

Aus der Orthopädischen Klinik und Poliklinik
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. M. Rudert

**Charakterisierung und Analyse mesenchymaler Stammzellen dentalen Ursprungs
mit Fokus auf die dentalen Aspekte der Hypophosphatasie
- Etablierung eines *in vitro* Modells -**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg



vorgelegt von

Hannah Melms

aus Tübingen

Würzburg, Januar 2019

Referent: Prof. Dr. med. Franz Jakob

Korreferent: Prof. Dr. med. dent. Ulrich Schlagenhaut

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 09.10.2019

Die Promovendin ist Zahnärztin

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1 Die Hypophosphatasie	1
1.1.1 Klinik und Diagnostik der HPP	2
1.1.2 Die Gewebe-unspezifische Alkalische Phosphatase (TNAP)	4
1.1.2.1 Die TNAP in dentalem Gewebe	6
1.1.3 Die Pathophysiologie der Mineralisierungsstörung bei der HPP	6
1.1.4 Genotyp und Phänotyp - Genetik und Klinische Klassifikation der HPP	9
1.1.4.1 Genetik der HPP	9
1.1.4.2 Klinische Klassifikation der HPP	10
1.1.5 Dentale Aspekte der Hypophosphatasie	12
1.1.6 Aktuelle Behandlungskonzepte und therapeutische Ansätze der HPP	15
1.1.7 HPP-Forschung an Tier- und Zellkultur-Modellen	17
1.2 Mesenchymale Stammzellen (MSCs)	18
1.3 Dentale mesenchymale Stammzellen	21
1.3.1 Entwicklungsbiologischer Hintergrund dentaler Stammzellen	22
1.3.2 Charakteristische Merkmale dentaler Stammzellen	23
1.3.3 Stammzellen aus der Pulpa (DPSCs)	25
1.3.4 Stammzellen des parodontalen Ligaments (PDLSCs)	25
1.4 Hinführung zur Fragestellung und Vorstellung des <i>in vitro</i> HPP-Modells	26
1.5 Fragestellung der Dissertation	27
2. MATERIAL UND METHODEN	29
2.1 MATERIAL	29
2.1.1 Verbrauchsmaterial	29
2.1.2 Technische Ausstattung	30
2.1.3 Chemikalien und Reagenzien	31
2.1.4 Kits	32
2.1.5 ZELLKULTUR	33
2.1.5.1 Primäre Zellen	33

2.1.5.1.1 Mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark (BMSCs)	33
2.1.5.1.2 Dentale MSCs: DPSCs und PDLSCs	34
2.1.5.2 Zellkulturmedien und Zusätze	35
2.1.6 Puffer und Lösungen	36
2.1.7 Antikörper	37
2.1.8 Enzyme	38
2.1.9 Primer	39
2.1.10 Software und Online-Quellen	41
2.2 METHODEN	42
2.2.1 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	42
2.2.1.1 Aufarbeitung der BMSCs	42
2.2.1.2 Aufarbeitung und Isolation der dentalen MSCs (DPSCs und PDLSCs)	43
2.2.1.2.1 Isolation von Stammzellen aus dem parodontalen Ligament (PDLSCs)	44
2.2.1.2.2 Isolation von Stammzellen aus der Pulpa (DPSCs)	44
2.2.1.3 Kultivierung der MSCs	45
2.2.1.4 Zellzahlbestimmung	46
2.2.1.5 Differenzierung	46
2.2.1.5.1 Adipogene Differenzierung	48
2.2.1.5.2 Osteogene Differenzierung und Stimulation mit Levamisol (1mM)	48
2.2.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	49
2.2.2.1 RNA-Isolierung und Reverse Transkription (cDNA-Synthese)	49
2.2.2.1.1 Isolierung der RNA	49
2.2.2.1.2 cDNA-Synthese	50
2.2.2.2 Semi-quantitative Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) und Agarose-Gelelektrophorese	51
2.2.2.2.1 Semi-quantitative PCR (RT-PCR)	51
2.2.2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese	52
2.2.2.3 Quantitative real-time PCR (qPCR)	53
2.2.2.4 Proteinanalyse nach Bradford und CSPD-Assay	55
2.2.2.4.1 Proteinanalyse mit quantitativer Proteinbestimmung	55

2.2.2.4.2 CSPD-Assay zur AP-Aktivitätsmessung von Zelllysaten	55
2.2.2.4.3 CSPD-Assay der basalen Proben	56
2.2.2.4.4 CSPD-Assay der osteogen differenzierten Proben	56
2.2.2.5 Färbungen	57
2.2.2.5.1 Immunzytochemische TNAP-Färbung	57
2.2.2.5.2 Immunzytochemische Golgi-Färbung	58
2.2.2.5.3 Phalloidin-Färbung	58
2.2.2.5.4 Spezifische Färbungen zum Nachweis der Differenzierung	59
2.2.2.5.4.1 Ölrot-O-Färbung mit anschließender Quantifizierung	60
2.2.2.5.4.2 Alizarinrot-Färbung	61
2.2.2.6 FACS-Analyse	61
2.2.2.7 RNA-Sequenzierung (RNA-Seq)	63
2.2.2.8 Statistik	64
3. ERGEBNISSE	65
3.1 Isolation und Kultivierung dentaler Stammzellen	66
3.2 Morphologie und Proliferation der dentalen Stammzellen	67
3.3 Ergebnisse der basalen Charakterisierung	69
3.3.1 Basale Genexpressionsanalyse der BMSCs, DPSCs und PDLSCs	69
3.3.2 Immunophänotypische Charakterisierung	73
3.3.3 Analyse der basalen AP-Aktivität	76
3.3.4 Untersuchung der TNAP-Expression durch immunzytochemische Färbung	77
3.4. Untersuchung der Auswirkung des Levamisols	79
3.4.1 Untersuchung des Levamisol-Effektes auf die Zellmorphologie	79
3.4.2 Untersuchung der Auswirkung des Levamisols durch die immunzytochemische Golgi-Färbung	80
3.4.3 Untersuchung des Levamisol-Effektes auf das Zytoskelett	81
3.5 Genexpressionsanalyse der BMSCs, DPSCs und PDLSCs nach adipogener und osteogener Differenzierung (mit und ohne Levamisol)	82
3.5.1 Vergleich der Genexpression aller Proben mit allen Behandlungen	83
3.5.2 Veränderung der Genexpression durch die jeweilige Behandlung	88

3.6 Analyse der AP-Aktivität in Abhängigkeit von der osteogenen Differenzierung mit und ohne Stimulation mit Levamisol	90
3.7 Untersuchung des Differenzierungspotenzials der dentalen MSCs	93
3.7.1 Nachweis der adipogenen Differenzierung	93
3.7.2 Quantifizierung der Ölrot-O-Färbung	95
3.7.3 Nachweis der osteogenen Differenzierung	97
3.8 Analyse der RNA-Sequenzierung	102
3.8.1 Hochregulierte Genexpression durch die TNAP-Inhibition während der osteogenen Differenzierung	105
3.8.2 Herabregulierte Genexpression durch die TNAP-Inhibition während der osteogenen Differenzierung	105
4. DISKUSSION	108
<hr/>	
4.1 Charakterisierung und basale Analyse	108
4.2 Differenzierungspotenzial der dentalen MSCs	112
4.3 Analyse der TNAP-Expression und Enzym-Aktivität	115
4.4 TNAP-abhängige Genexpression	120
4.5 Beurteilung des etablierten <i>in vitro</i> HPP-Modells mit Einsatz der RNA-Sequenzierung	126
5. AUSBLICK	128
<hr/>	
ZUSAMMENFASSUNG	132
LITERATURVERZEICHNIS	134
ABKÜRZUNGEN	144
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	146
TABELLENVERZEICHNIS	148
DANKSAGUNG	
EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	

1. EINLEITUNG

1.1 Die Hypophosphatasie

Die Hypophosphatasie (HPP) ist eine seltene Stoffwechselerkrankung, deren Ursache in Mutationen des *ALPL*-Gens liegt, welches für die sogenannte Gewebe-unspezifische Alkalische Phosphatase (tissue-nonspecific alkaline phosphatase, TNAP, auch TNSALP) kodiert. Das Krankheitsbild ist durch die Mangelfunktion dieses Enzyms charakterisiert und äußert sich insbesondere in Mineralisierungsstörungen, die sowohl Knochen als auch Zähne in unterschiedlichem Ausmaß und Schweregrad betreffen können (Mornet, 2017). 1948 wurde dieses Krankheitsbild als eine „neue Entwicklungsanomalie“ erstmals von Rathbun, aufgrund der Entdeckung niedriger AP-Serumspiegel und -Aktivitätswerte eines therapieresistenten jungen Patienten als HPP beschrieben (Rathbun, 1948). Seither wurden ca. 300 HPP-Fallberichte veröffentlicht und die HPP zählt heute zu einer der seltenen Stoffwechselstörungen im muskuloskelettalen Bereich.

Derzeit sind über 340 verschiedene ursächliche Mutationen im *ALPL*-Gen identifiziert worden und in der Datenbank von Etienne Mornet gelistet (Dr. Etienne Mornet, http://www.sesep.uvsq.fr/03_hypo_mutations.php; 19.10.17) (Mornet, 2017). Missense-Mutationen stellen hierbei mit mehr als 70 % der nachgewiesenen Mutationen den Hauptteil (Millan and Whyte, 2016). Des Weiteren konnten Mornet et al. eine Häufigkeit von 1:300.000 für die schwerwiegendsten Ausprägungsformen bestimmen (Mornet et al., 2011). Die HPP wird aufgrund dessen zu den seltenen Erkrankungen gezählt. Auch die Frequenz der moderaten Manifestation mit einer Häufigkeit von 1:6.000-7.000 rechtfertigt nach der Definition der Europäischen Kommission die Klassifizierung als eine seltene Erkrankung (https://ec.europa.eu/health/rare_diseases/policy_en, 29.10.17).

1.1.1 Klinik und Diagnostik der HPP

Das Krankheitsbild der Hypophosphatasie umspannt ein äußerst breites Spektrum an Symptomen mit unterschiedlichsten Ausprägungsgraden (Millan and Whyte, 2016). Dieses reicht von einer perinatalen und, aufgrund respiratorischer Komplikationen, meist letalen Form bis hin zu einer vergleichsweise milden, adulten Manifestation mit später Erstdiagnose.

Symptomatik

Die vorherrschende skelettale Symptomatik, welche zu einem Osteomalazie- bzw. Rachitis-ähnlichem Krankheitsbild führt, verdeutlicht die Schlüsselrolle der TNAP in Mineralisierungsprozessen (Millan and Whyte, 2016). Millan et al. bezeichnen die HPP diesbezüglich auch als eine seltene Osteomalazie- bzw. Rachitis-Form, jedoch unterscheidet sich die HPP hiervon in den weiteren Begleitsymptomen, der Labordiagnostik und vor allem auch in der Therapie. Die Mineralisierungsstörungen führen zu Knochendeformationen, die sich beispielsweise in Gedeihstörungen, Fehlstellung der Beine und einem watschelnden Gang äußern. Ein erhöhtes Frakturrisiko bzw. pathologische Frakturen bereits nach einem geringen Trauma, chronische Muskel- und Gelenkschmerzen sind charakteristisch für die adulte Form der HPP. Klinisch werden zudem chronische muskuloskelettale Beschwerden beschrieben, die Erkrankungen aus dem rheumatologischen Formenkreis in die Differenzialdiagnose einbeziehen. Die Mineralisierungsstörung schließt häufig die Zahnhartsubstanz mit ein und kann diese auch isoliert betreffen. Die zahnmedizinischen Aspekte werden in Kapitel 1.1.5 separat thematisiert. Des Weiteren werden extraossäre Mineralisierungsprozesse, wie Arterienverkalkungen und Kalzifizierungen von Knorpel und Sehnen beobachtet (Beck et al., 2009). Neben der Mineralisierungs-assoziierten Symptomatik resultiert, aufgrund des namensgebenden, gewebeunspezifischen Vorkommens der TNAP, wie beispielsweise in der Niere, der Leber und in verschiedenen Gehirnregionen, zudem eine Reihe weiterer Beschwerden, welche die Komplexität dieser Erkrankung und das breite Einflussgebiet des Enzyms verdeutlichen. Hierzu gehören neurologische Störungen, wie das Auftreten epileptischer Anfälle, Depressionen und Angststörungen.

Auch schwerwiegende pulmonale, gastrointestinale und nephrologische Symptome gehören zu diesem Krankheitsbild (Beck et al., 2009).

Neben der enormen Bandbreite der klinischen Symptome stellt die Manifestation dieses Enzymdefizits in jeder Altersklasse (perinatal bis adult) sowie verschiedene Schweregrade (letal bis mild) eine besondere Herausforderung für die Diagnosestellung dar und erfordert eine umfangreiche Differentialdiagnostik.

Diagnostik

Abhängig vom Schweregrad kann manchmal bereits anhand des klinischen Bildes die Verdachtsdiagnose gestellt werden. Zudem kann die Familienanamnese Hinweise für die Diagnose geben und die Untersuchung weiterer Familienmitglieder zur Folge haben. Mit steigendem Schweregrad erfolgt die Diagnosestellung schneller und konkreter: Die perinatale Form der HPP mit ihrer fatalen Prognose kann beispielsweise bereits intrauterin mittels Sonographie festgestellt werden (Millan and Whyte, 2016). Neben einem charakteristischen klinischen Bild können auch wiederholt erniedrigte Aktivitätswerte der Alkalischen Phosphatase (AP) im Serum im Vergleich zu alters- und geschlechtsabhängigen Normwerten (Tab. 1) ein erster Hinweis zur Diagnose der HPP sein (Beck et al., 2009). Weitere charakteristische Laborparameter sind durch die Akkumulation der TNAP-Substrate bedingt, die sich in erhöhten Pyridoxal-5-Phosphat (PLP)-Werten im Serum und einem erhöhten Phosphoethanolamin-Spiegel im Urin äußern (Lundgren et al., 1991; Whyte et al., 1988).

Tab. 1: Normwerte der AP im Serum (37°C, IFCC Methode)

Säuglinge	110-590 IU/l
Kleinkinder	110-550 IU/l
Schulkinder	130-700 IU/l
Frauen	55-147 IU/l
Männer	62-176 IU/l

Wie bereits erwähnt, stellt die schwerwiegende Manifestation der HPP eine außergewöhnliche Rachitis- bzw. Osteomalazie-Form dar, da die Werte von Calcium, Pi und Vitamin D Metaboliten im Serum nicht wie hierbei zu erwarten gering sind.

Tatsächlich besteht bei der HPP vielmehr eine Blockade der Aufnahme von Mineralien in das Skelettsystem und daraus resultierende normale bis erhöhte Werte (Beck et al., 2009). Im Rahmen der multidisziplinären Diagnostik sind unter anderem radiologische, neurologische, nephrologische und zahnärztliche Untersuchungen erforderlich. Eine genetische Testung kann den eindeutigen Nachweis des Enzymdefekts zur Sicherung der Diagnose erbringen und ermöglicht zudem eine Mutations-spezifische Klassifikation (Mornet, 2017).

Abgrenzungen zur HPP bzw. der Ausschluss zahlreicher Differentialdiagnosen umfassen ebenfalls ein breites Spektrum. Aufgrund der erhöhten Frakturgefahr ist das Vorliegen einer Osteoporose, einer Osteogenesis imperfecta oder auch von Knochenmetastasen auszuschließen, die einer gänzlich anderen Therapie bedürfen. Die erhöhte Entzündungsbereitschaft, insbesondere im muskuloskelettalen Bereich, weist Ähnlichkeiten mit Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises auf. Im Bereich der Pädiatrie sind unter anderem die Osteogenesis imperfecta, bei lediglich dentaler Problematik die Odontogenesis imperfecta abzuklären sowie weiterhin eine Rachitis oder ein Vitamin D Mangel auszuschließen.

Regelmäßige Verlaufskontrollen mit umfassenden, klinischen und laborchemischen Untersuchungen durch eine interdisziplinäre Betreuung an einem Zentrum sind für die Einleitung frühzeitiger Fördermaßnahmen und die Therapieanpassung sehr wichtig.

1.1.2 Die Gewebe-unspezifische Alkalische Phosphatase (TNAP)

Für die humanen Alkalischen Phosphatasen (APs) kodieren vier Gene. Die Gewebe-unspezifische Alkalische Phosphatase (tissue-nonspecific alkaline phosphatase, TNAP) wird von dem *ALPL*-Gen auf Chromosom 1 kodiert. Das *ALPL*-Gen ist mit einer Länge von ungefähr 50 kb 5-mal länger als die Gene *ALPI* und *ALPP* der gewebespezifischen Isoformen der Alkalischen Phosphatase, was auf die größeren Intronabschnitte zurückzuführen ist. Des Weiteren beinhaltet es 11 kodierende Exons, die eine der Varianten des Exons 1 einschließen (Exon 1A und 1B) und je nach Gewebeart im Transkript vertreten sind (Mornet, 2017). Die TNAP wird, wie aus der Nomenklatur

hervorgeht, im Gegensatz zu den gewebespezifischen Isoformen, in verschiedenen Gewebe (Knochen, Zahnstrukturen, Leber, Niere, Gehirn) exprimiert. Die drei weiteren Gene, die für eine Alkalische Phosphatase (AP) kodieren, sind bei der HPP nicht betroffen. Die Expression dieser Gene ist auf bestimmte Gewebe beschränkt: man unterscheidet die intestinale-, plazentale- und Keimzell-AP. Von diesen Isoenzymen ist die TNAP als Gewebe-unspezifische AP abzugrenzen (Millan and Whyte, 2016).

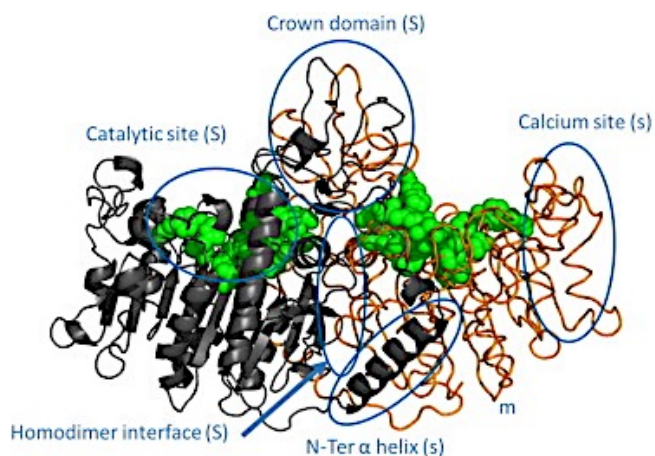


Abb. 1: Schematische Darstellung der TNAP. Diese Abbildung wurde aus der Publikation „Hypophosphatasia“ von Mornet et al. 2017, mit schriftlicher Genehmigung von Elsevier übernommen.

Die TNAP bildet üblicherweise ein Homodimer. Diese dimere Struktur wird durch die sogenannte crown domain und das N-terminale Ende der α -Helix stabilisiert (Mornet, 2017). Die Aktivität des Enzyms und damit die Ausprägung der Symptome ist auf diese dimere Funktionsweise zurückzuführen. Hoylaerts et al. zeigten, dass die korrekte Faltung des N-terminalen Endes für die gesamte strukturelle Integrität und die intramolekularen Übergangszustände während der Katalyse der AP essentiell ist (Hoylaerts et al., 1997). Bisher ist noch nicht geklärt, ob eine Substitution des N-Terminus bei einer Missense-Mutation die Faltung beeinflusst oder eine Dysfunktion des Proteins bedingt (Chen et al., 2017). Die TNAP ist ein Ektoenzym, welches über einen Glykosylinositolphosphat-Anker in der Zellmembran integriert ist (Mornet, 2007, 2017). Diese Verankerung wird bei der auf den Knochen gerichteten Enzymersatztherapie gezielt imitiert (Kap. 1.1.6 Therapie).

1.1.2.1 Die TNAP in dentalem Gewebe

Die Alkalische Phosphatase in dentalen Geweben wie der Pulpa und dem parodontalen Ligament konnte bereits in frühen Studien anhand von enzymatischen und immunologischen Eigenschaften als die TNAP identifiziert und nach ihrer mRNA als Isoform des Knochen-Typs nachgewiesen werden (Goseki-Sone et al., 1999). In der Biomineralisierung der Zahnhartsubstanz ist die TNAP ein zentrales Enzym für die Hydroxylapatit-Bildung. In dentalem Gewebe ist die TNAP in Ameloblasten, Odontoblasten sowie in Zellen des Stratum intermedium der Pulpa exprimiert (Hoshi et al., 1997). Dieses Vorkommen ist mit der Funktion dieser Zellen in der Biomineralisierung von Schmelz und Dentin begründet, wofür die Bereitstellung von Phosphat-Ionen zur Bildung des Hydroxylapatits essentiell ist (Tomlinson, 2015). Foster et al. konnten die zentrale Rolle der TNAP während der Dentinogenese bezüglich der Odontoblastendifferenzierung, Dentinmatrixsekretion und -mineralisierung im Mausmodell belegen und damit die molekulare Basis für die variablen und inkonsistenten Veränderungen der Dentindefekte bei der HPP legen (Foster et al., 2013). In einer Studie von Tomlinson et al. wurde eine TNAP-Expression in 2-10 % der Zellen aus einer nicht kultivierten und nicht verdauten Pulpa erwähnt (Tomlinson et al., 2015). Die TNAP in dentalen Zellen wurde insbesondere während der initialen Phase der Mineralisierungsprozesse sowie in der abschließenden Phase der Biomineralisierung dieser Gewebe nachgewiesen (Karbanova et al., 2011). *In vivo* ist die TNAP in spezialisierten Zellen präsent. Aber auch die proliferierenden und weniger spezialisierten Zellen *in vitro* zeigen ebenfalls eine TNAP-Expression. Tomlinson et al. konnten nachweisen, dass die TNAP-Expression mit unterschiedlichen *in vitro* Kulturbedingungen korreliert und mit zunehmender Zelldichte und Spezialisierung erhöht zu sein scheint (Tomlinson, 2015).

1.1.3 Die Pathophysiologie der Mineralisierungsstörung bei der HPP

Störungen im Mineralisierungsstoffwechsel können viele Ursachen haben. Diese können durch eine mangelhafte Substratzufuhr wichtiger Mineralien und Kofaktoren, wie Calcium, Phosphat oder Vitamin D3 oder durch Akkumulation von Substraten mit

inhibitorischer Wirkung auf die Mineralisierung wie z.B. Pyrophosphat (PPi) bedingt sein, aus einer eingeschränkten Mobilität oder systemischen Erkrankung resultieren und insbesondere auch durch Störungen zentraler Knochenstoffwechsel-Signalwege verursacht sein. Bei der seltenen Erkrankung der HPP sind Mutationen der TNAP mit reduzierter Enzymaktivität ursächlich. Der Fokus in der Erforschung der Pathogenese und neuer Therapieansätze liegt somit auf diesem Enzym.

Pathologie bei der Biomineralisierung von Knochen und Zahnhartsubstanz

Hydroxylapatit ist der Grundbaustein für die Biomineralisierung und Hauptbestandteil in Knochen- und Zahnhartgewebe. Der Mineralisierungsprozess wird durch das Vorhandensein der wichtigsten Substrate Calcium und Phosphat bestimmt und durch deren Konzentrationsverhältnis reguliert. APs katalysieren die Hydrolyse von Phosphatgruppen verschiedenster Substrate in einem alkalischen Milieu und stellen anorganisches Phosphat (Pi) bereit. Zu den natürlichen Substraten gehören anorganisches Pyrophosphat (PPi), Pyridoxal-5'-Phosphat (PLP) und Phosphoethanolamin (PEA). Die TNAP ist für ihre zentrale Rolle in der Biomineralisierung bekannt. Durch das Enzym werden nicht nur Substrate bereitgestellt, sondern auch Mineralisierungsinhibitoren, wie Pyrophosphat (PPi) durch Hydrolyse oder Osteopontin (OPN) durch Dephosphorylierung inaktiviert. ENPP1 und ANKH sind der TNAP durch Bereitstellung von PPi vorgeschaltet und in diesen Signalweg miteingeschlossen. Im Sinne eines negativen Rückkopplungskreislaufs durch vermehrte PPi-Produktion wird ein bestimmtes Verhältnis von Promotoren (Pi) und Inhibitoren (PPi) hergestellt. Hierdurch wird eine ausgeglichene Mineralisierungsbilanz mit der TNAP als einer der zentralen Angelpunkte erreicht. Neben der Substratakkumulation wird die Mineralisierung auch durch den inhibitorischen Einfluss von Osteopontin (OPN) und Osteocalcin (OC) moduliert. Die Phosphatase Orphan 1 (PHOSPHO1) ist ein weiteres Schlüsselenzym der Mineralisierung (Yadav, Simao, et al., 2011).

Tab. 2: Mineralisierungs-assoziierte Gene. Diese Tabelle wurde nach (Mornet, 2017) sowie nach dem Vorbild aus dem Buch Diagnostik und Management der Hypophosphatasie (Jakob, 2017).

Gen	Proteinname	Funktion
ANKH	Ankylosis Protein, progressiv homolog	Bereitstellung P _{Pi} , Hemmung der Mineralisierung
DMP1	Dentinmatrixprotein 1	Phosphathomöostase, Osteogenese und Dentinogenese
ENPP1	Ectonukleotid-Pyrophosphatase	Bereitstellung P _{Pi} , Hemmung der Mineralisierung
PHOSPHO1	Phosphatase Orphan 1	Initiierung der Matrixmineralisierung
OPN	Osteopontin	Hemmung der Mineralisierung
TNAP	Gewebe-unspezifische Alkalische Phosphatase	Hydrolyse P _{Pi} , Phosphatbereitstellung

Eine reduzierte Enzymaktivität der TNAP hat in zweierlei Hinsicht eine hemmende Wirkung auf die Mineralisierungsprozesse. Die mutierte TNAP kann P_{Pi} nicht zu Phosphat hydrolysieren, das damit zur Bildung von Hydroxylapatit fehlt. Zum anderen akkumuliert P_{Pi} extrazellulär im Sinne eines Substratstaus und übt einen inhibitorischen Effekt auf Mineralisierungsprozesse aus.

Auch ein hoher extrazellulärer ATP-Spiegel (eATP) hemmt den Mineralisierungsprozess und kann durch mehrere Ursachen bedingt sein: Eine reduzierte TNAP-Funktion führt dazu, dass sich ATP extrazellulär anreichert. Eine vermehrte ATP-Freisetzung kann auch von Osteoblasten im Rahmen der Biomineralisierung ausgehen. Weiterhin bewirkt ein vermehrter Zelltod in Folge einer Entzündung (Giuliani et al., 2017) ebenso wie die entzündungsfördernde ATP-Freisetzung aus Bakterien eine ATP-Anreicherung im extrazellulären Bereich (Binderman et al., 2017), dies verstärkt den alveolären Knochenverlust während einer Parodontitis. Der inhibitorische Effekt des ATP wird durch aktivierte purinerge Signalkaskaden umgesetzt und trägt zudem zu einem Anstieg des mineralisierungshemmenden P_{Pi} durch die vermehrte ATP-Hydrolyse bei.

1.1.4 Genotyp und Phänotyp - Genetik und Klinische Klassifikation der HPP

1.1.4.1 Genetik der HPP

Die HPP ist eine genetische Erkrankung, deren Ursache in unterschiedlichen Mutationsformen liegt und sowohl über den autosomal rezessiven als auch den autosomal dominanten Erbgang vererbt werden kann (Mornet et al., 2014). Eine sogenannte dominant negative Mutation bedeutet, dass der defekte Partner in der Lage ist, die enzymatische Funktion des Dimerisierungspartners herabzusetzen. Dieser Effekt ist vermutlich auf die mutationsbedingten Veränderungen der allosterischen Konformation zurückzuführen.

Schwere Formen der HPP, wie die perinatale und infantile Form, werden autosomal rezessiv vererbt, mildere Formen hingegen entweder dominant oder rezessiv (Mornet et al., 2014). Die milde Ausprägung ist am häufigsten mit heterozygoten Miss-Sense Mutationen mit dominant negativem Effekt verbunden (Fauvert et al., 2009). Es kommen aber auch Träger mit compound heterozygoten Allelen, d.h. zwei unterschiedliche Mutationen der beiden Allele, mit milden bis schweren Auswirkungen vor. Symptome können bei beiden Vererbungsarten vorkommen, es liegt somit nicht immer zwingend eine homozygote *ALPL*-Mutation vor.

In mehreren Fallstudien wurde keine strikte Genotyp-Phänotyp-Korrelation beobachtet. Die phänotypische Vielfalt scheint vorrangig auf das breite Mutationsspektrum bzw. die starke Heterogenität der Allele zurückzuführen zu sein. Zudem kann der Phänotyp auch durch andere Enzyme beeinflusst werden. Phospho1 scheint in der Lage zu sein, die TNAP-Funktion teilweise übernehmen zu können (Millan, 2013). Des Weiteren ist der Phänotyp auch von anderen bzw. kombinierten Mutationen abhängig, wie es Hessle et al. in Studien an Mäusen mit Doppel-Knockout der antagonistischen Regulatoren ENPP1 und TNAP zeigen konnten (Hessle et al., 2002). Anhand des Genotyps kann somit nicht direkt auf den Schweregrad und das Manifestationsalter geschlossen werden: Ein bestimmter Genotyp kann eine hohe klinische Variabilität zeigen. Die heterogene Ausprägung dieser Krankheit weist überdies intrafamiliäre phänotypische Unterschiede bei gleichem Genotyp auf. Dies wurde in einem Fallbericht zweier Geschwister mit

identischen compound heterozygoten Mutationen beobachtet, wobei ein Geschwister eine milde und das andere eine schwere Ausprägungsform hatte (Hofmann et al., 2014). Trotz der unscharfen Korrelation zwischen dem vorliegenden Genotyp und dem auftretenden Phänotyp konnte Silvent et al. ein Modell vorstellen, das eine relativ verlässliche Vorhersage der Ausprägung und Schwere der Symptome zulässt und auf der jeweiligen Mutation innerhalb der *ALPL*-Gens basiert (Silvent et al., 2014). Jedoch ist auch dieser Zusammenhang nicht allgemeingültig oder linear.

1.1.4.2 Klinische Klassifikation der HPP

Das variable, multisystemische Spektrum der klinischen Symptome reicht von einer sehr schweren, letalen Ausprägungsform bis hin zu vergleichsweise milden Mineralisierungsstörungen, welche in Einzelfällen wenig symptomatisch sind oder auf die Zähne beschränkt bleiben (Millan and Whyte, 2016; Mornet, 2007, 2017). Die allgemein gültige klinische Klassifikation der HPP mit Unterteilung in fünf Manifestationsformen basiert auf dem Alter der Erstmanifestation (Mornet, 2017) und ist in Tabelle 3 dargestellt. Die Grenzen zwischen diesen sind fließend, sodass sich eine eindeutige Zuordnung in vielen Fällen als schwierig erweist.

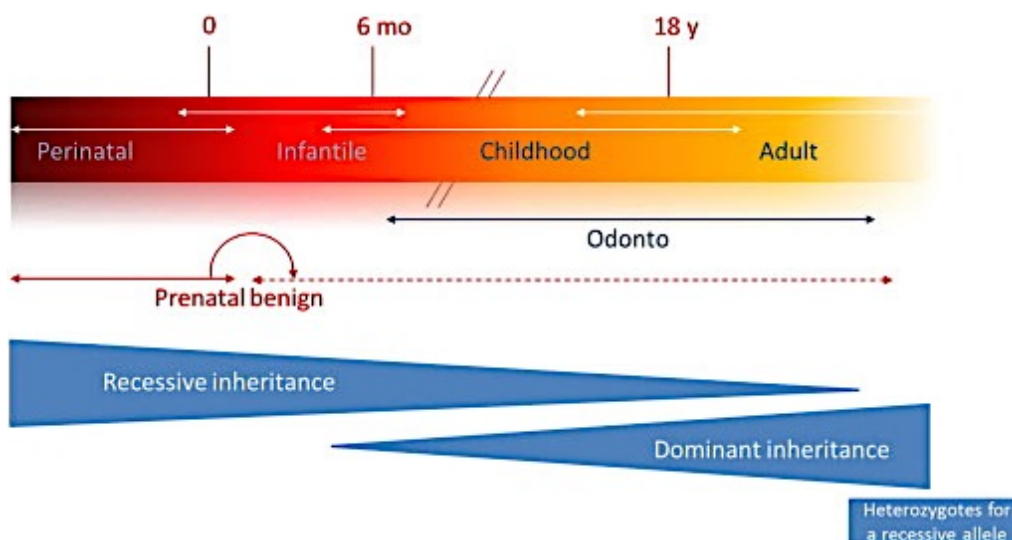


Abb. 2: Klassifikation der 5 Subtypen der HPP mit fließenden Übergängen und des vorherrschenden Erbgangs. Die eindeutige Zuordnung zu einer der Manifestationsformen wird in vielen Fällen aufgrund der überschneidenden Symptomatik erschwert. Diese Abbildung wurde aus der Publikation „Hypophosphatasia“ von Mornet et al. 2017, mit schriftlicher Genehmigung von Elsevier übernommen.

I. Einleitung

Das Manifestationsalter der HPP bzw. der Zeitpunkt der Erstdiagnose korreliert allerdings häufig mit dem Schweregrad und Krankheitsverlauf: Die Erstdiagnose kann bei schweren perinatalen Formen aufgrund ausgeprägter bis letaler Symptome sehr früh und genau bestimmt werden. Weniger symptomatische Formen, die erst im Erwachsenenalter diagnostiziert werden, können jedoch in ihrer milden Ausprägung bereits mehrere Jahre bestehen.

Tab. 3: Die 5 klinischen Subtypen der HPP. Eine exakte, klinische Klassifikation erweist sich aufgrund der fließenden Übergänge häufig als sehr schwierig. Diese Tabelle wurde anhand von Daten von Beck et al., 2009, Hofmann et al., 2013, Hofmann et al., 2013, Whyte, 2010 und Whyte et al., 2015 erstellt.

Klassifikation	Symptome	Manifestationsalter
Perinatal	<ul style="list-style-type: none">○ Hohe Mortalitätsrate○ Respiratorische Unterfunktion○ Kraniosynostose○ Krampfanfälle	<i>in utero</i>
Infantil	<ul style="list-style-type: none">○ Gedeihstörung○ Kraniosynostose○ Muskuläre Schwäche	< 6 Monate
Juvenil	<ul style="list-style-type: none">○ Kleinwuchs○ Kraniosynostose○ Vorzeitiger Milchzahnverlust	
Adult	<ul style="list-style-type: none">○ Verzögerte Knochenheilung○ Ermüdungsfrakturen○ Muskelschmerzen○ Depression, Angstzustände	Mittleres Alter
Odonto-HPP	<ul style="list-style-type: none">○ Vorzeitiger Zahnverlust○ Mineralisierungsstörungen der Zahnhartsubstanzen○ Mangelhafter Zahnstatus○ Parodontitis○ Vergrößerte Pulpencavi und Wurzelkanäle○ Keine skelettale Manifestation	Jedes Alter

Die Auswirkungen einer massiven Hypomineralisation bei der schweren frühkindlichen Form sind derart dramatisch und charakteristisch zugleich, sodass sie einen sofortigen Therapiebeginn erfordern. Die adulte, mildere Form ist aufgrund ihrer unspezifischen Symptomatik und dem häufig unklaren Krankheitsbeginn schwer zu diagnostizieren.

Durch Rekapitulation des Krankheitsverlaufs und eine ausführliche Anamnese fallen nicht selten bereits frühe Symptome, wie vorzeitiger Milchzahnverlust und massive Kariesprobleme seit der Kindheit auf, welche einen früheren Krankheitsbeginn und somit eine Einordnung in eine andere klinische Klassifikation nahelegen.

1.1.5 Dentale Aspekte der Hypophosphatasie

Der vorzeitige Verlust von Milchzähnen, mit dem auffälligen Merkmal der nur partiell anresorbierten Zahnwurzeln, ist als zahnmedizinisches Leitsymptom in vielen Fällen das erste Anzeichen einer HPP (Hughes et al., 2017; Millan and Whyte, 2016). Die dentale Manifestation der HPP ist daher insbesondere für die frühe, kindliche Form charakteristisch. Zahnmedizinische Untersuchungen und Verlaufskontrollen sind ein sehr wichtiger Bestandteil im Rahmen der Diagnosestellung und der prophylaktischen Therapiemaßnahmen.

Die Zahnentwicklung (Odontogenese) mit der Mineralisierung der Zahnhartsubstanz sowohl der Milchzähne als auch der bleibenden Dentition beginnt bereits in der frühen embryonalen Entwicklungsphase. Dentale Manifestationen sind besonders für die Milchzähne charakteristisch, können aber auch die bleibenden Zähne betreffen. Allgemein können dentale und parodontale Symptome als isolierte Ausprägung und sogenannte Odontohypophosphatasie, aber auch im Symptomenkomplex in allen Unterformen der HPP (Tab. 3) auftreten (Reibel et al., 2009).

Die **Odonto-HPP** stellt aufgrund der isolierten dentalen Symptomatik mit typischerweise fehlenden skelettalen Defekten eine relativ mild verlaufende Sonderform der HPP dar (Millan and Whyte, 2016; Mornet, 2007). Sie ist neben dem für eine HPP typischen vorzeitigen Milchzahnverlust durch Mineralisierungsstörungen gekennzeichnet, die alle Zahnhartsubstanzen -Schmelz, Dentin und Zement- betreffen können und zu Veränderungen der Zahnmorphologie führen können. Weiterhin kann eine radiologisch diagnostizierbare vergrößerte Pulpa mit verbreiterten Wurzelkanälen beobachtet werden, wie sie auch bei sogenannten „shell teeth“ bei einer Dentinogenesis imperfecta Typ III charakteristisch sind (Luder, 2015). Auch die dentale Anomalie der Regionalen Odontodysplasie (ROD) steht im kausalem Zusammenhang mit einer HPP (Mathew et

al., 2015). Schmelzhypoplasien sowie eine morphologische Zahnanomalie bedingen die sehr hohe Kariesanfälligkeit, welche bereits das Milchgebiss betreffen kann (van den Bos et al., 2005; Yadav et al., 2012).

Bezieht man sich auf die dentalen Aspekte der Hypophosphatasie ist, wie bereits erwähnt, zunächst der vorzeitige Verlust von Milchzähnen mit noch vorhandener, nahezu nicht resorbierter Wurzel als besonderes Merkmal hervorzuheben (Reibel et al., 2009). Dies ist häufig ein erster Hinweis auf das Vorliegen einer HPP mit dentaler Komponente, und stellt einen auffälligen Unterschied im Vergleich zur ansonsten beinahe vollständig resorbierten Milchzahnwurzel dar und sollte umgehend eine ausführliche Diagnostik nach sich ziehen. Der zeitliche Rahmen des Zahnwechsels ist als eine sehr individuelle Abfolge mit Abweichungen ohne zwingend pathologischen Wert zu betrachten und ist für jeden Zahn mit einem Altersrichtwert mit +/- 2 Jahren angeben. Die Entwicklungsperiode mit anschließender Nutzungsphase der Milchzähne erstreckt sich über einen individuell variablen Zeitraum für das gesamte Gebiss. Der vorzeitige Milchzahnverlust resultiert aus einer Aplasie, Hypoplasie oder Dysplasie des Zahnzements, als wichtiger Bestandteil des Zahnhalteapparates (Parodont), welches die Zahnwurzel über das sogenannte parodontale Ligament (PDL) mit dem umliegenden Alveolarknochen verankert (McKee et al., 2011). Das parodontale Ligament ist ein komplexer Faserapparat mit Kollagen I als Hauptbestandteil, welcher einerseits im Bereich der Zahnwurzel und andererseits im umgebenden Alveolarknochen verankert ist. Hauptursache des Milchzahnverlusts ist vermutlich die nur teilweise ausgebildete Zementschicht auf den Wurzeloberflächen, die für eine mechanisch stabile Verankerung der Fasern des Zahnhalteapparates in der Wurzeloberfläche unabdingbar ist. Die betroffenen Zähne mit fehlstrukturiertem, mangelhaft mineralisiertem Zement werden locker, bevor sie mit anresorbierten Wurzeln spontan ausfallen. Auch eine reduzierte Alveolarknochenhöhe wird bei der HPP häufig beobachtet, aus der eine verringerte Anheftungsfläche des Zahnhalteapparats resultiert (Olsson et al., 1996). Der Bereich des Knochens, in den die Fasern des PDL einstrahlen, wird als Bündelknochen bezeichnet und ist Teil des Zahnhalteapparates. Studien nach Zahnextraktionen haben ergeben, dass dieser Teil des Knochens bereits nach kurzer Zeit vollständig abgebaut ist (Chappuis

et al., 2017). Der Zahnverlust ist generell mit einer Reduzierung der Knochenhöhe und Strukturveränderungen verbunden. Ein fehlerhaft ausgebauter Zahnhalteapparat könnte in diesem Sinne umgekehrt die zu den dentalen Symptomen zählende, reduzierte Alveolarknochen-Höhe bedingen. Alveolarknochenresorptionen infolge unterschiedlich ursächlicher Entzündungsreaktionen können im Krankheitsbild der Parodontitis unter ungünstigen Bedingungen (fehlende Behandlung, kein Therapieansprechen) ebenfalls einen vorzeitigen, pathologischen Zahnausfall bedingen. Ursache für die parodontale Entzündung ist die Entstehung einer sogenannten bakteriellen Dysbiose, d.h. das Überwachen entzündungsstimulierender Bakterienarten innerhalb der Sulkusmikrobiota. Ein Trigger hierfür ist meist eine hohe systemische Entzündungslast, die bei HPP-Patienten aufgrund des häufig manifesten Hyperprostaglandinismus in der Regel ebenfalls gegeben ist (Girschick et al., 2006). Startpunkt der parodontalen Entzündung ist demnach immer die Entstehung der proinflammatorisch wirksamen bakteriellen Dysbiose (Hajishengallis, 2015). Extrazelluläres ATP (eATP) hat zudem einen Einfluss auf das Ausmaß der entzündungsgetriggerten Knochenresorption. Eine erhöhte eATP-Konzentration kann verschiedene Ursachen haben (Giuliani et al., 2017): Durch aktive Freisetzung infolge von Entzündungsreaktionen, oder einer Hypoxie, durch die passive Freisetzung bei Zelltod, sowie durch Sekretion von Parodontalbakterien und auch durch eine geringe Enzym-Aktivität wie bei der HPP. In einer Pilotstudie von Schlagenhaut et al. wurden mikrobiologische und klinische Parameter einer Parodontitis einer HPP-Patientengruppe mit kindlicher Form analysiert und mit nicht erkrankten Parodontitis-Patienten verglichen. Hierbei konnte ein vergleichbares subgingivales Mikrobiom angenommen werden (Valenza et al., 2006). Das Kollektiv von HPP-Patienten der Würzburger Kinderklinik war jedoch zur Prävention des Auftretens eines Hyperprostaglandinismus mit NSAIDs (Naxproren) behandelt worden, was das Fehlen der bakteriellen Dysbiose bei diesem Kollektiv von HPP-Patienten erklären könnte. Das im Gegensatz zur HPP weitverbreitete Krankheitsbild der Parodontitis kann ebenfalls in unterschiedlicher Form und Schwere vorliegen. In ihrer schweren Ausprägungsform ist die Parodontitis nach Kassebaum die 6. häufigste Erkrankung der

Weltbevölkerung (Kassebaum et al., 2014). Die Parodontitis steht vielfach im Zusammenhang mit zahlreichen systemischen Erkrankungen, wie dem Diabetes mellitus, Erkrankungen aus dem rheumatischen Formenkreis und dem Herz-Kreislauf-System (z.B. Arteriosklerose) (Bright et al., 2015; Jockel-Schneider et al., 2014; Zhu and Nikolajczyk, 2014) sowie neben der HPP auch mit anderen genetisch bedingten Erkrankungen (Chediak-Higashi-Syndrom, Trisomie 21, Ehlers-Danlos). Die Diagnose einer Parodontitis sollte demnach gegebenenfalls systemische Untersuchungen nach sich ziehen. Die HPP kann aus zahnmedizinischer Sicht als eine genetische Disposition der Parodontitis gesehen werden und entsprechend dieser behandelt werden.

Differentialdiagnostisch sind weitere Knochenstörungen mit dentaler Mitbeteiligung in Betracht zu ziehen, hierzu zählen im Kindesalter die fibröse Dyplasie, Osteogenesis und Odontogenesis Imperfecta, Morbus Paget und die renale Osteodystrophie (Yepes, 2017).

1.1.6 Aktuelle Behandlungskonzepte und therapeutische Ansätze der HPP

Aufgrund der vielseitigen, multisystemischen Manifestationen besteht die optimale Behandlung aus einer engen interdisziplinären Zusammenarbeit, die neben der Kinderheilkunde und der Orthopädie unter anderem die Fachbereiche Physiotherapie, Neurochirurgie, Zahnmedizin und Kieferorthopädie einbeziehen (Millan and Plotkin, 2012). Derzeitige Therapieansätze betreffen in erster Linie die Behandlung der klinischen Symptomatik und verfolgen prophylaktische Maßnahmen. Diese umfassen z.B. Behandlung mit NSAIDs, neurochirurgische Maßnahmen zur intrakraniellen Druckentlassung bei Hirndruck oder orthopädisch-chirurgische Maßnahmen bei Frakturen. Des Weiteren sind regelmäßige zahnmedizinische Kontrollen unerlässlich. Der vorzeitige Milchzahnverlust bedarf gegebenenfalls einer kieferorthopädischen Behandlung zur Vorbeugung daraus resultierender Zahnfehlstellungen, die zudem das weitere Kieferwachstum mit Folgesymptomen negativ beeinflussen können. Die Behandlung der Parodontitis ist für den Zahnerhalt essentiell.

Die Diagnose dieser seltenen Störung ist trotz einer bisher fehlenden, kurativen Therapie sehr wichtig, um falsche Therapieansätze, wie die Bisphosphonat-Therapie zu vermeiden (Aeby et al., 2016). Die Behandlung mit Bisphosphonaten wird in der Osteoporose-Therapie oder bei Knochenmetastasen zur Verminderung der Knochenresorption angewandt (Pavlakakis et al., 2005). Tatsächlich ist der Einsatz von Bisphosphonaten, synthetischer Pyrophosphat-Derivate, in der Behandlung von HPP-Patienten kontraindiziert, da sie negative Auswirkungen durch eine zusätzliche Erhöhung des PPI-Spiegels haben können und zu einer Verschlechterung der Symptome führen (Aeby et al., 2016; Mornet, 2007; Whyte, 2010). Eine hochdosierte Vitamin D3-Substitution, wie sie bei der Rachitis-Therapie angezeigt sein kann, ist ebenfalls zu vermeiden (Mornet, 2007), ebenso wie ein Vitamin D-Mangel mit sekundärem Hyperparathyreoidismus am anderen Ende des Spektrums.

Vielversprechende Therapieansätze ergeben sich durch Fortschritte der Stammzelltherapie. Die Anwendung humaner mesenchymaler Stammzellen durch allogene Knochenmarkstransplantation konnte bei schwerbetroffenen Patienten eine Verbesserung der muskuloskelettalen Symptomatik erzielen (Taketani et al., 2015; Undale et al., 2009). Dieser Behandlungsweg erfordert allerdings im Vorfeld eine gründliche Nutzen-Risikoabwägung, welche das generelle Risiko einer allogenen Knochenmarkstransplantation sowie das Entwicklungspotential einer sekundären Leukämie infolge einer Stammzelltherapie einschließt (Taketani et al., 2013).

Die kürzlich zugelassene Enzyersatztherapie mit Anwendung des humanen rekombinanten TNAP-Enzyms Asfotase alfa (Strensiq®) zur Therapie an HPP erkrankter Kinder in Europa bedeutet einen großen Fortschritt in der Behandlung dieser Erkrankung (Mornet, 2017; Taketani et al., 2013; Whyte et al., 2016). Bisherige Enzyersatztherapien verzeichnen vielversprechende Ergebnisse insbesondere in Bezug auf die Behandlung des skelettalen Phänotyps, wobei ein Effekt auf Kraniosynostosen offenbar nicht beobachtet wird. Dieses, auf den Knochen gerichtete, rekombinante Enzym bewirkt jedoch keine zusätzlichen positiven Effekte auf andere häufig mitbetroffene Organe wie die Niere oder das Gehirn (Hofmann et al., 2015). Da

es sich bei der HPP um eine Multisystem-Erkrankung handelt, müssen breiter wirksame Strategien und Therapieansätze verfolgt werden (Hofmann et al., 2015).

Die Gentherapie mit CRISPR/CAS9 ist bei erblich bedingten Erkrankungen ein vielversprechender Weg zur Heilung. Dieser Ansatz mit Korrekturanwendungen bei Mutationen ist noch sehr umstritten, sowohl aufgrund ethischer Aspekte als auch einem damit verbundenen Risiko einer malignen Entartung, und bedarf weiterer Forschung.

1.1.7 HPP-Forschung an Tier- und Zellkultur-Modellen

Die Pathophysiologie dieser Mineralisierungsstörung sowie weitere, beinahe den gesamten Organismus betreffende Störungen können sehr gut anhand von Tiermodellen nachvollzogen und analysiert werden. Gezielte Manipulationen, wie das Ausschalten bestimmter Gene oder Genkombinationen, ermöglichten einen Großteil des derzeitigen Verständnisses der Pathophysiologie dieser Erkrankung und deckten molekularbiologische Zusammenhänge sowie zahlreiche Gen- und Signalweg-Interaktionen auf (Fedde et al., 1999; Narisawa et al., 1997). Weiterhin konnten hierdurch Therapieansätze erforscht werden. Die Enzymersatztherapie mit dem Einsatz einer rekombinanten, auf den Knochen gerichteten TNAP konnte in Studien mit TNAP-defizienten Mäusen eine Verbesserung der charakteristischen Mineralisierungsassoziierten Symptome und insbesondere der dentalen Defekte zeigen (McKee et al., 2011; Yadav, Lemire, et al., 2011) (Yadav et al., 2012). Auch Millan et al. konnten in ihrer neueren Studie mit TNAP-Knockout Mäusen ($ALPL^{-/-}$, bzw. $Akp2^{-/-}$) durch die Verabreichung einer löslichen, chimären Form der AP (ChimAP) positive Effekte erzielen (Gasque et al., 2015). Dieses HPP-Tiermodell lieferte den ersten Beweis für den pharmakologischen Einsatz von ChimAP mit Verbesserung des skelettalen und dentalen Phänotyps bezüglich der Schmelz- und Dentinformaion und der Morphologie. Bestandteile des Parodonts (Zement und Alveolarknochen) wiesen in dieser Studie weiterhin Mineralisierungsstörungen auf, jedoch konnte ein parodontales Attachement mit Verbleib der Zähne im Kiefer nachgewiesen werden. Weiterhin wurden keine Anzeichen für eine Kraniosynostose, sowie weder radiologisch noch histologisch ektopische Mineralablagerungen entdeckt.

Zellkultur-Modelle der HPP sind ebenfalls seit längerem etabliert und stellen eine Ergänzung zu Tiermodellen dar, die unterschiedliche methodische Ansätze sowie die Möglichkeit der Verwendung vieler verschiedener Zelllinien bieten. Hierbei werden kommerziell erhältliche Zellen, Zellen aus Tiermodellen und humane Zellen verwendet.

In der vorliegenden Arbeit soll anhand humaner mesenchymaler Stammzellen aus unterschiedlichen Mineralisierungs-assoziierten Geweben ein weiteres *in vitro* HPP-Modell durch eine TNAP-Inhibition umgesetzt und analysiert werden. Die Fragestellung und Aspekte, die in diesem Modell untersucht werden, sind in Kapitel 1.5 näher erläutert. Im Folgenden soll ein Überblick über die in diesem *in vitro* Modell analysierten mesenchymalen Stammzellen mit zusätzlichem Fokus auf die hierzu zählenden, dentalen Stammzellen aus der Pulpa und dem parodontalen Ligament gegeben werden.

1.2 Mesenchymale Stammzellen (MSCs)

Mesenchymale Stammzellen (MSCs) gehen auf die Entdeckung und Isolation von Stammzellen aus dem Knochenmark von Friedenstein zurück (Bianco et al., 2008). Zeitgleich fanden ähnliche Untersuchungen von Caplan et al. statt, der für diese Zellen 1991 erstmals den Begriff der mesenchymalen Stammzellen und die Abkürzung MSC prägte (Caplan, 1991). Unter diesem Begriff wird ein sehr breites, unspezifisches Spektrum adulter Stammzellen zusammengefasst. Hierunter werden die undifferenzierten Zellen eines Gewebes verstanden, die auf gewebespezifische Signale durch asymmetrische Teilung das sie umgebende Gewebe aufrechterhalten können. Isoliert und unter anderen Umgebungsbedingungen sind diese undifferenzierten Zellen in der Lage, sich in eine andere Richtung zu differenzieren.

Knapp 30 Jahre nach ihrer Entdeckung herrscht eine rege Debatte zur Nomenklatur und den Eigenschaften dieser heterogenen Gruppe (Bianco, 2014; Caplan, 2017). Die einheitliche Definition und Gruppierung sämtlicher Gewebestammzellen unter den Überbegriff der mesenchymalen Stammzellen bzw. deren Abkürzung MSC wird derzeit umstritten diskutiert. Die Bezeichnung „mesenchymal“ ist in erster Linie als ein Begriff aus der Histologie zu verstehen, unter dem per Definition vorübergehendes,

I. Einleitung

embryonales Bindegewebe verstanden wird, welches vorrangig mesodermalen Ursprungs ist, aber auch teilweise von der Neuralleiste und somit folglich dem Ektoderm abstammt (Robey, 2017). Die Verwendung des Additivs „mesenchymal“ könnte zu der falschen Annahme eines einheitlichen, mesodermalen Ursprungs verleiten (Robey, 2017). Allgemein werden derzeit mehrheitlich in der Literatur unter den MSCs undifferenzierte Zellen mit Stammzellcharakter verschiedener Gewebearten zusammengefasst. Eine von Robey vorgeschlagene Bezeichnung „tissue-specific stem/progenitor cells“ hebt das Gewebe-abhängige Differenzierungspotenzial hervor und den damit zusammenhängenden Zweck der Reparaturkapazität durch gewebeeigene Zellen. Robey grenzt hiervon die vielfach angenommene Fähigkeit einer über die Lineage hinausreichenden Differenzierungskapazität („trans-differentiate“) ab, die lediglich embryonalen Stammzellen vorbehalten ist und diese als solche auszeichnet.

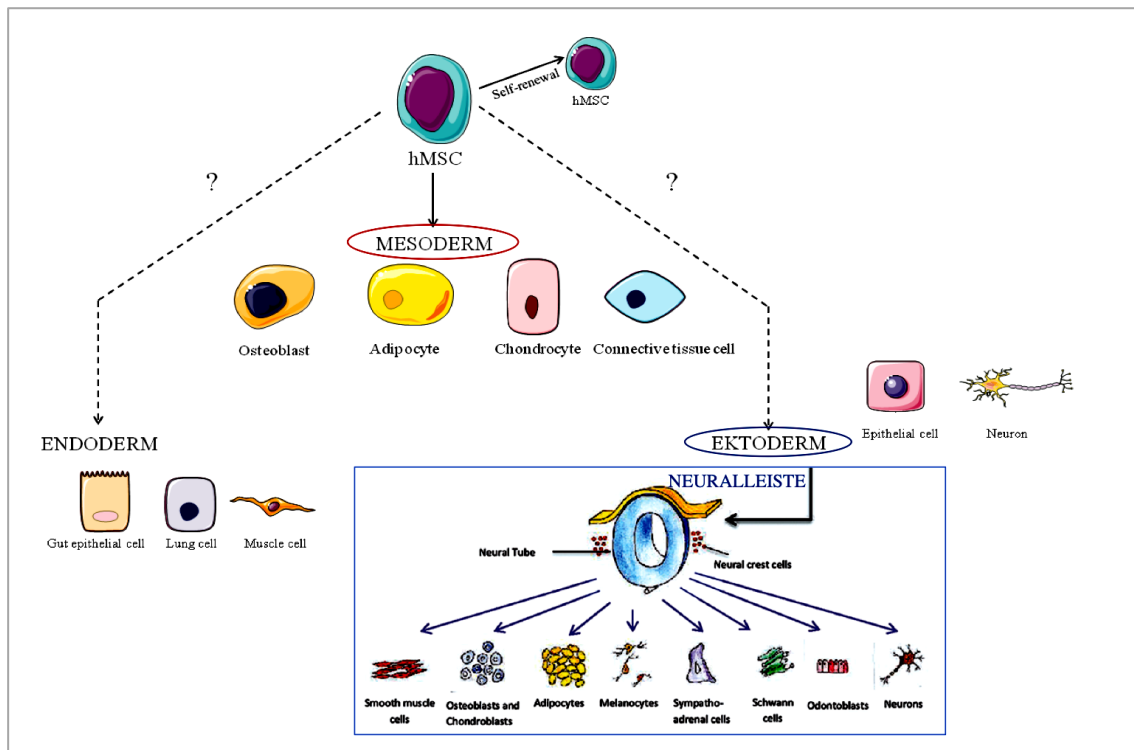


Abb. 3: Schematische Darstellung des Differenzierungspotentials von MSCs. Die Darstellung wurde auf Grundlage der Dissertation von S. Graser (Graser, 2015), adaptiert nach Vorlage von Glenn et al., 2014, Uccelli et al., 2000, mit Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd.: Nat Rev Immunol 8(9), Uccelli, A., et al., Mesenchymal stem cells in health and disease, p.726-36., copyright (2008) und mit Hilfe von „Servier Medical Art Elements“ modifiziert (<http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank>) (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>). Die Abbildung wurde zur Darstellung der neuroektodermalen Zellen um einen Ausschnitt aus *Neural Crest: The fourth germ layer* erweitert (Shyamala et al., 2015).

Des Weiteren herrscht über den Ursprung dieser Zellen noch Unklarheit. Eine sehr häufige und durchaus handfeste Annahme ist das Vorliegen einer perivaskulären Stammzellnische. In diesem Zusammenhang werden die Perizyten des jeweiligen Gewebes als Vorläufer der MSCs und auch sie selbst als die jeweiligen MSCs diskutiert (Bara et al., 2014). Hieraus könnten die gewebespezifischen Eigenschaften resultieren. MSCs wurden bereits hinsichtlich der typischen Stammzelleigenschaften, wie der Multipotenz und Selbsterneuerung untersucht. Unbestritten und anhand vieler *in vitro* Studien bestätigt, ist die Fähigkeit der MSCs sich in die Fülle verschiedener Zelltypen der jeweiligen Abstammungslinie differenzieren können. Die Fähigkeit sich in die gesamte Bandbreite an Zellen aller drei Keimblätter differenzieren zu können (Pluripotenz) ist nur embryonalen Stammzellen vorbehalten (Hynes et al., 2012).

Zur Charakterisierung der MSCs und Abgrenzung dieser zu anderen Stammzellpopulationen, wie beispielsweise den hämatopoetischen Stammzellen, wurden von der Internationalen Gesellschaft für Zelltherapie (International Society for Cellular Therapy) 2006 sogenannte „Minimalkriterien“ aufgesetzt, die MSCs nach derzeitigem Stand definieren (Dominici et al., 2006). Aufgrund des Fehlens eines einzelnen MSC-spezifischen Oberflächenmarkers umfassen diese Kriterien folgende drei experimentell bestimmbare Eigenschaften:

- Zu diesen gehört die (Plastik-)Adhärenz der Zellen unter *in vitro* Kulturbedingungen.
- Sie sollten ein spezifisches Expressionsmuster eines immunologischen Phänotypes aufweisen, welches mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt wird und die positive Expression von CD105, CD90 und CD73, sowie eine negative Expression typischer hämatopoetischer Marker wie CD34, CD11b, CD14 beinhaltet.
- Als weiteres Kriterium gilt die Multipotenz, welche die osteogene, chondrogene und adipogene Differenzierung der Zellen beinhaltet und *in vitro* durch Differenzierungs-Assays und spezifische Färbungen nachgewiesen werden kann.

1.3 Dentale mesenchymale Stammzellen

Stammzellen aus dem Knochenmark sind derzeit die am häufigsten verwendeten und vermutlich am besten charakterisierten MSCs. Neben dem Knochenmark gelang es mittlerweile, eine Reihe weiterer adulter Gewebe mit Stammzellnischen zu identifizieren. Hierzu gehören unter anderem die Haut, Haarfollikel, das Gehirn und die Zahnpulpa (Shi and Gronthos, 2003) sowie weitere dentale Gewebe. Die dentalen Stammzellen werden aufgrund ihrer zentralen Rolle in dieser Arbeit näher beschrieben. Gronthos et al. identifizierten in Pionierstudien bereits im Jahr 2000 eine Population humaner Pulpastammzellen (dental pulp stem cells, DPSCs) und schufen damit erste grundlegende Erkenntnisse. In den folgenden Jahren wurden diese Zellen fortwährend weiter charakterisiert und mit Knochenmarksstammzellen (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) verglichen. Die proliferativen, regenerativen und differenziellen Eigenschaften dieser Zellen innerhalb dentaler Gewebe definieren diese als Stammzellen (Graziano et al., 2008). Stammzellen aus dentalem Gewebe stellen selbst eine heterogene Population dar und weisen eine Reihe an Unterscheidungsmerkmalen bezüglich des jeweiligen entnommenen, dentalen Gewebes auf (Bluteau et al., 2008; Ulmer, 2010).

Dentale mesenchymale Stammzellen (DMSCs) können anhand ihrer Lokalisation unterteilt werden. Man unterscheidet 5 Haupt-DMSCs: Stammzellen aus der Pulpa, sogenannte dental pulp stem cells (DPSC), Stammzellen ausgefallener Milchzähne (stem cells of human exfoliated deciduous teeth, SHEDs), Stammzellen des parodontalen Ligaments (periodontal ligament stem cells, PDLSCs), sowie vom apikalen Bereich (stem cells of the apical papilla, SCAPs) und Stammzellen aus Vorläufern des Dentalen Follikels (dental follicle stem cells, DFSCs) (Botelho et al., 2017) (Bluteau et al., 2008) (Hynes et al., 2012; Miura et al., 2003) (Navabazam et al., 2013). Zähne stellen daher ein besonderes Reservoir zur Gewinnung unterschiedlicher adulter undifferenzierter Zellen für Forschungszwecke mit vielseitigem Anwendungspotenzial dar (Mao, 2008). Die dentalen Stammzellen sind durch eine Reihe spezifischer Eigenschaften charakterisiert, welche durch ihren Ursprung aus der Neuralleiste bedingt sind und sie beispielweise von den BMSCs abgrenzen.

1.3.1 Entwicklungsbiologischer Hintergrund dentaler Stammzellen

Die kraniofaziale Entwicklung stellt eine Abfolge von komplexen morphogenen Ereignissen mit zahlreichen Interaktionen dar. Verschiedene zelluläre Quellen sind an der Bildung der Gesichtsstrukturen beteiligt: Neben den drei Keimblättern, kraniales Ekto- und Endoderm, Mesoderm, gehört hierzu die Neuralleiste, die in diesem Zusammenhang als sogenanntes viertes Keimblatt benannt wird (Shyamala et al., 2015). Die Formation der Neuralleiste beginnt während der frühen Embryogenese am Rand zwischen Ektoderm und Neuralplatte. Als vorübergehende Zellquelle neuroektodermaler Zellen nimmt die Neuralleiste eine zentrale Rolle während der Entwicklung und Morphogenese des Gesichts ein. Die Neuralleistenzellen emigrieren von dort aus in unterschiedlichen Strömen zur Bereitstellung neuroektodermaler Zellen, zu welchen die dentalen mesenchymalen Stammzellen gerechnet werden (Adameyko and Fried, 2016). Chai et al. zeigten erstmals den großen Beitrag, den die Zellen der Neuralleiste zur Bildung des dentalen Mesenchyms, der Pulpa und des parodontalen Ligaments, von Zahnzement und Dentinmatrix sowie des Unterkieferknochens und vieler weiterer assoziierter Strukturen beitragen (Chai et al., 2000).

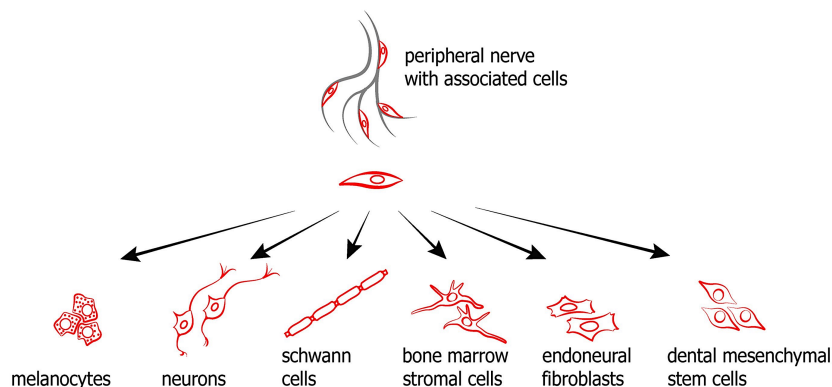


Abb. 4: Nerven und Nerven-assoziierte Zellen als Zellquelle für neuroektodermale Zellen. Sie sind eine Nische für verschiedenste Zellquellen und tragen einen großen Beitrag zur kraniofazialen Entwicklung bei, welche die Zahnentwicklung (Odontogenese) beinhaltet (Adameyko, I., and Fried, K. (2016). The Nervous System Orchestrates and Integrates Craniofacial Development: A Review. *Front Physiol* 7, 49.).

In der 4. Woche der Embryogenese wandern Neuralleistenzellen in die Schlundbögen ein, sodass der größte Teil des Mesenchyms neuroektodermalen Ursprungs ist (Ulmer, 2010). Die Zahnentwicklung beginnt etwa am 40. Tag nach der Befruchtung. Der Beginn der Hartgewebebildung folgt bereits nach 4 bis 5 Monaten der embryonalen

Entwicklung. Mit Ausnahme der schmelzbildenden Ameloblasten-Vorläuferzellen, welche aus dem Ektoderm stammen, sind alle an der Odontogenese beteiligten Stammzellen neuroektodermalen Ursprungs.

Es findet eine stetige, lebenslange Hartgewebsablagerung, sogenanntes Sekundärdentin, statt, welche zur Verkleinerung der Pulpenkammer und Wurzelkanäle führt. Die Zellteilung und sekretorische Aktivität der Odontoblasten ist aufgrund der Tatsache, dass es sich um postmitotische Zellen handelt, limitiert (Ruch et al., 1995). Die Reparaturkapazität der Pulpa und folglich die des umgebenden Zahnhartgewebes ist bis zu einem bestimmten Maße limitiert und wird lediglich als Antwort in Folge eines Reizes aktiviert (Shi and Gronthos, 2003). Schädigungen und Reize des Dentins unterschiedlichster Art, wie durch Karies, ein Präparationstrauma mit Temperaturerhöhung der Pulpa sowie Frakturen mit Exposition der Pulpa, können zum Absterben von Odontoblasten führen und eine reparative Hartgewebsbildung veranlassen (Mojarad et al., 2016). Diese Beobachtung legt seit Längerem das Vorhandensein von Stammzellen innerhalb der adulten Pulpa nach abgeschlossener Zahnentwicklung nahe. Odontoblasten im dentinanliegenden Odontoblastenlayer können reaktiviert, aber auch Odontoblasten-Vorläuferzellen aus dem Pulpagewebe rekrutiert und zur Differenzierung angeregt werden. Die Bildung von sogenanntem Tertiär- bzw. Reizdentin stellt einen funktionellen Beweis dar, dass innerhalb der postnatalen Pulpa Zellen mit Stammzeleigenschaften enthalten sind. Die Hartschichtablagerung und Reparaturvorgänge der Zahnhartschicht stehen im Gegensatz zu einem stetigen, an die Belastung angepassten, physiologischen Umbau des Knochengewebes sowie dessen Regenerationspotenzial.

1.3.2 Charakteristische Merkmale dentaler Stammzellen

Aufgrund des neuroektodermalen Ursprungs der dentalen Gewebe stellen deren Stammzellen einen Neuralleisten-Stammzellphänotyp dar und exprimieren neurogene Marker. Es konnte beobachtet werden, dass DPSCs in der Lage sind, sich zu funktionell aktiven Neuronen zu differenzieren (Arthur et al., 2008). Dieses neurogene Potenzial der DPSCs wird auf den Neuralleistenursprung dieser Zellen zurückgeführt.

I. Einleitung

Gronthos et al. und weitere Arbeitsgruppen konnten eine Stammzell-basierte Regeneration spezifischer, humaner Zahnstrukturen, wie dem Pulpa-Dentin-Komplex oder PDL-/Zement-Komplex in immunsupprimierten Mausmodellen erreichen (Gronthos et al., 2000, 2002; Seo et al., 2004). Die charakteristische Fähigkeit der DPSCs, einen Pulpa-Dentin-ähnlichen Komplex zu bilden, ist eng mit der Fähigkeit der BMSCs verbunden, Knochen bzw. Knochenmark zu regenerieren (Shi et al. 2001).

Eine häufig genutzte Stammzellquelle stellen die dritten Molaren dar. Diese können in impaktierte, noch vollständig von Kieferknochen umgebene, oder in retinierte, teilweise oder vollständig durchgebrochene, Weisheitszähne eingeteilt werden. Im Bereich der Oralchirurgie fallen MSCs aus extrahierten Weisheitszähnen, vergleichbar mit der Stammzellgewinnung aus der Spongiosa oder des Knochenmarks bei orthopädischen Eingriffen, als verwertbares Material an, das sonst verworfen werden würde. Aufgrund des relativ geringen operativen Eingriffs einer Weisheitszahnentfernung stellen diese eine gut zu erreichende Stammzellquelle dar.

In Rahmen dieser Arbeit wurden dentale Stammzellen aus der Pulpa und dem parodontalen Ligament isoliert und mit Knochenmarks-Stammzellen in Bezug auf die HPP-relevanten Faktoren verglichen. Diese beiden dentalen Stammzellarten sind im Folgenden nach aktuellem Forschungsstand beschrieben.

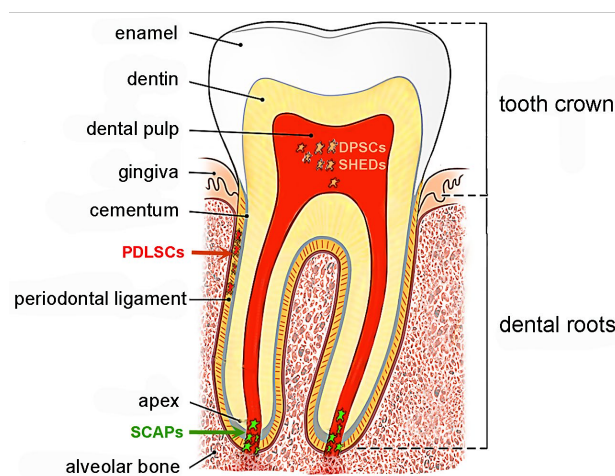


Abb. 5: Schematische Darstellung der Lokalisation der analysierten dentalen Stammzellen: DPSCs aus der Pulpa und PDLSCs aus dem parodontalen Ligament. Diese Abbildung wurde aus „stem cell-based approaches in dentistry“ mit Genehmigung des Autors übernommen (Mitsiadis et al., 2015).

1.3.3 Stammzellen aus der Pulpa (DPSCs)

Im adulten Pulpagewebe befinden sich verschiedene Progenitorzell-Subpopulationen mit unterschiedlich ausgeprägten Stammzeleigenschaften wie der Selbsterneuerung und Multipotenz. Ein interessanter Aspekt ist die Tatsache, dass die Weisheitszahnentwicklung im Gegensatz zur Odontogenese der Milchzähne und der bleibenden Zähne erst postnatal beginnt. Die postnatale Entwicklung der Weisheitszähne kann als einzigartige Organogenese gesehen werden, die komplett nach der Geburt abläuft und somit währenddessen dentales embryonales Gewebe im Kiefer vorliegt (Ulmer, 2010). Auch im Rahmen endodontischer Maßnahmen kann entferntes Pulpagewebe zur Isolation von DPSCs verwendet werden (Graziano et al., 2008). Adulte DPSCs besitzen die Fähigkeit, sich zu Dentinmatrix-bildenden Odontoblasten zu differenzieren. *In vivo* konnte in immunsupprimierten Mäusen die Bildung eines Pulpa-Dentin-Komplexes beobachtet werden, diese Fähigkeit charakterisiert diese Zellen. Bei der odontogenen oder osteogenen Differenzierung von DPSCs wurden zur Anlagerung und Mineralablagerung teilweise Hydroxylapatit-Partikel hinzugegeben (Gronthos et al., 2000). Dies macht man sich in der Zahnmedizin mit Hilfe von Überkappungsmaterialien zur Dentinwundversorgung zu Nutze, um eine Defektüberbrückung, eine sogenannte „dentine bridge“, durch reparatives Dentin zu erreichen (Neves et al., 2017).

1.3.4 Stammzellen des parodontalen Ligaments (PDLSCs)

Das parodontale Ligament (PDL) stellt einen wichtigen Teil des Zahnhalteapparates (Parodont) dar. Weitere Bestandteile sind das Zement und der umgebende Alveolarknochen. Das PDL ist ein Fasernetzwerk, wobei die sogenannten Sharpey`schen Fasern mit Kollagen I als Hauptbestandteil der Aufhängung des Zahns in der knöchernen Alveole dienen (Alvarez et al., 2015). Charakteristische Eigenschaften der PDLSCs können vom Aspekt der Zahnentwicklung hergeleitet werden: Dieser Faserapparat stammt von dem Zahnfollikel ab, einem Bindegewebsäckchen, das den Zahnkeim während der Odontogenese umgibt und ein Reservoir von Zement-bildenden Zellen enthält (Seo et al., 2004).

Die Stammzellen aus dem PDL wurden als eine eigenständige Stammzellgruppe in Abgrenzung zu den DPSCs und BMSCs von Seo et al. charakterisiert (Seo et al., 2004). PDLSCs stellen eine heterogene Stammzellpopulation dar, die sich einerseits zu Osteoblasten und andererseits zu Zementoblasten differenzieren können (Seo et al., 2004). Charakteristisch war zudem die höhere Expression von Scleraxis als in DPSCs und BMSCs (Alvarez et al., 2015). Eine Besonderheit der PDLSCs stellt ihre Fähigkeit dar, nach *in vitro* Expansion und anschließender Transplantation *in vivo* einen Zement-/PDL-ähnlichen Komplex bilden zu können (Seo et al., 2004). Das Potenzial der PDLSCs wird derzeit insbesondere im Bereich der Parodontologie und des Tissue Engineering intensiv untersucht und eröffnete neue Perspektiven für die parodontale Regeneration dieses spezialisierten Gewebes (Iwasaki et al., 2013) (Hu et al., 2017). Die exakte Lokalisation der PDLSCs ist noch nicht vollständig geklärt (Hynes et al., 2012; Seo et al., 2004).

1.4 Hinführung zur Fragestellung und Vorstellung des *in vitro* HPP-Modells

In Anlehnung an die Nomenklatur der aktuellen Literatur wird für die in dieser Arbeit analysierten Stammzellen aus dem Knochenmark und den dentalen Geweben die übergeordnete Bezeichnung mesenchymale Stammzellen und deren Abkürzung MSCs verwendet. Für die MSCs aus dem Knochenmark wurde die Abkürzung BMSCs (bone marrow mesenchymal stem cells) gewählt. Die Stammzellen aus der Pulpa werden in Anlehnung an die mehrheitliche Verwendung in der Literatur als DPSCs abgekürzt (dental pulp stem cells) und die Stammzellen aus dem parodontalen Ligament mit der Abkürzung PDLSCs (periodontal ligament stem cells) von diesen abgegrenzt.

Vergleichende Untersuchungen der Genexpressionsprofile durch cDNA Microarray-Analysen von DPSCs und BMSCs, welche als repräsentative Vorläuferpopulationen von Odontoblasten bzw. Osteoblasten gelten, wurden 2009 durch Gronthos et al. durchgeführt. Sie konnten dabei eine ähnliche Genexpression von mehr als 4000 Genen feststellen. Des Weiteren wurde eine große Ähnlichkeit bezüglich der Expression verschiedener Proteine der jeweiligen Extrazellulärmatrix nachgewiesen (Shi et al.,

2001). Diese und weitere Analysen stellen für die vorliegende Arbeit eine Basis zur weiteren Charakterisierung der BMSCs und DPSCs sowie der PDLSCs dar.

In einem durch Enzyminhibition mit Levamisol induzierten Zellkultur-Modell der HPP soll die TNAP-abhängige Genexpression unter osteogenen Differenzierungsbedingungen analysiert werden. Aufgrund der häufigen Beteiligung dentaler Gewebe bei der HPP erscheint die Einbeziehung von Stammzellen aus diesem Bereich wichtig.

Levamisol gehört zu den Imidazolthiazolen und ist unter anderem als Anthelminthikum zur Behandlung von Fadenwürmern bekannt. In der Literatur ist Levamisol, neben Theophyllin und L-Homoarginin, als ein nicht-kompetitiver Inhibitor der TNAP mit einer mittleren inhibitorischen Konzentration von 20 μ M beschrieben (Fonta, 2015; Sergienko and Millan, 2010). Levamisol wird jedoch keine rein spezifische Inhibition der TNAP zugesprochen (Nowak et al., 2015).

1.5 Fragestellung der Dissertation

Für die Charakterisierung und Analyse von MSCs aus drei unterschiedlichen Mineralisierungs-assoziierten Geweben wurde in dieser Arbeit ein *in vitro* HPP-Modell mit einer Levamisol-induzierten TNAP-Inhibition etabliert. Hierfür wurde die Gliederung in eine **basale Charakterisierung** mit anschließender **Differenzierung und TNAP-abhängigen Analyse** vorgenommen und den folgenden Fragestellungen nachgegangen.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollten die Voraussetzungen für das *in vitro* Modell der HPP geschaffen werden. Hierzu sollte die Isolation der DPSCs und PDLSCs etabliert und experimentell verifiziert werden, um diese anschließend für vergleichende Analysen mit BMSCs heranzuziehen. Es sollte jeweils eine repräsentative Probenanzahl (n=5) der BMSCs, DPSCs und PDLSCs hinsichtlich ihrer MSC-Charakteristika und Differenzierungseigenschaften verglichen werden. Welche Gemeinsamkeiten und Unterscheidungsmerkmale können festgestellt werden?

I. Einleitung

Die Analyse der Differenzierung dieser BMSCs, DPSCs und PDLSCs bestimmt den zweiten Teil dieser Arbeit. Welche Genexpression ist für die unterschiedlichen MSCs charakteristisch? Wie verändert sich die Genexpression während der Differenzierung?

In diesem Zusammenhang soll die Auswirkung der TNAP-Inhibition durch Levamisol auf die osteogene Differenzierung der MSCs untersucht werden. Welche Genexpression ist an die TNAP gekoppelt und verändert sich mit ihrer Inhibition?

Diese Analysen sollen Aufschluss über die zentrale Fragestellung nach einer TNAP-abhängigen Genexpression während der osteogenen Differenzierung geben und zum näheren Verständnis molekularer Zusammenhänge bei der HPP beitragen. Insbesondere sollen translationale Ansätze für die Behandlung der dentalen Problematik abgeleitet werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIAL

2.1.1 Verbrauchsmaterial

Folgende Verbrauchsmaterialien wurden verwendet.

Tab. 4: Verbrauchsmaterial mit Bezugsquelle

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Deckgläschen	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG Lauda-Königshofen
Filterspitzen	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
Multiwell-Platten (6-/12-Well-Platten)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Objektträger	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim
Petrischalen (Nunclon Surface)	Nunc A/S, Roskilde, Dänemark
Plastikpipetten (1, 2, 5, 10, 20 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
Reaktionsröhrchen	Eppendorf AG, Hamburg
Snap Caps	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Sterile Filter	A. Hartenstein Gesellschaft für Labor- und Medizintechnik mbH, Würzburg
Tubes für PCR (0,2 ml)	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
Low Profile PCR-Tubes (weiß)	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
UV-Küvetten	Eppendorf AG, Hamburg
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ²)	Thermo Fisher Scientific, Thermo Electron LED GmbH, Langeneselbold
Zellkulturflaschen (175 cm ²)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellschaber (13 mm)	SPL Life Sciences
Zentrifugenröhrchen (50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

2.1.2 Technische Ausstattung

Tab. 5: Geräte mit Bezugsquellen

Ausstattung	Hersteller
Autoklav Systec VX-75	Systec GmbH, Linden
BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg
Blockheizer DRI Block, DB 2D	Techne, Großbritannien
CO ₂ -Inkubator Heracell 240i	Thermo Fisher Scientific GmbH, Erlangen
Fusion SL Vilber Lourmat	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
GloMax®-Multi Detection System	Promega GmbH, Mannheim
LSR II Durchflusszytometer	BD Bioscience, Heidelberg
Kreis-Schüttler 3015	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
MS2 Minishaker	IKA Works Inc. Wilmington, NC
Mikroskop Wilovert®	Helmut Hund GmbH, Wetzlar
Mikroskop Axioskop 2	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Multipette® plus	Eppendorf AG, Hamburg
Orion II Microplate Luminometer	Berthold Detection Systems GmbH, Pforzheim
Sonificator Sonopuls	BANDELIN Electronic GmbH & Co. KG, Berlin
Sterilwerkbänke	
Heraeus LaminAir, HA 2472 GS	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Herasafe KS	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold
PCR-Blöcke (RT-PCR)	
MJ Research PTC-200	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
peqSTAR	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
PCR-Blöcke (qPCR)	
TProfessional Thermocycler	Biometra GmbH, Göttingen
DNA Engine Opticon	MJ Research, Waltham, USA (Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf)
Pipetten (0,1 µl-2,5 µl)	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe accu-jet® pro	BRAND GMBH & CO KG, Wertheim
Wasserbad GFL 1083	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel

Zählkammer	Neubauer improved, Marienfeld
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Zentrifuge für PCR-Tubes Sprout	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
Zentrifuge Mikro 20	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Zentrifuge Heraeus Sepatech	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Megafuge 1.0 (Zellkultur)	

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Tab. 6: Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien	Hersteller
100 DNA-Basenpaar-Marker	VWR International, Darmstadt
2-Mercaptoethanol (2-ME)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
Aceton	PanReac AppliChem GmbH, Darmstadt
Agarose	Genaxxon Bioscience GmbH, Ulm
Alizarinrot S	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
Ammoniaklösung (25 %)	PanReac AppliChem GmbH, Darmstadt
Bovines Serumalbumin (BSA)	PanReac AppliChem GmbH, Darmstadt
DNA-Ladepuffer (RT-PCR)	VWR International, Darmstadt
Dulbecco's modified eagle's Medium (DMEM)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
DMEM Ham's F-12, mit Glutamin	
DMEM high glucose (4.5 g/l), mit Glutamin	
Ethanol	PanReac AppliChem GmbH, Darmstadt
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom GmbH, Berlin
GelRed®	Genaxxon Bioscience GmbH, Berlin
GoTaq® (qPCR Master-Mix)	Promega GmbH, Mannheim
Methanol	PanReac AppliChem GmbH, Darmstadt
Magermilchpulver	PanReac AppliChem GmbH, Darmstadt

Ölrot	Certistain, Diagnostica Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd (4 %-ig in PBS)	Affymetrix, Ohio, USA (Vertrieb durch VWR International GmbH, Ismaning)
Proteaseinhibitor (PI) complete	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Phosphat gepuffertes NaCl (PBS)	PanReac AppliChem GmbH, Darmstadt
Propanol	PanReac AppliChem GmbH, Darmstadt
Roti®-Quant	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tris	PanReac AppliChem GmbH, Darmstadt
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
Trypanblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
Trypsin-EDTA (0,05 %, 1x)	Gibco, Life Technologies GmbH Darmstadt
Tween 20	Merck KGaA, Darmstadt
Wasser, doppelt destilliert (ddH ₂ O)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Wasser, nukleasefrei	Promega, Madison, WI, USA
Vectashield® Mounting Medium mit DAPI H-1200	Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA (Vertrieb LINARIS GmbH, Dossenheim)

2.1.4 Kits

Tab. 7: Kits

Kits	Hersteller
CSPD® ready-to-use	Roche Deutschland Holding GmbH
GoTaq qPCR Mix	Promega, Madison, WI, USA
Nucleo Spin® RNA II Kit	Macherey-Nagel GmbH and Co. KG, Düren
Roti-Quant® universal	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe

2.1.5 ZELLKULTUR

2.1.5.1 Primäre Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden MSCs aus drei verschiedenen Quellen analysiert: humane mesodermale Stammzellen aus dem Knochenmark (Bone Marrow Stem Cells, BMSCs) sowie neuroektodermale Stammzellen aus Pulpagewebe (dental pulp stem cells, DPSCs) und aus dem entsprechenden parodontalen Ligament (periodontal ligament stem cells, PDLSCs) extrahierter humaner Weisheitszähne. Die Aufarbeitungs- und Isolationsprozedur der Zellen aus den drei Geweben (Knochenmark, Pulpa und parodontales Ligament) ist in den Kapiteln 2.2.1.1 und 2.2.1.2. beschrieben. Zur Charakterisierung und vergleichenden Analyse wurden jeweils 5 unterschiedliche biologische Proben verwendet und in alphabetischer Reihenfolge benannt (BMSCs Donor a-e, DPSCs und PDLSCs jeweils Donor A-E). Die 5 Probenpaare aus korrespondierenden DPSCs und PDLSCs wurden jeweils aus einem gemeinsamen Donor isoliert und gleich benannt.

MSCs	Probe	
BMSCs	a-e	
DPSCs	A-E	} jeweils aus einer gemeinsamen Donorquelle (A-E)
PDLSCs	A-E	

2.1.5.1.1 Mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark (BMSCs)

Die humanen MSCs aus dem Knochenmark (BMSCs) wurden aus Femurspongiosa-Proben isoliert, welche im Rahmen von Hüftgelenkersatzoperationen in der Orthopädischen Klinik König-Ludwig-Haus Würzburg entnommen und nach vorheriger schriftlicher Einwilligung der Patienten und zugrundeliegender Genehmigung der lokalen Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg für die Zellkultur bereitgestellt worden waren. Das Alter der männlichen und weiblichen Patienten lag zwischen 47 und 76 Jahren.

2.1.5.1.2 Dentale MSCs: DPSCs und PDLSCs

Sämtliche Weisheitszähne, die zur Isolation von Stammzellen aus der Pulpa und dem parodontalen Ligament (PDL) verwendet wurden, wurden von der Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Würzburg zur Verfügung gestellt. Die Aufklärung und schriftliche Einverständniserklärung der Patienten bzw. der Erziehungsberechtigten zur Verwendung der Zähne erfolgte vor der operativen Entfernung der Weisheitszähne. Die Gewinnung und Verarbeitung des biologischen Probenmaterials wurde gemäß einem Ethikantrag des Lehrstuhls für Tissue Engineering und Regenerative Medizin der Universität Würzburg mit Genehmigung durch die lokale Ethikkommission durchgeführt (Antragsnummer 182/10 vom 04.04.2011, eine Verlängerung um 5 Jahre erfolgte am 25.11.2015). Zuvor wurden in Korrespondenz mit Herrn Prof. Schlagenhaut (Leiter der Abteilung für Parodontologie in der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie des Universitätsklinikums Würzburg) Informationen bezüglich der Gewinnung dentaler Stammzellen eingeholt. Des Weiteren wurden Studien sowie bereits etablierte Protokolle und Erfahrungen aus der Literatur für die eigene Etablierung eines Protokolls für die Isolation dentaler MSCs im Labor des Muskuloskeletalen Centrum Würzburg (MCW) herangezogen.

Für die Isolation von Stammzellen wurden kariesfreie, klinisch und röntgenologisch unauffällige Weisheitszähne aus Ober- und Unterkiefer verwendet, welche im Rahmen einer kieferorthopädischen Behandlung oder seltener aufgrund einer Dentitio difficilis entfernt worden waren. Für die vorliegende Arbeit wurden Stammzellen aus Weisheitszähnen von insgesamt 19 Patienten isoliert, pro Patient konnten zwei bis vier Weisheitszähne verwendet werden. Das Patientenalter lag zwischen 13,5 und 44 Jahren und durchschnittlich bei 24 Jahren für die 5 Probenpaare (Donor A-E), anhand derer der Hauptteil der Untersuchungen durchgeführt wurde (Durchschnittsalter der gesamten Proben war 20,6). Die Geschlechtsverteilung der Donoren aller Proben war ausgeglichen, für die 5 Probenpaare lag das Verhältnis von männlichen und weiblichen Donoren bei 4:1. Es gelang im Rahmen dieses Projektes von 5 Donoren (A-E) ein vollständiges Probenpaar aus DPSCs und PDLSCs zu gewinnen und für den Vergleich heranzuziehen. Somit konnte der Einfluss der Spendervariabilität insgesamt reduziert

und ein direkter Vergleich zwischen den DPSCs (A-E) und den PDLSCs (A-E) ermöglicht werden. Die Stammzellproben der anderen Donoren (n=14) ohne eine korrespondierende DPSC- bzw. PDLSC-Probe wurden als Zusatzmaterial verwendet.

2.1.5.2 Zellkulturmedien und Zusätze

Das Zellkulturmedium wurde bei 4 °C gelagert und vor Gebrauch im Wasserbad auf 37 °C vorgewärmt, um einen möglichst schonenden Umgang mit den Zellen zu gewährleisten. Das fötale Kälberserum (FCS) wurde vor Gebrauch bei 56 °C für eine Stunde hitzeinaktiviert und bei -20 °C gelagert. Das Medium wurde regelmäßig im Abstand von 3 bis 4 Tagen gewechselt. Für alle drei MSCs wurde standardmäßig das MSC-Kulturmedium DMEM Ham's F12 mit L-Glutamin und Trypsin-EDTA (0,05 %) verwendet. Folgende Zusätze wurden vor Gebrauch hinzugefügt: 10 % hitzeinaktiviertes FCS, L-Ascorbat (50 µg/ml) sowie 1 % Penicillin/Streptomycin. Dieses MSC-Kulturmedium wurde in der Wachstumsphase bis zum Beginn der Differenzierung (BMSCs Passage 1, Passage 2 bei den dentalen MSCs) verwendet. Als Grundlage für die Differenzierungsmedien wurde DMEM High Glucose (4,5 g/l) eingesetzt und die jeweiligen Zusätze vor Gebrauch hinzugegeben (Tab. 8).

Tab. 8: Zusammensetzung der Zellkulturmedien

Zellkulturmedien	Medium	Zusätze
MSC-Standard-Kulturmedium	DMEM Ham's F-12	10 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin 50 µg/ml L-Ascorbat-2-Phosphat
Kontrollmedium für Differenzierungen	DMEM High Glucose (4,5 g/l)	10 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin
Osteogenes Differenzierungsmedium	DMEM High Glucose (4,5 g/l)	10 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin Zusätze direkt vor Gebrauch (Endkonzentration) 50 µg/ml L-Ascorbat-2-Phosphat 10 mM β-Glycerophosphat 100 nM Dexamethason

Adipogenes Differenzierungsmedium	DMEM High Glucose (4,5 g/l)	10 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin Zusätze direkt vor Gebrauch (Endkonzentration) 1 µM Dexamethason 500 µM IBMX 1 µg/ml Insulin 100 µM Indomethacin
-----------------------------------	------------------------------------	---

Tab. 9: Zellkulturzusätze

Zellkulturzusätze	Konzentration (Stammlösung)
Amphotericin B	250 µg/ml
L-Ascorbat 2-Phosphat	50 mg/ml
β-Glycerophosphat	1 M
Dexamethason	1 mM (in 100 % EtOH gelöst)
3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX)	500 mM (in DMSO gelöst)
Insulin (humanes rekombinantes)	2 mg/ml
Indomethacin	100 mM (in DMSO gelöst)
Levamisol	41,53 mM (Endkonzentration 1 mM)

2.1.6 Puffer und Lösungen

Die Puffer und Lösungen wurden nach Herstellerangaben vorbereitet und wenn nicht anders ausgewiesen bei Raumtemperatur gelagert.

Tab. 10: Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen		
Ladepuffer (PCR) (10x)	6,85 M 1 mM 4,6 mM 3,7 mM	Glycerol EDTA Xylencyanolblau Bromphenolblau in ddH ₂ O
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	9,55 g auf 1000 ml	PBS Dulbecco w/o Ca ²⁺ & Mg ²⁺ in ddH ₂ O

II. Material und Methoden

Trypanblau-Lösung	0,4 % 0,9 %	Trypanblau NaCl in ddH ₂ O
TBE-Puffer (10x)	890 mM 890 mM 20 mM	Tris Borsäure EDTA in ddH ₂ O

Tab. 11: Färbelösungen

Färbelösungen

Alizarinrot S Färbelösung	1 g 1 ml 100 ml	Alizarinrot S 25 % (v/v) Ammoniaklösung dH ₂ O
Ölrot-O-Färbelösung (Stammlösung)	0,5 g 100 ml	Ölrot-O 99 % Isopropanol
Ölrot-O-Färbelösung (Gebrauchslösung)	3:2	Stammlösung mit dH ₂ O mischen 24 h stehen lassen vor Gebrauch filtrieren
Phalloidin-Färbelösung	5 µl 200 µl	Phalloidin Stammlösung (300 units) 200 units/ml abgedunkelt bei -20 °C gelagert 1 % BSA in PBS
Methanol-Aceton-Fixierlösung	1:1	bei -20 °C gelagert

2.1.7 Antikörper

Tab. 12: Antikörper für die Immunzytochemie

Erstantikörper	Verdünnung	Hersteller
TNAP (B4-78): sc-81754	1:100 (Stamm: 0,2 µg/µl)	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
Golgi: sc 58770	1:100 (Stamm: 0,2 µg/µl)	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
mouse serum: sc 45051	1:100 (Stamm: 6,4 µg/µl)	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
Zweitantikörper	Verdünnung	Hersteller
donkey anti-mouse IgG NL557 (Phycoerythrin, rot)	1:400	R+D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt

Alle Antikörper wurden von Thermo Fischer (eBioscience) bezogen und nach Herstellerangaben eingesetzt. Folgende Antikörper wurden zur FACS-Analyse verwendet.

Tab. 13: Antikörper für die FACS-Analyse (Test: Menge des Antikörpers, der eine Zellprobe mit 10^5 - 10^8 Zellen in einem Endvolumen von 100 μ l färbt)

Antikörper	Verdünnung
MSC Marker	
CD 44 eFluor 450	0,2 mg/ml
CD 73 PerCP-eFluor 710	5 μ l/Test
CD 90 FITC	5 μ l/Test
Hämatopoetische Marker	
CD 34 FITC	5 μ l/Test
CD 45 eFluor 506	5 μ l/Test
Endothelium	
CD 31 PE-Cyanine7	5 μ l/Test
CD 105 APC	5 μ l/Test
CD 105 PE-Cyanine7	5 μ l/Test
Sonstige	
HLA-DR APC-eFluor 780	5 μ l/Test
CD 11b APC-eFluor 780	5 μ l/Test
CD 14 APC-eFluor 780	5 μ l/Test
CD 19 APC-eFluor 780	5 μ l/Test

2.1.8 Enzyme

Tab. 14: Enzyme

Enzym	Hersteller
rDNase	Macherey-Nagel GmbH und Co. KG, Düren
Dispase II (Stamm 10 mg/ml)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
Kollagenase (Stamm 10,4 mg/ml)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
Reverse Transkriptase	Promega GmbH, Mannheim
peqGold Taq-DNA-Polymerase	VWR International, Darmstadt (ehemals PEQLAB)

2.1.9 Primer

Die verwendeten Primer wurden von der Firma biomers.net GmbH (Ulm) oder Eurofins MWG Synthesis GmbH (Ebersberg) bezogen.

Tab. 15: Primer für die RT-PCR, AT=Annealing-Temperatur

Primer	Sequenz 5'-3'	Produkt (bp)	AT (°C)	Zyklen
ALPL (TNAP)	s: GCTGAACAGGAACAACGTGA as: AGACTGCGCCTGGTAGTTGT	441	55	33
EEF1a	s: CTGTATTGGATTGCCACACG as: AGACCGTTCTTCCACCACTG	369	55	21
CD73	s: TGGAACCACGTATCCATGTG as: CTCGACACTTGGTGCAAAGA	301	57	40
CD90	s: CGAACCAACTTCACCAGCAA as: CTGATGCCCTCACACTTGAC	173	55	40
CD105	s: TCCATTGTGACCTTCAGCCT as: CTTGGATGCCTGGAGAGTCA	176	55	40
CD34	s: TAGCCTTGCAACATCTCCCA as: CTTAAACTCCGCACAGCTGG	157	55	40
NES	s: ACCTCAAGATGTCCCTCAGC as: TCA GGACTGGGAGCAAAGAT	176	55	40
OPN	s: ACCCTTCCAAGTAAGTCCAA as: GTGATGTCCTCGTCTGTAGC	353	52	40
SOX 2	s: CCCCTGTGGTTACCTCTTCC as: CCTCCCATTTCCCTCGTTTT	261	55	40

Tab. 16: Primer für die qPCR (Real-Time), AT = Annealing-Temperatur

Primer	Sequenz 5'-3'	Produkt (bp)	AT(°C)
Haushaltsgen			
Rps27a	s: TCGTGGTGGTGCTAAGAAAA as: TCTCGACGAAGGCGACTAAT	141	60
Phosphatstoffwechsel			
AP	s: GTACGAGCTGAACAGGAACAACG as: CTTGGCTTTTCCTTCATGGTG	151	58
ANKH	s: TTCACAGTCACCTGGAATGC as: CAGGGATGATGTCGTGAATG	126	58
ENPP1	s: TTGGCTATGGACCTGGATTC as: TAGGAGCCGGTGTCAAATTC	105	60 (76 °C Schmelzschrift)

Adipogene Differenzierung

FABP4	s: TACTGGGCCAGGAATTTGAC as: GACACCCCATCTAAGGTTATG	77	60
LPL	s: CCGGTTTATCAACTGGATGG as: TGGTCAGACTTCCTGCAATG	110	58
PPARG2	s: CCAGAAAGCGATTCTTCAC as: ACGGAGCTGATCCCAAAG	110	57

Osteogene Differenzierung

OC	s: TGACCACATCGGCTTTCAG as: AAGGGGAAGAGGAAAGAAGG	126	60
OPN	s: TATGATGGCCGAGGTGATAG as: CATTCAACTCCTCGCTTCC	133	60
RUNX2	s: CTTCAAAATCCTCCCAAG as: ATGCGCCCTAAATCACTGAG	147	58

Sonstige

CTNAP2	s: ACCATCTGCCAAGTTCATCC as: GACTCTGGAGAGGCAACCAG	139	60
DMP1	s: AGCATCCTGCTCATGTTCTTT as: GAGCCAAATGACCCTTCCATT	106	60
GABBR2	s: GCTGCTGATCGACCTGTGTA as: GGTGTTCTCACAGTGCTCCA	141	60
NES	s: ACCTCAAGATGTCCCTCAGC as: TCAGGACTGGGAGCAAAGAT	176	60
P2X7A	s: GGCACCGGAGGAAAATTTGA as: TGAGGAAGTCGATGAACACA	96	60
WNT2	s: GTGGATGCAAAGGAAAGGAA as: AGCCAGCATGTCCTGAGAGT	150	60
WNT7B	s: TACTACAACCAAGCCGAGGG as: TGCATCCGGTCCTCTAGAAC	173	60

2.1.10 Software und Online-Quellen

Tab. 17: Software und Online-Quellen

Software bzw. Online-Quelle	Unternehmen bzw. Web-Adresse
Adobe Photoshop CS4	Adobe Systems Software Ireland Ltd, Irland
Axio Vision Rel 4.6	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Endnote X7.1	Thomson Reuters, New York, USA
FlowJo, Version	Tree Star, Inc., Ashland, OR, USA
Fusion Capt Advance SL2 Xpress	PEQLAB Biotechnologie GmbH, München (jetzt VWR)
GraphPad Prism 7	GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA
ImageJ	U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, http://imagej.net
Microsoft® Office 2007	Microsoft Corporation, Redmond, WA, US
NCBI Blast	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/
NCBI Pubmed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed
Primer3web version 4.0.0	http://primer3.ut.ee/
Servier Medical Art elements	http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank
Simplicity 4.2	Berthold Detection Systems GmbH, Pforzheim
Software qPCR	qPCRsoft 3.1 und Opticon Monitor 3
UEye Mikroskop	IDS Imaging Development Systems GmbH, Obersulm

2.2 METHODEN

2.2.1 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

Zellkultur mit primären Zellen

Die Zellkulturtechniken wurden mit steriler Glas- und Plastik-Ausstattung sowie autoklavierten oder steril-filtrierte Lösungen an einer Sterilwerkbank durchgeführt. Die Zellkulturmedien sowie Zusätze und Lösungen wurden stets vor Gebrauch auf 37 °C vorgewärmt, um eine möglichst schonende Behandlung der Zellen zu gewährleisten. Die Zellen wurden bei 37 °C und humifizierter Atmosphäre von 5 % CO₂ in einem HeraCell 240i Inkubator kultiviert.

2.2.1.1 Aufarbeitung der BMSCs

Die humanen mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark (BMSCs) wurden aus Spongiosa und Knochenfragmenten von Hüftköpfen isoliert, die im Rahmen orthopädischer Operationen am König-Ludwig-Haus Würzburg entnommen worden waren. Die Aufarbeitung und Isolation der Stammzellen erfolgte unter S2-Bedingungen durch die technischen Assistenten des König-Ludwig-Hauses Würzburg nach etabliertem Protokoll (modifiziert nach Nöth et al, 2002).

Zum Auswaschen der Zellen aus der Spongiosa wurde zunächst DMEM Ham's F-12 vorgewärmt und ohne weitere Zusätze verwendet. Hierzu wurde die Spongiosa in sterile Zentrifugenröhrchen (50 ml) überführt und diese mit DMEM Ham's F-12 bis zur vollständigen Bedeckung des Gewebes aufgefüllt. Die Proben wurden per Hand geschüttelt und anschließend mit 250 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und frisches Medium hinzugegeben. Die Proben wurden erneut kräftig geschüttelt, um Zellen aus dem Knochengewebe herauszulösen, und der Überstand von den sedimentierten Gewebefragmenten in ein neues Röhrchen abgenommen und das Gewebe wiederum mit frischem Medium versetzt. Dieses Vorgehen wurde 2-3 Mal wiederholt bis das Gewebe letztendlich beinahe weiß erschien. Der gesamte

abgenommene Überstand wurde für 5 Minuten mit 250 x g zentrifugiert und anschließend abgenommen, sodass lediglich die rote Phase des Pellets übrig blieb. Dieses Pellet wurde in 20-30 ml MSC-Kulturmedium resuspendiert und die darin isolierten Zellen gezählt. Die Zellen wurden in einer Dichte von 1×10^9 in 25 ml Standard- MSC-Kulturmedium in eine 175-cm² Kulturflasche überführt. Nach 2-3 Tagen konnten die BMSCs von anfangs noch vorhandenen nicht adhärenen Zellen (z.B. Erythrozyten) aufgrund ihrer charakteristischen Plastikadhärenz durch Abnahme des Mediums und anschließendem Waschen mit steriler phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, phosphate buffered saline) nach und nach selektiert werden.

2.2.1.2 Aufarbeitung und Isolation der dentalen MSCs (DPSCs und PDLSCs)

Die dentalen Stammzellen wurden ausschließlich aus humanen extrahierten dritten Molaren aus dem Ober- und Unterkiefer isoliert (Kap. 2.1.5.1.2). Pro Patient konnten jeweils 2 bis 4 extrahierte Weisheitszähne für die Gewinnung der Zellen verwendet werden. Die Zähne wurden direkt nach der Extraktion in Standard- MSC-Kulturmedium überführt und zur weiteren Präparation zum Muskuloskelettalen Centrum Würzburg (MCW) transportiert. Die Aufarbeitung erfolgte innerhalb von 1-2 Stunden nach Extraktion nach einem hierfür etablierten Protokoll.

Vor der Präparation wurde die Lösung für den Verdau der Gewebeproben in einem Reaktionsgefäß angesetzt. Das Protokoll für die Verdauung wurde nach der Vorlage von Karbanova et al. modifiziert (Karbanova et al., 2011) und beinhaltete die Inkubation mit 0,4 mg/ml Kollagenase und 4 mg/ml Dispase. Der hier verwendete Reaktionsansatz für zwei Proben (Pulpa und PDL) mit insgesamt ca. 1500 µl war wie folgt zusammengesetzt:

842 µl steriles PBS

600 µl Dispase (Endkonzentration 4 mg/ml)

57,6 µl Kollagenase (Endkonzentration 0,4 mg/ml)

Die Präparation erfolgte an einer sterilen Werkbank unter Einsatz sterilen Instrumentariums sowie sterilen Lösungen und MSC-Kulturmedien.

2.2.1.2.1 Isolation von Stammzellen aus dem parodontalen Ligament (PDLSCs)

Zur Gewinnung von Stammzellen aus dem PDL wurden bei der Extraktion mitentfernte Gewebereste insbesondere des mittleren und teilweise apikalen Drittels der Wurzeloberfläche, mit steriler Pinzette und Skalpell entfernt, teilweise konnte das Desmodont regelrecht abgezogen werden. Gewebereste im zervikalen Drittel wurden hierfür nicht verwendet, um eine Vermischung mit Fibroblasten aus der Gingiva zu vermeiden (Otabe et al., 2012; Somerman et al., 1988). Die Gewebestücke des Zahnhalteapparats wurden ggf. nochmals zerkleinert und in die zuvor angesetzte Verdauung mit einer Endkonzentration 0,4 mg/ml Kollagenase und 4 mg/ml Dispase überführt und in einem Blockheizer bei 37 °C für eine Stunde inkubiert.

2.2.1.2.2 Isolation von Stammzellen aus der Pulpa (DPSCs)

Das Pulpacavum war in einigen Fällen bereits im Rahmen der Extraktion eröffnet worden und das Pulpagewebe teilweise freigelegt. Dies war insbesondere bei dritten Molaren des Unterkiefers aufgrund deren Lage im Kiefer und ihrer Wurzelanatomie der Fall. Im Falle eines intakten extrahierten Weisheitszahns wurde dieser mechanisch unter sterilen Bedingungen eröffnet. Hierfür wurden entweder sterile Zangen verwendet oder die Zähne in zuvor autoklavierter, steriler Aluminiumfolie eingepackt und mit Hilfe eines Hammers zertrümmert. Das Pulpagewebe wurde mit sterilen Pinzetten und Exkavatoren entnommen.

Das präparierte Pulpagewebe und die Gewebestücke des parodontalen Ligaments wurden getrennt in je 700 µl der zuvor angesetzten Verdauung für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und die Gewebeproben je nach Gewebemenge und -größe bis zur vollständigen Bedeckung in 5-7 ml MSC-Kulturmedium mit dem Zusatz von 2,5 µg/ml Amphotericin B in eine 25 cm²-Kulturflasche überführt. Die Proben wurden anschließend bei 37 °C und einer Atmosphäre von 5 % CO₂ inkubiert.

2.2.1.3 Kultivierung der MSCs

Alle Zellen wurden in Zellkulturflaschen aus Polystyrol mit Filterdeckel in einem Zell-Inkubator bei konstanten Standardbedingungen von 37 °C, einer Atmosphäre von 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Zusammensetzung des Standard-MSC-Kulturmediums ist Tabelle 8 zu entnehmen. Das Medium wurde nach Standardprotokoll regelmäßig im Abstand von 3 bis 4 Tagen gewechselt. Nach Erreichen einer ca. 90 %-igen Konfluenz wurden die Zellen in festgelegter Dichte, je nach vorgesehenem Versuchsansatz, ausgesät oder im Verhältnis 1:3 passagiert.

Hierfür wurden die Zellen mit sterilem PBS gewaschen, um Serumreste zu beseitigen, und anschließend die Zellhaftung durch kurze Inkubation bei 37 °C mit 2 ml einer vorgewärmten Trypsin-EDTA-Lösung (0,05 %) reduziert und die Zellen somit abgelöst. Durch Zugabe von serumhaltigem Medium wurde dieser Prozess unterbrochen und die Zellsuspension bei 1200 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands wurde das Zellpellet in frisch hinzugegebenem MSC-Kulturmedium resuspendiert, die Zellzahl bestimmt und die Zellen in der jeweils definierten Dichte ausgesät.

In sämtlichen Analysen (PCRs, CSPD-Assays, Färbungen) wurden stets Zellen der gleichen Passage miteinander verglichen: Die BMSCs aus Passage 1, die dentalen MSCs aufgrund der anderen Aufarbeitung aus Passage 2.

Die Kultivierung der ausgewachsenen dentalen Zellen erfolgte analog zu den BMSCs mit dem einzigen Unterschied in der Zugabe von Amphotericin B (2,5 µg/ml) bei jedem Wechsel des Mediums bis zum Aussäen der Zellen in Passage 2 für die Hauptanalysen, um Kontaminationen vorzubeugen. Nach der Bildung mehrerer einzelner Kolonien in den 25 cm²-Flaschen (Passage 0) erfolgte die Überführung der DPSCs bzw. PDLSCs in eine 75 cm²-Flasche (Passage 1). Der jeweilige Zeitpunkt wurde je nach Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen individuell gewählt. Bei Erreichen einer 90 %-igen Konfluenz in der 75 cm²-Flasche wurden die Zellen für die Differenzierung (Kap. 2.2.1.5) in 25 cm²-Flaschen und 12-Well Platten sowie für die immunzytochemische Färbung (Kap. 2.2.2.5.1) auf einer 6-Well Platte jeweils in definierter Dichte ausgesät.

2.2.1.4 Zellzahlbestimmung

Um vergleichbare Versuchsbedingungen zu gewährleisten, wurden die Zellen stets in einer definierten Dichte ausgesät. Hierzu musste zuvor die Zellzahl in einer Neubauer improved-Zählkammer ermittelt werden. Die Zellsuspension wurde durch kräftiges Pipettieren mit einer Glaspipette gut durchmischt und bei Bedarf durch ein 70 µm Zellsieb gefiltert, um die Zellen vor der Zählung zu vereinzeln. Für die Bestimmung der Zellzahl wurde eine 2-fache Verdünnung aus 50 µl Trypanblau-Lösung und 50 µl Zellsuspension angesetzt. Von dieser Lösung wurden nach guter Durchmischung 10 µl in die Zählkammer appliziert. Es wurden die lebenden Zellen (nicht blau gefärbt) in vier Quadranten einbezogen. Die Anzahl an Zellen pro Milliliter wurde ermittelt, indem die Zellzahl aus allen Quadranten summiert, der Mittelwert bestimmt und dieser mit dem Verdünnungsfaktor 2 und dem Kammerfaktor 10 000 multipliziert wurde.

2.2.1.5 Differenzierung

Die Differenzierung wurde bei allen drei Stammzellarten unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Als Startpunkt der Differenzierung wurde das Erreichen der Konfluenz festgelegt. Die Differenzierungsmedien wurden nach Protokoll vor Gebrauch angesetzt (Tab. 8). Für die Kontrollen wurde das Kontrollmedium für Differenzierungen ohne weitere Zusätze verwendet. Die Stimulation mit Levamisol (1 mM) wurde immer zeitgleich mit dem Start der Differenzierung begonnen und dieses bei jedem Mediumwechsel hinzugegeben. Auf den Zusatz von Amphotericin B zu den dentalen Stammzellproben wurde ab Passage 2 verzichtet.

Zur Differenzierung mit anschließender RNA- und Protein-Extraktion nach zwei Wochen wurden die **BMSCs** (Passage 1) in einer Dichte von 5×10^5 Zellen / 25 cm²-Kulturflasche mit 5 ml Medium in insgesamt 10 Flaschen nach dem folgenden Schema ausgesät:

2x Basale Proben

2x Kontrolle (K)

2x Kontrolle mit Levamisol (1mM) (K + Lev)

2x osteogene Differenzierung (oD)

2x osteogene Differenzierung mit Levamisol (1mM) (oD + Lev)

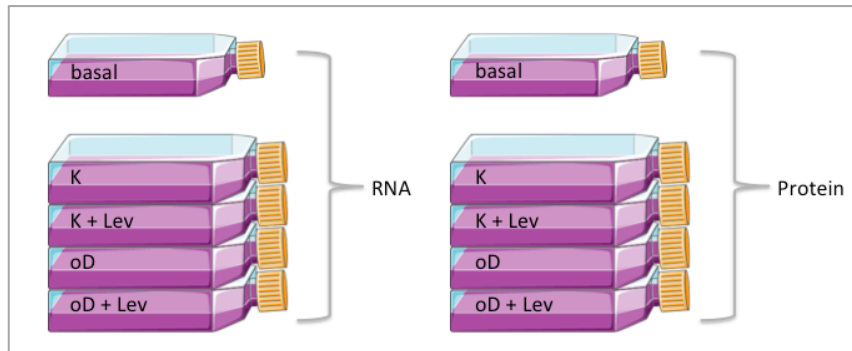


Abb. 6: Schematische Darstellung der Aufteilung der BMSC-Proben zur Differenzierung. Jeweils eine Flasche der Duplikate war für die RNA- bzw. für die Protein-Ernte nach zwei Wochen vorgesehen. Die Darstellung wurde mit Hilfe von Servier Medical Art Elements (<http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank>) erstellt. Servier Medical Art ist von Creative Commons 3.0 lizenziert (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

Die 5 BMSC-Proben (a-e) wurden in dieser Arbeit lediglich osteogen differenziert. Die adipogene Differenzierung von BMSCs stellte eine gut etablierte Methode dar und erfolgte im Rahmen eigener Vorversuche (Ergebnisse Kap. 3.7.1), sodass die adipogene Differenzierung der ausgewählten 5 BMSC-Proben nicht zusätzlich durchgeführt wurde.

Differenzierung der DPSCs und PDLSCs: adipogene und osteogene Differenzierung

Die dentalen Stammzellen sollten neben der osteogenen Differenzierung zusätzlich hingehend ihrem adipogenem Differenzierungspotenzial untersucht werden, um hierdurch das Kriterium der Multipotenz *in vitro* zu bestätigen.

Zellen aus der Pulpa und dem PDL wurden in einer Dichte von jeweils 5000 Zellen/ cm² bzw. 1,2x 10⁵ Zellen/ 25 cm²-Flasche ausgesät. Für die RNA- und Protein-Ernte der differenzierten Proben wurde aufgrund der zusätzlichen adipogenen Differenzierung für die insgesamt zwölf 25 cm²-Flaschen jeder Probe folgendes Schema verwendet:

- 2x Basale Proben (Standard MSC-Kulturmedium)
- 2x Kontrolle (K)
- 2x Kontrolle mit Levamisol (1mM) (K + Lev)
- 2x osteogene Differenzierung (oD)
- 2x osteogene Differenzierung mit Levamisol (1mM) (oD + Lev)
- 2x adipogene Differenzierung (aD)**

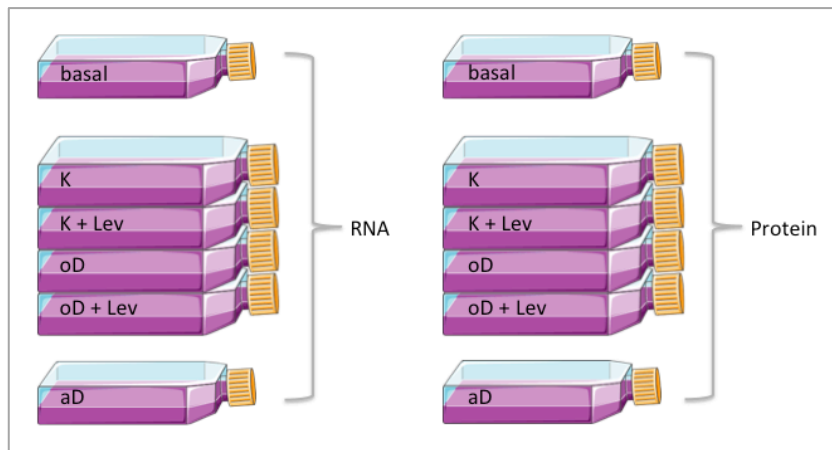


Abb. 7: Schematische Darstellung der Aussaat der DPSC- bzw. PDLSC-Proben zur Differenzierung (Passage 2). Die RNA- bzw. Protein-Ernte erfolgte nach zwei Wochen, hierfür war jeweils eine Flasche der Duplikate vorgesehen. Die Darstellung wurde mit Servier Medical Art Elements erstellt (<http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank>) (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

Die RNA- und Protein-Ernte (Kap. 2.2.2.1.1 bzw. 2.2.2.4.1) der differenzierten Proben und deren Kontrollen erfolgte stets nach zwei Wochen, die basalen Proben wurden in Standard-MSC-Kulturmedium kultiviert und bereits wenige Tage nach dem Aussäen geerntet. Bis zur weiteren Analyse wurden die Proben bei $-4\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

Zur spezifischen Färbung der Differenzierung (Ölrot-O-/Alizarinrot-Färbung) wurden die Zellen auf 12-Well Platten ausgesät.

2.2.1.5.1 Adipogene Differenzierung

Zur adipogenen Differenzierung wurden die dentalen Stammzellen in einer Dichte von 5000 Zellen / cm^2 bzw. mit $1,2 \times 10^5$ Zellen / 25 cm^2 -Flasche und mit $1,9 \times 10^4$ / Well auf einer 12-Well Platte im Triplikat zusammen mit einer Kontrollreihe ausgesät. Das adipogene Differenzierungsmedium wurde mit den in Tabelle 8 aufgeführten Zusätzen vor Gebrauch angesetzt und alle 3 bis 4 Tage gewechselt.

2.2.1.5.2 Osteogene Differenzierung und Stimulation mit Levamisol (1mM)

Das osteogene Differenzierungsmedium wurde mit den in Tabelle 8 aufgeführten Zusätzen vor Gebrauch frisch angesetzt und alle 3 bis 4 Tage gewechselt. Parallel wurden Zellen unter osteogenen Differenzierungsbedingungen zusätzlich mit dem TNAP-

Inhibitor Levamisol (1 mM) stimuliert. Um den Effekt des Levamisols beurteilen zu können, wurden zudem stets eine Kontrolle mit Kontroll-Differenzierungsmedium ohne Zusatz sowie eine Kontrollreihe mit Levamisol-Zusatz verwendet.

2.2.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

2.2.2.1 RNA-Isolierung und Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

2.2.2.1.1 Isolierung der RNA

Für die RNA-Analyse wurden die basalen Proben nach 4 bis 5 Tagen, die differenzierten Proben (mit und ohne Levamisol) zwei Wochen nach dem Start der Differenzierung durch Abnahme des Mediums und anschließender Zugabe von 350 µl RA1 Puffer mit 1 % β-Mercaptoethanol (2-ME) unter Verwendung eines Zellschabers abgelöst. Alternativ wurde das Zellpellet direkt nach Zentrifugation in RA1 Puffer mit 1 % 2-ME aufgenommen. Diese Zellysate wurden bis zur RNA-Isolation bei -20 °C aufbewahrt. Die RNA-Extraktion erfolgte unter Verwendung des kommerziell erhältlichen Nucleo Spin® RNA II Kits (Macherey-Nagel GmbH und Co. KG, Düren) und wurde nach Herstellerprotokoll durchgeführt (http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/RNA%20and%20mRNA/UM_TotalRNA.pdf;08/09/17), abgesehen von folgenden Abweichungen: Nach Zugabe des RAW2- sowie RA3-Puffers (erster und zweiter Waschschrift) wurde die Zentrifugation jeweils auf 1 Minute anstelle von 30 Sekunden bei 11 000 x g verlängert. Im letzten Schritt der RNA-Eluierung wurde anstelle von 60 µl RNase-freien Wassers nur 40 µl verwendet, um die Konzentration der finalen RNA-Lösung zu erhöhen. Die isolierten RNA-Proben wurden aufgrund ihrer Instabilität stets auf Eis oder bei -20 °C gelagert. Die isolierten RNA-Proben wurden nach Bestimmung der Konzentration zur cDNA-Synthese und Genexpressionsanalyse mittels RT- und qPCR eingesetzt.

Die RNA-Konzentration jeder einzelnen Probe wurde mit dem BioPhotometer bestimmt. Zu Beginn der Messungen wurden 50 µl Tris-Puffer (10 mM) als Leerwert für RNA

eingesetzt. Die RNA-Proben wurden zur Messung nach guter Durchmischung in eine dafür vorgesehene UV-Küvette pipettiert. Hierfür wurde in den meisten Fällen das Verdünnungsverhältnis von 2 μl der jeweiligen RNA-Probe in 48 μl Tris-Puffer (10 mM) gewählt. Das Verhältnis wurde bei abnormen OD_{260} -Werten durch Erhöhung des RNA-Anteils oder weiterer Verdünnung für eine regelrechte RNA-Konzentrationsbestimmung angepasst. Die Reinheit der RNA wurde durch Bestimmung des $\text{OD}_{260/280}$ Wertes ermittelt. Als Richtwert für reine RNA gelten $\text{OD}_{260/280}$ Werte von 2.0.

2.2.2.1.2 cDNA-Synthese

Um die Genexpression der drei MSCs zu vergleichen, wurde die reine RNA zunächst im Rahmen der cDNA-Synthese in die komplementäre DNA umgeschrieben. Für die cDNA-Synthese wurde standardmäßig für jede Probe 1 μg der isolierten RNA in RNase-freiem H_2O bis zu einem Gesamtvolumen von 17 μl verdünnt und 1 μl der oligo-dT-Primer (Stammlösung 50 μM) zugegeben. Diese Proben wurden nach dem ersten Denaturierungs- und Hybridisierungsschritt bei 70 °C für 5 Minuten anschließend unmittelbar auf Eis gelagert. Nach diesem Schritt wurden zu jeder Probe 7 μl einer zuvor angesetzten Reaktionsmischung hinzugefügt, sodass das Gesamtvolumen 25 μl betrug. Reaktionsmischung pro Ansatz:

5 μl	5x-Reverse-Transkriptase 5x-Puffer
0,625 μl	dNTPs (0,2 mM je dNTP)
0,375 μl	RNase-freies H_2O
1 μl	Reverse-Transkriptase

Die Proben wurden für den Elongationsschritt bei 42 °C für eine Stunde und anschließend bei 94 °C für weitere 10 Minuten zur Hitzeinaktivierung der Reversen-Transkriptase inkubiert.

2.2.2.2 Semi-quantitative Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) und Agarose-Gelelektrophorese

2.2.2.2.1 Semi-quantitative PCR (RT-PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) dient dem Nachweis und der Amplifizierung spezifischer DNA-Sequenzen. Der Ablauf ist in die drei Phasen Denaturierung, Hybridisierung und Elongation unterteilt. Bei der Denaturierung werden die Doppelstrangbindungen der DNA bei hoher Temperatur aufgebrochen, sodass im folgenden Schritt der Primer-Hybridisierung sequenz-spezifische Primer an die komplementäre Sequenz binden können. Die Amplifikation der spezifischen Sequenz nach Anlagerung der Sense- und Antisense-Primer erfolgt mit Hilfe der hitzestabilen Taq-Polymerase im Elongationsschritt. Dieser Ablauf wird durch Änderungen der Temperatur bestimmt und die Reaktion durch Denaturierung des Enzyms beendet. Die PCR ist von verschiedenen Faktoren wie der $MgCl_2$ -Konzentration, der Annealing-Temperatur (AT) sowie der Anzahl der Zyklen abhängig und kann darüber gesteuert werden. Die Annealing-Temperatur sowie die Zyklenanzahl der jeweiligen Primer musste zuvor experimentell bestimmt werden und ist in Tabelle 15 angegeben.

Alle PCR-Reaktionen wurden zuvor als Mastermix angesetzt. Die jeweilige cDNA-Probe (1 μ l) wurde nach Verteilung des Mastermixes (49 μ l pro Ansatz) hinzugefügt. Um eine mögliche Kontamination erkennen zu können, wurde zusätzlich für jedes analysierte Gen eine Negativ-Kontrollprobe mit Zusatz von 1 μ l RNase-freiem H_2O anstelle der cDNA mitgeführt. Der übliche Ansatz pro Probe war wie folgt:

40,3 μ l	RNase-freies H_2O
5 μ l	10x-Puffer
0,5 μ l	dNTPs
0,5 μ l	Sense-Primer
0,5 μ l	Antisense-Primer
2 μ l	$MgCl_2$
0,2 μ l	Taq-DNA-Polymerase

Es wurden jeweils drei unabhängige Ansätze zur Verifizierung der Ergebnisse pipettiert. Die Hybridisierungstemperatur und Zyklenanzahl wurden im Vorfeld abhängig von den

verwendeten Primerkombinationen getestet und festgelegt (Tab. 15). Die RT-PCRs wurden in einem Thermocycler nach dem folgenden standardisierten Protokoll durchgeführt (AT = Annealing-Temperatur):

94 °C	3 min	
72 °C	2 min	
94 °C	30 sec	} 21- 40 x
AT	30 sec	
72 °C	1 min pro 1000 bp	
AT	1 min	
72 °C	2 min	
10 °C	10 min	

2.2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese visualisiert. Zur Herstellung des Agarose-Gels wurden 1,5 % Agarose in 0,5 % TBE-Puffer durch Erwärmung in einer Mikrowelle gelöst. Pro 10 ml Agaroselösung wurde 1 µl GelRed® hinzugefügt. Diese Lösung wurde in eine hierfür vorgesehene Gießkammer gefüllt und im noch flüssigen Zustand zwei Kämme zur Bildung von Gel-Taschen eingesetzt. Nachdem sich das Gel verfestigt hat, wurde es in eine Gelkammer mit darin enthaltenem 0,5 x TBE-Puffer platziert und die eingesetzten Kämme entfernt. Als Größenreferenz wurden 7 µl des 100 bp-Markers in der ersten Tasche platziert, anschließend erfolgte die Beladung der restlichen Taschen mit 10 µl jedes PCR-Produktes nach vorheriger Mischung mit ca. 3 µl des Ladepuffers (1:10). Zur Auftrennung der Proben wurde eine Spannung von 80-120 Volt angelegt. Die PCR-Produkte konnten nach der Auftrennung im Gel durch Interkalation des im Gel enthaltenen GelReds® unter UV-Lichtexposition des Fusion SL Silber Lourmat als Banden detektiert und mit der Software Fusion Capt Advance SL2 Xpress erfasst werden. Die densitometrische Auswertung der Genexpression wurde anschließend mit dem Programm ImageJ durchgeführt. Die Ergebnisse der semiquantitativen PCR bzw. die Bandenstärke jedes PCR-Produktes wurde zur Auswertung auf die Expression des Haushaltgens *EEF1α* bezogen. Bei dieser PCR-Methode handelt es sich um eine Endpunktanalyse, bei der die jeweilige Expression

am Ende der Amplifikationsphase beurteilt wird und nicht wie bei der qPCR permanent, im Verlauf der Amplifikation Messungen gemacht werden können.

2.2.2.3 Quantitative real-time PCR (qPCR)

Bei der qPCR wird das Expressionslevel permanent, während der gesamten Amplifikationsphase bestimmt und somit ist, durch Festlegen eines spezifischen Schwellenwerts, eine Analyse und Quantifizierung der Genexpression während der exponentiellen Phase möglich. Die Reinheit der Produkte kann zudem anhand der Schmelzkurve beurteilt werden. Die cDNA-Synthese der Proben wurde wie in Kap. 2.2.2.1.2 beschrieben durchgeführt und 1:10 mit RNase-freiem H₂O verdünnt. Für die qPCRs wurde ein Mastermix nach etabliertem Protokoll angesetzt.

Verwendeter qPCR-Ansatz pro Probe:

10 µl GoTaq qPCR Mix
0,5 µl sense Primer
0,5 µl antisense Primer
7 µl RNase-freies H₂O

Die qPCRs wurden mit einem Gesamtvolumen von 20 µl pro Probe pipettiert, bestehend aus 18 µl des Mastermix sowie 2 µl der 1:10 verdünnten cDNA. Zur Kontrolle bzw. Ausschluss einer Kontamination wurde zusätzlich zu jeder qPCR eine weitere Probe mit 2 µl RNase-freiem H₂O anstelle der cDNA pipettiert. Mit Ausnahme der qPCRs zur biologischen Validierung der RNA-Sequenzierung (Kap. 2.2.2.7) wurden sämtliche qPCRs der differenzierten Proben mit dem qPCR-Thermocycler von Biometra nach dem folgenden standardisierten Programm durchgeführt:

	1	95 °C	3 min
40x	2	95 °C	10 sec
	3	58 °C	10 sec
	4	72 °C	10 sec
	5	Schmelzkurve 60-95 °C	

II. Material und Methoden

Die Spezifität des Produkts wurde anhand der Schmelzkurve dargestellt. Des Weiteren konnte, wenn nötig, ein Schmelzschrift in das Protokoll integriert werden (ENPP1). Die verwendeten Primer für die qPCR sind in Tabelle 16 aufgeführt. Die qPCRs wurden jeweils in drei unabhängigen Ansätzen durchgeführt.

Zur Bestimmung der Effizienz der verwendeten Primer wurde folgende cDNA-Verdünnungsreihe verwendet: 1:2; 1:5; 1:10; 1:20; 1:30; 1:50; 1:100 sowie eine H₂O-Kontrolle. Folgender Mastermix mit Angabe pro Probe wurde angesetzt:

10 µl Kappa SYBR Green
0,5 µl Sense-Primer
0,5 µl Antisense-Primer
7 µl RNase-freies H₂O

Hieraus wurden 8 Proben, jeweils aus Mastermix und einer der verdünnten cDNAs aus der Verdünnungsreihe bestehend, pipettiert und dieser Ansatz anschließend auf drei Proben aufgeteilt. Die Effizienzbestimmung erfolgte mit Hilfe eines bereits etablierten Programms am qPCR-Thermocycler (Biometra). Die Effizienzwerte zeigen, wie effektiv eine qPCR funktioniert und wurden für die Auswertung der qPCR-Daten benötigt.

Die Auswertung der qPCRs erfolgte mit Hilfe des Microsoft Office Excel Programms auf zwei unterschiedliche Methoden ($2^{-\Delta\text{ct}}$ - und $\Delta\Delta\text{ct}$ -Methode, Kap. 3.5), anhand derer jeweils andere Aspekte dieser Analyse hervorgehoben und somit der Fokus auf unterschiedliche Aspekte der Fragestellung gelegt werden konnte. Die graphische Darstellung und statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism 7.

2.2.2.4 Proteinanalyse nach Bradford und CSPD-Assay

2.2.2.4.1 Proteinanalyse mit quantitativer Proteinbestimmung

Die Proteinernte aus den basalen Proben erfolgte 4 bis 5 Tage nach dem Aussäen, die Ernte der differenzierten Proben zwei Wochen nach Beginn der osteogenen Differenzierung (mit und ohne Zusatz von 1 mM Levamisol). Um Proteinlysate zu gewinnen, wurde das Medium entfernt und die Zellen mit sterilem PBS gewaschen. Nach Zugabe von 350 µl PBS mit Proteaseinhibitor (PI) (25:1) konnten die Zellen auf Eis mit Hilfe eines Zellschabers von der Plastikoberfläche abgekratzt und bis zur weiteren Aufarbeitung bzw. Analyse in einem Reaktionsgefäß bei -20 °C aufbewahrt werden.

Um die Zellen aufzubrechen, wurde die Zellsuspension unter permanenter Eiskühlung mit 10 Impulsen und 80 % Intensität sonifiziert und anschließend 10 Minuten bei 4 °C und 7500 x g zentrifugiert, um die ungelösten Zellkomponenten vom Überstand zu trennen. Die Proteinkonzentration des Überstandes wurde nach Herstellerangaben mit Hilfe der Roti-Quant® Universal-Lösung gemessen. Diese Methode wurde von Bradford 1976 eingeführt und basiert auf der Messung des Farbumschlags der braunen in eine blaue Lösung, was vom jeweiligen Proteingehalt der Probe abhängt (Bradford, 1976). Als Referenz für den Proteingehalt der Proben wurde eine Verdünnungsreihe (0,0; 0,8; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 µg) mit BSA verwendet. Alle Proben wurden als Duplikate mit je 4 µl pro Well auf eine farblose 96-Well Platte appliziert. Die Messung des kalorimetrischen Farbumschlags erfolgte bei 600 nm durch das GloMax®-Multi Detection System. Die Auswertungen wurden mit dem Programm Microsoft Office Excel 2007 durchgeführt.

2.2.2.4.2 CSPD-Assay zur AP-Aktivitätsmessung von Zelllysaten

Die Anwendung des CSPD®-Assays ermöglicht die Bestimmung der AP-Aktivität in Zelllysaten. Als Protokoll diente das etablierte Vorgehen, welches nach der Vorlage von Ermonval et al. angepasst worden war. Das CSPD®-Substrat in der verwendeten CSPD ready-to-use-Lösung kann durch die AP in ein metastabiles Phenolat-Anion umgewandelt werden, welches während seines Zerfalls Licht emittiert. Diese Lumineszenzsignale werden mit einem Luminometer erfasst. Um den Reaktionsprozess zu spezifizieren, wurde der TNAP-Inhibitor Levamisol in einer finalen Konzentration von

1 mM (bezogen auf 200 µl Endvolumen) verwendet. Die Werte wurden zu Beginn jedes Experiments auf einen Gesamtproteingehalt von 2 µg pro Well normiert und die Proben jeweils in Triplikaten gemessen. Durchschnittswerte wurden anschließend berechnet, von diesen wurde einer zur Vergleichbarkeit in der graphischen Darstellung als 100 % angesetzt und die restlichen Werte darauf bezogen.

2.2.2.4.3 CSPD-Assay der basalen Proben

Die Zelllysate wurden wie in Kapitel 2.2.2.4.1 vorbereitet und auf eine Proteinkonzentration von 2 µg pro Well in PBS mit PI (25 %) verdünnt. Diese Lösung wurde für jede Proteinlysateprobe zuvor als Mastermix (einen mit und ohne Levamisol-Zusatz von 1mM) angesetzt. Das gesamte Prozedere erfolgte stets auf Eis. Von jeder Mastermix-Probe wurden drei Wells mit je 100 µl pro Well auf eine 96-Well Platte (weißer Boden) appliziert. Hierzu wurden 100 µl des kommerziell erhältlichen CSPD-Reagenzes mit einer Multipipette® hinzugefügt, sodass das Endvolumen bei 200 µl pro Well lag. Die Platte wurde zur Durchmischung leicht geschüttelt und für 5 Minuten bei 37 °C und einer Atmosphäre von 5 % CO₂ inkubiert. Die Chemielumineszenzsignale wurden mit Hilfe des Orion II Microplate Luminometer für 1 Sekunde gemessen.

2.2.2.4.4 CSPD-Assay der osteogen differenzierten Proben

Die Aufarbeitung der Proteinlysate und Proteingehaltsbestimmung der differenzierten Proben erfolgte nach demselben Prozedere wie für die basalen Proben beschrieben. Für die Untersuchung der AP-Aktivität unter osteogener Differenzierung und dieser unter Levamisol-Stimulation wurden die Proteinproben (Kontrolle, Kontrolle mit Levamisol, osteogene Differenzierung und osteogene Differenzierung mit Levamisol) einer Stammzellart nach 2-wöchiger Behandlung zunächst getrennt verglichen.

In einem weiteren Ansatz wurde die AP-Aktivität nach zwei Wochen osteogener Differenzierung in den 5 BMSCs, DPSCs und PDLSCs untersucht und verglichen.

2.2.2.5 Färbungen

2.2.2.5.1 Immunzytochemische TNAP-Färbung

Für die immunzytochemische Färbung zur Darstellung der TNAP-Expression wurden die Zellen aller drei MSCs in abgedeckten 6-Well Platten mit eingelegten, sterilen Deckgläschen in einer Dichte von 1×10^5 Zellen pro Well ausgesät. Die Zugabe des TNAP-Inhibitors Levamisol (1 mM) erfolgte ungefähr 24 h nach dem Aussäen, die Zellen wurden einmalig bis zur Fixierung nach weiteren 48 h stimuliert.

Zur Fixierung der Zellen auf den Deckgläschen wurde das Medium abgenommen, mit PBS gewaschen und eiskalte Methanol-Aceton-Lösung (1:1) für 5 Minuten zugegeben und die Proben anschließend für 10 Minuten an der Luft getrocknet. Die Zellproben konnten bei -80°C bis zur Färbeprozedur gelagert werden. Zu Beginn wurden die Proben hierzu 3 x für 5 Minuten mit PBS gewaschen, alle Waschvorgänge zur Vorbereitung der Färbung wurden unter leichtem Schwenken durchgeführt. Hiernach wurden die Zellmembranen durch 20-minütige Inkubation mit 2 ml 0,05 % Tween 20 in PBS permeabilisiert und zwei weitere Waschschritte mit PBS für 5 Minuten abgeschlossen. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch eine 30-minütige Inkubation mit 3 %-igem BSA (Albumin fraction V) in PBS blockiert. Der jeweilige Primärantikörper wurde in einer 1 %-igen BSA in PBS-Lösung in der angegebenen Verdünnung hinzugegeben (Tab. 12). Je 1 ml dieser Lösung wurde zur Inkubation über Nacht bei 4°C auf die Proben aufgetragen. Am folgenden Tag wurden die Proben erneut 3 x für 5 Minuten mit 2 ml PBS unter leichtem Schwenken gewaschen, bevor der Zweitantikörper (donkey anti-mouse NL557, 1:400), welcher mit einem roten Fluoreszenzfarbstoff konjugiert ist, hinzugegeben wurde. Dieser spezifische Zweitantikörper wurde im Verhältnis von 1:400 in einer 1 %-igen BSA in PBS-Lösung verdünnt und mit je 1 ml pro Well bzw. Probe verteilt. Die Proben wurden mit dem Zweitantikörper für 1,5 Stunden abgedunkelt inkubiert. Die folgenden drei Waschschritte mit PBS für 5 Minuten wurden ebenfalls abgedunkelt durchgeführt. Nach dem letzten Waschschritt wurden die Deckglasplättchen in destilliertes H_2O getaucht und nach Abtropfen direkt auf einen mit einem Tropfen Vectashield Mounting Medium mit DAPI (H-1200) versehenen

Mikroskop-Objektträger übertragen und fixiert. Die Proben wurden unter dem Mikroskop Axioskop 2 der Firma Zeiss analysiert und verglichen.

2.2.2.5.2 Immunzytochemische Golgi-Färbung

Zur Analyse des Levamisol-Effektes wurde die Golgi-Färbung durchgeführt. Zusätzliche Proben aller drei MSCs wurden mit einer Dichte von 1×10^5 Zellen/ Well (6-Well Platte) mit eingelegtem Deckgläschen ausgesät. Es wurde jeweils eine Probe mit einmaliger Levamisol-Stimulation für 48 h sowie die Kontrolle untersucht. Der verwendete Antikörper ist in Tabelle 12 aufgeführt. Die immunzytochemische Färbung wurde analog dem zuvor beschriebenen Protokoll durchgeführt.

2.2.2.5.3 Phalloidin-Färbung

Die Phalloidin-Färbung wurde zur Darstellung des Zytoskeletts durch Färbung der Aktin-Filamente mit einem fluoreszierenden Phalloidin-Konjugat verwendet. Es wurden Kontrollproben sowie nach einmaliger Levamisol-Stimulation (1 mM) gefärbt, um einen möglichen Effekt des Levamisols auf das Zytoskelett darzustellen.

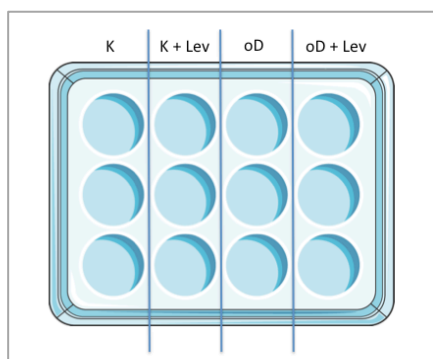
Für die Färbung wurde Phalloidin CF488A (Biotium) verwendet. Das lyophilisierte Phalloidin wurde nach Herstellerangaben in 1,5 ml doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O) gelöst, um eine Endkonzentration von 200 Units/ml zu erhalten. Diese Stammlösung wird stets lichtgeschützt bei -20 °C gelagert. Die Phalloidin-Färbelösung wurde durch Zugabe von 5 µl der Phalloidin-Stammlösung auf 200 µl 1 % BSA-PBS pro Probe angesetzt. Die Färbung wurde nach etabliertem Protokoll durchgeführt:

Die Zellen wurden nach Abnahme des Mediums mit PBS gewaschen und durch 10-minütige Inkubation mit 4 %-igem PFA fixiert. Drei Waschschrte mit PBS für je 30 Sekunden erfolgten vor der 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur mit 0,5 % Triton X-100 in PBS, das durch Zugabe von 100 µl Triton X-100 zu 20 ml PBS vorbereitet worden war. Hiernach wurde dreimal mit PBS für je 30 Sekunden gewaschen. Die Zellen wurden mit 3 % entrahmtem Milchpulver in PBS für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, dieses war vor Gebrauch durch Lösung von 30 mg des Milchpulvers pro 1 ml PBS angesetzt worden. Ein weiterer Waschschrte mit PBS folgte vor der 20-minütigen

Inkubation mit der Phalloidin-Färbelösung, die abgedunkelt bei Raumtemperatur erfolgte. Abschließend wurde dreimal mit PBS für je 30 Sekunden gewaschen und die Deckgläschen auf einen Objektträger mit einem Tropfen Vectashield Mounting Medium mit DAPI (H-1200) übertragen. Die Färbung wurde abgedunkelt bei 4 °C gelagert und am Fluoreszenzmikroskop Axioskop 2 der Firma Zeiss analysiert.

2.2.2.5.4 Spezifische Färbungen zum Nachweis der Differenzierung

Für die Beurteilung der Differenzierungsfähigkeit mit Hilfe spezifischer Färbelösungen wurden die Zellen auf 12-Well Platten ausgesät. Die BMSCs-Proben (a-e) wurden in dieser Arbeit, aufgrund des initialen Fokus der Fragestellung auf die osteogene Differenzierung und der Tatsache, dass die adipogene Differenzierung der BMSCs im Labor bereits vielfach nachgewiesen worden war, nur osteogen differenziert. Der Nachweis des adipogenen Differenzierungspotenzials der BMSCs wurden daher nur im Rahmen eigener Vorversuche (Kap. 3.7.1) durchgeführt. Die BMSCs wurden zur osteogenen Differenzierung mit anschließender spezifischer Färbung mit $1,5 \times 10^5$ Zellen pro Well je als Triplikate nach dem folgenden Schema ausgesät:



- Kontrolle (K)
- Kontrolle mit Levamisol (K + Lev)
- osteogene Differenzierung (oD)
- osteogene Differenzierung mit Levamisol (oD + Lev)

Abb. 8: Schematische Darstellung der Aussaat der BMSCs zur Differenzierung für die Färbung. Es wurden jeweils Triplikate ausgesät: K = Kontrolle, K + Lev = Kontrolle mit Levamisol, oD = osteogene Differenzierung, oD + Lev = osteogene Differenzierung mit Levamisol.

Die DPSCs und PDLSCs wurden zur Methodenetablierung sowie für die Analyse bzw. den Nachweis ihrer Multipotenz sowohl osteogen als auch adipogen differenziert. Für die spezifische Färbung wurden die dentalen MSCs in einer Dichte von $1,9 \times 10^4$ Zellen pro Well jeweils als Triplikate auf 12-Well Platten wie folgt ausgesät:

Kontrolle (K)
Kontrolle mit Levamisol (K + Lev)
osteogene Differenzierung (oD)
osteogene Differenzierung mit Levamisol (oD + Lev)
+ adipogene Differenzierung (aD)

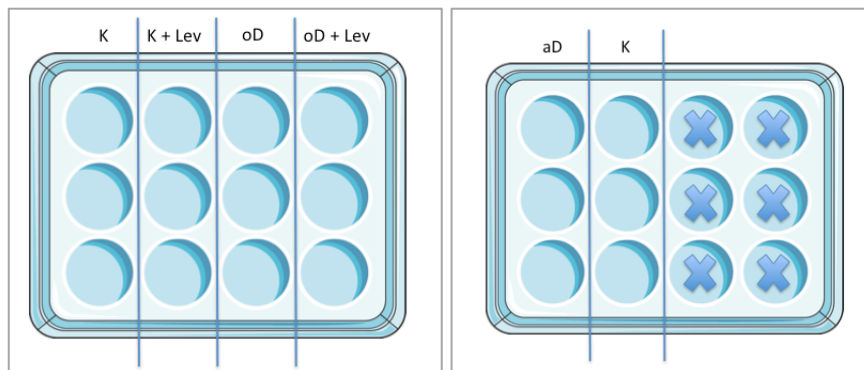


Abb. 9: Schematische Darstellung der Aussaat der DPSCs bzw. PDLSCs zur adipogenen und osteogenen Differenzierung und die Levamisol-Stimulation (1mM) für den anschließenden Differenzierungsnachweis durch spezifische Färbung. Es wurden jeweils Triplikate verwendet.

Die Zellen wurden bis zur Färbung nach 3 (adipogen) bzw. 4 (osteogen) Wochen mit dem jeweiligen Differenzierungsmedium (Tab. 8) versorgt und zum Teil, wie oben dargestellt, mit einem Zusatz von 1 mM Levamisol stimuliert.

2.2.2.5.4.1 Ölrot-O-Färbung mit anschließender Quantifizierung

Für den Nachweis der adipogenen Differenzierung wurde die Ölrot-O-Färbung zur spezifischen Färbung von Lipidtröpfchen verwendet. Hierfür wurde das Triplikat jeder Probe nach 3 Wochen Wachstum unter adipogenen Differenzierungsbedingungen, zusammen mit einer Kontrollreihe, welche mit Kontroll-Differenzierungsmedium behandelt worden war, nach Protokoll gefärbt. Das Medium wurde abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und mit einer 4 %-igen Paraformaldehyd-Lösung (PFA) für 10 Minuten fixiert. Hiernach wurden die Zellen mit ddH₂O gewaschen und für 5 Minuten mit 60 %-igem Isopropanol versetzt. Für die Färbung wurde stets frisch gefilterte Färbelösung verwendet und zur Einwirkung für 10 Minuten auf den Zellen belassen. Nach Abnahme der Färbelösung wurde erneut mit 60 %-igem Isopropanol gewaschen, wobei auf eine kurze Einwirkzeit geachtet wurde, und nach Abnahme dessen die Zellen nochmals mit ddH₂O gewaschen wurden. Angefärbte Lipidvesikel wurden bei 10-facher

Vergrößerung unter dem Mikroskop begutachtet. Die Quantifizierung der aufgenommenen Färbelösung durch die Lipidtröpfchen erfolgte nach Entfernung des Wassers mit komplett trockenen Well-Platten. Die Färbelösung wurde hierfür mit 300 µl 100 %-igem Isopropanol pro Well unter Eiskühlung, zur Verminderung der Verdunstung, sowie unter leichtem Schwenken für 10 Minuten herausgelöst. Diese Lösung wurde aus den Wells in jeweils ein Reaktionsröhrchen überführt und als Duplikat mit je 90 µl pro Well auf eine durchsichtige 96-Well Platte pipettiert. Die Auswertung erfolgte mit dem GloMax[®]-Multi Detection System bei einer Wellenlänge von 450 nm relativ zur jeweiligen Kontrolle.

2.2.2.5.4.2 Alizarinrot-Färbung

Die Alizarinrot-Färbung zur Darstellung und Quantifizierung der osteogenen Differenzierung wurde bei allen drei MSCs stets nach demselben Protokoll durchgeführt. Die Färbung erfolgte 25 bis 28 Tage (3,5 bis 4 Wochen) nach dem Start der osteogenen Differenzierung. Zuvor wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und durch Zugabe von eiskaltem Methanol (500 µl/ Well) für 5 Minuten fixiert. Nach kurzer Lufttrocknung wurden die fixierten Zellen mit ddH₂O gewaschen und für 2 Minuten mit der zuvor angesetzten Alizarinrot-Färbelösung (Tab. 11) inkubiert. Nach Abnahme der Färbelösung wurden die Wells dreimal mit ddH₂O gewaschen und im letzten Schritt an der Luft getrocknet. Die Färbung wurde unter dem Mikroskop bewertet.

2.2.2.6 FACS-Analyse

Eine FACS-Analyse kann zum Nachweis von typischen MSC-Oberflächenmarkern der isolierten Zellen aus Pulpa und PDL eingesetzt werden. Zudem konnte diese Analyse dazu verwendet werden, um diese Zellpopulationen mit den als Positivkontrolle eingesetzten BMSCs zu vergleichen. Die Antikörper der hierfür ausgewählten Oberflächenmarker sind in Tabelle 13 aufgeführt, in die Auswahl wurden entsprechend den Minimalkriterien für MSCs typische Oberflächenmarker sowie relevante Marker aus der Literatur einbezogen (Alge et al., 2010; Dominici et al., 2006; Karbanova et al., 2011).

Die Antikörper wurden nach Herstellerangaben verdünnt und nach etabliertem Protokoll eingesetzt. Zur Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurden repräsentative Proben aller drei MSC-Gruppen verwendet: Die Analyse erfolgte bei einer BMSC-Probe, um Richtwerte zu erhalten, da diese bereits als MSCs deklariert und als solche verwendet werden. Zur Bestätigung der Isolation von (Stamm-) Zellen aus dem dentalen Gewebe mit Expression der typischen MSC-Oberflächenmarker wurden zusätzlich vier Probenpaare aus Pulpa und entsprechendem PDL (n = 4, Proben 1-4 benannt) in der FACS-Analyse untersucht. Diese Zellen wurden bis zur Passage 2 kultiviert, da Zellen aus dieser Passage für sämtliche Methoden zuvor verwendet worden waren und somit die Vergleichbarkeit der FACS-Ergebnisse mit den 5 ausgewählten Probenpaaren (A-E) gegeben war. Die Proben aus Pulpa und PDL wurden nach dem folgenden Prozedere vorbereitet: Nach erreichter Konfluenz in Passage 2 wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen, mit Trypsin abgelöst, zentrifugiert und die Zellzahl bestimmt. Pro FACS-Röhrchen wurde eine Zellzahl von $2-4 \times 10^5$ verwendet (nach Protokoll werden pro Röhrchen $0.1-0.5 \times 10^6$ Zellen benötigt). Die verdünnten Antikörper (AK) bzw. Antikörpermix sowie die Pufferlösung aus PBS mit 1 % FCS für die ungefärbte Kontrolle wurden zuvor angesetzt. Vor der AK-Färbung wurden die lebenden Zellen der Proben mit dem fixierbaren viability dye (FVD) gefärbt. Hierzu wurden die Zellen in Zentrifugenröhrchen überführt, für 5 Minuten bei $1200 \times g$ zentrifugiert, der Überstand abgenommen und zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden in der zuvor angesetzten FVD-Gebrauchslösung resuspendiert, gut durchmischt und für 30 Minuten bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ abgedunkelt inkubiert. Als letzter Vorbereitungsschritt für die Oberflächenmarkerfärbung wurden die Zellen mit 1 % FCS in PBS gewaschen. Für die AK-Färbung wurden die Zellen 5 Minuten bei $1200 \times g$ zentrifugiert, der Überstand abgenommen, im vorbereiteten AK-Mix (50 μl) resuspendiert und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 1 ml PBS mit 1 % FCS hinzugegeben, erneut zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen in 200 μl 2 %-igem PFA resuspendiert. Zur Fixierung wurden die Zellproben für 15 Minuten auf Eis inkubiert und ein weiteres Mal 1 ml PBS mit 1 % FCS hinzugegeben, zentrifugiert und nach Abnahme des Überstandes die Zellen in 200 μl PBS mit 1 % FCS resuspendiert. Die vorbereiteten

FACS-Proben wurden bis zur Analyse abgedunkelt bei 4 °C aufbewahrt. Die FACS-Analyse wurde am Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg von Frau Dr. Marietta Herrmann (IZKF Nachwuchsforschergruppe, Lehrstuhl für Orthopädie) mit dem LSR II Durchflusszytometer der Firma BD Bioscience durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der Software FlowJo ebenfalls durch Frau Dr. Herrmann.

2.2.2.7 RNA-Sequenzierung (RNA-Seq)

Die RNA-Sequenzierung (RNA-Seq) ist auch als Next-Generation-RNA-Sequenzierung bekannt. Sie stellt eine moderne, hochsensitive Methode zur hypothesefreien Expressionsanalyse dar und ermöglicht die Analyse ganzer Transkriptome sowie die Identifizierung und Quantifizierung einzelner Transkripte (Wang, Gerstein, et al., 2009) (http://www.sysmed.uni-wuerzburg.de/wissenschaftliche_expertise/).

Für die RNA-Sequenzierung wurden von den ausgewählten 5 PDLSC-Proben (A-E), die bereits für sämtliche Analysen verwendet worden waren, jeweils die osteogen differenzierten RNA-Proben sowie diese mit zusätzlicher Levamisol-Stimulation ausgewählt (5 x oD, 5 x oD+Lev). Mit dieser Methode sollte der Einfluss des Levamisols auf die osteogene Differenzierung auf RNA-Ebene näher analysiert werden. Die Analyse von Änderungen in der Genexpression ist für das Verständnis der Zellreaktion auf interne und externe Stimuli sehr hilfreich. Die RNA-Seq sowie deren bioinformatische Auswertung wurden an der Core Unit Systemmedizin der Universität Würzburg unter der Leitung von Dr. Konrad Förstner durchgeführt. Hierfür wurde von jeder der 10 RNA-Proben 1 µg auf Eis übergeben und die RNA-Qualität am Bioanalyzer nach der in der Core Unit üblichen Methode bestätigt. Die anschließenden Analysen wurden von Dr. Richa Bharti durchgeführt. Die Auswahlkriterien für die Erstellung der Heatmap und die Verteilungsanalyse wurden mit einem log₂ fold change und einem p-value von $p < 0.05$ festgelegt. Nach bioinformatischer Auswertung der RNA-Seq wurden einzelne Gene zur weiteren Analyse und biologischen Validierung mittels qPCRs mit je drei unabhängigen Durchführungen ausgewählt. Diese qPCR-Validierungen wurden am Thermocycler Opticon durchgeführt.

2.2.2.8 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism 7. Die Gaus'sche Verteilung wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov Test überprüft und hiervon abhängig anschließend mit einem parametrischen bzw. einem nicht-parametrischen Testverfahren ausgewertet. Für den paarweisen Vergleich wurde entweder der t-Test (Normalverteilung) oder der two-tailed Mann-Whitney U Test (nicht normalverteilt) verwendet. Um mehrere Gruppen (mehr als 2) untereinander vergleichen zu können, wurde bei Normalverteilung der ANOVA Test mit Tukey Posthoc-Test verwendet, wenn diese nicht erfüllt war, wurde der Kruskal-Wallis Test mit Dunn's Posthoc-Test angewandt. Die Statistik wurde für die CSPD-Assays, die Ölrot-O-Quantifizierung und alle qPCRs berechnet. Statistisch signifikante Ergebnisse wurden unterhalb der Abbildung erwähnt. Die Signifikanzgrenze wurde bei einem p-value von $p < 0.05$ gesetzt.

3. ERGEBNISSE

In der vorliegenden Arbeit wurden die Aspekte der Fragestellung anhand derselben 5 BMSC-Proben zusammen mit den 5 dentalen MSC-Probenpaaren aus DPSC- und PDLSC-Proben untersucht. Die Vergleichbarkeit zwischen den DPSCs (A-E) und korrespondierenden PDLSCs (A-E) wurde durch die Isolation aus denselben 5 Donoren unter Berücksichtigung der alphabetischen Reihenfolge erreicht und die Spendervariabilität somit so gering wie möglich gehalten.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Isolation und Kultivierung dentaler MSCs aus der Pulpa und dem PDL etabliert und die so gewonnen Proben der DPSCs und PDLSCs auf basaler Ebene analysiert. Hierbei wurden Charakteristika der DPSCs und PDLSCs herausgearbeitet und bezüglich der basalen Genexpression und der AP-Aktivität in Referenz zu den basalen BMSCs verglichen.

Der zweite Teil sollte Aufschluss über die zentrale Fragestellung dieser Arbeit nach einer TNAP-abhängigen Genexpression der drei Stammzellarten geben. Das Differenzierungspotenzial wurde anhand derselben DPSC-, PDLSC- und BMSC-Proben charakterisiert. Parallel dazu wurde mit diesen Zellen durch Levamisol-Zusatz ein *in vitro* HPP-Modell umgesetzt, um den Einfluss einer *in vitro* TNAP-Inhibition auf die osteogene Differenzierung, die Genexpression und die AP-Aktivität zu analysieren.

Teil I: Isolation dentaler Stammzellen und basale Charakterisierung

3.1 Isolation und Kultivierung dentaler Stammzellen

Für die Charakterisierung der dentalen MSCs und die Analyse im *in vitro* HPP-Modell wurde zunächst die Isolation und Kultivierung dentaler Stammzellen aus zwei verschiedenen Geweben - der Pulpa (DPSCs) und dem PDL (PDLSCs) - etabliert. Diese Zellen standen anschließend für vergleichende Analysen untereinander sowie mit den BMSCs zur Verfügung. Um vergleichbare Bedingungen zu erhalten, wurde die Kultivierung an das bereits etablierte Zellkulturprotokoll für BMSCs angepasst und alle Zellen mit demselben Zellkulturmedium kultiviert. Lediglich die Aufbereitung der dentalen Gewebe, einschließlich des enzymatischen Verdauens sowie der Zusatz von Amphotericin B bis zum Beginn der Passage 2 sind hier zu nennen.

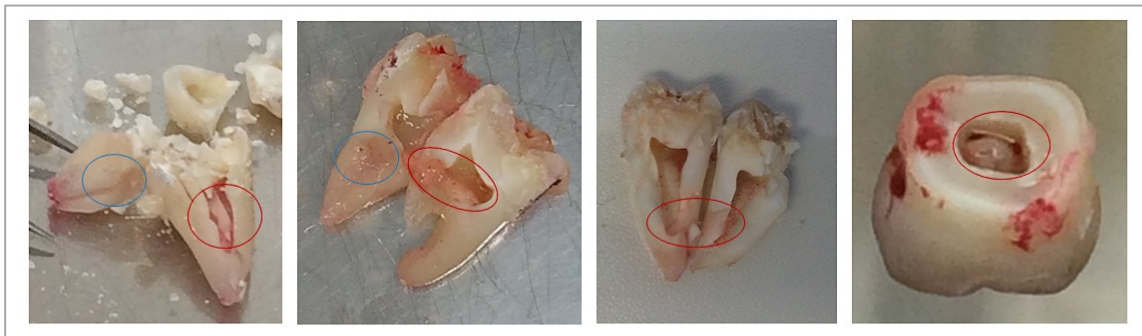


Abb. 10: Beispiele aus der Aufbereitungsprozedur zur Isolation der DPSCs und PDLSCs. Die Weisheitszähne wurden, wenn sie nicht bereits intraoperativ geteilt wurden, mechanisch eröffnet. Pulpagewebe (rot) und parodontales Gewebe (blau) wurde anschließend zur Isolation der Stammzellen herauspräpariert.

Primär stellte sich die Gewinnung einer ausreichenden Menge an Stammzellen aus den Pulpen und dem parodontalen Ligament, sowie deren sterile Kultivierung als Herausforderung dar: Wie erwähnt, wurden für die Etablierung der Isolation dieser Stammzellen im Labor des MCW Weisheitszähne von insgesamt 19 Donoren verwendet. Hierbei gelang es, aus allen Zähnen Zellen mit den typischen MSC-Charakteristika zu isolieren (Kapitel 3.2, 3.3.2 und 3.7), während sich die anschließende Kultivierung dieser aus Kontaminationsgründen initial als schwierig erwies. Es gelang aus diesem

Probenmaterial 5 vollständige Probenpaare (A-E) aus DPSCs und PDLSCs zusammenzustellen, und für sämtliche Versuche (Ausnahme FACS-Analyse) zu verwenden. Diese Zusammenstellung diente der besseren Vergleichbarkeit zwischen den DPSCs und PDLSCs, da hierdurch der große Einfluss der Spendervariabilität, wie er allgemein bei primären Zellen vorliegt, reduziert werden konnte. Die dentalen MSCs konnten paarweise direkt miteinander verglichen werden. Mit n=5 wurde eine übliche Anzahl für repräsentative Ergebnisse von Untersuchungen an primären Zellen erreicht.

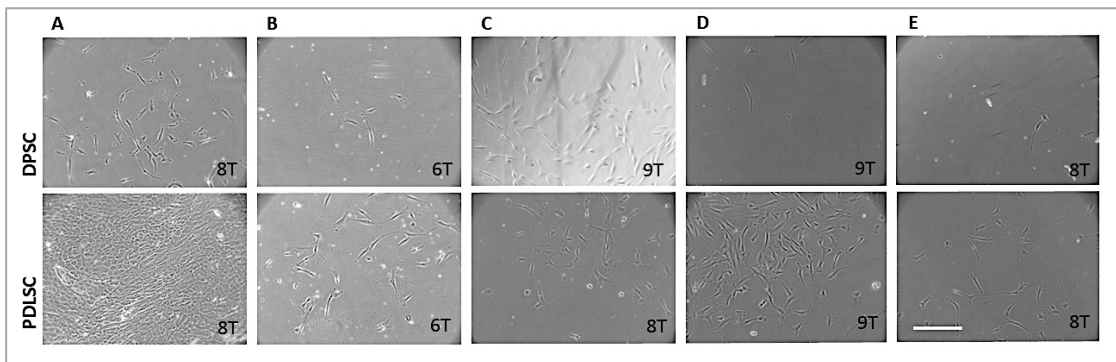


Abb. 11: Mikroskopische Aufnahmen zur Veranschaulichung der 5 Probenpaare (Donor A-E) aus DPSCs und PDLSCs, die für die Hauptanalysen dieser Arbeit verwendet wurden. Der Maßstab beträgt 250 μ m.

3.2 Morphologie und Proliferation der dentalen Stammzellen

Die isolierten dentalen Zellen schienen sich morphologisch nicht von den parallel kultivierten BMSCs zu unterscheiden. Alle kultivierten Zellen wiesen eine für MSCs typische fibroblastenartige, spindelförmige Morphologie, wie sie in der Literatur mehrfach beschrieben ist (Kemp et al., 2005), sowie die Plastik-Adhärenz und ein kolonieartiges Wachstum auf. Initial erschienen die adhärennten Zellen aus den dentalen Geweben kubisch bis rundlich mit weniger deutlichen Pseudopodien. Nach wenigen Tagen konnte eine spindelförmige bis sternartige Morphologie, wie sie für MSCs charakteristisch ist, beobachtet werden (Abb. 12). Nach der Passage wurde das Erscheinungsbild der Zellen stetig homogener.

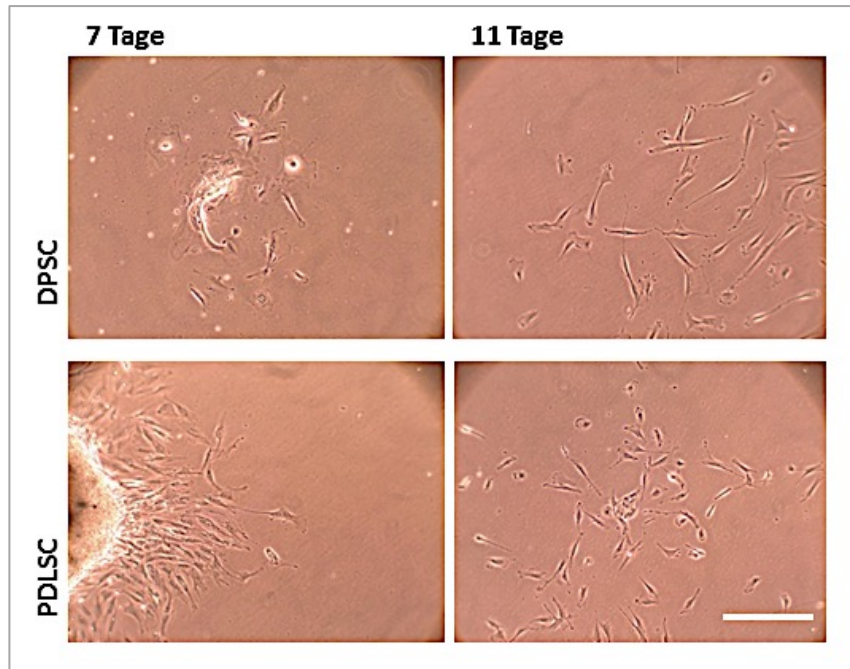


Abb. 12: Zellkultur-Beispiel einer DPSC-Probe und PDLSC-Probe nach 7 bzw. 11 Tagen. Beide wiesen eine für MSCs typische fibroblastenartige Morphologie und ein kolonieartiges Wachstum auf. Unten links ist das Auswachsen von Zellen aus einer PDL-Gewebeprobe sehr anschaulich. Der Maßstab beträgt 250 μm .

Ein sehr auffälliges und beständiges Merkmal der *in vitro* Kultivierung war die deutlich schnellere Proliferation der PDLSCs im Vergleich zu den entsprechenden DPSCs. Insbesondere innerhalb der ersten Tage in Passage 0 konnte ein schnelles, zu dichten Kolonien führendes Proliferationsverhalten der PDLSCs im Vergleich zu dem sehr vereinzelt und eher verstreuten Wachstum der DPSCs beobachtet werden (Abb. 13). Diese rasante Expansion der PDLSCs wurde ebenfalls von Trivanovic et al. beschrieben (Trivanovic, Jaukovic et al. 2015). In jedem der 5 verglichenen Probenpaare waren die PDLSCs einige Tage früher konfluent als die DPSCs und somit früher bereit für die Passage bzw. das Ausplattieren für die Versuchsdurchführung. Durchschnittlich konnte zwischen sämtlichen kultivierten DPSCs und PDLSCs eine Differenz von 5-6 Tagen bis zur Konfluenz beobachtet werden: Die DPSCs benötigten ab Passage 0 (verdauter Gewebestücke in Medium überführt) durchschnittlich 29 Tage, die PDLSCs nur 23 Tage bis zur Konfluenz in Passage 1.

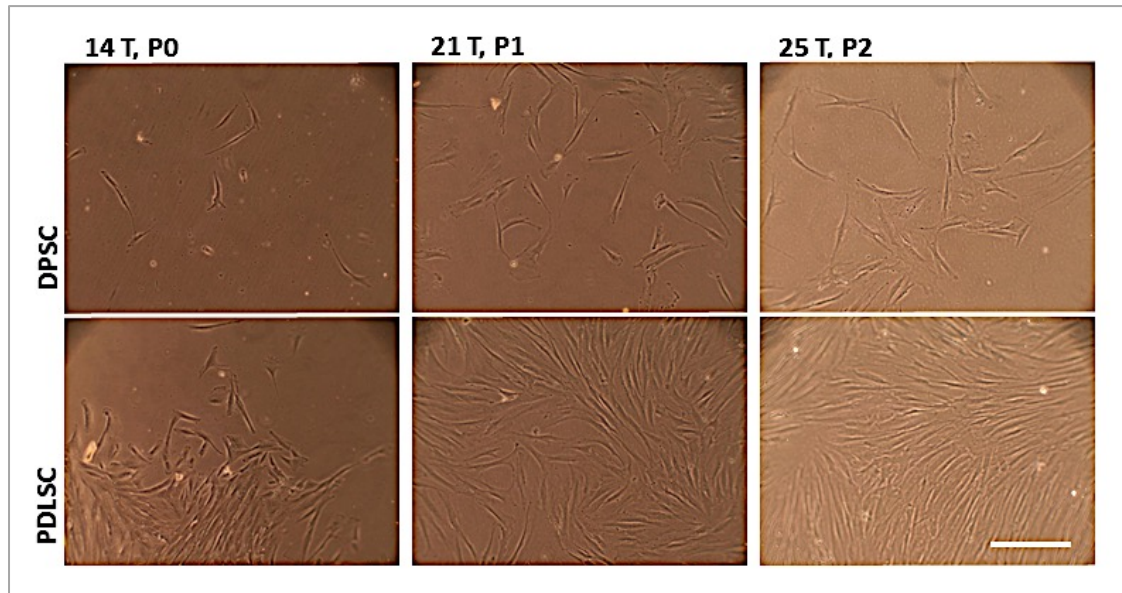


Abb. 13: Morphologie und Wachstumsverhalten der DPSCs und PDLSCs im Vergleich, dargestellt anhand eines repräsentativen Probenpaares. Die Aufnahmen wurden bei 10-facher Vergrößerung aufgenommen. Der Maßstabsbalken bemisst eine Distanz von 250 μm . T = Tage nach der Präparation, P = Passage.

3.3 Ergebnisse der basalen Charakterisierung

In dieser Arbeit wurden die MSCs zu unterschiedlichen Zeitpunkten bzw. unter unterschiedlichen Bedingungen verglichen. Im diesem ersten Teil der Analyse erfolgten zunächst basale Untersuchungen der Genexpression mittels RT-PCRs (Kap. 3.3.1) und der AP-Aktivität anhand des CSPD-Assays (Kap. 3.3.3). Diese wurden mit den ausgewählten Proben, bestehend aus den 5 BMSCs- und den 5 DPSCs- und 5 PDLSCs-Proben, durchgeführt. Die Zellen wurden für die basalen Analysen nach wenigen Tagen geerntet und RNA bzw. Protein für die Untersuchungen isoliert.

3.3.1 Basale Genexpressionsanalyse der BMSCs, DPSCs und PDLSCs

Die basale Genexpression wurde durch RT-PCRs analysiert. Die 15 Proben, wurden für jedes der analysierten Gene auf ein gemeinsames Gel aufgetragen und unter UV-Licht analysiert. Es wurden stets drei unabhängige Ansätze zur Verifizierung der Ergebnisse pipettiert. In Abbildung 14 und 15 sind die Ergebnisse der ersten Durchführung repräsentativ dargestellt, diese konnten größtenteils in den beiden weiteren Durchläufen bestätigt werden.

Die BMSCs, DPSCs und PDLSCs erfüllen die Minimalkriterien der typischen MSC-Oberflächenmarker-Expression.

Anhand der basalen RT-PCRs wurden zunächst die sogenannten Minimalkriterien für MSC-Oberflächenmarker untersucht (Dominici et al., 2006). Diese umfassen eine Reihe positiver und negativer Marker, welche in Kap. 1.2 der Einleitung beschrieben sind. Hiervon wurden CD73, CD90 und CD105 als typische positive MSC-Marker und CD34, ein Marker, der ausschließlich von hämatopoetischen Zellen nicht aber von den MSCs exprimiert wird (Ponnaiyan and Jegadeesan, 2014), für die RT-PCR ausgewählt.

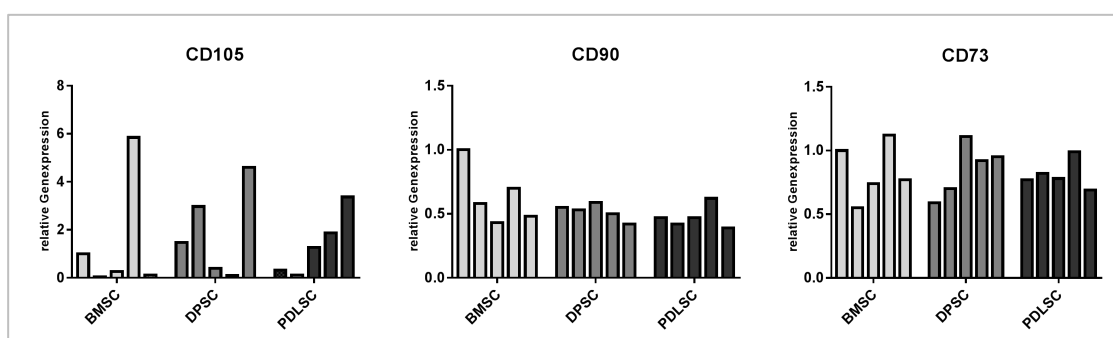


Abb. 14: Relative Genexpression der basalen MSC-Proben, Ergebnisse der RT-PCRs. Die MSCs sind mit ihren jeweiligen 5 Proben gruppiert dargestellt: BMSCs (Donor a-e), DPSCs (Donor A-E) und PDLSCs (Donor A-E). CD34 wurde den Kriterien entsprechend nicht nachgewiesen und ist daher nicht dargestellt. Zwischen den alphabetisch geordneten Proben der DPSCs und PDLSCs (A-E, hier nicht zusätzlich beschriftet) ist ein direkter Vergleich möglich.

In allen Proben (n=15) konnten die Marker CD73 und CD90 eindeutig nachgewiesen werden. CD105 zeigte eine sehr unterschiedliche, spendervariable Expression auf RNA-Ebene. Entsprechend den Kriterien waren zudem alle Proben vollständig negativ für die Expression von CD34 (nicht graphisch dargestellt).

Des Weiteren wurde die relative Genexpression von TNAP, OPN, SOX2 und NES verglichen.

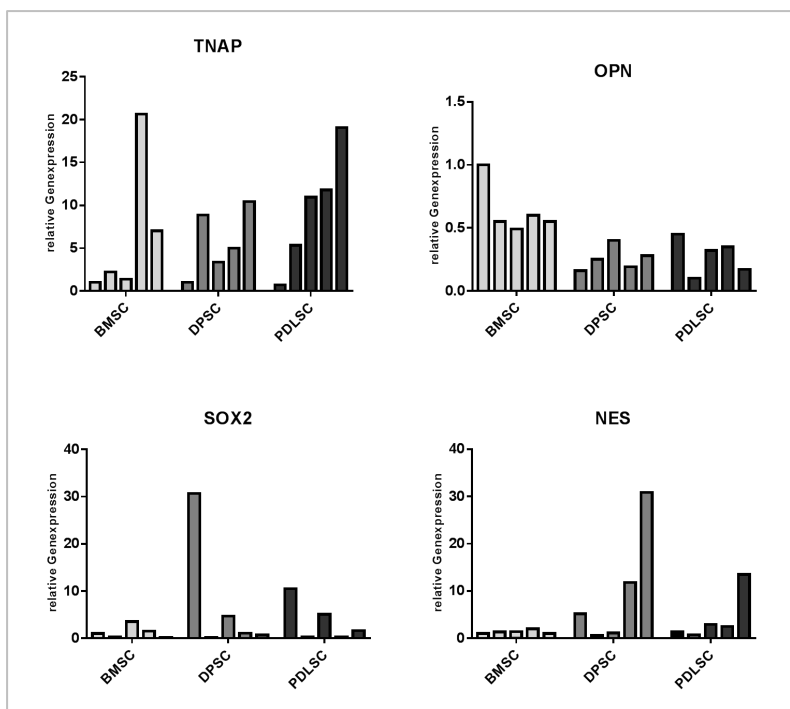


Abb. 15: Relative Genexpression von TNAP, OPN, SOX2 und NES in den basalen Proben. Die jeweiligen 5 Proben sind gruppiert dargestellt, BMSCs (Donor a-e), DPSCs (Donor A-E), PDLSCs (Donor A-E), hierdurch wird eine individuelle Donor-abhängige Genexpression deutlich. Zwischen den alphabetisch geordneten Proben der DPSCs und PDLSCs (A-E, hier nicht zusätzlich beschriftet) ist ein direkter Vergleich möglich: Beispielsweise ist die NES-Expression der 5. Probe (entspricht Probe E) in den DPSCs und PDLSCs am stärksten exprimiert. TNAP = tissue-nonspecific alkaline phosphatase, OPN = Osteopontin, SOX2 = sex determining region Y box 2, NES = Nestin.

Die TNAP zeigt auf basaler RNA-Ebene ein variables Expressionsmuster mit großer individueller Variabilität.

Es lag insgesamt eine sehr große Donor-Variabilität vor, sodass keine eindeutige Aussage getroffen werden konnte, welche der drei MSCs im Allgemeinen die höchste bzw. niedrigste TNAP-Expression zeigt. Die stärkste Expression insgesamt wurde bei einer der BMSC-Proben (d) ermittelt, jedoch wurde in den restlichen 4 BMSC-Proben eine deutlich schwächere Expression gemessen, die zudem meist geringer war als die der DPSC- und PDLSC-Proben. Des Weiteren konnte aufgrund der Vergleichsmöglichkeit zwischen den DPSCs und PDLSCs eine etwas stärkere Expression in drei der 5 PDLSC-Proben (C, D und E) als in den entsprechenden DPSC-Proben festgestellt werden. Die enorme Differenz zwischen den einzelnen Proben wurde hier ebenfalls deutlich: Der höchste Wert der DPSCs war 10-mal so hoch wie der niedrigste, bei den PDLSCs schwankte die Differenz um das 26-fache.

Osteopontin war in den BMSCs basal stärker exprimiert als in den DPSCs und PDLSCs.

Osteopontin (OPN) ist ein essentielles Protein für Mineralisierungsprozesse und Knochenumbauvorgänge. Es wurde erstmals in Osteoblasten entdeckt, ist aber auch in vielen weiteren Zellen wie Osteoklasten, Osteozyten, Chondrozyten, Odontoblasten, Makrophagen und glatten Muskelzellen vorhanden. Neben seiner Funktion in der Biomineralisierung wird OPN zudem eine wichtige Rolle in chronischen Entzündungsvorgängen zugeschrieben (Lund et al., 2009). OPN wurde in allen Proben nachgewiesen, die Expression war insgesamt in den BMSCs am stärksten.

Einzelne Proben der dentalen MSCs zeigten eine sehr deutliche SOX2-Expression.

SOX2 gilt neben Oct4 und Nanog als Pluripotenzgen und kodiert für einen Transkriptionsfaktor im Rahmen der Selbsterneuerung undifferenzierter embryonaler Stammzellen. SOX2 stellt einen wichtigen Kontrollfaktor für die Pluripotenz und neurale Differenzierung dar (Zhang and Cui, 2014). Die Probe A der DPSCs und PDLSCs zeigten die stärkste Expression innerhalb ihrer Gruppe, wobei die DPSC-Probe eine fast 3-fach höhere SOX2-Expression zeigte als die PDLSC-Probe. In den BMSCs war die Expression von SOX2 insgesamt sehr niedrig.

Der neurogene Marker Nestin (NES) wies basal eine differenzielle Genexpression in den BMSCs, DPSCs und PDLSCs auf.

Die Expression des neurogenen Markers Nestin (NES) war insbesondere in drei der 5 DPSC-Proben (A, D, E) sehr deutlich. Bei den PDLSC-Proben wurden relativ geringe Werte bestimmt. In den dentalen MSCs wies die Probe E die stärkste NES-Expression auf, und war in der DPSC-Probe im Vergleich zur entsprechenden PDLSC-Probe mehr als doppelt so stark exprimiert. In den BMSC-Proben wurde keine signifikante NES-Expression detektiert.

3.3.2 Immunophänotypische Charakterisierung

Nachweis der MSC-Marker auf dentalen Stammzellen durch die FACS-Analyse

Die FACS-Analyse wurde in erster Linie zum Nachweis verschiedener MSC-Oberflächenmarker herangezogen, um die Isolation dentaler MSCs zu bestätigen und somit vergleichbare Parameter zu schaffen.

Es konnte eine homogene positive Expression der typischen MSC-Marker (CD44, CD73, CD90, CD105) gemessen werden. Der Anteil an positiven Zellen ist für die einzelnen Marker jeweils separat und als Mittelwert der Proben in Tabelle 17 dargestellt. Alle Proben exprimierten die MSC definierenden Marker auf mindestens 95 % der Zellen. Die Mittelwerte lagen bei den DPSCs teilweise bei über 99 %.

Zusätzlich konnte durch die angewandte Gating-Strategie (Abb. 16) der prozentuale Anteil der 4-fach positiven Zellen (CD73+, CD44+, CD90+, CD105+) bestimmt werden: Dieser lag bei den DPSCs bei 97,5 %, bei den PDLSCs bei 98,58 %.

Die Expression der hämatopoetischen Oberflächenmarker (CD11b, CD14, CD19, CD31, CD34, CD45) lag bei allen Proben unter 2 %. Dieser Phänotyp erfüllte somit die Minimalkriterien der Oberflächenmarker für MSCs (nicht separat dargestellt). Diese Ergebnisse deckten sich mit dem Expressionsmuster der BMSCs, welche hierfür als Referenz verwendet wurden, sowie mit zahlreichen Angaben aus der Literatur (Dominici et al., 2006; Ponnaiyan and Jegadeesan, 2014).

Diese Untersuchung bestätigte somit die Isolation von Stammzellen aus der Pulpa (DPSCs) und dem parodontalen Ligament (PDLSCs, jeweils aus Passage 2) hinsichtlich des immunologischen Phänotyps, wie sie von der Internationalen Gesellschaft für Zelltherapie (International Society for Cellular Therapy, ISCT) definiert wurden (Dominici et al., 2006).

III. Ergebnisse

Tab. 18: Prozentuale Expressionswerte der Oberflächenmarker in 4 weiteren Probenpaaren (1-4), mit Mittelwerten (MW). Der Median von CD105 der 4-fach Positiven (+) konnte wegen unterschiedlichen verwendeten fluoreszenzmarkierten Farbstoffen nicht ausgewertet werden (-).

	CD44	CD90	CD105	CD73	CD73, CD44, CD90, CD105	Median CD44 in 4-fach +	Median CD90 in 4-fach +	Median CD105 in 4-fach +	Median CD73 in 4-fach +
DPSC 1	99,8%	99,7%	99,2%	99,0%	98,1%	4610	5038	2748	5390
DPSC 2	99,8%	99,9%	98,4%	95,4%	96,9%	5993	5479	2733	4844
DPSC 3	99,7%	98,6%	99,9%	99,4%	96,9%	1884	2262	9795	3176
DPSC 4	100%	99,0%	99,9%	100%	98,8%	12156	2957	20862	14086
MW DPSC	99,8 %	99,3%	99,4%	98,5%	97,68%	6160,8	3934,0	-	6874,0
PDLSC 1	99,6%	99,9%	94,5%	92,0%	94,9%	4547	4411	2092	3558
PDLSC 2	99,4%	99,8%	97,6%	96,4%	96,8%	5692	5881	2878	4855
PDLSC 3	99,8%	95,4%	99,8%	95,9%	92,3%	2433	1928	7748	2095
PDLSC 4	100%	99,9%	99,9%	100%	99,9%	8208	5664	27085	11881
MW PDLSC	99,7%	98,8%	98,0%	96,1%	96,0%	5220,0	4471,0	-	5597,3

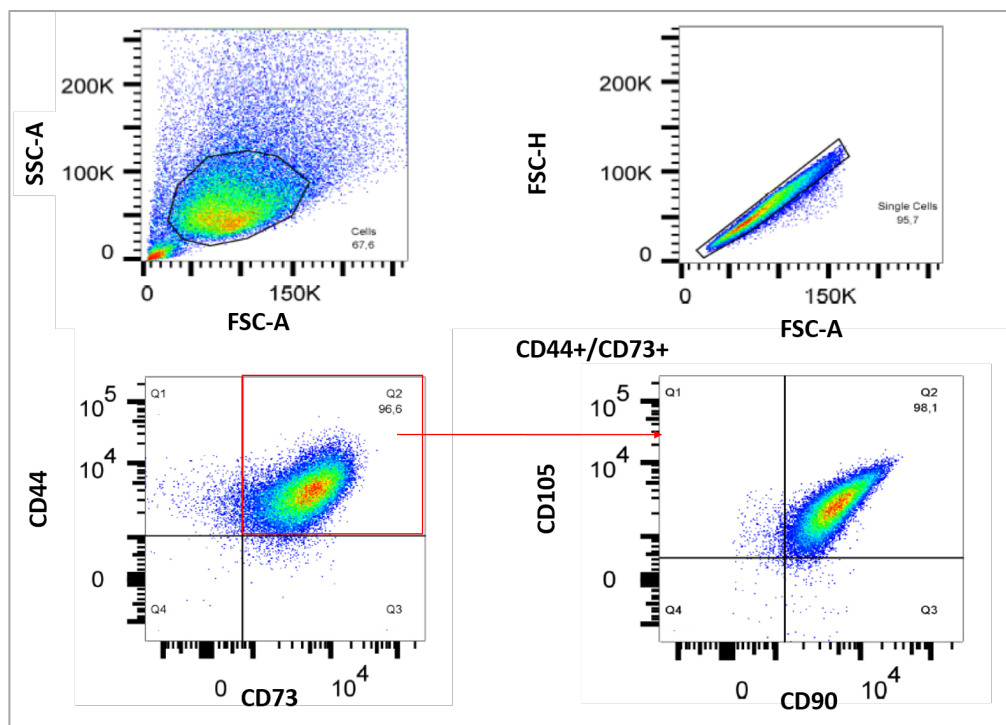


Abb. 16: Gating-Strategie der FACS-Analyse. Oben: Darstellung der Auswahl der zu messenden Zellen, unten links: CD44+ und CD73+ positive Zellen, unten rechts: 4-fach positive Expression von CD44/CD73/CD90/CD105.

III. Ergebnisse

Folgende weitere Aussagen konnten anhand der FACS-Analyse getroffen werden:

Der Perizytenmarker CD146 wurde in diesen 4 zusätzlich untersuchten Probenpaaren (1-4) auf den PDLSCs im Vergleich zu den entsprechenden DPSCs tendenziell stärker exprimiert.

In zwei der vier Probenpaare war zudem die CD146 Marker-Expression in etwa gleichem Verhältnis in den PDLSCs jeweils höher exprimiert (Tab. 19, Probe 1 und 2). Die positive CD146-Expression scheint ebenfalls mit einer Spendervariabilität verbunden zu sein.

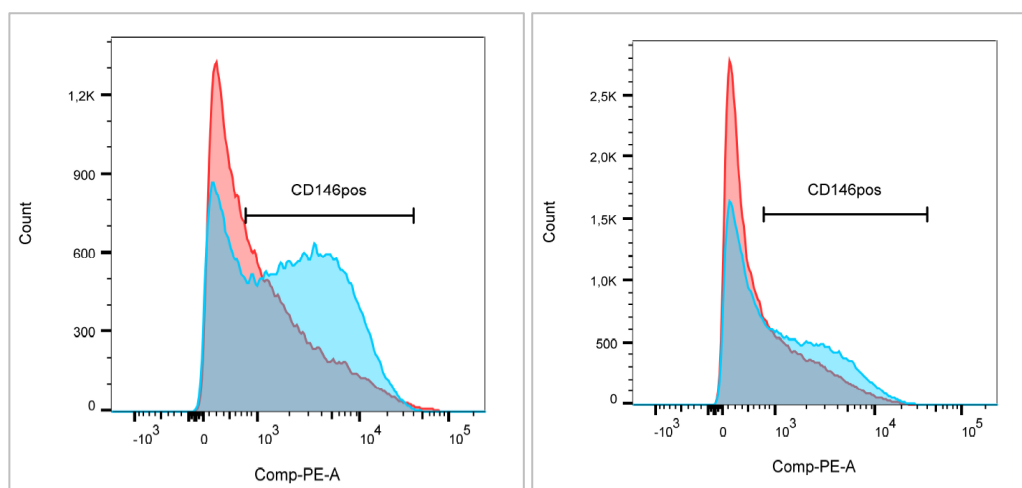


Abb. 17: Differentielle CD146-Expression: In den Probenpaaren 1 (links) und 2 (rechts) aus PDLSCs (blau) und der DPSCs (rot) besteht eine deutlich unterschiedliche Expression von CD146. Die Probenpaare 3 und 4 sind nicht dargestellt, sie zeigten diese Tendenz der stärkeren CD146-Expression auf der PDLSC-Probe im Vergleich zur entsprechenden DPSC-Probe nicht (3) bzw. nur sehr gering ausgeprägt (4).

Tab. 19: Anteil der CD146 positiven Zellen und mediane Expressionsstärke in DPSCs und PDLSCs (je 1-4)

	CD146	Median CD146
DPSC 1	67,7 %	1368
DPSC 2	50,5 %	1242
DPSC 3	99,2 %	4167
DPSC 4	95,6 %	2257
MW DPSCs	78,3 %	2258,5
PDLSC 1	80,4 %	2650
PDLSC 2	65,9 %	1667
PDLSC 3	98,0 %	3792
PDLSC 4	98,0 %	5664
MW PDLSCs	85,6 %	3443,25

3.3.3 Analyse der basalen AP-Aktivität

Anhand der jeweiligen 5 Proben der BMSCs, DPSCs und PDLSCs wurde die AP-Aktivität in drei unabhängigen Durchführungen des CSPD-Assays bestimmt und der Mittelwert für jede Stammzellart ermittelt. In den basalen Proben konnte insgesamt allerdings bei einem Einsatz von 2 µg Gesamtprotein nur eine sehr geringe AP-Aktivität festgestellt werden, welche in den BMSCs höher als in den DPSCs und PDLSCs war. Von jeder Probe wurde die AP-Aktivität der Kontrolle und der Probe mit Levamisol-Behandlung gemessen. Mit Ausnahme weniger Proben (DPSC A, PDLSC B) wurde eine reduzierte AP-Aktivität unter Levamisol-Zugabe beobachtet, wobei die teilweise hohen Standardabweichungen der Mittelwerte aus den drei unterschiedlichen Messdurchläufen mitbeachtet werden müssen. Zudem konnten individuelle Schwankungen innerhalb jeder Stammzellart beobachtet werden. Der Vergleich sowohl innerhalb einer Stammzellart also auch untereinander war in dieser Auswertung möglich.

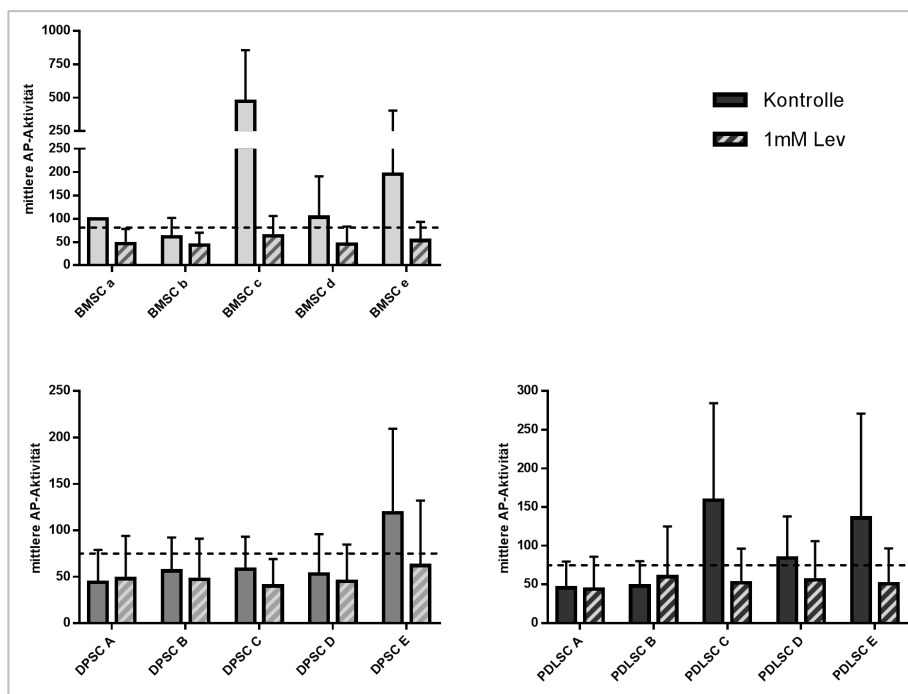


Abb. 18: Mittlere basale AP-Aktivität der BMSCs (a-e), DPSCs (A-E) und PDLSCs (A-E). Graphische Auswertung des CSPD-Assays aller basalen Proben separat. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Durchführungen der ausgewählten 5 Proben (oben BMSCs: a-e; unten links: DPSCs A-E; unten rechts: PDLSCs: A-E) jeweils als Kontrolle sowie nach Zugabe von 1 mM Levamisol zu den basalen Protein-Proben unmittelbar vor der CSPD-Messung. Die Linie markiert das Hintergrundsignal, hierdurch wird die sehr geringe, basal nachgewiesene Enzym-Aktivität deutlich. Insgesamt kann trotz der teilweise sehr hohen Fehlerbalken eine Reduktion der AP-Aktivität nach Levamisol-Zugabe beobachtet werden. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

Die basalen Ergebnisse des CSPD-Assays können den Ergebnissen derselben, im Anschluss differenzierten Proben im Rahmen des zweiten Teils der Arbeit (Kap. 3.6) gegenübergestellt werden.

3.3.4 Untersuchung der TNAP-Expression durch immunzytochemische Färbung

Die immunzytochemischen Färbungen sollten Aufschluss über den Anteil an Zellen mit einer positiven TNAP-Expression innerhalb der dentalen MSCs geben und diese in den Vergleich zur Expression in den BMSCs stellen.

Die TNAP ist ein Glykoprotein der Zelloberfläche, das über einen Glykosylphosphatidylinositol-Anker mit der Zellmembran verbunden ist, und agiert somit als Ektoenzym (Whyte et al., 2015). Die Proben mit positiver TNAP-Expression zeigten die für ein Ektoenzym erwartungsgemäße Lokalisation in der Zellmembran.

Geringer Anteil an TNAP-positiven Zellen in basalen Proben dentaler Stammzellen

Bezüglich der Präsenz der TNAP waren hierbei Unterschiede zwischen den dentalen MSCs und den BMSCs auffällig. Die DPSCs und PDLSCs wiesen eine deutlich geringere Anzahl an TNAP-positiven Signalen im Vergleich zu BMSCs auf (Abb. 19).

Donor-abhängige Variabilität in der TNAP-Expression

Innerhalb aller drei Stammzellarten war eine hohe Spendervariabilität bezüglich der TNAP-Expression vorhanden: Der Anteil an positiven und negativen TNAP-Zellen schwankte je nach Donor sehr stark. Es gab sowohl Proben mit sehr starken TNAP-positiven Signalen (v.a. in den Proben der BMSCs) sowie auch Proben mit nur geringem bis keinem positiven Signal (v.a. DPSCs und PDLSCs).

III. Ergebnisse

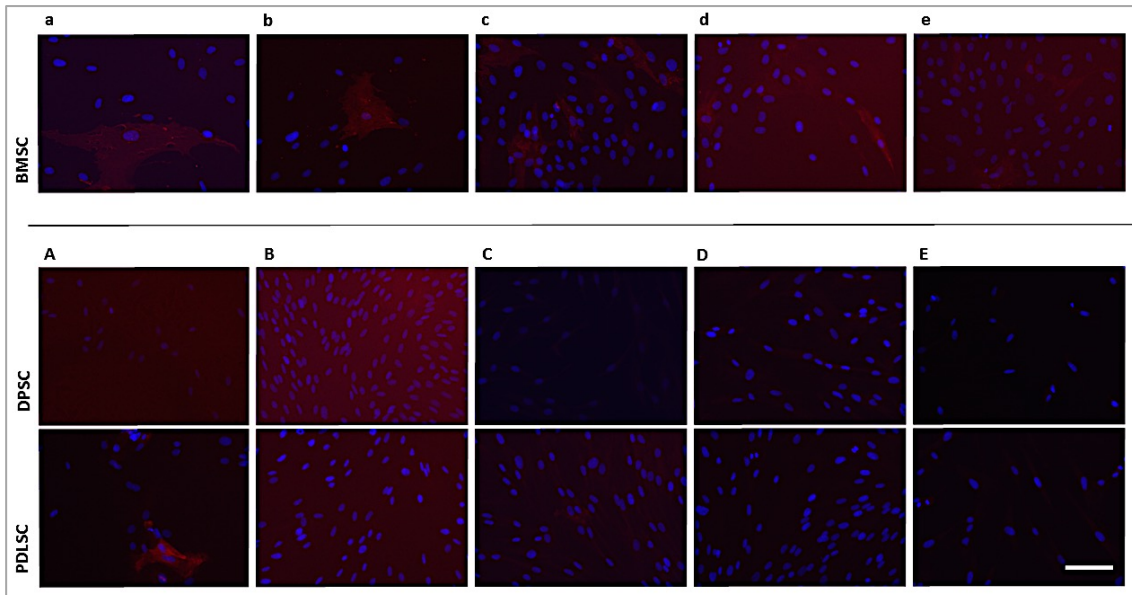


Abb. 19: Immunzytochemische Färbungen der basalen BMSCs (oben, a-e), DPSCs (Mitte, A-E) und PDLSCs (unten, A-E). Die repräsentativ ausgewählten Aufnahmen zeigen Unterschiede des TNAP-positiven Anteils (rot) zwischen den MSCs. Die BMSCs weisen einige deutliche positive Signale auf, in den PDLSCs konnte die TNAP nur vereinzelt nachgewiesen werden, in den 5 DPSC-Proben war kein TNAP-positives Signal erkennbar. Die Aufnahme erfolgte bei einer 20-fachen Vergrößerung. Der Maßstabsbalken zeigt eine Distanz von 100 μm . TNAP-Antikörper: TNAP (B4-78): sc-81754.

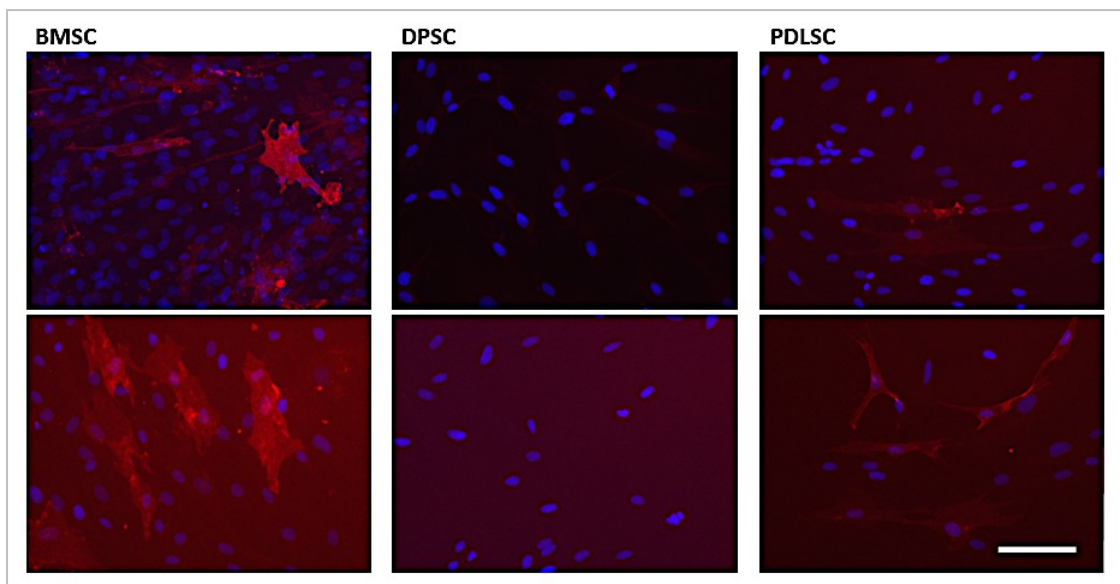


Abb. 20: Immunzytochemische Färbungen zusätzlicher basaler Proben. Es sind jeweils zwei weitere Proben von BMSCs, DPSCs und PDLSCs zur Veranschaulichung des unterschiedlichen Anteils an TNAP-positiven Zellen dargestellt. Die BMSCs weisen die stärkste TNAP-Präsenz auf, in den Proben der DPSCs konnte kein positives Signal nachgewiesen werden. Die PDLSCs zeigten vereinzelte TNAP-positive Signale. Dieser Nachweis wurde in 20-facher Vergrößerung aufgenommen. Der Maßstabsbalken beträgt 100 μm . TNAP-Antikörper: TNAP (B4-78): sc-81754.

Teil II: Vergleichende Analyse der Differenzierung und Untersuchung der TNAP-Inhibition während der osteogenen Differenzierung

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden dieselben MSC-Proben (BMSCs a-e, DPSCs und PDLSCs A-E) zunächst in Bezug auf ihre Differenzierungsfähigkeit untersucht. Das adipogene bzw. osteogene Differenzierungspotenzial ist eines der experimentell bestimmbaren Minimalkriterien für MSCs und wurde zum Multipotenznachweis *in vitro* herangezogen. Des Weiteren wurde insbesondere die osteogene Differenzierung (oD) der BMSCs, DPSCs und PDLSCs durch Zusatz des TNAP-Inhibitors Levamisol sowohl auf RNA-Ebene (qPCR) als auch in Bezug auf die AP-Aktivität (CSPD-Assay) analysiert. Dieser Untersuchungsansatz stellt ein Zellkultur-Modell der HPP dar, anhand dessen das Mineralisierungsdefizit dieses Krankheitsbildes nachvollzogen werden soll. Die Levamisol-Stimulation erfolgte in den Kontrollen und während der osteogenen Differenzierung.

3.4. Untersuchung der Auswirkung des Levamisols

Die Auswirkungen des Levamisols wurden vielseitig untersucht, sowohl in den basalen MSCs (Zellmorphologie, Immunzytochemie und Phalloidin-Färbung) als auch in den osteogen differenzierten Proben durch die qPCR-Analyse, AP-Aktivitätsbestimmung und Untersuchung des Mineralisierungspotenzials durch die Alizarinrot-Färbung.

3.4.1 Untersuchung des Levamisol-Effektes auf die Zellmorphologie

In allen Proben unter Levamisol-Stimulation unabhängig davon, ob die Substanz in Standardkulturmedium oder osteogenem Differenzierungsmedium verabreicht wurde, konnte eine auffällig veränderte, vergrößert erscheinende Zellkernregion beobachtet werden (Abb. 21). Diese Effekte wurden durch immunzytochemische Golgi-Färbung und die Phalloidin-Färbung des Zytoskeletts weiterverfolgt. Das Wachstumsverhalten der Zellen war unter Levamisol-Stimulation nicht erkennbar verändert.

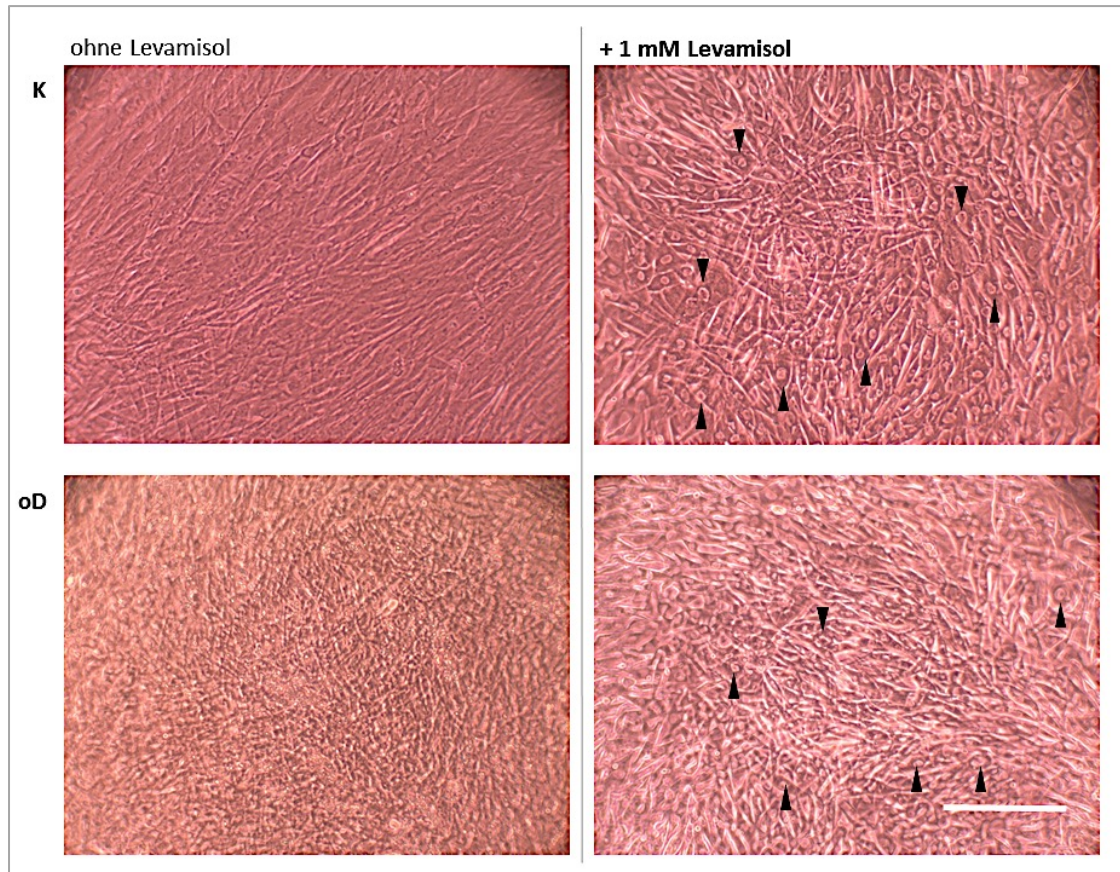


Abb. 21: Intrazelluläre morphologische Auffälligkeiten unter regelmäßiger Levamisol-Stimulation. Dargestellt sind repräsentative basale (K = Kontrolle, ohne und + 1 mM Lev) und osteogen differenzierte Proben (oD, ohne und + 1 mM Lev). Der Maßstabsbalken beträgt 250 μm .

3.4.2 Untersuchung der Auswirkung des Levamisols durch die immunzytochemische Golgi-Färbung

Wie zuvor beschrieben, wiesen die Zellen aller drei MSCs bei Levamisol-Behandlung sowohl in der Kontrollreihe als auch während der osteogenen Differenzierung eine scheinbar vergrößerte Nukleusregion auf (Abb. 21). Die immunzytochemische Golgi-Färbung wurde aufgrund der Vermutung, dass der mikroskopisch beobachtete, vergrößerte Bereich um den Zellkern durch Veränderungen des Golgi-Apparates zustande kommen könnte, zusätzlich bei jeweils drei weiteren Proben jeder MSC-Gruppe (BMSCs, DPSCs, PDLSCs, jeweils $n=3$) durchgeführt. In allen Färbungen konnte ein unterschiedliches Färbeverhalten zwischen der Kontrolle und der jeweiligen mit Levamisol behandelten Probe beobachtet werden: In den Kontrollfärbungen war die kappenartige Struktur des Golgi-Apparats deutlich erkennbar. Bei einmaliger Zugabe

von 1 mM Levamisol erschien die Färbung im Allgemeinen jedoch deutlich intensiver. Die parallel durchgeführte DAPI-Färbung der Zellkerne zeigte zudem, entgegen der Erwartungen, dass die Zellkerne an sich keine auffälligen Größenunterschiede nach Stimulation mit Levamisol aufwiesen.

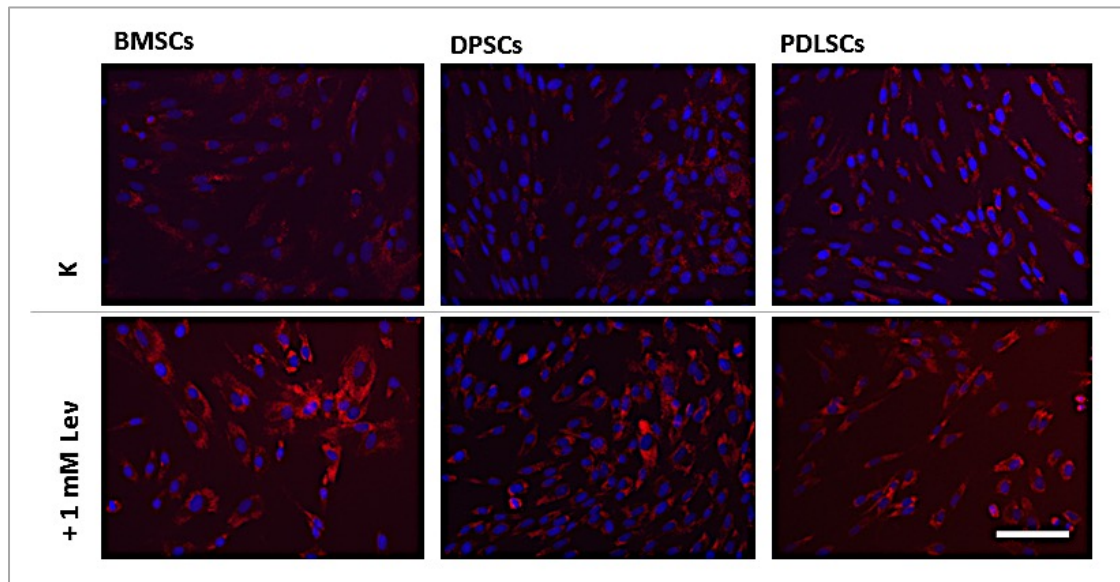


Abb. 22: Immunzytochemische Golgi-Färbungen zur weiteren Untersuchung des Levamisol-Effektes, dargestellt anhand je einer repräsentativen Probe (aus n=3) jeder Stammzellart. Diese Färbung sollte Aufschluss über die auffällige Morphologie der perinukleären Region unter Levamisol-Stimulation geben. Verwendet wurde der Golgi-Marker sc-58770 (1:100). Die gleichzeitige DAPI-Färbung der Kerne (blau) zeigte keine vergrößerten Zellkerne unter Levamisol. Die Aufnahme wurde bei einer 20-fachen Vergrößerung gemacht. Der Maßstabsbalken beträgt 100 μm .

3.4.3 Untersuchung des Levamisol-Effektes auf das Zytoskelett

Um Effekte auf die intrazelluläre Struktur der Zellen darzustellen, wurde eine Phalloidin-Färbung zur Färbung des Aktin-Zytoskeletts durchgeführt. Phalloidin ist als Pilzgift bekannt und bindet an filamentäres Aktin, woraus die Giftwirkung mit Inhibition der Aktin-Dynamik resultiert (<http://www.pnas.org/content/76/9/4498.full.pdf>).

In der Analyse der Färbungen unter dem Fluoreszenzmikroskop konnten keine signifikanten Veränderungen beobachtet werden, die auf Levamisol zurückzuführen waren. Der Zytoskelettaufbau bzw. die Anordnung der Filamente war durch die Behandlung nicht auffällig verändert. Die Filamente erschienen lediglich leicht verdichtet, was jedoch auch auf die Mikroskopierebene zurückgeführt werden könnte.

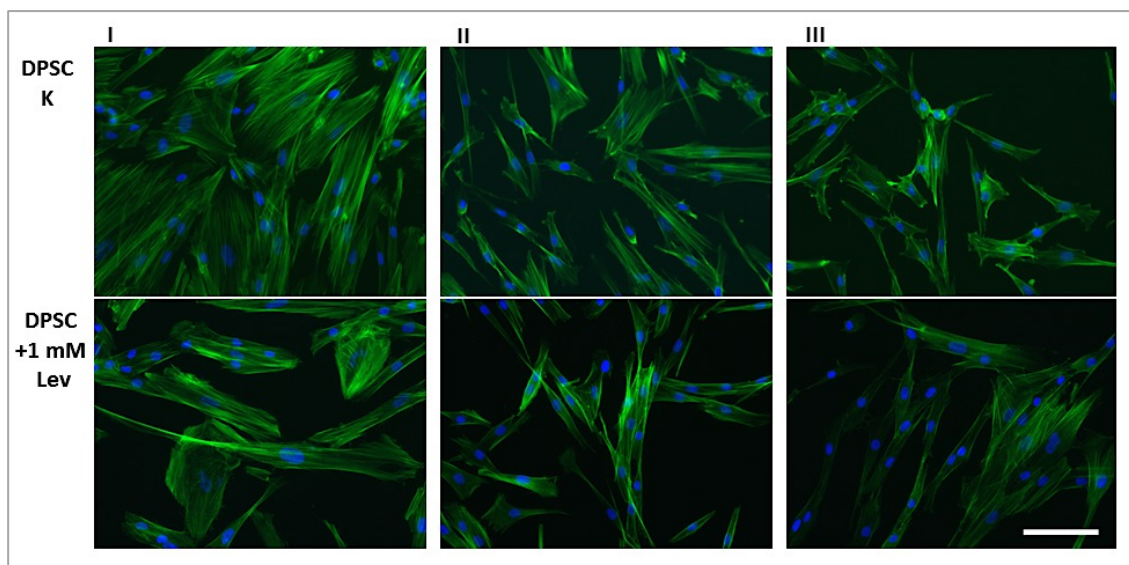


Abb. 23: Phalloidin-Färbung drei zusätzlicher DPSC-Proben (I-III) zur Untersuchung des Levamisol-Effektes auf das Zytoskelett. Es sind jeweils die Kontrollprobe (K) und die Probe mit einmaliger Levamisol-Stimulation (+ 1 mM Lev) nach 48 h im Vergleich dargestellt. Der Maßstabsbalken zeigt eine Distanz von 100 μm an, die Färbung wurde bei einer 20-fachen Vergrößerung aufgenommen.

Die Effekte des Levamisols auf die osteogene Differenzierung und das Mineralisierungspotenzial wurden im Folgenden auf RNA-Ebene durch qPCRs (Kap. 3.5) und mit der Alizarinrot-Färbung (Kap. 3.7.3) untersucht.

3.5 Genexpressionsanalyse der BMSCs, DPSCs und PDLSCs nach adipogener und osteogener Differenzierung (mit und ohne Levamisol)

Zur Analyse der Genexpression nach der Differenzierung und Levamisol-Behandlung wurden qPCRs durchgeführt. Die untersuchten Markergene sind in Tabelle 16 gelistet. Analysiert wurden sechs osteogene, drei adipogene Markergene sowie die Expression des bereits basal analysierten neurogenen Stammzellmarkers Nestin. Aufgrund der bereits angesprochenen, nicht zusätzlich durchgeführten adipogenen Differenzierung der 5 BMSC-Proben, ist eine Beurteilung der Genexpression unter adipogenen Differenzierungsbedingungen nur bei bzw. zwischen den DPSCs und PDLSCs möglich. Auch in den differenzierten Proben konnte eine differenzielle Genexpression zwischen den Stammzellarten auf RNA-Ebene gezeigt werden.

3.5.1 Vergleich der Genexpression aller Proben mit allen Behandlungen

Auswertung der qPCR-Ergebnisse mit der $2^{-\Delta ct}$ -Methode (Abb. 24)

Diese Auswertungsmethode bietet die Möglichkeit einer vielseitigen Analyse. Die drei Stammzellarten sind der jeweiligen Behandlung bzw. Differenzierung (K, K+Lev, oD, oD+Lev, aD) zugeordnet und können sowohl innerhalb ihrer Gruppe bezüglich der Effekte der jeweiligen Differenzierung oder Levamisol-Stimulation als auch untereinander verglichen werden. Die Standardfehler zeigen die Donor-abhängige Variabilität der 5 Proben, die jeweils zu einem Mittelwert zusammengefasst wurden. Die statistische Signifikanz wurde für jede Behandlung berechnet, sodass die Auswirkung der unterschiedlichen Behandlung zwischen den MSCs verglichen werden konnte.

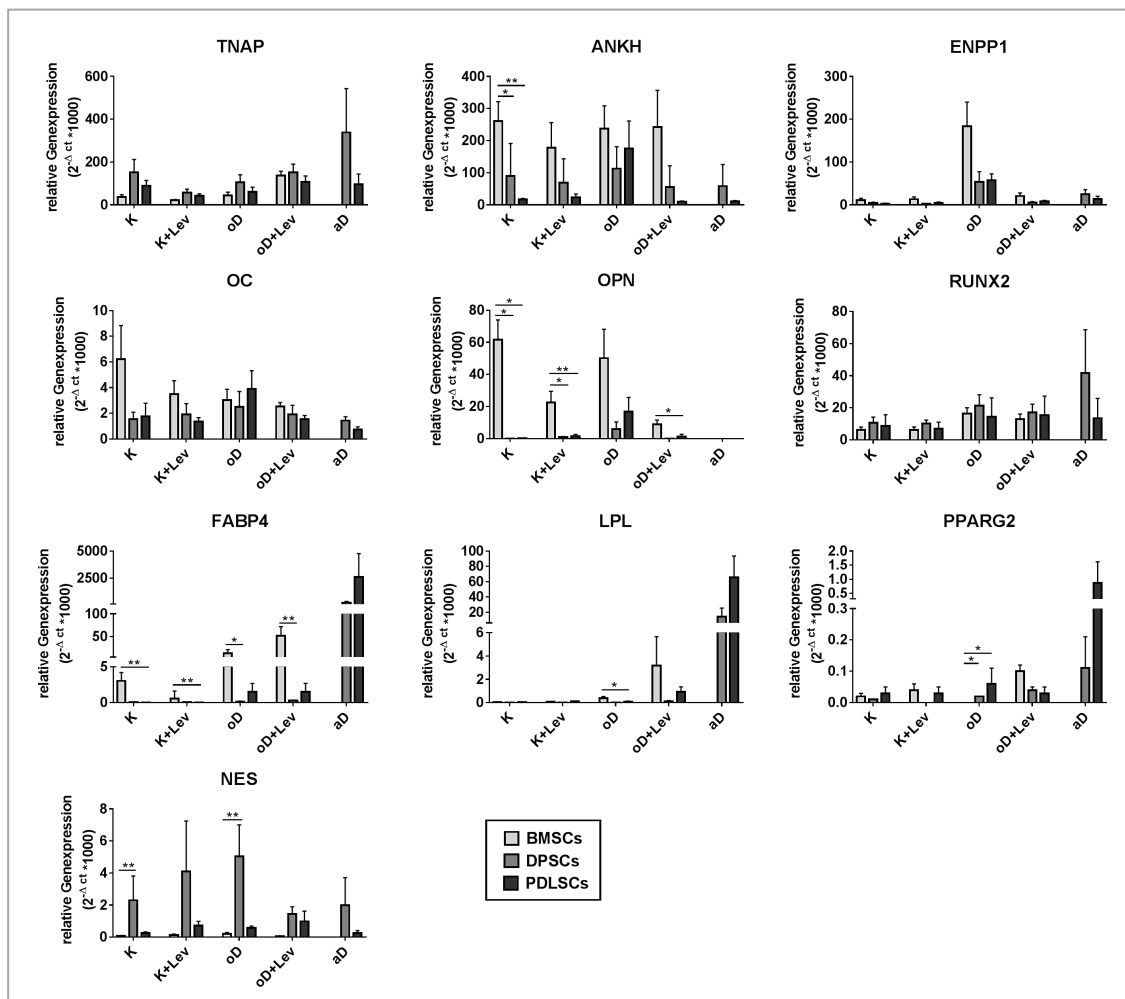


Abb. 24: Relative Genexpression (nach Auswertung mit der $2^{-\Delta ct}$ -Methode). Der Fokus liegt auf der Auswirkung der TNAP-Inhibition durch Levamisol auf die Genexpression. Diese kann in dieser Auswertung sowohl zwischen den MSCs als auch zwischen den Behandlungen verglichen werden. Die BMSCs, DPSCs und PDLSCs sind als Mittelwerte aus den 5 Donoren mit dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. Die Statistik wurde für die jeweiligen Behandlungen der MSCs bei Normalverteilung mit dem

III. Ergebnisse

ANOVA mit dem Tukey Posthoc-Test (ANKH, LPL), bei nicht normalverteilten Proben mit dem Kruskal-Wallis mit dem Dunn`s Posthoc-Test berechnet: (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$. K = Kontrolle, K+Lev = Kontrolle mit Levamisol, oD = osteogene Differenzierung, oD+Lev = osteogene Differenzierung mit Levamisol, aD = adipogene Differenzierung.

Die TNAP zeigte kein einheitliches Expressionsmuster und keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression zwischen den MSCs.

Eine reduzierte Expression infolge des Levamisol-Zusatzes konnte bei allen drei Stammzellarten nur in den Kontrollen, jedoch nicht während der osteogenen Differenzierung beobachtet werden. Der Levamisol-Zusatz während der osteogenen Differenzierung zeigte tatsächlich eine erhöhte TNAP-Expression, welche insbesondere bei den BMSCs sehr deutlich war. Der höchste Wert entspricht hier dem Mittelwert der adipogen differenzierten DPSC-Proben. Unter diesen Bedingungen wiesen die DPSCs eine mehr als doppelt so starke Expression auf als die zugehörigen Kontrollen.

Neben der TNAP-Expression wurden die Gene ANKH und ENPP1, welche ebenfalls mit dem Phosphatstoffwechsel assoziiert und der TNAP funktionell vorgeschaltet sind, verglichen.

Die Expression von ANKH wies ebenfalls ein variables Muster auf: ANKH wurde besonders stark in den BMSCs exprimiert und zeigte in den dentalen MSCs einen deutlichen Einfluss des Levamisol.

ANKH wurde von den BMSCs in den Kontrollproben signifikant stärker exprimiert als in den DPSCs und PDLSCs. Die BMSCs wiesen stets die höchsten Werte auf. Die dentalen Stammzellen zeigten unter osteogener Differenzierung ihre jeweils stärkste Expression. Unter diesen Bedingungen war diese bei den PDLSCs deutlich höher als bei den DPSCs und schien hierbei einen besonders deutlichen Unterschied zu den Kontrollen im Vergleich zu den DPSCs aufzuweisen. In den Kontrollproben und unter Levamisol-Zusatz war es umgekehrt der Fall, in diesen Proben exprimierten die DPSCs ANKH stärker als die PDLSCs. Eine reduzierte Expression infolge der Levamisol-Stimulation unter osteogenen Differenzierungsbedingungen war sowohl bei den DPSCs als auch den PDLSCs sehr deutlich festzustellen, bei den BMSCs hingegen lediglich in den Kontrollen.

Die Expression von ENPP1 war unter osteogener Differenzierung (oD) im Vergleich zu den anderen Behandlungen (K, K+Lev, oD+Lev, aD) in allen MSCs deutlich erhöht, in den BMSCs jedoch 3-4 Mal so stark wie in den PDLSCs bzw. DPSCs.

ENPP1 ist ebenfalls aus dem purinergen Signalweg bekannt und kodiert für das Enzym, welches durch die Bereitstellung von PPI der TNAP unmittelbar vorgeschaltet ist. Unter osteogener Differenzierung wurde ENPP1 von BMSCs, DPSCs und PDLs verstärkt exprimiert. Bei zusätzlicher Stimulation mit Levamisol war die Expression sehr deutlich reduziert und nur geringfügig höher als in den Kontrollen.

Osteocalcin (OC) konnte bei allen MSCs nachgewiesen werden und zeigte ein relativ homogenes Expressionsniveau.

In den Kontrollproben der BMSCs war OC am stärksten und doppelt so hoch wie unter osteogener Differenzierung exprimiert. Die osteogen differenzierten PDLSCs zeigten unter diesen Bedingungen (oD) die für sie stärkste OC-Expression und damit insgesamt die zweithöchste. Durch den Levamisol-Zusatz zur osteogenen Differenzierung konnte in allen drei MSCs eine reduzierte OC-Expression beobachtet werden, diese Differenz zwischen oD und oD+Lev war am deutlichsten in den Proben der PDLSCs zu beobachten.

Osteopontin (OPN) wies eine signifikant höhere Expression in den BMSC-Proben im Vergleich zu den DPSCs und den PDLSCs auf und scheint ein guter Marker für die BMSCs zu sein. OPN zeigte auf Levamisol besonders deutliche Effekte im Sinne einer reduzierten Expression.

Osteopontin ist als Inhibitor der Biomineralisierung bekannt. Erhöhte OPN-Werte gelten in diesem Zusammenhang als Pathogenitätsfaktor bei Mineralisierungsdefekten (Yadav et al., 2012). In der qPCR wiesen die BMSCs, wie in der basalen RT-PCR (Kap. 3.3.1), eine höhere Expression auf als die DPSCs und PDLSCs. Dies war in den Kontrollen, den Kontrollen mit Levamisol und während der osteogenen Differenzierung mit Levamisol (K, K+Lev, oD+Lev) statistisch signifikant. Tatsächlich konnte lediglich in den osteogen differenzierten Proben der DPSCs und PDLSCs eine deutliche OPN-Expression gemessen werden, diese war in den PDLSCs in etwa doppelt so hoch wie in den DPSCs.

Eine reduzierte Expression von OPN als Levamisol-Effekt war in den BMSCs besonders

deutlich. Bei diesen war sowohl bei der undifferenzierten Kontrolle mit Levamisol im Vergleich zur Kontrolle als auch bei der osteogenen Differenzierung mit Levamisol im Vergleich zur osteogenen Differenzierung eine stark verringerte OPN-Expression gemessen worden. Allgemein schien die reduzierte Expression nach Levamisol-Zusatz bei OPN im Vergleich zu den übrigen Genen besonders deutlich zu sein.

RUNX2 wurde von allen drei MSCs relativ homogen exprimiert.

Unter osteogener Differenzierung war diese etwas stärker als in der Kontrolle. Insgesamt scheint sie durch den Zusatz von Levamisol geringfügig reduziert zu werden. Die höchste Expression von RUNX2 wurde interessanterweise bei den adipogen differenzierten DPSCs bestimmt, in den adipogen differenzierten PDLSCs ist die Expression hingegen im Vergleich zu den anderen Behandlungen nicht verändert.

Differentielle Expression der adipogenen Marker (FABP4, LPL, PPARG2): höhere Genexpression in den BMSCs im Vergleich zu den dentalen Stammzellen.

Die Expression aller drei Marker (FABP4, LPL, PPARG2) war in einzelnen Behandlungen in den BMSCs im Vergleich zu den DPSCs bzw. PDLSCs jeweils signifikant erhöht.

FABP4 (fatty acid binding protein 4) war in den Kontrollen (K, K+Lev) der BMSCs signifikant stärker exprimiert als in den Kontrollen der PDLSCs. In den osteogen differenzierten Proben mit und ohne Levamisol wurde FABP4 in den BMSCs signifikant stärker als in den DPSCs exprimiert. Die Lipoproteinlipase **LPL** war zudem während der osteogenen Differenzierung in den BMSCs ebenfalls signifikant höher exprimiert im Vergleich zu den DPSCs. **PPARG2** (peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2) war in den osteogen differenzierten Proben der BMSCs sowohl verglichen mit den DPSCs als auch den PDLSCs signifikant erhöht.

Insbesondere in den PDLSC-Proben konnte während der **adipogenen Differenzierung** eine sehr deutliche Expression der typischen adipogenen Markergene FABP4, LPL und PPARG2 bestimmt werden, trotz der vergleichsweise geringen Lipidvesikelbildung, wie sie in der anschließenden Ölrot-O-Färbung und deren Quantifizierung beobachtet werden konnte (Kap. 3.7.1 und 3.7.2). Die DPSCs zeigten unter adipogenen Differenzierungsbedingungen im Vergleich hierzu für jeden der Marker eine deutlich

geringere Expression. Die adipogene Differenzierung der BMSCs wurde nicht durchgeführt und konnte daher nicht in den Vergleich miteinbezogen werden.

Während der osteogenen Differenzierung mit Levamisol (oD+Lev) wurden infolge der TNAP-Hemmung adipogene Marker verstärkt exprimiert.

Diese Beobachtung war ein interessanter Aspekt des *in vitro* Modells. Insbesondere PPARG2 und FABP4 zeigten unter dieser Bedingung (oD+Lev) eine signifikant erhöhte Expression (Abbildung 25, unten). In den BMSCs war die verstärkte Expression von LPL und PPARG2 bei Levamisol-Stimulation während der osteogenen Differenzierung sehr deutlich. Dieser Anstieg infolge des Levamisols war bei den dentalen Proben nicht zu beobachten.

Der neuronale Stammzellmarker Nestin (NES) zeigte eine signifikant höhere Expression in den DPSCs im Vergleich zu den BMSCs.

Nestin ist ein Intermediärfilamentprotein und ein typischer neurogener Stammzellmarker. Es wird unter anderem von undifferenzierten Zellen des ZNS während der Entwicklung, sowie von adulten ZNS-Zellen und -Tumorzellen exprimiert (Suzuki, Namiki et al. 2010). Die Genexpression von Nestin war sowohl in den Kontrollen als auch unter osteogener Differenzierung in den DPSCs im Vergleich zu den BMSCs signifikant erhöht. Die in den basalen Proben bereits beobachtete stärkere NES-Expression der DPSCs (RT-PCR, Kap. 3.3.1) scheint somit in den differenzierten Proben um einiges deutlicher fortzubestehen. Unter jeder Bedingung war die NES-Expression in den Proben der DPSCs stets höher, unter osteogener Differenzierung der DPSCs war sie am höchsten: NES zeigte in den osteogen differenzierten DPSCs eine signifikante, mehr als 25-fach höhere Expression im Vergleich zu den entsprechenden BMSCs.

3.5.2 Veränderung der Genexpression durch die jeweilige Behandlung

Auswertung der qPCR-Ergebnisse anhand der $\Delta\Delta\text{ct}$ -Methode (Abb. 25)

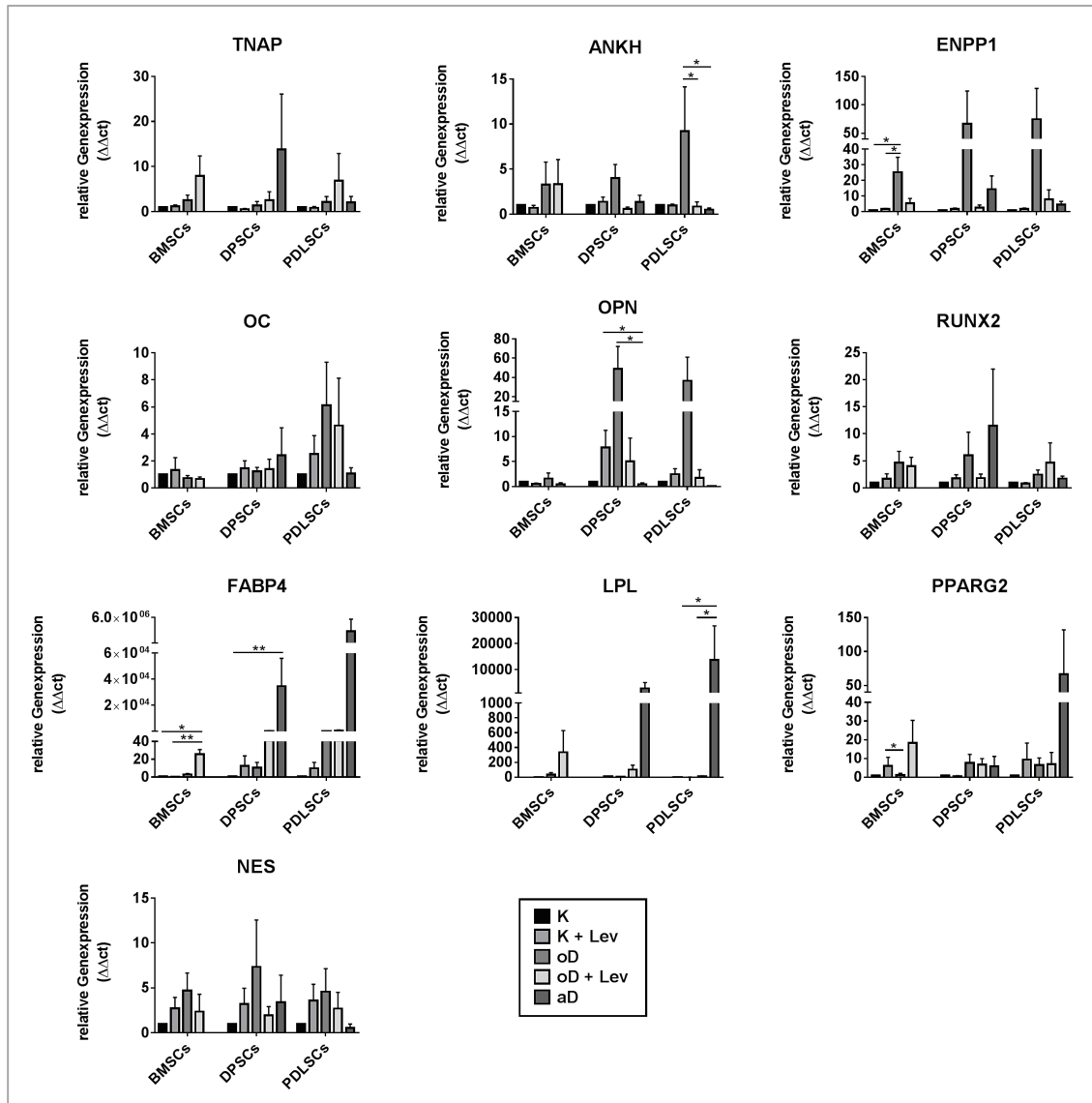


Abb. 25: Ergebnisse der qPCRs: Relative Genexpression der BMSCs, DPSCs und PDLSCs (Auswertung mit der $\Delta\Delta\text{ct}$ -Methode). Hierbei sind die MSCs separat dargestellt, ein Vergleich ist nur innerhalb einer Gruppe möglich. Die Einflüsse der unterschiedlichen Behandlungen werden in dieser Darstellung deutlich. Legende: K = Kontrolle, K+Lev = Kontrolle + Levamisol, oD = osteogene Differenzierung, oD+Lev = osteogene Differenzierung mit Levamisol, aD = adipogene Differenzierung. Für die BMSCs wurde keine aD durchgeführt. Die Statistik wurde hier innerhalb jeder MSC-Gruppe separat mit dem Kruskal-Wallis-Test (nicht normal verteilt) berechnet: (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (SEM).

Anhand dieser Auswertungsmethode wurde die Genexpression derselben qPCR-Daten für jede Stammzellart nochmals separat voneinander mit Fokus auf die jeweiligen Behandlungseffekte dargestellt (Reihenfolge s. Legende: K, K mit Levamisol, oD, oD mit

Levamisol und adipogene Differenzierung nur bei den DPSCs und PDLSCs). Hierbei ist nur ein Vergleich innerhalb einer MSC-Gruppe zwischen den einzelnen Behandlungen mit Bezug zur jeweiligen Kontrolle möglich, die Stammzellarten untereinander können in dieser Auswertung und Darstellung nicht verglichen werden. In dieser Auswertung wurde ein anderer Schwerpunkt gelegt, um gegebenenfalls weitere Hypothesen zu vertiefen. Wie zuvor wurden Mittelwerte aus den jeweiligen 5 Proben ermittelt. Die statistische Signifikanz wurde innerhalb einer MSC-Gruppe berechnet.

Die **TNAP** wies in dieser Darstellung insofern ein besonderes Expressionsmuster auf, indem die Expression unter osteogenen Differenzierungsbedingungen in allen MSCs verstärkt wurde und insbesondere der Zusatz von Levamisol während der oD einen deutlichen Anstieg der Expression zu bewirken schien.

ANKH wurde in den dentalen Stammzellen hingegen während der osteogenen Differenzierung stärker exprimiert als mit einem Zusatz von Levamisol, während die BMSCs diesbezüglich keine Auswirkung zeigten. Die PDLSCs zeigten hierbei eine signifikant höhere Expression während der osteogenen Differenzierung ohne Zusatz als mit Levamisol und auch im Vergleich der osteogenen zur adipogenen Differenzierung.

ENPP1 war bereits in der Auswertung zuvor in den BMSCs unter osteogener Differenzierung vergleichsweise stark exprimiert, in dieser Auswertung konnte diese Expression zudem als signifikant zur Kontrolle sowohl mit als auch ohne Levamisol beurteilt werden. Insgesamt war in jeder MSC-Gruppe ENPP1 ähnlich wie ANKH während der osteogenen Differenzierung am stärksten exprimiert, durch den Zusatz von Levamisol zeigte sich jedoch eine noch deutlichere reduzierte Expression als für ANKH.

Die adipogenen Marker FABP4 und PPARG2 zeigten beide unter osteogener Differenzierung mit Levamisol eine signifikant erhöhte Expression.

Für FABP4 war dies in der Kontrolle ohne und mit Levamisol zu beobachten, PPARG2 zeigte diese Wirkung auf die osteogene Differenzierung.

Die **NES**-Expression war nach dieser Auswertung in den osteogen differenzierten Proben jeweils am stärksten und wurde durch Levamisol deutlich reduziert.

3.6 Analyse der AP-Aktivität in Abhängigkeit von der osteogenen Differenzierung mit und ohne Stimulation mit Levamisol

Im Rahmen des zweiten Teils wurde die AP-Aktivität unter osteogener Differenzierung mit Fokus auf die Levamisol-Stimulation analysiert. Von den BMSCs (a-e), DPSCs und PDLSCs (jeweils A-E) wurden die Protein-Proben der Kontrolle mit und ohne Levamisol sowie der osteogenen Differenzierung mit und ohne Levamisol in separaten Ansätzen mit drei Durchführungen untersucht:

In diesem Versuchsansatz des CSPD-Assays wurde der Zusatz von 1 mM Levamisol auf die osteogene Differenzierung innerhalb jeder MSC-Gruppe untersucht und anhand der Auswirkung auf die jeweilige Kontrollprobe beurteilt. Ein direkter Vergleich zwischen den einzelnen Stammzellarten war aufgrund der separaten Durchführung der Messungen nicht möglich.

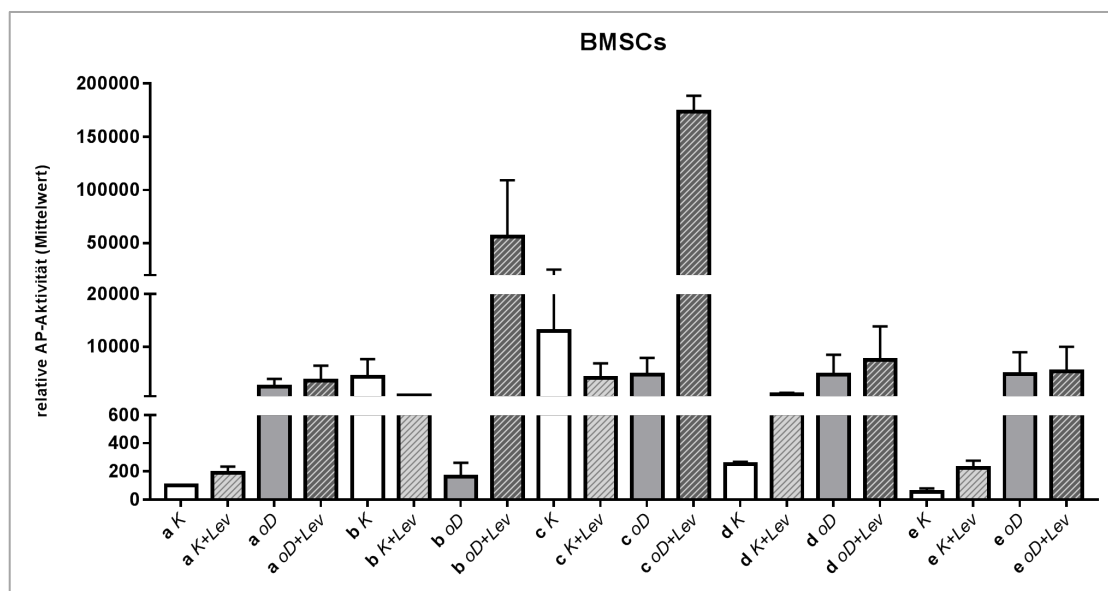


Abb. 26: CSPD-Assay der osteogen differenzierten BMSC-Proben (a-e) mit und ohne Levamisol sowie der jeweiligen Kontrollen (K und K+Lev) hierzu im Vergleich. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei separaten Durchführungen mit dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM).

III. Ergebnisse

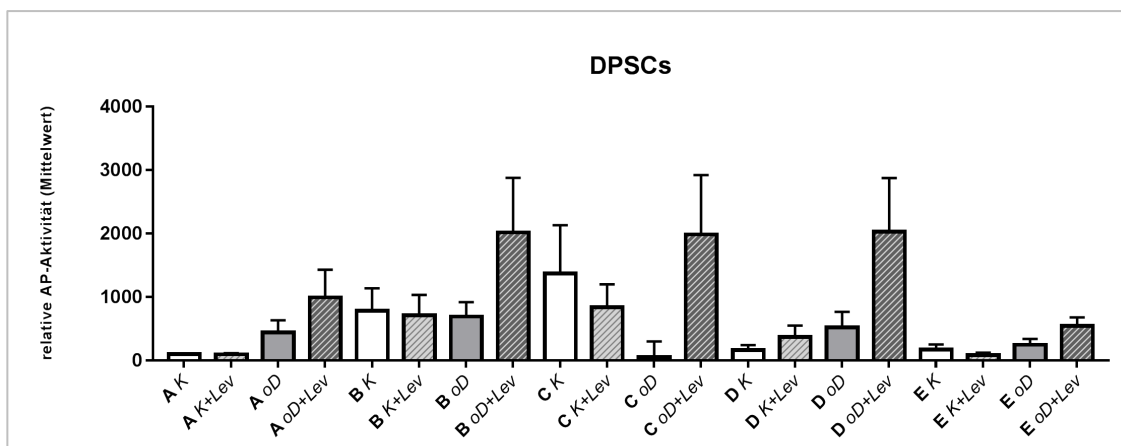


Abb. 27: CSPD-Assay der osteogen differenzierten DPSC-Proben (A-E) mit und ohne Levamisol sowie der jeweiligen Kontrollen (K und K+Lev) hierzu im Vergleich. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei separaten Durchführungen mit dem Standardfehler des Mittelwerts (SEM).

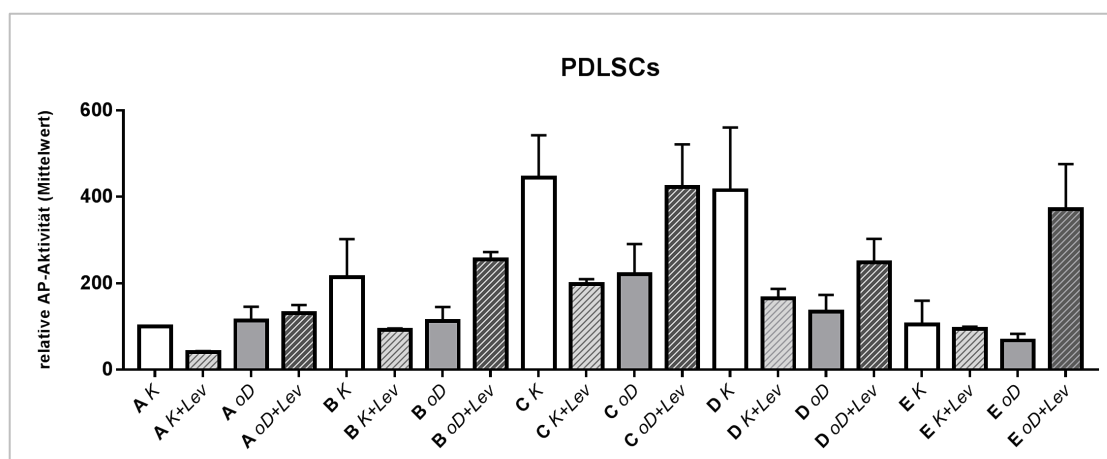


Abb. 28: CSPD-Assay der osteogen differenzierten PDLSC-Proben (A-E) mit und ohne Levamisol sowie der jeweiligen Kontrollen (K und K+Lev) hierzu im Vergleich. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei separaten Durchführungen mit dem jeweiligen Standardfehler des Mittelwerts (SEM).

In einem zweiten Ansatz wurde die AP-Aktivität zwischen den BMSCs, DPSCs und PDLSCs in Abhängigkeit zur osteogenen Differenzierung durch Bezug auf die entsprechende Kontrolle verglichen (Abb. 29). Hierbei wurden alle Kontrollproben und osteogen differenzierten Proben in einem gemeinsamen Ansatz gemessen, sodass ein direkter Vergleich zwischen den BMSCs, DPSCs und PDLSCs möglich war. Ein eindeutiges Muster der AP-Aktivität war nicht erkennbar. Ein Anstieg der AP war zwar in allen drei Gruppen in jeweils 3 der 5 Proben zu beobachten, in den beiden anderen Proben war es jedoch umgekehrt der Fall oder nur geringfügig verändert.

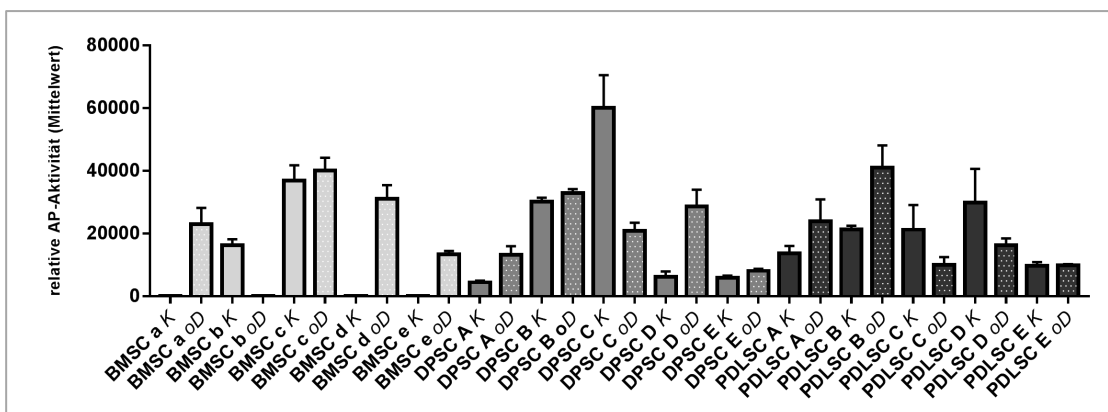


Abb. 29: Vergleich der relativen AP-Aktivität zwischen Kontrolle (K) und osteogen differenzierter Probe (oD) der BMSCs (a-e), DPSCs (A-E) und PDLSCs (A-E). Mit Ausnahme einzelner Proben (BMSC b, DPSC C, PDLSC C und PDLSC D) war ein Anstieg der AP-Aktivität zwischen K und oD zu beobachten. Die Donor-abhängigen Unterschiede werden in dieser Darstellung sehr deutlich. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (SEM).

Höhere mittlere AP-Aktivität der undifferenzierten DPSCs und PDLSCs

Des Weiteren ist bei Betrachtung der Mittelwerte in Abbildung 30 insbesondere bei den BMSCs ein deutlicher Anstieg der AP-Aktivität unter osteogener Differenzierung zu beobachten. Zudem konnte generell anhand dieser Darstellung eine höhere AP-Aktivität in den undifferenzierten Kontrollproben der DPSCs und PDLSCs im Vergleich zu den Kontrollen der BMSCs gezeigt werden. Die Fehlerbalken resultieren aus der Donor-abhängigen Varianz der zu Mittelwerten zusammengefassten 5 Proben und spiegeln die in Abbildung 29 deutlich erkennbare, sehr hohe Spendervariabilität wieder.

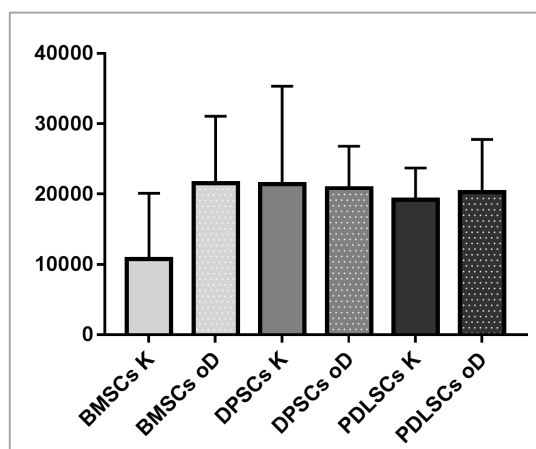


Abb. 30: Mittelwerte der im CSPD-Assay ermittelten relativen AP-Aktivität. Ein Anstieg der AP-Aktivität unter osteogener Differenzierung im Vergleich zur Kontrolle war bei den BMSCs deutlich. Die AP-Aktivität der DPSCs und PDLSCs war in den Kontrollproben bereits relativ hoch und scheint durch die osteogene Differenzierung nicht signifikant gesteigert zu werden. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts (SEM) und resultieren aus den großen Unterschieden zwischen den einzelnen Proben.

3.7 Untersuchung des Differenzierungspotenzials der dentalen MSCs

Nachweis der Multipotenz anhand spezifischer Färbungen

3.7.1 Nachweis der adipogenen Differenzierung

Die Ölrot-O-Färbung wurde nach 3 Wochen adipogener Differenzierung der DPSCs und PDLSCs durchgeführt. Zwischen den dentalen MSCs schien kein signifikanter Unterschied bezüglich des adipogenen Differenzierungspotenzials zu bestehen. Vielmehr war eine deutliche Variabilität zwischen den Proben auffallend, sowie die sehr vereinzelte und weniger gleichmäßige Verteilung der Lipidtröpfchen im Gegensatz zu den Referenz-BMSCs aus den Vorversuchen (Abb. 34). Dies zeigte sich als ein auffälliger Unterschied zwischen BMSCs und DPSCs bzw. PDLSCs. Es konnte zudem ein etwas stärker ausgeprägtes adipogenes Differenzierungspotenzial der PDLSCs im Vergleich zu den DPSCs im Überblick der gesamten Proben angenommen werden.

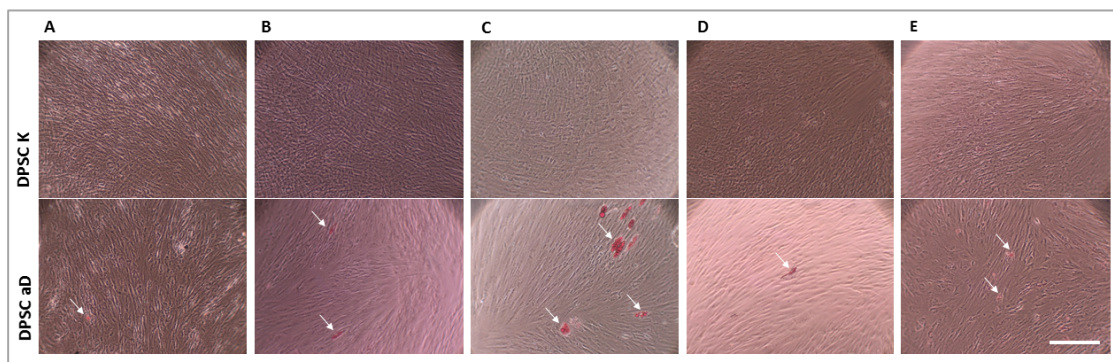


Abb. 31: Ölrot-O-Färbung der 5 DPSC-Proben (A-E) nach 3 Wochen adipogener Differenzierung. Der Maßstab beträgt 250µm, die Aufnahme erfolgte bei 10-facher Vergrößerung. Die Pfeile markieren angefärbte intrazelluläre Lipidvesikel. K = Kontrolle, aD = adipogene Differenzierung.

III. Ergebnisse

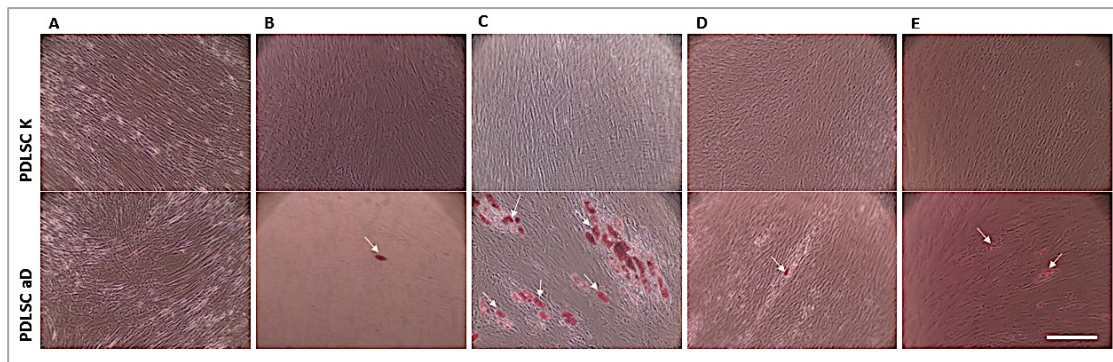


Abb. 32: Ölrot-O-Färbung der PDLSC-Proben (A-E) nach 3 Wochen adipogener Differenzierung. Die weißen Pfeile weisen auf angefärbte intrazelluläre Lipidvesikel. Der Maßstabsbalken beträgt 250 μm , die Aufnahme erfolgte bei 10-facher Vergrößerung. K = Kontrolle, aD = adipogene Differenzierung.

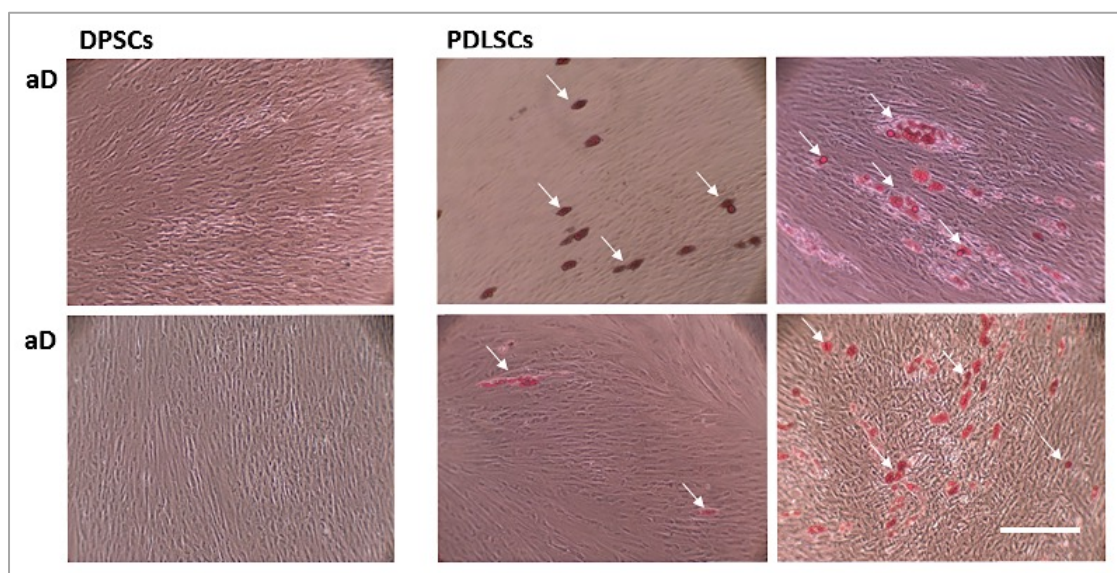


Abb. 33: 6 weitere Ölrot-O-Färbungen zusätzlich zu den ausgewählten Probenpaaren. Rechts sind zwei weitere Beispiele adipogen differenzierter DPSCs, links vier zusätzliche PDLSC-Proben. Die Donor-abhängigen Unterschiede werden deutlich, die adipogene Differenzierung der PDLSC-Proben scheint ausgeprägter. Der Maßstabsbalken beträgt 250 μm , die Aufnahme erfolgte mit einer 10-fachen Vergrößerung. aD = adipogene Differenzierung.

Die adipogene Differenzierung der BMSCs war im Labor des MCW bereits vielfach nachgewiesen und mit Hilfe der Ölrot-O-Färbung dargestellt worden. Hierfür lag ein etabliertes Protokoll vor, welches im Rahmen eigener Vorversuche zu dieser Arbeit verwendet worden war. Zur Veranschaulichung der adipogenen Differenzierungsfähigkeit der BMSCs sind in Abbildung 34 Färbungen von drei BMSC-Proben (f-h) aus eigenen Vorversuchen dargestellt. Diese konnten für den Vergleich mit dem adipogenen Potenzial der dentalen MSCs (Abb. 30-33) hinzugezogen werden.

Insgesamt konnte eine deutlich bessere adipogene Differenzierungsfähigkeit der mesodermalen BMSCs im Vergleich zu den dentalen Stammzellen festgestellt werden, was einer deutlich reduzierten adipogenen Kapazität der Zellen neuroektodermalen Ursprungs entspricht.

Bei der Ölrot-O-Färbung fällt die deutlich intensivere und zuverlässigere adipogene Differenzierung der drei BMSCs aus den Vorversuchen (f-h, Abb. 34) im Vergleich zu den Proben der DPSCs (A-E) und PDLSCs (A-E) auf.

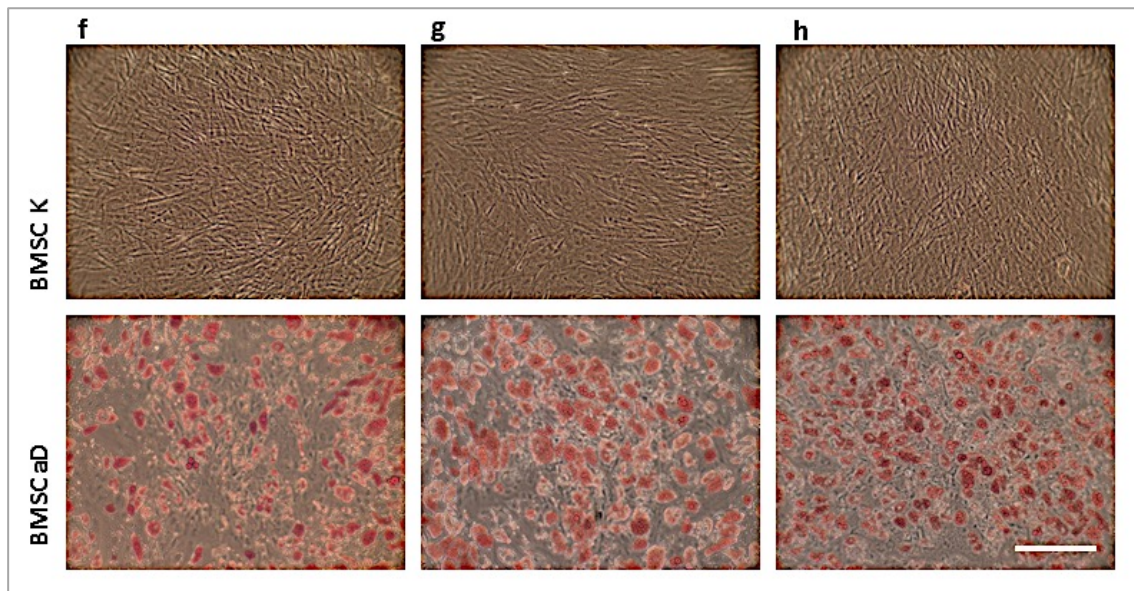


Abb. 34: Ölrot-O-Färbung drei zusätzlicher BMSC-Proben (f-h) aus eigenen Vorversuchen als Referenz für das adipogene Differenzierungspotenzial der MSCs. Der Maßstabsbalken beträgt 250 μm , die Aufnahme erfolgte mit einer 10-fachen Vergrößerung. K = Kontrolle, aD = adipogene Differenzierung.

3.7.2 Quantifizierung der Ölrot-O-Färbung

Die Quantifizierung der Ölrot-O-Färbung wurde zur statistischen Auswertung eventueller Unterschiede im adipogenen Differenzierungspotenzial zwischen DPSCs und PDLSCs durchgeführt. Hierdurch sollte die zuvor vermutete vermehrte Bildung von Lipidvesikeln der PDLSCs im Vergleich zu den DPSCs überprüft werden. Insgesamt konnte aus allen DPSCs und PDLSCs die rote Färbung der intrazellulären Lipidvesikel, die im Rahmen der adipogenen Differenzierung gebildet worden waren, herausgelöst und gemessen werden. Die adipogene Differenzierung wurde bei dieser Messung jeweils im Vergleich zur entsprechenden Kontrollprobe bewertet.

III. Ergebnisse

Eine signifikant höhere Extinktion der adipogen differenzierten Probe im Vergleich zur Kontrolle wurde in der PDLSC-Probe C gemessen. Dies entspricht einer deutlich höheren Farbaufnahme der Lipidvesikel und somit einem höheren Anteil adipogen differenzierter PDLSCs in dieser Probe.

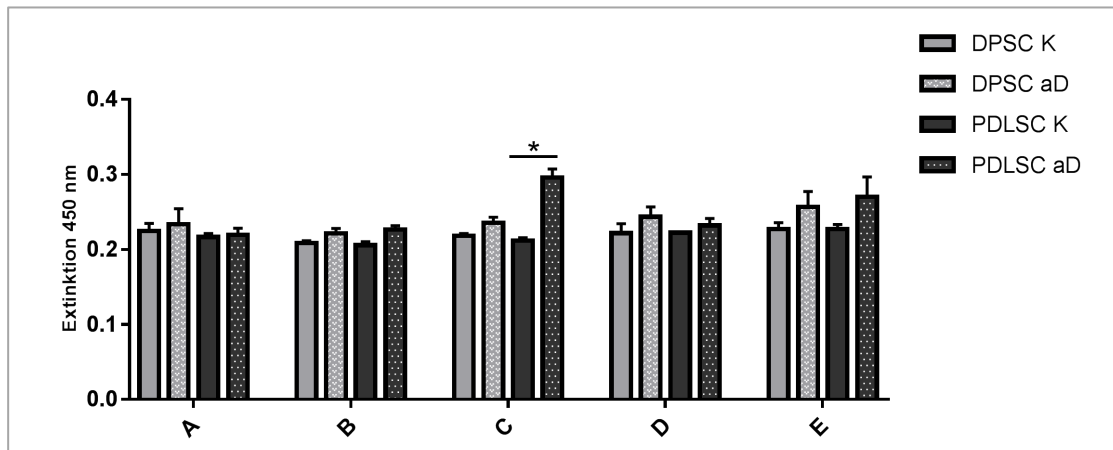


Abb. 35: Quantifizierung der Ölrot-O-Färbungen nach adipogener Differenzierung der 5 Probenpaare aus DPSCs und PDLSCs. Es sind die Kontrollproben (K) und die adipogene Differenzierung (aD) der DPSCs und PDLSCs für jeden Donor (A-E) separat dargestellt. Die Extinktionsmessung ergab lediglich leicht erhöhte Werte für die adipogen differenzierten Proben. Eine signifikant höhere Extinktion zwischen Kontrolle und adipogener Differenzierung konnte bei der PDLSC-Probe C gemessen werden. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Die Statistik wurde mit dem Kruskal-Wallis Test mit dem Dunn's Posthoc-Test berechnet. Statistische Signifikanz: (*) $p < 0,05$.

Aufgrund der stärksten Lipidproduktion der PDLSC-Probe C lag nach der Extinktionsmessung eine etwas höhere Ölrot-O-Farbaufnahme und eine hieraus ableitbare stärkere adipogene Differenzierung der PDLSCs im Vergleich zu den DPSCs vor, wobei der Unterschied nur gering ausgeprägt und nicht signifikant war.

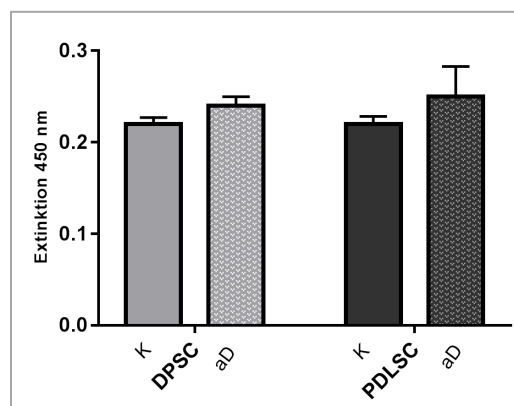


Abb. 36: Mittelwerte der Ölrot-O-Quantifizierung der DPSCs und PDLSCs. In der Zusammenfassung der 5 Proben kann aus der etwas höheren Extinktion der adipogen differenzierten PDLSCs auf eine etwas stärkere adipogene Differenzierung dieser geschlossen werden. Der Fehlerbalken zeigt die Standardabweichung des Mittelwerts. Die Messung erfolgte bei einer Extinktion von 450 nm.

3.7.3 Nachweis der osteogenen Differenzierung

Das Mineralisierungspotenzial der Proben im Rahmen der osteogenen Differenzierung sollte mit der Alizarinrot-Färbung bestätigt werden. Zudem sollte im Vergleich die Auswirkung des Levamisols auf das osteogene Differenzierungspotenzial untersucht werden. Hierfür wurden die Zellen auf 12-Well Platten in bestimmter Dichte ausgesät (Kap. 2.2.1.5.2). Die Färbung erfolgte 4 Wochen nach dem Beginn der osteogenen Differenzierung. Die einzige Ausnahme bildete die PDLSC-Probe A, da die Färbung zu einem früheren Zeitpunkt (bereits nach 2,5 Wochen) stattfinden musste, um das vorzeitige vollständige Ablösen der Zellen zu verhindern. Eine leichte Ablösung an den Rändern war in den meisten Proben zu beobachten, am deutlichsten jedoch während der osteogenen Differenzierung und dieser mit Levamisol-Stimulation (1 mM).

Die Alizarinrot-Färbung zeigte bei allen drei MSCs eine deutlichere Färbung von Calcium in den osteogen differenzierten Proben im Vergleich zur osteogenen Differenzierung mit Levamisol (Abb. 37-39).

Levamisol ist folglich in der Lage die Calcium-Mineralisierung unter osteogenen Differenzierungsbedingungen zu hemmen. Innerhalb eines Probenpaares aus DPSCs und PDLSCs konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die Intensität der osteogenen Differenzierung war in allen Proben sehr stark von dem jeweiligen Donor abhängig und wurde ausnahmslos unter Levamisol-Zusatz (1 mM) weitgehend blockiert.

III. Ergebnisse

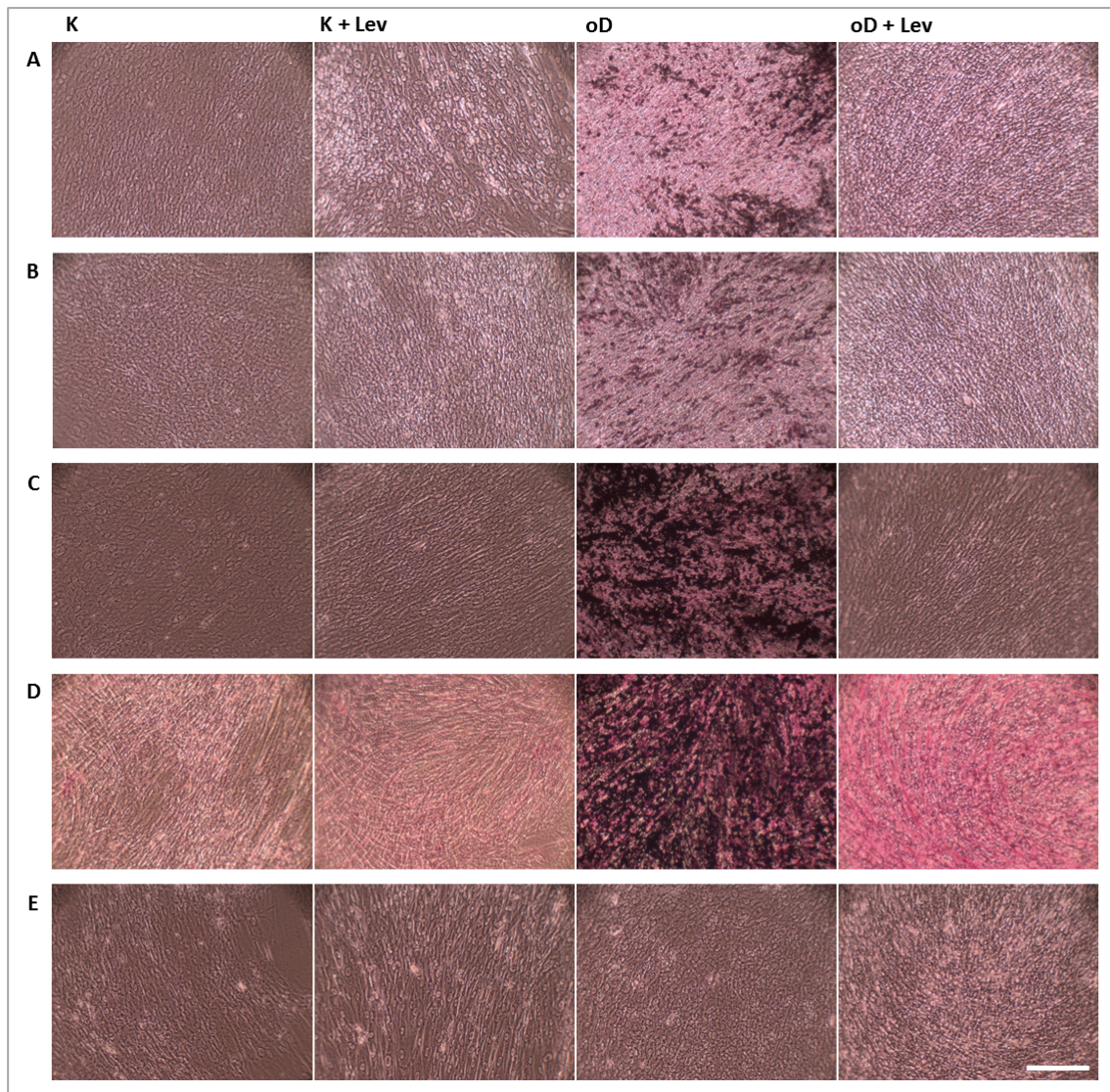


Abb. 37: Alizarinrot-Färbung: Nachweis der osteogenen Differenzierung und Darstellung des Levamisol-Effektes anhand der DPSC-Proben (A-E). Mikroskopische Aufnahmen der 5 Proben mit der jeweiligen Behandlung sind in dieser Übersicht der Alizarinrot-Färbung nach 4 Wochen dargestellt (K = Kontrolle, K+Lev = Kontrolle mit Levamisol, oD = osteogene Differenzierung, oD+Lev = osteogene Differenzierung mit Levamisol). Der Maßstabsbalken zeigt eine Distanz von 250 μm .

III. Ergebnisse

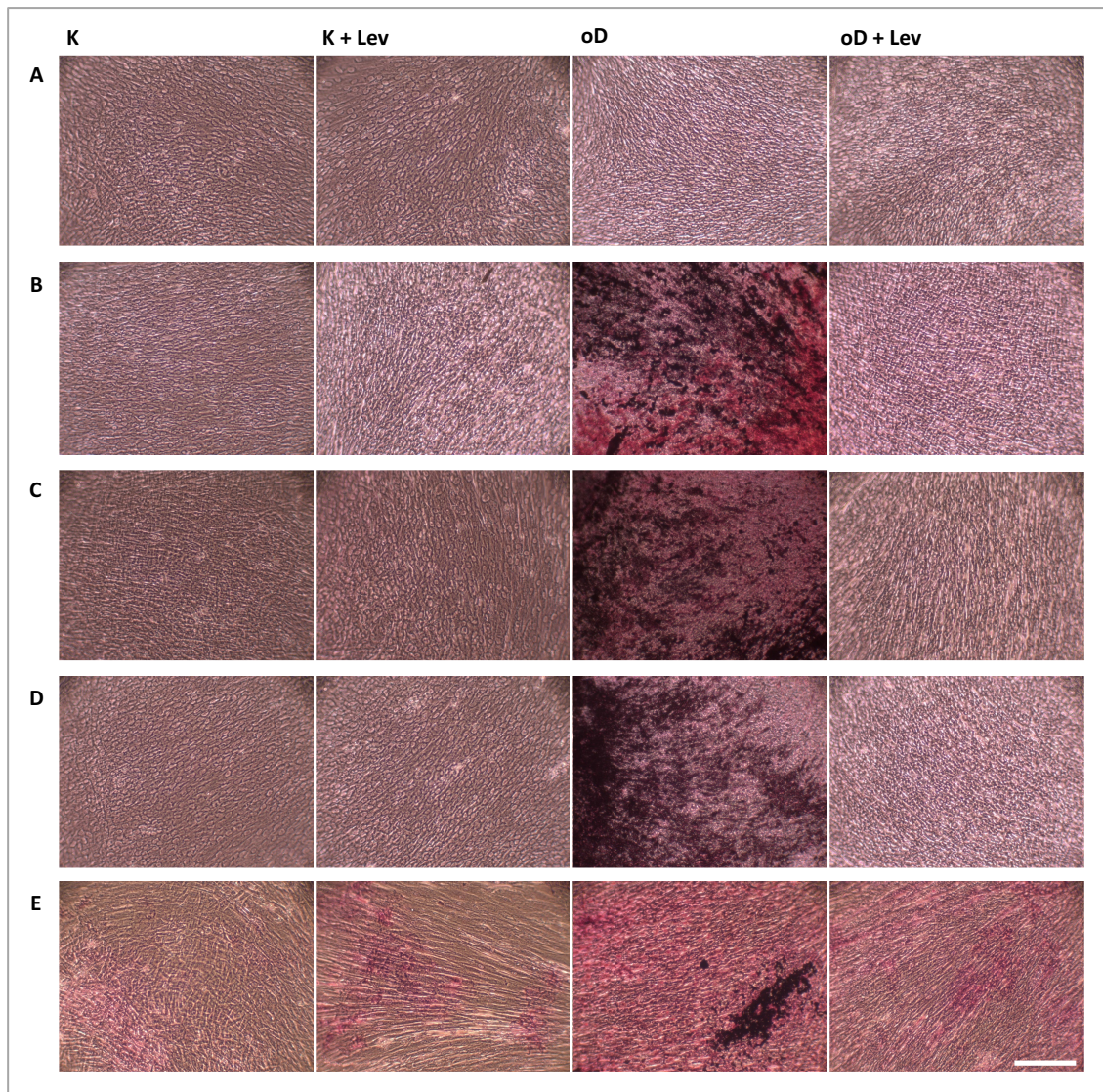


Abb. 38: Alizarinrot-Färbung: Nachweis der osteogenen Differenzierung und Darstellung des Levamisol-Effektes in den PDLSC-Proben (A-E). In dieser Übersicht sind repräsentative mikroskopische Aufnahmen der 5 Proben mit der jeweiligen Behandlung nach der Alizarinrot-Färbung nach 4 Wochen gezeigt (K = Kontrolle, K+Lev = Kontrolle mit Levamisol, oD = osteogene Differenzierung, oD+Lev = osteogene Differenzierung mit Levamisol). Ausnahme ist die Probe A, hier fand die Färbung bereits nach 2,5 Wochen aufgrund der bevorstehenden vorzeitigen Ablösung der Zellen statt. Der Maßstabsbalken zeigt eine Distanz von 250 μm .

III. Ergebnisse

Im Vergleich zu den dentalen Proben konnte in den BMSC-Proben eine deutlicher reduzierte Mineralisierungsfärbung unter regelmäßiger Levamisol-Stimulation beobachtet werden, was auf eine stärkere Hemmung der osteogenen Differenzierung in den BMSCs hinweist. In den BMSCs konnte in der Färbung zwischen der osteogenen Differenzierung mit Levamisol und den Kontrollreihen mit und ohne Levamisol kein Unterscheid festgestellt werden. Diese Beobachtung konnte bereits in der Übersichtsdarstellung der Well-Platten (Abb. 40 und 41, unten) gemacht werden.

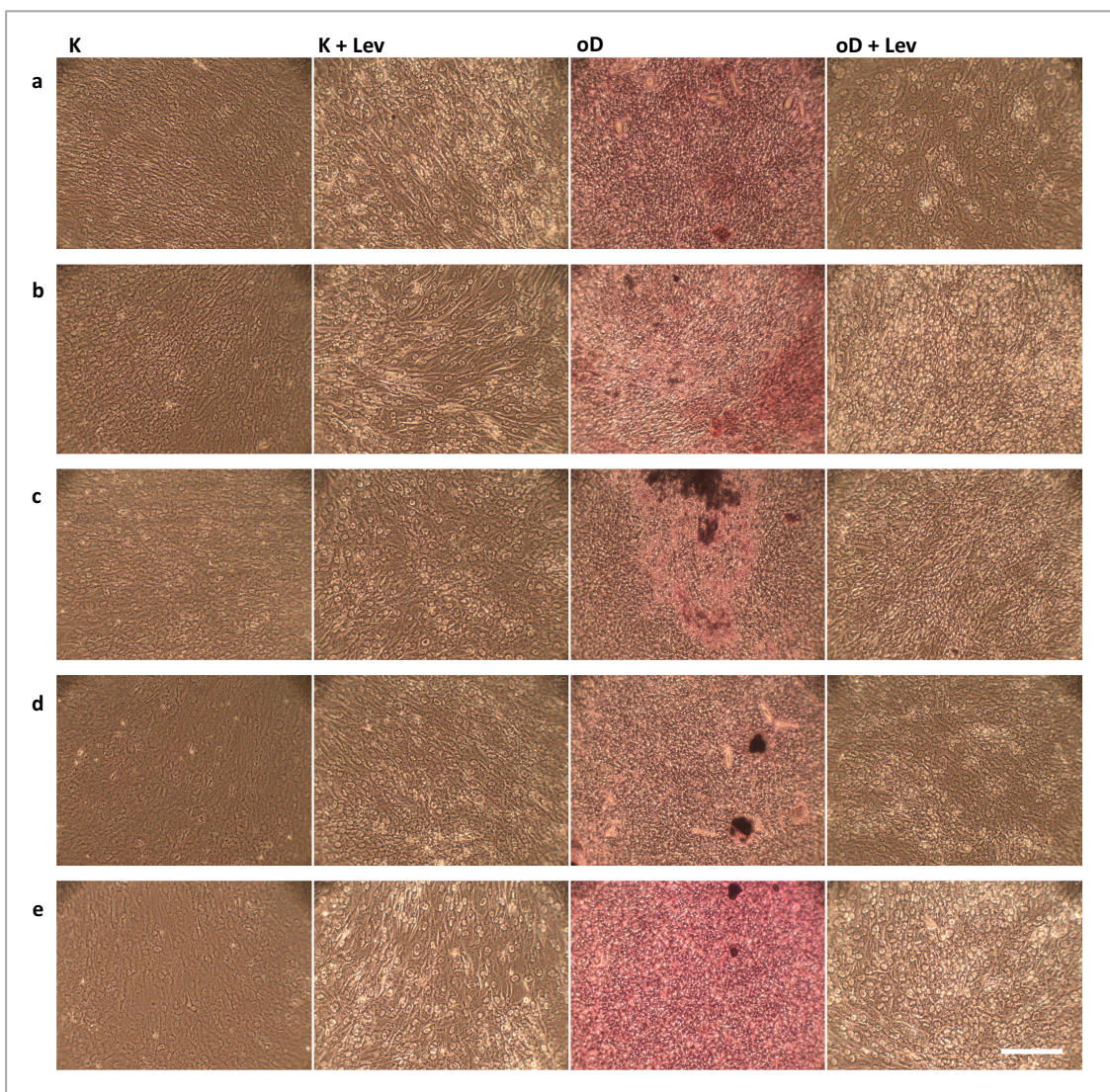


Abb. 39: Alizarinrot-Färbung: Nachweis der osteogenen Differenzierung und Darstellung des Levamisol-Effektes bei den BMSC-Proben (a-e). In dieser Übersicht sind jeweils repräsentative mikroskopische Aufnahmen der 5 Proben mit der jeweiligen Behandlung und Alizarinrot-Färbung nach 4 Wochen gezeigt (K = Kontrolle, K+Lev = Kontrolle mit Levamisol, oD = osteogene Differenzierung, oD+Lev = osteogene Differenzierung mit Levamisol). Der Maßstabsbalken zeigt eine Distanz von 250 µm.

III. Ergebnisse

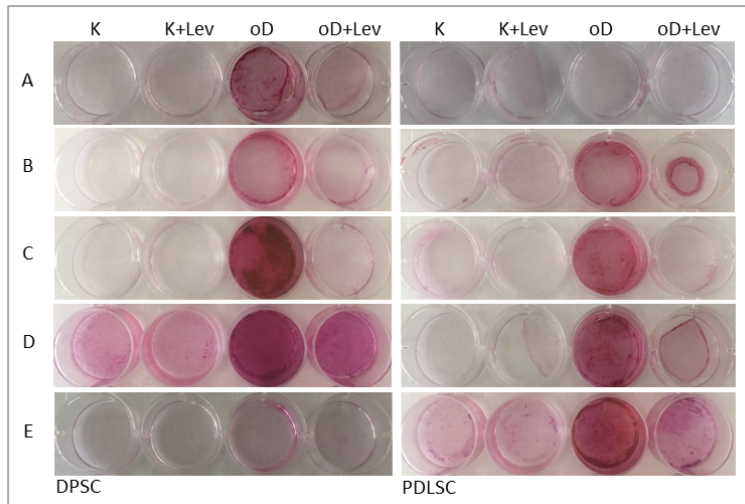


Abb. 40: Alizarinrot-Färbung der DPSCs und der entsprechenden PDLSC-Proben (jeweils Donor A-E) nach 4 Wochen osteogener Differenzierung, Übersichtsdarstellung repräsentativer Ausschnitte der 12-Well Platten. Insgesamt konnte eine deutliche Hemmung der Calcium-Mineralisierung bei oD+Lev beobachtet werden. Individuelle Unterschiede bezüglich des Mineralisierungspotenzials sind in beiden Gruppen vorhanden, zwischen den PDLSCs und DPSCs wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Die sehr geringe Färbung der PDLSC-Proben des Donors A (oben links) ist auf die vorzeitige Färbung nach 2,5 Wochen zurückzuführen. (K = Kontrolle, K+Lev = Kontrolle mit Levamisol, oD = osteogene Differenzierung, oD+Lev = osteogene Differenzierung mit Levamisol).

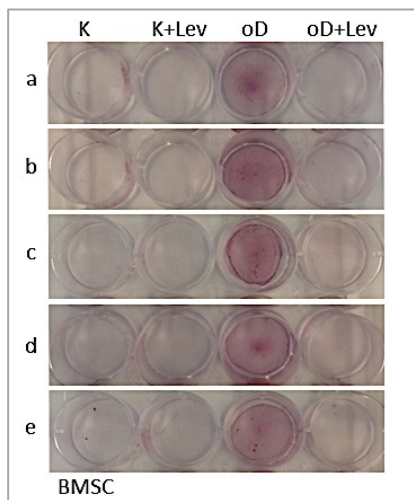


Abb. 41: Alizarinrot-Färbungen der BMSCs (Donor a-e) nach 4 Wochen unter osteogenen Differenzierungsbedingungen. Dargestellt sind Ausschnitte der 12-Well Platten als Übersicht. Die Färbung der oD ist innerhalb jeder Probe deutlich intensiver gefärbt als unter Levamisol-Stimulation. Dies ist sowohl auf dieser Übersicht als auch in den mikroskopischen Aufnahmen (Abb. 39) sehr deutlich sichtbar. Es konnten keine Unterschiede zwischen oD+Lev, K und K+Lev beobachtet werden. (K = Kontrolle, K+Lev = Kontrolle mit Levamisol, oD = osteogene Differenzierung, oD+Lev = osteogene Differenzierung mit Levamisol).

Das Levamisol schien bei der osteogenen Differenzierung von DPSCs und PDLSCs weniger starke Effekte hervorzurufen als in den BMSCs. Untereinander zeigten die DPSCs und PDLSCs keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Wirkung des Levamisols.

3.8 Analyse der RNA-Sequenzierung

TNAP-abhängige Genexpression während der osteogenen Differenzierung

Ziel dieser Analyse war es, die TNAP-abhängige Genexpression während der osteogenen Differenzierung zu untersuchen. Dabei sollten Kandidatengene aufgedeckt werden, deren Expression sich während der osteogenen Differenzierung verändert, wenn diese unter Levamisol-Stimulation stattfindet, um dadurch Aufschlüsse über Interaktionen und Vernetzungen auf molekularer Ebene zu erhalten, die für die Pathogenese der HPP relevant sein könnten.

Diese hochsensitive Methode wurde anhand der 5 PDLSC-Proben (A-E) angewandt. Von diesen wurden jeweils die Probe nach osteogener Differenzierung (oD) sowie mit Levamisol-Stimulation (1 mM, oD+Lev) ausgewählt. Bei dieser Analyse wurden 168 Gene berücksichtigt, wovon 88 hoch- und 80 herunterreguliert waren. Die Sortierung wurde auf der Basis eines p-value von $p < 0.05$ und einem log₂ fold-change von mindestens 2 von Dr. Richa Bharti (Core Unit Systemmedizin, Universität Würzburg) vorgenommen.

III. Ergebnisse

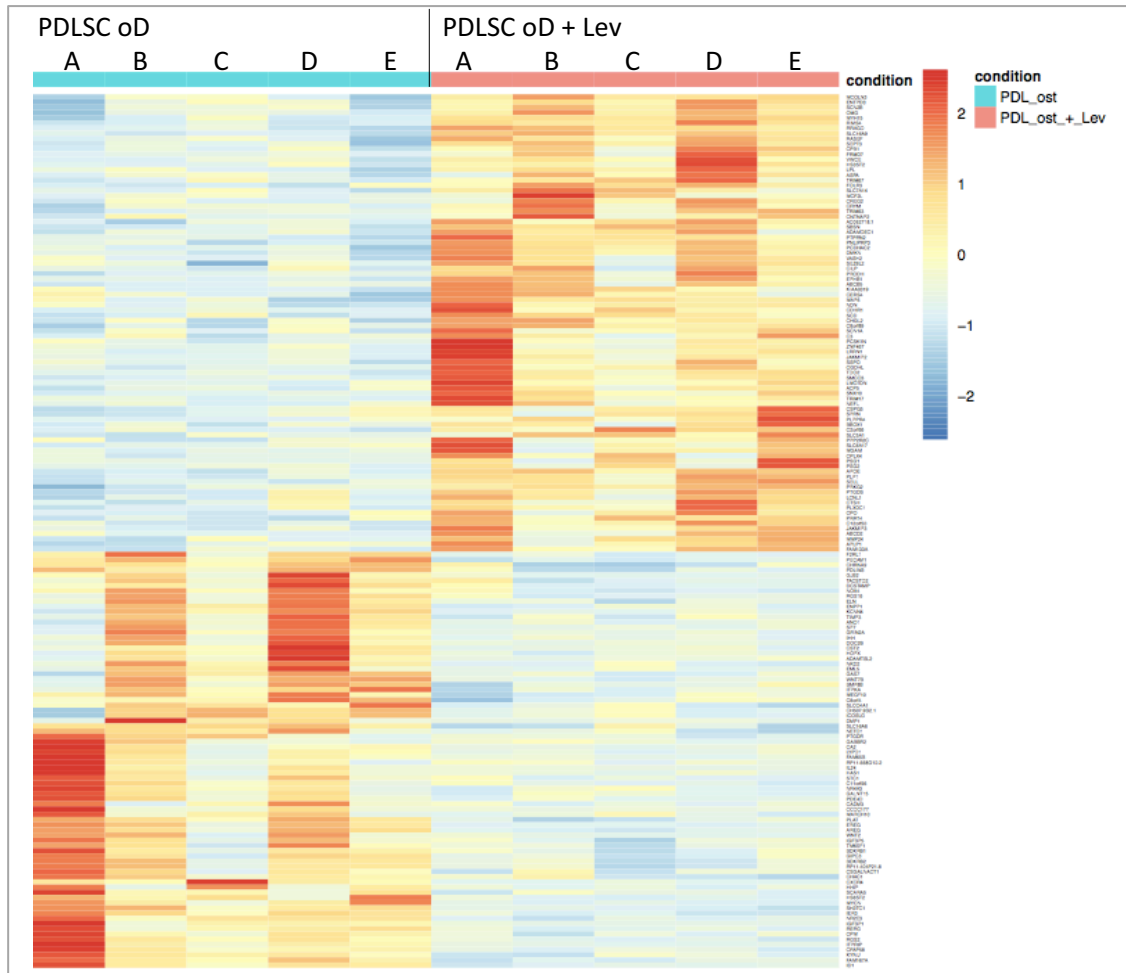


Abb. 42: Heatmap der RNA-Sequenzierung. Links sind die 5 PDLSC-Proben nach oD und rechts die 5 Proben nach oD mit Levamisol dargestellt. Die gelisteten Gene nach den zuvor genannten Kriterien sind rechts benannt, anhand der Farbkodierung kann die Herauf- (rot) bzw. Herabregulation (blau) der jeweiligen Genexpression beurteilt werden. Die Heatmap wurde von Frau Dr. Bharti von der Core Unit System Medizin der Universität Würzburg erstellt.

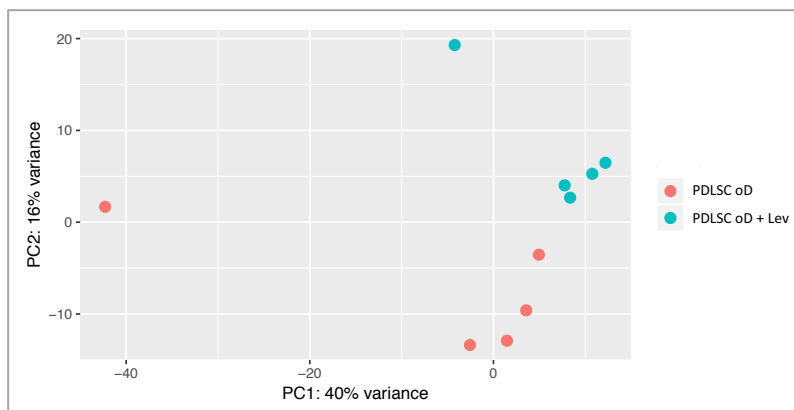


Abb. 43: Verteilungsanalyse der 10 PDLSC-Proben in der RNA-Seq. Eine deutliche Abweichung zeigte sich für die Probe A der osteogen differenzierten PDLSCs sowie der osteogen differenzierten Probe D mit Levamisol, hierfür konnte keine Begründung bezüglich der Aufbereitung, Kultivierung oder Differenzierung rekapituliert werden, ein Ausschluss dieser Proben führte zudem zu keinem bedeutenden Unterschied in der Zusammenstellung der regulierten Gene.

III. Ergebnisse

Für die biologische Validierung mit Hilfe der qPCR wurden aus der oben genannten Liste (p-value < 0.05, log2 fold change von mindestens 2) hoch- bzw. herunterregulierte Gene ausgewählt, die in Bezug auf die HPP relevant und interessant erschienen. Die qPCR-Ergebnisse der ausgewählten Gene sind in Abbildung 45 (nur PDLSCs) und 46 (zusätzlich mit entsprechenden DPSCs) dargestellt.

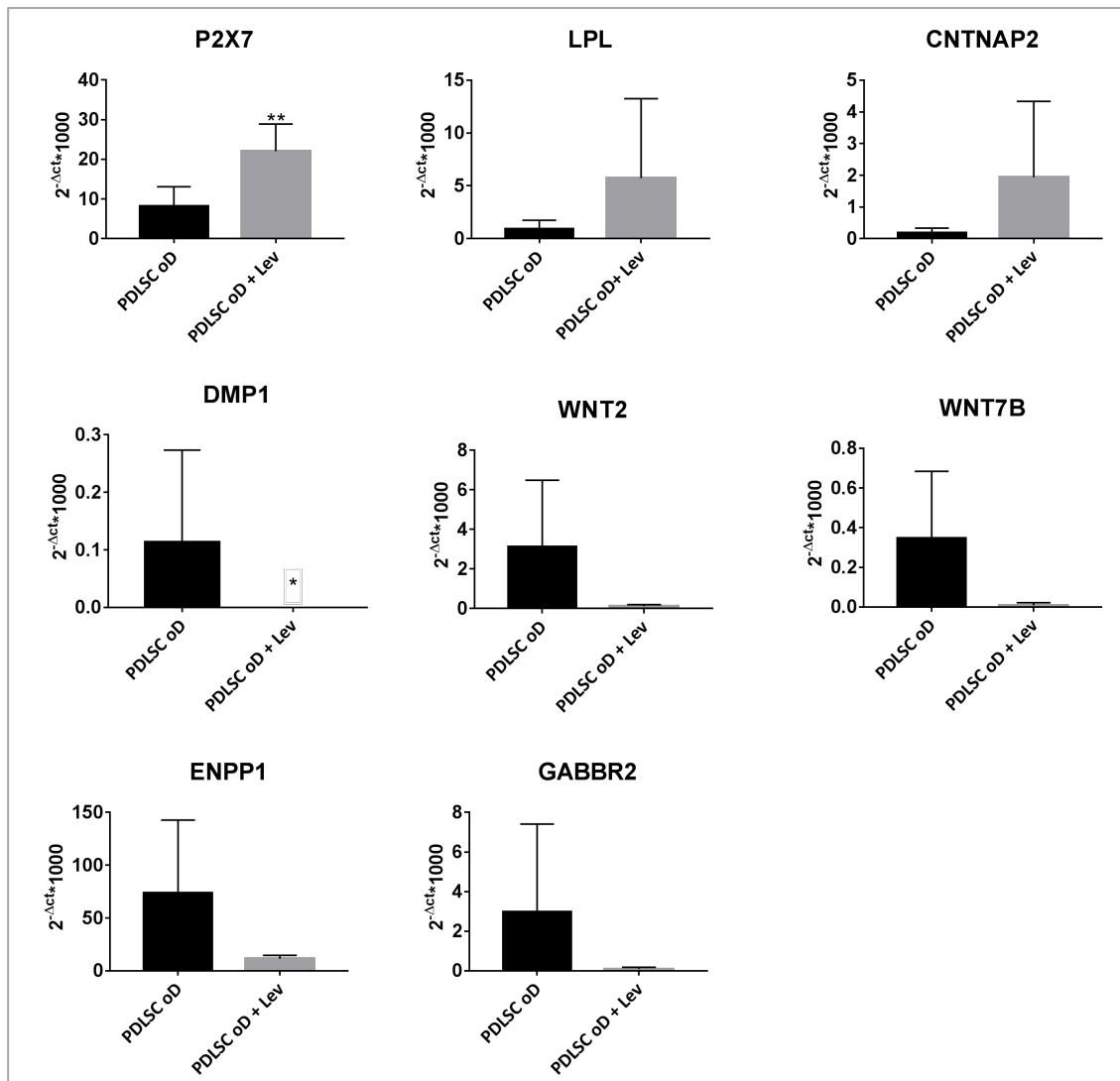


Abb. 44: Validierung der Ergebnisse aus der RNA-Sequenzierung: Differenzielle Genexpression unter Levamisol-Zusatz während der osteogenen Differenzierung. Die dargestellten Gene wurden zur biologischen Validierung mittels qPCR ausgewählt. Es konnte stets die erwartete, veränderte Expression bestätigt werden. Eine signifikant differenzielle Genexpression zeigte sich für P2X7 (**) im Sinne einer Hochregulierung durch Levamisol, sowie einer Herabregulation der DMP1-Expression (*) infolge der TNAP-Hemmung durch Levamisol. Die Statistik wurde entweder dem t-Test (Normalverteilung) oder dem two-tailed Mann-Whitney U Test (nicht normalverteilt) berechnet. Statistische Signifikanz: (*) p < 0,05; (**) p < 0,01. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

3.8.1 Hochregulierte Genexpression durch die TNAP-Inhibition während der osteogenen Differenzierung

Die Expression von P2X7 ist bei TNAP-Inhibition signifikant erhöht.

P2X7 kodiert für einen ATP-gesteuerten P2X-Purinorezeptor und ist für seine proinflammatorische Rolle insbesondere in der Inflammasom-Bildung und der Freisetzung von IL-1 β durch Zellen des Immunsystems bekannt (Giuliani et al., 2017).

Die Hemmung der TNAP scheint eine stärkere adipogene Genexpression in den PDLSCs zur Folge zu haben.

In Übereinstimmung mit den zuvor durchgeführten qPCRs (Kap. 3.5) konnten Veränderungen in der adipogenen Expression hier am Beispiel der Lipoproteinlipase (LPL) gezeigt werden. Dieser adipogene Marker wurde ebenfalls infolge der Levamisol-Stimulation während der osteogenen Differenzierung verstärkt exprimiert.

Das neuronale Zelladhäsions-Rezeptorprotein CNTNAP2 wurde unter Levamisol während der osteogenen Differenzierung ebenfalls stärker exprimiert. Contactin-associated Protein-like 2 (CNTNAP2) gehört zur Neurexin-Familie und ist ein neuronales Zelladhäsionsprotein (www.genecards.org).

3.8.2 Herabregulierte Genexpression durch die TNAP-Inhibition während der osteogenen Differenzierung

Die DMP1-Expression war nach Levamisol-Zusatz während der osteogenen Differenzierung in den PDLSCs signifikant reduziert.

Das Dentinmatrixprotein 1 (DMP1) wurde erstmals im Dentin entdeckt, woraus sich die Namensgebung ableiten lässt, und später auch im Knochen nachgewiesen (Zhao et al., 2016). Es kodiert ein nicht-kollagenes Matrixprotein und spielt im Krankheitsbild der Hypophosphatämie aufgrund einer inaktivierenden Mutation eine zentrale Rolle (Rangiani et al., 2012). Unter Berücksichtigung der entsprechenden DPSC-Proben (oD, oD+Lev) wurde eine höhere Expression in den oD DPSCs im Vergleich zu den oD PDLSCs festgestellt und eine deutlich reduzierte Genexpression infolge der Levamisol-Stimulation (Abb. 45, unten).

ENPP1 wurde infolge des Levamisol-Zusatzes während der osteogenen Differenzierung deutlich herabreguliert.

ENPP1 gehört zur Familie der Ektonukleotid Pyrophosphatasen und kodiert für ein transmembranes Glykoprotein. Dieses Protein spielt mit der Bereitstellung von PPI im purinergen Signalweg ebenfalls eine zentrale Rolle. Mutationen dieses Gens scheinen unter anderem im Zusammenhang mit Arterienverkalkungen und anderen ektopen Kalzifizierungen zu stehen (Rutsch et al., 2001).

Des Weiteren konnte bei den Proteinen **WNT7B** und **WNT2** ebenfalls eine reduzierte Expression infolge des Levamisols beobachtet werden.

Hinsichtlich der neuronalen Störungen im Zusammenhang mit TNAP-Defekten und unveröffentlichten, bereits in der Arbeitsgruppe durchgeführten Vorversuchen, wurde **GABBR2** in diese Analyse eingeschlossen. GABBR2 kodiert einen Rezeptor aus der GABA-B-Rezeptor-Familie, welche die neuronale Aktivität inhibiert und die Freisetzung von Neurotransmittern reguliert. Die Expression wurde durch Levamisol ebenfalls deutlich herabreguliert.

Analyse der RNA-Seq-Ergebnisse mit den entsprechenden DPSC-Proben (Abb. 45)

Neben den in der RNA-Seq untersuchten PDLSC-Proben wurden zusätzlich die entsprechenden Proben (oD und oD+Lev) der DPSCs im gleichen pPCR-Ansatz analysiert und in der folgenden Abbildung (Abb. 45) dargestellt. P2X7 wurde unter Levamisol verstärkt exprimiert und zeigte damit in den DPSC-Proben die gleiche Tendenz wie in den PDLSC-Proben. Die zuvor bestimmte signifikant herunterregulierte DMP1-Expression in den PDLSC-Proben war in den DPSC-Proben deutlicher. Eine signifikant höhere Expression des adipogenen Markers LPL konnte in den Proben der PDLSCs unter TNAP-Inhibition (oD+Lev) im Vergleich zu den oD DPSC-Proben beobachtet werden. WNT7B wurde in den oD DPSC-Proben signifikant höher exprimiert als in den DPSCs mit zusätzlicher Levamisol-Stimulation (oD+Lev) sowie auch signifikant höher als in den osteogen differenzierten PDLSC-Proben mit Levamisol. WNT2 zeigte in den DPSC-Proben keine differentielle Expression unter Levamisol-Behandlung. Die Expression von GABBR2 war in den osteogen differenzierten PDLSCs höher als in den DPSCs.

III. Ergebnisse

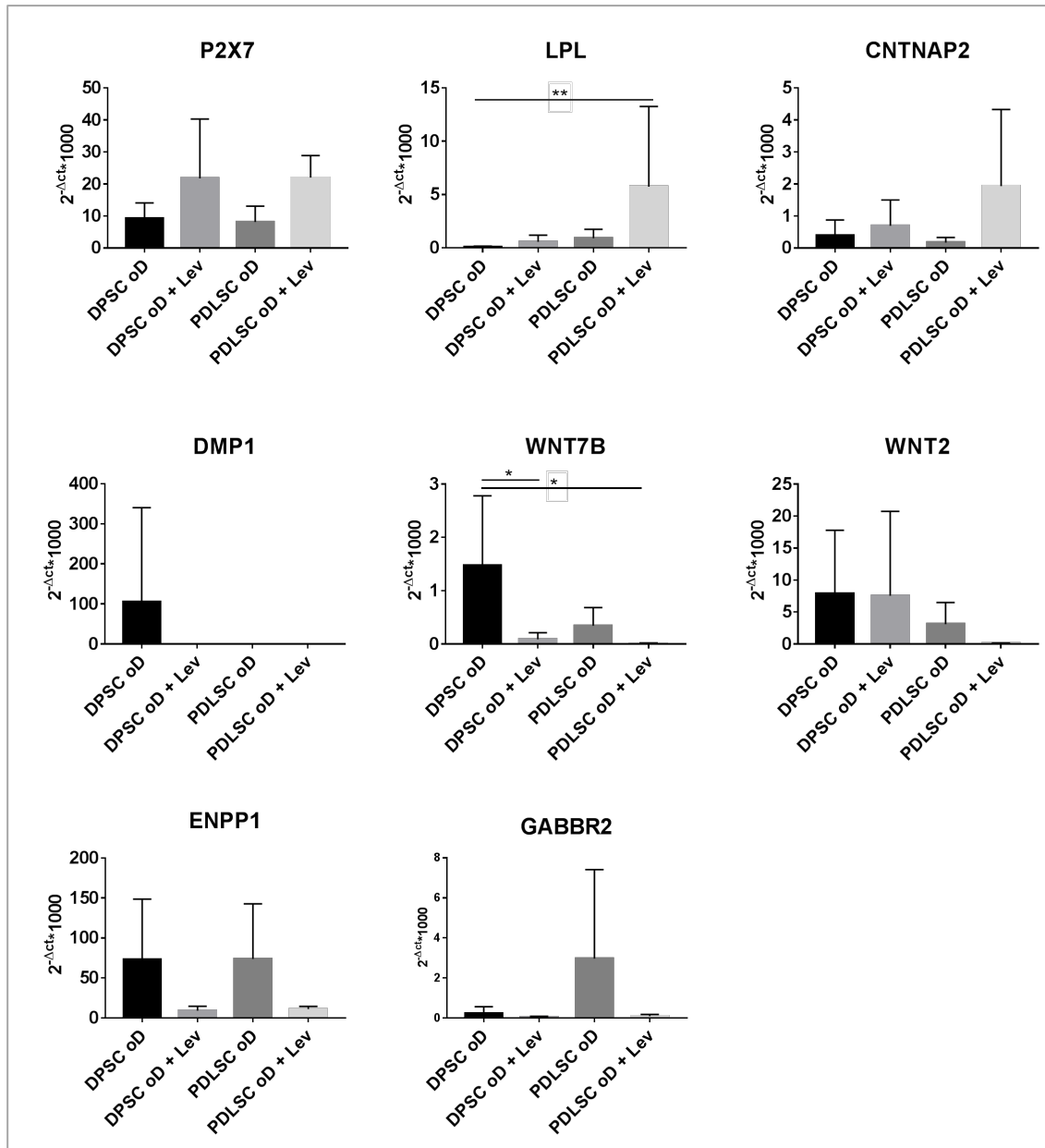


Abb. 45: Validierung der RNA-Seq Ergebnisse und Hinzunahme der DPSC-Proben: Differenzielle Genexpression unter Levamisol während der osteogenen Differenzierung. Neben den in der RNA-Seq untersuchten PDLSC-Proben (in Abb. 44) wurden zusätzlich die entsprechenden Proben (oD und oD+Lev) der DPSCs im gleichen qPCR-Ansatz analysiert. Die Gene wurden aus der zuvor genannten Liste (p-value < 0.05, log2 fold change größer als 2) zur biologischen Validierung mittels qPCR ausgewählt. Hierdurch konnte eine tatsächlich veränderte Expression bestätigt werden. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Die Statistik wurde mit dem ANOVA Test (Normalverteilung) berechnet und mit dem Tukey Posthoc-Test angewandt. Statistische Signifikanz: (*) p < 0,05; (**) p < 0,01.

4. DISKUSSION

In dieser Arbeit wurden BMSCs, DPSCs und PDLSCs insbesondere bezüglich ihrer osteogenen Differenzierung und Genexpression mit Fokus auf die TNAP in einem *in vitro* Modell der HPP analysiert. Ein solcher Vergleich zwischen MSCs aus drei unterschiedlichen Mineralisierungs-assoziierten Geweben mit dem Fokus auf die HPP wurde nach derzeitiger Kenntnis noch nicht durchgeführt. Zusätzlich scheint der direkte Vergleich humaner dentaler Stammzellen aus Pulpa und PDL aus einer gemeinsamen Donorquelle zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht die Regel zu sein und bietet diesbezüglich Vorteile im Vergleich zu bereits publizierten Untersuchungen. In einer Studie zur Untersuchung der neurotrophen Effekte verschiedener dentaler MSCs wurden DPSCs, PDLSCs und SCAPs (stem cells from the apical papilla) jeweils aus zwei Donoren isoliert und als erste dieser Art zu dieser Thematik erwähnt. Diese Studie wird im Rahmen des Ausblickes nochmals aufgegriffen (Kolar et al., 2017). Allgemeine Analysen zur Charakterisierung der unterschiedlichen dentalen MSCs im Hinblick auf deren Einsatzpotenzial zur Geweberegeneration liegen zahlreich vor, BMSCs und DPSCs wurden unter anderem von Shi und Gronthos gegenübergestellt (Shi et al., 2000; Yu et al., 2007).

Die Analyse verschiedener Oberflächenmerkmale in Verbindung mit dem Verhalten unter Kulturbedingungen ergab in dieser Arbeit eine starke Evidenz dafür, dass die isolierten Zellen aus Pulpa und PDL mesenchymale Stamm- bzw. Progenitorzellen sind und folglich in Analogie zur Literatur als DPSCs und PDLSCs deklariert werden können. Damit war die Grundlage für einen Vergleich der Ergebnisse mit der publizierten Literatur gegeben.

4.1 Charakterisierung und basale Analyse

Die initiale Charakterisierung konnte viele in der Literatur beschriebenen Ähnlichkeiten der DPSCs und PDLSCs mit den BMSCs bestätigen (Gronthos, Brahim et al. 2002) (Navabazam et al., 2013; Yamaza, 2015). Hierzu gehören die Fähigkeit zur Koloniebildung, die fibroblastenartige Morphologie, der Immunphänotyp sowie die

Fähigkeit der osteogenen und adipogenen Differenzierung. Ein systematischer, phänotypischer Vergleich von BMSCs und DPSCs bezüglich der Morphologie, MSC-Markerexpression, Wachstumscharakteristik und Multipotenz wurde zudem von Ponnaiyan et al. publiziert (Ponnaiyan and Jegadeesan, 2014).

Der Vergleich während der Kultivierung der dentalen MSCs ergab auffällige Unterschiede im Wachstumsverhalten und in der Proliferationsgeschwindigkeit zwischen den DPSCs und PDLSCs. Die deutlich höhere Proliferationsrate der DPSCs im Vergleich zu den BMSCs wurde bereits vielfach nachgewiesen (Gronthos et al., 2000) (Ponnaiyan and Jegadeesan, 2014). Eine Studie von Alge et al. war zum damaligen Zeitpunkt die erste, in welcher DPSCs und BMSCs aus einer gemeinsamen Donorquelle (einer Maus, zur vereinfachten Realisierung der Stammzellgewinnung) verglichen wurden (Alge et al., 2010). Alge et al. stellten in dieser vergleichenden Studie die Vermutung über einen höheren Anteil an primitiveren bzw. undifferenzierteren, MSC-ähnlichen Zellen innerhalb der Pulpa auf. Diese Vermutung basierte auf der Beobachtung der signifikant schnelleren Proliferationsrate der DPSCs im Vergleich zu den BMSCs: Die DPSCs waren beinahe zeitgleich konfluent wie die BMSCs, trotz der enormen Unterschiede in der isolierten Zellzahl aus einem Zahn ($0.5-1 \times 10^6$ Zellen/Zahn) bzw. einem Femur (100×10^6 mononukleäre Zellen/Knochen). Hierzu ist nun die eigene Beobachtung einer deutlich schnelleren Proliferation der PDLSCs im Vergleich zu den DPSCs aus derselben Donorquelle hinzuzufügen und erweitert diese Vergleichsreihe. Dieses rasante Wachstum der PDLSCs wurde ebenfalls in der Arbeit von Trivanovic et al. 2015 beschrieben (Trivanovic, Jaukovic et al. 2015).

Abgesehen von der unterschiedlichen Wachstumsdynamik wurden in der basalen Analyse keine signifikanten Unterschiede zwischen DPSCs und PDLSCs festgestellt. Die basale AP-Aktivität sowohl der dentalen Stammzellen als auch der BMSCs war extrem gering und spendervariabel.

DPSCs und PDLSCs exprimieren die typischen MSC-Marker in vergleichbar hoher Rate wie die BMSCs (über 95 % für positive, unter 2 % für negative Marker).

Die Charakterisierung der dentalen Stammzellen und der Nachweis der MSC-Eigenschaften gehen unter anderem auf mehrere Studien von Gronthos et al. zurück. In

einem aktuellen Versuch einer Standardisierung der Kriterien für die spezifischere Definition von PDLSCs wird von Gronthos et al. jedoch nun ein noch kritischerer Umgang gefordert. Die Oberflächenmarker-Expression beispielsweise soll nur einen schwachen Beweis einer Stammzellefähigkeit („stemness“) darstellen, da diese auch von nicht-multipotenten kultivierten Fibroblasten exprimiert werden können (Bartold and Gronthos, 2017). Auch Hynes et al. betonen in diesem Zusammenhang die Erfüllung aller drei Minimalkriterien (Hynes et al., 2012). Die Ergebnisse aus der vergleichenden FACS-Analyse dieser Arbeit stehen in Übereinstimmung mit den in der Literatur beschriebenen Expressionsprofilen der Oberflächenmarker dieser Zellen (Karbanova, Soukup et al. 2011, Tatullo, Marrelli et al. 2015).

Die differentielle Expression von CD146 unterstreicht die perivaskulären Charakteristika der PDLSCs: Der Perizytenmarker CD146 wird tendenziell stärker von PDLSCs als von DPSCs exprimiert.

CD146, auch als MCAM oder MUC18 bekannt, ist ein typischer Perizytenmarker und wird beispielsweise auf Gefäßendothelien und glatten Muskelzellen aber auch auf Subpopulationen aktivierter T-Zellen gefunden. Des Weiteren wird er auch zu der Reihe von MSC-Markern gezählt, da CD146 im Expressionsprofil von MSCs verschiedener Gewebe nachgewiesen und für deren Isolation verwendet werden konnte.

Die in der FACS-Analyse beobachtete spendervariable, differentielle Expression des Perizytenmarkers CD146 auf PDLSCs und DPSCs scheint ein interessanter Aspekt dieser Zellen zu sein. Die allgemein sehr hohe Expression wird auf die perivaskuläre Nische der MSCs zurückgeführt und begründet in diesem Sinne die Theorie einer Abstammung der MSCs von den Perizyten des jeweiligen Gewebes. Des Weiteren besteht in diesem Zusammenhang auch die Hypothese, dass Perizyten letztendlich MSCs sind (Crisan et al., 2008; Sacchetti et al., 2007) (Bara et al., 2014).

Neben der höheren prozentualen Anzahl an CD146-positiven Zellen in den PDLSCs, war zudem die Intensität der positiven PDLSCs deutlich höher als in den positiven DPSCs. Diese Beobachtung einer höheren CD146-Expression bei 3 von 4 PDLSC-Proben im Vergleich zu den DPSCs (im Probenpaar 1 und 2 sehr deutlich, im 3. kein Unterschied und im 4. weniger deutlich) erscheint insbesondere aufgrund der Tatsache relevant zu

sein, dass die Probenpaare aus derselben Donorquelle stammen und unter exakt denselben Kulturbedingungen untersucht wurden. Denn häufig werden immunphänotypische Ergebnisse unter verschiedenen Kulturbedingungen ohne ein standardisiertes Protokoll erhoben und anschließend in der Literatur untereinander verglichen, wie von Bara et al. kritisch kommentiert wurde (Bara et al., 2014). Vergleichende Analysen der CD146-Expression zwischen PDLSCs und DPSCs sind nach derzeitigem Stand und Kenntnis nicht in vergleichbar detaillierter Form veröffentlicht. In einer Studie mit Fokus auf das neuroprotektive Einsatzpotenzial dentaler MSCs wurden die Expressionsprofile von zwei dentalen Probenpaaren aus demselben Donor verglichen (Kolar et al., 2017). Es liegen lediglich allgemeine Nachweise vor, beispielsweise einer positiven CD146-Expression von PDLSCs (Iwasaki et al., 2013), sowie ein Vergleich der Expression auf BMSCs und DPSCs (Shi and Gronthos, 2003). Eine perivaskuläre Nische der MSCs wird in der Literatur von vielen Autoren postuliert (Bluteau et al., 2008; Iwasaki et al., 2013; Shi and Gronthos, 2003). Diese Theorie basiert auf dem regelmäßigen Nachweis der Oberflächenmarker N2G, STRO1 sowie CD146, welche als Perizytenmarker bekannt sind (Bara et al., 2014). Komaki et al. führten hierzu ausführliche Untersuchungen mit PDLSCs durch. Sie sprachen PDLSCs, neben ihrer spezifischen Eigenschaft Zement-/PDL-ähnliche Strukturen nach *in vivo* Transplantationen zu bilden, auch Perizyten-ähnliche Charakteristika zu. Dies wurde mit der Expression sowohl typischer MSC- als auch der Perizytenmarker N2G, CD140b und CD146 begründet (Iwasaki, Komaki et al. 2013).

In einer Studie von Alipour et al. wurde die CD146-Expression von dentalen Stammzellen (SHEDs) mit der von Stammzellen des Fettgewebes verglichen (adipose-derived stem cells, ADSCs) (Alipour et al., 2010). Hierbei wurde die Expression von CD146 in den SHEDs nachgewiesen, jedoch nicht in den ADSCs. Dies wurde von den Autoren durch die große Heterogenität von MSCs im Allgemeinen erklärt. Die CD146-Expression wurde auch von Karbanova et al. an undifferenzierten DPSCs mit Fokus auf zwei unterschiedliche Kultivierungs-Zeitpunkte (Passage 5-10 und 15-20) untersucht. Die Intensität der Expression wurde als sehr variabel beschrieben, und die Rate an positiven Zellen war wie in der vorliegenden Arbeit Donor-abhängig (Kurbanova et al., 2011).

4.2 Differenzierungspotenzial der dentalen MSCs

Zur Charakterisierung von MSCs aus unterschiedlichen Geweben wurde das experimentell bestimmbare *in vitro* Differenzierungspotential untersucht. Wie bereits einleitend thematisiert, ist die Differenzierungskapazität der MSCs ein kontrovers diskutierter Aspekt. Robey betonte die Gewebe-spezifische Differenzierungsfähigkeit, die neben der Keimblattabstammung unter anderem von dem vorherrschenden, spezifischen Mikromilieu bestimmt wird (Kan et al., 2017). Hieraus lässt sich beispielsweise auch das neurogene Differenzierungspotenzial der DPSCs - in dieser Arbeit anhand der NES-Expression untersucht - ableiten. Das multipotente Differenzierungspotenzial der BMSCs bezüglich der *mesodermalen* Abstammungslinie ist in der Literatur vielfach bestätigt worden (Caplan, 1991; Gronthos et al., 2000). Diese Kapazität wurde in einigen Studien auch für DPSCs und PDLSCs sowohl *in vitro* als auch *in vivo* analysiert und weitestgehend bestätigt (Alge et al., 2010; Karbanova et al., 2011; Ponnaiyan and Jegadeesan, 2014).

Das Differenzierungspotenzial der dentalen MSCs ist im Vergleich zu den BMSCs unterschiedlich ausgeprägt. DPSCs und PDLSCs zeigen eine stärkere osteogene als adipogene Differenzierungsfähigkeit.

In dieser Arbeit konnte die Fähigkeit der osteogenen und adipogenen Differenzierung dentaler Stammzellen durch den Nachweis der jeweils typischen Differenzierungsmarker sowie durch spezifische Färbungen bestätigt werden. Hierbei fiel eine sehr gute osteogene Differenzierungsfähigkeit der DPSCs und PDLSCs im Gegensatz zu deren adipogenem Differenzierungspotenzial auf, welches insbesondere im Vergleich zu den BMSCs sehr schwach ausgeprägt erschien. Diese Beobachtung wird durch Angaben in der Literatur gestützt (Ponnaiyan and Jegadeesan 2014) (Otabe et al., 2012). Die allgemeine und vielfach beschriebene multipotente Differenzierungskapazität von MSCs bezieht sich meist lediglich auf das vorhandene Potenzial und schließt die tatsächliche Ausprägung dieser Fähigkeit jedoch nicht mit ein. Die adipogene Differenzierung konnte in dieser Arbeit zwar auf Genebene unter adipogenen Differenzierungsbedingungen anhand der Marker FABP4, LPL und PPRG2 als deutlich ausgeprägt nachvollzogen werden, zeigte jedoch *funktionell*, aus der spärlichen

Färbung der tatsächlich gebildeten Lipidvesikel ableitbar, keine ausgeprägte terminale adipogene Maturation. Diese Diskrepanz zwischen der Markerexpression auf RNA-Ebene und der funktionalen Endpunktanalyse ist nicht eindeutig erklärbar und lässt Vermutungen über unterschiedliche Subpopulationen zu. Möglicherweise reichen nur wenige Stammzellen aus, die tatsächlich in der Lage sind adipogen zu differenzieren, um in der qPCR-Analyse bereits eine deutliche Erhöhung der spezifischen Markergen-Expression zu bewirken. Aus diesen Beobachtungen geht hervor, dass sowohl die Analyse der Genexpression als auch die Analyse der Funktionalität reifer Zellen für eine Gesamtbeurteilung notwendig ist. Untereinander wiesen die beiden dentalen Stammzellarten keine signifikanten Unterschiede auf, allenfalls konnte ein tendenziell besseres adipogenes Differenzierungspotenzial der PDLSCs anhand der Ölrot-O-Färbungen angenommen werden, welches sich in der deutlicheren Genexpression der adipogenen Marker in den qPCRs (LPL, PPARG2, FAPB4) widerspiegelte.

Eine Limitation der Multipotenzanalyse in dieser Arbeit stellt die nicht durchgeführte chondrogene Differenzierung dar. Diese war zuvor mit BMSCs nach etablierter Methode bewiesen worden. Für die dentalen MSCs wurde die chondrogene Differenzierung nicht untersucht, da dieses Potenzial im Kieferbereich keine physiologische Rolle spielt. Die chondrogene Differenzierung dentaler MSCs war bereits in einigen Studien nachgewiesen worden (Karbanova et al., 2011).

Musina et al. untersuchten das Differenzierungspotenzial von MSCs unterschiedlichen Ursprungs und kamen zu dem Ergebnis, dass sich das Differenzierungspotenzial möglicherweise aufgrund der bereits vorliegenden Vorläuferzellen unterscheiden kann (Musina et al., 2006). Die Vermutung der Festlegung auf eine Differenzierungsrichtung wird auch von Bluteau et al. in Bezug auf die hier untersuchten MSCs geteilt. Auch die Beobachtung eines geringeren odontogenen Differenzierungspotenzials der BMSCs im Vergleich zu den DPSCs belegt diese Vermutung (Yu et al., 2007).

Die differentielle Expression des neurogenen Markers Nestin blieb während der Differenzierung der BMSCs, DPSCs und PDLSCs bestehen

Im Hinblick auf das neurogene Differenzierungspotenzial von MSCs werden

unterschiedliche Meinungen vertreten. Die neurogene Differenzierungskapazität würde bei den BMSCs ein Keimblattgrenzen-überschreitendes Potenzial bedeuten (Graser, 2015), wohingegen die neurogene Differenzierung der neuroektodermalen DPSCs nachvollziehbar ist und deren Ursprung aus der Neuralleiste vielfach als Erklärung dieses Potenzials dient (Arthur et al., 2008; Chai et al., 2000; Karbanova et al., 2011; Ulmer, 2010). Diese Eigenschaft betont die Keimblattabstammung der unterschiedlichen MSCs als wichtiges Kriterium für die Differenzierungskapazität, die von der jeweiligen Abstammungslinie abhängt und gewebespezifisch ist. Auch könnte man die persistierende Expression von Nestin als eine Art „positional memory“ bezeichnen, wie es z.B. im Zusammenhang mit der Expression unterschiedlicher HOX-Gene vielfach diskutiert wurde (Sagi et al., 2012) (Wang, Helms, et al., 2009) (McCusker and Gardiner, 2014). In der Arbeitsgruppe wurde ein solches positionelles Gedächtnis auch beim Vergleich Pankreas-assoziiierter MSCs mit BMSCs beschrieben (Limbert et al., 2010). Inwiefern das positionelle Gedächtnis von Relevanz ist für die Organ-übergreifenden Mechanismen der Geweberegeneration beim Tissue Engineering, muss noch weiter untersucht werden.

Das Expressionsmuster von Nestin mit dem deutlichsten Nachweis in den DPSCs in der basalen Analyse blieb auch in den differenzierten Proben erhalten. Die Beobachtung einer reduzierten NES-Expression infolge der TNAP-Hemmung in den DPSCs stellt im Zusammenhang mit neuronalen Störungen bei der HPP ein interessantes Merkmal dar.

Die PDLSCs mit ihrer zahn- und knochennahen, intermediären Lage scheinen eine Zwischenstellung zwischen den DPSCs und den BMSCs einzunehmen. Dies gründet sich auf der Genexpression mit einem tendenziell stärkeren adipogenen Differenzierungspotenzial im Vergleich zu den DPSCs (qPCRs und Ölrot-O-Färbung), sowie der geringeren NES-Expression.

Die deutlichere Expression des Pluripotenzgens SOX2 der basalen dentalen MSCs im Vergleich zu den BMSCs legt ein breiteres Differenzierungspotenzial nahe.

Die in der basalen Charakterisierung beobachtete stärkere Expression des Pluripotenzgens SOX2 könnte in diesem Zusammenhang die Fähigkeit zur breiteren

Differenzierung innerhalb der *neuroektrodermalen* als auch der hier untersuchten *mesodermalen* Abstammungslinie (osteogen, adipogen) verdeutlichen.

Interessant erscheint hier die Beobachtung der höchsten SOX2-Expression des DPSC-/PDLSC-Probenpaares (A) bei dem jüngsten Donor (13,5 Jahre). Dies weist auf eine mögliche Korrelation zwischen Patientenalter und die Differenzierungsfähigkeit dieser Stammzellen hin. Weiterhin wurde beobachtet, dass die Probe A der DPSCs und PDLSCs sich in einigen Untersuchungen von allen anderen Proben unterschied und auch in der Analyse der RNA-Sequenzierung auffällig war.

4.3 Analyse der TNAP-Expression und Enzym-Aktivität

Der Fokus dieser Arbeit lag auf der TNAP, deren Genexpression und Enzym-Aktivität basal und nach osteogener Differenzierung analysiert wurde. In Bezug auf die HPP wurde die Hemmung der TNAP mit Levamisol an einem *in vitro* HPP-Modell untersucht. Dabei bestätigten sich die Unterschiede bezüglich der individuellen AP-Expression, die auch von Alge et al mit einer bis zu 40-fachen Varianz der AP-Aktivität beschrieben wurde (Alge et al., 2010).

Die TNAP zeigte kein regelhaftes Expressionsmuster in den untersuchten MSCs

Die vielfach beschriebene, signifikant erhöhte AP-Aktivität der DPSC im Vergleich zu den BMSCs nach osteogener Differenzierung sollte auf RNA-Ebene nachvollzogen und zusätzlich die Ergebnisse der PDLSCs in den Vergleich miteinbezogen werden. Die enormen individuellen Unterschiede zwischen den Proben führten sowohl in der basalen Genexpressionsanalyse also auch nach osteogener Differenzierung zu keinem eindeutigen Expressionsmuster und konnten die Literaturangaben nicht bestätigen.

Die TNAP-Expression wird entgegen der Erwartung durch Levamisol während der osteogenen Differenzierung nicht reduziert.

Tatsächlich war in den osteogen differenzierten Proben mit Levamisol tendenziell eine höhere Expression möglicherweise im Sinne einer Gegenregulation auf die Enzyminhibition während der Differenzierung zu beobachten. In allen Kontrollen hingegen bewirkte die Inhibition mit Levamisol die erwartete reduzierte TNAP-

Expression. Entgegen dieser Beobachtung beschrieb Orimo eine unterdrückte mRNA-Expression der TNAP und reduzierte Mineralisierung infolge einer Hemmung der Enzym-Aktivität *in vitro* (Orimo, 2010). In der eigenen Arbeit konnte dies nur bezüglich der Calcium-Mineralisierung in der Alizarinrot-Färbung nachvollzogen werden.

Die Expression von RUNX2 zeigte in der qPCR ein ebenso unspezifisches Muster, das sehr ähnlich zu dem der TNAP war (Abb. 25, 26). Die TNAP-Hemmung durch Levamisol führte bei RUNX2 jedoch im Gegensatz zur TNAP zu einer reduzierten Expression. Dies bestätigt die TNAP-abhängige mRNA-Expression von RUNX2, welche von Nam et al. in *Alpl*^{-/-} Mäusen ebenfalls beobachtet werden konnte (Nam et al., 2017).

In einer Studie von Hotton et al. wurden interessante Charakteristiken beim Vergleich der Biomineralisierung von Knochen, Schmelz und Dentin bezüglich der TNAP dargestellt: Die TNAP-Expression ist demnach in diesen Geweben nicht nur in Matrix produzierenden Zellen sondern auch sehr stark in sogenannten Satelliten-Zellen exprimiert, wie Osteoprogenitor-Zellen, supra-ameloblastische und subodontoblastischen Zellen, welche in Kontakt mit diesen stehen. Spezifisch für die dentale TNAP im Vergleich zum Knochen-Typ war eine deutliche Überexpression während der Vollendung der Biomineralisierung (Hotton et al., 1999).

Eine weitere auffällige Beobachtung war zudem, dass die TNAP-Expression in den DPSCs während der adipogenen Differenzierung sowohl innerhalb der Stammzellgruppe als auch insgesamt die höchste Expression aufwies. Diese Beobachtung konnte allerdings in Übereinstimmung mit den Ergebnissen einer Studie von Hernandez-Mosqueira et al. gebracht werden. Hierbei wurde ebenfalls eine hohe TNAP-(bzw. ALPL-) Expression in einer späten Phase der Adipogenese, während der terminalen Differenzierung, beobachtet (Hernandez-Mosqueira et al., 2015).

Die Enzym-Aktivität scheint zwischen den BMSCs und dentalen Stammzellen unterschiedlichen, zeitlichen Schwankungen zu erliegen.

Bei der Bestimmung der basalen AP-Aktivität wurden in allen drei MSCs überwiegend extrem geringe Werte gemessen. Die geringen Unterschiede zwischen den MSCs sind vermutlich vernachlässigbar, da sie sich hauptsächlich im Bereich des Hintergrundsignals bewegten. Auf den Zusammenhang zwischen der AP-Aktivität und

der Zelldichte wurde in einer Studie von Tomlinson et al. hingewiesen (Tomlinson et al., 2015). Dies scheint ein relevanter Faktor zu sein, da die Ernte der basalen Proben keinem festgelegten Zeitpunkt unterlag und auch durch die unterschiedliche Proliferationsgeschwindigkeit der Zellen bedingt war. Die Enzymhemmung durch Levamisol in den basalen Proben zeigte, wie auch in der Alizarinrot-Färbung, einen deutlicheren Effekt in den BMSCs als in den dentalen Proben.

Die TNAP wird typischerweise im Rahmen der osteogenen Differenzierung verstärkt exprimiert und gilt als ein recht früher osteogener Marker. Sie zerlegt durch Hydrolyse des PPI einen Hemmstoff der Mineralisierung und ermöglicht mit der Bereitstellung von Pi die Hydroxylapatit-Bildung. Ein Anstieg der AP-Aktivität als Phänomen und Folge der osteogenen Differenzierung wurde demnach erwartet.

Die differenzierten Proben der BMSCs zeigten in den überwiegenden Fällen (Ausnahme BMSC Probe b) diesen plausiblen Anstieg der AP-Aktivität unter osteogener Differenzierung im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. Im Vergleich hierzu war die beinahe nicht vorhandene Steigerung der Enzymaktivität während der osteogenen Differenzierung der DPSCs und PDLSCs nicht erwartungsgemäß. Dies wurde in der Darstellung der Mittelwerte zwischen den Kontrollen und den osteogen differenzierten Proben sehr deutlich (Abb. 30). Aufgrund dieser unerwartet niedrigen AP-Aktivitätswerte der dentalen Proben, welchen in der Literatur allgemein eine sehr hohe AP-Aktivität zugeschrieben wird, kann angenommen werden, dass die AP-Aktivität dieser Proben entweder zuvor höher lag oder ein Anstieg noch bevorstand. Diese Ergebnisse legen somit die Vermutung nahe, dass die AP-Aktivität in den BMSCs und dentalen Stammzellen einer zeitlich unterschiedlichen Schwankung unterliegen. Die tatsächlichen Schwankungen der AP-Aktivität konnten durch den gemeinsamen, festgelegten Zeitpunkt der AP-Aktivitäts-Messung von zwei Wochen nach Beginn der osteogenen Differenzierung nicht nachvollzogen werden. Die Annahme eines noch bevorstehenden AP-Aktivitätsanstiegs der DPSCs und PDLSCs bei einer Messung nach 2 Wochen, würde in Übereinstimmung mit den Beobachtungen von Alge et al. stehen, welche eine signifikant höhere AP-Aktivität der DPSCs im Vergleich mit den „BMMSCs“ nach 3 Wochen in osteogenem Medium messen konnten (Alge, Zhou et al. 2010). Auch

die deutlich intensivere Alizarinrot-Färbung sowohl der DPSCs als auch der PDLSCs im Vergleich zur schwächeren Färbung der BMSCs nach 4 Wochen osteogener Differenzierung spricht für diese Theorie. Jedoch ist darauf hinzuweisen, dass die AP-Aktivität zeitlich nicht immer zwingend mit dem Prozess der Mineralisierung korreliert. Für einen bereits stattgefundenen, nicht erfassten AP-Peak der DPSCs und PDLSCs andererseits sprechen starke Argumente. Die TNAP in dentalen Zellen wurde insbesondere während der initialen Mineralisierungsprozesse sowie in der abschließenden Phase der Biomineralisierung nachgewiesen (Karbanova et al., 2011). Auch Hotton et al. berichteten, dass die Initiierung der Biomineralisierung und sequentielle Schmelz- und Dentinforma-tion unter anderem mit einer Hochregulierung der AP-mRNA, des Proteins sowie der Aktivität verbunden ist. Auch wurde in diesem Zusammenhang eine reduzierte AP-Expression nach erfolgter Knochenmineralisierung *in vitro* im Vergleich zur Situation während der Osteoblasten-Proliferation und -Differenzierung beschrieben (Hotton et al., 1999). Des Weiteren ist diese Vermutung darin begründet, dass die AP während der terminalen Osteoblasten-Differenzierung sowie der initialen Biomineralisierung *in vitro* intensiviert exprimiert wird, und nach Abschluss der Mineralisierung wieder absinkt.

Aus der Beobachtung einer höheren AP-Aktivität (nach zwei Wochen) in den Kontrollen der DPSCs und PDLSCs im Vergleich zu den BMSCs könnte zudem eine unterschiedliche Ausgangssituation der Differenzierungsfähigkeit abgeleitet werden. Hierbei stellt sich die Frage nach einer potenziellen Vordifferenzierung im Sinne eines „Precommitments“ der dentalen Stammzellen und weiterhin, ob diese potenzielle Vordifferenzierung bei gleichzeitiger Expression der typischen MSC-Marker von knapp 100 % bestehen kann bzw. möglich ist. Diese Annahme geht auf die bereits erwähnte Studie von Musina et al. zum unterschiedlichen Differenzierungspotenzial von MSCs aus unterschiedlichen Geweben durch den Einfluss von Vorläuferzellen zurück (Musina et al., 2006). Die höhere AP-Aktivität der Kontrollproben der DPSCs und PDLSCs nach zwei Wochen (Abb. 30) könnte bedeuten, dass diese bereits in die Richtung einer *osteogenen* Differenzierung ausgerichtet sind. Auch die ausgeprägte osteogene Differenzierung mit stärkerer Calcium-Mineralisierung (Alizarinrot-Färbung) könnte hierdurch bedingt sein.

Die interessante histopathologische Untersuchung von sogenanntem Reparaturdentin, welches infolge eines Reizes mit Odontoblastenuntergang gebildet wird, zeigte tatsächlich eine knochenähnliche Struktur (Goldberg, 2011). Diese Form des Dentins, auch Fibro- oder Osteodentin genannt, wird von Odontoblasten-ähnlichen Zellen gebildet, welche innerhalb der Pulpa als mesenchymale Progenitorzellen vorliegen (Dimitrova-Nakov et al., 2014).

Ein weiterer Aspekt im Vergleich der AP-Aktivität war die differentielle Auswirkung der Levamisol-Zugabe. Wie bereits in der Genexpression beobachtet, wurde während der osteogenen Differenzierung unter Enzyminhibition durch die Levamisol-Stimulation tatsächlich eine Gegensteuerung im Sinne einer erhöhten AP-Aktivität beobachtet. Dies könnte auf die Messung nicht nur der extrazellulären AP sondern auch der intrazellulären AP (durch erhöhte Genexpression vermehrt prozessiert) zurückgeführt werden, welche durch die Proteinaufbereitung der Zelllysate möglicherweise mitgemessen wurde. Dieser Effekt wäre durch eine zusätzliche Levamisol-Zugabe während des Assays speziell auf die TNAP-Inhibition durch Levamisol zurückführbar.

Die großen Unterschiede zwischen den Donoren sowohl in der basalen TNAP-Analyse als auch nach osteogener Differenzierung führten zu keinem eindeutigen Ergebnis. Die vielfach beschriebene, signifikant erhöhte AP-Aktivität der DPSCs im Vergleich zu den BMSCs nach osteogener Differenzierung (Alge et al., 2010) konnte in dieser Arbeit nicht belegt werden. Oft wird in der Donor-abhängigen Variabilität die Ursache für die teilweise gegensätzlichen bzw. unerwarteten Ergebnisse gesehen, da eine genetische Heterogenität für dieses Verhalten verantwortlich gezeigt wurde (Phinney et al., 1999). Die Unterschiede zwischen den eigenen Beobachtungen und Angaben in der Literatur könnten neben der genetischen Variabilität auch aus der untersuchten Probenanzahl, deren Aufbereitung, Kultivierung oder einem unterschiedlichen Zeitpunkt der Aktivitätsbestimmung resultieren.

TNAP-Inhibition durch Levamisol reduziert das Mineralisierungspotenzial der MSCs während der osteogenen Differenzierung.

In allen Proben konnte eine reduzierte Alizarinrot-Färbung unter Zusatz von Levamisol während der osteogenen Differenzierung beobachtet werden. Levamisol scheint folglich in der Lage zu sein, die Calcium-Mineralisation unter osteogenen Differenzierungsbedingungen zu blockieren bzw. eine weniger ausgeprägte Mineralisierung zu bewirken. Es konnte eine etwas deutlichere Hemmung der Calcium-Mineralisierung in den BMSC-Proben (a-e) im Vergleich zu den DPSCs (A-E) und PDLSCs (A-E) beobachtet werden, was für eine effektivere Inhibition der TNAP in BMSCs spricht.

4.4 TNAP-abhängige Genexpression

Die Untersuchung einer TNAP-abhängigen Genexpression war zentraler Bestandteil der Analysen. Der Effekt des Levamisols auf die osteogene Differenzierungsfähigkeit wurde in dieser Arbeit vielseitig untersucht: Neben der Genexpressionsanalyse, der Messung der AP-Aktivität und der Alizarinrot-Färbung konnte insbesondere die RNA-Seq Aufschluss über weitere Auswirkungen der *in vitro* Inhibition der TNAP auf transkriptionaler Ebene geben.

Welche Gründe sprachen für die Auswahl der PDLSCs für die RNA-Sequenzierung?

Die PDLSCs scheinen für die Fragestellung mit dem Fokus auf die dentalen Aspekte der HPP einen interessanten Zelltyp darzustellen, anhand dessen weitere TNAP-bezogene Erkenntnisse gewonnen werden können. Wie bereits einleitend erwähnt, steht das typische Symptom des vorzeitigen Zahnausfalls der Milchzähne mit dem besonderen Merkmal der nichtresorbierten Wurzel in direktem Zusammenhang einer Fehlentwicklung des Parodonts (Reibel, Maniere et al. 2009) (Beck et al., 2009) mit dem parodontalen Ligament (PDL) als zentralem Bestandteil. Zudem besteht der Eindruck, dass in den überwiegenden Fällen in der Literatur bisher der Fokus auf einer Charakterisierung der DPSCs lag. PDLSCs waren insbesondere im Bereich der Tissue Engineering im Hinblick auf deren Einsatz für regenerative Parodontaltherapien untersucht worden (Zhu and Liang, 2015) (Hu et al., 2017).

Eine alternative Methode zur RNA-Seq wäre die cDNA Microarray-Analyse gewesen. Weitere Genanalysen und Erkenntnisse durch den Einsatz von Microarray-Analysen wurden auch von Ponnaiyan et al. als sinnvoll erachtet, um zu bestimmen, welche Gene in BMSCs und DPSCs unterschiedlich reguliert und für deren jeweiliges osteogenes Differenzierungsverhalten charakteristisch sind (Ponnaiyan and Jegadeesan 2014). Aufgrund der Tatsache, dass eine ausführliche Microarray-Analyse zum Genexpressionsvergleich von BMSCs und DPSCs bereits 2001 durch die Arbeitsgruppe von Shi und Gronthos durchgeführt worden war (Shi, Robey et al. 2001), wurde die RNA-Sequenzierung der PDLSC-Proben vorgezogen. Zudem konnte diese modernere Methode vor Ort in der Core Unit Systemmedizin der Universität Würzburg durchgeführt werden und erlaubte eine neue Herangehensweise zur Auswertung der differentiellen Genexpression. Die Ergebnisse der RNA-Seq und qPCRs bestätigten diese Entscheidung. Hierdurch ergaben sich Zusammenhänge nicht nur im Pathomechanismus der Parodontitis bei der HPP, sondern auch weitere unerwartete Einblicke u.a. die Hochregulation der Purinrezeptors P2X7 infolge der TNAP-Inhibition.

Anhand der validierten Ergebnisse der RNA-Seq durch qPCRs konnten TNAP-abhängige, molekulare Zusammenhänge verdeutlicht und Ansatzpunkte für das nähere Verständnis der dentalen Symptome bei der HPP diskutiert werden.

Infolge einer TNAP-Inhibition während der osteogenen Differenzierung konnte *in vitro* eine möglicherweise HPP-relevante Genregulierung beobachtet werden. Mit Bezug auf die dentalen Aspekte der HPP soll insbesondere die differentielle Genexpression von DMP1 und P2X7 weiterführend diskutiert werden.

P2X7 konnte in dieser Analyse als ein wichtiges Kandidatengen identifiziert werden und stellt einen Zusammenhang mit verschiedenen Pathomechanismen her. P2X7 ist allgemein für seine entzündungsfördernde Rolle, unter anderem in der Inflammasombildung sowie der Zytokin-Freisetzung (IL-1 β), bekannt (Giuliani et al., 2017). IL-1 β scheint bei Entzündungsreaktionen auf Kalziumpyrophosphatkristalle, welche auch bei der HPP aus der Akkumulation von anorganischem PPi resultieren, eine entscheidende Rolle zu spielen (Ferrari et al., 2006; Giuliani et al., 2017).

Die Verknüpfung des purinergen Signalwegs über eATP mit dem ebenfalls hieran gekoppelten IL-1 β -Signalweg legt einen kumulativen Effekt negativer Einflüsse auf HPP-assoziierte Entzündungsreaktionen nahe. In einer Studie von Ramos-Junior et al. konnte in der Untersuchung des typischen Parodontitis-assoziierten Bakteriums *Porphyromonas gingivalis* der direkte Zusammenhang zwischen eATP, dem P2X7-Rezeptor und einer damit verstärkten IL-1 β -Prozessierung und -Freisetzung gezeigt werden (Ramos-Junior et al., 2015). Auch Binderman et al. stellten einen deutlichen Zusammenhang zwischen eATP, P2X7 und der Parodontitis her (Binderman et al., 2017). Die Einflussnahme der TNAP in Entzündungsprozesse durch Regulation des purinergen Signalwegs wird auch von Rader et al beschrieben, während die intestinale AP über Dephosphorylierung von Lipopolysaccharid (LPS signaling) hierin eingreift (Rader, 2017). In einer Studie von Spoto et al. wurde die Aktivität der AP in gesunden und entzündeten humanen Pulpen untersucht. Es konnte eine zentrale Rolle des Enzyms während der initialen Entzündungsantwort mit Bildung mineralisierten Gewebes in der Pulpa gezeigt werden (Spoto et al., 2001). Aslanta et al. stellten ebenfalls einen Zusammenhang zwischen der AP-Aktivität und dem Entzündungszustand der Pulpa dar (gesunde Pulpa, reversible und irreversible Pulpitis) und analysierten diese zudem bezüglich des Patientenalters (Aslantas et al., 2016). Die erhöhte AP-Aktivität im Rahmen von Entzündungsreaktionen und der initialen Phase der Mineralisierung sowie die verstärkte Expression von P2X7 nach Inhibition der TNAP scheint ein interessanter Aspekt der Entzündungsreaktionen bezüglich der Parodontitis und der HPP zu sein.

Die hochregulierte P2X7-Expression infolge der TNAP-Hemmung wäre zudem eine rationale Begründung für den Einsatz von P2X7-Antagonisten bei Erkrankungen, deren Symptomatik auch im Krankheitsbild der HPP vertreten ist. Hierzu gehören unter anderem Osteoporose, rheumatische Erkrankungen und Depression (Burnstock, 2017). Sebastian-Serrano et al. konnten in ihrem Mausmodell der infantilen HPP eine Verbindung zwischen Veränderungen der neuronalen Entwicklung und dem purinergen Signalweg herstellen (Sebastian-Serrano et al., 2016). Ein Zusammenhang zwischen den neurologischen Symptomen bei der HPP und P2X7 wurde auch in der Dissertation von Frau Dr. Graser verfolgt (Graser, 2015). P2X7 ist als wichtiger Faktor für das

Fortsatzwachstum von Neuronen bekannt (Diez-Zaera et al., 2011). Eine Vertiefung der Analysen von P2X7 erscheint bezüglich der allgemein hohen Entzündungsbereitschaft sowie der neurologischen Symptomatik bei der HPP ausgehend von diesen Ergebnissen vielversprechend.

Die Expression von GABBR2, ein inhibitorischer neuronaler Rezeptor, war in diesem Modell ebenfalls TNAP-abhängig und unter Levamisol-Zusatz geringer. Dies kann in Einklang mit Beobachtungen neurologischer Störungen bei der HPP gebracht werden. Der PLP-abhängige, reduzierte Spiegel des inhibitorischen Neurotransmitters GABA steht im Zusammenhang mit einem defekten TNAP-Gen (Cruz et al., 2017). In einem TNAP-KO Mausmodell wurden Krampfanfälle beobachtet (Waymire et al., 1995). Zusätzlich zu der bekannten Vitamin B6-abhängigen Krampfneigung sind bei der HPP neuronale Entwicklungsprobleme beschrieben worden. In einem klinischen Fall mit einer TNAP-Nullvariante trat eine intractable Enzephalopathie auf, die letztlich zum Tode führte (Hofmann et al. 2013). Mutationen des GABBR2 Gens wurden in aktuellen Berichten mit epileptischen Enzephalopathien in Verbindung gebracht (Yoo et al., 2017, Hamdan et al., 2017).

Die TNAP-abhängige DMP1-Expression kann in Zusammenhang mit der dentalen Symptomatik gebracht werden

DMP1 wurde in dem *in vitro* HPP-Modell der PDLSCs signifikant geringer exprimiert. DMP1 wird auch von Zementozyten und Osteozyten exprimiert, sodass hierdurch ein weiterer Zusammenhang zwischen den unterschiedlichen Mineralisierungsprozessen dieser Gewebe hergestellt werden kann (Zhao et al., 2016). Im Hinblick auf die dentalen Aspekte der HPP scheint diese Herunterregulierung von Bedeutung zu sein, da diesem typischen Matrixprotein während der Amelogenese und der Dentinogenese eine wichtige protektive Rolle gegenüber apoptotischen Effekten zugesprochen wird (Rangiani et al., 2012).

Diese Veränderung in der Genexpression durch die TNAP-Inhibition, kann neben dem Einfluss auf den Phosphathaushalt auch mit einer reduzierten Dentindicke, eine der dentalen Manifestationen der HPP, in Einklang gebracht werden, die in DMP1-Knockout Mäusen beobachtet werden konnte. Mutationen im DMP1-Gen sind für eine Form der

autosomal-rezessiv vererbten hypophosphatämischen Rachitis ursächlich (Rangiani et al., 2012). In Mausmodellen mit DMP1-Knockout (niedrige Phosphatkonzentrationen) und mit klotho-Knockout (exzessiv erhöhte Phosphatkonzentrationen) konnte in der Arbeit von Rangiani et al. gezeigt werden, dass ein balancierter Phosphathaushalt für die Dentinbildung und für die Mineralisierung des Dentins wichtig ist. Sowohl ein Mangel als auch ein Überschuss an Pi verursachen jeweils Störungen der Dentinbildung. Bei der HPP liegt lokal ein Mangel an Pi vor. Dieser trägt wahrscheinlich maßgeblich zu der insuffizienten Stimulation der DMP1-Synthese bei (Nishino et al., 2017). Ein ausreichendes Phosphat-Angebot ist offenbar auch bei der (Re-)Mineralisierung von Dentindefekten von Bedeutung (Hara et al., 2008). Die Hypomineralisierung des Schmelzes und Dentins aufgrund einer defekten TNAP kann mit der hier beobachteten, reduzierten DMP1-Expression in Verbindung gebracht werden. Einen zusätzlichen Einfluss auf diese Vorgänge hat die Akkumulation von PPI bei der HPP (s. unten).

Ansatzpunkte für das nähere Verständnis der dentalen Symptome der HPP

Eine weitere Fokussierung auf die PDLSCs erscheint generell im Hinblick auf die bisher ungeklärte, auch für die HPP relevante Frage bezüglich der Herkunft der Zementozyten und der Zementogenese interessant zu sein (Zhao et al., 2016). Diese Zellen stellen in Studien zur regenerativen Parodontaltherapie ebenfalls eine interessante Zellpopulation dar (Jin et al., 2003). Lindskog et al. untersuchten einen von Zementozyten gebildeten Kollagenase-Inhibitor, der durch ein sogenanntes Anti-Invasionssignal möglicherweise die Resorption der Zahnwurzel durch die umgebenden Osteoklasten zu verhindern mag (Lindskog and Hammarstrom, 1980). *In vitro* Studien deuten ebenfalls darauf hin, dass Zementoblasten die Osteoklastendifferenzierung direkt inhibieren (Boabaid et al., 2004). Dies stellt einen Schutz der Zahnhartsubstanz vor osteoklastischer Resorption dar und trennt die Zahnhartsubstanz von den Knochenumbauvorgängen ab.

Die Zementdicke korreliert umgekehrt proportional mit der PPI-Produktion (McKee et al., 2013). TNAP, ANKH und ENPP1 sind für einen ausgeglichenen extrazellulären PPI-Spiegel verantwortlich. Eine defekte TNAP bewirkt bekanntlich eine PPI-Akkumulation mit nachfolgender Hemmung von Mineralisierungsprozessen. Dieser Effekt konnte mit

der Inhibition der TNAP weiter untersucht werden: Die signifikant reduzierte DMP1-Expression als Begleit-Effekt der TNAP-Inhibition durch Levamisol könnte zusätzlich zu einem pathologischen Phosphathaushalt beitragen. Der potenzierende Einfluss mehrerer Faktoren und die hier offensichtlich verstrickten Signalwege von TNAP und DMP1 könnten weitere Einblicke in die Pathologie, die der parodontalen Problematik der HPP zu Grunde liegt, erbringen.

TNAP-Inhibition reguliert den Wnt-Signalweg herab

Die Expression von WNT2 und WNT7B war infolge der TNAP-Inhibition im Rahmen der RNA-Seq ebenfalls herabreguliert. Dies weist auf einen Knochen- und HPP-relevanten Signalweg hin, der auch bezüglich der dentalen Mineralisierungsstörung auf molekularer Ebene nachvollziehbar erscheint: Kuchler et al. schreiben dem Wnt/ β -Catenin-Signalweg bei der Bildung von dentalen Geweben eine wichtige Rolle zu. In diesem Zusammenhang wurde Sclerostin (SOST) als Antagonist des Wnt-Signalwegs in Mäusen mit SOST-Knockout (KO) untersucht. Die genaue Rolle des Sclerostins bei der Zahnentwicklung und der umgebenden parodontalen Strukturen ist noch weitgehend unklar (Kuchler et al., 2014). Es wird allerdings klar, dass die Disinhibition des Wnt-Signalwegs in SOST-KO-Mäusen eher Auswirkungen auf die Struktur des Knochens und des Zements hat, während z.B. keine Auswirkungen auf die Struktur des Dentins festzustellen waren. Diese Studie erweitert den Einblick, der durch die TNAP-Inhibition gewonnen werden konnte: Die TNAP-Inhibition reguliert den Wnt-Signalweg herab, während in der Studie von Kuchler et al. über einen SOST-Knockout der Signalweg enthemmt wird, beide führen zu Veränderungen des Knochen- und Zement-Phänotyps. Bao et al. setzten Sclerostin als Inhibitor zur Zementblastenproliferation und -differenzierung ein und weisen auf einen vielversprechenden Einsatz in der Behandlung „Zement-assoziiertes“-Erkrankungen (Bao et al., 2013), zu welchen auch der dentale Phänotyp der HPP bzw. die Odonto-HPP gerechnet werden muss.

Regulation der adipogenen Differenzierung

Die Expression typischer adipogener Markergene zeigt in diesem HPP-Modell eine gegenläufige Reaktion. Der adipogene Marker LPL wurde infolge der TNAP-Inhibition

während der osteogenen Differenzierung verstärkt exprimiert, sodass aus der Hemmung der Mineralisierung die adipogene Genexpression erleichtert erfolgen könnte. Interessant erscheint in diesem Zusammenhang auch die bisher nicht veröffentlichte, präliminäre Beobachtung einer scheinbar stärkeren Lipidvesikel-Produktion während der adipogenen Differenzierung in BMSC-Proben eines HPP-Patienten (Graser, persönliche Mitteilung).

4.5 Beurteilung des etablierten *in vitro* HPP-Modells mit Einsatz der RNA-Sequenzierung

Das in dieser Arbeit etablierte *in vitro* Modell der HPP konnte in vieler Hinsicht erwartete und nachvollziehbare Reaktionen simulieren und bestätigen, welche dem derzeitigen Verständnis der allgemeinen Zusammenhänge dieser Erkrankung folgen und auf bisherigen Erkenntnisse aus der Literatur beruhen.

- Das Levamisol-induzierte *in vitro* Modell der HPP simuliert die Effekte dieser Erkrankung auf der Ebene der Genregulation.
- Die TNAP-Inhibition durch Levamisol greift in relevante Signalwege (z.B. den purinergen Signalweg) der HPP ein.

Die Auswahl von MSCs aus unterschiedlichen Mineralisierungs-assoziierten Geweben - Knochen, Pulpa und parodontales Ligament - scheint zur Realisierung eines *in vitro* HPP-Modells und dessen Analyse sehr gut geeignet zu sein. Die hier gezeigten Zusammenhänge lassen sich zukünftig anhand von HPP-Proben sowie im Tiermodell weiterverfolgen.

Zu erwähnen bleibt, dass alle derzeit bekannten TNAP-Inhibitoren nicht-kompetitiver Art sind (Sergienko and Millan, 2010) und nach aktueller Studienlage nicht, wie ursprünglich angenommen, rein spezifisch für die TNAP sind. Neuere Studien zeigen, dass Levamisol neuronale Nebenwirkungen aufweist, indem es unabhängig von der TNAP-Inhibition die Funktion von Ionenkanäle beeinflusst und damit in der Lage ist, die neuronale Aktivität zu hemmen (Nowak et al., 2015) (Robertson and Martin, 2007). Zudem ist die Inhibition nicht auf Zell-Ebene beschränkt, sondern betrifft sämtliche

Aktivitäts-abhängigen Prozesse des Enzyms (Nowak et al., 2015). Martin et al. zeigten eine Reihe TNAP-unabhängiger Wirkungen des Levamisols und dessen Rezeptoren auf (Martin et al., 2012). Die nicht-kompetitive, reversible und nicht spezifische Hemmung der TNAP durch Levamisol grenzt dieses *in vitro* Modell von der *in vivo* Situation ab.

Weitere Effekte des Levamisols, beispielsweise auf intrazelluläre Strukturen wie den Golgi-Apparat (Kap. 3.4.2), wurden beobachtet. Die prominente Darstellung der Golgi-Region unter Levamisol-Stimulation ist möglicherweise auf eine reaktiv gesteigerte Proteinsynthese, vermehrte Prozessierung und Akkumulation der TNAP zurückzuführen. Veränderungen auf intrazellulärer Ebene durch Inhibition der TNAP, einem Ektoenzym, mit nachfolgendem ATP-Stau und gegebenenfalls konsekutivem cAMP-Mangel, welches als intrazelluläres zentrales Signalmolekül vieler unterschiedlicher Signalwege agiert, wären denkbar.

Eine endgültige Validierung des Systems auf TNAP-unabhängige versus -abhängige Effekte kann ergänzend durch alternative Hemmstoffe erfolgen (z.B. MLS-0038949), durch transgene versus KO-Zelllinien und endgültig durch Analysen von KO-Tieren *in vivo*. Da letztere jedoch homozygot betroffen nicht lebensfähig sind, ist das vorliegende neu etablierte Modell extrem hilfreich bei der gezielten Suche nach TNAP-abhängig regulierten Genen und daraus resultierenden therapeutischen Ansatzpunkten.

Die TNAP-Inhibition mit MLS-0038949 ist bereits etabliert und zeigte beispielsweise in Kombination mit einer Hemmung von PHOSPHO1 (MLS-0263839) eine signifikant reduzierte Kalzifizierung von Gefäßmuskelzellen (Kiffer-Moreira et al., 2013). Die Auswirkung auf die osteogene Differenzierung dentaler MSCs und deren Mineralisierungspotenzial wurde nach derzeitigem Kenntnisstand noch nicht untersucht.

5. AUSBLICK

Dentale MSCs zeigen ein vielversprechendes Potential im Bereich des Tissue Engineerings und der Regenerativen Medizin.

Aufgrund zahlreicher Ähnlichkeiten der DPSCs mit den BMSCs wurde vielfach auf die potenziellen Anwendungen dieser im Bereich des Tissue Engineering und der regenerativen muskuloskelettalen Medizin hingewiesen (Botelho et al., 2017; Graziano et al., 2008). Diesbezügliche Vorteile der dentalen MSCs wurden einleitend erwähnt. Der Einsatz Stammzell-basierter Methoden in der zahnmedizinischen Behandlung wird derzeit intensiv erforscht. Die Regeneration der Pulpa und parodontaler Läsionen beispielsweise stellen noch immer eine große Herausforderung dar (Mitsiadis et al., 2015) (Mitsiadis and Orsini, 2016). Im Rahmen von Forschungsprojekten aus dem Bereich des Tissue Engineering gilt die Etablierung von Stammzellbanken mit Stammzellen aus dentalem Gewebe als zukunftsweisend (Hu et al., 2017). Hierzu liegen Studien über eine scheinbar uneingeschränkte Differenzierungskapazität der DPSCs nach der Kryopreservation von bis zu 2 Jahren vor (Karbanova, Soukup et al. 2011), welche auch an direkt eingefrorenen Zähnen mit erst anschließender Isolation untersucht wurde (Woods et al., 2009). Des Weiteren sind derzeit sogenannte induzierte pluripotente Stammzellen (iPSCs, induced pluripotent stem cells), die bereits auch aus dentalen MSCs erfolgreich generiert werden konnten, von großem Interesse bei der Suche neuer regenerativer Ansätze (Hynes et al., 2012; Hynes et al., 2015; Wada et al., 2011). Aus diesen neuen, derzeit intensiv verfolgten Aspekten der dentalen MSCs ergeben sich auch Spekulationen über Therapieansätze für die dentalen bzw. parodontalen Symptome der HPP-Patienten. Vergleichende Analysen von MSCs aus unterschiedlichen mineralisierten Geweben können weitere Einblicke in die variable Beteiligung bei der HPP bieten (Hu et al., 2017).

***In vivo* Analyse der *in vitro* Ansätze**

Das in dieser Arbeit etablierte und analysierte *in vitro* HPP-Modell stellt eine Basis dar, um insbesondere die dentale Problematik weiter zu erforschen. Abgeleitete Ansätze können mit einem alternativen TNAP-Inhibitor (MLS-0038949) validiert und

nachfolgend *in vivo* im Tiermodell weiterverfolgt werden, um die Auswirkungen auf den gesamten Organismus zu untersuchen und Zusammenhänge zwischen den einzelnen Systemen darzustellen. Denkbar wäre auch ein Vergleich des hier etablierten Modells mit Probenmaterial von HPP-Patienten, um die durch Levamisol hervorgerufenen Effekte der HPP-Situation *in vivo* gegenüberzustellen.

Ein besonders interessanter Aspekt anknüpfend an die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, würde der Vergleich mit PDLSCs von HPP-Patienten darstellen. Tatsächlich wurden in einer chinesischen Studie von Li et al. bereits „DPSCs aus Milchzähnen“ (entsprechen SHEDs) von HPP-Patienten untersucht und mit einer gesunden Kontrollgruppe verglichen. Aus der ins Englische übersetzten Zusammenfassung geht hervor, dass die AP-Aktivität dieser DPSCs verglichen mit gesunden Donoren reduziert war (Li et al., 2009). Ein solcher Vergleich war im Rahmen dieser Arbeit aufgrund der Seltenheit dieser Erkrankung in Kombination mit der zeitlichen Abpassung des meist unkalkulierbaren, vorzeitigen Zahnausfalls zur Stammzellgewinnung nicht möglich. Auch ein intrafamiliärer Vergleich, beispielsweise bei unterschiedlich ausgeprägter Symptomatik, könnte durch die Analyse der jeweiligen dentalen MSCs Hinweise zur Klärung der multipel ausgeprägten, dentalen Problematik geben, und gegebenenfalls die Frage nach einer Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp weiter vorantreiben. Stammzellen ausgefallener Milchzähne (SHEDs) stellen hierfür geeignete und bereits gut charakterisierte MSCs dar. Bei der Analyse von HPP-SHEDs könnte die nicht resorbierte Zahnwurzel durch die vorzeitige Exfoliation einen Schutz der Zellen bieten. Allgemein weisen SHEDs Vorteile gegenüber den DPSCs auf, wie beispielsweise der erleichterte Zugang durch die Exfoliation, die höhere Proliferationsrate der Zellen sowie die Möglichkeit MSCs sehr junger Patienten zu erhalten (Miura et al., 2003; Mojarad et al., 2016).

Aus dem *in vitro* HPP-Modell abgeleitete, potentielle Therapieansätze für die zahnmedizinische Symptomatik bei der HPP

Mojarad et al. konnten in einer *in vitro* Untersuchung der AP-Aktivität von SHEDs eine deutliche Erhöhung dieser durch Vitamin D3 Gabe beobachten (Mojarad et al., 2016). Aufgrund der eingangs erwähnten Vermeidung einer hohen, systemischen Vitamin D3

Verabreichung bei der HPP, könnte die besondere Stellung der Zähne als Strukturen, welche die Körperoberfläche durchbrechen, möglicherweise eine direkte Behandlung bieten. Denkbar wäre hierbei die lokale Applikation - analog zur lokalen Antibiotikatherapie der Parodontitis - über eine mit dem Präparat (z.B. Vitamin D3) versehene Fadeneinlage in den Parodontalspalt.

Vielversprechende Ansätze, wie die Enzymersatztherapie, die bereits in schweren Fällen therapeutisch erfolgreich angewandt werden, könnten bei isolierter, dentaler Problematik durch die Etablierung eines Zementozyten-spezifischen Ankers und möglicherweise durch eine lokale, intraligamentäre Applikation zum Einsatz kommen.

Erweiterung des *in vitro* HPP-Modells um die neurogene Differenzierung: Dentale MSCs zeigen positive Effekte auf die Axon-Regeneration (Kolar et al., 2017).

Weitere Aspekte der HPP, wie die Rolle der TNAP im neuronalen System, könnten in diesem *in vitro* Modell mit der neurogenen Differenzierung bei gleichzeitiger TNAP-Inhibition der dentalen Stammzellen -insbesondere der DPSCs- erforscht werden. Die bereits bestätigte Expression neurogener Marker (hier Nestin) der dentalen MSCs kann hierfür als Grundlage dienen (Karbanova et al., 2011; Lee et al., 2014). Aufgrund der Abstammung von Zellen der kranialen Neuralleiste versprechen sich einige Autoren eine künftige Zell-therapeutische Anwendung der DPSCs auch in der Behandlung neurologischer Erkrankungen (Arthur et al., 2008). In einer Studie von Arthur et al. wurde die Differenzierung von DPSCs zu funktionell aktiven Neuronen erwähnt und untersucht. Graser et al. konnten eine TNAP-abhängige Expression neurogener Marker darstellen und auf eine besondere Rolle der TNAP während der neurogenen Differenzierung hinweisen (Graser et al., 2015). Auch die bereits beschriebene Studie von Sebastian-Serrano et al. begründet die Eignung der dentalen MSCs für weitere Analysen einer reduzierten TNAP-Funktion mit Fokus auf die neuronalen Aspekte (Sebastian-Serrano et al., 2016).

Die PDLSCs scheinen im Rahmen der HPP-Forschung eine besonders interessante Stammzellpopulation darzustellen

Um nochmals die intensiv analysierten PDLSCs bezüglich der zahnmedizinischen Aspekte der HPP hervorzuheben, könnte deren Sclerostin-Expression einen interessanten Aspekt darstellen. Sclerostin wird sowohl von Osteozyten als auch Zementozyten exprimiert und ist als Antagonist des Wnt-Signalwegs ein negativer Regulator der Knochenbildung. Die genaue Rolle des Sclerostins bei der Zahnentwicklung und der umgebenden parodontalen Strukturen ist jedoch noch weitgehend unklar (Kuchler et al., 2014). In Bezug auf die positiven Ergebnisse einer Studie von Seefried et al. zur Anwendung des Sclerostin Antikörpers *BPS804* als Therapieansatz des milderen, adulten HPP-Subtyps (Seefried et al., 2017), könnten PDLSCs als potenzielle Vorläufer der Zementozyten weiter untersucht werden und gegebenenfalls einen weiteren, lokalen Therapieangriffspunkt bieten. Auch Bao et al. wiesen bereits auf das vielversprechende Einsatzpotenzial einer Sclerostin-Inhibition in Bezug auf Erkrankungen, welche die Zementogenese betreffen, hin (Bao et al., 2013).

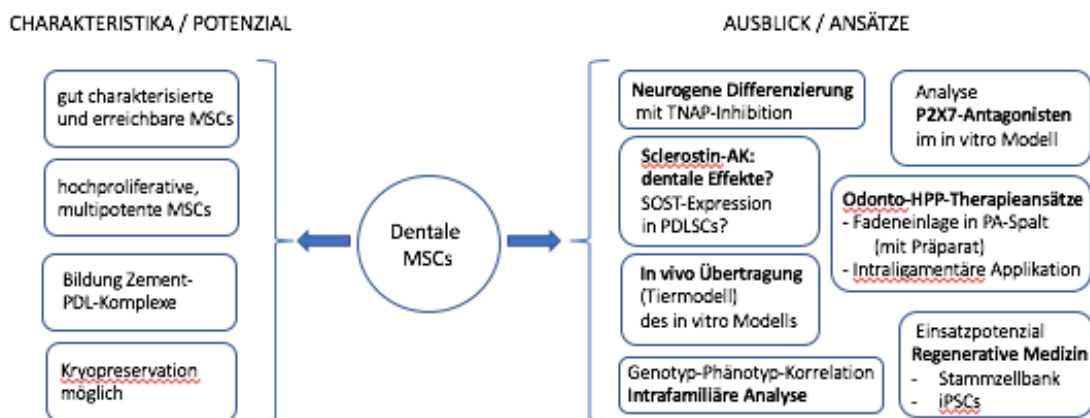


Abb. 46: Ausblick und Übersicht für weitere Ansätze zur Analyse dentaler MSCs im Rahmen der HPP-Forschung.

ZUSAMMENFASSUNG

Im seltenen Krankheitsbild der Hypophosphatasie (HPP) treten aufgrund der Fehlfunktion der Gewebe-unspezifischen Alkalischen Phosphatase (tissue-nonspecific alkaline phosphatase, TNAP) skelettale und dentale Symptome in sehr variabler Ausprägung auf. Der vorzeitige Verlust von Milchzähnen ist das zahnmedizinische Leitsymptom und in vielen Fällen ein erstes Anzeichen dieser Erkrankung. In dieser Arbeit wurde ein *in vitro* Modell der HPP etabliert und der Fokus auf die dentalen Aspekte dieser Erkrankung gelegt. Hierzu wurden mesenchymale Stammzellen (MSCs) aus Bereichen analysiert, die bei einer Erkrankung von dieser Mineralisierungsstörung betroffen sind. Es wurden dentale Stammzellen aus der Pulpa (dental pulp stem cells, DPSCs) und dem parodontalen Ligament (periodontal ligament stem cells, PDLSCs) isoliert und im Vergleich zu Stammzellen aus dem Knochenmark (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) charakterisiert. Um den Einfluss der Spendervariabilität zu reduzieren, wurden aus dem gesamten dentalen Probenmaterial nur vollständige Probenpaare aus DPSCs und PDLSCs von 5 Spendern für die vergleichenden Analysen verwendet. Die dentalen MSCs konnten somit paarweise direkt miteinander verglichen werden.

DPSCs gelten seit ihrer Entdeckung von Gronthos et al. im Jahr 2000 als geeignete Quelle für die Stammzellgewinnung mit vielversprechenden Anwendungsmöglichkeiten im Bereich des Tissue Engineering und der regenerativen muskuloskelettalen Medizin. PDLSCs sind aufgrund der parodontalen Problematik der HPP von besonderem Interesse in dieser Arbeit. Die Isolation von Stammzellen aus Pulpa und PDL konnte mit dem Nachweis der sogenannten Minimal Kriterien für MSCs bestätigt werden.

In diesem durch Enzyminhibition mit Levamisol induzierten *in vitro* Modell der HPP wurde die TNAP-abhängige Genexpression, die Enzym-Aktivität und das osteogene Differenzierungspotenzial an diesen drei Mineralisierungs-assoziierten MSCs untersucht. Die erweiterte Genexpressionsanalyse in Kooperation mit der Core Unit Systemmedizin der Universität Würzburg mit einer RNA-Sequenzierung der PDLSCs ergab interessante Einblicke in die differentielle Genexpression nach der TNAP-

Inhibition während der osteogenen Differenzierung und Ansatzpunkte für weitere Analysen. Die beobachteten Genregulationen waren nach dem derzeitigen Verständnis pathologischer Zusammenhänge nachvollziehbar und simulierten *in vitro* HPP-relevante Signalwege repräsentativ. Insbesondere die signifikante Genregulation von P2X7 und DMP1, sowie Zusammenhänge aus dem Wnt-Signalweg zeigen hinsichtlich der dentalen Aspekte der HPP neue Ansatzpunkte auf. Die erhöhte P2X7-Expression in diesem *in vitro* HPP-Modell scheint mit der Parodontitis-Problematik der HPP zu korrelieren und verdeutlicht unter anderem die multifaktorielle Ätiologie und Pathogenese der Parodontitis. Die Tatsache, dass die experimentellen Beobachtungen in Einklang mit dem klinischen Bild der HPP gebracht werden können, bestätigt die Relevanz des hier etablierten *in vitro* Modells. Zusammenfassend konnten anhand dieses *in vitro* Modells der HPP neue Aspekte aufgedeckt werden, die nicht nur im Hinblick auf die dentale Problematik der HPP aufschlussreich sind.

LITERATURVERZEICHNIS

- Adameyko, I., and Fried, K. (2016). The Nervous System Orchestrates and Integrates Craniofacial Development: A Review. *Front Physiol* 7, 49.
- Aeby, M., Wyss, T., Mentrup, B., Kunstmann, E., Jakob, F., and Aeberli, D. (2016). Low-Energy Trauma-Induced Intercondylar Femoral Fracture. *Clin Cases Miner Bone Metab* 13, 151-153.
- Alge, D.L., Zhou, D., Adams, L.L., Wyss, B.K., Shadday, M.D., Woods, E.J., Gabriel Chu, T.M., and Goebel, W.S. (2010). Donor-Matched Comparison of Dental Pulp Stem Cells and Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in a Rat Model. *J Tissue Eng Regen Med* 4, 73-81.
- Alipour, R., Sadeghi, F., Hashemi-Beni, B., Zarkesh-Esfahani, S.H., Heydari, F., Mousavi, S.B., Adib, M., Narimani, M., and Esmaeili, N. (2010). Phenotypic Characterizations and Comparison of Adult Dental Stem Cells with Adipose-Derived Stem Cells. *Int J Prev Med* 1, 164-171.
- Alvarez, R., Lee, H.L., Wang, C.Y., and Hong, C. (2015). Characterization of the Osteogenic Potential of Mesenchymal Stem Cells from Human Periodontal Ligament Based on Cell Surface Markers. *Int J Oral Sci* 7, 213-219.
- Arthur, A., Rychkov, G., Shi, S., Koblar, S.A., and Gronthos, S. (2008). Adult Human Dental Pulp Stem Cells Differentiate toward Functionally Active Neurons under Appropriate Environmental Cues. *Stem Cells* 26, 1787-1795.
- Aslantas, E.E., Buzoglu, H.D., Karapinar, S.P., Cehreli, Z.C., Muftuoglu, S., Atilla, P., and Aksoy, Y. (2016). Age-Related Changes in the Alkaline Phosphatase Activity of Healthy and Inflamed Human Dental Pulp. *J Endod* 42, 131-134.
- Bao, X., Liu, Y., Han, G., Zuo, Z., and Hu, M. (2013). The Effect on Proliferation and Differentiation of Cementoblast by Using Sclerostin as Inhibitor. *Int J Mol Sci* 14, 21140-21152.
- Bara, J.J., Richards, R.G., Alini, M., and Stoddart, M.J. (2014). Concise Review: Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Change Phenotype Following in Vitro Culture: Implications for Basic Research and the Clinic. *Stem Cells* 32, 1713-1723.
- Bartold, P.M., and Gronthos, S. (2017). Standardization of Criteria Defining Periodontal Ligament Stem Cells. *J Dent Res* 96, 487-490.
- Beck, C., Morbach, H., Stenzel, M., Schneider, P., Collmann, H., Girschick, G., and Girschick, H.J. (2009). [Hypophosphatasia]. *Klin Padiatr* 221, 219-226.
- Bianco, P. (2014). "Mesenchymal" Stem Cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 30, 677-704.
- Bianco, P., Robey, P.G., and Simmons, P.J. (2008). Mesenchymal Stem Cells: Revisiting History, Concepts, and Assays. *Cell Stem Cell* 2, 313-319.
- Binderman, I., Gadban, N., and Yaffe, A. (2017). Extracellular Atp Is a Key Modulator of Alveolar Bone Loss in Periodontitis. *Arch Oral Biol* 81, 131-135.
- Bluteau, G., Luder, H.U., De Bari, C., and Mitsiadis, T.A. (2008). Stem Cells for Tooth Engineering. *Eur Cell Mater* 16, 1-9.

- Boabaid, F., Berry, J.E., Koh, A.J., Somerman, M.J., and McCauley, L.K. (2004). The Role of Parathyroid Hormone-Related Protein in the Regulation of Osteoclastogenesis by Cementoblasts. *J Periodontol* 75, 1247-1254.
- Botelho, J., Cavacas, M.A., Machado, V., and Mendes, J.J. (2017). Dental Stem Cells: Recent Progresses in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Ann Med* 49, 644-651.
- Bradford, M.M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Bright, R., Proudman, S.M., Rosenstein, E.D., and Bartold, P.M. (2015). Is There a Link between Carbamylation and Citrullination in Periodontal Disease and Rheumatoid Arthritis? *Med Hypotheses* 84, 570-576.
- Burnstock, G. (2017). Purinergic Signalling: Therapeutic Developments. *Front Pharmacol* 8, 661.
- Caplan, A.I. (1991). Mesenchymal Stem Cells. *J Orthop Res* 9, 641-650.
- Caplan, A.I. (2017). Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name! *Stem Cells Transl Med* 6, 1445-1451.
- Chai, Y., Jiang, X., Ito, Y., Bringas, P., Jr., Han, J., Rowitch, D.H., Soriano, P., McMahon, A.P., and Sucov, H.M. (2000). Fate of the Mammalian Cranial Neural Crest During Tooth and Mandibular Morphogenesis. *Development* 127, 1671-1679.
- Chappuis, V., Araujo, M.G., and Buser, D. (2017). Clinical Relevance of Dimensional Bone and Soft Tissue Alterations Post-Extraction in Esthetic Sites. *Periodontol* 2000 73, 73-83.
- Chen, B., Li, L., Ren, W., Yi, L., Wang, Y., and Yan, F. (2017). A Novel Missense Mutation in the *Alpl* Gene Causes Dysfunction of the Protein. *Mol Med Rep* 16, 710-718.
- Crisan, M., Yap, S., Casteilla, L., Chen, C.W., Corselli, M., Park, T.S., Andriolo, G., Sun, B., Zheng, B., Zhang, L., *et al.* (2008). A Perivascular Origin for Mesenchymal Stem Cells in Multiple Human Organs. *Cell Stem Cell* 3, 301-313.
- Cruz, T., Gleizes, M., Balayssac, S., Mornet, E., Marsal, G., Millan, J.L., Malet-Martino, M., Nowak, L.G., Gilard, V., and Fonta, C. (2017). Identification of Altered Brain Metabolites Associated with Tnap Activity in a Mouse Model of Hypophosphatasia Using Untargeted Nmr-Based Metabolomics Analysis. *J Neurochem* 140, 919-940.
- Diez-Zaera, M., Diaz-Hernandez, J.I., Hernandez-Alvarez, E., Zimmermann, H., Diaz-Hernandez, M., and Miras-Portugal, M.T. (2011). Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase Promotes Axonal Growth of Hippocampal Neurons. *Mol Biol Cell* 22, 1014-1024.
- Dimitrova-Nakov, S., Baudry, A., Harichane, Y., Kellermann, O., Goldberg, M., and Dr es Sciences, N. (2014). Pulp Stem Cells: Implication in Reparative Dentin Formation. *J Endod* 40, S13-18.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., and Horwitz, E. (2006). Minimal Criteria for Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. The International Society for Cellular Therapy Position Statement. *Cytotherapy* 8, 315-317.
- Fauvert, D., Brun-Heath, I., Lia-Baldini, A.S., Bellazi, L., Taillandier, A., Serre, J.L., de Mazancourt, P., and Mornet, E. (2009). Mild Forms of Hypophosphatasia Mostly Result from Dominant Negative Effect of Severe Alleles or from Compound Heterozygosity for Severe and Moderate Alleles. *BMC Med Genet* 10, 51.

- Fedde, K.N., Blair, L., Silverstein, J., Coburn, S.P., Ryan, L.M., Weinstein, R.S., Waymire, K., Narisawa, S., Millan, J.L., MacGregor, G.R., *et al.* (1999). Alkaline Phosphatase Knock-out Mice Recapitulate the Metabolic and Skeletal Defects of Infantile Hypophosphatasia. *J Bone Miner Res* *14*, 2015-2026.
- Ferrari, D., Pizzirani, C., Adinolfi, E., Lemoli, R.M., Curti, A., Idzko, M., Panther, E., and Di Virgilio, F. (2006). The P2x7 Receptor: A Key Player in Il-1 Processing and Release. *J Immunol* *176*, 3877-3883.
- Fonta, N. (2015). Neuronal Tissue Nonspecific Alkaline Phosphatase (Tnap).
- Foster, B.L., Nagatomo, K.J., Tso, H.W., Tran, A.B., Nociti, F.H., Jr., Narisawa, S., Yadav, M.C., McKee, M.D., Millan, J.L., and Somerman, M.J. (2013). Tooth Root Dentin Mineralization Defects in a Mouse Model of Hypophosphatasia. *J Bone Miner Res* *28*, 271-282.
- Gasque, K.C., Foster, B.L., Kuss, P., Yadav, M.C., Liu, J., Kiffer-Moreira, T., van Elsas, A., Hatch, N., Somerman, M.J., and Millan, J.L. (2015). Improvement of the Skeletal and Dental Hypophosphatasia Phenotype in *Alpl*^{-/-} Mice by Administration of Soluble (Non-Targeted) Chimeric Alkaline Phosphatase. *Bone* *72*, 137-147.
- Giuliani, A.L., Sarti, A.C., Falzoni, S., and Di Virgilio, F. (2017). The P2x7 Receptor-Interleukin-1 Liaison. *Front Pharmacol* *8*, 123.
- Girschick, H.J., Schneider, P., Haubitz, I., Hiort, O., Collmann, H., Beer, M., Shin, Y.S., and Seyberth, H.W. (2006). Effective Nsaid Treatment Indicates That Hyperprostaglandinism Is Affecting the Clinical Severity of Childhood Hypophosphatasia. *Orphanet J Rare Dis* *1*, 24.
- Goldberg, M. (2011). Pulp Healing and Regeneration: More Questions Than Answers. *Adv Dent Res* *23*, 270-274.
- Goseki-Sone, M., Imura, T., Takeda, K., Nifuji, A., Ogata, Y., Yanagishita, M., and Oida, S. (1999). Expression of Mrna Encoding Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase in Human Dental Tissues. *Calcif Tissue Int* *64*, 160-162.
- Graser, S. (2015). Impact of Hypophosphatasia on the Biology of the Nervous System. Dissertation, Universität Würzburg.
- Graser, S., Mentrup, B., Schneider, D., Klein-Hitpass, L., Jakob, F., and Hofmann, C. (2015). Overexpression of Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase Increases the Expression of Neurogenic Differentiation Markers in the Human Sh-Sy5y Neuroblastoma Cell Line. *Bone* *79*, 150-161.
- Graziano, A., d'Aquino, R., Laino, G., and Papaccio, G. (2008). Dental Pulp Stem Cells: A Promising Tool for Bone Regeneration. *Stem Cell Rev* *4*, 21-26.
- Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P.G., and Shi, S. (2000). Postnatal Human Dental Pulp Stem Cells (DpSCs) in Vitro and in Vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 13625-13630.
- Hajishengallis, G. (2015). Periodontitis: From Microbial Immune Subversion to Systemic Inflammation. *Nat Rev Immunol* *15*, 30-44.
- Hara, A.T., Karlinsey, R.L., and Zero, D.T. (2008). Dentine Remineralization by Simulated Saliva Formulations with Different Ca and Pi Contents. *Caries Res* *42*, 51-56.
- Hernandez-Mosqueira, C., Velez-delValle, C., and Kuri-Harcuch, W. (2015). Tissue Alkaline Phosphatase Is Involved in Lipid Metabolism and Gene Expression and Secretion of Adipokines in Adipocytes. *Biochim Biophys Acta* *1850*, 2485-2496.

- Hessle, L., Johnson, K.A., Anderson, H.C., Narisawa, S., Sali, A., Goding, J.W., Terkeltaub, R., and Millan, J.L. (2002). Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase and Plasma Cell Membrane Glycoprotein-1 Are Central Antagonistic Regulators of Bone Mineralization. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 9445-9449.
- Hofmann, C., Girschick, H., Mornet, E., Schneider, D., Jakob, F., and Mentrup, B. (2014). Unexpected High Intrafamilial Phenotypic Variability Observed in Hypophosphatasia. *Eur J Hum Genet* *22*, 1160-1164.
- Hofmann, C., Jakob, F., Seefried, L., Mentrup, B., Graser, S., Plotkin, H., Girschick, H.J., and Liese, J. (2015). Recombinant Enzyme Replacement Therapy in Hypophosphatasia. *Subcell Biochem* *76*, 323-341.
- Hoshi, K., Amizuka, N., Oda, K., Ikehara, Y., and Ozawa, H. (1997). Immunolocalization of Tissue Non-Specific Alkaline Phosphatase in Mice. *Histochem Cell Biol* *107*, 183-191.
- Hotton, D., Mauro, N., Lezot, F., Forest, N., and Berdal, A. (1999). Differential Expression and Activity of Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase (Tnap) in Rat Odontogenic Cells in Vivo. *J Histochem Cytochem* *47*, 1541-1552.
- Hoylaerts, M.F., Manes, T., and Millan, J.L. (1997). Mammalian Alkaline Phosphatases Are Allosteric Enzymes. *J Biol Chem* *272*, 22781-22787.
- Hu, L., Liu, Y., and Wang, S. (2017). Stem Cell-Based Tooth and Periodontal Regeneration. *Oral Dis*.
- Hughes, S.L., Parkes, R.C., Drage, N., and Collard, M. (2017). Early Tooth Loss in Children: A Warning Sign of Childhood Hypophosphatasia. *Dent Update* *44*, 317-318, 320-311.
- Hynes, K., Menicanin, D., Gronthos, S., and Bartold, P.M. (2012). Clinical Utility of Stem Cells for Periodontal Regeneration. *Periodontol* *2000* *59*, 203-227.
- Hynes, K., Menicanin, D., Bright, R., Ivanovski, S., Hutmacher, D.W., Gronthos, S., and Bartold, P.M. (2015). Induced Pluripotent Stem Cells: A New Frontier for Stem Cells in Dentistry. *J Dent Res* *94*, 1508-1515.
- Iwasaki, K., Komaki, M., Yokoyama, N., Tanaka, Y., Taki, A., Kimura, Y., Takeda, M., Oda, S., Izumi, Y., and Morita, I. (2013). Periodontal Ligament Stem Cells Possess the Characteristics of Pericytes. *J Periodontol* *84*, 1425-1433.
- Jakob, F.H., C.; Girschick, H.; Seefried, L. (2017). Diagnostik Und Management Der Hypophosphatasie, Vol 1. (UNI-MED Verlag, Bremen).
- Jin, Q.M., Zhao, M., Webb, S.A., Berry, J.E., Somerman, M.J., and Giannobile, W.V. (2003). Cementum Engineering with Three-Dimensional Polymer Scaffolds. *J Biomed Mater Res A* *67*, 54-60.
- Jockel-Schneider, Y., Harks, I., Haubitz, I., Fickl, S., Eigenthaler, M., Schlagenhaut, U., and Baulmann, J. (2014). Arterial Stiffness and Pulse Wave Reflection Are Increased in Patients Suffering from Severe Periodontitis. *PLoS One* *9*, e103449.
- Kan, C., Chen, L., Hu, Y., Lu, H., Li, Y., Kessler, J.A., and Kan, L. (2017). Microenvironmental Factors That Regulate Mesenchymal Stem Cells: Lessons Learned from the Study of Heterotopic Ossification. *Histol Histopathol* *32*, 977-985.
- Karbanova, J., Soukup, T., Suchanek, J., Pytlik, R., Corbeil, D., and Mokry, J. (2011). Characterization of Dental Pulp Stem Cells from Impacted Third Molars Cultured in Low Serum-Containing Medium. *Cells Tissues Organs* *193*, 344-365.

- Kassebaum, N.J., Bernabe, E., Dahiya, M., Bhandari, B., Murray, C.J., and Marcenes, W. (2014). Global Burden of Severe Periodontitis in 1990-2010: A Systematic Review and Meta-Regression. *J Dent Res* 93, 1045-1053.
- Kiffer-Moreira, T., Yadav, M.C., Zhu, D., Narisawa, S., Sheen, C., Stec, B., Cosford, N.D., Dahl, R., Farquharson, C., Hoylaerts, M.F., *et al.* (2013). Pharmacological Inhibition of Phospho1 Suppresses Vascular Smooth Muscle Cell Calcification. *J Bone Miner Res* 28, 81-91.
- Kolar, M.K., Itte, V.N., Kingham, P.J., Novikov, L.N., Wiberg, M., and Kelk, P. (2017). The Neurotrophic Effects of Different Human Dental Mesenchymal Stem Cells. *Sci Rep* 7, 12605.
- Kuchler, U., Schwarze, U.Y., Dobsak, T., Heimel, P., Bosshardt, D.D., Kneissel, M., and Gruber, R. (2014). Dental and Periodontal Phenotype in Sclerostin Knockout Mice. *Int J Oral Sci* 6, 70-76.
- Lee, J.H., Um, S., Song, I.S., Kim, H.Y., and Seo, B.M. (2014). Neurogenic Differentiation of Human Dental Stem Cells in Vitro. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg* 40, 173-180.
- Li, J., Liu, H., and Ge, L.H. (2009). [Study on Dental Pulp Stem Cells from Patients with Hypophosphatasia]. *Beijing Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 41, 66-70.
- Limbert, C., Ebert, R., Schilling, T., Path, G., Benisch, P., Klein-Hitpass, L., Seufert, J., and Jakob, F. (2010). Functional Signature of Human Islet-Derived Precursor Cells Compared to Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Dev* 19, 679-691.
- Lindskog, S., and Hammarstrom, L. (1980). Evidence in Favor of an Anti-Invasion Factor in Cementum or Periodontal Membrane of Human Teeth. *Scand J Dent Res* 88, 161-163.
- Luder, H.U. (2015). Malformations of the Tooth Root in Humans. *Front Physiol* 6, 307.
- Lund, S.A., Giachelli, C.M., and Scatena, M. (2009). The Role of Osteopontin in Inflammatory Processes. *J Cell Commun Signal* 3, 311-322.
- Lundgren, T., Westphal, O., Bolme, P., Modeer, T., and Noren, J.G. (1991). Retrospective Study of Children with Hypophosphatasia with Reference to Dental Changes. *Scand J Dent Res* 99, 357-364.
- Mao, J.J. (2008). Stem Cells and the Future of Dental Care. *N Y State Dent J* 74, 20-24.
- Martin, R.J., Robertson, A.P., Buxton, S.K., Beech, R.N., Charvet, C.L., and Neveu, C. (2012). Levamisole Receptors: A Second Awakening. *Trends Parasitol* 28, 289-296.
- Mathew, A., Dauravu, L.M., Reddy, S.N., Kumar, K.R., and Venkataramana, V. (2015). Ghost Teeth: Regional Odontodysplasia of Maxillary First Molar Associated with Eruption Disorders in a 10-Year-Old Girl. *J Pharm Bioallied Sci* 7, S800-803.
- McCusker, C.D., and Gardiner, D.M. (2014). Understanding Positional Cues in Salamander Limb Regeneration: Implications for Optimizing Cell-Based Regenerative Therapies. *Dis Model Mech* 7, 593-599.
- McKee, M.D., Hoac, B., Addison, W.N., Barros, N.M., Millan, J.L., and Chaussain, C. (2013). Extracellular Matrix Mineralization in Periodontal Tissues: Noncollagenous Matrix Proteins, Enzymes, and Relationship to Hypophosphatasia and X-Linked Hypophosphatemia. *Periodontol* 2000 63, 102-122.
- McKee, M.D., Nakano, Y., Masica, D.L., Gray, J.J., Lemire, I., Heft, R., Whyte, M.P., Crine, P., and Millan, J.L. (2011). Enzyme Replacement Therapy Prevents Dental Defects in a Model of Hypophosphatasia. *J Dent Res* 90, 470-476.

- Millan, J.L. (2013). The Role of Phosphatases in the Initiation of Skeletal Mineralization. *Calcif Tissue Int* 93, 299-306.
- Millan, J.L., and Plotkin, H. (2012). Hypophosphatasia - Pathophysiology and Treatment. *Actual osteol* 8, 164-182.
- Millan, J.L., and Whyte, M.P. (2016). Alkaline Phosphatase and Hypophosphatasia. *Calcif Tissue Int* 98, 398-416.
- Mitsiadis, T.A., and Orsini, G. (2016). Editorial: A New Era in Dentistry: Stem Cell-Based Approaches for Tooth and Periodontal Tissue Regeneration. *Front Physiol* 7, 357.
- Mitsiadis, T.A., Orsini, G., and Jimenez-Rojo, L. (2015). Stem Cell-Based Approaches in Dentistry. *Eur Cell Mater* 30, 248-257.
- Miura, M., Gronthos, S., Zhao, M., Lu, B., Fisher, L.W., Robey, P.G., and Shi, S. (2003). Shed: Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 5807-5812.
- Mojarad, F., Amiri, I., Rafatjou, R., Janeshin, A., and Farhadian, M. (2016). The Effect of 1alpha,25(OH)2d3 on Osteogenic Differentiation of Stem Cells from Dental Pulp of Exfoliated Deciduous Teeth. *J Dent (Shiraz)* 17, 348-353.
- Mornet, E. (2007). Hypophosphatasia. *Orphanet J Rare Dis* 2, 40.
- Mornet, E. (2017). Hypophosphatasia. *Metabolism*.
- Mornet, E., Hofmann, C., Bloch-Zupan, A., Girschick, H., and Le Merrer, M. (2014). Clinical Utility Gene Card For: Hypophosphatasia - Update 2013. *Eur J Hum Genet* 22.
- Mornet, E., Yvard, A., Taillandier, A., Fauvert, D., and Simon-Bouy, B. (2011). A Molecular-Based Estimation of the Prevalence of Hypophosphatasia in the European Population. *Ann Hum Genet* 75, 439-445.
- Musina, R.A., Bekchanova, E.S., Belyavskii, A.V., and Sukhikh, G.T. (2006). Differentiation Potential of Mesenchymal Stem Cells of Different Origin. *Bull Exp Biol Med* 141, 147-151.
- Nam, H.K., Sharma, M., Liu, J., and Hatch, N.E. (2017). Tissue Nonspecific Alkaline Phosphatase (Tnap) Regulates Cranial Base Growth and Synchondrosis Maturation. *Front Physiol* 8, 161.
- Narisawa, S., Frohlander, N., and Millan, J.L. (1997). Inactivation of Two Mouse Alkaline Phosphatase Genes and Establishment of a Model of Infantile Hypophosphatasia. *Dev Dyn* 208, 432-446.
- Navabazam, A.R., Sadeghian Nodoshan, F., Sheikhha, M.H., Miresmaeili, S.M., Soleimani, M., and Fesahat, F. (2013). Characterization of Mesenchymal Stem Cells from Human Dental Pulp, Preapical Follicle and Periodontal Ligament. *Iran J Reprod Med* 11, 235-242.
- Neves, V.C., Babb, R., Chandrasekaran, D., and Sharpe, P.T. (2017). Promotion of Natural Tooth Repair by Small Molecule Gsk3 Antagonists. *Sci Rep* 7, 39654.
- Nowak, L.G., Rosay, B., Czege, D., and Fonta, C. (2015). Tetramisole and Levamisole Suppress Neuronal Activity Independently from Their Inhibitory Action on Tissue Non-Specific Alkaline Phosphatase in Mouse Cortex. *Subcell Biochem* 76, 239-281.

- Olsson, A., Matsson, L., Blomquist, H.K., Larsson, A., and Sjodin, B. (1996). Hypophosphatasia Affecting the Permanent Dentition. *J Oral Pathol Med* 25, 343-347.
- Orimo, H. (2010). The Mechanism of Mineralization and the Role of Alkaline Phosphatase in Health and Disease. *J Nippon Med Sch* 77, 4-12.
- Otabe, K., Muneta, T., Kawashima, N., Suda, H., Tsuji, K., and Sekiya, I. (2012). Comparison of Gingiva, Dental Pulp, and Periodontal Ligament Cells from the Standpoint of Mesenchymal Stem Cell Properties. *Cell Med* 4, 13-21.
- Pavlakos, N., Schmidt, R., and Stockler, M. (2005). Bisphosphonates for Breast Cancer. *Cochrane Database Syst Rev*, CD003474.
- Phinney, D.G., Kopen, G., Righter, W., Webster, S., Tremain, N., and Prockop, D.J. (1999). Donor Variation in the Growth Properties and Osteogenic Potential of Human Marrow Stromal Cells. *J Cell Biochem* 75, 424-436.
- Ponnaiyan, D., and Jegadeesan, V. (2014). Comparison of Phenotype and Differentiation Marker Gene Expression Profiles in Human Dental Pulp and Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Eur J Dent* 8, 307-313.
- Rader, B.A. (2017). Alkaline Phosphatase, an Unconventional Immune Protein. *Front Immunol* 8, 897.
- Ramos-Junior, E.S., Morandini, A.C., Almeida-da-Silva, C.L., Franco, E.J., Potempa, J., Nguyen, K.A., Oliveira, A.C., Zamboni, D.S., Ojcius, D.M., Scharfstein, J., *et al.* (2015). A Dual Role for P2x7 Receptor During *Porphyromonas Gingivalis* Infection. *J Dent Res* 94, 1233-1242.
- Rangiani, A., Cao, Z.G., Liu, Y., Voisey Rodgers, A., Jiang, Y., Qin, C.L., and Feng, J.Q. (2012). Dentin Matrix Protein 1 and Phosphate Homeostasis Are Critical for Postnatal Pulp, Dentin and Enamel Formation. *Int J Oral Sci* 4, 189-195.
- Rathbun, J.C. (1948). Hypophosphatasia; a New Developmental Anomaly. *Am J Dis Child* 75, 822-831.
- Reibel, A., Maniere, M.C., Clauss, F., Droz, D., Alembik, Y., Mornet, E., and Bloch-Zupan, A. (2009). Orofacial Phenotype and Genotype Findings in All Subtypes of Hypophosphatasia. *Orphanet J Rare Dis* 4, 6.
- Robertson, A.P., and Martin, R.J. (2007). Ion-Channels on Parasite Muscle: Pharmacology and Physiology. *Invert Neurosci* 7, 209-217.
- Robey, P. (2017). "Mesenchymal Stem Cells": Fact or Fiction, and Implications in Their Therapeutic Use. *F1000Res* 6.
- Ruch, J.V., Lesot, H., and Begue-Kirn, C. (1995). Odontoblast Differentiation. *Int J Dev Biol* 39, 51-68.
- Sacchetti, B., Funari, A., Michienzi, S., Di Cesare, S., Piersanti, S., Saggio, I., Tagliafico, E., Ferrari, S., Robey, P.G., Riminucci, M., *et al.* (2007). Self-Renewing Osteoprogenitors in Bone Marrow Sinusoids Can Organize a Hematopoietic Microenvironment. *Cell* 131, 324-336.
- Sagi, B., Maraghechi, P., Urban, V.S., Hegyi, B., Szigeti, A., Fajka-Boja, R., Kudlik, G., Nemet, K., Monostori, E., Gocza, E., *et al.* (2012). Positional Identity of Murine Mesenchymal Stem Cells Resident in Different Organs Is Determined in the Postsegmentation Mesoderm. *Stem Cells Dev* 21, 814-828.

- Sebastian-Serrano, A., Engel, T., de Diego-Garcia, L., Olivos-Ore, L.A., Arribas-Blazquez, M., Martinez-Frailes, C., Perez-Diaz, C., Millan, J.L., Artalejo, A.R., Miras-Portugal, M.T., *et al.* (2016). Neurodevelopmental Alterations and Seizures Developed by Mouse Model of Infantile Hypophosphatasia Are Associated with Purinergic Signalling Deregulation. *Hum Mol Genet* 25, 4143-4156.
- Seefried, L., Baumann, J., Hemsley, S., Hofmann, C., Kunstmann, E., Kiese, B., Huang, Y., Chivers, S., Valentin, M.A., Borah, B., *et al.* (2017). Efficacy of Anti-Sclerostin Monoclonal Antibody Bps804 in Adult Patients with Hypophosphatasia. *J Clin Invest* 127, 2148-2158.
- Seo, B.M., Miura, M., Gronthos, S., Bartold, P.M., Batouli, S., Brahim, J., Young, M., Robey, P.G., Wang, C.Y., and Shi, S. (2004). Investigation of Multipotent Postnatal Stem Cells from Human Periodontal Ligament. *Lancet* 364, 149-155.
- Sergienko, E.A., and Millan, J.L. (2010). High-Throughput Screening of Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase for Identification of Effectors with Diverse Modes of Action. *Nat Protoc* 5, 1431-1439.
- Shi, S., and Gronthos, S. (2003). Perivascular Niche of Postnatal Mesenchymal Stem Cells in Human Bone Marrow and Dental Pulp. *J Bone Miner Res* 18, 696-704.
- Shi, S., Robey, P.G., and Gronthos, S. (2001). Comparison of Human Dental Pulp and Bone Marrow Stromal Stem Cells by Cdna Microarray Analysis. *Bone* 29, 532-539.
- Shyamala, K., Yanduri, S., Girish, H.C., and Murgod, S. (2015). Neural Crest: The Fourth Germ Layer. *J Oral Maxillofac Pathol* 19, 221-229.
- Silvent, J., Gasse, B., Mornet, E., and Sire, J.Y. (2014). Molecular Evolution of the Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase Allows Prediction and Validation of Missense Mutations Responsible for Hypophosphatasia. *J Biol Chem* 289, 24168-24179.
- Somerman, M.J., Archer, S.Y., Imm, G.R., and Foster, R.A. (1988). A Comparative Study of Human Periodontal Ligament Cells and Gingival Fibroblasts in Vitro. *J Dent Res* 67, 66-70.
- Spoto, G., Fioroni, M., Rubini, C., Tripodi, D., Di Stilio, M., and Piattelli, A. (2001). Alkaline Phosphatase Activity in Normal and Inflamed Dental Pulps. *J Endod* 27, 180-182.
- Taketani, T., Kanai, R., Abe, M., Mishima, S., Tadokoro, M., Katsube, Y., Yuba, S., Ogushi, H., Fukuda, S., and Yamaguchi, S. (2013). Therapy-Related Ph⁺ Leukemia after Both Bone Marrow and Mesenchymal Stem Cell Transplantation for Hypophosphatasia. *Pediatr Int* 55, e52-55.
- Taketani, T., Oyama, C., Mihara, A., Tanabe, Y., Abe, M., Hirade, T., Yamamoto, S., Bo, R., Kanai, R., Tadenuma, T., *et al.* (2015). Ex Vivo Expanded Allogeneic Mesenchymal Stem Cells with Bone Marrow Transplantation Improved Osteogenesis in Infants with Severe Hypophosphatasia. *Cell Transplant* 24, 1931-1943.
- Tomlinson, M.J., Dennis, C., Yang, X.B., and Kirkham, J. (2015). Tissue Non-Specific Alkaline Phosphatase Production by Human Dental Pulp Stromal Cells Is Enhanced by High Density Cell Culture. *Cell Tissue Res* 361, 529-540.
- Ulmer, F. (2010). Stammzellen - Eine Perspektive Der Zahnmedizin. *Schweizer Monatsschrift für Zahnmedizin* 120.
- Undale, A.H., Westendorf, J.J., Yaszemski, M.J., and Khosla, S. (2009). Mesenchymal Stem Cells for Bone Repair and Metabolic Bone Diseases. *Mayo Clin Proc* 84, 893-902.

- Valenza, G., Burgemeister, S., Girschick, H., Schoen, C., Veihelmann, S., Moter, A., Haban, V., Vogel, U., and Schlagenhauf, U. (2006). Analysis of the Periodontal Microbiota in Childhood-Type Hypophosphatasia. *Int J Med Microbiol* 296, 493-500.
- van den Bos, T., Handoko, G., Niehof, A., Ryan, L.M., Coburn, S.P., Whyte, M.P., and Beertsen, W. (2005). Cementum and Dentin in Hypophosphatasia. *J Dent Res* 84, 1021-1025.
- Wada, N., Wang, B., Lin, N.H., Laslett, A.L., Gronthos, S., and Bartold, P.M. (2011). Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Gingival Fibroblasts and Periodontal Ligament Fibroblasts. *J Periodontal Res* 46, 438-447.
- Wang, K.C., Helms, J.A., and Chang, H.Y. (2009). Regeneration, Repair and Remembering Identity: The Three Rs of Hox Gene Expression. *Trends Cell Biol* 19, 268-275.
- Wang, Z., Gerstein, M., and Snyder, M. (2009). Rna-Seq: A Revolutionary Tool for Transcriptomics. *Nat Rev Genet* 10, 57-63.
- Waymire, K.G., Mahuren, J.D., Jaje, J.M., Guilarte, T.R., Coburn, S.P., and MacGregor, G.R. (1995). Mice Lacking Tissue Non-Specific Alkaline Phosphatase Die from Seizures Due to Defective Metabolism of Vitamin B-6. *Nat Genet* 11, 45-51.
- Whyte, M.P. (2010). Physiological Role of Alkaline Phosphatase Explored in Hypophosphatasia. *Ann N Y Acad Sci* 1192, 190-200.
- Whyte, M.P., Mahuren, J.D., Fedde, K.N., Cole, F.S., McCabe, E.R., and Coburn, S.P. (1988). Perinatal Hypophosphatasia: Tissue Levels of Vitamin B6 Are Unremarkable Despite Markedly Increased Circulating Concentrations of Pyridoxal-5'-Phosphate. Evidence for an Ectoenzyme Role for Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase. *J Clin Invest* 81, 1234-1239.
- Whyte, M.P., Rockman-Greenberg, C., Ozono, K., Riese, R., Moseley, S., Melian, A., Thompson, D.D., Bishop, N., and Hofmann, C. (2016). Asfotase Alfa Treatment Improves Survival for Perinatal and Infantile Hypophosphatasia. *J Clin Endocrinol Metab* 101, 334-342.
- Whyte, M.P., Zhang, F., Wenkert, D., McAlister, W.H., Mack, K.E., Benigno, M.C., Coburn, S.P., Wagy, S., Griffin, D.M., Ericson, K.L., *et al.* (2015). Hypophosphatasia: Validation and Expansion of the Clinical Nosology for Children from 25 Years Experience with 173 Pediatric Patients. *Bone* 75, 229-239.
- Woods, E.J., Perry, B.C., Hockema, J.J., Larson, L., Zhou, D., and Goebel, W.S. (2009). Optimized Cryopreservation Method for Human Dental Pulp-Derived Stem Cells and Their Tissues of Origin for Banking and Clinical Use. *Cryobiology* 59, 150-157.
- Yadav, M.C., de Oliveira, R.C., Foster, B.L., Fong, H., Cory, E., Narisawa, S., Sah, R.L., Somerman, M., Whyte, M.P., and Millan, J.L. (2012). Enzyme Replacement Prevents Enamel Defects in Hypophosphatasia Mice. *J Bone Miner Res* 27, 1722-1734.
- Yadav, M.C., Lemire, I., Leonard, P., Boileau, G., Blond, L., Beliveau, M., Cory, E., Sah, R.L., Whyte, M.P., Crine, P., *et al.* (2011). Dose Response of Bone-Targeted Enzyme Replacement for Murine Hypophosphatasia. *Bone* 49, 250-256.
- Yadav, M.C., Simao, A.M., Narisawa, S., Huesa, C., McKee, M.D., Farquharson, C., and Millan, J.L. (2011). Loss of Skeletal Mineralization by the Simultaneous Ablation of Phospho1 and Alkaline Phosphatase Function: A Unified Model of the Mechanisms of Initiation of Skeletal Calcification. *J Bone Miner Res* 26, 286-297.

Yamaza, H. (2015). Properties and Possibilities of Human Dental Pulp-Derived Stem Cells. *Archives of Stem Cells Research*.

Yepes, J.F. (2017). Dental Manifestations of Pediatric Bone Disorders. *Curr Osteoporos Rep*.

Yu, J., Wang, Y., Deng, Z., Tang, L., Li, Y., Shi, J., and Jin, Y. (2007). Odontogenic Capability: Bone Marrow Stromal Stem Cells Versus Dental Pulp Stem Cells. *Biol Cell* 99, 465-474.

Zhang, S., and Cui, W. (2014). Sox2, a Key Factor in the Regulation of Pluripotency and Neural Differentiation. *World J Stem Cells* 6, 305-311.

Zhao, N., Foster, B.L., and Bonewald, L.F. (2016). The Cementocyte-an Osteocyte Relative? *J Dent Res* 95, 734-741.

Zhu, M., and Nikolajczyk, B.S. (2014). Immune Cells Link Obesity-Associated Type 2 Diabetes and Periodontitis. *J Dent Res* 93, 346-352.

Zhu, W., and Liang, M. (2015). Periodontal Ligament Stem Cells: Current Status, Concerns, and Future Prospects. *Stem Cells Int* 2015, 972313.

ABKÜRZUNGEN

AP	Alkalische Phosphatase (auch ALP)
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BMSCs	bone marrow mesenchymal stem cells, Knochenmarksstammzellen
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	cyclic AMP, zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid, komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CNTNAP2	contactin-associated protein-like 2
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAPI	4', 6-diamino-2-phenylindole
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DMP1	Dentinmatrixprotein 1
DPSCs	dental pulp stem cells, Stammzellen aus der Pulpa
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEF1 α	eukaryotic translation elongation factor 1a
ENPP1	Ectonukleotid-Pyrophosphatase/phosphodiesterase 1
et al.	et altera, und andere
FACS	fluorescence-activated cell sorting, Durchflusszytometrie
FABP4	fatty acid binding protein 4
FCS	fetale calf serum, fötales Kälberserum
GABBR2	gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor 2
HPP	Hypophosphatasie
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
LPL	Lipoproteinlipase
MSC	mesenchymal stem cell, mesenchymale Stammzelle
NES	Nestin
OC	Osteocalcin
OPN	Osteopontin
PI	Proteaseinhibitor
PBS	phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PDL	parodontales Ligament
PDLSCs	periodontal ligament stem cells, Stammzellen des parodontalen Ligaments
PLP	Pyridoxalphosphat

PPARG2	peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2
PPi	Pyrophosphat
qPCR	quantitative polymerase-chain-reaction, quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
RUNX2	runt-related transcription factor 2
SEM	standard error of mean
SHED	stem cells of human exfoliated deciduous teeth, Stammzellen aus Milchzähnen
SCAP	stem cells of apical papilla, Stammzellen aus der apikalen Papille
SOST	Sclerostin
SOX2	sex determining region Y-box 2
Taq	Thermus aquaticus Polymerase
TNAP	tissue-nonspecific alkaline phosphatase, Gewebe-unspezifische Alkalische Phosphatase, auch als TNSALP abgekürzt

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABB. 1: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER TNAP	5
ABB. 2: KLASSIFIKATION DER 5 SUBTYPEN DER HPP	10
ABB. 3: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES DIFFERENZIERUNGSPOTENTIALS VON MSCs	19
ABB. 4: NERVEN UND NERVEN-ASSOZIIERTE ZELLQUELLE FÜR NEUROEKTODERMALE ZELLEN	22
ABB. 5: SCHEMAT. DARSTELLUNG DER LOKALISATION DER ANALYSIERTEN DENTALEN STAMMZELLEN ...	24
ABB. 6: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER AUFTEILUNG DER BMSC-PROBEN	46
ABB. 7: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER AUFTEILUNG DER DPSCs BZW. PDLSCs	47
ABB. 8: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER AUSSAAT DER BMSCs ZUR DIFFERENZIERUNG	58
ABB. 9: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER AUSSAAT DER DPSCs BZW. PDLSC	59
ABB. 10: BEISPIELE AUS DER AUFBEREITUNGSPROZEDUR ZUR ISOLATION DER DPSCs UND PDLSCs.....	65
ABB. 11: MIKROSKOPISCHE AUFNAHMEN ZUR VERANSCHAULICHUNG DER 5 PROBENPAARE	66
ABB. 12: ZELLKULTUR-BEISPIEL EINER DPSC-PROBE UND EINER PDLSC-PROBE.....	67
ABB. 13: MORPHOLOGIE UND WACHSTUMSVERHALTEN DER DPSCs UND PDLSCs	68
ABB. 14: RELATIVE GENEXPRESSION DER BASALEN MSC-PROBEN, ERGEBNISSE DER RT-PCRS.	69
ABB. 15: RELATIVE GENEXPRESSION VON TNAP, OPN, SOX2 UND NES (BASALE PROBEN)	70
ABB. 16: GATING DER FACS-ANALYSE.....	73
ABB. 17: DIFFERENTIELLE CD146-EXPRESSION	74
ABB. 18: MITTLERE BASALE AP-AKTIVITÄT	75
ABB. 19: IMMUNZYTOCHEMISCHE FÄRBUNGEN	77
ABB. 20: IMMUNZYTOCHEMISCHE FÄRBUNGEN ZUSÄTZLICHER BASALER PROBEN	77
ABB. 21: INTRAZELLULÄRE MORPHOLOGISCHE AUFFÄLLIGKEITEN	79
ABB. 22: IMMUNZYTOCHEMISCHE GOLGI-FÄRBUNGEN.....	80
ABB. 23: PHALLOIDIN-FÄRBUNG DREI ZUSÄTZLICHER DPSC-PROBEN	81
ABB. 24: RELATIVE GENEXPRESSION	82
ABB. 25: ERGEBNISSE DER QPCRS	87
ABB. 26: CSPD-ASSAY DER OSTEOGEN DIFFERENZIIERTEN BMSC-PROBEN MIT / OHNE LEVAMISOL.....	89
ABB. 27: CSPD-ASSAY DER OSTEOGEN DIFFERENZIIERTEN DPSC-PROBEN MIT / OHNE LEVAMISOL.....	90
ABB. 28: CSPD-ASSAY DER OSTEOGEN DIFFERENZIIERTEN PDLSC-PROBEN MIT /OHNE LEVAMISOL.....	90
ABB. 29: VERGLEICH DER RELATIVEN AP-AKTIVITÄT.....	91

ABB. 30: MITTELWERTE DER RELATIVEN AP-AKTIVITÄT	91
ABB. 31: ÖLROT-O-FÄRBUNG DER 5 DPSC-PROBEN.....	92
ABB. 32: ÖLROT-O-FÄRBUNG DER 5 PDLSC-PROBEN	93
ABB. 33: 6 WEITERE ÖLROT-O-FÄRBUNGEN	93
ABB. 34: ÖLROT-O-FÄRBUNG DREI ZUSÄTZLICHER BMSC-PROBEN	94
ABB. 35: QUANTIFIZIERUNG DER ÖLROT-O-FÄRBUNGEN	95
ABB. 36: QUANTIFIZIERUNG DER ÖLROT-O-FÄRBUNG DER DPSCS UND PDLSCS	95
ABB. 37: ALIZARINROT-FÄRBUNG: NACHWEIS DER OSTEOGENEN DIFFERENZIERUNG (DPSCs)	97
ABB. 38: ALIZARINROT-FÄRBUNG: NACHWEIS DER OSTEOGENEN DIFFERENZIERUNG (PDLSCs).....	98
ABB. 39: ALIZARINROT-FÄRBUNG: NACHWEIS DER OSTEOGENEN DIFFERENZIERUNG (BMSCs)	99
ABB. 40: ALIZARINROT-FÄRBUNG DER DPSCS UND DER ENTSPRECHENDEN PDLSC-PROBEN	100
ABB. 41: ALIZARINROT-FÄRBUNGEN DER BMSCS	100
ABB. 42: HEATMAP DER RNA-SEQUENZIERUNG	102
ABB. 43: VERTEILUNGSANALYSE DER 10 PDLSC-PROBEN.....	102
ABB. 44: VALIDIERUNG ERGEBNISSE AUS DER RNA-SEQUENZIERUNG.....	103
ABB. 45: VALIDIERUNG DER RNA-SEQ ERGEBNISSE UND HINZUNAHME DPSC-PROBEN	106
ABB. 46: AUSBLICK UND ÜBERSICHT WEITERER ANSÄTZE DER HPP-FORSCHUNG MIT DMSCS.....	130

TABELLENVERZEICHNIS

TAB. 1: NORMWERTE DER AP IM SERUM.....	3
TAB. 2: MINERALISIERUNGS-ASSOZIIERTE GENE	8
TAB. 3: DIE 5 KLINISCHEN SUBTYPEN DER HPP	11
TAB. 4: VERBRAUCHSMATERIAL	29
TAB. 5: GERÄTE.....	30
TAB. 6: CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN	31
TAB. 7: KITS	32
TAB. 8: ZUSAMMENSETZUNG DER ZELLKULTURMEDIEN	35
TAB. 9: ZELLKULTURZUSÄTZE.....	36
TAB. 10: PUFFER UND LÖSUNGEN	36
TAB. 11: FÄRBE LÖSUNGEN	37
TAB. 12: ANTIKÖRPER FÜR DIE IMMUNZYTOCHEMIE.....	37
TAB. 13: ANTIKÖRPER FÜR DIE FACS-ANALYSE.....	38
TAB. 14: ENZYME	38
TAB. 15: PRIMER FÜR DIE RT-PCR.....	39
TAB. 16: PRIMER FÜR DIE QPCR.....	39
TAB. 17: SOFTWARE UND ONLINE-QUELLEN	41
TAB. 18: PROZENTUALE EXPRESSIONSWERTE DER OBERFLÄCHENMARKER 4 WEITERER PROBENPAARE ..	74
TAB. 19: ANTEIL DER CD146 POSITIVEN ZELLEN UND MEDIANE EXPRESSIONSSTÄRKE	75

DANKSAGUNG

Zu allererst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Franz Jakob bedanken für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit und die Möglichkeit an dieser interessanten Fragestellung am Orthopädischen Centrum für Muskuloskelettale Forschung arbeiten zu können.

Ich danke Herrn Prof. Schlagenhaut für das Koreferat, die hilfreichen Ratschläge und Einblicke in seine Habilitationsschrift.

Frau Dr. Stephanie Graser danke ich sehr herzlich für die sehr gute Betreuung der experimentellen Arbeiten, für ihre wertvollen Ratschläge, die kritische Diskussion der Ergebnisse und die Beratung beim Erstellen dieser Arbeit. Vielen Dank für die große Hilfe und die schöne und konstruktive Zeit.

Frau Dr. Marietta Herrmann möchte ich sehr herzlich für die Unterstützung bei der FACS-Analyse, die hilfreichen Ratschläge, ihre Anregungen zu den Experimenten und der Thematik danken. Vielen Dank für die schöne und bereichernde Zeit. Mein Dank gilt weiterhin ihrer Arbeitsgruppe, der Nachwuchsforschergruppe des IZKF Würzburg, für den Austausch im Labor.

Für die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die stets sehr gute Zusammenarbeit und die gemeinsame Zeit danke ich der gesamten Arbeitsgruppe des MCW: Ich danke Frau PD Dr. Regina Ebert, Melanie Krug, Jutta Meißner-Weigl, Frau Dr. Sigrid Müller-Deubert, Doris Schneider und Sabine Zeck. Ich danke auch Frau Dr. Birgit Mentrup für die hilfreichen Ansätze zu Beginn meiner Arbeit.

Ich danke den Kollegen aus der Poliklinik der Abteilung für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Würzburg für die Unterstützung und die Bereitstellung der extrahierten Weisheitszähne. Herrn Dr. Ralf Krug danke ich für die hilfreiche Vermittlung und Korrespondenz zu Beginn dieser Arbeit. Für die Beteiligung am Ethikantrag danke ich der AG Walles vom Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin der Universität Würzburg.

Mein Dank gilt auch dem Hypophosphatasie Deutschland e.V. für die finanzielle Unterstützung und das Interesse an meiner Doktorarbeit mit dem Fokus auf die dentalen Aspekte der Erkrankung. Ich möchte mich sehr herzlich bei allen Autoren der Buchveröffentlichung „Hypophosphatasie: Diagnostik und Management“ für die Honorarspende zur Durchführung der RNA-Sequenzierung meiner PDLSC-Proben bedanken. Der Core Unit Systemmedizin der Universität Würzburg unter der Leitung von Dr. Konrad Förstner danke ich für die gute Zusammenarbeit, insbesondere Dr. Richa Bharti danke ich für die bioinformatische Auswertung der RNA-Sequenzierung und die Anleitung zur Interpretation der Ergebnisse.

Ich danke meiner Familie und meinen Freunden für die großartige Unterstützung.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Charakterisierung und Analyse mesenchymaler Stammzellen dentalen Ursprungs mit Fokus auf die dentalen Aspekte der Hypophosphatasie -Etablierung eines *in vitro* Modells-“ eigenständig, d.h. selbständig und ohne Zuhilfenahme Dritter, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben. Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.