

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

**Untersuchung der Auswirkung von Retinol/Entzündung auf
gingivale Stamm- und Progenitorzellen**

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

vorgelegt von
Daniela Hein
aus Grünstadt

Kiel 2020

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Karim Mohamed Fawzy
El-Sayed
2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Dr. Hendrik Naujokat
Tag der mündlichen Prüfung: 08.07.2021
Zum Druck genehmigt: Kiel, den 20.04.2021

gez.: Priv.-Doz. Dr. Karim Mohamed Fawzy El-Sayed

(Vorsitzender der Prüfungskommission)

*Für meine Eltern,
für Andreas.*

Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis	III
II. Abbildungsverzeichnis	IV
III. Tabellenverzeichnis	VII
1. Einleitung	1
1.1 Das Parodontium und die parodontale Stamm-/Progenitorzellen	1
1.2 Parodontitis und parodontale Regeneration	2
1.3 Zytokinvermittelte Stimulation von parodontalen Stammzellen	4
1.4 Gingivale mesenchymale Stammzellen (G-MSCs).....	6
1.5 Wnt-Signalweg.....	8
1.6 Vitamin A und seine Metaboliten	11
1.7 Zielsetzung der Arbeit.....	13
2. Material	14
2.1 Verbrauchsmaterial.....	14
2.2 Geräte.....	15
2.3 Medien, Puffer, Reagenzien, Chemikalien	16
2.4 CD-Antigene und Antikörper.....	18
2.5 Fertige Reaktionssysteme	18
2.6 Primer	19
3. Methoden	20
3.1 Sterilisationsverfahren	20
3.2 Zellkultur	21
3.2.1 Gewinnung von G-MSCs.....	21
3.2.2 Passagieren von Zellen	22
3.2.3 Zellsortierung – Magnetaktivierte Zellsortierung.....	22
3.2.4 Einfrieren von Zellen.....	24
3.3 Durchflusszytometrie (Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierer)	24
3.4 Differenzierung von G-MSCs.....	25
3.4.1 Osteogene Differenzierung.....	25
3.4.2 Adipogene Differenzierung	25
3.4.3 Chondrogene Differenzierung.....	25
3.4.4 Zellfärbungen.....	26
3.5 Experimentelle Gruppen	28
3.6 ELISA für Wnt/ β –Catenin	29
3.7 Zellproliferation	30
3.7.1 Zellwachstumskurve	30
3.7.2 MTT-Test	31
3.8 Koloniebildende Einheiten (KBE).....	33
3.9 Genexpressionsprofil	33
3.9.1 mRNA-Extraktion.....	33
3.9.2 RNA-Messung	34
3.9.3 cDNA-Synthese	35

3.9.4	<i>Echtzeit-Polymerasekettenreaktion</i>	35
3.10	Multipotente Differenzierung von stimulierten G-MCSs.....	37
3.11	Statistische Auswertung	39
4.	Ergebnisse	40
4.1	Nachweis der Stammzeleigenschaften von G-MSCs	40
4.2	ELISA für Wnt/ β -Catenin	43
4.3	Zellproliferation	44
4.4	Koloniebildenden Einheiten (KBE) von stimulierten G-MSCs	46
4.5	mRNA Expression von Pluripotenzmarkern	47
4.6	Multipotentes Differenzierungspotential von stimulierten G-MCSs.....	49
5.	Diskussion	54
5.1	Diskussion der Methoden	54
5.1.1	<i>Zellkultivierung</i>	54
5.1.2	<i>Nachweis von Stammzeleigenschaften</i>	55
5.1.3	<i>ELISA für Wnt/β-Catenin</i>	57
5.1.4	<i>Zellproliferation (MTT, Zellwachstumskurve)</i>	57
5.1.5	<i>Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)</i>	58
5.1.6	<i>Quantitative und qualitative Differenzierung von stimulierten G-MSCs</i>	59
5.2	Diskussion der Ergebnisse	59
6.	Zusammenfassung	66
7.	Literaturverzeichnis	68
8.	Anhang	77
8.1	Ethikantrag.....	77
8.2	Danksagung.....	78
8.3	Curriculum vitae.....	79

I. Abkürzungsverzeichnis

ACAN	Aggrecan
ALP	Alkalische Phosphatase
APC	<i>adenomatous polyposis coli</i>
ATRA	alltrans-Retinsäure
CD14, 34, 45, 73, 90, 105	<i>cluster of differentiation 14, 34, 45, 73, 90, 105</i>
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
FACS	Durchflusszytometrie (<i>fluorescence activated cell sorting</i>)
G-MSCs	Gingivale mesenchymale Stammzellen (<i>gingival mesenchymal stem cells</i>)
GSK3- β	Glykogensynthasekinase-3 β
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
ISCT	<i>International Society for Cellular Therapy</i>
KBE	koloniebildende Einheiten
LPL	Lipoprotein-Lipase
MACS	magnetisch aktivierte Zellsortierung (<i>magnetic activated cell sorting</i>)
M-CSF	Monozytenkolonien-stimulierender Faktor
MMP	Matrix-Metallproteinase

MSCs	mesenchymale Stammzellen (<i>mesenchymal stem cells</i>)
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
Oct-4	Oktamer-bindender Transkriptionsfaktor 4 (<i>octamer binding transcription factor 4</i>)
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCP	Planare Zellpolarität (<i>Planar Cell Polarity</i>)
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGK-1	Phosphatglyceratkinase
PPAR-γ	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor γ
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
RANKL	<i>Receptor Activator of NF-κB Ligand</i>
RT	Reverse Transkription
RUNX-2	<i>Runt-related transcription factor 2</i>
Sox2	SRY (sex determining region Y)-box 2
STRO-1	Mesenchymaler Stammzellmarker
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Wirkung von TNF- α auf die Osteoklastogenese. (angelehnt und modifiziert nach (Schett, 2011)	5
Abbildung 2: Auswirkung von INF-γ auf die Pathogenese von Parodontitis.....	6

Abbildung 3: Darstellung des kanonischen Wnt-Signalweges in inaktiver (A) und aktivierter (B) Form (angelehnt an (Gordon & Nusse, 2006)).....	10
Abbildung 4: Darstellung der nicht-kanonischen Signalwege; (A) Wnt/Calcium-Signalweg; (B) PCP-Signalweg (modifiziert und angelehnt an (A) (Sugimura & Li, 2010) und (B) (Semenov et al., 2007)).....	11
Abbildung 5: Überblick der Methoden	20
Abbildung 6: Beispiel für die Tage 1-3 für den Versuchsaufbau einer Zellwachstumskurve für den Patienten 1	31
Abbildung 7: Beispiel des Versuchsaufbaus für 24h mit einer Verdünnungsreihe für die Standardkurve Kontrollgruppe (K), Entzündungsgruppe (EM), Retinolgruppe (VA), Entzündungs-/Retinolgruppe (EM+VA).....	32
Abbildung 8: Mikroskopische Erscheinung und KBE von G-MSCs (A) Phasenkontrast-Mikroskopie: Erscheinungsbild einer anhaftenden gingivalen Bindegewebsmasse mit herauswachsenden Zellen. (B) KBE von G-MSCs. Der Pfeil verweist auf eine Kolonie.	40
Abbildung 9: Nachweis von CD-Antigenen mittels extrazellulärer FACS-Analyse zur Identifizierung von G-MSCs Die FACS-Analyse ergab die Expression von CD73, CD90 und CD105 und nicht von CD14, CD34 und CD45. Grüne Kurve = Oberflächenmarker, rote Kurve = Isotypkontrollen (n = 5).	41
Abbildung 10: Differenzierungspotential von G-MSCs (A) Alizarin-Rot-Färbung der G-MSCs nach osteogener Stimulierung und ihre (B) Kontrolle. (C) Oil-Red-O-Färbung der G-MSCs nach adipogener Stimulierung und ihre (D) Kontrolle. (E) Alcian-Blau- und Kernechtrot-Färbung der G-MSCs nach chondrogener Stimulierung und ihre (F) Kontrolle.	42
Abbildung 11: ELISA Ergebnisse für Wnt/ β -Catenin Signalweg der G-MSCs Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg wurde durch ELISA nach Stimulierung von G-MSCs mit Entzündung und Retinol (Box-Whisker-Plots mit Medianwerten und Quartilen) auf intrazellulären % β -Catenin untersucht. Signifikante Unterschiede sind mit Sternchen markiert (n=5, *p < 0,05).	43
Abbildung 12: Zellwachstumskurven von G-MSCs Zellwachstumskurven von G-MSCs nach Stimulation mit Entzündung und Retinol aufgenommen über 14 Tage. Rote Kurve = Kontrollgruppe, grüne Kurve = Entzündungsgruppe, blaue Kurve = Retinolgruppe, lila Kurve = Retinol-/Entzündungsgruppe.....	44
Abbildung 13: Relative Zellzahl mit MTT Die relative Zellzahl von G-MSCs nach Stimulation mit Entzündung und Retinol für 24 h und 72 h (Box-Whisker-Plots mit Medianwerten und Quartilen). Signifikante Unterschiede sind mit Sternchen markiert (n=5, *p < 0,05; **p < 0,01; Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test).	45

Abbildung 14: Nachweis von KBE nach 14 Tagen nach Stimulation mit Entzündung und Retinol (A) Kontrollgruppe, (B) Entzündungsgruppe, (C) Retinolgruppe, (D) Retinol-/Entzündungsgruppe. Nachweis von KBE nach Stimulation mit Entzündung und Retinol nach 14 Tagen. Der Pfeil in der Abbildung 14 (A) verweist auf eine Kolonie.	46
Abbildung 15: Zellzahl der KBE nach Stimulation mit Entzündung und Retinol Zellzahl der KBE nach Stimulation der G-MSCs mit Entzündungsmedium und Retinol (Box-Whisker-Plots mit Medianwerten und Quartilen). Signifikante Unterschiede sind mit Sternchen markiert (n = 5, *p < 0,05).	47
Abbildung 16: Expression von Pluripotenzgenen in G-MSCs, stimuliert durch Entzündung und Retinol. mRNA-Expression für Nanog, Oct4 und Sox2 nach Stimulation für 24, 72 und 120 Stunden (Box-Whisker-Plots mit Medianwerten und Quartilen). Signifikante Unterschiede zwischen Gruppen und im Zeitverlauf sind mit Sternchen markiert (n = 5, * p <0,05, ** p <0,01; Wilcoxon-Test mit Vorzeichen).	48
Abbildung 17: Osteogenes Differenzierungspotenzial von G-MSCs nach Stimulation mit Entzündung und Retinol und die unstimulierte Kontrolle (A) Osteogene Genexpression (RUNX2 und ALP) nach 14 Tagen osteogener Stimulation (Box-Whisker-Plots mit Medianen und Quartilen). (B) Alizarin-Rotfärbung und (C) Calcium-Quantifizierung (Box-Whisker-Plots mit Medianen und Quartilen) von der Kontrollgruppe, Entzündungsgruppe, Retinolgruppe und Retinol-/Entzündungsgruppe nach 14 Tagen osteogener Stimulation.	50
Abbildung 18: Adipogenes Differenzierungspotential von G-MSCs nach Stimulation mit Entzündung und Retinol und die unstimulierte Kontrolle (A) Adipogene Genexpression (PPAR- γ und LPL) nach 21 Tagen adipogener Stimulation (Box-Whisker-Plots mit Medianen und Quartilen). (B) Oil-Red-O-Färbung und (C) Quantifizierung des Lipidgehalts (Box-Whisker-Plots mit Medianen und Quartilen) von der Kontrollgruppe, Entzündungsgruppe, Retinolgruppe und Retinol-/Entzündungsgruppe nach 21 Tagen adipogener Stimulation.	52
Abbildung 19: Chondrogenes Differenzierungspotenzial von G-MSCs nach Stimulation mit Entzündung und Retinol und die unstimulierte Kontrolle (A) Chondrogene Genexpression (ACAN) nach 35 Tagen chondrogenen Stimulation (Box-Whisker-Plots mit Medianen und Quartilen). (B) Alcian-Blau- und Kernechtrot-Färbung der G-MSCs von der Kontrollgruppe, Entzündungsgruppe, Retinolgruppe und Retinol-/Entzündungsgruppe nach 35 Tagen chondrogener Stimulation.	53

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verbrauchsmaterial.....	14
Tabelle 2: Geräte mit Herstellernamen.....	15
Tabelle 3: Medien, Puffer, Reagenzien, Chemikalien	16
Tabelle 4: CD-Antigene und Antikörper	18
Tabelle 5: Fertige Reaktionssysteme	18
Tabelle 6: Primer	19
Tabelle 7: Experimentelle Gruppen	29
Tabelle 8: Primer Namen und ID, die für die PCR benutzt wurden (von Roche geliefert)	36

1. Einleitung

1.1 Das Parodontium und die parodontale Stamm-/Progenitorzellen

Das Parodontium ist ein hochzelluläres, vaskuläres und spezialisiertes Gewebe. Es besteht aus vier Komponenten, die als funktionelle Einheit betrachtet werden. Neben der Gingiva enthält es das Wurzelzement, den Alveolarknochen und das Desmodont. Die wesentliche Aufgabe des Parodontiums besteht darin den Zahn im Kiefer zu verankern. Weiterhin spielt das Parodontium auch eine entscheidende Rolle in der Zahnfunktion, der Homöostase und der Reparatur von geschädigtem Gewebe, das sowohl als Reaktion auf ein mechanisches, chemisches oder thermisches Trauma als auch bei einer entzündlichen Parodontitis beschädigt wurde (Bartold, McCulloch, Narayanan, & Pitaru, 2000). Die physiologische Funktion des Parodontiums wird durch ein komplexes Zusammenspiel der vier Hauptkomponenten, bestehend aus Gingiva, Wurzelzement, Alveolarknochen und Desmodont, bestimmt. Das parodontale Gewebe entwickelt sich während der Embryonalgenese zusammen mit der Zahnwurzel. Dabei wandern Zellen aus der Neuralleiste in die Zahnbögen und bilden ein dentales Ektomesenchym aus. Die ektomesenchymalen Zellen interagieren in reziproken induktiven Wechselwirkungen mit dem frühen oralen Epithel, wodurch die Vorstufen eines Zahns entstehen. Im reifen, funktionellen Parodontium sind mehrere zelluläre Komponenten enthalten, wie z.B. Zementoblasten, Endothelzellen, Epithelzellen, Fibroblasten, Myofibroblasten, Nervenzellen und Osteoblasten (Cho & Garant, 2000). Entscheidend sind vor allem Populationen von parodontalem Stamm-/Progenitorzellen (Fawzy El-Sayed et al., 2013). Es wurden unterschiedliche adulte multipotente Stamm-/Progenitorzellen aus dem Desmodont (PDLSCs) (Seo et al., 2004), der Pulpa (SCAP) (Sonoyama et al., 2006), der Gingiva (G-MSCs) (Fournier et al., 2010) und dem Alveolarknochen (AB-MSCs) (Fawzy El-Sayed, Paris, Becker, Kassem, et al., 2012) isoliert. Diese mesenchymalen Zellen haben aufgrund ihres bemerkenswerten Regenerationspotenzials ein großes biologisches und klinisches Interesse gefunden (Fawzy El-Sayed et al., 2019). Aufgrund der großen Bedeutung von mesenchymalen Stammzellen definierte die *International Society for Cellular Therapy* (ISCT) charakteristische Mindestkriterien für mesenchymalen Stammzellen, um einen

direkten Vergleich der von verschiedenen Forschern berichteten Eigenschaften und experimentellen Ergebnissen zu ermöglichen. Zur Identifizierung von MSCs werden neben einer multipotenten Differenzierung in mindestens drei Gewebslinien (z.B. adipogen, chondrogen und osteogen) zusätzlich noch drei weitere Charakteristika herangezogen. Die Stammzellen sollten abgesehen von ihrer Selbsterneuerung auch fähig sein, Kolonien zu bilden und sich plastisch an Gewebekulturschalen anzuheften. Zum weiteren Nachweis sollten die Zellen spezifische Oberflächenantigene exprimieren können. Dabei sollten mindestens mehr als 95 % der charakteristischen MSCs positiv auf CD73, CD90 und CD105, und auf CD14, CD34 und CD45 negativ getestet werden (Dominici et al., 2006).

1.2 Parodontitis und parodontale Regeneration

Parodontitis ist eine weit verbreitete, durch Bakterien induzierte inflammatorische Erkrankung des Parodontiums. Eine unbehandelte Parodontitis führt zu einer fortschreitenden Destruktion der zahnstützenden Strukturen (Page, Offenbacher, Schroeder, Seymour, & Kornman, 1997). Das Krankheitsbild und dessen Progression werden durch einen subgingivalen bakteriellen Biofilm ausgelöst, welcher hauptsächlich aus gramnegativen Anaerobiern und den damit verbundenen Virulenzfaktoren besteht (Potempa & Travis, 1996).

Einen wesentlichen Faktor spielt die Symbiose mit unserem individuellen Mikrobiom. Durch eine mikrobiellen Dysbiose unseres oralen Mikrobioms, also eine Abnahme der Anzahl nützlicher Symbionten und eine Zunahme der Anzahl pathogener Erreger, kann eine Parodontitis entstehen (Nath & Raveendran, 2013). Diese Dysbiose kann durch verschiedene Aspekte, wie z.B. Ernährung, Tabakkonsum, hormonelle Veränderungen, schlechte Mundhygiene und Allgemeinerkrankungen, entstehen. Während sich die orale Gesundheit des Wirts verschlechtert, entstehen mikrobielle Komplexe. Die einzelnen Bakterienspezies wurden von Socransky und Haffajee gemäß ihrer Pathogenität und ihrer Rolle während der Parodontitis verschiedenen Komplexen zugeordnet, welche in den roten Komplex, orangenen Komplex, Aa-Komplex, grünen Komplex und orange-assoziierten Komplex eingeteilt werden (Socransky, Haffajee, Cugini, Smith, & Kent, 1998). Der orangene Komplex, bestehend aus gramnegativen Anaerobiern wie *Prevotella intermedia*, *P. nigrescens*,

P. micros und *Fusobacterium nucleatum*, wird zunächst mit der Krankheit in Verbindung gebracht. Wenn sich der Zustand der Krankheit verschlechtert, verlagert sich das Mikrobiom in den roten Komplex, der aus den parodontalen Erregern *P. gingivalis*, *Tannerella forsythia* und *Treponema denticola* besteht (Socransky et al., 1998). Dadurch, dass der Anteil der parodontopathogenen Erregern signifikant ansteigt, kommt es zu einer Entgleisung des mikrobiologischen Gleichgewichts. Aus einer Symbiose entsteht eine Dysbiose (Nath & Raveendran, 2013; Solbiati & Frias-Lopez, 2018).

Die anfängliche Entzündung im parodontalem Gewebe wird dabei nicht als pathologisch angesehen, sondern eher als ein physiologischer Abwehrmechanismus gegen die mikrobielle Belastung (Cekici, Kantarci, Hasturk, & Van Dyke, 2014). Die Entzündung äußert sich klinisch zunächst als Rötung und Schwellung, welche durch die Gefäßerweiterungen bzw. durch den Austritt von Plasma aus den Gefäßen in das perivaskuläre Bindegewebe bedingt sind. Dadurch steigt die Blutzufuhr am Infektionsort und gleichzeitig erhöht sich die Kapillarpermeabilität durch den erhöhten Gefäßdruck und der Kontraktion der Endothelzellen. Als Folge der Permeabilitätsänderung der Gefäßwände kann der geschädigte Bereich mit Plasmaproteinen, Entzündungsmediatoren, Entzündungszellen und antibakteriellen Substanzen versorgt werden (Plagmann, 1998). Der Körper reagiert mit einer sofortigen angeborenen Immunantwort auf die Erreger und Virulenzfaktoren durch die Freisetzung von Neuropeptiden, wie Substanz P und *Calcitonin-Gene-Related Peptiden* (CGRP) (Tracey, 2002). Zusätzlich werden Komplementfaktoren, wie C3a, C4a und C5a über den alternativen Weg der Komplementaktivierung produziert (Wingrove et al., 1992). Dadurch angelockt, produzieren Phagozyten (unspezifische neutrophile Granulozyten) gezielt entzündungsfördernde Zytokine und Chemokine. Das führt dazu, dass ausreichend viele Entzündungszellen zu dem Infektionsort wandern (Cekici et al., 2014). Mobilisierte neutrophile Granulozyten lagern sich an die Erreger und setzen zahlreiche Lysozym-Entzündungsmediatoren (z.B. Proteinase und Sauerstoffradikale) frei und vernichten so die Bakterien (Waddington, Moseley, & Embery, 2000). Obwohl dieser Prozess primär für die Beseitigung der pathogenen Mikroorganismen dient, induziert dieser eine kollaterale katabolische Schädigung der angrenzenden parodontalen Strukturen. Die entstehende Entzündungskaskade aktiviert nacheinander verschiedene zusätzliche Zellen, insbesondere M1 Makrophagen, welche zusätzliche entzündungsfördernde

Zytokine wie Interleukin-1- β (IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) produzieren, die weiter zur Schwere und Progression der Parodontitis beitragen (Cekici et al., 2014).

Die parodontale Entzündung beginnt also zunächst als schützende Reaktion gegen einen bakteriellen Biofilm. Klingt die Infektion nicht ab, so wird eine chronische Reaktion eingeleitet und die adaptive Immunität unter der Beteiligung zellulären und nichtzellulären Mechanismen der erworbenen Immunität aktiviert. Epithelzellen, Fibroblasten, Makrophagen und neutrophile Granulozyten produzieren in der akuten und frühen chronischen Phase Zytokine und Chemokine, während diese in der etablierten und fortgeschrittenen chronischen Phase von Lymphozyten (z.B. Interferon- γ , IFN- γ) produziert werden. Dabei spielen die Immunreaktionen bei der Auflösung der Entzündung und beim Heilungsprozess, einschließlich der Reparatur und Regeneration des parodontalen Gewebes, eine entscheidende Rolle. Durch Koordination der angeborenen und der erworbenen Immunität kann das verletzte Gewebe zurück in die Homöostase versetzt werden (Cekici et al., 2014).

1.3 Zytokinvermittelte Stimulation von parodontalen Stammzellen

IL-1 β und TNF- α sind zwei der wichtigsten Zytokine im Frühstadium einer Entzündung. Sie sind hauptsächlich für die daraus resultierende parodontale Zerstörung und den Knochenverlust verantwortlich, da sie wichtige Induktoren der Osteoklastenbildung darstellen. IL-1 β wird im entzündlichen Gewebe frei exprimiert und fördert die Aktivierung von Leukozyten, Endothelzellen und Chondrozyten sowie Osteoklasten. Außerdem teilt sich IL-1 β mit TNF- α die Fähigkeiten *Receptor Activator of NF- κ B Ligand* (RANKL) sowie andere osteoklasteninduzierende Faktoren, wie Matrixmetalloproteinasen (MMPs), deutlich zu erhöhen. RANKL induziert durch seine Bindung an den *Receptor Activator of NF- κ B* (RANK), welcher auf Osteoklasten/Osteoklastenvorläuferzellen lokalisiert ist, die Osteoklastogenese. TNF- α übt seine Wirkung auf die Osteoklastogenese aus, indem er direkt auf die Osteoklastenvorläufer sowie indirekt auf die Regulierung der Produktion von Monozytenkolonien- stimulierender Faktor (M-CSF) und RANKL auf mesenchymalen Zellen einwirkt (Abbildung 1) (Schett, 2011).

In höheren Konzentrationen (z.B. 100 ng/ml) kann TNF- α das osteogene

Differenzierungspotential von MSCs-ähnlichen Zellen unterdrücken. Zudem kann TNF- α die Expression von knochenspezifischen Marker (wie alkalische Phosphatase (ALP), Osteocalcin (OC) und Runt-verwandtem Transkriptionsfaktor 2 (RUNX2)) verringern und die Bildung von kalzifizierter Knötchen eliminieren (Fawzy El-Sayed et al., 2019).

Später, während des parodontalen destruktiven Prozesses, tritt INF- γ auf, dessen Konzentration in der Sulkusflüssigkeit mit der Schwere der Parodontitis im Zusammenhang steht (Dutzan et al., 2009). Dabei aktivieren verschiedene Immun- und Entzündungsstimuli Untergruppen von T-Lymphozyten und natürliche Killerzellen (NK-Zellen), die INF- γ produzieren. INF- γ könnten einen zusätzlichen Stimulus für die monozytischen Reaktionen auf Virulenzfaktoren von parodontalen Pathogenen liefern (Salvi et al., 1998). Dementsprechend führt dies zu einer verstärkten monozytären Sekretion von proinflammatorischen Mediatoren, wie Prostaglandin E₂ (PGE₂) und knochenresorptiven Zytokinen, einschließlich TNF- α und IL-1 β , die die Pathogenese von Parodontitis weiter vorantreiben (Abbildung 2) (Fawzy El-Sayed et al., 2019; Nichols & Garrison, 1987; Raisz et al., 1977).

Ein entzündlicher „Cocktail“, der diese Zytokine enthält, könnte die entzündliche parodontale Mikroumgebung in vitro zum größten Teil auf molekularer Ebene nachahmen. Diese entzündlichen Biomoleküle und ihr zeitlich begrenztes Auftreten könnte das Überleben, das Verhalten und die Aktivität von parodontalen Zellen und damit die Dauer, das Ausmaß und den Ausgang der Krankheit oder der Therapie beeinflussen.

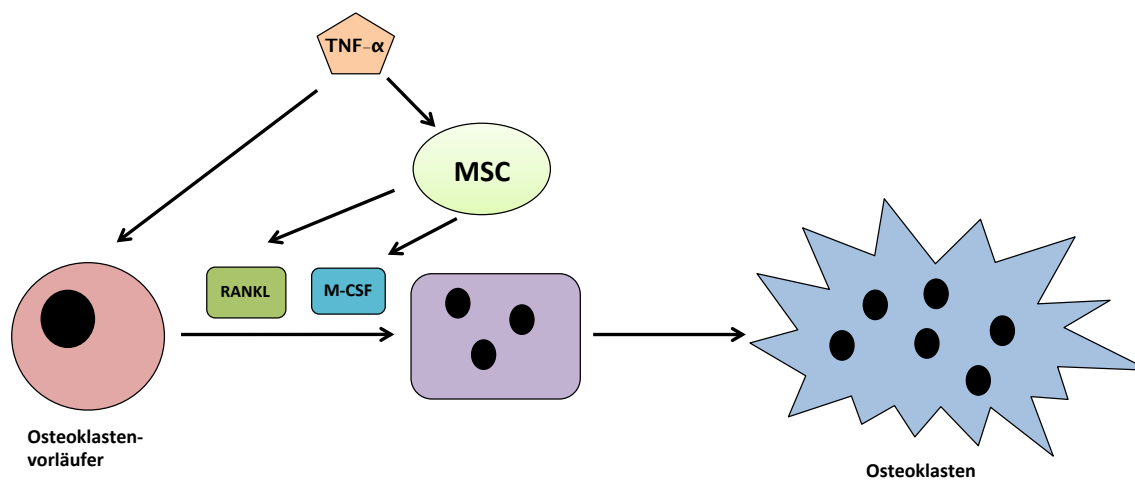


Abbildung 1: Wirkung von TNF- α auf die Osteoklastogenese.
(angelehnt und modifiziert nach (Schett, 2011))

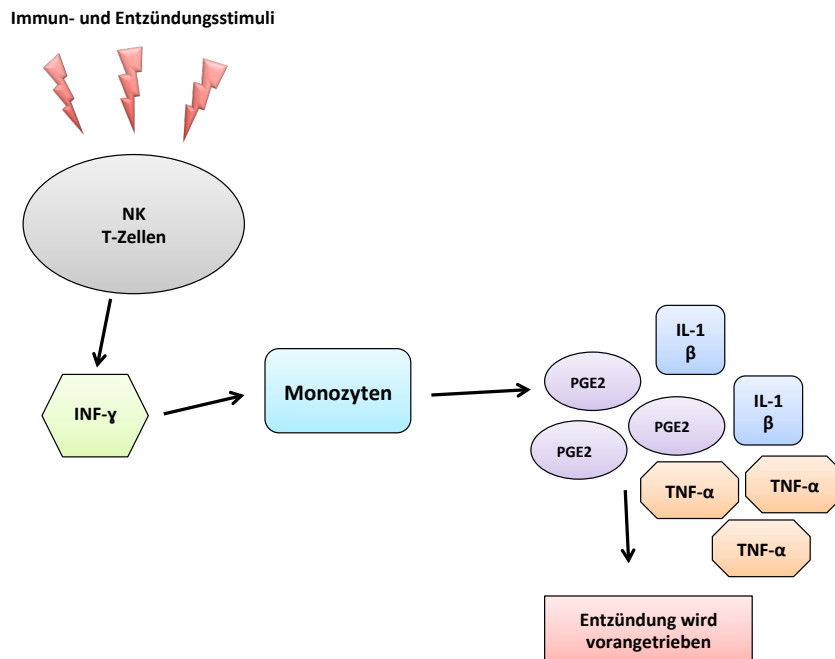


Abbildung 2: Auswirkung von INF- γ auf die Pathogenese von Parodontitis.

1.4 Gingivale mesenchymale Stammzellen (G-MSCs)

Besonders wichtig zeigt sich klinisch die Gingiva als Quelle für adulte mesenchymale Stamm-/Progenitorzellen, die die häufigste, zugänglichste und konservativste minimalinvasive Quelle für die Isolierung von Stamm-/Progenitorzellen aus der Mundhöhle darstellt (Fawzy El-Sayed et al., 2013).

Gingivale mesenchymale Stamm-/Progenitorzellen (G-MSCs) exprimieren bemerkenswerte parodontale reparative/regenerative Fähigkeiten (Fawzy El-Sayed et al., 2015; Fawzy El-Sayed, Paris, Becker, Neuschl, et al., 2012). Dies zeigte eine Studie mit Mini-Schweinen, bei denen parodontale Defekte im Prämolaren- und Molarenbereich induziert wurden. Anschließend wurden multipotente Stamm-/Progenitorzellen in Verbindung mit anorganischen deproteinierten Rinderspongiosa (DBCB) sowie mit einem organischen Kollagengerüst transplantiert. Das Ergebnis zeigte, dass histologische Ergebnisse sowie das Attachmentlevel (CAL), die Sondierungstiefe (PD) und die gingivale Rezession (GR) vor allem durch den Faktor G-MSCs oder „MACS⁺-Zellen“ beeinflusst wurden und nicht durch den Faktor „Gerüst“ (Fawzy El-Sayed, Paris, Becker, Neuschl, et al., 2012). Außerdem zeigt sich eine Resistenz gegenüber entzündlichen Reizen. Diese Resistenz gegen

Entzündungsstimuli unter Beibehaltung ihrer MSCs-Eigenschaften macht sie zu einer vielversprechenden zellulären Quelle für therapeutische Anwendungen im Bereich des „Tissue Engineering“, die in vivo ähnlichen Entzündungszuständen ausgesetzt sein könnten (Fawzy El-Sayed & Dorfer, 2016).

Des Weiteren zeigen G-MSCs lokale immunmodulatorische Eigenschaften und ein spezifisches Toll-like-Rezeptor-Expressionsprofil (Fawzy-El-Sayed, Mekhemar, Adam-Klages, Kabelitz, & Dorfer, 2016; Mekhemar, Adam-Klages, Kabelitz, Dorfer, & Fawzy El-Sayed, 2018). Weitere Studien weisen auf, dass gingivale mesenchymale Stamm-/Progenitorzellen, die aus entzündetem parodontalen Gewebe isoliert wurden, bemerkenswerte Differenzierungs- und Regenerationspotenziale aufweisen (Ge, Mrozik, Menicanin, Gronthos, & Bartold, 2012; Tang, Li, Xie, & Jin, 2011). Es wurde deutlich, dass diese funktionell MSCs-ähnlichen Zellen aus gesundem Zahnfleisch entsprechen. Das führte zu der Erkenntnis, dass die Gewinnung von gingivalen mesenchymalen Stamm-/Progenitorzellen nicht nur während Zahnextraktionen, bei denen Proben von gesunder Gingiva isoliert werden können, begrenzt ist. Vielmehr könnten G-MSCs auch während einer Parodontallappenoperation bei Patienten mit Parodontitis aus entzündetem Zahnfleisch oder während der Gingivektomie bei Formen von prävalenten Gingivawucherungen, insbesondere bei verschiedenen, durch arzneimittelinduzierte Gingivahyperplasien, gewonnen werden. Die überwiegende Mehrheit dieser präparierten Zahnfleischgewebe wird jedoch nach der derzeitigen chirurgischen Praxis verworfen. Aufgrund der relativen Häufigkeit dieser Operationen und leichten Zugänglichkeit stellen gingivale mesenchymale Stamm-/Progenitorzellen aus entzündetem Zahnfleischgewebe eine neu identifizierte Population von postnatalen Stammzellen dar, die ein großes Potenzial für die Geweberegeneration aufweisen und deshalb eine Alternative zu MSCs-ähnlichen Zellen darstellen.

Studien belegten, dass anfänglich kurzzeitig kontrollierte entzündliche Mikroumgebungen die Proliferations- und Differenzierungsfähigkeiten von G-MSCs positiv beeinflussen können (F. Zhang et al., 2017; Zhou, Dorfer, Chen, & Fawzy El-Sayed, 2017). Dafür wurden isolierte G-MSCs gleichzeitig in entzündlicher und entzündungshemmender Mikroumgebung stimuliert. Jedoch verschwindet mit einer entzündlichen Persistenz diese positive Wirkung, gefolgt von einem negativen Einfluss auf die Osteogenese. Daraus lässt sich schließen, dass in der ersten Phase der Gewebsregeneration die kurzfristig kontrollierte Entzündung die Zellzahlen

steigen lässt, während eine anschließende entzündungshemmende Phase für die osteogene Differenzierung und Reifung der Zellen wesentlich ist (F. Zhang et al., 2017).

1.5 Wnt-Signalweg

Eine kürzlich durchgeführte Studie zeigte den positiven Einfluss eines kontrollierten Entzündungsreizes auf die Multi-/Pluripotenz mit sowohl proliferativen als auch regenerativen Eigenschaften von parodontalen Stamm-/Progenitorzellen, einschließlich G-MSCs. In dieser Studie wurden die zugrunde liegenden intrazellulären Signalwege erörtert (Fawzy El-Sayed et al., 2019). Dabei wurden G-MSCs mit einem „Entzündungscocktail“, bestehend aus IL-1 β (20 ng/ml) und TNF- α (40 ng/ml) für bis zu 120 Stunden stimuliert (Tomasello et al., 2017).

In Abhängigkeit von β -Catenin unterscheidet man zwischen zwei grundlegenden Signalwegen: a) der kanonische, β -Catenin-abhängige Weg, der den am besten untersuchten Weg darstellt und b) der nicht-kanonische, β -Catenin-unabhängige Weg, zu denen der Wnt/Calcium-Signalweg und der Wnt/planare Zellpolaritätsweg (PCP Signalweg; PCP: *planar cell polarity*) gehört.

Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg reguliert die Pluripotenz von Stammzellen und das Fortschreiten der Knochenregeneration. Die Entwicklungskaskade integriert Signale aus anderen Signalwegen, wie z.B. Retinsäure. In Abwesenheit des Wnt-Liganden liegt β -Catenin im Wnt/ β -Catenin-Signalweg in einem Komplex, dem sogenannten *destruction-complex* gebunden vor. Dieser besteht aus dem Gerüstprotein Axin, der Kinase *glycogen synthase kinase-3 β* (GSK3- β) und dem Tumorsupressor-Protein *adenomatous polyposis coli* (APC) (Kimelman & Xu, 2006). Gebunden in diesem Komplex wird β -Catenin durch GSK3- β phosphoryliert. Nach der Ubiquitinierung des phosphorylierten β -Catenin wird es durch das Proteasom im Zytoplasma ständig abgebaut. Dadurch wird das β -Catenin-Level in der Zelle geringgehalten und es findet auch keine Transkription von Wnt-Zielgenen statt, welche eine Rolle bei der Zellregulierung spielt (Abbildung 3 A).

Bei Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs bindet β -Catenin an den *Frizzled* Rezeptor (Fzd) und dem Co-Rezeptor *low-density lipoprotein receptor-related protein* (LRP). Dies führt zur Aktivierung des zytoplasmatischen Phosphoproteins

Dishevelled (dsh), indem der intrazelluläre Anteil des Fzd-Rezeptors mit dsh interagiert. Der intrazelluläre Anteil der LRP geht mit Axin eine Verbindung ein. Hierdurch wird der *destruction-complex* inhibiert, sodass β -Catenin nicht phosphoryliert wird. Es kommt zur Freisetzung von β -Catenin ins Zytosol, wodurch es nicht mehr abgebaut werden kann. Hypophosphoryliertes β -Catenin wird in den Zellkern transloziert, wo es an die LEF/TCF-Transkriptionsfaktoren bindet, die wiederum aktiviert werden (Molenaar et al., 1996). Dabei verdrängt β -Catenin den Transkriptionsrepressor Groucho, der in Abwesenheit von β -Catenin die Transkription von Wnt-Zielgenen blockiert (Gordon & Nusse, 2006). Infolgedessen kommt es zur Transkription verschiedenerer Gene, die die Zellproliferation regulieren (Abbildung 3 B).

Im nicht-kanonischen Wnt-Calcium-Signalweg kommt es bei Aktivierung zu einer intrazellulären Freisetzung von Calciumkationen (Ca^{2+}). Diese Freisetzung von Ca^{2+} ist abhängig von der Aktivierung der Phosphatidylinositol-Kaskade und heterotrimären G-Proteinen. Das freigesetzte Ca^{2+} aktiviert die Calcium-abhängigen Proteine Proteinkinase C (PKC) und die Calcium/Calmodulin-abhängige Kinase II (CamKII) (Kuhl, Sheldahl, Malbon, & Moon, 2000). Darauf induziert CamKII die Aktivierung von *Nemo-like Kinase* (NLK). Durch eine erhöhte zytoplasmatische Ca^{2+} -Konzentration bei Aktivierung der Wnt/ Ca^{2+} -Signalweges verhindert NLK, dass der β -Catenin/TCF/LEF-Komplex an die DNA im Kern bindet, wodurch die Fähigkeit des β -Catenin-TCF/LEF-Komplexes zur Aktivierung der Transkription gehemmt wird (N. Liu et al., 2011). Dies führt dazu, dass das zelluläre Differenzierungspotential wiederhergestellt wird (Sugimura & Li, 2010) (Abbildung 4 A).

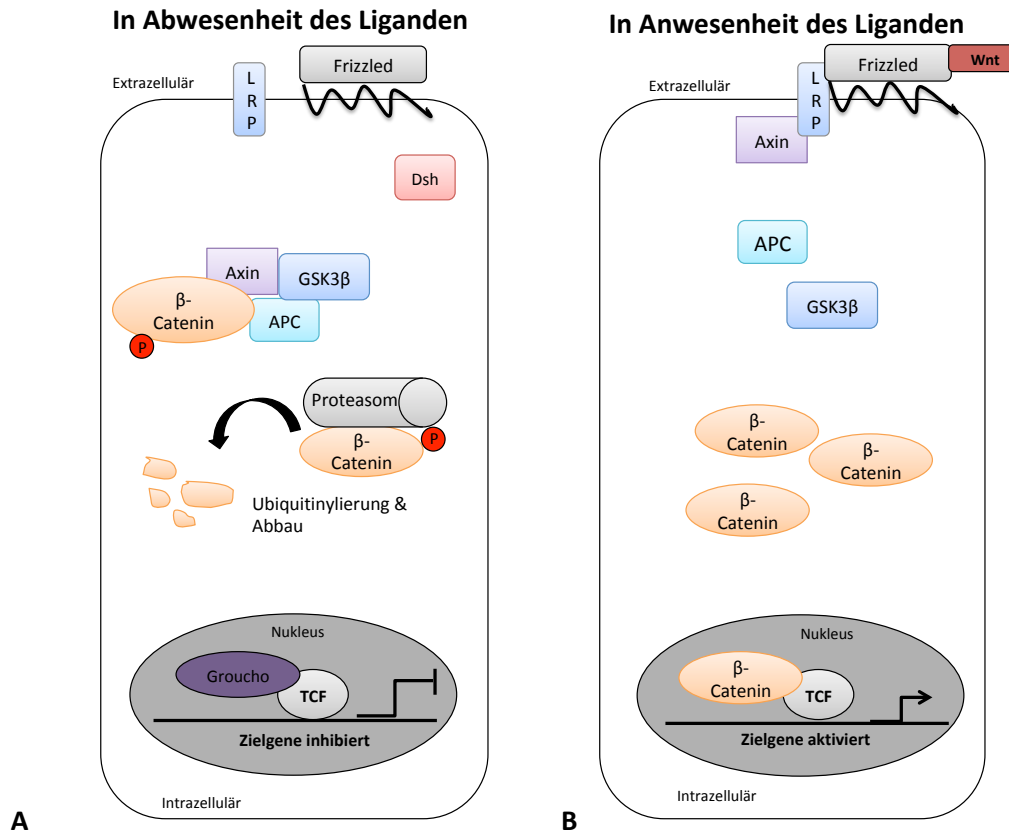


Abbildung 3: Darstellung des kanonischen Wnt-Signalweges in inaktiver (A) und aktivierter (B) Form
(angelehnt an (Gordon & Nusse, 2006))

Der PCP-Signalweg spielt vor allem in der Regulation der Zellpolarität eine große Rolle. Entdeckt wurde dieser Signalweg zuerst in der *Drosophila* (Adler, 1992). Primäre Mitglieder des Signalwegs sind der Fzd-Rezeptor und Dvl, wohingegen weder LRPs noch TCF beteiligt sind. Durch die Bindung von Wnt an Fzd kommt es zur Aktivierung von G-Proteinen und Dvl. Die weitere Signalübertragung verläuft anschließend über zwei getrennte Wege. Einerseits wird die C-Jun N-terminale Kinase (JNK) über *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1* (Rac1) aktiviert. Dadurch kann eine Transkription von *jun oncogene* (cJUN) -abhängiger Gene stattfinden (Semenov, Habas, Macdonald, & He, 2007). Andererseits wird ein Komplex aus Dvl und *dishevelled associated activator of morphogenesis 1* (Daam1) gebildet, welcher über das G-Protein *Ras-homologous A* (RhoA) und *Rho-associated kinase* (Rock) aktiviert wird. Infolgedessen führt das zu Veränderungen des Aktin-Cytoskeletts (Komiya & Habas, 2008) (Abbildung 4 B).

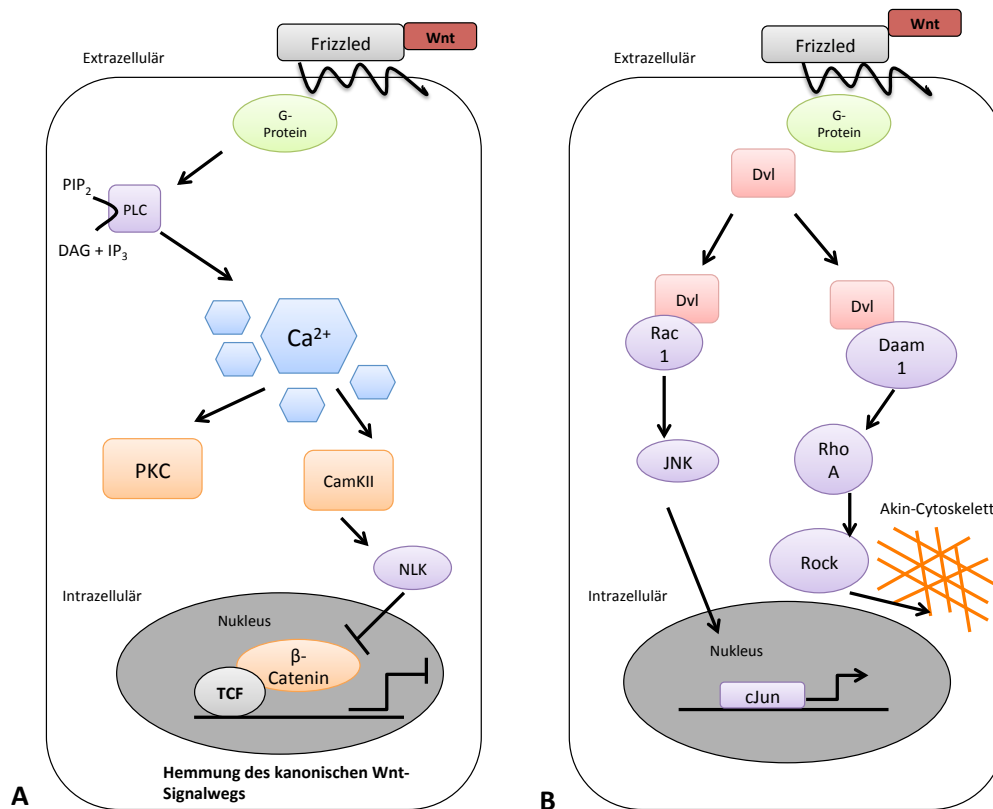


Abbildung 4: Darstellung der nicht-kanonischen Signalwege; (A) Wnt/Calcium-Signalweg; (B) PCP-Signalweg
 (modifiziert und angelehnt an (A) (Sugimura & Li, 2010) und (B) (Semenov et al., 2007))

1.6 Vitamin A und seine Metaboliten

Vitamin A stellt einen wichtigen Mikronährstoff in der Nahrung dar. Schon damals war den alten Ägyptern bekannt, dass ein Mangel an Vitamin A zur Nachtblindheit führt. Carotinoide sind eine Gruppe von Farbpigmenten, meist gelb, rot oder orange, die in Pflanzen verbreitet sind und mit der Nahrung aufgenommen werden. Da wir Menschen nicht zur Vitamin-A-Synthese fähig sind, können wir Vitamin A entweder in Form von Retinol aus Fleischprodukten aufnehmen oder über Carotinoide, die als Vorstufe von Vitamin A in Pflanzen vorkommen. Es wurde nachgewiesen, dass niedrige Carotinoidspiegel, insbesondere β -Cryptoxanthin und β -Carotin, mit einem signifikant erhöhtem Risiko für Parodontitis mit niedrigem Schwellenwert (mindestens zwei Zähne mit 6 mm Attachmentloss und 5 mm Taschentiefe) assoziiert sind (Linden et al., 2009). In einer Stichprobe wurden dabei 1258 Männer im Alter von 60

bis 70 Jahren in Westeuropa (Nordirland) untersucht.

All-trans-Retinsäure (ATRA), ein aktiver Metabolit von Vitamin A, spielt eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von Immunzellen. In einer Studie von Wang et al. wurde mit einem *Porphyromonas gingivalis*-induzierten Parodontitis-Modell bei Mäusen gezeigt, dass die orale Supplementation von all-trans-Retinsäure jeden zweiten Tag die parodontale entzündliche Erkrankung, das Infiltrieren entzündlicher Zellen und den weiteren Alveolarknochenverlust hemmt und die T-regulatorische Zellaktivierung verstärkt (Wang, Wang, Jin, Gao, & Lin, 2014).

Green und Mellanby schrieben schon im Jahr 1928 über die Wichtigkeit von Vitamin A bzw. Retinol als essentieller Nährstoff für die ordnungsgemäße Funktion des Immunsystems (Green & Mellanby, 1928). Ein Vitamin-A-Mangel kann daher die Gesundheit stark beeinträchtigen. Durch die Vitamin-A-Einnahme von Kindern und schwangeren Frauen in Entwicklungsländern, in welchen ein Vitamin-A-Mangel stark verbreitet ist, konnte ein etabliertes Programm der Weltgesundheitsorganisation (WHO) die Kindersterblichkeit um 24 % senken (Imdad, Herzer, Mayo-Wilson, Yakoob, & Bhutta, 2010).

Retinol, die aktive Form von Vitamin A, ist ein Antioxidans, das verschiedene physiologische Wirkungen steuert, einschließlich Proliferation, Metabolismus, Differenzierung und Zellwachstum bzw. Apoptose (Bi et al., 2010).

Untersuchungen zeigten eine signifikante Korrelation zwischen Vitamin-A-Mangel und dem Vorliegen einer chronischen Parodontitis. Studien, die Untersuchungen zu Parodontitis und verschiedene Vitamine und Minerale, wie z.B. Vitamin A, C und Eisen, durchgeführt haben, zeigten aber auch, dass eine chronische Parodontitis bei jungen koreanischen Frauen nur geringfügig mit einer geringen Vitamin-A-Zufuhr assoziiert ist (Park, Lee, Lee, Jin, & Bae, 2017).

Einer der zuletzt entdeckten Bereiche, auf die sich Vitamin A auswirkt, ist die Epigenetik. Es wurde kürzlich berichtet, dass Retinol weiterhin die Fähigkeit besitzt, die zelluläre Epigenetik durch Demethylierung von Kernbasen zu beeinflussen und möglicherweise adulte Zellen in pluripotente Zellen zu de-differenzieren (Hore, 2017). Eine Eigenschaft, die den Weg für ein neues Spektrum von parodontalen regenerativen Behandlungen auf Retinol-Basis bereiten könnte.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Der Großteil der proliferativen und regenerativen Eigenschaften von G-MSCs wird sowohl von der lokalen entzündlichen Mikroumgebung (IL-1 β , TNF- α und INF- γ) als auch der möglichen pluripotenz- und regenerationsfördernden Eigenschaften von Retinol beeinflusst. Somit stellte sich die Frage:

Welchen Effekt haben Entzündungsmediatoren, Retinol und die Kombination aus beiden auf G-MSCs?

Das Ziel der vorliegenden Studie war es zum ersten Mal die kontrolliert entzündlichen und retinol-bedingten Auswirkungen von G-MSCs auf die Pluripotenz, die Proliferation und das Differenzierungspotential in vitro zu untersuchen.

2. Material

2.1 Verbrauchsmaterial

In den folgenden Tabellen sind alle Materialien, die für die Studie verwendet wurden, aufgelistet.

Tabelle 1: Verbrauchsmaterial

Produkt	Bezugsquelle
6-Well-Platten	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
24-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
Parafilm	Sigma-Aldrich, München, 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 a. M., Deutschland
Zahnärztliche Pinzetten	Hu-Friedy, Frankfurt a. M., Deutschland
Zellkulturflaschen	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Zellschaber	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland

2.2 Geräte

Tabelle 2: Geräte mit Herstellernamen

Geräte	Hersteller
Axiovision HRc	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Biometra TB2 Thermoblock	Analytik Jena AG, Jena, Deutschland
Brutschrank	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Easypet Pipette Dispenser	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
FACs Calibur	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Inkubator, Hera Celle	Thermo Scientific, Waltham, USA
Light Cycler	Roche Life Science, Prenzberg, Deutschland
Mikrotom	Thermo Scientific, Waltham, USA
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank, Hera Safe	Thermo Scientific, Waltham, USA
MultiskanGO Mircoplate	ThermoFisher, Langenselbold, Deutschland
Spectrophotometer	Medax, Neumünster, Deutschland
Paraffinstreckbad	WTW, Weilheim, Deutschland
pH-Meter	Eppendorf, Hamburg, 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
Universal-Mirkoplatte- Spektrophotometers	ThermoFisher, Langenselbold, Deutschland
Vacusaft Comfort	IBS Integra Biosciences, Chur, Schweiz
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

2.3 Medien, Puffer, Reagenzien, Chemikalien

Tabelle 3: Medien, Puffer, Reagenzien, Chemikalien

Substanz	Bezugsquelle
Accutase	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Adipogenes Differenzierungsmedium	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Alcianblau	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Alizarin-Rot	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Ammoniumhydroxid	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Amphotericin	BioWest, Nuailé, 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
Formaldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glutamin	Lonza, Basel, Schweiz
Glutaraldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kernechtrot	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kristallviolett färbung	Merck, Darmstadt, Deutschland
MACS-Puffer	PBS, 0,5mM EDTA, 0,5 % BSA
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Minimum Essential Medium Eagle	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Osteogenes Differenzierungsmedium	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Oil-Red-O	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Paraffin	McCormick, Sparks, USA
PBS Dulbecco	Biochrom, Berlin, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin, Deutschland
RPMI 1640	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Sodium Acid	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Vitamin A	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Xylol	Büfa Chemie, Oldenburg, Deutschland

2.4 CD-Antigene und Antikörper

Tabelle 4: CD-Antigene und Antikörper

Antigen/Antikörper	Bezugsquelle
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, Isotyp Ctrl	BioLegend, San Diego, USA
STRO-1 Alexa 647	BioLegend, San Diego, USA

2.5 Fertige Reaktionssysteme

Tabelle 5: Fertige Reaktionssysteme

Reaktionssystem	Bezugsquelle
BD Cytotfix/Cytoperm™	BD Biosciences, Fanklin Lakes, USA
MACS Cell Separation Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2yl]- 2,5-diphenyltetrazoliumbromid)- Zellproliferations-Kit-I	Roche, Mannheim, Deutschland
PhosphoELISA-Kit	Invitrogen, CA, USA

QuantiTect® Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy® Protect Mini Kit (250)	Qiagen, Hilden, Deutschland

2.6 Primer

Tabelle 6: Primer

Primer	Identifikationsnummer vom Hersteller Roche	Hersteller
PGK-1	ENST00000373316	Roche, Mannheim, Deutschland
RUNX-2	ENST00000359524	Roche, Mannheim, Deutschland
ALP	ENST00000374840	Roche, Mannheim, Deutschland
PRARy	ENST00000287820	Roche, Mannheim, Deutschland
LPL	ENST00000311322	Roche, Mannheim, Deutschland
ACAN	ENST00000439576	Roche, Mannheim, Deutschland
Nanog	ENST00000229307	Roche, Mannheim, Deutschland
Oct4	ENST00000259915	Roche, Mannheim, Deutschland
Sox2	ENST00000325404	Roche, Mannheim, Deutschland

3. Methoden

Das aktuelle Experiment wurde in Übereinstimmung mit der im Jahr 2008 überarbeiteten Deklaration von Helsinki durchgeführt und von der Ethikkommission der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel akzeptiert (IRB:D 513/17).

Die Abbildung 5 zeigt einen Überblick über die Methoden, die in dieser Studie angewandt wurden.

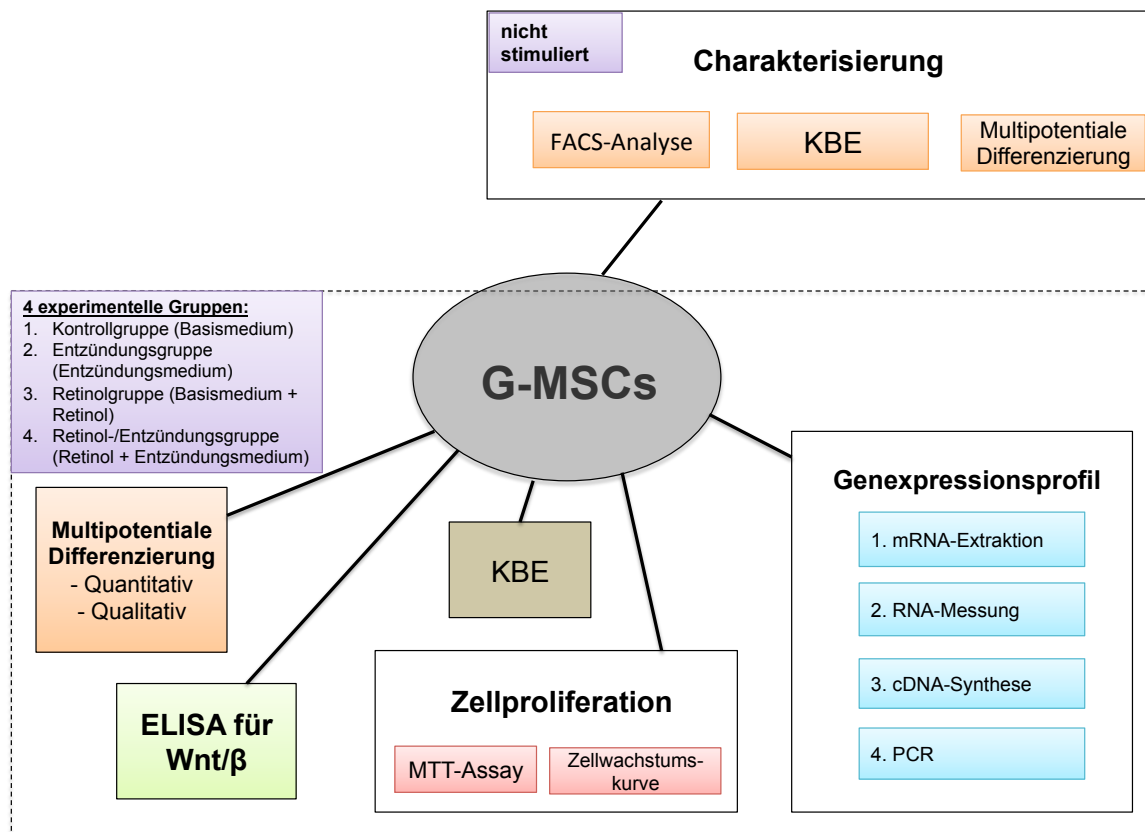


Abbildung 5: Überblick der Methoden

3.1 Sterilisationsverfahren

Zum Sterilisieren von allen nicht steril verpackten Materialien wurde der Vakuklav 24 (Melag, Berlin, Deutschland) benutzt. Die Sterilisationszeit betrug 3,5 Minuten bei

134 °C und 2 bar. Die sterilisierten Materialien wurden bis zur Verwendung trocken, licht- und staubgeschützt gelagert.

3.2 Zellkultur

3.2.1 Gewinnung von G-MSCs

Nachdem Gingiva von fünf verschiedenen Patienten, während der Extraktion von dritten Molaren, entnommen wurde, konnten die Stammzellen isoliert werden.

Zunächst wurden die einzelnen Gingiva-Proben in einer phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) (Biochrom, Berlin, Deutschland) mehrmals kräftig gespült, um die Oberflächenkeime zu entfernen. Anschließend wurde mit Ethanol (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) in einer Konzentration von 70 % für ca. 30 Sekunden gespült und wieder in PBS aufgenommen. Im nächsten Schritt wurden die Gingiva-Proben mit dem Basismedium (siehe nächsten Abschnitt) gespült und danach in einer Petrischale (Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland) überführt. Das Gewebe wurde mittels eines spitzen Skalpell (Hu-Friedy, Frankfurt a.M., Deutschland) in Millimeter große Stücke geschnitten. Diese wurden mit einer Pipettenspitze aufgenommen und in 25 ml große Kulturflaschen (Sarstedt AG) überführt. Auf jedes Gingiva-Stück wurde jeweils ein Tropfen Basismedium gegeben und für ca. 30 Minuten unter einer mikrobiologischen Sicherheitswerkbank (Thermo Scientific, Waltham, USA) inkubiert. Das Basismedium besteht aus α -Minimum Essential Medium Eagle (α -MEM; Sigma-Aldrich GmbH, Hamburg, Deutschland), ergänzt mit 15 % fötalem Kälberserum (FCS, HyClone, Logan, UT, USA), 100 μ l/ml Streptomycin, 100 U/ml Penicillin, 1 % Amphotericin und 400 mmol/ml L-Glutamin (Biochrom AG, Berlin, Deutschland). Die Kulturflaschen wurden in einen Inkubator (Thermo Scientific, Waltham, USA) gegeben und die Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt kultiviert. Das Grundmedium wurde zum ersten Mal nach einer Woche gewechselt. Außerdem wurden die Kulturflaschen alle 24 Stunden mit einem inversen Mikroskop mit Phasenkontrast (Zeiss Axiovert 40C, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) überprüft.

3.2.2 Passagieren von Zellen

Sobald die Zellen in der Kulturflasche eine Konfluenz von ca. 80-85 % erreicht haben, wurden diese unter der mikrobiologischen Werkbank passagiert.

Das Basismedium wurde mittels einer Vakuumpumpe (Vacusafe Comfort, IBS Integra Biosciences, Chur, Schweiz) und Glaspipetten entfernt. Anschließend wurde die Kulturflasche zweimal mit jeweils 5 ml PBS gewaschen. Um die angehafteten Zellen zu lösen, wurden 10 ml von einem Accutase/PBS (Biochrom, Berlin, Deutschland) Gemisch in einem Verhältnis von 1:10 hinzugefügt und für 10 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt inkubiert. Unter dem Lichtmikroskop wurde kontrolliert, ob sich die Zellen gelöst haben. Durch sanftes Klopfen wurden adhärentere Zellen gelöst. Die Zellsuspension wurde in ein steriles Falcon Zentrifugenröhrchen (Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland) überführt und bei 2000 U/min für 10 Minuten zentrifugiert (Zentrifuge 5810 R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Der Überstand wurde entfernt und das entstandene Zellpellet mit 10 ml Basismedium resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mithilfe einer Neubauer Zählkammer (Roth, Karlsruhe, Deutschland) gezählt. Dafür wurden sowohl die Zählkammer als auch das dazugehörige Deckglas mit 70 % Alkohol desinfiziert. Mit einer Dichte von 30 Zellen/cm² wurden die Zellen in eine 75 ml Kulturflaschen ausgesät. Zusätzlich wurden 10 ml vom Basismedium der Kulturflasche beigefügt. Die Zellen wurden erneut bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt inkubiert, damit sie sich anhaften und wachsen können. Täglich wurden die Zellen unter dem Lichtmikroskop überprüft und dreimal die Woche wurde das Basismedium gewechselt.

3.2.3 Zellsortierung – Magnetaktivierte Zellsortierung

Wenn die Zellen eine Konfluenz von ca. 80-85 % erreicht haben, wurden diese mit der Untersuchungsmethode der magnetaktivierten Zellsortierung (*magnetic activated cell sorting*, MACS) sortiert. Hierfür wurde das MACS Cell Separation Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Germany) verwendet.

Zuerst wurde das Basismedium aufgesaugt und im Anschluss wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Mittels 10 ml Accutase/PBS-Lösung im Verhältnis von 1:10 wurden die angehafteten Zellen von dem Kulturflaschenboden gelöst und bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt für 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurden 3 ml Basismedium hinzugegeben, die Zellsuspension in ein Falcon Zentrifugenröhrchen

überführt und bei 1500 U/min für 5 Minuten zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 10 ml frischem Basismedium resuspendiert. Die Zellzahl wurde mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Für 1×10^7 Zellen wurden 20 μ l STRO-1 Antikörper (BioLegend, San Diego, USA) und 20 μ l anti IgM MicroBeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) verwendet. Diese MicroBeads sind Partikel, die an spezifische Antikörper gebunden sind. Pro Patient wurde ein Falcon Röhrchen verwendet, in das jeweils 80 μ l MACS-Puffer hinzugefügt und mit einem Vortex Genie (Bender & Holbein AG, Bruchsal, Deutschland) durchgemischt wurde. Die Röhrchen wurden daraufhin für 15 Minuten bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Anschließend wurden jeweils 1200 μ l PBS in die Falcon Röhrchen pipettiert. Diese Suspension wurde bei 1700 U/min und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach wurden erneut 1200 μ l PBS hinzugefügt, die Suspension zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das entstandene Zellpellet wurde mit 500 μ l MACS-Puffer resuspendiert.

Als Vorbereitung wurde der MACS-Multistand (Magnetfeld) mit 70 % Ethanol (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) desinfiziert und unter die mikrobiologische Sicherheitswerkbank gestellt. Die MACS-Säulen wurden am Multistand aufgehängt und der dazugehörige Filter fixiert. Zunächst wurden die MACS-Säulen mit 1 ml reinem MACS-Puffer gespült, damit diese ständig befeuchtet bleiben. Mit einem Falcon Röhrchen wurde der Puffer aufgefangen und anschließend mit einem neuen Röhrchen ersetzt. Im nächsten Schritt wurden 500 μ l von der Zellsuspension mittels einer Eppendorf Pipette (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) durch den Filter pipettiert und in einem neuen Falcon Röhrchen aufgefangen. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt bis die gesamte Zellsuspension verbraucht wurde. Zuletzt wurden dreimal jeweils 500 μ l MACS-Puffer durch den Filter gespült. Die Zellen aus dem Falcon Röhrchen wurden nun als MACS-Negative Zellen kultiviert. Hierzu wurde die Zellsuspension bei 1700 U/min und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand anschließend verworfen und das erhaltene Zellpellet mit 20 ml Basismedium resuspendiert. Die Suspension wurde in eine 75 ml Kulturflasche überführt und im Zellkultur-Inkubator (37 °C und 5 % CO₂-Gehalt) gelagert. Das Medium wurde zum ersten Mal nach 3 Tagen gewechselt. Danach wurde der Mediumwechsel dreimal wöchentlich durchgeführt und die Zellen täglich unter dem Lichtmikroskop kontrolliert.

Die MACS-Säulen wurden vom magnetischen Feld entfernt und mit 1 ml MACS-

Puffer gefüllt. Der zum Kit dazugehörige Stempel wurde eingebracht und die Flüssigkeit in ein neues steriles Falcon Röhrchen gedrückt. Die aus den Säulen gelösten Zellen konnten als MACS-Positive Zellen kultiviert werden. Dazu wurden auch diese zuerst bei 1700 U/min und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und anschließend das Zellpellet mit Basismedium resuspendiert und in eine 75 ml Kulturflasche überführt. Die MACS-Positiven Kulturflaschen wurden unter selben Bedingungen wie die MACS-Negativen Zellen gelagert. Ebenso erfolgte der Medienwechsel und die optischen Kontrollen nach jeweils gleichen Abständen.

3.2.4 Einfrieren von Zellen

Um die nicht genutzten Zellen vor einer Kontamination mit Mikroorganismen, einer Variabilität durch Subkultivierung oder Zellalterung zu bewahren, wurden die Zellen eingefroren und als Vorrat gelagert.

Die ersten Schritte entsprachen dem Protokoll des Passagierens von Zellen (Kapitel 3.2.2). Das entstandene Zellpellet wurde mit 1 ml Gefriermedium Biofreeze (Biochrom, Berlin, Deutschland) resuspendiert und in Kryo-Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) überführt. Diese Kryo-Röhrchen wurden umgehend bei -70 °C gelagert.

3.3 Durchflusszytometrie (Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierer)

Nachdem die Zellen magnetisch sortiert wurden, wurde ein Teil der positiv sortierten Zellen mittels einer Durchflusszytometrie unter Verwendung von CD14, CD34, CD45, CD73, CD90 und CD105 Antikörpern (alle von BioLegend, San Diego, USA), CD146/MUC18 (eBioscience, NatuTec GmbH) und STRO-1 (BioLegend) charakterisiert.

Die Bindung der primären Antikörper und die entsprechenden Isotypenkontrollen wurden gemäß den Standardprotokollen unter Verwendung von rFcR-Blockierungsreagenz (5 µl/ 100 µl Zellsuspension) (Miltenyi Biotec) durchgeführt und mit FACSCalibur E6370 und FACSCComp 5.1.1. Software (Becton Dickinson

Biosciences, Franklin Lakes, NJ) bewertet. Es wurden Expressionskurven für die Marker auf den Zellen aufgezeichnet.

3.4 Differenzierung von G-MSCs

Um die Multipotenz der Stammzellen zu testen, wurden für jede Differenzierung jeweils G-MSCs aus der zweiten Passage verwendet. Bei einer Konfluenz von 80-85 % wurden sie wie beim Passagieren (Kapitel 3.2.2) vorbereitet und die Zellzahl bestimmt.

3.4.1 Osteogene Differenzierung

Für die osteogene Differenzierung wurden in einer 6-Well-Platte (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) pro Well 2×10^4 G-MSCs ausgesät und diese mit osteogenem Medium stimuliert (PromoCell, Heidelberg, Deutschland). Das Medium wurde 14 Tage lang dreimal wöchentlich gewechselt. Die Lagerung der 6-Well-Platte erfolgte im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt. Parallel wurden zusätzlich als Kontrolle G-MSCs in 6-Well-Platten ausgesät und in Basismedium kultiviert.

3.4.2 Adipogene Differenzierung

Für die adipogene Differenzierung wurden in einer 6-Well-Platte 3×10^5 G-MSCs pro Well ausgesät. Die Stimulierung erfolgte mit adipogenem Medium (PromoCell, Heidelberg, Deutschland). Das Medium wurde für 21 Tage dreimal wöchentlich gewechselt. Die Lagerung erfolgte im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt. Als Kontrolle wurden gleichzeitig G-MSCs in Basismedium kultiviert.

3.4.3 Chondrogene Differenzierung

Für die chondrogene Differenzierung wurden jeweils 3×10^4 G-MSCs in 1,5 ml Eppendorf Röhrchen (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) kultiviert. Die Zellen wurden 35 Tage lang mit chondrogenem Medium (PromoCell, Heidelberg, Deutschland) stimuliert. Der Medienwechsel erfolgte dreimal wöchentlich bei einer

Lagerung im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt.

Für eine dreidimensionale Anlagerung der Zellen wurden die Eppendorf Röhren jeweils vor und nach Mediumwechsel bei 1700 U/min und 37 °C für 5 Minuten zentrifugiert (Zentrifuge 5417 R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland), sodass in jedem Eppendorf Röhren ein Zellpellet sichtbar wurde. Die Kontrollen wurden unter den selben Bedingungen, jedoch in Basismedium kultiviert.

3.4.4 Zellfärbungen

Osteogene Färbung

Um die kalzifizierten Knötchen bei der osteogenen Differenzierung zu veranschaulichen und zu bewerten, wurde eine Alizarinrot-Färbung (Sigma-Aldrich) durchgeführt. Die Farbe wurde unter dem Abzug angesetzt. Hierbei wurden zu 1,0 g Alizarinrot (Sigma-Aldrich) 50 ml destilliertes Wasser in ein Falcon-Röhren hinzugegeben und mit einem pH-Messgerät (WTW, Weilheim, Deutschland) der pH-Wert auf 4,1-4,2 eingestellt.

Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und mit 1 ml eiskaltem 70 % Ethanol (Sigma-Aldrich) für 5 Minuten fixiert. Das Ethanol wurde anschließend abpipettiert. Zur Färbung wurden 2 ml Alizarinrot pro Well pipettiert und nach 5 Minuten verworfen. Nach der Färbung wurden die Zellen mit destilliertem Wasser so lange gewaschen bis die Spülflüssigkeit farblos war. Die kalzifizierten Knötchen wurden mittels eines Lichtmikroskops untersucht (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) und mit der Mikroskopkamera (Canon, Tokio, Japan) fotografiert.

Adipogene Färbung

Um bei der adipogenen Differenzierung die Bildung von Lipid-Tröpfchen zu verdeutlichen, wurden die Zellen mit Oil-Red-O (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) gefärbt. Dazu wurden 0,125 g Oil-Red-O in 25 ml 99 % Isopropanol (Merck, Darmstadt, Deutschland) vermengt und für 5 Minuten auf dem Rotamax (Heidolph, Schwabach, Deutschland) vermischt. Anschließend wurden 10 ml destilliertes Wasser in 15 ml Oil-Red-O pipettiert. Die Suspension wurde bei 1700 U/min für 10 Minuten zentrifugiert und danach durch ein Membranpapier

(Satorius, Göttingen, Deutschland) gefiltert.

Nachdem die Farbe vorbereitet wurde, wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mit 1 ml 60 % Isopropanol für 5 Minuten fixiert. Isopropanol wurde anschließend vorsichtig abgegossen. Zum Färben der Zellen wurde pro Well 1 ml Oil-Red-O pipettiert und nach 10 Minuten vorsichtig wieder verworfen. Die Zellen wurden so lange mit destilliertem Wasser gewaschen bis das Spülwasser farblos war. Unter dem Mikroskop wurde die Bildung der Lipid-Inklusionen bewertet und fotografiert.

Chondrogene Färbung

Mit der Alcianblau-Färbung (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) erfolgte der Nachweis der chondrogenen Differenzierung. Dafür mussten die Zellpellets entsprechend vorbereitet werden: Die Eppendorf Röhrchen wurden bei 1700 U/min für 5 Minuten zentrifugiert. Danach wurde das Medium abgesaugt und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Mit einer Fixierlösung, bestehend aus 10 ml 25 % Glutaraldehyd (Merck, Darmstadt, Deutschland), 4 ml 37 % Formaldehyd (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 100 ml Phosphatpuffer wurden das Zellpellet für 24 Stunden fixiert. Nach der Fixierungszeit wurden die Zellpellets wieder dreimal mit PBS gewaschen und die einzelnen Zellpellets vorsichtig mit einer Pinzette auf die Biopsy Pads (Bio Optica, Mailand, Italien) in die Bio Cassetten (Bio Optica, Mailand, Italien) gelegt. Anschließend wurde ein weiteres Biopsy Pad auf das Zellpellet gelegt, um das Zellpellet komplett mit Schaumstoff zu umschließen. Die Cassette wurde verschlossen und für 24 Stunden in das Einbettprogramm des Tissue Processor TPC15 Duo (Medite Medizintechnik, Burgdorf, Deutschland) gelegt. Dieses Programm umschließt 12 Schritte, bei welchen die Bio Cassetten in verschiedene Bäder gelegt werden. Für jeweils zwei Stunden bei 30 °C wurden in den ersten sechs Schritten die Zellpellets in Ethanol gelagert. Dabei veränderte sich die Konzentration des Ethanols in jedem Schritt: Der erste Schritt betrug 70 % Ethanol, der zweite Schritt 80 % Ethanol, der dritte Schritt 90 % Ethanol und die Schritten vier bis sechs 100 % Ethanol. Die Schritte sieben bis neun umfassten das Einlegen mit Xylol (Büfa Chemie, Oldenburg, Deutschland) bei 30 °C für zwei Stunden. Die letzten drei Schritte, zehn bis zwölf, umfassten das Einlegen in Paraffin (McCormick, Sparks, USA) für jeweils zwei Stunden bei 62 °C. Nach den insgesamt 24 Stunden wurden

die Zellpellets aus den Bio Cassetten ausgebettet und mit einer Pinzette in einen Metallträger gelegt. Die Metallträger wurden mit flüssigem Einbettwachs (Medite, Burgdorf, Deutschland) gefüllt und direkt mit dem Deckel der Kassette zugedeckt. Über Nacht wurde der Metallträger im Kühlschrank bei 8 °C zur Trocknung gelagert. Als Nächstes wurden 5 µm breite Schnitte mit einem Schlittenmikrotom (Thermo Scientific, Waltham, USA) angefertigt. Im Paraffinstreckbad (Medax, Neumünster, Deutschland) wurden die Schnitte auf einen Objektträger (Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland) gelegt und in heißem Wasser gestreckt. Anschließend wurden die Schnitte für 8 Stunden im Brutschrank (Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland) bei 30 °C getrocknet. Vor der Einfärbung wurden die Schnitte entparaffiniert. Zuerst wurden die Objektträger mit den Zellschnitten in einen Trägerkorb aus Glas gelegt. Dreimal für jeweils 5 Minuten wurden die Schnitte in ein Xylolbad gehängt. Anschließend folgten drei Bäder mit 96 %, 70 % und 60 % Ethanol, welches mit 1 % Methylethylketon vergällt war, für jeweils 2 Minuten. Zum Schluss wurden die Zellschnitte für 2 Minuten in ein Bad mit destilliertem Wasser gehängt. Die Färbung erfolgte mittels 1 % Alcianblau und 3 % Essigsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland) für insgesamt 60 Minuten. Danach wurden die Objektträger für 5 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen. Für die Gegenfärbung wurde für 5 Minuten 0,1 % Kernechtrot (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) verwendet, welches anschließend für 1 Minute in destilliertem Wasser gewaschen wurde. Des Weiteren wurden die Objektträger wieder zweimal für jeweils 2 Minuten in 100 % Ethanol und nochmals zweimal für 5 Minuten in ein Xylolbad gehängt. Abschließend wurden die Schnitte der Zellpellets mit xylolhaltigem Eindeckmittel gedeckelt. Es folgte eine mikroskopische Auswertung und fotografische Dokumentation.

3.5 Experimentelle Gruppen

Für das Hauptexperiment wurden G-MSCs aus der zweiten Passage von fünf verschiedenen Patienten verwendet. Diese wurden in vier verschiedenen Medien kultiviert (Tabelle 7). Täglich wurden die Zellen unter dem Lichtmikroskop kontrolliert und dreimal wöchentlich fand ein Medienwechsel statt.

Tabelle 7: Experimentelle Gruppen

Gruppe	Medium
Kontrollgruppe	Basismedium
Entzündungsgruppe	Entzündungsmedium bestehend aus Basismedium, ergänzt mit den wichtigsten proinflammatorischen Zytokinen, die während einer Parodontitis beobachtet wurden: IL-1 β (1 ng/ml), TNF- α (10 ng/ml) und IFN- γ (100 ng/ml) (PeproTech.Inc, Rocky Hill, New Jersey, USA); (Sidney, Kirkham, & Buttery, 2014)
Retinolgruppe	Basismedium, ergänzt mit 20 μ mol/l Retinol (Sigma-Aldrich) (S. Zhang et al., 2016)
Retinol- /Entzündungsgruppe	Entzündungsmedium, ergänzt mit 20 μ mol/l Retinol

3.6 ELISA für Wnt/ β –Catenin

Der enzymgekoppelter Immunsorptionsstest (*enzyme-linked immunosorbent assay*, *ELISA*) ist eine sensitive und reproduzierbare diagnostische Methode zum Nachweis von Antigenen (Engvall & Perlmann, 1971). In Form eines Sandwich-ELISA-Formats liefern zwei Antikörper, die gegen β -Catenin aufgetragen werden, eine hohe Spezifität.

Für die quantitative Bestimmung des gesamten β -Catenin wurde das PhosphoELISA-Kit (Invitrogen, CA, USA) verwendet. Dafür wurden 8×10^4 G-MSCs pro Well in eine 6-Well-Platte ausgesät. Zeitgleich wurde eine Verdünnungsreihe für eine Standardkurve angesetzt. Die Zellen wurden eine Stunde gemäß den Gruppen in Tabelle 7 stimuliert. Nachdem die Zellen sich angehaftet haben, wurde das Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Es folgte eine Zugabe von 350 μ l Lysepuffer in jedes Well. Anschließend wurden jeweils 50 μ l von jeder Probe und jedes Standards in eine 96-Well-Platte (Roche, Mannheim, Deutschland) gegeben und mit 100 μ l des β -Catenins (Gesamt)-Detektionsantikörper vermischt.

Bei Raumtemperatur wurden die Lösungen für eine Stunde inkubiert. Danach wurden die Lösungen abgesaugt und jedes Well gründlich mit PBS gewaschen. Daraufhin wurden 100 µl von anti-Rabbit IgG HRP Arbeitslösung hinzugegeben und die Platten auf einem Rotamax (Heidolph, Schwabach, Deutschland) für 30 Minuten inkubiert. Die Lösung wurde abgesaugt und die Wells erneut mit PBS gewaschen. 100 µl vom Stabilized Chromogen wurden in jedes Well hinzugegeben und 30 Minuten im Dunkeln gelagert. Schließlich wurden 100 µl vom Stop Solution pro Well hinzugegeben und leicht an die Seite der Platte geklopft, sodass sich die Lösungen vermischen. Abschließend wurden die Werte bei OD450 nm (MultiskanGO Microplate Spectrophotometer, ThermoFisher, Langenselbold, Deutschland) aufgezeichnet. Die Niveaus des gesamten intrazellulären β -Catenins wurden durch das Vergleichen mit Standardkurven berechnet.

3.7 Zellproliferation

Anhand von Zellwachstumskurven über 14 Tagen und das MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)-Zellproliferations-Kit-I (Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland) (Ng et al., 2015) wurde die Zellproliferation bewertet. Für die Versuche wurden Zellen aus der zweiten Passage verwendet.

3.7.1 Zellwachstumskurve

Für eine Zellwachstumskurve wurden 1×10^4 G-MSCs je Well in 24-Well-Platten (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) entsprechend dem Versuchsaufbau aus Abbildung 6 ausgesät. Die Zellen wurden insgesamt 14 Tage gemäß der vier Gruppen aus Tabelle 7 stimuliert und in einem Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt gelagert. Der Medienwechsel fand dreimal wöchentlich statt. Um den Zellwachstum verdeutlichen zu können, wurden täglich 14 Tage lang die Zellen von zwei unterschiedlichen Beobachtern gezählt und die Anzahl notiert. Dafür wurden die Zellen des jeweiligen Tages zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mittels Accutase/PBS gelöst. Die jeweiligen Suspensionen wurden in Falcon-Röhrchen überführt und bei 1700 U/min für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde

vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet mit Basismedium resuspendiert. Die Zellzahl wurde mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Patient 1	Tag 1		Tag 2		Tag 3	
Kontroll- gruppe (K)	Probe 1 (K)	Probe 2 (K)	Probe 1 (K)	Probe 2 (K)	Probe 1 (K)	Probe 2 (K)
Entzündungs- gruppe (EM)	Probe 1 (EM)	Probe 2 (EM)	Probe 1 (EM)	Probe 2 (EM)	Probe 1 (EM)	Probe 2 (EM)
Retinol- gruppe (VA)	Probe 1 (VA)	Probe 2 (VA)	Probe 1 (VA)	Probe 2 (VA)	Probe 1 (VA)	Probe 2 (VA)
Retinol- /Entzündungs- gruppe (VA+EM)	Probe 1 (VA+EM)	Probe 2 (VA+EM)	Probe 1 (VA+EM)	Probe 2 (VA+EM)	Probe 1 (VA+EM)	Probe 2 (VA+EM)

Abbildung 6: Beispiel für die Tage 1-3 für den Versuchsaufbau einer Zellwachstumskurve für den Patienten 1

3.7.2 MTT-Test

Der MTT-Test dient zur Einschätzung der Viabilität und des Wachstums der Zellen. Mit Hilfe des Tests wird die Aktivität der Dehydrogenase in Mitochondrien bestimmt, welche voraussetzend für die Stoffwechselaktivität und Lebensfähigkeit der Zelle sind. Es lässt sich eine große Anzahl von Proben messen, da der Test einfach durchführbar und der zeitliche Aufwand gering ist.

Für den MTT-Test wurden 1×10^4 G-MSCs pro Well in 24-Well-Platten ausgesät und entsprechend Tabelle 7 mit 1 ml Medium stimuliert. Nachdem die Zellen sich nach 24 und 72 Stunden angehaftet haben, wurden die Medien durch ein serumfreies Medium (RPMI 1640, PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland) ersetzt. Nach der Inkubationszeit wurden 100 µl des MTT-Markierungsreagens (Endkonzentration 0,5mg/ml) in jedes Well hinzugegeben und für 4 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt inkubiert. Anschließend wurden 1 ml der Lyse-Lösung pro Well hinzugegeben

und über Nacht im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt stehen gelassen. Am nächsten Tag folgte die Messung der spektrophotometrischen Absorption der Proben unter Verwendung eines Universal-Mikroplatten-Spektrophotometers (ThermoFisher, Langenselbold, Deutschland) bei 450 nm Wellenlänge. Jedes Assay wurde doppelt durchgeführt und der Wert gemittelt. Die relevanten Zellzahlen wurden durch den Vergleich mit dazugehörigen Standardkurven berechnet. Dafür wurde zeitgleich eine Verdünnungsreihe für eine Standardkurve angesetzt (Abbildung 7).

MTT 24h						
Patient 1	K	EM	VA	VA+EM		
Patient 2	K	EM	VA	VA+EM		
Patient 3	K	EM	VA	VA+EM		
Patient 4	K	EM	VA	VA+EM		

MTT 24h						
Patient 5	K	EM	VA	VA+EM		
Verdünnungsreihe (Basismedium)	1:1	1:2	1:4	1:16	1:32	1:64

Abbildung 7: Beispiel des Versuchsaufbaus für 24h mit einer Verdünnungsreihe für die Standardkurve

Kontrollgruppe (K), Entzündungsgruppe (EM), Retinolgruppe (VA), Retinol-/Entzündungsgruppe (VA+EM)

3.8 Koloniebildende Einheiten (KBE)

Zum Nachweis von Stammzeleigenschaften wurde die Fähigkeit der G-MSCs getestet koloniebildenden Einheiten (KBE) zu entwickeln.

Für den Test zur Bestimmung der KBE wurden G-MSCs aus der zweiten Passage verwendet. Diese wurden in Gewebekultur-Petrischalen (Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland) mit einem Durchmesser von 10 cm in einer Dichte von 1,63 Zellen/cm² ausgesät. Pro Patient wurden in den vier unterschiedlichen Gruppen (Tabelle 7) die Zellen 14 Tage entsprechend stimuliert. Der Medienwechsel fand dreimal wöchentlich statt und die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt gelagert. Am 14. Tag wurden die Zellen zuerst mit PBS zweimal gewaschen bevor sie mit eiskaltem 100 % Ethanol fixiert wurden. Mit einer 0,1 % Kristallviolett färbung (Merck, Darmstadt, Deutschland), die frisch angesetzt wurde, wurden die Zellen für 10 Minuten gefärbt und anschließend mit destilliertem Wasser ausgespült bis das Spülwasser klar war. Die Petrischalen wurden danach bei Raumtemperatur getrocknet und konnten zur Dokumentation fotografisch festgehalten werden (Canon, Tokio, Japan). Die koloniebildenden Einheiten wurden von zwei unterschiedlichen Beobachtern unter dem invertierten Phasenkontrastmikroskop bewertet. Dabei wurden Aggregationen von 50 oder mehr Zellen als eine Kolonie bewertet.

3.9 Genexpressionsprofil

Die Echtzeit-Polymerasekettenreaktion ermöglicht nicht nur den Nachweis eines bestimmten Gens, sondern ist auch in der Lage seine Expression zu quantifizieren.

3.9.1 mRNA-Extraktion

Um die Expression der Pluripotenzmarker Nanog, Oktamer-bindender Transkriptionsfaktor 4 (Oct-4) und SRY (sex determining region Y)-box 2 (Sox2) zu testen, wurde nach 24, 72 und 120 Stunden eine mRNA-Extraktion der vier verschiedenen Gruppen unter Verwendung des RNeasy® Protect Mini Kit (250) (Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt.

Es wurden G-MSCs der verschiedenen Gruppen in 24-Well-Platten kultiviert. Zuerst

wurde das Medium aufgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Das PBS wurde danach abgekippt, sodass keine Reste mehr in den Wells vorhanden waren. Durch Zugabe von 250 μ l pro RLT-Puffer, welches frisch mit β -Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) angesetzt wurde (Verhältnis: 10 μ l β -Mercaptoethanol/1 ml RLT Puffer), wurden die adhärennten Zellen aufgebrochen und mit einem Zellschaber (Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland) gelöst. Mit einer Eppendorf-Pipette wurden die Proben vorsichtig und gut durchmischt, wodurch eine homogene visköse Suspension entstand. 250 μ l 70 % Ethanol wurde anschließend hinzu pipettiert, resuspendiert und die Probe in Mini-Spin-Säulen des RNeasy Mini Kits überführt, die in passende 2 ml Sammelröhrchen platziert wurden. Die Deckel der Säulen wurden vorsichtig verschlossen und die Röhrchen wurden danach für 21 Sekunden bei 10.000 U/min zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen. Als Nächstes wurden 700 μ l Buffer RW1 in die RNeasy Mini-Spin-Säule hinzugefügt, der Deckel wieder verschlossen und erneut bei 10.000 U/min für 21 Sekunden zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen und die Sammelröhrchen wurden durch neue ausgetauscht. Im nächsten Schritt wurden 500 μ l RPE Puffer, welches mit Ethanol angesetzt wurde, in die RNeasy Mini-Spin-Säulen pipettiert, vorsichtig verschlossen und 15 Sekunden bei 10.000 U/min zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen. Die Röhrchen wurden trocken (ohne weiteren Puffer) noch einmal 15 Sekunden bei 10.000 U/min zentrifugiert und das Eluat verworfen. Zum Schluss wurden die RNeasy Mini-Spin-Säulen auf 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen überführt und 25 μ l RNase-freies Wasser direkt in die Kieselgelmembran der RNeasy Mini-Spin-Säulen pipettiert. Die Röhrchen wurden vorsichtig verschlossen und für 1 Minute bei 10.000 U/min zentrifugiert. Die erhaltene RNA wurde unter Verwendung von RNase-freier DNase I (Promega, Mannheim, Deutschland) gereinigt und photometrisch quantifiziert.

3.9.2 RNA-Messung

Die RNA-Messung wurde mit einem Photometer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Der gemessene Wert entsprach der extrahierten totalen RNA (μ g/ml). Für die Angabe der RNA in μ l wurde aus der gemessenen totalen RNA der Mittelwert bestimmt und davon der Kehrwert gebildet.

3.9.3 cDNA-Synthese

Die komplementäre cDNA wurde aus der RNA (1 µg/µl) durch reverse Transkription (RT) synthetisiert, wobei das QuantiTect Reverse Transkription Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet wurde.

Zunächst wurden alle Materialien des Kits und alle mRNA Proben mit dem Vortexer durchmischt und anschließend kurz zentrifugiert, um die Flüssigkeitsreste an den Seiten der Röhrchen zu sammeln. Im Anschluss wurden alle mRNA Proben und zu verwendeten Röhrchen auf Eis gelegt, um das Risiko einer RNA Degradation zu minimieren. Als erste Vorbereitung wurde der RT Master Mix angesetzt. Dafür wurden pro Ansatz 1 µl Quant Script Reverse Transcriptase, 4 µl Quant Script RT Puffer und 1 µl RT Premix (RT Primer Mix und Quantiscript RT Puffer im 1:4 Verhältnis) vermischt und direkt auf Eis gelegt. Danach wurde die genomische DNA-Eliminierungsreaktion vorbereitet, indem 8 µl template RNA mit 4 µl RNase freies Wasser und 2 µl gDNA Wipeout Puffer vermengt wurden, die für 2 Minuten bei 42 °C inkubiert und anschließend sofort auf Eis gelegt wurden. Es wurden nun die 6 µl RT Mastermix pro Ansatz hinzugefügt, vermischt und sofort auf Eis gelegt. Zunächst wurden die Proben für 15 Minuten bei 42 °C inkubiert. Für die Inaktivierung der Quantiscript Reverse Transkriptase wurden die Proben danach für 3 Minuten bei 95 °C inkubiert. Durch die reverse Transkription sind insgesamt 20 µl cDNA pro mRNA Probe für die Polymerasen-Kettenreaktion (RT-PCR) synthetisiert worden. Es wurden 5 µl cDNA anschließend für die RT-PCR weiterverwendet, die mit 45 µl DNase RNase freies Wasser verdünnt wurden. Der Rest der cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

3.9.4 Echtzeit-Polymerasekettenreaktion

Eine Polymerasenkettenreaktion wurde mittels Echtzeit-Polymerasenkettenreaktion (RT-PCR; LightCycler 96 Real-Time PCR-System, Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, Indiana, USA) durchgeführt. Dafür wurden pro Probe 10 µl Fast-Start-DNA Probes Master (Roche, Mannheim, Deutschland), 4 µl RNase freies Wasser, 1 µl jedes Primers (4 pmol/µl) (Tabelle 8) und 5 µl cDNA verwendet, wodurch ein Gesamtvolumen von 20 µl pro Probe entstand. Diese 20 µl pro Probe wurden dann in ein 96-Well-Platte (Roche, Mannheim, Deutschland) pipettiert und die Platte in den Light Cycler eingesetzt. Im Anschluss wurde das Programm gestartet.

Das Programm enthält folgende Schritte: Zuerst erfolgt die Vorinkubation bei 95 °C für 10 Minuten, gefolgt von 40 Zyklen von 95 °C für 10 Sekunden (Denaturierung), 60 °C für 30 Sekunden (Primer-Annealing) und 72 °C für 1 Sekunde (Elongation). Schließlich erfolgt eine Abkühlung bei 37 °C für 30 Sekunden.

Um das am besten geeignete Referenzgen auszuwählen, welches nicht durch das Experiment reguliert werden würde, wurden 19 Referenzgene in unstimulierte und stimulierte G-MSCs getestet. Es stellte sich durch die Auswertung der Daten über die NormFinder Software heraus, dass die meisten der 19 Referenzgene durch das Experiment reguliert wurden und dass PGK1 das beste Referenzgen für unser Experiment ist. Aus dem Grund wurde das sogenannte *Housekeeping* Gen PGK1 als Referenz verwendet. Die Echtzeit-Ready-Assays wurden von Roche Diagnostics gestellt (Tabelle 8). Die relevante Quantifizierung der Genexpression erfolgte nach der $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode. Alle Experimente wurden dreimal durchgeführt und die Ergebnisse gemittelt.

Tabelle 8: Primer Namen und ID, die für die PCR benutzt wurden (von Roche geliefert)

Gen	Assay ID	Gen Symbol	Accession ID	Primer Sequenz
PGK-1	102083	PGK1 H.sapiens	ENST00000373316	FWD: GGAGAACCTCCGCTTTCAT REV: GCTGGCTCGGCTTTAACC
RUNX-2	113380	RUNX-2 H.sapiens	ENST00000359524	FWD: GCCTAGGCGCATTTCAGAT REV: CTGAGAGTGGAAGGCCAGAG
ALP	103448	ALP H.sapiens	ENST00000374840	FWD: AGAACCCCAAAGGCTTCTTC REV: CTTGGCTTTTCCTTCATGGT
PPAR γ	110607	PPAR γ H.sapiens	ENST00000287820	FWD: GACAGGAAAGACAACAGACAAATC REV: GGGGTGATGTGTTTGAAGCTTG
LPL	113230	LPL H.sapiens	ENST00000311322	FWD: TCGTTCTCAGATGCCCTACA REV: GCCTGATTGGTATGGGTTTC
ACAN	138057	ACAN H.sapiens	ENST00000439576	FWD: GAACGACAGGACCATCGAA REV: AAAGTTGTCAGGCTGGTTGG
Nanog	148147	Nanog H.sapiens	ENST00000229307	FWD: GAGATGCCTCACACGGAGAC REV: AGGGCTGTCCTGAATAAGCA

Oct4	113034	Oct4 H.sapiens	ENST00000259915	FWD: GCAAACCCGGAGGAGTC REV: TCCCAGGGTGATCCTCTTCT
Sox2	111867	Sox2 H.sapiens	ENST00000325404	FWD: ATGGGTTTCGGTGGTCAAGT REV: GGAGGAAGAGGTAACCACAGG

ACAN (Aggrecan); ALP (Alkalische Phosphatase); LPL (Lipoproteinlipase); Nanog; Sox2 („sex determining region Y-box 2“); Oct4 (Oktamer-bindender Transkriptionsfaktor 4); PGK-1 (Phosphoglyceratkinase 1); PPAR γ (Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren- γ); RT-PCR (Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion); RUNX-2 (Runt-related transcription factor 2).

3.10 Multipotente Differenzierung von stimulierten G-MSCs

In diesem Versuch wurde der Effekt der Mikroumgebung bestehend aus einer Entzündung, Retinol und die Kombination aus Entzündung und Retinol auf G-MSCs getestet, um zu sehen, ob die Stimulation die Differenzierung von G-MSCs beeinflusst. Dafür wurden G-MSCs zunächst 7 Tage lang in den vier verschiedenen Gruppen unter denselben Bedingungen kultiviert. Anschließend folgte eine 14-tägige osteogene, 21-tägige adipogene und 35-tägige chondrogene Differenzierung (wie in Kapitel 3.4.1, 3.4.2, 3.4.3 beschrieben).

Die osteogene Differenzierungskapazität wurde durch die mRNA-Expression von Runt-related transcription factor 2 (RUNX-2) und Alkalische Phosphatase (ALP) sowie die quantitative und qualitative Alizarin-Rot-Färbung beurteilt. Für die quantitative Alizarin-Rotfärbung wurden 200 μ l 10 %ige Essigsäure in jeden Well einer 24-Well-Platte (Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland) gegeben und 30 Minuten auf dem Rotamax (Heidolph, Schwabach, Deutschland) inkubiert. Dabei löste sich die zelluläre Monoschicht ab, welche mithilfe eines Zellschabers (Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland) vorsichtig abgekratzt und in ein 1,5 ml Eppendorf Röhrchen überführt wurde. Als Nächstes wurden die Eppendorf Röhrchen 30 Sekunden lang mit dem Vortex Genie 2 (Bender&Holbein AG, Bruchsal, Deutschland) gemixt und danach 10 Minuten auf 85 °C (Biometra TB2 Thermoblock, Analytik Jena AG, Jena, Deutschland) erhitzt. Um Verdunstungen zu vermeiden, wurden die Röhrchen mit Parafilm (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) verschlossen. Die Röhrchen wurden anschließend für 5 Minuten auf Eis gelegt und

schließlich 15 Minuten lang bei einer Zentrifugalbeschleunigung von 420 g zentrifugiert. Während des Zentrifugierens wurde ein Alizarin-Rot-Standard erstellt. Nach Ablauf der Zeit wurden 200 µl des entstandenen Überstandes in ein 1,5 ml Eppendorf Röhrchen überführt. Um den pH-Wert zu neutralisieren, wurden 75 µl 10 % Ammoniumhydroxid (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) hinein pipettiert, sodass der pH-Wert nun im Bereich von 4,1-4,5 betrug. 50 µl der Probe und des Alizarin-Rot-Standards wurden in eine undurchsichtige 96-Well-Platte pipettiert, damit diese bei OD405 (ThermoFisher) gemessen werden konnten. Die standardisierte Alizarin-Rot-Konzentration wurde, wie zuvor beschrieben, aufgetragen (Mahmood et al., 2011).

Für die adipogene Differenzierung wurden die mRNA-Expressionen für Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor (PPAR- γ) und Lipoprotein-Lipase (LPL) sowie die qualitative und quantitative Bewertung der Oil-Red-O-Färbung untersucht. Die Kulturen der verschiedenen Gruppen wurden nach Fixierung vorsichtig mit PBS gespült und anschließend mit 1 ml Oil-Red-O-Färbelösung 15 Minuten lang bei Raumtemperatur gefärbt. Danach wurden die Wells dreimal gründlich mit destilliertem Wasser gespült bis eine klare Spülflüssigkeit entstand. Zur Quantifizierung von Oil-Red-O wurden die gefärbten Kulturen mit 1 ml Isopropanol pro Well behandelt und 15 Minuten lang auf dem Rotamax (Heidolph) inkubiert. 100 µl der Lösung wurden pro Well entnommen und in eine undurchsichtige 96-Well-Platte zum Ablesen bei OD405 (ThermoFisher) überführt. Die relativen Oil-Red-O-Konzentrationen wurden im Vergleich zu dem Oil-Red-O-Standard aufgetragen (Sun, Ye, Xie, & Ye, 2016).

Schließlich wurde für die chondrogene Differenzierung eine mRNA-Expression für Aggrecan (ACAN) sowie eine Alcianblau- und eine Kernechtrot-Färbung der vier Gruppen durchgeführt. Die Primer für die Real-Time-PCR wurden von Roche geliefert (Tabelle 8).

3.11 Statistische Auswertung

Anhand des Shapiro-Wilk Tests wurde die Normalverteilung der Daten untersucht. Unter Verwendung des Friedman-Tests wurden die Unterschiede in der Gesamt- β -Catenin, MTT, KBEs, mRNA-Expression aller getesteten Gene und der quantitativen osteogenen und adipogenen Differenzierungskapazität zwischen den vier Gruppen bewertet. Unterschiede in den MTT-Ergebnissen und der mRNA-Expression der Pluripotenzgene zwischen den Zeitpunkten wurden mithilfe des Friedman-Tests und des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests weiter untersucht.

Alle Analysen wurden anhand der SPSS-Software (SPSS Version 11.5, Chicago, IL, USA) durchgeführt und das Signifikanzniveau wurde auf $p = 0,05$ eingestellt.

4. Ergebnisse

4.1 Nachweis der Stammzeleigenschaften von G-MSCs

Als Voraussetzung für das Experiment sollten die Stammzellen die folgenden charakteristischen Kriterien erfüllen: a) die Fähigkeit zur Bildung von Kolonien, b) Exprimierung von spezifischen Oberflächenantigenen und c) Multipotenz in mindestens drei Gewebslinien (z.B. adipogen, chondrogen und osteogen) (Dominici et al., 2006).

Die isolierten gingivalen Bindegewebszellen wiesen zunächst eine Fibroblasten-ähnliche Morphologie auf (Abbildung 8 A).

Koloniebildende Einheiten (KBE)

Abbildung 8 B zeigt, dass die G-MSCs nach 14 Tagen aus den MACS-positiven Zellen charakteristische multiple koloniebildende Einheiten (KBE) aufweisen, die mittels der Kristallviolettffärbung nachgewiesen werden konnten.

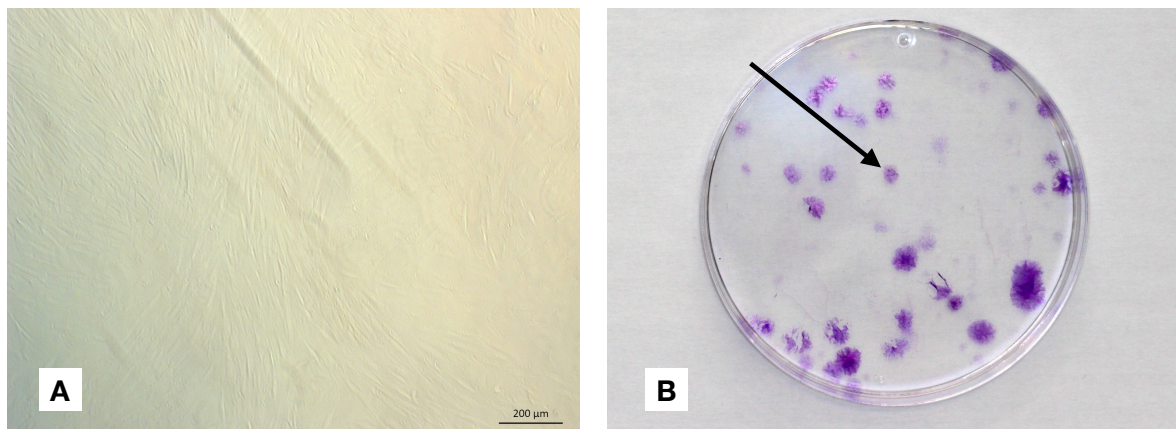


Abbildung 8: Mikroskopische Erscheinung und KBE von G-MSCs

(A) Phasenkontrast-Mikroskopie: Erscheinungsbild einer anhaftenden gingivalen Bindegewebsmasse mit herauswachsenden Zellen. (B) KBE von G-MSCs. Der Pfeil verweist auf eine Kolonie.

Durchflusszytometrische Analyse (FACS-Analyse)

Bei der Durchführung der durchflusszytometrischen Analyse wurde eine negative Expression für die Zelloberflächenmarker CD14, CD34 und CD45 festgestellt. In Bezug auf die Zelloberflächenmarker CD73, CD90, CD105 zeigten die Zellen eine positive Expression (Abbildung 9).

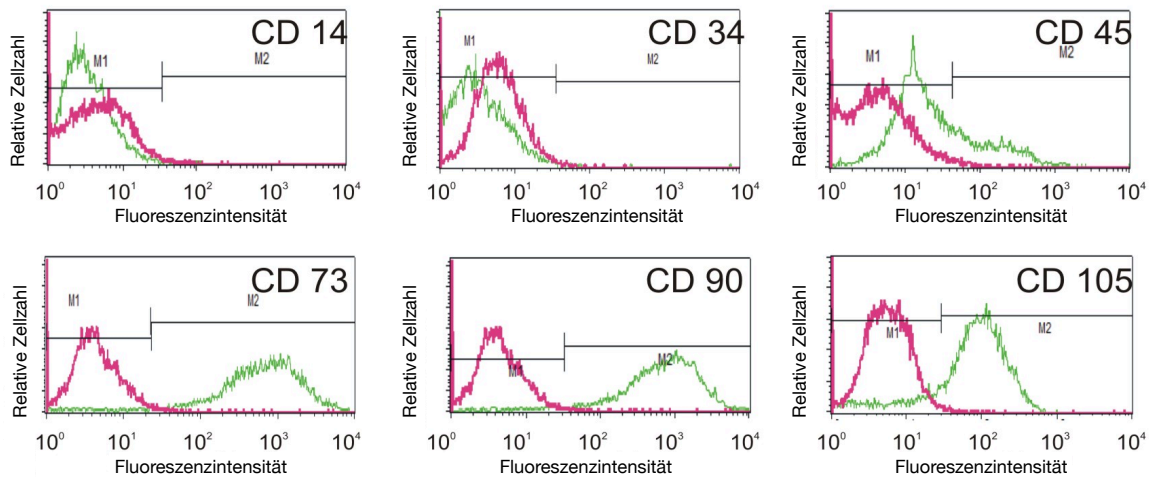


Abbildung 9: Nachweis von CD-Antigenen mittels extrazellulärer FACS-Analyse zur Identifizierung von G-MSCs

Die FACS-Analyse ergab die Expression von CD73, CD90 und CD105 und nicht von CD14, CD34 und CD45. Grüne Kurve = Oberflächenmarker, rote Kurve = Isotypkontrollen.

Multipotente Differenzierung

Die osteogene Differenzierung der G-MSCs zeigte eine Bildung von Alizarin-Rot-positiven kalzifizierten Ablagerungen im Vergleich zu ihren Kontrollen (Abbildung 10 A und B).

Die adipogene Differenzierung von G-MSCs konnten im Gegensatz zu ihren Kontrollen die Bildung von Oil-Red-O-positiven Lipid-Vesikelkörpern festgestellt werden (Abbildung 10 C und D).

Die chondrogene Differenzierung der dreidimensionalen Mikromassen der G-MSCs führte zu einer Ablagerung extrazellulärer Glykosaminoglykane, die im Gegensatz zu ihren Kontrollen positiv mit Alcianblau und säurefestem rot gefärbt waren (Abbildung 10 E und F).

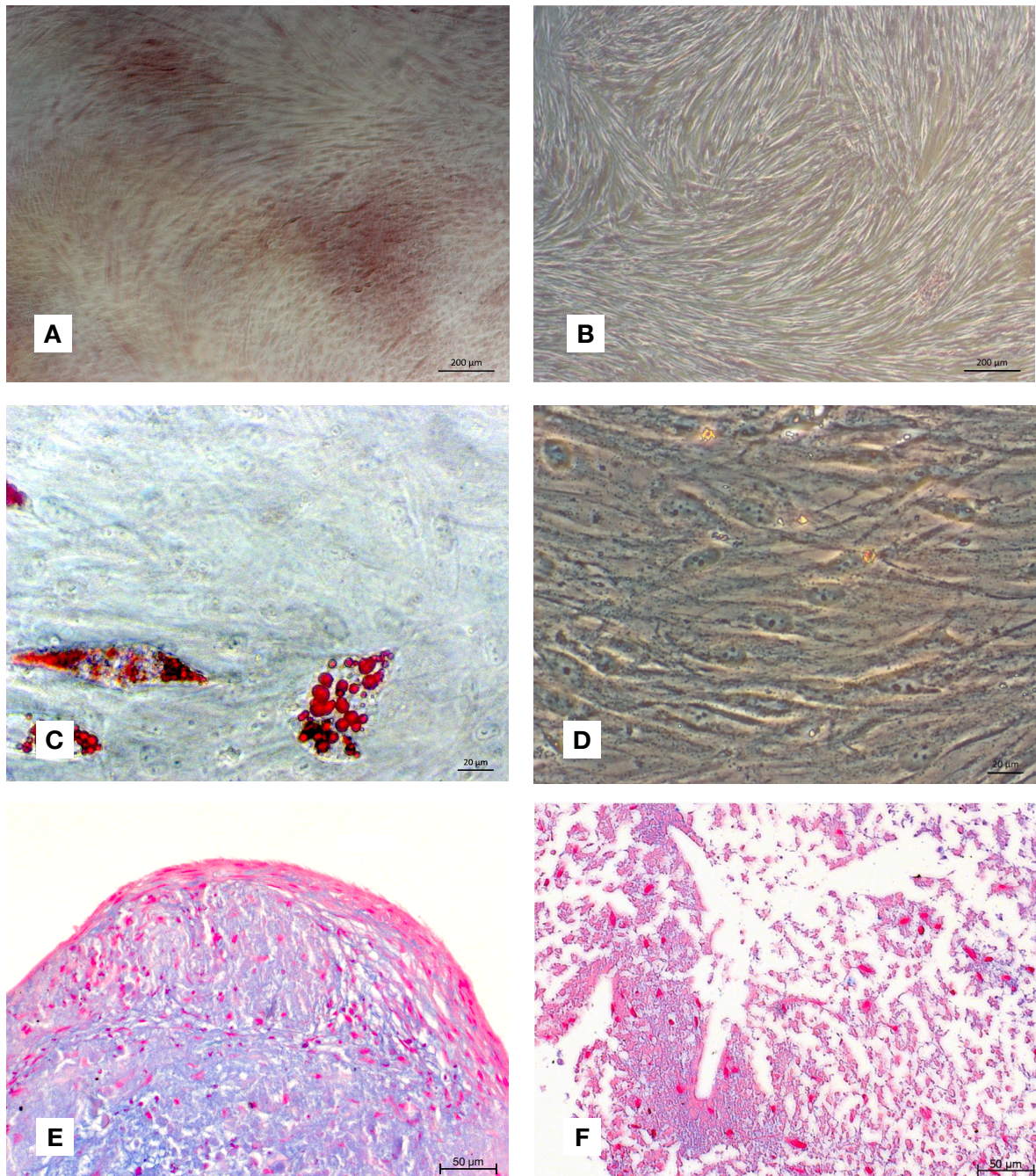


Abbildung 10: Differenzierungspotential von G-MSCs

(A) Alizarin-Rot-Färbung der G-MSCs nach osteogener Stimulierung und ihre (B) Kontrolle.
 (C) Oil-Red-O-Färbung der G-MSCs nach adipogener Stimulierung und ihre (D) Kontrolle.
 (E) Alcian-Blau- und Kernechtrot-Färbung der G-MSCs nach chondrogener Stimulierung und ihre (F) Kontrolle.

4.2 ELISA für Wnt/ β -Catenin

Der intrazelluläre Wnt/ β -Catenin-Weg wurde, im Gegensatz zur nicht stimulierten Kontrollgruppe, durch die drei Behandlungen mit einer signifikanten Abnahme des gesamten β -Catenin ausgelöst. Die intrazelluläre β -Cateninexpression (Median% Proteinexpression normalisiert auf Stammlysat, Q25/Q75) war in der nicht stimulierten Kontrollgruppe (12,3 %, 10,0/15,3) am höchsten, gefolgt von der Entzündungsgruppe (11,3 %, 10,0/14,0), der Retinol-/Entzündungsgruppe (10,9 %, 9,7/13,8) und zum Schluss die Retinolgruppe (10,6 %, 9,9/12,6; $p = 0,031$, Friedman-Test). Ein statistischer signifikanter Unterschied lag zwischen der Entzündungsgruppe und unstimulierten Kontrollgruppe vor ($p = 0,017$, Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, Abbildung 11).

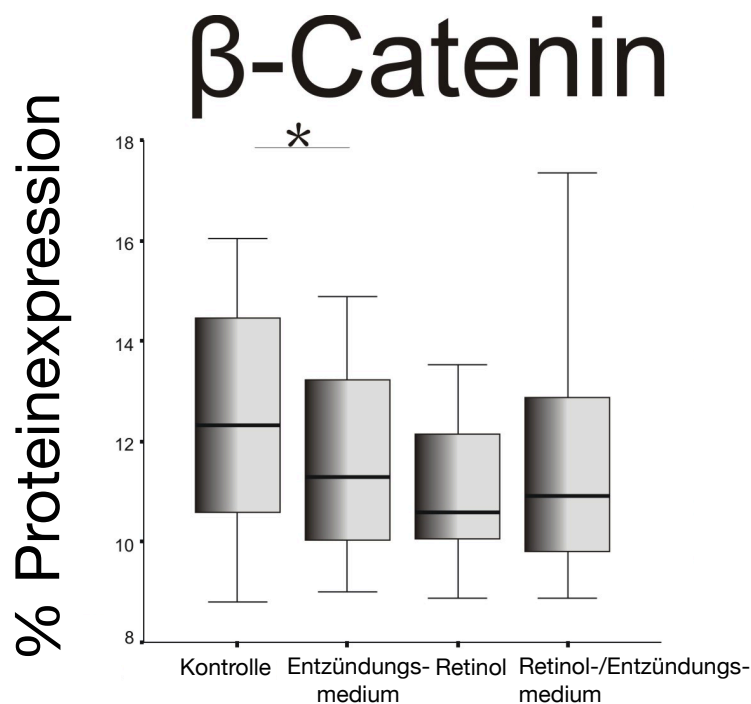


Abbildung 11: ELISA Ergebnisse für Wnt/ β -Catenin Signalweg der G-MSCs

Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg wurde durch ELISA nach Stimulierung von G-MSCs mit Entzündung und Retinol (Box-Whisker-Plots mit Medianwerten und Quartilen) auf intrazellulären % β -Catenin untersucht. Signifikante Unterschiede sind mit Sternchen markiert ($n=5$, $*p < 0,05$).

4.3 Zellproliferation

Die Zellproliferationskurven zeigten im Verlauf der 14 Tage die höchsten Zellzahlen (Median-Zellzahlen, Q25/Q75) in der Retinolgruppe (67083, 45833/103750), gefolgt von der Kontrollgruppe (63750, 40833/86042), der Entzündungsgruppe (54167, 39792/70833) und der Retinol-/Entzündungsgruppe (53750, 35000/70208; $p < 0,001$, Friedman-Test, Abbildung 12).

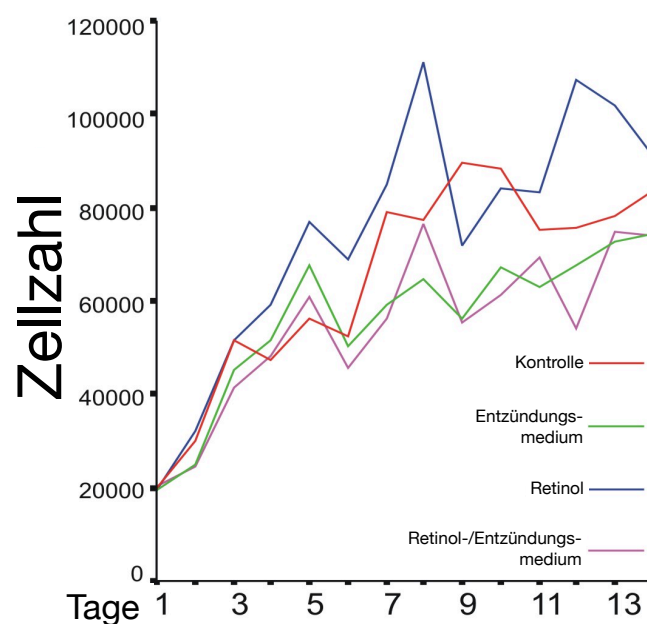


Abbildung 12: Zellwachstumskurven von G-MSCs

Zellwachstumskurven von G-MSCs nach Stimulation mit Entzündung und Retinol aufgenommen über 14 Tage. Rote Kurve = Kontrollgruppe, grüne Kurve = Entzündungsgruppe, blaue Kurve = Retinolgruppe, lila Kurve = Retinol-/Entzündungsgruppe.

Zwischen 24 und 72 Stunden zeigte die Kontrollgruppe die höchste Zellzahl (6807, 4983/7312), gefolgt von der Entzündungsgruppe (5415, 4457/7230), der Retinol-/Entzündungsgruppe (4014, 1516/5745) und schließlich der Retinolgruppe (3687, 2193/5133; $p < 0,001$, Friedman-Test, Abbildung 13).

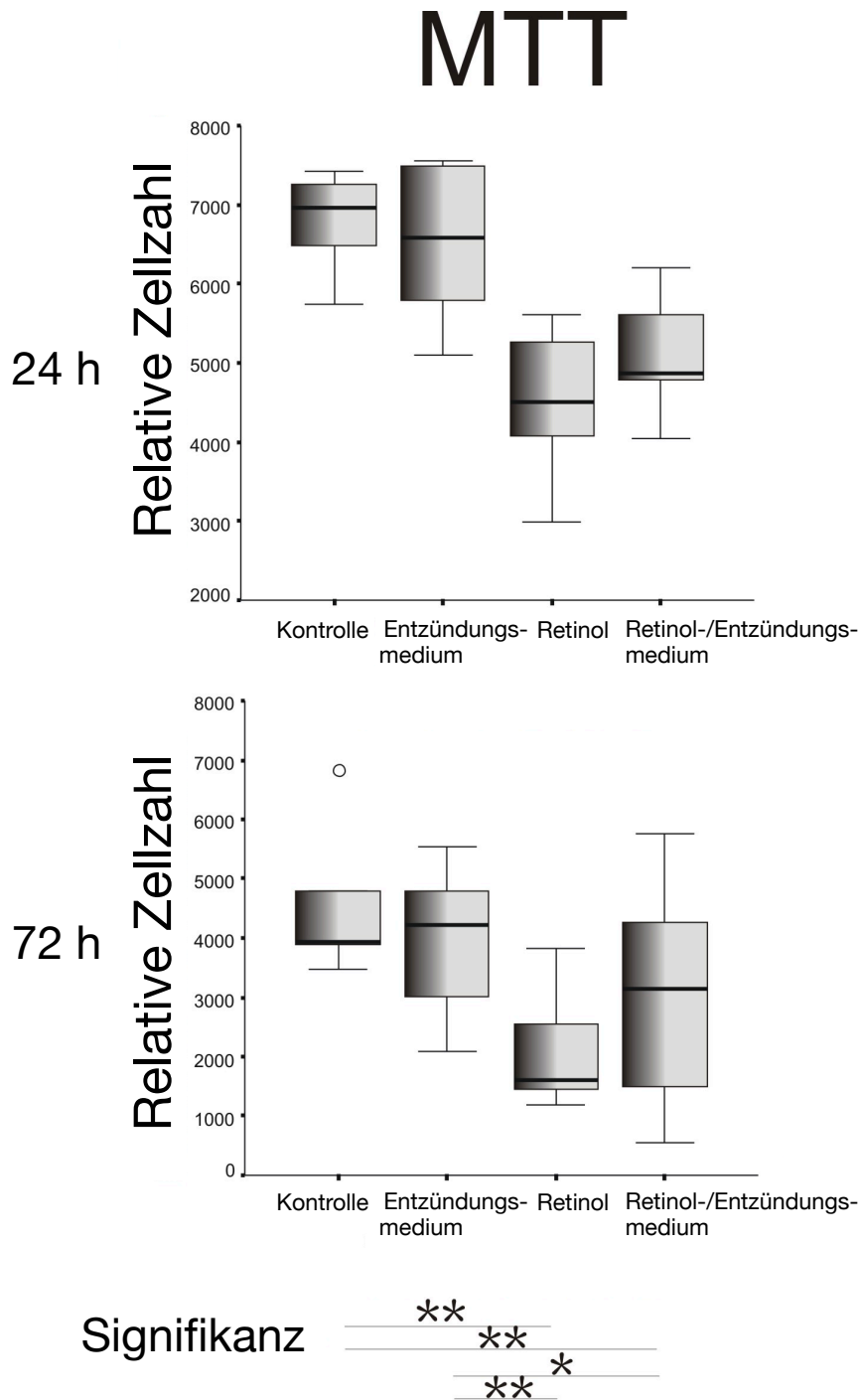


Abbildung 13: Relative Zellzahl mit MTT

Die relative Zellzahl von G-MSCs nach Stimulation mit Entzündung und Retinol für 24 h und 72 h (Box-Whisker-Plots mit Medianwerten und Quartilen). Signifikante Unterschiede sind mit Sternchen markiert (n=5, *p < 0,05; **p < 0,01; Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test).

4.4 Koloniebildenden Einheiten (KBE) von stimulierten G-MSCs

Die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KBE) waren nach 14 Tagen signifikant am höchsten (Median KBE, Q25/Q75) in der Retinolgruppe (35, 20/58), gefolgt von der Kontrollgruppe (12, 5/31), wobei in den anderen beiden Gruppen fast keine KBE beobachtet wurden ($p = 0,002$, Friedman-Test, Abbildung 14 und Abbildung 15).

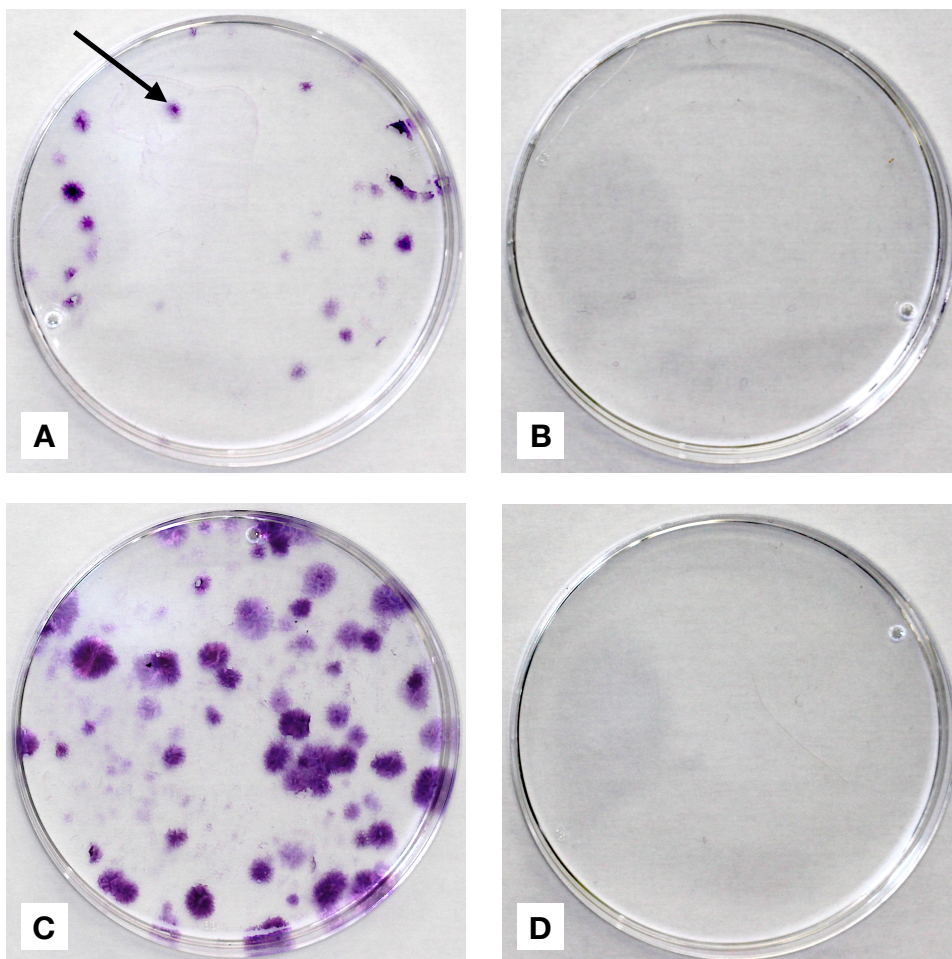


Abbildung 14: Nachweis von KBE nach 14 Tagen nach Stimulation mit Entzündung und Retinol

(A) Kontrollgruppe, (B) Entzündungsgruppe, (C) Retinolgruppe, (D) Retinol-/Entzündungsgruppe.

Nachweis von KBE nach Stimulation mit Entzündung und Retinol nach 14 Tagen. Der Pfeil in der Abbildung 14 (A) verweist auf eine Kolonie.

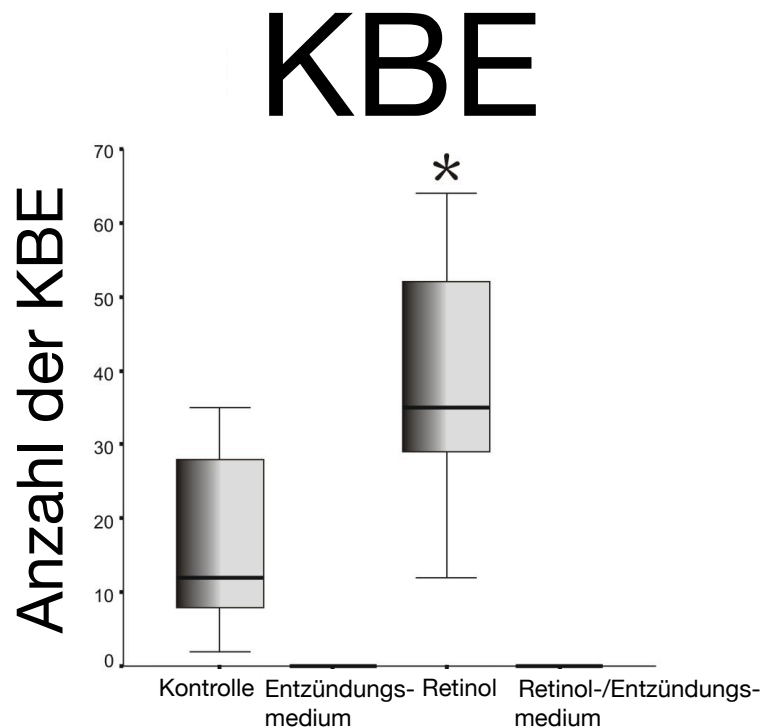


Abbildung 15: Zellzahl der KBE nach Stimulation mit Entzündung und Retinol
Zellzahl der KBE nach Stimulation der G-MSCs mit Entzündungsmedium und Retinol (Box-Whisker-Plots mit Medianwerten und Quartilen). Signifikante Unterschiede sind mit Sternchen markiert (n = 5, *p < 0,05).

4.5 mRNA Expression von Pluripotenzmarkern

Die Expression der Pluripotenzmarker auf mRNA-Ebene wurde mittels RT-PCR ermittelt.

Nanog (Median der Genexpression/PGK1, Q25/Q75) wurde am höchsten in der Entzündungsgruppe (0,00060, 0,00022/0,00140) exprimiert, gefolgt von der Retinolgruppe (0,00053, 0,00028/0,00084), der Retinol-/Entzündungsgruppe (0,00031, 0,00009/0,00070) und zum Schluss der Kontrollgruppe (0,00028, 0,00013/0,00092).

Oct4 war am höchsten in der Retinolgruppe (0,00025, 0,00017/0,00039), gefolgt von der Retinol-/Entzündungsgruppe (0,00024, 0,00007/0,00038), der Kontrollgruppe (0,00021, 0,00006/0,00041) und schließlich der Entzündungsgruppe (0,00017, 0,0001/0,00043).

Eine signifikante höhere Expression von Sox2 zeigte sich in der Entzündungsgruppe (0,00023, 0,00008/0,00052), gefolgt von der Kontrollgruppe (0,00014,

0,00005/0,00061). In den beiden anderen Gruppen, der Retinolgruppe und der Retinol-/Entzündungsgruppe, wurden fast keine nennenswerte Expressionen festgestellt ($p < 0,001$, Friedman-Test, Abbildung 16).

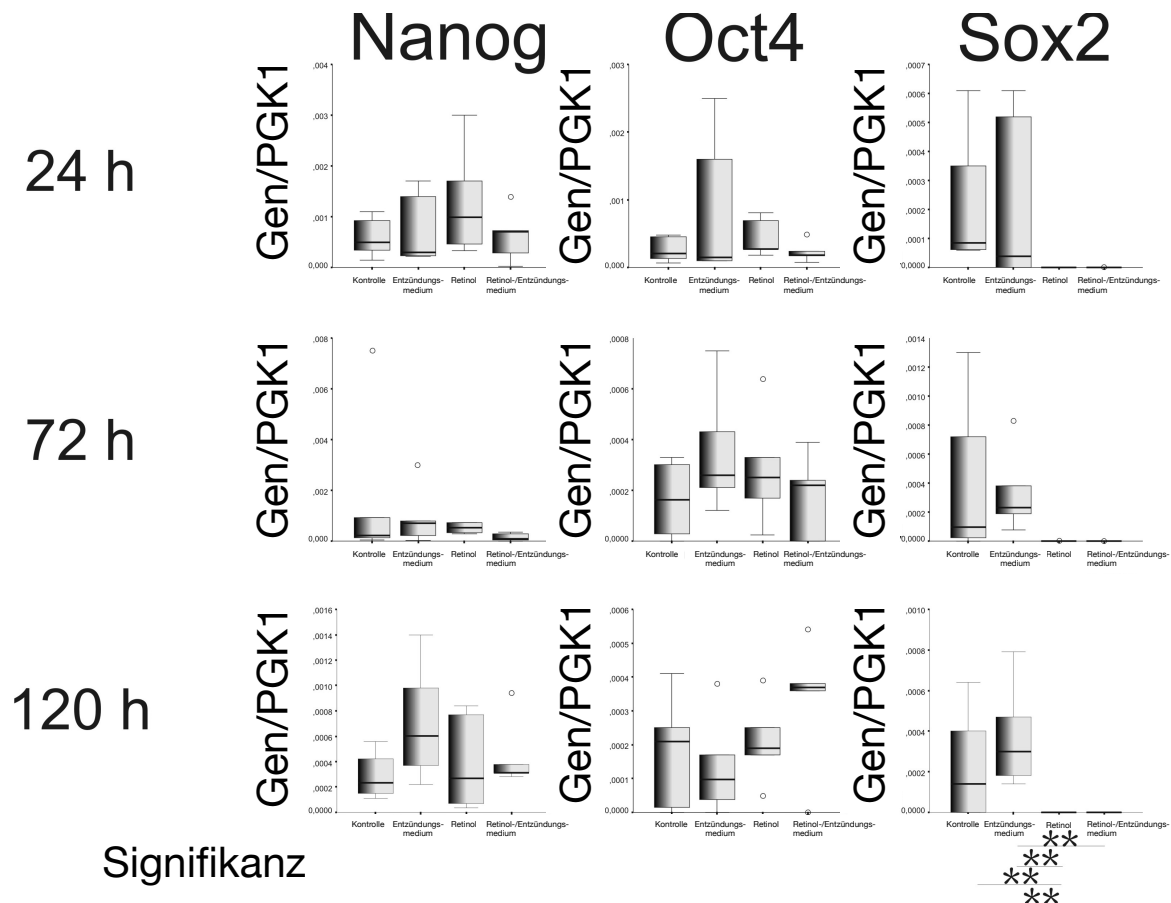


Abbildung 16: Expression von Pluripotenzgenen in G-MSCs, stimuliert durch Entzündung und Retinol.

mRNA-Expression für Nanog, Oct4 und Sox2 nach Stimulation für 24, 72 und 120 Stunden (Box-Whisker-Plots mit Medianwerten und Quartilen). Signifikante Unterschiede zwischen Gruppen und im Zeitverlauf sind mit Sternchen markiert ($n = 5$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; Wilcoxon-Test mit Vorzeichen).

4.6 Multipotentes Differenzierungspotential von stimulierten G-MSCs

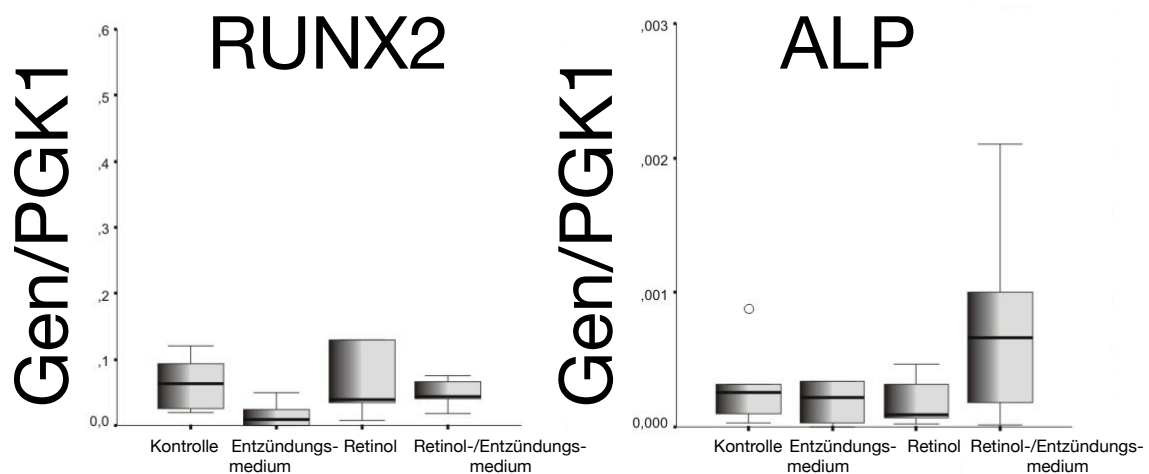
Alle G-MSCs aus den vier verschiedenen Testgruppen zeigten osteogene, adipogene und chondrogene Differenzierungspotentiale.

Abgesehen von einer Tendenz zu einer höheren Expression von ALP in der Retinolgruppe und der Retinol-/Entzündungsgruppe, waren keine signifikanten Unterschiede für die Genexpression von RUNX2 nach 14 Tagen (Abbildung 17 A), LPL und PPAR- γ nach 21 Tagen (Abbildung 18 A) oder ACAN nach 35 Tagen (Abbildung 19 A) festzustellen.

Die histochemische Färbung der vier Gruppen zeigte sich in allen drei Differenzierungen positiv. Nach der osteogenen Differenzierung konnte eine kalzifizierte Knötchenbildung festgestellt werden (Abbildung 17 B). Bei der adipogenen Differenzierung waren Oil-Red-O-positive Lipideinschlusskörper zu erkennen (Abbildung 18 B), während sich bei der chondrogenen Differenzierung Glykosaminoglykane bildeten (Abbildung 19 B).

Es war jedoch ein konstantes Muster erkennbar: Die Retinol-/Entzündungsgruppe wies das höchste Differenzierungspotenzial mit der größten Ca²⁺- und Lipidablagerung auf, gefolgt von der Entzündungsgruppe (Abbildung 17, 18 und 19).

Die Abbildung 17 veranschaulicht das osteogene Differenzierungspotenzial von G-MSCs sowohl nach Stimulation mit Entzündung und Retinol als auch die unstimulierte Kontrolle, während Abbildung 18 das adipogene Differenzierungspotential und Abbildung 19 das chondrogene Differenzierungspotential verdeutlicht.



A

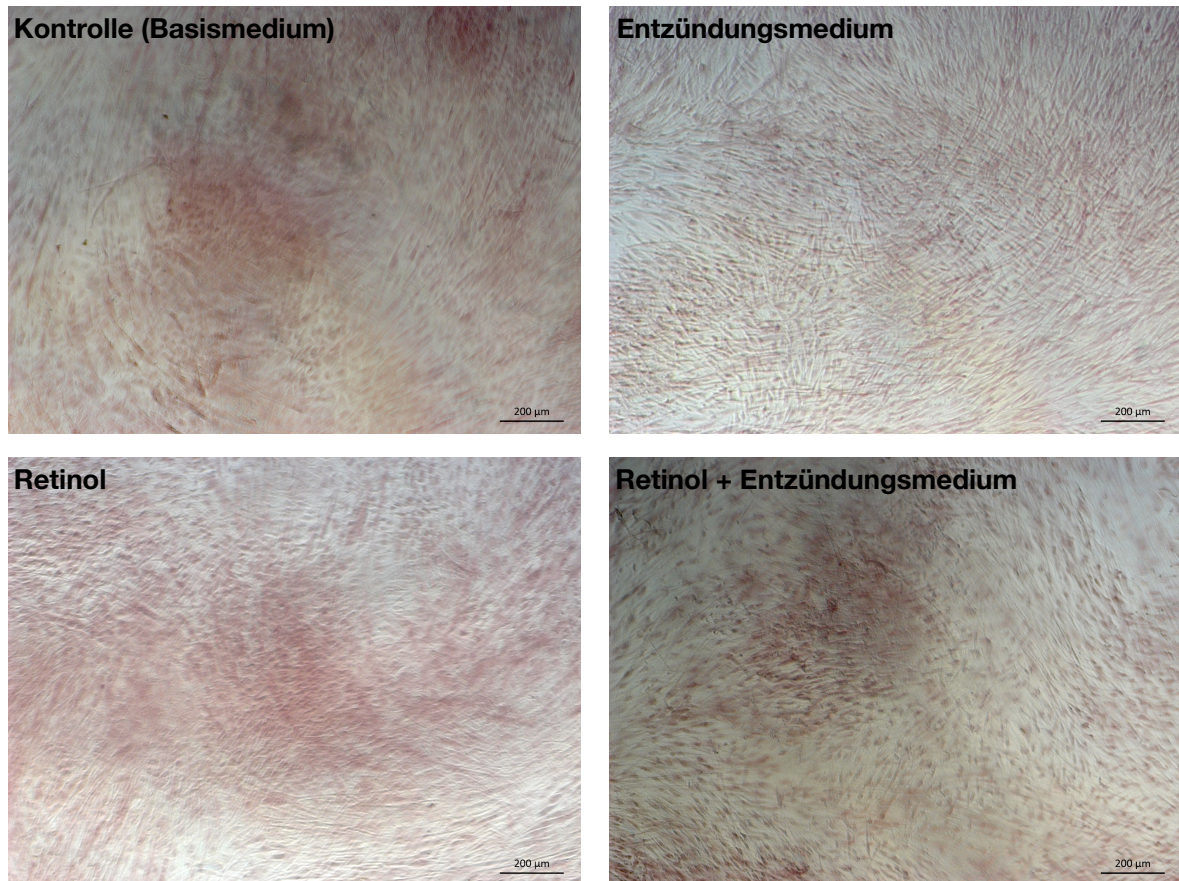
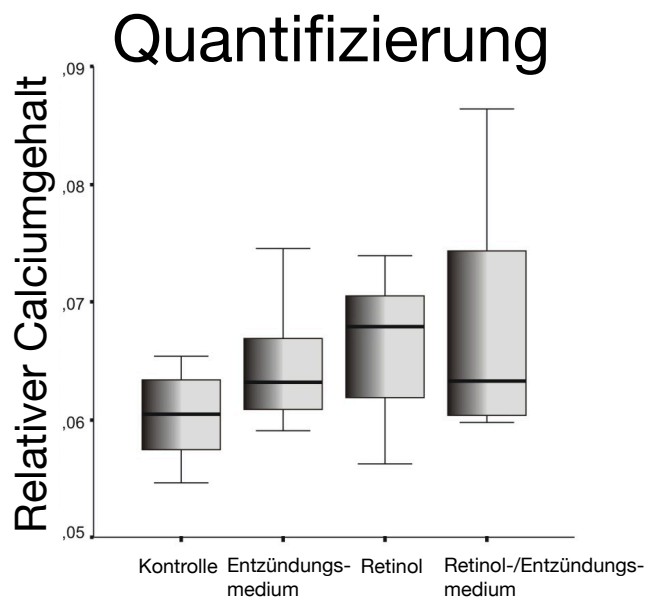
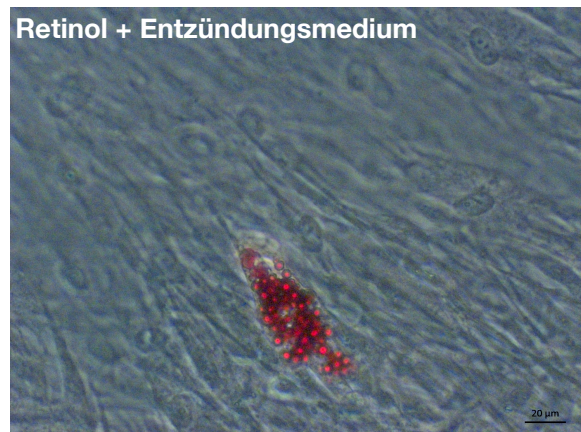
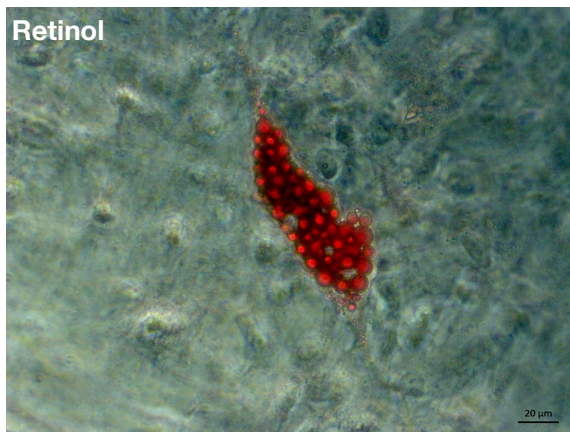
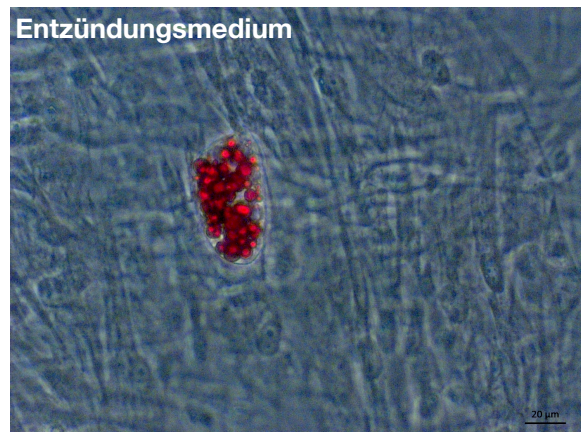
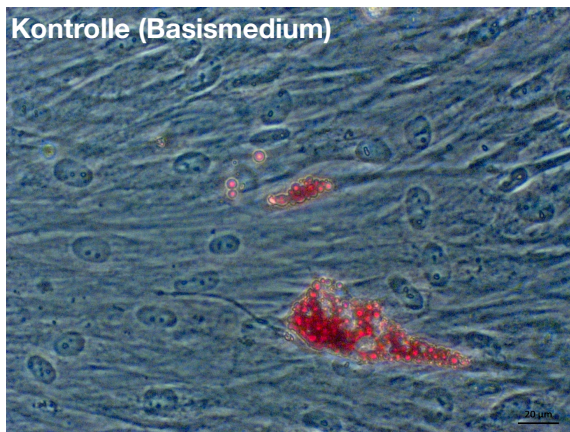
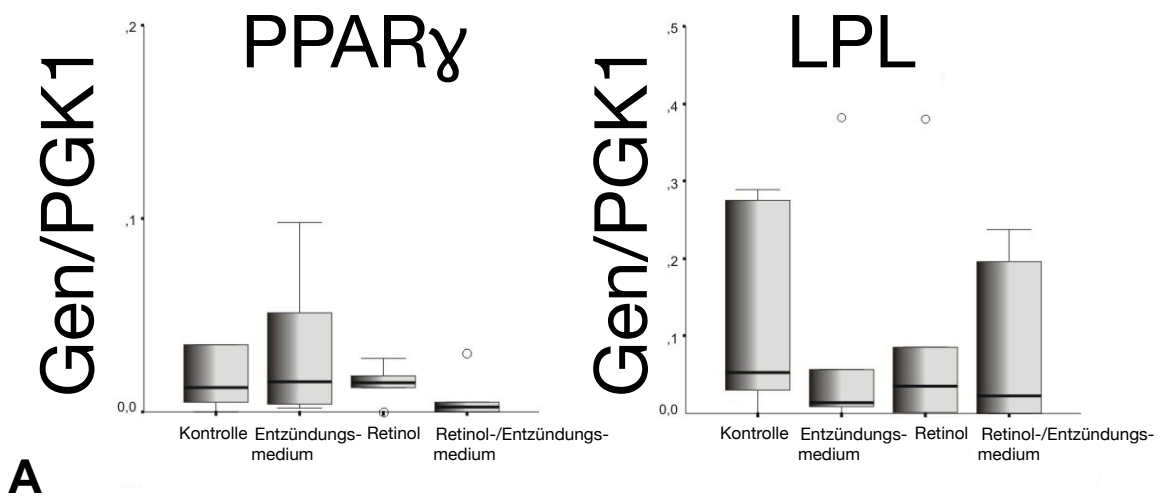
**B****C**

Abbildung 17: Osteogenes Differenzierungspotenzial von G-MSCs nach Stimulation mit Entzündung und Retinol und die unstimulierte Kontrolle

(A) Osteogene Genexpressionen (RUNX2 und ALP) nach 14 Tagen osteogener Stimulation (Box-Whisker-Plots mit Medianen und Quartilen). (B) Alizarin-Rotfärbung und (C) Calcium-Quantifizierung (Box-Whisker-Plots mit Medianen und Quartilen) von der Kontrollgruppe, Entzündungsgruppe, Retinolgruppe und Retinol-/Entzündungsgruppe nach 14 Tagen osteogener Stimulation.



B

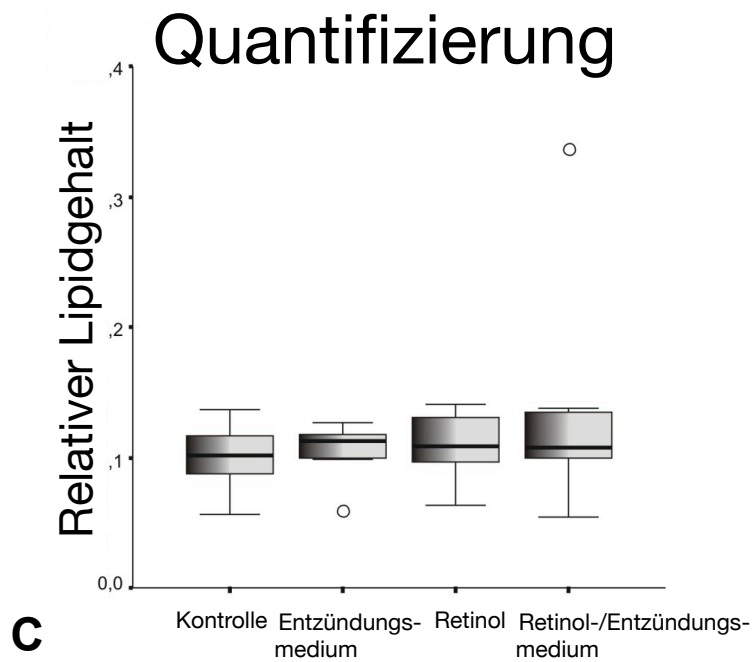
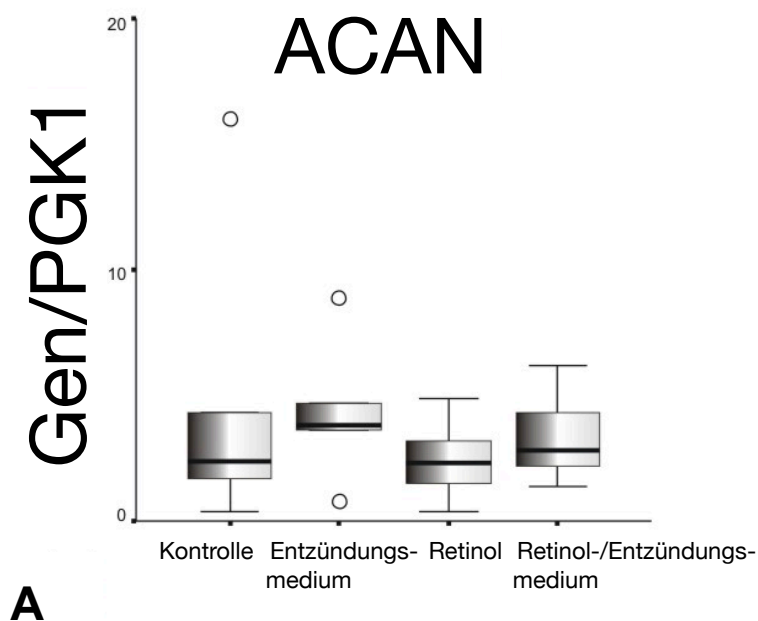
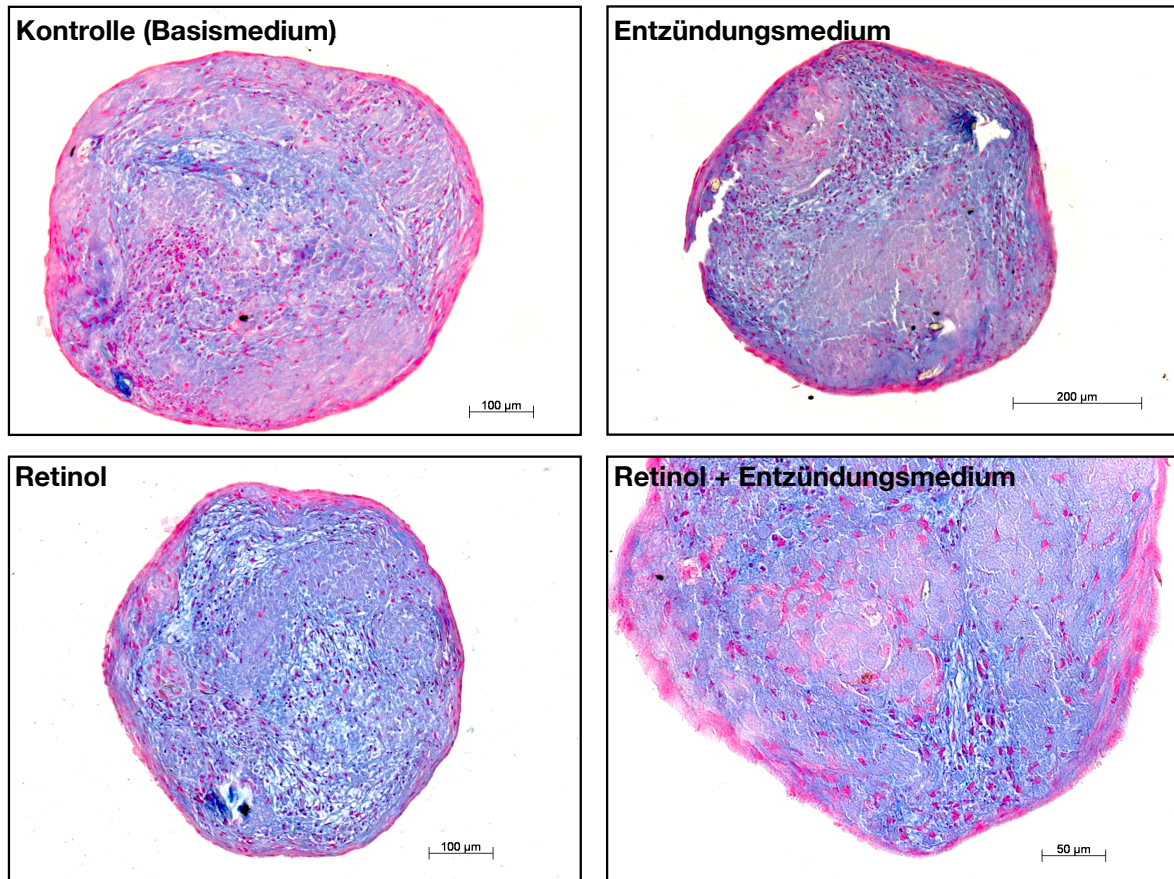


Abbildung 18: Adipogenes Differenzierungspotential von G-MSCs nach Stimulation mit Entzündung und Retinol und die unstimulierte Kontrolle

(A) Adipogene Genexpression (PPAR- γ und LPL) nach 21 Tagen adipogener Stimulation (Box-Whisker-Plots mit Medianen und Quartilen). (B) Oil-Red-O-Färbung und (C) Quantifizierung des Lipidgehalts (Box-Whisker-Plots mit Medianen und Quartilen) von der Kontrollgruppe, Entzündungsgruppe, Retinolgruppe und Retinol-/Entzündungsgruppe nach 21 Tagen adipogener Stimulation.



**B****Abbildung 19: Chondrogenes Differenzierungspotenzial von G-MSCs nach Stimulation mit Entzündung und Retinol und die unstimulierte Kontrolle**

(A) Chondrogene Genexpression (ACAN) nach 35 Tagen chondrogenen Stimulation (Box-Whisker-Plots mit Medianen und Quartilen). (B) Alcian-Blau- und Kernechtrot-Färbung der G-MSCs von der Kontrollgruppe, Entzündungsgruppe, Retinolgruppe und Retinol-/Entzündungsgruppe nach 35 Tagen chondrogenen Stimulation.

5. Diskussion

5.1 Diskussion der Methoden

5.1.1 Zellkultivierung

In der vorliegenden Studie wurden nach Entfernung von dritten Molaren Gingiva Proben entnommen, um Stammzellen gewinnen zu können. Fawzy El-Sayed et al. zeigten hierzu die Möglichkeit einer minimal invasiven Technik zur Isolierung von MSCs aus Gingiva-Proben (Fawzy El-Sayed, Paris, Becker, Kassem, et al., 2012). Aufbauend aus diesen Ergebnissen wurden in der vorliegenden Studie die MSCs aus den gesammelten Gingiva-Proben isoliert und kultiviert.

Die MACS Methode ist ein etabliertes Verfahren, das zur Zellsortierung von spezifischen Zellen anhand ihrer verschiedenen Oberflächenstrukturen eingesetzt wird (Miltenyi, Muller, Weichel, & Radbruch, 1990). Zur magnetischen Sortierung der potenziellen G-MSCs aus dem Gingiva-Gewebe wurden STRO-1-Antikörper und Anti-IgM-MicroBead-Antikörper verwendet (Fawzy El-Sayed, Paris, Becker, Neuschl, et al., 2012). Das Prinzip der MACS-Methode beruht darauf, dass die STRO-1-Antikörper gemeinsam mit den Anti-IgM-MicroBead-Antikörper an den MSCs binden werden, da nur diese Zellen in der oralen Kavität das STRO-1 Antigen exprimieren. Diese werden dann durch das starke Magnetfeld angezogen, während die restlichen Zellbestandteile ungehindert hindurchfließen können. Anschließend können die markierten Zellen außerhalb des Magnetfeldes eluieren, da diese von der ferromagnetischen Matrix nicht mehr gehalten werden konnten. Das Verfahren ist zudem einfach anzuwenden und die Isolierung von STRO-1-exprimierenden Zellen ist schnell durchzuführen. Jedoch kann eine vollständige Reinheit aus gemischten Zellkulturen nicht erzielt werden.

5.1.2 Nachweis von Stammzelleigenschaften

Ein wichtiger Schritt dieser Studie war es zu beweisen, dass es sich bei den untersuchten Zellen eindeutig um MSCs handelte. Aus diesem Grund wurde nach standardisierten Protokollen von Dominici et al. zur Bestimmung und Identifizierung von MSCs vorgegangen (Dominici et al., 2006). Dabei mussten alle Kriterien zur Identifikation erfüllt werden. Dies zeigte sich in der Fähigkeit sich nach standardisierten Kulturbedingungen plastisch an Gewebekulturschalen anzuheften und Zellkolonien (KBE) zu bilden. Weiterhin beinhalteten die Kriterien die Differenzierung in osteogenen, adipogenen und chondrogenen Zellen und die Expression bestimmter Oberflächenmarker. Es wurden mindestens 95% der charakteristischen MSCs positiv auf CD73, CD90 und CD105 und auf CD14, CD34 und CD45 negativ getestet.

Koloniebildende Einheiten (KBE)

Als Kriterium zum Nachweis von mesenchymaler Stammzellen beschrieben Dominici et al. die Fähigkeit zur Koloniebildung (Dominici et al., 2006). Friedenstein et al. zeigten, dass in geringer Dichte ausgesäte MSCs klar abgrenzbare Kolonien bilden (Friedenstein, Chailakhyan, Latsinik, Panasyuk, & Keiliss-Borok, 1974). Diese unterscheiden sich zu den morphologisch ähnlichen Fibroblasten, die diese koloniebildende Fähigkeit unter gleichen Bedingungen nicht besitzen. Durch die Bildung von Kolonien aus jedem einzelnen MSC kann außerdem die Fähigkeit zur Selbstreplikation und Erzeugung von klonogenen Tochterzellen gezeigt werden (El-Sayed et al., 2015).

Zelldifferenzierungen

Ein weiteres Merkmal für die Identifizierung von Stammzellen ist ihre Multipotenz, d.h. die Fähigkeit sich in verschiedene Zellarten zu differenzieren und anschließend verschiedene Gewebe zu bilden (Pittenger et al., 1999). Dazu wurde in der vorliegenden Studie nach Standardprotokollen das Differenzierungspotential der Zellen getestet. Die Zusammensetzung der Stimulationsmedien in osteogenen, adipogenen und chondrogenen Differenzierung wurde nach

Standarduntersuchungen bestimmt. Die anschließende Differenzierungsfärbung wurde nach Dominici et al. durchgeführt (Dominici et al., 2006).

Zum Nachweis der osteogenen Differenzierung wurde eine Alizarinrot-Färbung verwendet, welche zur Verdeutlichung der Kalziumphosphat-Einlagerungen als Goldstandard verwendet wird. Mit der Oil-Red-O-Färbung wurden die Lipidtröpfchen, die durch die adipozytären Induktion entstanden sind, verdeutlicht. Für die Veranschaulichung der chondrogenen Differenzierung durch Anfärbung der Glykosaminoglykanen wurde eine Alcianblau-Färbung durchgeführt (Amin, Olsen, Knowles, & Donos, 2011; El-Sayed et al., 2015).

Durchflusszytometrie (Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierer)

Die fluoreszenzaktivierte Zellanalyse ermöglicht das Zählen und die Analyse von z.B. Oberflächenmolekülen in einem Flüssigkeitsstrom innerhalb von Sekunden. Diese Methode der Zellsortierung wurde von Bonner et al. in den 1960er Jahren etabliert (Bonner, Hulett, Sweet, & Herzenberg, 1972). Die zu analysierenden Zellen wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern markiert und in einer Flüssigkeit suspendiert. Die Zellsuspension wurde als linearer Flüssigkeitsstrom durch das Gerät überführt, wobei ein Laserstrahl auf die einzelnen Zellen traf. Dabei kam es beim Durchgang der Zelle zur Streuung des Lichts. Die Größe der Streuung korrelierte mit der relativen Größe der Zellen. Zusätzlich wurden die fluoreszierenden Moleküle an den Zellen angeregt, welche anschließend ihre Fluoreszenz abgeben. Mehrere Detektoren erfassten die Lichtsignale aus gestreutem und fluoreszierendem Licht und wandelten diese in elektrische Signale um. Durch die Analyse der Helligkeitsschwankungen an jedem Detektor ist es möglich verschiedene Informationen über die physikalische und chemische Struktur jedes Partikels abzuleiten (Picot, Guerin, Le Van Kim, & Boulanger, 2012).

In der vorliegenden Studie wurde dieses Verfahren verwendet, um die Expression der Oberflächenmarker der MSCs nachzuweisen. Basierend auf der Arbeit von Dominici et al. wurden die Oberflächenmarker CD14, CD34, CD45, CD73, CD90, CD105, CD146 und STRO-1 ausgewählt (Dominici et al., 2006). Dabei sollten entsprechend dieser Identifikationskriterien die MSCs positive Expressionen von CD73, CD90 und CD105 aufweisen, gleichzeitig sollten CD14, CD34 und CD45 nicht bzw. kaum exprimiert werden (El-Sayed et al., 2015; Fawzy El-Sayed et al., 2015). Die Oberflächenmarkerexpression der negativen Indikatoren CD45, CD34 und CD14

wurde verwendet, um eine Kontamination von Monozyten, Makrophagen, neutrophile Granulozyten und hämatopoetische Vorläufer auszuschließen, welche für die genannten Zellen charakteristisch sind (Huang & Li, 2008).

5.1.3 ELISA für Wnt/ β -Catenin

Der ELISA Test ist eine sensitive und reproduzierbare diagnostische Methode zum Nachweis von Antigenen (Engvall & Perlmann, 1971). In Form eines Sandwich-ELISA-Formats liefern zwei Antikörper, die gegen β -Catenin aufgetragen werden eine hohe Spezifität. Nach Zugabe des β -Catenin (Gesamt)-Detektionsantikörper kommt es zur Bindung an das Antigen. Im Anschluss wird ein zweiter gegen das Antigen gerichteter Antikörper, an dem ein Enzym gebunden ist, hinzugefügt. Das gebundene Enzym kann nun einen Farbstoff spalten, wodurch ein Farbwechsel entsteht. Dadurch lassen sich die gebundenen Antikörper gegen das Antigen sichtbar machen.

Mit Hilfe des PhosphoELISA-Kit (Invitrogen, CA, USA) konnte das gesamte β -Catenin, unabhängig vom phosphorylierten Zustand, bestimmt werden. Die Enzymaktivität konnte anschließend photometrisch bei OD450 erfasst werden.

5.1.4 Zellproliferation (MTT, Zellwachstumskurve)

Der MTT Test ermöglicht es die Lebensfähigkeit und das Wachstum einer Zellkultur einzuschätzen (Vistica et al., 1991). Durch Zugabe des 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) wird der gelbe, wasserlösliche Farbstoff durch Aufbrechen des Tetrazoliumrings von der Dehydrogenase in das blauviolette, in Alkohol lösliche Formazan, reduziert. Die Konzentration ist direkt proportional zur zellulären Stoffwechselaktivität und der Viabilität der Zellen. Anschließend kommt es durch Zugabe des Detergenz Dimethylsulfoxid (DMSO) zur Lyse der Zellen und das Formazan wird freigesetzt. Mit einem Photometer wird die optische Dichte der alkoholischen Formazan-Lösung gemessen. Dieser MTT Test wurde in der vorliegenden Studie basierend auf Standardprotokollen von Ng et al. aufgrund der einfachen Durchführung und der Möglichkeit eine große Anzahl von Proben zu messen, verwendet (Ng et al., 2015). Der Test ermöglichte die Bestimmung der Proliferation der unstimulierten und stimulierten Zellen aller vier Versuchsgruppen.

Eine weitere Möglichkeit zur Einschätzung der Proliferation von Zellen stellt die Zellwachstumskurve dar, welche eine einfache, aber auch zeitaufwändige Methode zur Beobachtung und Dokumentation der Proliferation von unstimulierten und stimulierten Zellen bietet. In der vorliegenden Studie wurden die Zellen dabei jeden Tag für insgesamt 14 Tage mittels Neubauer-Zählkammer gezählt. Um die möglichen Fehlerquellen gering zu halten, wurde die Zählkammer zwischen jeder Probe desinfiziert und eine luftblasenfreie Kammer sichergestellt. Die Zellen wurden jeden Tag zur gleichen Uhrzeit gezählt, um einen einheitlichen zeitlichen Abstand zwischen den einzelnen Zählungen zu gewährleisten. Des Weiteren wurde jedes Assay doppelt geführt, die Zellen von zwei unterschiedlichen Beobachtern gezählt und die Ergebnisse gemittelt (Iloki Assanga, 2013).

5.1.5 Echtzeit-Polymerasenkettenreaktion (RT-PCR)

Die Polymerasenkettenreaktion ermöglicht die DNA exponentiell zu vervielfältigen, wobei beliebig viele Kopien einer bestimmten DNA-Sequenz erzeugt werden können. Durch mehrere thermische Zyklen aus wiederholtem Erhitzen und Abkühlen kommt es zur Schmelzung und der enzymatischen Replikation der DNA. Als Bausteine benötigt man ein DNA-Template, zwei Primer, die jeweils Start- und Endpunkt der zu vervielfältigten DNA definieren, und das Enzym DNA-Polymerase (VanGuilder, Vrana, & Freeman, 2008).

In dieser Studie wurde anhand des LightCycler 96-Real-Time PCR-System (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, Indiana, USA) eine Echtzeit-PCR durchgeführt. Es wurde das Genexpressionsprofil der unstimulierten und stimulierten Zellen gemäß der vier Gruppen auf die Marker RUNX-2, ALP, PPAR γ , LPL, ACAN, Nanog, Oct4 und Sox2 getestet. Die Echtzeit-PCR erfolgt nach dem gleichen Verfahren wie bei einer allgemeinen PCR. Der Unterschied zur Standard-PCR besteht darin, dass die amplifizierte DNA in Echtzeit gemessen werden kann, wohingegen bei der Standard-PCR die Messung zum Ende der Reaktion erfolgt. Mit Hilfe von fluoreszierenden Farbstoffen, die sich auf den Sonden des Light Cyclers befinden, können die entstandenen DNA-Produkte durch Bindung an die DNA detektiert werden. Nach jedem Zyklus (Denaturierung, Primer-Annealing und Extension) kann eine Messung erfolgen. Durch die automatisierte Technik mit

sekundenschnellem Temperaturwechsel konnten relativ schnelle und präzise Ergebnisse erzielt werden.

5.1.6 Quantitative und qualitative Differenzierung von stimulierten G-MSCs

Aufbauend auf vorherigen Studien, die zeigten, dass eine chronische entzündliche Mikroumgebung, wie die bei einer Parodontitis auftritt, die Anzahl oder das Expressionsprofil von Stammzellen nicht negativ beeinflussen (Tomasello et al., 2017; Yang et al., 2013), wurde getestet, welchen Einfluss die Stimulation von G-MSCs mit Entzündung, Retinol und die Kombination aus Retinol/Entzündung auf deren Fähigkeit zur multipotenten Differenzierung aufweist.

Zunächst wurden die G-MSCs 7 Tage lang entsprechend der vier experimentellen Gruppen stimuliert. Anschließend folgten die Stimulationen für eine osteogene, adipogene und chondrogene Differenzierung nach Standardprotokollen mit anschließender Färbung (Dominici et al., 2006). Basierend auf den Protokollen von Mahmood et al. wurde eine quantifizierte Alizarin-Rotfärbung durchgeführt und bei OD405 gegen eine standardisierte Alizarin-Rot-Konzentration gemessen (Mahmood et al., 2011). Für die quantifizierte Oil-Red-O-Färbung wurde nach Protokollen von Sun et al. gearbeitet und anschließend bei OD405 gegen einen Oil-Red-O-Standard gemessen (Sun et al., 2016). Zusätzlich wurde auf die osteo-spezifischen Differenzierungsmarker RUNX-2 und ALP, auf die adipo-spezifischen Differenzierungsmarker PPAR- γ und LPL und auf den chondro-spezifischen Differenzierungsmarker ACAN mittels Echtzeit-PCR getestet.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

Die parodontale Wundheilung erfolgt typischerweise in fünf Phasen: Blutung, Entzündung, Rekrutierung von Zellen, Proliferation und Differenzierung (Yin et al., 2017). Klinisch gesehen erfolgt die parodontale Reparatur und/oder Regeneration hauptsächlich in einem lokalen entzündeten Mikromilieu. Erst kürzlich stießen G-MSCs auf großes Interesse auf dem Gebiet der Heilung bzw. Regeneration, da sie bemerkenswerte proliferativen/regenerative und entzündungsresistente Eigenschaften aufweisen. Mehrere Studien haben gezeigt, wie das lokale entzündliche Mikromilieu das reparative/regenerative Verhalten des Gewebes

verbessern kann (F. Zhang et al., 2017; Zhou et al., 2017). Dabei beeinflussen entzündliche Zytokine das Ergebnis und die immunmodulatorischen und regenerativen Eigenschaften der Stamm-/Vorläuferzellen. Deshalb ist eine Untersuchung des Einflusses entzündlicher Zytokine auf durch Stamm-/Progenitorzellen vermittelte parodontale Heilungsprozesse von zentraler Bedeutung. Es zeigten kürzlich durchgeführte Studien, dass das Vorhandensein von entzündlichen Zytokinen das Regenerationspotenzial von Stamm-/Progenitorzellen bis zu einem gewissen Grad positiv stimulieren kann (Fawzy El-Sayed et al., 2019; F. Zhang et al., 2017; Zhou et al., 2017). Eine anfängliche kurzzeitige Entzündungsphase scheint dabei die Proliferation von G-MSCs zu stimulieren, während jedoch eine fortbestehende Entzündung sich negativ auf die G-MSCs auswirkt. Deshalb ist ein anschließendes Abklingen der Entzündung durch eine wirksame entzündungshemmende Phase für die Differenzierung/Proliferation der Zellen wesentlich.

Vitamin A und seine Metaboliten üben dosisabhängig immunmodulatorische Eigenschaften auf Stamm-/Progenitorzellen, Makrophagen, dendritische Zellen, B-Zellen und T-Zellen aus. Dabei rufen sie tolerogene und entzündungsfördernde Reaktionen hervor (Erkelens & Mebius, 2017).

Des Weiteren zeigen sie die Fähigkeit, die Lebensfähigkeit der Zellen zu erhöhen, den Zelltod (Apoptose) zu verringern und dem Entzündungsprozess entgegenzuwirken, der durch die Lipopolysaccharid-vermittelte TLR4-Aktivierung ausgelöst wird (Abdelhamid, Hussein, Ghanem, & Eissa, 2017). Dies zeigt, dass der Vitamin-A-Metabolit Retinsäure als wirksamer Immunmodulator dienen kann.

Die Migration von Stamm-/Progenitorzellen könnte über Vitamin A durch Erhöhung der Expression und Aktivität der Matrix-Metallproteinase-2/-9 (MMP-2/-9) und Hemmung der Caspase-3-Enzymaktivität (Pourjafar, Saidijam, Etemadi, & Najafi, 2017) stimuliert werden. Zusätzlich könnte Vitamin A die Migration durch einen biphasischen Effekt beeinflussen, welcher durch zelluläre Differenzierungsprozesse (S. Zhang et al., 2016) oder Dedifferenzierungsprozesse (Hore, 2017) beschrieben wird. Die Migration von Stamm-/Progenitorzellen durch die extrazelluläre Matrix (ECM) umfasst verschiedene Arten von Molekülen, darunter auch Matrix-Metallproteinase. Die Matrix-Metallproteinase sind in der extrazellulären Matrix lokalisiert, welche sie im aktiven Zustand abbauen können. Ausgeschieden werden

sie als Proenzyme, deren Aktivierung durch Zn^{2+} für die Regulierung der MMP-Aktivität entscheidend ist. Sie interagieren mit Zelloberflächenrezeptoren und regulieren deren biologische Aktivitäten, einschließlich Migration, Angiogenese und Apoptose. Es wurde gezeigt, dass mit all-trans-Retinsäure (ATRA) vorbehandelte MSCs die Expression und Aktivität von MMP-2/-9 erhöhten. Dies hat zur Folge, dass die Zellmigration dadurch positiv induziert wird. Des Weiteren wurde in der Studie beobachtet, dass die Caspase-3-Aktivität, die eine Rolle in der Apoptose spielt, bei den mit ATRA vorbehandelten MSCs signifikant abnahm. Aus diesem Grund kann argumentiert werden, dass ATRA die Lebensfähigkeit der Stammzellen erhöht und die Proliferation der MSCs durch Verringerung der Caspase 3-Aktivität induziert (Pourjafar et al., 2017).

In der vorliegenden Studie zeigten G-MSCs, ähnlich wie in früheren in-vitro Studien (El-Sayed et al., 2015; Fournier et al., 2010), alle vordefinierten Eigenschaften von Stamm-/Progenitorzellen: G-MSCs bildeten koloniebildende Einheiten (KBE) aus, 95 % der MSC-Populationen wiesen die charakteristische Expression (CD105, CD73, CD90) bzw. Abwesenheit (CD45, CD34, CD14) von Oberflächenmarker nach und es wurde ein multipotentes Differenzierungspotential zu Osteoblasten, Adipozyten und Chondroblasten vorgewiesen (Dominici et al., 2006). Diese Eigenschaften beweisen, dass isolierte gingivale mesenchymale Stammzellen vorliegen, welche für das Hauptexperiment verwendet wurden.

Die G-MSCs wurden mit einem entzündungsfördernden Zytokin-„Cocktail“ (IL-1 β , TNF- α und IFN- γ) (F. Zhang et al., 2017), mit Retinol (S. Zhang et al., 2016) oder mit der Kombination beider auf deren Pluripotenz, Proliferation und Differenzierungskapazität getestet. Es wurde vermutet, dass Vitamin-A- und Wnt/ β -Catenin-Signale komplementäre, aber im Wesentlichen getrennte Rollen bei der anterior-posterioren Strukturierung spielen (Onai et al., 2009). Die Wnt/ β -Catenin-Signale sind für die osteogene Differenzierung von Stamm-/Progenitorzellen von entscheidender Bedeutung, indem sie mit mehreren Kernrezeptoren, einschließlich dem Retinsäure-Rezeptor (S. Zhang et al., 2016), interagieren. Das kanonische Wnt-Signal reicht für die osteogene Differenzierung alleine nicht aus, um die Knochenbildung zu induzieren. Dieser Prozess kann jedoch teilweise durch all-trans-Retinsäure reguliert werden.

In dieser Studie aktivierten Retinol und die entzündliche Stimulation von G-MSCs

den kanonischen Wnt/ β -Catenin-Signalweg, was zu einem signifikanten Abbau und einer Reduktion der intrazellulären β -Catenin-Spiegel führte. Dies könnte möglicherweise deren Stammzeleigenschaften (Rasmussen, Ortolano, Romero-Morales, & Gama, 2018), Proliferations- (N. Liu et al., 2011) und Differenzierungsfähigkeit (Kong et al., 2013) beeinflussen. Dabei wurde in den Studien gezeigt, dass TNF- α in entzündlichen Mikroumgebungen die Phosphorylierung von Glykogensynthasekinase 3 β (GSK3- β) induziert, die eine Hemmung der GSK3- β zu Folge hat. Diese Phosphorylierung setzt β -Catenin frei und führt zu einer nuklearen Akkumulation von β -Catenin, zur Bildung von β -Catenin/Lymphozyten-Enhancer-Bindungsfaktor 1 (Lef-1)-Komplexen und schließlich zur Unterdrückung der Runx2-assoziierten Differenzierung der Osteoblasten (Kong et al., 2013). Während die Akkumulation von β -Catenin die osteogene Differenzierung verringerte, wurde die Proliferation von parodontalen Stammzellen in einer anderen Studie gefördert.

Nanog, Oct4 (Octamer binding transcription factor 4) und Sox2 (SRY-related HMG-box 2) bilden ein transkriptionsregulierendes Protein-Netzwerk, welches den pluripotenten Status von Stammzellen aufrechterhält. In diesem Experiment wurde die Wirkung des entzündlichen „Cocktails“ zusammen mit Retinol auf die Expression der Hauptpluripotenzmarker Nanog, Oct4 und Sox2 nach 24, 72 und 120 Stunden untersucht. Ähnlich wie bei früheren Untersuchungen zur Expression von Pluripotenz-Kernmarker wurden in dieser Studie die Expressionen von Nanog, Oct4 und Sox2 durch Entzündung nicht negativ beeinflusst, sondern deutlich hochreguliert (Tomasello et al., 2017). Durch die Stimulation mit Retinol und die Kombination von Entzündung mit Retinol wurden Nanog und Oct4 in G-MSCs hochreguliert, jedoch weniger als bei reiner Entzündung. Der beobachtete Anstieg der Pluripotenzmarker Nanog und Oct4 durch Retinol kann hauptsächlich auf die Fähigkeit zurückgeführt werden, die Ten-Eleven-Translokationsdemethylasen (TET) zu stimulieren, die DNA-Methylierung zu entfernen und epigenetische Reprogrammierungsereignisse mit erhöhter Pluripotenz in G-MSCs zu steuern (Hore, 2017; Hore et al., 2016).

Während der Differenzierung von Zellen wird ein epigenetisches Gedächtnis, insbesondere durch DNA-Methylierung, aufgebaut. Um naive (induzierte) pluripotente Stammzellen zu erzeugen, muss dieses Gedächtnis aktiv entfernt werden. Ein Schlüsselweg für die aktive DNA-Demethylierung ist die TET-Proteinfamilie. Diese katalysieren die Oxidation von 5-Methylcytosin (5mC) zu 5-

Hydroxymethylcytosin (5hmC). Dabei wirkt Retinol als Modulator des TET-Spiegels. Obwohl die Gene Nanog und Oct4 zwei Varianten aufweisen, nämlich Nanog1 und Nanog2, sowie Oct4A und Oct4B, wurde gezeigt, dass die Transkriptionsvarianten Nanog1 und Nanog2 bei der Aktivierung spezifischer Stammzellfunktionen funktionell äquivalent sind (Eberle, Pless, Braun, Dingermann, & Marschalek, 2010).

Bei Verwendung eines unspezifisch ausgelegten POU5F1-Primers zur Untersuchung der Oct4-mRNA-Expression erfolgt keine Unterscheidung zwischen den beiden Oct4-Varianten Oct4A und Oct4B, da beide eine große Ähnlichkeit in ihrer Basenpaar-Sequenz aufweisen (Liedtke, Stephan, & Kogler, 2008; Meng et al., 2018). Der Transkriptionsfaktor Oct4 codiert ein Protein, das spezifisch in embryonalen Stammzellen exprimiert wird und eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Pluripotenz und der Selbsterneuerung spielt (Scholer, Ruppert, Suzuki, Chowdhury, & Gruss, 1990). Durch die Fähigkeit zur Regulierung der Pluripotenz und der Selbsterneuerung von Stammzellen zeichnet sich Oct4 somit zu einem Pluripotenzmarker aus. Durch alternatives Spleißen können die Varianten Oct4A und Oct4B erzeugt werden. Es ist bekannt, dass Oct4A die Eigenschaften von Stammzellen aufrechterhält, eine Selbsterneuerung verleiht und eine Kernlokalisation aufweist, wohingegen vergleichsweise Oct4B hauptsächlich im zytoplasmatischen Kompartiment der Zelle exprimiert wird und Einfluss auf die somatische Zellaktivitäten, Zellzyklusregulation und Apoptose-Prävention hat (Liedtke et al., 2008; Meng et al., 2018). Lee et al. zeigten, dass nur die Oct4A-Isoform für die Stammzeleigenschaften verantwortlich war, während Oct4B nicht ausreichte die Selbsterneuerung oder den undifferenzierten Zustand der Stammzellen aufrechtzuerhalten (Lee, Kim, Rho, Han, & Kim, 2006). Somit zeigt sich Oct4A als eigentlicher Pluripotenzmarker. Aus diesem Grund sollten jedoch alle Ergebnisse bezüglich der Oct4-Expression mit Vorsicht interpretiert werden.

Im Gegensatz zu einem früheren Bericht (Khillan, 2014) verringerte die Stimulation mit Retinol in der vorliegenden Studie schließlich die Sox2-Expression in den G-MSCs. Dies könnte auf die Divergenz des Ursprungs der Zellen und ihre charakteristischen Reaktionen sowie den Unterschied in den Konzentrationen des Retinols zwischen beiden Studien zurückführen.

Das primäre Stadium eines parodontalen regenerativen/reparativen Ansatzes bleibt die Zellproliferation um ausreichende Zellmengen für die nachfolgenden Stadien der Zellmigration /-homing und der funktionellen Differenzierung zu erhalten. Eines der

entscheidenden Merkmale von Stamm- /Vorläuferzellen ist ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Produktion von KBE.

Nach einer 24-stündigen Verzögerungsphase verstärkten die Entzündungsstimuli in der vorliegenden Studie, ähnlich wie in früheren Untersuchungen (F. Zhang et al., 2017), die zelluläre Proliferation von G-MSCs für 72 Stunden und trieben sie bei Langzeitstimulation zur Apoptose. Ähnlich wie bei früheren Untersuchungen modulierte Retinol die Zellproliferation (Davis & Vucic, 1988). Anfänglich nach 24 und 72 Stunden verringerte Retinol die Zellproliferation (Kunzler et al., 2017) und deutet darauf hin sogar den zellproliferationsstimulierenden Einfluss von Entzündungen in der Retinol-/Entzündungsgruppe abzuschwächen.

Dennoch zeigte Retinol, ähnlich wie in früheren Untersuchungen (Yoo et al., 2007), ein umgekehrt verzögertes Langzeitpotential für die proliferative Induktion über 14 Tage und signifikant höhere KBE. Andererseits könnte die beobachtete kurzzeitige entzündliche Stimulation der Zellproliferation auf einen aktivierten Wnt/ β -Catenin-Signalweg und eine Unterdrückung des nichtkanonischen Wnt/ Ca^{2+} -Signalweges zurückgeführt werden (N. Liu et al., 2011). Dies wurde durch die beobachtete Verringerung des intrazellulären Gesamt- β -Catenin-Spiegels in den stimulierten Gruppen deutlich.

Bei Langzeitstimulation könnte $\text{TNF-}\alpha$ jedoch eine Apoptose von Stamm- /Vorläuferzellen induziert haben, insbesondere in Kombination mit $\text{IFN-}\gamma$, wie im aktuellen entzündlichen „Cocktail“. Durch Transformation der Signalübertragung der $\text{IFN-}\gamma$ -aktivierten, nicht-apoptotischen Form der *Tumor necrosis factor receptor superfamily member 6* (Fas) in einen Caspase-3- und Caspase-8-assoziierten proapoptotischen Signalweg, konnte die apoptotische Signalübertragung in den G-MSCs aktiviert werden (Y. Liu et al., 2011). Es scheint, dass Retinol und die entzündliche Stimulation entgegengesetzte biphasische Effekte auf die kurz- und langfristige Zellproliferation ausüben.

G-MSCs, die durch den entzündlichen „Cocktail“ oder das Retinol stimuliert wurden, zeigten hinsichtlich ihres multipotenten Differenzierungspotentials eine hochregulierte osteogene, adipogene und chondrogene Differenzierung.

Insbesondere die Kombination von Entzündung und Retinol erwies sich als vorteilhaft, was die multipotente Differenzierung der G-MSCs angeht. Ähnlich wie bei früheren Untersuchungen (S. Zhang et al., 2016) regulierte Vitamin A die Expression von ALP und die Bildung von mineralisierten Knötchen. Hierbei spielte

die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs mit einer signifikanten Reduktion des gesamten intrazellulären β -Catenins in der Entzündungs-, Retinol- und Entzündungs-/Retinol-Gruppe eine signifikante Rolle. Der intrazelluläre Aufbau von nuklearem β -Catenin mit seiner Translokation und Aktivierung des Lymphozyten-Enhancer-Bindungsfaktors-1 (Lef-1) unterdrückt schließlich die Differenzierung der Osteoblasten im Zusammenhang mit den für die Osteogenese essentiellen Transkriptionsfaktoren RUNX2/Osterix (Osx) (Kong et al., 2013). Daher würde die beobachtete Herabregulierung des gesamten intrazellulären β -Catenins, ähnlich wie die Steigerung der Proliferation, die Differenzierungsfähigkeit von G-MSCs zusätzlich steigern. Bemerkenswerterweise wurde in der Retinol-/Entzündungsgruppe das höchste multipotente Differenzierungspotential festgestellt, was auf mögliche synergistische Wirkungen ihrer Anwendung hinweist.

Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Ergebnisse demnach verbesserte Eigenschaften für G-MSCs, die unter kontrollierten, leicht entzündlichen Mikroumgebungen und Retinol kultiviert wurden. Die beobachteten Eigenschaften schienen mit der Aktivierung des intrazellulären Wnt/ β -Catenin-Weges verbunden zu sein.

Ähnlich wie bei früheren Ergebnissen, verstärkte die kontrollierte entzündliche Mikroumgebung die anfängliche Zellproliferation, wohingegen Retinol in Langzeitkulturen hervorragende Ergebnisse erzielen würde. Eine kontrollierte entzündliche Mikroumgebung und Retinol besitzen die Fähigkeit, die Pluripotenzmarker von G-MSCs sowie deren Differenzierungspotential differenziell zu erhöhen, wobei sich herausstellte, dass ihre Kombination einen weiteren synergistischen Effekt hat.

Als Fazit dieser vorliegenden Studie zeigen die vorliegenden Beobachtungen, dass eine zeitlich begrenzte anfängliche kontrollierte Entzündungsreaktion von G-MSCs, die durch eine verzögerte Stimulation mit Retinol hervorgerufen wird, und schließlich eine Retinol-/Entzündungs-Kombination, sobald die Zellen in ihrem Differenzierungsstadium angekommen sind, ein innovatives Muster zur Verfeinerung ihrer Eigenschaften von Stamm-/Progenitorzellen bieten könnten.

6. Zusammenfassung

Parodontitis ist eine Entzündung des Zahnhalteapparats, welche unbehandelt zur Destruktion von Desmodont, Zement, Alveolarknochen und Gingiva führt. Die biologische Reaktion auf die parodontalen Pathogene und die damit verbundenen Virulenzfaktoren beinhaltet eine massive Freisetzung proinflammatorischer Zytokine in den parodontalen Geweben, einschließlich Interleukin-1- β (IL-1- β), Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-6 (IL-6), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und später Interferon- γ (IFN- γ). Diese entzündlichen Zytokine beeinflussen dabei den Verlauf von Parodontitis, Reparatur und Regeneration. Gingivale mesenchymale Stamm-/Vorläuferzellen (G-MSCs) zeigen parodontale reparative/regenerative Fähigkeiten mit Resistenz gegen Entzündungsreize und lokale immunmodulatorische Eigenschaften.

Vitamin A und seine Metaboliten sind entzündungsmodulierende Biomoleküle, die zusammen mit dem lokalen entzündlichen Mikromilieu die verschiedenen physiologischen Wirkungen wie Proliferation, Stoffwechsel, Differenzierung und Zellwachstum/Apoptose von G-MSCs beeinflussen.

Darauf aufbauend war das Ziel dieser Arbeit die erstmalige Untersuchung der kontrollierten Entzündungs- und Retinol-Effekte, isoliert und kombiniert, auf das Pluripotenz-, Proliferations- und Differenzierungspotential von G-MSCs in-vitro.

Um Stammzellen für das aktuelle Experiment zu gewinnen, wurde Gingiva, nach Extraktion von dritten Molaren, isoliert. G-MSCs (n = 5) wurden STRO-1-immunmagnetisch sortiert (MACS-Sorting), wodurch die Stammzellen, die MACS-positiven Zellen von den anderen Zellen, MACS-negativen Zellen, getrennt wurden. Um nachzuweisen, dass es sich bei den MACS-positiven Zellen um Stammzellen handelt, wurde diese entsprechend der definierten Kriterien des International Society for Cellular Therapy (ISCT) charakterisiert (Dominici et al., 2006):

a) Adhärenz an Gewebekulturplatten und Bildung von koloniebildenden Einheiten nach 14 Tagen, b) die Expression der Oberflächenantigene CD73, CD90 und CD105 bzw. keine Expression von CD14, CD34 und CD45 mittels Fluoreszenz- (FACS-) Analyse, c) das Vorweisen eines multipotenten Differenzierungspotenzial (osteogen, adipogen und chondrogen).

Im Rahmen des Hauptexperiments wurden die G-MSCs entsprechend vier Gruppen

stimuliert: Die Kontrollgruppe wurde in basischem Medium, die Entzündungsgruppe in basischen Medium mit Entzündungszytokinen (IL-1 β (1 ng/ml), TNF- α (10 ng/ml) und IFN- γ (100 ng/ml)), die Retinolgruppe in basischem Medium mit Retinol (20 μ mol/l) und schließlich die Entzündungs-/Retinolgruppe mit Retinol (20 μ mol/l), das dem Entzündungsmedium zugesetzt wurde, kultiviert.

Untersucht wurden die β -Catenin-Spiegel nach 1 Stunde, die Zellproliferation über 14 Tage und koloniebildende Einheiten (KBE) nach 14 Tagen. Pluripotenz-Genexpressionen wurden nach 1, 3 und 5 Tagen mittels Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) untersucht. Nach 5 Tagen wurde das Differenzierungspotenzial unter Verwendung von qualitativer und quantitativer Histochemie und RT-PCR bewertet. Außerdem wurde eine osteogene, adipogene und chondrogene Differenzierungsreihe untersucht.

Es zeigte, dass das intrazelluläre β -Catenin in den stimulierten Gruppen signifikant abnahm. Die Zellproliferation zeigte nach 72 Stunden die stärkste Ausprägung in der Kontroll- und Entzündungsgruppe, gefolgt von der Retinolgruppe. Nach 14 Tagen wies die Retinolgruppe die höchsten koloniebildenden Einheiten auf. Auf mRNA Ebene wurde Nanog am häufigsten in der Entzündungs- und Retinolgruppe exprimiert. Die Entzündung erhöhte die Sox2-Expression signifikant, während die Expression in der Retinol- und Entzündungs- /Retinolgruppe verringert war. Bei der Untersuchung der multipotenten Differenzierung wies die Retinol-/Entzündungsgruppe das höchste Potential auf.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine kontrollierte kurzzeitige Stimulation mit Entzündung bzw. Retinol den Wnt/ β -Catenin-Signalweg aktivieren und die Pluripotenz, Proliferation und Differenzierung von G-MSCs positiv beeinflussen. Die vorliegenden Ergebnisse liefern weitere Einblicke in die entzündlich-regenerativen Wechselwirkungen und ihr Modulationspotential für die durch G-MSCs vermittelte parodontale Reparatur/Regeneration.

7. Literaturverzeichnis

- Abdelhamid, L., Hussein, H., Ghanem, M., & Eissa, N. (2017). Retinoic acid-mediated anti-inflammatory responses in equine immune cells stimulated by LPS and allogeneic mesenchymal stem cells. *Res Vet Sci*, *114*, 225-232. doi:10.1016/j.rvsc.2017.05.006
- Adler, P. N. (1992). The genetic control of tissue polarity in *Drosophila*. *Bioessays*, *14*(11), 735-741. doi:10.1002/bies.950141103
- Amin, H. D., Olsen, I., Knowles, J., & Donos, N. (2011). A procedure for identifying stem cell compartments with multi-lineage differentiation potential. *Analyst*, *136*(7), 1440-1449. doi:10.1039/c0an00816h
- Bartold, P. M., McCulloch, C. A., Narayanan, A. S., & Pitaru, S. (2000). Tissue engineering: a new paradigm for periodontal regeneration based on molecular and cell biology. *Periodontol 2000*, *24*, 253-269. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11276871>
- Bi, Y., Gong, M., Zhang, X., Zhang, X., Jiang, W., Zhang, Y., . . . Li, T. (2010). Pre-activation of retinoid signaling facilitates neuronal differentiation of mesenchymal stem cells. *Dev Growth Differ*, *52*(5), 419-431. doi:10.1111/j.1440-169X.2010.01182.x
- Bonner, W. A., Hulett, H. R., Sweet, R. G., & Herzenberg, L. A. (1972). Fluorescence activated cell sorting. *Rev Sci Instrum*, *43*(3), 404-409. doi:10.1063/1.1685647
- Cekici, A., Kantarci, A., Hasturk, H., & Van Dyke, T. E. (2014). Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol 2000*, *64*(1), 57-80. doi:10.1111/prd.12002
- Cho, M. I., & Garant, P. R. (2000). Development and general structure of the periodontium. *Periodontol 2000*, *24*, 9-27. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11276876>
- Davis, B. H., & Vucic, A. (1988). The effect of retinol on Ito cell proliferation in vitro. *Hepatology*, *8*(4), 788-793. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3391506>
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., . . . Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal

- stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315-317. doi:10.1080/14653240600855905
- Dutzan, N., Vernal, R., Hernandez, M., Dezerega, A., Rivera, O., Silva, N., . . . Gamonal, J. (2009). Levels of interferon-gamma and transcription factor T-bet in progressive periodontal lesions in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol*, 80(2), 290-296. doi:10.1902/jop.2009.080287
- Eberle, I., Pless, B., Braun, M., Dingeremann, T., & Marschalek, R. (2010). Transcriptional properties of human NANOG1 and NANOG2 in acute leukemic cells. *Nucleic Acids Res*, 38(16), 5384-5395. doi:10.1093/nar/gkq307
- El-Sayed, K. M., Paris, S., Graetz, C., Kassem, N., Mekhemar, M., Ungefroren, H., . . . Dorfer, C. (2015). Isolation and characterisation of human gingival margin-derived STRO-1/MACS(+) and MACS(-) cell populations. *Int J Oral Sci*, 7(2), 80-88. doi:10.1038/ijos.2014.41
- Engvall, E., & Perlmann, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8(9), 871-874. doi:10.1016/0019-2791(71)90454-x
- Erkelens, M. N., & Mebius, R. E. (2017). Retinoic Acid and Immune Homeostasis: A Balancing Act. *Trends Immunol*, 38(3), 168-180. doi:10.1016/j.it.2016.12.006
- 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. doi:10.1007/10_2012_151
- Fawzy El-Sayed, K. M., & Dorfer, C. E. (2016). Gingival Mesenchymal Stem/Progenitor Cells: A Unique Tissue Engineering Gem. *Stem Cells Int*, 2016, 7154327. doi:10.1155/2016/7154327
- Fawzy El-Sayed, K. M., Elahmady, M., Adawi, Z., Aboushadi, N., Elnaggar, A., Eid, M., . . . Dorfer, C. E. (2019). The periodontal stem/progenitor cell inflammatory-regenerative cross talk: A new perspective. *J Periodontal Res*, 54(2), 81-94. doi:10.1111/jre.12616
- Fawzy El-Sayed, K. M., Mekhemar, M. K., Beck-Broichsitter, B. E., Bahr, T., Hegab, M., Receveur, J., . . . Dorfer, C. E. (2015). Periodontal regeneration employing gingival margin-derived stem/progenitor cells in conjunction with IL-1ra-hydrogel synthetic extracellular matrix. *J Clin Periodontol*, 42(5), 448-457. doi:10.1111/jcpe.12401

- Fawzy El-Sayed, K. M., Paris, S., Becker, S., Kassem, N., Ungefroren, H., Fandrich, F., . . . Dorfer, C. (2012). Isolation and characterization of multipotent postnatal stem/progenitor cells from human alveolar bone proper. *J Craniomaxillofac Surg*, *40*(8), 735-742. doi:10.1016/j.jcms.2012.01.010
- Fawzy El-Sayed, K. M., Paris, S., Becker, S. T., Neuschl, M., De Buhr, W., Salzer, S., . . . Dorfer, C. E. (2012). Periodontal regeneration employing gingival margin-derived stem/progenitor cells: an animal study. *J Clin Periodontol*, *39*(9), 861-870. doi:10.1111/j.1600-051X.2012.01904.x
- Fawzy-El-Sayed, K., Mekhemar, M., Adam-Klages, S., Kabelitz, D., & Dorfer, C. (2016). TIR expression profile of human gingival margin-derived stem progenitor cells. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, *21*(1), e30-38. doi:10.4317/medoral.20593
- Fournier, B. P., Ferre, F. C., Couty, L., Lataillade, J. J., Gourven, M., Naveau, A., . . . Gogly, B. (2010). Multipotent progenitor cells in gingival connective tissue. *Tissue Eng Part A*, *16*(9), 2891-2899. doi:10.1089/ten.TEA.2009.0796
- 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*(4), 331-340. doi:10.1097/00007890-197404000-00001
- Ge, S., Mrozik, K. M., Menicanin, D., Gronthos, S., & Bartold, P. M. (2012). Isolation and characterization of mesenchymal stem cell-like cells from healthy and inflamed gingival tissue: potential use for clinical therapy. *Regen Med*, *7*(6), 819-832. doi:10.2217/rme.12.61
- Gordon, M. D., & Nusse, R. (2006). Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J Biol Chem*, *281*(32), 22429-22433. doi:10.1074/jbc.R600015200
- Green, H. N., & Mellanby, E. (1928). Vitamin a as an Anti-Infective Agent. *Br Med J*, *2*(3537), 691-696. doi:10.1136/bmj.2.3537.691
- Hore, T. A. (2017). Modulating epigenetic memory through vitamins and TET: implications for regenerative medicine and cancer treatment. *Epigenomics*, *9*(6), 863-871. doi:10.2217/epi-2017-0021
- Hore, T. A., von Meyenn, F., Ravichandran, M., Bachman, M., Ficz, G., Oxley, D., . . . Reik, W. (2016). Retinol and ascorbate drive erasure of epigenetic memory

- and enhance reprogramming to naive pluripotency by complementary mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(43), 12202-12207. doi:10.1073/pnas.1608679113
- Huang, N. F., & Li, S. (2008). Mesenchymal stem cells for vascular regeneration. *Regen Med*, 3(6), 877-892. doi:10.2217/17460751.3.6.877
- Iloki Assanga, S. B., Gil-Salido, A. A., Lewis Luján, L. M., Rosas-Durazo, A., Acosta-Silva, A. L., Rivera-Castañeda, E. G. and Rubio-Pino, J. L. (2013). Cell growth curves for different cell lines and their relationship with biological activities . *International Journal for Biotechnology and Molecular Biology Research*, Vol. 4(4), pp. 60-70. doi:10.5897/IJBMBR2013.0154
- Imdad, A., Herzer, K., Mayo-Wilson, E., Yakoob, M. Y., & Bhutta, Z. A. (2010). Vitamin A supplementation for preventing morbidity and mortality in children from 6 months to 5 years of age. *Cochrane Database Syst Rev*(12), CD008524. doi:10.1002/14651858.CD008524.pub2
- Khillan, J. S. (2014). Vitamin A/retinol and maintenance of pluripotency of stem cells. *Nutrients*, 6(3), 1209-1222. doi:10.3390/nu6031209
- Kimelman, D., & Xu, W. (2006). beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. *Oncogene*, 25(57), 7482-7491. doi:10.1038/sj.onc.1210055
- Komiya, Y., & Habas, R. (2008). Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis*, 4(2), 68-75. doi:10.4161/org.4.2.5851
- Kong, X., Liu, Y., Ye, R., Zhu, B., Zhu, Y., Liu, X., . . . Jin, Y. (2013). GSK3beta is a checkpoint for TNF-alpha-mediated impaired osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in inflammatory microenvironments. *Biochim Biophys Acta*, 1830(11), 5119-5129. doi:10.1016/j.bbagen.2013.07.027
- Kuhl, M., Sheldahl, L. C., Malbon, C. C., & Moon, R. T. (2000). Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II is stimulated by Wnt and Frizzled homologs and promotes ventral cell fates in *Xenopus*. *J Biol Chem*, 275(17), 12701-12711. doi:10.1074/jbc.275.17.12701
- Kunzler, A., Kolling, E. A., da Silva, J. D., Jr., Gasparotto, J., de Bittencourt Pasquali, M. A., Moreira, J. C. F., & Gelain, D. P. (2017). Retinol (Vitamin A) Increases alpha-Synuclein, beta-Amyloid Peptide, Tau Phosphorylation and RAGE Content in Human SH-SY5Y Neuronal Cell Line. *Neurochem Res*, 42(10), 2788-2797. doi:10.1007/s11064-017-2292-y

- Lee, J., Kim, H. K., Rho, J. Y., Han, Y. M., & Kim, J. (2006). The human OCT-4 isoforms differ in their ability to confer self-renewal. *J Biol Chem*, *281*(44), 33554-33565. doi:10.1074/jbc.M603937200
- Liedtke, S., Stephan, M., & Kogler, G. (2008). Oct4 expression revisited: potential pitfalls for data misinterpretation in stem cell research. *Biol Chem*, *389*(7), 845-850. doi:10.1515/BC.2008.098
- Linden, G. J., McClean, K. M., Woodside, J. V., Patterson, C. C., Evans, A., Young, I. S., & Kee, F. (2009). Antioxidants and periodontitis in 60-70-year-old men. *J Clin Periodontol*, *36*(10), 843-849. doi:10.1111/j.1600-051X.2009.01468.x
- Liu, N., Shi, S., Deng, M., Tang, L., Zhang, G., Liu, N., . . . Jin, Y. (2011). High levels of beta-catenin signaling reduce osteogenic differentiation of stem cells in inflammatory microenvironments through inhibition of the noncanonical Wnt pathway. *J Bone Miner Res*, *26*(9), 2082-2095. doi:10.1002/jbmr.440
- Liu, Y., Wang, L., Kikuri, T., Akiyama, K., Chen, C., Xu, X., . . . Shi, S. (2011). Mesenchymal stem cell-based tissue regeneration is governed by recipient T lymphocytes via IFN-gamma and TNF-alpha. *Nat Med*, *17*(12), 1594-1601. doi:10.1038/nm.2542
- Mahmood, M., Li, Z., Casciano, D., Khodakovskaya, M. V., Chen, T., Karmakar, A., . . . Biris, A. S. (2011). Nanostructural materials increase mineralization in bone cells and affect gene expression through miRNA regulation. *J Cell Mol Med*, *15*(11), 2297-2306. doi:10.1111/j.1582-4934.2010.01234.x
- Mekhemar, M. K., Adam-Klages, S., Kabelitz, D., Dorfer, C. E., & Fawzy El-Sayed, K. M. (2018). TLR-induced immunomodulatory cytokine expression by human gingival stem/progenitor cells. *Cell Immunol*, *326*, 60-67. doi:10.1016/j.cellimm.2017.01.007
- Meng, L., Hu, H., Zhi, H., Liu, Y., Shi, F., Zhang, L., . . . Lin, A. (2018). OCT4B regulates p53 and p16 pathway genes to prevent apoptosis of breast cancer cells. *Oncol Lett*, *16*(1), 522-528. doi:10.3892/ol.2018.8607
- Miltenyi, S., Muller, W., Weichel, W., & Radbruch, A. (1990). High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry*, *11*(2), 231-238. doi:10.1002/cyto.990110203
- Molenaar, M., van de Wetering, M., Oosterwegel, M., Peterson-Maduro, J., Godsave, S., Korinek, V., . . . Clevers, H. (1996). XTcf-3 transcription factor mediates

- beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell*, *86*(3), 391-399. doi:10.1016/s0092-8674(00)80112-9
- Nath, S. G., & Raveendran, R. (2013). Microbial dysbiosis in periodontitis. *J Indian Soc Periodontol*, *17*(4), 543-545. doi:10.4103/0972-124X.118334
- Ng, T. K., Huang, L., Cao, D., Yip, Y. W., Tsang, W. M., Yam, G. H., . . . Cheung, H. S. (2015). Cigarette smoking hinders human periodontal ligament-derived stem cell proliferation, migration and differentiation potentials. *Sci Rep*, *5*, 7828. doi:10.1038/srep07828
- Nichols, F. C., & Garrison, S. W. (1987). Interferon-gamma potentiation of lipopolysaccharide-induced eicosanoid release from human monocytes. *J Interferon Res*, *7*(1), 121-129. doi:10.1089/jir.1987.7.121
- Onai, T., Lin, H. C., Schubert, M., Koop, D., Osborne, P. W., Alvarez, S., . . . Holland, L. Z. (2009). Retinoic acid and Wnt/beta-catenin have complementary roles in anterior/posterior patterning embryos of the basal chordate amphioxus. *Dev Biol*, *332*(2), 223-233. doi:10.1016/j.ydbio.2009.05.571
- Page, R. C., Offenbacher, S., Schroeder, H. E., Seymour, G. J., & Kornman, K. S. (1997). Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol 2000*, *14*, 216-248. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9567973>
- Park, J. A., Lee, J. H., Lee, H. J., Jin, B. H., & Bae, K. H. (2017). Association of Some Vitamins and Minerals with Periodontitis in a Nationally Representative Sample of Korean Young Adults. *Biol Trace Elem Res*, *178*(2), 171-179. doi:10.1007/s12011-016-0914-x
- Picot, J., Guerin, C. L., Le Van Kim, C., & Boulanger, C. M. (2012). Flow cytometry: retrospective, fundamentals and recent instrumentation. *Cytotechnology*, *64*(2), 109-130. doi:10.1007/s10616-011-9415-0
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., . . . Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, *284*(5411), 143-147. doi:10.1126/science.284.5411.143
- Plagmann, H.-C. (1998). *Lehrbuch der Parodontologie*. München: Carl Hanser Verlag
- Potempa, J., & Travis, J. (1996). Porphyromonas gingivalis proteinases in periodontitis, a review. *Acta Biochim Pol*, *43*(3), 455-465. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8922027>

- Pourjafar, M., Saidijam, M., Etemadi, K., & Najafi, R. (2017). All-trans retinoic acid enhances in vitro mesenchymal stem cells migration by targeting matrix metalloproteinases 2 and 9. *Biotechnol Lett*, *39*(8), 1263-1268. doi:10.1007/s10529-017-2350-1
- Raisz, L. G., Dietrich, J. W., Simmons, H. A., Seyberth, H. W., Hubbard, W., & Oates, J. A. (1977). Effect of prostaglandin endoperoxides and metabolites on bone resorption in vitro. *Nature*, *267*(5611), 532-534. doi:10.1038/267532a0
- Rasmussen, M. L., Ortolano, N. A., Romero-Morales, A. I., & Gama, V. (2018). Wnt Signaling and Its Impact on Mitochondrial and Cell Cycle Dynamics in Pluripotent Stem Cells. *Genes (Basel)*, *9*(2). doi:10.3390/genes9020109
- Salvi, G. E., Brown, C. E., Fujihashi, K., Kiyono, H., Smith, F. W., Beck, J. D., & Offenbacher, S. (1998). Inflammatory mediators of the terminal dentition in adult and early onset periodontitis. *J Periodontal Res*, *33*(4), 212-225. doi:10.1111/j.1600-0765.1998.tb02193.x
- Schett, G. (2011). Effects of inflammatory and anti-inflammatory cytokines on the bone. *Eur J Clin Invest*, *41*(12), 1361-1366. doi:10.1111/j.1365-2362.2011.02545.x
- 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*(6265), 435-439. doi:10.1038/344435a0
- Semenov, M. V., Habas, R., Macdonald, B. T., & He, X. (2007). SnapShot: Noncanonical Wnt Signaling Pathways. *Cell*, *131*(7), 1378. doi:10.1016/j.cell.2007.12.011
- Seo, B. M., Miura, M., Gronthos, S., Bartold, P. M., Batouli, S., Brahim, J., . . . Shi, S. (2004). Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*, *364*(9429), 149-155. doi:10.1016/S0140-6736(04)16627-0
- Sidney, L. E., Kirkham, G. R., & Buttery, L. D. (2014). Comparison of osteogenic differentiation of embryonic stem cells and primary osteoblasts revealed by responses to IL-1beta, TNF-alpha, and IFN-gamma. *Stem Cells Dev*, *23*(6), 605-617. doi:10.1089/scd.2013.0336
- Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C., & Kent, R. L., Jr. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol*, *25*(2), 134-144. doi:10.1111/j.1600-051x.1998.tb02419.x

- Solbiati, J., & Frias-Lopez, J. (2018). Metatranscriptome of the Oral Microbiome in Health and Disease. *J Dent Res*, *97*(5), 492-500.
doi:10.1177/0022034518761644
- Sonoyama, W., Liu, Y., Fang, D., Yamaza, T., Seo, B. M., Zhang, C., . . . Shi, S. (2006). Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS One*, *1*, e79. doi:10.1371/journal.pone.0000079
- Sugimura, R., & Li, L. (2010). Noncanonical Wnt signaling in vertebrate development, stem cells, and diseases. *Birth Defects Res C Embryo Today*, *90*(4), 243-256.
doi:10.1002/bdrc.20195
- Sun, J., Ye, X., Xie, M., & Ye, J. (2016). Induction of triglyceride accumulation and mitochondrial maintenance in muscle cells by lactate. *Sci Rep*, *6*, 33732.
doi:10.1038/srep33732
- Tang, L., Li, N., Xie, H., & Jin, Y. (2011). Characterization of mesenchymal stem cells from human normal and hyperplastic gingiva. *J Cell Physiol*, *226*(3), 832-842.
doi:10.1002/jcp.22405
- Tomasello, L., Mauceri, R., Coppola, A., Pitrone, M., Pizzo, G., Campisi, G., . . . Giordano, C. (2017). Mesenchymal stem cells derived from inflamed dental pulpal and gingival tissue: a potential application for bone formation. *Stem Cell Res Ther*, *8*(1), 179. doi:10.1186/s13287-017-0633-z
- Tracey, K. J. (2002). The inflammatory reflex. *Nature*, *420*(6917), 853-859.
doi:10.1038/nature01321
- VanGuilder, H. D., Vrana, K. E., & Freeman, W. M. (2008). Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques*, *44*(5), 619-626.
doi:10.2144/000112776
- Vistica, D. T., Skehan, P., Scudiero, D., Monks, A., Pittman, A., & Boyd, M. R. (1991). Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Res*, *51*(10), 2515-2520. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2021931>
- Waddington, R. J., Moseley, R., & Embery, G. (2000). Reactive oxygen species: a potential role in the pathogenesis of periodontal diseases. *Oral Dis*, *6*(3), 138-151. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10822357>
- Wang, L., Wang, J., Jin, Y., Gao, H., & Lin, X. (2014). Oral administration of all-trans retinoic acid suppresses experimental periodontitis by modulating the

- Th17/Treg imbalance. *J Periodontol*, 85(5), 740-750.
doi:10.1902/jop.2013.130132
- Wingrove, J. A., DiScipio, R. G., Chen, Z., Potempa, J., Travis, J., & Hugli, T. E. (1992). Activation of complement components C3 and C5 by a cysteine proteinase (gingipain-1) from *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis*. *J Biol Chem*, 267(26), 18902-18907. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1527018>
- Yang, H., Gao, L. N., An, Y., Hu, C. H., Jin, F., Zhou, J., . . . Chen, F. M. (2013). Comparison of mesenchymal stem cells derived from gingival tissue and periodontal ligament in different incubation conditions. *Biomaterials*, 34(29), 7033-7047. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.05.025
- Yin, Y., Li, X., He, X. T., Wu, R. X., Sun, H. H., & Chen, F. M. (2017). Leveraging Stem Cell Homing for Therapeutic Regeneration. *J Dent Res*, 96(6), 601-609. doi:10.1177/0022034517706070
- Yoo, H. G., Chang, I. Y., Pyo, H. K., Kang, Y. J., Lee, S. H., Kwon, O. S., . . . Kim, K. H. (2007). The additive effects of minoxidil and retinol on human hair growth in vitro. *Biol Pharm Bull*, 30(1), 21-26. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17202653>
- Zhang, F., Si, M., Wang, H., Mekhemar, M. K., Dorfer, C. E., & Fawzy El-Sayed, K. M. (2017). IL-1/TNF-alpha Inflammatory and Anti-Inflammatory Synchronization Affects Gingival Stem/Progenitor Cells' Regenerative Attributes. *Stem Cells Int*, 2017, 1349481. doi:10.1155/2017/1349481
- Zhang, S., Chen, X., Hu, Y., Wu, J., Cao, Q., Chen, S., & Gao, Y. (2016). All-trans retinoic acid modulates Wnt3A-induced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells via activating the PI3K/AKT/GSK3beta signalling pathway. *Mol Cell Endocrinol*, 422, 243-253. doi:10.1016/j.mce.2015.12.018
- Zhou, L., Dorfer, C. E., Chen, L., & Fawzy El-Sayed, K. M. (2017). *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharides affect gingival stem/progenitor cells attributes through NF-kappaB, but not Wnt/beta-catenin, pathway. *J Clin Periodontol*, 44(11), 1112-1122. doi:10.1111/jcpe.12777

8. Anhang

8.1 Ethikantrag

MEDIZINISCHE FAKULTÄT
DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL

ETHIK-KOMMISSION



Universitäts-Kinderklinik · Schwannenweg 20 · 24105 Kiel

PD Dr. Karim Fawzy El-Sayed
UKSH, Campus Kiel
Klinik für Zahnerhaltung und Parodontologie
Arnold-Heller-Str. 3, Haus 26
24105 Kiel

Postadresse:
Arnold-Heller-Straße 3 / Haus 9
D-24105 Kiel

Telefon 04 31 / 500-14 191
Telefax 04 31 / 500-14 195
ethikkomm@email.uni-kiel.de

Datum: 07. August 2017

AZ: D 513/17 (bitte stets angeben)
Studienplan: **In-vitro Untersuchung der Wirkung verschiedener Biomoleküle und Entzündung auf gingivale Stammzellen**
Basisformular v. 18.07.17; Studienprotokoll undatiert; Informationsblatt und Einverständniserklärung für wissenschaftliche Untersuchungen an körpereigenem Material

Antragsteller und Studienleiter: PD Dr. Karim Fawzy El-Sayed, Dr. Mohamed Mekhemar, Klinik für Zahnerhaltung und Parodontologie, UKSH Kiel

Antrag vom: 3. Juni 2017 (Eingang: 20. Juli 2017)

Sehr geehrter Herr Kollege El-Sayed,

wir bestätigen den Eingang des obengenannten Antrages zur Beratung gemäß § 15 Berufsordnung (BO) der Ärztekammer Schleswig-Holstein. Nach Durchsicht der Unterlagen durch die Geschäftsstelle und durch mich als Vorsitzenden der Ethik-Kommission bestehen gegen die Durchführung der Studie keine berufsethischen und berufsrechtlichen Bedenken.

Die im Folgenden aufgeführten Hinweise müssen beachtet werden:

1. Bitte aktualisieren Sie eine zutreffende Studienbeschreibung im *Informationsblatt und Einverständniserklärung für wissenschaftliche Untersuchungen an körpereigenem Material* und reichen Sie das Dokument vor Studienbeginn per E-Mail nach.
2. Es wird darauf hingewiesen, dass künftige Änderungen der Studie der Ethik-Kommission anzuzeigen sind und gegebenenfalls eine erneute Beratung erforderlich machen.
3. Die ethische und rechtliche Verantwortung für die Durchführung dieser Studie verbleibt beim Studienleiter.
4. Gemäß Deklaration von Helsinki **muss** der Ethik-Kommission nach Studienende ein Abschlussbericht vorgelegt werden, der eine Zusammenfassung der Ergebnisse und Schlussfolgerungen der Studie enthält.

Wir wünschen Ihnen für die Durchführung der Studie viel Erfolg.

Mit freundlichen kollegialen Grüßen

Prof. Dr. med. H. M. Mehdorn
Vorsitzender der Ethik-Kommission

Dr. med. Christine Glinicke
Geschäftsführung der Ethik-Kommission

8.2 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. dent. Christof Dörfer bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit in seiner Abteilung durchzuführen.

Mein ausgesprochener Dank gilt insbesondere Herrn PD Dr. med. dent. Karim M. Fawzy El-Sayed. Vielen Dank für die engagierte Betreuung bei der Durchführung der Untersuchungen und für die konstruktive Kritik. Ich konnte mich im Laufe der Dissertation jederzeit auf Ihre Unterstützung und Vertrauen in meine Arbeit verlassen.

Außerdem möchte ich mich bei Frau Mojgan Paymard-Stolz bedanken, die durch ihre humorvolle Art und Leidenschaft es schaffte mich mit dem wissenschaftlichen Arbeiten im Labor vertraut zu machen. Durch sie habe ich nicht nur an Wissen gewonnen, sondern auch eine liebenswerte Persönlichkeit kennengelernt.

Zudem möchte ich mich bei Frau Regina Marquardt bedanken, die mir bei Problemen und Anregungen stets zur Seite stand.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Kerstin Marx für Ihre Unterstützung in der FACS-Analyse bedanken.

Ich danke meinen Freunden, die mich in dieser Zeit begleitet haben. Vor allem möchte ich mich bei Nhung Nguyen für die vielen Stunden in toller Zusammenarbeit im Labor bedanken.

Abschließend geht ein großer Dank an meine Eltern, Andreas und meinem Bruder Artur, dass sie es mir ermöglicht haben meinen Weg zu gehen. Vielen Dank für die liebevolle Unterstützung und das offene Ohr, ob nah oder fern. Für den unermüdlichen Rückhalt bin ich euch sehr dankbar.

8.3 Curriculum vitae

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.