

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

**Untersuchung der Sekretome von Zellen des
Parodontalligaments jugendlicher und
erwachsener Patienten mittels metabolischer
Markierung und Massenspektrometrie**

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von
Astrid Jensen (geb. Steding)
aus
Langenhagen

Göttingen 2021

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer: Prof. Dr. med. dent. P. Meyer-Marcotty

Ko-Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. H. Urlaub

Prüfungskommission

Referent/in: Prof. Dr. med. dent. P. Meyer-Marcotty

Ko-Referent/in: Prof. Dr. rer. nat. H. Urlaub

Drittreferent/in: Prof. Dr. med. R. Dressel

Datum der mündlichen Prüfung: 27.09.2022

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Untersuchung der Sekretome von Zellen des Parodontalligaments jugendlicher und erwachsener Patienten mittels metabolischer Markierung und Massenspektrometrie" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 27.09.2022

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Parodontales Ligament und PDL-Zellen	2
1.1.1 Veränderungen des parodontalen Ligaments im Alter	4
1.2 Zahnbewegung	5
1.3 Gingivales zervikales Fluid.....	7
1.4 Molekulare Biologie im Zahnhalteapparat.....	8
1.5 Massenspektrometrie für Proteinanalytik.....	10
1.5.1 Isotopenmarkierung mit Aminosäuren.....	10
1.5.2 Massenspektrometrie – Aufbau und Ablauf.....	11
1.5.3 Massenspektrometrie in der Zahnheilkunde.....	14
1.6 Fragestellung der Dissertation	16
2 Material und Methoden	18
2.1 Materialien.....	18
2.1.1 Verbrauchsmaterialien.....	18
2.1.2 Chemikalien.....	19
2.1.3 Puffer und Lösungen	21
2.1.4 Geräte.....	22
2.2 Methoden	23
2.2.1 Herkunft der Proben	23
2.2.2 Zellanzucht	24
2.2.3 Passagierung und Zellernte.....	25
2.2.4 Erstellung von Zellpellets.....	27
2.2.5 Proteinbestimmung.....	27
2.2.6 Trichloressigsäure-Aceton-Präzipitation.....	28
2.2.7 SDS-PAGE	30
2.2.8 Färbung der Gele	31
2.2.9 In-Gel-Verdau für die Massenspektrometrie.....	31
2.2.10 Massenspektrometrische Analyse.....	32

2.2.11	Proteinidentifizierung und -quantifizierung	33
2.2.12	Statistische Analyse der Proteindaten	34
3	Ergebnisse	35
3.1	Entwicklung eines Versuchsablaufs	35
3.2	Proteinidentifikationen im Sekretom juveniler und adulter Probanden	38
3.3	Quantitativer Vergleich der Sekretome juveniler und adulter Probanden ...	46
3.3.1	Vergleich signifikant unterschiedlich sekretierter Proteine	48
4	Diskussion	52
4.1	Etablierung einer PDL-Zellkultur mit SILAC für MS-Analyse	52
4.2	Qualitative Analyse des Sekretoms aus PDL-Zellen	54
4.2.1	Qualitativer Vergleich der Sekretome	55
4.3	Quantitative Analyse des Sekretoms aus PDL-Zellen	57
4.4	GCF-Datenbank	63
4.5	Ausblick	63
5	Zusammenfassung	66
6	Literaturverzeichnis	67

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Zahnhalteapparats	3
Abbildung 2: Druck-Zug-Theorie der Zahnbewegung	7
Abbildung 3: Schwer markierte Aminosäuren Lysin+8 und Arginin+10	10
Abbildung 4: Aufbau eines HPLC-gekoppelten Massenspektrometers	11
Abbildung 5: Schematische Darstellung der chromatographischen Auftrennung..	12
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Elektro-Spray-Ionisation.....	13
Abbildung 7: Schematische Darstellung eines Orbitrap-Massenanalysators	14
Abbildung 8: Repräsentative Darstellung des Wachstums von PDL-Zellen	25
Abbildung 9: Ablauf der TCA-Aceton-Fällung	29
Abbildung 10: Ablauf des etablierten Versuchsablaufs.....	36
Abbildung 11: Übersicht Zellwachstum in SILAC-Medium im zeitlichen Vergleich	37
Abbildung 12: Qualitätskontrolle via Scatter Plot	39
Abbildung 13: Identifizierte Signalwege in Sekretomen der Probanden	46
Abbildung 14: Qualitätskontrolle in Histogrammform.....	47
Abbildung 15: Identifizierte Proteine in Sekretomen von PDL-Zellen	48
Abbildung 16: Differenziell sezernierte Proteine juveniler und adulter PDL-Zellen	49
Abbildung 17: Signalwege signifikant unterschiedlicher Proteine in Sekretomen..	51
Abbildung 18: Unterschiedliche Proteine nach biochemischen Prozessen	63

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien	18
Tabelle 2: Chemikalien	19
Tabelle 3: Puffer und Lösungen.....	21
Tabelle 4: Geräte	22
Tabelle 5: Die im Sekretom aller Proben identifizierten humanen Proteine.....	39
Tabelle 6: Nur in juvenilen Probanden identifizierte Proteine	45
Tabelle 7: Nur in adulten Probanden identifizierte Proteine.....	45
Tabelle 8: Unterschiedlich sezernierte Proteine juveniler und adulter Probanden	49

Abkürzungsverzeichnis

AGC	Automatische Ertragskontrolle (<i>automatic gain control</i>)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BMPs	<i>bone morphogenetic proteins</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CAL	Klinischer Attachmentverlust (<i>clinical attachment loss</i>)
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CBB	colloidal coomassie brilliant blue
DMEM	dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI	Elektrospray Ionisation
EtOH	Ethanol
FCS	Fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FWHM	Halbwertsbreite (<i>full width at half maximum</i>)
GCF	Gingivales zervikales Fluid (<i>gingival crevicular fluid</i>)
GO	<i>Gene Ontology</i>
GOBP	<i>Gene Ontology Biochemical Pathways</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
hTERT	humane Telomerase-Reverse-Transkriptase
IAA	Iodoacetamid
IL-1	Interleukin-1
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
LDS	Lithiumdodecylsulfat
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
MALDI	<i>matrix-assisted laser-desorption ionization</i>
MMPs	Matrixmetalloproteasen
OPG	Osteoprotegerin
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PDL	Parodontalligament
PDLSCs	<i>PDL stem cells</i>
PGE2	Prostaglandin E2
RANKL	<i>receptor activator of NF-κB ligand</i>
RIPA	Radioimmunopräzipitationsassay-Puffer
RT	Raumtemperatur
RUNX2	Runt-verwandter Transkriptionsfaktor 2
SDS	Natriumlaurylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

SILAC	<i>stable isotope labeling with amino acids in cell culture</i>
TCA	Trichloressigsäure
TE	Trypsin-EDTA
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TIMPs	Matrixmetalloproteasen Inhibitoren
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
TOF-MS	Flugzeitmassenspektrometer (<i>time-of-flight mass spectrometer</i>)

1 Einleitung

Das Parodontalligament (Desmodont) ist ein wesentlicher Bestandteil des Zahnhalteapparates, der für die Aufhängung von Zähnen im Knochenfach zuständig ist. Dieses Ligament besteht aus einer heterogen gemischten Zellpopulation, die für den Umbau und die Remodellierung der extrazellulären Anteile verantwortlich ist (Bevelander und Nakahara 1968; Bartold et al. 2000). Die orthodontische Steuerung der Zahnbewegung wird durch die Fähigkeit des Parodontalligaments zur Remodellierung ermöglicht.

Als Sekretom bezeichnet man alle in den extrazellulären Raum sekretierten Proteine eines bestimmten Zelltyps (Tjalsma et al. 2000). Bisher wurde das Sekretom von Parodontalligamentzellen noch nicht mittels Massenspektrometrie untersucht. Erkenntnisse über Mechanismen der kieferorthopädischen Zahnbewegung auf zellulärer und molekularbiologischer Ebene könnten dabei helfen, die Remodellierungsprozesse besser zu verstehen. Die gewonnenen Erkenntnisse könnten zukünftig zu einer Verbesserung von orthodontischen Therapien führen.

Insbesondere der Vergleich der Sekretome juveniler und adulter Patienten könnte Informationen liefern, weshalb kieferorthopädische Interventionen in beiden Patientengruppen unterschiedlich wirken. Bei der Erfassung eines Sekretoms ist die besondere Schwierigkeit zwischen sekretierten Proteinen und Proteinen des Zellkulturmediums zu unterscheiden. Um dies zu ermöglichen und um auch quantitative Unterschiede der Sekretome zu ermitteln, wurde eine metabolische Markierung der Zellen mittels SILAC (*stable isotope labeling with amino acids in cell culture*)-Technologie durchgeführt.

In den folgenden Abschnitten der Einleitung werden zunächst die physiologischen Zusammenhänge von Parodontalligament (PDL), Zahnbewegung und Sulkusfluid (Gingivales zervikales Fluid, *gingival crevicular fluid*, GCF) erläutert. Da die massenspektrometrische Analyse von Proteinen in dieser Arbeit Anwendung fand, werden auch Grundlagen dieser Methode im Folgenden beschrieben.

1.1 Parodontales Ligament und PDL-Zellen

Das Parodont ist der Zahnhalteapparat (siehe Abbildung 1) und setzt sich aus vier verschiedenen Geweben zusammen, die wiederum in Hart- und Weichgewebe unterteilt werden. Zu den Hartgeweben zählen der Alveolarknochen (bestehend aus Spongiosa und Kompakta) und das Wurzelzement, sowie auf Seiten der Weichgewebe die Gingiva und das PDL (Bartold et al. 2000). Die Funktionsweise dieser Gewebe ist klar definiert und so zählen zu den Aufgaben des Parodontiums unter anderem die Verankerung eines Zahnes im Knochen und die Abwehrfunktionen (Nanci und Bosshardt 2006).

Im Folgenden werden das PDL und sein Aufbau näher beschrieben. Entwicklungsgeschichtlich leitet sich das PDL aus dem Zahnsäckchen ab und ist ektomesenchymalen Ursprungs. Die Umwandlung von Zahnsäckchen zu parodontalem Ligament beginnt mit der Bildung des Wurzelzements. Es werden kollagene Faserbündel von Fibroblasten gebildet, die in das neu synthetisierte Wurzelzement einerseits und in die Knochenwand weiter koronal andererseits inserieren (Levy und Bernick 1968). Das Fasergeflecht wird erst nach Einstellung des Zahnes in die Okklusionsebene dichter und erscheint kontinuierlicher. Unter den Fasern sind nicht nur kollagene Fasern, sondern auch Oxytalanfasern, die zeitgleich während der Entwicklung des Parodonts gebildet und in das kollagene Fasergeflecht eingeflochten werden (Fullmer et al. 1974).

Die kollagenen Fasern innerhalb des Parodonts setzen sich aus Typ I + III Kollagen zusammen, wobei von den Fibroblasten hauptsächlich Kollagenfasern des Typ I produziert werden (Butler et al. 1975). Die Oxytalanfasern, die ebenfalls eine Verbindung zwischen Wurzelzement und Knochenfach darstellen, werden von Fibroblasten synthetisiert und verlaufen in apikokoronarer Richtung. Ihnen wird eine Bedeutung in der Regulierung des Blutflusses bei funktioneller Beanspruchung der Zähne zugesprochen (Jonas und Riede 1980).

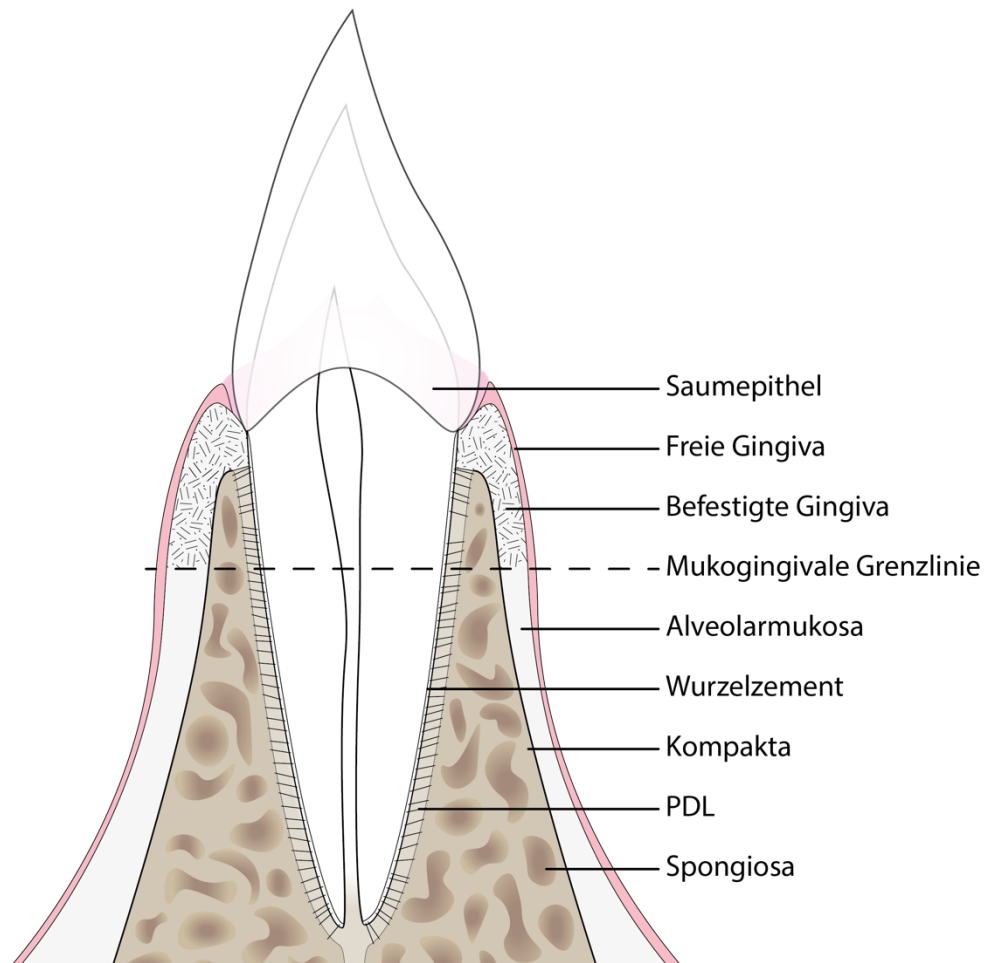


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Zahnhalteapparats. Die Abbildung zeigt schematisch den Aufbau des Zahnhalteapparates. Zwischen Wurzelzement und Alveolarknochen spannt sich das Parodontalligament (PDL) und hängt den Zahn in seinem Knochenfach syndesmatisch auf.

Die Zellen des parodontalen Ligaments sind heterogen durchmischt und setzen sich zusammen aus Fibroblasten, Zemento- und Osteoprogenitorzellen, Zemento- und Osteoblasten (Bevelander und Nakahara 1968). Die Fibroblasten sind langgezogene, spindelförmige Zellen mit ovalem Zellkern, viel endoplasmatischem Retikulum für die Produktion extrazellulärer Matrix wie z. B. der Kollagensynthese, und länglichen Zytoplasmaausläufern. Zahlenmäßig sind die Fibroblasten die größte Zellpopulation innerhalb des PDL. Die Fibroblasten liegen zwischen den Faserbündeln des parodontalen Ligaments verteilt und sind oft in Faserrichtung angeordnet. Sie sind über *gap junctions*, Desmosomen, und *tight junctions* miteinander verbunden und bilden so ein faserreiches Netzwerk (Bevelander und Nakahara 1968). Das parodontale Ligament zieht von Knochen zu Wurzelzement in Faserbündeln und verankert die Zähne in ihren Alveolen. So handelt es sich nicht um eine starre Verbindung mit dem Alveolarknochen, sondern vielmehr um eine Syndesmose (Schroeder 2000). Die Breite dieses Bindegewebes variiert rund um den Zahn zwischen

0,15 - 0,38 mm und nimmt mit dem Alter ab (Nanci und Bosshardt 2006). Die Anordnung in primäre kollagene Faserbündel hat Hassel 1993 beschrieben. Sie werden auch als Sharpey Fasern bezeichnet. Die Organisation der Fasern zu Bündeln weist eine klare Richtung auf und lässt eine Einteilung in Gruppen anhand ihrer Funktion zu (Hassell 1993). Zwischen den heterogenen Zellen des PDL finden sich auch multipotente postnatale Stammzellen (*PDL stem cells*, *PDLSCs*) (Seo et al. 2004; Trubiani et al. 2005). Diese Zellen wiesen ein vergleichbares phänotypisches Profil wie Stammzellen des Knochenmarks auf, jedoch mit einer höheren Teilungsrate (Eleuterio et al. 2013; Trubiani et al. 2019). Neben ihrem regenerativen Potenzial zeigten isolierte *PDLSCs* auch *ex vivo* ihre Fähigkeit zur Ausbildung von Wurzelzement und PDL-artigem Gewebe. Induzierte *PDLSCs* könnten somit einen therapeutischen Beitrag zur Regeneration von Gewebe des Zahnhalteapparates leisten (Park et al. 2011).

1.1.1 Veränderungen des parodontalen Ligaments im Alter

Nach heutiger Auffassung nimmt die Adaptionmöglichkeit des Parodontiums im Alter ab (Göz 1990). Die Altersforschung unterscheidet zwischen primärem und sekundärem Altern. Das primäre Altern ist ein physiologischer Prozess, der keinerlei Krankheitswert hat. Das sekundäre Altern hingegen wird von exogenen Faktoren beeinflusst, die zu parodontaler Knochendestruktion, Gingivarezession oder pathologischen Zahnwanderungen führen können (Götz 2013).

Mit zunehmendem Lebensalter schwindet die Belastbarkeit kollagenfaserreicher Bänder, was auf degenerative Prozesse zurückzuführen ist (Noyes und Grood 1976). Die Fibroblastendichte im Parodontalspalt verringert sich und im gleichen Zuge ist die Kollagenneusynthese vermindert. Das Gewebe wird fibröser und die Stabilität des vorhandenen Kollagens nimmt zu (Grant und Bernick 1972).

Im Alter nimmt die Breite des Parodontalspaltes ab, was auf eine Verbreiterung des Wurzelzements zurückzuführen ist (Louridis et al. 1972). Im Parodontalligament älterer Patienten kommen nach wie vor Zellen mit Stammzellfunktion vor, deren Fähigkeit zu Differenzierung und Proliferation jedoch vermindert ist. Aufgrund dieser verbleibenden Zellen mit Stammzellfunktion lässt sich auch die lebenslange Zementapposition erklären (Grant und Bernick 1972; Velden 1984).

Untersuchungen an PDL-Zellen weisen eine verminderte Teilungsrate und verringerte Zelldichte auf (Grant und Bernick 1972). Die extrazelluläre Matrix, in der die

Zellen des parodontalen Ligaments liegen, setzt sich aus verschiedenen Kollagenen, Glykoproteinen, Glykosaminoglykanen und Proteoglykanen zusammen (Connor et al. 1984; Häkkinen et al. 1993; Zhang et al. 1993). Im Parodont alternder Patienten liegen Fibrosierung, fokale Hyalinisierungen, Knorpel- oder Verkalkungsherde vor (Grant und Bernick 1972; Götz 2013).

1.2 Zahnbewegung

Die Einheit aus Gingiva, Alveolarknochen, Desmodont und Wurzelzement wird als Parodont oder Zahnhalteapparat bezeichnet. Die aufhängenden Fasern sind das Desmodont, Bindegewebsfaserbündel, die eine Verbindung zwischen Knochen und Wurzelzement herstellen. Zähne sind nicht fest im Knochen verankert, sondern über Fasern im Knochenfach aufgehängt und zeigen deshalb eine physiologische Beweglichkeit durch Wangen-, Zungen-, und Kaudruck. Diese Drücke sind jedoch zeitlich begrenzt und die Bewegung der Zähne deshalb reversibel. Die Zellen des Desmodonts setzen sich aus einer heterogen gemischten Zellpopulation aus Fibroblasten, undifferenzierten mesenchymalen Stammzellen, Monozyten und Makrophagen, Osteoblasten und Osteoklasten, malassez'schen Epithelresten, Zementoblasten und Odontoklasten zusammen. Den zellulär größten Anteil am PDL bilden die Fibroblasten, die die Substanz des Parodontalligaments bilden, und für den Umbau und die Neusynthese der extrazellulären Anteile verantwortlich sind (Beertsen 1975; Nanci und Bosshardt 2006).

Bei der kieferorthopädischen Zahnbewegung werden gezielt Kräfte angesetzt und die einzelnen Parodontalfasern unterschiedlich stark belastet. Die Zähne sollen hierbei effizient und schonend bewegt werden, wobei die Nebenwirkungen für die Gewebe gering zu halten sind (von Bohl und Kuijpers-Jagtman 2009). Grundlegende Erkenntnisse über die orthodontischen Bewegungen sind auf die Versuche von Schwarz (1932) zurück zu führen, wonach die einwirkende orthodontische Kraft durch die Höhe des kapillären Drucks limitiert ist. Das richtige Maß der orthodontischen Kraft ist dem Patienten individuell anzupassen, jedoch nicht über den kapillären Druck hinausgehend zu wählen, um Wurzelresorptionen zu vermeiden (Schwarz 1932).

Reitan (1975) hat die kieferorthopädischen Zahnbewegungen in drei Phasen eingeteilt. In der ersten Phase kommt es durch die Bewegung des Zahnes innerhalb der Knochenalveole zu Veränderungen der Blutzirkulation. Zunächst tritt noch keine Deformation des Knochens oder Remodelling des Gewebes auf. Durch die Bewegung

kann man in Richtung der Bewegung von einer Druck- und entgegengesetzt von einer Zugzone sprechen. In der Druckzone kommt es zur Kompression der Parodontalfasern und Annäherung des Zahnes an die Knochenalveole. Analog kommt es in der Zugzone zur Dehnung der Parodontalfasern und zur Erweiterung des Parodontalspalt. Sowohl Druck als auch Zug auf die PDL-Zellen führen zu einer Freisetzung von Signalmolekülen, wie Zytokinen und Prostaglandinen, die die Rekrutierung von Osteoblasten und -klasten bedingen (Davidovitch 1991; Von den Hoff 2003; Yamaguchi et al. 2004).

Zum Ende dieser Phase nach ein bis drei Tagen wird die zweite Phase eingeleitet und es kommt zur Anlagerung von Osteoblasten an die Knochenwände. Die zweite Phase nennt sich Hyalinisation. In den Kompressionsbereichen auf Seiten der Druckzone kommt es zur Unterbrechung des Blutflusses und partielle Nekrosen entstehen. Im histologischen Bild sind diese Nekrosen als hyalinisierte Bereiche erkennbar (Reitan 1967). Diese hyalinisierten Bereiche bedingen einen Stillstand der kieferorthopädischen Zahnbewegung, der zwischen vier und 30 Tagen andauern kann. Während des Stillstandes ist kein Abtransport von Zellbestandteilen möglich, da die Zirkulation behindert ist. Das nekrotische Gewebe wird durch Makrophagen und Osteoklasten abgebaut, die aus unbeschädigten Bereichen des PDL rekrutiert werden, und ermöglicht so eine indirekte Resorption in der Druckzone. In der Zugzone kommt es zur Proliferation der Osteoblasten und somit zur Neubildung von Knochenmatrix (Osteoid). Ist der Stillstand der zweiten Phase beendet beginnt die dritte Phase der Zahnbewegung. Auf der Druckseite ist nun vermehrte Osteoklastenaktivität an der Knochenoberfläche erkennbar und man spricht von direkter Resorption, was die Zahnbewegung beschleunigt. Auf der Zugseite wird weiterhin von den Osteoblasten neues Osteoid gebildet, das PDL adaptiert an die Dehnung und wird umgeformt. Zunächst wird ein Übergangsgewebe gebildet, das später mineralisiert wird und so den entstandenen Spalt zwischen Wurzelzement und Alveolarknochen auffüllt. Es ist also davon auszugehen, dass die knöchernen Anteile des Parodontiums auf Druck- und Zugkräfte mit Appositions- und Resorptionsvorgängen reagieren (Krishnan und Davidovitch 2006).

Göz (1990) hat diese drei Phasen der Zahnbewegung benannt. Zunächst die Verformung und Kompression des parodontalen Ligaments, anschließend die Hyalinisierung und abschließend die Phase des Umbaus.

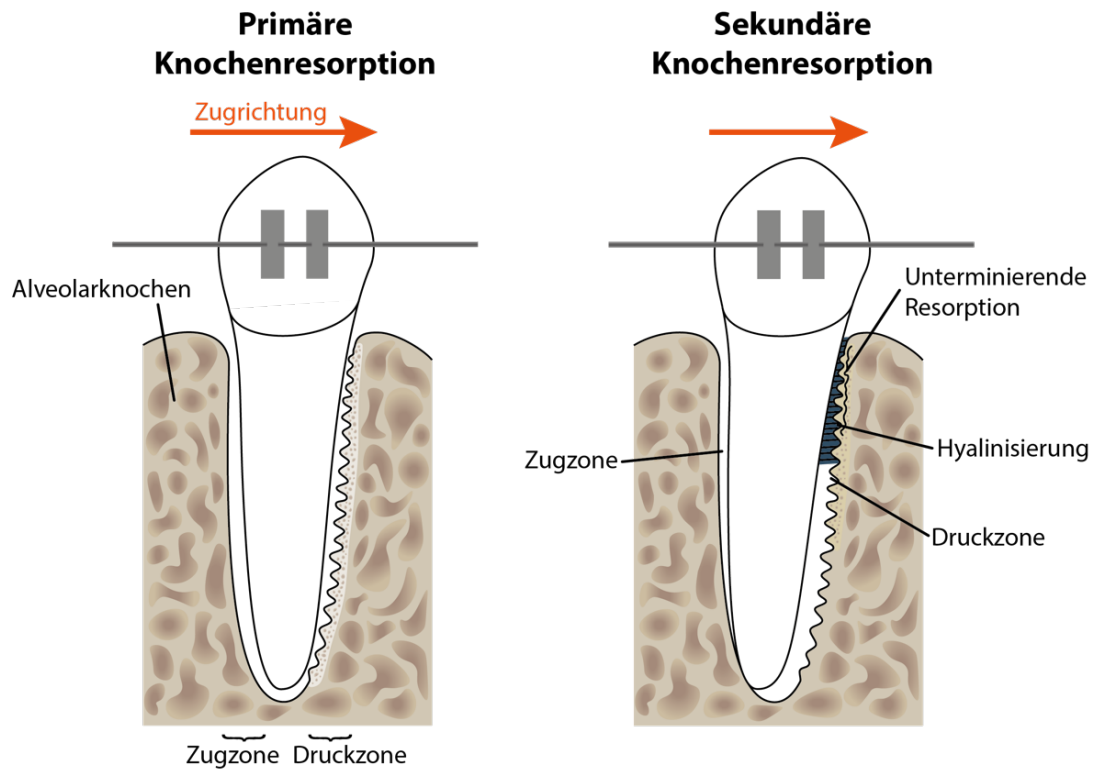


Abbildung 2: Druck-Zug-Theorie der Zahnbewegung. Dargestellt ist die orthodontische Bewegung eines Zahnes durch seine Knochenalveole. Im linken Bild sind die Druck- und Zugzone zu erkennen, die auf Seiten der Zugzone eine Dehnung des Parodontalligaments, und in der Druckzone eine Kompression des Parodontalligaments erkennen lassen. Im rechten Bild ist die unterminierende Resorption dargestellt, die nun auf Seiten der Druckzone zu einer Hyalinisierung und am Knochen zu unterminierender Resorption führt.

Auswirkungen des Alterns auf die Zahnbewegung lassen sich mit vermindertem Mineralstoffwechsel, andauernden Hyalinisationsphasen und daraus resultierender verzögerter Zahnbewegung (Bridges et al. 1988) und Veränderungen der Knochendichte erklären (Reid und Boyde 1987). Für orthodontische Zahnbewegungen im erwachsenen Gebiss sollten deshalb andere Kräfte und größere Zeitabstände gewählt werden (Göz 1990).

1.3 Gingivales zervikales Fluid

Gingivales zervikales Fluid (*gingival crevicular fluid*, GCF) ist ein serumhaltiges Transsudat der parodontalen Gewebe und kann im Falle eines entzündlichen Prozesses auch als Exsudat bezeichnet werden. Es besteht aus Serumanteilen, Gewebe- und Zellbestandteilen, Zellen des Immunsystems, sowie Mikroorganismen (Lamster und Ahlo 2007). Zum Schutz der Epithelbarriere und somit der Immunabwehr des Parodonts kommt es bei entzündlichen Prozessen zu erhöhten Flussraten

und Spülung des Sulkus zum Abtransport von Bakterien und ihren Stoffwechselprodukten (Eley und Cox 2003). Die Untersuchung des GCFs lieferte Hinweise, dass neben Bestandteilen des Blutplasmas und Proteinen aus entzündlichen Prozessen des Gewebes zusätzlich Proteine gefunden wurden, die demnach dem Parodont zugeordnet werden können (Carneiro et al. 2012).

1.4 Molekulare Biologie im Zahnhalteapparat

Druck- und Zugbelastungen durch orthodontische Interventionen auf den Zahnhalteapparat führen zu Remodellierung der umliegenden Gewebe, welches auf molekularer Ebene durch die Sekretion von Zytokinen und anderen Mediatoren gesteuert wird.

In frühen Phasen der kieferorthopädischen Zahnbewegung spielen Gene für die Sensorik auf mechanische Stimuli, sowie Entzündungsprozesse und Remodellierung der extrazellulären Matrix im Parodontalligament eine Rolle (Brooks und Gong 2015). Hierzu zählen diverse Interleukine, Tumornekrosefaktoren, Prostaglandine, Matrixmetalloproteasen (MMPs) und Integrine. Explizit finden sich während der Zahnbewegung auf Seiten der Druckzone Zellen des Parodontalligaments, die Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α), Interleukin-1 (IL-1) und Prostaglandine sekretieren (Lowney et al. 1996; Uematsu et al. 1996; Bletsa et al. 2006; Tzannetou et al. 2008). Prostaglandine werden von Zellen des Parodontalligaments bereits kurz nach Einwirkung mechanischer Kräfte sekretiert (Ngan et al. 1990). Der Umbau der extrazellulären Matrix wird weiterhin durch Matrixmetalloproteasen und deren Inhibitoren (TIMPs) bedingt, die wiederum von Parodontalligamentzellen sekretiert werden (Bodet et al. 2007). Außerdem wurde auch die Expression von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) und Inositolphosphat in der initialen Phase der kieferorthopädischen Zahnbewegung beobachtet (Ngan et al. 1990).

Zusätzlich stehen die Zellen des Parodontalligaments über Integrine in direkter Verbindung zu der sie umgebenden extrazellulären Matrix. Hierdurch können mechanische Stimuli die Aktivierung von Ionenkanälen, Integrinen und Zell-Zell-Kontakten induzieren (Hoffman et al. 2011).

Die Remodellierung des Knochens führt darüber hinaus zur Aktivierung von Osteozyten, welche wiederum Signalmoleküle wie *bone morphogenetic proteins* (BMPs), Proteine des Wnt-Signalwegs, Prostaglandin E2 (PGE2) und Stickstoffmonoxid

(NO) produzieren. Diese können eine direkte Wirkung auf die Differenzierung und Aktivität von Osteoblasten und Osteoklasten ausüben (Henneman et al. 2008). In den späten Phasen kieferorthopädischer Zahnbewegung kommt es zur Remodellierung des Parodontalligaments sowie Appositions- und Resorptionsvorgängen des Knochens (Pilon et al. 1996). Hierbei spielen unter anderem der *receptor activator of NF- κ B Ligand* (RANKL), ein Protein, das wesentlich an der Regulation des Knochenumbaus beteiligt ist (Keck und Pecherstorfer 2003), und Osteoprotegerin (OPG), ein sogenannter „Köder-Rezeptor“ für RANKL, wichtige Rollen (Kawasaki et al. 2006). RANKL wird unter anderem von Osteoblasten und Zellen des Parodontalligaments während der Zahnbewegung in der Druckzone exprimiert (Ogasawara et al. 2004; Brooks et al. 2009). Zusätzlich reagieren PDL-Zellen auf mechanische Stimuli neben der Expression von RANKL auch durch die Expression von PGE₂, was wiederum zu einer Erhöhung der RANKL-Expression und der Aktivierung von proosteoklastischen Zellen führt (Kanzaki et al. 2002; Teitelbaum und Ross 2003). Neben RANKL wurden in Zellen des Parodontalligaments weitere Osteoblasten-assoziierten Marker, wie zum Beispiel Alkalische Phosphatase, Knochensialoprotein und Runt-verwandter Transkriptionsfaktor 2 (RUNX2) beschrieben (Pavlin et al. 2000a; Kawasaki et al. 2006; Balducci et al. 2007). Diese Mediatoren und Gene indizieren die durch mechanische Stimuli induzierte Differenzierung und Aktivität von Osteoblasten (Pavlin et al. 2000a; Pavlin et al. 2000b; Garlet et al. 2008). Ein Vergleich der GCF-Konzentrationen von RANKL und OPG zwischen juvenilen und adulten Patienten während kieferorthopädischer Zahnbewegung zeigte, dass RANKL im GCF juveniler Patienten signifikant erhöht und OPG signifikant erniedrigt vorlag (Nishijima et al. 2006). Dieser Effekt war allerdings nur zum Zeitpunkt nach 24 Stunden zu beobachten, nicht davor und nicht danach, was vermuten lässt, dass RANKL und OPG ihre Funktionen in der Knochenresorption zeitlich begrenzt und bedingt durch den Druck der kieferorthopädischen Zahnbewegung ausüben. Für alle bisher im Zusammenhang mit kieferorthopädischer Zahnbewegung identifizierten Gene und Proteine sind bereits Funktionen in anderen physiologischen Zusammenhängen beschrieben, sodass diese nicht ausschließlich mit Zahnbewegung assoziiert werden können. Bisher wurde kein Gen gefunden, welches ausschließlich für die Regulation der kieferorthopädischen Zahnbewegung verantwortlich gemacht werden kann (Brooks und Gong 2015).

1.5 Massenspektrometrie für Proteinanalytik

1.5.1 Isotopenmarkierung mit Aminosäuren

Stabile Isotopenmarkierung mit Aminosäuren in Zellkultur (*stable isotope labeling with amino acids in cell culture* – SILAC) ist ein Verfahren, bei dem essentielle Aminosäuren im Zellkulturmedium mit Isotopen-markierten Analoga ersetzt werden.

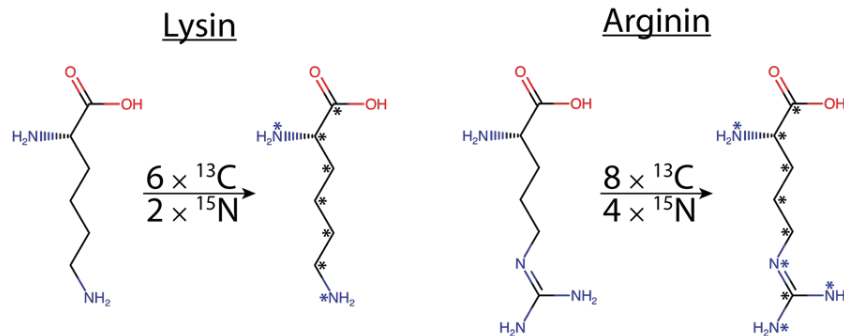


Abbildung 3: Schwer markierte Aminosäuren Lysin+8 und Arginin+10. Durch den Austausch von regulären ¹²C- und ¹⁴N-Atomen in den Aminosäuren Lysin und Arginin durch ¹³C (*) bzw. ¹⁵N (*) wird ein Massenzuwachs von 8 u (Lysin) und 10 u (Arginin) gesichert, der letztendlich die massenspektrometrische Diskriminierung der Peptide ermöglicht.

Ohne essentielle Aminosäuren können Zellen/Organismen keine Synthese betreiben. Durch Zusatz essentieller Aminosäuren, die mehrere stabile Isotope enthalten, wie zum Beispiel ¹³C anstelle des natürlicherweise deutlich häufiger vorkommenden ¹²C, kann gewährleistet werden, dass neu synthetisierte Proteine ebendiese enthalten. Nach circa sechs Zellteilungen kann von einer hinreichenden Verbreitung der Aminosäuren mit definierten (schweren) Massen in den Proteinen der Zellen ausgegangen werden. Diese nun inkorporierten schweren Proteine können mit Hilfe von Massenspektrometrie, spezifisch detektiert werden. Folglich ist die Anwendung von SILAC-Experimenten auf sich teilende Zellen beschränkt und erfordert unfixiertes Probenmaterial (Ong et al. 2002).

Ein SILAC-Experiment mit massenspektrometrischer Analyse gliedert sich in verschiedene Schritte. Ausgangspunkt ist eine Zellpopulation, die in Zellkultur kultivierbar ist. Allerdings erfolgt eine zuverlässige Anzucht von Zellen ausschließlich unter der Verwendung von fetalem Kälberserum. Da dieses Serum neben wichtigen Induktoren der Zellproliferation auch Aminosäuren enthält, welche mit den isotopenmarkierten Aminosäuren konkurrieren würden, wird für SILAC-Experimente grundsätzlich auf dialysiertes Kälberserum zurückgegriffen.

An die Zellkultur schließt sich dann die Probenvorbereitung an, bei der eine Auftrennung der Proteine nach ihren Massen mittels Gelelektrophorese durchgeführt wird. Das Gel aus dieser Gelelektrophorese wird im Anschluss gefärbt und in Stücke zerschnitten. Endoproteasen hydrolysieren die Proteine beim folgenden In-Gel-Verdau zu Peptiden und werden mit organischen Lösungsmitteln aus dem Gel extrahiert. Da die schweren Proteine die gleichen biochemischen Eigenschaften, wie zum Beispiel Retentionszeit in der Chromatographie, oder Ionisationseffizienz besitzen, wie die normalgewichtigen Originale oder Proteine mit anderen Aminosäuren definierten Gewichts, eignet sich die *high performance liquid chromatography* (HPLC)-gekoppelte Massenspektrometrie, um die Proteine zu identifizieren und zu vergleichen.

1.5.2 Massenspektrometrie – Aufbau und Ablauf

Die Massenspektrometrie ist ein analytisches Verfahren zur Messung von Molekülmassen freier Ionen im Hochvakuum. Mithilfe dieses Verfahrens ist eine Identifizierung von Peptiden oder Proteinen, aber auch von organischen Molekülen wie Medikamenten oder endogenen Stoffen möglich (Rehm und Letzel 2010). Ein Massenspektrometer setzt sich zusammen aus einer Ionenquelle, einem Analysator und einem Detektor. Heutzutage werden Massenspektrometer häufig als Detektoren hinter HPLC-Systemen verwendet und die Daten digital ausgewertet (siehe Abbildung 4).

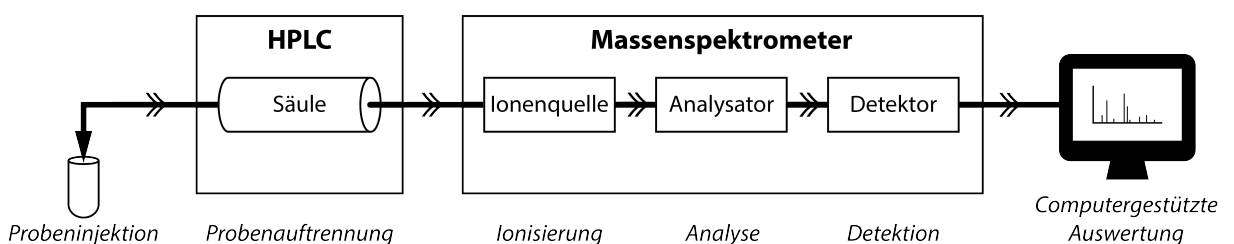


Abbildung 4: Aufbau eines HPLC-gekoppelten Massenspektrometers. Der Aufbau eines HPLC-gekoppelten Massenspektrometers beginnt mit der Injektion der Probe und der Auftrennung in der HPLC. Im Massenspektrometer wird die Probe ionisiert, analysiert und detektiert, bevor die Auswertung der Messung computergestützt erfolgt.

Zur Separation der einzelnen Peptide, und um eine ausreichende Sensitivität der Analyse zu gewährleisten, können die zuvor aufbereiteten Peptide mit Hilfe von HPLC aufgetrennt werden. Die Art der Auftrennung per HPLC kann der Art der Probe angepasst werden und sorgt für eine allmähliche Injektion der Probe in das

Massenspektrometer (siehe Abbildung 5), da nicht alle Moleküle zum selben Zeitpunkt erfasst werden können, sondern eine allmähliche Ionisierung, Analyse, Detektion und Auswertung erfolgen muss. Die Peptide wurden für die hier beschriebene Arbeit in einer Umkehrphase-Säule mit organischem Lösungsmittel entsprechend ihrer Hydrophobizität eluiert.

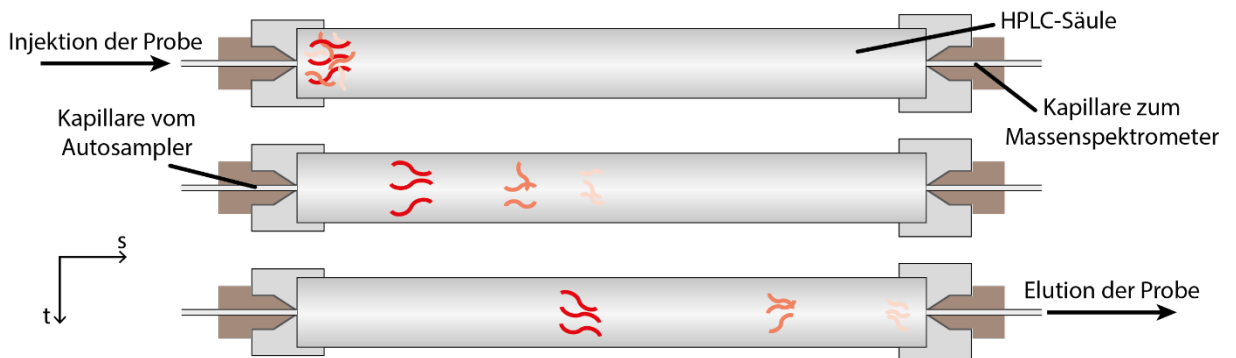


Abbildung 5: Schematische Darstellung der chromatographischen Auftrennung. Die schematische Darstellung der chromatographischen Auftrennung zeigt die Trennung der Probenbestandteile (hier: Peptide) in Abhängigkeit von Säulenbeschaffenheit und Elutionsmittel (mobile Phase). Die Trennung der simultan injizierten Probe erfolgt allmählich über die Zeit t und über die Strecke s der Säule. Die Elution der Probe durch die Kapillare zum Massenspektrometer ermöglicht eine zeitgleiche Messung gleicher Moleküle, zeitlich getrennt von anderen.

Im Massenspektrometer durchläuft die Probe zunächst die Ionenquelle. Die Ionenquelle erzeugt isolierte Ionen aus der Probensubstanz. Hierbei gibt es unterschiedliche Formen der Ionisation, unter anderem die Elektrospray-Ionisation (ESI) und die *matrix-assisted laser-desorption ionization* (MALDI). Die Ionisation erfolgt, um die Analyten im Anschluss in einem elektrischen Feld zu beschleunigen bzw. zu filtern, und das Masse-zu-Ladung-Verhältnis (m/z) der Moleküle zu bestimmen. In dieser Arbeit wurde die Elektrospray-Ionisation verwendet, die bereits Anfang der 1970er Jahre entwickelt wurde (Fenn et al. 1989). Die Probensubstanz wird in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst, durch eine Metallkapillare geleitet, an deren Spitze eine Spannung angelegt ist, sodass es eine Potenzialdifferenz zwischen Anode und Kathode gibt, und als feiner Nebel hinausgesprüht (siehe Abbildung 6). Hierdurch kommt es zur Bildung eines sogenannten Taylor-Konus (Taylor 1964) und einer Verteilung von Flüssigkeitsmolekülen in kleine Tröpfchen mit entsprechender Ladung im elektrischen Feld. Durch die angelegte Spannung werden die ionisierten Moleküle – zunächst zu mehreren in Tröpfchen des Lösungsmittels – gelenkt. Unter hohen Temperaturen und leichtem Vakuum verdampft das Lösungsmittel, sodass schlussendlich die ionisierten Moleküle (Peptide) frei vorliegen, wenn sie in den Analysator geleitet werden.

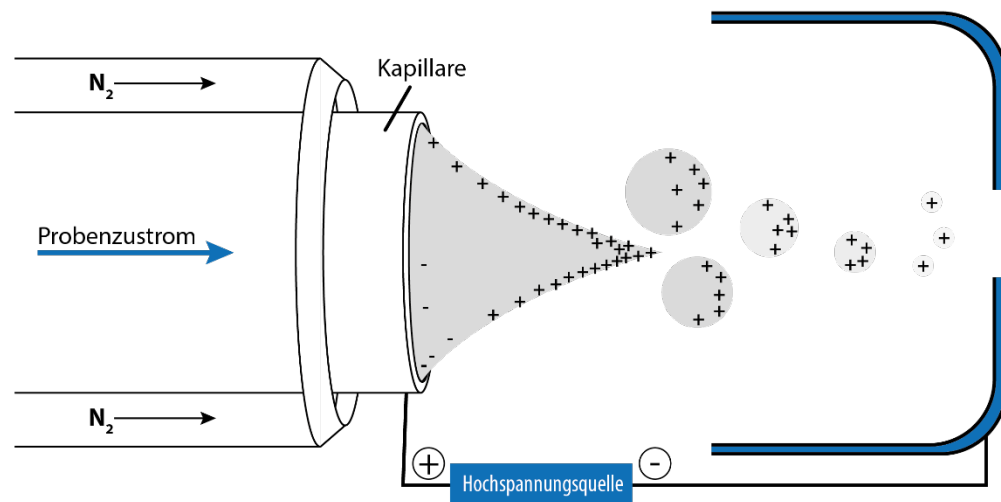


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Elektro-Spray-Ionisation. Die schematische Darstellung der Elektro-Spray-Ionisation verdeutlicht den Vorgang der Ionisation der Probenmoleküle. Während des kontinuierlichen Probekonzentratstroms kommt es durch die angelegte Spannung zur Beschleunigung der positiv geladenen Moleküle (+). Gleichzeitiges Verdunsten des Lösungsmittels (grau) bei hohen Temperaturen führt zu immer kleiner werdenden Tröpfchen und letztendlich zum lösungsmittelfreien Vorliegen der geladenen Peptide, welche unter elektrischer Spannung ins Hochvakuum des Massenspektrometers gelangen.

Der Analysator besteht in dieser Arbeit aus einer Kombination aus Triple-Quadrupol und einem Flugzeitmassenspektrometer (*time-of-flight mass spectrometer, TOF-MS*) (Andrews et al. 2011). Zunächst passieren die Ionen im Hochvakuum die Quadrupole, vier längs-parallel angeordnete Stäbe, die entweder jegliche Ionen, oder durch speziell angelegte Wechselspannung nur Ionen mit einem bestimmten m/z -Verhältnis zum Detektor passieren lassen, welcher das Massenspektrum aus Masse pro Ladung erfasst (Rehm und Letzel 2010). Anschließend werden die Ionen im TOF-MS beschleunigt. Durch Beschleunigung und Ablenkung der Ionen in einem angelegten elektrischen Feld kann die Masse eines Moleküls (bzw. das Masse-zu-Ladung-Verhältnis) über die Flugzeit in der Apparatur bestimmt werden (Rehm und Letzel 2010).

In dem in dieser Arbeit verwendeten Versuchsaufbau fand ein Orbitrap-Massenanalysator Verwendung, in dem die eingeführten Ionen in mehreren Dimensionen um eine zentrale Spindel oszillieren (siehe Abbildung 7). Die Stärke und Frequenz der Oszillation wird hierbei von Detektoren erfasst, wobei die Frequenz einzigartig für jedes m/z -Verhältnis ist. Via Fourier-Transformation werden die Informationen der Detektoren in ein Massenspektrum überführt. Bei der hier verwendeten TOP-Methode wurden in kurzen zeitlichen Abständen die zum jeweiligen Zeitpunkt am häufigsten vorkommenden Peptide sequenziell analysiert und ihre Massen bestimmt.

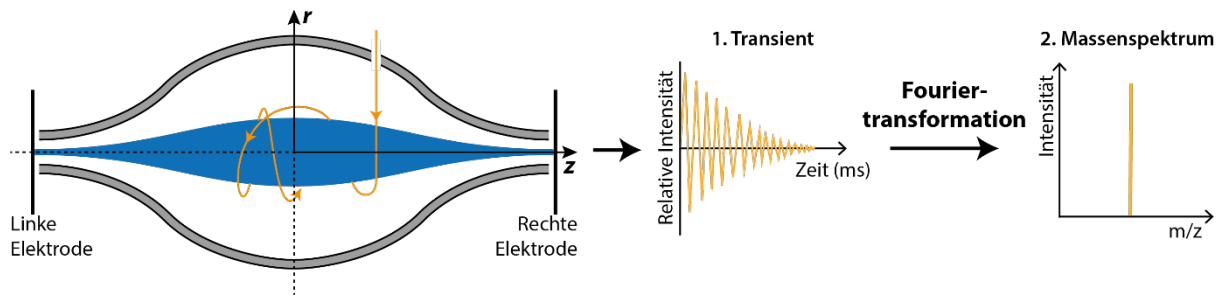


Abbildung 7: Schematische Darstellung eines Orbitrap-Massenanalysators. Im Orbitrap-Massenanalysator wird die Oszillation der ionisierten Moleküle registriert und der gemessene Transient durch Fourier-Transformation in ein Massenspektrum überführt.

Ist eine Analyse abgeschlossen werden die Datensätze mit Proteinsequenzen in Datenbanken abgeglichen. Dieses *peptide mass fingerprinting* genannte Verfahren nutzt das Wissen über die theoretischen Massen sämtlicher Proteine nach Verdau mit Endoproteasen. Hierbei können posttranslationale Modifikationen berücksichtigt werden. Dieser Abgleich geschieht mit Hilfe einer Software (z. B. Mascot von Matrix Science oder MaxQuant vom Max-Planck-Institut für Biochemie, (Cox und Mann 2008)), die die ermittelten Peptid-Massen mit allen errechneten Massen der entsprechenden Proteine (Peptide) der Datenbank vergleicht (Perkins et al. 1999). Die Quantifizierung eines jeden Peptids wird über die Intensität des Signals am Detektor des Massenspektrometers berechnet. Es kann ohne Standards zwar keine absolute Quantifizierung vorgenommen werden, aber der Vergleich zweier Peaks identischer Peptide in unterschiedlichen Proben (oder von unterschiedlicher Masse nach vorausgegangener Markierung mit schweren Aminosäuren) lässt eine relative Quantifizierung zu (Mann 2006).

Auch die Auswertung eines SILAC-Experiments kann mit der vom Max-Planck-Institut bereitgestellten Software Perseus (Tyanova et al. 2016; Tyanova und Cox 2018) nach der veröffentlichten Anleitung durchgeführt werden.

1.5.3 Massenspektrometrie in der Zahnheilkunde

Um die Entstehung und die Pathophysiologie von parodontalen Erkrankungen und physiologischen Remodellierungsprozessen zu verstehen, können die Proteine des GCF wichtige Informationen liefern (Ngo et al. 2010). Essentiell hierbei ist, zwischen Proteinen des Speichels und solchen des GCF zu differenzieren. Massenspektrometrische Analysen haben gezeigt, dass sich das Proteom des GCF zum einen von dem des Serums unterscheidet und auf eine spezifische Mikroumgebung in der

Mundhöhle hindeutet (Carneiro et al. 2012). Zum anderen wurden im GCF im Vergleich zu Proteinen aus Speichel einige signifikant erhöhten Proteine gefunden, darunter Superoxiddismutase 1 (SOD1), Apolipoprotein A-1 (ApoA-I), Alpha-1-Antitrypsin (SERPINA1) und Dermcidin (DCD) (Tsuchida et al. 2012). Die Zusammensetzung der exprimierten Proteine im GCF scheint allerdings kein statischer Zustand zu sein, sondern sich abhängig vom Alter zu verändern. Durch massenspektrometrische Analysen aus GCF nach Markierung mit *tandem mass tags* zeigte sich eine Erhöhung von Vitamin-D-bindendem Protein (DBP) und Serotransferrin (Tf) in pubertierenden Jugendlichen verglichen mit postpubertären Probanden (Wen et al. 2018). In einer vergleichenden Studie zwischen Parodontalligament von Milchzähnen und bleibenden Zähnen wurden altersabhängige Unterschiede in der differentiellen Expression von Laminin-Untereinheiten festgestellt (Giovani et al. 2016).

Die Anwendung der Massenspektrometrie kann außerdem zur Untersuchung des GCF im Zusammenhang von Parodontitis Anwendung finden, da hier Proteine aus humanem, aber auch bakteriellem und viralem Ursprung identifiziert werden können. So wurde gezeigt, dass Proteine, die im Zusammenhang mit Abwehrfunktionen stehen, wie zum Beispiel Cystatin-B, nur bei gesunden Probanden zu finden waren. Außerdem wurden Proteine wie L-Plastin spezifisch im GCF von Probanden mit und Annexin-I nur im GCF von Probanden ohne Parodontitis gefunden (Bostanci et al. 2010).

Bisherige Erkenntnisse aus massenspektrometrischen Analysen im Zusammenhang mit kieferorthopädischen Interventionen beschränken sich vornehmlich auf die Analyse von Proteinen in Speichel und Sulkusfluid. Erste Untersuchungen mittels *surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry* (SELDI-TOF-MS) haben bereits gezeigt, dass sich das Profil im Speichel vorhandener Proteine innerhalb der ersten drei Monate einer kieferorthopädischen Behandlung verändert. Diese Methode könnte folglich als Instrument für nicht-invasive Untersuchungen von Remodellierungsprozessen in oralen Hart- und Weichgeweben Verwendung finden (Ciavarella et al. 2011). Die Untersuchung von Biomarkern in GCF-Proben von Patienten mit externer Wurzelresorption zeigte eine Vielzahl von vermehrt und vermindert exprimierten Proteinen. Ein relativ großer Anteil dieser identifizierten Proteine findet sich in Exosomen, also extrazellulären Vesikeln, die sekretiert wurden (Rody Jr et al. 2014). Generell scheint die Untersuchung von Proteinen aus Speichelproben ein probates diagnostisches Verfahren darzustellen,

durch welches sowohl die Effektivität von kieferorthopädischen Interventionen als auch mögliche nachteilige Nebenwirkungen, wie zum Beispiel Wurzelresorption, erkannt werden können (Allen et al. 2019; Awang-Kechik et al. 2019).

Bezüglich des Proteoms von Zellen des Parodontalligaments wurde gezeigt, dass vor allem das Intermediärfilament Vimentin und auch Kollagen Typ VI – beide für die Integrität der extrazellulären Matrix zuständig – zu finden waren (Cho et al. 2017). Proteomanalysen zu spezifischen Oberflächenmarkern von PDLSCs haben gezeigt, dass diese, im Gegensatz zu Keratinozyten, CD73, CD90, Annexin A2 und Sphingosinkinase 1 exprimieren (Xiong et al. 2016). Einer der am häufigsten angereicherten *Gene Ontology (GO)* Signalwege in Zellen des Parodontalligaments von Milchzähnen sowie permanenten Zähnen war der Signalweg „Proteinbindung“, was auf die Zell-verankernden Aufgaben des Parodontalligaments hinweist (Giovani et al. 2018).

Bisher ist jedoch wenig bekannt über das komplette Sekretom von Zellen des Parodontalligaments bezogen auf kieferorthopädische Behandlungen. Gerade durch den dynamischen Charakter der Proteinexpression ist eine Untersuchung der altersabhängigen Veränderungen des Sekretoms von großem Interesse.

1.6 Fragestellung der Dissertation

Diese Dissertation beschäftigt sich mit den Mechanismen der kieferorthopädischen Zahnbewegung auf zellulärer und molekularbiologischer Ebene. Die PDL-Zelle gilt mit ihren Stammzeleigenschaften als der Mediator der orthodontischen Zahnbewegung. Insbesondere die Biomoleküle, die in den Extrazellularraum sekretiert werden, sind deshalb von hohem Interesse. Hierdurch gewonnene Erkenntnisse könnten Rückschlüsse auf die Induktion von Remodellierungsprozessen der umliegenden Gewebe des Zahnhalteapparates durch parakrine Sekretion von Zytokinen und Mediatoren zulassen. Auch könnten potenzielle Biomarker die dynamischen Umbauprozesse begleiten und im Sekretom zu finden sein.

Da der Zahnhalteapparat intrinsischen und extrinsischen Alterungsfaktoren unterliegt und die Reaktionsbereitschaft des Parodonts im Alter abnimmt, sollten die Untersuchungen der Sekretome vergleichend an Zähnen juveniler Probanden zwischen dem 12. und 16. Lebensjahr und adulten Patienten ab dem 30. Lebensjahr erfolgen.

Da zum Zeitpunkt der Dissertation kein etablierter Versuchsablauf für die Kultivierung und metabolische Markierung von Zellen des Parodontalligaments vorlag, musste ein solcher zunächst entwickelt werden. Für Untersuchungen an Zellen des Parodontalligaments in unterschiedlichen Altersgruppen bietet sich die metabolische Markierung von Proteinen mit isotoopenmarkierten, schweren Aminosäuren in Zellkultur an, da diese in der massenspektrometrischen Analyse relativ zueinander quantifiziert werden können, und zudem eine Differenzierung zu Proteinen aus Zellkulturmedium erfolgen kann.

Folgende Zielsetzungen sollen in dieser Dissertation besondere Berücksichtigung finden:

1. Die Etablierung einer Zellkultur aus Zellen des Parodontalligaments mit SILAC-Medium für die Analyse im Massenspektrometer.
2. Die qualitative Identifikation des Sekretoms aus Zellen des Parodontalligaments, um biologisch aktive Moleküle der Zahnbewegung darzustellen.
3. Die Frage nach der Zusammensetzung des Sekretoms juveniler und adulter Probanden in Hinblick auf die quantitativen Unterschiede und ihre möglichen Einflüsse auf die orthodontische Zahnbewegung.
4. Die bei der orthodontischen Zahnbewegung freigesetzten Mediatoren können im GCF nachgewiesen werden. Die Anwendung von Massenspektrometrie für die Identifizierung von Proteinen ist aber durch Kontaminationen mit Speiseresten, Speichel und Serum limitiert. Ein Ziel dieser Arbeit war deshalb die Erstellung einer individuellen Datenbank aus Sekretomdaten der juvenilen und adulten Probanden zur Diskriminierung des GCF-Proteoms von Kontaminanten.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Die in dieser exploratorischen Arbeit verwendeten Materialien und die angewandten Methoden werden in den nachfolgenden Kapiteln 2.1 und 2.2 beschrieben. Die Probengewinnung erfolgte im Rahmen notwendiger zahnärztlicher Eingriffe nach Aufklärung und Zustimmung der Patienten. Die Extraktionen humaner oraler Gewebeproben und Prämolaren, die im Rahmen von gerechtfertigten, medizinisch indizierten zahnärztlichen Eingriffen durchgeführt wurden, wurden in der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Universitätsmedizin Göttingen bei adulten und juvenilen Patienten vorgenommen. Dieses Studienvorhaben ist unter der Antragsnummer 23/7/15 in der Sitzung der Ethik-Kommission der Universitätsmedizin Göttingen vom 16.07.2015 genehmigt worden.

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Verbrauchsmaterialien sowie deren Hersteller sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
15 ml Zentrifugenröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
25 cm ² Kulturflasche	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
50 ml Zentrifugenröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
6-Well-Platte	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
75 cm ² Kulturflasche	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Einfrierröhrchen 1 ml	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
Handschuhe	Starlab, Hamburg, Deutschland
Objektträger	Nexcelom Bioscience
Pipettenspitzen (20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Starlab, Hamburg, Deutschland

Name	Hersteller
Reaktionsgefäß 0,5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Serologische Pipetten 10 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Skalpell (Nr. 10)	Feather Safety Razor Co. LTD, Osaka, Japan

2.1.2 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien sowie deren Hersteller sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2: Chemikalien

Name	Hersteller
10 % SDS (SDS-Pellets 99 %)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Aceton	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Acetonitril	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Acrylamid: Rotiphorese Gel30	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumsulfat	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
APS Ammoniumperoxodisulfat 98 %	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Braunol	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Coomassie Brilliant Blue G250	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dithiothreitol	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dulbecco's modified eagle's me- dium + GlutaMax™	Thermo Fischer Scientific, Darmstadt, Deutschland
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethanol 100 % (vergällt)	Apotheke Universitätsmedizin Göttingen, Göttingen, Deutschland
FCS (fetal bovine serum)	Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, Darmstadt, Deutschland
Gentamycin 50 mg/ml cellpure	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Name	Hersteller
GlutaMAX™	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
ITS™ + Premix	Corning, New York, USA
L-Prolin	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
NuPAGE LDS Sample Buffer (4 ×)	Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, Darmstadt, Deutschland
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fischer Scientific, Darmstadt, Deutschland
Phosphate-buffered saline (PBS) Tabletten	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fischer Scientific, Darmstadt, Deutschland
SILAC Medium	Thermo Fischer Scientific, Darmstadt, Deutschland
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trichloressigsäure (99 %)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin/EDTA	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland

2.1.3 Puffer und Lösungen

Die Namen der verwendeten Puffer und Lösungen sind inklusive ihrer Zusammensetzungen in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Puffer und Lösungen

Name	Zusammensetzung
5 % Ameisensäure	5 % (v/v) konz. Ameisensäure 95 % (v/v) H ₂ O
Ammoniumbicarbonat 100 mM	320 mg in 40 ml H ₂ O pH-Wert 8,0 steril filtriert
Calciumchlorid 100 mM in H ₂ O	0,0147 g in 1 ml steril filtriert
CoomassieBrilliantBlue	0,08 % (v/v) CBB 250 1,6 % (v/v) ortho-Phosphorsäure 8 % (v/v) Ammoniumsulfat 20 % (v/v) Methanol
Dithiotreitol	10 mM DTT in 100 mM NH ₄ HCO ₃ 1,54 mg/mL frisch ansetzen
DMEM +/+	500 ml DMEM +/+ 450 ml DMEM 50 ml FCS 500 µl Gentamycin
Einfriermedium	10 % (v/v) DMSO 20 % (v/v) FCS 70 % (v/v) DMEM+GlutaMax™
Iodoacetamid (IAA)	55 mM IAA in 100 mM NH ₄ HCO ₃ 10,2 mg/ml frisch ansetzen
RIPA Puffer pH 7,4	6,058 g Tris 8,760 g NaCl 2,5 g Na-deoxycholate 100 % 2,0 ml 0,5 M EDTA 10,0 ml 100 % NP-40 10,0 ml 10 % SDS

Name	Zusammensetzung
Sammelgel 5 %	1,25 ml 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) 50 µl 10 % SDS-Lösung, 5 µl TEMED, 0,8 ml Rotiphorese Gel30 (30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid) 2,7 ml H ₂ O 0,2 ml 10 % APS
SILAC Medium _{suppl}	45 ml SILAC Medium 5 ml dialysiertes fetales Kälberserum 500 µl GlutaMax 100´ 50 µl Gentamycin (50 µg/ml) 100 µl L-Prolin (200 mg/L) 100 µl Arginin (30 mg/L) 100 µl Lysin (60 mg/L)
TCA-Aceton 10 %	10 % (v/v) Trichloressigsäure 90 % (v/v) Aceton
TE	45 ml PBS 5 ml Trypsin/EDTA 10´
Trenngel 10 %	1,4 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 8,9) 55 µl 10 % (v/v) SDS-Lösung 5 µl TEMED 1,85 ml Rotiphorese Gel30 (30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid) 2,0 ml H ₂ O 0,25 ml 10 % APS
Trypsin 0,1 µg/µL	25 µg Trypsin in 250 µl 1 mM HCL

2.1.4 Geräte

Die verwendeten Geräte sind inklusive ihrer Hersteller in der Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Geräte

Name	Hersteller
Einfrierbehälter Cryo 1 °C	Nalgene Nunc, Rochester, NY, USA
Elektrophoresekammer	Nachbau, wissenschaftliches Labor UMG, Göttingen, Deutschland
Inkubator Labotect C200	Labotect, Göttingen, Deutschland
Kamera Nikon D90	Nikon, Düsseldorf, Deutschland

Name	Hersteller
Kühlzentrifuge Heraeus Fresco 17	Thermo Fischer Scientific, Darmstadt, Deutschland
Massenspektrometer TripleTOF® 5600+ System	SCIEX, Darmstadt, Deutschland
Mikroskop Axiovert 40 CFL Zeiss	Zeiss, Göttingen, Deutschland
pH-Meter inoLab pH 720	WTW, Weilheim, Deutschland
Plattformschüttler Duomax 1030	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Scanner CanoScan 9000F Mark II	Canon, Krefeld, Deutschland
Spektrophotometer NanoDrop™ 1000	Thermo Fischer Scientific, Darmstadt, Deutschland
Sterilwerkbank Herasafe™ KS12	Thermo Fischer Scientific, Darmstadt, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vakuumbzentrifuge Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Waage Sartorius Extend	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Wasserbäder TW8 und TW12	Julabo, Seelbach, Deutschland
Zellzählgerät Nexcelom Cellometer™ Auto T4	peqLab, Erlangen, Deutschland
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5810	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Herkunft der Proben

Die Probengewinnung erfolgte durch Zahnextraktionen im Rahmen von gerechtfertigten, medizinisch indizierten zahnärztlichen Eingriffen nach Aufklärung und Zustimmung der Patienten. Sie wurde in Zusammenarbeit mit der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Universitätsmedizin Göttingen bei adulten und juvenilen Patienten vorgenommen. Insgesamt wurden drei Prämolaren von adulten Patienten (Alter 25 bis 29 Jahre) und drei Prämolaren von juvenilen Patienten (Alter 12 bis 13 Jahre) in die Studie einbezogen. Dieses Studienvorhaben ist unter der

Antragsnummer 23/7/15 in der Sitzung der Ethik-Kommission der Universitätsmedizin Göttingen vom 16.07.2015 genehmigt worden.

2.2.2 Zellanzucht

Die oralen Gewebe/Zähne wurden extrahiert und direkt in DMEM+GlutaMaxTM (*Dulbecco's modified eagle medium*) eingelegt. Das Medium wurde zuvor mit Gentamycin als präventivem Antibiotikazusatz und 10 % fetalem Kälberserum (FCS) supplementiert (im Folgenden DMEM+/- genannt, s. Tabelle 2).

Die Zellen des Parodontalligaments wurden nach einem modifizierten Protokoll gewonnen, das im Folgenden näher erläutert wird (Somerman et al. 1988).

An der Sterilbank wurde der Zahn mit Hilfe einer Pinzette an der Zahnkrone gefasst und gründlich mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung gespült, bevor er mit Braunol ca. 10 s desinfiziert wurde, um Bakterien und Pilze abzutöten. Mit Hilfe eines Skalpells wurde das Gewebe im mittleren Wurzelf Drittel unidirektional abgeschabt und in eine 6-Well-Platte mit je 3 ml DMEM+/- überführt, das als Breitbandantibiotikum den Zusatz Gentamycin enthält, um verbleibende Bakterien abzutöten. Kleine Gewebestücke wurden mit runden Deckgläschen vorsichtig auf den Boden der 6-Well-Platte gedrückt, um das Adhärenieren der PDL-Zellen an die Kunststoffoberfläche des Wells zu erleichtern. Die Inkubation erfolgte acht bis zehn Tage in einem Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂, 95 % Luftfeuchtigkeit) ohne Mediumwechsel und Bewegung der Platte.

Nach acht bis zehn Tagen wurde das Medium abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt. Im Anschluss wurden die Deckgläschen abgelöst und in ein neues Well überführt. Die Anzucht erfolgte solange, bis ein ausreichender Bewuchs der Platte von etwa 70 bis 80 % Konfluenz erreicht war.

Bei ausreichendem Bewuchs wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA (im Folgenden TE genannt, siehe Tabelle 2) von den Wells unter mikroskopischer Kontrolle abgelöst, die Trypsinisierung mit Medium abgestoppt, die Zellen resuspendiert und auf Zellkulturflaschen (75 cm², für die Anzucht von adhärenenten Zellen) verteilt. So wurde weiter verfahren, bis erneut eine Konfluenz von 70 bis 80 % erreicht war.

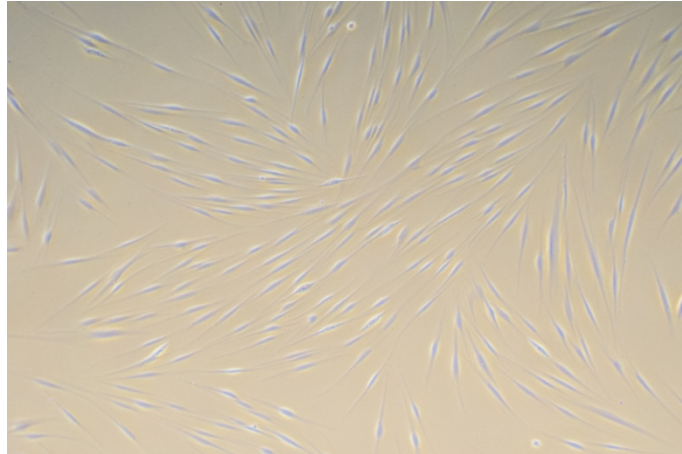


Abbildung 8: Repräsentative Darstellung des Wachstums von PDL-Zellen. Zu erkennen ist das Wachstum von PDL-Zellen unter dem Mikroskop. Sehr gut sind die spindelförmigen Ausläufer und die homogene Anordnung zu beobachten.

2.2.3 Passagierung und Zellernte

Die, wie in 2.2.2 beschrieben, gewonnenen Kulturen aus Primärzellen wurden für die folgenden Versuche vermehrt und in regelmäßigen Abständen passagiert. Bei einer erreichten Konfluenz von ca. 70 bis 80 % wurden die Zellen mit 2 ml TE vom Boden der Zellkulturflaschen gelöst, in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 10 min bei $300 \times g$ und Raumtemperatur zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde durch Dekantieren abgenommen, verworfen und das Zellpellet in 1 ml Einfriermedium (siehe Tabelle 2) resuspendiert. Es wurde Einfriermedium mit Dimethylsulfoxid (DMSO) genutzt, um die Eiskristallbildung innerhalb der Zellen zu vermindern, sodass die Integrität der Zellmembranen während des Einfrierprozesses nicht geschädigt wird (Dougherty 1962).

Zur Zellzählung wurden 20 μl der Zellsuspension auf einen *Nexcelom*-Objektträger gegeben und die Lebendzellzahl mit Hilfe des *Nexcelom Zellometers* gezählt. Anschließend wurden 8×10^4 Zellen zur Fortführung der Kultivierung erneut ausgesät. Es wurden 3×10^5 bis 5×10^5 Zellen in 1 ml Einfriermedium aufgenommen und in ein 1 ml Kryoröhrchen überführt. Zum langsamen und schonenden Einfrieren wurden die Kryoröhrchen in einen Einfrierbehälter mit Isopropanol gestellt und im Gefrierschrank bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ für 24 h bis maximal 5 Tage gelagert. Im Anschluss wurden die tiefgefrorenen Zellen in einem Flüssigstickstofftank (ca. $-180 \text{ }^\circ\text{C}$) überführt und gelagert.

Durch die Transfektion eines lentiviralen Vektors, der durch Überexpression humaner Telomerase-Reverse-Transkriptase (hTERT) die Zellen immortalisiert, erhalten

die Zellen die Fähigkeit zur theoretisch unbegrenzten Zellteilung. Die hTERTisierung der Zellen erfolgte in der ersten Passage durch Christa Bode aus der Arbeitsgruppe Orale Biologie und Geweberegeneration der Universität Göttingen.

Die Zellkultur mit SILAC_{suppl} verhält sich nahezu identisch. Es wurden immortalisierte PDL-Zellen aufgetaut, in Zellkulturflaschen überführt und mit DMEM+/+ versetzt. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit wurde das Medium getauscht, sodass das DMSO entfernt wurde. Nach weiteren 24 Stunden wurde das Medium erneut getauscht und gegen Medium in einem 50:50 Verhältnis bestehend aus DMEM+/+ und SILAC_{suppl} (siehe Tabelle 3) ersetzt, wodurch den Zellen eine langsame Adaption an die neuen Wachstumsbedingungen ermöglicht wurde. Nach weiteren 24 Stunden wurde das Medium erneut ausgetauscht und durch reines SILAC_{suppl} ersetzt. Für den vorliegenden Versuchsansatz wurden zwei Vergleichsgruppen geschaffen. Die Markierung der juvenilen Zellen erfolgte mit Lysin+4 und Arginin+6, wohingegen die adulten Zellen mit Lysin+8 und Arginin+10 markiert wurden. Des Weiteren wurde L-Prolin im Überschuss zugegeben, um eine Arginin-zu-Prolin-Konversion zu vermeiden (Lößner et al. 2011). Die Versuchsansätze wurden im Weiteren identisch behandelt und die Zellen in ihrem Wachstum verglichen.

Das SILAC_{suppl} wurde alle zwei bis drei Tage getauscht und durch frisches ersetzt. Eine Passagierung erfolgte nachdem der Bewuchs der Zellkulturflasche eine Konfluenz von 70 bis 80 % erreicht hatte. Nach so erfolgten sechs Passagen Wachstum in SILAC_{suppl} wurden die Zellen mit PBS gründlich gewaschen, und 24 Stunden in SILAC_{suppl} kultiviert, bevor im Anschluss die Mediumüberstände gesammelt und eingefroren wurden.

Für die spätere mögliche Analyse des Proteoms wurden die verbleibenden Zellen mechanisch gelöst, mit PBS versetzt und in Reaktionsgefäße überführt. Nach Zentrifugation (10 min / 300 × g / 4 °C) wurde der Überstand entfernt, das Zellpellet gewogen und mit der 10-fachen Menge kaltem RIPA-Lyse-Puffer versetzt und gemischt. Nach 10 min Inkubation auf Eis folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (10 min / 13.000 rpm / 4 °C), sodass letztlich der entstandene Überstand entnommen und auf -80 °C eingefroren werden konnte.

Die PDL-Zellen wuchsen in dem SILAC_{suppl} mit den jeweils markierten Aminosäuren und inkorporierten diese im Laufe der Zeit, wobei nach sechs Passagen von einer ausreichenden Einbaurrate gesprochen wird (Ong et al. 2002). Es wurden sechs Zelllinien kultiviert (je drei juvenil und drei adult) und für die Analyse im Massenspektrometer je 10 µl Medium-Überstand pro Patienten genommen und in einem

Reaktionsgefäß zusammen pipettiert. Diese 60 µl gepoolte Probe wurde dann mit 240 µl 10% TCA-Aceton eiskalt versetzt, gemischt und über Nacht bei -20°C inkubiert (siehe Abschnitt 2.2.6). Nach der Inkubation folgte eine Zentrifugation (15 min / 13.000 rpm / 4 °C). Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Für die Auftragung auf ein LDS-Gel wurde die Probe im Anschluss mit 4 × LDS-NuPAGE-Buffer mit Dithiothreitol (DTT) Endkonzentration 25 mM versetzt, das Pellet gelöst und 5 min bei 95 °C aufgeköcht.

Nach diesem Schritt wurde die Probe auf -20 °C gelagert, bis sie in der wissenschaftlichen Serviceeinrichtung Proteomanalyse der Universitätsmedizin Göttingen unter der Leitung von Dr. Christof Lenz wie in Abschnitt 2.2.7 beschrieben weiter prozessiert wurde. Die unterschiedliche Markierung mit schweren und mittelschweren Aminosäuren ermöglicht im weiteren Verlauf die genaue Differenzierung der Herkunft der Aminosäuren im Massenspektrometer.

2.2.4 Erstellung von Zellpellets

Nachdem ausreichend viele Zellpassagen wie in 2.2.3 beschrieben in flüssigen Stickstoff eingefroren wurden, wurden Zellpellets erstellt, die in -80°C eingefroren wurden. Hierzu wurden die Zellkulturflaschen trypsinisiert und die Zellen in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt, welches dann 10 min bei 300 × g zentrifugiert wurde. Das Zellpellet wurde in PBS resuspendiert und mit 20 µl eine Zellzahlbestimmung mittels *Nexcelom*-Objektträger und *Zellometer* durchgeführt. 5 × 10⁵ Zellen wurden in Reaktionsgefäße (1,5 ml) gegeben und erneut pelletiert (10 min / 300 × g / 4 °C). Im Anschluss wurde der Überstand mit sehr viel Schwung dekantiert und die Reaktionsgefäße auf einem Tuch abgeklopft, um die Flüssigkeit zu entfernen. Die Pellets wurden bei -80 °C gelagert.

2.2.5 Proteinbestimmung

Für den Vergleich verschiedener Proben sollten diese auf ihre Gesamtproteinmenge normiert und eine bestimmte Menge für die Trichloressigsäure-Aceton-Präzipitation sowie den Einsatz zur Analyse im Massenspektrometer definiert werden. Für die Detektion und Quantifizierung des Gesamtproteins einer Probe wurde das *Pierce™ BCA protein assay kit* verwendet. Es beruht auf der Biuret-Reaktion bei der Cu²⁺ zu Cu⁺-Kationen in alkalischer Lösung reduziert werden (Gornall et al. 1949). Die Reduktion erfolgt aufgrund der Proteinstruktur, Zahl der Säureamidbindungen,

sowie des Vorhandenseins der vier Aminosäuren Cystein, Cystin, Tryptophan und Tyrosin. Es entsteht ein violetter Komplex aus zwei Molekülen Bicinchoninsäure und einem einwertigen Kupferkation dessen Absorption bei 562 nm gemessen wird und im Bereich von 20 µg/µl bis 2 mg/ml nahezu linear ist. Es handelt sich also um eine kolorimetrische Methode.

Die Proteinkonzentrationen werden im Bezug zu einer Referenz, in diesem Fall BSA, ermittelt. Hierzu wurde eine Reihe von Verdünnungen bekannter Konzentrationen erstellt und die Absorption gegenüber der Konzentration aufgetragen. Die unbekannte Konzentration der Probe wurde dann anhand dieser Eichgeraden abgeleitet.

Das Kit enthält drei Lösungen: Lösung A (Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat, Bicinchoninsäure, Natriumtartrat, 0,1 M Natriumhydroxid), Lösung B (4 % Kupfersulfat-Lösung), sowie die BSA-Stammlösung (2 mg/ml). Für die Reaktion wurde zunächst die Reaktionslösung angesetzt. Diese setzt sich aus 50 Teilen Lösung A und 1 Teil Lösung B zusammen. Zu 10 µl jeder Probe wurden 200 µl dieser Reaktionslösung gegeben, gemischt und 30 min im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Proben abzentrifugiert und auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Messung der Proben erfolgte am Nanodrop Spektralphotometer. Für die Quantifizierung musste zunächst eine Verdünnungsreihe mit der BSA-Stammlösung und anschließend eine Eichgerade mit Referenzwerten am Nanodrop erstellt werden.

2.2.6 Trichloressigsäure-Aceton-Präzipitation

Die wie in Abschnitt 2.2.3 beschrieben gesammelten Zellüberstände beinhalten durch die Kultivierung mit fetalem Kälberserum auch Albumin, was die Messung am Massenspektrometer stört und die eigentliche Suche nach den Proteinen des Sekretoms erschwert bzw. überdeckt. Die Fällung der Proben mit Trichloressigsäure-Aceton ist eine Möglichkeit, um die Albuminkonzentration in der Probe zu reduzieren (Abbildung 9). Das Prinzip der Fällung beruht darauf, dass Trichloressigsäure mit Albumin einen Komplex bildet, der in Aceton löslich ist (Chen et al. 2005). Nach Präzipitation lässt sich somit das Albumin entfernen, wodurch eine bessere Messung der übrigen Proteine gewährleistet wird (Gaida 2012).

Für die Durchführung dieser Trichloressigsäure (TCA)-Aceton-Fällung wurde zu dem Probenvolumen die vierfache Menge frische eiskalte TCA-Aceton-Lösung (10 %) gegeben, gemischt und 2 Stunden oder über Nacht bei -20°C inkubiert. Im

Anschluss wurde das Gemisch 30 min, bei 13.000 rpm, bei 4 °C zentrifugiert. Der entstandene Überstand (Überstand 1) wurde abgenommen und das entstandene Präzipitat (Präzipitat 1) wurde zum Waschen nochmal mit eiskalter 10 %iger TCA-Aceton-Lösung versetzt und 15 min bei 4°C und 13.000 rpm zentrifugiert. Der daraus entstandene Überstand (Überstand 2) wurde verworfen und das Präzipitat im SpeedVac getrocknet. Der zuerst abgenommene Überstand (Überstand 1) wurde mit 500 µl eiskaltem 100 % Aceton versetzt, 15 min auf Eis inkubiert und wieder 30 min, bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das entstandene Präzipitat (Präzipitat 2) wurde in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Der Überstand der letzten Zentrifugation wurde ebenfalls in der Vakuumzentrifuge getrocknet (Präzipitat 3). Die gepoolten und präzipitierten Zellüberstände wurden wie in Abschnitt 2.2.7 beschrieben via SDS-PAGE (und für die letztendliche Analyse im Massenspektrometer via LDS-PAGE) aufgetrennt und gefärbt.

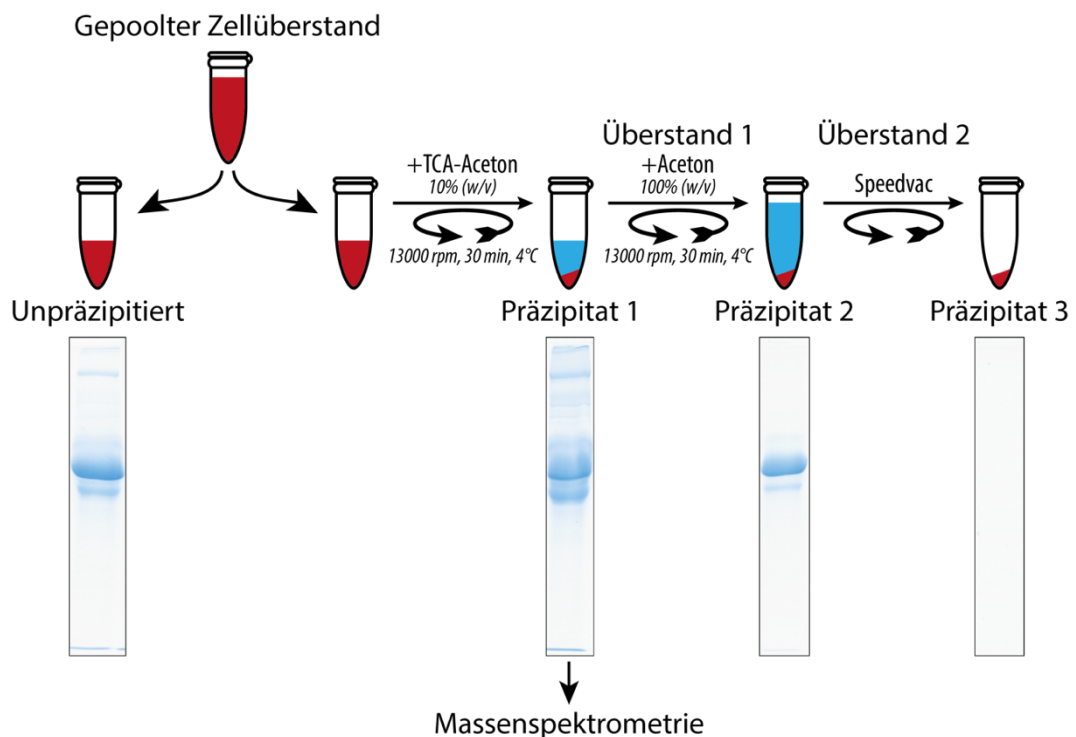


Abbildung 9: Ablauf der TCA-Aceton-Fällung. Der gepoolte Zellüberstand einzelner Kulturen von Probanden derselben Gruppe wurde in Vorversuchen aufgeteilt, um eine Hälfte zu präzipitieren. Der Überstand von Präzipitat 1 (nach TCA-Aceton-Fällung) wurde erneut präzipitiert (Aceton). Der daraus resultierende Überstand 2 wurde in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Alle Präzipitate wurden zum Vergleich mit dem unpräzipitierten Zellüberstand in einer SDS-PAGE aufgetrennt und gefärbt.

2.2.7 SDS-PAGE

Um die Effizienz der Reduktion von Albumin, welches die übrigen Proteine in der Probe bei der massenspektrometrischen Analyse überlagert und ihre Detektion erschweren würde, zu überprüfen, wurden Vorversuche an Überständen aus der Zellkultur durchgeführt. Die Qualität der Albumin-Präzipitation wurde mehrfach durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) überprüft. In der finalen Aufarbeitung der SILAC-markierten Proteine der Zellüberstände wurde anstelle des SDS-Gels ein LDS-Gel (Lithiumdodecylsulfat) verwendet (Laemmli 1970).

Die Gelelektrophorese ist ein analytisches Verfahren, um geladene Teilchen mit Hilfe eines elektrischen Feldes aufzutrennen. Die Auftrennung erfolgt hierbei, durch die Porengröße des zu durchwandernden Gels, nach dem Molekulargewicht. Durch die Zugabe von SDS (Sodium-Dodecyl-Sulfate), einem anionischen Tensid, werden Proteine zunächst denaturiert und mit einer ähnlichen Ladungsdichte versehen. Die Eigenladung der Proteine wird dabei durch SDS maskiert. Ein Gramm Protein bindet in etwa 1,4 g SDS (Smith 1984). Die Proteine wandern also unabhängig ihres genauen isoelektrischen Punkts in Richtung Anode. Die Auftrennung erfolgt dementsprechend nicht anhand der Ladung der Proteine, sondern nach der Größe der Moleküle. Die Denaturierung bricht die Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine auf, sodass nur die Molekulargewichte der zuvor verbundenen Untereinheiten von Bedeutung bei der Wanderungsgeschwindigkeit in der SDS-PAGE sind. Durch Zugabe von Dithiothreitol, einem Reduktionsmittel, kommt es zur Aufspaltung der Disulfidbrücken, sodass auch Quartärstrukturen aufgespalten werden können. Die Wanderungsgeschwindigkeit korreliert reziprok mit dem logarithmischen Molekulargewicht (Cleland 1964).

Für die diskontinuierliche Gelelektrophorese benötigt man ein Trenngel und ein Sammelgel auf die das Probenmaterial aufgetragen wird. Die benutzten Gele waren Polyacrylamidgele. Hier bilden das Acrylamid Ketten und das Bisacrylamid die Quervernetzung dieser Ketten aus. Tetramethylethyldiamin (TEMED) wird dem Ansatz als Katalysator hinzugegeben, um eine gleichmäßige Polymerisation zu fördern. Die Polymerisation wird durch Zugabe von Ammoniumperoxodisulfat als Radikalstarter eingeleitet und dem Reaktionsansatz deshalb als letztes hinzugefügt. Die diskontinuierliche Elektrophorese dient der besseren Auftrennung der Proteine. Sie besteht aus einem Sammelgel, in dem sich die Proben befinden und einem sich anschließenden Trenngel. Zunächst laufen die Proben durch das grobmaschigere Sammelgel (5 %), hier kommt es zu einer Aufkonzentrierung der Proben. Gleichzeitig wird eine höhere Bandenschärfe erreicht bevor die Proben in das

Trenngel laufen. Die höhere Polyacrylamid-Konzentration im Trenngel (10 %) führt im weiteren Verlauf zu einer Auftrennung der Proteine nach Molekulargewicht. Das noch flüssige Trenngel (siehe Tabelle 3) wurde zwischen zwei Glasplatten, die mit einer Gummidichtung abgedichtet sind, gegeben und mit 100 % Ethanol überschichtet, um eine glatte Trennlinie zu erreichen. Nach Polymerisation des Gels wurde das Ethanol abgegossen. Das noch flüssige Sammelgel (siehe Tabelle 3) wurde auf gleiche Weise zwischen die Glasplatten gegeben und so das Trenngel überschichtet. Anschließend wurde zur Bildung der Probenfächer im Gel im noch flüssigen Zustand ein Kamm eingesetzt. Nach Polymerisation des Gels wurden der Kamm und das Dichtungsgummi entfernt. Das Gel war nun einsatzbereit und konnte direkt in eine mit 1× Laufpuffer gefüllte Kammer gestellt oder bis zu zwei Wochen im Kühlschrank in einer feuchten Kammer aufbewahrt werden. Die Proteine liefen im Gel vom Minus- zum Pluspol, wobei im Sammelgel eine Stromstärke zwischen 10 bis 15 mA pro Gel und im Trenngel 20 bis 25 mA pro Gel bis zum Ende des Gels angelegt wurde.

Im Anschluss wurde das Gel aus den Glasplatten entfernt und wie in 2.2.8 beschrieben gefärbt, um die Proteine sichtbar zu machen.

2.2.8 Färbung der Gele

Vor der Färbung der in 2.2.7 beschriebenen Gele wurden diese mehrfach mit Reinstwasser gewaschen, um das mit der Färbung interferierende SDS auszuwaschen. Im Anschluss an diesen Waschschrift wurden die Gele mit kolloidalem Coomassie Brilliant Blue (CBB) gefärbt (Neuhoff et al. 1988), um die gewanderten Proteine sichtbar zu machen. Hierfür wurden die Gele in eine Kammer mit der Färbelösung gegeben und über Nacht schwenkend bei Raumtemperatur gefärbt. Die Zusammensetzung der Färbelösung (siehe Tabelle 3) geschieht in fester, angegebener Reihenfolge, um die Bildung von kolloidalen Partikeln zu ermöglichen.

Die gefärbten Gele wurden im Anschluss mit einem Durchlichtscanner eingescannt und digitalisiert.

2.2.9 In-Gel-Verdau für die Massenspektrometrie

Für die Massenspektrometrie wurden die Proben mit dem NuPAGE®-System der Firma Invitrogen unter Beachtung des Herstellerprotokolls behandelt. Die Proben

wurden in 1 × NuPAGE® LDS Sample Buffer (Invitrogen) aufgenommen, auf ein 4 – 12 % NuPAGE® Novex Bis-Tris Minigel (Invitrogen) aufgetragen und im Sinne einer Gelelektrophorese aufgetrennt, sodass abgrenzbare Gelbanden entstanden sind. Die Gele wurden mit Coomassie Blau gefärbt, um die Banden sichtbar zu machen. Jede Lane wurde in 23 gleichmäßige Stücke geschnitten.

Der In-Gel-Verdau setzt sich aus vielen Einzelschritten zusammen wobei die Gelstücke gewaschen und mit Acetonitril dehydriert werden. In einem weiteren Schritt wurden die Stücke mit Iodacetamid versetzt und inkubiert, um die Peptidsequenzen irreversibel zu alkylieren. Dieser Schritt musste in Dunkelheit geschehen, da sich sonst das Iodacetamid zersetzt.

Im Anschluss wurden die Gelstücke in Ammoniumhydrogencarbonat gewaschen. Eine weitere Dehydratisierung mit Acetonitril erfolgte und die Gelstücke wurden im SpeedVac getrocknet. Der eigentliche Verdau der Gelstücke erfolgte über Nacht, indem sie mit Verdauopuffer (Trypsin, NH_4HCO_3 , CaCl_2) zunächst rehydriert und bei 37°C verdaut wurden.

Die Extraktion der Peptide schloss sich an. Zuerst wurde das Gemisch mit H_2O versetzt und zentrifugiert, bevor sich ein Inkubationsschritt mit Acetonitril anschloss. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde der Überstand mit den gelösten Peptiden abgenommen und gesammelt. Die Gelstücke wurden mit Ameisensäure versetzt, inkubiert und zentrifugiert, um eine weitere Peptidextraktion zu erreichen. Der gesammelte Überstand wurde mit dem anderen Überstand gepooled.

Der entstandene Überstand mit den gelösten Peptiden wurde im nächsten Schritt auf das Massenspektrometer TripleTOF® 5600+ System gebracht (Atanassov und Urlaub 2013).

2.2.10 Massenspektrometrische Analyse

Die massenspektrometrische Analyse wurde in der Wissenschaftlichen Serviceeinrichtung Proteomanalyse der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführt, unter der Leitung von Dr. Christof Lenz.

Für die massenspektrometrische Analyse wurden die Proben mittels einer selbstgepackten Umkehrphasen-C18-Vorsäule (0,15 mm ID x 20 mm, Reprosil-Pur 120 C18-AQ 5 µm, Dr. Maisch, Ammerbuch-Entringen, Deutschland) angereichert und auf einer Umkehrphasen-C18-Säule (0,075 mm ID x 200 mm, Reprosil-Pur 120 C18-AQ, 3 µm, Dr. Maisch) analytisch getrennt. Hierbei wurde ein linearer 30-minütiger Gradient von 5 – 35 % Acetonitril gegen 0,1 % Ameisensäure (v/v) bei einer

Flussrate von 300 nl min^{-1} verwendet. Das Eluat wurde in einem hybriden Quadrupol-Orbitrap Massenspektrometer (Q Exactive mit FlexIon-Ionenquelle, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Germany) unter Verwendung einer Top12 datenabhängigen Acquisitionsmethode analysiert. Hierbei wurde in jedem experimentellen Zyklus zunächst ein MS^1 -Scan im Massenbereich $350\text{-}1600 \text{ m/z}$ bei einer Auflösung von 70.000 FWHM durchgeführt, mit einem Zielwert der *automatic gain control* (AGC) von 1×10^6 Ionen und einer maximalen Füllzeit von 60 ms . Bis zu 12 der intensivsten MS^1 -Vorläuferionen mit einer Intensität von mindestens 2×10^4 und Ladungszuständen zwischen $2+$ und $5+$ wurden sequenziell mit einer Isolierungsweite von 2.0 FWHM (*full width half maximum*) isoliert, mit einer normalisierten Kollisionsenergie von 25% fragmentiert, und die entstandenen Fragmente bei einer Auflösung von 17.500 FWHM , einem AGC von 2×10^5 und einer maximalen Füllzeit von 60 ms aufgezeichnet. Bereits ausgewählte Vorläuferionen wurden für die folgenden 15 Sekunden von der Analyse ausgeschlossen. Von jeder Probe wurden zwei technische Replikate gemessen und aufgezeichnet (Atanassov und Urlaub 2013).

2.2.11 Proteinidentifizierung und -quantifizierung

Die Identifizierung und relative Quantifizierung von Proteinen erfolgte mittels der Software MaxQuant (Version 1.5.2.8, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, Deutschland) gegen eine Proteinsequenz-Datenbank der UniProt Knowledgebase (www.uniprot.org), inklusive eines Satzes bekannter Laborkontaminanten. Als proteolytisches Enzym wurde gemäß der Probenvorbereitung Trypsin mit bis zu zwei möglichen Fehlsplaltungen spezifiziert; Carbamidomethylierung als feste Cystein-Modifikation; sowie Acetylierung am N-Terminus des Proteins sowie Methionin-Oxidation als variabel Modifikationen. Der Instrumententyp „orbitrap“ wurde ausgewählt, um die typische gerätespezifische Datenqualität zu berücksichtigen. Die Massen „Arginin+10“ (R10) und „Lysin+8“ (K8) wurden für die adulten und „Arginin+6“ (R6) und „Lysin+4“ (K4) für die juvenilen Probanden ausgewählt und die „requantify“-Option für die relative Proteinquantifizierung aktiviert. Die Peptid- und Proteinerggebnisse wurden auf eine maximale Falschpositivrate von jeweils 1% hin gefiltert (Cox und Mann 2008).

2.2.12 Statistische Analyse der Proteindaten

Die anschließende statistische Auswertung, wurde mit der Software Perseus (Version 1.5.0.15 bis 1.6.7.0, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, Deutschland) durchgeführt (Tyanova und Cox 2018). Für die detektierten Proteine wurden funktionelle Annotationen aus *Gene Ontology* (GO) sowie der *Kyoto encyclopedia of genes and genomes* (KEGG)-Datenbank importiert (Ashburner et al. 2000; Kanehisa 2000).

Hierbei wurden zunächst Laborkontaminanten aus der Ergebnisliste entfernt, anschließend dann Proteine, die lediglich als Proteine aus Rind identifiziert wurden und keine Homologie zu humanen Proteinen zeigten. Ebenfalls wurden Proteine gefiltert, die lediglich durch ein einzelnes Peptid nachgewiesen wurden (sog. *one hit wonders*). Für die verbleibenden Proteine wurden die SILAC-Verhältnisse \log_2 -transformiert, um Normalverteilungen der Peakflächenverhältnisse her zu stellen. Die statistische Auswertung der Daten durch erfolgte jeweils durch paarweisen Vergleich mittels eines FDR-basierten t-Tests ($p = 0,05$, $S0 = 0,58$). Auf eine Anreicherung funktionaler Annotationen aus GO bzw. KEGG hin wurde mittels *fisher exact test* hin geprüft.

3 Ergebnisse

3.1 Entwicklung eines Versuchsablaufs

Im Folgenden sollen die wichtigsten Schritte zur Entwicklung einer Methode für die Untersuchung des Sekretoms von Zellen des Parodontalligaments dargestellt werden. Zur Veranschaulichung ist der erarbeitete Versuchsablauf in Abbildung 10 zusammenfassend dargestellt. Dieser Versuchsablauf musste zunächst etabliert werden, da zum Zeitpunkt der Dissertation kein Versuchsablauf für die Kultivierung und metabolische Markierung von Zellen des Parodontalligaments vorlag.

Zunächst sollten die Gewinnung, Kultivierung und Expansion der PDL-Zellen von extrahierten Zähnen aller teilnehmenden Probanden erfolgen. Nach Immortalisierung der Zellen galt es zu beachten, dass für die metabolische Markierung eine ausreichend hohe Zellteilungsrate erzielt würde, damit ein adäquater Einbau der isotope markierten, schweren Aminosäuren erzielt werden konnte. Ebenso sollte die Möglichkeit einer serumfreien Kultivierung der Parodontalligamentzellen geprüft werden, um eine verbesserte Detektion von Proteinen niedriger Konzentrationen zu ermöglichen. Sollte eine solche serumfreie Kultivierung nicht möglich sein, müsste eine Methode zur Abreicherung des hoch-abundanten Serumalbumins verwendet werden. Letztendlich sollte nach der Detektion im Massenspektrometer die Unterscheidung von bovinen und humanen Proteinen ermöglicht werden.

Zunächst wurde geprüft, ob die Zugabe von fetalem Kälberserum essenziell für das Wachstum der PDL-Zellen ist, oder ob hierauf verzichtet werden konnte. Allerdings war das Wachstum der kultivierten PDL-Zellen in serumfreier Zellkultur stark zurückgegangen und die Zellen zugrunde gegangen. Das Ergebnis zeigt, dass PDL-Zellen für ihr andauerndes Zellwachstum, ebenso wie die meisten anderen Zellkulturen, auf die Zugabe von fetalem Kälberserum angewiesen sind.

Da die Anzucht und das Wachstum von gewonnenen PDL-Zellen in standardisierten Zellkulturmedien möglich sind, konnte für die metabolische Markierung ein Zellkulturmedium benutzt werden, das einen Mangel an den essentiellen Aminosäuren Lysin und Arginin aufweist. Um ein Wachstum zu gewährleisten und gleichzeitig eine metabolische Markierung zu erzielen wurden dem defizienten Medium isotope markierte, schwere Aminosäuren (Zusammensetzung siehe Tabelle 3) zugefügt.

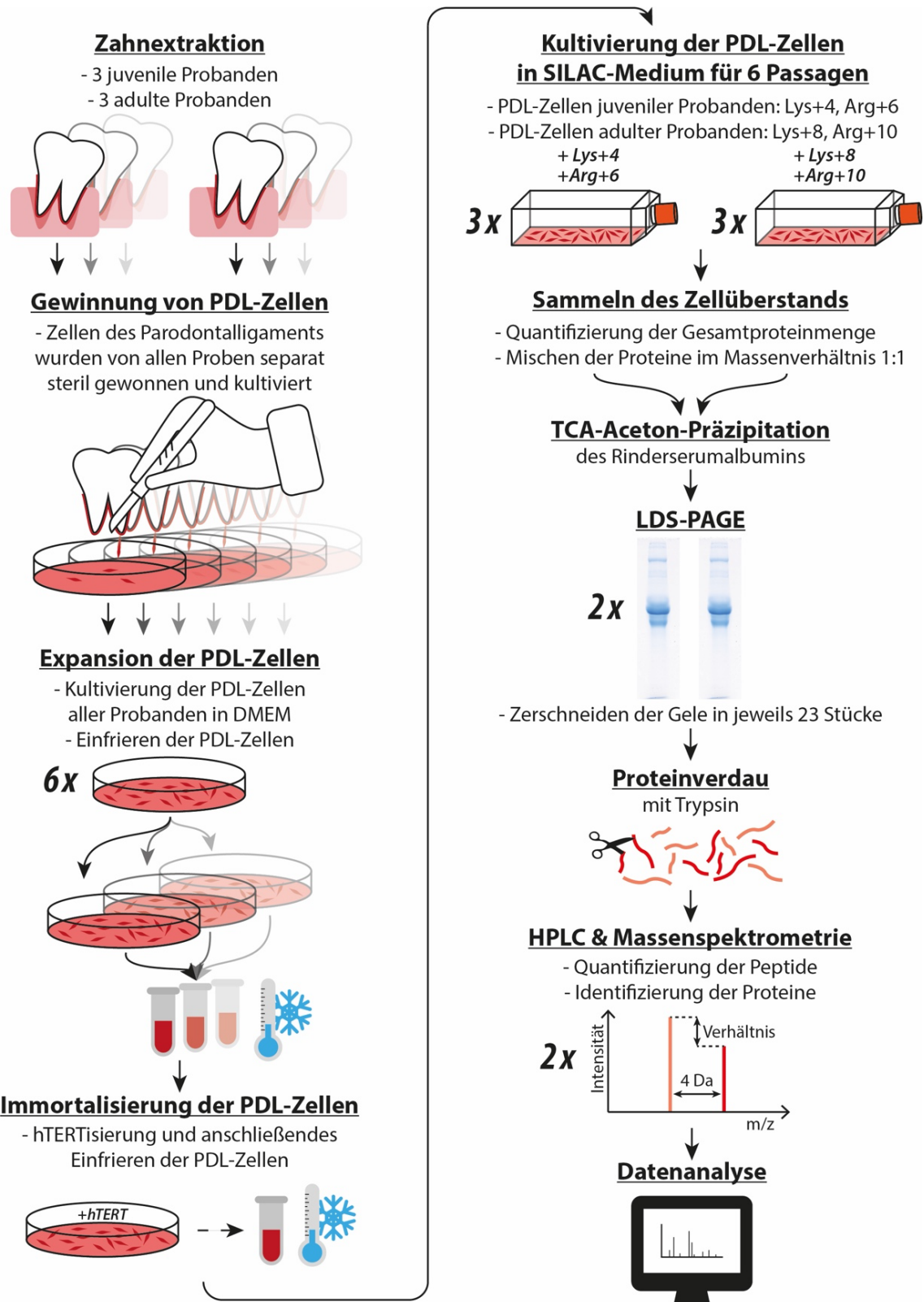


Abbildung 10: Ablauf des etablierten Versuchsablaufs. Zu Beginn erfolgte die Probengewinnung durch Abschaben des Parodonts von den extrahierten Zähnen. Im nächsten Schritt wurden die Zellen kultiviert, vermehrt, kryokonserviert und immortalisiert bevor sie mit SILAC-Medium und isotonenmarkierten Aminosäuren ihrem Typ entsprechend (juvenil/adult) unterschiedlich kultiviert und passagiert wurden. Nach erfolgreicher Aminosäureinkorporation wurde der Zellüberstand abgenommen, eine TCA-Aceton-Fällung angeschlossen, um die Proteine aufzukonzentrieren und das Serumalbumin zu reduzieren. Der nachfolgende Schritt war die LDS-PAGE mit anschließendem Gel-Verdau der einzelnen Gelstückchen und Vorbereitung der Proben für die Analyse im Massenspektrometer zur Quantifizierung und Identifizierung der Peptide bevor sich die Datenanalyse mit MaxQuant und Perseus anschloss.

Wie in Abbildung 11 zu erkennen ist, war das Wachstum der Zellen sowohl in DMEM als auch in SILAC-Medium mit isotopenmarkierten, schweren Aminosäuren (SILAC_{suppl}) erfolgreich und vergleichbar. Dieser Vergleich lies ein adäquates Wachstum in SILAC-Medium erkennen, sodass von einer Inkorporation der supplementierten Aminosäuren ausgegangen wurde.

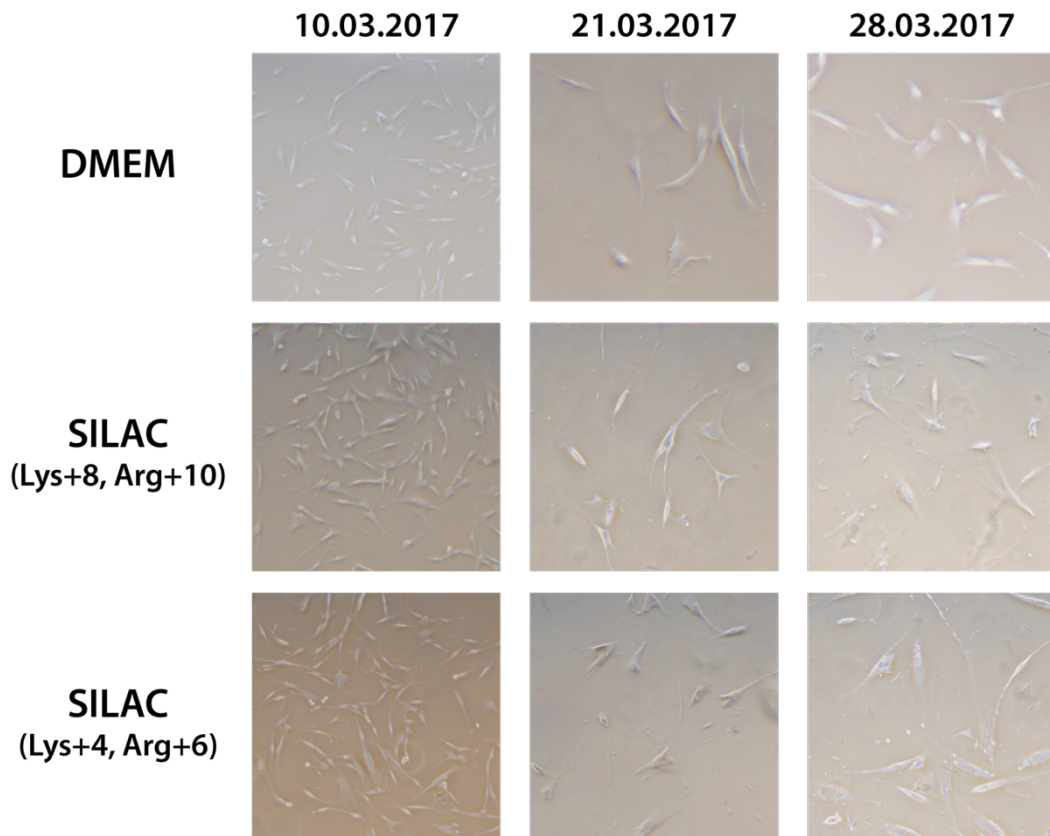


Abbildung 11: Übersicht Zellwachstum in SILAC-Medium im zeitlichen Vergleich. Zum Vergleich des Wachstums der PDL-Zellen in unterschiedlichen Nährmedien ist das Wachstum im zeitlichen Verlauf dargestellt. Zu drei definierten Zeitpunkten wurden Fotos unter dem Mikroskop der drei unterschiedlichen Kulturen gemacht. Zu erkennen ist jeweils ein adäquates Wachstum unabhängig von der Mediumzusammensetzung.

Aufgrund der geringen Proteinkonzentration im Zellkulturmediumüberstand musste eine Methode der Aufkonzentrierung gefunden werden. In Vorversuchen wurden eine Ethanol- und eine Trichloressigsäure (TCA)-Aceton-Präzipitation verwandt. Es stellte sich heraus, dass sich die Qualität der Anreicherung im Elektrophoresegele deutlich unterscheidet: Bei der Ethanolpräzipitation war bei Einsatz gleicher Probenmengen keine saubere Auftrennung unterhalb etwa 60 kDa mehr möglich. Dies resultierte in der Anwendung der TCA-Aceton-Präzipitation, wie sie im Labor der Oralen Biologie und Geweberegeneration der Universität Göttingen bereits etabliert war (Gaida 2012). Außerdem bietet die TCA-Aceton-Präzipitation den Vorteil, dass

zusätzlich zur Präzipitation der sekretierten Proteine das Serumalbumin aus dem Zusatz des fetalen Kälberserums reduziert werden kann.

Die albuminreduzierten Proben konnten anschließend für die LDS-PAGE und den In-Gel-Verdau verwendet werden, sodass weniger Interferenzen und Überlagerungen anderer Proteine im Massenspektrometer zu erwarten waren.

3.2 Proteinidentifikationen im Sekretom juveniler und adulter Probanden

In diesem Abschnitt soll auf die qualitative Auswertung der Sekretome juveniler gegenüber adulter Probanden eingegangen werden. Das Gesamtsekretom setzt sich aus 182 Proteinen zusammen (Tabelle 5), wobei hier darauf hingewiesen wird, dass es sich um alle humanen Proteine handelt, die in beiden technischen Replikaten gefundenen wurden, ohne dass eine weitere Filterung vorgenommen wurde. Im Weiteren wurden nur solche Proteine berücksichtigt, die sowohl in den Proben juveniler als auch adulter Probanden gefunden wurden.

Wie in Abschnitt 2.2.12 beschrieben, wurden zunächst die identifizierten Proteine mit einer Datenbank für Rinderproteine abgeglichen und Proteine, die eindeutig bovinen Ursprungs waren, wurden entfernt. Die Auswertung mit der Software Perseus erlaubte darüber hinaus ein Filtern der Proteindaten, wodurch potenzielle Kontaminanten oder Proteine, die nur in einer der beiden Doppelbestimmungen zu finden waren, entfernt wurden. Somit wurden in die letztendliche Auswertung nur solche Proteine mit einbezogen, welche in beiden technischen Replikaten der massenspektrometrischen Messung enthalten waren und identifiziert wurden. Außerdem wurden nur die mittelschwer und schwer markierten Proteine bei der Auswertung berücksichtigt, da nur diese in den Zellen nach Zugabe der mittelschweren und schweren essenziellen Aminosäuren Arginin und Lysin entstanden sein können. Leichte, normalschwere Proteine waren entweder bereits vor Zugabe der essenziellen Aminosäuren vorhanden oder entstammten dem zugegebenen fetalen Kälberserum.

Die graphische Gegenüberstellung der Proteine, die in beiden technischen Replikaten vorhanden waren, zeigt im Scatter Plot, dass die Verteilung der Proteine in beiden technischen Replikaten in etwa gleich war, diese somit qualitativ ähnlich waren. Dies ist abzuleiten von der in Abbildung 12 eingezeichneten schwarze Linie, welche

die Ursprungsgerade mit der Funktion $y = x$ darstellt. Der Pearson-Korrelationskoeffizient der Messwerte zu dieser Funktion beträgt 0,66 und das Bestimmtheitsmaß r^2 0,43.

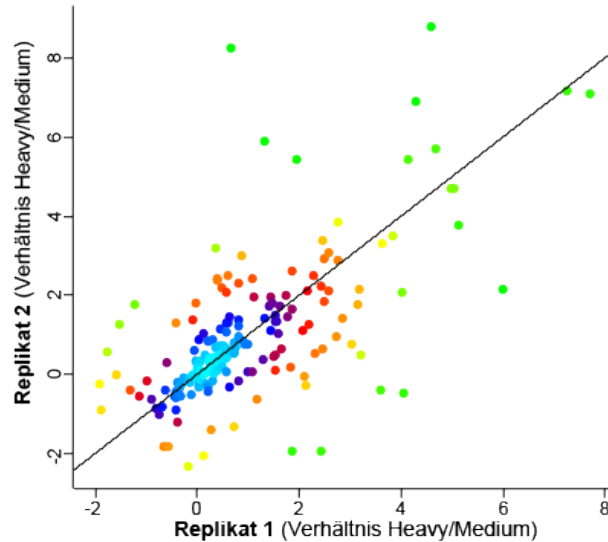


Abbildung 12: Qualitätskontrolle via Scatter Plot. Die in den Replikaten 1 und 2 (Spuren 1 und 2 auf dem LDS-Gel) gefundenen Proteine, dargestellt nach dem Schwer/Mittelschwer-Verhältnis in einem Scatterplot. Im Density Plot werden Punkte in dichten Bereichen hellblau und die am wenigsten dichten Punkte grün dargestellt. Eingezeichnet ist die Gerade der Funktion $y = x$ (Pearson-Korrelationskoeffizient = 0,66; $r^2 = 0,43$).

Nachfolgend sind alle 182 in den Sekretomen beider Probandengruppen identifizierten Proteine inklusive Gennamen aufgeführt (Tabelle 5).

Tabelle 5: Die im Sekretom aller Proben identifizierten humanen Proteine

Nr.	Proteinname	Gename	Verhältnis schwer/medium (\log_2)
1	Phosphoglycerate kinase 1	PGK1	-1,38 ($\pm 0,73$)
2	Semaphorin-4B	SEMA4B	-1,24 ($\pm 1,49$)
3	60S ribosomal protein L12	RPL12	-1,24 ($\pm 0,80$)
4	Heat shock cognate 71 kDa protein	HSPA8	-1,19 ($\pm 0,88$)
5	Collagen alpha-1(X) chain	COL10A1	-1,08 ($\pm 1,20$)
6	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C	PPIC	-0,95 ($\pm 1,50$)
7	Apolipoprotein M	APOM	-0,87 ($\pm 0,18$)
8	C-type lectin domain family 11 member A	CLEC11A	-0,86 ($\pm 0,66$)
9	Thrombospondin-2	THBS2	-0,83 ($\pm 0,44$)
10	Insulin-like growth factor-binding protein 7	IGFBP7	-0,82 ($\pm 0,03$)
11	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, testis-specific	GAPDHS	-0,79 ($\pm 0,58$)

Nr.	Proteinname	Genname	Verhältnis schwer/medium (log₂)
12	Argininosuccinate synthase	ASS;ASS1	-0,79 (± 1,14)
13	Ras-related protein Rab-10	RAB10	-0,77 (± 0,20)
14	Glia-derived nexin	SERPINE2	-0,74 (± 0,06)
15	Pentraxin-related protein PTX3	PTX3	-0,64 (± 0,32)
16	Serotransferrin	TF	-0,59 (± 1,67)
17	Cartilage intermediate layer protein 2	CILP2	-0,57 (± 0,61)
18	Immunoglobulin heavy variable 3-66	IGHV3-66	-0,55 (± 1,16)
19	Collagen alpha-1(VI) chain	COL6A1	-0,51 (± 0,10)
20	Stanniocalcin-2	STC2	-0,50 (± 0,18)
21	Complement C1s subcomponent	C1S	-0,49 (± 0,06)
22	SPARC	SPARC	-0,44 (± 0,14)
23	Collagen alpha-1(I) chain	COL1A1	-0,43 (± 0,01)
24	Olfactomedin-like protein 3	OLFML3	-0,42 (± 0,08)
25	Galectin-3-binding protein	LGALS3BP	-0,36 (± 0,03)
26	Fibulin-1	FBLN1	-0,32 (± 0,26)
27	Collagen alpha-2(I) chain	COL1A2	-0,30 (± 1,41)
28	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase gamma	PTPRG	-0,30 (± 0,05)
29	Complement C1r subcomponent	C1R	-0,29 (± 0,10)
30	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	HPD	-0,29 (± 0,17)
31	Serine protease HTRA1	HTRA1	-0,18 (± 0,02)
32	Vimentin	VIM	-0,18 (± 0,16)
33	Protocadherin gamma-C3	PCDHGC3	-0,15 (± 0,65)
34	Cathepsin B	CTSB	-0,13 (± 0,22)
35	Follistatin-related protein 1	FSTL1	-0,13 (± 0,20)
36	Alpha-enolase	ENO1	-0,12 (± 2,00)
37	Sulfhydryl oxidase 1	QSOX1	-0,11 (± 0,08)
38	Thyroglobulin	TG	-0,11 (± 0,42)
39	Procollagen C-endopeptidase enhancer 1	PCOLCE	-0,07 (± 0,13)
40	Collagen alpha-1(XII) chain	COL12A1	-0,05 (± 0,34)
41	Galectin-1	LGALS1	-0,05 (± 0,07)
42	Fibronectin	FN1	-0,04 (± 2,67)
43	Centrosomal protein of 164 kDa	CEP164	-0,04 (± 0,02)
44	Metalloproteinase inhibitor 2	TIMP2	-0,03 (± 0,12)
45	Follistatin	FST	-0,02 (± 0,27)
46	72 kDa type IV collagenase	MMP2	-0,01 (± 0,04)
47	Amyloid beta A4 protein	APP	0,00 (± 0,04)

Nr.	Proteinname	Genname	Verhältnis schwer/medium (log₂)
48	Fructose-bisphosphate aldolase A	ALDOA	0,05 (± 0,07)
49	Coagulation factor IX	F9	0,08 (± 0,31)
50	14-3-3 protein sigma	SFN	0,08 (± 0,14)
51	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	0,09 (± 0,07)
52	Fibrillin-1	FBN1	0,09 (± 0,04)
53	Thrombospondin-1	THBS1	0,11 (± 0,03)
54	Tenascin	TNC	0,12 (± 0,07)
55	Triosephosphate isomerase	TPI1	0,13 (± 0,20)
56	Plasminogen activator inhibitor 1	SERPINE1	0,14 (± 0,09)
57	Dextrin	DSTN	0,15 (± 0,64)
58	Pantetheinase	VNN1	0,15 (± 0,26)
59	Collagen alpha-2(VI) chain	COL6A2	0,19 (± 0,18)
60	Myosin-9	MYH9	0,22 (± 0,22)
61	Complement C5	C5	0,25 (± 0,20)
62	14-3-3 protein zeta/delta	YWHAZ	0,26 (± 3,07)
63	Fibulin-1	FBLN1	0,26 (± 0,10)
64	Histone H3	H3F3B; H3F3A	0,27 (± 0,50)
65	Fructose-bisphosphate aldolase B	ALDOB	0,27 (± 1,27)
66	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	HEL-S-69p	0,27 (± 2,13)
67	Glycogen phosphorylase. liver form	PYGL	0,28 (± 0,08)
68	Cadherin-5	CDH5	0,28 (± 0,13)
69	Metalloproteinase inhibitor 1	TIMP1	0,31 (± 0,09)
70	L-lactate dehydrogenase A chain	LDHA	0,31 (± 0,04)
71	Decorin	DCN	0,32 (± 0,32)
72	Lactadherin	MFGE8	0,33 (± 0,15)
73	Prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1	LRP1	0,33 (± 0,68)
74	Annexin A2	ANXA2	0,34 (± 0,26)
75	Actin cytoplasmic 1	ACTB	0,34 (± 0,04)
76	Cathepsin D	HEL-S-130P	0,35 (± 0,19)
77	Vasorin	VASN	0,38 (± 0,12)
78	Peroxiredoxin-1	PRDX1	0,40 (± 0,07)
79	Coagulation factor XI	F11	0,41 (± 0,00)
80	Voltage-dependent calcium channel subunit alpha-2/delta-2	CACNA2D2	0,44 (± 1,25)
81	Elongation factor 1-alpha 1	EEF1A1	0,46 (± 0,64)

Nr.	Proteinname	Genname	Verhältnis schwer/medium (log ₂)
82	Periostin	POSTN	0,47 (± 0,06)
83	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3	TGFBI	0,50 (± 0,01)
84	Profilin-1	PFN1	0,50 (± 0,09)
85	Dystroglycan	DAG1	0,52 (± 0,23)
86	Pyruvate kinase PKM	PKM	0,52 (± 0,64)
87	Vascular cell adhesion protein 1	VCAM1	0,53 (± 0,46)
88	CD109 antigen	CD109	0,57 (± 0,67)
89	Complement component C8 beta chain	C8B	0,58 (± 0,71)
90	Actin alpha skeletal muscle	ACTA1	0,58 (± 0,20)
91	Complement factor D	CFD	0,58 (± 0,43)
92	Laminin subunit gamma-1	LAMC1	0,62 (± 0,16)
93	Heat shock protein HSP 90-beta	HSP90AB1	0,62 (± 0,12)
94	Adipocyte plasma membrane-associated protein	APMAP	0,62 (± 0,01)
95	40S ribosomal protein S16	RPS16	0,62 (± 0,01)
96	Tubulin beta-4B chain	TUBB4B	0,63 (± 0,13)
97	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	HNRNPH2	0,65 (± 0,11)
98	Keratin type II cytoskeletal 2 epidermal	KRT2	0,65 (± 1,06)
99	Alpha-actinin-4	ACTN4	0,71 (± 0,03)
100	Histone H2B	HIST1H2B	0,77 (± 0,08)
101	Contactin-1	CNTN1	0,81 (± 0,51)
102	Cofilin-1	CFL1	0,82 (± 0,38)
103	Proteasome subunit alpha type-6	PSMA6	0,83 (± 0,98)
104	Polyubiquitin-B	UBB	0,84 (± 0,62)
105	Keratin type II cytoskeletal 1	KRT1	0,86 (± 0,10)
106	Ceruloplasmin	CP	0,87 (± 0,03)
107	Collagen alpha-3(VI) chain	COL6A3	0,87 (± 0,14)
108	Fructose-1,6-bisphosphatase isozyme 2	FBP2	0,87 (± 0,12)
109	ADP-ribosylation factor 1;ADP-ribosylation factor 3	ARF1; ARF3	0,89 (± 1,29)
110	Ectonucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterase family member 2	ENPP2	0,93 (± 1,69)
111	Complement component C8 alpha chain	C8A	0,95 (± 0,53)
112	MHC class I antigen	HLA-B	0,96 (± 0,54)
113	SPARC-like protein 1	SPARCL1	0,98 (± 0,73)
114	Myelin proteolipid protein	PLP1	1,00 (± 1,15)
115	Interstitial collagenase	MMP1	1,02 (± 0,30)

Nr.	Proteinname	Genname	Verhältnis schwer/medium (log ₂)
116	Collagen, type I, alpha 1, isoform CRA_a	COL1A1	1,02 (± 0,71)
117	Carbohydrate sulfotransferase 3	CHST3	1,04 (± 1,49)
118	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	AHNAK	1,05 (± 0,60)
119	Prostaglandin reductase 1	PTGR1	1,10 (± 0,42)
120	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	PGD	1,16 (± 0,68)
121	Chondroitin sulfate proteoglycan 4	CSPG4	1,27 (± 0,22)
122	Hyaluronan-binding protein 2	HABP2	1,31 (± 0,37)
123	Adenosylhomocysteinase	AHCY	1,33 (± 1,09)
124	Retinol-binding protein 4	RBP4	1,35 (± 1,2)
125	Phosphatidylcholine-sterol acyltransferase	LCAT	1,36 (± 0,08)
126	Cadherin-6	CDH6	1,40 (± 1,43)
127	Thrombospondin-4	THBS4	1,41 (± 1,45)
128	Cadherin-2	CDH2	1,43 (± 1,23)
129	Dipeptidyl peptidase 1	CTSC	1,44 (± 0,12)
130	Mannan-binding lectin serine protease 1	MASP1	1,46 (± 0,15)
131	Cadherin-11	CDH11	1,51 (± 0,02)
132	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 13	ADAMTS13	1,54 (± 0,63)
133	Aldo-keto reductase family 1 member C4	AKR1C4	1,55 (± 1,27)
134	Quinone oxidoreductase	CRYZ	1,56 (± 1,37)
135	Cation-independent mannose-6-phosphate receptor	IGF2R	1,57 (± 0,25)
136	Prolyl endopeptidase FAP	FAP	1,58 (± 1,08)
137	Tubulin beta chain	TUBB	1,59 (± 0,65)
138	Histone H4	HIST1H4H	1,62 (± 2,80)
139	Tubulin alpha-1B chain	TUBA1B	1,62 (± 0,22)
140	Filamin-C	FLNC	1,64 (± 0,24)
141	Talin-1	TLN1	1,68 (± 0,08)
142	Complement component 1, r subcomponent, isoform CRA_a	C1R	1,69 (± 0,40)
143	Xaa-Pro dipeptidase	PEPD	1,74 (± 0,64)
144	Insulin-like growth factor-binding protein 2	IGFBP2	1,75 (± 0,99)
145	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase mu	PTPRM	1,77 (± 0,13)
146	Collagen alpha-1(IX) chain	COL9A1	1,77 (± 2,01)
147	Laminin subunit beta-1	LAMB1	1,79 (± 3,17)
148	Collagen alpha-1(V) chain	COL5A1	1,86 (± 1,24)

Nr.	Proteinname	Genname	Verhältnis schwer/medium (log₂)
149	14-3-3 protein epsilon	YWHAE	1,86 (± 1,88)
150	Coagulation factor X	F10	1,87 (± 0,21)
151	Fibromodulin	FMOD	1,90 (± 1,59)
152	Protocadherin-12	PCDH12	1,94 (± 1,52)
153	Interleukin-1 receptor accessory protein	IL1RAP	2,14 (± 0,03)
154	Aldose 1-epimerase	GALM	2,15 (± 1,00)
155	Biliverdin reductase A	BLVRA	2,18 (± 0,43)
156	Lysosomal alpha-mannosidase	MAN2B1	2,24 (± 0,53)
157	Putative protein C3P1	C3P1	2,33 (± 0,11)
158	Secreted phosphoprotein 24	SPP2	2,34 (± 0,31)
159	cDNA FLJ55415, highly similar to Gamma-glutamyl hydrolase	N/A	2,39 (± 0,18)
160	Flavin reductase (NADPH)	BLVRB	2,45 (± 0,96)
161	Collectin-10	COLEC10	2,66 (± 0,71)
162	Phospholipid transfer protein	PLTP	2,70 (± 0,32)
163	Heat shock protein HSP 90-alpha	HSP90AA1	2,82 (± 0,38)
164	Nidogen-1	NID1	2,83 (± 0,12)
165	GTP-binding nuclear protein Ran	RAN	2,93 (± 0,70)
166	Plexin-B2	PLXNB2	3,06 (± 1,34)
167	Fibrocystin-L	PKHD1L1	3,30 (± 0,80)
168	Cytosolic 10-formyltetrahydrofolate de- hydrogenase	ALDH1L1	3,48 (± 0,19)
169	F-actin-capping protein subunit alpha-1	CAPZA1	3,61 (± 3,26)
170	Tyrosine-protein kinase receptor Tie-1	TIE1	3,68 (± 0,22)
171	Regucalcin	RGN	3,69 (± 2,49)
172	C-type mannose receptor 2	MRC2	4,08 (± 2,68)
173	Keratin. type II cytoskeletal 6B	KRT6B	4,45 (± 0,94)
174	Calsyntenin-1	CLSTN1	4,46 (± 5,40)
175	Sphingomyelin phosphodiesterase	SMPD1	4,78 (± 0,92)
176	Glutamate dehydrogenase	GLUD1	4,84 (± 0,16)
177	Glutaminy-peptide cyclotransferase	QPCT	4,87 (± 0,21)
178	S-methylmethionine--homocysteine S- methyltransferase BHMT2	BHMT2	5,18 (± 0,75)
179	Alcohol dehydrogenase class-3	ADH5	5,59 (± 1,88)
180	Sorbitol dehydrogenase	SORD	6,68 (± 2,99)
181	Histone H2A	HIST1H2A	7,21 (± 0,06)
182	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H5	ITIH5	7,40 (± 0,41)

Die Ähnlichkeit der Sekretome juveniler und adulter Probanden lässt sich ebenfalls aus dem Umstand ableiten, dass lediglich je ein Protein im Sekretom jeder Gruppe zu finden war.

Das Protein, das ausschließlich im Sekretom der juvenilen Probanden identifiziert wurde, ist in der nachfolgenden Tabelle 6 beschrieben.

Tabelle 6: Nur in juvenilen Probanden identifizierte Proteine

Genname	Protein	Intensität
ALDH9A1	4-Trimethylaminobutyraldehyd-dehydrogenase	$3,07 \times 10^8 (\pm 1,26 \times 10^8)$

Das Protein, das ausschließlich im Sekretom der adulten Probanden identifiziert wurde, ist in der nachfolgenden Tabelle 7 beschrieben.

Tabelle 7: Nur in adulten Probanden identifizierte Proteine

Genname	Protein	Intensität
ZADH2	Prostaglandin-Reduktase 3	$2,33 \times 10^8 (\pm 1,47 \times 10^8)$

Die Untersuchung der identifizierten Proteine bezüglich ihrer Zugehörigkeit zu biologischen Signalwegen laut *Gene Ontology* ergibt eine vergleichbare Verteilung in den Sekretomen beider Probandengruppen. Hierbei ist zu beachten, dass einzelne Proteine mehreren Prozessen und Signalwegen zugeordnet sein können. Mehrfachnennungen bei entsprechend ausgeprägter Charakterisierung eines Proteins können vorkommen. Sowohl im Sekretom juveniler als auch im Sekretom adulter Probanden waren die Signalwege zu zellulären und metabolischen Prozessen die am häufigsten vertretenen (14 % bzw. 12 % der identifizierten Proteine konnten diesen Prozessen zugeordnet werden). Nächsthäufige Prozesse waren in beiden Probandengruppen die „Regulation biologischer Prozesse“ sowie „Antwort auf Stimuli“ und „Organisation von zellulären Komponenten“. Unterschiede zwischen den Sekretomen beider Probandengruppen zeigten sich nur vereinzelt und im niedrigen Prozentbereich. Diese Unterschiede sind nicht signifikant. So kann davon ausgegangen werden, dass trotz ungleicher Anzahl der als vermehrt detektierten Proteine diese von ihren Eigenschaften her ähnlich sind und zwei vergleichbare Proben für die Analyse herangezogen wurden.

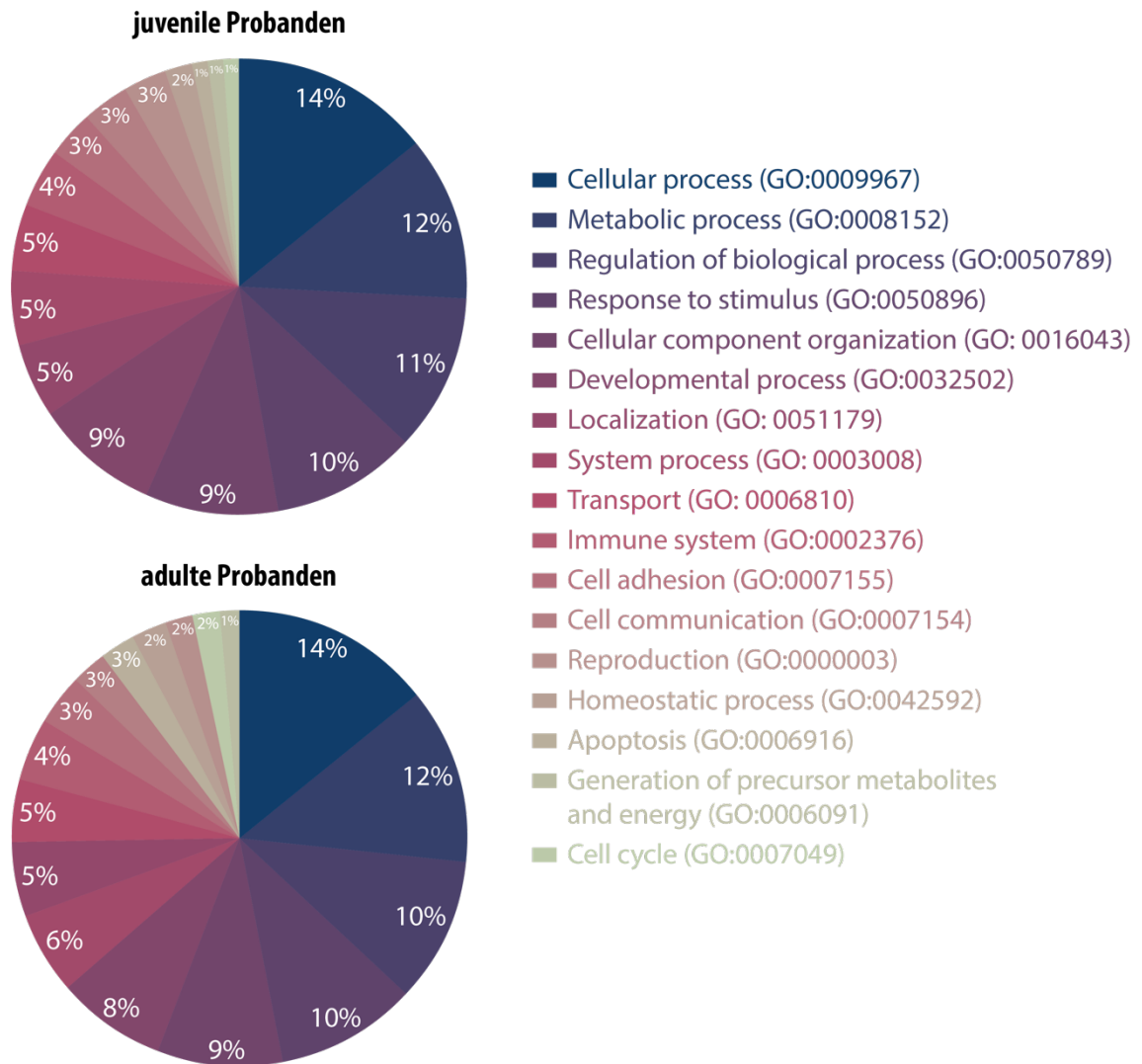


Abbildung 13: Identifizierte Signalwege in Sekretomen der Probanden. Analyse der in den Sekretomen juveniler und adulter Probanden identifizierten Proteine bezüglich Zugehörigkeit zu biochemischen Prozessen (Gene Ontology Biochemical Pathways, GOBP).

Abschließend lässt sich feststellen, dass kein qualitativer Unterschied zwischen den Sekretomen von Zellen des Parodontalligaments juveniler und adulter Probanden zu erkennen ist.

3.3 Quantitativer Vergleich der Sekretome juveniler und adulter Probanden

Da die Proteine der kultivierten Zellen beider Probandengruppen mit unterschiedlich schweren Aminosäuren markiert wurden, sind diese als schwer (*heavy*, adult) und

mittelschwer (*medium*, juvenil) zu identifizieren. Daher wurde die folgende Auswertung über das Verhältnis (*Ratio*) der Menge von schweren zu mittelschweren Proteinen berechnet.

Der Histogrammdarstellung der Proteine in beiden technischen Replikaten ist zu entnehmen, dass das Verhältnis der Proteine im Sekretom adulter und juveniler Probanden mehrheitlich positiv ist (Abbildung 14 A). Dies bedeutet, dass von den Proteinen, die in den Proben beider Altersgruppen vorkamen, in der Regel mehr im Sekretom adulter Probanden zu finden waren. Allerdings waren Proteine, die laut *Gene Ontology* sekretorischen Prozessen zugeordnet werden konnten (*Gene Ontology*-Gruppen *Protein secretion*, *regulation of chemokine secretion*, *regulation of cytokine secretion*, *secretion*, *secretion by cell*) um „0“ verteilt und somit in keiner der beiden Probandengruppen angereichert (Abbildung 14 B).

Anhand der Zahlen lässt sich ableiten, dass die Ähnlichkeit der technischen Replikate vorhanden ist und diese für die quantitative Auswertung der Sekretome herangezogen werden können.

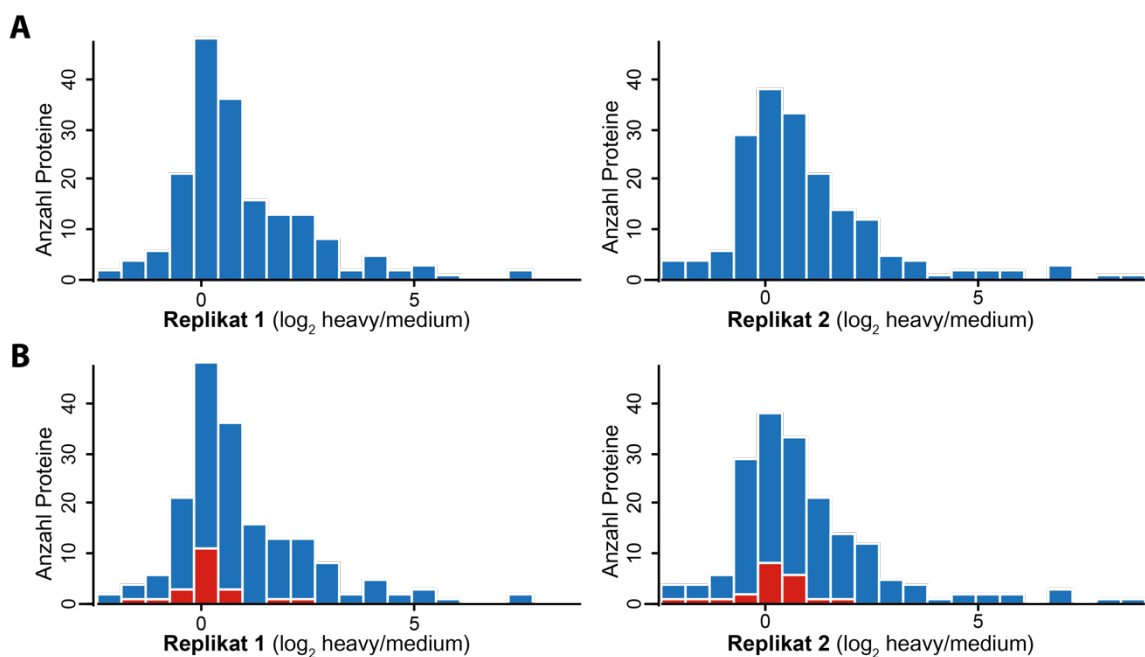


Abbildung 14: Qualitätskontrolle in Histogrammform. Dargestellt sind die in den LDS-Gel-Spuren 1 (links) und 2 (rechts) gefundenen Proteine, in Histogrammen. Blau gefärbt ist die Gesamtheit aller als human identifizierten Proteine (A und B). Rot hervorgehoben sind die Proteine, die mit sekretorischen Prozessen assoziiert sind und den *Gene Ontology*-Gruppen *Protein secretion*, *regulation of chemokine secretion*, *regulation of cytokine secretion*, *secretion*, *secretion by cell* zugeordnet sind.

Die Darstellung der Mittelwerte der in beiden technischen Replikaten identifizierten Proteine, sortiert nach dem Verhältnis schwer/mittelschwer, zeigt alle 182 identifizierten Proteine aus Tabelle 5 (Abbildung 15). Es ist zu erkennen, dass der Schnittpunkt mit der X-Achse ($\log_2(\text{Verhältnis Schwer/Mittelschwer}) = 0$) bereits nach 46 Proteinen liegt. Somit waren 46 sezernierte Proteine vermehrt im Sekretom juveniler Probanden zu finden, die übrigen 136 Proteine waren erhöht im Sekretom adulter Probanden. Allerdings sind viele Mittelwerte mit deutlichen Fehlern anzugeben, da die Verhältnisse von schweren zu mittelschweren Proteinen in beiden technischen Replikaten entsprechend voneinander abwichen. Dies macht eine weitere Auswertung nach signifikant unterschiedlich sezernierten Proteinen unabdingbar.

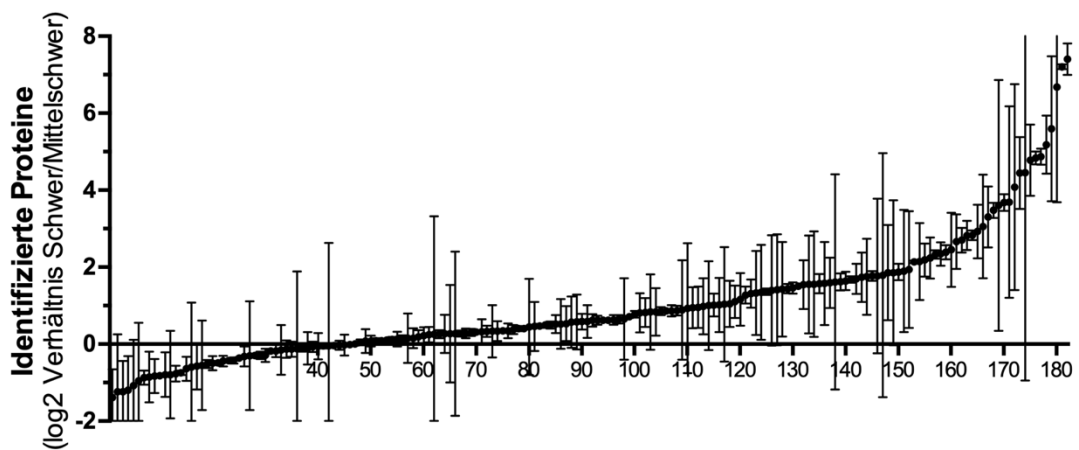


Abbildung 15: Identifizierte Proteine in Sekretomen von PDL-Zellen. Alle 182 identifizierten Proteine, gemittelt über beide technische Replikate, dargestellt in aufsteigender Reihenfolge des Verhältnisses Schwer/Mittelschwer (adult/juvenil) inklusive Standardabweichung.

3.3.1 Vergleich signifikant unterschiedlich sekretierter Proteine

Wie bereits in der Darstellung des Verhältnisses schwer/mittelschwer aller 182 identifizierten Proteine (Abbildung 15) gezeigt, waren die in den Sekretomen beider Probandengruppen gefundenen Proteine vornehmlich in den adulten Probanden erhöht, welches sich an der Mehrzahl an positiven Quotienten des Verhältnisses schwer/mittelschwer erkennen lässt. Unter den signifikant unterschiedlich sezernierten Proteinen (T-Test; „ $S = 0,58$ “ ($2^{0,58}$ entspricht circa 1,5 – es wurde also auf einen Mindestunterschied um den Faktor 1,5 getestet) fanden sich erneut mehrheitlich solche, die stärker von PDL-Zellen adulter Probanden sezerniert wurden. Lediglich vier der 28 signifikant differenziell sezernierten Proteine sind im Sekretom

juveniler Probanden erhöht, die übrigen 24 im Sekretom adulter Probanden (Abbildung 16).

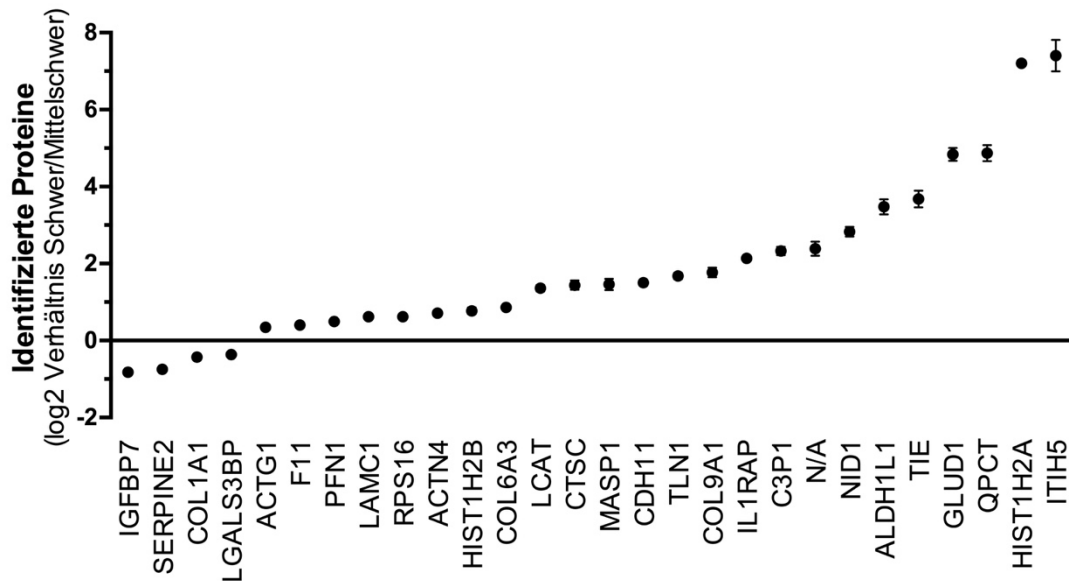


Abbildung 16: Differenziell sezernierte Proteine juveniler und adulter PDL-Zellen. Alle 28 signifikant unterschiedlich identifizierten Proteine, gemittelt über beide technischen Replikate, dargestellt in aufsteigender Reihenfolge des Verhältnisses schwer/mittelschwer (adult/juvenil) inklusive Standardabweichung.

Nachfolgend sind alle 28 in den Sekretomen beider Probandengruppen als statistisch signifikant unterschiedlich identifizierten Proteine inklusive Gennamen aufgeführt (Tabelle 8). Aus Gründen der Symmetrie und zur besseren Darstellung wurde das Verhältnis der Intensität von adulten (schwer) gegenüber juvenilen (medium) Peptiden logarithmiert (Verhältnis schwer/medium (\log_2)).

Tabelle 8: Unterschiedlich sezernierte Proteine juveniler und adulter Probanden

Nr.	Proteinname	Gename	Verhältnis schwer/me- dium (\log_2)
1	Insulin-like growth factor-binding protein 7	IGFBP7	-0,82 (\pm 0,03)
2	Glia-derived nexin	SERPINE2	-0,74 (\pm 0,06)
3	Collagen alpha-1(I) chain	COL1A1	-0,43 (\pm 0,01)
4	Galectin-3-binding protein	LGALS3BP	-0,36 (\pm 0,03)
5	Actin cytoplasmic 1/2	ACTG1	0,35 (\pm 0,04)
6	Coagulation factor XI	F11	0,41 (\pm 0,00)
7	Profilin-1	PFN1	0,50 (\pm 0,01)
8	Laminin subunit gamma-1	LAMC1	0,62 (\pm 0,01)
9	40S ribosomal protein S16	RPS16	0,62 (\pm 0,01)

Nr.	Proteinname	Genname	Verhältnis schwer/medium (log ₂)
10	Alpha-actinin-4	ACTN4	0,71 (± 0,03)
11	Histone H2B	HIST1H2B	0,77 (± 0,08)
12	Collagen alpha-3(VI) chain	COL6A3	0,87 (± 0,03)
13	Phosphatidylcholine-sterol acyltransferase	LCAT	1,36 (± 0,08)
14	Dipeptidyl peptidase 1	CTSC	1,44 (± 0,12)
15	Mannan-binding lectin serine protease 1	MASP1	1,46 (± 0,15)
16	Cadherin-11	CDH11	1,51 (± 0,02)
17	Talin-1	TLN1	1,68 (± 0,08)
18	Collagen alpha-1(IX) chain	COL9A1	1,77 (± 0,13)
19	Interleukin-1 receptor accessory protein	IL1RAP	2,14 (± 0,03)
20	Putative protein C3P1	C3P1	2,33 (± 0,11)
21	cDNA FLJ55415, highly similar to Gamma-glutamyl hydrolase	N/A	2,39 (± 0,18)
22	Nidogen-1	NID1	2,83 (± 0,12)
23	Cytosolic 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase	ALDH1L1	3,48 (± 0,19)
24	Soluble TIE1 variant 5	TIE	3,68 (± 0,22)
25	Glutamate dehydrogenase 1/2	GLUD1; GLUD2	4,84 (± 0,16)
26	Glutaminy-peptide cyclotransferase	QPCT	4,87 (± 0,21)
27	Histone H2A	HIST1H2A	7,21 (± 0,06)
28	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H5	ITIH5	7,40 (± 0,41)

Die Untersuchung der signifikant unterschiedlich sezernierten Proteine in beiden Probandengruppen zeigt, im Gegensatz zu obigem Vergleich zwischen der Gesamtheit an Proteinen, deutliche Unterschiede (Abbildung 17). So ist die *Gene Ontology*-Kategorie „Zelladhäsion“ (*cell adhesion*, GO:0007155) im Sekretom juveniler Probanden (11 % bzw. alle vier Proteine) deutlich häufiger vertreten als im Sekretom adulter Probanden (4 %). Interessanterweise ist auch die Kategorie „Zellkommunikation“ (*cell communication*, GO:0007154) in juvenilen Probanden erhöht assoziiert (5 % bzw. zwei von vier Proteinen gegenüber 1 % bei adulten Probanden).

Andersherum wurde die Kategorie „Metabolischer Prozess“ (*metabolic process*, GO:0008152) seltener mit den im Sekretom Juveniler vorkommender Proteine assoziiert (8 %), als mit Proteinen im Sekretom Adulter (14 %).

Diese Ergebnisse sind selbstverständlich beeinflusst durch die deutlich unterschiedliche Anzahl an Proteinen, die in den beiden Probandengruppen signifikant gehäuft identifiziert wurden.

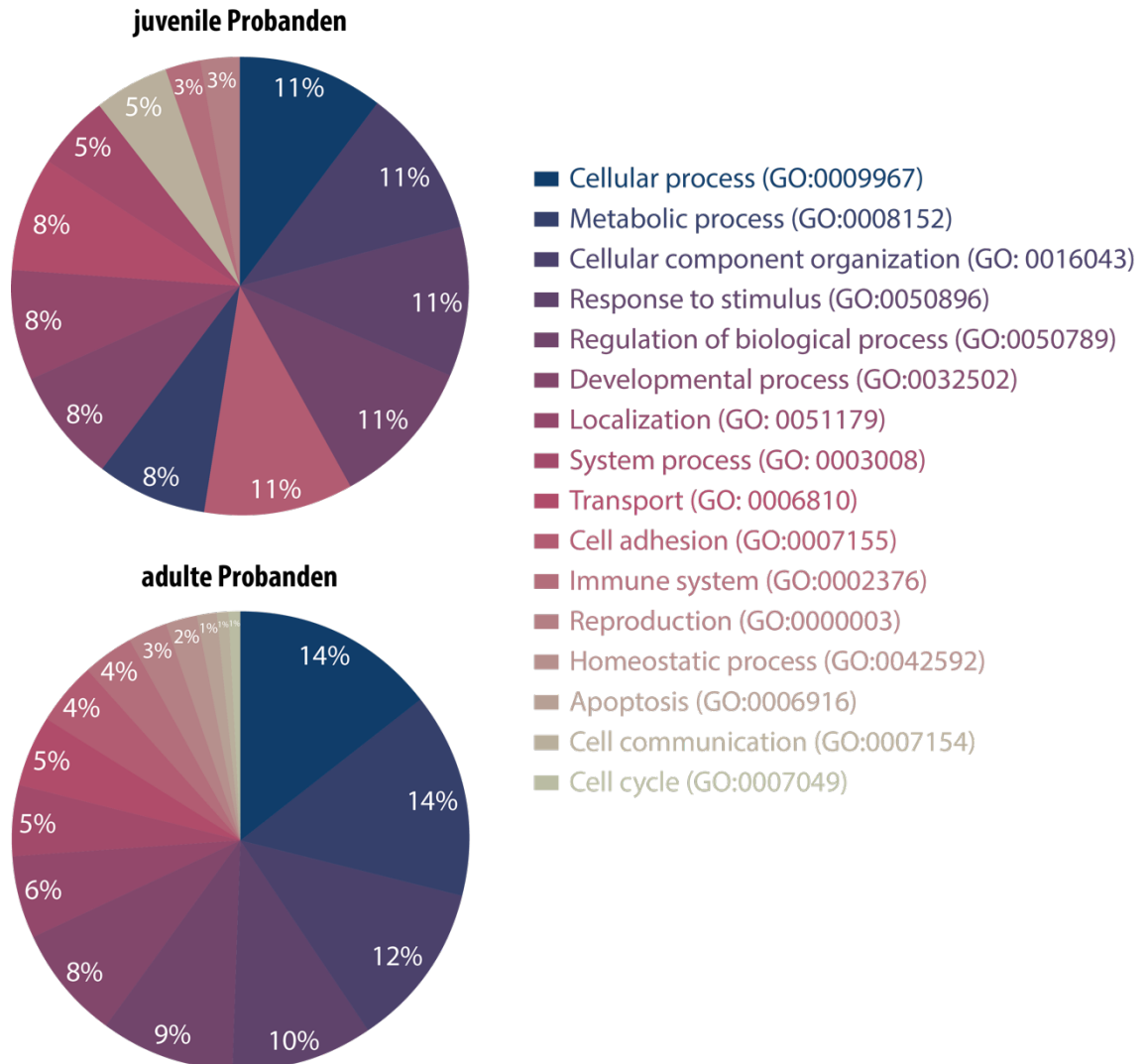


Abbildung 17: Signalwege signifikant unterschiedlicher Proteine in Sekretomen. Die Darstellung der biochemischen Prozesse (Gene Ontology Biochemical Pathways, GOBP), denen die signifikant unterschiedlich sezernierten Proteine der Sekretome juveniler und adulter Probanden zuzuordnen sind.

Abschließend lässt sich feststellen, dass ein quantitativer Unterschied zwischen den Sekretomen von Zellen des Parodontalligaments juveniler und adulter Probanden für 28 Proteine gefunden wurde.

4 Diskussion

Um den Erfolg und Misserfolg kieferorthopädischer Behandlungen durch biologische Prozesse besser zu verstehen (und wie andersherum biologische Prozesse beeinflusst werden könnten) muss als Fundament ein grundlegendes Verständnis für die Strukturen des Parodontalligaments und ihre Funktion im kieferorthopädischen Kontext erfolgen. Die vorliegenden Untersuchungen zum Sekretom von Zellen des Parodontalligaments sollen im Folgenden in diesem Kontext gedeutet werden.

4.1 Etablierung einer PDL-Zellkultur mit SILAC für MS-Analyse

Die Zellkultur aus Zellen des Parodontalligaments mit SILAC-Medium für die Analyse im Massenspektrometer wurde in dieser Arbeit erfolgreich etabliert. Allerdings stellte sich die Kultivierung von PDL-Zellen adulter Probanden mit einem Alter deutlich über 30 Jahren als nicht verlässlich dar. Bereits zum Zeitpunkt der Inkulturnahme wanderten nicht bei allen Studienproben Zellen aus den gewonnenen PDL-Fragmenten aus. Falls die altersabhängige Diskriminierung hierdurch erschwert worden ist, könnten die Altersspannen der Probanden in nachfolgenden Untersuchungen angepasst werden. Die juvenile Probandengruppe könnte auf eine Altersspanne von acht bis zehn Jahren eingegrenzt werden. Gleichzeitig werden selten Prämolaren bei juvenilen Patienten unter zwölf Jahren aus kieferorthopädischen Gründen extrahiert, sodass ein vergrößerter Altersabstand zwischen den Probandengruppen kaum zu realisieren wäre.

Diese Arbeit stellt die ersten Versuche dar, in denen Zellen des Parodontalligaments in SILAC-Medium erfolgreich kultiviert wurden. Beim Einbau der isotonenmarkierten, schweren Aminosäuren musste auf Informationen aus früheren Publikationen mit anderen Zelllinien zurückgegriffen und eine ausreichende Einbaurate nach sechs Zellteilungen angenommen werden (Ong et al. 2002).

Ein Problem bei der Entwicklung des Versuchsablaufs bestand darin, dass eine Zellkultur ohne Zugabe von fetalem Kälberserum (FCS) nicht möglich war. Durch dessen Zugabe lag folglich im Zellüberstand neben den sekretierten Proteinen auch

hoch-abundantes Serumalbumin aus dem FCS vor. In der massenspektrometrischen Analyse würden so selten vorkommende sekretierte Proteine durch ebendieses Serumalbumin und weitere hoch-abundante Proteine aus dem FCS überdeckt werden (Bunkenborg et al. 2010). Eine Option könnte an dieser Stelle eine Kultivierung der PDL-Zellen in serumfreien Medien darstellen. Bei diesem Ansatz müssen zusätzliche Maßnahmen zur Kultivierung bedacht werden. So wäre neben der Zugabe von Hormonen und Wachstumsfaktoren in gereinigter Form eine Beschichtung der Kulturgefäße mit Anheftungsfaktoren nötig (Bunkenborg et al. 2010). Einige dieser Anheftungsfaktoren wie z. B. Laminin oder Fibronectin befinden jedoch unter den in dieser Arbeit detektierten sekretierten Proteinen (siehe Tabelle 5), sodass eine Diskrimination hier eine weitere Schwierigkeit darstellen würde. Abhilfe könnte spezielle, nicht-humane Anheftungsfaktoren schaffen. Letztendlich in dieser Arbeit verwendet wurde die Präzipitation mit TCA-Aceton, durch die das hoch-abundante Serumalbumin erfolgreich reduziert werden konnte (Chen et al. 2005; Gaida 2012). Nicht auszuschließen ist jedoch, dass durch die Präzipitation auch andere sekretierte Proteine entfernt wurden. Um dies zu untersuchen, könnte Präzipitat 2 (siehe Abbildung 9) analysiert werden. Anschließend würde mit der Analyse und Identifikation der Proteine des zweiten Präzipitats ebenfalls die Spezifität der TCA-Aceton-Präzipitation überprüft werden können.

Eine Schwierigkeit bei der Auswertung stellt die Zuordnung der identifizierten Proteine dar. Die Unterscheidung zwischen humanen und bovinen Proteinen erfolgte durch den Abgleich mit Proteindatenbanken, da die Aminosäuremarkierung mittels SILAC lediglich die Proteine humanen Ursprungs betraf (Hathout 2007). Allerdings waren in der Ergebnisliste noch vor der Filterung der Proteine nach Spezies Proteine bovinen Ursprungs enthalten, die sowohl mit der SILAC-Markierung *heavy* als auch *medium* detektiert wurden. Eine mögliche Ursache hierfür ist, dass bovine Proteine, die dem FCS entstammen müssen, in den Metabolismus der humanen PDL-Zellen integriert und dadurch ebenfalls metabolisch markiert wurden. Bei hochkonservierten Proteinen (solche, die in Menschen wie Rindern eine sehr ähnliche Struktur aufweisen) kann folglich eine Kontamination durch Anteile des FCS nicht ausgeschlossen werden.

4.2 Qualitative Analyse des Sekretoms aus PDL-Zellen

Die große Anzahl identifizierter Proteine im Gesamtsekretom zeigt, dass die Wahl der Methode erfolgreich war und zu messbaren Ergebnissen führte. Es zeigten sich nur geringe Unterschiede zwischen juvenilen und adulten Probanden, dies zeigt, eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.

Allerdings könnte die Ähnlichkeit der Sekretome beider Altersgruppen auch auf einen zu geringen Altersunterschied schließen lassen. Dies bedarf weiterer Untersuchungen. Auch die Immortalisierung der Zellen könnte hier eine Rolle gespielt haben. Die Analysen der Sekretome wurden an immortalisierten PDL-Zellen durchgeführt, da hierdurch ein adäquater Einbau der essenziellen Aminosäuren gewährleistet werden konnte (Ong et al. 2002). Diese Immortalisierung könnte allerdings zu Veränderungen der Alterungsprozesse bzw. des Differenzierungsgrades geführt haben (Jha et al. 1998). Um dieser Möglichkeit auf den Grund zu gehen, könnte ein Versuchsansatz erfolgen, in dem die Zellkultur von primären Zellen genutzt und auf die Immortalisierung verzichtet würde. Gleichzeitig sollte bei diesem Versuchsansatz mit primärer Zellkultur bedacht werden, dass die primären Zellen in der Lage sein müssen, genügend Passagen zu überleben, um eine adäquate Einbaurrate der SILAC-Aminosäuren zu gewährleisten (Ong et al. 2002).

Des Weiteren kann in dieser Arbeit nicht ausgeschlossen werden, dass sich unter den Sekretomdaten auch Proteine befinden, die eigentlich dem Proteom (die Gesamtheit der Proteine in einer Zelle) der PDL-Zellen zuzuordnen sind. Trotz gewissenhaftem Umgang mit den Proben während der Zellkultur und der TCA-Fällung könnte es bei der Probenaufarbeitung zum Verletzen und zum Absterben von Zellen gekommen sein (Hathout 2007). Mit diesem Wissen könnte möglicherweise das Vorkommen von bisher nicht als sekretiert oder im Zellkern befindlichen Proteinen erklärt werden, wie zum Beispiel von HIST1H2A, und HIST1H2B. In einem Versuchsansatz haben Baberg und Kollegen (2019) eine vergleichende Studie von Sekretomen und Proteomen von Knochenmarkszellen durchgeführt und Proteine identifiziert, die sowohl in den Sekretom- als auch in den Proteomdatensätzen vorkamen. Durch einen solchen Versuchsansatz ließen sich Kontaminationen durch das Proteom reduzieren. Allerdings wurden die hier gefundenen und auch weitere Histonproteine bereits in früheren Arbeiten als Proteine des GCF beschrieben (Bostanci et al. 2010; Ngo et al. 2010; Wen et al. 2018).

Die Sekretomdaten sind in dieser Studie aus zwei technischen Replikaten entstanden, sodass keine biologische Varianz messbar ist. Die Analyse von biologischen Replikaten war in dieser Arbeit aufgrund des Versuchsansatz mit gepoolten Proben

nicht vorgesehen. Es kann also bei den vorliegenden Daten durchaus ein Zufallstreffer dabei sein, der in einer erneuten Messung nicht zu finden wäre und so zu einer Verzerrung der hier abgebildeten Ergebnisse führt. Des Weiteren ist zu bedenken, dass aus der Vielzahl der Proteine in den Zellkulturmediumüberständen durch technische Limitationen nicht alle Proteine identifiziert werden konnten bzw. können. Darüber hinaus konnten, unter anderem durch Wahrung von Qualitätsstandards im Rahmen der Auswertung, nicht alle der identifizierten Proteine quantifiziert werden (Bantscheff et al. 2007). Diese mehrfache, in ihrer Größe nicht abzuschätzende Reduktion der ursprünglichen Anzahl der Proteine führt letztendlich zu einer methodisch bedingten Nichtquantifizierung einer Vielzahl von Proteinen.

4.2.1 Qualitativer Vergleich der Sekretome

In dieser Studie wurden einige Proteine identifiziert, die bereits in vorausgegangen Arbeiten dem Proteom und/oder Sekretom von Zellen des Parodontalligaments zugeordnet wurden. In beiden Altersgruppen wurden Matrixmetalloproteasen (MMP1, MMP2 und ADAMTS13) und ihre Inhibitoren (TIMP1 und TIMP2) gefunden, wie es auch Bodet und Kollegen (2007) in ihrer Studie zeigen konnten. Somit könnte in beiden Altersgruppen der Umbau der extrazellulären Matrix, initiiert durch die Zellen des Parodontalligaments, möglich sein. Ebenfalls in beiden Sekretomen konnten einige Gene nachgewiesen werden, die für unterschiedliche Kollagentypen codieren (COL10A1, COL6A1, COL1A1, COL1A2, COL12A1, COL6A2, COL9A1, COL5A1) und somit die Umbauprozesse des Parodontalligaments anzeigen können, da es sich hier erneut um Bestandteile der EZM handelt (Connor et al. 1984; Häkkinen et al. 1993; Zhang et al. 1993). Die Integrität der EZM wird durch Kollagen VI und Vimentin gewährleistet und ebendiese konnten auch in dieser Arbeit identifiziert werden (Cho et al. 2017). Das in beiden Probandengruppen identifizierte Semaphorin ist bekannt als sekretiertes Molekül, dessen Ausschüttung nach örtlicher Reizung die Ausbildung von Muskelfasern und Motoneuronen stimuliert (Hüttl und Huber Brösamle 2012). Auch ein Rezeptor der Semaphorine wurde in dieser Arbeit erfolgreich identifiziert: Plexin-B2 ist bekannt für die Expression auf Wachstumskegeln von Axonendigungen und steuert deren Wachstum in Abhängigkeit der Semaphorinkonzentration (Purves und Williams 2001; Janssen et al. 2012). Ein Zusammenspiel dieser beiden Proteine wäre auch im Parodontalligament denkbar, da sie dynamische Prozesse, wie die Remodellierung nach Druck- und Zugbelastung steuern könnten.

Letztendlich wurden in den Zellüberständen beider Altersgruppen jeweils ein als definitiv human identifiziertes Protein gefunden, welches in der anderen Altersgruppe nicht vorkam: Im Sekretom der juvenilen Probanden wurde das Protein 4-Trimethylaminobutyraldehyd-dehydrogenase identifiziert. Die 4-Trimethylaminobutyraldehyd-dehydrogenase katalysiert die Oxidation von gamma-Aminobutyraldehyd sowie anderen Aminoaldehyden (McPherson et al. 1994). Im Allgemeinen ist sie damit an metabolischen Prozessen wie der Glykolyse oder Glukoneogenese, dem Fettsäureabbau und dem Metabolismus von Aminosäuren beteiligt. Die höchste Expression dieses Enzyms ist in der Leber, der Skelettmuskulatur und in den Nieren zu finden. Allerdings ist auch eine Expression im Pankreas, im Herz, sowie Lunge, Plazenta und Gehirn nachgewiesen worden (Lin et al. 1996). Im Kontext des Zahnhalteapparates bzw. von Alterungsprozessen ist dieses Protein bisher nicht beschrieben.

Ausschließlich im Sekretom der adulten Probanden wurde das Protein Prostaglandin-Reduktase 3 identifiziert. Die Prostaglandin-Reduktase 3 ist als Gewebshormon am Prostaglandin-Metabolismus beteiligt. Eine Dysregulation dieses Signalwegs kann unter anderem bei der Entwicklung von Typ-2-Diabetes beobachtet werden (Wang et al. 2014). Auch bei der negativen Regulation der Differenzierung von Adipozyten soll die Prostaglandin-Reduktase 3 eine Rolle spielen (Yu et al. 2013). Zusätzlich ist die Assoziation einer Hypomethylierung des ZADH2-Gens mit der Entstehung von Alzheimer beschrieben (Madrid et al. 2018), Allerdings ist bislang die Prostaglandin-Reduktase 3 nicht im Kontext des Zahnhalteapparates bzw. von Alterungsprozessen beschrieben.

Weitere qualitative Unterschiede zwischen den Altersgruppen sind potentiell möglich. Die automatisiert detektierten Proteine wurden wie in Abschnitt 2.2.12 beschrieben gefiltert. Hierbei ist zu beachten, dass es bei den genannten Selektionsvorgängen, die der Einhaltung von Qualitätsstandards dienen, zu Verlusten von weiteren Proteinen gekommen sein könnte.

4.3 Quantitative Analyse des Sekretoms aus PDL-Zellen

Im Sekretom juveniler Probanden wurden folgende Proteine signifikant mehr exprimiert:

IGFBP7 (Insulin-like growth factor-binding protein 7)

Das IGFBP7 ein Polypeptid, das eine insulinähnliche Struktur aufweist. Es ist durch Bindung an IGFs (insulin-like growth factor) an Proliferation und Differenzierung von Zellen beteiligt (Oh et al. 1996). Es wird ubiquitär exprimiert (Oh et al. 1996), im Allgemeinen sezerniert und ist an der Zelladhäsion beteiligt (Akaogi et al. 1994). Bekannt über IGFBP7 ist bisher, dass es unter anderem eine Rolle bei der Umprogrammierung von Fibroblasten zu Osteoblasten spielt, was von Lu beschrieben wurde (Lu et al. 2020). Es ist an der Regulierung des Knochenstoffwechsels beteiligt (Zhang et al. 2018) und wird auch im Zusammenhang mit Dentinapposition genannt (James et al. 2004). IGFBP7 könnte demnach eine Schlüsselfunktion im Umbau des Zahnhalteapparates von jugendlichen Patienten spielen und Einfluss auf die kieferorthopädische Zahnbewegung nehmen.

SERPINE2 (Glia-derived nexin)

Das SERPINE2 gehört zur Serpin-Familie und ist ein Serin-Protease-Inhibitor, der bei der Kultivierung von Fibroblasten sezerniert wird und im extrazellulären Raum vorliegt (Scott et al. 1985). Er kann mit unterschiedlichen Serin-Proteasen wie Urokinase, Thrombin und Plasmin Komplexe bilden und ist an der Proteolyse beteiligt (Farrell et al. 1988). In neuromuskulären Geweben ist das Protein an Umbauvorgängen und Remodellierung der Synapsen sowie extrazellulärer Matrix beteiligt (Carter et al. 1995). Im Kontext des Zahnhalteapparates bzw. von Alterungsprozessen ist dieses Protein bisher nicht beschrieben. Durch seine Funktion bei der Remodellierung der EZM im Allgemeinen, wäre durchaus denkbar, dass dieses Protein auch bei den Remodellierungsprozessen des Zahnhalteapparates eine zentrale Rolle innehat.

COL1A1

Kollagen 1 ist am Aufbau des Prokollagens beteiligt, welches wiederum am Aufbau von Kollagen beteiligt ist. Es besitzt Bindungsstellen, um in der extrazellulären Matrix Monomere aus Kollagen Typ1 miteinander zu verbinden (Malfait et al. 2007) und

schaft eine Verbindung zwischen Thrombozyten bei der Wundheilung (Somasundaram und Schuppan 1996). Eine verminderte Genexpression von COL1A1 ist unter anderem assoziiert mit dem Auftreten von Osteogenesis imperfecta (Steinmann et al. 1979; Rowe et al. 1985). Zusätzlich haben Carneiro und Kollegen (2012) dieses Protein im GCF gesunder Patienten identifizieren können, sodass davon ausgegangen werden kann, dass es sich um ein sekretiertes Protein des Parodontalligaments handelt. In einer mikroskopischen Analyse wurde zudem vorrangig Kollagen Typ 1 im Parodontalligament gefunden (Becker et al. 1991).

LGALS3BP (Galectin-3-binding protein)

Das Protein fördert die Zelladhäsion (Sasaki 1998). Es wird in Neoplasien exprimiert und ist an der Entwicklung von Karzinomen und Metastasen beteiligt (Tinari et al. 2001). Es handelt sich um ein extrazelluläres Matrixprotein, das an Integrine bindet (Stampolidis et al. 2015). LGALS3BP könnte somit bei der Sensorik mechanischer Stimuli direkt bei der Remodellierung des Zahnhalteapparates von jugendlichen Patienten eine Rolle spielen (Hoffman et al. 2011).

Eine Auswahl, der im Sekretom adulter Probanden signifikant verstärkt exprimierten Proteine, wird nachfolgend näher dargestellt:

ITIH5 (inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H5)

Es handelt sich um ein Protein, das am Aufbau der extrazellulären Matrix beteiligt ist und gehört zur Familie der ITI-Gene (Himmelfarb et al. 2004). Inter- α -Trypsin-Inhibitoren gelten als wichtige Regulatoren von Akute-Phase-Prozessen, speziell ITIH5 ist assoziiert mit entzündlichen Prozessen bei Hauterkrankungen (Huth et al. 2015).

HIST1H2A (Histone H2A) / HIST1H2B (Histone H2B)

Das Vorkommen von Histonen beschränkt sich auf den Nukleus menschlicher Zellen. Histon 2A und Histon 2B sind je eines der fünf Haupt-Histon-Proteine und maßgeblich an der engen Packung der menschlichen DNA im Zellkern zu Nukleosomen beteiligt (Kornberg und Thonmas 1974; Arents et al. 1991). Allerdings wurden sie bereits mehrfach im GCF von (unterem anderem parodontal gesunder) Probanden nachgewiesen (Bostanci et al. 2010; Ngo et al. 2010; Carneiro et al. 2012; Wen et al. 2018). Es bedarf weiterer Klärung durch den Vergleich mit Proteomdaten, ob

Histon H2A oder Histon H2B tatsächlich sekretorische Funktionen erfüllt oder aufgrund der Aufarbeitungsprozesse freigesetzt wird (Hathout 2007).

QPCT (glutaminy-peptide cyclotransferase)

Die Glutaminyl-Peptid-Cyclotransferase ist ein Enzym, das die Bildung von Pyroglutamyl-Gruppen in neuroendokrinen Peptiden während ihrer Reifung katalysiert (Cynis et al. 2008). Genetische Varianten und damit letztendlich die Struktur des Proteins haben Einfluss auf die Knochenmineralisation, wodurch ein Zusammenhang zur Bildung von extrazellulärer Matrix aufgezeigt wird (Ezura et al. 2004; Huang und Kung 2007). Als sezerniertes Protein wurde die Glutaminyl-Peptid-Cyclotransferase bereits beschrieben (Cynis et al. 2008).

GLUD1; GLUD2 (glutamate dehydrogenase 1/2)

Die Glutamatdehydrogenase ist Bestandteil des Stickstoffstoffwechsels, der in den Mitochondrien menschlicher Zellen abläuft. Bisher sind zwei Isoformen bekannt. Es wird angenommen, dass das Vorkommen ausschließlich auf die Mitochondrien begrenzt ist, daher wird das Enzym in der Diagnostik von Zellschäden eingesetzt (Mastorodemos et al. 2005; Rosso et al. 2008). Eine Erhöhung der GLUD1 wurde in Stammzellen der Zahnpulpa nach osteogener Stimulation festgestellt (Lu et al. 2017).

TIE (soluble TIE1 variant 5)

Es handelt sich um ein Oberflächenstrukturprotein, das auf der Oberfläche von Endothelzellen und wenigen hämatopoetischen Zellen liegt und auch Tyrosinkinase mit immunglobulinähnlichen Domänen genannt wird (Partanen et al. 1992; Korhonen et al. 1994; Seegar et al. 2010). TIE1 interagiert mit Integrinen und ist daher essentiell bei der Zelladhäsion und -migration als Antwort auf Stimuli durch die extrazelluläre Matrix (Dalton et al. 2016).

CTSC (Dipeptidyl peptidase 1)

Die Dipeptidyl-Peptidase 1 wird auch Cathepsin C genannt und ist eine lysosomale Peptidase, die für den Abbau von Proteinen und die Aktivierung von Proenzymen verantwortlich ist. Eine Mutation im CTSC-Gen wurde bereits im Zusammenhang mit aggressiver Parodontitis mit und ohne Papillon-Lefèvre-Syndrom bei Jugendlichen beschrieben (Hewitt et al. 2004; Noack et al. 2004).

ACTG1 (Actin. Cytoplasmic 1/2)

Aktin ist ein Strukturprotein und am Aufbau des Zytoskeletts beteiligt. ACTG1 wurde von Carneiro (2012) im GCF von Patienten mit gesundem Parodont nachgewiesen. Auch andere Aktin-Isoformen wurden in Untersuchungen von GCF identifiziert (Ngo et al. 2010).

PFN1 (Profilin-1)

Profilin ist ein Aktin-bindendes Protein und Teil einer großen Genfamilie (Carlsson et al. 1977). Es ist an der Bildung des Zytoskeletts beteiligt und nimmt maßgeblich Einfluss auf Bewegungsabläufe in und Signalübertragung zwischen Zellen (Jockusch et al. 2007). Zusätzlich wurde es von Carneiro (2012) in GCF parodontal gesunder Patienten gefunden, sodass man durch die Erkenntnisse aus der vorliegenden Arbeit von einem sekretierten Protein des Parodontalligaments sprechen kann.

LAMC1 (Laminin subunit gamma-1)

Laminin ist ein Glykoprotein, das aus drei verschiedenen Untereinheiten (alpha, beta, gamma) besteht (Timpl et al. 1979). Gemeinsam mit Kollagen Typ IV, Nidogen und Perlecan bildet es die Basalmembran von Zellen aus. LAMC1 wurde bereits im Zusammenhang mit dem Sekretom von Parodontalligamentzellen beschrieben. Vermehrt kam es jedoch mit anderen Lamininuntereinheiten im Parodontalligament von Milchzähnen vor (Giovani et al. 2016).

ACTN4 (Alpha-actinin-4)

Alpha-aktinin ist ein Strukturprotein, das Aktin bindet (Sjöblom et al. 2008). Es besteht aus vier Isoformen, die in Skelettmuskulatur (Isoformen 2 und 3), glatter Muskulatur (alpha-Aktinin-1) gefunden werden und der vierten Isoform, die nicht muskelspezifisch (alpha-Aktinin-4) und unter anderem in Fibroblastenkulturen zu finden ist (Honda et al. 1998). Im Zusammenhang mit parodontal gesunden Patienten wurde es außerdem in GCF identifiziert, was zu der in dieser Arbeit identifizierten Proteine passt, sodass von einem sekretierten Protein des Parodontalligaments gesprochen werden kann (Carneiro et al. 2012).

MASP1 (Mannan-binding lectin serine protease 1)

MASP1 gehört zu den Akute-Phase-Proteinen und damit zur Immunabwehr des menschlichen Körpers. Innerhalb der Komplementaktivierung wird es bei Kontakt

mit pathogenen Oberflächen aktiviert (Janeway 2001). MASP1 wurde bereits 2016 im Sekretom des Parodontalligaments von Milchzähnen gefunden (Giovani et al. 2016).

TLN1 (Talin-1)

Talin ist ein Strukturprotein des Zytoskeletts, welches an der Bindung von Integrin zu Aktin beteiligt ist. Infolgedessen kommt es zur Integrin-Aktivierung und dem Aufbau von Zell-Matrix-Kontakten (Critchley 2004). Zusätzlich wurde es im GCF parodontal gesunder Patienten gefunden (Carneiro et al. 2012). Talin könnte somit bei der Sensorik mechanischer Stimuli direkt an der Remodellierung des Zahnhalteapparates beteiligt sein (Hoffman et al. 2011).

ALDH1L1 (Cytosolic 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase)

Die ALDH1L1 ist ein Enzym, das am Folsäurestoffwechsel beteiligt ist und gehäuft vorkommt (Krupenko et al. 2010). Eine Studie hat einen Zusammenhang von Alkoholsensitivität und parodontaler Destruktion dargestellt, in der die Alkoholsensitivität anhand der Aldehyddehydrogenaseaktivität gemessen wurde (Nishida et al. 2010). Den Zusammenhang von klinischem Attachmentverlust (*clinical attachment loss*, CAL) und Alkoholkonsum hat bereits Pitiphat (2003) dargestellt.

IL1RAP (Interleukin-1 receptor accessory protein)

IL1RAP bildet einen Teil des Interleukin-1-Rezeptor-Komplexes. Interleukin-1 ist ein Zytokin und an proinflammatorischen Prozessen beteiligt. IL1RAP wurde 2014 bereits im Zusammenhang mit schwangerschaftsassoziierter Parodontitis beschrieben (Gürsoy et al. 2014).

Auffällig ist, dass viele identifizierte Proteine (COL1A1, LGALS3BP, ITIH5, TIE1, ACTG1, PFN1, LAMC1, ACTN4 und TLN1) im Zusammenhang mit der Integrität des Zytoskeletts oder der EZM stehen. Weiterhin wurden einige Proteine identifiziert, die mit entzündlichen Prozessen assoziiert sind (ITIH5, CTSC, MASP1 und IL1RAP). Besonders deren vermehrtes Auftreten in der adulten Probandengruppe dient als Hinweis, dass in dieser Gruppe Parodontopathien einen direkten Einfluss auf die altersbedingten Veränderungen des Zahnhalteapparates ausüben.

Viele der identifizierten Proteine sind in dieser Arbeit erstmals im Zusammenhang mit Sekretion von Zellen des Parodontalligaments beschrieben worden, sodass weitere Versuche folgen müssen, um die Funktion der Proteine im Zusammenhang mit

dem Zahnhalteapparat zu untersuchen. Die Messung des Proteoms der Zellen des Parodontalligaments (siehe 2.2.3) und des GCF könnte hier zusätzliche Hinweise auf die Ursprünge der Proteine liefern.

Bezüglich der Frage, inwieweit das Sekretom Anhaltspunkte für zukünftige orthodontische Therapien liefern kann, können die Ergebnisse dieser exploratorischen Arbeit einen Anstoß für weitere Analysen darstellen, um das dynamische Sekretom der Parodontalligamentzellen zu entschlüsseln. Die Betrachtung der Proteine nach biochemischen Prozessen (*Gene Ontology biochemical pathways*) zeigt jedoch diverse unterschiedliche Gruppen, sodass nicht direkt geschlussfolgert werden kann, dass es sich ausschließlich um Proteine handelt, die z. B. am Aufbau der extrazellulären Matrix beteiligt sind.

Aus den hier präsentierten Ergebnissen geht hervor, dass im Sekretom der juvenilen Probanden alle signifikant erhöhten Proteine (100 %) im Zusammenhang mit Zelladhäsion stehen (GO:0007155 *cell adhesion*). Beim Sekretom der adulten Probanden ist dies lediglich bei sechs (ACTG1, CDH11, COL6A3, LAMC1, NID1 und TLN1) aus 24 Proteinen (25 %) der Fall (siehe Abbildung 18 A). Dies könnte darauf hindeuten, dass PDL-Zellen juveniler Patienten eine verstärkte Ausbildung von extrazellulärer Matrix aufweisen und damit den Halt des Parodonts fördern.

Außerdem sind alle vier der im Sekretom juveniler Probanden signifikant erhöhten Proteine (100 %) ebenfalls dem biochemischen Prozess der Stimulusantwort (GO:0050896 *response to stimulus*) zuzuordnen, wohingegen lediglich 14 (ACTG1, ACTN4, COL6A3, COL9A1, CTSC, F11, HIST1H2A, HIST1H2B, IL1RAP, LAMC1, MASP1, PFN1, TIE und TLN1) der 24 signifikant erhöhten Proteine (58 %) in adulten Probanden zu dieser Gruppe gezählt werden (siehe Abbildung 18 B). Dies könnte darauf hinweisen, dass PDL-Zellen juveniler Patienten durch die Aktivierung reaktiver Zellprozesse besser auf äußere Stimuli antworten.

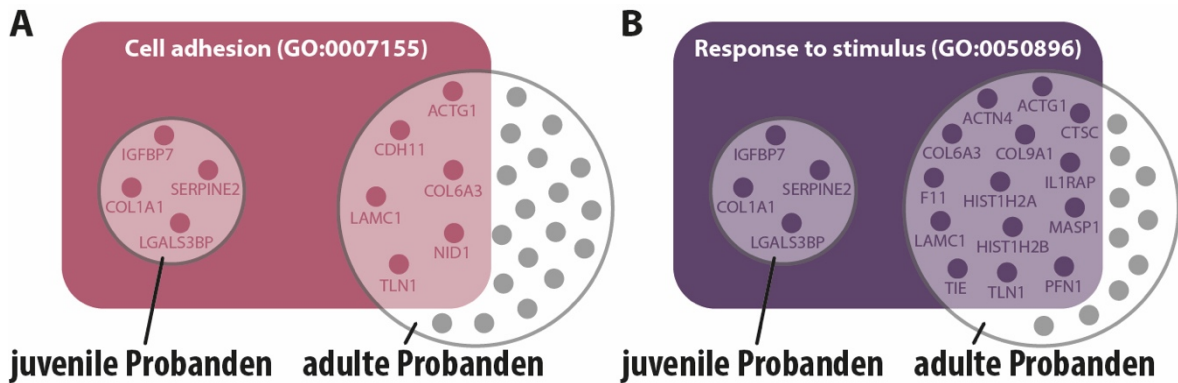


Abbildung 18: Unterschiedliche Proteine nach biochemischen Prozessen. Die in den Sekretomen juveniler und adulter Probanden signifikant unterschiedlich vorkommenden Proteine nach biochemischen Prozessen Zelladhäsion (GO:0007155 cell adhesion) und Stimulusantwort (GO:0050896 response to stimulus).

4.4 GCF-Datenbank

Die in Tabelle 5 und Tabelle 8 aufgeführten Proteine, die in den Sekretomen der Zellen des Parodontalligaments juveniler und adulter Probanden identifiziert wurden, sollten die Grundlage für eine Datenbank darstellen (Batschkus et al. 2018). Durch den Vergleich mit Proteomdaten des GCF orthodontisch bewegter Zähne soll die Diskrimination von Kontaminanten aus Speichel, Blut oder exogenen Quellen von Proteinen aus Zellen des Parodontalligaments ermöglicht werden. Die hier gelieferten Sekretomdaten sind aktuell Teil einer explorativen Studie. Allerdings ist die Ausbeute dieser Analyse zum jetzigen Zeitpunkt mit 182 identifizierten Proteinen nicht ausreichend genug, um eine solche Diskriminierung per Datenbank durchzuführen. Somit ist die Erstellung einer Datenbank auf Grundlage der hier gebrachten Ergebnisse nicht aussagekräftig genug.

4.5 Ausblick

Diese explorative Arbeit diene als Grundlage, um neue Erkenntnisse über das Sekretom von Zellen des Parodontalligaments in Abhängigkeit des Alters zu gewinnen. Zukünftig könnten weitere Studien folgen, die durch eine verbesserte Methodik sowie einen angepassten Studienaufbau, diese Arbeit ergänzend fortsetzen. Die Zellkultur mit SILAC sollte entsprechend wiederholt werden, inklusive der TCA-Fällung zur Reduktion des Serumalbumins. Allerdings sollte im Anschluss die MS-Analyse von allen Präzipitaten erfolgen, damit an dieser Stelle keine Sekretomdaten verloren gehen (Batschkus et al. 2018). Alternativ könnte die Zellkultur mit primären

Zellen wiederholt werden, um die Auswirkungen der Immortalisierung auf die Alterungsprozesse besser einschätzen zu können und gegebenenfalls zu bestätigen. Der hier vorgestellte Versuchsablauf (Abschnitt 3.1.) muss weiter modifiziert werden, um die Anzahl der identifizierten Proteine zu erhöhen und die Qualität der massenspektrometrischen Analyse zu verbessern. Zum Beispiel könnte die Probenaufarbeitung auf dieses Ziel hin optimiert werden, durch die Verwendung von magnetischen Kügelchen (*SP3 magnetic beads, single-pot solid-phase-enhanced sample preparation*) die Anreicherung der Proteine durch hydrophile Interaktion verbessert werden. Hierdurch ließen sich Proteomanalysen aus sehr kleinen Mengen Protein (<1 µg) durchführen (Hughes et al. 2019; Müller et al. 2020). Außerdem könnte ein LDS-Gel anderer Dichte gewählt werden, um die Identifikation kleinerer Proteine, wie zum Beispiel RANKL oder OPG (Keck und Pecherstorfer 2003; Ogasawara et al. 2004; Kawasaki et al. 2006; Brooks et al. 2009), zu verbessern. In zukünftigen Studien müsste das Signifikanzlevel für die Auswertung der Sekretome angepasst werden, sodass ein multiples Testen (gleichzeitiger Vergleich vieler Proteine) berücksichtigt wird.

Das Analysieren biologischer Replikate könnte von Nutzen sein, damit eine Fehlerkorrektur zwischen den einzelnen Proben möglich und gleichzeitig die biologische Varianz zu erkennen wäre. Dies bedeutete im gleichen Zug, dass die Proben nicht gepoolt werden dürfen und so mehrere MS-Analysen durchgeführt werden müssten.

Um den quantitativen Vergleich zwischen Sekretomen aus Zellen des Parodontalligaments juveniler und adulter Probanden zu verbessern, könnte eine Wiederholung der Studie mit einem größeren Patientenkollektiv sinnvoll sein, um individuelle Unterschiede in der Zahnextraktion, Zellanzucht, Probenaufarbeitung sowie identifizierbare Proteine zu minimieren. In Anlehnung an die Studie von Baberg und Kollegen (2019) müsste zum Ausschluss falsch-positiver Proteine im Sekretom parallel das Proteom der kultivierten Zellen des Parodontalligaments identifiziert werden, um Proteine, die aus untergegangenen Zellen stammen, nicht fälschlicherweise als sekretiert zu bezeichnen. Über die Mengenverhältnisse von putativ sekretierten Proteinen zu vermeintlich zellulären Proteinen beider Analysen, könnte leicht verdeutlicht werden, ob die Proteine dem Sekretom oder eher dem Proteom zugehörig sind. Somit ließe sich eindeutiger auf die Zusammensetzung des Sekretoms, inklusive der hier identifizierten Proteine, die im Zusammenhang mit der EZM oder der Integrität des Zytoskeletts stehen (COL1A1, LGALS3BP, ITIH5, TIE1, ACTG1, PFN1,

LAMC1, ACTN4 und TLN1) bzw. mit entzündlichen Prozessen assoziiert sind (ITIH5, CTSC, MASP1 und IL1RAP), schließen.

In der Summe liefern die Ergebnisse dieser Arbeit eine solide Grundlage für weitere Experimente zur Aufklärung der altersabhängigen Sekretion von Proteinen aus Zellen des Parodontalligaments.

5 Zusammenfassung

Für das Verständnis über den Einfluss von biologischen Prozessen auf kieferorthopädische Behandlungen müssen Untersuchungen über die Strukturen des Parodontalligaments und ihre Funktionen im kieferorthopädischen Kontext erfolgen. Ein wesentliches Element hierfür kann die vergleichende Analyse sekretierter Proteine aus Zellen des Parodontalligaments darstellen, um Rückschlüsse auf die Induktion von Remodellierungsprozessen der umliegenden Gewebe des Zahnhalteapparates zuzulassen. Da die Reaktionsbereitschaft des Parodonts auf orthodontische Interventionen mit dem Alter abnimmt, sollen die Unterschiede der Sekretome juveniler und adulter Probanden untersucht werden.

In dieser Arbeit wurde eine Methode zur Kultivierung von PDL-Zellen in SILAC-Medium mit isotope markierten Aminosäuren und anschließender Analyse des Sekretoms im Massenspektrometer etabliert. Dafür wurden die mit mittelschweren (juvenil) und schweren (adult) Aminosäuren metabolisch markierten Proben aufbereitet und per LC-MS/MS analysiert.

Es konnten 182 Proteine identifiziert werden, die in den Sekretomen juveniler und adulter Probanden vorkamen. Hierzu zählten zahlreiche Proteine, die bereits in vorangegangenen Studien als Proteine des GCF-Proteoms beschrieben wurden, wie z. B. MMPs, TIMPs, Kollagene und andere Proteine des Zytoskeletts sowie der extrazellulären Matrix.

Im Vergleich der Sekretome juveniler und adulter Probanden zeigten sich einige Proteine, die in jugendlichen Probanden erhöht vorkamen (IGFBP7, SERPINE2, COL1A1, LGALS3BP), sowie 24 andere, die in adulten Probanden erhöht sekretiert wurden (z. B. ITIH5, HIST1H2A, QPCT, GLUD1). Die Ergebnisse zeigen, dass vorrangig Proteine des juvenilen Sekretoms in Zusammenhang mit biochemischen Prozessen wie Zelladhäsion und Reaktion auf Stimulusantwort stehen, was Hinweise auf die erhöhte Reaktionsbereitschaft der juvenilen PDL-Zellen und deren Aktivierung im Vergleich zu adulten PDL-Zellen liefern könnte.

Grundsätzlich liefern die Ergebnisse dieser Arbeit Hinweise darauf, dass Zellen des Parodontalligaments juveniler Patienten durch Aktivierung reaktiver Zellprozesse besser auf äußere Stimuli antworten als adulte.

6 Literaturverzeichnis

- Akaogi K, Okabe Y, Funahashi K, Yoshitake Y, Nishikawa K, Yasumitsu H, Umeda M, Miyazaki K (1994): Cell adhesion activity of a 30-kDa major secreted protein from human bladder carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 198, 1046–1053
- Allen RK, Edelmann AR, Abdulmajeed A, Bencharit S (2019): Salivary protein biomarkers associated with orthodontic tooth movement: A systematic review. *Orthod Craniofac Res* 22, 14–20
- Andrews GL, Simons BL, Young JB, Hawkrigde AM, Muddiman DC (2011): Performance characteristics of a new hybrid quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometer (TripleTOF 5600). *Anal Chem* 83, 5442–5446
- Arents G, Burlingame RW, Wang BC, Love WE, Moudrianakis EN (1991): The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 10148–10152
- Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT et al. (2000): Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nat Genet* 25, 25–29
- Atanassov I, Urlaub H (2013): Increased proteome coverage by combining PAGE and peptide isoelectric focusing: Comparative study of gel-based separation approaches. *Proteomics* 13, 2947–2955
- Awang-Kechik N-H, Ahmad R, Doustjalali S-R, Sabet N-S, Abd-Rahman A-N-A (2019): Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS) analysis in determining the saliva protein of orthodontic patients during retention phase. *J Clin Exp Dent* 11, e269–e274
- Baberg F, Geyh S, Waldera-Lupa D, Stefanski A, Zilkens C, Haas R, Schroeder T, Stühler K (2019): Secretome analysis of human bone marrow derived mesenchymal stromal cells. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics* 1867, 434–441
- Balducci L, Ramachandran A, Hao J, Narayanan K, Evans C, George A (2007): Biological markers for evaluation of root resorption. *Arch Oral Biol* 52, 203–208

- Bantscheff M, Schirle M, Sweetman G, Rick J, Kuster B (2007): Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Anal Bioanal Chem* 389, 1017–1031
- Bartold PM, Walsh LJ, Narayanan AS (2000): Molecular and cell biology of the gingiva. *Periodontol 2000* 24, 28–55
- Batschkus S, Cingoez G, Urlaub H, Miosge N, Kirschneck C, Meyer-Marcotty P, Lenz C (2018): A new albumin-depletion strategy improves proteomic research of gingival crevicular fluid from periodontitis patients. *Clin Oral Investig* 22, 1375–1384
- Becker J, Schuppan D, Rabanus JP, Rauch R, Niechoy U, Gelderblom HR (1991): Immunoelectron microscopic localization of collagens type I, V, VI and of procollagen type III in human periodontal ligament and cementum. *J Histochem Cytochem* 39, 103–110
- Beertsen W (1975): Migration of fibroblasts in the periodontal ligament of the mouse incisor as revealed by autoradiography. *Arch Oral Biol* 20, 659–666
- Bevelander G, Nakahara H (1968): The fine structure of the human periodontal ligament. *Anat Rec* 162, 313–325
- Bletsa A, Berggreen E, Brudvik P (2006): Interleukin-1 alpha and tumor necrosis factor-alpha expression during the early phases of orthodontic tooth movement in rats. *Eur J Oral Sci* 114, 423–429
- Bodet C, Andrian E, Tanabe S, Grenier D (2007): *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide regulates matrix metalloproteinase, tissue inhibitors of matrix metalloproteinase, and plasminogen activator production by human gingival fibroblasts: a potential role in connective tissue destruction. *J Cell Physiol* 212, 189–194
- Bostanci N, Heywood W, Mills K, Parkar M, Nibali L, Donos N (2010): Application of label-free absolute quantitative proteomics in human gingival crevicular fluid by LC/MS^E (gingival exudatome). *J Proteome Res* 9, 2191–2199

- Bridges T, King G, Mohammed A (1988): The effect of age on tooth movement and mineral density in the alveolar tissues of the rat. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 93, 245–250
- Brooks PJ, Gong S-G: Biological Mediators and Molecular Changes to Orthodontic Force. In: Vishwakarma A, Sharpe P, Shi S, Ramalingam M (Hrsg.): *Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences*. Academic Press, Boston 2015, 777–786
- Brooks PJ, Nilforoushan D, Manolson MF, Simmons CA, Gong SG (2009): Molecular markers of early orthodontic tooth movement. *Angle Orthod* 79, 1108–1113
- Bunkenborg J, García GE, Paz MIP, Andersen JS, Molina H (2010): The minotaur proteome: avoiding cross-species identifications deriving from bovine serum in cell culture models. *Proteomics* 10, 3040–3044
- Butler WT, Birkedal-Hansen H, Beegle WF, Taylor RE, Chung E (1975): Proteins of the periodontium. Identification of collagens with the $[\alpha 1(I)]_2\alpha 2$ and $[\alpha 1(III)]_3$ structures in bovine periodontal ligament. *J Biol Chem* 250, 8907–8912
- Carlsson L, Nyström LE, Sundkvist I, Markey F, Lindberg U (1977): Actin polymerizability is influenced by profilin, a low molecular weight protein in non-muscle cells. *J Mol Biol* 115, 465–483
- Carneiro LG, Venuleo C, Oppenheim FG, Salih E (2012): Proteome data set of human gingival crevicular fluid from healthy periodontium sites by multidimensional protein separation and mass spectrometry: Proteome of gingival crevicular fluid. *J Periodontal Res* 47, 248–262
- Carter RE, Cerosaletti KM, Burkin DJ, Fournier REK, Jones C, Greenberg BD, Citron BA, Festoff BW (1995): The gene for the serpin thrombin inhibitor (P17), protease nexin I, is located on human chromosome 2q33-q35 and on syntenic regions in the mouse and sheep genomes. *Genomics* 27, 196–199
- Chen YY, Lin SY, Yeh YY, Hsiao HH, Wu CY, Chen ST, Wang AHJ (2005): A modified protein precipitation procedure for efficient removal of albumin from serum. *Electrophoresis* 26, 2117–2127

- Cho SY, Park J, Chung WY, Kim E, Jung IY, Choi SH, Park KK, Lee SJ (2017): Proteome expression in human periodontal ligament after delayed hypothermic preservation. *J Endod* 43, 1317–1322
- Ciavarella D, Mastrovincenzo M, D’Onofrio V, Chimenti C, Parziale V, Barbato E, Lo Muzio L (2011): Saliva analysis by Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (SELDI-TOF-MS) in orthodontic treatment: first pilot study. *Prog Orthod* 12, 126–131
- Cleland WW (1964): Dithiothreitol, a new protective reagent for SH groups. *Biochemistry* 3, 480–482
- Connor NS, Aubin JE, Melcher AH (1984): The distribution of fibronectin in rat tooth and periodontal tissues: an immunofluorescence study using a monoclonal antibody. *J Histochem Cytochem* 32, 565–572
- Cox J, Mann M (2008): MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol* 26, 1367–1372
- Critchley DR (2004): Cytoskeletal proteins talin and vinculin in integrin-mediated adhesion. *Biochem Soc Trans* 32, 831–836
- Cynis H, Rahfeld JU, Stephan A, Kehlen A, Koch B, Wermann M, Demuth HU, Schilling S (2008): Isolation of an isoenzyme of human glutaminyl cyclase: retention in the Golgi complex suggests involvement in the protein maturation machinery. *J Mol Biol* 379, 966–980
- Dalton AC, Shlamkovitch T, Papo N, Barton WA (2016): Constitutive association of Tie1 and Tie2 with endothelial integrins is functionally modulated by angiopoietin-1 and fibronectin. *PLoS One* 11, e0163732
- Davidovitch Z (1991): Tooth movement. *Crit Rev Oral Biol Med* 2, 411–450
- Dougherty RM (1962): Preservation of cells in tissue culture: use of dimethyl sulphoxide for preservation of tissue culture cells by freezing. *Nature* 193, 550–552

- Eleuterio E, Trubiani O, Sulpizio M, Di Giuseppe F, Pierdomenico L, Marchisio M, Giancola R, Giammaria G, Miscia S, Caputi S et al. (2013): Proteome of human stem cells from periodontal ligament and dental pulp. *PloS One* 8, e71101
- Eley BM, Cox SW (2003): Proteolytic and hydrolytic enzymes from putative periodontal pathogens: characterization, molecular genetics, effects on host defenses and tissues and detection in gingival crevice fluid. *Periodontol 2000* 31, 105–124
- Ezura Y, Kajita M, Ishida R, Yoshida S, Yoshida H, Suzuki T, Hosoi T, Inoue S, Shiraki M, Orimo H, Emi M (2004): Association of multiple nucleotide variations in the pituitary glutaminyl cyclase gene (QPCT) with low radial BMD in adult women. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res* 19, 1296–1301
- Farrell DH, Wagner SL, Yuan RH, Cunningham DD (1988): Localization of protease nexin-1 on the fibroblast extracellular matrix. *J Cell Physiol* 134, 179–188
- Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM (1989): Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 246, 64–71
- Fullmer HM, Sheetz JH, Narkates AJ (1974): Oxytalan connective tissue fibers: A review. *J Oral Pathol Med* 3, 291–316
- Gaida S: Untersuchung des Sekretoms chondrogener Progenitorzellen mittels metabolischer Markierung und quantitativer Massenspektrometrie. Med. Diss. Göttingen 2012
- Garlet TP, Coelho U, Repeke CE, Silva JS, Cunha F de Q, Garlet GP (2008): Differential expression of osteoblast and osteoclast chemoattractants in compression and tension sides during orthodontic movement. *Cytokine* 42, 330–335
- Giovani PA, Salmon CR, Martins L, Paes Leme AF, Rebouças P, Puppim Rontani RM, Mofatto LS, Sallum EA, Nociti FH, Kantovitz KR (2016): Secretome profiling of periodontal ligament from deciduous and permanent teeth reveals a distinct expression pattern of laminin chains. *PloS One* 11, e0154957

- Giovani PA, Salmon CR, Martins L, Leme AFP, Puppini-Rontani RM, Mofatto LS, Nociti Jr. FH, Kantovitz KR (2019): Membrane proteome characterization of periodontal ligament cell sets from deciduous and permanent teeth. *J Periodontol* 90, 775–787
- Gornall AG, Bardawill CJ, David MM (1949): Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem* 177, 751–766
- Götz W (2013): Das alternde Parodont. *Z Für Senioren-Zahnmed* 2, 87–92
- Göz G (1990): Die Altersabhängigkeit der Gewebereaktion bei Zahnbewegungen. *Fortschritte Kieferorthopädie* 51, 4–7
- Grant D, Bernick S (1972): The periodontium of ageing humans. *J Periodontol* 43, 660–667
- Gürsoy M, Zeidán-Chuliá F, Könönen E, Moreira JCF, Liukkonen J, Sorsa T, Gürsoy UK (2014): Pregnancy-induced gingivitis and OMICS in dentistry: *in silico* modeling and *in vivo* prospective validation of estradiol-modulated inflammatory biomarkers. *OMICS J Integr Biol* 18, 582–590
- Häkkinen L, Oksala O, Salo T, Rahemtulla F, Larjava H (1993): Immunohistochemical localization of proteoglycans in human periodontium. *J Histochem Cytochem* 41, 1689–1699
- Hassell TM (1993): Tissues and cells of the periodontium. *Periodontol 2000* 3, 9–38
- Hathout Y (2007): Approaches to the study of the cell secretome. *Expert Rev Proteomics* 4, 239–248
- Henneman S, Von den Hoff JW, Maltha JC (2008): Mechanobiology of tooth movement. *Eur J Orthod* 30, 299–306
- Hewitt C, McCormick D, Linden G, Turk D, Stern I, Wallace I, Southern L, Zhang L, Howard R, Bullon P et al. (2004): The role of cathepsin C in Papillon-Lefèvre syndrome, prepubertal periodontitis, and aggressive periodontitis: mutations of cathepsin C in periodontitis. *Hum Mutat* 23, 222–228

- Himmelfarb M, Klopocki E, Grube S, Staub E, Klamann I, Hinzmann B, Kristiansen G, Rosenthal A, Dürst M, Dahl E (2004): ITIH5, a novel member of the inter- α -trypsin inhibitor heavy chain family is downregulated in breast cancer. *Cancer Lett* 204, 69–77
- Hoffman BD, Grashoff C, Schwartz MA (2011): Dynamic molecular processes mediate cellular mechanotransduction. *Nature* 475, 316–323
- Honda K, Yamada T, Endo R, Ino Y, Gotoh M, Tsuda H, Yamada Y, Chiba H, Hirohashi S (1998): Actinin-4, a novel actin-bundling protein associated with cell motility and cancer invasion. *J Cell Biol* 140, 1383–1393
- Huang QY, Kung AWC (2007): The association of common polymorphisms in the QPCT gene with bone mineral density in the Chinese population. *J Hum Genet* 52, 757–762
- Hughes CS, Moggridge S, Müller T, Sorensen PH, Morin GB, Krijgsveld J (2019): Single-pot, solid-phase-enhanced sample preparation for proteomics experiments. *Nat Protoc* 14, 68–85
- Huth S, Heise R, Vetter-Kauczok CS, Skazik C, Marquardt Y, Czaja K, Knüchel R, Merk HF, Dahl E, Baron JM (2015): Inter- α -trypsin inhibitor heavy chain 5 (ITIH5) is overexpressed in inflammatory skin diseases and affects epidermal morphology in constitutive knockout mice and murine 3D skin models. *Exp Dermatol* 24, 663–668
- Hüttl RE, Huber Brösamle A (2012): Durch Kommunikation ans Ziel - Nervenfasern-Interaktionen während der Embryonalentwicklung. 16 (1/2), 20–23
- James MJ, Järvinen E, Thesleff I (2004): Bono1: a gene associated with regions of deposition of bone and dentine. *Gene Expr Patterns* 4, 595–599
- Janeway C (Hrsg.): *Immunobiology: the immune system in health and disease*. 5. Auflage; Garland Publ., New York, NY 2001
- Janssen BJC, Malinauskas T, Weir GA, Cader MZ, Siebold C, Jones EY (2012): Neuropilins lock secreted semaphorins onto plexins in a ternary signaling complex. *Nat Struct Mol Biol* 19, 1293–1299

- Jha KK, Banga S, Palejwala V, Ozer HL (1998): SV40-mediated immortalization. *Exp Cell Res* 245, 1–7
- Jockusch BM, Murk K, Rothkegel M: The profile of profilins. In: Amara SG, Bamberg E, Fleischmann B, Gudermann T, Hebert SC, Jahn R, Lederer WJ, Lill R, Miyajima A, Offermanns S, Zechner R (Hrsg.): *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg 2007, 131–149
- Jonas IE, Riede UN (1980): Reaction of oxytalan fibers in human periodontium to mechanical stress. A combined histochemical and morphometric analysis. *J Histochem Cytochem* 28, 211–216
- Kanehisa M (2000): KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res* 28, 27–30
- Kanzaki H, Chiba M, Shimizu Y, Mitani H (2002): Periodontal ligament cells under mechanical stress induce osteoclastogenesis by receptor activator of nuclear factor κ B ligand up-regulation via prostaglandin E2 synthesis. *J Bone Miner Res* 17, 210–220
- Kawasaki K, Takahashi T, Yamaguchi M, Kasai K (2006): Effects of aging on RANKL and OPG levels in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement. *Orthod Craniofac Res* 9, 137–142
- Keck AV, Pecherstorfer M (2003): Knochenstoffwechsel bei malignen Erkrankungen. *J Min Stoffwechs* 10, 6–11
- Korhonen J, Polvi A, Partanen J, Alitalo K (1994): The mouse tie receptor tyrosine kinase gene: expression during embryonic angiogenesis. *Oncogene* 9, 395–403
- Kornberg RD, Thonmas JO (1974): Chromatin structure: oligomers of the histones. *Science* 184, 865–868
- Krishnan V, Davidovitch Z (2006): Cellular, molecular, and tissue-level reactions to orthodontic force. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 129, 469.e1-469.e32

- Krupenko NI, Dubard ME, Strickland KC, Moxley KM, Oleinik NV, Krupenko SA (2010): ALDH1L2 Is the mitochondrial homolog of 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase. *J Biol Chem* 285, 23056–23063
- Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685
- Lamster IB, Ahlo JK (2007): Analysis of gingival crevicular fluid as applied to the diagnosis of oral and systemic diseases. *Ann N Y Acad Sci* 1098, 216–229
- Levy BM, Bernick S (1968): Studies on the biology of the periodontium of marmosets: v. lymphatic vessels of the periodontal ligament. *J Dent Res* 47, 1166–1170
- Lin SW, Chen JC, Hsu LC, Hsieh CL, Yoshida A (1996): Human γ -aminobutyraldehyde dehydrogenase (ALDH9): cDNA sequence, genomic organization, polymorphism, chromosomal localization, and tissue expression. *Genomics* 34, 376–380
- Lößner C, Warnken U, Pscherer A, Schnölzer M (2011): Preventing arginine-to-proline conversion in a cell-line-independent manner during cell cultivation under stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC) conditions. *Anal Biochem* 412, 123–125
- Louridis O, Bazopoulou-Kyrkanidou E, Demetriou N (1972): Age effect upon cementum width of albino rat: a histometric study. *J Periodontol* 43, 533–536
- Lowney JJ, Norton LA, Shafer DM, Rossomando EF (1995): Orthodontic forces increase tumor necrosis factor alpha in the human gingival sulcus. *Am J Orthod Dentofac Orthop Off Publ Am Assoc Orthod Its Const Soc Am Board Orthod* 108, 519–524
- Lu X, Liu SF, Zhao SL (2017): Effect of GLUD1 on proliferation, osteogenic differentiation and mineralization of human dental pulp stem cells. *Shanghai Kou Qi-ang Yi Xue Shanghai J Stomatol* 26, 358–362
- Lu Z, Chiu J, Lee LR, Schindeler A, Jackson M, Ramaswamy Y, Dunstan CR, Hogg PJ, Zreiqat H (2020): Reprogramming of human fibroblasts into osteoblasts by insulin-like growth factor-binding protein 7. *Stem Cells Transl Med* 9, 403–415

- Madrid A, Hogan KJ, Papale LA, Clark LR, Asthana S, Johnson SC, Alisch RS (2018): DNA hypomethylation in blood links B3GALT4 and ZADH2 to Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 66, 927–934
- Malfait F, Symoens S, De Backer J, Hermanns-Lê T, Sakalihasan N, Lapière CM, Coucke P, De Paepe A (2007): Three arginine to cysteine substitutions in the pro- α (I)-collagen chain cause Ehlers-Danlos syndrome with a propensity to arterial rupture in early adulthood. *Hum Mutat* 28, 387–395
- Mann M (2006): Functional and quantitative proteomics using SILAC. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 952–958
- Mastorodemos V, Zaganas I, Spanaki C, Bessa M, Plaitakis A (2005): Molecular basis of human glutamate dehydrogenase regulation under changing energy demands. *J Neurosci Res* 79, 65–73
- McPherson JD, Wasmuth JJ, Kurys G, Pietruszko R (1994): Human aldehyde dehydrogenase: chromosomal assignment of the gene for the isozyme that metabolizes γ -aminobutyraldehyde. *Hum Genet* 93, 211–212
- Müller T, Kalxdorf M, Longuespée R, Kazdal DN, Stenzinger A, Krijgsveld J (2020): Automated sample preparation with SP3 for low-input clinical proteomics. *Mol Syst Biol* 16, e9111
- Nanci A, Bosshardt DD (2006): Structure of periodontal tissues in health and disease*. *Periodontol 2000* 40, 11–28
- Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W (1988): Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9, 255–262
- Ngan P, Saito S, Saito M, Lanese R, Shanfeld J, Davidovitch Z (1990): The interactive effects of mechanical stress and interleukin-1 β on prostaglandin E and cyclic AMP production in human periodontal ligament fibroblasts in vitro: Comparison with cloned osteoblastic cells of mouse (MC3T3-E1). *Arch Oral Biol* 35, 717–725

- Ngo LH, Veith PD, Chen YY, Chen D, Darby IB, Reynolds EC (2010): Mass spectrometric analyses of peptides and proteins in human gingival crevicular fluid. *J Proteome Res* 9, 1683–1693
- Nishida N, Tanaka M, Sekine S, Takeshita T, Nakayama K, Morimoto K, Shizukuishi S (2010): Association of ALDH2 genotypes with periodontitis progression. *J Dent Res* 89, 138–142
- Nishijima Y, Yamaguchi M, Kojima T, Aihara N, Nakajima R, Kasai K (2006): Levels of RANKL and OPG in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement and effect of compression force on releases from periodontal ligament cells in vitro. *Orthod Craniofac Res* 9, 63–70
- Noack B, Görgens H, Hoffmann Th, Fanghänel J, Kocher Th, Eickholz P, Schackert HK (2004): Novel mutations in the *cathepsin C* gene in patients with pre-pubertal aggressive periodontitis and Papillon-Lefèvre syndrome. *J Dent Res* 83, 368–370
- Noyes FR, Grood ES (1976): The strength of the anterior cruciate ligament in humans and Rhesus monkeys. *J Bone Joint Surg Am* 58, 1074–1082
- Ogasawara T, Yoshimine Y, Kiyoshima T, Kobayashi I, Matsuo K, Akamine A, Sakai H (2004): In situ expression of RANKL, RANK, osteoprotegerin and cytokines in osteoclasts of rat periodontal tissue. *J Periodontal Res* 39, 42–49
- Oh Y, Nagalla SR, Yamanaka Y, Kim HS, Wilson E, Rosenfeld RG (1996): Synthesis and characterization of insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP)-7: recombinant human mac25 protein specifically binds IGF-I and -II. *J Biol Chem* 271, 30322–30325
- Ong SE, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen DB, Steen H, Pandey A, Mann M (2002): Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics* 1, 376–386
- Park JC, Kim JM, Jung IH, Kim JC, Choi SH, Cho KS, Kim CS (2011): Isolation and characterization of human periodontal ligament (PDL) stem cells (PDLSCs) from the inflamed PDL tissue: in vitro and in vivo evaluations: Stem cells from inflamed PDL. *J Clin Periodontol* 38, 721–731

- Partanen J, Armstrong E, Mäkelä TP, Korhonen J, Sandberg M, Renkonen R, Knuutila S, Huebner K, Alitalo K (1992): A novel endothelial cell surface receptor tyrosine kinase with extracellular epidermal growth factor homology domains. *Mol Cell Biol* 12, 1698–1707
- Pavlin D, Dove SB, Zadro R, Gluhak-Heinrich J (2000a): Mechanical loading stimulates differentiation of periodontal osteoblasts in a mouse osteoinduction model: effect on type I collagen and alkaline phosphatase genes. *Calcif Tissue Int* 67, 163–172
- Pavlin D, Goldman ES, Gluhak-Heinrich J, Magness M, Zadro R (2000b): Orthodontically stressed periodontium of transgenic mouse as a model for studying mechanical response in bone: The effect on the number of osteoblasts. *Clin Orthod Res* 3, 55–66
- Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS (1999): Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20, 3551–3567
- Pilon JJGM, Kuijpers-Jagtman AM, Maltha JC (1996): Magnitude of orthodontic forces and rate of bodily tooth movement. An experimental study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 110, 16–23
- Pitiphat W, Merchant AT, Rimm EB, Joshipura KJ (2003): Alcohol consumption increases periodontitis risk. *J Dent Res* 82, 509–513
- Purves D, Williams SM (Hrsg.): *Neuroscience*. 2nd ed; Sinauer Associates, Sunderland, Mass 2001
- Rehm H, Letzel T: *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics (Der Experimentator)*. 6. Auflage; Spektrum, Akad. Verl, Heidelberg 2010
- Reid SA, Boyde A (1987): Changes in the mineral density distribution in human bone with age: Image analysis using backscattered electrons in the SEM. *J Bone Miner Res* 2, 13–22
- Reitan K (1957): Some factors determining the evaluation of forces in orthodontics. *Am J Orthod* 43, 32–45

- Reitan K (1967): Clinical and histologic observations on tooth movement during and after orthodontic treatment. *Am J Orthod* 53, 721–745
- Rody Jr WJ, Holliday LS, McHugh KP, Wallet SM, Spicer V, Krokhin O (2014): Mass spectrometry analysis of gingival crevicular fluid in the presence of external root resorption. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 145, 787–798
- Rosso L, Marques AC, Reichert AS, Kaessmann H (2008): Mitochondrial targeting adaptation of the hominoid-specific glutamate dehydrogenase driven by positive Darwinian selection. *PLoS Genet* 4, e1000150
- Rowe DW, Shapiro JR, Poirier M, Schlesinger S (1985): Diminished type I collagen synthesis and reduced alpha 1(I) collagen messenger RNA in cultured fibroblasts from patients with dominantly inherited (type I) osteogenesis imperfecta. *J Clin Invest* 76, 604–611
- Sasaki T (1998): Mac-2 binding protein is a cell-adhesive protein of the extracellular matrix which self-assembles into ring-like structures and binds beta 1 integrins, collagens and fibronectin. *EMBO J* 17, 1606–1613
- Schroeder HE: *Orale Strukturbiologie: Entwicklungsgeschichte, Struktur und Funktion normaler Hart- und Weichgewebe der Mundhöhle und des Kiefergelenks*. 5., unveränderte Auflage; Thieme, Stuttgart 2000
- Schwarz AM (1932): Die Gewebsveränderungen bei orthodontischen Maßnahmen. *Fortschritte Orthod* 2, 154–176
- Scott RW, Bergman BL, Bajpai A, Hersh RT, Rodriguez H, Jones BN, Barreda C, Watts S, Baker JB (1985): Protease nexin. Properties and a modified purification procedure. *J Biol Chem* 260, 7029–7034
- Seegar TCM, Eller B, Tzvetkova-Robev D, Kolev MV, Henderson SC, Nikolov DB, Barton WA (2010): Tie1-Tie2 interactions mediate functional differences between angiopoietin ligands. *Mol Cell* 37, 643–655
- Seo B-M, Miura M, Gronthos S, Mark Bartold P, Batouli S, Brahim J, Young M, Gehron Robey P, Wang CY, Shi S (2004): Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *The Lancet* 364, 149–155

- Sjöblom B, Salmazo A, Djinović-Carugo K (2008): α -Actinin structure and regulation. *Cell Mol Life Sci* 65, 2688–2701
- Smith BJ: SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. In: *Proteins*. Band 1; Humana Press, New Jersey 1984, 41–56
- Somasundaram R, Schuppan D (1996): Type I, II, III, IV, V, and VI collagens serve as extracellular ligands for the isoforms of platelet-derived growth factor (AA, BB, and AB). *J Biol Chem* 271, 26884–26891
- Somerman MJ, Archer SY, Imm GR, Foster RA (1988): A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts in vitro. *J Dent Res* 67, 66–70
- Stampolidis P, Ullrich A, Iacobelli S (2015): LGALS3BP, lectin galactoside-binding soluble 3 binding protein, promotes oncogenic cellular events impeded by antibody intervention. *Oncogene* 34, 39–52
- Steinmann BU, Martin GR, Baum BI, Crystal RG (1979): Synthesis and degradation of collagen by skin fibroblasts from controls and from patients with osteogenesis imperfecta. *FEBS Lett* 101, 269–272
- Taylor GI (1964): Disintegration of water drops in an electric field. *Proc R Soc Lond Ser Math Phys Sci* 280, 383–397
- Teitelbaum SL, Ross FP (2003): Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet* 4, 638–649
- Timpl R, Rohde H, Robey PG, Rennard SI, Foidart JM, Martin GR (1979): Laminin-a glycoprotein from basement membranes. *J Biol Chem* 254, 9933–9937
- Tinari N, Kuwabara I, Huflejt ME, Shen PF, Iacobelli S, Liu FT (2001): Glycoprotein 90K/MAC-2BP interacts with galectin-1 and mediates galectin-1-induced cell aggregation. *Int J Cancer* 91, 167–172
- Tjalsma H, Bolhuis A, Jongbloed JDH, Bron S, van Dijk JM (2000): Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: a genome-based survey of the secretome. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 515–547

- Trubiani O, Di Primio R, Traini T, Pizzicannella J, Scarano A, Piattelli A, Caputi S (2005): Morphological and cytofluorimetric analysis of adult mesenchymal stem cells expanded *ex vivo* from periodontal ligament. *Int J Immunopathol Pharmacol* 18, 213–221
- Trubiani O, Pizzicannella J, Caputi S, Marchisio M, Mazzon E, Paganelli R, Paganelli A, Diomedede F (2019): Periodontal ligament stem cells: current knowledge and future perspectives. *Stem Cells Dev* 28, 995–1003
- Tsuchida S, Satoh M, Umemura H, Sogawa K, Kawashima Y, Kado S, Sawai S, Nishimura M, Kodaera Y, Matsushita K, Nomura F (2012): Proteomic analysis of gingival crevicular fluid for discovery of novel periodontal disease markers. *Proteomics* 12, 2190–2202
- Tyanova S, Cox J: Perseus: a bioinformatics platform for integrative analysis of proteomics data in cancer research. In: von Stechow L (Hrsg.): *Cancer Systems Biology*. Band 1711; Springer New York, New York 2018, 133–148
- Tyanova S, Temu T, Sinitcyn P, Carlson A, Hein MY, Geiger T, Mann M, Cox J (2016): The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat Methods* 13, 731–740
- Tzannetou S, Efstratiadis S, Nicolay O, Grbic J, Lamster I (2008): Comparison of levels of inflammatory mediators IL-1 β and β G in gingival crevicular fluid from molars, premolars, and incisors during rapid palatal expansion. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 133, 699–707
- Uematsu S, Mogi M, Deguchi T (1996): Interleukin (IL)-1 β , IL-6, tumor necrosis factor- α , epidermal growth factor, and β 2-microglobulin levels are elevated in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement. *J Dent Res* 75, 562–567
- Velden U (1984): Effect of age on the periodontium. *J Clin Periodontol* 11, 281–294
- von Bohl M, Kuijpers-Jagtman AM (2009): Hyalinization during orthodontic tooth movement: a systematic review on tissue reactions. *Eur J Orthod* 31, 30–36

- Von den Hoff JW (2003): Effects of mechanical tension on matrix degradation by human periodontal ligament cells cultured in collagen gels. *J Periodontal Res* 38, 449–457
- Wang Q, Zhao Z, Shang J, Xia W (2014): Targets and candidate agents for type 2 diabetes treatment with computational bioinformatics approach. *J Diabetes Res* 2014, 1–8
- Wen X, Franchi L, Chen F, Gu Y (2018): Proteomic analysis of gingival crevicular fluid for novel biomarkers of pubertal growth peak. *Eur J Orthod* 40, 414–422
- Xiong J, Menicanin D, Zilm PS, Marino V, Bartold PM, Gronthos S (2016): Investigation of the cell surface proteome of human periodontal ligament stem cells. *Stem Cells Int* 2016, 1–13
- Yamaguchi M, Ozawa Y, Nogimura A, Aihara N, Kojima T, Hirayama Y, Kasai K (2004): Cathepsins B and L increased during response of periodontal ligament cells to mechanical stress in vitro. *Connect Tissue Res* 45, 181–189
- Yu YH, Chang YC, Su TH, Nong JY, Li CC, Chuang LM (2013): Prostaglandin reductase-3 negatively modulates adipogenesis through regulation of PPAR γ activity. *J Lipid Res* 54, 2391–2399
- Zhang W, Chen E, Chen M, Ye C, Qi Y, Ding Q, Li H, Xue D, Gao X, Pan Z (2018): IGFBP7 regulates the osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells *via* Wnt/ β -catenin signaling pathway. *FASEB J* 32, 2280–2291
- Zhang X, Schuppan D, Becker J, Reichart P, Gelderblom HR (1993): Distribution of undulin, tenascin, and fibronectin in the human periodontal ligament and cementum: comparative immunoelectron microscopy with ultra-thin cryosections. *J Histochem Cytochem* 41, 245–251