Aus der Abteilung Kieferorthopädie
(Prof. Dr. med. dent. P. F. Meyer-Marcotty)
im Zentrum Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Differenzierungspotenzial humaner primärer Parodontalligament-Zellen von Patienten mit gesundem Zahnhalteapparat

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
für Zahnmedizin
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Fabian Maximilian Weeber
aus
Langenfeld

Göttingen 2021

Dekan:	Prof. Dr. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer/in	Prof. Dr. med. K. G. Wiese
Ko-Betreuer/in:	Prof. Dr. mult. T. Meyer

Prüfungskommission

Referent/in	Prof. Dr. med. K. G. Wiese
Ko-Referent/in:	Prof. Dr. mult. T. Meyer
Drittreferent/in:	

Datum der mündlichen Prüfung: 07.06.2022

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Differenzierungspotenzial humaner primärer Parodontalligament-Zellen von Patienten mit gesundem Zahnhalteapparat" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den …….. ……

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis IV
Tabellenverzeichnis V
Abkürzungsverzeichnis VI

1 Einleitung 1

1.1 Das Parodontium: Bestandteile, Strukturen und Zusammensetzung 1
1.1.1 Der Alveolarknochen 1
1.1.2 Das Wurzelzement 2
1.1.3 Die Gingiva 2
1.1.4 Das Parodontalligament (PDL) 3
1.2 Stammzellen 6
1.3 Multipotentes Differenzierungsverhalten von PDL-Zellen 7
1.3.1 Adipogene Differenzierung von PDL-Zellen 7
1.3.2 Chondrogene Differenzierung von PDL-Zellen 7
1.3.3 Osteogene Differenzierung von PDL-Zellen 8
1.4 Aufgabenstellung 9

2 Methoden 11

2.1 Probenmaterial 11
2.2 Zellkultur 12
2.2.1 Standardmedium 12
2.2.2 Kultivieren und Ernten von Zellen 13
2.2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen 13
2.3 Durchflusszytometrie 14
2.3.1 FACS-Analyse 14
2.4 Spezifischer mRNA-Nachweis 15
2.4.1 Isolierung von mRNA 16
2.4.2 Umschreiben von mRNA in cDNA 16
2.4.3 Quantitative Real-Time-PCR 17
2.4.4 Verwendete Primer 19
2.5 Western-Blot 19
2.5.1 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese 20
2.5.2 Proteintransfer auf Membranen 23

2.5.3 Spezifischer Proteinnachweis 24
2.5.4 Aufbewahrung und Strippen der PVDF-Membranen 25
2.6 Immunfluoreszenz 26
2.6.1 Verwendete primäre und sekundäre Antikörper 27
2.7 Färbungen 27
2.7.1 Oil-Red-Färbung 27
2.7.2 Färbung mittels alkalischer Phosphatase 28
2.8 Adipogene Differenzierung 29
2.9 Chondrogene Differenzierung 29
2.9.1 Alginat-Zellkultur 29
2.9.2 Chondrogenes Differenzierungsmedium 30
2.10 Immunzytochemie 31
2.10.1 Fixierung und Einbettung 31
2.10.2 Anfertigung von histologischen Schnitten 32
2.10.3 Entparaffinierung und Rehydrierung 32
2.10.4 HiDef Detection HRP Polymer System für Alginat-Präparate 33
2.10.5 Chromogenfärbung 33
2.11 Osteogene Differenzierung 33

3 Ergebnisse 35

3.1 FACS-Analyse 35
3.2 Adipogene Differenzierung 37
3.2.1 Relatives mRNA-Level von adipogen differenzierten PDL-Zellen 37
3.2.2 Nachweis adipogener Eigenschaft durch Oil-Red-Färbung 38
3.3 Chondrogene Differenzierung 39
3.3.1 Relatives mRNA-Level von chondrogen differenzierten PDL-Zellen 39
3.3.2 Nachweis von SOX9 bei chondrogen differenzierten PDL-Zellen 40
3.3.3 Immunzytochemischer Nachweis von SOX9 42
3.4 Osteogene Differenzierung 43
3.4.1 Relatives mRNA-Level von osteogen differenzierten PDL-Zellen 43
3.4.2 Nachweis von Kollagen-Typ-I und RUNX2 bei osteogen differenzierten PDL-Zellen 44
3.4.3 Immunzytochemischer Nachweis von Proteinen 46
3.4.4 Nachweis der Aktivität der alkalischen Phosphatase 49

4 Diskussion 50

4.1 Klinische Bedeutung **50**

4.2 FACS-Analyse **51**

4.3 Diskussion der adipogenen Differenzierung **51**

4.4 Diskussion der chondrogenen Differenzierung **53**

4.5 Diskussion der osteogenen Differenzierung **54**

5 Zusammenfassung **57**

6 Literaturverzeichnis **59**

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturen des Parodontiums 1
Abbildung 2: Schritte der osteogenen Differenzierung 9
Abbildung 3: Exemplarische Darstellung der FACS-Analyse 36
Abbildung 4: Relatives mRNA-Level adipogen differenzierter PDL-Zellen 37
Abbildung 5: Oil-Red-Färbung 38
Abbildung 6: Relatives mRNA-Level chondrogen differenzierter PDL-Zellen 39
Abbildung 7: Nachweis von SOX9 auf Proteinebene 41
Abbildung 8: Immunzytochemischer Nachweis von SOX9 42
Abbildung 9: Relatives mRNA-Level osteogen differenzierter PDL-Zellen 43
Abbildung 10: Nachweis von COLI und RUNX2 auf Proteinebene 45
Abbildung 11: Immunzytochemischer Nachweis von COLI und Osteonectin (ON) 47
Abbildung 12: Immunzytochemischer Nachweis von Osteopontin (OPN) 48
Abbildung 13: Nachweis der Aktivität der alkalischen Phosphatase (AP) 49

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Standardmedium 12
Tabelle 2: PBS: Phosphatgepufferte Natriumchlorid-Lösung 12
Tabelle 3: Einfriermedium 14
Tabelle 4: Verwendete Antikörper 15
Tabelle 5: Mastermix für qRT-PCR 17
Tabelle 6: Einstellungen am Realplex 18
Tabelle 7: Temperaturprotokoll der qRT-PCR 18
Tabelle 8: Primer für PCR 19
Tabelle 9: Trenngelpuffer 20
Tabelle 10: Sammelgelpuffer 21
Tabelle 11: Zusammensetzung Sammelgel 21
Tabelle 12: Zusammensetzung Trenngel 21
Tabelle 13: 3x SDS-Probenpuffer 22
Tabelle 14: 5x Laufpuffer 22
Tabelle 15: 1x Transferpuffer 23
Tabelle 16: Coomassie-blau-Färbelösung 23
Tabelle 17: Entfärbelösung 24
Tabelle 18: Primäre Antikörper für Immunzytochemie 27
Tabelle 19: Sekundäre Antikörper für Immunzytochemie 27
Tabelle 20: Fixierlösung zur Färbung der alkalischen Phosphatase 29
Tabelle 21: Alkalifarbstoffgemisch 29
Tabelle 22: Chondrogenes Differenzierungsmedium 31
Tabelle 23: Fixierungs- und Einbettungsprotokoll 32
Tabelle 24: Entparaffinierungs- und Rehydrierungsprotokoll 32
Tabelle 25: Zusammensetzung osteogenes Differenzierungsmedium 34
Tabelle 26: Prozentangaben PE-positiver Zellen 35

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
AP	alkalische Phophatase
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ß2M	ß2-Mikroglobulin
BSA	Bovines Serum Albumin
BSP	Bone-Sialoprotein
C/EBP-β	*CCAAT/enhancer binding protein-β*
CD	*cluster of differentiation*
HRP	*horseraddish peroxidase*
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	*complementary DNA*
COLI	Kollagen-Typ-I
COLII	Kollagen-Typ-II
COX	Cyclooxygenase
CPC	chondrogene Progenitorzelle
CT	*cycle threshold*
DAPI	4´,6-Diamidin-2-phenylindiol
DMEM	Dulbecco´s modifiziertes Eagle-Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	*fluorescence-activated cell sorting*
FCS	fetales Kälberserum
GAG	Glykosaminoglykane
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HMG	*high-mobility group*
hTERT	humane Telomerase Reverse Transkriptase
IBMX	Isobutylmethylxanthin
LPL	Lipoproteinlipase

mRNA	*messenger RNA*
ON	Osteonectin
OPN	Osteopontin
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PBS	Phospatgepufferte Natriumchlorid-Lösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-PCR
PDL	Parodontalligament
PG	Proteoglykane
PGE2	Prostaglandin
PPAR-γ	*peroxisome proliferator-activated receptor-γ*
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RUNX2	*Runt-related transcription factor 2*
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SOX9	*SRY (sex-determining region Y)-box 9*
TBS-T	*Tris-buffered saline and tween 20*
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin
TGF-β	*transforming-growth factor β*

1 Einleitung

1.1 Das Parodontium: Bestandteile, Strukturen und Zusammensetzung

Das Parodontium besteht aus vier Gewebsanteilen, die zusammen eine funktionelle Einheit darstellen und den Zahn in der Alveole des Kieferknochens verankern. Dabei ist zwischen den zwei Hartgeweben, Alveolarknochen und Wurzelzement, und den zwei Weichgeweben, Parodontalligament (PDL) und Gingiva, zu unterscheiden.

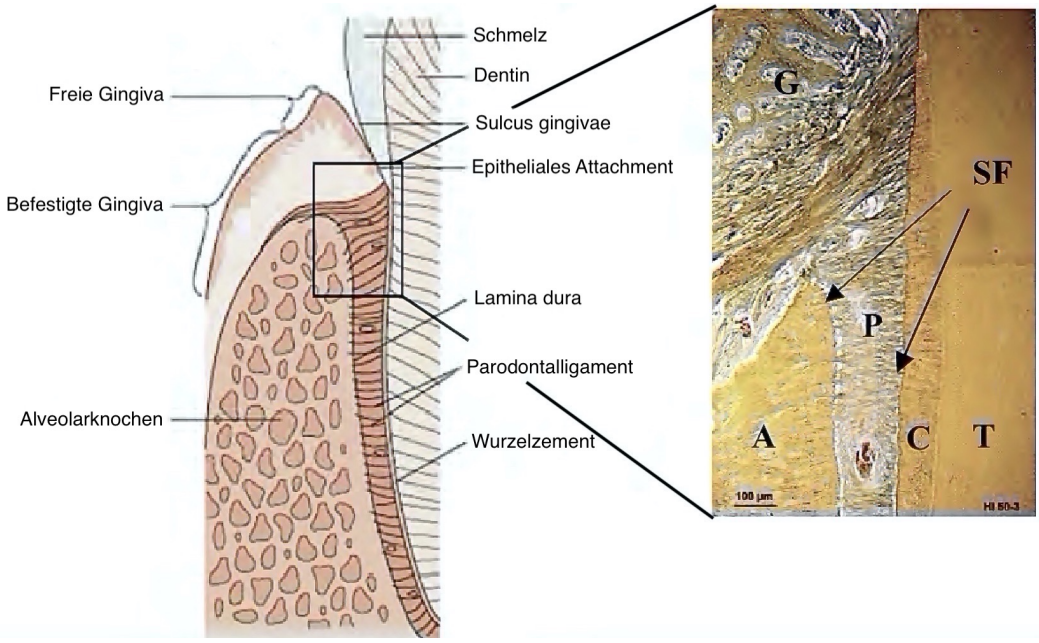


Abbildung 1: Strukturen des Parodontiums (modifiziert nach Barczyk et al. (2013)). A = Alveolarknochen, C = Wurzelzement, G = Gingiva, P = Parodontalligament, SF = Sharpey-Fasern, T = Zahn. Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von John Wiley & Sons.

1.1.1 Der Alveolarknochen

Als Alveolarknochen wird der Teil des Kieferknochens bezeichnet, der die Zähne in den von ihm gebildeten Zahnfächern (Alveolen) aufnimmt und über Sharpey-Fasern verankert. Anatomisch besteht der Alveolarknochen aus einer äußeren dünnen, glatten und kompakten Knochenwand (Substantia corticalis), die die Alveole begrenzt und von den Knochenbälkchen des sich anschließenden spongiösem Knochens gestützt wird (Substantia spongiosa). Die alveoläre Knochengewebskompakta (Lamina cribriformis) ist eine feste,

stark durchlöcherte Rindenschicht, die von gefäßreichen Volkmannschen Kanälen durchzogen ist. In dieser Schicht sind die eingelagerten Bündel der Sharpey-Fasern erkennbar. Neben der Zahnverankerung kommt dem Alveolarknochen bei der Aufnahme und Verteilung der Kaukräfte eine wichtige Rolle zu.

1.1.2 Das Wurzelzement

Im Bereich der Zahnwurzel ist das Dentin mit einer dem Knochengewebe sehr ähnlichen Schicht, dem Wurzelzement, überzogen. In ihm sind die Sharpey-Fasern verankert, wodurch die bindegewebige Befestigung der Zähne im Alveolarfach gewährleistet wird. Das Wurzelzement ist folglich sowohl Bestandteil des Zahnhalteapparats als auch des Zahnes und kann zeitlebens nachgebildet werden, solange ein funktionsfähiges Desmodont besteht. Hauptbestandteile des Zements sind Zementoblasten, Zementozyten, Kollagen, Fibroblasten und extrazelluläre Matrix.

1.1.3 Die Gingiva

Die Gingiva stellt den äußersten Bestandteil des Zahnhalteapparats dar und ist der zu ihm gehörende Teil der Mundschleimhaut. Sie überzieht den Alveolarknochen und die interdentalen Knochensepten, umschließt zudem den Zahnhals und trägt zur Verankerung der Zähne und der Stabilisierung ihrer Position im Alveolarknochen bei.
Klinisch wird die freie von der befestigten Gingiva unterschieden. Der schmale Gewebsstreifen oberhalb des knöchernen Alveolarrandes wird als befestigte Gingiva bezeichnet, an den sich die freie Gingiva anschließt und girlandenartig um die Kontur der Zahnhälse zieht. Sie ist frei beweglich. Das dem Zahn zugewandte Sulkusepithel geht apikal am Sulkusboden in das Saumepithel über, welches den Epithelansatz am Zahn darstellt. Histologisch handelt es sich bei den beiden Epithelien um ein mehrschichtig, unverhorntes Plattenepithel, welche nicht mit darunter liegendem Bindegewebe verzahnt sind. Das Saumepithel unterscheidet sich dennoch deutlich von dem Sulkusepithel, da die Zellen des Saumepithels durch eine innere Basalmembran und eine Basallamina begrenzt werden.
Die Durchlässigkeit des Epithels sorgt für einen Abwehrmechanismus, da zum einen ein nach außen gerichteter Leukozytenfluss eindringende Bakterien abtötet und zum anderen

als Antigen wirksame Substanzen das Saumepithel durchdringen und eine Antikörperreaktion auslösen können. Neben diesem Abwehrmechanismus kommt dem Saumepithel auch eine hohe Regenerationsfähigkeit zugute.

Die befestigte Gingiva (Gingiva propria) ist mit dem darunter liegenden Bindegewebe verzahnt und unbeweglich am Alveolarknochen verwachsen. Charakteristisch ist eine blassrosa und matt gestippelte Oberfläche. Im Anschluss an die befestigte Gingiva folgt die mukogingivale Grenzlinie, die eine Abgrenzung zwischen der unverschieblichen Gingiva propria und der beweglichen Alveolarschleimhaut (Mucosa vestibularis) darstellt. Histologisch setzt sich das geringfügig verhornte Plattenepithel von innen nach außen aus Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum und Stratum corneum zusammen (Schroeder und Theilade 1966).

1.1.4 Das Parodontalligament (PDL)

Das PDL ist ein derbes, faserreiches Bindegewebe zwischen Zahnwurzeloberfläche und den Innenwänden der Alveolen mit einer Breite von etwa 0,2 mm. Es besteht hauptsächlich aus unterschiedlichen Kollagen-Faserbündeln (Sharpey-Fasern), die den Zahn federnd in der Alveole befestigen sowie Varianten des elastischen Fasersystems (Oxytalanfasern). Oxytalanfasern (elastische Fasern) inserieren nur im Wurzelzement und enden im Bereich des apikalen Gefäßkomplexes. Man nimmt an, dass sie den Blutdurchfluss im Parodontalspalt bei funktioneller Belastung des Zahnes regulieren (Schroeder 2000). Die Sharpey-Fasern inserieren im Bindegewebe der Gingiva, im Periost der Alveolen sowie im Wurzelzement. Zwischen den kollagenen und oxytalanen Faserbündeln verlaufen Blut- und Lymphgefäße sowie sensible Nerven. Die Blutgefäße bilden zum Teil im zervikalen Anteil des PDLs arteriovenöse Knäuelanastomosen (Wedlsche Gefäßknäuel), denen bei Zahnauslenkung eine Pufferungsfunktion zugesagt wird. Vermittler des außerordentlich feinen Tastgefühls des Zahnes sind die Ruffini-Körperchen, die mit der Kaumuskulatur einen Reflexbogen bilden (Lehmann und Wenz 2011). Dieser dient dem Schutz der Zähne und Zahnhalteapparat, da bei plötzlichem Aufbeißen auf einen harten Gegenstand die Kontraktion der Kaumuskulatur aufgehoben wird.
Bei den im PDL vorkommenden Zellen handelt es sich um Fibroblasten, Osteo- und Zementoprogenitorzellen, Osteoblasten, Osteoklasten, Zementoblasten, Epithelzellen und

Leukozyten (Mai 1995). Die Epithelzellen des PDLs sind epitheliale Zellüberbleibsel der sogenannten Hertwig´schen Epithelscheide; sie werden als MER (Malassez-Epithelreste) bezeichnet (Rincon et al. 2006). Zahlenmäßig bilden die Fibroblasten die größte Population. Morphologisch charakteristisch ist ihre spindelförmige Gestalt mit einem länglichen, ovalen Zellkern und zahlreichen länglichen zytoplasmatischen Fortsätzen. Die Zellpopulationen des PDLs übernehmen eine Reihe physiologischer Prozesse und beteiligen sich an der Bildung und Ernährung des Wurzelzements und des Alveolarknochens. Die von Fibroblasten gebildeten Kollagenfasern sind zu 80% dem Kollagen-Typ-I (COLI) zugeordnet, wobei die restlichen 20% dem Typ-III-Kollagen angehören. Sowohl an der Proteinsynthese und Sekretion der Grundsubstanz der extrazellulären Matrix (EZM), besonders von Kollagen-Typ-I, als auch an dem enzymatischen Abbau des Kollagens sind größtenteils Fibroblasten beteiligt (Melcher und Chan 1981). Die Kollagensynthese findet im PDL viermal so schnell wie in der Dermis und doppelt so schnell wie in der Gingiva statt (Radlanski 2011). Durch kaufunktionelle Belastung des Zahnes wird sie stimuliert und so der parodontale Faserapparat an neue funktionelle Belastungen angepasst (Hellwig et al. 2013). Somit ist der Faserapparat des Parodontiums einer dauerhaften Erneuerung unterworfen und keinesfalls ein stillstehendes System.

Die Grundsubstanz der EZM des PDL besteht, wie jede andere des menschlichen Körpers, aus Glykosaminoglykanen (GAG), Proteoglykanen (PG) und Glykoproteinen. Moleküle, in denen bis zu 100 Kohlenhydratgruppen, GAG, an einen Proteinkern gebunden sind, werden als PG bezeichnet. Zu den häufigsten GAG zählen Hyaluronat, Chondroitinsulfat, Heparansulfat, Keratansulfat und Dermatansulfat. Sie besitzen den größten Anteil an der EZM und sorgen durch ihre Fähigkeit zur Wasserbindung für eine hohe Elastizität in Geweben.

Für das PDL typische PG sind Decorin, Biglycan, Versican und Lumican (Foster et al. 2013). Decorin ist ein kollagenbindendes Protein, welches in den Fibroblasten gebildet wird und wichtig für die Synthese von Kollagenfasern ist. Immunhistochemische Untersuchungen von Häkkinen et al. (2000) zeigten im Jahre 2000, dass neben Decorin auch Biglycan im PDL vorkommt. Die Genexpression von Biglycan ist im PDL wesentlich stärker als im Gingivagewebe. Kähäri et al. konnten zeigen, dass der transformierende Wachstumsfaktor (*transforming-growth factor β,* TGF-β) die Expression der PG Biglycan

und Versican einerseits hochreguliert, andererseits die Expression von Decorin herunterreguliert (Kähäri et al. 1991). Die Funktionen von Biglycan konnte jedoch noch nicht vollständig geklärt werden.

Versican ist als hochmolekulares Chondroitinsulfat-PG und in der Tiefe des PDLs zwischen den Kollagenfaserbündeln lokalisiert (Larjava et al. 1992; Häkkinen et al. 1993). Es ist in der Lage, Hyaluronsäure zu binden und so hygroskopisch ein großes Volumen einzunehmen (Zimmermann und Ruoslahti 1989). Das Molekül hat also die Funktion, große Mengen Wasser binden zu können. Durch diese Volumenzunahme kann eine hohe Druckelastizität im gesamten PDL erreicht werden (Wight 2002).

Worapamorn et al. (2000) untersuchten 2000 das PDL von Ratten und fanden die Transmembranproteine Syndecan 1, 2 und 3 sowie Glypican und Betaglykan. Diese PG nehmen Einfluss auf die Wachstumsvorgänge in Zellen, da sie eine Bindungsstelle für Wachstumsfaktoren bieten. Sie spielen eine entscheidende Rolle bei Reparatur- und Regenerationsvorgängen.

Es gibt außer Kollagen noch weitere Glykoproteine in der EZM. Sie sorgen für den Kontakt zwischen Komponenten der EZM und stellen so Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte her. Osteonectin (ON) ist in der Lage an Kalzium, COLI und Hydroxylapatit zu binden und so die Osteoidmineralisation anzustoßen (Termine et al. 1981). Das Glykoprotein Osteopontin (OPN) kann ebenfalls an Hydroxylapatit binden, ist maßgeblich an dem Mineralisationsprozess und einigen wichtigen Immunprozessen beteiligt (Lund et al. 2009). ON und OPN gelten als klassische osteogene Marker, dessen Expression von RUNX2 reguliert wird.

Das Zelladhäsionsprotein Fibronektin des Bindegewebes fungiert als Brücke zwischen Integrinen und Kollagenen und verankert die Zellen in der EZM. In der Basalmembran übernimmt das Laminin dieselbe Funktion. Es agiert als Ankerprotein, das die Zelle mit der Basallamina und diese nunmehr mit der EZM verbindet. Integrine gewährleisten die Adhäsion von Zellen an Proteine der EZM und werden daher auch als Adhäsionsmoleküle bezeichnet. Sie sind an der Oberfläche von Fibroblasten, Osteoblasten und weiteren Zellen des PDLs lokalisiert (Steffensen et al. 1992).

1.2 Stammzellen

Unter dem Begriff Stammzellen werden Zellen zusammengefasst, die noch nicht ausdifferenziert sind. In ihrer endgültigen Funktion im Körper sind sie folglich noch nicht festgelegt. Sie haben jedoch die Fähigkeit sich zu teilen und zu einem bestimmten Zelltyp zu entwickeln. So entstehen aus diesen unspezialisierten Vorläuferzellen im Zuge der embryonalen Entwicklung spezialisierte Zelltypen. Man kann Stammzellen zum einen nach ihrem Zelltyp, Differenzierungspotenzial und zum anderen nach ihrem ontogenetischen Alter klassifizieren. Bei der Klassifizierung des Zelltyps kann es sich entweder um hämatopoetische, mesenchymale, epitheliale oder neuronale Stammzellen handeln. Das Differenzierungspotenzial einer Stammzelle ist umso größer, je früher sie in der Embryonalentwicklung entsteht. In einem kurzen Zeitraum von drei Tagen nach der Befruchtung der Zygote werden die Blastomere bis zum Erreichen des 8-Zell-Stadiums als totipotent bezeichnet. Aus ihnen kann sich ein kompletter Organismus entwickeln. Pluripotente Stammzellen können sich in alle Körperzellen differenzieren und unendlich oft teilen (Morsczeck et al. 2007). Anders als bei totipotenten Stammzellen kann aus ihnen aber kein kompletter Organismus entstehen. Multipotente Stammzellen sind zwar in der Lage, unterschiedliche Zelltypen hervorzubringen, diese sind jedoch auf eine bestimmte Gewebeart festgelegt. Bei den hämatopoetischen Stammzellen handelt es sich um multipotente Stammzellen. Sie bilden alle Bestandteile des Blutes wie Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten. Oligopotente und unipotente Stammzellen können sich nur in wenige oder einen einzigen Zelltyp ausdifferenzieren.

Zusätzlich werden Stammzellen hinsichtlich ihres ontogenetischen Alters unterschieden. Embryonale Stammzellen sind pluripotent und daher für die Stammzellforschung von besonderer Bedeutung. Durch diese Pluripotenz wird gewährleistet, dass sich Derivate aller drei Keimblätter entwickeln können. Adulte Stammzellen hingegen sind multipotent. Sie sind theoretisch in jedem Gewebe zu finden und für die lebenslange Erneuerung von stark beanspruchten Geweben und Organen zuständig. Ebenso wie bei den embryonalen Stammzellen kann ihre Differenzierung mittels bestimmter Wachstumsfaktoren in vitro gesteuert werden (Chamberlain et al. 2007).

1.3 Multipotentes Differenzierungsverhalten von PDL-Zellen

1.3.1 Adipogene Differenzierung von PDL-Zellen

Mittels eines adipogenen Differenzierungsmediums lassen sich die PDL-Zellen in eine adipogene Richtung lenken. Bestandteile des Mediums sind Dexamethason, Insulin und Isobutylmethylxanthin (IBMX). Dexamethason aktiviert dabei den Transkriptionsfaktor C/EBP-β (*CCAAT/enhancer binding protein-β*), während IBMX die Phosphodiesterase inhibiert, was sowohl zu einer Erhöhung des intrazellulären cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) führt als auch zur Aktivierung von C/EBP-δ. C/EBP-β und C/EBP-δ aktivieren C/EBP-α und PPAR-γ (*peroxisome proliferator-activated receptor-γ*). C/EBP-α und PPAR-γ wirken sich auf das Wachstum der Präadipozyten aus und sind damit Voraussetzung für die Differenzierung zu reifen Adipozyten. Insulin bindet an seinen Rezeptor und induziert damit die Aufnahme von Glukose in die Zelle (Scott et al. 2011). Charakteristisch für die reifen Adipozyten sind ihre zytoplasmatischen Lipidvakuolen um den Zellkern, die sich bereits nach 10 Tagen durch eine Oil-Red-Färbung nachweisen lassen. Um das Genexpressionsmuster typischer adipogener Marker zu erfassen, bedarf es jedoch einer Differenzierungszeit von mindestens 21 Tagen (Sekiya et al. 2004).

1.3.2 Chondrogene Differenzierung von PDL-Zellen

Die Entstehung des Knorpels, auch Chondrogenese genannt, ist ein komplexer Prozess. Dem Transkriptionsfaktor SOX9 (*SRY [sex-determining region Y]-box 9*) wird bei der chondrogenen Differenzierung eine Schlüsselrolle zugeschrieben (Bi et al. 1999). Er gehört zu der Gruppe der SOX-Transkriptionsfaktoren (*SRY-related high-mobility group [HMG]- Box*), die zur (HMG)-Box-Familie zählt (Wegner 1999). Die Mitglieder der SOX-Familie, die die Expression von Kollagen-Typ-II (COLII) und Aggrecan regulieren (Wang et al. 2014), besitzen eine als HMG-Box bezeichnete DNA-bindende Domäne.
Aggrecan ist das am häufigsten vorkommende PG im Knorpel (Sekiya et al. 2000). Die SOX9-Expression wird von dem synthetischen Glukokortikoid Dexamethason verstärkt (Sekiya et al. 2001). Ascorbinsäure, L-Prolin und Na-Pyruvat wirken sich zusätzlich unterstützend auf die Chondrogenese aus. Im Vergleich zur 2D-Kultur erwies sich die 3D-Zellkultur bei der chondrogenen Differenzierung als erfolgreicher und effizienter.

1.3.3 Osteogene Differenzierung von PDL-Zellen

Osteoblasten werden in mehreren Reifungsprozessen aus mesenchymalen Stammzellen gebildet. In der Proliferationsphase wird hauptsächlich die aus COLI bestehende EZM gebildet. Die hohe Expression der alkalischen Phosphatase (AP) und von Matrixproteinen, wie z.B. Bone-Sialoprotein (BSP) und das nicht-kollagene Glykoprotein ON, sind charakteristisch für die zweite Phase, auch Matrix-Entwicklung genannt (Reichert et al. 1992). Osteocalcin wird von reifen Osteoblasten in der dritten Phase exprimiert. Die reifen Osteoblasten differenzieren entweder zu Osteozyten oder gehen in Apoptose (Ringe 2006).
Das zytoplasmatische Enzym alkalische Phosphatase kommt in verschiedenen Geweben, überwiegend aber in Leber, Knochen, Plazenta und Dünndarm, vor (Golub et al. 1992). Bis zum heutigen Stand der Wissenschaft ist seine Rolle im Metabolismus noch nicht vollständig aufgeklärt. Im Knochen wird die AP von den Osteoblasten synthetisiert. Das membrangebundene Glykoprotein spielt eine wichtige Rolle bei der Mineralisation der extrazellulären Knochenmatrix und ist heutzutage ein wichtiger Parameter bei der osteogenen Differenzierung (Owen et al. 1990). Die Expression von AP findet in der Phase der Matrixproduktion statt und steigt an, wenn der Knochen wächst oder umgebaut wird (Golub et al. 1992).
Bei der osteogenen Differenzierung kommt dem Transkriptionsfaktor RUNX2 (*Runt-related transcription factor 2*) eine Schlüsselrolle zu (Ducy et al. 1997; Ducy et al. 1999; Komori 2006). Mit den Transkriptionsfaktoren RUNX1 und RUNX3 zusammen zählt er zur „*runt-domain*“-Genfamilie. Durch ihn werden ON, OPN, Osteocalcin, BSP und COLI hochreguliert. RUNX2 steht unter maßgeblichem Einfluss von Co-Aktivatoren, Co-Repressoren, anderen Transkriptionsfaktoren und extrazellulären Faktoren, die sich auf seine Genexpression auswirken (Schroeder und Jensen 2005).
OPN wurde nicht nur in stark mineralisiertem Gewebe gefunden, sondern auch in anderen Geweben, wie den Nieren und arteriellen Muskelzellen, was darauf schließen lässt, dass es noch weitere wichtige Funktionen erfüllt (Denhardt und Guo 1993). Präosteoblasten, Osteoblasten und Osteozyten bilden OPN, das in das Osteoid sezerniert und dann in den Knochen integriert wird (Butler 1989; Loveridge 1999). OPN vermittelt zudem die Verankerung der Osteoklasten an der noch nicht mineralisierten Knochenmatrix. Bei der osteogenen Differenzierung wird die Genexpression von OPN gesteigert (Frank et al. 2002). Mithilfe eines osteogenen Differenzierungsmediums werden die undifferenzierten

Zellen stimuliert und so in die osteogene Richtung gelenkt. Durch Zugabe von Dexamethason wird die Proliferation der Zellen inhibiert und die osteogene Differenzierung induziert (Beresford et al. 1993). Als zusätzliche Phosphatquelle dient Glycerol-2-Phosphat. Im Jahre 2006 zeigte Ringe eine gesteigerte Kollagensynthese durch 2-Phospho-L-Ascorbinsäure (Ringe 2006). Die AP-Aktivität sowie die intestinale Ca^{2+}-Aufnahme und dessen Einbau in Knochengewebe wird durch das Hormon Vitamin D_3 reguliert (Kerler 2014).

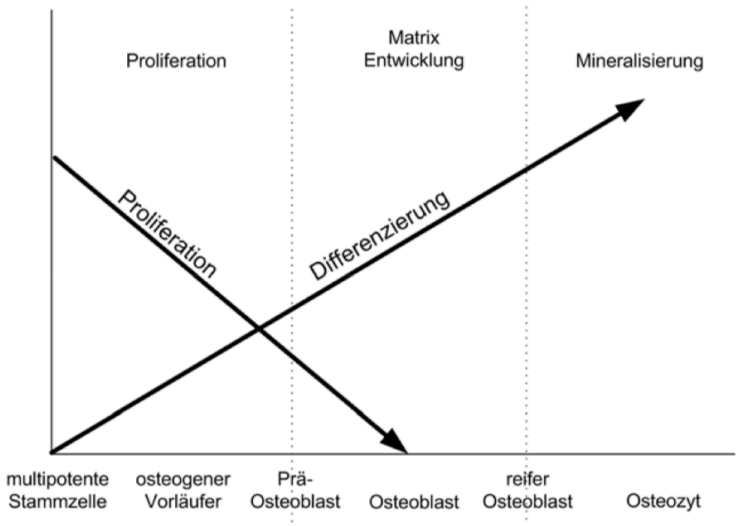


Abbildung 2: Schritte der osteogenen Differenzierung (modifiziert nach Owen et al. (1990)). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von John Wiley & Sons.

1.4 Aufgabenstellung

Die vorliegende Arbeit soll Aufschluss über die Differenzierungsbereitschaft juveniler und adulter PDL-Zellen geben. Es liegen dazu jeweils drei biologische Replikate von PDL-Zellen juveniler und adulter Patienten im Alter von 12 und ca. 30 Jahren vor. Der Einfachheit halber wird im Weiteren nur noch von juvenilen und adulten PDL-Zellen gesprochen. Dass es sich bei dem Parodontium um ein dynamisches System handelt, welches ständiger Erneuerung unterworfen ist, wurde bereits ausführlich erklärt. Moxham und Evans zeigten 1995 auf, dass das Parodontium strukturellen Alterungsprozessen unterworfen ist. Es ist also zu erwarten, dass mit diesem Vergleich unterschiedliche Expressionsmuster gezeigt werden können. Das Ziel ist es, die etablierte Zellkultur der PDL-Zellen sowohl adipogen und chondrogen als auch osteogen zu differenzieren und anhand dieser Differenzierungen mithilfe von qRT-PCR und Western-Blot das Gen- und Proteinexpressionsmuster juveniler und adulter PDL-Zellen zu beschreiben. In diesem Kontext soll auch der

immunzytochemische Nachweis des Transkriptionsfaktors SOX9, der Nachweis von Proteinen durch Immunfluoreszenz und der Aktivität der alkalischen Phosphatase sowie die Färbung von Lipiden Aufschluss über eine mögliche effektive Differenzierung geben und damit den mesenchymalen Stammzellcharakter von PDL-Zellen zeigen. Nach vorliegendem Kenntnisstand sind noch keine genauen Untersuchungen zum direkten Vergleich von juvenilen und adulten PDL-Zellen in dieser Form vorgenommen worden.

2 Methoden

2.1 Probenmaterial

Die in dieser Arbeit untersuchten humanen Parodontalligament-Zellen (PDL-Zellen) stammen von extrahierten Zähnen. Alle Patienten im Alter von 12 und ca. 30 Jahren wurden vor dem Eingriff über die geplante Gewebeuntersuchung informiert (Ethik-Antrag 16/06/09) und willigten schriftlich ein. Alle Patienten befanden sich in zahnärztlicher Behandlung der Universitätsmedizin Göttingen (UMG), wo die Extraktionen in der Klinik für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführt wurden.

Die weitere notwendige Aufarbeitung der Gewebe wurde bereits in einer vorherigen Arbeit ausführlich beschrieben (Bernhardt 2018). Zunächst werden alle extrahierten Zähne mit PBS und Braunol gespült, um einer Kontamination mit Pilzen und Bakterien entgegenzuwirken. Anschließend wurde mit einem scharfen Einmal-Skalpell das parodontale Ligament (PDL) von der Wurzeloberfläche des Zahns entfernt. Das so gewonnene PDL-Gewebe wurde in eine 6-Well-Platte mit Dulbecco's modifiziertem Eagle-Medium (DMEM) und 20% fetalem Kälberserum (FCS) überführt und mit einem Deckgläschen bedeckt und bei 37°C sowie 5% CO_2 und einer Luftfeuchtigkeit von 95% im Wärmeschrank für 10 Tage inkubiert. Nachdem die Zellen aus dem Gewebe ausgewandert waren, wurden die Deckgläschen umgedreht und das Medium gewechselt. Nach einigen Tagen konnten die Zellen in Kultur-Flaschen überführt werden. Die weiteren experimentellen Untersuchungen setzen eine Immortalisierung der Zellen voraus.

Das Genom der Zellen wurde mit einer aktiven Version der humanen Telomerase Reverse Transkriptase (hTERT) versetzt, um zu gewährleisten, dass die Zellen ohne signifikante Zellwachstumsminderung über 200 Passagen überstehen können. Zur Selektion erfolgreich transfizierter Zellen wurde zudem eine Antibiotikaresistenz gegen Blasticidin eingebracht.

2.2 Zellkultur

Alle Arbeiten mit lebenden Zellen wurden unter sterilen Bedingungen an einer Zellbank durchgeführt. Vor Beginn und nach Beendigung der Arbeit wurden alle Oberflächen gründlich mit 70% Ethanol gereinigt.

2.2.1 Standardmedium

Für die Zellkultur wurde Dulbecco's modifiziertes Eagle-Medium (DMEM + Glutamax, [Gibco, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland]) als Standardmedium eingesetzt (Tabelle 1). Um einer bakteriellen Kontamination entgegenzuwirken, wurde das Antibiotikum Gentamycin zugesetzt. Zusätzlich wurde dem Medium 10% fetales Kälberserum (FCS) zugesetzt. Das Medium wurde alle drei bis vier Tage gewechselt, damit den Zellen immer genügend Nährstoffe zur Vermehrung zur Verfügung standen. Die Inkubation der Zellen erfolgte in einem Wärmeschrank bei 37°C sowie 5% CO_2 und einer Luftfeuchtigkeit von 95%.

Tabelle 1: Standardmedium

Menge	Substanz
500 ml	DMEM + Glutamax
50 ml	Fetales Kälberserum (FCS)
500 µl	Gentamycin (50 mg/ml)

Tabelle 2: PBS: Phosphatgepufferte Natriumchlorid-Lösung

Menge	Substanz
137 mM	Natriumchlorid
2,7 mM	Kaliumchlorid
12 mM	Gesamt-Phosphat
	pH 7,4

2.2.2 Kultivieren und Ernten von Zellen

Die Konfluenz wurde regelmäßig unter dem Mikroskop kontrolliert. Um zu verhindern, dass die Zellen innerhalb der Kultur-Flasche entarten, wurden die Zellkulturen bei einer Konfluenz von 80% geteilt. Das Kulturmedium wurde hierfür verworfen und die Flaschen zweimal sorgfältig mit PBS (Tabelle 2) gespült, um mögliche Proteine des Kulturmediums zu entfernen, da diese das zur Ablösung der Zellen vom Flaschenboden verwendete Trypsin inaktivieren würden. Die Trypsinierung der Zellen mit 2 ml Trypsin erfolgte für maximal 5 min im Wärmeschrank. Durch leichtes Klopfen auf die Seiten der Flaschen lösten sich die Zellen vom Boden. Nach mikroskopischer Kontrolle wurden die abgelösten, in Trypsin-haltigem Medium befindlichen Zellen in 2 ml Standardmedium pro Flasche gegeben, um den Verdauungsvorgang zu stoppen. Die Flaschen wurden noch zwei- bis dreimal mit jeweils 2 ml Medium gespült, um möglichst alle Zellen zu überführen. Nach 10 min Zentrifugation bei 300 g wurde der Medium-Trypsin-Überstand abgeschüttet und das Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert. Die Anzahl der lebenden Zellen wurde mit einem Zellometer optisch und durch statistische Hochrechnung ermittelt, sodass erneut wieder eine entsprechende Zellzahl neu kultiviert oder für anschließende Untersuchungen eingesetzt werden konnte.

2.2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Bei längeren Pausen zwischen den Untersuchungen wurden die Zellen aus der Kultur genommen, um das Passagieren zu umgehen. Dazu wurden die Zellen bei -196°C in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach der oben beschriebenen Zellernte wurden die Zellen in Einfriermedium resuspendiert (Tabelle 3), welches Dimethylsulfoxid (DMSO) enthielt, und anschließend in ein Cryoröhrchen überführt. Pro Cryoröhrchen konnten bis zu 1×10^6 Zellen in 1 ml Einfriermedium eingefroren werden (Tabelle 3). Die Zellsuspension wurde durch eine Einfrierbox, die mit 100% Isopropanol befüllt war, um 1°C/min im Kühlschrank auf -82°C langsam runtergekühlt. Nach 24 h wurden die Zellen in einen Behälter mit flüssigem Stickstoff bei -196°C gestellt.

Bei einem raschen Temperaturanstieg im 37°C warmen Wasserbad beim Auftauen der Zellen, musste berücksichtigt werden, dass entstehende Kristalle die Zellen zerstören

würden. Die Zellen wurden mit Einfriermedium in eine neue Kulturflasche mit 10 ml Standardmedium gegeben. Ein essentieller Schritt war das Wechseln des Mediums nach 24 h, um tote Zellen und Zelltrümmer sowie DMSO zu entfernen.

Tabelle 3: Einfriermedium

Anteil	Substanz
10%	DMSO
20%	FCS
70%	DMEM + Glutamax

2.3 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie wird zur Untersuchung von Zellsuspensionen angewandt. Dadurch ist es möglich, Zellen in verschiedene Populationen zu trennen und zu sortieren. Diese Methode wird z.B. für einen Nachweis von spezifischen Zelloberflächenantigenen und intrazellulären Antigenen eingesetzt. Der Nachweis erfolgt mithilfe fluoreszierender Antikörper (AK). In einem Analyse-Gerät wird jede Zelle separat an einem Laser vorbeigeleitet und gebundene Antikörper emittieren je nach eingesetzter Wellenlänge fluoreszierendes Licht. Die Emission erfolgt abhängig vom eingesetzten Farbstoff. In den vorliegenden Analysen wurde der Farbstoff Phycoerythrin (PE) eingesetzt, der bei 578 nm Wellenlänge sein Emissions-Maximum besitzt.

2.3.1 FACS-Analyse

Zur Vorbereitung wurden die Zellen wie anfangs beschrieben zunächst geerntet und in einer Konzentration von 1 x 10^5 bis 3 x 10^5 in 100 µl PBS auf die Analyseröhrchen aufgeteilt. In einem weiteren Schritt wurden 2 µl Blockierungsreagenz (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland) hinzugegeben und für 5 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungen zu minimieren und freie Zelloberflächen abzudecken. Zum Beenden des Blockierungschritts wurden jeweils 2 ml PBS zu jeder Probe hinzugegeben und bei 200 g für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 100 µl PBS resuspendiert. Anschließend wurden spezifische, PE-gekoppelte Antikörper zu der Zellsuspension gegeben. Um grundlegend

zu untersuchen, ob PDL-Zellen mesenchymale Stammzelleigenschaften aufweisen, wurden Antikörper gegen folgende Oberflächenmarker eingesetzt: CD73, CD90, CD105, CD146 und CD166 (Tabelle 4). Eine Negativkontrolle (Zellsuspension ohne Antikörper) und eine Iso-Kontrolle (nicht bindende, aber Farbstoff-gekoppelte Antikörper) dienten zur Kalibrierung der Nachweisgrenze. Um eine Verunreinigung der Zelllinie und unspezifische Antikörperbindungen auszuschließen, werden zwei hämatopoetische Kontrollen (CD34 und CD45) benutzt. Der Antikörper wurde in einer Konzentration von 1:50 (2 µl Antikörper in 100 µl Zellsuspension) hinzugeben und für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Ein optimales Probenvolumen von 400 µl wurde durch die Resuspendierung des Zellpellets in einer entsprechenden Menge PBS erreicht.

Tabelle 4: Verwendete Antikörper

Name	Farbstoff	Herkunft	Menge	Firma
CD 73	PE	Maus	2 µl	BD Pharmingen
CD 90	PE	Maus	2 µl	Biozol Diagnostica Vertrieb
CD 105	PE	Maus	2 µl	Biozol Diagnostica Vertrieb
CD 146	PE	Maus	2 µl	BD Pharmingen
CD 166	PE	Maus	2 µl	BD Pharmingen
CD 34	PE	Maus	2 µl	BD Pharmingen
CD 45	PE	Maus	2 µl	Miltenyi Biotec

2.4 Spezifischer mRNA-Nachweis

Durch Transkriptionsfaktoren gesteuert wird über die im Zellkern synthetisierte mRNA die genetische Information vom Zellkern zu den extranukleären Ribosomen transportiert, an denen die Translation stattfindet. Über einen spezifischen Nachweis der mRNA können so Rückschlüsse auf die Expression der codierten Proteine geschlossen werden, sowohl qualitativ als auch quantitativ. Nach vorbereitenden Maßnahmen wie dem Isolieren der RNA aus den Zellen und dem anschließenden Umschreiben in cDNA wird durch eine Polymerase-Kettenreaktion (englisch: *polymerase chain reaction*, PCR) die zu untersuchende Sequenz vervielfältigt. Ein Nachweis über eine erfolgreiche Amplifizierung kann entweder quantitativ (qRT) mithilfe bestimmter fluoreszierender Farbstoffe (*real-time*) oder qualitativ mit einer anschließenden Gelelektrophorese erbracht werden.

2.4.1 Isolierung von mRNA

Die Isolation der RNA erfolgte mithilfe des peqGOLD Total RNA Kit (Erlangen, Deutschland). Im ersten Schritt wurden die Zellen durch RNA Lysis Buffer T (ein chaotropes Salz) lysiert, um die Nukleinsäuren freizugeben. In einem zweiten Schritt wurde das Lysat auf einer DNA Removing Column zentrifugiert, um DNA und andere Zellreste aus der Lösung zu entfernen (1 min bei 12.000 g). Die DNA bindet an die Matrix der Removing Column und wurde mit dieser verworfen. Der Durchfluss wurde mit 400 µl 70% Ethanol versetzt. Im dritten Schritt wurde die RNA-Lösung weiter aufbereitet. Enthaltene RNA wurde durch Zentrifugation (1 min bei 10.000 g) an die PerfectBind RNA Column aus der Lösung gebunden. Andere Zellbestandteile, die nicht an die Silikamatrix binden, wurden durch einmaliges Waschen mit 500 µl RNA Wash Buffer I und zweimaligem Waschen mit 600 µl RNA Wash Buffer II entfernt, wobei die Zentrifugation jeweils bei 10.000 g für 30 sec erfolgte. Der Durchfluss wurde nach jedem Waschschritt verworfen. Durch Zugabe von 30 µl RNase-freiem destillierten Wasser wurde die gebundene RNA von der Perfect Bind Column-Matrix gespült und in einem Biopur 1,5 ml Eppendorf-Gefäß aufgefangen. Die Konzentration der RNA wurde anschließend photometrisch mithilfe des Nanodrops bestimmt.

2.4.2 Umschreiben von mRNA in cDNA

Da bei der PCR nur DNA amplifiziert werden kann, musste die isolierte mRNA noch in cDNA umgeschrieben werden. Hierzu wurde sich dem Enzym reverse Transkriptase bedient, das natürlicherweise in Retro-Viren vorkommt. Die Durchführung erfolgte mithilfe des QuantiTect Reverse Transcription Kits (Cat.No. 205313) von Qiagen (Hilden, Deutschland). Durch die Zugabe von 2 µl genomic DNA Wipeout Buffer zu 200 ng RNA in einem Gesamtvolumen von 14 µl (aufgefüllt durch RNase freies Wasser) und einer Inkubation bei 42°C für 2 min im Thermomix wurden letzte DNA-Reste aus der Lösung entfernt. Die Umschreibung der mRNA zu cDNA erfolgte durch die Zugabe von 1 µl unspezifischem Primermix, 1 µl reverser Transkriptase, 4 µl Transkriptionspuffer und bei 42°C für 15 min. Anschließend wurde 3 min bei 95°C der neusynthetisierte DNA-Strang von der RNA-Matrize getrennt. Durch die Zugabe von 180 µl RNase freiem Wasser wurde eine Konzentration der umgeschriebenen cDNA von 1 ng/µl eingestellt.

2.4.3 Quantitative Real-Time-PCR

Ziel der Polymerasen-Kettenreaktion ist eine Vervielfältigung bekannter Gensequenzen. Mithilfe der hitzestabilen DNA-Polymerase, Nukleotiden (dNTPs) und der Zugabe von zwei Primern, die die zu vervielfältigende Gensequenz begrenzen, werden bei optimalem pH-Wert rechnerisch $N_n = N_0 * 2^n$ Kopien erstellt. Für die qRT-PCR wurde das KAPA SYBR Fast Universal Kit von peqlab (Erlangen, Deutschland) verwendet. Durchgeführt wurde die PCR in einer 96-Well Platte, die bis zur Benutzung mit einer Microseal B Adhesive Folie (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland) versiegelt war, um Verunreinigungen zu vermeiden und ein sauberes Arbeiten zu ermöglichen. Unter ständiger Kühlung wurden 9 µl Mastermix und 1 µl cDNA pro Well in eine 96-Well-Platte pipettiert (Tabelle 5). Für den Vorgang der PCR im Mastercycler Realplex (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) wurden die Reaktionsräume mit Optical Flat Cap Strips verschlossen. Die Wellplatte wurde anschließend für ca. 20 sec bei 200 g abzentrifugiert.
Bei der qRT-PCR ist es wichtig, dass vorher ein geeignetes, konstantes Housekeeping-Gen ermittelt wurde, dessen Expression keiner intrinsischen oder extrinsischen Regulation unterliegt. Das Housekeeping-Gen exprimiert in allen Geweben und ist zudem zeitlich unabhängig, was bedeutet, dass zu jedem Zeitpunkt eine konstante Expression stattfindet. Es codiert Proteine, die für die Zellfunktion, -struktur und -entwicklung sowie die Aufrechterhaltung des Zellstoffwechsels von großer Bedeutung sind. Da sich in einem vorherigen Experiment β2-Mikroglobulin (ß2M) als geeignetes Housekeeping-Gen für PDL-Zellen darstellte, wurde dieses für alle Versuche benutzt. Durch die Zugabe des interkalierenden Farbstoffs SYBR Green, der sich nach jeder Expressions-Phase in die Produkte einlagerte, konnte für jeden Zyklus eine Fluoreszenz-Emission gemessen werden. Die Einstellungen für den Mastercycler sind in den Tabellen 6 und 7 aufgeführt.

Tabelle 5: Mastermix für qRT-PCR

Menge	Substanz
5 µl	SYBR-green
2 µl	Primer-Mix (10 ρmol/µl/Primer)
2 µl	RNase freies H_2O
1 µl	cDNA (1ng/µl)

Tabelle 6: Einstellungen am Realplex

Filter 520 nm	SYBR
Filter 550 nm	(Leer)
Reference Dye	NONE
Sample vol.	10 µl
Probe	SYBR
Background	MJ white 10 µl Flatcap

Tabelle 7: Temperaturprotokoll der qRT-PCR

Schritt	Dauer	Temperatur
Initiale Aktivierung	5 min	95°C
Denaturierung	15 sec	95°C
Annealing	15 sec	Primer-abhängig
Elongation	20 sec	72°C
Finale Extension	10 min	72°C

Für eine statistische Auswertung wurde die Methode nach Pfaffl (2001) herangezogen. Es findet ein Vergleich der gemessenen Emission mit der des Housekeeping-Gens statt, sodass Rückschlüsse auf die relative quantitative Expression des Zielgens gezogen werden können. Durch diese Normalisierung der gemessenen Werte werden die Einflussfaktoren der RNA-Extraktion und der Umschreibung der RNA in cDNA vermindert, da eventuelle Fehler sowohl das Zielgen als auch das Housekeeping-Gen betreffen. Mithilfe der Effizienz-korrigierten ΔΔCT Methode (Extensionseffizienz 1,7- 1,9) können nun relative quantitative Unterschiede zwischen behandelter Probe und Kontrollprobe ermittelt werden.

$$\text{Ratio} = \frac{E(\text{Zielgen})^{\Delta CT\ \text{Zielgen (Kontrolle- Behandlung)}}}{E(\text{Referenzgen})^{\Delta CT\ \text{Referenzgen (Kontrolle- Behandlung)}}}$$

E = Emission

CT = CT-Wert für englisch *cycle threshold*: Wert, bei dem die Fluoreszenz erstmals exponentiell über den Hintergrundwert ansteigt

ΔCT = CT Zielgen – CT Referenzgen

ΔΔCT = ΔCT Behandlung – ΔCT Kontrolle

Ratio = $2^{-\Delta\Delta CT}$

Die CT-Werte des Referenzgens sollten sowohl in der behandelten als auch in der Kontrollprobe übereinstimmen, sodass sich der Nenner in der oben beschriebenen Formel herauskürzt.

Mithilfe von vassarstats.net wurden die Ergebnisse auf ihre Signifikanz mit einem t-test überprüft. Dabei wurde die Signifikanz wie folgt festgelegt: * = $P < 0{,}05$, ** = $P < 0{,}005$, *** = $P < 0{,}001$, ns (nicht signifikant) = $P > 0{,}05$.

2.4.4 Verwendete Primer

In Tabelle 8 sind alle verwendeten Primer für die qRT-PCR einschließlich der Annealing-Temperatur aufgeführt.

Tabelle 8: Primer für PCR

Zielgen	Forward Primer 5´→ 3´	Reverse Primer 5´→ 3´	Annealing-Temp.
LPL	agagccaaaagaagcag	ggcagagtgaatgggat	59°C
PPARγ	cttttggtgactttatgga	cttgtagcaggttgtcttg	57°C
SOX9	caggctttgcgatttaagga	ccgttttaaggctcaaggtg	60°C
COLII	ctcctggagcatctggagac	accacgatcacccttgactc	63°C
RUNX2	ttccagaccagcagcactc	cagcgtcaacaccatcatt	63°C
COLI	ttcccccagccacaaagagtc	cgtcatcgcacaacacct	61°C

2.5 Western-Blot

Bei einem Western-Blot wird ein Proteingemisch zunächst durch eine Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt und anschließend ebenfalls durch ein elektrisches Feld auf eine Polyvinylidenfluorid-(PVDF)-Membran übertragen, sodass Antigenstrukturen für weitere Untersuchungen zugänglich sind. Die zu untersuchenden Proteine können durch spezifisch bindende Antikörper nachgewiesen werden.

2.5.1 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Bevor die Proteine auf eine Membran übertragen werden können, müssen sie zunächst aufgetrennt werden. Dazu wird die Methode der diskontinuierlichen Gelelektrophorese benutzt, in der die Proteine im elektrischen Feld nach ihrer Größe (Masse) aufgetrennt werden. Dazu dient ein zweiphasiges Gel bestehend aus einem Sammel- und einem Trenngel. Im ersten Schritt wurden die beiden zueinander gehörenden Glasplatten mit 100% Ethanol gereinigt und zusammen mit der zugehörigen Gummidichtung und zwei Klammern an der Seite fixiert. Eine Markierung wurde 6 cm vom unteren Rand angebracht, sodass die Gelphasen immer die gleiche Ausdehnung aufwiesen. Das angesetzte Trenngel (Tabelle 12) wurde bis zur gesetzten Markierung in den Hohlraum zwischen den Glasplatten eingefüllt und während der Polymerisation mit 100% Ethanol überschichtet, sodass eine glatte sichtbare Abschlusskante entstand. Nach der beendeten Polymerisation wurde das Ethanol wieder abgeschüttet, das Sammelgel bis zur oberen Kante eingefüllt und ein Kamm eingesetzt, um Taschen zum Auftragen der Proben zu formen.
Die Zusammensetzung der beiden Gele unterscheidet sich in den verwendeten Puffer, den eingestellten pH-Werten und der Konzentration des Polyarcrylamids. Im Sammelgel (5% Polyacrylamid) (Tabelle 11) liegt ein pH-Wert von 6,8 vor, sodass das im Elektrodenpuffer enthaltene Glycin neutral vorliegt und die Proben auf eine schmale Bande konzentriert werden. Im Trenngel ist ein pH-Wert von 8,9 eingestellt, Glycin liegt negativ geladen vor, wandert schneller zur Anode. Dadurch wird die aufzutrennende Proteinprobe nur nach ihrer Größe aufgetrennt und nicht nach Ladung der einzelnen Aminosäuren. Durch Variieren der Konzentration der eingesetzten Acrylamid-Monomere im Trenngel (8-10%) wird die Porengröße vorgegeben und somit die Wanderungsgeschwindigkeit und Auftrennung der Proteine in der Gelelektrophorese. Das hinzugefügte Ammoniumperoxidsulfat (APS) startet die Polymerisation der Acrylamid-Monomere.

Tabelle 9: Trenngelpuffer

1,5 M Tris
pH 8,9 mit HCl einstellen

Tabelle 10: Sammelgelpuffer

0,5 M Tris
pH 6,8 mit HCl einstellen

Tabelle 11: Zusammensetzung Sammelgel (Menge für zwei Gele)

	5%
Sammelgelpuffer	1,25 ml
10% SDS	50 µl
TEMED	5 µl
Acrylamid	0,8 ml
H_2O	2,7 ml
Gesamtvolumen	4,8 ml
+ 0,2 ml 10% APS	

Tabelle 12: Zusammensetzung Trenngel

	8%	10%	12%	15%
Trenngelpuffer	1,4 ml	1,4 ml	1,4 ml	1,4 ml
10% SDS	55 µl	55 µl	55 µl	55 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
Acrylamid	1,48 ml	1,85 ml	2,22 ml	2,78 ml
H_2O	2,36 ml	2,0 ml	1,62 ml	1,06 ml
Gesamtvolumen	5,3 ml	5,3 ml	5,3 ml	5,3 ml
+ 0,25 ml 10% APS				

Für das benötigte Proteingemisch wurden entweder Zellpellets verwendet, die aus kurz zuvor geernteten Zellkulturen gewonnen wurden oder Pellets, die bei -80°C unmittelbar nach dem Ernten eingefroren wurden. Letzteres setzt ein 10-minütiges Auftauen bei Raumtemperatur voraus.

Die Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur der Proteine wird durch die Zugabe von dreifach konzentriertem SDS-Probenpuffer (Tabelle 13) mit 10% β-Mercaptoethanol und der Erhitzung auf 95°C für 5 min aufgelöst. Das SDS lagert sich dabei an das Protein, überdeckt die Eigenladung und β-Mercaptoethanol spaltet die Disulfidbrücken.

Anschließend wurden die Proben auf das vorbereitete Gel zur Durchführung der Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-Page) aufgetragen. Das maximale Auftragsvolumen entsprach 30 µl mit 3 x 10^5 Zellen.

Tabelle 13: 3x SDS-Probenpuffer

Menge	Substanz
0,3 M (3,6 g)	TRIS (MG 121,14)
9% (9 g)	SDS
22,5% (22,5 g)	Glycerin
Spatelspitze	Bromphenolblau
pH-Einstellung auf 6,7	HCl
Auffüllen auf 100 ml	H_2O

Zur Durchführung der Gelelektrophorese wurden Dichtungsgummi, Klammern und Probenkamm von den vorbereiteten Gelen entfernt. Es ist beim Einsetzen des Gels in die Laufpuffer (Tabelle 14) befüllte Elektrophoresekammer darauf zu achten, dass sich keine Luftblasen unter dem Gel befanden. Mithilfe von Klammern wurde das Gel an der Kammer befestigt. Anschließend wurden die Proben in die entsprechenden Taschen pipettiert (maximal 30 µl). Die äußeren Taschen sollten unbefüllt bleiben. Um das Molekulargewicht der aufgetrennten Proteine abschätzen zu können, wurden zusätzlich 4 µl eines entsprechenden Größenmarkers aufgetragen. Die Proteine sind entsprechend ihrer Masse durch das zugefügte SDS negativ geladen und wandern im elektrischen Feld zur Anode. Im Sammelgel wurde eine Stromstärke von 15 mA pro Gel angelegt. Im Trenngel wurde die Stromstärke auf 25 mA pro Gel erhöht. Kurz vor Erreichen des Endes des Trenngels wurde die Elektrophorese beendet.

Tabelle 14: 5x Laufpuffer

Menge	Substanz
0,25 M (30,3 g)	TRIS (MG 121,14)
1,9 M (142,6 g)	Glycin
0,5% (50 ml 10% SDS)	SDS
Auffüllen auf 1000 ml	H_2O

2.5.2 Proteintransfer auf Membranen

Beim Western-Blot werden die aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine PVDF-Membran übertragen. Dazu muss die Membran in 100%-igem MeOH aktiviert werden und anschließend mit zwei Schwämmen und sechs Filterpapieren für mindestens 15 min in kaltem Transferpuffer eingeweicht werden (Tabelle 15). Bei dem Zusammenbau der Kassette wurde zuerst auf der Anodenseite (rot, positiv) ein Schwamm, drei Filterpapiere und die aktivierte Transfermembran gelegt. Darauf wurde luftblasenfrei das Trenngel, welches von drei Filterpapieren und einem Schwamm bedeckt wurde, platziert. Mit zwei Gummibändern wurde die Blotkassette verschlossen. Durch ein senkrecht zur Blotkassette angelegtes elektrisches Feld (350 mA) wurden die Proteine für 90 min auf die Membran übertragen. Durchgeführt wurde dies in einer mit kaltem Transferpuffer gefüllten Kammer mit konstanter Wasserkühlung und Rührvorrichtung.
Eine erfolgreiche Übertragung der Proteine aus dem SDS-Gel auf die Membran ist erst nach der Coomassie-blau-Färbung erkennbar. Hierzu wurde die Membran für 2-10 min in der Färbelösung (Tabelle 16) auf einer Wippe bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden mit einer Entfärbelösung (Tabelle 17) die Bereiche ohne gebundene Proteine mehrmals entfärbt. Zur Dokumentation wurde die gefärbte Membran gescannt.

Tabelle 15: 1x Transferpuffer

Substanz und Konzentration	Molekulargewicht	
25 mM Tris	121,14	6,05 g
192 mM Glycin	75,07	28,8 g
20% Methanol		400 ml
mit Aqua dest. auf 2 l auffüllen, pH 8,3		

Tabelle 16: Coomassie-blau-Färbelösung

7% Essigsäure
0,1% Coomassie brilliant blue R250
50% Methanol

Tabelle 17: Entfärbelösung

Menge	Substanz
50 ml	Methanol (50%)
7 ml	Essigsäure (7%)
Mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen	

2.5.3 Spezifischer Proteinnachweis

Der spezifische Proteinnachweis wurde mithilfe von primären und sekundären Antikörpern durchgeführt. Der primäre Antikörper band spezifisch an das nachzuweisende Protein, stammte aber aus einer anderen Spezies, zum Beispiel Maus oder Hase. Der sekundäre Antikörper reagierte nun spezifisch am Primer-Antikörper der anderen Spezies und war mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRP, *horseraddish peroxidase*) gekoppelt, welches das vor dem Scanvorgang zugegebene Substrat (WesternBright Sirius) spaltete und so eine Chemilumineszenz-Reaktion auslöst.
Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, musste die Membran, bevor sie mit Primärantikörpern inkubiert wurde, für eine Stunde bei Raumtemperatur in 5% Milchpulver in TBS-T oder 5% BSA in TBS-T geblockt werden. Anschließend wurde der primäre Antikörper in einer vorher ausgetesteten Verdünnung in Blocklösung auf die Membran gegeben und mindestens über Nacht bei 4°C auf einer Wippe inkubiert.
Durch 5 x 5 min Waschen mit TBS-T wurde der nicht gebundene Antikörper nach der Inkubation von der Membran entfernt. Der sekundäre Antikörper wird nach der Herkunft des Primärantikörpers ausgewählt und ebenfalls in Blocklösung verdünnt. Die Inkubation des Sekundärantikörpers betrug eine Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Membran erneut 5 x 5 min mit TBS-T gewaschen, um Reste des Sekundärantikörpers zu entfernen. Der Nachweis der Immunreaktion erfolgte durch eine Chemilumineszenz-Reaktion. Die Banden der Proteinleiter wurden mit einem WesternBright ChemiPen nachgezogen. Das Substrat WesternBright Sirius (Advansta, Menlo Park, USA), bestehend aus den beiden im Verhältnis 1:1 gemischten Komponenten A und B wurde 5 min lichtgeschützt auf dem Blot inkubiert und dort von dem gekoppelten Enzym HRP des sekundären Antikörpers gespalten. Die Membran wurde mit dem C-Digit Blot Scanner (LICOR, Homburg, Deutschland) gescannt und mithilfe des Programms Image Studio Digits C-

Digit sichtbar gemacht. Ein Vergleich der detektierten Banden mit denen des Größenmarkers brachte Aufschluss über das Molekulargewicht des gesuchten Proteins und konnte mit Literaturangaben überprüft werden. Unterschiedlich aufgetragene Zellmengen, die zu möglichen Intensitätsunterschieden führten, mussten normalisiert werden. Dazu wurde der Quotient aus Zielprotein und Kontrollprotein (Housekeeping-Protein) gebildet. Die normalisierten Werte der differenzierten Zellen wurden mit denen der Kontrollzellen (undifferenziert) ins Verhältnis gesetzt, sodass ein relatives Proteinlevel berechnet werden konnte. Mithilfe von vassarstats.net wurden die Ergebnisse auf ihre Signifikanz mit einem Student-t-Test mit zwei Freiheitsgraden überprüft. Dabei wurde die Signifikanz wie folgt festgelegt: * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,005$, *** = $P < 0,001$, ns = nicht signifikant.

2.5.4 Aufbewahrung und Strippen der PVDF-Membranen

Die Membranen konnten zur Aufbewahrung durch ein erneutes Einlegen in Methanol für 15 sec inaktiviert, anschließend 15 min bei Raumtemperatur getrocknet und bei -20°C zwischen zwei beschrifteten Pappen eingefroren werden. Die eingefrorene Membran konnte für weitere Untersuchungen verwendet werden. Dazu musste sie aufgetaut werden und erneut mit Methanol aktiviert werden.

Wurde an einer Membran bereits ein Protein nachgewiesen, mussten für den Nachweis eines anderen Proteins die gebundenen Antikörper zuvor entfernt werden. Dieser Vorgang, als „Strippen“ bezeichnet, wurde wie folgt durchgeführt: Die Membran wurde bei 60°C in Stripping-Puffer inkubiert und 2 x 10 min mit TBS-T gewaschen. Eine gestrippte Membran konnte für weitere Immunreaktionen verwendet werden. Bei jedem Strippen kann jedoch eine kleine Menge des auf der Membran fixierten Proteins verlorengehen.

2.6 Immunfluoreszenz

Mit dieser Methode wurden die auf Deckgläschen fixierten Zellen mittels entsprechender farbstoffgekoppelter Antikörper inkubiert, die spezifisch an den nachzuweisenden Antigenstrukturen binden können. Die gesuchten Proteine konnten mithilfe des fluoreszierenden Farbstoffs in einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Der Nachweis der Proteine basierte auf einer Antigen-Antikörperreaktion in den fixierten Zellen. In den folgenden Versuchen handelte es sich um eine indirekte Immunfluoreszenz, da die Antigen-Antikörperkomplexe durch Inkubation mit einem sekundären Antikörper sichtbar gemacht wurden.

Bis zu einer Konfluenz von 70-80% mussten die Zellen auf den Deckgläschen in einer 24-Well-Platte kultiviert werden, um sie anschließend auf Parafilm zu färben. Bei differenzierten Zellen ist vorher auf eine entsprechend lange Inkubationszeit des Differenzierungsmediums zu achten. Es wird eine Zellzahl von 1 x 10^3 pro Deckgläschen und Well angestrebt. Die bewachsenen Deckgläschen wurden nach 6-10 Tagen auf Parafilm gelegt und zwei Mal mit PBS gewaschen (ca. 100 µl/Deckgläschen). Die Zellen wurden 15 min mit 100 µl 2% Paraformaldehyd in PBS bei Raumtemperatur fixiert und anschließend zwei Mal mit PBS (ca. 100 µl) gewaschen. Um auch die intrazellulär gelegenen Proteine dem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern zugänglich zu machen, wurde die Zellmembran bei Raumtemperatur mit 0,25% Triton X-100 in PBS bei 10 min permeabilisiert. Das 0,25% Triton X-100 wurde durch Waschen mit PBS wieder vollständig entfernt. Bei Raumtemperatur wurde mit 1% BSA in PBS für 15 min geblockt. Die Inkubation des primären Antikörpers (ca. 50 µl/Deckgläschen) erfolgte für 1 h in einer feuchten Kammer bei 37°C unter Lichtausschluss gemäß den Konzentrationsangaben des Herstellers. Es folgte ein zweimaliger Waschschritt mit PBS. Der sekundäre Antikörper wurde ebenfalls gemäß den Herstellerangaben mit 1% BSA in PBS und mit DAPI (1:1000) verdünnt und für 30-60 min bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Die überschüssigen nicht gebundenen Antikörper wurden durch zweimaliges Waschen mit je 100 µl PBS pro Deckgläschen entfernt, bevor die Deckgläschen mit den gefärbten Zellen nach unten auf einem Objektträger mithilfe von 10 µl/Deckgläschen Moviol eingedeckelt werden konnten. Die eingedeckelten Präparate waren ca. eine Woche bei 4°C haltbar und konnten mithilfe des Fluoreszenzmikroskops (Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland) untersucht und fotografiert werden.

2.6.1 Verwendete primäre und sekundäre Antikörper

In den Tabellen 18 und 19 sind alle für die Immunzytochemie verwendeten primären und sekundären Antikörper aufgeführt.

Tabelle 18: Primäre Antikörper für Immunzytochemie

Name	Herkunft	Verdünnung	Firma
Kollagen 1	Hase, IgG polyklonal	1:100	acris, (R1038)
Osteonectin	Maus, IgG monoklonal	1:25	DSHB, (AON-1)
Osteopontin	Maus, IgG monoklonal	1:80	DSHB, (MPIIIB10(1))

Tabelle 19: Sekundäre Antikörper für Immunzytochemie

Name	Herkunft	Verdünnung	Firma
anti-mouse IgG H&L (Alexa Fluor 555)	Ziege, IgG polyklonal	1:1000	abcam, ab150114
anti-rabbit IgG H&L (Alexa Fluor 555)	Esel, IgG polyklonal	1:1000	abcam, ab150074

2.7 Färbungen

2.7.1 Oil-Red-Färbung

Mit der Oil-Red-Färbung können intrazelluläre Lipide nachgewiesen werden, die typisch für Adipozyten sind. Für die adipogene Differenzierung wurden zunächst 4 x 10^3 Zellen pro Well in einer 24-Well-Platte kultiviert. Die Zellen entwickelten sich durch eine 10-tägige Inkubation mit dem adipogenen Medium zu Adipozyten. Die Deckgläschen mit den differenzierten und den undifferenzierten Zellen als Kontrolle wurden auf Parafilm gelegt und zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden diese für 1 h bei Raumtemperatur mit 10% gepuffertem Formalin fixiert. Nach einem Waschgang mit destilliertem Wasser wurden die Zellen mit der Oil-Red-Gebrauchslösung für 10-30 min bei Raumtemperatur

gefärbt. Die Oil-Red-Stammlösung bestehend aus 0,35 g Oil-Red-O-Pulver (Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland) und 100 ml 100% 2-Propanol wurde über Nacht gerührt und anschließend die Gebrauchslösung im Verhältnis 3:2 mit destilliertem Wasser über Nacht angesetzt und durch einen 0,2 µm-Filter steril filtriert. Nach dem Färbegang wurden die Deckgläschen mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Kernfärbung wurde mit Mayer's Hämalaun für 1-2 min durchgeführt. Nach einem Waschvorgang wurden die Zellen für 5-10 min mit Leitungswasser gebläut. Die Proben wurden mit dem wässrigem Eindeckmedium Moviol auf Objektträgern eingedeckelt und anschließend unter einem Lichtmikroskop untersucht.

2.7.2 Färbung mittels alkalischer Phosphatase

Für den Nachweis der osteogenen Differenzierung ist die Färbung der alkalischen Phosphatase (AP) unverzichtbar. Alkalische Phosphatasen sind zytoplasmatische Enzyme und kommen überwiegend in Leber, Knochen, Plazenta und Dünndarm vor. Die Färbung wurde mit einem Kit (Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland) an undifferenzierten Kontrollzellen und differenzierten PDL-Zellen durchgeführt. Die zu untersuchenden Zellen wurden auf Deckgläschen bis zu einer Konfluenz von 70-80% in einer 24-Well-Platte kultiviert und für 10 Tage differenziert. Die Färbung wurde auf Parafilm durchgeführt. Zunächst wurden Deckgläschen zweimal mindestens 15 min mit PBS gespült. Die Fixierung der Zellen erfolgte durch die Fixierlösung (Tabelle 20) für 30 sec bei Raumtemperatur. Es schloss sich ein erneuter Waschschritt für 45 sec an. Um die Zellen zu permeabilisieren, wurden sie 3 min bei Raumtemperatur mit 20% Triton X-100 in PBS inkubiert, welches danach durch mehrmaliges Waschen mit destilliertem Wasser wieder entfernt wurde. Die Färbung wurde lichtgeschützt bei 37°C für 30-60 min mit dem Alkalifarbstoffgemisch durchgeführt (Tabelle 21), welches zuvor nach Herstellerangabe angesetzt werden musste. Der alkalischen Phosphatase wurde ein chromogenes Substrat (Phosphatverbindungen) angeboten, welches unter enzymatischer Abspaltung zu einem farbigen Endprodukt reagierte. Nach erfolgter Inkubation musste der Farbstoff durch 2 min Waschen mit destilliertem Wasser entfernt werden. Mit dem unmittelbar vor der Durchführung filtrierten Farbstoff Neutral Red (Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland) wurden AP-negative Zellen gegengefärbt. Vor dem Eindeckeln erfolgte ein letzter Waschschritt mit Leitungswasser. Ausgewertet wurde die Färbung an einem Lichtmikroskop.

Tabelle 20: Fixierlösung zur Färbung der alkalischen Phosphatase

Menge	Substanz
2,5 ml	Citrat-Lösung
6,5 ml	Aceton
(0,8 ml	37% Formaldehyd)

Tabelle 21: Alkalifarbstoffgemisch

Menge	Substanz
0,1 ml	Natrium-Nitrit-Lösung
0,1 ml	FBB-Alkali-Lösung
mischen und 2 min ruhen lassen, anschließend mit folgender Lösung mischen:	
4,5 ml	Aqua dest.
0,1 ml	Naphthol AS-BI-Alkali-Lösung

2.8 Adipogene Differenzierung

Die adipogene Differenzierung der PDL-Zellen wurde mithilfe eines bereits vom Hersteller angemischten Differenzierungsmediums durchgeführt. Die Zusammensetzung ist in dem Beiblatt des Herstellers nicht aufgeführt (PromoCell, Heidelberg, Deutschland). Die Zellen wurden für 21 Tage dem Differenzierungsmedium ausgesetzt und währenddessen lichtmikroskopisch überprüft. Die ersten 24 Stunden wurde 50% Kultivierungsmedium DMEM +/+ und 50% adipogenes Differenzierungsmedium zugesetzt und nach 24 Stunden durch 100% adipogenes Differenzierungsmedium ausgetauscht. Ernten und Zählen der Zellen wurden wie bereits beschrieben durchgeführt.

2.9 Chondrogene Differenzierung

2.9.1 Alginat-Zellkultur

Bei der chondrogenen Differenzierung war es wichtig, dass die PDL-Zellen in Alginatkugeln eingekapselt waren, um eine enge räumliche Beziehung zwischen den Zellen und dreidimensionale Zell-Zellkontakte zu schaffen. Für eine 1,2% Alginatlösung wurde

0,12 g Alginat in 10 ml einer 0,15 M NaCl-Lösung im Wasserbad für 1-2 h bei 37°C gelöst und durch einen 0,2 µm Sterilfilter filtriert. Nach dem Ernten, der photometrischen Zählung der Zellen und einem erneuten Zentrifugationsdurchgang (10 min bei 300 g) wurde das Pellet in einer entsprechenden Menge Alginatlösung (70.000 Zellen/20 µl Alginatkugelvolumen) resuspendiert. Es wurden jeweils 20 µl der Suspension mithilfe einer um 3-4 mm gekürzten Pipette unter sterilen Bedingungen in 3 ml/Well Calciumchlorid-Dihydrat-Lösung (147,02 g/mol) in eine 6-Well-Platte pipettiert. Optimal dabei sind runde Kugeln, da diese Form das geringste Oberflächen-Volumen-Verhältnis aufweist. Abschließend wurden die so erzeugten 3D-Alginat-Kulturen in bereits beschriebenem Standardmedium gespült und 24 Stunden in 1,5 ml Standardmedium (50%) und 1,5 ml chondrogenem Differenzierungsmedium (50%) inkubiert. Die chondrogene Differenzierung erfolgte für 32-35 Tage in chondrogenem Medium bei einem Mediumwechsel alle drei bis vier Tage.

Die Alginatkulturen mussten nach erfolgter Differenzierung wieder lysiert werden. Die Alginatkugeln wurden in ein 15 ml-Falcon-Röhrchen mithilfe eines Löffels überführt, mit 0,5-1 ml HEPES-EDTA-Puffer (Lyse-Puffer) versetzt und leicht geschwenkt, bis alle Kugeln gelöst waren. Der Lyse-Puffer setzte sich aus 55 mM EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) und 10 mM HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure) bei einem pH-Wert von 7,4 zusammen und wurde mit einem 0,2 µm Sterilfilter filtriert. Um die zellulären Bestandteile von der flüssigen Phase zu trennen, wurde bei 300 g für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in einem definierten Volumen PBS resuspendiert und erneut gezählt und zentrifugiert und zuletzt nach Absaugen des PBS bei -80°C gefroren.

2.9.2 Chondrogenes Differenzierungsmedium

Das chondrogene Differenzierungsmedium (Tabelle 22) wurde mit den Zusätzen von Dexamethason, Pyruvat, L-Prolin und Ascorbat gemäß Protokoll angesetzt und war ca. sechs Wochen haltbar. ITS Premix Universal Culture Supplement (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) musste immer frisch zugesetzt werden. Die ersten 24 Stunden wurde 50% Kultivierungsmedium DMEM +/+ und 50% chondrogenes Differenzierungsmedium zugesetzt und nach 24 Stunden durch 100% chondrogenes Differenzierungsmedium ausgetauscht.

Tabelle 22: Chondrogenes Differenzierungsmedium

550 ml Kultivierungsmedium DMEM +/+
Dexamethason 3,9 µg/100 ml
Na-Pyruvat 10 mg/100 ml
L-Prolin 4 mg/100 ml
Ascorbat 5 mg/100 ml
ITS 5 µl/ml Medium

2.10 Immunzytochemie

2.10.1 Fixierung und Einbettung

Die geernteten Alginatkugeln wurden nach ca. 32-35 Tagen in gepuffertem Formalin 3,7% nach Lillie fixiert. Dazu wurde 1 Teil Formaldehyd 37% (Merck, Darmstadt, Deutschland) mit 9 Teilen 0,1 M Sörensen-Puffer vermengt. Die Fixierung erfolgt in sterilen 15 ml Falcon-Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) für 6-24 Stunden bei 4 bis 8°C in einem Kühlraum. Anschließend musste die Probe unter fließendem Leitungswasser vorsichtig gewässert werden.

Die Einbettung erfolgte mithilfe eines Einbettautomaten (Shandon Duplex Processor, Runcorn, England) nach dem folgenden Protokoll. Die Präparate wurden im nächsten Schritt in speziellen Metallförmchen ausgerichtet, mit vorgewärmtem flüssigen Paraffin aufgefüllt und für ungefähr 5 Minuten über einer Kühlplatte in den festen Zustand überführt (Tabelle 23).

Tabelle 23: Fixierungs- und Einbettungsprotokoll

Position 1	70% Ethanol	3 h
Position 2	80% Ethanol	1 h
Position 3	90% Ethanol	1 h
Position 4	96% Ethanol	1 h
Position 5	100% Ethanol	2 h
Position 6	Isopropylalkohol	2 h
Position 7	Isopropylalkohol	1,5 h
Position 8	Xylol	30 min
Position 9	Xylol	45 min
Position 10	Xylol	45 min
Position 11	Paraplast Plus	30 min
Position 12	Paraplast Plus	7 h (60°C)

2.10.2 Anfertigung von histologischen Schnitten

Mit einem Mikrotom (Jung Biocut 2035 Leica, Nussloch, Deutschland) wurden dünne Paraffinschnitte (10 µm) angefertigt. Anschließend wurden diese in einem Wasserbad (Typ 1052 GFL, Burgwedel, Deutschland) platziert, dann mit Objektträgern (Superfrost Plus Menzel, Braunschweig, Deutschland) aufgenommen und auf einer Wärmeplatte (Typ 14801 Medax, Rendsburg, Deutschland) bei 37°C vorgetrocknet. Die nächsten 24 Stunden verblieben die Objektträger in einem Wärmeschrank (Typ B 5042 Heraeus, Hanau, Deutschland) bei 37°C.

2.10.3 Entparaffinierung und Rehydrierung

Die Entparaffinierung und Rehydrierung wurde nach folgendem Protokoll nach einer Hitzefixierung bei 80°C für 30 min durchgeführt (Tabelle 24).

Tabelle 24: Entparaffinierungs- und Rehydrierungsprotokoll

Position 1	Xylol	5 min
Position 2	Xylol	5 min
Position 3	100% Ethanol	2 min

Position 4	90% Ethanol	2 min
Position 5	80% Ethanol	2 min
Position 6	60% Ethanol	2 min
Position 7	50% Ethanol	2 min
Position 8	1 x PBS (pH 7,4)	10 min

2.10.4 HiDef Detection HRP Polymer System für Alginat-Präparate

Zunächst wurden die histologischen Schnitte mit 1% BSA für 10 min geblockt und überschüssige Flüssigkeit abgetropft. Die Inkubation des primären Antikörpers (1:100 oder 1:50 in Aqua dest.) erfolgte mindestens eine Stunde bei 37°C oder bei Raumtemperatur über Nacht in einer feuchten Kammer. Es folgte ein weiterer Waschschritt und erneutes Ablaufen der Flüssigkeit. Der HiDef Detection Amplifier (HiDef Detection Polymer System, Cell Marque, Darmstadt, Deutschland) wurde für 10 min zugegeben (ca. 100 µl pro Schnitt). Das Präparat wurde anschließend mit Aqua dest. gewaschen, bevor der HiDef Detection HRP Polymer (Cell Marque, Darmstadt, Deutschland) für 10 min hinzugegeben wurde. Abschließend wurde nochmal mit Aqua dest. gewaschen.

2.10.5 Chromogenfärbung

Unmittelbar vor der Chromogenfärbung wurden ein Teil Chromogen und ein Teil Puffer gemischt und unter Beobachtung für 6-12 min gefärbt. Nach einem Waschschritt wurde mit Lichtgrün für 90 sec gegengefärbt und in 1% Essigsäure überführt. Die Dehydrierung wurde gemäß aufsteigender Alkoholreihe vorgenommen und dann mit Xylol 2 für mindestens 2-5 min und Xylol 1 für mindestens 5 min abgeschlossen.

2.11 Osteogene Differenzierung

Um die Zellen osteogen zu differenzieren (10 Tage), wurden bei einer Konfluenz von 80% die in Tabelle 25 aufgeführten Substanzen in den angegebenen Konzentrationen zugegeben.

Tabelle 25: Zusammensetzung osteogenes Differenzierungsmedium

50 ml Kultivierungsmedium DMEM +/+	
Dexamethason	EK 1 nM
Glycerol-2-Phosphat	EK 10 mM
2-Phospho-L-Ascorbinsäure	EK 10 mM
Vitamin D_3	EK 50 nM

Die ersten 24 Stunden wurde 50% Kultivierungsmedium DMEM +/+ und 50% osteogenes Differenzierungsmedium zugesetzt und nach 24 Stunden durch 100% osteogenes Differenzierungsmedium ausgetauscht.

3 Ergebnisse

3.1 FACS-Analyse

Die FACS-Analyse wurde verwendet, um die Existenz verschiedener Oberflächenantigene der PDL-Zellen zu untersuchen. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Tabelle 26 dargestellt. Die Zellen waren positiv für folgende mesenchymale Stammzellmarker: CD73, CD90, CD105, CD146, CD166. Auf die hämatopoetischen Marker CD34 und CD45 waren PDL-Zellen negativ.

Tabelle 26: Prozentangaben PE-positiver Zellen

Name	PDL juv.	PDL juv.	PDL juv.	PDL ad.	PDL ad.	PDL ad.
Kontrolle	0,1	0	0,1	1,4	0	0
Iso-Kontrolle	0	0	0,1	0	0	0,1
CD73	92,8	95,9	92	98,3	96,5	99,2
CD90	100	100	100	100	100	100
CD105	93,2	99,5	89,3	99,1	98,8	97,7
CD146	15,4	44	11,8	51,6	19	99,2
CD166	97,6	99,5	96,7	99,4	97,2	86,5
CD34	0,1	0	0,1	0,1	0	0,1
CD45	0,1	0,2	0,2	0	0,1	0

PDL-Zellen waren auf die mesenchymalen Stammzellmarker CD73, CD90, CD105, CD146 und CD166 PE-positiv und auf die hämatopoetischen Marker CD34 und CD45 negativ. Eine Negativkontrolle (Zellsuspension ohne Antikörper) und eine Iso-Kontrolle (nicht bindende, aber Farbstoff-gekoppelte Antikörper) dienten zur Kalibrierung der Nachweisgrenze.

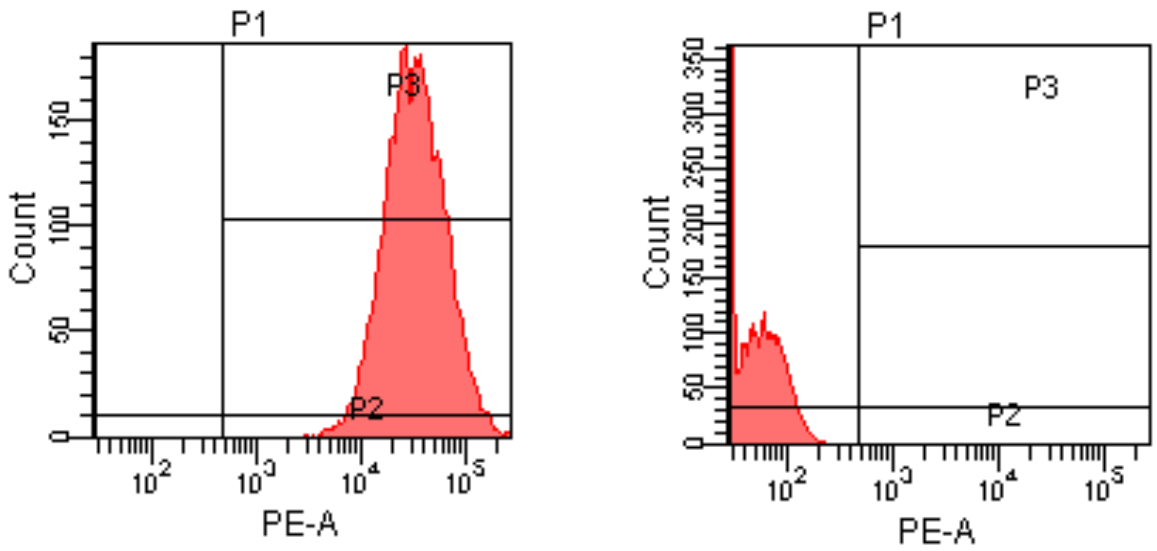


Abbildung 3: Exemplarische Darstellung der FACS-Analyse: Stammzellmarker CD90 (links) und CD34 (rechts). Sowohl juvenile als auch adulte PDL-Zellen waren auf den mesenchymalen Stammzellmarker CD90 PE-positiv und auf den hämatopoetischen Stammzellmarker CD34 negativ. P1 stellt die Unterteilung zwischen PE-positiv und PE-negativ dar.

3.2 Adipogene Differenzierung

3.2.1 Relatives mRNA-Level von adipogen differenzierten PDL-Zellen

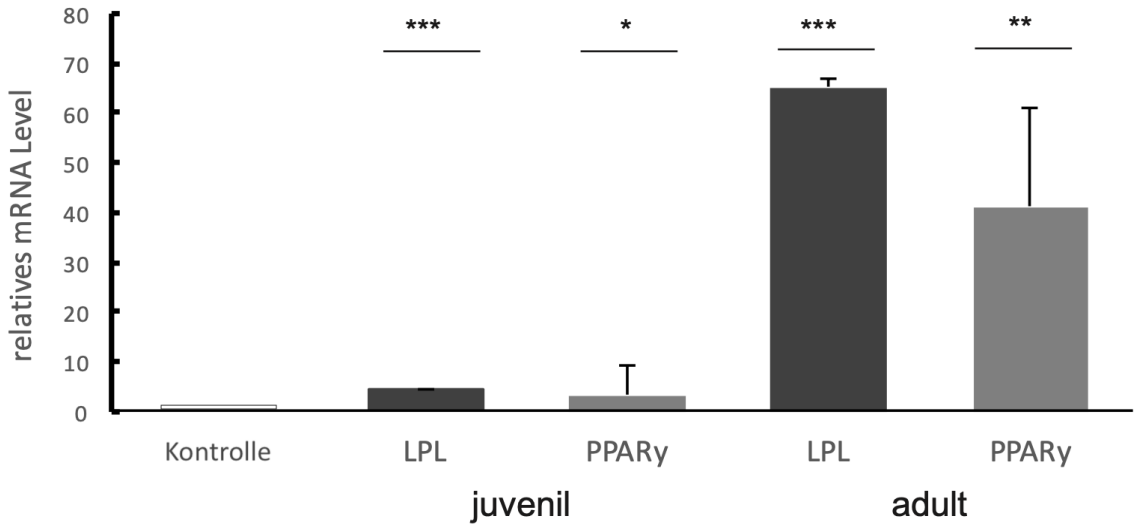


Abbildung 4: Relatives mRNA-Level adipogen differenzierter PDL-Zellen: Die Genexpressionslevel von LPL und PPARγ zeigten nach 21 Tagen in adipogenem Differenzierungsmedium sowohl bei den juvenilen als auch den adulten PDL-Zellen eine Erhöhung. Für die Auswertung wurde die mRNA auf β2M normalisiert und anschließend die Erhöhung in Bezug auf die Kontrolle berechnet. Als Kontrolle wurden undifferenzierte PDL-Zellen eingesetzt. Die Ergebnisse sind die Mittelwerte von drei Experimenten, die Anzahl der Replikate ist n = 3. Die Fehlerbalken beschreiben die Standardabweichung. * = P < 0,05, ** = P < 0,005, *** = P < 0,001.

In Abbildung 4 sind die Genexpressionslevel von Lipoproteinlipase (LPL) und PPARγ bei juvenilen und adulten PDL-Zellen dargestellt. Nach 21 Tagen in adipogenem Differenzierungsmedium zeigten sich deutliche Unterschiede in der mRNA-Expression zwischen juvenilen und adulten PDL-Zellen. Während sich die Genexpression von LPL bei adulten PDL-Zellen im Vergleich zur Kontrolle um das 65-fache erhöhte, war sie bei juvenilen PDL-Zellen lediglich 5-fach erhöht. Die Genexpression von PPARγ zeigte eine ähnliche Tendenz. PPARγ war verglichen mit den juvenilen PDL-Zellen um das 16-fache erhöht.
Für die Auswertung wurde die mRNA auf β2M normalisiert und anschließend die Erhöhung in Bezug auf die Kontrolle berechnet. Als Kontrolle wurden undifferenzierte PDL-Zellen eingesetzt. Die Fehlerbalken beschreiben die Standardabweichung. Da drei juve-

nile und drei adulte PDL-Zellreihen für die Versuche herangezogen wurden, war die Anzahl der Replikate jeweils n = 3. Dabei wurde die Signifikanz wie folgt festgelegt: * = P < 0,05, ** = P < 0,005, *** = P < 0,001, ns = nicht signifikant.

3.2.2 Nachweis adipogener Eigenschaft durch Oil-Red-Färbung

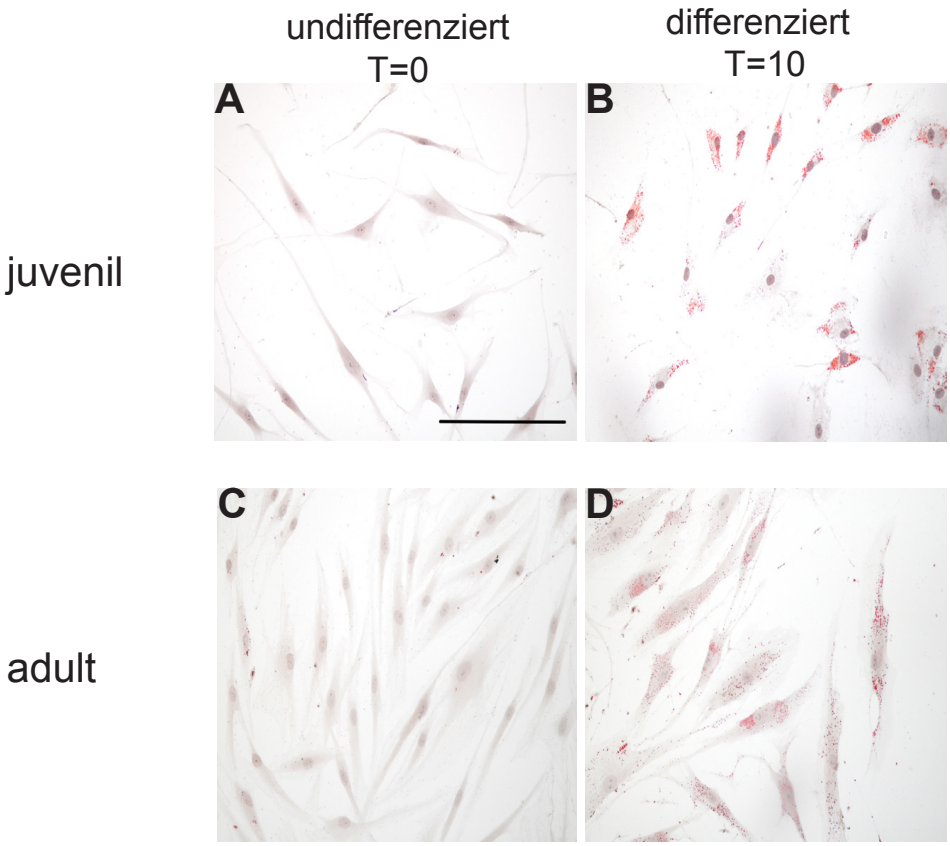


Abbildung 5: Oil-Red-Färbung: (A) Kontrolle, undifferenzierte PDL-Zellen (juvenil). (B) Lipid-Nachweis in adipogen differenzierten PDL-Zellen (juvenil) nach 10 Tagen. (C) Kontrolle, undifferenzierte PDL-Zellen (adult). (D) Lipid-Nachweis in adipogen differenzierten PDL-Zellen (adult) nach 10 Tagen. Der abgebildete Messbalken entspricht 100 µm. Vergrößerung 40x.

Abbildung 5 zeigt den Nachweis adipogener Eigenschaften durch Oil-Red-Färbung in juvenilen und adulten PDL-Zellen. Die Zellen wurden für 10 min mit der Oil-Red-Gebrauchslösung gefärbt. Alle Aufnahmen erfolgten mit einer 40-fachen Vergrößerung. Lipidtropfen wurden lediglich in den differenzierten PDL-Zellen (T = 10) nachgewiesen. Bei den Abbildungen A und B handelt es sich um juvenile PDL-Zellen. Die Abbildungen C und D stellen die Oil-Red-Färbung bei adulten PDL-Zellen dar.

3.3 Chondrogene Differenzierung

3.3.1 Relatives mRNA-Level von chondrogen differenzierten PDL-Zellen

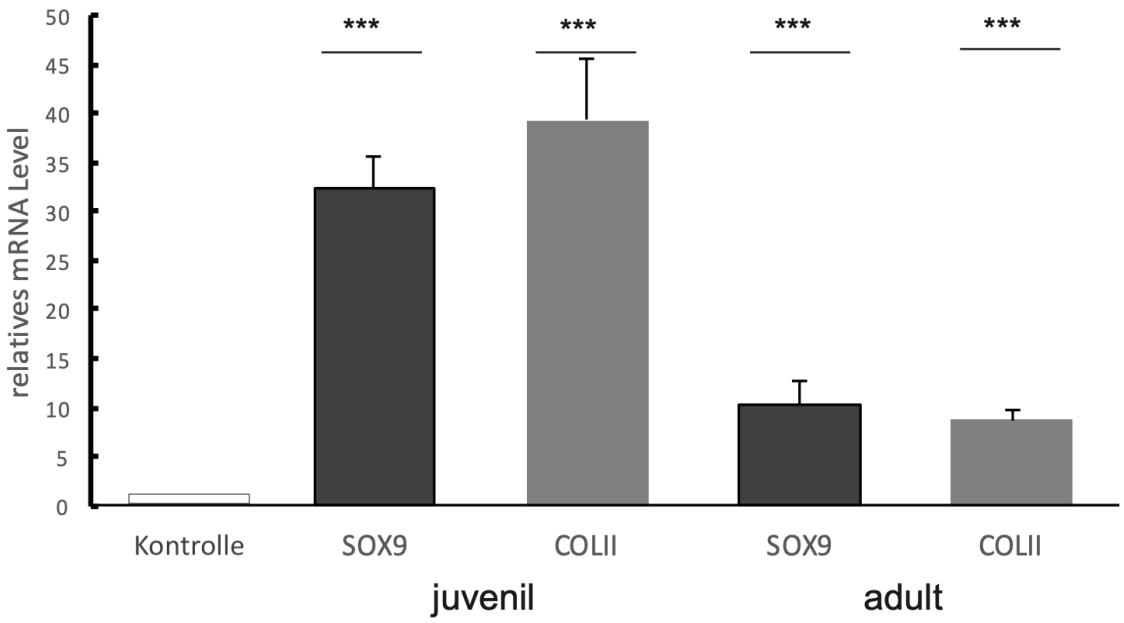


Abbildung 6: Relatives mRNA-Level chondrogen differenzierter PDL-Zellen: Die Genexpressionslevel von SOX9 und COLII zeigten bei den juvenilen PDL-Zellen eine deutliche Erhöhung. Die Expression von SOX9 und COLII war bei den adulten PDL-Zellen ebenfalls erhöht, jedoch in schwächerem Ausmaß. Für die Auswertung wurde die mRNA auf β2M normalisiert und anschließend die Erhöhung in Bezug auf die Kontrolle berechnet. Als Kontrolle wurden undifferenzierte PDL-Zellen eingesetzt. Die Ergebnisse sind die Mittelwerte von drei Experimenten, die Anzahl der Replikate ist n = 3. Die Fehlerbalken beschreiben die Standardabweichung. *** = P < 0,001.

In Abbildung 6 sind die Genexpressionslevel von SOX9 und COLII bei juvenilen und adulten PDL-Zellen dargestellt. SOX9 ist dabei als Transkriptionsfaktor von zentraler Bedeutung für den Ablauf der Chondrogenese und reguliert die Expression von COLII. Nach 32-35 Tagen in chondrogenem Differenzierungsmedium zeigten die juvenilen PDL-Zellen ein hohes Expressionslevel von SOX9 und COLII. Eine geringe Erhöhung der Genexpression wurde auch bei den adulten PDL-Zellen beobachtet. Sie betrug jedoch bei SOX9 nur ein Drittel und bei COLII ein Fünftel der Genexpression in juvenilen PDL-Zellen.
Für die Auswertung wurde die mRNA ebenfalls auf das Niveau von β2M normalisiert und anschließend die Erhöhung in Bezug auf die Kontrolle berechnet. Als Kontrolle wurden undifferenzierte PDL-Zellen eingesetzt. Die Fehlerbalken beschreiben die Standardabweichung. Die Anzahl der Replikate betrug jeweils n = 3. *** = P < 0,001.

3.3.2 Nachweis von SOX9 bei chondrogen differenzierten PDL-Zellen

Mittels Western-Blot konnte die Expression des Transkriptionsfaktors SOX9 auf Proteinebene nachgewiesen werden. Bei der chondrogenen Differenzierung wurde im Vergleich zu den undifferenzierten PDL-Zellen, sowohl bei PDL-Zellen juveniler und adulter Patienten, lediglich SOX9 nachgewiesen. Hinweise auf die Expression von COLII wurden in beiden differenzierten Zellreihen nicht gefunden. Undifferenzierte, immortalisierte CPCs dienten dabei als Kontrollgruppe. In den folgenden Abbildungen zeigen sich die positiven Immunreaktionen für die jeweiligen Proteine auf den PVDF-Membranen. Das Laufverhalten der Proteine, also deren Molekülgewichte, wurden mit der zuvor eingezeichneten Proteinleiter verglichen. Es wurde für SOX9 ein Molekulargewicht von 56 kDa bestimmt. Als Housekeeping-Gen wurde Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) mit einem Molekulargewicht von 37 kDa eingesetzt. Unterschiedlich aufgetragene Zellmengen, die zu möglichen Intensitätsunterschieden führten, mussten mittels eines Housekeeping-Gens normalisiert werden. Erst nach der Normalisierung erfolgte eine statistische Auswertung, wie oben beschrieben.

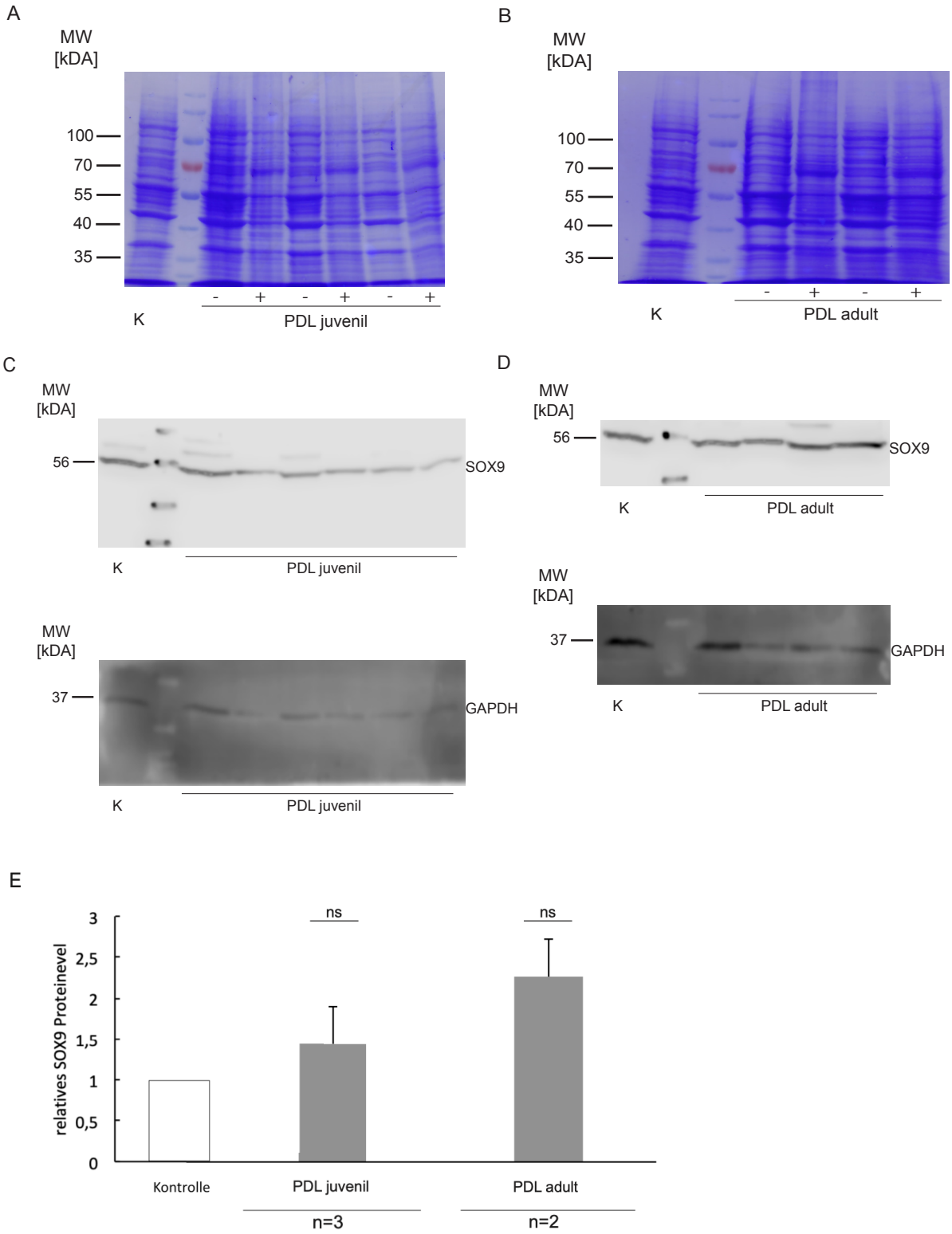


Abbildung 7: Nachweis von SOX9 auf Proteinebene: (A) Coomassie-Färbung des Western-Blots (juvenil): K = Kontrollgruppe undifferenzierte CPCs, - = undifferenzierte PDL-Zellen, + = differenzierte PDL-Zellen. Für die Darstellungen B, C und D gilt selbiges Muster. (B) Coomassie-Färbung des Western-Blots (adult). (C) Proteinbanden für SOX9 bei einem Molekulargewicht von 56 kDa und einer AK-Verdünnung von 1:1000 und GAPDH bei einer AK-Verdünnung von 1:2500 (juvenil). Das Housekeeping-Gen GAPDH diente der Normalisierung. (D) Proteinbanden für SOX9 (adult). (E) Relatives Proteinlevel von SOX9 bei juvenil und adult. Als Kontrolle wurden undifferenzierte PDL-Zellen eingesetzt. Die Ergebnisse

sind die Mittelwerte von drei Experimenten, die Anzahl der Replikate ist n = 3 bzw. n = 2. Die Fehlerbalken beschreiben die Standardabweichung. ns = nicht signifikant.

In Abbildung 7 ist das Ergebnis des Western-Blots zum Nachweis von SOX9 dargestellt. Als Kontrollgruppe dienten in beiden Blots undifferenzierte CPCs. Die Abbildungen A und B zeigen die Coomassie-Färbung der Western-Blots mit juvenilen und adulten PDL-Zellen. In C und D wird SOX9 auf Proteinebene nachgewiesen und zeigt charakteristische Banden bei 56 kDa. Die Proteinbanden von GAPDH liegen bei 37 kDa und sind jeweils darunter dargestellt. COLII war zwar in den undifferenzierten Kontrollen, nicht aber in den differenzierten PDL-Zellen nachzuweisen. Die quantitative Auswertung von SOX9 auf Proteinebene im Vergleich zur undifferenzierten Kontrolle ist in E verdeutlicht. Das relative Proteinlevel war sowohl bei juvenilen als auch bei adulten Zellen hochreguliert. Bei den adulten PDL-Zellen war der Wert 2,3-fach so hoch wie in der Kontrolle, bei den juvenilen PDL-Zellen aber lediglich um den Faktor 1,4 erhöht. Die Fehlerbalken beschreiben die Standardabweichung. Die Anzahl der Replikate beträgt n = 3 bzw. n = 2.

3.3.3 Immunzytochemischer Nachweis von SOX9

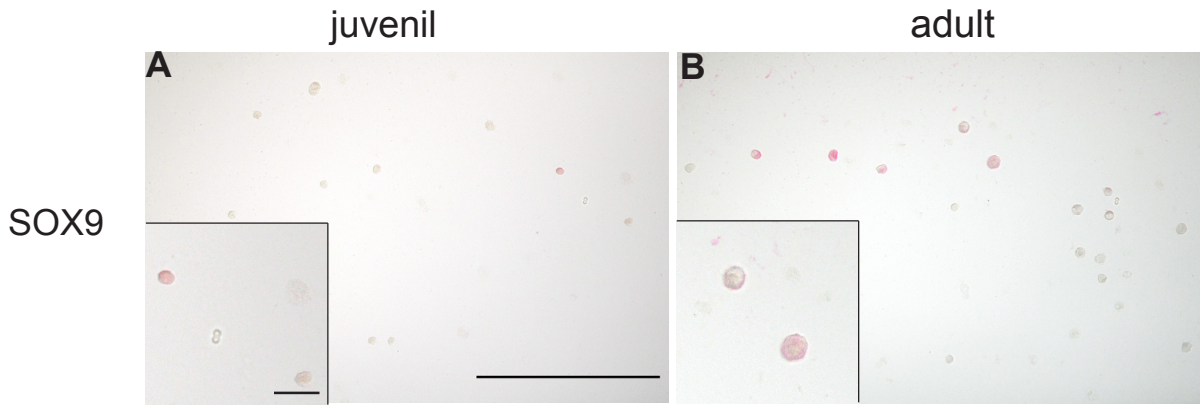


Abbildung 8: Immunzytochemischer Nachweis von SOX9: (A) Nachweis von SOX9 (juvenil) nach 32-35 Tagen. (B) Nachweis von SOX9 (adult) nach 32-35 Tagen. Die abgebildeten Messbalken entsprechen 12,5 µm bzw. 100 µm. Vergrößerung 80x bzw. 40x.

Abbildung 8 zeigt den immunzytochemischen Nachweis von SOX9 in juvenilen und adulten PDL-Zellen. Alle Aufnahmen erfolgten mit einer 40-fachen Vergrößerung. SOX9 ist ausschließlich im Zellkern und Zytoplasma lokalisiert. Die Herstellung der Alginat-Präparate ist in 2.10 ausführlich erklärt.

3.4 Osteogene Differenzierung

3.4.1 Relatives mRNA-Level von osteogen differenzierten PDL-Zellen

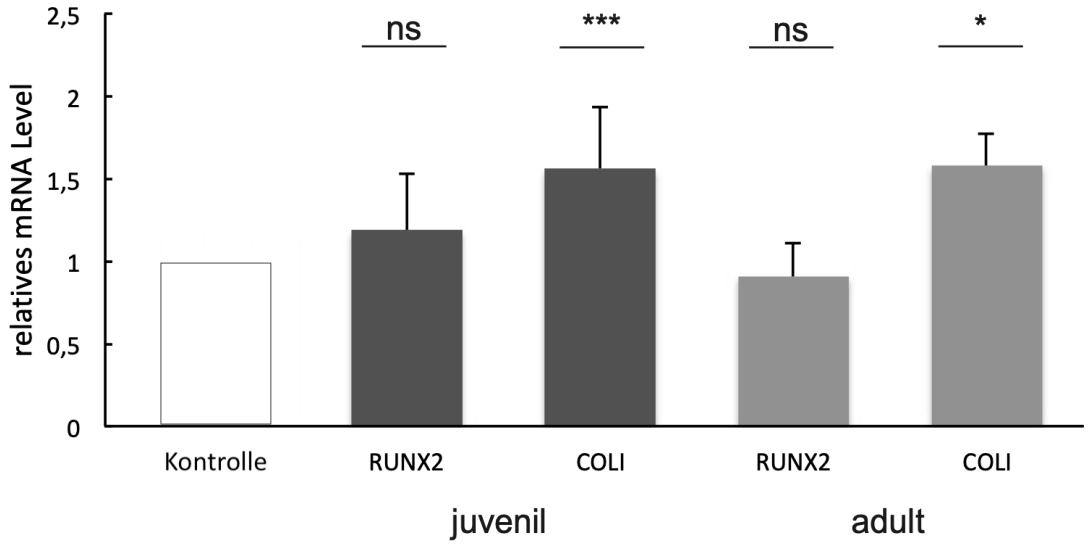


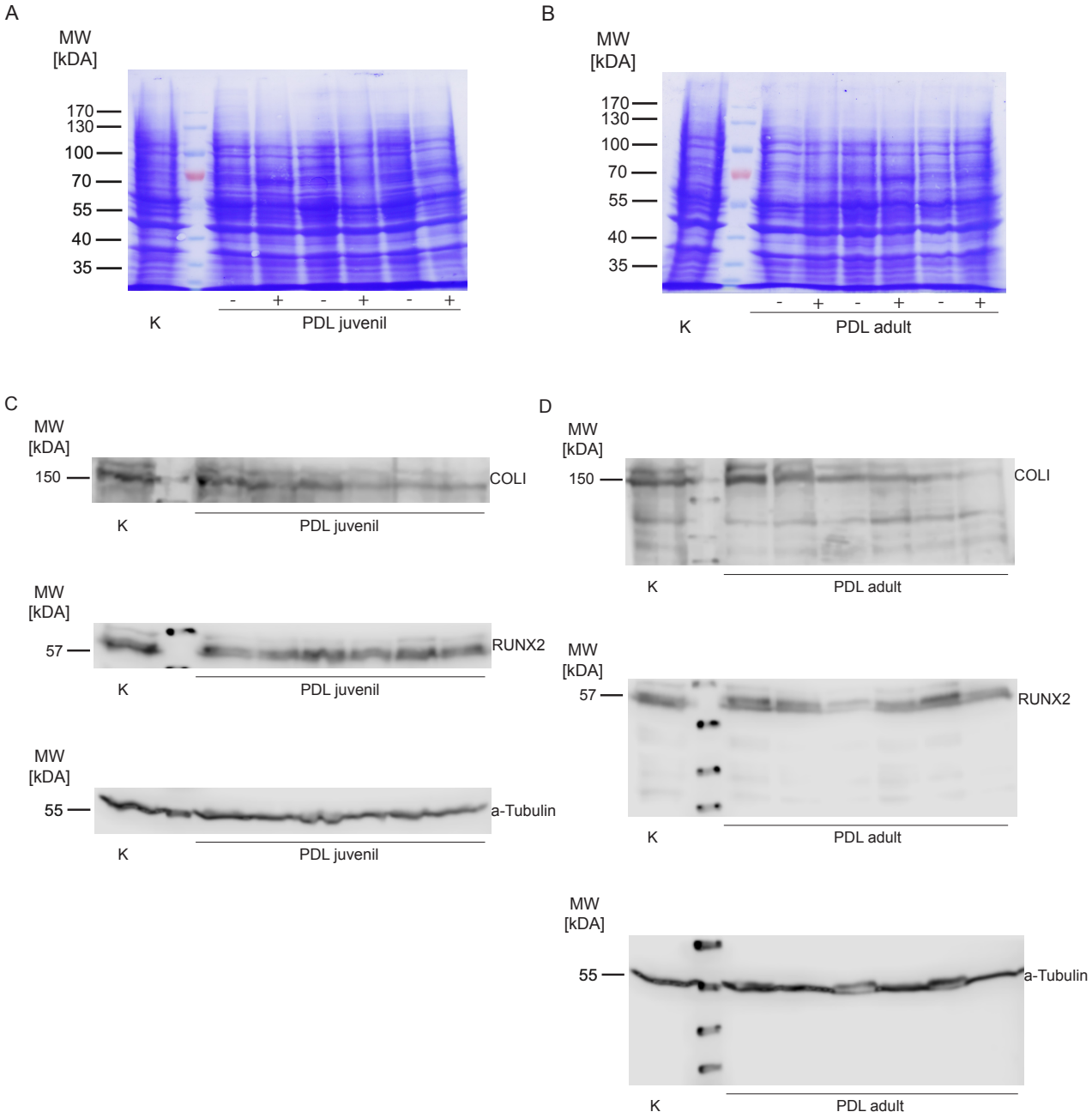
Abbildung 9: Relatives mRNA-Level osteogen differenzierter PDL-Zellen: Das Genexpressionslevel von RUNX2 ist bei den juvenilen PDL-Zellen um ein Fünftel hochreguliert, bei den adulten PDL-Zellen hingegen leicht erniedrigt. Es zeigen sich bei juvenilen und adulten PDL-Zellen nach 10 Tagen in osteogenem Differenzierungsmedium ähnliche Genexpressionslevel bei COLI im Vergleich zur Kontrolle. Als Kontrolle wurden undifferenzierte PDL-Zellen eingesetzt. Die Ergebnisse sind die Mittelwerte von drei Experimenten, die Anzahl der Replikate ist n = 3. Die Fehlerbalken beschreiben die Standardabweichung. * = P < 0,05, *** = P < 0,001, ns = nicht signifikant.

In Abbildung 9 sind die Genexpressionslevel von RUNX2 und COLI bei juvenilen und adulten PDL-Zellen dargestellt. RUNX2 ist ein Transkriptionsfaktor der „runt-domain"-Genfamilie, der für die osteogene Differenzierung essentiell ist. Er stellt den frühesten osteogenen Marker dar. COLI wird durch den Transkriptionsfaktor RUNX2 hochreguliert.

Nach 10 Tagen in osteogenem Differenzierungsmedium zeigten sich bei juvenilen und adulten PDL-Zellen ähnliche Genexpressionslevel bei COLI im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. RUNX2 hingegen war bei den juvenilen PDL-Zellen um ein Fünftel hochreguliert und bei den adulten PDL-Zellen um ein Zehntel leicht herunterreguliert.

Für die Auswertung wurde die mRNA auf β2M normalisiert und anschließend die Erhöhung in Bezug auf die Kontrolle berechnet. Als Kontrolle wurden undifferenzierte PDL-Zellen eingesetzt. Die Fehlerbalken beschreiben die Standardabweichung. Die Anzahl der Replikate beträgt jeweils n = 3. * = P < 0,05, *** = P < 0,001, ns = nicht signifikant.

3.4.2 Nachweis von Kollagen-Typ-I und RUNX2 bei osteogen differenzierten PDL-Zellen



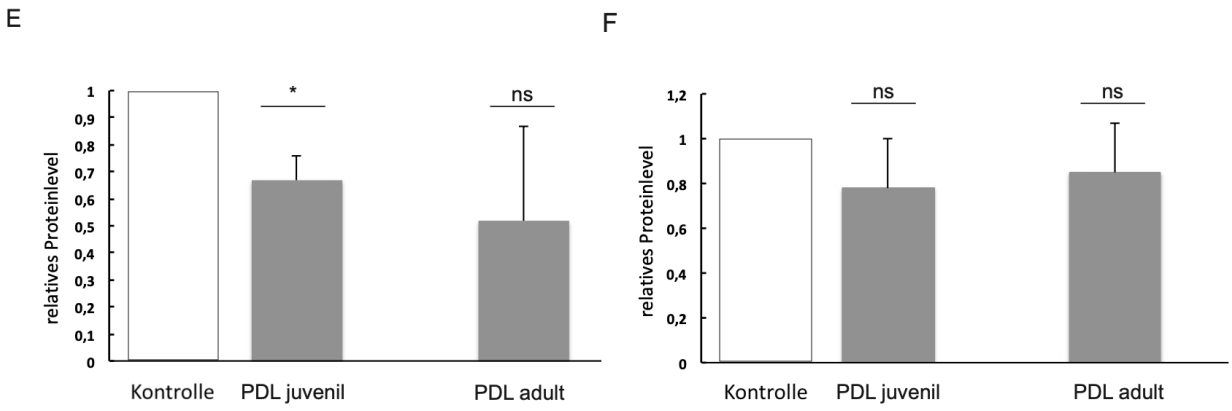


Abbildung 10: Nachweis von COLI und RUNX2 auf Proteinebene: (A) Coomassie-Färbung des Western-Blots (juvenil): K = Kontrollgruppe undifferenzierte CPCs, - = undifferenzierte PDL-Zellen, + = differenzierte PDL-Zellen. Für die Darstellungen B, C und D gilt selbiges Muster. (B) Coomassie-Färbung des Western-Blots (adult). (C) Proteinbanden für COLI bei einem Molekulagewicht von 150 kDa (AK-Verdünnung von 1:500) sowie Proteinbanden für RUNX2 mit einem Molekulargewicht von 57 kDa (AK-Verdünnung von 1:1000) und Proteinbanden für α-Tubulin (AK-Verdünnung von 1:5000) (juvenil). (D) Proteinbanden für COLI sowie für RUNX2 und α-Tubulin) (adult). (E) Relatives Proteinlevel von COLI bei juvenil und adult. (F) Relatives Proteinlevel von RUNX2 bei juvenil und adult. (E) und (F) Als Kontrolle wurden undifferenzierte PDL-Zellen eingesetzt. Die Ergebnisse sind die Mittelwerte von jeweils 3 Experimenten, die Anzahl der Replikate beträgt n = 3. Die Fehlerbalken beschreiben die Standardabweichung. * = $P < 0,05$, ns = nicht signifikant.

In Abbildung 10 ist das Ergebnis des Western-Blots zum Nachweis von COLI und RUNX2 dargestellt. Als Kontrollgruppe dienten in beiden Blots undifferenzierte CPCs. Die Abbildungen A und B zeigen die Coomassie-Färbung der Western-Blots mit juvenilen und adulten PDL-Zellen. In C und D wird COLI und RUNX2 auf Proteinebene nachgewiesen und zeigt charakteristische Banden bei 150 und 57 kDa. Die Proteinbanden von α-Tubulin liegen bei 55 kDa und sind jeweils darunter dargestellt. Die quantitative Auswertung der Proteine auf Proteinebene im Vergleich zur undifferenzierten Kontrolle ist in E und F verdeutlicht. Das relative Proteinlevel von COLI und RUNX2 war sowohl bei juvenil als auch bei adult herunterreguliert. COLI war bei den juvenilen PDL-Zellen um ein Drittel niedriger als in der Kontrolle. Die adulten PDL-Zellen zeigten eine um 50% niedrigere Expression von COLI. Die Auswertung von RUNX2 zeigte ein ähnliches Bild. Der Wert bei den juvenilen war um den Faktor 0,21 und bei adulten PDL-Zellen um den Faktor 0,18 herunterreguliert im Vergleich zur undifferenzierten Kontrolle. Die Fehlerbalken beschreiben die Standardabweichung. Die Anzahl der Replikate beträgt jeweils n = 3.

3.4.3 Immunzytochemischer Nachweis von Proteinen

COLI, ON und OPN konnten mittels Immunfluoreszenz erfolgreich nachgewiesen werden. Nach ca. 10 Tagen in osteogenem Differenzierungsmedium wurden die Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Die Blaufärbung der Zellkerne ist auf den Fluoreszenzfarbstoff DAPI zurückzuführen. Sowohl COLI als auch ON und OPN sind im Bereich der extrazellulären Matrix lokalisiert. Die Rotfärbung der Proteine ist auf den Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor 555 zurückzuführen. Aus Platzgründen wird auf die Darstellung jedes Immunfluoreszenzbildes verzichtet. Es wird jeweils aus der juvenilen und adulten PDL-Zellreihe ein Ergebnis präsentiert, welches repräsentativ für die aus gleicher Zellreihe stammenden anderen PDL-Zellen ist. Alle Aufnahmen am Fluoreszenzmikroskop wurden mit einer 20-fachen Vergrößerung aufgenommen. Die jeweilige Negativkontrolle zeigte keine Fluoreszenz.

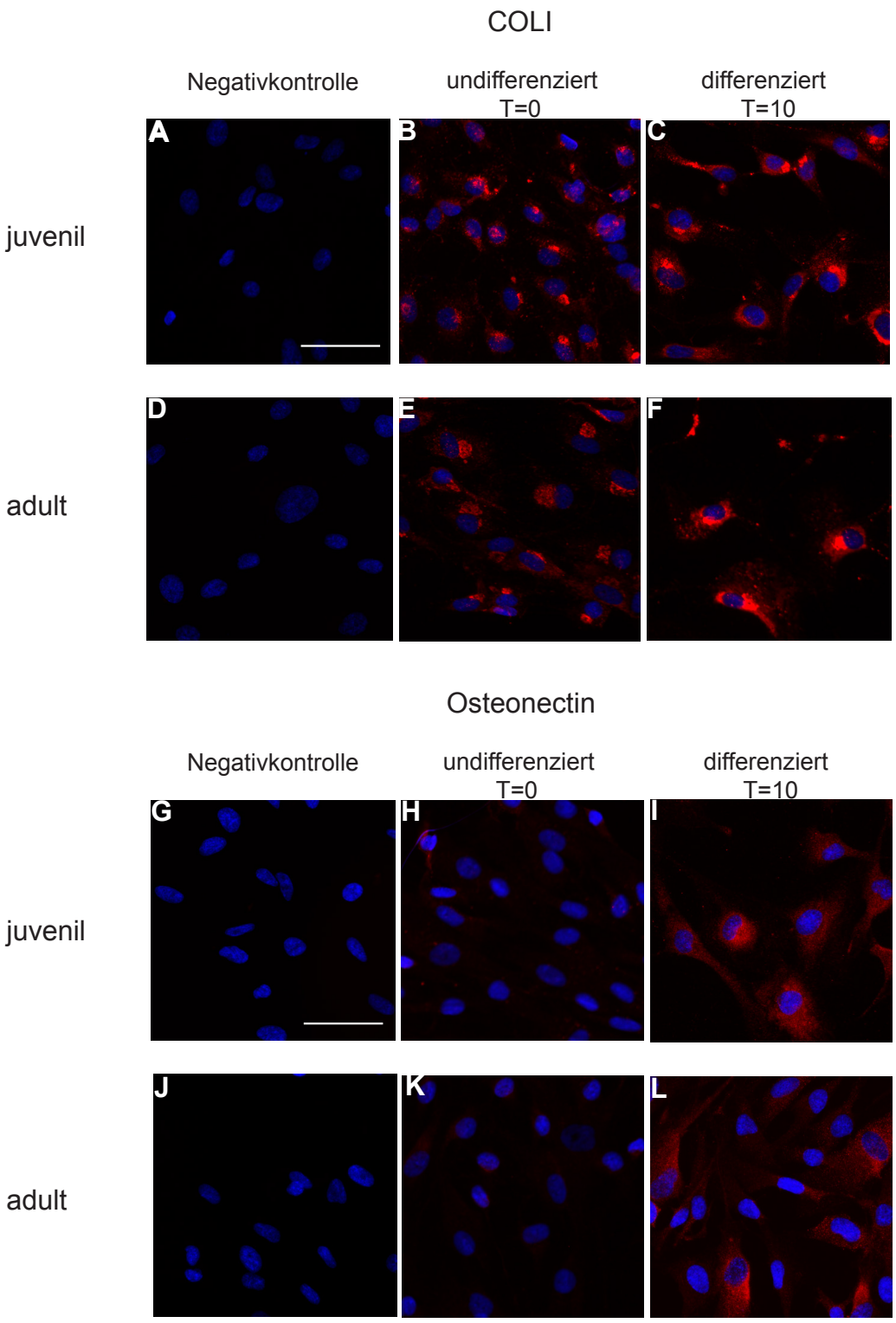


Abbildung 11: Immunzytochemischer Nachweis von COLI und Osteonectin (ON): (A) Negativkontrolle (juvenil). (B) COLI-Nachweis in undifferenzierten PDL-Zellen (juvenil) nach 0 Tagen. (C) COLI-Nachweis in osteogen differenzierten PDL-Zellen (juvenil) nach 10 Tagen. (D) Negativkontrolle (adult). (E) COLI-Nachweis in undifferenzierten PDL-Zellen (adult) nach 0 Tagen. (F) COLI-Nachweis in differenzierten PDL-Zellen (adult) nach 10 Tagen. (G) Negativkontrolle (juvenil). (H) Osteonectin-Nachweis in undifferenzierten PDL-Zellen (juvenil) nach 0 Tagen. (I) Osteonectin-Nachweis in differenzierten PDL-Zellen (juvenil) nach 10 Tagen. (J) Negativkontrolle (adult). (K) Osteonectin-Nachweis in undifferenzierten PDL-Zellen (adult) nach 0 Tagen. (L) Osteonectin-Nachweis in differenzierten PDL-Zellen (adult) nach 10 Tagen. Der abgebildete Messbalken entspricht 100 µm. Vergrößerung 20x.

Abbildung 11 zeigt den immunzytochemischen Nachweis von COLI und ON in juvenilen und adulten PDL-Zellen. Alle Aufnahmen erfolgten mit einer 20-fachen Vergrößerung. COLI ist in der EZM lokalisiert, das immunzytochemisch detektierbare ON lässt sich nicht gleichmäßig in der EZM, sondern assoziiert mit Zellen anfärben. Bei den Abbildungen A-C und G-I handelt es sich um juvenile PDL-Zellen. Die Abbildungen D-F und J-L stellen den Proteinnachweis bei den adulten PDL-Zellen dar.

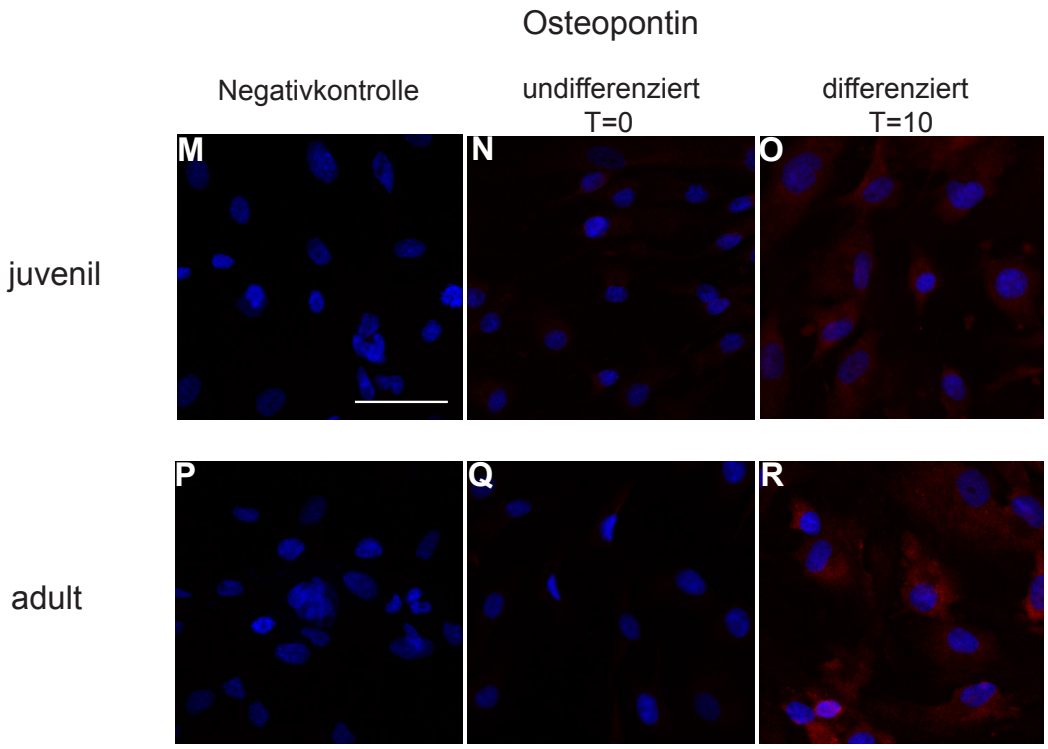


Abbildung 12: Immunzytochemischer Nachweis von Osteopontin (OPN): (M) Negativkontrolle (juvenil). (N) Osteopontin-Nachweis in undifferenzierten PDL-Zellen (juvenil) nach 0 Tagen. (O) Osteopontin-Nachweis in differenzierten PDL-Zellen (juvenil) nach 10 Tagen. (P) Negativkontrolle (adult). (Q) Osteopontin-Nachweis in undifferenzierten PDL-Zellen (adult) nach 0 Tagen. (R) Osteopontin-Nachweis in differenzierten PDL-Zellen (adult) nach 10 Tagen. Der abgebildete Messbalken entspricht 100 µm. Vergrößerung 20x.

Abbildung 12 zeigt den immunzytochemischen Nachweis von OPN in juvenilen und adulten PDL-Zellen. Alle Aufnahmen erfolgten mit einer 20-fachen Vergrößerung. OPN ist in der EZM lokalisiert. Bei den Abbildungen M-O handelt es sich um juvenile PDL-Zellen. Die Abbildungen P-R stellen den Proteinnachweis bei den adulten PDL-Zellen dar.

3.4.4 Nachweis der Aktivität der alkalischen Phosphatase

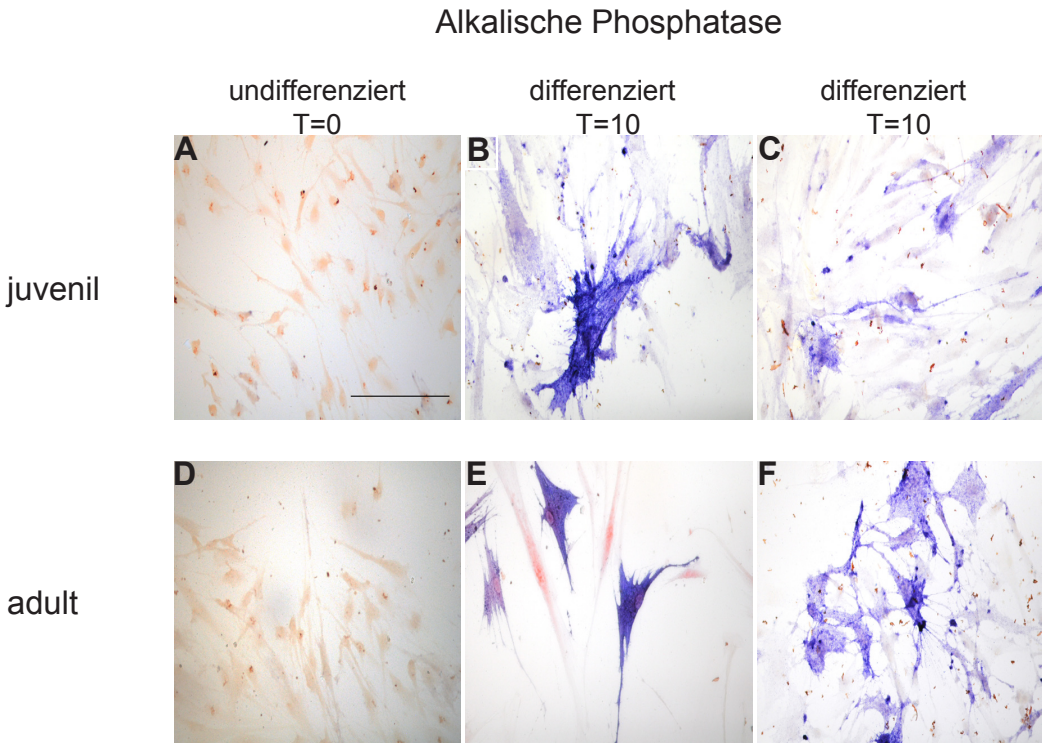


Abbildung 13: Nachweis der Aktivität der alkalischen Phosphatase (AP): (A) Kontrolle, undifferenzierte PDL-Zellen (juvenil). (B) und (C) Nachweis der Aktivität der AP in osteogen differenzierten PDL-Zellen (juvenil) nach 10 Tagen. (D) Kontrolle, undifferenzierte PDL-Zellen (adult). (E) und (F) Nachweis der Aktivität der AP in osteogen differenzierten PDL-Zellen (adult) nach 10 Tagen. Der abgebildete Messbalken entspricht 100 µm. Vergrößerung 20x.

Abbildung 13 zeigt den Nachweis der Aktivität der alkalischen Phosphatase in juvenilen und adulten PDL-Zellen. Alle Aufnahmen erfolgten mit einer 40-fachen Vergrößerung. Die osteogen differenzierten PDL-Zellen wurden jeweils für 60 min mit dem Alkalifarbstoffgemisch lichtgeschützt gefärbt. Bei den Abbildungen A-C handelt es sich um juvenile PDL-Zellen. Die Abbildungen D-F stellen die alkalische Phosphatase bei adulten PDL-Zellen dar. Zellen, die 10 Tage osteogenem Differenzierungsmedium ausgesetzt werden, weisen eine andere Morphologie auf als undifferenzierte und vergrößern sich merklich.

4 Diskussion

Genaue Untersuchungen der Strukturen des PDLs sind häufig Ziel vergangener Studien gewesen. Bevelander und Nakahara (1968) beschäftigten sich bereits im Jahre 1968 intensiv mit dem strukturellen Aufbau des menschlichen Zahnhalteapparates. Strukturelle Veränderungen des PDLs, die physiologisch im Laufe des menschlichen Lebens auftreten, wurden von Grant und Bernick (1972) untersucht. Weitere Studien sollten die Unterschiede zwischen gesundem und erkranktem Gewebe verdeutlichen (Nanci und Bosshardt 2006). Heutzutage beschäftigen sich wissenschaftliche Arbeiten über das PDL mit Stammzelleigenschaften (Seo et al. 2004; Nagatomo et al. 2006; Gay et al. 2007). Der Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren auf Proliferation und Differenzierung von PDL-Zellen wurde bereits im Jahre 2007 untersucht (Lallier und Spencer 2007). In einer weiteren Studie beschrieben Zheng et al. (2009), dass die Differenzierungsbereitschaft von PDL-Zellen im Alter sinken wird und konnten dies durch einen Vergleich von juvenilen und adulten Zellen nachweisen. Ein direkter Vergleich der Differenzierungsbereitschaft von juvenilen und adulten PDL-Zellen fand in der Vergangenheit jedoch in dieser Form noch nicht statt und soll unter anderem im Folgenden diskutiert werden.
Zunächst wurden in der hier vorliegenden Arbeit PDL-Zellen über einen bestimmten Zeitraum adipogenem, chondrogenem und osteogenem Differenzierungsmedium ausgesetzt und mit der undifferenzierten Kontrolle verglichen. Anschließende Nachweise spezifischer Proteine sowie Färbungen sollten Aufschluss über eine effektive Differenzierung der PDL-Zellen geben und damit deren möglichen mesenchymalen Stammzellcharakter untersuchen.

4.1 Klinische Bedeutung

Grob unterteilt besteht das Parodontium aus vier Gewebsanteilen, die zusammen eine funktionelle Einheit darstellen und so den Zahn in der Alveole des Kieferknochens bindegewebig befestigen. Dabei wird zwischen den zwei Hartgeweben, Alveolarknochen und Wurzelzement, und den zwei Weichgeweben, PDL und Gingiva, unterschieden. Als konnektives Gewebe verbindet das PDL die Zahnwurzel mit dem Alveolarknochen und genießt vor allem in der Kieferorthopädie besondere Aufmerksamkeit. Durch Kraftappli-

kation einer kieferorthopädischen Behandlung oder kaufunktionelle Belastung des Zahnes wird die Kollagensynthese stimuliert und so der parodontale Faserapparat an neue funktionelle Belastungen angepasst (Hellwig et al. 2013). Wie bereits erwähnt ist das PDL somit einer dauerhaften Erneuerung unterworfen und keinesfalls ein ausschließlich mechanisches System (Oehmke et al. 2004). Ob und wie weit sich dieses System anpassen kann, wird in vitro durch gezielte Stimulation von Zellpopulationen untersucht. Eine effektive Differenzierung in adipogene, chondrogene und osteogene Richtung zeigt, dass PDL-Zellen mesenchymalen Stammzellcharakter besitzen (Gay et al. 2007). Die Tatsache, dass das menschliche PDL in der Lage ist, Fett-, Knorpel- sowie Knochengewebe nach Stimulation synthetisieren zu können, wirft ein neues Licht auf die weitere Erforschung des Parodontiums (Jain et al. 2014). Bereits 2008 wurden in einer Studie am Tiermodell ebendiese mesenchymalen Stammzellen genutzt, um parodontale Defekte zu therapieren (Liu et al. 2008). Es ist daher essentiell, Umbauprozesse innerhalb des PDLs, die im Zuge einer Belastung des Zahnes und im Laufe eines menschlichen Lebens stattfinden, zu verstehen und daraus evidente Schlüsse ziehen zu können.

4.2 FACS-Analyse

Die Auswahl der relevanten mesenchymalen CD-Marker geht auf Santamaría (2017) und Koelling (2009) zurück. Durch die Oberflächenantigene CD73, CD90, CD105, CD146 und CD166 konnten die PDL-Zellen erfolgreich als mesenchymale Stammzellen charakterisiert werden.

4.3 Diskussion der adipogenen Differenzierung

Um eine Veränderung im Expressionsmuster von PPARγ und LPL zwischen juvenilen und adulten PDL-Zellen erkennen zu können, wurden die PDL-Zellen 21 Tage adipogenem Differenzierungsmedium ausgesetzt. PPARγ ist ein für Fettgewebe typischer Transkriptionsfaktor der nukleären Rezeptorfamilie, der sowohl in weißem als auch in braunem Fettgewebe vorkommt und als Hauptregulator der Adipogenese gilt (Tontonoz et al. 1994). Das Protein reguliert verschiedene Gene, die für den Glukose- und Fettstoffwechsel der Zelle verantwortlich sind. Eines seiner Zielgene kodiert für das Enzym LPL. LPL spielt eine

wichtige Rolle im Lipoproteinmetabolismus und dient als typischer Marker der adipogenen Differenzierung.

Die Differenzierung nach 21 Tagen ergab in den oben geschilderten Versuchen bei den juvenilen PDL-Zellen lediglich einen um 2,5-fach erhöhten Wert des PPARγ im Vergleich zur undifferenzierten Kontrolle. Die adulten PDL-Zellen zeigten einen um 40-fach erhöhten Wert. Eine erhöhte Expression von PPARγ führte offenbar auch zu einer gesteigerten Genexpression von LPL. Verglichen mit den juvenilen PDL-Zellen war die LPL bei den adulten PDL-Zellen um das 13-fache erhöht. Justesen et al. (2002) konnten 2002 zeigen, dass eine starke Tendenz zur Adipogenese im Alter besteht. Im Jahre 1991 erkannten zudem Bennett et al. (1991), dass eine Korrelation zwischen zunehmender Adipogenese im Alter und der Abnahme des osteogenen Potenzials besteht (Beresford et al. 1992). Offensichtlich wird der Weg der mesenchymalen Stammzellen zu Adipozyten im zunehmenden Alter bevorzugt zuungunsten der Osteogenese beschritten (Jakob und Schütze 2013).

Laplante et al. (2003) beschrieben schon 2003 den Einfluss von PPARγ auf die Genexpression und Aktivität von LPL und kamen zu dem gleichen Ergebnis. Um für die adipogene Differenzierung charakteristische intrazelluläre Lipidvakuolen nachzuweisen, wurde eine Oil-Red-Färbung vorgenommen. Bereits nach 10 Tagen adipogener Stimulation waren Lipidtropfen sichtbar. Es besteht eine Korrelation zwischen dieser Beobachtung und der erhöhten Expression von PPARγ und LPL (Seo et al. 2004). Diese ergänzenden histologischen Färbungen sollten jedoch lediglich als Nachweis der Bildung von Lipidtröpfchen dienen und keineswegs als quantitativer Vergleich.

Es konnte gezeigt werden, dass undifferenzierte PDL-Zellen bei Stimulation mit adipogenem Differenzierungsmedium in die adipogene Richtung gelenkt werden können und so zu spezialisierten Zellen, den Adipozyten, werden.

Ausschließlich über die relativen mRNA-Level von juvenilen und adulten PDL-Zellen kann jedoch keine weitere vergleichende Aussage über die Tendenz der Adipogenese getroffen werden. Eine wesentliche Limitation der vorliegenden Arbeit ist die nur sehr begrenzte Anzahl von untersuchten Zelllinien. Die geschilderten Experimente sollten deshalb an einer größeren Zahl von PDL-Zellisolaten unterschiedlich alter Spender und unter Einbeziehung weiterer Markerproteine wiederholt werden.

4.4 Diskussion der chondrogenen Differenzierung

Für die chondrogene Differenzierung wurden die PDL-Zellen für mindestens vier Wochen in einer Alginatkultur chondrogen differenziert. Die Genexpressionslevel von SOX9 und COLII ergaben enorme Unterschiede zwischen juvenilen und adulten PDL-Zellen. Bei juvenilen PDL-Zellen zeigte die Genexpression von SOX9 einen um 32,5-fach erhöhten Wert im Vergleich zur undifferenzierten Kontrolle. Die gemeinsame Erhöhung von SOX9 und COLII kann auf die von Akiyama et al. (2002) beschriebene positive Regulierung des COLII durch SOX9 zurückgeführt werden.

Auf Proteinebene zeigte sich ein anderes Bild. Bei vier Wochen Differenzierungsdauer konnte COLII hier nicht nachgewiesen werden. Das Proteinlevel von SOX9 war sowohl bei den juvenilen (1,4-fach) und als auch bei den adulten PDL-Zellen (2,3-fach) erhöht. Zwischen beiden Zellreihen gab es dennoch einen nennenswerten Unterschied. Vergleicht man die Ergebnisse der qRT-PCR mit denen auf Proteinebene, ist festzustellen, dass das Proteinlevel von SOX9 der juvenilen PDL-Zellen unter dem der adulten PDL-Zellen liegt, obwohl die relativen mRNA-Level zuvor eine andere Tendenz zeigten. Auf Proteinebene wird deutlich, dass zwar eine Erhöhung von SOX9 verzeichnet werden konnte, der Unterschied jedoch marginal war. Die Differenzierungsbereitschaft juveniler und adulter PDL-Zellen war sehr ähnlich. An dieser Stelle wäre es denkbar, weitere PDL-Zellen höheren Spenderalters für die Versuche hinzuzuziehen, um mögliche Unterschiede hervorzuheben, die aufgrund des zu geringen Altersunterschiedes des zur Verfügung stehenden Materials noch nicht dargestellt werden konnten. Die anschließende Immunzytochemie lieferte einen Nachweis von SOX9, das überwiegend im Zellkern lokalisiert ist. Der Export von SOX9 ins Zytoplasma wird durch ein Exportsignal der HMG-Domäne im Zellkern geregelt (Gasca et al. 2002).

Da die PDL-Zellen als multipotente Vorläuferzellen zur chondrogenen Differenzierung befähigt sind (Gay et al. 2007), ist es naheliegend, dass es sich um mesenchymale Stammzellen handelt (Seo et al. 2004). Auf mRNA- und Proteinlevel konnte sowohl bei den juvenilen als auch bei den adulten PDL-Zellen SOX9 nachgewiesen werden. SOX9 ist als Transkriptionsfaktor für die Regulierung des Proteins COLII zuständig. Ein Nachweis von COLII war trotz Erhöhung von SOX9 während der chondrogenen Differenzierung nicht erfolgreich, was möglicherweise darauf hindeuten könnte, dass SOX9 in diesem Fall keinen induktiven Effekt auf die Expression von COLII hat.

SOX9 beeinflusst nicht nur die Chondrogenese maßgeblich, sondern auch die Differenzierung hypertropher Chondrozyten zu Osteoblasten (Dy et al. 2012). Eine negative Korrelation zwischen der Expression von SOX9 und dem osteogenen Transkriptionsfaktor RUNX2 konnte durch Untersuchungen mit multipotenten chondrogenen Vorläuferzellen gezeigt werden. Es ließ sich demnach eine erhöhte Expression von SOX9 infolge der Herunterregulierung von RUNX2 feststellen (Koelling et al. 2009).

4.5 Diskussion der osteogenen Differenzierung

Zwischen juvenilen und adulten PDL-Zellen ergab der anschließende Vergleich der Genexpression von RUNX2 nach 10 Tagen osteogener Stimulierung eine Hochregulierung um ein Fünftel. Die Expression von COLI wird von dem Transkriptionsfaktor RUNX2 reguliert (Ducy et al. 1997). Auf mRNA-Level zeigte sich demnach auch eine Erhöhung von COLI um 55% verglichen mit der undifferenzierten Kontrolle. Eine andere Tendenz wurde bei den adulten PDL-Zellen deutlich. Hier induzierte eine Herunterregulierung von RUNX2 um ein Zehntel offenbar die Hochregulierung von COLI um 56%. Offensichtlich spielte nicht ausschließlich RUNX2 bei der Regulierung von COLI eine Rolle und hatte einen induktiven Effekt auf seine Expression (Ducy et al. 1996). RUNX2 steht außerdem unter maßgeblichem Einfluss von Co-Aktivatoren, Co-Repressoren, anderen Transkriptionsfaktoren und extrazellulären Faktoren, die sich auf seine Genexpression auswirken (Ducy et al. 1997).

Auf Proteinebene war sowohl RUNX2 als auch COLI bei juvenilen und adulten PDL-Zellen im Vergleich zur Kontrolle herunterreguliert. Eine geringere Proteinexpression von RUNX2 induzierte demnach die Herunterregulierung von COLI. Bislang galt die Annahme, dass die osteogene Differenzierungsbereitschaft der PDL-Zellen im Alter sinkt und damit auch die Proteinexpression (Benatti et al. 2008; Benatti et al. 2009; Du et al. 2017). Krieger et al. (2013) kamen 2013 erstmals zu dem Ergebnis, dass die Fibroblastendichte im menschlichen PDL mit zunehmendem Alter sinkt, woraus sich möglicherweise Verzögerungen in der Kollagenfaserproduktion ergeben (Needleman 2018). Die Faserbündel des PDL sind bei Erwachsenen anders organisiert und die Umsatzrate der Fibroblasten ist reduziert, was wiederrum zu geänderten elastischen Eigenschaften führt (Ren et al. 2003). Da die Zahnmobilität bei Erwachsenen folglich geringer ist, sollte eine kieferorthopädische Behandlung im Alter mit geringerer Kraft durchgeführt und in der Anfangsphase mehr Zeit

eingeplant werden (Tanne et al. 1998). In einer 2008 angelegten Studie konnten Ren et al. (2008) histologisch zeigen, dass das PDL von juvenilen und adulten Ratten in den Druckbereichen durch Kraftapplikation umgebaut wurde. Dieser Umbau vollzog sich bei juvenilen Ratten früher und war stärker ausgeprägt. Mayahara et al. (2007) untersuchten 2007 den Einfluss von mechanischen Stress auf juvenile und adulte PDL-Zellen und konnten sowohl eine erhöhte Produktion von Prostaglandin (PGE2) als auch eine signifikant erhöhte Genexpression der Cyclooxygenase (COX) im Alter nachweisen (Ohzeki et al. 1999). Ähnliche Untersuchungen, die im Alter eine erhöhte Produktion von Enzündungsmediatoren zeigten, wurden an Ratten durchgeführt (Abiko et al. 1998). Diese Ergebnisse können positiv mit der Beschleunigung des alveolären Knochenabbaus zusammenhängen. Es liegen zwar einige Studien zur histologischen Untersuchung der Zahnmobilität vor, jedoch deutlich weniger biomechanische Untersuchungen des PDL (Severson et al. 1978).

Der Nachweis der erfolgreichen osteogenen Differenzierung von PDL-Zellen erfolgte zum einen über die Proteinexpression osteogener Marker, wie z.B. RUNX2, COLI, ON und OPN, zum anderen über die Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase (AP) (Ram et al. 2015). Diese klassischen osteogenen Marker sind im physiologischen Knochengewebe reichhaltig vorhanden (Aubin 1998). Osteogene Markerproteine wie COLI, ON und OPN konnten nach 10 Tagen osteogener Stimulation mittels Immunfluoreszenz sowohl in juvenilen als auch adulten PDL-Zellen erfolgreich nachgewiesen werden. Osteogen differenzierte PDL-Zellen zeigten die Aktivität der AP, die in der Phase der Matrixproduktion exprimiert wird (Golub et al. 1992). Sawa et al. (2004) untersuchten 2004 die Expression der AP in PDL-Zellen juveniler und adulter Spender und stellten fest, dass die Aktivität der AP in juvenilen PDL-Zellen stärker ausgeprägt ist als in adulten. Die effektive Differenzierung zeigt, dass juvenile und adulte PDL-Zellen in der Lage sind, sich anzupassen (Nagatomo et al. 2006).

Eine Schlüsselrolle beim Verständnis der osteogenen Stimulation nehmen Untersuchungen mit Stimulation durch Dexamethason ein. Rickard et al. (1996) beschrieben 1996, dass Dexamethason die Kalzifizierung der EZM moduliert. Es wurde jedoch auch gezeigt, dass das artifizielle Dexamethason als Glukokortikoid eher zu einer Dedifferenzierung führt (Pereira et al. 2002), indem die Expression des Transkriptionsfaktors RUNX2 inhibiert wird. Einen steigernden Effekt hat Dexamethason aber offensichtlich auf die Enzymakti-

vität der alkalischen Phosphatase (Beloti und Rosa 2005). Man vermutet, dass sich Glukokortikoide auf die Genexpression von RUNX2 in den frühen Differenzierungsstadien hemmend und in den späten Stadien stimulierend auswirkt (Viereck et al. 2002; Li et al. 2005).

Sowohl bei der chondrogenen als auch osteogenen Differenzierung fiel auf, dass ein Unterschied zwischen mRNA- und Proteinlevel besteht. Die relativen mRNA-Level können einen ersten Hinweis auf die spätere gebildete Menge an Protein geben, der jedoch nicht als zwingend verlässlich eingestuft werden sollte. Diese Korrelation hängt von unterschiedlichen biologischen und technischen Faktoren ab (Maier et al. 2009). Zu den biologischen Faktoren zählen die Translationseffizienz, posttranskriptionelle Mechanismen, die an der Umwandlung von mRNA in Protein beteiligt sind, und Proteinhalbwertszeiten. Die Untersuchung der Korrelation von mRNA- und Proteinmengen ist allerdings experimentell aufwändig und teilweise fehleranfällig (Greenbaum et al. 2003).

5 Zusammenfassung

Der Faserapparat des menschlichen Parodontiums ist sowohl strukturellen Alterungsprozessen als auch einer Anpassung an funktionelle Belastungen unterworfen und zeigt damit Eigenschaften eines dynamischen Systems. Strukturelle Untersuchungen des Parodontalligaments wurden in der Vergangenheit häufig vorgenommen. Heutzutage stehen jedoch Untersuchungen in Hinblick auf Stammzellen und deren Eigenschaften im Vordergrund. Durch das multipotente Differenzierungsverhalten der Parodontalligament-Zellen können sie sich zwar in unterschiedliche Zelltypen differenzieren, sind aber auf eine Gewebeart festgelegt. Ziel dieser Arbeit war es, Parodontalligament-Zellen unterschiedlichen Spenderalters hinsichtlich ihrer adipogenen, chondrogenen und osteogenen Differenzierungsbereitschaft zu untersuchen und damit mesenchymalen Stammzellcharakter nachzuweisen. Alle für die Arbeit relevanten Zellen stammten aus dem Parodontalligament zuvor extrahierter Zähne, die zunächst durch entsprechendes Medium stimuliert wurden. Eine vor den jeweiligen Differenzierungen angelegte FACS-Analyse diente zum Charakterisieren der Parodontalligament-Zellen durch die mesenchymalen Oberflächenantigene CD73, CD90, CD105, CD146 und CD166. Es konnte nachgewiesen werden, dass es sich um mesenchymale Stammzellen handelt. Charakteristische Marker der jeweiligen Differenzierungslinie konnten mittels quantitativer Echtzeit-PCR, Western-Blot, Immunfluoreszenzfärbungen und Immunzytochemie nachgewiesen werden. Die Ergebnisse zeigten, dass Parodontalligament-Zellen als multipotente Vorläuferzellen in der Lage sind sich adipogen, chondrogen und osteogen zu differenzieren.

Bei der adipogenen Differenzierung waren beide betrachteten charakteristischen Marker, PPARγ und LPL, sowohl bei juvenilen als auch adulten Parodontalligament-Zellen im Vergleich zur undifferenzierten Kontrolle erhöht. Die chondrogen differenzierten Parodontalligament-Zellen zeigten im Vergleich zur Kontrolle eine erhöhte Genexpression von SOX9 und COLII, während ausschließlich die Proteinexpression von SOX9 erhöht war. Die Tendenz der Erhöhung der relativen mRNA-Level von juvenilen und adulten Parodontalligament-Zellen wurde durch die Auswertung der Western-Blots und die damit gebildete Menge an Protein bestätigt. Mithilfe der Immunzytochemie konnte SOX9 im Zellkern nachgewiesen werden.

Bei osteogen differenzierten juvenilen Parodontalligament-Zellen zeigte sich im Vergleich zu den adulten eine Erhöhung des mRNA-Levels von RUNX2. COLI war bei beiden Zellreihen erhöht. Hier wurde die zuvor erkennbare Tendenz der mRNA-Level von juvenil und adult durch die Auswertung der Western-Blots nicht bestätigt. Die erfolgreiche osteogene Differenzierung konnte in diesem Fall zum einen über den immunzytochemischen Nachweis der Proteine COLI, ON und OPN mittels Immunfluoreszenz und zum anderen über die alkalische Phosphatase gezeigt werden.

Diese Arbeit bietet eine fundierte Grundlage für weitere Untersuchungen des menschlichen Parodontiums hinsichtlich der Differenzierungsbereitschaft. Für einen weiteren Vergleich von Parodontalligament-Zellen unterschiedlichen Spenderalters ist es essentiell, zusätzlich zu den in dieser Arbeit berücksichtigten beiden Altersgruppen, auch Patienten höheren Alters in die Untersuchungen miteinzubeziehen, um mögliche Unterschiede hervorzuheben, die aufgrund des geringen Altersunterschiedes des zur Verfügung stehenden Materials noch nicht dargestellt werden konnten. Als weitere Ergänzung könnte in der Zukunft ebenso ein Augenmerk auf zusätzliche Marker und den Vergleich unterschiedlicher Differenzierungsdauer gelegt werden.

6 Literaturverzeichnis

Abiko Y, Shimizu N, Yamaguchi M, Suzuki H, Takiguchi H (1998): Effect of aging on functional changes of periodontal tissue cells. Ann Periodontol 3, 350–69

Akiyama H, Chaboissier M, Martin J, Schedl A, de Crombrugghe B (2002): The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. Genes Dev 16, 2813–28

Aubin J (1998): Bone stem cells. J Cell Biochem Suppl 72, 73–82

Barczyk M, Bolstad AI, Gullberg D (2013): Role of integrins in the periodontal ligament: organizers and facilitators. Periodontal 2000 63, 29-47

Beloti M, Rosa A (2005): Osteoblast differentiation of human bone marrow cells under continuous and discontinuous treatment with dexamethasone. Braz Dent J 16, 156–61

Benatti B, Silvério K, Casati M, Sallum E, Nociti F (2008): Influence of aging on biological properties of periodontal ligament cells. Connect Tissue Res 49, 401–8

Benatti B, Silvério K, Casati M, Sallum E, Nociti Jr. F (2009): Inflammatory and bone-related genes are modulated by aging in human periodontal ligament cells. Cytokine 46, 176–81

Bennett J, Joyner C, Triffitt J, Owen M (1991): Adipocytic cells cultured from marrow have osteogenic potential. J Cell Sci 99, 131–9

Beresford J, Bennett J, Devlin C, Leboy P, Owen M (1992): Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures. J Cell Sci 102, 341–51

Beresford J, Graves S, Smoothy C (1993): Formation of mineralized nodules by bone derived cells in vitro: a model of bone formation? Am J Med Genet 45, 163–78

Bernhardt K: Sourcing and characterisation of human cementoblasts. Med. Diss. Göttingen 2018

Bevelander G, Nakahara H (1968): The fine structure of the human peridental ligament. Anat Rec 162, 313–25

Bi W, Deng J, Zhang Z, Behringer R, de Crombrugghe B (1999): Sox9 is required for cartilage formation. Nat Genet 22, 85–9

Butler W (1989): The nature and significance of osteopontin. Connect Tissue Res 23, 123–36

Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J (2007): Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. Stem Cells 25, 2739–49

Denhardt D, Guo X (1993): Osteopontin: a protein with diverse functions. FASEB J 7, 1475–82

Du T, Liu N, Gu B, Li Y, Yuan Y, Zhang W, Zhang T (2017): Effects of aging on the proliferation and differentiation capacity of human periodontal ligament stem cells. Chinese Med Sci J 32, 83–91

Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, Smith E, Bonadio J, Goldstein S, Grundberg C et al. (1996): Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. Nature 382, 448–52

Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall A, Karsenty G (1997): Osf2/Cbfa1: A transcriptional activator of osteoblast differentiation. Cell 89, 747–54

Ducy P, Starbuck M, Priemel M, Shen J, Pinero G, Geoffroy V, Amling M, Karsenty G (1999): A Cbfa1-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. Genes Dev 15, 1025–36

Dy P, Wang W, Bhattaram P, Wang Q, Wang L, Ballock R, Lefebvre V (2012): Sox9 directs hypertrophic maturation and blocks osteoblast differentiation of growth plate chondrocytes. Dev Cell 22, 597–609

Foster LF, Nociti FH, Somerman MJ: Tooth Root Development. In: Huang G, Thesleff I (Hrsg.): Stem cells in craniofacial development and regeneration. John Wiley & Sons, New Jersey 2013, 153-79

Frank O, Heim M, Jakob M, Barbero A, Schafer D, Bendik I, Dick W, Heberer M, Martin I (2002): Real-time quantitative RT-PCR analysis of human bone marrow stromal cells during osteogenic differentiation in vitro. J Cell Biochem 85, 737–46

Gasca S, Canizares J, De Santa Barbara P, Mejean C, Poulat F, Berta P, Boizet-Bonhoure B (2002): A nuclear export signal within the high mobility group domain regulates the nucleocytoplasmic translocation of SOX9 during sexual determination. Proc Natl Acad Sci U S A 99, 11199–204

Gay I, Chen S, MacDougall M (2007): Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells. Orthod Craniofac Res 10, 149–60

Golub E, Harrison G, Taylor A, Camper S, Shapiro I (1992): The role of alkaline phosphatase in cartilage mineralization. Bone Miner 17, 273–8

Grant D, Bernick S (1972): The periodontium of ageing humans. J Periondontal 43, 660–7

Greenbaum D, Colangelo C, Williams K, Gerstein M (2003): Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. Genome Biol 4, 117

Häkkinen L, Oksala O, Salo T, Rahemtulla F, Larjava H (1993): Immunohistochemical localization of proteoglycans in human periodontium. J Histochem Cytochem 41, 1689–99

Häkkinen L, Strassburger S, Kähäri V, Scott P, Eichstetter I, Iozzo R, Larjava H (2000): A role for decorin in the structural organization of periodontal ligament. Lab Invest 80, 1869–80

Hellwig E, Attin T, Klimek J (Hrsg.): Einführung in die Zahnerhaltung. 6. Auflage; Deutscher Ärzte Verlag, Köln 2013

Jain A, Agarwal A, Gokhale S, Manjunath R, Mishra N (2014): Periodontal ligament stem cell: An update. J Adv Clin Res Insights 1, 120–22

Jakob F, Schütze N: Molekulare Mechanismen altersspezifischer Veränderungen des Kalzium- und Knochenstoffwechsels. In: Ganten D, Ruckpaul K (Hrsg.): Molekularmedizinische Grundlagen von altersspezifischen Erkrankungen. 1. Auflage; Springer Medizin Verlag, Berlin 2013, 344-70

Justesen J, Stenderup K, Eriksen E, Kassem M (2002): Maintenance of osteoblastic and adipocytic differentiation potential with age and osteoporosis in human marrow stromal cell cultures. Calcif Tissue Int 71, 36–44

Kähäri V, Larjava H, Uitto J (1991): Differential regulation of extracellular matrix proteoglycan (PG) gene expression. Transforming growth factor-beta 1 up-regulates biglycan (PGI), and versican (large fibroblast PG) but down-regulates decorin (PGII) mRNA levels in human fibroblasts in culture. J Biol Chem 266, 10608–15

Kerler I: Optimierung der osteogenen Differenzierung mesenchymaler Stammzellen aus Fettgewebe. Med. Diss. München 2014

Koelling S, Kruegel J, Irmer M, Path J, Sadowski B, Miro X, Miosge N (2009): Migratory chondrogenic progenitor cells from repair tissue during the later stages of human osteoarthritis. Cell Stem Cell 4, 324–35

Komori T (2006): Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. J Cell Biochem 99, 1233–9

Krieger E, Hornikel S, Wehrbein H (2013): Age-related changes of fibroblast density in the human periodontal ligament. Head Face Med 9, 22

Lallier T, Spencer A (2007): Use of microarrays to find novel regulators of periodontal ligament fibroblast differentiation. Cell Tissue Res 327, 93–109

Laplante M, Sell H, MacNaul K, Richard D, Berger J, Deshaies Y (2003): PPAR-γ activation mediates adipose depot-specific effects on gene expression and lipoprotein lipase activity. Diabetes 52, 291–99

Larjava H, Häkkinen L, Rahemtulla F (1992): A biochemical analysis of human periodontal tissue proteoglycans. Biochem J 284 (Pt 1), 267–74

Lehmann K, Wenz HJ (Hrsg.): Zahnärztliche Propädeutik: Einführung in die Zahnheilkunde. 12. Auflage; Deutscher Ärzte Verlag, Köln 2011

Li X, Jin L, Cui Q, Wang G, Balian G (2005): Steroid effects on osteogenesis through mesenchymal cell gene expression. Osteoporos Int 16, 101–8

Liu Y, Zheng Y, Ding G, Fang D, Zhang C, Bartold P, Gronthos S, Shi S, Wang S (2008): Periodontal ligament stem cell-mediated treatment for periodontitis in miniature swine. Stem Cells 26, 1065–73

Loveridge N (1999): Bone: More than a stick. J Anim Sci 77, 190–6

Lund S, Giachelli C, Scatena M (2009): The role of osteopontin in inflammatory processes. J Cell Commun Signal 3, 311–22

Mai JK: Funktionelle Anatomie für Zahnmediziner Band I. 1. Auflage; Quintessenz Verlags-GmbH, Berlin 1995

Maier T, Güell M, Serrano L (2009): Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. FEBS Letters 583, 3966–73

Mayahara K, Kobayashi Y, Takimoto K, Suzuki N, Mitsui N, Shimizu N (2007): Aging stimulates cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E production in human periodontal ligament cells after the application of compressive force. J Periondontal Res 42, 8–14

Melcher A, Chan J (1981): Phagocytosis and digestion of collagen by gingival fibroblasts in vivo: a study of serial sections. J Ultrastruct Res 77, 1–36

Morsczeck C, Reichert T, Völlner F, Gerlach T, Driemel O (2007): The state of the art in human dental stem cell research. Mund Kiefer Gesichtschir 11, 259–66

Moxham B, Evans I (1995): The effects of aging upon the connective tissues of the periodontal ligament. Connect Tissue Res 33, 31–5

Nagatomo K, Komaki M, Sekiya I, Sakaguchi Y, Noguchi K, Oda S, Muneta T, Ishikawa I (2006): Stem cell properties of human periodontal ligament cells. J Periondontal Res 41, 303–10

Nanci A, Bosshardt D (2006): Structure of periodontal tissues in health and disease. Periodontol 2000 40, 11–28

Needleman I: Aging and the Periodontium. In: Newman M, Takei H, Klokkevold P, Carranza F (Hrsg.): Newman and Carranza's Clinical Periodontology. Elsevier Health Sciences, Los Angeles 2018, 50-5

Oehmke M, Schramm C, Knolle E, Frickey N, Bernhart T, Oehmke H (2004): Age-dependent changes of the periodontal ligament in rats. Microsc Res Tech 63, 198–202

Ohzeki K, Yamaguchi M, Shimizu N, Abiko Y (1999): Effect of cellular aging on the induction of cyclooxygenase-2 by mechanical stress in human periodontal ligament cells. Mech Ageing Dev 108, 151–63

Owen T, Aronow M, Shalhoub V, Barone L, Wilming L, Tassinari M, Kennedy M, Pockwinse S, Lian J, Stein G (1990): Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. J Cell Physiol 143, 420–30

Pereira R, Delany A, Canalis E (2002): Effects of cortisol and bone morphogenetic protein-2 on stromal cell differentiation: correlation with CCAAT-enhancer binding protein expression. Bone 30, 685–91

Pfaffl M (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res 29, e45

Radlanski R: Orale Struktur- und Entwicklungsbiologie. 1. Auflage; Quintessenz Verlags-GmbH, Berlin 2011

Ram V, Parthiban, Sudhakar U, Mithradas N, Prabhakar R (2015): Bone biomarkers in periodontal disease: A Review Article. J Clin Diagn Res 9, ZE07-10

Reichert T, Störkel S, Becker K, Fisher L (1992): The role of osteonectin in human tooth development: An immunohistological study. Calcif Tissue Int 50, 468–72

Ren Y, Maltha J, Van 't Hof M, Kuijpers-Jagtman A (2003): Age effect on orthodontic tooth movement in rats. J Dent Res 82, 38–42

Ren Y, Maltha J, Stokroos L, Liem R, Kuijpers-Jagtman A (2008): Age-related changes of periodontal ligament surface areas during force application. Angle Orthod 78, 1000–5

Rickard D, Kassem M, Hefferan T, Sarkar G, Spelsberg T, Riggs B (1996): Isolation and characterization of osteoblast precursor cells from human bone marrow. J Bone Miner Res 11, 312–24

Rincon J, Young W, Bartold P (2006): The epithelial cell rests of Malassez – a role in periodontal regeneration? J Periondontal Res 41, 245–52

Ringe J: Differenzierungs- und Migrationspotential mesenchymaler Stamm- und Progenitorzellen für das in situ Tissue Enginering. Med. Diss. Berlin 2006

Santamaría S, Sanchez N, Sanz M, Garcia-Sanz J (2017): Comparison of periodontal ligament and gingiva-derived mesenchymal stem cells for regenerative therapies. Clin Oral Investig 21, 1095–102

Sawa Y, Yamaoka Y, Kuroshima S, Yoshida S (2004): Reduction of alkaline phosphatase activity in aged human osteogenic periodontal ligament fibroblasts exhibiting short telomeres. Cell Tissue Res 315, 331–7

Schroeder HE: Orale Strukturbiologie. 5. Auflage; Thieme Verlag, Stuttgart 2000

Schroeder HE, Theilade J (1966): Electron microscopy of normal human gingival epithelium. J Periondontal Res 1, 95–119

Schroeder T, Jensen E (2005): Runx2: A master organizer of gene transcription in developing and maturing osteoblasts. Birth Defects Res C Embryo Today 75, 213–25

Scott M, Nguyen V, Levi B, James A (2011): Current methods of adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells. Stem Cells Dev 20, 1793–804

Sekiya I, Noda M, Nifuji A, Shinomiya K, Harley V, Mertin S, Tsuji K, Koopman P, Yamada Y (2001): Dexamethasone enhances SOX9 expression in chondrocytes. J Endocrinol 169, 573–9

Sekiya I, Larson B, Vuoristo J, Cui J, Prockop D (2004): Adipogenic differentiation of human adult stem cells from bone marrow stroma (MSCs). J Bone Miner Res 19, 256–64

Sekiya I, Tsuji K, Koopman P, Noda M, Watanabe H, Yamada Y, Shinomiya K, Nifuji A (2000): SOX9 enhances aggrecan gene promoter/enhancer activity and is up-regulated by retinoic acid in a cartilage-derived cell line. J Biol Chem 275, 10738–44

Seo B, Miura M, Gronthos S, Bartold P, Batouli S, Brahim J, Young M, Robey P, Wang C, Shi S (2004): Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. Lancet 364, 149–55

Severson J, Moffett B, Kokich V, Selipsky H (1978): A histologic study of age changes in the adult human periodontal joint (ligament). Journal Periodontol 49, 189–200

Steffensen B, Duong A, Milam S, Protempa C, Winborn W, Magnuson V, Chen D, Zardeneta G, Klebe R (1992): Immunohistological localization of cell adhesion proteins and integrins in the periodontium. Journal of Periodontol Research 63, 584–92

Tanne K, Yoshida S, Kawata T, Sasaki A, Knox J, Jones M (1998): An evaluation of the biomechanical response of the tooth and periodontium to orthodontic forces in adolescent and adult subjects. Br J Orthod 25, 109–15

Termine J, Kleinman H, Whitson S, Conn K, McGarvey M, Martin G (1981): Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. Cell 26, 99–105

Tontonoz P, Hu E, Spiegelman B (1994): Stimulation of adipogenesis in fibloblasts by PPAR2 a lipid-acivated transcription factor. Cell 79, 1147–56

Viereck V, Siggelkow H, Tauber S, Raddatz D, Schutze N, Hüfner M (2002): Differential regulation of Cbfa1/Runx2 and osteocalcin gene expression by vitamin-D3, dexamethasone, and local growth factors in primary human osteoblasts. J Cell Biochem 86, 348–56

Wang ZH, Li XL, He XJ, Wu BJ, Xu M, Chang HM, Zhang XH, Xing Z, Jing XH, Kong DM et al. (2014): Delivery of the Sox9 gene promotes chondrogenic differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in an in vitro model. Braz J Med Biol Res 47, 279–86

Wegner M (1999): From head to toes: the multiple facets of Sox proteins. Nucleic Acids Res 27, 1409–20

Wight T (2002): Versican: a versatile extracellular matrix proteoglycan in cell biology. Curr Opin Cell Biol 14, 617–23

Worapamorn W, Li H, Pujic Z, Xiao Y, Young W, Bartold P (2000): Expression and distribution of cell-surface proteoglycans in the normal Lewis rat molar periodontium. J Periodontal Res 35, 214–24

Zheng W, Wang S, Ma D, Tang L, Duan Y, Jin Y (2009): Loss of proliferation and differentiation capacity of aged human periodontal ligament stem cells and rejuvenation by exposure to the young extrinsic environment. Tissue Eng Part A 15, 2363–71

Zimmermann D, Ruoslahti E (1989): Multiple domains of the large fibroblast proteoglycan, versican. EMBO J 8, 2975–81

Danksagungen

Zu guter Letzt möchte ich die Gelegenheit nutzen und allen Menschen, die mir immer zur Seite standen und mich unterstützt haben, großen Dank aussprechen.
Allen voran danke ich Prof. Dr. Nicolai Miosge, ohne den diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre, für seine hervorragende Betreuung, Zeit und zielführenden Anregungen.
Ebenfalls danken möchte ich Prof. Dr. mult. Thomas Meyer für seine konstruktiven Anregungen und Ergänzungen.

Ein weiterer besonderer Dank gilt Christa Bode für viele nette Gespräche und ihre engagierte Mitarbeit sowie Geduld an diesem Projekt.

Ich danke außerdem Elvira Henze für ihre Unterstützung und Jérôme Janßen, der bei methodischen und technischen Fragen immer eine passende Antwort parat hatte.

Für die gemeinsamen konstruktiven Stunden im Labor, die gegenseitige Unterstützung und Hilfestellung bei der Arbeit danke ich meinen Mitdoktoranden, Jochen Hassfeld und Nima Biji Gholamzadeh.