Aus der Poliklinik für Zahnärztliche Prothetik (Prof. Dr. med. dent. R. Bürgers) im Zentrum Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Differenzierung mesenchymaler Progenitorzellen aus dem Wurzelzement humaner Zähne und Co-Kultivierung mit PDL-Zellen

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Ruth Florentine Neumann

aus Heidenheim an der Brenz

Göttingen 2020

Dekan:	Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer/in:	Prof. Dr. med. N. Miosge
Ko-Betreuer/in:	Prof. Dr. med. R. Dressel

Prüfungskommission

Referent/in:	Prof. Dr. med. N. Miosge
Ko-Referent/in:	Prof. Dr. med. R. Dressel
Drittreferent/in:	

Datum der mündlichen Prüfung: 8. März 2021

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Differenzierung mesenchymaler Progenitorzellen aus dem Wurzelzement humaner Zähne und Co-Kultivierung mit PDL-Zellen" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abb	ildungsverzeichnis	III
Tab	ellenverzeichnis	V
Abk	ürzungsverzeichnis	VI
1	Einleitung	1
1.1	Das Parodontium	1
1.2	Mesenchymale Stammzellen	14
1.3	Fragestellung	17
2	Material	18
3	Methoden	22
3.1	Probenmaterial	22
3.2	Zellkultur	23
3.3	FACS	24
3.4	Spezifischer Nachweis der messenger Ribonukleinsäure (mRNA)	27
3.5	Western Blot	
3.6	Statistische Auswertung	
3.7	Färbungen	
3.8	Mesenchymale Differenzierung	40
3.9	Co-Kultur	42
4	Ergebnisse	43
4.1	Ausgangszellen: immortalisierte Zementoblasten	43
4.2	Analyse und Sorting auf mesenchymale Oberflächenmarker	44
4.3	Morphologie der gesorteten Zementoblasten	
4.4	Adipogene Differenzierung	
4.5	Chondrogene Differenzierung	51
4.6	Osteogene Differenzierung	57
4.7	Co-Kultur mit PDL-Zellen	63
4.8	Osteogene Differenzierung der Co-Kultur	68
4.9	Übersicht der Ergebnisse	73

I

5	Diskussion	76
5.1	Methodik der Zellisolierung	78
5.2	Analyse und Sorting von Zementoblasten	79
5.3	Mesenchymale Differenzierung	83
5.4	Co-Kultivierung	
6	Zusammenfassung	92
7	Literatur	93
Dar	nksagung	108

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht der Bestandteile des Parodontiums	2
Abbildung 2: Nachweis der erfolgreichen Immortalisierung von Zementoblasten	44
Abbildung 3: FACS-Analyse von Zementoblasten auf mesenchymale CD-Marker	45
Abbildung 4: FACS-Kontrolle des Sortings auf CD90- und CD105-positive	
Zementoblasten	46
Abbildung 5: Stammbaum der durchgeführten FACS-Sortings	47
Abbildung 6: FACS-Sorting auf CD90- und CD105-negative Zementoblasten	47
Abbildung 7: Morphologie der gesorteten Zementoblasten	48
Abbildung 8: Morphologie der Zementoblasten nach adipogener Differenzierung	49
Abbildung 9: Oil-Red-Färbung an adipogen differenzierten Zementoblasten	50
Abbildung 10: qRT-PCR adipogener Marker mit adipogen differenzierten	
Zementoblasten	50
Abbildung 11: Teilausschnitt einer Alginatkugel mit Zementoblasten	51
Abbildung 12: Kollagen Typ I in chondrogen differenzierten Zementoblasten	53
Abbildung 13: Kollagen Typ II in chondrogen differenzierten Zementoblasten	54
Abbildung 14: RUNX2 in chondrogen differenzierten Zementoblasten	55
Abbildung 15: SOX9 in chondrogen differenzierten Zementoblasten	56
Abbildung 16: Morphologie der Zementoblasten nach osteogener Differenzierung	57
Abbildung 17: Nachweis des Enzyms Alkalische Phosphatase in osteogen	
differenzierten Zementoblasten	58
Abbildung 18: Kollagen Typ I in osteogen differenzierten Zementoblasten	60
Abbildung 19: RUNX2 in osteogen differenzierten Zementoblasten	61
Abbildung 20: SOX9 in osteogen differenzierten Zementoblasten	62
Abbildung 21: Morphologie der Zementoblasten nach Co-Kultivierung mit PDL-	
Fibroblasten	63
Abbildung 22: Kollagen Typ I in mit PDL co-kultivierten Zementoblasten	65
Abbildung 23: RUNX2 in mit PDL co-kultivierten Zementoblasten	66
Abbildung 24: SOX9 in mit PDL co-kultivierten Zementoblasten	67
Abbildung 25: Morphologie der Zementoblasten nach Co-Kultivierung mit PDL-	
Fibroblasten und osteogener Differenzierung	68
Abbildung 26: Kollagen Typ I in mit PDL co-kultivierten und osteogen	
differenzierten Zementoblasten	70

Abbildung 27: RUNX2 in mit PDL co-kultivierten und osteogen differenzierten	
Zementoblasten	71
Abbildung 28: SOX9 in mit PDL co-kultivierten und osteogen differenzierten	
Zementoblasten	72
Abbildung 29: Übersicht der Western Blot-Ergebnisse	74
Abbildung 30: Übersicht der qRT-PCR-Ergebnisse	75

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte	18
Tabelle 2: Verwendete Chemikalien	19
Tabelle 3: Verwendete Kits	20
Tabelle 4: Verwendete Verbrauchsmaterialien	20
Tabelle 5: Sonstiges verwendetes Material	21
Tabelle 6: Verwendete Antikörper in der FACS-Analyse	25
Tabelle 7: Verwendete Antikörper im FACS-Sorting	27
Tabelle 8: Sequenz und Annealing-Temperatur der verwendeten PCR-Primer	29
Tabelle 9: Mastermix pro <i>Well</i> in der PCR	30
Tabelle 10: Mastermix pro <i>Well</i> in der qRT-PCR	30
Tabelle 11: Temperaturprotokoll der PCR	30
Tabelle 12: Temperaturprotokoll der qRT-PCR	31
Tabelle 13: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel	34
Tabelle 14: Verwendete primäre Antikörper für den spezifischen Proteinnachweis	
beim Western Blot	37
Tabelle 15: Verwendete sekundäre Antikörper beim Western Blot	37
Tabelle 16: Zusammensetzung des chondrogenen Differenzierungsmediums	41
Tabelle 17: Zusammensetzung des osteogenen Differenzierungsmediums	42
Tabelle 18: Expression und SD der untersuchten CD-Marker auf Zementoblasten	45

Abkürzungsverzeichnis

ALCAM	aktiviertes Leukozyten-Zell-Adhäsionsmolekül
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BMP	bone morphogenetic protein
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
BSP	Bone Sialoprotein
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
ct-Wert	cycle threshold-Wert
d	Tag
DEPC-Wasser	RNase freies Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
dNTP	Desoxy-Nukleotid, bzwNukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMP	Enamel Matrix Protein
FABP4	
FACS	fluorescence activated cell scanning
FCS	
FITC	Fluorescein isothiocyanate
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	horseraddish Peroxidase
hTERT	humane Telomerase
LPL	Lipoproteinlipase
MCAM	melanoma cell adhesion molecule
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
nicht-kollagenes Protein	
OPN	Osteopontin
PBS	Phosphat gepufferte Natriumchlorid-Lösung
PCR	Polymerase chain reaction
PDL	Parodontales Ligament
PE	
PPARγ	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor γ

PTH	Parathormon
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT	quantitativ real-time
RANK	Rezeptoraktivator des NF-κB
RANKL	Rezeptoraktivator des NF-ĸB-Ligand
rpm	revolutions per minute
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid
shRNA	small hairpin RNA
SOX9	Sry-related HMG box transcriptional activator
TBS-T	tris-buffered saline and tween 20

1 Einleitung

Stammzellen wurden schon in Gingiva (Zhang et al. 2009; El-Sayed und Dörfer 2016), PDL (Seo et al. 2004; Feng et al. 2010), Zahnpapille (Ikeda et al. 2006), Zahnfollikel (Morsczeck et al. 2005; Luan et al. 2006; Gulses et al. 2016), der Pulpa von Milch- (Miura et al. 2003) und bleibenden Zähnen (Gronthos et al. 2000) und dem Alveolarknochen (Lohberger et al. 2014) nachgewiesen; lediglich im Wurzelzement steht der Nachweis noch aus.

In der vorliegenden Arbeit werden Zellen des humanen Wurzelzements auf mesenchymale Oberflächenmarker untersucht und selektiert. Anschließend erfolgt die osteogene, chondrogene und adipogene Differenzierung der Zellen zum Nachweis von Progenitoreigenschaften. Zusätzlich wird in einer Co-Kultur der metabolische Einfluss von parodontalem Ligament (PDL) auf Zellen des Wurzelzements untersucht und mit einer gleichzeitigen osteogenen Differenzierung verglichen. In den folgenden Abschnitten dieses Kapitels werden zunächst der Aufbau des Parodontiums, insbesondere des Wurzelzements mit Regulation der Zementogenese, und die Eigenschaften von Progenitorzellen beschrieben.

1.1 Das Parodontium

Das Parodontium (griechisch von para = neben und odontos = Zahn) bildet eine funktionelle Einheit aus vier spezialisierten Gewebetypen: dem Alveolarknochen, dem Wurzelzement, dem Desmodont und der Gingiva (Wolf et al. 2004; Radlanski 2011, vgl. Abbildung 1). Zusammen erfüllen sie verschiedene Funktionen (Linß und Halbhuber 1991): Jeder einzelne Zahn wird in seiner Alveole durch desmodontale Faserbündel verankert, sodass Kaudruck in Zugkräfte umgewandelt und somit der Alveolarknochen physiologisch belastet wird. Die Kontinuität der epithelialen Auskleidung der Mundhöhle wird durch das sogenannte Saumepithel gewahrt, welches als Teil der Gingiva koronal des Alveolarknochens dem Zahn anhaftet, um pathogenen Mikroorganismen keine Eintrittspforte zu bieten (Listgarten 1980). Zudem verfügt das Parodontium über Reparaturmechanismen und kann sich äußeren Einflüssen anpassen, wie zum Beispiel nach traumatischen Schädigungen (u. a. Wurzelfrakturen) oder kieferorthopädischen Zahnstellungsänderungen (Nanci und Bosshardt 2006).

1

		Col, interpapillärer Sattel
ANA	IAN	interdentale faziale Papille
AN IN		Saumepithel
		freie Gingiva
Suppose a suppose of		befestigte Gingiva
		mukogingivale Grenzlinie
Welkeller of .		Alveolarmukosa
100 m		Wurzelzement
		PDL
		Alveolarknochen
		Knochenkompakta
La Pal		Spongiosa

Abbildung 1: Übersicht der Bestandteile des Parodontiums (modifiziert nach Wolf et al. 2004) Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Thieme-Verlags.

1.1.1 Die Gingiva

Die Gingiva (marginales Parodont) wird vestibulär durch die mukogingivale Grenzlinie von der beweglichen Alveolarschleimhaut getrennt (Orban 1948); lingual grenzt sie an die Mundbodenschleimhaut, bzw. palatinal an die Gaumenschleimhaut. Schon vor Durchbruch der ersten Milchzähne sind makroskopische Unterschiede zwischen Gingiva und Alveolarschleimhaut zu erkennen (Schroeder und Theilade 1966).

Klinisch kann die befestigte Gingiva von der koronal gelegenen sondierbaren freien Gingiva unterschieden werden (Schumacher 1991). Die befestigte Gingiva macht den größten Teil des marginalen Parodonts aus, wobei ihr Ausmaß je nach Zahnregion unterschiedlich groß sein kann. Zwischen Zahn und freier Gingiva liegt der sondierbare Sulcus. Durch Attachementverlust des Zahnhalteapparats oder Schwellung der Gingiva nimmt die Sulcustiefe zu. Bei einigen Menschen sind V-förmige Einziehung, sogenannte gingivale Furchen, zwischen befestigter und freier Gingiva zu erkennen (Ainamo und Löe 1966). Durch innere kollagene Faserzüge ist die befestigte Gingiva am Alveolarknochen verankert und daher nicht verschieblich. Die inserierenden kollagenen Faserbündel bewirken zudem eine orangenhautähnliche Stippelung auf der Oberfläche klinisch gesunder Gingiva (Bergström 1984). Die freie Gingiva unterscheidet sich strukturell nicht von der befestigten Gingiva, liegt jedoch nicht dem Alveolarknochen auf, sondern koronal der Schmelz-Zement-Grenze eines Zahns und ist mechanisch in zwei Ebenen beweglich (Schroeder 1992). Interdental bildet sich eine Papille aus, die den apikalen Zwischenraum zwischen zwei Zähnen komplett ausfüllt. An Zähnen mit größerer oral-vestibulärer Ausdehnung, wie den Molaren, bilden sich zwei Papillen aus, die über eine Einziehung, den sogenannten Col (vgl. Abbildung 1), verbunden sind (Radlanski 2011).

Die Gingiva ist histologisch dem mehrschichtig verhornten Plattenepithel mit den vier typischen Schichten zuzuordnen: *Stratum basale*, *Stratum spinosum*, *Stratum granulosum* und *Stratum corneum* (Hellwig et al. 2013) mit darunterliegendem Bindegewebe. Bereiche des Cols sind nicht keratinisiert. Im Bindegewebe der Gingiva liegen neben Fibroblasten physiologisch Leukozyten vor. Bei pathologischen Reizen können diese durch Chemotaxis mobilisiert werden und in den Gingivasulkus migrieren (Page et al. 2007). Nicht-epitheliale Zellen des oralen Epithels sind Langerhans-Zellen, Merkel-Zellen und im *Stratum basale* liegende Melanozyten. Keratinozyten nehmen zum Schutz ihres Erbguts das von Melanozyten produzierte Melanin auf und keratinisieren auf ihrem Weg zur Hautoberfläche (Okazaki 1976).

1.1.2 Das PDL

Das PDL ist mit einer Schichtdicke von ca. 200 µm zwischen Wurzelzement und Alveolarknochen positioniert (Nanci und Bosshardt 2006). Es verfügt über einen hohen Anteil bindegewebiger Strukturen, wie den primären kollagenen *Fibrae dentoalveolares* bzw. Sharpeysche Fasern und einem kleinen Anteil an lockerem Bindegewebe mit Blutgefäßen und sensiblen Nervenendigungen (Welsch 2014), die in eine Grundsubstanz eingebettet sind (Nanci und Bosshardt 2006). Über die *Fibrae dentoalveolares* wird der Zahn in der Zahnalveole bandhaft aufgehangen. Sie inserieren im Alveolarknochen und dem Wurzelzement und haben einen etwa 30° abwärts in Richtung Wurzelspitze gerichteten Verlauf (Lüllmann-Rauch 2015). Bei Belastung des Zahns spannen sich die gewellt vorliegenden Fasern (Hassell 1993) und geben die Kraft als Zug an den Alveolarknochen weiter (Lüllmann-Rauch 2015). Durch die bandhafte Aufhängung ist eine physiologische Eigenbeweglichkeit des Zahns gegeben (Wucher et al. 2017), die bei einer horizontalen Belastung von 2 – 5 N zwischen 50 und 100 µm beträgt (Lehmann 2015).

Im PDL können drei Regionen unterschieden werden: die zementnahe Schicht mit dickeren parallel angeordneten Kollagenfasern, der zell- und gefäßreiche knochennahe Anteil und der dazwischenliegende zellärmere Abschnitt mit dünneren Kollagenfibrillen (Carter und Sloan 1994). Die extrazelluläre Matrix des lockeren Bindegewebes wird von sekundären kollagenen Fasern und elastischen Oxytalanfasern gebildet (Sims 1973). Sekundäre kollagene Fasern sind im Gegensatz zu primären Fasern ungerichtet; Oxytalanfasern sind mit Blutgefäßen und sensiblen Nervenendigungen assoziiert und werden deshalb mit regulatorischen Aufgaben in Verbindung gebracht (Fullmer et al. 1974). Kollagen Typ I und Typ III stellen den größten Anteil der gesamten Fasern dar (Huang et al. 1991). Des Weiteren kommen Kollagen Typ V, Typ VI und Typ XII im PDL vor (Beertsen et al. 1997).

Der zelluläre Anteil besteht zu 65 % aus Fibroblasten, die die Kollagenfasern synthetisieren, aber auch wieder abbauen (Nanci und Bosshardt 2006). Weitere im PDL vorkommende Zellen sind Zellen der anderen parodontalen Gewebearten (Osteoblasten und -klasten, Zementoblasten), Zellen der Immunabwehr (Makrophagen, Leukozyten), Reste der Hertwigschen Epithelscheide und mesenchymale Progenitorzellen. Die Reste der Hertwigschen Epithelscheide, bzw. Malassezsche Epithelreste stehen im Verdacht unter der Einwirkung eines entzündlichen Reizes radikuläre Zysten auszubilden (Schwenzer und Eckelt 2009), sie sollen aber auch zur Reparatur des Wurzelzements beitragen (Nam et al. 2014). Auch die im PDL vorkommenden mesenchymalen Progenitorzellen werden in Verbindung mit der parodontalen Regeneration gebracht (Beertsen et al. 1997).

1.1.3 Der Alveolarknochen

Der Alveolarknochen ist der spezialisierte Anteil des Kieferknochens, in welchem die Zähne über Sharpeysche Fasern in Zahnfächern (Alveolen) verankert sind (Hassell 1993). Sind Zähne verloren gegangen, wird der Kieferknochen aufgrund fehlender physiologischer Zugbelastung sukzessive abgebaut (Radlanski 2011). Der Mundhöhle zugewandt (bukkal und oral) zeigt der Alveolarfortsatz eine kompakte *Corticalis*, welche am *Limbus alveolaris* in den die Zahnalveole begrenzenden Alveolarknochen übergeht (vgl. Abbildung 1). Zentral besteht der Alveolarfortsatz aus *Spongiosa* (Wolf et al. 2004; Radlanski 2011).

Der Alveolarknochen wird von zwei unterschiedlich orientierten kollagenen Fasern durchzogen: Die vom PDL ausgehenden Sharpeyschen Fasern inserieren im Alveolarknochen, verlaufen senkrecht zu dessen Oberfläche und mineralisieren, wobei jedoch das Innere dieser Fasern stets unmineralisiert bleibt. Ein weiteres internes fibrilläres Netzwerk geht von Osteoblasten aus: Diese Fasern sind weniger stark geordnet (Saffar et al. 2007; Radlanski 2011). Bei physiologischen oder durch orthodontische Apparaturen herbeigeführte Zahnbewegungen kann beobachtet werden, dass der Alveolarknochen Remodellierungsprozesse durchläuft. Hierbei muss die appositionelle Seite von der Resorptionsseite unterschieden werden: Die Resorptionsseite ist durch Osteoklasten-Lakunen geprägt, die appositionelle Seite erscheint glatt (Rana et al. 2001; Saffar et al. 2007). Essentiell für den Vorgang dieser Knochenmodellierung ist das sogenannte "Rezeptoraktivator des NF- κ B (RANK)/ RANK-Ligand (RANKL)/ Osteoprotegerin (OPG)-System" (Hofbauer und Heufelder 2001; Goldring 2003): RANKL wird von Ostoblasten, Osteozyten, PDL-Zellen und Zementoblasten sezerniert (Hasegawa et al. 2002; Sakata et al. 2002; Diercke et al. 2012a), bindet an den RANK-Rezeptor von mononukleären unreifen Osteoblasten und bewirkt dort eine Differenzierung zu reifen Osteoklasten. Das ebenfalls von Osteoblasten sezernierte OPG erfüllt eine Schutzfunktion, indem es als Scheinligand ungebundene RANKL bindet und diese somit antagonisiert (Goldring 2003).

Weitere Untersuchungen zeigten, dass das RANK/ RANKL/ OPG-System eine Rolle bei physiologischer Wurzelresorption inne hat (Lossdörfer et al. 2002; Fukushima et al. 2003): Amelogenin-*Knockout*-Mäuse zeigten *in vivo* vermehrt Wurzelresorptionen, welche wahrscheinlich im Zusammenhang mit einer erhöhten Expression von RANKL stehen (Oshiro et al. 2002).

1.1.4 Das Wurzelzement

Zellen des humanen Wurzelzements stellen das zentrale Untersuchungsobjekt dieser Arbeit dar. In der Erforschung der dentalen Gewebe wurde das Zement lange Zeit sehr stiefmütterlich behandelt; so wurde dieses zwar im 17. Jahrhundert zusammen mit dem Zahnschmelz und dem Dentin erstmal von Leeuwenhoek und Malpighi erwähnt, im folgenden Jahrhundert wurde die Existenz aber wieder bestritten, sodass eine erste Beschreibung erst 1798 durch Robert Blake erfolgte (Malpighi 1700; Blake 1801; Foster 2017).

Das Wurzelzement ist im Bereich der Zahnwurzel mit einer Schicht von 200 – 1500 µm dem Dentin aufgelagert (Schroeder 1992), überlagert meist zervikal den Zahnschmelz und bedeckt den apikalen Wurzelkanal. Anatomisch kann es als Teil des Zahns betrachtet werden, funktionell ist es jedoch dem Zahnhalteapparat zuzuordnen: Das Zement verbindet die Sharpeyschen Fasern des PDLs mit der Wurzeloberfläche (Nanci und Bosshardt 2006).

1.1.4.1 Histologisch-topographische Klassifizierung

Eine Einteilung des Zements erfolgt histologisch-topografisch primär nach Zellvorkommen: Dünneres azelluläres Zement befindet sich vornehmlich im zervikalen Bereich des Zahns, dickere Schichten von zellulärem Zement sind im apikalen Bereich zu finden (Yamamoto et al. 2016). Als weiteres Unterscheidungsmerkmal wird die Anzahl und Art der eingelagerten Fasern herangezogen: Externe Fasern strahlen aus dem PDL ein und dienen der Zahnverankerung; interne Fasern werden von Zementoblasten gebildet. In Kombination dieser beiden Merkmale sind vor allem das azelluläre Fremdfaserzement, das zelluläre Eigenfaserzement und das Gemischtfaserzement hervorzuheben. Eine Sonderstellung nimmt das Intermediärzement ein (Schroeder 1992; Yamamoto et al. 2016).

Azelluläres afibrilläres Zement befindet sich zervikal und bedeckt auch einen schmalen Streifen des Zahnschmelzes (Bosshardt und Selvig 1997). Während der Zahnentwicklung wird diese Zementart zuerst gebildet (Radlanski 2011; Yamamoto et al. 2016). Zellen und kollagene Fasern kommen in dieser Zementart nicht vor, jedoch kann durch Vorkommen von knochentypischen NCPs eine Parallele zu *bone-lining*-Zellen gezogen werden. *Bone-lining*-Zellen verbinden im Knochengewebe neu gebildeten mit schon bestehendem Knochen; welche Funktion azelluläres afibrilläres Zement übernimmt, ist nicht bekannt (Bosshardt und Selvig 1997; Nanci und Bosshardt 2006). Wie das azelluläre afibrilläre Zement gebildet wird, ist ebenfalls nicht geklärt; es werden Bindegewebszellen, die Zellen des inneren Schmelzepithels, die später zur Hertwigschen Epithelscheide werden oder eine Ablagerung von extrazellulärer Matrix diskutiert (Yamamoto et al. 2016).

Azelluläres Zement mit Fremdfasern befindet sich auf der zervikalen Wurzelhälfte und hat eine größere Ausdehnung an Frontzähnen (Beertsen und Everts 2016). Im Laufe des Lebens nimmt die Schichtdicke zu (Schroeder 1992; Bosshardt und Selvig 1997).

Auffällig ist eine sehr einheitliche Morphologie (Bosshardt 2005): Zellen sind in dieser Zementart nicht nachzuweisen. Aus dem angrenzenden PDL strahlen viele dicht gepackte Sharpeysche Fasern ein, ca 30000/ mm² (Schroeder 1992). Das azelluläre Fremdfaserzement übernimmt somit eine wichtige Rolle in der Verankerung des Zahns in seiner Alveole (Schroeder 1986; Bosshardt und Selvig 1997). Die einstrahlenden Fasern sind im Zement parallel ausgerichtet und passen sich an vorherrschende Belastungen, wie posteruptive Zahnbewegungen, an (Diercke et al. 2014a).

Über die Verbindung zwischen Zement und Dentin gibt es zwei unterschiedliche Hypothesen: Ein Großteil der Studien postuliert einstrahlende Fasern aus dem Dentin, welche im Zement mineralisieren und mit den Sharpeyschen Fasern des PDLs verzahnen (Schroeder et al. 1992; Bosshardt und Selvig 1997; Nanci und Bosshardt 2006). In anderen Untersuchungen wurde ein nicht-kollagenes Protein (NCP) nachgewiesen, welches als Adhäsiv zwischen Dentin und Zement dienen soll (Yamamoto et al. 1999).

Durch anpassungsbedingte Auflagerung weiterer Schichten können in azellulärem Fremdfaserzement hochmineralisierte Wachstumslinien beobachtet werden (Bosshardt 2005); dementsprechend unterscheidet sich auch die Faserausrichtung in den unterschiedlichen Schichten (Schroeder et al. 1992). Noch nicht mineralisiertes azelluläres Fremdfaserzement wird als Zementoid oder Präzement bezeichnet (Schroeder et al. 1992).

Das zelluläre Zement mit Eigenfasern ist isoliert als Reparaturgewebe in Resorptionslakunen oder traumatischen Wurzelfrakturen anzutreffen, hauptsächlich ist es Bestandteil des zellulären Gemischtfaserzements (Schroeder 1986).

Enthalten sind Zellen, die, wie im Lamellenknochen, vollständig von Matrix umgeben sind. Durch die vollständige Einmauerung differenzieren die innenliegenden Zementoblasten zu Zementozyten (Bosshardt und Selvig 1997). Bei einer zu raschen Matrixapposition können jedoch zellfreie Bereiche entstehen, die als azelluläres Eigenfaserzement bezeichnet werden (Bosshardt und Schroeder 1996).

Die Anordnung der intrinsischen Fasern ähnelt ebenfalls dem Lamellenknochen (Yamamoto et al. 1999, Yamamoto et al. 1997): Sie umschließen zirkulär extrinsische Fasern und mineralisieren. Die eingelagerten extrinsischen Fasern haben einen Durchmesser von etwa 10 µm und enthalten meistens zentral einen unmineralisierten Kern. Je nach Masse der extrinsischen Fasern kann eine Unterteilung in fremdfaserreich, fremdfaserarm und fremdfaserfrei erfolgen.

Da keine Sharpeyschen Fasern aus dem PDL einstrahlen, hat das zelluläre Eigenfaserzement keine Funktion bei der Aufhängung des Zahns in der Alveole (Bosshardt 2005). Eine schnelle Matrixapposition von Zementoblasten des zellulären Eigenfaserzements könnte bei der Anpassung an okklusale Gegebenheiten eine Rolle spielen (Schroeder 1986; Bosshardt 2005).

Das Gemischtfaserzement bedeckt ein bis zwei Drittel der apikalen Zahnwurzel und die, falls vorhandene, Furkation (Schroeder 1986). Die Dicke des Gemischtfaserzements kann Aufschluss über das Alter des Menschen geben, da dieses kontinuierlich zunimmt (Swetha et al. 2018). Ein zeitlebens stattfindender Mesialdrift verursacht distal verstärkte Zugbelastung, sodass es in diesen Bereichen zu einer vermehrten Zementablagerung kommt (Dastmalchi et al. 1990; Bellucci und Perrini 2002).

7

Gemischtfaserzement setzt sich aus Schichten von fremdfaserarmen und fremdfaserfreien zellulärem Eigenfaserzement und vereinzelt vorkommendem azellulären Fremdfaserzement zusammen, die in abwechselnden oder auch verwobenen Lagen angeordnet sind (Radlanski 2011). Bei einer Anfärbung mit Hämatoxylin zeigen sich abwechselnd hell und dunkel gefärbte Lamellen mit einer Dicke von 2,5 µm, die einer abwechselnd longitudinalen und transversalen Ausrichtung von zellulärem Eigenfaserzement entsprechen (Yamamoto et al. 1997; Yamamoto et al. 2010) und damit der Anordnung in Knochenkompakta sehr ähneln (Weiner et al. 1999). Diese "sperrholzartige" Anordnung wirkt multidirektionalem mechanischen Stress entgegen (Ascenzi und Bonucci 1968).

Kontrovers diskutiert wird das Intermediärzement. Erstmals wurde es von Bencze als schmale lakunenauffüllende Schicht zwischen Dentin und Gemischtfaserzement liegend, vom Zement stammend, beschrieben (Bencze 1927). Homolog wurde von Hopewell-Smith eine periphere hyaline Dentinschicht zervikal in Kontakt zum azellulären Fremdfaserzement als vom Dentin stammend charakterisiert (Hopewell-Smith 1920). Histologisch ist diese Schicht dem Dentin zuzuordnen, da sie auf der Dentin-Zement-Grenze der Dentinseite anliegt und zu diesem keine klare Abgrenzung auszumachen ist; dennoch wird in sämtlichen Studien der Begriff Intermediärzement weiterhin verwendet (Yamamoto et al. 2016).

Da die Dentintubuli auch im Intermediärzement weitergeführt sind, wird vermutet, dass es sich um unmineralisiertes Dentin handelt. Fortführend wird auch diskutiert, ob Intermediärdentin aus geschwollenen durch die Dentinkanälchen führende Odontoblastenfortsätze oder zellkörper mit misslungener Anlagerung an das sich bildende Pulpenkavum besteht (Owens 1972; Yamamoto et al. 2016).

1.1.4.2 Biochemie des Wurzelzements

Die Biochemie eines Gewebes gibt Aufschluss über dessen Zusammensetzung, Metabolismus und Regulation, womit dieses spezifisch charakterisiert werden kann. Zement ist neben Knochen und Dentin ein drittes vitales Hartgewebe im Körper (Bosshardt und Selvig 1997). Es besteht aus einem zellulären Anteil und der funktionsgebenden mineralisierten extrazellulären Matrix. Bisherige Forschung nach einem zementspezifischen Protein blieben bisher erfolglos, bzw. entsprechende Kandidaten wurden in weiteren Untersuchungen auch in anderen Geweben nachgewiesen (Matthews et al. 2016). Der kleinere Anteil des Zements ist zellulär und besteht hauptsächlich aus Zementoblasten. Ist ein Zementoblast vollständig von mineralisierender Matrix umgeben, entweder durch eigene oder durch Apposition benachbarter Zementoblasten, ist er zum Zementozyt gereift; die Zahl der Zementozyten hängt demnach von der Geschwindigkeit der Matrixapposition ab. Dieser Vorgang verläuft ähnlich der Entwicklung von Osteozyten: Zunächst wird eine noch unmineralisierte Matrix, Osteoid bzw. Zementoid, produziert, welche im weiteren Verlauf die entsprechenden Zellen einmauert (Bosshardt und Schroeder 1992). Funktionell unterschiedliche Zellen innerhalb des Wurzelzements, wie sie zum Beispiel im Knochengewebe mit Osteoblasten, Osteoklasten und *bone-lining*-Zellen vertreten sind, sind im Zement nicht nachgewiesen (Bosshardt 2005).

Während bei azellulärem afibrillärem Zement diskutiert wird, ob dieses überhaupt zellulärer Herkunft ist (Yamamoto et al. 2016), wird azelluläres Zement mit eingelagerten Fremdfasern von Zellen gebildet, die morphologisch PDL-Fibroblasten stark ähneln. Der Vergleich der Genexpression ergab jedoch deutliche Unterschiede (D'Errico et al. 1999). Die Zementoblasten des Gemischtfaserzements sind große Zellen mit einem runden euchromatinreichen Kern, der auf eine hohe Proteinsyntheserate hindeutet (Bosshardt und Schroeder 1992).

Ein großer Unterschied zum Knochen besteht in der fehlenden Vaskularisierung des Zements, sodass ein Nährstoffaustausch insbesondere mit tiefer liegenden Zementschichten sehr eingeschränkt ist. Leere Lakunen im inneren des Zements deuten deshalb auf eine Ansammlung von Metabolismusprodukten oder untergegangene Zementoblasten hin (Grzesik et al. 2000).

Die extrazelluläre Matrix des Zements besteht, wie im Knochen, zum größten Teil aus Wasser, Kollagenen und NCPs, in welche sich Minerale einlagern (Bosshardt und Selvig 1997). Außerdem dienen Knochen und Zement als Speicher für Wachstumsfaktoren und Zytokine. Abhängig von der anatomischen Lage, der Nachweismethode und der untersuchten Spezies variieren die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix und die Geschwindigkeit der Bildung (Nanci 1999).

Die Kollagene machen 80 – 90% der extrazellulären Matrix aus; im humanen Zement liegen vor allem Kollagen Typ I und Typ III vor (Christner et al. 1977), es konnten aber auch Kollagen Typ V, VI und XII nachgewiesen werden (Bosshardt 2005). Zusammen mit NCPs bilden Kollagene ein organisches Gefüge, in welches sich anorganische Minerale einlagern (Christoffersen und Landis 1991).

Bisher wurden in Knochen, Zement und Dentin über 20 verschiedene NCPs nachgewiesen. In Hartgewebe nachgewiesene NCPs lassen sich in Glykoproteine, Proteoglykane, Plasmaproteine und andere, nicht in diese Einteilung passende Proteine einteilen (AlvarezPérez et al. 2006). In Hinblick auf Genaufbau, Expression, Lokalisation und Funktion dieser Proteingruppe bedarf es jedoch noch weiterer Forschungsarbeit. Möglicherweise haben NCPs regulierende Funktion bei Bildung und Umbau von extrazellulärer Matrix und Mineralisation (Fisher et al. 2001).

Die Annahme, dass bestimmte NCPs wie Osteopontin (OPN), Dentin-Sialoprotein, Dentin-Phosphoprotein, Dentin-Matrix-Protein 1 und bestimmte Proteine des Schmelzes gewebespezifisch sind, wurde bereits widerlegt. Weiterführend wird diskutiert, ob mineralisierte Gewebe gleiche NCPs enthalten, diese jedoch in unterschiedlichen Verhältnissen kombiniert sind (Butler et al. 2003). Insbesondere *Cementum derived growth factor, cementum attachment protein* und *cementum protein 23* wurden als zementspezifisch gehandelt, wurden aber auch in anderen Geweben nachgewiesen, sodass bis dato kein Marker für Zementoblasten bekannt ist (Matthews et al. 2016).

Die wichtigsten NCPs im Zement sind *bone sialoprotein* (BSP) und Osteopontin (Bosshardt et al. 1998). Beide sind am Mineralisationsprozess und der Aufrechterhaltung der Struktur des Zements beteiligt. Proteoglykane bestehen aus einem *Core*-Protein an welches Glykosaminoglykane gebunden sind. Im zellulären Zement wurden Versican und die kleineren Proteoglycane Decorin, Biglycan und Lumican nachgewiesen. Es wird vermutet, dass sie durch Besetzen der Kollagenfibrillen einer Mineralisation entgegenwirken (Ababneh et al. 1999). Auch wird diskutiert, ob schmelzverwandte Proteine im Zement vorkommen und dort als Differenzierungsfaktoren wirken (Hammarström 1997).

1.1.4.3 Entwicklung des Zements

Die Zementogenese ist eng mit der Zahnentwicklung verbunden. Bereits in der 20. Lebenswoche werden im Menschen die bleibenden Zähne angelegt, vermutlich durch einen Transkriptionsfaktor aus dem Gewebe des ersten Kiemenbogens (Yen und Sharpe 2008): Epithelzellen dringen in das ektomesenchymale Gewebe des Kiefers vor, werden von diesem komplett umschlossen und ordnen sich zu einem inneren und äußeren Schmelzepithel, dem Schmelzorgan, an; im weiteren Verlauf entwickeln sich die Zellen des inneren Schmelzepithels zu Ameloblasten und bilden im Kronenbereich den Zahnschmelz aus. Durch Differenzierung ektomesenchymaler Zellen am inneren Schmelzepithel bildet sich die Zahnpapille, aus welcher die dentinbildenden Odontoblasten hervorgehen. Peripher des Schmelzorgans entsteht aus dem umgebenden Ektomesenchym der Zahnfollikel (Thesleff 2006).

Der Übergang vom inneren und äußeren Schmelzepithel wird als Hertwigsche Epithelscheide bezeichnet. Durch nach apikal gerichtetes Wachstum induziert sie die Dentinbildung und bildet eine Leitschiene für die Entstehung der Zahnwurzel (Radlanski 2011; Fleischmannova et al.

2010). Zervikal zerfällt die Hertwigsche Epithelscheide anschließend in Zellcluster, welche als Mallasezsche Epithelreste bezeichnet werden. Auf dieser nun freiliegenden Dentinfläche lagern sich fibroblastenartige Zementoblasten an, welche morphologisch den PDL-Zellen ähneln, jedoch eine deutlich abweichende Genexpression aufweisen (Beertsen und Everts 2016; D'Errico et al. 1999). Im Gegensatz zur Knochenbildung ist die Zementbildung also abhängig von einer anderen Hartgewebsbildung; auch Geflechtknochen kann unabhängig durch intramembranöse Ossifikation eines bindegewebigen Templates entstehen (Lüllmann-Rauch 2015).Die angelagerten Zementoblasten synthetisieren Kollagenfibrillen, welche sich senkrecht zur Wurzeloberfläche ausrichten, mineralisieren und somit die Matrix des azellulären Fremdfaserzements darstellen. Zu diesem Zeitpunkt sekretieren die Zementoblasten eine erhöhte Konzentration von BSP und OPN (Bosshardt und Schroeder 1992). Wie bei der Schmelzbildung der Ameloblasten ziehen sich die Zementoblasten bei der Zementapposition nach peripher zurück, sodass zellfreie Bereiche entstehen (Gühring und Barth 1992). Sobald der Zahn okklusal belastet wird, bildet sich ein Verbund zu den Sharpeyschen Fasern des PDLs aus (Bosshardt und Selvig 1997; Nanci und Bosshardt 2006).

Weiter apikal ist der Zementaufbau dem des Knochengewebes vergleichbar: Zementoblasten mauern sich durch die eigene Matrixapposition ein und werden fortan als Zementozyten bezeichnet (Bosshardt und Selvig 1997), sodass zelluläres Zement entsteht. Eine weitere Parallele zum Knochen sind die zahlreichen Zellfortsätze, über die Zementoblasten ebenso wie Osteoblasten verfügen. Durch diese Fortsätze stehen tiefer liegende Zementoblasten mit der Zementoberfläche und auch untereinander in Kontakt, sodass ein Nährstoff- und Informationsaustausch möglich ist (Gühring und Barth 1992) und die schon beschriebene lamellenartige Anordnung kontrolliert werden kann (Yamamoto et al. 2010).

Welchem Gewebe Zementoblasten entstammen, wird noch diskutiert: Die klassische Theorie (Foster et al. 2007) geht davon aus, dass die Zellen des Zahnfollikels und des angrenzenden Mesenchyms als Ursprung für die Osteoblasten des Alveolarknochens, die Fibroblasten des PDLs und die Zementoblasten dienen und bei Kontakt mit dem Dentin differenzieren (Ten Cate 1998; Cho und Garant 2000; Foster et al. 2007).

Als alternative Theorie (Foster et al. 2007) zur Entwicklung der Zementoblasten kann auch ein epithelial-mesenchymaler *Shift* von Zellen der Hertwigschen Epithelscheide in Betracht gezogen werden (Bosshardt und Schroeder 1992; Bosshardt und Schroeder 1996; Webb et al. 1996; Zeichner-David et al. 2003). Ein Indiz stellt der zeitgleiche Nachweis von Vimentin und Keratin dar, die spezifische Intermediärfilamente des Mesenchyms bzw. des Epithels sind. Durch diese unterschiedlichen Ursprungszellen von Osteoblasten und Zementoblasten wären auch die deutlich abweichenden Phänotypen dieser Zellen zu erklären (Webb et al. 1996).

Es wird angenommen, dass *bone morphogenetic proteins* (BMPs) eine Rolle bei der Zahnentwicklung spielen. Erstmals beschrieben und ihren Namen erhalten hat diese Proteingruppe, weil sie die Neubildung von Knochen induziert (Torii et al. 2016; Malik et al. 2018). BMPs sind in demineralisiertem Knochen und der Dentinmatrix enthalten und wurden in mehreren Studien an unterschiedlichen tierischen Geweben als Spleißprodukt des Amelogenin-Gens identifiziert. In der Zahnentwicklung haben die BMPs die Funktion eines epithelial-mesenchymalen *Shifts*: Die Zellen der Zahnpapille werden in Odontoblasten umgewandelt und Zellen des inneren Schmelzepithels in schmelzbildende Ameloblasten (Veis 2003). Die Tatsache, dass die BMPs in der Zahnentwicklung keine Knochenneubildung hervorrufen, beruht wahrscheinlich auf Anwesenheit von weiteren Signalmolekülen, unter anderem aus der *transforming growth factor* der β -Familie (TGF- β) (Coin et al. 1999; Papagerakis et al. 2002).

Über die Regulation von Zementoblasten liegen im Gegensatz zu den Hartgeweben Knochen und Dentin weitaus weniger Informationen vor (Grzesik et al. 2000; Saygin et al. 2000): Das humane Wurzelzement unterliegt keinem physiologischen Umbau. Lediglich in pathologischen Szenarien, wie der Wurzelresorption nach kieferorthopädischer Behandlung, einer Parodontitis oder einem Zahntrauma, ist ein Umbau des Zements zu beobachten (Diercke et al. 2014a). Wie schon beschrieben, spielt das RANK/ RANKL/ OPG-System eine wichtige Rolle im Knochenstoffwechsel: Bei einer Krafteinwirkung auf einen Zahn wird durch das RANK/ RANKL/ OPG-System eine Knochenremodellation bewirkt. Aktiviert durch eine sogenannte aseptische Entzündungsreaktion, wie sie bei der kompressionsbedingten Nekrotisierung von PDL auftritt, stimulieren Makrophagen die Differenzierung von Osteoblasten zu Osteoklasten, welche das degradierte Gewebe abbauen und Osteoblasten hemmen (von Böhl und Kuijpers-Jagtman 2009). Parallel zu diesem Knochenabbau an der Druckseite wurden vermehrt Wurzelresorptionen festgestellt; manche Studien postulieren sogar, dass selbst bei rein physiologischen Zahnbewegungen Resorptionen der Wurzeln auftreten (Owman-Moll et al. 1995). Ursächlich sind vermutlich zum einen eine überschießende Resorption durch Makrophagen, Odontoklasten bzw. Osteoklasten, die durch die enge räumliche Beziehung sogar bis in das Dentin reichen können (Brudvik und Rygh 1995). Darüber hinaus wird eine ähnliche Kopplung zwischen Osteoklasten und Zementoblasten vermutet, die den Ab- und Aufbau von Knochen und Zement steuert (Diercke et al. 2012b). Durch welche Stimulation eine Reparatur der Resorptionsdefekte durch zelluläres Eigenfaserzement stattfindet bzw. ausbleibt ist nach wie vor nicht bekannt (Weltman et al. 2010; Diercke et al. 2012b).

Auch in PDL-Zellen wurde *in vitro* eine Expression von RANKL und OPG nachgewiesen (Hasegawa et al. 2002; Sakata et al. 2002). Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass

12

das RANK/ RANKL/ OPG-System zudem eine Rolle bei physiologischer Wurzelresorption (Lossdörfer et al. 2002; Fukushima et al. 2003) und experimenteller Zahnbewegung übernimmt: Amelogenin-*Knockout*-Mäuse zeigten *in vivo* vermehrt Wurzelresorptionen, welche wahrscheinlich im Zusammenhang mit einer erhöhten Expression von RANKL stehen (Oshiro et al. 2002).

Das von den Nebenschilddrüsen gebildete Parathormon (PTH) reguliert über die Einflussnahme auf das RANK/ RANKL/ OPG-System den Calciumspiegel im Blut: PTH wird bei einem niedrigen Calciumspiegel von den Epithelkörperchen sezerniert und bindet an spezielle Rezeptoren auf Osteoblasten, wodurch die Expression von RANKL induziert wird. Wie bereits beschrieben, differenzieren Osteoblasten mit gebundenem RANKL zu Osteoklasten, wodurch Ca²⁺ freigesetzt wird (Bosshardt 2005).

Auch in Zementoblasten, die das zelluläre Eigenfaserzement bilden, wurden PTH-Rezeptoren nachgewiesen (Tenorio und Hughes 1996). Außerdem wurde eine Korrelation zwischen einem Ca²⁺- und Vitamin D-Mangel und vermehrten Wurzelresorptionen beobachtet. Immunologisch wurden in Zementoblasten bereits Vitamin D-Rezeptoren nachgewiesen (D'Errico et al. 1997; Torii et al. 2016). Sowohl Osteoblasten als auch Zementoblasten reagieren auf Vitamin D-Mangel mit einer gesteigerten Expression von BSP und einer verminderten Expression von OPN (Chen et al. 1999).

Welche Rolle das angrenzende PDL bei der Entwicklung des Zements spielt, ist noch nicht geklärt. Als selbst nicht-mineralisiertes Gewebe, vor allem bestehend aus PDL-Fibroblasten, können sich mineralisierende Zellen wie Osteoblasten und Zementoblasten mit entsprechender Stimulation dennoch aus diesem differenzieren (Beertsen et al. 1997; Bartold et al. 2000). Dabei ist nicht bekannt, ob Osteoblasten und Zementoblasten sich aus gleichen Progentorzellen differenzieren oder ob unterschiedliche Vorläuferzellen als Ursprung dienen (Bosshardt 2005). Dem Zement grenzt zervikal Zahnschmelz an, vor allem bestehend aus *Enamel Matrix proteins* (EMPs), welche von der Hertwigschen Epithelscheide synthetisiert wurden. Auch dieses angrenzende Gewebe steht im Verdacht eine Bildung von azellulärem Fremdfaserzement zu stimulieren: Durch Kontakt zu EMPs differenzieren Progenitorzellen des Zahnfollikels zu Zementoblasten (Hammarström 1997).

1.2 Mesenchymale Stammzellen

Multipotente mesenchymale Stammzellen wurden 2006 von der Internationalen Gesellschaft für Zelltherapie nach folgenden drei Kriterien charakterisiert (Dominici et al. 2006): Mesenchymale Stammzellen wachsen kunststoffadhärent und weisen eine spindelförmige fibroblastenähnliche Morphologie auf; bei entsprechender Stimulation lassen sie sich *in vitro* unter anderem zu Adipozyten, Osteoblasten und Chondrozyten differenzieren (Blau et al. 2001; Caplan und Bruder 2001) und bilden die typischen Oberflächenmarkern, bzw. *Cluster of differentiation* (CD), wie CD90, CD105 und CD73 aus, bei Abwesenheit der hämatopoetischen Marker CD34 und CD45. Einen spezifischer Marker, der nur auf mesenchymalen Stammzellen zu finden ist, ist bis heute noch nicht entdeckt (Matthews et al. 2016).

Stammzellen können in vielen Geweben angetroffen werden, insbesondere bei einem hohen Turnover. Die mit am besten erforschten mesenchymalen Stammzellen entstammen Knochenmarkaspiraten. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass sich aus einer klonal expandierten Stroma-Zelle aus dem Knochenmark durch entsprechende Stimulation Adipozyten, Osteozyten und Chondrozyten differenzieren ließen (Pittenger et al. 1999). Weiterführend konnten Stammzellen aus dem Knochenmark auch in Myozyten und neuronale Vorläuferzellen entwickelt werden (Pittenger et al. 1999; Caplan und Bruder 2001). In verschiedenen oralen Geweben, wie dem Zahnfollikel, und der Zahnpapille, dem PDL und der Pulpa wurden bereits multipotente Stammzellen nachgewiesen (Lei et al. 2014). Die oralen

der Pulpa wurden bereits multipotente Stammzellen nachgewiesen (Lei et al. 2014). Die oralen Stammzellen sind ektomesenchymaler und ektodermaler Herkunft, allerdings gehen letztere mit dem Zahndurchbruch verloren und stellen somit kein verfügbares Stammzellreservoir dar (Morsczeck et al. 2005).

1.2.1 Oberflächenmarker

Als CD-Marker werden Oberflächenmerkmale von Zellen bezeichnet, die als Rezeptor dienen, eine Signalfunktion haben oder enzymatisch aktiv sein können. Teilweise werden diese CD-Marker zellspezifisch exprimiert, sodass eine immunophänotypische Unterscheidung von Zellen möglich ist (Zola et al. 2007).

Mesenchymale Oberflächenmarker lassen sich durch fluoreszierende Antikörper mithilfe eines *Fluorescence Activated Cell Scannings* (FACS) nachweisen. Wichtig ist hierbei, dass diese nicht von dem Enzym Trypsin beeinflusst werden, da das in der Versuchsvorbereitung (vgl. 3.2) eingesetzt wird (Lennon und Micklem 1986). Neben einer Analyse ist auch ein Sorting durch

das FACS-Gerät möglich, wodurch einzelne Populationen aus einer Mischzellkultur isoliert werden können (Ibrahim und van den Engh 2007).

CD73, CD90, CD105, CD146 und CD166 sind einige mesenchymale Marker und bereits auf Stammzellen anderer oraler Gewebe nachgewiesen (Lei et al. 2014; Kadkhoda et al. 2016). CD73 ist zellwandgebunden und hat eine 5'-Nukleotidase-Aktivität: Extrazellulär hydrolysiert das Enzym Nukleotide zu Nukleosiden, insbesondere Adenosinmonophasphat zu Adenosin, welches zu einer Gefäßerweiterung und Entzündungs- und Gerinnungshemmung führt (Misumi et al. 1990). CD90 ist ein Oberflächenprotein zur Zelladhäsion und Ausbildung von Zell-ZellKontakten. Da CD90 auch eine Rolle bei der Apoptose spielt, ist es ein Tumorsuppressorgen; bei Mutation ist die Wahrscheinlichkeit einer Tumorentstehung erhöht (Yamamoto und Wilson 1987). CD105, oder auch Endoglin genannt, ist an der Angiogenese beteiligt. In einem Tumorgeschehen kann die Expression von CD105 erhöht sein, sodass die Versorgung mit Nährstoffen für ein Tumorwachstum sichergestellt ist und eine Ausschwemmung von veränderten Zellen und somit eine Metastasenbildung möglich ist (Attisano und Wrana 1996). CD146 bzw melanoma cell adhesion molecule (MCAM) ist ein Rezeptor für Laminin $\alpha 4$; es wirkt bei Zellad-häsion und der Verbindung zum Aktin-Zytoskelett mit. In einigen Studien wird diskutiert, ob CD146 als quantitativer Marker für mesenchymale Progenitorzellen genutzt werden kann (Sorrentino et al. 2008). CD166 oder auch aktiviertes Leukozyten-Zell-Adhäsionsmolekül (ALCAM) wird als potentieller Marker für Entartung von Stammzellen eingesetzt. Zu finden ist dieses Oberflächenprotein auf Leukozyten, Fibroblasten, Neuronen und Melanomzellen (Bowen et al. 1995; Swart 2002).

1.2.2 Differenzierung

Wie beschrieben wird der Nachweis von mesenchymalen Stammzellen über die osteogene, chondrogene und adipogene Differenzierung geführt (Dominici et al. 2006). Über die Zugabe von bestimmten Zusätzen zum Nährmedium der Zellen wird eine entsprechende Differenzierung induziert (vgl. 3.8).

1.2.2.1 Adipogene Differenzierung

Die Adipogenese kann in die Determination der Stammzelle und die eigentliche Differenzierung unterteilt werden (Rosen und MacDougald 2006). Die mesenchymale Progenitorzelle entwickelt sich über das Stadium des Adipoblasten zu einem Präadipozyten. Bereits in dieser Phase sind schon adipogene Marker wie die Lipoproteinlipase (LPL) und der Transkriptionsfaktor Peroxisom-Proliferation-aktivierter Rezeptor γ (PPAR γ) nachzuweisen

(Enerbäck et al. 1992; Tontonoz et al. 1994). Lichtmikroskopisch ist eine erfolgreiche adipogene Differenzierung durch eine Hyperplasie und eine Einlagerung von sich verbindenden Fettvakuolen im Zytoplasma gekennzeichnet. Durch diese extensive Einlagerung von Triacylglyceriden wird der Zellkern an den Rand gedrängt (Entenmann und Hauner 1996).

1.2.2.2 Chondrogene Differenzierung

Die Knorpelentstehung ist komplex: Mesenchymale Progenitorzellen kondensieren zu Prächondrozyten, durchlaufen die Stadien eines frühen Chondroblasten und ordnen sich säulenförmig an. Diese erste Hälfte der Chondrogenese wird vom sogenannten "*Sry-related HMG box transcriptional activator 9*" (SOX9) reguliert (Ducy 2000). Anschließend hypertrophieren die Zellen zu Chondrozyten, die im reifen Knorpelgewebe in eine extrazelluläre Matrix aus Kollagen, Wasser und wasserbindenden Substanzen eingebettet sind (Barry et al. 2001; Lefebvre und Smits 2005). Kollagen Typ II ist das charakteristische Kollagen des Knorpels, es wurden aber auch Typ IX und XI nachgewiesen. Die wasserbindenen Substanzen setzen sich aus Proteoglykane (z.B. Aggrecan) und Glykoproteinen zusammen. SOX9 ist insbesondere ein Transkriptionsfaktor für Kollagen Typ II, Typ XI und Aggrecan (Bridgewater et al. 1998; Sekiya et al. 2000; Lefebvre und Smits 2005).

1.2.2.3 Osteogene Differenzierung

Die osteogene Differenzierung kann in drei Phasen eingeteilt werden, die durch die vermehrte Expression spezifischer Marker unterschieden werden können (Owen et al. 1990): In der Phase der aktiven Proliferation synthetisieren die Zellen zum Aufbau der extrazellulären Matrix insbesondere Kollagen Typ I. Für die anschließende Matrixreifung wird vor allem das Enzym alkalische Phosphatase (AP) exprimiert. Die Mineralisation der Matrix lässt sich durch den Marker Osteocalcin nachweisen. Ein bedeutender Transkriptionsfaktor der osteogenen Differenzierung ist der *runt-related transcription factor* 2 (RUNX2), bzw. auch *core-binding factor alpha* 1 genannt (Ducy 2000). Dieser induziert die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu unreifen Osteoblasten (Ducy et al. 1997). Fehlt RUNX2 im Verlauf der Embryogenese, endet dies in der fehlenden Ausbildung der mineralisierten Gewebe, nicht nur des Knochens, sondern auch von Zahnhartgeweben (Mundlos et al. 1997; Camilleri und McDonald 2006). In reifen Osteoblasten reguliert RUNX2 die Transkription der wichtigsten osteoblastären Gene, wie BSP, Osteocalcin, Osteopontin und Kollagen Typ I (Ducy et al. 1999).

1.3 Fragestellung

In den parodontalen Geweben Gingiva, Alveolarknochen und PDL wurden bereits teilungsfähige, differenzierbare Vorläuferzellen identifiziert (Saffar et al. 2007; Feng et al. 2010; El-Sayed und Dörfer 2016). Ob auch das Wurzelzement als viertes Gewebe des Parodontiums Vorläuferzellen enthält, ist bislang unklar.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es deshalb, das humane Wurzelzement auf das Vorkommen von mesenchymalen Progenitorzellen zu untersuchen. Hierzu werden Zellen aus dem humanen Wurzelzement gewonnen, kultiviert und mittels FACS-Analyse auf typische mesenchymale CD-Marker untersucht. Anhand dieser Marker wird anschließend ein Zellsorting durchgeführt, um eine homogene Subpopulation zu gewinnen; diese wird adipogen, chondrogen und osteogen differenziert. Der Nachweis der erfolgreichen Differenzierung erfolgt auf Gen- und Proteinebene.

Darüber hinaus wird in der vorliegenden Arbeit erstmals der metabolische Einfluss von PDL-Fibroblasten auf Zementoblasten beschrieben. Dies ist von Interesse, da beide Zelltypen *in vivo* unmittelbar benachbart vorliegen und eine metabolische Beeinflussung anzunehmen ist. Mit einer zusätzlichen osteogenen Differenzierung der Co-Kultur werden außerdem Faktoren, wie sie *in vivo* im angrenzenden Alveolarknochen vorliegen, in die *In-vitro*-Untersuchung einbezogen. Besonderes Interesse gilt dem Vergleich der Expression der Marker RUNX2, SOX9 und Kollagen Typ I und Typ II in der osteogen differenzierten Zementoblasten-Monokultur sowie in der Zementoblasten-Fibroblasten-Co-Kultur ohne und mit osteogener Differenzierung.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit leisten einen wichtigen Beitrag zur parodontalen Grundlagenforschung und tragen langfristig dazu bei, regenerative Konzepte in der Parodontitistherapie zu entwickeln.

2 Material

2.1 Geräte

Tabelle 1: Verwendete Geräte

Gerät	Bezeichnung, Hersteller, Ort, Land
Blot-Scanner	#9000F Mark II, Canon, Krefeld, D
Blot-Transferkammer	PerfectBlue, peqLab, Erlangen, D
Elektrophoresekammer	Nachbau, wissenschaftliches Labor UMG, Göttingen, D
FACS-Analyse-Gerät	FACS Canto II, BD, Franklin Lakes, USA
FACS-Sorting-Gerät	FACS Aria II, BD, Franklin Lakes, USA
Herafreeze -86 °C	HerasafeTM KS12, Thermo Fisher, Waltham, USA
Inkubator	C200 # 13946, Labotect Labor-Technik-Göttingen GmbH, Rosdorf, D
Kamera Nikon D90	D90, Nikon, Düsseldorf, D
Lumineszenz-Scanner	C-DiGit, LI-COR, Bad Homburg, D
Mikroskop (für Objektträger)	#415500-0004-000, Carl Zeiss, Jena, D
Mikroskop (für Zellkultur)	Axiovert 40 CFL, Carl Zeiss, Jena, D
Nanodrop	TM 1000 Spectrophotometer, Thermo Fisher, Waltham, USA
Software Lumineszenz- Scanner	ImageJ Studio Digits
Software Gel-Scanner	Canon Scan IJ
Software Statistica	Version 13.3.1 Deutsch für Windows 10, StatSoft
Software Thermocycler	Mastercycler ep gradient S realplex 2
Software Zellometer	Cellometer Auto
Thermocycler comfort	Mastercycler #4345 epgradient s, Eppendorf, Hamburg, D
Thermomixer	#5000-1012, Eppendorf AG, Hamburg, D
Wasserbad	#TW12 GB, Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, D
Wippe	Duomax 1030 #543-32205-00-3, Heidolph instruments, Schwabach, D
Zellometer	Cellometer Auto T4, Nexcelom, Lawrence MA, USA
Zentrifuge	#58100011535, Eppendorf, Hamburg, D
Zentrifuge	#5426 no.: 0015772, Eppendorf AG, Hamburg, D

2.2 Chemikalien

Chemikalien	Bezeichnung, Hersteller, Ort, Land
β-Mercaptoethanol	#4227.3, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Adipogenes Differenzierungsmedium	#C-28016, PromoCell, Heidelberg, D
Alginat	#LV FMC 8132419, Keltone, Philadelphia, USA
Blockingreagenz	#120-000-442, MACS Miltenyi Biotec, Berg. Gladbach, D
Bovines Serumalbumin (BSA)	#A9647-50g, Sigma Aldrich, Steinheim, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	#D2650-100ML, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	DMEM+GlutaMaxTM #21885-025, Gibco, Paisley, UK
Ethanol	#2212.5000, Chemsolute, Renningen, D
Fetales Rinderserum (FCS)	#10270-106, Gibco, Paisley, UK
Gentamycin	#HN09.1, Roth, Karlsruhe, D
Magermilchpulver	#A0830,0500, AppliChem, Darmstadt, D
Methanol	#4627.5, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Mowiol	#4-88, Hoechst, Frankfurt-Höchst, D
Oil-Red Gebrauchslösung	#O-0625.100G, Sigma Aldrich, Steinheim, D
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	Phosphate Buffered Saline #P4417, Sigma Aldrich, Steinheim, D
Roti-Safe GelStain	#3865.1, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Trypsin	PAN Biotech, Aidenbach, D
WesternBright Chemilumineszenz Substrat Sirius	#541021, Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, D
WesternSure Pen	#P/N 926-91000, LI-CORE, Lincoln NE, USA

2.3 Kits

Kit	Bezeichnung, Hersteller, Ort, Land
AP-Färbung	#86C-1KT, Sigma-Aldrich, Steinheim, D
KAPA SYBR FAST Universal	#07-KK4600-03, PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
peqGOLD Total RNA Kit	#12-6834-02, PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
Quanti-Tect-Reverse- Transkription-Kit	Quantitect Whole Transciptome Kit #207043, Qiagen GmbH, Hilden, D

2.4 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4: Verwendete	Verbrauchsmaterialien
-----------------------	-----------------------

Verbrauchsmaterial	Bezeichnung, Hersteller, Ort, Land
24-Well Platte	CytoOne #CC7672-7596, Starlab, Hamburg, D
6-Well-Platte	#83.3920.300, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, D
96-Well-PCR-Platte	#621835, Biozym Scientific GmbH, Hessisch Olendorf, D
Cryoröhrchen	#5000-1012, Thermo Fisher Scientific, Bremen, D
Einmal-Skalpell	#11.000.00.724 No. 22, Dahlhausen & Co. GmbH, Köln, D
FACS-Röhrchen	Falcon, Rundboden-Polystyrolröhrchen #352058, Thermo Fisher Scientific, Bremen, D
Flasche (25 cm ²)	#83.3910.002, Sarstedt, Nümbrecht, D
Flasche (75 cm ²)	#83.3911.002, Sarstedt, Nümbrecht, D
Mowiol	#4-88, Hoechst, Frankfurt-Höchst, D
Objektträger	#7 695 002, Labsolute Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, D
Optical Flat Cap	#621816, Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, D
PVDF-Membran	Immobilon-P #IPVH00010, Merck KGaA Millipore, Darmstadt, D
Safe-Lock Tube	#0030 121.589, Eppendorf AG, Hamburg, D
Schutzfolie	Microseal B Adhesive Folie #621719, Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, D
<i>ThinCert</i> ®, 0,4 μm	# 657640 und # 657641, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D # 83.3930.500, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, D

2.5 Sonstiges

Tabelle 5: Sonstiges ve	erwendetes Material
-------------------------	---------------------

Bezeichnung	Bezeichnung, Hersteller, Ort, Land
Coomassie-Blau-Färbung	#R 250, Roth, Karlsruhe, D
hTERT, Lentivirus- Genexpressions-Vektor	pLV[Exp]-Bsd-EF1A>hTERT[NM_198253.2], amsbio, Abingdon, GB
Iso-Standard (FACS)	'B49179, Beckmann Coulter, Brea, USA
Protein-Größenstandard (Western Blot)	PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Fisher, Bremen, D
SDS-PAGE-Größenmarker	#SM0671, Fermentas, Waltham, USA

3 Methoden

3.1 Probenmaterial

Die in dieser Arbeit untersuchten humanen Zementoblasten stammen von einem extrahierten Weisheitszahn, der im Rahmen eines medizinisch notwendigen Eingriffs als sogenanntes "Restgewebe" anfiel. Alle Patienten wurden vor dem Eingriff über die geplante Gewebeuntersuchung informiert (Ethik-Antrag 16/06/09) und willigten schriftlich ein. Die Extraktion wurde in der Klinik für Mund-, Kiefer und Gesichtschirurgie der Universitätsmedizin Göttingen (UMG) durchgeführt.

Die weitere Aufarbeitung der Gewebe wurde bereits in einer vorherigen Arbeit beschrieben (Bernhardt 2017): Nach Spülung mit PBS und Braunol um einer Kontamination mit Pilzen und Bakterien entgegenzuwirken, wurde mit einem scharfen Einmal-Skalpell zunächst das PDL von der Wurzeloberfläche des Zahns entfernt und anschließend das Wurzelzement vorsichtig abgeschabt. Die so gewonnenen Gewebefragmente wurden in einer Petrischale mit DMEM zugesetzt mit 10 % FCS angezüchtet und bei 37 °C sowie 5 % CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 95 % im Wärmeschrank inkubiert. Nach etwa 10 Tagen (d) waren lichtmikroskopisch erste ausgewachsene Zellen zu beobachten, ca. 14 d nach der Isolierung wurden die Zellen das erste Mal passagiert und in eine 75 cm²-Flasche überführt.

In weiteren Untersuchungen wurden zudem PDL-Zellen eingesetzt, deren Gewinnung durch den selben Ethikantrag (16/06/09) genehmigt worden war. Die Isolation der PDL-Fibroblasten wurde ähnlich der der Zementoblasten durchgeführt. Nach einer Spülung mit PBS und Braunol wurden mit einem Einmalskalpell die PDL-Zellen vom mittleren Wurzeldrittel des Zahns geschabt. Hierbei musste darauf geachtet werden keine Zellen der darunterliegenden Zementschicht abzutragen. Die Inkubation erfolgte ebenfalls bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit mit DMEM in einer Petrischale.

In den Nachweisen nach osteogener Differenzierung wurden zudem alveoläre Osteoblasten als Positivkontrolle mitgeführt. Auch diese Zellen fielen als "Restgewebe" bei der Extraktion von Zähnen an, sodass die Gewinnung über denselben Ethikantrag (16/06/09) genehmigt worden war; meist haftete der Alveolarknochen den extrahierten Zähnen interradikulär an. Auch bei dieser Zellart musste eine Kontamination einerseits durch die umliegenden Gewebe und andererseits durch Bakterien und Pilze verhindert werden; dies wurde ebenfalls mit Spülungen mit Braunol und PBS, dem Arbeiten mit einem Einmalskalpell und dem Verwerfen der Zellen, die in Kontakt mit den anderen Geweben standen, erreicht. Die gewonnen Zellfragmente wurden unter den schon beschriebenen Bedingungen (DMEM-Medium bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit) inkubiert und nach ca. 14 d das erste Mal passagiert. Für weitere experimentelle Untersuchungen erfolgte eine Immortalisierung in Passage 5 der isolierten Zementoblasten, PDL-Fibroblasten und alveolären Osteoblasten: In das Genom der Zellen wurde eine aktive Version der humanen Telomerase (hTERT) inseriert, sodass die Zellen über 200 Passagen ohne signifikante Zellwachstumsminderung überstehen konnten. Zur Selektion erfolgreich transfizierter Zellen wurde zudem eine Antibiotikaresistenz gegen Blastizidin eingebracht; auf eine Selektion mittel Fluoreszenz konnte verzichtet werden. Diese Vorbereitung der Zementoblasten wurde von C. Bode (Arbeitsgruppe Miosge, UMG) übernommen, ihr gilt mein ganz besonderer Dank.

3.2 Zellkultur

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

3.2.1 Standardmedium

Für die Zellkultur wurde DMEM als Standardmedium eingesetzt. Um einer bakteriellen Kontamination entgegenzuwirken, wurde 0,1 % Gentamycin zugesetzt. Außerdem wurde das Medium durch 10 % fetales Kälberserum (FCS) ergänzt.

Damit den Zellen immer genügend Nährstoffe zur Verfügung standen, wurde das Medium alle 3-4 d gewechselt. Die Inkubation der Zellen erfolgte in einem Wärmeschrank bei 37 °C sowie 5 % CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 95 % in der Regel in 75 cm²-Flaschen mit 10 ml Medium.

3.2.2 Kultivierung und Ernte

Bei zu großer Zellzahl innerhalb einer Kultur-Flasche entarten die Zellen. Um dies zu verhindern, wurde die Konfluenz regelmäßig unter dem Mikroskop kontrolliert. Bei einer Konfluenz von 80 % wurden die Zellkulturen geteilt: Hierfür wurde zunächst das Kulturmedium verworfen und die Flaschen zweimal mit PBS gespült um mögliche Proteine des Mediums zu entfernen, da diese das zur Ablösung der Zellen vom Flaschenboden verwendete Trypsin inaktivieren würden. Die Trypsinierung der Zellen mit 2 ml Trypsin erfolgte für maximal 3 min

im Wärmeschrank. Zusätzlich wurden noch mechanische Impulse seitlich auf die Flaschen ausgeübt. Nach mikroskopischer Kontrolle wurden die abgelösten, im Trypsin befindlichen Zellen in eine äquivalente Menge Standardmedium gegeben um den Trypsinierungsvorgang zu beenden. Anschließend wurden die Flaschen zweimal mit jeweils 2 ml Medium gespült, um möglichst alle Zellen zu überführen. Nach 10 min Zentrifugation bei 1200 rpm (*revolutions per minute*, bzw Umdrehungen pro Minute) wurde der Trypsin-Medium-Überstand verworfen und das Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert. Mit einem Zellometer wurde die Anzahl der lebenden Zellen optisch und durch statistische Hochrechnung ermittelt, sodass eine entsprechende Zellzahl wieder neu kultiviert oder für Untersuchungen eingesetzt werden konnte. In der Regel wurde ein wöchentlicher Rhythmus für das Trennen voll bewachsener Flaschen angestrebt; dies wurde mit einer neu ausgesäten Zellzahl von 4 x 10⁴ Zellen/ 75 cm²-Flasche bzw. 1 x 10⁴ Zellen/ 25 cm²-Flasche sowohl der Zementoblasten als auch der PDL-Fibroblasten und Osteoblasten erreicht.

3.2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Um während längerer Pausen zwischen den Untersuchungen die Zellen aus der Kultur zu nehmen und somit das Passagieren zu umgehen, wurden Zellen bei -196 °C in flüssigem Stickstoff eingefroren. Für diesen Vorgang mussten die Zellen nach der beschriebenen Zellernte in Einfriermedium (70 % DMEM, 20 % FCS, 10 % DMSO) resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt werden: Pro Kryoröhrchen konnten bis zu 1 x 10⁶ Zellen in 1 ml Einfriermedium eingefroren werden. Durch eine Einfrierbox, die mit 100 % Isopropanol befüllt war, wurde ein langsameres Abkühlen von 1 °C/ 1 min im Kühlschrank bei -82 °C gewährleistet. Nach 24 h konnten die Zellen in den flüssigen Stickstoff bei -196 °C gestellt werden. Bei einem Auftauen der Zellen musste auf einen raschen Temperaturanstieg im Wasserbad bei 37 °C geachtet werden. Anschließend wurden die Zellen mitsamt Einfriermedium in eine Kulturflasche mit 10 ml Standardmedium gegeben. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt, um Zelltrümmer und tote Zellen zu entfernen.

3.3 FACS

Bei der Durchflusszytometrie werden Zellen spezifisch mit fluoreszierenden Antikörpern markiert. Im Analyse-Gerät wird jede Zelle separat an einem Laser vorbeigeleitet; ein gebundener Antikörper emittiert je nach eingesetzter Wellenlänge fluoreszierendes Licht. Die Emission erfolgt abhängig vom eingesetzten Farbstoff. In den vorliegenden Analysen wurde der Farbstoff Phycoerythrin (PE) eingesetzt, der bei 578 nm Wellenlänge sein Emissions-Maximum besitzt (vgl. Tabelle 6); im anschließenden Sorting wurde zusätzlich ein Fluorescein-Isothiocyanate (FITC)-gekoppelter Antikörper verwendet, dessen Emissions-Maximum bei 519 nm liegt, um gleichzeitig zwei verschiedene Marker zu detektieren.

3.3.1 FACS-Analyse

Zur Vorbereitung wurden die Zellen wie beschrieben zunächst geerntet und in einer Konzentration von 1 x 10⁵ bis 2,5 x 10⁵ in 100 µl PBS auf die Analyseröhrchen aufgeteilt. Anschließend wurden 2 µl Blockingreagenz hinzugegeben und für 5 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert, um freie Zelloberflächen abzudecken und unspezifische Antikörperbindungen zu minimieren. Zum Beenden des Blockings wurden jeweils 2 ml PBS zu jeder Probe hinzugegeben und bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 100 µl PBS resuspendiert. Anschließend wurden PE-gekoppelte Antikörper zur Zellsuspension gegeben (vgl. Tabelle 6). Um grundlegend zu untersuchen ob Zementoblasten mesenchymale Stammzelleigenschaften aufweisen, wurden folgende Antikörper eingesetzt: CD73, CD90, CD105, CD146 und CD166. Eine Negativkontrolle (Zellsuspension ohne Antikörper) und ein Iso-Standard (nicht bindende, aber Farbstoff-gekoppelte IgG1- und IgG2a-Antikörper) dienten zur Kalibrierung der Nachweisgrenze. Zwei Kontrollproben mit hämatopoetischen Antikörpern (CD34 und CD45) sollten eine Verunreinigung der Zelllinie und unspezifische Antikörperbindungen ausschließen.

Name	Farb stoff	lsotyp	Her- kunft	Hersteller
CD 73	PE	lgG1 κ	Maus	#550257, BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA
CD 90	PE	lgG1 κ	Maus	#328109, Biozol Diagnostica Vertrieb, Eching, D
CD 105	PE	lgG1 κ	Maus	#323205, Biozol Diagnostica Vertrieb, Eching, D
CD 146	PE	lgG1 κ	Maus	#561013, BD Pharmingen, , Franklin Lakes, USA
CD 166	PE	lgG1 κ	Maus	#560903, BD Pharmingen, , Franklin Lakes, USA
CD 34	PE	lgG1 κ	Maus	#345802, BD Pharmingen, , Franklin Lakes, USA
CD 45	PE	lgG2a к	Maus	#130-080-202, Miltenyi Biotec, Berg. Gladbach, D

Tabelle 6: Verwendete Antikörper in der FACS-Analyse

Die Antikörper wurden in einer Konzentration von 1:50 (2 µl Antikörper in 100 µl Zellsuspension) hinzugeben und für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Ungebundene Antikörper wurden durch die Hinzugabe von 2 ml PBS und anschließende Zentrifugation für 5 min bei 1200 rpm aus der Lösung entfernt. Ein optimales Probenvolumen von 400 µl wurde durch die Resuspension des Zellpellets in einer entsprechenden Menge PBS erreicht. Die FACS-Analyse wurde mit dem Gerät der Abteilung Hämatologie und Onkologie der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführt.

3.3.2 FACS-Sorting

Die Durchflusszytometerie ermöglicht es zudem Zellen nach detektierten Emissionen zu sortieren. Hierbei kann gleichzeitig nach mehreren Antikörpern mit unterschiedlichen Fluoreszenz-Maxima selektiert werden. Außerdem ist es möglich, die gesuchte Population anschließend wieder in Kultur zu bringen und weitere Untersuchungen an dieser durchzuführen.

Basierend auf den Ergebnissen der FACS-Analyse wurde die Zementoblastenpopulation nach CD90- und CD105-positiven und -negativen Zellen sortiert. Die Vorbereitung der Proben erfolgte gemäß dem Protokoll der FACS-Analyse, allerdings ausschließlich unter sterilen Bedingungen. Um gleichzeitig ein Sorting auf doppelt positive und negative Zellen durchführen zu können, wurden unterschiedlich fluoreszierende Antikörper eingesetzt: CD90-Rezeptoren wurden mit dem schon in der FACS-Analyse eingesetzten PE-gekoppelten Antikörper markiert; der CD105-Antikörper war FITC-gekoppelt und fluoreszierte mit einem anderen Emissionsmaximum. In Sortings auf nur einen der beiden Antikörper wurde jedoch auf den PEgekoppelten Antikörper zurückgegriffen (vgl. Tabelle 7). Auf die hämatopoetischen Kontrollen wurde verzichtet, da diese in allen Analyse-Durchgängen negativ waren. Die gesorteten Zellen wurden anschließend in Standardmedium kultiviert, abhängig von der gewonnenen Zellzahl entweder in einer 75 cm²-Flasche (6 x 10⁴ Zellen/ Flasche) oder einer 24-Well Platte. Durchgeführt wurde das FACS-Sorting ebenfalls mit einem Gerät der Abteilung Hämatologie und Onkologie der Universitätsmedizin Göttingen. Um das Ergebnis des Zellsortings zu verifizieren, wurde nach erfolgreicher Kultivierung und Vergrößerung der Zellzahl der CD90und CD105 -positiven und -negativen Zellen eine weitere FACS-Analyse durchgeführt und entsprechende weitere Sorting-Vorgänge angeschlossen.

26
Name	Farbstoff	lsotyp	Herkunft	Hersteller
CD 90	PE	lgG1 κ	Maus	#328109, Biozol Diagnostica Vertrieb, Eching, D
CD 105	FITC	lgG2a κ	Maus	#312403, Biozol Diagnostica Vertrieb, Eching, D
CD 105	PE	lgG1 κ	Maus	#323205, Biozol Diagnostica Vertrieb, Eching, D

Tabelle 7: Verwendete Antikörper im FACS-Sorting

3.4 Spezifischer Nachweis der *messenger* Ribonukleinsäure (mRNA)

Gesteuert durch Transkriptionsfaktoren wird über mRNA die genetische Information vom Zellkern zu den extranukleären Ribosomen transportiert, wo die Proteinbiosynthese stattfindet. Über einen spezifischen Nachweis der mRNA können also Rückschlüsse auf die Expression der codierten Proteine geschlossen werden, sowohl qualitativ als auch quantitativ. Nach einigen vorbereitenden Maßnahmen wie der Isolation der RNA aus den Zellen und der Umschreibung dieser in komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA), wird durch eine Polymerase-Ketten Reaktion (*Polymerase chain reaction*, PCR) die zu untersuchende Sequenz vervielfältigt. Ein Nachweis über eine erfolgreiche Amplifizierung kann entweder quantitativ und in Echtzeit (*real-time*, qRT) mithilfe bestimmter fluoreszierender Farbstoffe oder qualitativ mit einer anschließenden Gelelektrophorese erbracht werden.

3.4.1 Isolation der mRNA

Die Isolation der mRNA erfolgte mithilfe des *peqGOLD Total RNA Kits*: Im ersten Schritt wurden die Zellen durch *RNA Lysis Buffer T* (ein chaotropes Salz) lysiert, um die Nukleinsäuren freizugeben. Um DNA und andere Zellreste aus der Lösung zu entfernen, wurde das Lysat in einem zweiten Schritt auf einer *DNA Removing Column* zentrifugiert (1 min bei 12000 g): DNA bindet an die Matrix der Säule und wurde mit dieser verworfen. Im dritten Schritt wurde die RNA-Lösung weiter aufbereitet; Zellbestandteile wurden durch ein *PerfectBind RNA Column* und Zentrifugation (1 min bei 10000 g) aus der Lösung entfernt: In der Silikamatrix herrschen Hochsalzbedingungen, wodurch die Nukleinsäuren neutralisiert werden und durch hydrophile Wechselwirkungen an diese binden. Die Zugabe von 400 µl 70 % Ethanol verstärkt diese Wirkung noch zusätzlich. Andere Zellbestandteile binden nicht an die Silikamatrix und wurden durch einmaliges Waschen mit 500 µl *RNA Wash Buffer I* und zweimaligem Waschen mit 600 µl

RNA Wash Buffer II entfernt (Zentrifugation jeweils 30 sec bei 10000 g). Im letzten Schritt wurde die DNA von der Silikamatrix getrennt: Durch die Zugabe von 30 µl RNase freiem destillierten Wasser (DEPC-Wasser) werden Niedrigsalzbedingungen hergestellt, wodurch keine hydrophilen Wechselwirkungen mehr stattfinden und die RNA in einem *Safe Lock* 1,5 ml *Eppendorfcup* aufgefangen werden konnte. Die Konzentration der RNA wurde anschließend photometrisch mithilfe des *Nanodrops* bestimmt.

3.4.2 Umschreiben von mRNA in cDNA

Da bei der PCR nur DNA amplifiziert werden kann, musste die isolierte mRNA noch in cDNA umgeschrieben werden. Hierzu wird sich dem Enzym Reverse Transkriptase bedient, das natürlicherweise in Retro-Viren vorkommt. Die Durchführung erfolgte mithilfe des *QuantiTect Reverse Transkription Kits* von Qiagen.

Durch die Zugabe von 2 μ l *genomic DNA wipeout buffer* zu 200 ng DNA in einem Gesamtvolumen von 14 μ l (aufgefüllt durch DEPC- Wasser) und einer Inkubation bei 42 °C für 2 min im Thermomix, wurden letzte DNA-Reste aus der Lösung entfernt. Die Umschreibung der mRNA zu DNA erfolgte durch die Zugabe von 1 μ l unspezifischen Primern, 1 μ l Reverser Transkriptase, 4 μ l Transkriptionspuffer und Inkubation bei 42 °C für 15 min. Durch Erhöhung der Temperatur auf 95 °C für 3 min wurden neusynthetisierter DNA-Strang und RNA-*Template* voneinander getrennt. Die Konzentration der umgeschriebenen cDNA wurde durch die Zugabe von 180 μ l DEPC-Wasser auf 200 ng/ μ l eingestellt, weil davon ausgegangen wird, dass eine Umschreibung im Verhältnis 1 : 1 stattfindet.

3.4.3 PCR

Ziel der PCR ist eine Vervielfältigung bekannter Gensequenzen. Mithilfe der hitzestabilen Taq-Polymerase (isoliert aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*), der Zugabe von zwei Primern, die die zu vervielfältigende Gensequenz begrenzen und Desoxy-Nukleotiden (dNTPs) werden bei optimalem pH-Wert rechnerisch $N_n = N_0 * 2^n$ Kopien erstellt. Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden bereits in früheren Untersuchungen etabliert, sodass kein neues Design mit Überprüfung der *Annealing*-Temperatur nötig war (vgl. Tabelle 8). In der Durchführung wurde zunächst die entsprechende Menge Mastermix, im Wesentlichen aus den beiden Primern, der Taq DNA-Polymerase und dNTPs bestehend, in eine 96-*Well* Platte vorgelegt und die DNA hinzugegeben (vgl. Tabelle 9); bei der qRT-PCR wurde *SYBR Green* eingesetzt, in welchem bereits vom Hersteller die Bestandteile des Mastermix und zusätzlich noch ein an doppelsträngige DNA bindender Farbstoff enthalten war (vgl. Tabelle 10). Bis zur Benutzung war die PCR-Platte mit einer Microseal B Adhesive Folie versiegelt. Für den Vorgang der PCR im Thermocycler wurden die Wells mit Optical Flat Cap Strips verschlossen. Durch bestimmte Temperaturzyklen (vgl. Tabelle 11 und Tabelle 12), gesteuert durch den Thermocycler, wird die Vervielfältigung umgesetzt: Als erstes wird der Doppelstrang der Ausgangs-DNA durch Hitze in seine beiden Einzelstränge zerlegt (denaturiert). Im zweiten Schritt, dem Annealing, lagert sich der Primer spezifisch an die Zielseguenz an: Hierfür wird zunächst in einem Vorversuch die optimale Temperatur zur Anlagerung ermittelt; diese ist für jeden Primer spezifisch, da zu niedrige Temperaturen unspezifische Bindungen des Primers begünstigen. Als dritten und den Zyklus abschließenden Schritt erfolgt die Neusynthese des gewünschten DNA-Abschnitts (Elongation). Durch die zugefügte DNA-Polymerase wird die DNA ausgehend von den Primern in 5' \rightarrow 3'-Richtung synthetisiert. Hierzu wird die Temperatur auf das Temperaturoptimum (72 °C) der Taq-Polymerase erhöht. Je nach Länge der zu vervielfältigenden Sequenz wird das Zeitintervall gewählt, in der Regel 10 sec pro 100 Basenpaare (bp) der Zielsequenz (vgl. Tabelle 11 und Tabelle 12). Diese thermostabile Polymerase ermöglichte erst die Automatisierung der PCR: Vor der Entdeckung der Tag-Polymerase musste nach jeder Denaturierung erneut Enzym hinzugegeben werden, denn durch die hohe Temperatur wurde die Polymerase inaktiviert. Durch mehrfache Wiederholung dieser drei Schritte (Denaturierung - Annealing - Elongation) wird der DNA-Abschnitt mit exponentieller Zunahme vermehrt. Üblich sind etwa 30 Wiederholungen, denn bei mehr Zyklen wird die Synthese unspezifischer PCR-Produkte begünstigt.

-			
Zielgen	Reverse $(5' \rightarrow 3')$	Forward (5' \rightarrow 3')	Annealing-
			Temperatur
hTERT	gacacttcagccgcaagac	ctacggcgacatggagaac	55 °C
Lamin A/ C	ttgctttggggaggagaga	ggtcactggaaagggaga	60 °C
Kollagen Typ I	cgtcatcgcacaacacct	ttcccccagccacaaagagtc	61 °C
Kollagen Typ II	accacgatcacccttgactc	ctcctggagcatctggagac	63 °C
RUNX2	cagcgtcaacaccatcatt	ttccagaccagcagcactc	63 °C
SOX9	ccgttttaaggctcaaggtg	caggctttgcgatttaagga	60 °C
$PPAR\gamma$	cttgtagcaggttgtcttg	cttttggtgactttatgga	57 °C
LPL	ggcagagtgaatgggat	agagccaaaagaagcag	59 °C

Tabelle 8: Sequenz und Annealing-Temperatur der verwendeten PCR-Primer

Substanz	Menge
DEPC-Wasser	32 µl
10x PCR Puffer	2 µl
dNTP (2 mM)	2 µl
Primer forward 10pmol/ µl	2 µl
Primer backward 10pmol/ µl	2 µl
Taq DNA-Polymerase 1 U/ μ l	2 µl
cDNA	2 µl
Totalvolumen	50 µl

Tabelle 10: Mastermix pro Well in der qRT-PCR

Menge	Substanz		
5 µl	SYBR Green		
2 µl	Primer-Mix, bestehend aus:		
	20 μl <i>Forward</i> Primer (100 pmol/ μl)		
	20 μl <i>Reverse</i> Primer (100 pmol/ μl)		
	160 μ l RNAase freies H ₂ O		
2 µl	DEPC-Wasser		
1 µl	cDNA		

Tabelle 11: Temperaturprotokoll der PCR (30 Zyklen)

Schritt	Dauer	Temperatur
Initiale Aktivierung	2 min	95 °C
Denaturierung	15 sec/ Zyklus	95 °C
Annealing	30 sec/ Zyklus	Primer-abhängig
Elongation	60 sec/ Zyklus	72 °C
Finale Elongation	2 min	72 °C

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

Tabelle 12: Temperaturprotokoll der qRT-PCR

Schmelzkurve 1 °C unter Annealing-Temperatur, Resolution 0,2

3.4.4 Überprüfung der PCR-Produkte in der Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte können durch eine Gelelektrophorese sichtbar gemacht werden: Nukleinsäuren sind bei neutralem pH-Wert aufgrund ihres Phosphatrests negativ geladen. Diese Tatsache bewirkt, dass die DNA im elektrischen Feld zur Anode (Pluspol) wandert.

In der Durchführung geschieht das mit einem Gel (Agarose oder Polyacrylamid), das als eine Art Molekularsieb fungiert: Größere Moleküle wandern im elektrischen Feld langsamer voran als kleinere. Auch die Konzentration der eingesetzten Trägersubstanz beeinflusst die Geschwindigkeit und die Feinheit der Auftrennung. In der Regel wird ein 1,5 %-iges Agarose-Gel (0,75 g Agarose auf 50 ml 1x TAE-Puffer) eingesetzt: Durch Kochen wird die Agarose gelöst. Um die DNA im Anschluss an die Auftrennung sichtbar zu machen, wird dem Gel 4 µl *Roti-Safe GelStain* bei einer Temperatur von ca. 60 °C hinzugefügt. Anschließend wird die Suspension in den dafür vorgesehenen Trägerschlitten mit eingehängtem Probenkamm gefüllt und härtet in etwa 20 min aus. Im Verlauf der Elektrophorese verbindet sich der Farbstoff fest mit der DNA und kann im Anschluss unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

Während der elektrischen Trennung (bei 90 V für 45 min) sammeln sich Ketten gleicher Länge in sogenannten Banden. Parallel zu den unbekannten Proben wird auch ein Größenstandard aufgetragen. Durch Vergleich der Position der Banden mit diesem Standard kann das Molekulargewicht der unbekannten Probe ermittelt werden.

Außerdem werden alle aufzutrennenden Proben mit einem Ladungspuffer (12,5 µl 6x Ladepuffer/ 50 µl PCR-Produkt) versetzt. In diesem ist der Farbstoff Bromphenolblau enthalten, wodurch das Befüllen der Geltaschen mit den farblosen Proben erleichtert wird und auch eine Verlaufskontrolle gegeben ist. Oftmals ist noch Saccharose im Ladungspuffer enthalten; dadurch wird die Dichte der Proben erhöht und diese bleiben somit nach Befüllen ohne angelegte Spannung zunächst in der Geltasche und diffundieren nicht in den Laufpuffer.

3.4.5 qRT-PCR

Mit der Methode der qRT-PCR ist es möglich die Expression eines Gens quantitativ in Echtzeit zu bestimmen. Durch die Zugabe des interkalierenden Farbstoffs *SYBR Green*, der sich nach jeder Expressionsphase in entstandene doppelsträngige DNA einlagert, konnte für jeden Zyklus eine Fluoreszenz-Emission gemessen werden. Der Thermocycler ist hierbei auf einen bestimmten Schwellenwert geeicht; ist dieser erreicht, entspricht der PCR-Zyklus dem sogenannten *cycle-threshold*-Wert (ct-Wert). Der ermittelte ct-Wert ist also antiproportional zur eingebrachten cDNA und somit zur isolierten mRNA.

3.4.6 Auswertung der gemessenen Emissionen in der qRT-PCR

Um die Untersuchungsprobe mit der Kontrollprobe vergleichen zu können, müssen die ermittelten ct-Werte zunächst normalisiert werden um Einflussfaktoren, wie zum Beispiel aus der Extraktion und der Umschreibung der RNA, zu vermindern; dafür muss zunächst ein *House-keeping*-Gen ermittelt werden, dessen Expression keiner intrinsischen oder extrinsischen Regulation unterliegt. In einer vorherigen Arbeit wurde bereits *Lamin A/C* als geeignetes *House-keeping*-Gen für Zementoblasten etabliert (Bernhardt 2017). Durch den Vergleich der vom Thermocycler gemessenen Emissionen von Ziel- und *Housekeeping-Gen* kann die relative quantitative Expression des Zielgens ermitttelt werden. Mithilfe der Effizienz-korrigierten $\Delta\Delta$ CT Methode nach Pfaffl (Extensionseffizienz 1,7– 1,9) können nun relative quantitative Unterschiede zwischen behandelter Probe und Kontrollprobe ermittelt werden (Pfaffl 2001): Die Probe wird = 1 gesetzt, sodass eine ermittelte Ratio > 1 einer Hochregulierung des Zielgens entspricht.

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

E: Emission CT: ct-Wert Δ CT = CT Zielgen - CT *Housekeeping*-Gen $\Delta\Delta$ CT= Δ CT Behandlung - Δ CT Kontrolle Ratio: $2^{-\Delta\Delta$ CT

Im Idealfall stimmen die ct-Werte des *Housekeeping*-Gens sowohl in der behandelten als auch in der Kontrollprobe überein, sodass sich der Nenner in der Formel herauskürzt.

3.5 Western Blot

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

3.5.1 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung der in den Zellen enthaltenen Proteine wird sich der Methode der diskontinuierlichen Gelelektrophorese bedient, in der die Proteine im elektrischen Feld nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Hierzu wurde ein zweiphasiges Gel mit einer Sammel- und einer Trenngelphase hergestellt (vgl. Tabelle 13). Trenngel- und Sammelgelpuffer bestehen aus 0,5 M bzw. 1,5 M TRIS-Puffer in *Aqua dest*.; der pH der beiden Puffer von 8,9 bzw. 6,8 wurde mit HCl eingestellt.

Die angesetzten Gele wurden zwischen zwei fixierte Platten, mit einer entsprechenden Gummidichtung dazwischen, gegossen. Das angesetzte Trenngel wurde bis zu einer zuvor angebrachten Markierung 6 cm vom unteren Rand in den Hohlraum zwischen den Glasplatten eingefüllt und während der Polymerisation mit 100% Ethanol überschichtet, sodass eine glatte Abschlusskante entstand. Nach der beendeten Polymerisation wurde das Ethanol wieder abgeschüttet, das Sammelgel bis zur oberen Kante eingefüllt und ein Kamm eingesetzt, um Taschen Auftragen Proben formen. zum der zu Durch das hinzugefügte Ammoniumperoxodisulfat (APS) wurde die Polymerisation der Acrylamid-Monomere beider Gele gestartet.

Die Zusammensetzung der beiden Phasen unterscheidet sich durch die verwendeten Puffer, den eingestellten pH-Werten und die Konzentration des Polyarcrylamids: Im Sammelgel (5 % Polyacrylamid) liegt ein pH von 6,8 vor, sodass das im Elektrodenpuffer enthaltene Glycin neutral vorliegt und die Proben auf eine schmale Bande konzentriert werden. Im Trenngel ist ein pH von 8,8 eingestellt, Glycin liegt negativ geladen vor, wandert schneller zur Anode und hebt somit die Potentialdifferenz auf. Die aufzutrennende Proteinprobe wird deshalb nur nach ihrer Größe aufgetrennt und nicht nach Ladung der einzelnen Aminosäuren.

Die Konzentration der eingesetzten Acrylamid-Monomere, im Trenngel 8 %, bestimmt die Porengrößere und somit die Wanderungsgeschwindigkeit und die Feinheit der Auftrennung der Proteine in der Gelelektrophorese: Größere Proteine (bsp. Kollagene) können besser in Gelen mit niedrigerer Acrylamid-Konzentration nachgewiesen werden.

	Trenngel (8 %)	Sammelgel (5 %), Menge für 2 Gele
Puffer (s.u.)	1,4 ml	1,25 ml
10% SDS	55 μΙ	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl
Acrylamid	1,48 ml	0,8 ml
H ₂ O	2,36 ml	2,7 ml
Gesamtvolumen	5,3 ml	4,8 ml
10% APS	+ 0,25 ml	+ 0,2 ml

Tabelle 13: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel

Die Proteinproben, die auf das Gel aufgetragen wurden, stammten entweder aus kurz zuvor geernteten Zellen oder wurden nach dem Ernten bei -82 °C als Pellet eingefroren und vor der Weiterbehandlung für 10 min bei Raumtemperatur wieder aufgetaut (vgl. 3.2).

Durch die Zugabe von 10 µl dreifach konzentriertem SDS-Probenpuffer (0,5 M TRIS-Puffer, 9 % SDS, 22,5 % Glycerin, einer Spatelspitze Bromphenolblau und mit *Aqua dest.* auf 100 ml aufgefüllt) mit 10 % β -Mercaptoethanol auf 10⁵ Zellen und der Erhitzung auf 95 °C für 5 min wurde die Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur der Proteine aufgelöst, sodass diese sich in ihre Untereinheiten aufspalteten, linear vorlagen und entsprechend ihrer Masse im elektrischen Feld wanderten, da das gleiche Ladung : Masse-Verhältnis hergestellt wurde. Anschließend wurden die Proben auf das vorbereitete SDS-Gel aufgetragen. Das maximale Auftragsvolumen entsprach 30 µl oder 4 x 10⁵ Zellen.

Zur Durchführung der Gelelektrophorese wurden Dichtungsgummi, Klammern und Probenkamm von den vorbereiteten Gelen entfernt. Beim Einsetzen des Gels in die mit 1x Laufpuffer (0,4 M TRIS-Puffer, 0,125 % SDS, 0,725 M Glycin in *Aqua dest.*) befüllte Elektrophoresekammer musste darauf geachtet werden, dass sich keine Luftblasen zwischen Puffer und Gel befanden. Mithilfe von Klammern wurde das Gel an der Kammer befestigt. Anschließend wurden die Proben in die entsprechenden Taschen pipettiert (maximal 25 µl), vorzugsweise wurden die äußeren Taschen freigelassen. Um das Molekulargewicht der aufgetrennten Proteine abschätzen zu können, wurden zusätzlich 4 µl eines entsprechenden Größenmarkers aufgetragen. Da die Proteine entsprechend ihrer Masse durch das zugefügte SDS negativ geladen waren, wandern sie im elektrischen Feld zur Anode. Im Sammelgel wurde eine Stromstärke auf 25 mA pro Gel erhöht. Vor Erreichen des Randes des Trenngels wurde die Elektrophorese beendet.

3.5.2 Übertragung der Proteine auf eine Membran

Die zuvor aufgetrennten Proteine wurden durch die Methode des Western Blots auf einer Membran fixiert. Zunächst wurden alle Komponenten des Blots vorbereitet: Sechs Filterpapiere und eine PVDF-Membran wurden auf die Größe des Trenngels zugeschnitten. Die PVDF-Membran wurde durch 10 sec in 100 % Methanol aktiviert. Für mindestens 15 min mussten die Filterpapiere, die Membran und die benötigten Schwämme vor dem Blot in Transferpuffer, bestehend aus 25 mM TRIS-Puffer, 192 mM Glycin, 20 % Methanol in Aqua dest. und pH auf 8,3 eingestellt, eingelegt werden. Der Zusammenbau der Blotkassette erfolgte in einem mit Transferpuffer gefüllten Behältnis um möglichst keine Luftblasen zwischen den Schichten zu haben: Das gelaufene Polyacrylamidgel wurde dazu auf die aktivierte PVDF-Membran gelegt, jeweils zwischen drei Filterpapiere und einen Schwamm gepackt und in der Blotkassette mit Gummibändern verschlossen; wichtig war, dass das Polyacrylamidgel zur Kathode (schwarz) und die PVDF-Membran zur Anode (rot) zeigte, sodass die Kassette auch in der korrekten Ausrichtung in die Blotkammer gesetzt werden konnte. Durch ein senkrecht zur Blotkasette angelegtes elektrisches Feld (350 mA für 90 min) wurden die Proteine auf die Membran übertragen, da die negativ geladenen Proteine zur Anode gewandert sind und durch hydrophobe und polare Wechselwirkungen auf der Membran fixiert wurden. Durchgeführt wurde dies in einer mit kaltem Transferpuffer gefüllten Kammer mit konstanter Wasserkühlung und Rührvorrichtung.

Als Nachweis für eine erfolgreiche Übertragung der Proteine aus dem SDS-Gel auf die Membran wurde anschließend eine Coomassie-Blau-Färbung durchgeführt. Diese bestand aus 0,1 % Brilliant-Blau R 250, 50 % Methanol und 7 % Essigsäure gelöst in *Aqua dest*.. Zum Färben wurde die Membran für 2 – 10 min in der Färbelösung auf einer Wippe inkubiert. Durch mehrmaliges Entfärben mit der Entfärbelösung wurden die Bereiche ohne gebundenes Protein wieder entfärbt. Für die Entfärbelösung wurden 50 % Methanol und 7 % Essigsäure mit *Aqua dest.* auf 100 ml aufgefüllt. Durch die enthaltene Essigsäure wurden die Proteine auf der Membran fixiert. Zur Dokumentation wurde ein Scan der gefärbten Membranen angefertigt.

3.5.3 Spezifischer Proteinnachweis

Der spezifische Proteinnachweis wird mithilfe von primären und sekundären Antikörpern durchgeführt: Der primäre Antikörper bindet spezifisch an das nachzuweisende Protein, stammt aber aus einer anderen Spezies, zum Beispiel Maus oder Hase. Der sekundäre Antikörper bindet nun spezifisch an die Antikörper der anderen Spezies und ist mit dem Enzym *horseraddish*-Peroxidase (HRP) gekoppelt, welches das vor dem Scanvorgang zugegebene Substrat (WesternBright Sirius) spaltet und so eine chemilumineszente Reaktion auslöst.

In der Durchführung mussten zunächst alle Stellen der Membran ohne gebundenes Probenprotein geblockt werden, sodass die für den spezifischen Proteinnachweis eingesetzten Antikörper nur an den nachzuweisenden Proteinen koppelten. Hierzu wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur in 5 % Milchpulver in *tris-buffered saline and tween 20* (TBS-T), bzw. für den Nachweis des *Housekeeping*-Proteins Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) in 5 % bovinem Serumalbumin (BSA) gelöst in TBS-T für 1 h bei Raumtemperatur geblockt. Anschließend wurde der primäre Antikörper in einer vorher ausgetesteten Verdünnung in Blocklösung auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4 °C auf einer Wippe inkubiert.

Nach der Inkubation wurden nicht gebundene Antikörper durch fünfmaliges 5 min Waschen mit TBS-T von der Membran entfernt. Der sekundäre Antikörper wurde gemäß der Herkunft des Primär-Antikörpers gewählt und nach den Herstellerangaben in Blocklösung verdünnt. Nähere Angaben zu den eingesetzten Antikörpern und die verwendeten Konzentrationen sind den Tabellen zu entnehmen (vgl. Tabelle 14 und Tabelle 15). Inkubiert wurde der sekundäre Antikörper für 1 h auf einer Wippe bei Raumtemperatur. Anschließend mussten wieder nicht gebundene Antikörper entfernt werden, wozu der Blot fünf Mal für 5 min mit TBS-T gewaschen wurde. Der Nachweis erfolgte anschließend durch eine chemilumineszente Reaktion: Die farbigen Banden der Proteinleiter wurden mit einem WesternBright ChemiPen nachgezogen und die rote 70 kDa-Bande besonders markiert; das Substrat Sirius WesternBright, bestehend aus zwei zu vermischenden Komponenten im Verhältnis 1:1, wurde 5 min lichtgeschützt auf dem Blot inkubiert und dort von dem gekoppelten Enzym HRP des sekundären Antikörpers gespalten; die entstehende Lichtreaktion konnte von einem speziellen Lumineszenz-Scanner detektiert werden. Durch den Vergleich der detektierten Banden mit denen des Größenmarkers konnte das Molekulargewicht des gesuchten Proteins abgelesen und mit Literaturwerten überprüft werden.

Mithilfe der Software ImageJ konnte die detektierte Lichtreaktion graphisch ausgewertet werden; durch den Vergleich mit den Ergebnissen des *Housekeeping*-Proteins GAPDH war eine quantitative Auswertung möglich: Um mögliche Intensitätsunterschiede, z.B. durch

unterschiedlich aufgetragene Zellmengen, zu normalisieren, wurde der Quotient aus Zielprotein und *Housekeeping*-Protein gebildet. Die normalisierten Werte der zu untersuchenden Zellen wurden mit denen der Kontrollzellen ins Verhältnis gesetzt, sodass ein relatives Proteinlevel berechnet werden konnte.

Zur Aufbewahrung konnten die Membranen durch ein erneutes Einlegen in Methanol für 15 sec inaktiviert, anschließend 15 min getrocknet und bei -20 °C zwischen zwei Pappen (zum mechanischen Schutz) eingefroren werden. Für weitere Untersuchungen der eingefrorenen Membranen musste diese zunächst aufgetaut und wieder aktiviert werden durch 15 sec Eintauchen in Methanol.

Name	Wirt	Klonalität	Konzen- tration	Protein- größe	Bezeichnung, Hersteller
COL1	Kaninchen	polyklonal	1 : 1000	150 kDa	#R1038, Acris, Herford, D
COL 2	Kaninchen	polyklonal	1 : 1000	200 kDa	#NB100-91715, Novus Biologicals, Littleton, USA
RUNX2	Kaninchen	monoklonal	1 : 1000	70 kDa	#8486, Cell Signaling, Frankfurt, D
SOX9	Kaninchen	polyklonal	1 : 1000	55 kDa	#AP06583PU-N, Acris, Herford, D
GAPDH	Maus	monoklonal	1 : 5000	38 kDa	#ab9484, abcam, Cambridge, GB

Tabelle 14: Verwendete primäre Antikörper für den spezifischen Proteinnachweis beim Western Blot

Name	Wirt	Klonalität	Konzentration	Bezeichnung, Hersteller
Anti-Maus	Ziege	polyklonal	1 : 40000	#A9917, Sigma-Adrich, St. Louis, USA
Anti-Kaninchen	Ziege	polyklonal	1 : 100000	#A0545, Sigma-Adrich, St. Louis, USA

3.6 Statistische Auswertung

3.6.1 qRT-PCR

Insgesamt wurde jeder Versuchsdurchlauf mit drei Ansätzen (Triplets) durchgeführt und drei Mal wiederholt, sodass zu jedem untersuchten Gen jeder Probe drei Mittelwerte aus drei Triplets vorlagen, welche wiederum gemittelt wurden. Die vom Thermocycler ermittelten Daten wurden mit dem Programm Mastercycler ep gradient S realplex 2 ausgewertet und die entsprechenden ct-Werte ermittelt. Die Mittelwerte und die Standardabweichung (SD) wurden aus den nach Pfaffl normalisierten Werten mit Microsoft Excel 2016 berechnet. Im Ergebnisteil dieser Arbeit sind die ermittelten Mittelwerte als Säulendiagramm dargestellt, die Fehlerindikatoren entsprechen hierbei der SD.

Das Signifikanzniveau wurde mit Students Zweistichproben-t-Test (zwei Freiheitsgrade) ermittelt. Ergebnisse wurden eingestuft als signifikant bei einem p-Wert < 0,05, als hoch signifikant bei p < 0,01 und als höchst signifikant bei p < 0,001. Durchgeführt wurde dieser t-Test mit dem Programm Statistica.

3.6.2 Western Blot

Jeder Versuchsdurchlauf wurde mindestens drei Mal unabhängig voneinander durchgeführt, sodass für jedes untersuchte Protein jeder Probe mindestens drei Werte ermittelt wurden; für die graphische Verarbeitung der Western Blots wurde das Programm ImageJ Studio Digits genutzt. Die Mittelwerte und die SD der normalisierten Werte wurden mit Microsoft Excel 2016 berechnet. Im Ergebnissteil dieser Arbeit sind die ermittelten Mittelwerte als Säulendiagramm dargestellt, die Fehlerindikatoren entsprechen hierbei der SD.

Das Signifikanzniveau wurde mit Students Zweistichproben-t-Test (zwei Freiheitsgrade) ermittelt. Ergebnisse wurden eingestuft als signifikant bei einem p-Wert < 0,05, als hoch signifikant bei p < 0,01 und als höchst signifikant bei p < 0,001. Durchgeführt wurde dieser t-Test mit dem Programm Statistica.

3.7 Färbungen

3.7.1 Oil-Red-Färbung

Die *Oil-Red*-Färbung dient zum mikroskopischen Nachweis von intrazellulären Lipiden, die typisch für Adipozyten sind. Für die adipogene Differenzierung wurde zunächst die Zellzahl ermittelt, die in 8 d auf einem Deckgläschen in einer 24-*Well*-Platte wächst. Durch Inkubation mesenchymaler Zellen mit dem nachfolgend beschriebenen adipogenen Medium (vlg. 3.8) entwickeln sich diese zu Adipozyten.

Die Deckgläschen mit differenzierten und undifferenzierten Zellen als Negativkontrolle wurden auf Parafilm gelegt und zunächst zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 1 h bei Raumtemperatur mit 10 % gepuffertem Formalin fixiert. Nach einem Waschgang mit *Aqua dest.* wurde mit *Oil-Red*-Gebrauchslösung für 15 – 30 min bei Raumtemperatur gefärbt. Zum Ansetzen dieser Gebrauchslösung wurde 0,35 g *Oil-Red*-Pulver mit 100 ml 100 % 2-Propanol über Nacht verrührt und anschließend im Verhältnis 3 : 2 mit *Aqua dest.* wieder über Nacht angesetzt und durch einen 0,2 µm-Filter filtriert. Nach diesem Färbegang wurden die Deckgläschen mit destilliertem Wasser gewaschen. Zur Gegenfärbung der Zellkerne wurden diese für 1 – 2 min mit Meyers Hämalaun inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 5 – 10 min mit mehrfach ausgetauschtem Leitungswasser gebläut. Die Proben wurden mit dem wässrigen Eindeckmedium Mowiol eingedeckelt und anschließend unter einem Lichtmikroskop untersucht.

3.7.2 Färbung der Alkalischen Phosphatase

Die Färbung des Enzyms AP wird zum Nachweis einer erfolgreichen osteogenen Differenzierung angewendet, da dieses Enzym typischerweise in Osteoblasten vorkommt. Durchgeführt wurde die Färbung mit dem Kit #86C-1KT von Sigma-Aldrich an osteogen differenzierten Zementoblasten und undifferenzierten Kontrollzellen.

Die zu untersuchenden Zellen mussten auf Deckgläschen in einer 24-*Well*-Platte bis zu einer Konfluenz von 70 – 80 % kultiviert und entsprechend lang differenziert (vgl. 3.8) werden. Wichtig bei der Durchführung war, dass die Färbung im *Well* stattfand, da bei einer Färbung auf Parafilm alle Zellen weggespült wurden. Im ersten Schritt wurde das Deckgläschen im *Well* zweimal mindestens 15 min mit PBS gespült. Die Fixierung der Zellen erfolgte anschließend für 30 sec bei Raumtemperatur durch die Fixierlösung, welche gemäß den Herstellerangaben aus 25 % Citrat-Lösung, 65 % Aceton und 10 % Formaldehyd zuvor angesetzt wurde. Durch

45 sec Waschen mit PBS wurde die Fixierlösung wieder aus dem *Well* entfernt. Anschließend wurden die Zellen durch 3 min Inkubation bei Raumtemperatur mit 20 % Triton X-100 in PBS permeabilisiert, welches danach durch mehrmaliges Waschen mit *Aqua dest.* wieder entfernt wurde. Die Färbung wurde lichtgeschützt bei 37 °C mit dem Alkalifarbstoffgemisch durchgeführt, das ebenfalls zuvor gemäß den Herstellerangaben frisch angesetzt werden musste. Nach erfolgter Inkubation wurde der Farbstoff durch 2 min Waschen mit *Aqua dest.* entfernt. Mit dem kurz vor der Durchführung filtrierten Farbstoff *Neutral Red* wurden AP-negative Zellen gegengefärbt. Zum Schluss folgte noch ein letzter Waschschritt mit Leitungswasser. Erst vor dem Eindeckeln mit Mowiol auf einem Objektträger wurden die Deckgläschen aus dem *Well* genommen. Die Auswertung der Färbung erfolgte an einem Lichtmikroskop.

3.8 Mesenchymale Differenzierung

3.8.1 Adipogene Differenzierung

Die adipogene Differenzierung von Zementoblasten wurde mithilfe eines fertigen Differenzierungsmedium des Herstellers PromoCell durchgeführt. Hierzu wurden für die Untersuchung der adipogenen Marker auf mRNA-Ebene 1 x 10⁴ Zellen in einer 25 cm²-Flasche kultiviert. Für die *Oil-Red*-Färbung wurden 1 x 10³ Zellen in einer 24-*Well*-Platte auf Deckgläschen kultiviert.

Nach einer Anwachsphase von 24 h in 3 ml Standardmedium wurden die Zellen für weitere 7 d in 3 ml adipogenem Differenzierungsmedium inkubiert. Nach 3 – 4 d fand ein Mediumwechsel statt und es wurden tägliche lichtmikroskopische Kontrollen durchgeführt. Die anschließende Ernte der differenzierten Zellen erfolgte nach dem Standardprotokoll (vgl. 3.2). Bis zur weiteren Untersuchung konnten die geernteten Zellpellets bei -82 °C aufbewahrt werden.

3.8.2 Chondrogene Differenzierung

Für die chondrogene Differenzierung wurden die Zementoblasten in Alginatkugeln eingekapselt, um eine dreidimensionale Situation zu schaffen. Für eine 1,2 % Alginatlösung wurde 0,12 g Alginat in 10 ml einer 0,15 M NaCI-Lösung im Wasserbad für 1 – 2 h bei 37 °C gelöst und durch einen 0,2 µm Sterilfilter filtriert. Nach dem Ernten der Zellen, der photometrischen Zählung und einem erneuten Zentrifugationsdurchgang (10 min bei 300 g) wurde das Pellet in einer entsprechenden Menge Alginatlösung

(5 x 10⁴/20 µl Alginatkugelvolumen) resuspendiert. Anschließend wurden jeweils 20 µl der Suspension mithilfe einer Pipette und einer unter sterilen Bedingungen etwa 4 mm gekürzten Pipettenspitze in ein Well einer 6-Well-Platte mit 3 ml CaCl₂x2H₂O-Lösung (147,02 g/mol) pipettiert. Es wurde eine möglichst runde Morphologie der Kugeln angestrebt, da diese Formation das geringste Oberflächen-Volumen-Verhältnis aufweist. Anschließend wurden die erzeugten dreidimensionalen Alginat-Kulturen in bereits beschriebenem Standardmedium 24 h 1,5 ml Standardmedium 1,5 ml gespült und in und chondrogenem Differenzierungsmedium inkubiert. Erst nach dieser Anwachsphase erfolgte die chondrogene Differenzierung für 28 d in 3 ml chondrogenem Medium bei einem Wechsel alle 3 – 4 d. Für eine anschließende Untersuchung mussten die Alginatkulturen nach erfolgter Differenzierung wieder lysiert werden. Hierfür wurden die Alginatkugeln in ein 15 ml-Falkonröhrchen überführt und mit 0,5 – 1 ml HEPES-EDTA-Puffer (Lyse-Puffer) versetzt und leicht geschwenkt, bis makroskopisch alle Kugeln gelöst waren. Der Lyse-Puffer bestand aus 55 mM EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) und 10 mM HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure) bei einem pH-Wert von 7,4 und wurde mit einem 0,2 µm Sterilfilter filtriert. Durch eine Zentrifugation bei 300 g für 10 min wurden die zellulären Bestandteile von der flüssigen Phase getrennt. Für eine Zellzählung wurde das Pellet in einem definierten Volumen PBS resuspendiert und entsprechend der bereits beschriebenen Methodik verfahren (vlg. 3.2). Bis zu einer Weiterverarbeitung konnten das Zellpellet und das in HEPES-Puffer gelöste Alginat mit extrazellulären Proteinen getrennt voneinander bei -82 °C eingefroren werden.

Das chondrogene Differenzierungsmedium wurde bereits hinreichend beschrieben, die Herstellung erfolgte nach bekannten Protokollen. Mit den Zusätzen von Dexamethoson, Pyruvat, L-Prolin und Ascorbat zum Standardmedium war das Medium sechs Wochen haltbar; ITS musste immer frisch kurz vor Verwendung zugesetzt werden (Colter et al. 2001; Sekiya et al. 2002).

Konzentration	Substanz		
Standardmedium mit	Standardmedium mit		
0,1 µM	Dextamethason		
1 mM	Na-Pyruvat		
0,35 mM	L-Prolin		
0,28 mM	Ascorbat		
+ 5 µl/ ml	ITS		

Tabelle 16: Zusammen	setzuna des c	bondrogenen D)ifferenzierung	Ismediums
	Solzung dos o	nonalogenen E	morenzierung	Sinculums

3.8.3 Osteogene Differenzierung

Für die osteogene Differenzierung wurden zum einen 3 x 10⁴ Zellen in einer 75 cm²-Flasche kultiviert. Zum anderen wurden 1 x 10³ Zellen in einer 24-*Well*-Platte auf Deckgläschen für eine anschließende AP-Färbung kultiviert. Nach einer Anwachsphase von 24 h wurde das Medium durch das selbstangesetzte Differenzierungsmedium (Eijken et al. 2005; Roberts et al. 2011) getauscht (vgl. Tabelle 17). Ein Mediumwechsel wurde parallel zu der undifferenzierten Kontrolle im Dreitagesrhythmus durchgeführt. Die Ernte der Zellen für die PCR- und Western Blot-Untersuchung erfolgte nach einer Woche bei einer Konfluenz von 80 %. Bis zur weiteren Untersuchung konnten die Zellproben bei -82 °C als Zellpellet aufbewahrt werden (vgl. 3.2). Die auf den Deckgläschen gewachsenen Zellen mussten direkt nach Abschluss der Differenzierung cytochemisch untersucht werden.

Konzentration	Substanz
Standardmedium mit	
10 mM	Glycerol-2-Phosphat
10 µM	2-Phospho-L-Ascorbat
50 nM	Vitamin D ₃
10 nM	Dexamethason

Tabelle 17: Zusammensetzung des osteogenen Differenzierungsmediums

3.9 Co-Kultur

Zum Ansatz der Co-Kultur mit PDL-Fibroblasten wurde zunächst die Zellzahl ermittelt, die innerhalb von 8 d bis zur maximalen Konfluenz von 80 % in einer 6-Well-Platte heranwächst. Die ermittelte Zellzahl (2 x 10³ Zellen) der zu untersuchenden Zementoblasten wurde zusammen mit 2 ml Standardmedium in das Well gegeben, bevor der Einsatz mit einer separierenden Membran (ThinCert® 0,4 µm) eingehangen wurde. In diesen Einsatz wurde dann ebenfalls 2 x 10³ PDL-Zellen mit 2 ml Standardmedium pipettiert. Über die Membran standen die Zellarten im metabolischen Austausch, konnten jedoch nicht in das andere Kompartiment übertreten. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt: Ein Teil der Zellen wurde weiter mit Standardmedium versorgt, ein anderer Teil erhielt osteogenes Differenzierungsmedium. Beide Versuchsansätze wurden für eine Woche ohne weiteren Mediumwechsel inkubiert.

4 Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Untersuchungen an humanen immortalisierten Zementoblasten vorgestellt. Zunächst erfolgte eine FACS-Analyse auf mesenchymale Oberflächenantigene und anschließend ein Zellsorting auf CD90- und CD105-positive und - negative Zellen. Da lediglich eine Isolierung von CD90- und CD105-positiven Zellen möglich war, konnten nur diese Zellen weiter charakterisiert werden.

Um den mesenchymalen Progenitorcharakter zu belegen, wurden die Zellen chondrogen, adipogen und osteogen differenziert und entsprechende Marker mithilfe von qRT-PCR, Western Blot und zytologischen Färbungen überprüft.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden Zementoblasten mit PDL-Zellen in Co-Kultur und somit in metabolischen Austausch gebracht; durch Untersuchung der osteogenen und chondrogenen Marker zeigte sich ein osteogener Einfluss der PDL-Fibroblasten auf die Zementoblasten. Anschließend wurde zum weiteren Vergleich eine zusätzliche osteogene Differenzierung der PDL-Co-Kultur durchgeführt.

Alle Untersuchungen wurden mindestens dreimal unabhängig voneinander wiederholt: Bei Western Blots wurden mindestens drei Werte aufgenommen, qRT-PCR-Ergebnisse beruhen auf drei Mittelwerten aus drei Triplets. Auch die zytologischen Färbungen wurden mindestens dreimal durchgeführt, wobei jeweils ein repräsentatives Bild abgebildet wurde.

4.1 Ausgangszellen: immortalisierte Zementoblasten

Primäre Zementoblasten wurden nach der mechanischen Entfernung des PDLs von der Wurzeloberfläche extrahierter Zähne abgetragen. Nach Kultivierung und Expansion wurde eine Immortalisierung durch Transfektion mit einer aktiven Form des hTERT-Gens durchgeführt: Das Genprodukt verlängert die Telomerregion der Zelle, sodass die Zellen 200 Passagen ohne Wachstumsminderung überstehen können. Der Nachweis über eine erfolgreiche Immortalisierung der Zellen wurde über eine PCR der in cDNA umgeschriebenen mRNA aus immortalisierten Zementoblasten (iZ) und anschließender Gelektrophorese des PCR-Produkts geführt: Das amplifizierte hTERT-Gen war 400 bp groß und als Bande im Vergleich mit dem Größenstandard unter UV-Licht zu erkennen; in der Negativkontrolle mit primären Zementoblasten (pZ) konnte keine mRNA des hTERT-Gens nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 2). Alle weiteren Untersuchungen wurden an diesen nachweislich immortalisierten Zementoblasten vorgenommen, sodass die Immortalisierung nicht mehr explizit erwähnt wird.



Abbildung 2: Nachweis der erfolgreichen Immortalisierung von Zementoblasten. Gelelektrophorese des PCR-Produkts hTERT zum Nachweis der erfolgreichen Immortalisierung von Zementoblasten. Links ist ein Größenmarker (M) aufgetragen, daneben die Negativkontrolle mit primären Zementoblasten (pZ); die rechte Probe mit immortalisierten Zemenoblasten (iZ) zeigt ein 400 bp großes Amplifikationsprodukt, das der hTERT-mRNA entspricht.

4.2 Analyse und Sorting auf mesenchymale Oberflächenmarker

In der Analyse der mesenchymalen CD-Marker CD72, CD90, CD105, CD146 und CD166 von Zementoblasten wurden direkt PE-gekoppelte Antikörper eingesetzt (vgl. Tabelle 6). Da das anschließende Sorting der Zementoblasten simultan auf zwei Marker erfolgen sollte, musste hierbei einer der Antikörper mit einem Fluoreszenz-Farbstoff mit anderem Emissions-Maximum gewählt werden; in diesem Fall wurde auf den FITC-markierten CD105-Antikörper zurückgegriffen (vgl. Tabelle 7). Ein Sorting auf drei der analysierten CD-Marker konnte auf Grund der Fehleranfälligkeit und aus Effizienzgründen nicht umgesetzt werden. Die Vorbehandlung der Zellen auf das FACS-Sorting unterschied sich von der auf die FACS-Analyse nur durch sterile Maßnahmen, wie verschließbare FACS-Röhrchen und Arbeiten unter der Sterilbank, die für eine anschließende Kultivierung nötig waren. Während der Durchführung im FACS-Automaten musste darauf geachtet werden, dass die Zellen nicht aggregierten; vor allen Versuchen wurde die Zellsuspensionen deshalb durch kurzes Vortexen homogenisiert. Zudem wurden die Einstellungen am FACS so gewählt, dass ausschließlich einzelne vitale Zellen in die Auswertung eingingen, auch als gate, bzw. P1 bezeichnet (vgl. Abbildung 4 und Abbildung 6).

4.2.1 FACS-Analyse

Die Zementoblasten wiesen alle untersuchten mesenchymalen Progenitormarker auf (vgl. Abbildung 3). Die Mittelwerte der positiven Zementoblasten für mesenchymale Stammzellmarker nahmen folgende Werte an:

CD-Marker	Expression	SD
CD73	46,83 %	13,062
CD90	99,97%	0,058
CD105	75,43 %	19,581
CD146	11,63 %	3,661
CD166	65,27 %	31,510

Tabelle 18: Expression und SD der untersuchten CD-Marker auf Zementoblasten

Insgesamt wurde die Versuchsreihe dreimal unabhängig voneinander wiederholt. Die Konfluenz der Zellen war vor jedem Versuch bei etwa 80%. Zusätzlich wurden eine ISO-Kontrolle und eine Negativkontrolle ohne Antikörper zur Kalibration mitgeführt. Die hämatopoetischen Kontrollen mit CD34 und CD45 waren negativ, sodass eine Kontamination der Kultur mit Zellen des Bluts ausgeschlossen werden konnte.



Abbildung 3: FACS-Analyse von Zementoblasten auf mesenchymale CD-Marker. Zementoblasten sind positiv für CD73 (47 %), CD90 (99 %), CD105 (75 %), CD146 (12 %) und CD166 (65 %) und negativ für die hämatopoetischen Kontrollen CD34 und CD45. In der Abbildung sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchsreihen dargestellt, die Fehlerbalken geben die SD wieder. Die Kalibration wurde durch eine ISO- und eine Negativkontrolle ohne Antikörper vorgenommen.

4.2.2 FACS-Sorting

Um hinsichtlich der mesenchymalen CD-Marker eine homogene Zellpopulation zu erhalten, wurde ein Zellsorting auf CD90- und CD105-positive Zellen durchgeführt; die Auswahl fiel auf diese beiden CD-Marker, da diese am stärksten von den Zementoblasten exprimiert wurden und zunächst zu befürchten war, dass eine zu geringe Zellzahl für eine anschließende Kultivierung das Sorting überstehen würde. Außerdem war eine weitere Schwierigkeit in der Durchführung die Auswahl der Farbstoffe, sodass ein Sorting auf drei Marker im Rahmen dieser Arbeit nicht umsetzbar war. Anders als zuvor vermutet, haben die Zementoblasten den Vorgang des Sortings gut toleriert. Die durch das Sorting erhaltene Population wurde expandiert und das Ergebnis mit einer weiteren FACS-Analyse kontrolliert (vgl. Abbildung 4).



Abbildung 4: FACS-Kontrolle des Sortings auf CD90- und CD105-positive Zementoblasten, Seitenstreulicht (SSC).

A: Kontrolle nach 1. Sorting auf CD90- und CD105-positive Zellen, CD90 ist mit PE markiert (Q1 + Q2 = 99 %), CD105 ist mit FITC markiert (Q2 = 69,5 %).

B: Kontrolle nach 2. Sorting auf CD105 positive Zellen mit PE-gekoppeltem Antikörper (Q4 = 99,9 %).

Nach dem ersten Sorting-Durchlauf auf CD90- und CD105-positive Zementoblaten waren etwa 99 % der Zellen positiv für CD90 und 69,5 % positiv für CD105. Ein weiteres Sorting auf CD105-positive Zellen wurde angeschlossen, sodass eine Population, die zu 99,9 % positiv für CD105 war, isoliert werden konnte (vgl. Abbildung 4).

Zum Vergleich der Auswirkung von CD90 und CD105 auf die im weiteren Verlauf der Arbeit untersuchten mesenchymalen Progenitoreigenschaften von Zementoblasten, wurde ein Sorting auf CD90- und CD105-negative Zellen durchgeführt. Nach drei hintereinander geschalteten Durchläufen betrug jedoch der relative Anteil an doppelt negativen Zellen (3x CD90-/ 3x CD105-) < 0,1 %; die absolute Zellzahl lag nach dem dritten Sorting bei 537; in der anschließenden Kultivierung wurden nach zwei Wochen keine adhärenten Zellen beobachtet, sodass die Untersuchung als nicht erfolgreich eingestuft wurde. Der Anteil nur CD90-negativer Zellen (3x CD90- aus 2x CD90-/ 2x CD105-) lag bei < 0,1 % und der nur CD105-negativen Zellen (3x CD105- aus 2x CD90-/ 2x CD105-) bei 12,3 % (vgl. Abbildung 5 und Abbildung 6). Eine anschließende Kultivierung war bei beiden Populationen möglich.



Abbildung 5: Stammbaum der durchgeführten FACS-Sortings auf CD90- und CD105-positive und einfach und doppelt CD90- und CD105-negative Zementoblasten.





- A: 3. Sorting aus 2x CD90-/ 2x CD105-, CD90 mit PE- und CD105 mit FITC-Antikörper markiert (Q1 = 3x CD105- = 12,3 %; Q4 = 3x CD90- = < 0,1 %; Q3 = 3x CD90-/ 3x CD105- = < 0,1 %).
- B: 2. Sorting aus 1x CD90-, CD90 PE-markiert (Q3 + Q4 = 2x CD90- aus 1x CD90- = 0,7 %).
- C: 2. Sorting aus 1x CD105-, CD105 PE-markiert (Q3 + Q4 = 2x CD105- = 35,1 %).

Zweimal CD90- und CD105-negativ gesortete Zellen sind bereits nach zwei Wochen Kultivierung wieder zu einem großen Anteil positiv für die entsprechenden Antikörper: Eine stabil negative Population auf einen oder beide der untersuchten CD-Marker war nicht zu isolieren. Alle weiteren Untersuchungen wurden an CD90- und CD105- positiven Zementoblasten durchgeführt, die in folgenden Abbildungen als Z bezeichnet werden.

4.3 Morphologie der gesorteten Zementoblasten

Lichtmikroskopische Bilder der CD90- und CD105-positiven Zellpopulation, die für alle weiteren Untersuchungen genutzt wurde, sind folgend dargestellt (vgl. Abbildung 7).



Abbildung 7: Morphologie der gesorteten Zementoblasten (CD90+/2x CD105+) in unterschiedlichen Vergrößerungen.

Die gewonnene CD90- und CD105-positive Zellpopulation wurde anschließend einer adipogenen, chondrogenen und osteogenen Differenzierung und einer Co-Kultivierung mit PDL-Fi-broblasten mit zusätzlicher osteogener Differenzierung unterzogen. Bilder von behandelten Zementoblasten sind den entsprechenden Unterkapiteln zu entnehmen. Da keine CD90- und CD105-negativen Zellen isoliert werden konnten und alle Untersuchungen nur an den CD90- und CD105-positiv gesorteten Zellen vorgenommen wurden, wird im Folgenden auf den Zusatz "1x CD90+/ 2x CD105+" verzichtet, wie dies bereits mit dem Zusatz "immortalisiert" geschehen ist.

4.4 Adipogene Differenzierung

Die adipogene Differenzierung wurde am zweiten Tag nach dem Passagieren der Zellen für 7 d und einem Mediumwechsel nach 3 d mit adipogenem Differenzierungsmedium durchgeführt. Neben der Funktion als Baufett, wie zum Beispiel bei der Ausbildung des Nierenlagers, ist die Hauptaufgabe von Adipozyten die Speicherung von Energie. Durch Einlagerung von Di- und Triglyceriden in Lipidvakuolen im Zytoplasma, werden in Adipozyten Moleküle gespeichert, die in Energie umsetzbar sind.

4.4.1 Morphologie nach adipogener Differenzierung

Die lichtmikroskopischen Aufnahmen wurden kurz vor der Ernte bei einer Konfluenz von 80 % am siebten Tag der Differenzierung vorgenommen. Schon lichtmikroskopisch sind in den ungefärbten Zellen Fettvakuolen zu erkennen; außerdem hat sich die Morphologie der Zellen von fibroblastenähnlich zu einer mehr polygonalen Form verändert, sodass auch die zweidimen-sionale Fläche zugenommen hat (vgl. Abbildung 8).



Abbildung 8: Morphologie der Zementoblasten nach adipogener Differenzierung für 7 d in unterschiedlichen Vergrößerungen.

4.4.2 Oil-Red-Färbung

Im Zytoplasma der mit *Oil-Red*-gefärbten Zementoblasten sind in den adipogen differenzierten Zementoblasten deutlich kleine rot angefärbte Lipidvakuolen zu erkennen; in den undifferenzierten, zur Kontrolle mitgeführten Zementoblasten fehlen diese rotgefärbten Bereiche. Das Zytoplasma erscheint sowohl bei den mit adipogenem Differenzierungsmedium behandelten als auch bei den unbehandelten Zementoblasten durch eine Gegenfärbung mit Meyers Hämalaun gräulich (vgl. Abbildung 9).



Abbildung 9: *Oil-Red*-Färbung an adipogen differenzierten Zementoblasten und undifferenzierten Kontroll-Zementoblasten. Die undifferenzierten Zementoblasten (A und B) und die adipogen differenzierten Zementoblasten (C und D) sind in unterschiedlichen Vergrößerungen abgebildet.

4.4.3 Nachweis bestimmter mRNA

Die qRT-PCR wurde mit adipogen differenzierten (Z adi) und undifferenzierten Zellen (Z) zum Vergleich auf die adipogenen Marker $PPAR\gamma$ und LPL durchgeführt. Als *House-keeping*-Gen zur Normalisierung der eingesetzten cDNA-Mengen wurde *Lamin A/C* herangezogen. $PPAR\gamma$ veränderte sich durch die adipogene Differenzierung nicht; LPL wurde signifikant (p-Wert < 0,05) auf 1,95 hochreguliert, die SD lag bei 0,34 (vgl. Abbildung 10).



Abbildung 10: qRT-PCR adipogener Marker mit adipogen differenzierten Zementoblasten. Die Expression von $PPAR\gamma$ blieb unverändert (p-Wert > 0,05 (nicht signifikant (ns)), die Expression von *LPL* stieg signifikant mit einem p-Wert < 0,05 (*) an. Insgesamt wurden in drei unabhängigen Versuchsdurchläufen jeweils drei Werte (n = 3) aufgenommen.

4.5 Chondrogene Differenzierung

Für eine chondrogene Differenzierung wurden die Zementoblasten in Alginatkugeln eingebracht. Beim Ansetzen der Kultur wurden etwa 7×10^6 Zellen eingesetzt; nach einem Differenzierungszeitraum von 28 d war die Zellzahl mit 5,5 x 10⁶ Zellen niedriger, was unter anderem durch Unvorsichtigkeiten beim Mediumwechsel zu erklären ist.

4.5.1 Morphologie nach chondrogener Differenzierung

Die Alginatkultur wurde täglich lichtmikroskopisch kontrolliert. Hierbei wurde zunächst auf die Form der Alginatkugeln geachtet, ob diese weiterhin rund und glatt waren, wie dies in Abbildung 11 zu sehen ist. Des Weiteren wurde auf den Boden der verwendeten 6-*Well*-Platte geachtet und die Alginatkugeln in eine neue Platte umgesetzt, falls die Zahl der ausgewanderten Zellen aus den Randbereichen der Alginatkugeln zu groß wurde.

In der Aufnahme sind im Randbereich eingekapselte Zellen mit sphärischer Morphologie zu erkennen: Zentral ist ein dunkles Konglomerat mit einer hell wirkenden Peripherie auszumachen. Weiter mittig der Alginatkugel wurde die Schärfeebene nicht getroffen, sodass dort keine Zellen mit dem beschriebenen Aussehen zu erkennen sind.



Abbildung 11: Teilausschnitt einer Alginatkugel mit Zementoblasten nach 28 d chondrogener Differenzierung. Im Randbereich sind eingekapselte Zellen mit dunklem Zentrum und heller Peripherie zu erkennen.

4.5.2 Protein- und mRNA-Nachweis

4.5.2.1 Kollagen Typ I-Expression nach chondrogener Differenzierung

Durch die chondrogene Differenzierung sank die Expression von Kollagen Typ I sowohl auf mRNA-Ebene (qRT-PCR) als auch auf Protein-Ebene (Western Blot): Im Vergleich zu unbehandelten Zementoblasten war 60 % weniger Kollagen Typ I in chondrogen differenzierten Zementoblasten (Abbildung 12 A bis C) nachweisbar (SD 0,028); der Unterschied war höchst signifikant (p < 0,001). Im Western Blot wurden zusätzlich Osteoblasten als Positiv-Kontrolle mitgeführt, welche im Vergleich zu undifferenzierten Zementoblasten signifikant 15 % mehr Kollagen Typ I aufwiesen (SD 0,017), sodass die spezifische Bindung des Antikörpers bestätigt wurde. Der Western Blot wurde drei Mal wiederholt mit Zellen aus drei getrennt durchgeführten Differenzierungen.

Auch die Auswertung der qRT-PCR (Abbildung 12 D) zeigte einen starken Rückgang der Kollagen Typ I-Expression in chondrogen differenzierten im Vergleich zu den unbehandelten Zementoblasten auf < 0,001 %, bei einer SD < 0,001; der Unterschied war höchst signifikant (p < 0,001). Die Auswertung umfasste drei Werte aus drei unabhängig voneinander durchgeführten qRT-PCR-Durchläufen.



Abbildung 12: Kollagen Typ I in chondrogen differenzierten Zementoblasten und Osteoblasten im Verhältnis zu undifferenzierten Zementoblasten. A: Coomassie-Färbung der Protein-Gelelektrophorese. B: Antikörpermarkierte Proteinbanden Kollagen Typ I (COL1) bei 150 kDa und GAPDH bei 38 kDa. C: statistische Auswertung des Western Blots mit GAPDH als Ladungskontrolle. D: statistische Auswertung der qRT-PCR mit Lamin A/ C als Ladungskontrolle; für die quantitative Auswertung wurden die chondrogen differenzierten Zementoblasten (Z chon) und Osteoblasten (O) mit den unbehandelten Zementoblasten (Z) ins Verhältnis gesetzt, sodass die dargestellten Werte ein Vielfaches der Werte dieser Kontrollprobe sind. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus jeweils drei getrennten Experimenten (Western Blot n = 3, qRT-PCR: n = 3); die SD sind durch die Fehlerindikatoren dargestellt; Signifikanz: p-Wert < 0,01 (**), < 0,001 (***).

4.5.2.2 Kollagen Typ II-Expression nach chondrogener Differenzierung

Durch die chondrogene Differenzierung stieg die Expression von Kollagen Typ II, sowohl auf mRNA-Ebene (qRT-PCR) als auch auf Protein-Ebene (Western Blot) stark an: Im Vergleich zu unbehandelten Zementoblasten war das Protein-Level von Kollagen Typ II (Abbildung 13 A bis C) in chondrogen differenzierten Zementoblasten auf das 25-fache gestiegen (SD 9,3); der Unterschied war signifikant (p < 0,05). Bei den im Western Blot zusätzlich mitgeführten Osteoblasten konnte kein Kollagen Typ II-Protein nachgewiesen werden. Der Western Blot wurde drei Mal wiederholt mit Zellen aus drei getrennt durchgeführten Differenzierungen.

Die Auswertung der qRT-PCR (Abbildung 13 D) zeigte eine Steigerung der *Kollagen Typ II*-Expression in den chondrogen differenzierten im Vergleich zu den unbehandelten Zementoblasten im Mittel auf das 3,8-fache, bei einer SD von 3,76; die Werte geben einen Hinweis auf eine gesteigerte Kollagen Typ II-Expression, sind aufgrund der hohen Streuung jedoch nicht signifikant (p-Wert > 0,05). Die Auswertung umfasste drei Werte aus drei unabhängig voneinander durchgeführten qRT-PCR-Durchläufen.



Abbildung 13: Kollagen Typ II in chondrogen differenzierten Zementoblasten und Osteoblasten im Verhältnis zu undifferenzierten Zementoblasten. A: Coomassie-Färbung der Protein-Gelelektrophorese. B: Antikörpermarkierte Proteinbanden Kollagen Typ II (COL2) bei 200 kDa und GAPDH bei 38 kDa. C: statistische Auswertung des Western Blots mit GAPDH als Ladungskontrolle. D: statistische Auswertung der qRT-PCR mit *Lamin A/ C* als Ladungskontrolle; für die quantitative Auswertung wurden die chondrogen differenzierten Zementoblasten (Z chon) und Osteoblasten (O) mit den unbehandelten Zementoblasten (Z) ins Verhältnis gesetzt, sodass die dargestellten Werte ein Vielfaches der Werte dieser Kontrollprobe sind. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus jeweils drei getrennten Experimenten (Western Blot: n = 3, qRT-PCR: n = 3); die SD sind durch die Fehlerindikatoren dargestellt; Signifikanz: p-Wert < 0,05 (*), > 0,05 (ns).

4.5.2.3 RUNX2-Expression nach chondrogener Differenzierung

Die Expression von RUNX2 auf Proteinebene (Abbildung 14 A bis C) war in chondrogen differenzierten Zementoblasten stark reduziert: Im Vergleich zu unbehandelten Zementoblasten lag das RUNX2-Level bei 21 % (SD 0,19); der Unterschied war signifikant (p < 0,05). Im Western Blot wurden zusätzlich Osteoblasten als Positiv-Kontrolle mitgeführt, welche im Vergleich zu undifferenzierten Zementoblasten das 4-fache an RUNX2 aufwiesen (SD 1,27), sodass die spezifische Bindung des Antikörpers bestätigt wurde. Der Western Blot wurde drei Mal mit unabhängig voneinander chondrogen differenzierten Zementoblasten bzw. vier Mal mit Osteoblasten wiederholt.

Die Auswertung der qRT-PCR (Abbildung 14 D) zeigte einen Rückgang der *RUNX2*-Expression in den chondrogen differenzierten Zementoblasten im Vergleich zu den unbehandelten Zementoblasten auf 7 %, bei einer SD von 0,07; der Unterschied war hoch signifikant (p < 0,01). In die Auswertung wurden drei Werte aus drei unabhängig voneinander durchgeführten qRT-PCR-Durchläufen aufgenommen.



Abbildung 14: RUNX2 in chondrogen differenzierten Zementoblasten und Osteoblasten im Verhältnis zu undifferenzierten Zementoblasten. A: Coomassie-Färbung der Protein-Gelelektrophorese. B: Antikörpermarkierte Proteinbanden RUNX2 (70 kDa) und GAPDH (38 kDa). C: statistische Auswertung des Western Blots mit GAPDH als Ladungskontrolle. D: statistische Auswertung der qRT-PCR mit *Lamin A/ C* als Ladungskontrolle; für die quantitative Auswertung wurden die chondrogen differenzierten Zementoblasten (Z chon) und Osteoblasten (O) mit den unbehandelten Zementoblasten (Z) ins Verhältnis gesetzt, sodass die dargestellten Werte ein Vielfaches der Werte dieser Kontrollprobe sind. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus jeweils drei bzw. vier getrennten Experimenten (Western Blot Z chon: n = 3, Western Blot O: n = 4, qRT-PCR: n = 3); die SD sind durch die Fehlerindikatoren dargestellt; Signifikanz: p-Wert < 0,05 (*), < 0,01 (**).

4.5.2.4 SOX9-Expression nach chondrogener Differenzierung

Die Ergebnisse von Western Blot und qRT-PCR für SOX9 in chondrogen differenzierten Zementoblasten unterschieden sich: Auf Proteinebene konnte ein Anstieg von SOX9 gezeigt werden, in der qRT-PCR war allerdings fast kein SOX9 nachweisbar. Die Expression von SOX9 auf Proteinebene (Abbildung 15 A bis C) war in chondrogen differenzierten Zementoblasten auf das 1,46-fache (SD 0,23) angestiegen, der Unterschied war signifikant (p < 0,05). Im Western Blot wurden zusätzlich Osteoblasten als Kontrolle mitgeführt, welche 69 % des SOX9-Gehalts von undifferenzierten Zementoblasten aus vier bzw. mit Osteoblasten aus drei getrennt durchgeführten Differenzierten Zementoblasten durch die qRT-PCR nicht oder nur in sehr geringen Mengen im Vergleich zu undifferenzierten Zementoblasten nachweisbar (0,001 %); bei einer SD < 0,0012 war der Unterschied höchst signifikant (p < 0,001). Die Auswertung umfasste drei Werte aus drei unabhängig voneinander durchgeführten qRT-PCR-Durchläufen.



Abbildung 15: SOX9 in chondrogen differenzierten Zementoblasten und Osteoblasten im Verhältnis zu undifferenzierten Zementoblasten. A: Coomassie-Färbung der Protein-Gelelektrophorese. B: Antikörpermarkierte Proteinbanden SOX9 (55 kDa) und GAPDH (38 kDa). C: statistische Auswertung des Western Blots mit GAPDH als Ladungskontrolle. D: statistische Auswertung der qRT-PCR mit *Lamin A/C* als Ladungskontrolle; für die quantitative Auswertung wurden die chondrogen differenzierten Zementoblasten (Z chon) und Osteoblasten (O) mit den unbehandelten Zementoblasten (Z) ins Verhältnis gesetzt, sodass die dargestellten Werte ein Vielfaches der Werte dieser Kontrollprobe sind. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus jeweils drei getrennten Versuchen (Western Blot Z chon: n = 4, Western Blot O: n = 3, qRT-PCR: n = 3); die SD sind durch die Fehlerindikatoren dargestellt; Signifikanz: p < 0,05 (*), < 0,001 (***).

4.6 Osteogene Differenzierung

Die osteogene Differenzierung wurde in allen Untersuchungen durch Inkubation der Zellen für eine Woche in osteogenem Differenzierungsmedium durchgeführt.

Auffällig war, dass in allen durchgeführten osteogenen Differenzierungen die Zellen nach dem Inkubationszeitraum deutlich schlechter vom Kulturbehältnis durch Trypsin zu lösen waren: Die Trypsinierung musste sehr viel länger und durch mehrfache mechanische Impulsabgabe erfolgen. Um durch diese Besonderheit dennoch eine hohe Zellzahl zu ernten, wurden die Flaschen mehrfach mit PBS gespült und der Trypsinierungsvorgang zwei bis dreimal wiederholt; bei der Zellernte von undifferenzierten Zementoblasten reichte hingegen das Standardprotokoll mit zwei Spüldurchgängen aus.

4.6.1 Morphologie nach osteogener Differenzierung

Folgende Aufnahmen zeigen Zementoblasten nach 7 d Inkubation mit osteogenem Differenzierungsmedium in unterschiedlichen Vergrößerungen (vgl. Abbildung 16). Lichtmikroskopische Bilder undifferenzierter Zementoblasten in selber Vergrößerung und Konfluenz sind Kapitel 4.3 zu entnehmen. Zu bemerken ist, dass die Morphologie der osteogen differenzierten Zementoblasten deutlich flächiger ist, als die der undifferenzierten Zementoblasten; zudem weisen die mit osteogenem Medium behandelten Zellen mehr und stärker verzweigte Zellfort-sätze auf.



Abbildung 16: Morphologie der Zementoblasten nach osteogener Differenzierung für 7 d in unterschiedlichen Vergrößerungen.

4.6.2 AP-Färbung

In der Phase der Reifung exprimieren Osteoblasten vermehrt das Enzym AP. Zum Nachweis dieses im Zytoplasma vorkommenden Enzyms wurde die AP-Färbung mit dem Kit 86C-1KT der Firma Sigma-Aldrich durchgeführt. Bei der Durchführung war darauf zu achten, dass die Zellen zum einen ausreichend auf den Deckgläschen fixiert wurden, zum anderen aber das Enzym in seiner Aktivität nicht eingeschränkt wurde. Die besten Ergebnisse wurden bei Durchführung der Färbung im Zellkultur-*Well* erreicht.

In Abbildung 17 sind undifferenzierte (A und B) und osteogen differenzierte Zementoblasten (C und D) gleicher Passage nach AP-Färbung in unterschiedlichen Vergrößerungen abgebildet: Die Aktivität der AP hat zum violetten Farbumschlag in osteogen differenzierten Zementoblasten geführt; in undifferenzierten Zementoblasten war lediglich die Gegenfärbung mit dem Farbstoff Lichtrot zu beobachten. Außerdem fallen osteogen differenzierte Zementoblasten durch größere Zellleiber auf.



Abbildung 17: Nachweis des Enzyms Alkalische Phosphatase in osteogen differenzierten Zementoblasten und undifferenzierten Kontroll-Zementoblasten in unterschiedlichen Vergrößerungen. Die osteogen differenzierten Zementoblasten (C und D) weisen einen violetten Farbumschlag auf, im Gegensatz zu den undifferenzierten Kontroll-Zementoblasten (A und B), in welchen keine AP nachgewiesen wurde.

4.6.3 Protein- und mRNA-Nachweis

4.6.3.1 Kollagen Typ I-Expression nach osteogener Differenzierung

Durch die osteogene Differenzierung stieg die Expression von Kollagen Typ I sowohl auf mRNA-Ebene (qRT-PCR) als auch auf Protein-Ebene (Western Blot) an: Die Expression von Kollagen Typ I auf Proteinebene (Abbildung 18 A bis C) war in osteogen differenzierten im Vergleich zu unbehandelten Zementoblasten auf das 3,27-Fache gestiegen (SD 0,13); der Unterschied war höchst signifikant (p < 0,001). Im Western Blot wurden zusätzlich Osteoblasten als Positiv-Kontrolle mitgeführt, welche im Vergleich zu undifferenzierten Zementoblasten 2,65-fach Kollagen Typ I exprimierten (SD 0,57). Der Western Blot wurde drei Mal wiederholt mit Zellen aus drei getrennt durchgeführten Differenzierungen.

Da in Kollagenen häufig das Aminosäuretriplett Glycin-Prolin-Hydroxyprolin vorkommt, kann eine spezifische Bindung des Antikörpers nur bedingt gewährleistet werden. Im abgebildeten Western Blot hat der Antikörper zusätzlich an die Vorstufe des Kollagens Typ I (pn COL1) gebunden; die Banden konnten durch einen Vergleich mit dem Größenmarker unterschieden werden: Kollagen Typ I besitzt eine Größe von 150 Basenpaaren, pn COL1 ist etwas größer.

Die Auswertung der qRT-PCR (Abbildung 18 D) zeigte auch eine gesteigerte *Kollagen Typ I*-Expression in den osteogen differenzierten im Vergleich zu den unbehandelten Zementoblasten auf das 6,87-fache bei einer SD von 2,6; der Unterschied war signifikant (p < 0,05). Die Auswertung umfasste drei Werte aus drei unabhängig voneinander durchgeführten qRT-PCR-Durchläufen.



Abbildung 18: Kollagen Typ I in osteogen differenzierten Zementoblasten und Osteoblasten im Verhältnis zu undifferenzierten Zementoblasten. A: Coomassie-Färbung der Protein-Gelelektrophorese. B: Antikörpermarkierte Proteinbande Kollagen Typ I (COL1) bei 150 kDa und GAPDH (38 kDa). C: statistische Auswertung des Western Blots mit GAPDH als Ladungskontrolle. D: statistische Auswertung der qRT-PCR mit *Lamin A/C* als Ladungskontrolle; für die quantitative Auswertung wurden die osteogen differenzierten Zementoblasten (Z ost) und Osteoblasten (O) mit den unbehandelten Zementoblasten (Z) ins Verhältnis gesetzt, sodass die dargestellten Werte ein Vielfaches der Werte dieser Kontrollprobe sind. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus jeweils drei getrennten Experimenten (Western Blot: n = 3, qRT-PCR: n = 3); die SD sind durch die Fehlerindikatoren dargestellt; Signifikanz: p-Wert < 0,05 (*), < 0,001 (***).

4.6.3.2 RUNX2-Expression nach osteogener Differenzierung

Durch die osteogene Differenzierung stieg die Expression von RUNX2 sowohl auf mRNA-Ebene (qRT-PCR) als auch auf Protein-Ebene (Western Blot) an: Im Western Blot war das RUNX2-Level in osteogen differenzierten Zementoblasten (Abbildung 19 A bis C) auf 1,73 erhöht (SD 0,023); der Unterschied war höchst signifikant (p < 0,001). Im Western Blot wurden zusätzlich Osteoblasten als Positiv-Kontrolle mitgeführt, in welchen ein ähnliches RUNX2-Level nachgewiesen werden konnte wie in osteogen differenzierten Zementoblasten (1,7-fach, SD 0,4). Der Western Blot wurde drei Mal mit unabhängig voneinander osteogen differenzierten Zementoblasten bzw. vier Mal mit Osteoblasten wiederholt.

Die Auswertung der qRT-PCR (Abbildung 19 D) zeigte ebenfalls einen Anstieg der *RUNX2*-Expression in den osteogen differenzierten im Vergleich zu den unbehandelten Zementoblasten auf 4,43 bei einer SD von 0,77; der Unterschied war signifikant (p < 0,05). Die Auswertung umfasste drei Werte aus drei unabhängig voneinander durchgeführten qRT-PCR-Durchläufen.



Abbildung 19: RUNX2 in osteogen differenzierten Zementoblasten und Osteoblasten im Verhältnis zu undifferenzierten Zementoblasten. A: Coomassie-Färbung der Protein-Gelelektrophorese. B: Antikörpermarkierte Proteinbanden RUNX2 (70 kDa) und GAPDH (38 kDa). C: statistische Auswertung des Western Blots mit GAPDH als Ladungskontrolle. D: statistische Auswertung der qRT-PCR mit *Lamin A/ C* als Ladungskontrolle; für die quantitative Auswertung wurden die osteogen differenzierten Zementoblasten (Z ost) und Osteoblasten (O) mit den unbehandelten Zementoblasten (Z) ins Verhältnis gesetzt, sodass die dargestellten Werte ein Vielfaches der Werte dieser Kontrollprobe sind. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus jeweils drei getrennten Experimenten (Western Blot Z ost: n = 3, Western Blot O: n = 4, qRT-PCR: n = 3); die SD sind durch die Fehlerindikatoren dargestellt; Signifikanz: p-Wert < 0,05 (*), < 0,001 (***).

4.6.3.3 SOX9-Expression nach osteogener Differenzierung

Die Ergebnisse von Western Blot und qRT-PCR für SOX9 unterschieden sich: Auf Proteinebene zeigte sich ein Anstieg von SOX9, in der qRT-PCR war die Gen-Expression von SOX9 gesunken. Die Expression von SOX9 auf Proteinebene (Abbildung 20 A bis C) war in osteogen differenzierten Zementoblasten im Vergleich zu unbehandelten Zementoblasten um 36 % gestiegen (SD 0,03); der Unterschied war hoch signifikant (p < 0,01). Im Western Blot wurden zusätzlich Osteoblasten als Kontrolle mitgeführt, welche im Vergleich zu undifferenzierten Zementoblasten signifikant 37 % weniger SOX9 aufwiesen (SD 0,042). Der Western Blot wurde drei Mal wiederholt mit Zellen aus drei getrennt durchgeführten Differenzierungen.

Die Auswertung der qRT-PCR (Abbildung 20 D) zeigte einen Rückgang der *SOX9*-Expression in den osteogen differenzierten im Vergleich zu den unbehandelten Zementoblasten um 37 % bei einer SD von 0,05; der Unterschied war hoch signifikant (p < 0,01). Die Auswertung umfasste drei Werte aus drei unabhängig voneinander durchgeführten qRT-PCR-Durchläufen.



Abbildung 20: SOX9 in osteogen differenzierten Zementoblasten und Osteoblasten im Verhältnis zu undifferenzierten Zementoblasten. A: Coomassie-Färbung der Protein-Gelelektrophorese. B: Antikörpermarkierte Proteinbanden SOX9 (55 kDa) und GAPDH (38 kDa). C: statistische Auswertung des Western Blots mit GAPDH als Ladungskontrolle. D: statistische Auswertung der qRT-PCR mit *Lamin A/ C* als Ladungskontrolle; für die quantitative Auswertung wurden die osteogen differenzierten Zementoblasten (Z ost) und Osteoblasten (O) mit den unbehandelten Zementoblasten (Z) ins Verhältnis gesetzt, sodass die dargestellten Werte ein Vielfaches der Werte dieser Kontrollprobe sind. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus jeweils drei getrennten Experimenten (Western Blot: n = 3, qRT-PCR: n = 3); die SD sind durch die Fehlerindikatoren dargestellt; Signifikanz: p-Wert < 0,01 (**).
4.7 Co-Kultur mit PDL-Zellen

Bei der Co-Kultur wurden Zementoblasten mit PDL-Fibroblasten im selben Medium, durch eine Membran (*ThinCert*®) getrennt, inkubiert. Die Poren der Membran (0,4 µm) waren so klein gewählt, dass metabolischer Austausch, aber keine Zellmigration möglich war.

Am zweiten Tag der Inkubation mit Standardmedium wurde dieses ausgetauscht und bis zur Ernte der Zellen am achten Tag beibehalten. Die Menge des Mediums war im Verhältnis zur Zellzahl etwa 2/3 kleiner gewählt, als bei den undifferenzierten Zellen; zudem war die Inkubationszeit ohne Mediumwechsel, respektive FCS, doppelt so lang.

4.7.1 Lichtmikroskopische Aufnahmen

Die Aufnahmen der mit PDL-Fibroblasten co-kultivierten Zementoblasten entstanden kurz vor der Zellernte am achten Tag der Inkubation (vgl. Abbildung 21). Das Zell-*ThinCert*®, welches die PDL-Zellen beherbergte, wurde bereits aus dem Kultivierungs-*Well* entnommen, sodass ausschließlich Zementoblasten auf den Bildern zu sehen sind. Morphologische Veränderungen der co-kultivierten Zementoblasten sind auszumachen, auch wenn diese weniger ausgeprägt sind als bei der adipogenen, osteogenen und kombinierten osteogen-co-kultivierten Zementoblastenkultur: Die Zellleiber erscheinen etwas größer und somit etwas weniger fibroblastenartig. Die Anzahl der Zellausläufe hat zugenommen (vgl. Abbildung 21).



Abbildung 21: Morphologie der Zementoblasten nach Co-Kultivierung mit PDL-Fibroblasten für 7 d in unterschiedlichen Vergrößerungen.

4.7.2 Protein- und mRNA-Nachweis

4.7.2.1 Kollagen Typ I-Expression nach Co-Kultur mit PDL-Zellen

Die Ergebnisse von Western Blot und qRT-PCR für Kollagen Typ I unterschieden sich: Auf Proteinebene zeigte sich keine Änderung der Kollagen Typ I-Konzentration, in der qRT-PCR war die Gen-Expression von Kollagen Typ I hingegen stark angestiegen.

Im Western Blot konnte kein signifikanter Unterschied der Kollagen Typ I-Expression zwischen co-kultivierten und unbehandelten Zementoblasten (Abbildung 22 A bis C) nachgewiesen werden (SD 0,02). Zusätzlich wurden Osteoblasten als Positiv-Kontrolle mitgeführt, welche im Vergleich zu undifferenzierten Zementoblasten signifikant 2,78-fach mehr Kollagen Typ I aufwiesen (SD 0,149), sodass die spezifische Bindung des Antikörpers bestätigt wurde. Der Western Blot wurde drei Mal wiederholt mit Zellen aus drei getrennt durchgeführten Differenzierungen.

Die Auswertung der qRT-PCR (Abbildung 22 D) zeigte einen deutlichen Anstieg der *Kollagen Typ I*-Expression in den co-kultivierten im Vergleich zu den unbehandelten Zementoblasten auf das 6,4-fache bei einer SD von 0,84; der Unterschied war hoch signifikant (p < 0,01). Die Auswertung umfasste drei Werte aus drei unabhängig voneinander durchgeführten qRT-PCR-Durchläufen.



Abbildung 22: Kollagen Typ I in mit PDL co-kultivierten Zementoblasten und Osteoblasten im Verhältnis zu undifferenzierten Zementoblasten. A: Coomassie-Färbung der Protein-Gelelektrophorese. B: Antikörpermarkierte Proteinbanden Kollagen Typ I (COL1) bei 150 kDa und GAPDH (38 kDa). C: statistische Auswertung des Western Blots mit GAPDH als Ladungskontrolle. D: statistische Auswertung der qRT-PCR mit *Lamin A/C* als Ladungskontrolle; für die quantitative Auswertung wurden die mit PDL co-kultivierten Zementoblasten (Z co) und Osteoblasten (O) mit den unbehandelten Zementoblasten (Z) ins Verhältnis gesetzt, sodass die dargestellten Werte ein Vielfaches der Werte dieser Kontrollprobe sind. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus jeweils drei getrennten Experimenten (Western Blot: n = 3, qRT-PCR: n = 3); die SD sind durch die Fehlerindikatoren dargestellt; Signifikanz: p-Wert > 0,05 (ns), < 0,01 (**).

4.7.2.2 RUNX2-Expression nach Co-Kultur mit PDL-Zellen

Durch die Co-Kultivierung mit PDL-Zellen stieg die Expression von RUNX2, sowohl auf mRNA-Ebene (qRT-PCR) als auch auf Protein-Ebene (Western Blot) an. Die Expression von RUNX2 auf Proteinebene (Abbildung 23 A bis C) war in co-kultivierten Zementoblasten leicht gestiegen: Im Vergleich zu unbehandelten Zementoblasten lag das RUNX2-Level 33 % höher (SD 0,097); der Unterschied war signifikant (p < 0,05). Im Western Blot wurden zusätzlich Osteoblasten als Positiv-Kontrolle mitgeführt, welche im Vergleich zu undifferenzierten Zementoblasten signifikant 37 % mehr RUNX2 aufwiesen (SD 0,110), sodass die spezifische Bindung des Antikörpers bestätigt wurde. Die Auswertung des Western Blots umfasste drei Werte mit Zellen aus drei getrennt durchgeführten Differenzierungen.

Die Auswertung der qRT-PCR (Abbildung 23 D) zeigte eine Steigerung der RUNX2-Expression in den co-kultivierten im Vergleich zu den unbehandelten Zementoblasten auf das 2,2-fache, bei einer SD von 0,23; der Unterschied war signifikant (p < 0,05). Die Auswertung umfasste drei Werte aus drei unabhängig voneinander durchgeführten qRT-PCR-Durchläufen.



Abbildung 23: RUNX2 in mit PDL co-kultivierten Zementoblasten und Osteoblasten im Verhältnis zu undifferenzierten Zementoblasten. A: Coomassie-Färbung der Protein-Gelelektrophorese. B: Antikörpermarkierte Proteinbande RUNX2 (70 kDa) und GAPDH (38 kDa). C: statistische Auswertung des Western Blots mit GAPDH als Ladungskontrolle. D: statistische Auswertung der qRT-PCR mit *Lamin A/ C* als Ladungskontrolle; für die quantitative Auswertung wurden die mit PDL co-kultivierten Zementoblasten (Z co) und Osteoblasten (O) mit den unbehandelten Zementoblasten (Z) ins Verhältnis gesetzt, sodass die dargestellten Werte ein Vielfaches der Werte dieser Kontrollprobe sind. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus jeweils drei getrennten Experimenten (Western Blot: n = 3, qRT-PCR: n = 3); die SD sind durch die Fehlerindikatoren dargestellt; Signifikanz: p-Wert < 0,05 (*).

4.7.2.3 SOX9-Expression nach Co-Kultur mit PDL-Zellen

Durch die Co-Kultivierung mit PDL-Zellen war die Expression von SOX9 sowohl auf Protein-Ebene, als auch auf mRNA-Ebene leicht hochreguliert. Im Vergleich zu unbehandelten Zementoblasten lag das SOX9-Proteinlevel in co-kultivierten Zementoblasten (Abbildung 24 A bis C) bei 1,15 (SD 0,05); der Unterschied war signifikant (p < 0,05). Der Western Blot wurde drei Mal wiederholt mit Zellen aus drei getrennt durchgeführten Differenzierungen.

Die Auswertung der qRT-PCR (Abbildung 24 D) zeigte einen leichten Anstieg von 15 % der SOX9-Expression in PDL-co-kultivierten im Vergleich zu unbehandelten Zementoblasten, bei einer SD von 0,29; der Unterschied war jedoch nicht signifikant (p > 0,05). Die Auswertung umfasste drei Werte aus drei unabhängig voneinander durchgeführten qRT-PCR-Durchläufen.



Abbildung 24: SOX9 in mit PDL co-kultivierten Zementoblasten und Osteoblasten im Verhältnis zu undifferenzierten Zementoblasten. A: Coomassie-Färbung der Protein-Gelelektrophorese. B: Antikörpermarkierte Proteinbanden SOX9 (55 kDa) und GAPDH (38 kDa). C: statistische Auswertung des Western Blots mit GAPDH als Ladungskontrolle. D: statistische Auswertung der qRT-PCR mit *Lamin A/ C* als Ladungskontrolle; für die quantitative Auswertung wurden die mit PDL co-kultivierten Zementoblasten (Z co) und Osteoblasten (O) mit den unbehandelten Zementoblasten (Z) ins Verhältnis gesetzt, sodass die dargestellten Werte ein Vielfaches der Werte dieser Kontrollprobe sind. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus jeweils drei getrennten Experimenten (Western Blot: n = 3, qRT-PCR: n = 3); die SD sind durch die Fehlerindikatoren dargestellt; Signifikanz: p-Wert > 0,05 (ns), < 0,05 (*), < 0,01 (**).

4.8 Osteogene Differenzierung der Co-Kultur

Die Versuchsreihe der Co-Kultivierung mit PDL und osteogener Differenzierung wurde parallel zur reinen Co-Kultivierung mit Zementoblasten der gleichen Passage angesetzt; wie bei der reinen Co-Kultivierung, wurde auch das osteogene Medium um den Faktor 2/ 3 reduziert und die Inkubationszeit ohne Wechsel verdoppelt: Am zweiten Tag der Inkubation wurde das Standardmedium gegen osteogenenes Differenzierungsmedium ausgetauscht und bis zur Ernte der Zellen am achten Tag beibehalten. Wie bereits beschrieben, ließen sich die osteogen differenzierten Zellen sehr viel schlechter vom Boden des *Wells* durch Trypsinierung lösen. Zwar sind die Kulturbehältnisse Flasche und 6-*Well*-Platte nicht direkt miteinander zu vergleichen, dennoch entstand der Eindruck, dass die kombiniert co-kultivierten und osteogen differenzierten Zellen sich noch schlechter vom Boden lösen ließen, als die rein osteogen differenzierten Zentoblasten.

4.8.1 Lichtmikroskopische Aufnahmen

Folgend sind Aufnahmen von co-kultivierten Zementoblasten mit osteogener Differenzierung zu sehen. Die Bilder entstanden kurz vor der Zellernte am achten Tag der Inkubation. Das Zell-*ThinCert*®, welches die PDL-Zellen beherbergte, wurde bereits aus dem Kultivierungs-*Well* entnommen, sodass ausschließlich Zementoblasten abgebildet sind. Auffällig ist eine weniger gleichmäßige Verteilung der Zellen im Kulturmedium. Wie auch schon die rein osteogen differenzierten Zementoblasten, weisen die co-kultivierten und osteogen differenzierten Zementoblasten viele verzweigte Zellausläufer auf und eine flächigere Zellmorphologie (vgl. Abbildung 25).



Abbildung 25: Morphologie der Zementoblasten nach Co-Kultivierung mit PDL-Fibroblasten und osteogener Differenzierung für 7 d in unterschiedlichen Vergrößerungen.

4.8.2 Nachweis bestimmter Proteine und mRNA

4.8.2.1 Kollagen Typ I-Expression nach Co-Kultur und osteogener Differenzierung

Durch die Co-Kultivierung mit PDL-Zellen und zusätzlicher osteogener Differenzierung stieg die Expression von Kollagen Typ I, sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Protein-Ebene. Die Expression von Kollagen Typ I in mit PDL-Zellen co-kultivierten und osteogen differenzierten Zementoblasten war auf Proteinebene (Abbildung 26 A bis C) im Vergleich zu unbehandelten Zementoblasten auf das 2,11-fache gestiegen (SD 0,23); der Unterschied war signifikant (p < 0,05). Im Western Blot wurden zusätzlich Osteoblasten als Positiv-Kontrolle mitgeführt, welche im Vergleich zu undifferenzierten Zementoblasten 2,78-fach Kollagen Typ I aufwiesen (SD 0,149). Der Western Blot wurde drei Mal wiederholt mit Zellen aus drei getrennt durchgeführten Differenzierungen.

Die Auswertung der qRT-PCR (Abbildung 26 D) zeigte eine Hochregulation der Kollagen Typ I-Expression in den co-kultivierten und osteogen differenzierten im Vergleich zu den unbehandelten Zementoblasten auf 4,6 bei einer SD von 1,27; der Unterschied war signifikant (p < 0,05). Die Auswertung umfasste drei Werte aus drei unabhängig voneinander durchgeführten qRT-PCR-Durchläufen.



Abbildung 26: Kollagen Typ I in mit PDL co-kultivierten und osteogen differenzierten Zementoblasten und Osteoblasten im Verhältnis zu undifferenzierten Zementoblasten. A: Coomassie-Färbung der Protein-Gelelektrophorese. B: Antikörpermarkierte Proteinbande Kollagen Typ I (COL1) bei 150 kDa und GAPDH (38 kDa). C: statistische Auswertung des Western Blots mit GAPDH als Ladungskontrolle. D: statistische Auswertung der qRT-PCR mit *Lamin A/ C* als Ladungskontrolle; für die quantitative Auswertung wurden die mit PDL co-kultivierten und osteogen differenzierten Zementoblasten (Z co-ost) und die Osteoblasten (O) mit den unbehandelten Zementoblasten (Z) ins Verhältnis gesetzt, sodass die dargestellten Werte ein Vielfaches der Werte dieser Kontrollprobe sind. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus jeweils drei getrennten Experimenten (Western Blot: n = 3, qRT-PCR: n = 3); die SD sind durch die Fehlerindikatoren dargestellt; Signifikanz: p-Wert < 0,05 (*), < 0,01 (**).

4.8.2.2 RUNX2-Expression nach Co-Kultur und osteogener Differenzierung

Durch die Co-Kultivierung mit PDL-Zellen und zusätzlicher osteogener Differenzierung stieg die Expression von RUNX2 sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Protein-Ebene (vgl. Abbildung 27 A bis C). Im Vergleich zu unbehandelten Zementoblasten lag das RUNX2-Level in mit PDL co-kultivierten und osteogen differenzierten Zementoblasten bei 2,71 (SD 0,80); der Unterschied war durch die große Streuung nicht signifikant (p > 0,05), gibt jedoch einen ersten Hinweis. Im Western Blot wurden zusätzlich Osteoblasten als Positiv-Kontrolle mitgeführt, welche im Vergleich zu undifferenzierten Zementoblasten 37 % mehr RUNX2 aufwiesen (SD 0,11). Die Auswertung des Western Blots umfasste drei Werte mit Zellen aus drei getrennt durchgeführten Differenzierungen.

Die Auswertung der qRT-PCR (Abbildung 27 D) zeigte einen Anstieg der RUNX2-Expression in den co-kultivierten und osteogen differenzierten im Vergleich zu den unbehandelten Zementoblasten auf 4,06 bei einer SD von 1,15; der Unterschied war signifikant (p < 0,05). Die Auswertung umfasste drei Werte aus drei unabhängig voneinander durchgeführten qRT-PCR-Durchläufen.



Abbildung 27: RUNX2 in mit PDL co-kultivierten und osteogen differenzierten Zementoblasten und Osteoblasten im Verhältnis zu undifferenzierten Zementoblasten. A: Coomassie-Färbung der Protein-Gelelektrophorese. B: Antikörpermarkierte Proteinbande RUNX2 (70 kDa) und GAPDH (38 kDa). C: statistische Auswertung des Western Blots mit GAPDH als Ladungskontrolle. D: statistische Auswertung der qRT-PCR mit *Lamin A/ C* als Ladungskontrolle; für die quantitative Auswertung wurden die mit PDL co-kultivierten und osteogen differenzierten Zementoblasten (Z co-ost) und Osteoblasten (O) mit den unbehandelten Zementoblasten (Z) ins Verhältnis gesetzt, sodass die dargestellten Werte ein Vielfaches der Werte dieser Kontrollprobe sind. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus jeweils drei getrennten Experimenten (Western Blot: n = 3, qRT-PCR: n = 3); die SD sind durch die Fehlerindikatoren dargestellt; Signifikanz: p-Wert < 0,05 (*).

4.8.2.3 SOX9-Expression nach Co-Kultur und osteogener Differenzierung

Die Ergebnisse von Western Blot und qRT-PCR der mit PDL co-kultivierten und osteogen differenzierten Zementoblasten für SOX9 unterschieden sich: Auf Proteinebene zeigte sich ein leichter Anstieg von SOX9, in der qRT-PCR ist die Gen-Expression von SOX9 gesunken.

Die Expression von SOX9 auf Proteinebene (Abbildung 28 A bis C) lag im Vergleich zu unbehandelten Zementoblasten bei 1,49 (SD 0,091); der Unterschied war signifikant (p < 0,05). Der Western Blot wurde drei Mal wiederholt mit Zellen aus drei getrennt durchgeführten Differenzierungen.

Die Auswertung der qRT-PCR (Abbildung 28 D) zeigte einen Rückgang der SOX9-Expression in den co-kultivierten und osteogen differenzierten im Vergleich zu den unbehandelten Zementoblasten um 42 % bei einer SD von 0,08; der Unterschied war signifikant (p < 0,05). Die Auswertung umfasste drei Mittelwerte aus drei unabhängig voneinander durchgeführten qRT-PCR-Durchläufen.



Abbildung 28: SOX9 in mit PDL co-kultivierten und osteogen differenzierten Zementoblasten und Osteoblasten im Verhältnis zu undifferenzierten Zementoblasten. A: Coomassie-Färbung der Protein-Gelelektrophorese. B: Antikörpermarkierte Proteinbanden SOX9 (55 kDa) und GAPDH (38 kDa). C: statistische Auswertung des Western Blots mit GAPDH als Ladungskontrolle. D: statistische Auswertung der qRT-PCR mit *Lamin A/C* als Ladungskontrolle; für die quantitative Auswertung wurden die mit PDL co-kultivierten und osteogen differenzierten Zementoblasten (*Z* co-ost) und die Osteoblasten (O) mit den unbehandelten Zementoblasten (*Z*) ins Verhältnis gesetzt, sodass die dargestellten Werte ein Vielfaches der Werte dieser Kontrollprobe sind. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus jeweils drei getrennten Experimenten (Western Blot: n = 3, qRT-PCR: n = 3); die SD sind durch die Fehlerindikatoren dargestellt; Signifikanz: p-Wert < 0,05 (*), < 0,01 (**).

4.9 Übersicht der Ergebnisse

Das zu Beginn der Arbeit durchgeführte Screening auf die mesenchymalen CD-Marker CD73, CD90, CD105, CD146 und CD166 auf humanen Zementoblasten zeigte generell eine Expression dieser Marker in unterschiedlich hohen Konzentrationen. Wie belastbar die quantitativen Werte und damit die in der Literatur beschriebenen Eigenschaften sind, ist zu diskutieren. Ein anschließend durchgeführtes Zellsorting auf eine CD90- und CD105-positive Zementoblastenpopulation zur Homogenisierung des mesechymalen Differenzierungspotentials war nach einem zweiten Sorting-Durchlauf erfolgreich. Im Gegensatz dazu war eine CD90- und CD105-negativ gesortete Zellpopulation nicht stabil negativ für diese Marker oder aufgrund von zu geringen Zellzahlen nicht zu kultivieren. Auch dieses Ergebnis muss durch Vergleich mit anderen Studien diskutiert werden.

Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit war der Nachweis von Progenitorzellen aus dem humanen Wurzelzement. Neben der Expression der aufgeführten CD-Marker, einer fibroblastenähnlichen Morphologie und der Plastikadhärenz, ist das abschließende Kriterium eine Differenzierung in drei unterschiedliche mesenchymale Zellarten, wie den Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten. Da sich die Marker der chondrogenen und osteogenen Differenzierung konträr verhalten, sind diese im Folgenden gegenübergestellt. Die erfolgreiche adipogene Differenzierung von Zementoblasten wurde zum einen durch die zytologische Färbung von Di- und Tri-glyceriden, die sich in Vakuolen im Zytoplasma befanden, nachgewiesen; außerdem zeigte eine qRT-PCR die erhöhte Expression des adipogenen Markers LPL; PPAR γ zeigte in der durchgeführten qRT-PCR keine Änderung der Expression.

4.9.1 Protein-Nachweis

Auf Proteinebene zeigte sich nach chondrogener und osteogener Differenzierung der Zementoblasten die typischen Veränderungen von RUNX2 und den Kollagenen Typ I und II. Das Proteinlevel von SOX9 ist sowohl in der chondrogenen als auch in der osteogenen Differenzierung leicht gestiegen, sodass diese Ergebnisse diskutiert werden müssen.

Die im metabolischen Austausch mit PDL-Zellen stehenden Zementoblasten zeigten auf Proteinebene jeweils einen leichten Anstieg von den eigentlich konträr auftretenden Transkriptionsfaktoren RUNX2 und SOX9 im Vergleich zur Zementoblasten-Monokultur; eine Veränderung der von RUNX2 und SOX9 regulierten Kollagene Typ I und Typ II war nicht zu beobachten. Durch eine zusätzliche osteogene Differenzierung der mit PDL-Fibroblasten co-kultivierten Zementoblasten zeigte sich auf Proteinebene ein deutlicher Anstieg von RUNX2 und Kollagen Typ I, aber auch eine Zunahme von SOX9 (vgl. Abbildung 29).



Abbildung 29: Übersicht der Western Blot-Ergebnisse von chondrogen (Z chon), osteogen (Z ost), mit PDL co-kultivierten (Z co) und kombiniert co-kultiviert osteogen differenzierten Zementoblasten (Z coost) der Marker RUNX2, SOX9 und Kollagen Typ I (COL1); für die quantitative Auswertung wurden die chondrogen, osteogen, co-kultivierten und kombiniert co-kultiviert osteogen differenzierten Zementoblasten mit den unbehandelten Zementoblasten ins Verhältnis gesetzt, sodass die dargestellten Werte ein Vielfaches der Werte der Kontrollprobe sind. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus mindestens drei getrennten Experimenten; die SD sind durch die Fehlerindikatoren dargestellt; Signifikanz: p-Wert > 0,05 (nicht signifikant (ns)), < 0,05 (*), < 0,01 (**), < 0,001 (***).

4.9.2 mRNA-Nachweis

Die Ergebnisse der qRT-PCR von osteogen und chondrogen differenzierten Zementoblasten zeigen andere Tendenzen als die Ergebnisse des Western Blots: In den chondrogen differenzierten Zementoblasten waren *RUNX2*, *SOX9* und *Kollagen Typ I* im Vergleich zur unbehandelten Kontrollprobe auf mRNA-Ebene nur sehr gering exprimiert; mRNA von *Kollagen Typ II* war zwar in chondrogen differenzierten Zementoblasten nachzuweisen, jedoch nur in geringen Mengen in zweidimensional kultivierten Kontrollzellen, sodass eine Normalisierung der Werte keine signifikanten Ergebnisse lieferte.

Die mRNA-Werte von *RUNX2* und *Kollagen Typ I* der osteogen differenzierten, der mit PDL-Fibroblasten co-kultivierten und der kombiniert osteogen differenzierten co-kultivierten Zementoblasten zeigten die gleichen Tendenzen wie auf Proteinebene; der mRNA-Gehalt von *SOX9* ist in rein co-kultivierten Zementoblasten leicht gestiegen, in den osteogenen Differenzierungen sowohl in der Mono- als auch in der Co-Kultur leicht gesunken (vgl. Abbildung 30).

Diese Ergebnisse müssen sowohl in Zusammenhang untereinander als auch in Verbindung mit den Ergebnisse aus dem Western Blot diskutiert werden.



Abbildung 30: Übersicht der qRT-PCR-Ergebnisse von chondrogen (Z chon), osteogen (Z ost), mit PDL co-kultivierten (Z co) und kombiniert co-kultiviert osteogen differenzierten Zementoblasten (Z co-ost) der Marker *RUNX2*, *SOX9* und *Kollagen Typ I (COL1)*. Für die quantitative Auswertung wurden die chondrogen, osteogen, co-kultivierten und kombiniert co-kultiviert osteogen differenzierten Zementoblasten mit den unbehandelten Zementoblasten ins Verhältnis gesetzt, sodass die dargestellten Werte ein Vielfaches der Werte der Kontrollprobe sind. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus drei getrennt durchgeführten Experimenten; die SD sind durch die Fehlerindikatoren dargestellt; Signifikanz: p-Wert > 0,05 (nicht signifikant (ns)), < 0,05 (*), < 0,01 (**), < 0,001 (***).

5 Diskussion

Der Großteil bisheriger Untersuchungen an Zementoblasten wurden an tierischen Zellen, insbesondere von Nagern (Kaneda et al. 2006; Mada et al. 2006; Moon et al. 2018) durchgeführt. Eine erste humane, allerdings neoplastische, Zementoblastenkultur wurde 1998 von Arzate et al. aus einem Zementoblastom isoliert. Weitere Untersuchungen an humanen, jedoch nicht-immortalisierten Zementoblasten wurden von Carnes et al. (1997) und Nuñez et al. (2010) durchgeführt. Auch Grzesik et al. (1998) haben humane Zementoblasten isoliert, aber in einer Mischkultur mit Zellen aus dem Dentin, welche ebenso nicht immortalisiert wurden. Weitere Mischkulturen sind außerdem mit primären humanen Zementoblasten und PDL-Fibroblasten (D'Errico et al. 1995; 1991) beschrieben. In einigen Studien wurde durch osteogene Differenzierung tierischer und humaner oraler Progenitorzellen (meist aus dem PDL) sogenannte zementoblasten-ähnliche Zellinien etabliert (Saito et al. 2005; Fujii et al. 2008). In der hier vorliegenden Studie wurden Zellen aus dem Wurzelzement eines gesunden humanen Weisheitszahns, welcher aus medizinischer Notwendigkeit entfernt wurde, isoliert. Durch Immortalisierung konnten diese Zementoblasten ca. 200 Teilungszyklen überstehen, sodass alle Untersuchungen auf Grundlage des gleichen Materials durchgeführt werden konnten. Erste humane immortalisierte Zementoblastenkulturen wurden von Kitagawa (2006) und Diercke et al (2012a; 2014b) etabliert; die Forschungsschwerpunkte dieser Arbeiten liegen allerdings vor allem im Bereich der Kieferorthopädie und untersuchen insbesondere die Reaktion der Zementoblasten auf Druckbelastung und Entzündungsmediatoren. Im Gegensatz dazu wurde im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal untersucht, ob im Wurzelzement mesenchymale Progenitorzellen vorliegen, die für mögliche zukünftige regenerative Therapien von Parodontopathien genutzt werden können. Weiterführend wurde das erste Mal der metabolische Einfluss der physiologisch eng benachbarten PDL-Fibroblasten auf die Zellen des Wurzelzements untersucht. Mit einer zusätzlichen osteogenen Differenzierung dieser Co-Kultur wurden noch Faktoren, wie sie im angrenzenden Alveolarknochen vorliegen können, in die

Untersuchungen einbezogen.

Zwar gibt es einige Parallelen zwischen dem Wurzelzement von Nagern und dem von Menschen, dennoch können nicht alle Ergebnisse übertragen werden: Insbesondere die Geschwindigkeit der Zahnentwicklung, und damit auch der Zementogenese verläuft in Nagetieren sehr viel schneller ab als im Menschen. Morphologisch unterscheidet sich vor allem das Reparaturzement der beiden Spezies: Durch eine höhere Belastung der Zähne von Nagetieren wird ein azelluläres Reparaturzement gebildet, da dieses in kürzerer Zeit produziert werden kann. Defekte des menschlichen Wurzelzements, z. B nach einer externen Resorption oder einer Wurzelfraktur werden im Gegensatz dazu mit zellulärem Eigenfaserzement aufgefüllt (Bosshardt und Schroeder 1996; Diercke et al. 2012a und 2012b). Da klinisch vor allem die Regeneration nach parodontalen Erkrankungen und damit auch die Bildung von Reparaturzement interessiert, ist es unabdingbar, dass weitere Forschung an humanem Wurzelzement betrieben wird.

Ursachen von Parodontopathien können neben entzündlichen Geschehen auch Traumata, kieferorthopädische Zahnbewegungen sowie systemische und genetische Faktoren sein. Bisheriges Ziel der Parodontaltherapie ist eine Keimreduktion mit Ausheilung der chronischen Entzündung und Verbreiterung des Saumepithels von der Gingiva ausgehend (Chen et al. 2010, Ripamonti und Petit 2009). Regenerative Therapien, die die erkrankten Gewebe in Struktur und Funktion wiederherstellen, wie der Knochenaufbau mit Attachementgewinn durch im Wurzelzement eingelagerte Sharpeysche Fasern des PDL, sind auf mehrwandige Knochendefekte und noch nicht durchgängige Furkationsbefälle beschränkt (Ivanovski 2009). Bei diesen ersten regenerativen Therapien wurden eine chirurgische Exzision parodontaler Taschen mit der Applikation von Knochen oder Knochenersatzmaterial kombiniert: Transplantiert wurde autogener, allogener oder xenogener Knochen bzw. alloplastisches Knochenersatzmaterial, welches durch Einwanderung von Osteoblasten verknöchern sollte. Histologisch zeigte sich mehrheitlich jedoch nur die schon beschriebene Verbreiterung des Saumepithels ohne echten Zahn-Knochen-Verbund (Caton und Zander 1976; Listgarten und Rosenberg 1979).

Weitere klinische Studien wiesen histologisch im Tiermodell durch eine Wurzelglättung und -konditionierung einen Attachementgewinn nach: Freiliegende Dentinkanälchen wurden mit Zitronensäure angeätzt, sodass eine verstärkte Zementogenese vermutlich durch Kontakt mesenchymaler Stammzellen mit Dentinproteinen stattfand; klinisch konnten diese Ergebnisse jedoch nicht bestätigt werden (Moore et al. 1987; Fuentes et al. 1993). Weiterführend wurde die Wurzelkonditionierung modifiziert und die geglättete Oberfläche mit EMPs (Amelogenin) und EDTA behandelt. Diese Schmelzmatrixproteine haben eine induktive Wirkung auf die Differenzierung von Progenitorzellen und damit die parodontale Regeneration (Hammarström 1997; Gestrelius et al. 2000). In der klinischen Anwendung zeigten sich bei mehrwandigen Knochendefekten bzw. Furkationsbefall Klasse II eine Reduktion der Sondierungstiefen und ein Attachementgewinn (Matarasso et al. 2015).

Die Möglichkeit, Wachstumsfaktoren wie *platelet-derived growthfactors* (Nevins et al. 2003), Insulin-ähnliche Wachstumsfaktoren (Howell et al. 1997), Fibroblastenwachstumsfaktoren (Kitamura et al. 2011) und BMP (Wikesjö et al. 2004) synthetisch herzustellen, hat die regenerative Parodontaltherapie wiederum erweitert (Raja et al. 2009). Fortgeschrittener generalisierter horizontaler Knochenabbau in Folge einer chronischen Parodontitis kann allerdings nach wie vor nicht rückgängig gemacht werden.

5.1 Methodik der Zellisolierung

Die Isolierung teilungsfähiger Zellen aus einem oralen Gewebe kann auf zwei unterschiedliche Arten durchgeführt werden: Entweder werden einzelne Zellen durch einen Verdau aus einem Zellverband gelöst und kultiviert oder ein Gewebefragment, aus dem Zellen auswandern, wird in Kultur gebracht (Prateeptongkum et al. 2016). Bei der Methode der Zellauswanderung wird das Gewebe isoliert, zerkleinert und in eine Kulturflasche überführt. Anschließend wandern Zellen aus und heften sich an den Boden der Kulturflasche (Carnes et al. 1997; Schminke et al. 2014). Bei der Isolierung einer Zellkultur durch einen Verdau, wird das Gewebe zunächst mit Proteasen behandelt, sodass sich die Zellen aus dem Zellverbund lösen; anschließend wird die Lösung durch ein Sieb gegeben um Gewebebestandteile zu entfernen und die Zellsuspension kultiviert (Grzesik et al. 1998; MacNeil et al. 1998; D'Errico et al. 1999; Kaneda et al. 2006; Kitagawa et al. 2006).

Manche Autoren unterscheiden nach der Isolierungsmethode die Begriffe Stammzelle und Progenitorzelle, wobei Progenitorzellen mithilfe der Auswachsmethode gewonnen und Stammzellen durch den Verdau aus dem Gewebeverband gelöst wurden (Owen und Friedenstein 1988; D'Errico et al. 1999; Gronthos et al. 2000; Morsczeck et al. 2005). Eine konsequente Trennung der Begriffe im Hinblick auf die Methode zur Zellisolierung wurde in dieser Arbeit nicht vorgenommen. In der wissenschaftlichen Literatur sind Stammzellen zunächst als multipotent differenzierbare und teilungsfähige Zellen beschrieben; Progenitorzellen sind im Gegensatz dazu bereits weiter differenziert und vor allem nur beschränkt teilungsfähig. Die Übergänge von Stammzelle und Progenitorzelle sind fließend und in einigen Quellen werden die Begriffe bereits als Synonyme gehandelt (Seaberg und van der Kooy 2003).

Ein Großteil der dentalen und parodontalen Zellkulturen wurden nach einem Verdau isoliert (Gronthos et al. 2000; Miura et al. 2003). Die bisherigen immortalisierten Zementoblastenzelllinien (Kitagawa et al. 2006; Diercke et al. 2012a) im Speziellen wurden durch die modifizierte Methode des sequentiellen Verdaus isoliert: Um das PDL von der Wurzeloberfläche zu entfernen, wurden in beiden Studien die extrahierten Zähne mit Proteasen behandelt, da davon ausgegangen wurde, dass sich das gesamte PDL durch einen ausreichend langen Verdau ablöst; die ersten Fraktionen des Verdaus wurden verworfen und

erst die letzte Fraktion nach 150 bzw. 140 min wurde kultiviert, sodass davon ausgegangen wurde, ausschließlich Zementoblasten in Kultur zu bringen.

Die Zementoblasten, die für diese Arbeit genutzt wurden, wurden durch die Methode des Auswachsens kultiviert: Nach akribischer mechanischer Entfernung aller Weichgewebe, die am Zahn anhafteten, wurde das Wurzelzement abgeschabt und in Kultur gebracht. Nach etwa 7 d konnten erste kunststoffadhärente Zementoblasten beobachtet werden; nach ca. 14 d wurden diese erstmals passagiert und in eine 75 cm²-Flasche überführt. Diese Methode wurde ebenfalls von Carnes et al. (1997) zur Isolierung einer primären humanen Zementoblastenkultur genutzt.

In einigen Vorversuchen im Rahmen dieser Arbeit wurde auch eine Zellisolierung durch einen sequentiellen Verdau durchgeführt, jedoch war die extrahierte Zellzahl so gering, sodass eine Kontamination z.B. durch einen unvollständigen Verdau des PDL einen großen prozentualen Anteil der Zellkultur ausgemacht hätte: Waren nach zwei Wochen keine Zellen in der Zellkulturflasche sichtbar, wurde der Versuch als gescheitert angesehen. Der selbe strenge Zeitraum wurde bei der Versuchsreihe des FACS-Sortings angelegt: Nach eben diesen zwei Wochen waren in der FACS-gesorteten Population 3x CD90- aus 2x CD90-/ 2x CD105- (vgl. Abbildung 6) keine Zellen nachweisbar; andere Studien haben die Zeitspanne zum Anwachsen von Zementoblasten weiter gefasst: Grzesik et al. (1998) hat z.B. noch Zellen, die erst nach drei Wochen in der Zellkulturflasche sichtbar waren in seine Untersuchungen eingeschlossen. Untersuchungen an methodisch unterschiedlich isolierten PDL-Fibroblasten zeigten keine großen Unterschiede: Die beiden Zellpopulationen wiesen qualitativ die gleiche Expression von mesenchymalen Oberflächenmarkern auf, wobei die Ausprägung auf der durch Auswanderung gewonnen Zellkultur tendenziell etwas geringer war. Das osteogene und adipogene Differenzierungsverhalten der durch die unterschiedlichen Methoden gewonnenen Zellkulturen war ebenfalls sehr ähnlich: beide Zellpopulationen waren osteogen und adipogen differenzierbar (Feng et al. 2010; Prateeptongkum et al. 2016). Nach einigen nicht veröffentlichten Vorversuchen ist davon auszugehen, dass die Methode der Zellisolation von Zementoblasten ebenfalls keinen Einfluss auf das Differenzierungsverhalten hat.

5.2 Analyse und Sorting von Zementoblasten

Wie bereits beschrieben, wird der Nachweis von mesenchymalen Progenitorzellen zum einen über das kunststoffadhärente Wachstum und die fibroblastenähnliche spindelförmige Morphologie der Zellen geführt (Dominici et al. 2006); beides lag bei der isolierten Zementoblastenkultur in allen undifferenzierten Passagen dieser Arbeit vor. Ein weiteres Merkmal von mesenchymalen Progenitorzellen ist die Expression von typischen Oberflächenmarkern wie CD90, CD105 und CD73 und ein Fehlen von hämatopoetischen Markern wie CD34 und CD45 (Dominici et al. 2006). Zusätzlich zu diesen Markern wurden in der vorliegenden Arbeit humane Zementoblasten auf die membrangebundenen Immunglobuline CD146 und CD166 getestet.

CD73 und spezifische Adenosin-Rezeptoren spielen eine Rolle in der osteogenen Differenzierung (Katebi et al. 2009), während der chondrogenen Differenzierung ist CD73 hingegen vermindert ausgebildet (Song et al. 2006; Delorme et al. 2008). Die untersuchten Zementoblasten exprimierten CD73 zu etwa 50 % und ließen sich auch osteogen und chondrogen differenzieren. Wie sich die Ausprägung dieses Markers während der Differenzierung entwickelte, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht.

CD73 wurde schon auf weiteren oralen Progenitorzellen gefunden, wie PDL-Fibroblasten (Trubiani et al. 2010; Ayuthaya et al. 2017), alveolären Osteoblasten (Lohberger et al. 2014; Pettersson et al. 2017), dem Schmelzepithel exfoliierter Milchzähne, Stammzellen aus der Pulpa (Wang et al. 2018), Zahnfollikelzellen (Yalvac et al. 2009) und Zahnpapillenzellen (Pettersson et al. 2017). Quantitative Aussagen der CD73-Ausprägung im Vergleich zu anderen oralen Progenitorzellen sind auf Grund von unterschiedlichen Laborbedingungen nicht möglich.

CD90 ist als mesenchymaler Oberflächenmarker beschrieben (Dominici et al. 2006; Maleki et al. 2014), die genau Funktion in Progenitorzellen ist jedoch nicht bekannt. Die dieser Arbeit zugrundeliegende Zementoblastenkultur exprimierte CD90 fast vollständig und CD105 zu 75 %; ein FACS-Sorting auf CD90- und CD105-positive Zellen wurde durchgeführt um eine möglichst homogene Population in Bezug auf Stammzelleigenschaften zu erhalten. Die erfolgreiche Isolation einer CD90- und CD105-positiven Population wurde anschließend durch eine FACS-Analyse bestätigt. Interessanterweise stellte sich beim FACS-Sorting auf CD90und CD105-negative Zellen heraus, dass weder eine für die beiden Marker doppelt negative noch für nur einen der Marker negative Population zu isolieren war. Eine Untersuchung von Zementoblasten auf CD90 und CD105, insbesondere von einer für diese Marker negativen Population, wurde in der Literatur noch nicht beschrieben, sodass nur Vergleiche zu anderen Zellarten gezogen werden können. In einer Studie wurde die Expression von CD90 in unterschiedlichen mesenchymalen Progentorzellen, unter anderem Pulpa-Stammzellen, mit einem Knockdown durch Transfektion mit sogenannter "small hairpin RNA" (shRNA) reduziert. Durch ein anschließendes FACS-Sorting konnten nahezu vollständig CD90-negative Populationen der unterschiedlichen mesenchymalen Progenitorzellen isoliert werden. Eine Abhängigkeit zwischen CD90 und CD105 konnte in dieser Studie ausgeschlossen werden, da die CD90-negativen Populationen weiterhin positiv für CD29, CD73 und CD105 waren. Jedoch bestand eine Korrelation zwischen CD90 und CD166 und CD44, da diese beiden letztgenannten Marker durch den CD90-Knockdown deutlich herabgesetzt waren. Durch diese Studie konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, CD90-negative Zellen zu isolieren und zu kultivieren (Moraes et al. 2016). In der hier vorliegenden Arbeit wurde versucht eine CD90negative Zementoblastenkultur durch ein FACS-Sorting zu isolieren. Zwar konnten bei diesem Vorgang geringe Zellzahlen gewonnen werden, jedoch war bei einer Nachkontrolle, ebenso FACS-basiert, CD90 wieder so hoch ausgeprägt, wie bei der ungesorteten Zementoblastenkultur. Ob die Zellen durch unzureichende Antikörperbindung trotz CD90-Expression bereits falsch negativ gesortet wurden oder ob sich die CD90-Expression erst bei der anschließenden Kultivierung entwickelte, ist nicht zu beantworten. Einen Zusammenhang mit der Vorbereitung der Zellen für die FACS-Analyse, insbesondere eine Beeinflussung durch die Trypsinierung ist eher unwahrscheinlich, da auch andere Studien ähnliche Methoden an CD90-negativen Zellen angewandt haben (Seo et al. 2004; Fujii et al. 2008; Saito et al. 2014; Gulses et al. 2016; Prateeptongkum et al. 2016).

Zwar ist CD105 als einer der essentiellen mesenchymalen Stammzellmarker beschrieben (Dominici et al. 2006), jedoch variiert die Ausprägung zwischen den Ursprungsgeweben, der Anzahl der Passagen und dem Grad und der Art der Differenzierung (Kern et al. 2006; Jin et al. 2009): Während osteogen differenzierte humane mesenchymale Progenitorzellen im Verlauf der Differenzierung keine Expression von CD105 mehr zeigen (Levi et al. 2011), sind chondrogen differenzierte Zellen weiterhin positiv für CD105 (Chang et al. 2013); außerdem sinkt die Expression von CD105 bei steigender Konfluenz der Zellkultur (Anderson et al. 2013).

Stammzellen Eine Untersuchung an mesenchymalen isoliert aus humanem Unterhautfettgewebe zeigte, dass es möglich ist, zumindest eine Population mit weniger starker CD105-Expression mittels FACS-Sorting zu isolieren; diese wies zudem ein höheres osteogenes Differenzierungspotential auf (Levi et al. 2011). Eine CD105-negative mesenchymale Stammzelllinie konnte ebenfalls mittels FACS-Sorting aus dem Fettgewebe von Mäusen isoliert werden (Anderson et al. 2013). In dieser Arbeit ist eine Isolation von CD105negativen Zellen nicht gelungen, die Methodik des FACS-Sortings unterschied sich lediglich durch ein in dieser Arbeit durchgeführtes Blocking der Zellen. Eine Beeinflussung der CD105-Expression durch die vorbereitenden Schritte zur FACS-Analyse sind durch vorliegende Studien jedoch ausgeschlossen sein (Levi et al. 2011; Anderson et al. 2013). Außerdem wurde im Rahmen dieser Arbeit, zum Ausschluss der Beeinflussung der Oberflächenmarker durch die Trypsinierung, eine Immunozytochemie mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern

vorgenommen: Zementoblasten wurden auf Deckgläschen kultiviert und auf diesen weiter adhärent mit Antikörpern inkubiert. Auch in dieser Untersuchung war die Expression von CD90 und CD105 positiv; die Ergebnisse wurden nicht in dieser Arbeit veröffentlicht.

CD146, auch als MUC18 und MCAM bezeichnet, ist ein Molekül mit Immunglobulin-Domäne und wird von vielen verschiedenen Zellen ausgebildet (Shih et al. 1998); auf vielen oralen mesenchymalen Stammzellen aus der Pulpa (Gronthos et al. 2000), der apikalen Papille (Ikeda et al. 2006), dem Schmelzepithel exfoliierter Milchzähne (Miura et al. 2003), und dem PDL (Gay et al. 2007; Fujii et al. 2008) wurde CD146 bereits nachgewiesen.

Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von CD146 und die Expansionskapazität mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark mit der Fähigkeit zu differenzieren korreliert: Mesenchymale Stammzellen, die adipogen, chondrogen und osteogen differenziert werden konnten, wiesen dabei in der FACS-Analyse eine mittlere Fluoreszenzaktivität von 75 für CD146 auf (Russell et al. 2010). Diese Daten sind auf die hier vorliegende Zementoblastenkultur nicht übertragbar: Die Expression von CD146 lag im Mittel bei etwa 12 %, dennoch zeigte sich ein Differenzierungspotential in die drei genannten Differenzierungswege.

CD166, bzw. ALCAM, ist wie CD146 ein Molekül mit Immunglobulin-Domäne (Lehmann et al. 1989). Bemerkenswert ist, dass CD166 mit dem Beginn der osteogenen Differenzierung bzw. der Expression des Enzyms AP nicht mehr auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden kann (Bruder et al. 1998); mehr noch, durch den Zusatz von anti-CD166-Fab-Fragmenten zu einer osteogenen Differenzierung *in vitro* zu Zellen, die CD166 exprimierten, wurde diese verstärkt (Bruder et al. 1998).

In einigen Studien wurde die AP-Aktivität als Marker für Zementoblasten angeführt (Kaneda et al. 2006; Kitagawa et al. 2006; Diercke et al. 2014b), da dieses Enzym in der frühen Phase mineralisierender Gewebe vermehrt exprimiert wird (Harris 1990; Arzate et al. 1998): die Expression von AP in humanen Zementoblasten wird mit der von Osteoblasten in der frühen Phase der osteoblastären Differenzierung beschrieben (Diercke et al. 2012a).

Die wegfallende Expression von CD166 bei AP-Synthese (Bruder et al. 1998) und die hohe AP-Aktivität von Zementoblasten (Kaneda et al. 2006; Kitagawa et al. 2006; Diercke et al. 2014b) stehen im Widerspruch zu den Ergebnissen dieser Arbeit: Zunächst wurde eine Expression von CD166 im Mittel von 65 % in der FACS-Analyse nachgewiesen, wenn auch mit einer breiten Streuung der Werte. Zwar wurde keine AP-Aktivitätsbestimmung durchgeführt, aber eine Färbung des Enzyms wurde an undifferenzierten und osteogen differenzierten CD90und CD105-positiven Zementoblasten vorgenommen: In den Kontroll-Zementoblasten konnte kein AP nachgewiesen werden, die osteogen differenzierten Zementoblasten zeigten hingegen in der frühen Phase eine deutlich positive Färbung. Die Diskrepanz der AP-Expression von unbehandelten Zementoblasten zu Diercke et al. (2014b), Kitagawa et al. (2006) und Kaneda et al. (2006) ist nicht vollständig aufzuklären, da unterschiedliche Nachweismethoden genutzt wurden.

Die Untersuchungen von Carnes an primären humanen Zementoblasten zeigten im Vergleich zu isolierten Zellen aus der Gingiva und dem PDL eine mittlere AP-Expression, welche durch die Stimulation mit Vitamin D3 gesteigert wurde (Carnes et al. 1997). Dass die AP-Expression von Zementoblasten gesteigert werden kann, wurde in dieser Arbeit bestätigt; ob die erhöhte Expression auf Vitamin D3 zurückzuführen ist, ist nicht zu beantworten, da Zementoblasten nicht isoliert mit Vitamin D3 behandelt wurden, sondern dies nur ein Zusatz des osteogenen Differenzierungsmediums war. Ob die osteogen differenzierten Zementoblasten in der Phase der AP-Synthese noch CD166 exprimierten, gilt es in weiterführenden Untersuchungen zu klären.

5.3 Mesenchymale Differenzierung

Das abschließende Kriterium für den Nachweis von mesenchymalen Progenitorzellen ist die Differenzierung zu Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten durch entsprechende Kulturbedingungen (Dominici et al. 2006). Neben lichtmikroskopisch sichtbaren morphologischen Veränderungen in den differenzierten Zementoblasten, wurden noch Veränderungen typischer Marker auf Protein- und mRNA-Ebene bestimmt. Zusätzlich wurden die osteogene Differenzierung mit einer AP-Färbung und die adipogene Differenzierung mit einer Oil-Red-Färbung überprüft. Diese Untersuchungen wurden bisher an humanen Zementoblasten nicht durchgeführt, sodass in dieser Arbeit der erste Nachweis über das Differenzierungspotential von Zellen aus dem humanen Wurzelzement durchgeführt wurde. Die anderen Gewebearten des Zahnhalteapparats wurden bereits auf das mesenchymale Differenzierungsverhalten hin untersucht; insbesondere die Differenzierung von PDL-Fibroblasten wurde schon mehrfach beschrieben: Übereinstimmend kann gesagt werden, dass im PDL eine Population mit Progenitoreigenschaften vorkommt und dass diese Zellen mit entsprechenden Stimuli adipogen, chondrogen und osteogen differenzieren (Seo et al. 2004; Gay et al. 2007; Fujii et al. 2008; Singhatanadgit et al. 2009). Auch alveoläre Osteoblasten aus verschiedenen Bereichen von Ober- und Unterkiefer weisen eine trilineare Multipotenz auf (Lohberger et al. 2013). Progenitorzellen der Gingiva stellen ebenfalls ein Stammzellreservoir dar und sind zudem einfach zu gewinnen (El-Saved und Dörfer 2016).

5.3.1 Adipogene Differenzierung

Zementoblasten, die mit adipogenem Differenzierungsmedium behandelt wurden, zeigten unter dem Lichtmikroskop deutliche Veränderungen: Nativ waren die Zellen größer als unbehandelte Kontrollzellen und im Zytoplasma waren viele Vakuolen zu erkennen. Bei Energieüberschuss synthetisieren Adipozyten im Zytoplasma Fettsäuren, verestern diese mit Glycerin und speichern sie als Di- und hauptsächlich Triglyceride in den zu erkennenden Vakuolen. Durch Lipolyse können die Di- und Triglyzeride wieder hydrolysiert und zur Energiegewinnung genutzt werden. Der lipophile Farbstoff *Oil-Red* lagert sich in den Lipidtröpfchen ein, färbt diese rot und dient somit als spezifischer Nachweis für Adipozyten (Marshall 2006). Im Zytoplasma der adipogen differenzierten Zementoblasten dieser Arbeit waren rot eingefärbte Vakuolen zu erkennen, die in der undifferenzierten Kontrolle fehlten.

Das zellwandgebundene Enzym LPL spaltet extrazellulär Triglyceride in Glycerin und freie Fettsäuren, die von der Zelle aufgenommen werden können. In der frühen Phase der adipogenen Differenzierung steigt die Transkriptionsrate von LPL an und erreicht im weiteren Verlauf ein Plateau (Enerbäck et al. 1992). PPAR γ ist ein Transkriptionsfaktor für das Enzym Acyl-CoA-Oxidase, welches den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der β -Oxidation katalysiert (Dreyer et al. 1992) und somit Hauptregulator der Adipogenese ist. *In vivo* wird PPAR γ fast ausschließlich von Adipozyten sekretiert und ist ebenfalls ein früher Marker der adipogenen Differenzierung (Tontonoz et al. 1994). In Verbindung mit Fettsäuren stellt das *Fatty acid binding protein 4* (FABP4) einen Modulator für PPAR γ dar (Gorbenko et al. 2006).

Die Überprüfung der adipogenen Markergene LPL und PPAR γ auf mRNA-Level in Zementoblasten zeigten kein einheitliches Ergebnis: LPL stieg signifikant an, während PPAR γ keine Veränderung zeigte. Zusammengefasst kann aufgrund der anderen Ergebnisse dennoch gesagt werden, dass Zementoblasten über adipogenes Differenzierungspotential verfügen. Insgesamt war der Differenzierungszeitraum in dieser Arbeit mit 7 d im Vergleich zu anderen Studien mit 21 – 28 d relativ kurz gewählt (Seo et al. 2004; Gay et al. 2007; Fujii et al. 2008). Eine adipogene Differenzierung von Zementoblasten und der Nachweis der adipogenen Marker sollte künftig nach einem längeren Differenzierungszeitraum untersucht werden. Außerdem kann FABP4 mit in die Analyse aufgenommen werden, da es ebenfalls ein früher adipogener Marker ist und in Zusammenhang mit PPAR γ steht.

5.3.2 Chondrogene Differenzierung

Für die chondrogene Differenzierung ist es evident, dass Einflüsse durch die Kulturflasche möglichst minimiert werden und die Umgebung den physiologischen Gegebenheiten im

Knorpel angepasst wird; erst dadurch sind mesenchymale Stammzellen in der Lage eine knorpeltypische Expression mit entsprechender Matrixsynthese auszuprägen (De Ceuninck et al. 2004). Eine zweidimensionale Monolayer-Kultur eignet sich zwar gut, um eine gleichmäßige Nährstoffversorgung und schnelle Expansion zu erreichen, für eine chondrogene Differenzierung ist diese jedoch ungeeignet (Barry 2003; Lefebvre und Smits 2005). Um in vitro eine drei-dimensionale Umgebung zu simulieren, wurden verschiedene Methoden entwickelt: In dem trägerfreien Aggregatmodell werden die Zellen durch Zentrifugation in eine hochdichte Kultur gebracht und somit die Differenzierung initiiert (Johnstone et al. 1998). Bei der in dieser Arbeit angewandten etablierten Methode wird die dreidimensionale Umgebung durch Einkapselung der Zellen in Alginatkugeln mit einem Volumen von 20 µl erreicht (Guo et al. 1989; Smidsrod und Skjakbrk 1990). Vorteil ist, dass die eingebetteten Zellen eine kugelförmige Morphologie annehmen, wie sie auch in histologischen Schnitten im Knorpelgewebe zu beobachten ist; in einer Monolayer-Kultur nehmen die Zellen hingegen eine fibroblastenähnliche spindelförmige Gestalt an (Tuan et al. 2003). Weiterer Vorteil der Einkapselung der Zellen in Alginat besteht in den vergrößerten Abständen zwischen den Zellen, da Chondrozyten in vivo in isogenen Gruppen vorliegen, die von einem Knorpelhof bzw. Territorium umgeben sind (Lüllmann-Rauch 2015). Chondrogene Progenitorzellen zeigten bereits durch bloße dreidimensionale Kultivierung chondrogenes Differenzierungsverhalten ohne dass ein spezielles serumfreies chondrogenes Differenzierungsmedium mit Faktoren wie TGF-β zugefügt wurde (Goldring 2003; Koelling et al. 2009).

Die Chondrogenese während der enchondralen Ossifikation der Skelettentwicklung beginnt mit der Zellmigration, Kondensation und Proliferation von mesenchymalen Stammzellen. Dieser Vorgang geht mit der gesteigerten Sekretion von extrazellulärer Matrix und der vermehrten Expression von Adhäsionsproteinen wie N-Cadherin, Tenascin, Versican und Thrombospondin-4 einher (Hall und Miyake 2000). Insbesondere durch den Transkriptionsfaktor SOX9 reguliert, verlieren die im Stadium des Prächondrozyten befindlichen Zellen die mesenchymalen Oberflächenmarker und beginnen mit der Synthese von Kollagen Typ II und Aggrecan. Im Verlauf der Entwicklung zu frühen Chondroblasten sind weitere Matrixbestandteile wie Kollagen Typ IX und Typ XI und Link-Protein nachweisbar (Goldring et al. 2006). In der terminalen Phase der enchondralen Ossifikation hypertrophieren die Chondrozyten, die Expression von SOX9 nimmt ab und die Regulation der genetischen Prozesse wird zunehmend von dem Transkriptionsfaktor RUNX2 gesteuert, welcher auch die Differenzierung von Osteoblasten aus mesenchymalen Stammzellen bewirkt (Goldring 2003; Lefebvre und Smits 2005).

SOX9 und dessen Transkriptionsprodukt Kollagen Typ II dienen, wie beschrieben, als chondrogene Marker und wurden auch im Rahmen dieser Arbeit untersucht: Die chondrogen

behandelten Zementoblasten zeigten in Western Blot und qRT-PCR typische Ergebnisse für Kollagen Typ I und Typ II und RUNX2: Kollagen Typ II ist sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene stark angestiegen. Der osteogene Marker RUNX2 stellt einen Transkriptionsfaktor für Kollagen Typ I dar: Sowohl RUNX2 als auch Kollagen Typ I sind wie erwartet nach der chondrogenen Differenzierung gesunken, sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinlevel.

Interessanterweise zeigt der Transkriptionsfaktor SOX9 keine eindeutigen Ergebnisse. Zieht man zusätzlich die Ergebnisse des SOX9-Nachweises nach osteogener Differenzierung heran, scheint die Expression von SOX9 von der durchgeführten Differenzierung entkoppelt zu sein; sowohl nach chondrogener als auch nach osteogener Differenzierung zeigt die Expression im Vergleich zu den undifferenzierten Kontrollen ähnliche Tendenzen, obwohl lediglich ein Anstieg von SOX9 nach chondrogener Differenzierung zu erwarten stand: Der mRNA-Gehalt des SOX9-Transkripts ist sowohl nach osteogener als auch nach chondrogener Differenzierung gesunken, die Expression auf Proteinebene ist nach beiden Differenzierungen leicht gestiegen. Wie schon beschrieben, beinhaltet die chondrogene Differenzierung eine Kultivierung der Zellen in einer dreidimensionalen Umgebung (Johnstone et al. 1998; Barry 2003; Lefebvre und Smits 2005). Zwar handelt es sich hierbei um eine etablierte Methode zur Differenzierung, jedoch ist auch die Versorgung mit Nährstoffen geringer, als bei einer zweidimensionalen Kultur, sodass eine Herabsetzung des Grundumsatzes insbesondere unter dem Differenzierungsstress nachvollziehbar erscheint. Weiterführend ist allerdings die Frage zu beantworten warum die SOX9-Expression vor allem in Relation zu den anderen untersuchten Markern die beschriebenen Werte annimmt.

Da SOX9 wie gesagt ein wichtiger Transkriptionsfaktor von Kollagen Typ II ist (Goldring et al. 2006) und dieses sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene in den chondrogen differenzierten Zementoblasten deutlich angestiegen ist, ergeben sich weitere Fragestellungen aus diesen gegensätzlich wirkenden Ergebnissen. Festzuhalten ist, dass die Kollagen Typ II-Expression scheinbar unabhängig von SOX9 gestiegen ist. In der Literatur sind einige SOX9unabhängigen Signalwege der Chondrogenese beschrieben: Durch mehrfache Passage wurden humane Chondrozyten dedifferenziert und mit entsprechender SOX9-siRNA transfiziert. Anschließend wurde die Chondrogenese durch Hypoxie durchgeführt und der dadurch freigesetzte Hypoxie-induzierte Faktor 2α regulierte MIG6 und Inhibin β A SOX9-unabhängig hoch (Lafont et al. 2008). MIG6 und Inhibin β A sind ebenfalls als chondrogene Differenzierungsfaktoren und -regulatoren beschrieben (Murphy und Polak 2004; Zhang et al. 2005).

Eine weitere Studie zeigte, dass der Transkriptionsfaktor Nkx3.2 sowohl SOX9-abhängig als auch -unabhängig mesenchymale Progenitorzellen chondrogen differenziert: Über die

Methode der RNA-Interferenz wurde die SOX9-mRNA gespalten, bevor diese translatiert werden konnte; bei gleichzeitiger Überexpression von Nkx3.2 stieg bei chondrogener Differenzierung die Expression von Kollagen Typ II dennoch an (Kawato et al. 2012).

Warum die in dieser Arbeit untersuchten Zementoblasten in der chondrogenen Differenzierung keine erhöhte SOX9-Expression zeigte, kann nicht abschließend geklärt werden. Festzuhalten ist, dass Zementoblasten nach chondrogener Differenzierung eine deutlich gesteigerte Expression von Kollagen Typ II zeigten und die angestrebte Chondrogenese somit als erfolgreich gewertet werden kann. Auch wenn Knorpelgewebe keine Rolle in der Zahnentwicklung spielt, sollten die beschriebenen Ergebnisse weiter untersucht werden.

5.3.3 Osteogene Differenzierung

Die Osteogenese *in vivo* ist ein komplexer Vorgang von gezielter Resorption auf der einen und Matrixapposition auf der anderen Seite. Bewerkstelligt wird dies durch sensible Interaktion zwischen beteiligten Zellen, Matrixproteinen und Wachstums- und Differenzierungsfaktoren (Owen und Friedenstein 1988; Baylink et al. 1993). Die osteogene Differenzierung *in vitro* kann grob nach der Expression bestimmter Marker in drei Phasen unterteilt werden: Zunächst proliferieren die mesechymalen Stammzellen und synthetisieren Kollagen Typ I; das Enzym AP ist der Marker der frühen osteoblastären Differenzierung. Erst terminal wird Osteocalcin exprimiert, welches eine Mineralisation des Gewebes bewirkt (Owen et al. 1990).

Bereits nativ morphologische sind Veränderungen der mit osteogenem Differenzierungsmedium inkubierten Zementoblasten wahrzunehmen: wie bereits beschrieben, konnte in einer zytologischen Färbung das aktive Enzym AP im Gegensatz zu unbehandelten Zementoblasten an osteogen differenzierten Zellen nachgewiesen werden. Zu bemerken ist jedoch, dass von einer solchen Färbung nicht ohne Einschränkung auf die vorhandene Enzymmenge geschlossen werden kann, sodass diese Nachweismethode nie alleiniger Bestandteil der erfolgreichen osteogenen Differenzierung sein kann. Dem gegenübergestellt ist auch die photometrische AP-Aktivitätsbestimmung, wie sie in anderen Studien über Zementoblasten genutzt wurde (Kitagawa et al. 2006; Diercke et al. 2012b) nicht geeignet, um spezifische Aussagen über den osteogenen Charakter zu treffen, da AP ein ubiquitär im Körper vorkommendes Enzym ist (Harris 1990).

Der bedeutendste osteogene Transkriptionsfaktor ist RUNX2, der sowohl die Entwicklung von mesenchymalen Stammzellen induziert als auch in reifen Osteoblasten die Transkription von Osteocalcin, Osteopontin und Kollagen Typ I reguliert (Ducy et al. 1999). Sowohl auf mRNAals auch auf Proteinlevel sind die Expression von RUNX2 und Kollagen Typ I in osteogen differenzierten Zementoblasten gestiegen. Die Ergebnisse von SOX9 sind wie beschrieben etwas konträr: Auf mRNA-Ebene konnte ein Rückgang von SOX9 in osteogen differenzierten Zementoblasten verzeichnet werden, in der Untersuchung des Western Blots wurde jedoch ein leichter Anstieg des Proteins verzeichnet. Festzuhalten ist, dass das Verhältnis von RUNX2 zu SOX9 auf der Seite von RUNX2 liegt. In der Literatur wird dieser Quotient als Marker des osteogenen Potentials beschrieben (Loebel et al. 2015), demnach ist vor allem die stärker gestiegene Expression von RUNX2 in der osteogenen Differenzierung entscheidend. Kollagen Typ II, für welches SOX9 einen Transkriptionsfaktor darstellt, wurde hingegen in allen zweidimensionalen Proben sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinlevel nicht oder nur sehr schwach exprimiert.

Eine Untersuchung des in der terminalen Phase nachweisbaren Osteocalcins wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt. Der Differenzierungszeitraum wurde in dieser Arbeit mit 7 d im Vergleich zu anderen Studien relativ kurz gewählt (Gronthos et al. 2000; Miura et al. 2003; Seo et al. 2004; Gay et al. 2007; Fujii et al. 2008; Singhatanadgit et al. 2009), sodass eine Expression dieses späten osteogenen Markers eher nicht zu erwarten war. Da eine osteogene Differenzierung von humanen Zementoblasten in der Literatur noch nicht beschrieben ist, sollte in einer Vergleichsstudie nochmals die Expression von Osteocalcin auch nach einer längeren Differenzierungsphase untersucht werden.

5.4 Co-Kultivierung

Das Parodontium setzt sich aus Gingiva, Alveolarknochen, PDL und Wurzelzement zusammen. Wie diese Gewebe auf zellulärer Ebene miteinander interagieren, ist bisher noch weitestgehend unerforscht. Durch den Versuchsaufbau einer Co-Kultivierung *in vitro* wurden Zementoblasten mit PDL-Fibroblasten in metabolischen Austausch gebracht.

In der Literatur sind parakrine Einflüsse auf das Wurzelzement aus angrenzenden Geweben lediglich durch Inkubation mit entsprechenden Mediatoren nicht aber mit den sekretierenden Zellen selbst beschrieben: Diercke et al. simulierte *in vitro* den ausgeübten Druck während kieferorthopädischen Zahnbewegung auf Zementoblasten und etablierte dazu ebenfalls eine humane immortalisierte Zementoblastenzelllinie; Insbesondere auf dem Zusammenhang zwischen appliziertem Druck und der Sekretion von Entzündungsmediatoren lag der Fokus ihrer Arbeiten (Diercke et al. 2012a, 2012b, 2014a und 2014b). Auch Kitagawa et al. (2006) etablierten eine humane immortalisierte Zementoblastenzelllinie: In einer ersten Untersuchung wurden diese Zementoblasten in einer *Mikroarray*-Analyse mit humanen PDL-Fibroblasten verglichen. Auf Grundlage dieser Daten wurden die Gene, welche von den Zementoblasten höher exprimiert wurden, genauer untersucht (Kitagawa et al. 2012). Da kieferorthopädische

Zahnbewegungen mit einer aseptischen Entzündungsreaktion einhergehen, wurde des Weiteren das Verhalten der Zementoblasten hinsichtlich verschiedener Entzündungssignalwege untersucht (Ahn et al. 2013; Bae et al. 2016; Huynh et al. 2017). Außerdem wurde die von Kitagawa etablierte Zementoblastenzelllinie noch im Zusammenhang mit verschiedenen protektiven Faktoren (Kajiya et al. 2008, 2009 und 2014; Bae et al. 2018) und osteogenen Differenzierungsfaktoren untersucht (Tanimoto et al. 2012; Lee et al. 2014; Matarasso et al. 2015; Kunimatsu et al. 2017).

Im Fokus der aktuellen Forschung steht derzeit das RANK/ RANKL/ OPG-System: Durch Kraftapplikation auf einen Zahn sekretieren sowohl die alveolären Osteoblasten, als auch die PDL-Fibroblasten RANKL (Hasegawa et al. 2002; Sakata et al. 2002; Diercke et al. 2012b), welches eine Differenzierung von Makrophagen und Osteoblasten zu Osteoklasten stimuliert (Hofbauer und Heufelder 2001; Goldring 2003). Die Resorption der Osteoklasten ist nicht auf den Alveolarknochen beschränkt, sondern kann sich über das Wurzelzement hinweg bis ins Dentin erstrecken, sodass es zu Wurzelresorptionen kommt (Lossdörfer et al. 2002; Fukushima et al. 2003; Diercke et al. 2012b).

Außerdem ist ein mögliches Modell der Zementogenese in Interaktion mit den Zellen der Hertwigschen Epithelscheide beschrieben: Diese induziert durch ein nach apikal gerichtetes Wachstum die Bildung von Dentin, an welches sich fibroblastenartige Zementoblasten anlagern (D'Errico et al. 1999; Fleischmannova et al. 2010; Radlanski 2011; Beertsen und Everts 2016). PDL-Fibroblasten, die parakrin von den Zellen der Hertwigschen Epithelscheide beeinflusst werden, differenzieren osteogen. Weiterführend wird diskutiert, ob diese Differenzierung den Vorgang der Zementogenese darstellt. Hervorzuheben ist, dass Stammzellen aus dem Knochenmark in Co-Kultur mit Zellen der Hertwigschen Epithelscheide im Gegensatz zu den PDL-Fibroblasten nicht osteogen differenzieren (Sonoyama et al. 2007; Nam et al. 2014).

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal die parakrine Wirkung von PDL-Fibroblasten auf Zementoblasten untersucht: Hierzu wurden die beiden Zellarten mit einem *ThinCert*®, einer Art Einhang für eine 6-*Well*-Platte mit einer zellundurchlässigen Membran, separiert inkubiert; parakriner Austausch zwischen den Zellarten war möglich, eine direkte Interaktion über Zellfort-sätze konnte nicht stattfinden. Die Untersuchung der Marker RUNX2, SOX9 und der Kollagene Typ I und Typ II ergaben einen leicht osteogen differenzierenden Einfluss der PDL-Fibroblasten auf die Zementoblasten: Auf mRNA-Ebene ist die Expression von RUNX2 und Kollagen Typ I gestiegen; Kollagen Typ II konnte nicht nachgewiesen werden, jedoch war auch ein leichter Anstieg von SOX9 im Vergleich zu einer undifferenzierten Monokultur von Zementoblasten zu verzeichnen. In der Überprüfung dieser Proteine im Western Blot zeigte

sich ein leichter Anstieg von RUNX2, die Expression von Kollagen Typ I veränderte sich jedoch nicht; SOX9 war auch auf Proteinebene leicht gestiegen, eine Expression von Kollagen Typ II war nicht nachzuweisen. Insbesondere im Vergleich mit der chondrogenen und osteogenen Differenzierung der Zementoblastenmonokultur fallen die SOX9-Werte sowohl auf mRNA- als auch Proteinlevel aus dem Rahmen und scheinen, wie beschrieben, sowohl von der durchgeführten Differenzierung als auch von dem eigenen Transkriptionsprodukt Kollagen Typ II entkoppelt zu sein.

Ähnliche Versuchsaufbauten mit einer Co-Kultuvierung mit PDL-Fibroblasten sind in der Literatur lediglich mit anderen Zelllinien beschrieben: Bei der Co-Kultur mit Osteoblasten und -klasten ist ebenfalls ein osteogener Einfluss der PDL-Fibroblasten beschrieben: Die Marker BSP und OPN sind auf mRNA- und Proteinebene in Vorläuferzellen von Osteoblasten und Osteoklasten gestiegen; zudem wurde eine erhöhte AP-Aktivität nachgewiesen (Chen et al. 2015). Außerdem wird diskutiert, ob PDL-Fibroblasten zum einen direkten Einfluss auf den Knochenstoffwechsel haben, zum anderen aber auch über sezernierte Faktoren, wie Ephrin B2 und Ephrin B4 osteogene Progenitorzellen anregen (Caplan und Dennis 2006; Caplan und Dennis 2006; Meirelles et al. 2009).

Dedifferenzierte Fettzellen wurden ebenfalls schon mit PDL-Fibroblasten co-kultiviert und differenzierten unter diesem metabolischen Einfluss zu Osteoblasten: Auf mRNA-Ebene wurde eine erhöhte Expression von *RUNX2* nachgewiesen, wohingegen der adipogene Marker *PPAR* γ vermindert exprimiert wurde im Vergleich zur Kontrollgruppe. Außerdem wurde das Methylierungsmuster der Markergene untersucht; bei einer erhöhten Methylierung (> 50 %) ist die Transkription des Gens eingeschränkt, wie es bei *PPAR* γ in den mit PDL co-kultivierten dedifferenzierten Fettzellen der Fall war; *RUNX2* war hingegen weniger stark methyliert als in den Kontrollzellen. Zu erwähnen ist, dass die zur Co-Kultivierung genutzten PDL-Fibroblasten gleichzeitig alle Merkmale einer Stammzelle aufwiesen (Tansriratanawong et al. 2014).

Durch das Verhältnis RUNX2 : SOX9 > 1, wie es sowohl im Western Blot als auch in der qRT-PCR in den mit PDL- Fibroblasten co-kultivierten Zementoblasten nachzuweisen war, kann von einem osteogenen Einfluss der PDL-Fibroblasten gesprochen werden (Loebel et al. 2015). Zu beachten ist jedoch, dass das Verhältnis Zellzahl : Medium sich um den Faktor drei erhöht hat, sodass mit einem verminderten Proteinumsatz der Zellen durch eine Unterversorgung mit Nährstoffen zu rechnen ist. Durch diesen Sachverhalt könnte erklärt werden, warum zwar RUNX2 in co-kultivierten Zementoblasten signifikant erhöht ist, nicht jedoch Kollagen Typ I, für welches RUNX2 als Transkriptionsfaktor wirkt.

In der mit osteogenem Differenzierungsmedium inkubierten Co-Kultur von Zementoblasten und PDL-Fibroblasten zeigten sich etwas stärker ausgeprägte Veränderungen der Marker RUNX2,

SOX9 und Kollagen Typ I: Sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Protein-Ebene sind RUNX2 und Kollagen Typ I deutlich angestiegen; ein leichter Anstieg von SOX9 war ebenfalls auf Proteinebene zu verzeichnen, auf mRNA-Level sank SOX9 jedoch. Dennoch ist hervorzuheben, dass das Verhältnis RUNX2 : SOX9 > 1 und somit auf der Seite von RUNX2, also dem osteogenen der beiden Marker, lag (Loebel et al. 2015).

Im Vergleich zu der osteogen differenzierten Monokultur von Zementoblasten zeigte die osteogen differenzierte Co-Kultur ein weniger großes osteogenes Potential. Nach den Ergebnissen der reinen Co-Kultivierung von Zementoblasten mit PDL-Fibroblasten stand zu erwarten, dass bei einer doppelten osteogenen Differenzierung durch Co-Kultur mit PDL und osteogenem Differnezierungsmedium höhere Werte der osteogenen Marker nachzuweisen wären; worauf dieser dämpfende Einfluss des PDLs bei der Differenzierung mit osteogenem Medium zurückzuführen ist, kann nur gemutmaßt werden: Denkbar ist zum einen, wie bereits bei der reinen Co-Kultivierung besprochen, eine Unterversorgung mit Nährstoffen, sodass die Zellkultur zwar vital blieb, jedoch nicht vermehrt osteogen differenzieren konnte. Eine weitere Überlegung bezieht sich auf die Konzentration der Zusätze des osteogenen Differenzierungsmediums: Durch die erhöhte Zellzahl, war die Konzentration der Zusätze pro Zelle verringert, sodass entsprechende Schwellenwerte nicht erreicht wurden.

Im Umkehrschluss jedoch belegt diese geringere Ausprägung der osteogenen Differenzierung im Vergleich zur osteogen differenzierten Monokultur eine Auswirkung von PDL-Fibroblasten auf Zementoblasten, auch wenn sie anders ist, als die bisherige Literatur vermuten ließ.

6 Zusammenfassung

Parodontitis ist eine weitverbreitete Erkrankung des Zahnhalteapparats: Die Bundeszahnärztekammer sieht in der V. Mundgesundheitsstudie weiteren Bedarf bei der Behandlung von Parodontalerkrankungen, da jeder zweite jüngere Erwachsene (35 – 44-Jährige) von einer Parodontitis betroffen ist. Alle bisherigen konservativen Therapieansätze zielen lediglich auf ein Aufhalten von weiterem Knochenabbau ab. Für zukünftige regenerative Therapien könnten Stammzelleigenschaften aller Zellen des Parodonts genutzt werden.

Während in der Literatur Stammzellpopulationen von parodontalen Ligament-Zellen vielfach beschrieben sind, ist das Wurzelzement diesbezüglich noch weitestgehend unerforscht. Außerdem wurde ein Großteil der bisherigen Zementforschungen an Zellen tierischen Ursprungs durchgeführt. Um langfristig ein geeignetes Modell für die regenerative Therapie humaner oraler Erkrankungen zu entwickeln, ist es jedoch unabdingbar, humane Zellen *in vitro* zu untersuchen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte das erste Mal gezeigt werden, dass auch im humanen Wurzelzement Zellen mit Progenitoreigenschaften vorliegen: In der FACS-Analyse waren typische mesenchymale CD-Marker auf den Zementoblasten nachweisbar. Auf Grundlage dieser Daten wurde ein Sorting auf CD90- und CD105-positive sowie -negative Zellen vorgenommen. Hierbei konnte eine positive Population isoliert werden, eine negative jedoch nicht. Nach adipogener, chondrogener und osteogener Differenzierung der Zementoblasten konnten entsprechende Marker mittels qRT-PCR, Western Blot und zytologischen Färbungen nachgewiesen werden.

Weiterführend wurde in dieser Arbeit die erste Co-Kultur von Zementoblasten mit physiologisch eng benachbarten PDL-Fibroblasten durchgeführt: Unter diesem metabolischen Einfluss stehend zeigten Zementoblasten auf mRNA- und Proteinebene eine erhöhte Expression des osteogenen Markers RUNX2. Mit einer zusätzlichen osteogenen Differenzierung der Co-Kultur wurden noch Faktoren, wie sie im angrenzenden Alveolarknochen vorliegen können, in die Untersuchungen einbezogen. Anders als vermutet, zeigte die osteogen differenzierte Co-Kultur der Zementoblasten etwas geringer gestiegene osteogene Markerwerte als die osteogen differenzierte Monokultur. Die Expressionswerte der reinen Co-Kultur sind in dieser Rangfolge des osteogenen Potentials an hinterster Stelle einzuordnen.

Durch die zentrale Stellung des humanen Wurzelzements in der Verankerung der Zähne im Alveolarknochen, dem Nachweis von Progenitorzellen und der Interaktion mit PDL-Fibroblasten ist das Wurzelzement ein vielversprechender Ansatzpunkt für zukünftige regenerative Therapiemöglichkeiten.

7 Literatur

Ababneh KT, Hall RC, Embery G (1999): The proteoglycans of human cementum: immunohistochemical localization in healthy, periodontally involved and ageing teeth. J Periodontal Res <u>34</u>, 87–96

Ahn M, Yoon H, Park J, Lee J, Min S, Ahn S, Yoon J (2013): Characterization of NODs and TLRs in innate immune response of human cementoblast cells. Oral Dis <u>19</u>, 374–380

Ainamo J, Löe H (1966): Anatomical characteristics of gingiva. A clinical and microscopic study of the free and attached gingiva. J Periodontol <u>37</u>, 5–13

Alvarez-Pérez M, Narayanan S, Zeichner-David M, Rodríguez Carmona B, Arzate H (2006): Molecular cloning, expression and immunolocalization of a novel human cementum-derived protein (CP-23). Bone <u>38</u>, 409–419

Anderson P, Carrillo-Gálvez AB, García-Pérez A, Cobo M, Martín F (2013): CD105 (endoglin)negative murine mesenchymal stromal cells define a new multipotent subpopulation with distinct differentiation and immunomodulatory capacities. PLoS ONE <u>8</u>, e76979

Arzate H, Alvarez-Pérez MA, Aguilar-Mendoza ME, Alvarez-Fregoso O (1998): Human cementum tumor cells have different features from human osteoblastic cells in vitro. J Periodontal Res <u>33</u>, 249–258

Ascenzi A, Bonucci E (1968): The compressive properties of single osteons. Anat Rec <u>161</u>, 377–391

Attisano L, Wrana JL (1996): Signal transduction by members of the transforming growth factor- β superfamily. Cytokine Growth Factor Rev <u>7</u>, 327–339

Ayuthaya BIN, Satravaha P, Pavasant P (2017): Interleukin-12 modulates the immunomodulatory properties of human periodontal ligament cells. J Periodontal Res <u>52</u>, 546–555

Bae W, Auh Q, Lim H, Kim G, Kim H, Kim E (2016): Sonic hedgehog promotes cementoblastic differentiation via activating the BMP pathways. Calcif Tissue Int <u>99</u>, 396–407

Bae W, Park J, Kang S, Kwon I, Kim E (2018): Effects of melatonin and its underlying mechanism on ethanol-stimulated senescence and osteoclastic differentiation in human periodontal ligament cells and cementoblasts. Int J Mol Sci <u>19</u>, 1742–1763

Barry F, Boynton RE, Liu B, Murphy JM (2001): Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: Differentiation-dependent gene expression of matrix components. Exp Cell Res <u>268</u>, 189–200

Barry FP (2003): Biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. Birth Defects Res Part C Embryo Today Rev <u>69</u>, 250–256

Bartold PM, McCulloch CA, Narayanan AS, Pitaru S (2000): Tissue engineering: a new paradigm for periodontal regeneration based on molecular and cell biology. Periodontol 2000 <u>24</u>, 253–269

Baylink DJ, Finkelman RD, Mohan S (1993): Growth factors to stimulate bone formation. J Bone Miner Res <u>8</u>, 565–572

Beertsen W, Everts V (2016): Formation of acellular root cementum in to dental and non-dental hard tissues in the rat. J Dent Res <u>69</u>, 1669–1673

Beertsen W, McCulloch CA, Sodek J (1997): The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue. Periodontol 2000 <u>13</u>, 20–40

Bellucci C, Perrini N (2002): A study on the thickness of radicular dentine and cementum in anterior and premolar teeth. Int Endod J <u>35</u>, 594–606

Bencze L (1927): Befunde an der Dentizementgrenze. Z Stomatol 25, 877–896

Bergström J (1984): The topography of papillary gingiva in health and early gingivitis. J Clin Periodontol <u>11</u>, 423–431

Bernhardt K: Gewinnung und Charakterisierung von humanen Zementoblasten. Med. dent. Diss. Göttingen 2017

Blake R: An essay on the structure and formation of the teeth in man and various animals (American library of dental science). William Porter, Dublin 1801

Blau HM, T. R. Brazelton, Weimann JM (2001): The evolving concept of a stem cell: entity or function? Cell <u>105</u>, 829–841

Bosshardt DD (2005): Are cementoblasts a subpopulation of osteoblasts or a unique phenotype? J Dent Res <u>84</u>, 390–406

Bosshardt DD, Schroeder HE (1992): Initial formation of cellular intrinsic fiber cementum in developing human teeth. Cell Tissue Res <u>267</u>, 321–335

Bosshardt DD, Schroeder HE (1996): Cementogenesis reviewed: A comparison between human premolars and rodent molars. Anat Rec <u>245</u>, 267–292

Bosshardt DD, Selvig KA (1997): Dental cementum: the dynamic tissue covering of the root. Periodontol 2000 <u>13</u>, 41–75

Bosshardt DD, Zalzal S, Mckee MD, Nanci A (1998): Developmental appearance and distribution of bone sialoprotein and osteopontin in human and rat cementum. Anat Rec <u>250</u>, 13–33

Bowen MA, Patel DD, Li X, Modrell B, Malacko AR, Wang WC, Marquardt H, Neubauer M, Pesando JM, Francke U (1995): Cloning, mapping, and characterization of activated leukocyte-cell adhesion molecule (ALCAM), a CD6 ligand. J Exp Med <u>181</u>, 2213–2220

Bridgewater LC, Lefebvre V, de Crombrugghe B (1998): Chondrocyte-specific enhancer elements in the Col11a2gene resemble the Col2a1 tissue-specific enhancer. J Biol Chem <u>273</u>, 14998–15006

Bruder SP, Ricalton NS, Boynton RE, Connolly TJ, Jaiswal N, Zaia J, Barry FP (1998): Mesenchymal stem cell surface antigen SB-10 corresponds to activated leukocyte cell adhesion molecule and is involved in osteogenic differentiation. J Bone Miner Res <u>13</u>, 655–663 Brudvik P, Rygh P (1995): Transition and determinants of orthodontic root resorption-repair sequence. Eur J Orthod <u>17</u>, 177–188

Butler W, Brunn J, Qin C (2003): Dentin extracellular matrix (ECM) proteins: comparison to bone ECM and contribution to dynamics of dentinogenesis. Connect Tissue Res <u>44</u>, 171–178

Camilleri S, McDonald F (2006): Runx2 and dental development. Eur J Oral Sci 114, 361–373

Caplan AI, Bruder SP (2001): Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. Trends Mol Med <u>7</u>, 259–264

Caplan AI, Dennis JE (2006): Mesenchymal stem cells as trophic mediators. J Cell Biochem <u>98</u>, 1076–1084

Carnes DL, Maeder CL, Graves DT (1997): Cells with osteoblastic phenotypes can be explanted from human gingiva and periodontal ligament. J Periodontol <u>68</u>, 701–707

Carter DH, Sloan P (1994): The fibrous architecture of the rat periodontal ligament in cryosections examined by scanning electron microscopy. Arch Oral Biol <u>39</u>, 949–953

Caton J, Zander HA (1976): Osseous repair of an infrabony pocket without new attachment of connective tissue. J Clin Periodontol <u>3</u>, 54–58

Chang CB, Han SA, Kim EM, Lee S, Seong SC, Lee MC (2013): Chondrogenic potentials of human synovium-derived cells sorted by specific surface markers. Osteoarthritis Cartilage <u>21</u>, 190–199

Chen F, Zhang M, Zhang J, Wu Z-F, An Y, Chen F-M (2010): A review on endogenous regenerative technology in periodontal regenerative medicine. Biomaterials <u>31</u>, 7892–7927

Chen JJ, Jin H, Ranly DM, Sodek J, Boyan BD (1999): Altered expression of bone sialoproteins in vitamin D–deficient rBSP2.7Luc transgenic mice. J Bone Miner Res <u>14</u>, 221–229

Chen S, Ye X, Yu X, Xu Q, Pan K, Lu S, Yang P (2015): Co-culture with periodontal ligament stem cells enhanced osteoblastic differentiation of MC3T3-E1 cells and osteoclastic differentiation of RAW264.7 cells. Int J Clin Exp Pathol <u>8</u>, 14596

Cho M, Garant P (2000): Development and general structure of the periodontium. Periodontol 2000 24, 9–27

Christner P, Robinson P, Clark CC (1977): A preliminary characterization of human cementum collagen. Calcif Tissue Res <u>23</u>, 147–150

Christoffersen J, Landis WJ (1991): A contribution with review to the description of mineralization of bone and other calcified tissues in vivo. Anat Rec <u>230</u>, 435–450

Coin R, Haïkel Y, Ruch J-V (1999): Effects of apatite, transforming growth factor β -1, bone morphogenetic protein-2 and interleukin-7 on ameloblast differentiation in vitro. Eur J Oral Sci 107, 487–495

Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ (2001): Identification of a subpopulation of rapidly selfrenewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. Proc Natl Acad Sci U S A <u>98</u>, 7841–7845 Dastmalchi R, Poison A, Bouwsma O, Proskin H (1990): Cementum thickness and mesial drift. J Clin Periodontol <u>17</u>, 709–713

de Ceuninck F, Lesur C, Pastoureau P, Caliez A, Sabatini M (2004): Culture of chondrocytes in alginate beads. Methods Mol Med <u>100</u>, 15–22

Delorme B, Ringe J, Gallay N, Le Vern Y, Kerboeuf D, Jorgensen C, Rosset P, Sensebe L, Layrolle P, Haupl T, Charbord P (2008): Specific plasma membrane protein phenotype of culture-amplified and native human bone marrow mesenchymal stem cells. Blood <u>111</u>, 2631–2635

D'Errico JA, MacNeil RL, Strayhorn CL, Piotrowski BT, Somerman MJ (1995): Models for the study of cementogenesis. Connect Tissue Res <u>33</u>, 9–17

D'Errico JA, Macneil RL, Takata T, Berry J, Strayhorn C, Somerman MJ (1997): Expression of bone associated markers by tooth root lining cells, in situ and in vitro. Bone <u>20</u>, 117–126

D'Errico JA, Ouyang H, Berry JE, MacNeil RL, Strayhorn C, Imperiale MJ, Harris NL, Goldberg H, Somerman MJ (1999): Immortalized cementoblasts and periodontal ligament cells in culture. Bone <u>25</u>, 39–47

Diercke K, Koenig A, Kohl A, Lux C, Erber R (2012a): Human primary cementoblasts respond to combined IL-1 beta stimulation and compression with an impaired BSP and CEMP-1 expression. Eur J Cell Biol <u>91</u>, 402–412

Diercke K, Kohl A, Lux C, Erber R (2012b): IL-1 beta and compressive forces lead to a significant induction of RANKL-expression in primary human cementoblasts. J Orofac Orthop-Fortschritte Kieferorthopadie <u>73</u>, 397–412

Diercke K, Kohl A, Lux C, Erber R (2014a): Compression of human primary cementoblasts leads to apoptosis. A possible cause of dental root resorption? J Orofac Orthop-Fortschritte Kieferorthopadie <u>75</u>, 430–445

Diercke K, Zingler S, Kohl A, Lux C, Erber R (2014b): Gene expression profile of compressed primary human cementoblasts before and after IL-1 beta stimulation. Clin Oral Investig <u>18</u>, 1925–1939

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E (2006): Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy <u>8</u>, 315–317

Dreyer C, Krey G, Keller H, Givel F, Helftenbein G, Wahli W (1992): Control of the peroxisomal beta-oxidation pathway by a novel family of nuclear hormone receptors. Cell <u>68</u>, 879–887

Ducy P (2000): CBFA1: A molecular switch in osteoblast biology. Dev Dyn 219, 461-471

Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G (1997): Osf2/Cbfa1: A transcriptional activator of osteoblast differentiation. Cell <u>89</u>, 747–754

Ducy P, Starbuck M, Priemel M, Shen J, Pinero G, Geoffroy V, Amling M, Karsenty G (1999): A Cbfa1-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. Genes Dev <u>13</u>, 1025–1036

Eijken M, Hewison M, Cooper MS, de Jong FH, Chiba H, Stewart PM, Uitterlinden AG, Pols H a. P, van Leeuwen JPTM (2005): 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase expression and glucocorticoid synthesis are directed by a molecular switch during osteoblast differentiation. Mol Endocrinol <u>19</u>, 621–631

El-Sayed F, Dörfer CE (2016): Gingival mesenchymal stem/progenitor cells: A unique tissue engineering gem. Stem Cells Int <u>2016</u>, 7154327

Enerbäck S, Ohlsson BG, Samuelsson L, Bjursell G (1992): Characterization of the human lipoprotein lipase (LPL) promoter: evidence of two cis-regulatory regions, LP-alpha and LP-beta, of importance for the differentiation-linked induction of the LPL gene during adipogenesis. Mol Cell Biol <u>12</u>, 4622–4633

Entenmann G, Hauner H (1996): Relationship between replication and differentiation in cultured human adipocyte precursor cells. Am J Physiol-Cell Physiol <u>270</u>, 1011–1016

Feng F, Akiyama K, Liu Y, Yamaza T, Wang T-M, Chen J, Wang BB, Huang GTJ, Wang S, Shi S (2010): Utility of PDL progenitors for in vivo tissue regeneration: a report of 3 cases. Oral Dis <u>16</u>, 20–28

Fisher LW, Torchia DA, Fohr B, Young MF, Fedarkoac NS (2001): Flexible structures of SIBLING proteins, bone sialoprotein, and osteopontin. Biochem Biophys Res Commun <u>280</u>, 460–465

Fleischmannova J, Matalova E, Sharpe PT, Misek I, Radlanski RJ (2010): Formation of the tooth-bone interface. J Dent Res <u>89</u>, 108–115

Foster BL (2017): On the discovery of cementum. J Periodontal Res 52, 666-685

Foster BL, Popowics TE, Fong HK, Somerman MJ (2007): Advances in defining regulators of cementum development and periodontal regeneration. Curr Top Dev Biol <u>78</u>, 47–126

Fuentes P, Garrett S, Nilvéus R, Egelberg J (1993): Treatment of periodontal furcation defects. J Clin Periodontol <u>20</u>, 425–430

Fujii S, Maeda H, Wada N, Tomokiyo A, Saito M, Akamine A (2008): Investigating a clonal human periodontal ligament progenitor/stem cell line in vitro and in vivo. J Cell Physiol <u>215</u>, 743–749

Fukushima H, Kajiya H, Takada K, Okamoto F, Okabe K (2003): Expression and role of RANKL in periodontal ligament cells during physiological root-resorption in human deciduous teeth. Eur J Oral Sci <u>111</u>, 346–352

Fullmer H, Sheetz J, Narkates A (1974): Oxytalan connective tissue fibers: A review. J Oral Pathol Med <u>3</u>, 291–316

Gay IC, Chen S, MacDougall M (2007): Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells. Orthod Craniofac Res <u>10</u>, 149–160

Gestrelius S, Lyngstadaas SP, Hammarström L (2000): Emdogain – periodontal regeneration based on biomimicry. Clin Oral Investig <u>4</u>, 120–125

Goldring MB, Tsuchimochi K, Ijiri K (2006): The control of chondrogenesis. J Cell Biochem <u>97</u>, 33–44

Goldring SR (2003): Inflammatory mediators as essential elements in bone remodeling. Calcif Tissue Int <u>73</u>, 97–100

Gorbenko O, Filonenko V, Gout I (2006): Generation and characterization of monoclonal antibodies against FABP4. Hybridoma <u>25</u>, 86–90

Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S (2000): Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. Proc Natl Acad Sci <u>97</u>, 13625–13630

Grzesik WJ, Kuzentsov SA, Uzawa K, Mankani M, Robey PG, Yamauchi M (1998): Normal human cementum-derived cells: Isolation, clonal expansion, and in vitro and In vivo characterization. J Bone Miner Res <u>13</u>, 1547–1554

Grzesik WJ, Cheng H, Oh JS, Kuznetsov SA, Mankani MH, Uzawa K, Robey PG, Yamauchi M (2000): Cementum-forming cells are phenotypically distinct from bone-forming cells. J Bone Miner Res <u>15</u>, 52–59

Gühring W, Barth J: Anatomie: spezielle Biologie des Kausystems. 3. Auflage; Verlag Neuer Merkur GmbH, München 1992

Gulses A, Wiltfang J, Açil Y, Ayna M, Yang F, Gierloff M (2016): Isolation, characterization and investigation of differentiation potential of human periodontal ligament cells and dental follicle progenitor cells and their response to BMP-7 in vitro. Odontology <u>104</u>, 123–135

Guo J, Jourdian GW, Maccallum DK (1989): Culture and growth characteristics of chondrocytes encapsulated in alginate beads. Connect Tissue Res <u>19</u>, 277–297

Hall BK, Miyake T (2000): All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development. BioEssays <u>22</u>, 138–147

Hammarström L (1997): Enamel matrix, cementum development and regeneration. J Clin Periodontol 24, 658–668

Harris H (1990): The human alkaline phosphatases: What we know and what we don't know. Clin Chim Acta <u>186</u>, 133–150

Hasegawa T, Yoshimura Y, Kikuiri T, Yawaka Y, Takeyama S, Matsumoto A, Oguchi H, Shirakawa T (2002): Expression of receptor activator of NF-kappa B ligand and osteoprotegerin in culture of human periodontal ligament cells. J Periodontal Res <u>Volume 37</u>, 405–411

Hassell TM (1993): Tissues and cells of the periodontium. Periodontol 2000 <u>3</u>, 9–38

Hellwig E, Klimek J, Attin T: Einführung in die Zahnerhaltung: Prüfungswissen Kariologie, Endodontologie und Parodontologie; mit 63 Tabellen. 6. überarbeitete Auflage; Deutscher Zahnärzte Verlag, Köln 2013

Hofbauer LC, Heufelder AE (2001): Role of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. J Mol Med <u>79</u>, 243–253

Hopewell-Smith A (1920): Concerning human cementum. J Dent Res 2, 59-76

Howell TH, Fiorellini JP, Paquette DW, Offenbacher S, Giannobile WV, Lynch SE (1997): A phase I/II clinical trial to evaluate a combination of recombinant human platelet-derived growth
factor-BB and recombinant human insulin-like growth factor-I in patients with periodontal disease. J Periodontol <u>68</u>, 1186–1193

Huang YH, Ohsaki Y, Kurisu K (1991): Distribution of type I and type III collagen in the developing periodontal ligament of mice. Matrix Stuttg Ger <u>11</u>, 25–35

Huynh NC-N, Everts V, Pavasant P, Ampornaramveth RS (2017): Interleukin-1 β induces human cementoblasts to support osteoclastogenesis. Int J Oral Sci <u>9</u>, 1–8

Ibrahim SF, van den Engh G (2007): Flow cytometry and cell sorting. Cell Sep 106, 19–39

Ikeda E, Hirose M, Kotobuki N, Shimaoka H, Tadokoro M, Maeda M, Hayashi Y, Kirita T, Ohgushi H (2006): Osteogenic differentiation of human dental papilla mesenchymal cells. Biochem Biophys Res Commun <u>342</u>, 1257–1262

Ivanovski S (2009): Periodontal regeneration. Aust Dent J 54, 118–128

Jin HJ, Park SK, Oh W, Yang YS, Kim SW, Choi SJ (2009): Down-regulation of CD105 is associated with multi-lineage differentiation in human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. Biochem Biophys Res Commun <u>381</u>, 676–681

Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU (1998): In v itro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. Exp Cell Res <u>238</u>, 265–272

Kadkhoda Z, Rafiei SC, Azizi B, Khoshzaban A (2016): Assessment of surface markers derived from human periodontal ligament stem cells: An in vitro study. J Dent Tehran Univ Med Sci <u>13</u>, 325–332

Kajiya M, Shiba H, Fujita T, Ouhara K, Takeda K, Mizuno N, Kawaguchi H, Kitagawa M, Takata T, Tsuji K, Kurihara H (2008): Brain-derived neurotrophic factor stimulates bone/cementum-related protein gene expression in cementoblasts. J Biol Chem <u>283</u>, 16259–16267

Kajiya M, Shiba H, Fujita T, Takeda K, Uchida Y, Kawaguchi H, Kitagawa M, Takata T, Kurihara H (2009): Brain-derived neurotrophic factor protects cementoblasts from serum starvation-induced cell death. J Cell Physiol <u>221</u>, 696–706

Kajiya M, Takeshita K, Kittaka M, Matsuda S, Ouhara K, Takeda K, Takata T, Kitagawa M, Fujita T, Shiba H, Kurihara H (2014): BDNF mimetic compound LM22A-4 regulates cementoblast differentiation via the TrkB-ERK/Akt signaling cascade. Int Immunopharmacol <u>19</u>, 245–252

Kaneda T, Miyauchi T, Takekoshi S, Kitagawa S, Kitagawa M, Shiba H, Kurihara H, Takata T (2006): Characteristics of periodontal ligament subpopulations obtained by sequential enzymatic digestion of rat molar periodontal ligament. Bone <u>38</u>, 420–426

Katebi M, Soleimani M, Cronstein BN (2009): Adenosine A2A receptors play an active role in mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cell development. J Leukoc Biol <u>85</u>, 438–444

Kawato Y, Hirao M, Ebina K, Shi K, Hashimoto J, Honjo Y, Yoshikawa H, Myoui A (2012): Nkx3.2 promotes primary chondrogenic differentiation by upregulating Col2a1 transcription. PloS One <u>7</u>, e34703

Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K (2006): Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. Stem Cells <u>24</u>, 1294–1301

Kitagawa M, Tahara H, Kitagawa S, Oka H, Kudo Y, Sato S, Ogawa I, Miyaichi M, Takata T (2006): Characterization of established cementoblast-like cell lines from human cementumlining cells in vitro and in vivo. Bone <u>39</u>, 1035–1042

Kitagawa M, Ao M, Miyauchi M, Abiko Y, Takata T (2012): F-spondin regulates the differentiation of human cementoblast-like (HCEM) cells via BMP7 expression. Biochem Biophys Res Commun <u>418</u>, 229–233

Kitamura M, Akamatsu M, Machigashira M, Hara Y, Sakagami R, Hirofuji T, Hamachi T, Maeda K, Yokota M, Kido J, et al. (2011): FGF-2 stimulates periodontal regeneration: results of a multicenter randomized clinical trial. J Dent Res <u>90</u>, 35–40

Koelling S, Kruegel J, Irmer M, Path JR, Sadowski B, Miro X, Miosge N (2009): Migratory chondrogenic progenitor cells from repair tissue during the later stages of human osteoarthritis. Cell Stem Cell <u>4</u>, 324–335

Kunimatsu R, Yoshimi Y, Hirose N, Awada T, Miyauchi M, Takata T, Li W, Zhu L, Denbesten PK, Tanimoto K (2017): The C-terminus of amelogenin enhances osteogenic differentiation of human cementoblast lineage cells. J Periodontal Res <u>52</u>, 218–224

Lafont JE, Talma S, Hopfgarten C, Murphy CL (2008): Hypoxia promotes the differentiated human articular chondrocyte phenotype through SOX9-dependent and -independent pathways. J Biol Chem <u>283</u>, 4778–4786

Lee S, Auh Q, Kang S, Kim H, Lee J, Noh K, Jang J, Kim E (2014): Combined effects of dentin sialoprotein and bone morphogenetic protein-2 on differentiation in human cementoblasts. Cell Tissue Res <u>357</u>, 119–132

Lefebvre V, Smits P (2005): Transcriptional control of chondrocyte fate and differentiation. Birth Defects Res Part C Embryo Today Rev <u>75</u>, 200–212

Lehmann JM, Riethmüller G, Johnson JP (1989): MUC18, a marker of tumor progression in human melanoma, shows sequence similarity to the neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. Proc Natl Acad Sci <u>86</u>, 9891–9895

Lehmann KM: Zahnärztliche Propädeutik: Einführung in die Zahnheilkunde: mit 304 Abbildungen in 401 Einzeldarstellungen. 13. aktualisierte Auflage; Deutscher Zahnärzte Verlag, Köln 2015

Lei M, Li K, Gao LN, Jin Y, Chen F-M, Li B (2014): Mesenchymal stem cell characteristics of dental pulp and periodontal ligament stem cells after in vivo transplantation. Biomaterials <u>35</u>, 6332–6343

Lennon JE, Micklem HS (1986): Stromal cells in long-term murine bone marrow culture: FACS studies and origin of stromal cells in radiation chimeras. Exp Hematol <u>14</u>, 287–292

Levi B, Wan DC, Glotzbach JP, Hyun J, Januszyk M, Montoro D, Sorkin M, James AW, Nelson ER, Li S, et al. (2011): CD105 protein depletion enhances human adipose-derived stromal cell osteogenesis through reduction of transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) signaling. J Biol Chem <u>286</u>, 39497–39509

Linß W, Halbhuber K: Histologie und mikroskopische Anatomie. 17. neu bearbarbeitete Auflage; Thieme, Leipzig 1991

Listgarten M, Rosenberg M (1979): Histological study of repair following new attachment procedures in human periodontal lesions. J Periodontol <u>50</u>, 333–344

Listgarten MA (1980): Periodontal probing: what does it mean? J Clin Periodontol 7, 165–176

Loebel C, Czekanska EM, Bruderer M, Salzmann G, Alini M, Stoddart MJ (2015): In vitro osteogenic potential of human mesenchymal stem cells is predicted by Runx2/Sox9 ratio. Tissue Eng Part A <u>21</u>, 115–123

Lohberger B, Payer M, Rinner B, Kaltenegger H, Wolf E, Schallmoser K, Strunk D, Rohde E, Berghold A, Pekovits K, et al. (2013): Tri-lineage potential of intraoral tissue-derived mesenchymal stromal cells. J Cranio-Maxillofac Surg <u>41</u>, 110–118

Lohberger B, Kaltenegger H, Stuendl N, Payer M, Rinner B, Leithner A (2014): Effect of cyclic mechanical stimulation on the expression of osteogenesis genes in human intraoral mesenchymal stromal and progenitor cells. BioMed Res Int <u>2014</u>

Lossdörfer S, Götz W, Jäger A (2002): Immunohistochemical localization of receptor activator of nuclear factor kappaB (RANK) and its ligand (RANKL) in human deciduous teeth. Calcif Tissue Int <u>71</u>, 45–52

Luan X, Dangaria S, Diekwisch TGH, Ito Y (2006): Dental follicle progenitor cell heterogeneity in the developing mouse periodontium. Stem Cells Dev <u>15</u>, 595–608

Lüllmann-Rauch R: Taschenbuch Histologie. 5. vollständig überarbeitete Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2015

MacNeil RL, D'Errico JA, Ouyang H, Berry J, Strayhorn C, Somerman MJ (1998): Isolation of murine cementoblasts: unique cells or uniquely-positioned osteoblasts? Eur J Oral Sci <u>106</u>, 350–356

Mada Y, Miyauchi M, Oka H, Kitagawa M, Sakamoto K, Iizuka S, Sato S, Noguchi K, Somerman MJ, Takata T (2006): Effects of endogenous and exogenous prostaglandin E2 on the proliferation and differentiation of a mouse cementoblast cell line (OCCM-30). J Periodontol <u>77</u>, 2051–2058

Maleki M, Ghanbarvand F, Behvarz MR, Ejtemaei M, Ghadirkhomi E (2014): Comparison of mesenchymal stem cell markers in multiple human adult stem cells. Int J Stem Cells <u>7</u>, 118–126

Malik Z, Alexiou M, Hallgrimsson B, Economides AN, Luder HU, Graf D (2018): Bone morphogenetic protein 2 coordinates early tooth mineralization. J Dent Res <u>97</u>, 835–843

Malpighi M: Opera posthuma. G. Gallet, Amsterdam 1700

Marshall S (2006): Role of insulin, adipocyte hormones, and nutrient-sensing pathways in regulating fuel metabolism and energy homeostasis: A nutritional perspective of diabetes, obesity, and cancer. Sci STKE <u>346</u>, re7

Matarasso M, Iorio-Siciliano V, Blasi A, Ramaglia L, Salvi GE, Sculean A (2015): Enamel matrix derivative and bone grafts for periodontal regeneration of intrabony defects. A systematic review and meta-analysis. Clin Oral Investig <u>19</u>, 1581–1593

Matthews B, Roguljic H, Franceschetti T, Roeder E, Matic I, Vidovic I, Joshi P, Kum KY, Kalajzic I (2016): Gene-expression analysis of cementoblasts and osteoblasts. J Periodontal Res <u>51</u>, 304–312

Meirelles S, Fontes A, Covas D, Caplan A (2009): Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. Cytokine Growth Factor Rev <u>20</u>, 419–427

Misumi Y, Ogata S, Ohkubo K, Hirose S, Ikehara Y (1990): Primary structure of human placental 5'-nucleotidase and identification of the glycolipid anchor in the mature form. Eur J Biochem <u>191</u>, 563–569

Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S (2003): SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. Proc Natl Acad Sci <u>100</u>, 5807–5812

Moon JS, Kim SD, Ko HM, Kim YJ, Kim SH, Kim MS (2018): Twist1 suppresses cementoblast differentiation. Dent J <u>6</u>, 57–66

Moore JA, Ashley FP, Waterman CA (1987): The effect on healing of the application of citric acid during replaced flap surgery. J Clin Periodontol $\underline{14}$, 130–135

Moraes DA, Sibov TT, Pavon LF, Alvim PQ, Bonadio RS, Silva JRD, Pic-Taylor A, Toledo OA, Marti LC, Azevedo RB, Oliveira DM (2016): A reduction in CD90 (THY-1) expression results in increased differentiation of mesenchymal stromal cells. Stem Cell Res Ther <u>7</u>, 97

Morsczeck C, Götz W, Schierholz J, Zeilhofer F, Kühn U, Möhl C, Sippel C, Hoffmann KH (2005): Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. Matrix Biol <u>24</u>, 155–165

Mundlos S, Otto F, Mundlos C, Mulliken JB, Aylsworth AS, Albright S, Lindhout D, Cole WG, Henn W, Knoll JHM, et al. (1997): Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. Cell <u>89</u>, 773–779

Murphy CL, Polak JM (2004): Control of human articular chondrocyte differentiation by reduced oxygen tension. J Cell Physiol <u>199</u>, 451–459

Nam H, Kim JH, Kim Jae Won, Seo BM, Park JC, Kim Jung Wook, Lee G (2014): Establishment of Hertwig's epithelial root sheath/epithelial rests of malassez cell line from human periodontium. Mol Cells <u>37</u>, 562–567

Nanci A (1999): Content and distribution of noncollagenous matrix proteins in bone and cementum: relationship to speed of formation and collagen packing density. J Struct Biol <u>126</u>, 256–269

Nanci A, Bosshardt DD (2006): Structure of periodontal tissues in health and disease. Periodontol 2000 <u>40</u>, 11–28

Nevins M, Camelo M, Nevins ML, Schenk RK, Lynch SE (2003): Periodontal regeneration in humans using recombinant human platelet- derived growth factor-BB (rhPDGF-BB) and allogenic bone. J Periodontol <u>74</u>, 1282–1292

Nuñez J, Sanz-Blasco S, Vignoletti F, Muñoz F, Caffesse RG, Sanz M, Villalobos C, Nuñez L (2010): 17 β -estradiol promotes cementoblast proliferation and cementum formation in experimental periodontitis. J Periodontol <u>81</u>, 1064–1074

Orban B (1948): Clinical and histologic study of the surface characteristics of the gingiva. Oral Surg Oral Med Oral Pathol <u>1</u>, 827–841

Oshiro T, Shiotani A, Shibasaki Y, Sasaki T (2002): Osteoclast induction in periodontal tissue during experimental movement of incisors in osteoprotegerin-deficient mice. Anat Rec <u>266</u>, 218–225

Owen M, Friedenstein AJ (1988): Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. Ciba Found Symp <u>136</u>, 42–60

Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilming L, Tassinari MS, Kennedy MB, Pockwinse S, Lian JB, Stein GS (1990): Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: Reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. J Cell Physiol 143, 420–430

Owens PDA (1972): Light microscopic observations on the formation of the layer of Hopewell-Smith in human teeth. Arch Oral Biol <u>17</u>, 1785–1788

Owman-Moll P, Kurol J, Lundgren D (1995): Repair of orthodontically induced root resorption in adolescents. Angle Orthod <u>65</u>, 403–408

Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS (2007): Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. Periodontol 2000 <u>14</u>, 216–248

Papagerakis P, Berdal A, Mesbah M, Peuchmaur M, Malaval L, Nydegger J, Simmer J, Macdougall M (2002): Investigation of osteocalcin, osteonectin, and dentin sialophosphoprotein in developing human teeth. Bone <u>30</u>, 377–385

Pettersson LF, Kingham PJ, Wiberg M, Kelk P (2017): In vitro osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells from jawbone compared with dental tissue. Tissue Eng Regen Med <u>14</u>, 763–774

Pfaffl MW (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. Nucleic Acids Res <u>29</u>, 2002–2007

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999): Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science <u>284</u>, 143–147

Prateeptongkum E, Klingelhöffer C, Müller S, Ettl T, Morsczeck C (2016): Characterization of progenitor cells and stem cells from the periodontal ligament tissue derived from a single person. J Periodontal Res <u>51</u>, 265–272

Radlanski RJ: Orale Struktur- und Entwicklungsbiologie (Curriculum). Quintessenz-Verlag, Berlin 2011

Raja S, Byakod G, Pudakalkatti P (2009): Growth factors in periodontal regeneration. Int J Dent Hyg <u>7</u>, 82–89

Rana MWZ, Pothisiri V, Killiany DM, Xu XM (2001): Detection of apoptosis during orthodontic tooth movement in rats. Am J Orthod Dentofacial Orthop <u>119</u>, 516–521

Ripamonti U, Petit JC (2009): Bone morphogenetic proteins, cementogenesis, myoblastic stem cells and the induction of periodontal tissue regeneration. Cytokine Growth Factor Rev <u>20</u>, 489–499

Roberts SJ, Yantian C, Moesen M, Schrooten J, Luyten FP (2011): Enhancement of osteogenic gene expression for the differentiation of human periosteal derived cells. Stem Cell Res <u>7</u>, 137–144

Rosen ED, MacDougald OA (2006): Adipocyte differentiation from the inside out. Nat Rev Mol Cell Biol <u>7</u>, 885–896

Russell KC, Phinney DG, Lacey MR, Barrilleaux BL, Meyertholen KE, O'Connor KC (2010): In vitro high-capacity assay to quantify the clonal heterogeneity in trilineage potential of mesenchymal stem cells reveals a complex hierarchy of lineage commitment. Stem Cells <u>28</u>, 788–798

Saffar J, Lasfargues J, Cherruau M (2007): Alveolar bone and the alveolar process: the socket that is never stable. Periodontol 2000 $\underline{13}$, 76–90

Saito M, Handa K, Kiyono T, Hattori S, Yokoi T, Tsubakimoto T, Harada H, Noguchi T, Toyoda M, Sato S, Teranaka T (2005): Immortalization of cementoblast progenitor cells with Bmi-1 and TERT. J Bone Miner Res <u>20</u>, 50–57

Saito M, Salmon CR, Amorim BR, Ambrosano GMB, Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH, Silvério KG (2014): Characterization of highly osteoblast/cementoblast cell clones from a CD105enriched periodontal ligament progenitor cell population. J Periodontol <u>85</u>, 205–2011

Sakata M, Shiba H, Komatsuzawa H, Fujita T, Uchida Y, Yoshino H, Ogawa T, Kawaguchi H, Kurihara H (2002): Osteoprotegerin levels increased by interleukin-1beta in human periodontal ligament cells are suppressed through prostaglandin E(2) synthesized de novo. Cytokine <u>18</u>, 133–139

Saygin NE, Giannobile WV, Somerman MJ (2000): Molecular and cell biology of cementum. Periodontol 2000 <u>24</u>, 73–98

Schminke B, Muhammad H, Bode C, Sadowski B, Gerter R, Gersdorff N, Bürgers R, Monsonego-Ornan E, Rosen V, Miosge N (2014): A discoidin domain receptor 1 knock-out mouse as a novel model for osteoarthritis of the temporomandibular joint. Cell Mol Life Sci <u>71</u>, 1081–1096

Schroeder HE: Development, Structure, and Function of Periodontal Tissues. In: Schroeder HE (Hrsg.): The Periodontium (Handbook of Microscopic Anatomy). Springer Verlag, Berlin 1986, 23–323

Schroeder HE: Orale Strukturbiologie: Entwicklungsgeschichte, Struktur und Funktion normaler Hart- und Weichgewebe der Mundhöhle und des Kiefergelenks. 4. teilweise überarbarbeitete Auflage; Thieme, Stuttgart 1992

Schroeder HE, Theilade J (1966): Electron microscopy of normal human gingival epithelium. J Periodontal Res <u>1</u>, 95–119

Schroeder HE, Jeon KW, Friedlander M (1992): Biological problems of regenerative cementogenesis: synthesis and attachment of collagenous matrices on growing and established root surfaces. Int Rev Cytol <u>142</u>, 1–59

Schumacher GH: Kopf, orofaziales System, Auge, Ohr, Leitungsbahnen (Anatomie: Lehrbuch und Atlas / Gert-Horst Schumacher ; Bd. 1 ; Edition Zahnheilkunde). Barth, Leipzig 1991

Schwenzer N, Eckelt U (Hrsg.): Zahnärztliche Chirurgie (Zahn-Mund-Kiefer-Heilkunde Bd. 3). 4. vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage; Thieme, Stuttgart 2009

Seaberg RM, van der Kooy D (2003): Stem and progenitor cells: the premature desertion of rigorous definitions. Trends Neurosci <u>26</u>, 125–131

Sekiya I, Tsuji K, Koopman P, Watanabe H, Yamada Y, Shinomiya K, Nifuji A, Noda M (2000): SOX9 enhances aggrecan gene promoter/enhancer activity and is up-regulated by retinoic acid in a cartilage-derived cell line, TC6. J Biol Chem <u>275</u>, 10738–10744

Sekiya I, Larson BL, Smith JR, Pochampally R, Cui J-G, Prockop DJ (2002): Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. Stem Cells <u>20</u>, 530–541

Seo BM, 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 <u>364</u>, 149–155

Shih IM, Nesbit M, Herlyn M, Kurman RJ (1998): A new Mel-CAM (CD146)-specific monoclonal antibody, MN-4, on paraffin-embedded tissue. Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc <u>11</u>, 1098–1106

Sims MR (1973): Oxytalan fiber system of molars in the mouse mandible. J Dent Res <u>52</u>, 797–802

Singhatanadgit W, Donos N, Olsen I (2009): Isolation and characterization of stem cell Clones from adult human ligament. Tissue Eng Part A <u>15</u>, 2625–2636

Smidsrod O, Skjakbrk G (1990): Alginate as immobilization matrix for cells. Trends Biotechnol <u>8</u>, 71–78

Song L, Webb NE, Song Y, Tuan RS (2006): Identification and functional analysis of candidate genes regulating mesenchymal stem cell self-renewal and multipotency. Stem Cells <u>24</u>, 1707–1718

Sonoyama W, Seo BM, Yamaza T, Shi S (2007): Human Hertwig's epithelial root sheath cells play crucial roles in cementum formation: J Dent Res <u>86</u>, 594–599

Sorrentino A, Ferracin M, Castelli G, Biffoni M, Tomaselli G, Baiocchi M, Fatica A, Negrini M, Peschle C, Valtieri M (2008): Isolation and characterization of CD146 multipotent mesenchymal stromal cells. Exp Hematol <u>36</u>, 1035–1046

Swart GWM (2002): Activated leukocyte cell adhesion molecule (CD166/ALCAM): developmental and mechanistic aspects of cell clustering and cell migration. Eur J Cell Biol <u>81</u>, 313–321

Swetha G, Kattappagari KK, Poosarla CS, Chandra LP, Gontu SR, Badam VRR (2018): Quantitative analysis of dental age estimation by incremental line of cementum. J Oral Maxillofac Pathol <u>22</u>, 138–142 Tanimoto K, Kunimatsu R, Tanne Y, Huang Y-C, Michida M, Yoshimi Y, Miyauchi M, Takata T, Tanne K (2012): Differential effects of amelogenin on mineralization of cementoblasts and periodontal ligament cells. J Periodontol <u>83</u>, 672–679

Tansriratanawong K, Tamaki Y, Ishikawa H, Sato S (2014): Co-culture with periodontal ligament stem cells enhances osteogenic gene expression in de-differentiated fat cells. Hum Cell <u>27</u>, 151–161

Ten Cate AR: Oral histology: development, structure, and function. 5. Auflage; Mosby, St. Louis 1998

Tenorio F, Hughes FJ (1996): An immunohistochemical investigation of the expression of parathyroid hormone receptors in rat cementoblasts. Arch Oral Biol <u>41</u>, 299–305

Thesleff I (2006): The genetic basis of tooth development and dental defects. Am J Med Genet A <u>140</u>, 2530–2535

Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AI, Spiegelman BM (1994): mPPAR gamma 2: tissuespecific regulator of an adipocyte enhancer. Genes Dev <u>8</u>, 1224–1234

Torii D, Tsutsui TW, Watanabe N, Konishi K (2016): Bone morphogenetic protein 7 induces cementogenic differentiation of human periodontal ligament-derived mesenchymal stem cells. Odontology <u>104</u>, 1–9

Trubiani O, Zalzal SF, Paganelli R, Marchisio M, Giancola R, Pizzicannella J, Bühring H-J, Piattelli M, Caputi S, Nanci A (2010): Expression profile of the embryonic markers nanog, OCT-4, SSEA-1, SSEA-4, and frizzled-9 receptor in human periodontal ligament mesenchymal stem cells. J Cell Physiol <u>225</u>, 123–131

Tuan RS, Boland G, Tuli R (2003): Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. Arthritis Res Ther <u>5</u>, 32–45

Veis A (2003): Amelogenin gene splice products: potential signaling molecules. Cell Mol Life Sci CMLS <u>60</u>, 38–55

von Böhl M, Kuijpers-Jagtman AM (2009): Hyalinization during orthodontic tooth movement: a systematic review on tissue reactions. Eur J Orthod <u>31</u>, 30–36

Wang H, Zhong Q, Yang T, Qi Y, Fu M, Yang X, Qiao L, Ling Q, Liu S, Zhao Y (2018): Comparative characterization of SHED and DPSCs during extended cultivation in vitro. Mol Med Rep <u>17</u>, 6551–6559

Webb P, Moxham B, Benjamin M, Ralphs J (1996): Changing expression of intermediate filaments in fibroblasts and cementoblasts of the developing periodontal ligament of the rat molar tooth. J Anat <u>188</u>, 529–39

Weiner S, Traub W, Wagner HD (1999): Lamellar bone: structure–function relations. J Struct Biol <u>126</u>, 241–255

Welsch U: Lehrbuch Histologie. Elsevier, Urban & Fischer, München 2014

Weltman B, Vig K, Fields H (2010): Root resorption associated with orthodontic tooth movement: A systematic review. Am J Orthod Dentofacial Orthop <u>137</u>, 462–476

Wikesjö UME, Qahash M, Thomson RC, Cook AD, Rohrer MD, Wozney JM, Hardwick WR (2004): rhBMP-2 significantly enhances guided bone regeneration. Clin Oral Implants Res <u>15</u>, 194–204

Wolf HF, Rateitschak-Plüss EM, Rateitschak KH: Farbatlanten der Zahnmedizin / Band 1, Parodontologie. 3. vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage; Thieme, Stuttgart 2004

Wucher T, Wucher M, Dippenaar AM (2017): In-vivo determination of critical force levels using an intraoral electromechanical device to measure nonpathologic tooth mobility. Am J Orthod Dentofac Orthop <u>152</u>, 592–600

Yalvac ME, Ramazanoglu M, Gumru OZ, Sahin F, Palotás A, Rizvanov AA (2009): Comparison and optimisation of transfection of human dental follicle cells, a novel source of stem cells, with different chemical methods and electro-poration. Neurochem Res <u>34</u>, 1272–1277

Yamamoto T, Wilson CB (1987): Quantitative and qualitative studies of antibody-induced mesangial cell damage in the rat. Kidney Int <u>32</u>, 514–525

Yamamoto T, Domon T, Takahashi S, Wakita M (1997): Formation of an alternate lamellar pattern in the advanced cellular cementogenesis in human teeth. Anat Embryol (Berl) <u>196</u>, 115–121

Yamamoto T, Domon T, Takahashi S, Islam H, Suzuki F, Wakita M (1999): The structure and function of the cemento-dentinal junction in human teeth. J Periodontal Res <u>34</u>, 261–268

Yamamoto T, Li M, Liu Z, Guo Y, Hasegawa T, Masuki H, Suzuki R, Amizuka N (2010): Histological review of the human cellular cementum with special reference to an alternating lamellar pattern. Odontology <u>98</u>, 102–109

Yamamoto Tsuneyuki, Hasegawa T, Yamamoto Tomomaya, Hongo H, Amizuka N (2016): Histology of human cementum: Its structure, function, and development. Jpn Dent Sci Rev <u>52</u>, 63–74

Yen AHH, Sharpe PT (2008): Stem cells and tooth tissue engineering. Cell Tissue Res <u>331</u>, 359–372

Zeichner-David M, Oishi K, Su ZY, Zakartchenko V, Chen LS, Arzate H, Bringas P (2003): Role of Hertwig's epithelial root sheath cells in tooth root development. Dev Dyn <u>228</u>, 651–663

Zhang Q, Shi Shihong, Liu Y, Uyanne J, Shi Y, Shi Songtao, Le AD (2009): Mesenchymal stem cells derived from human gingiva are capable of immunomodulatory functions and ameliorate inflammation-related tissue destruction in experimental colitis. J Immunol <u>183</u>, 7787–7798

Zhang YW, Su Y, Lanning N, Swiatek PJ, Bronson RT, Sigler R, Martin RW, Vande Woude GF (2005): Targeted disruption of Mig-6 in the mouse genome leads to early onset degenerative joint disease. Proc Natl Acad Sci <u>102</u>, 11740–11745

Zola H, Swart B, Banham A, Barry S, Beare A, Bensussan A, Boumsell L, D. Buckley C, Bühring H-J, Clark G, et al. (2007): CD molecules 2006 — Human cell differentiation molecules. J Immunol Methods <u>319</u>, 1–5

Danksagung

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. N. Miosge für seine außergewöhnlich gute und unkomplizierte wissenschaftliche Betreuung. Ich danke ihm vor allem dafür, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat Teil seiner großartigen Forschungsgruppe zu sein und für die spannenden Einblicke in die Wissenschaft und den Laboralltag.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner direkten Betreuerin Dr. med. dent. A. Schubert für die vielen Gespräche und ihre Freundschaft. Danke, dass ich mit jedem Problem vorbei kommen konnte und ich hoffe, dass auch ich dich unterstützen kann.

Ein weiteres großes Dankeschön gilt Christa Bode, Jérôme Janßen, Stefan Lesemann und Elvira Henze für die gute Einarbeitung in die Labormethoden, die Bereitstellung ihrer Kompetenzen zu jeder Zeit und die sehr angenehme Laboratmosphäre. Vielen Dank für die stets bereitstehende starke Tasse Kaffee und die Erweiterung meines musikalischen Horizonts.