAPDH). Vergleicht man die TERT-Expression von -SB und +SB Zellen innerhalb der Passagen, ergeben sich keine relevanten Unterschiede.

3.4 Osteogene Differenzierung von iMSCs

3.4.1 Mineralisierung

Da die hergestellten iMSCs für das BTE eingesetzt werden sollen, wurde das Mineralisierungspotential der Zellen in vitro getestet.

Aus diesem Grund wurden während der iMSC-Differenzierung -SB und +SB Zellen ab P1 mit osteogenem Medium (OB) zur Differenzierung stimuliert. Die Mineralisierungsfähigkeit der -SB und +SB Zellen in unterschiedlichen Passagen wurde verglichen. Die Zellen wurden 21 Tage lang osteogen stimuliert, anschließend mit Alizarin Rot gefärbt und die Kalziumpräzipitatbildung photometrisch quantifiziert (siehe Abbildung 29). Eine Übersicht der Mineralisierung aller Proben ist in Abbildung 26 sowie Tabelle 10 dargestellt.

Vergleicht man die Alizarin Rot Färbung der Kalziumpräzipitate aller Wells, zeigt sich für die -SB Zellen im Laufe der in vitro Zellkultur von P2 bis P4 eine kontinuierliche Steigerung der Anzahl mineralisierter Wells. Für die +SB Zellen ist ebenso eine Steigerung über die Passagen erkennbar. Vergleicht man +SB mit -SB Zellen, zeigt sich eine deutlich höhere Mineralisierungsfähigkeit in allen Passagen für die +SB Zellen.

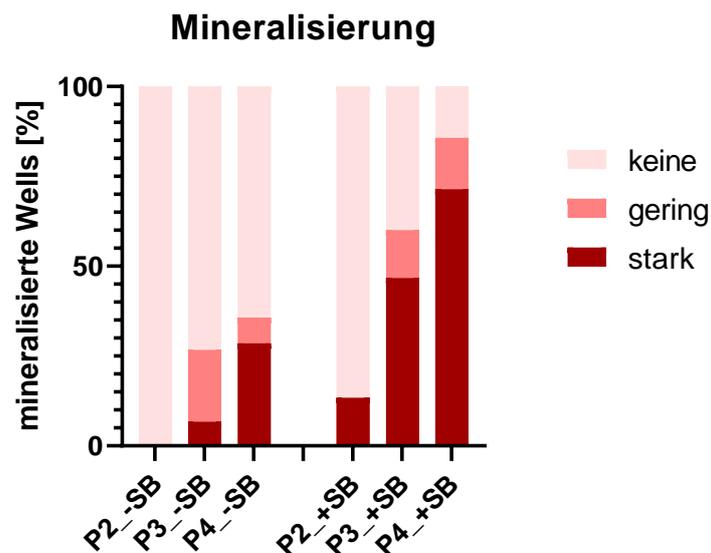


Abbildung 26: Mineralisierung von +/- SB differenzierter Zellen verschiedener Passagen. Zellen der Passagen 2-4 wurden 21 Tage lang in osteogenem Medium (OB) inkubiert. Kalziumphosphatpräzipitate

wurden mit Alizarin Rot gefärbt und die mineralisierten Wells gezählt. Mineralisierungsgrad: keine (hellrosa), gering (lachs), stark (dunkelrot), (n ≥ 14).

Tabelle 10: Mineralisierung von +/- SB differenzierten Zellen verschiedener Passagen. Zellen der Passagen 2-4 wurden 21 Tage lang in osteogenem Medium (OB) inkubiert. Kalziumphosphatpräzipitate wurden mit Alizarin Rot gefärbt und die mineralisierten Wells gezählt. Mineralisierungsgrad: keine (-), gering (+), stark (++), (n ≥ 14).

iMSCs	Passage	P2			P3			P4		
		-	+	++	-	+	++	-	+	++
-SB	Mineralisierungsgrad	-	+	++	-	+	++	-	+	++
	Anzahl Wells	16	0	0	11	3	1	9	1	4
	Anteil in %	100	0	0	73	20	7	64	7	28
+SB	Mineralisierungsgrad	-	+	++	-	+	++	-	+	++
	Anzahl Wells	13	0	2	6	2	7	2	2	10
	Anteil in %	87	0	13	40	13	47	14	14	71

Auch bei einem direkten Vergleich der -SB und +SB Zellen, anhand eines Patienten in der gleichen Passage, zeigt sich eine höhere Mineralisierungsfähigkeit der +SB Zellen (siehe Abbildung 27).

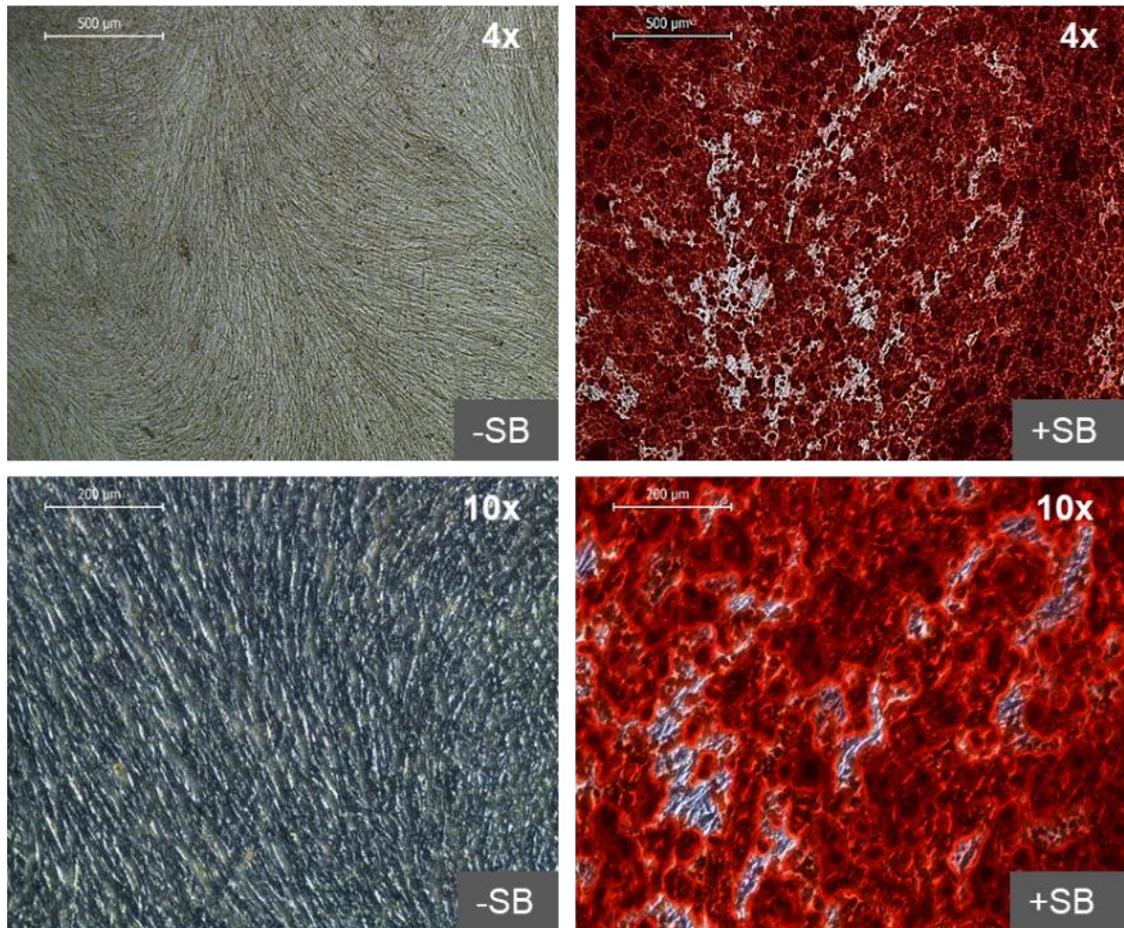


Abbildung 27: Mikroskopische Aufnahmen der Mineralisierung von -/+ SB differenzierter Zellen eines Patienten in Passage 3 (M114-iMSCs_F02_P3). Die Zellen wurden 21 Tage lang in osteogenem Medium (OB) inkubiert, die Zellen fixiert und die Kalziumphosphatpräzipitate mit Alizarin Rot gefärbt. Links: -SB, rechts: +SB. Repräsentative Hellfeldaufnahmen (oben: 4x Vergrößerung, Maßstabsbalken = 500 µm und unten: 10x Vergrößerung, Maßstabsbalken 200 µm).

Vergleicht man die osteogene Differenzierung von +SB Zellen eines Patienten in unterschiedlichen Passagen (P2 bis P4), zeigt sich eine Steigerung in der Mineralisationsfähigkeit mit steigender Passage (siehe Abbildung 28).

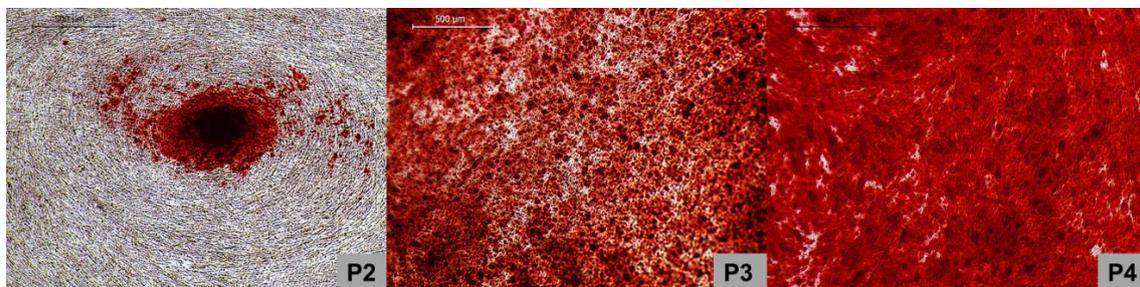


Abbildung 28: Mineralisierung von mit SB differenzierter Zellen eines Patienten über verschiedene Passagen. Zellen der Passagen 2-4 wurden 21 Tage lang in osteogenem Medium (OB) inkubiert, die Zellen fixiert und die Kalziumphosphatpräzipitate mit Alizarin Rot gefärbt. Repräsentative Hellfeldaufnahmen (4x Vergrößerung, Maßstabsbalken = 500 µm) zeigen eine Steigerung der Mineralisationsfähigkeit in aufeinander folgenden Passagen in Patientenzellen mit gutem Mineralisierungspotenzial.

Um das Differenzierungspotential in unterschiedlichen Passagen, sowie zwischen -SB und +SB Zellen zu vergleichen, wurden die Zellen über 21 Tage mit osteogenem Medium (OB) stimuliert und anschließend die Mineralisierung (Präzipitatbildung) mittels Alizarinfärbung und Quantifizierung verglichen (siehe Abbildung 29).

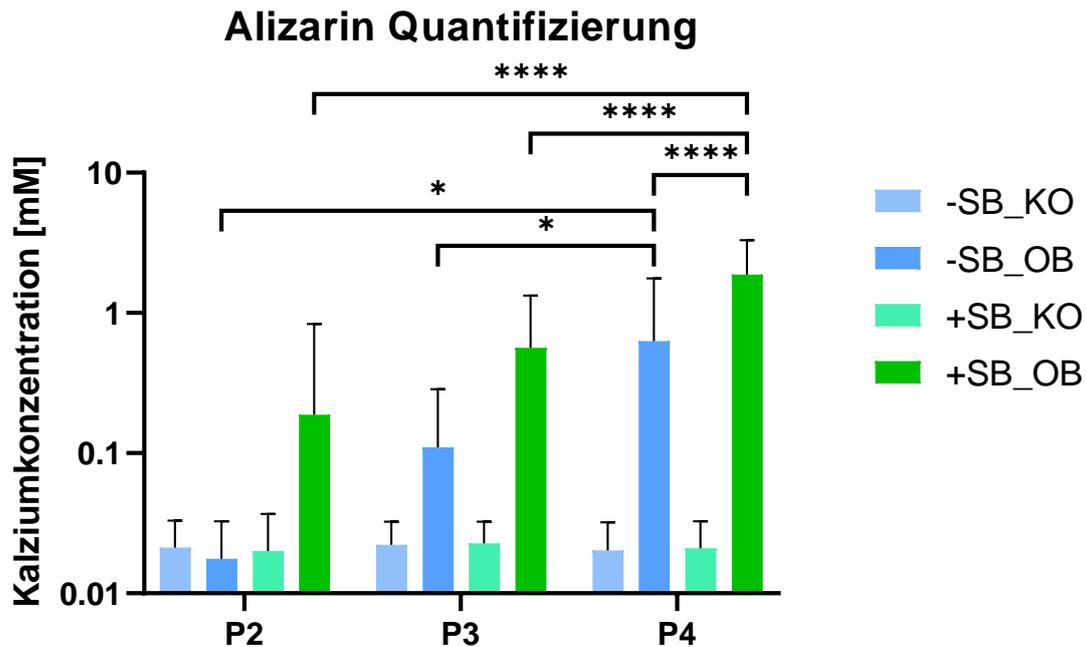


Abbildung 29: Mineralisierung von iMSCs verschiedener Passagen. Differenzierende Zellen +SB (grün) und -SB (blau) der Passagen 2-4 wurden 21 Tage lang in osteogenem Medium (OB) (-SB: dunkelblau, +SB: dunkelgrün) und 10% Plättchenlysate (Kontrolle, KO) (-SB: hellblau, +SB: hellgrün) inkubiert. Kalziumphosphatpräzipitate wurden mit Alizarin Rot gefärbt und photometrisch quantifiziert. Die Mineralisierung in unterschiedlichen Passagen sowie von -/+SB Zellen wurde mittels 2-way ANOVA verglichen ($n \geq 14$, * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$).

Die Alizarinquantifizierung osteogen stimulierter Zellen (OB) zeigt deutliche Unterschiede zwischen verschiedenen Passagen. Sowohl bei -SB als auch +SB differenzierter Zellen nimmt die Bildung von Kalziumphosphatpräzipitaten von P2 nach P4 deutlich zu. Die -SB Zellen zeigen signifikante Zuwächse von P2 ($1,8 \cdot 10^{-2} \pm 1,5 \cdot 10^{-2}$ mM) nach P4 ($6,28 \cdot 10^{-1} \pm 1,14$ mM; $p < 0,05$) und von P3 ($1,10 \cdot 10^{-1} \pm 1,76 \cdot 10^{-1}$ mM) nach P4 ($p < 0,05$). Ebenso zeigen Zellen +SB signifikante Zuwächse von P2 ($1,88 \cdot 10^{-1} \pm 6,45 \cdot 10^{-1}$ mM) nach P4 ($1,88 \pm 1,42$ mM; $p < 0,0001$) und von P3 ($5,64 \cdot 10^{-1} \pm 7,66 \cdot 10^{-1}$ mM) nach P4 ($p < 0,0001$). Die Zellen +SB zeigen im Vergleich zu -SB eine frühere und stärkere Mineralisierung. Signifikante Unterschiede zwischen -SB ($6,28 \cdot 10^{-1} \pm$

1,14 mM) und +SB Zellen ($1,88 \pm 1,42$ mM) ergeben sich jedoch nur in Passage 4 ($p < 0,0001$).

3.4.2 Genexpression osteogen stimulierter iMSCs

Um das osteogene Differenzierungspotenzial der Zellen während der iMSC-Differenzierung zu unterschiedlichen Zeitpunkten sowie für -SB und +SB Bedingungen zu vergleichen, wurden die Zellen mittels qPCR auf die Expression von osteogenen Markergenen untersucht. Hierfür wurden die -SB und +SB differenzierten Zellen der Passagen P2 - P4 15 Tage lang in osteogenem Medium (OB) und Kontrollmedium (hPL10, KO) kultiviert. Für die Analyse des osteogenen Potenzials wurden die osteogenen Markergene ALP (siehe Abbildung 30), OCN (siehe Abbildung 31) und RUNX2 (siehe Abbildung 32) untersucht.

Die alkalische Phosphatase (ALP) ist ein Enzym, dessen Aktivität in osteogen differenzierenden Zellen stark induziert wird.

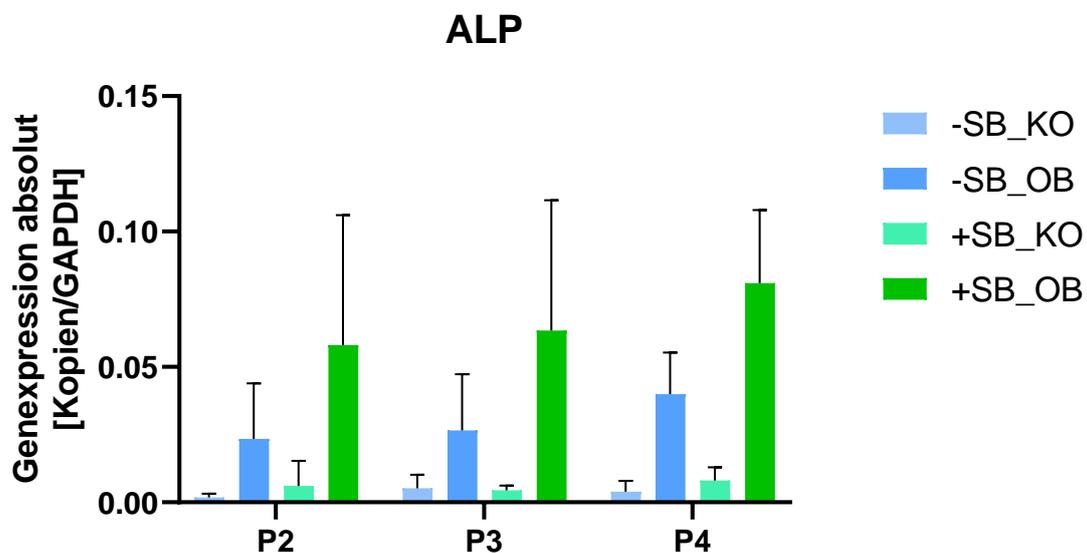


Abbildung 30: ALP Expression von iMSCs verschiedener Passagen. Die ALP-Genexpression von +SB (grün) und -SB (blau) differenzierten Zellen verschiedener Passagen wurden mittels qPCR quantifiziert. Zellen der Passagen 2-4 wurden 15 Tage lang in osteogenem Medium (OB) (-SB: dunkelblau, +SB: dunkelgrün) und Kontrollmedium (hPL10, KO) (-SB: hellblau, +SB: hellgrün) kultiviert. Die absoluten Kopienzahlen der Genexpression wurden auf das „Housekeepinggen“ Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) normiert. Die Mittelwerte wurden mittels 2-way ANOVA verglichen ($n \geq 3$).

Osteogen stimulierte -SB und +SB Zellen zeigen über die Passagen eine zunehmende ALP-Genexpression (siehe Abbildung 30). Die -SB Zellen zeigen über die Passagen P2 ($2,35 \cdot 10^{-2} \pm 2,0 \cdot 10^{-2}$ Kopien/GAPDH), P3 ($2,66 \cdot 10^{-2} \pm$

2,1 · 10⁻² Kopien/GAPDH) und P4 (3,99 · 10⁻² ± 1,5 · 10⁻² Kopien/GAPDH) geringe Zuwächse. Auch die Zellen +SB zeigen geringe Steigerungen in P2 (5,81 · 10⁻² ± 4,8 · 10⁻² Kopien/GAPDH), P3 (6,35 · 10⁻² ± 4,8 · 10⁻² Kopien/GAPDH) und P4 (8,09 · 10⁻² ± 2,7 · 10⁻² Kopien/GAPDH). Vergleicht man die -SB und +SB Zellen jeweils in einer Passage, dann zeigen +SB Zellen eine fast doppelt so starke Expression von ALP in allen untersuchten Passagen.

Osteocalcin (OCN) gilt als osteogener Marker, welcher von Zellen zu einem späten Zeitpunkt der osteogenen Differenzierung exprimiert wird.

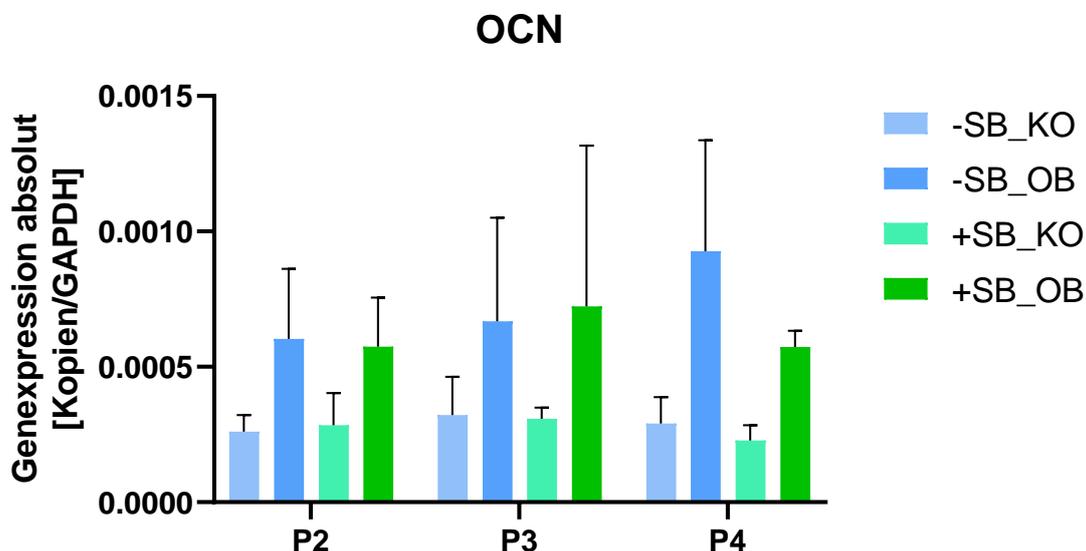


Abbildung 31: OCN-Expression von iMSCs verschiedener Passagen. Die OCN-Genexpression von +SB (grün) und -SB (blau) differenzierten Zellen verschiedener Passagen wurden mittels qPCR quantifiziert. Zellen der Passagen 2-4 wurden 15 Tage lang in osteogenem Medium (OB) (-SB: dunkelblau, +SB: dunkelgrün) und Kontrollmedium (hPL10, KO) (-SB: hellblau, +SB: hellgrün) kultiviert. Die absoluten Kopienzahlen der Genexpression wurden auf das „Housekeepinggen“ Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) normiert. Die Mittelwerte wurden mittels 2-way ANOVA verglichen (n ≥ 4).

Osteogen stimulierte -SB Zellen zeigen über die Passagen P2 (6,04 · 10⁻⁴ ± 2,58 · 10⁻⁴ Kopien/GAPDH) nach P3 (6,68 · 10⁻⁴ ± 3,82 · 10⁻⁴ Kopien/GAPDH) und von P3 nach P4 (9,27 · 10⁻⁴ ± 4,09 · 10⁻⁴ Kopien/GAPDH) eine zunehmende OCN-Expression (siehe Abbildung 31). Die +SB Zellen zeigen von P2 (5,74 · 10⁻⁴ ± 1,81 · 10⁻⁴ Kopien/GAPDH) nach P3 (7,23 · 10⁻⁴ ± 1 · 10⁻³ Kopien/GAPDH) einen Anstieg und von P3 nach P4 (5,74 · 10⁻⁴ ± 5,95 · 10⁻⁵ Kopien/GAPDH) eine Abnahme in der OCN-Expression. Vergleicht man

osteogen stimulierte -SB und +SB Zellen innerhalb einer Passage, zeigen Zellen -SB in P4 eine 1,62-fach höhere OCN-Expression.

RUNX2 (engl.: Runt-related transcription factor) ist ein Transkriptionsfaktor und gilt ebenfalls als osteogener Marker, welcher von Zellen zu einem frühen Zeitpunkt der osteogenen Differenzierung exprimiert wird.

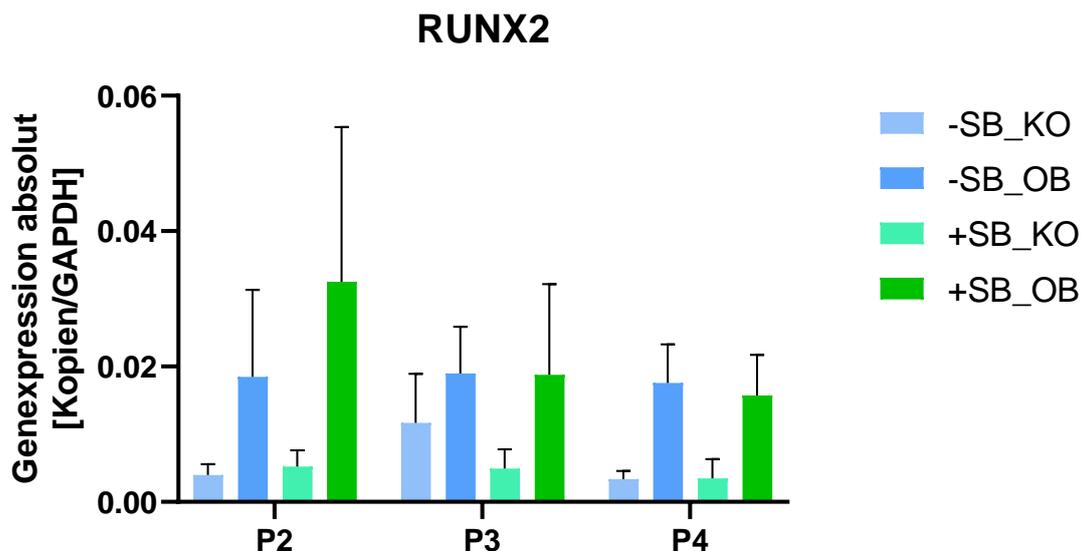


Abbildung 32: RUNX2 Expression von iMSCs verschiedener Passagen. Die RUNX2-Genexpression von +SB (grün) und -SB (blau) differenzierten Zellen verschiedener Passagen wurden mittels qPCR quantifiziert. Zellen der Passagen 2-4 wurden 15 Tage lang in osteogenem Medium (OB) (-SB: dunkelblau, +SB: dunkelgrün) und Kontrollmedium (hPL10, KO) (-SB: hellblau, +SB: hellgrün) kultiviert. Die absoluten Kopienzahlen der Genexpression wurden auf das „Housekeepinggen“ Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) normiert. Die Mittelwerte wurden mittels 2-way ANOVA verglichen ($n \geq 4$).

Osteogen stimulierte -SB Zellen zeigen über die Passagen P2 ($1,85 \cdot 10^{-2} \pm 1,3 \cdot 10^{-2}$ Kopien/GAPDH), P3 ($1,90 \cdot 10^{-2} \pm 7 \cdot 10^{-3}$ Kopien/GAPDH), und P4 ($1,76 \cdot 10^{-2} \pm 6 \cdot 10^{-3}$ Kopien/GAPDH) eine konstante RUNX2-Expression (siehe Abbildung 32). Die +SB Zellen zeigen in P2 ($3,25 \cdot 10^{-2} \pm 2,3 \cdot 10^{-2}$ Kopien/GAPDH) eine tendenziell höhere RUNX2-Expression, welche von P2 nach P3 ($1,88 \cdot 10^{-2} \pm 1,3 \cdot 10^{-2}$ Kopien/GAPDH) abnimmt und in P4 ($1,57 \cdot 10^{-2} \pm 6 \cdot 10^{-3}$ Kopien/GAPDH) in etwa konstant bleibt. Auch ist in P2 eine hohe Standardabweichung zu verzeichnen. Vergleicht man -SB und +SB Zellen innerhalb einer Passage, zeigt sich eine fast doppelt so starke Expression von RUNX2 in +SB ($3,25 \cdot 10^{-2} \pm 2,3 \cdot 10^{-2}$ Kopien/GAPDH) gegenüber -SB ($1,85 \cdot 10^{-2} \pm 1,3 \cdot 10^{-2}$ Kopien/GAPDH) Zellen in P2. In P3 und P4 wird RUNX2 vergleichbar exprimiert.

3.4.3 Dissoziation von iMSCs während der osteogenen Differenzierung

Um die Mineralisierungsfähigkeit der differenzierenden Zellen zu untersuchen, sollte ursprünglich neben Kontroll- (KO-) und osteogenes (OB-) Medium auch OB-Medium ohne Dexamethason (OB-D) verwendet werden. Der Versuch das OB-D-Medium zu verwenden, führte jedoch in den meisten Fällen zum Ablösen des Zellmonolayers (siehe Abbildung 33). Außerdem wurde eine bessere Mineralisierung mit OB-Medium als mit dem OB-D-Medium festgestellt (siehe Abbildung 33). Aus diesem Grund wurden die weiteren osteogenen Differenzierungen mit Dexamethason durchgeführt.

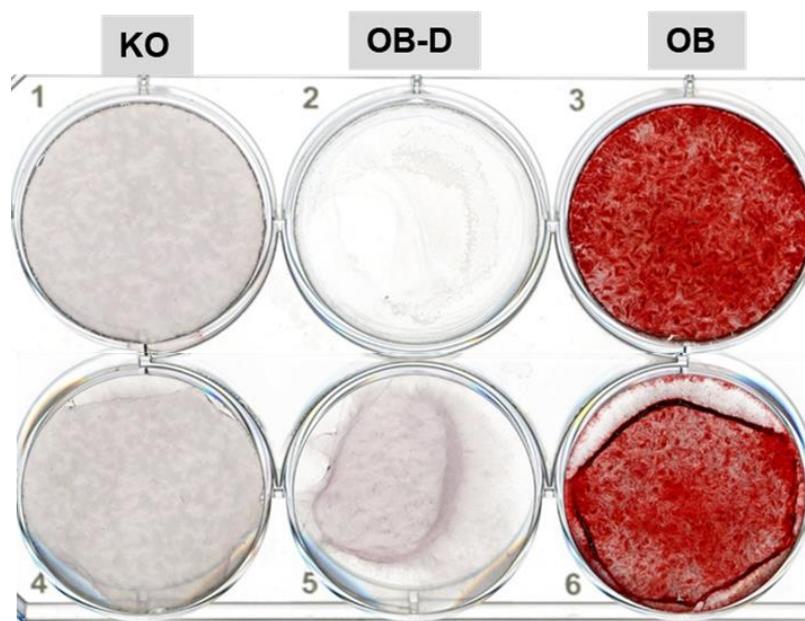


Abbildung 33: Repräsentativer Plattenscan der Mineralisierung von +SB differenzierten Zellen. Die Zellen wurden 21 Tage lang in Kontrollmedium (hPL10, KO), in osteogenem Medium ohne Dexamethason (OB-D) und osteogenem Medium mit Dexamethason (OB) kultiviert. Kalziumphosphatpräzipitate wurden mit Alizarin Rot gefärbt. Ein starkes Ablösen des Zellrasens wurde bei der Probe OB-D beobachtet. Wenig bis kein Ablösen zeigte dagegen die KO- und die OB-Probe. Zudem ist keine Mineralisierungsfähigkeit bei den Zellen ohne Dexamethason (OB-D) und hingegen eine starke Mineralisierungsfähigkeit bei den Zellen mit Dexamethason (OB) zu erkennen.

Das Ablösen des Zelllayers von der Plattenoberfläche trat in den weiteren Versuchen erneut auf. Obwohl osteogenes Medium mit Dexamethason (OB) verwendet wurde, lösten sich vor allem differenzierende -SB Zellen ab. Verglichen dazu zeigten +SB Zellen seltener ein Ablösen des Zellrasens (siehe Abbildung 34). Außerdem konnte beobachtet werden, dass ab dem Zeitpunkt des Auftretens von Kalziumpräzipitaten das Ablösen stagnierte.

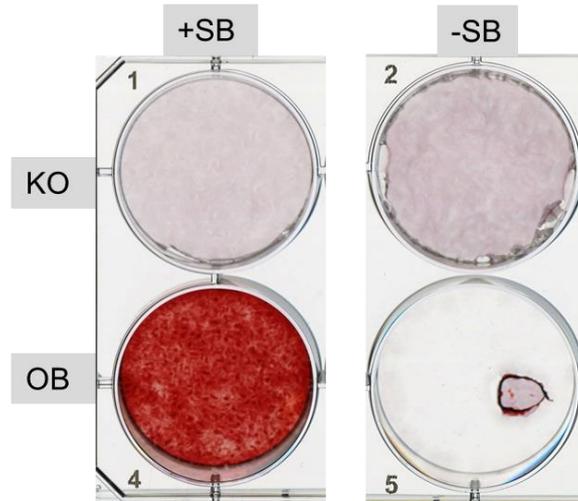


Abbildung 34: Repräsentativer Plattenscan der Mineralisierung von +SB und -SB differenzierten Zellen. Die Zellen wurden 21 Tage lang in osteogenem Medium (OB) und Kontrollmedium (hPL10, KO) kultiviert. Kalziumphosphatpräzipitate wurden mit Alizarin Rot gefärbt. Links: iMSCs +SB; rechts: iMSCs -SB. Zu sehen ist ein Ablösen des Zellrasens, welches bei den -SB Zellen deutlich in OB-Medium auftrat. Dagegen war bei den +SB Zellen kein Ablösen in OB-Medium sichtbar.

Vergleicht man das Ablösen der Zellen über die Passagen P2 bis P4, zeigen die -SB Zellen ein zunehmendes Ablösen über die Passagen. Dagegen zeigen die +SB Zellen über die Passagen eine Abnahme des Ablöses (siehe Tabelle 11, Abbildung 35).

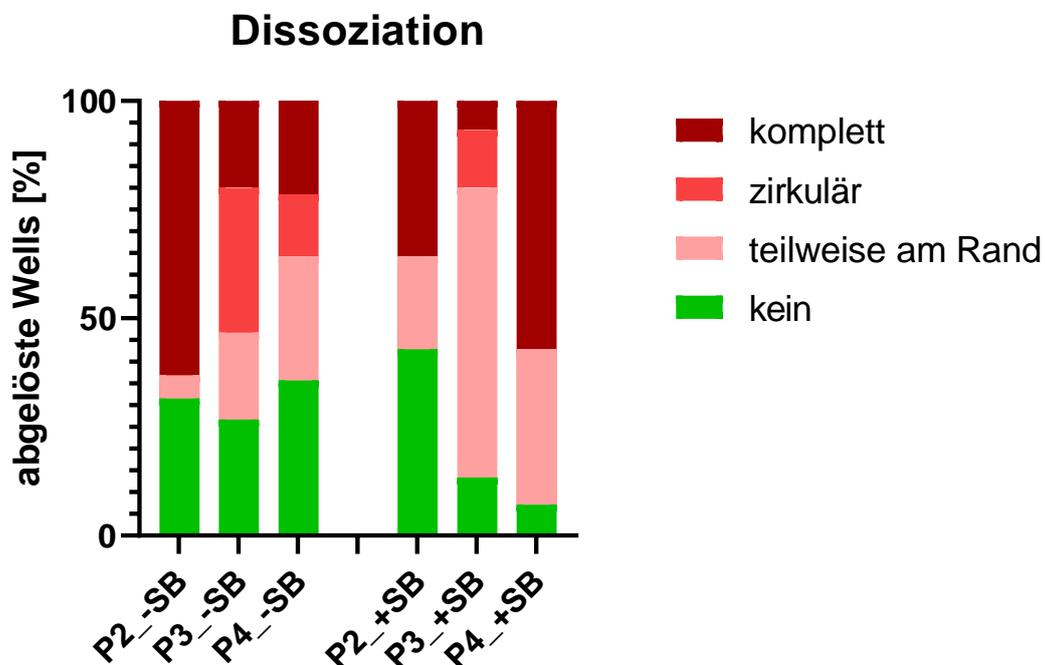


Abbildung 35: Anteil abgelöster Wells während der osteogenen Differenzierung. -/+ SB differenzierte Zellen der Passagen 2-4 wurden in osteogenem Medium kultiviert, wobei sich teilweise die Zellmonolayer von der Zellkulturplatte lösten. Grad der Dissoziation: kein Ablösen (grün), teilweise gelöst am Rand (rosa), zirkulär abgelöst (hellrot) und komplett abgelöst (dunkelrot), (n ≥ 14).

Tabelle 11: Anteil abgelöster Wells während der osteogenen Differenzierung. -/+SB differenzierte Zellen der Passage 2-4 wurden in osteogenem Medium kultiviert, wobei sich die Zellmonolayer teilweise von der Zellkulturplatte lösten. Grad des Ablösens: kein Ablösen (-), teilweise gelöst am Rand (+), zirkulär abgelöst (++) und komplett abgelöst (+++), (n ≥ 14).

Passage		P2				P3				P4			
	Ablösungsgrad	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
-SB	Anzahl Wells	12	0	1	6	3	5	3	4	3	2	4	5
	Anteil in %	63	0	5	32	20	33	20	26	21	14	29	36
	Ablösungsgrad	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++
+SB	Anzahl Wells	5	0	3	6	1	2	10	2	8	0	5	1
	Anteil in %	36	0	21	43	7	13	67	13	57	0	36	7
	Ablösungsgrad	-	+	++	+++	-	+	++	+++	-	+	++	+++

3.5 Expression von Seneszenzmarkern bei iMSCs

In vorangegangenen Arbeiten zeigten iMSCs (iMSCs „alt“) bereits während der Differenzierung und in frühen Passagen Anzeichen von Seneszenz (Umrath et al., 2020). In dieser Arbeit sollte u.a. durch eine schonende Differenzierung (keine Vereinzelung der Zellen) und durch die Steigerung der Differenzierungseffizienz mittels des TGF- β -Inhibitors SB, eine Verringerung der Stress-induzierten Seneszenz erreicht werden. Dennoch konnte am Ende der P0 sowohl bei -SB als auch bei +SB Zellen die typische Morphologie seneszenten Zellen (große flache Zellen mit großem Zellkern) beobachtet werden (siehe Abbildung 36).

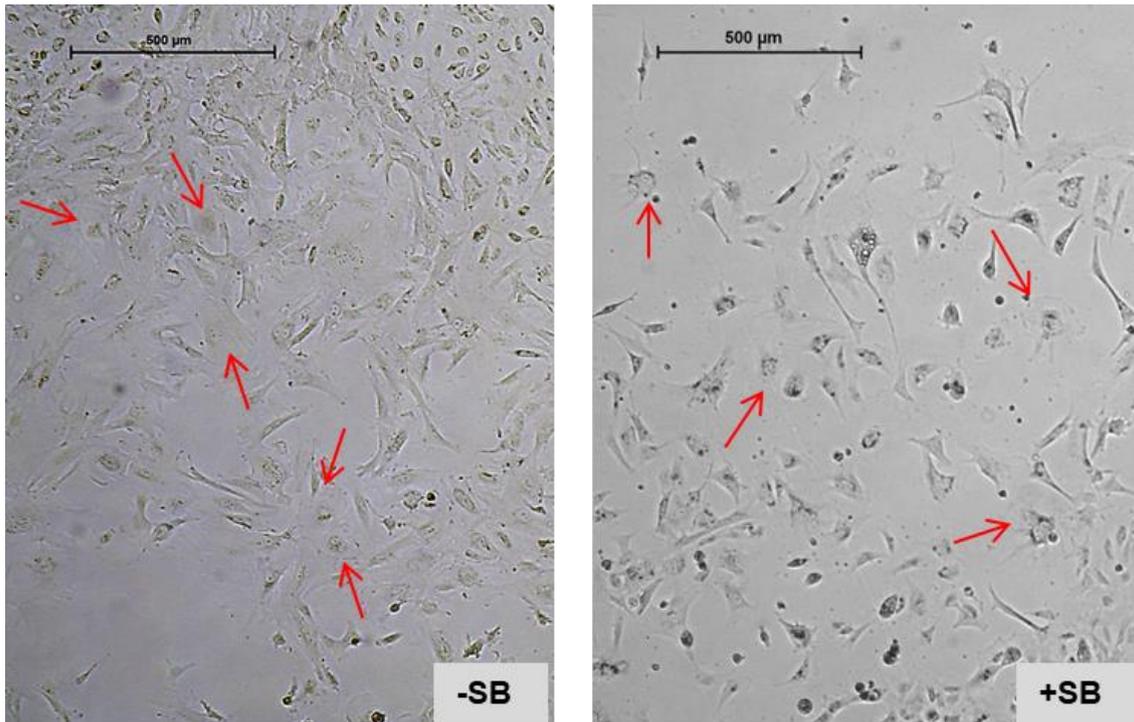


Abbildung 36: Seneszente Zellen unter den +/- SB differenzierten iMSCs in P0. Repräsentative Hellfeldaufnahmen seneszenter Zellen (rote Pfeile) (4x Vergrößerung, Maßstabsbalken = 500 µm).

Um den Grad der Seneszenz zu untersuchen, wurden die Zellen ab P1 am Ende jeder Passage auf die Aktivität der SA-β-Gal untersucht. Es wurde jeweils eine mit dem SA-β-Gal Assay Kit gefärbte (-SB, +SB) (siehe Abbildung 37) und eine ungefärbte Probe (-SB_KO, +SB_KO) auf ihre SA-β-Gal Aktivität mittels FACS untersucht. Die Aktivität der SA-β-Gal in den in dieser Arbeit hergestellten -SB und +SB Zellen wurden zudem mit den Zellen aus einem Vorversuch iMSCs „alt“ verglichen.

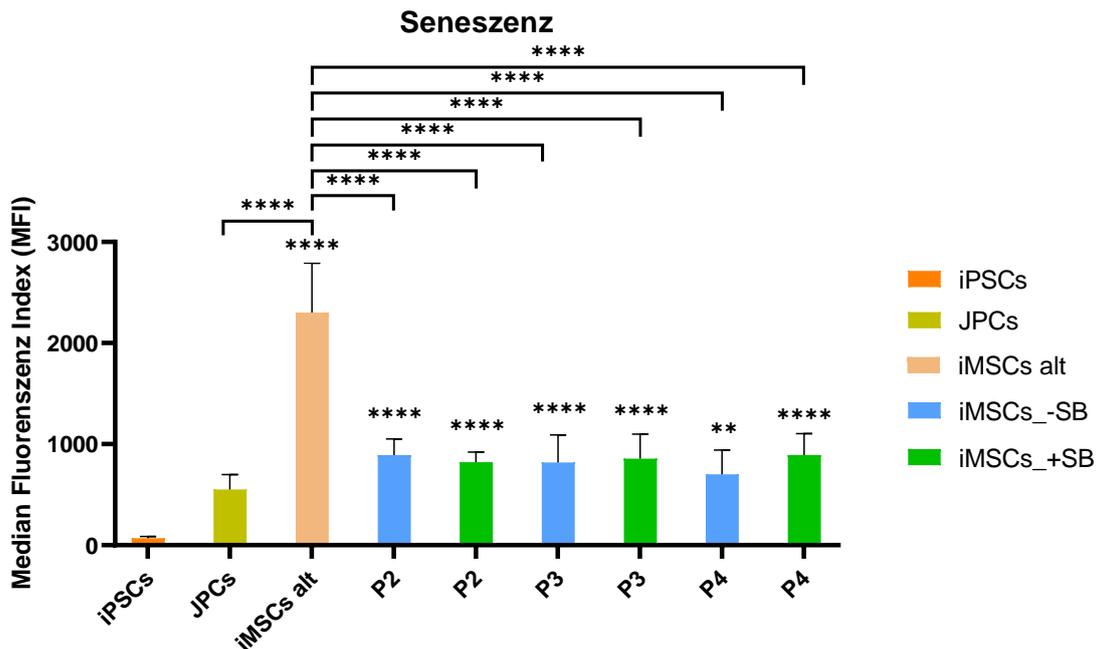


Abbildung 37: SA-β-Gal-Expression von iPSCs, JPCs, iMSCs „alt“ und iMSCs +SB und -SB. Median Fluoreszenz Index (MFI) Werte von iPSCs (orange), JPCs (ocker), iMSCs „alt“ (lachs) und iMSCs +SB (grün) und -SB (blau) verschiedener Passagen (P2-P4) wurden mittels FACS quantifiziert. Mittelwerte der MFIs wurden mittels one-way ANOVA verglichen ($n \geq 3$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$; Sternchen ohne Balken beziehen sich auf die Werte der iPSCs).

Die Aktivität der SA-β-Gal zeigt sich in den JPCs (MFI von $550,53 \pm 149,14$) um das 8-fache höher als in den iPSCs ($69,84 \pm 15,89$), jedoch nicht signifikant. Dagegen ist der MFI der iMSCs „alt“ mit $2300,04 \pm 490,31$ signifikant höher verglichen mit dem MFI der iPSCs ($p < 0,0001$). Auch ergibt sich, im Vergleich zu den iPSCs, eine signifikant höhere SA-β-Gal-Aktivität der Zellen in allen Passagen während der iMSC-Differenzierung ($p < 0,0001$). Eine Ausnahme hierbei zeigt sich beim MFI der -SB Zellen in P4 ($702,33 \pm 239,48$; $p < 0,01$), welche im Vergleich zu den anderen iMSCs einen geringeren MFI aufweist und somit weniger signifikant gegenüber der SA-β-Gal-Aktivität der iPSCs ist. Die -SB und +SB Zellen zeigen, verglichen mit den JPCs, über die Passagen hinweg keine signifikanten Unterschiede bezüglich ihrer SA-β-Gal-Aktivität. Dagegen zeigen, im Vergleich zu den iMSCs „alt“, alle Passagen der -SB und +SB Zellen signifikant geringere SA-β-Gal-Aktivitäten (von $702,33 \pm 239,48$ bis $891,29 \pm 211,29$; $p < 0,0001$). Auch die JPCs zeigen eine signifikant geringere SA-β-Gal-Aktivität auf als die iMSCs „alt“ ($p < 0,0001$).

Vergleicht man -SB und +SB Zellen innerhalb einer Passage zeigen sich keine signifikanten Unterschiede.

Die Expression von mit Seneszenz assoziierten Genen wurde mittels qPCR und spezifischer Primer für die Amplifikation der mRNA für die Seneszenzmarker P16^{INK4a} (siehe Abbildung 38) und P21^{Cip1} (siehe Abbildung 39) untersucht. Das Markergen P16^{INK4a} (CDK-Inhibitor 2A = cyclin dependent kinase inhibitor 2A) wird von seneszenten Zellen exprimiert. Die Genexpression der in dieser Arbeit hergestellten -SB und +SB Zellen werden zudem mit den Zellen iMSCs „alt“, aus einem Vorversuch, verglichen (siehe Abbildung 38).

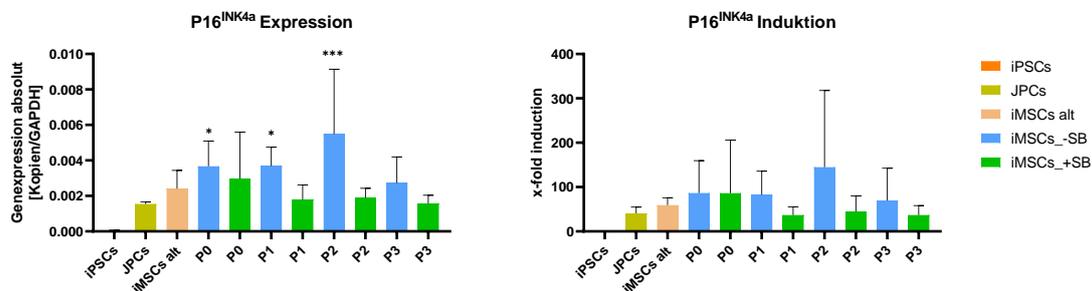


Abbildung 38: P16^{INK4a}-Expression von iPSCs, JPCs, iMSCs „alt“ und iMSCs +SB und -SB. Die Genexpression von iPSCs (orange), JPCs (ocker), iMSCs „alt“ (lachs) und iMSCs +SB (grün) und -SB (blau) verschiedener Passagen (P2-P3) wurde mittels qPCR quantifiziert. Die absolute Genexpression wurde auf das „housekeeping Gen“ GAPDH normiert. Die x-fache Induktion wurde im Verhältnis zu iPSCs berechnet. Mittelwerte wurden mittels one-way ANOVA verglichen (n ≥ 3, * p < 0,05, *** p < 0,001, Sternchen ohne Balken beziehen sich auf die Werte der iPSCs).

Verglichen mit den iPSCs ($3,71 \cdot 10^{-5} \pm 2,97 \cdot 10^{-5}$ Kopien/GAPDH) ist die P16^{INK4a}-Expression in den JPCs ($1,55 \cdot 10^{-3} \pm 1,02 \cdot 10^{-4}$ Kopien/GAPDH) deutlich höher, jedoch statistisch nicht signifikant. Auch zeigen die iMSCs „alt“ ($2,41 \cdot 10^{-3} \pm 1,02 \cdot 10^{-3}$ Kopien/GAPDH) keine signifikante Steigerung. Diese zeigen jedoch, im Vergleich zu den JPCs, eine gesteigerte Expression. Verglichen mit den iPSCs, exprimieren die differenzierenden -SB Zellen in P0 ($3,67 \cdot 10^{-3} \pm 1,42 \cdot 10^{-3}$ Kopien/GAPDH; p < 0,05), P1 ($3,69 \cdot 10^{-3} \pm 1,06 \cdot 10^{-3}$ Kopien/GAPDH; p < 0,05), und P2 ($5,49 \cdot 10^{-3} \pm 3,65 \cdot 10^{-3}$ Kopien/GAPDH; p < 0,001) signifikant mehr P16^{INK4a}. In P0 und P1 bleibt die Expression konstant. Einen deutlichen Anstieg der Expression zeigt sich in P2, jedoch mit einer sehr hohen Standardabweichung. In P3 ($2,73 \cdot 10^{-3} \pm 1,46 \cdot 10^{-3}$ Kopien/GAPDH) sinkt die Expression, verglichen zu allen anderen Passagen, deutlich.

Die +SB Zellen zeigen in P0 ($2,97 \cdot 10^{-3} \pm 2,63 \cdot 10^{-3}$ Kopien/GAPDH) eine höhere Expression von P16^{INK4a}, welche in P1 ($1,80 \cdot 10^{-3} \pm 8,10 \cdot 10^{-4}$ Kopien/GAPDH) deutlich abnimmt und anschließend bis P3 ($1,58 \cdot 10^{-3} \pm 4,55 \cdot 10^{-4}$ Kopien/GAPDH) in etwa konstant bleibt. Vergleicht man -SB mit +SB Zellen, zeigen +SB Zellen über alle Passagen eine geringere P16^{INK4a}-Expression. Zudem ist die Expression in +SB Zellen ab P1 konstant niedriger als jene der JPCs.

Das Markergen P21^{Cip1} (CDK-Inhibitor 1= cyclin-dependent kinase inhibitor 1) wird von seneszenten Zellen exprimiert.

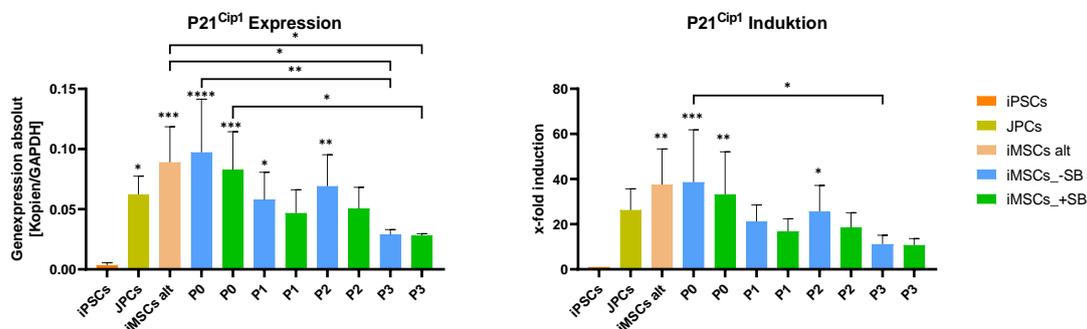


Abbildung 39: P21^{Cip1}-Expression von iPSCs, JPCs, iMSCs „alt“ und iMSCs +SB und -SB. Die Genexpression von iPSCs (orange), JPCs (ocker), iMSCs „alt“ (lachs) und iMSCs +SB (grün) und -SB (blau) verschiedener Passagen (P2-P3) wurde mittels qPCR quantifiziert. Die absolute Genexpression wurde auf das „housekeeping Gen“ GAPDH normiert. Die x-fache Induktion wurde im Verhältnis zu iPSCs berechnet. Mittelwerte wurden mittels one-way ANOVA verglichen ($n \geq 3$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, Sternchen ohne Balken beziehen sich auf die Werte der iPSCs).

Der Seneszenzmarker P21^{Cip1} wird von den iPSCs ($3,56 \cdot 10^{-3} \pm 1,88 \cdot 10^{-3}$ Kopien/GAPDH) sehr gering exprimiert (siehe Abbildung 39). Verglichen dazu zeigt sich die Expression in den JPCs signifikant höher ($6,23 \cdot 10^{-2} \pm 1,52 \cdot 10^{-2}$ Kopien/GAPDH; $p < 0,05$). Die iMSCs „alt“ ($8,91 \cdot 10^{-2} \pm 2,96 \cdot 10^{-2}$ Kopien/GAPDH) exprimieren ebenfalls signifikant mehr P21^{Cip1} als die iPSCs ($p < 0,001$). Auch die Expression, während der iMSC-Differenzierung ohne SB, ist, verglichen mit den iPSCs, in P0 ($9,73 \cdot 10^{-2} \pm 4,41 \cdot 10^{-2}$ Kopien/GAPDH; $p < 0,0001$), in P1 ($5,80 \cdot 10^{-2} \pm 2,28 \cdot 10^{-2}$ Kopien/GAPDH; $p < 0,05$) und in P2 ($6,92 \cdot 10^{-2} \pm 2,61 \cdot 10^{-2}$ Kopien/GAPDH; $p < 0,01$) signifikant höher. Die +SB Zellen zeigen nur in P0 ($8,29 \cdot 10^{-2} \pm 3,16 \cdot 10^{-2}$ Kopien/GAPDH; $p < 0,001$) eine signifikant höhere P21^{Cip1}-Expression. Über die Passagen ist bei den -SB Zellen eine Herunterregulierung der P21^{Cip1}-Expression zu verzeichnen. Wobei diese,

vergleicht man P0 mit P3 ($2,83 \cdot 10^{-2} \pm 1,41 \cdot 10^{-3}$ Kopien/GAPDH), statistisch signifikant ist ($p < 0,01$). Die -SB und +SB Zellen zeigen ab P1, verglichen mit den iMSCs „alt“, eine geringere Expression, als auch in P1 und P3 geringere Ratios als die JPCs. Signifikant niedriger zeigt sich die $P21^{Cip1}$ Expression, verglichen mit den iMSCs „alt“, in P3 ($p < 0,05$). Auch in den +SB Zellen zeigt sich über die Passagen eine Abnahme der $P21^{Cip1}$ -Expression, welche ebenso von P0 ($8,29 \cdot 10^{-2} \pm 3,16 \cdot 10^{-2}$ Kopien/GAPDH) nach P3 ($2,83 \cdot 10^{-2} \pm 1,4 \cdot 10^{-3}$ Kopien/GAPDH) signifikant reduziert wird ($p < 0,05$). Die +SB Zellen exprimieren in allen Passagen weniger $P21^{Cip1}$ als die iMSCs „alt“ und ab der P1 ($4,69 \cdot 10^{-2} \pm 1,94 \cdot 10^{-2}$ Kopien/GAPDH) weniger als die JPCs. Signifikant niedriger gegenüber den iMSCs „alt“ ist die Expression in P3 ($p < 0,05$).

Vergleicht man -SB und +SB Zellen innerhalb einer Passage, zeigen +SB Zellen über alle Passagen hinweg eine geringere $P21^{Cip1}$ -Expression als -SB Zellen. Lediglich in P3 wird $P21^{Cip1}$ von -SB und +SB Zellen gleich stark exprimiert.

4 Diskussion

In vorherigen Arbeiten konnten erfolgreich iPSCs aus JPCs generiert und weiter zu iMSCs differenziert werden. Jedoch war eine Optimierung des iMSC-Differenzierungsprotokolls notwendig, da die Differenzierungseffizienz verhältnismäßig gering war. Zudem zeigten die hergestellten iMSCs zwar ein gutes osteogenes, adipogenes und chondrogenes Differenzierungspotenzial, aber bereits nach wenigen Passagen geringe Proliferationsraten und Zeichen von Seneszenz.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher eine neue und optimierte Methode zur Herstellung von iMSCs entwickelt und getestet. Dabei sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Kann die Effizienz der iMSC-Differenzierung durch schonenderes Ausplattieren verbessert werden? (siehe 4.1.1)
2. Kann die Effizienz der iMSC-Differenzierung durch die Zugabe des TGF- β -Inhibitors SB431542 verbessert werden? (siehe 4.2.1)
3. Wie lange müssen die iMSCs differenziert werden, um als osteogene Vorläuferzellen eingesetzt werden zu können? (siehe 4.2.2)
4. Bewirkt eine Verbesserung der Differenzierungseffizienz eine Reduktion der Expression von Seneszenzmarkern? (siehe 4.2.3)

4.1 Methodik

4.1.1 Verbesserung der Differenzierungseffizienz durch schonenderes Ausplattieren

In gängigen Protokollen zur iMSC-Differenzierung werden die iPSCs zu Beginn enzymatisch vereinzelt (Luzzani et al., 2015, Hynes et al., 2014). Das Vereinzeln von iPSCs führt ohne die Zugabe des ROCK(Rho Kinase)-Inhibitors jedoch zum Zelltod durch Apoptose (Ohgushi et al., 2010, Watanabe et al., 2007). Durch die Zugabe eines ROCK-Inhibitors Y27632 kann die Apoptose verhindert werden (Watanabe et al., 2007). Trotzdem bedeutet eine Vereinzeln Stress für die Zellen, welcher einen negativen Einfluss auf die Differenzierungseffizienz hat (Gokoh et al., 2011).

Um die Differenzierung zu initiieren und dabei zellulären Stress zu reduzieren, wurde ein schonenderes Passagieren der iPSCs mittels Zellschaber durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen mit dem Zellschaber vom Zellkulturplattenboden abgelöst und ohne weitere Vereinzlung für die Differenzierung in eine neue Zellkulturflasche überführt.

Im Gegensatz zu den iPSCs, die mit EDTA für die Passagierung abgelöst wurden, zeigten die mit dem Zellschaber passagierten iPSCs bereits kurz nach dem Passagieren spindelförmige Zellen an den Rändern der angehafteten Kolonien (siehe Abbildung 3, Abbildung 4). Das deutet darauf hin, dass die mechanische Stimulation durch den Zellschaber die Differenzierung der Zellen fördert. Die Differenzierung mit dieser Methode funktionierte sehr zuverlässig und lieferte in P0 nach 10 Tagen Differenzierungsdauer in fast allen Fällen eine ausreichende Menge an CD105⁺ Zellen.

In einigen Fällen zeigte sich bei zu großen iPSCs-Konglomeraten (siehe Abbildung 2) ein schlechteres Anhaften an der Zellkulturplatte, gefolgt von einem Absterben der iPSCs und somit einer geringeren Anzahl an sich differenzierenden Zellen. Auf der anderen Seite zeigte ein zu starkes Vereinzeln des Zelllayers ebenso ein Absterben und eine geminderte Zellzahl in P0. Ein vorsichtiges Ablösen mittels Zellschaber mit nicht zu großen Zellplatten schien das beste Anwachsen zu bewirken. Auch konnte eine Verbesserung des Anhaftens bei größeren Konglomeraten durch eine Verlängerung der Wirkdauer des ROCK-Inhibitors auf 48 h erreicht werden. Das Anhaften der Zellen könnte durch die Verwendung alternativer Coatings wie z.B. von Laminin521 oder Matrigel weiter verbessert werden (Hayashi and Furue, 2016, Jiang et al., 2019).

4.1.2 Verbesserung der Differenzierungseffizienz durch Kontrolle der Zelldichte

In früheren Arbeiten zeigte sich der große Einfluss der anfänglichen Zelldichte auf die Differenzierungseffizienz. Dabei wurde die Beobachtung gemacht, dass die MSC-Differenzierung durch eine zu hohe Konfluenz zu Beginn inhibiert wurde. Eine zu geringe Konfluenz in frühen Phasen der Differenzierung führte jedoch, ähnlich wie bei iPSCs, zur Apoptose der Zellen. Die Bestimmung der

Anzahl an CD105⁺ Zellen mittels Durchflusszytometrie am Ende von P0 ermöglichte die Kontrolle der Zelldichte in P1. Hierdurch wurden Unterschiede durch verschieden große Koloniefragmente und Zelldichten in P0 ausgeglichen und gleiche Ausgangsbedingungen für die Zellkulturansätze in P1 geschaffen, wodurch eine weitere Verbesserung und Standardisierung der Differenzierungseffizienz erreicht wurde. Die Anzahl der CD105⁺ Zellen wurde auch in späteren Passagen gemessen. Aufgrund der hohen Zahl an CD105⁺ Zellen und der mit fortschreitender Differenzierung abnehmenden Apoptoseneigung der Zellen, könnte ab P1 auf die Bestimmung der CD105⁺ Zellen verzichtet werden. Zudem wurde ab P1 auf das Coating der Flaschen und die Zugabe des ROCK-Inhibitors während des Passagierens verzichtet. Dadurch wurde ein Absterben aller undifferenzierter Zellen hervorgerufen und somit die differenzierten Zellen selektiert.

Zusammengefasst konnte, durch die Anwendung des neuen Differenzierungsprotokolls, eine deutliche Verbesserung der Differenzierungseffizienz und durch die Bestimmung der CD105⁺ Zellen eine gute Reproduzierbarkeit der iMSC-Generierung erreicht werden. Somit können in Zukunft auch große Mengen an iMSCs, z.B. für klinische Anwendungen, zuverlässig hergestellt werden.

4.2 Differenzierung mit und ohne SB431542 (SB)

SB431542 wurde einem Teil der Zellen, in P0 einen Tag nach dem Ausplattieren der iPSCs bis Tag 10 der Differenzierung, zugegeben (siehe Abbildung 4). Dieser TGF- β -Inhibitor soll durch die Inhibierung des TGF- β -Signalwegs zur Induktion der Differenzierung führen. Durch die Hemmung der membranständigen Rezeptoren ALK4, ALK5 und ALK7 werden auch die intrazellulären Proteine SMAD 2/3 inhibiert, welche zur Aufrechterhaltung des pluripotenten Zustands durch TGF- β benötigt werden (Inman et al., 2002). Ein positiver Effekt von SB bei der iMSC-Differenzierung konnte bereits mehrfach gezeigt werden (Mahmood et al., 2010, Chen et al., 2012).

4.2.1 Auswirkungen von SB auf die Differenzierungseffizienz

Die Zugabe von SB in P0 führte, entgegen der Erwartungen, zu einer Verminderung der Anzahl an differenzierenden Zellen. Dies zeigte sich bei der Differenzierung mit SB (siehe Abbildung 4) ab Tag 5 durch ein Absterben der Zellen an den Rändern der Kolonien (siehe Abbildung 5) und folgend auch ein Absterben vom Inneren der Zellkolonien (siehe Abbildung 6). Zudem zeigten die Daten der Durchflusszytometrie, nach der Inkubation mit SB, eine geringere Zellpositivität für die MSC-Marker CD44, CD73 und CD105 (siehe Abbildung 11, Abbildung 9, Abbildung 8). Somit wurde die Differenzierungseffizienz in P0 durch die Zugabe des SB431542 nicht verbessert. Dieses Ergebnis steht im Kontrast zu den erwähnten Publikationen, welche von einem positiven Effekt von SB während der iMSC-Differenzierung berichten (Mahmood et al., 2010, Chen et al., 2012). Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein eventuell positiver Effekt von SB auf die Differenzierungseffizienz zu Beginn von P0, durch dessen toxische Wirkung auf differenzierende oder bereits differenzierte Zellen überdeckt wird. Um einen deutlichen positiven Effekt von SB nachzuweisen, könnte die Inkubation der Zellen mit SB verkürzt werden. Da die ersten Anzeichen absterbender Zellen an Tag 5 beobachtet wurden, könnte die SB-Gabe zu diesem Zeitpunkt beendet werden, bevor sich der toxische Effekt von SB auswirkt.

Der von der ISCT (International Society for Cell & Gene Therapy) vorgegebene Richtwert für die Expression von MSC-Oberflächenmarkern von 95% innerhalb der MSC-Zellpopulation konnte nach der iMSC-Differenzierung (P3) nicht erreicht werden (siehe Abschnitt 3.2). Hierbei ist zu erwähnen, dass die ursprünglichen JPCs teilweise diesen Wert ebenso nicht erreichten (Umrath et al., 2019). Denkbar wäre eine mögliche Verbesserung der Reinheit der Zellkultur durch eine Zellsortierung mittels FACS anhand der Oberflächenmarker CD105 und CD73. Um die Sicherheit der Zellen für eine spätere klinische Applikation zu verbessern, ist die Herunterregulierung der iPSC-Marker ebenso von Bedeutung. Hier zeigt sowohl die Expression der Oberflächenmarker als auch die Genexpression eine klare Herunterregulierung. Die Expression der Oberflächenmarker (Tra-1-60, Tra-1-81 und SSEA4)

reduziert sich von den anfänglichen Werten der iPSCs zwischen 51,45 % bis 78,57% während der Differenzierung auf Werte zwischen 0,04 % bis 17,36 % für -SB und zwischen 2,94 % bis 14,27 % für +SB in P3 (siehe Abschnitt 3.2). Die teils hohen Expressionswerte sind auf die Expression von SSEA4 zurückzuführen, welches auch in MSCs exprimiert werden kann (Gang et al., 2007). Alle anderen Marker zeigen eine deutliche Herunterregulierung, sodass davon ausgegangen werden kann, dass sich unter den iMSCs keine pluripotenten Stammzellen mehr befinden. Diesen Schluss lässt auch die deutliche Herunterregulierung der Expression der iPSC-Markergene zu. Die Expression der Gene (NANOG, OCT4 und TERT) wurde, im Verhältnis zu den iPSCs, in P3 um die Faktoren $1,57 \cdot 10^{-4}$ bis $4,86 \cdot 10^{-3}$ (-SB) und die Faktoren $1,13 \cdot 10^{-4}$ bis $2,76 \cdot 10^{-3}$ (+SB) herunterreguliert (siehe Abschnitt 3.3). Trotzdem muss die Sicherheit der iMSCs im Tierversuch überprüft werden.

4.2.2 Differenzierungsdauer bis zum Einsatz der iMSCs als osteogene Vorläuferzellen

Betrachtet man die Expression der Oberflächenmarker (CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD324, CD326, Tra-1-60, Tra-1-81 und SSEA4; (siehe Abschnitt 3.2)) sowie der Gene (CD44, CD73, NANOG, OCT4 und TERT; (siehe Abschnitt 3.3)) über die Passagen P0 bis P3, sind zwischen den +SB und -SB Zellen keine signifikanten Unterschiede zu erkennen. Dass in P0 die Expression der +SB Zellen niedriger als bei den -SB Zellen ausfällt, liegt vermutlich, wie bereits in Abschnitt 4.2.1 erwähnt, an der toxischen Wirkung von SB auf die sich differenzierenden Zellen.

Definiert man als Kriterium für die Differenzierung von iPSCs zu iMSCs ausschließlich die Hochregulierung von MSC-Markern, sowie die Herunterregulierung von iPSC-Markern, dann zeigt eine Verlängerung der Differenzierungsdauer über P2 hinaus, keine weitere Verbesserung. Untersucht man die Genexpression mittels qPCR, zeigen die iMSCs schon in P1 die erwartete Hochregulierung der MSC-Marker (CD44: 86,27-fach (-SB) bzw. 66,97-fach (+SB); CD73: 99,99-fach (-SB) bzw. 123,8-fach (+SB)) und die Herunterregulierung der iPSCs-Marker (NANOG: $7,03 \cdot 10^{-4}$ -fach (-SB) bzw.

5,98 · 10⁻⁴-fach (+SB); TERT: 4,55 · 10⁻³-fach (-SB) bzw. 6,20 · 10⁻³-fach (+SB); OCT4: 3,07 · 10⁻⁴-fach (-SB) bzw. 2,09 · 10⁻⁴-fach (+SB)) (siehe Abschnitt 3.3).

Die Proteinexpressionsuntersuchungen bestätigen die Annahme, dass eine Verlängerung der Differenzierungsdauer bis P3 ebenfalls nicht notwendig zu sein scheint. Die +SB und -SB Zellen erreichen die Expressionsminima von iPSC-Markern (Tra-1-60, Tra-1-80, CD324, CD326 und SSEA4) und die Expressionsmaxima von MSC-Markern (CD29, CD44, CD73 und CD105) meist bereits in P1 oder spätestens in P2 (siehe Abschnitt 3.2). Wenn man also von der Oberflächenmarker- und Genexpression auf die Differenzierung der iMSCs schließt, sind die Zellen bereits in P1/P2 ausdifferenziert. Wenn jedoch das osteogene Differenzierungspotenzial der iMSCs in Betracht gezogen wird, dann erfolgt die Ausreifung der Zellen zu einem späteren Zeitpunkt (siehe Abschnitt 3.4).

Beide Kulturansätze (-/+SB) zeigen über die Passagen einen kontinuierlichen Anstieg des Mineralisierungspotentials, welches durch die Alizarin-Färbung visualisiert wurde (siehe Abbildung 26). Die Alizarin-Quantifizierung zeigte die höchste Kalziumkonzentration für +SB und -SB Zellen erst in P4 (siehe Abbildung 29), wobei die maximalen Werte der Mineralisierung, vor allem für -SB Zellen, vermutlich noch nicht erreicht wurden.

Eine spätere Reifung der Zellen, bezogen auf das osteogene Potential, bestätigt auch die Genexpression der osteogenen Marker ALP und OCN (siehe Abbildung 30, Abbildung 31). Die Expression von RUNX2 (weiterer osteogener Marker) nimmt mit zunehmender Passage ab (siehe Abbildung 32). RUNX2 ist jedoch ein früher Marker der osteogenen Differenzierung. Da die Genexpression in den iMSCs an Tag 15 analysiert wurden, könnte es sein, dass dieses Gen zu diesem Zeitpunkt bereits sein Expressionsmaximum überschritten hat (Winning et al., 2019). Ein Expressionsabfall über die Passagen könnte somit auch bedeuten, dass mit aufsteigender Passage und zunehmendem osteogenem Differenzierungspotenzial das Maximum der RUNX2 Expression zu früheren Zeitpunkten zu messen wäre.

Im Vergleich zur Differenzierungseffizienz, zeigte sich für das osteogene Differenzierungspotenzial ein klarer Vorteil für die Zellen, die +SB differenziert

wurden. Diese zeigten ein früheres osteogenes Differenzierungspotential als die -SB Zellen. Bereits in P2 zeigten +SB Zellen zu 13% ein starkes Mineralisierungspotenzial, wogegen Zellen -SB gar nicht mineralisierten. In P4 zeigten -SB Zellen nur zu 28%, wogegen die +SB Zellen zu 71%, eine starke Mineralisierung zeigten (siehe Abbildung 26, Tabelle 10). Vermutlich benötigen die -SB Zellen eine Verlängerung der Differenzierungsdauer bis P5/P6, um ein ähnliches Niveau des osteogenen Differenzierungspotentials wie +SB Zellen zu erreichen. Die schnellere Steigerung des osteogenen Potentials über die Passagen hinweg deutet auf eine beschleunigte Ausreifung des Differenzierungspotenzials der Zellen durch die Zugabe von SB hin.

Da SB, entgegen der ursprünglichen Annahme, keinen positiven Effekt auf die Differenzierungseffizienz hat, jedoch aber einen Vorteil für das osteogene Differenzierungspotenzial zu erbringen scheint, könnte man die SB-Gabe variieren um negative Auswirkungen auf die Differenzierungseffizienz zu verhindern, z.B. durch eine verkürzte oder zeitlich verschobene Gabe von SB. Da das Sterben von +SB Zellen erst ab Tag 5 beobachtet wurde (siehe Abbildung 5), könnte die SB-Gabe zu diesem Zeitpunkt beendet werden. Eine weitere Möglichkeit wäre, die SB-Gabe erst in P1 zu beginnen, um diesen zusätzlichen zellulären Stress auf einen Zeitpunkt zu verschieben, an dem die Zellen bereits stressresistenter sind.

4.2.3 Auswirkungen der Differenzierungseffizienz auf die Expression von Seneszenzmarkern

Die Untersuchung der SA- β -Gal Aktivität zeigte, dass iPSCs im Vergleich zu JPCs und iMSCs sehr niedrige Werte exprimierten (siehe Abbildung 37). Die -/+SB Zellen wurden in P1 nicht auf ihre SA- β -Gal Expression untersucht. Jedoch war in P0 mikroskopisch zu erkennen, dass beide Zellkulturansätze seneszente Zellen enthielten und weder die -SB Zellen noch die +SB Zellen diesbezüglich Vorteile zeigten (siehe Abbildung 36). In den Passagen 2-4 zeigten die -SB und +SB Zellen im Vergleich zu den JPCs konstant leicht erhöhte SA- β -Gal Werte. Signifikante Unterschiede konnten jedoch nicht festgestellt werden (siehe Abbildung 37). Auch mikroskopisch konnten in P2-4 keine seneszenten Zellen beobachtet werden (siehe Abbildung 7). Im Vergleich

zu den in Vorversuchen hergestellten iMSCs (iMSC „alt“), zeigten die, mit der neuen Methode generierten, iMSCs eine signifikant niedrigere SA- β -Gal Expression, was auf eine deutliche Verbesserung der iMSC-Differenzierungsmethode hinweist (siehe Abbildung 37).

Während die SA- β -Gal-Expression der neu-generierten iMSCs über den Verlauf der iMSC-Differenzierung relativ konstant bleibt, zeigt die Expression der Seneszenzmarkergene P16^{INK4a} und P21^{CIP1} in P0 zunächst einen starken Anstieg um anschließend konstant abzufallen (siehe Abbildung 38, Abbildung 39). Hier zeigte sich, dass die Seneszenzmarker zu Beginn der Differenzierung stressbedingt induziert wurden. Die Ursache dieser Induktion ist vermutlich die Vereinzelung der iPSCs, wodurch es zur Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) innerhalb der Zellen kommt (Umrath et al., 2020, Jun and Lau, 2010, Ohgushi et al., 2010). Dies sollte in zukünftigen Arbeiten analysiert und eine Optimierung der Methode, durch den Einsatz von Antioxidantien zur ROS-Reduktion, geprüft werden.

In seneszenten Zellen wird die Expression von P16^{INK4a} und P21^{CIP1} hochreguliert. Diese Gene wirken als CDK-Inhibitoren (engl. cyclin-dependent kinase), wodurch es zum Zellzyklusarrest kommt (Lozano-Torres et al., 2019). Die P16^{INK4a} und P21^{CIP1}-Expression sinkt während der Differenzierung und erreicht in P3 bei P21^{CIP1} niedrigere Werte als die der ursprünglichen JPCs.

Die Abnahme der P16^{INK4a} und P21^{CIP1}-Expression mit fortschreitender Passage kann vermutlich durch eine höhere Stresstoleranz der bereits differenzierten Zellen erklärt werden (Dannenmann et al., 2015). Zudem werden durch das Passagieren der Zellen seneszente und undifferenzierte Zellen entfernt.

Vergleicht man die SA- β -Gal-Expression von +SB und -SB Zellen, ergeben sich durchflusszytometrisch keine signifikanten Unterschiede (siehe Abbildung 37). Ein Vorteil für die +SB Zellen zeigte sich erst bei der Untersuchung der Genexpression von P16^{INK4a} und P21^{CIP1} (siehe Abbildung 38, Abbildung 39). Die Zugabe von SB scheint die mRNA Levels dieser Gene verringern zu können. Möglich wäre, dass sich hierdurch die Differenzierung beschleunigt und die Zellen dadurch früher stressresistenter werden. Dieses Ergebnis korrelierte

mit der früheren Ausreifung des osteogenen Potentials in den +SB Zellen (siehe Abschnitt 3.4).

Somit ist festzuhalten, dass die neue Methode eine bessere Qualität von iMSCs liefert als die vorherigen Differenzierungsmethoden. Das erreichte Expressionsniveau der untersuchten Seneszenzmarker liegt in der Nähe sowie zum Teil unterhalb des Expressionsniveaus der ursprünglichen JPCs (siehe Abbildung 38, Abbildung 39).

4.3 Fazit

Die neue Methode zur Generierung von iMSCs erwies sich für die Herstellung von zuverlässigen osteogenen Vorläuferzellen mit hohem Mineralisierungspotential als besser geeignet.

Die Zugabe von SB brachte Vorteile für die osteogene Differenzierung und reduzierte die Zellseneszenz. Jedoch muss aufgrund der Toxizität von SB der Applikationszeitpunkt optimiert werden. Mögliche Alternativen sind eine verkürzte Zugabe bis Tag 5 der Passage 0 oder die Zugabe in Passage 1, wenn die Zellen durch die fortgeschrittene Differenzierung bereits stressresistenter geworden sind.

Die Ergebnisse sind durch den Rahmen dieser Arbeit limitiert gewesen und könnten in weiterführenden Arbeiten vertieft werden. Beispielsweise könnte durch die Verlängerung der Differenzierungsdauer überprüft werden, ob die Differenzierungseffizienz in späteren Passagen weiter zunimmt.

Aufgrund der Vorversuche mit den iMSCs der ersten Generation (Umrath et al., 2020), sollten zusätzlich die Proliferationsraten der Zellen in den einzelnen Passagen verglichen werden. iMSCs der ersten Generation zeigten sehr niedrige Proliferationsraten. Interessant wäre zudem die Untersuchung der Telomerlängen der -/+SB Zellen über die Differenzierungsdauer hinweg. Hierdurch könnte eine mögliche Verjüngung der Zellen über eine verlängerte Differenzierungszeit nachgewiesen werden.

Zudem wäre die Überlegung, ob man in jeder Passage zusätzlich die Expression des Markers MSCA-1 prüfen sollte. Da MSCA-1 ein Marker für osteogene Vorläuferzellen aus dem Periost ist (Umrath et al., 2018, Alexander

et al., 2010), könnte man hierdurch bessere Hinweise auf die Reifung der Zellen hinsichtlich ihres osteogenen Differenzierungspotentials erhalten.

Das Ablösen des Zelllayers bei osteogen induzierten Zellen, stellte in dieser Arbeit ein großes Problem dar (siehe Abschnitt 3.4.3). Das Ablösen konnte durch den Einsatz von Dexamethason-haltigem Medium zwar reduziert werden (siehe Abbildung 33), dennoch zeigten die -SB Zellen mit aufsteigender Passage eine reduzierte Adhärenzfähigkeit (siehe Abbildung 35, Tabelle 11). Im Gegensatz dazu zeigten die +SB Zellen mit aufsteigender Passage ein geringeres Ablösen. Hier ist zu erwähnen, dass die frühere Bildung von Kalziumphosphatpräzipitaten in +SB Zellen den Zelllayer vermutlich stabilisiert hat (siehe Abbildung 34). Das Glucocorticoid Dexamethason zeigt in vivo eine hemmende Wirkung auf den Knochenaufbau, für in vitro Bedingungen ist die gegenteilige Wirkung bekannt (Weinstein, 2012). Da die Zellen zukünftig jedoch ebenso in vivo verwendet werden sollen, ist eine osteogene in vitro Kultivierung der Zellen ohne Dexamethason wünschenswert. Eine Möglichkeit, wie sich in nachfolgenden Versuchen zeigte, stellt das Beschichten der Zellkulturplatten mit z.B. Gelatine dar.

Das langfristige Ziel, die, mit den generierten iMSCs besiedelten, Scaffolds in den Menschen zu implantieren, bedarf noch weiterer Untersuchungen. Hierfür sollte zuerst das Überleben der Zellen auf 3D Scaffolds getestet werden und gesichert sein, bevor die Scaffolds am Tiermodell und später am Menschen getestet werden. Zudem müssen die generierten iMSCs im Tiermodell auf ihre Sicherheit getestet werden. Hierfür sollte man unter anderem in vivo Teratomassays durchführen, um nachzuweisen, dass keine iPSCs in der Zellkultur verblieben sind. Weiterführend müsste das osteogene Potenzial der iMSCs in vivo nachgewiesen werden.

Die Donorvariabilität der JPCs und die hierdurch entstehenden Probleme führten ursprünglich zur Suche nach Zelltypalternativen und zur Entwicklung von iMSCs. Hierbei waren die Qualität sowie die Quantität entscheidende Kriterien. Die weiteren Forschungen an und mit iMSCs sollten sich an diesen Eckpfeilern orientieren und diese verbessern, um eine sichere und zuverlässige Alternative zur autologen Knochen transplantation zu entwickeln.

5 Zusammenfassung

In der MKGC sind große Knochendefekte noch immer eine Herausforderung und eine Limitation für den Einsatz von Knochenersatzmaterialien. Das Knochen-Tissue Engineering (BTE) versucht diese Limitierungen zu durchbrechen und zukünftig Alternativen zum autologen Knochenransplantat zu entwickeln.

Hierfür werden große Mengen autologer mesenchymaler Stammzellen (MSCs) benötigt, was in vielen Fällen ein Problem darstellt, da die Vervielfältigung der Zellen in vitro durch die Abnahme des osteogenen Potentials mit steigender Passage limitiert ist. Qualität und Quantität der verwendbaren Zellen variiert zudem stark zwischen verschiedenen Patienten und ist nicht zuletzt vom Gesundheitszustand und dem Alter des Patienten sowie der Entnahmestelle abhängig.

Diese Limitierungen könnten durch die Verwendung von iMSCs als alternative Stammzellquelle überwunden werden. Diese werden durch die Differenzierung von induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSCs) zu MSC-ähnliche Zellen hergestellt. iPSCs sind fähig sich selbst zu erneuern, in vitro unbegrenzt zu proliferieren und theoretisch in jedes Gewebe zu differenzieren. Durch die unlimitierte Verfügbarkeit der iPSCs, können auch große Mengen von iMSCs hergestellt werden. Jedoch zeigten die, in vorangegangenen Arbeiten hergestellten, iMSCs bislang eine niedrige Differenzierungseffizienz und frühe Anzeichen von Seneszenz.

In dieser Arbeit sollte daher für die Herstellung der iMSCs eine neue Methode entwickelt und getestet werden. Hierbei sollten die folgenden Fragestellungen beantwortet werden.

1. Kann die Effizienz der iMSC-Differenzierung durch schonenderes Ausplattieren verbessert werden?
2. Kann die Effizienz der iMSC-Differenzierung durch die Zugabe des TGF- β -Inhibitors SB431542 verbessert werden?
3. Wie lange müssen die iMSCs differenziert werden, um als osteogene Vorläuferzellen eingesetzt werden zu können?

4. Bewirkt eine Verbesserung der Differenzierungseffizienz eine Reduktion der Expression von Seneszenzmarkern?

Zur Untersuchung der Differenzierung wurden iPSCs über 4 Passagen hinweg zu iMSCs differenziert und dabei nach jeder Passage die Expression von MSC- und iPSC-Markern mittels Durchflusszytometrie und qPCR analysiert. Zudem wurde ab Passage 1 nach jeder Passage das osteogene Potenzial der Zellen durch die osteogene Stimulation und Analyse der Mineralisierung, sowie die Expression von Seneszenzmarkern mittels Durchflusszytometrie und qPCR analysiert.

Durch die schonendere Initiierung der Differenzierung durch mechanisches Ablösen der iPSCs, konnte eine verbesserte Adhäsion, ein geringeres Absterben und eine frühere Differenzierung der Zellen beobachtet werden. Die Messung der CD105⁺ Zellen am Ende von P0 ermöglichte die Regulierung der Zelldichte in P1, welche ein kritischer Faktor für das Gelingen der Differenzierung ist.

Die in früheren Versuchen beobachtete Seneszenz von iMSCs konnte durch die neue Differenzierungsmethode ebenfalls deutlich verringert werden. Die Analyse der SA- β -Gal Expression und der Expression der mit Seneszenz-assoziierten Gene P16^{INK4a} und P21^{CIP1} der iMSCs in P3 zeigten eine niedrigere Expression gegenüber den iMSCs aus vorherigen Versuchen, sowie ein ähnliches Expressionslevel wie die JPCs. Durch die Zugabe des TGF- β -Inhibitors SB431542 verstärkte sich dieser Effekt.

Der Verlauf der Oberflächenmarker- und Genexpression während der Differenzierung zeigte, dass eine Verlängerung der Differenzierungsdauer über P2 hinaus die Herunterregulierung von iPSC-Markern und die Hochregulierung von MSC-Markern nicht weiter verbesserte.

Durch die Zugabe des TGF- β -Inhibitors SB431542 in Passage 0, zeigten die Zellen mikroskopisch früher eine MSC-ähnliche Morphologie als die Zellen ohne SB. Jedoch zeigten die Zellkulturen mit SB ab Tag 5 ein erhöhtes Zellsterben der sich differenzierenden und bereits differenzierten Zellen, was auf eine toxische Wirkung des TGF- β -Inhibitors hindeutet. Dadurch ergaben sich, trotz

der anfänglich beschleunigten Differenzierung, in späteren Passagen keine positiven Auswirkungen auf die Markerexpression.

Obwohl eine Verlängerung der Differenzierung über Passage 2 hinaus keine Verbesserung hinsichtlich der Markerexpression bewirkte, zeigte die Analyse der osteogenen Differenzierung eine spätere Ausreifung des osteogenen Potenzials. Sowohl Zellen ohne als auch mit SB zeigten mit steigender Passage einen deutlichen Anstieg der Mineralisierung. Erstaunlicherweise zeigten dabei mit SB kultivierte Zellen eine deutliche Verbesserung gegenüber Zellen, die ohne SB kultiviert wurden. Daraus ergibt sich der Schluss, dass SB431542 die Reifung des osteogenen Potenzials in den iMSCs beschleunigte.

In der vorliegenden Arbeit konnte somit ein Protokoll etabliert werden, welches die zuverlässige Herstellung großer Mengen von qualitativ hochwertigen iMSCs erlaubt. Die Verwendung des TGF- β -Inhibitors führte zu einer früheren Ausprägung des osteogenen Potenzials und gleichzeitig zu einer Reduktion der Expression von Seneszenzmarkern.

6 Literaturverzeichnis:

- Agata, H., Asahina, I., Yamazaki, Y., Uchida, M., Shinohara, Y., Honda, M. J., Kagami, H. & Ueda, M. 2007. Effective bone engineering with periosteum-derived cells. *J. Dent. Res.*, 86, 79-83.
- Alexander, D., Schafer, F., Munz, A., Friedrich, B., Klein, C., Hoffmann, J., Buhning, H. J. & Reinert, S. 2009. LNGFR induction during osteogenesis of human jaw periosteum-derived cells. *Cell. Physiol. Biochem.*, 24, 283-90.
- Alexander, D., Schafer, F., Olbrich, M., Friedrich, B., Buhning, H. J., Hoffmann, J. & Reinert, S. 2010. MSCA-1/TNAP selection of human jaw periosteal cells improves their mineralization capacity. *Cell. Physiol. Biochem.*, 26, 1073-80.
- Amini, A. R., Laurencin, C. T. & Nukavarapu, S. P. 2012. Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Crit. Rev. Biomed. Eng.*, 40, 363-408.
- Amit, M., Carpenter, M. K., Inokuma, M. S., Chiu, C. P., Harris, C. P., Waknitz, M. A., Itskovitz-Eldor, J. & Thomson, J. A. 2000. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev. Biol.*, 227, 271-8.
- Angel, M. & Yanik, M. F. 2010. Innate immune suppression enables frequent transfection with RNA encoding reprogramming proteins. *PLoS One*, 5, e11756.
- Atil, F., Kocyigit, I. D., Suer, B. T., Alp, Y. E., Yazan, M., Tekin, U. & Tuz, H. H. 2016. Clinical Evaluation of the Use of Tibial Bone Grafting in Dentoalveolar Reconstructive Surgery. *Med. Princ. Pract.*, 25, 72-8.
- Bacher, M. 2011. *Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie: 48 Tabellen*, Thieme.
- Baker, N., Boyette, L. B. & Tuan, R. S. 2015. Characterization of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in aging. *Bone*, 70, 37-47.
- Baraniak, P. R. & McDevitt, T. C. 2010. Stem cell paracrine actions and tissue regeneration. *Regen. Med.*, 5, 121-43.
- Bragança, J., Lopes, J. A., Mendes-Silva, L. & Almeida Santos, J. M. 2019. Induced pluripotent stem cells, a giant leap for mankind therapeutic applications. *World J. Stem Cells*, 11, 421-430.
- Burnouf, T., Strunk, D., Koh, M. B. & Schallmoser, K. 2016. Human platelet lysate: Replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation? *Biomaterials*, 76, 371-87.
- Chen, P., Tao, J., Zhu, S., Cai, Y., Mao, Q., Yu, D., Dai, J. & Ouyang, H. 2015. Radially oriented collagen scaffold with SDF-1 promotes osteochondral repair by facilitating cell homing. *Biomaterials*, 39, 114-23.
- Chen, Y. S., Pelekanos, R. A., Ellis, R. L., Horne, R., Wolvetang, E. J. & Fisk, N. M. 2012. Small molecule mesengenic induction of human induced pluripotent stem cells to generate mesenchymal stem/stromal cells. *Stem Cells Transl Med*, 1, 83-95.
- Clark, K., Langeslag, M., Figdor, C. G. & van Leeuwen, F. N. 2007. Myosin II and mechanotransduction: a balancing act. *Trends Cell Biol.*, 17, 178-86.

- Collins, P. & Billett, F. S. 1995. The terminology of early development: History, concepts, and current usage. *Clin. Anat.*, 8, 418-425.
- D'Ippolito, G., Schiller, P. C., Ricordi, C., Roos, B. A. & Howard, G. A. 1999. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *J. Bone Miner. Res.*, 14, 1115-22.
- Dannenmann, B., Lehle, S., Essmann, F. & Schulze-Osthoff, K. 2015. Genome surveillance in pluripotent stem cells: Low apoptosis threshold and efficient antioxidant defense. *Molecular & Cellular Oncology*, 3, e1052183.
- De Bari, C., Dell'Accio, F. & Luyten, F. P. 2001. Human periosteum-derived cells maintain phenotypic stability and chondrogenic potential throughout expansion regardless of donor age. *Arthritis Rheum.*, 44, 85-95.
- Devito, L., Klontzas, M. E., Cvorovic, A., Galleu, A., Simon, M., Hobbs, C., Dazzi, F., Mantalaris, A., Khalaf, Y. & Ilic, D. 2019. Comparison of human isogenic Wharton's jelly MSCs and iPSC-derived MSCs reveals differentiation-dependent metabolic responses to IFNG stimulation. *Cell Death Dis.*, 10, 277.
- Deyle, D. R., Khan, I. F., Ren, G., Wang, P.-R., Kho, J., Schwarze, U. & Russell, D. W. 2012. Normal Collagen and Bone Production by Genetargeted Human Osteogenesis Imperfecta iPSCs. *Mol. Ther.*, 20, 204-213.
- DFG. 2002. *DFG-Stellungnahme zum Problemerkis "Humane embryonale Stammzellen"* [Online]. Deutsche Forschungsgesellschaft. Available: https://www.dfg.de/download/pdf/dfg_im_profil/reden_stellungnahmen/archiv_download/eszell_d_99.pdf [28.10.2020].
- DFG. 2006. *Stammzellforschung in Deutschland-Möglichkeiten und Perspektiven* [Online]. Deutsche Forschungsgemeinschaft. Available: https://www.dfg.de/download/pdf/dfg_im_profil/reden_stellungnahmen/2006/stammzellforschung_deutschland_lang_0610.pdf [28.10.2020].
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D. & Horwitz, E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8, 315-7.
- Donnelly MW, S. C., Moffett BC 1973. Alveolar bone deposition by means of periosteal tension. *J Dent Res* 1973;52:63.
- Drews, K., Tavernier, G., Demeester, J., Lehrach, H., De Smedt, S. C., Rejman, J. & Adjaye, J. 2012. The cytotoxic and immunogenic hurdles associated with non-viral mRNA-mediated reprogramming of human fibroblasts. *Biomaterials*, 33, 4059-68.
- Ebraheim, N. A., Elgafy, H. & Xu, R. 2001. Bone-graft harvesting from iliac and fibular donor sites: techniques and complications. *J. Am. Acad. Orthop. Surg.*, 9, 210-8.
- Egusa, H., Sonoyama, W., Nishimura, M., Atsuta, I. & Akiyama, K. 2012. Stem cells in dentistry--Part II: Clinical applications. *J Prosthodont Res*, 56, 229-48.
- Elsalanty, M. E. & Genecov, D. G. 2009. Bone grafts in craniofacial surgery. *Craniofacial Trauma Reconstr.*, 2, 125-34.

- Erices, A., Conget, P. & Minguell, J. J. 2000. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br. J. Haematol.*, 109, 235-42.
- Eto, S., Goto, M., Soga, M., Kaneko, Y., Uehara, Y., Mizuta, H. & Era, T. 2018. Mesenchymal stem cells derived from human iPS cells via mesoderm and neuroepithelium have different features and therapeutic potentials. *PLoS One*, 13, e0200790.
- Fränkel, R. 1962. Funktionskieferorthopädie vom Mundvorhof aus mit „Funktionsreglern“. *Fortschr. Kieferorthop.*, 23, 459-480.
- Fukuta, M., Nakai, Y., Kirino, K., Nakagawa, M., Sekiguchi, K., Nagata, S., Matsumoto, Y., Yamamoto, T., Umeda, K., Heike, T., Okumura, N., Koizumi, N., Sato, T., Nakahata, T., Saito, M., Otsuka, T., Kinoshita, S., Ueno, M., Ikeya, M. & Toguchida, J. 2014. Derivation of Mesenchymal Stromal Cells from Pluripotent Stem Cells through a Neural Crest Lineage using Small Molecule Compounds with Defined Media. *PLoS One*, 9, e112291.
- Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K. & Hasegawa, M. 2009. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences*, 85, 348-362.
- Gang, E. J., Bosnakovski, D., Figueiredo, C. A., Visser, J. W. & Perlingeiro, R. C. 2007. SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. *Blood*, 109, 1743-51.
- Gilbert, S. F. 2010. *Developmental biology*.
- Giuliani, M., Oudrhiri, N., Noman, Z. M., Vernochet, A., Chouaib, S., Azzarone, B., Durrbach, A. & Bennaceur-Griscelli, A. 2011. Human mesenchymal stem cells derived from induced pluripotent stem cells down-regulate NK-cell cytolytic machinery. *Blood*, 118, 3254-62.
- Gokoh, M., Nishio, M., Nakamura, N., Matsuyama, S., Nakahara, M., Suzuki, S., Mitsumoto, M., Akutsu, H., Umezawa, A., Yasuda, K., Yuo, A. & Saeki, K. 2011. Early senescence is not an inevitable fate of human-induced pluripotent stem-derived cells. *Cell Reprogram*, 13, 361-70.
- Goldstrohm, A. C. & Wickens, M. 2008. Multifunctional deadenylase complexes diversify mRNA control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 9, 337-44.
- Grudzien-Nogalska, E., Jemielity, J., Kowalska, J., Darzynkiewicz, E. & Rhoads, R. E. 2007. Phosphorothioate cap analogs stabilize mRNA and increase translational efficiency in mammalian cells. *RNA*, 13, 1745-55.
- Hayashi, Y. & Furue, M. K. 2016. Biological Effects of Culture Substrates on Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Int.*, 2016, 5380560.
- Hwang, N. S., Varghese, S., Lee, H. J., Zhang, Z., Ye, Z., Bae, J., Cheng, L. & Elisseeff, J. 2008. In vivo commitment and functional tissue regeneration using human embryonic stem cell-derived mesenchymal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 105, 20641-6.
- Hynes, K., Menicanin, D., Mroziak, K., Gronthos, S. & Bartold, P. M. 2014. Generation of functional mesenchymal stem cells from different induced pluripotent stem cell lines. *Stem Cells Dev.*, 23, 1084-96.
- Inman, G. J., Nicolás, F. J., Callahan, J. F., Harling, J. D., Gaster, L. M., Reith, A. D., Laping, N. J. & Hill, C. S. 2002. SB-431542 is a potent and specific

- inhibitor of transforming growth factor- β superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Mol. Pharmacol.*, 62, 65-74.
- Inoue, M., Ono, T., Kameo, Y., Sasaki, F., Ono, T., Adachi, T. & Nakashima, T. 2019. Forceful mastication activates osteocytes and builds a stout jawbone. *Sci. Rep.*, 9, 4404.
- James, D., Levine, A. J., Besser, D. & Hemmati-Brivanlou, A. 2005. TGFbeta/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. *Development*, 132, 1273-82.
- Jaquiere, C., Schaeren, S., Farhadi, J., Mainil-Varlet, P., Kunz, C., Zeilhofer, H. F., Heberer, M. & Martin, I. 2005. In vitro osteogenic differentiation and in vivo bone-forming capacity of human isogenic jaw periosteal cells and bone marrow stromal cells. *Ann. Surg.*, 242, 859-67, discussion 867-8.
- Jiang, C., Zeng, X., Xue, B., Campbell, D., Wang, Y., Sun, H., Xu, Y. & Wen, X. 2019. Screening of pure synthetic coating substrates for induced pluripotent stem cells and iPSC-derived neuroepithelial progenitors with short peptide based integrin array. *Exp. Cell Res.*, 380, 90-99.
- Jun, J. I. & Lau, L. F. 2010. The matricellular protein CCN1 induces fibroblast senescence and restricts fibrosis in cutaneous wound healing. *Nat. Cell Biol.*, 12, 676-85.
- Khoo, T. S., Jamal, R., Abdul Ghani, N. A., Alauddin, H., Hussin, N. H. & Abdul Murad, N. A. 2020. Retention of Somatic Memory Associated with Cell Identity, Age and Metabolism in Induced Pluripotent Stem (iPS) Cells Reprogramming. *Stem Cell Rev Rep*, 16, 251-261.
- Knight, R. J., Reddy, C., Rtshiladze, M. A., Lvoff, G., Sherring, D. & Marucci, D. 2010. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: tip of the iceberg. *J. Craniofac. Surg.*, 21, 25-32.
- Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W. J. & Peeper, D. S. 2010. The essence of senescence. *Genes Dev.*, 24, 2463-79.
- Lapasset, L., Milhavet, O., Prieur, A., Besnard, E., Babled, A., Aït-Hamou, N., Leschik, J., Pellestor, F., Ramirez, J.-M. & De Vos, J. 2011. Rejuvenating senescent and centenarian human cells by reprogramming through the pluripotent state. *Genes Dev.*, 25, 2248-2253.
- Lee, D. Y., Cho, T. J., Kim, J. A., Lee, H. R., Yoo, W. J., Chung, C. Y. & Choi, I. H. 2008. Mobilization of endothelial progenitor cells in fracture healing and distraction osteogenesis. *Bone*, 42, 932-41.
- Lee, J. M., Kim, M. G., Byun, J. H., Kim, G. C., Ro, J. H., Hwang, D. S., Choi, B. B., Park, G. C. & Kim, U. K. 2017. The effect of biomechanical stimulation on osteoblast differentiation of human jaw periosteum-derived stem cells. *Maxillofac Plast Reconstr Surg*, 39, 7.
- Lemoli, R. M., Bertolini, F., Cancedda, R., De Luca, M., Del Santo, A., Ferrari, G., Ferrari, S., Martino, G., Mavilio, F. & Tura, S. 2005. Stem cell plasticity: time for a reappraisal? *Haematologica*, 90, 360-81.
- Leucht, P., Kim, J. B., Amasha, R., James, A. W., Girod, S. & Helms, J. A. 2008. Embryonic origin and Hox status determine progenitor cell fate during adult bone regeneration. *Development*, 135, 2845-54.

- Lian, Q., Zhang, Y., Zhang, J., Zhang, H. K., Wu, X., Zhang, Y., Lam, F. F., Kang, S., Xia, J. C., Lai, W. H., Au, K. W., Chow, Y. Y., Siu, C. W., Lee, C. N. & Tse, H. F. 2010. Functional mesenchymal stem cells derived from human induced pluripotent stem cells attenuate limb ischemia in mice. *Circulation*, 121, 1113-23.
- Liu, Y., Goldberg, A. J., Dennis, J. E., Gronowicz, G. A. & Kuhn, L. T. 2012. One-step derivation of mesenchymal stem cell (MSC)-like cells from human pluripotent stem cells on a fibrillar collagen coating. *PLoS One*, 7, e33225.
- Lozano-Torres, B., Estepa-Fernández, A., Rovira, M., Orzáez, M., Serrano, M., Martínez-Máñez, R. & Sancenón, F. 2019. The chemistry of senescence. *Nature Reviews Chemistry*, 3, 426-441.
- Luzzani, C., Neiman, G., Garate, X., Questa, M., Solari, C., Fernandez Espinosa, D., Garcia, M., Errecalde, A. L., Guberman, A., Scassa, M. E., Sevlever, G. E., Romorini, L. & Miriuka, S. G. 2015. A therapy-grade protocol for differentiation of pluripotent stem cells into mesenchymal stem cells using platelet lysate as supplement. *Stem Cell. Res. Ther.*, 6, 6.
- Mahmood, A., Harkness, L., Schroder, H. D., Abdallah, B. M. & Kassem, M. 2010. Enhanced differentiation of human embryonic stem cells to mesenchymal progenitors by inhibition of TGF-beta/activin/nodal signaling using SB-431542. *J. Bone Miner. Res.*, 25, 1216-33.
- Mandai, M., Watanabe, A., Kurimoto, Y., Hiramami, Y., Morinaga, C., Daimon, T., Fujihara, M., Akimaru, H., Sakai, N., Shibata, Y., Terada, M., Nomiya, Y., Tanishima, S., Nakamura, M., Kamao, H., Sugita, S., Onishi, A., Ito, T., Fujita, K., Kawamata, S., Go, M. J., Shinohara, C., Hata, K. I., Sawada, M., Yamamoto, M., Ohta, S., Ohara, Y., Yoshida, K., Kuwahara, J., Kitano, Y., Amano, N., Umekage, M., Kitaoka, F., Tanaka, A., Okada, C., Takasu, N., Ogawa, S., Yamanaka, S. & Takahashi, M. 2017. Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. *N. Engl. J. Med.*, 376, 1038-1046.
- McHugh, D. & Gil, J. 2018. Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. *J. Cell Biol.*, 217, 65-77.
- Misch, C. M. 2015. Complications of autogenous bone grafting. *Dental Implant Complications*.
- Mitani, K. & Kubo, S. 2002. Adenovirus as an integrating vector. *Curr. Gene Ther.*, 2, 135-44.
- Nallagatla, S. R., Toroney, R. & Bevilacqua, P. C. 2011. Regulation of innate immunity through RNA structure and the protein kinase PKR. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 21, 119-27.
- Nashun, B., Hill, P. W. & Hajkova, P. 2015. Reprogramming of cell fate: epigenetic memory and the erasure of memories past. *EMBO J.*, 34, 1296-308.
- Nelakanti, R. V., Kooreman, N. G. & Wu, J. C. 2015. Teratoma formation: a tool for monitoring pluripotency in stem cell research. *Curr. Protoc. Stem Cell Biol.*, 32, 4A.8.1-4A.8.17.
- Ohgushi, M., Matsumura, M., Eiraku, M., Murakami, K., Aramaki, T., Nishiyama, A., Muguruma, K., Nakano, T., Suga, H., Ueno, M., Ishizaki, T., Suemori,

- H., Narumiya, S., Niwa, H. & Sasai, Y. 2010. Molecular pathway and cell state responsible for dissociation-induced apoptosis in human pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 7, 225-39.
- Ohi, Y., Qin, H., Hong, C., Blouin, L., Polo, J. M., Guo, T., Qi, Z., Downey, S. L., Manos, P. D., Rossi, D. J., Yu, J., Hebrok, M., Hochedlinger, K., Costello, J. F., Song, J. S. & Ramalho-Santos, M. 2011. Incomplete DNA methylation underlies a transcriptional memory of somatic cells in human iPS cells. *Nat. Cell Biol.*, 13, 541-9.
- Okita, K., Ichisaka, T. & Yamanaka, S. 2007. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*, 448, 313-7.
- Pankajakshan, D. & Agrawal, D. K. 2014. Mesenchymal Stem Cell Paracrine Factors in Vascular Repair and Regeneration. *Journal of biomedical technology and research*, 1, 10.19104/jbtr.2014.107.
- Paul-Ehrlich-Institut, B. f. I. u. b. A. 2020. *Somatische Zelltherapeutika* [Online]. Available: <https://www.pei.de/DE/arzneimittel/atmp/zelltherapeutika/somatische-zelltherapeutika-node.html> [27.03.2020 2020].
- Pereira, M. C., Secco, M., Suzuki, D. E., Janjoppi, L., Rodini, C. O., Torres, L. B., Araujo, B. H., Cavalheiro, E. A., Zatz, M. & Okamoto, O. K. 2011. Contamination of mesenchymal stem-cells with fibroblasts accelerates neurodegeneration in an experimental model of Parkinson's disease. *Stem Cell Rev Rep*, 7, 1006-17.
- Peterson, C. M., Buckley, C., Holley, S. & Menias, C. O. 2012. Teratomas: A Multimodality Review. *Curr. Probl. Diagn. Radiol.*, 41, 210-219.
- Pittenger, M. F., Discher, D. E., Péault, B. M., Phinney, D. G., Hare, J. M. & Caplan, A. I. 2019. Mesenchymal stem cell perspective: cell biology to clinical progress. *npj Regenerative Medicine*, 4, 22.
- Rassow, J. 2006. *Biochemie: 50 Tabellen*, Thieme.
- Regmi, S., Pathak, S., Kim, J. O., Yong, C. S. & Jeong, J.-H. 2019. Mesenchymal stem cell therapy for the treatment of inflammatory diseases: Challenges, opportunities, and future perspectives. *Eur. J. Cell Biol.*, 98, 151041.
- Sabapathy, V. & Kumar, S. 2016. hiPSC-derived iMSCs: NextGen MSCs as an advanced therapeutically active cell resource for regenerative medicine. *Journal of cellular and molecular medicine*, 20, 1571-1588.
- Sakkas, A., Wilde, F., Heufelder, M., Winter, K. & Schramm, A. 2017. Autogenous bone grafts in oral implantology-is it still a "gold standard"? A consecutive review of 279 patients with 456 clinical procedures. *Int J Implant Dent*, 3, 23.
- Sato, K., Ozaki, K., Mori, M., Muroi, K. & Ozawa, K. 2010. Mesenchymal stromal cells for graft-versus-host disease : basic aspects and clinical outcomes. *J. Clin. Exp. Hematop.*, 50, 79-89.
- Schantz, J.-T., Chim, H. & Whiteman, M. 2007. Cell Guidance in Tissue Engineering: SDF-1 Mediates Site-Directed Homing of Mesenchymal Stem Cells within Three-Dimensional Polycaprolactone Scaffolds. *Tissue Eng.*, 13, 2615-2624.
- Schlaeger, T. M., Daheron, L., Brickler, T. R., Entwisle, S., Chan, K., Cianci, A., DeVine, A., Ettenger, A., Fitzgerald, K., Godfrey, M., Gupta, D.,

- McPherson, J., Malwadkar, P., Gupta, M., Bell, B., Doi, A., Jung, N., Li, X., Lynes, M. S., Brookes, E., Cherry, A. B., Demirbas, D., Tsankov, A. M., Zon, L. I., Rubin, L. L., Feinberg, A. P., Meissner, A., Cowan, C. A. & Daley, G. Q. 2015. A comparison of non-integrating reprogramming methods. *Nat. Biotechnol.*, 33, 58-63.
- Schwenzer, N. & Ehrenfeld, M. 2010. *Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie*, Georg Thieme Verlag.
- Sebbagh, M., Renvoize, C., Hamelin, J., Riche, N., Bertoglio, J. & Breard, J. 2001. Caspase-3-mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing. *Nat. Cell Biol.*, 3, 346-52.
- Shen, X., Zhang, Y., Gu, Y., Xu, Y., Liu, Y., Li, B. & Chen, L. 2016. Sequential and sustained release of SDF-1 and BMP-2 from silk fibroin-nanohydroxyapatite scaffold for the enhancement of bone regeneration. *Biomaterials*, 106, 205-16.
- Sheridan, C. 2018. First off-the-shelf mesenchymal stem cell therapy nears European approval. *Nat. Biotechnol.*, 36, 212-214.
- Shi, Y. & Massague, J. 2003. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell*, 113, 685-700.
- Soufi, A., Donahue, G. & Zaret, K. S. 2012. Facilitators and impediments of the pluripotency reprogramming factors' initial engagement with the genome. *Cell*, 151, 994-1004.
- Spitzhorn, L. S., Megges, M., Wruck, W., Rahman, M. S., Otte, J., Degistirici, O., Meisel, R., Sorg, R. V., Oreffo, R. O. C. & Adjaye, J. 2019. Human iPSC-derived MSCs (iMSCs) from aged individuals acquire a rejuvenation signature. *Stem Cell. Res. Ther.*, 10, 100.
- Squillaro, T., Galano, G., De Rosa, R., Peluso, G. & Galderisi, U. 2018. Concise Review: The Effect of Low-Dose Ionizing Radiation on Stem Cell Biology: A Contribution to Radiation Risk. *Stem Cells*, 36, 1146-1153.
- Steinle, H., Behring, A., Schlensak, C., Wendel, H. P. & Avci-Adali, M. 2017. Concise Review: Application of In Vitro Transcribed Messenger RNA for Cellular Engineering and Reprogramming: Progress and Challenges. *Stem Cells*, 35, 68-79.
- Sullivan, S., Stacey, G. N., Akazawa, C., Aoyama, N., Baptista, R., Bedford, P., Bennaceur Griscelli, A., Chandra, A., Elwood, N., Girard, M., Kawamata, S., Hanatani, T., Latsis, T., Lin, S., Ludwig, T. E., Malygina, T., Mack, A., Mountford, J. C., Noggle, S., Pereira, L. V., Price, J., Sheldon, M., Srivastava, A., Stachelscheid, H., Velayudhan, S. R., Ward, N. J., Turner, M. L., Barry, J. & Song, J. 2018. Quality control guidelines for clinical-grade human induced pluripotent stem cell lines. *Regen. Med.*, 13, 859-866.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K. & Yamanaka, S. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131, 861-72.
- Takahashi, K. & Yamanaka, S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126, 663-76.

- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S. & Jones, J. M. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282, 1145-7.
- Turinetto, V., Vitale, E. & Giachino, C. 2016. Senescence in Human Mesenchymal Stem Cells: Functional Changes and Implications in Stem Cell-Based Therapy. *Int. J. Mol. Sci.*, 17, 1164.
- Ullah, M., Liu, D. D. & Thakor, A. S. 2019. Mesenchymal Stromal Cell Homing: Mechanisms and Strategies for Improvement. *iScience*, 15, 421-438.
- Umrath, F., Steinle, H., Weber, M., Wendel, H. P., Reinert, S., Alexander, D. & Avci-Adali, M. 2019. Generation of iPSCs from Jaw Periosteal Cells Using Self-Replicating RNA. *Int. J. Mol. Sci.*, 20.
- Umrath, F., Thomalla, C., Poschel, S., Schenke-Layland, K., Reinert, S. & Alexander, D. 2018. Comparative Study of MSCA-1 and CD146 Isolated Periosteal Cell Subpopulations. *Cell. Physiol. Biochem.*, 51, 1193-1206.
- Umrath, F., Weber, M., Reinert, S., Wendel, H. P., Avci-Adali, M. & Alexander, D. 2020. iPSC-Derived MSCs Versus Originating Jaw Periosteal Cells: Comparison of Resulting Phenotype and Stem Cell Potential. *Int. J. Mol. Sci.*, 21.
- Vaskova, E. A., Steklyeneva, A. E., Medvedev, S. P. & Zakian, S. M. 2013. "Epigenetic memory" phenomenon in induced pluripotent stem cells. *Acta Naturae*, 5, 15-21.
- Victorelli, S. & Passos, J. F. 2017. Telomeres and Cell Senescence - Size Matters Not. *EBioMedicine*, 21, 14-20.
- Wanner, Y., Umrath, F., Waidmann, M., Reinert, S. & Alexander, D. 2017. Platelet Lysate: The Better Choice for Jaw Periosteal Cell Mineralization. *Stem Cells Int.*, 2017, 8303959.
- Warren, L., Manos, P. D., Ahfeldt, T., Loh, Y. H., Li, H., Lau, F., Ebina, W., Mandal, P. K., Smith, Z. D., Meissner, A., Daley, G. Q., Brack, A. S., Collins, J. J., Cowan, C., Schlaeger, T. M. & Rossi, D. J. 2010. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell*, 7, 618-30.
- Watanabe, K., Ueno, M., Kamiya, D., Nishiyama, A., Matsumura, M., Wataya, T., Takahashi, J. B., Nishikawa, S., Nishikawa, S., Muguruma, K. & Sasai, Y. 2007. A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.*, 25, 681-6.
- Weinstein, R. S. 2012. Glucocorticoid-induced osteoporosis and osteonecrosis. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.*, 41, 595-611.
- Weiss, A. & Attisano, L. 2013. The TGFbeta superfamily signaling pathway. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 2, 47-63.
- Weiss, A. R. R. & Dahlke, M. H. 2019. Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells (MSCs): Mechanisms of Action of Living, Apoptotic, and Dead MSCs. *Front. Immunol.*, 10, 1191-1191.
- Winning, L., El Karim, I. A. & Lundy, F. T. 2019. A Comparative Analysis of the Osteogenic Potential of Dental Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Dev.*, 28, 1050-1058.
- Würtele, H., Little, K. C. & Chartrand, P. 2003. Illegitimate DNA integration in mammalian cells. *Gene Ther.*, 10, 1791-9.

- Yamanaka, S. 2012. Induced pluripotent stem cells: past, present, and future. *Cell Stem Cell*, 10, 678-684.
- Yang, Y.-H. K., Ogando, C. R., Wang See, C., Chang, T.-Y. & Barabino, G. A. 2018. Changes in phenotype and differentiation potential of human mesenchymal stem cells aging in vitro. *Stem Cell. Res. Ther.*, 9, 131.
- Yoshioka, N., Gros, E., Li, H. R., Kumar, S., Deacon, D. C., Maron, C., Muotri, A. R., Chi, N. C., Fu, X. D., Yu, B. D. & Dowdy, S. F. 2013. Efficient generation of human iPSCs by a synthetic self-replicative RNA. *Cell Stem Cell*, 13, 246-54.
- Younger EM, C. M. 1989. Morbidity at bone graft donor sites. *J. Orthop. Trauma*.
- Yu, J., Hu, K., Smuga-Otto, K., Tian, S., Stewart, R., Slukvin, II & Thomson, J. A. 2009. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science*, 324, 797-801.
- Zachar, L., Bacenkova, D. & Rosocha, J. 2016. Activation, homing, and role of the mesenchymal stem cells in the inflammatory environment. *J Inflamm Res*, 9, 231-240.
- Zhao, W., Ji, X., Zhang, F., Li, L. & Ma, L. 2012. Embryonic stem cell markers. *Molecules*, 17, 6196-236.
- Zhu, S. J., Choi, B. H., Huh, J. Y., Jung, J. H., Kim, B. Y. & Lee, S. H. 2006. A comparative qualitative histological analysis of tissue-engineered bone using bone marrow mesenchymal stem cells, alveolar bone cells, and periosteal cells. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, 101, 164-9.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Klinik für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde Tübingen/ Abteilung für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie unter Betreuung von Frau Prof. Dr. D. Alexander-Friedrich durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Frau Prof. Dr. D. Alexander-Friedrich, Doktormutter und Herrn Dr. F. Umrath, Mentor.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Herrn Dr. F. Umrath von mir eigenständig und mit Unterstützung durch Herrn Dr. F. Umrath durchgeführt. Vergleichsdaten (iMSCs „alt“), welche in Abbildung 37, Abbildung 38 und Abbildung 39 erscheinen, stammen aus Vorarbeiten von Dr. F. Umrath.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig nach Anleitung durch Herrn Dr. F. Umrath durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig nach Anleitung durch Frau Prof. Dr. D. Alexander-Friedrich verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 11.08.2021

8 Danksagung

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Frau Prof. Dr. Dorothea Alexander-Friedrich für die Möglichkeit meine Doktorarbeit im Labor unter ihrer Leitung durchführen zu dürfen. Ich danke ihr für die tolle Betreuung, die hilfreichen Besprechungen, die kollegiale Atmosphäre und die stets motivierenden Worte. Dankeschön!

Weiterhin bedanke ich mich ganz herzlich bei Herrn Dr. Felix Umrath für die unzählbaren Stunden physischen und psychischen Beistandes, für das tolle Mentoring meiner Doktorarbeit, die vielen Anregungen und die Kunst mich selbst in den schwersten Phasen zu motivieren und zu unterstützen.

Außerdem danke ich meiner Familie und meinen Freunden, die immer an mich glaubten und mir immer Kraft gaben durchzuhalten um meine Ziele zu erreichen.