

Aus der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

**Molekulare Mechanismen des osteogenen
Differenzierungspotenzials humaner dentaler
Pulpastromazellen**

Dissertation

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

vorgelegt von

Anna Julia Martina Johänning

2026

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

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

Zweitgutachter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Csaba Mahotka

Meinen Liebsten

*„Man merkt nie, was schon getan wurde, man sieht immer nur,
was noch zu tun bleibt.“ Marie Curie*

Teile dieser Arbeit wurden auf dem Symposium der medRSD am 4. und 6. Mai 2022 in Form einer digitalen Posterpräsentation mit Kurzvortrag veröffentlicht.

Zusammenfassung

Die regenerative Medizin benötigt verlässliche zellbasierte Verfahren zur Behandlung knöcherner Defekte. Dentale Stromazellen (DSC) stellen hierfür eine aussichtsreiche Quelle dar, da sie *in vitro* zielgerichtet osteogen differenziert werden können. Ziel dieser Arbeit war es, das proliferative und osteogene Potenzial von DSC unter definierten Kulturbedingungen systematisch zu charakterisieren, mit besonderem Fokus auf L-Arginin, dessen Metaboliten, Inhibitoren (L-NIO) sowie weiteren Mediatoren (L-Valin, L-Lysin, L-Ornithin). Zusätzlich wurden der Einfluss des Serumgehalts (FCS), der Zusammensetzung der Grundmedien und donorspezifische Unterschiede untersucht.

DSC wurden aus extrahierten Weisheitszähnen isoliert und kultiviert. Der stromazelluläre Phänotyp wurde mittels Durchflusszytometrie (u. a. CD44, CD73, CD90, CD105 positiv; CD34, CD45 negativ) bestätigt. Proliferation und Vitalität wurden mittels CellTiter-Blue-Assay, die Mineralisierung mittels Alizarinrot-S-Färbung mit Cetylpyridiniumchlorid-Rücklösung (OD 600) erfasst. Ausgewählte Proteine (CAT-1/-2, Arginase-1/-2, eNOS/iNOS) wurden per Western-Blot analysiert. Die statistische Auswertung erfolgte gegen die jeweiligen Kontrollen (gepaarter *t*-Test, Bonferroni-Korrektur; Effektstärken nach Cohen's *d*).

Zentraler Befund ist die Abhängigkeit von L-Arginin: L-Arginin-Entzug führte in nahezu allen Bedingungen zu einem deutlichen Rückgang von Vitalität und Mineralisierung. Eine Supplementierung ($\leq 200 \mu\text{M}$) besserte dies nur teilweise. In L-Arginin-haltigen osteogenen Medien nahm die Mineralisierung verlässlich zu. L-Arginin wirkte förderlich, erreichte jedoch nicht die Spitzenwerte der Kombination L-Lysin/L-Ornithin, die wiederholt die höchsten Mineralisierungsgrade erzielte. L-Valin zeigte demgegenüber konsistent eine hemmende Wirkung. L-NIO wirkte nicht konstant inhibitorisch: Zwar lagen absolute Werte teilweise unter dem osteogenen Standardmedium, gleichzeitig stiegen die Mineralisierungswerte gegenüber Tag 0 signifikant an und übertrafen in Teilen der Versuche sogar die osteogene Kontrolle, was auf eine dosis- und kontextabhängige Modulation der NO-Achse hinweist. Der FCS-Gehalt beeinflusste Vitalität und Differenzierung dosisabhängig; 10 % FCS erzielten die höchsten Werte. Donorabhängige Unterschiede (inter-/intraindividuelle Heterogenität) prägten Proliferations- und Differenzierungsmuster.

Das Basismedium war ebenfalls ein wesentlicher Einflussfaktor: RPMI zeigte insgesamt geringe Mineralisierungs- und höhere Ausfallraten, während in DMEM \pm L-Arginin stabilere und höhere absolute Werte festgestellt wurden. Im Western-Blot bestätigte sich ein signifikanter Unterschied für CAT-1 zwischen Standard- und osteogenem Medium. Weitere Zielproteine zeigten inkonsistente Befunde, was auf Optimierungsbedarf (Antikörper, Stimulation, Passage) hinweist.

Zusammenfassend belegt die Arbeit, dass L-Arginin ein kritischer Regulator der osteogenen Differenzierung von DSC ist und dass L-Lysin/L-Ornithin die Matrixbildung zusätzlich verstärken, während L-Valin sie hemmt. Die Effekte von L-NIO sind kontextabhängig. Medienwahl, Serumgehalt und donorspezifische Variabilität bestimmen die Ergebnisse maßgeblich. Methodisch sollten künftig standardisierte DMEM-basierte Protokolle, definierte Dosis-Wirkungs-Reihen (L-Arginin/NO-Modulatoren), die kombinierte Analyse funktioneller und molekularer Marker sowie größere Spenderkohorten untersucht werden. Die Ergebnisse liefern eine Grundlage zur Optimierung der Kultivierungsbedingungen und unterstreichen das Potenzial von DSC zur Anwendung in der regenerativen Zahnmedizin und Knochenregeneration.

Abstract

Regenerative medicine requires reliable cell-based methods for treating bone defects. Dental stromal cells (DSC) represent a promising source for this purpose, as they can be differentiated into osteocytes *in vitro*. The aim of this study was to systematically characterize the proliferative and osteogenic potential of DSC under defined culture conditions, with a particular focus on L-arginine, its metabolites, inhibitors (L-NIO) and other mediators (L-valine, L-lysine, L-ornithine). In addition, the influence of serum content (FCS), the composition of the basic media and donor-specific differences were investigated.

DSC were isolated from extracted wisdom teeth and cultured. The stromal cell phenotype was confirmed by flow cytometry (including CD44, CD73, CD90, CD105 positive; CD34, CD45 negative). Proliferation and vitality were measured using the CellTiter Blue assay, mineralization using alizarin red S staining with cetylpyridinium chloride redissolution (OD 600). Selected proteins (CAT-1/-2, arginase-1/-2, eNOS/iNOS) were analyzed by Western blot. Statistical analysis was performed against the respective controls (paired *t*-test, Bonferroni correction; effect sizes according to Cohen's *d*).

The key finding is the dependence on L-arginine: L-arginine withdrawal led to a significant decline in vitality and mineralization in almost all conditions. Supplementation ($\leq 200 \mu\text{M}$) only partially improved this. Mineralization increased reliably in osteogenic media containing L-arginine. L-arginine had a beneficial effect but did not reach the peak values achieved by the combination of L-lysine/L-ornithine, which repeatedly achieved the highest degrees of mineralization. In contrast, L-valine constantly showed an inhibitory effect. L-NIO did not have a consistent inhibitory effect: although absolute values were sometimes below the osteogenic standard medium, mineralization values increased significantly compared to day 0 and even exceeded the osteogenic control in some parts of the experiments, indicating a dose- and context-dependent modulation of the NO axis. The FCS content influenced vitality and differentiation in a dose-dependent manner; 10 % FCS achieved the highest values. Donor-dependent differences (inter-/intraindividual heterogeneity) characterized proliferation and differentiation patterns.

The base medium was also a significant influencing factor: RPMI showed low mineralization and higher failure rates overall, while DMEM \pm L-arginine showed more stable and higher absolute values. Western-blot analysis confirmed a significant difference for CAT-1 between standard and osteogenic medium. Other target proteins showed inconsistent findings, indicating a need for optimization (antibodies, stimulation, passage).

In summary, the study demonstrates that L-arginine is a critical regulator of osteogenic differentiation of DSC and that L-lysine/L-ornithine additionally enhance matrix formation, while L-valine inhibits it. The effects of L-NIO are context-dependent. Media choice, serum content, and donor-specific variability significantly determine the results. In terms of methodology, standardized DMEM-based protocols, defined dose-response series (L-arginine/NO modulators), the combined analysis of functional and molecular markers, and larger donor cohorts should be investigated in the future. The results provide a basis for optimizing cultivation conditions and underscore the potential of DSC for use in regenerative dentistry and bone regeneration.

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
3D	Dreidimensional
AAS	Aminosäure(n)
Abb.	Abbildung
ALP	Alkalische Phosphatase
APC	Allophycocyanin
<i>Aqua dest.</i>	destilliertes Wasser
Arg	L-Arginin
ASC	<i>Adipose-Derived Stem Cells</i> (Stammzellen des Fettgewebes)
ASL	Argininosuccinat-Lyase
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
BMSC	<i>Bone-Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells</i> (Stammzellen des Knochenmarks)
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i>
BMU	<i>Basic Multicellular Unit</i>
BSA	Bovines Serumalbumin

Ca²⁺	Calcium
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CAT	<i>Cationic Amino Acid Transporter</i> (kationischer Aminosäuren-Transporter)
CAV	Caveolin
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CFU-F	<i>Colony-Forming Unit-Fibroblast</i>
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
CHX	Chlorhexidin
cm	Zentimeter
CO₂	Kohlendioxid
CPC	Cetylpyridiniumchlorid
CTB	CellTiter-Blue®
d (Cohen's d)	Effektstärke
Da	Dalton
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i>
DPSC	<i>Dental Pulp Stem Cells</i> (Stammzellen der dentalen Pulpa)
DSC	Dentale Stromazellen
EDRF	<i>Endothelium-Derived Relaxing Factor</i>

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
et al.	<i>et alii/-ae/-a</i>
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i> (Durchflusszytometrie)
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> (fetales Kälberserum)
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g	Gramm
g (RCF)	Relative Zentrifugalkraft
GH	<i>Growth Hormone</i> (Somatotropin)
GPR4	Protonensensitiver G-Protein-gekoppelter Rezeptor 4
H₂O	Wasser
HCl	<i>Hydrochloric Acid</i> (Salzsäure)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1- piperazinethansulfonsäure
HLA-DR	<i>Human Leukocyte Antigen</i> , DR-Isotyp
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
HSC	<i>Haematopoietic Stem Cells</i> (hämatopoetische Stammzellen)

IFN-γ	Interferon-gamma
IGF	<i>Insulin-like Growth Factor</i>
IL	Interleukin
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
ISCT	<i>International Society for Cellular Therapy</i>
iPS	Induzierte pluripotente Stammzellen
K	Kontrolle
kDa	Kilodalton
l	Liter
L-NAME	N ω -Nitro-L-Arginin-Methylester
L-NIO	N ⁵ -(1-Iminoethyl)-L-Ornithin
LC-MS	Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
M-CSF	<i>Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
mg	Milligramm
Mg²⁺	Magnesium
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mmol	Millimol
mM	Millimolar

mm	Millimeter
MRONJ	<i>Medication-Related Osteonecrosis of the Jaw</i>
mRNA	<i>Messenger-RNA (ribonucleic acid)</i>
MSC	Mesenchymale Stammzellen
mTOR	<i>Mechanistic Target of Rapamycin</i>
MW	Mittelwert
n	Stichprobengröße/Anzahl biologischer Replikate
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NaHCO₃	Natriumhydrogencarbonat (Bicarbonat)
NEAA	<i>Non-Essential Amino Acid solution</i> (nicht-essenzielle Aminosäuren)
NFκB	<i>Nuclear Factor ,Kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
nm	Nanometer
nNOS	Neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
n. s.	Nicht signifikant
O₂	Sauerstoff
O₂⁻	Superoxidanion
OD 600	Optische Dichte (bei 600 nm)

OM	Osteogenes Differenzierungsmedium
OPG	Osteoprotegerin
P	Passage
PAF	Plättchenaktivierungsfaktor
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PDLSC	<i>Periodontal Ligament Stem Cells</i> (Stammzellen des Parodonts)
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PGE	Prostaglandin E
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Aktivität
PKG	Proteinkinase G
Ponceau S	Ponceau S-Proteinfarbstoff
PRMT	Protein-Arginin-Methyltransferase
PTH	Parathormon
qPCR	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RANK	<i>Receptor Activator of Nuclear Factor-κB</i>
RANKL	RANK-Ligand
RCF	<i>Relative Centrifugal Force</i> (relative Zentrifugalkraft)

RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation Assay Buffer</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (reaktive Sauerstoffspezies)
RpM	<i>Revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
Runx2	<i>Runt-related Transcription Factor 2</i>
s	Sekunde(n)
SCAP	<i>Stem Cells from the Apical Papilla</i> (Stammzellen der apikalen Papille)
SD	Standardabweichung
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (Natriumlaurylsulfat)
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SHED	<i>Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth</i> (Milchzahnstammzellen)
SILAC	<i>Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture</i>
SIRS	<i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i>
SOP	<i>Standard Operating Procedure</i>
t(df)	t-Statistik mit Freiheitsgraden (t-Test)
TBS	<i>Tris-Buffered Saline</i>
TBS-T	<i>Tris-Buffered Saline</i> mit Tween-20
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
TGX	<i>Tris-Glycine eXtended</i>
TNF-α	Tumor-Nekrosefaktor-alpha

Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TRPV5	<i>Transient Receptor Potential Vanilloid 5</i>
U	Unit/Enzymeinheit
U/ml	Enzymeinheiten pro Milliliter
V	Volt
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
w	<i>with</i>
w/o	<i>without</i>
WR	<i>Working Reagenz</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer

Tabelle 1: Abkürzungsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	<i>Allgemein</i>	1
1.2	<i>Stamm- und Stromazellen</i>	2
1.2.1	Allgemein	2
1.2.2	Embryonale Stammzellen	2
1.2.3	Adulte Stammzellen	2
1.2.4	Mesenchymale Stammzellen	3
1.2.5	Dentale Stammzellen	4
1.2.6	Zähne	6
1.3	<i>Knochen</i>	9
1.3.1	Allgemein	9
1.3.2	Knochenaufbau	9
1.3.3	Knochenzellen	10
1.3.4	Knochenumbau	12
1.3.5	Stammzellen und osteogene Differenzierung	12
1.3.6	Knochenheilung	14
1.3.7	Calcium-Phosphat-Haushalt	14
1.3.8	Ober- und Unterkieferknochen.....	17
1.4	<i>EZM</i>	17
1.5	<i>L-Arginin und NO</i>	18
1.5.1	Aminosäuren	18
1.5.2	L-Lysin, L-Valin, L-Leucin und L-Ornithin.....	19
1.5.3	L-Arginin.....	20
1.5.4	CAT	21
1.5.5	Ernährung in speziellen Lebensphasen.....	22
1.5.6	NO und NOS	23
1.5.7	Einfluss von NO auf die osteogene Differenzierung	31
1.6	<i>Alter</i>	34
1.7	<i>Pathologie Knochen</i>	34
1.7.1	Entzündungen in der Mundhöhle	35
1.7.2	Alveolarkammatrophy	35
1.7.3	Frakturen.....	36
1.7.4	Zysten	36
1.7.5	Knochenerkrankungen	36
1.7.6	Osteomyelitis	37
1.7.7	Tumore.....	37
1.7.8	Radiatio.....	38
1.7.9	Osteoporose	38

1.7.10	Medikamenten-assoziierte Osteonekrose (MRONJ)	39
1.8	<i>Rekonstruktion</i>	40
1.8.1	Rekonstruktion	40
1.8.2	Transplantation	41
1.8.3	Tissue Engineering	42
1.9	<i>Ziele der Arbeit</i>	45
2	Material und Methoden	47
2.1	<i>Materialien</i>	47
2.1.1	Geräte	47
2.1.2	Materialien	48
2.1.3	Substanzen	49
2.1.4	Medien, Lösungen und Puffer	51
2.1.5	Antikörper	58
2.1.6	Zytokine	58
2.1.7	Software	59
2.1.8	Einsatz von generativer KI	59
2.1.9	Spenderzellen	60
2.2	<i>Methoden</i>	61
2.2.1	Isolation dentaler Stromazellen aus der Pulpa	61
2.2.2	Zellkultivierung	63
2.2.3	Enzymatisches Passagieren	64
2.2.4	Vorgehen bei mikrobieller Kontamination	65
2.2.5	Bestimmung der Zellzahl	65
2.2.6	Kryokonservierung und Auftauen	66
2.2.7	Charakterisierung der Zellen mittels Durchflusszytometrie	67
2.2.8	Proteinnachweis mittels Western-Blot	68
2.2.9	CellTiter-Blue® Cell Viability Assay	71
2.2.10	Wachstumskinetik	72
2.2.11	Osteogene Differenzierung und Alizarinrot-S-Färbung	72
2.3	<i>Statistische Auswertung</i>	76
2.4	<i>Ethikvotum</i>	76
3	Ergebnisse	77
3.1	<i>Charakterisierung der DSC</i>	77
3.1.1	Plastikadhärenz	77
3.1.2	Immunphänotypisierung mittels FACS	77
3.1.3	Differenzierungspotential	78
3.1.4	Fazit	79
3.2	<i>Zellviabilität unter verschiedenen Kulturbedingungen – CTB-Assay</i>	79

3.2.1	Vergleich Standardmedium und DMEM ohne L-Arginin	79
3.2.2	Einfluss des FCS-Gehalts und L-Arginin-Resupplementierung	82
3.2.3	Standardmedium und Interdonorenvariationen.....	84
3.2.4	DMEM ohne L-Arginin und Interdonorenvariationen.....	88
3.2.5	Fazit	92
3.3	<i>Proteinnachweis mittels Western-Blot</i>	92
3.3.1	Ergebnisse der Proteinexpression	93
3.3.2	Spenderspezifische Unterschiede	114
3.3.3	Fazit	124
3.4	<i>Differenzierungsversuche</i>	125
3.4.1	Allgemeines	125
3.4.2	Auswertung erster Teil der Differenzierungsversuche	125
3.4.3	Auswertung zweiter Teil der Differenzierungsversuche.....	148
3.4.4	Auswertung erster und zweiter Teil der Differenzierungsversuche.....	163
4	Diskussion	169
4.1	<i>Allgemein</i>	169
4.2	<i>Stromazellcharakter der DSC</i>	169
4.2.1	Charakterisierung der DSC.....	169
4.2.2	Kritische Betrachtung.....	170
4.3	<i>Zellproliferation</i>	171
4.3.1	Einfluss von L-Arginin	171
4.3.2	Einfluss des FCS-Gehalts.....	171
4.3.3	Einfluss einzelner Zusätze	172
4.3.4	Donorabhängige Variabilität.....	172
4.3.5	Methodische Limitationen	173
4.3.6	Zellkultivierung	173
4.3.7	Kritische Betrachtung Isolation	174
4.3.8	Mikrobielle Kontamination.....	175
4.3.9	Weitere Versuche	175
4.3.10	Zusammenfassung	176
4.4	<i>Enzymexpression</i>	176
4.4.1	Analyse der Proteinexpression	176
4.4.2	Spenderspezifische Unterschiede	180
4.4.3	Kritische Betrachtung Proteinexpression	181
4.5	<i>Osteogene Differenzierung</i>	183
4.5.1	Alizarinrot-S-Färbung und Rücklösung sowie kritische Betrachtung	183
4.5.2	Effekte von L-Arginin und assoziierten Mediatoren	185
4.5.3	Weitere Aspekte.....	195
4.5.4	Fazit	200

4.6	<i>Kritische Betrachtung Spender</i>	200
4.6.1	Inter- und intraindividuelle Variabilität der Spenderzellen.....	200
4.6.2	Einfluss der Passagezahl.....	202
4.6.3	Methodische und biologische Konsequenzen für die Interpretation	204
4.7	<i>Überarbeitung Versuchsaufbau</i>	204
4.8	<i>Schlussfolgerungen</i>	209
4.9	<i>Ausblick</i>	210
5	Literatur- und Quellenverzeichnis	214
6	Anhang	236
6.1	<i>Standard Operating Procedures (SOP)</i>	236
6.1.1	Isolation dentaler Stammzellen aus der Zahnpulpa.....	237
6.1.2	Enzymatisches Passagieren mit Trypsin-EDTA	241
6.1.3	Zellzählung mit Trypanblau.....	243
6.1.4	Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	244
6.1.5	FACS-Charakterisierung	246
6.1.6	Proteinisolierung und Konzentrationsbestimmung.....	247
6.1.7	Western Blot Semi-Dry Blotting	251
6.1.8	CellTiter-Blue®-Viability Assay	261
6.1.9	Differenzierungsmedien	262
6.1.10	Alizarinrot-S-Färbung	263
6.2	<i>Weitere Ergebnisse</i>	265
6.2.1	Versuche zur Zellproliferation	265
6.2.2	Erster Vorversuch zur Zellproliferation.....	265
6.2.3	Zweiter Vorversuch zur Zellproliferation	266
6.2.4	FCS-Nebenversuch	272
6.2.5	Wachstumsversuch in OM.....	283
6.2.6	Fazit	286
6.2.7	OM mit 1,5 % FCS (Differenzierungsversuch).....	286

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Dentale Stammzellen	5
Abb. 2: Zahnaufbau	7
Abb. 3: Osteogenese und beteiligte Zelltypen	10
Abb. 4: RANK-RANKL-OPG-Achse und ihre Effekte auf Osteoklasten und Osteoblasten	16
Abb. 5: NO-Bildung durch verschiedene NOS-Isoformen	24
Abb. 6: NO und dessen Rolle im Knochenstoffwechsel	32
Abb. 7: Einfluss der L-Arginin/NO-Achse auf Osteoblasten, Osteoklasten und Knochen	33
Abb. 8: Tissue Engineering.....	43
Abb. 9: Zielsetzung der Versuche und Aufbau der Arbeit	46
Abb. 10: Isolation dentaler Stromazellen aus der Pulpa	63
Abb. 11: Neubauer-Zählkammer	66
Abb. 12: Reduktion von Resazurin zu Resorufin im CellTiter-Blue®-Assay	71
Abb. 13: 24-Well-Platten mit OM- und RPMI-Medien.....	74
Abb. 14: 24-Well-Platte mit OM- und DMEM ohne L-Arginin-Medien	75
Abb. 15: Durchflusszytometrische Charakterisierung dentaler Stromazellen	78
Abb. 16: Relative CTB-Signale zur Beurteilung der Zellviabilität in Standardmedien	80
Abb. 17: Relative CTB-Signale zur Beurteilung der Zellviabilität in DMEM ohne L-Arginin-Medien	82
Abb. 18: Zellviabilitäts-Assay: Vergleich L-Arginin-haltiger und -freier Medien, Tag 5	83
Abb. 19: Zellwachstum DSC zu Beginn.....	84
Abb. 20: Prozentuale Zunahme der CTB-Signale im Standardmedium an Tag 5.....	85
Abb. 21: Prozentuales Wachstum einzelner Spender in Standardmedien an Tag 5.....	87
Abb. 22: Prozentuale Zunahme der CTB-Signale in DMEM ohne L-Arginin an Tag 5.....	89
Abb. 23: Prozentuales Wachstum einzelner Spender in DMEM ohne L-Arginin an Tag 5.....	91
Abb. 24: Western-Blot zur Darstellung der Arginase-1-Expression	93
Abb. 25: Darstellung der Arginase-1-Expression nach Spendern	94
Abb. 26: Vergleich der Arginase-1-Expression in Standardmedium und OM	95

Abb. 27: Western-Blot zur Darstellung der Arginase-2-Expression	96
Abb. 28: Darstellung der Arginase-2-Expression nach Spendern, Ausschnitt	97
Abb. 29: Vergleich der Arginase-2-Expression in Standardmedium und OM	98
Abb. 30: Western-Blot zur Darstellung der CAT-1-Expression.....	99
Abb. 31: Darstellung der CAT-1-Expression nach Spendern	100
Abb. 32: Vergleich der CAT-1-Expression in Standardmedium und OM.....	101
Abb. 33: Western-Blot zur Darstellung der CAT-2 (Invitrogen)-Expression.....	102
Abb. 34: Darstellung der CAT-2 (Invitrogen)-Expression nach Spendern.....	103
Abb. 35: Vergleich der CAT-2 (Invitrogen)-Expression in Standardmedium und OM.....	104
Abb. 36: Western-Blot zur Darstellung der CAT-2 (SantaCruz)-Expression	105
Abb. 37: Darstellung der CAT-2 (SantaCruz)-Expression nach Spendern.....	106
Abb. 38: Vergleich der CAT-2 (SantaCruz)-Expression in Standardmedium und OM	107
Abb. 39: Western-Blot zur Darstellung der eNOS-Expression	108
Abb. 40: Darstellung der eNOS-Expression nach Spendern.....	109
Abb. 41: Vergleich der eNOS-Expression in Standardmedium und OM	110
Abb. 42: Western-Blot zur Darstellung der iNOS-Expression, Nachweisversuch 1	111
Abb. 43: Western-Blot zur Darstellung der iNOS-Expression, Nachweisversuch 2	112
Abb. 44: Vergleich der un- und stimulierten iNOS-Expression	113
Abb. 45: Darstellung DSC in Standardmedium	114
Abb. 46: Darstellung mit Zytokinen stimulierte DSC	114
Abb. 47: Proteinexpression verschiedener Marker bei Spender 1.....	115
Abb. 48: Proteinexpression verschiedener Marker bei Spender 2 in P3.....	116
Abb. 49: Proteinexpression verschiedener Marker bei Spender 2 in P5.....	117
Abb. 50: Proteinexpression verschiedener Marker bei Spender 3.....	118
Abb. 51: Proteinexpression verschiedener Marker bei Spender 4.....	119
Abb. 52: Proteinexpression verschiedener Marker bei Spender 5.....	120
Abb. 53: Proteinexpression verschiedener Marker bei Spender 6.....	121

Abb. 54: Proteinexpression verschiedener Marker bei Spender 7	122
Abb. 55: Proteinexpression verschiedener Marker bei Spender 8	123
Abb. 56: Proteinexpression verschiedener Marker in RAW 264.7-Zellen	124
Abb. 57: Osteogene Differenzierung in OM – lichtmikroskopische Darstellung	126
Abb. 58: Osteogene Differenzierung in OM + 20 mM L-Valin – lichtmikroskopische Darstellung	126
Abb. 59: Osteogene Differenzierung in OM + 10 mM L-Lysin + 10 mM L-Ornithin – lichtmikroskopische Darstellung	127
Abb. 60: Osteogene Differenzierung in OM + 1 mM L-Arginin – lichtmikroskopische Darstellung ...	128
Abb. 61: Osteogene Differenzierung in OM + 0,5 mM L-NIO – lichtmikroskopische Darstellung	128
Abb. 62: Kalzifizierung in OM, Teil 1, Tag 7	130
Abb. 63: Kalzifizierung in OM, Teil 1, Tag 14.....	132
Abb. 64: Osteogene Differenzierung in RPMI ohne L-Arginin – lichtmikroskopische Darstellung	133
Abb. 65: Osteogene Differenzierung in RPMI ohne L-Arginin + 50 µM L-Arginin – lichtmikroskopische Darstellung	134
Abb. 66: Osteogene Differenzierung in RPMI ohne L-Arginin + 200 µM L-Arginin – lichtmikroskopische Darstellung	135
Abb. 67: Osteogene Differenzierung in RPMI mit L-Arginin – lichtmikroskopische Darstellung	135
Abb. 68: Kalzifizierung in RPMI, Teil 1, Tag 7	137
Abb. 69: Kalzifizierung in RPMI, Teil 1, Tag 14	138
Abb. 70: Vergleich der Mineralisierung in RPMI-Medien	140
Abb. 71: Stärkere Mineralisierung in RPMI mit L-Arginin im Vergleich zu anderen RPMI-Medien	141
Abb. 72: Vergleich der Mineralisierung in OM- vs. in RPMI-Medien	142
Abb. 73: Prozentuale Kalzifizierung in OM, Teil 1, Tag 7	143
Abb. 74: Verstärkte Mineralisierung in OM + 10 mM L-Lysin + 10 mM L-Ornithin.....	144
Abb. 75: Prozentuale Kalzifizierung in OM, Teil 1, Tag 14	145
Abb. 76: Prozentuale Kalzifizierung in RPMI, Teil 1, Tag 7	146
Abb. 77: Prozentuale Kalzifizierung in RPMI, Teil 1, Tag 14.....	147
Abb. 78: Osteogene Differenzierung in OM – lichtmikroskopische Darstellung	149

Abb. 79: Osteogene Differenzierung in OM + 20 mM L-Valin – lichtmikroskopische Darstellung	149
Abb. 80: Osteogene Differenzierung in OM + 10 mM L-Lysin + 10 mM L-Ornithin – lichtmikroskopische Darstellung	150
Abb. 81: Osteogene Differenzierung in OM + 1 mM L-Arginin – lichtmikroskopische Darstellung....	150
Abb. 82: Osteogene Differenzierung in OM + 0,5 mM L-NIO – lichtmikroskopische Darstellung	151
Abb. 83: Kalzifizierung in OM, Teil 2, Tag 14.....	152
Abb. 84: Osteogene Differenzierung in DMEM ohne L-Arginin (mit 2 % FCS) – lichtmikroskopische Darstellung	154
Abb. 85: Osteogene Differenzierung in DMEM ohne L-Arginin + 50 µM L-Arginin – lichtmikroskopische Darstellung	154
Abb. 86: Osteogene Differenzierung in DMEM ohne L-Arginin + 200 µM L-Arginin – lichtmikroskopische Darstellung	155
Abb. 87: Kalzifizierung in DMEM ohne L-Arginin, Teil 2, Tag 14.....	156
Abb. 88: Kalzifizierung in DMEM ohne L-Arginin + 50 µM L-Arginin, alle Spender einzeln	157
Abb. 89: Kalzifizierung in DMEM ohne L-Arginin + 200 µM L-Arginin, alle Spender einzeln	158
Abb. 90: Prozentuale Kalzifizierung in OM, Teil 2	160
Abb. 91: Prozentuale Kalzifizierung in DMEM ohne L-Arginin, Teil 2	162
Abb. 92: Kalzifizierung in OM, Teil 1 und 2 zusammengefasst, Tag 14.....	164
Abb. 93: Vergleich der Mineralisierung in OM-Medien und Zusätzen.....	165
Abb. 94: Prozentuale Kalzifizierung in OM, Teil 1 und 2 zusammengefasst, Tag 14	167
Abb. 95: Darstellung zellfreier Randbereiche in den Wells.....	174
Abb. 96: Abgelöste Zellen beim Waschen	184
Abb. 97: Modell der Mediator-Einflüsse	186
Abb. 98: Ausgeprägte Mineralisierung unter OM + 10 mM L-Lysin + 10 mM L-Ornithin	187
Abb. 99: Inhomogene Mineralisierung eines Spenders unter denselben Mediumbedingungen	201
Abb. 100: Von DSC zum biotechnologisch hergestellten Zahn.....	212
Abb. 101: Zellzahlentwicklung von Spender 1 im zweiten Wachstumsvorversuch	268
Abb. 102: Prozentuales Wachstum von Spender 1 im zweiten Wachstumsvorversuch	269

Abb. 103: Zellzahlentwicklung von Spender 2 im zweiten Wachstumsvorversuch	270
Abb. 104: Prozentuales Wachstum von Spender 2 im zweiten Wachstumsvorversuch	271
Abb. 105: Einfluss verschiedener FCS-Konzentrationen und Zusätze auf die Zellproliferation, Mittelwerte der Spender	274
Abb. 106: Einfluss verschiedener FCS-Konzentrationen und Zusätze auf die Zellproliferation, Einzelwerte der Spender	275
Abb. 107: FCS-Versuch, OM, Tag 1 – lichtmikroskopische Darstellung	276
Abb. 108: DMEM ohne L-Arginin, mit OM, + 200 μ M L-Arginin, 2,5 % FCS – lichtmikroskopische Darstellung	277
Abb. 109: DMEM ohne L-Arginin, mit OM, + 200 μ M L-Arginin, 5 % FCS – lichtmikroskopische Darstellung	277
Abb. 110: DMEM ohne L-Arginin, mit OM, + 200 μ M L-Arginin, 10 % FCS – lichtmikroskopische Darstellung	278
Abb. 111: DMEM ohne L-Arginin, mit OM und 2,5 % FCS – lichtmikroskopische Darstellung.....	278
Abb. 112: DMEM ohne L-Arginin, mit OM und 5 % FCS – lichtmikroskopische Darstellung	279
Abb. 113: DMEM ohne L-Arginin, mit OM und 10 % FCS – lichtmikroskopische Darstellung.....	279
Abb. 114: OM-Kontrolle, Tag 2 – lichtmikroskopische Darstellung.....	280
Abb. 115: DMEM ohne L-Arginin, ohne OM, + 200 μ M L-Arginin, 2,5 % FCS – lichtmikroskopische Darstellung	280
Abb. 116: DMEM ohne L-Arginin, ohne OM, + 200 μ M L-Arginin, 5 % FCS – lichtmikroskopische Darstellung	281
Abb. 117: DMEM ohne L-Arginin, ohne OM, + 200 μ M L-Arginin, 10 % FCS – lichtmikroskopische Darstellung	281
Abb. 118: DMEM ohne L-Arginin, ohne OM und 2,5 % FCS – lichtmikroskopische Darstellung	282
Abb. 119: DMEM ohne L-Arginin, ohne OM und 5 % FCS – lichtmikroskopische Darstellung.....	282
Abb. 120: DMEM ohne L-Arginin, ohne OM und 10 % FCS – lichtmikroskopische Darstellung	283
Abb. 121: Prozentuales Wachstum in OM	285
Abb. 122: Kalzifizierung in OM mit 1,5 % FCS	287

1 Einleitung

1.1 Allgemein

Die Regeneration von Knochengewebe stellt trotz bedeutender Fortschritte in der rekonstruktiven Medizin weiterhin eine zentrale Herausforderung dar – insbesondere bei ausgedehnten ossären Defekten im kraniofazialen Bereich. Solche Defekte können sowohl durch traumatische Ereignisse als auch durch pathologische Prozesse bedingt sein, wie etwa Frakturen, Osteomyelitiden, Tumorresektionen, Osteoporose oder medikamenteninduzierte Kiefernekrosen (z. B. *MRONJ*). Die Rekonstruktion betroffener Strukturen ist häufig mit funktionellen und ästhetischen Einschränkungen sowie mit erheblicher patientenbezogener Belastung verbunden.

Ein innovativer Ansatz zur Förderung der Knochenneubildung besteht in der Nutzung mesenchymaler Stromazellen (MSC), die zur osteogenen Differenzierung fähig sind. Die Zahnpulpa stellt hierbei eine relativ einfach zugängliche und ethisch unbedenkliche Quelle für solche Zellen dar. Aus extrahierten Weisheitszähnen isolierte dentale Stromazellen (*dental stromal cells*, DSC) weisen ein hohes Differenzierungspotential auf und können im Rahmen des *Tissue Engineering* zur Herstellung knöcherner Strukturen *in vitro* eingesetzt werden.

Im Kontext zellulärer Osteogenese rückt die Rolle von L-Arginin zunehmend in den Fokus wissenschaftlicher Untersuchungen. L-Arginin ist eine semi-essenzielle Aminosäure, die als Substrat für Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) sowie für Arginasen dient und somit an zentralen Signal- und Stoffwechselwegen beteiligt ist. Insbesondere Stickstoffmonoxid (NO), ein Produkt der NOS, ist nachweislich in die Regulation der Knochenhomöostase involviert. Ein Mangel an L-Arginin – wie er häufig im Alter, bei systemischen Erkrankungen oder im Rahmen von Mangelernährung auftritt – kann die osteogene Aktivität negativ beeinflussen. Vor diesem Hintergrund erscheint die gezielte Modulation des L-Arginin-Stoffwechsels als potenzieller therapeutischer Ansatz zur Förderung der Osteogenese.

1.2 Stamm- und Stromazellen

1.2.1 Allgemein

Stammzellen sind undifferenzierte Zellen, die sich regelmäßig teilen und sowohl Tochterzellen, die sich selbst reproduzieren, als auch Zellen, die sich weiter differenzieren, bilden (Atari et al., 2012; Gilbert, 2010; Khan et al., 2012). Sie zeichnen sich durch Plastizität aus und können sich in Zellen unterschiedlicher Keimblätter differenzieren (Visvader & Lindeman, 2011). Stammzellen haben im Vergleich zu differenzierten Zellen ein unterschiedliches Genexpressionsmuster. Eine große Zahl von Faktoren, wie z. B. Hormone, Matrixfaktoren, Oxidation oder Strahlung, kann mit dem jeweiligen spezifischen Genexpressionsprogramm der Zellen interagieren (Vgl. Horn, 2021, S. 607-608; Vgl. Welsch, 2018, S. 84-85).

1.2.2 Embryonale Stammzellen

Embryonale Zellen sind im frühen Stadium totipotent bzw. omnipotent und können einen gesamten Organismus generieren (Atari et al., 2012; Gilbert, 2010). Im Blastozystenstadium verlieren sie diese Fähigkeit und werden pluripotent, d. h., sie können zu allen Geweben des Körpers differenzieren, aber nicht mehr zu extraembryonalen Geweben. Diese Zellen werden als embryonale Stammzellen bezeichnet. Auch die Zellen der Zahnpulpa sind pluripotent (Tataria et al., 2006).

Mit embryonalen Stammzellen wird in der experimentellen Forschung u. a. zum therapeutischen Klonen gearbeitet. Ziel dieser Forschung ist die Gewinnung von Zellen, die z. B. infolge von Krankheiten zugrunde gegangene Gewebe wieder neu aufbauen können. Allerdings bestehen auch noch einige Schwierigkeiten dabei. Eine fatale Nebenwirkung ist z. B. die Entstehung von Teratomen (Knoepfler, 2009). Da humane embryonale Stammzellen nur aus Embryonen gewonnen werden können, besteht eine stark berechtigte ethische Kritik an dieser Forschung.

1.2.3 Adulte Stammzellen

Adulte Stammzellen sind weniger differenzierungsfähig als embryonale Zellen (Gilbert, 2010; Krinner & Roeder, 2014) und kommen in verschiedenen Geweben vor. Dazu zählen unter anderem hämatopoetische, mesenchymale, neuronale und kardiale Stammzellen. Sie dienen der Regeneration und Reparatur von Geweben, verbleiben zeitlebens in Stammzellnischen verschiedener Organe (Krinner & Roeder, 2014) und werden daher auch

als Progenitorzellen bezeichnet. Ihr Potenzial zur Differenzierung schränkt sich jedoch über verschiedene Entwicklungsstadien immer weiter ein. Von zentraler Bedeutung ist die Wirkung regulatorischer Faktoren und hormonähnlicher Mediatoren, die die unterschiedlichen Differenzierungslinien koordiniert aktivieren oder hemmen. Zu den primär stimulierenden Signalen zählen insbesondere Zytokine. Sie wirken in komplexer Weise – oft in wechselnden Kombinationen – synergistisch auf die Proliferation der verschiedenen Differenzierungsstadien ein (Welsch, 2018). Vor allem Interleukine und *CSF (colony-stimulating factors)* spielen hier eine wichtige Rolle. Für verschiedene Stadien sind unterschiedliche Kombinationen kennzeichnend. Aber auch die Umgebung im Knochenmarksstroma ist für die Differenzierung bedeutend. Die Zellen können über Integrin-Rezeptoren mit der EZM oder anderen Zellen in Kontakt treten und so Differenzierungssignale empfangen.

Hemmende Faktoren können z. B. Interferone, Tumornekrosefaktor und Makrophagenproteine sein (Vgl. Heinrich, 2014, S. 863 f.; Vgl. Schmidt, 2010, S. 482-483; Vgl. Welsch, 2018, S. 234-239).

Mit zunehmender Entwicklung werden also aus pluripotenten Zellen multipotente, welche sich nicht mehr in alle Gewebe, aber in mehr als einen Zelltyp differenzieren können (Gilbert, 2010). Das geringste Differenzierungspotential weisen unipotente Stammzellen auf, welche lediglich Zellen des eigenen Typs hervorbringen können (Dulak et al., 2015). Man kann festhalten, dass sich das prospektive Potential also zunehmend verringert (Visvader & Lindeman, 2011).

1.2.4 Mesenchymale Stammzellen

Mesenchymale Stammzellen (MSC) weisen bereits ein reduziertes Differenzierungspotential auf, können sich aber noch in verschiedene Zelltypen differenzieren (Sobhani et al., 2017). Sie finden sich in Geweben wie z. B. Knochenmark, Fettgewebe und Zähnen (Bunnell et al., 2008; Cai et al., 2012; Gilbert, 2010; Kern et al., 2006; Wong, 2011; Yang et al., 2012; Zuk et al., 2002). MSC können sich u. a. in Knochen-, Knorpel- und Fettzellen differenzieren (Bianco, 2014; Cai et al., 2012; Gilbert, 2010; Niemeyer et al., 2010; Pittenger et al., 1999; Qi et al., 2018; Vater et al., 2011; Yang et al., 2012). Der Begriff umfasst daher eine Gruppe heterogener, multipotenter Zellen aus dem Mesenchym, deren Hauptaufgaben die Aufrechterhaltung, die Reparatur und das Wachstum der Zielgewebe umfassen (Krinner & Roeder, 2014). Sie proliferieren in Fibroblasten-ähnlichen Kolonien, differenzieren sich in die wichtigsten mesenchymalen Zelltypen, wachsen adhärent an Plastikoberflächen und weisen spezielle CD-Moleküle auf

ihrer Oberfläche auf (Choudhery et al., 2014; Dominici et al., 2006; Gimble & Nuttall, 2012; Lee et al., 2004; Wong, 2011). Als CD-Moleküle (*cluster of differentiation*, CD) bezeichnet man unterschiedliche phänotypische Proteinmarker auf der Oberfläche von Zellen, die zu deren Charakterisierung genutzt werden. CD-Antigene dienen sowohl der Unterscheidung von Zellphänotypen als auch der Einordnung ihrer Differenzierungs- und Aktivierungszustände. Zur Identifikation nutzt man etwa Fluorophor-markierte Antikörper, die mittels Fluoreszenzmikroskopie oder Durchflusszytometrie ausgewertet werden (Vgl. Heinrich, 2014, S. 887 und 903; Vgl. Horn, 2021, S. 713; Vgl. Schmidt, 2010, S. 489; Vgl. Welsch, 2018, S. 222).

Typisch für mesenchymale Stammzellen sind CD29, CD44, CD73, CD90 und CD105 (Takemitsu et al., 2012). Dabei handelt es sich um eindeutige Marker für den Nachweis der Stammzellidentität und sie dienen auch der Bestimmung des Anteils der Stammzellen an der Gesamtzellzahl. Für die Marker CD31, CD34 und CD45 sollen die mesenchymalen Stammzellen überwiegend negativ sein (Gimble et al., 2007; Gimble & Nuttall, 2012; Heinrich, 2014; Zong et al., 2010).

1.2.5 Dentale Stammzellen

Es gibt verschiedene Arten von dentalen Stammzellen, darunter solche aus der apikalen Papille (SCAP), dem Parodont (PDLSC), der Pulpa (DSC) und Milchzähnen (SHED) (siehe **Abb. 1: Dentale Stammzellen**). Nachfolgend werden die relevanten Zellarten beschrieben.

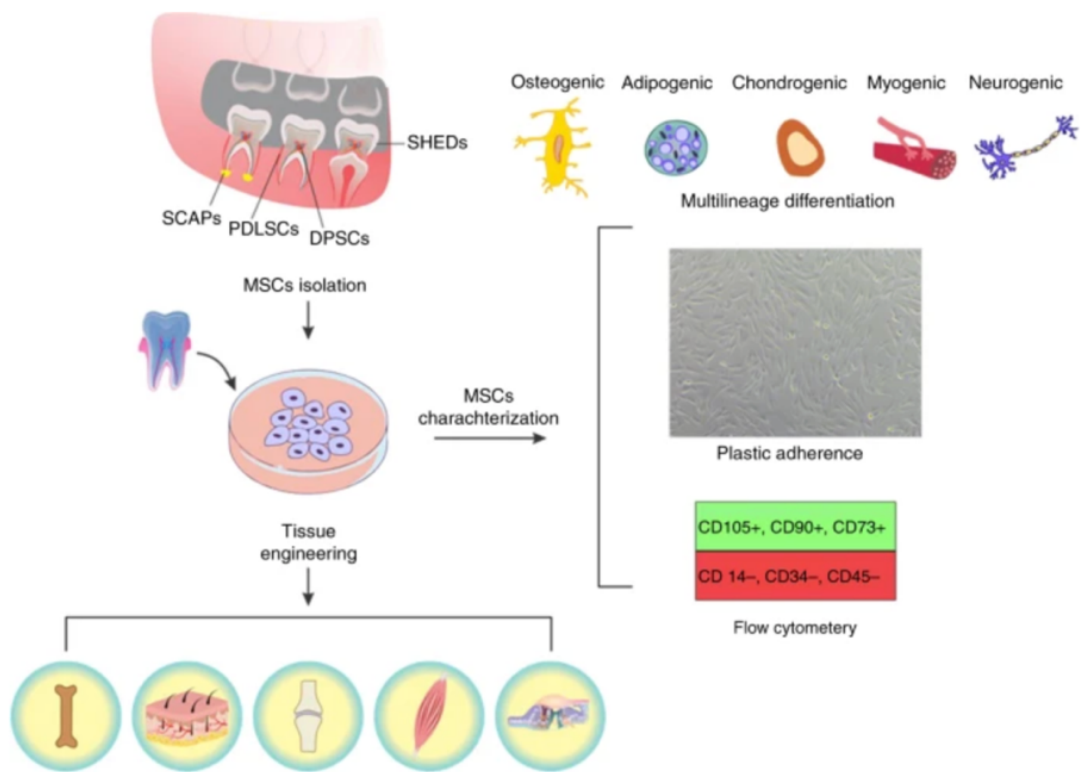


Abb. 1: Dentale Stammzellen

Schematische Übersicht: Oben links sind die wichtigsten Typen dentaler Stammzellen und ihre Herkunftsgewebe (SCAP, PDLSC, DPSC, SHED) dargestellt. Mittig und unten links erkennt man exemplarisch deren Isolation, die differenzielle Kultivierung mit anschließender Geweberichtung sowie potenzielle Zielorte im *Tissue Engineering*. Rechts sind die Mindestkriterien für mesenchymale Stammzellen (MSC) nach *ISCT*: Adhärenz an Kunststoff, Positivität für CD73, CD90 und CD105 bei gleichzeitiger Negativität für CD14, CD34 und CD45. Weitere Erläuterungen siehe Fließtext. SCAP = Stammzellen der apikalen Papille, PDLSC = parodontale Stammzellen, DPSC = Pulpastammzellen, SHED = Milchzahnstammzellen, MSC = mesenchymale Stammzellen, CD = *cluster of differentiation*. Darstellung nach (Sevari et al., 2021).

1.2.5.1 Pulpastromazellen (DSC)

Seit mehreren Jahren ist bekannt, dass Stammzellen aus der Pulpa adulter Spender isoliert werden können. Diese werden als *dental derived stem cells* (DSC) bezeichnet und enthalten sowohl multi- als auch pluripotente Stamm-, Stroma- und Progenitorzellen (Takemitsu et al., 2012; Tataria et al., 2006). Dabei handelt es sich u. a. um mesenchymale Stamm- bzw. Stromazellen, hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen, Endothelzellen, Fibroblasten, Lymphozyten, Makrophagen, Monozyten sowie Perizyten (Bourin et al., 2013; Cawthorn et al., 2012; Cousin et al., 2003; Han et al., 2010; McIntosh et al., 2006; Mitchell et al., 2006). Aus diesem Grund wird in der Literatur und auch in der hier vorliegenden Arbeit von Stromazellen und nicht nur von Stammzellen gesprochen (Bourin et al., 2013; Han et al., 2010).

DSC lassen sich unter anderem zu Osteoblasten differenzieren (Li et al., 2011). Sie wachsen ebenfalls plastikadhärent und können in immunsupprimierten Mäusen dentinähnliche Strukturen ausbilden (Gronthos et al., 2000). Genau wie bei iPS-Zellen kann unter bestimmten Voraussetzungen die Fähigkeit zur Bildung von Teratomen und von *embryoid bodies* nachgewiesen werden (Atari et al., 2012).

Sie eignen sich gut zur Stammzellisolation, da sie im Vergleich zu anderen Geweben deutlich einfacher zugänglich sind (Gronthos et al., 2000; Huang et al., 2009). Außerdem können trotz ihrer geringen Größe und trotz eines altersbedingten Volumenverlusts der Pulpa eine große Menge an Stammzellen isoliert werden (Atari et al., 2012; Pierdomenico et al., 2005).

Auch heute werden insbesondere die dritten Molaren häufig aus medizinischen Gründen extrahiert (Friedman, 2007). Weisen sie eine gesunde Pulpa auf, kann man aus ihnen verhältnismäßig einfach DSC gewinnen (Gronthos et al., 2000). Aus diesem Grund ist die dentale Pulpa eine nicht außer Betracht zu lassende Quelle für mesenchymale Stromazellen, die sich u. a. im Rahmen des *Tissue Engineering* nutzen lässt (Li et al., 2011).

1.2.5.2 Milchzahnstammzellen (SHED)

Milchzahnstammzellen (SHED) werden aus dem verbleibenden Pulpagewebe nach der Exfoliation von Milchzähnen gewonnen. Sie proliferieren besser als DSC und können ebenfalls Knochen bilden (Chadipiralla et al., 2010).

1.2.5.3 Parodontstammzellen (PDLSC)

Auch aus dem Parodont lassen sich Stammzellen isolieren. Studien zeigten, dass sich mit Retinoidsäuren behandelte PDLSC besser osteogen differenzieren als DSC (Chadipiralla et al., 2010).

1.2.6 Zähne

1.2.6.1 Aufbau der Zähne

Makroskopisch besteht ein Zahn aus mehreren Schichten: Schmelz, Dentin, Zement und Pulpa (siehe **Abb. 2: Zahnaufbau**). Das Dentin bildet den größten Teil des Zahns und erstreckt sich über den gesamten Zahn, während die Zahnkrone zusätzlich von Schmelz und die Wurzel von Zement bedeckt sind. Die Pulpahöhle ist von Dentin umgeben, erweitert sich im Bereich der Krone zur *Cavitas dentis* und verengt sich im Bereich der Wurzel zum

Canalis dentis. An der Wurzelspitze endet der Kanal im *Foramen apicale*, durch welches Nerven und Gefäße in die Pulpahöhle gelangen (Vgl. Samandari, 2009, S. 95).

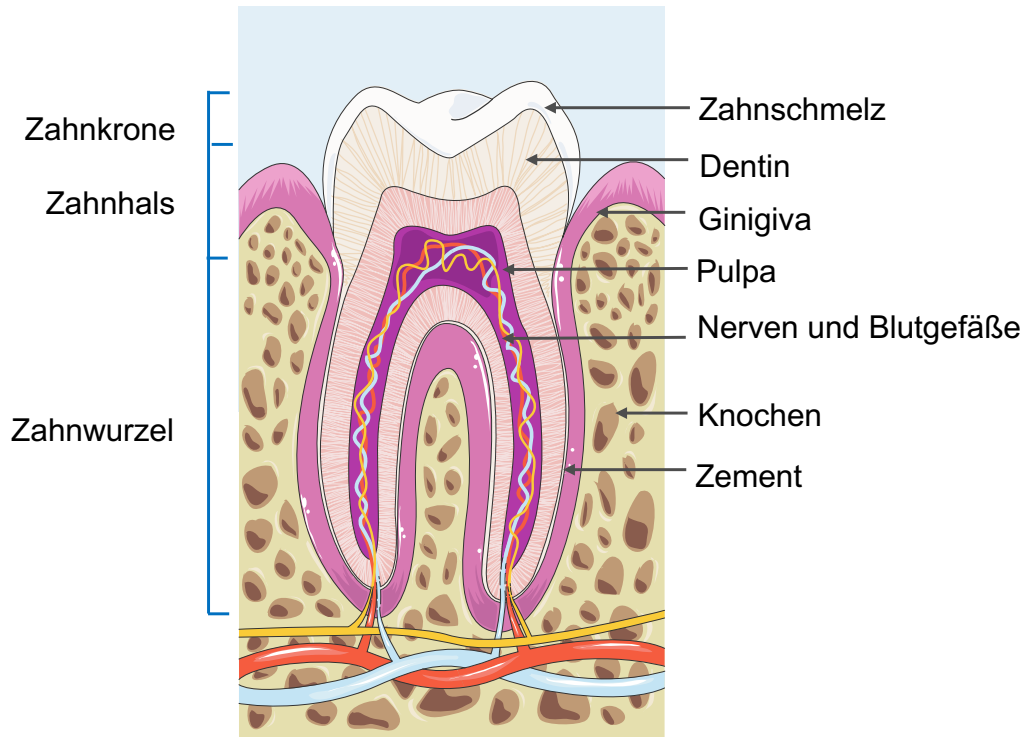


Abb. 2: Zahnaufbau

Schematische sagittale Schnittdarstellung eines menschlichen Zahns mit Kronen- und Wurzelanteilen. Ausgewiesen sind Schmelz, Dentin, Zement, Pulpa, Wurzelkanalsystem bis zum Apex, Alveolarknochen und Gingiva. Die Abbildung verdeutlicht die topografischen Beziehungen zwischen Hartgeweben und Stützapparat und dient als anatomische Referenz für die im Text diskutierten regenerativen Konzepte. Modifizierte Darstellung nach (SERVIER MEDICAL ART, 2016b).

In der Regel besitzen Menschen erst 20 Milchzähne, die später durch mindestens 28 permanente Zähne ersetzt werden (Hellwig, 2023). Beim Zahnwechsel kommt es durch Osteoklasten zur Resorption der Milchzähne, was dann zur Exfoliation führt.

Die Wurzel ist beim Zahndurchbruch noch nicht vollständig ausgebildet und entwickelt sich danach weiter (Vgl. Samandari, 2009, S. 114-116; Vgl. Welsch, 2018, S. 362-369). Bis zum Wachstumsabschluss der Wurzelspitze (Apexifikation) besitzt der Zahn noch Gewebeteile, die für das Wurzellängenwachstum verantwortlich sind. Wird die Papille beschädigt, so findet kein weiteres Wurzellängenwachstum und keine Bildung des *Foramen apicale* statt (Vgl. Horch, 2003, S. 239 ff.). Zähne mit gebildeter Krone, aber noch nicht ausgebildeter Wurzel, werden als Germe bezeichnet. Der Zahnkeim wird dabei durch das recht derbe,

fibrose Zahnsäckchen ernährt. Dieses enthält noch embryonales Gewebe, das die weitere Entwicklung des Keims festlegt. Wird das Zahnsäckchen zerstört, so bildet sich kein Wurzelzement, kein Desmodont und kein Alveolarknochen aus und der Zahnkeim wird resorbiert.

Als Parodont bezeichnet man alle Weich- und Hartgewebe, die die federnde Aufhängung des Zahnes in der Alveole ermöglichen. Dazu gehören Desmodont, Zement, Alveolarknochen und Gingiva. Diese bilden eine funktionelle Einheit, deren krankhafte Veränderungen zu Parodontitis führen können (Vgl. Samandari, 2009, S. 100).

Das Desmodont liegt zwischen Zementoberfläche und Alveole, ist stark vaskularisiert und besteht aus straffen Fasern, die den Zahn mit dem Knochen verbinden. Es besitzt eine große Plastizität, enthält sensible Nervenendigungen und kann auf Veränderungen der Form oder der Belastung des Zahnes und der Alveole mit entsprechendem Umbau reagieren. Der Erhalt des Desmodonts und des Alveolarknochens ist abhängig von der Kaubeanspruchung. Durch den Verlust einzelner Zähne kommt es zu einer zunehmenden Atrophie des gesamten Parodonts und zur Auflösung des Desmodonts (Vgl. Samandari, 2009, S. 100-101).

Auch die Gingiva ist Teil des Zahnhalteapparates. Sie hält die Krone fest, dichtet das Desmodont nach außen ab und verhindert so eine Kommunikation mit der Mundhöhle (Vgl. Samandari, 2009, S. 117).

1.2.6.2 *Weisheitszähne*

Weisheitszähne weisen eine große Variabilität in ihrer Morphologie sowie in Form und Anzahl ihrer Wurzeln auf. Der Durchbruch kann zwischen dem 15. und 30. Lebensjahr oder gar nicht erfolgen. Im Alter von 20 Jahren liegt die Inzidenz retinierter unterer Weisheitszähne bei ca. 84 %. Spätestens ab dem 16. Lebensjahr kann ein Weisheitszahn radiologisch dargestellt werden, wobei etwa 15 bis 33 % der dritten Molaren nicht angelegt sind. Allgemein kann man retinierte und impaktierte Zähne belassen, kieferorthopädisch einordnen, transplantieren oder operativ entfernen. Indikationen zur operativen Entfernung können Resorptionen benachbarter Zähne, Zysten, Entzündungen oder eine geplante prothetische Therapie sein. Außerdem kann eine Indikation bei Fokussuche, bei Unterkieferfrakturen und bei Zähnen, die sich im Bruchspalt einer Fraktur befinden, bestehen. Etwa 55 Prozent der Weisheitszähne werden aufgrund von entzündlichen Prozessen extrahiert (Eckelt, 2019).

Liegt keine Indikation vor, sollte auch keine prophylaktische Weisheitszahnentfernung erfolgen (Vgl. Friedman, 2007; Horch, 2003, S. 158 ff. und S. 239 ff.). Ist die Indikation

jedoch gestellt worden und der Patient lehnt mögliche Therapiealternativen ab, sollte die Entfernung möglichst bei noch nicht vollständig abgeschlossenem Wurzelwachstum erfolgen, da die Komplikationsrate dann am geringsten und die Zahnentfernung am unkompliziertesten ist. In den USA werden jährlich etwa 10 Millionen Weisheitszähne extrahiert (Friedman, 2007).

1.3 Knochen

1.3.1 Allgemein

Knochen sind ein wesentlicher Bestandteil des Bewegungsapparates und bestehen aus spezialisiertem, festem Bindegewebe, dessen besondere Eigenschaften auf der Zusammensetzung seiner Matrix und den darin eingelagerten Calciumsalzen beruhen. Sie dienen nicht nur als Stütze und Schutz für Organe, sondern auch als Calciumspeicher und Ort der Blutbildung (Zelzer & Olsen, 2003). Der menschliche Körper enthält 206 Knochen, die in Röhrenknochen, kurze Knochen und flache Knochen unterteilt werden. Knochenaufbau erfolgt durch Osteoblasten, während der Abbau durch Osteoklasten gesteuert wird (Vgl. Heinrich, 2014, S. 952 ff.; Vgl. Schmidt, 2010, S. 688; Vgl. Welsch, 2018, S. 133).

1.3.2 Knochenaufbau

Die hohe Festigkeit von Knochen resultiert aus der speziellen Anordnung von Hydroxylapatitkristallen und Kollagenfibrillen. Der Grundbaustein des ausgereiften Knochens ist das Osteon. Dabei handelt es sich um einen Zylinder mit einem Zentralgefäß. Die Kollagenfasern sind parallel schraubenartig in Längsrichtung um das Osteon gewunden. Dies erklärt die hohe mechanische Stabilität in Längsrichtung des Osteons. Zwischen Osteonen liegen Reste alter, abgebauter Osteone. Sie sind Ausdruck des ständigen Knochenumbaus (Vgl. Welsch, 2018, S. 140).

Die spezielle Matrix verleiht dem Knochen hohe Zug- und Druckfestigkeit und erlaubt hohe Torsions- sowie Biegebeanspruchung. Knochen kann mit der Zeit und je nach lokaler Beanspruchung funktionsgerecht modelliert und individuell verformt werden. Gesunder Knochen ist ein dynamisches Gewebe, das einem ständigen Umbau unterliegt.

Der Knochen besteht aus kompakter Kortikalis und trabekulärer Spongiosa, wobei die Spongiosa blutbildendes Gewebe oder Fettgewebe enthält (Vgl. Schwenzer, 2011, S. 165). Die Knochenoberfläche wird vom Periost bedeckt, während die Binnenräume von Endost

umgeben sind. Es besteht aus flachen, endostalen Knochendeckel- bzw. Saumzellen. Im Bindegewebe unter diesen ruhenden Osteoblasten befinden sich mesenchymale Stammzellen, Osteoblastenvorläufer und auch Osteoklastenvorstufen (Vgl. Samandari, 2009, S. 11-14; Vgl. Schwenzer, 2011, S. 165; Vgl. Welsch, 2018, S. 134 ff. und S.145).

Knochengewebe besteht zu etwa 25 % aus organischer Matrix, überwiegend Kollagen, und zu 75 % aus anorganischen Mineralien wie Calcium und phosphathaltigem Hydroxylapatit. Diese Mineralsalze sind entscheidend für die Festigkeit und Mineralisierung des Knochens. Lösliche Knochenproteine enthalten Signalmoleküle, Wachstumsfaktoren, Differenzierungsfaktoren und knochenspezifische Proteine (Vgl. Heinrich, 2014, S. 953; Vgl. Horch, 2003, S.347; Vgl. Schmidt, 2010, S. 758).

1.3.3 Knochenzellen

Bei den Knochenzellen unterscheidet man Osteoprogenitorzellen, Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten (siehe **Abb. 3: Osteogenese und beteiligte Zelltypen**).

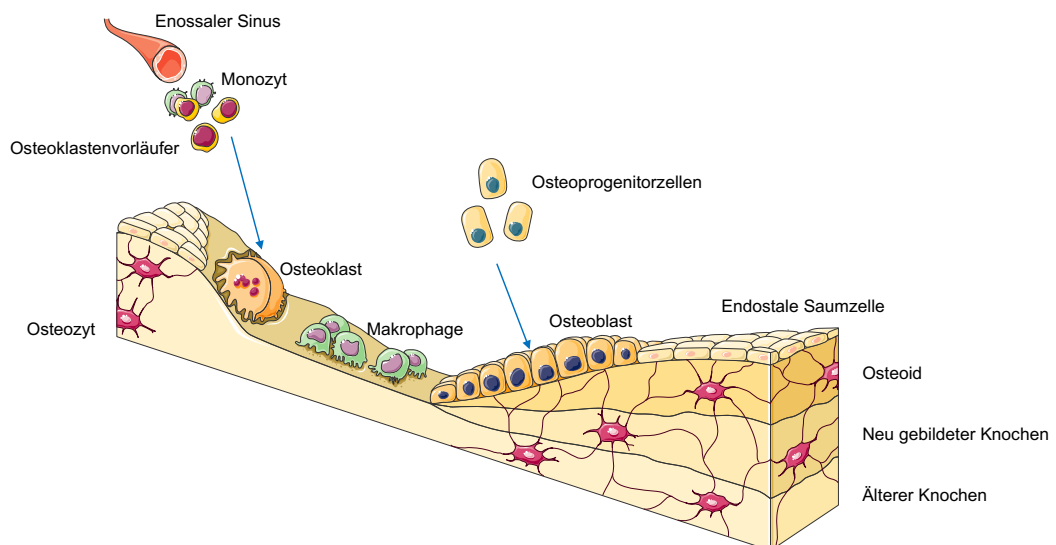


Abb. 3: Osteogenese und beteiligte Zelltypen

Schematische Übersicht der zellulären Akteure der Knochenbildung und -remodellierung. Dargestellt sind die mesenchymale Stammzelllinie (Osteoprogenitorzellen, Osteoblasten, Osteozyten, endostale Saumzellen) sowie die hämatopoetische Linie der Osteoklasten (Monozyten, Makrophagen, Osteoklastenvorläuferzellen, Osteoklasten). Ausgewiesen sind die Kernfunktionen: Matrixsynthese und -mineralisation durch Osteoblasten, Resorption durch Osteoklasten, mechanosensorische Steuerung und *Remodelling*-Regulation durch Osteozyten, Oberflächenhomöostase durch Saumzellen. Erläuterungen zu Funktionen und Signalwegen siehe Fließtext. Modifizierte Darstellung nach (SERVIER MEDICAL ART, 2016a).

Osteoblasten und Osteozyten stammen von mesenchymalen Stromazellen ab, Osteoklasten dagegen von hämatopoetischen Vorläufern (Vgl. Schwenzer, 2011, S. 165).

Osteoblasten sind knochenbildende Zellen, die aus Osteoprogenitorzellen entstehen. Bei diesen handelt es sich um multipotente, mesenchymale Stammzellen (MSC). Diese stellen eine Regenerationsreserve dar und werden auch noch bei Erwachsenen im Endost und Periost gefunden. Bei Frakturen können sie aktiviert werden.

Bei Bedarf differenzieren sie zu Osteoblasten, die Knochenmatrix synthetisieren und sich nach terminaler Reifung als Osteozyten in diese Matrix einlagern. Gesteuert wird dieser Prozess durch knochenmorphogenetische Proteine (BMP), diverse Wachstumsfaktoren, Calcitriol sowie die Transkriptionsfaktoren Osterix und *Runt-related transcription factor 2* (Runx2) (Heinrich, 2014). Osteoblasten sind aktiv sezernierend, über Nexus verbunden und liegen auf der Matrixoberfläche. Sie stehen über lange Fortsätze u. a. mit Osteozyten und Osteoklasten in Kontakt. Osteozyten nehmen mithilfe von mechanosensitiven Membrankanälen Beanspruchung oder Schädigungen des Knochens wahr (Crockett et al., 2011) und regulieren den Knochenumbau. Osteoblasten bilden zunächst unverkalktes Osteoid, welches später mineralisiert wird. Osteoblasten werden zu Osteozyten, treten in einen Ruhezustand als endostale Saumzelle ein oder gehen per Apoptose zugrunde. Nach dem 20. Lebensjahr nehmen Osteoblasten in Zahl ab (Vgl. Welsch, 2018, S. 145-146). Außerdem beeinflussen Osteoblasten mit Hilfe des RANK/RANKL/OPG-Systems auch die Aktivität der Osteoklasten (Caetano-Lopes et al., 2007).

Auch **Osteozyten** stimulieren über verschiedene Faktoren die Bildung und Aktivität der Osteoklasten. Mittels *macrophage colony stimulating factor* (M-CSF) der Osteozyten wird die Entstehung von Osteoklasten aus ihren Vorstufen stimuliert. Osteozyten tragen so zu einem erhöhten Knochenumbau bei.

Osteoklasten entstehen aus hämatopoetischen Stammzellen und fusionieren zu mehrkernigen Zellen. Dies wird durch M-CSF, Calcitriol, RANKL und Interleukin (IL) 6 stimuliert. Hierfür ist ein unmittelbarer Zell-Zell-Kontakt zwischen Osteoblasten und Progenitorzellen der Osteoklasten unerlässlich (Heinrich, 2014). Osteoblasten stimulieren die Osteoklasten-Bildung über RANKL, der an den Rezeptor RANK auf den Osteoklastenvorläufern bindet. Ein genetischer *Knockout* von RANK oder RANKL führt, zusätzlich zu ausgeprägten Immundefekten, zu einer vollständigen Blockade der Osteoklastogenese (Heinrich, 2014). Ohne Osteoblasten wird keine Osteoklastogenese ausgelöst. Osteoklasten können unterschiedliche Aktivitätsphasen durchlaufen. Beim Knochen-*Remodelling* übernehmen die Osteoklasten zusammen mit den Osteozyten die Resorption verkalkter Matrix. Dabei entsteht die sogenannte Resorptionslakune, in der die Matrixresorption durch Säure und daraus entstehende pH-Erniedrigung sowie lysosomale

und andere Enzyme erfolgt (Kim et al., 2020; Mulari et al., 2003). Meistens gehen die Osteoklasten nach einigen Tagen durch Apoptose zugrunde.

1.3.4 Knochenumbau

Knochen werden lebenslang umgebaut, etwa 18 % des Calciums im Skelett werden jährlich umgesetzt, und alle zehn Jahre ist das Skelettsystem einmal erneuert. Um sowohl als Stützgewebe als auch als Mineraldepot dienen zu können, unterliegt der Knochen einem ständigen Umbau. Äußere Einflüsse und mechanische Belastungen, die von Osteozyten wahrgenommen werden, lösen Anpassungsprozesse aus. Dieses *Remodelling* erfolgt durch die sogenannte *basic multicellular unit* (BMU), eine organisierte Gruppe von Osteoblasten und Osteoklasten. Mechanische Belastung beeinflusst vor allem die Differenzierung und Aktivität der Osteoblasten und fördert so den Knochenaufbau. Ein adaptives Remodellieren kann bereits innerhalb von Tagen geschehen (Vgl. Schwenger, 2011, S.313). Die Osteoklasten hingegen werden eher von calciumregulierenden Hormonen gesteuert. Der Umbau ist ein ständiger, fortlaufender Prozess, der durch die Wechselwirkung zwischen Osteoblasten und Osteoklasten ein statisches Gleichgewicht aufrechterhält (Vgl. Heinrich, 2014, S. 955 ff.; Vgl. Horch, 2003, S. 347; Vgl. Schmidt, 2010, S. 688 f.; Vgl. Welsch, 2018, S. 134-138). Ohne mechanische Belastung wird Knochen abgebaut (Vgl. Heinrich, 2014, S. 955 ff.; Vgl. Horch, 2003, S. 347; Vgl. Schmidt, 2010, S. 688 f.; Vgl. Welsch, 2018, S. 134-138).

1.3.5 Stammzellen und osteogene Differenzierung

Knochenbildung erfordert die fortlaufende Differenzierung multipotenter Mesenchymzellen und die Proliferation von Osteoprogenitorzellen, die durch Mitogene, Wachstumsfaktoren, und Morphogene, osteoinduktive Faktoren, reguliert werden. Morphogene scheinen die Differenzierung von multipotenten Mesenchymzellen zu Osteoprogenitorzellen zu induzieren, während Mitogene die finale Differenzierung zu Osteoblasten fördern.

Zu den Mitogenen *Insulin-like Growth Factor* 1 und 2 (IGF-1, IGF-2), *Transforming Growth Factor* (TGF-1, -2 und -3), *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF) und *Fibroblast Growth Factor* (FGF), die das Wachstum und die Proliferation fördern. FGF sind an der Extremitätenbildung beteiligt, und Störungen in ihrer Signaltransduktion verursachen Knochenfehlbildungen wie z. B. Kraniosynostosen. Wachstumsfaktoren wie TGF- β , FGF und BMP spielen eine wichtige Rolle bei Umbau und Regeneration. Mitogene, wie z. B. PDGF, können aus dem Blut des Patienten gewonnen werden. Ihre Wirkung ist jedoch auf

neugebildete bzw. bereits im Knochen vorhandene Osteoprogenitorzellen beschränkt, weshalb sie bei größeren Knochendefekten nur begrenzt wirksam sind.

Morphogene können selbst in nicht-ossifizierenden Geweben Knochenerneuerung induzieren und sind so unabhängig von vorhandenen Osteoprogenitorzellen. Bisher sind einige *bone morphogenetic proteins* (BMP) bekannt. BMP-2, -3 bis -7 und -9 gelten als osteoinduktiv, wobei die osteoinduktive Reaktionsweise dosisabhängig ist, je nachdem, wie viele BMP schon lokal vorhanden sind und wie viele BMP im Transplantat vorkommen (Yamaguchi et al., 1991). BMP fördern die Mesenchymkondensation, sichern die Aufrechterhaltung wichtiger Transkriptionsfaktoren und tragen zur Chondrogenese bei, wobei in jeder Phase ein typisches BMP-Expressionsprofil vorliegt (Heinrich, 2014; Komori et al., 1997; Yamaguchi et al., 1991). Außerdem sind sie für die Osteoblasten-Entwicklung essenziell (Vgl. Heinrich, 2014, S. 954 f.; Vgl. Reichart, 2002b, S.445-446). Sie beeinflussen grundlegende Prozesse des *Mesoderm-Patternings*.

Hormonell regulieren PTH, Calcitonin und Calcitriol den Calciumhaushalt, während Wachstumshormon (GH) und IGF-1 und -2 das Längenwachstum während der Embryonalentwicklung und Kindheit fördern. Somatotropin führt mittels IGF zur Bildung und Mineralisierung des Knochens, zur Stimulation der Calcitriolbildung, zur Stimulation enteraler Calcium- und Phosphatabsorption und zur Aktivierung der Osteoblasten. Schilddrüsenhormone modulieren die Chondrozyten-Differenzierung und erhöhen auch die Genexpression von GH und IGF. Ein Defizit führt zu vermindertem, ein Überangebot zu gesteigertem Wachstum (Heinrich, 2014). Zytokine wie z. B. IL-1 und TNF- α stimulieren den Knochenabbau, während andere Interleukine und Interferon- γ den Abbau hemmen. TGF- β und Prostaglandine wirken je nach Funktionszustand der Zellen entweder hemmend oder stimulierend (Heinrich, 2014). Zytokine wirken direkt auf Osteoklasten oder induzieren die Bildung von *M-CSF* und RANKL, welche den Knochenumbau fördern.

Auch Steroidhormone beeinflussen die Knochenhomöostase: Östrogene fördern den Knochenaufbau und sind während des Heranwachsens besonders bedeutsam (Vgl. Florencio-Silva et al., 2015; Heinrich, 2014, S. 955). Die Effekte auf Proliferation und Differenzierung sind vielschichtig, da Osteoblasten je nach Reifungsgrad und Umgebungsbedingungen unterschiedlich auf Sexualhormone reagieren (Heinrich, 2014). Sie hemmen die Osteoklastenaktivität und wirken so antiosteoporotisch. In der Postmenopause begünstigt der Östrogenmangel die Entmineralisierung des Knochens.

Hohe Glukokortikoidspiegel führen zu einer Entmineralisierung des Knochens. Glukokortikoide hemmen die Osteoblastenaktivität und fördern die Osteoporose durch erhöhte Apoptose von Osteoblasten und Osteozyten (Vgl. Heinrich, 2014, S. 957 f.).

1.3.6 Knochenheilung

Der Knochen ist im Gegensatz zu anderen Geweben zu einer vollständigen *restitutio ad integrum* in der Lage. Die Knochenheilung beginnt direkt nach Stillung der Blutung mit der Entstehung eines Koagulums. In der exsudativen Phase wandern Monozyten ein, die Zytokine exprimieren und so inflammatorische und proliferative Prozesse initiieren.

Aus den eröffneten Anteilen der Knochenmarkhöhle wandern nach wenigen Tagen Knochenstammzellen in den Defekt ein. Sie exprimieren erstmalig *Bone Morphogenetic Protein* (BMP), welches zusammen mit anderen Zytokinen bewirkt, dass aus den Stammzellen erst Osteoprogenitorzellen und dann Osteoblasten werden. Diese bilden bei mechanischer Ruhe Osteoid, das mineralisiert wird. Die Heilung erfolgt durch Knochenapposition an bestehenden Oberflächen und bildet zunächst Geflechtknochen, der später in lamellären Knochen umgewandelt wird.

Die Frakturheilung kann primär bzw. direkt oder sekundär bzw. indirekt erfolgen, wobei Letztere über eine Kallusbildung erfolgt. Eine verzögerte Heilung oder Pseudoarthrosen entstehen durch unzureichende Reposition, Vaskularisation oder Ruhigstellung (Vgl. Hausamen, 2003, S. 148-154; Vgl. Horch, 2003, S. 348 ff.).

1.3.7 Calcium-Phosphat-Haushalt

Bildung und Mineralisierung des Knochens werden durch verschiedene Faktoren reguliert. Dazu gehören u. a. Calcium- und Phosphat-Konzentration, pH, verschiedene Hormone und mechanische Belastung.

Calcium und Phosphat werden als Hydroxylapatit in Knochen und Zähnen eingebaut. Ein alkalischer pH-Wert ist erforderlich, da die Calcium-Phosphat-Salze in saurem Milieu löslich sind. Hydroxylapatit sorgt für die Steifigkeit des Knochens und speichert Calcium und Phosphat reversibel, sodass sie bei Bedarf mobilisiert werden können. Der Stoffwechsel von Calcium und Phosphat ist nicht nur eng mit dem Skelettstoffwechsel verbunden, sondern auch essenziell für nahezu alle zellulären Funktionen (Heinrich, 2014). Calcium- und Phosphatspiegel im Plasma steuern die Mineralisierung des Knochens. Bereits kleinste Mengen, die aus dem Knochen mobilisiert werden, können zu einer erheblichen Erhöhung im Plasma führen, die ernste gesundheitliche Folgen haben kann. Im Gegensatz zur lebenslang konstanten Calciumkonzentration im Plasma fällt die Plasmakonzentration des Phosphats im Alter ab. (Vgl. Brenner, 2019, S. 467 ff.; Vgl. Heinrich, 2014, S. 848 f. und 852 f.; Vgl. Horn, 2021, S. 603; Vgl. Schmidt, 2010, S. 684 f. und 824). Eine calciumarme Diät begünstigt die Entmineralisierung. Der Bedarf an Calcium ist besonders in

Schwangerschaft, Laktation und bei Kindern erhöht. Eine adäquate Calciumzufuhr ist insbesondere bis etwa zum 20. Lebensjahr von zentraler Bedeutung, da in diesem Zeitraum die maximale Knochendichte erreicht wird. Später verabreichtes Calcium kann die Resorptionsrate der Knochenmatrix zwar reduzieren, führt jedoch in der Regel nicht mehr zu einer substanziellen Zunahme der Dichte. Eine höhere Ausgangsknochendichte zu Beginn der Postmenopause verzögert folglich das Erreichen eines Abbauniveaus, bei dem die verminderte Stabilität das Frakturrisiko signifikant erhöht (Vgl. Brenner, 2019, S. 467 ff.; Vgl. Heinrich, 2014, S. 846 ff.; Vgl. Horn, 2021, S.603; Vgl. Schmidt, 2010, S. 670, 683 f., 791 und 824).

1.3.7.1 *Calcitriol, Calcitonin und Parathormon*

Die extrazelluläre Calciumhomöostase wird primär durch Parathormon (PTH), Calcitriol und Calcitonin reguliert (Vgl. Brenner, 2019, S. 467-468; Vgl. Heinrich, 2014, S. 853; Vgl. Horn, 2021, S.485-489; Vgl. Schmidt, 2010, S. 683 ff. und 687).

Parathormon (PTH) wird bei abfallender Serum-Calciumkonzentration freigesetzt. Es fördert die Mobilisierung von Calciumphosphat aus dem Knochen, erhöht die Rückresorption von Calcium in der Niere und steigert zugleich die renale Phosphatausscheidung (Schmidt, 2010). Es stimuliert die schnelle Bildung von Calcitriol, das wiederum den Knochenaufbau fördert. PTH bewirkt so eine rasche Normalisierung des Plasmacalciums und fördert die Knochenresorption, indem es die Osteoklasten aktiviert.

Calcitriol, die aktivierte Form von Vitamin D, fördert die Absorption von Calcium und Phosphat im Darm, welche zu einer Steigerung der Calcium- und Phosphat-Konzentration im Blut führt, und unterstützt so die Remineralisierung des Knochens. Das dabei resorbierte Phosphat hemmt durch eine negative Rückkopplung die Calcitriol-Biosynthese und PTH-Ausschüttung. Zusätzlich stimuliert Calcitriol in Osteozyten die Bildung von RANKL.

Calcitonin senkt die Calcium- und Phosphatkonzentration im Blut durch Förderung der Knochenmineralisierung und hemmt den Knochenabbau, indem es die Osteoklastenaktivität verringert. Synthetisches Calcitonin kommt bei Osteoporose zur Anwendung. Es unterdrückt eine pathologisch stimulierte Osteoklastenaktivität und begünstigt die Kalzifizierung des Skeletts. Es ist essenziell für die Skelettmineralisierung des Feten und des heranwachsenden Kindes und trägt während der Laktation maßgeblich zur Aufrechterhaltung der mütterlichen Knochenmineralisierung bei (Vgl. Heinrich, 2014, S. 849; Vgl. Schmidt, 2010, S. 688).

1.3.7.2 RANK-RANKL-OPG

Entscheidend für das dynamische Gleichgewicht zwischen Knochenaufbau und -abbau sind die Osteoblasten. Diese produzieren das Zytokin *M-CSF* (*macrophage colony-stimulating factor*), welches Monozyten zu Makrophagen-ähnlichen Vorläuferzellen anregt. Diese exprimieren RANK (Rezeptor für die Aktivierung von NF- κ B). Durch den passenden Ligand RANKL, welcher sich auf der Oberfläche der Osteoblasten befindet, wird aus der Vorläuferzelle ein Osteoklast. Mehrere Osteoklasten fusionieren dann zu einem mehrkernigen Osteoklasten (Kular et al., 2012).

Die Osteoblasten besitzen allerdings auch die Möglichkeit, den Knochenabbau zu stoppen, indem sie Osteoprotegerin (OPG) sezernieren, welches als natürlicher Antagonist mit einer stärkeren Affinität als RANK an RANKL bindet und so den Knochenabbau hemmt. So kommt es zur Verdrängung: RANKL kann nicht mehr an RANK binden und die Ausreifung der Osteoklasten wird verhindert (Luan et al., 2012). Die Osteoblasten regulieren also auch die Zahl der Osteoklasten und den Knochenabbau (siehe Abb. 4: RANK-RANKL-OPG-Achse und ihre Effekte auf Osteoklasten und Osteoblasten).

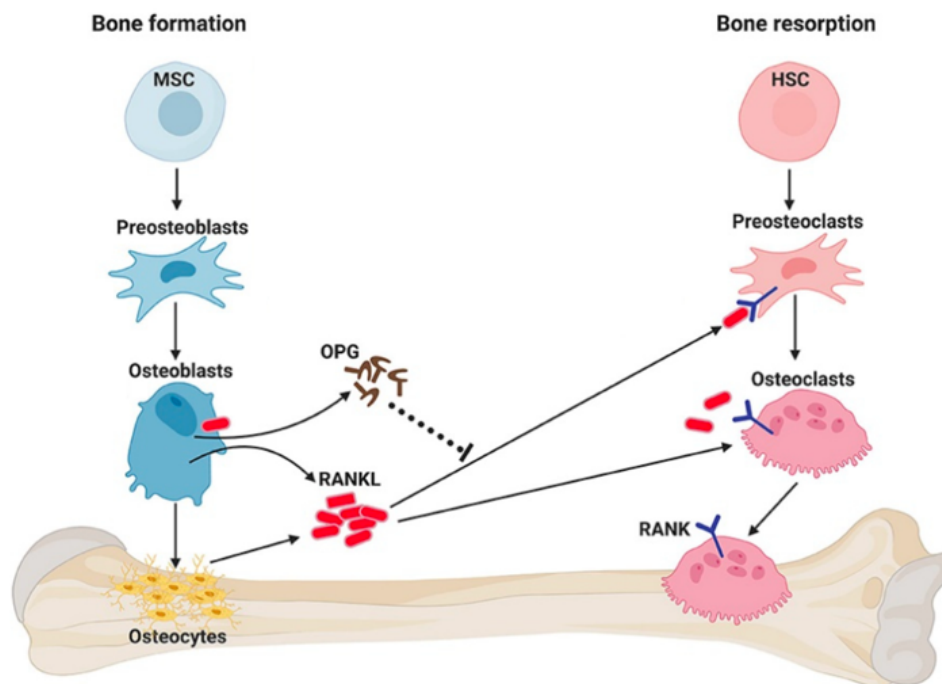


Abb. 4: RANK-RANKL-OPG-Achse und ihre Effekte auf Osteoklasten und Osteoblasten

Schematische Darstellung der Differenzierungslinien von Osteoblasten (aus MSC) und Osteoklasten (aus HSC) sowie der zentralen RANK-RANKL-OPG-Regulation. RANKL, überwiegend von Zellen der osteoblastären Linie (inkl.

Osteozyten) exprimiert, bindet an RANK auf Vorläuferzellen der Osteoklasten und aktiviert nachgeschaltete Signalwege (u. a. NF- κ B/NFATc1), die Fusion, Reifung und Resorptionsaktivität der Osteoklasten fördern. OPG wirkt als löslicher Rezeptor für RANKL und verhindert dessen Bindung an RANK. Das Verhältnis RANKL/OPG bestimmt somit die Netto-Knochenresorption und die Kopplung an die osteoblastäre Knochenbildung. Weitere Details siehe Fließtext. MSC = mesenchymale Stammzelle, OPG = Osteoprotegerin, RANK = Rezeptor für die Aktivierung von NF- κ B, RANKL = Ligand für den Rezeptor für die Aktivierung von NF- κ B, HSC = hämatopoetische Stammzelle. Modifizierte Darstellung nach (Ming et al., 2020).

Während Östrogene die Synthese von OPG fördern und so den Knochenaufbau begünstigen, erhöhen PTH, Vitamin D und Prostaglandine die RANKL-Expression. Parathormon kann außerdem die Synthese von OPG in den Osteoblasten hemmen, sodass die Osteoklasten vollständig ausreifen und den Knochen abbauen können. Ein Rückgang der Östrogene während der Menopause kann den Knochenabbau begünstigen und zu Osteoporose führen (Vgl. Horn, 2021, S. 494-495).

1.3.8 Ober- und Unterkieferknochen

Ober- und Unterkiefer sind neben externen Kräften auch internen Spannungen ausgesetzt, die durch Kaubewegungen und Mundöffnung zu deutlichen Deformierungen führen. Die Maxilla hat einen hohen Spongiosaanteil und eine dünne Kortikalis-Schicht. Die Mandibula besteht aus einer dicken Kompakta und einer geringeren Spongiosa (Vgl. Reichart, 2002b, S. 417-421). Beide Knochen sind auf unterschiedliche Belastungen durch Kaudruck und Biegebeanspruchung ausgelegt.

1.4 EZM

Die extrazelluläre Matrix (EZM) ist das Binde- und Stützgewebe zwischen den Zellen. Sie sorgt für Formgebung, Stabilität sowie Stoffaustausch und Abwehr. Die unterschiedliche Zusammensetzung bestimmt Funktion und Eigenschaften des Gewebes. Bindegewebe mit verkalkter EZM und damit Stütz- und Skelettfunktion sind Knorpel und Knochen (Vgl. Welsch, 2018, S. 115). Viele Bindegewebsarten weisen eine besondere Regenerationsfähigkeit auf, die sie lebenslang beibehalten. Die Matrix wird von den teilweise ortsständigen, teilweise mobilen Bindegewebszellen produziert (Vgl. Samandari, 2009, S. 6-9).

Die EZM besteht aus einer Grundsubstanz und Bindegewebefasern. Die Grundsubstanz ermöglicht den Transport von Gasen, Nährstoffen und Abbauprodukten (Vgl. Welsch, 2018, S. 121). Die EZM enthält Fibroblasten, Kollagen, Elastin, Hyaluronsäure,

Glykosaminoglykane und Glykoproteine, deren Anteil je nach Gewebeanteil variiert. Kollagen ist beispielsweise essenzieller Bestandteil von Knochen, Dentin und Knorpel. Es besteht aus Derivaten der Aminosäuren Prolin und Lysin (Vgl. Horn, 2021, S. 63 und 65). Der Kollagenumsatz ist im Erwachsenenalter langsam, außer im Knochen, wo Kollagen ständig umgebaut wird. Das Fehlen von Ascorbinsäure beeinträchtigt die Kollagensynthese, was z. B. zu Skorbut führen kann. Mit zunehmendem Alter wird Kollagen starrer und spröder, was wiederum Knochen brüchiger macht und die Elastizität von Bändern und Gelenken verringert (Vgl. Heinrich, 2014, S. 932 ff.; Vgl. Welsch, 2018, S. 122 ff.).

Knochenmatrix enthält spezifische Glykoproteine wie Osteonektin, Osteokalzin, *bone sialoprotein* und Osteopontin, die vermutlich an der Mineralisierung und Bindung der mineralischen Phase an die Matrix beteiligt sind (Vgl. Welsch, 2018, S.122).

1.5 L-Arginin und NO

1.5.1 Aminosäuren

Aminosäuren haben zahlreiche Funktionen im Körper, darunter als Substrate des Energiestoffwechsels, Bausteine von Proteinen und Peptiden, Vorläufer von Glucose, Lipiden und Nukleotiden, als Neurotransmitter, Antioxidantien, Regulatoren des Säure-Basen-Haushalts und vieles mehr (Vgl. Heinrich, 2014, S. 314). Der menschliche Körper verwendet 21 proteinogene α -Aminosäuren, die eine charakteristische Struktur aus einem zentralen C-Atom, einer Amino- und einer Carboxylgruppe, einem Wasserstoffatom sowie einem spezifischen Rest aufweisen. Diese Aminosäuren sind chiral und existieren in zwei stereoisomeren Formen, wobei für die Proteinsynthese nur die L-Form verwendet wird (Vgl. Heinrich, 2014, S. 41-42; Vgl. Horn, 2021, S. 61).

Proteinogene Aminosäuren werden zur Bildung von Proteinen genutzt, wobei deren Eigenschaften durch die Reihenfolge der Aminosäuren bestimmt werden. Nicht-proteinogene Aminosäuren, wie L-Ornithin, sind häufig Derivate der proteinogenen (Vgl. Horn, 2021, S. 61 und S. 65). Sie entstehen durch posttranslationale Modifikationen und haben unterschiedliche Stoffwechselfunktionen (Vgl. Heinrich, 2014, S. 40-41).

Aminosäuren gelangen über die Nahrung in den Körper, werden über den Darm aufgenommen, in der Leber verarbeitet und dann für verschiedene Stoffwechselprozesse verwendet, u. a. Gluconeogenese, Glykogensynthese und Proteinbiosynthese. Bei der enteralen Aufnahme werden verschiedene Gruppen von Aminosäuren zusammengefasst, u. a. auch kationische Aminosäuren (wie L-Arginin, L-Ornithin und L-Lysin). Dabei hemmen

sich die einzelnen Aminosäuren einer Gruppe bei der Absorption kompetitiv. Ein Teil der aufgenommenen Aminosäuren zirkuliert weiter. Dadurch können einzelne Zellen benötigte Aminosäuren aus dem Blut aufnehmen und zur Proteinbiosynthese oder zur Deckung des Energiebedarfs verwenden (Vgl. Heinrich, 2014, S. 448, 474 und 765; Vgl. Horn, 2021, S. 218; Vgl. Schmidt, 2010, S. 828). Da die meisten Proteine im menschlichen Körper relativ kurzlebig sind, werden täglich eine gewisse Menge an Proteinen ab- und etwa die gleiche Menge wieder aufgebaut. Im Organismus sind Proteinsynthese und -abbau streng reguliert, sodass die Konzentration freier Aminosäuren im Wesentlichen stabil bleibt (Vgl. Heinrich, 2014, S. 448, 474 und 502; Vgl. Horn, 2021, S. 218; Vgl. Schmidt, 2010, S. 828).

Ein Teil der Aminosäuren ist essenziell und muss daher exogen über die Nahrung zugeführt werden. Dazu gehören u. a. L-Lysin, L-Valin und L-Leucin. Bedingt essenzielle Aminosäuren, wie L-Arginin, können aus anderen Aminosäuren synthetisiert werden, wobei sie unter bestimmten Bedingungen ebenfalls essenziell werden können. Nicht-essenzielle Aminosäuren kann der Körper selbst herstellen.

Im Stoffwechsel nehmen Aminosäuren eine zentrale Rolle ein, insbesondere im Stickstoff-Stoffwechsel. Der Stickstoff aus den Amino-Gruppen wird über den Harnstoffzyklus entsorgt. Dabei wird toxisches Ammoniak (NH_3) in ungiftigen Harnstoff umgewandelt, der dann ausgeschieden wird (Vgl. Horn, 2021, S. 214-215). Abgesehen von der Harnstoff-Produktion dient der Harnstoffzyklus u. a. auch der Arginin-Biosynthese und der NO-Biosynthese (Vgl. Heinrich, 2014, S. 326-330 und 352 ff.; Vgl. Horn, 2021, S. 220, 223, 227-232).

1.5.2 L-Lysin, L-Valin, L-Leucin und L-Ornithin

L-Lysin ist eine basische, essenzielle Aminosäure, die der menschliche Körper nicht selbst synthetisieren kann (Vgl. Horn, 2021, S. 63-64). Es ist sehr hydrophil und hat eine Molekülmasse von 146 Da. L-Lysin ist für die Kollagensynthese von zentraler Bedeutung, da es als 5-Hydroxylysin ein typischer Baustein dieses Proteins ist. Es ist außerdem die Vorstufe von Carnitin und kommt in Histonen, Kollagenfibrillen und Carboxylasen vor. L-Lysin wird im Organismus zu Acetyl-CoA metabolisiert und zählt damit zu den ketogenen Aminosäuren. Unter Hungerbedingungen wird es in der Leber zur Bildung von Ketonkörpern und Fettsäuren verwendet (Vgl. Heinrich, 2014, S. 324; Vgl. Horn, 2021, S. 224-225). Ein erhöhter Proteingehalt in der Nahrung stimuliert die oxidative Verwertung von L-Lysin (Vgl. Heinrich, 2014, S. 40 und 348-351).

L-Valin und L-Leucin sind ebenfalls essenzielle, unpolare und verzweigt-kettige Aminosäuren mit lipophilen Eigenschaften (Vgl. Horn, 2021, S. 62, 64-65). Beide haben

eine geringe Molekülmasse (L-Valin: 117 Da, L-Leucin: 131 Da) und werden vor allem von der Muskulatur verstoffwechselt. L-Leucin fördert zusammen mit Glucose die Insulinausschüttung. Beim Abbau durchlaufen beide Aminosäuren eine Transaminierung und eine dehydrierende Decarboxylierung, wobei L-Leucin ein Zwischenprodukt der Ketonkörpersynthese liefert und somit ebenfalls eine ketogene Aminosäure ist. Der Abbau von L-Valin führt zu Propionyl-CoA und Succinyl-CoA, das in den Citratzyklus eingespeist wird (Vgl. Heinrich, 2014, S. 40 und 337-338; Vgl. Horn, 2021, S. 224).

L-Ornithin ist eine basische Aminosäure und ein Intermediat im Harnstoffzyklus. Es kann, wie L-Arginin und Prolin, aus Glutamat synthetisiert werden. L-Ornithin spielt eine Rolle bei der Synthese von Polyaminen, die die DNA-, Protein- und Protein-Protein-Wechselwirkungen modifizieren und insbesondere im Zellzyklus und der Apoptose eine wichtige Funktion haben (Vgl. Heinrich, 2014, S. 335-336).

1.5.3 L-Arginin

L-Arginin ist eine basische, bedingt essenzielle Aminosäure, die unter bestimmten Bedingungen wie Schwangerschaft, Stillzeit, nach Operationen, im Alter oder während des Wachstums essenziell wird, da der Körper sie in diesen Phasen nicht in ausreichender Menge synthetisieren kann (Vgl. Horn, 2021, S. 63-65, S. 223). L-Arginin hat eine Molekülmasse von 174 Da und ist die hydrophilste der proteinogenen Aminosäuren (Vgl. Heinrich, 2014, S. 40). Es liegt bei physiologischem pH-Wert dissoziiert vor und nimmt durch seine Ladung an ionischen Wechselwirkungen teil. Bei einem pH von 7 nimmt L-Arginin Protonen auf (Vgl. Horn, 2021, S. 63-65).

Ein Teil des in der Leber gebildeten Harnstoffs wird ins Darmlumen abgegeben und dort von Darmbakterien gespalten, wobei Citrullin gebildet wird, das zur Argininsynthese in den Nieren dient. Die Biosynthese von L-Arginin erfolgt hauptsächlich in den Nieren und im Darm. Aus L-Arginin können NO, Kreatin und Polyamine gebildet werden (Vgl. Heinrich, 2014, S. 330-331).

L-Arginin wird durch das Enzym Arginase zu L-Ornithin und Harnstoff abgebaut. L-Ornithin und L-Arginin sind beide Intermediate des Harnstoffzyklus. L-Arginin kann zu Glutamat oder zu Prolin abgebaut werden. L-Arginin kann auch über Agmatin und Putrescin zum Succinat abgebaut werden (Vgl. Heinrich, 2014, S. 335 f.) oder zu α -Ketoglutarat transaminiert werden, wodurch es in den Citratzyklus einfließt (Vgl. Horn, 2021, S.224). Arginase-1 spielt eine Schlüsselrolle in der Ureagenese. Experimente haben gezeigt, dass Arginase-1 die dominanteren der beiden Formen ist und dass *Knock-out*-Mäuse ohne Arginase-1 innerhalb von 10 bis 12 Tagen durch Hyperammonämie sterben (Cederbaum et al., 2004). Arginase-

2 ist bei der Biosynthese von Polyaminen, L-Ornithin, Prolin und Glutamat wichtig und spielt eine wichtige Rolle bei inflammatorischen Prozessen. Studien zeigen auch, dass Arginase-2 eine Rolle bei verschiedenen Arten von Krebs spielt und für die Spermienfunktion wichtig ist, da *Knock-out*-Mäuse eine reduzierte Fertilität aufweisen (Cederbaum et al., 2004). Experimente konnten zeigen, dass Makrophagen sowohl Arginase-1 als auch -2 exprimieren. Die Inhibition der Arginase-Aktivität *in vivo* und *in vitro* hat gezeigt, dass diese Aktivität zur Aufrechterhaltung des L-Ornithin-Spiegels für die Polyaminsynthese beiträgt (Cederbaum et al., 2004).

L-Arginin ist ein zentraler Metabolit des Harnstoffzyklus und wird als Substrat für Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) und Arginase-1 und -2 genutzt. Es beeinflusst die Wundheilung und die Immunantwort und dient als proteinogene Aminosäure. Außerdem stimuliert es die Bildung einiger Zytokine und die Sekretion von anabolen Hormonen wie *Growth*-Hormon (GH), Prolaktin und *Insulin-like Growth Factor* (IGF)-1. Diese Hormone fördern das Längenwachstum von Röhrenknochen und die Entwicklung anderer Gewebe und Organe. Zudem wird durch GH die Aufnahme von Aminosäuren und die Proteinsynthese gefördert. Es reguliert den Protein- und Kohlenhydratstoffwechsel sowie die Mineralisierung der Knochen. Ein Mangel oder eine Überproduktion von GH führt zu Wachstumsstörungen wie hypophysärem Minderwuchs oder Gigantismus (Vgl. Brenner, 2019, S. 606-609 und 969; Vgl. Schmidt, 2010, S. 442 f.).

In dieser Arbeit wird insbesondere der Einfluss von L-Arginin auf das osteogene Differenzierungspotential von DSC untersucht. Dabei steht vor allem die Rolle von L-Arginin als Ausgangsstoff für die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) durch die Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) im Fokus.

1.5.4 CAT

Transporter sind Transmembranproteine, durch die kleine hydrophile Moleküle wie Aminosäuren oder Zucker zwischen verschiedenen Zellkompartimenten transportiert werden können. Wenn dieser Transport keine Energie benötigt, handelt es sich um passiven Membrantransport. Dabei wird zwischen Uniport und Co-Transport unterschieden, wobei Co-Transport als Symport oder Antiport erfolgen kann. Beim sekundär-aktiven Transport folgt der Stoff dem Konzentrationsgradienten, der jedoch durch eine Pumpe aufrechterhalten wird, um einen anderen Stoff gegen den Gradienten zu transportieren.

Aminosäure-Transporter nehmen Aminosäuren aus der Nahrung im Dünndarm auf, setzen sie ins Blut frei und sind an der Rückresorption aus dem Blut in das Zielgewebe beteiligt.

Sie werden aufgrund ihrer Funktion in verschiedene Familien eingeteilt, wobei die Spezifität der Aminosäuren, der Transportmechanismus und die Kopplung an Ionen eine Rolle spielen (Wagner et al., 2001).

CAT-1 transportiert kationische Aminosäuren wie L-Arginin, L-Ornithin und L-Lysin im sekundär aktiven Symport mit Natrium. Dabei hemmen sich die einzelnen, kationischen Aminosäuren gegenseitig kompetitiv. NO moduliert die Transportaktivität von CAT-1 durch nicht-kompetitive Hemmung und reguliert damit seine eigene Produktion (Zheng et al., 2020). CAT lässt sich in fast jedem Zelltyp feststellen, wobei die CAT-2 keine so hohe Affinität für kationische Aminosäuren aufweist wie die CAT-1 (Abdelmagid et al., 2011). CAT-1 ist vor allem in den apikalen Epithelien des proximalen Tubulus der Niere und im Dünndarm zu finden (Vgl. Schmidt, 2010, S. 896).

Außerdem ist CAT-1 als *Carrier*-vermittelter Transporter für basische Aminosäuren wie L-Arginin auch in der Blut-Hirn-Schranke aktiv. Er kann bis zu 270 Moleküle pro Sekunde transportieren und arbeitet sekundär aktiv. Nicht lipidlösliche Stoffe wie bestimmte Aminosäuren und Glukose benötigen verschiedene Transportsysteme, um die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden, was eine selektive Extraktion von Substanzen aus dem Blut ins Gehirn ermöglicht (Vgl. Brenner, 2019, S. 955 f.; Vgl. Welsch, 2018, S. 23).

1.5.5 Ernährung in speziellen Lebensphasen

Schwangerschaft, Stillen, Wachstum, Alter und akute Erkrankungen erfordern eine besondere Nährstoffzufuhr. Während der Schwangerschaft und Stillzeit steigen die Syntheseleistungen und der Stoffwechsel verändert sich, was eine erhöhte Zufuhr essenzieller Nährstoffe und zusätzlicher Energie erfordert (Heinrich, 2014). Auch während des Wachstums benötigen Säuglinge und Kinder zusätzliche Energie und eine ausreichende Versorgung mit essenziellen Nährstoffen, um Mangelzustände zu vermeiden.

Mit zunehmendem Alter verändern sich Stoffwechsel und Organfunktionen; dabei kann insbesondere die intestinale Aufnahme bestimmter Nährstoffe vermindert sein (Heinrich, 2014). Der Nährstoffbedarf ist meist nicht erhöht, wobei jedoch die Nährstoffdichte der Lebensmittel aufgrund des sinkenden Energiebedarfs im Alter höher sein sollte. Besonders wichtig ist die ausreichende Wasseraufnahme, da das Durstempfinden im Alter nachlässt. Auch L-Arginin wird mit steigendem Alter zunehmend essenzieller, da die Biosynthesekapazität sinkt.

Akute Erkrankungen und postoperative Phasen erfordern ebenfalls einen erhöhten Bedarf an Energie, Nährstoffen sowie Vitaminen. Fieber geht mit einem erhöhten Verlust von

Wasser und Elektrolyten einher. Zudem können bei verschiedenen Erkrankungen durch gestörte Resorption, Diarrhö oder Wundexsudat zusätzliche Nährstoff- und Flüssigkeitsverluste auftreten. Eine unzureichende Ernährung kann das Immunsystem schwächen und den Krankheitsverlauf so negativ beeinflussen (Vgl. Heinrich, 2014, S. 703).

1.5.6 NO und NOS

1.5.6.1 Allgemeines

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein kurzlebiges Radikal mit intra- und interzellulärer Signalfunktion. NO ist evolutionär alt und NO-Synthasen kommen bei vielen Tier- und Pflanzenarten vor. Es hat eine Vielzahl von Funktionen, darunter die Modulation von Signalwegen und der Hämostase, als Neurotransmitter, bei der Erweiterung von Blutgefäßen sowie zur Beeinflussung von Immunantworten und physiologischen Prozessen (Ghalayini, 2004; Vgl. Heinrich, 2014, S. 894 ff.; Vgl. Horn, 2021, S. 713). Es kann als toxisches Gas vorkommen, Guanylatzyklen aktivieren und so zu einer Erhöhung des cGMP-Spiegels führen. Es weist nur eine geringe Halbwertszeit auf und zerfällt schnell zu Nitrit und Nitrat (Vgl. Heinrich, 2014, S. 335-336 und 436). Trotz seiner kurzen Lebensdauer weist NO aufgrund seiner schnellen Diffusion eine große Reichweite in Geweben auf. Diese geringe Halbwertszeit führt dazu, dass sich die anschließende Signalkaskade exakt regulieren lässt (Keshet & Erez, 2018). Es hat vielfältige Funktionen, wobei auch heute noch nicht alle Aufgaben und Wirkmechanismen von NO bekannt sind (Vgl. Horn, 2021, S. 524-526).

1.5.6.2 NOS-Isoformen

NO wird durch verschiedene Isoformen der Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) synthetisiert. Die Bildung von NO aus L-Arginin ist komplex und in ihren Details bislang nicht vollständig aufgeklärt (Heinrich, 2014). Die zwei Hauptreaktionsschritte sind bei allen Isoformen gleich: Aus L-Arginin entstehen über N-Hydroxy-Arginin Citrullin und NO. Dabei werden jeweils molekularer Sauerstoff und NADPH/H⁺ benötigt. Als Cofaktor dient Tetrahydrobiopterin (BH₄). Bei nNOS und eNOS besitzt die C-terminale Domäne zusätzlich die Fähigkeit, den Aktivator Calcium-Calmodulin zu binden. Durch Phosphorylierung kann Proteinkinase B die NOS aktivieren (Heinrich, 2014) (siehe **Abb. 5: NO-Bildung durch verschiedene NOS-Isoformen**).

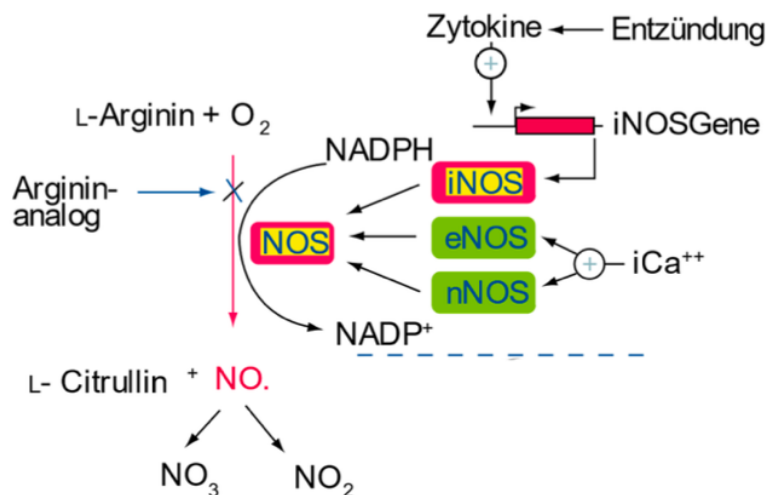


Abb. 5: NO-Bildung durch verschiedene NOS-Isoformen

Schematische Darstellung der Biogenese von Stickstoffmonoxid (NO) aus L-Arginin durch Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS). Gezeigt sind die drei Isoformen und ihre typischen Aktivierungsmodi: eNOS (endotheliale NOS) und nNOS (neuronale NOS) als überwiegend konstitutive, Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Enzyme sowie iNOS (induzierbare NOS) als überwiegend Ca²⁺-unabhängige, durch Zytokine und Entzündungsmediatoren transkriptionell aktivierte Form. Die Reaktion erfordert O₂, NADPH und Tetrahydrobiopterin und erzeugt neben NO das Nebenprodukt L-Citrullin. Nach Bildung wird NO rasch zu Nitrit (NO₂) und Nitrat (NO₃) weiteroxidiert. Weitere Details siehe Fließtext. O₂ = Sauerstoff, NO = Stickstoffmonoxid, NO₃ = Nitrat, NO₂ = Stickstoffdioxid, NADPH/NADP⁺ = Nicotinamidadenindinukleotidphosphat, NOS = Stickstoffmonoxid-Synthase, iNOS = induzierbare NOS, eNOS = endotheliale NOS, nNOS = neuronale NOS, iCa⁺⁺ = ionisiertes Calcium. Modifizierte Darstellung nach (Krausz & Friedman, 2015).

Man unterscheidet die folgenden drei Isoformen:

- **nNOS (neuronal):** Diese Form kommt induzierbar in nitrergen Neuronen und Gliazellen des zentralen Nervensystems vor und ist für die Modulation der synaptischen Übertragung verantwortlich. Sie wird durch Calciumeinstrom aktiviert und konstitutiv gebildet. Nach der Calcium-induzierten Aktivierung kommt es zur Freisetzung des kurzlebigen Gases NO aus L-Arginin. Indem NO in Neuronen die cGMP-Bildung erhöht, kann es die synaptische Signalübertragung modulieren. Durch den gasförmigen Aggregatzustand des Botenstoffes kommt es zu einigen Besonderheiten. NO lässt sich nicht in Vesikeln speichern, sondern diffundiert unmittelbar nach seiner Bildung. Da es keinen spezifischen membranständigen Rezeptor gibt, kommen alle nahegelegenen Neurone, die die NO-sensitive Guanylatzyklase exprimieren, als Zielzellen infrage (Heinrich, 2014).
- **eNOS (endothelial):** Diese Form ist in Endothelzellen der Blutgefäße aktiv und spielt eine zentrale Rolle bei der Regulierung des Blutdrucks. Sie ist ebenfalls calciumabhängig und wird durch Phosphorylierung reguliert. Sowohl eNOS als auch

nNOS werden konstitutiv ausgebildet. Die Aktivität der eNOS im Knochen kann durch verschiedene Faktoren, wie z. B. einen Calcium-Anstieg, mechanischen Stress oder Östrogen, in wenigen Sekunden induziert werden (van't Hof & Ralston, 2001).

- **iNOS (induzierbar):** iNOS ist im Gegensatz zu den anderen Isoformen nicht calciumabhängig und wird auch nicht konstitutiv ausgebildet. iNOS findet sich in Monozyten, Makrophagen, anderen Zellen des Immunsystems, glatten Muskelzellen, Kardiomyozyten, Mesangialzellen, Endothelzellen kleiner Gefäße und Neutrophilen. Diese Form wird durch bestimmte Stimuli (z. B. Zytokine und Endotoxine) und abhängig von deren Menge induziert. Bei einem Entzündungsgeschehen wird die Transkription von iNOS eingeleitet und nach wenigen Stunden erhöht sich die NO-Menge drastisch. Die produzierte NO-Menge kann bis zu 1000-fach höher liegen als die der eNOS und nNOS. In so hohen Konzentrationen kann NO zytotoxische Wirkungen haben. Eine gesteigerte iNOS-Expression in der Gefäßwand kann eine überschießende Vasodilatation auslösen und so zum kritischen Blutdruckabfall beim septischen Schock führen. Auch Glukokortikoide modulieren die iNOS-Expression (Vgl. Brenner, 2019, S. 111; Vgl. Heinrich, 2014, S. 436 f., 500 und 984; Vgl. Schmidt, 2010, S. 32, S. 410 und S. 601-603).

1.5.6.3 *Inhibitoren NOS*

Verschiedene Substanzen, z. B. NH_3 , können die NOS-Synthese hemmen und damit die NO-Produktion verringern (Vgl. Heinrich, 2014, S. 335-336).

Gehemmt werden kann die NOS außerdem durch analoge Formen von L-Arginin. Ein möglicher Inhibitor ist L-NIO (L-N⁵-(1-Iminoethyl)-Ornithin). Durch kompetitive Inhibition kommt es zu einer Blockierung der NOS (Víteček et al., 2012).

1.5.6.4 *Biochemische Wirkweisen*

NO wirkt als intra- bzw. interzellulärer Signalmetabolit entweder durch die Bildung von cGMP oder direkt als gasförmiges Molekül. Bindet ein Hormon an seinen Rezeptor, kommt es intrazellulär über Phospholipase C und IP_3 vermittelt zu einer erhöhten Calciumfreisetzung, welche die konstitutive NOS aktiviert, die aus L-Arginin NO freisetzt. NO diffundiert in die benachbarte Gefäßmuskelzelle bzw. retrograd durch die post- und präsynaptische Membran und aktiviert die lösliche Guanylatzyklase, die aus GTP cGMP synthetisiert. Der intrazelluläre Anstieg von cGMP aktiviert cGMP-abhängige

Proteinkinasen und führt zur Freisetzung von Transmittern und über eine Absenkung des intrazellulären Calciums und über die Erniedrigung der Calcium-Sensitivität zur Relaxation der glatten Muskulatur, was die Vasodilatation fördert. cGMP kann darüber hinaus auch direkt Ionenkanäle aktivieren oder mit anderen eisenhaltigen Enzymen reagieren. Einige NO-freisetzende Vasodilatoren induzieren bei direkter Einwirkung auf die glatte Gefäßmuskulatur paradoxe Kontraktionen. Der resultierende Gefäßtonus ergibt sich daher aus dem Gegenspiel von endothelabhängiger Dilatation und einer direkt glattmuskulär, myogen oder neurogen vermittelten Konstriktion (Vgl. Heinrich, 2014, S. 439-441).

iNOS ist calciumunabhängig und wird vermutlich durch Zytokine und Endotoxine induziert, was einige Zeit dauert.

1.5.6.5 *Physiologische Funktionen von NO*

NO scheint bei einer Vielzahl von physiologischen Vorgängen eine wichtige Rolle zu spielen:

Neurotransmitter und ZNS: NO wirkt als Neurotransmitter und modifiziert die synaptische Übertragung. Es spielt eine wichtige Rolle in der neuronalen Kommunikation, sowohl im zentralen Nervensystem (ZNS) als auch im peripheren Nervensystem. Es wirkt als Neurotransmitter an nitrinergen Neuronen im ZNS, vermutlich als Neurotoxin, als Makrophagenzytotoxin und als Modulator der renalen Autoregulation.

Im Gehirn erfolgt die Kopplung zwischen funktioneller Aktivität, Stoffwechsel und Durchblutung durch lokale Freisetzung von Faktoren aus den Zellen in den interstitiellen Raum des Gehirns. Dadurch wird der Tonus der Widerstandsgefäße reguliert. NO zählt hier zu den stoffwechselabhängigen, metabolischen Faktoren. Seine Bildung nimmt bei Sauerstoffmangel zu. NO wird nicht nur im Endothel, sondern auch in Astrozyten, glatten Muskelzellen, Mikroglia und vereinzelt in Neuronen produziert. Im Gehirn führt es zu einer basalen Vasodilatation und scheint die Wirkung anderer vasoaktiver Substanzen zu verstärken. In Hirn- und Koronargefäßen führt Vasopressin – anders als im Hochdrucksystem – über endotheliale V1-Rezeptoren zur NO-vermittelten Vasodilatation. Dieser Mechanismus gewährleistet bei Blutverlust und hämorrhagischem Schock eine Priorisierung des Herzzeitvolumens zugunsten von Herz und Gehirn. So bleibt die Durchblutung lebenswichtiger Organe trotz Gesamtminderdurchfluss erhalten (Vgl. Schmidt, 2010, S. 599).

Die neuronale NO-Synthase (nNOS) produziert NO in Neuronen, wo es eine Rolle bei Lern- und Gedächtnisprozessen spielt, insbesondere bei Langzeitpotenzierung (LTP) und Langzeitdepression (LTD). Hier wirkt NO als retrograder Botenstoff, der die präsynaptische

Transmitterausschüttung unterstützt und so die synaptische Effizienz stabilisiert (Vgl. Brenner, 2019, S. 78; Vgl. Schmidt, 2010, S. 28, S. 93-94 und S. 210).

In Speichel- und Drüsenzellen des Gastrointestinaltrakts bewirkt die Reizung parasymphatisch-cholinerger Fasern eine NO-vermittelte Dilatation. Die Stimulation postganglionärer parasymphatischer Fasern führt zur NO-Freisetzung aus den terminalen Nervenendigungen (Vgl. Brenner, 2019, S. 70 und S. 963-965; Vgl. Schmidt, 2010, S. 595 und S. 601). Auch im vegetativen Nervensystem wird NO aus diesen Neuronen freigesetzt und bewirkt eine Erschlaffung der glatten Muskulatur – etwa in Motoneuronen des Darmnervensystems bei der Peristaltik sowie im erektilen Gewebe des Penis (Vgl. Heinrich, 2014, S. 438; Vgl. Horn, 2021, S. 524-526; Vgl. Schmidt, 2010, S. 410 und 416). Funktionsstörungen der inneren Organe, bei denen die glatte Muskulatur mitbetroffen ist, beruhen häufig auf gestörter NO-Signalregulation. Die Kontraktilität kann dabei pathologisch erhöht, gelegentlich jedoch auch vermindert sein. Überaktivität des NO-Signalwegs kann zu einer Hypokontraktilität führen (Heinrich, 2014).

Vasodilatation und Blutdruckregulation: NO ist ein sehr kleiner, unkonventioneller Botenstoff, der ursprünglich als vasodilatierender Faktor (*Endothelium-Derived Relaxing Factor*, EDRF) in Endothelzellen entdeckt wurde. Es handelt sich um ein Autakoid, das als schubspannungsabhängiger Koordinator die endotheliale Tonusmodulation und damit die lokale Durchblutungsregulation beeinflusst.

Die NO-Bildung in Endothelzellen ist von der zytosolischen Calcium-Konzentration abhängig. Agonisten wie Acetylcholin, Bradykinin, Histamin oder Thrombin erhöhen die intrazelluläre Calciumkonzentration in den Endothelzellen und steigern aufgrund der Calcium-/Calmodulin-Abhängigkeit die NO-Bildung über Aktivierung von nNOS und eNOS. Auch Phosphorylierung durch mechanische Reize wie Schubspannung und Blutdruckschwankungen aktiviert die NO-Synthese in entscheidendem Maße. Sie dienen der Anpassung der Leistungsfähigkeit bei erhöhtem Durchblutungsbedarf. Dabei kann auch eine Vasokonstriktion aufgrund der Schubspannung zu einer verstärkten NO-Freisetzung führen. Von besonderer Bedeutung sind Proteinkinasen, die durch mechanische Stimulation des Endothels konstant angeregt werden. Schon in Ruhe setzt das Endothel in nahezu allen Gefäßen dauerhaft basal NO frei, das der sympathisch-adrenerg vermittelten Vasokonstriktion entgegenwirkt (Schmidt, 2010). Außerdem hemmt NO die Noradrenalinfreisetzung aus präjunktionale Varikositäten und fördert die Freisetzung von Adrenomedullin (Vgl. Schmidt, 2010, S. 600). Endothelin, das an glatten Muskelzellen vasokonstriktorisch und somit als Gegenspieler zu NO wirkt, kann über einen Endothelin-Rezeptor vom Typ B die NO-Bildung anregen. NO wiederum hemmt die Endothelinsynthese, was ebenfalls zur relaxierenden Wirkung von NO beiträgt. Histamin

wirkt über endotheliale H₁-Rezeptoren NO-freisetzend, obwohl es normalerweise direkt auf die glatte Muskulatur als Konstriktor wirkt (Vgl. Schmidt, 2010, S. 597). Abgesehen davon gibt es eine Vielzahl weiterer physiologischer Agonisten und Antagonisten, wie z. B. Bradykinin, Thrombin und ATP, die die Aktivität der endothelialen NOS modulieren.

Bei einer endothelialen Dysfunktion ist die Bildung und Freisetzung von NO aus dem Endothel vermindert. Eine verminderte, endotheliale NO-Bioverfügbarkeit entsteht durch vermehrte Bildung von Sauerstoffradikalen, die NO inaktivieren. Folgen sind eine gestörte Vasodilatation, NFκB-Aktivierung, vermehrte Adhäsionsmolekül-Expression, Thrombenbildung, Leukozytenadhäsion und letztlich Monozytenmigration. Ein NO-Mangel begünstigt eine Thrombozytenaktivierung, welche wiederum eine Vasokonstriktion und Gefäßwandproliferation bewirken. Dabei handelt es sich um initiale Prozesse, die zur Atherosklerose führen. Die Verringerung der intravaskulären NO-Konzentration schwächt das protektive, anti-atherosklerotische Wirkprinzip (Schmidt, 2010). NO wirkt protektiv auf das Gefäßsystem durch Hemmung von Muskelzellproliferation, Thrombozytenaggregation und -adhäsion, Expression von Adhäsionsmolekülen, Endothelin-Produktion und LDL-Oxidation. Bei fortschreitender Krankheit verlieren Endothelzellen ihre Schutzfunktion. Vasoaktive Substanzen aus der Blutbahn wirken direkt auf die glatte Muskulatur. Kardiovaskuläre Risikofaktoren und Entzündungen führen durch substanzielle Veränderungen zu endothelialer Dysfunktion, was Arteriosklerose sowie Herzinfarkt, Schlaganfall, Impotenz und periphere Gefäßverschlusskrankheit begünstigt (Vgl. Brenner, 2019, S. 70, 77-78, 248-250; Horn, 2021, S. 525; Vgl. Schmidt, 2010, S. 601-604; Vgl. Welsch, 2018, S. 438). NO kann durch externe Gabe oder endogene Synthese den endothelialen Zelltod hemmen und so der Atherosklerose vorbeugen (Vgl. Suschek et al., 2003).

Immunsystem-Regulation: Wie bereits erwähnt, limitieren während Entzündungsprozessen produzierte Sauerstoffradikale die biologischen Effekte von NO. Besonders große NO-Mengen entstehen, wenn iNOS in Makrophagen und Neutrophilen aktiviert wird. NO reagiert dabei mit Sauerstoffradikalen zu Peroxynitrit, einem der stärksten Oxidationsmittel im Körper. Sauerstoffradikale entstehen durch verschiedene zelluläre Systeme und tragen wesentlich zur Immunabwehr bei, da sie eindringende Bakterien und andere Mikroorganismen zerstören. Auch NO ist so Teil der unspezifischen Immunantwort und trägt zur Eliminierung von Krankheitserregern bei (Vgl. Heinrich, 2014, S. 910 f.). Infolge von Entzündungen kommt es daher im Körper zu erhöhten NO-Konzentrationen sowie zu einem Mangel an L-Arginin.

Weitere Funktionen: NO kann außerdem den zellulären Sauerstoffverbrauch reduzieren, indem es mit Hämproteinen der mitochondrialen Atmungskette interagiert (Vgl. Schmidt,

2010, S. 765). Des Weiteren spielt NO eine zentrale Rolle in der Stickstoffhomöostase des Körpers und beim Krankheitsbild der Psoriasis (Vgl. Suschek et al., 2004). Weitere Funktionen umfassen u. a. die Modulation der Apoptose, die Regulation von Proteinen durch Nitrosylierung und die Wirkung als Wachstumsfaktor.

1.5.6.6 NO bei weiteren pathophysiologischen Zuständen

Hypoxie: Bei Hypoxie sinkt der arteriöle Sauerstoffpartialdruck und der Sauerstoffbedarf des Gewebes steigt. Es kommt zur Freisetzung von NO und Prostazyklin aus dem Endothel, um durch Vasodilatation die Sauerstoffversorgung zu verbessern.

Neuere Erkenntnisse zeigen, dass Hämoglobin dabei nicht nur O₂ und CO₂ transportiert, sondern auch NO in einer Thiol-basierten Form. Bei Bedarf kann dieses NO aus seiner Bindung an Hämoglobin freigesetzt werden. Hämoglobin detektiert den sinkenden Sauerstoffgehalt eines Gewebes und katalysiert die Freisetzung von NO aus Nitrit oder aus S-nitrosierten Proteinen. Durch die so ausgelöste Vasodilatation kommt es zu einer verbesserten Sauerstoffbereitstellung im Gewebe. In Organen mit hohem Sauerstoffbedarf sind die Sauerstoffpartialdruckwerte in den Arteriolen besonders niedrig, was wiederum die NO-Bildung verstärkt. Außerdem kann über eNOS in den Endothelzellen zusätzlich NO gebildet werden (Horn, 2021, S. 525). Dieser Mechanismus ist unter anderem wichtig, um die Durchblutung der Herzmuskulatur an verschiedene Belastungen anpassen zu können.

Sepsis und septischer Schock: Beim septischen Schock führt die überschießende NO-Produktion zu einer massiven Vasodilatation und zum Blutdruckabfall. Beim Übertritt von bakteriellen Pathogenen ins Blut wird aus einer lokalisierten, unspezifischen Immunreaktion eine systemische Entzündungsreaktion (SIRS, *systemic inflammatory response syndrome*). Dabei werden die verschiedensten Organsysteme und Gewebe geschädigt. Zunächst wird die Sekretion proinflammatorischer Zytokine durch Makrophagen, Monozyten, Granulozyten und Endothelzellen induziert. In der Folge kommt es zur vermehrten Freisetzung weiterer Mediatoren, darunter NO, Prostaglandine, reaktive Sauerstoffspezies und Plättchenaktivierungsfaktor (PAF) (Heinrich, 2014).

Das übermäßig produzierte NO bewirkt dann eine generalisierte Gefäßrelaxation, senkt den Blutdruck, reduziert die Kontraktilität des Herzens und vermindert die Herzleistung. Dieser oft nicht zu beherrschende Blutdruckabfall führt zum septischen Schock, welcher in frühen Stadien die häufigste Todesursache darstellt. Durch eine Verminderung der Organperfusion, Gewebszerstörung und Bildung von Mikrothromben kommt es in späteren Stadien zu einem multiplen Organversagen (Vgl. Heinrich, 2014, S. 434-436).

Diabetes mellitus: Auch bei Diabetes mellitus spielt NO eine wichtige Rolle. Als Folge einer diabetischen Neuropathie kommt es zu einer verminderten NO-Freisetzung aus vegetativen Ganglien, was wiederum zu erektiler Dysfunktion und Motilitätsstörungen des Gastrointestinaltrakts, vor allem zur diabetischen Gastroparese, führen kann. Dies ist eine erworbene Motilitätsstörung des Magens. Sie entsteht bei einem lange bestehenden Diabetes mellitus und wird durch einen selektiven Untergang der NO-freisetzenden Ganglien des Plexus myentericus verursacht (Vgl. Brenner, 2019, S. 111; Vgl. Heinrich, 2014, S. 436 f. und 814-816; Vgl. Schmidt, 2010, S. 32, S. 410 und S. 601-603).

1.5.6.7 NO in der Therapie

Aufgrund seiner vasodilatierenden Eigenschaften wird NO vor allem bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen therapeutisch verwendet. NO-Donatoren, wie Nitroglycerin oder Nitroprussit, werden zur Behandlung von Angina pectoris und koronaren Herzerkrankungen eingesetzt, da sie die Guanylatcyclase aktivieren, so den Blutdruck senken und damit die Durchblutung verbessern. Im Sublingualspray entsteht NO beim Abbau des dort verwendeten Nitroglycerins. Es bewirkt im akuten Anfall eine rasche, periphere Vasodilatation und senkt so den Sauerstoffbedarf des Herzens und die Herzarbeit, was der Angina pectoris entgegenwirkt (Vgl. Brenner, 2019, S. 70).

Auch Phosphodiesterase-5-Inhibitoren, wie z. B. Sildenafil, steigern indirekt den cGMP-Spiegel, wodurch die NO-vermittelte Wirkung verlängert wird. Diese Medikamente finden u. a. Anwendung bei pulmonaler Hypertonie und erektiler Dysfunktion. Zudem sind sie in hoher Konzentration im Kleinhirn und in Thrombozyten nachweisbar, wo sie eine Hemmung der Aggregation bewirken (Vgl. Heinrich, 2014, S. 438).

Auch bei arterieller Hypertonie, Hypercholesterinämie oder Diabetes mellitus besteht häufig eine endotheliale Dysfunktion mit reduzierter NO-Verfügbarkeit, was zu einer gesteigerten Kontraktilität der glatten Muskulatur beiträgt (Vgl. Schmidt, 2010, S. 776). Auch hier kommen daher gezielt Medikamente zum Einsatz, die über NO-Freisetzung eine Relaxation der Gefäßmuskulatur herbeiführen. Dadurch, dass NO eine hohe Instabilität aufweist, können die Substanzen mit oder ohne Enzyme vermittelt werden. Bei chemischen Verbindungen mit Nitrosyl wird NO direkt abgespalten. Es gibt aber auch inaktive NO-Donoren, wie z. B. Nitroglycerin, die durch Hydrolyse ihre Wirkung erzielen (Ignarro et al., 2002).

1.5.7 Einfluss von NO auf die osteogene Differenzierung

Abhängig von der vorhandenen Menge NO ist auch dessen Funktion im Knochen. Dabei unterscheidet sich die produzierte Menge NO durch eNOS und iNOS voneinander, was als biphasische Umsetzung bezeichnet wird.

eNOS erzeugt NO aus L-Arginin, welches in Osteoblasten cGMP-abhängige Proteinkinasen aktiviert. Dies führt wiederum zu einer Aktivierung von Tyrosinkinasen, *extracellular-signal regulated kinases* und Proteinkinase B, was zur Differenzierung und einer erhöhten Aktivität der Osteoblasten führt.

Zusätzlich werden pro-apoptotische *Bcl-2-Antagonist of cell death* inaktiviert, Osteoklasten gehemmt und die Adhäsion und Sekretion von Protonen gesenkt, was insgesamt die osteogene Differenzierung fördert (Kalyanaraman et al., 2018).

Im Gegensatz dazu hat NO, das von iNOS produziert wird, eine verminderte osteogene Aktivität. Es kommt zu einem hohen Umsatz, welcher einen Verlust von Osteodensität bewirkt (Wimalawansa, 2008). Andererseits führt dies zu einer höheren Heilungsrate bei Frakturen, sodass sich unter diesen Umständen erhöhte Konzentrationen von allen NOS-Isoformen zeigen (siehe **Abb. 6: NO und dessen Rolle im Knochenstoffwechsel**) (Nichols et al., 2012).

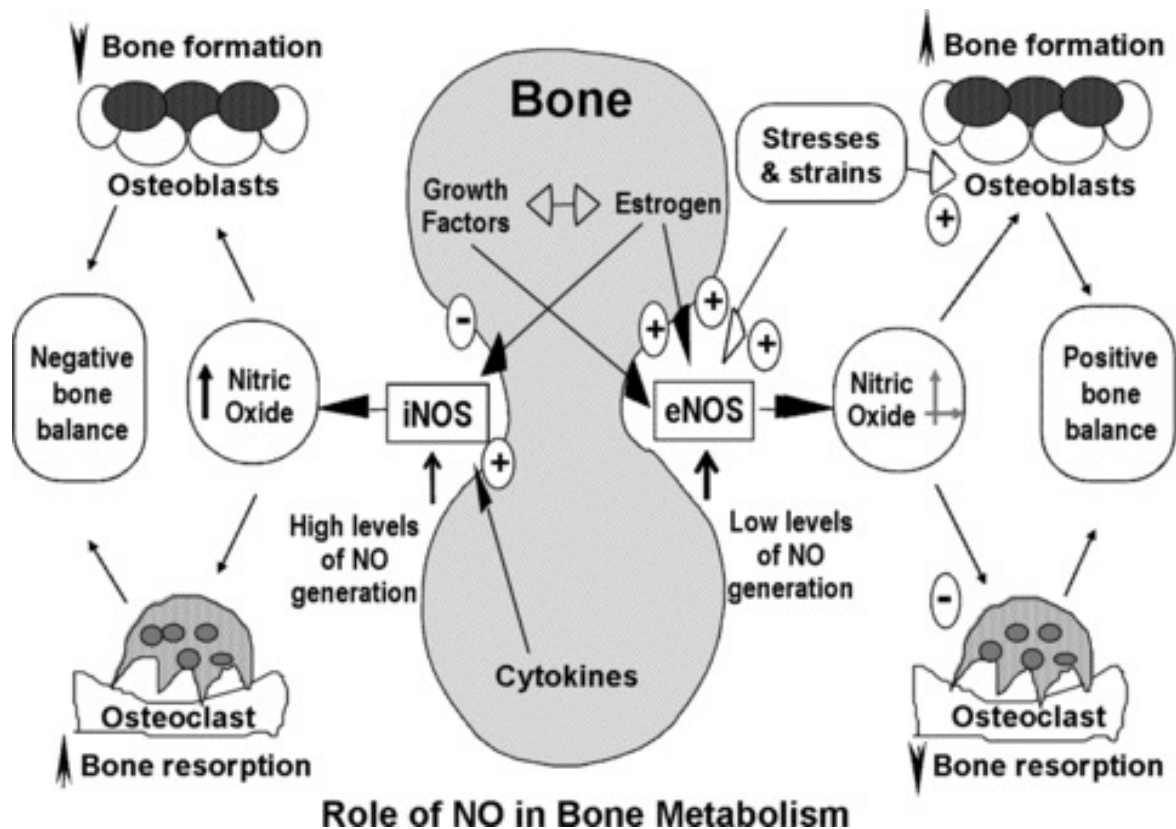


Abb. 6: NO und dessen Rolle im Knochenstoffwechsel

Schematische Übersicht der Isoform-spezifischen Effekte von Stickstoffmonoxid (NO) auf Knochenaufbau und -abbau. Links: iNOS-vermitteltes, meist hoch- und entzündungsinduziertes NO hemmt osteoblastäre Funktionen, fördert Osteoklastogenese und Resorptionsaktivität und kann über nitrosativen Stress apoptotische Prozesse verstärken. Rechts: eNOS-vermitteltes, konstitutives NO im niedrigen Konzentrationsbereich unterstützt osteoblastäre Differenzierung, Matrixmineralisation und Angiogenese und wirkt indirekt antiresorptiv (u. a. Modulation der RANKL/OPG-Achse). Die Nettowirkung ist konzentrations- und kontextabhängig (biphasisches Verhalten; cGMP/PKG-Signalwege versus nitrosativer Stress). Weitere Details siehe Fließtext. iNOS = induzierbare NOS, eNOS = endotheliale NOS, NOS = Stickstoffmonoxid-Synthase, NO = Stickstoffmonoxid, RANKL = Ligand für den Rezeptor für die Aktivierung von NF- κ B, OPG = Osteoprotegerin, cGMP = cyclisches Guanosinmonophosphat, PKG = Proteinkinase G. Darstellung nach (Wimalawansa, 2010).

Unter bestimmten Bedingungen, wie bei Entzündungen, bei metabolischen Reaktionen oder in der frühen Entwicklung, wird L-Arginin semi-essenziell. Dabei wird beobachtet, dass sich innerhalb der Zellen einzelne Pools von L-Arginin bilden. In Makrophagen wird L-Arginin für Arginase lediglich aus dem Pool transportierter Aminosäuren genutzt, während iNOS seine Substrate nur aus der *De-novo*-Synthese bezieht (Morris, 2016).

Es gibt verschiedene Zielproteine, die sich zur Beeinflussung des L-Arginin- und NO-Stoffwechsels eignen und deren Relevanz in der hier vorliegenden Arbeit untersucht wird.

L-Arginin dient als Substrat für Arginase und NOS. Durch die gezielte Inhibition von Arginase erhöht sich die Verfügbarkeit von L-Arginin für NOS und damit theoretisch die NO-Produktion. L-Valin gilt als kompetitiver Inhibitor von Arginasen (Huynh et al., 2009). L-NIO, eine analoge Form von L-Arginin, hemmt iNOS und eNOS als nicht-kompetitiver Inhibitor

(Gao et al., 2019) und reduziert so theoretisch den NO-Gehalt in der Zelle (Víteček et al., 2012).

Der Transport von L-Arginin in die Zellen kann durch das Transmembranprotein CAT beeinflusst werden, das kationische Aminosäuren mit hoher Affinität transportiert. Eine höhere extrazelluläre Konzentration von L-Ornithin und L-Lysin führt einerseits zu einer Hochregulierung des Transporters. Da L-Lysin und L-Ornithin andererseits als kompetitive Inhibitoren zu L-Arginin am CAT wirken, reduzieren sie den L-Arginin-Eintritt in die Zelle und beeinflussen so indirekt die NO-Produktion (siehe **Abb. 7: Einfluss der L-Arginin/NO-Achse auf Osteoblasten, Osteoklasten und Knochen**) (Messerli Dreissig et al., 2000).

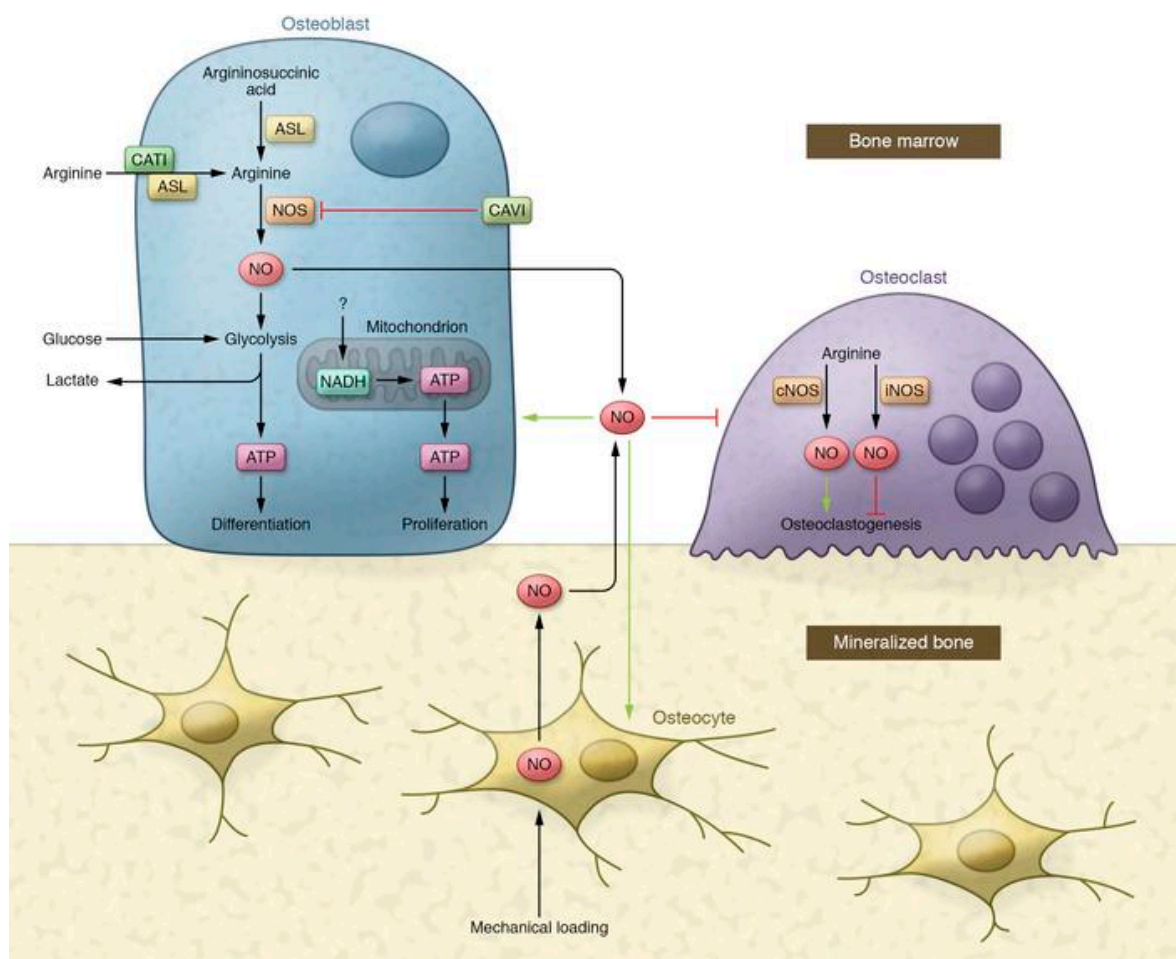


Abb. 7: Einfluss der L-Arginin/NO-Achse auf Osteoblasten, Osteoklasten und Knochen

Schematische Darstellung eines Osteoblasten (links, blau) und eines Osteoklasten (rechts, violett) im Markraum; darunter mineralisierte Knochenmatrix (braun). Gezeigt sind Aufnahme und intrazelluläre Bereitstellung von L-Arginin (CAT-1-vermittelter Transport; Regeneration über Argininosuccinat-Weg/ASL), die NO-Bildung durch konstitutive NOS (cNOS) bzw. iNOS sowie zentrale Modulatoren (CAV-1, Ca^{2+} /Calmodulin, ATP, NADPH/NADH). Markiert sind pharmakologische Eingriffspunkte zur Steuerung der Achse (Substratgabe, NOS-Inhibition, Arginase-Modulation, Kofaktorverfügbarkeit). *Downstream*-Effekte: Im Osteoblasten fördert NO über cGMP/PKG-Signalwege und PI3K/Akt die Differenzierung, Matrixsynthese und Mineralisation. Zudem verschiebt es die RANKL/OPG-Balance antiresorptiv. In Osteoklasten hemmen niedrige NO-Spiegel Fusion und Resorptionsaktivität, während hohe, iNOS-vermittelte NO-Mengen nitrosativen Stress und Apoptose auslösen können. Der untere Teil der Abbildung fasst die Nettoeffekte auf den Knochen zusammen: Förderung der Knochenformation und Abschwächung der Resorption bei niedrigen, eNOS-

typischen NO-Spiegeln versus potenziertem Abbau unter entzündlich erhöhtem, iNOS-dominantem NO. Weitere Einzelheiten siehe Fließtext. ASL = Argininosuccinat-Lyase, CAT-1 = kationischer Aminosäuren-Transporter-1, NOS = Stickstoffmonoxid-Synthase, CAV-1 = Caveolin-1, Ca²⁺ = Calcium, NO = Stickstoffmonoxid, ATP = Adenosintriphosphat, NADPH = Nikotinamidadenindinukleotidphosphat, NADH = Nikotinamidadenindinukleotid, cNOS = *constitutive* NOS = eNOS, iNOS = induzierbare NOS, RANKL = Ligand für den Rezeptor für die Aktivierung von NF- κ B, OPG = Osteoprotegerin, cGMP = cyclisches Guanosinmonophosphat, PKG = Proteinkinase G, PI3K/Akt = Phosphoinositid-3-Kinase/ Proteinkinase B-Signalweg. Darstellung nach (Liu & Rosen, 2021).

1.6 Alter

Seneszenz bezeichnet einen durch unterschiedliche Stressoren ausgelösten Zellzustand, in dem lebensfähige Zellen einen stabilen Zellzyklusarrest einnehmen und ihre Teilungsfähigkeit dauerhaft verlieren. Wie die Apoptose auch trägt Seneszenz zur Tumorsuppression bei. Gleichzeitig führt eine erschöpfte zelluläre Teilungsfähigkeit auch zum Altern von Geweben. Ein Anstieg seneszenten Zellen verändert das Organ und dessen Eigenschaften, da das Genexpressionsmuster stark von dem proliferationsfähiger Zellen abweicht. Das Alter der Spender beeinflusst die Differenzierungs- und Proliferationsfähigkeit der mesenchymalen Stromazellen (Charif et al., 2017; Siegel et al., 2013): Je älter der Spender, desto stärker die Seneszenz und desto geringer die Teilungsrate und osteogene Differenzierungskapazität (Choudhery et al., 2014; Stenderup et al., 2003). Heute wird davon ausgegangen, dass der Funktionsverlust der Organe im Wesentlichen auf eine eingeschränkte Regenerationsfähigkeit der Organe aufgrund nachlassender Stammzellkapazität beruht. Die Fähigkeit hämatopoetischer Stammzellen, Blutzellen zu bilden, nimmt ab, was zusätzlich die Immunabwehr im Alter schwächt.

Veränderungen im Hormonhaushalt, wie die Abnahme von Wachstumshormon und IGF-1, beeinflussen den Knochenstoffwechsel und die Muskelmasse. Eine verminderte IGF-1-Produktion kann dabei zu einer Abnahme der Knochendichte führen. Bei Frauen in der Menopause erhöht sich das Risiko für Osteoporose. Dabei kommt es zum Östrogenabfall, da die negative Rückkopplung auf die Hypophyse entfällt. Experimente an Mäusen zeigten, dass nach einer Eierstockentfernung eine erhöhte Knochenresorption auftrat (Khosla et al., 2012). Die Hormonersatztherapie mit Östrogen wird zur Osteoporoseprävention eingesetzt, ist aber umstritten (Vgl. Brenner, 2019, S. 968-977; Vgl. Heinrich, 2014, S. 693 und 853; Vgl. Schmidt, 2010, S. 878-891).

1.7 Pathologie Knochen

Im Skelettsystem können vielfältige pathophysiologische Störungen auftreten – angefangen bei kongenitalen Fehlbildungen bis hin zu erworbenen Schäden infolge falscher Haltung,

inadäquater Belastung oder gestörter Knochenhomöostase (Heinrich, 2014). Knochenerkrankungen sind von immenser Bedeutung, da sie langfristige gesundheitliche Beeinträchtigungen verursachen können (Vgl. Heinrich, 2014, S. 958). Im Fokus stehen hier Schädelknochenerkrankungen, insbesondere der Kieferknochen. Diese können vielfältige Ursachen haben und im Zusammenhang mit Verletzungen, Tumoren oder Entzündungen auftreten. Auch generalisierte oder lokalisierte Fehlbildungen und seltene angeborene Knochenerkrankungen spielen eine Rolle, darunter kraniofaziale Fehlbildungen, Dysgnathien und Lippen-Kiefer-Gaumenspalten, diverse Syndrome und Dysplasien (Vgl. Schwenger, 2011, S. 165).

Im Folgenden wird eine unvollständige Auswahl an möglichen Pathologien, die die Kieferknochen betreffen können und der Rekonstruktion bedürfen, dargestellt. Es besteht kein Anspruch auf Vollständigkeit.

1.7.1 Entzündungen in der Mundhöhle

Mikroorganismen können durch Verletzungen, beschädigte Zähne oder nach Operationen einfach in den Mund-Kiefer-Gesichtsbereich gelangen und Entzündungen verursachen (Vgl. Eckelt, 2019, S. 128-130). Am häufigsten sind odontogene Infektionen, die von Zähnen ausgehen und benachbarte Gewebe infizieren. Weitere Ursachen sind primäre Entzündungen der Schleimhaut oder der Haut des Gesichts durch Bakterien, Viren, Protozoen oder Pilze. Entzündungen können sich von den Zähnen auf Kieferknochen oder Weichteile durch osteolytische Umbauprozesse ausbreiten, was zu lokalen, aber auch zu sich in die Logen ausbreitenden Abszessen führen kann (Vgl. Eckelt, 2019, S. 76-77).

Nicht-odontogene Ursachen sind seltener, umfassen aber u. a. Lymphadenitis, Osteomyelitis und infizierte Frakturen, Kiefernekrosen unter Bisphosphonat- oder Strahlentherapie oder Fremdkörperinfektionen (Vgl. Eckelt, 2019, S. 81- 87).

1.7.2 Alveolarkammatrophie

Mit zunehmendem Alter kommt es zu Alveolarkammatrophie, wobei zwischen physiologischer, seniler Osteoporose und pathologischen Resorptionen nach Zahnverlust unterschieden wird. Zahnverlust führt zu Knochenatrophie, da die Kaubelastung entfällt. Dieser Prozess kann vertikal und horizontal erfolgen, wobei die Resorption im Unterkiefer stärker ist als im Oberkiefer. Dabei unterscheidet sich auch die Richtung der Resorption deutlich: In der Mandibula erfolgt sie zentrifugal und verstärkt vertikal, in der Maxilla zentripetal und sagittal (Vgl. Eckelt, 2019, S. 229-231).

Die Geschwindigkeit der Resorption variiert, beeinflusst durch Knochendichte, hormonelle Faktoren und flächige Druckbelastung durch Prothesen. Im Rahmen der präprothetischen Chirurgie versucht man, das Tragen von Zahnersatz oder die Voraussetzungen zur Implantation zu verbessern. Dazu nutzt man u. a. die Transplantation autologen Knochens oder den Einsatz von Knochenersatzmaterialien, um verlorengegangene Knochensubstanz wieder aufzubauen (Vgl. Eckelt, 2019, S. 198- 199).

1.7.3 Frakturen

Frakturen werden in traumatische, durch äußere Krafteinwirkungen verursachte, und pathologische Frakturen unterteilt, die ohne adäquate Gewalt auftreten. Letztere entstehen häufig bei Zysten, Tumoren oder Entzündungen, die die Knochen schwächen (Vgl. Hausamen, 2003, S. 373-421).

Bei geschlossenen Frakturen bleibt die Weichgewebedecke über der Fraktur geschlossen. Bei offenen oder komplizierten Frakturen besteht eine Verbindung des Bruchspaltes oder der Knochenfragmente mit der Außenwelt. Beinahe alle Frakturen innerhalb der Zahnreihe sind komplizierte Frakturen, da sie über das Parodontium Kontakt zur Mundhöhle haben. Offene Frakturen sind stets besonders infektionsgefährdet (Vgl. Hausamen, 2003, S. 373-421).

1.7.4 Zysten

Zysten sind pathologische, meist gutartige Gebilde, die durch eine Hohlraumbildung mit einer Epithelauskleidung, einen Zystenbalg und einen spezifischen Wachstumsmodus charakterisiert werden. Sie können eine unterschiedliche Ätiologie und Ausprägung haben, odontogenen oder nicht-odontogenen Ursprungs sein und führen durch verdrängendes Wachstum zu Knochenschwund. Oft asymptomatisch und langsam wachsend, können Zysten große Ausmaße erreichen und zu Frakturen führen (Vgl. Hausamen, 2003, S. 117-145; Vgl. Reichart, 2002a, S. 115-128; Vgl. Reichart, 2002b, S. 341-367).

1.7.5 Knochenerkrankungen

Systemische Knochenerkrankungen manifestieren sich auch im Kiefer- und Gesichtsschädel. Diese werden in toxische, zirkulatorische, infektiöse, neoplastische und metabolische Knochenerkrankungen unterteilt. Angeborene Erkrankungen wie z. B. Osteopetrosis, Dysostosen oder Osteogenesis imperfecta haben genetische Ursachen und

können nur symptomatisch behandelt werden. Erworbene Knochenerkrankungen wie z. B. Bisphosphonat-assoziierte Kiefernekrosen, Rachitis, Osteoporose und Osteomalazie sind hormonell oder mechanisch bedingt und können meist kausal behandelt werden. Zu den ätiologisch unklaren Erkrankungen gehören unter anderem Morbus Paget und hemimandibuläre Hyperplasie, die aktuell ebenfalls nur symptomatisch behandelt werden können (Vgl. Schwenger, 2011, S. 165-184).

1.7.6 Osteomyelitis

Osteomyelitis bezeichnet entzündliche Prozesse im Knochenmark oder kortikalen Knochen, meist durch bakterielle Infektionen verursacht. Selten sind auch abakterielle Entzündungen möglich, etwa als postoperative Komplikation oder durch physikalische Reize, z. B. durch Radiatio oder Bruchspaltosteomyelitis bei instabiler Frakturversorgung. Osteomyelitis tritt häufiger im Unterkiefer auf, vermutlich da dieser mehr anorganische Substanz und eine ausgeprägtere Kompakta besitzt. Liegt allerdings eine Osteomyelitis der Maxilla vor, ist auch deren Therapie deutlich schwieriger. Es kommt zu einer lokalen Durchblutungssteigerung und einem intraossären Druckanstieg, was Knochenabbau, Sequestern und Nekrosen verursachen kann (Vgl. Eckelt, 2019, S. 156; Vgl. Hausamen, 2003, S. 183-198). Die Therapie hängt von Form und Schwere der Entzündung, der klinischen Symptomatik und dem Verlauf ab (Vgl. Eckelt, 2019, S. 160-165). Die Ultima ratio ist eine Resektion des betroffenen Knochens und anschließende Rekonstruktion (Vgl. Hausamen, 2003, S. 196 f.; Vgl. Reichart, 2002b, S. 515-516 und 601-602).

1.7.7 Tumore

Tumore im Mund-Kiefer-Gesichtsbereich können odontogen oder nicht-odontogen sein. Sie umfassen benigne Knochentumore wie Osteome und maligne Tumore wie Osteosarkome. Dabei handelt es sich um mesenchymale Tumore (Vgl. Schwenger, 2011, S. 57 ff.). Die Therapie erfolgt meist chirurgisch, oft auch in Kombination mit Chemotherapie und/oder Strahlentherapie. Nach Tumoroperationen ist die funktionelle und ästhetische Rekonstruktion des Gesichts häufig eine große Herausforderung. Betroffene Patienten sind oftmals erheblich in ihrer Lebensqualität beeinträchtigt. Auch die Rekonstruktion nach einer Resektion stellt sich in den meisten Fällen nicht einfach dar, da häufig nach der ersten Operation große Defekte zurückbleiben, sodass kein primärer Verschluss möglich ist, unterschiedliche Gewebearten rekonstruiert werden müssen und schwierige Weichteilverhältnisse vorliegen. Auch heute besteht noch Bedarf zur Verbesserung und Vereinfachung der Rekonstruktion. Klinische Erfahrungen zeigen, dass dies oft der

besonders anspruchsvolle, zeitaufwändige und belastende Schritt ist (Vgl. Hausamen, 2003, S. 447-480; Vgl. Horch, 2007, S. 670-751).

1.7.8 Radiatio

Die Strahlentherapie zur Behandlung von Tumoren im Mund-Kiefer-Gesichtsbereich kann aufgrund des Strahlenfeldes Schäden an Kieferknochen und Zähnen verursachen. Insbesondere Zellen mit hoher Stoffwechselleistung werden in ihrer Reproduktions- und Reparaturfähigkeit beeinträchtigt. Es kommt zu einer gestörten Blutversorgung, Nekrosen und im schlimmsten Fall zu infizierten Osteoradionekrosen (IORN). Eine IORN liegt dann vor, wenn zusätzlich noch eine Infektion zur Osteonekrose hinzukommt. Dabei kommt es durch progrediente und therapieresistente Osteolysen zu intraoral freiliegenden Knochenabschnitten und zu extraoralen Fistelbildungen, die schlimmstenfalls zu pathologischen Frakturen und Kieferteilverlusten führen können.

Weitere Folgen nach einer Strahlentherapie sind bleibende Schäden der Weichgewebe, die häufig langwierige Wundheilungsstörungen verursachen, und es entstehen sklerosierte Knochenabschnitte, die eine geringere Vitalität aufweisen und zu einer verminderten Reaktionsfähigkeit des Knochens auf äußere Reize führen. Chirurgische Eingriffe sollten nach Möglichkeit vermieden werden, da die Gewebeheilung unter diesen Bedingungen erheblich kompromittiert ist (Vgl. Eckelt, 2019, S. 123, 67-171 und 290-293; Vgl. Hausamen, 2003, S. 193-196; Vgl. Reichart, 2002a, S. 109). Eine konsequente Resektion der betroffenen Bereiche und anschließend eine mikrochirurgische Augmentation mit nicht-bestrahltem Knochen sind oft erforderlich. Zusätzlich kann es im bestrahlten Gebiet zu speziellen Komplikationen kommen, da es oft durch vorherige Operationen bereits zur Narbenbildung gekommen ist. Es liegen zudem häufig bereits tumorbedingte Kieferdefekte vor. Auch die gestörte Weichteilheilung über dem Transplantat, das Fehlen von Anschlussgefäßen für die Transplantate oder Störungen bei der Anastomosenheilung werfen Probleme auf. Insgesamt führt dies zu wesentlich schlechteren Erfolgsaussichten der ohnehin schon schwierigen Therapie (Vgl. Eckelt, 2019, S. 123, 67-171 und 290-293; Vgl. Hausamen, 2003, S. 193-196; Vgl. Reichart, 2002a, S. 109).

1.7.9 Osteoporose

Osteoporose ist die häufigste systemische Skeletterkrankung und führt zu einer Abnahme der Knochendichte und einer erhöhten Frakturgefahr (Baron & Hesse, 2012; Feng & McDonald, 2011). Besonders betroffen sind Frauen nach der Menopause. 2013 wurde in

Deutschland bei über sechs Millionen Patienten Osteoporose diagnostiziert (Hadjji et al., 2013). Durch den demografischen Wandel häufen sich schwerwiegende Frakturen bei älteren Patienten, was zu einem Verlust der Selbstständigkeit führen kann und somit die Lebensqualität der Patienten stark beeinflusst. Aber auch für das Gesundheitssystem entstehen hohe Kosten durch operative Eingriffe und Pflegebedürftigkeit.

Die Ätiologie ist vielschichtig. Osteoporotische Veränderungen sind einerseits Ausdruck eines physiologischen Alterungsprozesses mit verlangsamter Knochenneubildung, andererseits Folge von pathologischen Stoffwechselerkrankungen. Ursächlich für eine Osteoporose können z. B. Inaktivität, Involution, Alter, Ernährung, Erkrankungen, Medikamente oder Hormone sein. Bei der postmenopausalen Osteoporose kommt es zu einem Östrogenabfall, einer verminderten Calciumabsorption, verändertem Parathormonspiegel, verminderter Calcitoninstimulierbarkeit und vermindertem Vitamin D₃. Da Östrogene die Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine (u. a. IL-1, IL-6, TNF- α) reduzieren, führt eine Abnahme des Östrogenspiegels zu erhöhten Zytokinspiegeln und infolgedessen zu einer verstärkten Knochenresorption (Heinrich, 2014).

Die Therapie umfasst Bewegung, eine ausgewogene Ernährung und in schweren Fällen Medikamente, wie z. B. Östrogene oder Bisphosphonate (Vgl. Hausamen, 2003, S. 151-154; Vgl. Heinrich, 2014, S. 500 und 958 f.; Vgl. Schmidt, 2010, S. 688 und 788; Vgl. Schwenger, 2011, S. 174). Eine postmenopausale Hormonersatztherapie wird nur in bestimmten Fällen empfohlen, da dies ein Risiko für das kardiovaskuläre System darstellen kann (Compston et al., 2019). Ein neuerer Therapieansatz sieht die Verwendung von NO-Donoren vor. Wie bereits beschrieben, wirkt NO, abhängig von der Dosis, positiv auf die Knochenhomöostase. Die Frakturwahrscheinlichkeit konnte bereits bei Anwendung geringer Dosen reduziert werden (Wimalawansa, 2010). In einer klinischen Studie konnte außerdem gezeigt werden, dass die Gabe von L-Arginin ähnlich erfolgreich wirkt wie die Anwendung von Bisphosphonaten. Es zeigten sich zudem mildere Symptome und therapeutische Vorteile in Hinblick auf Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Nierenfunktion und Wundheilung (Singh et al., 2014).

1.7.10 *Medikamenten-assoziierte Osteonekrose (MRONJ)*

Antiresorptive Medikamente, wie z. B. Bisphosphonate und monoklonale Anti-RANKL-Antikörper, werden zur Therapie von Knochenstoffwechselstörungen, multiplem Myelom, Plasmozytom, Hyperkalzämie, Morbus Paget, Osteoporose und Metastasen von malignen Tumoren der Brustdrüse und der Prostata eingesetzt. Es zeigte sich allerdings, dass es unter ihrer Anwendung häufig zu schweren medikamentenassoziierten Osteonekrosen im

Kiefer (*medication-related osteonecrosis of the jaw, MRONJ*) kommt. Diese betreffen häufiger den Unterkiefer, seltener auch den Oberkiefer. Abhängig von der Grunderkrankung, der Einnahmedauer, dem verabreichten Medikament und weiteren Kofaktoren zeigt sich eine unterschiedlich starke Hemmung der Knochenresorption und damit auch ein Unterschied bezüglich des Auftretens von Kiefernekrosen. Die Halbwertszeit der Antiresorptiva ist sehr lang, weshalb ein kurzfristiges Absetzen der Medikamente keine Änderung bewirkt.

Diese Nekrosen entstehen bereits nach kleinen Verletzungen, meistens nach Zahnextraktionen, und sind schwer zu behandeln.

Die *MRONJ* verläuft oft zunächst lange relativ asymptomatisch, führt jedoch zu intraoral freiliegendem Knochen, Knocheninfektionen, progredienten Osteolysen und Frakturen. Eine präventive Behandlung ist entscheidend, da die Therapie komplex und langwierig ist. Häufig bleiben die Patienten nach der Behandlung in einem chronischen Entzündungszustand oder es kommt zu Verlusten von Kieferabschnitten (Vgl. Eckelt, 2019, S. 7-8, 123, 293-296).

1.8 Rekonstruktion

1.8.1 Rekonstruktion

Die Rekonstruktion nach umfangreichen Weichgewebe- und Knochendefekten im Mund-Kiefer-Gesichtsbereich stellt eine der größten Herausforderungen der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie dar. Das Operationsgebiet ist durch eine permanente, hohe Keimbelastung und ständige Feuchtigkeit aufgrund des Speichels und der Bewegungen wie Sprechen, Kauen und Schlucken besonders anspruchsvoll. Trotz dieser Herausforderungen heilt das Gebiet meist gut, dank der guten Vaskularisation im Gesicht (Vgl. Reichart, 2002b, S. 113).

Die Wiederherstellung skelettaler Strukturen ist entscheidend, da Weichteile ohne knöcherne Rekonstruktion kollabieren. Knöcherne Defekte im Gesicht können zu funktionellen, ästhetischen und psychosozialen Beeinträchtigungen führen, die die Lebensqualität der Betroffenen dramatisch einschränken können. Ursachen für solche Defekte können Traumata, Tumoren, Entzündungen oder angeborene Fehlbildungen sein. Eine präzise Planung ist notwendig, wobei die individuelle Situation des Patienten, Zusatzerkrankungen, frühere Operationen, Bestrahlungen und der allgemeine Gesundheitszustand berücksichtigt werden müssen. Die Wahl der geeigneten Rekonstruktionsmethode hängt von der Größe, der Lage und von der ästhetischen und

funktionellen Bedeutung des Defektes sowie von der Beschaffenheit der Empfängerregion ab (Vgl. Hausamen, 2003, S. 148-154; Vgl. Reichart, 2002b, S. 434-437).

Nach der Rekonstruktion und Augmentation sollte der Kieferknochen mit Implantaten und adäquatem Zahnersatz belastet werden, um Atrophie zu verhindern (Vgl. Eckelt, 2019, S. 205-212, 213-223 und 251-258; Vgl. Reichart, 2002b, S. 434-458).

1.8.2 Transplantation

Transplantationen haben sich als medizinisches Standardverfahren etabliert, besonders für Organe wie z. B. Cornea, Niere und Stammzellen. Die Immunantwort des Empfängers spielt eine entscheidende Rolle für den Erfolg einer Transplantation. Bei allogenen Transplantationen, bei denen Zellen von einem genetisch unterschiedlichen Spender übertragen werden, kommt es zwangsläufig zu einer Immunantwort, die auf Unterschiede in den MHC-Molekülen zurückzuführen ist. Dabei kann es zu einer *Graft-versus-Host*-Reaktion kommen. Die Reaktion ist umso heftiger, je größer die Unterschiede zwischen den MHC-Molekülen sind. Außerdem besteht auch das Risiko einer möglichen Übertragung von Infektionskrankheiten. Eine Histokompatibilitätstestung und Immunsuppression sind daher notwendig (Vgl. Brenner, 2019, S. 289; Vgl. Heinrich, 2014, S. 900 f. und 929 f.; Vgl. Horn, 2021, S. 722- 724; Vgl. Welsch, 2018, S. 284-286).

Autogene Transplantate, die vom gleichen Individuum stammen, sind die sicherste Methode, da sie keine Abstoßungsreaktionen hervorrufen und keine Infektionsgefahr besteht. Autologer Knochen hat eine osteokonduktive und osteoinduktive Wirkung. Osteogenetische Potenz und Einheilmodus sind als ideal einzustufen. Spenderregionen können sowohl intraoral (z. B. Kinn, Kieferwinkel) als auch extraoral (z. B. Beckenkamm, Rippe) sein. Nachteile von Knochentransplantaten umfassen die aufwendige, lange Operation, Entnahmemorbidität, Gefahr pathologischer Frakturen, Resorption des Transplantates und mögliche funktionelle oder ästhetische Beeinträchtigungen. Außerdem sind die begrenzte Verfügbarkeit und die Tatsache, dass ein zusätzlicher operativer Eingriff zur Knochenentnahme notwendig ist, aufzuführen (Vgl. Reichart, 2002b, S. 437-439). Fortbestehende Beschwerden, Komplikationen in der Empfängerregion, postoperative Hämatome, Frakturen in der Entnahmeregion, Gefühlsstörungen sowie Gehstörungen und die Gefahr der Hernienbildung bei Beckenkammtransplantaten können ebenfalls auftreten (Vgl. Hausamen, 2003, S. 481-513; Vgl. Horch, 2007, S. 200-221 und S.754-795; Vgl. Schwenzer, 2011, S.435-477).

1.8.3 Tissue Engineering

Ziel des *Tissue Engineering* ist es, einen biologischen Ersatz zu entwickeln, der die Funktion des Ursprungsgewebes ersetzt, aufrechterhält oder verbessert. Dabei wird autologes Gewebe *in vitro* kultiviert und danach auf einem geeigneten Trägermaterial zurück in den Körper transplantiert, um fehlendes Gewebe zu ersetzen (Seo & Na, 2011). Stammzellen bzw. Stromazellen spielen dabei eine wichtige Rolle. Bereits 2001 konnte die Heilung von Knochendefekten kritischer Größe mit autologen Stammzellen des Knochenmarks durchgeführt werden (Quarto et al., 2001). In großen Frakturspalten, in denen eine regelrechte Heilung nicht möglich ist, können osteokonduktive Substanzen oder Vorläuferzellen eingebracht werden (Schroder et al., 2004).

Anders als bei synthetischen Knochenersatzmaterialien handelt es sich beim *Tissue Engineering* um einen biologischen Ersatz durch Biomaterialien, Zellen oder eine Kombination beider (Khan et al., 2012). Bereits Anfang der 60er Jahre wurden Stammzellen im Knochenmark von Mäusen identifiziert und innerhalb kürzester Zeit wurden mesenchymale Stammzellen zu einem festen Bestandteil der regenerativen Medizin (Bajek et al., 2015).

Periostzellen und Knochenmarkstromazellen werden mittels Biopsien gewonnen und *in vitro* in speziellen Medien unter Verwendung des Patientenserums kultiviert. Das Zellwachstum erfolgt auf *Scaffolds*, die als artifizielle, ortsständige Matrixgerüste die Form des zu ersetzenden Gewebedefekts nachbilden. Das neu gezüchtete Gewebe wird dann gezielt zur Auffüllung des Defekts eingesetzt und mit den Trägermaterialien transplantiert (Gilbert, 2010). Diese Methode befindet sich noch in der Entwicklung, da die Anzucht von Gewebe bisher nur in spezialisierten Laboren möglich ist (siehe **Abb. 8: Tissue Engineering**) (Vgl. Hausamen, 2003, S. 490 f.).

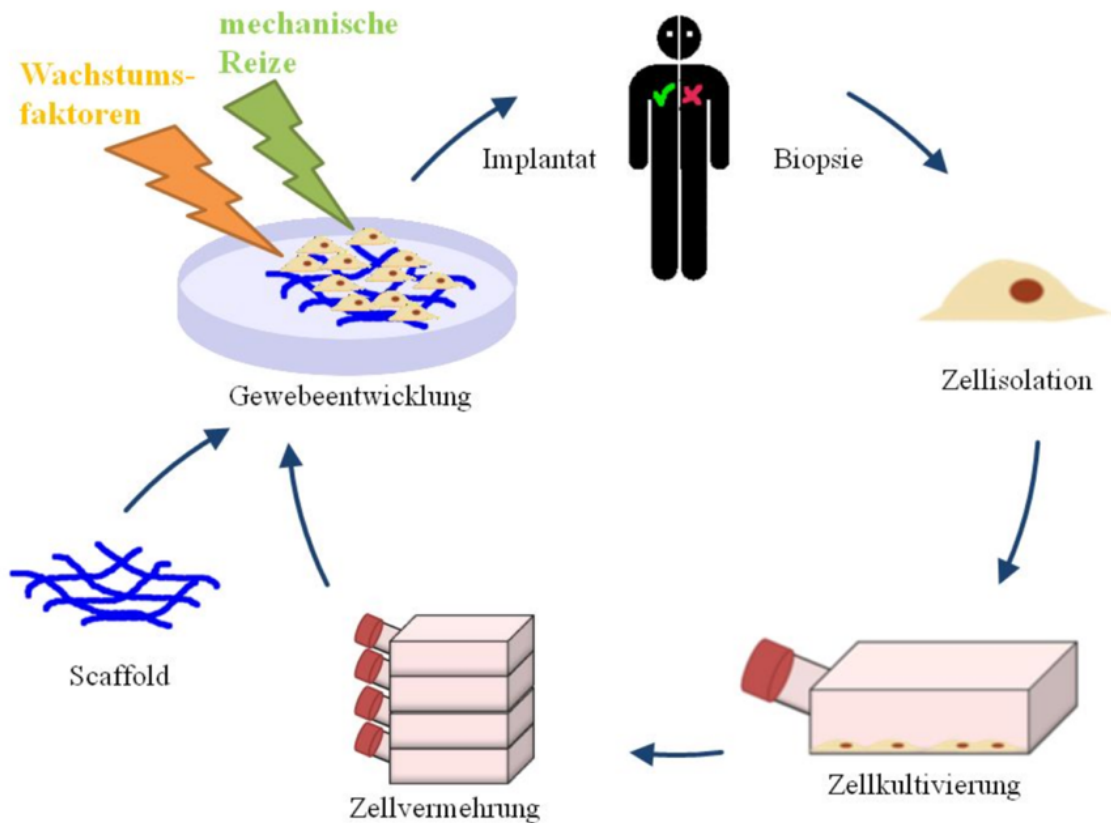


Abb. 8: Tissue Engineering

Schematische Prozesskette vom Patientenmaterial zur implantierbaren Gewebekonstruktion: Biopsie bzw. Gewebeentnahme; Isolation, Charakterisierung und Expansion geeigneter Zellen (z. B. mesenchymale oder dentale Stromazellen) unter sterilen Bedingungen; Besiedelung eines dreidimensionalen Trägermaterials (*Scaffold*) und ggf. Einbindung bioaktiver Faktoren; Reifung im Bioreaktor mit definierter mechanischer und biochemischer Stimulation; präimplantative Qualitätskontrollen (u. a. Viabilität, Sterilität, Differenzierungsmarker, mechanische Eigenschaften); Implantation in den Defekt und Integration sowie *Remodelling in vivo*. Weitere Erläuterungen siehe Fließtext. Darstellung nach (Rongen, 2010).

Ein Vorteil des *Tissue Engineering* ist, dass theoretisch unbegrenzt Gewebe gezüchtet werden kann, kein Entnahmedefekt versorgt werden muss und das Risiko von Abstoßungsreaktionen durch die Verwendung autologer Zellen signifikant verringert wird (Nordberg & Lobo, 2015; Zong et al., 2010). Mesenchymale Stromazellen haben immunmodulatorische und -suppressive Eigenschaften, die ihre Eignung für regenerative Medizin weiter erhöhen (Abumaree et al., 2012). Auch die Sekretion verschiedener Wachstumsfaktoren und Zytokine durch die Stromazellen spielt eine wichtige Rolle bei der Wundbehandlung (Pourrajab et al., 2013).

Tissue Engineering hat bereits in der Verbrennungschirurgie Anwendung gefunden und könnte auch in der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie, besonders bei der Rekonstruktion von Knochengewebe, von großer Relevanz sein. Es ist auch heute noch ein Problem, größere Knochendefekte in diesem Bereich zu decken, und auch vorbereitende Osteoplastiken

weisen eine hohe Entnahmemorbidität auf. Zudem gibt es bislang noch kein ideales Knochenersatzmaterial, sodass auf die Entnahme autologen Knochens gänzlich verzichtet werden könnte.

Mittlerweile sind sowohl in Tierversuchen als auch *in vivo* Transplantationen von kleineren Knochenäquivalenten gelungen. Es wurde bereits Knochen durch *Tissue Engineering* aus Stammzellen des Periosts und des Fettgewebes gezüchtet und klinisch für Kieferaugmentationen eingesetzt. Erfolgreiche Transplantationen sind z. B. bei Sinuslift-Operationen durchgeführt worden, bei denen vor der Operation Osteoblasten aus dem mandibulären Periost gewonnen wurden, die dann mit einem resorbierbaren *Scaffold* transplantiert werden konnten. Nach sechs Monaten konnte im augmentierten Bereich reifer lamellärer Knochen nachgewiesen werden. Auch adipogene Stammzellen konnten bereits zur Rekonstruktion von knöchernen Defekten des Schädels genutzt werden (Cui et al., 2007). Es gelang außerdem bereits, Knochendefekte kritischer Größe mithilfe von autologen Stammzellen aus dem Knochenmark zu reparieren. Dabei wurden die Zellen auf großporige *Scaffolds* aus Hydroxylapatit aufgebracht, deren Form und Größe dem zu rekonstruierenden Defekt entsprach (Quarto et al., 2001). Des Weiteren gibt es bereits einige Experimente, bei denen osteoinduktive Transplantate aus Stromazellen aus dem Knochenmark auf dreidimensionalen *Scaffolds* aus Keramik hergestellt wurden (Scaglione et al., 2006).

Trotzdem stellen Transplantationen größerer Knochenäquivalente immer noch ein Problem dar. Die Vaskularisation der Transplantate und die vorher notwendige Operation zur Gewinnung der Zellen sind immer noch mit Komplikationen verbunden (Vgl. Eckelt, 2019, S.213). Auch die Vermeidung einer sekundären Atrophie stellt noch ein Problem dar (Vgl. Schwenzer, 2011, S. 438 und S. 442). Nachteilig ist ebenfalls, dass die Transplantate nicht sofort zur Verfügung stehen. Außerdem proliferieren die Zellen außerhalb des Organismus nur eingeschränkt (Choi et al., 2006; Mauney et al., 2007). Es gibt auch Bedenken hinsichtlich des Krebsrisikos, hinsichtlich einer Transdifferenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Tumorzellen und hinsichtlich der möglichen Förderung des Tumorwachstums durch mesenchymale Stammzellen (Wong, 2011). Die Gewinnung von Stammzellen aus dem Knochenmark kann mit Schmerzen, Hämatomen, Infektionen mit Staphylokokken und weiteren Komplikationen verbunden sein (Bosi & Bartolozzi, 2010; Martino et al., 2012). Deswegen wurden alternative Stammzellquellen gesucht, die ein ähnliches Potential aufweisen, aber deren Gewinnung mit weniger Belastung und Komplikationen einhergeht (Choudhery et al., 2013). Der rasche Fortschritt im Bereich der regenerativen Medizin und der Stammzellforschung ermöglicht es heutzutage, mesenchymale Stammzellen aus fast jedem Gewebe des menschlichen Organismus zu isolieren und therapeutisch divers einzusetzen (Nordberg & Lobo, 2015; Qi et al., 2018).

Der Einsatz von pulpastämmigen Stromazellen für das osteogene *Tissue Engineering* stellt also eine gute Alternative zu den bisher vorwiegend eingesetzten Stammzellen aus Knochenmark und Fettgewebe dar (Li et al., 2011).

1.9 Ziele der Arbeit

Vor dem skizzierten wissenschaftlichen Hintergrund verfolgt die vorliegende Arbeit das Ziel, den Einfluss des L-Arginin-Stoffwechsels auf das osteogene Differenzierungspotential von Stromazellen aus der humanen Zahnpulpa systematisch zu untersuchen. Im Fokus stehen dabei sowohl die Wirkung physiologischer und pathologischer L-Arginin-Konzentrationen als auch die Rolle relevanter modulierender Faktoren – insbesondere Inhibitoren der Stickstoffmonoxid-Synthasen (iNOS, eNOS), der Arginasen (Arginase-1 und -2) sowie der zellulären Aminosäuretransporter (CAT-1, CAT-2).

Zur Umsetzung dieses Ziels wurde ein laborexperimentelles *In-vitro*-Modell etabliert. Die dentalen Stromazellen (DSC) wurden aus extrahierten humanen Weisheitszähnen isoliert, kultiviert und unter osteogenen Bedingungen differenziert. Die osteogene Aktivität wurde dabei unter Anwendung der Alizarinrot-S-Färbung und Rücklösung quantifiziert. Ergänzend erfolgte die Analyse der Proteinexpression spezifischer Enzyme und Transporter im Zusammenhang mit dem L-Arginin-Metabolismus. Eine genetische Analyse wurde im Rahmen dieser Studie nicht durchgeführt.

Des Weiteren wurde die mesenchymale Identität der isolierten Zellen mittels FACS-Analyse verifiziert sowie deren Wachstumskinetik unter verschiedenen Kulturbedingungen erfasst. Die zugrunde liegende Hypothese lautete, dass ein Mangel an L-Arginin die osteogene Differenzierung hemmt, während eine Substitution bzw. Aktivierung der L-Arginin-abhängigen Signalwege diesen Prozess fördern kann (siehe **Abb. 9: Zielsetzung der Versuche und Aufbau der Arbeit**).

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse liefern grundlegende Hinweise auf die molekularen Mechanismen der Osteogenese von DSC und könnten perspektivisch zur Entwicklung neuer therapeutischer Strategien im Bereich der regenerativen Zahnmedizin und der Knochengewebsrekonstruktion beitragen.

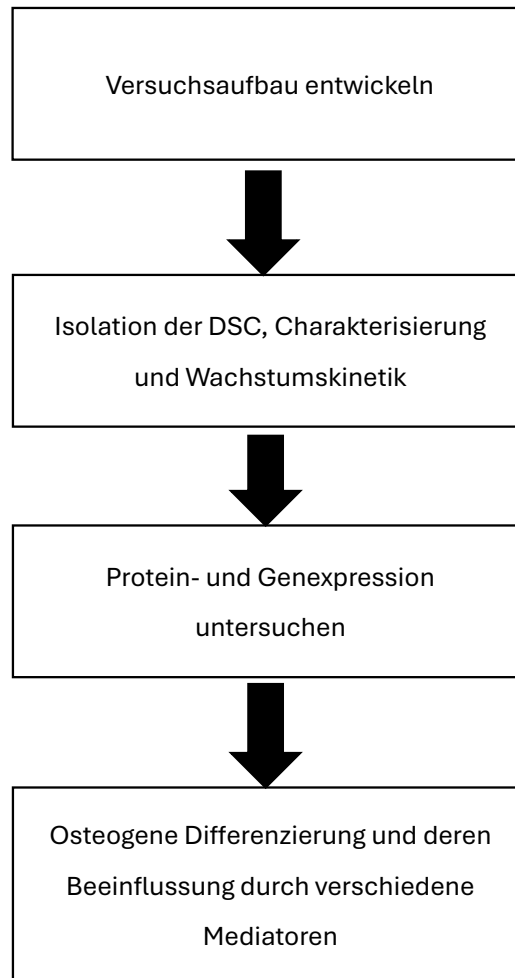


Abb. 9: Zielsetzung der Versuche und Aufbau der Arbeit

Schematische Darstellung des in dieser Arbeit verfolgten Arbeitsablaufs. Das Schema zeigt: (1) Entwicklung des Versuchsaufbaus, (2) Isolation dentaler Stromazellen (DSC), phänotypische Charakterisierung und Erhebung der Wachstumskinetik, (3) Analyse der Protein- und Genexpression, (4) osteogene Differenzierung und deren Modulation durch definierte Mediatoren. Die Grafik dient als Leitfaden durch Fragestellung, Methodik und Ergebniskapitel. Details siehe Fließtext. Eigene Anfertigung.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Gerät und Typenbezeichnung	Hersteller und Ort
Abzug	Waldner (Wangen/Deutschland)
Axiovert 40 und Axioskop 40 Mikroskop	Zeiss (Oberkochen/Deutschland)
ChemiDoc MP	BioRad (Hercules/USA)
BD FACSLyric	BD Biosciences (Franklin Lakes/USA)
Gelkammer Mini-PROTEAN® Tetra Cell	BioRad (Hercules/USA)
Heracell 150 Inkubator	Thermo Fisher Scientific (Dreieich/Deutschland)
Herasafe 2020 (S2020 1.8) Werkbank	Thermo Fisher Scientific (Dreieich/Deutschland)
Kryobox Gefrierbehälter <i>Mr. Frosty</i>	Thermo Fisher Scientific (Dreieich/Deutschland)
Magnetrührer	IKA (Staufen/Deutschland)
Multipipette plus	Eppendorf (Hamburg/Deutschland)
Multiplattenlesegerät VICTOR™ X3 Multilabel Counter	Perkin Elmer (Waltham/USA)
<i>Bio-Photometer plus</i>	Eppendorf (Hamburg/Deutschland)
Pipettboy Accu-Jet Pro	BRAND (Wertheim/Deutschland)
Pipetten (10 µl/100 µl/1000 µl)	Eppendorf (Hamburg/Deutschland)
PowerPac Power Supply	BioRad (Hercules/USA)
Saugpumpe	KNF Neuberger (Freiburg/Deutschland)
Sonifiziergerät	Hielscher Ultrasonics (Berlin/Deutschland)
Taumelrollenmischer	Labortechnik Fröbel (Lindau/Deutschland)

Vortexer	VWR (Darmstadt/Deutschland)
Waage	Sartorius (Göttingen/Deutschland)
Wasserbad	Thermo Fisher Scientific (Dreieich/Deutschland)
Zentrifuge: Megafuge 1.0 R	Thermo Fisher Scientific (Dreieich/Deutschland)
Zentrifuge: Pico 17 Microcentrifuge	Thermo Fisher Scientific (Dreieich/Deutschland)

Tabelle 2: Geräte

2.1.2 Materialien

Art des Materials	Hersteller und Ort
6-/24-/96-Well-Platten	Greiner Bio-One (Kremsmünster/Österreich)
Cryo.s Einfrierröhrchen 2 ml	Greiner Bio-One (Kremsmünster/Österreich)
Falcon 15 ml/50 ml	Greiner Bio-One (Kremsmünster/Österreich)
Küvetten	Sarstedt (Nürnbrecht/Deutschland)
Metallzylinder und -kolben	Selbstbau
Mini-PROTEAN TGX Stain-Free Gels 4- 15 %	BioRad (Hercules/USA)
Neubauer Zählkammer	LO Laboroptik (Friedrichsdorf/Deutschland)
Pasteurpipetten	BRAND (Wertheim/Deutschland)
pH-Indikatorpapier	Carl Roth (Karlsruhe/Deutschland)
Pipettenspitzen (10 µl/100 µl/1000 µl)	Eppendorf (Hamburg/Deutschland)
Safe-Lock-Tubes (1,5 ml)	Eppendorf (Hamburg/Deutschland)
Schraubbecher (100 ml)	Sarstedt (Nürnbrecht/Deutschland)
Spritzen	B. Braun (Melsungen/Deutschland)
Sterilfilter (20 µm/100 µm)	Thermo Fisher Scientific (Dreieich/Deutschland)
Stripetten (5 ml/10 ml/25 ml/50 ml)	Greiner Bio-One (Kremsmünster/Österreich)

T 25-/75-/175-Zellkulturflasche	Greiner Bio-One (Kremsmünster/Österreich)
Zellspachtel	Greiner Bio-One (Kremsmünster/Österreich)

Tabelle 3: Materialien

2.1.3 Substanzen

Substanz	Hersteller und Ort
1-Cetylpyridiniumchlorid Monohydrat	MERCK Millipore (Darmstadt/Deutschland)
2-Mercaptoethanol	MERCK Sigma-Aldrich (Darmstadt/Deutschland)
Alizarin red S mono	MERCK Millipore (Darmstadt/Deutschland)
Amphotericin B	Thermo Fisher Scientific (Dreieich/Deutschland)
Ampuwa Spüllösung	Fresenius Kabi (Bad Homburg vor der Höhe/Deutschland)
Aqua B.	B. Braun (Melsungen/Deutschland)
β -Glycerophosphat	Sigma (München/Deutschland)
<i>Bovine Serum Albumine</i> , Fraktion V, proteasefrei	Carl Roth (Karlsruhe/Deutschland)
CellTiter Blue	Promega (Madison/USA)
Chlorhexamed Spülung 0,2 % alkoholfrei	gsk (München/Deutschland)
<i>Dexamethasone-Water Solution</i>	Sigma (München/Deutschland)
D-Glucose	Sigma (München/Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma (München/Deutschland)
Dispase II (neutral protease, grade II)	Roche Diagnostics (Mannheim/Deutschland)
<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (DMEM) (4,5 g/l D-Glucose, L-Glutamin, ohne Pyruvat)	Thermo Fisher Scientific (Dreieich/Deutschland)
<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (DMEM) Silac™ Flex Media (ohne D-Glucose, ohne L-Arginin, ohne L-Lysin und ohne <i>Phenol Red</i>)	Thermo Fisher Scientific (Dreieich/Deutschland)

<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)</i> (w/o Ca^{2+} - and Mg^{2+} -Chlorid)	Sigma (München/Deutschland)
<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS)</i> (modified with Ca^{2+} - and Mg^{2+} -Chlorid)	PAN-Biotech (Aidenbach/Deutschland)
Ethanol	MERCK Millipore (Darmstadt/Deutschland)
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma (München/Deutschland)
FGF-2	ImmunoTools GmbH (Friesoythe/Deutschland)
Gentamicin	Thermo Fisher Scientific (Dreieich/Deutschland)
HEPES	Sigma (München/Deutschland)
Immobilon Forte Western HRP Substrate	Millipore (Burlington/USA)
Isopropanol	Sigma (München/Deutschland)
Kollagenase Typ I (<i>lyophilized</i>)	Gibco, Life Technologies Corporation (Grand Island/USA)
L-Arginin Hydrochlorid	Sigma (München/Deutschland)
L-Ascorbinsäure	Sigma (München/Deutschland)
L-Glutamin	Thermo Fisher Scientific (Dreieich/Deutschland)
L-Leucin	Sigma (München/Deutschland)
L-Lysin	Sigma (München/Deutschland)
L-N ⁵ -(1-Aminoethyl)-Ornithin (L-NIO)	Sigma (München/Deutschland)
L-Ornithin Monohydrochlorid	Sigma (München/Deutschland)
L-Valin	Sigma (München/Deutschland)
MEM <i>Non-Essential Amino Acids</i>	Thermo Fisher Scientific (Dreieich/Deutschland)
Methanol	Sigma (München/Deutschland)
Milchpulver	Carl Roth (Karlsruhe/Deutschland)
NaCl 0,9 %	B. Braun (Melsungen/Deutschland)
Paraformaldehyd (PFA)	MERCK Millipore (Darmstadt/Deutschland)

Penicillin-Streptomycin	Thermo Fisher Scientific (Dreieich/Deutschland)
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific (Dreieich/Deutschland)
<i>Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium (mit L-Glutamin und Natriumbicarbonat, ohne L-Arginin, L-Leucin, L-Lysin und Phenolrot)</i>	Sigma (München/Deutschland)
<i>Roswell Park Memorial Institute (RPMI) Medium 1640 (1 x) mit L-Glutamin</i>	Thermo Fisher Scientific (Dreieich/Deutschland)
ROTI-Mark Western Plus Proteinmarker	Carl Roth (Karlsruhe/Deutschland)
Salzsäure	MERCK Millipore (Darmstadt/Deutschland)
SDS	VWR® Natriumdodecylsulfat (SDS) für die Molekularbiologie
<i>Trypan Blue Solution</i>	Sigma (München/Deutschland)
<i>Trypsin-EDTA Solution</i>	Sigma (München/Deutschland)
Tween®20	Sigma (München/Deutschland)

Tabelle 4: Chemikalien

2.1.4 Medien, Lösungen und Puffer

2.1.4.1 Medien

Standardmedium

- DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) mit 4,5 g/l D-Glucose und L-Glutamin
- 10 % FCS
- 2 % Penicillin + Streptomycin
- 1 % HEPES
- 1 % Amphotericin B
- 0,1 % Gentamicin

Proliferationsmedien

Proliferationsmedium 1	Proliferationsmedium 2	Proliferationsmedium 3	Proliferationsmedium 4
DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>) mit 4,5 g/l D-Glucose und L-Glutamin	Standardmedium	Standardmedium	Standardmedium
20 % FCS	10 % FCS	10 % FCS	10 % FCS
2 ng/ml FGF	2 ng/ml FGF	1 ng/ml FGF	0,5 ng/ml FGF
1 % NEAA	1 % NEAA	1 % NEAA	1 % NEAA
3 % Penicillin und Streptomycin	1 % Penicillin und Streptomycin	1 % Penicillin und Streptomycin	1 % Penicillin und Streptomycin
1 % Amphotericin B	1 % Amphotericin B	1 % Amphotericin B	1 % Amphotericin B
0,1 % Gentamicin	0,1 % Gentamicin	0,1 % Gentamicin	0,1 % Gentamicin

Tabelle 5: Proliferationsmedien

Osteogenes Differenzierungsmittel mit 10 % FCS (OM) (nach SOP Differenzierungsmedien)

- DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) mit 4,5 g/l D-Glucose und L-Glutamin
- 10 % FCS
- 2 % Penicillin und Streptomycin (doppelt so hoch wie im SOP)
- 500 nM Dexamethason (MW 392,46 g/mol)
- 50 µM L-Ascorbin-2-Phosphat (MW 289,54 g/mol)
- 10 mM β-Glycerophosphat
- 1 % Amphotericin B (zusätzlich zum SOP Differenzierungsmedien)
- 0,1 % Gentamicin (zusätzlich zum SOP Differenzierungsmedien)

Dabei wurden dem Medium die folgenden Substanzen zugesetzt, die die osteogene Differenzierung ermöglichen und einleiten (Pittenger et al., 1999). Dexamethason ist ein Glukokortikoid, welches an intranukleäre Rezeptoren bindet. Es wurde bereits 1985 bei

Experimenten zur Osteogenese von Periostzellen des Huhns eingesetzt (Tenenbaum & Heersche, 1985). Dadurch wird die alkalische Phosphataseaktivität erhöht, es hemmt die Synthese von Kollagen-1 und stimuliert die Runx2-, Osteopontin- und die Osteokalzinproduktion in postproliferativen Zellen sowie die Bildung kalzifizierter Matrix (Hamidouche et al., 2008; Herbertson & Aubin, 1995; Schepmoes et al., 1991; Wong et al., 1990). In Zellkulturen von Osteoblasten stimuliert Dexamethason außerdem die Bildung von kalzifizierten Knötchen (Kögler, 2006).

Zusätzlich wurde Ascorbinsäure hinzugegeben, welche für viele biologische Prozesse benötigt wird. Dabei handelt es sich um ein wichtiges Antioxidans (Covarrubias-Pinto et al., 2015) sowie um einen wichtigen Kofaktor für den Hydroxylaufbau. Es stabilisiert die Kollagen-Trippl-Helix und es dient als Donor für anorganisches Phosphat (Beresford et al., 1993; Franceschi et al., 1994; Handschel et al., 2010; Kögler et al., 2004; Mackie et al., 2011; Vater et al., 2011; Xiao et al., 1998). Dadurch spielt es eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung kardiovaskulärer Funktionen und im Erhalt von Zähnen, Knochen sowie von Knorpelgewebe (Covarrubias-Pinto et al., 2015). Der menschliche Körper ist nicht in der Lage, eigenständig Vitamin C zu produzieren, weshalb es über die Nahrung zugeführt werden muss (Levine, 1986; Levine et al., 1995; Sies & Stahl, 1995).

β -Glycerophosphat wird von osteogenen Zellen zu löslichem Phosphat gespalten. Es dient als Phosphatquelle und verhindert die unspezifische Mineralaufnahme. Dabei dient Phosphat nicht nur als Teil des Hydroxylapatits der extrazellulären Matrix, sondern auch als intrazelluläres Signalmolekül, welches die Expression einiger osteogener Gene reguliert (Fatherazi et al., 2009; Foster et al., 2006).

Je nach Versuchsansatz wurde das osteogene Medium (OM) mit unterschiedlichen Zusätzen supplementiert. Im Einzelnen umfasst dies:

- + 20 mM L-Valin
- + 10 mM L-Lysin und 10 mM L-Ornithin
- + 1 mM L-Arginin
- oder + 0,5 mM L-NIO

Osteogenes Differenzierungsmittel mit 1,5 % FCS

- siehe OM
- statt 10 % FCS → hier nur 1,5 % FCS

RPMI-Medien

RPMI-Medium ohne L-Arginin	RPMI-Medium mit L-Arginin
RPMI (<i>Roswell Park Memorial Institute</i>) 1640 Medium (mit L-Glutamin und Natriumbicarbonat, ohne L-Arginin, L-Leucin, L-Lysin und Phenolrot)	RPMI (<i>Roswell Park Memorial Institute</i>) Medium 1640 mit L-Glutamin
1,5 % FCS	1,5 % FCS
2 % Penicillin und Streptomycin	2 % Penicillin und Streptomycin
500 nM Dexamethason	500 nM Dexamethason
50 µM L-Ascorbin-2-Phosphat	50 µM L-Ascorbin-2-Phosphat
10 mM β-Glycerophosphat	10 mM β-Glycerophosphat
1 % Amphotericin B	1 % Amphotericin B
0,1 % Gentamicin	0,1 % Gentamicin
40 mg/l L-Lysin	
50 mg/l L-Leucin	
Weitere Zusätze: <ul style="list-style-type: none"> • 50 µM L-Arginin • 200 µM L-Arginin 	

Tabelle 6: RPMI-Medien

DMEM-Medium ohne L-Arginin

- DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) Silac™ Flex Media (ohne D-Glucose, ohne L-Arginin, ohne L-Lysin und ohne *Phenol Red*)
- 2 % FCS
- 250 mg/ml steril filtrierte D-Glucose
- 73 mg/ml steril filtriertes L-Lysin
- 2 % Penicillin und Streptomycin

- 1 % HEPES
- 1 % NEAA
- 1 % Amphotericin B
- 0,1 % Gentamicin

DMEM-Medium ohne L-Arginin mit osteogenen Zusätzen

- Siehe oben und zusätzlich:
- 500 nM Dexamethason
- 50 µM L-Ascorbin-2-Phosphat
- 10 mM β-Glycerophosphat

Zellnährmedium für extrahierte Zähne

- DPBS (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*) (*w/o Ca²⁺- and Mg²⁺-Chlorid*)
- 2 % Penicillin und Streptomycin
- später auch: 1 % Amphotericin B

2.1.4.2 Puffer und Lösungen

Kollagenase-Dispase-Lösung

- DPBS (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*) (*modified with Ca²⁺- and Mg²⁺- Chlorid*)
- 1,5 % BSA (*Bovine Serum Albumine*, Fraktion V, pH 7.0, proteasefrei)
- 1,5 % Dispase II (*neutral protease, grade II, from Bacillus polymyxa, 0,9 U/mg, lyophilized*)
- 1 % Kollagenase I (von *Cl. histolyticum*, *lyophilized*, 2600 Units/mg)

Kryokonservierungsmedium

- 90 % FCS
- 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid)

RIPA-Puffer nach Abcam

- 50 mM Tris (pH=8)
- 150 mM NaCl
- 1 % NP-40
- 0,5 % Natriumdeoxycholat
- 0,1 % SDS

RIPA + Complete

- 1 Tablette Complete
- Mini in 10 ml RIPA lösen
- Aliquots zu je 1 ml herstellen und bei -20 °C lagern

Laufpuffer

- 25 mM Tris (pH 8,3 - 8,8)
- 192 mM Glycin
- 0,1 % SDS
- ad 1000 ml H₂O

Tris-Glycine Transferpuffer

- 12mM Tris-Base
- 96 mM Glycin
- ad 500 ml H₂O

Blotting-Puffer

- 60 ml Transferpuffer
- 75 ml Methanol

- ad 750 ml H₂O

TBS

- 7,7 mM Tris (pH 7,5)
- 150 mM NaCl
- ad 1000 ml H₂O

TBS-T

- TBS
- 0,1 % Tween-20

Blocking-Puffer

- TBS-T
- 5 % BSA oder 5 % Milchpulver

Laemmli-Puffer

- 252 mM Tris-HCl
- 40 % Glycerol
- 8 % SDS
- 0,01 % Bromphenolblau
- ad 10 ml H₂O
- 20 % Mercaptoethanol vor Gebrauch zusetzen

Alizarinrot S

- 0,5 % Alizarinrot S mono
- *Aqua dest.*

CPC

- 10 % CPC (pH 7)
- *Aqua dest.*

2.1.5 Antikörper

Antikörper	Hersteller und Ort
<i>Anti-Arg2 Antibody (EPR22626-38) (rabbit, ab264071)</i>	Abcam (Cambridge/UK)
<i>Anti-eNOS Antibody (rabbit, ab5589)</i>	Abcam (Cambridge/UK)
<i>Arginase-1 Recombinant Rabbit Monoclonal Antibody (24H4L3) (rabbit, #702730)</i>	Invitrogen (Carlsbad/USA)
<i>CAT-1 Polyclonal Antibody (rabbit, #PA5-100136)</i>	Invitrogen (Carlsbad/USA)
<i>iNOS Polyclonal Antibody (rabbit, #PA1-036)</i>	Invitrogen (Carlsbad/USA)
<i>TRPV5 (B-8) Polyclonal Antibody (mouse, sc-398345)</i>	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Heidelberg/Deutschland)
<i>TRPV5 Polyclonal Antibody (rabbit, #PA5-95269)</i>	Invitrogen (Carlsbad/USA)
<i>Sekundärantikörper: Polyclonal Goat anti Rabbit Immunoglobulins/HRP (#P0448, Dako)</i>	Agilent Technologies (Santa Clara/USA)
<i>Sekundärantikörper: Polyclonal Goat anti Mouse Immunoglobulins/HRP (#P0447, Dako)</i>	Agilent Technologies (Santa Clara/USA)

Tabelle 7: Antikörper

2.1.6 Zytokine

Zytokine	Hersteller und Ort
IL1-β	MERCK (Darmstadt/Deutschland) Sigma-Aldrich
IFN-γ	MERCK (Darmstadt/Deutschland) Sigma-Aldrich

LPS	MERCK Millipore (Darmstadt/Deutschland)
TNF- α	MERCK Millipore (Darmstadt/Deutschland)

Tabelle 8: Zytokine

2.1.7 Software

Software	Hersteller und Ort
Chat GPT	OpenAI (San Francisco/USA)
ChemiDoc	BioRad (Hercules/USA)
Durchflusszytometrische Messung (FACS) CellQuestPro	Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes/USA)
Image Lab	BioRad (Hercules/USA)
Literaturverzeichnis EndNote	Clarivate Analytics (London/UK)
Numbers	Apple (Cupertino/USA)
Office 365	Microsoft (Redmond/USA)
PerkinElmer 2030 Manager	PerkinElmer (Waltham/USA)
Zen 3.0 (<i>blue edition</i>)	Zeiss (Oberkochen/Deutschland)

Tabelle 9: Software

2.1.8 Einsatz von generativer KI

In dieser Dissertation wurde die KI-gestützte Software ChatGPT (OpenAI) punktuell zur sprachlichen und zur inhaltlichen Strukturierung eingesetzt. Wissenschaftliche Inhalte (u. a. Fragestellung, Studiendesign, Datenerhebung und -auswertung, Interpretation, Argumentation, Abbildungen, Tabellen sowie Schlussfolgerungen) stammen vollständig von der Autorin. Etwaige Vorschläge der KI wurden inhaltlich geprüft und, soweit verwendet, überarbeitet. Sämtliche fachlichen Aussagen sind eigenständig verifiziert, durch geeignete Quellen belegt und gemäß den in dieser Arbeit verwendeten Zitierstandards nachgewiesen. Die Nutzung erfolgte im Einklang mit den „Leitlinien zur Verwendung generativer KI“ der HHU und den Grundsätzen guter wissenschaftlicher Praxis, ohne unzulässige Auslagerung prüfungsrelevanter Eigenleistungen und ohne Verarbeitung nicht anonymisierter

personenbezogener Daten. Es wurden außerdem keine fachlichen Analysen durch KI durchgeführt. Datenschutz und Vertraulichkeit wurden beachtet. Die Hinweise der medRSD sowie die „*Living guidelines on the responsible use of generative AI in research*“ der Europäischen Kommission wurden beachtet. Für alle Inhalte, die wissenschaftliche Richtigkeit, Vollständigkeit und den finalen Wortlaut der Arbeit trägt die Autorin die alleinige Verantwortung.

2.1.9 Spenderzellen

Dentale Stromazellen (DSC)

Aus insgesamt 48 dentalen Pulpen von 28 verschiedenen Spenderinnen und Spendern konnten dentale Stromazellen (DSC) isoliert werden. Bei drei weiteren Spendern gelang die Isolation trotz identischer präanalytischer Bedingungen nicht. Verwendet wurden ausschließlich impaktierte Weisheitszähne beziehungsweise deren Germe. Die Extraktionen erfolgten aus medizinischer Indikation in externen oralchirurgischen Praxen. Aus Gründen der Anonymisierung lagen keine Angaben zu Alter, Geschlecht, Anamnese oder zur Identität der Patientinnen und Patienten vor. Dokumentiert wurden ausschließlich Entnahmedatum, Anzahl der Zähne und die Zahl der unterschiedlichen Spender. Die Proben wurden entsprechend kodiert (Schema: DSC JJMMTT-n). Beispiel: Wurden am 19.11.2020 bei Spender 1 zwei Weisheitszähne entfernt, wurde die Kultur als „DSC 201119-1“ bezeichnet; stammten Zähne eines weiteren Spenders vom selben Tag, lautete die Kodierung „DSC 201119-2“.

RAW 264.7

Die Zelllinie RAW 264.7 wurde von der American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA) bezogen. Sie ist gemäß § 5 Abs. 1 der Gentechnik-Sicherheitsverordnung (GenTSV, 2012) der Risikogruppe 2 zugeordnet, da es sich um aus BALB/c-Mäusen abgeleitete Monozyten/Makrophagen handelt, die durch das Abelson-Maus-Leukämie-Virus transformiert und dadurch immortalisiert wurden. RAW 264.7-Zellen werden in der Literatur häufig als Modell für Osteoklasten verwendet. In der vorliegenden Arbeit dienten sie ausschließlich als Kontrolle zur Verifizierung der iNOS-Expression, da diese Zelllinie im iNOS-Datenblatt des Herstellers (Invitrogen, Carlsbad, USA) als Referenz angegeben ist.

2.2 Methoden

Detaillierte Standardarbeitsanweisungen (*Standard Operating Procedure, SOP*) sind im Anhang dokumentiert (siehe „Standard Operating Procedures (SOP)“). Aus wissenschaftlichen Gründen ist es zwingend erforderlich, sämtliche Arbeitsschritte exakt gemäß diesen Vorgaben durchzuführen. Da die Einhaltung der SOPs unabdingbar ist, kann es vorkommen, dass die beschriebenen Arbeitsanweisungen in identischer oder ähnlicher Form auch in anderen Dissertationen erscheinen. In einem solchen Fall bitte ich um Verständnis und Berücksichtigung, dass dies auf die notwendige Standardisierung der Laborprozesse zurückzuführen ist.

2.2.1 Isolation dentaler Stromazellen aus der Pulpa

Die Isolation erfolgte in Anlehnung an die von Gronthos et al. beschriebene Methode unter Verwendung eines hausinternen, leicht modifizierten SOP (siehe „Isolation dentaler Stammzellen aus der Zahnpulpa“) (Gronthos et al., 2000). Eingeschlossen wurden 48 Weisheitszähne, die nach folgenden Kriterien ausgewählt wurden: möglichst sterile Extraktion und präoperative Impaktion, um einen frühzeitigen Kontakt der Pulpa mit der mikrobiell stark besiedelten Mundhöhle zu vermeiden. Unmittelbar nach der Extraktion wurden die Zähne eines Spenders in einen Schraubdeckelbehälter mit Zellnährmedium überführt und innerhalb von 24 Stunden in das Forschungslabor der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie transportiert. Vor der weiteren Verarbeitung erfolgte ein einmaliges Waschen mit PBS.

Aufgrund initial gehäuft aufgetretener bakterieller bzw. mykotischer Kontaminationen wurde unter sterilen Bedingungen gearbeitet. Zunächst wurde eine Desinfektion der Zahnoberfläche für 30 Sekunden mit Ethanol erprobt. Dies erwies sich wegen des offenen Apex als problematisch, da ein direkter Kontakt des Ethanols mit dem Pulpagewebe so nicht zu verhindern war. Im weiteren Verlauf wurde die Oberflächendesinfektion daher auf alkoholfreies Chlorhexidin (CHX) umgestellt (siehe **Abb. 10: Isolation dentaler Stromazellen aus der Pulpa**).

Für die Freilegung der Pulpa wurden die Zähne in einen Metallzylinder eingelegt und mithilfe eines Metallkolbens vorsichtig aufgebrochen (siehe **Abb. 10: Isolation dentaler Stromazellen aus der Pulpa**). Die Zahnfragmente wurden in eine Petrischale überführt, die Pulpa mit einer Pinzette entnommen, in eine weitere Petrischale gegeben und mit einem Skalpell mechanisch zerkleinert (siehe **Abb. 10: Isolation dentaler Stromazellen aus der Pulpa**). Die Pulpastücke wurden anschließend in einen 50-ml-Falcon überführt, in dem pro Pulpa 5 ml sterile Kollagenase-Dispase-Lösung vorgelegt waren, und mindestens 60 Minuten bei 37 °C auf einem Taumelrollenmischer im Wärmeschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurde

kurz gevortext; die Gefäßwände wurden mit 10 ml PBS abgewaschen, um möglichst alle Zellreste zu lösen.

Die Zellsuspension wurde mit dem Kolben einer Einwegspritze durch einen sterilen 100- μ m-Zellfilter gedrückt und anschließend 5 Minuten bei 350 g, 1300 RpM und 16 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 1 ml Proliferationsmedium 1 resuspendiert. Bei Einzelzähnen wurde die Suspension in eine T-25-Flasche mit 7,5 ml Proliferationsmedium 1 ausgesät. Bei mehreren Zähnen eines Spenders erfolgte die Aussaat in eine T-75-Flasche mit 15 ml Proliferationsmedium 1. Nach vorsichtigem horizontalem Schwenken wurden die Kulturen bei 37 °C und 5 % CO₂ im Inkubator inkubiert.

Der erste Mediumwechsel (Entfernung nicht adhärenter Zellen) erfolgte nach 24 bis 48 Stunden. Die anschließenden Mediumwechsel wurden in 2- bis 3-tägigen Abständen durchgeführt. Die Plastikadhärenz wurde als Selektionskriterium für mesenchymale Stromazellen genutzt (Nakagami et al., 2006). Bei Erreichen der Konfluenz wurden die FCS- und FGF-Zusätze im Medium schrittweise über Proliferationsmedium 2 bis 4 reduziert und die Zellen bei Bedarf gesplittet.

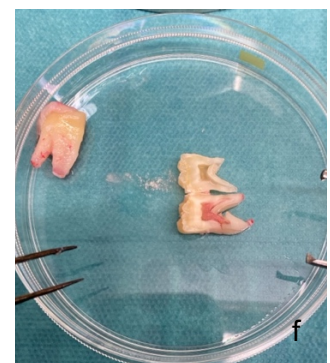
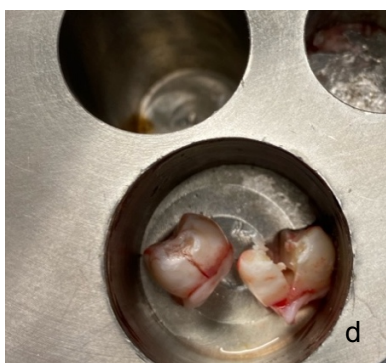
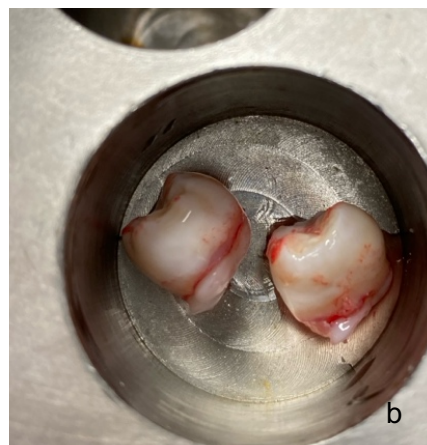




Abb. 10: Isolation dentaler Stromazellen aus der Pulpa

- a) Drei extrahierte Weisheitszähne, koronal orientiert, zur Oberflächendesinfektion in Falcon-Röhrchen positioniert.
- b) Zwei Germe zur mechanischen Spaltung in einem Metallzylinder platziert.
- c) Metallzylinder und -kolben als Instrumentarium zur kontrollierten Eröffnung der Zähne.
- d) Germe nach der Spaltung mit freigelegter Pulpa.
- e) Aus den gespaltenen Zahnanlagen entnommene Pulpen.
- f) Aufgespaltener Weisheitszahn mit freiliegender Zahnpulpa.
- g) Isolierte Pulpa eines Zahnes nach Entnahme.

Weitere Erläuterungen finden sich im Methodikteil. Eigene Aufnahmen.

2.2.2 Zellkultivierung

Die Zellkulturen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ im Inkubator geführt. Ein Medienwechsel erfolgte im Abstand von zwei bis drei Tagen. Bei Anzeichen einer bakteriellen oder mykotischen Kontamination wurde vor dem Medienwechsel ein Waschschriff mit PBS eingeschoben. Bei ausgeprägtem Befall wurden zu Beginn zweimal täglich Medienwechsel vorgenommen. Die Konzentration von Amphotericin B wurde bei starkem Pilzbefall von 1 % auf 2 % erhöht und anschließend schrittweise wieder reduziert. Sämtliche Arbeiten an den Zellen erfolgten aseptisch unter einer Sicherheitswerkbank der Klasse II.

Bilddokumentationen wurden mit einem Zeiss-Axioskop-40-Durchlichtmikroskop (10-faches Objektiv) erstellt und mit der Software Zen 3.0 (*blue edition*) aufgenommen. Die Helligkeit wurde nachbearbeitet.

Zu Versuchsbeginn erfolgte die Kultivierung in T-25-Flaschen (bei Material aus einem einzelnen Zahn bzw. Germ) bzw. in T-75-Flaschen (bei mehreren Zähnen eines Spenders). Unmittelbar nach der Isolation wurden die Zellen in Proliferationsmedium 1 mit hohem FCS- und FGF-Gehalt überführt. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Kulturen in der Regel von T-25 auf T-75 umgesetzt bzw. Zellen aus einer T-75-Flasche im Verhältnis 1:3 auf drei

neue T-75-Flaschen verteilt. In der Folge wurde der FCS- und FGF-Gehalt stufenweise über Proliferationsmedium 2 bis 4 reduziert, bevor auf das Standardmedium umgestellt wurde.

2.2.3 Enzymatisches Passagieren

Mesenchymale Stromazellen (MSC) wachsen unter Standardkulturbedingungen plastikadhärent (Kovach et al., 1992). Das Passagieren erfolgte grundsätzlich in Anlehnung an das institutseigene SOP (siehe „Enzymatisches Passagieren mit Trypsin-EDTA“). Abweichungen vom SOP sind im Folgenden transparent dokumentiert.

Nach Erreichen hoher Konfluenz wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit 1:10 in PBS verdünntem Trypsin-EDTA behandelt. Im Unterschied zum SOP wurde kein vorgeschalteter Waschschrift mit vorgewärmtem PBS (37 °C) durchgeführt. Für T-25-Flaschen wurden 2,5 ml Trypsin-EDTA eingesetzt (SOP: 3 – 4 ml), für T-75 6 ml (SOP: 5 – 7 ml) und für T-175 10 ml (SOP-konform). Die Inkubation erfolgte 5 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂. Die Gesamtexposition gegenüber Trypsin blieb aus Protease-spezifischen Gründen unter 10 min, da Trypsin anfänglich nur Oberflächenproteine, später aber auch weitere Zellproteine angreift (Hedstrom, 1996). Waren nach 5 Minuten noch Zellverbände lichtmikroskopisch sichtbar, wurde abweichend vom SOP ein Zellschaber zum vollständigen Ablösen eingesetzt.

Zur Neutralisation wurde mehr Medium als Trypsin-EDTA zugegeben (T-25: 4 ml; T-75: 9 ml; T-175: 15 ml), also nicht strikt im 1:1-Verhältnis wie im SOP vorgesehen. Die Zellsuspension wurde in 50-ml-Röhrchen überführt und bei 350 g, 1300 RpM für 5 Minuten bei 16 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 1 ml Medium resuspendiert und anschließend auf vorbereitete, mit Medium befüllte Kulturflaschen geeigneter Wachstumsfläche ausgesät. Eine Zellzahlbestimmung vor dem Ausplattieren wurde nicht in jedem Durchgang dokumentiert. Die Flaschen wurden zur gleichmäßigen Verteilung kurz geschwenkt und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Passagenzahl nahm mit jedem Trypsiniervorgang zu.

Bei Verdacht auf mikrobiellen Befall kam ein modifiziertes Reinigungsprotokoll zur Anwendung, das nicht Bestandteil des SOP ist: Nach dem Trypsinieren wurden die Zellen in 15-ml-Röhrchen überführt, bei 133 g, 800 RpM für 8 Minuten bei 16 °C zentrifugiert, in 1 ml PBS resuspendiert, mit weiteren 10 ml PBS aufgefüllt und erneut bei 133 g und 800 RpM für 5 Minuten zentrifugiert. Das weitere Vorgehen entsprach dann der oben beschriebenen Standardprozedur.

2.2.4 Vorgehen bei mikrobieller Kontamination

Bei Auftreten bakterieller oder mykotischer Kontaminationen wurden die Kulturbedingungen temporär angepasst und die antimikrobiellen Zusätze angehoben: Penicillin/Streptomycin in doppelter Standarddosierung und Amphotericin B von 1 % auf 2 %, mit anschließender schrittweiser Rückführung auf die Ausgangskonzentrationen. Zusätzlich wurde Gentamicin als ergänzendes Antibiotikum eingesetzt. Dies erfolgte nicht routinemäßig, sondern erst im Verlauf nach Auftreten entsprechender Befunde.

Zur Reduktion der Keimlast wurde vor jedem Mediumwechsel ein zusätzlicher Waschschrift mit PBS implementiert und das Protokoll beim Passagieren angepasst (siehe „Enzymatisches Passagieren“). Bei ausgeprägtem Befall wurden in der Anfangsphase bis zu zwei Mediumwechsel pro Tag durchgeführt.

2.2.5 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte grundsätzlich gemäß dem instituteigenen SOP (siehe „Zellzählung mit Trypanblau“). Nach Trypsinierung und Zentrifugation wurde das Zellpellet abweichend vom SOP zunächst in 1 ml Standardmedium resuspendiert. Anschließend wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau-Lösung gemischt (1:2) und in eine Neubauer-Zählkammer überführt (siehe Abb. 11: Neubauer-Zählkammer). Die vier äußeren Großquadrate wurden unter dem Lichtmikroskop mäanderförmig ausgezählt und aus deren Mittelwert die Zellkonzentration pro Milliliter berechnet, indem der Mittelwert mit dem Faktor 2×10^4 multipliziert wurde. Dieser Faktor berücksichtigt die Verdünnung sowie die Kammergeometrie der Neubauer-Zählkammer. Vitale Zellen wurden als ungefärbt, nicht vitale Zellen als blau gefärbt gewertet, da sich durch Membranläsionen die Zellproteine anfärben (Chan et al., 2015).

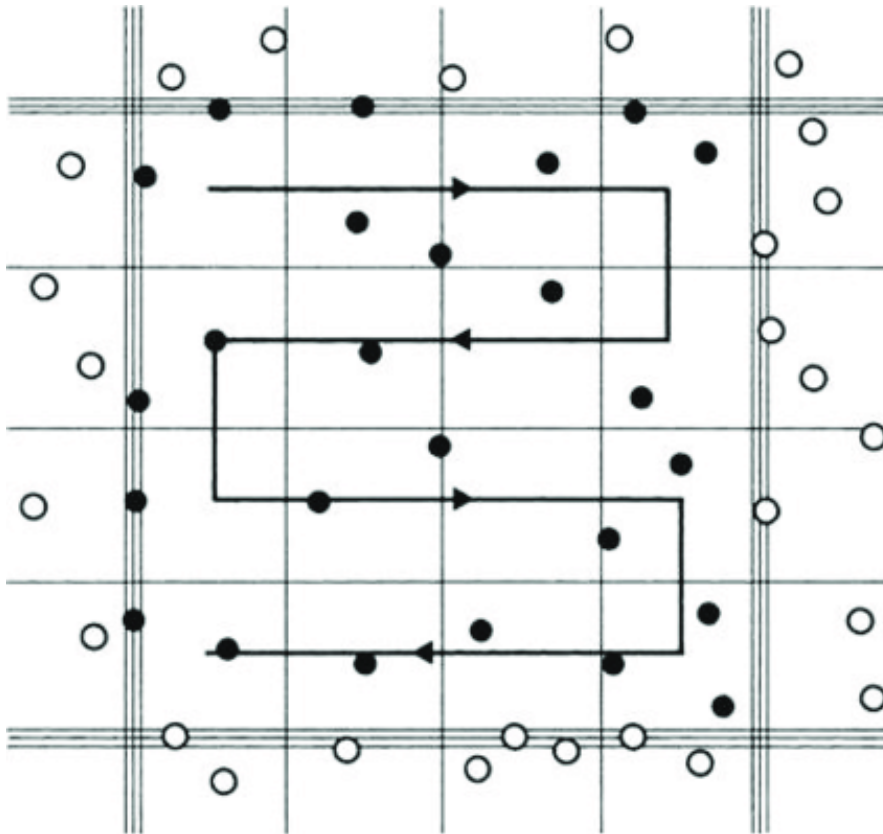


Abb. 11: Neubauer-Zählkammer

Schematisch dargestellt ist ein Großquadrat der Neubauer-Zählkammer. Die Zählung erfolgt entlang eines mäanderförmigen Pfades. Bewertungsregel: Zellen innerhalb des Feldes sowie auf der oberen und linken Begrenzungslinie werden mitgezählt; Zellen auf der unteren und rechten Linie werden nicht mitgezählt. Schwarze Markierungen kennzeichnen gezählte Zellen, weiß dargestellte Zellen werden nicht mitgezählt. Weitere Erläuterungen finden sich im Fließtext. Darstellung nach (Schmitz, 2011).

Im Unterschied zum SOP wurden für die Berechnung der Zellkonzentration und die weitere Prozessierung ausschließlich vitale Zellen herangezogen; der prozentuale Vitalitätsanteil gemäß SOP-Formel wurde nicht routinemäßig dokumentiert, sofern nicht anders angegeben. Die Gesamtzellzahl ergab sich aus der Multiplikation der so ermittelten Zellkonzentration mit dem Suspensionsvolumen. Auf dieser Basis wurde ein Verdünnungsfaktor berechnet, um die gewünschte Aussaatdichte einzustellen. Die Verdünnung erfolgte mit Standardmedium, anschließend wurden die Zellen in die vorgesehenen Kulturgefäße ausplattiert.

2.2.6 Kryokonservierung und Auftauen

Kryokonservierung und Auftauen der Zellen erfolgten grundsätzlich in Anlehnung an das institutseigene SOP (siehe „Kryokonservierung und Auftauen von Zellen“). Abweichend

vom SOP wurde nach der Trypsinierung keine Inaktivierung des Trypsins durch Zugabe der gleichen Mediummenge dokumentiert, sondern – analog zum Passagieren – mit etwas mehr Medium (siehe „Enzymatisches Passagieren“). Ebenso entfiel in diesem Arbeitsgang ein vorausgehender PBS-Waschschritt. Die Zentrifugation erfolgte nicht bei Raumtemperatur, sondern bei 16 °C mit 350 g und 1300 RpM für 5 Minuten. In der Zwischenzeit wurden Kryoröhrchen vorbereitet, wobei die Passage der Zellen beim Einfrieren gleich blieb und das Medium, in dem sich die Zellen zuletzt befunden haben, notiert wurde. Das entstandene Pellet wurde unmittelbar im Einfriermedium aus FCS und 10 % DMSO resuspendiert. Eine routinemäßige Zellzahlbestimmung vor dem Aliquotieren wurde nicht durchgeführt. Pro Kryoröhrchen wurden mindestens 1×10^6 Zellen in 1 ml Einfriermedium überführt. Das Einfrieren erfolgte in einem vorgekühlten Isopropanol-Kryocontainer (*Mr. Frosty*) bei -80 °C mit kontrollierter Abkühlrate von 1 °C pro min, um DMSO-bedingt zytotoxische Effekte zu minimieren (Stubbendorff, 2009).

Beim Auftauen wurden die *Tubes* im Wasserbad bei 37 °C geschwenkt und der Inhalt in 15 ml vorgelegtes Standardmedium überführt. Anschließend wurde bei 16 °C mit 350 g und 1300 RpM für 5 Minuten zentrifugiert. Eine unmittelbare Zellzahlbestimmung nach dem Auftauen sowie eine standardisierte Aussaatdichte wurden nicht regelhaft umgesetzt. Die vorbereiteten T-75-Flaschen wurden mit 15 ml Medium befüllt, das sich an dem Medium orientierte, in dem sich die Zellen zuletzt vor der Einlagerung befunden hatten. Nach Resuspension des Pellets in 1 ml Medium erfolgte die Ausplattierung und Kultivierung bei 37 °C und 5 % CO₂. Es gilt dabei zu beachten, dass die Passage der Zellen hierbei ansteigt. Alle nicht explizit genannten Schritte entsprachen dem SOP.

2.2.7 Charakterisierung der Zellen mittels Durchflusszytometrie

Die immunphänotypische Charakterisierung erfolgte im Grundsatz gemäß dem instituteigenen SOP (siehe „FACS-Charakterisierung“). Die Methode beruht auf der Detektion CD-spezifischer Oberflächenantigene mithilfe fluoreszenzmarkierter Antikörper und einer laserbasierten Einzelzellmessung im Durchfluss. CD steht für „*cluster of differentiation*“ und bezeichnet eine international standardisierte Nomenklatur für definierte Zelloberflächenmoleküle samt der dazugehörigen Referenzantikörper (Vgl. Horn, 2021, S. 726). Als Referenz für das stromazelluläre Mindestprofil dienten die Kriterien der *International Society for Cellular Therapy (ISCT)*: hohe Expression von CD105, CD90 und CD73 bei gleichzeitig fehlender Expression von CD45, CD34, CD19, CD14 sowie HLA-DR (Dominici et al., 2006). Zusätzlich wurde hier auch CD44 als Marker für Endothel, Epithel sowie für die Leukozytenadhäsion getestet.

Die praktische Umsetzung folgte dem SOP mit folgenden Abweichungen: Die erste Zentrifugation erfolgte bei 353 g und 1300 RpM für 5 Minuten bei 16 °C anstelle von 1200 RpM bei Raumtemperatur. Für die Färbung wurden die Zellen in insgesamt 520 µl FCS resuspendiert, auf fünf FACS-Röhrchen mit je 100 µl verteilt und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Das ungefärbte Kontrollröhrchen erhielt die doppelte Zellmenge. Das Antikörper-Panel entsprach dem SOP-Panel (ungefärbt; CD44-APC + CD73-PE + CD45-FITC; CD90-APC + CD34-FITC + HLA-DR-PE; CD105-APC + CD14-FITC; CD19-FITC). Nach 30 Minuten Inkubation auf Eis im Dunkeln wurden 4 ml *Cellwash* zugegeben und erneut bei 353 g und 1300 RpM für 5 Minuten bei 16 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 300 µl *Cellwash* aufgenommen und unmittelbar gemessen. Das abschließende Resuspensionsvolumen lag damit innerhalb der im SOP vorgegebenen Spanne (200–500 µl).

Die Auswertung basierte auf dem im SOP vorgesehenen Kontrollaufbau inklusive ungefärbter Referenz. Die Interpretation des Markerprofils erfolgte im Abgleich mit den *ISCT*-Kriterien (Dominici et al., 2006).

2.2.8 Proteinnachweis mittels Western-Blot

Die Kombination aus SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate*-Polyacrylamidgelelektrophorese) und Western-Blot stellt eine klassische proteinbiochemische Methode dar. Mittels SDS-PAGE trennt man Proteine eines Gemisches nach ihrer Molekülgröße auf, um sie anschließend weiter zu charakterisieren. Hierzu dient ein Polyacrylamid-Gel, dessen Porengröße an den zu erwartenden Größenbereich der Zielproteine angepasst wird. Natriumdodecylsulfat (SDS) fungiert dabei als anionisches Detergens, das Proteine denaturiert, hydrophobe Wechselwirkungen auflöst und ihnen durch Bindung eine einheitlich negative Ladung verleiht. In Anwesenheit von β -Mercaptoethanol als Reduktionsmittel, das Disulfidbrücken spaltet, kann das Protein vollständig denaturieren. Dabei dissoziieren Polymeraggregate in ihre Monomere. Die SDS-Moleküle binden an das Protein und bestimmen so die negative Gesamtladung des entstehenden Komplexes. Füllt man diese Proteine nun in die Taschen des Gels und legt eine Gleichspannung an, wandern die negativ geladenen Proteine in Richtung der Anode. Durch die Denaturierung wird verhindert, dass die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine einen Einfluss auf deren Wanderungsgeschwindigkeit hat. Damit hängt die Migrationsgeschwindigkeit ausschließlich von der Proteingröße ab und verhält sich nahezu proportional zur Molekülmasse. Längere Proteine migrieren langsamer als kürzere, sodass die Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht auf einer bestimmten Höhe gesammelt werden und dort definierte Banden bilden. Zur Ermittlung der Molekülmassen wird neben den Spuren

eine Referenzprobe mit Proteinen bekannter Größe aufgetragen. Nach Beendigung der Elektrophorese werden die Proteine fixiert und sichtbar gemacht (Heinrich, 2014).

Um danach einzelne Proteine im Gel identifizieren zu können, wird ein Western-Blot durchgeführt. Beim *Blotting* werden die Proteine des Gels auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Dies geschieht in Kammern, die einen horizontalen Stromfluss zwischen Gel und Membran aufbauen. Durch das senkrecht zur Geloberfläche angelegte elektrische Feld werden die Proteine vom Gel auf die Membran übertragen und es entsteht eine exakte Replik. Die Proteine auf der Membran können nun durch Zugabe verschiedener Antikörper weiter charakterisiert werden. Die Antikörper binden an spezifische Antigene. Die Detektion erfolgt über einen sekundären, enzymgekoppelten Antikörper, der die Antigen-Antikörper-Komplexe farblich sichtbar macht. Western-Blots sind hochspezifisch, sehr sensitiv und vergleichsweise einfach durchzuführen und werden daher häufig zur Identifizierung bekannter Proteine eingesetzt (Vgl. Heinrich, 2014, S. 89 und 93; Vgl. Horn, 2021, S.727).

Für die Versuche wurden Zellen aus konfluierenden T-75-Flaschen mittels Trypsin geerntet und in der Neubauer-Zählkammer quantifiziert. Üblicherweise wurden $1,5 \times 10^5$ Zellen/ml in 6-Well-Platten ausgesät. Der jeweiligen Zellsuspension wurde zusätzlich 1 ml Standardmedium zugesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂. Nach Erreichen hoher Dichte (meist nach einem Tag) wurden drei Wells mit 1,5 ml Standardmedium und drei Wells mit 1,5 ml osteogenem Medium (OM) ergänzt. Nach etwa drei Tagen wurden die Platten zur Proteinbestimmung geerntet: Dabei wurde das Altmedium abgenommen und die Wells wurden mit 1 ml PBS gewaschen. Nach Ablösen der Zellen mithilfe von Trypsin wurden die Zellen in separate Falcons (Standardmedium bzw. OM) gesammelt. Die Zellsuspensionen wurden 5 Minuten bei 470 g, 1500 RpM und 16 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen, die Pellets in 500 µl PBS resuspendiert und in 1,5-ml-Eppendorf-*Tubes* überführt. Es folgte eine Kurz-Zentrifugation (17.000 g; 1330 RpM; 60 s), der Überstand wurde entfernt und 50 µl RIPA-Puffer auf die Zellpellets gegeben; die Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung ggf. bei -80 °C gelagert.

Zur Proteinbestimmung wurden tiefgefrorene Proben aufgetaut. Bei sehr kompakten Pellets wurden zusätzlich 20 µl RIPA zugegeben und kurz gevortext. Die Lyse wurde durch Sonifikation (10 Stöße; *Cycle* 0,5; Amplitude 80 %) unterstützt. Anschließend standen die Proben auf Eis. Das *Microplate*-Assay wurde gemäß SOP durchgeführt. Die lineare Regression der Standardkurve musste einen R²-Wert $\geq 0,95$ aufweisen. Auf Basis der Software-Auswertung wurden die für 10 µl Protein erforderlichen Volumina an Probe und *Aqua dest.* berechnet und in neue Eppendorf-Gefäße pipettiert. Zur Zwischenlagerung wurden Proben bei -20 °C eingefroren (siehe „Proteinisolierung und Konzentrationsbestimmung“).

Für die SDS-PAGE (siehe „Western Blot Semi-Dry Blotting“) wurden die Proben im Verhältnis 4:1 mit Laemmli-Puffer sowie 20 % β -Mercaptoethanol versetzt. Durch β -Mercaptoethanol wurden die Disulfidbrücken reduziert und die Proteine denaturiert. Dann erfolgte eine kurze Zentrifugation (17.000 g; 1330 RpM; 16 °C; 2 min) und Erhitzung zur vollständigen Denaturierung. Damit diese nicht wieder renaturierten, wurden die Proben bis zur Auftragung auf Eis gehalten. *Mini-PROTEAN TGX Stain-Free-Gele* (4–15 %) wurden in die Elektrophoresekammer eingesetzt, die Dichtigkeit geprüft und die Kammer vollständig mit Laufpuffer gefüllt. Nach Entfernen der Käbme wurden 6 μ l Proteinleiter und je 13 μ l Probe aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte zunächst 10 Minuten bei 60–80 V, anschließend bis zum Heraustreten der Farbstofffront bei 160 V.

Für den Blot wurden *Blotting-* und *Blocking-*Puffer (in der Regel 5 % BSA in TBS-T) hergestellt und die Nitrocellulose-Membran zugeschnitten. Nach Detektion des Gels am ChemiDoc MP erfolgte das Äquilibrieren von Gel, Membran und *Blotting-*Papier im *Blotting-*Puffer, der blasenfreie Transferaufbau und der Transfer (ca. 10–15 min). Zur Immunmarkierung wurde die Membran eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Taumelrollenmischer in *Blocking-*Puffer geblockt. Dabei wurden die unspezifischen Bindungsstellen des Proteins blockiert und ein spezifisches Binden des Antikörpers ermöglicht. Danach erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper (Herstellerempfehlung) über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag folgten drei Waschschrirte in TBS-T (je 5 Minuten) und eine einstündige Inkubation im Dunkeln mit dem sekundären Antikörper (in TBS-T; spezies-spezifisch, z. B. Goat-anti-Rabbit bei Rabbit-Primärantikörpern). Der Sekundärantikörper sorgt für eine Signalverstärkung, indem er an den primären Antikörper bindet und mittels bestimmter Enzyme die Chemilumineszenz verstärkt. Nach erneutem dreimaligem Waschen (TBS-T, jeweils 5 Minuten) wurde in TBS gespült, die Membran geglättet, mit 1000 μ l *Immobilon Forte Western HRP Substrate* benetzt und die Chemilumineszenz am ChemiDoc MP detektiert. Die Proteinleiter sowie die Banden wurden so visualisiert und einer Größenbestimmung zugeführt. Zur Lagerung wurden die Blots in TBS überführt (Wechsel wöchentlich).

Zur Überprüfung der iNOS-Expression wurden ausgewählte DSC sowie die Kontrollzelllinie RAW 264.7 zusätzlich mit Zytokinen stimuliert. Bei DSC wurden drei Wells einer 6-Well-Platte in Standardmedium kultiviert und drei weitere Wells mit jeweils 500 U/ml IL-1, TNF- α und IFN- γ versetzt. Bei RAW 264.7 erfolgte die Kultur in Standardmedium + NEAA (drei Wells) bzw. die Stimulation mit 50 U/ml IFN- γ und 1 μ g/ml LPS (drei Wells).

Die Auswertung der Western-Blots erfolgte mit der Software ImageLab (Bio-Rad).

2.2.9 CellTiter-Blue® Cell Viability Assay

Der CellTiter-Blue®-Assay (CTB) basiert auf der Reduktion des nicht-fluoreszenten, blauen Redoxindikators Resazurin zum violetten Resorufin in metabolisch aktiven Zellen (siehe Abb. 12: Reduktion von Resazurin zu Resorufin im CellTiter-Blue). Resazurin diffundiert durch die Zellmembran und wird überwiegend durch mitochondriale, zytosolische und mikrosomale Reduktasen zu Resorufin umgewandelt. Das entstehende Resorufin zeigt einen deutlichen Farbwechsel und eine starke Zunahme der Fluoreszenz; das Signal ist im linearen Bereich proportional zur Anzahl lebender Zellen und erlaubt damit eine sensitive, quantitative Vitalitätsbestimmung (photometrisch oder fluorimetrisch).

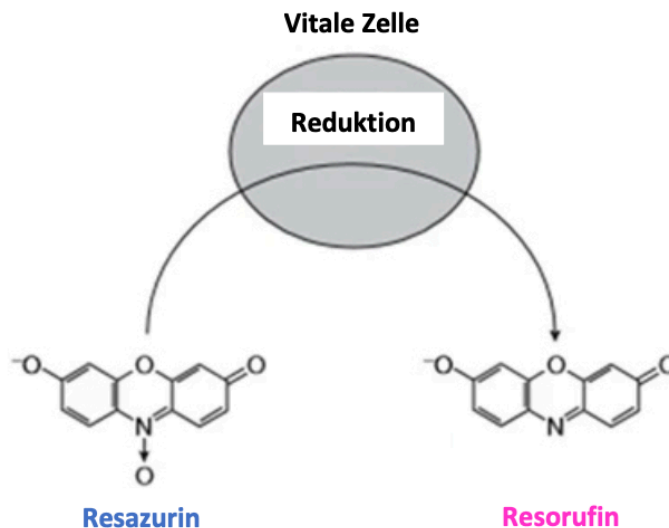


Abb. 12: Reduktion von Resazurin zu Resorufin im CellTiter-Blue®-Assay

Schematische Darstellung des redoxbasierten Vitalitätsnachweises: Resazurin (blau, nicht fluoreszent) wird in metabolisch aktiven Zellen durch intrazelluläre Reduktasen zu Resorufin (violett/rosa, fluoreszent) umgewandelt. Der Anstieg von Farbintensität bzw. Fluoreszenz ist im linearen Messbereich proportional zur Anzahl lebender Zellen. Weitere Erläuterungen finden sich im Fließtext. Bearbeitete Darstellung nach (Shenoy et al., 2017).

Die Messungen wurden in verschiedenen Medien durchgeführt; die Inkubationszeit betrug 60 Minuten. Um Artefakte durch substratinduzierte Zytotoxizität bzw. Überreduktion zu vermeiden, wurde die Inkubationsdauer grundsätzlich so kurz wie möglich gehalten (Riss et al., 2004).

2.2.10 Wachstumskinetik

Die Proliferationscharakteristika mesenchymaler Stromazellen (MSC) und grundlegende Bedingungen ihrer osteogenen Differenzierung sind in der Literatur umfassend beschrieben und bilden die Basis etablierter Versuchsdesigns (Bruder et al., 1997). Auf Grundlage von Vorversuchen mit variierenden Dichten beim Ausplattieren (3×10^3 , 5×10^3 , 1×10^4 , 2×10^4 , 3×10^4 Zellen/ml) wurde für die Wachstumskinetik eine Startdichte von 1×10^4 Zellen/ml in 24-Well-Platten definiert.

Die Zellzahl wurde mithilfe des CellTiter-Blue®-Assays an Tag 0 (einem Tag nach dem Ausplattieren) und an Tag 5 bestimmt. Für die Auswertung wurden die jeweiligen Blank-Mittelwerte von den Messwerten subtrahiert. Anschließend erfolgte die Berechnung von Mittelwert und Standardabweichung sowie eine Normierung der Werte auf Tag 0.

Die Versuche wurden mit $n = 4$ Spendern in insgesamt elf Medien durchgeführt. Als Basismedium diente Standardmedium; zusätzlich wurden folgende Bedingungen geprüft:

- Standardmedium
- Standardmedium + 20 mM L-Valin
- Standardmedium + 10 mM L-Lysin + 10 mM L-Ornithin
- Standardmedium + 1 mM L-Arginin
- Standardmedium + 0,5 mM L-NIO
- DMEM ohne L-Arginin (ohne osteogene Zusätze), 2,5 % FCS
- DMEM ohne L-Arginin (ohne osteogene Zusätze), 2,5 % FCS, + 50 μ M L-Arginin
- DMEM ohne L-Arginin (ohne osteogene Zusätze), 2,5 % FCS, + 200 μ M L-Arginin
- DMEM ohne L-Arginin (ohne osteogene Zusätze), 5 % FCS
- DMEM ohne L-Arginin (ohne osteogene Zusätze), 5 % FCS, + 50 μ M L-Arginin
- DMEM ohne L-Arginin (ohne osteogene Zusätze), 5 % FCS, + 200 μ M L-Arginin

Die Kultivierung erfolgte unter Standardbedingungen bei 37 °C und 5 % CO₂. Der Mediumwechsel wurde im Abstand von zwei bis drei Tagen durchgeführt.

2.2.11 Osteogene Differenzierung und Alizarinrot-S-Färbung

Zur Analyse der osteogenen Differenzierung wurde die Alizarinrot-S-Färbung eingesetzt. Alizarinrot-S bildet Komplexe mit anorganischen Ionen, insbesondere mit Calcium in

Knochen und extrazellulärer Matrix (EZM), und ermöglicht so den Nachweis der fortschreitenden Matrixmineralisierung (Puchtler et al., 1969). Nach anschließender Rücklösung der gebundenen Farbstoffkomplexe mit Cetylpyridiniumchlorid (CPC) erfolgte die photometrische Quantifizierung bei einer Wellenlänge von 600 nm.

Die Differenzierungsversuche gliederten sich in zwei Teile. In beiden Teilen wurden die Zellen in DMEM-basierten Medien mit L-Arginin und definierten, osteogenen Mediatoren kultiviert. Der erste Teil umfasste zusätzlich ein RPMI-Medium und die Versuche untersuchten n = 11 Spender in den Passagen 2, 3 und 5. Im zweiten Teil wurde das RPMI-Medium aufgrund methodischer Probleme (siehe „Unterschiede der Grundmedien“), durch ein DMEM-Medium ohne L-Arginin ersetzt und es wurden n = 7 Spender in den Passagen 2, 4 und 5 analysiert.

Für die Ansaat wurden die Zellen in der Neubauer-Zählkammer quantifiziert. In der Regel wurden 3×10^4 Zellen/ml in 24-Well-Platten ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ bis zur Konfluenz kultiviert (meist innerhalb von 24 Stunden). Die so erreichte Ausgangssituation wurde als „Tag 0“ definiert. Zu diesem Zeitpunkt wurde eine Kontrollplatte mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert und bis zur Auswertung verschlossen bei 4 °C gelagert. Die übrigen Wells wurden mit 0,5 ml des jeweiligen Mediums beschickt: osteogenes Medium (OM) als Referenz sowie OM + 20 mM L-Valin, OM + 10 mM L-Lysin + 10 mM L-Ornithin, OM + 1 mM L-Arginin und OM + 0,5 mM L-NIO.

Die L-Arginin-freien Bedingungen unterschieden sich zwischen den Versuchsteilen: In Teil eins wurden RPMI ohne L-Arginin, RPMI ohne L-Arginin + 50 µM L-Arginin, RPMI ohne L-Arginin + 200 µM L-Arginin sowie RPMI mit L-Arginin (Kontrolle) eingesetzt. Zur Minimierung potenzieller L-Arginin-Rückstände wurden die Wells vor Zugabe der RPMI-Medien jeweils mit 1 ml PBS gewaschen (siehe **Abb. 13: 24-Well-Platten mit OM- und RPMI-Medien**). Im zweiten Teil kamen DMEM ohne L-Arginin, DMEM ohne L-Arginin + 50 µM L-Arginin und DMEM ohne L-Arginin + 200 µM L-Arginin (Kontrolle) zum Einsatz. Auch hier erfolgte vorab ein PBS-Waschschritt (siehe **Abb. 14: 24-Well-Platte mit OM- und DMEM ohne L-Arginin-Medien**).

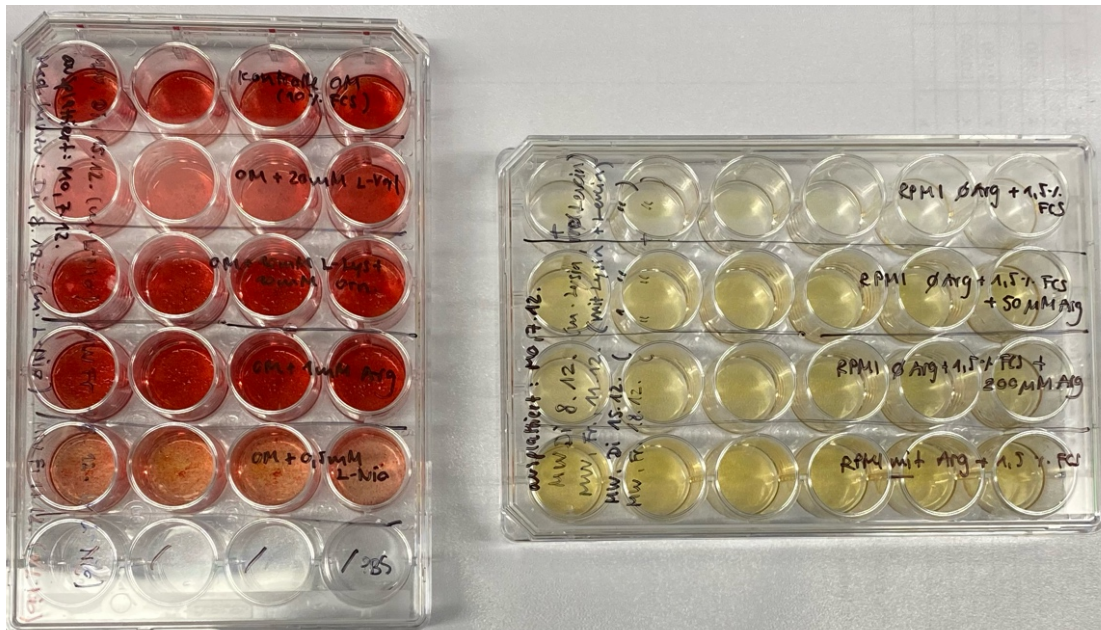


Abb. 13: 24-Well-Platten mit OM- und RPMI-Medien

Fotografische Dokumentation zweier 24-Well-Platten. Links: osteogenes Medium (OM) mit unterschiedlichen Zusätzen (OM als Kontrolle, zusätzlich 20 mM L-Valin, 10 mM L-Lysin + 10 mM L-Ornithin, 1 mM L-Arginin, 0,5 mM L-NIO, von oben nach unten). Rechts: RPMI-Varianten für L-Arginin-freie Bedingungen (RPMI ohne L-Arginin, RPMI + 50 μ M L-Arginin, RPMI + 200 μ M L-Arginin sowie RPMI mit L-Arginin als Kontrolle). Zur Minimierung potenzieller L-Arginin-Rückstände wurden die Wells vor der Medienapplikation mit PBS gespült. Die Abbildung dient der Übersicht über das Plattenlayout und die Alizarinrot-S-Färbung. Weiterführende Details sind dem Text zu entnehmen. OM = osteogenes Differenzierungsmedium, RPMI = *Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium*, mM = Millimolar, μ M = Mikromolar, PBS = Phosphate-Buffered Saline, Val = L-Valin, Lys = L-Lysin, Orn = L-Ornithin, Arg = L-Arginin, L-NIO = L-N⁵-(1-Aminoethyl)-Ornithin. Eigene Anfertigung.

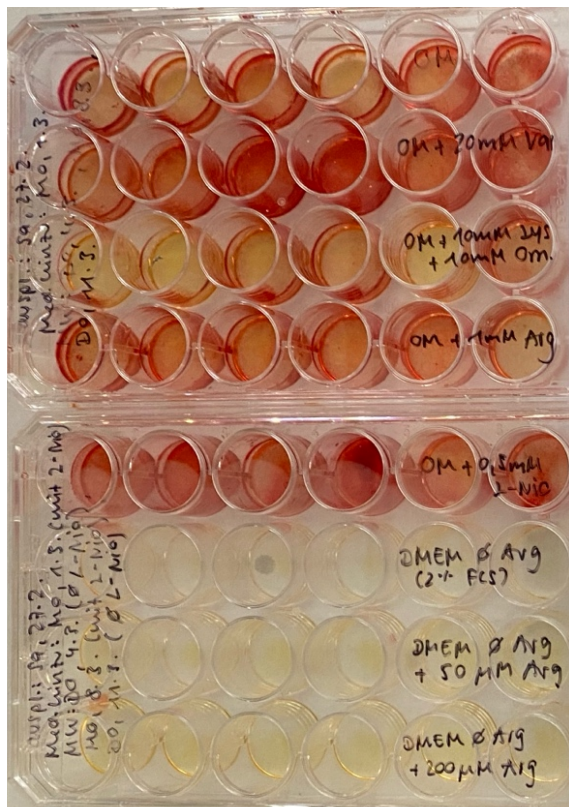


Abb. 14: 24-Well-Platte mit OM- und DMEM ohne L-Arginin-Medien

Fotografische Dokumentation zweier 24-Well-Platten. Oberes Panel sowie die erste Reihe der unteren Platte: osteogenes Medium (OM) mit unterschiedlichen Zusätzen (OM als Kontrolle, zusätzlich 20 mM L-Valin, 10 mM L-Lysin + 10 mM L-Ornithin, 1 mM L-Arginin und 0,5 mM L-NIO, von oben nach unten). Reihen 2–4 der unteren Platte: DMEM ohne L-Arginin mit Zusatzstufen 50 μ M bzw. 200 μ M L-Arginin (als Kontrolle). Zur Minimierung potenzieller L-Arginin-Rückstände wurden die Wells vor der Medienapplikation mit PBS gespült. Die Abbildung zeigt das Plattenlayout nach der Alizarinrot-S-Färbung. Weiterführende Details sind dem Text zu entnehmen. OM = osteogenes Differenzierungsmedium, DMEM = *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, mM = Millimolar, μ M = Mikromolar, PBS = Phosphate-Buffered Saline, Val = L-Valin, Lys = L-Lysin, Orn = L-Ornithin, Arg = L-Arginin, L-NIO = L-N⁵-(1-Aminoethyl)-Ornithin. Eigene Anfertigung.

Da in den Versuchen ein pH-Anstieg durch die basische Aminosäure L-Lysin beobachtet wurde, der mit Vitalitätsverlusten einherging, wurde vor jeder Mediumapplikation der pH-Wert mittels Indikatorpapier kontrolliert und bei Bedarf durch Titration mit steril filtrierter Salzsäure (HCl) auf etwa pH 7,0 eingestellt. Medienwechsel erfolgten regulär zweimal pro Woche (alle zwei bis drei Tage). Lediglich bei OM + 0,5 mM L-NIO wurde das Medium aus Kostengründen nur einmal wöchentlich gewechselt. Im Zuge jedes Mediumwechsels erfolgte eine lichtmikroskopische Kontrolle der Zellmorphologie.

Anfänglich wurden Auswertungen an Tag 7 und Tag 14 durchgeführt. Aufgrund der größeren Stabilität und Vergleichbarkeit der Befunde wurde der Fokus im weiteren Verlauf auf Tag 14 gelegt.

Am Auswertungstag wurden die Zellen zunächst lichtmikroskopisch beurteilt. Pro Well wurden 300 bis 350 μ l 4 % PFA zur Fixierung, anschließend 500 μ l 0,5 % Alizarinrot-S-

Lösung zur Färbung und schließlich 500 µl 10 % CPC zur Rücklösung eingesetzt. Die bereits fixierten „Tag-0-Platten“ wurden parallel bearbeitet. Die CPC-Inkubation erfolgte eine Stunde auf dem Rüttler bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die optische Dichte der Überstände bei 600 nm mit einem *Bio-Photometer* gemessen. Je Well wurden 500 µl analysiert; als Blank diente *Aqua dest.* (500 µl). Überschritten Messwerte den linearen Bereich ($> 2,0$), wurden die Proben 1:10 mit *Aqua dest.* verdünnt, erneut vermessen und die Extinktion in der Auswertung entsprechend mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert.

2.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten wurde mithilfe des Softwareprogramms „Numbers“ von Apple durchgeführt. Von den gemessenen Daten wurde der Mittelwert inklusive Standardabweichung (SD) gebildet. Alle Daten werden als Mittelwert \pm SD angegeben, sofern nicht anders beschrieben. Zur Sicherstellung der Vergleichbarkeit der CTB-Messdaten erfolgte eine Leerwertkorrektur durch Subtraktion des jeweiligen Hintergrundsignals (Blank). Dies gilt sowohl für die Zellviabilitätsversuche im Ergebnisteil als auch für die Versuche im Anhang.

Es erfolgte die Bestimmung des p -Wertes durch einen zweiseitigen, verbundenen t -Test, der mithilfe des Programms Numbers (Apple) durchgeführt wurde. Ein signifikanter Unterschied wurde bei $p < 0,05$ angegeben. In den Abbildungen wurden Unterschiede im Signifikanzniveau durch Sterne gekennzeichnet. Dabei entsprach ein Stern $p < 0,05$, zwei Sterne $p < 0,01$, drei Sterne $p < 0,001$ und vier Sterne $p < 0,0001$.

Zusätzlich wurden der p -Wert nach Bonferroni-Korrektur und das Effektstärkemaß Cohen's d ($> 0,8$) bestimmt.

Unterstützt wurde die statistische Auswertung durch die Firma punkt05-Statistikberatung.

2.4 Ethikvotum

Die Ethikkommission der Universität Düsseldorf genehmigte am 22.12.2020 den Antrag mit folgendem Titel und Studien-Nr.: „2020-1241 - andere Forschung erstvotierend, Einfluss von L-Arginin auf das osteogene Differenzierungspotenzial Zahnpulpa-stämmiger Stromazellen (DSC)“.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der DSC

3.1.1 Plastikadhärenz

Die Isolierung der pulpalen Zellen erfolgte aus extrahierten, impaktierten Weisheitszähnen. Direkt nach der Isolation wurden die Zellen in unbeschichtete T-25- bzw. T-75-Kulturflaschen aus Plastik mit Proliferationsmedium 1 ausplattiert. Die zunächst enthaltene Zellmischung umfasste Stromazellen, Stammzellen, Erythrozyten sowie weitere Zelltypen. Nach 24 Stunden wurde der erste Mediumwechsel durchgeführt, bei dem alle nicht adhärenen Zellen ausgewaschen wurden. Da alle verbleibenden Zellen nach diesem Schritt dauerhaft adhärent wuchsen, konnte das Kriterium der Plastikadhärenz erfüllt werden.

3.1.2 Immunphänotypisierung mittels FACS

Zur Bestätigung des stromazellulären Phänotyps wurde eine Durchflusszytometrie-basierte Analyse durchgeführt. Wie in **Abb. 15: Durchflusszytometrische Charakterisierung dentaler Stromazellen** dargestellt, zeigten die untersuchten DSC (n = 4 Spender) eine hohe Positivrate für stromazelltypische Marker: CD44 ($99,9 \pm 0,06$ %), CD90 ($99,8 \pm 0,1$ %), CD73 ($94 \pm 9,8$ %) und CD105 ($81 \pm 14,8$ %; jeweils Mittelwert \pm SD, normiert auf die Kontrolle = 100 %).

Die Expression hämatopoetischer oder immunspezifischer Marker lag dagegen erwartungsgemäß weit unterhalb des Schwellenwerts: CD45 ($0,37 \pm 0,55$ %), CD34 ($0,5 \pm 1,0$ %), CD19 ($0,42 \pm 0,44$ %), CD14 ($1,8 \pm 2,94$ %) und HLA-DR ($8,6 \pm 10,8$ %).

Damit erfüllen die getesteten DSC weitgehend die Kriterien der *International Society for Cellular Therapy (ISCT)* zur Klassifikation mesenchymaler Stromazellen: Plastikadhärenz unter Standardkulturbedingungen, ≥ 95 % Expression von CD105, CD73 und CD90, < 2 % Expression von CD45, CD34, CD14/CD11b, CD19/CD79 α sowie HLA-DR.

Während die Marker CD73 und CD90 durchgängig hoch exprimiert wurden, lag CD105 mit durchschnittlich 81 % etwas unterhalb des definierten Schwellenwertes. Auch HLA-DR überschritt diesen in Einzelfällen. Diese Abweichungen sind jedoch im Rahmen der bekannten Interdonorenvariabilität auf den isolationsbedingten Primärzellcharakter zurückzuführen.

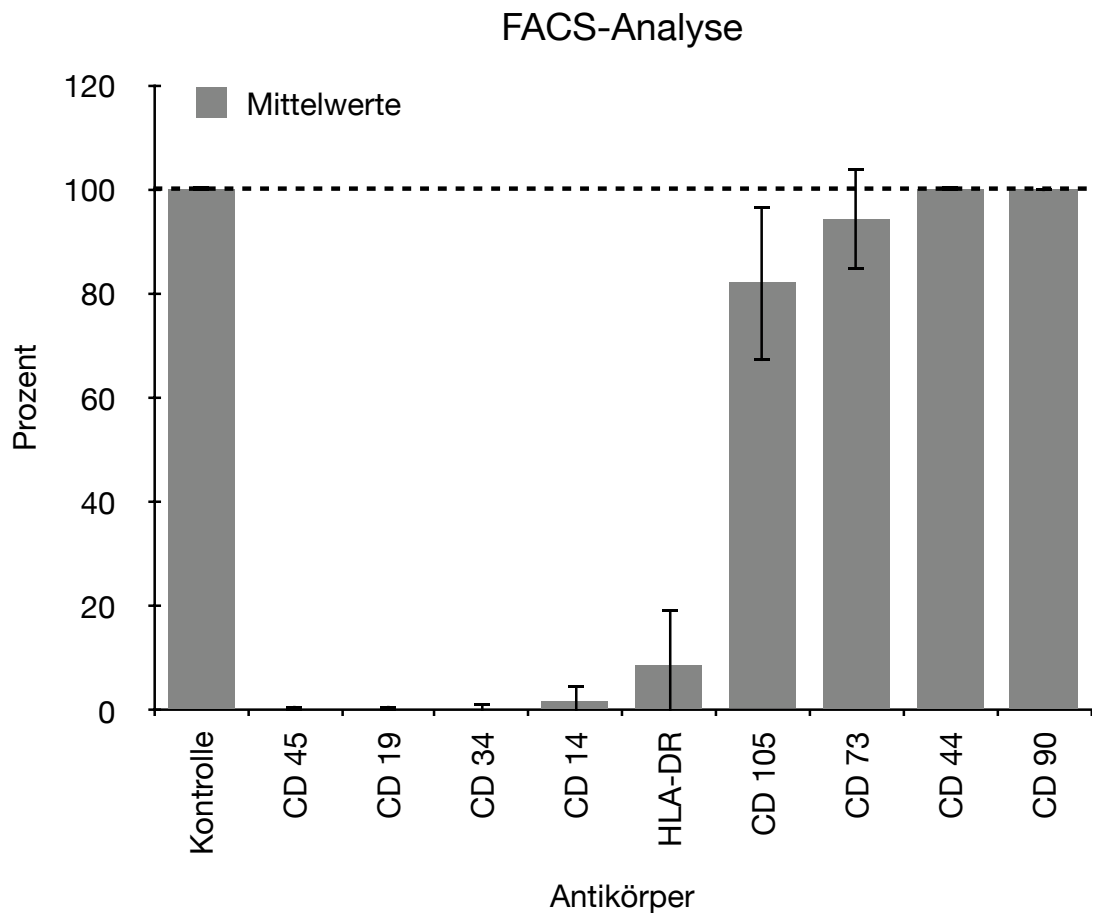


Abb. 15: Durchflusszytometrische Charakterisierung dentaler Stromazellen

Dargestellt ist die prozentuale Expression spezifischer Oberflächenantigene bei unbehandelten DSC (n = 4), ermittelt mittels FACS. Die Zellen zeigten eine hohe Positivrate für die mesenchymalen Marker CD44, CD90, CD73 und CD105, während hämatopoetische und nicht-mesenchymale Marker (CD45, CD34, CD14, CD19, HLA-DR) nur gering oder nicht exprimiert wurden. Gezeigt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung der normierten relativen Zellhäufigkeiten (Kontrolle = 100 %, siehe gestrichelte Referenzlinie). Die Daten bestätigen überwiegend die Einordnung der Zellen als mesenchymale Stromazellen gemäß den Kriterien der *International Society for Cellular Therapy (ISCT)*. Weitere Informationen können dem Text entnommen werden. FACS = Fluorescence-Activated Cell Sorting, CD = *cluster of differentiation*, HLA-DR = *human leukocyte antigen* – DR-Isotyp, DSC = dentale Stromazellen, n = Anzahl biologischer Replikate, % = Prozent. Eigene Darstellung.

3.1.3 Differenzierungspotential

Das dritte *ISCT*-Kriterium, die Fähigkeit zur Differenzierung in Osteoblasten, Adipozyten und Chondroblasten, wurde in dieser Arbeit lediglich hinsichtlich der osteogenen Differenzierung untersucht. Diese stellte zugleich den inhaltlichen Schwerpunkt der experimentellen Arbeiten dar. Die Ergebnisse der Differenzierungsversuche bestätigen eindeutig die osteogene Differenzierbarkeit der DSC. Eine Differenzierung in Adipo- oder Chondrogenese wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht überprüft.

3.1.4 Fazit

Auf Grundlage der beschriebenen Ergebnisse erfüllen die hier untersuchten DSC zwei der drei ISCT-Kriterien in vollem Umfang (Plastikadhärenz, immunphänotypische Marker) sowie das dritte (Differenzierungspotenzial) in Bezug auf die osteogene Linie. Da keine multipotente Differenzierung in alle drei Zelllinien untersucht wurde, wird in der vorliegenden Arbeit konsequent der Begriff „dentaler Stromazellen“ verwendet. Die Bezeichnung als Stammzellen bleibt bewusst zurückhaltend und die Versuche beschränken sich auf die osteogene Differenzierungsfähigkeit.

3.2 Zellviabilität unter verschiedenen Kulturbedingungen – CTB-Assay

Zur quantitativen Erfassung der Zellviabilität dentaler Stromazellen (DSC) wurde ein CellTiter-Blue (CTB)-Assay durchgeführt. Die Zellen wurden über fünf Tage in verschiedenen Mediumzusammensetzungen kultiviert. Die Auswertung erfolgte anhand relativer CTB-Signale zu zwei Zeitpunkten (Tag 0 und Tag 5), wobei jeweils vier biologische Replikate ($n = 4$ Spender) analysiert wurden.

Die CTB-Signale wurden als relative Fluoreszenzintensität gemessen und zur Beurteilung der Zellzahlentwicklung herangezogen. Dabei korreliert die CTB-Fluoreszenz mit der metabolischen Aktivität und dient somit als Surrogatparameter für die Zellviabilität bzw. die Zellzahlzunahme.

3.2.1 Vergleich Standardmedium und DMEM ohne L-Arginin

Die DSC zeigten in L-Arginin-haltigem **Standardmedium** mit 10 % FCS sowie in den getesteten Zusätzen (L-Valin, L-Lysin + L-Ornithin, L-Arginin, L-NIO) eine deutliche Zunahme der CTB-Signale zwischen Tag 0 und Tag 5 (siehe **Abb. 16: Relative CTB-Signale zur Beurteilung der Zellviabilität in Standardmedien**).

Statistisch signifikante Zunahmen (gepaarter t -Test, $p < 0,05$) zwischen Tag 0 und Tag 5 ergaben sich in reinem Standardmedium, in + 20 mM L-Valin, in + 10 mM L-Lysin + 10 mM L-Ornithin und in + 1 mM L-Arginin. Nur in der Gruppe mit dem NOS-Inhibitor L-NIO (0,5 mM) ergab sich kein signifikanter Unterschied ($n. s.$).

Cohen's d war in allen Fällen $> 0,8$ (starker Effekt).

Bei Betrachtung der Abb. 16: Relative CTB-Signale zur Beurteilung der Zellviabilität in Standardmedien fällt auf, dass sich für Standardmedium + 10 mM L-Lysin + 10 mM L-Ornithin an Tag 5 die niedrigsten Werte ergeben.

Die Zellen proliferierten im Standardmedium wie erwartet. Zusätze wie L-Valin, L-Lysin und L-Ornithin oder L-Arginin beeinträchtigten die Viabilität nicht. Die statistisch nicht signifikanten Werte in der L-NIO-Gruppe deuten auf eine mögliche Beeinflussung des Argininstoffwechsels hin.

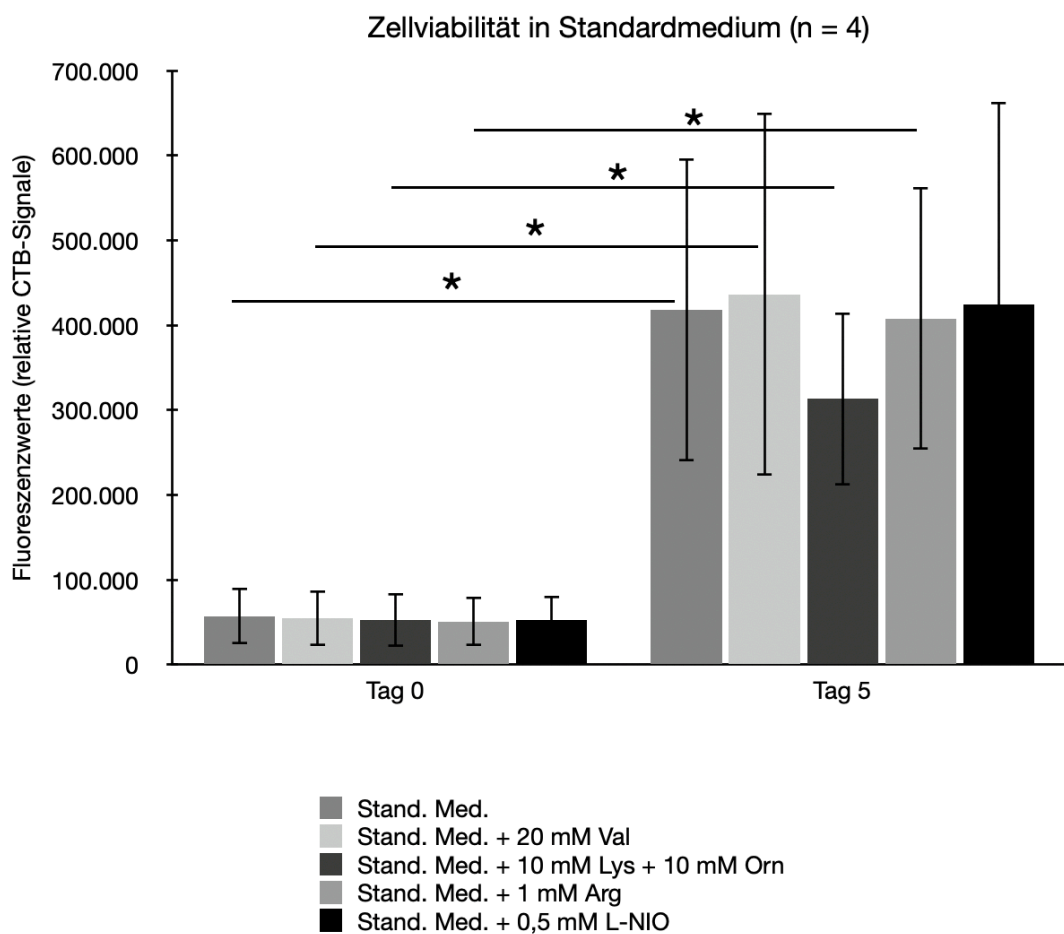


Abb. 16: Relative CTB-Signale zur Beurteilung der Zellviabilität in Standardmedien

Dargestellt sind die relativen CTB-Fluoreszenzsignale (Mittelwert \pm SD, n = 4) in Standardmedium mit unterschiedlichen Zusätzen an Tag 0 und Tag 5. Auf der linken Seite repräsentieren die Balken die relativen Viabilitätswerte in den einzelnen Medien an Tag 0 und auf der rechten Seite an Tag 5. Alle Versuchsbedingungen zeigten eine signifikante Zunahme der Zellviabilität zwischen Tag 0 und Tag 5 ($p < 0,05$), mit Ausnahme der Gruppe mit L-NIO. Die höchsten CTB-Signale wurden in den Bedingungen mit L-Valin beobachtet, während die Kombination aus L-Lysin + L-Ornithin den geringsten Anstieg zeigte. Die statistische Auswertung erfolgte mittels gepaartem t -Test. Cohen's $d > 0,8$ für alle Vergleiche. Nach Bonferroni-Korrektur zeigten sich jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede. Statistische Markierung: Ein Stern entspricht $p < 0,05$. Weitere Informationen können dem Text entnommen werden. CTB = CellTiter

Blue, SD = Standardabweichung, n = Anzahl biologischer Replikate, Stand. Med. = Standardmedium, Val = L-Valin, Lys = L-Lysin, Orn = L-Ornithin, Arg = L-Arginin, L-NIO = L-N⁵-(1-Aminoethyl)-Ornithin, mM = Millimolar. Eigene Anfertigung.

Im **L-Arginin-freien DMEM-Medium** wurden nicht die gleichen Zusätze wie im Standardmedium verwendet. Es sollte getestet werden, ob die FCS-Konzentration einen Einfluss auf die Zellviabilität hat. Deswegen wurden die Zellen einmal in 2,5 % FCS und einmal in 5 % FCS kultiviert. Zusätzlich wurden die Ergebnisse für alle Zellen jeweils in DMEM ohne L-Arginin, in + 50 µM und in + 200 µM L-Arginin festgehalten.

In allen DMEM ohne L-Arginin-Medien wurden deutlich niedrigere CTB-Signale gemessen als in den L-Arginin-haltigen Medien. In einigen Bedingungen kam es sogar zu einer Reduktion im Vergleich zu Tag 0 (siehe **Abb. 17: Relative CTB-Signale zur Beurteilung der Zellviabilität in DMEM ohne L-Arginin-Medien**). Zwischen Tag 0 und Tag 5 ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in diesen Gruppen (*n. s.*).

Cohen's $d > 0,8$ wurde beim Vergleich von Tag 0 und Tag 5 für DMEM ohne L-Arginin mit 5 % FCS und beim Vergleich von DMEM ohne L-Arginin mit 5 % FCS + 200 µM L-Arginin festgestellt.

L-Arginin-freies Medium reduziert die Zellviabilität drastisch. Eine Zunahme der FCS-Konzentration oder L-Arginin-Supplementierung kann den Effekt nur teilweise kompensieren.

Zellviabilität in DMEM ohne L-Arginin (n = 4)

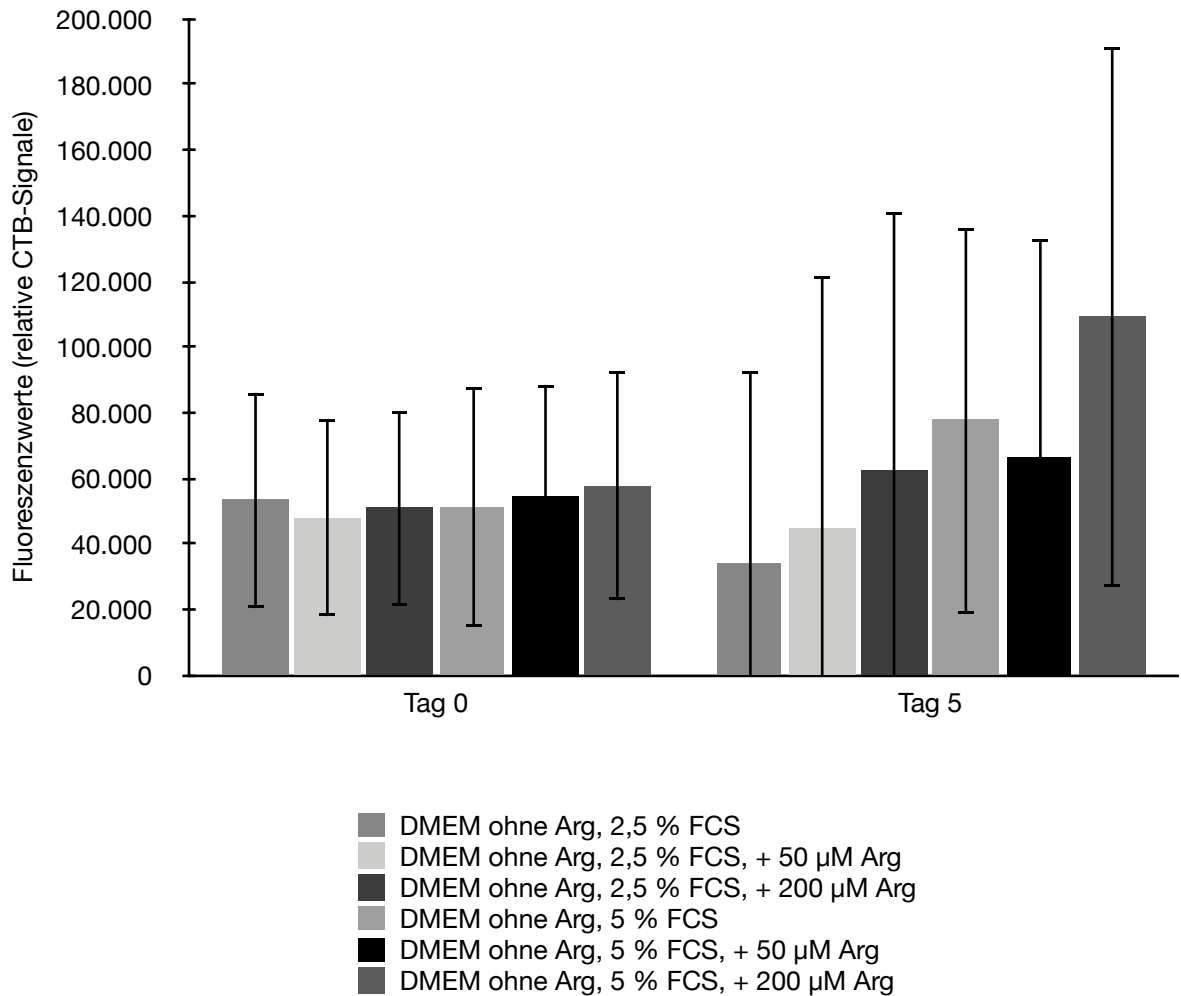


Abb. 17: Relative CTB-Signale zur Beurteilung der Zellviabilität in DMEM ohne L-Arginin-Medien

Gezeigt werden die relativen CTB-Signale (Mittelwert \pm SD, n = 4) in DMEM ohne L-Arginin mit variierendem FCS-Gehalt und L-Arginin-Zusätzen an Tag 0 und Tag 5. Die Zellen wurden mit 2,5 % bzw. 5 % FCS und 50 bzw. 200 μ M L-Arginin behandelt. Auf der linken Seite repräsentieren die Balken die relativen Viabilitätswerte in den einzelnen Medien an Tag 0 und auf der rechten Seite an Tag 5. Die statistische Auswertung erfolgte mittels gepaartem *t*-Test. In allen Bedingungen wurde keine signifikante Zunahme der Zellviabilität festgestellt. Ein deutlicher Anstieg wurde lediglich bei DMEM + 5 % FCS und bei DMEM + 5 % FCS + 200 μ M L-Arginin beobachtet. Für diese beiden Medien ergab sich Cohen's *d* > 0,8. In mehreren Gruppen kam es sogar zu einer Abnahme des CTB-Signals. Die Ergebnisse zeigen den kritischen Einfluss von L-Arginin auf die Zellviabilität dentaler Stromazellen. Weitere Erklärungen können dem Text entnommen werden. CTB = CellTiter Blue, SD = Standardabweichung, n = Anzahl biologischer Replikate, DMEM = *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Arg = L-Arginin, FCS = fetales Kälberserum, μ M = Mikromolar, % = Prozent. Eigene Anfertigung.

3.2.2 Einfluss des FCS-Gehalts und L-Arginin-Resupplementierung

Ein direkter Vergleich der Zellviabilität an Tag 5 von Standardmedium (10 % FCS, mit L-Arginin) mit DMEM ohne L-Arginin bei verschiedenen FCS-Konzentrationen zeigte signifikante Unterschiede:

- Standardmedium vs. DMEM, 2,5 % FCS: $t(3) = 3,75$, $p = 0,03$, $d = 1,87$

- Standardmedium vs. DMEM, 5 % FCS: $t(3) = 3,4, p = 0,04, d = 1,7$
- DMEM, 2,5 % vs. 5 % FCS: $t(3) = 3,2, p = 0,049, d = 1,6$

Die Werte unterscheiden sich dabei alle signifikant voneinander. Diese Ergebnisse deuten auf einen positiven Einfluss des FCS-Gehalts auf die Zellviabilität hin, auch unter Bedingungen ohne L-Arginin. Die Relevanz von Wachstumsfaktoren im Serum wird hierdurch unterstrichen (siehe **Abb. 18: Zellviabilitäts-Assay: Vergleich L-Arginin-haltiger und -freier Medien, Tag 5**).

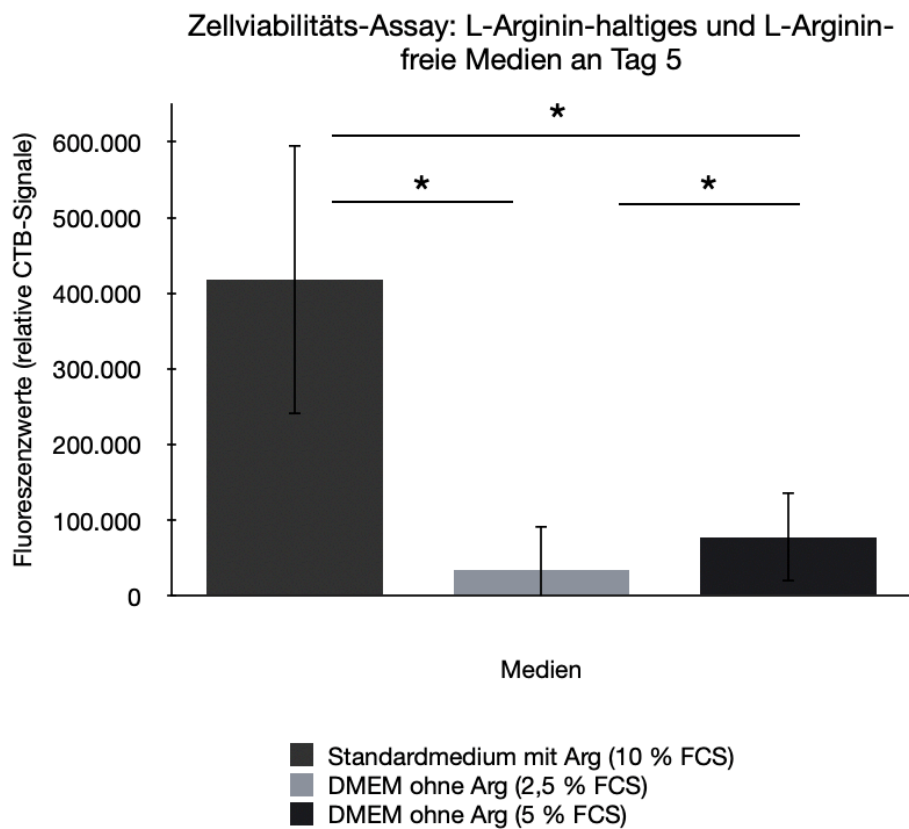


Abb. 18: Zellviabilitäts-Assay: Vergleich L-Arginin-haltiger und -freier Medien, Tag 5

Hier werden relative CTB-Signale (MW \pm SD, n = 4) an Tag 5 zur Beurteilung der Zellviabilität in Standardmedium mit L-Arginin und 10 % FCS, in DMEM ohne L-Arginin mit 2,5 und mit 5 % FCS miteinander verglichen. Es zeigen sich signifikant höhere Viabilitätswerte im Standardmedium gegenüber beiden L-Arginin-freien Bedingungen. Zudem war auch die Zellviabilität bei 5 % FCS signifikant höher als bei 2,5 % FCS, selbst ohne L-Arginin ($p < 0,05$). Cohen's $d > 0,8$ für alle Vergleiche. Diese Ergebnisse verdeutlichen den wachstumsfördernden Effekt von FCS auch unter L-Arginin-freien Bedingungen und betonen die Bedeutung serumabhängiger Faktoren für die Zellviabilität. Die statistische Auswertung erfolgte mittels gepaartem t -Test. Nach Bonferroni-Korrektur zeigten sich jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede. Statistische Markierung: Ein Stern entspricht $p < 0,05$. Weitere Erklärungen können dem Text entnommen werden. CTB = CellTiter Blue, DMEM = *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, n = Anzahl biologischer Replikate, Arg = L-Arginin, FCS = fetales Kälberserum, % = Prozent. Eigene Anfertigung.

3.2.3 Standardmedium und Interdonorenvariationen

Abb. 19: Zellwachstum DSC zeigt lichtmikroskopische Fotografien unterschiedlicher Wells eines Donors zu Beginn des Wachstums. Es werden bereits einzelne, dichte Wachstumszentren formiert, aber es hat noch keine flächendeckende Kultivierung stattgefunden. Die Abbildungen wurden mithilfe des 10-fachen Objektivs eines Zeiss-Axioskop-40-Durchlichtmikroskops und der Software *Zen 3.0 (blue edition)* aufgenommen. Zusätzlich wurde die Helligkeit bearbeitet.

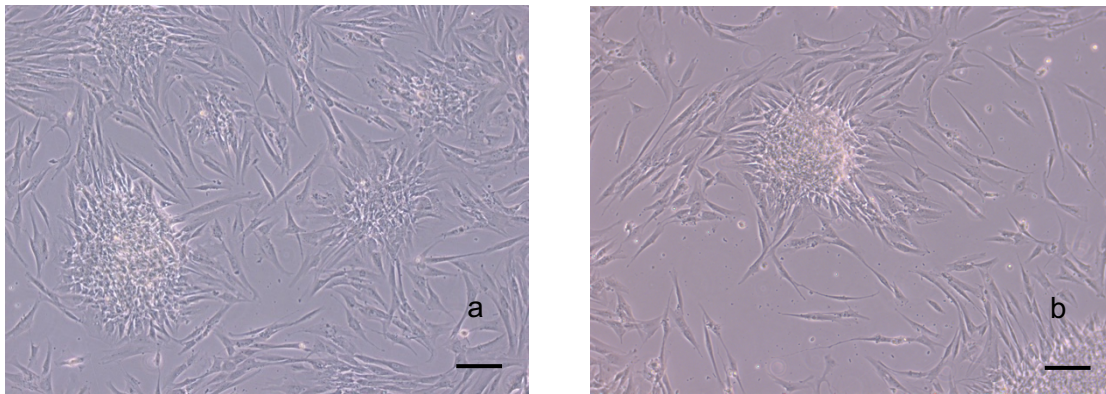


Abb. 19: Zellwachstum DSC zu Beginn

Gezeigt werden mikroskopische Aufnahmen (10x-Objektiv, Zeiss-Axioskop-40, Zen 3.0 *Blue*) der Zellkulturplatten zu Beginn des CTB-Assays. Die Fotografien (a) und (b) zeigen dabei Zellen eines Spenders (DSC-201217) in Passage 2 in unterschiedlichen Wells einer 6-Well-Platte kurz nach dem Ausplattieren. Bereits zu diesem frühen Zeitpunkt lassen sich einzelne Wachstumszentren erkennen, die auf beginnende Adhärenz und Proliferation hinweisen. Die Bilder wurden zur besseren Darstellung in Helligkeit angepasst. Die Maßstabsbalken entsprechen 100 μm . Weitere Informationen können dem Text entnommen werden. DSC = dentale Stromazellen, CTB = CellTiter Blue, μm = Mikrometer. Eigene Anfertigung.

Die erste Abbildung (siehe Abb. 20: Prozentuale Zunahme der CTB-Signale im Standardmedium an Tag 5) zeigt die prozentualen CTB-Signale der 4 Spender als $\text{MW} \pm \text{SD}$ an Tag 5, normiert auf Tag 0 = 100 % (Balken ganz links). Der Vergleich der Zusätze zeigte: Der höchste Wert findet sich bei Standardmedium + 20 mM L-Valin, gefolgt von Standardmedium + 0,5 mM L-NIO und Standardmedium + 1 mM L-Arginin. Der niedrigste Wert ließ sich in Standardmedium + 10 mM L-Lysin + 10 mM L-Ornithin feststellen. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (*n. s.*). Aber bei einigen Vergleichen ließ sich Cohen's $d > 0,8$ feststellen.

Der Zellzuwachs war zwischen den einzelnen Zusätzen ähnlich. L-Valin könnte eine leicht wachstumsfördernde Rolle spielen, während L-Lysin + L-Ornithin unter diesen Bedingungen keine stimulierende Wirkung zeigten.

Prozentuales Wachstum Standardmedium (n = 4) an Tag 5

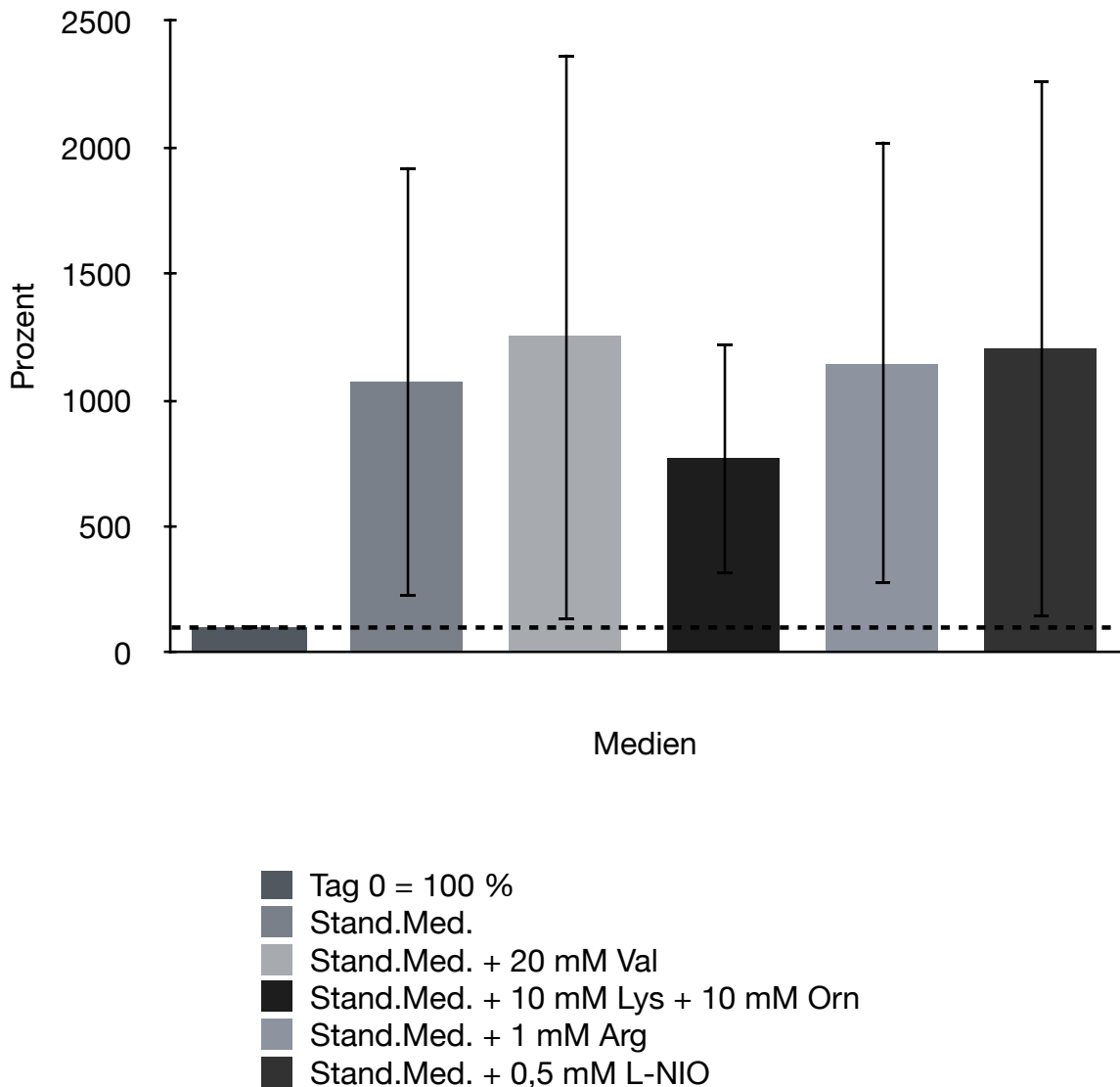


Abb. 20: Prozentuale Zunahme der CTB-Signale im Standardmedium an Tag 5

Die Balkendiagramme zeigen die prozentualen Veränderungen der Zellviabilität an Tag 5 in Standardmedium mit unterschiedlichen Zusätzen (Mittelwert \pm SD, n = 4). Dabei sind die Werte normiert auf Tag 0 = 100 % (Kontrollbalken ganz links). Die statistische Auswertung erfolgte mittels gepaartem *t*-Test. In allen Bedingungen wurde keine signifikante Zunahme der Zellviabilität festgestellt. Besonders hohe Signale wurden in den Bedingungen mit L-Valin, L-NIO und L-Arginin gemessen. Der niedrigste Wert ließ sich in Standardmedium + 10 mM L-Lysin + 10 mM L-Ornithin feststellen. Cohen's *d* > 0,8 für einige Vergleiche. L-Valin könnte eine leicht wachstumsfördernde Rolle spielen, während L-Lysin + L-Ornithin unter diesen Bedingungen keine stimulierende Wirkung zeigten. Weitere Erklärungen finden sich im Text. CTB = CellTiter Blue, Stand. Med. = Standardmedium, Val = L-Valin, Lys = L-Lysin, Orn = L-Ornithin, Arg = L-Arginin, L-NIO = L-N⁵-(1-Aminoethyl)-Ornithin, SD = Standardabweichung, n = Anzahl biologischer Replikate, mM = Millimolar, % = Prozent. Eigene Anfertigung.

Bei der Analyse des prozentualen Wachstums zwischen Tag 0 und Tag 5 (Tag 0 = 100 %) offenbarten sich deutliche Unterschiede zwischen den Spendern:

Während Spender 1 und 3 lediglich ein moderates Wachstum (320 bis 430 %) zeigten, erkennt man für Spender 2 und 4 eine starke Zunahme (bis zu 2.600 %) (siehe **Abb. 21: Prozentuales Wachstum einzelner Spender in Standardmedien an Tag 5**).

Dies zeigt ein Problem der Primärzellen: Hier liegt kein Ausreißerverhalten eines einzelnen Spenders vor, sondern eine systematische Aufteilung in „hochwachsende“ und „niedrigwachsende“ Spender. Dies verdeutlicht die hohe Variabilität der Primärzellen und die Individualität dieser Kohorte. Dabei zeigen Spender 1 und 3 ähnlich niedrige Werte und Spender 2 und 4 ähnlich hohe relative CTB-Signale. Dies erklärt auch die hohen Standardabweichungen der Ergebnisse an Tag 5.

Für Spender 1 ließ sich das größte relative CTB-Signal in Standardmedium + 1 mM L-Arginin verzeichnen. Für Spender 2 zeigten sich die höchsten relativen CTB-Signale in Standardmedium + 20 mM L-Valin, Standardmedium + 1 mM L-Arginin und in Standardmedium + 0,5 mM L-NIO. Spender 3 weist in allen Medien ungefähr gleich hohe relative CTB-Signale auf. Spender 4 zeigte von allen Spendern überall die höchsten Signale, mit einem Maximalsignal in Standardmedium + 20 mM L-Valin, dicht gefolgt von Standardmedium + 0,5 mM L-NIO. Die vergleichsweise geringsten Signale ließen sich für alle Spender in Standardmedium + 10 mM L-Lysin + 10 mM L-Ornithin feststellen.

Da hier einzelne Spender gezeigt werden, konnte keine Darstellung der MW \pm SD und keine Statistik erfolgen.

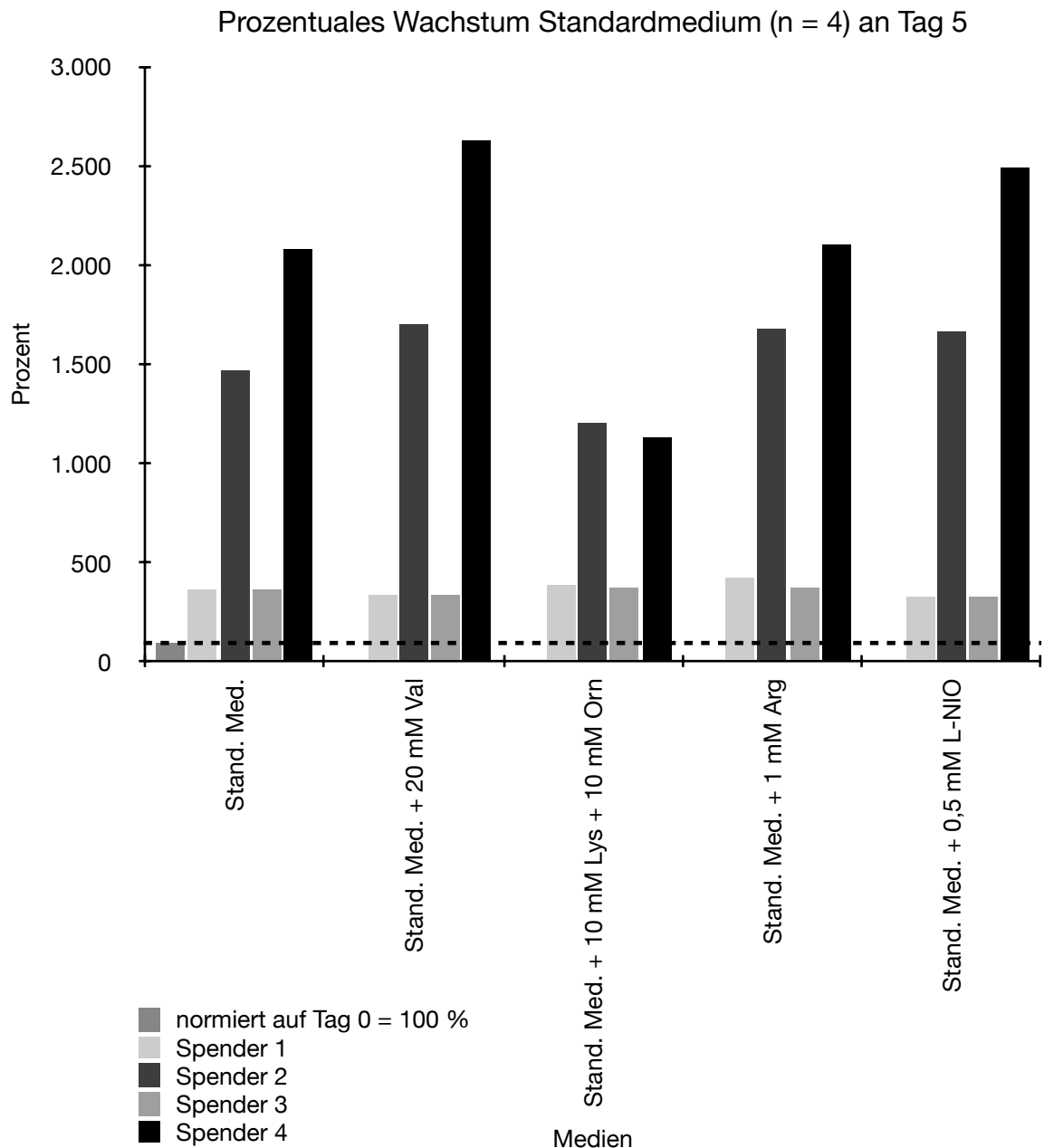


Abb. 21: Prozentuales Wachstum einzelner Spender in Standardmedien an Tag 5

Die Balkendiagramme zeigen die individuellen prozentualen Veränderungen der Zellviabilität an Tag 5 in Standardmedium mit unterschiedlichen Zusätzen pro Spender (n = 4). Dabei sind die Werte normiert auf Tag 0 = 100 % (Kontrollbalken ganz links). Es wird eine deutliche interindividuelle Variabilität ersichtlich. Spender 2 und 4 zeigten sehr hohe Zunahmen von bis zu 2.600 %, während Spender 1 und 3 lediglich moderate CTB-Zunahmen aufwiesen. Spender 4 zeigte von allen Spendern überall die höchsten Signale mit einem Maximalsignal in Standardmedium + 20 mM L-Valin. Die vergleichsweise geringsten Signale ließen sich für alle Spender in Standardmedium + 10 mM L-Lysin + 10 mM L-Ornithin feststellen. Man erkennt eine systematische Aufteilung in „hochwachsende“ und „niedrigwachsende“ Spender. Dies verdeutlicht die hohe Variabilität der Primärzellen und die interindividuellen Unterschiede der Donoren. Da es sich hier um eine Darstellung von Einzelwerten handelt, konnten keine Darstellung von Mittelwert \pm SD und keine statistische Auswertung durchgeführt werden. Weitere Erklärungen finden sich im Text. Stand. Med. = Standardmedium, Val = L-Valin, Lys = L-Lysin, Orn = L-Ornithin, Arg = L-Arginin, L-NIO = L-N⁵-(1-Aminoethyl)-Ornithin, n = Anzahl biologischer Replikate, CTB = CellTiter Blue, SD = Standardabweichung, % = Prozent, mM = Millimolar. Eigene Anfertigung.

3.2.4 DMEM ohne L-Arginin und Interdonorenvariationen

Die prozentuale Zunahme der CTB-Signale in DMEM ohne L-Arginin war insgesamt gering. Vielfach wurden sogar Abnahmen der CTB-Signale im Vergleich zu Tag 0 beobachtet (siehe **Abb. 22: Prozentuale Zunahme der CTB-Signale in DMEM ohne L-Arginin an Tag 5**).

Es zeigte sich lediglich ein leichter Anstieg der relativen CTB-Signale zwischen Tag 0 und Tag 5 in DMEM ohne Arg, 5 % FCS und in DMEM ohne Arg, 5 % FCS + 200 μ M Arg. In allen anderen Medien kam es zu einer Abnahme der prozentualen Werte unter den Kontrollwert von Tag 0 (= 100 %). Dies deutet auf eine insgesamt schlechte Zellviabilität ohne L-Arginin hin.

Insgesamt zeigten aber statistisch signifikante Unterschiede (alle $p < 0,05$) und Cohen's $d > 0,8$ bei zahlreichen Vergleichen.

Die Supplementierung mit 50 μ M oder 200 μ M L-Arginin konnte die Zellviabilität in L-Arginin-freiem DMEM geringfügig verbessern, insbesondere bei höheren FCS-Gehalten.

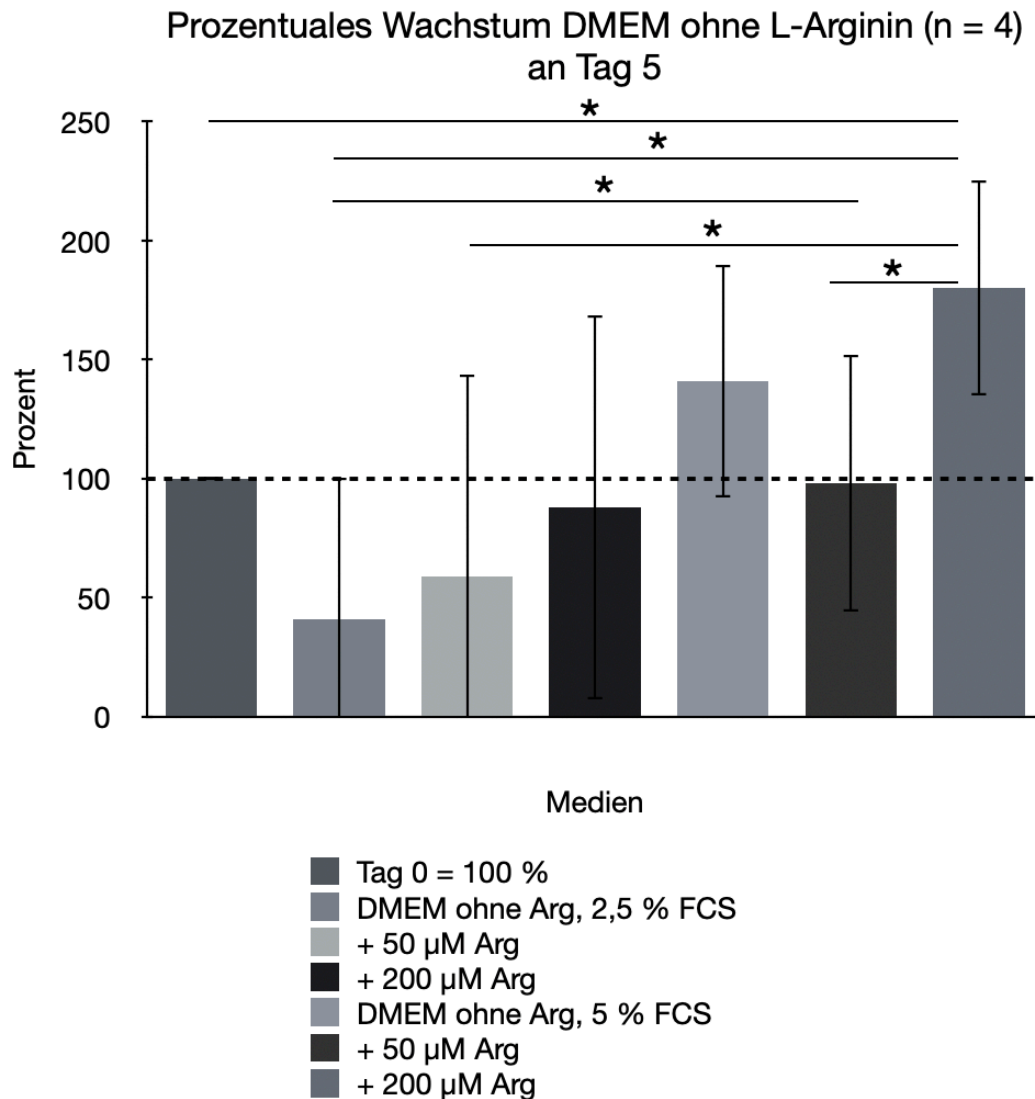


Abb. 22: Prozentuale Zunahme der CTB-Signale in DMEM ohne L-Arginin an Tag 5

Die Darstellung zeigt die normierten prozentualen CTB-Werte an Tag 5 in DMEM ohne L-Arginin mit variierendem FCS-Gehalt und L-Arginin-Zusätzen (Mittelwert \pm SD, n = 4). Die Zellen wurden mit 2,5 % bzw. 5 % FCS und 50 bzw. 200 μ M L-Arginin behandelt. Dabei sind die Werte normiert auf Tag 0 = 100 % (Kontrollbalken ganz links). Die statistische Auswertung erfolgte mittels gepaartem *t*-Test. Es zeigten sich statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) und Cohen's *d* $> 0,8$ bei zahlreichen Vergleichen. Nach Bonferroni-Korrektur zeigten sich jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede. Die prozentuale Zunahme der CTB-Signale in DMEM ohne L-Arginin war jedoch insgesamt gering. In den meisten Bedingungen blieb das Wachstum unterhalb des Ausgangsniveaus. Ein positiver Effekt wurde lediglich bei 5 % FCS und bei 5 % FCS + 200 μ M L-Arginin beobachtet. Dies deutet auf eine insgesamt schlechte Zellviabilität ohne L-Arginin hin. Die Supplementierung mit 50 μ M oder 200 μ M L-Arginin konnte die Zellviabilität in L-Arginin-freiem DMEM geringfügig verbessern, insbesondere bei höheren FCS-Gehalten. Statistische Markierung: Ein Stern entspricht $p < 0,05$. Weitere Erklärungen finden sich im Text. DMEM = *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Arg = L-Arginin, FCS = fetales Kälberserum, n = Anzahl biologischer Replikate, CTB = CellTiter Blue, SD = Standardabweichung, μ M = Mikromolar, % = Prozent. Eigene Anfertigung.

Auch bei Betrachtung der einzelnen Spender fällt die Abnahme der CTB-Signale im Vergleich zu Tag 0 deutlich auf. Nur in DMEM + 5 % FCS + 200 μ M L-Arginin zeigte sich

ein konsistenter Viabilitätsanstieg bei allen vier Spendern. Da hier einzelne Spender gezeigt werden, konnte keine Darstellung der $MW \pm SD$ und keine Statistik erfolgen (siehe **Abb. 23: Prozentuales Wachstum einzelner Spender in DMEM ohne L-Arginin an Tag 5**).

Besonders auffällig war das divergente Wachstumsmuster einzelner Spender: Spender 3 zeigte durchgängig in allen getesteten Medien und Zusätzen CTB-Signale über dem Ausgangswert (Tag 0 = 100 %), unabhängig von der Mediumzusammensetzung. Dies deutet auf eine besonders robuste metabolische Aktivität hin, selbst unter eingeschränkten Kulturbedingungen. Interessanterweise zeigte Spender 3 in L-Arginin-haltigen Medien (siehe **Abb. 21: Prozentuales Wachstum einzelner Spender in Standardmedien an Tag 5**) relativ geringe CTB-Signale im Vergleich zu den übrigen Donoren. Dies könnte möglicherweise auf spezifische Unterschiede im L-Arginin-Metabolismus oder in der Nährstoffsensitivität des einzelnen Spenders zurückzuführen sein.

Spender 4 wies im Gegensatz dazu in nahezu allen Versuchsbedingungen die geringsten CTB-Signale auf. Dies könnte ein Hinweis auf eine eingeschränkte Proliferationsfähigkeit oder erhöhte Empfindlichkeit sein.

Diese Befunde unterstreichen die hohe biologische Varianz bei Primärzellkulturen. Die geringe Spenderanzahl ($n = 4$) stellt dabei eine wesentliche Limitation dar, da individuelle Effekte überproportional ins Gewicht fallen. Eine Wiederholung der Versuche mit einer größeren Kohorte ist daher zwingend erforderlich, um valide Aussagen über populationsbasierte Effekte treffen zu können.

Prozentuales Wachstum DMEM ohne L-Arginin (n = 4) an Tag 5

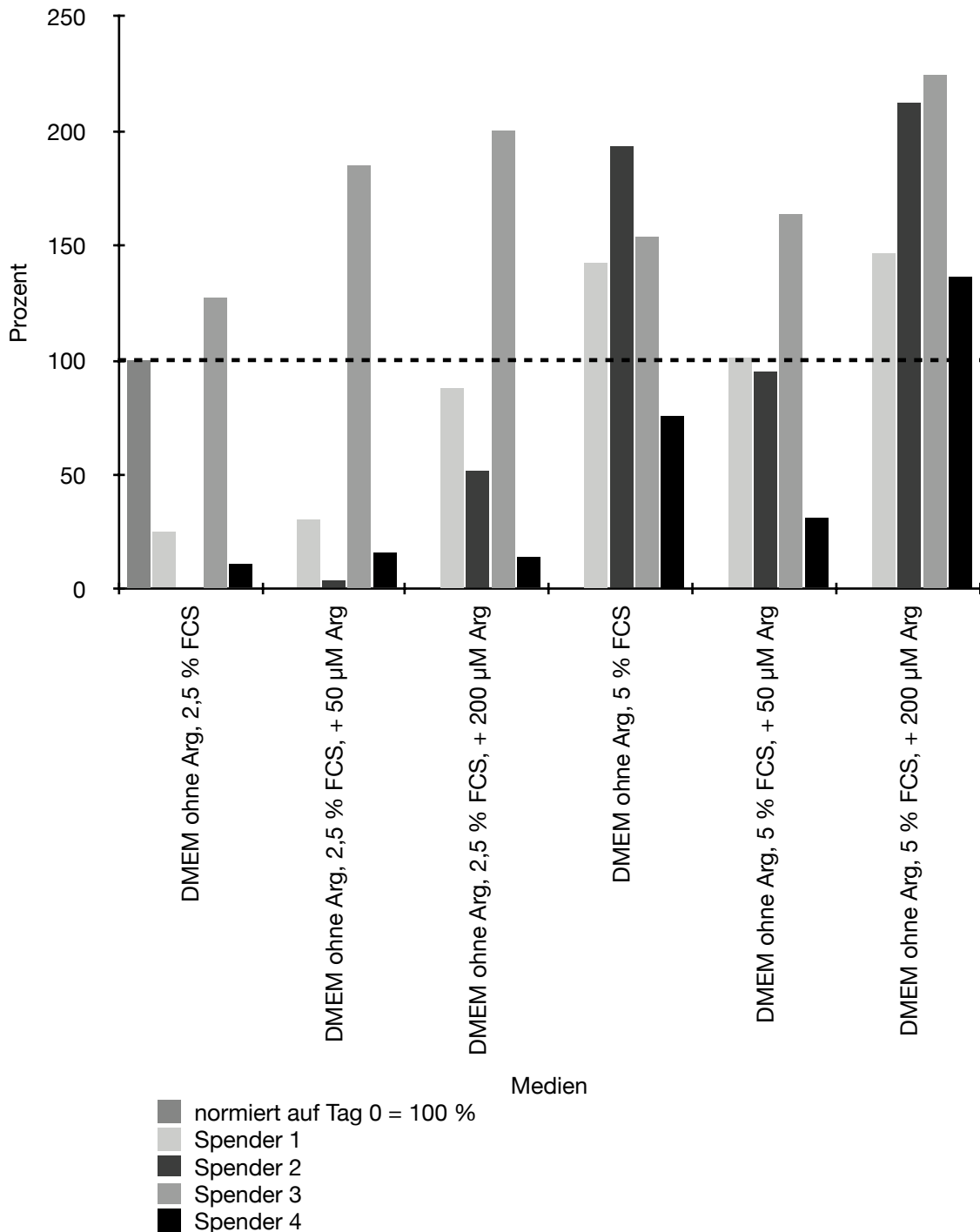


Abb. 23: Prozentuales Wachstum einzelner Spender in DMEM ohne L-Arginin an Tag 5

Die Darstellung zeigt die individuellen prozentualen CTB-Werte an Tag 5 in DMEM ohne L-Arginin mit variierendem FCS-Gehalt und L-Arginin-Zusätzen pro Spender (n = 4). Die Zellen wurden mit 2,5 % bzw. 5 % FCS und 50 bzw. 200 µM L-Arginin behandelt. Dabei sind die Werte normiert auf Tag 0 = 100 % (Kontrollbalken ganz links). Es wird eine deutliche interindividuelle Variabilität innerhalb der Primärkultur ersichtlich. Spender 3 zeigte durchgängig in allen getesteten Medien und Zusätzen CTB-Signale über dem Ausgangswert. Spender 4 wies im Gegensatz dazu in nahezu allen Versuchsbedingungen die geringsten CTB-Signale auf. Die prozentuale Zunahme der CTB-Signale in DMEM ohne L-Arginin war jedoch insgesamt deutlich geringer als in den L-Arginin-haltigen Medien. In den meisten Bedingungen blieb das Wachstum unterhalb des Ausgangsniveaus. Ein positiver Effekt, in dem alle Spender eine Zunahme zeigten, wurde lediglich bei 5 % FCS + 200 µM L-Arginin beobachtet. Da es sich hier um eine Darstellung von Einzelwerten handelt, konnten keine Darstellung von Mittelwert ± SD und keine statistische Auswertung durchgeführt werden. Weitere Erklärungen finden sich im Text. DMEM = *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Arg =

L-Arginin, FCS = fetales Kälberserum, n = Anzahl biologischer Replikate, CTB = CellTiter Blue, SD = Standardabweichung, μM = Mikromolar, % = Prozent. Eigene Anfertigung.

Insgesamt scheint die Re-Supplementierung mit L-Arginin einen Erholungseffekt bewirken zu können. Jedoch ist dieser stark abhängig vom FCS-Gehalt und von den Spendern. Nur bei + 200 μM L-Arginin und bei 5 % FCS zeigten sich verlässliche Effekte.

3.2.5 Fazit

Die Kultivierung in Standardmedium mit 10 % FCS und mit bestimmten Zusätzen fördert Zellviabilität und Zellwachstum signifikant und unterstützt so ein zuverlässiges Wachstum. L-Arginin scheint essenziell für die metabolische Aktivität der DSC zu sein, da ein Mangel zu einem drastischen Rückgang der Zellviabilität führt. Ein vollständiger Entzug scheint zytotoxische Effekte zu haben. Der FCS-Gehalt sowie die gezielte Supplementierung mit L-Arginin können die Viabilität partiell wiederherstellen.

Die Ergebnisse der CTB-Assays verdeutlichen ein zelltypisches Verhalten primärer Zellkulturen mit ausgeprägten Interdonorenvariationen. Für belastbare Schlussfolgerungen wäre demnach eine höhere Spenderzahl sinnvoll, da die geringe Spenderzahl die Aussagekraft einschränkt.

3.3 Proteinnachweis mittels Western-Blot

Zur Analyse regulatorischer Proteine im Rahmen der osteogenen Differenzierung dentaler Stromazellen (DSC) wurde eine Western-Blot-Analyse durchgeführt. Untersucht wurden die Enzyme Arginase-1, Arginase-2, CAT-1, CAT-2, eNOS und iNOS. Zelllysate stammten von acht verschiedenen Spendern, wobei Spender 2 in zwei unterschiedlichen Passagen (P3 und P5) analysiert wurde. Insgesamt ergab sich damit $n = 9$. Die Zellen wurden jeweils in Standardmedium sowie osteogenem Differenzierungsmedium (OM) kultiviert. Zusätzlich diente die Zelllinie RAW 264.7 in unstimuliertem Zustand sowie nach Stimulation mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS und 50 U/ml IFN- γ als Kontrolle, insbesondere als Positivkontrolle für die iNOS-Induktion.

3.3.1 Ergebnisse der Proteinexpression

Arginase-1: In den meisten Proben zeigte sich eine geringfügig erhöhte Expression in OM im Vergleich zum Standardmedium. Einzelne Spender (z. B. Spender 4, 5, 6, Spender 2 in P3 sowie RAW 264.7-Kontrolle) zeigten dagegen eine höhere Expression im Standardmedium (siehe Abb. 24: Western-Blot zur Darstellung der Arginase-1 und Abb. 25: Darstellung der Arginase-1-Expression nach Spendern). Statistisch zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Bedingungen ($p = 0,76$, Bonferroni-korrigiert $p = 0,76$; Cohen's $d = 0,1$) (siehe Abb. 26: Vergleich der Arginase-1-Expression in Standardmedium und OM).

Arginase-1 (ca. 37 kDa)

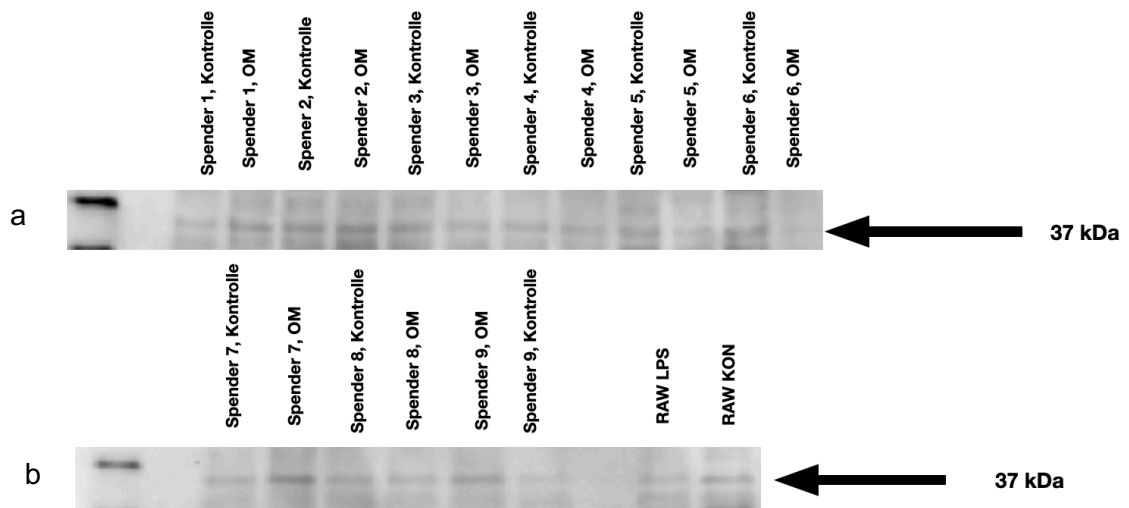


Abb. 24: Western-Blot zur Darstellung der Arginase-1-Expression

Western-Blot zur Darstellung der Arginase-1-Expression bei ca. 37 kDa in DSC aus acht Spendern, kultiviert in Standardmedium (Kontrolle) und osteogenem Differenzierungsmedium (OM). Die Proben wurden jeweils paarweise (Kontrolle und OM) für neun Spender (Spender 2 in zwei Passagen) sowie für die Zelllinie RAW 264.7 (un- und stimuliert mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS und 50 U/ml IFN- γ) aufgetragen. Teil (a) zeigt die Banden der Spender 1-6, Teil (b) die der Spender 7-9 sowie der RAW 264.7-Zellen. Bei Spender 9 und den RAW 264.7-Zellen entspricht die Reihenfolge: zuerst OM, dann Kontrolle. Der Pfeil markiert die zur quantitativen Auswertung herangezogene Bande. Die Analyse erfolgte mit $n = 9$ biologischen Replikaten sowie der RAW 264.7-Zelllinie. DSC = dentale Stromazellen, OM = osteogenes Differenzierungsmedium, RAW = RAW 264.7-Zellen, RAW LPS = RAW 264.7-Zellen stimuliert mit 50 U/ml IFN- γ und 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS, IFN- γ = Interferon-gamma, LPS = Lipopolysaccharid, KON = Kontrolle, n = Anzahl biologischer Replikate, kDa = Kilodalton, μg = Mikrogramm, ml = Milliliter, U = Unit. Eigene Anfertigung.

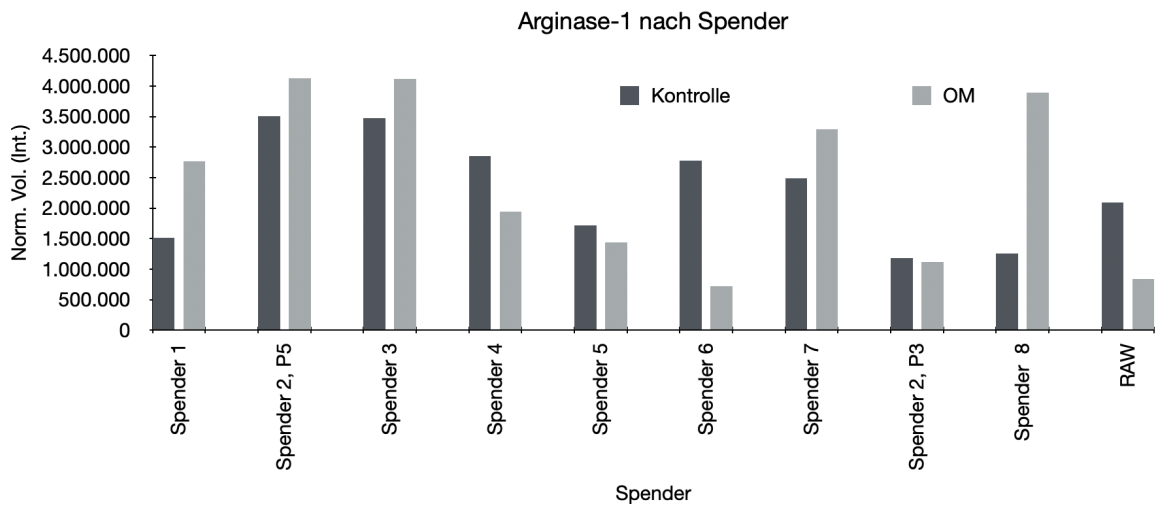


Abb. 25: Darstellung der Arginase-1-Expression nach Spendern

Darstellung der Proteinexpression von Arginase-1 in DSC der Spender 1 bis 8 sowie in RAW 264.7-Zellen. Jeweils zwei Balken pro Probe zeigen die Proteinexpression unter Standardkulturbedingungen (Kontrolle = Standardmedium; dunkelgrau) sowie nach Stimulation mit osteogenem Differenzierungsmedium (OM) bzw. mit 50 U/ml IFN- γ und 1 μ g/ml LPS bei den RAW 264.7-Zellen (hellgrau). Da es sich um Einzelmessungen handelt, wurden keine Standardabweichungen und keine statistische Auswertung angegeben. Unterschiede zwischen den Kulturbedingungen sind individuell ausgeprägt. Weitere Erläuterungen zu den experimentellen Bedingungen und zur Interpretation der Daten finden sich im Fließtext. Norm. Vol. = *Normalized Volume*, Int. = *Intensity*, P = *Passage*, DSC = dentale Stromazellen, RAW = RAW 264.7-Zellen, OM = osteogenes Differenzierungsmedium, IFN- γ = Interferon-gamma, LPS = Lipopolysaccharid, μ g = Mikrogramm, ml = Milliliter, U = *Unit*. Eigene Anfertigung.

Arginase-1 Mittelwerte (n = 9) nach Medium

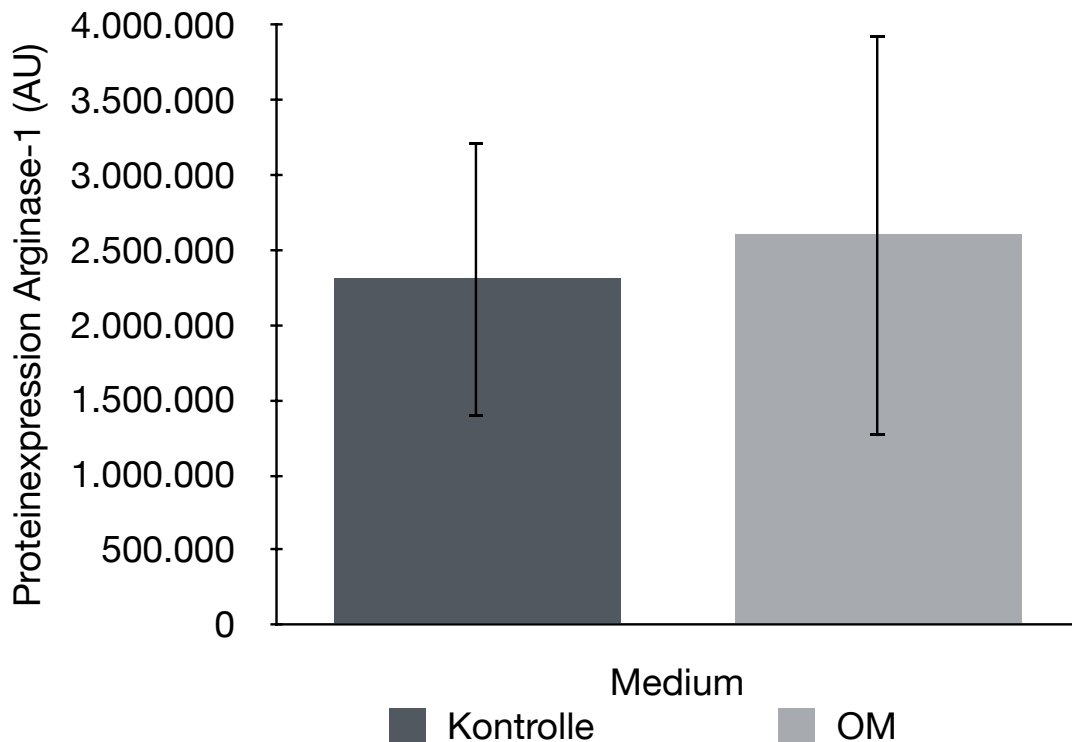


Abb. 26: Vergleich der Arginase-1-Expression in Standardmedium und OM

Dargestellt sind die Mittelwerte der Arginase-1-Expression mit zugehöriger Standardabweichung (n = 9, jeweils Einzelmessungen pro Spender und Medium) in Standardmedium (Kontrolle) und in OM. Die statistische Auswertung erfolgte mittels gepaartem *t*-Test. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied. Weitere Informationen zur Methodik und statistischen Auswertung sind dem Fließtext zu entnehmen. AU = *arbitrary unit*, OM = osteogenes Differenzierungsmedium, n = Anzahl biologischer Replikate. Eigene Anfertigung.

Arginase-2: Durchschnittlich lag die Expression unter OM höher. In den Spendern 4, 5 und 6 war die Expression jedoch im Standardmedium ausgeprägter (siehe Abb. 27: Western-Blot zur Darstellung der Arginase-2-Expression und Abb. 28: Darstellung der Arginase-2-Expression nach Spendern, Ausschnitt). In der positiven Kontrolle (RAW 264.7 mit 50 U/ml IFN- γ und 1 μ g/ml LPS) war eine mehr als 30-fach erhöhte Expression im Vergleich zur unstimulierten RAW 264.7-Kontrolle sichtbar. Da sich das Ergebnis der RAW 264.7-Zellen so extrem von denen der anderen Spender unterscheidet, wird zur besseren Übersicht lediglich ein Ausschnitt der Abbildung dargestellt (siehe Abb. 27: Western-Blot zur Darstellung der Arginase-2-Expression, siehe Abb. 28: Darstellung der Arginase-2-Expression nach Spendern, Ausschnitt). Statistisch ergaben sich auch hier keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,28$; $d = 0,37$) (siehe Abb. 29: Vergleich der Arginase-2-Expression in Standardmedium und OM) und eine hohe interindividuelle Varianz.

Arginase-2 (ca. 39 kDa)

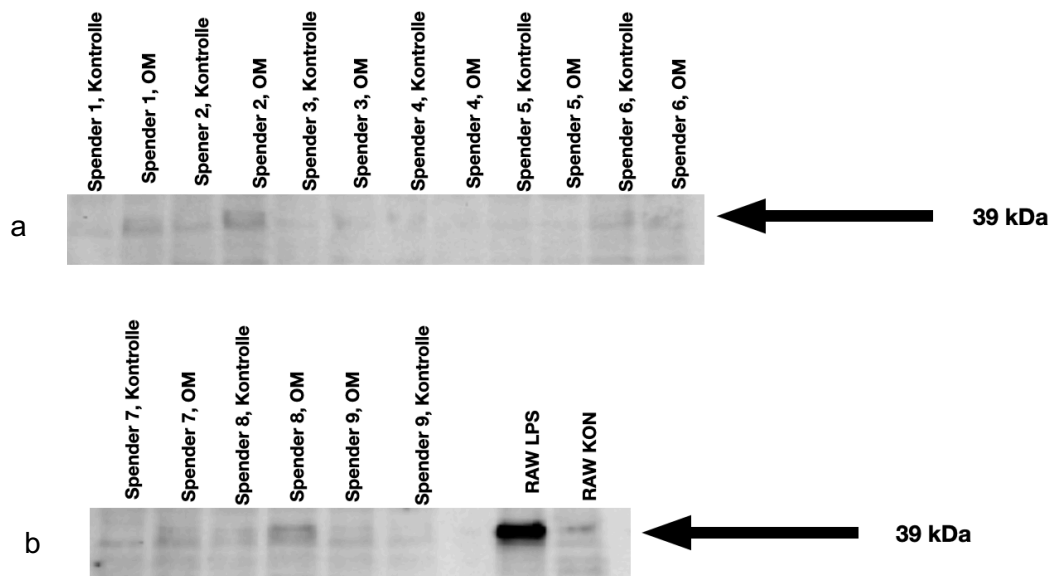


Abb. 27: Western-Blot zur Darstellung der Arginase-2-Expression

Western-Blot zur Darstellung der Arginase-2-Expression bei ca. 39 kDa in DSC aus acht Spendern, kultiviert in Standardmedium (Kontrolle) und osteogenem Differenzierungsmedium (OM). Die Proben wurden jeweils paarweise (Kontrolle und OM) für neun Spender (Spender 2 in zwei Passagen) sowie für die Zelllinie RAW 264.7 (un- und stimuliert mit 1 µg/ml LPS und 50 U/ml IFN-γ) aufgetragen. Teil (a) zeigt die Banden der Spender 1–6, Teil (b) die der Spender 7–9 sowie der RAW 264.7-Zellen. Bei Spender 9 und den RAW 264.7-Zellen entspricht die Reihenfolge: zuerst OM, dann Kontrolle. Der Pfeil markiert die zur quantitativen Auswertung herangezogene Bande. Die Kontrollzelllinie RAW 264.7 zeigt eine stark erhöhte Expression nach Stimulation. Die Analyse erfolgte mit n = 9 biologischen Replikaten sowie der RAW 264.7-Zelllinie. DSC = dentale Stromazellen, OM = osteogenes Differenzierungsmedium, RAW = RAW 264.7-Zellen, RAW LPS = RAW 264.7-Zellen stimuliert mit 50 U/ml IFN-γ und 1 µg/ml LPS, IFN-γ = Interferon-gamma, LPS = Lipopolysaccharid, KON = Kontrolle, n = Anzahl biologischer Replikate, kDa = Kilodalton, µg = Mikrogramm, ml = Milliliter, U = *Unit*. Eigene Anfertigung.

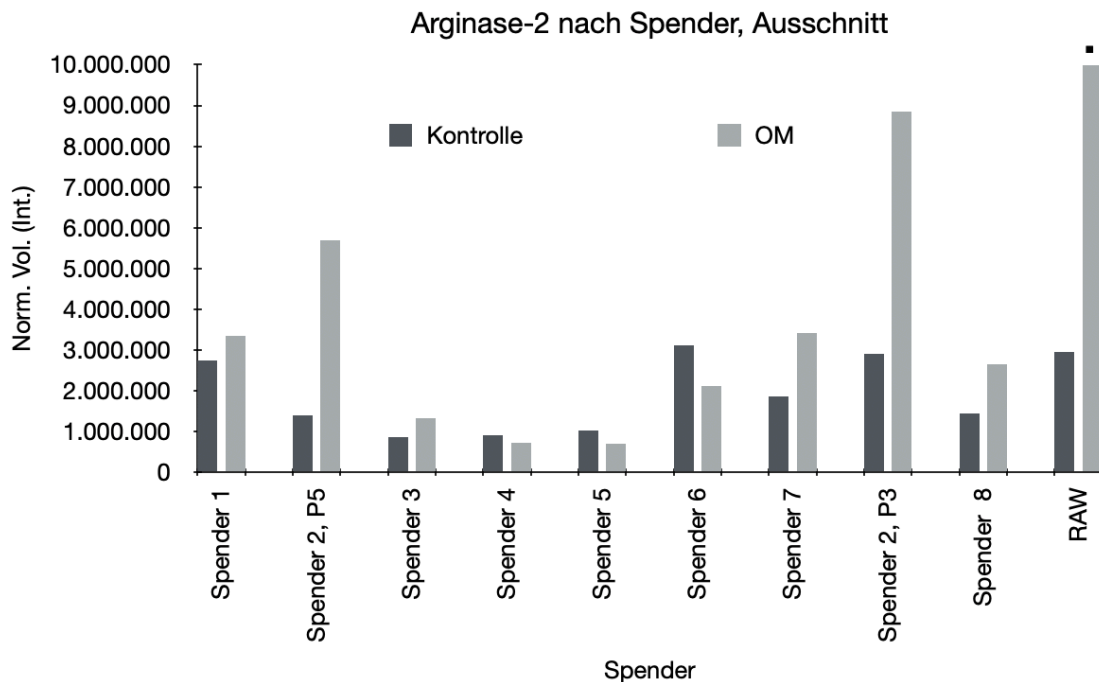


Abb. 28: Darstellung der Arginase-2-Expression nach Spendern, Ausschnitt

Darstellung der Proteinexpression von Arginase-2 in DSC der Spender 1 bis 8 sowie in RAW 264.7-Zellen. Jeweils zwei Balken pro Probe zeigen die Proteinexpression unter Standardkulturbedingungen (Kontrolle = Standardmedium; dunkelgrau) sowie nach Stimulation mit osteogenem Differenzierungsmedium (OM) bzw. mit 50 U/ml IFN- γ und 1 μ g/ml LPS bei den RAW 264.7-Zellen (hellgrau). Da es sich um Einzelmessungen handelt, wurden keine Standardabweichungen und keine statistische Auswertung angegeben. Darstellung individueller Unterschiede sowie starker Induktion in RAW 264.7. Der oberhalb des Balkens der stimulierten RAW 264.7-Zellen dargestellte Punkt (ganz rechts) zeigt an, dass die Darstellung aus Übersichtsgründen auf einen Teilbereich der Messwerte begrenzt ist. Weitere Erläuterungen zu den experimentellen Bedingungen und zur Interpretation der Daten finden sich im Fließtext. Norm. Vol. = *Normalized Volume*, Int. = *Intensity*, P = *Passage*, RAW = RAW 264.7-Zellen, OM = osteogenes Differenzierungsmedium, DSC = dentale Stromazellen, IFN- γ = Interferon-gamma, LPS = Lipopolysaccharid, μ g = Mikrogramm, ml = Milliliter, U = *Unit*. Eigene Anfertigung.

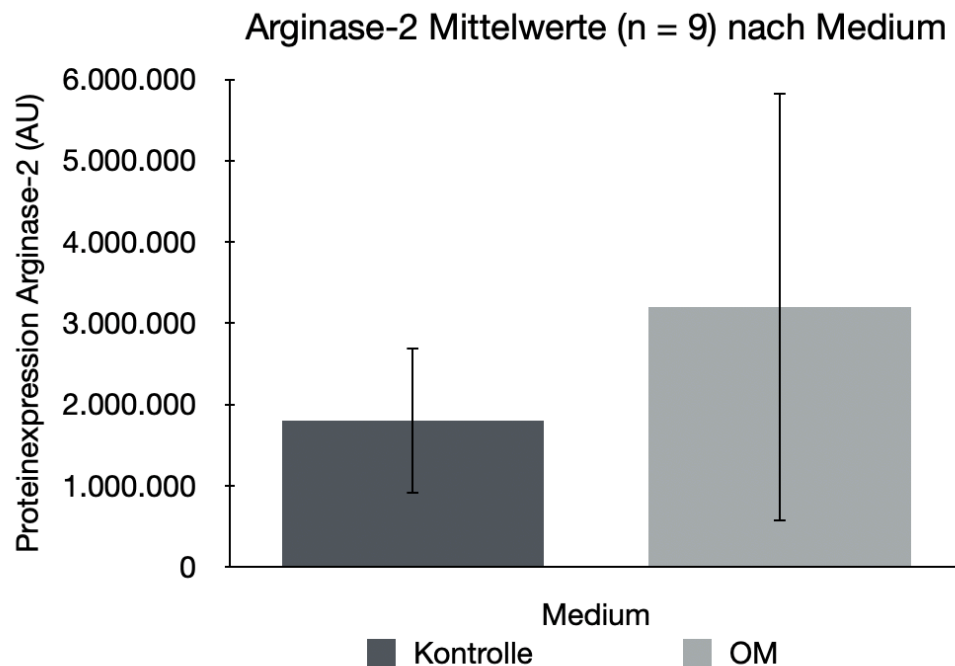


Abb. 29: Vergleich der Arginase-2-Expression in Standardmedium und OM

Dargestellt sind die Mittelwerte der Arginase-2-Expression mit zugehöriger Standardabweichung (n = 9, jeweils Einzelmessungen pro Spender und Medium) in Standardmedium (Kontrolle) und in OM. Die statistische Auswertung erfolgte mittels gepaartem *t*-Test. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied. Weitere Informationen zur Methodik und statistischen Auswertung sind dem Fließtext zu entnehmen. AU = *arbitrary unit*, OM = osteogenes Differenzierungsmedium, n = Anzahl biologischer Replikate. Eigene Anfertigung.

CAT-1: Dieses Protein wies bei allen Spendern eine höhere Expression im Standardmedium auf. Die einzige Ausnahme bildete die stimulierte RAW 264.7-Zelllinie (siehe **Abb. 30: Western-Blot zur Darstellung der CAT-1-Expression** und **Abb. 31: Darstellung der CAT-1-Expression nach Spendern**). Hier konnte als einzigem Marker ein signifikanter Unterschied zwischen den Bedingungen festgestellt werden ($p = 0,02$, Bonferroni-korrigiert $p = 0,02$; $d = 0,87$) (siehe **Abb. 32: Vergleich der CAT-1-Expression in Standardmedium und OM**). Dies könnte auf eine mögliche Rolle dieses Transporters in nicht differenzierten Zellzuständen hindeuten.

CAT-1 (ca. 55 kDa)

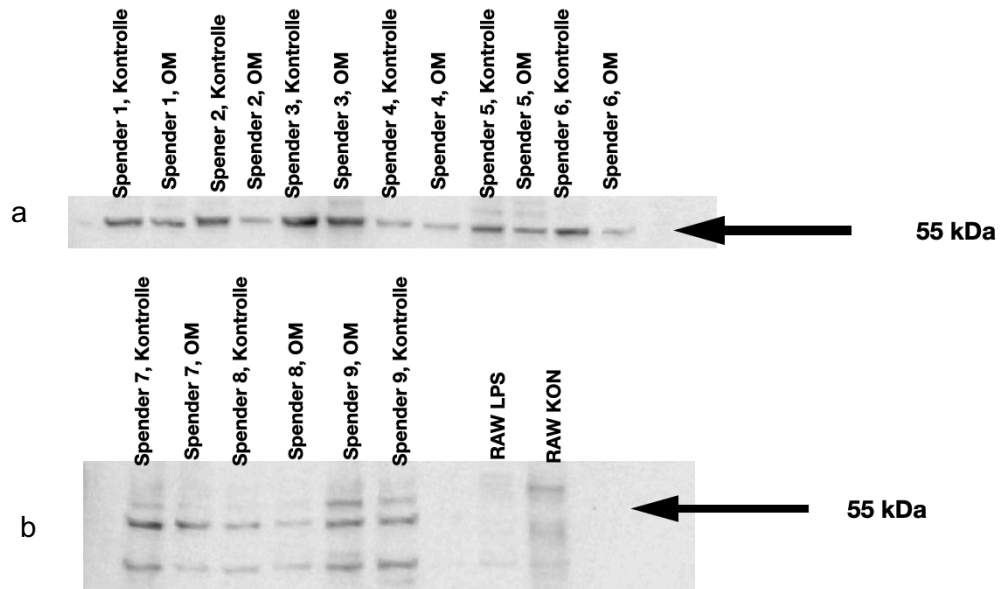


Abb. 30: Western-Blot zur Darstellung der CAT-1-Expression

Western-Blot zur Darstellung der CAT-1-Expression bei ca. 55 kDa in DSC aus acht Spendern, kultiviert in Standardmedium (Kontrolle) und osteogenem Differenzierungsmedium (OM). Die Proben wurden jeweils paarweise (Kontrolle und OM) für neun Spender (Spender 2 in zwei Passagen) sowie für die Zelllinie RAW 264.7 (un- und stimuliert mit 1 µg/ml LPS und 50 U/ml IFN-γ) aufgetragen. Teil (a) zeigt die Banden der Spender 1–6, Teil (b) die der Spender 7–9 sowie der RAW 264.7-Zellen. Bei Spender 9 und den RAW 264.7-Zellen entspricht die Reihenfolge: zuerst OM, dann Kontrolle. Der Pfeil markiert die zur quantitativen Auswertung herangezogene Bande. Die Analyse erfolgte mit n = 9 biologischen Replikaten sowie der RAW 264.7-Zelllinie. CAT = kationischer Aminosäuren-Transporter, DSC = dentale Stromazellen, OM = osteogenes Differenzierungsmedium, RAW = RAW 264.7-Zellen, RAW LPS = RAW 264.7-Zellen stimuliert mit 50 U/ml IFN-γ und 1 µg/ml LPS, IFN-γ = Interferon-gamma, LPS = Lipopolysaccharid, KON = Kontrolle, n = Anzahl biologischer Replikate, kDa = Kilodalton, µg = Mikrogramm, ml = Milliliter, U = *Unit*. Eigene Anfertigung.

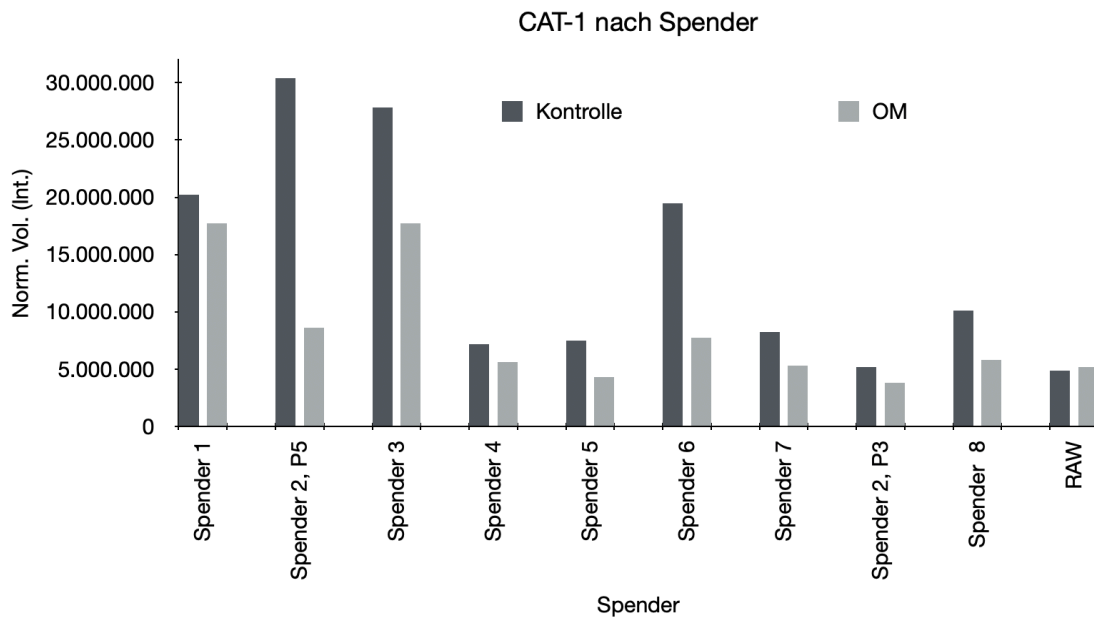


Abb. 31: Darstellung der CAT-1-Expression nach Spendern

Darstellung der Proteinexpression von CAT-1 in DSC der Spender 1 bis 8 sowie in RAW 264.7-Zellen. Jeweils zwei Balken pro Probe zeigen die Proteinexpression unter Standardkulturbedingungen (Kontrolle = Standardmedium; dunkelgrau) sowie nach Stimulation mit osteogenem Differenzierungsmedium (OM) bzw. mit 50 U/ml IFN- γ und 1 μ g/ml LPS bei den RAW 264.7-Zellen (hellgrau). Da es sich um Einzelmessungen handelt, wurden keine Standardabweichungen und keine statistische Auswertung angegeben. Unterschiede zwischen den Kulturbedingungen sind individuell ausgeprägt. Weitere Erläuterungen zu den experimentellen Bedingungen und zur Interpretation der Daten finden sich im Fließtext. CAT = kationischer Aminosäuren-Transporter, Norm. Vol. = *Normalized Volume*, Int. = *Intensity*, P = Passage, RAW = RAW 264.7-Zellen, OM = osteogenes Differenzierungsmedium, DSC = dentale Stromazellen, IFN- γ = Interferon-gamma, LPS = Lipopolysaccharid, μ g = Mikrogramm, ml = Milliliter, U = *Unit*. Eigene Anfertigung.

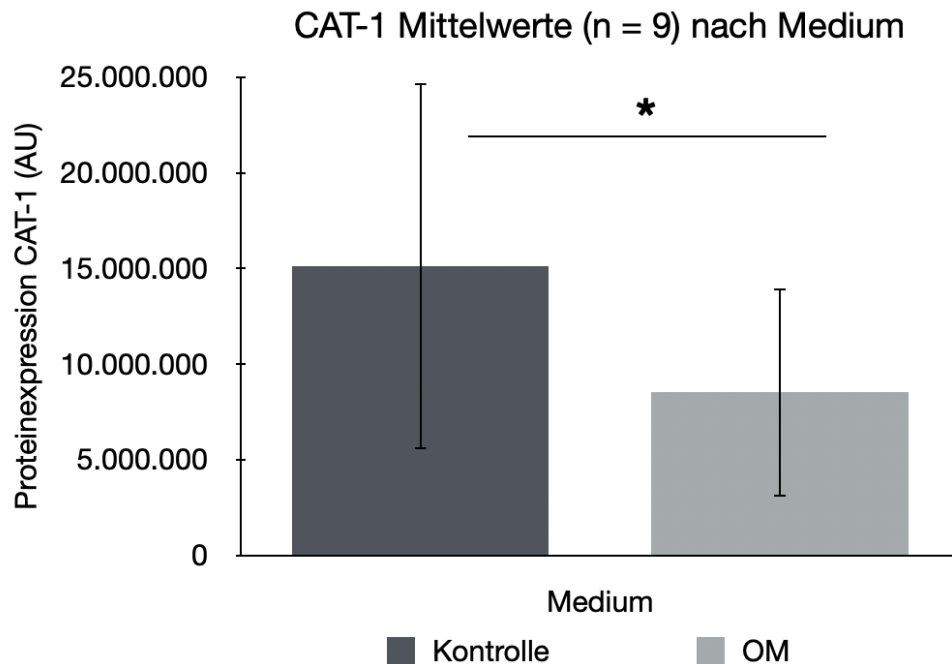


Abb. 32: Vergleich der CAT-1-Expression in Standardmedium und OM

Dargestellt sind die Mittelwerte der CAT-1-Expression mit zugehöriger Standardabweichung (n = 9, jeweils Einzelmessungen pro Spender und Medium) in Standardmedium (Kontrolle) und in OM. Die statistische Auswertung erfolgte mittels gepaartem *t*-Test. Es zeigt sich eine statistisch signifikant reduzierte Expression von CAT-1 im OM im Vergleich zum Standardmedium ($p = 0,02$) und auch nach Bonferroni-Korrektur ($p < 0,05$). Cohen's $d > 0,8$. Statistische Markierung: Ein Stern entspricht $p < 0,05$. Weitere Informationen zur Methodik und statistischen Auswertung sind dem Fließtext zu entnehmen. CAT = kationischer Aminosäuren-Transporter, AU = *arbitrary unit*, OM = osteogenes Differenzierungsmedium, n = Anzahl biologischer Replikate. Eigene Anfertigung.

CAT-2: Die Analyse erfolgte mit zwei Antikörpern unterschiedlicher Hersteller:

- *Invitrogen*: Höhere Expression im Standardmedium, jedoch mit Ausnahmen (Spender 1, 2 in P5, 6, 8 und RAW 264.7) (siehe **Abb. 33: Western-Blot zur Darstellung der CAT-2 (Invitrogen)-Expression** und **Abb. 34: Darstellung der CAT-2 (Invitrogen)-Expression nach Spendern**). Kein signifikanter Unterschied ($p = 0,75$; $d = 0,1$) (siehe **Abb. 35: Vergleich der CAT-2 (Invitrogen)-Expression in Standardmedium und OM**).
- *SantaCruz*: Durchschnittlich etwas erhöhte Expression unter OM, jedoch ebenfalls inkonsistente Ergebnisse (z. B. höhere Werte für Spender 2 in P5, 4 und 5 im Standardmedium) (siehe **Abb. 36: Western-Blot zur Darstellung der CAT-2 (SantaCruz)-Expression** und **Abb. 37: Darstellung der CAT-2 (SantaCruz)-Expression nach Spendern**). Kein signifikanter

Unterschied ($p = 0,42$; $d = 0,27$) (siehe Abb. 38: Vergleich der CAT-2 (SantaCruz)-Expression in Standardmedium und OM). Dies unterstreicht die Unsicherheit der Antikörperspezifität.

CAT-2 (Invitrogen) (ca. 80 kDa)

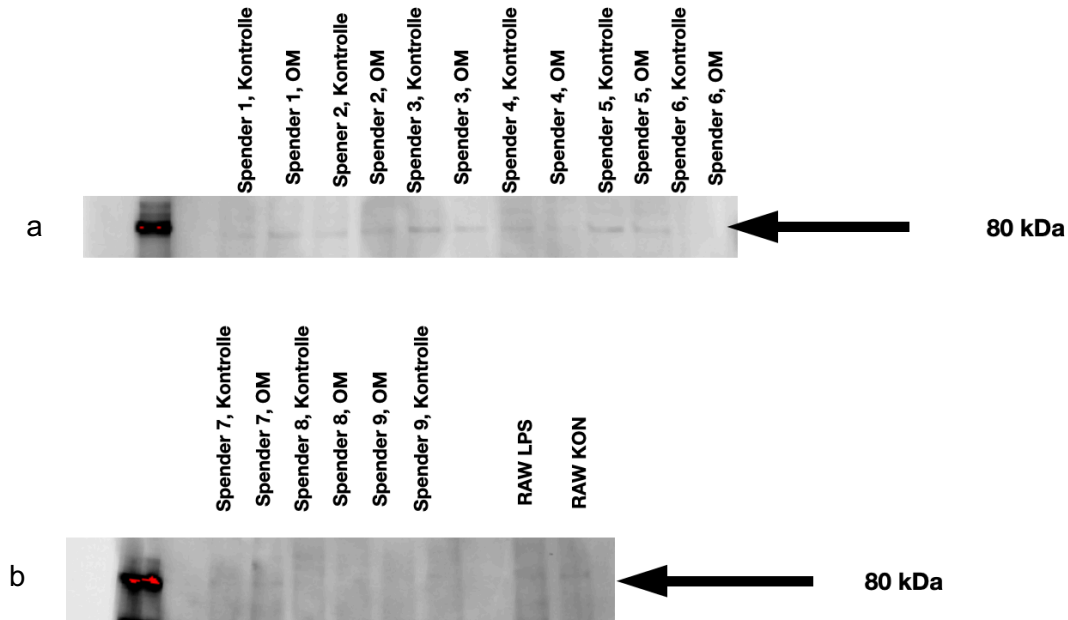


Abb. 33: Western-Blot zur Darstellung der CAT-2 (Invitrogen)-Expression

Western-Blot zur Darstellung der CAT-2-Expression (Hersteller Invitrogen) bei ca. 80 kDa in DSC aus acht Spendern, kultiviert in Standardmedium (Kontrolle) und osteogenem Differenzierungsmedium (OM). Die Proben wurden jeweils paarweise (Kontrolle und OM) für neun Spender (Spender 2 in zwei Passagen) sowie für die Zelllinie RAW 264.7 (un- und stimuliert mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS und 50 U/ml IFN- γ) aufgetragen. Teil (a) zeigt die Banden der Spender 1–6, Teil (b) die der Spender 7–9 sowie der RAW 264.7-Zellen. Bei Spender 9 und den RAW 264.7-Zellen entspricht die Reihenfolge: zuerst OM, dann Kontrolle. Der Pfeil markiert die zur quantitativen Auswertung herangezogene Bande. Die Analyse erfolgte mit $n = 9$ biologischen Replikaten sowie der RAW 264.7-Zelllinie. CAT = kationischer Aminosäuren-Transporter, DSC = dentale Stromazellen, OM = osteogenes Differenzierungsmedium, RAW = RAW 264.7-Zellen, RAW LPS = RAW 264.7-Zellen stimuliert mit 50 U/ml IFN- γ und 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS, IFN- γ = Interferon-gamma, LPS = Lipopolysaccharid, KON = Kontrolle, n = Anzahl biologischer Replikate, kDa = Kilodalton, μg = Mikrogramm, ml = Milliliter, U = Unit. Eigene Anfertigung.

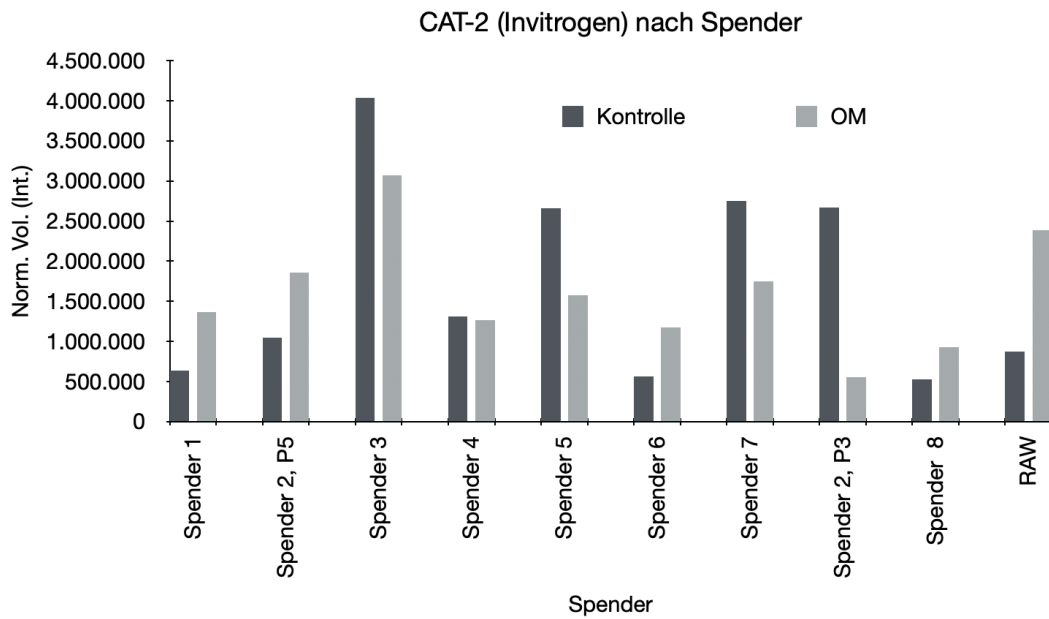


Abb. 34: Darstellung der CAT-2 (Invitrogen)-Expression nach Spendern

Darstellung der Proteinexpression von CAT-2 (Invitrogen) in DSC der Spender 1 bis 8 sowie in RAW 264.7-Zellen. Jeweils zwei Balken pro Probe zeigen die Proteinexpression unter Standardkulturbedingungen (Kontrolle = Standardmedium; dunkelgrau) sowie nach Stimulation mit osteogenem Differenzierungsmedium (OM) bzw. mit 50 U/ml IFN- γ und 1 μ g/ml LPS bei den RAW 264.7-Zellen (hellgrau). Da es sich um Einzelmessungen handelt, wurden keine Standardabweichungen und keine statistische Auswertung angegeben. Individuelle Schwankungen zwischen den Spendern. Erläuterungen zu den experimentellen Bedingungen und zur Interpretation der Daten finden sich im Fließtext. CAT = kationischer Aminosäuren-Transporter, Norm. Vol. = *Normalized Volume*, Int. = *Intensity*, P = Passage, RAW = RAW 264.7-Zellen, OM = osteogenes Differenzierungsmedium, DSC = dentale Stromazellen, IFN- γ = Interferon-gamma, LPS = Lipopolysaccharid, μ g = Mikrogramm, ml = Milliliter, U = *Unit*. Eigene Anfertigung.

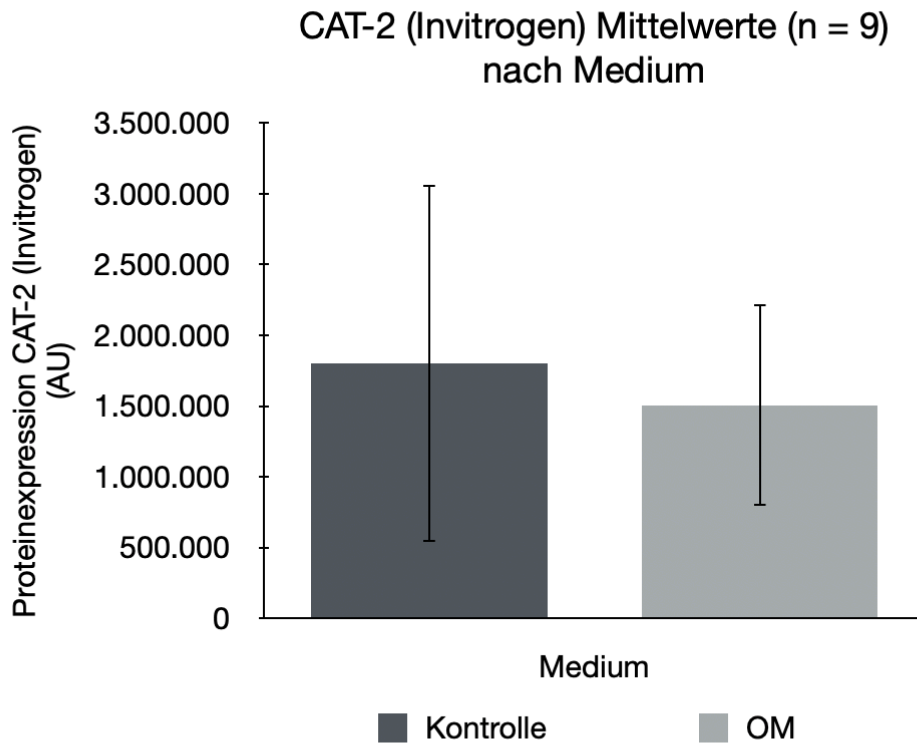


Abb. 35: Vergleich der CAT-2 (Invitrogen)-Expression in Standardmedium und OM

Dargestellt sind die Mittelwerte der CAT-2-Expression (Hersteller Invitrogen) mit zugehöriger Standardabweichung (n = 9, jeweils Einzelmessungen pro Spender und Medium) in Standardmedium (Kontrolle) und in OM. Die statistische Auswertung erfolgte mittels gepaartem *t*-Test. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied. Weitere Informationen zur Methodik und statistischen Auswertung sind dem Fließtext zu entnehmen. CAT = kationischer Aminosäuren-Transporter, AU = *arbitrary unit*, OM = osteogenes Differenzierungsmedium, n = Anzahl biologischer Replikate. Eigene Anfertigung.

CAT-2 (SantaCruz) (ca. 90 kDa)

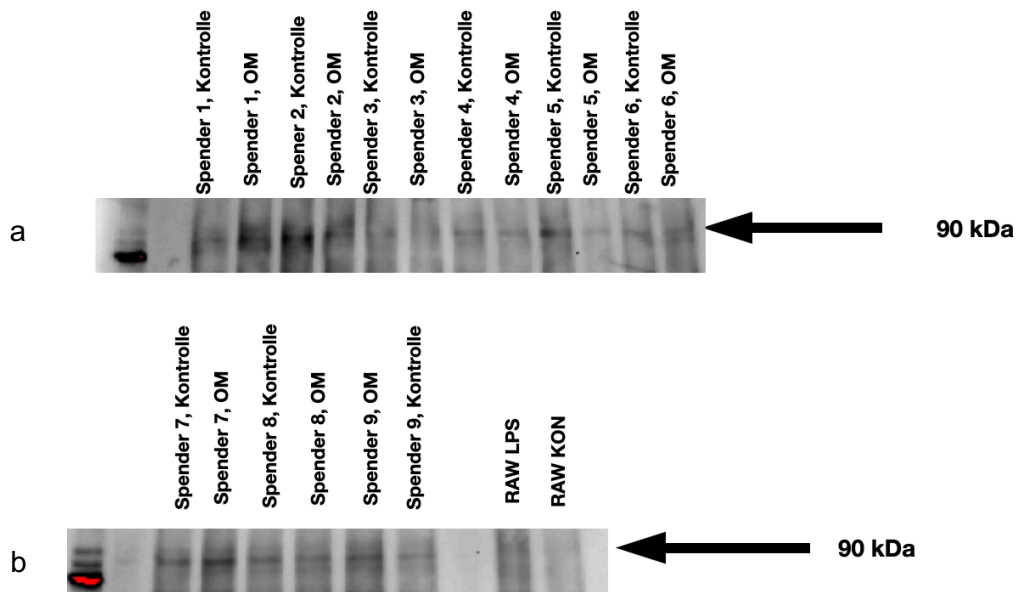


Abb. 36: Western-Blot zur Darstellung der CAT-2 (SantaCruz)-Expression

Western-Blot zur Darstellung der CAT-2-Expression (Hersteller SantaCruz) bei ca. 90 kDa in DSC aus acht Spendern, kultiviert in Standardmedium (Kontrolle) und osteogenem Differenzierungsmedium (OM). Die Proben wurden jeweils paarweise (Kontrolle und OM) für neun Spender (Spender 2 in zwei Passagen) sowie für die Zelllinie RAW 264.7 (un- und stimuliert mit 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS und 50 U/ml IFN- γ) aufgetragen. Teil (a) zeigt die Banden der Spender 1–6, Teil (b) die der Spender 7–9 sowie der RAW 264.7-Zellen. Bei Spender 9 und den RAW 264.7-Zellen entspricht die Reihenfolge: zuerst OM, dann Kontrolle. Der Pfeil markiert die zur quantitativen Auswertung herangezogene Bande. Die Analyse erfolgte mit $n = 9$ biologischen Replikaten sowie der RAW 264.7-Zelllinie. CAT = kationischer Aminosäuren-Transporter, DSC = dentale Stromazellen, OM = osteogenes Differenzierungsmedium, RAW = RAW 264.7-Zellen, RAW LPS = RAW 264.7-Zellen stimuliert mit 50 U/ml IFN- γ und 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS, IFN- γ = Interferon-gamma, LPS = Lipopolysaccharid, KON = Kontrolle, n = Anzahl biologischer Replikate, kDa = Kilodalton, μg = Mikrogramm, ml = Milliliter, U = *Unit*. Eigene Anfertigung.

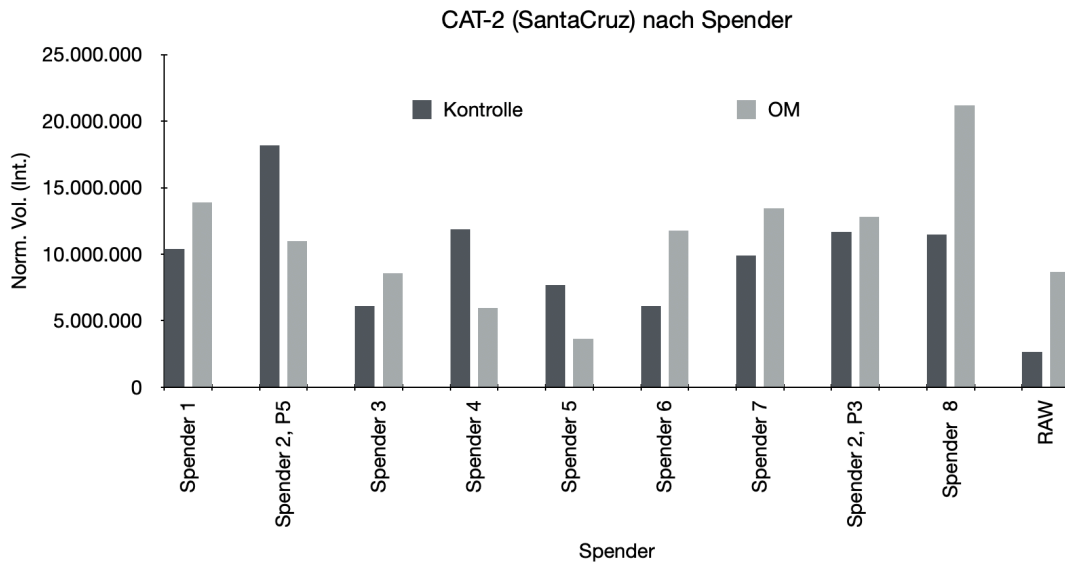


Abb. 37: Darstellung der CAT-2 (SantaCruz)-Expression nach Spendern

Darstellung der Proteinexpression von CAT-2 (SantaCruz) in DSC der Spender 1 bis 8 sowie in RAW 264.7-Zellen. Jeweils zwei Balken pro Probe zeigen die Proteinexpression unter Standardkulturbedingungen (Kontrolle = Standardmedium; dunkelgrau) sowie nach Stimulation mit osteogenem Differenzierungsmedium (OM) bzw. mit 50 U/ml IFN- γ und 1 μ g/ml LPS bei den RAW 264.7-Zellen (hellgrau). Da es sich um Einzelmessungen handelt, wurden keine Standardabweichungen und keine statistische Auswertung angegeben. Uneinheitliches Bild mit geringer Tendenz zur Erhöhung in OM. Weitere Erläuterungen zu den experimentellen Bedingungen und zur Interpretation der Daten finden sich im Fließtext. CAT = kationischer Aminosäuren-Transporter, Norm. Vol. = *Normalized Volume*, Int. = *Intensity*, P = Passage, RAW = RAW 264.7-Zellen, OM = osteogenes Differenzierungsmedium, DSC = dentale Stromazellen, IFN- γ = Interferon-gamma, LPS = Lipopolysaccharid, μ g = Mikrogramm, ml = Milliliter, U = *Unit*. Eigene Anfertigung.

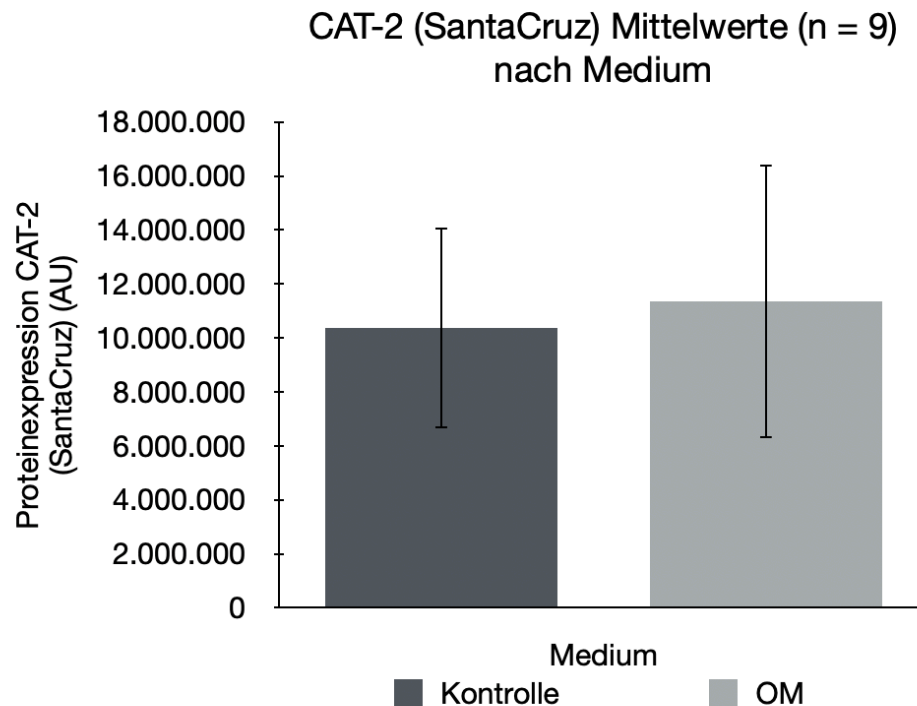


Abb. 38: Vergleich der CAT-2 (SantaCruz)-Expression in Standardmedium und OM

Dargestellt sind die Mittelwerte der CAT-2-Expression (Hersteller SantaCruz) mit zugehöriger Standardabweichung (n = 9, jeweils Einzelmessungen pro Spender und Medium) in Standardmedium (Kontrolle) und in OM. Die statistische Auswertung erfolgte mittels gepaartem *t*-Test. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied. Weitere Informationen zur Methodik und statistischen Auswertung sind dem Fließtext zu entnehmen. CAT = kationischer Aminosäuren-Transporter, AU = *arbitrary unit*, OM = osteogenes Differenzierungsmedium, n = Anzahl biologischer Replikate. Eigene Anfertigung.

eNOS: Die durchschnittliche Expression war unter beiden Bedingungen nahezu gleich (siehe Abb. 41: Vergleich der eNOS-Expression in Standardmedium und OM und Abb. 39: Western-Blot zur Darstellung der eNOS-Expression). Spenderindividuelle Schwankungen waren jedoch deutlich sichtbar (siehe Abb. 40: Darstellung der eNOS-Expression nach Spendern). Auch hier ergaben sich keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,85$; $d = 0,06$) (siehe Abb. 41: Vergleich der eNOS-Expression in Standardmedium und OM), was auf eine konstitutive und nicht differenzierungsabhängige Regulation schließen lässt.

eNOS (ca. 140 kDa)

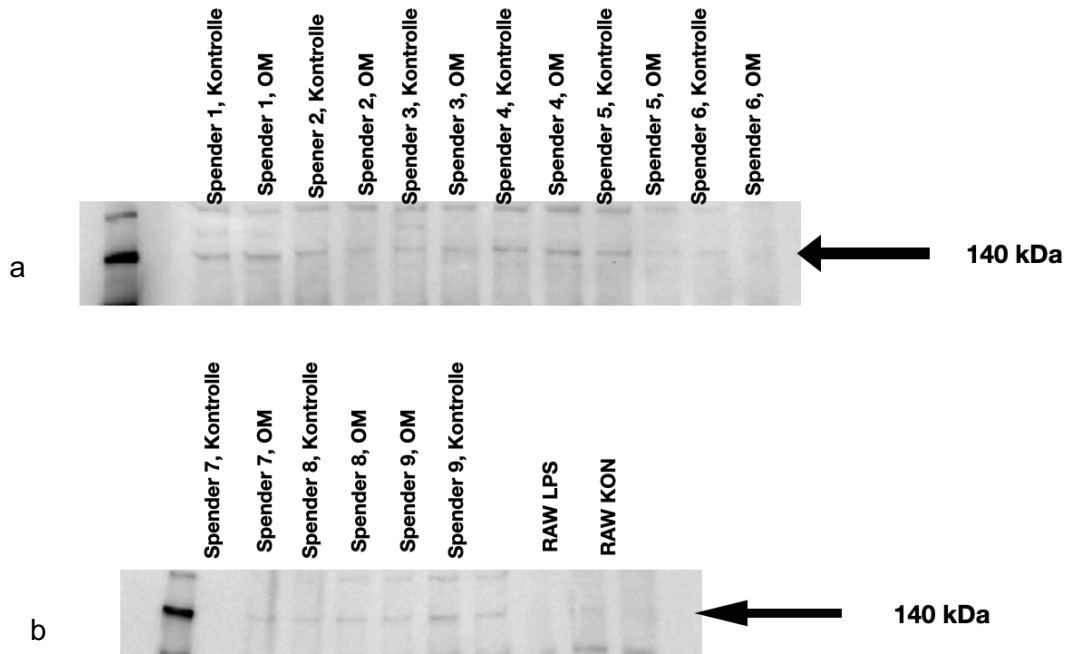


Abb. 39: Western-Blot zur Darstellung der eNOS-Expression

Western-Blot zur Darstellung der eNOS-Expression bei ca. 140 kDa in DSC aus acht Spendern, kultiviert in Standardmedium (Kontrolle) und osteogenem Differenzierungsmedium (OM). Die Proben wurden jeweils paarweise (Kontrolle und OM) für neun Spender (Spender 2 in zwei Passagen) sowie für die Zelllinie RAW 264.7 (un- und stimuliert mit 1 µg/ml LPS und 50 U/ml IFN-γ) aufgetragen. Teil (a) zeigt die Banden der Spender 1–6, Teil (b) die der Spender 7–9 sowie der RAW 264.7-Zellen. Bei Spender 9 und den RAW 264.7-Zellen entspricht die Reihenfolge: zuerst OM, dann Kontrolle. Der Pfeil markiert die zur quantitativen Auswertung herangezogene Bande. Die Analyse erfolgte mit n = 9 biologischen Replikaten sowie der RAW 264.7-Zelllinie. eNOS = endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase, DSC = dentale Stromazellen, OM = osteogenes Differenzierungsmedium, RAW = RAW 264.7-Zellen, RAW LPS = RAW 264.7-Zellen stimuliert mit 50 U/ml IFN-γ und 1 µg/ml LPS, IFN-γ = Interferon-gamma, LPS = Lipopolysaccharid, KON = Kontrolle, n = Anzahl biologischer Replikate, kDa = Kilodalton, µg = Mikrogramm, ml = Milliliter, U = *Unit*. Eigene Anfertigung.

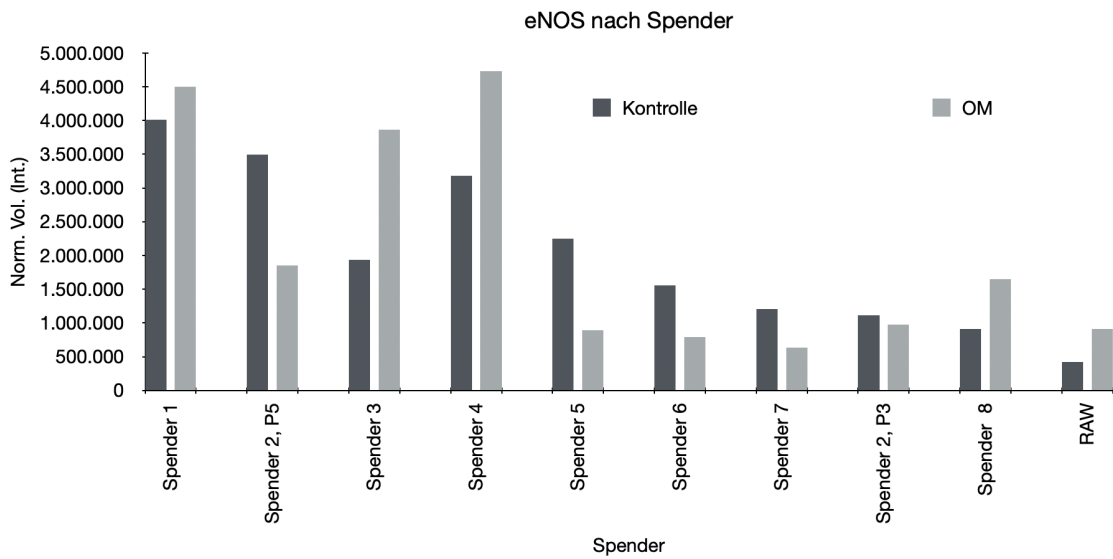


Abb. 40: Darstellung der eNOS-Expression nach Spendern

Darstellung der Proteinexpression von eNOS in DSC der Spender 1 bis 8 sowie in RAW 264.7-Zellen. Jeweils zwei Balken pro Probe zeigen die Proteinexpression unter Standardkulturbedingungen (Kontrolle = Standardmedium; dunkelgrau) sowie nach Stimulation mit osteogenem Differenzierungsmedium (OM) bzw. mit 50 U/ml IFN- γ und 1 μ g/ml LPS bei den RAW 264.7-Zellen (hellgrau). Da es sich um Einzelmessungen handelt, wurden keine Standardabweichungen und keine statistische Auswertung angegeben. Es liegt eine hohe interindividuelle Streuung vor. Weitere Erläuterungen zu den experimentellen Bedingungen und zur Interpretation der Daten finden sich im Fließtext. eNOS = endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase, Norm. Vol. = *Normalized Volume*, Int. = *Intensity*, P = Passage, RAW = RAW 264.7-Zellen, OM = osteogenes Differenzierungsmedium, DSC = dentale Stromazellen, IFN- γ = Interferon-gamma, LPS = Lipopolysaccharid, μ g = Mikrogramm, ml = Milliliter, U = *Unit*. Eigene Anfertigung.

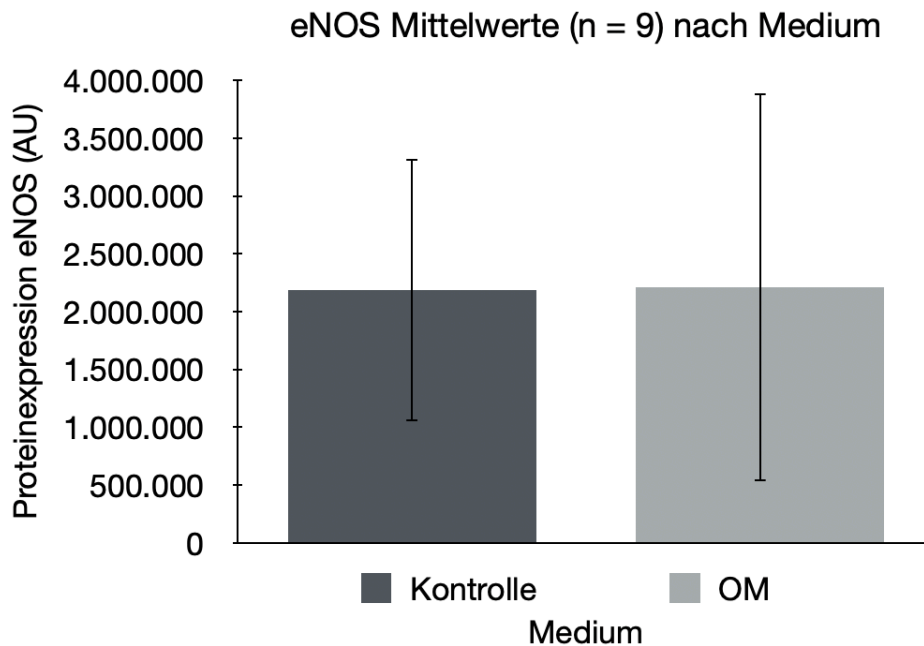


Abb. 41: Vergleich der eNOS-Expression in Standardmedium und OM

Dargestellt sind die Mittelwerte der eNOS-Expression mit zugehöriger Standardabweichung (n = 9, jeweils Einzelmessungen pro Spender und Medium) in Standardmedium (Kontrolle) und in OM. Die statistische Auswertung erfolgte mittels gepaartem *t*-Test. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied. Weitere Informationen zur Methodik und statistischen Auswertung sind dem Fließtext zu entnehmen. eNOS = endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase, AU = arbitrary unit, OM = osteogenes Differenzierungsmedium, n = Anzahl biologischer Replikate. Eigene Anfertigung.

iNOS: In zwei separaten Versuchsansätzen (n = 9 bzw. n = 4) konnte bei den DSC keine auswertbare Bande bei der erwarteten Molekülgröße (135 kDa) detektiert werden. Im ersten Versuch trat bei den in OM stimulierten DSC eine Bande bei ~ 90-100 kDa auf, im zweiten Versuch bei ~ 60 kDa (siehe **Abb. 42: Western-Blot zur Darstellung der iNOS-Expression, Nachweisversuch 1** und **Abb. 43: Western-Blot zur Darstellung der iNOS-Expression, Nachweisversuch 2**). Dabei wurden die DSC im zweiten Versuch nicht mittels OM stimuliert, sondern mittels Standardmedium mit jeweils 500 U/ml IL-1, TNF- α und IFN- γ (siehe **Abb. 45: Darstellung DSC in Standardmedium** und **Abb. 46: Darstellung mit Zytokinen stimulierte DSC**). Daran könnte auch die unterschiedliche Höhe der detektierten Banden liegen.

Nur die mit 1 μ g/ml Lipopolysaccharid sowie 50 U/ml Interferon- γ stimulierten RAW 264.7-Zellen zeigten eine deutliche Bande bei 135 kDa (siehe **Abb. 42: Western-Blot zur Darstellung der iNOS-Expression, Nachweisversuch 1**, **Abb. 43: Western-Blot zur Darstellung der iNOS-Expression, Nachweisversuch** und **Abb. 44: Vergleich der un- und stimulierten iNOS-Expression**). Dies wurde auch so erwartet, da iNOS nicht konstitutiv exprimiert wird, sondern nur nach Stimulation. Eine

statistische Auswertung war aufgrund fehlender Signale in den meisten Proben nicht möglich.

iNOS (ca. 135 kDa in RAW 264.7-Zellen, hier ca. 100 kDa)

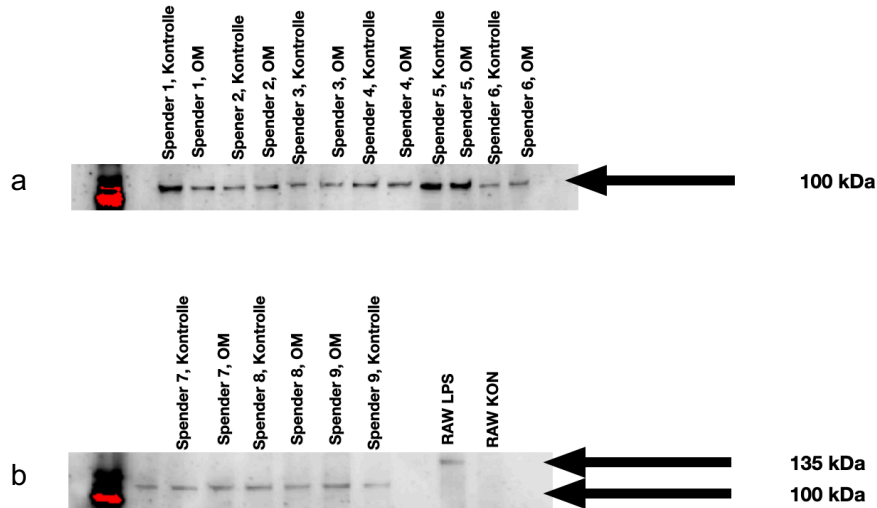


Abb. 42: Western-Blot zur Darstellung der iNOS-Expression, Nachweisversuch 1

Western-Blot zur versuchten Darstellung der iNOS-Expression bei ca. 135 kDa in DSC aus acht Spendern, kultiviert in Standardmedium (Kontrolle) und osteogenem Differenzierungsmedium (OM). Die Proben wurden jeweils paarweise (Kontrolle und OM) für neun Spender (Spender 2 in zwei Passagen) sowie für die Zelllinie RAW 264.7 (un- und stimuliert mit 1 µg/ml LPS und 50 U/ml IFN-γ) aufgetragen. Teil (a) zeigt die Banden der Spender 1–6, Teil (b) die der Spender 7–9 sowie der RAW 264.7-Zellen. Bei Spender 9 und den RAW 264.7-Zellen entspricht die Reihenfolge: zuerst OM, dann Kontrolle. Der Pfeil auf der rechten Seite markiert die Höhe der auszuwertenden Banden, wobei sich nur für die stimulierten RAW 264.7-Zellen eine Bande bei 135 kDa ergab. Allerdings ließen sich Banden für die osteogen stimulierten DSC bei ca. 90 - 100 kDa erkennen (siehe Pfeile). Die Analyse erfolgte mit n = 9 biologischen Replikaten sowie der RAW 264.7-Zelllinie. iNOS = induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase, DSC = dentale Stromazellen, OM = osteogenes Differenzierungsmedium, RAW = RAW 264.7-Zellen, RAW LPS = RAW 264.7-Zellen stimuliert mit 50 U/ml IFN-γ und 1 µg/ml LPS, IFN-γ = Interferon-gamma, LPS = Lipopolysaccharid, KON = Kontrolle, n = Anzahl biologischer Replikate, kDa = Kilodalton, µg = Mikrogramm, ml = Milliliter, U = *Unit*. Eigene Anfertigung.

iNOS (ca. 135 kDa)

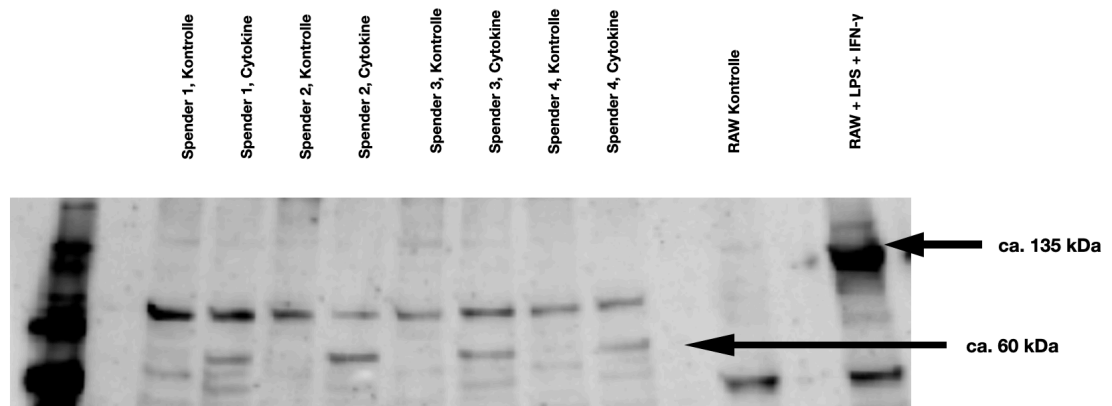


Abb. 43: Western-Blot zur Darstellung der iNOS-Expression, Nachweisversuch 2

Western-Blot zur versuchten Darstellung der iNOS-Expression bei ca. 135 kDa in DSC aus acht Spendern, kultiviert in Standardmedium (Kontrolle) und osteogenem Differenzierungsmedium (OM). Die Proben wurden jeweils paarweise (Kontrolle und stimuliert mit jeweils 500 U/ml IL-1, TNF- α und IFN- γ = Cytokine) für vier Spender sowie für die Zelllinie RAW 264.7 (un- und stimuliert mit 1 μ g/ml LPS und 50 U/ml IFN- γ) aufgetragen. Teil (a) zeigt die Banden der Spender 1–6, Teil (b) die der Spender 7–9 sowie der RAW 264.7-Zellen. Bei Spender 9 und den RAW 264.7-Zellen entspricht die Reihenfolge: zuerst OM, dann Kontrolle. Der Pfeil auf der rechten Seite markiert die auszuwertenden Banden, wobei sich für die DSC und die RAW 264.7-Kontrolle erneut keine Banden bei 135 kDa ergaben. Hier ließen sich für die stimulierten DSC jedoch Banden auf Höhe von ca. 60 kDa darstellen. Lediglich für die stimulierten RAW 264.7-Zellen zeigt sich eine Proteinexpression bei 135 kDa (siehe Pfeil). Die Analyse erfolgte mit $n = 4$ biologischen Replikaten sowie der RAW 264.7-Zelllinie. iNOS = induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase, DSC = dentale Stromazellen, OM = osteogenes Differenzierungsmedium, RAW = RAW 264.7-Zellen, IL-1 = Interleukin-1, TNF- α = Tumornekrosefaktor-alpha, IFN- γ = Interferon-gamma, RAW + LPS + IFN- γ = RAW 264.7-Zellen stimuliert mit 50 U/ml IFN- γ und 1 μ g/ml LPS, LPS = Lipopolysaccharid, KON = Kontrolle, n = Anzahl biologischer Replikate, kDa = Kilodalton, μ g = Mikrogramm, ml = Milliliter, U = *Unit*. Eigene Anfertigung.

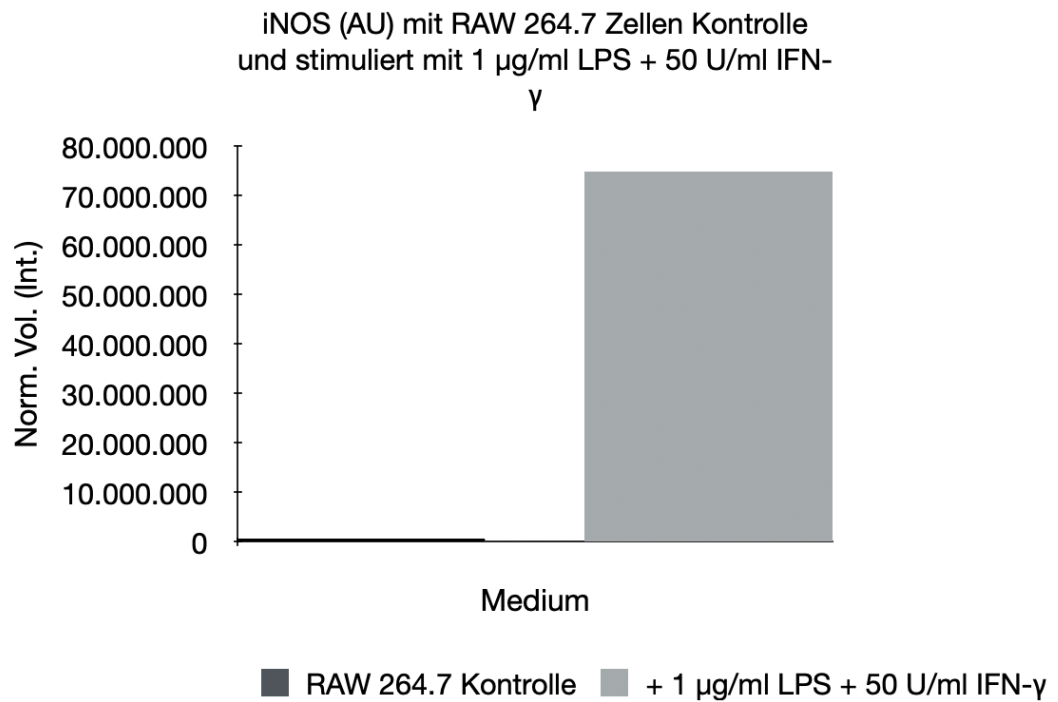
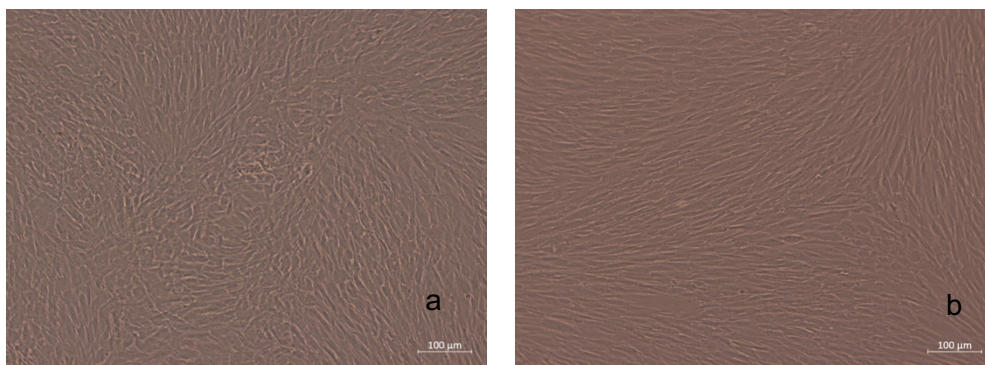


Abb. 44: Vergleich der un- und stimulierten iNOS-Expression

Dargestellt sind die Mittelwerte der iNOS-Expression für die RAW 264.7-Zellen im Kontrollmedium und stimuliert mit 1 µg/ml LPS sowie 50 U/ml IFN-γ. Kein Nachweis in den DSC. Die Messung basiert daher nur auf n = 1. Somit sind hier auch keine Standardabweichung und keine statistische Auswertung möglich. Klare Induktion in stimulierten RAW 264.7-Zellen. Weitere Informationen zur Methodik und statistischen Auswertung sind dem Fließtext zu entnehmen. iNOS = induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase, AU = *arbitrary unit*, Norm. Vol. = *Normalized Volume*, Int. = *Intensity*, OM = osteogenes Differenzierungsmedium, n = Anzahl biologischer Replikate, LPS = Lipopolysaccharid, IFN-γ = Interferon-gamma, DSC = dentale Stromazellen, µg = Mikrogramm, ml = Milliliter, U = *Unit*. Eigene Anfertigung.



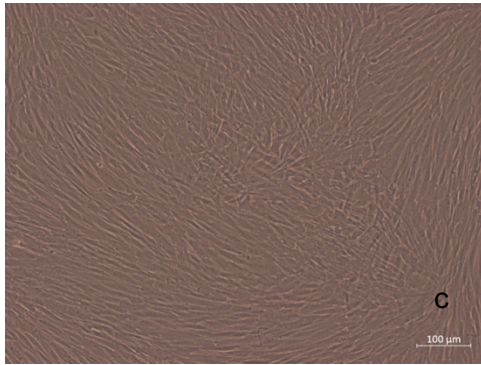


Abb. 45: Darstellung DSC in Standardmedium

Gezeigt sind lichtmikroskopische Aufnahmen von DSC in einer 6-Well-Platte unter Standardkulturbedingungen. Die Aufnahmen wurden bei 10-facher Vergrößerung aufgenommen. Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm. **(a)** zeigt Zellen eines Spenders (DSC-210121-1) in Passage 3; **(b)** und **(c)** zeigen Zellen eines weiteren Spenders (DSC-210204-3) in Passage 4. Weitere Informationen zu den experimentellen Bedingungen sind dem Fließtext zu entnehmen. DSC = dentale Stromazellen, µm = Mikrometer. Eigene Anfertigung.

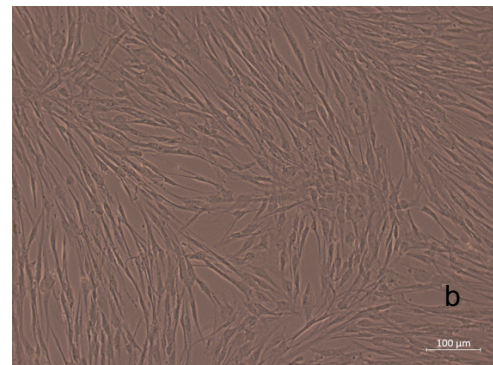
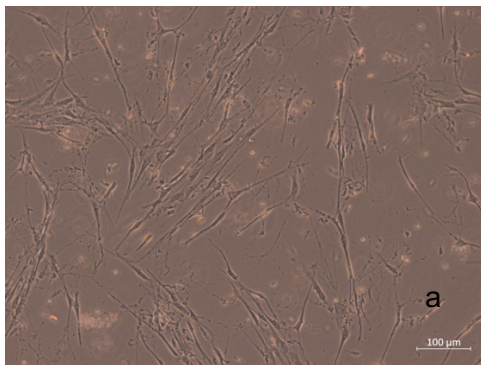


Abb. 46: Darstellung mit Zytokinen stimulierte DSC

Gezeigt sind lichtmikroskopische Aufnahmen von stimulierten DSC in einer 6-Well-Platte. Die Stimulation erfolgte mit jeweils 500 U/ml IL-1, TNF-α und IFN-γ in Standardmedium. Die Aufnahmen wurden bei 10-facher Vergrößerung aufgenommen. Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm. **(a)** zeigt Zellen eines Spenders (DSC-210121-1) in Passage 3; **(b)** zeigt die Zellen eines weiteren Spenders (DSC-210204-3) in Passage 4. Weitere Informationen zu den experimentellen Bedingungen sind dem Fließtext zu entnehmen. DSC = dentale Stromazellen, IL-1 = Interleukin-1, TNF-α = Tumornekrosefaktor-alpha, IFN-γ = Interferon-gamma, U = *Unit*, ml = Milliliter, µm = Mikrometer. Eigene Anfertigung.

3.3.2 Spenderspezifische Unterschiede

Vergleicht man die unterschiedliche Proteinexpression der einzelnen Spender, lässt sich Folgendes bemerken:

Spender 1: Höhere Expression in OM für alle Marker außer CAT-1 (siehe **Abb. 47: Proteinexpression verschiedener Marker bei Spender 1**).

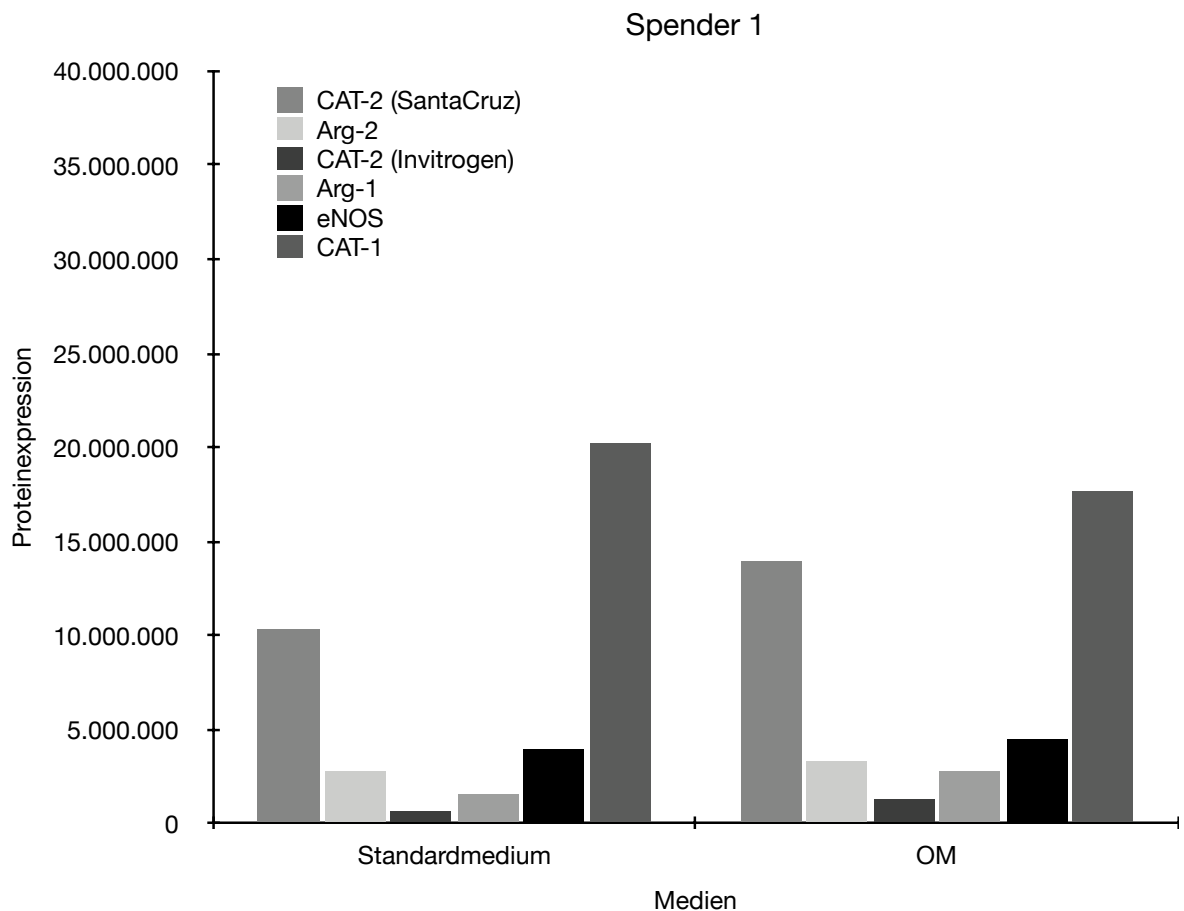


Abb. 47: Proteinexpression verschiedener Marker bei Spender 1

Dargestellt ist die Proteinexpression der untersuchten Enzyme im Western-Blot im direkten Vergleich zwischen Standardmedium (links) und osteogenem Differenzierungsmedium (rechts) für Spender 1. Das individuelle Expressionsmuster der untersuchten Marker wird hiermit visualisiert. Die Messung basiert daher nur auf $n = 1$. Somit sind hier auch keine Standardabweichung und keine statistische Auswertung möglich. Weitere Informationen zur Methodik und Interpretation finden sich im Fließtext. CAT = kationischer Aminosäuren-Transporter, Arg = Arginase, eNOS = endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase, OM = osteogenes Differenzierungsmedium, n = Anzahl biologischer Replikate. Eigene Anfertigung.

Spender 2:

- *Passage 3*: Höhere Expression unter OM für CAT-2 (SantaCruz), Arginase-2; höhere Expression im Standardmedium für CAT-2 (Invitrogen), CAT-1, Arginase-1; eNOS nahezu identisch. Insgesamt niedrigere Proteinexpression als in P5 (siehe **Abb. 48: Proteinexpression verschiedener Marker bei Spender 2 in P3**).
- *Passage 5*: Erhöhte Werte im Standardmedium für CAT-2 (SantaCruz), CAT-1, eNOS; niedrigere Werte für Arginase-1, -2 und CAT-2 (Invitrogen) (siehe **Abb. 49: Proteinexpression verschiedener Marker bei Spender 2 in P5**).

Spender 2, P3

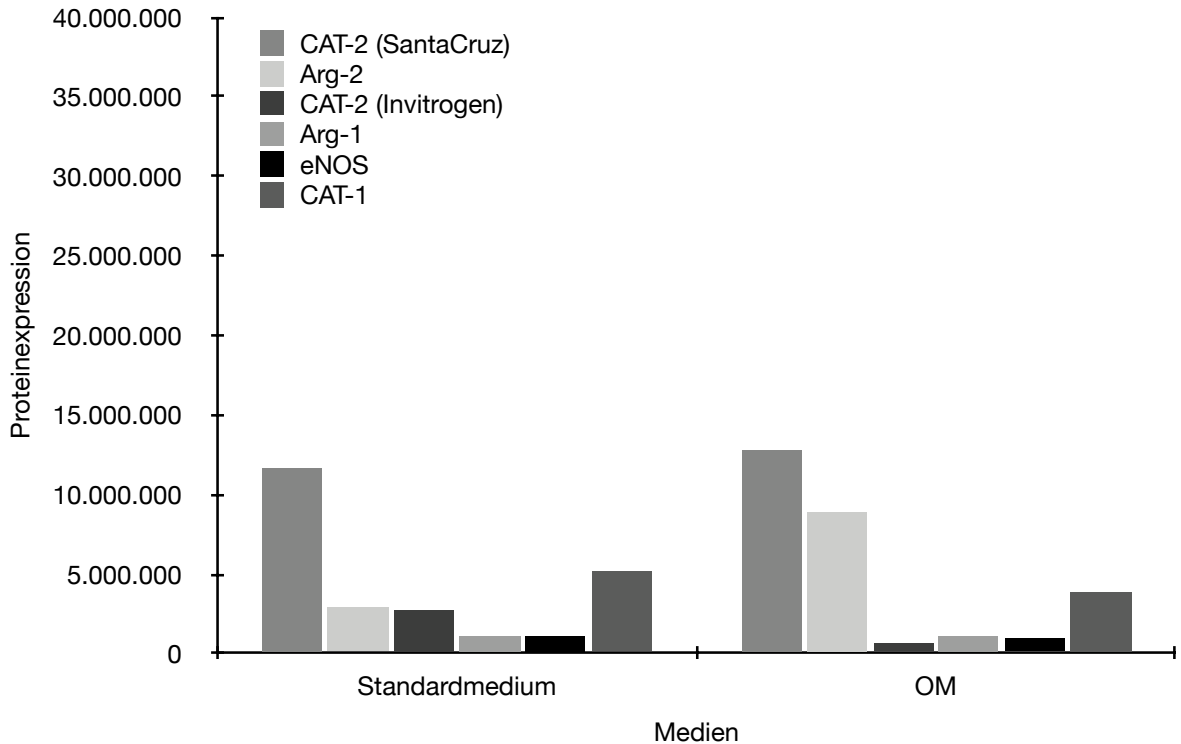


Abb. 48: Proteinexpression verschiedener Marker bei Spender 2 in P3

Dargestellt ist die Proteinexpression der untersuchten Enzyme im Western-Blot im direkten Vergleich zwischen Standardmedium (links) und osteogenem Differenzierungsmedium (rechts) für Spender 2 in Passage 3. Das individuelle Expressionsmuster der untersuchten Marker wird hiermit visualisiert. Die Messung basiert daher nur auf $n = 1$. Somit sind hier auch keine Standardabweichung und keine statistische Auswertung möglich. Weitere Informationen zur Methodik und Interpretation finden sich im Fließtext. CAT = kationischer Aminosäuren-Transporter, Arg = Arginase, eNOS = endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase, OM = osteogenes Differenzierungsmedium, P = Passage, n = Anzahl biologischer Replikate. Eigene Anfertigung.

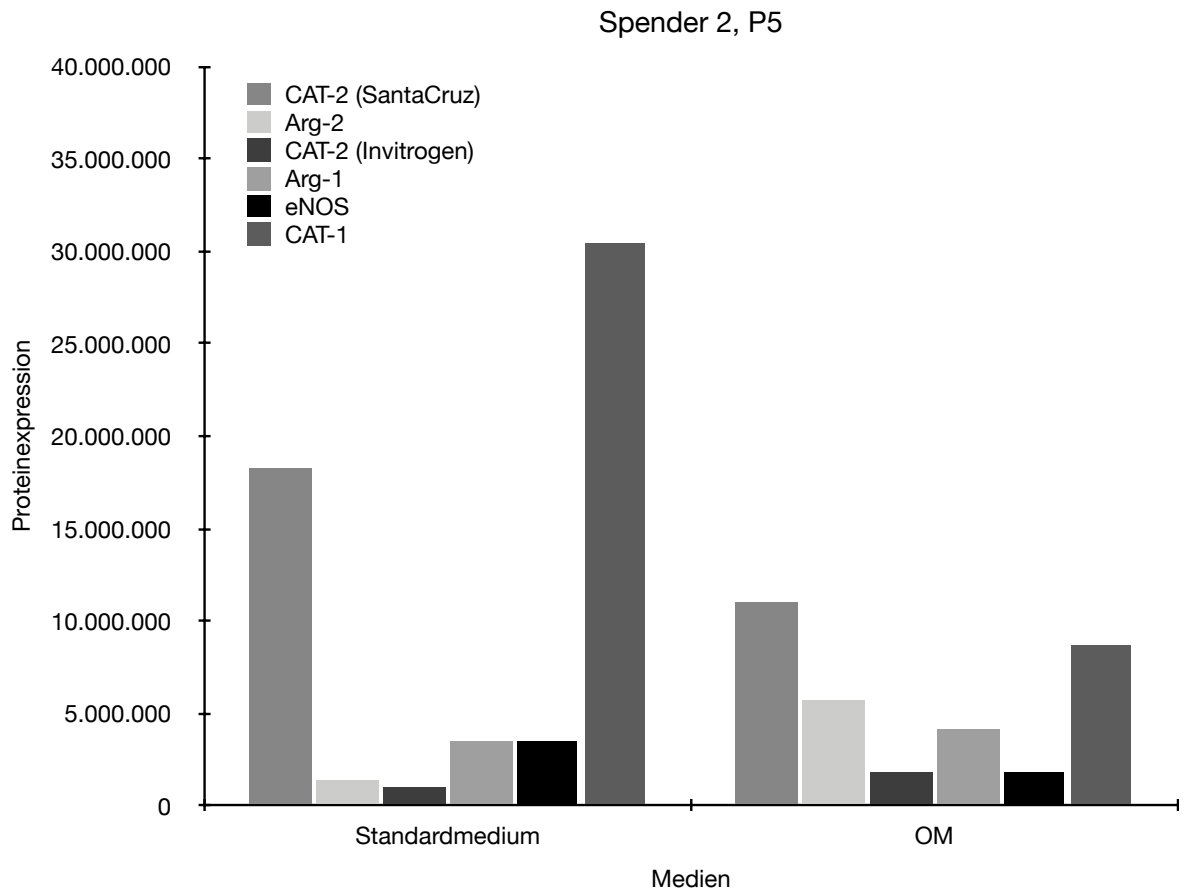


Abb. 49: Proteinexpression verschiedener Marker bei Spender 2 in P5

Dargestellt ist die Proteinexpression der untersuchten Enzyme im Western-Blot im direkten Vergleich zwischen Standardmedium (links) und osteogenem Differenzierungsmedium (rechts) für Spender 2 in Passage 5. Das individuelle Expressionsmuster der untersuchten Marker wird hiermit visualisiert. Die Messung basiert daher nur auf $n = 1$. Somit sind hier auch keine Standardabweichung und keine statistische Auswertung möglich. Weitere Informationen zur Methodik und Interpretation finden sich im Fließtext. CAT = kationischer Aminosäuren-Transporter, Arg = Arginase, eNOS = endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase, OM = osteogenes Differenzierungsmedium, P = Passage, n = Anzahl biologischer Replikate. Eigene Anfertigung.

Spender 3: Deutlich höhere Expression im OM für fast alle Marker, außer für CAT-1 und CAT-2 (Invitrogen) (siehe **Abb. 50: Proteinexpression verschiedener Marker bei Spender 3**).

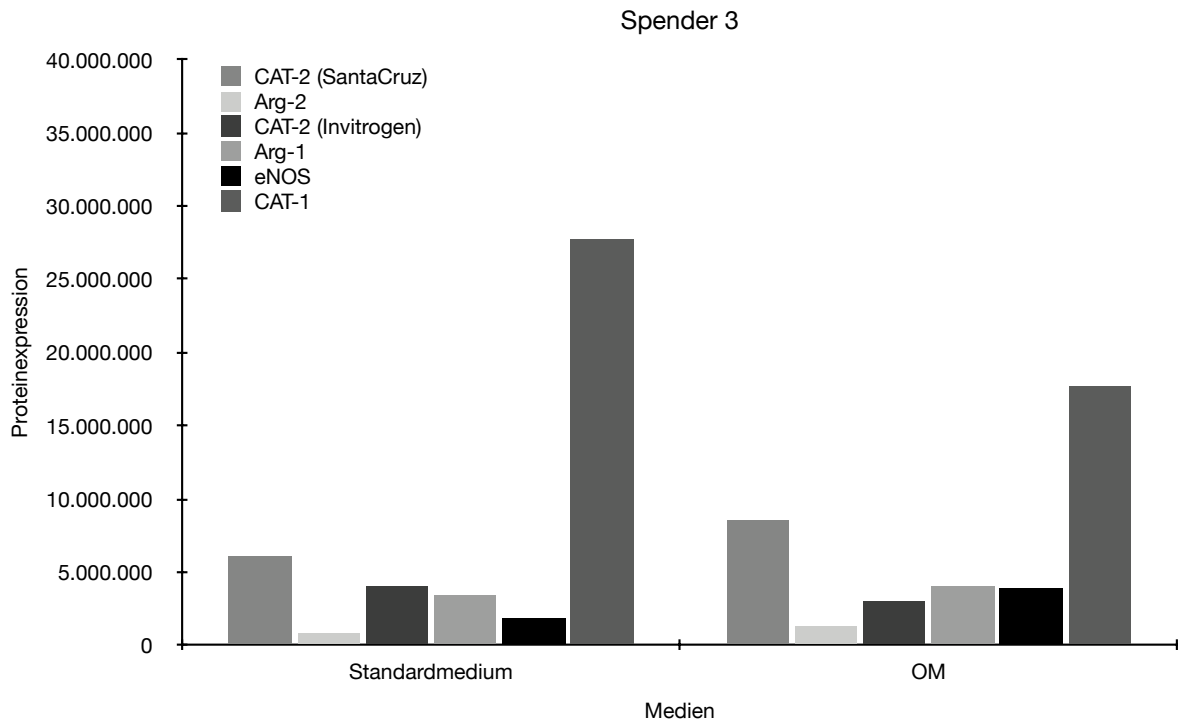


Abb. 50: Proteinexpression verschiedener Marker bei Spender 3

Dargestellt ist die Proteinexpression der untersuchten Enzyme im Western-Blot im direkten Vergleich zwischen Standardmedium (links) und osteogenem Differenzierungsmedium (rechts) für Spender 3. Das individuelle Expressionsmuster der untersuchten Marker wird hiermit visualisiert. Die Messung basiert daher nur auf $n = 1$. Somit sind hier auch keine Standardabweichung und keine statistische Auswertung möglich. Weitere Informationen zur Methodik und Interpretation finden sich im Fließtext. CAT = kationischer Aminosäuren-Transporter, Arg = Arginase, eNOS = endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase, OM = osteogenes Differenzierungsmedium, n = Anzahl biologischer Replikate. Eigene Anfertigung.

Spender 4 und 5: Höhere Proteinexpression im Standardmedium (Ausnahme: eNOS bei Spender 4) (siehe Abb. 51: Proteinexpression verschiedener Marker bei Spender und siehe Abb. 52: Proteinexpression verschiedener Marker bei Spender 5).

Spender 4

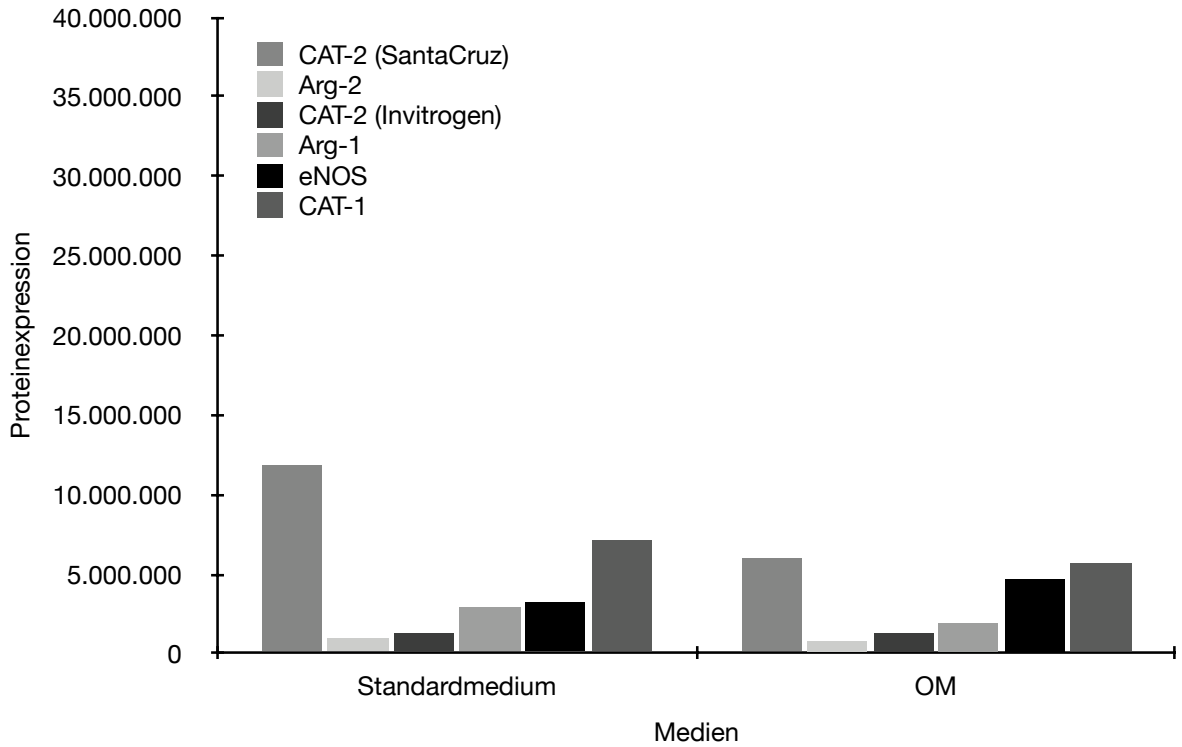


Abb. 51: Proteinexpression verschiedener Marker bei Spender 4

Dargestellt ist die Proteinexpression der untersuchten Enzyme im Western-Blot im direkten Vergleich zwischen Standardmedium (links) und osteogenem Differenzierungsmedium (rechts) für Spender 4. Das individuelle Expressionsmuster der untersuchten Marker wird hiermit visualisiert. Die Messung basiert daher nur auf $n = 1$. Somit sind hier auch keine Standardabweichung und keine statistische Auswertung möglich. Weitere Informationen zur Methodik und Interpretation finden sich im Fließtext. CAT = kationischer Aminosäuren-Transporter, Arg = Arginase, eNOS = endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase, OM = osteogenes Differenzierungsmedium, n = Anzahl biologischer Replikate. Eigene Anfertigung.

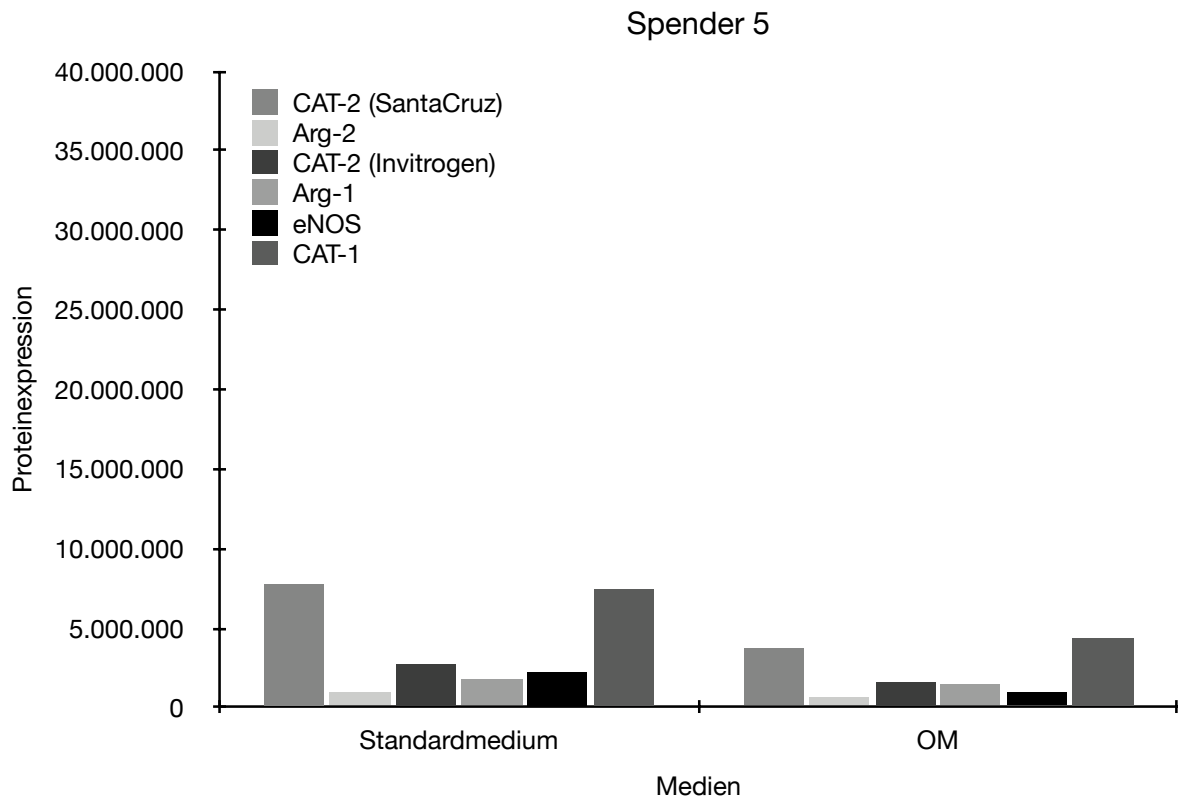


Abb. 52: Proteinexpression verschiedener Marker bei Spender 5

Dargestellt ist die Proteinexpression der untersuchten Enzyme im Western-Blot im direkten Vergleich zwischen Standardmedium (links) und osteogenem Differenzierungsmedium (rechts) für Spender 5. Das individuelle Expressionsmuster der untersuchten Marker wird hiermit visualisiert. Die Messung basiert daher nur auf $n = 1$. Somit sind hier auch keine Standardabweichung und keine statistische Auswertung möglich. Weitere Informationen zur Methodik und Interpretation finden sich im Fließtext. CAT = kationischer Aminosäuren-Transporter, Arg = Arginase, eNOS = endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase, OM = osteogenes Differenzierungsmedium, n = Anzahl biologischer Replikate. Eigene Anfertigung.

Spender 6: Höhere CAT-2-Expression (beide Antikörper) in OM; andere Marker im Standardmedium ausgeprägter (siehe **Abb. 53: Proteinexpression verschiedener Marker bei Spender 6**).

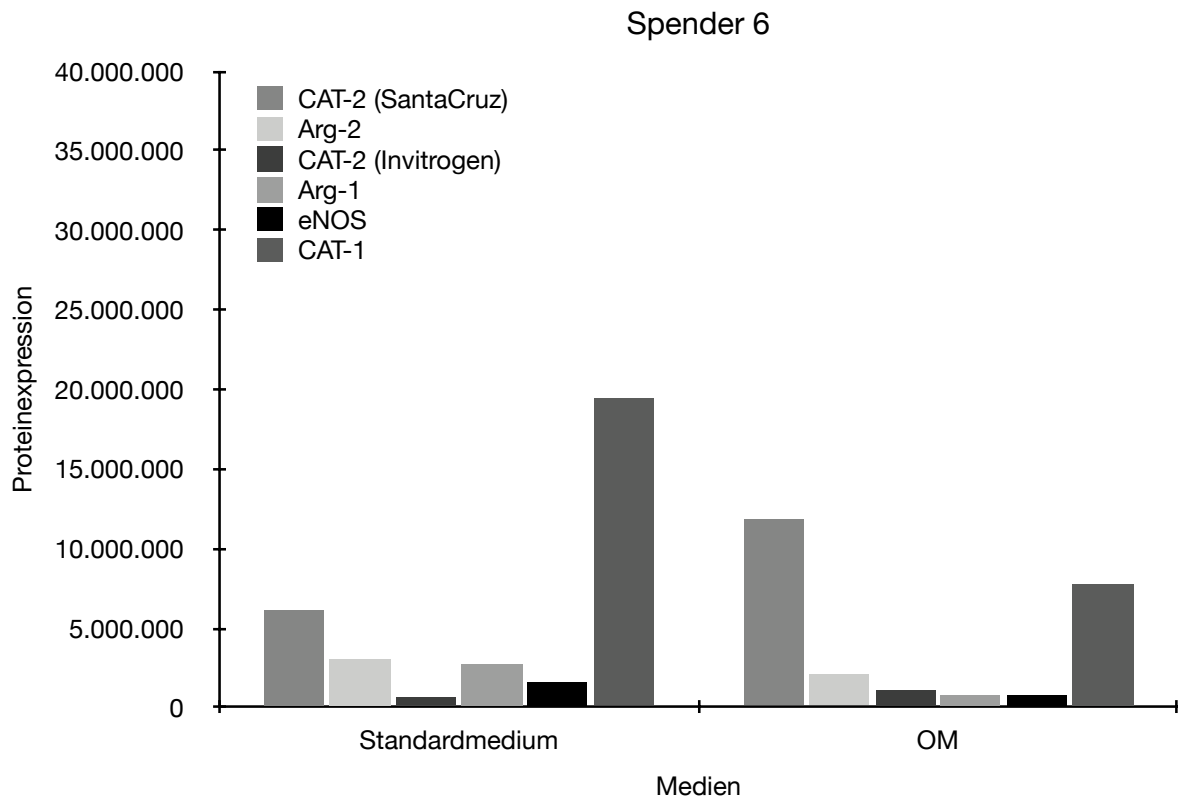


Abb. 53: Proteinexpression verschiedener Marker bei Spender 6

Dargestellt ist die Proteinexpression der untersuchten Enzyme im Western-Blot im direkten Vergleich zwischen Standardmedium (links) und osteogenem Differenzierungsmedium (rechts) für Spender 6. Das individuelle Expressionsmuster der untersuchten Marker wird hiermit visualisiert. Die Messung basiert daher nur auf $n = 1$. Somit sind hier auch keine Standardabweichung und keine statistische Auswertung möglich. Weitere Informationen zur Methodik und Interpretation finden sich im Fließtext. CAT = kationischer Aminosäuren-Transporter, Arg = Arginase, eNOS = endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase, OM = osteogenes Differenzierungsmedium, n = Anzahl biologischer Replikate. Eigene Anfertigung.

Spender 7: Höhere Expression in OM für Arginase-1, -2, CAT-2 (SantaCruz); andere Marker im Standardmedium (siehe **Abb. 54: Proteinexpression verschiedener Marker bei Spender 7**).

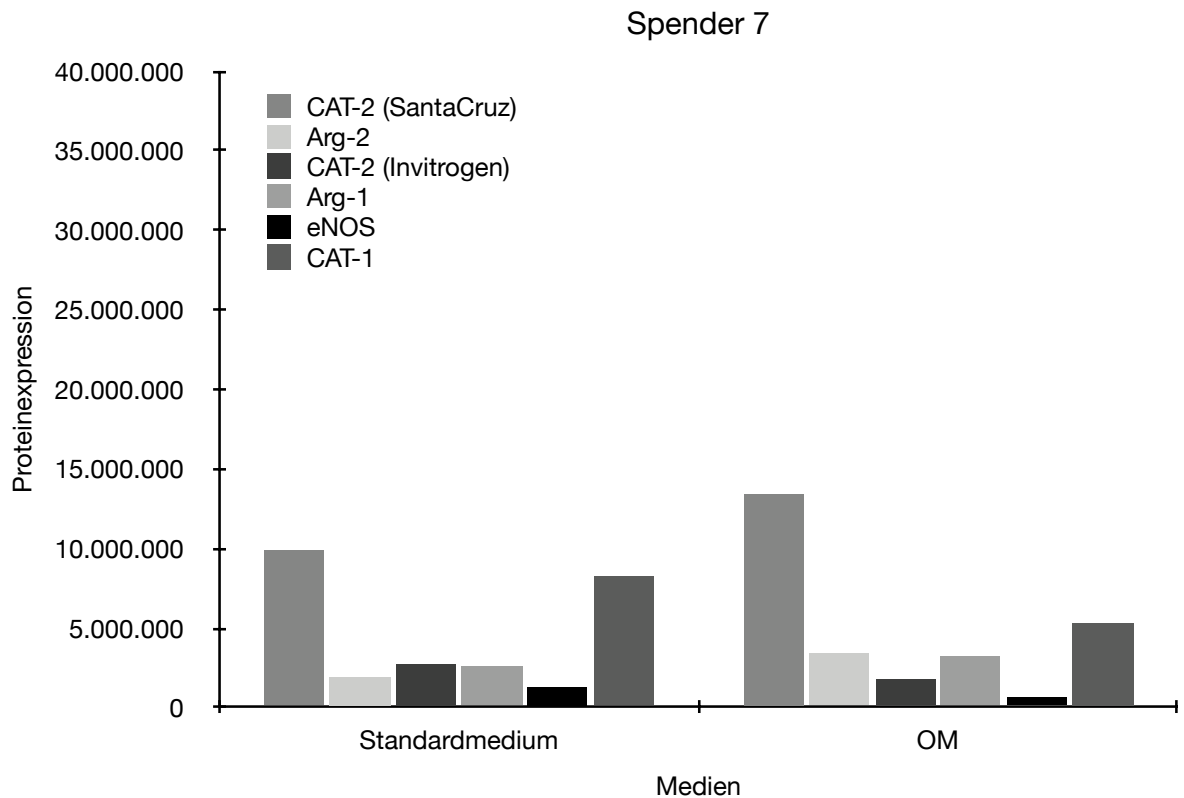


Abb. 54: Proteinexpression verschiedener Marker bei Spender 7

Dargestellt ist die Proteinexpression der untersuchten Enzyme im Western-Blot im direkten Vergleich zwischen Standardmedium (links) und osteogenem Differenzierungsmedium (rechts) für Spender 7. Das individuelle Expressionsmuster der untersuchten Marker wird hiermit visualisiert. Die Messung basiert daher nur auf $n = 1$. Somit sind hier auch keine Standardabweichung und keine statistische Auswertung möglich. Weitere Informationen zur Methodik und Interpretation finden sich im Fließtext. CAT = kationischer Aminosäuren-Transporter, Arg = Arginase, eNOS = endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase, OM = osteogenes Differenzierungsmedium, n = Anzahl biologischer Replikate. Eigene Anfertigung.

Spender 8: Erhöhte Expression in OM für alle Marker außer CAT-1 (siehe **Abb. 55: Proteinexpression verschiedener Marker bei Spender 8**).

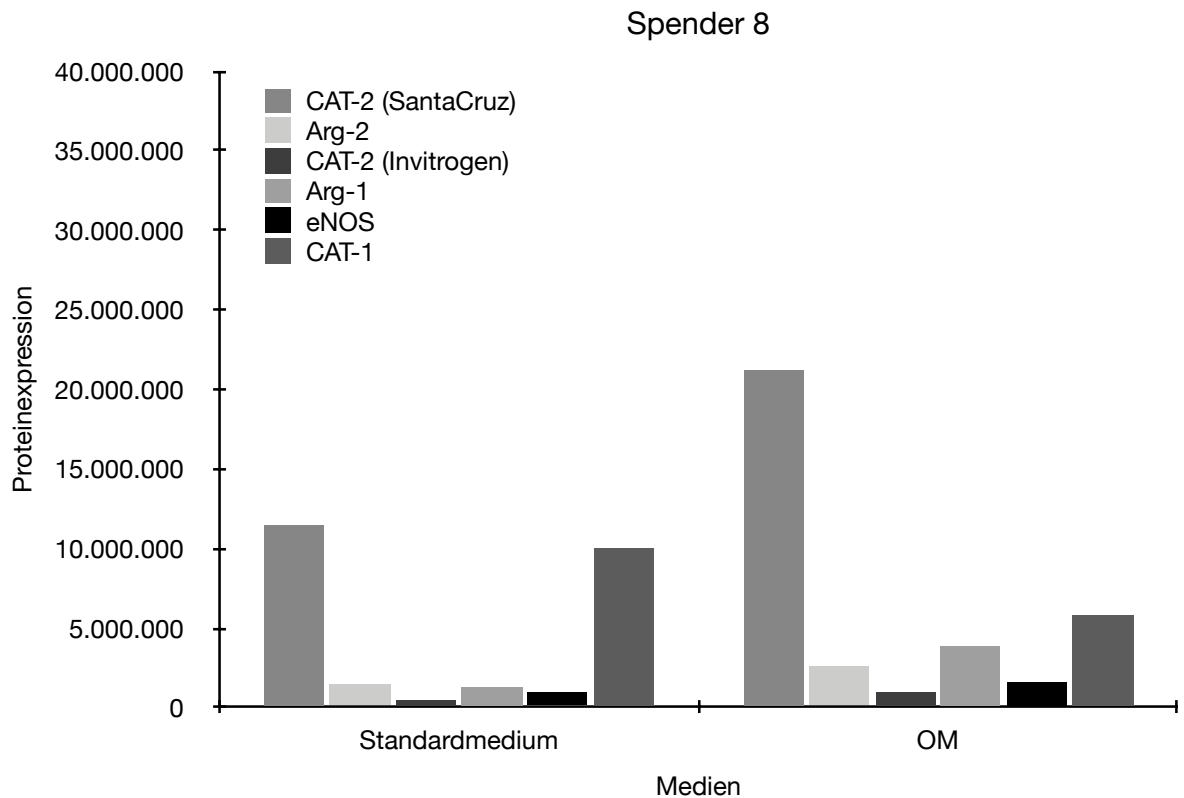


Abb. 55: Proteinexpression verschiedener Marker bei Spender 8

Dargestellt ist die Proteinexpression der untersuchten Enzyme im Western-Blot im direkten Vergleich zwischen Standardmedium (links) und osteogenem Differenzierungsmedium (rechts) für Spender 8. Das individuelle Expressionsmuster der untersuchten Marker wird hiermit visualisiert. Die Messung basiert daher nur auf $n = 1$. Somit sind hier auch keine Standardabweichung und keine statistische Auswertung möglich. Weitere Informationen zur Methodik und Interpretation finden sich im Fließtext. CAT = kationischer Aminosäuren-Transporter, Arg = Arginase, eNOS = endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase, OM = osteogenes Differenzierungsmedium, n = Anzahl biologischer Replikate. Eigene Anfertigung.

RAW 264.7: Deutlich stärkere Expression in mit 50 U/ml IFN- γ und 1 μ g/ml LPS stimulierten Zellen für Arginase-2, CAT-2 (beide Antikörper), CAT-1 und eNOS. Arginase-1 war in der unstimulierten Kontrolle höher exprimiert (siehe Abb. 56: Proteinexpression verschiedener Marker in RAW 264.7-Zellen). Besonders auffällig ist auch hier die extrem starke Expression von Arginase-2.

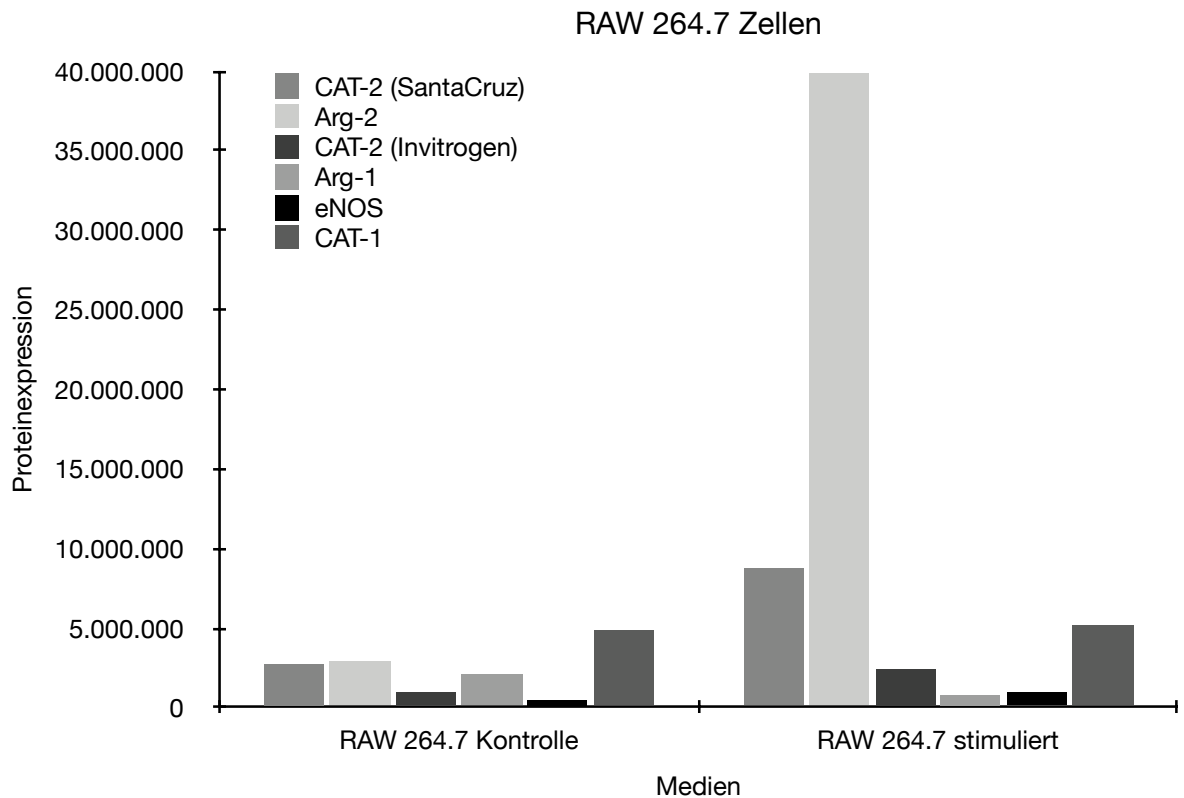


Abb. 56: Proteinexpression verschiedener Marker in RAW 264.7-Zellen

Dargestellt ist die Expression verschiedener Proteine in RAW 264.7-Zellen. Die linke Seite zeigt die Expression unter Standardkulturbedingungen (unstimuliert), die rechte Seite die Expression nach Stimulation mit 1 µg/ml LPS und 50 U/ml IFN-γ. Auffällig ist insbesondere die stark erhöhte Expression von Arginase-2 nach Stimulation. Die Messung basiert daher nur auf n = 1. Somit sind hier auch keine Standardabweichung und keine statistische Auswertung möglich. Weitere Informationen zu den experimentellen Bedingungen und zur Interpretation finden sich im Fließtext. CAT = kationischer Aminosäuren-Transporter, Arg = Arginase, eNOS = endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase, n = Anzahl biologischer Replikate, LPS = Lipopolysaccharid, IFN-γ = Interferon-gamma. Eigene Anfertigung.

3.3.3 Fazit

Die Western-Blot-Analyse ergab für die meisten untersuchten Enzyme keine signifikanten Unterschiede zwischen Kultivierung in osteogenem Differenzierungsmedium und Standardmedium. Lediglich für CAT-1 zeigte sich eine signifikant höhere Expression im Standardmedium. Die Ergebnisse deuten auf eine hohe interindividuelle Variabilität zwischen den Spendern hin, was eine Interpretation potenzieller regulatorischer Effekte erschwert. Die Rolle einzelner Transporter und Enzyme im Verlauf der Differenzierung bedarf daher weiterführender Untersuchungen, idealerweise mit größerem Spenderkollektiv und komplementären Nachweismethoden.

3.4 Differenzierungsversuche

3.4.1 Allgemeines

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Differenzierungsversuche gliedern sich in zwei Teile. Im ersten Teil kam als L-Arginin-freies Medium ein RPMI-Medium zum Einsatz, während im zweiten Teil ein DMEM-Medium verwendet wurde. Der Wechsel des Mediums erfolgte aufgrund experimenteller Schwierigkeiten mit RPMI (siehe „Unterschiede der Grundmedien“).

Aufgrund der teilweise starken Variabilität der Ergebnisse – insbesondere zwischen den verwendeten Grundmedien – wurden die Achsenskalierungen der Diagramme jeweils an die Wertebereiche angepasst, um die Resultate bestmöglich darzustellen. Diese Anpassung ist bei der Interpretation der Ergebnisse zu berücksichtigen.

3.4.2 Auswertung erster Teil der Differenzierungsversuche

Die Versuche des ersten Teils wurden mit Zellen von insgesamt elf Spendern in den Passagen 2, 3 und 5 durchgeführt. Die osteogene Differenzierung wurde an den Zeitpunkten Tag 7 und Tag 14 untersucht. Aufgrund erster Beobachtungen wurde die Auswertung an Tag 7 im späteren Verlauf reduziert, da diese lediglich eine Momentaufnahme während der Differenzierung darstellte. Die Werte an Tag 14 zeigten stabilere und besser vergleichbare Resultate.

3.4.2.1 Ergebnisse erster Teil in OM

Bereits lichtmikroskopisch waren Unterschiede in der Morphologie und Mineralisierung der Zellen in den verschiedenen Medien erkennbar (siehe **Abb. 57: Osteogene Differenzierung in OM**, **Abb. 58: Osteogene Differenzierung in OM + 20 mM L-Valin**, **Abb. 59: Osteogene Differenzierung in OM + 10 mM L-Lysin + 10 mM L-Ornithin**, **Abb. 60: Osteogene Differenzierung in OM + 1 mM L-Arginin** und **Abb. 61: Osteogene Differenzierung in OM + 0,5 mM L-NIO**).

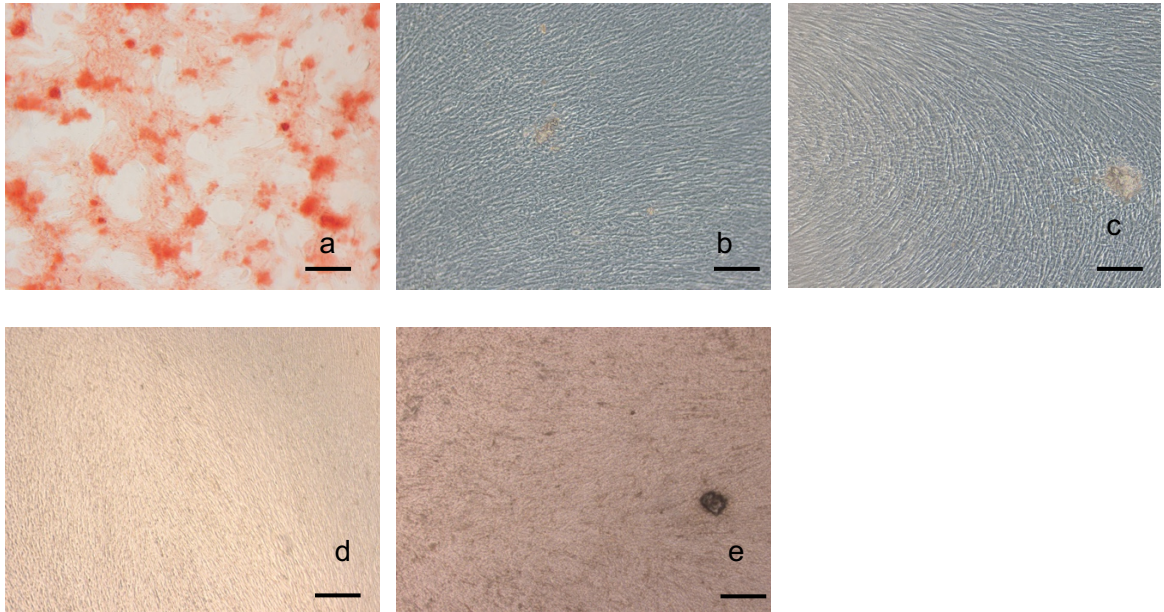


Abb. 57: Osteogene Differenzierung in OM – lichtmikroskopische Darstellung

Lichtmikroskopische Aufnahmen der osteogenen Differenzierung dentaler Stromazellen (DSC) nach Kultur in osteogenem Medium (OM). Die Aufnahmen wurden mit einer 10-fachen Vergrößerung angefertigt, Maßstabsbalken entsprechen 100 μm (Zeiss-Axioskop-40, Zen 3.0 *Blue*). Abbildung (a) zeigt Zellen des Spenders DSC-2011-19-02 an Tag 7, (b) und (c) zwei verschiedene Wells des Spenders DSC-201105-2 in Passage 5, (d) Zellen des Spenders DSC-201119-4 (P5) und (e) des Spenders DSC-201217 in Passage 2. Weitere Informationen zur Versuchsführung und Auswertung sind dem Fließtext zu entnehmen. OM = osteogenes Differenzierungsmedium, DSC = dentale Stromazellen, μm = Mikrometer. Eigene Anfertigung.

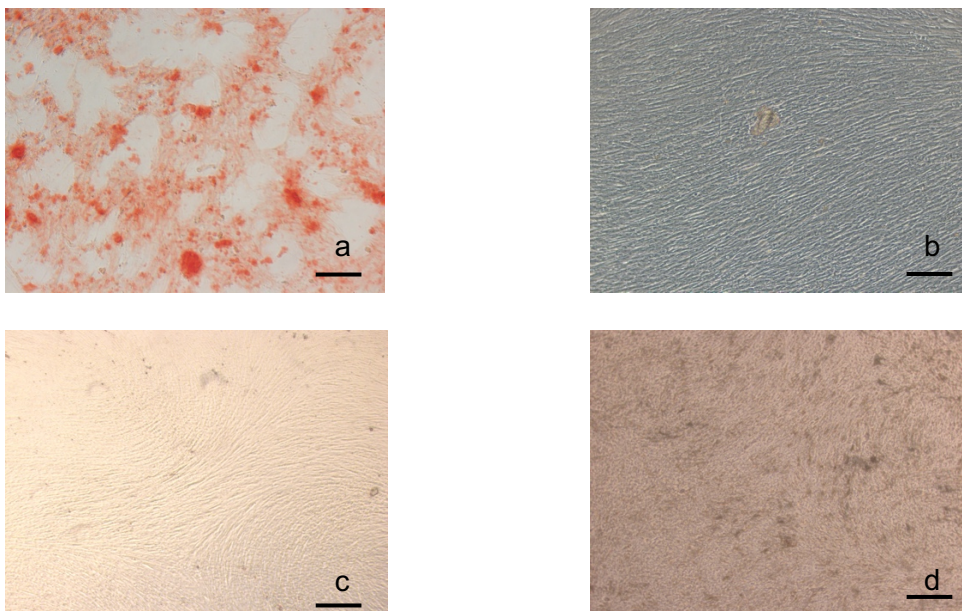


Abb. 58: Osteogene Differenzierung in OM + 20 mM L-Valin – lichtmikroskopische Darstellung

Lichtmikroskopische Darstellung der osteogenen Differenzierung in OM mit + 20 mM L-Valin. Aufnahmen mit 10x-Vergrößerung (Zeiss-Axioskop-40, Zen 3.0 *Blue*). Maßstabsbalken entsprechen 100 μm . Abbildung (a) zeigt Zellen von

DSC-2011-19-02 an Tag 7, **(b)** von DSC-201105-2 (P5), **(c)** Zellen von DSC-201119-4 (P5) und **(d)** von DSC-201217 (P2). Die Mineralisierung ist im Vergleich zu reinem OM tendenziell vermindert. Weitere Informationen zur Versuchsführung und Auswertung sind dem Fließtext zu entnehmen. OM = osteogenes Differenzierungsmedium, DSC = dentale Stromazellen, mM = Millimolar, μm = Mikrometer. Eigene Anfertigung.

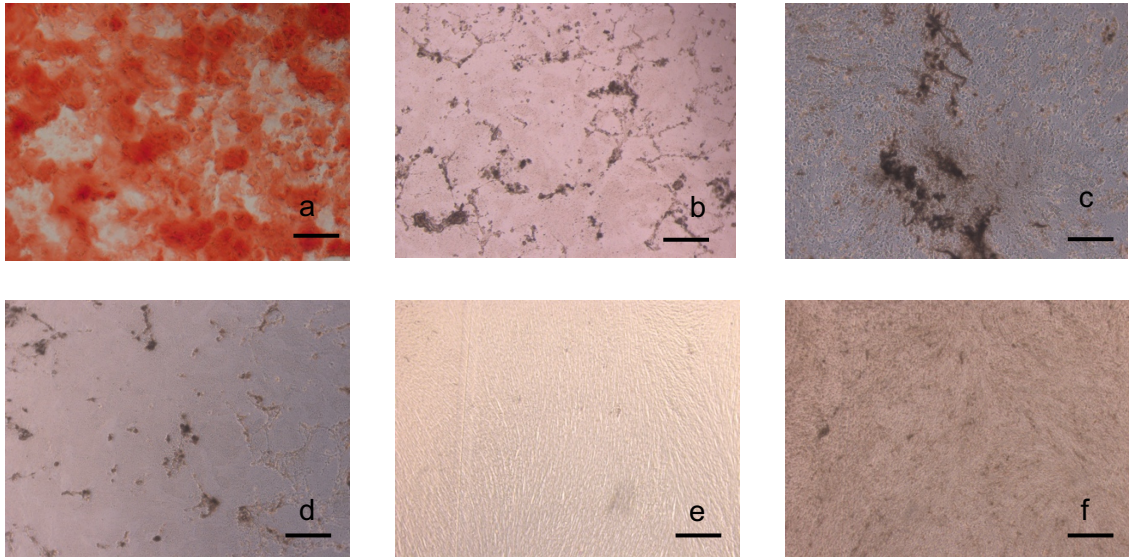
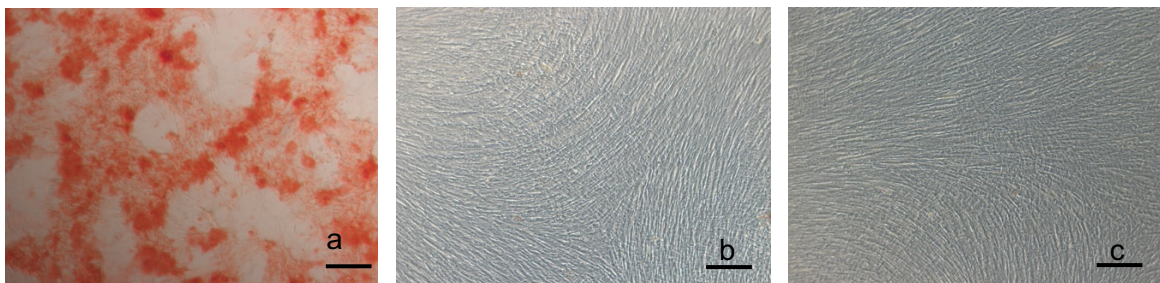


Abb. 59: Osteogene Differenzierung in OM + 10 mM L-Lysin + 10 mM L-Ornithin – lichtmikroskopische Darstellung

Lichtmikroskopische Aufnahmen der osteogenen Differenzierung in OM + 10 mM L-Lysin + 10 mM L-Ornithin. Die Aufnahmen wurden mit einer 10-fachen Vergrößerung angefertigt, Maßstabsbalken entsprechen 100 μm (Zeiss-Axioskop-40, Zen 3.0 Blue). Abbildung **(a)** zeigt Zellen des Spenders DSC-2011-19-02 an Tag 7, **(b)**, **(c)** und **(d)** zeigen verschiedene Wells des Spenders DSC-201105-2 in Passage 5, **(e)** Zellen des Spenders DSC-201119-4 (P5) und **(f)** des Spenders DSC-201217 in Passage 2. Eine Mineralisierungssteigerung der DSC wird durch eine kräftige Färbung gezeigt. Weitere Informationen zur Versuchsführung und Auswertung sind dem Fließtext zu entnehmen. OM = osteogenes Differenzierungsmedium, DSC = dentale Stromazellen, mM = Millimolar, μm = Mikrometer. Eigene Anfertigung.



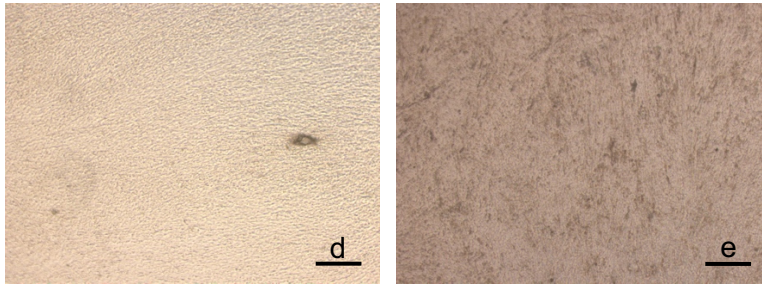


Abb. 60: Osteogene Differenzierung in OM + 1 mM L-Arginin – lichtmikroskopische Darstellung

Lichtmikroskopische Darstellung der osteogenen Differenzierung in OM mit + 1 mM L-Arginin. Aufnahmen mit 10x-Vergrößerung (Zeiss-Axioskop-40, Zen 3.0 *Blue*). Maßstabsbalken entsprechen 100 μm . Abbildung (a) zeigt Zellen von DSC-2011-19-02 an Tag 7, (b) und (c) von DSC-201105-2 (P5), (d) Zellen von DSC-201119-4 (P5) und (e) von DSC-201217 (P2). Die Kalzifizierung ist gegenüber dem Standard-OM leicht verstärkt. Weitere Informationen zur Versuchsführung und Auswertung sind dem Fließtext zu entnehmen. OM = osteogenes Differenzierungsmedium, DSC = dentale Stromazellen, mM = Millimolar, μm = Mikrometer. Eigene Anfertigung.

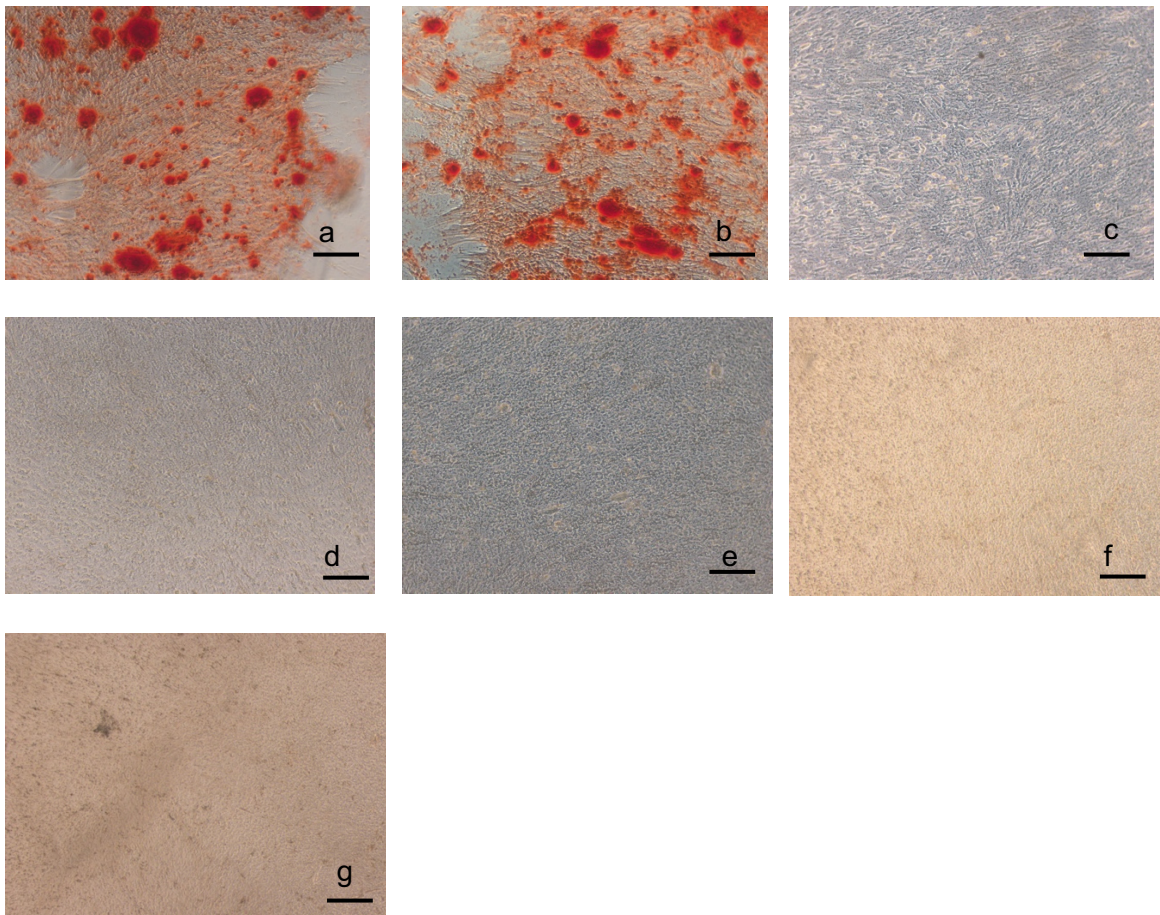


Abb. 61: Osteogene Differenzierung in OM + 0,5 mM L-NIO – lichtmikroskopische Darstellung

Lichtmikroskopische Darstellung der osteogenen Differenzierung in OM mit + 0,5 mM L-NIO. Aufnahmen mit 10x-Vergrößerung (Zeiss-Axioskop-40, Zen 3.0 *Blue*). Maßstabsbalken entsprechen 100 μm . Abbildung (a) und (b) zeigen Zellen von DSC-2011-19-02 an Tag 7, (c), (d) und (e) von DSC-201105-2 (P5), (f) Zellen von DSC-201119-4 (P5) und (g) von DSC-201217 (P2). Im Vergleich zu OM liegt eine verminderte Kalzifizierung vor. Weitere Informationen zur Versuchsführung und Auswertung sind dem Fließtext zu entnehmen. OM = osteogenes Differenzierungsmedium, DSC = dentale Stromazellen, mM = Millimolar, μm = Mikrometer. Eigene Anfertigung.

Versuchsführung und Auswertung sind dem Fließtext zu entnehmen. OM = osteogenes Differenzierungsmedium, DSC = dentale Stromazellen, L-NIO = L-N⁵-(1-Aminoethyl)-Ornithin, mM = Millimolar, µm = Mikrometer. Eigene Anfertigung.

Insgesamt ließ sich für alle Medien eine signifikante Steigerung der osteogenen Differenzierung über den Beobachtungszeitraum nachweisen.

Zwischen Tag 0 und Tag 7 ergaben sich signifikante Unterschiede in den folgenden Medien (siehe **Abb. 62: Kalzifizierung in OM, Teil 1, Tag 7**):

- OM: $p < 0,016$, Cohen's $d = 1,46$
- OM + 20 mM L-Valin: $p < 0,027$, $d = 1,261$
- OM + 10 mM L-Lysin + 10 mM L-Ornithin: $p < 0,002$, $d = 2,341$
- OM + 1 mM L-Arginin: $p < 0,041$, $d = 1,117$
- OM + 0,5 mM L-NIO: $d = 1,023$

Nach Bonferroni-Korrektur blieb nur der Vergleich OM + 10 mM L-Lysin + 10 mM L-Ornithin vs. Tag 0 signifikant ($p < 0,034$).

Zwischen Tag 0 und Tag 7 zeigte sich in allen getesteten Medien eine signifikante Zunahme der osteogenen Differenzierung mit mittleren bis starken Effektstärken (Cohen's $d > 1,0$), wobei der Zusatz von L-Lysin und L-Ornithin den deutlichsten Effekt erzielte. Nach Bonferroni-Korrektur blieb jedoch nur dieser Unterschied statistisch signifikant, was auf einen besonders ausgeprägten Einfluss dieser Kombination auf die frühe Mineralisierungsdynamik hindeutet.

Vergleiche zwischen den Medien an **Tag 7** (siehe **Abb. 62: Kalzifizierung in OM, Teil 1, Tag 7**):

- OM vs. OM + L-Lysin/L-Ornithin: $p < 0,041$, $d = 1,117$
- OM + L-Valin vs. OM + L-Lysin/L-Ornithin: $p < 0,044$, $d = 1,093$
- OM + L-Lysin/L-Ornithin vs. OM + L-NIO: $p < 0,017$, $d = 1,425$

Nach Bonferroni-Korrektur ergaben sich hier jedoch keine signifikanten Unterschiede mehr.

An Tag 7 zeigten sich im direkten Vergleich einzelner Medien signifikante Unterschiede in der Kalzifizierung zugunsten des Zusatzes von L-Lysin und L-Ornithin. Dabei wiesen OM + L-Lysin/L-Ornithin im Vergleich zu OM, OM + L-Valin sowie OM + L-NIO jeweils signifikant höhere Werte auf ($p < 0,05$). Die Effektstärken (Cohen's d zwischen 1,093 und 1,425) deuten auf einen mittel- bis stark ausgeprägten Einfluss hin. Nach Bonferroni-Korrektur blieben diese Unterschiede jedoch nicht mehr signifikant, was auf eine erhöhte Wahrscheinlichkeit von α -Fehlern bei multiplen Vergleichen hinweist.

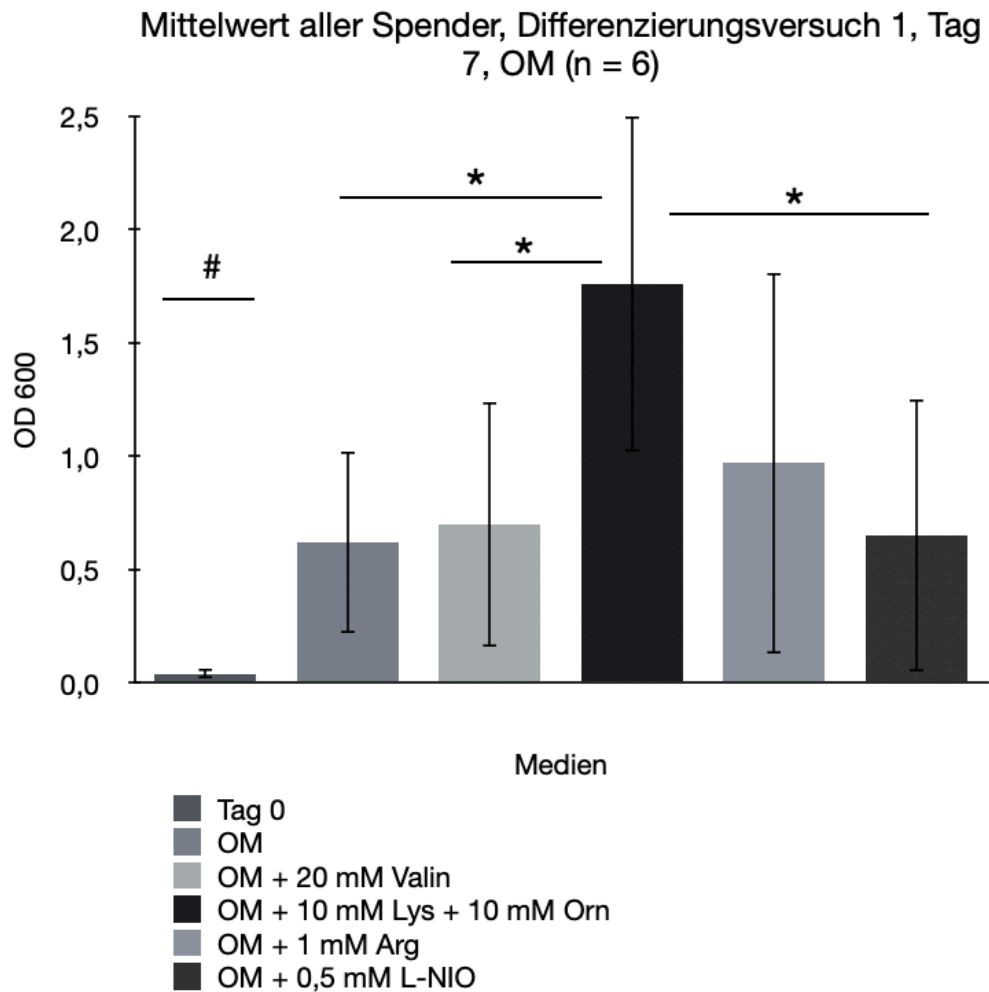


Abb. 62: Kalzifizierung in OM, Teil 1, Tag 7

Dargestellt ist die osteogene Kalzifizierung dentaler Stromazellen (DSC) in verschiedenen Medien an Tag 7 anhand der optischen Dichte bei 600 nm (OD 600). Gezeigt werden die Mittelwerte \pm Standardabweichung der Messungen von $n = 6$ Spendern in folgenden Medien: osteogenes Differenzierungsmedium (OM), OM + 20 mM L-Valin, OM + 10 mM L-Lysin + 10 mM L-Ornithin, OM + 1 mM L-Arginin und OM + 0,5 mM L-NIO. Deutlich höhere Mineralisierungsgrade in OM + L-Lysin/L-Ornithin im Vergleich zu den anderen Gruppen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels gepaartem t -Test. Signifikante Unterschiede zwischen einzelnen Gruppen erkennbar und für mehrere Bedingungen Cohen's $d > 0,8$. Nach Bonferroni-Korrektur zeigte sich jedoch nur noch beim Vergleich von Tag 0 und OM + L-Lysin/L-Ornithin ein statistisch signifikanter Unterschied. Statistische Markierung: Ein Stern entspricht $p < 0,05$. # kennzeichnet einen statistisch signifikanten Unterschied im Vergleich zu allen anderen Bedingungen, mit Ausnahme von OM + L-NIO. Weitere Informationen zur Versuchsführung und Auswertung sind dem Fließtext zu entnehmen. OD 600 = optische Dichte bei 600 nm, OM = osteogenes Differenzierungsmedium, Val = L-Valin, Lys = L-Lysin, Orn = L-Ornithin, Arg = L-Arginin, L-NIO = L-N⁵-(1-Aminoethyl)-Ornithin, DSC = dentale Stromazellen, n = Anzahl biologischer Replikate, mM = Millimolar. Eigene Anfertigung.

Zwischen Tag 0 und Tag 14 waren die Steigerungen noch ausgeprägter (siehe **Abb. 63: Kalzifizierung in OM, Teil 1, Tag 14**):

- OM: $p < 0,001$ (Bonferroni-korrigiert $p < 0,003$), $d = 1,721$
- OM + L-Valin: $p < 0,001$ ($p < 0,019$), $d = 1,342$
- OM + L-Lysin/L-Ornithin: $p < 0,001$ ($p < 0,004$), $d = 1,654$
- OM + L-Arginin: $p < 0,001$ ($p < 0,008$), $d = 1,518$
- OM + L-NIO: $p < 0,001$ ($p < 0,002$), $d = 1,815$

Zwischen Tag 0 und Tag 14 zeigte sich in allen getesteten Bedingungen eine signifikante und zum Teil ausgeprägt starke Zunahme der osteogenen Differenzierung, wobei sämtliche p -Werte auch nach Bonferroni-Korrektur statistisch signifikant blieben. Die Effektstärken (Cohen's d zwischen 1,342 und 1,815) bestätigen eine deutliche Differenzierungsdynamik über den Untersuchungszeitraum hinweg. Besonders hervorzuheben ist die starke Wirkung von OM + 0,5 mM L-NIO, das die höchste Effektstärke aufwies.

An **Tag 14** zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied zwischen (siehe **Abb. 63: Kalzifizierung in OM, Teil 1, Tag 14**):

- OM vs. OM + L-NIO: $p < 0,032$
- OM + L-Valin vs. OM + L-Lysin/L-Ornithin: $p < 0,006$, $d = 1,047$
- OM + L-Lysin/L-Ornithin vs. OM + L-NIO: $p < 0,01$, $d = 0,952$
- OM + L-Arginin vs. OM + L-Valin: $p < 0,017$, $d = 0,863$

Auch hier entfielen die signifikanten Unterschiede nach Bonferroni-Korrektur.

Die Standardabweichungen lagen je nach Medium und Zeitpunkt zwischen 0,02 (Tag 0) und 3,58 (Tag 14, OM + L-Lysin/L-Ornithin).

Auch an Tag 14 konnten signifikante Unterschiede zwischen einzelnen Medien festgestellt werden. Insbesondere zeigte OM + L-Lysin/L-Ornithin eine im Vergleich zu OM + L-Valin signifikant höhere Kalzifizierung ($p < 0,006$; $d = 1,047$), ebenso wie im Vergleich zu OM + L-NIO ($p < 0,01$; $d = 0,952$). Zudem war die Mineralisierung in OM signifikant höher als in OM + L-NIO ($p < 0,032$), während sich auch zwischen OM + L-Arginin und OM + L-Valin ein signifikanter Unterschied zugunsten von L-Arginin zeigte ($p < 0,017$; $d = 0,863$). Die Effektstärken deuten auf moderat bis stark ausgeprägte Unterschiede hin. Allerdings verloren alle Unterschiede nach Bonferroni-Korrektur ihre statistische Signifikanz, was auf die begrenzte Aussagekraft einzelner Vergleiche bei kleiner Stichprobe und multipler Testung hinweist. Die zum Teil hohen Standardabweichungen, insbesondere in OM + L-Lysin/L-Ornithin (bis zu 3,58 an Tag 14), unterstreichen zusätzlich die interindividuelle Variabilität.

Mittelwert aller Spender, Differenzierungsversuch 1, Tag 14, OM (n = 11)

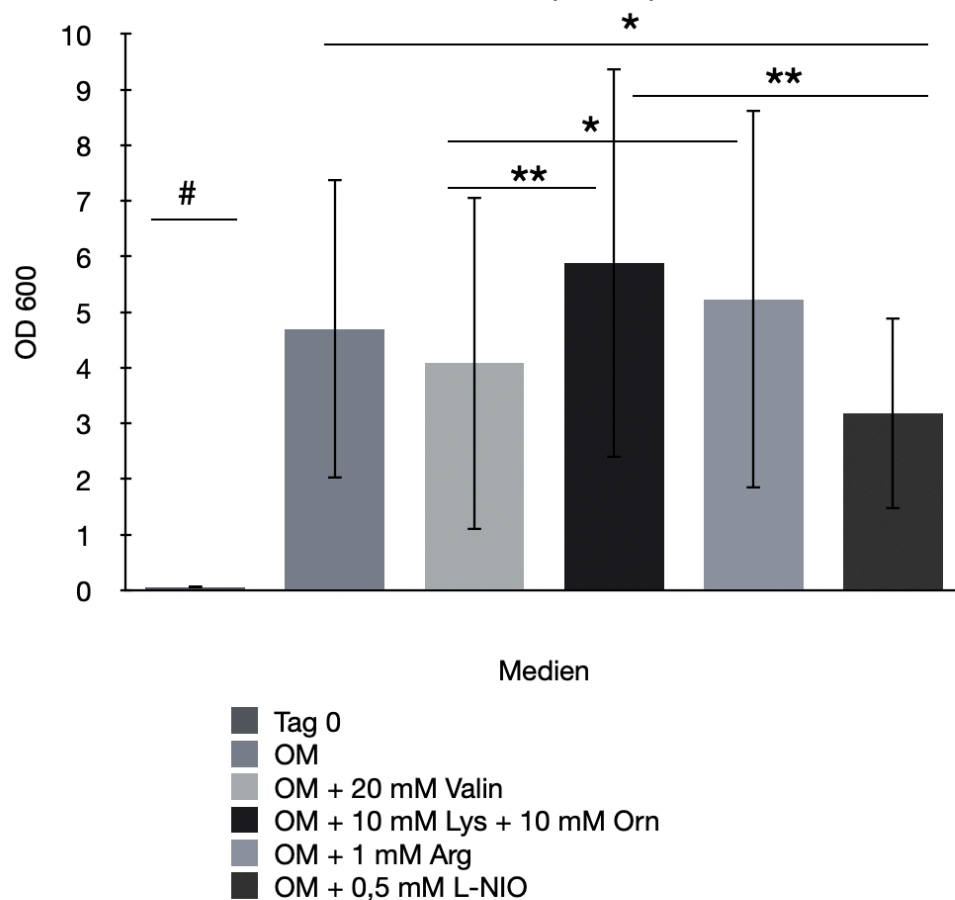


Abb. 63: Kalzifizierung in OM, Teil 1, Tag 14

Dargestellt ist die osteogene Kalzifizierung dentaler Stromazellen (DSC) in verschiedenen Medien an Tag 14 anhand der optischen Dichte bei 600 nm (OD 600). Gezeigt werden die Mittelwerte \pm Standardabweichung der Messungen von n = 11 Spendern in folgenden Medien: osteogenes Differenzierungsmedium (OM), OM + 20 mM L-Valin, OM + 10 mM L-Lysin + 10 mM L-Ornithin, OM + 1 mM L-Arginin und OM + 0,5 mM L-NIO. OM + L-Lysin/L-Ornithin zeigt die höchste, OM + L-NIO die geringste Kalzifizierung. Die statistische Auswertung erfolgte mittels gepaartem *t*-Test. Signifikante Unterschiede zwischen einzelnen Gruppen erkennbar und für mehrere Bedingungen Cohen's $d > 0,8$. Nach Bonferroni-Korrektur zeigten sich nur statistisch signifikante Unterschiede beim Vergleich von Tag 0 mit den einzelnen Bedingungen an Tag 14. Statistische Markierung: Ein Stern entspricht $p < 0,05$; zwei Sterne entsprechen $p < 0,01$. # kennzeichnet einen statistisch signifikanten Unterschied im Vergleich zu allen anderen Bedingungen. Weitere Informationen zur Versuchsführung und Auswertung sind dem Fließtext zu entnehmen. OD 600 = optische Dichte bei 600 nm, OM = osteogenes Differenzierungsmedium, Val = L-Valin, Lys = L-Lysin, Orn = L-Ornithin, Arg = L-Arginin, L-NIO = L-N⁵-(1-Aminoethyl)-L-Ornithin, DSC = dentale Stromazellen, n = Anzahl biologischer Replikate, mM = Millimolar. Eigene Anfertigung.

Zwischen Tag 7 und Tag 14 konnten hochsignifikante weitere Steigerungen für alle Medien festgestellt werden ($p < 0,003$ bis $< 0,001$; Bonferroni-korrigiert ebenfalls signifikant), mit besonders hohen Effektstärken:

- OM: $d = 3,263$

- OM + L-Valin: $d = 2,664$
- OM + L-Lysin/L-Ornithin: $d = 4,648$
- OM + L-Arginin: $d = 2,121$
- OM + L-NIO: $d = 2,143$

Diese Ergebnisse unterstreichen, dass unabhängig vom spezifischen Zusatz alle Varianten des osteogenen Differenzierungsmediums zu einer signifikanten Zunahme der Mineralisierung im Verlauf der Kulturzeit führten. Besonders stark war der Effekt bei der Supplementierung mit L-Lysin und L-Ornithin ausgeprägt.

3.4.2.2 Ergebnisse erster Teil in RPMI-Medium

Bereits im Lichtmikroskop zeigten sich Unterschiede im Mineralisierungsverhalten der Zellen in den verschiedenen RPMI-Medien (1,5 % FCS-Gehalt) (siehe **Abb. 64: Osteogene Differenzierung in RPMI ohne L-Arginin**, **Abb. 65: Osteogene Differenzierung in RPMI ohne L-Arginin + 50 μM L-Arginin**, **Abb. 66: Osteogene Differenzierung in RPMI ohne L-Arginin + 200 μM L-Arginin** und **Abb. 67: Osteogene Differenzierung in RPMI mit L-Arginin**).

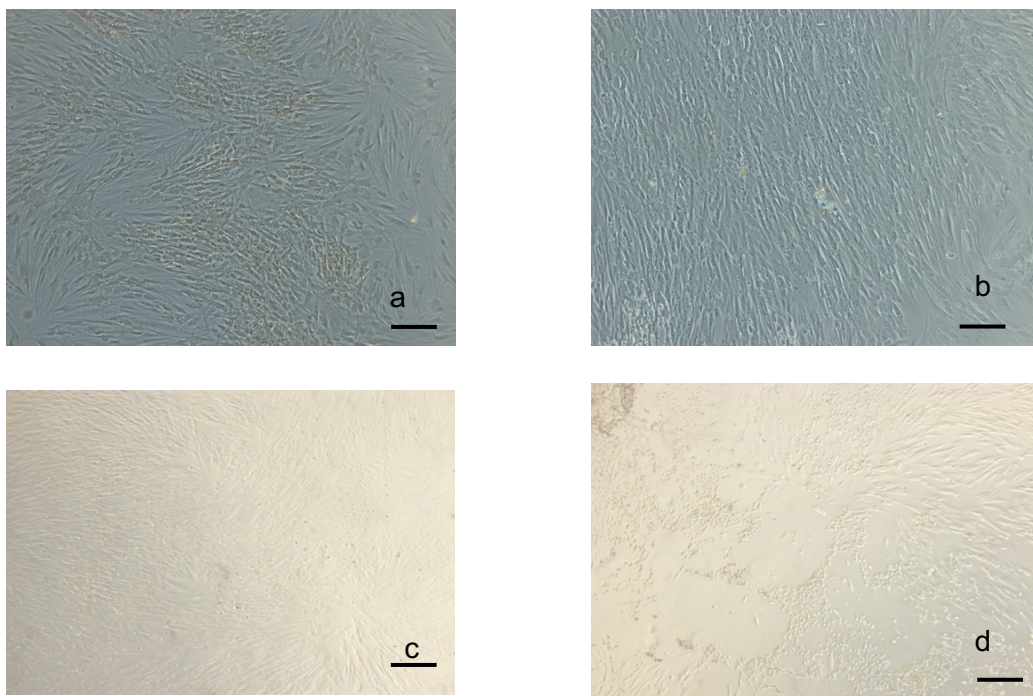


Abb. 64: Osteogene Differenzierung in RPMI ohne L-Arginin – lichtmikroskopische Darstellung

Lichtmikroskopische Aufnahmen der osteogenen Differenzierung dentaler Stromazellen (DSC) nach Kultur in RPMI ohne L-Arginin. Die Aufnahmen wurden mit einer 10-fachen Vergrößerung angefertigt, Maßstabsbalken entsprechen 100 μm (Zeiss-Axioskop-40, Zen 3.0 *Blue*). Abbildung **(a)** zeigt Zellen des Spenders DSC-2011-19-02 an Tag 7, **(b)** Zellen des Spenders DSC-201105-2 in Passage 5, **(c)** Zellen des Spenders DSC-201119-4 (P5) und **(d)** Zellen des

Spenders DSC-201217 in Passage 2. Weitere Informationen zur Versuchsführung und Auswertung sind dem Fließtext zu entnehmen. DSC = dentale Stromazellen, RPMI = *Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium*, μm = Mikrometer. Eigene Anfertigung.

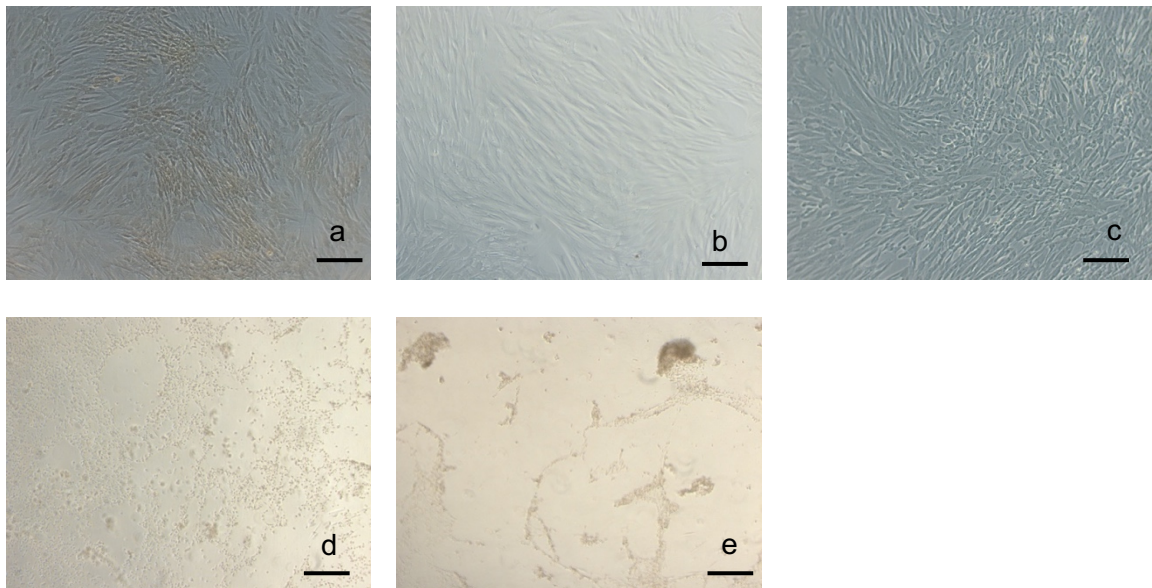
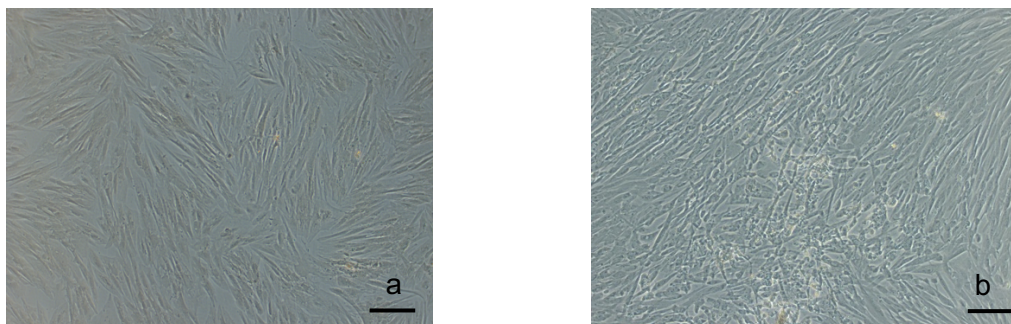


Abb. 65: Osteogene Differenzierung in RPMI ohne L-Arginin + 50 μM L-Arginin – lichtmikroskopische Darstellung

Lichtmikroskopische Aufnahmen der osteogenen Differenzierung dentaler Stromazellen (DSC) nach Kultur in RPMI ohne L-Arginin + 50 μM L-Arginin. Die Aufnahmen wurden mit einer 10-fachen Vergrößerung angefertigt, Maßstabsbalken entsprechen 100 μm (Zeiss-Axioskop-40, Zen 3.0 *Blue*). Abbildung (a) zeigt Zellen des Spenders DSC-2011-19-02 an Tag 7, (b) und (c) die Zellen des Spenders DSC-201105-2 in Passage 5, (d) Zellen des Spenders DSC-201119-4 (P5) und (e) Zellen des Spenders DSC-201217 in Passage 2. Weitere Informationen zur Versuchsführung und Auswertung sind dem Fließtext zu entnehmen. DSC = dentale Stromazellen, RPMI = *Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium*, μM = Mikromolar, μm = Mikrometer. Eigene Anfertigung.



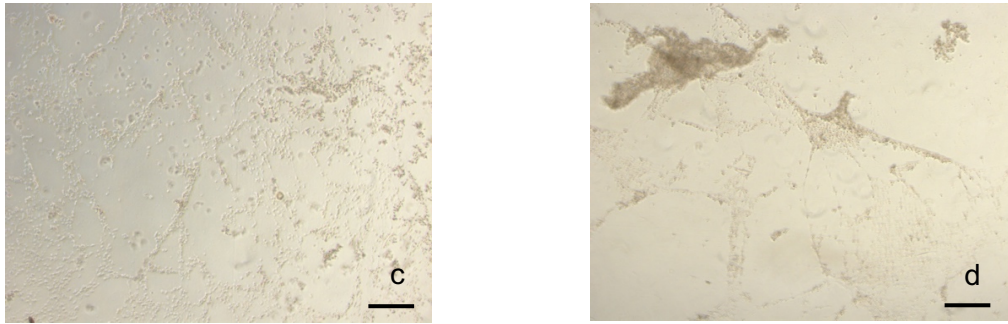


Abb. 66: Osteogene Differenzierung in RPMI ohne L-Arginin + 200 μ M L-Arginin – lichtmikroskopische Darstellung

Lichtmikroskopische Aufnahmen der osteogenen Differenzierung dentaler Stromazellen (DSC) nach Kultur in RPMI ohne L-Arginin + 200 μ M L-Arginin. Die Aufnahmen wurden mit einer 10-fachen Vergrößerung angefertigt, Maßstabsbalken entsprechen 100 μ m (Zeiss-Axioskop-40, Zen 3.0 Blue). Abbildung (a) zeigt Zellen des Spenders DSC-2011-19-02 an Tag 7, (b) Zellen des Spenders DSC-201105-2 in Passage 5, (c) Zellen des Spenders DSC-201119-4 (P5) und (d) Zellen des Spenders DSC-201217 in Passage 2. Weitere Informationen zur Versuchsführung und Auswertung sind dem Fließtext zu entnehmen. DSC = dentale Stromazellen, RPMI = Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium, μ M = Mikromolar, μ m = Mikrometer. Eigene Anfertigung.

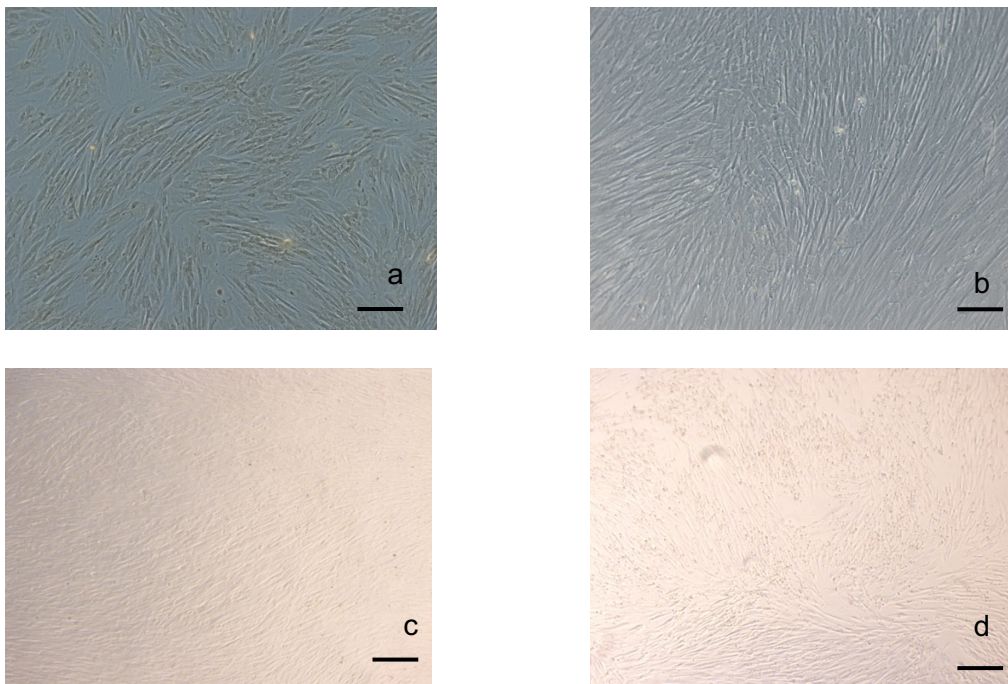


Abb. 67: Osteogene Differenzierung in RPMI mit L-Arginin – lichtmikroskopische Darstellung

Lichtmikroskopische Aufnahmen der osteogenen Differenzierung dentaler Stromazellen (DSC) nach Kultur in RPMI mit L-Arginin. Die Aufnahmen wurden mit einer 10-fachen Vergrößerung angefertigt, Maßstabsbalken entsprechen 100 μ m (Zeiss-Axioskop-40, Zen 3.0 Blue). Abbildung (a) zeigt Zellen des Spenders DSC-2011-19-02 an Tag 7, (b) Zellen des Spenders DSC-201105-2 in Passage 5, (c) Zellen des Spenders DSC-201119-4 (P5) und (d) Zellen des Spenders DSC-201217 in Passage 2. Weitere Informationen zur Versuchsführung und Auswertung sind dem Fließtext zu entnehmen. DSC = dentale Stromazellen, RPMI = Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium, μ m = Mikrometer. Eigene Anfertigung.

Zur Bewertung der osteogenen Differenzierung wurden die Extinktionswerte an den Tagen 7 und 14 mit denen von Tag 0 verglichen.

Vergleich Tag 0 vs. Tag 7:

Zwischen Tag 0 und Tag 7 konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Eine Ausnahme bildete der Vergleich zwischen Tag 0 und der Bedingung RPMI ohne L-Arginin + 50 μ M L-Arginin, der ein nicht signifikantes Effektstärkemaß von Cohen's $d = 0,8$ aufwies. Dies deutet auf einen moderaten Effekt hin, erreicht jedoch keinen signifikanten Unterschied (siehe **Abb. 68: Kalzifizierung in RPMI, Teil 1, Tag 7**).

Tag 7:

Ein Ausreißer in der Gruppe RPMI ohne L-Arginin (ein Einzelwert mit OD 600 = 2,18 bei ansonsten 0–0,03) an Tag 7 wurde aus der Analyse ausgeschlossen. Ohne diesen Ausreißer ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen RPMI ohne L-Arginin und RPMI mit L-Arginin an Tag 7 ($p = 0,046$, Cohen's $d = 1,078$). Nach Bonferroni-Korrektur wurde jedoch keine statistische Signifikanz mehr erreicht. Die übrigen Gruppen zeigten keine signifikanten Unterschiede (siehe **Abb. 68: Kalzifizierung in RPMI, Teil 1, Tag 7**).

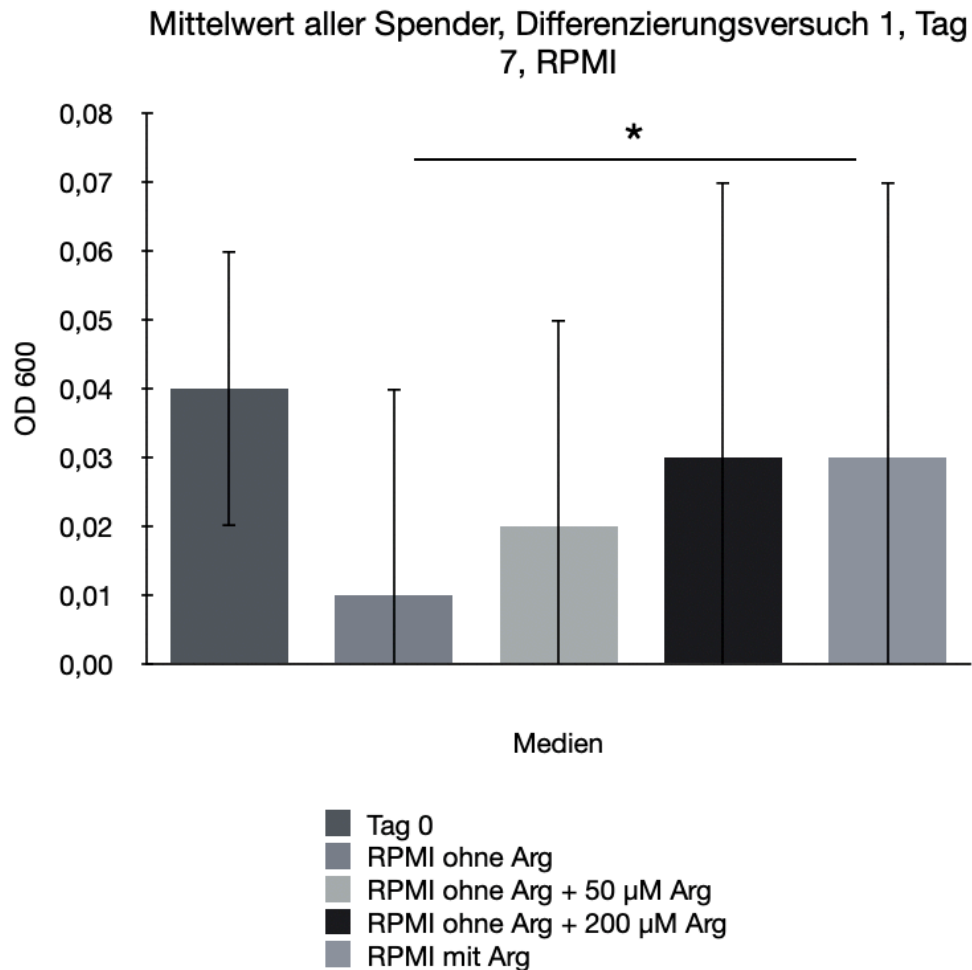


Abb. 68: Kalzifizierung in RPMI, Teil 1, Tag 7

Dargestellt ist die osteogene Kalzifizierung dentaler Stromazellen (DSC) in verschiedenen Medien an Tag 7 anhand der optischen Dichte bei 600 nm (OD 600). Gezeigt werden die Mittelwerte \pm Standardabweichung der Messungen von $n = 6$ Spendern in folgenden Medien: RPMI ohne L-Arginin, RPMI ohne L-Arginin + 50 μM L-Arginin, RPMI ohne L-Arginin + 200 μM L-Arginin und RPMI mit L-Arginin. Bei der Auswertung der Ergebnisse des RPMI ohne L-Arginin wurden hier nur $n = 5$ Spender berücksichtigt, da es bei einem Spender zu stark abweichenden Werten kam und diese Extremwerte daher vernachlässigt wurden. Der FCS-Gehalt betrug 1,5 %. Die statistische Auswertung erfolgte mittels gepaartem t -Test. Es ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen RPMI ohne L-Arginin und RPMI mit L-Arginin. Nach Bonferroni-Korrektur zeigten sich jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede. Cohen's $d > 0,8$ für den Vergleich zwischen RPMI mit L-Arginin und ohne L-Arginin sowie für den Vergleich von Tag 0 und RPMI ohne L-Arginin + 50 μM L-Arginin. Statistische Markierung: Ein Stern entspricht $p < 0,05$. Weitere Informationen zur Versuchsführung und Auswertung sind dem Fließtext zu entnehmen. OD 600 = optische Dichte bei 600 nm, RPMI = Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium, Arg = L-Arginin, DSC = dentale Stromazellen, n = Anzahl biologischer Replikate, FCS = fetales Kälberserum, μM = Mikromolar, % = Prozent. Eigene Anfertigung.

Eine signifikante Abnahme der osteogenen Differenzierung **zwischen Tag 0 und Tag 14** wurde in der Gruppe RPMI ohne L-Arginin beobachtet ($p < 0,002$; Bonferroni-korrigiert $p = 0,022$; Cohen's $d = 1,343$), was auf einen Rückgang der Kalzifizierung bzw. eine mangelnde Differenzierung unter L-Arginin-freien Bedingungen hinweist. Alle anderen Gruppen zeigten keine signifikanten Veränderungen über diesen Zeitraum (siehe **Abb. 69: Kalzifizierung in RPMI, Teil 1, Tag 14**).

An **Tag 14** konnte für die Zellen in RPMI mit L-Arginin eine signifikant höhere Mineralisierung im Vergleich zu folgenden Gruppen nachgewiesen werden:

- RPMI ohne L-Arginin ($p < 0,003$; $d = 1,296$)
- RPMI ohne L-Arginin + 50 μM L-Arginin ($p < 0,01$; $d = 1,031$)
- RPMI ohne L-Arginin + 200 μM L-Arginin ($p < 0,01$; $d = 1,027$)

Nach Bonferroni-Korrektur blieb nur der Unterschied zwischen RPMI mit und ohne L-Arginin signifikant ($p < 0,027$). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass L-Arginin in ausreichender Konzentration eine fördernde Wirkung auf die osteogene Differenzierung ausübt.

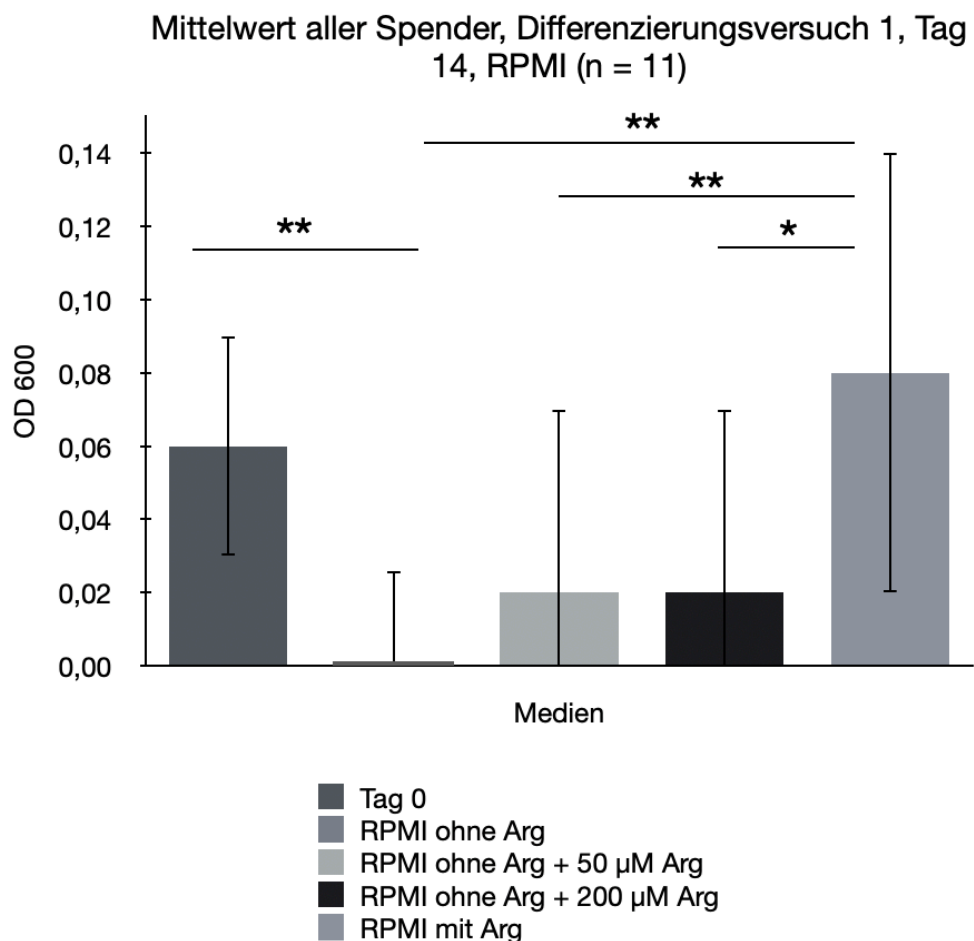


Abb. 69: Kalzifizierung in RPMI, Teil 1, Tag 14

Dargestellt ist die osteogene Kalzifizierung dentaler Stromazellen (DSC) in verschiedenen Medien an Tag 14 anhand der optischen Dichte bei 600 nm (OD 600). Gezeigt werden die Mittelwerte \pm Standardabweichung der Messungen von $n = 11$ Spendern in folgenden Medien: RPMI ohne L-Arginin, RPMI ohne L-Arginin + 50 μM L-Arginin, RPMI ohne L-Arginin + 200 μM L-Arginin und RPMI mit L-Arginin. Der FCS-Gehalt betrug 1,5 %. Die statistische Auswertung erfolgte mittels gepaartem t -Test. Signifikante Unterschiede zwischen einzelnen Gruppen erkennbar und für mehrere Bedingungen Cohen's $d > 0,8$. Nach Bonferroni-Korrektur zeigten sich jedoch nur noch für den Vergleich von Tag 0 und RPMI ohne L-Arginin sowie für den Vergleich von RPMI ohne L-Arginin und RPMI mit L-Arginin statistisch

signifikante Unterschiede. Statistische Markierung: Ein Stern entspricht $p < 0,05$. Zwei Sterne entsprechen $p < 0,01$. Weitere Informationen zur Versuchsführung und Auswertung sind dem Fließtext zu entnehmen. OD 600 = optische Dichte bei 600 nm, RPMI = *Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium*, Arg = L-Arginin, DSC = dentale Stromazellen, n = Anzahl biologischer Replikate, FCS = fetales Kälberserum, μM = Mikromolar, % = Prozent. Eigene Anfertigung.

Zwischen Tag 7 und Tag 14 konnten keine statistisch signifikanten Veränderungen innerhalb der jeweiligen Medien festgestellt werden. Dies spricht für ein frühes Plateau der Mineralisierung unter den getesteten Bedingungen.

Abb. 70: Vergleich der Mineralisierung in RPMI-Medien und Abb. 71: Stärkere Mineralisierung in RPMI mit L-Arginin im Vergleich zu anderen RPMI-Medien zeigen exemplarisch die optischen Unterschiede in der Alizarinrot-S-Färbung zwischen den einzelnen RPMI-Medien. Bereits visuell war eine verstärkte Mineralisierung in RPMI mit L-Arginin im Vergleich zu anderen Bedingungen erkennbar.

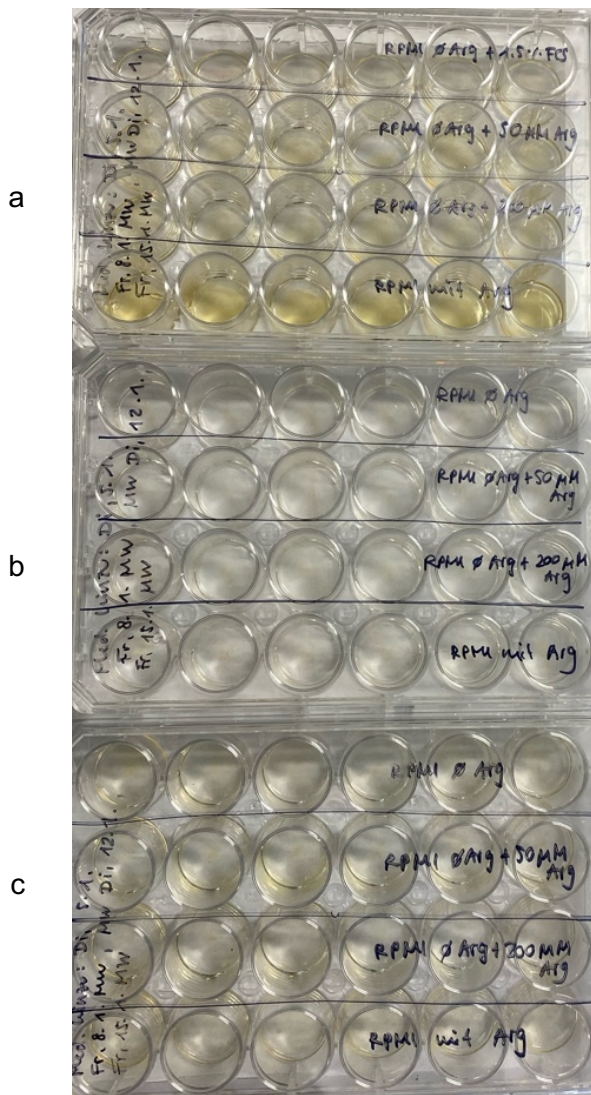


Abb. 70: Vergleich der Mineralisierung in RPMI-Medien

Makroskopische Darstellung der osteogenen Differenzierung der DSC in verschiedenen RPMI-Medien an Tag 14. Gezeigt werden jeweils 24-Well-Platten: **(a)** Spender DSC-201119-4, Passage 5; **(b)** Spender DSC-201207-2, Passage 2; **(c)** Spender DSC-201119-2, Passage 3. Die Zellen wurden jeweils in der obersten Reihe in RPMI ohne L-Arginin, in der zweiten Reihe in RPMI ohne L-Arginin + 50 µM L-Arginin, in der dritten Reihe in RPMI ohne L-Arginin + 200 µM L-Arginin und in der vierten Reihe in RPMI mit L-Arginin kultiviert. Bereits während der Alizarinrot-S-Färbung wurden Unterschiede in der Mineralisierung sichtbar, insbesondere eine stärkere Färbung in den Gruppen mit L-Arginin-Zusatz. Außerdem erkennt man auch hier bereits die Variabilität der verschiedenen Donoren. Weitere Informationen sind dem Fließtext zu entnehmen. DSC = dentale Stromazellen, RPMI = *Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium*, Arg = L-Arginin, µM = Mikromolar. Eigene Anfertigung.

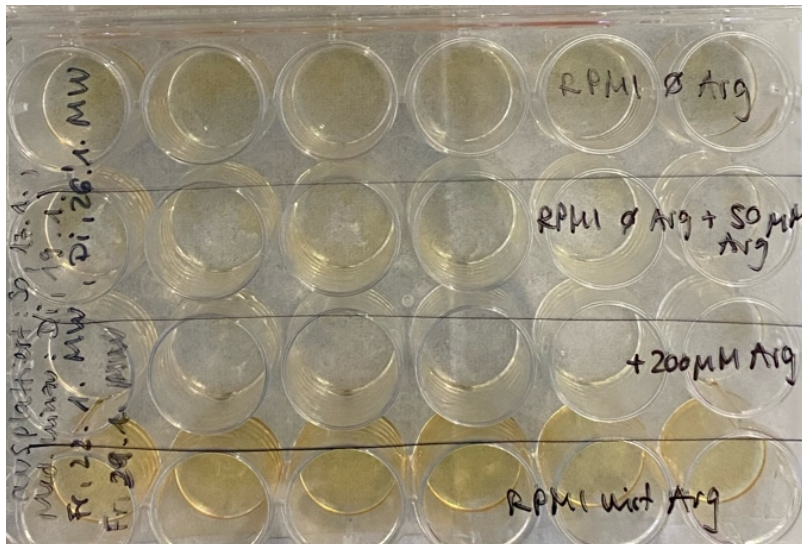


Abb. 71: Stärkere Mineralisierung in RPMI mit L-Arginin im Vergleich zu anderen RPMI-Medien

Makroskopische Darstellung der osteogenen Differenzierung der DSC in verschiedenen RPMI-Medien. Bereits während der Alizarinrot-S-Färbung wurden Unterschiede in der Mineralisierung sichtbar, insbesondere eine stärkere Färbung in RPMI mit L-Arginin-Zusatz. Weitere Informationen sind dem Fließtext zu entnehmen. DSC = dentale Stromazellen, RPMI = Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium, Arg = L-Arginin, μM = Mikromolar. Eigene Anfertigung.

Die absoluten Extinktionswerte in den RPMI-Medien lagen mit maximaler $OD_{600} = 0,04$ an Tag 7 und $0,08$ an Tag 14 deutlich unter den Werten, die in den OM-Medien erzielt wurden (z. B. OM: $OD_{600} = 10,79$ an Tag 14, Teil eins und zwei zusammengefasst). Die Standardabweichungen bewegten sich in einem geringen Bereich ($0,02-0,06$), was auf eine relativ konstante Messqualität hinweist.

Bereits während der Alizarinrot-S-Färbung ließen sich visuell erkennbare Unterschiede zwischen den einzelnen Bedingungen feststellen. **Abb. 72: Vergleich der Mineralisierung in OM- vs. in RPMI-Medien** illustriert dabei die insgesamt deutlich schwächere Mineralisierung der Zellen in den RPMI-Medien im Vergleich zu den OM-basierten Bedingungen.

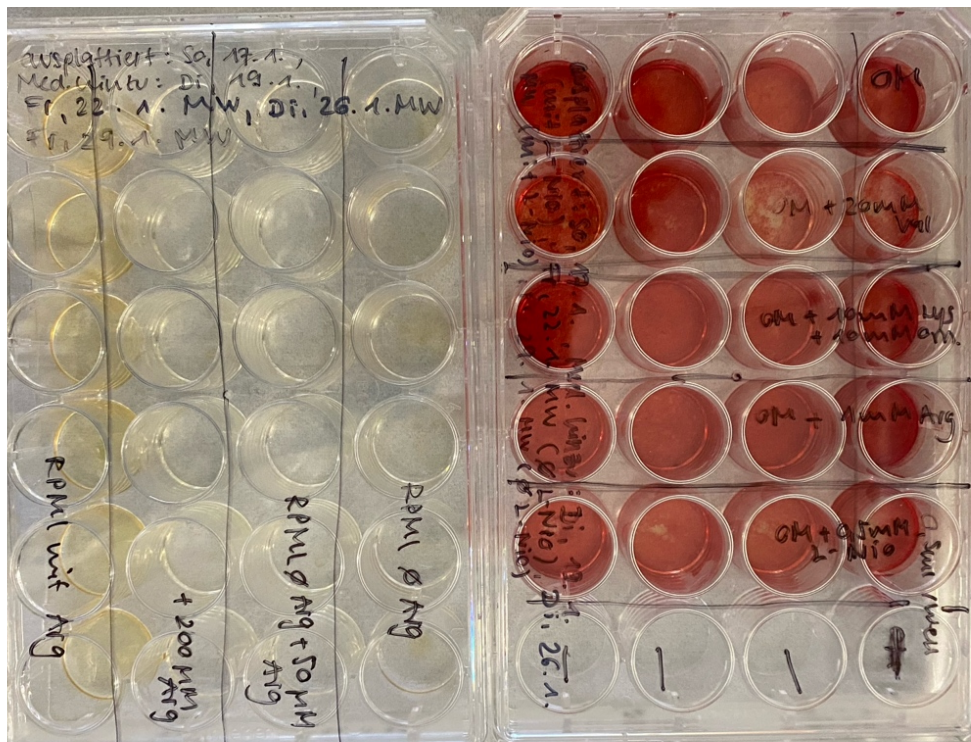


Abb. 72: Vergleich der Mineralisierung in OM- vs. in RPMI-Medien

Makroskopische Darstellung der osteogenen Differenzierung der DSC in OM- (rechts) und RPMI-Medien (links). Dabei erkennt man bereits makroskopisch eine deutlich stärkere Färbung und Mineralisierung der DSC in den OM-Medien. Weitere Informationen sind dem Fließtext zu entnehmen. DSC = dentale Stromazellen, OM = osteogenes Differenzierungsmedium, RPMI = Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium, Val = L-Valin, Lys = L-Lysin, Orn = L-Ornithin, Arg = L-Arginin, L-NIO = L-N⁵-(1-Aminoethyl)-Ornithin, µM = Mikromolar. Eigene Anfertigung.

Die Ergebnisse der RPMI-Medien deuten darauf hin, dass die osteogene Differenzierung unter L-Arginin-freien Bedingungen signifikant gehemmt wurde. In der Gruppe RPMI ohne L-Arginin wurde zwischen Tag 0 und Tag 14 eine statistisch signifikante Abnahme der Kalzifizierung beobachtet, was auf eine unzureichende Differenzierung in Abwesenheit von L-Arginin schließen lässt. Die Effektstärke (Cohen's $d = 1,343$) unterstreicht die Relevanz dieses Rückgangs. In allen übrigen Gruppen mit L-Arginin-Zusätzen konnten hingegen keine signifikanten zeitabhängigen Veränderungen festgestellt werden. Dies legt nahe, dass die bloße Zugabe von L-Arginin in geringer Konzentration (z. B. 50 oder 200 µM) nicht ausreichte, um die Differenzierung signifikant zu steigern, wenngleich punktuelle Effekte beobachtet wurden.

3.4.2.3 Normierte osteogene Differenzierung in OM, Teil eins

Bei Normierung der osteogenen Differenzierung auf das Vergleichsmedium OM (100 %) zeigten alle experimentellen Zusätze an Tag 7 eine verstärkte Kalzifizierung der Zellen (siehe Abb. 73: Prozentuale Kalzifizierung in OM, Teil 1, Tag 7).

Die Supplementierung mit L-Arginin führte zu einer moderaten Steigerung auf 130 %, während OM + L-Valin (149 %) und insbesondere OM + L-NIO (213 %) deutlich stärkere Effekte zeigten. Den mit Abstand stärksten Effekt zeigte die Kombination aus L-Lysin und L-Ornithin, bei der ein durchschnittlicher Anstieg der Kalzifizierung auf 819 % im Vergleich zu OM beobachtet wurde. Obwohl diese Ergebnisse auf eine verstärkte frühe osteogene Differenzierung durch bestimmte Aminosäuren hindeuten, ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede, und auch die Effektstärken (Cohen's *d*) lagen in allen Gruppenvergleichen unter dem Schwellenwert von 0,8.

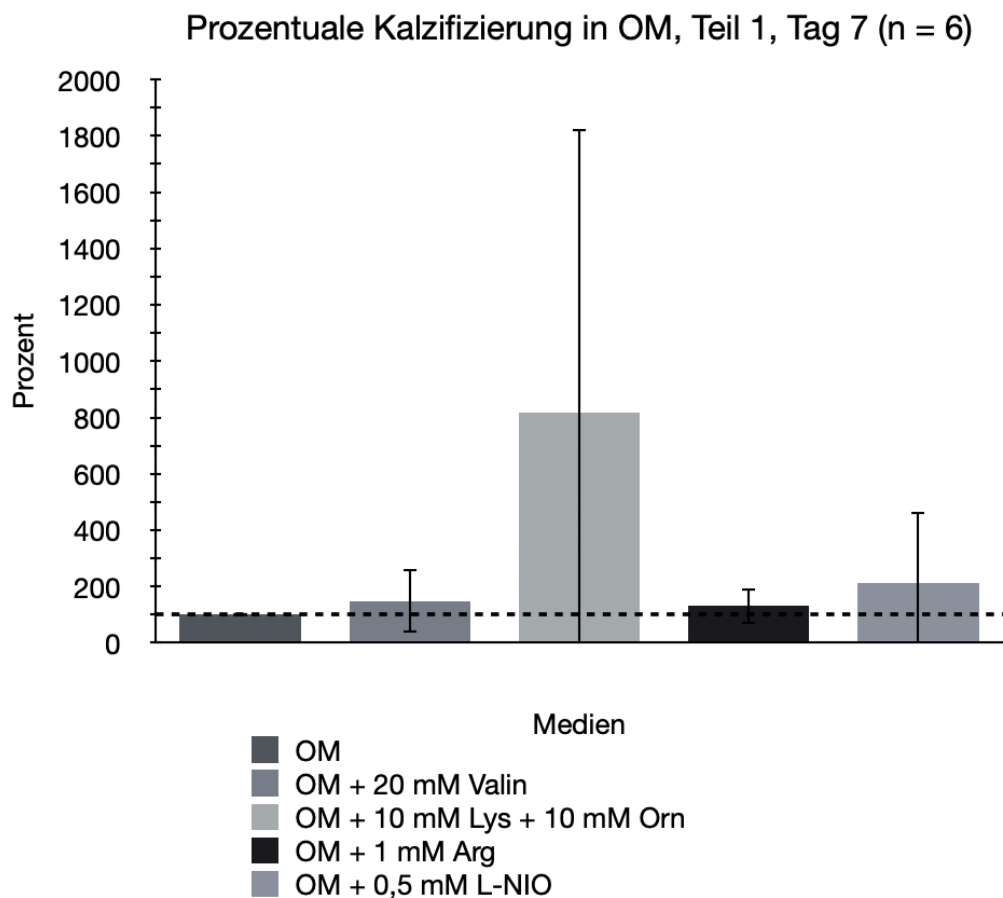


Abb. 73: Prozentuale Kalzifizierung in OM, Teil 1, Tag 7

Dargestellt ist die osteogene Differenzierung der dentalen Stromazellen (DSC) an Tag 7 in verschiedenen Zusätzen zum osteogenen Differenzierungsmedium (OM), normiert auf die Kalzifizierung in reinem OM (= 100 %, Kontrollbalken ganz links). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung der prozentualen Kalzifizierung in OM + 20 mM L-Valin, OM + 10 mM L-Lysin + 10 mM L-Ornithin, OM + 1 mM L-Arginin und OM + 0,5 mM L-NIO. Es wurden $n = 6$ Spender ausgewertet. Es zeigte sich eine tendenziell verstärkte Mineralisierung in allen Zusätzen, insbesondere bei L-Lysin/L-Ornithin (819 %), jedoch ohne statistische Signifikanz (alle $p > 0,05$; Cohen's $d < 0,8$). Die statistische Auswertung erfolgte mittels gepaartem *t*-Test. Weitere Informationen zur Versuchsführung und Auswertung sind dem Fließtext zu entnehmen. OM = osteogenes Differenzierungsmedium, Val = L-Valin, Lys = L-Lysin, Orn = L-Ornithin, Arg = L-Arginin, L-NIO = L-N⁵-(1-Aminoethyl)-Ornithin, DSC = dentale Stromazellen, n = Anzahl biologischer Replikate, mM = Millimolar, % = Prozent. Eigene Anfertigung.

Dies ließ sich auch bereits während des Färbeporgangs durch erkennbare Farbintensitäten feststellen (siehe Abb. 74: Verstärkte Mineralisierung in OM + 10 mM L-Lysin + 10 mM L-Ornithin).

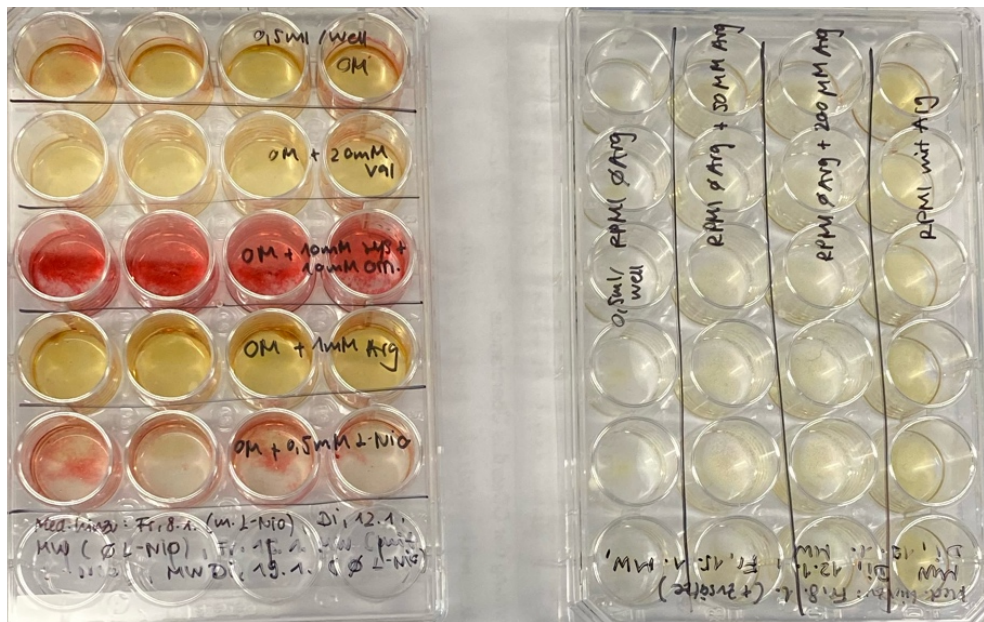


Abb. 74: Verstärkte Mineralisierung in OM + 10 mM L-Lysin + 10 mM L-Ornithin

Makroskopische Darstellung der osteogenen Differenzierung der DSC in verschiedenen Medien. Bereits während der Alizarinrot-S-Färbung wurden Unterschiede in der Mineralisierung sichtbar, insbesondere eine stärkere Färbung in OM + 10 mM L-Lysin + 10 mM L-Ornithin. Weitere Informationen sind dem Fließtext zu entnehmen. DSC = dentale Stromazellen, OM = osteogenes Differenzierungsmedium, Val = L-Valin, Lys = L-Lysin, Orn = L-Ornithin, Arg = L-Arginin, L-NIO = L-N⁵-(1-Aminoethyl)-Ornithin, RPMI = Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium, mM = Millimolar, µM = Mikromolar. Eigene Anfertigung.

Am Tag 14 setzte sich das differenzierte Bild der osteogenen Kalzifizierung fort. Bezogen auf das Vergleichsmedium OM (100 %) zeigten die Zellen in OM + L-Lysin + L-Ornithin mit 173 % erneut den höchsten durchschnittlichen Anstieg der Mineralisierung. Eine moderate Steigerung wurde auch bei OM + L-Arginin beobachtet (112 %). Im Gegensatz dazu wiesen die Zellen in OM + L-NIO (101 %) nahezu identische Werte wie im Vergleichsmedium auf, während die Kalzifizierung in OM + L-Valin mit 80 % deutlich verringert war (siehe Abb. 75: Prozentuale Kalzifizierung in OM, Teil 1, Tag 14). Der direkte Vergleich zwischen OM + L-Valin und OM + L-Arginin ergab ein signifikantes Ergebnis ($p < 0,05$) mit einer mittleren Effektstärke (Cohen's $d = 0,847$), das nach Bonferroni-Korrektur jedoch nicht mehr signifikant war. Für alle weiteren Gruppenvergleiche konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Diese Daten sprechen dafür, dass insbesondere L-Lysin/L-Ornithin sowie L-Arginin auch langfristig einen positiven Einfluss auf die Mineralisierung ausüben könnten, während L-Valin möglicherweise hemmend wirkt.

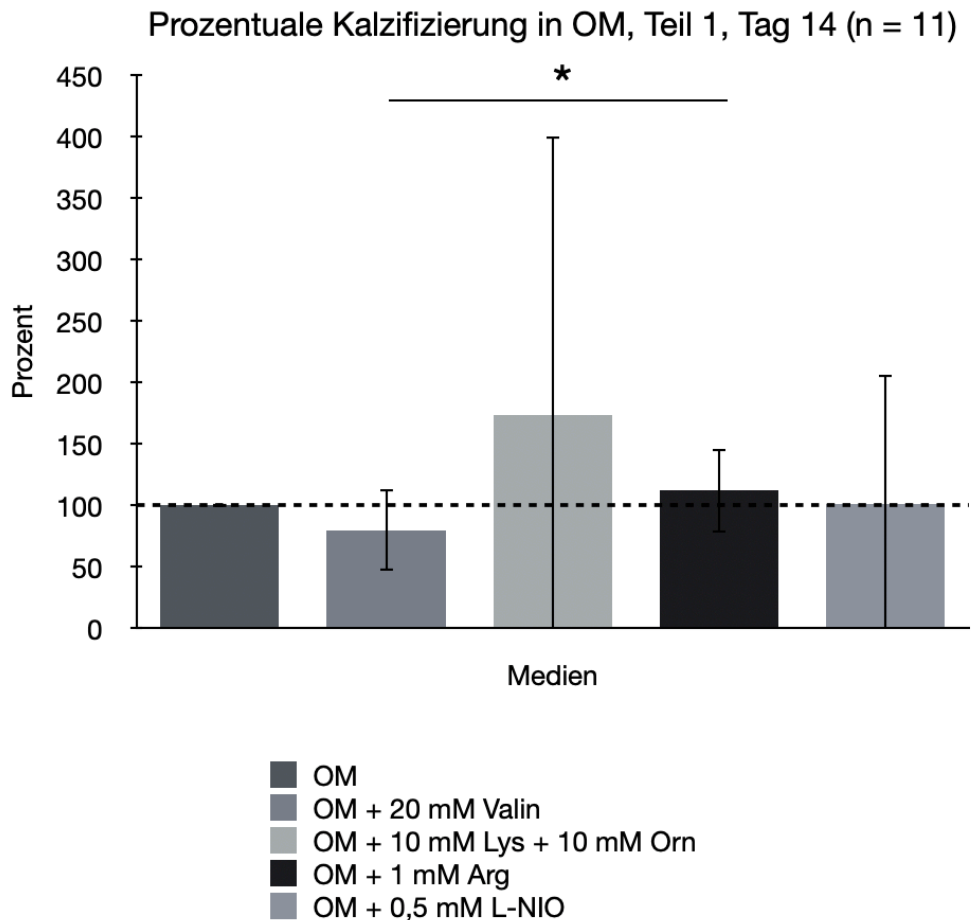


Abb. 75: Prozentuale Kalzifizierung in OM, Teil 1, Tag 14

Dargestellt ist die osteogene Differenzierung der dentalen Stromazellen (DSC) an Tag 14 in verschiedenen Zusätzen zum osteogenen Differenzierungsmedium (OM), normiert auf die Kalzifizierung in reinem OM (= 100 %, Kontrollbalken ganz links). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung der prozentualen Kalzifizierung in OM + 20 mM L-Valin, OM + 10 mM L-Lysin + 10 mM L-Ornithin, OM + 1 mM L-Arginin und OM + 0,5 mM L-NIO. Es wurden n = 11 Spender ausgewertet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels gepaartem *t*-Test. Der Vergleich zwischen OM + L-Valin und OM + L-Arginin ergab ein signifikantes Ergebnis ($p < 0,05$, $d > 0,8$), das nach Bonferroni-Korrektur jedoch nicht mehr signifikant war. Für alle weiteren Gruppenvergleiche konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Die Zellen in OM + L-Lysin + L-Ornithin zeigten den höchsten durchschnittlichen Anstieg der Mineralisierung (173 %). Statistische Markierung: Ein Stern entspricht $p < 0,05$. Weitere Informationen zur Versuchsführung und Auswertung sind dem Fließtext zu entnehmen. OM = osteogenes Differenzierungsmedium, Val = L-Valin, Lys = L-Lysin, Orn = L-Ornithin, Arg = L-Arginin, L-NIO = L-N⁵-(1-Aminoethyl)-Ornithin, DSC = dentale Stromazellen, n = Anzahl biologischer Replikate, mM = Millimolar, % = Prozent. Eigene Anfertigung.

3.4.2.1 Normierte osteogene Differenzierung in RPMI, Teil eins

Für die normierte Auswertung wurde das RPMI-Medium mit L-Arginin als Referenzwert (100 %) herangezogen.

An **Tag 7** zeigte sich in den Zellen, die in RPMI ohne L-Arginin kultiviert wurden, eine deutlich reduzierte Mineralisierung mit lediglich 62 % im Vergleich zur Referenz. Die

Zugabe von 50 μM L-Arginin führte zu einer Mineralisierung von 78 %, während 200 μM L-Arginin zu einer weiteren Annäherung an den Referenzwert (92 %) führten (siehe **Abb. 76: Prozentuale Kalzifizierung in RPMI, Teil 1, Tag 7**). Dennoch lagen in keiner dieser Gruppen signifikante Unterschiede vor (alle p -Werte $> 0,05$; Cohen's $d < 0,8$).

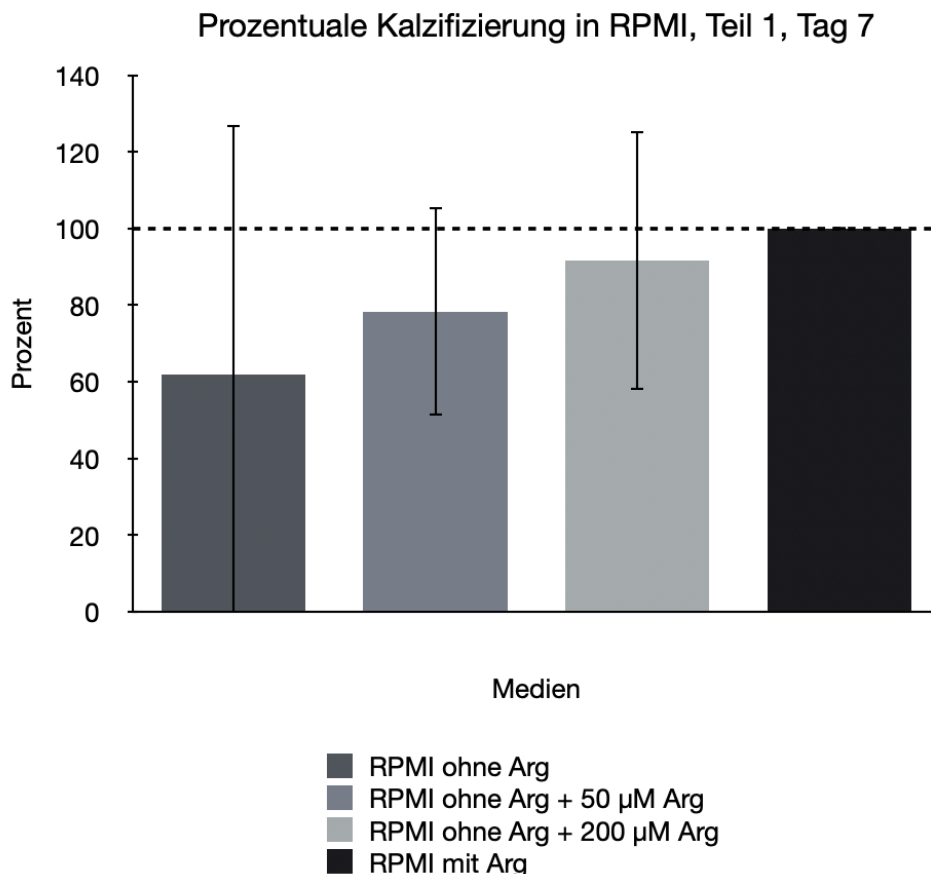


Abb. 76: Prozentuale Kalzifizierung in RPMI, Teil 1, Tag 7

Dargestellt ist die osteogene Differenzierung der dentalen Stromazellen (DSC) an Tag 7 in verschiedenen Zusätzen zum RPMI, normiert auf die Kalzifizierung in RPMI mit L-Arginin (= 100 %, Kontrollbalken ganz rechts). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung der prozentualen Kalzifizierung in RPMI ohne L-Arginin, RPMI ohne L-Arginin + 50 μM L-Arginin und RPMI ohne L-Arginin + 200 μM L-Arginin. Es wurden $n = 6$ Spender ausgewertet. Bei der Auswertung der Ergebnisse des RPMI ohne L-Arginin wurden hier nur $n = 5$ Spender berücksichtigt, da es bei einem Spender zu stark abweichenden Werten kam und diese Extremwerte daher vernachlässigt wurden. Der FCS-Gehalt betrug 1,5 %. Die Zellen in RPMI ohne L-Arginin zeigten eine deutlich reduzierte Mineralisierung (62 %). Die statistische Auswertung erfolgte mittels gepaartem t -Test. In keiner der Gruppen kamen signifikante Unterschiede vor ($p > 0,05$ und $d < 0,8$). Weitere Informationen zur Versuchsführung und Auswertung sind dem Fließtext zu entnehmen. RPMI = Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium, Arg = L-Arginin, DSC = dentale Stromazellen, n = Anzahl biologischer Replikate, FCS = fetales Kälberserum, μM = Mikromolar, % = Prozent. Eigene Anfertigung.

An Tag 14 verstärkte sich der Unterschied zur Referenzgruppe weiter: Die Zellen in RPMI ohne L-Arginin wiesen nur noch eine durchschnittliche Mineralisierung von 33 % auf,

während die Gruppen mit 50 μM und 200 μM L-Arginin auf 56 % bzw. 76 % kamen (siehe **Abb. 77: Prozentuale Kalzifizierung in RPMI, Teil 1, Tag 14**). Der einzige signifikante Unterschied wurde zwischen RPMI mit L-Arginin und RPMI ohne L-Arginin festgestellt ($p = 0,011$; Cohen's $d = 1,005$). Die übrigen Vergleiche blieben statistisch unauffällig.

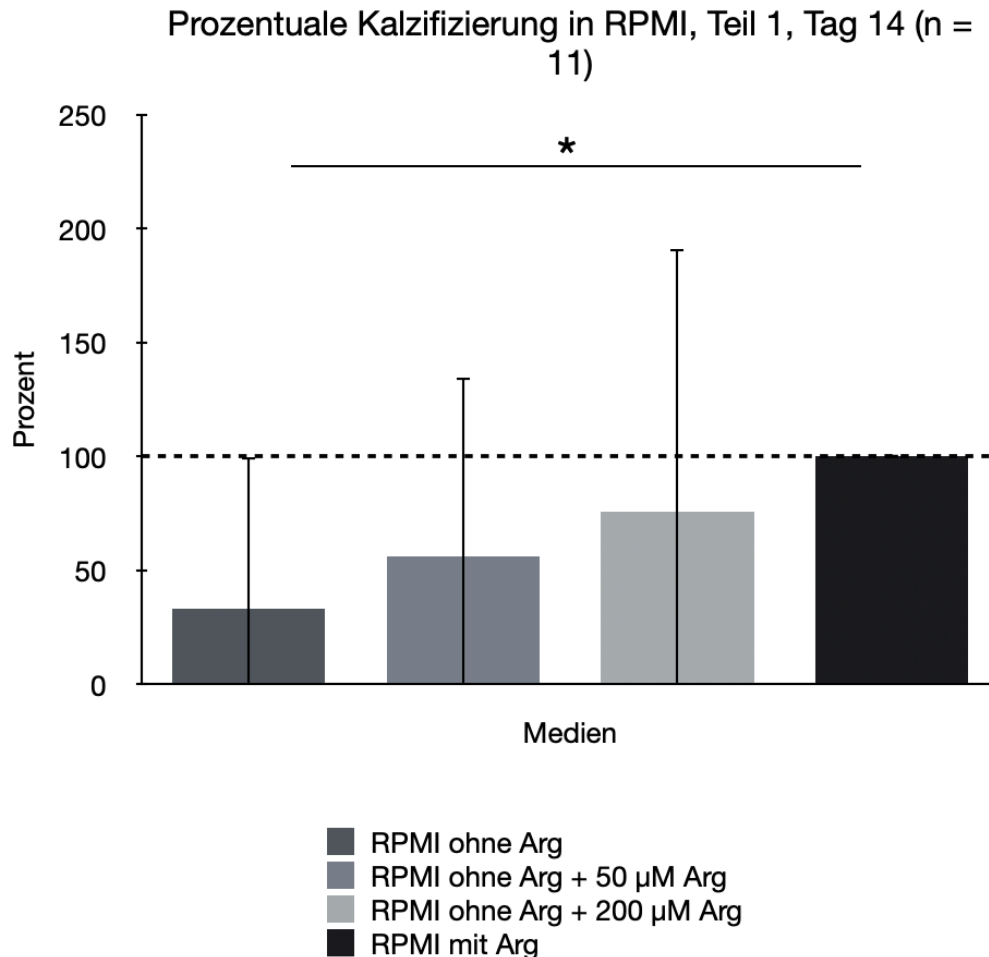


Abb. 77: Prozentuale Kalzifizierung in RPMI, Teil 1, Tag 14

Dargestellt ist die osteogene Differenzierung der dentalen Stromazellen (DSC) an Tag 14 in verschiedenen Zusätzen zum RPMI, normiert auf die Kalzifizierung in RPMI mit L-Arginin (= 100 %, Kontrollbalken ganz rechts). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung der prozentualen Kalzifizierung in RPMI ohne L-Arginin, RPMI ohne L-Arginin + 50 μM L-Arginin und RPMI ohne L-Arginin + 200 μM L-Arginin. Es wurden $n = 11$ Spender ausgewertet. Der FCS-Gehalt betrug 1,5 %. Alle Medien mit reduziertem L-Arginin-Gehalt wiesen eine verminderte Mineralisierung auf. Besonders ausgeprägt war das Ergebnis bei RPMI ohne L-Arginin (33 %). Die statistische Auswertung erfolgte mittels gepaartem t -Test. Es wurde ein signifikanter Unterschied zwischen RPMI mit L-Arginin und RPMI ohne L-Arginin festgestellt ($p < 0,05$; $d > 0,8$), der sich jedoch nach Bonferroni-Korrektur nicht mehr nachweisen ließ. Statistische Markierung: Ein Stern entspricht $p < 0,05$. Weitere Informationen zur Versuchsführung und Auswertung sind dem Fließtext zu entnehmen. RPMI = *Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium*, Arg = L-Arginin, DSC = dentale Stromazellen, n = Anzahl biologischer Replikate, FCS = fetales Kälberserum, μM = Mikromolar, % = Prozent. Eigene Anfertigung.

Die normierte Auswertung der osteogenen Differenzierung in den RPMI-Medien unterstreicht die zentrale Rolle von L-Arginin für die Kalzifizierungskapazität der dentalen Stromazellen. Sowohl an Tag 7 als auch an Tag 14 zeigte sich in den Gruppen ohne oder mit geringer L-Arginin-Konzentration eine zum Teil stark reduzierte Mineralisierung im Vergleich zur L-Arginin-haltigen Kontrolle. Insbesondere an Tag 14 war dieser Effekt ausgeprägt und statistisch signifikant für den Vergleich von RPMI mit und ohne L-Arginin. Die Effektstärke (Cohen's $d > 1$) spricht ebenfalls für einen biologisch relevanten Einfluss.

Die anderen Gruppen mit geringen L-Arginin-Zusätzen (50–200 μM) zeigten zwar tendenziell höhere Werte als die L-Arginin-freie Gruppe, unterschieden sich jedoch nicht signifikant. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass für eine effektive osteogene Differenzierung eine ausreichende Konzentration von L-Arginin erforderlich ist und dass niedrige Konzentrationen diesen Effekt möglicherweise nicht vollständig kompensieren können. Im Vergleich zu OM-basierten Bedingungen fiel die Mineralisierung in den RPMI-Medien insgesamt deutlich schwächer aus, was zusätzlich die Bedeutung des Grundmediums für die Differenzierungsprozesse hervorhebt.

3.4.3 Auswertung zweiter Teil der Differenzierungsversuche

Im zweiten Teil der Experimente wurde die osteogene Differenzierung ausschließlich an Tag 14 ausgewertet. Hierbei wurden Zellen von sieben Spendern in den Passagen 2, 4 und 5 untersucht.

3.4.3.1 Ergebnisse zweiter Teil in OM

Bereits lichtmikroskopisch zeigten sich deutliche Unterschiede im Ausmaß der Mineralisierung zwischen den verschiedenen Kulturbedingungen (siehe Abb. 78: Osteogene Differenzierung in OM, Abb. 79: Osteogene Differenzierung in OM + 20 mM L-Valin, Abb. 80: Osteogene Differenzierung in OM + 10 mM L-Lysin + 10 mM L-Ornithin, Abb. 81: Osteogene Differenzierung in OM + 1 mM L-Arginin und Abb. 82: Osteogene Differenzierung in OM + 0,5 mM L-NIO).

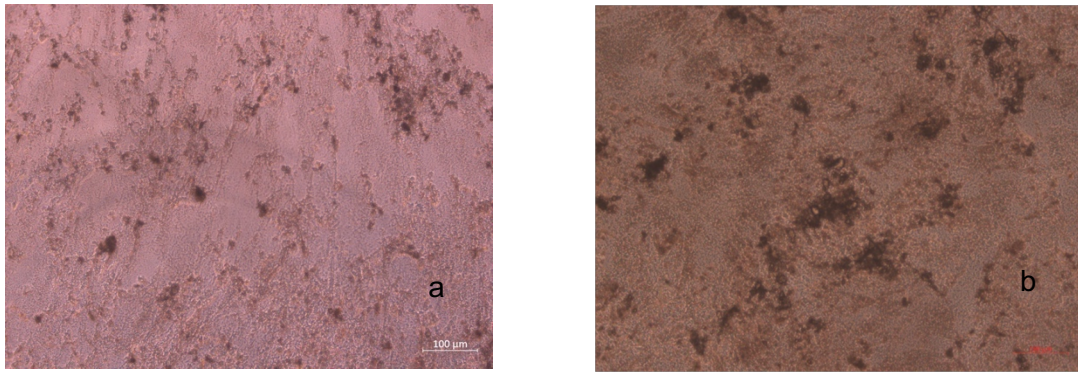


Abb. 78: Osteogene Differenzierung in OM – lichtmikroskopische Darstellung

Lichtmikroskopische Aufnahmen der osteogenen Differenzierung dentaler Stromazellen (DSC) nach Kultur in osteogenem Medium (OM). Die Aufnahmen wurden mit einer 10-fachen Vergrößerung angefertigt, Maßstabsbalken entsprechen 100 µm (Zeiss-Axioskop-40, Zen 3.0 *Blue*). Abbildung (a) zeigt Zellen des Spenders von DSC 210121-2 an Tag 11, (b) die Zellen von DSC210204-2 in Passage 4 an Tag 14. Weitere Informationen zur Versuchsführung und Auswertung sind dem Fließtext zu entnehmen. OM = osteogenes Differenzierungsmedium, DSC = dentale Stromazellen, µm = Mikrometer. Eigene Anfertigung.

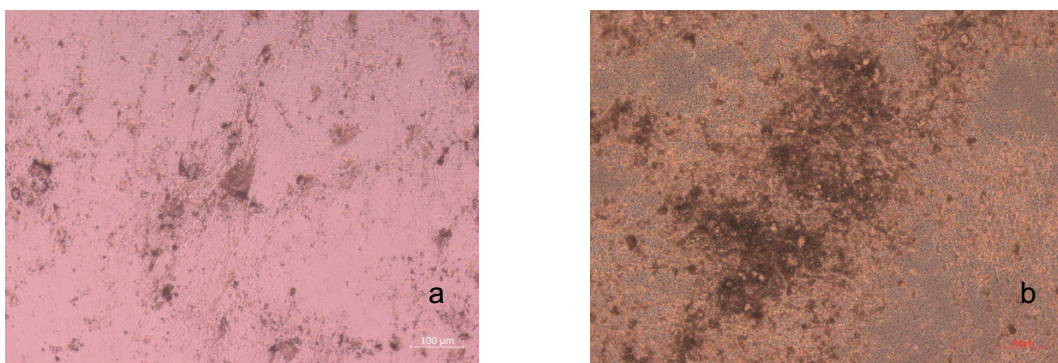


Abb. 79: Osteogene Differenzierung in OM + 20 mM L-Valin – lichtmikroskopische Darstellung

Lichtmikroskopische Aufnahmen der osteogenen Differenzierung dentaler Stromazellen (DSC) nach Kultur in OM + 20 mM L-Valin. Die Aufnahmen wurden mit einer 10-fachen Vergrößerung angefertigt, Maßstabsbalken entsprechen 100 µm (Zeiss-Axioskop-40, Zen 3.0 *Blue*). Abbildung (a) zeigt Zellen des Spenders von DSC 210121-2 an Tag 11, (b) die Zellen von DSC210204-2 in Passage 4 an Tag 14. Weitere Informationen zur Versuchsführung und Auswertung sind dem Fließtext zu entnehmen. OM = osteogenes Differenzierungsmedium, DSC = dentale Stromazellen, mM = Millimolar, µm = Mikrometer. Eigene Anfertigung.

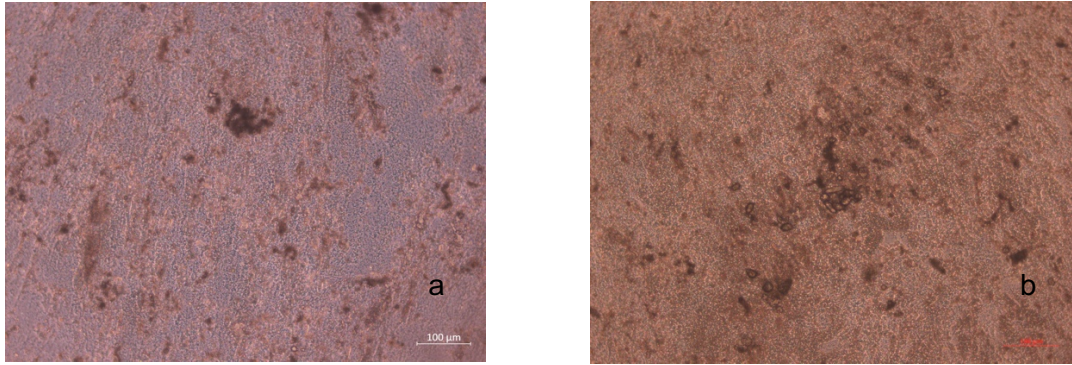


Abb. 80: Osteogene Differenzierung in OM + 10 mM L-Lysin + 10 mM L-Ornithin – lichtmikroskopische Darstellung

Lichtmikroskopische Aufnahmen der osteogenen Differenzierung dentaler Stromazellen (DSC) nach Kultur in OM + 10 mM L-Lysin + 10 mM L-Ornithin. Die Aufnahmen wurden mit einer 10-fachen Vergrößerung angefertigt, Maßstabsbalken entsprechen 100 µm (Zeiss-Axioskop-40, Zen 3.0 Blue). Abbildung (a) zeigt Zellen des Spenders von DSC 210121-2 an Tag 11, (b) die Zellen von DSC210204-2 in Passage 4 an Tag 14. Weitere Informationen zur Versuchsführung und Auswertung sind dem Fließtext zu entnehmen. OM = osteogenes Differenzierungsmedium, DSC = dentale Stromazellen, mM = Millimolar, µm = Mikrometer. Eigene Anfertigung.

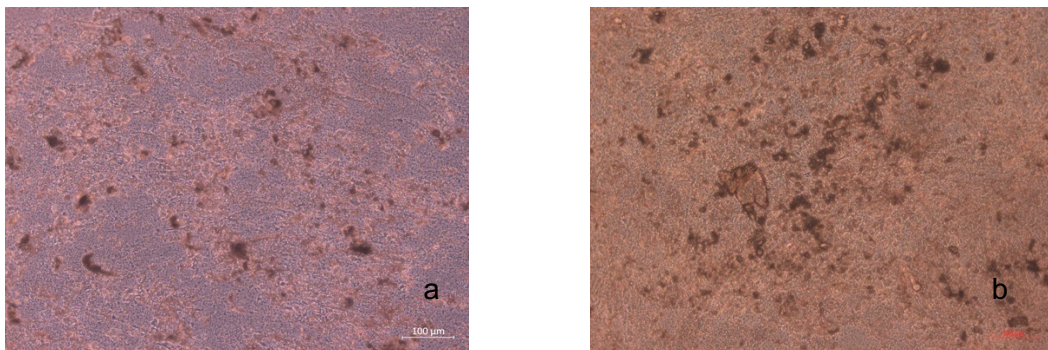


Abb. 81: Osteogene Differenzierung in OM + 1 mM L-Arginin – lichtmikroskopische Darstellung

Lichtmikroskopische Aufnahmen der osteogenen Differenzierung dentaler Stromazellen (DSC) nach Kultur in OM + 1 mM L-Arginin. Die Aufnahmen wurden mit einer 10-fachen Vergrößerung angefertigt, Maßstabsbalken entsprechen 100 µm (Zeiss-Axioskop-40, Zen 3.0 Blue). Abbildung (a) zeigt Zellen des Spenders von DSC 210121-2 an Tag 11, (b) die Zellen von DSC210204-2 in Passage 4 an Tag 14. Weitere Informationen zur Versuchsführung und Auswertung sind dem Fließtext zu entnehmen. OM = osteogenes Differenzierungsmedium, DSC = dentale Stromazellen, mM = Millimolar, µm = Mikrometer. Eigene Anfertigung.

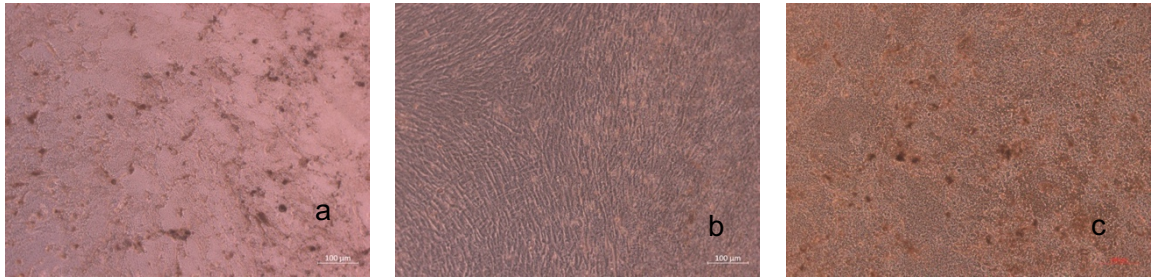


Abb. 82: Osteogene Differenzierung in OM + 0,5 mM L-NIO – lichtmikroskopische Darstellung

Lichtmikroskopische Aufnahmen der osteogenen Differenzierung dentaler Stromazellen (DSC) nach Kultur in OM + 0,5 mM L-NIO. Die Aufnahmen wurden mit einer 10-fachen Vergrößerung angefertigt, Maßstabsbalken entsprechen 100 µm (Zeiss-Axioskop-40, Zen 3.0 Blue). Abbildung (a) zeigt Zellen des Spenders von DSC 210121-2 an Tag 11, (b) die Zellen von DSC210204-2 in Passage 4 an Tag 14. Weitere Informationen zur Versuchsführung und Auswertung sind dem Fließtext zu entnehmen. OM = osteogenes Differenzierungsmedium, L-NIO = L-N⁵-(1-Aminoethyl)-Ornithin, DSC = dentale Stromazellen, mM = Millimolar, µm = Mikrometer. Eigene Anfertigung.

Im Vergleich zu Tag 0 ließ sich eine signifikante Zunahme der osteogenen Differenzierung in den folgenden Medien feststellen:

- OM: $p < 0,011$; $d = 1,38$
- OM + 10 mM L-Lysin + 10 mM L-Ornithin: $p < 0,021$; $d = 1,17$
- OM + 1 mM L-Arginin: $p < 0,029$; $d = 1,08$
- OM + 0,5 mM L-NIO: $p < 0,011$; $d = 1,36$

Lediglich in der Gruppe OM + 20 mM L-Valin konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Tag 0 und Tag 14 festgestellt werden. Das Effektstärkemaß Cohen's d zeigte in allen signifikanten Gruppen Werte > 1 , was auf eine substantielle Wirkung der jeweiligen Zusätze auf die osteogene Differenzierung hinweist.

Auffällig war, dass die maximalen Mineralisierungswerte im zweiten Teil der Versuchsreihe deutlich über denen aus Teil eins lagen, obwohl dieselben osteogenen Medien eingesetzt wurden. Beispielsweise erreichte der OD-600-Wert in OM in Teil zwei bis zu 10,8, während er im ersten Teil maximal 5,9 betrug. Dies deutet auf eine generell höhere Differenzierungsaktivität in diesem Experimentteil hin.

Ein Vergleich der verschiedenen Kulturbedingungen an Tag 14 (siehe Abb. 83: Kalzifizierung in OM, Teil 2, Tag 14) ergab folgende signifikante Unterschiede:

- Zellen in OM zeigten eine signifikant höhere Mineralisierung als jene in OM + 20 mM L-Valin ($p < 0,037$; $d = 1,01$) und in OM + 10 mM L-Lysin + 10 mM L-Ornithin ($p < 0,048$; $d = 0,94$).
- OM + 1 mM L-Arginin wies eine signifikant stärkere Differenzierung auf als OM + 20 mM L-Valin ($p < 0,035$; $d = 1,02$).
- Auch OM + 0,5 mM L-NIO zeigte eine signifikant höhere Mineralisierung im Vergleich zu OM + 20 mM L-Valin ($p < 0,033$; $d = 1,04$).

Die Standardabweichungen lagen zwischen 0,14 (Tag 0) und 7,71 (OM), was auf eine hohe Variabilität insbesondere in den stark differenzierenden Gruppen hinweist.

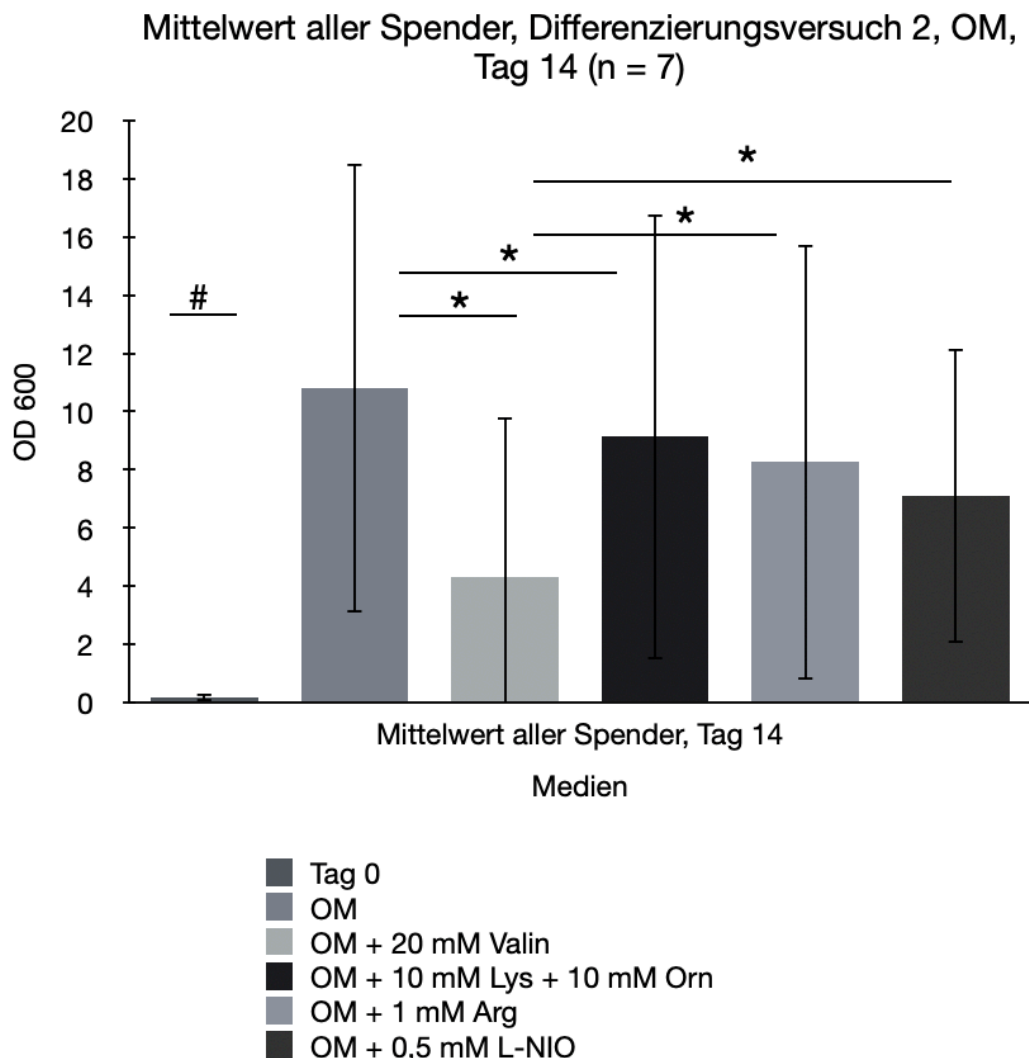


Abb. 83: Kalzifizierung in OM, Teil 2, Tag 14

Dargestellt ist die osteogene Kalzifizierung dentaler Stromazellen (DSC) in verschiedenen Medien an Tag 14 anhand der optischen Dichte bei 600 nm (OD 600). Gezeigt werden die Mittelwerte \pm Standardabweichung der Messungen von $n = 7$ Spendern in folgenden Medien: osteogenes Differenzierungsmedium (OM), OM + 20 mM L-Valin, OM + 10 mM

L-Lysin + 10 mM L-Ornithin, OM + 1 mM L-Arginin und OM + 0,5 mM L-NIO. Die statistische Auswertung erfolgte mittels gepaartem *t*-Test. Signifikante Unterschiede zwischen einzelnen Gruppen erkennbar und für mehrere Bedingungen Cohen's *d* > 0,8. Nach Bonferroni-Korrektur zeigten sich jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede. Statistische Markierung: Ein Stern entspricht $p < 0,05$. # kennzeichnet einen statistisch signifikanten Unterschied im Vergleich zu allen anderen Bedingungen, mit Ausnahme von OM + L-Valin. Weitere Informationen zur Versuchsführung und Auswertung sind dem Fließtext zu entnehmen. OD 600 = optische Dichte bei 600 nm, OM = osteogenes Differenzierungsmedium, Val = L-Valin, Lys = L-Lysin, Orn = L-Ornithin, Arg = L-Arginin, L-NIO = L-N⁵-(1-Aminoethyl)-Ornithin, DSC = dentale Stromazellen, n = Anzahl biologischer Replikate, FCS = fetales Kälberserum, mM = Millimolar. Eigene Anfertigung.

Die Ergebnisse aus Teil zwei der Differenzierungsexperimente zeigen, dass die osteogene Aktivität unter OM-Bedingungen und mit bestimmten Aminosäurezusätzen – insbesondere L-Arginin und L-NIO – signifikant gesteigert werden konnte. Die höchsten Mineralisierungswerte wurden in der OM-Gruppe erreicht, wobei die Kombination mit L-Valin die osteogene Differenzierung sogar tendenziell hemmte. Diese Beobachtung wird durch die signifikant niedrigeren Werte in der L-Valin-Gruppe im Vergleich zu anderen Medien gestützt.

Bemerkenswert ist, dass sich die Mineralisierung in diesem Versuchsteil insgesamt deutlich stärker ausprägte als im ersten Teil, was auf experimentelle Unterschiede wie Spendercharakteristika oder Passagezahl zurückzuführen sein könnte.

3.4.3.2 *Ergebnisse zweiter Teil in DMEM ohne L-Arginin*

Bei der Analyse der Zellen, die in DMEM ohne L-Arginin (mit 2 % FCS) kultiviert wurden, zeigten sich bereits lichtmikroskopisch Unterschiede in der Zelldichte in Abhängigkeit von der zugesetzten L-Arginin-Konzentration (siehe **Abb. 84: Osteogene Differenzierung in DMEM ohne L-Arginin (mit 2 % FCS)**, **Abb. 85: Osteogene Differenzierung in DMEM ohne L-Arginin + 50 µM L-Arginin** und **Abb. 86: Osteogene Differenzierung in DMEM ohne L-Arginin + 200 µM L-Arginin**). Eine zunehmende L-Arginin-Supplementierung ging visuell mit einer erhöhten Zellkonfluenz und verstärkter Mineralisierung einher.

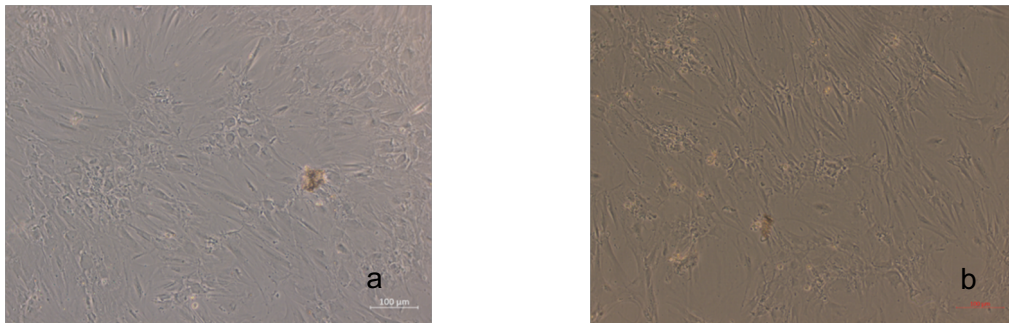


Abb. 84: Osteogene Differenzierung in DMEM ohne L-Arginin (mit 2 % FCS) – lichtmikroskopische Darstellung

Lichtmikroskopische Aufnahmen der osteogenen Differenzierung dentaler Stromazellen (DSC) nach Kultur in DMEM ohne L-Arginin (mit 2 % FCS). Die Aufnahmen wurden mit einer 10-fachen Vergrößerung angefertigt, Maßstabsbalken entsprechen 100 µm (Zeiss-Axioskop-40, Zen 3.0 Blue). Abbildung (a) zeigt Zellen des Spenders DSC-210121-2 an Tag 11, (b) Zellen des Spenders DSC-210204-2 in Passage 4 an Tag 14. Weitere Informationen zur Versuchsführung und Auswertung sind dem Fließtext zu entnehmen. DMEM = *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, FCS = fetales Kälberserum, DSC = dentale Stromazellen, % = Prozent, µm = Mikrometer. Eigene Anfertigung.

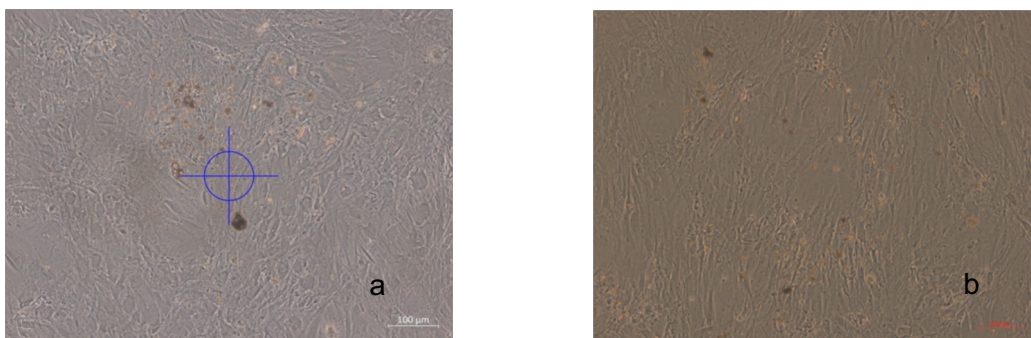


Abb. 85: Osteogene Differenzierung in DMEM ohne L-Arginin + 50 µM L-Arginin – lichtmikroskopische Darstellung

Lichtmikroskopische Aufnahmen der osteogenen Differenzierung dentaler Stromazellen (DSC) nach Kultur in DMEM ohne L-Arginin + 50 µM L-Arginin. Die Aufnahmen wurden mit einer 10-fachen Vergrößerung angefertigt, Maßstabsbalken entsprechen 100 µm (Zeiss-Axioskop-40, Zen 3.0 Blue). Abbildung (a) zeigt Zellen des Spenders DSC-210121-2 an Tag 11, (b) Zellen des Spenders DSC-210204-2 in Passage 4 an Tag 14. Weitere Informationen zur Versuchsführung und Auswertung sind dem Fließtext zu entnehmen. DMEM = *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, DSC = dentale Stromazellen, µM = Mikromolar, µm = Mikrometer. Eigene Anfertigung.

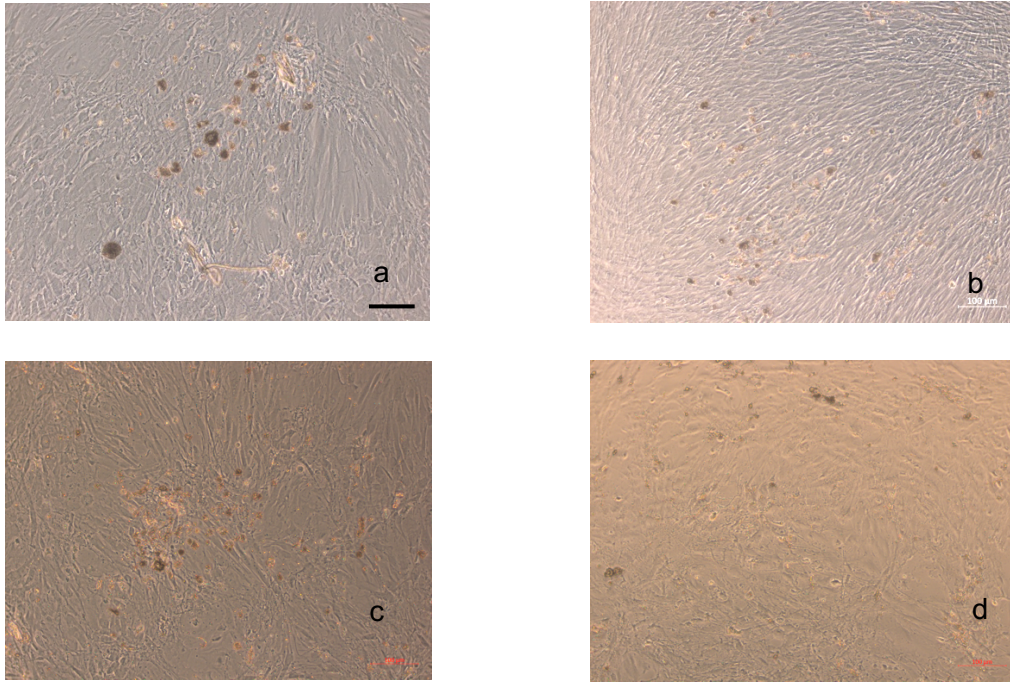


Abb. 86: Osteogene Differenzierung in DMEM ohne L-Arginin + 200 μ M L-Arginin – lichtmikroskopische Darstellung

Lichtmikroskopische Aufnahmen der osteogenen Differenzierung dentaler Stromazellen (DSC) nach Kultur in DMEM ohne L-Arginin + 200 μ M L-Arginin. Die Aufnahmen wurden mit einer 10-fachen Vergrößerung angefertigt, Maßstabsbalken entsprechen 100 μ m (Zeiss-Axioskop-40, Zen 3.0 *Blue*). Abbildung (a) zeigt Zellen des Spenders DSC-210121-2 an Tag 11, (b) von DSC-210217-2 in Passage 2 an Tag 11, (c) und (d) von DSC-210204-2 in Passage 4 an Tag 14. Weitere Informationen zur Versuchsführung und Auswertung sind dem Fließtext zu entnehmen. DMEM = *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, DSC = dentale Stromazellen, μ M = Mikromolar, μ m = Mikrometer. Eigene Anfertigung.

Statistisch konnten jedoch weder im Vergleich zu Tag 0 noch zwischen den einzelnen DMEM-Gruppen signifikante Unterschiede festgestellt werden. Dies galt sowohl für den unkorrigierten p -Wert als auch nach Bonferroni-Korrektur sowie für die Effektstärkemaße (Cohen's $d < 0,8$).

Die Standardabweichungen variierten je nach Bedingung deutlich und lagen zwischen 0,12 (DMEM ohne L-Arginin) und 2,03 (DMEM ohne L-Arginin + 50 μ M L-Arginin) (siehe **Abb. 87: Kalzifizierung in DMEM ohne L-Arginin, Teil 2, Tag 14**). Diese Werte weisen auf eine teils erhebliche interindividuelle Variabilität der Spenderantworten hin.

Mittelwert aller Spender, Differenzierungsversuch 2,
DMEM ohne Arg, Tag 14 (n = 7)

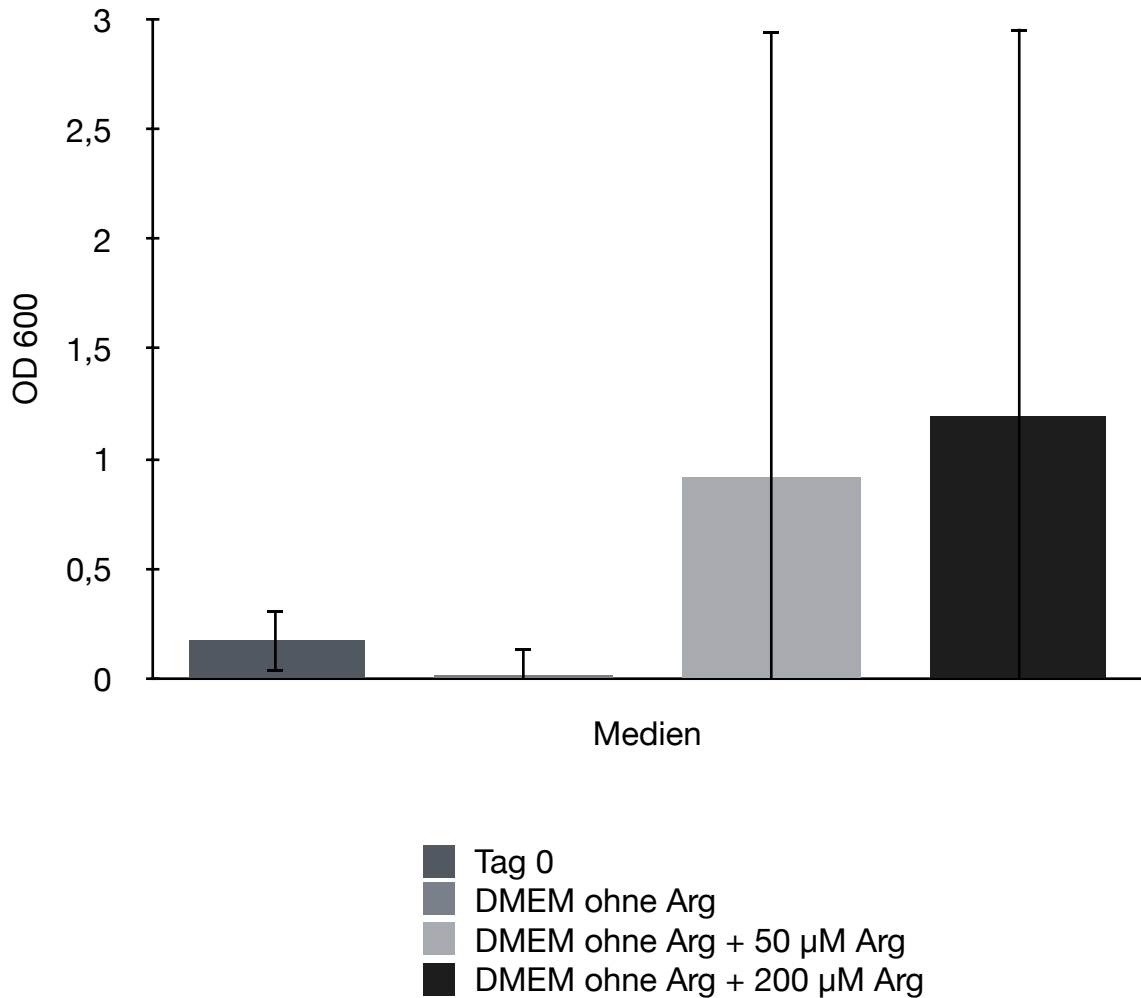


Abb. 87: Kalzifizierung in DMEM ohne L-Arginin, Teil 2, Tag 14

Dargestellt ist die osteogene Kalzifizierung dentaler Stromazellen (DSC) in verschiedenen Medien an Tag 14 anhand der optischen Dichte bei 600 nm (OD 600). Gezeigt werden die Mittelwerte \pm Standardabweichung der Messungen von n = 7 Spendern in folgenden Medien: DMEM ohne L-Arginin, DMEM ohne L-Arginin + 50 μ M L-Arginin und DMEM ohne L-Arginin + 200 μ M L-Arginin. Der FCS-Gehalt betrug 2 %. Die statistische Auswertung erfolgte mittels gepaartem t-Test. Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt werden ($p > 0,05$ und $d < 0,8$) und es liegt eine hohe Streuung der Werte vor. Weitere Informationen zur Versuchsführung und Auswertung sind dem Fließtext zu entnehmen. OD 600 = optische Dichte bei 600 nm, DMEM = *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Arg = L-Arginin, DSC = dentale Stromazellen, n = Anzahl biologischer Replikate, FCS = fetales Kälberserum, μ M = Mikromolar, % = Prozent. Eigene Anfertigung.

In **Abb. 88: Kalzifizierung in DMEM ohne L-Arginin + 50 μ M L-Arginin, alle Spender einzeln** wird diese Heterogenität deutlich: Für DMEM + 50 μ M L-Arginin zeigte der Spender DSC 210217-1 (Passage 4) stark erhöhte OD 600-Werte mit einem Mittelwert von 5,5, während alle anderen Spender Werte im Bereich von 0,06–0,36 aufwiesen.

DMEM ohne Arg + 50 μ M Arg, Differenzierungsversuch
Teil 2, Ausreißerwert an Tag 14

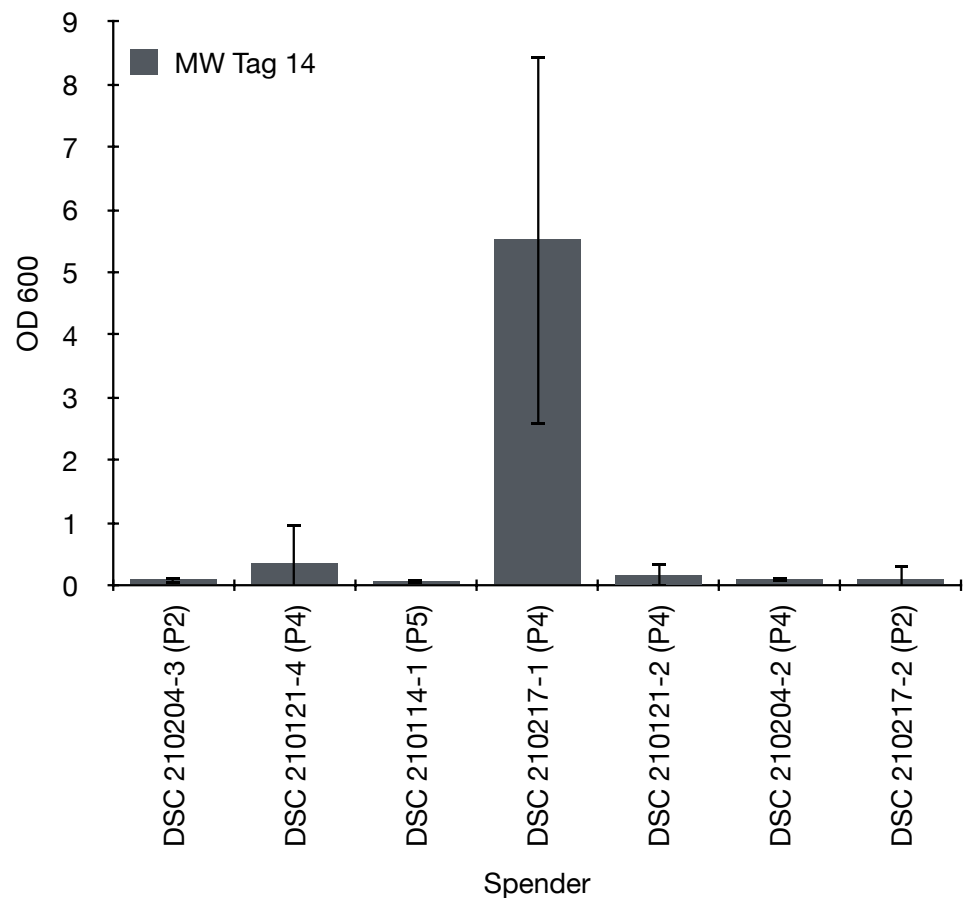


Abb. 88: Kalzifizierung in DMEM ohne L-Arginin + 50 μ M L-Arginin, alle Spender einzeln

Dargestellt ist die osteogene Kalzifizierung dentaler Stromazellen (DSC) nach Kultivierung in DMEM ohne L-Arginin, ergänzt mit 50 μ M L-Arginin, an Tag 14. Gezeigt werden die Mittelwerte (MW) der optischen Dichte bei 600 nm (OD 600) für alle einzelnen Spender (n = 7) sowie deren jeweilige Standardabweichung. Der FCS-Gehalt betrug 2%. Es zeigt sich eine deutliche interindividuelle Heterogenität: Während die meisten Spender Kalzifizierungswerte zwischen 0,06 und 0,36 aufwiesen, zeigte ein Spender (DSC 210217-1, Passage 4) stark erhöhte Werte mit einem MW von 5,5. Weitere Informationen zur Bewertung dieser Ausreißer und zur Interpretation der Ergebnisse finden sich im Text. OD 600 = optische Dichte bei 600 nm, DMEM = *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Arg = L-Arginin, DSC = dentale Stromazellen, P = Passage, MW = Mittelwert, n = Anzahl biologischer Replikate, FCS = fetales Kälberserum, μ M = Mikromolar, % = Prozent. Eigene Anfertigung.

Auch in DMEM + 200 μ M L-Arginin zeigten sich ausgeprägte Einzelwerte (siehe **Abb. 89: Kalzifizierung in DMEM ohne L-Arginin + 200 μ M L-Arginin, alle Spender einzeln**) bei:

- DSC 210121-4, P4 (MW 0,51)
- DSC 210217-1, P4 (MW 4,1)
- DSC 210217-2, P2 (MW 3,39)

Die restlichen Spender lagen in einem deutlich niedrigeren Bereich (MW 0,01–0,24).

Diese starken donorabhängigen Schwankungen sind als idiopathische interindividuelle Reaktionen zu interpretieren, die sich nicht auf einzelne technische Ausreißer zurückführen lassen (wie in RPMI-Medien), sondern eine biologische Variabilität widerspiegeln. Aus diesem Grund wurden die betreffenden Spenderdaten nicht aus der Gesamtauswertung ausgeschlossen, sollten jedoch in der Diskussion kritisch berücksichtigt werden.

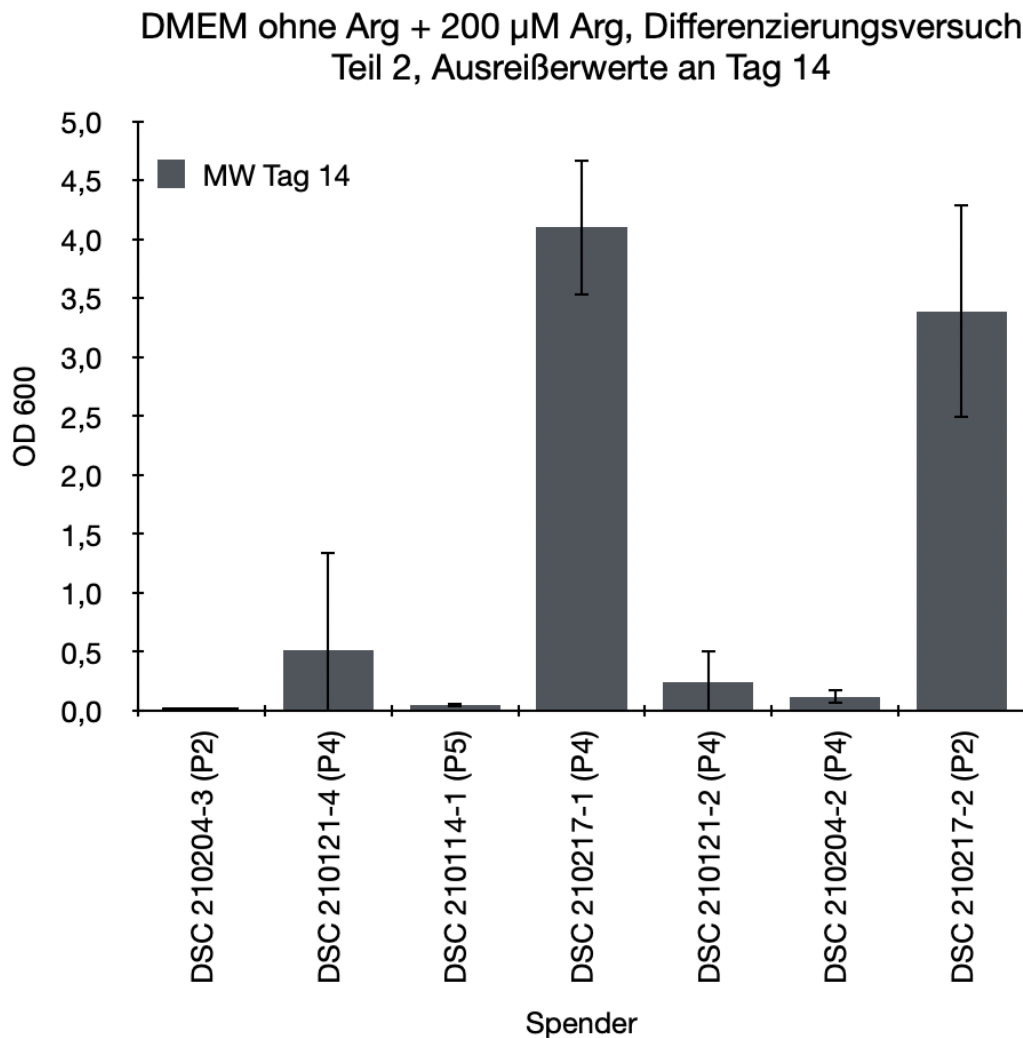


Abb. 89: Kalzifizierung in DMEM ohne L-Arginin + 200 μ M L-Arginin, alle Spender einzeln

Dargestellt ist die osteogene Kalzifizierung dentaler Stromazellen (DSC) nach Kultivierung in DMEM ohne L-Arginin, ergänzt mit 200 μ M L-Arginin, an Tag 14. Gezeigt werden die Mittelwerte (MW) der optischen Dichte bei 600 nm (OD 600) für alle einzelnen Spender (n = 7) sowie deren jeweilige Standardabweichung. Der FCS-Gehalt betrug 2 %. Drei Spender zeigten deutlich erhöhte Mineralisierungswerte: DSC 210121-4 (Passage 4, MW = 0,51), DSC 210217-1 (P4, MW = 4,1) und DSC 210217-2 (P2, MW = 3,39), während die übrigen Spender deutlich niedrigere Werte im Bereich von 0,01–0,24 aufwiesen. Diese ausgeprägten Unterschiede deuten auf eine interindividuelle, biologisch bedingte Heterogenität hin und sind nicht als technischer Artefakt zu werten. Daher wurden diese Daten in der Gesamtauswertung belassen. Weitere Informationen zur Bewertung dieser Ausreißer und zur Interpretation der Ergebnisse finden sich im Text. OD 600 = optische Dichte bei 600 nm, DMEM = *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Arg = L-Arginin, DSC = dentale Stromazellen, P = Passage, MW = Mittelwert, n = Anzahl biologischer Replikate, FCS = fetales Kälberserum, μ M = Mikromolar, % = Prozent. Eigene Anfertigung.

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die osteogene Differenzierung in DMEM ohne L-Arginin zwar in Abhängigkeit von der L-Arginin-Konzentration variiert, jedoch keine statistisch signifikanten Effekte erzielt wurden. Die visuelle Zunahme der Zellkonfluenz sowie einzelne stark erhöhte OD-600-Werte bei bestimmten Spendern deuten jedoch auf eine mögliche individuelle Reaktivität auf L-Arginin-Supplementierung hin.

Die ausgeprägte Spenderheterogenität erschwert eine klare statistische Bewertung. Insgesamt legen die Daten nahe, dass L-Arginin potenziell die osteogene Differenzierung fördern kann, dieser Effekt aber stark vom donorspezifischen zellulären Antwortverhalten abhängt.

3.4.3.1 *Normierte osteogene Differenzierung in OM, Teil zwei*

Zur besseren Vergleichbarkeit der Differenzierungsleistung unter verschiedenen Kulturbedingungen wurde die osteogene Mineralisierung im osteogenen Standardmedium (OM) auf 100 % normiert (siehe **Abb. 90: Prozentuale Kalzifizierung in OM, Teil 2**). Die normierten Mittelwerte ergaben dabei folgende Verteilung:

- OM + 0,5 mM L-NIO: 115 %
- OM + 1 mM L-Arginin: 78 %
- OM + 10 mM L-Lysin + 10 mM L-Ornithin: 76 %
- OM + 20 mM L-Valin: 46 %

Die statistische Auswertung ergab signifikante Unterschiede in folgenden Vergleichen:

- OM vs. OM + L-Valin: $p = 0,01$; Cohen's $d = 1,415$
- OM vs. OM + L-Lysin + L-Ornithin: $p = 0,012$; $d = 1,343$
- OM + L-Valin vs. OM + L-Arginin: $p = 0,006$; $d = 1,567$

Nach Anwendung der Bonferroni-Korrektur zur Kontrolle für multiples Testen entfielen jedoch alle Signifikanzen. Für die übrigen Vergleiche zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede.

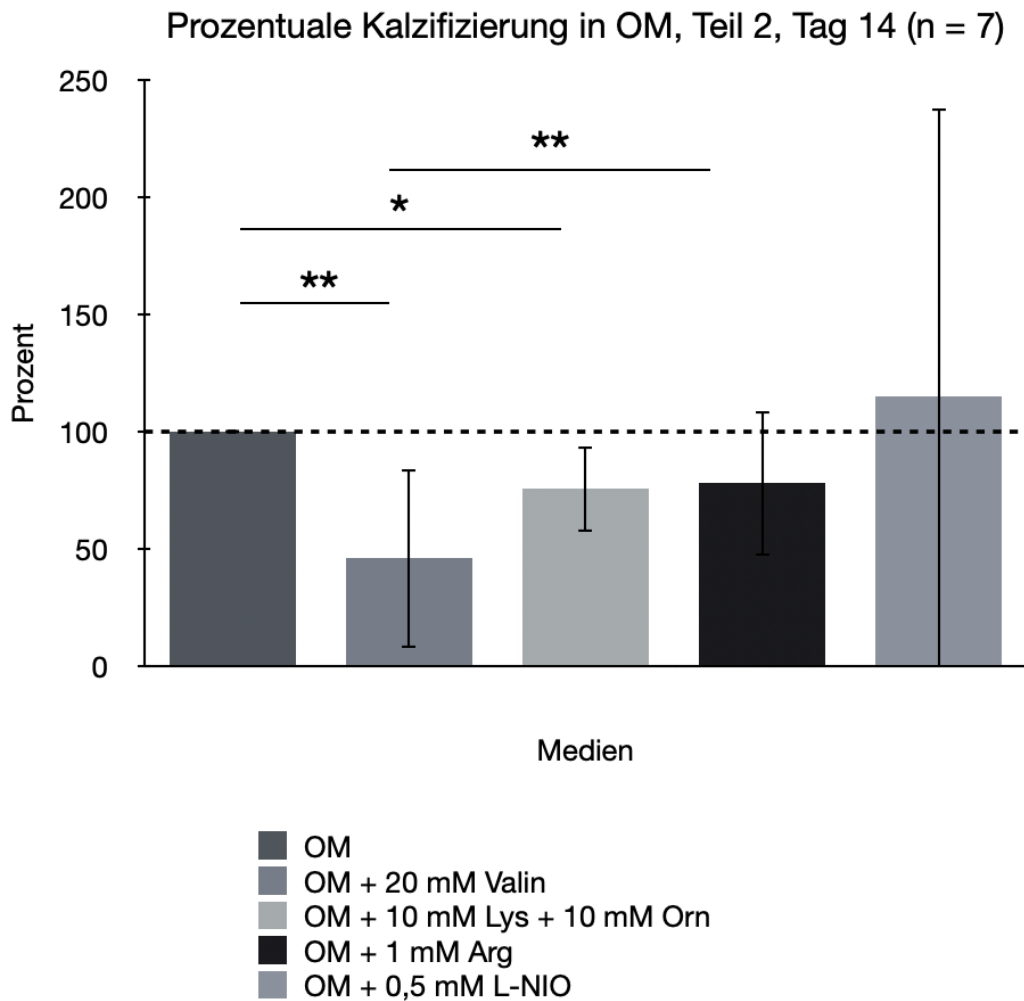


Abb. 90: Prozentuale Kalzifizierung in OM, Teil 2

Dargestellt ist die osteogene Differenzierung der dentalen Stromazellen (DSC) an Tag 14 in verschiedenen Zusätzen zum osteogenen Differenzierungsmedium (OM), normiert auf die Kalzifizierung in reinem OM (= 100 %, Kontrollbalken ganz links). Gezeigt sind die Mittelwerte der prozentualen Kalzifizierung sowie deren Standardabweichung in OM + 20 mM L-Valin (46 %), OM + 10 mM L-Lysin + 10 mM L-Ornithin (76 %), OM + 1 mM L-Arginin (78 %) und OM + 0,5 mM L-NIO (115 %). Es wurden n = 7 Spender ausgewertet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels gepaartem t-Test. Die statistische Auswertung ergab signifikante Unterschiede in folgenden Gruppenvergleichen: OM und OM + L-Valin ($p = 0,01$; $d > 0,8$), OM und OM + L-Lysin + L-Ornithin ($p = 0,012$; $d > 0,8$) sowie OM + L-Valin und OM + L-Arginin ($p = 0,006$; $d > 0,8$). Nach Anwendung der Bonferroni-Korrektur entfielen jedoch alle Signifikanzen. Statistische Markierung: Ein Stern entspricht $p < 0,05$; zwei Sterne entsprechen $p < 0,01$. Weitere Informationen zur Versuchsführung und Auswertung sind dem Fließtext zu entnehmen. OM = osteogenes Differenzierungsmedium, Val = L-Valin, Lys = L-Lysin, Orn = L-Ornithin, Arg = L-Arginin, L-NIO = L-N⁵-(1-Aminoethyl)-Ornithin, DSC = dentale Stromazellen, n = Anzahl biologischer Replikate, FCS = fetales Kälberserum, mM = Millimolar, % = Prozent. Eigene Anfertigung.

Die normierten Ergebnisse aus dem zweiten Teil zeigen, dass die Mineralisierungskapazität der Zellen unter Standard-OM-Bedingungen am höchsten war. Ergänzungen mit L-Valin führten zu einer ausgeprägten Reduktion der osteogenen Differenzierung auf nur 46 % im Vergleich zu OM. Auch unter L-Lysin/L-Ornithin und L-Arginin resultierte eine geringere

Mineralisierung (76 % bzw. 78 %). Lediglich L-NIO erreichte mit 115 % einen höheren Durchschnittswert als das Referenzmedium OM.

Die Effektstärkemaße deuten in mehreren Vergleichen auf substantielle Unterschiede hin (Cohen's $d > 1,3$), insbesondere im Vergleich von L-Valin zu OM sowie zu L-Arginin. Dennoch entfielen diese Signifikanzen nach Bonferroni-Korrektur.

Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass L-Valin eine potenziell hemmende Wirkung auf die Mineralisierung haben könnte, während L-NIO eine leicht förderliche Tendenz zeigt. Die Supplementierungen mit L-Arginin sowie L-Lysin/L-Ornithin scheinen hingegen in diesem Versuchsteil die Differenzierungskapazität nicht weiter gesteigert zu haben. Der Befund verdeutlicht die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen zur differenziellen Wirkung einzelner Aminosäuren auf die osteogene Differenzierung.

3.4.3.1 *Normierte osteogene Differenzierung in DMEM ohne L-Arginin, Teil zwei*

Zur Bewertung des Einflusses unterschiedlicher L-Arginin-Konzentrationen auf die osteogene Differenzierung in DMEM ohne L-Arginin wurde das Medium mit 200 μM L-Arginin als Referenz (100 %) gewählt (siehe **Abb. 91: Prozentuale Kalzifizierung in DMEM ohne L-Arginin, Teil 2**).

Im Vergleich dazu zeigten die Zellen in

- DMEM ohne L-Arginin eine durchschnittliche Kalzifizierung von 75 %,
- DMEM ohne L-Arginin + 50 μM L-Arginin eine deutlich gesteigerte Mineralisierung von 182 %.

Statistisch ergaben sich jedoch weder signifikante Unterschiede im Sinne des p -Wertes, noch Effektstärken mit Cohen's $d > 0,8$.

Auffällig war insbesondere der Vergleich zu den Werten in vergleichbaren RPMI-Medien: Die Mineralisierung in DMEM ohne L-Arginin + 200 μM L-Arginin erreichte einen optischen Dichtewert (OD 600) von 1,2, während RPMI mit L-Arginin lediglich einen Wert von 0,08 erreichte. Dies deutet auf eine insgesamt höhere osteogene Aktivität in der DMEM-basierten Kultur hin.

Die Standardabweichungen wurden für alle Gruppen dargestellt und zeigten besonders bei den Zellen in DMEM ohne L-Arginin + 50 μM L-Arginin auffällig hohe Schwankungen, was auf eine starke interindividuelle Varianz der Spenderantworten schließen lässt.

Prozentuale Kalzifizierung in DMEM ohne Arg, Teil 2, Tag 14 (n = 7)

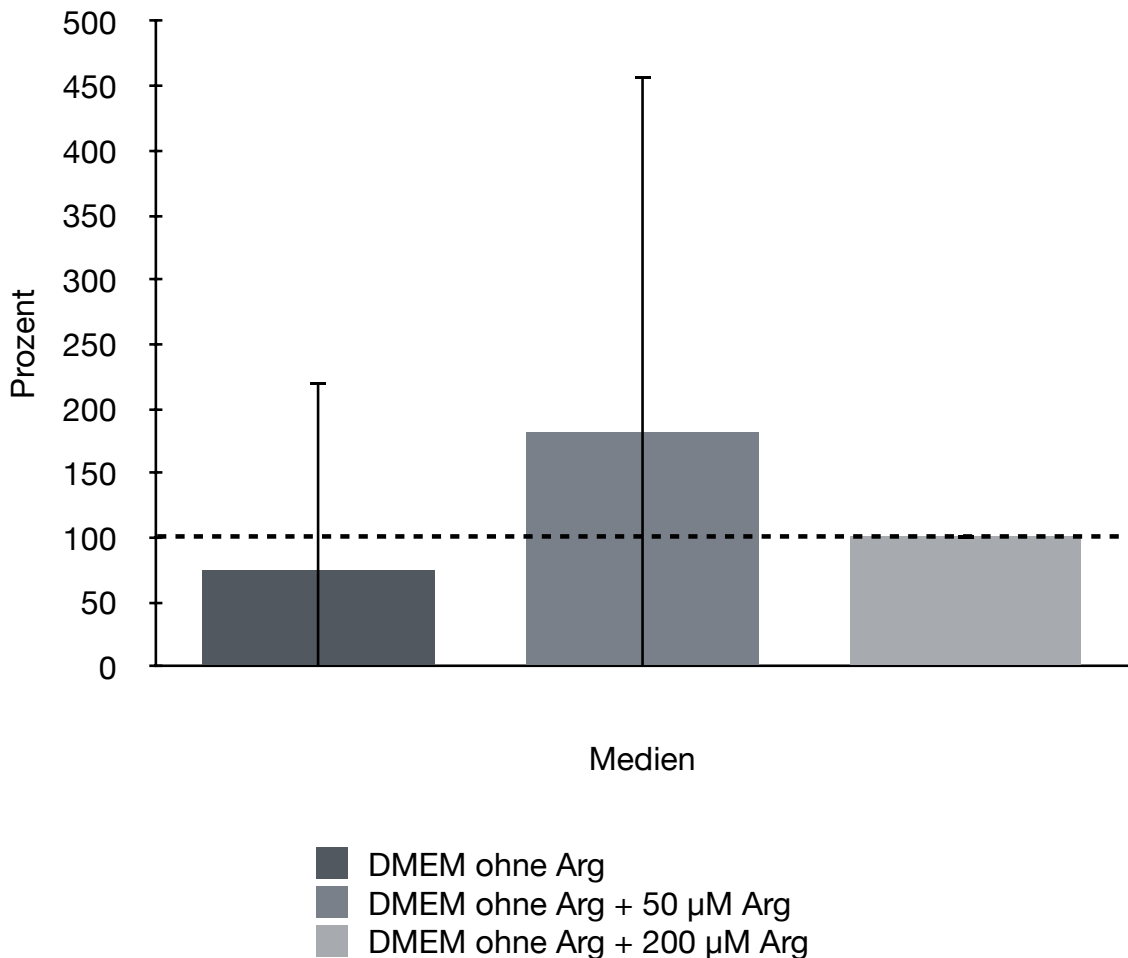


Abb. 91: Prozentuale Kalzifizierung in DMEM ohne L-Arginin, Teil 2

Dargestellt ist die osteogene Differenzierung der dentalen Stromazellen (DSC) an Tag 14 in unterschiedlichen DMEM ohne L-Arginin-Medien, normiert auf die Kalzifizierung in DMEM ohne L-Arginin + 200 µM L-Arginin (= 100 %, Kontrollbalken ganz rechts). Gezeigt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung der prozentualen Kalzifizierung in DMEM ohne L-Arginin und DMEM ohne L-Arginin + 50 µM L-Arginin. Es wurden n = 7 Spender ausgewertet. Der FCS-Gehalt betrug 2 %. DMEM ohne L-Arginin + 50 µM L-Arginin zeigt die stärkste Wirkung, allerdings bei einer hohen Streuung. Die statistische Auswertung erfolgte mittels gepaartem *t*-Test. Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt werden ($p > 0,05$ und $d < 0,8$). Weitere Informationen zur Versuchsführung und Auswertung sind dem Fließtext zu entnehmen. DMEM = *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Arg = L-Arginin, DSC = dentale Stromazellen, n = Anzahl biologischer Replikate, FCS = fetales Kälberserum, µM = Mikromolar, % = Prozent. Eigene Anfertigung.

Trotz fehlender statistischer Signifikanz weisen die normierten Daten auf eine dosisabhängige Wirkung von L-Arginin auf die osteogene Differenzierung hin. Besonders die starke Zunahme der Mineralisierung bei 50 µM L-Arginin (182 %) legt einen potenziell stimulierenden Effekt nahe. Gleichzeitig deuten die hohen Standardabweichungen auf individuelle Unterschiede im Zellverhalten hin, wodurch ein klarer statistischer Effekt in dieser Stichprobengröße nicht erkennbar wurde.

Der Vergleich mit den RPMI-Medien unterstreicht zudem, dass das verwendete DMEM ohne L-Arginin bei identischer L-Arginin-Konzentration eine deutlich höhere Mineralisierungsleistung ermöglicht, was auf Unterschiede in der Medienzusammensetzung und deren Auswirkungen auf das Differenzierungspotenzial hinweist.

3.4.4 Auswertung erster und zweiter Teil der Differenzierungsversuche

Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Ergebnisse der osteogenen Differenzierung aus dem ersten und zweiten Teil der Versuchsreihen zusammengeführt. Für die Auswertung von Tag 14 der OM-Medien und ihrer Zusätze lagen Daten von insgesamt 18 Spendern vor.

3.4.4.1 Ergebnisse erster und zweiter Teil

Wie in **Abb. 92: Kalzifizierung in OM, Teil 1 und 2 zusammengefasst, Tag 14** dargestellt, zeigten die Zellen in OM + 10 mM L-Lysin + 10 mM L-Ornithin (OD 600 = 7,14) und in OM allein (OD 600 = 7,07) die höchsten durchschnittlichen Mineralisierungswerte. Im Gegensatz dazu wiesen die Zellen in OM + 20 mM L-Valin die geringste Kalzifizierung auf (OD 600 = 4,17).

Die statistische Auswertung ergab mehrere signifikante Unterschiede:

Vergleich zu Tag 0:

- OM: $p = 0,0001$ (Bonferroni-korrigiert $p = 0,0015$), Cohen's $d = 1,19$
- OM + 20 mM L-Valin: $p = 0,0005$ ($p = 0,0075$), $d = 1,01$
- OM + 10 mM L-Lysin + 10 mM L-Ornithin: $p = 0,00005$ ($p = 0,0007$), $d = 1,27$
- OM + 1 mM L-Arginin: $p = 0,0001$ ($p = 0,0017$), $d = 1,17$
- OM + 0,5 mM L-NIO: $p = 0,0001$ ($p = 0,0013$), $d = 1,21$

Vergleich zwischen Medien:

- OM vs. OM + L-Valin: $p = 0,0235$
- OM vs. OM + L-NIO: $p = 0,0103$
- OM + L-Valin vs. OM + L-Lysin + L-Ornithin: $p = 0,0111$
- OM + L-Valin vs. OM + L-Arginin: $p = 0,0042$
- OM + L-Lysin + L-Ornithin vs. OM + L-NIO: $p = 0,02$
- OM + L-Arginin vs. OM + L-NIO: $p = 0,0369$

Die Standardabweichungen lagen, abhängig vom Medium und Spender, zwischen 0,1 (Tag 0) und 5,88 (OM an Tag 14) und verdeutlichen erneut eine interindividuell stark schwankende Differenzierungsantwort.

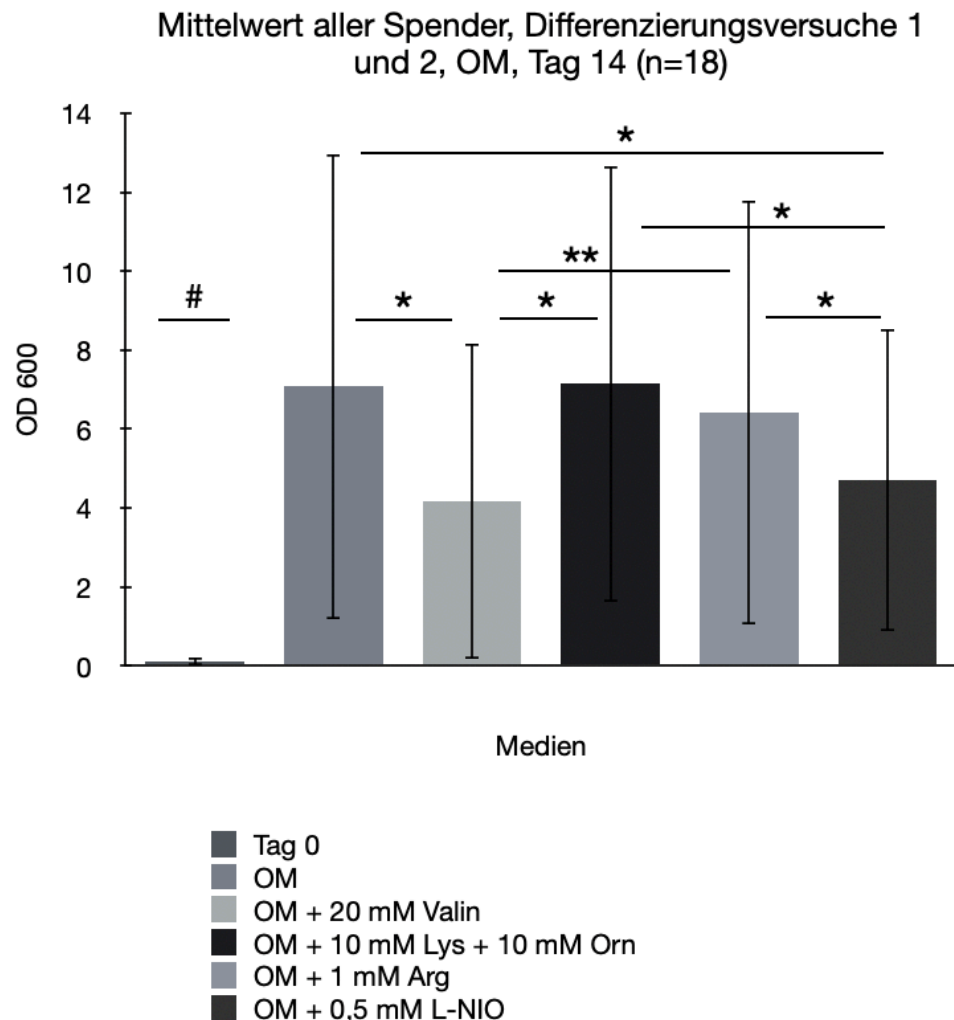


Abb. 92: Kalzifizierung in OM, Teil 1 und 2 zusammengefasst, Tag 14

Dargestellt ist die osteogene Kalzifizierung aller dentaler Stromazellen (DSC) aus Teil eins und zwei der Versuche in verschiedenen Medien an Tag 14 anhand der optischen Dichte bei 600 nm (OD 600). Gezeigt werden die Mittelwerte \pm Standardabweichung der Messungen von $n = 18$ Spendern in folgenden Medien: OM, OM + 20 mM L-Valin, OM + 10 mM L-Lysin + 10 mM L-Ornithin, OM + 1 mM L-Arginin und OM + 0,5 mM L-NIO. Die höchsten Werte wurden in OM + L-Lysin + L-Ornithin (7,14) und OM (7,07), die niedrigsten in OM + L-Valin (4,17) beobachtet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels gepaartem t -Test. Signifikante Unterschiede zeigten sich im Vergleich zu Tag 0 ($p < 0,001-0,00005$; Bonferroni-korrigiert $p < 0,0075$; $d > 1,01-1,27$), ebenso zwischen einzelnen Medien (z. B. OM vs. OM + L-Valin: $p = 0,0235$). Standardabweichungen lagen je nach Medium zwischen 0,1 und 5,88. Statistische Markierung: Ein Stern entspricht $p < 0,05$; zwei Sterne entsprechen $p < 0,01$. # kennzeichnet einen statistisch signifikanten Unterschied im Vergleich zu allen anderen Bedingungen. Weitere Informationen zur Versuchsführung und Auswertung sind dem Fließtext zu entnehmen. OD 600 = optische Dichte bei 600 nm, OM = osteogenes Differenzierungsmedium, Val = L-Valin, Lys = L-Lysin, Orn = L-Ornithin, Arg = L-Arginin, L-NIO = L-N⁵-(1-Aminoethyl)-Ornithin, DSC = dentale Stromazellen, n = Anzahl biologischer Replikate, FCS = fetales Kälberserum, mM = Millimolar. Eigene Anfertigung.

In Abb. 93: Vergleich der Mineralisierung in OM-Medien und Zusätzen werden die Unterschiede der Mineralisierungsgrade visuell anhand von drei 24-Well-Platten dargestellt. Die identischen Medien befinden sich jeweils in einer Zeile, was eine direkte optische Vergleichbarkeit erleichtert.

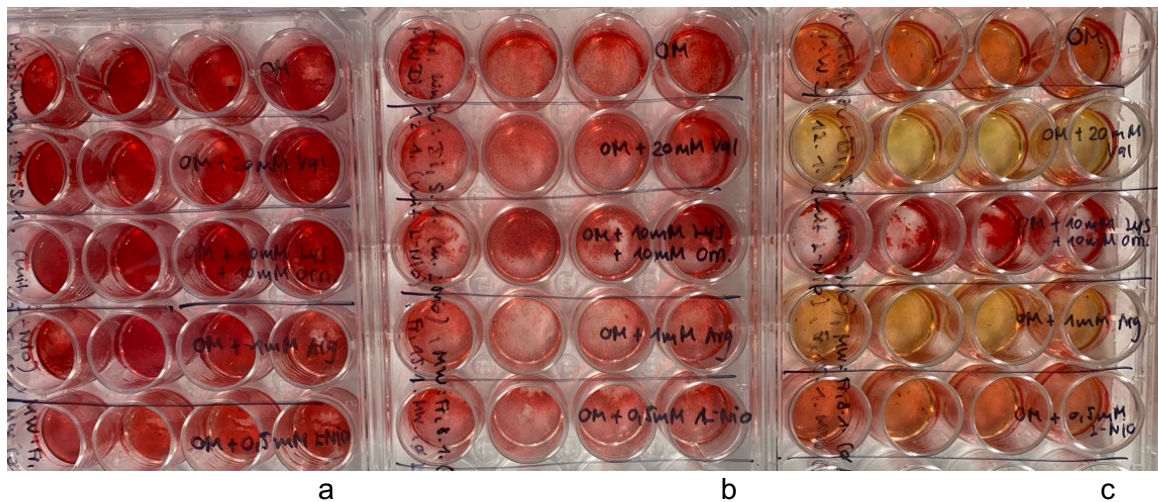


Abb. 93: Vergleich der Mineralisierung in OM-Medien und Zusätzen

Makroskopische Darstellung der osteogenen Differenzierung der DSC in verschiedenen OM-Medien und Zusätzen am Tag 14. Gezeigt werden jeweils 24-Well-Platten: (a) Spender DSC-201119-2 in Passage 3; (b) Spender DSC-201207-2 in Passage 2; (c) Spender DSC-201119-4 in Passage 5. Die Zellen wurden jeweils in der obersten Reihe in OM, in der zweiten Reihe in OM + 20 mM L-Valin, in der dritten Reihe in OM + 10 mM L-Lysin + 10 mM L-Ornithin, in der vierten Reihe in OM + 1 mM L-Arginin und in der fünften Reihe in OM + 0,5 mM L-NIO kultiviert. Die Unterschiede in der Farbintensität zeigen eine variierende Mineralisierung. Außerdem erkennt man auch hier bereits die Variabilität der verschiedenen Donoren. Weitere Informationen sind dem Fließtext zu entnehmen. OM = osteogenes Differenzierungsmedium, DSC = dentale Stromazellen, Val = L-Valin, Lys = L-Lysin, Orn = L-Ornithin, Arg = L-Arginin, L-NIO = L-N⁵-(1-Aminoethyl)-Ornithin, mM = Millimolar. Eigene Anfertigung.

Die zusammengefassten Ergebnisse aus beiden Versuchsteilen bestätigen, dass die Zusätze L-Lysin + L-Ornithin sowie L-Arginin die osteogene Differenzierung dentaler Stromazellen in OM signifikant fördern. Besonders die Kombination aus L-Lysin und L-Ornithin führte zu einem der höchsten mittleren Mineralisierungsgrade und einem starken Effektmaß (Cohen's $d = 1,27$).

Im Gegensatz dazu zeigte L-Valin einen eher hemmenden Einfluss, was sich in der vergleichsweise geringen OD 600 und signifikanten Unterschieden im Vergleich zu anderen Zusätzen widerspiegelt. Die ebenfalls signifikanten Unterschiede zwischen OM + L-NIO und anderen Medien legen nahe, dass auch die Hemmung der NO-Synthese die osteogene Differenzierung beeinflussen kann – jedoch nicht eindeutig fördernd oder hemmend, sondern abhängig vom Kontext.

Die relativ hohen Standardabweichungen verdeutlichen erneut die spenderspezifische Variabilität in der osteogenen Reaktion auf bestimmte Zusätze, was bei der Interpretation und zukünftigen Studien berücksichtigt werden sollte.

3.4.4.2 Normierte osteogene Differenzierung (Zusammenfassung Teil eins und zwei)

Wird die Mineralisierung der Zellen in osteogenem Differenzierungsmedium (OM) auf 100 % normiert, so ergeben sich für die Zusätze folgende prozentuale Werte an Tag 14:

- OM + 10 mM L-Lysin + 10 mM L-Ornithin: 135 %
- OM + 0,5 mM L-NIO: 107 %
- OM + 1 mM L-Arginin: 99 %
- OM + 20 mM L-Valin: 67 %

Diese Ergebnisse sind in **Abb. 94: Prozentuale Kalzifizierung in OM, Teil 1 und 2 zusammengefasst, Tag 14** grafisch dargestellt.

Die statistische Auswertung ergab signifikante Unterschiede:

- OM vs. OM + L-Valin: $p = 0,0017$; p (Bonferroni-korrigiert) = 0,0169; Cohen's $d = 0,88$
- OM + L-Valin vs. OM + L-Arginin: $p = 0,0005$; ($p = 0,0047$), $d = 1,02$

Die Standardabweichungen lagen teils deutlich über dem Mittelwert, insbesondere bei OM + L-Lysin + L-Ornithin (SD = 181), was auf eine hohe interindividuelle Streuung innerhalb dieser Gruppe hinweist.

Prozentuale Kalzifizierung in OM, Teil 1 und 2, Tag 14 (n = 18) mit Standardabweichung

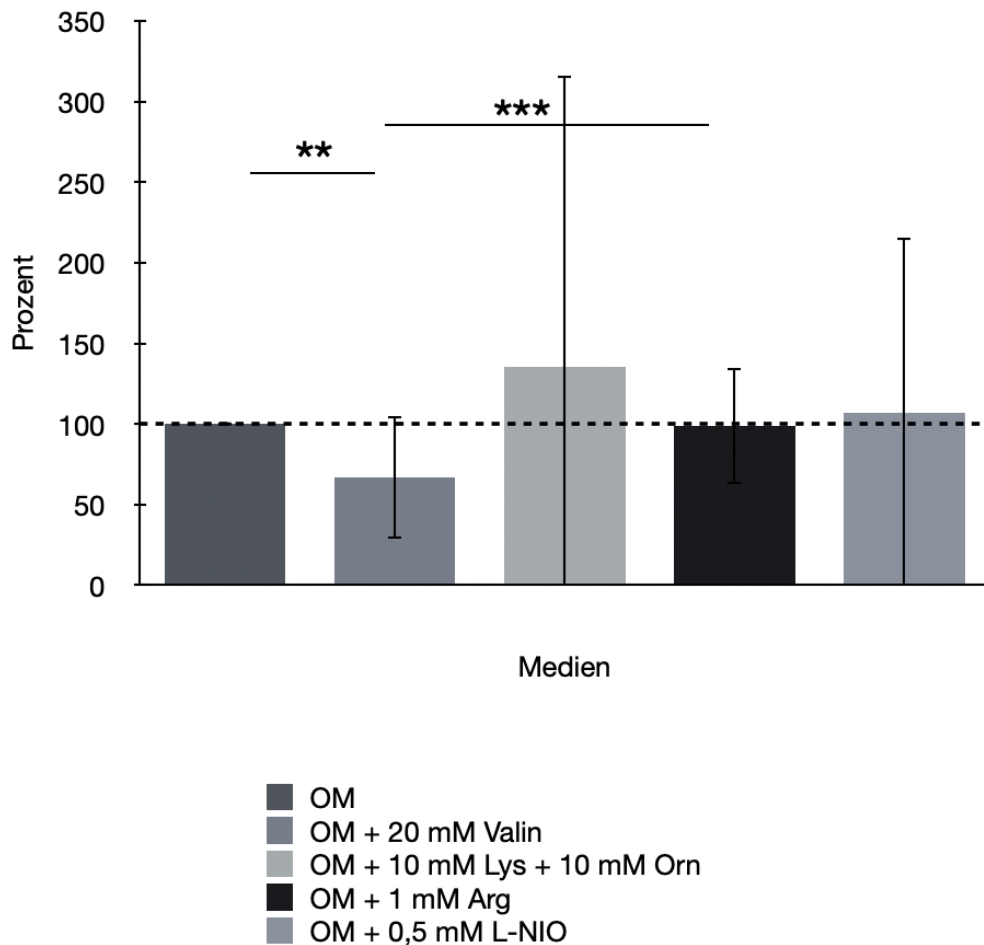


Abb. 94: Prozentuale Kalzifizierung in OM, Teil 1 und 2 zusammengefasst, Tag 14

Dargestellt ist die osteogene Differenzierung aller dentalen Stromazellen (DSC) aus Teil eins und zwei der Versuche an Tag 14 in verschiedenen Zusätzen zum osteogenen Differenzierungsmedium (OM), normiert auf die Kalzifizierung in reinem OM (= 100 %, Kontrollbalken ganz links). Gezeigt sind die Mittelwerte der prozentualen Kalzifizierung sowie deren Standardabweichung in OM + 20 mM L-Valin, OM + 10 mM L-Lysin + 10 mM L-Ornithin, OM + 1 mM L-Arginin und OM + 0,5 mM L-NIO. Es wurden n = 18 Spender ausgewertet. OM + L-Lysin/L-Ornithin führte zur höchsten Kalzifizierung (135 %), gefolgt von L-NIO (107 %) und L-Arginin (99 %). OM + L-Valin zeigte die geringste Mineralisierung (67 %). Die statistische Auswertung erfolgte mittels gepaartem *t*-Test. Statistisch signifikante Unterschiede bestanden zwischen OM und OM + L-Valin ($p = 0,0017$; Bonferroni-korrigiert $p = 0,0169$; $d = 0,88$) sowie zwischen OM + L-Valin und OM + L-Arginin ($p = 0,0005$; Bonferroni-korrigiert $p = 0,0047$; $d = 1,02$). Die hohen Standardabweichungen, insbesondere bei OM + L-Lysin/L-Ornithin (SD = 181), deuten auf eine ausgeprägte interindividuelle Variabilität hin. Statistische Markierung: Ein Stern entspricht $p < 0,05$; zwei Sterne entsprechen $p < 0,01$; drei Sterne $p < 0,001$. Weitere Informationen zur Versuchsführung und Auswertung sind dem Fließtext zu entnehmen. OM = osteogenes Differenzierungsmedium, Val = L-Valin, Lys = L-Lysin, Orn = L-Ornithin, Arg = L-Arginin, L-NIO = L-N⁵-(1-Aminoethyl)-Ornithin, DSC = dentale Stromazellen, n = Anzahl biologischer Replikate, SD = Standardabweichung, mM = Millimolar, % = Prozent. Eigene Anfertigung.

Die normierte Auswertung der Kalzifizierungsraten bestätigt, dass L-Valin einen signifikant hemmenden Effekt auf die osteogene Differenzierung ausübt. Sowohl im direkten Vergleich zu OM als auch zu OM + L-Arginin zeigten sich signifikante Unterschiede mit mittlerer bis hoher Effektstärke (Cohen's $d = 0,88$ bzw. $1,02$). Diese Befunde sprechen gegen eine unterstützende Rolle von L-Valin in der späten Mineralisierungsphase.

Während L-Arginin und L-NIO jeweils zu Kalzifizierungswerten nahe oder leicht über OM führten, wies nur die Kombination aus L-Lysin + L-Ornithin eine erhöhte Mineralisierung auf. Aufgrund der hohen Standardabweichung dieser Gruppe ist jedoch von einer großen individuellen Variabilität auszugehen, was die Interpretation limitiert und eine größere Probenanzahl in künftigen Studien notwendig macht.

4 Diskussion

4.1 Allgemein

Nicht heilende Knochendefekte kritischer Größe bleiben in der rekonstruktiven Medizin eine große Herausforderung. Zur Therapie kommen verschiedene Biomaterialien, autologe Knochentransplantationen und der Einsatz von verschiedenen Zytokinen, Hormonen und Wachstumsfaktoren in Frage (Park et al., 2003). Neuere Möglichkeiten zur Behandlung von Knochendefekten ergeben sich durch den Einsatz von mesenchymalen Stromazellen (MSC). Frühere Studien zeigten, dass autologe Stammzellen aus dem Knochenmark erfolgreich auf *Scaffolds* aus Hydroxylapatit appliziert wurden, deren Form und Größe dem Knochendefekt entsprachen (Quarto et al., 2001).

Im Fokus dieser Arbeit stehen die molekularen Einflüsse des L-Arginin- und NO-Metabolismus auf die Osteogenese dentaler Stromazellen (DSC), wobei ein direkter Vergleich zur Literatur aufgrund des heterogenen Versuchsaufbaus schwierig ist. Die rasche Proliferation und Differenzierung der DSC bleibt langfristig eine zentrale Voraussetzung für den klinischen Einsatz. Zu beachten ist, dass sämtliche Befunde auf Primärkulturen beruhen. Primärzellen können sich *in vitro* durch Adaptation, Passage und Stressantworten verändern und zeigen daher eine höhere Streuung als immortale Zelllinien. Zwar liefern Zelllinien über lange Kulturzeiträume stabilere Eigenschaften (z. B. durch tumorogene Herkunft oder virale Immortalisierung), jedoch ist unklar, in welchem Ausmaß Ergebnisse aus solchen Zelllinien auf Primärzellen übertragbar sind. Die externe Validität der Ergebnisse ist deshalb grundsätzlich gegeben, erfordert aber eine vorsichtige Einordnung und möglicherweise eine Validierung in komplementären Modellen.

4.2 Stromazellcharakter der DSC

4.2.1 Charakterisierung der DSC

Vor Beginn der eigentlichen Versuche musste der Stromazellcharakter der verwendeten DSC überprüft werden, da es sich um primäres Zellmaterial handelt. Stamm- bzw. Stromazellen lassen sich durch die Erfüllung spezieller Kriterien charakterisieren (Dominici et al., 2006; Takemitsu et al., 2012), welche von der *International Society for Cellular Therapy (ISCT)* festgelegt wurden.

Die DSC erfüllten weitgehend die mesenchymalen Kriterien (plastikadhärent, CD44 +, CD90 +, CD73 +, CD105 +) mit minimalem hämatopoetischem Anteil (CD14 –, CD19 –, CD34 –, CD45 – und HLA-DR –). Die heterogene CD105- und HLA-DR-Expression lässt sich durch mögliche Vorinduktion oder altersabhängige Variabilität erklären. Da das Alter der Spender unbekannt ist, sich die Zähne aber in unterschiedlichen Entwicklungsstadien befanden, wäre dies eine mögliche Erklärung, da fortschreitendes Alter zu einer Reduktion des Stammzellpotentials führt (Stenderup et al., 2003). Die nicht überprüfte Differenzierungsfähigkeit zu Chondro- und Adipozyten schränkt die Charakterisierung als Stammzellen ein.

Insgesamt stehen die DSC jedoch in Übereinstimmung mit mesenchymalen Stromazellen – allerdings mit deutlich ausgeprägter interindividueller Homogenitätsstörung. Die hohe Streuung einiger Werte innerhalb der Primärzellfraktion deutet auf eine Inhomogenität der Zellen und möglicherweise auf das Vorliegen einer stromal vaskulären Fraktion hin. In letzterer können neben mesenchymalen Stammzellen auch hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen, Endothelzellen, Erythrozyten, Fibroblasten, Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen und Perizyten vorkommen (Cawthorn et al., 2012; Cousin et al., 2003; Han et al., 2010; Mitchell et al., 2006). Aufgrund des kaum nachzuweisenden Anteils von CD14 und CD19 wurde sichergestellt, dass sich in der stromal vaskulären Fraktion keine Monozyten, Makrophagen oder B-Lymphozyten befanden (Wang et al., 2012; Ziegler-Heitbrock & Ulevitch, 1993). Ähnlich wie adipogene Stammzellen weisen auch dentale Stammzellen an sich eine höhere Heterogenität auf als beispielsweise Stammzellen des Knochenmarks (Erickson et al., 2002; Gronthos et al., 2001; Li et al., 2011; Planat-Benard et al., 2004; Zuk et al., 2002).

4.2.2 Kritische Betrachtung

Die anfängliche Verwendung von CellFix führte zu Zellverklumpungen, daher sollte auf diesen Fixierer verzichtet werden. Insgesamt waren drei FACS-Durchgänge notwendig, bis überhaupt ein Ergebnis festgestellt werden konnte. Da nur vier Spender (Passage 3) untersucht wurden, empfiehlt sich künftig die Erweiterung auf mehr Spender und unterschiedliche Passagen, um Faktoren wie Alter, Entwicklungsstatus oder Seneszenz zu kontrollieren. Es wurde bereits in der Literatur beschrieben, dass mehrfaches Passagieren der Zellen zu Seneszenz und zur Abnahme des Stammzellcharakters führt (Choi et al., 2015; Hayflick, 1965).

4.3 Zellproliferation

Die Proliferation dentaler Stromazellen (DSC) wurde in verschiedenen Medien und unter Zugabe spezifischer Substanzen untersucht. Die Ergebnisse verdeutlichen die zentrale Bedeutung von L-Arginin und FCS (*fetal calf serum*) für die Zellviabilität und das Zellwachstum der DSC.

4.3.1 Einfluss von L-Arginin

Die Kultivierung der DSC in L-Arginin-haltigen Medien führte zu einer deutlich höheren Zellviabilität im Vergleich zu L-Arginin-freien Bedingungen. Ein vollständiger Entzug von L-Arginin, wie in einigen Varianten des DMEM ohne L-Arginin, führte zu einem drastischen Rückgang der metabolischen Aktivität und in einigen Fällen zu zytotoxischen Effekten. Diese Beobachtung weist auf eine essenzielle Rolle von L-Arginin für den zellulären Energiestoffwechsel und die Aufrechterhaltung der Zellhomöostase der DSC hin. Jüngere Studien bestätigen die zentrale Funktion von L-Arginin für die NO-Synthese, die wiederum mit der Viabilität und Immunmodulation mesenchymaler Stromazellen (MSC) korreliert (Li et al., 2023).

Eine gezielte Supplementierung mit 50 μM oder 200 μM L-Arginin konnte die Viabilität in L-Arginin-freiem DMEM partiell verbessern, insbesondere bei gleichzeitigem Zusatz von mehr als 5 % FCS. Dennoch blieb der Effekt im Vergleich zu vollwertigem Standardmedium begrenzt.

4.3.2 Einfluss des FCS-Gehalts

Ein signifikanter Unterschied zeigte sich auch in Abhängigkeit vom FCS-Gehalt. Die Viabilität stieg mit zunehmender Serumkonzentration deutlich an. Selbst unter L-Arginin-Mangelbedingungen führte eine höhere FCS-Konzentration (5 % statt 2,5 %) zu signifikant höheren Proliferationsergebnissen. Die Kultivierung in Standardmedium mit 10 % FCS stellte durchweg die höchsten CTB-Signale sicher (siehe **Abb. 18: Zellviabilitäts-Assay: Vergleich L-Arginin-haltiger und -freier Medien, Tag 5**). Dies weist auf die multiplen, wachstumsfördernden Funktionen von Serumkomponenten (Wachstumsfaktoren, Hormone, Nährstoffe) hin, die auch bei limitierter Argininverfügbarkeit eine Zellproliferation ermöglichen (van der Valk et al., 2004).

4.3.3 Einfluss einzelner Zusätze

In Standardmedium mit 10 % FCS und verschiedenen Zusätzen (L-Valin, L-Lysin, L-Ornithin, L-Arginin, L-NIO) zeigten sich signifikante Unterschiede hinsichtlich der prozentualen Zellviabilität von Tag 0 und Tag 5 mit Ausnahme von L-NIO. Cohen's d war in allen Gruppen $> 0,8$, was auf einen potenziell starken Effekt hindeutet.

Auffällig war die leicht erhöhte Proliferation bei L-Valin-Zusatz, während L-Lysin + L-Ornithin unter den getesteten Bedingungen die geringste Wachstumsrate erzeugten. Dies könnte auf eine kompetitive Hemmung von L-Arginin-Transportern hindeuten. In allen normierten Bedingungen wurden keine signifikanten Unterschiede der Zellviabilität detektiert. Aber bei einigen Vergleichen konnte ein starker Effekt (Cohen's $d > 0,8$) festgestellt werden. Die Zusätze zeigten keine zytotoxischen Effekte, was für deren grundsätzliche Biokompatibilität spricht. Die statistisch nicht signifikanten Werte in der L-NIO-Gruppe deuten ebenfalls auf eine mögliche Modulation des Argininstoffwechsels hin.

4.3.4 Donorabhängige Variabilität

Die Ergebnisse der CTB-Assays spiegeln ein zelltypisches Verhalten primärer Zellkulturen wider, das durch eine ausgeprägte interindividuelle Heterogenität geprägt ist. Es zeigte sich keine systematische Reaktion aller Spender auf bestimmte Zusätze. Vielmehr reagierten die Spenderkulturen höchst unterschiedlich auf die getesteten Bedingungen. Ein besonders auffälliges Beispiel stellte Spender 3 dar, der in allen getesteten DMEM ohne L-Arginin-Medien eine durchgängig erhöhte Proliferation zeigte. Dies könnte auf eine erhöhte endogene Synthese, eine starke metabolische Aktivität oder auf die Aktivierung alternativer Stoffwechselwege hindeuten. Interessanterweise zeigte dieser Spender in L-Arginin-haltigen Medien relativ geringe Zellviabilitätssignale im Vergleich zu den anderen Spendern. Im Gegensatz dazu zeigte Spender 4 in den L-Arginin-freien Medien eine durchgehend niedrige Zellviabilität und in den L-Arginin-haltigen Medien jedoch relativ hohe Zellviabilität-Signale. Dies könnte möglicherweise auf spezifische Unterschiede im L-Arginin-Metabolismus oder in der Nährstoffsensitivität einzelner Spender zurückzuführen sein. Insgesamt ergaben sich so hohe Standardabweichungen bei geringen Spenderzahlen. Diese Unterschiede blieben auch bei vergleichbarer Passage (P2 und P4) und Kulturzeit bestehen, was auf stabile, donorabhängige Eigenschaften hinweist. Eine Aufteilung der Spender in „hochwachsend“ vs. „niedrigwachsend“ ließ sich konsistent über unterschiedliche Medienzusammensetzungen hinweg beobachten.

4.3.5 Methodische Limitationen

Die geringe Spenderzahl ($n=4$) stellt eine zentrale Einschränkung der statistischen Aussagekraft dar. Individuelle Schwankungen wirken sich stark auf den Gesamtmittelwert aus, sodass sich keine allgemeingültigen populationsbasierten Aussagen treffen lassen. Für zukünftige Studien sind die Einbeziehung größerer Spenderkohorten sowie ein vergleichbarer Entwicklungsstatus durch eine bestimmte Passagezahl erforderlich.

4.3.6 Zellkultivierung

Zu Beginn der Versuchsreihen wurde bei der Zellzahlbestimmung ein systematischer Fehler festgestellt: Es wurden zu viele Zellen ausgesät, was insbesondere bei schnell proliferierenden DSC zu einer Überkonfluenz führen kann. Verglichen mit Stammzellen aus dem Knochenmark weisen dentale Stammzellen eine höhere Proliferationsrate auf (Gronthos et al., 2000). Sie wachsen schnell, was daran liegen könnte, dass sich die Stromazellen aus der Pulpa in einem früheren Entwicklungsstadium befinden und im Vergleich zu den gewebeerhaltenden Stromazellen aus dem Knochenmark aktiver sind (Gronthos et al., 2000). Diese Überkonfluenz führt potenziell zu einer Kontaktinhibition der DSC untereinander und beeinflusst die Proliferation negativ.

Darüber hinaus wurde eine ungleichmäßige Dichte und Zellverteilung in den Wells beobachtet, wobei sich die Zellen unter L-Arginin-freien Bedingungen vorzugsweise in der Mitte der Wells ansiedelten (siehe **Abb. 95: Darstellung zellfreier Randbereiche in den Wells**). Dies könnte durch Nährstoffgradienten oder veränderte Adhäsionsbedingungen bedingt sein.

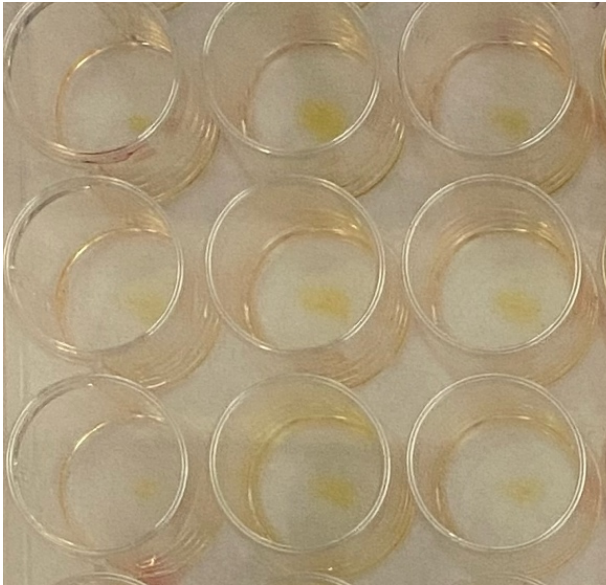


Abb. 95: Darstellung zellfreier Randbereiche in den Wells

Makroskopische Darstellung der osteogenen Differenzierung der DSC in L-Arginin-freien Medien. Bereits während der Alizarinrot-S-Färbung zeigen sich makroskopisch Besonderheiten im Mineralisierungsverhalten. Es ist erkennbar, dass die osteogene Kalzifizierung der DSC unter diesen Bedingungen ausschließlich zentral innerhalb der Wells lokalisiert auftrat, während periphere Bereiche keine Anfärbung zeigten. Weitere Details sind dem Fließtext zu entnehmen. DSC = dentale Stromazellen. Eigene Anfertigung.

Für künftige Experimente empfiehlt sich daher eine präzisere Standardisierung der Zellzahl und Kulturbedingungen. Auch der Einsatz alternativer Kultursysteme (z. B. rotierende 3D-Flaschen) sollte in Betracht gezogen werden, da sich durch 3D-Kultivierung ein Ablösen des Zelllayers vermeiden lässt (Frith et al., 2010). Mehrfach wurde außerdem bereits der Einfluss von unterschiedlichen Oberflächenbeschichtungen verschiedener Zellkulturmaterialien auf das Proliferations- und auf das Differenzierungsverhalten der Zellen beschrieben (García et al., 1999).

4.3.7 Kritische Betrachtung Isolation

Die Etablierung der Zellkulturen erfolgte aus insgesamt 48 Pulpen von 28 Spendern. Bei drei Spendern war eine erfolgreiche Isolierung dentaler Stromazellen nicht möglich. Isolationsfehler, geringe Zellmaterialmenge oder kontaminationsbedingte Ausfälle könnten die Erfolgsrate beeinträchtigt haben. Es könnte allerdings auch am Alter der Spender, am Entwicklungsstadium oder dem Zustand der Germe selbst gelegen haben. Ein angepasstes Protokoll mit Amphotericin B im Transportmedium sowie eine alkoholfreie CHX-Desinfektion erwiesen sich als effektiv zur Reduktion mikrobieller Kontamination.

Auch die Methode zur Zellisolierung selbst wurde im Verlauf der Versuchsreihe optimiert. So wurde die Inkubationszeit der Pulpa in der Kollagenase-Dispase-Lösung auf über eine Stunde verlängert, da sich andernfalls nicht alle Pulpaanteile vollständig enzymatisch aufschließen ließen.

Für zukünftige Versuche ist eine optimierte und standardisierte Vorgehensweise bei der Desinfektion, Auflösung und Lagerung sinnvoll, um die Effizienz der Isolation zu maximieren.

4.3.8 Mikrobielle Kontamination

In einigen Fällen kam es zu mikrobiellen Kontaminationen, die den Verlauf der Zellkultivierung beeinträchtigt haben könnten. Die Kombination aus erhöhten Antimykotikum- und Antibiotikakonzentrationen (Amphotericin B, Gentamicin, Penicillin/Streptomycin), regelmäßigen Waschschritten mit PBS und häufigerem Mediumwechsel konnte diesen Befall eindämmen. Es ist jedoch zu beachten, dass antimikrobielle Zusätze selbst Einfluss auf das Zellverhalten nehmen könnten, was in zukünftigen Arbeiten berücksichtigt und gezielt untersucht werden sollte.

4.3.9 Weitere Versuche

Zu Beginn der Experimente wurden mehrere Vorversuche zur Proliferation der DSC unter unterschiedlichen Kulturbedingungen durchgeführt. Aufgrund methodischer und konzeptioneller Unterschiede – insbesondere hinsichtlich Zellzahl, Zeitpunkten der Analyse und verwendeter Medienzusammensetzungen – war ein direkter Vergleich der Ergebnisse nicht möglich, weshalb diese nicht in die Hauptauswertung aufgenommen wurden (siehe „Weitere Ergebnisse“).

In den Zellviabilitäts- und Differenzierungsexperimenten wurden darüber hinaus unterschiedliche Zellzahlen ausplattiert, was die Vergleichbarkeit der Ergebnisse ebenfalls einschränkte. In zukünftigen Experimenten sollte daher auf eine standardisierte Zellzahl bei der Ausplattierung geachtet werden, um konsistente Bedingungen und eine valide Vergleichbarkeit zwischen den unterschiedlichen Versuchsreihen sicherzustellen.

4.3.10 Zusammenfassung

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen belegen die essenzielle Rolle von L-Arginin für die Zellproliferation dentaler Stromazellen. Ein vollständiger Entzug führte zu einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität, teilweise mit zytotoxischen Effekten. Der FCS-Gehalt zeigte einen klar dosisabhängigen, positiven Effekt auf die Zellviabilität. Eine gezielte Supplementierung mit L-Arginin konnte die Proliferation partiell verstärken.

Die stärksten Wachstumszunahmen wurden in Standardmedien mit L-Valin, L-Arginin und L-NIO beobachtet. Zusätze wie L-Lysin und L-Ornithin führten zu einer geringeren Proliferationsrate, blieben aber biokompatibel. Die interindividuelle Reaktion auf diese Zusätze fiel stark unterschiedlich aus, was eine bedeutende Heterogenität unter den getesteten Spendern bestätigt. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit einer individualisierten Betrachtung primärer Zellkulturen.

Zudem zeigen die Daten, dass methodische Aspekte – wie Zellzahl, Wellgröße, Passagenzahl und Kulturprotokoll – einen erheblichen Einfluss auf das Ergebnis haben können. Für belastbare und reproduzierbare Ergebnisse bedarf es daher standardisierter Versuchsbedingungen, einer höheren Spenderanzahl und ergänzender funktioneller Analysen.

Diese Ergebnisse liefern wichtige Hinweise für die Optimierung von Kulturbedingungen und eröffnen Perspektiven für den therapeutischen Einsatz dentaler Stromazellen im Bereich des *Tissue Engineering*.

4.4 Enzymexpression

4.4.1 Analyse der Proteinexpression

Zur Analyse der Rolle des L-Arginin-Stoffwechsels während der osteogenen Differenzierung dentaler Stromazellen (DSC) wurden zentrale Enzyme und Transporter mittels Western-Blot erfasst. Insgesamt ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Proteinexpression zwischen den getesteten Kulturbedingungen – mit Ausnahme des kationischen Aminosäuretransporters CAT-1, dessen Expression im Standardmedium signifikant erhöht war ($p = 0,02$; Bonferroni-korrigiert $p = 0,02$; Cohen's $d = 0,87$). Die übrigen Marker, darunter Arginase-1, Arginase-2, CAT-2 (getestet mit zwei verschiedenen Antikörpern), eNOS sowie iNOS, zeigten keine statistisch relevanten Differenzen zwischen den Gruppen.

Die selektiv erhöhte Expression von **CAT-1** im Standardmedium legt nahe, dass dieser Transporter vor allem im undifferenzierten Zustand der DSC eine funktionelle Rolle spielen könnte. CAT-1 gilt als hochaffiner Transporter, der eine zentrale Rolle bei der zellulären L-Arginin-Versorgung spielt, insbesondere in metabolisch aktiven, nicht differenzierten Zelltypen (Peluffo, 2021). Studien weisen darauf hin, dass CAT-1 im Rahmen autoregulatorischer Mechanismen selbst durch Stickstoffmonoxid (NO) reguliert werden kann. NO wirkt in diesem Zusammenhang als negativer Modulator der CAT-Aktivität, indem eine Rückkopplungsschleife zwischen NO-Produktion und L-Arginin-Verfügbarkeit erzeugt wird. Dies wurde unter anderem im kardiovaskulären System bereits so beobachtet (Peluffo, 2021). Diese Feedback-Regulation konnte auch in anderen Modellsystemen gezeigt werden. So demonstrierten Schwartz et al. in einem Sepsis-Modell, dass eine durch Lipopolysaccharid (LPS) induzierte iNOS-Expression zu einer erhöhten L-Arginin-Aufnahme in den Glomeruli der Rattenniere führte. Dieser Effekt war mit einer gesteigerten Expression von **CAT-2**, nicht aber von CAT-1, assoziiert und wurde durch die Gabe eines iNOS-Inhibitors vollständig aufgehoben. In Mesangialzellen kam es ebenfalls zu einem Anstieg der CAT-2-mRNA, was auf eine selektive Induktion dieses Transporters im inflammatorischen Milieu hinweist. Die Autoren der Studie vermuten einen Zusammenhang zwischen der Hochregulation von CAT-2 und Veränderungen der iNOS- und eNOS-Aktivität unter septischen Bedingungen (Schwartz et al., 2003).

Obwohl die Expression von CAT-2 in der vorliegenden Untersuchung nicht signifikant verändert war, stützen die dargestellten Befunde die Hypothese, dass CAT-1 eine regulative Rolle im Frühstadium der Differenzierung spielt. Die selektive Hochregulation im Standardmedium – und damit im nicht-differenzierenden Zustand – könnte auf eine besondere Bedeutung in der initialen Versorgung mit L-Arginin hindeuten. Dies steht im Einklang mit Berichten, die CAT-1 eine entscheidende Funktion in nicht-terminal differenzierten oder proliferierenden Zellen zuschreiben (Closs et al., 2006).

Ein auffälliges Ergebnis stellte die divergente Expression von CAT-2 in Abhängigkeit vom verwendeten Antikörper dar. Während mit dem Antikörper von Invitrogen tendenziell eine höhere Expression im Standardmedium nachgewiesen wurde, zeigte sich beim Antikörper von Santa Cruz eine leicht erhöhte Expression unter osteogenen Bedingungen. Diese Diskrepanz ist vermutlich auf die Detektion unterschiedlicher Isoformen (CAT-2A vs. CAT-2B) oder auf Unterschiede in den erfassten Epitopen zurückzuführen. Die beiden Isoformen unterscheiden sich nicht nur in ihrer Gewebeverteilung, sondern auch in ihrer funktionellen Charakteristik: CAT-2A weist eine vergleichsweise geringe Transporteffizienz auf, während CAT-2B als hochaktiver L-Arginin-Transporter mit hoher Substrataffinität gilt (Closs, 1996; Closs et al., 2006). Sowohl CAT-1 als auch CAT-2 führen zu einem L-Arginin-Influx in die Zelle und sind deswegen essenziell für iNOS und Arginase (Closs, 1996; Closs et al., 2006;

Schnorr et al., 2003). Die unterschiedliche Detektion von CAT-2 durch verschiedene Antikörper unterstreicht die Bedeutung einer gezielten Antikörpervalidierung, insbesondere bei Western-Blot-Analysen. Ohne ausreichende Validierung können falsch-positive Banden, unspezifische Signale oder uneindeutige Expressionsmuster auftreten, die die Interpretation der Daten erheblich beeinträchtigen (Kahn et al., 2024; Uhlen et al., 2016). Vor diesem Hintergrund erscheint eine differenzierte Bewertung der Ergebnisse für CAT-2 in der vorliegenden Arbeit zwingend erforderlich. Die beobachteten Unterschiede könnten auf biologische Variabilität, technische Limitierungen oder Isoform-spezifische Expressionsmuster zurückzuführen sein, die durch künftige Experimente unter Einsatz validierter Isoform-spezifischer Antikörper weiter zu klären wären.

Beide **Arginase**-Isoformen zeigten in den meisten Spendern tendenziell eine höhere Expression im osteogenen Differenzierungsmedium, allerdings ohne signifikante Unterschiede. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der bekannten Funktion der Arginase als kompetitiver Antagonist zur Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS): Beide Enzyme teilen sich mit L-Arginin ein gemeinsames Substrat, sodass eine vermehrte Aktivität der Arginase zu einer reduzierten NO-Biosynthese führen kann (Devignes et al., 2022; Lacchini et al., 2015). Die stärkste Expression von Arginase-2 wurde in den stimulierten RAW 264.7-Zellen detektiert, die nach LPS/IFN- γ -Behandlung eine über 30-fache Induktion zeigten. Dies ist konsistent mit der Literatur, in der Arginase-2 mit inflammatorischen Prozessen in Verbindung gebracht wird (Cederbaum et al., 2004; Munder et al., 1999). In pathophysiologischen Kontexten wurde ein erhöhter Plasmaspiegel von Arginase-2 zudem als möglicher Risikofaktor für endotheliale Dysfunktion identifiziert – mutmaßlich vermittelt über eine reduzierte NO-Verfügbarkeit (Lacchini et al., 2015). Im Kontext der osteogenen Differenzierung gewinnen diese Mechanismen zunehmend an Relevanz. Jüngere Studien zeigen, dass eine durch Arginase vermittelte Reduktion der NO-Produktion nicht nur proliferative Kapazitäten, sondern auch die Differenzierungskapazität mesenchymaler Zellen beeinflussen kann (Devignes et al., 2022). Da NO über verschiedene Signalwege in die Regulation von Osteoblastenaktivität und Matrixmineralisation involviert ist, könnte eine gesteigerte Arginase-Expression indirekt die osteogene Differenzierung modulieren (Devignes et al., 2022).

Obgleich die in der vorliegenden Studie beobachteten Expressionsunterschiede nicht signifikant ausfielen, legen die hier berichteten Ergebnisse nahe, dass Arginase-2 im osteogenen Milieu eine differenzierte, möglicherweise kontextabhängige Rolle einnehmen könnte – sei es über die Regulation der L-Arginin-Verfügbarkeit, über den NO-Stoffwechsel oder über direkte zelluläre Effekte auf Differenzierungsprozesse.

Die Expression der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (**eNOS**) zeigte – wie erwartet – keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kulturbedingungen. Die hohe interindividuelle Varianz unter den Spenderzellen spiegelte sich jedoch auch hier wider. Dies ist mit der bekannten konstitutiven Expression der eNOS vereinbar, die in osteoblastischen Zellen unter basalen Bedingungen aufrechterhalten wird (Aguirre et al., 2001). In ihrer Funktion trägt eNOS maßgeblich zur Aufrechterhaltung des osteoanabolen Gleichgewichts im Knochenstoffwechsel bei, insbesondere durch moderate NO-Produktion, die unter anderem die Osteoblastenaktivität unterstützt (van't Hof & Ralston, 2001).

Die induzierbare NO-Synthase (**iNOS**) konnte in den untersuchten dentalen Stromazellen (DSC) in keinem der beiden Versuchsansätze zuverlässig nachgewiesen werden – auch nicht nach Stimulation mit jeweils 500 U/ml IL-1, TNF- α und IFN- γ . Eine klare Bande war ausschließlich in den mit 50 U/ml IFN- γ und 1 μ g/ml LPS stimulierten RAW 264.7-Zellen sichtbar, die als etablierte Positivkontrolle dienten. Diese Ergebnisse legen nahe, dass iNOS in DSC entweder nur sehr niedrig exprimiert oder unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht ausreichend induziert wird. Möglich ist, dass eine intensivere oder zeitlich verlängerte Stimulation notwendig wäre, um eine messbare iNOS-Expression zu erzielen.

Die funktionelle Bedeutung dieser Beobachtung wird durch die bekannten gegenteiligen Effekte von eNOS und iNOS im Knochenstoffwechsel unterstrichen: Während niedrige NO-Konzentrationen, wie sie durch eNOS vermittelt werden, osteogenetisch stimulierend wirken, steht eine übermäßige NO-Produktion – typischerweise durch iNOS – in Zusammenhang mit osteoklastären, knochenabbauenden Prozessen (Jamal & Hamilton, 2012; van't Hof & Ralston, 2001). In Tiermodellen konnte beispielsweise gezeigt werden, dass iNOS-defiziente Mäuse nach Ovariectomie einen geringeren Knochensubstanzverlust aufwiesen als Wildtyp-Kontrollen. Dies deutet darauf hin, dass iNOS eine zentrale Rolle in der Entstehung von postmenopausaler Osteoporose spielen könnte (Cuzzocrea et al., 2003). iNOS scheint damit ein wichtiger pathophysiologischer Mediator in östrogenabhängigen Umbauvorgängen des Knochens zu sein.

Demgegenüber konnte bei eNOS-defizienten Mäusen ein signifikanter Rückgang der Osteoblastenaktivität, des Knochenvolumens und der Knochendichte beobachtet werden, was die essenzielle Rolle der eNOS im Erhalt der Knochenhomöostase unterstreicht (Aguirre et al., 2001). Diese gegenläufigen Effekte belegen, dass nicht nur das Vorhandensein von NO, sondern insbesondere dessen Ursprung und Konzentration entscheidend für seine Wirkung im Knochengewebe sind.

Neben eNOS und iNOS wurde auch **nNOS** (neuronal NOS) bereits im Zusammenhang mit Knochenphysiologie untersucht. Diese Isoform ist bislang weniger gut charakterisiert, scheint jedoch ebenfalls relevante Funktionen auszuüben. Studien mit nNOS-*Knockout*-Mäusen deuten auf einen möglichen hormonellen oder neuronalen Regulationsmechanismus hin, wobei die Effekte im Vergleich zur eNOS-Inhibition teilweise gegensätzlich ausfallen (van't Hof et al., 2004). Die genauen zellulären und molekularen Wirkmechanismen von nNOS im Knochenstoffwechsel bleiben bislang jedoch weitgehend unklar und bedürfen weiterer Forschung.

Insgesamt zeigen die Daten, dass die NO-Homöostase im Knochengewebe durch ein fein abgestimmtes Zusammenspiel der NOS-Isoformen reguliert wird. Die Balance zwischen konstitutiver NO-Produktion (eNOS, nNOS) und induzierter NO-Freisetzung (iNOS) bestimmt dabei maßgeblich, ob NO als Differenzierungssignal oder als Entzündungsmediator wirkt – mit direkten Konsequenzen für die osteoblastäre Aktivität, die Matrixmineralisation und den Knochenumbau.

4.4.2 Spenderspezifische Unterschiede

Die Analyse der Expressionsprofile dentaler Stromazellen offenbarte eine ausgeprägte inter- und intraindividuelle Heterogenität, die sich sowohl zwischen verschiedenen Spendern als auch innerhalb eines Spenders in unterschiedlichen Passagen zeigte. Besonders auffällig war dies bei Spender 2, der in zwei Passagen (P3 und P5) untersucht wurde und dabei deutliche Unterschiede in der Proteinexpression zahlreicher Marker aufwies. Diese Differenzen betrafen sowohl die Reaktion auf unterschiedliche Kulturbedingungen als auch die Antikörperdetektion, was auf ein komplexes Zusammenspiel von Zellalter, Passagezahl, metabolischem Status und möglicher Seneszenz schließen lässt.

In Passage 3 zeigte Spender 2 im osteogenen Medium eine verstärkte Expression von Arginase-2 und CAT-2 (nachgewiesen mit dem Antikörper von Santa Cruz), während in Passage 5 zusätzlich eine verstärkte Expression von CAT-1 zu beobachten war. Im Standardmedium wurde in Passage 3 eine höhere Expression von CAT-1 und CAT-2 (Invitrogen) festgestellt, wohingegen in Passage 5 neben CAT-1 und CAT-2 (Santa Cruz) auch Arginase-1 und eNOS vermehrt exprimiert wurden. Konstant blieb lediglich die Beobachtung, dass Arginase-2 in beiden Passagen unter osteogenen Bedingungen stärker exprimiert wurde, während CAT-1 in beiden Fällen eine höhere Expression im Standardmedium zeigte. Das heterogene Bild bei CAT-2 deutet auf Isoform-spezifische Unterschiede oder Epitop-bedingte Detektionsunterschiede hin: ein Effekt, der in der

Literatur mehrfach beschrieben wurde und die Notwendigkeit sorgfältiger Antikörpervalidierung unterstreicht (Kahn et al., 2024; Uhlen et al., 2016). Diese Beobachtungen legen nahe, dass sowohl die Passage als auch zelluläre Anpassungsvorgänge im Verlauf der Kultivierung einen relevanten Einfluss auf das Expressionsverhalten haben.

Auch die übrigen Spender bestätigen die Heterogenität der Ergebnisse, wenngleich sich innerhalb einzelner Spender mitunter ein konsistenteres Muster erkennen ließ. So zeigten Spender 1, 3 und 8 – mit Ausnahme von CAT-1 – eine insgesamt stärkere Proteinexpression unter osteogenen Bedingungen. Auch die RAW 264.7-Zellen reagierten erwartungsgemäß mit einer verstärkten Expression (außer Arginase-1) auf die Stimulation mit 50 U/ml IFN- γ und 1 μ g/ml LPS. Im Gegensatz dazu war bei den Spendern 4, 5 und 6 eine stärkere Expression der untersuchten Enzyme überwiegend im Standardmedium zu beobachten. Wobei auch hier Ausnahmen auftraten, etwa eine stärkere Expression von CAT-2 (Invitrogen und Santa Cruz) bei Spender 6 unter osteogenen Bedingungen.

Ein gemischtes Bild zeigte sich bei Spender 7: Hier wurde unter osteogener Stimulation eine stärkere Expression von Arginase-1, Arginase-2 und CAT-2 (Santa Cruz) festgestellt, während CAT-1, eNOS und CAT-2 (Invitrogen) im Standardmedium dominanter waren.

Insgesamt lässt sich festhalten, dass die Enzymexpression der DSC sowohl durch die individuelle Spenderbiologie als auch durch externe Faktoren wie Medium, Passage und Antikörperwahl beeinflusst werden kann. Die teilweise gegensätzlichen Muster zwischen verschiedenen Spendern und Passagen erschweren eine Interpretation, machen aber zugleich deutlich, wie wichtig es ist, diese Variablen in zukünftigen Studien gezielt zu berücksichtigen. Eine höhere Fallzahl, standardisierte Passage-Bedingungen und ergänzende genomische oder metabolische Analysen könnten dazu beitragen, die zugrunde liegenden Mechanismen dieser Variabilität besser zu verstehen. Darüber hinaus wäre es spannend, Spender gezielt in mehreren Passagen zu untersuchen, um alters- oder seneszenzbedingte Effekte systematisch erfassen zu können.

4.4.3 Kritische Betrachtung Proteinexpression

Die Ergebnisse der Western-Blot-Analysen zeigten ein insgesamt heterogenes Expressionsmuster, das vermutlich durch zahlreiche Variabilitätsquellen beeinflusst wurde. Unterschiede in der Spendercharakteristik, der Passage, der Wahl der Antikörper sowie den Stimulationsbedingungen führten zu teils deutlichen Abweichungen in der Signalintensität und Reproduzierbarkeit. Die einzige signifikante Expressionserhöhung wurde für den L-Arginin-Transporter CAT-1 im Standardmedium festgestellt, was auf eine

mögliche funktionelle Rolle dieses Transporters im basalen Zellstoffwechsel der DSC hindeutet.

Die beobachtete Interdonor-Variabilität war besonders ausgeprägt. Sowohl zwischen den Spendern als auch in unterschiedlichen Passagen eines Spenders kam es zu deutlichen Abweichungen der Proteinexpression, was auf individuelle Unterschiede in der zellulären Aktivierung, Differenzierung oder metabolischen Kapazität hinweisen könnte. Auch der Einfluss von zellulärer Seneszenz und Passagezahl sollte künftig systematisch erfasst werden, da bereits mehrfach beschrieben wurde, dass spätere Passagen funktionelle Veränderungen der DSC mit sich bringen können.

Zudem wurde deutlich, dass die Wahl des Antikörpers einen erheblichen Einfluss auf die Nachweisqualität hat. Für CAT-2 beispielsweise zeigten zwei Antikörper unterschiedlicher Hersteller divergente Ergebnisse, möglicherweise aufgrund unterschiedlicher Epitope oder durch Isoform-Spezifitäten. Dieser Befund unterstreicht die Notwendigkeit einer Antikörpervalidierung, wie sie auch in aktuellen Publikationen zur Reproduzierbarkeit in der Proteinanalytik gefordert wird (Uhlen et al., 2016).

Ein weiteres kritisches Ergebnis war das Ausbleiben eines iNOS-Nachweises in den mit proinflammatorischen Zytokinen stimulierten DSC. Nur in den RAW 264.7-Zellen war eine deutliche iNOS-Expression zu erkennen. Diese Ergebnisse legen nahe, dass iNOS in DSC unter den gewählten Bedingungen nicht oder nur sehr schwach exprimiert wurde. Eine Verlängerung oder Intensivierung der Stimulation durch höhere Zytokin-Konzentrationen könnte helfen, die Induktion von iNOS künftig erfolgreicher zu gestalten.

Interessant ist in diesem Zusammenhang auch der Regulationsmechanismus von NO über CAT-Transporter: Stickstoffmonoxid kann seine eigene Biosynthese über eine negative Rückkopplung auf die CAT-vermittelte L-Arginin-Aufnahme modulieren – ein Mechanismus, der unter anderem in Herzmuskelzellen beschrieben wurde (Peluffo, 2021). Die genaue Rolle dieser Rückkopplung in DSC bleibt jedoch bislang ungeklärt und sollte weiter untersucht werden.

Zudem wäre es sinnvoll, die Analyse der Proteinexpression künftig durch komplementäre Methoden wie qPCR, ELISA, Aktivitätsassays oder spezifische FACS-basierte Proteinquantifizierung zu ergänzen, um die Bedeutung der erfassten Expressionsunterschiede besser beurteilen zu können. Auch die Erhebung funktioneller Parameter wie L-Arginin-Aufnahme, NO-Konzentrationen oder Arginase-Aktivität wäre ein wichtiger Schritt zur Einordnung der biologischen Relevanz der beobachteten Marker.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass methodische und biologische Faktoren gleichermaßen zur beobachteten Variabilität beigetragen haben. Eine höhere

Fallzahl, systematische Variation der Kulturbedingungen, standardisierte Antikörper und die Kombination mehrerer Nachweisverfahren sind erforderlich, um reproduzierbare Aussagen über die Rolle L-Arginin-assoziiierter Enzyme in der osteogenen Differenzierung von DSC treffen zu können.

4.5 Osteogene Differenzierung

4.5.1 Alizarinrot-S-Färbung und Rücklösung sowie kritische Betrachtung

Die Alizarinrot-S-Färbung gilt als Standardmethode zur Detektion von mineralisierter extrazellulärer Matrix durch Bindung von Calcium, das als Indikator für osteoblastische Differenzierung dient (Bernar et al., 2022; Danti et al., 2013; Rawadi et al., 2003).

In den durchgeführten Experimenten zeigte sich bereits an Tag 7 die erste Mineralisierung, die sich bis Tag 14 deutlich intensivierte. Dies steht im Widerspruch zu früheren Studien, in denen eine Mineralisierung bei DSC erst nach etwa fünf Wochen auftrat (Gronthos et al., 2000). Dabei war die Mineralisierung in den osteogenen Medien visuell und spektrophotometrisch signifikant ausgeprägter als in den Kontrollgruppen. Die Entscheidung, die Auswertung auf Tag 14 zu fokussieren, basiert auf der größeren Stabilität und Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu diesem Zeitpunkt. Dies wurde im weiteren Verlauf der Versuche berücksichtigt.

Die Methode birgt jedoch technische Herausforderungen. Besonders ein möglicher Zellverlust durch Ablösung beim Waschen nach der Fixierung oder eine unspezifische Bindung kann zu einer Unterrepräsentation der Mineralisierung führen (siehe **Abb. 96: Abgelöste Zellen beim Waschen**).

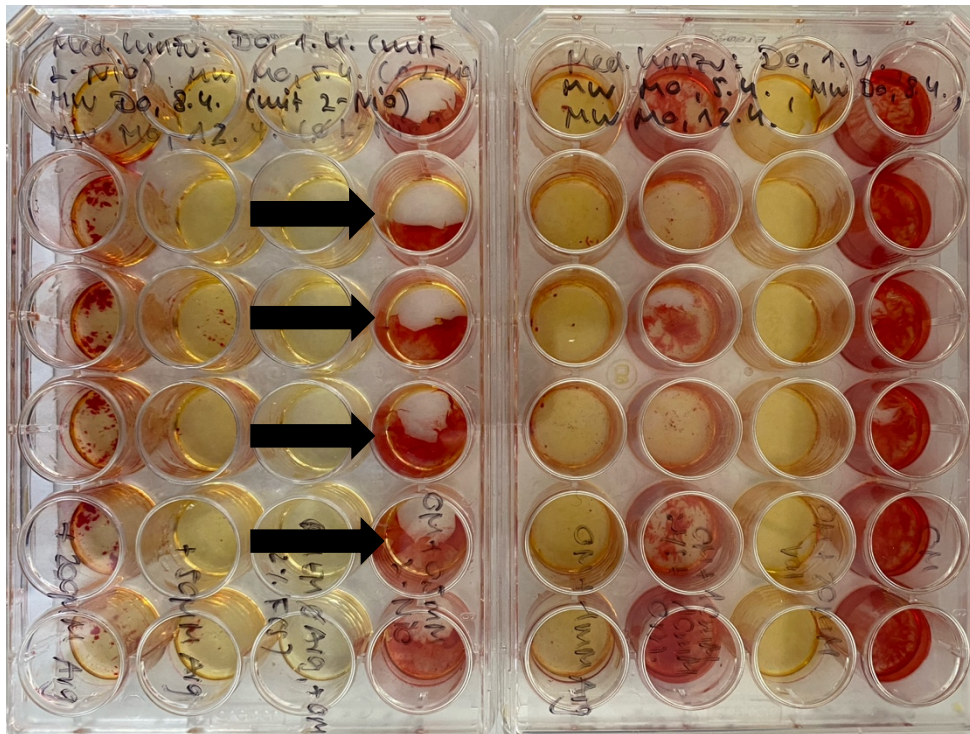


Abb. 96: Abgelöste Zellen beim Waschen

Makroskopische Aufnahme der osteogenen Differenzierung dentaler Stromazellen in verschiedenen Medien. Die Pfeile markieren Areale mit partieller bzw. vollständiger Ablösung des Zellrasens nach Fixierung und den anschließenden Waschschritten im Rahmen der Alizarinrot-S-Färbung. Die unvollständige Bedeckung der Wellböden führt zu einer systematischen Unterrepräsentation der Mineralisierungssignale und erschwert die Vergleichbarkeit zwischen den Bedingungen. Zusätzlich werden zwischen den gezeigten Spendern ausgeprägte Intensitätsunterschiede sichtbar (interindividuelle Variabilität). Weitere Informationen sind dem Fließtext zu entnehmen. OM = osteogenes Differenzierungsmedium, Val = L-Valin, Lys = L-Lysin, Orn = L-Ornithin, Arg = L-Arginin, L-NIO = L-N⁵-(1-Aminoethyl)-Ornithin, mM = Millimolar, % = Prozent. Eigene Anfertigung.

Die Alizarinrot-S-Färbung bleibt semi-quantitativ und anfällig für subjektive Verzerrung. Verbesserte Quantifizierungsmethoden, wie *Destain-and-read*-Protokolle mit saurer Extraktion (z. B. 10 % Essigsäure) gefolgt von photometrischer Messung, sind etabliert (Kok et al., 2019).

Alternative Marker wie die Bestimmung der alkalischen Phosphatase-Aktivität oder ELISA-basierte OPG-Detektion könnten zukünftig eine objektivere Bewertung erlauben. Alkalische Phosphatase gilt als Markerprotein für die osteogene Mineralisierung und zeigt die Aktivität von Osteoblasten. Zur Messung der Osteoklasten-Aktivität könnte man z. B. zusätzlich ein PIT-Assay verwenden. Auch die Analyse molekularer Marker der Osteogenese wie Runx2, Osterix, Osteopontin oder BMP-2 wäre hier sinnvoll, um die osteogene Differenzierung auf mehreren Ebenen zu validieren.

Zudem sollten künftige Studien eine einheitliche Zellzahl bei Wachstums- und Differenzierungsversuchen, konsistente Passagezahlen und ggf. zusätzliche Zeitpunkte (z. B. Tag 21) einbeziehen, um die Differenzierungsdynamik umfassender abzubilden.

4.5.2 Effekte von L-Arginin und assoziierten Mediatoren

4.5.2.1 Hypothesenlage

Die Rolle von L-Arginin in der Osteogenese wurde anhand verschiedener experimenteller Bedingungen untersucht. Ausgehend von der Funktion von L-Arginin als Substrat der NO-Synthese war anzunehmen, dass eine höhere Konzentration des Moleküls eine positive Wirkung auf die Osteogenese haben würde. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass es durch vermehrte extrazelluläre L-Arginin-Verfügbarkeit zu einer Erhöhung der NO-Konzentration kommt (Bode-Böger et al., 1998). Aufgrund seiner besseren biologischen Verträglichkeit wurde L-Arginin anstelle von NO selbst verwendet (Singh et al., 2014). Weitere Hypothesen bezogen sich auf assoziierte Mediatoren (siehe **Abb. 97: Modell der Mediator-Einflüsse**):

L-Valin sollte über eine kompetitive Hemmung der Arginase den intrazellulären L-Arginin-Pool erhöhen, was in anderen Zelltypen wie Makrophagen zu einer erhöhten NO-Produktion führen konnte (Pang et al., 2020).

L-Lysin und L-Ornithin wurden aufgrund ihrer Konkurrenz mit L-Arginin um den kationischen Aminosäuretransporter CAT als mögliche Modulatoren der L-Arginin-Aufnahme betrachtet (Rosenberg et al., 1962).

Der selektive eNOS-Inhibitor L-NIO sollte hingegen durch Hemmung der NO-Bildung die osteogene Differenzierung reduzieren. Bereits 2001 konnte durch Samuels et al. gezeigt werden, dass der Einsatz des eNOS-Inhibitors L-NAME zu einer reduzierten Knochendichte führt (Samuels et al., 2001).

Durch L-Arginin-Entzug sollte im Gegensatz dazu erwartungsgemäß weniger NO entstehen und es sollte somit eher zu einer Osteoklasten-Aktivierung führen, welche dann in einer negativen Knochenbilanz resultieren sollte.

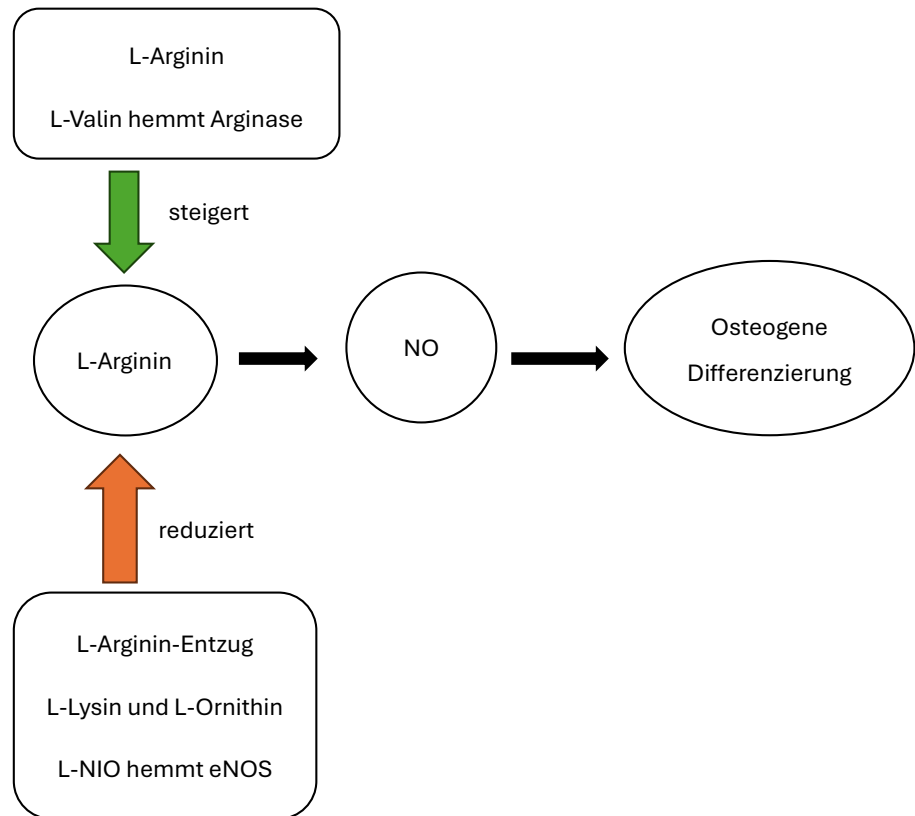


Abb. 97: Modell der Mediator-Einflüsse

Schematische Darstellung der angenommenen Wirkbeziehungen der untersuchten Mediatoren auf L-Arginin-Verfügbarkeit, NO-Bildung und osteogene Differenzierung. Als fördernd postuliert: L-Arginin (Substrat der NO-Synthasen, NOS) und L-Valin (über Arginase-Hemmung, Erhöhung des intrazellulären L-Arginin-Pools). Als hemmend postuliert: L-Arginin-Entzug, L-Lysin und L-Ornithin (kompetitive Hemmung des kationischen Aminosäuretransporters, CAT) sowie L-NIO (Inhibitor der endothelialen NOS). Aktivierende Effekte sind als grüner Pfeil, hemmende als oranger Pfeil dargestellt. Das Diagramm spiegelt die Hypothesenlage vor den Experimenten wider; abweichende bzw. kontextspezifische Effekte werden in den folgenden Kapiteln diskutiert. Weitere Informationen sind dem Fließtext zu entnehmen. NO = Stickstoffmonoxid, NOS = Stickstoffmonoxid-Synthase, eNOS = endotheliale NOS, CAT = kationischer Aminosäuren-Transporter, L-NIO = L-N⁵-(1-Aminoethyl)-Ornithin. Eigene Darstellung.

Diese Annahmen basierten auf publizierten Stoffwechselfaden, müssen jedoch angesichts der experimentellen Ergebnisse differenziert betrachtet werden.

4.5.2.2 Ergebnisse in L-Arginin-haltigen Medien

Die Auswertung zeigte, dass sowohl L-Arginin als auch insbesondere die Kombination aus L-Lysin und L-Ornithin die Mineralisierung der Zellen signifikant steigerten. L-Arginin fördert die Mineralisierung zuverlässig und wies zwischen Tag 7 und Tag 14 die stärkste Zunahme auf. Zwar führte L-Arginin zu einer verbesserten Mineralisierung im Vergleich zum reinen OM, blieb jedoch in seiner Wirkung hinter der Kombination L-Lysin/L-Ornithin zurück.

Wiederholt erzielte diese Kombination die höchsten OD 600-Werte (siehe Abb. 98: Ausgeprägte Mineralisierung unter OM + 10 mM L-Lysin + 10 mM L-Ornithin).

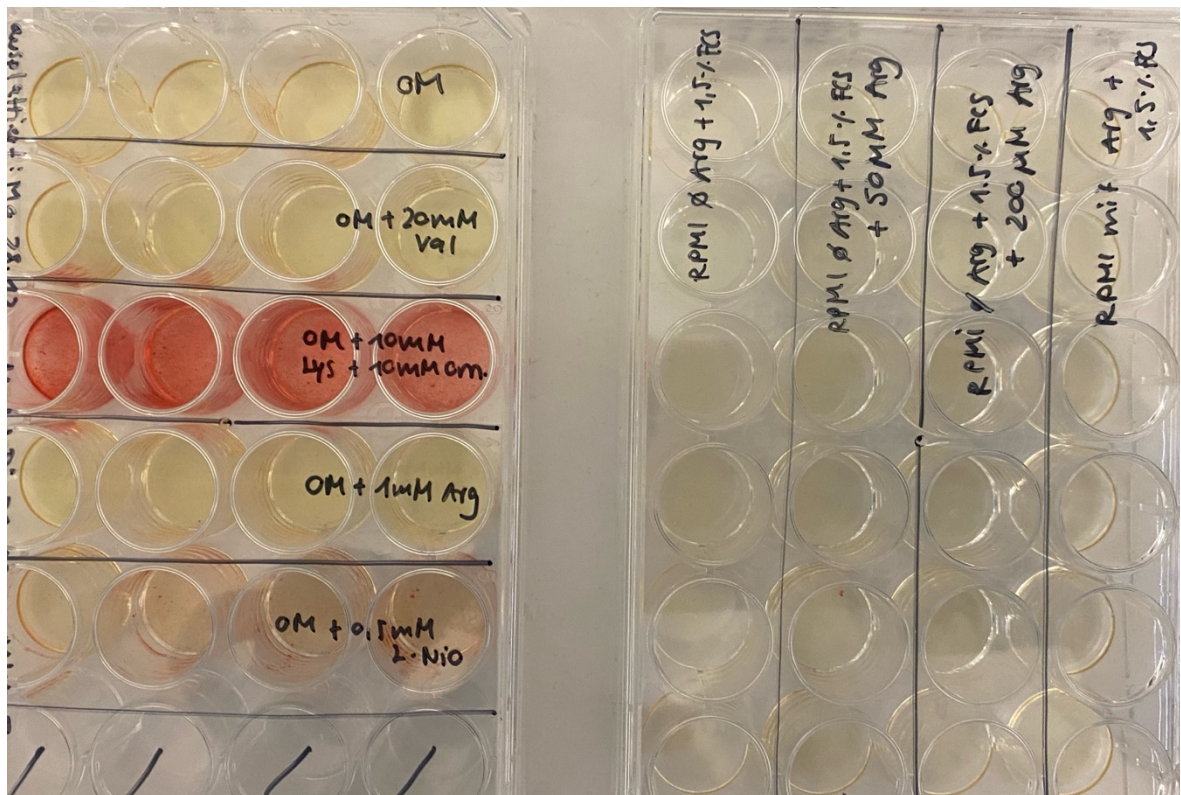


Abb. 98: Ausgeprägte Mineralisierung unter OM + 10 mM L-Lysin + 10 mM L-Ornithin

Makroskopische Aufnahmen repräsentativer 24-Well-Platten nach Alizarinrot-S-Färbung der dentalen Stromazellen (DSC) in L-Arginin-haltigen (links) und L-Arginin-freien Kulturbedingungen (rechts). Der Zusatz von L-Lysin und L-Ornithin (je 10 mM) führt zu einer deutlich intensiveren, flächigen Färbung im Vergleich zu allen anderen gezeigten Bedingungen (u. a. OM, OM + L-Arginin, OM + L-Valin, OM + L-NIO, RPMI ohne L-Arginin, + 50 μ M L-Arginin, + 200 μ M L-Arginin und mit L-Arginin). Die erhöhte Färbeintensität indiziert eine gesteigerte Calciumeinlagerung und damit eine verstärkte Matrixmineralisierung (siehe linke Platte, 3. Reihe). Details zur quantitativen Auswertung siehe Fließtext. OM = osteogenes Differenzierungsmedium, Val = L-Valin, Lys = L-Lysin, Orn = L-Ornithin, Arg = L-Arginin, L-NIO = L-N⁵-(1-Aminoethyl)-Ornithin, DSC = dentale Stromazellen, RPMI = Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium, FCS = fetales Kälberserum, mM = Millimolar, μ M = Mikromolar, % = Prozent. Eigene Darstellung.

Ein möglicher Erklärungsansatz für diese ausgeprägten Effekte liegt in der metabolischen Funktion von L-Ornithin: Als Zwischenprodukt des Harnstoffzyklus ist es in die Prolinsynthese eingebunden und fördert dadurch die Bildung kollagenreicher extrazellulärer Matrix. Darüber hinaus könnte L-Ornithin durch reversible Konversion zu L-Arginin die intrazelluläre L-Arginin-Verfügbarkeit erhöhen. Auch ist es ein essenzielles Substrat der Polyamin-Biosynthese, deren Inhibition nachweislich mit einer verstärkten osteogenen Genexpression, erhöhter alkalischer Phosphatase-Aktivität und gesteigerter Matrixmineralisierung von MSC assoziiert ist (Tsai et al., 2015). Zudem wurde eine Suppression der Osteoklastendifferenzierung beschrieben (Lee et al., 2024). L-Lysin kann

darüber hinaus den pH-Wert des Mediums erhöhen, was die osteogene Differenzierung zusätzlich begünstigen könnte (siehe „pH“). Künftige Studien sollten L-Ornithin und L-Lysin daher auch isoliert untersuchen, um synergistische und individuelle Effekte zu trennen.

L-Valin führte entgegen der Ausgangshypothese zu einer signifikant geringeren Mineralisierung und zeigt damit eine klar hemmende Tendenz. Vermutlich spielt hier eine negative Rückkopplung im Aminosäuremetabolismus eine Rolle, insbesondere die Hemmung der Acetolactat-Synthase, welche zur Akkumulation von 2-Oxobutansäure, einem toxischen Stoffwechselprodukt, führt (Gedi & Yoon, 2012).

Die Wirkung von L-NIO war nicht durchgängig inhibitorisch. Im ersten Teil zeigte sich eine deutliche Zunahme der Mineralisierung zwischen Tag 0 und Tag 14 (starke Effektstärke), wenngleich die Werte an Tag 14 unter jenen von OM lagen und OM in mehreren Paarvergleichen signifikant höhere Werte aufwies. Im zweiten Teil war ebenfalls eine signifikante Steigerung gegenüber Tag 0 nachweisbar. Zudem lag L-NIO in den Paarvergleichen über L-Valin und zeigte in der Normierung (OM = 100 %) mit 115 % sogar höhere Werte als das Kontrollmedium. Insgesamt deuten die Befunde auf eine dosis- und kontextabhängige Modulation der NO-Achse hin, aber nicht auf eine konstante Hemmung. Methodische Faktoren wie Mediumwechsel, Inhibitor-Stabilität oder Spenderheterogenität könnten diese Unterschiede erklären.

Im ersten Teil zeigte sich in allen OM-Medien mit Zusätzen eine signifikante Steigerung der Mineralisierung zwischen Tag 0 und Tag 14. Die deutlichste Veränderung ließ sich im Intervall zwischen Tag 7 und Tag 14 feststellen. Nur OM + 0,5 mM L-NIO zeigte zwischen Tag 0 und Tag 7 keine signifikante Steigerung, wobei auch hier ein starker Effekt nach Cohen's *d* festgestellt wurde. Aufgrund der stärkeren Effekte zwischen Tag 7 und 14 wurde die Analyse in der späteren Auswertung auf Tag 14 reduziert.

Normiert auf OM = 100 % ergaben sich an Tag 7 folgende Werte: 819 % für OM + L-Lysin/L-Ornithin, 213 % für OM + L-NIO, 149 % für OM + L-Valin und 130 % für OM + L-Arginin. An Tag 14 wurden folgende Werte beobachtet: 173 % (L-Lysin/L-Ornithin), 112 % (L-Arginin), 101 % (L-NIO) und 80 % (L-Valin). Diese Verteilung unterstreicht die besondere Wirkung der Kombination aus L-Lysin und L-Ornithin. Dass L-Arginin im Vergleich dazu schwächer wirkte, weist auf komplexe, regulative Wechselwirkungen hin.

Im zweiten Versuchsteil wurden insgesamt höhere OD 600-Werte erzielt als in Teil 1, obwohl die gleichen Medien verwendet wurden. Mögliche Ursachen könnten methodische Verbesserungen (z. B. Färbung, Waschtechnik) oder Unterschiede zwischen den

Zellspendern sein (siehe „Kritische Betrachtung Spender“). Zwischen Tag 0 und Tag 14 zeigten alle Medien, mit Ausnahme von OM + 20 mM L-Valin, eine signifikante Steigerung der Mineralisierung mit hohen Effektstärken. Allerdings wurden auch hier sehr hohe Standardabweichungen beobachtet. Bemerkenswert ist, dass OM allein nun die höchsten Werte an Tag 14 erreichte, gefolgt von OM + L-Lysin/L-Ornithin. Im Gegensatz zu Teil eins war die Mineralisierung in OM signifikant höher als in OM + 10 mM L-Lysin + L-Ornithin. L-Valin blieb das Medium mit der geringsten Mineralisierung, während L-NIO hier geringere Werte als OM, aber höhere als L-Valin aufwies. Diese Verschiebung deutet auf ein Zusammenspiel zwischen biologischer Variabilität und methodischer Standardisierung hin.

Sowohl OM als auch OM + 1 mM L-Arginin als auch OM + 0,5 mM L-NIO weisen signifikant höhere Werte und einen stärkeren Effekt im Vergleich zu OM + 20 mM L-Valin auf. Die besonders niedrigen Werte für OM + L-Valin bestätigten sich damit in beiden Versuchsteilen und stehen im Widerspruch zu den Literaturerwartungen.

Normiert auf OM = 100 % ergaben sich im zweiten Teil folgende Werte: OM + L-Valin 46 %, OM + L-Lysin/L-Ornithin 76 %, OM + L-Arginin 78 % und OM + L-NIO 115 %. Diese Ergebnisse unterscheiden sich von Teil 1, verdeutlichen aber, dass L-Valin erneut den geringsten Mineralisierungsgrad aufwies, während L-NIO hier leicht über OM lag.

Bei Zusammenfassung der Ergebnisse aus Teil eins und zwei (n = 18 Spender) zeigte sich eine insgesamt höchste Mineralisierung in OM sowie in OM + L-Lysin/L-Ornithin. Die niedrigsten Werte wurden für OM + L-Valin beobachtet. Die Normierung auf OM = 100 % ergab für OM + L-Lysin/L-Ornithin 135 %, für OM + L-NIO 107 %, für OM + L-Arginin 99 % und für OM + L-Valin 67 %. Diese Verteilung entspricht eher den Ergebnissen aus Teil 1. Signifikant waren OM versus OM + L-Valin ($p = 0,0017$; Bonferroni $p = 0,0169$; $d = 0,88$) und OM + L-Valin versus OM + L-Arginin ($p = 0,0005$; Bonferroni $p = 0,0047$; $d = 1,02$). Damit bestätigt die Gesamtschau die starke Leistung von L-Lysin/L-Ornithin, den moderaten, aber robusten Effekt von L-Arginin, die leichte Überlegenheit von L-NIO gegenüber OM in der Normierung sowie die konsistent hemmende Wirkung von L-Valin. Die hohe Streuung innerhalb der Spender (vgl. Standardabweichungen) muss bei der Interpretation jedoch berücksichtigt werden (siehe „Kritische Betrachtung Spender“).

4.5.2.3 *Ergebnisse in L-Arginin-freien Medien*

Die Ergebnisse aus den L-Arginin-freien Kulturbedingungen zeigen deutlich, dass L-Arginin essenziell für eine erfolgreiche osteogene Differenzierung der dentalen Stromazellen ist. Während niedrige Konzentrationen bis 200 μM dies nur bedingt auszugleichen vermochten,

fürten sie nicht zu einer vollständigen Wiederherstellung des Differenzierungsniveaus. Die Ergebnisse aus RPMI und DMEM verdeutlichen zugleich, dass sowohl die Grundmedien als auch die individuelle Spenderreaktivität den Einfluss von L-Arginin wesentlich modifizieren.

In RPMI ohne L-Arginin kam es zwischen Tag 0 und Tag 14 zu einer signifikanten Abnahme der Mineralisierung ($p < 0,002$; Bonferroni-korrigiert $p = 0,022$; Cohen's $d = 1,343$). Diese Beobachtung spricht für eine Hemmung der osteogenen Differenzierung unter L-Arginin-Entzug. Die Supplementierung mit 50 μM oder 200 μM L-Arginin führte zwar tendenziell zu höheren Werten als die reine L-Arginin-freie Kultur, erreichte jedoch keinen signifikanten Unterschied. Erst RPMI mit L-Arginin führte an Tag 14 zu signifikant höheren Werten im Vergleich zu allen L-Arginin-freien oder niedrig supplementierten Gruppen ($p < 0,027$ nach Bonferroni-Korrektur). Dies weist darauf hin, dass geringe L-Arginin-Mengen das Defizit nicht ausgleichen können. Zwischen Tag 7 und Tag 14 waren keine weiteren Steigerungen erkennbar, was auf ein frühes Differenzierungsplateau in RPMI hinweisen könnte. Ein einzelner Ausreißer mit extrem hoher OD 600 in RPMI ohne L-Arginin an Tag 7 könnte durch einen technischen Fehler oder durch den Primärzellcharakter der DSC bedingt sein und wurde daher von der statistischen Analyse ausgeschlossen. Insgesamt blieben die absoluten Extinktionswerte in allen RPMI-Bedingungen sehr niedrig (max. 0,08) und deutlich unterhalb der Werte in OM-Medien, was die limitierte Differenzierungskapazität in RPMI unterstreicht.

Die normierte Analyse (RPMI mit L-Arginin = 100 %) zeigte an Tag 14 Mineralisierungswerte von 33 % für RPMI ohne L-Arginin, 56 % für RPMI mit 50 μM L-Arginin und 76 % für RPMI mit 200 μM L-Arginin. Nur der Unterschied beim Vergleich zwischen RPMI mit und ohne L-Arginin war statistisch signifikant. Dies bestätigt die Bedeutung ausreichender L-Arginin-Konzentrationen.

In DMEM ohne L-Arginin stellte sich ein heterogeneres Bild dar: Zwar war auch hier insgesamt eine Zunahme der Mineralisierung bei steigender L-Arginin-Konzentration erkennbar, jedoch blieben statistisch signifikante Unterschiede aus. Auffällig war die starke interindividuelle Variabilität: Während die meisten Spender nur sehr geringe OD 600-Werte zeigten, erreichten einzelne Spender – insbesondere in den Supplementgruppen mit 50 μM oder 200 μM L-Arginin – extrem hohe Werte von bis zu 5,5 (siehe **Abb. 88: Kalzifizierung in DMEM ohne L-Arginin + 50 μM L-Arginin, alle Spender einzeln** und **Abb. 89: Kalzifizierung in DMEM ohne L-Arginin + 200 μM L-Arginin, alle Spender einzeln**). Diese Werte wurden nicht als technische Fehler, sondern als Ausdruck biologischer Heterogenität gewertet. Zudem traten in den DMEM-Kulturen wiederholt zellfreie Randbereiche in den Wells auf, was auf spezifische

Wachstumsbedingungen in diesem Medium oder auf eine Besonderheit der Zellkulturplatte hinweisen könnte.

Die normierte Betrachtung (DMEM + 200 μ M L-Arginin = 100 %) ergab für DMEM ohne L-Arginin 75 % und für DMEM + 50 μ M L-Arginin 182 %. Letzteres deutet auf einen möglichen dosisabhängigen Stimulus hin, der jedoch aufgrund der hohen Standardabweichungen nicht statistisch gesichert werden konnte. Bemerkenswert ist, dass die absoluten Werte in DMEM deutlich höher lagen als in vergleichbaren RPMI-Medien: DMEM + 200 μ M L-Arginin erreichte einen maximalen Mittelwert von OD 600 = 1,2, während RPMI mit L-Arginin lediglich OD 600 = 0,08 erzielte. Dies unterstreicht die zentrale Bedeutung des Grundmediums für die osteogene Differenzierung (Wu et al., 2009).

Auf mechanistischer Ebene ist auch plausibel, dass L-Arginin-Entzug die NO-Bioverfügbarkeit senkt und damit proapoptotische Signalkaskaden in osteoblastischen und osteoklastären Zellkompartimenten begünstigt. Direkte Apoptose-Nachweise wurden in dieser Arbeit nicht erhoben; der Zusammenhang ist daher als arbeitshypothetisch zu verstehen und sollte in Folgestudien (z. B. Annexin-V/PI, Caspase-Aktivität) gezielt geprüft werden.

Zusammenfassend verdeutlichen die Ergebnisse aus den L-Arginin-freien Medien, dass eine ausreichende L-Arginin-Versorgung eine notwendige Voraussetzung für die osteogene Differenzierung darstellt. Niedrige Supplementierungen (\leq 200 μ M) kompensieren diesen Mangel nur unzureichend. Während in RPMI eine klare Hemmung der Differenzierung festzustellen war, zeigte DMEM eine höhere Grundaktivität mit ausgeprägter Spenderheterogenität. Beide Befunde unterstreichen die Bedeutung sowohl der L-Arginin-Verfügbarkeit als auch der Grundmedienzusammensetzung für die Differenzierungsleistung dentaler Stromazellen.

4.5.2.4 Zusammenfassende Bewertung

Die osteogene Differenzierung dentaler Stromazellen ist in hohem Maß von der Verfügbarkeit von L-Arginin sowie von der Zusammensetzung des Grundmediums abhängig. Unter L-Arginin-haltigen Bedingungen nimmt die Mineralisierung über den Kulturverlauf zuverlässig zu. Innerhalb dieser Gruppe wirkt L-Arginin förderlich, erreicht jedoch nicht die Spitzenwerte der Kombination aus L-Lysin und L-Ornithin, die eigentlich als kompetitive Hemmstoffe des L-Arginin-Transports über CAT gelten (Rosenberg et al., 1962). Die wiederholt beobachteten hohen Mineralisierungsgrade unter L-Lysin/L-Ornithin lassen sich möglicherweise über die Kopplung des Ornithin-Prolin-Kollagen-Stoffwechsels sowie pH-Effekte durch L-Lysin erklären. L-Ornithin speist die Prolinsynthese. Prolin ist

zentral für die Kollagenbiosynthese und damit für die Bildung kollagenreicher extrazellulärer Matrix (EZM). Durch NO kommt es zur induzierten Aktivierung früher Schritte der Integrin-Synthese (Al-Koussa et al., 2020). Fehlt L-Arginin, ist diese Signalkaskade gestört und es resultiert eine Bildungsstörung der EZM. L-Lysin ist darüber hinaus essenziell für die kollagene Quervernetzung, sodass beide Achsen maßgebliche Determinanten der Knochenmatrixqualität darstellen (Eyre et al., 2019; McAdams et al., 1998; Tsuneizumi et al., 2024). Störungen oder Förderungen dieser Achse wirken sich direkt auf die Osteogenese aus. Diese Verbindung wird durch aktuelle Übersichtsarbeiten zur Rolle von Prolin in der Kollagen- und Matrixhomöostase untermauert (Karna et al., 2020; Sautchuk & Eliseev, 2022). Ergänzend könnte eine Verstoffwechslung von L-Ornithin zu L-Arginin die L-Arginin-Verfügbarkeit erhöhen (Ginguay et al., 2017).

Auch eine Beteiligung der Polyaminachse ist wahrscheinlich: Die Hemmung der Ornithindecarboxylase und damit eine Dämpfung der Polyaminbiosynthese kann osteogene Programme, alkalische Phosphatase-Aktivität und Matrixmineralisation verstärken, während eine Polyamin-Überladung die Hydroxylapatit-Bildung beeinträchtigen kann (Tsai et al., 2015). Des Weiteren führt dies zu einer Suppression der Osteoklastendifferenzierung (Lee et al., 2024). Dass Inhibitor-basierte Strategien osteogene Defizite teilweise beheben, unterstreicht die Relevanz dieser Achse auch für MSC (Cressman et al., 2024; Tsai et al., 2015).

L-Valin wirkt demgegenüber konsistent hemmend und zeigt die niedrigsten Mineralisierungswerte. Die hemmende Wirkung ist mit einer feedbackbedingten Hemmung der Acetolactat-Synthase und der potenziellen Akkumulation zytotoxischer Zwischenprodukte vereinbar und wird in der Literatur zu verzweigt-kettigen Aminosäuren, deren Regulationsmechanismen sowie zu metabolischem Stress gestützt (Reitzer, 2009). Diese biochemische Plausibilität korrespondiert mit den konsistent niedrigen Mineralisierungswerten unter L-Valin in den hier vorliegenden Experimenten und in der Literatur (Bertels et al., 2024; Devignes et al., 2022; Suzuki & Iwata, 2021). Möglich ist zudem, dass in den Experimenten eine zu hohe L-Valin-Konzentration eingesetzt wurde.

L-NIO zeigte kein durchgängig inhibitorisches Verhalten: Zwar lagen die absoluten Werte teils unter osteogenem Standardmedium, zugleich kam es aber in beiden Versuchsteilen zu deutlichen Zunahmen gegenüber Tag 0 und in einem Teil der Versuche sogar zu Werten leicht oberhalb des Kontrollmediums. Dieses Muster ist mit der bekannten biphasischen Wirkung von NO vereinbar, die je nach Dosis, Zeitfenster und Mediumvoraussetzungen osteogene Programme fördern oder abschwächen kann (Aguirre et al., 2001). Die NO-Biologie stellt sich komplex dar: NO und NOS-abhängige Signalwege sind grundsätzlich an der Osteogenese beteiligt, aber die jeweiligen Effekte sind konzentrations- und

kontextabhängig. Während eNOS/iNOS-Modulation osteogene Prozesse fördern oder hemmen kann, zeigen jüngere Arbeiten, dass Arginase- und NOS-verknüpfte Knotenpunkte (z. B. ASL-abhängige L-Arginin-Kanalisation) für die Balance aus anabolen und katabolen Signalen entscheidend sind. Es wurde zudem gezeigt, dass selbst unter NOS-Inhibition ein inhibitorischer Effekt von NO in Osteoklasten auftreten kann (Brandi et al., 1995). Eine niedrige NO-Konzentration scheint für die Osteoklasten-Aktivität notwendig zu sein. Ein Schwellenwert zwischen Inhibition und normaler Verstoffwechslung ist daher plausibel. Dies deckt sich mit den hier beobachteten Befunden für L-NIO, die eher eine Modulation als eine einfache Hemmung nahelegen (Bandara et al., 2016; Cataldi et al., 2022; Jin et al., 2021; Nichols et al., 2012). Wie im Methoden-Teil beschrieben (siehe „Osteogene Differenzierung und Alizarinrot-S-Färbung“) erfolgten für L-NIO seltener Mediumwechsel. Die Dosierung und Wechselhäufigkeit sollte in künftigen Untersuchungen systematisch variiert werden.

Aktuelle Forschung rückt zudem L-Arginin-abhängige Posttranslationen in den Fokus: L-Arginin-Methylierungen durch PRMT (*protein arginine methyltransferases*) regulieren osteogene Programme und BMP-abhängige Signalwege in MSC. Die Literatur stützt die grundsätzliche Bedeutung von L-Arginin jenseits der reinen Substratfunktion für NOS und ist mit den hier beobachteten Effekten in L-Arginin-haltigen Medien vereinbar (Kota et al., 2018; Vuong et al., 2024; Wen et al., 2025).

Im klinischen Kontext ist die Evidenz zu L-Arginin gemischt: Während ältere randomisierte Daten bei postmenopausalen Frauen keinen Nutzen einer L-Arginin-Monosupplementierung zeigen (Baecker et al., 2005), deuten jüngere präklinische Arbeiten auf kontext- und geschlechtsspezifische Effekte hin. Singh et al. berichteten über einen mit Bisphosphonaten vergleichbaren, L-Arginin-assoziierten Nutzen auf den Knochenstoffwechsel bei Osteoporose (Singh et al., 2014).

Mögliche Erklärungen dieser Diskrepanzen könnten Sättigungseffekte, die zentrale Stellung von L-Arginin im Zellstoffwechsel sowie konkurrierende Verbrauchswege, die die Substratverfügbarkeit für die Osteogenese senken, umfassen. Neuere Studien zeigen zudem die Rolle von L-Arginin bei der Regulierung zellulärer Signalwege (u. a. mTOR, Wnt/ β -Catenin). L-Arginin wirkte in porzinen Trophoblasten proliferations- und differenzierungssteigernd (Li et al., 2024). Ähnliche Effekte wurden auch in dentalen Pulpazellen beschrieben (Lay et al., 2023). Vor diesem Hintergrund erscheinen die *in vitro* beobachteten, klaren Unterschiede zwischen L-Arginin-haltigen und -freien Bedingungen biologisch plausibel. Ihre Übertragbarkeit hängt jedoch von Dosis, Matrix und Systemebene ab (Baecker et al., 2005; Saki et al., 2024). Die möglichen Anwendungen in der

regenerativen Medizin, insbesondere im Hinblick auf MSC-basierte Therapien, werden zunehmend untersucht (KERANMU Saitierguli, 2025).

Die Ergebnisse aus L-Arginin-freien Medien unterstreichen die Notwendigkeit einer ausreichenden L-Arginin-Versorgung. In RPMI ohne L-Arginin nahm die Mineralisierung zwischen Tag 0 und Tag 14 signifikant ab, wobei Supplementierungen im unteren Konzentrationsbereich (50–200 μM) die Situation zwar tendenziell verbesserten, den Mangel aber nicht vollständig kompensierten. Da der FCS-Gehalt geringer war als im OM, könnte die L-Arginin-Zugabe primär den Serummangel kompensiert haben, ohne zusätzliche Substratverfügbarkeit für NOS zu schaffen. Zur Ausschaltung solcher Einflüsse sollten die Medien stärker angeglichen werden. Erst die Kultur in RPMI mit L-Arginin erreichte an Tag 14 signifikant höhere Werte gegenüber den L-Arginin-freien bzw. niedrig supplementierten Bedingungen. In DMEM ohne L-Arginin zeigte sich im Gegensatz dazu zwar eine höhere absolute Mineralisierung, jedoch mit ausgeprägter Spenderheterogenität: Einzelne Spender reagierten stark auf L-Arginin-Zusätze, während der Großteil eher niedrige Werte aufwies. Insgesamt verdeutlicht der Vergleich, dass neben der Argininverfügbarkeit die basale Zusammensetzung des Mediums einen eigenständigen, substanziellen Einfluss auf Metabolismus und Osteogenese besitzt. Der starke Einfluss des Grundmediums bestätigt sich ebenfalls in externen Daten: DMEM unterstützt osteogenes Verhalten häufig besser als RPMI. Vergleichende Arbeiten und methodische Studien zur Medienwahl, zum FCS-Gehalt und zur Supplementierung sprechen dem Basismedium einen eigenständigen Steuerungsanteil an Proliferation, Markerepression und Matrixbildung zu. Die hier beobachteten höheren absoluten OD-Werte in DMEM gegenüber RPMI passen dazu (Kannan et al., 2020; Wu et al., 2009; Zainal Ariffin et al., 2016).

Methodisch ist die deutliche interindividuelle Streuung hervorzuheben, die für Versuche mit Primärzellen typisch ist. Unterschiede in Grundmedium, FCS-Gehalt, Passage, Spenderkollektiv und Handhabung (z. B. Mediumwechsel, pH-Milieu, mikrobielle Kontamination) können die Varianz zusätzlich erhöhen. Die konsequente Auswertung an Tag 14 erweist sich vor diesem Hintergrund als sinnvoll, da gerade zwischen Tag 7 und 14 die größten, praktisch relevanten Effekte auftraten.

Künftige Studien sollten sich auf die molekularen Mechanismen konzentrieren, durch die L-Arginin und seine Metabolite Differenzierung und Matrixbildung besonders beeinflussen. Aus den vorliegenden Daten leiten sich konkrete Möglichkeiten ab: Erstens sollten Dosis-Wirkungs-Reihen für L-Arginin und NO-Modulatoren (einschließlich L-NIO) in streng standardisierten Medien etabliert werden, um biphasische Bereiche und Schwellenwerte sicher zu bestimmen. Zweitens empfiehlt sich die getrennte und kombinierte Prüfung von L-Lysin und L-Ornithin, um Synergien gegenüber Einzeleffekten eindeutig zuzuordnen und

den Beitrag von Prolin/Kollagen- sowie Polyaminpfaden quantitativ zu erfassen (z. B. durch Flux-Analysen, zielgerichtete Inhibitionen). Drittens sollte der Fokus auf molekulare Mechanismen erweitert werden: Neben NO-abhängigen Prozessen könnte man L-Arginin-Sensorik, PRMT-abhängige L-Arginin-Methylierungen und Modulationen des Polyamin- und Prolin/Kollagen-Metabolismus einbeziehen. Viertens sind methodische Variablen konsequent zu kontrollieren und die Spenderzahl zu erhöhen, um robuste Effektstärken trotz Heterogenität zu gewährleisten. Insgesamt zeigen die Daten, dass L-Arginin nicht nur ein passiver Bestandteil des Kulturmediums ist, sondern aktiv das differenzielle Zellverhalten reguliert. Im Kontext hoher metabolischer Aktivität (z. B. Matrixaufbau und Mineralisierung) wirkt L-Arginin selbst funktionell als limitierender Faktor: Eine unzureichende Verfügbarkeit schlägt sich unmittelbar in reduzierter Viabilität und abgeschwächter Mineralisierung nieder, wohingegen eine ausreichende Bereitstellung die Differenzierungsleistung stabilisiert.

In Summe ergeben sich folgende Kernaussagen, die mit der aktuellen Forschungslage konsistent sind: L-Arginin fördert die osteogene Differenzierung – besonders klar im Vergleich zum L-Arginin-Entzug. Die Kombination L-Lysin/L-Ornithin zeigt die stärksten Matrixeffekte, L-Valin wirkt hemmend und L-NIO moduliert die Differenzierung kontextabhängig, statt sie strikt zu hemmen. Vergleichsmedien und Spenderheterogenität sind große Einflussgrößen, die biologisch wie methodisch kontrolliert werden müssen. Insgesamt sprechen die Daten dafür, L-Arginin nicht als passiven Mediumbestandteil zu betrachten, sondern als aktiven Regulator differenzieller Zellprogramme, dessen Wirkung über NO-abhängige und NO-unabhängige metabolische sowie epigenetische Achsen vermittelt wird.

4.5.3 Weitere Aspekte

4.5.3.1 L-Arginin-Reste und FCS-Gehalt in L-Arginin-freien Medien

Ein zentrales methodisches Problem besteht in der potenziellen Kontamination der L-Arginin-freien Medien mit L-Arginin-Resten aus vorhergehenden Kulturschritten. Das Waschen mit PBS stellt keine vollständige Garantie für L-Arginin-Freiheit dar. Möglicherweise kam es jedoch auch zu einer nachträglichen Kontamination mit L-Arginin. Denkbar wäre der Einsatz von Arginasen, um L-Arginin enzymatisch zu entfernen, wobei dadurch entstehendes L-Ornithin und Harnstoff wiederum den Stoffwechsel beeinflussen könnten.

Auch der Gehalt an fetalem Kälberserum (FCS) hat einen maßgeblichen Einfluss auf Zellvitalität, Proliferation und Differenzierung. Bereits geringe Konzentrationen unter 5 %

sind mit reduzierter Zellaktivität assoziiert (Devignes et al., 2022). FCS enthält essenzielle Wachstumsfaktoren, Proteine und Hormone und wird daher trotz experimenteller Einschränkungen auch in L-Arginin-freien Medien zugesetzt. Problematisch ist dabei, dass FCS selbst L-Arginin enthält, wodurch eine exakte Kontrolle der L-Arginin-Wirkung erschwert wird.

In eigenen Versuchen zeigte sich eine ausgeprägte, statistisch signifikante Sensitivität der DSC gegenüber reduzierten FCS-Konzentrationen (siehe „Einfluss des FCS-Gehalts und L-Arginin-Resupplementierung“ und „Einfluss des FCS-Gehalts“). Rezaei et al. dokumentierten bei einer Reduktion von 2,5 % auf 1,25 % FCS eine signifikante Abnahme der Zellvitalität (Rezaei et al., 2013). Zudem ist bekannt, dass für die NO-Synthese durch eNOS extrazelluläres L-Arginin oder L-Arginin aus dem Proteinabbau erforderlich ist (Karbach et al., 2011), was bei zu niedrigem FCS-Gehalt nicht ausreichend verfügbar sein könnte. Die supplementäre Gabe von L-Arginin kompensierte den Mangel von FCS nur teilweise (siehe „FCS-Nebenversuch“).

Interessanterweise berichten Mori et al. über eine 20-fache Zunahme der Zellzahl innerhalb einer Woche bei lediglich 5 % FCS (Mori et al., 2012). Diese ausgeprägte Proliferation könnte darauf hindeuten, dass die DSC selbst autolog Wachstumsfaktoren produzieren, welche die Zellteilung fördern. Ein solcher Mechanismus wurde bereits für ASC beschrieben (Pallua et al., 2009).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sowohl ein ausreichender FCS-Gehalt als auch eine kontrollierte L-Arginin-Versorgung entscheidend für das Überleben, Wachstum und die Differenzierung von DSC sind. Künftige Experimente sollten daher weitere Versuche durchführen, um die Effekte einzelner Substanzen valide bewerten zu können.

4.5.3.2 *Unterschiede der Grundmedien*

Ein zentrales Problem für die Vergleichbarkeit der Experimente lag in der heterogenen Zusammensetzung der verwendeten Basismedien. DMEM unterscheidet sich in seiner Nährstoffzusammensetzung signifikant von RPMI. Es enthält beispielsweise höhere Glukose- und Calciumkonzentrationen sowie andere Supplementierungskonzentrationen als RPMI und ist aufgrund seiner Zusammensetzung grundsätzlich besser für die Kultivierung adhärenter Zellen geeignet, insbesondere im Hinblick auf Prozesse der Knochenhomöostase (Yang et al., 2012). Zur besseren Vergleichbarkeit wurde DMEM ohne L-Arginin mit 1 % nicht-essenziellen Aminosäuren (NEAA), 250 mg/ml Glukose (steril filtriert) und 73 mg/ml L-Lysin (steril filtriert) ergänzt, um eine möglichst große Übereinstimmung mit dem Standardmedium zu erzielen. RPMI ohne L-Arginin musste

zusätzlich mit 40 mg/l L-Lysin und 50 mg/l L-Leucin angereichert werden. Dennoch blieben Unterschiede zwischen den Medien bestehen. Besonders problematisch war, dass RPMI mit L-Arginin herstellerseitig bereits vollständig supplementiert war, was direkte Vergleiche mit RPMI ohne L-Arginin plus nachträglicher Supplementierung erschwerte. Daher eignete sich RPMI mit L-Arginin nicht als Kontrollmedium.

Diese Annahmen wurden auch durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gestützt: Im zweiten Versuchsteil führte die Verwendung von DMEM ohne L-Arginin zu einer deutlich verbesserten osteogenen Differenzierung. In RPMI kam es bei mehreren Spendern zum vollständigen Verlust der Zellvitalität und kaum nachweisbarer Mineralisierung. Die Umstellung auf DMEM ohne L-Arginin führte zu stabileren Ergebnissen, wenngleich die Mineralisierungsgrade weiterhin geringer waren als in OM. Dies wurde bereits so in der Literatur beschrieben (Grossner et al., 2022; Wu et al., 2009). Daraus lässt sich ableiten, dass für zukünftige Experimente einheitlich mit DMEM gearbeitet werden sollte, um Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit zu gewährleisten.

In wenigen Fällen zeigten einzelne Wells oder einzelne Spender auffällig hohe Mineralisierungsgrade in den L-Arginin-freien Medien. Da diese Werte jedoch nicht durch andere Proben reproduziert wurden, liegt der Verdacht auf experimentelle Artefakte oder Kontaminationen nahe. Aus diesem Grund wurde ein Ausreißer aus der Analyse der L-Arginin-freien RPMI-Medien an Tag 7 ausgeschlossen (siehe „Ergebnisse erster Teil in RPMI-Medium“, siehe **Abb. 88: Kalzifizierung in DMEM ohne L-Arginin + 50 µM L-Arginin, alle Spender einzeln** und **Abb. 89: Kalzifizierung in DMEM ohne L-Arginin + 200 µM L-Arginin, alle Spender einzeln**).

Auch der FCS-Gehalt variierte: Während im osteogenen Medium (OM) und im Standardmedium jeweils 10 % FCS enthalten waren, lag der FCS-Gehalt in DMEM ohne L-Arginin bei 2 % und in RPMI bei nur 1,5 % (siehe „Substanzen“ sowie „L-Arginin-Reste und FCS-Gehalt in L-Arginin-freien Medien“). Da FCS selbst L-Arginin enthält, stellt es einen weiteren, potenziell interferierenden Faktor bei der Interpretation der L-Arginin-Effekte dar. Trotz Nährstoffangleichung zeigten sich Unterschiede in Vitalität, Proliferation und Mineralisierung – sowohl in RPMI- als auch in DMEM-basierten Medien ohne L-Arginin. Auffällig war zudem, dass selbst innerhalb der osteogenen Medien sowie zwischen dem ersten und zweiten Versuchsteil zum Teil stark abweichende Ergebnisse erzielt wurden. Neben den verschiedenen FCS- und L-Arginin-Konzentrationen könnten auch bislang nicht identifizierte Faktoren die Differenzierung beeinflusst haben. Daher lassen sich auf Basis der vorliegenden Daten keine allgemeingültigen Aussagen über die Wirkung einzelner Zusätze treffen.

Ein weiteres Problem war die ungleichmäßige Zellverteilung innerhalb der Wells unter L-Arginin-freien Medien. Oft kam es zu zellfreien Randbereichen. Da sich die Mineralisierung

in vielen Fällen auf zentrale Areale beschränkte, sollten künftige Versuche auf eine homogene Zellverteilung achten und gegebenenfalls alternative Kulturgefäße oder Plattentypen verwenden.

Wie aus den Ergebnissen hervorgeht, ist die osteogene Differenzierung in den L-Arginin-freien Medien erwartungsgemäß nur in sehr begrenztem Umfang erfolgt. Durch gezielte Optimierung der Kulturbedingungen konnte dieses Defizit zwar teilweise kompensiert werden, dennoch war der Differenzierungsgrad gegenüber den Zellen in den Kontrollmedien klar vermindert. Perspektivisch sollten für zukünftige Versuche definierte Basismedien mit standardisierter Zusammensetzung verwendet werden. Dabei sollten alle Bestandteile – abgesehen von dem zu untersuchenden Faktor – konstant gehalten werden, um valide Aussagen über dessen Wirkung treffen zu können.

4.5.3.3 *Allgemeine Zusätze zur osteogenen Differenzierung*

Die Kombination aus Dexamethason, Ascorbinsäure-2-Phosphat und β -Glycerophosphat hat sich als Standardzusatz für osteogene Medien bewährt (Jaiswal et al., 1997).

Dexamethason beeinflusst über nukleäre Rezeptoren die Genexpression und stimuliert die Bildung osteogener Marker wie Osteokalzin, alkalische Phosphatase und Osteopontin (Shalhoub et al., 1992). β -Glycerophosphat dient als Substrat für die mineralisierte Matrix, während Ascorbinsäure die Synthese der alkalischen Phosphatase stimuliert (Leboy et al., 1989; Tenenbaum & Heersche, 1985).

Allerdings sollte die Konzentration der Zusätze kontrolliert werden, da Überschüsse von β -Glycerophosphat zu falsch positiven Färbungsergebnissen durch unspezifische Färbung (z. B. von Phosphatniederschlägen) oder im Falle von Ascorbinsäure zu toxischen Effekten führen können (Chung et al., 1992).

4.5.3.4 *FGF-2 im Proliferationsmedium*

FGF-2 steigert nachweislich die Proliferationsrate von dentalen Stammzellen, wie bereits durch He et al. für Stammzellen aus der Pulpa und durch Lee und Hughes et al. für Stammzellen aus dem Desmodont gezeigt wurde (He et al., 2008; Hughes et al., 2006; Lee et al., 2012). Auch in dieser Arbeit dürfte der Einsatz von FGF-2 in den Proliferationsmedien eine Rolle gespielt haben.

4.5.3.5 pH

Der pH-Wert stellt einen zentralen Parameter für die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen dar, da selbst geringe Abweichungen des extrazellulären pH-Wertes die Zellvitalität, Proliferation und Differenzierung beeinflussen können. In den durchgeführten Versuchen zeigte sich insbesondere bei Zugabe basischer Aminosäuren wie L-Lysin und L-Ornithin eine deutliche pH-Erhöhung, welche in mehreren Fällen mit einer reduzierten Zellvitalität und morphologischen Veränderungen einherging. Gleichzeitig ist bekannt, dass ein leicht alkalisches Milieu Differenzierungsprozesse fördert (McAdams et al., 1998). Eine *in vivo*-Studie zeigte, dass ein pH über 7,8 die Differenzierung hemmen kann (Fliefel et al., 2016; Monfoulet et al., 2014). Eine weitere Untersuchung zeigte, dass MSC bei pH 8,0 und 8,5 verstärkte Proliferation und Osteogenese aufweisen (Fliefel et al., 2016; Lu et al., 2025). Auch in pathophysiologischen Kontexten zeigt sich die Bedeutung des pH-Milieus für die Osteogenese (Massa et al., 2017). So wurde beschrieben, dass eine Absenkung des extrazellulären pH-Wertes durch das protonensensitive GPR4–YAP-Signalnetzwerk die osteogene Differenzierung von BMSC stark hemmt (Tao et al., 2016).

In den ersten Versuchsdurchläufen wurde der pH-Wert zunächst über die Zugabe von 1 % HEPES stabilisiert. Später wurde der pH durch Titration von steril filtrierter Salzsäure (HCl) auf ca. 7,0 eingestellt. Die Kontrolle erfolgte mittels pH-Indikatorpapier. Diese Methode erwies sich jedoch im Hinblick auf Genauigkeit und Reproduzierbarkeit als unzureichend. Das verwendete Indikatorpapier lieferte lediglich grobe Schätzwerte und die Titration war durch die Tropfenzugabe nur eingeschränkt reproduzierbar.

Zu beachten ist außerdem die Rolle des Bicarbonatpuffer-Systems durch den CO₂-Gehalt im Inkubator. Die Kultivierung unter standardisierten Bedingungen bei fünf Prozent CO₂ führt zu einer Pufferung des Mediums über NaHCO₃, wodurch sich der pH-Wert in einem leicht alkalischen Bereich stabilisiert. Werden hier zusätzlich Puffersysteme wie HEPES eingesetzt, kann es zu komplexen, unerwarteten pH-Schwankungen kommen, die die Differenzierung beeinträchtigen können.

Die starke pH-Erhöhung nach Zugabe von L-Lysin wurde im Vorfeld nicht erwartet. Erst die wiederholte Kontrolle der Medien vor dem Mediumwechsel brachte diese Problematik zum Vorschein. Die erheblichen Unterschiede zwischen den beiden Versuchsteilen lassen sich möglicherweise zum Teil auch durch die variable pH-Einstellung erklären. Der bessere Verlauf des zweiten Teils könnte auf eine stabilere pH-Kontrolle zurückzuführen sein. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, bei der Herstellung und dem Einsatz experimenteller Medien die Wirkung einzelner Zusätze auf den pH-Wert systematisch zu überprüfen. Eine standardisierte, objektive Messung mittels pH-Meter anstelle von Indikatorpapier wäre für zukünftige Versuche deutlich zuverlässiger und sollte fest etabliert werden.

4.5.4 Fazit

Die Alizarinrot-S-Färbung bestätigte eine früh einsetzende, bis Tag 14 deutlich zunehmende Mineralisierung und rechtfertigt die Fokussierung der Auswertung auf diesen stabileren Zeitpunkt. Methodisch bleibt das Verfahren semi-quantitativ und anfällig für Zellverlust und pH-bedingte Artefakte. Die beobachtete Streuung zwischen Spendern und Versuchsteilen unterstreicht den Bedarf an streng standardisierten Protokollen (u. a. pH-Kontrolle, konsistente Serum- und Passagebedingungen, ergänzende Marker).

Inhaltlich zeigen die Daten, dass L-Arginin die osteogene Differenzierung zuverlässig fördert, die stärksten Effekte jedoch durch die Kombination L-Lysin/L-Ornithin erzielt wurden, was sich plausibel über Prolin/Kollagen- und Polyaminpfade sowie pH-Effekte erklären lässt. L-Valin wirkte konsistent hemmend. L-NIO erwies sich nicht als strikt inhibitorisch, sondern zeigte kontext- und dosisabhängige Modulationen. In L-Arginin-freien Medien war die Differenzierung deutlich eingeschränkt; niedrige Resupplementierungen ($\leq 200 \mu\text{M}$) kompensierten dies nur teilweise. Zugleich beeinflusste das Grundmedium die Resultate substantziell: DMEM ermöglichte insgesamt höhere Mineralisierungsleistungen als RPMI, blieb jedoch spendenabhängig variabel. Zusätzlich trugen FCS-Gehalt und seltene Mediumwechsel (L-NIO) in Einzelfällen zur Varianz bei.

Zusammenfassend ist L-Arginin nicht als passiver Mediumbestandteil zu verstehen, sondern als aktiver Regulator differenzieller Zellprogramme. Für zukünftige Arbeiten sind standardisierte Medienvergleiche, Dosis-Wirkungs-Reihen für L-Arginin und NO-Modulatoren, die getrennte versus kombinierte Prüfung von L-Lysin und L-Ornithin sowie eine Erweiterung der Endpunkte (alkalische Phosphatase-Aktivität, osteogene Marker, funktionelle und metabolische Analysen) angezeigt. Eine höhere Spenderzahl und strengere Kontrolle methodischer Variablen sind notwendig, um verlässliche Aussagen zur Rolle von L-Arginin und dessen assoziierten Mediatoren in der osteogenen Differenzierung treffen zu können.

4.6 Kritische Betrachtung Spender

4.6.1 Inter- und intraindividuelle Variabilität der Spenderzellen

Insgesamt wurden in der hier vorliegenden Arbeit DSC von 28 Spendern untersucht. Dabei zeigte sich eine hohe interindividuelle Variabilität im Hinblick auf Proliferationsverhalten, Differenzierungspotenzial und Mineralisierungsausmaß. Diese Heterogenität spiegelt sich

sowohl in den absoluten Kalzifizierungswerten als auch in den hohen Standardabweichungen der Messwerte wider. So lagen die Extinktionswerte an Tag 14 beispielsweise im Medium OM + L-Lysin/L-Ornithin zwischen OD 600 = 0,53 und bis zu 10,04 – ein Hinweis auf stark divergente Zellantworten, selbst unter gleichen Kulturbedingungen.

Auch intraindividuelle Schwankungen innerhalb eines Spenders wurden beobachtet: In manchen Fällen zeigten die Zellen desselben Spenders in verschiedenen Wells deutliche Unterschiede im Mineralisierungsverhalten – trotz identischer Medienzusammensetzung (siehe **Abb. 99: Inhomogene Mineralisierung eines Spenders unter denselben Mediumbedingungen**). Dies lässt technische und biologische Einflussfaktoren wie Zellverteilung, Zellzyklusphase oder lokale Dichteunterschiede vermuten.

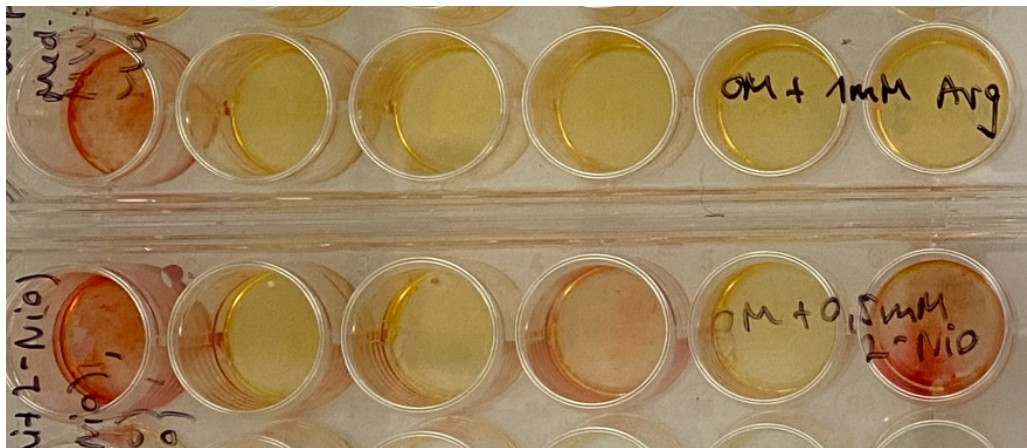


Abb. 99: Inhomogene Mineralisierung eines Spenders unter denselben Mediumbedingungen

Makroskopische Aufnahmen eines Ausschnitts einer 24-Well-Platte nach Alizarinrot-S-Färbung dentaler Stromazellen (DSC); pro Reihe ist ein identisches Medium kultiviert. Sichtbar sind deutlich abweichende Färbintensitäten einzelner Wells eines Spenders gegenüber den übrigen Replikaten derselben Reihe. Die hohe Variabilität von Platten und Spendern weist auf technische (z. B. Zellverteilung, Randeffekte, Waschschrte) und biologische Streuquellen hin und unterstreicht die Notwendigkeit standardisierter Plattierung und ausreichender Replikation. Details zur quantitativen Auswertung siehe Fließtext. DSC = dentale Stromazellen, OM = osteogenes Differenzierungsmedium, Arg = L-Arginin, L-NIO = L-N⁵-(1-Aminoethyl)-Ornithin, mM = Millimolar. Eigene Darstellung.

Die Zellen erfüllten zwar alle formalen Kriterien mesenchymaler Stromazellen, unterschieden sich jedoch erheblich in ihrem funktionellen Verhalten. Diese Beobachtungen lassen auf eine heterogene Zellpopulation mit unterschiedlichen Differenzierungs- und Wachstumspotenzialen schließen. In der Literatur wird dieses Phänomen u. a. durch *High-*, *Low-* oder *Non-Responder*-Zellen beschrieben (Kerkis et al., 2006). Mögliche Ursachen können Unterschiede in der Expression spezifischer Oberflächenantigene, epigenetische Prägungen, individuelle Anamnese oder Alter der

Donoren bzw. das Entwicklungsstadium der extrahierten Zähne sein. Tatsächlich wurden Zellen aus Zähnen unterschiedlicher Reifegrade – von Germen bis zu apexifizierten Zähnen – isoliert. Auch die mögliche Isolation von Stammzellen, die nicht primär für die Pulpadifferenzierung vorgesehen sind (z. B. Zellen des periapikalen Gewebes), könnte zu funktionellen Unterschieden beigetragen haben. Es wurde bereits in der Literatur beschrieben, dass mesenchymale Stammzellen aktiv in bestimmte Gewebe wandern (Zhu et al., 2006). Neuere Studien beschäftigen sich außerdem mit geschlechtsabhängigen Effekten von L-Arginin auf die Knochenmineralisierung (Saki et al., 2024). Auch dies könnte hier eine Rolle gespielt haben.

Da keinerlei Informationen über das Alter oder die Anamnese der Spender vorlagen, lässt sich auch eine alters- oder krankheitsbedingte Reduktion der Differenzierungsleistung nicht ausschließen. Während einige Studien (Dufrane, 2017) keinen klaren Zusammenhang zwischen Spenderalter und osteogener Kapazität beschreiben, belegen andere Arbeiten eine altersabhängige Abnahme der Differenzierungsfähigkeit (Bruna et al., 2016; Li et al., 2014; Stenderup et al., 2003). Das steigende Osteoporoserisiko im Alter hängt mit einer verminderten Kalzifizierungskapazität zusammen (Banfi et al., 2008; Lean et al., 2005; Manolagas, 2010). Auch systemische Faktoren wie Adipositas könnten durch chronische Entzündungszustände und erhöhte proinflammatorische Zytokin-Konzentrationen (z. B. TNF- α , IL-6, IL-1 β) die Differenzierung beeinflussen (Fain, 2006; Ghavipour et al., 2013).

Die Ergebnisse zeigen, dass diese inter- und intraindividuelle Heterogenität eine der Hauptursachen für hohe Standardabweichungen und ausgeprägte Streuungen in den experimentellen Daten ist. Dies schränkt die statistische Aussagekraft ein, erlaubt aber dennoch die Ableitung biologischer Tendenzen. Um die zugrunde liegenden Ursachen besser zu verstehen, sind künftig systematische Analysen erforderlich, z. B. durchflusszytometrische Charakterisierungen zur Bestimmung von Oberflächenantigenen sowie Studien mit höherer Fallzahl und definierter Spenderanamnese.

4.6.2 Einfluss der Passagezahl

Die Stromazellen wurden in den Passagen 2 bis 5 eingesetzt, wobei sich keine konsistente Abnahme des Differenzierungspotenzials mit zunehmender Passage feststellen ließ. Sowohl in niedrigen als auch in höheren Passagen wurden hohe Kalzifizierungswerte erreicht, was im Gegensatz zu vielen Literaturangaben steht, die eine Reduktion der osteogenen Kapazität in späteren Passagen beschreiben (Choi et al., 2015; Elkhenany et al., 2016; Hayflick, 1965). Für adipogene Stromazellen in Passage fünf und sieben wurde

bereits eine signifikante Reduktion des adipogenen Differenzierungspotentials nachgewiesen (Lo Surdo et al., 2013).

Möglicherweise spielte bei den durchgeführten Experimenten die oft noch moderate Passagezahl eine Rolle, da ausgeprägte Seneszenz-Effekte häufig erst ab Passage 6 auftreten (Choi et al., 2015; Elkhenany et al., 2016; Hayflick, 1965). Zudem wurden die Zellen nur bis Tag 14 kultiviert. Ob ein längerer Beobachtungszeitraum weitere Unterschiede sichtbar gemacht hätte, bleibt offen.

Ein systematischer Vergleich identischer Spender über mehrere Passagen hinweg wurde bisher nicht durchgeführt. Dies wäre jedoch für künftige Studien sinnvoll, um die Auswirkungen der Passage isoliert bewerten zu können. Ergänzend könnten Seneszenz- oder stressassoziierte Parameter, wie z. B. SA- β -Gal-Färbung oder die Bestimmung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), herangezogen werden, da in der Literatur ein Zusammenhang zwischen erhöhtem ROS-Level und abnehmender Differenzierungsfähigkeit vermutet wird (Davalli et al., 2016; Liochev, 2013; Tan et al., 2015).

Darüber hinaus beeinflusst die Passage vermutlich nicht nur die Differenzierungskapazität, sondern auch die Proliferationsrate und Zusammensetzung der Zellpopulation. Mit fortschreitender Kultivierung können sich schnell proliferierende Subpopulationen durchsetzen, was langfristig zu einer veränderten Homogenität und möglicherweise auch zu funktionellen Veränderungen führt. Diese könnten dann wiederum potenzielle Auswirkungen auf die Differenzierung haben.

Auch in dieser Arbeit zeigten sich teils deutliche intraindividuelle Unterschiede bei einzelnen Spendern, was neben der Passagezahl vermutlich auf weitere individuelle oder methodische Faktoren zurückzuführen ist. Aufgrund der relativ geringen Fallzahlen und der teils hohen Standardabweichungen können diese Effekte bislang jedoch nicht eindeutig quantifiziert werden.

Insgesamt lassen sich anhand der hier vorliegenden Ergebnisse nur Tendenzen ableiten. Um belastbare Aussagen zur Rolle der Passage auf das Differenzierungsverhalten und die Matrixbildung treffen zu können, bedarf es standardisierter Langzeitversuche mit einer größeren Zahl an Spendern, wiederholter Passage-Vergleiche innerhalb derselben Zelllinien und begleitender funktioneller Analysen.

4.6.3 Methodische und biologische Konsequenzen für die Interpretation

Die beschriebene Variabilität macht deutlich, dass in Studien mit Primärzellen aus multiplen Spendern besonders sorgfältige Kontrollen und möglichst große Fallzahlen notwendig sind. Bei geringen Spenderzahlen führen Ausreißer und individuelle Reaktionsprofile leicht zu Verzerrungen, die auch durch statistische Korrekturmaßnahmen (z. B. Bonferroni-Korrektur) nur begrenzt kompensiert werden können.

In dieser Arbeit konnten trotz der Limitierungen konsistente Trends identifiziert werden. Dazu gehören die stark förderliche Wirkung von L-Lysin + L-Ornithin, die hemmende Wirkung von L-Valin, die abhängige Wirkung von L-Arginin je nach Medium und die verzögerte bzw. schwächere Osteogenese in RPMI.

Diese Aussagen sollten dennoch im Kontext der beobachteten Streuung interpretiert werden. Für zukünftige Arbeiten wird empfohlen, eine höhere Zahl an Spendern, definierte Spendermerkmale (Alter, Geschlecht, Anamnese) und ggf. eine gezielte Charakterisierung der Zellen mittels Durchflusszytometrie (z. B. neben CD73, CD90 und CD105 auch Nachweis von SSEA4 und STRO-1) einzubeziehen, um das Differenzierungspotenzial zuverlässiger einzuschätzen und Zellen mit hoher osteogener Kapazität gezielt zu identifizieren.

Für die Planung zukünftiger Studien empfiehlt sich ein gezielter Parallelansatz: Hypothesengetriebene Tests mit immortalen Zelllinien (Reproduzierbarkeit, Mechanismenklärung) und anschließende Validierung in Primärzellen sowie deren physiologische Relevanz. So lassen sich Stabilitätseffekte von Zelllinien nutzen, ohne die Übertragbarkeit auf das primäre, heterogene Zellmilieu zu verlieren.

4.7 Überarbeitung Versuchsaufbau

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse verdeutlichen das große Potenzial dentaler Stromazellen (DSC) für Anwendungen im Bereich der regenerativen Medizin. Gleichzeitig offenbaren sie aber auch eine Vielzahl methodischer und biologischer Herausforderungen, die in zukünftigen Arbeiten gezielt adressiert werden sollten. Die Optimierung und strikte Standardisierung des experimentellen Versuchsaufbaus sind essenziell, um reproduzierbare und verlässliche Aussagen über das Differenzierungsverhalten sowie die molekularen Grundlagen der osteogenen Differenzierung treffen zu können.

Die Analyse der Versuche hat gezeigt, dass insbesondere die Standardisierung der Kulturbedingungen, die präzise Dosierung von Zusätzen, die Charakterisierung der Zellpopulationen sowie die Reduktion biologischer Streuung dringend verbessert werden

sollten. Viele der beobachteten Abweichungen, z. B. bei der Zellvitalität, Differenzierung oder Western-Blot-Analyse, sind sowohl auf methodische Faktoren als auch auf biologische Heterogenität innerhalb der Spenderpopulation zurückzuführen.

Zukünftig sollten spezifische Variablen wie L-Arginin-Konzentration, FCS-Gehalt und Mediumzusammensetzung systematisch variiert und deren Effekt auf Zellproliferation und Differenzierung differenzierter erfasst werden. Auch der Einfluss des pH-Wertes, der Oberflächenbeschichtung und der Zellverteilung im Well spielt hierbei eine Rolle. Die Verwendung ungeeigneter Medien (z. B. RPMI) sowie unkontrollierte Reste von L-Arginin im System stellten sich in der vorliegenden Arbeit als potenzielle Störfaktoren heraus. Eine gezielte Optimierung der Basismedien und eine exakte Kontrolle der Supplementierung sind daher zentrale Ansatzpunkte.

Künftig sollen die Prüfvariablen in Dosis-Wirkungs-Reihen untersucht (L-Arginin, L-Lysin, L-Ornithin, L-Valin, L-NIO) und funktionelle mit molekularen Endpunkten verknüpft werden. Um CAT-vermittelte Effekte valide zu isolieren, sollte L-Ornithin nicht gemeinsam mit L-Lysin getestet werden. L-Ornithin speist die Prolin-/Kollagenbiosynthese und beeinflusst damit die Matrixbildung unabhängig vom Transport, sodass aus Kombinationsansätzen keine eindeutige Aussage zu CAT ableitbar ist. In künftigen Versuchen sollten L-Lysin zunächst allein (\pm definierte CAT-Inhibitoren) und L-Ornithin separat geprüft werden. Begleitend sollten L-Arginin-Aufnahme, CAT-1/2-Expression sowie Prolin-/Kollagenmarker erfasst werden. Darüber hinaus sollten zukünftige Studien auch vermehrt molekulare Marker einbeziehen, um das Differenzierungsgeschehen objektiver beurteilen zu können. Die alleinige Reliabilität der Alizarinrot-S-Färbung als funktioneller Endpunkt ist begrenzt. Eine Kombination mit *Destain-and-Read*, DNA-Normalisierung sowie Expressionsanalysen von Runx2, Osterix, BMP-2 oder der quantitativen Bestimmung von ALP- oder OPG-Leveln mittels ELISA könnte die Aussagekraft deutlich erhöhen. Mechanistisch könnten auch Prolin/Kollagen- und Polyaminpfade (inkl. Ornithindecaboxylase-Modulation) sowie PRMT (Protein-L-Arginin-Methyltransferasen)-abhängige L-Arginin-Methylierungen adressiert werden. Da Mineralisierung mit hoher metabolischer Aktivität einhergeht, ist L-Arginin in diesem *Setting* möglicherweise selbstlimitierend. Künftige Designs sollten L-Arginin-Titrations mit zeitaufgelöster Messung der Medienspiegel (mittels HPLC/LC-MS) und standardisierten Nachdosierintervallen kombinieren. Endpunkte könnten auf die Argininverfügbarkeit normiert werden (z. B. pro verbrauchtem L-Arginin), inklusive Kontrollen, um Sättigungs- und Schwellenbereiche sauber zu definieren.

Ein weiteres zentrales Problem stellte die hohe inter- und intraindividuelle Variabilität der verwendeten Primärzellkulturen dar. Eine Aufstockung der Spenderzahl, Passageunterschiede sowie eine systematische Klassifizierung in potenzielle *High-/Low-*

/Non-Responder erscheinen dringend geboten. Auch sollte der Einfluss der Passagezahl intensiver untersucht werden, ggf. unter Einbeziehung von Seneszenz- oder ROS-Messungen. Zusätzlich könnten Randomisierung und *Mixed-Effects*-Modelle (Spender als Zufallsfaktor) die Varianz reduzieren.

Die ermittelten Probleme und konkreten Optimierungsvorschläge lassen sich in zwei tabellarischen Übersichten zusammenfassen (siehe Tabelle 10: Problem-Analyse und empfohlene Änderungen des Versuchsaufbaus und Tabelle 11: Methodenspezifische Überarbeitungsvorschläge).

Problematik	Empfohlene Maßnahmen
Isolation nicht erfolgreich	Transportmedium mit Amphotericin B/ggf. Gentamicin anreichern; Isolationszeit verkürzen; alkoholfreies CHX zur Desinfektion; längere und standardisierte Inkubation in Kollagenase-Dispase; steriles Arbeiten optimieren; Viabilitäts-/CFU-F-Check (<i>Colony-Forming Unit-Fibroblast</i>)
Mikrobielle Kontamination	Transportmedium optimieren (Amphotericin B); Anpassung von Antibiotika- und Antimykotika-Konzentrationen; zeitlich begrenzte Anwendung; zusätzliche Wasch- und Zentrifugationsschritte; Gentamicin ergänzen; Zusätze filtrieren; Sofort-Quarantäne kontaminierter Kulturen; Auswirkungen der Medikamente evaluieren; ggf. routinemäßige Mykoplasmen-PCR
Abweichende Zellvitalität	Einheitliche Medienzusammensetzung (kein RPMI); L-Arginin- und FCS-Gehalt standardisieren; Osmolalität/pH-Wert regelmäßig protokollieren; Antibiotikaeffekte evaluieren; Vermeidung von Kontamination
Inhomogene Zelldichte	Startzellzahl standardisieren; homogenes Ausplattieren sicherstellen; kurze Ausschwenk-Routinen; Überwachsen vermeiden; alternative Kulturformen oder Oberflächenbeschichtungen testen
Extrem hohe Einzelwerte	Technische Fehler oder L-Arginin-Kontamination prüfen; L-Arginin-Reste durch zusätzliche Waschschrirte oder Arginase entfernen; Extremwerte separat analysieren und Replizierbarkeit überprüfen

Zusammensetzung und Vergleichbarkeit der Medien	Medienzusammensetzung exakt angleichen; nur zu untersuchende Variable verändern; FCS-Gehalt vereinheitlichen
RPMI	Ausschluss aus zukünftigen Experimenten; stattdessen DMEM ohne L-Arginin verwenden
L-Arginin-Reste	Zusätzliche Waschschriffe einführen; getrennte <i>Workflows</i> ; enzymatische Entfernung mit Arginase erwägen
FCS-Gehalt	Standardisierung auf einheitlichen Gehalt; mögliche enthaltene Faktoren (z. B. Wachstumsfaktoren) untersuchen; Einfluss auf Differenzierung und Zellvitalität untersuchen; enzymatische Entfernung von L-Arginin mit Arginase erwägen
OM-Zusätze	Konzentration von Dexamethason, β -Glycerophosphat und Ascorbinsäure ggf. variieren; Kontrolle unspezifischer Phosphatniederschläge; Negativkontrollen; Stabilität dokumentieren
L-Valin	Konzentration reduzieren; Dosis-Wirkung und Zytotoxizität erfassen
L-Lysin + L-Ornithin	Separat und kombiniert testen (faktoriell); pH-Wert regulieren; metabolische Effekte analysieren; Prolin, Polyamine und Ornithindecaboxylase messen
pH-Wert	Regelmäßige Kontrolle mit kalibriertem pH-Meter; Einfluss des pH-Wertes auf Differenzierung gezielt untersuchen; pH-Wert vor und nach Mediumwechsel kontrollieren; Zugabe von HEPES-Puffer und ggf. HCl nur protokolliert
L-Arginin	Schwellenwert und Sättigung untersuchen (Dosisreihen); differenzielle Wirkung auf Viabilität und Differenzierung erfassen; zentrale Rolle im Stoffwechsel berücksichtigen; PRMT-Marker prüfen
L-NIO	Dosis-Zeit-Reihen; Replizierbarkeit überprüfen; Konzentration anpassen; Medienwechselfrequenz erhöhen; Licht-/Temperaturschutz
Hohe Standardabweichung	Mehr Replikate pro Spender und Bedingung; mehr Spender; Randomisierung; gezielte Identifikation und ggf. Ausschluss von Extremwerten (<i>Mixed-Effects-Modelle</i>); statistische Robustheit erhöhen (<i>Multiple-Test-Korrektur</i>)

Spenderunterschiede	Größere Spenderkohorte; Alter, Geschlecht und Anamnese berücksichtigen; Spendercharakteristika erfassen (<i>High-/Low-/Non-Responder</i>); molekulare Zelltypisierung (z. B. CD-Oberflächenmarker); Einschluss-/Ausschlusskriterien
Passage	Vergleich identischer Spender in unterschiedlichen Passagen; Vergleich Einfluss der Passagezahl; Markerprofilierung; längerer Zeitraum der Experimente; mögliche Seneszenzmarker oder ROS-Messungen integrieren; maximale Passage begrenzen

Tabelle 10: Problem-Analyse und empfohlene Änderungen des Versuchsaufbaus

Methode	Kritische Betrachtung/Optimierung
FACS-Analyse	Positiv- und Negativmarker validieren; differenzierte Betrachtung des Keimentwicklungsstadiums (vorinduzierte Zellen); Ausschluss von <i>Osteoblast-like-cells</i> ; Bestimmung weiterer Oberflächenmarker (Mischpopulationen); Aggregation durch Verzicht auf CellFix vermeiden; <i>Viability-Dye</i> ; klare <i>Gating</i> -Strategie; gleiche Passagebedingungen
CTB-Assay	L-Arginin- und FCS-Gehalt systematisch untersuchen; Referenz- und Auswertungstag definieren; einheitliche Zellzahlen für Proliferations- und Differenzierungsversuche; Standardkurven; Hintergrundabzug; Platten-Randomisierung; Replikate
Western-Blot	Antikörper verschiedener Hersteller vergleichen (Antikörper-Cross-Validierung); interne Lade-Kontrollen; positive/negative Kontrollen; stärkere Zytokin-Stimulation der DSC für iNOS (z. B. längere Inkubation); zusätzliche Untersuchung von nNOS; Protokolle für Proteinabbau
Differenzierungsversuche	Zusätzliche Messung an Tag 21/28 einführen; selektive Isolation matrixbildender Zellen; RPMI ausschließen; pH-Wert kontrollieren; Medienzusammensetzung und Zellzahl standardisieren; Randomisierung
Alizarinrot-S-Färbung (Techniksensitivität)	Sorgfältige Durchführung; sanfte Waschschrte; Verlust von Zellen bei Färbung beachten; ergänzende osteogene Marker-Analyse (z. B. ALP, Runx2, Osterix, BMP-2, OPG

	mittels ELISA, PIT-Assay für Osteoklasten, LC-MS/HPLC (<i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i> bzw. <i>High-Performance Liquid Chromatography</i>) für L-Arginin, L-Ornithin, Polyamine); <i>Destain-and-Read</i> mit DNA-Normalisierung; Bilddokumentation vor/nach Färbung; Randartefakte vermeiden
Statistik	<i>Mixed-Effects-Modelle</i> ; präregistrierte Hypothesen/Endpunkte; Power-Berechnung; <i>Platten-Mapping</i> ; verblindete Auswertung; QC-Logs; Daten/Code versioniert archivieren; Effektstärken/Konfidenzintervalle berichten
Alle Methoden	Höhere Fallzahl; gleiche Spender in verschiedenen Passagen; Identifikation und statistische Kontrolle von Ausreißern; Reduktion der Standardabweichung durch strukturierte Versuchswiederholung

Tabelle 11: Methodenspezifische Überarbeitungsvorschläge

4.8 Schlussfolgerungen

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass L-Arginin eine zentrale Voraussetzung für die Viabilität und die osteogene Differenzierung dentaler Stromazellen ist. DMEM unterstützt diese Prozesse verlässlicher als RPMI und ein höherer FCS-Gehalt begünstigt Proliferation und Differenzierung zusätzlich. Unter L-Arginin-haltigen Bedingungen steigert die Kombination aus L-Lysin und L-Ornithin die Mineralisierung am stärksten. Plausible Mechanismen könnten eine Förderung der Prolin-/Kollagen- und Polyaminpfade sowie pH-Effekte sein. L-Valin wirkt demgegenüber konsistent hemmend, während L-NIO keine strikt inhibitorische, sondern eine kontext- und dosisabhängige Modulation zeigt. Die Verwendung von FGF-2 dürfte zur gesteigerten Proliferation beigetragen haben, während die Standardzusätze des osteogenen Mediums wirksam sind, aber sorgfältig dosiert werden müssen, um Artefakte zu vermeiden.

Auf Proteinebene spricht die selektiv erhöhte CAT-1-Expression im Standardmedium für eine Rolle in frühen beziehungsweise undifferenzierten Stadien, während iNOS in den untersuchten Bedingungen nicht induziert werden konnte. Trends bei den Arginase-Isoformen blieben ohne signifikante Unterschiede. Die divergenten CAT-2-Signale unterstreichen die Notwendigkeit einer strikten Antikörpervalidierung und komplementärer Messverfahren.

Die Ausgangspopulation war mesenchymal und erfüllte die *ISCT*-Kriterien, zeigte jedoch eine ausgeprägte donor- und passagespezifische Heterogenität. Methodische Einflussfaktoren – pH-Kontrolle, FCS-Charge, Mediumwechsel, Zellzahl und Verteilung im Well, mögliche L-Arginin-Reste in „L-Arginin-freien“ Medien sowie gelegentliche mikrobielle Kontaminationen – erklären einen Teil der Streuung und begrenzen die Generalisierbarkeit. Die Alizarinrot-S-Färbung bestätigte die Mineralisierung, bleibt jedoch semi-quantitativ und anfällig für Verluste beziehungsweise pH-Artefakte.

Für belastbare Aussagen sind standardisierte Protokolle und größere Spenderkohorten erforderlich. Prioritär sind Dosis-Wirkungs-Reihen für L-Arginin und NO-Modulatoren (einschließlich separater sowie kombinierter Prüfung von L-Lysin und L-Ornithin) in einheitlich definiertem DMEM mit standardisiertem FCS, eine konsequente pH-Kontrolle, validierte Antikörper sowie ergänzende Endpunkte (z. B. ALP, OPG, Runx2/Osterix, funktionelle Messungen der NO-/Arginase-Aktivität, *Destain-and-Read*). Statistische Modelle sollten Spender als Zufallsfaktor berücksichtigen und spätere Zeitpunkte einschließen. Insgesamt ist L-Arginin nicht als passiver Mediumbestandteil zu verstehen, sondern als aktiver Regulator differenzieller Zellprogramme, dessen gezielte Modulation die DSC-basierte Knochenregeneration perspektivisch verbessern kann.

4.9 Ausblick

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen das vielversprechende Potenzial dentaler Stromazellen (DSC) für die regenerative Medizin. Ihre leichte Zugänglichkeit, ethische Unbedenklichkeit, hohe Proliferationsrate und ihre Differenzierungsfähigkeit machen sie zu einer vielversprechenden Option im *Tissue Engineering* – insbesondere im Hinblick auf die Osteogenese.

Zentraler Untersuchungsgegenstand dieser Arbeit war die Rolle von L-Arginin. Es zeigte sich, dass dieser Metabolit die Zellvitalität unterstützt und in bestimmten Konzentrationen auch die osteogene Differenzierung fördern kann. Die Wirkung war jedoch nicht eindeutig linear und unterlag komplexen Konzentrations- und Spenderabhängigkeiten: Unterschiedliche L-Arginin-Konzentrationen führten zu teils gegensätzlichen Effekten, was auf eine komplexe, möglicherweise dosis- und kontextabhängige Regulation zellulärer Signalwege schließen lässt. Auch die Aktivierung des NO-Stoffwechsels durch L-Arginin und seine Modulation durch Inhibitoren wie L-NIO deuten auf molekulare Mechanismen hin, die künftig genauer untersucht werden müssen.

Die Daten bestätigen zwar einige der initialen Hypothesen – etwa die Bedeutung von L-Arginin für die Zellvitalität –, legen aber auch eine erhebliche biologische Varianz offen. Die hohe inter- und intraindividuelle Variabilität der Spenderzellen stellte eine wesentliche Herausforderung für die Interpretation der Daten dar. Unterschiede in Proliferation, Differenzierung und Mineralisierung zwischen Spendern – aber auch innerhalb einzelner Spender über verschiedene Passagen – legen nahe, dass die Heterogenität von Primärzellkulturen gezielter charakterisiert werden muss. Die Identifikation von *High-*, *Low-* oder *Non-Responder-Zellen* könnte helfen, Zellquellen für therapeutische Zwecke besser zu selektieren und personalisierte Strategien zu entwickeln. Sowohl die Charakterisierung zellulärer Subpopulationen (z. B. über FACS) als auch die standardisierte Beobachtung über verschiedene Passagen hinweg sollten in künftigen Versuchen erfolgen.

Zur Verbesserung der Aussagekraft künftiger Studien sollten standardisierte Versuchsbedingungen etabliert werden: Dazu gehören die Auswahl geeigneter Basismedien (z. B. DMEM), kontrollierte FCS-Gehalte, präzise definierte Supplementierungen sowie pH-Kontrollen und Beobachtungen über längere Zeiträume. Eine alleinige Bewertung auf Basis der Alizarinrot-S-Färbung ist als funktioneller Nachweis zwar etabliert, sollte jedoch um molekulare Marker erweitert werden. Nur durch eine Kombination funktioneller und molekularer Endpunkte lassen sich verlässliche Aussagen zur Osteogenese treffen.

Der in dieser Arbeit durchgeführte methodenkritische Abgleich offenbarte zudem eine Reihe technischer Verbesserungsmöglichkeiten. Um potenzielle Reste von L-Arginin in als „L-Arginin-frei“ deklarierten Medien zu vermeiden, sind zusätzliche Waschschriffe sowie ggf. der Einsatz von Arginase zu prüfen. Neben einer standardisierten Zellanzahl beim Ausplattieren sollten alternative Kulturformen (z. B. 3D-Modelle) getestet und Durchflusszytometrie sowie Proteinanalysen methodisch erweitert werden. Die hier gewonnenen methodenkritischen Erkenntnisse sind bereits im Kapitel 4.7 „Überarbeitung Versuchsaufbau“ detailliert beschrieben und bilden die Grundlage für ein überarbeitetes, robusteres Versuchsdesign.

Langfristig eröffnen die gewonnenen Erkenntnisse Perspektiven für die klinische Anwendung: Die medizinische Anwendung von mesenchymalen Stammzellen (MSC) hat sich bereits in verschiedenen Kontexten als vielversprechende Therapieoption erwiesen. Schon 2004 konnte eine schwerwiegende Abstoßungsreaktion bei einer Transplantation mithilfe von körperfremden, haploiden MSC behandelt werden (Le Blanc et al., 2004). Sie finden zunehmend auch Anwendung bei entzündlichen oder neurodegenerativen Erkrankungen sowie im onkologischen Bereich (Nakamizo et al., 2005). In präklinischen Modellen wurden mittels *Bioengineering* aus DSC Zähne erzeugt und Mäusen transplantiert

(Ohazama et al., 2004). Es ist auch bereits möglich, die Bildung neuer Zähne in transgenen Mausmodellen zu induzieren. Dabei wird in die Signalwege der frühen Zahnentwicklung eingegriffen (siehe **Abb. 100: Von DSC zum biotechnologisch hergestellten Zahn**) (Thesleff, 2018).

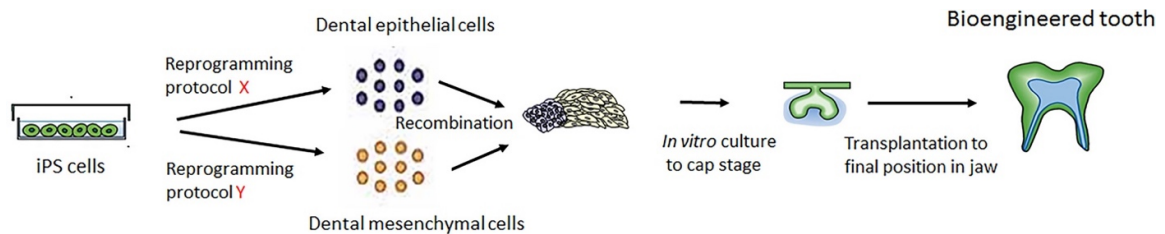


Abb. 100: Von DSC zum biotechnologisch hergestellten Zahn

Schematische Sequenz (links nach rechts) der extraoralen Zahnentwicklung von Stammzellen – exemplarisch induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS) – hin zu einem biotechnologisch erzeugten, vollständigen Zahn. Die Zahnanlage entsteht *in vitro* durch Rekombination dentaler Epithel- mit dentalen Mesenchymzellen und durchläuft die typischen histologischen Stadien (u. a. hier dargestellt das Kappenstadium); anschließende Reifung und Mineralisation resultieren in einer transplantierbaren Zahnstruktur für die Insertion in den Alveolarknochen. Weitere Erläuterungen sind im Fließtext dargestellt. iPS = induzierte pluripotente Stammzellen, DSC = dentale Stromazellen. Darstellung nach (Thesleff, 2018).

Erste Ansätze zur Nutzung von *Scaffolds* und de- bzw. rekellularisierten Organstrukturen zeigen neue Wege zur Geweberegeneration. Auch für komplexe Defekte, die das körpereigene Regenerationspotenzial übersteigen, könnte dieses Forschungsfeld künftig neue Lösungen bereitstellen. Dabei können sowohl einzelne Stammzellen als auch Gewebeverbände *in vitro* entlang biomimetischer Trägermaterialien kultiviert werden. Schon geringe Zellzahlen reichen aus, um diese vorgefertigten Strukturen zu besiedeln und funktionelle Gewebe zu erzeugen, die später transplantiert werden können. In Tiermodellen konnten mit Nervenzellen besiedelte Polymer-*Scaffolds* bereits erfolgreich zur Behandlung schwerer Rückenmarksverletzungen eingesetzt werden, was zur funktionellen Regeneration bis hin zur Rückbildung von Lähmungserscheinungen führte (Pritchard et al., 2010).

Neben synthetischen Gerüsten kommen auch natürliche *Scaffolds* zum Einsatz, etwa durch gezielte Dekellularisierung von Organen. Dabei wird das zelluläre Material entfernt und die verbleibende extrazelluläre Matrix anschließend mittels Perfusion z. B. mit Endothel- oder Herzmuskelzellen rekellularisiert – ein Verfahren, das das Potenzial zur Wiederherstellung komplexer Organstrukturen bietet (Ott et al., 2008).

Nicht zuletzt deutet der rasch wachsende Markt für Stammzellbanken darauf hin, dass isolierte und charakterisierte Stammzellprodukte künftig therapeutisch verfügbar sein könnten – möglicherweise auch auf patienteneigener Basis durch Reprogrammierung zu

pluripotenten Zellen. Bis dahin bleibt jedoch ein erheblicher Forschungsbedarf, insbesondere hinsichtlich der standardisierten Differenzierung, der Immunverträglichkeit und der Langzeitintegration solcher Zellprodukte.

Abschließend lässt sich festhalten: L-Arginin und NO zeigen deutliches Potenzial als Modulatoren der Osteogenese, doch eine abschließende Bewertung ihrer therapeutischen Relevanz erfordert vertiefte molekulare Analysen sowie reproduzierbare Ergebnisse unter definierten Bedingungen. Nur durch ein systematisch kontrolliertes Studiendesign lässt sich langfristig beurteilen, ob L-Arginin ein gezielt beeinflussbarer Faktor für die Behandlung ossärer Defekte ist.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Abdelmagid, S. A., Rickard, J. A., McDonald, W. J., Thomas, L. N., & Too, C. K. (2011). CAT-1-mediated arginine uptake and regulation of nitric oxide synthases for the survival of human breast cancer cell lines. *Journal of Cellular Biochemistry*, 112(4), 1084-1092. <https://doi.org/10.1002/jcb.23022>
- Abumaree, M., Al Jumah, M., Pace, R. A., & Kalionis, B. (2012). Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Rev Rep*, 8(2), 375-392. <https://doi.org/10.1007/s12015-011-9312-0>
- Aguirre, J., Buttery, L., O'Shaughnessy, M., Afzal, F., Fernandez de Marticorena, I., Hukkanen, M., Huang, P., MacIntyre, I., & Polak, J. (2001). Endothelial nitric oxide synthase gene-deficient mice demonstrate marked retardation in postnatal bone formation, reduced bone volume, and defects in osteoblast maturation and activity. *American Journal of Pathology*, 158(1), 247-257. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)63963-6](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)63963-6)
- Al-Koussa, H., El Mais, N., Maalouf, H., Abi-Habib, R., & El-Sibai, M. (2020). Arginine deprivation: a potential therapeutic for cancer cell metastasis? A review. *Cancer Cell International*, 20, 150. <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01232-9>
- Atari, M., Gil-Recio, C., Fabregat, M., García-Fernández, D., Barajas, M., Carrasco, M. A., Jung, H. S., Alfaro, F. H., Casals, N., Prosper, F., Ferrés-Padró, E., & Giner, L. (2012). Dental pulp of the third molar: a new source of pluripotent-like stem cells. *Journal of Cell Science*, 125(Pt 14), 3343-3356. <https://doi.org/10.1242/jcs.096537>
- Baecker, N., Boese, A., Schoenau, E., Gerzer, R., & Heer, M. (2005). L-arginine, the natural precursor of NO, is not effective for preventing bone loss in postmenopausal women. *Journal of Bone and Mineral Research*, 20(3), 471-479. <https://doi.org/10.1359/jbmr.041121>
- Bajek, A., Gurtowska, N., Gackowska, L., Kubiszewska, I., Bodnar, M., Marszałek, A., Januszewski, R., Michalkiewicz, J., & Drewa, T. (2015). Does the liposuction method influence the phenotypic characteristic of human adipose-derived stem cells? *Bioscience Reports*, 35(3). <https://doi.org/10.1042/bsr20150067>
- Bandara, N., Gurusinghe, S., Lim, S. Y., Chen, H., Chen, S., Wang, D., Hilbert, B., Wang, L. X., & Strappe, P. (2016). Molecular control of nitric oxide synthesis through eNOS and caveolin-1 interaction regulates osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells by modulation of Wnt/ β -catenin signaling. *Stem Cell Research & Therapy*, 7(1), 182. <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0442-9>
- Banfi, G., Iorio, E. L., & Corsi, M. M. (2008). Oxidative stress, free radicals and bone remodeling. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 46(11), 1550-1555. <https://doi.org/10.1515/cclm.2008.302>

- Baron, R., & Hesse, E. (2012). Update on bone anabolics in osteoporosis treatment: rationale, current status, and perspectives. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 97(2), 311-325. <https://doi.org/10.1210/jc.2011-2332>
- 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? *American Journal of Medical Genetics*, 45(2), 163-178. <https://doi.org/10.1002/ajmg.1320450205>
- Bernar, A., Gebetsberger, J. V., Bauer, M., Streif, W., & Schirmer, M. (2022). Optimization of the Alizarin Red S Assay by Enhancing Mineralization of Osteoblasts. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1). <https://doi.org/10.3390/ijms24010723>
- Bertels, J. C., He, G., & Long, F. (2024). Metabolic reprogramming in skeletal cell differentiation. *Bone Res*, 12(1), 57. <https://doi.org/10.1038/s41413-024-00374-0>
- Bianco, P. (2014). "Mesenchymal" stem cells. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 30, 677-704. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100913-013132>
- Bode-Böger, S. M., Böger, R. H., Galland, A., Tsikas, D., & Frölich, J. C. (1998). L-arginine-induced vasodilation in healthy humans: pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 46(5), 489-497. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2125.1998.00803.x>
- Bosi, A., & Bartolozzi, B. (2010). Safety of Bone Marrow Stem Cell Donation: A Review. *Transplantation Proceedings*, 42(6), 2192-2194. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2010.05.029>
- Bourin, P., Bunnell, B. A., Casteilla, L., Dominici, M., Katz, A. J., March, K. L., Redl, H., Rubin, J. P., Yoshimura, K., & Gimble, J. M. (2013). Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy*, 15(6), 641-648. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.02.006>
- Brandi, M. L., Hukkanen, M., Umeda, T., Moradi-Bidhendi, N., Bianchi, S., Gross, S. S., Polak, J. M., & MacIntyre, I. (1995). Bidirectional regulation of osteoclast function by nitric oxide synthase isoforms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(7), 2954-2958. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.7.2954>
- Brenner, B. (2019). *Physiologie* (9., vollständig überarbeitete Auflage ed.). Georg Thieme Verlag. https://deposit.dnb.de/cgi-bin/dokserv?id=3c537a8914894b41b7f3a70189bd0286&prov=M&dok_var=1&dok_ext=htm
- http://digitale-objekte.hbz-nrw.de/storage2/2019/12/05/file_12/8786083.pdf
- Bruder, S. P., Jaiswal, N., & Haynesworth, S. E. (1997). Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *Journal*

of *Cellular Biochemistry*, 64(2), 278-294. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4644\(199702\)64:2<278::aid-jcb11>3.0.co;2-f](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4644(199702)64:2<278::aid-jcb11>3.0.co;2-f)

- Bruna, F., Contador, D., Conget, P., Erranz, B., Sossa, C. L., & Arango-Rodríguez, M. L. (2016). Regenerative Potential of Mesenchymal Stromal Cells: Age-Related Changes. *Stem Cells International*, 2016, 1461648. <https://doi.org/10.1155/2016/1461648>
- Bunnell, B. A., Flaat, M., Gagliardi, C., Patel, B., & Ripoll, C. (2008). Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods*, 45(2), 115-120. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2008.03.006>
- Caetano-Lopes, J., Canhão, H., & Fonseca, J. E. (2007). Osteoblasts and bone formation. *Acta Reumatol Port*, 32(2), 103-110.
- Cai, J. Q., Huang, Y. Z., Chen, X. H., Xie, H. L., Zhu, H. M., Tang, L., Yang, Z. M., Huang, Y. C., & Deng, L. (2012). Sonic hedgehog enhances the proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Cell Biology International*, 36(4), 349-355. <https://doi.org/10.1042/cbi20110284>
- Cataldi, A., Amoroso, R., di Giacomo, V., Zara, S., Maccallini, C., & Gallorini, M. (2022). The Inhibition of the Inducible Nitric Oxide Synthase Enhances the DPSC Mineralization under LPS-Induced Inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(23). <https://doi.org/10.3390/ijms232314560>
- Cawthorn, W. P., Scheller, E. L., & MacDougald, O. A. (2012). Adipose tissue stem cells meet preadipocyte commitment: going back to the future. *Journal of Lipid Research*, 53(2), 227-246. <https://doi.org/10.1194/jlr.R021089>
- Cederbaum, S. D., Yu, H., Grody, W. W., Kern, R. M., Yoo, P., & Iyer, R. K. (2004). Arginases I and II: do their functions overlap? *Molecular Genetics and Metabolism*, 81 Suppl 1, S38-44. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2003.10.012>
- Chadipiralla, K., Yochim, J. M., Bahuleyan, B., Huang, C. Y., Garcia-Godoy, F., Murray, P. E., & Stelnicki, E. J. (2010). Osteogenic differentiation of stem cells derived from human periodontal ligaments and pulp of human exfoliated deciduous teeth. *Cell and Tissue Research*, 340(2), 323-333. <https://doi.org/10.1007/s00441-010-0953-0>
- Chan, L. L., Kuksin, D., Laverty, D. J., Saldi, S., & Qiu, J. (2015). Morphological observation and analysis using automated image cytometry for the comparison of trypan blue and fluorescence-based viability detection method. *Cytotechnology*, 67(3), 461-473. <https://doi.org/10.1007/s10616-014-9704-5>
- Charif, N., Li, Y. Y., Targa, L., Zhang, L., Ye, J. S., Li, Y. P., Stoltz, J. F., Han, H. Z., & de Isla, N. (2017). Aging of bone marrow mesenchymal stromal/stem cells: Implications on autologous regenerative medicine. *Bio-Medical Materials and Engineering*, 28(s1), S57-s63. <https://doi.org/10.3233/bme-171624>
- Choi, J. S., Lee, B. J., Park, H. Y., Song, J. S., Shin, S. C., Lee, J. C., Wang, S. G., & Jung, J. S. (2015). Effects of donor age, long-term passage culture, and cryopreservation on tonsil-derived mesenchymal stem cells. *Cellular*

- Choi, Y. S., Cha, S. M., Lee, Y. Y., Kwon, S. W., Park, C. J., & Kim, M. (2006). Adipogenic differentiation of adipose tissue derived adult stem cells in nude mouse. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 345(2), 631-637. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.04.128>
- Choudhery, M. S., Badowski, M., Muise, A., & Harris, D. T. (2013). Comparison of human mesenchymal stem cells derived from adipose and cord tissue. *Cytotherapy*, 15(3), 330-343. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2012.11.010>
- Choudhery, M. S., Badowski, M., Muise, A., Pierce, J., & Harris, D. T. (2014). Donor age negatively impacts adipose tissue-derived mesenchymal stem cell expansion and differentiation. *Journal of Translational Medicine*, 12, 8. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-12-8>
- Chung, C. H., Golub, E. E., Forbes, E., Tokuoka, T., & Shapiro, I. M. (1992). Mechanism of action of beta-glycerophosphate on bone cell mineralization. *Calcified Tissue International*, 51(4), 305-311. <https://doi.org/10.1007/bf00334492>
- Closs, E. I. (1996). CATs, a family of three distinct mammalian cationic amino acid transporters. *Amino Acids*, 11(2), 193-208. <https://doi.org/10.1007/bf00813860>
- Closs, E. I., Boissel, J. P., Habermeier, A., & Rotmann, A. (2006). Structure and function of cationic amino acid transporters (CATs). *Journal of Membrane Biology*, 213(2), 67-77. <https://doi.org/10.1007/s00232-006-0875-7>
- Compston, J. E., McClung, M. R., & Leslie, W. D. (2019). Osteoporosis. *Lancet*, 393(10169), 364-376. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(18\)32112-3](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(18)32112-3)
- Cousin, B., André, M., Arnaud, E., Pénicaud, L., & Casteilla, L. (2003). Reconstitution of lethally irradiated mice by cells isolated from adipose tissue. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 301(4), 1016-1022. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(03\)00061-5](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(03)00061-5)
- Covarrubias-Pinto, A., Acuña, A. I., Beltrán, F. A., Torres-Díaz, L., & Castro, M. A. (2015). Old Things New View: Ascorbic Acid Protects the Brain in Neurodegenerative Disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12), 28194-28217. <https://doi.org/10.3390/ijms161226095>
- Cressman, A., Morales, D., Zhang, Z., Le, B., Foley, J., Murray-Stewart, T., Genetos, D. C., & Fierro, F. A. (2024). Effects of Spermine Synthase Deficiency in Mesenchymal Stromal Cells Are Rescued by Upstream Inhibition of Ornithine Decarboxylase. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(5). <https://doi.org/10.3390/ijms25052463>
- Crockett, J. C., Rogers, M. J., Coxon, F. P., Hocking, L. J., & Helfrich, M. H. (2011). Bone remodelling at a glance. *Journal of Cell Science*, 124(Pt 7), 991-998. <https://doi.org/10.1242/jcs.063032>
- Cui, L., Liu, B., Liu, G., Zhang, W., Cen, L., Sun, J., Yin, S., Liu, W., & Cao, Y. (2007). Repair of cranial bone defects with adipose derived stem cells and coral scaffold in a canine model. *Biomaterials*, 28(36), 5477-5486. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.08.042>

- Cuzzocrea, S., Mazzon, E., Dugo, L., Genovese, T., Di Paola, R., Ruggeri, Z., Vegeto, E., Caputi, A. P., Van De Loo, F. A., Puzzolo, D., & Maggi, A. (2003). Inducible nitric oxide synthase mediates bone loss in ovariectomized mice. *Endocrinology*, *144*(3), 1098-1107. <https://doi.org/10.1210/en.2002-220597>
- Danti, S., Serino, L. P., D'Alessandro, D., Moscato, S., Danti, S., Trombi, L., Dinucci, D., Chiellini, F., Pietrabissa, A., Lisanti, M., Berrettini, S., & Petrini, M. (2013). Growing bone tissue-engineered niches with graded osteogenicity: an in vitro method for biomimetic construct assembly. *Tissue Eng Part C Methods*, *19*(12), 911-924. <https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2012.0445>
- Davalli, P., Mitic, T., Caporali, A., Lauriola, A., & D'Arca, D. (2016). ROS, Cell Senescence, and Novel Molecular Mechanisms in Aging and Age-Related Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2016*, 3565127. <https://doi.org/10.1155/2016/3565127>
- Devignes, C. S., Carmeliet, G., & Stegen, S. (2022). Amino acid metabolism in skeletal cells. *Bone Rep*, *17*, 101620. <https://doi.org/10.1016/j.bonr.2022.101620>
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., & Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, *8*(4), 315-317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Dufrane, D. (2017). Impact of Age on Human Adipose Stem Cells for Bone Tissue Engineering. *Cell Transplantation*, *26*(9), 1496-1504. <https://doi.org/10.1177/0963689717721203>
- Dulak, J., Szade, K., Szade, A., Nowak, W., & Józkwicz, A. (2015). Adult stem cells: hopes and hypes of regenerative medicine. *Acta Biochimica Polonica*, *62*(3), 329-337. https://doi.org/10.18388/abp.2015_1023
- Eckelt, U. (2019). *Zahnärztliche Chirurgie* (5., unveränderte Auflage ed.). Georg Thieme Verlag. <https://d-nb.info/1173728457/04>
- Elkhenany, H., Amelse, L., Caldwell, M., Abdelwahed, R., & Dhar, M. (2016). Impact of the source and serial passaging of goat mesenchymal stem cells on osteogenic differentiation potential: implications for bone tissue engineering. *J Anim Sci Biotechnol*, *7*, 16. <https://doi.org/10.1186/s40104-016-0074-z>
- Erickson, G. R., Gimble, J. M., Franklin, D. M., Rice, H. E., Awad, H., & Guilak, F. (2002). Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *290*(2), 763-769. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.6270>
- Eyre, D. R., Weis, M., & Rai, J. (2019). Analyses of lysine aldehyde cross-linking in collagen reveal that the mature cross-link histidinohydroxylysinonorleucine is an artifact. *Journal of Biological Chemistry*, *294*(16), 6578-6590. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.007202>
- Fain, J. N. (2006). Release of interleukins and other inflammatory cytokines by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily due to the nonfat cells. *Vitamins and Hormones*, *74*, 443-477. [https://doi.org/10.1016/s0083-6729\(06\)74018-3](https://doi.org/10.1016/s0083-6729(06)74018-3)

- Fatherazi, S., Matsa-Dunn, D., Foster, B. L., Rutherford, R. B., Somerman, M. J., & Presland, R. B. (2009). Phosphate regulates osteopontin gene transcription. *Journal of Dental Research*, 88(1), 39-44. <https://doi.org/10.1177/0022034508328072>
- Feng, X., & McDonald, J. M. (2011). Disorders of bone remodeling. *Annual Review of Pathology*, 6, 121-145. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130203>
- Fliefel, R., Popov, C., Tröltzsch, M., Kühnisch, J., Ehrenfeld, M., & Otto, S. (2016). Mesenchymal stem cell proliferation and mineralization but not osteogenic differentiation are strongly affected by extracellular pH. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, 44(6), 715-724. <https://doi.org/10.1016/j.icms.2016.03.003>
- Florencio-Silva, R., Sasso, G. R., Sasso-Cerri, E., Simões, M. J., & Cerri, P. S. (2015). Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int*, 2015, 421746. <https://doi.org/10.1155/2015/421746>
- 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. *Calcified Tissue International*, 78(2), 103-112. <https://doi.org/10.1007/s00223-005-0184-7>
- 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. *Journal of Bone and Mineral Research*, 9(6), 843-854. <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650090610>
- Friedman, J. W. (2007). The prophylactic extraction of third molars: a public health hazard. *American Journal of Public Health*, 97(9), 1554-1559. <https://doi.org/10.2105/ajph.2006.100271>
- Frith, J. E., Thomson, B., & Genever, P. G. (2010). Dynamic three-dimensional culture methods enhance mesenchymal stem cell properties and increase therapeutic potential. *Tissue Eng Part C Methods*, 16(4), 735-749. <https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2009.0432>
- Gao, Y., Zhou, S., Xu, Y., Sheng, S., Qian, S. Y., & Huo, X. (2019). Nitric oxide synthase inhibitors 1400W and L-NIO inhibit angiogenesis pathway of colorectal cancer. *Nitric Oxide*, 83, 33-39. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2018.12.008>
- García, A. J., Vega, M. D., & Boettiger, D. (1999). Modulation of cell proliferation and differentiation through substrate-dependent changes in fibronectin conformation. *Molecular Biology of the Cell*, 10(3), 785-798. <https://doi.org/10.1091/mbc.10.3.785>
- Gedi, V., & Yoon, M.-Y. (2012). Bacterial acetohydroxyacid synthase and its inhibitors – a summary of their structure, biological activity and current status. *The FEBS Journal*, 279(6), 946-963. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08505.x>

- Ghalayini, I. F. (2004). Nitric oxide-cyclic GMP pathway with some emphasis on cavernosal contractility. *International Journal of Impotence Research*, 16(6), 459-469. <https://doi.org/10.1038/sj.ijir.3901256>
- Ghavipour, M., Saedisomeolia, A., Djalali, M., Sotoudeh, G., Eshraghyan, M. R., Moghadam, A. M., & Wood, L. G. (2013). Tomato juice consumption reduces systemic inflammation in overweight and obese females. *British Journal of Nutrition*, 109(11), 2031-2035. <https://doi.org/10.1017/s0007114512004278>
- Gilbert, S. F. (2010). *Developmental biology* (9. ed.). Sinauer. https://digitale-objekte.hbz-nrw.de/storage/2012/12/05/file_240/4826478.pdf
- Gimble, J. M., Katz, A. J., & Bunnell, B. A. (2007). Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circulation Research*, 100(9), 1249-1260. <https://doi.org/10.1161/01.Res.0000265074.83288.09>
- Gimble, J. M., & Nuttall, M. E. (2012). The relationship between adipose tissue and bone metabolism. *Clinical Biochemistry*, 45(12), 874-879. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2012.03.006>
- Ginguay, A., Cynober, L., Curis, E., & Nicolis, I. (2017). Ornithine Aminotransferase, an Important Glutamate-Metabolizing Enzyme at the Crossroads of Multiple Metabolic Pathways. *Biology (Basel)*, 6(1). <https://doi.org/10.3390/biology6010018>
- Gronthos, S., Franklin, D. M., Leddy, H. A., Robey, P. G., Storms, R. W., & Gimble, J. M. (2001). Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *Journal of Cellular Physiology*, 189(1), 54-63. <https://doi.org/10.1002/jcp.1138>
- Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P. G., & Shi, S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(25), 13625-13630. <https://doi.org/10.1073/pnas.240309797>
- Grossner, T., Haberkorn, U., Hofmann, J., & Gotterbarm, T. (2022). Effects of Different Basal Cell Culture Media upon the Osteogenic Response of hMSCs Evaluated by 99mTc-HDP Labeling. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(11), 6288. <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/11/6288>
- Hadji, P., Klein, S., Gothe, H., Häussler, B., Kless, T., Schmidt, T., Steinle, T., Verheyen, F., & Linder, R. (2013). The epidemiology of osteoporosis--Bone Evaluation Study (BEST): an analysis of routine health insurance data. *Dtsch Arztebl Int*, 110(4), 52-57. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2013.0052>
- Hamidouche, Z., Hay, 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 Journal*, 22(11), 3813-3822. <https://doi.org/10.1096/fj.08-106302>
- Han, J., Koh, Y. J., Moon, H. R., Ryoo, H. G., Cho, C. H., Kim, I., & Koh, G. Y. (2010). Adipose tissue is an extramedullary reservoir for functional hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*, 115(5), 957-964. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-05-219923>

- Handschel, J., Naujoks, C., Langenbach, F., Berr, K., Depprich, R. A., Ommerborn, M. A., Kübler, N. R., Brinkmann, M., Kögler, G., & Meyer, U. (2010). Comparison of ectopic bone formation of embryonic stem cells and cord blood stem cells in vivo. *Tissue Eng Part A*, 16(8), 2475-2483. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2009.0546>
- Hausamen, J.-E. (2003). *Curriculum Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie präprothetische Chirurgie, orthopädische Chirurgie, Lippen-Kiefer-Gaumenspalten, Tumorthherapie, Traumatologie, Distractionsosteogenese, plastische Chirurgie, Chirurgie des Kiefergelenks Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie*. Quintessenz-Verl. http://digitale-objekte.hbz-nrw.de/storage/2005/12/28/file_446/955504.pdf
- Hayflick, L. (1965). THE LIMITED IN VITRO LIFETIME OF HUMAN DIPLOID CELL STRAINS. *Experimental Cell Research*, 37, 614-636. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(65\)90211-9](https://doi.org/10.1016/0014-4827(65)90211-9)
- He, H., Yu, J., Liu, Y., Lu, S., Liu, H., Shi, J., & Jin, Y. (2008). Effects of FGF2 and TGFbeta1 on the differentiation of human dental pulp stem cells in vitro. *Cell Biology International*, 32(7), 827-834. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2008.03.013>
- Hedstrom, L. (1996). Trypsin: a case study in the structural determinants of enzyme specificity. *Biological Chemistry*, 377(7-8), 465-470.
- Heinrich, P. C. (2014). *Biochemie und Pathobiochemie* (9., vollst. überarb. Aufl. ed.). Springer. http://deposit.d-nb.de/cgi-bin/dokserv?id=3949673&prov=M&dok_var=1&dok_ext=htm
http://digitale-objekte.hbz-nrw.de/storage2/2014/05/19/file_5/5614148.pdf
- Hellwig, E. (2023). *Einführung in die Zahnerhaltung Prüfungswissen Kariologie, Endodontologie und Parodontologie* (8. überarbeitete Auflage ed.). Deutscher Ärzteverlag. [/digitale-objekte-hbz/storage2/2024/01/25/file_7/9494933.pdf](http://digitale-objekte-hbz/storage2/2024/01/25/file_7/9494933.pdf)
- Herbertson, A., & Aubin, J. E. (1995). Dexamethasone alters the subpopulation make-up of rat bone marrow stromal cell cultures. *Journal of Bone and Mineral Research*, 10(2), 285-294. <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650100216>
- Horch, H.-H. (2003). *Zahnärztliche Chirurgie*. Urban & Fischer. http://digitale-objekte.hbz-nrw.de/storage/2006/08/04/file_257/1631004.pdf
- Horch, H.-H. (2007). *Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie* (4., vollst. überarb. Aufl. ed.). Elsevier, Urban & Fischer. http://deposit.d-nb.de/cgi-bin/dokserv?id=2834268&prov=M&dok_var=1&dok_ext=htm
http://digitale-objekte.hbz-nrw.de/storage/2007/05/22/file_68/1874085.pdf
- Horn, F. (2021). *Biochemie des Menschen das Lehrbuch für das Medizinstudium* (8. überarbeitete und erweiterte Auflage ed.). Georg Thieme Verlag. https://deposit.dnb.de/cgi-bin/dokserv?id=c6bdff6da4fa4ee5bd2f479b816ef365&prov=M&dok_var=1&dok_ext=htm
http://digitale-objekte.hbz-nrw.de/storage2/2020/12/10/file_8/8969677.pdf

- Huang, G. T., Gronthos, S., & Shi, S. (2009). Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *Journal of Dental Research*, 88(9), 792-806. <https://doi.org/10.1177/0022034509340867>
- Hughes, F. J., Turner, W., Belibasakis, G., & Martuscelli, G. (2006). Effects of growth factors and cytokines on osteoblast differentiation. *Periodontology 2000*, 41, 48-72. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2006.00161.x>
- Huynh, N. N., Harris, E. E., Chin-Dusting, J. F., & Andrews, K. L. (2009). The vascular effects of different arginase inhibitors in rat isolated aorta and mesenteric arteries. *British Journal of Pharmacology*, 156(1), 84-93. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2008.00036.x>
- Ignarro, L. J., Napoli, C., & Loscalzo, J. (2002). Nitric oxide donors and cardiovascular agents modulating the bioactivity of nitric oxide: an overview. *Circulation Research*, 90(1), 21-28. <https://doi.org/10.1161/hh0102.102330>
- Jaiswal, N., Haynesworth, S. E., Caplan, A. I., & Bruder, S. P. (1997). Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *Journal of Cellular Biochemistry*, 64.
- Jamal, S. A., & Hamilton, C. J. (2012). Nitric oxide donors for the treatment of osteoporosis. *Curr Osteoporos Rep*, 10(1), 86-92. <https://doi.org/10.1007/s11914-011-0087-7>
- Jin, Z., Kho, J., Dawson, B., Jiang, M. M., Chen, Y., Ali, S., Burrage, L. C., Grover, M., Palmer, D. J., Turner, D. L., Ng, P., Nagamani, S. C., & Lee, B. (2021). Nitric oxide modulates bone anabolism through regulation of osteoblast glycolysis and differentiation. *Journal of Clinical Investigation*, 131(5). <https://doi.org/10.1172/jci138935>
- Kahn, R. A., Virk, H., Laflamme, C., Houston, D. W., Polinski, N. K., Meijers, R., Levey, A. I., Saper, C. B., Errington, T. M., Turn, R. E., Bandrowski, A., Trimmer, J. S., Rego, M., Freedman, L. P., Ferrara, F., Bradbury, A. R. M., Cable, H., & Longworth, S. (2024). Antibody characterization is critical to enhance reproducibility in biomedical research. *Elife*, 13. <https://doi.org/10.7554/eLife.100211>
- Kalyanaraman, H., Schall, N., & Pilz, R. B. (2018). Nitric oxide and cyclic GMP functions in bone. *Nitric Oxide*, 76, 62-70. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2018.03.007>
- Kannan, S., Ghosh, J., & Dhara, S. K. (2020). Osteogenic differentiation potential of porcine bone marrow mesenchymal stem cell subpopulations selected in different basal media. *Biology Open*, 9(10). <https://doi.org/10.1242/bio.053280>
- Karbach, S., Simon, A., Slenzka, A., Jaenecke, I., Habermeier, A., Martiné, U., Förstermann, U., & Closs, E. I. (2011). Relative contribution of different L-arginine sources to the substrate supply of endothelial nitric oxide synthase. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 51(5), 855-861. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2011.07.024>

- Karna, E., Szoka, L., Huynh, T. Y. L., & Palka, J. A. (2020). Proline-dependent regulation of collagen metabolism. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77(10), 1911-1918. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03363-3>
- KERANMU Saitierguli, Q. L., DING Siyi, MAHELIMUHAN Hanati, YANG Xueer, JIA Hao. (2025). Research progress of arginine metabolism in the regulation of mesenchymal stem cell function. *Journal of Shanghai Jiao Tong University (Medical Science)*, 45(7), 910-915. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1674-8115.2025.07.013>
- Kerkis, I., Kerkis, A., Dozortsev, D., Stukart-Parsons, G. C., Gomes Massironi, S. M., Pereira, L. V., Caplan, A. I., & Cerruti, H. F. (2006). Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. *Cells Tissues Organs*, 184(3-4), 105-116. <https://doi.org/10.1159/000099617>
- Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Klüter, H., & Bieback, K. (2006). Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*, 24(5), 1294-1301. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0342>
- Keshet, R., & Erez, A. (2018). Arginine and the metabolic regulation of nitric oxide synthesis in cancer. *Disease Models & Mechanisms*, 11(8). <https://doi.org/10.1242/dmm.033332>
- Khan, W. S., Rayan, F., Dhinsa, B. S., & Marsh, D. (2012). An osteoconductive, osteoinductive, and osteogenic tissue-engineered product for trauma and orthopaedic surgery: how far are we? *Stem Cells International*, 2012, 236231. <https://doi.org/10.1155/2012/236231>
- Khosla, S., Oursler, M. J., & Monroe, D. G. (2012). Estrogen and the skeleton. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 23(11), 576-581. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.03.008>
- Kim, J. M., Lin, C., Stavre, Z., Greenblatt, M. B., & Shim, J. H. (2020). Osteoblast-Osteoclast Communication and Bone Homeostasis. *Cells*, 9(9). <https://doi.org/10.3390/cells9092073>
- Knoepfler, P. S. (2009). Deconstructing stem cell tumorigenicity: a roadmap to safe regenerative medicine. *Stem Cells*, 27(5), 1050-1056. <https://doi.org/10.1002/stem.37>
- Kögler, C. (2006). *Altersabhängige Unterschiede in der Kolonienbildung von humanen osteoblastären Vorläuferzellen in einem Zellkulturmodell mit geringer Zelldichte* <https://hss-opus.ub.ruhr-uni-bochum.de/opus4/frontdoor/index/index/docId/1082>
<https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:hbz:294-17461>
- Kögler, G., Sensken, S., Airey, J. A., Trapp, T., Müschen, M., Feldhahn, N., Liedtke, S., Sorg, R. V., Fischer, J., Rosenbaum, C., Greschat, S., Knipper, A., Bender, J., Degistirici, O., Gao, J., Caplan, A. I., Colletti, E. J., Almeida-Porada, G., Müller, H. W., . . . Wernet, P. (2004). A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *Journal of Experimental Medicine*, 200(2), 123-135. <https://doi.org/10.1084/jem.20040440>

- Kok, D., Peeters, C., Mardina, Z., Oterdoom, D., Bulstra, S., Veldhuizen, A., Kuijer, R., & Wapstra, f. (2019). Is remaining intervertebral disc tissue interfering with bone generation during fusion of two vertebrae? *PloS One*, *14*, e0215536. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215536>
- 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*(5), 755-764. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80258-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80258-5)
- Kota, S. K., Roening, C., Patel, N., Kota, S. B., & Baron, R. (2018). PRMT5 inhibition promotes osteogenic differentiation of mesenchymal stromal cells and represses basal interferon stimulated gene expression. *Bone*, *117*, 37-46. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2018.08.025>
- Kovach, N. L., Carlos, T. M., Yee, E., & Harlan, J. M. (1992). A monoclonal antibody to beta 1 integrin (CD29) stimulates VLA-dependent adherence of leukocytes to human umbilical vein endothelial cells and matrix components. *Journal of Cell Biology*, *116*(2), 499-509. <https://doi.org/10.1083/jcb.116.2.499>
- Krausz, A., & Friedman, A. J. (2015). Nitric oxide as a surgical adjuvant. *Future Sci OA*, *1*(1), Fso56. <https://doi.org/10.4155/fso.15.56>
- Krinner, A., & Roeder, I. (2014). Quantification and modeling of stem cell-niche interaction. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *844*, 11-36. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2095-2_2
- Kular, J., Tickner, J., Chim, S. M., & Xu, J. (2012). An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level. *Clinical Biochemistry*, *45*(12), 863-873. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2012.03.021>
- Lacchini, R., Muniz, J. J., Nobre, Y. T., Cologna, A. J., Martins, A. C., & Tanus-Santos, J. E. (2015). Relationship between Arginase 1 and Arginase 2 levels and genetic polymorphisms with erectile dysfunction. *Nitric Oxide*, *51*, 36-42. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2015.10.003>
- Lay, S., Margono, A., Bagio, D., & Julianto, I. (2023). Viability of human dental pulp stem cells: The potential of L-arginine-based culture media. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, *14*, 306. https://doi.org/10.4103/japtr.japtr_719_22
- Le Blanc, K., Rasmusson, I., Sundberg, B., Götherström, C., Hassan, M., Uzunel, M., & Ringdén, O. (2004). Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet*, *363*(9419), 1439-1441. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(04\)16104-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(04)16104-7)
- Lean, J. M., Jagger, C. J., Kirstein, B., Fuller, K., & Chambers, T. J. (2005). Hydrogen peroxide is essential for estrogen-deficiency bone loss and osteoclast formation. *Endocrinology*, *146*(2), 728-735. <https://doi.org/10.1210/en.2004-1021>
- Leboy, P. S., Vaias, L., Uschmann, B., Golub, E., Adams, S. L., & Pacifici, M. (1989). Ascorbic acid induces alkaline phosphatase, type X collagen, and calcium

- deposition in cultured chick chondrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 264(29), 17281-17286.
- Lee, C. C., Chuang, C. C., Chen, C. H., Huang, Y. P., Chang, C. Y., Tung, P. Y., & Lee, M. J. (2024). In vitro and in vivo studies on exogenous polyamines and α -difluoromethylornithine to enhance bone formation and suppress osteoclast differentiation. *Amino Acids*, 56(1), 43. <https://doi.org/10.1007/s00726-024-03403-8>
- Lee, J. H., Um, S., Jang, J. H., & Seo, B. M. (2012). Effects of VEGF and FGF-2 on proliferation and differentiation of human periodontal ligament stem cells. *Cell and Tissue Research*, 348(3), 475-484. <https://doi.org/10.1007/s00441-012-1392-x>
- Lee, O., Kuo, T., Chen, W.-M., Lee, K.-D., Hsieh, S.-L., & Chen, T.-H. (2004). Isolation of multipotent MSCs from Umbilical cord blood. *Blood*, 103, 1669-1675. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-05-1670>
- Levine, M. (1986). New concepts in the biology and biochemistry of ascorbic acid. *New England Journal of Medicine*, 314(14), 892-902. <https://doi.org/10.1056/nejm198604033141407>
- Levine, M., Dhariwal, K. R., Welch, R. W., Wang, Y., & Park, J. B. (1995). Determination of optimal vitamin C requirements in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 62(6 Suppl), 1347s-1356s. <https://doi.org/10.1093/ajcn/62.6.1347S>
- Li, H., Dai, H., & Li, J. (2023). Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal/stem cells: The link with metabolism. *Journal of Advanced Research*, 45, 15-29. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jare.2022.05.012>
- Li, J. H., Liu, D. Y., Zhang, F. M., Wang, F., Zhang, W. K., & Zhang, Z. T. (2011). Human dental pulp stem cell is a promising autologous seed cell for bone tissue engineering. *Chinese Medical Journal (Engl.)*, 124(23), 4022-4028.
- Li, S., Ye, X., Wen, X., Yang, X., Wang, L., Gao, K., Xiao, H., & Jiang, Z. (2024). Arginine and its metabolites stimulate proliferation, differentiation, and physiological function of porcine trophoblast cells through β -catenin and mTOR pathways. *BMC Veterinary Research*, 20(1), 167. <https://doi.org/10.1186/s12917-024-04023-w>
- Li, Y., Charif, N., Mainard, D., Bensoussan, D., Stoltz, J. F., & de Isla, N. (2014). Donor's age dependent proliferation decrease of human bone marrow mesenchymal stem cells is linked to diminished clonogenicity. *Bio-Medical Materials and Engineering*, 24(1 Suppl), 47-52. <https://doi.org/10.3233/bme-140973>
- Liochev, S. I. (2013). Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 60, 1-4. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.02.011>
- Liu, H., & Rosen, C. J. (2021). Nitric oxide and bone: The phoenix rises again. *Journal of Clinical Investigation*, 131(5). <https://doi.org/10.1172/JCI147072>
- Lo Surdo, J. L., Millis, B. A., & Bauer, S. R. (2013). Automated microscopy as a quantitative method to measure differences in adipogenic differentiation in

- preparations of human mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*, 15(12), 1527-1540. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.04.010>
- Lu, J., Wang, X., Lu, N., Chen, A., & Xiao, L. (2025). Hypoxia-Driven Regulation of Osteogenic Differentiation in Human Periosteal Stem Cells via the HIF-1 α /miR-129-5p/BMP2 Axis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 29(13), e70703. <https://doi.org/10.1111/jcmm.70703>
- Luan, X., Lu, Q., Jiang, Y., Zhang, S., Wang, Q., Yuan, H., Zhao, W., Wang, J., & Wang, X. (2012). Crystal structure of human RANKL complexed with its decoy receptor osteoprotegerin. *Journal of Immunology*, 189(1), 245-252. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103387>
- Mackie, E. J., Tatarczuch, L., & Mirams, M. (2011). The skeleton: a multi-functional complex organ: the growth plate chondrocyte and endochondral ossification. *Journal of Endocrinology*, 211(2), 109-121. <https://doi.org/10.1530/joe-11-0048>
- Manolagas, S. C. (2010). From estrogen-centric to aging and oxidative stress: a revised perspective of the pathogenesis of osteoporosis. *Endocrine Reviews*, 31(3), 266-300. <https://doi.org/10.1210/er.2009-0024>
- Martino, M., Console, G., Russo, L., Messina, G., D'Arro, B. L., Irrera, G., & Barreca, G. (2012). Internal iliac artery perforation following bone marrow aspiration in a patient with no previously identified risk factors: a case report and review of the literature. *Acta Haematologica*, 127(1), 23-25. <https://doi.org/10.1159/000331487>
- Massa, A., Perut, F., Chano, T., Woloszyk, A., Mitsiadis, T., Avnet, S., & Baldini, N. (2017). The effect of extracellular acidosis on the behaviour of mesenchymal stem cells in vitro. *European cells & materials*, 33, 252-267. <https://doi.org/10.22203/eCM.v033a19>
- Mauney, J. R., Nguyen, T., Gillen, K., Kirker-Head, C., Gimble, J. M., & Kaplan, D. L. (2007). Engineering adipose-like tissue in vitro and in vivo utilizing human bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells with silk fibroin 3D scaffolds. *Biomaterials*, 28(35), 5280-5290. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.08.017>
- McAdams, T. A., Miller, W. M., & Papoutsakis, E. T. (1998). pH is a potent modulator of erythroid differentiation. *British Journal of Haematology*, 103(2), 317-325. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.1998.00975.x>
- McIntosh, K., Zvonic, S., Garrett, S., Mitchell, J. B., Floyd, Z. E., Hammill, L., Kloster, A., Di Halvorsen, Y., Ting, J. P., Storms, R. W., Goh, B., Kilroy, G., Wu, X., & Gimble, J. M. (2006). The immunogenicity of human adipose-derived cells: temporal changes in vitro. *Stem Cells*, 24(5), 1246-1253. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0235>
- Messeri Dreissig, M. D., Hammermann, R., Mössner, J., Göthert, M., & Racké, K. (2000). In rat alveolar macrophages lipopolysaccharides exert divergent effects on the transport of the cationic amino acids L-arginine and L-ornithine. *Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology*, 361(6), 621-628. <https://doi.org/10.1007/s002100000241>

- Ming, J., Cronin, S. J. F., & Penninger, J. M. (2020). Targeting the RANKL/RANK/OPG Axis for Cancer Therapy. *Frontiers in Oncology*, *10*, 1283. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01283>
- Mitchell, J. B., McIntosh, K., Zvonic, S., Garrett, S., Floyd, Z. E., Kloster, A., Di Halvorsen, Y., Storms, R. W., Goh, B., Kilroy, G., Wu, X., & Gimble, J. M. (2006). Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells*, *24*(2), 376-385. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0234>
- Monfoulet, L.-E., Becquart, P., Marchat, D., Vandamme, K., Bourguignon, M., Pacard, E., Viateau, V., Petite, H., & Logeart, D. (2014). The pH in the Microenvironment of Human Mesenchymal Stem Cells Is a Critical Factor for Optimal Osteogenesis in Tissue-Engineered Constructs. *Tissue engineering. Part A*, *20*. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2013.0500>
- Mori, G., Ballini, A., Carbone, C., Oranger, A., Brunetti, G., Di Benedetto, A., Rapone, B., Cantore, S., Di Comite, M., Colucci, S., Grano, M., & Grassi, F. R. (2012). Osteogenic differentiation of dental follicle stem cells. *International Journal of Medical Sciences*, *9*(6), 480-487. <https://doi.org/10.7150/ijms.4583>
- Morris, S. M., Jr. (2016). Arginine Metabolism Revisited. *Journal of Nutrition*, *146*(12), 2579s-2586s. <https://doi.org/10.3945/jn.115.226621>
- Mulari, M. T., Zhao, H., Lakkakorpi, P. T., & Väänänen, H. K. (2003). Osteoclast ruffled border has distinct subdomains for secretion and degraded matrix uptake. *Traffic*, *4*(2), 113-125. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2003.40206.x>
- Munder, M., Eichmann, K., Morán, J. M., Centeno, F., Soler, G., & Modolell, M. (1999). Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells. *Journal of Immunology*, *163*(7), 3771-3777.
- Nakagami, H., Morishita, R., Maeda, K., Kikuchi, Y., Ogihara, T., & Kaneda, Y. (2006). Adipose tissue-derived stromal cells as a novel option for regenerative cell therapy. *J Atheroscler Thromb*, *13*(2), 77-81. <https://doi.org/10.5551/jat.13.77>
- Nakamizo, A., Marini, F., Amano, T., Khan, A., Studeny, M., Gumin, J., Chen, J., Hentschel, S., Vecil, G., Dembinski, J., Andreeff, M., & Lang, F. F. (2005). Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer Research*, *65*(8), 3307-3318. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.Can-04-1874>
- Nichols, S. P., Storm, W. L., Koh, A., & Schoenfish, M. H. (2012). Local delivery of nitric oxide: targeted delivery of therapeutics to bone and connective tissues. *Adv Drug Deliv Rev*, *64*(12), 1177-1188. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.03.002>
- Niemeyer, P., Fechner, K., Milz, S., Richter, W., Suedkamp, N. P., Mehlhorn, A. T., Pearce, S., & Kasten, P. (2010). Comparison of mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue for bone regeneration in a critical size defect of the sheep tibia and the influence of platelet-rich plasma. *Biomaterials*, *31*(13), 3572-3579. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.01.085>

- Nordberg, R. C., & Lobo, E. G. (2015). Our Fat Future: Translating Adipose Stem Cell Therapy. *Stem cells translational medicine*, 4(9), 974-979. <https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0071>
- Ohazama, A., Modino, S. A. C., Miletich, I., & Sharpe, P. T. (2004). Stem-cell-based Tissue Engineering of Murine Teeth. *Journal of Dental Research*, 83(7), 518-522. <https://doi.org/10.1177/154405910408300702>
- Ott, H. C., Matthiesen, T. S., Goh, S. K., Black, L. D., Kren, S. M., Netoff, T. I., & Taylor, D. A. (2008). Perfusion-decellularized matrix: using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nature Medicine*, 14(2), 213-221. <https://doi.org/10.1038/nm1684>
- Pallua, N., Pulsfort, A. K., Suschek, C., & Wolter, T. P. (2009). Content of the growth factors bFGF, IGF-1, VEGF, and PDGF-BB in freshly harvested lipoaspirate after centrifugation and incubation. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 123(3), 826-833. <https://doi.org/10.1097/PRS.0b013e318199ef31>
- Pang, R., Zhou, H., Huang, Y., Su, Y., & Chen, X. (2020). Inhibition of Host Arginase Activity Against Staphylococcal Bloodstream Infection by Different Metabolites. *Frontiers in Immunology*, 11, 1639. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01639>
- Park, J., Ries, J., Gelse, K., Kloss, F., von der Mark, K., Wiltfang, J., Neukam, F. W., & Schneider, H. (2003). Bone regeneration in critical size defects by cell-mediated BMP-2 gene transfer: a comparison of adenoviral vectors and liposomes. *Gene Therapy*, 10(13), 1089-1098. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301960>
- Peluffo, R. D. (2021). Cationic amino acid transporters and their modulation by nitric oxide in cardiac muscle cells. *Biophysical Reviews*, 13(6), 1071-1079. <https://doi.org/10.1007/s12551-021-00870-1>
- Pierdomenico, L., Bonsi, L., Calvitti, M., Rondelli, D., Arpinati, M., Chirumbolo, G., Becchetti, E., Marchionni, C., Alviano, F., Fossati, V., Staffolani, N., Franchina, M., Grossi, A., & Bagnara, G. P. (2005). Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. *Transplantation*, 80(6), 836-842. <https://doi.org/10.1097/01.tp.0000173794.72151.88>
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., & Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284(5411), 143-147. <https://doi.org/10.1126/science.284.5411.143>
- Planat-Benard, V., Silvestre, J. S., Cousin, B., André, M., Nibbelink, M., Tamarat, R., Clergue, M., Manneville, C., Saillan-Barreau, C., Duriez, M., Tedgui, A., Levy, B., Pénicaud, L., & Casteilla, L. (2004). Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation*, 109(5), 656-663. <https://doi.org/10.1161/01.Cir.0000114522.38265.61>
- Pourrajab, F., Forouzannia, S. K., & Tabatabaee, S. A. (2013). Molecular characteristics of bone marrow mesenchymal stem cells, source of regenerative medicine. *International Journal of Cardiology*, 163(2), 125-131. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2011.11.017>

- Pritchard, C. D., Slotkin, J. R., Yu, D., Dai, H., Lawrence, M. S., Bronson, R. T., Reynolds, F. M., Teng, Y. D., Woodard, E. J., & Langer, R. S. (2010). Establishing a model spinal cord injury in the African green monkey for the preclinical evaluation of biodegradable polymer scaffolds seeded with human neural stem cells. *Journal of Neuroscience Methods*, 188(2), 258-269. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2010.02.019>
- Puchtler, H., Meloan, S. N., & Terry, M. S. (1969). On the history and mechanism of alizarin and alizarin red S stains for calcium. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 17(2), 110-124. <https://doi.org/10.1177/17.2.110>
- Qi, K., Li, N., Zhang, Z., & Melino, G. (2018). Tissue regeneration: The crosstalk between mesenchymal stem cells and immune response. *Cellular Immunology*, 326, 86-93. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2017.11.010>
- Quarto, R., Mastrogiacomo, M., Cancedda, R., Kutepov, S. M., Mukhachev, V., Lavroukov, A., Kon, E., & Marcacci, M. (2001). Repair of Large Bone Defects with the Use of Autologous Bone Marrow Stromal Cells. *New England Journal of Medicine*, 344(5), 385-386. <https://doi.org/doi:10.1056/NEJM200102013440516>
- Rawadi, G., Vayssière, B., Dunn, F., Baron, R., & Roman-Roman, S. (2003). BMP-2 controls alkaline phosphatase expression and osteoblast mineralization by a Wnt autocrine loop. *Journal of Bone and Mineral Research*, 18(10), 1842-1853. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2003.18.10.1842>
- Reichart, P. A. (2002a). *Curriculum Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten Diagnostik, spezifische Entzündungen, Herderkrankungen, Zysten, Erkrankungen der Kiefer, der Kieferhöhle, der Mundschleimhaut, der Speicheldrüsen und der Kiefergelenke, Tumoren Zahn-, Mund- und Kieferkrankheiten*. http://digitale-objekte.hbz-nrw.de/storage/2005/12/30/file_237/1031961.pdf
- Reichart, P. A. (2002b). *Curriculum zahnärztliche Chirurgie chirurgische Grundlagen, Anästhesie, allgemeine Operationsprinzipien, spezielle Operationslehre*. Quintessenz-Verl.-GmbH. http://digitale-objekte.hbz-nrw.de/storage/2005/12/29/file_275/986723.pdf
- Reitzer, L. (2009). Amino Acid Synthesis. In (pp. 1-17). <https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00063-8>
- Rezaei, M., Zarkesh-Esfahani, S. H., & Gharagozloo, M. (2013). The effect of different media composition and temperatures on the production of recombinant human growth hormone by CHO cells. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 8(3), 211-217.
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. (2004). Cell Viability Assays. In S. Markossian, A. Grossman, K. Brimacombe, M. Arkin, D. Auld, C. Austin, J. Baell, T. D. Y. Chung, N. P. Coussens, J. L. Dahlin, V. Devanarayan, T. L. Foley, M. Glicksman, K. Gorshkov, J. V. Haas, M. D. Hall, S. Hoare, J. Inglese, P. W. Iversen, S. C. Kales, M. Lal-Nag, Z. Li, J. McGee, O. McManus, T. Riss, P. Saradjian, G. S. Sittampalam, M. Tarselli, O. J. Trask, Jr., Y. Wang, J. R. Weidner, M. J. Wildey, K. Wilson, M. Xia, & X. Xu (Eds.), *Assay Guidance Manual*. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.

- Rongen. (2010). *Tissue engineering deutsch.jpg*. Rongen. Retrieved 11.10.2024 from https://de.wikipedia.org/wiki/Tissue_Engineering#/media/Datei:Tissue_engineering_deutsch.jpg
- Rosenberg, L. E., Downing, S. J., & Segal, S. (1962). Competitive inhibition of dibasic amino acid transport in rat kidney. *Journal of Biological Chemistry*, 237, 2265-2270.
- Saki, F., Rahimikashkooli, N., Masjedi, M., Dastghaib, S., & Koochpeyma, F. (2024). Gender-Specific effects of L-arginine supplementation on bone mineral density and trabecular bone volume in Sprague-Dawley rats; stereological study. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 24(1), 425. <https://doi.org/10.1186/s12906-024-04736-3>
- Samandari, F. (2009). *Curriculum Funktionelle Anatomie für Zahnmediziner [Allgemeine Anatomie, Skelettsystem, Kopf/Hals/Brust, Bauch/Becken, Aufbauprinzip der Extremitäten, Nervensystem, Rückenmark, Hirn, Sinnesorgane, Neurotransmitter und Gefäßversorgung]* (2., überarb. und erw. Aufl. ed.). Quintessenz-Verl. http://deposit.d-nb.de/cgi-bin/dokserv?id=3166095&prov=M&dok_var=1&dok_ext=htm
http://digitale-objekte.hbz-nrw.de/storage/2008/12/21/file_16/2737106.pdf
- Samuels, A., Perry, M. J., Gibson, R. L., Colley, S., & Tobias, J. H. (2001). Role of endothelial nitric oxide synthase in estrogen-induced osteogenesis. *Bone*, 29(1), 24-29. [https://doi.org/10.1016/s8756-3282\(01\)00471-9](https://doi.org/10.1016/s8756-3282(01)00471-9)
- Sautchuk, R., Jr., & Eliseev, R. A. (2022). Cell energy metabolism and bone formation. *Bone Rep*, 16, 101594. <https://doi.org/10.1016/j.bonr.2022.101594>
- Scaglione, S., Braccini, A., Wendt, D., Jaquiere, C., Beltrame, F., Quarto, R., & Martin, I. (2006). Engineering of osteoinductive grafts by isolation and expansion of ovine bone marrow stromal cells directly on 3D ceramic scaffolds. *Biotechnology and Bioengineering*, 93(1), 181-187. <https://doi.org/10.1002/bit.20677>
- Schepmoes, G., Breen, E., Owen, T. A., Aronow, M. A., Stein, G. S., & Lian, J. B. (1991). Influence of dexamethasone on the vitamin D-mediated regulation of osteocalcin gene expression. *Journal of Cellular Biochemistry*, 47(2), 184-196. <https://doi.org/10.1002/jcb.240470212>
- Schmidt, R. F. (2010). *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie ; mit 85 Tabellen ; mit herausnehmbaren Repetitorium* (31., überarb. und aktualisierte Aufl. ed.). Springer. http://digitale-objekte.hbz-nrw.de/storage/2010/10/28/file_7/3932491.pdf
- Schmitz, S. (2011). *Der Experimentator: Zellkultur*. <https://doi.org/10.1007/978-3-8274-2573-7>
- Schnorr, O., Suschek, C. V., & Kolb-Bachofen, V. (2003). The importance of cationic amino acid transporter expression in human skin. *J Invest Dermatol*, 120(6), 1016-1022. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2003.12139.x>

- Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T., & Hume, D. A. (2004). Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of Leukocyte Biology*, 75(2), 163-189. <https://doi.org/10.1189/jlb.0603252>
- Schwartz, D., Schwartz, I. F., Gnessin, E., Wollman, Y., Chernichovsky, T., Blum, M., & Iaina, A. (2003). Differential regulation of glomerular arginine transporters (CAT-1 and CAT-2) in lipopolysaccharide-treated rats. *American Journal of Physiology: Renal Physiology*, 284(4), F788-795. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00221.2002>
- Schwenzer, N. (2011). *Zahn-Mund-Kiefer-Heilkunde Lehrbuchreihe zur Aus- und Weiterbildung [2] Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie : 48 Tabellen / hrsg. von Norbert Schwenzer ... Mit Beitr. von Margit Bacher (4., vollst. überarb. und erw. Aufl. ed.)*. Thieme.
- Seo, S., & Na, K. (2011). Mesenchymal stem cell-based tissue engineering for chondrogenesis. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2011, 806891. <https://doi.org/10.1155/2011/806891>
- SERVIER MEDICAL ART. (2016a). *Bone remodeling cycle (1)*. Servier Medical Art, . Retrieved 11.10.2024 from <https://smart.servier.com/wp-content/uploads/2016/10/Bones.pptx>
- SERVIER MEDICAL ART. (2016b). *Tooth*. Servier Medical Art, . Retrieved 06.10.2024 from https://smart.servier.com/wp-content/uploads/2016/10/Digestive_system.pptx
- Sevari, S. P., Ansari, S., & Moshaverinia, A. (2021). A narrative overview of utilizing biomaterials to recapitulate the salient regenerative features of dental-derived mesenchymal stem cells. *International Journal of Oral Science*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41368-021-00126-4>
- Shalhoub, V., Conlon, D., Tassinari, M., Quinn, C., Partridge, N., Stein, G. S., & Lian, J. B. (1992). Glucocorticoids promote development of the osteoblast phenotype by selectively modulating expression of cell growth and differentiation associated genes. *Journal of Cellular Biochemistry*, 50(4), 425-440. <https://doi.org/10.1002/jcb.240500411>
- Shenoy, N., Stenson, M., Lawson, J., Abeykoon, J., Patnaik, M., Wu, X., & Witzig, T. (2017). Drugs with anti-oxidant properties can interfere with cell viability measurements by assays that rely on the reducing property of viable cells. *Laboratory Investigation*, 97(5), 494-497. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2017.18>
- Siegel, G., Kluba, T., Hermanutz-Klein, U., Bieback, K., Northoff, H., & Schäfer, R. (2013). Phenotype, donor age and gender affect function of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *BMC Medicine*, 11, 146. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-11-146>
- Sies, H., & Stahl, W. (1995). Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *American Journal of Clinical Nutrition*, 62(6 Suppl), 1315s-1321s. <https://doi.org/10.1093/ajcn/62.6.1315S>
- Singh, A., Sc, G., Kumar, S., Tb, S., & Manjhi. (2014). Role of L-arginine in Treatment of Osteoporosis. *international journal of orthopedics*, 1. <https://doi.org/10.6051/j.issn.2311-5106.2014.01.32>

- Sobhani, A., Khanlarkhani, N., Baazm, M., Mohammadzadeh, F., Najafi, A., Mehdinejadiani, S., & Sargolzaei Aval, F. (2017). Multipotent Stem Cell and Current Application. *Acta Medica Iranica*, 55(1), 6-23.
- Stenderup, K., Justesen, J., Clausen, C., & Kassem, M. (2003). Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone*, 33(6), 919-926. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2003.07.005>
- Stubbendorff, M. V. V. (2009). *Lokalisationsdiagnostik markierter Stammzellen mittels Fluoreszenzangiographie am Schweineherz in vivo* [Tierärztliche Hochschule]. Hannover. https://elib.tiho-hannover.de/receive/etd_mods_00001290
<http://gso.gbv.de/DB=2.1/PPNSET?PPN=617351910>
- Suschek, C. V., Schnorr, O., Hemmrich, K., Aust, O., Klotz, L.-O., Sies, H., & Kolb-Bachofen, V. (2003). Critical Role of Arginine in Endothelial Cell Survival During Oxidative Stress. *Circulation*, 107(20), 2607-2614. <https://doi.org/10.1161/01.Cir.0000066909.13953.F1>
- Suschek, C. V., Schnorr, O., & Kolb-Bachofen, V. (2004). The Role of iNOS in Chronic Inflammatory Processes In Vivo: Is it Damage-Promoting, Protective, or Active at all? *Current Molecular Medicine*, 2004, 4, 763-774.
- Suzuki, A., & Iwata, J. (2021). Amino acid metabolism and autophagy in skeletal development and homeostasis. *Bone*, 146, 115881. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2021.115881>
- Takemitsu, H., Zhao, D., Yamamoto, I., Harada, Y., Michishita, M., & Arai, T. (2012). Comparison of bone marrow and adipose tissue-derived canine mesenchymal stem cells. *BMC Veterinary Research*, 8, 150. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-150>
- Tan, J., Xu, X., Tong, Z., Lin, J., Yu, Q., Lin, Y., & Kuang, W. (2015). Decreased osteogenesis of adult mesenchymal stem cells by reactive oxygen species under cyclic stretch: a possible mechanism of age related osteoporosis. *Bone Res*, 3, 15003. <https://doi.org/10.1038/boneres.2015.3>
- Tao, S.-C., Gao, Y.-S., Zhu, H.-Y., Yin, J.-H., Chen, Y.-X., Zhang, Y.-L., Guo, S.-C., & Zhang, C.-Q. (2016). Decreased extracellular pH inhibits osteogenesis through proton-sensing GPR4-mediated suppression of yes-associated protein. *Scientific Reports*, 6(1), 26835. <https://doi.org/10.1038/srep26835>
- Tataria, M., Perryman, S. V., & Sylvester, K. G. (2006). Stem cells: tissue regeneration and cancer. *Seminars in Pediatric Surgery*, 15(4), 284-292. <https://doi.org/10.1053/j.sempedsurg.2006.07.008>
- Tenenbaum, H. C., & Heersche, J. N. (1985). Dexamethasone stimulates osteogenesis in chick periosteum in vitro. *Endocrinology*, 117(5), 2211-2217. <https://doi.org/10.1210/endo-117-5-2211>
- Thesleff, I. (2018). From understanding tooth development to bioengineering of teeth. *European Journal of Oral Sciences*, 126 Suppl 1, 67-71. <https://doi.org/10.1111/eos.12421>

- Tsai, Y. H., Lin, K. L., Huang, Y. P., Hsu, Y. C., Chen, C. H., Chen, Y., Sie, M. H., Wang, G. J., & Lee, M. J. (2015). Suppression of ornithine decarboxylase promotes osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *FEBS Letters*, 589(16), 2058-2065. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.06.023>
- Tsuneizumi, K., Kasamatsu, A., Saito, T., Fukushima, R., Taga, Y., Mizuno, K., Sunohara, M., Uzawa, K., & Yamauchi, M. (2024). Generation of bone-specific lysyl hydroxylase 2 knockout mice and their phenotypes. *Biochem Biophys Rep*, 39, 101790. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2024.101790>
- Uhlen, M., Bandrowski, A., Carr, S., Edwards, A., Ellenberg, J., Lundberg, E., Rimm, D. L., Rodriguez, H., Hiltke, T., Snyder, M., & Yamamoto, T. (2016). A proposal for validation of antibodies. *Nature Methods*, 13(10), 823-827. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3995>
- van der Valk, J., Mellor, D., Brands, R., Fischer, R., Gruber, F., Gstraunthaler, G., Hellebrekers, L., Hyllner, J., Jonker, F. H., Prieto, P., Thalen, M., & Baumans, V. (2004). The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture. *Toxicology in Vitro*, 18(1), 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2003.08.009>
- van't Hof, R. J., Macphee, J., Libouban, H., Helfrich, M. H., & Ralston, S. H. (2004). Regulation of bone mass and bone turnover by neuronal nitric oxide synthase. *Endocrinology*, 145(11), 5068-5074. <https://doi.org/10.1210/en.2004-0205>
- van't Hof, R. J., & Ralston, S. H. (2001). Nitric oxide and bone. *Immunology*, 103(3), 255-261. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2001.01261.x>
- Vater, C., Kasten, P., & Stiehler, M. (2011). Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells. *Acta Biomaterialia*, 7(2), 463-477. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.07.037>
- Visvader, J. E., & Lindeman, G. J. (2011). The unmasking of novel unipotent stem cells in the mammary gland. *EMBO Journal*, 30(24), 4858-4859. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.415>
- Víteček, J., Lojek, A., Valacchi, G., & Kubala, L. (2012). Arginine-based inhibitors of nitric oxide synthase: therapeutic potential and challenges. *Mediators of Inflammation*, 2012, 318087. <https://doi.org/10.1155/2012/318087>
- Vuong, T. A., Zhang, Y., Kim, J., Leem, Y. E., & Kang, J. S. (2024). Prmt7 is required for the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells via modulation of BMP signaling. *BMB Rep*, 57(7), 330-335. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2023-0203>
- Wagner, C. A., Lang, F., & Bröer, S. (2001). Function and structure of heterodimeric amino acid transporters. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 281(4), C1077-C1093. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2001.281.4.C1077>
- Wang, K., Wei, G., & Liu, D. (2012). CD19: a biomarker for B cell development, lymphoma diagnosis and therapy. *Exp Hematol Oncol*, 1(1), 36. <https://doi.org/10.1186/2162-3619-1-36>
- Welsch, U. (2018). *Histologie Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie : das Lehrbuch* (5. Auflage ed.). Elsevier. <https://deposit.dnb.de/cgi->

bin/dokserv?id=dc4fe23bc14a465092b316ac2001452e&prov=M&dok_var=1&dok_ext=htm

<https://shop.elsevier.de/978-3-437-44434-0>

http://digitale-objekte.hbz-nrw.de/storage2/2019/09/05/file_2/8719867.pdf

Wen, R., Huang, R., Yang, M., Yang, J., & Yi, X. (2025). Regulation of protein arginine methyltransferase in osteoporosis: a narrative review. *Front Cell Dev Biol*, 13, 1453624. <https://doi.org/10.3389/fcell.2025.1453624>

Wimalawansa, S. J. (2008). Nitric oxide: novel therapy for osteoporosis. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 9(17), 3025-3044. <https://doi.org/10.1517/14656560802197162>

Wimalawansa, S. J. (2010). Nitric oxide and bone. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1192, 391-403. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05230.x>

Wong, M. M., Rao, L. G., Ly, H., Hamilton, L., Tong, J., Sturtridge, W., McBroom, R., Aubin, J. E., & Murray, T. M. (1990). Long-term effects of physiologic concentrations of dexamethasone on human bone-derived cells. *Journal of Bone and Mineral Research*, 5(8), 803-813. <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650050803>

Wong, R. S. (2011). Mesenchymal stem cells: angels or demons? *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2011, 459510. <https://doi.org/10.1155/2011/459510>

Wu, X., Lin, M., Li, Y., Zhao, X., & Yan, F. (2009). Effects of DMEM and RPMI 1640 on the biological behavior of dog periosteum-derived cells. *Cytotechnology*, 59, 103-111. <https://doi.org/10.1007/s10616-009-9200-5>

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. *Journal of Biological Chemistry*, 273(49), 32988-32994. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.49.32988>

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. *Journal of Cell Biology*, 113(3), 681-687. <https://doi.org/10.1083/jcb.113.3.681>

Yang, L., Cheng, F., Liu, T., Lu, J. R., Song, K., Jiang, L., Wu, S., & Guo, W. (2012). Comparison of mesenchymal stem cells released from poly(N-isopropylacrylamide) copolymer film and by trypsinization. *Biomedical Materials (Bristol, England)*, 7(3), 035003. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/7/3/035003>

Zainal Ariffin, S. H., Mohamed Rozali, N. A., Megat Abdul Wahab, R., Senafi, S., Zainol Abidin, I. Z., & Zainal Ariffin, Z. (2016). Analyses of basal media and serum for in vitro expansion of suspension peripheral blood mononucleated stem cell. *Cytotechnology*, 68(4), 675-686. <https://doi.org/10.1007/s10616-014-9819-8>

- Zelzer, E., & Olsen, B. R. (2003). The genetic basis for skeletal diseases. *Nature*, 423(6937), 343-348. <https://doi.org/10.1038/nature01659>
- Zheng, R., da Rosa, G., Dans, P. D., & Peluffo, R. D. (2020). Molecular Determinants for Nitric Oxide Regulation of the Murine Cationic Amino Acid Transporter CAT-2A. *Biochemistry*, 59(44), 4225-4237. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.0c00729>
- Zhu, H., Mitsuhashi, N., Klein, A., Barsky, L. W., Weinberg, K., Barr, M. L., Demetriou, A., & Wu, G. D. (2006). The role of the hyaluronan receptor CD44 in mesenchymal stem cell migration in the extracellular matrix. *Stem Cells*, 24(4), 928-935. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0186>
- Ziegler-Heitbrock, H. W., & Ulevitch, R. J. (1993). CD14: cell surface receptor and differentiation marker. *Immunology Today*, 14(3), 121-125. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(93\)90212-4](https://doi.org/10.1016/0167-5699(93)90212-4)
- Zong, C., Xue, D., Yuan, W., Wang, W., Shen, D., Tong, X., Shi, D., Liu, L., Zheng, Q., Gao, C., & Wang, J. (2010). Reconstruction of rat calvarial defects with human mesenchymal stem cells and osteoblast-like cells in poly-lactic-co-glycolic acid scaffolds. *Eur Cell Mater*, 20, 109-120. <https://doi.org/10.22203/ecm.v020a10>
- Zuk, P. A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D. A., Huang, J. I., Mizuno, H., Alfonso, Z. C., Fraser, J. K., Benhaim, P., & Hedrick, M. H. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular Biology of the Cell*, 13(12), 4279-4295. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-02-0105>

6 Anhang

6.1 Standard Operating Procedures (SOP)

Die in dieser Arbeit verwendeten Methoden (siehe Kapitel „Methoden“) basieren auf etablierten Protokollen und wurden entsprechend der folgenden *Standard Operating Procedures* (SOP) umgesetzt. Die nachfolgend beschriebenen Abweichungen und Modifikationen betreffen spezifische Schritte der Probenverarbeitung, Zellkultur, Proteinextraktion und Färbemethoden.

6.1.1 Isolation dentaler Stammzellen aus der Zahnpulpa

Isolation dentaler Stammzellen aus der Zahnpulpa

Materialien:

100 µM Zellfilter
5-, 10- und 25 ml Pipetten
6-Well Platten
Falcons
Petrischalen
Pipettierhilfe
Skalpellen
Spritze
Sterilfilter (0,22 µM)
T25er Flaschen
Zange
Zellkulturflaschen

Substanzen:

Bovine Serum Albumin Fraction V pH 7.0	PAA
DMEM 4,5 g/L Glucose 41965	Gibco
Kollagenase Type CLS 270 U/mg	Biochrom
PBS (w Ca ²⁺ Mg ²⁺)	PAN Biotech
PBS (w/o Ca ²⁺ Mg ²⁺)	Sigma
Penicillin/Streptomycin (100X)	PAA
SeraPlus Special Processed FBS	PAN Biotech
Trypsin/EDTA Solution 0,05 % / 0,02 %(w/v) in PBS w/o Ca ²⁺ w/o Mg ²⁺	Biochrom

Orthopädie und Unfallchirurgie 04.05.2020
Isolation dentaler Stammzellen aus der Zahnpulpa

Extraktion, Vorbereitung und Transport der Zähne

- Die Zellen werden aus der Pulpa (Zahnnerv) von noch nicht in die Mundhöhle durchgebrochenen Weisheitszähnen gewonnen
- Die Weisheitszähne werden direkt nach der Extraktion trepaniert und anschließend in einer „Dentosafe-Box“ gelagert oder in einem Gefäß mit Medium (DMEM 4,5 g/L Glucose mit 2 % P/S und 0,02 % Natriumazid)
- Im Idealfall werden die Stammzellen noch am Tag der Extraktion isoliert

Vorbereitungen für die Isolation:

↳ Kollagenase-Puffer wird nicht mehr verwendet!!! Es wird durch **DPBS (w Ca²⁺ Mg²⁺)** ersetzt

- Kollagenase / Dispase-Lösung herstellen:
 - ↳ dazu 1,5 % BSA + 1,5% Dispase und 1,0% Kollagenase in - DPBS (with Ca²⁺ Mg²⁺) Puffer auflösen und steril filtrieren

Pro Pulpa werden ca. 5ml Kollagenase/Dispase-Lösung benötigt

- *Proliferationsmedium 1* herstellen:
 - ↳ dazu DMEM 4,5 g/L Glucose mit 2 ng/ml FGF-2, 1 % P/S und 20 % FCS, 1 % NEAA und ggf. 1 % L-Glutamin (wenn nicht im Medium enthalten) versetzen

Orthopädie und Unfallchirurgie 04.05.2020
Isolation dentaler Stammzellen aus der Zahnpulpa

Isolierung:

- „knacken“ der Zähne mit einer Zange um an die Pulpa zu gelangen
- Isolation der Pulpa aus dem Zahn in 50 ml PBS mit 15 ml P/S
- Alle Pulpen eines Spenders in eine Petrischale geben und mit 10 -15 ml Kollagenase / Dispase-Lösung überschichten, dort die Pulpen zerkleinern (so klein wie möglich) danach alles in ein 50 ml Röhrchen überführen
- Inkubation für 1 Stunde schütteln bei 37 °C
- Kollagenase / Dispase-Lösung mit Gewebe durch einen 100 µm Zellfilter mörsern und anschließend den Filter mit Proliferationsmedium gut ausspülen
- Lösung in ein 50 ml Falcon geben und bei 1200 rpm 10 min zentrifugieren
- Überstand absaugen und Zellen in 7-10 ml *Proliferationsmedium 1* resuspendieren
- Zellen in T25er-Flasche aussähen, bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubieren

Nach 24 Stunden

- Mediumwechsel um nicht adhärente Zellen zu entfernen – regelmäßiger Medienwechsel alle 2 – 3 Tage
- Nach ca. 1-2 Woche werden $\frac{3}{4}$ des *Proliferationsmedium 1* mit $\frac{1}{4}$ DMEM 4,5 g/L Glucose mit 10 % FCS, 1 % L-Glutamin, 1 % P/S versetzt = *Proliferationsmedium 2*
- Beim nächsten Medienwechsel: *Proliferationsmedium 2* 1:1 mit DMEM 4,5 g/L Glucose mit 10 % FCS, 1 % P/S und 1 % L-Glutamin versetzen
- Ab dem nächsten Medienwechsel werden die Zellen ausschließlich mit DMEM 4,5 g/L Glucose mit 10 % FCS, 1 % P/S und 1 % L-Glutamin kultiviert

Das ursprüngliche SOP zur Isolierung der DSC wurde wie folgt modifiziert: Die Weisheitszähne wurden nicht direkt postoperativ trepaniert, sondern zunächst im

Schraubgefäß mit Zellkulturmedium (anstatt in einer *Dentosafe*®-Box) ins Labor überführt. Der Transport erfolgte idealerweise am Tag der Extraktion, spätestens jedoch innerhalb von 24 Stunden. Im Labor wurden die Zähne zunächst mit PBS gespült und anschließend 30 Sekunden lang entweder mit Ethanol oder mit alkoholfreiem Chlorhexidin (CHX) desinfiziert. Zur Eröffnung der Pulpa wurden die Zähne in ein steriles Metallgefäß gelegt und vorsichtig mittels Metallstößel und Hammer aufgebrochen. Die freigelegte Pulpa wurde unmittelbar mit einem Skalpell zerkleinert und in ein Falcon-Röhrchen mit Kollagenase-Dispase-Lösung überführt. Die Inkubation erfolgte für mindestens eine Stunde, je nach Bedarf auch länger. Anschließend wurde die Suspension kurz gevortext und die Wände des Falcon mit PBS abgespült, um Zellrückstände zu entfernen. Die Zentrifugation wurde bei 350 g (1300 RpM) für 5 Minuten bei 16 °C durchgeführt. Das resultierende Zellpellet wurde in 1 ml Proliferationsmedium 1 resuspendiert. Bei der Isolation aus einem Zahn wurde dieses in 7,5 ml Medium in einer T-25-Flasche überführt, bei mehreren Zähnen eines Spenders wurden 15 ml Medium in einer T-75-Flasche verwendet. Der erste Mediumwechsel erfolgte nach 24 bis 48 Stunden. Mit zunehmender Konfluenz wurden FCS und FGF schrittweise über Proliferationsmedium 2 bis 4 reduziert.

6.1.2 Enzymatisches Passagieren mit Trypsin-EDTA

Enzymatisches Passagieren mit Trypsin-EDTA

PBS 37°C

(Trypsin-EDTA) - 1:10 mit PBS verdünnt

→ 3 - 4 ml je T25

→ 5 - 7 ml je T75

→ 10 ml je T175

Medium abgießen oder absaugen

- Zellen mit PBS waschen
- Trypsin-EDTA-Lösung 3-5 Minuten/37°C
- Zufügen der gleichen Menge Medium
- Suspension in ein Zentrifugenröhrchen überführen
- \cup 1300 rpm = 300g /RT für 5 Minuten
- Überstand absaugen
- Pellet mit 1ml **oder mehr je nach Pelletgröße** Medium gut resuspendieren
- Zellzahl bestimmen und in Zellkulturflasche mit entsprechender Wachstumsfläche ausplattieren

Hier wurde das enzymatische Passagieren mit Trypsin-EDTA in mehreren Punkten vom SOP abgewandelt. Nach dem Abgießen des Mediums erfolgte kein vorgängiger Waschschrift mit vorgewärmtem PBS (37 °C), wie ihn das SOP vorsieht. Das aufgebrauchte Trypsin-EDTA-Volumen wich bei T-25-Flaschen nach unten ab (2,5 ml statt 3–4 ml), während die Volumina für T-75 (6 ml; innerhalb des SOP-Bereichs 5–7 ml) und T-175 (10 ml; SOP-konform) unverändert blieben. Die Neutralisation der Trypsin-EDTA-Lösung erfolgte nicht mit einem gleich großen, sondern mit einem größeren Mediumvolumen (T-25: 4 ml; T-75: 9 ml; T-175: 15 ml), sodass das Verhältnis Medium:Trypsin $> 1:1$ lag. Bei unvollständiger Ablösung wurde ergänzend ein Zellschaber eingesetzt. Die anschließende Zentrifugation wurde bei 350 g (≈ 1300 RpM) für 5 Minuten bei 16 °C durchgeführt und wich damit von der im SOP geforderten Raumtemperatur (≈ 300 g/1300 RpM, 5 Minuten) ab. Das Zellpellet wurde unabhängig von seiner Größe in 1 ml Medium resuspendiert, während

das SOP eine an die Pelletgröße adaptierte Resuspension empfiehlt. Zudem ist in der praktischen Durchführung keine obligate Zellzahlbestimmung vor jedem erneuten Ausplattieren dokumentiert, die im SOP gefordert wird.

Bei Verdacht auf mikrobiellen Befall wurde ein modifiziertes Dekontaminationsschema angewandt, bestehend aus zwei aufeinanderfolgenden Niedrig-g-Zentrifugationen (133 g; 800 RpM; 8 bzw. 5 Minuten, jeweils 16 °C) mit dazwischenliegenden PBS-Waschschritten. Im Übrigen (1:10-Verdünnung von Trypsin-EDTA in PBS, Inkubation bei 37 °C, Überführung in Zentrifugenröhrchen, Absaugen des Überstands und Ausplattieren auf geeignete Wachstumsflächen) entsprach die Durchführung dem SOP.

6.1.3 Zellzählung mit Trypanblau

Zellzählung mit Trypanblau

10 µL Zellsuspension mit 10 µL Trypanblaulösung gut mischen = 1:2 Verdünnung

In einer Neubauer-Zählkammer die **4 äußeren Großquadrate meanderförmig auszählen** und den **Mittelwert** bilden.

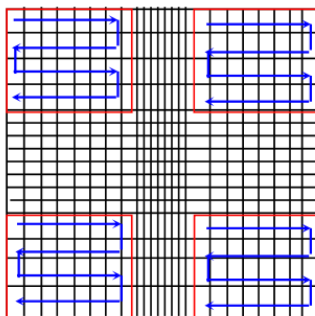
Zellzahl x 2 x 10⁴ = Zellkonzentration / mL

Zellzahl / mL x Suspensionsvolumen = Gesamtzellzahl

Vitale Zellen sind ungefärbt, tote Zellen färben sich blau an, da sich durch Membranläsionen die Proteine der Zellen anfärben.

Berechnung des prozentualen Anteils vitaler Zellen:

Anzahl ungefärbte Zellen / (Anzahl gefärbte + ungefärbte Zellen) x 100%



Abweichend vom SOP wurden die Zellen nach Trypsinierung und Zentrifugation zunächst in 1 ml Standardmedium resuspendiert (im SOP nicht spezifiziert). Für die Berechnung der Zellkonzentration wurde jedoch ausschließlich die Anzahl ungefärbter Zellen herangezogen; eine explizite Dokumentation des prozentualen Anteils vitaler Zellen erfolgte in der Regel nicht. Entsprechend beziehen sich die ausgewiesenen Zellkonzentrationen auf vitale Zellen pro Milliliter. Zusätzlich – über das SOP hinaus – wurde aus der ermittelten

Konzentration ein Verdünnungsfaktor berechnet, um definierte Aussaatdichten einzustellen.

6.1.4 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Kryokonservierung

Medium

Einfriermedium = FCS + 10 % DMSO (4°C)

- Medium absaugen
- PBS waschen
- Trypsin-EDTA 3 - 5 Minuten / 37°C
- Zufügen der gleichen Menge Medium
- Suspension in ein Zentrifugenröhrchen überführen
- \cup 1300 rpm 300g / RT für 5 Minuten
- Überstand absaugen
- Pellet mit 1ml (10 ml) Medium resuspendieren
- Zellzahl bestimmen
- Max. 2×10^6 Zellen in 1000 μ L FCS/DMSO aufnehmen und in ein Kryoröhrchen überführen
- Zellen **sofort** in einem vorgekühlten Cryo-Container bei -80°C einfrieren

Sollen die Zellen für längere Zeit konserviert werden, müssen sie in flüssigen Stickstoff überführt werden (frühestens nach ca. 24 Std., spätestens nach 14 Tagen)

Auftauen von Zellen

Medium auf 37°C vorgewärmt

- Aussaat Bsp. ca. 5000 Zellen / cm^2
- 10 - 50 ml Medium in einem Röhrchen vorlegen
- Zellen im Wasserbad antauen lassen
- Zellsuspension **sofort** in das 50 ml Röhrchen überführen und resuspendieren
- \cup 1300 rpm 300g / RT für 5 Minuten
- Überstand absaugen
- Pellet mit 1ml Medium resuspendieren
- Evtl. Zellzahl bestimmen
- Medium in entsprechender Kulturflasche / Wellplatte vorlegen
- Zellen ausplattieren

Im Vergleich zum SOP wurden bei der Kryokonservierung folgende Abweichungen vorgenommen: Die Zentrifugation erfolgte nicht bei Raumtemperatur, sondern bei 16 °C

und mit 350 g und 1300 RpM für 5 Minuten; auf den PBS-Waschschritt vor der Trypsinierung wurde verzichtet. Abweichend von der im SOP vorgesehenen Inaktivierung des Trypsins durch Zugabe der gleichen Mediummenge vor der Zentrifugation wurde etwas mehr Medium verwendet. Das Zellpellet wurde unmittelbar im Einfriermedium (FCS + 10 % DMSO) resuspendiert, ohne vorherige Resuspension in Kulturmedium und Zellzahlbestimmung. Pro Kryoröhrchen wurden mindestens 1×10^6 Zellen aliquotiert. Das Einfrieren erfolgte in einem vorgekühlten Isopropanol-Kryocontainer (*Mr. Frosty*) bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ mit kontrollierter Abkühlrate. Aus Gründen der DMSO-Toxizität wurden die *Tubes* unverzüglich überführt.

Beim Auftauen wichen die Bedingungen ebenfalls in einzelnen Punkten ab: Nach dem Auftauen im Wasserbad bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ wurde die Zellsuspension in 15 ml Standardmedium überführt und bei $16 \text{ }^\circ\text{C}$ mit 350 g und 1300 RpM für 5 Minuten zentrifugiert. Eine standardisierte Aussaatdichte wurde nicht festgelegt. Eine Zellzahlbestimmung unmittelbar nach dem Auftauen erfolgte nicht routinemäßig, sondern zu späteren Zeitpunkten.

6.1.5 FACS-Charakterisierung

FACS Charakterisierung mittels Antikörper:

Färbung für Fibros und ASCs / DSCs (fast alle Zelltypen)

- Zellen ernten
- 10 min mit Medium ruhen lassen 4°C danach auf FACS-Röhrchen aufteilen
- Zellen mit Cellwash + 1% FCS waschen, abzentrifugieren bei 1200 rpm 5 min
- Zellen in 50 µl FCS aufnehmen
- 5 min im Eisbad inkubieren
- + AK, sanft mischen und 30 min im Eisbad inkubieren, dunkel
- + 4 ml Cellwash, abzentrifugieren bei 1200 rpm 5 min
- Pelett in 200-500 µl Cellwash aufnehmen, facsen
- AK-Menge: **große Flasche** = 10µl einzeln Färbung
kleine Flasche = 5µl einzeln Färbung
bei Kombinationen **5 +3 µl** vom AK

ASC / DSC / Fibro-Panel

1. Ungefärbt
2. CD44-APC + CD73-PE + CD45-FITC
3. CD90-APC + CD34-FITC + HLADR-PE
4. CD105-APC+ CD14-FITC
5. CD19-FITC

Die praktische Durchführung wich in folgenden Punkten davon ab: Die erste Zentrifugation erfolgte bei 353 g und 1300 RpM für 5 Minuten bei 16 °C anstelle von 1200 RpM für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Für die Ansatzvorbereitung wurden die Zellen in insgesamt 520 µl FCS resuspendiert und auf fünf FACS-Röhrchen à 100 µl verteilt. Das ungefärbte Kontrollröhrchen erhielt die doppelte Zellmenge. Damit wich das Resuspensionsvolumen je Ansatz von den im SOP genannten 50 µl ab. Nach der 30-minütigen Inkubation auf Eis im Dunkeln erfolgte der Waschschrift mit 4 ml *Cellwash* und eine erneute Zentrifugation wiederum bei 353 g und 1300 RpM für 5 Minuten bei 16 °C. Alle übrigen Arbeitsschritte entsprachen dem SOP.

6.1.6 Proteinisolierung und Konzentrationsbestimmung

Orthopädie und Unfallchirurgie 04.05.20 Proteinisolierung und Konzentrationsbestimmung

1. Zweck und Geltungsbereich:

How the BCA Protein Assay Detects Protein:

The BCA Protein Assay combines the well-known reduction of Cu^{2+} to Cu^{1+} by protein in an alkaline medium with the highly sensitive and selective colorimetric detection of the cuprous cation (Cu^{1+}) by bicinchoninic acid. The **first step is the chelation of copper with protein in an alkaline environment to form a light blue complex**. In this reaction, known as the biuret reaction, peptides containing three or more amino acid residues form a colored chelate complex with cupric ions in an alkaline environment containing sodium potassium tartrate.

In the second step of the color development reaction, bicinchoninic acid (BCA) reacts with the reduced (cuprous) cation that was formed in step one. The intense purple-colored reaction product results from the chelation of two molecules of BCA with one cuprous ion. **The BCA/copper complex is water-soluble and exhibits a strong linear absorbance at 562 nm** with increasing protein concentrations. The BCA reagent is approximately 100 times more sensitive (lower limit of detection) than the pale blue color of the first reaction

2. Definitionen / Begriffe:

3. benötigte Geräte:

Gerät / Hersteller	Geräte-Nr.
Ultraschallgerät UP50H mit Sonotrode MS1, Welabo	Nicht nötig
Ultra-Turrax, Welabo	Nicht nötig
Victor 3, Perkin Elmer	Nicht nötig

4. benötigte Materialien:

Beschreibung / Hersteller	Material / Bestell-Nr.
Dulbecco's PBS w/o Mg/ Ca / Biochrom	L1825
Sodium dodecylsulfate (SDS), Sigma	L-3771
Nonidet-P40, Biomol	N3500
Na-deoxycholat, Roth	3484.1
Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo	23225
Complete, Mini, Roche	11 836 153 001
Eppendorf-Reaktionsgefäße 1,5ml	0030.120.086
96-F-Mikrotiterplatten	

Orthopädie und Unfallchirurgie 04.05.20 Proteinisolierung und Konzentrationsbestimmung

5. benötigte Lösungen:

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

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

RIPA+Complete

1 Tablette Complete, Mini in 10 ml RIPA lösen (bei sehr starker Proteaseaktivität 1 Tab./7 ml RIPA). Aliquots a 1 ml machen und diese bei -20°C lagern (12 Wochen!!)

6. Durchführung:

6.1 Proteinisolation

A. Zellen:

Zellpellet in RIPA+Complete kann für längere Zeit bei -80°C aufbewahrt werden.
Zur Zell-Lyse stark vortexen,, anschließend Probe sonifizieren (2 x 30 sec)
(10 Stöße).

B. Gewebe:

Gewebestück in RIPA+Complete homogenisieren, anschließend mehrmals sonifizieren, Zelltrümmern für 10 min bei 10 000 rpm und 4°C abzentrifugieren und Überstand in ein neues Eppi sammeln.

6.2 Herstellung des BSA Standards

Jede Ampulle enthält 1 ml BSA Standard in einer Konz. von 2 mg/ml.

Sensitivität beträgt **125-2000 µg/ml = 0,125-2 µg/µl** (zum Vergleich: der Dc Protein Assay Kit von BioRad hat eine Sensitivität von 0,2-1,5 µg/µl).

Standard in saubere Eppis ansetzen und Reste bei -20°C aufbewahren.

Kennzeichnung:

In was ist Standard angesetzt?

Wer hat angesetzt?

Wann wurde angesetzt?

Orthopädie und Unfallchirurgie 04.05.20
Proteinisolierung und Konzentrationsbestimmung

Konzentration (µg/µl)	Probe	BSA-Standard (µl)	PBS oder RIPA (µl)
2	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

6.3 Herstellung des BCA Working Reagent (WR)

Volumen des WR nach folgender Formel bestimmen:

$$(\# \text{ standard} + \# \text{ Proben}) \times (\# \text{ Anzahl Replikate}) \times (\text{Volumen WR pro Probe} = 200 \mu\text{l}) = \text{Volumen WR}$$

Beispiel mit 3 Proben:

$(9 + 3) \times 2 \times 200 \mu\text{l} = 4,8 \text{ ml WR}$ benötigt (immer etwas mehr ansetzen als man für den Ansatz braucht!)

WR ansetzen: 50 Teile Reagent A + 1 Teil Reagent B (**50:1, Reagent A:B**). Für das obere Beispiel: 5 ml A + 100 µl B. WR ist stabil für mehrere Tage wenn es geschlossen bei RT aufbewahrt wird.

Orthopädie und Unfallchirurgie 04.05.20
Proteinisolierung und Konzentrationsbestimmung

6.3 Microplate Assay Protocol

- Proben werden 1:6 mit PBS verdünnt, dicke Zellpellets werden / können auch bis 1:20 verdünnt. (4µl Probe und 20µl PBS =1:6) mixen!!!
- Je 10 µl Standard bzw. Probe in eine 96well Platte pipettieren (Duplets!)
- 200 µl WR zusetzen und Platte auf dem Schüttler für 30 sec platzieren
- Platte mit einem Deckel / Folie schließen und 30 min bei 37°C (Brutschrank) inkubieren
- Platte auf RT abkühlen
- Absorption bei **562 nm** (Inkubationszeit kann bis auf 2 h verlängert werden). Die Absorption kann generell bei einer Wellenlänge von 540-590 nm gemessen werden.

7. Änderungsdienst:

Bei besonders dichten Zellpellets wurde zur Verbesserung der Lyse zusätzlich 20 µl RIPA-Lysepuffer direkt auf das Pellet gegeben und die Probe ggf. kurz gevortext. Anschließend

erfolgte die Sonifikation mittels Ultraschallgerät (10 Pulse, Cycle 0,5, Amplitude 80 %). Die Proben wurden danach auf Eis inkubiert.

6.1.7 Western Blot Semi-Dry Blotting

Orthopädie und Unfallchirurgie 04.04.2020 Western Blot Semi-Dry Blotting

1. Zweck und Geltungsbereich:

Diese Arbeitsanweisung regelt die Abläufe für den elektrophoretischen Transfer von Proteinen aus einem Gel auf eine Membran und anschließende Detektion unter Verwendung von mono- und/oder polyklonaler Antikörper.

2. Definitionen / Begriffe:

TBS:	Tris-gepufferte Salzlösung
RT:	Raumtemperatur
SDS:	Natriumdodecylsulfat
APS:	Ammoniumpersulfat
TEMED:	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
AK:	Antikörper

3. benötigte Geräte:

Gerät / Hersteller	Geräte-Nr.
Mini-PROTEAN Tetra Cell / BioRad	Nicht nötig
BioRad Turbo Blot	Nicht nötig
PowerPac HC Power Supply / BioRad	Nicht nötig
Schüttler	

Orthopädie und Unfallchirurgie 04.04.2020
Western Blot Semi-Dry Blotting

4. benötigte Materialien:

Beschreibung / Hersteller	Material / Bestell-Nr.
Glasplatten (0,75 mm), BioRad	165-3329
Casting Stands, BioRad	165-3303
Casting Frames, BioRad	165-3304
Filterpapier 2,5 mm, Invitrogen	LC2010
Nitrocellulose-Membran (0,2 µm), VWR	39-1010
Falconröhrchen	
Tris HCl, Calbiochem	648317
Tris Base, Calbiochem	648310
30 % Acrylamide/Bis Solution 37,5:1, BioRad	161-0158
Glycin, Roth	3908.2
APS, Sigma	A-3678
TEMED, Roth	2367.3
PonceauS, Serva	33427
Methanol, Merck	1.06009.2511
SDS, VWR	444464T
Mercaptoethanol, Sigma	M7154
Glycerol, Roth	3783.1
Bromphenolblau, Roth	A512.1
Tween 20, Sigma	P5927
Roti-Mark Western Set, Roth	0947.1
BSA, Roth	
Milchpulver, Roth	T145.2
ECL Western Blotting Substrate, Pierce (Thermo)	32209

**Orthopädie und Unfallchirurgie 04.04.2020
Western Blot Semi-Dry Blotting**

5. Durchführung:

5.1 Lösungen & Puffer

Laufpuffer (Elphopuffer) (kein pH einstellen!!)

1 x Puffer	für 10 x Puffer
25 mM Tris, pH 8,3-8,8	30,3 g
192 mM Glycin	144,2 g
0,1 % SDS	10 g
	ad 1000 ml H ₂ O

Tris-Glycine Transferpuffer (kein pH einstellen) - 6 Monate bei RT haltbar!

1 x Puffer	für 25 x Puffer
12 mM Tris-Base	18,2 g
96 mM Glycin	90 g
	ad 500 ml H ₂ O

Blotting-Puffer (2 x Tris-Glycine Transferpuffer)

	<u>Für 2 Minigele</u>	<u>Für 4 Minigele</u>
25 x Transferpuffer	40 ml	60 ml
Methanol	50 ml	75 ml
H ₂ O	ad 500 ml	ad 750 ml

4 x Trenngelpuffer

1,5 M Tris	91 g (pH 8,8)
0,4 % SDS	2 g SDS
	ad 500 ml H ₂ O

4 x Sammelgelpuffer

0,5 M Tris	6,05 g (pH 6,8)
0,4 % SDS	0,4 g SDS
	ad 100 ml H ₂ O

Ponceau S (dunkel bei RT aufbewahren, kann mehrmals verwendet werden)

0,1 % Ponceau
3 % Trichloressigsäure

Orthopädie und Unfallchirurgie 04.04.2020
Western Blot Semi-Dry Blotting

TBS

1 x Puffer	für 10 x Puffer
7,7 mM Tris (pH 7,5)	12,1 g
150 mM NaCl	87,7 g

ad 1000 ml H₂O

4 x Tris-Glycine SDS Sample Buffer(4 x Laemmli-Puffer)

- bei 4°C aufbewahren, 6 Monate haltbar! Vor Gebrauch auf RT aufwärmen bis sich das SDS vollständig gelöst hat!

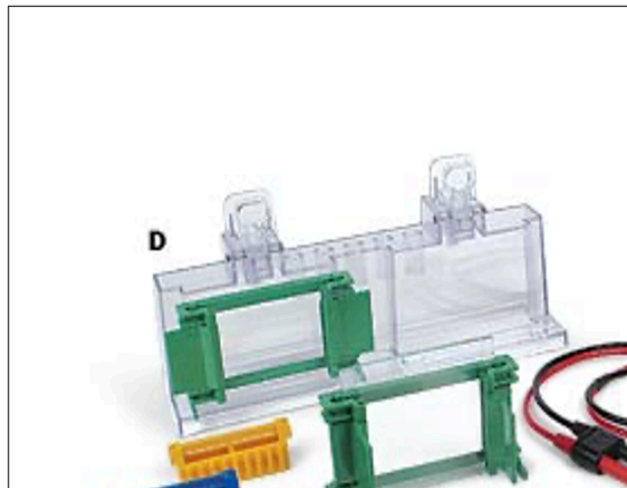
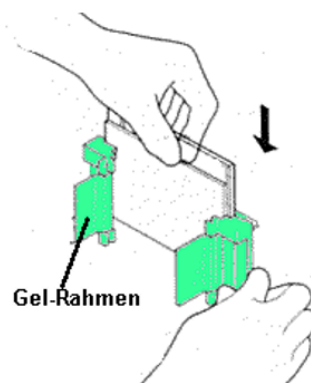
252 mM Tris-HCl	2,5 ml 1 M Tris-HCl, pH 6,8
40 % Glycerol	4 ml
8 % SDS	0,8 g
0,01 % Bromphenolblau	eine Spatelspitze
	Ad 10 ml H ₂ O

Vor Gebrauch: Laemmli-Puffer mit 20 % Mercaptoethanol zusetzen!! (80 µl Laemmli + 20 µl Mercapto)

Orthopädie und Unfallchirurgie 04.04.2020 Western Blot Semi-Dry Blotting

5.2 Giessen von SDS-Polyacrylamidgelen

Glasplatten mit 70 % EtOH reinigen und die Gelgiessapparatur zusammenbauen



Orthopädie und Unfallchirurgie 04.04.2020 Western Blot Semi-Dry Blotting

Die folgenden Tabellen enthalten Mengenangaben für die Zusammensetzung der SDS-Gele

Mengenangaben 1 Trenngel

	%	30% Acrylamid (ml)	H ₂ O (ml)
>250kDa	5	1,25	4,375
250-120 kDa	7,5	1,875	3,75
120-40 kDa	10	2,5	3,125
40-15 kDa	12	3	2,625
<20 kDa	15	3,75	1,875

Mengenangaben 2 Trenngele

%	30% Acrylamid (ml)	H ₂ O (ml)
5	2,5	8,75
7,5	3,75	7,5
10	5	6,25
12	6	5,25
15	7,5	3,75

jeweils + 1,875 ml 4 x Trenngelpuffer
+ 10 µl TEMED
+ 25 µl 10% APS

jeweils + 3,75 ml 4 x Trenngelpuffer
+ 20 µl TEMED
+ 50 µl 10% APS

ACHTUNG: Der Polymerisationsprozess startet sofort nach Zugabe von APS. Daher APS erst zum Schluss zugeben und die Gelkomponenten durch schwenken vermischen.

Das Gel wird sofort zwischen die Glasplatten gegossen (mit Hilfe einer Pipette, einmal Auf- und Abpipettieren).

Das Trenngel wird sofort mit 70 % EtOH überschichtet. Nach der Polymerisation (20 min) das EtOH abgießen und durch das Sammelgel ersetzen.

Mengenangaben 1 Sammelgel

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

Mengenangaben 2 Sammelgele

1300 µl 30% Acrylamid
6 ml H₂O
2,5 ml 4 x Sammelgelpuffer
20 µl TEMED
50 µl 10% APS

Jetzt den Kamm einsetzen und ca. 20 min warten bis das Gel auspolymerisiert.

Orthopädie und Unfallchirurgie 04.04.2020 Western Blot Semi-Dry Blotting

Zurzeit werden nur fertige Gele verwendet!!!

Mini-Protean TGX Stain-Free Gels, 4-15%, 12%..etc....

15-well / slots, 15µl maximales Probenvolumen

Proben mit Laemmli-Puffer (1:4 zur Probe) versetzen und 5 min bei 95 °C erhitzen.

Proben sofort auf Eis und das Gel beladen, Proteinleiter nicht vergessen!!!

Bei Verwendung eines 10 er Kamm

Maximales Probenvolumen bei 0,75 mm Gelen: ~25 µl

Maximales Probenvolumen bei 1,0 mm Gelen: ~35 µl

Maximales Probenvolumen bei 1,5 mm Gelen: ~45 µl

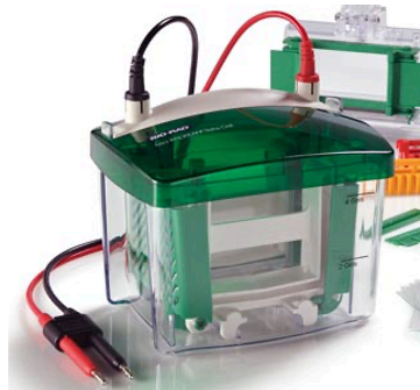
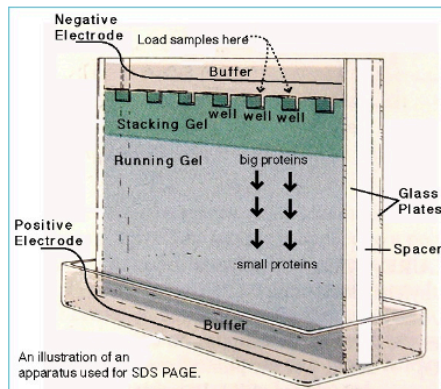
Bei Verwendung eines 15 er Kamm

Maximales Probenvolumen bei 1,0 mm Gelen: bis 16 µl

5.3 SDS-PAGE

Kammer mit Laufpuffer auffüllen, mit **60 V** starten und sobald die Proteine durch das Sammelgel gewandert sind mit **110-130 V** fortsetzen, 20 min.

Dauer: 1-2 Stunden. Stoppen, wenn der Marker anfängt auszulaufen.



Orthopädie und Unfallchirurgie 04.04.2020 Western Blot Semi-Dry Blotting

Mini-Protean TGX Stain-Free Gels werden nach dem Gellauf im ChemiDoc MP detektiert, das ist notwendig für die Normalisierung der Proben!!!!

5.4 Transfer

Nach dem Gellauf, erfolgt die Aufnahme des Gels mit dem ChemiDoc MP

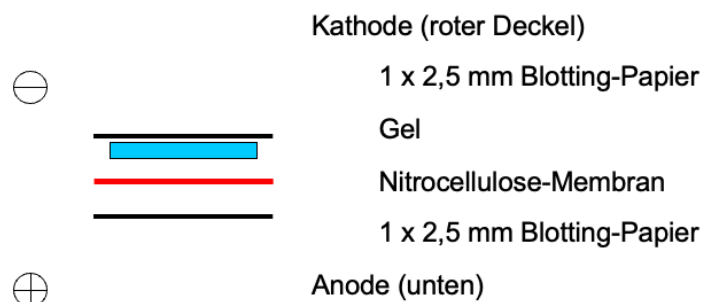
Kurz die Gele in Blotting-Puffer äquilibrieren lassen.

Aufbau des Transfers:



- Blotting-Papier und Membran werden vor dem Aufbau in Blotting-Puffer befeuchtet. Luftblasen entfernen!

Transfer wie aufgelistet aufbauen:



Transferzeit: hängt ab vom Wassergehalt des Gels, Bsp. 12%iges Gel

15 min, andere Gele für 10-30 min bloten!

Orthopädie und Unfallchirurgie 04.04.2020 Western Blot Semi-Dry Blotting

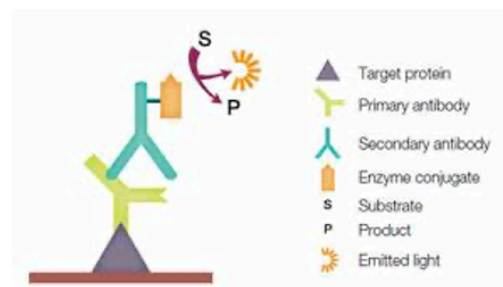
Optional (früher)

Anschließend Ponceau S-Färbung der Membran (2-3 min). Membran mit Wasser und anschließend mit TBS / 0,1 % Tween20 entfärben.

5.5 Immunmarkierung

Je nach Antikörper und Herstellerangaben sind Puffer und Inkubationszeiten unterschiedlich. Die tatsächliche Vorgehensweise kann daher von diesem Protokoll abweichen (siehe AK-data sheet)

- Blocken der Membran für 1 Std. bei RT mit TBS / 0,1 % Tween 20 (TBS/T) + 5 % Milchpulver oder 5 % BSA (oder ON bei 4°C)
- Inkubation mit dem 1. AK in TBS / 0,1 % Tween 20 (TBS/T) + BSA oder Milchpulver (1-5 %) für **2 Std. bei RT** oder ON bei 4°C
- 3 x 5 min waschen mit TBS/T (=Waschpuffer)
- Inkubation mit dem 2. AK in Waschpuffer für 1 Std. bei RT (DUNKEL)
- 3 x 5 min waschen mit Waschpuffer (DUNKEL), die Blots werden in TBS aufbewahrt.
- Detektion mit ChemiDoc MP



6. Änderungsdienst:

9

Es wurden ausschließlich vorgefertigte *Mini-PROTEAN® TGX™ Stain-Free™*-Gele mit einem Gradienten von 4–15 % verwendet, sodass Punkt 5.2 des SOPs (Gießen von SDS-

Polyacrylamidgelen) entfiel. Das maximale Probenvolumen betrug 13 μ l. Die SDS-PAGE erfolgte initial mit 80 V für 10 Minuten, anschließend mit 160 V bis zum Auslaufen des Proteinmarkers. Die Transferzeit beim *Blotting* betrug 10–15 Minuten. Eine Ponceau-S-Färbung wurde nicht durchgeführt. Für die Immunmarkierung wurden TBS/T und 5 % BSA eingesetzt. Das Blocken der Membran erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur, die Inkubation mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4 °C in *Blocking*-Puffer.

6.1.8 CellTiter-Blue®-Viability Assay

Orthopädie und Unfallchirurgie 30.04.2020 CellTiter-Blue® Cell Viability Assay

Substanzen

DMEM 4,5 g/L Glucose	Gibco
CellTiterBlue	Promega Cat. Nr. G8081

Der CellTiter-Blue®-Assay basiert auf der Reduktion des (blauen) Farbstoffs Resazurin in den (violetten) Farbstoff Resorufin durch lebende Zellen. Das Fluoreszenzmaximum von Resorufin liegt bei 590 nm.

Protokoll

- CellTiterBlue im Verhältnis 1:20 direkt ins Medium geben
Alternativ: Medium mit CellTiterBlue versetzen und anschließend auf die Zellen geben
→ **Blank mitführen!**
 - Inkubationszeit: zwischen 1 und 4 Stunden – abhängig von dem Zelltyp
 - Mit CellTiterBlue versetztes Medium in 96-Well-Platte überführen (100 µl /Well – ggf. in Doppelbestimmung)
 - Messung bei 590 nm im Victor (Filter: P540, F590)
 - Sollen die Zellen anschließend weiter kultiviert werden:
 - die Zellen 1-mal mit PBS waschen
 - frisches Medium auf die Zellen geben
- ⇒ Stets mitgeführt werden muss ein Blank (nur Medium mit CellTiterBlue), welcher über den gleichen Zeitraum im Brutschrank inkubiert wird, wie die mit CellTiterBlue behandelten Zellen.

6.1.9 Differenzierungsmedien

Orthopädie und Unfallchirurgie 19.08.2020

Differenzierungsmedien

Osteogene Differenzierung:

- DMEM Medium von Gibco (4,5 g/ml Glucose)
- + 10 % (50ml) FCS / FBC
- + 1 % (5ml) Pen/Strep
- + 1 % (5ml) L-Glutamin (falls nicht im Medium enthalten)

- + 500nM (98µg) Dexamethason MW 392,46 g/mol
- + 50µM (7,95mg) L-Ascorbin-2-Phosphat MW 289,54 g/mol
- + 10mMol (1,08g) β-Glycerophosphat

Die Substanzen werden sterilfiltriert!!!!

Chondrogene Differenzierung:

- DMEM Medium von Gibco (4,5 g/ml Glucose) 500ml
- + 10 % (50ml) FCS / FBC
- + 1 % (5ml) Pen/Strep
- + 1 % (5ml) L-Glutamin (falls nicht im Medium enthalten)

- + 100nM (19,6µg) Dexamethason MW 392,46 g/mol
- + 1µg/ml (500µg in 500ml Medium) L-Ascorbin-2-Phosphat MW 289,54 g/mol
- + 500µl / 500 ml Medium ITS (Insulin-Transferrin-Selenium) Gibco
- + 10 ng/ml (5 ml von der Stammlösung 1µg/ml) TGFβ

1

Zusätzlich zum SOP wurden 1 % Amphotericin B und 0,1 % Gentamicin zur Kontaminationsprophylaxe supplementiert.

6.1.10 Alizarinrot-S-Färbung

Osteoblasten - Färbung mit Alizarin Rot

Substanzen:

1-Cetylpyridiniumchlorid Monohydrat for synthesis	Merck
Alizarin red S mono	Merck
Aqua dest	
Isopropanol 99,5 %	Merck Emplura®
Paraformaldehyd (PFA)	Merck
PBS	

Vorbereitung:

0,5 % Alizarin Rot S in Aqua dest. lösen

Als Kontrolle werden Zellen, die nicht mit Differenzierungsmedium behandelt wurden,
mitgefärbt

Protokoll

Medium abnehmen

- Zellen mit 1 x PBS (1 ml) waschen
- 15 min mit 4%-igem PFA in PBS bei RT fixieren
- PFA abnehmen
- mit Aqua dest. – waschen
- Alizarin-Rot-Lösung hinzugeben – 20 min bei 37°C inkubieren lassen
- Färbelösung abnehmen und mit Aqua dest. waschen, bis der Überstand farblos ist
- danach mit PBS überschichten

Die Zellen können jetzt fotografiert werden

Rücklösung der Alizarin Rot-Färbung:

Vorbereitung:

10%-ige Cetylpyridinium Chlorid Lösung (pH=7):

- Cetylpyridiniumchlorid abwiegen und in Aqua dest. lösen (Vorsicht: bei Cetylpyridiniumchlorid besteht Lebensgefahr beim Einatmen!!!)
- Vorteilhaft ist es, die Lösung im Falcon anzusetzen und dieses für 1 -2 Stunden auf den Taumelrollenmischer zu legen - das Cetylpyridiniumchlorid ist danach vollständig gelöst

Protokoll:

- ⇒ Alle Schritte unter dem Abzug durchführen!
- PBS abnehmen
 - 10%-ige Cetylpyridinium Chlorid Lösung auf die Zellen geben
 - 1-2-stündige Inkubation bei Raumtemperatur (bis die Zellen vollständig entfärbt sind)
 - Bestimmung der OD₆₀₀ des Überstandes

Zur Durchführung der Alizarinrot-S-Färbung wurden die Zellen zunächst mit 1 ml PBS pro Well gewaschen. Pro Well wurden anschließend 300–350 µl 4-%iges PFA zur Fixierung verwendet. Danach folgte die Färbung mit 500 µl 0,5 % Alizarinrot-S-Lösung und die

Rücklösung mit 500 µl 10 % Cetylpyridiniumchlorid (CPC). Zusätzlich wurden bereits zuvor fixierte Tag-0-Platten mit einbezogen. Nach dem Waschschrift wurden die Zellen für die Fotografien nicht erneut mit PBS überschichtet. Es wurde direkt mit der Rücklösung mittels CPC begonnen. Die Inkubation zur Rücklösung erfolgte für eine Stunde auf einem Rüttler bei Raumtemperatur. Die optische Dichte wurde anschließend bei 600 nm (OD 600) mit einem *Bio-Photometer* gemessen. Pro Well wurden 500 µl der Lösung verwendet. Ein Blankwert mit 500 µl *Aqua dest.* wurde parallel bestimmt. Überschritten die Werte den Messbereich (> 2,0), wurde die Probe im Verhältnis 1:10 mit *Aqua dest.* verdünnt, erneut gemessen und der Wert mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert.

6.2 Weitere Ergebnisse

Im Folgenden werden ergänzende Vor- und Parallelversuche zur Zellproliferation dargestellt, die aus methodischen oder konzeptionellen Gründen nicht in den Hauptteil der Arbeit integriert wurden. Ziel dieser Experimente war es insbesondere, geeignete Zellzahlen zur Ausplattierung sowie die Wachstumsdynamik der dentalen Stromazellen (DSC) in frühen Versuchsstadien zu evaluieren.

6.2.1 Versuche zur Zellproliferation

Im Rahmen mehrerer Vorversuche wurde untersucht, welche Zellkonzentrationen für das Ausplattieren von DSC in 24-Well-Platten am besten geeignet sind. Hierzu wurden Zellzahlen von 3×10^3 , 5×10^3 , 1×10^4 , 2×10^4 sowie 3×10^4 Zellen/ml getestet. Die Ergebnisse dieser Vorversuche wurden nicht im Detail ausgewertet und sind daher an dieser Stelle nur der Vollständigkeit halber erwähnt.

6.2.2 Erster Vorversuch zur Zellproliferation

In einem ersten Vorversuch wurden DSC zweier Spender mit Zellkonzentrationen von 3×10^3 , 1×10^4 und 3×10^4 Zellen/ml ausplattiert. Die Auswertung der Zellviabilität erfolgte ausschließlich an Tag 5 mittels CTB-Assay, eine Referenzmessung an Tag 0 wurde nicht durchgeführt. Die CTB-Rohwerte wurden jeweils um den Blankwert korrigiert. Aufgrund des fehlenden Ausgangswertes war keine Berechnung des relativen Zellzuwachses möglich, was die Aussagekraft dieser Untersuchung deutlich einschränkt. Eine Wiederholung dieses Experiments mit geeigneter Referenzzeitpunkt-Erhebung ist daher anzuraten.

6.2.3 Zweiter Vorversuch zur Zellproliferation

In einem zweiten Vorversuch wurden wiederum zwei Spender berücksichtigt, diesmal mit Zellkonzentrationen von 5×10^3 , 1×10^4 und 2×10^4 Zellen/ml. Die CTB-Messungen wurden sowohl einen Tag nach dem Ausplattieren (Tag 0) als auch fünf Tage später (Tag 5) durchgeführt. Zur Analyse wurden Mittelwert und Standardabweichung berechnet, die CTB-Werte auf Tag 0 normiert und der prozentuale Zuwachs bis Tag 5 ermittelt. Der jeweilige Blankwert wurde von den Rohdaten subtrahiert.

Spender 1 (Passage 3) zeigte in allen getesteten Zellkonzentrationen ein ausgeprägtes Proliferationsverhalten. Insbesondere bei der niedrigsten Startzellzahl (5×10^3 Zellen/ml) wurde ein relativer Anstieg von 3329 % festgestellt. Bei 1×10^4 Zellen/ml lag der Zuwachs bei 1463 %, während bei der höchsten getesteten Konzentration (2×10^4 Zellen/ml) ein relativer Anstieg von 777 % gemessen wurde (siehe **Abb. 101: Zellzahlentwicklung von Spender 1 im zweiten Wachstumsvorversuch** und **Abb. 102: Prozentuales Wachstum von Spender 1 im zweiten Wachstumsvorversuch**).

Spender 2 (Passage 2) wies bei denselben Zellzahlen insgesamt geringere Zuwächse von 671 %, 621 % bzw. 381 % auf (siehe **Abb. 103: Zellzahlentwicklung von Spender 2 im zweiten Wachstumsvorversuch** und **Abb. 104: Prozentuales Wachstum von Spender 2 im zweiten Wachstumsvorversuch**).

Auffällig war, dass niedrigere Ausgangszellzahlen mit einem höheren relativen Zellwachstum einhergingen. Dieses Phänomen könnte durch dichtere Zellkonfluenz und damit einhergehende Kontaktinhibition bei höheren Zelldichten erklärt werden. Ein vergleichbares Verhalten wurde bereits von Mori et al. beschrieben, die bei dentalen Stammzellen eine rund 20-fache Zellzunahme von Tag 1 bis Tag 7 beobachteten (Mori et al., 2012). Die hier erzielten Werte stehen somit in Übereinstimmung mit früheren Arbeiten zur Proliferationsdynamik von DSC.

Bezogen auf die absoluten Zellzahlen zeigte Spender 1 ein deutlich höheres Proliferationspotenzial (max. 1,66 Mio. Zellen), verglichen mit Spender 2 (max. 910.000 Zellen) (vgl. **Abb. 101: Zellzahlentwicklung von Spender 1 im zweiten Wachstumsvorversuch** und **Abb. 103: Zellzahlentwicklung von Spender 2 im zweiten Wachstumsvorversuch**). Dies verdeutlicht die interdonore Variabilität, die auch in anderen Teilen dieser Arbeit beobachtet wurde. Unterschiede in der Passage (Passage 2 vs. Passage 3), genetische Hintergründe, Alter oder metabolische Aktivität könnten potenzielle Ursachen für diese Beobachtungen sein. Da der Versuch nur zwei Spender in unterschiedlichen Passagen einschloss, ist die Aussagekraft limitiert. Eine Wiederholung mit einer größeren Spenderkohorte sowie einer erweiterten

Beobachtungsdauer (z. B. über sieben Tage) erscheint für eine belastbare Aussage zwingend erforderlich.

Die beobachteten Unterschiede zwischen den Bedingungen erwiesen sich in nahezu allen getesteten Konstellationen als statistisch hochsignifikant (p -Werte $< 0,001$, Bonferroni-korrigiert $p < 0,01$). Die Effektstärken nach Cohen's d lagen durchweg im hohen bis sehr hohen Bereich ($> 1,89$ bis > 35), was auf besonders starke Effekte hinweist.

Für Spender 1 zeigten sich signifikante Unterschiede sowohl zwischen den Zellkonzentrationen an Tag 0 als auch an Tag 5 (alle $p < 0,0001$; $d = 2,82$ – $15,27$). Auch der Vergleich zwischen Tag 0 und Tag 5 war für alle drei Zellzahlen hochsignifikant (alle $p < 0,0001$; $d = 9,16$ bis $35,68$).

Auch bei Spender 2 ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen allen getesteten Bedingungen, sowohl für Tag 0 als auch für Tag 5 ($p < 0,001$; $d = 1,89$ – $12,25$). Die stärksten relativen Veränderungen zeigten sich ebenfalls beim Vergleich zwischen den beiden Zeitpunkten (alle $p < 0,0001$; $d = 8,63$ – $11,72$).

In der statistischen Auswertung der normierten CTB-Werte zeigte sich sowohl bei Spender 1 als auch bei Spender 2 eine deutliche Zunahme der Zellproliferation über die fünf Tage hinweg. Der Vergleich der CTB-Werte zwischen Tag 0 und Tag 5 ergab bei beiden Spendern durchweg hochsignifikante Unterschiede, mit p -Werten zwischen $0,01$ und $0,000000001$. Auch nach Bonferroni-Korrektur blieben alle Unterschiede signifikant. Die Effektstärken (Cohen's d) lagen in einem hohen bis extrem hohen Bereich zwischen $1,13$ und $14,29$, was auf eine sehr starke Wachstumsdynamik über den Beobachtungszeitraum hinweist.

Bei den Vergleichen der Zellzahlen an Tag 5 zwischen den unterschiedlichen Ausgangszellzahlen zeigten sich ebenfalls signifikante Unterschiede. Für Spender 1 lagen die p -Werte zwischen $0,037$ und $0,000001$, bei Effektstärken (d) von $0,91$ bis $5,69$. Bei Spender 2 lagen die entsprechenden p -Werte zwischen $0,00002$ und $0,000001$ mit Bonferroni-korrigierten Werten bis maximal $0,0001$ und Effektstärken zwischen $3,54$ und $5,53$. Statistisch nicht signifikant war bei beiden Spendern jeweils nur der Vergleich von Tag 5 und 5×10^3 Zellen/ml mit Tag 5 und 1×10^4 Zellen/ml.

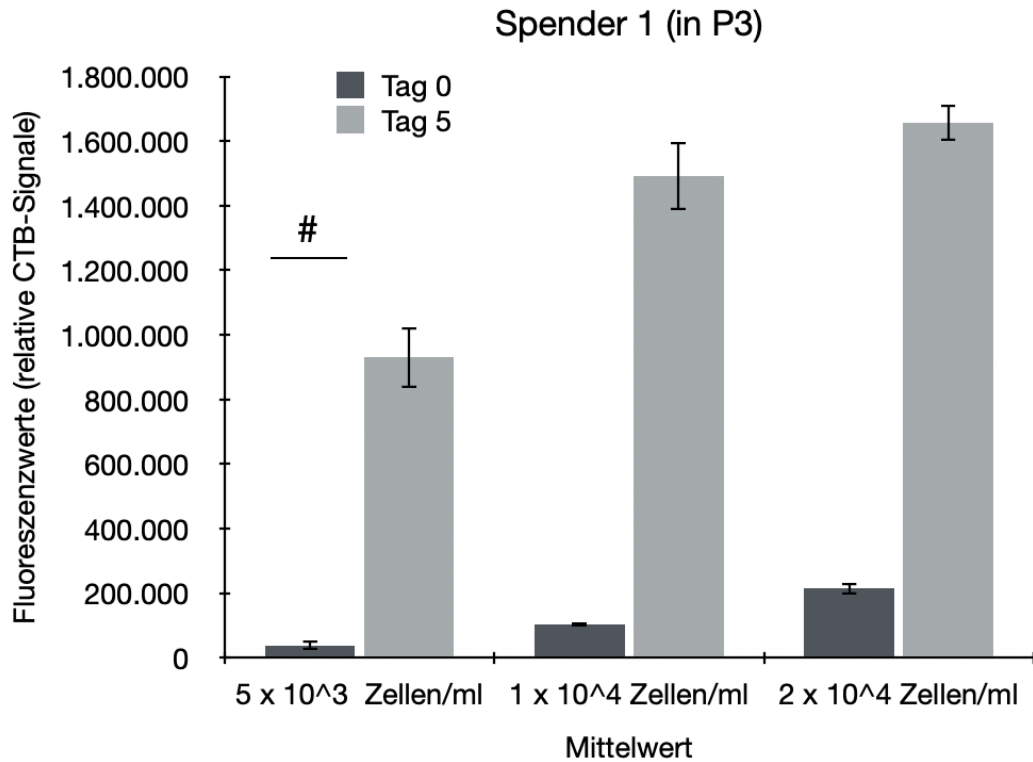


Abb. 101: Zellzahlentwicklung von Spender 1 im zweiten Wachstumsvorversuch

Dargestellt sind die mittleren CTB-Werte (MW ± SD) der Zellen von Spender 1 (Passage 3) an Tag 0 (dunkelgrau) und Tag 5 (hellgrau) bei drei verschiedenen Ausgangszellzahlen (5×10^3 , 1×10^4 und 2×10^4 Zellen/ml). Der deutlichste absolute Zellzuwachs wurde bei der geringsten Startzellzahl beobachtet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels gepaartem *t*-Test. Die statistische Auswertung zeigte überall signifikante Unterschiede sowohl zwischen den Zeitpunkten als auch zwischen den Zellkonzentrationen ($p < 0,0001$; *d* bis 35,68). Cohen's *d* > 0,8 für alle Vergleiche. Auch nach Bonferroni-Korrektur zeigten sich zwischen allen Bedingungen noch statistisch signifikante Unterschiede. Statistische Markierung: # kennzeichnet einen statistisch signifikanten Unterschied von einer Bedingung im Vergleich zu allen anderen Bedingungen (alle $p < 0,0001$). Weitere Informationen zur Methodik und Interpretation finden sich im Text. CTB = CellTiter Blue, P = Passage, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, ml = Milliliter. Eigene Anfertigung.

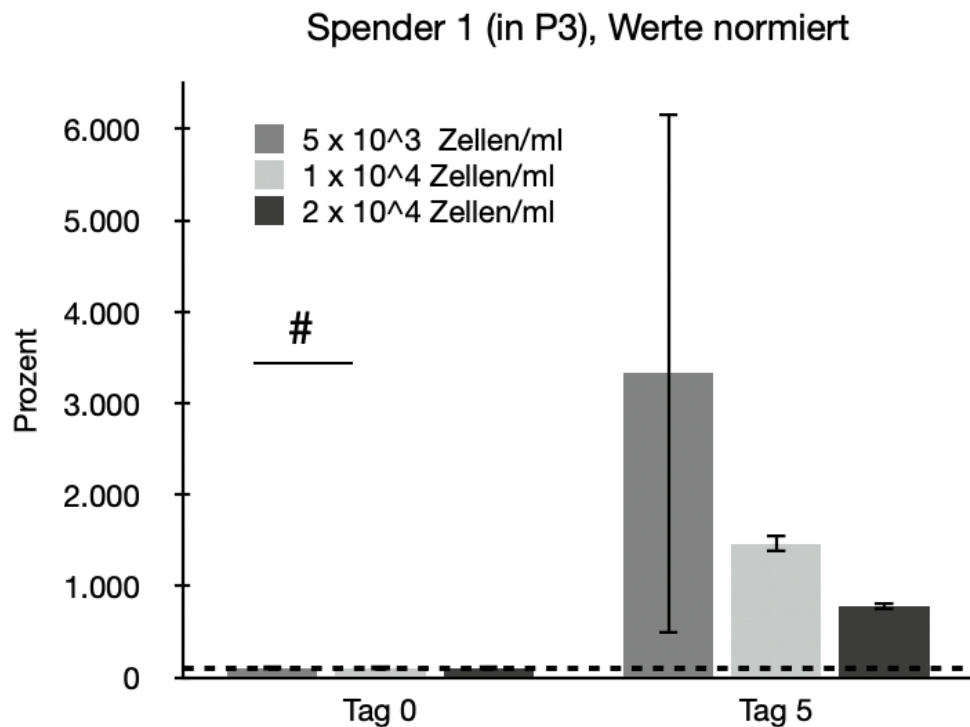


Abb. 102: Prozentuales Wachstum von Spender 1 im zweiten Wachstumsvorversuch

Relative Veränderung der Zellzahl von Spender 1 (Mittelwert \pm SD) zwischen Tag 0 und Tag 5 in Prozent, normiert auf die jeweiligen Ausgangswerte (Kontrollbalken links, gestrichelte Linie entspricht 100 %). Der stärkste prozentuale Zuwachs (3329 %) wurde bei der niedrigsten Startkonzentration (5×10^3 Zellen/ml) festgestellt, was auf eine höhere Wachstumsdynamik bei niedriger Zellbesatzdichte hindeutet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels gepaartem *t*-Test. Alle Unterschiede zu Tag 0 und nahezu alle Vergleiche an Tag 5 untereinander waren statistisch hochsignifikant ($p < 0,03$, $d > 0,91$). Nach Bonferroni-Korrektur zeigten sich jedoch nicht mehr in allen Bedingungen statistisch signifikante Unterschiede. Cohen's $d > 0,8$ für alle Vergleiche, abgesehen vom auch statistisch nicht signifikanten Unterschied von Tag 5 und 5×10^3 Zellen/ml zu Tag 5 und 1×10^4 Zellen/ml. Statistische Markierung: # kennzeichnet einen statistisch signifikanten Unterschied von einer Bedingung im Vergleich zu allen anderen Bedingungen, abgesehen vom Vergleich zwischen Tag 5 und 5×10^3 Zellen/ml mit Tag 5 und 1×10^4 Zellen/ml ($p < 0,03$, $d > 0,91$). Weitere Informationen zur Methodik und Interpretation finden sich im Text. P = Passage, SD = Standardabweichung, ml = Milliliter, % = Prozent. Eigene Anfertigung.

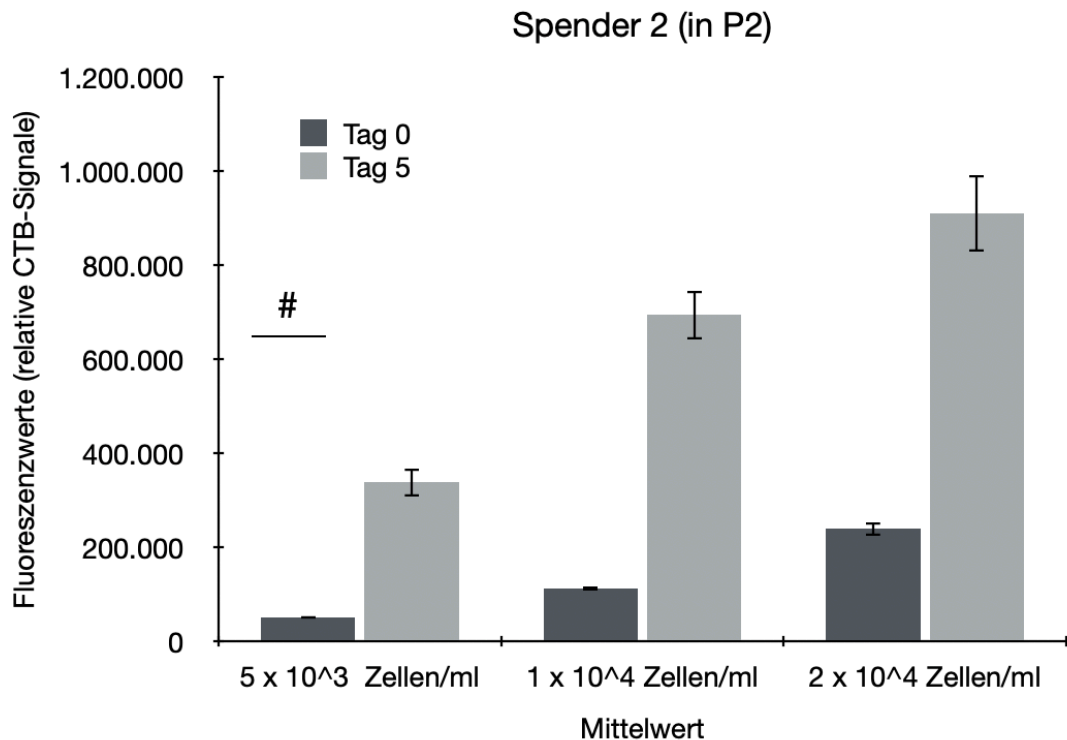


Abb. 103: Zellzahlentwicklung von Spender 2 im zweiten Wachstumsvorversuch

Dargestellt sind die mittleren CTB-Werte (MW \pm SD) der Zellen von Spender 2 (Passage 2) an Tag 0 (dunkelgrau) und Tag 5 (hellgrau) bei drei verschiedenen Ausgangszellzahlen (5×10^3 , 1×10^4 und 2×10^4 Zellen/ml). Die absolute Zellzahlentwicklung fiel geringer aus als bei Spender 1 (max. 910.000 Zellen), was auf eine interindividuelle Differenz in der Proliferationskapazität hinweist. Die statistische Auswertung erfolgte mittels gepaartem *t*-Test. Auch hier zeigten sich überall signifikante Unterschiede zwischen den Bedingungen ($p < 0,001$; *d* bis 12,25). Cohen's *d* $> 0,8$ für alle Vergleiche. Auch nach Bonferroni-Korrektur zeigten sich zwischen allen Bedingungen noch statistisch signifikante Unterschiede. Statistische Markierung: # kennzeichnet einen statistisch signifikanten Unterschied von einer Bedingung im Vergleich zu allen anderen Bedingungen (alle $p < 0,001$). Weitere Informationen zur Methodik und Interpretation finden sich im Text. CTB = CellTiter Blue, P = Passage, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, ml = Milliliter. Eigene Anfertigung.

Spender 2 (in P2), Werte normiert

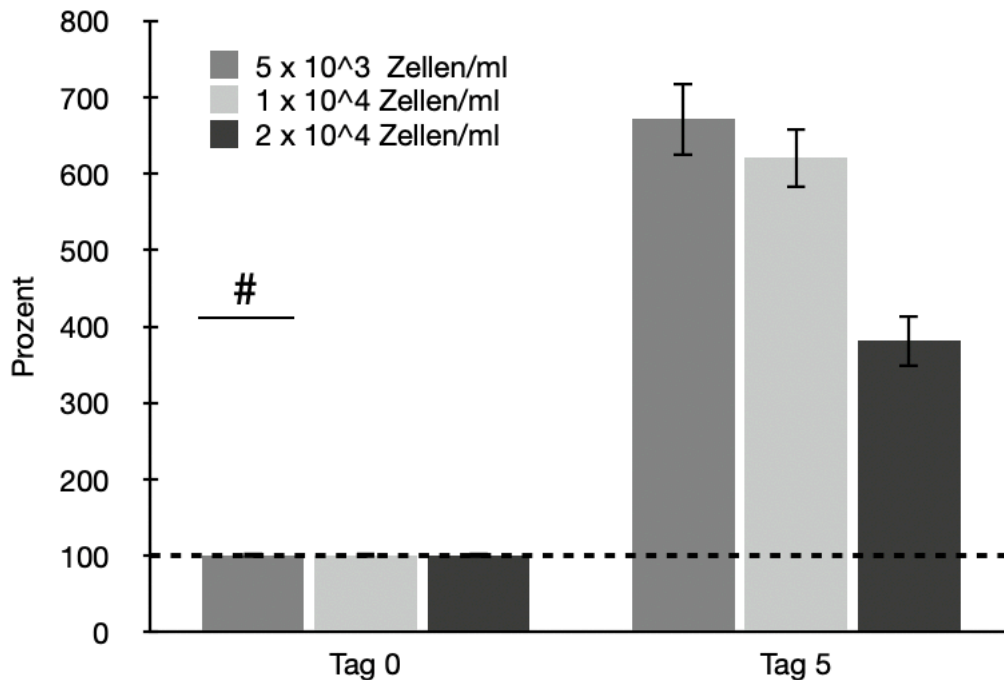


Abb. 104: Prozentuales Wachstum von Spender 2 im zweiten Wachstumsvorversuch

Relative Veränderung der Zellzahl von Spender 2 (Mittelwert \pm SD) zwischen Tag 0 und Tag 5 in Prozent, normiert auf die jeweiligen Ausgangswerte (Kontrollbalken links, gestrichelte Linie entspricht 100 %). Der größte Zuwachs (671 %) wurde bei der geringsten Startzellzahl (5×10^3 Zellen/ml) beobachtet. Bei höheren Zellzahlen fielen die relativen Wachstumsraten geringer aus. Die statistische Auswertung erfolgte mittels gepaartem *t*-Test. Die statistische Analyse ergab für nahezu alle Bedingungen signifikante Unterschiede ($p < 0,00002$; $d > 3,54$), die auch nach Bonferroni-Korrektur statistisch signifikant blieben. Cohen's $d > 0,8$ für alle Vergleiche, abgesehen vom auch statistisch nicht signifikanten Unterschied von Tag 5 und 5×10^3 Zellen/ml zu Tag 5 und 1×10^4 Zellen/ml. Statistische Markierung: # kennzeichnet einen statistisch signifikanten Unterschied von einer Bedingung im Vergleich zu allen anderen Bedingungen, abgesehen vom Vergleich zwischen Tag 5 und 5×10^3 Zellen/ml mit Tag 5 und 1×10^4 Zellen/ml ($p < 0,00002$; $d > 3,54$). Weitere Informationen zur Methodik und Interpretation finden sich im Text. P = Passage, SD = Standardabweichung, ml = Milliliter, % = Prozent. Eigene Anfertigung.

Diese Ergebnisse verdeutlichen nicht nur die Reproduzierbarkeit und Robustheit des Versuchs, sondern auch eine klare Abhängigkeit des Proliferationsverhaltens von der Dichte beim Ausplattieren: Geringere Ausgangszellzahlen führten zu einem deutlich höheren relativen Zellwachstum. Gleichzeitig wurde eine deutliche Interdonorvariabilität beobachtet, wobei Spender 1 ein insgesamt höheres Proliferationspotenzial aufwies als Spender 2.

Insgesamt liefern die Daten damit eine starke Evidenz für dichteabhängige Effekte auf das Zellwachstum bei dentalen Stammzellen, stützen frühere Beobachtungen (Mori et al., 2012) und verdeutlichen die Bedeutung von Donor- und Passagenunterschieden in der Zellkultur.

Eine Erweiterung des Versuchsdesigns auf eine größere Spenderkohorte und längere Beobachtungszeiträume sind zur weiteren Absicherung dieser Effekte notwendig.

6.2.4 FCS-Nebenversuch

Ein Zusatzexperiment evaluierte den Effekt variierender FCS-Konzentrationen und der Supplementierung von L-Arginin sowie osteogenen Differenzierungszusätzen auf die Proliferation von dentalen Stromazellen (DSC). Drei Spenderzellen wurden dazu jeweils mit einer Dichte von 3×10^4 Zellen/ml in 24-Well-Platten ausgesät. Die Auswertung erfolgte ausschließlich an Tag 5 mittels CTB-Assay, ohne Erhebung eines Referenzwertes an Tag 0. Die Rohdaten wurden dabei um den entsprechenden Blankwert korrigiert. Anschließend wurden Mittelwert und Standardabweichung berechnet.

Da lediglich drei Spender berücksichtigt wurden ($n = 3$) und keine Messwerte für den Referenztag vorlagen, wurde auf eine statistische Auswertung verzichtet. Eine belastbare Aussage zur zeitlichen Proliferationsdynamik war daher nicht möglich. Aufgrund dieser methodischen Einschränkungen wurde der Versuch nicht in die Hauptanalyse der Arbeit aufgenommen, sondern dient ausschließlich der deskriptiven Einordnung ergänzender Beobachtungen.

Die Zellen wurden in folgenden Medien kultiviert:

- OM
- DMEM ohne Arg, ohne OM-Zusätze, 2,5 %, 5 % oder 10 % FCS
- DMEM ohne Arg, ohne OM-Zusätze, + 200 μ M Arg, 2,5 %, 5 % oder 10 % FCS
- DMEM ohne Arg, mit OM-Zusätzen, 2,5 %, 5 % oder 10 % FCS
- DMEM ohne Arg, mit OM-Zusätzen, + 200 μ M Arg, 2,5 %, 5 % oder 10 % FCS

Spender 3 wies in nahezu allen Bedingungen die höchsten absoluten Zellzahlen auf (siehe **Abb. 106: Einfluss verschiedener FCS-Konzentrationen und Zusätze auf die Zellproliferation, Einzelwerte der Spender**). Besonders hohe Werte wurden in OM sowie in DMEM ohne L-Arginin mit OM-Zusätzen, + 200 μ M Arg, 5 % und 10 % FCS erzielt. Dies deutet darauf hin, dass sowohl die FCS-Konzentration als auch die Zugabe von L-Arginin und osteogenen Zusätzen einen positiven Einfluss auf das Zellwachstum haben.

Generell war bei allen Spendern ein wachstumsfördernder Effekt bei steigender FCS-Konzentration und Zugabe von L-Arginin zu beobachten (siehe **Abb. 105: Einfluss verschiedener FCS-Konzentrationen und Zusätze auf die Zellproliferation, Mittelwerte der Spender**). Die geringste

Proliferation zeigten die Zellen in Medien mit 2,5 % FCS ohne L-Arginin-Zusatz, was die übrigen Ergebnisse dieser Arbeit konsistent bestätigt (siehe „Einfluss des FCS-Gehalts und L-Arginin-Resupplementierung“ und siehe „Einfluss des FCS-Gehalts“).

Auffällig war, dass in DMEM ohne Arg, ohne OM-Zusätze, mit 10 % FCS höhere Zellzahlen erreicht wurden als in der Bedingung mit 200 μ M L-Arginin bei nur 2,5 % FCS (siehe **Abb. 105: Einfluss verschiedener FCS-Konzentrationen und Zusätze auf die Zellproliferation, Mittelwerte der Spender**). Dies könnte darauf hindeuten, dass der FCS-Gehalt einen größeren Einfluss auf die Proliferation hat als die externe L-Arginin-Zugabe. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass auch FCS endogen L-Arginin enthält. Interessanterweise konnte dieses Muster nicht bei allen Spendern einheitlich beobachtet werden, was auf interindividuelle Unterschiede hinweist (siehe **Abb. 106: Einfluss verschiedener FCS-Konzentrationen und Zusätze auf die Zellproliferation, Einzelwerte der Spender**).

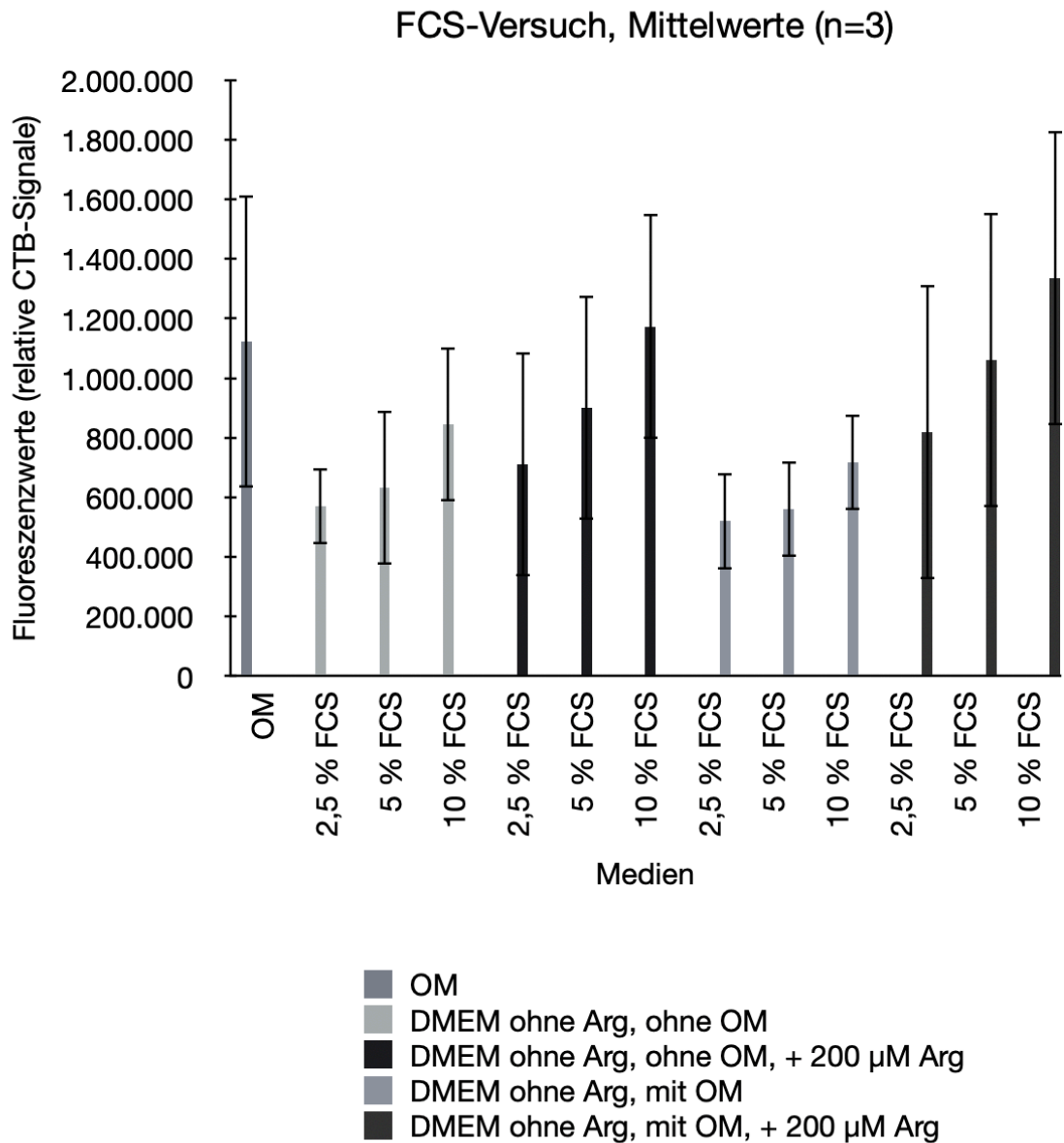


Abb. 105: Einfluss verschiedener FCS-Konzentrationen und Zusätze auf die Zellproliferation, Mittelwerte der Spender

CTB-basierte Darstellung der mittleren Zellzahlen (MW \pm SD) aller drei Spender an Tag 5 unter verschiedenen Bedingungen mit variierenden FCS-Konzentrationen, L-Arginin-Zugabe (200 μ M) und osteogenen Zusätzen (Kontrollmedium OM, linker Balken). Die Abbildung zeigt, dass steigende FCS-Konzentrationen sowie die Zugabe von L-Arginin und osteogenen Differenzierungszusätzen generell mit einem Anstieg der Zellproliferation einhergingen. Die niedrigsten Zellzahlen wurden in Medien mit 2,5 % FCS ohne L-Arginin-Zusatz gemessen, während die höchsten Werte in OM und in DMEM ohne L-Arginin mit 200 μ M L-Arginin bei 10 % FCS beobachtet wurden. Es wurde keine statistische Auswertung durchgeführt, da nur drei Spender (n = 3) berücksichtigt wurden und kein Referenzwert an Tag 0 erhoben wurde. Weitere Informationen zur Methodik und Interpretation finden sich im Text. CTB = CellTiter Blue, FCS = fetales Kälberserum, n = Anzahl biologischer Replikate, OM = osteogenes Differenzierungsmedium, DMEM = *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Arg = L-Arginin, MW = Mittelwert, SD = Standardabweichung, μ M = Mikromolar, % = Prozent. Eigene Anfertigung.

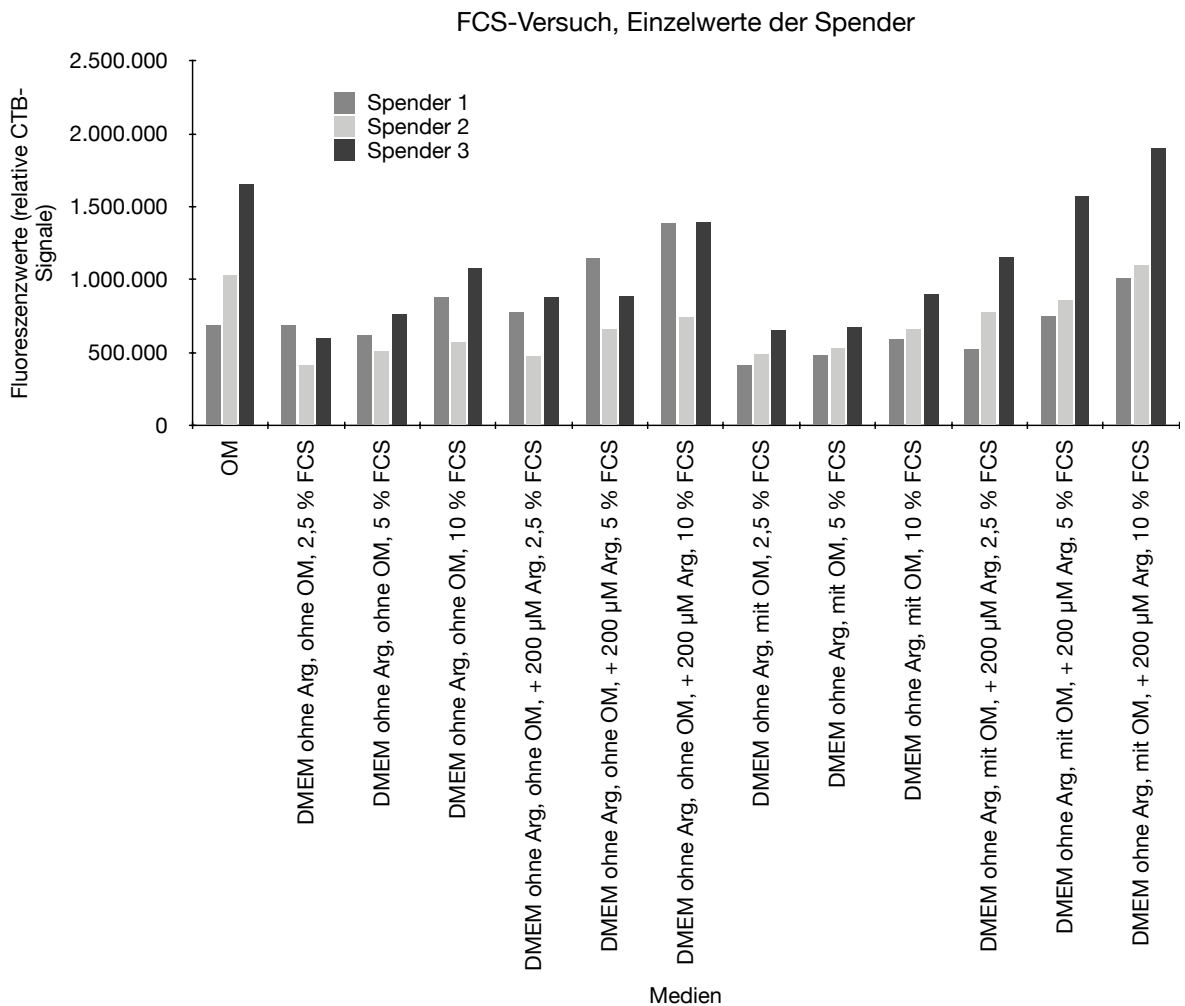


Abb. 106: Einfluss verschiedener FCS-Konzentrationen und Zusätze auf die Zellproliferation, Einzelwerte der Spender

CTB-basierte Darstellung der Zellzahlen einzelner Spender an Tag 5 unter den jeweiligen Versuchsbedingungen mit variierenden FCS-Konzentrationen, L-Arginin-Zugabe (200 µM) und osteogenen Zusätzen (Kontrollmedium OM, linker Balken). Es handelt sich um Einzelwerte, weshalb weder Mittelwert noch Standardabweichung dargestellt noch eine statistische Auswertung durchgeführt wurde. Diese Abbildung veranschaulicht die interindividuelle Reaktion der drei Spender auf unterschiedliche Kulturbedingungen (Spender 1 grau, Spender 2 hellgrau, Spender 3 dunkelgrau). Spender 3 zeigte oft die höchsten Zellzahlen und damit das stärkste Proliferationsverhalten. Besonders hohe Zellzahlen wurden in OM sowie in DMEM ohne L-Arginin mit L-Arginin-Zusatz bei 5 % und 10 % FCS erreicht. Während sich bei allen Spendern ein genereller Trend zugunsten höherer FCS-Gehalte und L-Arginin-Zugabe abzeichnete, unterschieden sich die genauen Muster zwischen den Individuen. Dies deutet auf eine Interdonorvariabilität hin, die bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden muss. Weitere Informationen zur Methodik und Interpretation finden sich im Text. CTB = CellTiter Blue, FCS = fetales Kälberserum, n = Anzahl biologischer Replikate, OM = osteogenes Differenzierungsmedium, DMEM = *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Arg = L-Arginin, µM = Mikromolar, % = Prozent. Eigene Anfertigung.

Lichtmikroskopische Aufnahmen bestätigen die genannten Beobachtungen visuell (siehe **Abb. 107: FCS-Versuch, OM, Tag 1, Abb. 108: DMEM ohne L-Arginin, mit OM, + 200 µM L-Arginin, 2,5 % FCS, Abb. 109: DMEM ohne L-Arginin, mit OM, + 200 µM L-Arginin, 5 % FCS, Abb. 110: DMEM ohne L-Arginin, mit OM, + 200 µM L-Arginin, 10 % FCS, Abb. 111: DMEM ohne L-Arginin, mit OM und 2,5 % FCS, Abb. 112: DMEM ohne L-Arginin, mit OM und 5 % FCS, Abb. 113: DMEM ohne L-Arginin, mit OM und 10 % FCS, Abb. 114: OM-Kontrolle,**

Tag 2, Abb. 115: DMEM ohne L-Arginin, ohne OM, + 200 μ M L-Arginin, 2,5 % FCS, Abb. 116: DMEM ohne L-Arginin, ohne OM, + 200 μ M L-Arginin, 5 % FCS, Abb. 117: DMEM ohne L-Arginin, ohne OM, + 200 μ M L-Arginin, 10 % FCS, Abb. 118: DMEM ohne L-Arginin, ohne OM und 2,5 % FCS, Abb. 119: DMEM ohne L-Arginin, ohne OM und 5 % FCS und Abb. 120: DMEM ohne L-Arginin, ohne OM und 10 % FCS). Eine höhere Zelldichte war insbesondere bei steigender FCS- und L-Arginin-Konzentration erkennbar, wobei die Morphologie in OM derjenigen in DMEM ohne Arg, mit OM, + 200 μ M L-Arginin, 10 % FCS am ähnlichsten war.

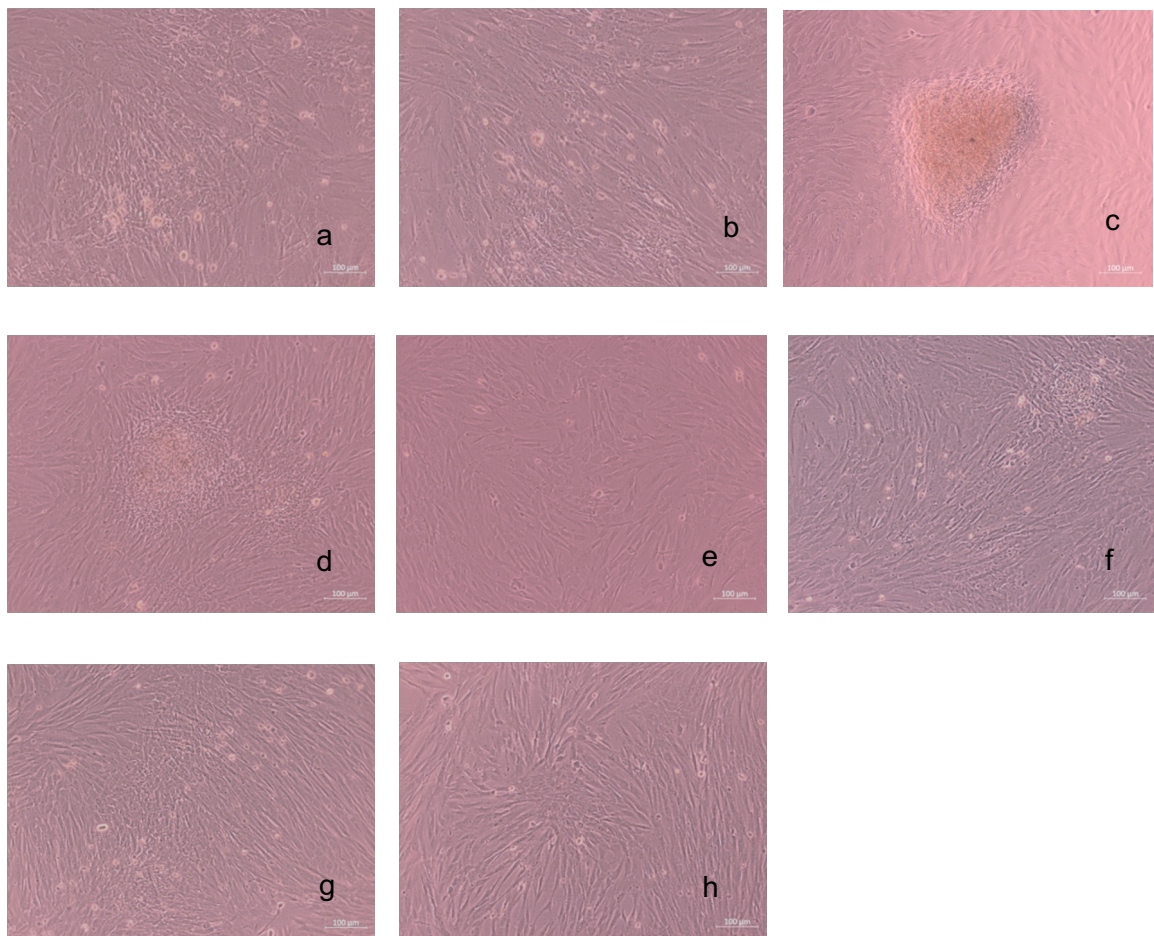


Abb. 107: FCS-Versuch, OM, Tag 1 – lichtmikroskopische Darstellung

Lichtmikroskopische Darstellung des Zellwachstums dentaler Stromazellen (DSC) in osteogenem Medium (OM) an Tag 1. Die Aufnahmen wurden mit einer 10-fachen Vergrößerung angefertigt, Maßstabsbalken entsprechen 100 μ m (Zeiss-Axioskop-40, Zen 3.0 *Blue*). Die Abbildungen (a) und (b) zeigen Zellen von Spender DSC-210121-2 in Passage 3. Die Abbildungen (c), (d), (e) und (f) zeigen unterschiedliche Bildausschnitte von Spender DSC-210204-2 in Passage 2. In (g) und (h) sind die Zellen von Spender DSC-210204-3 in Passage 4 dargestellt. Diese Aufnahme dient als Referenz für den Vergleich mit anderen Kulturbedingungen. Weitere Informationen zu den Bedingungen finden sich im zugehörigen Text. FCS = fetales Kälberserum, OM = osteogenes Differenzierungsmedium, DSC = dentale Stromazellen, μ m = Mikrometer. Eigene Anfertigung.

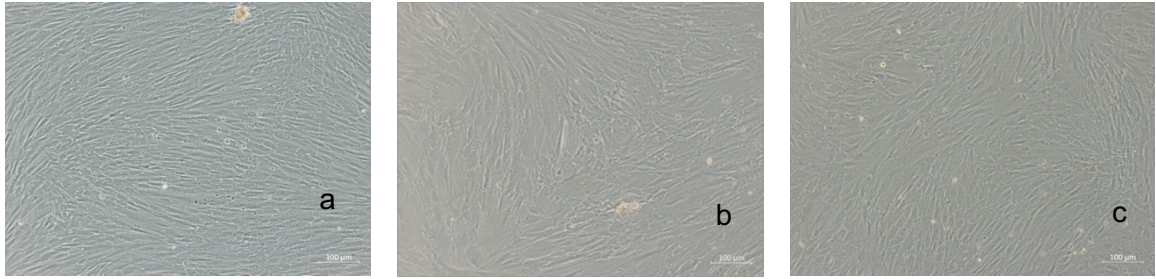


Abb. 108: DMEM ohne L-Arginin, mit OM, + 200 µM L-Arginin, 2,5 % FCS – lichtmikroskopische Darstellung

Lichtmikroskopische Darstellung des Zellwachstums dentaler Stromazellen (DSC) in DMEM ohne L-Arginin mit osteogenen Zusätzen sowie 200 µM L-Arginin und 2,5 % FCS an Tag 2. Die Aufnahmen wurden mit einer 10-fachen Vergrößerung angefertigt, Maßstabsbalken entsprechen 100 µm (Zeiss-Axioskop-40, Zen 3.0 *Blue*). Dabei zeigt Abbildung (a) die Zellen von Spender DSC-210204-3 in Passage 4, (b) zeigt Spender DSC-210121-2 in Passage 3 und (c) Spender DSC-210204-2 in Passage 2. Eine Zunahme der Zellzahl mit wachsender FCS-Konzentration ist im Vergleich zu den anderen Abbildungen erkennbar. Weitere Informationen zu den Bedingungen finden sich im zugehörigen Text. DMEM = *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, OM = osteogenes Differenzierungsmedium, FCS = fetales Kälberserum, DSC = dentale Stromazellen, µM = Mikromolar, % = Prozent, µm = Mikrometer. Eigene Anfertigung.

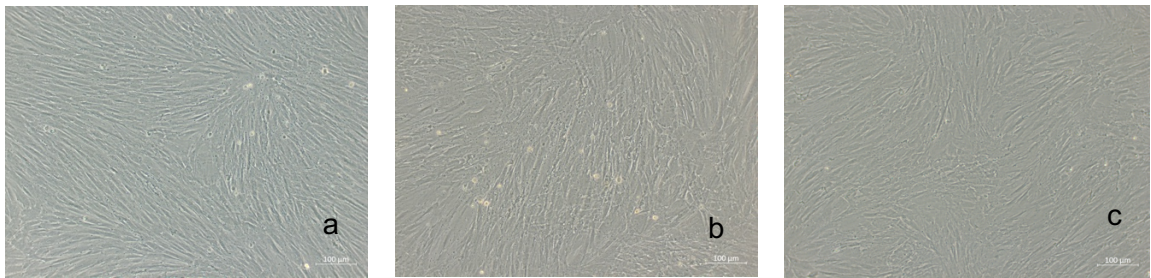


Abb. 109: DMEM ohne L-Arginin, mit OM, + 200 µM L-Arginin, 5 % FCS – lichtmikroskopische Darstellung

Lichtmikroskopische Darstellung des Zellwachstums dentaler Stromazellen (DSC) in DMEM ohne L-Arginin mit osteogenen Zusätzen sowie 200 µM L-Arginin und 5 % FCS an Tag 2. Die Aufnahmen wurden mit einer 10-fachen Vergrößerung angefertigt, Maßstabsbalken entsprechen 100 µm (Zeiss-Axioskop-40, Zen 3.0 *Blue*). Dabei zeigt Abbildung (a) die Zellen von Spender DSC-210204-3 in Passage 4, (b) zeigt Spender DSC-210121-2 in Passage 3 und (c) Spender DSC-210204-2 in Passage 2. Eine Zunahme der Zellzahl mit wachsender FCS-Konzentration ist im Vergleich zu den anderen Abbildungen erkennbar. Weitere Informationen zu den Bedingungen finden sich im zugehörigen Text. DMEM = *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, OM = osteogenes Differenzierungsmedium, FCS = fetales Kälberserum, DSC = dentale Stromazellen, µM = Mikromolar, % = Prozent, µm = Mikrometer. Eigene Anfertigung.

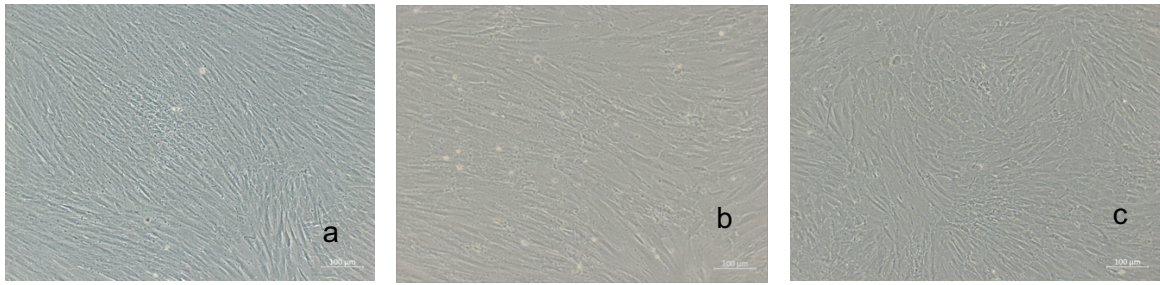


Abb. 110: DMEM ohne L-Arginin, mit OM, + 200 µM L-Arginin, 10 % FCS – lichtmikroskopische Darstellung

Lichtmikroskopische Darstellung des Zellwachstums dentaler Stromazellen (DSC) in DMEM ohne L-Arginin mit osteogenen Zusätzen sowie 200 µM L-Arginin und 10 % FCS an Tag 2. Die Aufnahmen wurden mit einer 10-fachen Vergrößerung angefertigt, Maßstabsbalken entsprechen 100 µm (Zeiss-Axioskop-40, Zen 3.0 *Blue*). Dabei zeigt Abbildung (a) die Zellen von Spender DSC-210204-3 in Passage 4, (b) zeigt Spender DSC-210121-2 in Passage 3 und (c) Spender DSC-210204-2 in Passage 2. Eine Zunahme der Zellzahl mit wachsender FCS-Konzentration ist im Vergleich zu den anderen Abbildungen erkennbar. Weitere Informationen zu den Bedingungen finden sich im zugehörigen Text. DMEM = *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, OM = osteogenes Differenzierungsmedium, FCS = fetales Kälberserum, DSC = dentale Stromazellen, µM = Mikromolar, % = Prozent, µm = Mikrometer. Eigene Anfertigung.

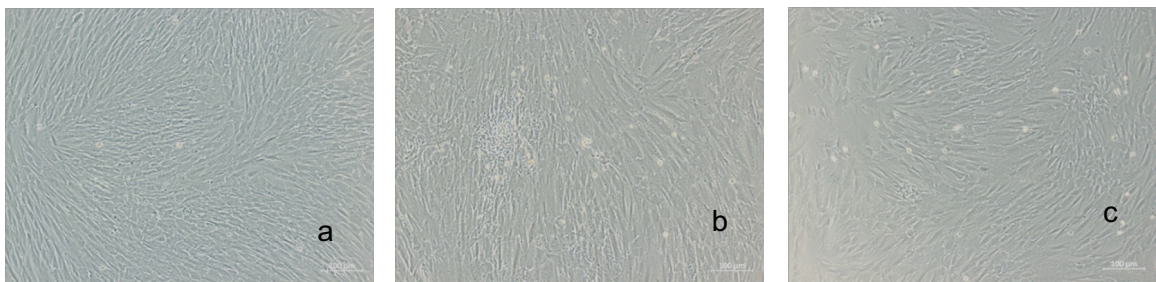


Abb. 111: DMEM ohne L-Arginin, mit OM und 2,5 % FCS – lichtmikroskopische Darstellung

Lichtmikroskopische Darstellung des Zellwachstums dentaler Stromazellen (DSC) in DMEM ohne L-Arginin mit osteogenen Zusätzen und 2,5 % FCS an Tag 2. Die Aufnahmen wurden mit einer 10-fachen Vergrößerung angefertigt, Maßstabsbalken entsprechen 100 µm (Zeiss-Axioskop-40, Zen 3.0 *Blue*). Dabei zeigt Abbildung (a) die Zellen von Spender DSC-210204-3 in Passage 4, (b) zeigt Spender DSC-210121-2 in Passage 3 und (c) Spender DSC-210204-2 in Passage 2. Mit steigendem Serumgehalt nimmt die Zelldichte zu, bleibt jedoch unter den Bedingungen mit L-Arginin-Zusatz (siehe andere Abbildungen). Weitere Informationen zu den Bedingungen finden sich im zugehörigen Text. DMEM = *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, OM = osteogenes Differenzierungsmedium, FCS = fetales Kälberserum, DSC = dentale Stromazellen, % = Prozent, µm = Mikrometer. Eigene Anfertigung.

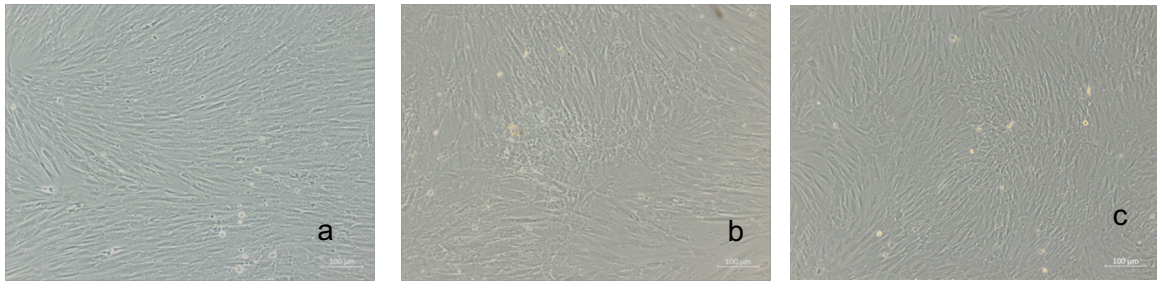


Abb. 112: DMEM ohne L-Arginin, mit OM und 5 % FCS – lichtmikroskopische Darstellung

Lichtmikroskopische Darstellung des Zellwachstums dentaler Stromazellen (DSC) in DMEM ohne L-Arginin mit osteogenen Zusätzen und 5 % FCS an Tag 2. Die Aufnahmen wurden mit einer 10-fachen Vergrößerung angefertigt, Maßstabsbalken entsprechen 100 µm (Zeiss-Axioskop-40, Zen 3.0 Blue). Dabei zeigt Abbildung (a) die Zellen von Spender DSC-210204-3 in Passage 4, (b) zeigt Spender DSC-210121-2 in Passage 3 und (c) Spender DSC-210204-2 in Passage 2. Mit steigendem Serumgehalt nimmt die Zelldichte zu, bleibt jedoch unter den Bedingungen mit L-Arginin-Zusatz (siehe andere Abbildungen). Weitere Informationen zu den Bedingungen finden sich im zugehörigen Text. DMEM = *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, OM = osteogenes Differenzierungsmedium, FCS = fetales Kälberserum, DSC = dentale Stromazellen, % = Prozent, µm = Mikrometer. Eigene Anfertigung.

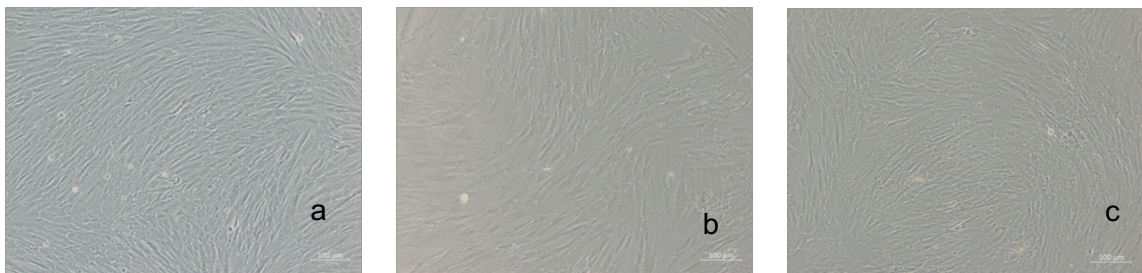


Abb. 113: DMEM ohne L-Arginin, mit OM und 10 % FCS – lichtmikroskopische Darstellung

Lichtmikroskopische Darstellung des Zellwachstums dentaler Stromazellen (DSC) in DMEM ohne L-Arginin mit osteogenen Zusätzen und 10 % FCS an Tag 2. Die Aufnahmen wurden mit einer 10-fachen Vergrößerung angefertigt, Maßstabsbalken entsprechen 100 µm (Zeiss-Axioskop-40, Zen 3.0 Blue). Dabei zeigt Abbildung (a) die Zellen von Spender DSC-210204-3 in Passage 4, (b) zeigt Spender DSC-210121-2 in Passage 3 und (c) Spender DSC-210204-2 in Passage 2. Mit steigendem Serumgehalt nimmt die Zelldichte zu, bleibt jedoch unter den Bedingungen mit L-Arginin-Zusatz (siehe andere Abbildungen). Weitere Informationen zu den Bedingungen finden sich im zugehörigen Text. DMEM = *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, OM = osteogenes Differenzierungsmedium, FCS = fetales Kälberserum, DSC = dentale Stromazellen, % = Prozent, µm = Mikrometer. Eigene Anfertigung.

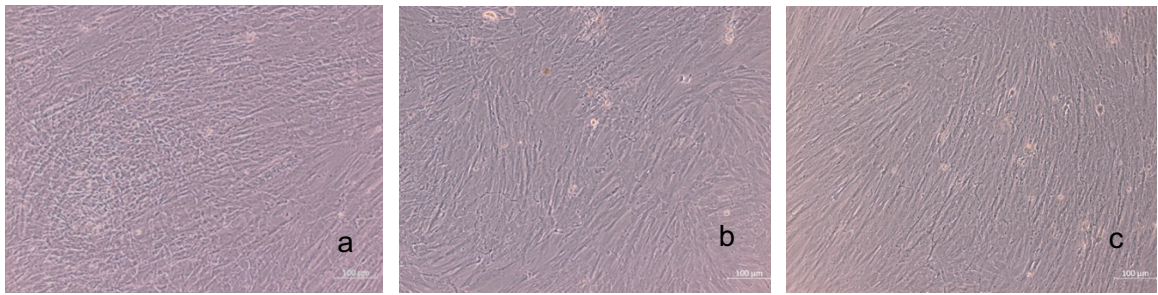


Abb. 114: OM-Kontrolle, Tag 2 – lichtmikroskopische Darstellung

Lichtmikroskopische Darstellung des Zellwachstums dentaler Stromazellen (DSC) in osteogenem Medium (OM) an Tag 2. Die Aufnahmen wurden mit einer 10-fachen Vergrößerung angefertigt, Maßstabsbalken entsprechen 100 µm (Zeiss-Axioskop-40, Zen 3.0 *Blue*). Abbildung (a) zeigt Spender DSC-210121-2 in Passage 3, (b) zeigt DSC-210204-2 in Passage 2 und (c) Spender DSC-210204-3 in Passage 4. Kontrollaufnahme der Zellen: Die Zelldichte ist bereits deutlich höher als in den vergleichbaren Bedingungen mit geringem FCS-Gehalt (vgl. mit den anderen Abbildungen). Weitere Informationen zu den Bedingungen finden sich im zugehörigen Text. OM = osteogenes Differenzierungsmedium, DSC = dentale Stromazellen, FCS = fetales Kälberserum, µm = Mikrometer. Eigene Anfertigung.

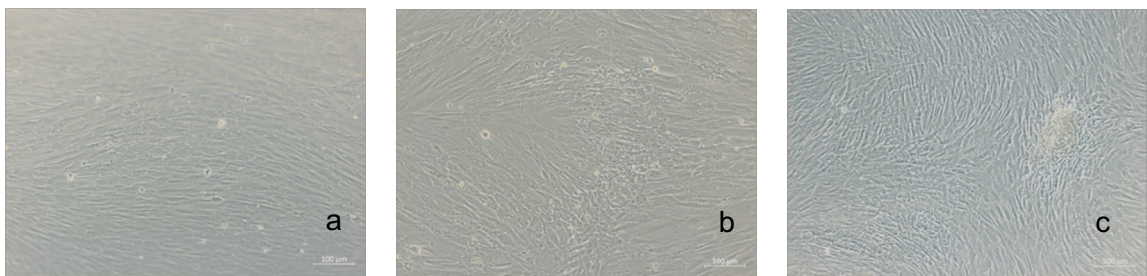


Abb. 115: DMEM ohne L-Arginin, ohne OM, + 200 µM L-Arginin, 2,5 % FCS – lichtmikroskopische Darstellung

Lichtmikroskopische Darstellung des Zellwachstums dentaler Stromazellen (DSC) in DMEM ohne L-Arginin mit 200 µM L-Arginin und 2,5 % FCS an Tag 2. Die Aufnahmen wurden mit einer 10-fachen Vergrößerung angefertigt, Maßstabsbalken entsprechen 100 µm (Zeiss-Axioskop-40, Zen 3.0 *Blue*). Dabei zeigt Abbildung (a) die Zellen von Spender DSC-210204-3 in Passage 4, (b) zeigt Spender DSC-210121-2 in Passage 3 und (c) Spender DSC-210204-2 in Passage 2. Es zeigt sich eine dosisabhängige Zunahme der Zellzahl mit steigendem FCS-Gehalt (siehe andere Abbildungen). Weitere Informationen zu den Bedingungen finden sich im zugehörigen Text. DMEM = *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, OM = osteogenes Differenzierungsmedium, FCS = fetales Kälberserum, DSC = dentale Stromazellen, µM = Mikromolar, % = Prozent, µm = Mikrometer. Eigene Anfertigung.

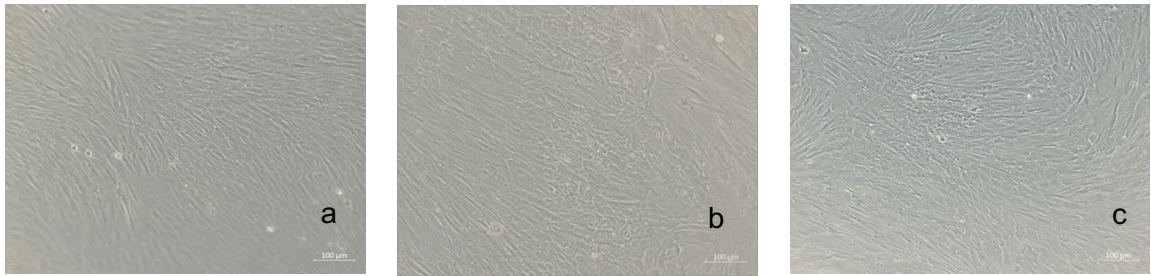


Abb. 116: DMEM ohne L-Arginin, ohne OM, + 200 µM L-Arginin, 5 % FCS – lichtmikroskopische Darstellung

Lichtmikroskopische Darstellung des Zellwachstums dentaler Stromazellen (DSC) in DMEM ohne L-Arginin mit 200 µM L-Arginin und 5 % FCS an Tag 2. Die Aufnahmen wurden mit einer 10-fachen Vergrößerung angefertigt, Maßstabsbalken entsprechen 100 µm (Zeiss-Axioskop-40, Zen 3.0 *Blue*). Dabei zeigt Abbildung (a) die Zellen von Spender DSC-210204-3 in Passage 4, (b) zeigt Spender DSC-210121-2 in Passage 3 und (c) Spender DSC-210204-2 in Passage 2. Es zeigt sich eine dosisabhängige Zunahme der Zellzahl mit steigendem FCS-Gehalt (siehe andere Abbildungen). Weitere Informationen zu den Bedingungen finden sich im zugehörigen Text. DMEM = *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, OM = osteogenes Differenzierungsmedium, FCS = fetales Kälberserum, DSC = dentale Stromazellen, µM = Mikromolar, % = Prozent, µm = Mikrometer. Eigene Anfertigung.

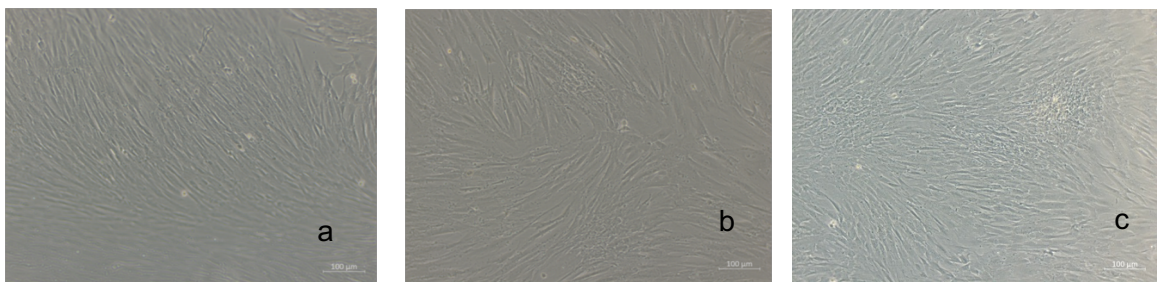


Abb. 117: DMEM ohne L-Arginin, ohne OM, + 200 µM L-Arginin, 10 % FCS – lichtmikroskopische Darstellung

Lichtmikroskopische Darstellung des Zellwachstums dentaler Stromazellen (DSC) in DMEM ohne L-Arginin mit 200 µM L-Arginin und 10 % FCS an Tag 2. Die Aufnahmen wurden mit einer 10-fachen Vergrößerung angefertigt, Maßstabsbalken entsprechen 100 µm (Zeiss-Axioskop-40, Zen 3.0 *Blue*). Dabei zeigt Abbildung (a) die Zellen von Spender DSC-210204-3 in Passage 4, (b) zeigt Spender DSC-210121-2 in Passage 3 und (c) Spender DSC-210204-2 in Passage 2. Es zeigt sich eine dosisabhängige Zunahme der Zellzahl mit steigendem FCS-Gehalt (siehe andere Abbildungen). Weitere Informationen zu den Bedingungen finden sich im zugehörigen Text. DMEM = *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, OM = osteogenes Differenzierungsmedium, FCS = fetales Kälberserum, DSC = dentale Stromazellen, µM = Mikromolar, % = Prozent, µm = Mikrometer. Eigene Anfertigung.

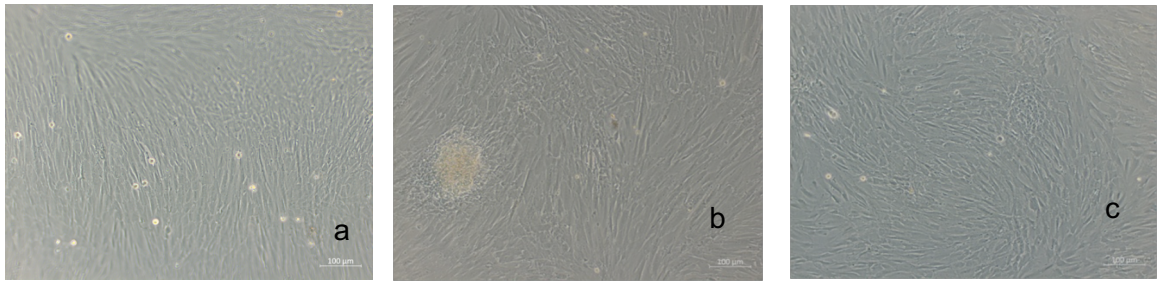


Abb. 118: DMEM ohne L-Arginin, ohne OM und 2,5 % FCS – lichtmikroskopische Darstellung

Lichtmikroskopische Darstellung des Zellwachstums dentaler Stromazellen (DSC) in DMEM ohne L-Arginin und mit 2,5 % FCS an Tag 2. Die Aufnahmen wurden mit einer 10-fachen Vergrößerung angefertigt, Maßstabsbalken entsprechen 100 µm (Zeiss-Axioskop-40, Zen 3.0 *Blue*). Dabei zeigt Abbildung (a) die Zellen von Spender DSC-210204-3 in Passage 4, (b) zeigt Spender DSC-210121-2 in Passage 3 und (c) Spender DSC-210204-2 in Passage 2. Geringe Zelldichten belegen den limitierenden Einfluss von FCS und L-Arginin auf die Zellproliferation. Weitere Informationen zu den Bedingungen finden sich im zugehörigen Text. DMEM = *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, OM = osteogenes Differenzierungsmedium, FCS = fetales Kälberserum, DSC = dentale Stromazellen, % = Prozent, µm = Mikrometer. Eigene Anfertigung.

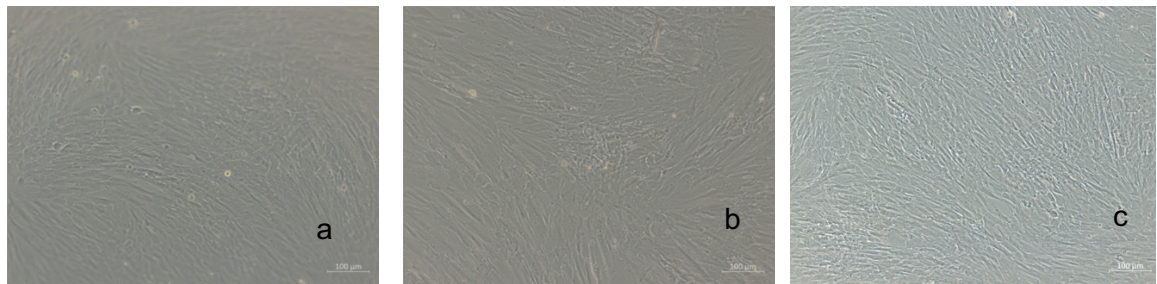


Abb. 119: DMEM ohne L-Arginin, ohne OM und 5 % FCS – lichtmikroskopische Darstellung

Lichtmikroskopische Darstellung des Zellwachstums dentaler Stromazellen (DSC) in DMEM ohne L-Arginin und mit 5 % FCS an Tag 2. Die Aufnahmen wurden mit einer 10-fachen Vergrößerung angefertigt, Maßstabsbalken entsprechen 100 µm (Zeiss-Axioskop-40, Zen 3.0 *Blue*). Dabei zeigt Abbildung (a) die Zellen von Spender DSC-210204-3 in Passage 4, (b) zeigt Spender DSC-210121-2 in Passage 3 und (c) Spender DSC-210204-2 in Passage 2. Geringe Zelldichten belegen den limitierenden Einfluss von FCS und L-Arginin auf die Zellproliferation. Weitere Informationen zu den Bedingungen finden sich im zugehörigen Text. DMEM = *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, OM = osteogenes Differenzierungsmedium, FCS = fetales Kälberserum, DSC = dentale Stromazellen, % = Prozent, µm = Mikrometer. Eigene Anfertigung.

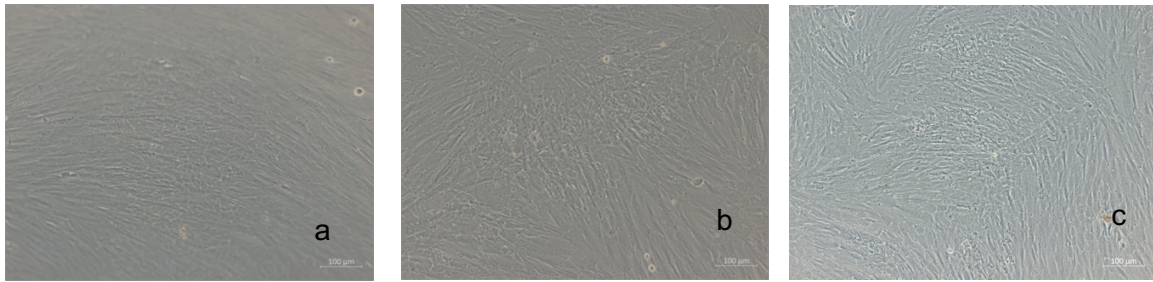


Abb. 120: DMEM ohne L-Arginin, ohne OM und 10 % FCS – lichtmikroskopische Darstellung

Lichtmikroskopische Darstellung des Zellwachstums dentaler Stromazellen (DSC) in DMEM ohne L-Arginin und mit 10 % FCS an Tag 2. Die Aufnahmen wurden mit einer 10-fachen Vergrößerung angefertigt, Maßstabsbalken entsprechen 100 µm (Zeiss-Axioskop-40, Zen 3.0 *Blue*). Dabei zeigt Abbildung (a) die Zellen von Spender DSC-210204-3 in Passage 4, (b) zeigt Spender DSC-210121-2 in Passage 3 und (c) Spender DSC-210204-2 in Passage 2. Geringe Zelldichten belegen den limitierenden Einfluss von FCS und L-Arginin auf die Zellproliferation. Weitere Informationen zu den Bedingungen finden sich im zugehörigen Text. DMEM = *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, OM = osteogenes Differenzierungsmedium, FCS = fetales Kälberserum, DSC = dentale Stromazellen, % = Prozent, µm = Mikrometer. Eigene Anfertigung.

Weitere Versuche mit höherer Fallzahl, unterschiedlichen Passagen sowie variierenden L-Arginin- und FCS-Konzentrationen sind notwendig, um die beobachteten Zusammenhänge sicher zu bestätigen. Für eine gezieltere Bewertung des Einflusses von L-Arginin wäre außerdem der Zusatz von Arginasen zur vollständigen Eliminierung endogener L-Arginin-Quellen denkbar. Zudem sollte die Auswertung künftig auch am Referenztag (Tag 0) erfolgen, um belastbare Aussagen über die Proliferationsdynamik treffen zu können.

6.2.5 Wachstumsversuch in OM

In einem weiteren Versuch wurde das Zellwachstum von vier Spendern in osteogenem Differenzierungsmedium (OM) unter dem Einfluss spezifischer Zusätze untersucht. Die Zellen wurden mit einer Dichte von 1×10^4 Zellen/ml ausgesät. Anders als in vorangegangenen Vorversuchen wurden hier Differenzierungsmedien verwendet, obwohl das Hauptziel die Analyse des Wachstums war. Die untersuchten Bedingungen umfassten:

- OM
- OM + 20 mM L-Valin
- OM + 10 mM L-Lysin + 10 mM L-Ornithin
- OM + 1 mM L-Arginin
- OM + 0,5 mM L-NIO

Die Auswertung erfolgte an Tag 0 sowie an Tag 5 mittels CTB-Assay, inklusive Bereinigung um den Blankwert, Darstellung von Mittelwert und Standardabweichung sowie anschließender Normierung auf den Ausgangswert. Die prozentuale Zunahme der Zellzahl variierte zwischen 700 % und 1353 % (siehe **Abb. 121: Prozentuales Wachstum in OM**).

In allen vier Spenderkulturen zeigte sich das geringste Wachstum unter dem Zusatz von L-Lysin und L-Ornithin (siehe **Abb. 121: Prozentuales Wachstum in OM**). Dies könnte auf eine kompetitive Hemmung des L-Arginin-Transports durch den gemeinsamen Transportweg über CAT-Transporter hinweisen, wodurch weniger L-Arginin für proliferative Prozesse zur Verfügung steht – im Einklang mit den theoretischen Annahmen dieser Arbeit.

Das stärkste Wachstum wurde in OM und in OM + 1 mM L-Arginin beobachtet, gefolgt von den Bedingungen mit L-NIO und L-Valin bei Spender 3 und 4. Sowohl L-NIO (NOS-Hemmung) als auch L-Valin (Arginase-Hemmung) erhöhen potenziell die intrazelluläre Verfügbarkeit von L-Arginin und könnten dadurch wachstumsfördernd wirken.

Zur Bewertung des Proliferationsverhaltens wurden ein gepaarter *t*-Test und eine Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Der Vergleich der Zellviabilität zwischen dem Ausgangszeitpunkt (Tag 0) und Tag 5 zeigte signifikante Proliferationszunahmen in allen Versuchsbedingungen.

Insbesondere war der Unterschied zwischen Tag 0 und OM an Tag 5 hochsignifikant ($p = 0,001$; Bonferroni-korrigiert $p = 0,019$), mit einem sehr starken Effekt (Cohen's $d = 5,99$). Auch die Supplementierung mit 1 mM L-Arginin führte zu einer signifikanten Zunahme der Zellviabilität im Vergleich zu Tag 0 ($p = 0,001$; Bonferroni $p = 0,017$; $d = 6,23$), ebenso wie OM + 20 mM L-Valin ($p = 0,006$; $d = 3,43$), OM + 10 mM L-Lysin + 10 mM L-Ornithin ($p = 0,025$; $d = 2,1$) sowie OM + 0,5 mM L-NIO ($p = 0,009$; $d = 2,98$).

Auch die Paarvergleiche der Bedingungen an Tag 5 zeigten deutliche Differenzen: Zwischen OM und OM + L-Lysin + L-Ornithin bestand ein signifikanter Unterschied ($p = 0,011$; $d = 2,82$), während der Vergleich OM und OM + L-Valin zwar eine mittlere Effektstärke ergab ($d = 1,18$), jedoch ohne statistische Signifikanz blieb. Zwischen OM + L-Valin und OM + L-Lysin + L-Ornithin wurde ebenfalls ein signifikanter Unterschied festgestellt ($p = 0,021$; $d = 2,25$).

Besonders deutlich fiel der Unterschied zwischen OM + L-Lysin + L-Ornithin und OM + L-Arginin aus ($p = 0,002$; Bonferroni $p = 0,025$; $d = 5,43$), ebenso zwischen OM + L-Lysin + L-Ornithin und OM + L-NIO ($p = 0,004$; $d = 4,00$). Die Ergebnisse sprechen dafür, dass L-Arginin und L-NIO die Proliferation deutlich stärker fördern als L-Lysin und L-Ornithin. Vermutlich erfolgt dies über unterschiedliche Wege des Argininstoffwechsels.

Insgesamt belegen die statistischen Auswertungen signifikante Unterschiede zwischen den Zusätzen hinsichtlich ihres Effekts auf das Zellwachstum im osteogenen Medium, wobei L-Arginin die stärkste stimulierende Wirkung zeigte.

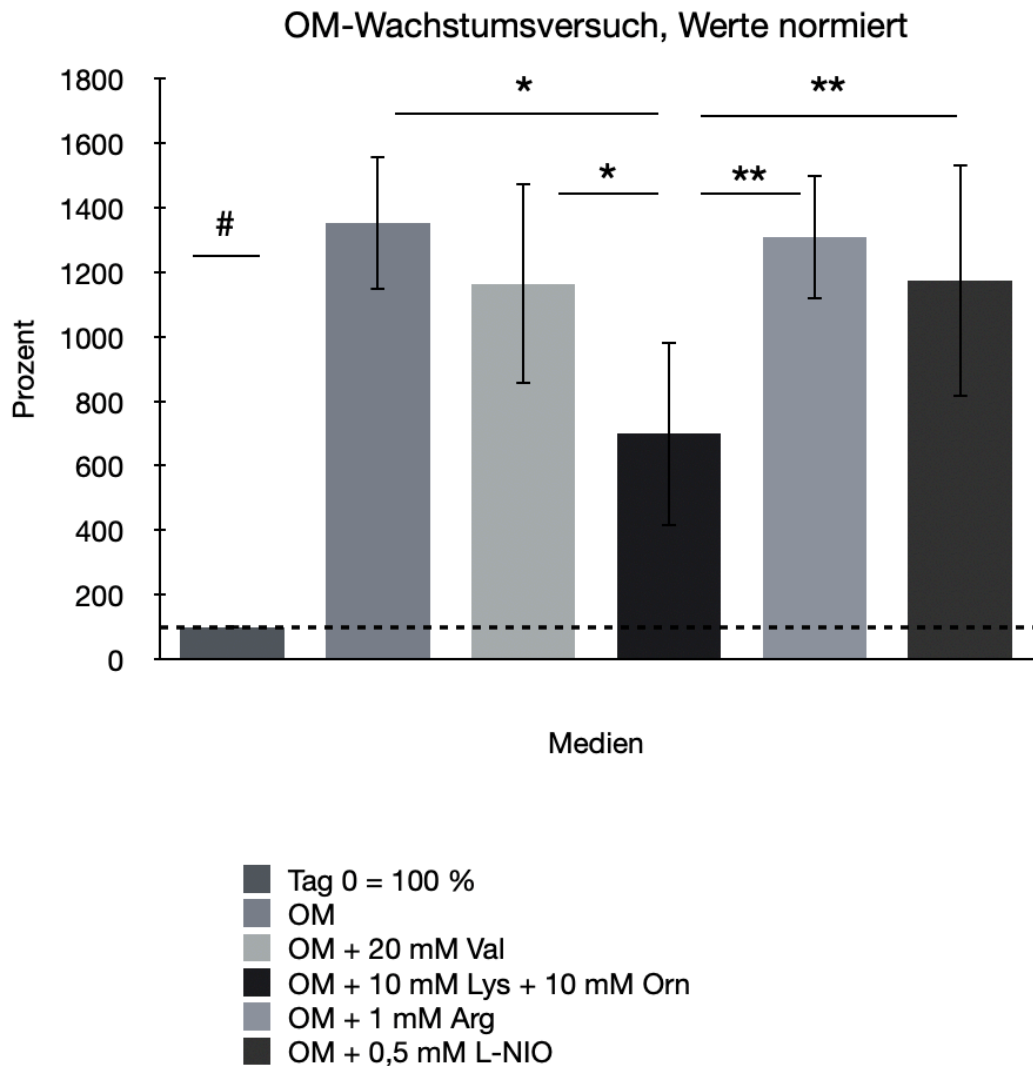


Abb. 121: Prozentuales Wachstum in OM

Dargestellt ist das prozentuale Zellwachstum (Mittelwert \pm SD) von vier Spendern ($n = 4$) in osteogenem Differenzierungsmedium (OM) mit und ohne Zusatz von 20 mM L-Valin, 10 mM L-Lysin + 10 mM L-Ornithin, 1 mM L-Arginin oder 0,5 mM L-NIO. Die CTB-Auswertung erfolgte an Tag 0 und Tag 5, normiert auf Tag 0 (100 %, Balken ganz links, gestrichelte Linie entspricht 100 %). Die statistische Auswertung erfolgte mittels gepaartem t -Test. Signifikante Unterschiede zeigten sich sowohl im Vergleich zwischen Tag 0 und Tag 5 ($p = 0,001-0,025$; Bonferroni-korrigiert $p = 0,017-0,019$; $d = 2,1-6,23$) als auch zwischen einzelnen Zusätzen an Tag 5 ($p = 0,002-0,02$; $d = 1,18-5,43$). Das geringste Wachstum zeigte sich in OM + L-Lysin + L-Ornithin, das stärkste in OM und OM + L-Arginin. Statistische Markierung: Ein Stern entspricht $p < 0,05$; zwei Sterne entsprechen $p < 0,01$. # kennzeichnet einen statistisch signifikanten Unterschied von Tag 0 im Vergleich zu allen anderen Bedingungen. Weitere Informationen zur Versuchsführung und Auswertung sind dem Fließtext zu entnehmen. P = Passage, OM = osteogenes Differenzierungsmedium, Val = L-Valin, Lys = L-Lysin, Orn = L-Ornithin, Arg = L-Arginin, L-NIO = L-N⁵-(1-Aminoethyl)-

Ornithin, SD = Standardabweichung, n = Anzahl biologischer Replikate, CTB = CellTiter Blue, mM = Millimolar, % = Prozent. Eigene Anfertigung.

Obwohl die Ergebnisse grundsätzlich die ursprüngliche Hypothese stützen, ist die Aussagekraft dieses Versuchs eingeschränkt, da Differenzierungs- und keine spezifischen Wachstumsmedien verwendet wurden. Eine Wiederholung mit angepasstem Mediumdesign erscheint daher sinnvoll.

6.2.6 Fazit

Die durchgeführten Vor- und Nebenversuche zur Zellproliferation liefern wichtige Hinweise auf das komplexe Zusammenspiel von FCS-Konzentration, L-Arginin-Verfügbarkeit und Medienzusammensetzung. Gleichzeitig zeigen sie jedoch auch deutliche Limitationen, insbesondere durch fehlende Referenzwerte oder geringe Fallzahlen, weswegen sie nicht im Hauptteil der Arbeit berücksichtigt wurden.

Es ließ sich durchgehend eine erhöhte Proliferation bei niedriger initialer Zelldichte, höherem FCS-Gehalt und zusätzlichem L-Arginin feststellen. Um die Einflüsse dieser Faktoren besser differenzieren zu können, sind systematische Vergleichsstudien notwendig. Dabei können auch Arginasen zur L-Arginin-Elimination eingesetzt und weitere Spender in verschiedenen Passagen berücksichtigt werden, um Seneszenz-bedingte oder individuelle Schwankungen besser beurteilen zu können.

Insbesondere die Hemmung der Proliferation durch L-Lysin und L-Ornithin sollte weiter untersucht werden. Dies legt nahe, dass CAT-vermittelte Transportmechanismen eine zentrale Rolle im Zellstoffwechsel der DSC spielen. Auch hier wäre eine gezielte Analyse mithilfe von Inhibitoren oder *Knockdown*-Experimenten denkbar. Zudem sollten künftig auch RPMI-basierte Medien einbezogen werden, um Unterschiede in der basalen Medienzusammensetzung zu analysieren.

6.2.7 OM mit 1,5 % FCS (Differenzierungsversuch)

In einem weiteren Nebenversuch wurde untersucht, ob eine Differenzierung der DSC auch bei einem deutlich reduzierten FCS-Gehalt von 1,5 % möglich ist. Dazu wurden zwei Spender analysiert, wobei bei einem Spender ausschließlich Tag 14 und beim anderen Tag 7 und 14 ausgewertet wurden.

An Tag 7 ließ sich nur eine geringe Mineralisierung nachweisen, während an Tag 14 eine ausgeprägtere Differenzierung erkennbar war (siehe **Abb. 122: Kalzifizierung in OM mit 1,5 % FCS**).

Bei Spender 2 zeigte sich zwischen Tag 7 und Tag 14 ein hochsignifikanter Anstieg der Kalzifizierung ($p = 0,0025$; Bonferroni-korrigiert $p = 0,0049$) mit einem besonders starken Effekt (Cohen's $d = 183,54$). Darüber hinaus konnte auch ein relevanter Unterschied in der Ausprägung der Kalzifizierung zwischen den beiden Spendern am Tag 14 festgestellt werden (Cohen's $d = 2,61$), was auf eine interindividuelle Variabilität in der Differenzierungsfähigkeit unter den gegebenen Kulturbedingungen hinweist.

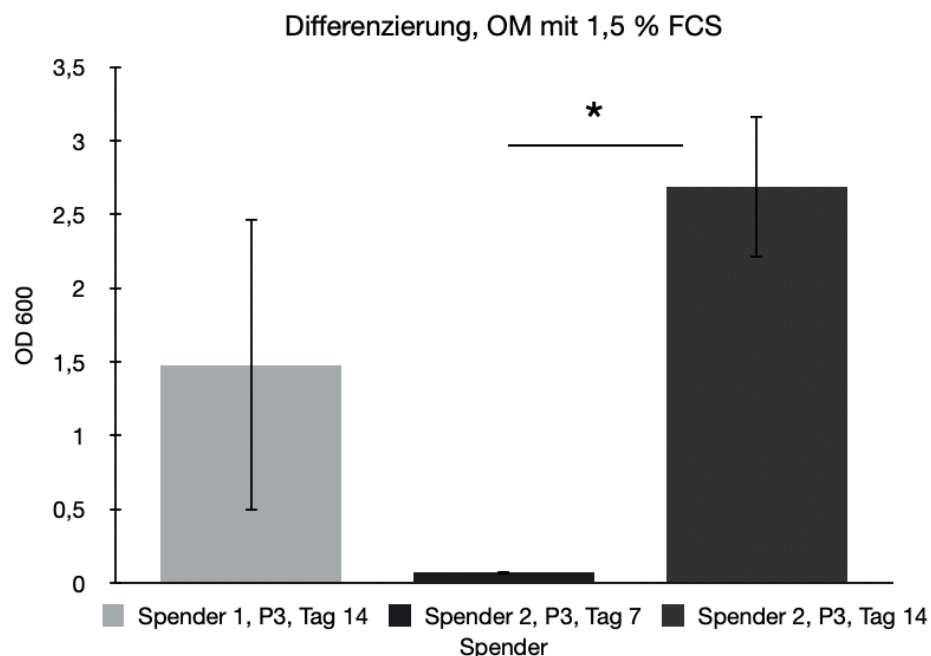


Abb. 122: Kalzifizierung in OM mit 1,5 % FCS

Dargestellt ist die osteogene Differenzierung zweier Spenderzellen ($n = 2$) anhand der optischen Dichte bei 600 nm (OD 600) in OM mit 1,5 % FCS. Spender 1 wurde nur an Tag 14 ausgewertet, Spender 2 an Tag 7 und Tag 14. Die Balken zeigen Mittelwerte \pm Standardabweichung. Die statistische Auswertung erfolgte mittels gepaartem t -Test. Zwischen Tag 7 und Tag 14 zeigte sich bei Spender 2 ein hochsignifikanter Anstieg der Kalzifizierung ($p = 0,0025$, Bonferroni-korrigiert $p = 0,0049$) mit einer extrem hohen Effektstärke ($d = 183,54$). Der Vergleich zwischen Spender 1 und 2 an Tag 14 ergab ebenfalls einen deutlichen Effekt ($d = 2,61$), was auf eine relevante interindividuelle Variabilität in der Differenzierungsleistung hinweist. Allerdings ergab sich hier kein statistisch signifikanter Unterschied. Statistische Markierung: Ein Stern entspricht $p < 0,05$. Weitere Informationen zur Methodik und Interpretation finden sich im Text. OD 600 = optische Dichte bei 600 nm, OM = osteogenes Differenzierungsmedium, FCS = fetales Kälberserum, P = Passage, n = Anzahl biologischer Replikate, % = Prozent. Eigene Anfertigung.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine osteogene Differenzierung grundsätzlich auch bei geringem FCS-Gehalt möglich ist – wenngleich in abgeschwächter Form. Besonders bei Spender 2 zeigte sich zwischen Tag 7 und Tag 14 eine signifikante Zunahme der Kalzifizierung mit einem sehr starken Effekt ($d = 183,54$), was die Zeitabhängigkeit der Differenzierung betont. Zudem konnte an Tag 14 ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Spendern festgestellt werden ($d = 2,61$), was eine interindividuelle Varianz in der Differenzierungsfähigkeit nahelegt. Aufgrund der geringen Spenderzahl ist die Aussagekraft allerdings eingeschränkt. Weitere systematische Untersuchungen mit größerem Kollektiv und unterschiedlichen FCS-Konzentrationen sind notwendig, um die Bedeutung von Serumanteilen für die osteogene Differenzierung valide beurteilen zu können.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Abkürzungsverzeichnis.....	X
Tabelle 2: Geräte.....	48
Tabelle 3: Materialien	49
Tabelle 4: Chemikalien	51
Tabelle 5: Proliferationsmedien	52
Tabelle 6: RPMI-Medien.....	54
Tabelle 7: Antikörper	58
Tabelle 8: Zytokine	59
Tabelle 9: Software.....	59
Tabelle 10: Problem-Analyse und empfohlene Änderungen des Versuchsaufbaus	208
Tabelle 11: Methodenspezifische Überarbeitungsvorschläge.....	209

Danksagung

Zunächst danke ich Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf und Herrn Prof. Dr. rer. nat. Christoph Viktor Suschek herzlich für die Möglichkeit, meine Dissertation im Forschungslabor der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie anfertigen zu dürfen. Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Csaba Mahotka danke ich ebenfalls sehr dafür, die Zweitbetreuung übernommen zu haben.

Lieber Christoph, Dir gilt mein besonderer Dank für die stets ausgezeichnete fachliche und menschliche Betreuung. Die zahlreichen Gespräche und E-Mails, Deine nie endende Geduld (insbesondere bei der Länge der Arbeit), Dein offenes Ohr und die konstruktive Diskussionskultur sowie Deine fortwährende Unterstützung haben diese Arbeit maßgeblich geprägt. Ich hätte mir keinen besseren Doktorvater wünschen können!

Frau Dr. rer. nat. Vera Grotheer, der gesamten Arbeitsgruppe und allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Forschungslabors – insbesondere Frau Jutta Schneider, Frau Christa Wilkens, Frau Sabine Lensing-Höhn und ganz besonders Frau Samira Seghrouchni – danke ich für die lehrreiche und schöne Zusammenarbeit. Die herzliche Betreuung, die große Hilfsbereitschaft sowie die vielen Tipps und Tricks zur Laborarbeit waren von unschätzbarem Wert. Trotz der Einschränkungen während der COVID-19-Pandemie herrschte jederzeit eine sehr gute Arbeitsatmosphäre. Ich durfte vom Wissensschatz und den Erfahrungen jeder und jedes Einzelnen profitieren, durfte alle meine Fragen loswerden und konnte stets auf Hilfe bei großen und kleinen Problemen zählen. Es hat mir sehr viel Spaß gemacht mit Euch!

Mein Dank gilt zudem der Firma punkt05-Statistikberatung für die kompetente statistische Unterstützung. Den beteiligten Zahnarztpraxen danke ich für die Bereitstellung der extrahierten Zähne.

Meinem Partner sowie meiner Familie danke ich von Herzen für die jahrelange, bedingungslose Unterstützung. Ohne Euren Rückhalt wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Ihr seid das Wichtigste für mich.

Abschließend danke ich allen Leserinnen und Lesern, die bis hierhin durchgehalten haben.