

Aus dem Institut für Anatomie II

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktorin: Univ.-Prof. Dr. Charlotte Freifrau von Gall

Charakterisierung und Differenzierung muriner
pulpaler Zellen unter dem Aspekt der Deletion von
Bmal1

Dissertation

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

vorgelegt von

Victoria-Katharina Zanders

2022

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Prof. Dr. phil. nat. Freifrau Charlotte von Gall

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Christoph V. Suschek

Für mein größtes Vorbild, meine Mutter

Zusammenfassung

Unser endogen gesteuerter Tag- und Nachtrhythmus wird als zirkadianer Rhythmus bezeichnet und über eine Reihe von Uhrengenen gesteuert. In dieser Arbeit wurde mit *Bmal1*-defizienten Mäusen gearbeitet, bei denen das Uhrengen *Bmal1* als einer der zentralen Transkriptionsfaktoren des molekularen Uhrenwerkes deletiert ist. *Bmal1*-defiziente Mäuse zeigen in der Folge einen gestörten Wach-Schlaf-Rhythmus, sowie Progerie ähnliche Entwicklungsverläufe. Sie bleiben kleiner, leiden unter peripheren Pathologien und weisen einen altersabhängigen Muskel- und Knochenverlust auf, welcher als Sarkopenie und Osteoporose, ein Kennzeichen des Alterungsprozesses von Säugern, darstellt.

Zielsetzung dieser Arbeit war zunächst die Charakterisierung muriner pulpaler Zellen nach Fragmentation des Zahnes. Als weiterer Schwerpunkt wurde die Differenzierungsfähigkeit dieser Zellen nach Deletion von *Bmal1* untersucht, um zu zeigen, ob eine Beeinflussung der Osteogenese durch eine Störung des molekularen Uhrenwerkes feststellbar ist.

Es wurden Zellen aus der murinen Pulpa von *Bmal1*^{+/-}-, sowie *Bmal1*^{-/-}- Mäusen isoliert und kultiviert, indem die Inzisivi adulter Tiere extrahiert und nach Spaltung in Nährmedium inkubiert wurden. Die plastikadhärent wachsenden Zellen migrierten aus den Zahnstücken und wurden kultiviert. Die Zellen wurden anschließend weiterführend charakterisiert, wobei die Kriterien der International Society for Cellular Therapy (ISCT) für mesenchymale Stammzellen (MSCs) zur Hilfe genommen wurden: Die ISCT fordert für MSCs neben der Plastikadhärenz, die Differenzierungsfähigkeit in Osteoblasten, Adipozyten und Chondroblasten, sowie die Expression spezifischer Oberflächenantigene: MSCs müssen hier CD105, CD73 und CD90 exprimieren und sollten negativ für CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a oder CD19 und HLA-DR sein. Die von mir kultivierten Zellen zeigten lediglich die Fähigkeit osteogen zu differenzieren und entsprachen auch hinsichtlich ihrer Antigenexpression nicht vollständig den Anforderungen der ISCT, weshalb sie als unipotente Progenitorzellen definiert wurden. Für die Erforschung des Einflusses einer *Bmal1*-Deletion auf die Osteogenesefähigkeit dieser Progenitorzellen, wurden Zellen der *Bmal1*^{+/-}- mit *Bmal1*^{-/-}-Tieren verglichen. Eine Kalzifizierung markiert den Endpunkt der Osteogenese. Das in die Extrazelluläre Matrix eingelagerten Kalzium wurde analysiert und damit das Ausmaß der Osteogenese quantifiziert. Hierbei zeigten die Zellen der *Bmal1*-defizienten-Mäuse eine tendenziell stärkere osteogene Differenzierungsfähigkeit. Durch Western Blot Analyse wurden die Proteine BMP2, Osterix, Osteocalcin und Osteopontin untersucht, um die osteogene Differenzierung von *Bmal1*^{+/-}- und *Bmal1*^{-/-}-Zellen auf molekularer Ebene darzustellen. Auch hier zeigte sich eine teilweise signifikant ausgeprägtere osteogene Differenzierungsfähigkeit der Zellen der *Bmal1*-defizienten Tiere. Zukünftige Studien könnten eine Störung der zirkadianen Rhythmik, hervorgerufen durch eine Haltung der Tiere unter Dauerlichtbedingungen vorsehen, um zu untersuchen, ob eine solche Störung ähnliche Einflüsse auf das osteogene Differenzierungsverhalten der pulpalen Progenitorzellen nimmt. Vor allem im Bereich der Zahnheilkunde sind Zellen mit einem osteogenen Differenzierungspotential im Bereich der Knochenregeneration und Heilung nach Zahnextraktionen, gefolgt von prothetischen Versorgungen, wichtige Therapieansätze und auch für die autologe Knochenregeneration von entscheidender Bedeutung und damit die von uns etablierten murinen pulpalen Progenitorzellen interessant für zukünftige Studienmodelle in diesem Bereich.

Summary

Our internal clock is called circadian rhythm and is controlled through a series of clock genes. Within this dissertation, *Bmal1*-deficient mice were examined, in which the clock gene *Bmal1* as one of the central transcription factors of the molecular clockwork is deleted. *Bmal1*-deficient mice as a consequence show a disturbed sleep-wake rhythm as well as progeria like trajectories. They remain tinier, suffer from peripheral pathologies and show age related muscle and bone loss, which as sarcopenia and osteoporosis depict as a characteristic of the aging process of mammals.

The objective of this dissertation was initially the characterization of murine pulpal cells, after fragmentation of the incisors. As an additional focus the ability of these cells to differentiate after deletion of *Bmal1* was examined, to show if an influence of the osteogenesis through a disturbance of the molecular clockwork can be determined.

Cells out of the murine pulpa of *Bmal1*^{+/+} as well as *Bmal1*^{-/-} mice have been isolated and cultivated, through extraction of the incisors of adult animals which have been split and incubated in culture medium. The plastic adherent growing cells migrated out of tooth pieces and have been cultivated. Subsequently the cells were characterized, whereas the criteria of the International Society for Cellular Therapy (ISCT) for mesenchymal stem cells (MSCs) was made use of. The ISCT demands for MSCs next to the plastic adherence, the ability to differentiate into osteoblasts, adipocytes and chondroblasts as well as the expression of specific cell surface markers: MSCs here have to express CD105, CD73 and CD90 and should be negative for CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a or CD19 and HLA-DR. The cells that I cultivated only showed the ability to differentiate in the osteogenic way and did not fully comply with the criteria of the ISCT in terms of their antigen expression. Due to that fact, they have been defined as unipotent progenitor cells. For the research of the influence of the *Bmal1* deletion on to the osteogenesis differentiation capability of these progenitor cells, *Bmal1*^{+/+} and *Bmal1*^{-/-} cells have been compared to each other. A calcification marks the end of the osteogenesis. The calcium that is embedded into the extracellular matrix was analyzed and therefore the extend of the osteogenesis quantified. In this connection the cells of the *Bmal1* deficient mice showed a tending stronger osteogenic ability to differentiate. Through a western blot analysis the proteins BMP2, Osterix, Osteocalcin and Osteopontin have been examined in order to show the osteogenic differentiation of *Bmal1*^{+/+}- und *Bmal1*^{-/-} cells on a molecular basis. Here as well the cells of the *Bmal1* deficient animals showed a partially significant pronounced ability of osteogenic differentiation. Future studies could provide a disturbance of the circadian rhythm, induced by keeping the animals under a continuous light exposure, in order to examine if such a disturbance has similar influences on to the osteogenic differentiationability of pulpal progenitor cells. Especially in dental medicine, cells with a potential for osteogenic differentiation in the field of bone regeneration and socket healing after tooth extractions, followed by prosthetics, are important therapy approaches and are as well of curical importance for the autologous bone regeneration. Therefore are the by us established murine pulpal progenitor cells interesting for prospective studies in this area.

Abkürzungsverzeichnis

α	alpha
β	beta
γ	gamma
δ	delta
L	Liter
ml	Milliliter
μ l	Mikroliter
g	Gramm
μ g	Mikrogramm
ng	Nanogramm
M	Mol
mM	Millimol
μ M	Mikromol
nm	Nanometer
$^{\circ}$ C	Grad Celsius
%	Prozent
Abb.	Abbildung
ABMSC	<i>Alveolar bone marrow derived stem cell</i>
ALP	Alkalische Phosphatase
ARNT	<i>Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator</i>
Aqua dest.	<i>Aqua destillata</i>
BCA	<i>Bicinchoninic Acid</i>
<i>Bmal1</i>	<i>Brain and muscle ARNT-like Protein</i>
BM	<i>Bone marrow</i>
BMSC	<i>Bone marrow-derived mesenchymal stem cells</i>
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise

Cat.No.	<i>Catalogue Number</i>
ca.	<i>circa</i>
Ca²⁺	Calcium
Cbfa1	<i>Core-binding factor alpha 1</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CIM	<i>Columnae intermediolaterales</i>
<i>Clock</i>	<i>Circadian locomotor output cycles kaput</i>
CO₂	Kohlenstoffdioxid
Co-Smad	<i>Common-mediator Smad</i>
Col IA1	Kollagen Typ 1
C57BI/6J	<i>C57 black 6 Jackson</i>
cAMP	<i>cyclic adenosine monophosphate</i>
CRE	<i>cyclic AMP response element</i>
CREB	<i>cyclic AMP response element binding protein</i>
<i>Cry</i>	<i>Cryptochrome</i>
Cu	Kupfer
DBP	<i>Albumin D-Site-binding Protein</i>
Dlx5	<i>Distal-Less Homeobox 5</i>
DMEM	<i>Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DFPC	Dental follicle precursor cells
DPSC	<i>Dental pulp stem cell</i>
DSC	<i>Dental stem cell</i>
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	<i>et alii / et alia</i>
EZM	extrazelluläre Matrix
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
ff	folgende

FHL2	<i>Four And A Half LIM Domains protein 2</i>
GABA	Gamma- Aminobuttersäure
GMSC	<i>Gingiva-Derived Mesenchymal Stem Cells</i>
GCS	<i>Ganglia cervicalia superiora</i>
h	<i>hour</i>
HCL	Salzsäure
HLA-DR	<i>Human Leukocyte Antigen- DR isotype</i>
HLF	Hepatic Leucocyte Factor
HRP-Substrat	<i>Horseradish peroxidase-Substrat</i>
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
ISCT	<i>International Society for Cellular Therapy</i>
kDA	Kilodalton
LIM domain	<i>LIN-11, Isl-1 and MEC-3-domain</i>
L-Ascorbinsäure-2P	L-Ascorbin-2-Phosphat
LD	<i>Light/ Dark</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MEL	Melatonin
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
Mg²⁺	Magnesium
min	Minute
MKP-1	<i>mitogen-activated protein kinase phosphatase-1</i>
MSC	<i>mesenchymal stem cell</i>
MSCs	<i>mesenchymal stem cells</i>
Msx2	<i>Msh Homeobox homolog 2</i>
mMSCs	murine MSC
n	Anzahl
NA	Noradrenalin
NaCl	Natriumchlorid
NF-κB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>

NP-40	nonyl phenoxy polyethoxy ethanol
OC	Osteocalcin
OSX	Osterix
OD₆₀₀	<i>optical density at 600nm</i>
OPN	Osteopontin
PACAP	<i>Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide</i>
PAR-Proteine	<i>Proline and Acidic amino acid-Rich-Proteine</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PDL-FB	<i>Periodontal fibroblasts</i>
PDLSC	<i>Periodontal Ligament Stem Cells</i>
Per	<i>Period</i>
PFA	Paraformaldehyd
PIN	Pinealorgan/ Zirbeldrüse
Ppar_γ	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor gamma
PT	<i>Pars tuberalis</i>
PVN	paraventriculäre Kerne
RANKL	<i>Receptor Activator of NF-κB Ligand</i>
Rev-Erbα	<i>nuclear receptor subfamily 1 group D member 1</i>
RIPA	<i>Radio-Immunoprecipitation Assay</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
ROR	<i>Retinoic Acid-Related Orphan Receptor</i>
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RNS	Reaktive Nitrogen Spezies
RUNX2	<i>Runt-related transcription factor 2</i>
s.	siehe
SCAP	<i>Stem cells of the apical papilla</i>
SCN	<i>Nucleus suprachiasmaticus</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
Ser	Serin
SHED	<i>Human Exfoliated Deciduous Teeth Stem Cells</i>

Smad	<i>Suppressor of Mothers against Decapentaplegic</i>
Smurf1	<i>Smad ubiquitination regulatory factor-1</i>
TAZ	<i>Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBS-T	<i>Tris-buffered saline with Tween20</i>
TEF	<i>Thyrotrophic Embrionic Factor</i>
TGFβ	<i>Transforming growth factor beta</i>
VIP	vasoaktives intestinales Peptid
VSMC	<i>Vascular smooth muscle cells</i>
wk	<i>week</i>
x	Multiplikation
ZETT	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Die Zirkadianik	1
1.1.1	Das zirkadiane System	1
1.1.2	Der zentrale Mechanismus des molekularen Uhrenwerkes.....	4
1.1.3	Störungen der Zirkadianik durch Bmal1 Deletion.....	8
1.2	Stammzellen	10
1.2.1	Charakterisierung von Stammzellen.....	10
1.2.2	Der mesenchymale Stammzellcharakter	11
1.2.3	Murine mesenchymale Stammzellen	12
1.2.4	Dentale Stammzellen.....	13
1.2.4.1	Charakterisierung dentaler Stammzellen	13
1.2.4.2	Dentale Progenitorzellen.....	14
1.2.4.3	Der Zahnaufbau	15
1.3	Die Osteogenese.....	20
1.3.1	Die desmale und chondrale Osteogenese	20
1.3.2	Die Osteogenese in Bezug auf den BMP-Smad-Signalweg (molekular).....	22
1.3.3	Die Osteogenese <i>in vitro</i>	25
1.3.4	Einflüsse der Zirkadianik und Bmal1 auf die Osteogenese	27
1.3.5	Die Osteogenese in der Zahnheilkunde.....	28
1.4	Ziele der Arbeit	30
2	Material und Methoden	31
2.1	Geräte, Verbrauchsmaterialien, Substanzen, Programme, Antikörper, Zellen	31
2.1.1	Geräte.....	31
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	33
2.1.3	Substanzen	35
2.1.4	Programme und Software	37
2.1.5	Antikörper	37
2.2	Medien, Lösungen, Puffer	39
2.2.1	Medien	39
2.2.2	Lösungen	40
2.2.3	Puffer.....	41
2.2.4	Tiere.....	43
2.3	Isolation muriner pulpaler Zellen	43

2.4	Zellkultur.....	44
2.4.1	Allgemeine Kulturbedingungen	44
2.4.2	Passagieren der Zellen.....	44
2.4.3	Kryokonservierung.....	45
2.4.4	Auftauen der Zellen	45
2.5	FACS-Analyse zur Zellcharakterisierung	46
2.6	Differenzierung.....	47
2.6.1	Allgemeines	47
2.6.2	Osteogene Differenzierung	47
2.6.2.1	Alizarin-Rot-S-Färbung zum Nachweis der osteogenen Differenzierung	48
2.6.2.2	Rüchlösung der Alizarin-Rot-S-Färbung	48
2.6.3	Chondrogene Differenzierung	49
2.6.3.1	Alcianblau- Färbung zum Nachweis der chondrogenen Differenzierung	49
2.6.3.2	Rüchlösung der Alcianblau-Färbung	50
2.6.4	Adipogene Differenzierung.....	50
2.6.4.1	Ölrotfärbung zum Nachweis der Adipogenen-Differenzierung.....	51
2.6.4.2	Rüchlösung der Ölrotfärbung	51
2.7	Proteinnachweis mittels Western-Blot	52
2.7.1	Allgemeines	52
2.7.2	Proteinlysate.....	53
2.7.3	BCA-Assay (Reaktion der Proteinbestimmung)	53
2.7.4	Proteinbestimmung.....	53
2.7.4.1	Vorbereitung	53
2.7.4.2	Durchführung	54
2.7.5	Elektrophorese zur Auftrennung von Proteinen (PAGE)	55
2.7.6	Blotting in Trans-Blot®Turbo™ Transfer System	56
2.7.7	Ponceau-Rot-Färbung.....	56
2.7.8	Blocken und Antikörperfärbung	57
2.7.9	Entwicklung/ Detektion der Banden/Auswertung	57
2.7.10	Blot Stripping.....	58
2.8	Statistik.....	58
3	Ergebnisse	59
3.1	Kultivierung	59
3.2	Charakterisierung	60
3.2.1	Plastikadhärenz	61
3.2.2	Expressionsmuster der Oberflächenantigene	61

3.2.3	Osteogene, chondrogene und adipogene Differenzierung	63
3.2.3.1	Adipogene Differenzierung.....	63
3.2.3.2	Chondrogene Differenzierung	65
3.2.3.3	Osteogene Differenzierung	68
3.3	Western Blot.....	70
4	Diskussion.....	78
4.1	Schlussfolgerung: Kritische Begutachtung der Ergebnisse und klinische Verwendbarkeit.....	92
5	Literaturverzeichnis.....	95

1 Einleitung

1.1 Die Zirkadianik

1.1.1 Das zirkadiane System

In einer Umwelt mit einem geregelter Tag- und Nachtrhythmus folgt die molekulare Uhr *„der Länge des astrophysiologischen Tages von genau 24 h“* (Korf and Stehle, 2005). In einer Umgebung, in welcher die Zeitsignale von Tag und Nacht fehlen, geht dieser Rhythmus zwar nicht verloren, aber er *„weicht geringfügig von der Länge des astrophysikalischen Tages ab“* (Korf and Stehle, 2005). Dieser endogen gesteuerte Rhythmus wird als zirkadianer Rhythmus bezeichnet. Die Länge des zirkadianen Rhythmus ist *„genetisch festgelegt“*, sodass sie sich bei Individuen derselben Art nicht unterscheidet (Korf and Stehle, 2005). Somit besitzt der Mensch zwei unterschiedliche Rhythmen: zum einen den 24 Stunden andauernden Tag- und Nachtrhythmus, sowie den sich davon lediglich moderat in der Länge unterscheidenden zirkadianen Rhythmus (Korf and Stehle, 2005). Hierbei wird der *„zirkadiane Rhythmus der inneren Uhr“* mit 25 Stunden angegeben und somit wird deutlich, dass dieser *„dem astrophysikalischen Tag um eine Stunde nachgeht“* (Korf and Stehle, 2005).

Das zirkadiane Uhrenwerk gilt als eine Adaptation an die Erdrotation und verleiht sämtlichen Prozessen des Körpers, angefangen von der Genexpression bis hin zum Verhalten, eine 24-Stunden-Struktur (Roenneberg and Mellow, 2016). Das zirkadiane Uhrenwerk arbeitet autonom und generiert den 24-Stunden-Rhythmus auch bei Ausfall der täglichen Umweltsignale, den sogenannten Zeitgebern, des Tag- und Nachtrhythmus mit allen seinen Eigenschaften, wie zum Beispiel Temperaturveränderungen, aber vor allem Dunkelheit und Licht, welche als die Hauptzeitgeber gelten (Roenneberg and Mellow, 2016, Korf and Stehle, 2005). Die Fähigkeit einen täglichen Rhythmus zu generieren, findet auf zellulärer Ebene statt (siehe Abb.1): Der *„zentrale zirkadiane Schrittmacher“* befindet sich in den *Nuclei suprachiasmatici* (SCN) des Hypothalamus und ist über dem

Chiasma opticum lokalisiert (Korf and Stehle, 2005). Er erhält photonische Informationen über die Ganglienzellen der Retina, die über den *Tractus retinohypothalamicus* zu den Neuronen des SCN gelangen, synchronisiert diese Informationen in seine eigene neuronale zelluläre Uhr und transformiert diese über neuronale, neuroendokrine und endokrine Mechanismen an den restlichen Organismus (Roenneberg and Merrow, 2016, Pape et al., 2014). So führen Pathologien des *Nucleus suprachiasmaticus*, wie zum Beispiel Tumore (Müller, 2010) zu einer Störung dieses durch Licht gesteuerten Signalweges und führen zu Arrhythmien.

Der *Tractus retinohypothalamicus* findet seinen Ursprung ausgehend von „*einer Unterklasse von retinalen Ganglienzellen*“, welche wiederum PACAP (ein Neuropeptid namens pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide) und Glutamat (ein Neurotransmitter) als Signalstoffe verwenden (Korf and Stehle, 2005). Die Übertragung im SCN erfolgt weitergehend über neuronale-synaptische Verfahren, welche über Nervenbahnen vor allem in anliegende Kerngebiete übertragen werden oder auch auf neuroendokrinen Wege (Korf and Stehle, 2005). Die bilateral angeordneten paraventriculären Kerne (PVN) des Hypothalamus bilden im Folgenden eine entscheidende „*Schaltstation*“ für die Verbindung an das autonome Nervensystem, indem von ihnen aus „*lange absteigende Nervenbahnen*“ zu den paarig angelegten *Columnae intermediolaterales* (CIM), welche sich im Rückenmark innerhalb des oberen thorakalen Segmentes befinden und welche als die „*zentralen sympathischen Neurone*“ gelten, ziehen (Korf and Stehle, 2005). Von hier ausgehend innervieren die Neurone mittels „*präganglionärer Fasern*“ die „*Ganglia cervicalia superiora*“ (GCS), welche nahe der linken und rechten *Ateria carotis interna* unter der Schädelbasis angelegt sind (Korf and Stehle, 2005). Hiervon ziehen sogenannte „*postganglionäre Nervenfasern*“, welche als Neurotransmitter Noradrenalin beinhalten, in sämtliche Kopfareale (Korf and Stehle, 2005). Eine entscheidende Verbindung, welche vom GCS zum Pinealorgan (PIN) führt, bildet aus Teilen die *Nervi conarii*, welche über dem *Tentorium cerebelli* lokalisiert sind (Korf and Stehle, 2005). Eine entscheidende Bedeutung kommt den Nervenfasern zu, welche Noradrenalin enthalten und im Pinealorgan als freie Nervenendigungen terminieren und hier nachts Noradrenalin exprimieren (Korf and Stehle, 2005), da dieses zu einer Stimulation der Produktion und Ausschüttung von Melatonin führt,

welches über die Melatoninrezeptoren Mel1a (MTA) und Mel1b (MTB) „im Sinne einer Rückkopplungsschleife“ auf die zirkadiane Rhythmogenese im SCN Einfluss nimmt und hier in bestimmten Zeitperioden die neuronale Aktivität unterdrückt, sowie „die Phasenlage des circadianen Rhythmusgenerators“ verändert (Korf and Stehle, 2005). Melatonin nimmt weiterführend über die *Pars tuberalis* über den Mel1a-Rezeptor Einfluss auf die Aktivität der Zellen im Hypophysenvorderlappen, sowie auch die Prolactinbildung in „*lactrotrophen Hypophysenzellen*“ (Korf and Stehle, 2005).

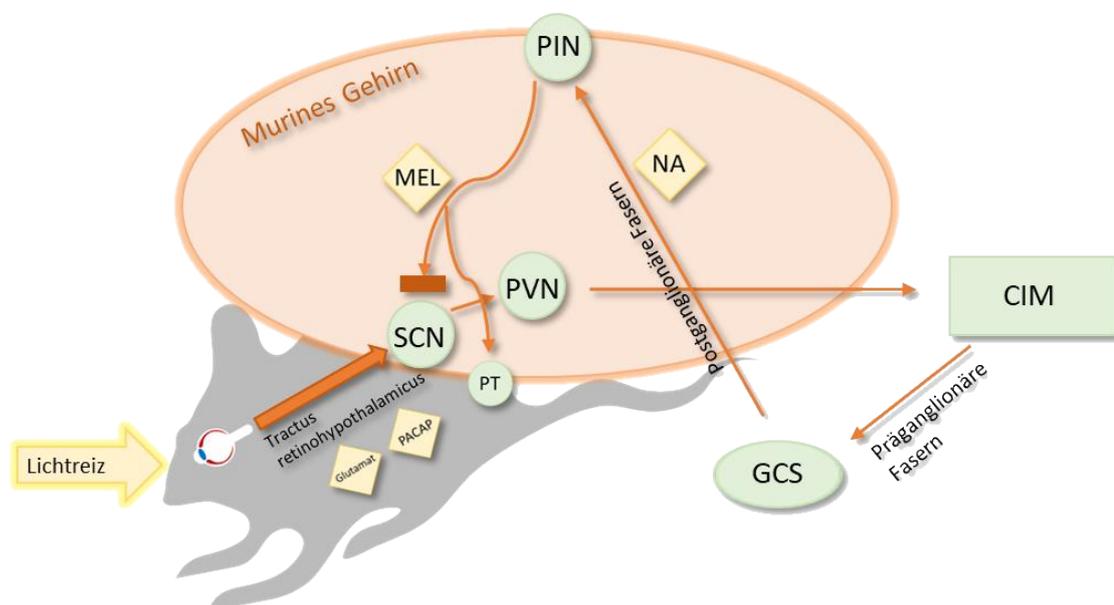


Abb.1: Regulierung des murinen zirkadianen Systems

Schematische Darstellung des zirkadianen Systems im murinen Gehirn. Die Lichtinformation gelangt über den *Tractus retinohypothalamicus* zu den suprachiasmatischen Kernen (SCN). Von hier aus gelangt die neuronale und synaptische Projektion weiter zu den paraventrikulären Kernen (PVN), wovon lange Nervenbahnen zu den *Columnae intermediolaterales* (CIM) im Rückenmark ziehen und präganglionäre Fasern in der Folge die *Ganglia cervicalia superiora* (GCS) innervieren und präganglionäre Fasern wiederum die Zirbeldrüse (PIN). Diese Nervenfasern enthalten Noradrenalin (NA), welches nachts ausgeschüttet wird und wiederum die Produktion von Melatonin (MEL) im Pinealorgan (PIN) induziert, was hieraufhin einen hemmenden Einfluss auf die neuronale Aktivität des SCN nimmt und sich in der *Pars tuberalis* (PT) unter anderem auf die Prolactinsekretion auswirkt. (Korf and Stehle, 2005)

Abbildung modifiziert nach Korf and Stehle (Korf and Stehle, 2005).

1.1.2 Der zentrale Mechanismus des molekularen Uhrenwerkes

Der zentrale zirkadiane Schrittmacher der Säuger befindet sich in paarigen bilateral angeordneten Kernen am dritten Ventrikel (SCN) (Kondratov et al., 2006). Die Lichtreize des „Licht-Dunkel-Wechsels“, welche als die Hauptzeitgeber gelten und für die molekulare Uhr entscheidend sind, kommen über die Retina und regulieren das molekulare Uhrenwerk (Korf and Stehle, 2005).

Im Folgenden sei das molekulare Uhrenwerk bei Mäusen und Ratten erklärt:

So stellt GABA den Neurotransmitter dar, welcher von den in etwa 10.000 Nervenzellen eines SCNs verwendet wird (Korf and Stehle, 2005, Moore et al., 2002). Da „bestimmte SCN-Nervenzellen“ wiederum verschiedene Neuropeptide verwenden, ist hierdurch eine weitere Unterteilung „des SCN in Zentrum und Schale“, welche sich auch bei Menschen wiederfindet, möglich (Korf and Stehle, 2005, Moore et al., 2002). Das Zentrum, welches seine Zeitgeber aus der *Retina* empfängt, enthält neben dem bereits beschriebenen Neuropeptid GABA, ebenfalls Neurone, welche zusätzlich zu diesem, das Vasoaktive Intestinale Peptid (VIP), besitzen (Korf and Stehle, 2005). In ihm terminieren „die Axone des *retinohypothalamischen Traktes*“ (Korf and Stehle, 2005). Die Schale wiederum enthält Neurone, welche zusätzlich zum Neuropeptid GABA, ebenso „Vasopressin enthalten“ und welche „über kurze axonale Verbindungen“ eine Vielzahl von „*hypothalamischen Kerngebieten*“ innervieren (Korf and Stehle, 2005). Weiterführend zeigen sie eine Expression von Vasopressin ebenfalls auf „*neuroendokrinen Wege in den Liquor Cerebrospinalis*“, welche einen klassischen Tag- und Nachtrhythmus aufzeigt. (Korf and Stehle, 2005)

Dem molekularen Mechanismus der Rhythmogenese liegen sogenannte „Uhrengene“ und ihre weiterführenden Transkriptionsfaktoren zugrunde, welche „interagierenden transkriptional/translationalen Rückkopplungsschleifen“ unterliegen (Korf and Stehle, 2005) (siehe Abb.2):

Zentral entscheidend ist hierbei die „Aktivierung der Transkription der Uhrengene“ *Per1-3*, welche zur *Period*-Familie gehören, sowie *Cry1* und *2*, welche der *Cryptochrom*-Familie angehören (Korf and Stehle, 2005). Dies geschieht durch die Uhrengene *Bmal1* (*brain and muscle ARNT-like protein*), welches rhythmisch exprimiert wird und *Clock* (*circadian locomotor output cycles kaput*), welches

konstant exprimiert wird, indem sie die aktivierenden Transkriptionsfaktoren BMAL1 und CLOCK kodieren, die sich wiederum zu Heterodimeren zusammenfügen und im Zellkern an die E-Box-Elemente (Enhancer-Box) mit der typischen Sequenz CANNTG im Promotorelement von *Per* und *Cry* binden, was die „*Expression von Per und Cry*“ zur Folge hat, und weiterführend auch die Expression von *Rev-Erba* induzieren können (Korf and Stehle, 2005). CLOCK und BMAL1 gelten dabei als Transkriptionsfaktoren, welche eine „*basic-helix-loop-helix*“-Struktur aufweisen (Korf and Stehle, 2005). Dieser Mechanismus unterliegt einer negativen Rückkopplungsschleife, indem PER- und CRY-Dimere (PER1/CRY1-Heterodimer) wiederum nach etwas Zeitverzögerung, die Signalkaskade des Heterodimeres CLOCK/BMAL1 unterdrücken, indem sie, wie angenommen wird, einen „*großen negativen Komplex*“ formen und mit CLOCK interagieren, jedoch sind genaue Mechanismen aktuell nicht genau erforscht (Korf and Stehle, 2005). Der Transkriptionsfaktor REV-ERB α zeigt wiederum eine Einflussnahme auf *Bmal1* über den ROR-Rezeptor (Korf and Stehle, 2005). Der proteasomale Abbau von PER1 wird durch Phosphorylierung durch die Caseinkinase 1 ϵ/δ eingeleitet, weshalb die Konzentration von PER dem Ausmaß der Phosphorylierung unterliegt und somit erst bei erhöhter „*Konzentration von nicht phosphoryliertem PER1*“ wieder eine Dimerbildung mit CRY 1 möglich ist (Korf and Stehle, 2005, Reppert and Weaver, 2002). Durch eine Herabsetzung des PER- und CRY-Spiegels wird in der Folge die negative Rückkopplungsschleife unterbrochen und die Transkription durch CLOCK und BMAL1 kann von Neuem beginnen und einen neuen Transkriptionszyklus am nächsten Morgen starten (Takahashi, 2017).

Diese beschriebenen Rückkopplungsschleifen bilden den zentralen Mechanismus der zirkadianen Rhythmik und werden durch „*Schleifen auf einer zweiten Ebene*“ erweitert, welche von „*Proline and Acidic amino acid-Rich-Proteinen*“ (PAR-Proteine) gebildet werden, wie beispielsweise der „*Hepatic Leucocyte Factor*“ (HLF), der „*Thyrotrophic Embryonic Factor*“ (TEF) und das „*Albumin D-site-binding Protein*“ (DBP) (Korf and Stehle, 2005, Okamura et al., 2002). Weiterführend aktivieren CLOCK und BMAL1 molekular nachfolgend die Transkription von „*Uhren-kontrollierte(n) Gene(n)*“ über E-Box Elemente in deren Promotoren und PER und CRY führen wiederum zu ihrer Inaktivierung (Korf and

Stehle, 2005). „Ein solches Uhren kontrolliertes Gen kodiert die Vorstufe des Vasopressins“ (Korf and Stehle, 2005, Jin et al., 1999).

Um den Tag- und Nacht-Rhythmus mit dem zirkadianen Rhythmus in Einklang zu bringen, sind die Zeitgeber (Lichtreize), welche über die Retina aufgenommen und über Glutamat und PACAP als „*Neurotransmitter des retinohypothalamischen Traktes*“ überbracht werden, entscheidend (Korf and Stehle, 2005). Lichtreize nehmen lediglich in der nächtlichen Zeitphase eine Verschiebung des zirkadianen Rhythmus vor, indem sie mit einer „*Phosphorylierung von CREB (cyclic AMP response element (CRE) binding protein)*“ einherkommen (Korf and Stehle, 2005). Das nun phosphorylierte CREB bildet Homodimere aus, die an jeweils ein CRE binden (Korf and Stehle, 2005). Hierbei ist für die „*Synchronisation des zirkadianen Rhythmus*“ „*die CRE-abhängige Induktion von Per1*“ bedeutend (Korf and Stehle, 2005). Lichtreize/ Glutamat führen während Nachtzeiten zur Phosphorylierung „*von CREB an den Serinresten 133 und 142*“, wodurch erst durch diese doppelte Phosphorylierung die vollständige „*Aktivierungskapazität*“ von CREB erlangt wird (Korf and Stehle, 2005), welche in der Folge über CRE zur Aktivierung bzw. Induktion von *Per1* führt. PACAP im Gegenteil zu Glutamat führt zur „*Phasenverschiebungen und CREB Phosphorylierung an Ser133 am Ende des Tages*“, was wiederum durch Melatonin aufgehoben wird (Korf and Stehle, 2005).

So unterliegt auch die Hormonausschüttung der Zirkadianik: Vor allem die Sekretion von Cortisol und Testosteron, sowie auch des neuroendokrinen Hormons Vasopressin. Wachstumshormone werden vor allem in der ersten Tiefschlafphase sekretiert (Pape et al., 2014). Melatonin wird in diesem Zusammenhang in der *Epiphysis cerebri* gebildet und hat seine Höchstkonzentration in der Schlafphase (Pape et al., 2014), aufgrund eines vom SCN generierten neuronalen Ausgangssignals. Es wird von dort in den dritten Ventrikel abgegeben und anschließend in die Blutzirkulation (Reiter, 1991, Zisapel, 2018). Lichteinfluss führt beim SCN hingegen zu einer Inhibition der Melatoninsynthese (Zisapel, 2018). So wurde eine schlaffördernde Wirkung bei exogener Applikation von Melatonin beschrieben, zum Beispiel im Zusammenhang mit Jetlag. Diese Applikation gilt jedoch nicht als unumstritten (Pape et al., 2014).

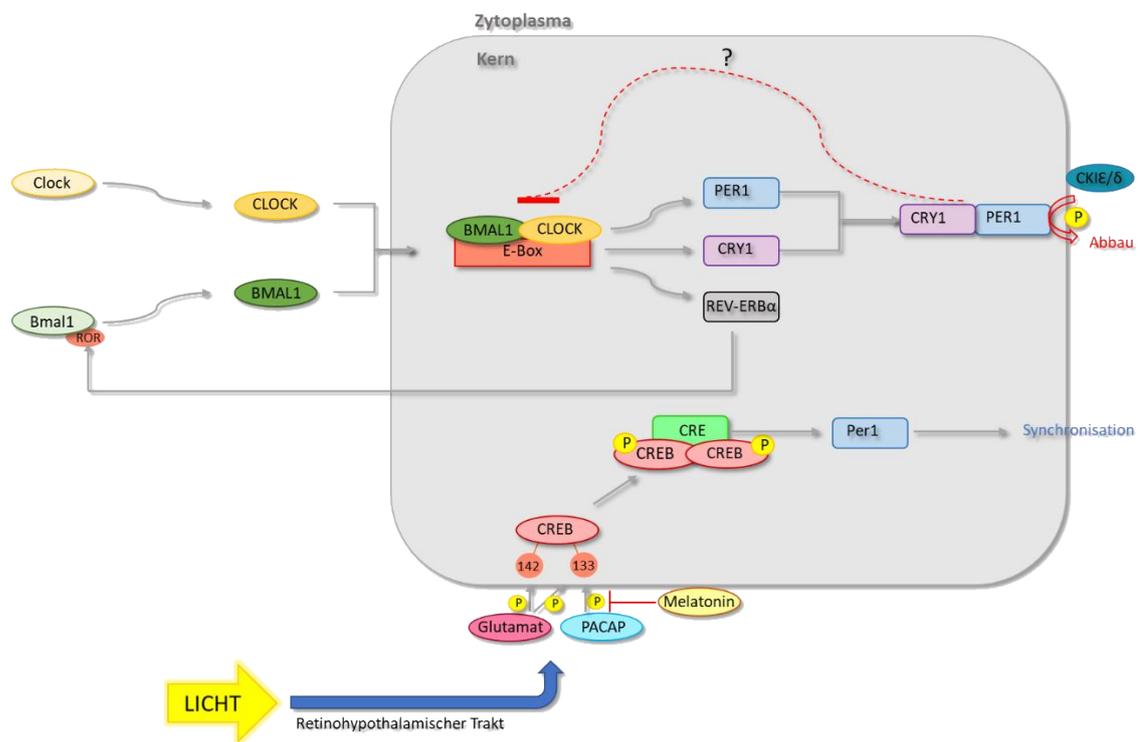


Abb.2: Signalkaskade der molekularen Rhythmik in den *Nuclei Suprachiasmatici*

Die Uhrengene *Bmal1* und *Clock* kodieren die aktivierenden Transkriptionsfaktoren BMAL1 und CLOCK, die sich wiederum zu Heterodimeren zusammenfügen und im Zellkern an die E-Box-Elemente (Enhancer-Box) im Promotorelement von *Per* und *Cry* binden, was die „Expression von *Per* und *Cry*“ zur Folge hat und induzieren ebenfalls die Expression von *Rev-Erbα*. Dieser Mechanismus unterliegt einer negativen Rückkopplungsschleife, indem PER- und CRY-Dimere (PER1/Cry1-Heterodimer) wiederum die Signalkaskade des Heterodimeres CLOCK/BMAL1 unterdrücken, indem sie, wie angenommen wird, mit CLOCK interagieren, jedoch sind genaue Mechanismen aktuell nicht genau erforscht. Der Transkriptionsfaktor REV-ERBα zeigt wiederum eine Einflussnahme auf *Bmal1* über den ROR-Rezeptor. Der proteasomale Abbau von z.B. PER1 wird durch Phosphorylierung durch die Caseinkinasen1ε/δ (CKI1 ε/δ) eingeleitet. Diese Phosphorylierungen sind entscheidend zur Kontrolle der Heterodimerbildungen.

Um den Tag- und Nacht-Rhythmus mit dem zirkadianen Rhythmus in Einklang zu bringen, sind die Lichtreize, welche über die Retina aufgenommen und über Glutamat und PACAP als „Neurotransmitter des retinohypothalamischen Traktes“ überbracht werden, entscheidend. Lichtreize nehmen lediglich in der nächtlichen Zeitphase eine Verschiebung des zirkadianen Rhythmus vor, indem sie mit einer „Phosphorylierung von CREB (cyclic AMP response element (CRE) binding protein)“ einhergehen. Das nun phosphorylierte CREB bildet Homodimere aus, die an jeweils ein CRE binden. Hierbei ist für die „Synchronisation des zirkadianen Rhythmus“ die CRE-abhängige Induktion von *Per1* bedeutend. Lichtreize und so Glutamat führen während

Nachtzeiten zur Phosphorylierung „von CREB an den Serinresten 133 und 142“, wodurch erst durch diese doppelte Phosphorylierung die vollständige „Aktivierungskapazität“ von CREB erlangt wird, welche in der Folge über CRE zur Aktivierung bzw. Induktion von *Per1* führt. PACAP im Gegenteil zu Glutamat führt zur „Phasenverschiebungen und CREB Phosphorylierung an Ser133 am Ende des Tages“, was wiederum durch Melatonin aufgehoben wird. (Korf and Stehle, 2005). Zeichnung modifiziert nach Korf und Stehle (Korf and Stehle, 2005)

1.1.3 Störungen der Zirkadianik durch Bmal1 Deletion

Bmal1 als einer der zentralen Transkriptionsfaktoren des molekularen Uhrenwerkes, führt bei seiner Deletion zu einer Beeinflussung der zirkadianen Rhythmik (Lowrey and Takahashi, 2004, Bunger et al., 2000).

Die Deletion von *Bmal1* in Mäusen führt zu einer Störung und einem Verlust der zirkadianen Funktion und zu Progerie ähnlichen Entwicklungsverläufen, welche zeigen, dass *Bmal1* den Alterungsprozess zu kontrollieren scheint (Kondratov et al., 2006). *Bmal1 knock-out* Mäuse haben eine deutlich reduzierte Lebenserwartung (Kondratov et al., 2006, Bunger et al., 2005) und zeigen diverse Pathologien, welche mit einer verfrühten Alterung einhergehen und spezifisch für Phänotypen einer *Bmal1* Deletion zu sein scheinen. (Kondratov et al., 2006) Zur Geburt sind keine sichtbaren Defekte ersichtlich, jedoch zeigt sich mit zunehmender Entwicklung (16-18 Lebenswoche) ein geringeres Gewicht als Folge einer Wachstumsretardierung (Kondratov et al., 2006). Sie sind lediglich halb so groß, wie Mäuse, ohne *Bmal1* Deletion (Kondratov et al., 2006), was begründet ist in einer reduzierten Muskel- und Fettgewebsmasse (Kondratov et al., 2006). Während die Hauptorgane zu Lebensbeginn (10 wk of age; erste Lebenswochen) noch die gleiche Größe aufweisen, sind die akzessorischen Geschlechtsdrüsen der männlichen Tiere bereits geringer ausgebildet, was zu einer gestörten sexuellen Reifung, gefolgt von männlicher Infertilität führen könnte (Kondratov et al., 2006). *Bmal1 knock-out* Mäuse weisen einen altersabhängigen Muskel- und Knochenverlust auf (Kondratov et al., 2006), welcher als Sarkopenie und Osteoporose ein Kennzeichen des Alterungsprozesses von Säugern darstellt (Weiss et al., 1991, Karakelides and

Nair, 2005). Mit zunehmendem Alter (40. Lebenswoche) nimmt die Masse diverser Hauptorgane, wie die der Lunge, der Hoden, des Herzens, der Nieren und der Milz, ab (Kondratov et al., 2006).

Sie weisen Veränderungen des peripheren Blutes mit einer verringerten Lymphozyten- und erhöhten Monozyten/Neutrophilen Anzahl (Kondratov et al., 2006), sowie ein vermindertes Haarwachstum, auf (Kondratov et al., 2006), was ebenfalls Ausdruck der Alterung von Säugetieren ist (Tyner et al., 2002, Harrison and Archer, 1988) und entwickeln verfrüht Katarakte eines oder beider Augen (Kondratov et al., 2006). Eine *Bmal1* Deletion konnte in Zusammenhang gebracht werden mit Gelenkankylose, aufgrund von Ossifikation der Bänder und Sehnen (Bunger et al., 2005), welche mit einer verminderten Aktivität einhergeht.

Oxidativer Stress wird immer wieder in Zusammenhang mit den degenerativen Prozessen der Alterung gebracht (Balaban et al., 2005, Kondratov et al., 2006, Ali et al., 2019).

Es wurde gezeigt, dass ein Zusammenhang zwischen erhöhten reaktiven Sauerstoffspezies-Spiegeln und oxidativen Produkten in diversen Geweben, und der Alterung besteht (Balaban et al., 2005, Kondratov et al., 2006, Ali et al., 2019). Reaktive Sauerstoffspezies (ROS), sowie Nitrogen Spezies (RNS) sind entscheidende Regulatoren der Genexpression, sowie des Zellmetabolismus und kontrollieren diverse physiologische Prozesse. Erhöhte Konzentrationen freier Radikale, sowie ROS und RNS, führen zu destrukturierenden Effekten sämtlicher biologischer Makromoleküle (Kondratov et al., 2006).

Kondratov *et al.* wiesen nach, dass die Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies in den Geweben von Milz und Nieren von *Bmal1-Knock-out*-Typen mit dem Alter zunahm und so im Zusammenhang mit der Altersdegeneration stand (Kondratov et al., 2006). Sie stellten einen direkten Zusammenhang von BMAL1 zur ROS Homöostase dar und zeigten, dass eine Inhibition von BMAL1 zu einer Hochregulation der ROS-Spiegel führte (Kondratov et al., 2006).

1.2 Stammzellen

1.2.1 Charakterisierung von Stammzellen

Stammzellen sind eine Population zunächst undifferenzierter Zellen, welche bereits im fetalen bis hin zum adulten Organismus jeden Alters zu finden sind. Sie können im Hinblick auf ihre verschiedenen Potentiale und Fähigkeiten in die unterschiedlichsten Gewebe und Zellarten differenzieren, und können dadurch klassifiziert werden (Kolios and Moodley, 2013).

In Bezug auf ihr Differenzierungspotential lassen sich Stammzellen in totipotente/omnipotente, pluripotente, multipotente, oligopotente und unipotente Stammzellen unterteilen (Bozdağ et al., 2018, Kolios and Moodley, 2013).

Totipotente Stammzellen sind die undifferenziertesten Stammzellen, welche in der frühen Entwicklung gefunden werden und fähig sind, in ganze Organismen zu differenzieren. So ist die befruchtete Oozyte (=Zygote), sowie die Zellen der ersten beiden Teilungen, die Blastomeren, in der Lage, in embryonale, sowie extraembryonale Gewebe zu differenzieren und so den Embryo, sowie auch die Plazenta zu bilden (Rossant, 2001, Kolios and Moodley, 2013).

Pluripotente Stammzellen haben das Potential in Zellen der drei embryonalen Keimblätter zu differenzieren (Endoderm, Mesoderm und Ektoderm). Somit sind sie in der Lage bis auf extraembryonales Gewebe, jeden fetalen bis hin zum adulten Zelltypen zu bilden (De Miguel et al., 2010).

Multipotente Stammzellen finden sich in vielen Geweben und differenzieren lediglich in Zellen eines Keimblattes (Ratajczak et al., 2012, Kolios and Moodley, 2013). Besonders die mesenchymalen Stammzellen sind als multipotente Stammzellen bekannt, welche aus vielen Geweben, wie zum Beispiel dem Knochenmark, Knochen, Fettgewebe und peripherem Blut gewonnen werden (Augello et al., 2010, Kolios and Moodley, 2013). Diese differenzieren in Osteoblasten, Adipozyten und Chondrozyten (Dominici et al., 2006) und somit in Zellen des Mesoderms.

Oligopotente Stammzellen sind in der Lage innerhalb eines Gewebes zwei oder mehrere Zelllinien zu bilden und sich selbst zu erneuern (Kolios and Moodley, 2013).

Unipotente Stammzellen differenzieren lediglich in einen Zelltypen und besitzen im Gegensatz zu den final ausdifferenzierten Zellen noch ihre Fähigkeit sich selbst zu erneuern (Kolios and Moodley, 2013).

Es werden ebenfalls embryonale und adulte Stammzellen unterschieden. Adulte Stammzellen stammen aus Gewebe, welche keine omnipotenten Stammzellen mehr besitzen. Als Beispiel können mesenchymale Stammzellen angeführt werden (Kolios and Moodley, 2013). Obwohl sie ein limitiertes Differenzierungsvermögen haben, konnten sie in unterschiedliche Gewebe der drei Keimzellschichten differenziert werden (Moodley et al., 2010, Kolios and Moodley, 2013, Ilancheran et al., 2009).

Induziert pluripotente Stammzellen werden aus adulten somatischen Zellen gebildet, indem diese genetisch reprogrammiert werden, um so einen embryonalen Stammzellstatus zu erreichen (Kolios and Moodley, 2013, Rossant, 2008).

1.2.2 Der mesenchymale Stammzellcharakter

Um eine Vereinheitlichung der Charakterisierung für humane mesenchymale Stammzellen zu schaffen und somit den wissenschaftlichen Austausch zu vereinfachen, legte die ISCT (*International Society for Cellular Therapy*) drei Minimalkriterien fest, welche mesenchymale Stammzellen erfüllen müssen (Dominici et al., 2006):

Als erstes Kriterium müssen Zellen unter Standardkulturbedingungen innerhalb Zellkulturflaschen, Plastikadhärenz aufweisen. Als zweites Kriterium muss mehr als 95% der mesenchymalen Stammzellpopulation die Oberflächenantigene CD105, CD73 und CD90 exprimieren, dürfen jedoch nicht die Oberflächenantigene CD45, CD34, CD14 oder CD11b, CD79a oder CD19 und HLA-DR aufweisen. Hier sollten weniger als zwei Prozent der *Cluster of differentiation* exprimiert sein, da diese Zellen sonst nicht als Stammzellen

charakterisiert werden dürfen. Die Bestimmung erfolgt mittels Durchflusszytometrie.

Als drittes Standardkriterium müssen mesenchymale Stammzellen *in vitro* unter Gewebekultur-differenzierungsstandards in der Lage sein, in Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten zu differenzieren (Dominici et al., 2006).

Dementsprechend sind mesenchymale Stammzellen multipotente Stammzellen. Die osteogene Differenzierung kann mittels Alizarin Rot oder von Kossa Färbung verifiziert werden, die adipogene Differenzierung mit Ölrot und die chondrogene Differenzierung mit Alcian Blau oder mit immunhistochemischer Färbung für Kollagen Typ II (Dominici et al., 2006).

1.2.3 Murine mesenchymale Stammzellen

Während die Plastikadhärenz, sowie die adipogene, chondrogene und osteogene Differenzierung auch als charakteristisch für Zellen anderer Spezies als der Humanen gelten und so auch für murine MSCs, konnte die Oberflächenantigenexpression jedoch noch nicht universal charakterisiert werden (Tropel et al., 2004, Dominici et al., 2006).

Es wurde jedoch nahegelegt, dass CD90 und CD105 gute Marker für die Multipotenz von kultivierten mMSCs sein könnten (Morikawa et al., 2009) und Tropel *et al.* nutzten CD45 und CD11b um hämatopoetische Kontaminationen ihrer Zellkultur von murinen MSCs des Knochenmarkes festzustellen (Tropel et al., 2004).

Es gibt deutlich weniger aktuelle Informationen über murine mesenchymale Stammzellen als bisher über humane mesenchymale Stammzellen, was die Erforschung unter anderem ihrer therapeutischen Bedeutung deutlich erschwert (Morikawa et al., 2009). Dies ist damit begründet, dass es beispielsweise deutlich schwieriger ist, mesenchymale Stammzellen von murinem Knochenmark zu isolieren, im Vergleich zu humanen MSCs oder solchen aus dem Knochenmark von Ratten (Phinney et al., 1999, Sun et al., 2003, Peister et al., 2004, Morikawa et al., 2009).

1.2.4 Dentale Stammzellen

1.2.4.1 Charakterisierung dentaler Stammzellen

Die Entdeckung humaner pulpaler Stammzellen gelang das erste Mal im Jahre 2000 aus den dritten Molaren von 19-29 Jahre alten Probanden (Gronthos et al., 2000, Gronthos et al., 2002).

Dentale Stammzellen wurden bereits aus diversen Zahngeweben isoliert, so zum Beispiel die dentalen pulpalen Stammzellen (DPSCs) (Gronthos et al., 2000), Stammzellen aus humanen exfolierten Milchzähnen (SHEDs) (Miura et al., 2003), Stammzellen aus dem parodontalen Ligament (PDLSCs)(Seo et al., 2004), Vorläuferzellen aus humanen Zahnfollikeln (DFPCs)(Morsczeck et al., 2005), Stammzellen der apikalen Papille (SCAPs) (Sonoyama et al., 2008), sowie Stammzellen aus gingivalem Gewebe (GMSCs)(Zhang et al., 2009) und Alveolarknochen-stämmige mesenchymale Stammzellen (ABMSCs)(Matsubara et al., 2005).

DPSCs, SHEDs, DFPCs, sowie PDLSCs erfüllen alle die Kriterien, welche die ISCT für mesenchymale Stammzellen festlegt (Rodríguez-Lozano et al., 2011). Somit könnten Zähne als Quelle von Stammzellen, welche aufgrund ihrer Multipotenz in der Lage sind in bestimmte Zelltypen zu differenzieren, in der Zelltherapie, sowie der Entwicklung von Techniken in der regenerativen Endodontie und bei degenerativen Erkrankungen von Nutzen sein (Rodríguez-Lozano et al., 2011).

Der Knochenverlust ist in der heutigen Zeit eines der herausforderndsten Probleme der Zahnheilkunde (Wang et al., 2020). Es können unter anderem Krebs, Entzündungen, Trauma, sowie auch kongenitale Malformationen Knochendefekte verursachen (Wang et al., 2020, Fernandes and Yang, 2016) und systemische Faktoren wie Osteoporose (Wang et al., 2020, Chen et al., 2017), Diabetes (Wang et al., 2020, Camargo et al., 2017), sowie auch die Alterung (Wang et al., 2020, Ambrosi et al., 2017, Gibon et al., 2016) diesen verschlimmern und die Knochenheilung stören (Wang et al., 2020). Knochenverlust, welcher wiederum mit Zahnverlust einhergeht, führt zwangsläufig zu einer Einschränkung der Kaufunktion, der Aussprache, der Ästhetik und so auch der mentalen Gesundheit (Wang et al., 2020).

Zunehmend zeigen Forschungen die Fähigkeit von DSCs (vor allem DPSCs) knochenähnliches Gewebe zu bilden und Knochendefekte zu reparieren (Laino et al., 2006, Fu et al., 2014, d'Aquino et al., 2009, Aimetti et al., 2014, Laino et al., 2005), was sie somit zu einer vielversprechenden Ressource für die autologe Zelltherapie macht (Wang et al., 2020, Laino et al., 2006). DPSCs besitzen die Fähigkeit in Adipozyten, Chondrozyten, Osteozyten, sowie auch neuronal ähnliche Zellen zu differenzieren (Nutti et al., 2016).

Harada und Otsu beschrieben bereits ein Protokoll für die Kultivierung dentaler epithelialer Stammzellen und die Produktion von Zelllinien aus murinen Inzisivkeimen und zeigten, dass diese 3-7 Tage postnatal am besten geeignet wären (Harada and Otsu, 2019). Balic beschrieb 2019 Methoden zur Isolation von epithelialen Stammzellen aus murinen Inzisivi (Balic, 2019) und weiterführend die Gewinnung von Populationen, die mit MSCs aus murinen Inzisivi angereichert sind, durch FACS-Sortierung von Antikörper-markierten Zellen (Balic, 2019).

Um dentale Zellen, sowie den Dentin-Pulpa-Komplex zu erforschen, erwies sich das „*tooth-slice-organ-culture*“-Modell, bei welchem der Zahn in mehrere Fragmente aufgetrennt und in Nährmedium inkubiert wird, bereits in diversen Studien als hilfreich. So wurde dies bereits bei Ratten-Inzisivi (Murray et al., 2008, Sloan et al., 1998), Ratten Molaren (Ritchie et al., 2004), Humanen Molaren (Farges et al., 2003, Magloire et al., 1996) und Molaren von 3-Wochen-alten Mäusen (Iida-Yonemochi et al., 2014) umgesetzt und soll auch in dieser Dissertation zur Isolation muriner pulpaler Zellen herangezogen werden.

1.2.4.2 Dentale Progenitorzellen

Morsczeck *et al.* beschrieben die Isolation und Charakterisierung von Vorläuferzellen aus humanen dentalen Follikeln der 3. Molaren (Morsczeck et al., 2005) und Balic *et al.* die enzymatische Isolation und Charakterisierung von Progenitorzellen von eruptierten und nicht eruptierten murinen Inzisivi und Molaren (Balic and Mina, 2010, Balic et al., 2010). Progenitorzellen der Pulpa

entstammen vor allem der osteo-/dentinogenen Abstammungslinie (Balic et al., 2010) und gelten als unipotent, sowie plastikadhärent. Balic *et. al* beschrieben, dass Marker von „*MSC-ähnlichen-Populationen*“ ebenfalls von Progenitorzellen exprimiert werden und somit nicht exklusiv für die Isolation von MSCs gelten können (Balic et al., 2010).

1.2.4.3 Der Zahnaufbau

Der Zahn setzt sich aus den vier Hauptstrukturen Schmelz, Dentin, Pulpa und Zement zusammen (siehe Abb.3).

Der Zahnschmelz als härteste Struktur des menschlichen Körpers wird im Ursprung von „*Ameloblasten gebildet*“, ist er jedoch nach der präeruptiven und „*posteruptiven Schmelzreifung*“ fertiggestellt, ist kein zellulärer Reparaturmechanismus mehr möglich (Hellwig et al., 2013). Der Zahnschmelz besteht hauptsächlich zu 93-98 Gewichtsprozent aus anorganischen Bestandteilen, „*wie Kalzium, Phosphor, Karbonat, Magnesium und Natrium*“, sowie weiteren Spurenelementen (Hellwig et al., 2013). Der zweitgrößte Bestandteil, mit jedoch nur ca. 1,5-4 Gewichtsprozent, ist Wasser und der Letzte, geringste Bestandteil, sind organische Substanzen, wie hauptsächlich Lipide und Proteine, jedoch auch, in deutlich geringerem Umfang, Laktat, Kohlenhydrate und Zitrat (Hellwig et al., 2013).

Phosphor und Kalzium bilden kristalline Apatitverbindungen aus (Hellwig et al., 2013). Sogenannte Apatitkristalle zeigen einen „*annähernd hexagonal(en)*“ Querschnitt (Hellwig et al., 2013). Je „*100 Schmelzkristalle liegen im Querschnitt zusammengefügt und bilden die sog. Schmelzprismen bzw. Schmelzstäbe, die sich von der Schmelz-Dentin-Grenze bis fast zur Schmelzoberfläche erstrecken*“ (Hellwig et al., 2013). Die Kristalle sind von einer Hydratationsschale umgeben. Um die Prismen befindet sich eine zwischenprismatische, ebenfalls schmelzkristalline Substanz, jedoch gibt es auch Prismen freien Schmelz, z.B. bei Milchzähnen und Fissuren. (Hellwig et al., 2013)

Dentin ist im koronalen Bereich von Schmelz und im Wurzelbereich von Zement bedeckt. Den Übergang bezeichnet man als Schmelz-Zement-Grenze (Hellwig et al., 2013).

Dentin besteht hauptsächlich zu 70 Gewichtsprozent aus anorganischen Substanzen, wie vor allem aus Phosphat und Kalzium und geringfügiger aus Spurenelementen (Hellwig et al., 2013). Zu 20 Gewichtsprozent besteht es aus organischen Substanzen, vor allem Kollagen, sowie „*kollagenartigen Verbindungen*“ und auch aus Wasser (Hellwig et al., 2013).

Der anorganische Anteil liegt „*in kristalliner Form als Apatit bzw. amorphes Kalziumphosphat vor*“ (Hellwig et al., 2013). Hier zeigt sich keine Prismenstruktur und Dentin im Allgemeinen besitzt nicht die gleiche Härte wie Schmelz (Hellwig et al., 2013).

Odontoblasten, welche ihren Körper in der Zahnpulpa besitzen und ihre Zellfortsätze im Dentin, bilden dieses und liegen in Dentinkanälchen. Im Gegensatz zum Schmelz versorgen sie es „*nach Abschluss der Zahnbildung*“ weiter (Hellwig et al., 2013).

Im Dentin selbst gibt es einzelne Dentinschichten: So liegt direkt an der Pulpagrenze das noch hypomineralisierte, unvollständig gereifte Prädentin, welches in einzelnen Tubuli, Nervenfasern aufweist (Hellwig et al., 2013). Ihm folgt das Zwischendentin, das zirkumpulpale Dentin und das Manteldentin (Hellwig et al., 2013). Sogenanntes peritubuläres Dentin umgibt die Dentinkanälchen und intertubuläres Dentin trennt dieselbigen (Hellwig et al., 2013).

Das Primärdentin wird bis zum Ende des Wurzelwachstums gebildet. Ab diesem Zeitpunkt nennt sich das physiologisch gebildete Dentin, Sekundärdentin (Hellwig et al., 2013). Wird Dentin jedoch „*aufgrund eines Reizes (z.B. Attrition, Erosion, Karies, iatrogene Schäden) lokal als Abwehrbarriere gebildet*“ (Hellwig et al., 2013), wird dieses als Tertiärdentin bezeichnet. (Hellwig et al., 2013)

Das Zahnzement besteht zu ca. 65 Gewichtsprozent aus anorganischen Bestandteilen, wie vor allem Kalzium und Phosphat, welche „*Apatitkristalle oder amorphe Kalziumphosphate*“ bilden, zu 23 Gewichtsprozent aus organischen Komponenten, wie vor allem Kollagen und zu 12 Gewichtsprozent aus Wasser (Hellwig et al., 2013).

Zement umgibt die Wurzel, sowie auch in Teilen die apikalen Wurzelkanalwände (Hellwig et al., 2013). Es wird ein Leben lang gebildet. Zement, welches in den Schmelz ausstrahlt, wird als azellulär-afibrilläres Zement bezeichnet (Hellwig et al., 2013).

Die Schmelzzementgrenze kann überlappend, direkt angrenzend, oder auch so konfiguriert sein, dass ein kleiner Bereich des Dentins frei liegt. Das Zement *„gehört zum Zahnhalteapparat, da an ihm die Parodontalfasern haften, die die Zähne in der Alveole beweglich befestigen“* (Hellwig et al., 2013). Eine stark mineralisierte Zementschicht bedeckt das Dentin und ist gefolgt von unterschiedlich stark mineralisierten, lamellenförmigen Zonen, welche die Phasen verschiedener Zementauflagerungen und Ruhephasen widerspiegeln (Hellwig et al., 2013). Sogenanntes azelluläres, fibrilläres Zement findet sich im koronalen Drittel der Zähne. Wie der Name zu erkennen gibt, enthält es diverse kollagene Fibrillen, welche *„Ausdruck der inserierenden parodontalen Fasern (Sharpey Fasern)“* sind (Hellwig et al., 2013). Der azellulären Zementschicht, liegt das Zementoid als unstrukturierte Zone auf, welches Zementoblasten enthalten kann. Sogenanntes zelluläres, fibrilläres Zement findet sich im apikalen Bereich der Zahnwurzel, wo sich stark mit weniger stark mineralisierte Zonen abwechseln (Hellwig et al., 2013). *„Peripher findet man wieder ein Zementoid mit Zementoblasten“* (Hellwig et al., 2013).

Die Pulpa mit ihrer sensorischen, formativen, nutritiven und defensiven Funktion *„besteht aus gut vaskularisiertem und innerviertem Bindegewebe“* (Hellwig et al., 2013). Die Pulpa teilt sich in die Kronenpulpa mit entsprechenden okklusalen und inzisalen Ausläufern, welche als Pulpahörner postuliert werden und in die Wurzelpulpa (Hellwig et al., 2013). Die Dentinschicht, welche die Pulpa koronal bedeckt, wird als Pulpdach beschrieben (Hellwig et al., 2013). Die Pulpa ist nicht vom Parodontium abgeschirmt, sondern steht über das *„Foramen apicale, die Seitenkanäle, akzessorische Kanäle und Pulpaperiodontalkanäle“* mit diesem in Verbindung (Hellwig et al., 2013).

Die Grundmatrix der Pulpa besteht hauptsächlich aus Glykosamino- und Proteoglykanen (Hellwig et al., 2013). Ein Netzwerk aus Kollagenfasern zieht sich durch die gesamte Pulpa, elastische Fasern sind jedoch nur in größeren Blutgefäßwänden vorzufinden (Hellwig et al., 2013).

In ihr befinden sich dentinbildende Odontoblasten, die mit Odontoblastenfortsätzen in die Dentinkanälchen hineinragen, Fibroblasten, welche die Grundsubstanz und auch Kollagenfasern bilden, sowie undifferenzierte Mesenchymzellen, welche als multipotent gelten und zu deren Gruppe auch die pulpalen Stammzellen gehören (*dental pulp cells*), welche sich zu Zellen entwickeln können, „die auf Markerproteine reagieren, die auch in Endothelzellen, Myozyten, Osteozyten, Chondrozyten, neuronalen Zellen und epithelialen Stammzellen gefunden werden“ (Hellwig et al., 2013). Als Abwehrzellen liegen T- und B-Lymphozyten, Makrophagen, eosinophile und basophile Granulozyten, sowie dendritische Zellen vor (Hellwig et al., 2013).

Die Pulpa teilt sich vor allem koronal in einzelne Gewebezonen auf:

Ein gallertiger Bindegewebestrang, welcher zentrale Blutgefäße, sowie auch Nervenfasern enthält, wird von der bipolaren Zone umgeben, welche neben undifferenzierten Zellen und Fibroblasten auch starke Verzweigungen des zentralen Nervenbündels enthält, den sogenannten „*Raschkow-Plexus*“ (Hellwig et al., 2013). Hierauf folgt die kernarme Weil-Zone, welche „*zytoplasmatische Fortsätze der Fibroblasten*“, sowie „*Endäste der Nervenfasern*“ besitzt, gefolgt von der Odontoblastenschicht, welcher sich das Prädentin anschließt (Hellwig et al., 2013).

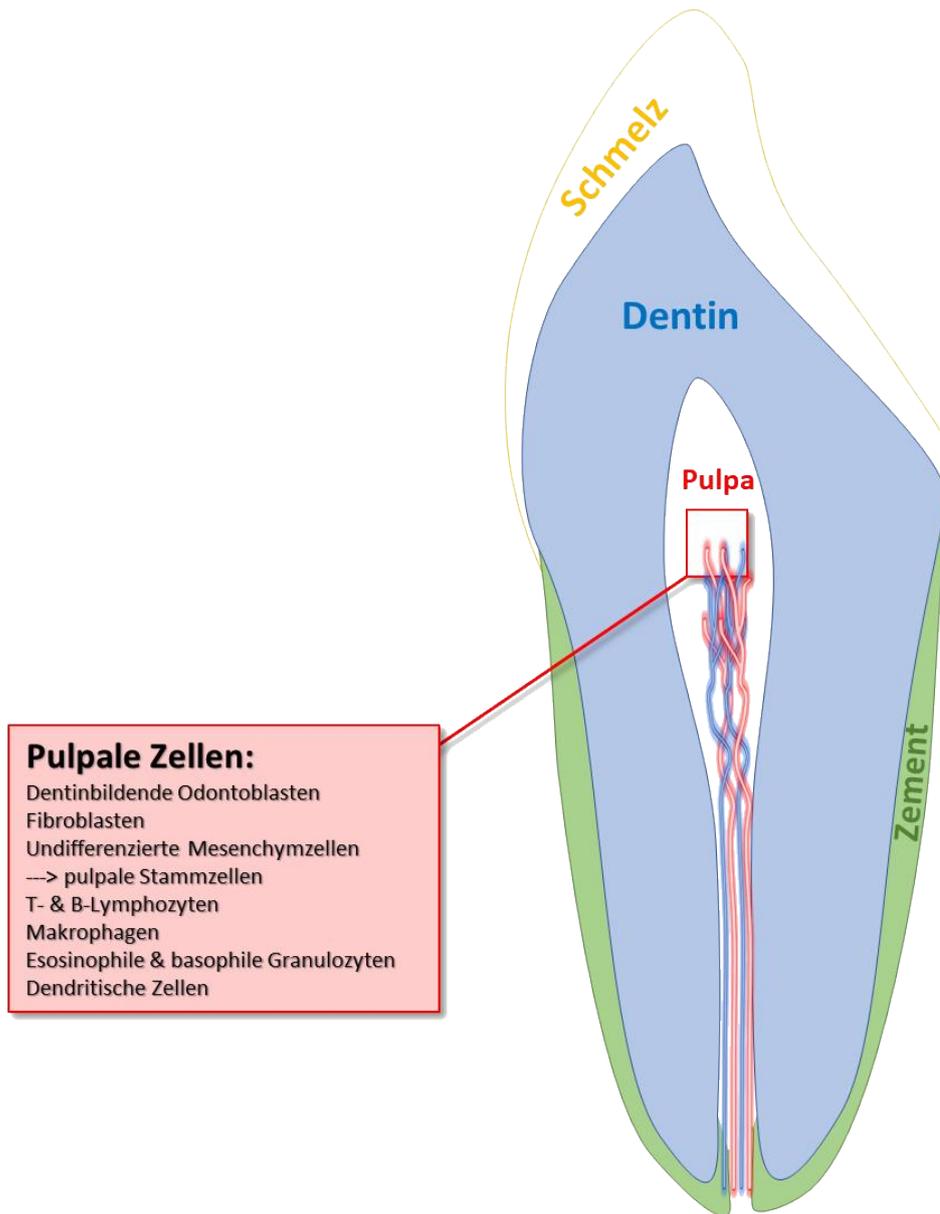


Abb.3: Der Zahnaufbau

Schematische Darstellung des Zahnaufbaus mit seinen vier Hauptstrukturen: Schmelz, Dentin, Zement und der Pulpa mit weiterführender Auflistung der einzelnen Zelltypen innerhalb dieser.

So wie die oben beschriebenen humanen Zähne, bestehen auch die Zähne von Nagetieren und somit auch murine Zähne aus den gleichen Substanzen, wie Schmelz, Dentin, Zement und der Pulpa (Böhmer, 2015). Inzisiven von Nagetieren sind bekannt als kontinuierlich wachsende Zähne, die sowohl durch die Zellproliferation am apikalen Ende, als auch die inzisale Attrition aufrecht

erhalten werden (Harada and Otsu, 2019). Kontinuierliches Wachstum wird durch epitheliale und mesenchymale Stammzellen ermöglicht, welche Schmelz und Dentin immer wieder aufbauen (Balic, 2019). So unterscheidet sich der murine Inzisivus von murinen Molaren, als auch von humanen Zähnen, durch seine Eigenschaft, ein Leben lang kontinuierlich durchzubrechen (Harada et al., 1999).

1.3 Die Osteogenese

1.3.1 Die desmale und chondrale Osteogenese

Die Osteogenese beginnt zunächst mit einer Mesenchymverdichtung (Lüllmann-Rauch and Paulsen, 2012).

Sie findet entweder über die desmale oder die chondrale Osteogenese, welche sich wiederum in die peri- und enchondrale Ossifikation gliedert, statt.

Bei der desmalen Osteogenese kommt es zu einer direkten Umwandlung von Mesenchym in Geflechtknochen, durch die direkte Differenzierung von Mesenchymzellen in Osteoblasten (Aumüller et al., 2010, Lüllmann-Rauch and Paulsen, 2012): „*Während der Embryonalzeit verdichten sich in Knochenanlagen Mesenchymzellen inselartig zu Vorläuferzellen*“ (Aumüller et al., 2010). Sie differenzieren zu Osteoblasten, welche in der Lage sind, Osteoid zu synthetisieren. Dieses bildet die organische Extrazellulärmatrix. Dabei werden wiederum nachkommende Osteoblasten eingemauert und zu sogenannten Osteozyten. Die so entstehenden Osteoidspangen mineralisieren schließlich zum Knochengerüst (Aumüller et al., 2010). Auf diesem finden sich Osteoblasten und Osteoklasten in sogenannten *Howship*-Lakunen, welche durch Osteoklasten gebildet werden und den ständigen Knochenumbau widerspiegeln. Blutgefäße und Stammzellen wachsen in Bindegewebsräume ein. Ein appositionelles Wachstum findet schließlich durch Osteoblasten statt, welche an bereits gebildeten Knochen neues Knochengewebe anlagern. (Aumüller et al., 2010)

Die desmale Osteogenese wird in einigen Knochen der Schädelkalotte, sowie auch Teilen der Mandibula und Klavikula beobachtet (Aumüller et al., 2010).

Bei der chondralen Osteogenese differenzieren die Mesenchymzellen zu Chondroblasten, welche wiederum aus hyalinem Knorpel das Primordialskelett bilden. Dieses wird wiederum sukzessiv zu Knochen verändert (Lüllmann-Rauch and Paulsen, 2012). Die chondrale Osteogenese findet in Röhrenknochen in der Diaphyse zweiphasig und in der Epiphyse einphasig statt. Hierbei gliedert sich die zweiphasige chondrale Osteogenese der Diaphyse in die perichondrale und enchondrale Ossifikation:

Die perichondrale Osteogenese „geht von der Wand der Knochenanlage (*Knorpelmodell*) aus“ (Aumüller et al., 2010). Es wird aus Perichondrium Periost: So wird ein primärer Knochenkern über perichondrale Ossifikation als perichondrale Knochenmanschette gebildet. Durch diese Knochenmanschette kommt es zu einer Verschlechterung der Stoffwechselverhältnisse des Knorpelinneren. Die Folge ist eine Ausbildung von Blasenknorpel durch Hypertrophie und blasiger Degeneration der Knorpelzellen, sowie die Einlagerung von Kalksalzen in die extrazelluläre Matrix. (Aumüller et al., 2010)

Durch die Hypoxie kommt es zur enchondralen Ossifikation, bei welcher ein interstitielles Wachstum vorliegt, bei welchem sich Osteoblasten mit einer Grundsubstanz des Knochen umgeben (Aumüller et al., 2010). Es entsteht eine Vaskularisierung von Knorpelgewebe über das spätere *Foramen nutricium*. Hierbei kommt es zur Differenzierung von ins Knorpelgewebe eingewanderten Vorläuferzellen zu Chondroblasten und weiteren spezifischen Zellen. Chondroblasten bauen die Extrazellulärmatrix ab und eröffnen die Knorpelhöhlen. Osteoblasten wiederum bauen nun Knochen an. Dieser Knochenanbau schreitet proximal- und distalwärts fort. (Aumüller et al., 2010) So entsteht die primäre Markhöhle mit Blutgefäßen und Mesenchymzellen, welche ab dem 5. Fetalmonat mit dem Eintritt der Blutbildung als sekundäre Markhöhle bezeichnet wird. (Aumüller et al., 2010)

In der Epiphyse findet hingegen eine reine enchondrale Ossifikation statt, welche erst kurz vor oder sogar erst Jahre nach der Geburt erfolgt (Lüllmann-Rauch and Paulsen, 2012). Hier wird eine zentrifugal fortschreitende Ossifikation, welche

von sekundären Knochenkernen ausgeht, beobachtet. Diese entstehen in der fetal vaskularisierten Epiphysenanlage (Aumüller et al., 2010).

1.3.2 Die Osteogenese in Bezug auf den BMP-Smad-Signalweg (molekular)

Der Knochen und so die skelettale Architektur unterliegen ständigen Auf- und Abbauprozessen, bei welchen Osteoblasten maßgeblich für die Bildung und den Erhalt verantwortlich sind, indem sie Proteine der extrazellulären Matrix, sowie Regulatoren der Matrixmineralisierung während der initialen Knochenbildung, sowie auch beim Knochenremodelling, produzieren. (Neve et al., 2011)

So regulieren die Osteoblasten ebenfalls die Osteoclasten-Differenzierung und Resorptionsaktivität durch die Sekretion von Zytokinen oder durch direkten Zellkontakt (Neve et al., 2011).

In diesem Zusammenhang stimulieren *Bone morphogenetic proteins* (BMPs) die Differenzierung von Osteoprogenitorzellen in reife Osteoblasten und induzieren nicht-osteogene Zellen zur Differenzierung in Zellen mit osteoblastärer Abstammung (siehe Abb.4) (Wu and Lu, 2008, Wang et al., 1993, Nakamura et al., 2005, Gersbach et al., 2007, Yamaguchi et al., 1991).

BMP-2-Dimere binden an BMP-Rezeptoren mit der Folge, dass zwei Paare BMPR-I und BMPR-II einen heterotetramer-aktivierten Rezeptorkomplex bilden, welcher die intrinsische Serin-/Threoninkinase aktiviert (siehe Abb.4) (Moustakas and Heldin, 2002, Nohe et al., 2002, Liu et al., 1995, Rosenzweig et al., 1995, Katagiri and Takahashi, 2002, Wu and Lu, 2008, Wrana, 2002). So phosphorylieren durch BMP-2 aktivierte heterotetramere BMP-Rezeptoren (der phosphorylierte BMPRI Rezeptor) über die intrinsische Serin-/Threoninkinase sogenannte R-Smads, wie Smad1 und 5, welche wiederum mit Co-Smad (*common-mediator Smad*), wie Smad4 einen Komplex ausbilden und in den *Nucleus* eintreten, um dort mit diversen Transkriptionsfaktoren, wie Dlx5 (*Distal-less homeobox 5*) und Msx2 (*msh homeobox homolog 2*) zu interagieren (Kretzschmar and Massagué, 1998, Sykaras and Opperman, 2003, Nohe et al., 2002, Massagué and Chen, 2000, Massagué, 1998, Shimasaki et al., 2004,

Nishimura et al., 1998, Bruderer et al., 2014, Wu and Lu, 2008). Dlx5 als erstes Ziel der BMP-2 aktivierten R-Smads, reguliert die Expression der Transkriptionsfaktoren Runx2/Cbfa1 und Osterix (Nakashima et al., 2002) und ist hierzu auch unabhängig in der Lage (Wu and Lu, 2008). Diese wiederum stellen die frühesten Hauptmoleküle dar, welche die Osteoblasten-Differenzierung regulieren und wiederum Osteoblasten-Zielgene, wie Kollagen Typ I und Fibronectin in frühen Stadien und alkalische Phosphatase (ALP)(Kim et al., 2004) und Osteocalcin (Newberry et al., 1998, Hassan et al., 2004, Yamaguchi et al., 1991, Ducy and Karsenty, 1995) in späteren Stadien der Differenzierung stimulieren (Bruderer et al., 2014, Wu and Lu, 2008, Ducy et al., 1997). Die Dlx5 Expression stimuliert die Osteoblasten Differenzierung in späteren Stadien, während Msx2 die Zelldifferenzierung & -proliferation stimuliert und die terminale osteogene Differenzierung inhibiert (Wu and Lu, 2008). Dlx5 und Msx2 antagonisieren sich gegenseitig (Wu and Lu, 2008, Kim et al., 2004) und Msx2 inaktiviert Runx2/Cbfa1 über die Bildung eines Komplexes (Wu and Lu, 2008, Shirakabe et al., 2001).

Sogenannte Anti-Smads (Smad6 und 7) blockieren die intrazelluläre Signalkaskade und beeinflussen die BMP-2 Signaltransduktion negativ, um sicherzustellen, dass die BMP-2 Expression ihre normale Funktion beibehält (Shimasaki et al., 2004, Katagiri and Takahashi, 2002, Wu and Lu, 2008). So führt auch der *Smad ubiquitination regulatory factor-1* (Smurf-1) zur Ubiquitinierung und dem proteasomalen Abbau von Smad1 und 5 (Wu and Lu, 2008, Zhu et al., 1999).

Runx2 ist entscheidend für die intramembranöse und enchondrale Ossifikation und ist als wichtiger Transkriptionsfaktor und Hauptregulator essenziell für die Osteoblastendifferenzierung, sowie die Expression Osteoblasten spezifischer Gene und somit der Knochenbildung (Wu and Lu, 2008, Yamaguchi et al., 2000, Bruderer et al., 2014, Franceschi et al., 2007, Komori et al., 1997, Otto et al., 1997).

So ist es in der Lage, die Genexpression diverser Osteoblastentypen zu regulieren und ist entscheidend für die skelettale Entwicklung (Wu and Lu, 2008). In der postnatalen Entwicklung reguliert Runx2, neben der Reifung der Osteoblasten, auch die Knochenresorptionsfähigkeit von Osteoklasten (Wu and Lu, 2008). Dies möglicherweise über zwei potenzielle Bindungsstellen in der

Promotorregion des *RANKL*gens und über die Regulierung von dessen Expression im Zusammenhang mit der Osteoklastengnese (Kitazawa et al., 1999, Geoffroy et al., 2002, Bruderer et al., 2014).

Runx2 inhibiert wiederum die Osteoklastenbildung, indem es Osteoprotegerin positiv reguliert, welches die Osteoklastendifferenzierung über eine Bindung und Inhibition von *RANKL* inhibiert (Thirunavukkarasu et al., 2000, Blair et al., 2017, Neve et al., 2011, Bruderer et al., 2014, Khosla, 2001).

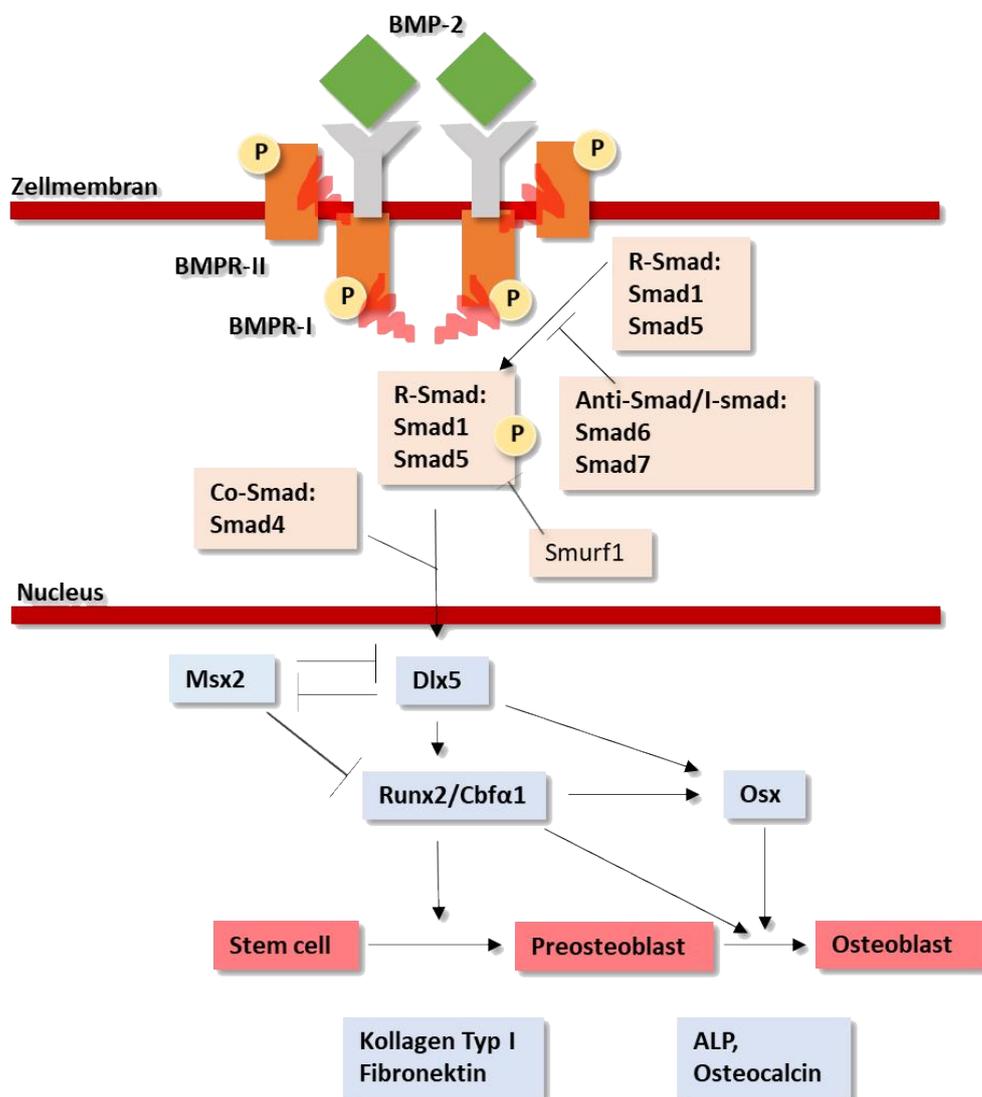


Abb.4: Der BMP2/Smad Signalweg

Schematische Darstellung der BMP2 induzierten Osteoblastendifferenzierung über den BMP-2/Smad-Signalweg. Modifiziert nach Wu and Lu (Wu and Lu, 2008).

BMP: *Bone morphogenetic protein*, SMAD: *Suppressor of Mothers against Decapentaplegic*, Smurf1: *Smad ubiquitination regulatory factor-1*, MSX2: *Msh Homeobox homolog 2*, Dlx5: *Distal-Less Homeobox 5*, RunX2: *Runt-related transcriptionfactor 2*, Cbfa1: *Core-binding factor alpha 1*, Osx: *Osterix*, ALP: *Alkalische Phosphatase*, P: *Phosphorylierung*

1.3.3 Die Osteogenese *in vitro*

Eine *in vitro* induzierte Osteogenese beschreibt gewöhnlich die desmale Ossifikation, da zumeist auf direktem Wege die mesenchymalen Stammzellen osteogen differenzieren.

Die osteogene Differenzierung humaner mesenchymaler Stammzellen wird mit einem Differenzierungsmedium induziert, welches beta-Glycerophosphat, L-Ascorbinsäure und das Glucocorticoid Dexamethason enthält (Pittenger et al., 1999, Song et al., 2009, Langenbach and Handschel, 2013).

Tenenbaum und Heersch postulierten bereits 1985 eine Dexamethasonkonzentration von 100 nM als optimal für die Osteogenese von Periostzellen des Huhns (Tenenbaum and Heersche, 1985, Langenbach and Handschel, 2013).

Die Wirkungsweise von Dexamethason beruht auf der Induktion der *Runx2* Expression durch die Aktivierung des FHL2/WNT/beta-Catenin-Signalweges und einer Hochregulierung von Kollagen Typ I (Hamidouche et al., 2008, Langenbach and Handschel, 2013, Gaur et al., 2005). Hong et al. 2009 zeigten, dass Dexamethason die *Runx2* Funktion über die Aktivierung von TAZ (*transcriptional co-activator with PDZ-binding motif*) reguliert und die Expression von BMP-2 hochreguliert (Hong et al., 2009, Langenbach and Handschel, 2013). Ebenso zeigen Forschungen, dass Dexamethason zu einer Hochregulierung von MKP-1 (*mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase-1*) führt, welche zur Dephosphorylierung von Serin 125 von *Runx2* und so einer gesteigerten Transaktivierung desselbigen führt (Phillips et al., 2006). Ebenfalls induziert es die Expression von Osteocalcin als eines der osteogenen Markerproteine (Phillips et al., 2006).

Ascorbinsäure spielt vor allem im Hinblick auf die Sekretion von Kollagen Typ I in die extrazelluläre Matrix eine entscheidende Rolle in der osteogenen Differenzierung (Langenbach and Handschel, 2013). Ascorbinsäure ist ein Kofaktor von Enzymen, die Prolin und Lysin in Pro-Kollagen hydroxylieren (Vater et al., 2011). Ohne Ascorbinsäure kann Prolin nicht hydroxyliert werden und Kollagenketten können keine helikale Struktur ausbilden (Franceschi and Iyer, 1992, Langenbach and Handschel, 2013). Xiao *et al.* postulierten ein Modell zur Erklärung der Rolle der EZM in der Induktion und Erhaltung der Osteoblastendifferenzierung, in welchem Kollagen eine entscheidende Rolle aufgrund der Tatsache spielt, dass Osteoblasten mit einer kollagenhaltigen Extrazellulärmatrix in Kontakt treten müssen, um osteogen differenzieren zu können. Die Bindung an die extrazelluläre Matrix entsteht zwischen Kollagen Typ I und $\alpha 2\beta 1$ -Integrinen, als Hauptrezeptoren der Osteoblasten für Kollagen Typ I (Xiao et al., 1998, Xiao et al., 2002). Die Integrinligandenbindung wiederum aktiviert den MAPK-Signalweg, was zur Phosphorylierung und Aktivierung von Runx2 führt. Dies wiederum führt zur Stimulation der osteogenen Differenzierung durch eine gesteigerte Transkription von osteoblastären Markergenen, wie Osteocalcin. (Xiao et al., 2002, Langenbach and Handschel, 2013, Franceschi et al., 1994, Xiao et al., 1998).

Beta-Glycerophosphat dient als Ressource für Phosphat-Ionen (Tenenbaum and Heersche, 1982). Phosphat wird benötigt zur Synthese von Hydroxylapatit, jedoch stellt anorganisches Phosphat auch ein Signalmolekül dar, welches die Expression diverser osteogener Gene reguliert, wie zum Beispiel *Osteopontin* (Foster et al., 2006, Fathrazi et al., 2009) und *BMP2* (Tada et al., 2011). (Langenbach and Handschel, 2013)

1.3.4 Einflüsse der Zirkadianik und *Bmal1* auf die Osteogenese

Es wurde bisher dokumentiert, dass *Bmal1 knock-out* Mäuse *in vivo* einen reduzierten Knochenmassephänotypen und eine reduzierte Anzahl von aktiven Osteoblasten und reifen Osteozyten aufweisen, sowie eine herabgesetzte Osteoblastendifferenzierung *in vitro* zeigen (Samsa et al., 2016, Tsang et al., 2019).

Tsang *et al.* wiederum stellten eine kritische Funktion der zirkadianen molekularen Uhrengene in Bezug auf mesenchymale Stammzellen heraus und zeigten, dass die konditionale Deletion von *Bmal1* in mesenchymalen Stammzellen, nicht jedoch in Osteoklasten, den geringen Knochenmassephänotypen widerspiegelte (Tsang et al., 2019).

Es wurde bisher nachgewiesen, dass *Cry2^(-/-)*-und *Per2^(Brdm1)*-Mäuse ein signifikant erhöhtes Knochenvolumen in der 12. Lebenswochen besitzen (Maronde et al., 2010). *Per2^(Brdm1)*-Mäuse zeigten hierbei Änderungen bei Parametern, welche spezifisch für Osteoblasten sind. *Cry2^(-/-)*-Mäuse wiesen hingegen Änderungen in Bezug auf Parameter auf, welche spezifisch für Osteoklasten sind (Maronde et al., 2010).

In diesem Zusammenhang stellten Tang *et al.* eine Inhibition von CRY2 durch STAT3/miRNA-7-5p zur Förderung der osteogenen Differenzierung durch den CLOCK/BMAL1/P300 Signalweg heraus (Tang et al., 2020).

Es ist bekannt, dass eine Inhibition von BMAL1 zu einer Hochregulierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) führt (Kondratov et al., 2006, Ali et al., 2019). Byon *et al.* wiesen in diesem Zusammenhang nach, dass oxidativer Stress unter Bildung von Wasserstoffperoxid zur osteogenen Differenzierung und Kalzifizierung der glatten Gefäßmuskelzellen führt, mit der Folge von atherosklerotischen Läsionen (Byon et al., 2008). Die Expression der Knochenmarker ALP, Col IA1 und OC war hierbei unter H₂O₂ stark erhöht und die Expression von Markern der glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC-Marker), während der Kalzifizierung der VSMC erniedrigt. H₂O₂ steigerte ebenfalls die Expression von Runx2 (Byon et al., 2008). Bunker *et al.* fanden bei *Bmal1* defizienten Mäusen keine Unterschiede im Serumphosphat, -calcium,- und kreatinin- Spiegel, jedoch eine Zunahme des Osteocalcinspiegels und geringeres Calcitonin im Zusammenhang mit

Arthropathien (Bunger et al., 2005). Diese biochemischen Marker der Knochenzellaktivität stehen im Einklang mit aktiver neuer Knochenbildung (Bunger et al., 2005).

1.3.5 Die Osteogenese in der Zahnheilkunde

Für die Zahnmedizin mit ihrer Lehre von dem Zahn mit seinen spezifischen Geweben und Strukturen (siehe Kapitel 1.2.4.3) als solchen, seinem Zahnhalteapparat und somit auch seiner Verankerung in der Mandibula und Maxilla, spielt die Osteogenese eine immer entscheidendere Rolle, wenn es um den Erhalt des Zahnes, jedoch auch um prothetische Versorgungen und der Knochenregeneration nach dessen Verlust geht. So ist der Knochenverlust eines der herausforderndsten Probleme der Zahnmedizin (Wang et al., 2020).

Nach einer Zahnextraktion führt die Heilung der Extraktionsalveole zumeist zu einem Höhen- und Weitenverlust des Alveolarknochens, was wiederum die dentale Ästhetik und Stabilität von Implantaten beeinflusst (Yang et al., 2020, Araújo et al., 2015, Serino et al., 2003, Mecall and Rosenfeld, 1991, Van der Weijden et al., 2009).

Die Heilung der Alveole wird vermutlich durch die Funktion von BM-MSCs reguliert und positiv beeinflusst. (De Kok et al., 2005, Mu et al., 2018, Yang et al., 2020). Yang *et. al* beschreiben in diesem Zusammenhang eine gesteigerte Proliferation und osteogene Differenzierung der BM-MSCs von $p53^{(-/-)}$ -Mäusen (Yang et al., 2020).

So können mesenchymale Stammzellen aus dentalen Geweben dazu genutzt werden, neuen Knochen für die Regeneration orofazialer Knochenstrukturen zu bilden oder um diese zu unterstützen (Liu et al., 2015, Honda et al., 2010, Nuti et al., 2016). Wang *et al.* zeigten, dass GMSCs in der Lage sind Knochendefekte der Mandibula in Ratten zu regenerieren (Wang et al., 2011) und d'Aquino *et al.* erreichten als Erste eine humane autologe Knochenregeneration in der Mandibula mit der Hilfe dentaler pulpaler Stammzellen (d'Aquino et al., 2009).

Die osteogene Differenzierungsfähigkeit von dentalen Stammzellen (vor allem DPSCs) ist entscheidend für ihren Einsatz in der Knochenregeneration und

wurde von diversen Studien belegt (Wang et al., 2020, Papaccio et al., 2006, Yasui et al., 2017).

Somit werden dentale Stammzellen mit ihrer ausgeprägten osteogenen Aktivität immer interessanter für die regenerative Medizin und die Erzeugung von 3D-Knochengewebestrukturen (Nutti et al., 2016, Kim et al., 2012, Laino et al., 2005, Papaccio et al., 2006, Rodríguez-Lozano et al., 2011), was der Osteogenese einen großen Stellenwert in der Zahnmedizin zuschreibt.

1.4 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Promotion ist, die Charakterisierung und Kultivierung muriner pulpaler Zellen aus den Ober- und Unterkieferinzisivi adulter Mäuse der Linie C57Bl/6J nach den Kriterien der ISCT.

Ferner beschäftigt sich diese Arbeit als zweitem Schwerpunkt mit der Differenzierung muriner pulpaler Zellen unter dem Aspekt der Deletion von *Bmal1*.

Es wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. Welche Zelltypen lassen sich aus murinen Pulpen mittels Fragmentierung kultivieren?
2. Welches Potential weisen diese kultivierten Zellen auf?
3. In welche Bindegewebsarten lassen sich diese Zellen differenzieren?
4. Inwiefern beeinflusst die Deletion von *Bmal1* die Differenzierungsfähigkeit muriner pulpaler Zellen?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden folgende molekularbiologischen Methoden angewendet: Präparation und Kultivierung, FACS-Analysen, induzierte Differenzierungen und Rücklösungen, sowie WesternBlot-Analysen.

2 Material und Methoden

Die in diesen Versuchsreihen verwendeten Geräte, Verbrauchsmaterialien, Substanzen, Programme und Antikörper finden sich im Folgenden in tabellarischer Darstellung aufgelistet. Die Zusammensetzung von Medien, Lösungen und Puffern ist entsprechend tabellarisch beschrieben und die verwendeten Zelllinien werden mit der entsprechenden Organentnahmenummer der zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität angegeben, woraufhin die Versuchsabläufe in detaillierter Form dargelegt sind.

2.1 Geräte, Verbrauchsmaterialien, Substanzen, Programme, Antikörper, Zellen

2.1.1 Geräte

Tabelle 1: Aufstellung der verwendeten Geräte

Absauganlage	BVC21 Vacuubrand, Wertheim, Deutschland
Abzug	Waldner, Wangen, Deutschland
Brutschrank	Galaxy [®] 1705 New Brunswick [™] Eppendorf <i>company</i> , Hamburg, Deutschland
Flüssigstickstofftank	Linde <i>Cryosystem</i> 1500 MVE <i>Cryogenics</i> Pfungen, Schweiz/ Pullach, Deutschland
Kryoeinfriergerät	Thermo Fisher <i>Scientific</i> [™] , <i>Mr. Frosty</i> [™] , Waltham, USA
Vortexer	NeoVortex [®] Neolab [®] D-6012, Heidelberg, Deutschland
Mikrozentrifuge	Neolab [®] I-1810, Heidelberg, Deutschland
Präzisionswaage	Sartorius M-power, Göttingen, Deutschland
Sicherheitsschrank	Düperthal [®] Typ G90, Karlstein, Deutschland
Mikroliterpipette 0,5-10 µl	Eppendorf <i>Research</i> [®] plus 152250A Ergo One [®] Starlab, Hamburg, Deutschland

Mikroliterpipette 10-100 µl	Eppendorf <i>Research</i> [®] plus 152355A Ergo One [®] Starlab, Hamburg, Deutschland
Mikroliterpipette 100-1000 µl	Eppendorf <i>Research</i> [®] plus 140681A Ergo One [®] Starlab, Hamburg, Deutschland
Mikroskop	Axiovert 40C7L Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Computer	Apple MacBook Air Design: Kalifornien, USA Produktion: China
Spektrophotometer	SmartSpec TM Plus Bio-Rad <i>Laboratories</i> , Hercules, Kalifornien, USA
Pipettierhilfe	Ergo One [®] FAST Starlab R15931D, Hamburg, Deutschland
Präparierbesteck	NeoLab [®] , Heidelberg, Deutschland
Milli-Q-Anlage	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland/ Billerica, USA
Spritzflaschen	VWR, Radnor, Pennsylvania/ Darmstadt, Germany
Sterilbank	Safe 2020 Thermo Scientific TM Langenselbold, Deutschland/ Waltham, USA
Taumelrollenmischer	Neolab [®] RM5 –IOV, Heidelberg, Deutschland
Wasserbad	Aqualine AL 12 LAUDA, Lauda-Königshofen, Deutschland
Zentrifuge	UNIVERSAL 320R Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Heidolph Polymax 1040 Neolab [®] , Heidelberg, Deutschland Und: Eppendorf Centrifuge 5810R, Hamburg, Deutschland
Kamera Mikroskop	AXIO <i>Cam</i> MRC Zeiss, Nr. 248082090, Oberkochen, Deutschland
Handstück Absauganlage	Vacuum <i>Hand Control</i> Vacuubrand, Wertheim, Deutschland
Gefriertruhe	-86°C <i>Freezer</i> ThermoScientific TM Forma TM WELABO, Waltham, USA
Kühlschrank	Smart Device <i>BluPerformance</i> Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
Präparationsset	Euromex Präparierbesteck PB.5114, Arnhem, Niederlande
Gelkammer	X Cell Sure Lock TM Electrophoresis cell Serial No: 120761-0599 invitrogen TM Novex [®] Mini-Cell, China
Dummy	XCellSureLock TM Buffer Dam for MiniGels Ref.: EI0012 Novex [®] by life technologies, Waltham, USA
Power supply	peqPOWER Peqlab VWR Erlangen, Deutschland/ Radnor, USA
Blottingsystem	Trans-Blot [®] Turbo TM Transfersystem BioRad, Hercules, USA
Plattenschüttler	Heidolph Polymax 2040, Schwabach, Deutschland

Plattenlesegerät	FLUOstar® Omega BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland
FACS Calibur	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Heizblock	Eppendorf ThermoMixer® compact, Hamburg, Deutschland
Geldokumentationsanlage	VWR Chemi only ECN:730-1471 SN: VWRCO/1001, Radnor, USA

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Aufstellung der verwendeten Verbrauchsmaterialien

6-Well-Platten	6-well cell culture plate Cellstar® Greiner Bio-One™ 657160, Kremsmünster, Oberösterreich/ Frickenhausen, Deutschland
24-Well-Platten	24-well cell culture plate Cellstar® Greiner Bio-one™ 662160, Kremsmünster, Oberösterreich/ Frickenhausen, Deutschland
96-Well-Platten	Greiner BioOne™ Ref.: 655101, Kremsmünster, Oberösterreich/ Frickenhausen, Deutschland
Glaspasteurpipette	BRAND™, Cat Nr. 747715, Wertheim, Deutschland
Kryotube	VWR low temperature Freezer Vials 479- 1239, Radnor, Pennsylvania Darmstadt, Germany
Küvetten	SARSTEDT No. 67742, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen 10 µl	TipOne® 10 µl Bevelled FilterTip Sterile cat. Nr 1840 Starlab, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen 100 µl	TipOne® 100 µl Bevelled FilterTip Sterile cat.51120, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen 1000 µl	TipOne® 1000 µl Bevelled FilterTip StarLab, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäß 1,5 ml	SARSTEDT MicroTube 1,5 ml ret Nr. 72690001, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäß 15 ml	Cellstar® Tubes blue screw cap Sterile Cat. No.188271 Greiner Bio-One™ Frickenhausen, Deutschland/ Kremsmünster Oberösterreich

Reaktionsgefäß 50 ml	Cellstar® <i>Tubes blue screw cap Sterile</i> Cat. No.227261 Greiner Bio-One™ Frickenhausen, Deutschland/ Kremsmünster, Oberösterreich
Reaktionsgefäß 2 ml	Eppendorf <i>Safe-Lock Tubes</i> , Hamburg, Deutschland
Stripetten 10 ml	Costar® STRIPETTE® 10 ml <i>Serological Pipet</i> 4488 Sigma-Aldrich Merck, Darmstadt, Deutschland
Stripetten 2 ml	Costar® STRIPETTE® 2 ml <i>Serological Pipet</i> 4486 Sigma-Aldrich Merck, Darmstadt, Deutschland
Stripetten 25 ml	Costar® STRIPETTE® 25 ml <i>Serological Pipet</i> 4489 Sigma-Aldrich Merck, Darmstadt, Deutschland
Stripetten 5 ml	Costar® STRIPETTE® 5 ml <i>Serological Pipet</i> 4487 Sigma-Aldrich Merck, Darmstadt, Deutschland
Zellkulturflaschen T25iger	CELLSTAR® <i>Cellculture Flasks</i> Greiner Bio-One™ 690175, Frickenhausen, Deutschland/ Kremsmünster Oberösterreich
Zellkulturflaschen T75iger	CELLSTAR® <i>Cellculture Flasks</i> Greiner Bio-one 658175, Frickenhausen, Deutschland/ Kremsmünster Oberösterreich
Zellschaber	<i>Cell Scraper 16 cm² position blade</i> 83.1832 SARSTEDT, Newton USA/ Nümbrecht, Deutschland
Nitrocellulosemembran	GE Healthcare Life Sciences Amersham™ Protran™ Premium Cat.: NO10600004 Solingen, Deutschland
Filterpapiere	Dicke 1,5 mm CL75.1 Carl Roth ROTILABO® Blottingpapiere, Karlsruhe, Deutschland
FACS-Falcon	Falcon® 5 ml Polystyrene Round-Bottom Tubi Ref.: 352052, New York, USA
Fertiggele	NuPAGE™ 4-12 % Bis-Tris Gel Ref.: NP0323BOX invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.1.3 Substanzen

Tabelle 3: Aufstellung der verwendeten Substanzen

10x Trypsin	2,5 % Trypsin (10x) gibco REF 15090-046, Carlsbad, Kalifornien, USA
1-Cetylpyridiniumchlorid-Monohydrat	VWR <i>Chemicals</i> Prolabo 22608.180 Radnor, Pennsylvania, USA/ Darmstadt, Deutschland
Alizarin-Rot-S	<i>Alizarinred S mono sodiumsalt</i> 1.06278.0025, Darmstadt, Deutschland
Bad Stabil	Neo lab [®] 1-6095, Heidelberg, Deutschland
CO ₂	Linde Pullach, Deutschland/ Pfulgen, Schweiz
Dexamethason	Sigma D1756-25MG, St. Louis, USA/ Darmstadt, Deutschland
DMEM Glutamax 4,5 g/L Glucose+ Pyruvate	DMEM (1x)+GlutaMAX [™] REF 31966-021 500 ml Gibco [®] <i>by life technologies</i> , Carlsbad, USA/ Waltham, USA
DMSO	Dimethylsulfoxide SIGMA-ALDRICH 276855-100ML, St. Louis Missouri, USA/ Darmstadt, Deutschland
Ethanol absolut	EMSURE <i>Ethanol absolute for analysis</i> Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol zur Desinfektion	Otto Fischer GmbH & Co KG, Saarbrücken, Deutschland
FCS	Gibco [®] <i>by lifetechnologies</i> [™] 10270, Carlsbad, USA/ Waltham, USA
Isopropanol 99,5%	2-Propanol VWR Chemicals 20839297, Darmstadt, Deutschland
L-Ascorbinsäure-2-Phosphat	SIGMA-Aldrich <i>L-Ascorbic acid 2-phosphate sesquimagnesium salt hydrate</i> A8960 >95 % Merck, Darmstadt, Deutschland
Paraformaldehyd	SIGMA-Aldrich 441244-1KG Merck, St.Louis, USA/ Darmstadt, Deutschland
PBS wo Ca ²⁺ / Mg ²⁺	DPBS(1x) Gibco [®] REF14190-094 / ref.: 14190-144 500ml, Waltham, USA
Penicillin-Streptomycin	PenStrep Gibco [®] REF 15140-122 <i>for life technologies</i> , Waltham, USA
Beta-Glycerophosphat disodium salt hydrate	BioUltra, <i>suitable for cell culture</i> SIGMA <i>life science</i> 99422-509 Merck, Darmstadt, Deutschland
Aqua dest.	Aus Milli-Q [™] MilliPore Merck, Darmstadt, Deutschland
Insulin	Sigma 19278-5ML, St. Louis, USA/ Darmstadt, Deutschland
TGF-β1	Recombinant Human TGF-β1 PeproTech Cat.: #100-21, Hamburg, Deutschland

Alcianblau	Staining solution Merck TMS-010-C, Darmstadt, Deutschland
Rauchende Salzsäure	Emsure [®] Merck 1.00062.1000, Darmstadt, Deutschland
IBMX	I70.18-1G Sigma, St. Louis, USA/ Darmstadt, Deutschland
Ölrot Stammlösung	0062525G Sigma-Aldrich, St. Louis, USA/ Darmstadt, Deutschland
MES	4256.4 Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris Base	T1503-1KG Sigma Life Science, St. Louis, USA/ Darmstadt, Deutschland
SDS	L4390-250G Sigma, St. Louis, USA/ Darmstadt, Deutschland
EDTA	1.08418.1000 Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycin	M103-1KG VWR, Radnor, USA
Tween20	9127.1 Roth, Karlsruhe, Deutschland
Nu Page [™] Antioxidant	Ref.: NP0005 Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Methanol	1.06009.2511 Emsure [®] Merck, Darmstadt, Deutschland
Milchpulver	Nonfat Dry Milk 9992 Roth, Karlsruhe, Deutschland
BSA	Albumin Faktor V 0163.4 Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris pH8	Trizma [®] base T103-1KG Sigma, St. Louis, USA/ Darmstadt, Deutschland
NaCl	1.06404.1000 Emsure [®] , Darmstadt, Deutschland
NP-40	Sigma-Aldrich IGEPAL [®] CA-630 Ref.: 18896-50ML, St.Louis, USA/ Darmstadt, Deutschland
Na-deoxycholat	Sigma 078K0102, St.Louis, USA/ Darmstadt, Deutschland
Phosphatase-Proteinaseinhibitor	Halt [™] Protease & Phosphatase Inhibitorcocktail Ref 78440 Thermo Scientific, Waltham, USA
Proteinstandard Western Blot	Precision Plus Protein [™] Dual Color Standards Cat.:# 16.1-0374 Bio-Rad, Hercules, USA
Probenpuffer	LDS Sample Buffer (4x) Ref.: NP007 invitrogen by Thermo Fisher Scientific NuPAGE [®] , Waltham, USA
DTT	R0861 Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Ponceau S	(C.I. 27195) Roth, Karlsruhe, Deutschland
Eisessig	VWR BDH Chemicals 84528.290, Radnor, USA
Entwicklerreagenz WesternBlot	Millipore Immobilon [®] Western Chemiluminescent HRP Substrate 500ml Cat.No WBKLS0500, Waltham, USA
FACS-Puffer	BD Pharmingen Stain Buffer BSA Cat.: 554657, Heidelberg, Deutschland

BCA Kit Reagent A Pierce™ BCA Protein Assay	Thermo Scientific 23228, Waltham, USA
BCA Kit Reagent B Pierce™ BCA Protein Assay	Thermo Scientific 1859107, Waltham, USA
BCA Kit Albumin Standard	Thermo Scientific 23209, Waltham, USA
BSA	Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.1.4 Programme und Software

Tabelle 4: Aufstellung der verwendeten Programme und Software

Histologische Bildverarbeitung	AxioVision Carl Zeiss <i>Microscopy</i> GmbH, Oberkochen, Deutschland
Verfassung der Dissertation	Microsoft® Word® 2010, Washington, USA
Tabellenerstellung	Microsoft® Excel® 2010, Washington, USA
Statistik	GraphPadPrism 9 Statcon GmbH, Witzenhausen, Deutschland/ San Diego, USA
Poster und Präsentation	PowerPoint® Microsoft®, Washington, USA
Chemilumineszenzmessung	<i>Quantity One</i> ® 4.6.5 Basic Bio-Rad, Hercules, Kalifornien USA
Photometrische Messung	Wallac 1420 Workstation, Turcu, Finnland
Literaturverzeichnis	EndNote X7 Bilaney <i>Consultants</i> GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland

2.1.5 Antikörper

Tabelle 5: Aufstellung der verwendeten Antikörper der FACS-Analyse

CD45	APC Rat Anti Mouse Clone: 30-F11 Catalog: 561018 BD Pharmingen™, Heidelberg, Deutschland
CD44	APC Rat Anti Mouse Clone: IM7 Catalog: 561862 BD Pharmingen™, Heidelberg, Deutschland

CD19	APC Rat Anti Mouse Clone: 1D3 Catalog: 561738 BD Pharmingen™, Heidelberg, Deutschland
CD13	FITC Rat anti Mouse Clone: R3-242 Catalog: 558744 BD Pharmingen™, Heidelberg, Deutschland
CD90	FITC Mouse anti Rat Clone: OX-7 Catalog: 561973 BD Pharmingen™, Heidelberg, Deutschland
CD31	BB700 Rat anti Mouse Clone: MEC 13.3 Catalog: 566491 BD Horizon™, Heidelberg, Deutschland
CD11b	FITC, monoclonal AB, ThermoFisher Scientific, Rat anti mouse IgG2b kappa, Waltham, USA
CD34	BV421 Rat anti Mouse Clone: RAM34 Catalog: 562608 BD Horizon™, Heidelberg, Deutschland
CD73	V450 Rat anti Mouse Clone: Ty/23 Catalog: 561544 BD Horizon™, Heidelberg, Deutschland
CD105	BV421 Rat anti Mouse Clone: MJ7 18 Catalog: 562760 BD Horizon™, Heidelberg, Deutschland

Tabelle 6: Aufstellung der verwendeten primären Antikörper der Western Blots

Primäre Antikörper:	
BMP2	Abcam, Cambridge, UK Rabbit monoclonal, clone EPR20807, Verdünnung: 1:1000 Banden-Größe: 44 kDa
Osterix	Abcam, Cambridge, UK Rabbit monoclonal, Verdünnung: 1:1000, Banden-Größe: 45 kDa
Osteocalcin	Abcam, Cambridge, UK Rabbit polyclonal, Verdünnung: 1:500 Banden-Größe: 11 kDa
Osteopontin	Invitrogen, Waltham, MA, USA Polyclonal Rabbit IgG Verdünnung 1:1000, Banden-Größe: 25-55-kDa
Actin β	Anti-Actin (<i>rabbit origin</i>), Cytoskeleton, Inc 1/1000 Cat.# AAN01 Banden-Größe: 43 kDa Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland

Tabelle 7: Sekundärer Antikörper der Western Blots

Goat Anti-Rabbit IgG (H+L): HRP, (human, mouse, rat adsorbed) polyclonal	1/5000 CatNo ZRH1143 LINARIS GmbH Biologische Produkte, Dossenheim, Deutschland
---	---

2.2 Medien, Lösungen, Puffer

2.2.1 Medien

Tabelle 8: Wachstumsmedium

Substanz	Konzentration (Stocklösungen)
DMEM 4,5 g/L Glucose	-
Penicillin/Streptomycin	1 %
FCS	20 %

Tabelle 9: Osteogenes Differenzierungsmedium

Substanz	Konzentration (Stocklösungen)
DMEM 4,5 g Glukose/l	-
FCS	20 %
Penicillin/ Streptomycin	1 %
β -Glycerophosphat	2,16 mg/ml
L-Ascorbinsäure-2-Phosphat	15,9 μ g/ml
Dexamethason	1000 μ g/ml

Tabelle 10: Chondrogenes Differenzierungsmedium

Substanz	Konzentration (Stocklösungen)
DMEM 4,5 g Glukose/L	-
FCS	10 %
Penicillin/ Streptomycin	1 %
L-Ascorbinsäure-2-P	0,0088 μ g/ml
Insulin	6,525 μ g/ml
TGF- β 1	10 ng/ml

Tabelle 11: Adipogenes Differenzierungsmediums

Substanz	Konzentration (Stocklösungen)
DMEM 4,5 g Glukose/L	-
FCS	20 %
Penicillin/Streptomycin	1 %
Dexamethason	0,4 µg/ml
IBMX	0,5 µM
Insulin	10 µg/ml

Tabelle 12: Kryokonservierungsmedium

Substanz	Konzentration
FCS	90 %
DMSO	10 %

2.2.2 Lösungen

Tabelle 13: Trypsin Verdünnung (1fach)

Substanz	Konzentration (auf 1x)
10-fach Trypsin	1 ml
PBS	9 ml

Ölrot-Färbelösung:

Stammlösung:

Tabelle 14: Ölrot-Stammlösung

Substanz	Konzentration
Ölrot	0,5 g
Isopropanol 99 %	100 ml

Gebrauchslösung:

Tabelle 15: Ölrot-Gebrauchslösung

Substanz	Konzentration
Ölrot-Stammlösung	6 ml
Aqua dest.	4 ml

Im Anschluss filtrieren

Tabelle 16: Alizarin-Rot-S-Färbelösung

Substanz	Konzentration
Alizarin-Rot-S	(0,5 %) 0,2 g
Aqua dest.	40 ml

(pH: 4,1-4,3 %)

Tabelle 17: 10 %ige Cetylpyridiniumchloridlösung zur Rücklösung

Substanz	Konzentration
Cetylpyridiniumchlorid	10 %
Aqua dest.	90 %

(pH: 7)

Tabelle 18: Ponceau-Rot-S-Lösung

Substanzen	Konzentration
Ponceau S	1 g
Eisessig	50 ml
Aqua-dest.	1 L

2.2.3 Puffer

Tabelle 19: RIPA-Puffer nach Abcam (Lagerung bei 4 °C unbegrenzt)

Substanzen	Konzentration
Tris pH 8	50 mM
NaCl	150 mM
NP-40	1 %
Na-deoxycholat	0,5 %
SDS	0,1 %

Direkt vor Gebrauch hinzugeben:

Phosphatase-/Proteinaseinhibitor in Verdünnung 1/100

Tabelle 20: Waschpuffer TBS

Substanzen	Konzentration
Tris	200 mM
NaCl	1500 mM

Tabelle 21: TBS-T

Substanzen	Konzentrationen
Tris	200 mM
NaCl	1500 mM
Tween 20	0,1 %

Tabelle 22: 20x Laufpuffer MES (für kleine bis mittlere Proteingrößen (<100 kDa))

Substanzen	Konzentration
MES	50 mM
TrisBase	50 mM
SDS	0,1 %

Tabelle 23: 20x Laufpuffer MES auf 500ml Aqua-dest.

Substanzen	Konzentration
MES	97,6 g
TrisBase	60,6 g
SDS	10 g
EDTA	3 g

-> die 1x Lösung hat einen pH von 7,3

Tabelle 24: 25-fach Tris Glycin Transferpuffer auf 500 ml Aqua-dest.

Substanzen	Konzentration
TrisBase	18,2 g
Glycin	90 g

Tabelle 25: *Stripping* Puffer

Substanz	Konzentration
Glycin	15 g
SDS	1 g
Tween20	10 ml
Aqua-dest.	800 ml

Der pH-Wert wurde auf 2,2 eingestellt und im Anschluss auf 1 L mit Aqua-dest. aufgefüllt.

2.2.4 Tiere

Die Zellen wurden aus den Ober- und Unterkieferinzisivi adulter männlicher Mäuse der Linie C57Bl/6J gewonnen. Die Tiere stammten aus der zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Die Versuche liefen unter der Organentnahmemummer des ZETT: O76/11 für *Bmal1*^{+/+}- und Z48/18 für *Bmal1*^{-/-}-Tiere. Die Tiere wurden von Frau Dr. Beryl Schwarz-Herzke und Frau Dr. Benita Sahlender getötet und das entsprechende Gewebe für diese Dissertation zur Verfügung gestellt.

2.3 Isolation muriner pulpaler Zellen

Zur Isolation muriner pulpaler Zellen aus den Inzisivi adulter Mäuse der Linie C57Bl/6J wurde nach Tötung der Tiere, die Haut des Schädels abpräpariert und der Schädel entlang der *Sutura sagittalis* mittels Skalpell aufgespalten, um zunächst das Gehirn zu entnehmen und im Anschluss die Zähne mit einer Zange und Pinzette zu extrahieren. Ebenso wurde aus demselben Grund die Mandibula gespalten, um im Anschluss die Inzisivi zu extrahieren. Die extrahierten Inzisivi wurden in 2 ml PBS gewaschen und danach in möglichst kleine Fragmente zerteilt.

Die Zahnstücke wurden in ein Well einer 6-Well-Platte mit je 1,5 ml Wachstumsmedium (siehe Kapitel 2.2.1, Tabelle 8, S.39) überführt und bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit über Nacht im Brutschrank inkubiert. Das geringe Medienvolumen ermöglichte ein Absetzen der Fragmente, welches für eine Migration der Zellen aus dem Zahngewebe heraus unerlässlich war. Nach einem Tag wurde Nährmedium hinzugefügt. Es wurde anschließend regelmäßig ein halber Mediumwechsel durchgeführt, bis eine 80 %ige Konfluenz erreicht war. Zu diesem Zeitpunkt wurden die Zahnfragmente mittels einer Pinzette aus den Wells entfernt. Nach Erreichen einer 100 %igen Konfluenz, wurden die Zellen in eine T25-iger Flasche mit je 8 ml Nährmedium überführt

(siehe Kapitel 2.4.2 Passagieren der Zellen S.44). Die Zellen wurden weiter kultiviert, wobei zweimal pro Woche ein Wechsel des Nährmediums erfolgte. Nach Erreichen einer ausreichenden Zellzahl, wurden die Zellen kryokonserviert (siehe Kapitel 2.4.3 Kryokonservierung S. 45) und in den jeweiligen Versuchen eingesetzt.

2.4 Zellkultur

2.4.1 Allgemeine Kulturbedingungen

Die Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank.

2.4.2 Passagieren der Zellen

Passagierung ist definiert als das Ablösen und Überführen von Zellen in ein neues Kulturgefäß. Zum Passagieren der Zellen wurde das Nährmedium abgenommen und die Zellschicht zweimal mit PBS gewaschen. Zum Ablösen wurde eine 1xTrypsinlösung (siehe Kapitel 2.2.2, Tabelle 13, S.40) auf die Zellschicht gegeben und für 1 bis 5 Minuten im Brutschrank inkubiert. Die Inkubationszeit des Trypsins darf 10 Minuten nicht überschreiten. Trypsin löst zunächst die Adhäsionsproteine ab, nach längerer Zeit jedoch werden die Zellen irreversibel geschädigt. Nachdem ein Ablösen der Zellen ersichtlich war, wurde mit ruckartigen Bewegungen gegen das Zellkulturgefäß geklopft, um so die restlichen Zellen abzulösen. Sobald sämtliche Zellen gelöst waren, wurde die Reaktion im Verhältnis von mindestens 1:1 mit FCS haltigem Wachstumsmedium abgestoppt, da FCS das Trypsin inhibiert. Die Zellen wurden resuspendiert und konnten nun, entsprechend der geplanten Versuche, eingesetzt oder kryokonserviert werden.

2.4.3 Kryokonservierung

Nachdem eine 80-100 %ige Konfluenz der Zellen erreicht wurde, wurden die Zellen wie in Abschnitt 2.4.2 beschrieben mit Trypsin gelöst und in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 1200 rpm, 4 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in Einfriermedium (siehe Kapitel 2.2.1, Tabelle 12, S.40) resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Da DMSO über 0 °C zytotoxisch ist, wurde auf Eis gearbeitet, um die Temperatur des DMSO haltigen Einfriermediums möglichst niedrig zu halten. Die Kryotubes wurden mithilfe eines Kryo-Einfriergerätes bei -80 °C eingefroren. Es ermöglichte eine gleichmäßige Reduktion der Temperatur um 1 °C pro Minute. Nach 24 Stunden erfolgte schließlich die Kryokonservierung der Zellen in Flüssigstickstoff bei -196 °C.

2.4.4 Auftauen der Zellen

Die gefrorene Zellsuspension wurde angetaut und in Nährmedium aufgenommen. Um das DMSO-haltige Einfriermedium zu entfernen, wurde die Zellsuspension für 10 Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert und die Zellen danach in ein T-75iger Zellkulturgefäß mit Nährmedium überführt. Am nächsten Tag wurden die Zellen gewaschen, um tote, nicht adhärent gewordene Zellen zu entfernen.

2.5 FACS-Analyse zur Zellcharakterisierung

Zur Bestimmung des für mesenchymale Stammzellen charakteristischen Oberflächenantigenexpressionsmusters wurde eine *Fluorescence-activated-cell-sorting*-(FACS) Analyse mit Zellen aus der murinen Pulpa von *Bmal1^{+/+}*-Tieren (n=3) und *Bmal1^{-/-}*-Tieren (n=3) der Linie C57Bl/6J durchgeführt. Die Zellsuspensionen aus der Zellkultur wurden zunächst vorbereitet. Dazu wurden die Zellen in T-75iger Flaschen einmal mit PBS gewaschen, auf Eis mit 0,05 %iger EDTA Lösung in PBS abgelöst und die Zellsuspension in ein *Falcon* überführt. Das *Falcon* wurde mit *Cellwash* mit 1 % FCS aufgefüllt und bei 1300 rpm 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels Dekantierens entfernt. Dieser Schritt wurde wiederholt. FCS dient hier der Absättigung der Glykokalyx und Abwendung unspezifischer Bindungen durch die Antikörper.

Die Zellen wurden im Anschluss zweimal in kaltem BSA gewaschen und bei 300 xg bei 4 °C herunterzentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Zellen in kaltem BSA aufgenommen. 50 µl Aliquots der Zellsuspension (10^6 Zellen pro Aliquot) wurden in jedes FACS-Falcon überführt. Die Fluoreszenzantikörper wurden auf ihre vorgegebene optimale Konzentration in BSA verdünnt und die Zellsuspension damit für 30 Minuten auf Eis, Lichtgeschützt inkubiert. Die Kälte erhöhte die Spezifität der Antikörper.

Im Anschluss wurden die Zellen zweimal mit BSA gewaschen, um die ungebundenen Antikörper zu entfernen. Die Zellen wurden als 300 xg für 5 Minuten zentrifugiert und nach jeder Zentrifugation vorsichtig die Überstände von den Zellpellets aspiriert. Das entsprechende Zellpellet wurde in 0,5 ml BSA resuspendiert und gefärbte Zellen in die entsprechenden *Tubes* für die FACS-Analyse transferiert und das Volumen auf 0,5 ml angepasst. Die Zellen wurden abschließend mittels FACS-Calibur in einem Zeitraum von unter 4 h nach Färbung analysiert.

2.6 Differenzierung

2.6.1 Allgemeines

Die Differenzierungsversuche wurden mit Zellen von *Bmal1^{+/-}*-Tieren (n=4) und *Bmal1^{-/-}*-Tieren (n=4) in Passage drei in 24-Well-Platten durchgeführt. Die Zellen wurden induziert, nachdem sie eine 100 %ige Konfluenz erreicht hatten. Hierzu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anstelle des Wachstumsmediums mit dem entsprechenden Differenzierungsmedium (adipogen, chondrogen, osteogen siehe Kapitel 2.2.1, Tabelle 9-11, S.39/40) versehen. Die Zellen wurden 3 Wochen im jeweiligen Differenzierungsmedium inkubiert. Zugleich wurden entsprechend Kontrollen mit normalem Wachstumsmedium versehen und angesetzt. An Tag 7, 14 und 21 nach Induktion erfolgte die Auswertung mittels Färbung, sowie anschließender Rücklösung zur Quantifizierung der entsprechenden Färbungen (siehe Kapitel 2.6.2.1/2 S.48/49; 2.6.3.1/2 S.49/50; 2.6.4.1/2 S.51).

Der jeweilige Nähr- und Differenzierungsmediumwechsel erfolgte zweimal pro Woche als vollständiger Mediumwechsel.

Die im Folgenden aufgeführten Differenzierungsmedien wurden bereits in der Arbeitsgruppe innerhalb einer anderen Versuchsreihe, welche unter der Ethikantragsnummer: 2020-898-*andere Forschung, erstvotuerend*, lief und noch nicht veröffentlicht wurde, durch die Doktorandinnen Isabel Hercher und Paula Starcke an humanen pulpalen Zellen (Spender n=6, Durchschnittsalter 25 Jahre) getestet. Hier konnte nachgewiesen werden, dass die Differenzierungsmedien, Zellen erfolgreich induzieren können (siehe Kapitel 4 Diskussion, Abb.21, S.82).

2.6.2 Osteogene Differenzierung

Die Zellen wurden mittels osteogenem Differenzierungsmedium (siehe Kapitel 2.2.1, Tabelle 9, S.39) induziert. Dexamethason induziert die osteogene Differenzierung, indem es die Expression des Transkriptionsfaktors *Runx2* als

eines der Schlüsselgene zur Osteogenese aktiviert und seine Aktivität steigert (Hamidouche et al., 2008, Langenbach and Handschel, 2013). Das Phosphat des β -Glycerophosphats dient als Donor des Phosphats im Hydroxylapatit und beeinflusst die intrazellulären Signalmoleküle der osteogenen Differenzierung (Langenbach and Handschel, 2013, Tenenbaum and Heersche, 1982). L-Ascorbinsäure wiederum dient als ein Kofaktor des Hydroxylaufbaus und als Stabilisator der Kollagen-Trippl-Helix, sowie als Donor für anorganisches Phosphat (Beresford et al., 1993, Langenbach and Handschel, 2013).

2.6.2.1 Alizarin-Rot-S-Färbung zum Nachweis der osteogenen Differenzierung

Alizarin-Rot-S bindet an die Kalziumkristalle in der extrazellulären Matrix. Eingelagerte Kalziumkristalle sind ein Indikator für die erfolgte osteogene Differenzierung. Die Zellen der *Bmal1^{+/+}*- und der *Bmal1^{-/-}*-Tiere wurden 7, 14 und 21 Tage nach osteogener Induktion fixiert. Die Zellen wurden dafür nach einmaligem Waschen mit 4 %igem PFA in PBS für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und dadurch fixiert. Das PFA wurde anschließend abgenommen und die Zellen mit Aqua-dest. gewaschen. Im Anschluss wurde die Alizarin-Rot-S-Färbelösung (siehe Kapitel 2.2.2, Tabelle 16, S.41) auf die Zellschicht gegeben und bei 37 °C für 20 min inkubiert. Als Kontrolle wurden die Zellen, welche nicht mit Differenzierungsmedium behandelt worden waren, mitgefärbt. Die Färbelösung wurde im Anschluss abgenommen und die Zellen mit Aqua-dest. gewaschen, bis der Überstand farblos war. Danach wurde die Zellschicht mit PBS überschichtet und die Zellen unter dem Lichtmikroskop fotografiert.

2.6.2.2 Rücklösung der Alizarin-Rot-S-Färbung

Zur Quantifizierung des in die extrazelluläre Matrix eingelagerten Kalziums, als Nachweis der erfolgten osteogenen Differenzierung, wurde die Menge des vom Kalzium gebundenen Farbstoffes Alizarin-Rot-S mittels Rücklösung quantifiziert, um so indirekt auf die Menge des Kalziums rückschließen zu können. Das PBS

wurde abgenommen und die Zellen wurden in 10 %iger Cetylpyridiniumchlorid Lösung in Aqua dest. (siehe Kapitel 2.2.2, Tabelle 17, S.41) über 90 min bei Raumtemperatur inkubiert, bis der gebundene Farbstoff vollständig zurückgelöst war. Die optische Dichte des Überstandes wurde im Photometer bei OD₆₀₀ gemessen.

2.6.3 Chondrogene Differenzierung

Die Zellen wurden mittels chondrogenem Differenzierungsmedium (siehe Kapitel 2.2.1, Tabelle 10, S.39) induziert. Insulin induziert die chondrogene Differenzierung (Phornphutkul et al., 2006) und TGF- β ist ein Wachstumsfaktor zur Induktion und Regulation der Chondrogenese (Chen et al., 2018). L-Ascorbinsäure-2-Phosphat bildet einen Kofaktor der Kollagen-Synthese und ist ein wichtiges Substrat für den Erhalt des Knorpelgewebes (Pinnell, 1985).

2.6.3.1 Alcianblau- Färbung zum Nachweis der chondrogenen Differenzierung

Alcianblau ist ein in der Histologie verwendeter Farbstoff. Dieser besitzt die Fähigkeit, sulfatierte Glykosaminoglykane, wie unter anderem Hyaluronsäure, bei einem pH-Wert von 1,0 bis 2,5 selektiv anzufärben (Lüllmann-Rauch and Paulsen, 2012). Da sich Glykosaminoglykane in der extrazellulären Matrix von Chondrozyten befinden, kann ihr Nachweis somit zur Verifizierung der Chondrogenese durch Verdeutlichung der Chondrone und Chondroblasten genutzt werden. Es wurden an Tag 7, Tag 14 und Tag 21 nach chondrogener Induktion, Zellen der Bmal1^{+/+}- und der Bmal1^{-/-}-Tiere fixiert. Die Zellen wurden nach einmaligem Waschen mit 4 %igem PFA in PBS für 20 min bei Raumtemperatur fixiert. Das PFA wurde anschließend abgenommen und die Zellen 10 min mit 0,1 M Salzsäure zur Absenkung des pH-Wertes inkubiert, wodurch eine Erhöhung der Bindungsspezifität von Alcianblau erreicht werden konnte. Die Salzsäure wurde abgenommen und die Zellschicht mit Alcianblaulösung überschichtet. Als Kontrolle wurden die Zellen, welche nicht mit

Differenzierungsmedium behandelt wurden, mitgefärbt. Nach 12-stündiger Inkubation (über Nacht) wurde die Färbelösung abgenommen und die Zellen mit Aqua-dest. gewaschen, bis der Überstand farblos war. Danach wurde die Zellschicht mit PBS überschichtet und die Zellen unter dem Lichtmikroskop fotografiert.

2.6.3.2 Rücklösung der Alcianblau-Färbung

Zur Quantifizierung der Menge der selektiv angefärbten, sulfatierten Glykosaminoglykane als Nachweis der erfolgten chondrogenen Differenzierung, welche unter anderem von Chondroblasten exprimiert werden, wurde die Menge des gebundenen Alcianblaufarbstoffes mittels Rücklösung quantifiziert, um so indirekt auf die Menge der Glykosaminoglykane schließen zu können.

Eine HCl-Isopropanol-Lösung wurde unter dem Abzug angesetzt (3/4 rauchende Salzsäure/10 M und 1/4 99 %iges Isopropanol). Das PBS wurde abgenommen und die Zellen mit der HCl-Isopropanol-Lösung überschichtet und für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, bis der gebundene Farbstoff vollständig zurückgelöst war. Die optische Dichte des Überstandes wurde im Photometer bei OD₆₀₀ gemessen.

2.6.4 Adipogene Differenzierung

Die Zellen wurden mittels adipogenem Differenzierungsmedium (siehe Kapitel 2.2.1 Tabelle 11, S.40) induziert. Insulin induziert die Proliferation und Differenzierung von Präadipozyten, Dexamethason als antiinflammatorisches Steroidhormon, stimuliert die adipogene Differenzierung und IBMX reguliert in Kombination mit Dexamethason *Ppar_γ* und fördert so die Adipogenese. (Scott et al., 2011, Gurriarán-Rodríguez et al., 2011)

2.6.4.1 Ölrotfärbung zum Nachweis der Adipogenen-Differenzierung

Ölrot färbt die Lipide in den Vakuolen der adipogen differenzierten Zellen an. Ihr Nachweis kann damit zur Verifizierung der Adipogenese genutzt werden.

Die Zellen der *Bmal1^{+/-}*- und der *Bmal1^{-/-}*-Tiere wurden 7, 14 und 21 Tage nach adipogener Induktion fixiert. Die Zellen wurden nach einmaligem Waschen mit 4%igem PFA in PBS für 5 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Das PFA wurde anschließend abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurde die Gebrauchslösung des Ölrots (siehe Kapitel 2.2.2, Tabelle 15, S.40) auf die Zellschicht gegeben und bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert. Als Kontrolle wurden die Zellen, welche nicht mit Differenzierungsmedium behandelt worden waren, mitgefärbt. Die Färbelösung wurde im Anschluss abgenommen und die Zellen mit Aqua-dest. gewaschen, bis der Überstand farblos war. Danach wurde die Zellschicht mit PBS überschichtet und die Zellen unter dem Lichtmikroskop fotografiert.

2.6.4.2 Rücklösung der Ölrotfärbung

Zur Quantifizierung der erfolgten adipogenen Differenzierung wurde die Menge des von den Lipiden gebundenen Farbstoffes Ölrot rückgelöst. Das Aqua-dest. wurde abgenommen und die Zellen wurden mit 100 %igem Isopropanol für 15 Minuten inkubiert, bis der gebundene Farbstoff vollständig zurückgelöst war. Die spektrometrische Messung der Absorption des Überstandes erfolgte bei 540 nm im Spektrophotometer.

2.7 Proteinnachweis mittels Western-Blot

2.7.1 Allgemeines

Die Versuchsreihe wurde mit *Bmal1^{+/+}*-Tieren (n=4-5) und *Bmal1^{-/-}*-Tieren (n=4-5) durchgeführt, welche osteogen differenziert wurden.

Zum Nachweis der osteogenen Differenzierung auf molekularer Ebene wurden die Proteine Osterix, BMP2, Osteocalcin und Osteopontin mittels Western Blot nachgewiesen.

Bone morphogenetic proteins (BMPs) stimulieren die Differenzierung von Osteoprogenitorzellen in Osteoblasten und induzieren nicht-osteogene Zellen zur Differenzierung in Zellen mit osteoblastärer Abstammung (Wu and Lu, 2008, Wang et al., 1993, Nakamura et al., 2005, Gersbach et al., 2007, Yamaguchi et al., 1991). BMP2 gilt darunter als einer der stärksten knocheninduzierenden Komponenten der Osteoblastendifferenzierung (Kim et al., 2004) und reguliert über *Dlx5* die Expression des Transkriptionsfaktors Osterix (Nakashima et al., 2002). Osterix wiederum stellt eines der frühesten Hauptmoleküle dar, welches die Osteoblasten-Differenzierung reguliert und Osteoblastenzielgene stimuliert.

Osteopontin und Osteocalcin gelten als die Haupt-nicht-kollagenen Proteine, welche eine Schlüsselrolle in der biologischen, sowie der mechanischen Funktion des Knochens spielen und dessen Größe, Form und Stärke bestimmen (Bailey et al., 2017). Sie werden im späten Mineralisationsprozess der Knochenbildung produziert und steuern direkt, sowie auch indirekt die Knochenmasse, Mineralgröße, sowie Orientierung und sind durch die Organisation von Zellmatrix zu Mineralmatrix Interaktionen in die Koordination der extrazellulären Matrix involviert. (Bailey et al., 2017, Stein et al., 1990, Boskey et al., 1998, Turner et al., 2010, Poudarik et al., 2012)

2.7.2 Proteinlysate

Die Zellen wurden bis zur vollständigen Konfluenz in normalem Wachstumsmedium inkubiert. An Tag 0, 3, 6, 9, 12 und 15 nach osteogener Induktion wurden die Zellen geerntet. Daraufhin wurden die Zellen gewaschen und RIPA-Puffer (Radio-Immunoprecipitation Assay (RIPA)-Puffer siehe Kapitel 2.2.3, Tabelle 19, S.41) wurde mit einem Phosphatase- und Proteinaseinhibitor versetzt auf die Zellschicht appliziert. Die lysierten Zellen wurden mithilfe eines Schabers abgeschabt und die Zellsuspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Proteinlysate wurden bei -20 °C eingefroren.

2.7.3 BCA-Assay (Reaktion der Proteinbestimmung)

Der BCA-Assay beruht auf einer Kombination von zwei verschiedenen Reaktionen und wird zur Bestimmung der Proteinkonzentration herangezogen: Zunächst kommt es zur Biuret-Reaktion, welche die Bildung eines hellblauen Chelatkomplexes von Cu^{1+} Ionen mit Proteinen mit drei oder mehr Aminosäureresten in alkalischer Umgebung beschreibt. Im Anschluss entsteht ein Chelatkomplex aus zwei Biocinonsäure-Molekülen und einem Kupferion. Dieser hat eine purpurne Färbung. Der gebildete BCA/Kupfer Komplex ist wasserlöslich und weist ein Absorptionsmaximum von 562 nm auf.

2.7.4 Proteinbestimmung

2.7.4.1 Vorbereitung

Zunächst musste ein neuer Proteinstandard, wie in Tabelle 26 aufgeführt, angesetzt werden (BSA in der Konzentration von 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ liegt dem BCA-Kit bei). Die zu bestimmenden Proben wurden in einem Metallblock bei Raumtemperatur aufgetaut. Um einer Denaturierung der Proteine vorzubeugen, wurden die

Proben anschließend auf Eis gesetzt und die gesamte Zeit über auf Eis gearbeitet.

Tabelle 26: Proteinstandard- Pipettierschema

Konzentration (µg/µl)	Probe (Bezeichnung)	BSA-Standard (µl)	PBS oder RIPA (µl)
2,0	A	300	0
1,5	B	375	125
1,0	C	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	H	100 von G	400
0=BLANK	I	0	400

2.7.4.2 Durchführung

Das *Working* Reagenz wurde angesetzt. Das benötigte Volumen wurde mit folgender Formel berechnet:

$$(9(\text{Standard})+X (\text{Anzahl der Proben})) \times 2 (\text{Doppelbestimmung}) \times 200\mu\text{l} = \text{Volumen } \textit{Working} \text{ Reagenz}$$

Es wurden immer 50 Anteile Reagenz A mit einem Anteil Reagenz B gemischt. Jede der Proben wurde in einem Verhältnis von 1:4 mit Aqua-dest. verdünnt. Vor Probenentnahme wurden die Proteinlysate gut gemischt, um einer Verfälschung der Messung durch Sedimentation vorzubeugen. Die Verdünnungen wurden auf Eis angesetzt.

In Doppelbestimmung wurden jeweils 10 µl des Standards und ebenso 10 µl der verdünnten Proteinlysate auf eine 96-Well-Platte (siehe Abb.5) aufgetragen.

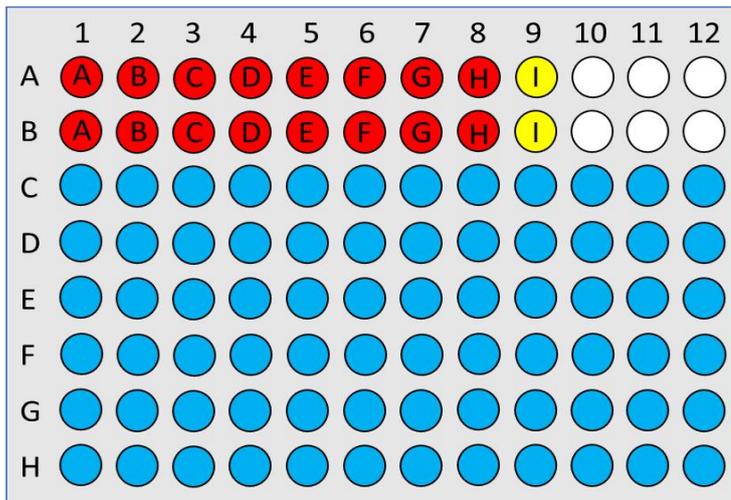


Abb.5: Pipettierschema der 96-Well-Platte. Die Abbildung zeigt die Aufteilung der *Wells* innerhalb der 96-Well-Platte. Innerhalb der rot markierten *Wells* wurde ein Standard pipettiert, die gelben *Wells* markieren *Blanks*, die weißen *Wells* blieben leer und in die blauen *Wells* wurden die Proben pipettiert.

Es wurden jeweils 200 µl des vorher angesetzten BCA *Working* Reagenzes in jedes Well gegeben, welches Standard, *Blank* oder Probe enthielt. Im Anschluss wurde ca. 30 Sekunden auf dem Plattenschüttler gemischt, die Platte abgedeckt und für mindestens 45 Minuten bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert. Die Messung erfolgte am Plattenlesegerät. Die Auswertung wurde mit 3rd Polynomial *fit* durchgeführt.

2.7.5 Elektrophorese zur Auftrennung von Proteinen (PAGE)

Ein Heizblock wurde auf 70 °C vorgeheizt. Die Proben setzten sich aus 4-fach Probenpuffer, DTT im Verhältnis 1:10 und 15µg der Probe zusammen. Durch ein 5-minütiges Erhitzen der Proben denaturierten die Proteine. Dies war wichtig, um eine gute Auftrennung im Acrylamidgel zu bekommen.

Für die anschließende Elektrophorese wurden fertige Acrylamidgele (Gradienten Gele 4-12 %) verwendet. Die Gelkammer wurde mit 1-fach Laufpuffer (siehe Kapitel 2.2.3 MES-Puffer Tabelle 22/23, S.42) befüllt.

Für die Größenbestimmung wurden zusätzlich 3,5 µl Proteinstandard aufgetragen. Das Gel wurde bei 100 Volt für 10-15 Minuten gestartet und auf 175

Volt hochgestellt, nachdem die Proben an der Grenze vom Sammel- zum Trenngel gesammelt waren. Um der Hitzeentwicklung entgegenzuwirken, wurde die Elektrophorese auf Eis durchgeführt. Das Gel wurde gestoppt, sobald der, den Proben vorauslaufende Probenpuffer aus dem Gel austrat.

2.7.6 Blotting im Trans-Blot®Turbo™ Transfer System

Nach Beendigung des Gellaufes wurde das Gel aus der Gelkammer entnommen und der Blot wie in Abbildung 6 geschichtet.

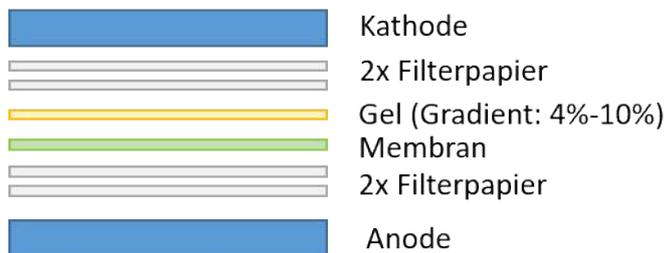


Abb.6: Schichtung eines Blots

Schematische Darstellung eines Blotaufbaus und seine Einteilung zwischen Kathode und Anode in Filterpapiere, Gel und Membran.

Alle verwendeten Elemente des Blots wurden zuvor in Transferpuffer getränkt (siehe Kapitel 2.2.3, Tabelle 24, S.42). Der 25-fach Puffer wurde 1:25 mit Aqua dest. verdünnt und mit 20 % Methanol versetzt. Geblottet wurde im Trans-Blot® Turbo™ System.

2.7.7 Ponceau-Rot-Färbung

Zur Kontrolle der Proteinübertragung wurde die Membran für ca. 30 Sekunden bis 1 Minute mit Ponceau S Lösung überschichtet (siehe Kapitel 2.2.2, Tabelle 18, S.41). Nachdem die Banden sichtbar waren, wurde die Membran mit Aqua-dest. gespült, bis die Banden deutlich sichtbar waren, zurechtgeschnitten und mit Kugelschreiber beschriftet. Die Entfärbung erfolgte auf dem Plattenschüttler mit TBS-T (siehe Kapitel 2.2.3, Tabelle 21, S.42) für ca. 5 Minuten.

2.7.8 Blocken und Antikörperfärbung

Die Membran wurde in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und in 10 ml Blockingreagenz (abhängig vom Erstantikörper: 5 % Milchpulver oder 5 % BSA in TBS-T) für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Taumelrollenmischer inkubiert. Das Blockingreagenz wurde abgenommen und der Erstantikörper in entsprechender Verdünnung (siehe Kapitel 2.1.5, Tabelle 6, S.38) in Blockingreagenz auf die Membran gegeben und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Erstantikörper verworfen und die Membran 3mal mit TBS-T für je 10 Minuten gewaschen. Anschließend wurde der Sekundärantikörper 1:5000 in TBS-T verdünnt auf die Membran gegeben. Dieser wird stets so gewählt, dass er gegen die Spezies gerichtet ist, in welcher der Erstantikörper generiert wurde.

Die Inkubation erfolgte für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Taumelrollenmischer. Die Antikörperlösung wurde im Anschluss abgenommen und die Membran 2-mal mit TBS-T und im Folgenden mindestens 1-mal mit TBS für 10 Minuten gewaschen. Anschließend konnte die Membran entwickelt werden.

2.7.9 Entwicklung/ Detektion der Banden/Auswertung

Die Detektion der Banden erfolgte mit dem Immobilon Western Chemilumineszentes HRP-Substrat. Bei der Detektion wurden die beiden Substrate Lunimol und Peroxidlösung im Verhältnis 1:1 gemischt und über die Blotmembran pipettiert. Die Peroxidase bricht das HRP-Konjugat auf und mithilfe des Luminols können die Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Die Kamera des Quantity One® 4.6.5 Basic Bio-Rad ermöglichte die Fotodokumentation der Banden und weiterführend, dass ihre Intensität mit dem dazugehörigen Analyseprogramm direkt im Anschluss gemessen werden konnte. Die Auswertung der Banden erfolgte mithilfe von Excel, womit zunächst die Verhältnisse des „*Proteins of interest*“ zum *Housekeeper*, in diesem Falle Actin β ermittelt wurden. Die Statistische Auswertung wurde hieraufhin mit den errechneten Daten und dem Statistikprogramm Graphpad Prism 9 durchgeführt.

Eine Signifikanz zweier oder mehrerer Datensätze wurden auf einen p-Wert von 0,5 festgelegt.

2.7.10 Blot Stripping

Beim Stripping werden die Antikörper-Antigen Interaktionen gelöst, was es ermöglicht, auf der Nitrocellulosemembran andere Proteine via Antigen-Antikörperreaktion nachzuweisen.

Die Membran wurde mit 10 ml des *Stripping* Puffers (siehe Kapitel 2.2.3, Tabelle 25, S.42) überschichtet und 10 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Der *Stripping* Puffer wurde verworfen und der Schritt mit frischem *Stripping* Puffer wiederholt. Anschließend wurde die Membran 2 mal 10 Minuten mit 10 ml PBS gewaschen. Darauffolgend wurde zweimal für 5 Minuten mit 10 ml TBS-T gewaschen. Anschließend konnte die Membran erneut mit Blocking Reagenz inkubiert werden oder bis zur weiteren Verwendung getrocknet und gelagert werden.

2.8 Statistik

Die Statistik wurde mithilfe von Graphpad Prism9 kalkuliert. Da mehrere Parameter bei der Berechnung wichtig waren, wurde eine 2way Anova Analyse durchgeführt. Alpha wurde auf 0,05 gesetzt und der p-Wert auf 0,5. Um eine einzelne Analyse zu erhalten, wurden mehrere Vergleiche vorgenommen. So wurde der Mittelwert der *Bmal1^{+/+}*-Tiere eines Zeitpunktes mit dem Mittelwert der *Bmal1^{-/-}*-Tiere desselben Zeitpunktes verglichen. Dabei wurde die Standardabweichung ebenfalls berechnet.

3 Ergebnisse

3.1 Kultivierung

In dieser Promotion galt es zunächst zu ermitteln, welche Art von Zellen mit der von uns durchgeführten Methodik aus der murinen Pulpa kultiviert wurden und ob eine molekulare Störung der inneren Uhr, ausgelöst durch eine Deletion von *Bmal1*, Auswirkungen auf deren Differenzierungsfähigkeit besitzt.

Dafür wurden Zellen aus den Inzisivi des Ober- und Unterkiefers von Mäusen der Linie C57Bl/6J von *Bmal1*^{-/-}-Tieren, sowie deren Wurfgeschwistern (*Bmal1*^{+/+}) wie in Kapitel 2.3 des Material- und Methodenteils beschrieben, isoliert und wie in Kapitel 2.4 aufgeführt, in Kultur genommen.

Die im folgenden aufgeführten Abbildungen (Abb.7A & B) zeigen die Migration der plastikadhärenten Zellen aus einem Zahnfragment. Abbildung 8 stellt einen zu 100% konfluent gewachsenen Zellrasen dar. Hier wird eine pflastersteinartige Anordnung der Zellen sichtbar.

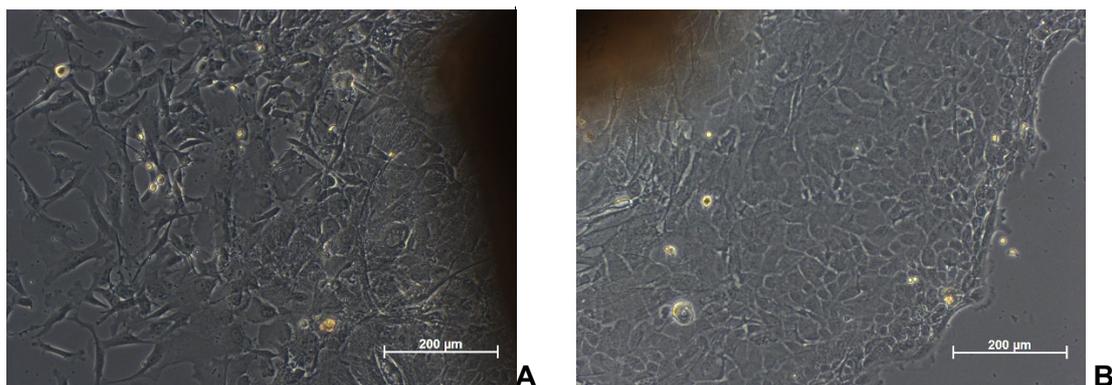


Abb.7: Kultivierung muriner pulpaler Zellen Migration der Zellen aus Inzisivistücken 6 Tage nach der Isolation. A) Die Abbildung zeigt migrierende plastikadhärente Zellen aus dem rechtsseitig gelegenen Zahnstück. B) Die Abbildung zeigt migrierende plastikadhärente Zellen aus dem oben links gelegenen Zahnstück.

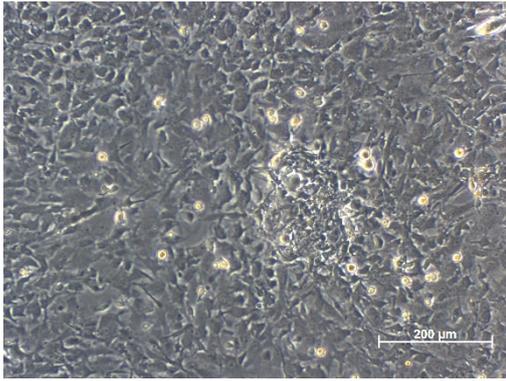


Abb.8: Konfluenz der Zellen Die Abbildung zeigt vollständig konfluente Zellen 14 Tage nach der Isolation.

3.2 Charakterisierung

Die murinen pulpalen Zellen wurden aus den Inzisivi von *Bmal1^{+/+}*-Tieren und *Bmal1^{-/-}*-Tieren isoliert und kultiviert (siehe Kapitel 2.3 und 2.4, S.43ff.).

Um die Zellen weiterführend zu charakterisieren, entschied ich mich zu untersuchen, inwieweit die Zellen die Standardkriterien der *International Society for Cellular Therapy* für mesenchymale Stammzellen erfüllten (Dominici et al., 2006):

Diese legte fest, dass Zellen als erstes Kriterium unter Standardkulturbedingungen Plastikadhärenz aufweisen müssen (siehe Kapitel 2.4.1., S.44). Als zweites Kriterium muss mehr als 95 % der mesenchymalen Stammzellpopulation die Oberflächenantigene CD105, CD73 und CD90 exprimieren und darf nicht die Oberflächenantigene CD45, CD34, CD14 oder CD11b, CD79a oder CD19 und HLA-DR aufweisen. Hier muss der Ausschlag unter 2 Prozent liegen, da er ansonsten als positiv für das entsprechende Oberflächenantigen gewertet wird (siehe Kapitel 2.5, S.46) und als drittes Standardkriterium müssen die Zellen *in vitro* unter Gewebekultur-differenzierungsstandards in der Lage sein, in Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten zu differenzieren (siehe Kapitel 2.6, S.47ff.). (Dominici et al., 2006)

3.2.1 Plastikadhärenz

Die Zähne wurden nach der Extraktion in PBS gewaschen, eröffnet, in Proliferationsmedium gelegt und bei 37 °C und 5 % CO₂-Begasung kultiviert (siehe Kapitel 2.3/ 2.4 S.43ff.). Nach ca. 6 Tagen (siehe Abb.7, S.59) wurden ein paar Zellen sichtbar, die das Kriterium der Plastikadhärenz erfüllten. Nach weiterer Kultivierung unter denselben Bedingungen proliferierten die Zellen weiter, bis sie in die Versuche genommen werden konnten. Im Folgenden galt es, die Zellen über das Expressionsmuster der Oberflächenantigene zu charakterisieren und die Differenzierungsfähigkeit der Zellen in die Bindegewebsarten zu untersuchen.

3.2.2 Expressionsmuster der Oberflächenantigene

Mesenchymale Stammzellen besitzen im Unterschied zu vielen anderen Zellarten nicht ein spezifisches Oberflächenantigen, sondern viel mehr ein *Cluster* spezifischer Oberflächenantigene, welches für sie als charakteristisch gilt. Die ISCT definierte in diesem Zusammenhang, dass mehr als 95 % der mesenchymalen Stammzellpopulation die Oberflächenantigene CD105, CD73 und CD90 exprimieren muss und nicht die Oberflächenantigene CD45, CD34, CD14 oder CD11b, CD79a oder CD19 und HLA-DR aufweisen darf. Bei Letzteren muss der Ausschlag unter 2 % liegen, da er ansonsten als positiv für das entsprechende Oberflächenantigen gewertet wird. (Dominici et al., 2006)

Die Bestimmung erfolgte mittels Durchflusszytometrie (siehe Kapitel 2.5, S.46). In der nachfolgenden Arbeit wurden zusätzlich weitere Oberflächenantigene untersucht, da die oben aufgeführten Antigene lediglich ein Mindestkriterium darstellen.

Sowohl die Zellen der *Bmal1^{+/+}*-Tiere (n=3), als auch jene der *Bmal1^{-/-}*-Tiere (n=3), waren positiv für die Oberflächenantigene CD34, CD45, CD11b, CD19, CD90, CD73, CD105, CD44 und CD13 und negativ für das Oberflächenantigen CD31, da hier der Ausschlag unter 2 % lag (siehe Abb.9).

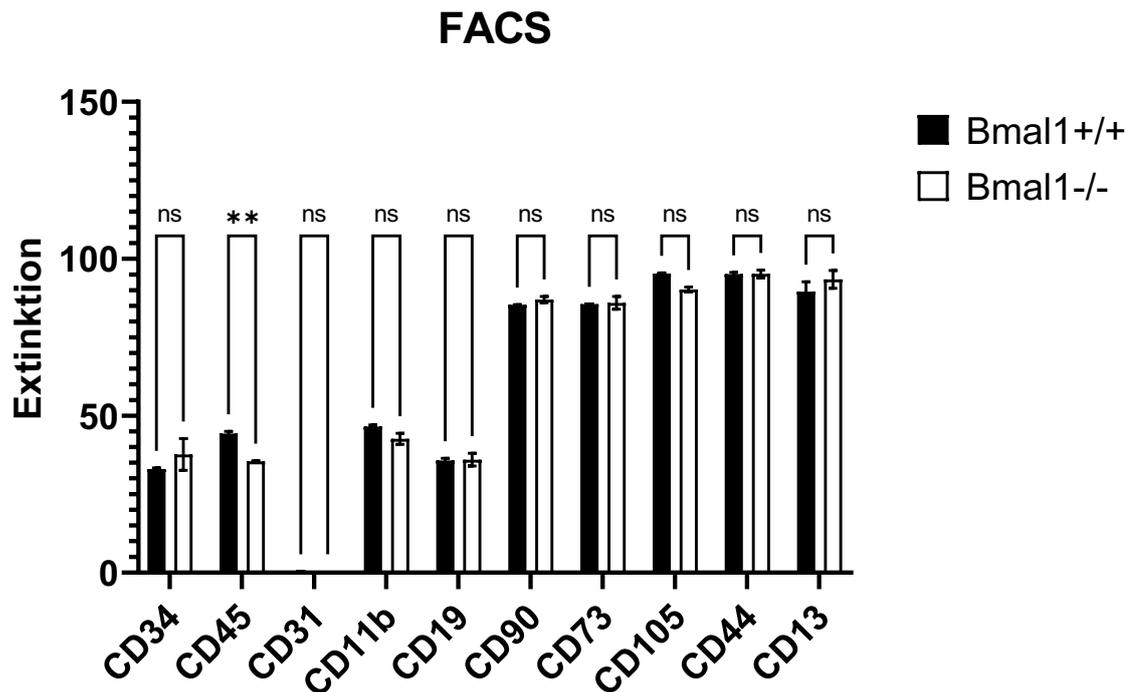


Abb.9: FACS-Analyse des Oberflächenantigenexpressionsmusters von Zellen aus den Inzisivi der *Bmal1*^{+/+}- und *Bmal1*^{-/-}-Tiere. Die Abbildung zeigt den prozentualen Anteil der Zellen der Zellpopulationen, welche positiv für die aufgelisteten Oberflächenantigene war. Wiesen weniger als 2 % der Zellen ein Antigen auf, wurde die Zellpopulation als negativ für dieses gewertet, anderenfalls, als positiv. Die Anzahl der Tiere pro Gruppe betrug je n=3. FACS: *Fluorescence activated cell sorting* ; CD: *Cluster of Differentiation* ; **: p<0.01, ns: kein signifikanter Unterschied

Das Muster der exprimierten Oberflächenantigene zeigte, dass Zellen der *Bmal1*^{+/+}-Tiere, als auch jene der *Bmal1*^{-/-}-Tiere, positiv für die Oberflächenantigene CD34, CD45, CD11b und CD19 waren, obwohl diese von mesenchymalen Stammzellen nicht exprimiert werden dürfen. CD45 wurde auf der Zelloberfläche von *Bmal1*^{-/-} - Tieren in signifikant geringerem Maße exprimiert, verglichen mit dem entsprechenden Oberflächenantigen auf den Zellen der *Bmal1*^{+/+} - Tiere. Deutlich höhere Werte, beginnend bei einer Extinktion von 82,4, zeigten die Messungen für CD90, CD73, CD105, welche für mesenchymale Stammzellen als charakteristisch gelten. Zusätzlich waren sie

ebenfalls in deutlich höherem Maße positiv für CD44 und CD13. Jedoch waren diese Werte bei einem Vergleich der Oberflächenantigene zwischen den Zellen der beiden Genotypen nicht signifikant verändert.

3.2.3 Osteogene, chondrogene und adipogene Differenzierung

Die Differenzierungsversuche wurden zur Untersuchung des dritten Kriteriums der ISCT für mesenchymalen Stammzellen (Dominici et al., 2006), mit Zellen der *Bmal1^{+/+}*-Tiere (n=4) und der *Bmal1^{-/-}*-Tiere (n=4) in Passage 3 durchgeführt (siehe Kapitel 2.6, S.47ff.). Die Zellen sollten sich osteogen, adipogen und chondrogen differenzieren lassen. In dieser Arbeit wurde die Differenzierungsfähigkeit in die 3 Bindegewebsarten untersucht.

3.2.3.1 Adipogene Differenzierung

Um die Zellen in die Adipogenese zu bekommen, wurden die Zellen der *Bmal1^{+/+}*-Tiere (n=4) und der *Bmal1^{-/-}*-Tiere (n=4) 21 Tage in adipogenem Differenzierungsmedium inkubiert und zur Kontrolle der Differenzierung anschließend mittels Ölrot gefärbt (siehe Kapitel 2.6.4, S.50ff.).

Nach der Färbung und Fotodokumentation zeigte sich bereits lichtmikroskopisch (siehe Abb.10) kein Unterschied zwischen den Zellen der *Bmal1^{+/+}*-, sowie den *Bmal1^{-/-}*-Tieren. Vereinzelt rote Ölrotablagerungen waren in der Bildgebung sichtbar.

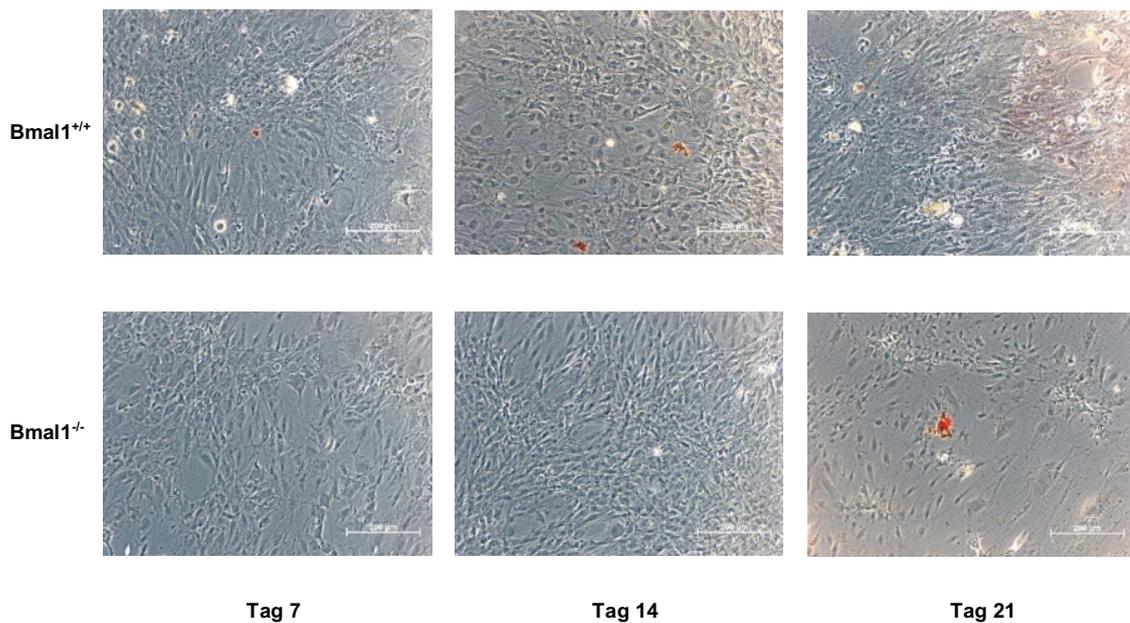


Abb.10: Fotodokumentation nach 21 Tagen adipogener Differenzierung von Zellen aus den Inzisivi der *Bmal1*^{+/+}- und *Bmal1*^{-/-}- Tiere. Es handelt sich um beispielhafte Fotodokumentationen von angefärbten Zellen der *Bmal1*^{+/+}- und der *Bmal1*^{-/-}- Tiere an Tag 7, 14 und 21 adipogener Differenzierung und Färbung mittels Ölrot.

Bei der Quantifizierung des rückgelösten Farbstoffes Ölrot der Zellen der *Bmal1*^{+/+}-Tiere und der *Bmal1*^{-/-}-Tiere (siehe Abb.11), zeigte sich in Woche 1 zwar eine tendenziell stärkere Färbung der Zellen der *Bmal1*^{-/-}-Tiere als jener, der *Bmal1*^{+/+}-Tiere, jedoch war diese nicht statistisch signifikant unterschiedlich. In Woche 2 sind die Werte tendenziell gleich und ohne eine Zunahme des gebundenen Farbstoffes Ölrot. Auch in Woche 3 ist keine deutliche Zunahme bei beiden Genotypen zu detektieren und es bestehen keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen diesen. An allen 3 Auswertungszeitpunkten ist keine deutliche Zunahme des rückgelösten Farbstoffes Ölrot und somit keine Zunahme der Triacylglyceride in den Vakuolen der Zellen nach Inkubation in adipogenem Differenzierungsvermögen zu verzeichnen.

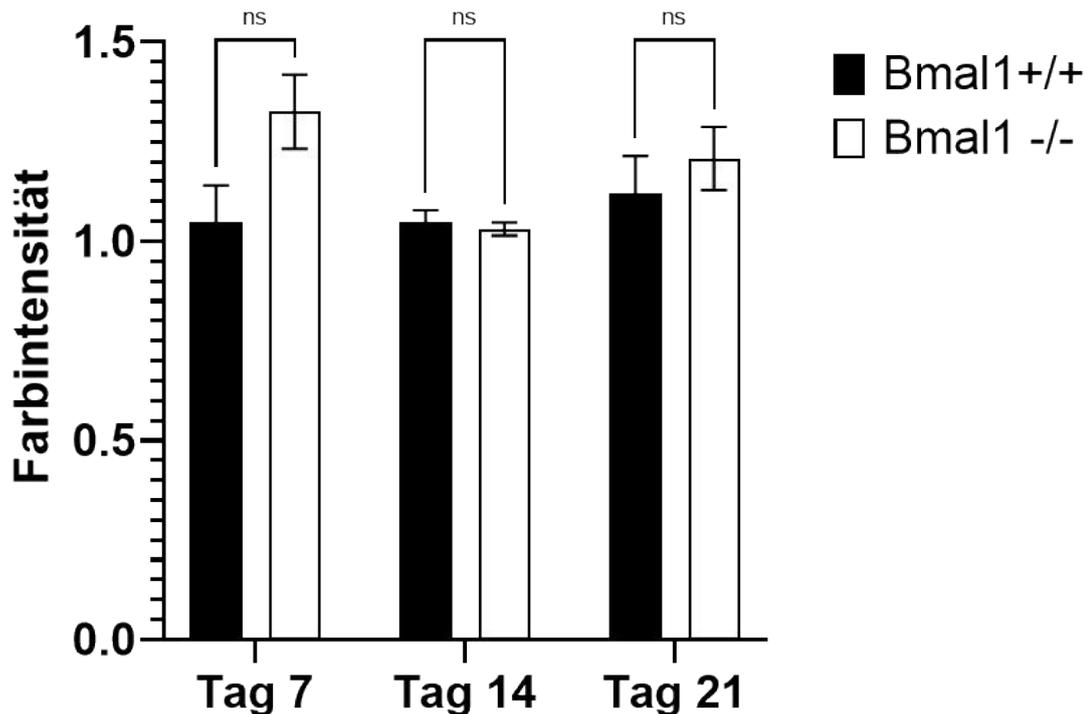


Abb.11: Rücklösungswerte nach Ölrotfärbung adipogen differenzierter Zellen

Die Grafik zeigt die Quantifizierung des eingelagerten Farbstoffes Ölrot, jeweils 1, 2 und 3 Wochen nach erfolgter Inkubation mit adipogenem Differenzierungsmedium. Die Farbintensität von Ölrot wurde relativ zur Kontrolle ermittelt. Die Anzahl der Tiere pro Gruppe betrug je n=4. ns: kein signifikanter Unterschied

3.2.3.2 Chondrogene Differenzierung

Die Zellen der *Bmal1*^{+/+} (n=4) und der *Bmal1*^{-/-}-Tiere (n=4) wurden über einen Zeitraum von 3 Wochen in chondrogenem Differenzierungsmedium inkubiert und mittels Alcianblau gefärbt (siehe Kapitel 2.6.3 S.49ff.). Nach anschließender Fotodokumentation (siehe Abb.12) zeigte sich im lichtmikroskopischen Bild keine Blaufärbung der Zellen und somit kein visueller Nachweis einer chondrogenen Differenzierung, weder bei den isolierten Zellen der *Bmal1*^{+/+}-, noch der *Bmal1*^{-/-}-Tiere.

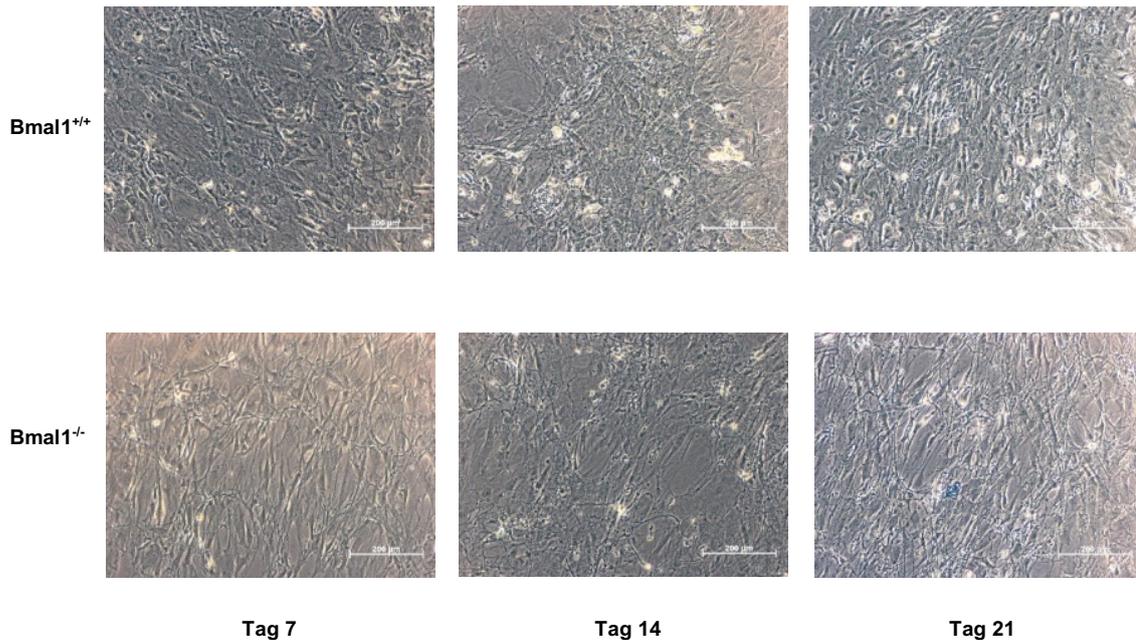


Abb.12: Fotodokumentation nach 21 Tagen chondrogener Differenzierung von Zellen aus den Inzisivi der *Bmal1*^{+/+}- und *Bmal1*^{-/-}- Tiere. Es handelt sich um beispielhafte Fotodokumentationen von angefärbten Zellen der *Bmal1*^{+/+}- und der *Bmal1*^{-/-}- Tiere an Tag 7, 14 und 21 chondrogener Differenzierung und Anfärbung mittels Alcianblau.

Bei der Quantifizierung des rückgelösten Farbstoffes Alcianblau (siehe Abb.13), zeigte sich nach einer Woche eine erhöhte Menge des rückgelösten Alcianblaus bei den Zellen der *Bmal1*^{+/+}-Tiere. Jedoch war dies statistisch gesehen nicht signifikant. Diese nahm bis Tag 14 zu und bis Tag 21 unter den Wert von Tag 7 deutlich ab. Bei den Zellen der *Bmal1*^{-/-}-Tiere war ein minimaler Anstieg bis zu Tag 14 zu verzeichnen. Zu diesem Zeitpunkt zeigte sich eine signifikante Erhöhung des rückgelösten Farbstoffes der Zellen der *Bmal1*^{+/+}- Tiere.

An allen 3 Auswertungszeitpunkten nahm die Menge des rückgelösten Farbstoffes der *Bmal1*^{-/-}-Zellen nicht deutlich zu. In der dritten Woche war bei beiden Gruppen ein Rückgang und sich annähernde Werte zu verzeichnen. Zu jedem Auswertungszeitpunkt waren die Werte der *Bmal1*^{+/+}-Zellen, jenen der *Bmal1*^{-/-}-Zellen zwar überlegen, jedoch waren die Unterschiede zwischen den Genotypen lediglich an Auswertungszeitpunkt Tag 14 statistisch signifikant, an Tag 7 und 21 bestanden hingegen keine signifikanten Unterschiede.

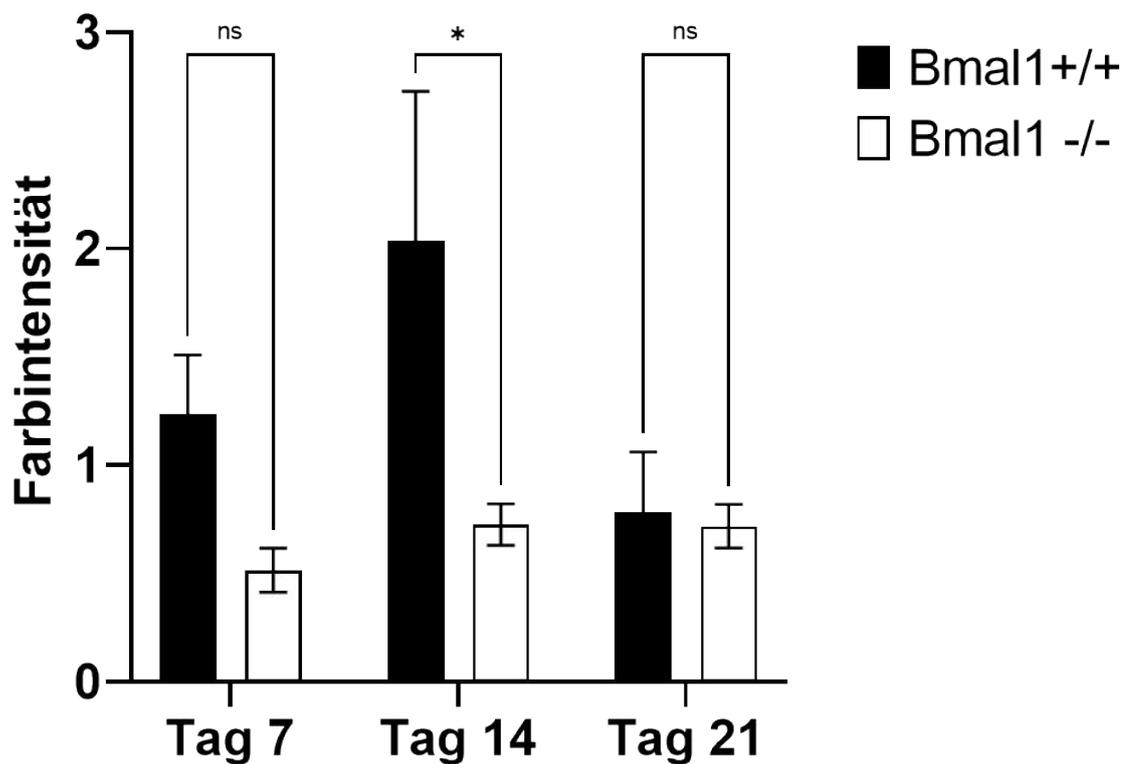


Abb.13: Rücklösungswerte nach Alcianblaufärbung chondrogen differenzierter Zellen aus den Inzisivi der *Bmal1*^{+/+}- und der *Bmal1*^{-/-}-Tiere

Die Abbildung zeigt die Rücklösungswerte der Färbung mit Alcianblau von Zellen der *Bmal1*^{+/+}-Tiere (n=4) und der *Bmal1*^{-/-}-Tiere (n=4) nach 1-, 2- und 3-wöchiger Inkubation mit chondrogenem Differenzierungsmedium, sowie die statistische Signifikanz zwischen den Genotypen *: P ≤ 0,05. Die Farbintensität von Alcianblau wurde relativ zur Kontrolle ermittelt.

3.2.3.3 Osteogene Differenzierung

Um die Osteogenese zu untersuchen, wurden die Zellen von *Bmal1^{+/+}*- (n=4) und *Bmal1^{-/-}*-Tieren (n=4) über 3 Wochen in osteogenem Differenzierungsmedium inkubiert (siehe Kapitel 2.6.2, S.47ff.). Nach Anfärbung mit Alizarin-Rot-S (siehe Abb.14) wurde bei beiden Genotypen eine Kalzifizierung der extrazellulären Matrix sichtbar. Bei den Zellen aus den Inzisivi der *Bmal1^{+/+}*-Tiere, sowie auch der *Bmal1^{-/-}*-Tiere war eine Zunahme von Woche 1 bis Woche 3 zu verzeichnen, welche bei den Zellen der *Bmal1^{-/-}*-Tiere tendenziell höher war.

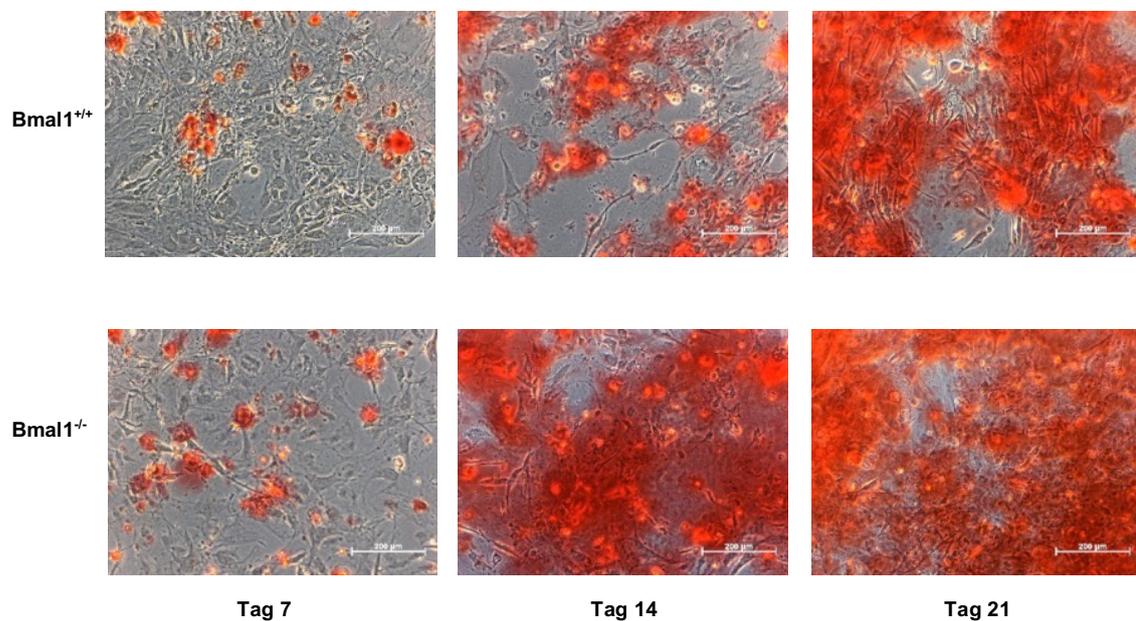


Abb.14: Fotodokumentation nach 21 Tagen osteogener Differenzierung von Zellen aus den Inzisivi der *Bmal1^{+/+}*- und *Bmal1^{-/-}*-Tiere. Es handelt sich um beispielhafte Fotodokumentationen von angefärbten Zellen der *Bmal1^{+/+}*- und der *Bmal1^{-/-}*- Tiere an Tag 7, 14 und 21 osteogener Differenzierung und Anfärbung mittels Alizarin-Rot-S. Die angefärbte Kalzifizierung der extrazellulären Matrix nahm bei beiden Genotypen bis Woche 3 zu und war bei den *Bmal1^{-/-}*-Tieren tendenziell höher.

Zur Verifizierung dieser Ergebnisse und genauen Quantifizierung der Alizarin-Rot-S Färbung und somit indirekt der relativen Kalzifizierung der EZM als

Nachweis der osteogenen Differenzierung, wurde die Färbung zurückgelöst (siehe Abb.15). Eine kontinuierliche Zunahme der relativen Kalzifizierung der extrazellulären Matrix war bei den Zellen der *Bmal1^{+/+}*- Tiere, sowie auch jenen der *Bmal1^{-/-}*-Tiere von Woche 1 bis 3 zu verzeichnen. Diese lag in Woche 1, 2 und auch 3 zwar tendenziell bei den Zellen der *Bmal1^{-/-}*-Tiere über jener, der *Bmal1^{+/+}*-Tiere, jedoch war dies nicht statistisch signifikant.

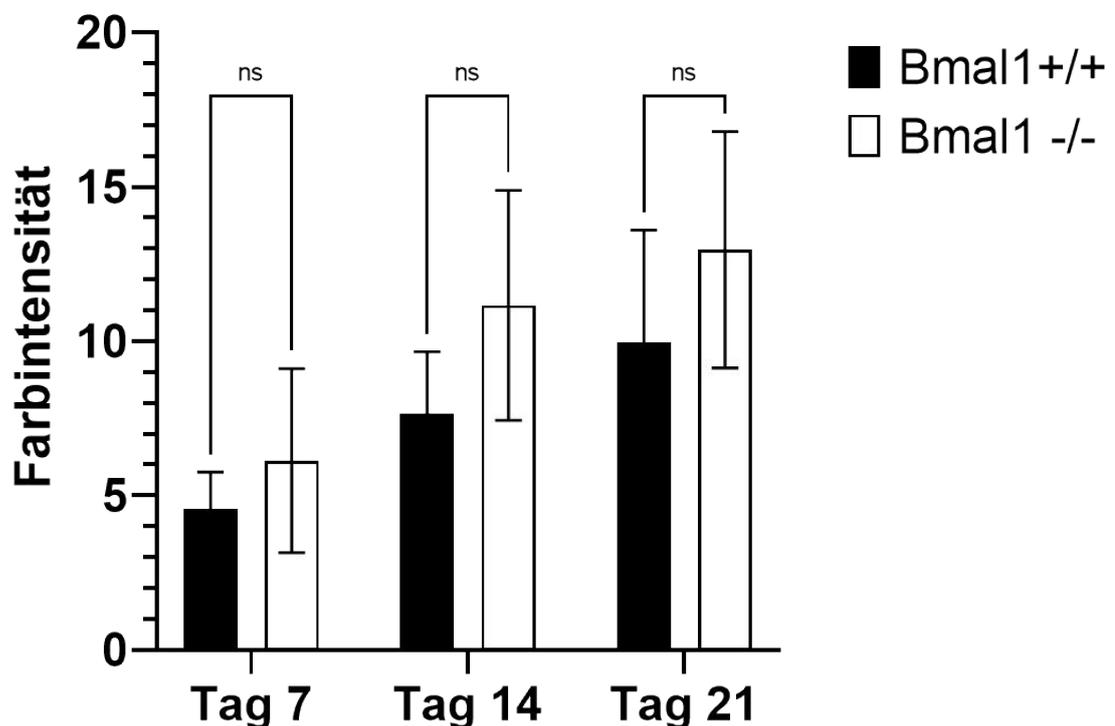


Abb.15: Rücklösungswerte nach Alizarin-Rot-S-Färbung osteogen differenzierter Zellen

Die Rücklösung des an die kalzifizierte Matrix gebundene Alizarin-Rot-S zeigt bei den Zellen der *Bmal1^{+/+}*-Tiere (n=4) und jenen, der *Bmal1^{-/-}*-Tiere (n=4) eine Zunahme des eingelagerten Kalziums von Woche 1 bis 3. Die Menge des eingelagerten Kalziums der Zellen der *Bmal1^{-/-}*-Tiere übersteigt in jeder Woche jene der *Bmal1^{+/+}*-Tiere, jedoch statistisch nicht signifikant (ns). Die Farbintensität von Alizarin-Rot-S wurde hierbei relativ zur Kontrolle ermittelt.

Die Experimente zur Charakterisierung der isolierten Zellen unter Zuhilfenahme der Kriterien der ISCT zeigten, dass die Zellen Plastikadhärenz aufwiesen, jedoch lediglich in der Lage waren, osteogen zu differenzieren und nicht adipogen und chondrogen. Da sie ebenfalls die für mesenchymale Stammzellen charakteristischen Oberflächenantigene zwar in einem höheren Maße exprimierten, als jene, die mesenchymale Stammzellen nicht aufweisen dürfen, diese jedoch dennoch vorlagen, entschied ich mich, die Zellen als pulpale unipotente Progenitorzellen mit einem ausgeprägten osteogenen Differenzierungsvermögen zu postulieren. Die Rücklösungswerte zeigten ein moderat ausgeprägteres osteogenes Differenzierungsvermögen der *Bmal1^{-/-}*-Zellen im Vergleich zu den *Bmal1^{+/+}*-Zellen, was statistisch jedoch nicht signifikant war und im Folgenden molekular weiter zu untersuchen galt.

3.3 Western Blot

Zur Analyse der Osteogenese muriner pulpaler Progenitorzellen nach Deletion von *Bmal1*, wurde bisher das Differenzierungsvermögen von Zellen aus den Zähnen der *Bmal1^{+/+}*-Tiere im Vergleich zu jenen der *Bmal1^{-/-}*-Tiere mittels Anfärbung und Rücklösung untersucht. Zur weiteren Verifizierung dieser Ergebnisse sollte die osteogene Differenzierung auf molekularer Proteinebene nachgewiesen und auch hier Unterschiede zwischen Zellen der *Bmal1^{+/+}*- und *Bmal1^{-/-}*-Tiere herausgestellt werden, indem die Expression der Proteine BMP2, Osterix, Osteocalcin und Osteopontin gemessen wurde (siehe Kapitel 2.7, S.52 ff).

Abbildung 16 zeigt die Expression des osteogenen Markerproteins BMP2 während der Behandlung der Zellen mit osteogenem Differenzierungsmedium über 15 Tage. Die Zellen aus den Zähnen der *Bmal1^{+/+}*-Tiere zeigen eine gesteigerte BMP2 Expression ab Tag 9, welche fortlaufend in geringem Maße bis Tag 15 wiederum abnimmt. Die *Bmal1^{-/-}*-Zellen zeigen einen Anstieg der BMP2 Expression ab Tag 9 und fortlaufend bis Tag 12, welcher daraufhin bis Tag 15 wieder abnimmt. Zu jedem dieser Auswertungszeitpunkte, ist die Expression von

BMP2 der Zellen der *Bmal1*^{-/-}-Tiere, jener der *Bmal1*^{+/+}-Tiere statistisch mit ausgeprägter Signifikanz überlegen. Die BMP2 Expressionsanalyse durch Western Blot wurde gegen das *Housekeeping*-Protein Actin β normiert, da die Expression von Actin β im Gegensatz zu jener von BMP2 nicht durch die Osteogenese der Zellen beeinflusst wird. BMP2 besitzt eine Größe von 44kDa und Actin β eine Größe von 43 kDa.

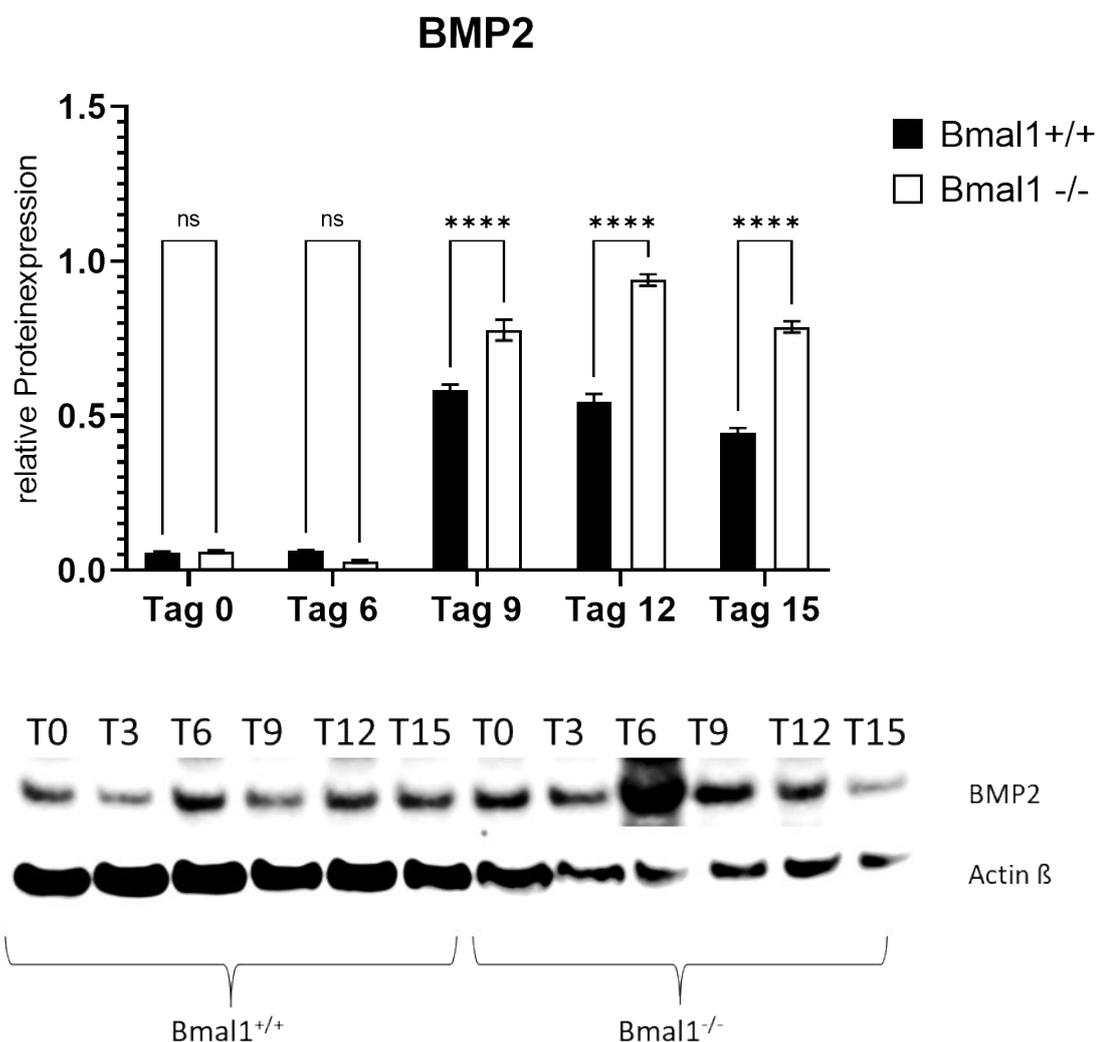


Abb.16: Messung der BMP2-Proteinexpression (Western Blot) von Zellen aus den Zähnen der *Bmal1*^{+/+}- und *Bmal1*^{-/-}-Tiere über einen Zeitraum von 15 Tagen bei gleichzeitiger Inkubation in osteogenem Differenzierungsmedium. Tag 0 zeigt die BMP2-Expression in den Zellen vor Beginn der Differenzierung. Die Proteinexpressionswerte wurden normiert gegen das *Housekeepingprotein* Actin β . Darunter sind exemplarische Western Blots für BMP2, sowie auch

Actin β beider Genotypen dargestellt. Die Anzahl der Tiere pro Gruppe betrug je n=5.
****:P<0,0001

Western Blots zum Nachweis des osteogenen Markerproteins Osterix (siehe Abb.17) zeigen, dass die Expression dieses Proteins in den Zellen der *Bmal1^{+/-}*-Tiere bis zu Tag 9 fortlaufenden anstieg, hieraufhin jedoch kontinuierlich bis Tag 15 wiederum abnahm. Der Höhepunkt der Expression war an Tag 9 erreicht und überstieg hier die Expression von Osterix in den Zellen der *Bmal1^{-/-}*-Tiere in statistisch ausgeprägt signifikanter Weise. Bei *Bmal1^{-/-}*-Zellen war ein fortlaufender Anstieg der Expression bis Tag 12 zu verzeichnen, welcher an Tag 12 seinen Höhepunkt erreichte und hieraufhin wieder bis zu Tag 15 abnahm. Bis auf den Auswertungszeitpunkt an Tag 9 war die Expression von Osterix in den Zellen der *Bmal1^{-/-}*-Tiere, jener der in den *Bmal1^{+/-}*-Tiere überlegen, jedoch war dies lediglich an Tag 12 ausgeprägt statisch signifikant zu vermerken. An den Auswertungszeitpunkten an Tag 0, 6, sowie 15 sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen zu vermerken. Die Osterix-Expressionsanalyse durch Western Blot wurde gegen das *Housekeeping*-Protein Actin β normiert, da die Expression von Actin β im Gegensatz zu jener von Osterix nicht durch die Osteogenese der Zellen beeinflusst wird. Osterix zeigte eine Größe von 45 kDa, Actin β war 43 kDa groß.

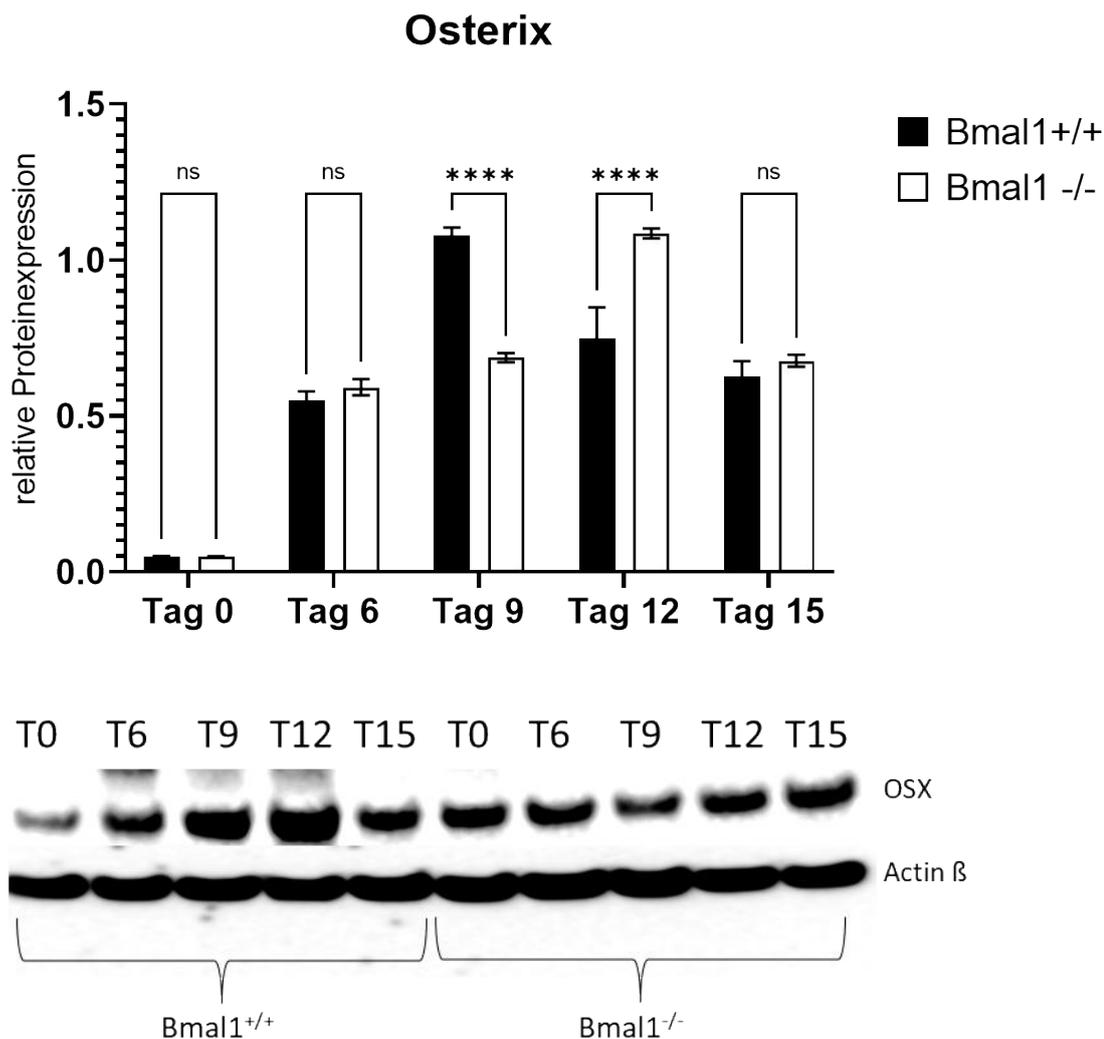


Abb.17: Messung der Osterix-Proteinexpression (Western Blot) von Zellen aus den Zähnen der *Bmal1^{+/+}*- und *Bmal1^{-/-}*-Tiere über einen Zeitraum von 15 Tagen bei gleichzeitiger Inkubation in osteogenem Differenzierungsmedium. Tag 0 zeigt die Osterix-Expression in den Zellen vor Beginn der Differenzierung. Die Proteinexpressionswerte wurden gegen das *Housekeepingprotein* Actin β normiert. Darunter sind exemplarische Western Blots für Osterix (OSX), sowie auch Actin β beider Genotypen dargestellt. Die Anzahl der Tiere pro Gruppe war je n=5. ****P < 0,0001

Abbildung 18 zeigt die Expression des osteogenen Markerproteins Osteocalcin während der Induktion der Zellen in osteogenem Differenzierungsmedium über 15 Tage (siehe Abb.18). Bei den Zellen aus den Zähnen der *Bmal1^{+/+}*-Tiere war eine Zunahme der Expression erst an Tag 9 ersichtlich, welche daraufhin jedoch

wieder abnahm. Die Zellen der *Bmal1*^{-/-} Tiere zeigten einen fortlaufenden Anstieg der Expression von Osteocalcin, welcher seinen Höhepunkt an Tag 12 erreichte und darauf wieder abnahm. An den Auswertungszeitpunkten an Tag 3, 6, 12 und 15 war die Expression von Osteocalcin bei den Zellen der *Bmal1*^{-/-} Tiere signifikant jenen, der *Bmal1*^{+/+}-Tiere überlegen. Dabei war die Signifikanz ausgeprägt an den Auswertungszeitpunkten Tag 12 und 15 und mehr noch an Tag 12. Geringe Signifikanz war an Tag 3 und die geringste an Tag 6 zu verzeichnen. Lediglich an Auswertungszeitpunkt Tag 9 bestand keine statistische Signifikanz. Die Osteocalcin-Expressionsanalyse durch Western Blot wurde zusätzlich zu Tag 0 auch gegen das *Housekeeping*-Protein Actin β normiert, da die Expression von Actin β im Gegensatz zu jener von Osteocalcin nicht durch die Osteogenese der Zellen beeinflusst wird. Osteocalcin ist 11 kDa groß und Actin β 43 kDa.

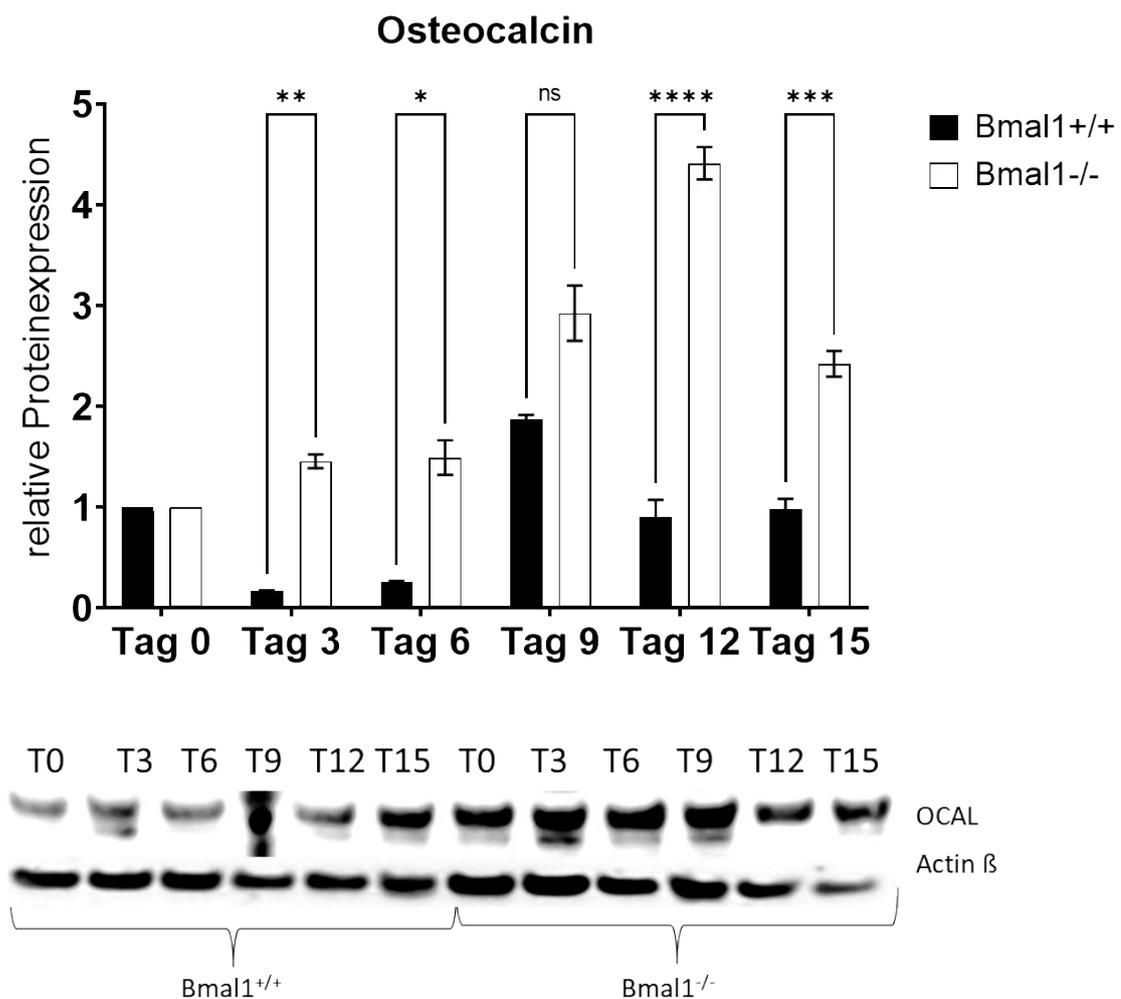


Abb.18: Messung der Osteocalcin-Proteinexpression mittels Western Blot von Zellen aus den Zähnen der *Bmal1^{+/+}*-Tiere und der *Bmal1^{-/-}*-Tiere über einen Zeitraum von 15 Tagen bei gleichzeitiger Induktion mit osteogenem Differenzierungsmedium.

Die Osteocalcinexpressionsanalyse wurde gegen das *Housekeepingprotein* Actin β normiert. Zusätzlich wurde auf Tag 0 normiert. Darunter sind exemplarische Western Blot-Aufsichten für Osteocalcin (OCAL), sowie auch Actin β beider Genotypen dargestellt. Die Anzahl der Tiere pro Gruppe betrug je n=4. *:P \leq 0.5; **: P<0.01; ***: P<0.001; ****: P<0.0001

Abbildung 19 zeigt Western Blots zum Nachweis des osteogenen Markerproteins Osteopontin (siehe Abb.19). Bei den Zellen der *Bmal1^{-/-}*-Tiere zeigte sich eine Zunahme, die an Tag 9 das Maximum der Proteinexpression zeigte, bis Tag 12 wieder abnahm und an Tag 15 wieder leicht zunahm. Bei den Zellen der *Bmal1^{+/+}*-Tiere war erst an Tag 15 eine Zunahme der Proteinexpression zu verzeichnen, welche jedoch die maximale Proteinkonzentration der Zellen der *Bmal1^{-/-}*-Tiere an Tag 9 überstieg. An den Auswertungszeitpunkten Tag 6, 9 und 12 zeigte die Expression von Osteopontin der Zellen der *Bmal1^{-/-}*-Tiere signifikant höhere Werte als bei den Zellen der *Bmal1^{+/+}*-Tiere. Diese waren an Tag 6 ausgeprägt signifikant und nahmen bis Tag 12 in ihrer Signifikanz ab. An Tag 15 zeigten die Zellen der *Bmal1^{+/+}*-Tiere signifikant höhere Werte als jene, der *Bmal1^{-/-}*-Tiere, welche in der Signifikanz simultan zu Tag 9 der *Bmal1^{-/-}*-Tiere lagen. Die Osteopontin-Expressionsanalyse durch Western Blot wurde zusätzlich zu Tag 0 auch gegen das *Housekeeping*-Protein Actin β normiert, da die Expression von Actin β im Gegensatz zu jener von Osteopontin nicht durch die Osteogenese der Zellen beeinflusst wird. Osteopontin ist 25-55 kDa groß und Actin β 43 kDa.

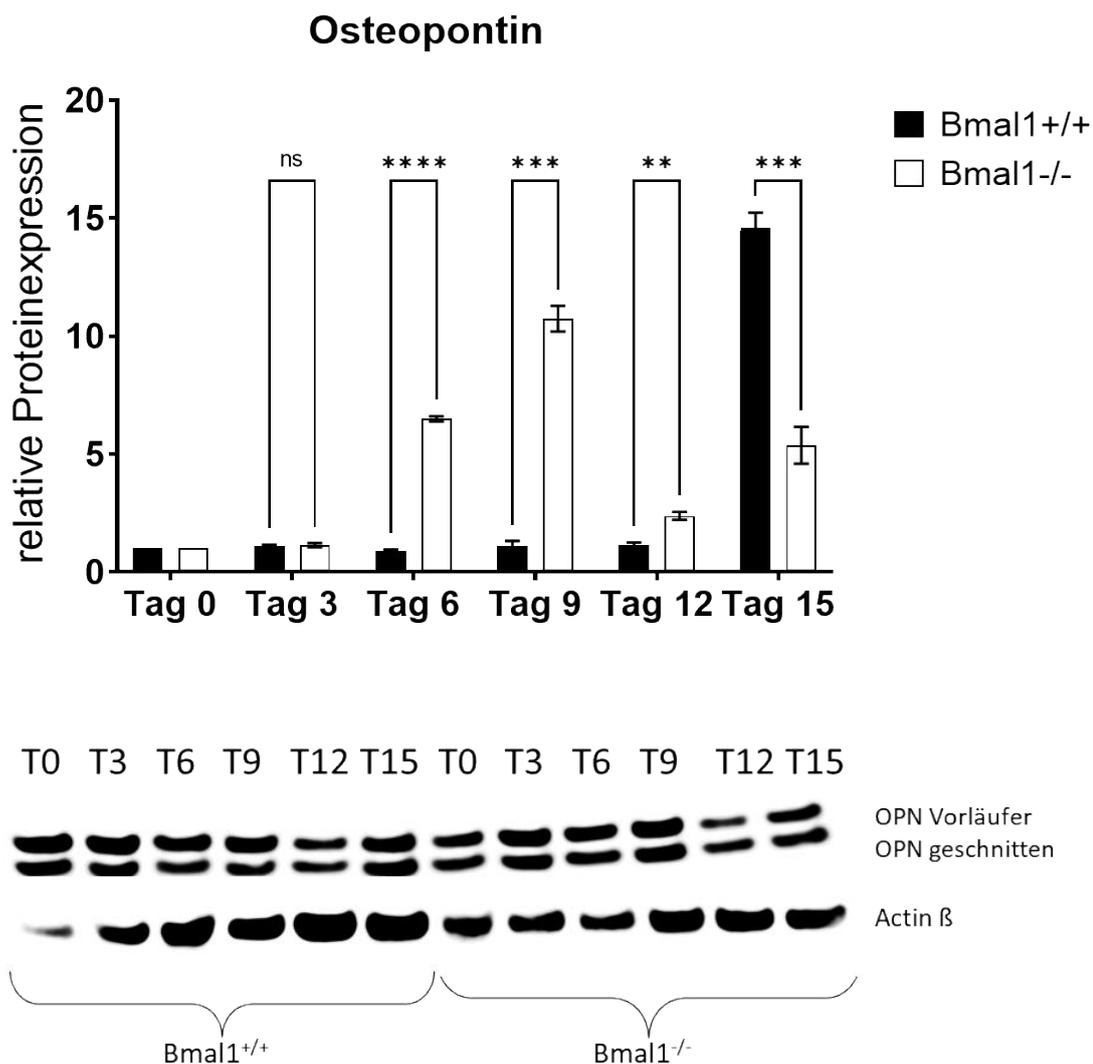


Abb.19: Messung der Osteopontin-Proteinexpression mittels Western Blot von Zellen aus den Zähnen der *Bmal1*^{+/+}- und der *Bmal1*^{-/-}-Tiere über einen Zeitraum von 15 Tagen bei gleichzeitiger Induktion mit osteogenem Differenzierungsmedium.

Die Osteopontinexpressionsanalyse wurde gegen das *Housekeepingprotein* Actin β normiert. Zusätzlich wurde auf Tag 0 normiert. Die Anzahl der Tiere pro Gruppe betrug je n=4. Darunter sind exemplarische Western Blot-Aufsichten für Osteopontin (OPN), sowie auch Actin β beider Genotypen dargestellt. **: P < 0,01; ***: P < 0.001; ****: P < 0.0001

Während die Rücklösungswerte ein tendenziell, jedoch nicht signifikant ausgeprägteres osteogenes Differenzierungsvermögen der *Bmal1*^{-/-}-Zellen im Vergleich zu den *Bmal1*^{+/+}-Zellen zeigten, konnte die Osteogenese auf molekularer Ebene bei beiden Genotypen nachgewiesen werden und zeigte im

Hinblick auf die Expression von Osterix lediglich an Auswertungszeitpunkt Tag 12 und Osteopontin an den Tagen 6, 9 und 12 signifikant höhere Werte der Zellen der *Bmal1*^{-/-}-Tiere im Vergleich zu jenen, der *Bmal1*^{+/+}-Tiere, bei BMP2 und Osteocalcin waren hingegen signifikant ausgeprägtere Werte der Zellen der *Bmal1*^{-/-}-Tiere an fast allen Auswertungszeitpunkten zu verzeichnen.

4 Diskussion

Zielsetzung dieser Arbeit war es zunächst, murine pulpale (Progenitor)-Zellen aus den Inzisivi des Ober- und Unterkiefers adulter Mäuse der Linie C57Bl/6J zu charakterisieren, sowie weiterführend die Differenzierungsfähigkeit dieser Zellen unter dem Aspekt der Deletion von *Bmal1* zu untersuchen, um zu zeigen, ob eine Beeinflussung der Osteogenese durch eine Störung des molekularen Uhrenwerkes feststellbar ist.

Die Literatur beschrieb bereits zur Untersuchung dentaler Zellen das „*tooth-slice-organ-culture*“-Modell als geeignet, welches eine Fragmentierung des Zahnes zur Zellgewinnung vorsieht. So wurde dies bei Ratten-Inzisivi (Murray et al., 2008, Sloan et al., 1998), Ratten Molaren (Ritchie et al., 2004), humanen Molaren (Farges et al., 2003, Magloire et al., 1996) und Molaren drei Wochen alter Mäuse (Ida-Yonemochi et al., 2014) durchgeführt. Balic beschrieb 2019 Methoden zur Gewinnung von Populationen, die mit MSCs aus murinen Inzisivi angereichert sind, durch FACS-Sortierung von Antikörper-markierten Zellen (Balic, 2019). Harada und Otsu definierten ein Protokoll für die Kultivierung dentaler epithelialer Stammzellen und die Produktion von Zelllinien aus murinen Inzisivikeimen und postulierten, dass diese 3-7 Tage postnatal am Besten geeignet wären (Harada and Otsu, 2019). Zainal Ariffin *et al.* isolierten die murine Pulpa und gewannen DPSCs letztlich auf enzymatischem Wege (Zainal Ariffin et al., 2012). So war es in dieser Dissertation das Ziel, murine pulpale Zellen aus den Ober-, sowie Unterkieferinzisivi adulter Mäuse mittels Fragmentierung nach vorheriger Extraktion zu isolieren und zu kultivieren. Um die Zellen weiterführend zu charakterisieren (siehe Abb.20, S.81), nutzte ich die Kriterien der ISCT (*international society for cellular therapy*), welche diese für MSCs postulierte. Diese fordert drei Minimalkriterien, welche mesenchymale Stammzellen erfüllen müssen (Dominici et al., 2006): So müssen die Zellen unter Standardkulturbedingungen, Plastikadhärenz aufweisen. Als zweites Kriterium muss mehr als 95 % der mesenchymalen Stammzellpopulation die Oberflächenantigene CD105, CD73 und CD90 exprimieren und darf nicht die Oberflächenantigene CD45, CD34, CD14 oder CD11b, CD79a oder CD19 und

HLA-DR aufweisen. Hier muss der Ausschlag unter 2 Prozent liegen, da er ansonsten als positiv für das entsprechende Oberflächenantigen gewertet wird. Die Bestimmung erfolgt mittels Durchflusszytometrie. (Dominici et al., 2006)

Als drittes Standardkriterium müssen sie *in vitro* unter Gewebekulturdifferenzierungsstandards die Fähigkeit besitzen, in Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten zu differenzieren (Dominici et al., 2006).

Die Plastikadhärenz konnte bereits während der Isolation gezeigt werden und war die Grundvoraussetzung für die weiterführenden Experimente (siehe Kapitel 3.1, Abb.7/8, S.59/60). Damit war bereits das erste Kriterium der ISCT erfolgreich erfüllt.

In Bezug auf die Expression der Oberflächenantigene wurden in der nachfolgenden Arbeit zusätzlich weitere Oberflächenantigene untersucht, da die oben aufgeführten Antigene lediglich ein Mindestkriterium darstellen.

Bei diesen Analysen mittels Durchflusszytometrie waren sowohl die Zellen der *Bmal1^{+/+}*-Tiere, als auch jene der *Bmal1^{-/-}*-Tiere positiv für die Oberflächenantigene CD34, CD45, CD11b, CD19, CD90, CD73, CD105, CD44 und CD13 und lediglich negativ für das Oberflächenantigen CD31, da hier der Ausschlag unter 2 % lag (siehe Kapitel 3.2.2, Abb.9, S.62). Das Muster der exprimierten Oberflächenantigene zeigte, dass Zellen der *Bmal1^{+/+}*-Tiere, als auch jene der *Bmal1^{-/-}*-Tiere, positiv für die Oberflächenantigene CD34, CD45, CD11b und CD19 waren, welche mesenchymale Stammzellen laut ISCT nicht exprimieren dürfen. In deutlich höherem Maße, beginnend bei einer Extinktion von 82,4, wurden die Oberflächenantigene CD90, CD73 und CD105, welche für mesenchymale Stammzellen als charakteristisch gelten, stark exprimiert. Aufgrund dessen schlussfolgerte ich, dass es sich um keine mesenchymalen Stammzellen handelte, diese jedoch ihnen in ihren Eigenschaften ähnelten. Die Analyse ergab außer bei CD45 keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zellen der *Bmal1^{+/+}*-, sowie der *Bmal1^{-/-}*-Tiere. Dominic *et al.* beschrieben bereits, dass die Oberflächenantigen-charakterisierung noch nicht universal verifiziert werden konnte und bei nicht humanen Zellen divergieren kann (Dominici et al., 2006, Tropel et al., 2004). Tropel *et al.* nutzten jedoch CD11b und CD45, um hämatopoetische Kontaminationen ihrer Zellkultur von murinen MSCs des

Knochenmarkes festzustellen (Tropel et al., 2004). Die Signifikanz, die ich bei einem Vergleich von CD45 auf den Oberflächen der Zellen der *Bmal1^{-/-}* - Mäuse mit jenen der *Bmal1^{+/+}* - Tiere feststellte, ist demnach auf eine höhere „Kontamination“ der Kultur mit Leukozyten zurückzuführen.

Morikawa *et al.* legten nahe, dass CD90 und CD105 gute Marker für die Multipotenz muriner mesenchymaler Stammzellen sein könnten (Morikawa et al., 2009). Wie bereits beschrieben, waren unsere Zellen in höherem Maße für CD90 und CD105 positiv, was unsere Annahme, dass unsere Zellen eine Multipotenz, die auch mesenchymale Stammzellen besitzen, aufweisen könnten, unterstützt. So zeigten Lacerda-Pinheira *et al.* bei drei murinen klonalen pulpalen Vorläuferzelllinien aus den ersten Molaren von murinen Embryos die Expression unter anderem der von uns untersuchten Oberflächenantigene CD44 und CD34 (mit Variationen), und beschrieben ebenfalls keine signifikante Expression von CD31, jedoch dies ebenfalls auch für CD45 und CD 105, welche bei uns dennoch exprimiert wurden (Lacerda-Pinheiro et al., 2012). Da die multipotente Progenitorzelllinie bei ihnen negativ für CD90 war, die anderen bereits weiter differenzierten Zellen (unipotente Vorläufer) jedoch positiv, postulierten sie, dass eine Korrelation zwischen der CD90 Expression und dem Potential pulpaler Progenitorzellen zur Differenzierung bestehen könnte (Lacerda-Pinheiro et al., 2012), woraus ich schlussfolgerte, dass es sich auch bei unseren Zellen gegebenenfalls um Progenitorzellen gehandelt haben könnte, welche demnach ein eingeschränktes Differenzierungsvermögen besitzen würden, da unsere Zellen ebenfalls CD90 in hohem Maße exprimierten.

Zur weiteren Charakterisierung führten ich die adipogene, chondrogene und osteogene Induktion der Zellen durch. Ich konnte lediglich die Differenzierungsfähigkeit der Zellen in Osteoblasten, nicht jedoch in Adipozyten und Chondrozyten nachweisen (siehe Kapitel 3.2.3, Abb.10-15, S.64ff.). Während die Oberflächenantigenexpression in der Literatur noch nicht als universal gut charakterisiert gilt, wird die Plastikadhärenz, sowie die Differenzierungsfähigkeit in die drei Hauptkomponenten, als charakteristisch auch für andere Zelllinien, als der Humanen und auch für jene von murinen mesenchymalen Stammzellen beschrieben (Dominici et al., 2006), was zeigt, dass es sich um keine mesenchymalen Stammzellen, sondern um unipotente

Progenitorzellen mit stammzellähnlichen Eigenschaften handelte. Dies würde auch die Schlussfolgerungen von Lacerda-Pinheiro *et al.*, dass es sich in ihren Experimenten um Progenitorzellen handelte, belegen, da auch unsere Zellen mit eingeschränkter Differenzierungsfähigkeit in hohem Maße CD90 exprimierten (Lacerda-Pinheiro *et al.*, 2012).

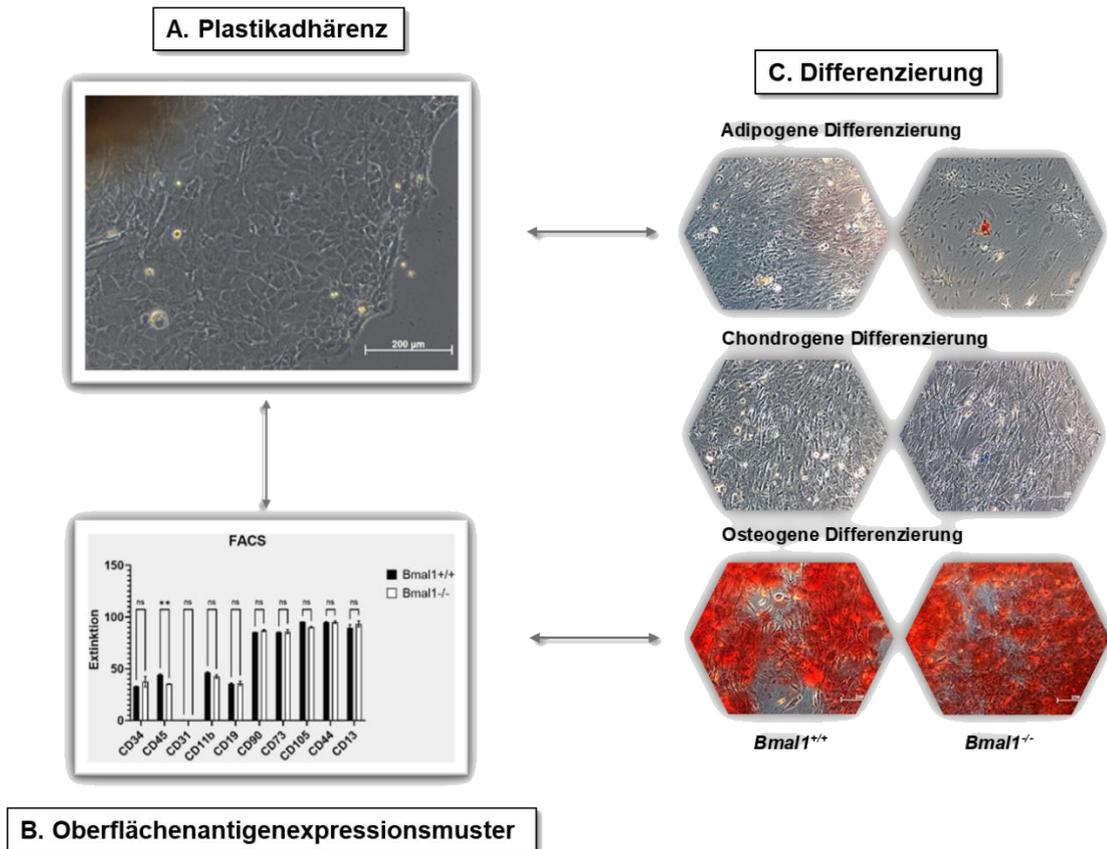


Abb.20: Charakterisierung der isolierten Zellen Die Charakterisierung der murinen pulpalen Zellen aus den OK und UK Inzisivi wurde anhand der Kriterien der ISCT untersucht. Die geforderte Plastikadhärenz wurde bereits bei der erfolgreichen Isolation und Kultivierung nachgewiesen. Das Oberflächenantigenexpressionsmuster zeigte eine höhere Expression der Oberflächenantigene CD90, CD73 und CD105, welche für mesenchymale Stammzellen als charakteristisch gelten, jedoch ebenfalls in geringerem Ausmaß, eine Expression der Oberflächenantigene CD34, CD45, CD11b und CD19. Eine Differenzierung war lediglich osteogen möglich. CD: *Cluster of Differentiation*, **: $p < 0.01$

Um zu belegen, dass die Differenzierung in Adipozyten und Chondrozyten mit den in dieser Dissertation verwendeten Medien möglich ist und somit ein Unvermögen der hier verwendeten Zelllinie zur Adipo- und Chondrogenese darstellte und ihre Unipotenz belegt, wurden die Differenzierungsmedien in der Arbeitsgruppe, in einer bisher noch nicht veröffentlichten anderen Versuchsreihe, durch die Doktorandinnen Isabel Hercher und Paula Starcke an humanen pulpalen Zellen als Kontrolle der Medienwirksamkeit getestet (siehe Abb.21). Hier konnte nachgewiesen werden, dass die Differenzierungsmedien die Fähigkeit besitzen, Zellen erfolgreich osteogen, adipogen und chondrogen induzieren zu können (siehe Abb.21).

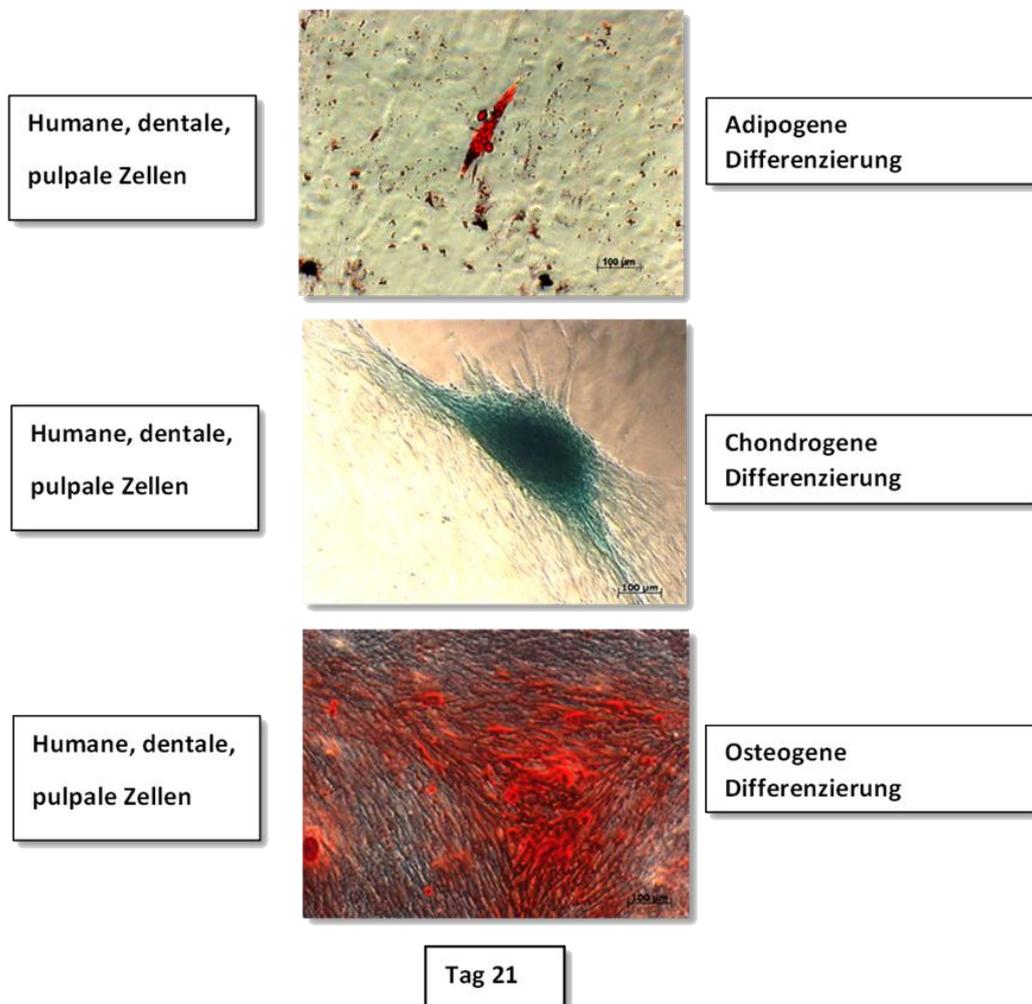


Abb.21: Fotodokumentation nach 21 Tagen adipogener, chondrogener und osteogener Induktion von humanen dentalen pulpalen Zellen. Beispielhafte Fotodokumentation der erfolgreichen Induktion humaner pulpaler Zellen (n=6) nach 21 Tagen adipogener, chondrogener

und osteogener Differenzierung und Färbung mittels Ölrot, Alcianblau und Alizarin-Rot-S. An Tag 21 ist eine deutliche adipogene, chondrogene und osteogene Differenzierung sichtbar.

Die bei unseren Zellen nicht erfolgte Adipogenese wurde mittels Ölrot-Färbung dargestellt (siehe Kapitel 3.2.3.1, Abb.10, S.64). Ölrot wird in der Literatur als geeignet beschrieben, um adipogene Differenzierungen nachzuweisen (Dominici et al., 2006). Es färbt die Triacylglyceride in den Vakuolen von adipogen differenzierten Zellen an. Ihr Nachweis kann damit zur Verifizierung der Adipogenese genutzt werden. Zur Quantifizierung des gebundenen Ölrotes, wurde die Färbung mittels 100 %igem Isopropanol zurückgelöst. Die nachfolgend für die Quantifizierung wichtige spektrometrische Messung der Absorption des Überstandes erfolgte bei 540 nm im Spektrophotometer. Die Menge des rückgelösten Farbstoffes Ölrot der Zellen der *Bmal1^{+/+}*-Tiere und der *Bmal1^{-/-}*-Tiere (siehe Kapitel 3.2.3.1, Abb.11, S.65) wies in Woche 1 zwar eine tendenziell stärkere Färbung der Zellen der *Bmal1^{-/-}*-Tiere als jener, der *Bmal1^{+/+}*-Tiere auf, jedoch war diese statistisch nicht signifikant. In Woche 2 wurden tendenziell sich annähernde Werte zwischen den Genotypen gemessen, jedoch ohne eine Zunahme des gebundenen Farbstoffes Ölrot zu detektieren. Auch in Woche 3 ist keine deutliche Zunahme des eingelagerten Farbstoffes bei beiden Genotypen zu detektieren und es bestehen keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen diesen. Folglich schloss ich daraus, dass, wie auch schon in der mikroskopischen Bildgebung sichtbar, keine adipogene Differenzierung stattgefunden hat, da keine Zunahme des gebundenen Farbstoffes Ölrot zu verzeichnen war. Folglich sind einzelne Ausschläge zu Anfang, sowie auch geringe Färbungen in der mikroskopischen Bildgebung lediglich als Färbeartefakte zu werten.

Die in dieser Versuchsreihe nicht geglückte chondrogene Differenzierung wurde mittels Alcianblau dargestellt (siehe Kapitel 3.2.3.2, Abb.12, S.66). Alcianblau wird in der Literatur als geeignet beschrieben, um die chondrogene Differenzierung darzustellen (Dominici et al., 2006), da es an Glykosaminoglykane der extrazellulären Matrix von Chondrozyten bindet. Ihr Nachweis kann damit zur Verifizierung der Chondrogenese genutzt werden. Mikroskopisch war keine Blaufärbung und somit keine chondrogene

Differenzierung visuell nachweisbar. Um diese Ergebnisse zu verifizieren und den gebundenen Farbstoff zu quantifizieren, wurde der Farbstoff mittels HCL-Isopropanol-Lösung zurückgelöst und die optische Dichte des Überstandes im Photometer bei OD600 gemessen. Bei der Quantifizierung des rückgelösten Farbstoffes Alcianblau (siehe Kapitel 3.2.3.2, Abb.13, S.67), zeigte sich nach einer Woche eine erhöhte Menge des rückgelösten Alcianblaus bei den Zellen der *Bmal1^{+/-}*-Tiere, welche bis Tag 14 zwar zunahm, jedoch bis Tag 21 noch unter den Ausgangswert deutlich zurückging. Bei den Zellen der *Bmal1^{-/-}*-Tiere war ein minimaler Anstieg bis zu Tag 14 zu verzeichnen. An allen 3 Auswertungszeitpunkten nahm die Menge des rückgelösten Farbstoffes der *Bmal1^{-/-}*-Zellen jedoch nicht deutlich zu. In der dritten Woche war bei beiden Gruppen ein Rückgang und sich annähernde Werte zu verzeichnen. Die Unterschiede zwischen den Genotypen waren lediglich zum Auswertungszeitpunkt an Tag 14 in geringem Maße statistisch signifikant, an den anderen Auswertungszeitpunkten bestand hingegen keine Signifikanz. So schlussfolgerte ich, dass keine chondrogene Differenzierung stattgefunden hat, da die Werte der *Bmal1^{+/-}*-Tiere an Tag 21 sogar noch unter jenen von Tag 7 lagen und bei den *Bmal1^{-/-}*-Tieren überhaupt keine deutliche Zunahme des gebundenen Farbstoffes sichtbar war. Mikroskopisch und nach den Rücklösungswerten ist somit kein kontinuierliches und zunehmendes Differenzierungsvermögen bei den Zellen der *Bmal1^{+/-}*-, noch jenen der *Bmal1^{-/-}*-Tiere nachweisbar. Vereinzelt Blaufärbungen in der histologischen Bildgebung, sowie auch der erhöhte Ausschlag der *Bmal1^{+/-}*-Zellen sind somit als Färbeartefakt zu werten.

Die in dieser Versuchsreihe geglückte Osteogenese wurde mittels Alizarin-Rot-S dargestellt (siehe Kapitel 3.2.3.3, Abb.14, S.68). Alizarin-Rot-S wird in der Literatur als geeignet beschrieben, um osteogene Differenzierungen nachzuweisen (Dominici et al., 2006), da es an die Kalziumkristalle in der extrazellulären Matrix bindet, welche den Endpunkt der Osteogenese markieren und somit einen Indikator für die erfolgte osteogene Differenzierung darstellen. Bereits visuell konnte in der mikroskopischen Bildgebung eine geglückte osteogene Differenzierung bei den *Bmal1^{+/-}*-, sowie den *Bmal1^{-/-}*-Zellen verzeichnet werden, welche bei jenen der *Bmal1^{-/-}*-Zellen tendenziell höher war

(siehe Kapitel 3.2.3.3, Abb.14, S.68). Zur Verifizierung dieser Beobachtung und Quantifizierung des gebundenen Farbstoffes, wurde die Menge des vom Kalzium gebundenen Farbstoffes Alizarin-Rot-S mittels 10 %iger Cetylpyridiniumchlorid-Lösung in Aqua dest. zurückgelöst. Die optische Dichte des Überstandes wurde im Photometer bei OD600 gemessen. Eine lineare Zunahme der relativen Kalzifizierung der extrazellulären Matrix war bei den Zellen beider Genotypen kontinuierlich ersichtlich. Diese lag zu jedem Auswertungszeitpunkt zwar tendenziell bei den Zellen der *Bmal1^{-/-}*-Tiere über jener, der *Bmal1^{+/+}*-Tiere, jedoch war dies nicht statistisch signifikant (siehe Kapitel 3.2.3.3, Abb.15, S.69)

Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass sich in der Pulpa neben dentinbildenden Odontoblasten und Fibroblasten auch undifferenzierte Mesenchymzellen, welche als multipotent gelten und zu deren Gruppe auch die pulpalen Stammzellen gehören, befinden (Hellwig et al., 2013). So gelang im Jahre 2000 das erste Mal die Entdeckung humaner pulpaler Stammzellen aus den dritten Molaren von 19-20jährigen Probanden (Gronthos et al., 2000, Gronthos et al., 2002). Humane DPSCs besitzen die Fähigkeit in Osteoblasten, Adipozyten und Chondroblasten zu differenzieren (Nuti et al., 2016). In dieser Versuchsreihe wurde hingegen mit Zellen aus murinen Pulpen gearbeitet. Da die von uns etablierten murinen Zellen zeigten, dass die Zellen eine ausgeprägte Plastikadhärenz aufwiesen, jedoch lediglich die Fähigkeit besaßen, osteogen zu differenzieren und nicht adipogen und chondrogen und sie ebenfalls die für mesenchymale Stammzellen charakteristischen Oberflächenantigene zwar in einem höheren Maße exprimierten, als jene, die mesenchymale Stammzellen nicht aufweisen dürfen, diese jedoch dennoch vorlagen, schlussfolgerte ich, dass es sich bei den murinen Zellen nicht um mesenchymale Stammzellen handelte. Balic *et al.* postulierten, dass dentale Pulpen von nicht durchgebrochenen murinen Molaren keine multipotenten oder MSC-ähnlichen Populationen enthalten könnten und lediglich primäre Progenitorzellen der dentino- und osteogenen Linie mit einem extensiven Mineralisationspotenzial, jedoch ohne die Fähigkeit Adipozyten oder Chondrozyten zu bilden (Balic et al., 2010). Und Balic und Mina beschrieben Primärkulturen aus der Pulpa von nicht durchgebrochenen, sowie auch durchgebrochenen murinen Inzisivi, welche

ebenfalls nicht in der Lage waren adipogen und chondrogen zu differenzieren, jedoch osteogen und schlussfolgerten, dass es sich um Progenitorzellen handelte (Balic and Mina, 2010). In beiden Versuchsreihen erfolgte die Zellgewinnung - anders als in dieser Versuchsreihe - auf enzymatischem Wege (Balic and Mina, 2010, Balic et al., 2010). Yang *et al.* zeigten, dass die multipotente Differenzierung in der *STRO-1+* Population verbleibe, welche 0.5 % der pulpalen Zellen in Ratten bildet (Yang et al., 2007a, Yang et al., 2007b, Yang et al., 2009), woraufhin Balic und Mina schlussfolgerten, dass die Differenzierung einer geringeren MSC-ähnlichen Population in den durchgebrochenen Inzisivzellen gegebenenfalls maskiert werden könnte, durch eine signifikante Nummer von osteo-/dentinogenen Progenitorzellen und gingen somit davon aus, dass murine Inzisivi eine große Population von Progenitorzellen enthalten und wenn überhaupt nur eine geringere Population von Stammzellen (Balic and Mina, 2010). Diese Hypothese konnte auch in unserer Versuchsreihe bei adulten, murinen pulpalen Zellen bestätigt werden, welche ebenfalls nur in der Lage waren, osteogen zu differenzieren und weder adipo-, noch chondrogen, woraus auch ich schlussfolgerte, dass es sich bei den von uns isolierten pulpalen Zellen, um unipotente Progenitorzellen der osteogenen Linie handelte.

Harada und Otsu beschrieben 2019 ein Protokoll für die Kultivierung von dentalen epithelialen Stammzellen bei murinen Inzisivkeimen und postulierten jedoch, dass Zahnkeime 3-7 Tage postnatal am geeignetsten wären (Harada and Otsu, 2019). In unserer Versuchsreihe waren es hingegen bereits Inzisivi adulter Tiere, welche unter Umständen weniger geeignet sein könnten, um mesenchymale Stammzellen zu isolieren, sondern viel mehr die von uns isolierten Progenitorzellen.

Zusammenfassend lässt sich in Bezug auf die erste Zielsetzung eine erfolgreiche Charakterisierung und Kultivierung von unipotenten Progenitorzellen mit einem ausgeprägten osteogenen Differenzierungsvermögen verzeichnen.

Im Folgenden galt es nun weiterführend die Osteogenese dieser Zellen unter dem Aspekt der Deletion von *Bmal1* zu untersuchen (siehe Abb.22, S.88).

Bmal1 gilt als einer der zentralen Transkriptionsfaktoren des molekularen Uhrenwerkes und führt bei seiner Deletion zu einem sofortigen und kompletten Verlust zirkadianer Rhythmik bei Mäusen in konstanter Dunkelheit, sowie zusätzlich zu einer Veränderung der Bewegungsaktivität in LD-Zyklen und Reduzierung des totalen Aktivitätslevels (Lowrey and Takahashi, 2004, Bunger et al., 2000). In der Literatur wurde bisher gezeigt, dass dies in der Folge zu einer Störung und einem Verlust der zirkadianen Funktion und damit einhergehend zu Progerie ähnlichen Entwicklungsverläufen führt, welche mit diversen Pathologien, die mit einer verfrühten Alterung zusammenhängen, in Verbindung stehen (Kondratov et al., 2006).

Es wurde bereits beschrieben, dass *Bmal1 knock-out* Mäuse einen altersabhängigen Muskel- und Knochenverlust aufweisen (Kondratov et al., 2006), welcher als Sarkopenie und Osteoporose ein Kennzeichen des Alterungsprozesses von Säugern darstellt (Weiss et al., 1991, Karakelides and Nair, 2005). Die Literatur zeigte bisher, dass *Bmal1 knock-out* Mäuse *in vivo* einen reduzierten Knochenmassephänotypen besitzen (Samsa et al., 2016, Tsang et al., 2019) und Samsa *et al.* beschrieben in diesem Zusammenhang eine reduzierte Mineralisierung von knochenmarksstämmigen Osteoprogenitorzellen der *Bmal1* defizienten Mäuse im Vergleich zu jener der Wildtypen (Samsa et al., 2016). Mesenchymale Stammzellen des *Bmal1^{-/-}*-Genotypen wiesen eine herabgesetzte Fähigkeit auf, osteogen zu differenzieren *in vitro* und es bestand eine reduzierte Anzahl aktiver Osteoblasten und Osteozyten *in vivo* (Samsa et al., 2016). Dies liegt im Widerspruch zu unseren Ergebnissen der osteogenen Differenzierung *in vitro*, bei welchen die Rücklösungswerte ergaben, dass keine herabgesetzte, sondern eine tendenziell ausgeprägtere osteogene Differenzierungsfähigkeit, wenn auch nicht statistisch signifikant, bei den Zellen der *Bmal1^{-/-}*-Tiere vorzuliegen schien (siehe Abb.22, S.88). In diesem Zusammenhang beschrieben Bunger *et al.* im Jahre 2005 jedoch unterstützenderweise eine Verbindung zwischen *Bmal1* Deletion mit Gelenkankylose aufgrund von Ossifikation der Bänder und Sehnen (Bunger et al., 2005). So ist es weiterführend bekannt, dass eine Inhibition von BMAL1 zu einer Hochregulierung von reaktiven Sauerstoffspezies führt (Kondratov et al., 2006) und Byon *et al.* wiesen wiederum in diesem Zusammenhang nach, dass

oxidativer Stress zur osteogenen Differenzierung und Kalzifizierung der glatten Gefäßmuskelzellen führt, mit der Folge von atherosklerotischen Läsionen (Byon et al., 2008), was ebenfalls ein Erklärungsansatz dafür sein könnte, wieso eine verstärkte Osteogenese nach *Bmal1* Deletion in unserer Versuchsreihe stattfand. So stellten auch Ali et al. 2019 einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten Migrationsgeschwindigkeit von neuronalen Progenitorzellen des *Bmal1*^{-/-}-Genotypen und erhöhtem oxidativen Stress dar (Ali et al., 2019). Weiterführend stellten auch Zhuo et al. heraus, dass die osteogene Differenzierungsfähigkeit von BMSCs erweitert ist nach der Inhibition von *Bmal1* oder *Per2*, was wiederum indiziert, dass *Bmal1* und *Per2* vital negative Rollen in der Regulation der osteogenen Differenzierung von BMSCs besitzen könnten (Zhuo et al., 2018) und was auch unsere Beobachtungen bestätigen würde.

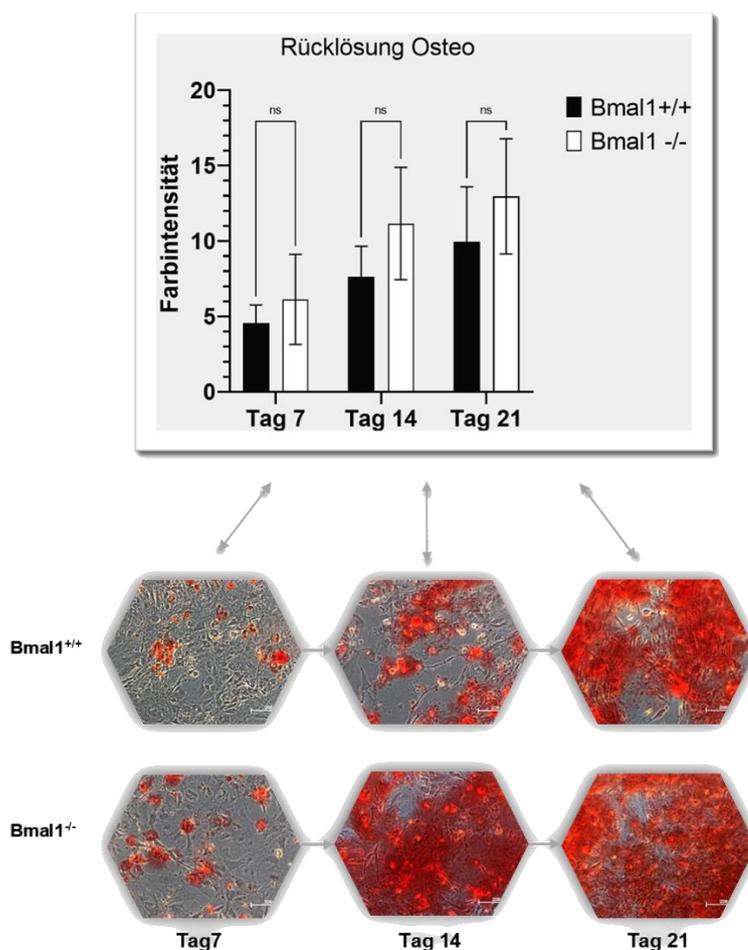


Abb.22: Gegenüberstellung der mikroskopischen Bildgebung und der Rücklösungswerte osteogen differenzierter Zellen der *Bmal1*^{+/+}- & *Bmal1*^{-/-}-Tiere nach Alizarin-Rot-S-Färbung

Mikroskopisch, sowie auch anhand der Rücklösungswerte zeigt die Abbildung bei Zellen beider Genotypen eine kontinuierliche Zunahme der osteogenen Differenzierung von Tag 7 bis Tag 21. Die quantifizierte Menge des eingelagerte Alizarin-Rot-S lag an allen Auswertungszeitpunkten bei den Zellen der *Bmal1^{-/-}*-Tiere tendenziell, jedoch statistisch nicht signifikant (ns), über jener, der *Bmal1^{+/+}*-Tiere.

Zur Verifizierung der bisherigen Ergebnisse und zum Nachweis der osteogenen Differenzierung auf molekularer Ebene sollten die Proteine BMP2, Osterix, Osteocalcin und Osteopontin mittels Western Blot nachgewiesen werden (siehe Kapitel 3.3, Abb.16-19, S.71-76).

Bone morphogenetic proteins (BMPs) sind für die Osteogenese entscheidend, indem sie die Differenzierung von Osteoprogenitorzellen in reife Osteoblasten stimulieren und nicht-osteogene Zellen zur Differenzierung in Zellen mit osteoblastärer Abstammung induzieren (Wu and Lu, 2008, Wang et al., 1993, Nakamura et al., 2005, Gersbach et al., 2007, Yamaguchi et al., 1991).

Es wurde ersichtlich, dass die Zellen der *Bmal1^{+/+}*-Tiere eine gesteigerte BMP2 Expression ab Tag 9 zeigten, welche fortlaufenden in geringem Maße bis Tag 15 wiederum abnahm. Die Zellen der *Bmal1^{-/-}*-Tiere zeigten einen fortlaufenden Anstieg der BMP2 Expression bis Tag 12, welcher daraufhin bis Tag 15 wieder abnahm. Zu jedem dieser Auswertungszeitpunkte, war die Expression von BMP2 der Zellen der *Bmal1^{-/-}*-Tiere, jener der *Bmal1^{+/+}*-Tiere statistisch mit ausgeprägter Signifikanz überlegen (siehe Kapitel 3.3, Abb.16, S.71), was die aus den vorherigen Ergebnissen resultierende Vermutung einer gesteigerten Osteogenese der Zellen der *Bmal1^{-/-}*-Genotypen unterstützt. Dies wurde bereits in einem anderen Zusammenhang in der Literatur von Qian *et al.* 2020 beschrieben, welche darlegten, dass eine Deletion von *Bmal1* in Osteoblasten zu einer erhöhten trabekularen Osteoblastenaktivität durch die Aktivierung des BMP2/SMAD1 Signalweges durch eine Förderung der *Bmp2* Expression und Phosphorylierung von SMAD1 führte und wiederum in einer erhöhten trabekularen Knochenmasse in jungen adulten Mäusen resultierte (Qian et al., 2020). In diesem Zusammenhang wurde postuliert, dass *Bmal1* ein Inhibitor von *Bmp2* zu sein scheint, welcher den *Bmp2*-promoter tangiert (Qian

et al., 2020). Dies stützt auch unsere Ergebnisse, welche eine erhöhte Proteinexpression von BMP2 nach *Bmal1* Deletion darlegen.

Verfolgt man die Signalkaskade weiter, so ist *Dlx5* das erste Ziel der BMP-2 aktivierten R-Smads und reguliert die Expression der Transkriptionsfaktoren Runx2/Cbfa1 und Osterix (Nakashima et al., 2002). Western Blots zum Nachweis des osteogenen Markerproteins Osterix (siehe Kapitel 3.3, Abb.17, S.73) zeigten, dass die Expression dieses Proteins in den Zellen der *Bmal1*^{+/+}-Tiere bis zu Tag 9 fortlaufenden anstieg, hieraufhin jedoch kontinuierlich bis Tag 15 wiederum abnahm. Der Höhepunkt der Expression war an Tag 9 erreicht und überstieg hier die Expression von Osterix in den Zellen der *Bmal1*^{-/-}-Tiere in statistisch ausgeprägt signifikanter Weise. Bei Zellen der *Bmal1*^{-/-}-Genotypen war ein fortlaufender Anstieg der Expression bis Tag 12 zu verzeichnen, welcher an Tag 12 seinen Höhepunkt erreichte und hieraufhin wieder bis zu Tag 15 abnahm. Bis auf den Auswertungszeitpunkt an Tag 9 war die Expression von Osterix in den Zellen der *Bmal1*^{-/-}-Tiere, jener der in den *Bmal1*^{+/+}-Tieren überlegen, jedoch war dies lediglich an Tag 12 ausgeprägt statistisch signifikant zu vermerken. Auch diese Beobachtungen bestätigen die oben aufgeführten Hypothesen, da Osterix, BMP2 in der Signalkaskade untergestellt ist und eine gesteigerte BMP2 Expression, somit auch positiv auf Osterix Einfluss nehmen würde, was die tendenziell und teilweise auch signifikant gesteigerten Werte der *Bmal1*^{-/-}-Tiere erklären würde.

Bezugnehmend auf die BMP/SMAD-Signalkaskade zeigt die Literatur, dass *Dlx5* keine signifikante Transkriptionsaktivatorfunktion in Bezug auf Osteocalcin besitzt, jedoch desuppressiert es den basalen Osteocalcin-Promotor in calvarialen Osteoblasten durch Antagonisierung von *Msx2* (Newberry et al., 1998). Bei den Zellen der *Bmal1*^{+/+}-Tiere war eine Zunahme der Expression von Osteocalcin erst moderat an Tag 9 ersichtlich, welche daraufhin jedoch wieder abnahm. Die Zellen der *Bmal1*^{-/-}-Mäuse zeigten einen fortlaufenden Anstieg der Expression von Osteocalcin, welcher einen Höhepunkt an Tag 12 erreichte und darauf wieder abnahm. Zu jedem Zeitpunkt war die Expression von Osteocalcin bei den Zellen der *Bmal1*^{-/-}-Tiere jener, der *Bmal1*^{+/+}-Tiere überlegen (siehe Kapitel 3.3, Abb.18, S.74/75). Dies war an Tag 3, 6, 12 und 15 statistisch signifikant. Dabei war die Signifikanz ausgeprägt an den Auswertungszeitpunkten Tag 12 und 15 und mehr noch an Tag 12. Geringe

Signifikanz war an Tag 3 und die geringste an Tag 6 zu verzeichnen. Da Osteocalcin in der Signalkaskade später geschaltet ist, würde dies die starke Zunahme erst gegen Tag 9 und 12 erklären. Die hier beobachtete erhöhte Osteocalcinexpression der Zellen der *Bmal1^{-/-}*-Genotypen wurde in der Literatur bereits von Bunker *et al.* beschrieben, welche eine *Bmal1*-Deletion in Mäusen und einen erhöhten Osteocalcinspiegel in Zusammenhang mit Gelenkankylosen feststellten (Bunker *et al.*, 2005).

Neben Osteocalcin, gilt auch Osteopontin als eines der Haupt- nicht-kollagenen Proteine, welches eine Schlüsselrolle in der biologischen, sowie der mechanischen Funktion des Knochens spielt und dessen Größe, Form und Stärke bestimmt (Bailey *et al.*, 2017). Western Blots zum Nachweis des osteogenen Markerproteins Osteopontin (siehe Kapitel 3.3, Abb.19, S.76) zeigten bei den Zellen der *Bmal1^{-/-}*-Tiere eine Zunahme, die an Tag 9 das Maximum der Proteinexpression erreichte, bis Tag 12 wieder abnahm und an Tag 15 wieder leicht zunahm. Bei den Zellen der *Bmal1^{+/+}*-Tiere war erst an Tag 15 eine Zunahme der Proteinexpression zu verzeichnen, welche jedoch die maximale Proteinkonzentration der Zellen der *Bmal1^{-/-}*-Genotypen an Tag 9 überstieg. An den Auswertungszeitpunkten Tag 6, 9 und 12 zeigte die Expression von Osteopontin der Zellen der *Bmal1^{-/-}*-Tiere signifikant höhere Werte als bei den Zellen der *Bmal1^{+/+}*-Tiere. Diese waren an Tag 6 ausgeprägt signifikant und nahmen bis Tag 12 in ihrer Signifikanz ab. An Tag 15 zeigten die Zellen der *Bmal1^{+/+}*-Tiere signifikant höhere Werte, als jene der *Bmal1^{-/-}*-Tiere, welche in der Signifikanz simultan zu Tag 9 der *Bmal1^{-/-}*-Tiere lagen. Die Literatur beschrieb bereits, dass Osteopontin, wie auch Osteocalcin im späten Mineralisationsprozess der Knochenbildung produziert werden (Bailey *et al.*, 2017), was einen Erklärungsansatz dafür bildet, wieso auch in dieser Versuchsreihe die Expression von Osteopontin, vor allem bei den Zellen der *Bmal1^{+/+}*-Genotypen, erst zu einem späteren Auswertungszeitpunkt deutlich wurde.

Molekular ließ sich folglich die Osteogenese anhand der Proteine BMP-2, Osterix, Osteocalcin und Osteopontin nachweisen. Hierbei zeigten die Zellen der

Bmal1^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu jener, der *Bmal1*^{+/+}-Genotypen, keine herabgesetzte Differenzierungsfähigkeit und in Bezug auf die Expression von BMP2 und Osteocalcin sogar eine erhöhte Expression. Hinsichtlich der Expression der Proteine Osterix und Osteopontin zeigten sie tendenziell ausgeprägtere Werte. Die Zellen der *Bmal1*^{-/-}- Tiere wiesen auf molekularer Ebene somit keine Einschränkung ihrer osteogenen Differenzierungsfähigkeit auf.

In dieser Versuchsreihe war die Charakterisierung von murinen pulpalen unipotenten Progenitorzellen, die zur Osteogenese fähig sind, mittels Fragmentierung erfolgreich. Es konnte gezeigt werden, dass die osteogene Differenzierungsfähigkeit dieser murinen pulpalen Progenitorzellen nach Deletion von *Bmal1* nicht eingeschränkt und in Teilen sogar signifikant jener, von Zellen der *Bmal1*^{+/+}-Genotypen, überlegen war.

4.1 Schlussfolgerung: Kritische Begutachtung der Ergebnisse und klinische Verwendbarkeit

Der Knochenverlust stellt in der heutigen Zeit eines der herausforderndsten Probleme der Zahnheilkunde dar. Knochenverlust, welcher wiederum mit Zahnverlust einhergeht, führt zwangsläufig zu einer Einschränkung der Kaufunktion, der Aussprach, der Ästhetik und so auch der mentalen Gesundheit. (Wang et al., 2020) So wurde bereits beobachtet, dass nach einer Zahnextraktion die Heilung der Extraktionsalveole zumeist zu einem Höhen- und Weitenverlust des Alveolarknochens führt, was wiederum die dentale Ästhetik und Stabilität von Implantaten beeinflusst (Yang et al., 2020, Araújo et al., 2015, Serino et al., 2003, Meccall and Rosenfeld, 1991, Van der Weijden et al., 2009). Die osteogene Differenzierungsfähigkeit von dentalen Stammzellen ist in diesem Zusammenhang entscheidend für ihren Einsatz in der Knochenregeneration und

wurde von diversen Studien belegt (Wang et al., 2020, Ge et al., 2020, Papaccio et al., 2006, Yasui et al., 2017, Stovall et al., 2020). Aufgrund dessen wurde die Fähigkeit von DSCs (vor allem DPSCs) knochenähnliches Gewebe zu bilden und Knochendefekte zu reparieren für die Forschung zunehmend von entscheidender Bedeutung (Laino et al., 2006, Fu et al., 2014, d'Aquino et al., 2009, Aimetti et al., 2014, Laino et al., 2005). So können mesenchymale Stammzellen aus dentalen Geweben dazu genutzt werden, neuen Knochen für die Regeneration orofazialer Knochenstrukturen zu bilden oder um diese zu unterstützen (Liu et al., 2015, Honda et al., 2010, Nuti et al., 2016, d'Aquino et al., 2009). D'Aquino *et al.* erreichten in diesem Zusammenhang als Erste eine humane autologe Knochenregeneration in der Mandibula mit der Hilfe dentaler pulpaler Stammzellen (d'Aquino et al., 2009). Bereits Morszeck *et al.* postulierten, dass Zahnfollikel abgeleitet von humanen Weisheitszähnen eine rationale Quelle für Vorläuferzellen für PDL-FB, Zementoblasten und Osteoblasten für den Alveolarknochen darstellen (Morszeck et al., 2005). Da die von uns gewonnenen Progenitorzellen ebenfalls ein ausgeprägtes osteogenes Differenzierungsverhalten aufweisen, könnten sie somit für weitere Forschungen zur regenerativen Zahnheilkunde genutzt werden, weshalb die Isolation und Kultivierung für zukünftige Versuchsreihen in dieser Arbeit dargelegt wurde. Auf längere Sicht wären Studien zur autologen Knochenregeneration mit Progenitorzellen somit denkbar.

In der Literatur ist bereits bekannt, dass *Bmal1* einer der zentralen Transkriptionsfaktoren des molekularen Uhrenwerkes ist und bei seiner Deletion unter anderem zu einem sofortigen und kompletten Verlust zirkadianer Rhythmik bei Mäusen in konstanter Dunkelheit führt (Lowrey and Takahashi, 2004, Bunger et al., 2000). Die Deletion von *Bmal1* führte in dieser Versuchsreihe zu keiner Einschränkung der osteogenen Differenzierungsfähigkeit von murinen pulpalen Zellen von Genotypen, welche unter LD-Verhältnissen gehalten wurden und zeigte sogar ein in Teilen signifikant gesteigertes, osteogenes Differenzierungsvermögen. In der vorliegenden Arbeit wurde im Hinblick auf *Bmal1* somit das molekulare Uhrenwerk betrachtet. Zukünftige Studien könnten nun eine Störung der Zirkadianik, hervorgerufen durch eine Haltung der Tiere unter Dauerlicht/-dunkelbedingungen vorsehen, um zu untersuchen, ob eine

solche Störung der zirkadianen Rhythmik ähnliche Einflüsse auf das osteogene Differenzierungsverhalten der pulpalen Progenitorzellen nimmt. Auf längere Sicht wären darauffolgend Studien mit humanen pulpalen Zellen, deren Spender einer gestörten zirkadianen Rhythmik unterliegen (bspw. durch Jetlag oder Schichtarbeit) denkbar.

5 Literaturverzeichnis

- AIMETTI, M., FERRAROTTI, F., CRICENTI, L., MARIANI, G. M. & ROMANO, F. 2014. Autologous dental pulp stem cells in periodontal regeneration: a case report. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 34 Suppl 3, s27-33.
- ALI, A. A. H., SCHWARZ-HERZKE, B., MIR, S., SAHLENDER, B., VICTOR, M., GÖRG, B., SCHMUCK, M., DACH, K., FRITSCH, E., KREMER, A. & VON GALL, C. 2019. Deficiency of the clock gene *Bmal1* affects neural progenitor cell migration. *Brain Struct Funct*, 224, 373-386.
- AMBROSI, T. H., SCIALDONE, A., GRAJA, A., GOHLKE, S., JANK, A. M., BOCIAN, C., WOELK, L., FAN, H., LOGAN, D. W., SCHÜRMAN, A., SARAIVA, L. R. & SCHULZ, T. J. 2017. Adipocyte Accumulation in the Bone Marrow during Obesity and Aging Impairs Stem Cell-Based Hematopoietic and Bone Regeneration. *Cell Stem Cell*, 20, 771-784.e6.
- ARAÚJO, M. G., SILVA, C. O., MISAWA, M. & SUKEKAVA, F. 2015. Alveolar socket healing: what can we learn? *Periodontol 2000*, 68, 122-34.
- AUGELLO, A., KURTH, T. B. & DE BARI, C. 2010. Mesenchymal stem cells: a perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niches. *Eur Cell Mater*, 20, 121-33.
- AUMÜLLER, G., AUST, G., DOLL, A., ENGELE, J., KIRSCH, J., MENSE, S., REIßIG, D., SALVETTER, J., SCHMIDT, W., SCHMITZ, F., SCHULTE, E., SPANEL-BOROWSKI, K., WOLFF, W., WURZINGER, L. J. & ZILCH, H.-G. 2010. Duale Reihe Anatomie 2, 45-52.
- BAILEY, S., KARSENTY, G., GUNDBERG, C. & VASHISHTH, D. 2017. Osteocalcin and osteopontin influence bone morphology and mechanical properties. *Ann N Y Acad Sci*, 1409, 79-84.
- BALABAN, R. S., NEMOTO, S. & FINKEL, T. 2005. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*, 120, 483-95.
- BALIC, A. 2019. Isolation of Dental Stem Cell-Enriched Populations from Continuously Growing Mouse Incisors. *Methods Mol Biol*, 1922, 29-37.
- BALIC, A., AGUILA, H. L., CAIMANO, M. J., FRANCONI, V. P. & MINA, M. 2010. Characterization of stem and progenitor cells in the dental pulp of erupted and unerupted murine molars. *Bone*, 46, 1639-51.
- BALIC, A. & MINA, M. 2010. Characterization of progenitor cells in pulps of murine incisors. *J Dent Res*, 89, 1287-92.
- BERESFORD, J. N., GRAVES, S. E. & SMOOTHY, C. A. 1993. Formation of mineralized nodules by bone derived cells in vitro: a model of bone formation? *Am J Med Genet*, 45, 163-78.
- BLAIR, H. C., LARROUTURE, Q. C., LI, Y., LIN, H., BEER-STOLTZ, D., LIU, L., TUAN, R. S., ROBINSON, L. J., SCHLESINGER, P. H. & NELSON, D. J. 2017. Osteoblast Differentiation and Bone Matrix Formation In Vivo and In Vitro. *Tissue Eng Part B Rev*, 23, 268-280.
- BÖHMER, E. 2015. *Dentistry in rabbits and rodents* Chichester, West Sussex, John Wiley & Sons, Ltd. Authorized translation from the German language edition published by Schattauer GmbH in 2011.
- BOSKEY, A. L., GADALETA, S., GUNDBERG, C., DOTY, S. B., DUCY, P. & KARSENTY, G. 1998. Fourier transform infrared microspectroscopic analysis of bones of osteocalcin-deficient mice provides insight into the function of osteocalcin. *Bone*, 23, 187-96.
- BOZDAĞ, S. C., YÜKSEL, M. K. & DEMIRER, T. 2018. Adult Stem Cells and Medicine. *Adv Exp Med Biol*, 1079, 17-36.
- BRUDERER, M., RICHARDS, R. G., ALINI, M. & STODDART, M. J. 2014. Role and regulation of *RUNX2* in osteogenesis. *Eur Cell Mater*, 28, 269-86.
- BUNGER, M. K., WALISSER, J. A., SULLIVAN, R., MANLEY, P. A., MORAN, S. M., KALSCHUR, V. L., COLMAN, R. J. & BRADFIELD, C. A. 2005. Progressive arthropathy in mice with a targeted disruption of the *Mop3/Bmal-1* locus. *Genesis*, 41, 122-32.

-
- BUNGER, M. K., WILSBACHER, L. D., MORAN, S. M., CLENDENIN, C., RADCLIFFE, L. A., HOGENESCH, J. B., SIMON, M. C., TAKAHASHI, J. S. & BRADFIELD, C. A. 2000. Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. *Cell*, 103, 1009-17.
- BYON, C. H., JAVED, A., DAI, Q., KAPPES, J. C., CLEMENS, T. L., DARLEY-USMAR, V. M., MCDONALD, J. M. & CHEN, Y. 2008. Oxidative stress induces vascular calcification through modulation of the osteogenic transcription factor Runx2 by AKT signaling. *J Biol Chem*, 283, 15319-27.
- CAMARGO, W. A., DE VRIES, R., VAN LUIJK, J., HOEKSTRA, J. W., BRONKHORST, E. M., JANSEN, J. A. & VAN DEN BEUCKEN, J. 2017. Diabetes Mellitus and Bone Regeneration: A Systematic Review and Meta-Analysis of Animal Studies. *Tissue Eng Part B Rev*, 23, 471-479.
- CHEN, M. J., WHITELEY, J. P., PLEASE, C. P., SCHWAB, A., EHLICKE, F., WATERS, S. L. & BYRNE, H. M. 2018. Inducing chondrogenesis in MSC/chondrocyte co-cultures using exogenous TGF- β : a mathematical model. *J Theor Biol*, 439, 1-13.
- CHEN, X. Y., XU, S. Z., WANG, X. W., YANG, X. Y., MA, L., ZHANG, L., YANG, G. J., YANG, F., WANG, L. H., ZHANG, X. L., TING, K., GAO, C. Y., MOU, X. Z., GOU, Z. R. & ZOU, H. 2017. Systematic comparison of biologically active foreign ions-codoped calcium phosphate microparticles on osteogenic differentiation in rat osteoporotic and normal mesenchymal stem cells. *Oncotarget*, 8, 36578-36590.
- D'AQUINO, R., DE ROSA, A., LANZA, V., TIRINO, V., LAINO, L., GRAZIANO, A., DESIDERIO, V., LAINO, G. & PAPACCIO, G. 2009. Human mandible bone defect repair by the grafting of dental pulp stem/progenitor cells and collagen sponge biocomplexes. *Eur Cell Mater*, 18, 75-83.
- DE KOK, I. J., DRAPEAU, S. J., YOUNG, R. & COOPER, L. F. 2005. Evaluation of mesenchymal stem cells following implantation in alveolar sockets: a canine safety study. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 20, 511-8.
- DE MIGUEL, M. P., FUENTES-JULIÁN, S. & ALCAINA, Y. 2010. Pluripotent stem cells: origin, maintenance and induction. *Stem Cell Rev Rep*, 6, 633-49.
- DOMINICI, M., LE BLANC, K., MUELLER, I., SLAPER-CORTENBACH, I., MARINI, F., KRAUSE, D., DEANS, R., KEATING, A., PROCKOP, D. & HORWITZ, E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8, 315-7.
- DUCY, P. & KARSENTY, G. 1995. Two distinct osteoblast-specific cis-acting elements control expression of a mouse osteocalcin gene. *Mol Cell Biol*, 15, 1858-69.
- DUCY, P., ZHANG, R., GEOFFROY, V., RIDALL, A. L. & KARSENTY, G. 1997. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*, 89, 747-54.
- FARGES, J. C., ROMEAS, A., MELIN, M., PIN, J. J., LEBECQUE, S., LUCCHINI, M., BLEICHER, F. & MAGLOIRE, H. 2003. TGF-beta1 induces accumulation of dendritic cells in the odontoblast layer. *J Dent Res*, 82, 652-6.
- FATHERAZI, S., MATSA-DUNN, D., FOSTER, B. L., RUTHERFORD, R. B., SOMERMAN, M. J. & PRESLAND, R. B. 2009. Phosphate regulates osteopontin gene transcription. *J Dent Res*, 88, 39-44.
- FERNANDES, G. & YANG, S. 2016. Application of platelet-rich plasma with stem cells in bone and periodontal tissue engineering. *Bone Res*, 4, 16036.
- FOSTER, B. L., NOCITI, F. H., JR., SWANSON, E. C., MATSA-DUNN, D., BERRY, J. E., CUPP, C. J., ZHANG, P. & SOMERMAN, M. J. 2006. Regulation of cementoblast gene expression by inorganic phosphate in vitro. *Calcif Tissue Int*, 78, 103-12.
- FRANCESCHI, R. T., GE, C., XIAO, G., ROCA, H. & JIANG, D. 2007. Transcriptional regulation of osteoblasts. *Ann N Y Acad Sci*, 1116, 196-207.
- FRANCESCHI, R. T. & IYER, B. S. 1992. Relationship between collagen synthesis and expression of the osteoblast phenotype in MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res*, 7, 235-46.

- FRANCESCHI, R. T., IYER, B. S. & CUI, Y. 1994. Effects of ascorbic acid on collagen matrix formation and osteoblast differentiation in murine MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res*, 9, 843-54.
- FU, X., JIN, L., MA, P., FAN, Z. & WANG, S. 2014. Allogeneic stem cells from deciduous teeth in treatment for periodontitis in miniature swine. *J Periodontol*, 85, 845-51.
- GAUR, T., LENGNER, C. J., HOVHANNISYAN, H., BHAT, R. A., BODINE, P. V., KOMM, B. S., JAVED, A., VAN WIJNEN, A. J., STEIN, J. L., STEIN, G. S. & LIAN, J. B. 2005. Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. *J Biol Chem*, 280, 33132-40.
- GE, X., LI, Z., JING, S., WANG, Y., LI, N., LU, J. & YU, J. 2020. Parathyroid hormone enhances the osteo/odontogenic differentiation of dental pulp stem cells via ERK and P38 MAPK pathways. *J Cell Physiol*, 235, 1209-1221.
- GEOFFROY, V., KNEISSEL, M., FOURNIER, B., BOYDE, A. & MATTHIAS, P. 2002. High bone resorption in adult aging transgenic mice overexpressing cbfa1/runx2 in cells of the osteoblastic lineage. *Mol Cell Biol*, 22, 6222-33.
- GERSBACH, C. A., GULDBERG, R. E. & GARCÍA, A. J. 2007. In vitro and in vivo osteoblastic differentiation of BMP-2- and Runx2-engineered skeletal myoblasts. *J Cell Biochem*, 100, 1324-36.
- GIBON, E., LU, L. & GOODMAN, S. B. 2016. Aging, inflammation, stem cells, and bone healing. *Stem Cell Res Ther*, 7, 44.
- GRONTHOS, S., BRAHIM, J., LI, W., FISHER, L. W., CHERMAN, N., BOYDE, A., DENBESTEN, P., ROBEY, P. G. & SHI, S. 2002. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res*, 81, 531-5.
- GRONTHOS, S., MANKANI, M., BRAHIM, J., ROBEY, P. G. & SHI, S. 2000. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 13625-30.
- GURRIARÁN-RODRÍGUEZ, U., AL-MASSADI, O., ROCA-RIVADA, A., CRUJEIRAS, A. B., GALLEGO, R., PARDO, M., SEOANE, L. M., PAZOS, Y., CASANUEVA, F. F. & CAMIÑA, J. P. 2011. Obestatin as a regulator of adipocyte metabolism and adipogenesis. *J Cell Mol Med*, 15, 1927-40.
- HAMIDOUCHE, Z., HAË, E., VAUDIN, P., CHARBORD, P., SCHÜLE, R., MARIE, P. J. & FROMIGUÉ, O. 2008. FHL2 mediates dexamethasone-induced mesenchymal cell differentiation into osteoblasts by activating Wnt/beta-catenin signaling-dependent Runx2 expression. *Faseb j*, 22, 3813-22.
- HARADA, H., KETTUNEN, P., JUNG, H. S., MUSTONEN, T., WANG, Y. A. & THESLEFF, I. 1999. Localization of putative stem cells in dental epithelium and their association with Notch and FGF signaling. *J Cell Biol*, 147, 105-20.
- HARADA, H. & OTSU, K. 2019. Microdissection and Isolation of Mouse Dental Epithelial Cells of Continuously Growing Mouse Incisors. *Methods Mol Biol*, 1922, 3-11.
- HARRISON, D. E. & ARCHER, J. R. 1988. Biomarkers of aging: tissue markers. Future research needs, strategies, directions and priorities. *Exp Gerontol*, 23, 309-25.
- HASSAN, M. Q., JAVED, A., MORASSO, M. I., KARLIN, J., MONTECINO, M., VAN WIJNEN, A. J., STEIN, G. S., STEIN, J. L. & LIAN, J. B. 2004. Dlx3 transcriptional regulation of osteoblast differentiation: temporal recruitment of Msx2, Dlx3, and Dlx5 homeodomain proteins to chromatin of the osteocalcin gene. *Mol Cell Biol*, 24, 9248-61.
- HELLWIG, E., KLIMEK, J. & ATTIN, T. 2013. Einführung in die Zahnerhaltung: Prüfungswissen Kariologie, Endodontologie und Parodontologie. 6., überarb. Auflage. Dt. Zahnärzte-Verl., Köln, 3-14; 323-328.
- HONDA, M. J., IMAIZUMI, M., TSUCHIYA, S. & MORSCZECK, C. 2010. Dental follicle stem cells and tissue engineering. *J Oral Sci*, 52, 541-52.
- HONG, D., CHEN, H. X., XUE, Y., LI, D. M., WAN, X. C., GE, R. & LI, J. C. 2009. Osteoblastogenic effects of dexamethasone through upregulation of TAZ expression in rat mesenchymal stem cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 116, 86-92.

-
- IDA-YONEMOCHI, H., NAKATOMI, M. & OHSHIMA, H. 2014. Establishment of in vitro culture system for evaluating dentin-pulp complex regeneration with special reference to the differentiation capacity of BrdU label-retaining dental pulp cells. *Histochem Cell Biol*, 142, 323-33.
- ILANCHERAN, S., MOODLEY, Y. & MANUELPILLAI, U. 2009. Human fetal membranes: a source of stem cells for tissue regeneration and repair? *Placenta*, 30, 2-10.
- JIN, X., SHEARMAN, L. P., WEAVER, D. R., ZYLKA, M. J., DE VRIES, G. J. & REPERT, S. M. 1999. A molecular mechanism regulating rhythmic output from the suprachiasmatic circadian clock. *Cell*, 96, 57-68.
- KARAKELIDES, H. & NAIR, K. S. 2005. Sarcopenia of aging and its metabolic impact. *Curr Top Dev Biol*, 68, 123-48.
- KATAGIRI, T. & TAKAHASHI, N. 2002. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Dis*, 8, 147-59.
- KHOSLA, S. 2001. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology*, 142, 5050-5.
- KIM, B. C., BAE, H., KWON, I. K., LEE, E. J., PARK, J. H., KHADEMHOSEINI, A. & HWANG, Y. S. 2012. Osteoblastic/cementoblastic and neural differentiation of dental stem cells and their applications to tissue engineering and regenerative medicine. *Tissue Eng Part B Rev*, 18, 235-44.
- KIM, Y. J., LEE, M. H., WOZNEY, J. M., CHO, J. Y. & RYOO, H. M. 2004. Bone morphogenetic protein-2-induced alkaline phosphatase expression is stimulated by Dlx5 and repressed by Msx2. *J Biol Chem*, 279, 50773-80.
- KITAZAWA, R., KITAZAWA, S. & MAEDA, S. 1999. Promoter structure of mouse RANKL/TRANSC/OPGL/ODF gene. *Biochim Biophys Acta*, 1445, 134-41.
- KOLIOS, G. & MOODLEY, Y. 2013. Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration*, 85, 3-10.
- KOMORI, T., YAGI, H., NOMURA, S., YAMAGUCHI, A., SASAKI, K., DEGUCHI, K., SHIMIZU, Y., BRONSON, R. T., GAO, Y. H., INADA, M., SATO, M., OKAMOTO, R., KITAMURA, Y., YOSHIKI, S. & KISHIMOTO, T. 1997. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*, 89, 755-64.
- KONDRATOV, R. V., KONDRATOVA, A. A., GORBACHEVA, V. Y., VYKHOVANETS, O. V. & ANTOCH, M. P. 2006. Early aging and age-related pathologies in mice deficient in BMAL1, the core component of the circadian clock. *Genes Dev*, 20, 1868-73.
- KORF, H.-W. & STEHLE, J. 2005. Das circadiane System der Säugetiere- integraler Bestandteil des neuroendokrinen Systems. *Endokrinologie II, Vorträge im Rahmen des Projekts "Zeitstrukturen endokriner Systeme" Sächsische Akademie der Wissenschaften zu Leipzig. Hirzel Verlag, Stuttgart*, 9-31.
- KRETZSCHMAR, M. & MASSAGUÉ, J. 1998. SMADs: mediators and regulators of TGF-beta signaling. *Curr Opin Genet Dev*, 8, 103-11.
- LACERDA-PINHEIRO, S., DIMITROVA-NAKOV, S., HARICHANE, Y., SOUYRI, M., PETIT-COCAULT, L., LEGRÈS, L., MARCHADIER, A., BAUDRY, A., RIBES, S., GOLDBERG, M., KELLERMANN, O. & POLIARD, A. 2012. Concomitant multipotent and unipotent dental pulp progenitors and their respective contribution to mineralised tissue formation. *Eur Cell Mater*, 23, 371-86.
- LAINO, G., CARINCI, F., GRAZIANO, A., D'AQUINO, R., LANZA, V., DE ROSA, A., GOMBOS, F., CARUSO, F., GUIDA, L., RULLO, R., MENDITTI, D. & PAPACCIO, G. 2006. In vitro bone production using stem cells derived from human dental pulp. *J Craniofac Surg*, 17, 511-5.
- LAINO, G., D'AQUINO, R., GRAZIANO, A., LANZA, V., CARINCI, F., NARO, F., PIROZZI, G. & PAPACCIO, G. 2005. A new population of human adult dental pulp stem cells: a useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB). *J Bone Miner Res*, 20, 1394-402.

-
- LANGENBACH, F. & HANDSCHEL, J. 2013. Effects of dexamethasone, ascorbic acid and β -glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro. *Stem Cell Res Ther*, 4, 117.
- LIU, F., VENTURA, F., DOODY, J. & MASSAGUÉ, J. 1995. Human type II receptor for bone morphogenic proteins (BMPs): extension of the two-kinase receptor model to the BMPs. *Mol Cell Biol*, 15, 3479-86.
- LIU, J., YU, F., SUN, Y., JIANG, B., ZHANG, W., YANG, J., XU, G. T., LIANG, A. & LIU, S. 2015. Concise reviews: Characteristics and potential applications of human dental tissue-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 33, 627-38.
- LOWREY, P. L. & TAKAHASHI, J. S. 2004. Mammalian circadian biology: elucidating genome-wide levels of temporal organization. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 5, 407-41.
- LÜLLMANN-RAUCH, R. & PAULSEN, F. 2012. Taschenlehrbuch Histologie. 4, 165-174; 632.
- MAGLOIRE, H., JOFFRE, A. & BLEICHER, F. 1996. An in vitro model of human dental pulp repair. *J Dent Res*, 75, 1971-8.
- MARONDE, E., SCHILLING, A. F., SEITZ, S., SCHINKE, T., SCHMUTZ, I., VAN DER HORST, G., AMLING, M. & ALBRECHT, U. 2010. The clock genes Period 2 and Cryptochrome 2 differentially balance bone formation. *PLoS One*, 5, e11527.
- MASSAGUÉ, J. 1998. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem*, 67, 753-91.
- MASSAGUÉ, J. & CHEN, Y. G. 2000. Controlling TGF-beta signaling. *Genes Dev*, 14, 627-44.
- MATSUBARA, T., SUARDITA, K., ISHII, M., SUGIYAMA, M., IGARASHI, A., ODA, R., NISHIMURA, M., SAITO, M., NAKAGAWA, K., YAMANAKA, K., MIYAZAKI, K., SHIMIZU, M., BHAWAL, U. K., TSUJI, K., NAKAMURA, K. & KATO, Y. 2005. Alveolar bone marrow as a cell source for regenerative medicine: differences between alveolar and iliac bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res*, 20, 399-409.
- MECALL, R. A. & ROSENFELD, A. L. 1991. Influence of residual ridge resorption patterns on implant fixture placement and tooth position. 1. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 11, 8-23.
- MIURA, M., GRONTHOS, S., ZHAO, M., LU, B., FISHER, L. W., ROBEY, P. G. & SHI, S. 2003. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 5807-12.
- MOODLEY, Y., ILANCHERAN, S., SAMUEL, C., VAGHJANI, V., ATIENZA, D., WILLIAMS, E. D., JENKIN, G., WALLACE, E., TROUNSON, A. & MANUELPILLAI, U. 2010. Human amnion epithelial cell transplantation abrogates lung fibrosis and augments repair. *Am J Respir Crit Care Med*, 182, 643-51.
- MOORE, R. Y., SPEH, J. C. & LEAK, R. K. 2002. Suprachiasmatic nucleus organization. *Cell Tissue Res*, 309, 89-98.
- MORIKAWA, S., MABUCHI, Y., KUBOTA, Y., NAGAI, Y., NIIBE, K., HIRATSU, E., SUZUKI, S., MIYAUCHI-HARA, C., NAGOSHI, N., SUNABORI, T., SHIMMURA, S., MIYAWAKI, A., NAKAGAWA, T., SUDA, T., OKANO, H. & MATSUZAKI, Y. 2009. Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow. *J Exp Med*, 206, 2483-96.
- MORSCZECK, C., GÖTZ, W., SCHIERHOLZ, J., ZEILHOFER, F., KÜHN, U., MÖHL, C., SIPPEL, C. & HOFFMANN, K. H. 2005. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol*, 24, 155-65.
- MOUSTAKAS, A. & HELDIN, C. H. 2002. From mono- to oligo-Smads: the heart of the matter in TGF-beta signal transduction. *Genes Dev*, 16, 1867-71.
- MU, S., TEE, B. C., EMAM, H., ZHOU, Y. & SUN, Z. 2018. Culture-expanded mesenchymal stem cell sheets enhance extraction-site alveolar bone growth: An animal study. *J Periodontol Res*, 53, 514-524.
- MÜLLER, H. L. 2010. Increased daytime sleepiness in patients with childhood craniopharyngioma and hypothalamic tumor involvement: review of the literature and perspectives. *Int J Endocrinol*, 2010, 519607.

-
- MURRAY, P. E., SMITH, A. J., GARCIA-GODOY, F. & LUMLEY, P. J. 2008. Comparison of operative procedure variables on pulpal viability in an ex vivo model. *Int Endod J*, 41, 389-400.
- NAKAMURA, Y., WAKITANI, S., SAITO, N. & TAKAOKA, K. 2005. Expression profiles of BMP-related molecules induced by BMP-2 or -4 in muscle-derived primary culture cells. *J Bone Miner Metab*, 23, 426-34.
- NAKASHIMA, K., ZHOU, X., KUNKEL, G., ZHANG, Z., DENG, J. M., BEHRINGER, R. R. & DE CROMBRUGGHE, B. 2002. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*, 108, 17-29.
- NEVE, A., CORRADO, A. & CANTATORE, F. P. 2011. Osteoblast physiology in normal and pathological conditions. *Cell Tissue Res*, 343, 289-302.
- NEWBERRY, E. P., LATIFI, T. & TOWLER, D. A. 1998. Reciprocal regulation of osteocalcin transcription by the homeodomain proteins Msx2 and Dlx5. *Biochemistry*, 37, 16360-8.
- NISHIMURA, R., KATO, Y., CHEN, D., HARRIS, S. E., MUNDY, G. R. & YONEDA, T. 1998. Smad5 and DPC4 are key molecules in mediating BMP-2-induced osteoblastic differentiation of the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. *J Biol Chem*, 273, 1872-9.
- NOHE, A., HASSEL, S., EHRlich, M., NEUBAUER, F., SEBALD, W., HENIS, Y. I. & KNAUS, P. 2002. The mode of bone morphogenetic protein (BMP) receptor oligomerization determines different BMP-2 signaling pathways. *J Biol Chem*, 277, 5330-8.
- NUTI, N., CORALLO, C., CHAN, B. M., FERRARI, M. & GERAMI-NAINI, B. 2016. Multipotent Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells: a Literature Review. *Stem Cell Rev Rep*, 12, 511-523.
- OKAMURA, H., YAMAGUCHI, S. & YAGITA, K. 2002. Molecular machinery of the circadian clock in mammals. *Cell Tissue Res*, 309, 47-56.
- OTTO, F., THORNELL, A. P., CROMPTON, T., DENZEL, A., GILMOUR, K. C., ROSEWELL, I. R., STAMP, G. W., BEDDINGTON, R. S., MUNDLOS, S., OLSEN, B. R., SELBY, P. B. & OWEN, M. J. 1997. Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell*, 89, 765-71.
- PAPACCIO, G., GRAZIANO, A., D'AQUINO, R., GRAZIANO, M. F., PIROZZI, G., MENDITTI, D., DE ROSA, A., CARINCI, F. & LAINO, G. 2006. Long-term cryopreservation of dental pulp stem cells (SBP-DPSCs) and their differentiated osteoblasts: a cell source for tissue repair. *J Cell Physiol*, 208, 319-25.
- PAPE, H.-C., KURTZ, A. & SILBERNAGL, S. 2014. Physiologie. *Thieme*, 7, 597ff.; 936-938.
- PEISTER, A., MELLAD, J. A., LARSON, B. L., HALL, B. M., GIBSON, L. F. & PROCKOP, D. J. 2004. Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. *Blood*, 103, 1662-8.
- PHILLIPS, J. E., GERSBACH, C. A., WOJTOWICZ, A. M. & GARCÍA, A. J. 2006. Glucocorticoid-induced osteogenesis is negatively regulated by Runx2/Cbfa1 serine phosphorylation. *J Cell Sci*, 119, 581-91.
- PHINNEY, D. G., KOPEN, G., ISAACSON, R. L. & PROCKOP, D. J. 1999. Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. *J Cell Biochem*, 72, 570-85.
- PHORNPHUTKUL, C., WU, K. Y. & GRUPPUSO, P. A. 2006. The role of insulin in chondrogenesis. *Mol Cell Endocrinol*, 249, 107-15.
- PINNELL, S. R. 1985. Regulation of collagen biosynthesis by ascorbic acid: a review. *Yale J Biol Med*, 58, 553-9.
- PITTENGER, M. F., MACKAY, A. M., BECK, S. C., JAISWAL, R. K., DOUGLAS, R., MOSCA, J. D., MOORMAN, M. A., SIMONETTI, D. W., CRAIG, S. & MARSHAK, D. R. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284, 143-7.
- POUNDARIK, A. A., DIAB, T., SROGA, G. E., URAL, A., BOSKEY, A. L., GUNDBERG, C. M. & VASHISHTH, D. 2012. Dilatational band formation in bone. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 19178-83.

-
- QIAN, Z., ZHANG, Y., KANG, X., LI, H., ZHANG, Y., JIN, X., GAO, X., XU, M., MA, Z., ZHAO, L., ZHANG, Z., SUN, H. & WU, S. 2020. Postnatal Conditional Deletion of *Bmal1* in Osteoblasts Enhances Trabecular Bone Formation Via Increased BMP2 Signals. *J Bone Miner Res*, 35, 1481-1493.
- RATAJCZAK, M. Z., ZUBA-SURMA, E., KUCIA, M., PONIEWIERSKA, A., SUSZYNSKA, M. & RATAJCZAK, J. 2012. Pluripotent and multipotent stem cells in adult tissues. *Adv Med Sci*, 57, 1-17.
- REITER, R. J. 1991. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr Rev*, 12, 151-80.
- REPPERT, S. M. & WEAVER, D. R. 2002. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*, 418, 935-41.
- RITCHIE, H. H., PARK, H., LIU, J., BERVOETS, T. J. & BRONCKERS, A. L. 2004. Effects of dexamethasone, vitamin A and vitamin D3 on DSP-PP mRNA expression in rat tooth organ culture. *Biochim Biophys Acta*, 1679, 263-71.
- RODRÍGUEZ-LOZANO, F. J., BUENO, C., INSAUSTI, C. L., MESEGUER, L., RAMÍREZ, M. C., BLANQUER, M., MARÍN, N., MARTÍNEZ, S. & MORALEDA, J. M. 2011. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues. *Int Endod J*, 44, 800-6.
- ROENNEBERG, T. & MERROW, M. 2016. The Circadian Clock and Human Health. *Curr Biol*, 26, R432-43.
- ROSENZWEIG, B. L., IMAMURA, T., OKADOME, T., COX, G. N., YAMASHITA, H., TEN DIJKE, P., HELDIN, C. H. & MIYAZONO, K. 1995. Cloning and characterization of a human type II receptor for bone morphogenetic proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 7632-6.
- ROSSANT, J. 2001. Stem cells from the Mammalian blastocyst. *Stem Cells*, 19, 477-82.
- ROSSANT, J. 2008. Stem cells and early lineage development. *Cell*, 132, 527-31.
- SAMSA, W. E., VASANJI, A., MIDURA, R. J. & KONDRATOV, R. V. 2016. Deficiency of circadian clock protein BMAL1 in mice results in a low bone mass phenotype. *Bone*, 84, 194-203.
- SCOTT, M. A., NGUYEN, V. T., LEVI, B. & JAMES, A. W. 2011. Current methods of adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*, 20, 1793-804.
- SEO, B. M., MIURA, M., GRONTHOS, S., BARTOLD, P. M., BATOULI, S., BRAHIM, J., YOUNG, M., ROBEY, P. G., WANG, C. Y. & SHI, S. 2004. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*, 364, 149-55.
- SERINO, G., BIANCU, S., IEZZI, G. & PIATTELLI, A. 2003. Ridge preservation following tooth extraction using a polylactide and polyglycolide sponge as space filler: a clinical and histological study in humans. *Clin Oral Implants Res*, 14, 651-8.
- SHIMASAKI, S., MOORE, R. K., OTSUKA, F. & ERICKSON, G. F. 2004. The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocr Rev*, 25, 72-101.
- SHIRAKABE, K., TERASAWA, K., MIYAMA, K., SHIBUYA, H. & NISHIDA, E. 2001. Regulation of the activity of the transcription factor Runx2 by two homeobox proteins, *Msx2* and *Dlx5*. *Genes Cells*, 6, 851-6.
- SLOAN, A. J., SHELTON, R. M., HANN, A. C., MOXHAM, B. J. & SMITH, A. J. 1998. An in vitro approach for the study of dentinogenesis by organ culture of the dentine-pulp complex from rat incisor teeth. *Arch Oral Biol*, 43, 421-30.
- SONG, I. H., CAPLAN, A. I. & DENNIS, J. E. 2009. In vitro dexamethasone pretreatment enhances bone formation of human mesenchymal stem cells in vivo. *J Orthop Res*, 27, 916-21.
- SONOYAMA, W., LIU, Y., YAMAZA, T., TUAN, R. S., WANG, S., SHI, S. & HUANG, G. T. 2008. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod*, 34, 166-71.
- STEIN, G. S., LIAN, J. B. & OWEN, T. A. 1990. Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation. *Faseb j*, 4, 3111-23.

-
- STOVALL, K. E., TRAN, T. D. N., SUANTAWEE, T., YAO, S., GIMBLE, J. M., ADISAKWATTANA, S. & CHENG, H. 2020. Adenosine triphosphate enhances osteoblast differentiation of rat dental pulp stem cells via the PLC-IP(3) pathway and intracellular Ca (2+) signaling. *J Cell Physiol*, 235, 1723-1732.
- SUN, S., GUO, Z., XIAO, X., LIU, B., LIU, X., TANG, P. H. & MAO, N. 2003. Isolation of mouse marrow mesenchymal progenitors by a novel and reliable method. *Stem Cells*, 21, 527-35.
- SYKARAS, N. & OPPERMAN, L. A. 2003. Bone morphogenetic proteins (BMPs): how do they function and what can they offer the clinician? *J Oral Sci*, 45, 57-73.
- TADA, H., NEMOTO, E., FOSTER, B. L., SOMERMAN, M. J. & SHIMAUCHI, H. 2011. Phosphate increases bone morphogenetic protein-2 expression through cAMP-dependent protein kinase and ERK1/2 pathways in human dental pulp cells. *Bone*, 48, 1409-16.
- TAKAHASHI, J. S. 2017. Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock. *Nat Rev Genet*, 18, 164-179.
- TANG, Z., XU, T., LI, Y., FEI, W., YANG, G. & HONG, Y. 2020. Inhibition of CRY2 by STAT3/miRNA-7-5p Promotes Osteoblast Differentiation through Upregulation of CLOCK/BMAL1/P300 Expression. *Mol Ther Nucleic Acids*, 19, 865-876.
- TENENBAUM, H. C. & HEERSCHKE, J. N. 1982. Differentiation of osteoblasts and formation of mineralized bone in vitro. *Calcif Tissue Int*, 34, 76-9.
- TENENBAUM, H. C. & HEERSCHKE, J. N. 1985. Dexamethasone stimulates osteogenesis in chick periosteum in vitro. *Endocrinology*, 117, 2211-7.
- THIRUNAVUKKARASU, K., HALLADAY, D. L., MILES, R. R., YANG, X., GALVIN, R. J., CHANDRASEKHAR, S., MARTIN, T. J. & ONYIA, J. E. 2000. The osteoblast-specific transcription factor Cbfa1 contributes to the expression of osteoprotegerin, a potent inhibitor of osteoclast differentiation and function. *J Biol Chem*, 275, 25163-72.
- THURNER, P. J., CHEN, C. G., IONOVA-MARTIN, S., SUN, L., HARMAN, A., PORTER, A., AGER, J. W., 3RD, RITCHIE, R. O. & ALLISTON, T. 2010. Osteopontin deficiency increases bone fragility but preserves bone mass. *Bone*, 46, 1564-73.
- TROPEL, P., NOËL, D., PLATET, N., LEGRAND, P., BENABID, A. L. & BERGER, F. 2004. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. *Exp Cell Res*, 295, 395-406.
- TSANG, K., LIU, H., YANG, Y., CHARLES, J. F. & ERMANN, J. 2019. Defective circadian control in mesenchymal cells reduces adult bone mass in mice by promoting osteoclast function. *Bone*, 121, 172-180.
- TYNER, S. D., VENKATACHALAM, S., CHOI, J., JONES, S., GHEBRANIOUS, N., IGELMANN, H., LU, X., SORON, G., COOPER, B., BRAYTON, C., PARK, S. H., THOMPSON, T., KARSENTY, G., BRADLEY, A. & DONEHOWER, L. A. 2002. p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature*, 415, 45-53.
- VAN DER WEIJDEN, F., DELL'ACQUA, F. & SLOT, D. E. 2009. Alveolar bone dimensional changes of post-extraction sockets in humans: a systematic review. *J Clin Periodontol*, 36, 1048-58.
- VATER, C., KASTEN, P. & STIEHLER, M. 2011. Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells. *Acta Biomater*, 7, 463-77.
- WANG, E. A., ISRAEL, D. I., KELLY, S. & LUXENBERG, D. P. 1993. Bone morphogenetic protein-2 causes commitment and differentiation in C3H10T1/2 and 3T3 cells. *Growth Factors*, 9, 57-71.
- WANG, F., YU, M., YAN, X., WEN, Y., ZENG, Q., YUE, W., YANG, P. & PEI, X. 2011. Gingiva-derived mesenchymal stem cell-mediated therapeutic approach for bone tissue regeneration. *Stem Cells Dev*, 20, 2093-102.
- WANG, W., YUAN, C., GENG, T., LIU, Y., ZHU, S., ZHANG, C., LIU, Z. & WANG, P. 2020. EphrinB2 overexpression enhances osteogenic differentiation of dental pulp stem cells partially through ephrinB2-mediated reverse signaling. *Stem Cell Res Ther*, 11, 40.

-
- WEISS, A., ARBELL, I., STEINHAGEN-THIESEN, E. & SILBERMANN, M. 1991. Structural changes in aging bone: osteopenia in the proximal femurs of female mice. *Bone*, 12, 165-72.
- WRANA, J. L. 2002. Phosphoserine-dependent regulation of protein-protein interactions in the Smad pathway. *Structure*, 10, 5-7.
- WU, C.-J. & LU, H.-K. 2008. Smad signal pathway in BMP-2-induced osteogenesis a mini review. *Journal of dental sciences*, 3, 13-21.
- XIAO, G., GOPALAKRISHNAN, R., JIANG, D., REITH, E., BENSON, M. D. & FRANCESCHI, R. T. 2002. Bone morphogenetic proteins, extracellular matrix, and mitogen-activated protein kinase signaling pathways are required for osteoblast-specific gene expression and differentiation in MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res*, 17, 101-10.
- XIAO, G., WANG, D., BENSON, M. D., KARSENTY, G. & FRANCESCHI, R. T. 1998. Role of the alpha2-integrin in osteoblast-specific gene expression and activation of the Osf2 transcription factor. *J Biol Chem*, 273, 32988-94.
- YAMAGUCHI, A., KATAGIRI, T., IKEDA, T., WOZNEY, J. M., ROSEN, V., WANG, E. A., KAHN, A. J., SUDA, T. & YOSHIKI, S. 1991. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic maturation and inhibits myogenic differentiation in vitro. *J Cell Biol*, 113, 681-7.
- YAMAGUCHI, A., KOMORI, T. & SUDA, T. 2000. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr Rev*, 21, 393-411.
- YANG, X., VAN DEN DOLDER, J., WALBOOMERS, X. F., ZHANG, W., BIAN, Z., FAN, M. & JANSEN, J. A. 2007a. The odontogenic potential of STRO-1 sorted rat dental pulp stem cells in vitro. *J Tissue Eng Regen Med*, 1, 66-73.
- YANG, X., WALBOOMERS, X. F., VAN DEN BEUCKEN, J. J., BIAN, Z., FAN, M. & JANSEN, J. A. 2009. Hard tissue formation of STRO-1-selected rat dental pulp stem cells in vivo. *Tissue Eng Part A*, 15, 367-75.
- YANG, X., ZHANG, W., VAN DEN DOLDER, J., WALBOOMERS, X. F., BIAN, Z., FAN, M. & JANSEN, J. A. 2007b. Multilineage potential of STRO-1+ rat dental pulp cells in vitro. *J Tissue Eng Regen Med*, 1, 128-35.
- YANG, X., ZHOU, Z., MAO, Z., SHEN, M., CHEN, N. & MIAO, D. 2020. Role of p53 deficiency in socket healing after tooth extractions. *J Mol Histol*, 51, 55-65.
- YASUI, T., MABUCHI, Y., MORIKAWA, S., ONIZAWA, K., AKAZAWA, C., NAKAGAWA, T., OKANO, H. & MATSUZAKI, Y. 2017. Isolation of dental pulp stem cells with high osteogenic potential. *Inflamm Regen*, 37, 8.
- ZAINAL ARIFFIN, S. H., KERMANI, S., MEGAT ABDUL WAHAB, R., SENAFI, S., ZAINAL ARIFFIN, Z. & ABDUL RAZAK, M. 2012. In vitro chondrogenesis transformation study of mouse dental pulp stem cells. *ScientificWorldJournal*, 2012, 827149.
- ZHANG, Q., SHI, S., LIU, Y., UYANNE, J., SHI, Y., SHI, S. & LE, A. D. 2009. Mesenchymal stem cells derived from human gingiva are capable of immunomodulatory functions and ameliorate inflammation-related tissue destruction in experimental colitis. *J Immunol*, 183, 7787-98.
- ZHU, H., KAVSAK, P., ABDOLLAH, S., WRANA, J. L. & THOMSEN, G. H. 1999. A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation. *Nature*, 400, 687-93.
- ZHUO, H., WANG, Y. & ZHAO, Q. 2018. The Interaction between Bmal1 and Per2 in Mouse BMSC Osteogenic Differentiation. *Stem Cells Int*, 2018, 3407821.
- ZISAPEL, N. 2018. New perspectives on the role of melatonin in human sleep, circadian rhythms and their regulation. *Br J Pharmacol*, 175, 3190-3199.

6 Danksagung

Mein Dank gilt als Erstes Frau Professor Dr. Charlotte Freifrau von Gall, für die Möglichkeit, meine Dissertation unter ihrer Betreuung und in ihrem Institut anfertigen zu dürfen, sowie für ihre Unterstützung und ihre zahlreichen Anregungen, welche mich während dieser Arbeit begleiteten.

Ich bedanke mich bei Herrn Professor Dr. Christoph V. Suschek herzlichst, dass er die Cobetreuung übernommen hat.

Ein besonders herzlicher Dank geht an Frau Dr. Beryl Schwarz-Herzke. Liebe Beryl, Du hast maßgeblich zur Verwirklichung dieser Promotion beigetragen und standest mir immer zur Seite. Danke, dass ich so viel von Dir lernen durfte und dass Du mein wissenschaftliches Arbeiten so geprägt hast. Wie schön, dass ich diesen Weg mit Dir gehen konnte.

Ich bedanke mich bei Frau Dr. Benita Sahlender für die Unterstützung innerhalb der Versuchsreihen.

Dem Institut für Anatomie II und allen seinen Mitarbeitern möchte ich dafür danken, dass ich die Experimente hier problemlos durchführen konnte und mir stets alle erforderlichen Mittel zu Verfügung standen.

Ich danke dem Institut für Molekulare Kardiologie, dass sie die Durchführung der FACS-Analyse ermöglichten.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei meiner Familie und meinem Lebensgefährten für das große Verständnis und für die Unterstützung in wirklich jeder Situation.

Zum Schluss möchte ich mich besonders bei meiner Mutter, Ursula Zanders, bedanken. Mama, ohne Dich hätte ich all das im Leben niemals erreicht. Dir habe ich zu verdanken, wo ich nun stehe. Danke für Deine liebevolle Art, Dein immer offenes Ohr, Deine Wärme und Güte, die Du mich jeden Tag spüren lässt.