Aus der Klinik für Unfall- und Handchirurgie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. J. Windolf

Dentale Stammzellen in Proliferation und osteogener Differenzierung

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

> vorgelegt von Johannes Schmidt

> > 2015

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Suschek Zweitgutachter: Univ.-Prof. Dr. Stüttgen

Zusammenfassung

Die dentale Pulpa stellt eine interessante neuartige Quelle für mesenchymale Stammzellen dar. Durch ihre gute Erreichbarkeit in der Mundhöhle kann sie ohne große Gewebsdefekte entnommen werden. Weiterhin könnten in Zukunft aus medizinischen Gründen extrahierte Zähne mit gesunder Pulpa in Stammzellbanken aufbereitet und die gesicherten Stammzellen gelagert werden, wodurch eine traumatische Entnahme zu einem späteren Zeitpunkt vermieden wird. Eine Grundvoraussetzung für die Nutzung organspezifischer mesenchymaler Stammzellen ist daher deren starker Proliferations- sowie spezifischer Differenzierungspotential.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Gewinnung, molekulare Charakterisierung sowie die grundlegende Untersuchung proliferativer Eigenschaften zahnpulpastämmiger Stammzellen (DSC). Die Arbeiten zur Zellproliferation erfolgten *in vitro* unter bereits etablierten Wachstumsbedingungen sowie unter Bedingungen einer lokalen Entzündung unter Zugabe von IL-1 β , IFN γ und TNF α oder in Anwesenheit bekannter wachstumsfördernder Faktoren wie z.B. IL-6, FGF-2, TGF β , PDGF und VEGF. Zusätzlich sollte das osteogene Differenzierungspotential dieses Zelltyps im Vergleich zum gut etablierten Differenzierungspotential fettstämmiger Stammzellen dargestelltwerden.

Der wesentliche Befund der vorliegenden Arbeit ist, dass normiert auf Gramm des verwendeten Gewebes sich aus der Zahnpulpa ein Vielfaches mehr an adhärenten und sich teilenden Zellen gewinnen lässt als zum Beispiel aus Fettgewebe. Im Vergleich zu humanen mesenchymalen Stammzellen aus dem Fettgewebe, ASCs, deren potenter Stammzellcharakter mittlerweile als gut akzeptiert gilt, zeigten humane dentale Stammzellen (DSCs) zudem eine signifikant erhöhte, nahezu massive Proliferationsrate auf. Im Gegensatz zu mit ASCs beobachteten Effekten ließ sich diese hohe Teilungsrate von DSCs auch durch Zugabe hoher Mengen der genannten Wachstumsfaktoren oder proinflammatorischer Zytokine nicht zusätzlich signifikant steigern. Im Gegensatz dazu, zeigten DSCs unter den in der Literatur für osteogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen optimalen Bedingungen (100 nM Dexamethason, 10 mM β -Glycerophosphat und 50 μ M L-Ascorbinsäure-2-Phosphat im Medium mit 10% FCS) mit ASCs verglichen, sehr niedrige Anzeichen einer osteogenen Differenzierung. Dies konnte sowohl auf der Ebene typischer morphologischer Zellveränderung beobachtet werden, wie z.B. der schwachen Ausbildung einer kalzifizierten Matrix, aber auch auf der molekularen Ebene, in Form des Fehlens osteogenesespezifischer Marker wie z.B. RUNX2 demonstriert werden. Im Gegensatz dazu konnte unter ansonsten identischen Bedingungen eine ausgezeichnete osteogene Differenzierung der ASCs beobachtet werden.

Das besonders starke Wachstumspotential im Vergleich zu anderen Stammzellarten weist darauf hin, dass die menschliche Zahnpulpa eine ernstzunehmende und relevante Stammzellquelle für regenerative medizinische Therapieformen darstellen könnte. Dazu muss jedoch in Zukunft der die osteogene Differenzierungsfähigkeit limitierende molekulare Mechanismus aufgeklärt werden sowie eine das osteogene Differenzierungpotential steigende Anwendung etabliert werden.

Abkürzungen

- **APS** Ammonium Persulfat
- **ASCs** Adipose derived stem cells
- BMSCs Bone marrow derived stem cells
- BSA Bovines Serum Albumin
- cAMP Cyklisches Adenosin-Monophosphat
- **CD** Cluster of differentiation
- **COX** Cyclooxigenase
- DMSO Dimethylsulfoxid
- **DPSCs** Dental pulp stem cells
- **DSCs** Dental stem cells
- FCS Fetal calf serum
- FGF Fibroblast growth factor
- HGF Hematopoetic growth factor
- IFN Interferon
- IGF Insulin like growth factor
- IL Interleukin
- **iPSCs** Induced pluripotent stem cells
- LIF Leukämie inhibierender Faktor
- **MEM** Modified eagle medium
- mRNA Messenger RNA (Ribonucleic acid)
- **MSCs** Mesenchymal stem cells

NEAA Non essential amino acids

NO Stickstoffmonoxid

NP-40 Nonylphenolethoxylat

PBS Phosphate buffered saline

PDGF Platelet derived growth factor

PDLSCs Periodontal ligament stem cells

PGE Prostaglandin

PTH Parathormon

RIPA Radio immunoprecipitation assay

RUNX Runt related transcription factor x

SDS-PAGE Sodium dodecyl sulfate polyacrylamid gel electrophoresis

SHEDs Stem cells from human exfoliated deciduous teeth

TBS-T Tris based saline and Tween 20

TEMED Tetramethylethylendiamin

TGF *Tissue* growth factor

TH1 T-Helfer-Zellen

TNF Tumor Nekrose Faktor

UCBs Umbilical cord blood stem cells

VEGF Vascular endothelial growth factor

<u>Inhalt</u>

1 Einleitung1
1.1 Stammzellen1
1.1.1 Embryonale Stammzellen und ihre weitere
Entwicklung1
1.1.2 Mesenchymale Stammzellen3
1.1.2.1 Adipogene Stammzellen
1.1.2.2 Knochenmarkstammzellen
1.1.2.3 Nabelschnurblutstammzellen4
1.1.2.4 Dentale Stammzellen4
Anatomie des Zahnes4
Anatomie des Zahnhalteapparates8
Pulpastammzellen 8
Milchzahnstammzellen8
Parodontstammzellen8
1.2 Fragestellung - Regenerative Defektdeckung durch Tissue
Engeneering9
2 Materialien und Methoden11
2.1 Materialien11

2.1.1 (Geräte	11
2.1.2	Gefäße und Materialien zur Zellpflege	.12
2.1.3	Substanzen	.13
2.1.4	Medien	.16
2.2 Methode	en	.18
2.2.1	Isolation	.18
	Isolation mesenchymaler Stammzellen aus dentalem	l
	Pulpagwebe	.18
	Charakterisierung von dentalen Stammzellen	21
	Isolation mesenchymaler Stammzellen	aus
	Liposuktionsfett	21
2.2.27	Zellkultur	22
	2.2.2.1 Kulturbedingungen	22
	2.2.2.2 Kryokonservierung von Zellen	22
	2.2.2.3 Auftauen von Zellen	23
	2.2.2.4 Erstellen einer Wachstumskinetik	21
	2.2.2.5 Bestimmung der Zellproliferation	.24
	2.2.2.6 CellTiter-Blue [®] Cell Viability Assay	.25
	2.2.2.7 Passagieren der Zellen	.25
	2.2.2.8 Bestimmung der Zellzahl	26

2.3 Differenzierung der dentalen Stammzellen2			
2.3	3.1 Gelatinebeschichtung der Zellkulturplatten	27	
2.3	3.2 Alizarin-Rot Färbung	28	
2.3	3.3 Alizarin-Rot Rücklösung	28	
2.3	3.4 Alkalische Phosphatase Assay	28	
2.3	3.5 Proteinbestimmung der Zelllysate	29	
2.3	3.6 SDS-Page	30	
2.3	3.7 Die Western-Blot Analyse	32	
2.4	4 Statistik	34	
2.5	5 Ethikvotum	35	
3 Ergebnisse		36	
3.1 Isolation		36	
3.2 Zellcharakte	erisierung	38	
3.3 Zellprolifera	ation	39	
3.3.1 Wa	ichstumskinetik unter Standardbedingungen	39	
3.3.2 Wa	ichstumskinetik unter Zytokinzugabe	41	
Ze			
	llproliferation unter Interleukin-1β	41	
Ze	llproliferation unter Interleukin-1β Ilproliferation unter Interleukin-6	41 42	
Ze Ze	llproliferation unter Interleukin-1β Ilproliferation unter Interleukin-6 Ilproliferation unter FGF-2	41 42 43	

Zellproliferation unter IFNγ4	5
Zellproliferation unter TNFα	46
Zellproliferation unter PDGF	47
Zellproliferation unter VEGF4	.8
3.4 Differenzierung4	9
3.4.1 Alzarinrot Färbung49	9
3.4.2 Alizarinrot Rücklösung5	56
3.4.3 Alkalische Phosphatase Assay5	58
3.4.4 Western Blot6	51
4 Diskussion	2
4.1 Zellcharakterisierung6	52
4.2 Proliferation moduliert durch Zytokine6	3
4.3 Differenzierung der DPSC's6	7
4.3.1 Alizarinrot Färbung6	9
4.3.2 Alizarinrot Rücklösung6	59
4.3.3 Alkalische Phosphatase Assay7	'0
4.3.4 Western Blot7	1
4.4 Kritische Betrachtung7	1
5 Ausblick7	5
6 Quellenverzeichnis	6

<u>1 Einleitung</u>

<u>1.1 Stammzellen</u>

Im Jahre 1875 vermutete der deutsche Pathologe J. Cohnheim, dass es im Körper eine besondere Art von Zellen gebe, die "Stammzellen". Er charakterisierte diese Zellen jedoch nicht im heutigen Sinne, sondern vermutete, dass einzelne, embryonal fehlgeleitete "Stammzellen" zu einem späteren Zeitpunkt Krebs auslösen können ¹. Unter dem Begriff "Stammzellen" versteht man Zellen, die für den ständigen Ersatz abgestorbener Zellen zuständig sind. Charakteristisch für diese Zellen sind drei Eigenschaften; sie können sich erstens mitotisch teilen und somit die Anzahl der vorhandenen Stammzellen erhöhen, zweitens in andere Zellarten differenzieren und damit ein neues Gewebe bilden ⁸ und exprimieren drittens CD73, CD 90 und CD 105⁷³.

1.1.1 Embryonale Stammzellen und ihre weitere Entwicklung

Bereits wenige Stunden nach der Befruchtung findet die erste Zellteilung statt. Die Blastomeren gelten bis zum Erreichen des 8-Zell-Stadiums als totipotent, können sich also sowohl zu jedem Zelltyp eines Organismus als auch in extraembryonales Gewebe differenzieren. Ab dem 16-Zell-Stadium der Morula spricht man von Pluripotenz, da die inneren Zellen der Blastozyste in der Lage sind, jede Zelle des adulten Organismus zu bilden. Die Plazenta ist hiervon ausgeschlossen. In der weiteren Entwicklung werden aus pluripotenten multipotente Zellen (s. Abb. 1), die sich nicht mehr in alle Gewebe differenzieren können. Die prospektive Potenz wird somit gemindert. Das geringste Differenzierungspotential findet man bei unipotenten Stammzellen, die nur noch Zellen des eigenen Typs generieren. Als Beispiel sind die Basalzellen der Epidermis zu nennen, die zeitlebens für eine Erneuerung der Haut dienen. Embryonale Stammzellen besitzen das mit Abstand größte Differenzierungspotential, da sie zu fast allen Zellarten werden können. Viele hereditäre und erworbene Krankheiten könnten in Zukunft mit diesen Zellen geheilt werden, allerdings ist die Entstehung von Teratomen eine Nebenwirkung, die im Moment noch nicht zu verhindern ist ⁴. Des Weiteren ist die Forschung mit embryonalen Stammzellen ethisch bedenklich, da für ihre Gewinnung Embryonen verwendet werden. Eine Alternative bieten hier die sogenannten iPSCs, *induced pluripotent stem cells*, bei welchen es sich um reprogrammierte somatische Zellen handelt, die pluripotente Eigenschaften besitzen. Die prospektive Potenz ist noch nicht endgültig bestimmt worden, scheint aber den embryonalen Stammzellen nahe zu kommen ⁵. Zur Generierung dieser Zellen werden beispielsweise Sendai Viren verwendet, die eine Demethylierung hervorrufen können ⁷⁷, allerdings könnten bei diesem Verfahren wichtige Gene beschädigt werden.



Abb. 1 Die Entwicklung des Mesenchyms aus der Embryonalen Stammzelle.

1.1.2 Mesenchymale Stammzellen (MSCs):

Mesenchymale Stammzellen finden sich unter anderem in Knochenmark, Fettgewebe, Nabelschnurblut, peripherem Blut, fötaler Leber, Lunge und in Zähnen ² und können in Knochen-, Knorpel, Muskel-, Bänder-, Sehnen-, und Fettgewebe differenzieren und für die Regeneration dieser Gewebe sorgen ³.

Sie besitzen per Definition die Eigenschaft, sich zu proliferieren und sind adhärent an Plastikoberflächen. Weiterhin wird in der Literatur eine spezifische Konfiguration von CD-Molekülen angeben, die eine Zellpopulation als mesenchymale Stammzellen identifizieren. So zeigen sie folgendes Antigenexpressionsmuster an ihrer Oberfläche 13,14,73.

CD14 -, CD29 +, CD31 -, CD34 -, CD44 +, CD45 -, CD73 +, CD90 +, CD105 +, CD106 +, CD 133 -, CD 144 -

<u>1.1.2.1</u> Adipogene Stammzellen (ASCs):

Fettgewebe ist mesenchymalen Ursprungs und enthält mesenchymale mulitpotente Stammzellen. Seit über 10 Jahren sind etablierte Methoden und Protokolle für ihre Isolation bekannt. Sie lassen sich unter anderem zu Knochen differenzieren ¹⁶. Zu Forschungszwecken wird meist Liposuktionsfett verwendet, das im Zeitalter der Schönheitschirurgie verstärkt verfügbar ist. Nachteilig ist hier die Menge an Material, die benötigt wird, um eine ausreichende Stammzelldichte zu erreichen, allerdings ist Fett bei den meisten Patienten in ausreichender Form vorhanden. Der Einsatz zur Knochenheilung ist möglich und wurde schon durchgeführt^{69,78}.

1.1.2.2 Knochenmarkstammzellen (BMSCs)

Knochenmarkstammzellen stammen ebenfalls aus dem Mesenchym, die Isolationsmethoden sind ebenfalls etabliert ⁷⁹. Nachteilig ist die Entnahmeprozedur, bei der ein intraossärer Defekt gesetzt werden muss, die geringe Gewebemenge und

die nachlassende Potenz der Zellen im Alter. BMSCs zeigen eine niedrige Proliferationsrate, differenzieren sich auch zu Knochen ^{13,69}.

<u>1.1.2.3 Nabelschnurblutstammzellen (UCBs)</u>

Nabelschnurblut kann selbstverständlich nur direkt postnatal entnommen werden, somit kommt diese Quelle nur nach Entnahme und Konservierung für Patienten in Frage. UCBs können zwar isoliert werden, allerdings ist die Isolation nur zu 63 % erfolgreich und die Zellen lassen sich nicht zu Fett differenzieren ¹³. Ein Vorteil dieser Methode ist jedoch, dass kein Invasiver Eingriff stattfinden muss, da die Nabelschnur per se entfernt wird. Die anschließende Lagerung ist allerdings noch mit hohen Kosten verbunden, sodass zurzeit kein wirtschaftlicher Nutzen besteht, weiterhin ist die Zahl der entnommenen Zellen sehr begrenzt.

1.1.2.4 Dentale Stammzellen (DSCs)

Anatomie des Zahnes

"Der Mund ist die Tür zum Körper" heißt es in einem volkstümlichen Sprichwort. Eine bedeutende Funktion dieser Eingangspforte besitzen die Zähne. Menschen besitzen 20 Milchzähne und 32 bleibende Zähne, die alle einen ähnlichen Bauplan besitzen. Die obere Schicht der Zähne bildet der von Ameloblasten sezernierte Schmelz (s. Abb. 2), eine Schicht aus 93-98 % anorganischem Material wie zum Beispiel Kalzium, Phosphor, Magnesium, Karbonat und Natrium, der Rest des Schmelzes besteht aus Wasser⁸⁰.

Unter dem Schmelz findet sich das von Odontoblasten gebildete Dentin. Es besteht zu 70% aus anorganischem, zu 20 % aus organischem Material wie Kollagen und zu 10% aus Wasser⁸⁰. Das Dentin bildet die größte Masse des Zahnes und umschließt komplett die Zahnpulpa. So wie koronal und damit in der Mundhöhle das Dentin von Schmelz geschützt wird, wird es zervikal und apikal, also am Zahnhals und der Wurzel, das heißt unter der Schleimhaut, von Zement geschützt. Der Zement wird von Zementoblasten gebildet und besteht zu 65 % aus anorganischen, zu 23 % aus organischen Stoffen und zu 12 % aus Wasser⁸⁰.



Abb. 2 Die Anatomie der Zahnhartsubstanzen und der Pulpa.

Die dentale Pulpa wird allgemein in zwei Bereiche aufgeteilt. Koronal sitzt die sogenannte Kronenpulpa, in den Wurzelkanälen die Wurzelpulpa (s. Abb. 3).



Abb. 3 Die Aufteilung der Pulpa.

Die Pulpa (s. Abb. 4) besteht aus lockerem Bindegewebe, in dem sich Fibrozyten, Odontoblasten, Abwehrzellen und Stammzellen befinden ⁹. Die Versorgung der Pulpa erfolgt insbesondere durch das *Foramen apicale*, den Eintrittspunkt der Nerven- und Gefäßbündel an der Spitze der Wurzel, aber auch durch das apikale Delta, Seitenkanäle sowie die Pulpa-Periodontkanäle ⁹. Während die Zellen der Wurzelpulpa eher ungeordnet vorliegen, organisieren sich die Zellen der Kronenpulpa in mehreren Schichten. Zuoberst liegen die Odontoblasten, die zeitlebens Dentin bilden und mit diesem durch feine Kanäle kommunizieren. Unter den Odontoblasten befindet sich die Weil'sche Zone, eine zellarme Schicht, die vorwiegend der Ernährung der Odontoblasten und der Abwehrbereitschaft der Pulpa dient. In ihr verlaufen Endäste der Nerven und Fibroblastenfortsätze. Darunter findet sich die bipolare Zone, in der Fibroblasten und Stammzellen zu finden sind ⁷⁰. Diese kernreiche Zone stellt das Zielgebiet der Isolation dar, allerdings kann sie durch ihre geringe Größe nicht isoliert gewonnen werden. Die bipolare Zone wird von einem dichten Nervengeflecht unterwandert, welches als Raschkow-Plexus bezeichnet wird ⁹, außerdem bildet sich an der Innenseite des Dentins der Bradlaw-Plexus⁷⁰.



Abb. 4 Die **Anatomie der Grenzschicht von Pulpa und Dentin**. Dargestellt sind die zellulären Anteile und ihre Bezeichnung.

7

Anatomie des Zahnhalteapparates

Das Parodont umschließt die Zahnwurzel und dient dem Schutz und der Verankerung des Zahnes. Es besteht aus Desmodont (Wurzelhaut), Zement, desmodontalen Fasern, Alveolarknochen und Gingiva. Zellulär wurden Zementoblasten, Osteoblasten, Osteoblasten, Epithelzellen, Leukozyten und Fibrozyten nachgewiesen⁷¹.

Pulpastammzellen (DPSCs)

Seit dem Jahr 2000 ist bekannt, dass aus pulpalem Gewebe adulter Spender Stammzellen isoliert werden können. Diese Zellen erfüllen die Kriterien der Plastik-Adhärenz und können in andere Gewebe differenziert werden, außerdem bildeten sie in immunsupprimierten Mäusen Strukturen, die Dentin ähneln ¹⁰. Weiterhin eignet sich die dentale Pulpa gut zur Stammzellisolation, da aus dem Gewebe trotz der geringen Größe eine große Anzahl Stammzellen isoliert werden kann¹⁷.

Milchzahnstammzellen (SHEDs)

Im Laufe der Entwicklung der bleibenden Zähne resorbieren diese im Zuge ihres Durchbruchs in die Mundhöhle die Wurzeln der Milchzähne. Werden die Wurzeln immer kürzer, kommt es zum Wackeln der Zähne, dass irgendwann dazu führt, dass die Milchzähne ausfallen. In der Regel befindet sich in der offenen Pulpenkammer ein Geweberest der Pulpa, aus dem Stammzellen isoliert werden können, die besser proliferieren als DPSCs und *in vivo* Knochen bilden, aber kein Dentin¹¹.

Parodontstammzellen (PDLSCs)

Das parodontale Ligament übernimmt die wichtige Rolle der Verankerung der Zähne. Dabei wird der Zahn nicht starr, sondern flexibel im Knochen verankert und durch das stark durchblutete Parodontalgewebe gesichert. Mit Retinoidsäuren versehene PDLSCs differenzieren besser osteogen als DPSCs¹¹.

<u>1.2 Fragestellung – Regenerative Defektdeckung durch *Tissue Engeneering*</u>

Ossäre Gewebsdefekte, zum Beispiel infolge eines Unfalls oder einer Tumorresektion können zum Teil mit den vorhandenen Reserven nur schwer gedeckt werden. Ein Unterkiefer kann beispielsweise mit einer Rippe rekonstruiert werden. Dies stellt Operateure bei großen Defekten vor Schwierigkeiten. Körperfremde Spendertransplantate sind in der Regel nicht vorhanden und werden oft vom Immunsystem abgestoßen, was durch eine starke Immunsuppression verhindert werden soll. Nebenwirkung dieser iatrogenen Maßnahme sind zum Beispiel Schädigungen von Leber und Niere, außerdem ist das Immunsystem stark unterdrückt, dadurch steigt die Wahrscheinlichkeit eines Infektes und auch die einer Krebserkrankung⁸⁵, weshalb überlegt werden muss, ob durch eine autologe Stammzellentnahme, Transplantatgeneration und Transplantation eine Regeneration erreicht werden kann. Die dentalen Gewebe sind, wie schon oben erwähnt, eine aussichtsreiche Quelle für Stammzellen. Im Gegensatz zu Fettgewebe, aus dem man ASCs isolieren kann, sind Zähne ohne ein großes Trauma und innere Verletzungen zu gewinnen.

10.000.000 humane Weisheitszähne werden pro Jahr in den USA extrahiert ¹⁵. Etwa 56 % der Weisheitszähne werden aufgrund von entzündlichen Prozessen entfernt ⁶, etwa 17 bis 32% sind impaktiert, also vollständig von Knochen umgeben ⁷.

Der Eingriff wird meist unter Lokalanästhesie vorgenommen, dauert bei einem geübten Operateur circa 30 min und verläuft in aller Regel ohne Komplikationen. Somit könnten Zähne als Stammzellreservoir im Falle eines Knochendefektes entnommen, die Stammzellen isoliert, proliferiert, osteogen differenziert und wieder inseriert werden, um den Defekt zu decken. Bis dato wird diese Praxis noch nicht angewendet, da sich einige Probleme zeigen. Ein Gewebsdefekt sollte nach Möglichkeit relativ schnell behandelt werden, da sonst ein erneuter Eingriff durch einwachsendes Narbengewebe erschwert wird.

9

Ziel meiner Arbeit war es, DPSCs zu isolieren und das Wachstumspotential zu bestimmen, um eine vorhersagbare Prognose im Hinblick auf die zu erwartende Zellmenge treffen zu können. Die Zellproliferation sollte durch den Einsatz von Zytokinen gesteigert werden, in Folgeversuchen wird noch ermittelt, ob sich das Differenzierungspotential durch den Einsatz dieser Wachstumsfaktoren optimieren lässt.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

<u>2.1.1 Geräte</u>

Abzug	Waldner		
Blotter	Life Technologies™ Blotter: <u>Novex® Semi-Dry Blotter</u>		
Brutschrank	Thermo Electron Corporation HERAcell [®] 150		
Crvo-Einfriergerät	Schmidt Laborgeräte und Umweltsimulationen Cryo-Einfriergerät		
	Mr. Frosty		
Fuge	Thermo Scientific Heraeus Pico 17 Microcentrifuge		
Fuge groß	Thermo Scientific Heraeus Megafuge 16 R		
für 1-5 ml	Gilson PIPETMAN Classic™		
Geldokumentationsanlage	BioRad GelDoc		
Heizbad	Fisher Scientific drybath		
Magnetrührer	IKA [®] RET control/t IKAMAG [®] safety contro		
Mikroskop	Zeiss Axiovert 40		
Multipipette	Eppendorf Multipette [®] plus		
pH-Meter	HANNA instruments [®] HI 2211 Basic pH/ORP Benchtop Meter		
Photometer	Eppendorf BioPhotometer plus		
Pipettboy	BRAND accu-jet [®] pro		
	Eppendorf Research [®] fix 10 - 100 μl		
Pipetten	Eppendorf Research [®] fix 100 - 1000 μl		
	Eppendorf Research [®] fix 0,5 - 10 μl		
	Thermo Scientific DH09306		
Taumel-Bollenmischer	RM5-V 1750		
	RM5-V80 1752		
Victor	Perkin Elmer VICTOR3™ V Multilabel Counter model 1420		
Waage	KenABJ Log NoA01 Electronic Balance Typ ABJ2204 No		
	WB1150494 Ken 440-45		

Werkbank	Thermo Electron Corporation HERAsafe®		
	Thermo Electron Corporation Haraeus Fresco 17 Centrifuge		
Zentrifuge	Thermo Scientific Heraeus Megafuge 16 R		
	Thermo Scientific Heraeus Pico 17 Microcentrifuge		
Power Supplier	BioRad Power Pac HC, VWR Power Source		

2.1.2 Gefäße und Materialien zur Zellpflege

0,5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf Safe-Lock Tubes™ 0,5 ml
1,5 ml Reaktionsgefäße	SARSTEDT Reagiergefäß 1,5 ml EASY CAP
1,5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf Safe-Lock Tubes™ 1.5 ml
(safety lock)	
12-Well Platten	GREINER 12-Well CELLSTAR [®] Tissue Culture Plates
15-ml Falcons	greiner bio-one ArtNr.: 188171
2 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf Safe-Lock Tubes™ 2 ml
50-ml Falcons	greiner bio-one ArtNr.: 227261
6-Well Platten	CytoOne 6-well TC plate
96-Well Platten	GREINER 96-Well CELLSTAR [®] Tissue Culture Plates
Einfrierröhrchen	greiner bio-one Cryo.s [™] Einfrierröhrchen 2 ml™
Pasteurpipetten aus Glas	BRAND GmbH + CO KG Pasteurpipetten ISO 7712
Stripetten, 10 ml	Costar [®] 10mL Shorty Stripette [®] Serological Pipets
Stripetten, 2 ml	Costar [®] 2mL Shorty Stripette [®] Serological Pipets
Stripetten, 25 ml	Costar [®] 25mL Shorty Stripette [®] Serological Pipets
Stripetten, 5 ml	Costar [®] 5mL Shorty Stripette [®] Serological Pipets
T-25er Flaschen	CELLSTAR [®] Cell Culture Flasks 25 cm ² red filter cap
T-75er Flaschen	CELLSTAR [®] Cell Culture Flasks 75 cm ² red filter cap
Zählkammer	Neubauer Zählkammer
Zellschaber	Greiner BioOne Cell Scraper, blue, 40cm

2.1.3 Substanzen

1- Cetylpyridiniumchlorid Monohydrat	VWR [®] 1-Cetylpyridiniumchlorid Monohydrat TECHNICAL		
2-Mercaptoethanol	SIGMA-ALDRICH [®] 2-Mercaptoethanol M7154 for electrophoresis		
4-Nitrophenol Solution, 10mM	SIGMA 4-Nitrophenol Solution, 10mM N7660		
Acrylamid	Bio-Rad 30% Acrylamide/Bis Solutions		
Agarose	SIGMA-ALDRICH [®] Agarose A9539 - For routine use		
Alcianblau	Merck KGaA 101647 Alcianblau-Lösung für die Mikroskopie		
Alizarinrot	Merck KGaA 106278 Alizarin red S mono sodiumsalt (C.I. 58005		
Aqua dest. (steril)	Aqua B. Braun, 1000 ml		
Bad Stabil	neoLab-BAD Stabil [®]		
BSA	PAA BSA Fraction V pH 7,0		
CaCl ₂	SIGMA-ALDRICH [®] Calcium chloride dihydrate C7902		
CellTiter Blue	Promega CellTiter-Blue [®] Cell Viability Assay		
Dexamethasone	SIGMA Dexamethasone D1756 - ≥98% (HPLC), powder		
Dispase II	ROCHE Dispase II (neutral protease grade II)		
DMEM (4,5 g/l Glucose)	PAN P04-03500		
DMEM/F12	PAN P04-41450		
DMSO	SIGMA-ALDRICH [®] Dimethyl sulfoxide D2650 - Hybri-Max™,		
	sterile-filtered, BioReagent, suitable for hybridoma, ≥99.7%		
Eisessig	Merck KGaA 100062 Essigsäure 96% zur Analyse EMSURE®		
Ethanol zur Desinfektion	Merck KGaA 100974 Ethanol denatured with about		
	1% methyl ethyl ketone for analysis EMSURE®		
FBS	PAA Fetal Bovine Serum Gold		
FGF-2	Immunotools		
Fibronectin	Biochrom AG Fibronectin aus Humanplasma		
Gelatine	SIGMA-ALDRICH [®] Gelatin from porcine skin G1890		
	- Type A, powder, BioReagent, suitable for cell culture		

Glucose	SIGMA-ALDRICH [®] D-(+)-Glucose G7528 BioXtra, ≥99.5% (GC)			
Glycin	Merck KGaA 104201 Glycin zur Analyse			
Hepes	SIGMA-ALDRICH [®] HEPES H3375 - ≥99.5% (titration)			
IFN-v	SIGMA-ALDRICH [®] Interferon-γ human I3265≥98%			
	ImmunoTools rh IFN-gamma 352245			
	SIGMA-ALDRICH [®] Interleukin-1β human I9401 lyophilized			
IL1-ß	powder,			
	recombinant, expressed in Escherichia coli, cell culture tested			
	SIGMA-ALDRICH [®] IL-6 human SRP3096 - Animal-component free,			
IL6	recombinant, expressed in Escherichia coli			
	ImmunoTools rh IL-6			
11.8	SIGMA-ALDRICH [®] Interleukin-8 human I1645 -≥98%			
	ImmunoTools rh II-8			
Insulin	SIGMA-ALDRICH [®] Insulin solution human			
Isopropanol	Merck KGaA 818766 2-Propanol EMPLURA®			
Kaliumchlorid	Carl Roth [®] Kaliumchlorid ≥99,5 %, p.a., ACS, ISO			
Kollagenase Typ I	Biochrom AG Collagenase Typ I, CLS I			
L-Ascorbinsäure-2-	SIGMA-ALDRICH [®] L-Ascorbic acid 2-phosphate sesquimagnesium			
Phosphat	salt hydrate A8960 - ≥95%			
L-Glutamin	Life Technologies™ L-Glutamine - 200 mM (100X), liquid			
Methanol	Merck KGaA 106009 Methanol zur Analyse EMSURE®			
	ACS,ISO, Reag. Ph Eur			
Milchpulver	Carl Roth [®] Milchpulver T145.2			
NaCl 0,9%	B. Braun NaCl 0,9% Spüllösung			
NaCl2	VWR [®] Natriumchlorid ACS, ISO, Reag.Ph.Eur. zur Analyse			
Nicht-essentielle	Life Technologies™ MEM Non-Essential Amino Acids Solution			
Aminosäuren	10 mM (100X), liquid			
PBS	Biochrom AG PBS Phosphate Buffered Saline (Dulbecco)			
	PBS-Lösung mit Ca2+, Mg2+			

Penicillin / Streptomycin	Gibco [®] Penicillin-Streptomycin 100X Solution (1000 units)			
Ponceau	SERVA Electrophoresis Ponceau S			
Runx2	Santa Cruz Biotechnology [®] runx2 M-70			
Salzsäure	Salzsäure rauchend 37 % ROTIPURAN [®] , 37 %, p.a., ACS, ISO			
SDS	VWR [®] Natriumdodecylsulfat (SDS) für die Molekularbiologie			
Sodium Pyruvat	Gibco [®] Sodium Pyruvate MEM 100 mM, liquid			
Spitzenfiltervorsätze	neoLab Spitzenfiltervorsätze 0,22 µm			
	SIGMA-ALDRICH [®] β-Glycerophosphate disodium salt hydrate			
ß Glycorophosphat	G9422 BioUltra, suitable for cell culture, suitable for plant cell			
is-diverophosphat	culture,			
	≥99.0% (titration			
TEMED	VWR [®] N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) zur Analyse			
TGF-β	ImmunoTools rh TGF-beta 1			
TNF-α	PeproTech [®] Human TNF-a 50 μg			
Tris	Carl Roth [®] TRIS PUFFERAN [®] , ≥99,3 %, Buffer Grade,			
	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan			
Tris-Base	Merck KGaA 648310 Tris Base, Molecular Biology Grade			
IIIS-DdSC	Calbiochem®			
Tris-HCl	Merck KGaA 648310648313 Tris, Hydrochloride, ULTROL [®]			
	Grade Calbiochem [®]			
Trypsin/FDTA	Biochrom AG Trypsin/EDTA-Lösung (0,05%/0,02%) in PBS,			
	ohne Ca2+, MG2+			

3.1.4 Medien

Proliferationsmedium für DSCs

- 500 ml Dulbeccos MEM 4,5 mg / l Glucose
- 20 % FCS
- 1 % Penicillin / Streptomycin
- 1 % Glutamin
- 1 % NEAA
- 2 ng / ml FGF-2
- 10 µM L-Ascorbinsäure-2-Phosphat

Proliferationsmedium für ASCs

- 500 ml Dulbeccos MEM 4,5 mg / l Glucose
- 10 % FCS
- 1 % Penicillin / Streptomycin
- 1 % Glutamin
- 2 ng / ml FGF-2

Osteogenes Differenzierungsmedium

- 500 ml Dulbeccos MEM 4,5 mg/l Glucose
- 10 % FCS
- 1 % Penicillin / Streptomycin
- 10 mM Glycerophosphat
- 50 µM L-Ascorbinsäure-2-Phosphat
- 100 nM Dexamethason

Einfriermedium

- 10 % DMSO
- 90 % FCS

RIPA-Puffer modifiziert nach Abcam

- 150 mM NaCl
- 50 mM Tris bei pH=8
- 1 % NP-40
- 0,5 % Na-Desoxycholat
- 0,1 % SDS

RIPA + Complete

1 Tablette Proteaseinhibitor und 1 Tablette *Complete*, mini wurde in 7 ml RIPA gelöst. *Aliquots* á 1 ml wurden bei – 20°C gelagert.

Western Blot Sammelgel

- 3 ml H₂O
- 1,25 ml 4-fach Sammelgelpuffer
- 650 μl 30 % Acrylamid
- 25 μl 10 % APS
- 10 μl TEMED

<u>10 % Trenngel</u>

- 3,125 ml H₂O
- 2,5 ml 30 % Acrylamid
- 1,875 ml 4-fach Trenngelpuffer
- 25 μl 10 % APS
- $10 \ \mu l \ TEMED$

2.2 Methoden

2.2.1 Isolation

Isolation mesenchymaler Stammzellen aus dentalem Pulpagwebe

Um mesenchymale Stammzellen zu isolieren, wurde die Methode nach Gronthos angewandt ¹⁰. Impaktierte Weisheitszähne werden unter teilsterilen Bedingungen extrahiert und hatten noch keinen Kontakt zur stark mit Keimen besiedelten Mundhöhle. Die Zähne wurden kurz nach der operativen Entnahme in ein Glasgefäß mit Wachstumsmedium gelegt, in der sie vollständig von Medium bedeckt waren. Im nächsten Schritt wurden die Zähne aus dem Nährmedium entnommen und an der Schmelz-Dentin-Grenze unter Wasserkühlung mit einem zuvor sterilisierten Diamantbohrer bei 40.000 U/min an gefräst, um sie später leichter spalten zu können (Abb. 5)



Abb. 5 Die Fräsung entlang der Schmelz-Zement-Grenze.

Anschließend wurden die Zähne wieder in die Gefäße gelegt. Der Transport des Behälters erfolgte bei -5°C. Im Labor wurden die Zähne unter sterilen Bedingungen mit einer Pinzette aus dem Gefäß entnommen und auf eine Petrischale mit 1 ml PBS gelegt. An die Sollbruchstelle wurde eine Extraktionszange angesetzt und die Zähne in 2 Teile gespalten (Abb. 6).



Abb. 6 Der entzweite **Zahn mit freiliegender Pulpa** und Zange.

Die freiliegende Zahnpulpa (s. Abb. 7) wurde mit einem scharfen Löffel aus dem Zahn entfernt und in ein Well einer 6-Well Platte gelegt (s. Abb. 8).



Abb. 7 erlaubt den Blick von oben auf die **Pulpa**.



Abb. 8 Pulpastücke in den entsprechenden Wells mit Kollagenase-Dispase-Lösung.

Danach wurde die Pulpa zum Verdau des Gewebes mit 1 ml Kollagenase-Dispase-Lösung (1 % Kollagenase, 1,5 % Dispase mit Kollagenasepuffer) versetzt und mit einem Skalpell in ca. 1 x 1 mm große Stücke zerschnitten. Nach 1 h Inkubation bei 37°C und 5

% CO₂ wurde die Suspension durch ein 20 μm Sieb in ein 50 ml Falcon überführt und 5 min bei 5000 U/min zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde 2 ml Kulturmedium auf das Pellet gegeben und 1 min lang resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in eine T25-Flasche mit 8 ml Kulturmedium überführt. Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37°C und 5 % CO₂. Etwa 24 h später wurde das Medium entfernt und die Zellen einmal mit warmem PBS gewaschen, um die nicht adhärenten Zellen zu

entfernen. Anschließend wurden wieder 8 ml Kulturmedium in die Flasche gegeben und die Zellen bis zum Erreichen der Konfluenz bei 37°C und 5% CO $_2$ kultiviert.

Charakterisierung von dentalen Stammzellen

Nachdem die Zellen trypsiniert wurden, wurden sie mittels Durchfluss-Zytometrie auf die Expression folgender Oberflächenantigene analysiert. Es wurden CD 29, 34, 44, 45, 73, 90 und 105 analysiert.

Isolation mesenchymaler Stammzellen aus Liposuktionsfett

Zur Isolation der mesenchymalen Stammzellen wurde die Methode nach Bunnell angewandt, dazu wurde Liposuktionsfett verwendet ⁸¹. Es wurden jeweils circa 40 ml in ein 50 ml Falcon gegeben und für 10 min bei 1200 U/min zentrifugiert, um das Gewebe aufzutrennen. Nach der Zentrifugation zeigten sich drei Phasen von oben nach unten - Eine ölige Phase mit Fett aus beschädigten Vakuolen, eine bindegewebige Phase aus Bindegewebe und Fett und zuunterst eine flüssige Phase aus Blut. Die oberste, ölige Phase wurde verworfen, die mittlere Phase in ein neues 50 ml Falcon überführt und 1:1 mit einer Kollagenase-Lösung versetzt. Die Suspension wurde bei 37°C im Wasserbad für 45 min schwenkend inkubiert und anschließend durch ein 20 µm Zellsieb filtriert. Das Filtrat wurde für 10 min bei 1200 U/min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das entstandene Zellpellet am Boden des Falcons wurde mit 30 ml Kochsalzlösung resuspendiert und die Suspension wiederum für 10 min bei 1200 U/min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Proliferationsmedium resuspendiert und die Suspension in T-75er-Flaschen ausgesät. Nach 24 h Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen mit PBS gewaschen, um nicht adhärente Zellen wie Erythrozyten zu entfernen.

2.2.2 Zellkultur

<u>2.2.2.1 Kulturbedingungen</u> Die Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO_2 im Brutschrank inkubiert. Die Kultivierung erfolgte direkt nach Isolation in T-25er-Flaschen, ab der ersten Passage in T-75er-

Flaschen.

2.2.2.2 Kryokonservierung von Zellen

Zu Beginn wurde das Medium abgenommen und die Zellen einmal mit 5 ml 37°C warmem PBS pro T-25er-Flasche gewaschen, um nicht adhärente Zellen zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen trypsiniert (s. S. 25), die Reaktion mit Medium abgestoppt und die Zellen vollständig resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein Falcon überführt und die Zellzahl durch Zählen bestimmt. Nach Zentrifugation bei 1100 U/min für 5 min wurde der Überstand abgenommen und die Zellen mit der Menge Einfriermedium versetzt, die nötig war, um $1*10^{6}$ Zellen pro ml zu erhalten. In ein Kryotube wurden jeweils 1 ml der Suspension gegeben und nach dem Verschließen direkt auf Eis gestellt, um die zytotoxische Wirkung von DMSO zu hemmen (DMSO entfaltet seine zytotoxische Wirkung erst ab 0°C). Anschließend wurden die Kryotubes in Kryo-Einfriergeräte einsortiert, welche durch ein Isopropanol-Reservoir ein rapides Absinken der Temperatur verhindern und eine Temperaturabsenkung um 1°C pro min gewährleisten. Die bestückten Kryo-Einfriergeräte wurden bei -80°C eingefroren und

die Zellen nach frühestens 24 h aus dem Kryo-Einfriergerät entnommen und bei -80°C gelagert.

2.2.2.3 Auftauen von Zellen

Ein Kryotube mit 1 x 10⁶ Zellen wurde im Wasserbad bei 37°C unter leichtem Schwenken aufgetaut. Die bereits flüssige Zellsuspension wurde in ein Falcon, in welches bereits 10 ml 37°C warmes Wachstumsmedium vorgelegt worden war, überführt. Danach wurde die Suspension bei 1100 U/min 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Pellet mit 5 ml Wachstumsmedium resuspendiert und die entstandene Zellsuspension in eine mit 13 ml 37°C warmem Wachstumsmedium bestückte T-75er-Flasche überführt. Durch leichtes, manuelles Schwenken wurde eine gleichmäßige Verteilung der Zellen gewährleistet.

2.2.2.4 Erstellen einer Wachstumskinetik

Seit längerer Zeit ist bekannt, dass Zellen in Kultur ein exponentielles Wachstum zeigen (exponentielle log-Phase), um danach ein Wachstums-Plateau zu bilden ¹⁸. Um zu bestimmen, zu welchem Zeitpunkt die Zellen in die exponentielle Wachstumsphase übergehen, wurde nach der Isolation eine Zellkinetik angesetzt. Dazu wurden die Zellen trypsiniert (s. S. 25) und gezählt (s. S. 26). Anschließend wurde die

Zellsuspension mit Kulturmedium auf $5 \cdot 10^3$ Zellen / ml verdünnt. Dann wurde jeweils 1 ml des Gemisches in eine 12-Well-Platte überführt und die Platte leicht geschwenkt,

um die Zellen gleichmäßig in den Wells zu verteilen. Zuletzt wurden sie im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO_2 kultiviert. Nun wurde von Tag 1 (1. Tag nach dem Ausplattieren) bis Tag 12 täglich 3 Wells trypsiniert und durch Zellzählung die Zellzahl jedes Wells bestimmt.

2.2.2.5 Bestimmung der Zellproliferation

Dentale Stammzellen besitzen im Vergleich zu adipogenen Stammzellen eine deutlich erhöhte Proliferationsrate (s.S.37). Da für eine klinische Anwendbarkeit die Zahl der aus dem pulpalen Gewebe erhaltenen Zellen trotzdem viel zu gering wäre, wurde versucht, durch Zytokinzugabe am Zeitpunkt des Übergangs der lag- zur log-Phase eine maximale Proliferationsrate zu erreichen. Die Versuche wurden auf 12-Well-Platten in 3-fach Bestimmung durchgeführt, die vorher mit Gelatine beschichtet wurden. Dies geschah im Hinblick auf die spätere Differenzierung, die ebenfalls mit beschichteten Platten erfolgte. Zu Beginn des Versuches wurden Zellen aus T-75er-Flaschen trypsiniert, gezählt und auf 5*10³ Zellen/ml Zellkulturmedium verdünnt. Pro Well wurde 1 ml der Zellsuspension eingesetzt und durch leichtes Schwenken gut verteilt. Am 4. Tag danach wurde das Zellkulturmedium entfernt und durch ein mit Zytokinen versetztes Medium ausgetauscht (s. Tab. 1). Die Zytokine wurden stets genau nach Herstellerangabe gelagert und rekonstituiert. Um eine exakte Dosierung zu gewährleisten, wurde das Wachstumsmedium mit der entsprechenden Konzentration an Zytokinen versehen. Anschließend wurde genau 1 ml Zytokin-Medium-Gemisch pro Well pipettiert. Sämtliche Vorarbeiten wie zum Beispiel die Vorverdünnung der rekonstituierten Zytokine mit destilliertem Wasser wurden auf Eis durchgeführt, um die Wirkung der Zytokine nicht zu beeinträchtigen.

Zytokin	Konzentration	Konzentration	Konzentration	Konzentration
	l in U/l	ll in U/l	III in U/I	IV in U/l
IL-1β	10	33	100	333
IL-6	10	33	100	333
IFN-y	10	33	100	333
TNF-a	10	33	100	333
TGF-b	10	33	100	333
FGF-2	10	33	100	333
VEGF	0,1	0,3	1	3
PDGF	0,1	0,3	1	3

Zytokine und Konzentrationen

Tab. 1 beschreibt die eingesetzten Zytokine und ihre Konzentration (I-IV) in U/I (Units pro Liter).

2.2.2.6 CellTiter-Blue® Cell Viability Assay

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde der Umsatz von Resazurin, welches vitale Zellen in Resorufin reduzieren, ermittelt. Dieser Resorufin-Nachweis lässt Rückschlüsse auf die Stoffwechselaktivität zu und korreliert mit der Zellzahl. Zu Beginn wurden 100 µl CellTiter-Blue in ein Well mit 1 ml Kulturmedium pipettiert, wobei die gleichmäßige Verteilung der Färbelösung durch leichtes Schwenken für 1 min erreicht wurde. Nach

einer Inkubationszeit von 1 h bei 37°C und 5 % CO $_2$ wurde die Fluoreszenz bei 590 nm photometrisch bestimmt.

2.2.2.7 Passagieren der Zellen

Mesenchymale Stammzellen zeigen unter anderem Adhärenz auf Plastik-Oberflächen ¹⁹. Daher benötig man ein standardisiertes Vorgehen zum Ablösen der Zellen. Nach Entfernen des Mediums wurden die Zellen mit 500 µl 37°C warmem Trypsin/EDTA (Gibco) pro Well einer 12-Well-Platte beziehungsweise 5 ml pro T-75er- und 2,5 ml pro T-25er-Flasche versetzt und für 5 min bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Daraufhin wurde unter dem Lichtmikroskop überprüft, ob sich alle Zellen gelöst haben. Falls nicht, wurde das *Shake-Off*-Verfahren angewandt. Dabei wird die Platte vorsichtig gegen den Handballen geschlagen, um adhärenten Zellen vom Wellboden zu lösen. Falls danach noch keine vollständige Ablösung der Zellen zu beobachten war, wurde die Inkubation um maximal 5 min verlängert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Zugabe von FCS-haltigem Medium im Verhältnis von 1:1 zur Trypsin-Menge.

2.2.2.8 Bestimmung der Zellzahl

Zur quantitativen Bestimmung der Zellzahl in 12-Well-Platten wurden die Zellen zunächst trypsiniert. Die Zellsuspension wurde aus 3 Wells in ein 15 ml Falcon überführt. Nach Zentrifugation bei 1100 U/min für 5 min wurde das Medium bis 1 mm über dem Pellet abgesaugt und das Zellpellet im Überstand resuspendiert. Der Vorgang erfolgte mit einer 50 µl Pipette, mit der auch eine 50 µl Probe entnommen wurde. Diese wurde auf einer 96-Well-Platte mit 50 µl Trypan-Blau-Lösung vermischt und anschließend auf eine Neubauer-Zählkammer appliziert. Die Zählkammer wurde vorbereitet, indem die Oberseite mit der Atemluft angefeuchtet und ein Deckgläschen mit leichtem Druck aufgesetzt wurde, bis die Newton'schen Ringe erschienen. Unter dem Lichtmikroskop wurden nun in 4 Quadranten alle lebendigen (und damit nicht angefärbten) Zellen gezählt. Die Zellkonzentration per ml wurde mir folgender Formel berechnet:

X sei die Zahl lebender Zellen in 4 Quadranten, y die Zellzahl pro ml.

$$x \cdot 2 \cdot 10^4 = y$$

4

Anschließend wurde die Restflüssigkeit der Falcons bestimmt, indem in eine 1000 µl Pipette die Flüssigkeit aufgenommen und unter ständigem Drehen des Einstellrades der Pegel solange verschoben wurde, bis er genau die Pipettenspitze berührte. 50 µl Volumen wurden vorher entnommen und anschließend auf das Flüssigkeitsvolumen und der Pipettenspitze addiert. Das Volumen in μ l wurde danach in folgende Formel einbezogen:

y sei weiterhin die Zellzahl pro ml, z das Volumen in µl, g die Gesamtzellzahl pro Well.

 $y \cdot z \cdot 0,001 \div 3 = g$

2.3 Differenzierung der dentalen Stammzellen

Um die dentalen Stammzellen in osteogene Zellen zu differenzieren, wurden zunächst die Platten mit Gelatine beschichtet und die ausplattierten Zellen bis zum Erreichen der Konfluenz unter Standardbedingungen inkubiert. Man geht davon aus, dass Zellen erst nach erfolgter Kontaktinhibition gut differenzieren können.

Nach Erreichen der Konfluenz wurde die obere Reihe der Wells als Kontrolle festgelegt, also weiterhin mit Wachstumsmedium versehen, welches 2 mal pro Woche gewechselt wurde. Die anderen Wells wurden mit osteogenem Differenzierungsmedium versehen. Der Medienwechsel erfolgte ebenfalls 2 mal pro Woche.

2.3.1 Gelatinebeschichtung der Zellkulturplatten

Um ein Ablösen der DPSCs nach längerer Kultivierung zu verhindern, wurden die Wells mit Gelatine beschichtet. Dazu wurde eine 1 %-ige Gelatinelösung in destilliertem Wasser hergestellt und im Autoklaven gleichzeitig sterilisiert und aufgekocht. Die fertige Lösung kühlte 24 Stunden ab und wurde dann in 300 µl Portionen in die Wells einer 12-Well-Platte gegeben. Anschließend wurde durch leichtes Schwenken die gleichmäßige Verteilung gewährleistet. Die Wells wurden im Brutschrank bei 37°C und

5 % CO₂ eine Stunde getrocknet. Danach wurde der Überstand entfernt und die Wells mit 500 μl PBS überschichtet, um eine Austrocknung zu verhindern und überschüssige Gelatinereste zu entfernen.
2.3.2 Alizarin-Rot Färbung

Das Kulturmedium der Wells wurde unter der Sterilbank entfernt. Anschließend wurde für eine min jeweils 2 ml PBS pro Well auf die Zellen gegeben. Das PBS wurde entfernt und die Zellen für 15 min mit 4 % Paraformaldehyd in PBS fixiert. Das Waschen der Zellen erfolgte nach Entfernung des Paraformaldehyds mit jeweils 2 ml destilliertem Wasser für 1 min. Die vorher angesetzte Alizarin-Rot-Lösung (0,5 % Alizarin-Rot in destilliertem Wasser auf pH 4,1 bis 4,3 eingestellt) wurde nach Absaugen des destillierten Wassers auf die fixierten Zellen gegeben und für 30 min bei 37°C und 5 %

CO₂ inkubiert. Anschließend wurde nach dem Entfernen der Lösung 4 mal 1 min mit 2 ml destilliertem Wasser gewaschen, dann mit 1 ml PBS überschichtet und das Ergebnis lichtmikroskopisch analysiert und fotografisch dokumentiert.

2.3.3 Alizarin-Rot-Rücklösung

Um die Intensität der Färbung quantitativ bestimmen zu können, wurde die Alizarin-Rot-Färbung zurückgelöst. Dies erfolgte nach Abnehmen des PBS durch Inkubation der gefärbten Zellen in 1 ml 10 % Cetylpyridinium-Chlorid (1 g Cetylpyridinium-Chlorid in 10 ml Wasser). Nach vollständiger Rücklösung auf dem Taumler bei 60 U/min wurde die Absorption des Überstandes gemessen. Als Blank diente 1 ml 10 % Cetylpyridinium-Chlorid und gegen diesen wurde die optische Dichte bei 600 nm gemessen. Lag der Wert über 1, wurde mit Cetylpyridinium-Chlorid verdünnt und erneutgemessen.

2.3.4 Alkalische Phosphatase Assay

p-Nitrophenol dient zum Nachweis der Aktivität der alkalischen Phosphataseaktivität. Das Enzym setzt p-Nitrophenylphosphat zu Nitrophenol und einem anorganischen Phosphatmolekül um. Im basischen pH-Bereich geschieht ein Farbumschlag, dessen Endprodukt ein Absorptionsmaximum hat, welches bei circa 405 nm liegt. Das Nährmedium wurde in den entsprechenden Wells abgesaugt und die Zellen zweimal für 1 min mit 1 ml PBS gewaschen. Danach wurde das PBS entfernt und durch 1 ml der 10 mM p-Nitrophenylphosphatlösung ersetzt. Der nun entstehende, gelbe Farbumschlag wurde nach 15 min Inkubationszeit unter Raumtemperatur bei 405 nm gemessen.

2.3.5 Proteinbestimmung der Zelllysate

Um die Proteinmenge der Proben zu bestimmen, wurden die Zellen nach Entfernung des Mediums einmal mit 1 ml 37°C warmem PBS pro Well für 1 min gewaschen. Danach wurden die Zellen trypsiniert und die Zellen einer Spenderin getrennt nach Kontrolle und Probe gepoolt. Die Gefäße wurden verschlossen und 10 min bei 13.000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurde das Medium vollständig entfernt, die Proben mit 60 μ l RIPA-Puffer versehen und durch invertieren 1 min lang gründlich durchmischt, um die Proteasen und Phosphatasen zu hemmen. Die fertig gemischte Zellsuspension wurde bei -80°C eingefroren.

Zur Proteinbestimmung wurde die Zellsuspension im Eisbad aufgetaut und anschließend mit 10 Ultraschallstößen sonifiziert, wieder auf Eis gelegt und im Vortexer gut durchmischt. 4 μl der Suspension wurden mit 20 μl PBS verdünnt.

Der Proteingehalt der Proben wurde anhand eines Proteinstandards (BSA-Standard s. Tab. 2) ermittelt.

Konzentration	Probe	BSA-Standard	PBS oder RIPA
in μg/μl		in μl	In μl
2	А	300	0
1,5	В	375	125
1	С	325	325
0,75	D	175 von B	175
0,5	E	325 von C	325
0,25	F	325 von E	325
0,125	G	325 von F	325
0,025	Н	100 von G	400
0 (Blank)	1	0	400

BSA-Standard

Tab. 2 Konzentration des BSA-Standards.

Nach Ansetzen des Standards wurden die vorbereiteten Proben jeweils in Doppelbestimmung auf eine 96-Well-Platte pipettiert, danach wurde 200 µl Working Reagenz (*Biocinonic Assay* von Thermo Scientific) dazu gegeben (50 Teile Biocinonsäure und 1 Teil 4 % Kupfersulfat). In der sogenannten Biuret-Reaktion bilden im alkalischen pH-Bereich Proteine mit mindestens drei Aminosäuren einen hellblauen Chelatkomplex mit Cu¹⁺. Im folgenden Schritt reagieren Kupferkationen und Biocinonsäure miteinander zu einem rotem Chelatkomplex. Nach Abdecken der Platte wurde diese für 30 Sekunden auf dem Rüttler vermischt. Anschließend betrug die

Inkubationszeit bei 37°C und 5 % $\rm CO_2$ 30 min. Die Absorption wurde bei 562 nm gemessen.

2.3.6 SDS-PAGE

Um die osteogene Differenzierung auf molekularer Ebene nach zu weisen, wurden Proteinlysate von differenzierten und nicht differenzierten Zellen auf das Protein RUNX2 analysiert. Zunächst wurden Gele gegossen, die jeweils aus einem Sammel- und einem Trenngel bestanden. Das Sammelgel dient dazu, die Proben im Gel auf zu konzentrieren, wodurch eine definierte Proteinbande an der Grenze von Sammel- und Trenngel entsteht. Im Trenngel erfolgt anschließend die Auftrennung der Proteine nach Molekulargewicht. Die Prozentigkeit des Trenngels richtet sich in der Regel nach der Größe des zu detektierenden Proteins. Da das in der vorliegenden Arbeit zu detektierende Protein (RUNX2) 57 kDa groß ist, wurden 10 %-ige Gele benötigt. Das Trenngel wurde zwischen zwei BioRad Glasplatten gegeben, die durch einen Spacer auf 1 mm Abstand eingestellt waren. Danach wurde sofort mit Ethanol überschichtet. Nach 30 min wurde das Sammelgel fertiggestellt, das Ethanol vorsichtig abgegossen und das Sammelgel eingefüllt. Anschließend wurde ein Probenkamm luftblasenfrei in das noch flüssige Sammelgel gesteckt, um somit Taschen zum Einbringen der Proben zu erhalten. Nach der Polymerisierung des Gels wurde der Kamm vorsichtig entfernt und das Gel bis zur Verwendung in feuchten Tüchern bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

Durch die Proteinbestimmung wurde sichergestellt, dass immer genau 40 µg Protein pro Tasche aufgetragen wurden. Um eine Auftrennung nach der Masse zu gewährleisten, mussten die Proteine zuvor denaturiert und linearisiert werden.

Die Proben wurden durch Zugabe des Laemmli-Puffers 5 min lang bei 95°C hitzedenaturiert. Die Denaturierung erfolgte durch Reduktion der Disulfidbrücken mittels β-Mercaptoethanol, welches im Laemmli-Puffer enthalten ist. Das enthaltene SDS (Natriumdodecylsulfat) überdeckt die Eigenladung der Proteine und stellt eine konstant negative Ladungsverteilung linear zum Eigengewicht sicher, dabei beträgt das Verhältnis von SDS zum Protein 1,4 g SDS / 1 g Protein.

Nachdem die Proben vorbereitet waren, wurde das Gel in die Laufapparatur gehängt, der Kamm vorsichtig entfernt und die Apparatur mit Laufpuffer gefüllt. Die Taschen wurden mit dem Puffer kurz gespült, um Luftblasen und Gelreste zu entfernen. Anschließend wurde in die erste Tasche 2 µl eines Proteinstandards gegeben, in die folgenden Taschen die Proben. Um die Proben an der Grenze von Trenn- und Sammelgel zu sammeln, wurde danach eine Spannung von 60 V angelegt und 20 min

31

laufen lassen, bis sich die Proben am Rand des Sammelgels befanden. Nun wurde die Spannung auf 120 V erhöht und gewartet, bis die Proben das komplette Gel durchlaufen hatten und damit nach Molekulargewicht aufgetrennt waren. Nach Auslaufen des Laufpuffers aus dem Trenngel wurde der Stromgestoppt.

Die Proben setzten sich folgendermaßen zusammen:

6 μl Laemmli + X μl Probe + (19 μl – X μl Wasser) = 25 μl Volumen

2.3.7 Die Western-Blot-Analyse

Zur Übertragung der SDS-Page auf eine Nitrozellulosemembran wurde die Western Blot Methode angewandt. Die Gelkammer wurde geöffnet und das Sammelgel verworfen, das Trenngel wurde kurz in Transferpuffer äquilibriert. Zeitgleich wurden 2 Whatman-Papiere und 1 Nitrozellulose-Membran auf die Größe des Gels zugeschnitten und ebenfalls kurz im Laufpuffer äquilibriert. In der Trans Blot Turbo Apparatur wurde in folgender Reihenfolge (von oben nach unten) der Western Blot aufgebaut:

- Kathode
- Whatman Papier
- Gel
- Nitrozellulose-Membran
- Whatman Papier
- Anode

Der Aufbau wurde unter leichtem Druck mit einem Verschlussroller kurz entwässert und angedrückt, dann wurde die Apparatur geschlossen. Die Kathode befand sich am Deckel der Apparatur, die Anode am Boden. Geblottet wurde für 40 min bei 2,5 A und 25 V.

Ponceau-S-Färbung

Nach Entnahme der Membranen aus der Blotting Apparatur wurden diese 3 min in Ponceau-S-Färbelösung inkubiert. Bei erfolgreicher, luftblasenfreier Übertragung der Proteine wurden rote Banden sichtbar, da Ponceau-S unspezifisch an alle übertragenen Proteine bindet. Danach wurde die Färbelösung abgenommen und die Membran mit destilliertem Wasser gewaschen, um den Erfolg des Transfers betrachten zu können. Anschließend wurde das destillierte Wasser abgenommen, einmal mit TBS-T.

<u>Blocken</u>

Um unspezifische Proteinbindungsstellen des Proteins zu "blockieren" und ein spezifisches Binden des Antikörpers an das Zielprotein zu ermöglichen, wurde die Membran für eine Stunde mit einer 10 % Milchpulverlösung überschichtet. Das Blockingreagenz wurde nach Angabe des Herstellers des verwendeten Primärantikörpers ausgewählt.

Antikörperdetektion

Inkubation mit dem Primärantikörper

Nach Entfernung des Blocking-Reagenz wurde die Membran drei Mal mit TBS-T gewaschen. Der Primärantikörper gegen RUNX2 wurde in der vom Hersteller empfohlenen Verdünnung (hier 1:200) in TBS-T auf die Membran gegeben. Um eine vollständige Benetzung zu ermöglichen, erfolgte die Inkubation in einem 50 ml Falcon, welches auf einem Rollenmischer bei 4°C über Nacht gedreht wurde. Am nächsten Morgen wurde für 2 h bei Raumtemperatur auf einem Rock 'n' Roller inkubiert, anschließend der Primärantikörper entfernt und die Membran drei Mal mit TBS-T gewaschen.

Inkubation mit dem Sekundärantikörper

Nun wurde der Sekundärantikörper Mouse anti-Rabbit (1:1000) in TBS-T verdünnt und auf die Membran gegeben. Der Sekundärantikörper ist gegen die Fc-Fragment-Epitope der Spezies gerichtet, die den Sekundärantikörper generiert hat und sorgt für eine spezifische Signalverstärkung. Weiterhin ist er mit der HRP (Horseradish peroxidase – Meerrettich Peroxidase) konjugiert und katalysiert damit die Chemilumineszenz des Luminols. Zur optischen Verwertbarkeit des Markers wurde 1 µl Marker Detection in das Falcon gegeben und die Membran 1 h lichtgeschützt bei Raumtemperatur auf dem Rollenmischer inkubiert.

Visualisierung des detektierten Proteins

Der Sekundärantikörper wurde aus dem Falcon entfernt und die Membran drei Mal mit TBS-T gewaschen. Danach wurde eine Luminol enthaltende Entwicklerlösung auf die Membran gegeben. Die HRP katalysiert dabei die Oxidation des Luminols in Gegenwart von H₂O₂. Die entstehende Chemilumineszenzreaktion wird unter UV-Licht sichtbar. Mithilfe einer Gel-Dokumentationsanlage (BioRad) können so der Proteinstandard und die entstandenen Banden sichtbar gemacht werden. Da die Bandenhöhe des Proteinstandards spezifisch definierten Proteingrößen entspricht, kann die Größe der markierten Proteinfragmente anhand dieser Höhen abgelesen werden.

2.4 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mithilfe des Tabellenkalkulationsprogrammes Excel 2010. Die Signifikanz der Werte wurde mithilfe eines zweiseitigen, gepaarten t-Tests durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde dabei auf p \leq 0,05 festgelegt. p-Werte von kleiner oder gleich 0,05 wurden dann als signifikant (1 Stern), p-Werte kleiner oder gleich 0,005 mit 2 Sternen und p-Werte kleiner oder gleich 0,005 mit 3 Sternen gekennzeichnet. Der Stichprobenumfang betrug stets mindestens n = 3, also 3 Spenderinnen, das Alter war 13, 14 und 16 Jahre.

<u>2.5 Ethikvotum</u>

Laut Sitzung der Ethikkommission am 12.09.2011 ergaben sich keine Bedenken gegen die durchgeführten Studien unter der Nr. 3634.

<u>3 Ergebnisse</u>

3.1 Isolation

Die Isolation von DPSCs aus dentalem Pulpengewebe sowieso die Isolation von ASCs aus Liposuktionsgewebe wurde im Hinblick auf die Stammzellzahl nach einer Woche pro Gramm entnommenem Gewebe analysiert (s. Abb. 9). Aus einer Zahnpulpa mit der Größe von ca. 0,5 g ließen sich im Vergleich zur Menge des Fettgewebes (ca. 10-40g) deutlich mehr Zellen generieren. (Morphologie s. Abb. 10a und 10b).



Zellzahl nach 7 Tagen pro Gramm Gewebe

Abb. 9 zeigt die durchschnittliche Zellzahl nach Isolation für dentale und adipogene Stammzellen pro Gramm nach 7 Tagen Proliferation.



Dentale Stammzellen

Abb. 10a zeigt die Morphologie dentaler Stammzellen nach ihrer Isolation.

Adipogene Stammzellen



Abbildung 10b zeigt die Morphologie adipogener Stammzellen nach ihrer Isolation.

3.2 Zellcharakterisierung

Charakteristisch für mesenchymale Stammzellen sind auf molekularer Ebene die sogenannten CD-Moleküle CD73, CD90 und CD105⁷³, die "cluster of differentiation". Sie kommen als Glykoproteine auf der Oberfläche vieler körpereigener Zellen vor und lassen per Durchfluss-Zytometrischer Analyse eine Zell-Typisierung zu, wie in Abb. 11 dargestellt wurde.



Abb. 11 zeigt die Oberflächenantigenexpressionsmuster der verwendeten DPSCs.

Wie die Durchfluss-zytometrische Analyse zeigen konnte, exprimierten über 95% der getesteten DPSCs die Marker CD29, CD44, CD73 und CD90 auf und über 76% der Zellen waren für CD105 positiv. Weiterhin waren weniger als 0,4 % der Zellen positiv für die hämatopoetischen Stammzellmarker CD31, CD34 und CD 45, womit die Population als bedingt mesenchymale Stammzellpopulation angesehen werden kann.

3.3 Zellproliferation

3.3.1 Wachstumskinetik unter Standardbedingungen

Im Vorversuch wurde überprüft, unter welchen Kulturbedingungen die DPSCs ein stabiles Wachstum zeigen und in kurzer Zeit die exponentielle Phase erreichen. In 6-Well-Platten konnten keine zufrieden stellenden Ergebnisse erreicht werden, da die Zellen nur langsam und ungleichmäßig proliferierten. 12-Well-Platten zeigten deutlich bessere Ergebnisse. Es wurden pro Well 5000 Zellen ausplattiert und jeden Tag eine Platte trypsiniert und gezählt. Die Kultur erfolgte unter Standardbedingungen, ein Medienwechsel wurde alle 3 Tage durchgeführt. Abb. 12 stellt das Wachstumdar.



Zellwachstum DPSCs

Abb. 12 zeigt die Zellzahl pro Well an den Tagen 0 bis 11 nach Ausplattierung. Ausgangswert an Tag 0 ist 5000 Zellen pro Well. Rot angelegt ist die Steigung von 1,48 pro Tag zwischen Tag 4 und 8.

Wie in Abbildung 12 zu sehen, zeigte sich ab Tag 4 nach Aussäen der Übergang der linearen Lag- in die exponentielle Log-Phase, gefolgt von einer Plateau-Phase ab Tag 9. Eine Absterbephase konnte auch in längeren Ansätzen nicht beobachtet werden, da die DPSCs dazu neigten, mehrere übereinander liegende Zellschichten zu bilden.

3.3.2 Wachstumskinetik unter Zytokinzugabe

Wie im Vorversuch bestimmt wurde, gehen die DPSCs unter Standardbedingungen am vierten Tag in die exponentielle Log-Phase über, daher erfolgte die Zugabe der Zytokine am vierten Tag. Ziel des Versuches war es, Zytokine und Konzentrationen zu bestimmen, die eine erhöhte Zellproliferation in der Log-Phase ermöglichen. Von Tag 0 bis 4 wuchsen die Zellen unter Standardbedingungen, ab Tag 4 wurden alle Zellen außer den Kontrollzellen mit Zytokinen versehen.



Zellproliferation unter Interleukin-1ß

Abb. 13 Die Proliferation unbehandelter Zellen im Vergleich mit Zellen unter Zugabe von 10, 33, 100 und 333 U/ml IL-1 β .

Abb. 13 zeigt die Zellzahl an den Tagen 5 und 7, es wurden die unbehandelten Kontrollzellen mit den mit IL-1 β versehenen Zellen verglichen.

Die Zugabe von IL-1 β zeigte keine signifikante Auswirkung am fünften Tag, aber eine deutliche Proliferationssteigerung an Tag 7. Den stärksten Zuwachs konnte die Konzentration 100 U/ml induzieren.

Zellproliferation unter Interleukin-6



Zellproliferation unter IL-6

Abb. 14 Die Proliferation unbehandelter Zellen verglichen mit denen unter Zugabe von 10, 33, 100 und 333 U/ml IL-6.

Abb. 14 zeigt die Zellaktivität an den Tagen 5 und 7, verglichen wurden die unbehandelten Kontrollzellen mit den mit IL-6 behandelten Zellen.

42

Die Zugabe von IL-6 führte am fünften Tag zu einer tendenziellen Abschwächung der Proliferation, wogegen am Tag 7 eine leichte Steigerung der Proliferation gemessen wurde. Die Zytokin-Konzentrationen unterscheiden sich im Resultat kaum, die Konzentration 100 U/ml zeigte bei einer Spenderin eine Schwächung der Proliferation, was zu einem schlechteren Gesamtwert führte.

Zellproliferation unter FGF-2



Zellproliferation unter FGF-2

Abb. 15 Die Proliferation unbehandelter Kontrollzellen verglichen mit Zellen unter der Zugabe von 10, 33, 100 und 333 U/ml FGF-2.

Abb. 15 zeigt die Zellaktivität an den Tagen 5 und 7, es wurden die unbehandelten Kontrollzellen mit den mit FGF-2 inkubierten Zellen verglichen.

Die Zugabe von FGF-2 zeigte am Tag 5 eine leichte, am Tag 7 eine etwas deutlichere tendenzielle Proliferationshemmung. Die verschiedenen Konzentrationen bewirkten ähnliche Ergebnisse.

Zellproliferation unter TGFβ



Zellproliferation unter TGFβ

Abb. 16 Die Proliferation unbehandelter Zellen im Vergleich mit Zellen unter Zugabe von 10, 33, 100 und 333 U/ml TGF β .

Abb. 16 zeigt die Zellaktivität der unbehandelten Kontrollzellen verglichen mit den mit TGFβ versehenen Zellen an den Tagen 5 und 7.

Die Zugabe von TGFβ bewirkte am fünften Tag keine signifikanten Unterschiede, am siebten Tag wurden jedoch tendenziell erhöhte Zellzahlen gemessen. Es scheint, dass ein Anstieg der Konzentration mit einer proportionalen Proliferationssteigerung korreliert.

Zellproliferation unter IFNy



Zellproliferation unter IFNy

Abb. 17 Die Proliferation unbehandelter Zellen verglichen mit Zellen unter Zugabe von 10, 33, 100 und 333 U/ml IFNγ.

Abb. 17 zeigt die Zellaktivität an den Tagen 5 und 7, es wurden die unbehandelten Kontrollzellen mit den mit IFNy inkubierten Zellen verglichen.

Die Zugabe von IFNy bewirkte am fünften Tag eine tendenzielle Proliferationssteigerung, am siebten Tag konnten nur vereinzelt erhöhte Zellzahlen festgestellt werden. Der Proliferationsfördernde Effekt scheint besser mit niedrigen INFy Konzentrationen zu funktionieren.

Zellproliferation unter TNFα



Zellproliferation unter TNFα

Abb. 18 zeigt die Proliferation unbehandelter Zellen im Vergleich mit Zellen unter Zugabe von 10 U/ml TNFα.

Abb. 18 zeigt die Zellaktivität an den Tagen 5 und 7, verglichen wurden die unbehandelten Kontrollzellen mit den mit TNF α behandelten Zellen.

Die Zugabe von TNFα bewirkte am fünften und siebten Tag eine leichte Proliferationssteigerung. Eine 100 U/ml Lösung brachte am siebten Tag den stärksten Anstieg der Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle.

Zellproliferation unter PDGF



Zellproliferation unter PDGF

Abb. 19 zeigt die Proliferation unbehandelter Kontrollzellen im Vergleich mit Zellen unter Zugabe von 0,1, 0,3, 1 und 3 U/ml PDGF.

Abb. 19 zeigt die Zellaktivität an den Tagen 5 und 7, es wurden die unbehandelten Kontrollzellen mit den mit PDGF versehenen Zellen verglichen.

Die Zugabe von PDGF bewirkte besonders in der niedrigsten Konzentration von 0,1 U/ml einen tendenziellen Anstieg der Zellproliferation. Es konnten am fünften und am siebten Tag erhöhte Zellzahlen festgestellt werden, der Effekt scheint unabhängig von der Konzentration auf zu treten.

Zellproliferation unter VEGF



Zellproliferation unter VEGF

Abb. 20 zeigt die Proliferation unbehandelter Zellen verglichen mit Zellen unter Zugabe von 0,1, 0,3, 1 und 3 U/ml VEGF.

48

Abb. 20 zeigt die Zellaktivität der unbehandelten Kontrollzellen im Vergleich mit den mit VEGF versehenen Zellen an den Tagen 5 und 7.

VEGF führte in der niedrigsten Konzentration zu einer tendenziellen Proliferationshemmung am siebten Tag, während mit zunehmender Konzentration am siebten Tag eine leicht erhöhte Zellzahl beobachtet werden konnte.

3.4 Differenzierung

3.4.1 Alizarinrot Färbung

Als Nachweis möglicher osteogener Differenzierung der DPSCs wurde eine Alizarinrot Färbung verwendet, welche die kalzifizierten Bereiche innerhalb der Zellmatrix anfärbt. Es wurden die Kontrollzellen und die Zellen, die mit Differenzierungs-Medium inkubiert wurden, gefärbt.

Es zeigt sich deutlich, dass ab der zweiten Woche bei allen Spenderinnen vereinzelte, kalzifizierte Bereiche zu erkennen waren. Diese Bereiche zeigten sich im weiteren Verlauf der Differenzierung zwar verstärkt, allerdings konnte keine zusammenhängende, flächendeckende Kalzifizierung des Gewebes beobachtet werden.

Abb. 21-26 zeigt die Alizarinrot Färbung der Kontrollzellen verglichen mit den in Differenzierungsmedium inkubieren Zellen der jeweiligen Woche.



Abb. 21 Die Alizarinrot-Färbung unbehandelter Kontrollzellen auf der linken und in Differenzierungsmedium inkubierter Zellen auf der rechten Seite von Spenderin I in den Wochen 1 bis 4.



Abb. 22 Vergleich der Alizarinrot-Färbung unbehandelter Kontrollzellen auf der linken und in Differenzierungsmedium inkubierter Zellen auf der rechten Seite von Spenderin I in den Wochen 5 bis 8.



Abb. 23 Die Alizarinrot-Färbung unbehandelter Kontrollzellen auf der linken und in Differenzierungsmedium inkubierter Zellen auf der rechten Seite von Spenderin II in den Wochen 1 bis 4.



Abb. 24 Vergleich der Alizarinrot-Färbung unbehandelter Kontrollzellen auf der linken und in Differenzierungsmedium inkubierter Zellen auf der rechten Seite von Spenderin II in den Wochen 5 bis 8.



Abb. 25 Die Alizarinrot-Färbung unbehandelter Kontrollzellen auf der linken und in Differenzierungsmedium inkubierter Zellen auf der rechten Seite von Spenderin III in den Wochen 1 bis 4.



Abb. 26 Vergleich der Alizarinrot-Färbung unbehandelter Kontrollzellen auf der linken und in Differenzierungsmedium inkubierter Zellen auf der rechten Seite von Spenderin III in den Wochen 5 bis 8.

3.4.2 Alizarinrot Rücklösung

Um eine Quantifizierung der Färbung durchzuführen, wurde die Alizarinrot Färbung zurückgelöst und photometrisch analysiert. Auffallend ist, dass erst ab der zweiten Woche eine Zunahme der kalzifizierten Matrix zu verzeichnen war. Alle Werte sind relativ zur Kontrolle dargestellt, die Kontrolle beträgt den Wert 1. Ab Woche 6 konnte keine relevante Zunahme der Matrixbildung festgestellt werden. Abbildungen 46 – 49 sind relativ zur Kontrollprobe (Wert = 1) normiert.



Kalzifizierte Matrix Spenderin I

Abb. 27 zeigt die relative Zunahme der kalzifizierten Matrix von Spenderin I.



Abb. 28 zeigt die relative Zunahme der kalzifizierten Matrix von Spenderin II.



Kalzifizierte Matrix Spenderin III

Abb. 29 zeigt die relative Zunahme der kalzifizierten Matrix von Spenderin III.



Kalzifizierte Matrix aller Spenderinnen

Abb. 30 zeigt die relative Zunahme der kalzifizierten Matrix aller Spenderinnen.

Bereits ab der zweiten Woche kam es zu einem tendenziellen Anstieg der kalzifizierten Matrix, allerdings konnte sogar nach 8 Wochen kein Maximum erreicht werden, wie in Abb. 27-30 dargestellt. Interessant ist das unterschiedliche Potential der Spenderinnen. Lediglich Spenderin III produzierte kontinuierlich mehr kalzifizierte Matrix.

3.4.3 Alkalische Phosphatase Assay

Die Aktivität der alkalischen Phosphatase wurde bei 405 nm gemessen. Sämtliche Werte wurden zur Kontrollprobe (Wert = 1) normiert (siehe Abb. 31-34).



Abb. 31 zeigt die Alkalische Phosphatase Aktivität in den Wochen 1 bis 3 von Spenderin I.



Abb. 32 zeigt die Alkalische Phosphatase Aktivität in den Wochen 1 bis 3 von Spenderin II.



Abb. 33 zeigt die Alkalische Phosphatase Aktivität in den Wochen 1 bis 3 von Spenderin III.



Abb. 34 zeigt die Alkalische Phosphatase Aktivität in den Wochen 1 bis 3 aller Spenderinnen.

In der ersten Woche konnte mit fast 1,4 facher Erhöhung der Alkalischen Phosphatase Aktivität der höchste Wert gemessen werden. In den Wochen 2 und 3 fiel dieser Wert leicht ab, blieb aber über dem Wert der Kontrollproben. Lediglich in den Proben einer Spenderin konnte nach einer Woche eine Verdopplung der Werte gemessen werden.

3.4.4 Western Blot

Der Nachweis der osteogenen Differenzierung auf Molekularebene erfolgte durch den Western Blot. Es wurde der Marker RUNX2 detektiert.



Abb. 35 zeigt oben die RUNX2 Detektion von Spenderin I, unten von Spenderin III der Wochen 1 (K1 für Kontrolle 1 und P1 für Probe mit osteogener Differenzierung) bis 3. M steht für Marker.

In Woche 1 und 2 der Probe (Abb. 35) sieht man ein angedeutetes Band bei <60 kDa, das in etwa der Höhe des gesuchten Bandes entspricht (57 kDa).

4 Diskussion

4.1 Zellcharakterisierung

Mesenchymale Stammzellen lassen sich, wie anfangs beschrieben, durch spezielle Eigenschaften von anderen Zellen unterscheiden ⁷³. Die erwähnte Fähigkeit zur Adhärenz an Plastikoberflächen konnte schon eine Stunde nach der Isolation beobachtet werden. Lichtmikroskopisch war ein Konglomerat frei schwimmender Zellen zu beobachten, die sich langsam absenkten. Nachdem die Zellen abgesunken waren, veränderten einige dieser Zellen ihre kugelförmige Morphologie und breiteten sich auf dem Flaschenboden aus, nach 24 Stunden waren sie auch durch Waschen nicht mehr zu entfernen. Der größte Anteil an Zellen war nicht adhärent, bestand vorwiegend aus Erythrozyten und wurde bei dieser Prozedur entfernt, wodurch nur adhärente Zellen verblieben, die auch die typische Morphologie mesenchymaler Stammzellen zeigten. Durch filamentöse Pseudopodien imponierte ein fibroblastäre Charakter. Weiterhin konnte das Proliferationsverhalten der Zellen durch Wachstumskinetiken analysiert werden. In einer Konzentration von 5000 Zellen pro Well gingen die Zellen erst in eine lag-Phase mit linearem Wachstum, um über die exponentielle log-Phase zur stationären Phase zu gelangen. Interessanter Weise trat in Vorversuchen keine typische Absterbephase auf, die DPSCs neigten vielmehr dazu, in mehreren Zellschichten übereinander zu wachsen. Trotz einer Gelatinebeschichtung der Wellböden konnte nach 6-8 Wochen wiederholt ein Ablösen des Zellayers vom Wellboden beobachtet werden, dieser Vorgang ließ sich auch durch extrem langsames Absaugen und Einbringen des Mediums während des Medienwechsels nicht vermeiden. Eine Alternative wäre eine seit kurzem etablierte Kulturmethode, z.B. in rotierenden Flaschen, in denen die Zellen dreidimensional wachsen können und sich so nicht ablösen⁸³. Auf molekularer Ebene können mesenchymale Stammzellen durch die Expression der in Punkt 2.1.2 beschriebenen Cluster of differentiation identifiziert werden ⁷³. Über 95 % der Zellen waren positiv für CD 29, ein Adhäsionsmolekül ¹², das als Antikörper von beta-1 Integrin angesehen wird ¹⁹, während weniger als 1 % der

getesteten Zellen positiv für das Molekül CD 31 waren. Es wurde als endothelialer Zellmarker und hämatopoetischer Stammzellmarker identifiziert²⁰. Die Zellen waren negativ für CD 34 (1%), ein Sialomucin auf hämatopoetischen Stammzellen und Endothel ²¹. Für CD 44, ein Oberflächenrezeptor, der Adhäsion, Zellkinese und Aktivierung normaler und neoplastischer Zellen reguliert²², waren über 95 % der Stammzellen positiv. Dieser Rezeptor spielt durch seine Bindung an Hyaluronsäure eine wichtige Rolle in der Migration von Stammzellen²³. Unter 1 % der getesteten Zellen waren positiv für CD 45. Das Oberflächenmolekül wird als Transmembrane Tyrosin Protein Tyrosin Phosphatase bezeichnet und reguliert Antigen-Rezeptoren, weiterhin ist es ein hämatopoetischer Stammzellmarker²⁴. Über 98 % der getesteten Zellen waren positiv für CD 73. Es ist im Lymphgewebe zu finden, beeinflusst die Signaltransduktion des hämatopoetischen Knochenmarkes und die Aktivierung der B-Lymphozyten. Ein Zusammenhang mit der Interaktion Stroma – Knochenmark und eine eventuelle Beeinflussung der Differenzierung mesenchymaler Stammzellen wird diskutiert ²⁶. Für CD 90, welches mit CD 97 am Endothel interagiert und auch als Thy-1 bekannt ist ²⁵, waren über 99 % der Zellen positiv. Für CD 105 waren über 76 % der getesteten Zellen positiv. Das Oberflächenmolekül dient als TGF Rezeptor und spielt eine Rolle in der Angio- und Tumorgenese²⁷. Die erwarteten Resultate der Durchflusszytometrischen Analyse auf MSC-spezifische Marker zeigen, dass es sich bei der Population um eine MSC-Linie handelt, die nicht durch Fibrozyten oder hämatopoetische Stammzellen verunreinigt wurde. Fibrozyten weisen tragen auf ihrer Oberfläche die Marker CD 29, CD 34, CD 44, und CD 105 28,20, hämatopoetische Stammzellen dagegen CD 31, CD 34 und CD 45^{20,21,24}.

4.2 Zellproliferation moduliert durch Zytokine

In der Einleitung wurde bereits ein Problem der Stammzellforschung beschrieben; Im Falle eines Traumas bleibt nur wenig Zeit, die Stammzellen ausreichend zur Proliferation anzuregen und danach zu differenzieren, um ein autologes Gewebsstück an den gewünschten Ort zu implantieren. Um die Proliferation in der log – Phase zu
steigern, wurden die Zellen mit Medium versehen, in das Zytokine in spezifischen Konzentrationen hinzugefügt wurde. Jedes Zytokin wurde einzeln und in verschiedenen Konzentrationen verwendet, um die bestmögliche Proliferation zu erreichend Der Zeitpunkt des Medienwechsels wurde auf den vierten Tag festgelegt, da das Zellwachstum in der log-Phase gesteigert werden sollte. IL-1 β aus der Gruppe der proinflammatorischen Zytokine wird zum größten Teil von Blut – Monozyten gebildet. Die Beimischung dieses Interleukins konnte besonders am 7. Tag und bei 33 U/ml, 100 U/ml und 333 U/ml eine deutliche Proliferationssteigerung hervorrufen. Bemerkenswert waren die interindividuellen Unterschiede. Spenderin C reagierte sehr stark auf die mittleren Konzentrationen, schien aber durch die 333 U/ml IL-1β tendentiell im Wachstum gehemmt zu werden. Der proliferationssteigernde Effekt wurde schon 1993 beobachtet²⁹ und beruht vermutlich auf der IL-1ß abhängigen Aktivierung des Sphingomyelin-Signalweges, indem es Sphingomyelin und Ceramid freisetzt und die Aktivität der Ceramid-aktivierten Protein Kinase steigert ^{30,31}, welche wiederum die Zellproliferation steigern kann³².

IL-6 wird von Monozyten, Epithel- und Endothelzellen gebildet und bewirkt eine Aktivierung des Glykoproteins 130, welches die MAP (*Mitogen activated protein*)-Kinase und den JAK / STAT (Janus Kinase / *Signal transducer and activator of transcription*)-Signalweg induziert. Die MAP aktiviert unter anderem die Raf (*rapidly accelerated fibrosarcoma*) \rightarrow MEK 1 / 2 (MAP- Kinase-Kinase) \rightarrow ERK 1 / 2 (*Extracellular-signal Regulated Kinase*) Kaskade, welche die Proliferation und Differenzierung beeinflusst ³³. Die Zugabe von IL-6 erhöhte die Zellzahl insbesondere an Tag 7, der Effekt schien mit steigender Konzentration zuzunehmen. Auch dieses Zytokin wirkte nicht gleich auf alle Spenderinnen, Zellen der Kandidatin III wurde von 100 U/ml IL-6 im Wachstum gehemmt. Der proliferationssteigernde Effekt wurde bereits beobachtet ³⁴.

FGF-2 (*Fibroblast growth factor*) wird auch von Adipozyten gebildet und wirkt über Rezeptoren, die sich auf der Zelloberfläche befinden. Die ausgelöste Genaktivierung beeinflusst die Differenzierung und Proliferation von adulten Zellen und die

64

Organbildung ³⁵. Im vorliegenden Versuch konnte unter FGF-2 keine Proliferationssteigerung beobachtet werden. Dieser Effekt liegt im Widerspruch zur Literatur ³⁶, da es zu den Kompetenzfaktoren gezählt wird, welche den zellulären Austritt der GO- zum Eintritt in die G1-Phase induzieren ³⁷. Denkbar wäre, dass das dem Proliferationsmedium standardmäßig beigemischte FGF-2 schon eine Wachstumssteigerung der Zellen hervorgerufen hat und daher eine weitere Steigerung nicht möglich ist.

TGFβ (*Transforming growth factor*) wird zum größten Teil von Makrophagen gebildet, wirkt über eine membranständige Serin/Threonin-Kinase und beeinflusst unter anderem die Proliferation und Differenzierung von Zellen ³⁸. Besonders die chondrogene Differenzierung wird gesteigert ³⁹. Die Sezernierung wird in der Medizin durch die Einnahme von Ciclosporin induziert, was zum Beispiel eine Abstoßungsreaktion nach einer Organtransplantation verhindern soll. Durch seine antiinflammatorische Wirkung hemmt TGF β die Proliferation der TH1 – Zellen ⁴⁰. TGF β konnte vor allem in den Konzentrationen 100 U/ml und 333 U/ml am 7. Tag eine erhöhte Zellzahl hervorrufen, obwohl die Progressionsfaktoren am Ende der G1-Phase 37 Der langfristige gehemmt werden Einsatz dieses Zytokins in der Stammzellproliferation ist fraglich, da es zu einer Kulturseneszenz von Stammzellen führen könnte⁴¹.

IFNγ (Interferon) wird unter anderem von T – Helferzellen gebildet, nachdem diese mit Bakterien phagozytierenden Makrophagen interagieren. Es wirkt über 2 Rezeptoren, die mit dem Zytokin einen Komplex bilden und den JAK-STAT-Signalweg (s.o.) aktivieren ⁴³. In keiner Konzentration wurde eine statistisch relevante Zellzahlerhöhung beobachtet, was damit zusammen hängen könnte, dass auch IFNγ die Progressionsfaktoren am Ende der G1-Phase hemmt. So konnten in anderen Versuchen eine proliferationshemmende Wirkung nachgewiesen werden ⁴⁴. In Zukunft wird auch eine adipogene und chondrogene Differenzierung getestet, in diesen Fällen ist ein Einsatz von IFNγ möglich, von einer osteogenen Differenzierung sollte abgesehen werden, da dieses Interferon auch zur Therapie von Osteopetrose eingesetzt wird ⁴² und dadurch Beeinträchtigung von Osteoblasten und Osteoklasten führt.

TNFα (Tumor Nekrose Faktor) zählt zu den proinflammatorischen Zytokinen und wird unter anderem von aktivierten Makrophagen sezerniert. Nach der Freisetzung verbinden sich zwei membranständige Rezeptoren mit dem Molekül und aktivieren intrazellulär unter anderem den NFκB-Signalweg (*nuclear factor kappa – light – chain – enhancer of activated B cells*), die MAP-Kinase (s.o.) und können die Apoptose aktivieren. TNFα erhöhte nur in der Konzentration 100 U/ml die Zellzahl, dieser Effekt war an Tag 7 am stärksten ausgeprägt. In der Literatur finden sich Quellen, die vor allem unter der verstärkten Aktivierung des NFκB-Signalweges eine erhöhte Zellproliferation feststellen konnten, allerdings schien sich dieser Effekt vor allem auf neoplastische Zellen auszuwirken ⁴⁵. TNFα alleine kann die Freisetzung von FGF-2 VEGF, IGF-1 und HGF erhöhen, die wiederum das Zellwachstum anregen ⁴⁶. Weiterhin aktiviert TNFα den Sphingomyelin-Signalweg, der die Zellproliferation aktiviert^{30,31,32}.

PDGF (*Platelet derived growth factor*) wird von Thrombozyten nach Gefäßverletzungen gebildet. Das Protein bindet an einen membranständigen Rezeptor und aktiviert so intrazellulär unter anderem den PI3K-Signalweg (Phosphoinositid-3-Kinase), der Zellproliferation, Wachstum und Mobilität steuern. Weiterhin induziert PDGF die Angiogenese ⁴⁷. Die mit PDGF behandelten Zellen zeigten vor allem in niedriger Dosierung (0,1 U/ml und 0,3 U/ml) ein gesteigertes Wachstum. Dieser Effekt verhielt sich umgekehrt proportional zur Konzentration. Am ersten Messpunkt war ein leichter Anstieg der Zellzahl zu verzeichnen, eventuell wurde die frühe exponentielle Phase beeinflusst. Andere Forschungsgruppen konnten nachweisen, dass ein *platelet derived lysat* (Lysat aus Thrombozyten-Zytokinen) die Zellen zum Wachstum anregt ⁴⁸. Da PDGF die Zellen am Übergang der G0- zur G1-Phase unterstützt, wird insbesondere in der frühen Log-Phase eine gesteigerte Proliferation begünstigt ³⁷. Im Hinblick auf eine osteogene Differenzierung könnte das PDGF allerdings zu Problemen führen, da es diesen Differenzierungsprozess hemmt⁴⁹.

VEGF (Vascular endothelial growth factor) wird unter anderem von Endothelzellen, Makrophagen, Thrombozyten und Tumorzellen gebildet und wirkt unter anderem über 50,51 Tyrosin-Kinase-Rezeptor Fs einen membranständigen reguliert die Gefäßneubildung (Angiogenese) besonders nach einer anhaltenden Hypoxie, aber auch in der Embryogenese. Im Endothel wird auf einen VEGF-Anstieg hin vermehrt NO gebildet, was zur Vasodilatation führt ⁵². VEGF führte bei steigender Konzentration zu einer Proliferationssteigerung, insbesondere an Tag 7 wurden erhöhte Zellzahlen festgestellt. Es ist jedoch anzunehmen, dass VEGF als Wachstumsfaktor nicht dauerhaft verwendet werden kann, da VEGF eine endotheliale Differenzierung hervorrufen kann ⁵³.

4.3 Differenzierung der DPSC's

DPSCs proliferieren, wie die Zellproliferationsversuche zeigten, recht stark und neigen dazu, nach der log-Phase ihr Wachstum etwas zu verlangsamen, ohne in dem in der vorliegenden Arbeit analysierten Zeitraum eine klassische Plateauphase zu erreichen. Zur Differenzierung der Zellen wurden diese bis zur Konfluenz in Wells mit Proliferationsmedium behandelt, da MSCs sich vermehrt in andere Zellarten differenzieren lassen, wenn eine Kontaktinhibitation das Wachstum einschränkt. Messbar wird dies wird durch einen Konzentrationsabfall von Cyklin E und A sowie der Proliferationkinase CDK2 ⁵⁴. Wie 1998 gezeigt werden konnte, differenzieren MSCs optimal unter der Zugabe von 100 nM Dexamethason, 10 mM β-Glycerophosphat und 50 µM L-Ascorbinsäure-2-Phosphat in Medium mit 10 % FCS ⁵⁵. Dexamethason (9-Flour-16- α -Methylprednisolon) ist ein synthetisches Glukokortikoid, das an zytoplasmatische Rezeptoren andockt, sich mit diesen verbindet und Kernrezeptoren aktiviert. Dadurch wird die mRNA Bildung erhöht, Enzyme und Proteine wie zum Beispiel die Glucose-6-Phosphatase, ein wichtiges Element der Gluconeogenese, synthetisiert ^{56,84}. Diese komplizierte Wirkungsweise erklärt die Wirkdauer, die erst nach einigen Stunden eintritt. Beispielsweise wird die Phospholipase A2 gehemmt, dadurch keine Arachidonsäure produziert und letztendlich keine COX1, COX2 und

Lipoxygenasen ⁵⁶. Gleichzeitig wird *in vitro* die Exprimierung von LIF, IL-6 und IL-11 durch MSCs deutlich erhöht ⁵⁷, weiterhin werden verstärkt Osteocalcin, alkalische Phosphatase und Osteopontin exprimiert ⁵⁸. Osteocalcin sorgt für eine Bindung des Hydroxylapatits an Calcium, wodurch der Knochenaufbau gesteigert wird. Eine Inhibition des zuständigen Gens führt zu Osteopetrose, also unkontrolliertem Wachstum von unreifem Knochen, der zwar viel Masse bildet, aber unzureichend mineralisiert ist ⁵⁹. Dexamethason scheint bei dauerhafter Langzeitapplikation *in vivo* die Lebenszyklen der Osteoklasten zu verlängern. Dadurch wird ihre Fähigkeit, Knochen abzubauen vermindert. Osteoblasten benötigen aber die Aktivierung von Osteoklasten, da ansonsten Osteoporose entsteht ⁶⁰. Es gibt Hinweise darauf, dass die renale Phosphatresorption, die enterale Resorption von Kalzium, Phosphat und Vitamin D gehemmt wird ⁵⁶, wodurch das Glukokortikoid nur in der Anfangsphase der osteogenen Differenzierung eingesetzt werden sollte.

Ascorbinsäure wiederum aktiviert die alkalische Phosphatase innerhalb von 24 Stunden ⁶¹, steigert die Affinität von cAMP (cyklisches Adenosin Monophosphat) zu PTH (Parathormon) und PGE₁ (Prostaglandin E₁ beziehungsweise Alprostadil), die wiederum die osteogene Differenzierung unterstützen. Weiterhin sorgt es dafür, dass die Proliferationsrate sinkt, womit die Zellen leichter differenzieren⁶².

 β -Glycerophosphat wird von Osteoblasten innerhalb von 24 Stunden zu 80 % hydrolysiert ⁶³, wobei die alkalische Phosphatase zum Einsatz kommt ⁶⁴. Dieses organische Phosphat dient als Substrat für eine Matrix, die die Osteoblasten aufbauen.

Das Zusammenspiel der drei eingesetzten Faktoren ermöglicht eine osteogene Differenzierung.

4.3.1 Alizarinrot Färbung

Lichtmikroskopisch waren nach dem Durchführen der Färbung bereits ab der zweiten Woche kleine, kalzifizierte Zellbereiche sichtbar. Sie zeigten eine deutliche Grenze und imponierten rundlich, weiterhin waren sie nur in den Zellen zu beobachten, die seit zwei Wochen mit osteogenem Differenzierungsmedium versetzt wurden. Die Kontrollzellen, die mit Proliferationsmedium behandelt wurden, blieben bis zum Ende unkalzifiziert, der Farbstoff konnte nicht gebunden werden. Im Verlauf der acht wöchigen Differenzierung wurde nie eine Konfluenz der kalzifizierten "Nester" beobachtet, allerdings traten diese öfter pro Well auf und zeigten nach erfolgter Anfärbung lichtmikroskopisch einen größeren Durchmesser. Bei diesen Nodules kann es sich also um einzelne, differenzierte Zellkluster oder sogar Tochterzellen einer Stammzelle handeln, die ein osteogenes Differenzierungspotential aufweisen. Dafür spricht die runde Struktur, die den Embryoid Bodys embryonaler Stammzellen ähnelt und ein Zentrum vermuten lässt, von dem die Matrixbildung ausgeht. Eine flächendeckende, gleichmäßige Differenzierung konnte hier nicht nachgewiesen werden. Mesenchymale Stammzellen differenzieren unseren Beobachtungen zufolge erst dann, wenn sie konfluent sind und durch die sogenannte Kontaktinhibition die Proliferation gehemmt wird ⁵⁴. Es ist denkbar, dass die Kontaktinhibition bei den DPSCs nicht stattfand, da sie dazu neigten, in mehreren Schichten übereinander zu wachsen. Diese Eigenschaft erschwerte vor allem in den Kontrollzellen die Medienwechsel ab der 6. Woche massiv, da sich die übereinander liegenden Zellschichten lösten und zusammenzogen, wodurch sich ein frei schwimmendes Gebilde von ca. 4 – 7 mm Durchmesser bildete. Dieser Effekt trat trotz der Gelatinebeschichtung auf.

4.3.2 Alizarinrot Rücklösung

Um die Alizarinrotfärbung zu quantifizieren wurde eine Rücklösung der Färbung vorgenommen. Es zeigten sich ab der zweiten Woche signifikant erhöhte Rücklösungswerte in den Zellen, die mit Differenzierungsmedium versetzt wurden. Im Verlauf der Differenzierung stiegen die Werte leicht an, erreichten aber nur bei einer Spenderin ein Maximum in der achten Woche. Dies zeigt das unterschiedliche Differenzierungspotenzial der Spenderinnen, weiter könnte die Eigenschaft der DPSCs ausschlaggebend sein, mit zunehmender Kultivierungsdauer in mehreren Schichten übereinander zu Wachsen. Besonders die Kontrollzellen neigten zur Schichtbildung. Durch ein aufeinander wachsen der Zellschichten, die sich teilweise bei den Medienwechseln ablösten, traten beim Färben der Zellen Schwierigkeiten auf. Die im Medium gelöste, nicht an kalzifizierte Matrix gebundene Färbelösung muss im Verlauf des Experimentes vollständig ausgewaschen werden. Dabei werden nicht kalzifizierte Bereiche vollständig entfärbt. Die übereinander wachsenden Zellschichten bildeten aber abgeschirmte Bereiche zwischen den einzelnen Zelllagen, in die zwar Färbelösung gelang, diese aber nicht wieder heraus gewaschen werden konnte. Lichtmikroskopisch imponierten die Zellen weiterhin als ungefärbt, aber durch die Behandlung der Zellen mit Cetylpyridiniumchlorid löste die Rücklösung auch den in den abgeschirmten Bereichen gesammelten Farbstoff. Dadurch kam es insgesamt zu niedrigeren Rücklösungswerten, da die Werte der Kontrollzellen in Relation zu den Werten der osteogen differenzierten Zellen gesetzt wurden. Wie unten beschrieben, stehen Versuche mit anderen Beschichtungen noch aus.

4.3.3 Alkalische Phosphatase Assay

Ein weiterer Nachweis der osteogenen Differenzierung bestand in der Detektion der Aktivität der alkalischen Phosphatase. Die Alkalische Phosphatase hydrolysiert das Substrat p-Nitrophenolphosphat, ein Phosphorsäureester zu Phosphat und p-Nitrophenol. Ab der ersten Woche konnten bei den osteogen differenzierten Zellen Werte festgestellt werden, die das 1,5-fache der Kontrolle betrugen. In den beiden folgenden Wochen nahmen die relativen Werte leicht ab. Bei Betrachtung der einzelnen Spender fällt auf, dass zwei der Spenderinnen eine Erhöhung der Werte in Woche 2 und eine Spenderin eine Erhöhung in Woche 1 zeigen. Dies deutet wiederum auf das unterschiedliche Differenzierungspotential hin und könnte bedeuten, dass bereits in der ersten Woche eine maximale Anzahl an Zellen differenziert sind und sich in den nachfolgenden Wochen weniger Zellen in der frühen Differenzierungsphase befinden.

4.3.4 Western Blot

Der molekularbiologische Nachweis der osteogenen Differenzierung erfolgte durch den Nachweis von RUNX 2 Proteinexpression mittels Western Blot. RUNX-2 (*Runt related transcription factor 2*) ist einer der wichtigsten Transkriptionsfaktoren während der Osteogenese. RUNX-2 wird nicht nach Kontaktinhibitation freigesetzt, erst der Proliferationsstopp am Übergang der G1- zur G0-Phase scheint ein ausreichender Stimulus zu sein, weiterhin scheint es essentiell die Zellproliferation zu steuern ⁵⁴. Trotz mehrerer Durchläufe zu in verschiedenen Differenzierungsstadien (7., 14. und 21. Tag) konnte im Vergleich kaum Protein detektiert werden. Möglicherweise handelte es sich bei den Zellen nicht um fertig differenzierte Osteoblasten, sondern um *Osteoblast-like cells*, die weniger RUNX-2 freisetzen, aber eine kalzifizierte Matrix bilden⁶⁵.

4.4 Kritische Betrachtung

Im Hinblick auf das unterschiedliche Differenzierungpotential der einzelnen Spender wird in Folgeversuchen ermittelt, ob sich die Zelllinien hinsichtlich anderer Oberflächenantigene unterscheiden. Es ist denkbar, dass sich die Zellen durch ihr unterschiedliches Spenderalter (13,14 und 16 Jahre) in verschiedenen Entwicklungsstadien befanden. So könnte die Zahnpulpa der jüngsten Spenderin etwas weniger weit entwickelt gewesen sein als die der beiden anderen Spenderinnen, wodurch die Stammzellen andere Differenzierungsmöglichkeiten haben könnten. Ein Hinweis darauf könnten die Unterschiede im Antigenexpressionsmuster sein, nur bei einer Spenderin wiesen über 95 % der Zellen CD 105 auf, die Zellen der beiden anderen Spenderinnen waren zu 50 % und 80 % positiv. Alle verwendeten Zähne waren jedoch in ihrer Kronenbildung abgeschlossen und noch nicht apexifiziert, also das Wurzelwachstum war noch nicht abgeschlossen. Denkbar ist auch ein Konglomerat

verschiedener Stammzellen, deren prospektive Potenz sich unterscheidet, diese Erkenntnis wird in der Literatur diskutiert⁷⁴. Zum Beispiel könnten Stammzellen, die nicht für die Entwicklung der Pulpa, sondern der des Apex und des periapikalen Gewebes programmiert waren, noch im Entwicklungsstadium und in der Pulpa ansässig gewesen sein. In der Literatur finden sich Hinweise, dass mesenchymale Stammzellen aktiv in ein bestimmtes Gewebe wandern²³. Ausgeschlossen ist jedoch, dass sich die Entnahmeorte unterschieden. Es wurde ausschließlich die Zahnpulpa verwendet, kein parodontaler Faserapparat und keine periapikalen Fasern.

Betrachtet man die unterschiedlichen Zeitpunkte der Zellzahlerhöhungen in den Proliferationsversuchen, wäre in Zukunft eine Kombination aus verschiedenen Zytokinen interessant. Zu diesem Zweck sollten die Konzentrationen verwendet werden, unter welchen der größte Zellzahlanstieg zu beobachten war, weiterhin könnten synergistische Effekte auftreten. Es ist möglich, dass auch andere Kulturformen oder andere Wellgrößen beziehungsweise Zellzahlkonzentrationen die maximale Zellzahl weiter ansteigen lassen, da trotz des mehrlagigen Wachstums auch DPSCs einer Kontaktinhibitation unterliegen könnten. Dreidimensionale Ansätze sollten besonders geprüft werden. Anschließend müssen im Hinblick auf eine osteogene Entwicklung Differenzierungsexperimente folgen, da unter anderem IFNy, PDGF und VEGF die osteogene Differenzierung negativ beeinflussen könnten. IL-1, IL-6, FGF-2 und TNFα scheinen geeignete Zytokine für weitere Proliferationssteigerungsversuche mit osteogener Differenzierung zu sein, da sie der Differenzierung nicht im Wege stehen.

Im Hinblick auf die osteogene Differenzierung könnten die Konzentrationen angepasst werden. So kann zu viel β – Glycerophosphat zu einem falsch positiven Ergebnis der Färbung führen, wenn sich ein Phosphatniederschlag ungebunden an Zellen niederlässt⁶³. Dexamethason sollte aus den oben genannten Gründen (verlängerter Lebenszyklus) nicht in einer stark erhöhten Konzentration zum Einsatz kommen, um

72

die Produktivität der Osteoklasten nicht zu beeinträchtigen. Ascorbinsäure könnte allerdings in gesteigerter Konzentration verwendet werden, da es, wie oben beschrieben, die Eigenschaft besitzt, die Zellproliferation zu steuern. So könnte das übermäßige Wachstum der DPSCs eingedämmt und damit eine bessere Differenzierung erreicht werden. In zu hohen Dosen wirkt Ascorbat allerdings toxisch.

Es stehen noch Versuche aus, in denen andere Beschichtungen getestet werden. Weiterhin sollte versucht werden, die differenzierten Zellen, welche die calcifizierte Matrix bilden zu identifizieren, damit eine selektive Isolation stattfinden kann. Alizarinrot scheidet für dieses Vorhaben aber aus, da die Zellen während der Zellfärbung fixiert werden.

Tägliche Messungen der Aktivität der alkalischen Phophatase und von RUNX2 könnten ein kurz auftretendes Expressions-Maximum erfassen, außerdem sollte eine höhere Dosierung des Ascorbates eventuell zu höheren Werten in der frühen Differenzierungsphase führen. Falls die oben beschriebene, selektive Isolation gelingt, könnten auch deutlich höhere Werte gemessen werden, da dadurch evtl. die osteogene Differenzierung der gesamten kultivierten Zellen erreicht werden kann.

Eine Durchfluss-zytometrische Analyse der differenzierten Zellen könnte über die eventuell auftretenden Osteoblast-like cells Aufschluss geben.

Die vorliegende Arbeit diente der Grundlagenforschung und der Etablierung, da mit drei Spenderinnen keine statistisch signifikanten Ergebnisse produziert werden können. DPSCs proliferieren im Vergleich zu anderen Stammzellarten deutlich besser, zeigen aber noch keine definitive Differenzierung zu Osteoblasten. In Zukunft sollte das Proliferationspotential weiter gesteigert werden und insbesondere eine osteogene Differenzierung angestrebt werden.

73

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass dentale Stammzellen durch ihre leichte Zugänglichkeit und ihr enormes Wachstumspotential eine potente Option in der regenerativen Medizin darstellen. Durch Verbesserung der Differenzierung könnten in Zukunft multiple Einsatzbereiche versorgt werden.

<u>5 Ausblick</u>

Humane Stammzellen bieten schon heute eine beeindruckende Auswahl an Therapiemöglichkeiten, die zum Teil in vivo getestet wurden. Stammzellen können isoliert und direkt wieder inseriert werden, so ist es 2004 gelungen, schwerwiegende Abstoßungsreaktion im Rahmen von Transplantationen durch körperfremde, haploide MSCs zu behandeln ⁶⁶. Auch neoplastische Vorgänge können durch die Therapie mit MSCs behandelt werden, wie zum Beispiel Gliome⁶⁷. Weiterhin werden aus Stammzellisolaten auch Gewebe gezüchtet, die später ihren Einsatz finden. In London ist es zum Beispiel gelungen, aus DPSCs Zähne zu züchten, die Mäusen eingesetzt wurden ⁶⁸. Eine weitere, interessante Einsatzmöglichkeit von Stammzellen findet sich in der Benutzung sogenannter Scaffolds, also einem Biomaterial, in das Zellen oder ganze Gewebe einwachsen können. Der Vorteil bei diesem Ansatz liegt in der vorgefertigten Form und der geringeren Anzahl an Zellen, die für eine Besiedlung benötigt werden. Tiefe Rückenmarksverletzungen, die im schlimmsten Fall zu einer Querschnittslähmung führen, könnten in Zukunft behandelt werden. Ein mit Nervenzellen bewachsener Polymer-Scaffold führte im Tiermodell zu einer Heilung und zum Aufheben der Lähmungserscheinungen ⁷⁵. Es werden aber auch natürliche Scaffolds verwendet, indem Zellen aus Organen "herausgewaschen" werden. Dies geschieht durch Perfusion, das zellfreie Gewebe kann anschließend zum Beispiel mit Endothel- oder Herzmuskelzellen besiedelt werden ⁷⁶. Weiterhin könnten in Zukunft Defekte kritischer Größe versorgt werden, die heute noch nicht durch körpereigenes Regenerationspotential ersetzt werden können und zum Teile eine letale Prognose nach sich ziehen.

Schon heute entwickelt sich ein rasch wachsender Markt für Stammzelltherapien, auch die ersten Stammzellbanken haben ihren Betrieb aufgenommen. Es bleibt zu hoffen, dass die Forschung in diesem Bereich weiterhin ambitioniert fortgeführt wird, um der Medizin in Zukunft neue Therapieformen zu bieten.

6 Quellenverzeichnis

- Wicha, Max S., Suling Liu, und Gabriela Dontu. "Cancer Stem Cells: An Old Idea—A Paradigm Shift". *Cancer Research* 66, Nr. 4 (15. Februar 2006): 1883– 1890. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-3153.
- Bobis, Sylwia, Danuta Jarocha, und Marcin Majka. "Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications." *Folia Histochemica et Cytobiologica* 44, Nr. 4 (16. Januar 2007): 215–230. doi:10.5603/4554.
- Chamberlain, Giselle, James Fox, Brian Ashton, und Jim Middleton. "Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing". *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 25, Nr. 11 (November 2007): 2739–2749. doi:10.1634/stemcells.2007-0197.
- Knoepfler, Paul S. "Deconstructing Stem Cell Tumorigenicity: A Roadmap to Safe Regenerative Medicine". *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 27, Nr. 5 (Mai 2009): 1050–1056. doi:10.1002/stem.37.
- Yamanaka, Shinya, und Helen M. Blau. "Nuclear Reprogramming to a Pluripotent State by Three Approaches". *Nature* 465, Nr. 7299 (10. Juni 2010): 704–712. doi:10.1038/nature09229.
- Schwenzer, N. (Hg.) *"Zahnärztliche Chirurgie"*, Georg Thieme Verlag, 4. Auflage (Stuttgart 2009): S. 22
- Becker, Prof. Dr. J. (Hg.) *"Curriculum Chirurgie Band I"*, , Quintessenz Verlag, 1. Auflage (Berlin 2002): S. 204
- Welsch, U. (Hg.) "Repetitorium Histologie", Elsevier GmbH, 1. Auflage (München 2006): S. 28 ff.
- 9. Hellwig, E. (Hg.), *"Einführung in die Zahnerhaltung"*, Deutscher Zahnärzte Verlag, 5. Auflage (Köln 2009): S. 311-314
- Gronthos, S, M Mankani, J Brahim, P G Robey, und S Shi. "Postnatal Human Dental Pulp Stem Cells (DPSCs) in Vitro and in Vivo". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, Nr. 25 (5. Dezember 2000): 13625–13630. doi:10.1073/pnas.240309797.

- 11. Chadipiralla, Kiranmai, Ji Min Yochim, Bindu Bahuleyan, Chun-Yuh Charles Huang, Franklin Garcia-Godoy, Peter E Murray, und Eric J Stelnicki. "Osteogenic Differentiation of Stem Cells Derived from Human Periodontal Ligaments and Pulp of Human Exfoliated Deciduous Teeth". *Cell and Tissue Research* 340, Nr. 2 (Mai 2010): 323–333. doi:10.1007/s00441-010-0953-0.
- Ito, M, M Watanabe, T Ihara, H Kamiya, und M Sakurai. "Increased Expression of Adhesion Molecules (CD54, CD29 and CD44) on Fibroblasts Infected with Cytomegalovirus". *Microbiology and Immunology* 39, Nr. 2 (1995): 129–133.
- Kern, Susanne, Hermann Eichler, Johannes Stoeve, Harald Klüter, und Karen Bieback. "Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue". *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 24, Nr. 5 (Mai 2006): 1294–1301. doi:10.1634/stemcells.2005-0342.
- Lee, Oscar K, Tom K Kuo, Wei-Ming Chen, Kuan-Der Lee, Shie-Liang Hsieh, und Tain-Hsiung Chen. "Isolation of Multipotent Mesenchymal Stem Cells from Umbilical Cord Blood". *Blood* 103, Nr. 5 (1. März 2004): 1669–1675. doi:10.1182/blood-2003-05-1670.
- Friedman, Jay W. "The Prophylactic Extraction of Third Molars: a Public Health Hazard". *American Journal of Public Health* 97, Nr. 9 (September 2007): 1554– 1559. doi:10.2105/AJPH.2006.100271.
- 16. Zuk, Patricia A, Min Zhu, Peter Ashjian, Daniel A De Ugarte, Jerry I Huang, Hiroshi Mizuno, Zeni C Alfonso, John K Fraser, Prosper Benhaim, und Marc H Hedrick. "Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells". *Molecular Biology of the Cell* 13, Nr. 12 (Dezember 2002): 4279–4295. doi:10.1091/mbc.E02-02-0105.
- Pierdomenico, Laura, Laura Bonsi, Mario Calvitti, Damiano Rondelli, Mario Arpinati, Gabriella Chirumbolo, Ennio Becchetti, u. a. "Multipotent Mesenchymal Stem Cells with Immunosuppressive Activity Can Be Easily Isolated from Dental Pulp". *Transplantation* 80, Nr. 6 (27. September 2005): 836–842.

- 18. Bruder, S P, N Jaiswal, und S E Haynesworth. "Growth Kinetics, Self-renewal, and the Osteogenic Potential of Purified Human Mesenchymal Stem Cells During Extensive Subcultivation and Following Cryopreservation". *Journal of Cellular Biochemistry* 64, Nr. 2 (Februar 1997): 278–294.
- 19. Kovach, N L,T M Carlos, E Yee und J M Harlan. "A monoclonal antibody to beta 1 integrin (CD29) stimulates VLA-dependent adherence of leukocytes to human umbilical vein endothelial cells and matrix components". The Journal of Cell Biology Nr. 116 (Februar 1992): 499-509.
- 20. Miettinen, M, A E Lindenmayer, und A Chaubal. "Endothelial Cell Markers CD31, CD34, and BNH9 Antibody to H- and Y-antigens--evaluation of Their Specificity and Sensitivity in the Diagnosis of Vascular Tumors and Comparison with von Willebrand Factor". *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 7, Nr. 1 (Januar 1994): 82–90.
- Baumheter, S, M S Singer, W Henzel, S Hemmerich, M Renz, S D Rosen, und L A Lasky. "Binding of L-selectin to the Vascular Sialomucin CD34". Science (New York, N.Y.) 262, Nr. 5132 (15. Oktober 1993): 436–438.
- Weber, G F, S Ashkar, M J Glimcher, und H Cantor. "Receptor-ligand Interaction Between CD44 and Osteopontin (Eta-1)". *Science (New York, N.Y.)* 271, Nr. 5248 (26. Januar 1996): 509–512.
- 23. Zhu, Hui, Noboru Mitsuhashi, Andrew Klein, Lora W Barsky, Kenneth Weinberg, Mark L Barr, Achilles Demetriou, und Gordon D Wu. "The Role of the Hyaluronan Receptor CD44 in Mesenchymal Stem Cell Migration in the Extracellular Matrix". *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 24, Nr. 4 (April 2006): 928–935. doi:10.1634/stemcells.2005-0186.
- Penninger, J M, J Irie-Sasaki, T Sasaki, und A J Oliveira-dos-Santos. "CD45: New Jobs for an Old Acquaintance". *Nature Immunology* 2, Nr. 5 (Mai 2001): 389– 396. doi:10.1038/87687.
- 25. Wetzel, Anne, Triantafyllos Chavakis, Klaus T Preissner, Michael Sticherling, Uwe-Frithjof Haustein, Ulf Anderegg, und Anja Saalbach. "Human Thy-1 (CD90)

on Activated Endothelial Cells Is a Counterreceptor for the Leukocyte Integrin Mac-1 (CD11b/CD18)". *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 172, Nr. 6 (15. März 2004): 3850–3859.

- Barry, F, R Boynton, M Murphy, S Haynesworth, und J Zaia. "The SH-3 and SH-4 Antibodies Recognize Distinct Epitopes on CD73 from Human Mesenchymal Stem Cells". *Biochemical and Biophysical Research Communications* 289, Nr. 2 (30. November 2001): 519–524. doi:10.1006/bbrc.2001.6013.
- 27. Duff, Sarah E, Chenggang Li, John M Garland, und Shant Kumar. "CD105 Is Important for Angiogenesis: Evidence and Potential Applications". FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 17, Nr. 9 (Juni 2003): 984–992.doi:10.1096/fj.02-0634rev.
- Hoshino, Ayuko, Haruki Chiba, Kanji Nagai, Genichiro Ishii, und Atsushi Ochiai. "Human Vascular Adventitial Fibroblasts Contain Mesenchymal Stem/progenitor Cells". *Biochemical and Biophysical Research Communications* 368, Nr. 2 (4. April 2008): 305–310. doi:10.1016/j.bbrc.2008.01.090.
- Ogawa, M. "Differentiation and Proliferation of Hematopoietic Stem Cells".
 Blood 81, Nr. 11 (1. Juni 1993): 2844–2853.
- 30. Mathias, S, K A Dressler, und R N Kolesnick. "Characterization of a Ceramideactivated Protein Kinase: Stimulation by Tumor Necrosis Factor Alpha". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, Nr. 22 (15. November 1991): 10009–10013.
- 31. Mathias, S, A Younes, C C Kan, I Orlow, C Joseph, und R N Kolesnick. "Activation of the Sphingomyelin Signaling Pathway in Intact EL4 Cells and in a Cell-free System by IL-1 Beta". Science (New York, N.Y.) 259, Nr. 5094 (22. Januar 1993): 519–522.
- 32. Hou, Qi, Junfei Jin, Hui Zhou, Sergei A Novgorodov, Alicja Bielawska, Zdzislaw M Szulc, Yusuf A Hannun, Lina M Obeid, und Yi-Te Hsu. "Mitochondrially Targeted Ceramides Preferentially Promote Autophagy, Retard Cell Growth, and Induce Apoptosis". *Journal of Lipid Research* 52, Nr. 2 (Februar 2011): 278–288. doi:10.1194/jlr.M012161.

- 33. Heinrich, Peter C, Iris Behrmann, Serge Haan, Heike M Hermanns, Gerhard Müller-Newen, und Fred Schaper. "Principles of Interleukin (IL)-6-type Cytokine Signalling and Its Regulation". *The Biochemical Journal* 374, Nr. Pt 1 (15. August 2003): 1–20. doi:10.1042/BJ20030407.
- 34. Koller, M R, J G Bender, W M Miller, und E T Papoutsakis. "Expansion of Primitive Human Hematopoietic Progenitors in a Perfusion Bioreactor System with IL-3, IL-6, and Stem Cell Factor". *Bio/technology (Nature Publishing Company)* 11, Nr. 3 (März 1993): 358–363.
- 35. Ornitz, D M, und N Itoh. "Fibroblast Growth Factors". *Genome Biology* 2, Nr. 3 (2001): REVIEWS3005.
- Bianchi, Giordano, Andrea Banfi, Maddalena Mastrogiacomo, Rosario Notaro, Lucio Luzzatto, Ranieri Cancedda, und Rodolfo Quarto. "Ex vivo enrichment of mesenchymal cell progenitors by fibroblast growth factor 2". *Experimental Cell Research* 287, Nr. 1 (1. Juli 2003): 98–105. doi:10.1016/S0014-4827(03)00138-1.
- Dettmer, U. (Hg.) "Intensivkurs Biochemie" Elsevier GmbH, 1. Auflage, (München 2005): S. 359
- 38. Khalil, N. "TGF-beta: From Latent to Active". *Microbes and Infection / Institut Pasteur* 1, Nr. 15 (Dezember 1999): 1255–1263.
- Barry, Frank, Raymond E. Boynton, Beishan Liu, und J.Mary Murphy. "Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow: Differentiation-Dependent Gene Expression of Matrix Components". *Experimental Cell Research* 268, Nr. 2 (15. August 2001): 189–200. doi:10.1006/excr.2001.5278.
- Prashar, Y, A Khanna, P Sehajpal, V K Sharma, und M Suthanthiran. "Stimulation of Transforming Growth Factor-beta 1 Transcription by Cyclosporine". *FEBS Letters* 358, Nr. 2 (23. Januar 1995): 109–112.
- 41. Kordon, E C, R A McKnight, C Jhappan, L Hennighausen, G Merlino, und G H Smith. "Ectopic TGF Beta 1 Expression in the Secretory Mammary Epithelium Induces Early Senescence of the Epithelial Stem Cell Population".

Developmental Biology 168, Nr. 1 (März 1995): 47–61. doi:10.1006/dbio.1995.1060.

- 42. Key, L L, Jr, W L Ries, R M Rodriguiz, und H C Hatcher. "Recombinant Human Interferon Gamma Therapy for Osteopetrosis". *The Journal of Pediatrics* 121, Nr. 1 (Juli 1992): 119–124.
- 43. Schroder, Kate, Paul J Hertzog, Timothy Ravasi, und David A Hume. "Interferongamma: An Overview of Signals, Mechanisms and Functions". *Journal of Leukocyte Biology* 75, Nr. 2 (Februar 2004): 163–189.doi:10.1189/jlb.0603252.
- 44. Mangan, K F, M E Hartnett, S A Matis, A Winkelstein, und T Abo. "Natural Killer Cells Suppress Human Erythroid Stem Cell Proliferation in Vitro". *Blood* 63, Nr.
 2 (Februar 1984): 260–269.
- 45. Escárcega, R O, S Fuentes-Alexandro, M García-Carrasco, A Gatica, und A Zamora. "The Transcription Factor Nuclear Factor-kappa B and Cancer". *Clinical Oncology (Royal College of Radiologists (Great Britain))* 19, Nr. 2 (März 2007): 154–161.
- 46. Crisostomo, Paul R., Yue Wang, Troy A. Markel, Meijing Wang, Tim Lahm, und Daniel R. Meldrum. "Human Mesenchymal Stem Cells Stimulated by TNF-α, LPS, or Hypoxia Produce Growth Factors by an NFκB- but Not JNK-dependent Mechanism". *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 294, Nr. 3 (3. Januar 2008): C675–C682. doi:10.1152/ajpcell.00437.2007.
- Heldin, C H, und B Westermark. "Mechanism of Action and in Vivo Role of Platelet-derived Growth Factor". *Physiological Reviews* 79, Nr. 4 (Oktober 1999): 1283–1316.
- 48. Doucet, Christelle, Isabelle Ernou, Yizhou Zhang, Jean-Roch Llense, Laurent Begot, Xavier Holy, und Jean-Jacques Lataillade. "Platelet Lysates Promote Mesenchymal Stem Cell Expansion: a Safety Substitute for Animal Serum in Cell-based Therapy Applications". *Journal of Cellular Physiology* 205, Nr. 2 (November 2005): 228–236. doi:10.1002/jcp.20391.
- 49. Kratchmarova, Irina, Blagoy Blagoev, Mandana Haack-Sorensen, Moustapha Kassem, und Matthias Mann. "Mechanism of Divergent Growth Factor Effects

in Mesenchymal Stem Cell Differentiation". *Science* 308, Nr. 5727 (6. März 2005): 1472–1477.doi:10.1126/science.1107627.

- 50. Horn, Florian (Hg.), *"Biochemie des Menschen"*, Thieme Verlag, 3. Auflage, (Stuttgart 2005): S. 408 ff.
- Shweiki, D, A Itin, D Soffer, und E Keshet. "Vascular Endothelial Growth Factor Induced by Hypoxia May Mediate Hypoxia-initiated Angiogenesis". *Nature* 359, Nr. 6398 (29. Oktober 1992): 843–845. doi:10.1038/359843a0.
- Henry, Timothy D, Brian H Annex, George R McKendall, Michael A Azrin, John J Lopez, Frank J Giordano, P K Shah, u. a. "The VIVA Trial: Vascular Endothelial Growth Factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis". *Circulation* 107, Nr. 10 (18. März 2003): 1359–1365.
- 53. Jiang, Yuehua, Balkrishna N. Jahagirdar, R. Lee Reinhardt, Robert E. Schwartz, C. Dirk Keene, Xilma R. Ortiz-Gonzalez, Morayma Reyes, u. a. "Pluripotency of Mesenchymal Stem Cells Derived from Adult Marrow". *Nature* 418, Nr. 6893 (4. Juli 2002): 41–49. doi:10.1038/nature00870.
- Pratap, Jitesh, Mario Galindo, S Kaleem Zaidi, Diana Vradii, Bheem M Bhat, John A Robinson, Je-Yong Choi, u. a. "Cell Growth Regulatory Role of Runx2 During Proliferative Expansion of Preosteoblasts". *Cancer Research* 63, Nr. 17 (1. September 2003): 5357–5362.
- 55. Jaiswal, N, S E Haynesworth, A I Caplan, und S P Bruder. "Osteogenic Differentiation of Purified, Culture-expanded Human Mesenchymal Stem Cells in Vitro". *Journal of Cellular Biochemistry* 64, Nr. 2 (Februar 1997): 295–312.
- 56. Burgis, E. (Hg.), *"Intensivkurs Allgemeine und spezielle Pharmakologie"*, Elsevier GmbH, 4. Auflage, (München 2008): S. 454
- 57. Haynesworth, S E, M A Baber, und A I Caplan. "Cytokine Expression by Human Marrow-derived Mesenchymal Progenitor Cells in Vitro: Effects of Dexamethasone and IL-1 Alpha". *Journal of Cellular Physiology* 166, Nr. 3 (März 1996): 585–592. doi:10.1002/(SICI)1097-4652(199603)166:3<585::AID-JCP13>3.0.CO;2-6.

- 58. Shalhoub, V, D Conlon, M Tassinari, C Quinn, N Partridge, G S Stein, und J B Lian. "Glucocorticoids Promote Development of the Osteoblast Phenotype by Selectively Modulating Expression of Cell Growth and Differentiation Associated Genes". *Journal of Cellular Biochemistry* 50, Nr. 4 (Dezember 1992): 425–440. doi:10.1002/jcb.240500411.
- Ducy, P, C Desbois, B Boyce, G Pinero, B Story, C Dunstan, E Smith, u. a.
 "Increased Bone Formation in Osteocalcin-deficient Mice". *Nature* 382, Nr.
 6590 (1. August 1996): 448–452. doi:10.1038/382448a0.
- 60. Kim, Hyun-Ju, Haibo Zhao, Hideki Kitaura, Sandip Bhattacharyya, Judson A. Brewer, Louis J. Muglia, F. Patrick Ross, und Steven L. Teitelbaum. "Glucocorticoids suppress bone formation via the osteoclast". *The Journal of Clinical Investigation* 116, Nr. 8 (1. August 2006): 2152–2160. doi:10.1172/JCI28084.
- Leboy, P S, L Vaias, B Uschmann, E Golub, S L Adams, und M Pacifici. "Ascorbic Acid Induces Alkaline Phosphatase, Type X Collagen, and Calcium Deposition in Cultured Chick Chondrocytes". *The Journal of Biological Chemistry* 264, Nr. 29 (15. Oktober 1989): 17281–17286.
- 62. Sugimoto, T, M Nakada, M Fukase, Y Imai, Y Kinoshita, und T Fujita. "Effects of Ascorbic Acid on Alkaline Phosphatase Activity and Hormone Responsiveness in the Osteoblastic Osteosarcoma Cell Line UMR-106". *Calcified Tissue International* 39, Nr. 3 (September 1986): 171–174.
- 63. Chung, C H, E E Golub, E Forbes, T Tokuoka, und I M Shapiro. "Mechanism of Action of Beta-glycerophosphate on Bone Cell Mineralization". *Calcified Tissue International* 51, Nr. 4 (Oktober 1992): 305–311.
- 64. Hc, Tenenbaum. "Levamisole and Inorganic Pyrophosphate Inhibit Betaglycerophosphate Induced Mineralization of Bone Formed in Vitro." *Bone and Mineral* 3, Nr. 1 (Oktober 1987): 13–26.
- 65. Lee, Kyeong-Sook, Hyun-Jung Kim, Qing-Lin Li, Xin-Zi Chi, Chisato Ueta, Toshihisa Komori, John M. Wozney, u. a. "Runx2 Is a Common Target of Transforming Growth Factor ?1 and Bone Morphogenetic Protein 2, and

Cooperation between Runx2 and Smad5 Induces Osteoblast-Specific Gene Expression in the Pluripotent Mesenchymal Precursor Cell Line C2C12". *Molecular and Cellular Biology* 20, Nr. 23 (Dezember 2000):8783–8792.

- 66. Le Blanc, Katarina, Ida Rasmusson, Berit Sundberg, Cecilia Götherström, Moustapha Hassan, Mehmet Uzunel, und Olle Ringdén. "Treatment of Severe Acute Graft-versus-host Disease with Third Party Haploidentical Mesenchymal Stem Cells". *Lancet* 363, Nr. 9419 (1. Mai 2004): 1439–1441. doi:10.1016/S0140-6736(04)16104-7.
- Nakamizo, Akira, Frank Marini, Toshiyuki Amano, Asadullah Khan, Matus Studeny, Joy Gumin, Julianne Chen, u. a. "Human Bone Marrow–Derived Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Gliomas". *Cancer Research* 65, Nr. 8 (15. April 2005): 3307–3318. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1874.
- Ohazama, A, S A C Modino, I Miletich, und P T Sharpe. "Stem-cell-based Tissue Engineering of Murine Teeth". *Journal of Dental Research* 83, Nr. 7 (Juli 2004): 518–522.
- 69. Niemeyer, Philipp, Katharina Fechner, Stefan Milz, Wiltrud Richter, Norbert P. Suedkamp, Alexander T. Mehlhorn, Simon Pearce, und Philip Kasten. "Comparison of mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue for bone regeneration in a critical size defect of the sheep tibia and the influence of platelet-rich plasma". *Biomaterials* 31, Nr. 13 (Mai 2010): 3572– 3579. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.01.085.
- 70. Mai, Prof. Dr. Jürgen K. (Hg.), *"Funktionelle Anatomie für Zahnmediziner Band I"* Quintessenz Verlags-GmbH, 1. Auflage (Berlin 1995): S. 202
- 71. Mai, Prof. Dr. Jürgen K. (Hg.), *"Funktionelle Anatomie für Zahnmediziner Band I"* Quintessenz Verlags-GmbH, 1. Auflage (Berlin 1995): S. 137
- 72. Hausamen, J.-E. (Hg.), *"Curriculum Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie Band III"*, Quintessenz Verlags-GmbH, 1. Auflage (Berlin 2003): S.378
- 73. Dominici, M., K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F.C Marini, D.S. Krause, R.J. Deans, A. Keating, D.J. Prockop, und E.M. Horwitz. "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society

for Cellular Therapy position statement". *Cytotherapy* 8, Nr. 4 (2006): 315–317. doi:10.1080/14653240600855905.

- 74. Kerkis, Irina, Alexandre Kerkis, Dmitri Dozortsev, Gaëlle Chopin Stukart-Parsons, Sílvia Maria Gomes Massironi, Lygia V. Pereira, Arnold I. Caplan, und Humberto F. Cerruti. "Isolation and Characterization of a Population of Immature Dental Pulp Stem Cells Expressing OCT-4 and Other Embryonic Stem Cell Markers". *Cells Tissues Organs* 184, Nr. 3–4 (2006): 105– 116. doi:10.1159/000099617.
- 75. Pritchard, Christopher D., Jonathan R. Slotkin, Dou Yu, Haining Dai, Matthew S. Lawrence, Roderick T. Bronson, Francis M. Reynolds, Yang D. Teng, Eric J. Woodard, und Robert S. Langer. "Establishing a model spinal cord injury in the African green monkey for the preclinical evaluation of biodegradable polymer scaffolds seeded with human neural stem cells". *Journal of Neuroscience Methods* 188, Nr. 2 (15. Mai 2010): 258–269.

doi:10.1016/j.jneumeth.2010.02.019.

- 76. Ott, Harald C., Thomas S. Matthiesen, Saik-Kia Goh, Lauren D. Black, Stefan M. Kren, Theoden I. Netoff, und Doris A. Taylor. "Perfusion-decellularized Matrix: Using Nature's Platform to Engineer a Bioartificial Heart". *Nature Medicine* 14, Nr. 2 (Februar 2008): 213–221. doi:10.1038/nm1684.
- 77. Fusaki, Noemi, Hiroshi Ban, Akiyo Nishiyama, Koichi Saeki, und Mamoru Hasegawa. "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, Nr. 8 (2009): 348–362.
- 78. Cui, Lei, Bo Liu, Guangpeng Liu, Wenjie Zhang, Lian Cen, Jian Sun, Shuo Yin, Wei Liu, und Yilin Cao. "Repair of cranial bone defects with adipose derived stem cells and coral scaffold in a canine model". *Biomaterials* 28, Nr. 36 (Dezember 2007): 5477–5486. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.08.042.
- 79. Scaglione, S., A. Braccini, D. Wendt, C. Jaquiery, F. Beltrame, R. Quarto, und Ivan Martin. "Engineering of Osteoinductive Grafts by Isolation and Expansion

of Ovine Bone Marrow Stromal Cells Directly on 3D Ceramic Scaffolds". *Biotechnology and Bioengineering* 93, Nr. 1 (2006): 181–187. doi:10.1002/bit.20677.

- 80. Hellwig, E. (Hg.), *"Einführung in die Zahnerhaltung"*, Deutscher Zahnärzte Verlag, 5. Auflage, (Köln 2009): S.4-12
- Bunnell, Bruce A., Mette Flaat, Christine Gagliardi, Bindiya Patel, und Cynthia Ripoll. "Adipose-derived stem cells: Isolation, expansion and differentiation". *Methods* 45, Nr. 2 (Juni 2008): 115–120. doi:10.1016/j.ymeth.2008.03.006.
- Gregory, Carl A, W Grady Gunn, Alexandra Peister, und Darwin J Prockop. "An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction". *Analytical Biochemistry* 329, Nr. 1 (1. Juni 2004): 77–84. doi:10.1016/j.ab.2004.02.002.
- Frith, Jessica E., Brian Thomson, und Paul G. Genever. "Dynamic Three-Dimensional Culture Methods Enhance Mesenchymal Stem Cell Properties and Increase Therapeutic Potential". *Tissue Engineering Part C: Methods* 16, Nr. 4 (August 2010): 735–749. doi:10.1089/ten.tec.2009.0432.
- 84. Newton, R. "Molecular Mechanisms of Glucocorticoid Action: What Is Important?" *Thorax* 55, Nr. 7 (Juli 2000): 603–613.
- Bantal, J., Pohanka, E. "Malignancies in renal transplantation: an unmet medical need." *Nephrology Dialysis Transplantation 22* (Supplement 1) (2007), i4–i10. doi:10.1093/ndt/gfm085

Danksagung

Ich danke meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und meiner Freundin für die seelische Unterstützung, außerdem den Mitarbeitern im Forschungslabor der Unfall- und Handchirurgie, vor allem Christoph, Vera, Benita und Samira, für die netten Stunden zwischen den Versuchen. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

31.03.2014, Johannes Schmidt