

Aus der Klinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie  
(Direktor: Prof. Dr. med. dent. C. Dörfer)  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

# Expressionsprofil der Toll-like Rezeptoren in humanen pulpalen Stammzellen

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde der Zahnheilkunde  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrecht-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
Pauline Elisabeth Klingebiel  
aus Göttingen

Kiel 2018

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. dent. C. Dörfer

2. Berichterstatter/in: Prof. Dr. A. Klettner

Tag der mündlichen Prüfung: 21.05.2019

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 01.03.2019

gez.: Prof. Dr. Johann Roider

(Vorsitzender des Ausschusses für Promotion)

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>IX</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>X</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Die Pulpa</b>	<b>1</b>
1.1.1. Die Bedeutung der Pulpa	1
1.1.2. Die reversible und irreversible Pulpitis	3
<b>1.2. Pulpale Stammzellen (DPSCs)</b>	<b>7</b>
1.2.1. Marker zur Charakterisierung von DPSCs	9
1.2.1.1. STRO-1	9
1.2.1.2. Oktamer-bindender Transkriptionsfaktor ( <i>octamer binding transcription factor 4</i> ) (Oct-4)	9
1.2.1.3. SRY ( <i>sex determining region Y</i> )-box 2 (Sox-2)	9
1.2.1.4. <i>Cluster of differentiation</i> (CD)	10
<b>1.3. Toll-like Rezeptoren (TLRs)</b>	<b>13</b>
1.3.1. Extrazelluläre TLRs	14
1.3.1.1. Komplexbildende extrazelluläre TLRs	14
1.3.1.2. Nicht komplexbildende extrazelluläre TLRs	15
1.3.2. Intrazelluläre TLRs	16
1.3.2.1. Komplexbildende intrazelluläre TLRs	16
1.3.2.2. Nicht komplexbildende intrazelluläre TLRs	17
1.3.3. TLR10	17
1.3.4. Funktion der Toll-like-Rezeptoren in MSCs	18

1.3.5.	Funktion der TLRs in DPSCs	19
<b>1.4.</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>20</b>
<hr/>		
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>21</b>
<hr/>		
<b>2.1.</b>	<b>Material</b>	<b>21</b>
2.1.1.	Verbrauchsmaterialien	21
2.1.2.	Geräte	22
2.1.3.	Medien, Puffer, Reagenzien und Chemikalien	23
2.1.4.	CD-Antigene und Antikörper	24
2.1.5.	Fertige Reaktionssysteme	25
2.1.6.	Primer	26
2.1.7.	Sterilisationsverfahren	26
<b>2.2.</b>	<b>Methoden</b>	<b>27</b>
2.2.1.	Gewinnung der DPSCs	27
2.2.1.1.	Gewinnung von Zellen aus der Pulpa	27
2.2.1.2.	Passagieren der Zellen	28
2.2.1.3.	Zellsortierung ( <i>magnetic activated cell sorting</i> )	28
2.2.1.4.	Einfrieren von Zellen	30
2.2.2.	Verfahren zum Nachweis von Stammzeleigenschaften	30
2.2.2.1.	Colony forming unit assay (CFU)	30
2.2.2.2.	Differenzierung der DPSCs	31
2.2.2.3.	Osteogene Differenzierung	31
2.2.2.4.	Adipogene Differenzierung	31
2.2.2.5.	Chondrogene Differenzierung	31
2.2.2.6.	Zellfärbungen	32
2.2.3.	Experimenteller Ansatz und Analysen	34
2.2.3.1.	Ansetzen eines Entzündungsmediums	34
2.2.4.	Extraktion der Ribonukleinsäure (RNA)	35
2.2.4.1.	RNA-Messung	35

2.2.4.2.	cDNA-Synthese	36
2.2.4.3.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	36
2.2.4.4.	Fluorescence-activated cell sorting (FACS-Analyse)	39
2.2.5.	Statistische Auswertung	42
<hr/>		
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>44</b>
<hr/>		
<b>3.1.</b>	<b>Nachweis der Stammzeleigenschaften</b>	<b>44</b>
3.1.1.	Nachweis von Zellwachstum aus Pulpafragmenten	44
3.1.2.	Identifizierung als pulpale Stammzellen (DPSCs)	45
3.1.2.1.	Nachweis von koloniebildenden Einheiten ( <i>colony forming units</i> , CFU)	45
3.1.2.2.	Extrazelluläre FACS-Analyse zum Nachweis der CD-Antigene	45
3.1.2.3.	Differenzierungspotenzial der DPSCs	46
<b>3.2.</b>	<b>Expression der Toll-like Rezeptoren in DPSCs auf mRNA-Ebene</b>	<b>48</b>
<b>3.3.</b>	<b>Expression der Toll-like Rezeptoren in DPSCs auf Proteinebene</b>	<b>49</b>
<hr/>		
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>51</b>
<hr/>		
<b>4.1.</b>	<b>Diskussion der Methodik</b>	<b>51</b>
4.1.1.	Zellkultivierung	51
4.1.2.	Nachweis von Stammzeleigenschaften	52
4.1.2.1.	Stammzellidentifikation	52
4.1.2.2.	<i>Colony forming unit assay</i>	53
4.1.2.3.	Zelldifferenzierungen	53
4.1.3.	<i>Magnetic activated cell sorting</i> (MACS)	55
4.1.4.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	55
4.1.5.	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i> (FACS)	56
<b>4.2.</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse</b>	<b>57</b>
4.2.1.	Expression der Toll-like Rezeptoren auf mRNA-Ebene	57

4.2.2.	Expression der Toll-like Rezeptoren auf Proteinebene	58
4.2.3.	Schlusswort zur Diskussion	58
<hr/>		
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>60</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>62</b>
<b>7.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>81</b>
	<b>Publikationen</b>	<b>82</b>
<hr/>		

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
%	Prozent
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
ADMSCs	aus Fettgewebe gewonnene Stammzellen ( <i>adipose derived mesenchymal stem cells</i> )
AMP	Adenosinmonophosphat
AP-1	Aktivator-Protein-1
APC	Allophycocyanin
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BMSSCs	Stammzellen aus dem Knochenmark ( <i>bone marrow stromal stem cells</i> )
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CaOH <sub>2</sub>	Calciumhydroxid
CD14, 34, 45, 73, 90, 105, 146	<i>cluster of differentiation</i> 14, 34, 45, 73, 90, 105, 146
cDNA	komplementäre DNA ( <i>complementary DNA</i> )
CFU	<i>colony forming unit</i>
CFU-F	CFU-Fibroblast
CGRP	<i>calcitonin gene related peptide</i>
cm <sup>3</sup>	Kubikzentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
CT	CT-Wert ( <i>threshold cycles</i> )
Ctrl	Kontrolle ( <i>control</i> )
DFSCs	Stammzellen aus dem Zahnsäckchen ( <i>dental follicle stem cells</i> )
DNA	Desoxyribonukleinsäure

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DPSCs	dentale pulpale Stammzellen ( <i>dental pulp stem cells</i> )
DPSCs-i	entzündete ( <i>inflamed</i> ) DPSCs
FACS	Durchflusszytometrie ( <i>fluorescence-activated cell sorting</i> )
FAM	Fluorescein
FcR	<i>fragment crystallisable receptor</i>
FCS	fetales Kälberserum
FGF-4	Fibroblasten Wachstumsfaktor 4 ( <i>fibroblast growth factor 4</i> )
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FRET-Effekt	Förster-Resonanzenergietransfer
G	Gramm
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
IDO-1	Indoleamine-2,3-Dioxygenase
IFN- $\beta$	Interferon $\beta$
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IKK	<i>inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase</i>
IKK $\epsilon$	<i>IKK-related kinase <math>\epsilon</math></i>
IL	Interleukin
IRAK	IL-1-Rezeptor-assoziierte Kinase
IRF	Interferon-regulierenden Faktor ( <i>interferon regulatory factor</i> )
JNK auch SAPK	c-Jun N-terminale Kinasen, auch <i>stress-activated protein kinase</i>
LBP	Lipopolysaccharid-bindendes Protein
LPS	Lipopolysaccharide
MACS	magnetisch aktivierte Zellsortierung ( <i>magnetic activated cell sorting</i> )
mCD14	membrangebundenes CD14
MSCs	mesenchymale Stammzellen
MEK	Methylethylketon
mg <sup>2+</sup>	Magnesium



<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
MKK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mRNA	Boten- RNA ( <i>messenger RNA</i> )
MyD88	<i>myeloid differentiation primary response gene 88</i>
NF-κB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
ng	Nanogramm
NKA	Neurokinin A
NPY	Neuropeptid Y
NT5E	Ecto-5'-nucleotidase
Oct-4	Oktamer-bindender Transkriptionsfaktor 4 ( <i>octamer binding transcription factor 4</i> )
p125-FAK	<i>focal adhesion kinase p125-FAK</i>
p38 MAPK	p38 mitogenaktivierte Proteinkinase
p59fyn	Tyrosinkinase p59fyn
PAMPs	Pathogen-assoziierte molekulare Muster ( <i>pathogen associated molecular patterns</i> )
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDLSCs	Stammzellen aus der Wurzelhaut ( <i>periodontal ligament stem cells</i> )
PE	Phycoerythrin
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PG-Fα	Prostaglandin Fα
Pit-Oct-Unc	POU-Familie
PKG2	Proteinkinase G 2
PMNL	polymorphkernige Granulozyten
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
PTP	Protein Tyrosin Phosphatase
PTPRC	Protein Tyrosin Phosphatase Rezeptor C
RNA	Ribonukleinsäure

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
RS	schnell autoreplizierend ( <i>rapidly selfreplicating</i> )
s. o./ u.	siehe oben/ unten
sCD14	<i>soluble CD14</i>
SHEDs	Stammzellen aus humanen Milchzähnen ( <i>stem cells of human exfoliated deciduous teeth</i> )
Sox2	SRY ( <i>sex determining region Y</i> )-box 2
SP	Substanz P
SR	langsam autoreplizierend ( <i>slowly selfreplicating</i> )
STRO-1	mesenchymaler Stammzellmarker
TAK1	<i>transforming growth factor <math>\beta</math>-activated kinase 1</i>
TAMRA	Tetramethylrhodamin
TBK1	<i>serine/threonine-protein kinase 1</i>
TGF $\beta$	<i>transforming growth factor <math>\beta</math></i>
Thy-1	<i>thymocyte differentiation antigen-1</i>
TIRAP	<i>toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein</i>
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TRAF3	TNF Rezeptor assoziierter Faktor 3
TRAF6	TNF Rezeptor assoziierter Faktor 6
TRAM	<i>toll-like receptor adaptor molecule 2</i>
TRIF	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-<math>\beta</math></i>
U	Einheiten ( <i>units</i> )
UPM	Umdrehungen pro Minute
UV-Licht	ultraviolettes Licht
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule 1</i>
VIP	vasoactive intestinal peptide
VLA-4	<i>very late antigen 4</i>
Wnt5a	<i>wingless-type MMTV integration site family, member 5A</i>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Aufbaus des menschlichen Dentins aus Hellwig et al. (2010) „Einführung in die Zahnerhaltung“ (Mit freundlicher Genehmigung des Deutschen Zahnärzte Verlages). .....	2
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Aufbaus der dentalen Pulpa nach Avery 1973 aus Hellwig et. al (2010) „Einführung in die Zahnerhaltung“ (Mit freundlicher Genehmigung des Deutschen Zahnärzte Verlages). .....	2
Abbildung 3: Pathogenese der Pulpitis in Anlehnung an Smulson und Sieraski (1996) und Trowbridge und Emling (1997) aus Klimm (2011) „Endodontologie“ (Mit freundlicher Genehmigung des Deutschen Zahnärzte Verlages). .....	7
Abbildung 4: Signaltransduktionswege der Toll-like Rezeptoren aus Zhao et al. (2014). .....	18
Abbildung 5: Untersuchung des Zellwachstums aus Pulpafragmenten. ....	44
Abbildung 6: Nachweis von <i>colony forming units</i> . .....	45
Abbildung 7: Nachweis von CD-Antigenen mittels extrazellulärer FACS-Analyse zur Identifizierung von DPSCs.....	46
Abbildung 8: Nachweis einer osteogenen Differenzierung der DPSCs.....	47
Abbildung 9: Nachweis einer adipogenen Differenzierung der DPSCs. ....	47
Abbildung 10: Nachweis einer chondrogenen Differenzierung der DPSCs. ....	48
Abbildung 11: Expression der TLRs auf mRNA-Ebene in DPSCs und DPSCs-i. ....	49
Abbildung 12: Expression der TLRs auf Proteinebene in DPSCs und DPSCs-i. ....	50

## Tabellenverzeichnis

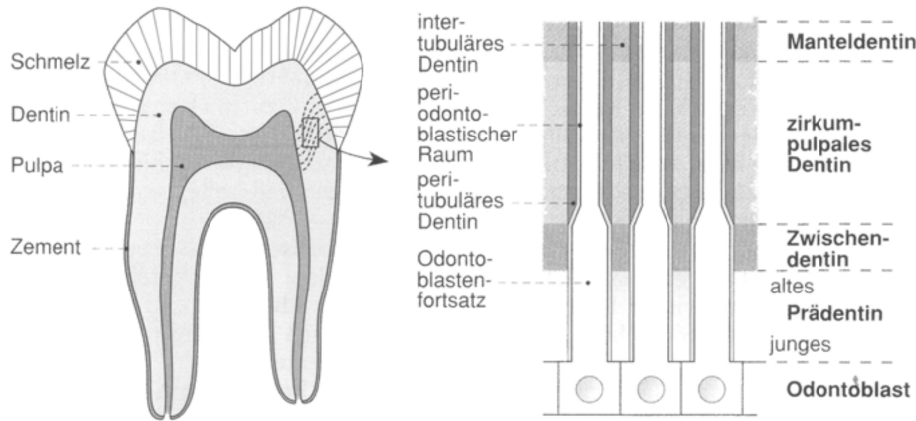
Tabelle 1: Toll-like Rezeptoren und die PAMPs, die sie erkennen aus Fawzy El-Sayed et al. (2018). .....	13
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien .....	22
Tabelle 3: Geräte .....	23
Tabelle 4: Medien, Puffer, Reagenzien und Chemikalien .....	24
Tabelle 5: CD-Antigene und Antikörper.....	25
Tabelle 6: Fertige Reaktionssysteme.....	25
Tabelle 7: Primer .....	26
Tabelle 8: Programm der quantitativen Echtzeit-PCR mit dem Light Cycler <sup>TM</sup> .....	38
Tabelle 9: Protokoll zum Ansetzen der CD-Antigen-Proben.....	40
Tabelle 10: Protokoll zum Ansetzen der Toll-like Rezeptoren-Proben .....	41
Tabelle 11: Protokoll zum Ansetzen der Proben für die intrazelluläre FACS-Analyse.....	42

# **1. Einleitung**

## **1.1. Die Pulpa**

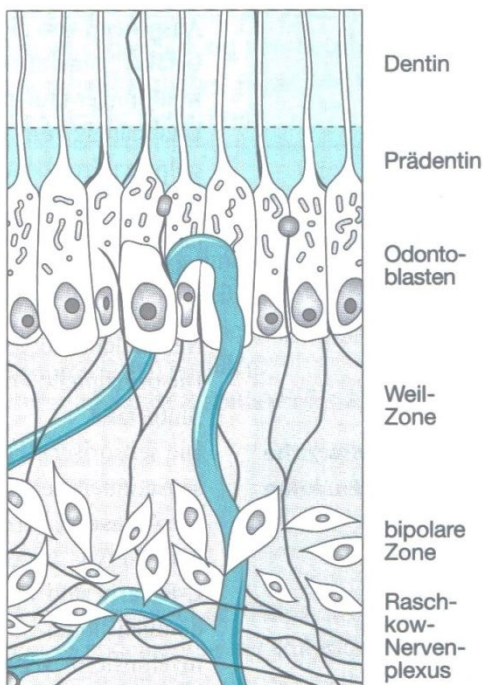
### **1.1.1. Die Bedeutung der Pulpa**

Die Pulpa oder das Zahnmark ist das Weichgewebe des Zahnes. Sie füllt die Pulpakammer und die Wurzelkanäle aus. Topographisch lassen sich die Kronen- und die Wurzelpulpa unterscheiden (Meyer et al. 1954; Schumacher et al. 1990). Die Grundsubstanz der Pulpa besteht aus gallertartigem Bindegewebe, in das sensible Nervenfasern, sowie Blut- und Lymphgefäße eingebettet sind (Linde 1973). Sie besteht zu 75% aus Wasser und zu 25% aus organischen Bestandteilen (Beveridge et al. 1965). Durch das Foramen apicale an der Wurzelspitze können ein Zu- und Abfluss der Gefäße stattfinden und Nervenfasern ein- und austreten. So können sie mit außenliegenden Strukturen kommunizieren (Schumacher et al. 1990). Die Pulpa wird von einer Reihe Odontoblastenzellkörpern umgeben. Die Odontoblasten synthetisieren ein Leben lang neues Dentin. Zuerst bilden sie eine Schicht nicht mineralisierten Prädentins. Darauf folgen eine Schicht Zwischendentin, das zirkumpulpale Dentin und schließlich das Manteldentin an der Schmelz-Dentin-Grenze (Hellwig et al. 2010) (s. Abb.1). Die Pulpa bildet zusammen mit dem Dentin eine funktionelle Einheit, die als Pulpa-Dentin-Komplex beschrieben wird, bei dem Reize gleichermaßen Reaktionen in Pulpa und Dentin hervorrufen. (Mjor et al. 2002; Mjor et al. 2001).



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung des Aufbaus des menschlichen Dentins aus Hellwig et al. (2010) „Einführung in die Zahnerhaltung“ (Mit freundlicher Genehmigung des Deutschen Zahnärzte Verlages).

Wie in Abbildung 2 dargestellt weist die Pulpa einen schichtartigen Aufbau auf. Der Odontoblastenreihe folgt die zellarme Weil-Zone. Sie enthält lediglich Fibroblastenfortsätze und zentrale Endäste eines Nervenplexus. Die bipolare zellreiche Zone schließt sich ihr an. Ein Bindegewebsstrang mit dem eingebetteten Raschkow-Nervenplexus bildet pulpazentral den Abschluss (Baume 1980; Chiego 1994; Junqueira et al. 1996).



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung des Aufbaus der dentalen Pulpa nach Avery 1973 aus Hellwig et. al (2010) „Einführung in die Zahnerhaltung“ (Mit freundlicher Genehmigung des Deutschen Zahnärzte Verlages).

Die Pulpa erfüllt als vitale Einheit des Zahnes zahlreiche wichtige Funktionen. Sensible Nervenfasern erlauben ein Empfinden von thermischen, chemischen und mechanischen Reizen (sensorische Funktion). Die Durchblutung ermöglicht eine nutritive Funktion für die Odontoblasten des Dentins. Die Odontoblasten übernehmen eine formative Funktion durch Bildung des Dentins. Dabei unterscheidet man Primärdentin (Orthodentin), Sekundärdentin und Tertiär- oder Reizdentin. Primärdentin wird im Gegensatz zum Sekundärdentin bis zum Abschluss des Wurzelwachstums gebildet. Sekundärdentin wird auch nach dem Abschluss des Wurzelwachstums produziert. Es entsteht das Phänomen der Sklerosierung. Reizdentin wird als Reaktion auf pathologische Reize, wie z. B. Karies, produziert (Mjor et al. 2001). In der Pulpa gibt es verschiedene Zellpopulationen. Die Größte machen die Fibroblasten aus. Sie produzieren die pulpale Grundsubstanz sowie Kollagenfasern des Typs I und III (Avery 1971). Eine weitere Gruppe wird von undifferenzierten, postnatalen/adulten, multipotenten, mesenchymalen Stammzellen gebildet. Diese sogenannten *dental pulp stem cells* (DPSCs) gewinnen aufgrund ihres regenerativen Potenzials immer mehr an Bedeutung. Sie haben die Fähigkeit, sich nach bestimmter Stimulation in andere Zellen zu differenzieren, wie z. B. in Odontoblasten (Shiba et al. 2003). Die Odontoblasten bilden, wie oben beschrieben, einen randwallartigen Saum um die Pulpa herum. Neben der Reizdentinbildung verfügt die Pulpa auch über weitere auf immunologischer Ebene basierende Abwehrmechanismen. In der Pulpa sind viele Abwehrzellen wie z. B. Makrophagen, T- und B-Lymphozyten, Granulozyten, Histozyten, Monozyten und dendritische Zellen zu finden (Jontell et al. 1987; Jontell et al. 1998).

### **1.1.2. Die reversible und irreversible Pulpitis**

Eine Entzündung der Pulpa bezeichnet man als Pulpitis. Die häufigste Ursache für eine Pulpitis ist die Karies (Bergenholtz 1981). Je nach klinischen Symptomen und den Behandlungsoptionen wird zwischen dem Stadium einer reversiblen und irreversiblen Pulpitis unterschieden. Die reversible Pulpitis äußert sich durch einen stechenden Sekundenschmerz, der lokalisiert vor allem reizabhängig entsteht. Durch eine entsprechende Therapie, z. B. die konservierende Überkappungstherapie mit Calciumhydroxid (CaOH<sub>2</sub>), kann die reversible Pulpitis unter Verschwinden der klinischen Symptome behandelt werden, ohne dass das Pulpakavum eröffnet werden muss. CaOH<sub>2</sub> wirkt durch den alkalischen pH-Wert von 12 neutralisierend und regt die Odontoblasten zur Produktion von Reizdentin an

(Chen et al. 2016). Anschließend muss die Kavität mittels suffizienter Füllungstherapie für einen langfristigen Erfolg bakteriendicht gefüllt werden. Bei der irreversiblen Pulpitis hingegen ist der Schmerz nach Reiz lang anhaltend und häufig ausstrahlend. Eine Vitalerhaltung der Pulpa ist nach heutigem Kenntnisstand nicht möglich. Die Behandlung erfolgt unter möglichst vollständiger Entfernung der Weichgewebe aus dem Kanalsystem der Pulpa und einer Obturation desselben ebenfalls gefolgt von einem dichten und dauerhaften, die Kaufunktion wiederherstellenden Verschlusses der Kavität. Beide Pulpitisformen können asymptomatisch verlaufen (Hellwig et al. 2010). Organische Bestandteile sterben auch im Dentin ab, wünschenswert wäre eine Vitalerhaltung des ganzen Systems mittels regenerativer Therapie.

Histologisch lassen sich primär bei beiden Arten der Pulpitis immunologisch aktive Zellen, wie z. B. Lymphozyten, Makrophagen, Plasmazellen und T-Lymphozyten, nachweisen. Hinzukommen die vermehrte Anzahl von Blutgefäßen, Kollagenfasern und Fibroblasten (Izumi et al. 1995; Trowbridge et al. 1997). Eine Pulpitis kann durch die lange Infektionsdauer von oftmals mehreren Jahren als ein chronischer Krankheitsverlauf betrachtet werden. Sobald die kariesverursachenden Bakterien nahe genug an die Pulpa herangetreten sind, geht der chronische in einen akuten Zustand über (Kim et al. 1994). Es gibt mehrere Theorien, die die Pathogenese der Pulpitis erklären. Eine davon ist die Selbststrangulationstheorie. Der akute Zustand beginnt mit der Freisetzung primär pathogenetischer Faktoren durch die mikrobielle Noxe (Weine 1996). Dies initiiert die Freisetzung neurogener Faktoren wie Substanz P (SP), das *calcitonin gene related peptide* (CGRP), Neurokinin A (NKA), Neuropeptid Y (NPY) und *vasoactive intestinal peptide* (VIP), die weiterführend die Synthese der Gewebefaktoren Histamin, Bradykinin, Serotonin und der Prostaglandine PGE<sub>2</sub> und PG-F $\alpha$  anregen (Stashenko et al. 1998). Es kommt zur Vasodilatation pulpaler Gefäße durch eine Relaxation der Muskulatur in der Gefäßwand. Der folgende verringerte Strömungswiderstand in den Arteriolen und der Anstieg des lokalen Blutdrucks und Blutflusses in den Kapillaren resultiert in einer Hyperämie (Trowbridge et al. 1997). Die postkapillären Venolen der Pulpa dilatieren und die Gefäßwandpermeabilität steigt. Es treten vermehrt Serumproteine (Serumdiapese) und Plasmabestandteile (Plasmadiapese) aus dem Endothel in das umliegende Gewebe aus und das resultiert in einem Ödem des Pulpagewebes. Aufgrund der harten Ummantelung der Pulpa durch die Zahnhartsubstanzen steigt der intrapulpare Druck, was die Blutzirkulation beeinträchtigt (Hämostase) (Trowbridge et al. 1997). Zu diesem Zeitpunkt wandern polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMNL) zur Wand der Blutgefäße (Margination), haften über

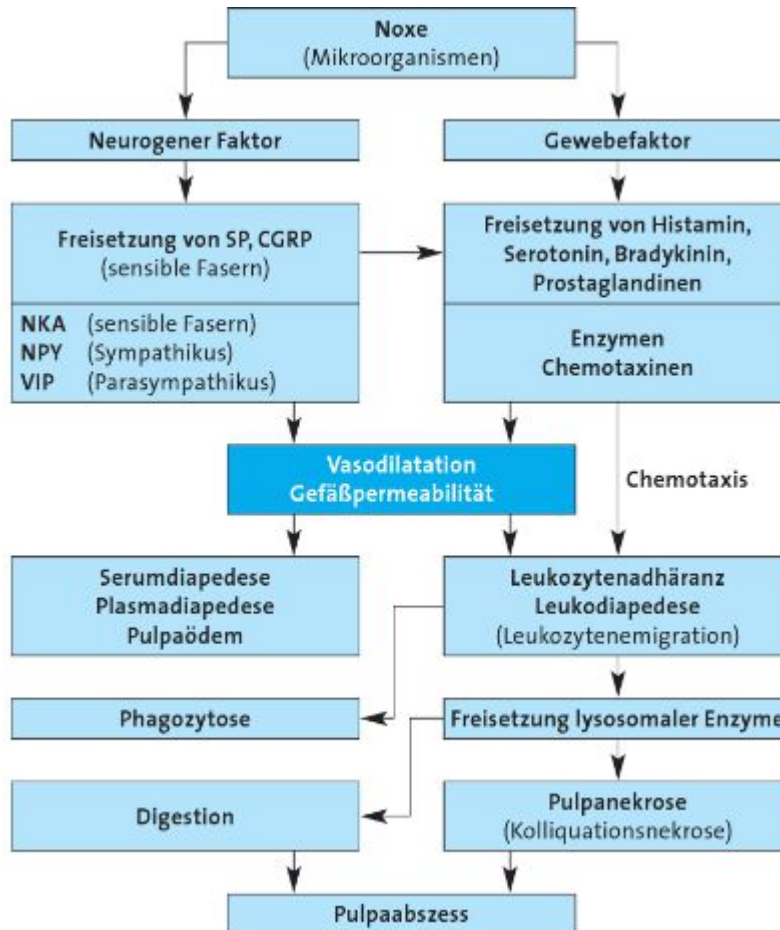


bestimmte Adhäsionsmoleküle an der Gefäßwand (Adhäsion) und emigrieren durch das Gefäßendothel (Emigration). Durch von Bakterien freigesetzte Zytokine (Chemokine) werden die PMNL angelockt (Chemotaxis), opsonisieren die Mikroorganismen mit bestimmten Antikörpern oder Komplementproteinen (Opsonisierung), so dass eine darauffolgende Phagozytose stattfinden kann. Nach diesem Vorgang kann eine Abtötung der phagozytierten Mikroorganismen durch die Fusion mit antibakteriellen Faktoren, wie z. B. Kollagenase, stattfinden. Zuletzt werden die inaktiven mikrobakteriellen Bestandteile durch lysosomale Enzyme verdaut (Digestion). Einige Stoffwechselprodukte der PMNL greifen allerdings auch gesundes Gewebe an. Beispielsweise bauen Matrix-Metallproteasen pulpales Bindegewebe ab. Es kommt zur Destruktion des Pulpagewebes. Aufgrund der verschlechterten Durchblutung entsteht eine intrapulpare Ischämie, die in einer lokalen Gewebsnekrose endet. Der Blutstrom verlangsamt sich, die Erythrozyten aggregieren und die Blutviskosität steigt. Es entsteht ein „*Circulus vitiosus*“ (Langeland 1981). Durch eine Minderversorgung des Gewebes mit Sauerstoff und verringertem Abtransport von Abfallprodukten steigt der CO<sub>2</sub>-Partialdruck. Der pH-Wert sinkt unter die physiologische Grenze von 7,35-7,45 in den sauren Bereich. Die Nekrose breitet sich in der gesamten Pulpa aus (Kolliquationsnekrose). Durch die Entstehung von Pus entwickelt sich ein Pulpaabszess (Trowbridge et al. 1997) (s. Abb. 3). Viele Autoren beschreiben die Selbststrangulationstheorie als veraltet. Die Autoren Trowbridge und Emling sagen, dass ein steigender Druck im Gewebe der Pulpa keinen direkten Einfluss auf die Vitalität des Gewebes hat und der Druckanstieg in einem Teil nicht zwangsläufig eine Veränderung des Drucks in anderen Teilen der Pulpa nach sich zieht. Sie erklären dies durch die Fähigkeit der Pulpa, Wasser an Proteoglykane zu binden. Dadurch würde sich eine Resilienz des Gewebes ergeben, was den Gefäßen eine Möglichkeit gibt, sich ausdehnen zu können. Trowbridge und Emling sehen die mikrobielle Kolonisierung und die daraus resultierende geschwächte Wirtsabwehr als Hauptursache für die Entstehung einer Pulpanekrose an (Trowbridge et al. 1997). Moderne Theorien besagen, dass generalisierte Ödeme durch eine erhöhte Lymphdrainage, die vermehrte Absorption der exsudativen Flüssigkeiten durch gesunde Kapillaren und einen nur auf das entzündete Gebiet beschränkten Druckanstieg verhindert werden können (Hellwig et al. 2010). Auch andere Autoren postulieren, dass der „*Circulus vitiosus*“ durch einen vermehrten Lymphfluss und eine vermehrte Aufnahme der austretenden Gewebeflüssigkeit durch die Kapillare durchbrochen werden kann (Heyeraas et al. 1999).

Pathogenetisch gibt es also mehrere Herangehensweisen die Pulpitis zu erklären. Die Pulpitis wird als dynamischer Prozess bezeichnet, weil unterschiedliche Entzündungsstadien zur

selben Zeit nebeneinander existieren können (Hellwig et al. 2010). Trotz bekannter Unterschiede in der Schmerzsymptomatik reversibler und irreversibler Pulpitiden, lassen sich diese deswegen schwer voneinander abgrenzen und unterscheiden, was die Diagnose und notwendige Therapieplanung erschwert. Des Weiteren kann sowohl eine reversible, als auch eine irreversible Pulpitis wie oben beschrieben asymptomatisch verlaufen, weswegen man eine reversible Pulpitis zu spät erkennt und diese durch eine Exazerbation in eine entweder symptomatische, oder asymptomatische irreversible Pulpitis oder sogar in eine Pulpanekrose übergeht (Hellwig et al. 2010).

Um trotzdem ein letztes Ende doch notwendige Devitalisierung des Zahnes durch das Entfernen des pulpalen Gewebes zu verhindern, gibt es immer mehr regenerative, therapeutische Herangehensweisen, allen voran die stammzellenbasierte Gewebeproduktion (*stemcell-based tissue engineering*), z. B. mit bestimmten Wachstumsfaktoren und Gerüstsystemen (Potdar et al. 2015). Die dentalen pulpalen Stammzellen (DPSCs) werden durch die Wachstumsfaktoren zur Produktion von Reizdentin angeregt, umso die Wundheilung in der Pulpa zu stimulieren. Studien zeigten bereits, dass DPSCs bei ischämischen Herzerkrankungen eine Vaskulogenese durch die Synthese eines proangiogenen Faktors induzieren können (Gandia et al. 2008; Iohara et al. 2008). Des Weiteren ist bekannt, dass die ossären Defekte bei einer apikalen Parodontitis mit einer Implantation von DPSCs innerhalb von drei bis vier Wochen ausheilen (Shieh-zadeh et al. 2014). Die gleiche Arbeitsgruppe postuliert ebenfalls, dass eine Kombination aus Desinfektion des infizierten Gewebes, Stammzellen, Wachstumsfaktoren und Gerüsten zu einer Revaskularisierung der nekrotischen Pulpa führen kann (Shieh-zadeh et al. 2014).



**Abbildung 3:** Pathogenese der Pulpitis in Anlehnung an Smulson und Sieraski (1996) und Trowbridge und Emling (1997) aus Klimm (2011) „Endodontologie“ (Mit freundlicher Genehmigung des Deutschen Zahnärzte Verlages).

## 1.2. Pulpale Stammzellen (DPSCs)

Die dentalen pulpalen Stammzellen (DPSCs) sind multipotente, mesenchymale Zellen (MSCs) und haben ihren Ursprung in der Neuralleiste (Janebodin et al. 2011). Schon beim Durchbruch des Zahnes in die Mundhöhle induzieren Stammzellen die Synthese von Sekundärdentin, um die Pulpa vor äußerlichen Einflüssen zu schützen (Potdar et al. 2015). Auf Reize, wie z. B. Attrition, fördern DPSCs nach dem Zahndurchbruch die Synthese von Tertiärdentin zum Schutz der Pulpa. Aufgrund ihres hohen Differenzierungspotenzials in verschiedene Zelltypen haben sie in den letzten Jahren in der regenerativen Medizin an Bedeutung gewonnen. Dazu gehört die Therapie kardiovaskulärer Krankheiten (Psaltis et al.

2008), Typ I Diabetes, neurologischer Erkrankungen, Erkrankungen von Knochen und Knorpel (Potdar et al. 2015), die parodontale Regeneration (Monsarrat et al. 2014) und die reparative bzw. regenerative Therapie der erkrankten Pulpa (Fawzy El-Sayed et al. 2015). *In vivo* transplantierte Stammzellen sind in der Lage, ihr Umfeld zu verändern und somit die Regeneration eines pathologisch veränderten Gewebes zu fördern. Dies gelingt durch Induktion körpereigener Zellen (Ilic et al. 2012; Shin et al. 2013), Aktivierung des Migrations- und Proliferationspotenzials und Steigerung der Produktion extrazellulärer Matrixbestandteile (Hynes et al. 2012). Aufgrund ihrer parakrinen Aktivität (Psaltis et al. 2008) und Multipotenz (Dominici et al. 2006) agieren sie auf den Ebenen der Neovaskularisation (Wu, Y. et al. 2007), Immunomodulation (Shi, Y. et al. 2010) und Geweberegeneration (Monsarrat et al. 2014).

Eine zentrale und charakteristische Eigenschaft aller Stammzellen ist, dass sie in verschiedene Zelllinien differenzieren können. Dies gilt auch für pulmale Stammzellen. Dazu gehören osteogene/odontogene, chondrogene, adipogene, neurogene, endotheliale und muskuläre Zellen, sowie die Differenzierung in  $\beta$ -Zellen der pankreatischen Langerhans-Inseln (Karaoz et al. 2011; Potdar et al. 2015; Zhang, W. et al. 2006). Außerdem zeichnen sie sich durch eine hohe Proliferationsrate, ein großes Selbsterneuerungspotenzial und ihre Klonogenität aus (Gronthos et al. 2002). Aufgrund der leichten Isolation und geringer ethischer Einschränkungen sind sie eine geeignete Quelle adulter multipotenter Stammzellen (Barachini et al. 2014; Pierdomenico et al. 2005). *In vivo* Studien haben gezeigt, dass Patienten bei allogenen Transplantationen von pulpalen Stammzellen eine hohe Toleranz aufweisen, welches an der geringen immunologischen Ablehnung liegt (Pierdomenico et al. 2005). Zur Identifizierung von pulpalen Stammzellen werden neben den Differenzierungsreihen, wie z.B. der osteogenen, adipogenen und chondrogenen Differenzierung zusätzlich noch zwei weitere Charakteristika herangezogen. Die Stammzellen müssen in der Lage sein, Kolonien zu bilden. Dieses wird getestet im sogenannten *colony unit forming assay* (CFU). Zum eindeutigen Nachweis, ob Stammzellen vorliegen, werden verschiedene Marker auf den Stammzellen, bzw. deren Fehlen, bestimmt. DPSCs wurden auf die Marker STRO-1, Oct-4, Sox 2, CD73, CD90, CD105 und CD146 positiv und auf die Marker CD14, CD34 und CD45 negativ getestet (Al-Habib et al. 2013; Karamzadeh et al. 2012).

## **1.2.1. Marker zur Charakterisierung von DPSCs**

### **1.2.1.1. STRO-1**

STRO-1 ist ein Zelloberflächenantigen und gilt als Marker für mesenchymale Stammzellen (Ning et al. 2011). Dazu gehören DPSCs, Stammzellen aus dem Knochenmark (*bone marrow stromal stem cells*, BMSSCs), Stammzellen von exfoliierten Milchzähnen (*stem cells of human exfoliated deciduous teeth*, SHEDs), Stammzellen aus dem Zahnfollikel (*dental follicle stem cells*, DFSCs) und Stammzellen aus dem parodontalen Ligament (*periodontal ligament stem cells*, PDLSCs) (Choung et al. 2013; Fawzy El-Sayed et al. 2013; Morszeck et al. 2005; Seo et al. 2005; Shi, S. et al. 2003). Zur Isolation der Stammzellen wird eine Kombination aus STRO-1 und Glycophorin A genutzt (Simmons et al. 1991).

### **1.2.1.2. Oktamer-bindender Transkriptionsfaktor (*octamer binding transcription factor 4*) (Oct-4)**

Oct-4 oder auch POU5F1 ist ein Transkriptionsfaktor aus der POU-Familie (Pit-Oct-Unc) (Ryan et al. 1997). Er ist ein wichtiges Kontrollgen in der frühen Embryonalentwicklung (Scholer et al. 1990). Oct-4 steuert die Transkription einiger Gene, wie z. B. vom Fibroblasten Wachstumsfaktor 4 (*fibroblast growth factor 4*, FGF-4) und ist dafür verantwortlich, eine Differenzierung embryonaler Zellen zu verhindern und ihre Totipotenz zu erhalten. Oct-4-negativ getestete Embryos weisen eine hohe Letalitätsrate auf (Pesce et al. 2000).

### **1.2.1.3. SRY (*sex determining region Y*)-box 2 (Sox-2)**

Sox-2 ist ein Transkriptionsfaktor aus der Sox-Familie (Bowles et al. 2000). Zusammen mit Oct-4 und dem Transkriptionsfaktor Nanog erhält er das Selbsterneuerungspotenzial undifferenzierter embryonaler Stammzellen (Sarkar et al. 2013). Während der embryonalen Entwicklung trägt er außerdem zur Bildung von ektodermalen und endodermalen Geweben bei (Arnold et al. 2011).

#### **1.2.1.4. Cluster of differentiation (CD)**

##### ***Cluster of differentiation 73 (CD73)***

CD73 oder auch ecto-5'-nucleotidase (NT5E) ist ein Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Zelloberflächenenzym. Es wandelt Adenosinmonophosphat (AMP) durch eine Dephosphorylierung in Adenosin um. Weitere Studien haben ergeben, dass CD73 ebenfalls eine Rolle bei physiologischen Reaktionen, wie dem epithelialen Transport von Flüssigkeit und Ionen, Gewebsverletzungen, Hypoxie, Thrombozytenfunktionen, dem Austritt von Flüssigkeit aus Gefäßen und ischämischer Präkonditionierung spielt (Colgan et al. 2006; Linden 2001; Resta et al. 1998). Des Weiteren soll CD73 eine Rolle beim Voranschreiten von Krebserkrankungen haben. Es wird vor allem in von Krebs befallenen Geweben exprimiert, wie z. B. im Colon, in der Lunge, in den Ovarien und im Pankreas (Jin, D. et al. 2010). Eine hohe Expression von CD73 wird assoziiert mit einer erhöhten Tumorneovaskularisierung, Metastasierung, invasivem Wachstum und verkürztem Überleben der betroffenen Patienten (Spychala 2000). Vor allem fördert es die Migration, Invasion und Adhäsion von Zellen des Mammakarzinoms (Wang et al. 2008).

##### ***Cluster of differentiation 90 (CD90)***

CD90, auch Thy-1-Membran-Glykoprotein genannt, ist ein Zelloberflächenmolekül aus der Immunglobulin-Superfamilie (Kisselbach et al. 2009). Es ist über einen GPI-Anker an der Oberfläche von verschiedenen Zellen befestigt (Zucchini et al. 2001). CD90 produziert Zytokine, Wachstumsfaktoren, extrazelluläre Matrixbestandteile und ist an der Wundheilung und Entzündungsprozessen beteiligt. Zusätzlich wird CD90 für Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte von Entzündungsmediatoren benötigt (Saalbach et al. 2000). Neuere Studien zeigen, dass CD90 eventuell auch beim Wachstum und der Differenzierung von Stammzellen mitwirkt (Rege et al. 2006).

##### ***Cluster of differentiation 105 (CD105)***

CD105 oder Endoglin ist ein transmembranes Glykoprotein. Es fungiert als Rezeptor für den *transforming growth factor  $\beta$*  (TGF $\beta$ ) und kann somit als regulatorische Einheit des

Rezeptorkomplexes vom TGF $\beta$  bezeichnet werden. Als Teil dieses Komplexes nimmt CD105 Einfluss auf intrazelluläre Signalkaskaden und spielt eine Rolle bei der Angiogenese, die vor allem für das Tumorwachstum und deren Progression entscheidend ist (Duff et al. 2003). Es ist beispielsweise in den Synzythiotrophoblasten der Plazenta, Endothelzellen von Blutgefäßen, hämatopoetischen Vorläuferzellen (Fonsatti et al. 2000), Fibroblasten (Gougos et al. 1988), Stromazellen (Rokhlin et al. 1995), glatten Muskelzellen (Adam et al. 1998) und Makrophagen (O'Connell et al. 1992) zu finden.

### ***Cluster of differentiation 146 (CD146)***

CD146 ist ein Glykoprotein und Teil der Immunglobulin-Superfamilie (Alais et al. 2001; Lehmann et al. 1989). Durch die Identifikationen in verschiedenen Geweben gibt es mehrere Synonyme wie MCAM, Mel-Cam, A32 Antigen und Glykoprotein MUC18 (Shih 1999). CD146 liegt in zwei Formen vor. Die gebundene Form vermittelt Ca<sup>2+</sup>-unabhängig heterotope Zell-Zell-Kontakte (Shih et al. 1997). Die lösliche Form ist wichtig für die Kontrolle und Regulation des Moleküls (Bardin et al. 1998). Des Weiteren kann vermutet werden, dass CD146 durch die Interaktion mit zytoplasmatischen Proteinen wie der Tyrosinkinase p59fyn (p59fyn) und der *focal adhesion kinase p125-FAK* (p125-FAK) Paxillin aktiviert, was für Signalkaskaden von extrazellulär nach intrazellulär wichtig ist (Bardin et al. 1998). Letztlich ist CD146 ein wichtiger Faktor für die Progression und Suppression in Tumoren (Shih 1999). Im malignen Melanom beeinflusst CD146 die Bindung zwischen Melanom- und Endothelzellen und führt zur verstärkten Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten. CD146 in den Endothelzellen bindet an den in den Melanomzellen zu findenden passenden Rezeptor. Aufgrund dessen werden intrazelluläre Signalkaskaden in Gang gesetzt. Diese führen dazu, dass die Endothelzellen Interleukin-1 (IL-1) sezernieren, das die Expression vom *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1) erhöht. VCAM-1 bindet an das *very late antigen 4* (VLA-4). VLA-4 ist ein entscheidender Faktor bei dem Transport von Tumorzellen durch das vaskuläre System und der Bildung von Metastasen (Chigaev et al. 2011). Die Aktivierung von VLA-4 ermöglicht den Melanomzellen also, Abwehrzellen zu imitieren und durch die Blutgefäße in jedes Gewebe zu gelangen (Johnson, J. P. 1999). Im Mammakarzinom hat CD146 die entgegengesetzte Wirkung. Während es im Melanom die Bildung von Tumoren fördert, veranlasst es im Mammakarzinom durch eine verstärkte Kohäsion der Tumorzellen, dass diese sich auf den Primärtumor beschränken und keinem infiltrativen Wachstum unterliegen (Shih 1999).

### ***Cluster of differentiation 14 (CD14)***

CD14 ist ein Glykoprotein und fungiert als *pattern recognition receptor* (PRR). Es ist ein Teil der angeborenen Immunabwehr und bindet zusammen mit dem Toll-like Rezeptor 4 (s. TLR4) in Anwesenheit des Lipopolysaccharid-bindenden Proteins (LBP) bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) (Kurt-Jones et al. 2000; Wright et al. 1990). CD14 wird vor allem von Makrophagen und Monozyten exprimiert (Tobias et al. 1985). Es kommt als gebundene Form, die über ein GPI an der Membran befestigt ist (mCD14), und als gelöste Form vor (sCD14) (Pugin et al. 1994).

### ***Cluster of differentiation 34 (CD34)***

CD34 ist ein transmembranes Glykoprotein. Es wird von hämatopoetischen Stammzellen (Krause et al. 1996), embryonischen Fibroblasten (Brown et al. 1991) und Endothelzellen (Fina et al. 1990) exprimiert. Es wird als Marker für hämatopoetische Stammzellen genutzt (Krause et al. 1996). Die genaue Funktion ist bisher noch ungeklärt. Es wird aber vermutet, dass CD34 bei Entzündungsprozessen, beim Aufrechterhalten des Phänotyps hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen und bei der Adhäsion und Lokalisation von Stamm- und Progenitorzellen im Knochenmark eine Rolle spielt (Krause et al. 1996).

### ***Cluster of differentiation 45 (CD45)***

CD45 oder auch Protein Tyrosin Phosphatase Rezeptor C (PTPRC) ist ein transmembranes Protein aus der Protein-Tyrosin-Phosphatase-Familie (PTP-Familie) mit Tyrosin-Phosphatase-Aktivität (Streuli et al. 1989; Tonks et al. 1990). Es besteht aus 3 Teilen: einer extrazellulären Domäne, einem transmembranen Stück und einer intrazellulären Domäne (Tonks et al. 1990). Es wird von hämatopoetischen Zellen exprimiert (Johnson, N.A. et al. 1989). CD45 gilt als Leukozyten-Antigen und wird als Marker jener genutzt. Es wurden 7 Isoformen von CD45 gefunden, die jeweils zellspezifisch exprimiert werden. CD45 spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulierung von T-Zellen durch Induktion der Tyrosin-Phosphatase-Aktivität (Altin et al. 1997).



### 1.3. Toll-like Rezeptoren (TLRs)

Toll-like Rezeptoren sind Typ-1-transmembrane Rezeptorproteine (Liotta et al. 2008). Sie gehören zu der Gruppe der PRRs und sind ein Teil des angeborenen Immunsystems (Basith et al. 2012). Sie dienen der Erkennung sogenannter Pathogen-assoziiertes molekularer Muster (*pathogen associated molecular patterns*, PAMPs), die für Bakterien charakteristisch sind, wie z. B. Lipopolysaccharide der Zellmembran gram-negativer Bakterien (Kawai et al. 2010). Jeder Toll-like Rezeptor erkennt unterschiedliche PAMPs (s. Tab. 1). Die spezifische Erkennung und Bindung dieser PAMPs führt dann zur Aktivierung eines Signaltransduktionsweges. Die TLRs nutzen unterschiedliche Signaltransduktionswege, die in der Synthese verschiedener Zytokine und Proteinkinasen resultieren (s. Abb. 4). Einige TLRs bilden untereinander Komplexe, während andere unabhängig agieren. Beim Menschen konnten bisher 10 TLRs identifiziert werden (Kawai et al. 2005).

TLR	extra- bzw. intrazellulär	PAMP-Agonist
1	extrazellulär	Triacyllipoprotein
2	extrazellulär	Lipoproteine, Lipoteichonsäure, Zymosan
3	intrazellulär	virale doppelsträngige RNA
4	extrazellulär	Lipopolysaccharide, Hitzeschockproteine
5	extrazellulär	Flagellin
6	extrazellulär	Lipoteichonsäure, Triacyllipoprotein, Zymosan
7	intrazellulär	virale einzelsträngige RNA
8	intrazellulär	virale einzelsträngige RNA
9	intrazellulär	unmethylierte CpG-DNA
10	extrazellulär	unbekannt

**Tabelle 1:** Toll-like Rezeptoren und die PAMPs, die sie erkennen aus Fawzy El-Sayed et al. (2018).

Es werden extrazelluläre (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 und TLR10) von intrazellulären TLRs (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9) unterschieden (Iwasaki et al. 2004).

Mesenchymale Stammzellen exprimieren TLRs je nach ihrer Herkunft in einem spezifischen Muster, so dass eine suffiziente Immunreaktion spezifisch für das Umfeld möglich ist. Nach Aktivierung der TLRs durch exogene Erreger sind diese in der Lage, in die Funktion der MSCs, also auch DPSCs, einzugreifen (Hwa Cho et al. 2006; Liotta et al. 2008; Tomchuck et al. 2008; van den Berk et al. 2009). Beispielsweise beeinflusst TLR4 nach Stimulation die Proliferation und das Migrationspotenzial der DPSCs (Liu et al. 2014). Im Folgenden werden die TLRs vorgestellt.

### **1.3.1. Extrazelluläre TLRs**

TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 und TLR10 sind extrazelluläre PRRs. Auf TLR10 wird in 1.3.3. gesondert eingegangen. Die TLRs1, 2, 4, 5 und 6 können abermals unterschieden werden in die komplexbildenden TLRs1, 2 und 6 und die allein agierenden TLRs4 und 5. Die Aktivierung der extrazellulären Toll-like Rezeptoren führt zur Synthese proinflammatorischer Zytokine. Alle extrazellulären TLRs sind auf Zellen exprimiert, die Teil der zellulären Abwehr sind. Dazu gehören Leukozyten wie B- und T-Lymphozyten, natürliche Killerzellen, Granulozyten und Monozyten, sowie dendritische Zellen, Makrophagen und myelomonozytischen Zellen (Muzio et al. 2000; Zhao et al. 2014).

#### **1.3.1.1. Komplexbildende extrazelluläre TLRs**

TLR1, TLR2 und TLR6 erkennen vor allem Triacyllipoproteine, Lipoteichonsäuren, Lipoproteine und Zymosane (Fawzy El-Sayed et al. 2018; Iwasaki et al. 2004; Tomchuck et al. 2008) (s. Tab. 1). TLR1 bildet zusammen mit TLR2 ein Heterodimer, während TLR2 ebenfalls einen Komplex mit TLR6 formt.

Die Aktivierung des TLR1/TLR2- und des TLR2/6-Komplexes führt über die Stimulation des Adapterproteins *myeloid differentiation primary response gene 88* (MyD88) zur Synthese proinflammatorischer Zytokine. MyD88 aktiviert die IL-1-Rezeptor-assoziierten Kinasen 1, 2, 4 (IRAK1, 2 und 4) und den TNF Rezeptor assoziierten Faktor 6 (TRAF6). Dadurch wird die *transforming growth factor  $\beta$ -activated kinase 1* (TAK1) angeregt, die weiterführend die *mitogen-activated protein kinases 3/6* und *4/7* (MKK3/6, MKK4/7) und die *inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit  $\alpha$*  und  *$\beta$*  (IKK $\alpha$  und IKK $\beta$ ) aktiviert. Die Ik Kinasen  $\alpha$

und  $\beta$  führen zur Synthese vom *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- $\kappa$ B). NF- $\kappa$ B ist ein für das Immunsystem wichtiger Transkriptionsfaktor. Er fördert die Synthese verschiedener Zytokine, wie dem Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8) und dem Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Matsusaka et al. 1993; Sosis et al. 2003). Die Aktivierung von MKK3/6 und MKK4/7 resultiert in der Produktion der p38 mitogenaktivierten Proteinkinase (p38 MAPK) und der c-Jun N-terminalen Kinasen (JNK, auch *stress-activated protein kinase* (SAPK)) (s. Abb. 4). Sowohl p38 als auch JNK gehören zur Gruppe der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK). Die Synthese von p38 wird unter anderem durch Zytokine und Stress getriggert, während JNK ebenfalls aufgrund von Stress und auch UV-Licht produziert wird. p38 spielt eine entscheidende Rolle bei Entzündungen, Zelldifferenzierung, beim Zellwachstum und der Apoptose (Ono et al. 2000). JNK stimulieren nach Aktivierung mit Hilfe des Aktivator-Proteins-1 (AP-1) Zytokine wie z. B. das Interferon  $\beta$  (IFN- $\beta$ ), das im Folgenden antivirale Faktoren synthetisiert (Ludwig et al. 2002) (s. Abb. 4).

### 1.3.1.2. Nicht komplexbildende extrazelluläre TLRs

#### TLR4

TLR4 ist ein Mitglied der extrazellulären TLRs. Seine Aufgabe besteht darin, LPS und Hitzeschockproteine zu erkennen, die spezifisch für gramnegative Bakterien sind und sich in der äußeren Membran befinden (Fawzy El-Sayed et al. 2018; Iwasaki et al. 2004) (s. Tab. 1).

Die Aktivierung von TLR4 führt zur Synthese von sowohl proinflammatorischen Zytokinen als auch vom Interferon $\beta$ . TLR4 bedient sich zweier intrazellulärer Signalkaskaden. Die Aktivierung vom Adaptermolekül *toll-interleukin 1 receptor* (TIR) *domain containing adaptor protein* (TIRAP) führt zur MyD88-abhängigen Kaskade und resultiert in der Produktion von NF- $\kappa$ B, p38 und JNK (s. o., s. Abb. 4). Die zweite Kaskade wird durch die Aktivierung des Adapterproteins *toll-like receptor adaptor molecule 2* (TRAM), auch TICAM2 genannt, eingeleitet und führt über das Adapterprotein TRIF zur Synthese von IRF3 (s. Abb. 4).

## **TLR5**

TLR5 besteht als einzelner Toll-like Rezeptor und erkennt bakterielles Flagellin (Iwasaki et al. 2004) (s. Tab.1). Die Aktivierung von TLR5 aktiviert denselben Signaltransduktionsweg wie die Komplexe TLR1/TLR2 und TLR2/TLR6 (s. o).

### **1.3.2. Intrazelluläre TLRs**

Zu den intrazellulären TLRs gehören TLR3, TLR7/8 und TLR9. Auch intrazelluläre TLRs können unterteilt werden in komplexbildende und nicht komplexbildende Toll-like Rezeptoren. Die Aktivierung der intrazellulären TLRs führt zur Synthese von Interferonen. Auch die intrazellulären TLRs werden von Zellen des angeborenen Immunsystems exprimiert wie z. B. B-Lymphozyten, dendritischen Zellen und Makrophagen (Edwards et al. 2003; Zhang, M. et al. 2017; Zhao et al. 2014).

#### **1.3.2.1. Komplexbildende intrazelluläre TLRs**

TLR7/8 erkennen beide virale einzelsträngige DNA (Fawzy El-Sayed et al. 2018) (s. Tab. 1). TLR7/8 aktivieren eine MyD88-abhängige Signalkaskade. Nach Aktivierung des Rezeptorproteins MyD88 werden IRAK1, 2, 4 und TRAF3 stimuliert und fördern die Aktivität von IKK $\alpha$ . Als Resultat wird der Interferon-regulierende Faktor 7 (*interferon regulatory factor 7*) (IRF7) synthetisiert (s. Abb. 4). IRF7 regt ebenso wie IRF3 die Produktion von den Typ-1-Interferonen  $\alpha$  und  $\beta$  an (Honda et al. 2005).

### 1.3.2.2. Nicht komplexbildende intrazelluläre TLRs

#### TLR3

TLR3 ist einer der intrazellulären TLRs und erkennt virale doppelsträngige Ribonukleinsäure (RNA) (Iwasaki et al. 2004) (s. Tab. 1).

TLR3 aktiviert über das Rezeptorprotein *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$*  (TRIF) das Protein *TNF receptor-associated factor 3* (TRAF3). TRAF3 führt zur Aktivierung des Enzyms *serine/threonine-protein kinase 1* (TBK1) und *IKK-related kinase  $\epsilon$*  (IKK $\epsilon$ ). Es folgt die Synthese vom Interferon regulierenden Faktor 3 (*interferon regulatory factor 3*) (IRF3). IRF3 initiiert die Produktion der Interferone  $\alpha$  und  $\beta$ . Diese beiden Interferone sind vor allem an der Bekämpfung viraler Infektionen beteiligt (Barro et al. 2007; Zhang, W. et al. 2006).

#### TLR9

TLR9 gehört ebenfalls zu den intrazellulären TLRs. TLR9 reagiert auf virale und bakterielle, unmethylierte CpG-Desoxyribonukleinsäure (Iwasaki et al. 2004) (s. Tab. 1). TLR9 aktiviert dieselbe MyD88-abhängige Signalkaskade wie der Rezeptorkomplex TLR7/8 (s. o).

### 1.3.3. TLR10

TLR10 ist ein Pseudogen und nur ein „*orphan member*“ der TLR-Familie. Ein passender Agonist und die Funktion sind noch unklar. Es wird vermutet, dass TLR10 eine Rolle bei der Immunantwort auf virale Influenzainfektionen spielt und zu der Induktion der Synthese proinflammatorischer Zytokine beiträgt (Lee et al. 2014). TLR10 ist strukturell TLR1 und TLR6 am ähnlichsten. TLR10 ist in der Lage, mit TLR1 und TLR2 Heterodimere zu bilden (Hasan et al. 2005). Des Weiteren wurde die Expression von TLR10 in Verbindung gebracht mit der Entstehung von Morbus Crohn (Morgan et al. 2012), Blasen Tumoren (Guirado et al. 2012), Nasopharyngealkarzinomen (Zhou et al. 2006) und Asthma bronchiale (Lazarus et al. 2004). TLR10 wird vor allem in lymphatischen Geweben exprimiert, dazu gehören

Lymphknoten, die Milz, Tonsillen und der Thymus (Nalubamba et al. 2008; Chuang et al. 2001).

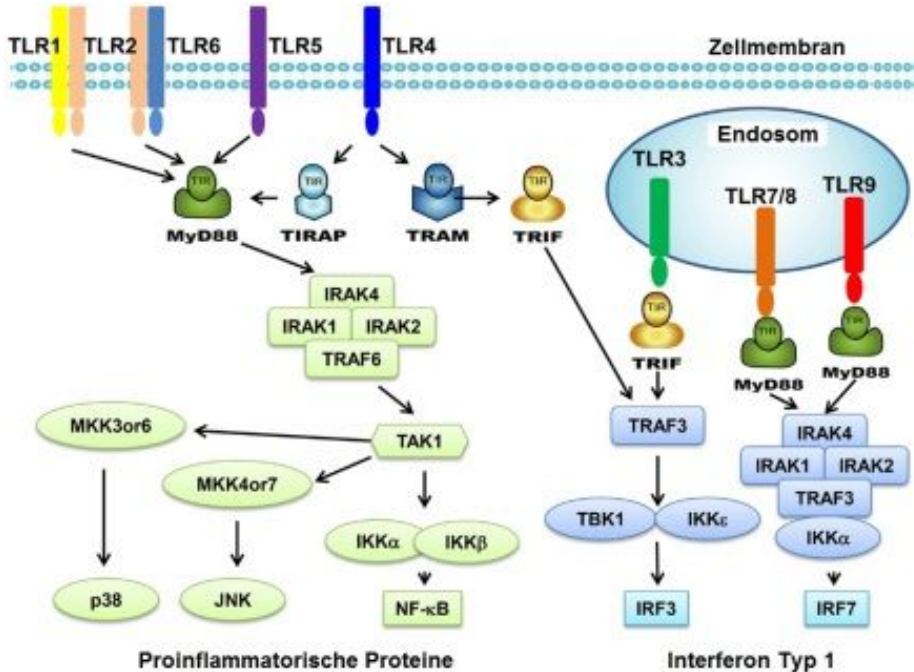


Abbildung 4: Signaltransduktionswege der Toll-like Rezeptoren aus Zhao et al. (2014).

### 1.3.4. Funktion der Toll-like-Rezeptoren in MSCs

Viele Studien beschäftigten sich bereits mit der Rolle der Toll-like Rezeptoren in MSCs. Mesenchymale Stammzellen, zu denen die DPSCs ja gehören, haben wie oben beschrieben in den letzten Jahren durch ihr hohes Differenzierungspotenzial und ihre immunogene Aktivität an Wichtigkeit in der regenerativen Medizin gewonnen. Im Allgemeinen haben die Toll-like Rezeptoren auch in MSCs eine immunregulierende Funktion. Nach Waterman et al. (2010) können MSCs eine entweder pro- oder antiinflammatorische, suppressive Rolle einnehmen. Dieses sogenannte „licensing“ ist abhängig von Faktoren wie der Quelle der Zellen, von welcher Spezies sie entstammen und Dauer und Konzentration bei TLR-Stimulation. Delarosa et al. sagen, dass MSCs unterschiedlicher Herkunft TLRs auf mRNA-Level exprimieren, die Expression auf Proteinlevel vergleichsweise aber niedrig erscheint und mittels Durchflusszytometrie schwer zu messen ist (2012). In einer ihrer Studien haben Delarosa et al. (2012) den Effekt von TLRs in MSCs hinsichtlich Differenzierung, Proliferation und

immunmodulatorischen Fähigkeiten untersucht. In menschlichen MSCs ist beispielsweise die adipogene Differenzierung durch TLR-Aktivierung nicht beeinflusst, während die Aktivierung von TLR2, 3 und 4 die osteogene Differenzierung steigert und die Stimulation von TLR9 sie reduziert. Die Aktivierung von TLR9 beeinflusst die Proliferationsrate nur in aus Fettgewebe gewonnenen Stammzellen (ADMSCs). Ergebnisse hinsichtlich der immunmodulatorischen Eigenschaften sind oft sehr widersprüchlich. Dies sei auf die unterschiedliche Herkunft der Stammzellen und die unterschiedlichen experimentellen Herangehensweisen in verschiedenen Studien zurückzuführen. Die immunmodulatorischen Fähigkeiten seien sehr komplex und nicht nur von der TLR-Aktivierung abhängig. Widersprüchliche Ergebnisse könnten zusätzlich damit erklärt werden, dass MSCs je nachdem in welchem Milieu sie sich befinden, immer eine unterschiedliche Reaktion aufzeigen. Dies kann als dynamischer Prozess angesehen werden (Delarosa et al. 2012).

### **1.3.5. Funktion der TLRs in DPSCs**

Wenige Studien haben es sich bisher zum Ziel gesetzt, speziell die Funktionen der TLRs bei DPSCs zu betrachten. Zum jetzigen Zeitpunkt sind nur einige Funktionen der Toll-like Rezeptoren wie z. B. von TLR2, 3 und 4 in DPSCs bekannt (Fawzy El-Sayed et al. 2016). Tomic et al. (2011) zeigen als eine der wenigen in einer Studie, dass beispielsweise die Aktivierung von TLR3 in dentalen pulpalen Stammzellen eine Lymphozytenproliferation *in vitro* reguliert. Des Weiteren konnte belegt werden, dass eine Aktivierung von TLR4 die immunsuppressiven Eigenschaften steigert, zu einer vermehrten Produktion von IL 1, 6 und 8 führt und die endogene TGF- $\beta$ - undIDO-1- Synthese gesteigert wird. (Tomic et al. 2011; He et al. 2014; Liu et al. 2014). Darüber hinaus fördert die TLR4-Stimulation die Zellmigration, vermindert die -proliferation, steigert das osteogene Differenzierungspotenzial und reduziert das adipogene.

Derzeit ist nicht abschließend geklärt, in wie weit die in MSCs in mehreren Studien gezeigten Effekte der TLR-Aktivierung auch für DPSCs gelten und gegebenenfalls welche weiteren immunmodulatorischen Funktionen in den DPSCs durch die TLRs moduliert werden.

## **1.4. Zielsetzung der Arbeit**

Die Toll-like Rezeptoren spielen eine entscheidende Rolle bei der initialen defensiven Reaktion des angeborenen Immunsystems. Diese immune Reaktion ist für die Pulpa wichtig aufgrund der Reize, der sie ausgesetzt ist, damit eine Erhaltung der Vitalität des Zahnes gewährleistet ist. Die Schwelle zwischen einer reversiblen und einer irreversiblen Pulpitis ist schwer definierbar. Der voranschreitende Prozess der Entzündung zeigt sich oft erst, wenn der Patient eine Beschwerdesymptomatik äußert und die irreversible Pulpitis sich etabliert hat. Somit ist die Vitalerhaltung der Pulpa nicht mehr möglich und eine Devitalisierung erforderlich. In bereits publizierten Dissertationen konnten einige regulierende Funktionen der TLRs in pulpalen Stammzellen nachgewiesen werden. Vieles bleibt allerdings wie Waterman et al. bereits erläutern durch mehrere und sich beeinflussende Faktoren unklar (2010). Aufgrund der vielversprechenden therapeutischen Anwendungen von Stammzellen wie z. B. die stammzellbasierte Technik Gewebe herzustellen, um degenerative neurologische und kardiovaskuläre, parodontale und endodontale, sowie ossäre und chondrogene und stoffwechselbedingte Erkrankungen in der Zukunft zu therapieren, ist es wichtig, sich dieser Ungereimtheiten mit weiteren Forschungen bewusst zu werden (Griffin et al. 2010; Le Blanc et al. 2003; McIntosh et al. 2006), um das volle Potenzial der DPSCs ausschöpfen zu können. Ziel dieser Arbeit ist es daher, ein genaues Expressionsprofil der TLRs auf den dentalen pulpalen Stammzellen im gesunden und im entzündeten Zustand aufzustellen.



## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Verbrauchsmaterialien

<b>Produkt</b>	<b>Bezugsquelle</b>
6-Well-Platten	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
96-Well Hard Shell Platte	Roche, Mannheim, Deutschland
Bio Cassette	Bio Optica, Mailand, Italien
Bio Pads	Bio Optica, Mailand, Italien
Biosphere Quality Tips (10µl)	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Biosphere Quality Tips (100µl)	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Biosphere Quality Tips (100-1000µl)	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Eppendorf Tubes	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Falcon Röhrchen (50ml)	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Kryoröhrchen	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Membranfilterpapier	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Microtome Blade	PFM Medical, Köln, Deutschland
Neubauerzählkammer	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Objektträger	Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland
Pasteurpipetten	Assistent, Sondheim v. d. Rhön, Deutschland
Petrischalen	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Röhren (5ml) für FACs	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten (10ml)	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten (25ml)	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Skalpell	Hu-Friedy, Frankfurt am Main, Deutschland

<b>Produkt</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Zahnärztliche Pinzetten	Hu-Friedy, Frankfurt am Main, Deutschland
Zellkulturflaschen	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Zellschaber	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland

**Tabelle 2:** Verbrauchsmaterialien

### 2.1.2. Geräte

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller</b>
Axiovision HRc	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Brutschrank	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Easypet Pipette Dispenser	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
FACs Calibur	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Inkubator, Hera Cell	Thermo Scientific, Waltham, USA
Light Cycler	Roche Life Science, Prenzlberg, Deutschland
Microm	Thermo Scientific, Waltham, USA
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank, Hera Safe	Thermo Scientific, Waltham, USA
Paraffinstreckbad	Medax, Neumünster, Deutschland
pH-Meter	WTW, Weilheim, Deutschland
Pipette 0, 1 -2, 5µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipette 10µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipette 100-1000µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipette 20-100µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Rotamax	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Sartorius AC210S Waage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Spiegelreflexkamera	Canon, Tokio, Japan
Tissue Processor	Medite Medizintechnik, Burgdorf, Deutschland
Vacunsafe Comfort	IBS Integra Biosciences, Chur, Schweiz

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller</b>
Vakuklav 24	Melag, Berlin, Deutschland
Vortex Genie 2	Bender&Holbein AG, Bruchsal, Deutschland
Wachseinbettmaschine	Medite Medizintechnik, Burgdorf, Deutschland
Wasserbad	GFL, Burgwedel, Deutschland
Zeiss Axiovert 40C	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

**Tabelle 3:** Geräte

### 2.1.3. Medien, Puffer, Reagenzien und Chemikalien

<b>Substanz</b>	<b>Bezugsquelle</b>
adipogenes Differenzierungsmedium	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Akkutase	Biochrom, Berlin, Deutschland
Alcianblau	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Amphotericin	BioWest, Nuaille, Frankreich
Aqua Dest	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Langenhagen, Deutschland
Biofreeze	Biochrom, Berlin, Deutschland
Bovin Serum Albumin	Biochrom, Berlin, Deutschland
chondrogenes Differenzierungsmedium	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Essigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
FACS-Puffer	PBS, 0,5-1,0% BSA, 0,1% Sodium Acid
FcR Blocking Reagent	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
fetales Kälberserum	Biochrom, Berlin, Deutschland

<b>Substanz</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Formaldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glutamin	Lonza, Basel, Schweiz
Glutaraldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kristallviolett färbung	Merck, Darmstadt, Deutschland
MACS-Puffer	PBS, 0,5mM EDTA, 0,5% BSA
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Methylethylketon	Behr Labortechnik, Düsseldorf, Deutschland
MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Minimum Essential Medium Eagle	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
osteogenes Differenzierungsmedium	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Paraffin	McCormick, Sparks, USA
PBS Dulbecco	Biochrom, Berlin, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin, Deutschland
Sodium Acid	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Xylol	Büfa Chemie, Oldenburg, Deutschland

**Tabelle 4:** Medien, Puffer, Reagenzien und Chemikalien

#### 2.1.4. CD-Antigene und Antikörper

<b>Antigen/Antikörper</b>	<b>Bezugsquelle</b>
anti TLR1	eBioscience, San Diego, USA
anti TLR2	Enzo Life Sciences, Lörrach, Deutschland
anti TLR3	eBioscience, San Diego, USA
anti TLR4	Enzo Life Sciences, Lörrach, Deutschland
anti TLR5	R&D Systems, Minneapolis, USA
anti TLR6	BioLegend, San Diego, USA
anti TLR7	Perbio Science, Bonn, Deutschland
anti TLR8	Enzo Life Sciences, Lörrach, Deutschland

<b>Antigen/Antikörper</b>	<b>Bezugsquelle</b>
anti TLR9	eBioscience, San Diego, USA
anti TLR10	Acris Antibodies, Herford, Deutschland
anti-human APC CD45	BioLegend, San Diego, USA
anti-human FITC CD14	BioLegend, San Diego, USA
anti-human PE CD105	BioLegend, San Diego, USA
anti-human PE CD34	BioLegend, San Diego, USA
anti-human PE CD73	BioLegend, San Diego, USA
anti-human PE CD90	BioLegend, San Diego, USA
IgG2aAPC, κ Isotyp Ctrl	BioLegend, San Diego, USA
IgG2aFITC, κ Isotyp Ctrl	BioLegend, San Diego, USA
IgM Alexa 647	BioLegend, San Diego, USA
Mouse IgG1aPE, κ Isotyp Ctrl	BioLegend, San Diego, USA
Mouse IgG2aPE, κ Isotyp Ctrl	BioLegend, San Diego, USA
Rat IgG1 κ PE, Isotype Control	BioLegend, San Diego, USA
STRO-1 Alexa 647	BioLegend, San Diego, USA

**Tabelle 5:** CD-Antigene und Antikörper

### 2.1.5. Fertige Reaktionssysteme

<b>Reaktionssystem</b>	<b>Bezugsquelle</b>
BD Cytotfix/Cytoperm™	BD Biosciences, Fanklin Lakes, USA
MACS Cell Separation Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
QuantiTect® Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy® Protect Mini Kit (250)	Qiagen, Hilden, Deutschland

**Tabelle 6:** Fertige Reaktionssysteme

### 2.1.6. Primer

<b>Primer</b>	<b>Identifikationsnummer von Roche</b>	<b>Hersteller</b>
TLR1 H. sapiens	ENST00000308979	Roche, Mannheim, Deutschland
TLR2 H. sapiens	ENST00000260010	Roche, Mannheim, Deutschland
TLR3 H. sapiens	ENST00000296795	Roche, Mannheim, Deutschland
TLR4 H. sapiens	ENST00000355622	Roche, Mannheim, Deutschland
TLR5 H. sapiens	ENST00000366881	Roche, Mannheim, Deutschland
TLR6 H. sapiens	ENST00000381950	Roche, Mannheim, Deutschland
TLR7 H. sapiens	ENST00000380659	Roche, Mannheim, Deutschland
TLR8 H. sapiens	ENST00000218032	Roche, Mannheim, Deutschland
TLR9 H. sapiens	ENST00000360658	Roche, Mannheim, Deutschland
TLR10 H. sapiens	NM_001017388	Roche, Mannheim, Deutschland
PKG2 H. sapiens	ENST00000373316	Roche, Mannheim, Deutschland

**Tabelle 7:** Primer

### 2.1.7. Sterilisationsverfahren

Alle nicht steril verpackten Materialien wurden vor und nach dem Gebrauch mit dem Vakuklav 24 bei 134°C und 2 bar für 3,5 Minuten sterilisiert. Nach der Sterilisation und bis zur Benutzung wurden sie trocken und lichtgeschützt für maximal ein halbes Jahr aufbewahrt. Nach Ablauf der sechs Monate wurden die Materialien erneut unter gleichen Bedingungen sterilisiert.

## **2.2. Methoden**

### **2.2.1. Gewinnung der DPSCs**

#### **2.2.1.1. Gewinnung von Zellen aus der Pulpa**

Die Isolation der pulpalen Zellen erfolgte an einer mikrobiologischen Sicherheitswerkbank (Thermo Scientific, Waltham, USA). Es wurden kariesfreie und zur Extraktion indizierte dritte Molaren von Patienten (n = 6, 15-20 Jahre alt) extrahiert und mit dem Einverständnis der Patienten für die wissenschaftliche Arbeit dieser Dissertation genutzt (Genehmigungsnummer der Ethikkommission: D-444/10). Die Zähne wurden in einem 50 ml Falcon Röhrchen (Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland) mit 20 ml  $\alpha$ -Minimum Essential Medium Eagle (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) für eine Stunde zwischengelagert. Dem Medium wurden die Antibiotika Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100  $\mu$ g) (beide von Biochrom, Berlin, Deutschland), 1% Amphotericin (Bio West, Nuaille, Frankreich), 5 ml Glutamin (Lonza, Basel, Schweiz) und 100 ml fetales Kälberserum (FCS) (Biochrom, Berlin, Deutschland) hinzugefügt. Alle Bestandteile wurden vorher in einem Wasserbad (GFL, Burgwedel, Deutschland) auf 37°C erwärmt und anschließend in die Flasche des Zellkulturmediums pipettiert. Im Labor wurden die Zähne in einer Petrischale (Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland) mit 5 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) (Biochrom, Berlin, Deutschland) gereinigt. Dafür wurde eine Petrischale pro Patient verwendet. An den Zähnen anhaftende Reste von Alveolarknochen und Gingiva wurden mit sterilen Skalpell (Hu-Friedy, Frankfurt am Main, Deutschland) entfernt. Nach der Reinigung wurden die Zähne unter sterilen Bedingungen mechanisch aufgebrochen. Die freiliegende Pulpa wurde mit sterilen Pinzetten (Hu-Friedy, Frankfurt am Main, Deutschland) aus der Pulpakammer und den Wurzelkanälen entfernt und mit einem Skalpell in ca. 1 mm<sup>3</sup> große Stücke geschnitten. Diese Pulpafragmente wurden mit Dulbeccos Basalmedium befeuchtet und in eine 75 ml Zellkulturflasche (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) in einem Abstand von ca. 2-3 cm eingebracht. Dabei wurden drei Fragmente pro Flasche ausgesät. Vor Befüllen der Flaschen mit Kulturmedium wurden die Zellkulturflaschen für 15 Minuten unverschlossen unter der Laborbank belassen, damit die Pulpafragmente an der Plastikoberfläche antrocknen konnten. Beim Befüllen der Flaschen mit Basalmedium wurde

somit die Gefahr des Ablösens der Pulpa minimiert. In jede Zellkulturflasche wurden langsam 20 ml Basalmedium pipettiert. Die Flaschen wurden für drei Tage in einem Inkubator (Thermo Scientific, Waltham, USA) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> gelagert. Dabei wurden die Zellkulturflaschen so wenig wie möglich bewegt. Nach drei Tagen wurde das Medium mechanisch mit einem Absauggerät (IBS Integra Biosciences, Chur, Schweiz) abgesaugt. Nicht angehaftete Pulpafragmente wurden somit entfernt. In jede Zellkulturflasche wurden erneut 20 ml Basalmedium pipettiert. Das Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt.

### **2.2.1.2. Passagieren der Zellen**

Bei einer Konfluenz von 80-85% wurde das Medium aus den Zellkulturflaschen abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 10 ml PBS gewaschen und das PBS wieder abgesaugt. Eine *worksolution* aus 1 ml Akkutase (Biochrom, Berlin, Deutschland) und 9 ml PBS wurde angesetzt. In jede Zellkulturflasche wurden 10 ml der *worksolution* pipettiert. Die Flaschen wurden für 15 Minuten in dem Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> gelagert. Unter dem Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) wurde kontrolliert, ob sich die Zellen vollständig von der Zellkulturflasche abgelöst hatten. Schließlich wurde die Zell-Flüssigkeits-Suspension abpipettiert, in ein Falcon Röhrchen gegeben und bei 1700 Umdrehungen pro Minute (UPM) und 37°C für zehn Minuten zentrifugiert (Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Der verbliebene Flüssigkeitsüberstand wurde unter Schutz des am Boden abgelagerten Zellpellets abgesaugt. Die Zellen wurden anschließend für weitere Versuche genutzt.

### **2.2.1.3. Zellsortierung (*magnetic activated cell sorting*)**

Beim Erreichen einer Konfluenz von 80-85% wurden die Zellen mit Hilfe des MACS Cell Separation Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) sortiert.

Die Zellen wurden wie oben beschrieben passagiert und die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauerzählkammer (Roth, Karlsruhe, Deutschland) bestimmt. Dafür wurden sowohl die Zählkammer als auch das dazugehörige Deckglas mit 70% Alkohol (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) desinfiziert. Pro  $1 \times 10^7$  Zellen wurden 20 µl STRO-1 Antikörper (BioLegend, San Diego, USA) und 20 µl an spezifische Antikörper gebundene supermagnetischen Partikel, sogenannte MicroBeads (50nm), (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) genutzt. Die Antikörper binden an die dafür spezifischen Antigene



auf der Oberfläche der Stammzellen. Die markierten Pulpastammzellen wurden durch eine in einem magnetischen Feld befindliche, mit ferromagnetischer Stahlwolle befüllte Säule filtriert und magnetisch sortiert. Nicht markierte Zellen blieben nicht in der ferromagnetischen Stahlwolle hängen und wurden durch den Filter hindurchgespült.

Für die Zellsortierung wurde für jeden Patienten ein Falcon Röhrchen mit 80 µl MACS-Puffer benutzt. Die Suspension wurde mit dem Vortex Genie (Bender&Holbein AG, Bruchsal, Deutschland) gemischt. Die Falcon Röhrchen wurden für 15 Minuten im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Danach wurde 20-mal die Menge PBS, also 2 ml, in das Falcon Röhrchen pipettiert. Die Suspension wurde erneut bei 1700 UPM und 37°C für zehn Minuten zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Dieser Vorgang wurde wiederholt. Es verblieb ein Zellpellet, welches mit 500 µl MACS-Puffer resuspendiert wurde.

Der MACS-Multistand (Magnetfeld) wurde mit 70% Alkohol desinfiziert und unter die mikrobiologische Sicherheitswerkbank gestellt. Die MACS-Säule wurde an den Multistand gehängt und der dazugehörige Filter anschließend daran fixiert. Die Säule wurde zuerst mit reinem MACS-Puffer gespült. Der durchlaufende Puffer wurde in einem darunter gestellten Falcon Röhrchen aufgefangen. Dieses Röhrchen wurde nach dem Spülvorgang unter der Säule entfernt und ein neues darunter platziert. Mit einer Eppendorf Pipette (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) wurden 500 µl von der Zellsuspension in den Filter pipettiert. Die durchlaufende Flüssigkeit wurde erneut in einem Falcon Röhrchen aufgefangen. Der Vorgang wurde solange wiederholt, bis die Zellsuspension aufgebraucht war. Danach wurde die Säule dreimal mit 500 µl Macs-Puffer gespült. Die erhaltenen Zellen wurden als MACS-negative Zellen in einer Zellkulturflasche gezüchtet. Dafür wurde die erhaltene Zellsuspension in der Zentrifuge bei 1700 UPM für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde mit dem Vacusafe comfort Absauggerät abgesaugt. Das erhaltene Zellpellet wurde in 20 ml Basalmedium resuspendiert. Die Medium-Zell-Suspension wurde in eine Zellkulturflasche pipettiert und im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> gelagert. Das Medium wurde nach drei Tagen erstmals und anschließend alle zwei Tage gewechselt. Zuletzt wurde die Säule vom magnetischen Feld entfernt und in einem benachbarten Raum unter sterilen Bedingungen mit 1 ml MACS-Puffer gefüllt. Der dazugehörige Stempel wurde in die Säule eingebracht und die Flüssigkeit wurde in ein neues Falcon Röhrchen gedrückt. Diese Zellen wurden als MACS-positive Zellen in Zellkulturflaschen gezüchtet. Dafür wurde die Suspension ebenso wie bei den MACS-negativen Zellen bei 1700 UPM und 37°C für zehn Minuten zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in Basalmedium resuspendiert und in einer

Zellkulturflasche im Inkubator unter denselben Bedingungen gelagert wie die MACS-negativen Zellen.

#### **2.2.1.4. Einfrieren von Zellen**

Die gezüchteten Zellen wurden bei  $-70^{\circ}\text{C}$  eingefroren und nach einmaligem Waschen mit 10 ml PBS wie in oben beschrieben passagiert. Das entstandene Zellpellet wurde mit 500  $\mu\text{l}$  Biofreeze (Biochrom, Berlin, Deutschland) resuspendiert. Die Suspension wurde in Kryoröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) pipettiert und bei  $-70^{\circ}\text{C}$  im Gefrierschrank gelagert.

### **2.2.2. Verfahren zum Nachweis von Stammzeleigenschaften**

#### **2.2.2.1. Colony forming unit assay (CFU)**

Für das *colony forming unit assay* wurden die DPSCs im Basalmedium mit einer Dichte von  $1,63 \text{ Zellen}/\text{cm}^3$  pro Petrischale kultiviert. Die Zellen wurden vorher passagiert und das Zellpellet in 1 ml Basalmedium resuspendiert. Die so gewonnenen Zellen wurden mit Hilfe einer desinfizierten Neubauerzählkammer gezählt. Schließlich wurden jeweils 10  $\mu\text{l}$  von oben und von unten unter das Deckglas auf die Zählkammer pipettiert und unter dem Mikroskop gezählt. Für zwölf Tage wurde jeden zweiten Tag das Medium der Zellen gewechselt, um sie schließlich mit einer Kristallviolett-Färbung zu färben. Die Kristallviolettlösung wurde frisch angesetzt und bestand aus 10 ml destilliertem Wasser (Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Langenhagen, Deutschland) und 0,03 g Kristallviolett (Merck, Darmstadt, Deutschland). Zuerst wurden die Zellen für zehn Minuten mit 4%igem Formaldehyd fixiert. Dann wurden 800  $\mu\text{l}$  von der Färbelösung auf die Zellen in der Petrischale pipettiert und für zehn Minuten auf den Zellen belassen. Danach wurden die Zellen mit destilliertem Wasser gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Nachfolgend wurden sie unter dem Mikroskop betrachtet und fotografiert.

#### **2.2.2.2. Differenzierung der DPSCs**

Von den DPSCs wurden jeweils drei Differenzierungsreihen mit handelsüblichen Stimulationsmedien (PromoCell, Heidelberg, Deutschland) angesetzt.

#### **2.2.2.3. Osteogene Differenzierung**

Für die osteogene Differenzierungsreihe wurden die Stammzellen auf einer 6-Well-Platte (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) kultiviert. Bei einer Konfluenz von 80-85% wurde in drei Wells ein osteogenes Stimulationsmedium (PromoCell, Heidelberg, Deutschland) und in die drei anderen Wells das normale Basalmedium pipettiert (Kontrolle). Die 6-Well-Platte wurde im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> gelagert. Pro Well wurden jeweils 3 ml Medium genutzt. Für vier Wochen wurde jeden zweiten Tag das Medium in allen Wells gewechselt.

#### **2.2.2.4. Adipogene Differenzierung**

Für die adipogene Differenzierungsreihe wurden die Stammzellen in einer 6-Well-Platte kultiviert. Bei einer Konfluenz von 80-85% wurde bei drei Wells ein adipogenes Stimulationsmedium (PromoCell, Heidelberg, Deutschland) und in die anderen drei Wells das Basalmedium pipettiert (Kontrolle). Die Zellen wurden unter identischen Bedingungen wie die der osteogenen Differenzierung gelagert. Für drei Wochen wurde jeden zweiten Tag das Medium in allen Wells gewechselt.

#### **2.2.2.5. Chondrogene Differenzierung**

Für die chondrogene Differenzierung wurden die Zellen in zwei Zellkulturflaschen gezüchtet. Bei einer Konfluenz von 80-85% wurden die Zellen passagiert. Das Zellpellet in einem Falcon-Röhrchen wurde in 1500 µl chondrogenem Stimulationsmedium (PromoCell, Heidelberg, Deutschland) resuspendiert. In das andere Falcon-Röhrchen wurden 1500 µl Basalmedium pipettiert und das Pellet resuspendiert (Kontrolle). Beide Zellsuspensionen wurden mit dem Vortex Genie für fünf Sekunden gemischt. Schließlich wurden jeweils 500 µl aus jedem Falcon-Röhrchen in sechs 1,5 ml Eppendorf Röhrchen (Eppendorf, Hamburg,

Germany) pipettiert. Die Eppendorf Röhren wurden dann bei 1700 UPM und 37°C für fünf Minuten zentrifugiert, so dass in jedem Eppendorf Röhren ein Zellpellet sichtbar war. Für fünf Wochen wurde jeden zweiten Tag das Medium gewechselt. Dafür mussten die Eppendorf Röhren jeweils vor und nach dem Mediumwechsel zentrifugiert werden, damit immer ein stabiles Zellpellet vorhanden war.

#### **2.2.2.6. Zellfärbungen**

##### **Osteogene Färbung**

Die osteogene Färbung der Zellen wurde mit einer Lösung aus Alizarin rot durchgeführt. Diese wurde unter dem Abzug angesetzt. Dazu wurde 1,0 g Alizarin rot (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) mit einer Waage (Satorius, Göttingen, Deutschland) abgewogen und in ein Falcon-Röhren gefüllt. Das Alizarin rot wurde in 50 ml destilliertem Wasser in Lösung gebracht. Mit einem pH-Messgerät (WTW, Weilheim, Deutschland) wurde der pH auf 4,1-4,2 eingestellt. Danach wurde der Deckel des Falcon-Röhrens geschlossen.

Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen. Schließlich wurden sie mit 1 ml eiskaltem 70% Ethanol für fünf Minuten fixiert. Das Ethanol wurde danach abpipettiert. Vorsichtig wurden 2 ml Alizarin rot pro Well auf die Zellen pipettiert und nach fünf Minuten dekantiert. Die Zellen wurden mit destilliertem Wasser gewaschen, bis die Spülflüssigkeit klar war. Die Bildung mineralisierter Knoten wurde dann unter dem Mikroskop beurteilt und mit der Mikroskopkamera (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) fotografiert.

##### **Adipogene Färbung**

Die adipogene Färbung der Zellen wurde mit Oil Red O durchgeführt. Dafür wurden 0,125 g Oil Red O in 25 ml 99% Isopropanol in Lösung gebracht und für fünf Minuten auf dem Rotamax (Heidolph, Schwabach, Deutschland) vermischt. Dann wurden 10 ml destilliertes Wasser in 15 ml Oil Red O (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) pipettiert. Die Suspension wurde für zehn Minuten bei 1700 UPM zentrifugiert und schließlich durch ein Membranpapier (Satorius, Göttingen, Deutschland) gefiltert.

Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und mit 1 ml 60% Isopropanol für fünf Minuten fixiert. Das Isopropanol wurde dekantiert. Pro Well wurde 1 ml Oil Red O für zehn Minuten auf den Zellen belassen und schließlich dekantiert. Die Zellen wurden mit destilliertem Wasser gewaschen, bis das Spülwasser farblos war. Die Zellen wurden dann unter dem Mikroskop hinsichtlich der Bildung von Lipid-Inklusionen untersucht und fotografiert.

### **Chondrogene Färbung**

Die Färbung der Chondrogenität wurde mit Alcianblau (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) durchgeführt. Das Medium in den Eppendorf Röhren wurde abgesaugt und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend folgte die Fixierung für 24 Stunden. Die Fixierlösung bestand aus 10 ml 25% Glutaraldehyd (Merck, Darmstadt, Deutschland), 4 ml 37% Formaldehyd (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 100 ml Phosphatpuffer. Nach der Fixierungszeit wurden die Zellpellets erneut dreimal mit PBS gewaschen. Das PBS wurde abgesaugt und die Zellpellets mit einer Pinzette vorsichtig aus den Eppendorf Röhren entfernt und auf die Biopsy Pads (Bio Optica, Mailand, Italien) in die Bio Cassetten (Bio Optica, Mailand, Italien) gelegt. Es wurde ein weiteres Biopsy Pad auf das Zellpellet gelegt, so dass jedes Zellpellet komplett vom Schaumstoff der Pads umschlossen war. Die Bio Cassetten wurden geschlossen und für 24 Stunden in das Einbettprogramm des Tissue Processor TPC15 Duo (Medite Medizintechnik, Burgdorf, Deutschland) gelegt. Das Programm beinhaltet zwölf Schritte, in denen die Bio Cassetten in unterschiedliche Bäder gelegt wurden. Während der ersten sechs Schritte wurden die Zellpellets für jeweils zwei Stunden bei 30°C in Ethanol mit aufsteigender Konzentration gelagert. Während des ersten Schrittes wurde 70% Ethanol, während des zweiten Schrittes 80% Ethanol, während des dritten Schrittes 90% Ethanol und während der Schritte vier bis sechs 100% Ethanol genutzt. In den weiterführenden Schritten sieben bis neun folgte das Einlegen in mit Xylol (Büfa Chemie, Oldenburg, Deutschland) befüllte Bäder für jeweils zwei Stunden bei 30°C. Abschließend folgten die Schritte zehn bis zwölf, in denen die Zellpellets für jeweils zwei Stunden bei 62°C in Paraffin (McCormick, Sparks, USA) eingebettet wurden. Nach 24 Stunden wurden die Zellpellets aus den Bio Cassetten ausgebettet und mit einer Pinzette in einen Metallträger gelegt. Danach wurde in die Metallträger flüssiges Einbettwachs (Medite, Burgdorf, Deutschland) gefüllt und der Deckel der Bio Cassette auf die noch flüssige Wachsoberfläche gelegt. Die Metallträger wurden über Nacht zur Trocknung in einem

Kühlschrank bei 8°C gelagert. Nachfolgend wurden die 5 µm dicken Schnitte mit einem Schlittenmikrotom (Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland) angefertigt. Die Schnitte wurden im Paraffinstreckbad (Medax, Neumünster, Deutschland) auf Objektträger (Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland) gelegt und im Folgenden in heißem Wasser gestreckt. Die Schnitte wurden für acht Stunden in einem 30°C warmen Brutschrank (Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland) getrocknet. Dann erfolgte die Färbung der Schnitte mit Alcianblau. Dafür wurden die Objektträger mit den Zellschnitten in einen Trägerkorb aus Glas gelegt. Der Färbeprozess bestand aus 15 Schritten. Während der ersten drei Schritte wurden die Objektträger für jeweils fünf Minuten in ein Xylolbad gehängt. Danach folgten drei Bäder mit 96%, 70% und 60% Ethanol für jeweils zwei Minuten. Das Ethanol war mit 1% Methylethylketon (MEK) (Behr Labortechnik, Düsseldorf, Deutschland) vergällt. Anschließend wurden die Objektträger für zwei Minuten in ein Bad mit destilliertem Wasser gehängt. Es folgte die Färbung mit 1% Alcianblau und 3% Essigsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland) für 60 Minuten. Die Objektträger wurden danach für fünf Minuten in destilliertem Wasser gewaschen. Es wurde eine Gegenfärbung mit 0,1% Kernechtrot (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) für fünf Minuten durchgeführt und erneut für eine Minute in destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Objektträger erneut zweimal für jeweils zwei Minuten in 100% Ethanol gehängt. Abschließend wurden die Schnitte nochmals zweimal für fünf Minuten in ein Xylolbad gehängt. Nach dem abgeschlossenen Färbeprozess wurden die Schnitte der Zellpellets mit xylolhaltigem Eindeckmittel gedeckelt.

### **2.2.3. Experimenteller Ansatz und Analysen**

#### **2.2.3.1. Ansetzen eines Entzündungsmediums**

Bevor die Zellen durch die Polymerase-Kettenreaktion und die FACS-Analyse (s. u.) weiter charakterisiert wurden, wurde ein Entzündungsmedium angesetzt, um jeweils die Hälfte der Zellen damit zu stimulieren. Zu dem für Zellkulturen genutzten Medium wurden zusätzlich 25 ng/ml IL-1 $\beta$ , 1x10<sup>3</sup> U/ml IFN- $\gamma$ , 50 ng/ml TNF- $\alpha$  und 3x10<sup>3</sup> U/ml IFN- $\alpha$  (alle von PeproTech, Hamburg, Deutschland) hinzugefügt. Die Hälfte der Zellkulturen wurde mit 20 ml Entzündungsmedium für 18 Stunden stimuliert.

## **2.2.4. Extraktion der Ribonukleinsäure (RNA)**

Für die Extraktion der RNA aus den DPSCs wurde das RNeasy® Protect Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet.

Die DPSCs wurden in einer 6-Well-Platte gezüchtet. Bei einer Konfluenz von 80-85% wurden drei Wells mit dem Entzündungsmedium für 24 Stunden stimuliert, während die weiteren drei Wells mit normalem Basalmedium als Kontrolle behandelt wurden. Zuerst wurde ein Lysispuffer frisch angesetzt. Er bestand aus Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) und RLT Puffer (Qiagen, Hilden, Deutschland). Pro ml RLT Puffer wurden 10 µl Mercaptoethanol genutzt. Aufgrund der hohen Toxizität des Mercaptoethanols musste es unter dem Abzug verarbeitet werden. Die Zellen wurden zweimal mit 2 ml PBS pro Well gewaschen. Das PBS wurde schließlich dekantiert. Pro Well wurden mit RNase freien Pipettenspitzen (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) 250 µl Lysispuffer auf die Zellen gegeben. Die adhärenen Zellen wurden dann mit einem Zellschaber von der Oberfläche der Wells abgelöst. Auf die Zellen wurden 250 µl 70% Ethanol pipettiert. Die Suspension wurde mit einer Pipette homogenisiert, aufgenommen und in die für die RNA Extraktion verwendeten RNeasy mini spin columns (Qiagen, Hilden, Deutschland) gegeben. Diese Spins bestanden aus zwei Teilen: einem Filter und einem Zentrifugierröhrchen. Die Spins wurden bei 10.000 UPM für 20 Sekunden zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde abgekippt. Im Folgenden wurden 700 µl RW1-Puffer (Qiagen, Hilden, Deutschland) in jeden Spin pipettiert und diese erneut bei 10.000 UPM für 20 Sekunden zentrifugiert. Der Überstand wurde abermals abgekippt. Danach wurden 500 µl RPE-Puffer (Qiagen, Hilden, Deutschland) pro Spin auf die Zellen gegeben und diese zweimal bei 10.000 UPM für 20 Sekunden zentrifugiert. Schließlich wurde der Filter aus dem Zentrifugierröhrchen entfernt und einem anderen Reagiergefäß zugeordnet. Auf den Filter wurden 30 µl RNA-freies Wasser pipettiert. Die Reagiergefäße mit den Filtern wurden für eine Minute bei 10.000 UPM zentrifugiert. Die Flüssigkeit mit enthaltener RNA wurde bei -70°C gelagert.

### **2.2.4.1. RNA-Messung**

Die RNA-Messung wurde mit einem Eppendorfer Photometer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Der gemessene Wert entsprach der extrahierten totalen RNA (µg/ml). Um den Wert in µl angeben zu können, wurde aus der gemessenen totalen RNA der

Mittelwert bestimmt und davon der Kehrwert gebildet. Die Menge RNA in  $\mu\text{l}$  wurde schließlich mit 12  $\mu\text{l}$  destilliertem Wasser vermischt, um eine einheitliche Menge für die folgende cDNA-Synthese zu erlangen. Pro Reaktion wurde ein Gesamtvolumen von 12  $\mu\text{l}$  destilliertem Wasser und RNA ( $\mu\text{l}$ ) verwendet.

#### **2.2.4.2. cDNA-Synthese**

Die cDNA-Synthese wurde mit dem QuantiTect® Reverse Transcription Kit (Qiagen) durchgeführt.

Die RNA-Proben wurden vor der cDNA-Synthese auf Eis gelagert. gDNA Wipeout Buffer, Quantiscript® Reverse Transcriptase, Quantiscript RT Buffer, RT Primer Mix und RNA-freies Wasser wurden vor Gebrauch bei Zimmertemperatur (15-25°C) gelagert. Die Lösungen wurden gemischt und kurz zentrifugiert. Anschließend wurde die genomische DNA Eliminationsreaktion vorbereitet. Pro Probe wurden 2  $\mu\text{l}$  gDNA Wipeout Buffer auf 8  $\mu\text{l}$  Template RNA pipettiert, mit 4  $\mu\text{l}$  RNA-freiem Wasser (Gesamtvolumen von 14  $\mu\text{l}$ ) gemischt und für zwei Minuten bei 42°C inkubiert und danach sofort auf Eis gelegt. Zum Ansetzen des Reverse Transcriptase Master Mix wurden 4  $\mu\text{l}$  RT-Buffer und 1  $\mu\text{l}$  RT Primer Mix miteinander vermischt. Der RT Buffer enthielt  $\text{Mg}^{2+}$  und Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs). Pro Reaktion wurden 5  $\mu\text{l}$  von diesem 1:4 verdünnten RT Primer Mix zu 1  $\mu\text{l}$  Reverse Transkription Master Mix Quantiscript Reverse Transcriptase hinzugefügt. Dieses Gesamtvolumen von 6  $\mu\text{l}$  wurde schließlich zu den 14  $\mu\text{l}$  des Gemisches aus Wipeout Buffer, Template RNA und RNA-freiem Wasser hinzugefügt. Die Proben mit 20  $\mu\text{l}$  Gesamtvolumen wurden für 15 Minuten bei 42°C und weitere drei Minuten bei 95°C inkubiert. Die Reaktionsgefäße wurden wieder auf Eis gelagert, um anschließend mit der real-time PCR beginnen zu können.

#### **2.2.4.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

##### **Prinzip der PCR**

Mit Hilfe der PCR können Nukleinsäuren exponentiell amplifiziert werden.

Die PCR beinhaltet 3 aufeinander folgende Schritte (Saiki et al. 1988):



1. *Denaturierung*: Die Wasserstoffbrückenbindungen, die den DNA-Doppelstrang an den Basenpaaren zusammenhalten, werden bei 95°C getrennt, so dass zwei komplementäre Einzelstränge vorliegen, die als Template für die Amplifikation dienen. Ein Einzelstrang liegt in 3'-5'-Richtung und der andere in 5'-3'-Richtung vor.
2. *Primer Annealing*: Bei der Annealingtemperatur von 65°C haften sich die Primer an den DNA-Einzelstrang und legen Start- und Endpunkt der Amplifikation fest. Die Primer sind komplementär zum DNA-Segment, an das sie haften.
3. *Elongation*: Um eine optimale Temperatur für die DNA-Polymerase zu schaffen, wird die Temperatur im dritten Schritt wieder auf 72°C erhöht. Nun synthetisiert die DNA-Polymerase vom Primer ausgehend einen neuen DNA-Doppelstrang. Die Kettenverlängerung erfolgt immer in 5'-3'-Richtung.

### **Quantitative Echtzeit-PCR**

Die Methode der quantitativen Echtzeit-PCR ermöglicht die Menge der amplifizierten DNA in Echtzeit zu messen. Man unterscheidet zwischen einer absoluten und einer relativen Quantifizierung. In der vorliegenden Dissertation wurde die relative Quantifizierung genutzt, so dass auch nur diese im Folgenden erläutert wird. Für die relative Quantifizierung wurde ein endogenes Referenzgen, ein sogenanntes *Housekeeping* Gen, benötigt. Bei dieser Arbeit wurde das Protein PKG2 (Protein Kinase G 2) (Roche, Mannheim, Deutschland) verwendet. *Housekeeping* Gene müssen unabhängig von äußeren Einflüssen, Zelltyp und Zellstadium stabil exprimiert werden (Szabo et al. 2004). Mit Hilfe des *Housekeeping* Gens konnte eine Quantifizierung des Zielgens erfolgen (Chini et al. 2007). Über cDNA-Verdünnungsreihen wurden die Mengen beider Gene bestimmt. Um eventuelle Effizienzunterschiede auszugleichen und die Menge des unbekanntes Gens zu bestimmen, wurden zwei Standardkurven, ebenfalls aus cDNA-Verdünnungsreihen, beider Gene angefertigt. Die Menge des gesuchten Gens kann ins Verhältnis zum *Housekeeping* Gen gesetzt werden. Der Quotient beider Mengen ist die relative Expression des Zielgens und wurde ohne Einheit beschrieben. Die eigentliche Quantifizierung erfolgt durch die Messung eines Fluoreszenzfarbstoffes, der in die kleine Furche der doppelsträngigen DNA bindet. Die Fluoreszenz ist proportional zur entstandenen DNA-Menge. Die PCR beginnt zuerst langsam, steigert sich in der exponentiellen Phase und erreicht danach ein Plateau (Kainz 2000). Die Quantifizierung ist nur in der exponentiellen Phase mit optimalen Bedingungen möglich. Sie erfolgt mittels Berechnung eines sogenannten *threshold cycles* ( $C_T$ -Wert). Zum Beginn einer

PCR herrscht eine gewisse Hintergrundfluoreszenz. Noch ist zu wenig Zeit vergangen, als dass ausreichend DNA-Produkte hätten fluoreszieren können. Der  $C_T$ -Wert legt den Moment fest, an dem die Rezeptorfluoreszenz, also die Fluoreszenz der entstandenen DNA, die Hintergrundfluoreszenz übersteigt und eine exponentielle Reaktion entsteht (Bustin et al. 2005).

### Quantitative Echtzeit-PCR mit dem Light Cycler™

Für die Echtzeit-PCR mit dem Light Cycler™ (Roche, Mannheim, Deutschland) wurden pro Probe 10 µl Fast Start-DNA Probes Master, 4 µl RNase freies Wasser, 1 µl Primer und 5 µl cDNA genutzt, so dass ein Gesamtvolumen von 20 µl pro Probe entstand. Diese 20 µl wurden in eine 96-Well hard shell PCR-Platte (Roche, Mannheim, Deutschland) pipettiert. Die 96-Well-Platte wurde in den Light Cycler™ eingesetzt und das Programm gestartet:

Programm		Temperatur (°C)	Dauer (Sekunden)	Zyklusanzahl
<b>Vorinkubation</b>		95	600	1
<b>Amplifikation</b>	1. Denaturierung	95	10	40
	2. Abkühlung	60	30	
	3. Elongation	72	1	
<b>Abkühlung</b>		37	30	1

**Tabelle 8:** Programm der quantitativen Echtzeit-PCR mit dem Light Cycler™

### Funktionsprinzip der Light Cycler™-Sonden

Die Sonden des Light Cyclers™ waren mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert und konnten die entstandenen DNA-Produkte detektieren. Die Sonden bestanden aus zwei verschiedenen Oligonukleotiden, die während der Abkühlphase bei 60°C sequenzspezifisch an die DNA gebunden haben. An das 5'-Ende des DNA-Stranges hat ein als Donor (Reporter) fungierender Fluoreszenzfarbstoff, 6-FAM-phosphoramidit, gebunden. Er wurde von Licht mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und emittierte bei 518 nm. Das emittierte Licht wiederum hat einen weiteren Fluoreszenzfarbstoff (Akzeptor oder Quencher) angeregt, TAMRA (Tetramethylrhodamin), am 3'-Ende der DNA. Somit kam es bei einer solchen positiven Reaktion zur Entstehung eines sogenannten FRET-Effektes (Förster-Resonanzenergietransfers). Durch diese Energieübertragung entstand eine Fluoreszenz, die in

jedem Zyklus vom Light Cycler<sup>TM</sup> erfasst und gemessen wurde. Sie war proportional zu der in der Probe vorhandenen DNA (Loeffler et al. 2000). Die Sonden mussten in einem bestimmten Abstand zueinander an der DNA binden. Ist dieser Abstand zu groß, konnte keine positive Reaktion stattfinden. Sowohl in der Elongationsphase, in der sich der Abstand zwischen den Sonden vergrößert, als auch während der Denaturierung war keine Fluoreszenz mehr messbar.

#### **2.2.4.4. Fluorescence-activated cell sorting (FACS-Analyse)**

##### **Extrazelluläre FACS-Analyse**

Die extrazelluläre FACS-Analyse wurde zum Nachweis der CD-Antigene und der extrazellulären Toll-like Rezeptoren angewendet. Die extrazelluläre FACS-Analyse beruht auf mit einem fluoreszierenden Farbstoff markierten Antikörpern. Diese binden an einer Stelle der CD-Antigene und TLRs auf der Oberfläche der DPSCs. Als fluoreszierende Farbstoffe wurden Allophycocyanin (APC), Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE) und Alexa Fluor 647 und 488 verwendet. Die so markierten DPSCs wurden in einer Flüssigkeit suspendiert und mit Hilfe des FACS Caliburs detektiert und analysiert. Zum Nachweis der Antigenexpression wurden die Zellen mit Licht der Wellenlängen zwischen 488-650nm bestrahlt. Im Falle des Vorhandenseins der Antikörper wird das Licht mit einer anderen Wellenlänge wieder abgegeben. Das emittierte Licht wurde detektiert und analysiert.

##### **CD-Antigene**

Für die extrazelluläre FACS-Analyse zum Nachweis der CD-Antigene wurde das Basalmedium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Sie wurden mit einer Worksolution aus PBS und Akkutase geerntet (s. o.). Nachdem die Zellsuspension zentrifugiert und der Flüssigkeitsüberstand abgesaugt wurde, wurden 700 µl PBS und 35 µl FcR Blocking Reagent (Miltenyi Biotec) zu den Zellen gegeben. Die Zell-Flüssigkeits-Suspension wurde für zehn Sekunden mit dem Vortex Genie gemischt. Es wurden sieben Proben in FACS-Röhrchen angesetzt (s. Tab 9). Dafür wurden pro Röhrchen 100 µl Zell-Flüssigkeits-Suspension verwendet.

<b>Probe</b>	<b>Antikörper/Isotypkontrolle</b>	<b>Antikörper/Isotypkontrolle</b>
1	CD14 FITC (10 µl)	CD45 APC (10 µl) + CD146 PE (10 µl)
2	CD90 PE (10 µl)	IgG2a APC (10 µl)
3	CD105 PE (10 µl)	IgG2a FITC (10 µl)
4	CD73 PE (10 µl)	Stro-1 Alexa 647 (5 µl)
5	CD34 PE(10 µl)	IgM Alexa 647 (1 µl)
6	Mouse IgG2a PE (10 µl)	
7	Mouse IgG1a PE (10 µl)	

**Tabelle 9:** Protokoll zum Ansetzen der CD-Antigen-Proben

Nach dem Ansetzen der Proben wurden sie für 30 Minuten bei Dunkelheit und 4°C gelagert. Danach wurde jede Probe mit 2 ml PBS gewaschen und mit Hilfe des Vortex Genies gemischt. Nachfolgend wurden die Proben bei 1700 UPM und 4°C für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert. Abschließend wurde in jedes Röhrchen 300 µl FACS-Puffer pipettiert. Die anschließende FACS-Messung wurde mit einem FACS Calibur Cell Analyzer E6370 (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) durchgeführt und mit der FACSComp 5.1.1 Software (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) ausgewertet.

### **Toll-like Rezeptoren**

Die extrazelluläre FACS-Analyse zum Nachweis der extrazellulären Toll-like Rezeptoren wurde bei den unstimulierten (DPSCs) und entzündlich veränderten (DPSCs-i) DPSCs mit demselben Gerät und derselben Software durchgeführt wie bei der extrazellulären FACS-Analyse zum Nachweis der CD-Antigene. Dafür wurde das Medium in den Zellkulturflaschen abgesaugt und die Zellen mit 10 ml PBS pro Flasche gewaschen. Sie wurden anschließend, wie oben beschrieben, passagiert. Der nach dem Passagieren verbliebene Flüssigkeitsüberstand wurde unter Schutz des Zellpellets abgesaugt. Das Pellet wurde in 600 µl PBS resuspendiert und mit Hilfe des Vortex Genies vermischt. Zu der Flüssigkeits-Zell-Suspension wurden 30 µl FcR hinzu pipettiert und erneut mit dem Vortex Genie vermischt. Jeweils 100 µl der Suspension wurden in sechs Falcon Röhrchen verteilt und die Antikörper für die FACS-Analyse nach folgendem Protokoll angesetzt:

<b>Probe</b>	<b>Antikörper/Isotypkontrolle</b>
<b>1</b>	anti TLR1 PE (5 µl) + anti TLR2 FITC (10 µl)
<b>2</b>	PE Mouse IgG1 (5 µl) + Mouse IgG2a FITC (1 µl)
<b>3</b>	anti TLR4 FITC (2 µl) + anti TLR10 PE (2 µl)
<b>4</b>	Mouse IgG2a FITC (2 µl) + PE Mouse IgG2 (1 µl)
<b>5</b>	anti TLR5 Alexa Fluor 488 (5 µl) + anti TLR6 PE (5 µl)
<b>6</b>	Alexa Flour 488 conjugated Isotype Ctrl (5 µl) + PE Mouse IgG1 Isotype Ctrl

**Tabelle 10:** Protokoll zum Ansetzen der Toll-like Rezeptoren-Proben

Die Proben wurden nach dem Hinzufügen der Antikörper und Isotypkontrolle mit Hilfe des Vortex Genies vermischt und bei 4°C für 30 Minuten in Dunkelheit gelagert. Danach wurden jeder Probe 2 ml PBS beigefügt und sie wurden erneut vermischt. Die Proben konnten dann bei 1700 UPM für zehn Minuten zentrifugiert werden. Der Überstand wurde dekantiert. Zu jeder Probe wurden dann 300 µl FACS-Puffer pipettiert. Die Zellen konnten abschließend mit dem FACS Calibur Cell Analyzer und der FACSComp 5.1.1 Software (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) analysiert werden.

### **Intrazelluläre FACS-Analyse**

Das Funktionsprinzip der intrazellulären FACS-Analyse wurde zum Nachweis intrazellulärer TLRs angewendet. Im Unterschied zur extrazellulären FACS-Analyse wurde hierbei die Zellwand der DPSCs für die markierten Antikörper permeabel gemacht und die Zellen fixiert. So kam es zu einer intrazellulären Bindung zwischen Antikörper und TLR. Das Prinzip der Fluoreszenzmessung war dasselbe wie bei der extrazellulären FACS-Analyse.

Die intrazelluläre FACS-Analyse wurde bei den unstimulierten (DPSCs) und entzündeten (DPSCs-i) DPSCs mit demselben Gerät und derselben Software durchgeführt wie bei der extrazellulären FACS-Analyse. Dafür wurde das Medium in den Zellkulturflaschen abgesaugt und die Zellen mit 10 ml PBS pro Flasche gewaschen. Sie wurden nachfolgend, wie oben beschrieben, passagiert. Der nach dem Passagieren verbliebene Flüssigkeitsüberstand wurde unter Schutz des Zellpellets abgesaugt und 70 µl FCR Blocking Reagent wurden hinzu pipettiert. Die Flüssigkeits-Zell-Suspension wurde mit Hilfe des Vortex Genies gemischt. Danach wurden insgesamt 1750 µl Fixation/Permeabilization Lösung (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) direkt in das Falcon Röhrchen pipettiert und für 20 Minuten bei 4°C

inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde der Wash Buffer (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt. Die Zellen wurden zweimal mit 1 ml Perm/Wash Buffer (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) pro Falcon Röhrchen gewaschen. Nachdem der Perm/Wash Buffer auf die Zellen pipettiert wurde, wurde das Falcon Röhrchen für zehn Sekunden mit dem Vortex Genie vermischt und schließlich für zehn Minuten bei 1700 UPM und 4°C zentrifugiert und der Überstand danach abgesaugt. Für die intrazelluläre Färbung wurde das Zellpellet sorgfältig in 350 µl Perm/Wash Buffer resuspendiert und 50 µl pro Falcon Röhrchen genutzt. Dann wurden nach dem unten gezeigten Protokoll sieben Proben mit Antikörpern angesetzt.

<b>Probe</b>	<b>Antikörper/Isotypkontrolle</b>
1	Rat IgG1 κ PE, Isotype Ctrl (1:10 verdünnt mit Aqua dest., 5 µl)
2	Rat IgG1 κ PE, Isotype Ctrl (5 µl)
3	Anti TLR3 PE (5 µl)
4	Anti TLR7 PE (2 µl)
5	Anti TLR8 PE (2 µl)
6	Mouse IgG2a κ PE, Isotype Control (20 µl)
7	Anti TLR9 PE (10 µl)

**Tabelle 11:** Protokoll zum Ansetzen der Proben für die intrazelluläre FACS-Analyse

Nachdem die Proben angesetzt worden waren, wurden sie für 30 Minuten bei 4°C abgedunkelt im Kühlschrank inkubiert. Zum Schluss wurden die Zellen zweimal mit jeweils 1 ml Perm/Wash Buffer gewaschen und zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 200 µl Stanning Buffer (BD Biosciences) resuspendiert. Die Zellen wurden schließlich mit dem FACS Calibur Cell Analyzer und der FACSComp 5.1.1 Software (Becton Dickinson) analysiert.

### **2.2.5. Statistische Auswertung**

Zum Testen der Normalverteilung der Ergebnisse wurde der Shapiro-Wilk-Test genutzt. Bei nicht normalverteilten Variablen wurden als Lagemaß der Median und als Streumaß das untere (Q25) und obere (Q75) Quartil berechnet. Unterschiede in der TLR-Expression auf

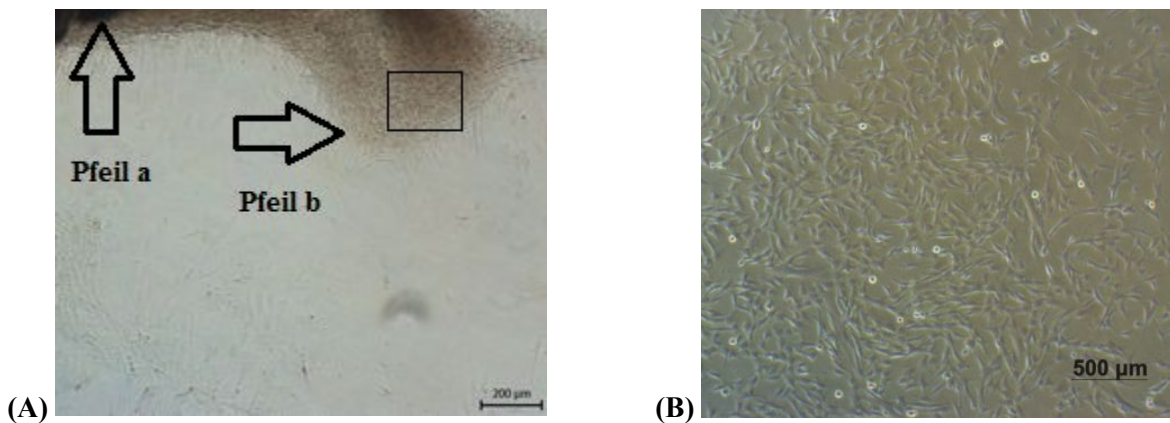
Protein- und m-RNA-Ebene der DPSCs und DPSCs-i wurden mit dem nichtparametrischen Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test ausgewertet. Dazu wurde die Software SPSS (SPSS Version 11.5, SPSS, Chicago, IL) verwendet. Das Signifikanzlevel wurde bei  $p = 0,05$  gesetzt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Nachweis der Stammzeleigenschaften

##### 3.1.1. Nachweis von Zellwachstum aus Pulpafragmenten

Eine Woche nachdem die Pulpafragmente sich an der Oberfläche der Zellkulturflaschen angehaftet hatten, wurden diese mit dem Phasenkontrastmikroskop analysiert. Diese Analyse ergab, dass erste Zellen aus dem Pulpagewebe hervorgewachsen waren. Die Zellen hatten durchgehend ein fibroblastisches Aussehen (s. Abb. 5(A) und (B)).



**Abbildung 5: Untersuchung des Zellwachstums aus Pulpafragmenten.**

Zellwachstum eine Woche nach Anhaftung der Pulpafragmente an die Oberfläche der Zellkulturflaschen dargestellt mittels Phasenkontrastmikroskopaufnahme. (A) Repräsentative Übersichtsaufnahme der fibroblastisch aussehenden Zellen aus einem Pulpafragment. Pfeil a zeigt auf das anhaftende Pulpafragment (schwarze Struktur im oberen linken Bildrand). Pfeil b verweist auf die aus dem Pulpafragment hervorgewachsenen Zellen. (B) Ausschnitt aus (A) (Rechteck in Bild (A)).

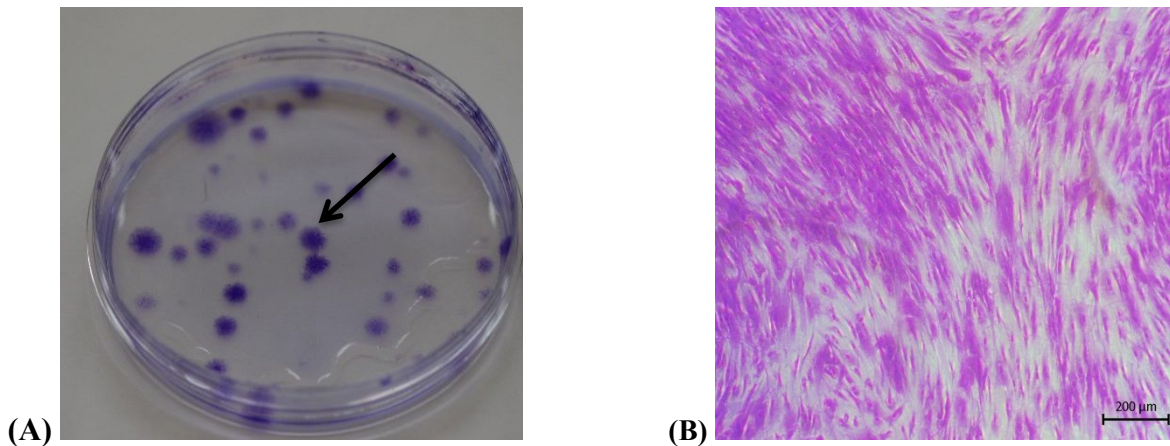


### 3.1.2. Identifizierung als pulpale Stammzellen (DPSCs)

Wie bereits ausführlich unter 1.2. beschrieben, wurden zur Charakterisierung der Zellen als Stammzellen und als Voraussetzung für das eigentliche Experiment die folgenden Kriterien geprüft.

#### 3.1.2.1. Nachweis von koloniebildenden Einheiten (*colony forming units*, CFU)

Abbildung 6 (A) zeigt, dass nach 12 Tagen aus den MACS-positiven Zellen multiple koloniebildende Einheiten erwachsen waren, die mittels Kristallviolett färbung nachgewiesen werden konnten. Abbildung 6 (B) zeigt eine gleichmäßige Zellverteilung innerhalb der Kolonie und ein gesammeltes, eng beieinander liegendes Wachstum.

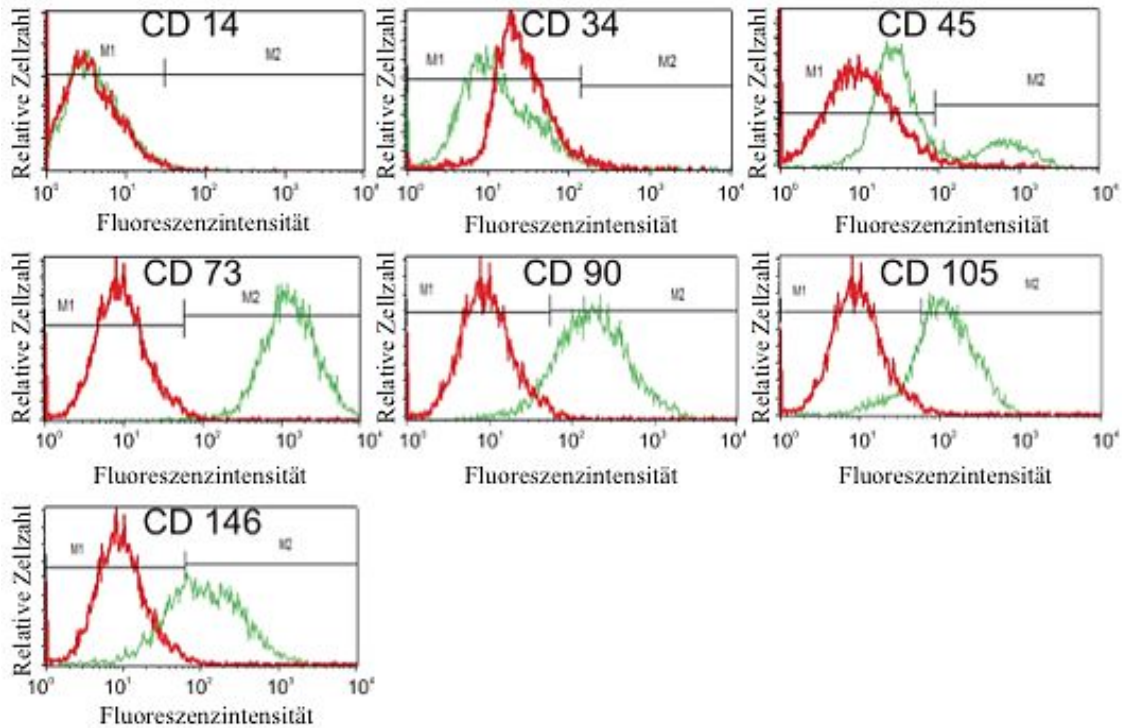


#### Abbildung 6: Nachweis von *colony forming units*.

Nach 12 Tagen bildeten sich aus den kultivierten MACS-positiven Zellen koloniebildende Einheiten, die mittels Kristallviolett färbung sichtbar gemacht werden konnten. Der Pfeil in Abbildung 6 (A) verweist auf eine Kolonie. (A) Übersichtsfotografie zur Darstellung gebildeter CFUs. (B) Mikroskopische Vergrößerung einer Kolonie.

#### 3.1.2.2. Extrazelluläre FACS-Analyse zum Nachweis der CD-Antigene

Die extrazelluläre FACS-Analyse ergab, dass die untersuchten Zellen die Oberflächenmarker CD73, CD90, CD105 und CD146 auf ihrer Oberfläche exprimierten, während die Oberflächenantigene CD14, CD34 und CD45 nicht nachgewiesen werden konnten (s. Abb.7).



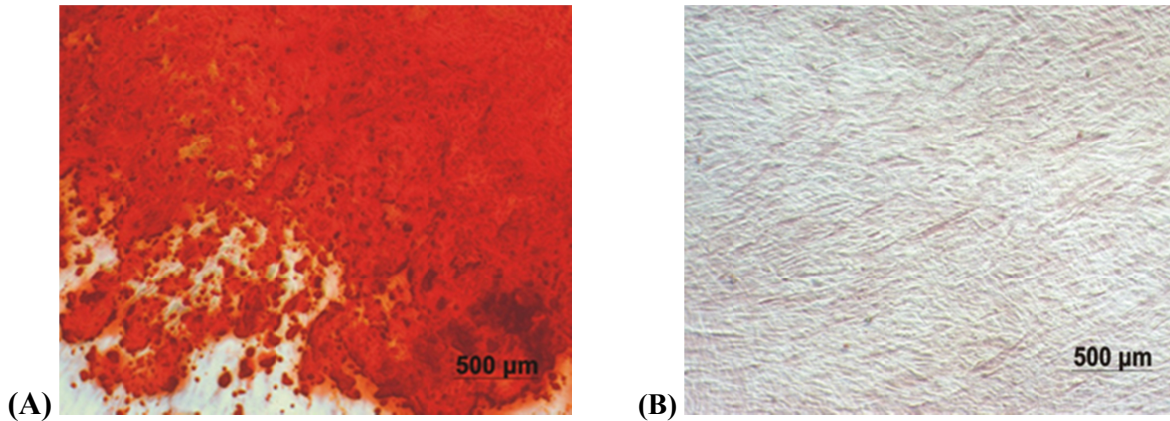
**Abbildung 7: Nachweis von CD-Antigenen mittels extrazellulärer FACS-Analyse zur Identifizierung von DPSCs.**

Nach magnetisch aktivierter Sortierung ergab die FACS-Analyse die Expression von CD73, CD90, CD105 und CD146 und nicht von CD14, CD34 und CD45. Grüne Kurve = DPSCs, Rote Kurve = Isotypkontrollen (n = 6).

### 3.1.2.3. Differenzierungspotenzial der DPSCs

#### Osteogene Differenzierung

Nachdem die MACS-positiven Zellen für zwei Wochen mit einem osteogenen Differenzierungsmedium stimuliert wurden, zeigte die Färbung mit Alizarin Rot eine Formation von kalzifizierten Bereichen als Hinweis auf eine osteogene Aktivität der DPSCs (s. Abb. 8 (A)). Abbildung 8 (B) zeigt die negative Kontrolle von unstimulierten MACS-positiven Zellen.

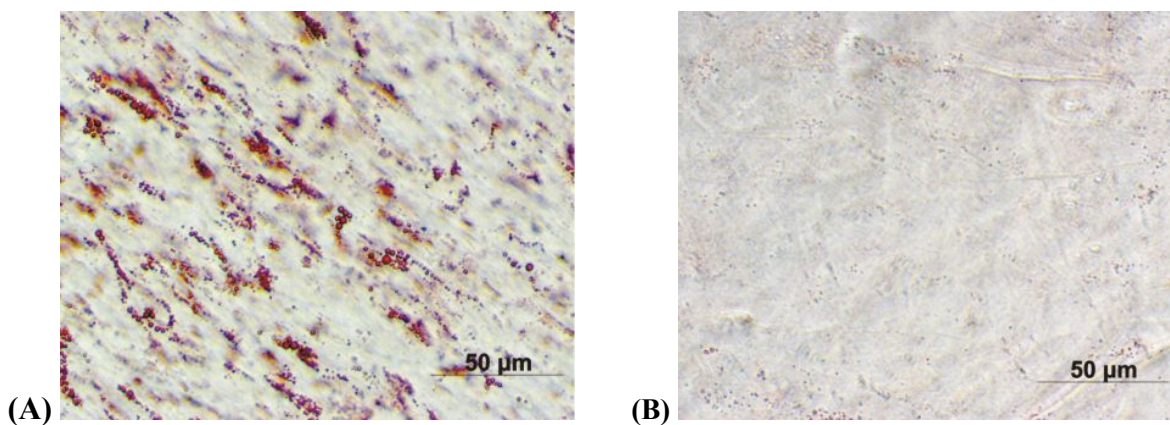


**Abbildung 8: Nachweis einer osteogenen Differenzierung der DPSCs.**

Nach zweiwöchiger Stimulierung mit einem osteogenen Differenzierungsmedium erfolgte eine Alizarin-Rot-Färbung. **(A)** Positiv gefärbte kalzifizierte Ablagerungen in den DPSCs. **(B)** Negative Kontrolle von unstimulierten MACS-positiven Zellen.

**Adipogene Differenzierung**

Nachdem die MACS-positiven Zellen für drei Wochen mit einem adipogenen Differenzierungsmedium stimuliert wurden, konnte mittels Färbung mit Oil Red O die Bildung runder Lipidtröpfchen nachgewiesen werden als Hinweis auf eine adipogene Differenzierung der DPSCs (s. Abb. 9 (A)). Abbildung 9 (B) zeigt die negative Kontrolle.

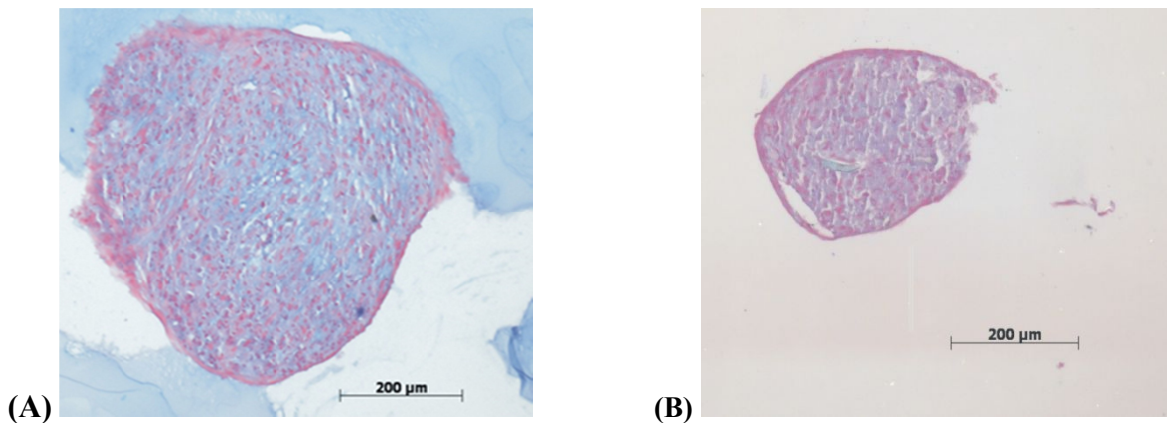


**Abbildung 9: Nachweis einer adipogenen Differenzierung der DPSCs.**

Nach dreiwöchiger Stimulierung mit einem adipogenen Differenzierungsmedium erfolgte eine Oil-Red-O-Färbung. **(A)** Positiv gefärbte Lipidtröpfchen der DPSCs. **(B)** Negative Kontrolle von unstimulierten MACS-positiven Zellen.

### Chondrogene Differenzierung

Nachdem die MACS-positiven Zellen für vier Wochen mit einem chondrogenen Differenzierungsmedium stimuliert wurden, konnte mittels Alcianblau-Färbung die Produktion von Glykosaminoglykanen nachgewiesen werden als Hinweis auf eine chondrogene Differenzierung der DPSCs (s. Abb. 10 (A)). Abbildung 10 (B) zeigt die negative Kontrolle.



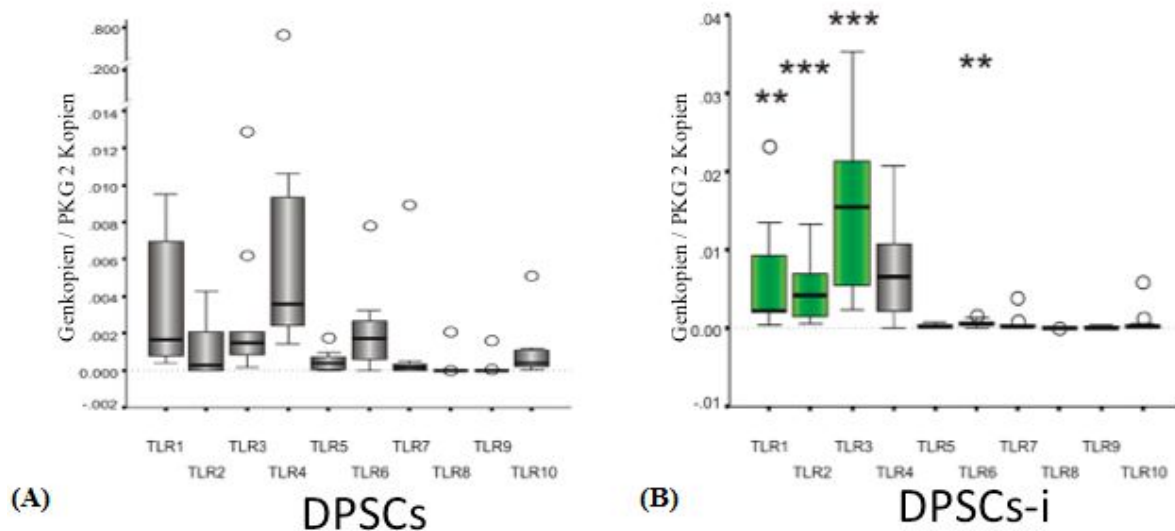
**Abbildung 10: Nachweis einer chondrogenen Differenzierung der DPSCs.**

Nach vierwöchiger Stimulierung mit einem chondrogenen Differenzierungsmedium erfolgte eine Alcianblau-Färbung. Beide Abbildungen zeigen den Querschnitt eines Zellpellets. (A) Positiv gefärbte Produktion von Glykosaminoglykanen (blau gefärbten Bereiche im Zentrum des Querschnittes). (B) Negative Kontrolle von unstimulierten MACS-positiven Zellen.

### 3.2. Expression der Toll-like Rezeptoren in DPSCs auf mRNA-Ebene

Die Expression der Toll-like Rezeptoren auf mRNA-Ebene wurde mittels quantitativer Echtzeit-PCR ermittelt. Pulpastammzellen, die in normalem Zellkulturmedium inkubiert wurden (DPSCs), zeigten auf mRNA-Ebene eine Expression (Quotient von Genkopien und PKG2Kopien; Q25/ Q75) von TLR1 (0,0013; 0,0008/0,0058), TLR2 (0,0002; 0,0000/0,0018), TLR3 (0,0015; 0,0009/0,0022) TLR4 (0,0067; 0,0024/0,105), TLR5 (0,0000; 0,0000/0,0005), TLR6 (0,0017; 0,0007/0,0026) und TLR10 (0,0005; 0,0002/0,0012) (s. Abb.11 (A)). Durch die Stimulation mit dem verwendeten Entzündungsmedium erfolgte eine signifikante Steigerung der Expression von TLR1 (0,0027; 0,0015/0,0114,  $p = 0,002$ ), TLR2 (0,0041;

0,0009/0,0075,  $p = 0,006$ ) und TLR3 (0,0160; 0,0049/0,0318,  $p = 0,002$ ) sowie eine signifikante Reduktion von TLR6 (0,0006; 0,0004/0,0012,  $p = 0,012$ ). Die Expression von TLR10 wurde unter stimulierten Bedingungen zwar vollständig herunterreguliert, das Ergebnis war jedoch genauso wie bei den TLRs4 und 5 nicht signifikant. Sowohl in der Gruppe der nicht stimulierten als auch der stimulierten DPSCs wurden TLR7, 8 und 9 nicht exprimiert (s. Abb. 11 (B)).



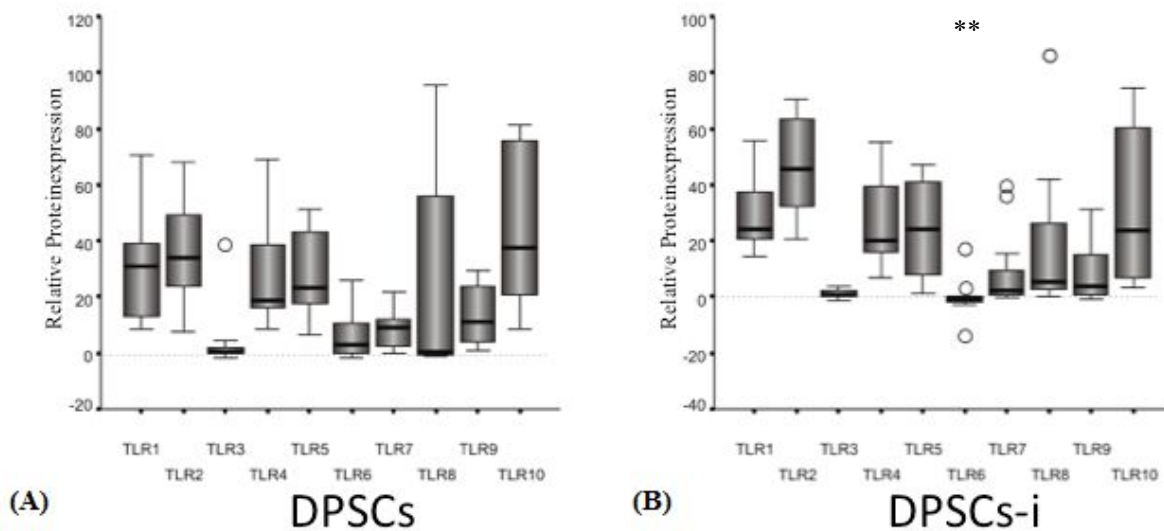
**Abbildung 11: Expression der TLRs auf mRNA-Ebene in DPSCs und DPSCs-i.**

(A) mRNA-Expression der TLRs 1-10 unter unstimulierten Bedingungen. (B) mRNA-Expression der TLRs 1-10 unter stimulierten Bedingungen mit signifikanter Steigerung der TLR1-, TLR2- und TLR3-Expression (grüne Balken) und signifikanter Reduktion der TLR6-Expression.  $n = 6$ . Boxplotdarstellung mit Median und oberer und unterer Quartile. (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, statistische Signifikanz gekennzeichnet durch Sternchen. \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , wobei  $p$  den Signifikanzwert darstellt).

### 3.3. Expression der Toll-like Rezeptoren in DPSCs auf Proteinebene

Die Expression der TLRs auf Proteinebene von unstimulierten und stimulierten DPSCs wurde mittels FACS-Analyse ermittelt (gemessen im FACS Calibur). Die Expression der DPSCs (Median; Q25/75) in unstimuliertem Zustand war wie folgt: TLR1 (30,67; 12,07/42,71), TLR2 (33,74; 22,78/52,94), TLR3 (0,60; -0,29/2,08), TLR4 (18,90; 14,92/43,13), TLR5 (23,42; 17,40/44,70), TLR6 (3,15; -0,23/10,60), TLR7 (9,14; 2,09/12,23), TLR8 (0,31;

-0,62/59,59), TLR9 (11,18; 2,78/24,22) und TLR10 (37,43; 19,28/75,72) (s. Abb. 12 (A)). Nach Stimulation der DPSCs mit dem verwendeten Entzündungsmedium wurde die Expression von TLR2 (45,45; 29,15/63,95), TLR3 (0,95; 0,12/2,34), TLR4 (19,84; 14,85/42,05), TLR5 (24,22; 7,78/42,07) und TLR8 (5,08; 2,39/34,06) nicht signifikant gesteigert. Die Expression von TLR1 (24,40; 20,55/37,81), TLR7 (2,21; 0,60/12,27), TLR9 (3,55; 0,52/14,84) und TLR10 (23,58; 6,48/ 62,44) dagegen war durch die Stimulation nicht signifikant verringert (s. Abb. 12 (B)). Die Expression von TLR6 (-0,91; -1,85/0,12,  $p = 0,008$ ) wurde nach Stimulation signifikant herabgesetzt.



**Abbildung 12: Expression der TLRs auf Proteinebene in DPSCs und DPSCs-i.**

**(A)** Proteinexpression der TLRs 1-10 unter unstimulierten Bedingungen. **(B)** Proteinexpression der TLRs 1-10 unter stimulierten Bedingungen mit signifikanter Reduktion der TLR6-Expression.  $n = 6$ . Boxplotdarstellung mit Median und oberer und unterer Quartile.

\*\*  $p = 0,01$ , (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, statistische Signifikanz gekennzeichnet durch Sternchen. \*\*  $p < 0,01$ ).

## **4. Diskussion**

### **4.1. Diskussion der Methodik**

Die für die Gewinnung adulter Stammzellen verwendeten Methoden haben sich in den vergangenen Jahren erheblich verändert. Diese Weiterentwicklungen beinhalten ein aufeinander abgestimmtes Set aus standardisierten, qualitätssichernden Prozeduren, bei denen der Erfolg häufig von der Beachtung kleiner Details abhängen kann. Im Folgenden werden daher diese Rahmenbedingungen ausführlich diskutiert.

#### **4.1.1. Zellkultivierung**

Studien haben gezeigt, dass mit steigendem Alter der Patienten die Deviationseffizienz, Differenzierungskapazität und exprimierte Oberflächenmarker der DPSCs abnehmen, die Anzahl apoptotischer Zellen zunimmt und sich die Teilungszeit verlängert (Wu, W. et al. 2015). Daher wurden die Stammzellen junger Patienten zwischen 15-20 Jahren für diese Studie ausgewählt. Dabei trifft es sich gut, dass häufig in dieser Altersgruppe aufgrund verschiedener Indikationen die dritten Molaren entfernt werden, so dass sie als Quelle für Stammzellen zur Verfügung stehen. Genau wie bei Feng und Mitarbeitern (2014) wurden die Zähne nach Reinigung der Oberflächen an der Schmelz-Zement-Grenze unter sterilen Bedingungen aufgebrochen. He et al. (2013) haben in ihrer Studie über IL8-Expression die Pulpa ebenfalls in kleine Fragmente zerteilt und die daraus wachsenden Zellen in Zellkulturflaschen kultiviert. In der vorliegenden Dissertation wurde die Größe der Fragmente auf 1 mm<sup>3</sup> festgelegt. Kleinere Stücke vertrockneten zu schnell, was in einem fehlenden Zellwachstum resultierte. Zu große Stücke hafteten nicht suffizient an der Plastikoberfläche der Zellkulturflasche an und wurden durch das hinein pipettierte Zellkulturmedium von der Oberfläche abgespült, was wiederum in einem fehlenden Zellwachstum resultierte. Die Arbeitsgruppe um Feng (2014) hat die Pulpafragmente mit einer Lösung aus Collagenase I

und Dispase verdaut und die verbliebene Zell-Lösungs-Suspension durch einen Zellfilter laufen lassen. Sowohl der enzymatische Verdauungsvorgang als auch das Filtern durch enge Filtermaschen bedeutet einen zusätzlichen Stress für die Zellen und führt im schlimmsten Fall zur Apoptose. Um diesen Stress zu vermeiden, wurden die Zellen in der vorliegenden Arbeit in dem Pulpagewebe nach dem Zerkleinern der Fragmente in der Zellkulturflasche mit Medium im Inkubator belassen.

## **4.1.2. Nachweis von Stammzeleigenschaften**

### **4.1.2.1. Stammzellidentifikation**

Eine der Herausforderungen bei Studien dieser Art ist es sicherzustellen, dass es sich bei den untersuchten Zellen tatsächlich um Stammzellen handelte. Wäre dies nicht der Fall, könnte die Fragestellung nicht bearbeitet werden. Daher kommt diesem Schritt eine besondere Bedeutung zu. Um dieser gerecht zu werden, wurde bei der Identifikation der Stammzellen, bzw. DPSCs, konsequent nach dem standardisierten von Dominici und Mitarbeitern aufgestellten Protokoll (Dominici et al. 2006) vorgegangen. Dabei wurde darauf geachtet, dass alle dort beschriebenen Kriterien zur Identifikation von Stammzellen erfüllt wurden. Dies sind die Differenzierungen in osteogene, adipogene und chondrogene Zellen, die Bildung von Zellkolonien im *colony forming unit assay* nach einer bestimmten Anzahl von Tagen, eine Adhärenz an der Oberfläche von Zellkulturflaschen aus Plastik unter standardisierten Kulturbedingungen und die Expression bestimmter Oberflächenmarker. Außerdem mussten die DPSCs positiv auf CD73, CD90 und CD105 (>95% der Zellen) und negativ auf CD14, CD34 und CD45 (<2%) getestet werden. Als verschärfende Prüfung wurden die Kriterien von Fawzy El-Sayed et al. (2015) in der Arbeit berücksichtigt, wonach die DPSCs außerdem den Oberflächenflächenmarker CD146 sowie den mesenchymalen Stammzellmarker STRO-1 exprimieren mussten.



#### 4.1.2.2. *Colony forming unit assay*

Die Koloniebildung dient als Kriterium zur Identifikation mesenchymaler Stammzellen, in diesem Falle von DPSCs (Arnold et al. 2011). Es hilft, sie von den morphologisch ähnlichen Fibroblasten zu unterscheiden, die im Gegensatz zu den DPSCs nicht zur Bildung von Kolonien fähig sind. DPSCs sind in der Lage, identische Tochterzellen zu bilden. Für das CFU-Assay müssen sie in geringer Zellzahl ausgesät werden und an der Plastikoberfläche adhärent sein (Friedenstein et al. 1974; Prockop 1997). Im Allgemeinen bildet bei humanen mesenchymalen Stammzellen jeweils eine Zelle, der sogenannte CFU-Fibroblast (CFU-F), eine Kolonie. Im Gegensatz dazu bildet z. B. bei Mäusen und Ratten eine dieser Zellen mehrere Kolonien (Javazon et al. 2001; Peister et al. 2004). Im Vergleich zum Knochenmark besitzt die Pulpa mehr Kolonien bildende CFU-Fs und proliferierende Zellen (Gronthos et al. 2000). Einige Studien unterscheiden zwischen zwei Methoden, um das koloniebildende Potenzial von mesenchymalen Stammzellen zu untersuchen. Zum einen benutzten sie den klassischen CFU-Assay, bei dem die Stammzellen mit einer geringen Dichte in Petrischalen eingebracht werden. Zum anderen machten sie sich das *Single-Cell-CFU* zunutze. Dabei werden einzelne Zellen in Mikrotiterplatten pipettiert. Es werden zwei Zellsorten beurteilt. Die spindelförmigen schnell selbstreplizierenden (RS, *rapidly selfreplicating*) (dominant in den ersten fünf Tagen nach Aussäen der Zellen) und die langsam selbstreplizierenden Zellen (SR, *slowly selfreplicating*) (vorherrschend bei einer Konfluenz der Kolonien). Dieses Verfahren hat den Vorteil, dass das koloniebildende Potenzial einzelner Zellen sichtbar wird, da jeweils nur eine Zelle ausgesät wird. In der vorliegenden Arbeit wurde das traditionelle Verfahren verwendet, um das gesamte koloniebildende Potenzial zu betrachten und nicht nur das einzelner Zellen.

#### 4.1.2.3. **Zelldifferenzierungen**

DPSCs sind durch ihre Multipotenz in der Lage, sich in andere Zellarten zu differenzieren. Es macht sie für die Forschung hinsichtlich Geweberegeneration und Gewebeherstellung sehr interessant. Studien zeigten, dass die Transplantation von DPSCs in den Wurzelkanal von Zähnen nach einer Pulpektomie in einer Bildung von vitalem Gewebe resultierte (Zhu et al. 2012). Aber nicht nur in der Zahnmedizin führten Untersuchungen zu positiven Ergebnissen. DPSCs wurden in das zentrale Nervensystem von Mäusen mit degenerativ geschädigten

Oligodendrozyten transplantiert. Sie differenzierten sich zu oligodendrozytären Progenitorzellen und wiesen eine reparative Wirkung am Nerven auf (Askari et al. 2015). In anderen Studien wurde gezeigt, dass in Oligodendrozyten differenzierte DPSCs Myelin produzieren können (Magri et al. 2014) und durch eine Remyelinisierung die saltatorische Reizweiterleitung des Nervensystems wiederherstellen (Mierzwa et al. 2013). Darüber hinaus zeigten DPSCs einen Reparaturreffekt nach Transplantation bei Knochendefekten im Alveolarknochen (d'Aquino et al. 2009; Shieh-zadeh et al. 2014) und durch die Synthese eines proangiogenen Faktors die Fähigkeit zur Revaskularisierung nach ischämischen Herzerkrankungen (Iohara et al. 2008). Die Differenzierung in osteogene, adipogene und lipogene Zellen wird daher als weiteres Identifikationskriterium für Stammzellen genutzt. Die Zelldifferenzierungen wurden mittels spezifischer Färbungen nachgewiesen (Bardin et al. 1998).

Für die adipogene Zellfärbung wurde in dieser Arbeit die Oil-Red-O-Färbung verwendet. Als Alternative hätte beispielsweise auch das dem Oil Red O strukturell ähnliche Sudan III verwendet werden können. Sowohl Oil Red O als auch Sudan III sind für konventionelle Lichtmikroskopie, aber auch für Fluoreszenzmikroskopie geeignet (Fukumoto et al. 2002; Koopman et al. 2001). Bei beiden Farbstoffen müssen die Zellen vorher mit Ethanol bzw. Isopropanol fixiert werden. Laut Fukomoto et al. führt diese Fixierung jedoch zur Fusion benachbarter Lipidtröpfchen und dadurch zur Entstehung künstlich vergrößerter Strukturen (Fukumoto et al. 2002). Um diesem gegebenenfalls nachteiligem Effekt aus dem Weg zu gehen, ist es möglich, Zellen alternativ mit fluoreszierenden Farbstoffen wie dem Nile Red zu färben (Fowler et al. 1985; Fukumoto et al. 2002). Oil Red O hat im Vergleich zu Nile Red allerdings den entscheidenden Vorteil, dass die Wells mit den gefärbten Zellen für spätere Aufnahmen mit dem Mikroskop aufgehoben werden können. Der Farbstoff Nile Red verblasst nach circa sechs Stunden und verliert so an Aussagekraft (Escorcía et al. 2018).

Für die chondrogene Färbung wurde in dieser Arbeit die für die Abteilung gebräuchliche Alcianblau-Färbung verwendet. Alternativ hätte ein Farbstoff namens Safranin O genutzt werden können. Er hat im Vergleich zum Alcianblau den Vorteil, dass die Farbpartikel kleiner sind und somit einfacher in das Gewebe gelangen (Goldstein et al. 1974). Des Weiteren bindet Safranin O spezifisch an das Substrat und eignet sich somit gleichzeitig zur Quantifizierung von Proteoglykanen (Kiviranta et al. 1985). Die Färbung mit Alcianblau hat sich in der Arbeitsroutine bewährt, weshalb bei der vorliegenden Dissertation auf sie zurückgegriffen wurde.

Die in der vorliegenden Arbeit angewandten Zellfärbungen waren problemlos ausführbar und lieferten eindeutige Ergebnisse, die jederzeit reproduzierbar waren.

#### **4.1.3. *Magnetic activated cell sorting (MACS)***

MACS ist eine seit den 90iger Jahren etablierte Methode der Zellsortierung (Miltenyi et al. 1990). Zellen können beispielsweise in Hinsicht auf Größe durch Zentrifugieren, Adhärenz zu Oberflächen und Vorhandensein bestimmter Oberflächenmarker sortiert werden, wie z. B. durch das „panning“. Diese Methoden haben im Gegensatz zur MACS-Methode eine geringe Sensitivität, eine geringe Qualität der Sortierung, weil es zum Verlust von eigentlich positiv markierten Zellen kommt und sind zeitintensiver (Miltenyi et al. 1990). Deswegen wurde in der vorliegenden Studie vom MACS-Sorting Gebrauch gemacht. Die verwendeten MicroBeads haben einige zu erwähnende Vorteile. Sie aggregieren nicht miteinander und somit kommt es nicht zu einem Verkleben der Zellen. Zusätzlich zeigen sie eine schnelle Bindung zu den Zellen, weil sie in einer kolloidalen, nicht verklumpenden Flüssigkeit gelöst sind. Die MicroBeads führen nicht zu einer Aktivierung der Zellen und müssen nach dem Sortieren nicht entfernt werden. Zuletzt übersättigen sie die Oberfläche der Zellen nicht (Miltenyi et al. 1990). In der vorliegenden Arbeit war das Zellwachstum aus den Pulpafragmenten sehr groß, weswegen beim MACS-Sorting die Gefahr bestand, dass der Filter durch die vielen Zellen verstopfen könnte. Aufgrund dieser Tatsache wurden die Zellen in einer größeren Menge Flüssigkeit resuspendiert, um die Zellkonzentration zu verringern. Des Weiteren wurde der Filter, nachdem die Flüssigkeits-Zell-Suspension aufgebraucht war, mehrmals mit Basismedium durchgespült, um die Effektivität des Sortierens zu erhöhen und die MACS-negativen Zellen aus dem Filter zu lösen.

#### **4.1.4. *Polymerase-Kettenreaktion (PCR)***

Die PCR erlaubt es, *in vitro* DNA zu vervielfältigen. Es können beliebig viele Kopien einzelner DNA-Sequenzen hergestellt werden (Templeton 1992). In der vorliegenden Studie wurde die Echtzeit-PCR durchgeführt. Der Unterschied zur normalen PCR ist, dass die Menge der amplifizierten DNA in Echtzeit gemessen werden kann und nicht wie bei der PCR

erst zum Ende der Reaktion. Weiterhin werden zwei Wege der Durchführung einer PCR unterschieden: die absolute und die relative Quantifizierung (Livak et al. 2001). Bei der absoluten Methode wird aus den  $C_T$ -Werten einer bekannten Standardprobe eine Standardkurve ermittelt. Diese dient folgend für die Berechnung eines absoluten Wertes des gesuchten Zielgens (Livak et al. 2001). Bei der PCR von Ziel- und Referenzgenen bestehen Effizienzunterschiede. Der Nachteil der absoluten Quantifizierung besteht darin, dass entstehende Effizienzunterschiede nicht ausgeglichen werden (Ferre 1992). Solche Inhomogenitäten werden bei der relativen Quantifizierung dadurch minimiert, dass das Zielgen mit einem *Housekeeping* Gen in Relation gesetzt wird (Boulter et al. 2016). Um sich diesen Vorteil zu Nutze zu machen, wurde in der vorliegenden Dissertation die relative Quantifizierung verwendet.

#### **4.1.5. *Fluorescence-activated cell sorting (FACS)***

Die Methode der fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung wurde in den 60er-Jahren von Bonner, Sweet, Hulett, Herzenberg und Weiteren etabliert (Bonner et al. 1972). Anfang der 70-er Jahre brachte Becton Dickinson die ersten Geräte auf den Markt, die diese Methodik realisierbar machten (Herzenberg et al. 2002). Mit der FACS-Analyse ist es möglich Partikel, wie z. B. Zellen, effizient zu zählen, zu untersuchen und zu sortieren (Herzenberg et al. 2002). Es wird die extra- von der intrazellulären FACS-Analyse unterschieden. In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe der extrazellulären FACS-Analyse die Expression der CD-Antigene, dem mesenchymalen Stammzellmarker STRO-1 und die der extrazellulären TLRs nachgewiesen. Die intrazelluläre FACS-Analyse wurde zum Nachweis intrazellulärer TLRs verwendet.

Die in der vorliegenden Dissertation angewandte Fluoreszenzmessung mit dem FACS Calibur war problemlos ausführbar und lieferte eindeutige und reproduzierbare Ergebnisse.

## **4.2. Diskussion der Ergebnisse**

In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, ein Expressionsprofil von TLRs auf DPSCs, die im normalen und im entzündlich veränderten Medium stimuliert wurden, aufzustellen. Die Ergebnisse zeigten, dass sich die TLR-Expression nach der Stimulation mit dem Entzündungsmedium im Vergleich zum Normalzustand sowohl intra- als auch extrazellulär verändert hat.

### **4.2.1. Expression der Toll-like Rezeptoren auf mRNA-Ebene**

Wie oben bereits beschrieben ist die Expression der TLRs unter anderem abhängig von der Herkunft der Zellen. Li et al. konnten zeigen, dass nicht stimulierte PDLSCs auf mRNA-Ebene die TLRs1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9 und 10 exprimierten. BMMSCs exprimierten hingegen die TLRs1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9 und 10. Bei beiden Stammzellarten konnte keine Expression von TLR7 nachgewiesen werden (2014). Stammzellen aus der Nabelschnur exprimierten im nicht stimulierten Zustand verhältnismäßig wenig TLR1, 3, 5 und 9, dafür vermehrt TLR4 und TLR6.

In der vorliegenden Arbeit wurden auf mRNA-Ebene die Toll-like Rezeptoren 1, 2, 3, 4, 5, 6 und 10 im unstimulierten Zustand auf den DPSCs exprimiert. Nach Stimulation mit dem Entzündungsmedium wurde die Expression von TLR1, TLR2 und TLR3 signifikant erhöht. Die Expression von TLR6 wurde signifikant vermindert. Auffällig in dieser Arbeit war, dass TLR 7, TLR 8 und TLR9 auf mRNA-Ebene nicht nachweisbar waren, auf Proteinebene jedoch exprimiert wurden. Diese Unstimmigkeit erklären Li et al. damit, dass die TLR-Proteine posttranskriptional modifiziert oder unterschiedlich schnell abgebaut werden (2014). Delarosa et al. hingegen beschrieben genau das Gegenteil. In einer ihrer Publikationen postulierten sie, dass die TLR-Expression auf mRNA-Ebene höher, auf Proteinebene vergleichsweise weniger sei (2012). Wie oben bereits beschrieben führen sie viele widersprüchliche Ergebnisse auf die unterschiedliche Herkunft der Zellen, experimentelle Durchführung der Versuche und die Komplexität der Immunologie der TLRs. Viele Autoren sind sich hingegen einig, dass man durch die TLR-Aktivierung, bzw. Suppression in die immunologischen Vorgänge eingreifen kann. Yamagishi et. al z. B. zeigten, dass eine Blockade der Bindung des LPS vom Bakterium *Porphyromonas gingivalis* an TLR2 den

schädlichen Effekt des LPSs verhindern kann (Yamagishi et al. 2011). Des Weiteren zeigten Li et al., dass eine Außerkraftsetzung der LPS-Bindung an TLR4 einen Abbau im Alveolarknochen verhindert (2014).

#### **4.2.2. Expression der Toll-like Rezeptoren auf Proteinebene**

Die einzige signifikante Veränderung bei der Expression der Toll-like Rezeptoren auf Proteinebene ist die Elimination der Expression von TLR6.

TLR1 und TLR6 bilden jeweils mit TLR2 einen Heterodimer, der Bestandteile der bakteriellen Zellwand erkennt und dessen Aktivierung jeweils in der Produktion proinflammatorischer Zytokine mündet. TLR2 ist als einziger der drei TLRs in der Lage, diacylierte und triacylierte Lipoproteine zu erkennen (Akira et al. 2004; Jin, M. S. et al. 2007). Innerhalb des Komplexes können TLR1 und TLR6 jeweils die Reaktionsfreudigkeit von TLR2 mit verschiedenen Liganden entweder positiv oder negativ beeinflussen (Hajjar et al. 2001; Ozinsky et al. 2000). Das hier nachgewiesene Ergebnis könnte dahingehend interpretiert werden, dass durch die verminderte Expression von TLR1 und TLR6 unter inflammatorischen Bedingungen TLR2 nicht einer negativen Rückkopplung der beiden anderen TLRs unterliegt.

#### **4.2.3. Schlusswort zur Diskussion**

Stammzellen jeglicher Herkunft sind in den letzten Jahren immer mehr in den Fokus der Forschung gerückt. Ihr weitreichendes therapeutisches Potenzial ist vielversprechend. Trotzdem verbleiben viele Faktoren immer noch unklar. Die Toll-like Rezeptoren könnten durch ihre regulative Fähigkeit zukünftig eine Möglichkeit bieten, Stammzellen in vielen fachmedizinischen Bereichen weiterreichend einzusetzen. Für Zahnärzte beispielsweise gehört eine Wurzelkanalbehandlung fast zur täglichen Arbeitsroutine. Die Vitalerhaltung eines Zahnes sollte immer erstes therapeutisches Ziel sein. Deswegen wäre eine Möglichkeit eine Pulpitis bei Eröffnung der Pulpa durch bestimmte Marker, also den Toll-like Rezeptoren, zu klassifizieren, von bedeutender klinischer Relevanz. Es könnte anschließend entschieden

werden, ob eine minimalinvasivere P-Behandlung mit Aussicht auf Erfolg möglich wäre, bevor fälschlicher Weise eine irreversible Wurzelkanalbehandlung begonnen werden muss. Sowohl in der Zahnmedizin als auch in der Humanmedizin sind weitere Studien nötig, um die genauen Effekte der TLR-Aktivierung oder –Herunterregulation auf den DPSCs und die nachfolgenden Reaktionen der Zellen zu analysieren. Da bis zum jetzigen Zeitpunkt nur die Wirkung einer Aktivierung von TLR2, TLR3 und TLR4 bekannt sind, muss auch die Auswirkung der Aktivierung der weiteren TLRs auf zellulärer Ebene erforscht werden. Zusätzlich muss weitere Klarheit über die Interaktion der TLRs untereinander erlangt werden. Dadurch wäre es möglich, in die Kommunikation der TLRs einzugreifen und gewünschte Effekte herbeizuführen oder im Umkehrschluss ungewünschte Reaktionen zu dezimieren. So könnte der Einsatz der DPSCs in der Transplantationsmedizin in-vivo einen noch größeren Stellenwert erlangen.

## 5. Zusammenfassung

Die Toll-like Rezeptoren nehmen eine wichtige Rolle bei der initialen Immunabwehr der Pulpa im Zahn ein. Sie gehören zu den *Pattern-Recognition-Rezeptoren* (PRRs) und erkennen bestimmte Merkmale pathogener Erreger, die man als Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs) bezeichnet. Bisher ist es gelungen, 10 Toll-like Rezeptoren im menschlichen Organismus nachzuweisen. Sie kommen sowohl extrazellulär (TLR1, 2, 4, 5, 6 und 10) auf der Oberfläche von Zellen als auch intrazellulär im Zellkern (TLR3, 7, 8, und 9) vor. Nach einer Aktivierung durch pathologische Reize werden spezifische intrazelluläre Signalkaskaden in Gang gesetzt, die schlussendlich zelluläre Funktionen beeinflussen und verändern. Die Toll-like Rezeptoren sind auch bei Stammzellen der Pulpa zu finden, wo sie unabkömmlich für den Schutz der Vitalität des Zahnes durch Bekämpfung pathologischer Reize sind.

Ziel dieser Arbeit war es, erstmalig ein Expressionsprofil der Toll-like Rezeptoren auf den pulpalen Stammzellen in gesundem Zustand und in einem durch ein Entzündungsmedium hervorgerufenen Zustand der akuten Immunabwehr zu erstellen.

Zur Untersuchung wurden kariesfreie Molaren junger Patienten verwendet, die aus verschiedenen Gründen zur Extraktion indiziert waren. Aus den Wurzelkanälen und der Pulpakammer der Zähne wurde die Pulpa entfernt. Die daraus wachsenden Zellen wurden durch ein magnetisches Zellsortierungsverfahren (MACS-Sorting) sortiert, wodurch die Stammzellen, die MACS-positiven Zellen, von anderen Zellen, den MACS-negativen Zellen, getrennt werden konnten. Um nachzuweisen, dass es sich bei den MACS-positiven Zellen tatsächlich um Stammzellen handelte, wurden entsprechend internationaler Standards Identifikationsverfahren durchgeführt. Zunächst konnte die charakteristische Bildung von Kolonien im *colony-forming unit assay* nachgewiesen werden. Durch Stimulation mit unterschiedlichen Differenzierungsmedien wurden die Zellen außerdem zur Produktion von osteogenem, adipogenem und chondrogenem Material angeregt. Darüber hinaus wurde das für pulmale Stammzellen spezifische Expressionsmuster von Oberflächenantigenen (Nachweis von CD73, CD90, CD105, CD146, STRO-1, kein Nachweis von CD14, CD34 und CD45) mittels Fluoreszenz- (FACS-) Analyse, nachgewiesen.



Im Rahmen des eigentlichen Experiments dienten die Echtzeit-PCR sowie die FACS-Analyse zum Nachweis der Toll-like Rezeptoren in den unstimulierten pulpalen Stammzellen (DPSCs) und den entzündlich stimulierten pulpalen Stammzellen (DPSCs-i) auf mRNA- bzw. auf Proteinebene. Auf mRNA-Ebene wurde unter stimulierten Bedingungen die Expression von TLR1, 2 und 3 signifikant gesteigert, die Expression von TLR6 signifikant reduziert und die Expression von TLR4, 5 und 10 nicht signifikant reduziert. TLR7, 8 und 9 waren auf mRNA-Ebene unter nicht stimulierten und stimulierten Bedingungen nicht nachweisbar. Auf Proteinebene wurde die Expression von TLR2, 3, 4, 5 und 8 nicht signifikant gesteigert, die Expression von TLR6 signifikant reduziert und die Expression von TLR1, 7, 9 und 10 nicht signifikant reduziert.

Die Ergebnisse konnten erstmals einen Unterschied in den Expressionsniveaus der einzelnen Toll-like Rezeptoren auf pulpalen Stammzellen in einem nicht-stimulierten und einem entzündlich stimulierten Zustand nachweisen. Weitere Forschung ist erforderlich, um die relevanten Konsequenzen der vorliegenden Expressionsunterschiede zu erarbeiten, damit die Funktion der Toll-like Rezeptoren in den pulpalen Stammzellen und deren Potenzial für die Verwendung in der Stammzellforschung zukünftig besser verstanden werden kann.

## 6. Literaturverzeichnis

Adam, P. J., Clesham, G. J., Weissberg, P. L. (1998): Expression of endoglin mRNA and protein in human vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 247, 33-37

Akira, S., Takeda, K. (2004): Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, 4, 499-511

Al-Habib, M., Yu, Z., Huang, G. T. (2013): Small molecules affect human dental pulp stem cell properties via multiple signaling pathways. *Stem Cells Dev*, 22, 2402-2413

Alais, S., Allioli, N., Pujades, C., Duband, J. L., Vainio, O., Imhof, B. A., Dunon, D. (2001): HEMCAM/CD146 downregulates cell surface expression of beta1 integrins. *J Cell Sci*, 114, 1847-1859

Altin, J. G., Sloan, E. K. (1997): The role of CD45 and CD45-associated molecules in T cell activation. *Immunol Cell Biol*, 75, 430-445

Arnold, K., Sarkar, A., Yram, M. A., Polo, J. M., Bronson, R., Sengupta, S., Seandel, M., Geijsen, N., Hochedlinger, K. (2011): Sox2(+) adult stem and progenitor cells are important for tissue regeneration and survival of mice. *Cell Stem Cell*, 9, 317-329

Askari, N., Yaghoobi, M. M., Shamsara, M., Esmaeili-Mahani, S. (2015): Tetracycline-regulated expression of OLIG2 gene in human dental pulp stem cells lead to mouse sciatic nerve regeneration upon transplantation. *Neuroscience*, 305, 197-208

Avery, J. K. (1971): Structural elements of the young normal human pulp. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 32, 113-125

Barachini, S., Danti, S., Pacini, S., D'Alessandro, D., Carnicelli, V., Trombi, L., Moscato, S., Mannari, C., Cei, S., Petrini, M. (2014): Plasticity of human dental pulp stromal cells with bioengineering platforms: a versatile tool for regenerative medicine. *Micron*, 67, 155-168

Bardin, N., Frances, V., Combes, V., Sampol, J., Dignat-George, F. (1998): CD146: biosynthesis and production of a soluble form in human cultured endothelial cells. *FEBS Lett*, 421, 12-14

Barro, M., Patton, J. T. (2007): Rotavirus NSP1 inhibits expression of type I interferon by antagonizing the function of interferon regulatory factors IRF3, IRF5, and IRF7. *J Virol*, 81, 4473-4481

Basith, S., Manavalan, B., Yoo, T. H., Kim, S. G., Choi, S. (2012): Roles of toll-like receptors in cancer: a double-edged sword for defense and offense. *Arch Pharm Res*, 35, 1297-1316

Baume, L. J. (1980): The biology of pulp and dentine. A historic, terminologic-taxonomic, histologic-biochemical, embryonic and clinical survey. *Monogr Oral Sci*, 8, 1-220

Bergenholtz, G. (1981): Inflammatory response of the dental pulp to bacterial irritation. *J Endod*, 7, 100-104

Beveridge, E. E., Brown, A. C. (1965): The measurement of human dental intrapulpal pressure and its response to clinical variables. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 19, 655-668

Bonner, W. A., Hulett, H. R., Sweet, R. G., Herzenberg, L. A. (1972): Fluorescence activated cell sorting. *Rev Sci Instrum*, 43, 404-409

Boulter, N., Suarez, F. G., Schibeci, S., Sunderland, T., Tolhurst, O., Hunter, T., Hodge, G., Handelsman, D., Simanainen, U., Hendriks, E., Duggan, K. (2016): A simple, accurate and universal method for quantification of PCR. *BMC Biotechnol*, 16, 27

Bowles, J., Schepers, G., Koopman, P. (2000): Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. *Dev Biol*, 227, 239-255

Brown, J., Greaves, M. F., Molgaard, H. V. (1991): The gene encoding the stem cell antigen, CD34, is conserved in mouse and expressed in haemopoietic progenitor cell lines, brain, and embryonic fibroblasts. *Int Immunol*, 3, 175-184

Bustin, S. A., Mueller, R. (2005): Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clin Sci (Lond)*, 109, 365-379

Chen, L., Zheng, L., Jiang, J., Gui, J., Zhang, L., Huang, Y., Chen, X., Ji, J., Fan, Y. (2016): Calcium hydroxide-induced proliferation, migration, osteogenic differentiation, and mineralization via the mitogen-activated protein kinase pathway in human dental pulp stem cells. *J Endod*, 42, 1355-1361

Chiego, D. (1994): *Histology of pulp*. Thieme, New York, 262-81

Chigaev, A., Wu, Y., Williams, D. B., Smagley, Y., Sklar, L. A. (2011): Discovery of very late antigen-4 (VLA-4, alpha4beta1 integrin) allosteric antagonists. *J Biol Chem*, 286, 5455-5463

Chini, V., Foka, A., Dimitracopoulos, G., Spiliopoulou, I. (2007): Absolute and relative real-time PCR in the quantification of *tst* gene expression among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: evaluation by two mathematical models. *Lett Appl Microbiol*, 45, 479-484

Choung, H. W., Lee, J. H., Lee, D. S., Choung, P. H., Park, J. C. (2013): The role of preameloblast-conditioned medium in dental pulp regeneration. *J Mol Histol*, 44, 715-721

Chuang, T., Ulevitch, R. J. (2001): Identification of hTLR10: a novel human toll-like receptor preferentially expressed in immune cells. *Biochim Biophys Acta*, 1518, 157-161

Colgan, S. P., Eltzschig, H. K., Eckle, T., Thompson, L. F. (2006): Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Purinergic Signal*, 2, 351-360

d'Aquino, R., De Rosa, A., Lanza, V., Tirino, V., Laino, L., Graziano, A., Desiderio, V., Laino, G., Papaccio, G. (2009): Human mandible bone defect repair by the grafting of dental pulp stem/progenitor cells and collagen sponge biocomplexes. *Eur Cell Mater*, 18, 75-83

Delarosa, O., Dalemans, W., Lombardo, E. (2012): Toll-like receptors as modulators of mesenchymal stem cells. *Front Immunol*, 3, 182

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

Duff, S. E., Li, C., Garland, J. M., Kumar, S. (2003): CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB J*, 17, 984-992

Edwards, A. D., Diebold, S. S., Slack, E. M., Tomizawa, H., Hemmi, H., Kaisho, T., Akira, S., Reis e Sousa, C. (2003): Toll-like receptor expression in murine DC subsets: lack of TLR7 expression by CD8 alpha+ DC correlates with unresponsiveness to imidazoquinolines. *Eur J Immunol*, 33, 827-833

Escorcía, W., Ruter, D. L., Nhan, J., Curran, S. P. (2018): Quantification of Lipid Abundance and Evaluation of Lipid Distribution in *Caenorhabditis elegans* by Nile Red and Oil Red O Staining. *J Vis Exp*, 133

Fawzy El-Sayed, K. M., Dorfer, C., Fandrich, F., Gieseler, F., Moustafa, M. H., Ungefroren, H. (2013): Adult mesenchymal stem cells explored in the dental field. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 130, 89-103

Fawzy El-Sayed, K. M., Elahmady, M., Adawi, Z., Aboushadi, N., Elnaggar, A., Eid, M., Hamdy, N., Sanaa, D., Dorfer, C. E. (2018): The periodontal stem/progenitor cell inflammatory-regenerative cross talk: A new perspective. *J Periodontal Res*, 3

Fawzy El-Sayed, K. M., Jakusz, K., Jochens, A., Doerfer, C., Schwendicke, F. (2015): Stem/progenitor cell transplantation for pulpal regeneration: A systematic review and meta-analysis of animal studies. *Tissue Eng Part B Rev*, 21, 451-460

Fawzy El-Sayed, K. M., Klingebiel, P., Dorfer, C. E. (2016): Toll-like receptor expression profile of human dental pulp stem/progenitor cells. *J Endod*, 42, 413-417

Feng, X., Feng, G., Xing, J., Shen, B., Tan, W., Huang, D., Lu, X., Tao, T., Zhang, J., Li, L., Gu, Z. (2014): Repeated lipopolysaccharide stimulation promotes cellular senescence in human dental pulp stem cells (DPSCs). *Cell Tissue Res*, 356, 369-380

Ferre, F. (1992): Quantitative or semi-quantitative PCR: reality versus myth. *PCR Methods Appl*, 2, 1-9

Fina, L., Molgaard, H. V., Robertson, D., Bradley, N. J., Monaghan, P., Delia, D., Sutherland, D. R., Baker, M. A., Greaves, M. F. (1990): Expression of the CD34 gene in vascular endothelial cells. *Blood*, 75, 2417-2426

Fonsatti, E., Jekunen, A. P., Kairemo, K. J., Coral, S., Snellman, M., Nicotra, M. R., Natali, P. G., Altomonte, M., Maio, M. (2000): Endoglin is a suitable target for efficient imaging of solid tumors: in vivo evidence in a canine mammary carcinoma model. *Clin Cancer Res*, 6, 2037-2043

Fowler, S. D., Greenspan, P. (1985): Application of Nile red, a fluorescent hydrophobic probe, for the detection of neutral lipid deposits in tissue sections: comparison with oil red O. *J Histochem Cytochem*, 33, 833-836

Friedenstein, A. J., Chailakhyan, R. K., Latsinik, N. V., Panasyuk, A. F., Keiliss-Borok, I. V. (1974): Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation*, 17, 331-340

Fukumoto, S., Fujimoto, T. (2002): Deformation of lipid droplets in fixed samples. *Histochem Cell Biol*, 118, 423-428

Gandia, C., Arminan, A., Garcia-Verdugo, J. M., Lledo, E., Ruiz, A., Minana, M. D., Sanchez-Torrijos, J., Paya, R., Mirabet, V., Carbonell-Uberos, F., Llop, M., Montero, J. A., Sepulveda, P. (2008): Human dental pulp stem cells improve left ventricular function, induce angiogenesis, and reduce infarct size in rats with acute myocardial infarction. *Stem Cells*, 26, 638-645

Goldstein, D. J., Horobin, R. W. (1974): Surface staining of cartilage by Alcian blue, with reference to the role of microscopic dye aggregates in histological staining. *Histochem J*, 6, 175-184

Gougos, A., Letarte, M. (1988): Identification of a human endothelial cell antigen with monoclonal antibody 44G4 produced against a pre-B leukemic cell line. *J Immunol*, 141, 1925-1933

Griffin, M. D., Ritter, T., Mahon, B. P. (2010): Immunological aspects of allogeneic mesenchymal stem cell therapies. *Hum Gene Ther*, 21, 1641-1655

Gronthos, S., Brahimi, J., Li, W., Fisher, L. W., Cherman, N., Boyde, A., DenBesten, P., Robey, P. G., Shi, S. (2002): Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res*, 81, 531-535

Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P. G., 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

Guirado, M., Gil, H., Saenz-Lopez, P., Reinboth, J., Garrido, F., Cozar, J. M., Ruiz-Cabello, F., Carretero, R. (2012): Association between C13ORF31, NOD2, RIPK2 and TLR10 polymorphisms and urothelial bladder cancer. *Hum Immunol*, 73, 668-672

Hajjar, A. M., O'Mahony, D. S., Ozinsky, A., Underhill, D. M., Aderem, A., Klebanoff, S. J., Wilson, C. B. (2001): Cutting edge: functional interactions between toll-like receptor (TLR) 2 and TLR1 or TLR6 in response to phenol-soluble modulin. *J Immunol*, 166, 15-19

Hasan, U., Chaffois, C., Gaillard, C., Saulnier, V., Merck, E., Tancredi, S., Guet, C., Briere, F., Vlach, J., Lebecque, S., Trinchieri, G., Bates, E. E. (2005): Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88. *J Immunol*, 174, 2942-2950

He, W., Qu, T., Yu, Q., Wang, Z., Lv, H., Zhang, J., Zhao, X., Wang, P. (2013): LPS induces IL-8 expression through TLR4, MyD88, NF-kappaB and MAPK pathways in human dental pulp stem cells. *Int Endod J*, 46, 128-136

He, W., Wang, Z., Zhou, Z., Zhang, Y., Zhu, Q., Wei, K., Lin, Y., Cooper, P. R., Smith, A. J., Yu, Q. (2014): Lipopolysaccharide enhances Wnt5a expression through toll-like receptor 4, myeloid differentiating factor 88, phosphatidylinositol 3-OH kinase/AKT and nuclear factor kappa B pathways in human dental pulp stem cells. *J Endod*, 40, 69-75

Hellwig, E., Klimek, J., Attin, T. (2010): Einführung in die Zahnerhaltung. 5. überarbeitete Auflage, Deutsche Zahnärzte Verlag, Köln, 9, 10, 313, 320, 321, 337

Herzenberg, L. A., Parks, D., Sahaf, B., Perez, O., Roederer, M., Herzenberg, L. A. (2002): The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford. *Clin Chem*, 48, 1819-1827

Heyeraas, K. J., Berggreen, E. (1999): Interstitial fluid pressure in normal and inflamed pulp. *Crit Rev Oral Biol Med*, 10, 328-336

Honda, K., Yanai, H., Negishi, H., Asagiri, M., Sato, M., Mizutani, T., Shimada, N., Ohba, Y., Takaoka, A., Yoshida, N., Taniguchi, T. (2005): IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature*, 434, 772-777

Hwa Cho, H., Bae, Y. C., Jung, J. S. (2006): Role of toll-like receptors on human adipose-derived stromal cells. *Stem Cells*, 24, 2744-2752

Hynes, K., Menicanin, D., Gronthos, S., Bartold, P. M. (2012): Clinical utility of stem cells for periodontal regeneration. *Periodontol 2000*, 59, 203-227

Ilic, D., Polak, J. (2012): Stem cell based therapy- where are we going? *Lancet*, 379, 877-878

Iohara, K., Zheng, L., Wake, H., Ito, M., Nabekura, J., Wakita, H., Nakamura, H., Into, T., Matsushita, K., Nakashima, M. (2008): A novel stem cell source for vasculogenesis in ischemia: subfraction of side population cells from dental pulp. *Stem Cells*, 26, 2408-2418

Iwasaki, A., Medzhitov, R. (2004): Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol*, 5, 987-995



Izumi, T., Kobayashi, I., Okamura, K., Sakai, H. (1995): Immunohistochemical study on the immunocompetent cells of the pulp in human non-carious and carious teeth. *Arch Oral Biol*, 40, 609-614

Janebodin, K., Horst, O. V., Ieronimakis, N., Balasundaram, G., Reesukumal, K., Pratumvinit, B., Reyes, M. (2011): Isolation and characterization of neural crest-derived stem cells from dental pulp of neonatal mice. *PLoS One*, 6, e27526

Javazon, E. H., Colter, D. C., Schwarz, E. J., Prockop, D. J. (2001): Rat marrow stromal cells are more sensitive to plating density and expand more rapidly from single-cell-derived colonies than human marrow stromal cells. *Stem Cells*, 19, 219-225

Jin, D., Fan, J., Wang, L., Thompson, L. F., Liu, A., Daniel, B. J., Shin, T., Curiel, T. J., Zhang, B. (2010): CD73 on tumor cells impairs antitumor T-cell responses: a novel mechanism of tumor-induced immune suppression. *Cancer Res*, 70, 2245-2255

Jin, M. S., Kim, S. E., Heo, J. Y., Lee, M. E., Kim, H. M., Paik, S. G., Lee, H., Lee, J. O. (2007): Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell*, 130, 1071-1082

Johnson, J. P. (1999): Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev*, 18, 345-357

Johnson, N. A., Meyer, C. M., Pingel, J. T., Thomas, M. L. (1989): Sequence conservation in potential regulatory regions of the mouse and human leukocyte common antigen gene. *J Biol Chem*, 264, 6220-6229

Jontell, M., Gunraj, M. N., Bergenholtz, G. (1987): Immunocompetent cells in the normal dental pulp. *J Dent Res*, 66, 1149-1153

Jontell, M., Okiji, T., Dahlgren, U., Bergenholtz, G. (1998): Immune defense mechanisms of the dental pulp. *Crit Rev Oral Biol Med*, 9, 179-200

Junqueira, J., Carneiro, J. (1996): Histologie. Springer, Berlin, 421-35

Kainz, P. (2000): The PCR plateau phase - towards an understanding of its limitations. *Biochim Biophys Acta*, 1494, 23-27

Karamzadeh, R., Eslaminejad, M. B., Aflatoonian, R. (2012): Isolation, characterization and comparative differentiation of human dental pulp stem cells derived from permanent teeth by using two different methods. *J Vis Exp*, 69

Karaoz, E., Demircan, P. C., Saglam, O., Aksoy, A., Kaymaz, F., Duruksu, G. (2011): Human dental pulp stem cells demonstrate better neural and epithelial stem cell properties than bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Histochem Cell Biol*, 136, 455-473

Kawai, T., Akira, S. (2005): Pathogen recognition with toll-like receptors. *Curr Opin Immunol*, 17, 338-344

Kawai, T., Akira, S. (2010): The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on toll-like receptors. *Nat Immunol*, 11, 373-384

Kim, S., Trowbridge, H. O. (1994): Pulpal reaction to caries and dental procedures. In: S. Cohen, R. C. Burns, *Pathways of the pulp.*, Mosby, St. Louis

Kisselbach, L., Merges, M., Bossie, A., Boyd, A. (2009): CD90 Expression on human primary cells and elimination of contaminating fibroblasts from cell cultures. *Cytotechnology*, 59, 31-44

Kiviranta, I., Jurvelin, J., Tammi, M., Saamanen, A. M., Helminen, H. J. (1985): Microspectrophotometric quantitation of glycosaminoglycans in articular cartilage sections stained with Safranin O. *Histochemistry*, 82, 249-255

Klimm, W. (2011): Endodontologie - Lehrbuch für Studium und Beruf. 2. überarbeitete Auflage, Deutsche Zahnärzte Verlag, Köln, 132

Koopman, R., Schaart, G., Hesselink, M. K. (2001): Optimisation of oil red O staining permits combination with immunofluorescence and automated quantification of lipids. *Histochem Cell Biol*, 116, 63-68

Krause, D. S., Fackler, M. J., Civin, C. I., May, W. S. (1996): CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood*, 87, 1-13

Kurt-Jones, E. A., Popova, L., Kwinn, L., Haynes, L. M., Jones, L. P., Tripp, R. A., Walsh, E. E., Freeman, M. W., Golenbock, D. T., Anderson, L. J., Finberg, R. W. (2000): Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol*, 1, 398-401

Langeland, K. (1981): Management of the inflamed pulp associated with deep carious lesion. *J Endod*, 7, 169-181

Lazarus, R., Raby, B. A., Lange, C., Silverman, E. K., Kwiatkowski, D. J., Vercelli, D., Klimecki, W. J., Martinez, F. D., Weiss, S. T. (2004): Toll-like receptor 10 genetic variation is associated with asthma in two independent samples. *Am J Respir Crit Care Med*, 170, 594-600

Le Blanc, K., Tammik, C., Rosendahl, K., Zetterberg, E., Ringden, O. (2003): HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol*, 31, 890-896

Lee, S. M., Kok, K. H., Jaume, M., Cheung, T. K., Yip, T. F., Lai, J. C., Guan, Y., Webster, R. G., Jin, D. Y., Peiris, J. S. (2014): Toll-like receptor 10 is involved in induction of innate immune responses to influenza virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 3793-3798

Lehmann, J. M., Riethmuller, G., Johnson, J. P. (1989): MUC18, a marker of tumor progression in human melanoma, shows sequence similarity to the neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 9891-9895

Li, C., Li, B., Dong, Z., Gao, L., He, X., Liao, L., Hu, C., Wang, Q., Jin, Y. (2014): Lipopolysaccharide differentially affects the osteogenic differentiation of periodontal

ligament stem cells and bone marrow mesenchymal stem cells through toll-like receptor 4 mediated nuclear factor kappaB pathway. *Stem Cell Res Ther*, 5, 67

Linde, A. (1973): Glycosaminoglycans of the dental pulp. A biochemical study. *Scand J Dent Res*, 81, 177-201

Linden, J. (2001): Molecular approach to adenosine receptors: receptor-mediated mechanisms of tissue protection. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 41, 775-787

Liotta, F., Angeli, R., Cosmi, L., Fili, L., Manuelli, C., Frosali, F., Mazzinghi, B., Maggi, L., Pasini, A., Lisi, V., Santarlasci, V., Consoloni, L., Angelotti, M. L., Romagnani, P., Parronchi, P., Krampera, M., Maggi, E., Romagnani, S., Annunziato, F. (2008): Toll-like receptors 3 and 4 are expressed by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and can inhibit their T-cell modulatory activity by impairing Notch signaling. *Stem Cells*, 26, 279-289

Liu, Y., Gao, Y., Zhan, X., Cui, L., Xu, S., Ma, D., Yue, J., Wu, B., Gao, J. (2014): TLR4 activation by lipopolysaccharide and *Streptococcus mutans* induces differential regulation of proliferation and migration in human dental pulp stem cells. *J Endod*, 40, 1375-1381

Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. *Methods*, 25, 402-408

Loeffler, J., Henke, N., Hebart, H., Schmidt, D., Hagemeyer, L., Schumacher, U., Einsele, H. (2000): Quantification of fungal DNA by using fluorescence resonance energy transfer and the light cycler system. *J Clin Microbiol*, 38, 586-590

Ludwig, S., Wang, X., Ehrhardt, C., Zheng, H., Donelan, N., Planz, O., Pleschka, S., Garcia-Sastre, A., Heins, G., Wolff, T. (2002): The influenza A virus NS1 protein inhibits activation of Jun N-terminal kinase and AP-1 transcription factors. *J Virol*, 76, 11166-11171

Magri, L., Swiss, V. A., Jablonska, B., Lei, L., Pedre, X., Walsh, M., Zhang, W., Gallo, V., Canoll, P., Casaccia, P. (2014): E2F1 coregulates cell cycle genes and chromatin components

during the transition of oligodendrocyte progenitors from proliferation to differentiation. *J Neurosci*, 34, 1481-1493

Matsusaka, T., Fujikawa, K., Nishio, Y., Mukaida, N., Matsushima, K., Kishimoto, T., Akira, S. (1993): Transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 10193-10197

McIntosh, K., Zvonic, S., Garrett, S., Mitchell, J. B., Floyd, Z. E., Hammill, L., Kloster, A., Di Halvorsen, Y., Ting, J. P., Storms, R. W., Goh, B., Kilroy, G., Wu, X., Gimble, J. M. (2006): The immunogenicity of human adipose-derived cells: temporal changes in vitro. *Stem Cells*, 24, 1246-1253

Meyer, W., Scheele, E. (1954): The anatomy of the root canals; preliminary report. *Dtsch Zahnarztl Z*, 9, 497-500

Mierzwa, A. J., Zhou, Y. X., Hibbits, N., Vana, A. C., Armstrong, R. C. (2013): FGF2 and FGFR1 signaling regulate functional recovery following cuprizone demyelination. *Neurosci Lett*, 548, 280-285

Miltenyi, S., Muller, W., Weichel, W., Radbruch, A. (1990): High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry*, 11, 231-238

Mjor, I. A., Ferrari, M. (2002): Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 6: Reactions to restorative materials, tooth-restoration interfaces, and adhesive techniques. *Quintessence Int*, 33, 35-63

Mjor, I. A., Sveen, O. B., Heyeraas, K. J. (2001): Pulp-dentin biology in restorative dentistry. Part 1: normal structure and physiology. *Quintessence Int*, 32, 427-446

Monsarrat, P., Vergnes, J. N., Nabet, C., Sixou, M., Snead, M. L., Planat-Benard, V., Casteilla, L., Kemoun, P. (2014): Concise review: mesenchymal stromal cells used for periodontal regeneration: a systematic review. *Stem Cells Transl Med*, 3, 768-774

Morgan, A. R., Lam, W. J., Han, D. Y., Fraser, A. G., Ferguson, L. R. (2012): Genetic variation within TLR10 is associated with Crohn's disease in a New Zealand population. *Hum Immunol*, 73, 416-420

Morszeck, C., Gotz, W., Schierholz, J., Zeilhofer, F., Kuhn, U., Mohl, C., Sippel, C., Hoffmann, K. H. (2005): Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol*, 24, 155-165

Muzio, M., Bosisio, D., Polentarutti, N., D'Amico, G., Stoppacciaro, A., Mancinelli, R., van't Veer, C., Penton-Rol, G., Ruco, L. P., Allavena, P., Mantovani, A. (2000): Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol*, 164, 5998-6004

Nalubamba, K. S., Gossner, A. G., Dalziel, R. G., Hopkins, J. (2008): Differential expression of pattern recognition receptors during the development of foetal sheep. *Dev Comp Immunol*, 32, 869-874

Ning, H., Lin, G., Lue, T. F., Lin, C. S. (2011): Mesenchymal stem cell marker Stro-1 is a 75 kd endothelial antigen. *Biochem Biophys Res Commun*, 413, 353-357

O'Connell, P. J., McKenzie, A., Fasicaro, N., Rockman, S. P., Pearse, M. J., d'Apice, A. J. (1992): Endoglin: a 180-kD endothelial cell and macrophage restricted differentiation molecule. *Clin Exp Immunol*, 90, 154-159

Ono, K., Han, J. (2000): The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal*, 12, 1-13

Ozinsky, A., Underhill, D. M., Fontenot, J. D., Hajjar, A. M., Smith, K. D., Wilson, C. B., Schroeder, L., Aderem, A. (2000): The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 13766-13771

Peister, A., Mellad, J. A., Larson, B. L., Hall, B. M., Gibson, L. F., Prockop, D. J. (2004): Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice

vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. *Blood*, 103, 1662-1668

Pesce, M., Scholer, H. R. (2000): Oct-4: control of totipotency and germline determination. *Mol Reprod Dev*, 55, 452-457

Pierdomenico, L., Bonsi, L., Calvitti, M., Rondelli, D., Arpinati, M., Chirumbolo, G., Becchetti, E., Marchionni, C., Alviano, F., Fossati, V., Staffolani, N., Franchina, M., Grossi, A., Bagnara, G. P. (2005): Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. *Transplantation*, 80, 836-842

Potdar, P. D., Jethmalani, Y. D. (2015): Human dental pulp stem cells: Applications in future regenerative medicine. *World J Stem Cells*, 7, 839-851

Prockop, D. J. (1997): Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*, 276, 71-74

Psaltis, P. J., Zannettino, A. C., Worthley, S. G., Gronthos, S. (2008): Concise review: mesenchymal stromal cells: potential for cardiovascular repair. *Stem Cells*, 26, 2201-2210

Pugin, J., Heumann, I. D., Tomasz, A., Kravchenko, V. V., Akamatsu, Y., Nishijima, M., Glauser, M. P., Tobias, P. S., Ulevitch, R. J. (1994): CD14 is a pattern recognition receptor. *Immunity*, 1, 509-516

Rege, T. A., Hagood, J. S. (2006): Thy-1 as a regulator of cell-cell and cell-matrix interactions in axon regeneration, apoptosis, adhesion, migration, cancer, and fibrosis. *FASEB J*, 20, 1045-1054

Resta, R., Yamashita, Y., Thompson, L. F. (1998): Ecto-enzyme and signaling functions of lymphocyte CD73. *Immunol Rev*, 161, 95-109

Rokhlin, O. W., Cohen, M. B., Kubagawa, H., Letarte, M., Cooper, M. D. (1995): Differential expression of endoglin on fetal and adult hematopoietic cells in human bone marrow. *J Immunol*, 154, 4456-4465

Ryan, A. K., Rosenfeld, M. G. (1997): POU domain family values: flexibility, partnerships, and developmental codes. *Genes Dev*, 11, 1207-1225

Saalbach, A., Hausteil, U. F., Anderegg, U. (2000): A ligand of human thy-1 is localized on polymorphonuclear leukocytes and monocytes and mediates the binding to activated thy-1-positive microvascular endothelial cells and fibroblasts. *J Invest Dermatol*, 115, 882-888

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239, 487-491

Sarkar, A., Hochedlinger, K. (2013): The sox family of transcription factors: versatile regulators of stem and progenitor cell fate. *Cell Stem Cell*, 12, 15-30

Scholer, H. R., Ruppert, S., Suzuki, N., Chowdhury, K., Gruss, P. (1990): New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4. *Nature*, 344, 435-439

Schumacher, G. H., Schmidt, H., Börnig, H., Richter, W. (1990): *Anatomie und Biochemie der Zähne*. Verlag Volk und Gesundheit, Berlin, 211-27

Seo, B. M., Miura, M., Sonoyama, W., Coppe, C., Stanyon, R., Shi, S. (2005): Recovery of stem cells from cryopreserved periodontal ligament. *J Dent Res*, 84, 907-912

Shi, S., 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, Y., Hu, G., Su, J., Li, W., Chen, Q., Shou, P., Xu, C., Chen, X., Huang, Y., Zhu, Z., Huang, X., Han, X., Xie, N., Ren, G. (2010): Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression and tissue repair. *Cell Res*, 20, 510-518

Shiba, H., Mouri, Y., Komatsuzawa, H., Ouhara, K., Takeda, K., Sugai, M., Kinane, D. F., Kurihara, H. (2003): Macrophage inflammatory protein-3alpha and beta-defensin-2 stimulate



dentin sialophosphoprotein gene expression in human pulp cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 306, 867-871

Shiehzhadeh, V., Aghmasheh, F., Shiehzhadeh, F., Joulae, M., Kosarieh, E., Shiehzhadeh, F. (2014): Healing of large periapical lesions following delivery of dental stem cells with an injectable scaffold: new method and three case reports. *Indian J Dent Res*, 25, 248-253

Shih, I. M. (1999): The role of CD146 (Mel-CAM) in biology and pathology. *J Pathol*, 189, 4-11

Shih, I. M., Speicher, D., Hsu, M. Y., Levine, E., Herlyn, M. (1997): Melanoma cell-cell interactions are mediated through heterophilic Mel-CAM/ligand adhesion. *Cancer Res*, 57, 3835-3840

Shin, L., Peterson, D. A. (2013): Human mesenchymal stem cell grafts enhance normal and impaired wound healing by recruiting existing endogenous tissue stem/progenitor cells. *Stem Cells Transl Med*, 2, 33-42

Simmons, P. J., Torok-Storb, B. (1991): Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood*, 78, 55-62

Sosic, D., Richardson, J. A., Yu, K., Ornitz, D. M., Olson, E. N. (2003): Twist regulates cytokine gene expression through a negative feedback loop that represses NF-kappaB activity. *Cell*, 112, 169-180

Spychala, J. (2000): Tumor-promoting functions of adenosine. *Pharmacol Ther*, 87, 161-173

Stashenko, P., Teles, R., D'Souza, R. (1998): Periapical inflammatory responses and their modulation. *Crit Rev Oral Biol Med*, 9, 498-521

Streuli, M., Saito, H. (1989): Regulation of tissue-specific alternative splicing: exon-specific cis-elements govern the splicing of leukocyte common antigen pre-mRNA. *EMBO J*, 8, 787-796

Szabo, A., Perou, C. M., Karaca, M., Perreard, L., Palais, R., Quackenbush, J. F., Bernard, P. S. (2004): Statistical modeling for selecting housekeeper genes. *Genome Biol*, 5, R59

Templeton, N. S. (1992): The polymerase chain reaction. History, methods, and applications. *Diagn Mol Pathol*, 1, 58-72

Tobias, P. S., McAdam, K. P., Soldau, K., Ulevitch, R. J. (1985): Control of lipopolysaccharide-high-density lipoprotein interactions by an acute-phase reactant in human serum. *Infect Immun*, 50, 73-76

Tomchuck, S. L., Zvezdaryk, K. J., Coffelt, S. B., Waterman, R. S., Danka, E. S., Scandurro, A. B. (2008): Toll-like receptors on human mesenchymal stem cells drive their migration and immunomodulating responses. *Stem Cells*, 26, 99-107

Tomic, S., Djokic, J., Vasilijic, S., Vucevic, D., Todorovic, V., Supic, G., Colic, M. (2011): Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from dental pulp and dental follicle are susceptible to activation by toll-like receptor agonists. *Stem Cells Dev*, 20, 695-708

Tonks, N. K., Diltz, C. D., Fischer, E. H. (1990): CD45, an integral membrane protein tyrosine phosphatase. Characterization of enzyme activity. *J Biol Chem*, 265, 10674-10680

Trowbridge, H. O., Emling, R. C. (1997): *Inflammation. A review of the process.* Fifth Edition, Quintessence, Chicago

van den Berk, L. C., Jansen, B. J., Siebers-Vermeulen, K. G., Netea, M. G., Latuhihin, T., Bergevoet, S., Raymakers, R. A., Kogler, G., Figdor, C. C., Adema, G. J., Torensma, R. (2009): Toll-like receptor triggering in cord blood mesenchymal stem cells. *J Cell Mol Med*, 13, 3415-3426

Wang, L., Zhou, X., Zhou, T., Ma, D., Chen, S., Zhi, X., Yin, L., Shao, Z., Ou, Z., Zhou, P. (2008): Ecto-5'-nucleotidase promotes invasion, migration and adhesion of human breast cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol*, 134, 365-372

Waterman, R. S., Tomchuck, S. L., Henkle, S. L., Betancourt, A. M. (2010): A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS One*, 5, e10088

Weine, F. S. (1996): *Endodontic Therapy*. Mosby, St. Louis, 84-165

Wright, S. D., Ramos, R. A., Tobias, P. S., Ulevitch, R. J., Mathison, J. C. (1990): CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*, 249, 1431-1433

Wu, W., Zhou, J., Xu, C. T., Zhang, J., Jin, Y. J., Sun, G. L. (2015): Derivation and growth characteristics of dental pulp stem cells from patients of different ages. *Mol Med Rep*, 12, 5127-5134

Wu, Y., Chen, L., Scott, P. G., Tredget, E. E. (2007): Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells*, 25, 2648-2659

Yamagishi, V. T., Torneck, C. D., Friedman, S., Huang, G. T., Glogauer, M. (2011): Blockade of TLR2 inhibits *Porphyromonas gingivalis* suppression of mineralized matrix formation by human dental pulp stem cells. *J Endod*, 37, 812-818

Zhang, M., Yan, Z., Wang, J., Yao, X. (2017): Toll-like receptors 7 and 8 expression correlates with the expression of immune biomarkers and positively predicts the clinical outcome of patients with melanoma. *Onco Targets Ther*, 10, 4339-4346

Zhang, W., Walboomers, X. F., Shi, S., Fan, M., Jansen, J. A. (2006): Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation. *Tissue Eng*, 12, 2813-2823

Zhao, S., Zhang, Y., Zhang, Q., Wang, F., Zhang, D. (2014): Toll-like receptors and prostate cancer. *Front Immunol*, 5, 352

Zhou, X. X., Jia, W. H., Shen, G. P., Qin, H. D., Yu, X. J., Chen, L. Z., Feng, Q. S., Shugart, Y. Y., Zeng, Y. X. (2006): Sequence variants in toll-like receptor 10 are associated with nasopharyngeal carcinoma risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 15, 862-866

Zhu, X., Zhang, C., Huang, G. T., Cheung, G. S., Dissanayaka, W. L., Zhu, W. (2012): Transplantation of dental pulp stem cells and platelet-rich plasma for pulp regeneration. *J Endod*, 38, 1604-1609

Zucchini, A., Del Zotto, G., Brando, B., Canonico, B. (2001): CD90. *J Biol Regul Homeost Agents*, 15, 82-85

## 7. Danksagung

Ich möchte mich auf diesem Wege sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. dent. Christof Dörfer sowohl für die Gelegenheit bedanken, in seiner Abteilung Erfahrungen im Bereich der wissenschaftlichen Forschungsarbeit zu sammeln als auch für sein Interesse an dem Fortschreiten dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. med. dent. Karim M. Fawzy El-Sayed. Trotz einer Entfernung von teilweise mehr als 5000 Kilometer erfuhr ich seine fortwährende Unterstützung, konstruktive Kritik und sehr viel Vertrauen in meine Arbeit. Diese Dinge trugen dazu bei, dass diese Dissertation, trotz vieler Höhen und Tiefen, nun fertiggestellt werden konnte.

Des Weiteren möchte ich Frau Mojgan Paymard-Stolz, Frau Regina Marquardt und Mohamed Mekhemar danken. Ihre eigene Leidenschaft für die wissenschaftliche Arbeit hat sich wie ein Funke auf mich übertragen und erleichterte mir den Einstieg in eine mir unbekanntes Thematik. Aber nicht nur auf wissenschaftlicher Ebene konnte ich viel von ihnen lernen. Ihre Menschlichkeit, Herzengüte und unerschöpfliche Hilfsbereitschaft haben mich so sehr berührt, dass aus gemeinsamer Arbeit in einem wissenschaftlichen Labor schließlich Freundschaft wurde.

Frau Kerstin Marx möchte ich herzlich für Ihre Unterstützung bei der FACS-Analyse danken.

Bei Herrn Dr. med. dent. Andreas Kerscher bedanke ich mich für die kooperative Hilfe beim Sammeln der Proben für meine Dissertationsarbeit.

Mein großer Dank geht an meine Eltern und meine Schwestern für ihre Unterstützung bei dieser Arbeit. Die aufmunternden Worte und der felsenfeste Glaube an mich haben mir stets den Rücken gestärkt und mich zu dem gemacht, was ich bin.

## **Publikationen**

Toll-like Receptor Expression Profile of Human Dental Pulp Stem/Progenitor Cells. Fawzy El-Sayed, K. M., Klingebiel, P., Dorfer, C. E. Journal of Endodontics, Volume 42, Issue 3, Pages 413-7