

Aus der Klinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie

(Direktor Prof. Dr. C. Dörfer)

im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Toll-like Rezeptor 3 vermittelte  
Pluripotenz gingivaler mesenchymaler Stammzellen**

**Inauguraldissertation**

zur

Erlangung der Doktorwürde der Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Vorgelegt von:

**Johannes Tölle**

aus **Münster**

**Kiel, 2021**

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Karim Mohamed Fawzy El-Sayed  
Klinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Yahya Açil  
Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie

Tag der mündlichen Prüfung: 26.11.2021

Zum Druck genehmigt: 01.10.2021

*Meiner Familie und meinen Freunden,  
die stets ein offenes Ohr und zwei helfende Hände  
haben.*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.</b>	<b>Das Parodont .....</b>	<b>1</b>
1.1.1.	Anatomie und Physiologie.....	1
1.1.2.	Parodontitis: Pathologie und Risikofaktoren .....	2
1.1.3.	Parodontitistherapie: konventionell und regenerativ.....	4
<b>1.2.</b>	<b>Immunologie.....</b>	<b>4</b>
1.2.1.	Die angeborene Abwehr.....	5
1.2.2.	Die erworbene Abwehr .....	7
<b>1.3.</b>	<b>Toll-like Rezeptoren .....</b>	<b>8</b>
1.3.1.	Historie .....	8
1.3.2.	Eigenschaften .....	9
1.3.3.	Toll-like Rezeptor 3.....	12
1.3.3.1.	Aufbau des TLR3 und Antigenbindung .....	12
1.3.3.2.	TRIF-Rekrutierung und Aktivierung von NFκB, IRF3/7 und AP-1.....	13
<b>1.4.</b>	<b>Stammzellen .....</b>	<b>15</b>
1.4.1.	Historie .....	15
1.4.2.	Gliederung und Potenz.....	16
1.4.3.	Mesenchymale Stammzellen.....	17
1.4.3.1.	Isolation und Charakterisierung mesenchymaler Stammzellen.....	18
1.4.3.2.	Immunregulation durch mesenchymale Stammzellen .....	19
1.4.3.3.	Dentale mesenchymale Stammzellen .....	20
1.4.3.3.1.	Gingivale Mesenchymale Stammzellen .....	21
1.4.3.3.2.	TLR-Expression oraler MSC .....	22
1.4.3.4.	Evidenz zur parodontalen Therapie .....	23
<b>1.5.</b>	<b>Ziel der Studie .....</b>	<b>25</b>
<b>2.</b>	<b>Materialien und Methoden .....</b>	<b>26</b>
<b>2.1.</b>	<b>Votum der Ethikkommission und Patientenaufklärung.....</b>	<b>26</b>
<b>2.2.</b>	<b>Isolation und Kultivierung der MACS<sup>+</sup> Zellen.....</b>	<b>26</b>
2.2.1.	Probenentnahme.....	26
2.2.2.	Kultivierung des gingivalen Gewebes.....	26
2.2.3.	Magnetic Activated Cell Sorting .....	27
2.2.4.	Zellselektion durch Auswahl monoklonaler Kolonien .....	28
2.2.5.	Kultivierung MACS <sup>+</sup> Zellen .....	29
<b>2.3.</b>	<b>Nachweis der Expression von TLR3 .....</b>	<b>29</b>

2.3.1.	Durchflusszytometrie .....	29
2.3.2.	Real-Time-Polymerasekettenreaktion.....	30
<b>2.4.</b>	<b>Untersuchung MSC-spezifischer Zellmerkmale .....</b>	<b>32</b>
2.4.1.	Durchflusszytometrie .....	32
2.4.2.	Real-Time-Polymerasekettenreaktion.....	33
2.4.3.	Koloniebildung.....	35
2.4.4.	Metabolische Aktivität .....	36
2.4.5.	Proliferation.....	37
2.4.6.	Multilineare Differenzierung (Färbung und Quantifizierung) .....	38
2.4.6.1.	Osteogene Differenzierung .....	38
2.4.6.2.	Adipogene Differenzierung .....	39
2.4.6.3.	Chondrogene Differenzierung .....	40
2.4.7.	Multilineare Differenzierung (RT-qPCR) .....	43
<b>2.5.</b>	<b>Statistische Auswertung .....</b>	<b>44</b>
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>45</b>
<b>3.1.</b>	<b>Isolation und Kultivierung MACS<sup>+</sup> Zellen.....</b>	<b>45</b>
<b>3.2.</b>	<b>Nachweis MSC-spezifischer Merkmale MACS<sup>+</sup> Zellen .....</b>	<b>46</b>
3.2.1.	Adhäsion an PMMA-Oberflächen.....	46
3.2.2.	Koloniebildung.....	47
3.2.3.	Multilineare Differenzierung .....	47
3.2.3.1.	Osteogene Differenzierung .....	47
3.2.3.2.	Adipogene Differenzierung .....	49
3.2.3.3.	Chondrogene Differenzierung .....	50
3.2.4.	Durchflusszytometrie .....	54
<b>3.3.</b>	<b>Nachweis der Expression von TLR3 .....</b>	<b>54</b>
<b>3.4.</b>	<b>Untersuchung MSC-spezifischer Merkmale MACS<sup>+</sup> Zellen nach TLR3 Aktivierung.....</b>	<b>55</b>
3.4.1.	Koloniebildung.....	55
3.4.2.	Zellaktivität (MTT) .....	56
3.4.3.	Proliferation.....	58
3.4.4.	Multilineare Differenzierung .....	59
3.4.4.1.	Osteogene Differenzierung .....	59
3.4.4.2.	Adipogene Differenzierung .....	61
3.4.4.3.	Chondrogene Differenzierung .....	63
3.4.5.	mRNA Transkriptionsprofile .....	66
3.4.6.	Expression MSC spezifischer Oberflächenmarker .....	67
<b>4.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>71</b>

<b>4.1.</b>	<b>Erklärung und Diskussion der Methodik .....</b>	<b>72</b>
4.1.1.	Isolation MACS <sup>+</sup> Zellen.....	72
4.1.1.1.	Magnetic Activated Cell Sorting .....	72
4.1.1.2.	Auswahl monoklonaler Kolonien.....	73
4.1.1.3.	Standardbedingungen zur Kultivierung MACS <sup>+</sup> Zellen .....	73
4.1.2.	Durchflusszytometrie .....	74
4.1.2.1.	MSC spezifische Oberflächenmarker.....	75
4.1.2.2.	Intrazellulärer TLR3-Nachweis.....	76
4.1.3.	Koloniebildung.....	77
4.1.4.	Metabolische Aktivität (MTT).....	78
4.1.5.	Proliferationskurve .....	79
4.1.6.	Real-Time-Polymerasekettenreaktion.....	79
4.1.6.1.	TLR3 Nachweis.....	80
4.1.6.2.	MSC-assoziierte Transkriptionsfaktoren .....	80
4.1.7.	In vitro Differenzierung .....	82
4.1.7.1.	Färbung und Quantifizierung .....	82
4.1.7.2.	Genexpression .....	83
4.1.8.	Stimulation von TLR3.....	85
4.1.9.	Statistische Auswertung .....	85
<b>4.2.</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse .....</b>	<b>87</b>
4.2.1.	Charakterisierung der MACS <sup>+</sup> Zellen .....	87
4.2.2.	Nachweis der Expression von TLR3 .....	87
4.2.3.	TLR3 vermittelte Pluripotenz gingivaler Stammzellen .....	88
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>93</b>
<b>6.</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>95</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>117</b>
7.1.	Abbildungen.....	117
7.2.	Tabellen .....	118
7.3.	Abkürzungen.....	119
7.4.	Ethikvotum .....	123
7.5.	Einwilligungsbogen .....	124
<b>8.</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>126</b>
<b>9.</b>	<b>Akademischer Lebenslauf .....</b>	<b>127</b>
<b>10.</b>	<b>Publikationen.....</b>	<b>128</b>
<b>11.</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>129</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Das Parodont

Als Parodont wird ein vielschichtiges Organ bezeichnet, welches die Verbindung zwischen dem *processus alveolaris* von Mandibula oder Maxilla und den Zähnen vermittelt [1], sowie - im physiologischen Zustand - einen bakteriedichten Verschluss zur Verhinderung der Erregerpenetration am dentogingivalen Übergang bildet [2].

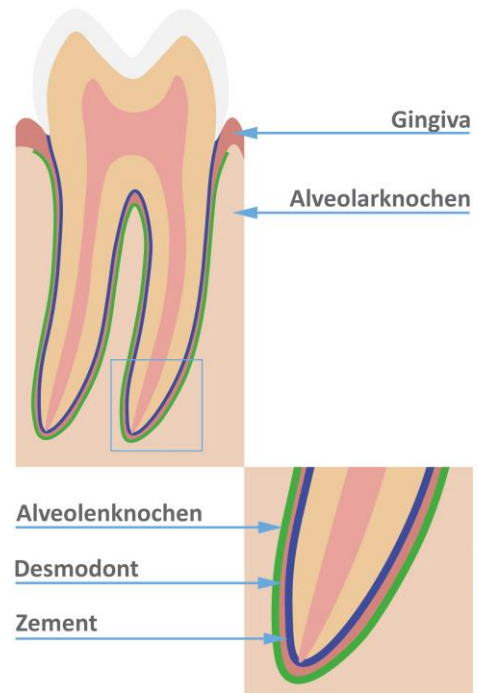


Abbildung 1 Aufbau des Parodonts

### 1.1.1. Anatomie und Physiologie

Das Parodont besteht aus vier Komponenten, die ektomesenchymalen Ursprungs sind und der Neuralleiste abstammen [3]: dem Alveolarknochen, dem parodontalen Ligament (Desmodont), der Gingiva und dem Zement.

Der *processus alveolaris* bildet über seine *lamina cribiformis* (*alveolar bone proper*/Alveolenknochen) die Zahnfächer, die vom parodontalen Ligament ausgekleidet werden [4]. Dieses stellt insbesondere über Fasern des Kollagentyps I und III ("*Sharpey-Fasern*") eine Verbindung zwischen dem Wurzelzement und dem Alveolenknochen her [5]. Außerdem bildet es ein Reservoir zur Reparatur und Regeneration der angrenzenden Gewebe [6]. Daran sind vor allem Fibroblasten, Zementoblasten, Zementoklasten, Osteoblasten, Osteoklasten, jedoch auch Progenitorzellen mesenchymaler Abstammung beteiligt [7]. Die Aufhängung der Zähne durch *Sharpey-Fasern* inseriert in den das Wurzelzement bedeckende azelluläre Fremdfaserzement [8]. Es existieren insgesamt fünf Typen an Zement, welche eine knochenähnliche Zusammensetzung besitzen und einem stetigen Umbau durch Zementoklasten und Zementoblasten unterliegen. Der Zement nimmt eine essenzielle Rolle in der Heilung dentaler Traumata und Frakturen ein [9]. Die Gingiva bildet mit ihrem ortho-/parakeratinisierten Epithel den koronalen Anteil des Zahnhalteapparats. Sie erstreckt sich von der vestibulären mukogingivalen Grenze bis hin zur palatinalen befestigten Gingiva bzw. der lingualen mukogingivalen Grenze [10]. Die Zähne

werden durch einen junktionalen Komplex eingeschlossen, welcher nach koronal aus dem epithelialen und nach apikal aus dem bindegewebigen Attachment besteht. Letzteres vermittelt über Hemidesmosomen eine dentogingivale Bindung mit einem zweischichtigen Plattenepithel [11]. Das Epithel wird von apikal nach koronal durch Progenitorzellen der *basallamina externa* stetig erneuert. Neben diesen konnten auch aus der Gingiva, dem Ligament und der Pulpa Stamm-/Progenitorzellen isoliert werden (s.u.) [12].

### 1.1.2. Parodontitis: Pathologie und Risikofaktoren

Die Pathologie des Parodonts wird nach neuer Klassifikation (2018) in gingivale und parodontale Erkrankungen und Zustände sowie in periimplantäre Erkrankungen und Zustände gegliedert [13]. Dabei ist die *Parodontitis* definiert als entzündliche degenerative Erkrankung des Zahnhalteapparates mit progressivem Attachmentverlust und knöcherner Resorption, beginnend im koronalen Bereich des Limbus alveolaris.

Die Prävalenz der Parodontitis, identifiziert über eine Sondierungstiefe von  $\geq 4$ mm, beträgt 95% aller Erwachsenen und 99,2% aller Senioren in Deutschland [14]. Von diesen zeigten nach der Definition des CDC-AAP [15] 20% einen schweren Verlauf.

Die Ätiologie der Erkrankung ist vielschichtig und basiert auf einer Veränderung der oralen Mikroflora [16] unter Ansiedlung verschiedener parodontalpathogener Erreger (meist Gram<sup>-</sup> Anaerobier) in Form eines bakteriellen Biofilms [17]. Aufgrund der multifaktoriellen Ätiologie und der strengen Assoziation zum individuellen Risikoprofil des Patienten wird die Parodontitis den non-communicable diseases (NCDs) zugeordnet [18, 19].

Bestimmte Bakterien (*Porphyromonas gingivalis*) bewirken eine Schwächung der epithelialen Zellkontakte [20], welches einen Wandel der kommensalen oralen Mikroflora zur dysbiotischen Aktivität initiiert. Der Wandel im Environment führt zur Etablierung neuer bakterieller Populationen mit hohem pathogenem Potential (z.B. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) [21]. Durch Aktivierung des Immunsystems unter Vermittlung von Mustererkennungsrezeptoren (PRR) wie Toll-like Rezeptoren (TLR), NOD-like-Rezeptoren (NLR) werden proinflammatorische Zytokine (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  [22]) freigesetzt. Das genaue Profil an aktivierten Entzündungsmediatoren hängt vom Erregerspektrum ab und hat



großen Einfluss auf die Etablierung und Progression der gingivalen/parodontalen Läsion [23]. Durch die Migration von Neutrophilen Granulozyten und anderen Phagozyten (primär resorptiv wirkenden M1 Makrophagen) kommt es bei persistierender Inflammation zur Freisetzung weiterer Zyto-/Chemokine. Die destruiierende Wirkung beruht in erster Linie auf der Sekretion reaktiver Sauerstoffspezies ( $\text{NO}^*$ ,  $\text{O}^*$ ) [24] sowie der Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen (MMP) [25]. Daraus resultieren eine Vasodilatation lokaler Blutgefäße (klinisch erfasst durch das *bleeding on probing*) und bei Chronifizierung die Lyse lokalen Gewebes mit progressiver Osteodestruktion. Die mikrobielle Dysbiose fördert außerdem über die Aktivierung von Toll-like Rezeptoren und die Induktion antiapoptotischer Signalwege (I3K/Akt, JAK/STAT, MAPK) die orale Karzinogenese [22].

Der Verlauf und die Inzidenz der Parodontitis können durch Manipulation individueller Risikofaktoren positiv wie negativ beeinflusst werden. Besonders Tabakkonsum und Diabetes mellitus, aber auch genetische Anomalien (IL-1 Polymorphismus [26]) können mit einer steigenden Inzidenz und rascheren Progression der Parodontaler Destruktion assoziiert werden [27].

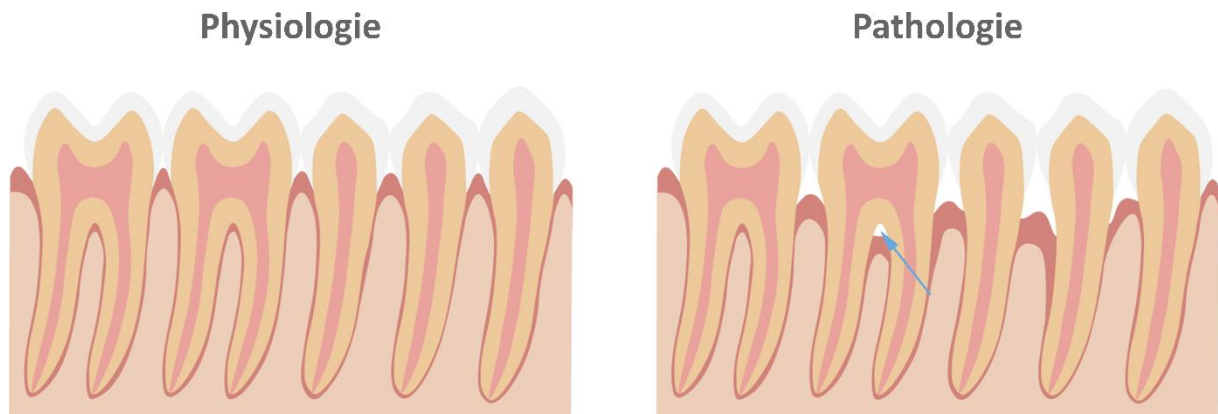


Abbildung 2 Physiologische und pathologische Anatomie des Parodonts

Links: physiologische Anatomie des Parodonts; rechts: pathologische Anatomie einer aktiven Parodontitis mit generalisiertem horizontalen Knochenabbau, multiplen vertikalen Knochendefekten und Furkationsbeteiligung Grad III am ersten Molar.

### 1.1.3. Parodontitistherapie: konventionell und regenerativ

Die konventionelle Therapie der *Parodontitis* beschäftigt sich in weiten Teilen mit Methoden des Biofilmmangements und der Generierung aseptischer oraler Bedingungen [28]. Zur Mobilisierung des subgingivalen Biofilms können geschlossene nichtchirurgische Verfahren in Form verschiedener *Debridments* und *root planing* angewandt werden [29]. Je nach anatomischen Gegebenheiten und Pathogenese kann der Reinigungseffekt durch offene Verfahren unter direkter visueller Kontrolle verbessert werden. Auch wenn die initiale antiinflammatorische Therapie die Progression der Erkrankung i.d.R. deutlich reduziert, so bleibt die knöcherne Regeneration durch die raschere weichgewebige *Reparatio* unter Ausbildung eines langen Saumepithels zurück [30].

Zur Unterstützung der ossären Regeneration vertikaler Knochendefekte können zum einen die gesteuerte Geweberegeneration (GTR) unter Abschirmung des Defektes mittels Membran [31] mit oder ohne Defektfüllung durch osteokonduktive (Kollagen, BioOs o.ä) oder osteoinduktive (Eigenknochen, PRF) Materialien vorgenommen werden [32]. Auch wird versucht das regenerative Potential des betroffenen Gewebes durch den Einsatz von Schmelz-Matrix-Proteinen zu steigern [33]. Momentan wird an dem Einfluss der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NFκB und der Beeinflussung des regenerativen und reparativen Potentials des Gewebes durch Stammzellen geforscht. Besonders im Fokus sind dabei die antiapoptotischen Eigenschaften und die immunomodulatorischen Einflüsse oraler Stammzellen und ihr Einfluss auf das orale Mikroenvironment [34, 35]. Dies könnte kurzfristig den Heilungsvorgang und auf lange Sicht den Krankheitsverlauf wesentlich beeinflussen [36].

Klinisch stellt jedoch noch immer die ständige Motivation und Instruktion sowie die Eingliederung des Patienten in eine unterstützende parodontale Therapie (UPT) den Schlüssel zur Minimierung des *clinical attachment loss* dar [37, 38].

## 1.2. Immunologie

In Konfrontation mit verschiedensten potentiell pathogenen Erregern, Toxinen oder beschädigten entarteten Zellen bieten sich dem Organismus verschiedene Möglichkeiten, sich zu schützen. Dazu gehören die Vermeidung des Pathogens durch Abschirmung, die Abwehr

eingedrungener Noxen und Erreger sowie die Reparatur der entstandenen Schäden (Toleranz) [39].

Diese Strategien umzusetzen bzw. zu fördern ist die Aufgabe des Immunsystems. Es wird grundsätzlich zwischen der angeborenen Abwehr und der erworbenen (adaptiven) Abwehr unterschieden. Beide führen auf unterschiedlicher Weise zur Auslösung von Effektormodulen [40, 41].

Die angeborene Abwehr bietet durch die Erkennung allgemeiner Muster pathogener Erreger (*pathogen-associated molecular patterns*; PAMPs) einen grundlegenden, aber semispezifischen Schutz [42]. Dagegen ist die adaptive Abwehr stark auf spezifische Antigene spezialisiert; sie besitzt nach Primärkontakt mit dem Antigen jedoch eine Latenz von ca. 4-5 Tagen, um effektive Zellpopulationen zu generieren [43].

### **1.2.1. Die angeborene Abwehr**

Der angeborene Teil des Immunsystems stellt die erste Linie der Immunabwehr dar. Die grundlegenden Bestandteile der angeborenen Abwehr sind physikalisch-chemische Barrieren und spezialisierte Immunzellen sowie humorale Komponenten. Sie dienen als Mediatoren zur Koordination der Immunreaktion oder zur unverzüglichen Neutralisierung verschiedener Pathogene [44].

Schon früh haben Organismen Methoden zur Aufrechterhaltung der Homöostase gegen wechselnde Umweltbedingungen und zur Verhinderung mikrobieller Invasionen entwickelt. Diese wurden im Laufe der Evolution modifiziert, wobei allerdings viele der grundlegenden Mechanismen konserviert wurden. Dazu gehört die Errichtung physikalisch-chemischer Barrieren [39]. Beim Menschen bestehen diese Barrieren aus Epithelmauern, die durch speziell verdichtete Zellkontakte (*tight junctions*) eine Abgrenzung gegen äußere Einflüsse bieten und die Invasion mikrobieller Erreger verhindern sollen [45]. Der antimikrobielle Schutz wird durch einen leicht sauren pH-Wert und antimikrobielle Peptide (AMPs) wie das Enzym Lysozym verstärkt [46]. Weiter wird die Ansiedelung pathogener Keime durch eine resiliente Besiedelung der (Schleim-) Häute mit kommensalen Bakterien erschwert [47].

Die AMPs repräsentieren einen Teil der angeborenen humoralen Abwehr. Die humoralen Faktoren sind vielfältig und erfüllen verschiedene Aufgaben, einerseits als unmittelbar interventionell wirksame Proteine (AMPs, Komplement), andererseits zur Modulation der Immunantwort und Regulation der Entzündungsreaktion (Zytokine, Akute Phase Proteine). Die Steuerung immunologisch aktiver Zellen wird durch Chemokine vermittelt [48].

Die Mechanismen der verschiedenen Transmitter sind vielfältig und gewährleisten eine fein abgestimmte Reaktion auf verschiedene Stimuli [49]. Mutationen oder Dysfunktionen innerhalb dieser Signalkaskaden können zu vielgestaltigen Erkrankungen des Parodonts führen (IL-1 Polymorphismus) [50].

Ein weiterer wichtiger Bestandteil der angeborenen Abwehr sind die Zellen. Grundsätzlich können ontogenetisch zwei Gruppen anhand ihres Ursprungs unterschieden werden: Zellen lymphatischen und myeloischen Ursprungs. Lymphatischer Genese sind die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und die angeborenen lymphatischen Zellen (ILC), welche in der Lage sind, entartete oder virusinfizierte Zellen abzutöten [41]. Myeloischer Genese sind Granulozyten und die Zellen des mononucleär-phagozytären Systems (MPS) [51].

Dendritische Zellen können sowohl aus der lymphatischen als auch der myeloischen Zelllinie hervorgehen. Ihre primären Funktionen sind das Erkennen von potentiell pathogenen Erregern, die Aktivierung der adaptiven T-Zell Immunantwort sowie die Antigenpräsentation im Rahmen der B-Zell-Reifung. Dendritische Zellen bauen somit eine Brücke zwischen der angeboren und der adaptiven Abwehr [52, 53].

Die Erkennung pathogener Muster geschieht durch genetisch codierte und stark konservierte Mustererkennungsrezeptoren (pattern-recognition-receptors; PRRs). [54, 55]

Diese Rezeptoren sind zwar nicht in der Lage, spezifische Antigene zu erkennen, reagieren aber auf stark konservierte allgemeine Strukturen verschiedener Erreger. Hierzu gehören Lipopolysaccharide, Oligosaccharide und Peptidoglykane als Bestandteile bakterieller Zellwände, aber auch virale doppelsträngige RNA (dsRNA) [56]. Mustererkennungsrezeptoren werden neben Zellen des Immunsystems auch von anderen Zelltypen exprimiert, die insgesamt als Sensorzellen zusammengefasst werden können. Dabei werden PRRs kontinuierlich und unabhängig vom Lebenszyklus exprimiert und unterliegen - im Gegensatz zu den antigenbindenden Domänen der adaptiven Abwehr - keinen funktionell bedingten

Mutationen. Die PRRs sind sowohl extrazellulär, im Zytosol, sowie endosomal vertreten [42]. Zu ihnen gehören die Toll-like Rezeptoren (TLR), die Nod-like-Rezeptoren (NLR), RIG-I-Rezeptoren (RLR) und die C-Typ-Lektin-Rezeptoren (CLR) [57].

Die Aktivierung von Mustererkennungsrezeptoren bewirkt die Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen. Dadurch wird die Aktivierung weiterer Immunzellen mit inflammatorischer Konsequenz stimuliert. Dabei werden die Bildung reaktiver antimikrobieller Substrate und die Produktion von Akute-Phase-Proteinen wie dem C-Reaktiven Protein (CRP) sowie die Genese eines inflammatorischen Environments gefördert [56]. Außerdem werden dendritische Zellen aktiviert, die nun als professionelle antigenpräsentierende Zellen das adaptive Immunsystem aktivieren [58].

### **1.2.2. Die erworbene Abwehr**

Phylogenetisch hat sich der adaptive (erworbene) Teil des Immunsystems nach dem angeborenen entwickelt. Dabei zeigen sich signifikante Ähnlichkeiten zwischen den Zellen beider Systeme. Beide agieren in enger Vergesellschaftung zueinander und gehen aus einer gemeinsamen Population pluripotenter hämatopoetischer Stammzellen hervor [59].

Auch das adaptive Immunsystem kann in einen humoralen und einen zellulären Teil unterteilt werden [60]. Die B-Lymphozyten und die T-Lymphozyten bilden den zellulären Anteil. Beide werden im Knochenmark aus einer lymphoiden Vorläuferzelle gebildet und differenzieren in den primären lymphatischen Organen. Grundlegender Unterschied zu den Zellen der angeborenen Abwehr ist die Beschränkung auf einen einzigen antigenspezifischen Rezeptor [61]: Die B-Zellen tragen einen B-Zell-Antigenrezeptor, der im Aufbau einem Immunglobulin entspricht, das über die konstante Region (Fc-Region) plasmalemmal verankert ist [62]. Auch T-Zell-Antigenrezeptoren sind mit den Immunglobulinen verwandt, weisen sie doch ebenfalls eine variable Antigenbindungsstelle auf. Jedoch unterscheiden sie sich in ihrem Aufbau aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ - Kette deutlich in ihrer Struktur, und erkennen i.d.R. nur Proteinantigene, die an Oberflächenrezeptoren vom Typ MHC gebunden sind [63]. T-Zellen werden weiter in CD4+ - und CD8+ Zellen unterteilt [64]. CD4+ Zellen sind T-Helferzellen ( $T_H$ -Zellen) und binden an MHC II Moleküle, CD8+ Zellen sind zytotoxische T-Zellen ( $T_{Zyt}$ -Zellen).  $T_{Zyt}$ -Zellen erkennen Antigene, welche vom MHC I Rezeptor, den fast alle körpereigenen Zellen tragen, präsentiert

werden und vermag so virusinfizierte oder mutierte Zellen abzutöten. Ihre Funktion ähnelt stark den NK-Zellen des angeborenen Immunsystems [65].

Der MHC II Rezeptor wird von antigenpräsentierenden Zellen wie den dendritischen Zellen exprimiert, die nach Aktivierung durch ihre PRRs die T<sub>H</sub>-Zellen aktivieren, welche nun ihrerseits weitere dendritische Zellen rekrutieren und zur B-Zell-Aktivierung und Differenzierung beitragen. Die dendritischen Zellen wandern nun zu den sekundären lymphatischen Organen, dem Ort der B-Zell-Reifung und Proliferation [66]. Native B-Zellen differenzieren zu Antikörper sezernierenden Plasmazellen und Gedächtniszellen, die die Immunreaktion bei Zweitkontakt mit dem Antigen beschleunigen [67]. Durch T<sub>Reg</sub>-Zellen kann die Funktion der T-Zellen beeinflusst und "reguliert" werden [68].

Immunglobuline sind Proteine, die (je nach Isotyp, hier IgG) aus einer konstanten (F<sub>C</sub>) und zwei stark variablen (F<sub>ab</sub>) Regionen bestehen. Die variablen Regionen können an Bereiche (Epitope) von Antigenen binden [69]. Dadurch werden Toxine neutralisiert oder Erreger opsoniert und anschließend durch Zellen des MPS phagozytiert [70]. Außerdem können Komplementfaktoren die F<sub>C</sub>-Regionen von Antikörpern binden und ihre lytische Wirkung entfalten [71].

## 1.3. Toll-like Rezeptoren

### 1.3.1. Historie

Das Toll-Gen wurde erstmals 1985 bei Untersuchungen zur Entwicklung der dorsoventralen Polarität von Embryos der Taufliege *drosophila melanogaster* durch Christine Nüsslein-Vollhardt entdeckt. Sie stellte fest, dass die dorsoventrale Ausrichtung der Embryonen von der lokalen Konzentration des Toll-Substrates abhängig ist bzw. ein Mangel an Toll-Genaktivität zur ausbleibenden Ausbildung von ventralen Zellen führt. Der vom Toll-Gen codierte Rezeptor wurde als Toll-Rezeptor bezeichnet [72, 73]. Später fand Jules Hoffmann erste Anzeichen einer immunologischen Bedeutung bei Experimenten mit ausgewachsenen *drosophilae*. Es zeigte sich, dass die Fliegen mit einer Mutation im Toll-Signalweg eine dramatisch gesteigerte Pilzanfälligkeit aufwiesen [74]. 1997 konnten Janeway et al. über den Vergleich der dToll Sequenz mit humanen Gendatenbanken schließlich die Existenz von Toll-ähnlichen Proteinen in menschlicher Leber und Nieren nachweisen. Weiter konnte die Existenz von hToll mRNA in

weiteren Zelllinien einschließlich Monozyten, dendritischen Zellen und Makrophagen sowie die Konservierung des Toll/NFκB Signalweges von *drosophila* bis zu Menschen bewiesen werden [75]. Der Nachweis der TLR Expression durch mesenchymale Stammzellen erfolgte später durch El-Sayed et al. [76] und lässt eine unmittelbare Verknüpfung der Erkennung pathogener Muster zur regenerativen Aktivität vermuten.

### 1.3.2. Eigenschaften

Toll-like Rezeptoren (TLR) bauen als Mustererkennungsrezeptoren (PRRs) eine Brücke zwischen angeborener und adaptiver Immunität. Sie stellen ein wichtiges Element zur Erkennung pathogen-assoziiertes molekularer Muster dar (PAMPs) und werden von Dendritischen Zellen, Natürlichen Killerzellen und Mastzellen exprimiert. Insbesondere auf Grund ihrer Schlüsselrolle in der T-Zell-Aktivierung durch dendritische Zellen sind TLR Bestandteil aktueller Forschungsprojekte. TLR werden allerdings auch von einigen Zellen exprimiert, welche bislang nicht primär dem Immunsystem zugeordnet werden. Dabei handelt es sich um Epi- und Endothelzellen [77] sowie um gingivale mesenchymale Stammzellen (G-MSC) [76]. Beim Menschen konnten zehn (TLR1-TLR10) und bei Mäusen zwölf (TLR1-TLR9, TLR11-TLR13) funktionale Rezeptoren identifiziert werden, wobei genetische Untersuchungen gezeigt haben, dass TLR10 zwar auch bei Mäusen im Genom vorhanden ist, das Gen allerdings auf Grund retroviraler Modifikationen deaktiviert wurde. TLR11-TLR13 sind im menschlichen Genom nicht mehr vorhanden. TLR sind in drei Domänen gegliedert: Die leucinreiche Ektodomäne, die Transmembrandomäne und die intrazelluläre Domäne, welche (mit Ausnahme von TLR3) über die Adaptorproteine MyD88 und TIRAP die Aktivierung von Kinasen der IRAK Familie und der Ubiquitin Ligase E3 bewirkt [78]. Anhand der Adaptorproteine können schon früh zwei verschiedene Signalwege differenziert werden: Zum einen der MyD88 abhängige Signalweg, welcher die Rezeptoren über einen Toll-Interleukin-1-enthaltendes Adapterprotein (TIRAP) mit der intrazellulären Kaskade verbindet und zum anderen den TRIF abhängigen Signalweg, welcher die Bindung über TRAM (*TRIF related adaptor molecule*) vermittelt [42]. Alle TLR, mit Ausnahme von TLR3 sind in der Lage den MyD88 abhängigen Signalweg zu aktivieren, wobei die duale Aktivierung von MyD88 und TRIF nur bei TLR4, TLR5 und in hohen Ligandendosierungen bei TLR9 möglich ist [79, 80]. Durch Rekrutierung individueller Adaptorproteine und rezeptorspezifischer Signalkaskaden haben die TLR einen jeweils spezifischen Einfluss auf die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFκB, IRF3, IRF7,

$\beta$ -Cateinin und AP-1. Dabei führt die Aktivierung von NF $\kappa$ B zur Synthese leichter Polypeptide und IRF3/7 zur Transkription proinflammatorischer Zytokine und Typ I Interferone [81, 82]. In einigen Fällen wurde durch Schaffung eines entzündlichen Environments eine proliferative und bisweilen onkogene Wirkung nach Rezeptoraktivierung beschrieben [81]. Besonders TLR3, TLR7 und TLR9 haben einen kostimulierenden Einfluss auf die Proliferation, Reifung und das Überleben verschiedener Zelllinien gezeigt [83, 84].

Neben der Einteilung nach ihren Adapterproteinen lassen sich TLR auch anhand ihrer Lokalisation innerhalb der Zelle kategorisieren: Plasmalemmal exprimiert werden die Rezeptoren TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 und TLR10, intrazellulär vesikulär hingegen TLR3, TLR7 und TLR9. Eine Sonderrolle nimmt TLR4 ein, welcher nach MD2 vermittelter Antigenbindung [85] durch Clathrin vermittelte Endozytose an endosomale Vesikel transloziert wird [86]. Es fällt auf, dass die TLR der Zelloberfläche hauptsächlich mikrobielle Membranbestandteile wie Proteine, Lipide und Lipopolysaccharide (LPS) [86, 87] erkennen, die intrazellulär gelegenen hingegen Nucleinsäuren, insbesondere doppelsträngige RNA (dsRNA; TLR3), Einzelstrang RNA (ssRNA; TLR7) und DNA [88]. Dabei ist die Toleranz und räumliche Trennung von zelleigenen Nucleinsäuren elementar zur Vermeidung von Autoimmunreaktionen, welche in Versuchen an Mäusen Lupus-ähnliche Verläufe zeigten [88, 89].



Tabelle 1 Liste humaner Toll-like Rezeptoren

Rezeptor	Lokalisation	Herterodimere	Adaptorprotein	Liganden	Quellen
<b>TLR1</b>	Plasmamembran	TLR2 TLR4 TLR6 TLR10	MyD88	Lipoproteine Peptidoglycane Lipoteichonsäure β-Defensin	[90-92]
<b>TLR2</b>	Plasmamembran	TLR1 TLR6 TLR10	MyD88	Lipoproteine Peptidoglycane Lipoteichonsäure β-Defensin	[90, 91, 93, 94]
<b>TLR3</b>	Plasmamembran Endosomen	---	TRIF	dsRNA, Poly I:C	[95-98]
<b>TLR4</b>	Plasmamembran Endosomen	TLR1 TLR5	MyD88/TRIF	Lipopolysaccharide Head-Shock-Proteine β-Defensin	[79, 92, 99, 100]
<b>TLR5</b>	Plasmamembran	TLR4	MyD88/TRIF	Flagellin	[101-103]
<b>TLR6</b>	Plasmamembran	TLR1 TLR2	MyD88	Lipoproteine Peptidoglycane Lipoteichonsäure	[85, 90, 104, 105]
<b>TLR7</b>	Endosomen	---	MyD88	ssRNA Guanosinanalogue	[96, 106-109]
<b>TLR8</b>	Endosomen	---	MyD88	ssRNA Imidazoquinoline	[96, 106, 108-110]
<b>TLR9</b>	Endosomen	---	MyD88/TRIF	CpG-Oligonukleotide Virale DNA	[80, 82, 96, 109, 111, 112]
<b>TLR10</b>	Plasmamembran	TLR1 TLR2	(MyD88)*	[unbekannt]	[113, 114]

\*Die MyD88 aktivierende Domäne ist kein Bestandteil von TLR10 [114]

### 1.3.3. Toll-like Rezeptor 3

Toll-like Rezeptor 3 (TLR3) ist ein endosomal und plasmalemmal lokalisierter Mustererkennungsrezeptor (PRR) [115], welcher durch Bindung doppelsträngiger RNA (dsRNA) oder des synthetischen Analogon *Polyinosinedeoxycytidylsäure* [Poly(I:C)] aktiviert wird. Vermittelt wird die Signaltransduktion über das TRIF-Adapterprotein und die Stimulation der Transkriptionsfaktoren NFκB, IRF-3/7 und AP-1, welche die Produktion von Typ I Interferonen (INFγ) und proinflammatorischen Zytokinen (IL-1, IL-6, IL12, TNF) induzieren [97, 116].

#### 1.3.3.1. Aufbau des TLR3 und Antigenbindung

TLR3 ist als Typ-1 Transmembranprotein ein *singlepass* α-helikales Protein. Wie alle TLR ist auch TLR3 in drei Anteile gegliedert: eine extrazellulär bzw. intraendosomal gelegene leucinreiche Ektodomäne zur Antigenbindung, eine Transmembrandomäne und eine intrazelluläre Toll/Interleukin-1 Rezeptor (TIR) bindende Domäne, die den Anschluss an die rezeptorspezifische Signalkaskade vermittelt [57]. Die Ektodomäne weist eine hufeisenförmige Struktur auf und besitzt 23 leucinreiche Sequenzen (LRR). Sie wird über Wasserstoffbrückenbindungen, den Carbonylgruppen von Asparagin ausgehend, stabilisiert. Die innere konkave Seite des „Hufeisens“ ist durch N-Acetylglycosamine glycolysiert, die äußere Seite hingegen frei davon, sodass hier Interaktion mit anderen Rezeptoren und Bindungen anderer Liganden möglich sind. Die homologe Dimerisierung von zwei TLR3 Proteinen wird hier mittels hydrophiler und ionischer Bindungen (Glu-Lys und Lys-Asp) vermittelt [117]. Die ligierende dsRNA kann mit geringer Affinität an einen singulären TLR3 binden, der Komplex wird allerdings erst durch die Dimerisierung mit einem anderen TLR3 Monomer und Bindung zweier C-terminaler TLR3-Ektodomänen stabilisiert. Eine Mindestlänge von 40 bis 50 Basenpaaren ist notwendig, damit ein Signal ausgelöst werden kann [118]. Längere dsRNA Fragmente sind potentere Induktoren [119], somit ist beispielsweise *high molecular weight*-Poly(I:C) [HMW Poly(I:C)] im Vergleich zu *low molecular weight*-Poly(I:C) [LMW Poly(I:C)] ein potenteres Stimulans des Rezeptors [98].

### 1.3.3.2. TRIF-Rekrutierung und Aktivierung von NFκB, IRF3/7 und AP-1

Der genaue Mechanismus zur Aktivierung der TIR-Domänen nach Musterbindung ist noch nicht abschließend geklärt. Diskutiert wird, dass die Dimerisierung der homologen Rezeptoren die zytoplasmatischen Domänen in Kontakt bringt, wodurch die intrazelluläre Signalkaskade ausgelöst werden könnte. Eine strukturelle Transformation durch Bindung der C-terminalen TLR3-Ektodomänen wäre ebenfalls möglich [120, 121]. TLR3 wird über das TIR-enthaltende Adaptermolekül TRIF (TICAM1) [122] in die intrazelluläre Signalkaskade integriert und kann somit als einziger TLR nicht von MyD88 gebunden werden. Nach TLR3 Aktivierung bindet TRIF über TIR an TLR3 und dissoziiert dann wieder, um die intrazelluläre Signalkaskade auszulösen [123]. Das TRIF Protein besitzt eine N-terminale Domäne (NTD), eine TRAF bindende Sequenz und RHIM am C-terminalen Ende. Durch Bindung von Transmittern an verschiedene Bereiche des TRIF entstehen unterschiedliche Wirkungen und können letztlich verschiedene Transkriptionsfaktoren aktiviert werden [124]. Onkologische Studien lassen außerdem auf einen TRIF unabhängigen Signalweg schließen, welcher über das TIR-bindende Proto-Onko-Protein c-Src vermittelt wird [125].

Nach Rekrutierung von TRAF3 durch die NTD des TRIF initiiert dieses eine eigenständige K63-Selbstubiquitinierung, welche die Formierung eines Proteinkomplexes aus K63-TRAF3, TBK1 und IKKi/IKKε [126] ermöglicht. Der Komplex phosphoryliert und aktiviert nun über TBK1 und IRAK1 die Faktoren IRF3 und IRF7, die im Anschluss Homodimere und Heterodimere bilden und in den Zellkern transloziert werden [124].

Die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF-κB und AP-1 ist TRAF6 abhängig. Nach Aktivierung über den IRAK4 Komplex bildet TRAF6 einen Komplex mit TAK1 und TAB1/2. Dieser ist nun in der Lage durch K63-Ubiquitinierung von IKKγ den IKK-Komplex zu aktivieren, wodurch die inhibierende NFκB Untereinheit IκB phosphoryliert und abgespalten wird [127, 128]. Weiter kann über die Aktivierung von MKK3/6/7 und p38/JNK [129] der Transkriptionsfaktor AP-1 induziert werden [130].

TRIF aktiviert außerdem über die Phosphorylierung von PI3K die AKT1, welche nun den Transkriptionsfaktor β-Catenin unter GSK3β-Regulation phosphoryliert und aktiviert [131-133]. Dabei ist für das weitere Schicksal von β-Catenin der Wnt-Signalweg essentiell. Nur unter Aktivierung des Wnt-Signalweges (*Wnt-on*) kann β-Catenin in den Zellkern transloziert werden [134], anderenfalls (*Wnt-off*) unterliegt das Protein der proteasomalen Degeneration. Wnt inhibiert außerdem die GSK3β/APC/Axin abhängige Destabilisierung von β-Catenin [135].

Die AKT1 bildet eine von vielen Schnittstellen zwischen den Signalwegen, einerseits über die Aktivierung von IRF3 durch Phosphorylierung, aber auch durch Beeinflussung der NF-κB Aktivität [131].

Die Aktivierung TLR3 assoziierter Transkriptionsfaktoren äußert sich in vielseitiger Weise und der Einfluss ihrer Regulation ist Thema intensiver onkoimmunologischer Untersuchungen. Hierbei konnten direkte Korrelationen zwischen der TLR3 Expression und Aktivierung zur Prognose onkologischer und inflammatorischer Pathologien nachgewiesen werden [136, 137]. Da noch keine Evidenz zur Wirkung von TLR3 auf die Eigenschaften parodontaler Stammzellen vorliegt, soll im Weiteren der Einfluss von TLR3 auf die Pluripotenz G-MSC diskutiert werden.

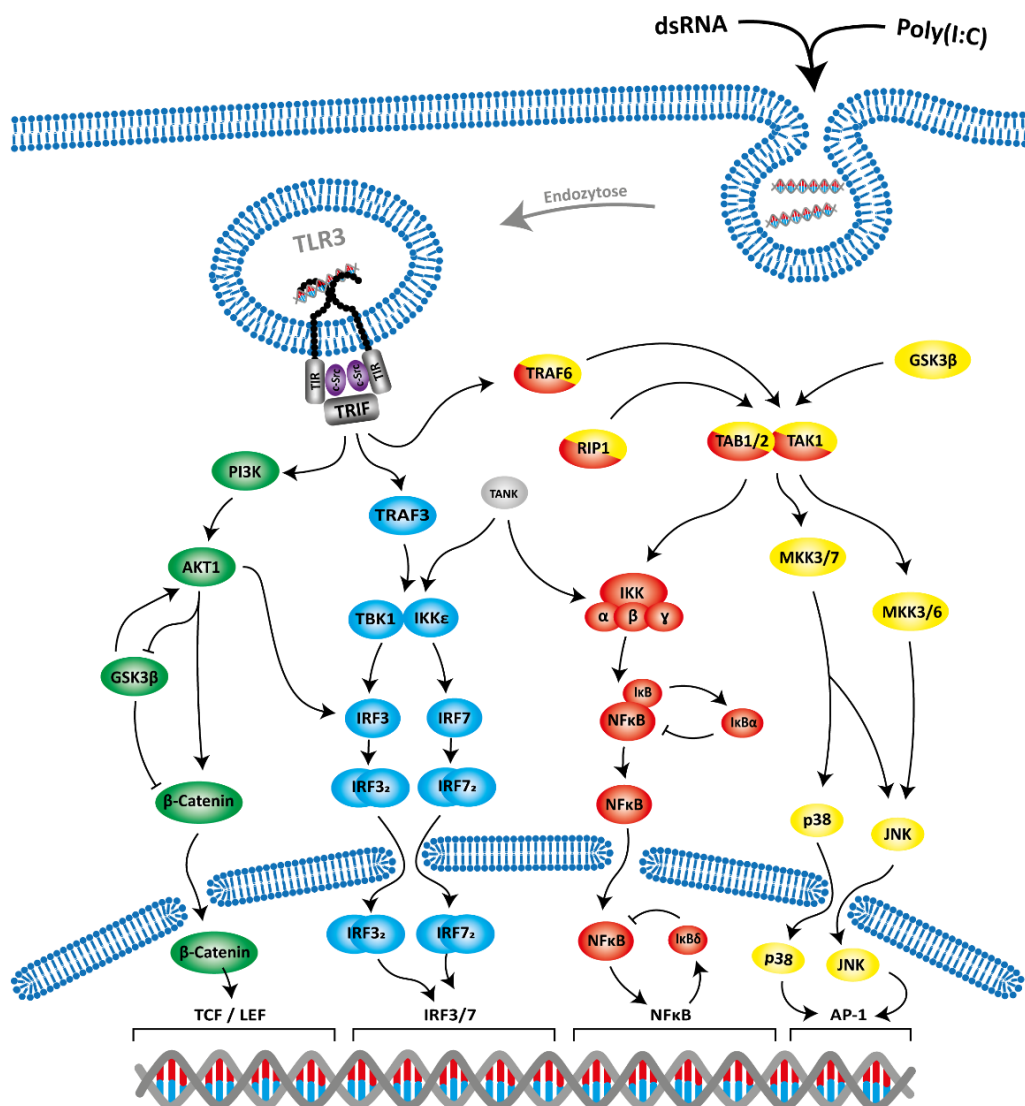


Abbildung 3 TLR3 spezifische Transkriptionsfaktoraktivierung

TLR3 induzierte intrazelluläre Signaltransduktion. Von links nach rechts: PI3K/AKT1 abhängige Aktivierung von β-Catenin (grün), TRAF3 abhängige Induktion der Transkriptionsfaktoren IRF3<sub>2</sub> und IRF7<sub>2</sub> (blau), TRAF6 abhängige Aktivierung von NF-κB (rot) und AP-1 (gelb).

## 1.4. Stammzellen

### 1.4.1. Historie

Der Begriff „Stammzelle“ entspringt der Feder des deutschen Biologen *Ernst Haeckel* (1834-1919). Dieser führte ihn 1868 in seinem Buch „*Natürliche Schöpfungsgeschichte*“ (Georg Reimer Verlag, Berlin) ein zur evolutionären Beschreibung der einzelnen Zelle, welche Ursprung allen höheren Lebens sei [138]. Später dehnte er den Begriff auf die befruchtete Eizelle als Ursprung der Ontogenese aus [139]. Man ging davon aus, dass die Zelle durch Teilung ihr „*Keim-Plasma*“ an jüngere Generationen weitergebe und so aus der ursprünglichen Zelle die differenzierten Effektorzellen entstünden [140]. Diesen Überlegungen folgend, trennte der Biologe *Hans Adolf Eduard Driesch* (1867-1941) die Zellen von Seeigelembryonen im Vierzellstadium und erwartete die isolierte (Unter-)Entwicklung einzelner Körperabschnitte. Da sich entgegen seiner Erwartungen jedoch vier voll entwickelte Larven entwickelten, folgerte er, „*die Potenz der Zellen [sei] größer als erwartet*“ [141]. Später (1892) wurde der Begriff von (1864-1927) für die Ursprungszelle späterer Keimzellen verwendet. Bei Untersuchungen der Blutbildung zur gleichen Zeit (1868) beschrieb der Pathologe und Hämatologe *Ernst Christian Neumann* (1834-1918) im Jahr 1868 das Knochenmark als Ursprung der Hämatopoese. Im Folgenden etablierte sich der Ausdruck „*Stammzelle*“ zur Beschreibung hämatopoetischer Vorläuferzellen. Der russische Pathologe *Alexander Maximow* (1874-1928) stellte im Anschluss (1908) die These auf, alle zellulären Bestandteile des Blutes entstammten einer einzigen lymphozytenartigen Zelle [142]. Der Beweis dieser Hypothese gelang erst 53 Jahre später durch die kanadischen Forscher *James Till* (\*1931) und *Ernest McCulloch* (1926-2011) in Versuchen an Mäusen [59, 143].

Maximows Postulate zur Existenz hämatopoetischer Stammzellen (HSC) ergänzend entdeckte *Alexander Friedenstein* 1976 eine Population von Zellen, welche ähnliche proliferative und differenzierende Fähigkeiten besaßen wie die HSC und bewies somit die Existenz nicht hämatopoetischer adulter Stammzellen, die mesenchymalen Stamm-/Stromazellen (MSC) [144, 145].

Erst im Jahre 1981 konnten embryonale Stammzellen aus Mäuseembryos gewonnen und kultiviert werden [146] und etwa 20 Jahre später (1998) menschliche embryonale Stammzellen (hESC) [147]. Da durch die beschriebene Extraktion von Blastozysten aus dem

embryonalen 14 Zellstadium der Embryo zerstört wird, löste die Publikation von *James A. Thomson et al.* kontroverse Debatten zwischen den Befürwortern, welche besonders auf das immense therapeutische Potential dieser Art der Forschung hinwiesen [148] und den Kritikern, welche insbesondere ethische Einwände gegen die Zerstörung humaner Embryonen erhoben [149], aus. Die Diskussion mündete 2002 in Deutschland in dem Verbot der Etablierung neuer hESC Linien und der Einfuhr nach dem 01.01.2002 gewonnener ESC Linien aus dem Ausland (§5 StZG „Gesetz zur Sicherstellung des Embryonenschutzes“).

Im Jahr 2000 konnten erstmalig adulte Stammzellen des menschlichen Zahns – genauer der Pulpa – nachgewiesen werden [150]. Seither gab es weitere Entwicklungen auf dem Gebiet der Stammzellforschung; insbesondere im Bereich der regenerativen Verfahren gibt es Bestrebungen, sich die speziellen Eigenschaften der Stammzellen zu Nutze zu machen [151]. Aufgrund der mangelnden Verfügbarkeit embryonaler Stammzellen stellt die Induktion mesenchymaler Stammzellen einen wichtigen Ansatz der Etablierung potenter Zelllinien dar.

### 1.4.2. Gliederung und Potenz

Stammzellen (SC) können anhand des ontogenetischen Entwicklungsstadiums differenziert werden: Blastozyten, die aus dem 14 Zell-Stadium menschlicher Embryonen gewonnen werden können, werden als Embryonale Stammzellen (hESC) bezeichnet [147]. Aber auch im postnatalen Organismus persistieren in vielen Geweben (einschließlich Pulpa [152] und Gingiva [153]) Zellen mit Stammzellcharakteristika. Diese werden als adulte Stammzellen bezeichnet und

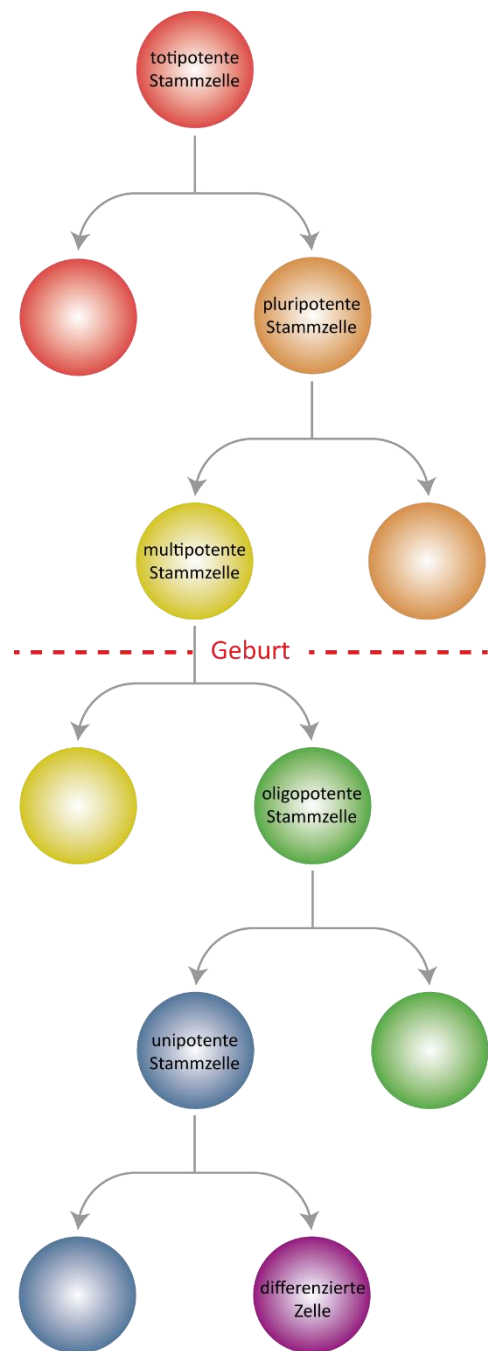


Abbildung 4 Stammbaum humaner Stammzellen

unterscheiden sich wesentlich von den erstgenannten. Ihre Potenz wird durch ein speziell geschaffenes Mikromilieu aufrechterhalten [154]. Man spricht auch von der „Stammzellnische“ [155]. Von diesen natürlich vorkommenden Stammzellen sind zum einen die Tumorstammzellen, deren Eigenschaften auf Mutationen des Genoms und des Verlustes von Reparatur-/Kontrollmechanismen basieren (epithelial-mesenchymale Transformation) und die induzierten Stammzellen abzugrenzen. Ausdifferenzierte Zellen können unter bestimmten Bedingungen pluripotente Eigenschaften entwickeln. Die Induktion erfolgt i.d.R. durch das Einbringen retroviraler Vektoren zur Aktivierung der pluripotenzassoziierten Transkriptome für NANOG, OCT4 und SOX2 [156]. Diese Erkenntnis wurde 2012 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet [157, 158]. Stammzellen können außerdem anhand ihrer pluripotenten Eigenschaften eingeteilt werden [159]. Totipotente SCs stellen die Ebene höchster Potenz dar und besitzen die Fähigkeit sich in alle Zellen des Organismus und der Plazenta zu differenzieren. Klassisches Beispiel dieses Zelltyps ist die Zygote [160]. Pluripotent sind hingegen Zellen, welche sich zwar ebenfalls in alle embryonalen Zellen wandeln können, jedoch nicht in extraembryonale. Nicht-induzierte SC des postnatalen Individuums (wie MSC) können maximal multipotent sein und sich nur in eine begrenzte Auswahl an Zelllinien differenzieren. Die Verwendung des Begriffes „Pluripotenz“ in Abgrenzung zu den „pluripotenten Eigenschaften“ kann hier verwirren. Mit weiterer Differenzierung wird die Potenz von den multipotenten über die oligopotenten bis hin zu unipotenten Progenitorzellen weiter eingeschränkt [161].

### **1.4.3. Mesenchymale Stammzellen**

Bei Versuchen an autologen Fragmenten des Knochenmarks von Ratten und Hunden konnten *Tavassoli et al.* feststellen, dass diese nach Transplantation in ein extramedullär gelegenes Gewebe nicht nur Knochen, sondern nach Bildung sinusoidaler Strukturen auch hämatopoetische Elemente des Knochenmarks ausbildeten. *Tavassoli* konnte jedoch die Entwicklungen nicht auf einen Zelltyp zurückführen [162]. Die Isolation und Charakterisierung dieser Zellen gelang erst später durch *Friedenstein und Owen*, welche einen nicht hämatopoetischen Zelltyp mit speziellen Eigenschaften isolieren konnten: Zum einen wurde in Transplantationsversuchen festgestellt, dass diese Zellen die Fähigkeit zur multilinearen Differenzierung besitzen, welche eine Differenzierung in Gewebe mesenchymaler Genese

(Knochen, Knorpel, Fett, Fibroblasten u.a.) ermöglicht [163], zum anderen weisen sie eine klonale Expansion und die Bildung von fibroblastenartigen Kulturen auf sowie in vivo die Bildung von Tochterzellen mit identischem Phänotyp und Funktion (Selbsterneuerung). Neben dieser symmetrischen Zellteilung können sich die Zellen auch asymmetrisch teilen [164], wobei zwei ungleiche Tochterzellen entstehen. Die Zellteilung in vitro geht über mehrere Generationen mit Veränderungen in Morphologie, Phänotyp und Genetik einher [165].

Ergänzend wurden noch adhäsive Eigenschaften an den Zellkulturflaschen beschrieben. Sie nannten den Zelltyp *bone marrow stroma cell* (BMSC) [166, 167]. Später konnten äquivalente Zellen auch in anderen Geweben nachgewiesen werden, darunter Nabelschnur, Fettgewebe, Pulpagewebe, Gingiva und viele mehr [150, 153, 168]. Diese werden in ihrer Gesamtheit als mesenchymale Stroma-/Stammzellen (MSC) bezeichnet [167], eine Terminologie, die allerdings wegen Missachtung der immunomodulatorischen therapeutischen Wirkungen transplantierte MSC kritisiert wird [169]. Das Vorkommen von MSC im Knochenmark wird auf 1:10<sup>5</sup> geschätzt, das Verhältnis zu anderen Zellen kann allerdings in Geweben mit abweichendem Zellumsatz (Haut: vollständige Erneuerung in 30 Tagen/Skelett: fünfmalige Erneuerung im Leben) variieren [153]. Entgegen früherer Postulate können MSC bei adäquater Stimulation nicht nur in Zellen mesodermaler Genese differenzieren, sondern bilden auch Zellen des Ektoderms und Endoderms [170].

### 1.4.3.1. Isolation und Charakterisierung mesenchymaler Stammzellen

Auf Grund des heterogenen Auftretens der MSC verschiedener Gewebe wurden von der „*International Society for Cellular Therapy*“ in einem Thesenpapier die minimalen Kriterien zur Definition mesenchymaler Stamm-/Stromazellen festgelegt [171]:

Adhäsion zu Plastikoberflächen unter Standardbedingungen		
Oberflächenmarker	<u>Negativ (&lt;5%)</u>	<u>Positiv (&gt;95%)</u>
	CD14/CD11b	CD73
	CD34	CD90
	CD45	CD105
	CD79α/CD19	
In vitro Differenzierung	Adipozyten	
	Osteoblasten	
	Chondroblasten	

Tabelle 2 Minimale Kriterien zur Definition mesenchymaler Stammzellen [1]



Die Adhäsion zu Plastikoberflächen wurde schon früh als Charakteristikum der BMSC definiert und später auch durch viele Studien als Merkmal von MSC bestätigt, wobei die Bindung der Zellen an die PMMA Oberflächen durch Integrine vermittelt wird [172-174]. Als Nachweis der Fähigkeit zur multilinearen Differenzierung wird in vitro die Differenzierung in Osteozyten, Chondrozyten und Adipozyten unter Stimulation mit verschiedenen induktiven Medien verwendet [153, 175], wobei auch eine in vivo Differenzierung singulärer MSC nach Transplantation herangezogen werden kann [176]. Im Weiteren exprimieren die Zellen MSC spezifische Oberflächenmarker. Diese sind in einzelner Betrachtung nur unter Vorbehalt zu interpretieren, in ihrer Gesamtheit ermöglichen sie jedoch Rückschlüsse auf die Zellentität. MSC zeichnen sich durch die Expression (>95%) von CD73, CD90 und CD105 bei gleichzeitigem Fehlen von CD14/CD11b, CD34, CD45 und CD79a/CD19 aus [171, 177]. Spezielle Bedeutung kommt den Markern Stro-1, CD271, SSEA-4 und CD146 zu, da sie häufig zur Selektion der MSC von anderen Zellstadien dienen [153, 177, 178].

#### **1.4.3.2. Immunregulation durch mesenchymale Stammzellen**

Bei näherer Untersuchung der selbsterneuernden Eigenschaften wurde festgestellt, dass bei MSC das Verhältnis von Proliferation neuer Progenitorzellen zur Differenzierung in Effektorzellen fein abgestimmt ist. Dies beruht auf einer Reihe lokaler parakriner Effekte, die im Weiteren einen großen Einfluss auf die Regeneration des betroffenen Gewebes haben können. Sie beinhalten eine Steigerung der Zellüberlebensrate durch verschiedene Mediatoren, Immunomodulation, Beeinflussung der lokalen Fibrose (überwiegend Kollagen Typ I), sowie mitochondrialen Transfer und Molekülaustausch durch extrazelluläre Vesikel (EV). [179].

Bei Studien an MSC Kulturen konnte festgestellt werden, dass sie über die Produktion bioaktiver topischer Faktoren die Reparationsmechanismen in parenchymalen Zellen stimulieren [180] und die Angiogenese des betroffenen Areals via VEGF-A fördern. Außerdem können MSC die proinflammatorischen Mediatoren IL-6, IL-8, TNF $\alpha$  und TGF $\beta$ 1 sezernieren und wirken weiter über die Chemokine vom Typ CXC und MCP-1 als Chemoattraktoren für Makrophagen und Granulozyten [181]. In Versuchen zur knorpeligen Regeneration bei Ratten konnte außerdem eine zunehmende Programmierung regenerativ wirkender CD163<sup>+</sup> M2 Makrophagen gegen eher inflammatorisch wirkende CD86<sup>+</sup> M1 Makrophagen gezeigt werden [182, 183]. Aktuell wird vermutet, dass die Sekretion von TGF $\beta$  und PGE<sub>2</sub> die Produktion von

TNF $\alpha$  und IL-12 durch dendritische Zellen zugunsten des antiinflammatorisch wirksamen IL-10 [184] verschiebt, wodurch es zu einem Austausch von proinflammatorischen T<sub>H</sub>-1-Zellen hin zu antiinflammatorischen T<sub>H</sub>2-Zellen käme sowie zur Verminderung der T<sub>H</sub>-Zellen im Gesamten durch T<sub>reg</sub>-Zellen [185, 186]. Die Bildung von T<sub>reg</sub>-Zellen kann auch durch Stimulation der MSC mittels des TLR3-Liganden via Poly(I:C) über die Bildung von PGE<sub>2</sub> undIDO induziert werden [187]. Auf NK-Zellen wirken MSC ebenfalls suppressiv, die Proliferation, Aktivierung und Überlebensrate von CD19<sup>+</sup> B-Zellen wird hingegen gesteigert. Dabei wird über VEGF die Angiogenese stimuliert und die Caspase-3-abhängige Apoptose unterdrückt [188].

MSC können aus vielen Geweben isoliert werden und können diese durch ihre multilinearen Differenzierungsmöglichkeiten regenerativ unterstützen [179]. Dieses wird durch ihre Fähigkeit zur TNF $\alpha$  vermittelten unspezifischen Migration in vaskularisierte (Knochen-) Regionen noch gesteigert [189, 190]. Neben dem Zellersatz und der Proliferation/Differenzierung von Progenitorzellen erhöhen MSC zusätzlich die Zellüberlebensrate und vermindern die Apoptose [179, 191, 192]. Daneben besitzen sie über die Sekretion der Wachstumsfaktoren EGF, FGF, PDGF und VEGF die Möglichkeit, das beschädigte Gewebe zur Reparatur und Regeneration anzuregen [193].

### 1.4.3.3. Dentale mesenchymale Stammzellen

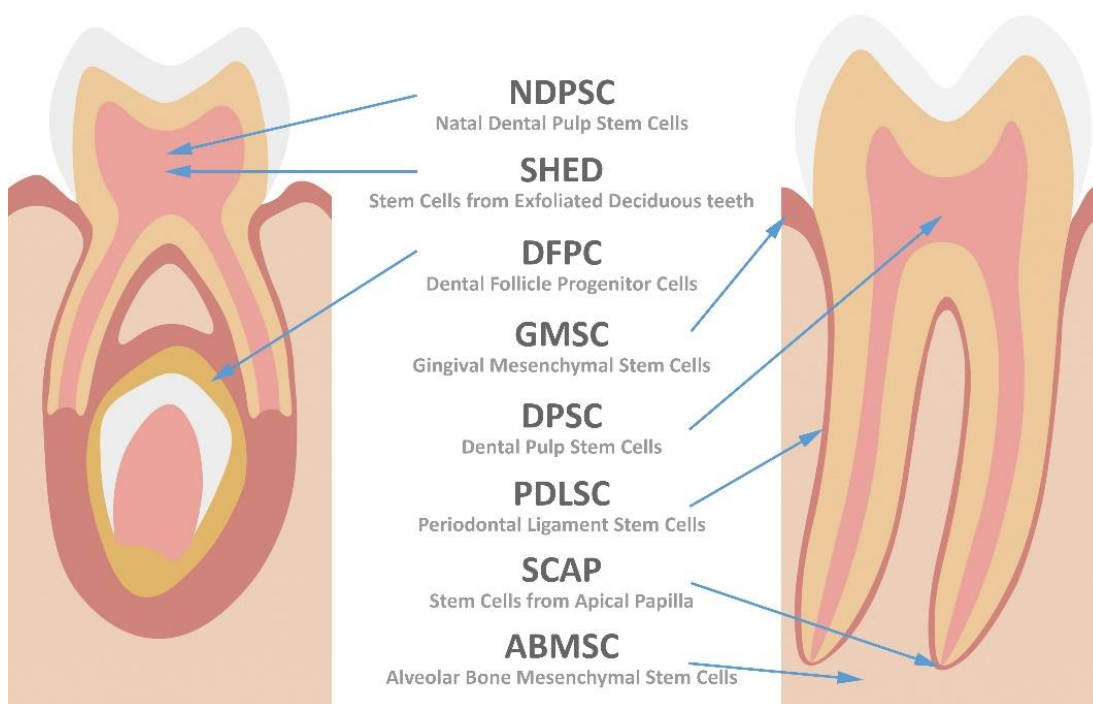


Abbildung 5 Lokalisation dentaler Stammzellen

Links: Quellen kindlicher und präeruptiver dentaler mesenchymaler Stammzellen; rechts: Quellen adulter dentaler mesenchymaler Stammzellen

In den zahntragenden Bereichen des stomatognathen Systems finden sich verschiedene Subpopulationen der MSC. Zu ihnen gehören die BMSC, die pulpalen MSC (DPSC), die MSC des Zahnfollikels (DFPC), die gingivalen MSC (G-MSC), die MSC des parodontalen Ligaments (PDLSC), die MSC der apikalen Papille (SCAP) [194] und jene des Alveolarknochens (AB-MSC). Sie alle sind Produkte der ektomesenchymalen Neuralleiste. Die innere Schicht der Follikel differenziert zu ABMSC, SCAP, Fibroblasten und Zellen des parodontalen Ligaments. Letztere bringen das dentogingivale Fasersystem hervor, welches zusammen mit den Fibroblasten, Zellen der äußeren Schicht des Zahnfollikels und weiteren Zellen der Neuralleiste die lamina propria gingivae mit ihren G-MSC bildet [36, 153].

Die Balance zwischen parodontaler Inflammation/Regeneration ist eng vergesellschaftet mit der Aktivität vorhandener Stammzellen [195]. Hier ist gerade die Beeinflussung des regenerativen Potentials durch vom Mikromilieu ausgehende Stimuli und verschiedene zelluläre Mediatoren von großem Interesse [196, 197].

Pulpale Stammzellen (DPSC) bewiesen in Experimenten ähnliches Potential wie aus dem Knochenmark extrahierte BMSC. Diese stehen in Bezug auf die Interaktion mit dem inflammatorischen pulpalen Mikroenvironment und dessen Einfluss auf die regenerativen Kapazitäten pulpalen Gewebes zur Unterstützung der dentalen Vitalität im Mittelpunkt endodontisch-regenerativer Investigationen [198].

#### **1.4.3.3.1. Gingivale Mesenchymale Stammzellen**

Die Gingiva erregte auf Grund ihrer einzigartigen regenerativen Fähigkeiten und Tendenz zur sehr raschen, narbenarmen Heilung Interesse [199]. Sie ist aus zwei Schichten aufgebaut: dem Epithel und der darunter gelegenen bindegewebigen *lamina propria* [200]. Sowohl im Bereich der befestigten, als auch der beweglichen Gingiva können mittels Stro-1 Zellen isoliert werden, die gemäß der ISCT [171] Eigenschaften mesenchymaler Stammzellen besitzen [153, 201]. *In vitro* können die G-MSC zu Osteoblasten, Chondroblasten, Adipozyten, Neuralzellen [202] und Epithelien differenzieren und auch *in vivo* zeigten sich bei Transplantationsversuchen an Mäusen Neubildungen von Bindegewebe, Knochen-/Zementmatrix und Kollagen [203]. Sie exprimieren CD73, CD90, und CD105 (>95%) sowie weitere MSC spezifische Marker (Stro-1, CD146) [204], bei geringer Expression von CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45, CD79 $\alpha$  und HLA-

DR (<5%). Auf mRNA Ebene zeigten sich pluripotenzassoziierte Transkripte von KLF4/8, Oct-4, MSX, REX, NANOG, NESTIN und SOX2 [204-206].

Die gingivalen Stammzellen können weiter in Subpopulationen unterteilt werden. Dabei werden anhand des Zustands des Ursprungsgewebes G-MSc der entzündeten Gingiva [207, 208] jene einer hyperplastischen Gingiva und die der gesunden Gingiva unterschieden [209]. Außerdem können gingivale Fibroblasten zu Stammzellen induziert werden [210]. Embryologisch stammen 90% der G-MSc der Neuralleiste (Ektoderm) ab, die verbleibenden 10% hingegen dem Mesoderm [3, 211].

Im Gegensatz zu anderen oralen Stammzellen sind G-MSc unter minimalinvasiven Voraussetzungen im Rahmen von kleinen Eingriffen wie der Gingivektomie unter lokaler Anästhesie zu gewinnen und stellen somit ein leicht zu erreichendes Reservoir an MSc dar [212].

### 1.4.3.3.2. TLR-Expression oraler MSc

Rezeptor	G-MSc [76]		DPSC [213]		AB-MSc* [214]
TLR1	Ja	↑	Ja	↓	Ja
TLR2	Ja	↑	Ja	↑	Ja
TLR3	Ja	-	Ja	↑	Nein
TLR4	Ja	↑	Ja	↑	Ja
TLR5	Ja	↑	Ja	↑	Ja
TLR6	Ja	↓	Ja	-	Ja
TLR7	Ja	↑	Ja	↓	Ja
TLR8	Nein	-	Ja	↑	Ja
TLR9	Nein	-	Ja	↓	Nein
TLR10	Ja	-	Ja	↓	Ja

**\*Daten zur Expression bei Inflammation existieren noch nicht**

Tabelle 3 TLR Expression oraler MScs und der Einfluss proinflammatorischen Mediums in vitro

Expression bei Inflammation

↑ Erhöht  
↓ Vermindert  
- Identisch

#### 1.4.3.4. Evidenz zur parodontalen Therapie

In der Hoffnung, das Potential regenerativer Verfahren der Parodontologie durch die einzigartigen Fähigkeiten mesenchymaler Stammzellen zu verbessern, wurden verschiedene Untersuchungen zur therapeutischen Bedeutung mesenchymaler Stammzellen durchgeführt. Die Forschung auf diesem Feld befindet sich allerdings noch in der präklinischen Phase, sodass Aussagen bislang nur anhand von *in vitro* Versuchen und Tiermodellen anzustellen sind.

Ein Ansatz ist, die ossäre und zementäre Neubildung im Rahmen einer *guided bone regeneration* (GBR), deren Indikation bei konventioneller Durchführung auf dreiwandige knöcherne Einbrüche und Furkationsgrad II limitiert ist, durch den Einsatz von MSC zu unterstützen [215]. Einen solchen Ansatz verfolgten *Suaid et al.* bei Versuchen an Klasse II Furkationen von Hunden. Dabei stellten sie durch Einsatz von Zellen des parodontalen Ligaments (PDL) im Vergleich zur Kontrolle eine verstärkte Neubildung von Zement und Alveolarknochen sowie ein kürzeres Saumepithel fest [216].

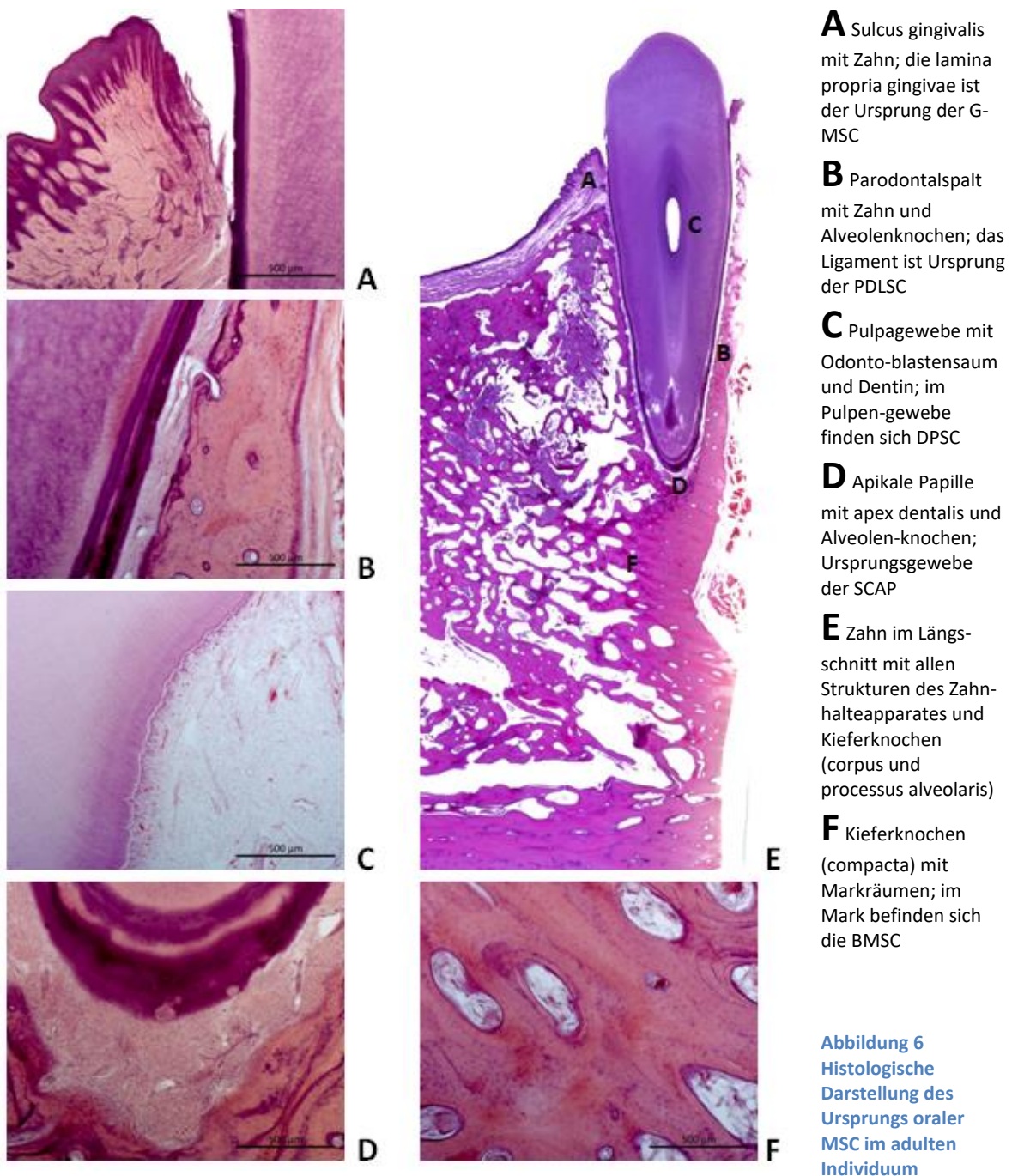
Die Supplementierung autologer Knochentransplantate mit MSC wurde unter Verwendung von DP MSC und den funktionell ähnlichen BMSC im Tiermodell an Hunden probiert, es konnte aber keine signifikante Verbesserung in der Regeneration der behandelten Defekte nachgewiesen werden [217].

Die Kombinationen von *BioOss* und Kollagen mit MSC zeigten hingegen klinisch und histologisch ein signifikant besseres *Outcome* im Vergleich zur Monotherapie mit den Trägermaterialien [217]. *El-Sayed et al.* bewiesen eine verstärkte Regeneration (gemessen über den *clinical attachment loss*) nach Behandlung induzierter parodontaler Defekte am Schweinemodell bei G- MSC Supplement [218].

Neben der Kombination mit verschiedenen Trägermaterialien und Membranen können die Eigenschaften von MSC durch gezielte Prästimulation beeinflusst werden. Der klinische Einsatz induzierter G- MSC ist allerdings noch nicht hinreichend erforscht [219].

Da mittlerweile die immunomodulatorischen Eigenschaften und die inflammatorischen Interaktionen der MSC vielmehr als maßgeblich zur erfolgreichen Regeneration und Reparatur gelten, wäre eine rezeptor-/substratspezifische Prästimulation ebenfalls denkbar. Zu diesem therapeutischen Ansatz wurden bereits einige *in vitro* Investigationen

durchgeführt. Die Stimulation von G-MSC mittels Vitamin A und Retinol im inflammatorischen Environment sowie die Einflüsse der Mustererkennungsrezeptoren auf die Pluripotenz von MSC könnten neue Wegweiser darstellen, geeignete Behandlungskonzepte zu etablieren [220, 221].



## 1.5. Ziel der Studie

Obwohl sich die aktuellen Kenntnisse zur oralen Immunologie und zu G-MSC modulierten Einflüssen auf inflammatorische Prozesse des Parodonts verbessert haben, verbleiben viele Wirkungsmechanismen einzelner Rezeptoren in der Kaskade bislang noch weitestgehend unklar. Diese Studie knüpft an aktuelle Erkenntnisse zur Expression von TLR durch gingivale mesenchymale Stammzellen an [76] und beleuchtet explizit die Veränderung pluripotenz-assoziiertes Merkmale und multilinearer Differenzierung durch TLR3 Ligation *in vitro* [222]. Dies wird uns Erkenntnisse über die Funktion von TLR3 in G-MSCs und die Verbindung zu (patho-) physiologischen parodontalen Umbauprozessen liefern.

## **2. Materialien und Methoden**

### **2.1. Votum der Ethikkommission und Patientenaufklärung**

Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel unter der IRB-Nummer D513/17 als Bestandteil des Studienplans zur „*In-vitro Untersuchung der Wirkung verschiedener Biomoleküle und Entzündung auf gingivale Stammzellen*“ vom 18.07.2017 genehmigt.

Die Patienten wurden vor der Gewebeentnahme individuell aufgeklärt und die schriftlichen Einwilligungen eingeholt. Kopien beider Dokumente sind der Arbeit beigelegt (siehe Anhang). Alle Proben wurden vor Kultivierung pseudonymisiert.

### **2.2. Isolation und Kultivierung der MACS<sup>+</sup> Zellen**

#### **2.2.1. Probenentnahme**

Fünf Gingivaproben (n=5) wurden im Rahmen von Elektiveingriffen an klinisch gesunden Patienten entnommen: P1 (17♀), P2 (18♀), P3 (20♀), P4 (27♂) und P5 (57♂). Die Eingriffe erfolgten unter Lokalanästhesie in der mund-kiefer-gesichtschirurgischen Praxis Kerscher Körner Föge in Kiel. Die Proben wurden nach der Entnahme in je einem sterilen 50ml *Falcon* Röhrchen (Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland) mit 15ml Basisnährmedium [*Minimum Essential Medium Eagle Alpha Modifikation* ( $\alpha$ -MEM, Sigma-Aldrich, München, Deutschland), 100U/ml Penicillin, 100 $\mu$ g/ml Streptomycin (Biochrom, Berlin, Deutschland), 1% Amphotericin (BioWest, Nuaille, Frankreich), 15% fötalem Kälberserum (FCS, HyClone) und 200mmol/ml L-Glutamin (Biochrom)], gesammelt.

#### **2.2.2. Kultivierung des gingivalen Gewebes**

Alle folgend beschriebenen Schritte wurden an der mikrobiologischen Sicherheitswerkbank (Hera Safe, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) durchgeführt.

Die gewonnenen Proben wurden dreimal mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, Biochrom) gewaschen, mit 70%igem Ethanol (Sigma-Aldrich) desinfiziert und ein weiteres Mal mit PBS



gewaschen. Anschließend folgte die Zerkleinerung der Proben in Stücke von  $1\text{mm}^3$ , welche je Patient auf 4 Petrischalen (Sarstedt AG) verteilt wurden. Nach 30 Minuten hatten sich die Stücke an die Polymethylmethacrylatoberfläche (PMMA) geheftet und konnten mit je 10ml Basisnährmedium bedeckt werden. Es folgte eine einwöchige Inkubation (Brutschrank, Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland) bei  $37^\circ\text{C}$  in einer 5%igen  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre. Die Kontrolle des Progresses erfolgte mittels phasenkontrastinvertierten Mikroskops (Axiovert 40C, Zeiss, Oberkochen, Deutschland). Nachdem sich ein breiter Saum Mischgewebe um die Proben gebildet hatte, wurde diese zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mittels Zellschabern (*cell scraper*; Sarstedt AG) von der Petrischale gelöst. Die Exzisate wurden verworfen. Die Zellen in der Suspension konnten nun durch Zentrifugation (Zentrifuge 5810R; Eppendorf, Hamburg, Deutschland) vom PBS getrennt und der Supernant abgesaugt werden (Vacusafe Comfort, IBS Integra Biosciences, Chur, Schweiz). Nach Resuspension in 25ml Basisnährmedium konnten die gewonnenen Zellen in 75ml Zellkulturflaschen (Sarstedt AG) transferiert werden. Die Flaschen wurden inkubiert ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ). Medienwechsel und mikroskopische Kontrollen erfolgten dreimal wöchentlich.

### **2.2.3. Magnetic Activated Cell Sorting**

Nach Erreichen einer 80%igen Konfluenz erfolgte die Sortierung durch das MACS Verfahren (*magnetic activated cell sorting*) gemäß der Herstelleranweisungen (MACS Cell Separation Kit, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland).

#### **Vorbereitung der Zellen**

Die Zellen wurden nach Absaugen des Mediums dreimal mit PBS gewaschen und danach mit 10ml *Accutase* (10%) benetzt. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten konnten die Zellen durch Spülen mit PBS gelöst und in 50ml *Falcon* Röhrchen gefüllt werden. Nach Zentrifugation ( $37^\circ\text{C}$ , 370G, 10 Minuten) wurde der Supernant abgesaugt und die Zellen in 10ml PBS neu gelöst (Vortex Genie 2, Bender&Holbein AG, Bruchsal, Deutschland).

### **Antikörperbindung an Stro-1 und Kopplung der MicroBeads**

Zur Ermittlung der Antikörperkonzentrationen musste die Zellzahl der vorbereiteten Zellsuspensionen bestimmt werden. Dies erfolgte unter Verwendung einer mit 70% Ethanol desinfizierten Neubauerzählkammer (Roth, Karlsruhe, Deutschland). Nach abgeschlossener Messung folgte eine erneute Zentrifugation (37°C, 370G, 10 Minuten) und das Absaugen des Supernatanten.

Pro  $10^7$  Zellen wurden 70µl frisch angesetzter MACS-Puffer (Miltenyi Biotec), 20µl Stro-1 Antikörper (STRO-1 Alexa 647, BioLegend, San Diego, USA) und 20µl MicroBeads (Miltenyi Biotec) zugegeben und vermischt. Es folgte eine kalte Inkubation (4°C, 15 Minuten).

Anschließend wurden die Zellen mit 1200µl PBS verdünnt und nach Zentrifugation (4°C, 370G, 10 Minuten) von überschüssigen Antikörpern und Microbeads gereinigt. Je Probe folgte die Resuspension in 5ml MACS-Puffer. Zur Entfernung von eventuellen Zellkonglomeraten wurde die Zellsuspension unter Zugabe von 1ml MACS-Puffer filtriert.

### **Zellsortierung**

Zur magnetischen Separation der markierten Zellen wurde der MACS-Multistand (Miltenyi Biotec) aufgebaut. Der Magnet (MiniMACS Separator, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) wurde angeheftet und die Säule (MS Column, Miltenyi Biotec) eingehängt. Für jede Probe musste eine neue Säule verwendet werden. Zunächst musste die Säule mit 500µl MACS-Puffer gespült werden, bevor die Probe zugegeben werden konnte. Das Filtrat wurde als MACS<sup>-</sup> aufgefangen. Nach vollständigem Durchlauf der Probe wurde die Säule aus dem Magneten entfernt und im Nachbarraum mit dem Stempel mit 1ml MACS Puffer ausgepresst. Die so gewonnene Suspension wurde als MACS<sup>+</sup> bezeichnet. Die MACS<sup>-</sup>Fraktionen wurden für anschließende Arbeiten eingefroren und sollten in dieser Arbeit keine weitere Verwendung finden.

### **2.2.4. Zellselektion durch Auswahl monoklonaler Kolonien**

Die MACS<sup>+</sup>-Fraktion wurde in je 10ml Basisnährmedium suspendiert und in Petrischalen (Petrischale 92 x 16 mm ohne Nocken, Sarstedt AG) kultiviert.

Nach Bildung scharf begrenzter Zellagglomerate (Kolonien), wurden diese selektiv unter mikroskopischer Kontrolle mit Zellschabern von der PMMA gelöst, in sterilen Zellkulturflaschen kultiviert und inkubiert (37°C, 5% CO<sub>2</sub>).

### 2.2.5. Kultivierung MACS<sup>+</sup> Zellen

Medienwechsel erfolgten erstmals nach 3 Tagen, danach dreimal pro Woche. Nachdem die Kulturen erneut eine Zelldichte von 80-85% erreicht hatten, wurden die Zellen passagiert und auf je 4 Flaschen aufgeteilt.

## 2.3. Nachweis der Expression von TLR3

Die MACS<sup>+</sup> Zellen der dritten Passage wurden auf die Expression von TLR3 durch intrazelluläre Anfärbung des Rezeptors und Durchflusszytometrie sowie die Transkription TLR3 spezifischer mRNA mittels RT-qPCR bestimmt.

### 2.3.1. Durchflusszytometrie

Die Permeabilisierung und Fixierung der Zellen erfolgte mit dem *BD Cytofix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Solution* Kit (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA).

#### Vorbereitung der Kulturen

MACS<sup>+</sup> Zellen der dritten Passage wurden nach Absaugen des Nährmediums mit PBS gewaschen und mit *Accutase* (10%) benetzt. Es folgte die Inkubation (37°C, 15 Minuten). Nach Lösen der Zellen wurden diese in 50ml *Falcon* Röhrchen pipettiert und zentrifugiert (37°C, 370G, 10 Minuten). Die Supernatanten wurden entfernt und die Zellpellets in 250µl *fixation/permeabilization solution* (BD Biosciences) mit 10µl *FCR Blocking Reagent* (Miltenyi Biotec) resuspendiert und inkubiert (4°C, 20 Minuten). Danach wurden die Zellen noch zweimal mit *Saponin* (BD Perm/Wash™ buffer, BD Biosciences) gewaschen.

#### Intrazelluläre TLR3 Färbung

Nach Resuspension der Zellpellets in 50µl *BD Perm/Wash Puffer* wurden 5µl *2-anti TLR3-PE* und 5µl *1-rat IgG1-k-PE Isotype Kontrolle* (beide BD Biosciences) zugegeben und (da es sich bei der Antikörperbindung um eine reversible Reaktion mit exothermer Hinreaktion handelt) im Dunkeln inkubiert (4°C, 30 Minuten). Die Proben wurden zwei weitere Male mit je 1ml *BD*

*Perm/Wash Puffer* gewaschen und schließlich in 200µl *Staining Puffer* (BD Biosciences) resuspendiert.

### **Messung**

Die Fluoreszenzmessung der Proben erfolgte mittels *FACSCalibur* E6370 und der Software *FACSComp 5.1.1* (beide: BD Biosciences).

### **2.3.2. Real-Time-Polymerasekettenreaktion**

Ergänzend zur durchflusszytometrischen Detektion von TLR3 wurde auch die Expression TLR3 spezifischer mRNA nach RNA-Extraktion und reverser Transkription durch RT-qPCR untersucht.

#### **Vorbereitung der Proben**

Die MACS<sup>+</sup> Zellen wurden mittels *Accutase* (10%) und halbstündlicher Inkubation (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) aus den Zellkulturflaschen gelöst. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert und das Eluat entfernt (37°C, 370G, 10 Minuten). Nach Resuspension in Basisnähmedium und Bestimmung der Zellzahl wurden 3x10<sup>5</sup> Zellen je Probe auf 6-Well-Platten bis zu einer Konfluenz von 80% kultiviert (37°C, 5% CO<sub>2</sub>).

#### **RNA-Extraktion**

Die RNA-Extraktion wurde mit dem *Rneasy® Protect Mini Kit* (250) (Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt. Die Medien wurden abgesaugt und die Zellen mit je 300µl *Lysis Puffer benetzt* [*RLT-Puffer* (Qiagen) /*β-Mercaptoethanol* (Sigma-Aldrich); 100:1]. Die Zellen wurden mit Zellschabern und durch Spülen mit je 300µl *Ethanol* (70%) gelöst, in Zentrifugenröhrchen (*Collection Tubes* (2 ml); Qiagen) mit Filter (*Rneasy MiniSpinColumns*; Qiagen) pipettiert und zentrifugiert (*Centrifuge* 5417 R, Eppendorf, 10000G, 20s). Das Eluat wurde verworfen, je 700µl *RW1 Puffer* (Qiagen) zugegeben und erneut zentrifugiert (10000G, 20s). Das Eluat wurde erneut verworfen und 500µl *RPE-Puffer* (Qiagen) zugegeben und zentrifugiert (10000G, 20s). Das Eluat wurde wiederum verworfen und der Vorgang wiederholt. Nach trockener Zentrifugation (10000G, 20s) konnten die Filter in neue 1,5ml Röhrchen gesteckt und mit je 25µl RNase freiem Wasser (Qiagen) zentrifugiert (10000G, 1min) werden.

## Reverse Transkription (RT)

Zur Reversen Transkription wurde das *QuantiTect® Reverse Transcription Kit* (Qiagen) verwendet. Die in den gewonnenen Proben enthaltene RNA wurde photometrisch (6131 *BioPhotometer*, Eppendorf) quantifiziert. Es folgte eine Verdünnung mit RNase freiem Wasser auf 1µg/10µl. Je Probe wurden 12µl [und zusätzlich in ein weiteres als Kontrolle des *DNA Wipeouts* (no-RT)] in PCR-Röhrchen (Qiagen) gegeben. Zur Reinigung der Proben von gDNA wurden sie mit je 2µl *gDNA Wipeout Puffer* (Qiagen) versetzt. Die Inkubation erfolgte bei 42°C für 2 Minuten und wurde abrupt mittels Eisbades beendet. Es folgte die Zugabe der Komponenten zur Reversen Transkription. Für die no-RT-Probe wurde keine RT durchgeführt.

Komponente:	Volumen je Probe [µl]	(alle Qiagen) <a href="#">Tabelle 4</a> Reaktionsgemisch zur reversen Transkription
<b>RT-master mix (Reverse Transkriptase)</b>	1	
<b>Quantiscript RT Buffer, 5x</b>	4	
<b>RT Primer Mix</b>	1	
<b>RNA Probe</b>	1	

Nach Inkubation (42°C, 15min) wurde die RT durch Denaturierung der Reversen Transkriptase (95°C, 3 Minuten) gestoppt. Die Proben wurden im Verhältnis 1:10 mit RNase freiem Wasser verdünnt.

## LightCycling (qPCR mit Sonden)

Pro Probe und Primer wurden je 5µl der cDNA-Probe mit 4µl RNase freiem Wasser, 10µl *FastStart Essential DNA Probes Master* (Roche Life Science, Prenzberg, Deutschland) und 1µl des jeweiligen Primers auf einer *96-Well-Platte* (96-Well Hard Shell Platte; Roche Life Science) vermischt. Selbiges geschah mit der no-RT Probe sowie einer Probe DNase freien Wassers.

Gen	Assay ID	Gene Symbol	Accession ID	Primer Sequenz
<b>PGK-1</b>	102083	PGK1 H. sapiens	ENST00000373316	FWD: GGAGAACCTCCGCTTTCAT REV: GCTGGCTCGGCTTTAACC
<b>TLR3</b>	111008	TLR3 H.sapiens	ENST00000296795	FWD: TTTGCGAAGAGGAATGTTAAATCT REV: CACCTATCCGTTCTTCTGAACTG

*PGK-1* (Phosphoglycerate kinase 1), *TLR3* (Toll-like Rezeptor 3)

Alle: Roche Life Science

[Tabelle 5 Primerliste zum Nachweis TLR3 assoziierter mRNA Transkription](#)

Die Platte wurde mit einer Folie (Thermo Fisher Scientific) verklebt und die *LightCycling* Prozedur für 40 Zyklen gestartet (LightCycler 96; Roche Life Science). Die Messung der Fluoreszenz wurde während der Denaturierung durchgeführt.

Programm	Temperatur [°C]	Dauer [s]	Zyklen
Vorinkubation	95	600	1
Denaturierung	95	10	
Abkühlung	60	30	40
Elongation	72	1	
Abkühlung	37	30	1

Tabelle 6 Thermocycling im LightCycler bei RT-qPCR

Die Anzahl an Transkripten wurde relativ zur Expression von PGK1 mit der  $\Delta\Delta\text{CP}$ -Methode bestimmt.

## 2.4. Untersuchung MSC-spezifischer Zellmerkmale

### 2.4.1. Durchflusszytometrie

Die MACS<sup>+</sup> Zellen der dritten Passage wurden mittels Durchflusszytometrie auf MSC spezifische Marker getestet. Dabei wurde die Expression definierter *Clusters of Differentiation* (CD) nach Stimulation mit Poly(I:C) (InvivoGen, San Diego, Kalifornien, USA) mit einer Kontrolle verglichen.

#### Stimulation der Zellen

Je Patient wurden zwei 75ml Zellkulturflaschen mit kultivierten MACS<sup>+</sup> Zellen der dritten Passage verwendet. Davon wurde eine Flasche mit *Poly(I:C)(HMW)* supplementiertem Basisnährmedium (10µg/ml) über 24 Stunden (37°C, 5% CO<sub>2</sub>,) stimuliert. Die Kontrollen erhielten weiterhin Basisnährmedium.

#### Vorbereitung der Proben

Die MACS<sup>+</sup> Zellen der dritten Passage wurden nach Absaugen des Mediums dreimal mit PBS gewaschen und mittels *Accutase* (10%) benetzt und inkubiert (37°C, 15 Minuten). Die Zellsuspensionen wurden in 50ml *Falcon Röhrchen* pipettiert. Nach Zentrifugation (37°C,

370G, 7 Minuten) wurden die Supernanten abgesaugt und die Zellpellets ein weiteres Mal mit PBS gewaschen. Danach wurden sie in 10ml PBS resuspendiert und ihre Konzentration mittels Neubauerzählkammer bestimmt. Je Patient sollten sieben Proben je  $10^6$  Zellen hergestellt werden, daher wurden die Zellen in zwei 5ml *FACS-Röhrchen* (Sarstedt AG) transferiert und das Volumen auf je 100 $\mu$ l pro Probe mit PBS aufgefüllt.

### Antikörperbindung und Fixierung

Zu jedem Röhrchen wurden 5 $\mu$ l *FCR-Blocking-Reagent* (Miltenyi Biotec) sowie Antikörper und Isotyp Kontrolle gegeben und vermischt. Anschließend folgte eine Inkubation im Dunkeln (4°C, 30min). Ungebundene Antikörper wurden durch Waschung mit PBS entfernt. Nach Zentrifugation (37°C, 370G, 7 Minuten) wurden die Supernanten abgekippt und die Zellpellets mit 300 $\mu$ l *FACS-Puffer* (PBS, 0,5-1,0% BSA, 0,1% Natriumacid) bedeckt.

Antikörper	Menge (AK)	Isotyp Kontrolle	Menge (IK)
antiCD14-FITC, human	10 $\mu$ l	mouse IgG2a-FITC	10 $\mu$ l
antiCD90-PE, human	10 $\mu$ l	mouse IgG1-PE	10 $\mu$ l
antiCD105-PE, human	10 $\mu$ l	mouse IgG1-PE	10 $\mu$ l
antiCD73-PE, human	10 $\mu$ l	mouse IgG1-PE	10 $\mu$ l
antiCD34-PE, human	10 $\mu$ l	mouse IgG2a-PE	10 $\mu$ l
antiCD45-APC, human	10 $\mu$ l	mouse IgG2a-APC	10 $\mu$ l
antiCD146-PE, human	10 $\mu$ l	mouse IgG1-PE	10 $\mu$ l

Alle: Miltenyi Biotec

Tabelle 7 Antikörper zur durchflusszytometrischen Bestimmung der G-MSC Marker

### Messung

Die Fluoreszenzmessung der Proben erfolgte mittels *FACSCalibur E6370* und der Software *FACSComp 5.1.1* (Becton Dickinson).

### 2.4.2. Real-Time-Polymerasekettenreaktion

Der Nachweis definierter mRNA wurde nach RNA Extraktion und *Reverser Transkription* (RT) unter Verwendung einer *Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion* (RT-qPCR) durchgeführt.

## Vorbereitung der Kulturen

Je Patient wurden zwei Kulturen a  $3 \times 10^5$  MACS<sup>+</sup> Zellen der dritten Passage auf 6-Well-Platten unter Anwendung von *Accutase* und Neubauerzählkammer vorbereitet.

## Stimulation

Nach Erreichen einer Zelldichte von 80% wurde je eine Kultur mit Poly(I:C) supplementiertem Basisnährmedium (10µg/ml) für 24h stimuliert. Die Kontrollen erhielten weiter Basisnährmedium.

## RT-qPCR

Die RT-qPCR wurde analog zum oben beschriebenen Vorgehen unter Verwendung des *Rneasy® Protect Mini Kit* (250) (Qiagen) und des *QuantiTect® Reverse Transcription Kit* (Qiagen) durchgeführt. Je 5µl der gewonnenen cDNA Probe wurde mit 4µl RNase freiem Wasser, 10µl *FastStart Essential DNA Probes Master* (Roche Life Science) und 1µl des entsprechenden Primers vermischt.

Gen	Assay ID	Gene Symbol	Accession ID	Primer Sequenz
<b>PGK-1</b>	102083	PGK1 H. sapiens	ENST00000373316	FWD: GGAGAACCTCCGCTTTCAT REV: GCTGGCTCGGCTTTAACC
<b>NANOG</b>	148147	NANOG H.sapiens	ENST00000229307	FWD: GAGATGCCTCACACGGAGAC REV: AGGGCTGTCCTGAATAAGCA
<b>OCT4A</b>	113034	OCT4A H.sapiens	ENST00000259915	FWD: GCAAAACCCGGAGGAGTC REV: TCCCAGGGTGATCCTCTCT
<b>SOX2</b>	111867	SOX2 H.sapiens	ENST00000325404	FWD: ATGGGTTCCGGTGGTCAAGT REV: GGAGGAAGAGGTAACCACAGG
<b>KLF4</b>	125775	KLF4 H. sapiens	ENST00000358094	FWD: CGCGCTGAGGAGGAGCC REV: CCTGGGTCATGTTCTGAGGGAG
<b>MSX-1</b>	137021	MSX-1 H. sapiens	ENST00000382723	FWD: AGTTCTCCAGTCGCTCAGC REV: GGAACCATATCTTCACCTGCGT
<b>REX-1</b>	122584	REXO1 H. sapiens	ENST00000170168	FWD: TGAAAGCCCACATCCTAACG REV: CAAGCTATCCTCTGCTTTGG

*PGK-1* (Phosphoglycerate kinase 1), *MSX-1* (*msh homeobox 1*), *NANOG* (*NANOG homeobox*), *SOX2* (*sex determining region Y- box 2*), *OCT4A* (*octamer- binding transcription factor 4*), *REX-1* (*RNA exonuclease 1 homolog*), *KLF4* (*Kruppel like factor 4*)

\*Alle: Roche Life Science

**Tabelle 8 Primerliste zur Analyse MSC spezifischer mRNA Transkription**



Die *LightCycling* Prozedur wurde über 40 Zyklen durchgeführt (Light Cycler 96; Roche Life Science) und die Transkripte mit der  $\Delta\Delta$ CP-Methode relativ zur Expression von PGK1 bestimmt.

### **2.4.3. Koloniebildung**

Zur Untersuchung der koloniebildenden Eigenschaften der kultivierten Zellen wurden je Probe 1,63 Zellen pro  $\text{cm}^2$  (~110 Zellen) in Petrischalen mit je 10ml Basisnährmedium kultiviert [153, 223].

#### **Vorbereitung der Kulturen**

MACS<sup>+</sup> Zellen der dritten Passage wurden in oben genannter Weise mittels Accutase (10%) abgelöst und suspendiert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte unter Verwendung einer Neubauerzählkammer. Pro Petrischale wurde ein Volumen entsprechend der benötigten Zellzahl abpipettiert (Pipette, Eppendorf) und in ein *Falcon* Röhrchen gefüllt. Dieses wurde nun bis zu einem Volumen von 10ml mit Basisnährmedium aufgefüllt und in eine Petrischale pipettiert. Nach mikroskopischer Kontrolle wurden die Schalen für 24 Stunden inkubiert (37°C, 5% CO<sub>2</sub>).

#### **Stimulation**

Die Stimulation erfolgte für 12 Tage mit Poly(I:C) supplementiertem Basisnährmedium (10µg/ml). Die Kontrollen erhielten weiterhin Basisnährmedium. Die Inkubation erfolgte unter Standardbedingungen (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Medienwechsel wurden jeden zweiten Tag durchgeführt.

#### **Färbung der Kolonien mit Kristallviolett und Zählung**

Nach Ansetzen des Kristallviolettfarbstoffs (0,3g, Merck, Darmstadt, Deutschland) /100ml *Aqua dest.* [Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Langenhagen, Deutschland]), wurde das Medium von den Zellen abgesaugt und eine zweifache Waschung durchgeführt. Zur Fixierung der Zellen wurden 5ml Ethanol (80%, -4°C) verwendet. Nach einer Fixierungszeit von 5 Minuten wurde der Alkohol abgekippt und 5ml Farbstoff zugegeben. Dieser wirkte 10 Minuten unter ständigem Schwenken (*Rotamax*, Heidolph, Schwabach, Deutschland) ein und wurde danach abgekippt. Nach zweimaligem Waschen mit destilliertem Wasser und anschließendem

Trocknen konnten die Kolonien fotografisch dokumentiert werden (Canon 6D Mark II [Canon Inc. Tokio, Japan] mit Sigma 105mm Makroobjektiv [Sigma Corporation, Kawasaki, Japan]). Zellansammlungen von  $\geq 50$  Zellen wurden als Kolonien gezählt [153]. Die Zählungen erfolgten durch drei gleichermaßen geschulte und erfahrene Personen.

#### **2.4.4. Metabolische Aktivität**

Der MTT-Test wurde mit dem *Cell proliferation Kit I (MTT)* (Roche Life Science) gemäß der Herstelleranweisungen durchgeführt.

##### **Vorbereitung der Kulturen**

Die Zellkulturen MACS<sup>+</sup> Zellen der dritten Passage wurden gewaschen, durch *Accutase* aus den Zellkulturflaschen gelöst, mittels Zentrifugation (37°C, 370G, 10 Minuten) getrennt und die Zellzahl mittels Neubauerzählkammer bestimmt). Die Zellen wurden resuspendiert und je  $5 \times 10^3$  Zellen/Probe in *24-Well-Hard-Shell-Platte* (Roche Life Science) verteilt. Es folgte die Herstellung eines Standards von  $5 \times 10^4$  Zellen. Die Zellen wurden 24 Stunden inkubiert (37°C, 5% CO<sub>2</sub>).

##### **Stimulation**

Nach 24 Stunden wurden die Zellen mittels phasenkontrastinvertierten Mikroskops kontrolliert und die Medien abgesaugt. Es wurden Kontroll- und Stimulationsmedien zugegeben und die Zellen für 1, 6 und 12 Tage stimuliert (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Das Kontrollmedium entsprach dem Basisnährmedium, für das Stimulationsmedium wurde Poly(I:C) HMW supplementiert (10µg/ml). Medienwechsel erfolgten dreimal pro Woche.

##### **Färbung**

Nach Absaugen der Medien wurden je 100µl des *MTT labeling reagent* (0,5mg/ml; Roche Life Science) den Wells zugegeben. Es folgte eine Inkubation für 4 Stunden (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Die Zellen wurden unter Zugabe von je 100µl *solubilisation solution* (Roche Life Science) und weiterer 12-stündiger Inkubation (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) lysiert.

##### **Messung**

Die Optische Dichte wurde mittels Multiscan Go Mikrotitrierplatten-Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific) bei einer Wellenlänge von 550nm bestimmt. Der Standard wurde

im Verhältnis 1:1 geometrisch verdünnt und die Probekonzentration durch Vergleich mit der Standardkurve bestimmt (ScanIt software for Microplate Readers v. 5.0.0.42, Thermo Fisher Scientific).

#### **2.4.5. Proliferation**

In Ergänzung zur MTT wurde die Proliferation der MACS<sup>+</sup> Zellen über einen Zeitraum von 12 Tagen unter Poly(I:C) Stimulation untersucht.

##### **Vorbereitung der Kulturen**

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit *Accutase* von der PMMA-Oberfläche der Zellkulturflaschen abgelöst. Nach Zentrifugation (37°C, 370G, 10 Minuten) und Entfernung des Supernatanten wurde die Zellzahl unter Einsatz der Neubauerzählkammer bestimmt. Je Patient, Tag und Stimulation wurden 10<sup>4</sup> Zellen in 24-Well-hard-shell-Platten ausgesät und für 24h inkubiert (37°C, 5% CO<sub>2</sub>).

##### **Stimulation**

Nach mikroskopischer Kontrolle der Wells wurde das Stimulationsmedium, bestehend aus Basisnährmedium und Poly(I:C) Supplement (10µg/ml), zugegeben. Die Kontrollen erhielten weiter Basisnährmedium. Die Stimulation erstreckte sich über ein Intervall von 1 bis 12 Tagen. Die Proben wurden unter Standardbedingungen inkubiert (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), wobei die Medien dreimal wöchentlich erneuert wurden.

##### **Messung**

Die Zählungen wurden an aufeinander folgenden Tagen über einen Gesamtzeitraum von 12 Tagen nach Stimulationsbeginn durchgeführt. Die Medien der entsprechenden Tage wurden abgesaugt und 1ml *Accutase* (10%) zugegeben. Nach einer halbstündigen Inkubationszeit unter Standardbedingungen (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) konnten die Zellen mittels Neubauerzählkammer quantifiziert werden. Um die Genauigkeit zu erhöhen, wurden alle Wells 3x gemessen und der Mittelwert bestimmt.

## 2.4.6. Multilineare Differenzierung (Färbung und Quantifizierung)

Untersucht wurde das osteogene, adipogene und chondrogene Differenzierungspotential der MACS<sup>+</sup> Zellen in qualitativer Weise [153, 171, 223]. Außerdem wurde die Menge des gebundenen Farbstoffs nach Extraktion mittels Photometrie quantifiziert.

### 2.4.6.1. Osteogene Differenzierung

#### Vorbereitung der Kulturen

Die Gewinnung und Zählung der MACS<sup>+</sup> Zellen der dritten Passage erfolgte wie oben beschrieben. Je Patient wurden drei Wells auf 6-Well-Platten (Sarstedt AG) mit einer Zelldichte von  $2 \times 10^4$  Zellen je Well besiedelt und inkubiert (37°C, 5% CO<sub>2</sub>).

#### Stimulation

Die Stimulation der Zellen begann nach Erreichen einer Zelldichte von 80-85% durch Zugabe von 2ml osteogenem Medium (PromoCell, Heidelberg, Deutschland) über einen Zeitraum von 3 Wochen. Die Kontrollen erhielten weiterhin Basisnährmedium. Die Negativkontrolle erfolgte über Basisnährmedium. Medienwechsel wurden dreimal wöchentlich durchgeführt und die Zellen unter Standardbedingungen inkubiert (37°C, 5% CO<sub>2</sub>).

#### Färbung

Nach 3 Wochen Stimulationszeit wurden die Medien abgesaugt und die Zellkulturen dreimal mit PBS gewaschen. Die Wells wurden mit Ethanol (70%, 0°C) für 5 Minuten fixiert und danach mit je 2ml *Alizarin Rot* (2%, Sigma-Aldrich) für 5 Minuten gefärbt. Zur Minimierung von Klumpen wurde der Farbstoff mit Salzsäure (1Mol, Merck KGaA) und Natronlauge (1Mol, Merck KGaA) tropfenweise auf einen pH-Wert von 4,1-4,2 titriert und für 5 Minuten auf den Wells belassen. Nach Abkippen des Farbstoffs wurden die Wells mit destilliertem Wasser von überflüssiger Farbe bereinigt und die Proben mittels phasenkontrastinvertierten Mikroskops untersucht.

#### Quantifizierung der Färbung

Die Extraktion des Farbstoffs erfolgte unter Zugabe von je 500µl Essigsäure (10%; Merck KGaA) je Well und Inkubation bei Raumtemperatur für 30 Minuten unter ständigem Schwenken. Der Zellrasen wurde anschließend mittels Zellschabern abgelöst, in 1,5ml Röhren transferiert und jeweils für 30 Sekunden auf höchster Stufe vermischt (Vortex Genie 2). Nach 10-minütiger

Erhitzung (85°C; Biometra TB2 Thermoblock, Analytik Jena AG, Jena, Deutschland) und anschließender Abkühlung im Eisbad wurden die Proben zentrifugiert (37°C, 20.000G, 15 Minuten). Vom Supernatant wurden 200µl abgenommen und auf eine 96-Well Platte gegeben. Der saure pH-Wert wurde unter Zugabe von 75µl Ammoniumhydroxid (10%; Sigma-Aldrich) neutralisiert. Die Messung erfolgte photometrisch (405nm; Multiscan Go Mikrotitrierplatten-Spektrophotometer, Thermo Fisher Scientific). Die Konzentrationen wurden relativ zu einem Standard des Farbstoffes ermittelt (ScanIt software for Microplate Readers v. 5.0.0.42, Thermo Fisher Scientific).

#### **2.4.6.2. Adipogene Differenzierung**

##### **Vorbereitung der Kulturen**

Die MACS<sup>+</sup> Zellen der dritten Passage wurden analog zur osteogenen Differenzierung gewonnen und auf 6 Well Platten kultiviert.

##### **Stimulation**

Nach Erreichen von 80-85%iger Konfluenz wurden die Kulturen mit je 2ml adipogenem Differenzierungsmedium (PromoCell) über einen Zeitraum von 4 Wochen stimuliert. Die Kontrollen erhielten weiter Basisnährmedium. Inkubiert wurde unter Standardbedingungen (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Medienwechsel erfolgten an jedem zweiten Tag.

##### **Färbung**

Zur Färbung der Lipid-Inklusionen wurden die Medien abgesaugt und die Kulturen dreimal mit PBS gewaschen. Nach Fixierung der Präparate durch Isopropanol (0°C, 60%, Sigma-Aldrich) für 5 Minuten wurde je 1ml Ölrot-Farbstoff (0,3%, *Red Oil O*, Chroma-Gesellschaft Schmid & Co. Stuttgart-Untertürkheim, Deutschland) zugegeben und 10 Minuten belassen. Der Farbstoff wurde abgekippt und die Proben mit destilliertem Wasser gewaschen.

##### **Quantifizierung der Färbung**

Der Ölrotfarbstoff wurde durch Zugabe von 1ml Isopropanol (100%) und 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur unter ständigem Schwenken gelöst. 100µl der Lösung wurden abgenommen und zur Messung auf eine 96-Well Platte gegeben. Die Menge an Farbstoff konnte photometrisch (540nm) gegen einen Standard ermittelt werden.

### 2.4.6.3. Chondrogene Differenzierung

#### Vorbereitung der Kulturen

Zur chondrogenen Differenzierung wurden je Patient zwei Proben von  $3 \times 10^5$  Zellen in beschriebener Weise den Zellkulturflaschen entnommen und in 1,5ml Röhrchen zu Mikromassen zentrifugiert (37°C, 370G, 10 Minuten). Diese wurden für 2 Tage inkubiert (37°C, 5% CO<sub>2</sub>).

#### Stimulation

Die Stimulation erfolgte 2 Tage nach Herstellung der Kulturen. Es wurde für 5 Wochen ein chondrogenes Differenzierungsmedium (PromoCell) zugegeben. Die Kontrollen erhielten weiter Basisnährmedium. Medienwechsel erfolgten an jedem zweiten Tag. Die Kulturen wurden grundsätzlich vor und nach dem Wechsel zentrifugiert (37°C, 370G, 5 Minuten).

#### Färbung

Nach Zentrifugation (37°C, 370G, 10 Minuten), Absaugen der Medien und dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellpellets in 100ml PBS mit 4ml Paraformaldehyd (37%, Merck KGaA) und 10ml Glutaraldehyd (25%, Merck KGaA) über 24 Stunden fixiert. Nach erneuter Waschung mit PBS wurden die Zellpellets in Bio Kassetten (Bio Optica, Mailand, Italien) zwischen zwei *Biopsy Pads* (Bio Optica) gelegt. Um die Pellets zur histologischen Färbung in einen schneidfähigen Zustand zu überführen, war die Einbettung in Paraffin notwendig. Da Paraffin stark lipophil ist und sich deshalb nicht mit der im Pellet befindlichen hydrophilen Flüssigkeit mischt, musste letztere über mehrere Zwischenstufen zunächst durch Ethanol, dann durch Xylol (Büfa Chemie, Oldenburg, Deutschland) und schließlich durch Paraffin (McCormick, Sparks, USA) substituiert werden. Die Einbettung in Paraffin wurde durch den *Tissue Processor TPC15 Duo* (Meditate Medizintechnik, Burgdorf, Deutschland) durchgeführt. Das Programm besteht aus 12 Schritten, die über einen Zeitraum von 24 Stunden automatisiert ablaufen. Dabei wurden die Bio Kassetten mit den Pellets über definierte Zeiträume in verschiedenen Bädern gelagert. Die nun paraffinfiltrierten Pellets wurden



Abbildung 7 Mikromasse vor chondrogener Differenzierung

anschließend in flüssiges Paraffin eingeschlossen und für eine Nacht im Kühlschrank gelagert (8°C, Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland).

Schritt	Dauer [h]	Temp. [°C]	Konzentration [Vol. %]	Medium
1	2	30	70	Ethanol
2	2	30	80	Ethanol
3	2	30	90	Ethanol
4	2	30	100	Ethanol
5	2	30	100	Ethanol
6	2	30	100	Ethanol
7	2	30	100	Xylol
8	2	30	100	Xylol
9	2	30	100	Xylol
10	2	60	100	Paraffin
11	2	60	100	Paraffin
12	2	60	100	Paraffin

Tabelle 9 Ablauf der Paraffineinbettung der Mikromassen nach chondrogener Differenzierung

Zur Herstellung histologischer Präparate wurden die Blöcke mit einem Schlittenmikrotom (Thermo Fisher Scientific) in 5µm dicke Scheiben geschnitten und über das Paraffinstreckbad (Medax, Neumünster, Deutschland) auf Objektträgern (Thermo Fisher Scientific) platziert. Vor der Färbung wurden die Schnitte 8 Stunden bei 30°C getrocknet.

Schritt	Dauer [min]	Konzentration [Vol. %]	Medium
1	5	100	Xylol*
2	5	100	Xylol
3	5	100	Xylol
4	2	96	Ethanol
5	2	70	Ethanol**
6	2	60	Ethanol
7	60	1% 3%	Alzianblau Essigsäure***
8	5	100	Aqua dest.
9	5	0,1	Kernechtrot
10	1	100	Aqua dest.
11	2	100	Ethanol
12	2	100	Ethanol
13	5	100	Xylol
14	5	100	Xylol

- \* Büfa Chemie, Oldenburg, Deutschland
- \*\* TH.Geyer, Stuttgart, Deutschland
- \*\*\* Merck, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 10 Färbeprotokoll nach chondrogener Differenzierung

Für die Alzianblaufärbung (eine Glykosaminoglykanfärbung) wurden die Objektträger durch mehrere Bäder geführt, welche das Ziel hatten das Paraffin aus den Präparaten zu eliminieren.

Es folgte das Färbebad mit Alzianblau (Merck KgaA), die Waschung und folgend die Zweitfärbung mit Kernechtrot (Sigma-Aldrich).

Nach Abschluss der Färbungen wurden die Deckgläschen mit Eukitt Einschlusmittel (O. Kindler GmbH, Freiburg, Deutschland) verklebt und mikroskopisch untersucht (Axioplan 2, Zeiss).

### **Automated digital image quantification**

Quantifiziert wurde sowohl die Alzianblau- als auch die Kernechtrotfärbung. Von beiden Farbstoffen wurden Verdünnungsreihen erstellt, welche der Kalibrierung der Farbmaskierung dienten. Im HSB Farbraum wurde die Darstellung der Alzianblaufärbung auf ein Winkelintervall von  $135^\circ$  bis  $272^\circ$  und die der Kernechtrotfärbung auf  $273^\circ$  bis  $-73^\circ$  definiert. Zur Reduktion von Artefakten wurde weiter die Empfindlichkeit an einem leeren Präparat über den Hellwert auf 62% kalibriert. Eine Filterung anhand der Farbsättigung erfolgte nicht.

Nach initialer Kontrolle und Selektion unversehrter Präparate wurden alle vorhandenen Schnitte mittels Zeiss Axiovert Mikroskop und AxioCam MRC Kamera unter Verwendung der Software ZEN 3.0 blue (alle: Zeiss) fotografiert. Die Bilder wurden als 36 bit Carl Zeiss Image File erstellt und als 8 bit Tagged Image File exportiert. Die Objektiv Vignettierung und der brennerspezifische Belichtungsgradient wurden mittels Adobe Photoshop Lightroom Classic (v. 9.2; Adobe Inc., San José, Kalifornien, USA) korrigiert. Die Auswertung der Färbungen aller Schnitte geschah unter Nutzung der Software ImageJ (v. 1.52a; Wayne Rasband, National Institute of Health, USA). Die gemessenen Pixelzahlen der zuvor definierten Spektren wurden relativ zur Anzahl der Pixel aller Spektren ( $0^\circ$ - $360^\circ$ ) bestimmt und statistisch ausgewertet.



## 2.4.7. Multilineare Differenzierung (RT-qPCR)

Die Vorbereitung der Proben geschah analog zur Färbung. Es wurden für jeden Patienten zwei Proben hergestellt.

### Osteogene Differenzierung

Stimuliert wurde die osteogene Differenzierungslinie mit osteogenem Differenzierungsmedium (PromoCell), substituiert mit 10µg/ml Poly(I:C) HMW für 3 Wochen. Die Kontrollen wurden ausschließlich mit osteogenem Differenzierungsmedium stimuliert.

### Adipogene Differenzierung

Zur Differenzierung wurden die Zellen mit adipogenem Differenzierungsmedium mit 10mg/ml Poly(I:C)HMW stimuliert (PromoCell). Die Kontrollen erhielten ausschließlich das Differenzierungsmedium. Der Stimulationszeitraum betrug 4 Wochen.

### Chondrogene Differenzierung

Die chondrogene Differenzierungslinie wurde für 5 Wochen mit Poly(I:C) HMW (10µg/ml) supplementiertem chondrogenem Differenzierungsmedium (PromoCell) stimuliert. Die Kontrolle erhielt reines Differenzierungsmedium. Die Proben wurden vor und nach jedem Medienwechsel zentrifugiert (37°C, 370G, 5 Minuten). Medienwechsel erfolgten an jedem zweiten Tag. Inkubiert wurde unter Standardbedingungen (37°C, 5% CO<sub>2</sub>).

#### 2.4.7.1. mRNA Extraktion und RT-qPCR

##### Osteogene und adipogene Differenzierung

Die RNA-Extraktion und RT-qPCR wurden nach Ablösung der Zellen unter Zuhilfenahme von Zellschabern durchgeführt. Anwendung fanden das *Rneasy® Protect Mini Kit* (250) (Qiagen) und das *QuantiTect® Reverse Transcription Kit* (Qiagen). Die Analyse der cDNA erfolgte mittels LightCyclers über 40 Zyklen.

## Chondrogene Differenzierung

Die Zellen wurden mittels Ultraschallimpulsen (Labsonic U, Braun, Melsungen, Deutschland; 30kHz, 75W, 10s) lysiert. Die RNA Extraktion und RT-qPCR wurden analog zu den osteo-/adipogenen Differenzierungslinien durchgeführt.

Gen	Assay ID	Gene Symbol	Accession ID	Primer Sequenz
<b>RUNX2</b>	113380	RUNX2 H. sapiens	ENST00000359524	FWD: GCCTAGGCCGATTTCAGAT REV: CTGAGAGTGGGAAGGCCAGAG
<b>ALP</b>	103448	ALP H. sapiens	ENST00000374840	FWD: AGAACCCCAAAGGCTTCTTC REV: CTTGGCTTTTCCTTCATGGT
<b>OPN</b>	101170	SPP1 H.sapiens	ENST00000395080	FWD: CGCAGACCTGACATCCAGT REV: GGCTGTCCCAATCAGAAGG
<b>ON</b>	103218	SPARC H.sapiens	ENST00000231061	FWD: GGTGGAAGTAGGAGAATTTGATG REV: TGGTTCTGGCAGGGATTT
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	110607	PPAR $\gamma$ H.sapiens	ENST00000287820	FWD: GACAGGAAAGACAACAGACAAATC REV: GGGGTGATGTGTTTGAACCTG
<b>LPL</b>	113230	LPL H.sapiens	ENST00000311322	FWD: TCGTTCTCAGATGCCCTACA REV: GCCTGATTGGTATGGGTTTC
<b>ACAN</b>	138057	ACAN H.sapiens	ENST00000439576	FWD: GAACGACAGGACCATCGAA REV: AAAGTTGTCAGGCTGGTTGG
<b>PGK-1</b>	102083	PGK1 H. sapiens	ENST00000373316	FWD: GGAGAACCTCCGCTTTCAT Rev: GCTGGCTCGGCTTTAACC

RUNX2 (Runt- related transcription factor 2), ALP (alkaline phosphatase), OPN (Osteopontin), ON (Osteonektin), LPL (lipoprotein lipase), ACAN (Aggrecan), PPAR $\gamma$  (proliferator- activated receptor gamma), PGK-1 (Phosphoglycerate kinase 1)

\*Alle von Roche Life Science

[Tabelle 11 Primerliste zur Analyse differenzierungsspezifischer mRNA Transkription](#)

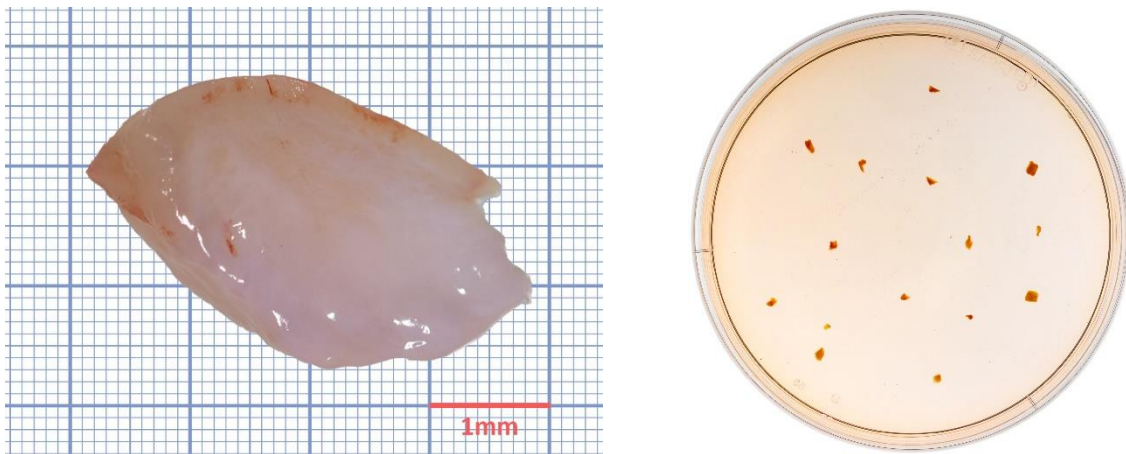
## 2.5. Statistische Auswertung

Die Daten wurde unter Verwendung des *Shapiro-Wilk-Tests* auf ihre Normalverteilung untersucht und die Signifikanz der Ergebnisse mit dem nicht-parametrischen *Wilcoxon Vorzeichen-Rang-Test* mit der Software *SPSS* (v. 18.0.0, Chicago, IL, USA) ermittelt. Die Signifikanzschwelle wurde in der vorliegenden Studie auf  $p \leq 0,05$  definiert.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Isolation und Kultivierung MACS<sup>+</sup> Zellen

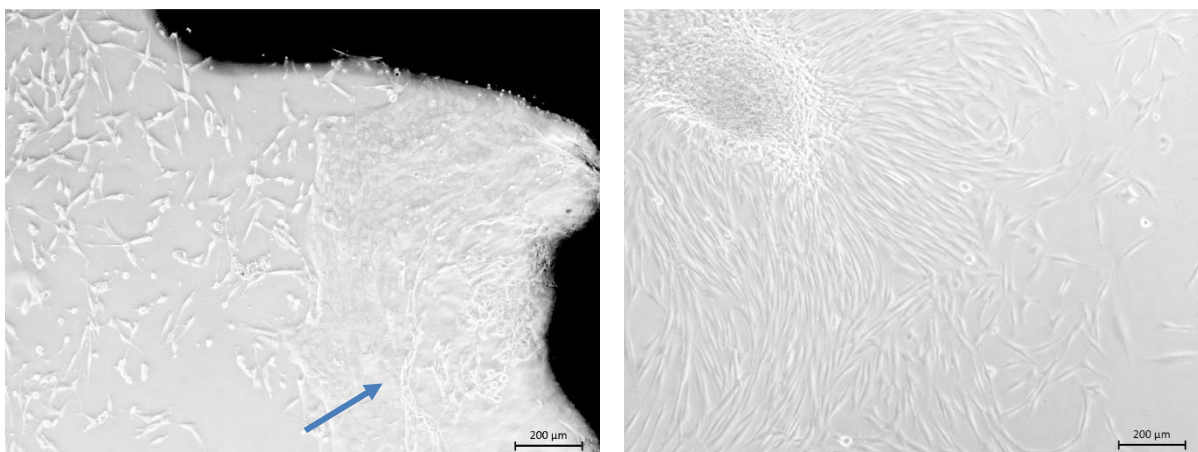
Die Gingivaproben wurden von 5 gesunden Spendern entnommen, präpariert und in Petrischalen mit Basisnährmedium angezchtet.



**Abbildung 8** Gingivaexzissat und Präparation zur Kultivierung gingivalen Mischgewebes

Links: gesäubertes Gingivaexzissat unmittelbar nach chirurgischer Entnahme; rechts: nach Präparation auf einer Petrischale plaziertes Gingivaexzissat mit Basisnährmedium

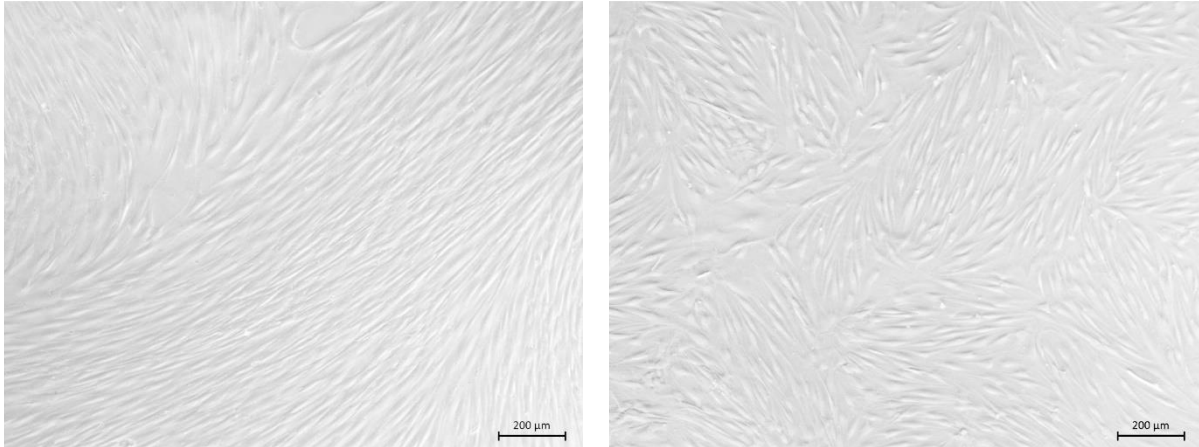
Es bildete sich ein Saum aus gingivalem Mischgewebe. Nach ausreichender Proliferation wurden Stro-1 positive Zellen durch immunomagnetische Sortierung (*MACS-Sorting*) isoliert.



**Abbildung 9** Kultivierung gingivalen Mischgewebes

Links: Zellwachstum nach 11 Tagen: Es hat sich ein deutlicher Saum epithelialer Zellen (Pfeil) um das Exzissat gebildet sowie diffus verteilte fibroblastische Zellen; rechts: Mischgewebe 1 Monat nach Entnahme vor MACS-Sorting

Nach *MACS Sorting* wurden die MACS<sup>+</sup> Zellen in Petrischalen kultiviert. Unter Ausbildung von scharf begrenzten Kolonien konnten diese selektiv abgelöst werden. Die gelösten Zellen wurden in 75ml Zellkulturflaschen kultiviert und passagiert. Die Zellen der dritten Passage wurden zur Durchführung der Versuche verwendet.



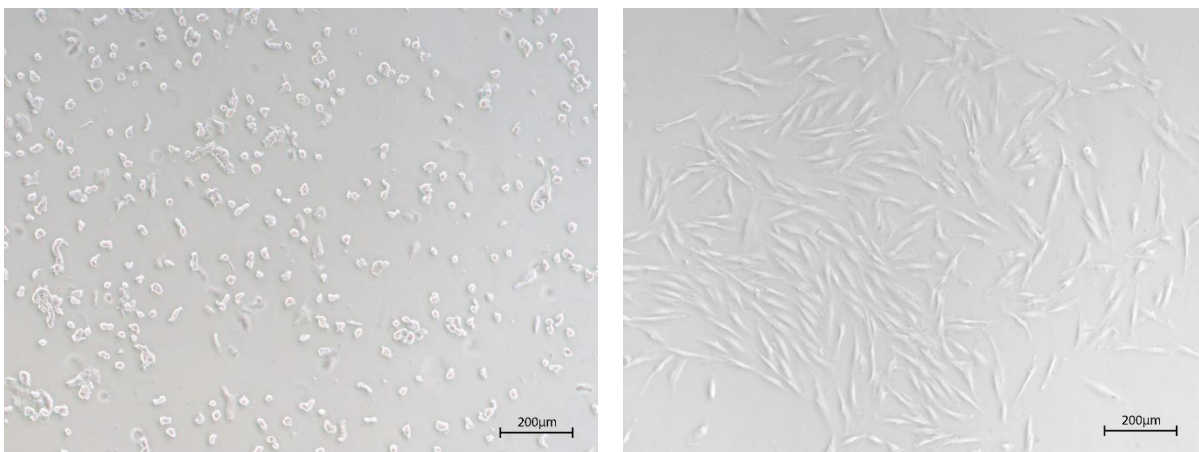
**Abbildung 10 MACS<sup>+</sup> sortierte Zellen**

Links: MACS<sup>+</sup> sortierte Zellen der ersten Passage; rechts: MACS<sup>+</sup> sortierte Zellen der dritten Passage vor Durchführung der Versuche

## 3.2. Nachweis MSC-spezifischer Merkmale MACS<sup>+</sup> Zellen

### 3.2.1. Adhäsion an PMMA-Oberflächen

Im Rahmen der Passagen wurden MACS<sup>+</sup> Zellen abgelöst und in neue Flaschen transferiert. Nach 24h hafteten die Zellen erneut der PMMA Oberfläche an.

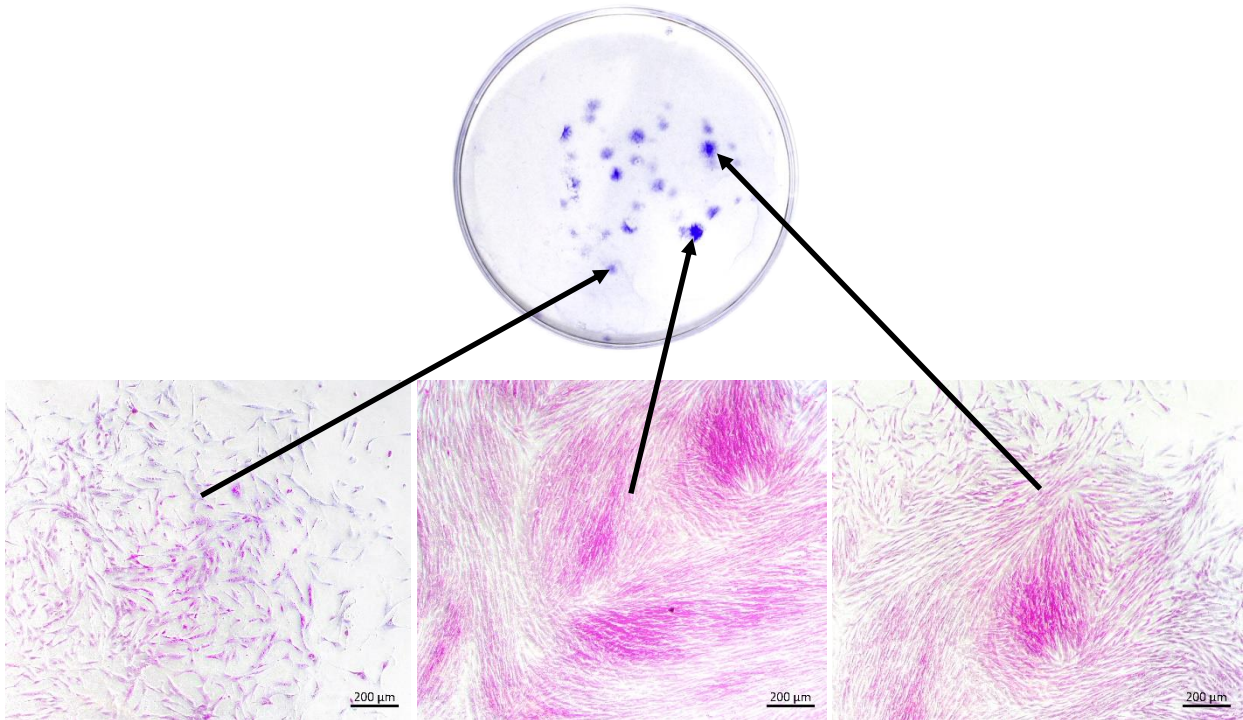


**Abbildung 11 Adhäsion MACS<sup>+</sup> Zellen an PMMA Oberflächen**

Links: MACS<sup>+</sup> sortierte Zellen unmittelbar nach Ablösung mittels Zellschabern; rechts: haftende Zellen, 24h nach Transfer

### 3.2.2. Koloniebildung

MACS<sup>+</sup> Zellen der dritten Passage wurden in einer Zelldichte von 1,63 Zellen/cm<sup>2</sup> auf 10cm Petrischalen 12 Tage kultiviert. Danach wurden sie mit Methanol fixiert und mit Kristallviolett gefärbt.



**Abbildung 5** Koloniebildung MACS<sup>+</sup> sortierter Zellen

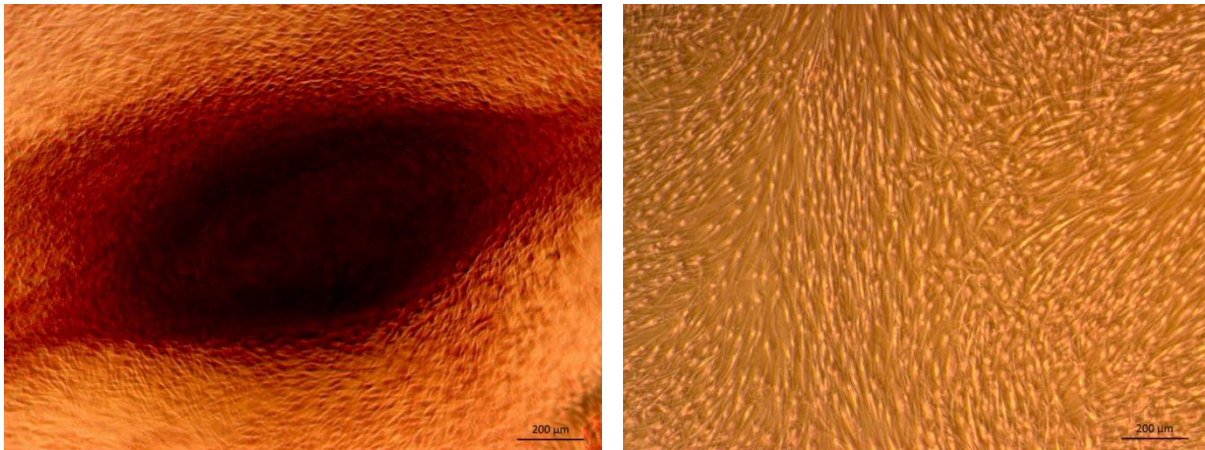
Oben: Photographische Darstellung der Koloniebildungen nach 12 Tagen und Färbung mit Kristallviolett; unten: mikroskopische Vergrößerung einer kleinen Kolonie (links), einer mittleren Kolonie (rechts) und einer großen Kolonie (Mitte)

### 3.2.3. Multilineare Differenzierung

#### 3.2.3.1. Osteogene Differenzierung

MACS<sup>+</sup> Zellen der dritten Passage wurden in 6-Well-Platten bis zu einer Dichte von 80% kultiviert. Es folgte die dreiwöchige Differenzierung mit osteoinduktivem Differenzierungsmedium. Die Kontrollen erhielten weiter Basisnährmedium. Im Anschluss folgte die Färbung kalzifizierter Bereiche mit Alizarin Rot.

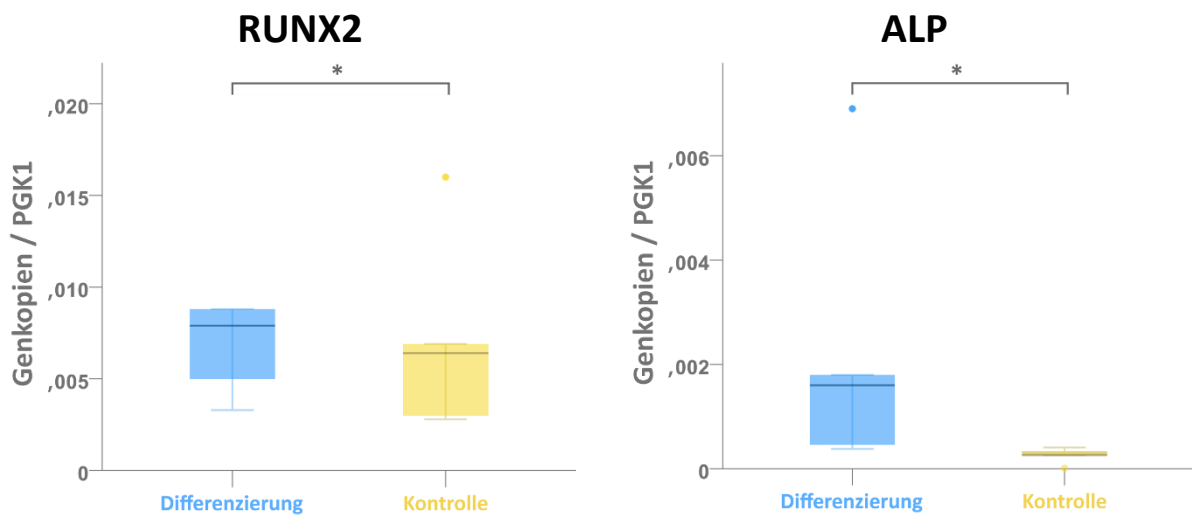




**Abbildung 12 Osteogene Differenzierung MACS<sup>+</sup> sortierter Zellen**

Links: zytologische Färbung mit Alizarin Rot nach dreiwöchiger osteogener Differenzierung und Färbung; rechts: Kontrolle

Nach Abschluss der Stimulation wurden die Zellen lysiert und die RNA extrahiert. Die mRNA der Gene RUNX2 und ALP wurde mittels RT-qPCR quantifiziert.



**Abbildung 13 Genexpression MACS<sup>+</sup> sortierter Zellen nach osteogener Differenzierung**

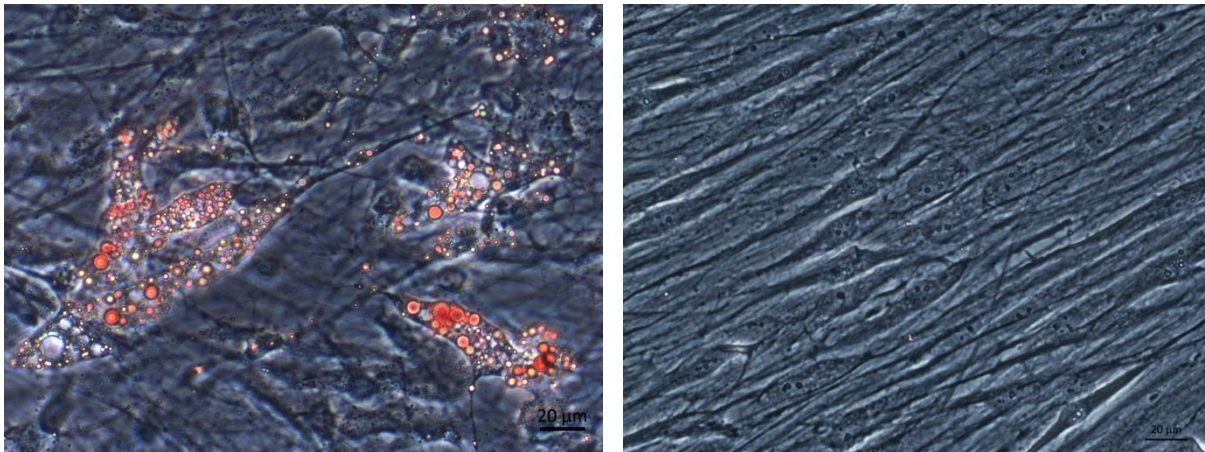
Links: Expression von *Runx2* relativ zur Expression der Phosphoglyceratkinase 1; rechts: Expression der Alkalischen Phosphatase relativ zu PGK1

Signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ; Wilcoxon Rangsummentest) wurden mit \* markiert.

Bei genauer Betrachtung der Genexpression MACS<sup>+</sup> sortierter Zellen [Mediane Genexpression (Q25/Q75)] zeigten sich nach Differenzierung signifikant ( $p=0,43$ ; Wilcoxon) erhöhte RUNX2 Expressionen [0,0079 (0,0042/0,0299)] im Vergleich zur Kontrolle [0,0064 (0,0029/0,0115)]. Die ALP Expression wurde im Vergleich von Stimulation [0,0016 (0,0004/0,0044)] und Kontrolle [0,0003 (0,0001/0,0004)] ebenfalls signifikant ( $p=0,043$ ) gesteigert.

### 3.2.3.2. Adipogene Differenzierung

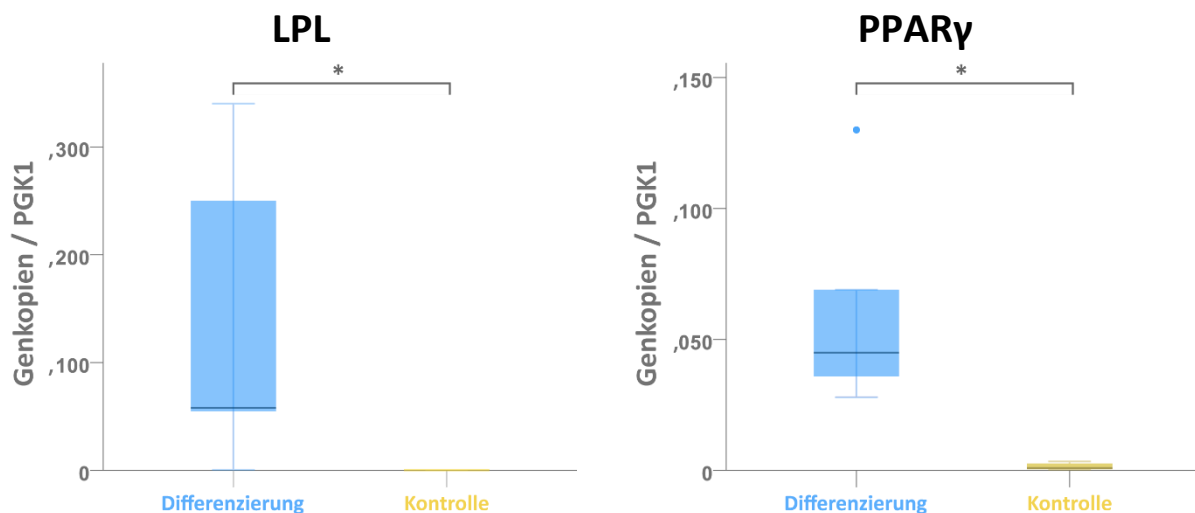
MACS<sup>+</sup> Zellen der dritten Passage wurden in 6-Well-Platten bis zu einer Dichte von 80% kultiviert. Danach erfolgte die Induktion mit adipogenem Differenzierungsmedium. Die Kontrollen erhielten Basisnährmedium. Nach 4 Wochen wurden entstandene Lipidtröpfchen mit Ölrot gefärbt.



**Abbildung 14 Adipogene Differenzierung MACS<sup>+</sup> sortierter Zellen**

Links: Zytologische Darstellung nach vierwöchiger adipogener Differenzierung und Färbung mit Ölrot; rechts: Kontrolle

Zum gleichen Zeitpunkt wurden die Zellen lysiert, die RNA extrahiert und die Expression von LPL und PPAR $\gamma$  durch RT-qPCR quantifiziert.



**Abbildung 15 Genexpression MACS<sup>+</sup> sortierter Zellen nach osteogener Differenzierung**

Links: Expression der Lipoproteinlipase relativ zur Expression der Phosphoglyceratkinase 1; rechts: Expression von peroxisome proliferator-activated receptor gamma relativ zu PGK1

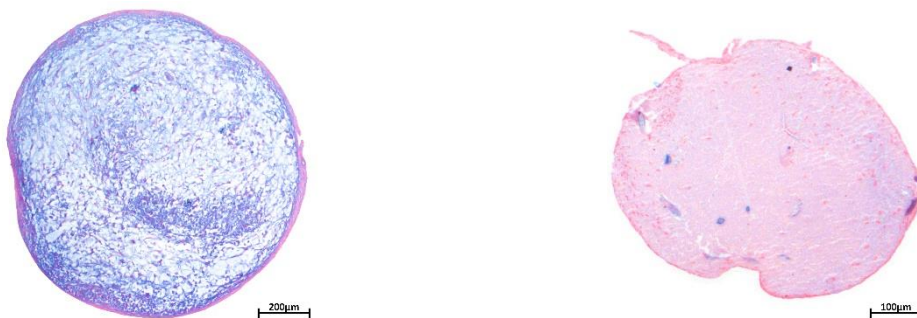
Signifikante Unterschiede ( $p \leq 0,05$ ; Wilcoxon Rangsummentest) wurden mit \* markiert.

Die Genexpression [mediane Genexpression/PGK1 (Q25/Q75)] des Differenzierungsmarkers LPL wurde durch den adipogenen Stimulus [0,0580 (0,0279/0,2950)] im Vergleich zur Kontrolle [0,0003 (0,0000/0,0004)] signifikant ( $p=0,043$ ; Wilcoxon) gesteigert. In gleicher Weise wurde auch die Transkription von PPAR $\gamma$  [0,0010 (0,0004/0,0031)] signifikant ( $p=0,043$ ) gesteigert [0,0450 (0,0320/0,0995)].

### 3.2.3.3. Chondrogene Differenzierung

MACS<sup>+</sup> Zellen der dritten Passage wurden in 1,5ml Röhrchen zur Mikromasse verdichtet und mit chondrogenem Differenzierungsmedium stimuliert. Die Kontrollen erhielten weiter Basisnährmedium.

Nach 5 Wochen wurden die Pellets fixiert, in Paraffin eingebettet und die gebildeten Glykosaminoglykane mit Alzianblau gefärbt. Als Gegenfärbung wurde Kernechtrot eingesetzt.



**Abbildung 16 Chondrogene Differenzierung MACS<sup>+</sup> sortierter Zellen**

*Links: Histologische Darstellung nach fünfwöchiger chondrogener Differenzierung und Färbung mit Alzianblau/Kernechtrot; rechts: Kontrolle*

Die chondrogene Differenzierung weist qualitativ deutlich mehr Alzianblau auf, die Kontrollen im Vergleich deutlich mehr Kernechtrot. Zur quantitativen Bestimmung der Farbstoffanteile musste das Programm ImageJ durch Identifikation der farbstoffspezifischen Spektren kalibriert werden. Hierzu wurden Verdünnungsreihen der Färbelösungen angefertigt und die Maskierung von ImageJ auf die Färbung der Lösungen kalibriert. Dabei diente die entsprechend zu quantifizierende Färbung als Positivkontrolle und die Gegenfärbung als Negativkontrolle.



Für Alzianblau ergab sich ein Farbspektrum von 135° bis 272° und für Kernechtrot von 273° bis -73° im HSB Farbraum. Durch Eingrenzung der Helligkeit auf das Intervall von 0% bis 61% konnten Artefakte in der Maskierung fast vollständig eliminiert werden.

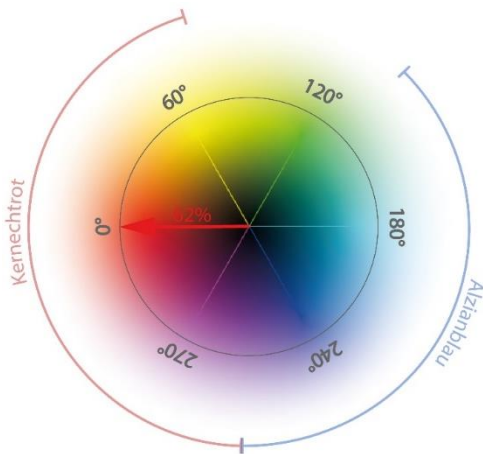


Abbildung 17 Kernechtrot und Alzianblau spezifische Farbspektren im HSB Farbraum

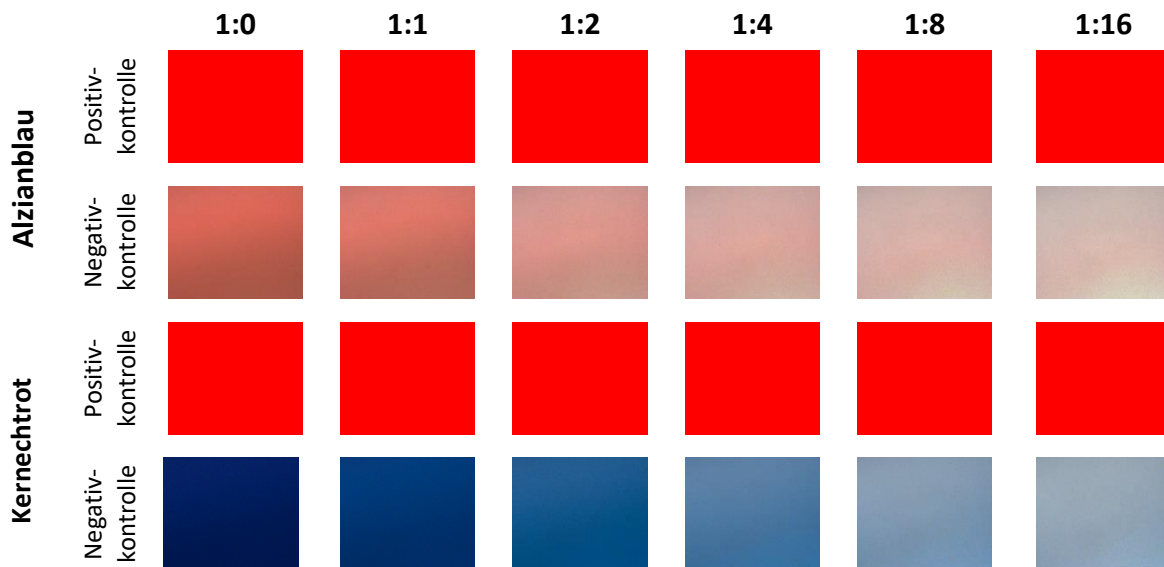
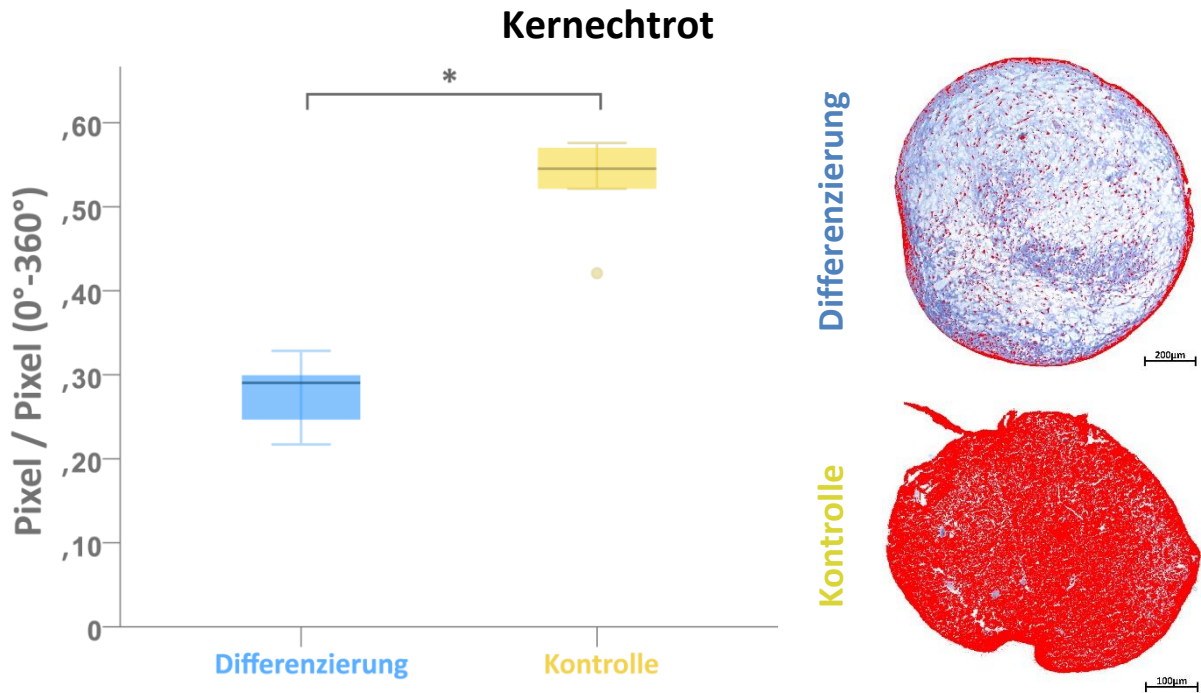


Abbildung 18 Kalibrierung der Alzianblau und Kernechtrot spezifischen Spektren mittels ImageJ

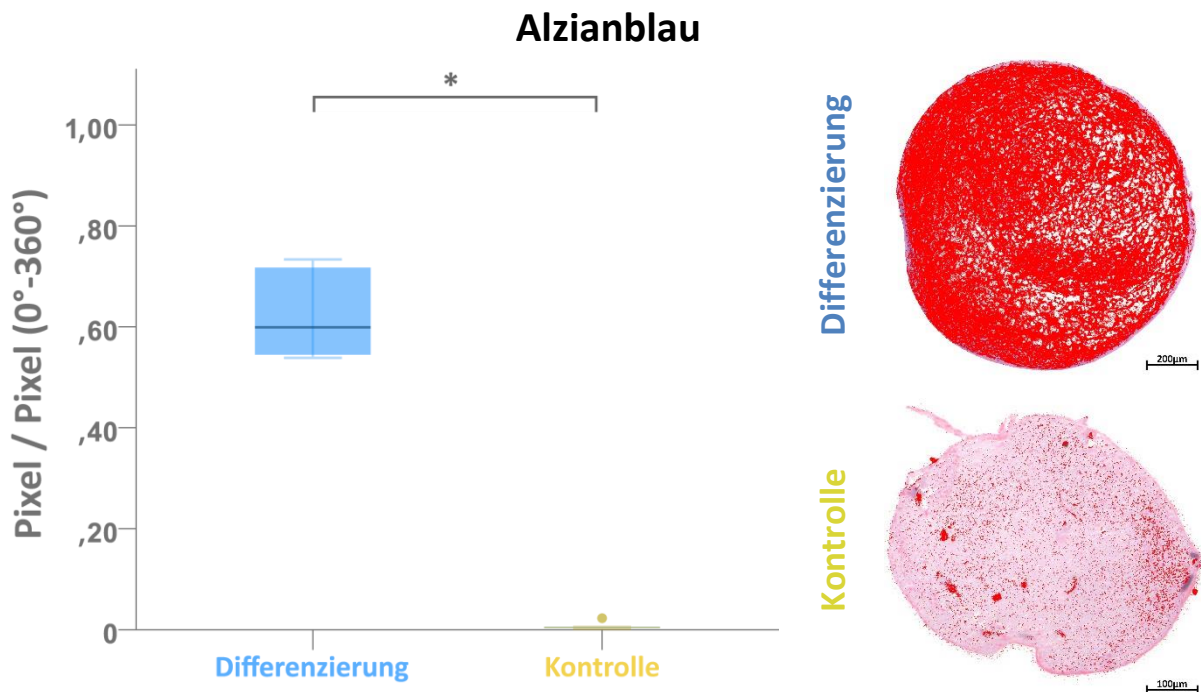
Verdünnungsreihen der Färbelösungen für Alzianblau und Kernechtrot. Die roten Felder beschreiben die Maskierung.

### Messung der Alzianblau und Kernechtrot Anteile

Die histologischen Schnitte wurden gemäß den oben bestimmten Parametern maskiert und die zur Färbung assoziierten Bereiche relativ zum Gesamtspektrum gemessen. Auf Grund der Dreidimensionalität des Modells mussten die Zellpellets vollständig aufgeschnitten und aus den Messungen aller Schnitte Mittelwerte gebildet werden.



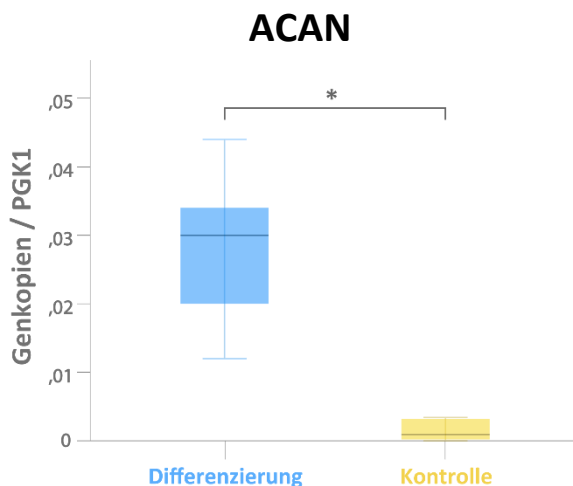
**Abbildung 19** Digitale Quantifizierung der Kernechtrot Färbung nach chondrogener Differenzierung MACS<sup>+</sup> Zellen  
 Links: Relativer Gehalt an Kernechtrot nach fünfwöchiger chondrogener Differenzierung und Kontrolle; oben: Maskierung des histologisch aufbereiteten Schnitts nach chondrogener Differenzierung; unten: Maskierung des histologisch aufbereiteten Schnitts der Kontrolle  
 Signifikante Unterschiede ( $p \leq 0,05$ ; Wilcoxon Rangsummentest) wurden mit \* markiert.



**Abbildung 20** Digitale Quantifizierung der Alzianblau Färbung MACS<sup>+</sup> Zellen nach chondrogener Differenzierung  
 Links: Relativer Gehalt an Alzianblau nach fünfwöchiger chondrogener Differenzierung und Kontrolle; oben: Maskierung des histologisch aufbereiteten Schnitts nach fünfwöchiger chondrogener Differenzierung; unten: Maskierung des histologisch aufbereiteten Schnitts der Kontrolle  
 Signifikante Unterschiede ( $p \leq 0,05$ ; Wilcoxon Rangsummentest) wurden mit \* markiert.

Die Quantifizierungen von Kernechtrot und Alzianblau [mediane relative Pixel (Q25/Q75)] fielen komplementär zu einander aus. Wo Kernechtrot in der chondrogenen Differenzierung signifikant ( $p=0,43$ ; Wilcoxon) vermindert war [,2903 (,2318/,3138)], war Alzianblau ebenfalls signifikant erhöht [,5991 (,5417/,7254) ( $p=0,43$ ; Wilcoxon)]. Umgekehrt war Kernechtrot in der Kontrolle stärker ausgeprägt [,5452 (,4711/,5730)] als Alzianblau [,0041 (,0025/,0142)].

Nach fünfwöchiger chondrogener Differenzierung wurden die Zellpellets mittels Ultraschalles homogenisiert, lysiert und die mRNA extrahiert. Die quantitative Expression von ACAN relativ zu PGK1 erfolgte durch RT-qPCR.

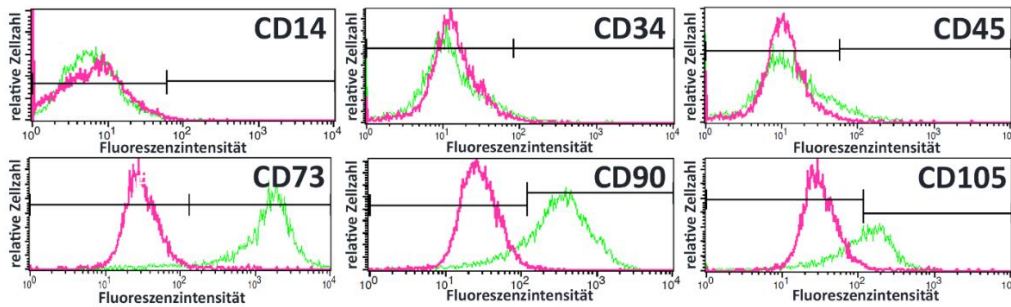


**Abbildung 21 Genexpression MACS+ sortierter Zellen nach chondrogener Differenzierung**  
 Expression von Aggrecan relativ zur Expression der Phosphoglyceratkinase 1  
 Signifikante Unterschiede ( $p \leq 0,05$ ; Wilcoxon Rangsummentest) wurden mit \* markiert.

Die Expression von ACAN [mediane Genexpression/PGK1 (Q25/Q75)] war nach chondrogener Differenzierung [,0300 (,0160/,0390)] im Vergleich zur Kontrolle [,0009 (,0001/,0033)] signifikant erhöht ( $p=0,043$ ; Wilcoxon).

### 3.2.4. Durchflusszytometrie

Die Expression der MSC spezifischen Marker CD14, CD34, CD45, CD73, CD90 und CD105 wurde durchflusszytometrisch nach Antigenbindung gegen die komplementäre Isotyp Kontrolle gemessen.



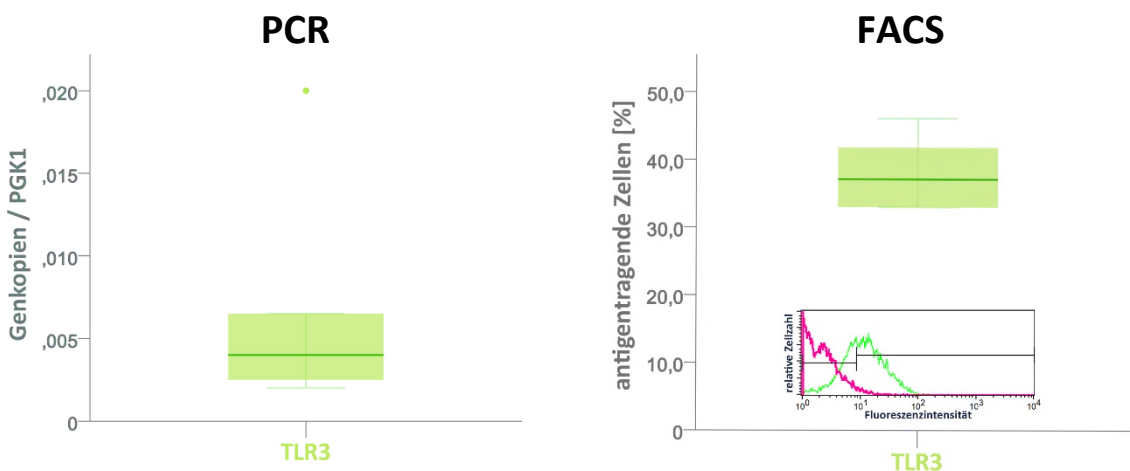
**Abbildung 22** Histogrammische Darstellung der Expression MSC-spezifischer Oberflächenmarker MACS<sup>+</sup> Zellen

Oben: Expression der Negativmarker CD14, CD34 und CD45; unten: Expression der Positivmarker CD73, CD90 und CD105

MACS<sup>+</sup> sortierte Zellen zeigten eine geringe Expression [mediane Fluoreszenzintensität (Q25/Q75)] der Marker CD14 [0,62 (0,52/0,85)] und CD34 [2,24 (0,64/3,39)], leicht erhöhte Expressionen von CD45 [22,51 (18,86/35,20)] und CD105 [16,53 (6,15/37,37)], sowie hohe Expressionen von CD73 [96,47 (93,44/97,08)] und CD90 [80,40 (74,91/84,66)] auf.

### 3.3. Nachweis der Expression von TLR3

Die Expression von TLR3 wurde an MACS<sup>+</sup> Zellen der dritten Passage nach Permeabilisierung und intrazellulärer Markierung mit *Anti TLR-3 PE* durch Durchflusszytometrie untersucht. Weiter wurde die Expression von TLR3 auf mRNA Ebene mittels RT-qPCR nachgewiesen.



**Abbildung 23** Nachweis der Expression von TLR3 auf MACS<sup>+</sup> sortierten Zellen

Links: Quantifizierung TLR3 spezifischer Transkripte mittels RT-qPCR; rechts: durchflusszytometrische Quantifizierung der intrazellulären TLR3 Expression

TLR3 wurde von allen Kulturen auf mRNA-Ebene [mediane Genexpression/PGK1 (Q25/Q75)] transkribiert [,0040 (,0022/,0133)], und auch phänotypisch [mediane Fluoreszenzintensität (Q25/Q75)] exprimiert [37,10 (20,15/43,94)].

### 3.4. Untersuchung MSC-spezifischer Merkmale MACS<sup>+</sup> Zellen nach TLR3 Aktivierung

#### 3.4.1. Koloniebildung

Die MACS<sup>+</sup> Zellen der dritten Passage wurden mit einer Zelldichte von 1,63 Zellen/cm<sup>2</sup> auf 10cm Petrischalen kultiviert und 12 Tage mit Basisnährmedium (Kontrolle) und Poly(I:C) supplementiertem Medium (Stimulation) stimuliert. Danach wurden sie mit eiskaltem Methanol fixiert und mit Kristallviolett gefärbt. Zellansammlungen von  $\geq 50$  Zellen wurden als Kolonien gezählt. Die Auszählung erfolgte dreifach unter Bestimmung des Mittelwertes.

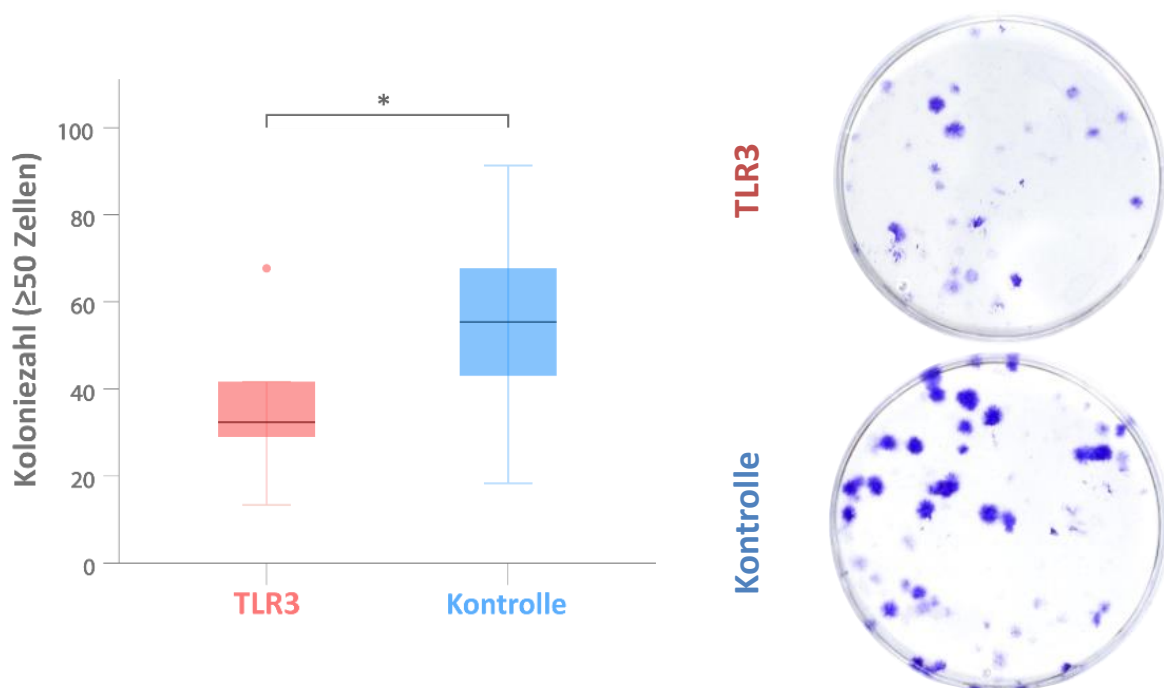


Abbildung 24 Koloniebildungen nach 12-tägiger Stimulation mit Poly(I:C)

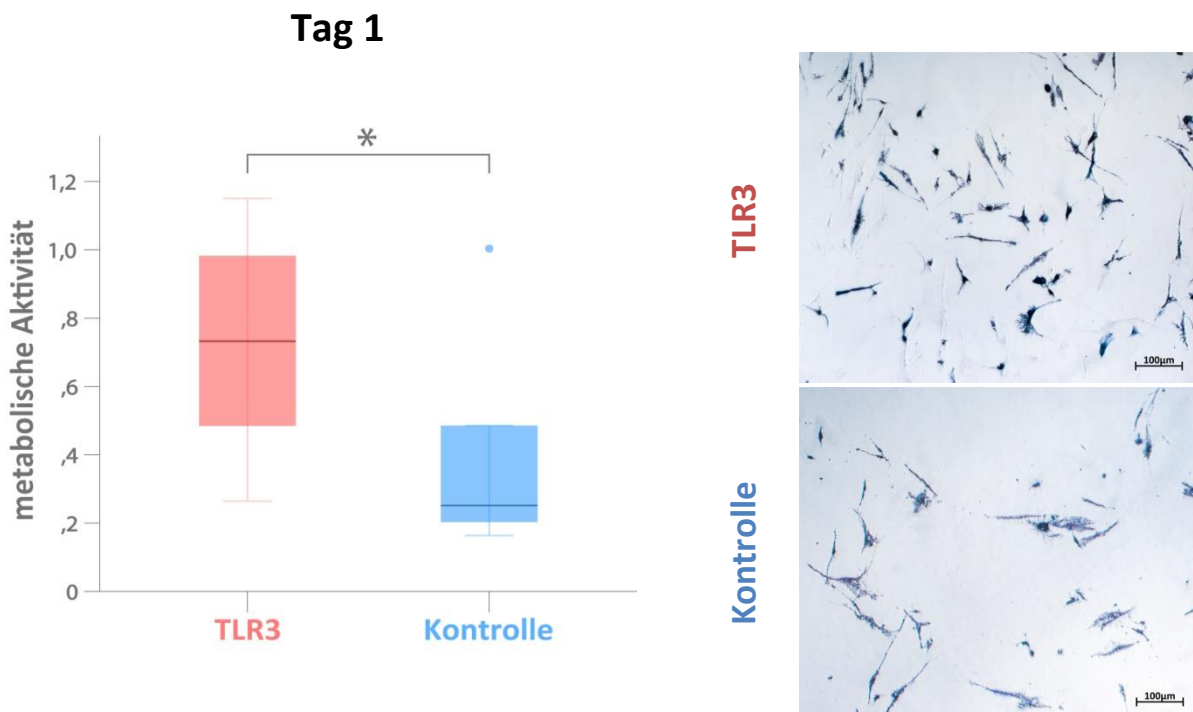
Links: Koloniezahl (≥ 50 Zellen) bei TLR3 Aktivierung durch Poly(I:C) und Kontrolle; oben: Koloniebildungen nach Stimulation mit Poly(I:C); unten: Koloniebildungen der Kontrolle

Signifikante Unterschiede ( $p \leq 0,05$ ; Wilcoxon Rangsummentest) wurden mit \* markiert.

Die Koloniebildung MACS<sup>+</sup> Kulturen [mediane Koloniezahl (Q25/Q75)] wurde in der Stimulation mit Poly(I:C) [32,33 (21,17/54,67)] im Vergleich zur Kontrolle [55,33 (30,67/79,50)] signifikant ( $p=0,043$ ; Wilcoxon) vermindert.

### 3.4.2. Zellaktivität (MTT)

Auf 24-Well Platten wurden jeweils  $10^3$  MACS<sup>+</sup> Zellen ausgesät und in Basisnährmedium (Kontrolle) und Poly(I:C) supplementiertem Medium (TLR3) kultiviert. Nach 1, 6 und 12 Tagen wurde MTT Salz zugegeben und weitere 4 Stunden inkubiert. 12-stündiger Lyse folgend konnte die optische Dichte bei 550nm gegen einen Standard bestimmt werden.



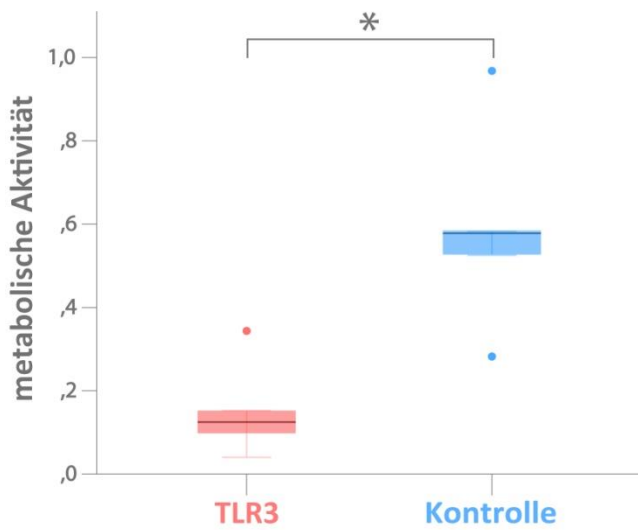
**Abbildung 25** Metabolische Aktivität nach 1 Tag unter Poly(I:C) Stimulation

Links: Metabolische Aktivität bei TLR3 Aktivierung durch Poly(I:C) und Kontrolle; oben: MTT Färbung nach Stimulation mit Poly(I:C); unten: MTT Färbung der Kontrolle

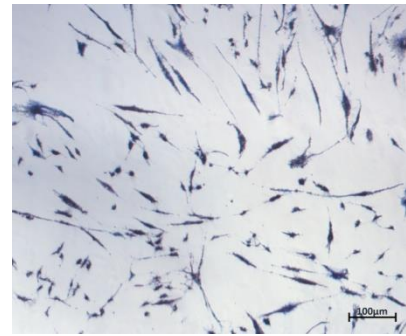
Signifikante Ergebnisse ( $p \leq 0,05$ ; Wilcoxon Rangsummentest) wurden mit \* markiert.



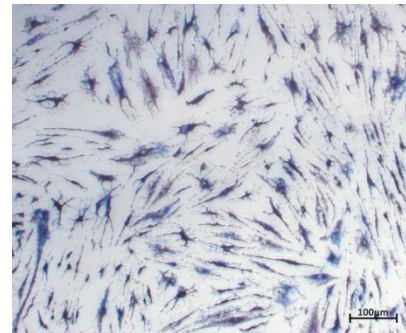
### Tag 6



TLR3



Kontrolle

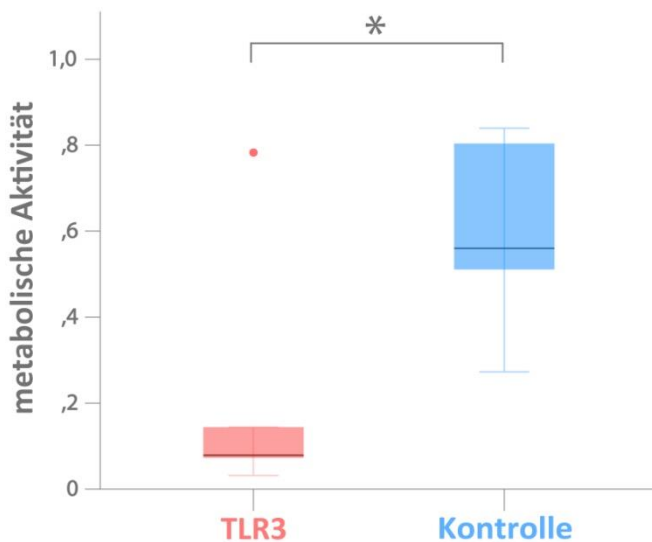


**Abbildung 26** Metabolische Aktivität nach 6 Tagen unter Poly(I:C) Stimulation

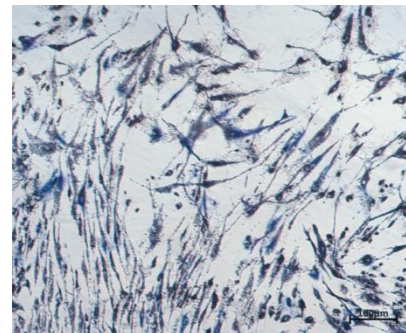
Links: Metabolische Aktivität bei TLR3 Aktivierung durch Poly(I:C) und Kontrolle; oben: MTT Färbung nach Stimulation mit Poly(I:C); unten: MTT Färbung der Kontrolle

Signifikante Ergebnisse ( $p \leq 0,05$ ; Wilcoxon Rangsummentest) wurden mit \* markiert.

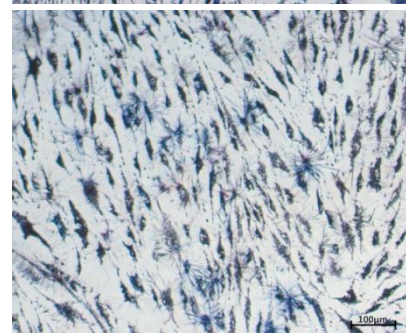
### Tag 12



TLR3



Kontrolle



**Abbildung 27** Metabolische Aktivität nach 6 Tagen unter Poly(I:C) Stimulation

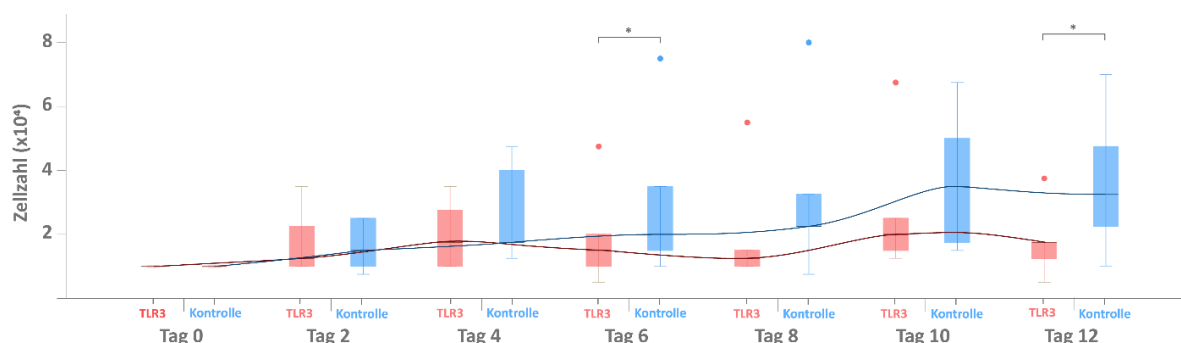
Links: Metabolische Aktivität bei TLR3 Aktivierung durch Poly(I:C) und Kontrolle; oben: MTT Färbung nach Stimulation mit Poly(I:C); unten: MTT Färbung der Kontrolle

Signifikante Ergebnisse ( $p \leq 0,05$ ; Wilcoxon Rangsummentest) wurden mit \* markiert.

Die Bestimmung der metabolischen Aktivität [mediane relative metabolische Aktivität (Q25/Q75)] zeigte nach einem Tag eine signifikant ( $p=0,043$ ; Wilcoxon) höhere MTT Färbung bei Poly(I:C) Supplementierung [0,7326 (0,3745/1,0668)] als in der Kontrollgruppe [0,2519 (0,18345/0,74455)]. Auf der anderen Seite zeigten folgende Auswertungen nach 6 und 12 Tagen signifikant ( $p=0,043$ ) verminderte metabolische Aktivitäten zwischen Tag 6 Stimulation [0,1249 (0,0690/0,2479)] und Kontrolle [0,5783 (0,4036/0,7752)], genau wie zwischen Tag 12 Stimulation [0,0788 (0,0521/0,4634)] und der korrespondierenden Kontrolle [0,5600 (0,3916/0,8217)].

### 3.4.3. Proliferation

Zur Durchführung wurden für 12 Tage je Tag und Patient  $10^4$  MACS<sup>+</sup> Zellen der dritten Passage auf 24-Well Platten kultiviert. Die Stimulation erfolgte unter Zugabe von Poly(I:C) supplementiertem Nährmedium, die Kontrollen erhielten Basisnährmedium. An jedem Tag wurden für 12 Tage die Zellzahlen mittels Neubauerzählkammer bestimmt.



**Abbildung 28 Proliferationskurve unter Poly(I:C) Stimulation**

Proliferation unter Stimulation von TLR3 durch Poly(I:C) über ein Intervall von 12 Tagen. Signifikante Ergebnisse ( $p \leq 0,05$ ; Wilcoxon Rangsummentest) wurden mit \* markiert.

Tag	TLR3			Kontrolle			Wilcoxon-Test
	Q25	Q50 (Median)	Q75	Q25	Q50 (Median)	Q75	
1	7500	10000	12500	6250	10000	12500	0,317
2	10000	12500	28750	8750	15000	25000	0,680
3	8750	17500	23750	13750	25000	30000	0,102
4	10000	17500	31250	15000	17500	43750	0,066
5	5000	12500	37500	7500	12500	42500	0,593
6	7500	15000	33750	12500	20000	55000	0,039*
7	5000	15000	20000	13750	27500	60000	0,043*



<b>8</b>	10000	12500	35000	15000	22500	56250	0,080
<b>9</b>	7500	17500	26250	18750	35000	51250	0,078
<b>10</b>	13750	20000	46250	16250	35000	58750	0,066
<b>11</b>	12500	15000	26250	18750	20000	48750	0,042*
<b>12</b>	8750	17500	27500	16250	32500	58750	0,042*

Tabelle 12 Statistische Auswertung der Zellzahl in 12 tägiger Stimulation mit Poly(I:C)

### 3.4.4. Multilineare Differenzierung

#### 3.4.4.1. Osteogene Differenzierung

Zur Quantifizierung der osteogenen Differenzierung wurden für jeden Patienten je 4 Proben von  $5 \times 10^4$  Zellen MACS<sup>+</sup> Zellen der dritten Passage in 6-Well Platten kultiviert. Nach Erreichen einer Dichte von 80% wurden zwei der Proben mit osteogenem Differenzierungsmedium und Poly(I:C) (10 $\mu$ g/ml), die Kontrollen jedoch nur mit osteogenem Differenzierungsmedium stimuliert. Nach 3 Wochen wurden zwei Proben für jeden Patienten mit Alizarin Rot gefärbt. Der Farbstoff wurde extrahiert und die Konzentration mittels Photometrie relativ zu einem Standard bestimmt. Die mRNA der verbleibenden Proben wurde extrahiert und nach reverser Transkription durch LightCycling mit DNA-Sonden quantifiziert.

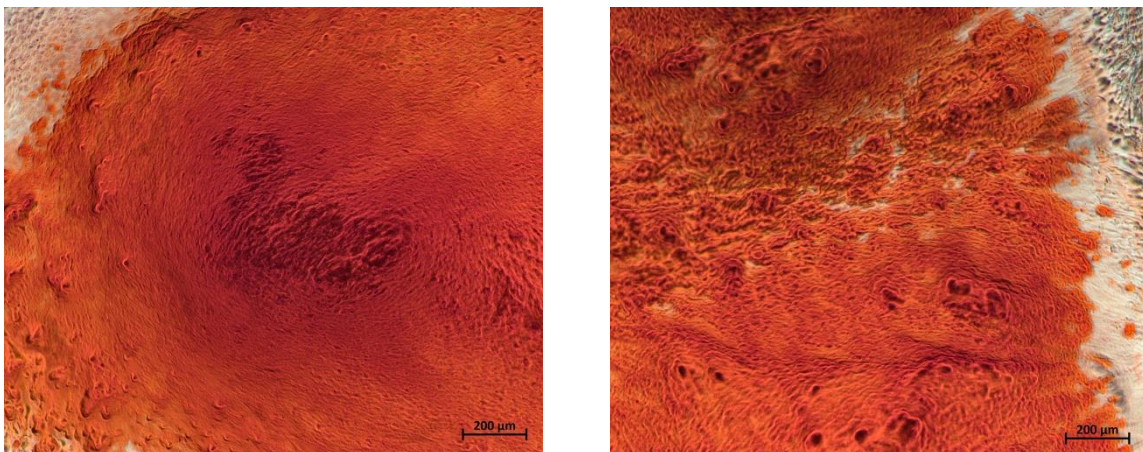
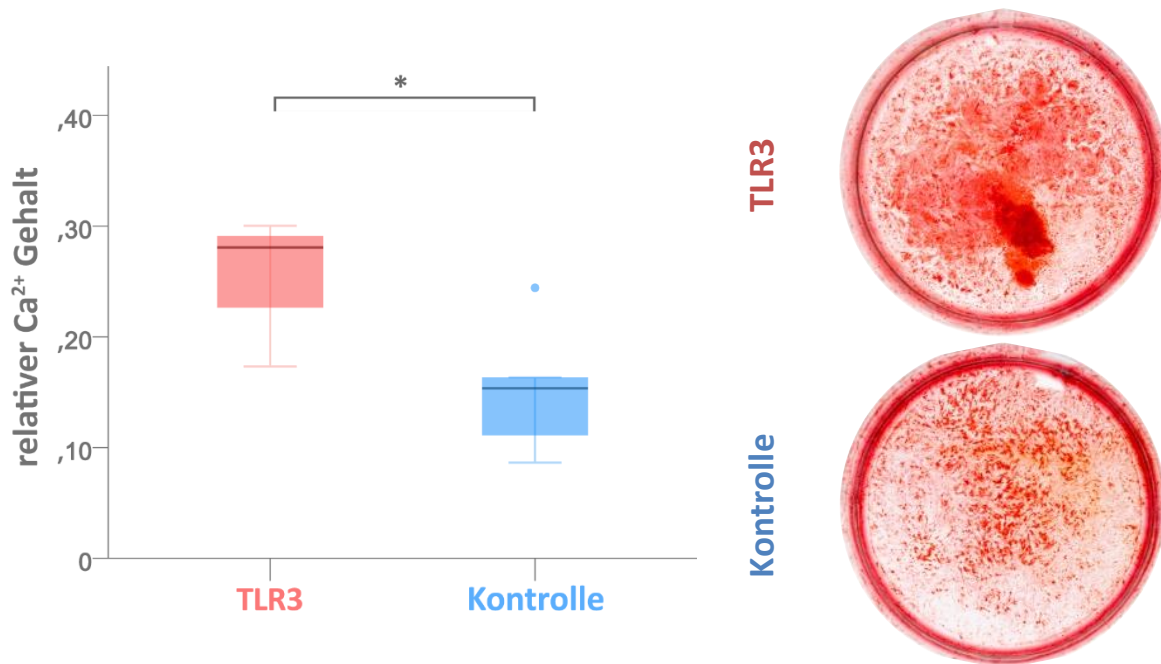


Abbildung 29 Osteogene Differenzierung MACS<sup>+</sup> sortierter Zellen unter Poly(I:C) Stimulation

Links: Zytologische Alizarin Rot Färbung nach dreiwöchiger osteogener Differenzierung und Poly(I:C) Stimulation; rechts: Alizarin Rot Färbung nach dreiwöchiger osteogener Differenzierung ohne Poly(I:C) Stimulation (Kontrolle)

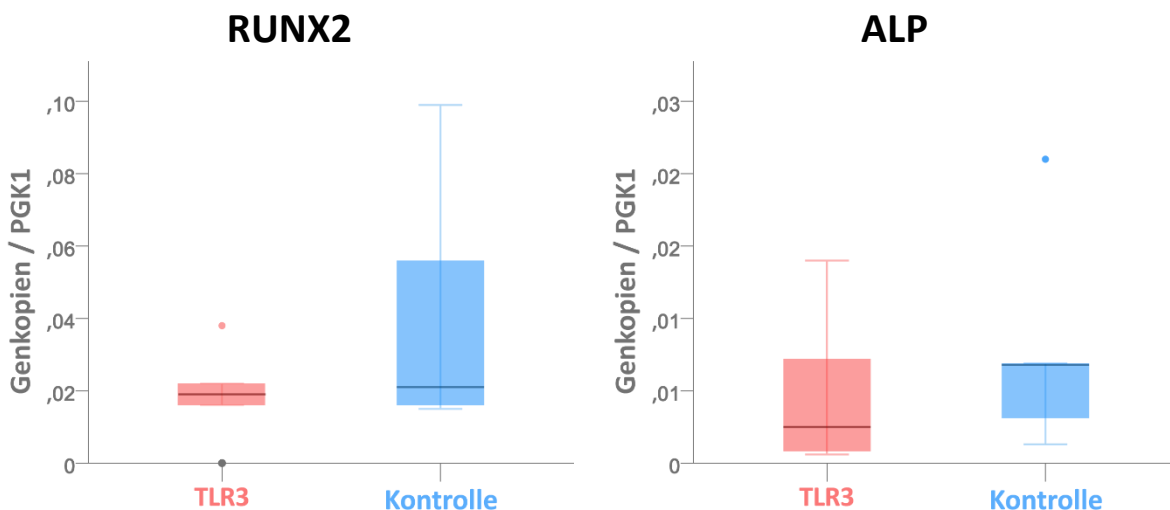
## Ergebnisse



**Abbildung 30 Alizarin Rot Quantifizierung nach dreiwöchiger osteogener Differenzierung mit Poly(I:C) Stimulation**

Links: Vergleich der Alizarin Rot Quantifizierung Poly(I:C) stimulierter und unstimulierter MACS<sup>+</sup> Zellen nach dreiwöchiger osteogener Differenzierung; oben: Alizarin Rot Färbung nach osteogener Differenzierung unter Poly(I:C) Stimulation; unten: Alizarin Rot Färbung nach osteogener Differenzierung ohne Poly(I:C) Stimulation (Kontrolle). *Signifikante Ergebnisse ( $p \leq 0,05$ ; Wilcoxon Rangsummentest) wurden mit \* markiert.*

Die Alizarin Rot Färbung [relativer Ca<sup>2+</sup> Gehalt (Q25/Q75)] wurde durch Poly(I:C) Stimulation [0,2819 (0,2264/0,3003)] signifikant ( $p=0,043$ ; Wilcoxon) im Vergleich zur Kontrolle [0,1536 (0,0988/0,2039)] erhöht.



**Abbildung 31 RUNX2 und ALP Expression nach osteogener Differenzierung unter Poly(I:C) Stimulation**

Vergleich der Genexpression zwischen MACS<sup>+</sup> sortierten Kulturen nach dreiwöchiger osteogener Differenzierung mit und ohne Poly(I:C) Stimulation

Links: *Runt-related transcription factor 2*; rechts: Alkalische Phosphatase

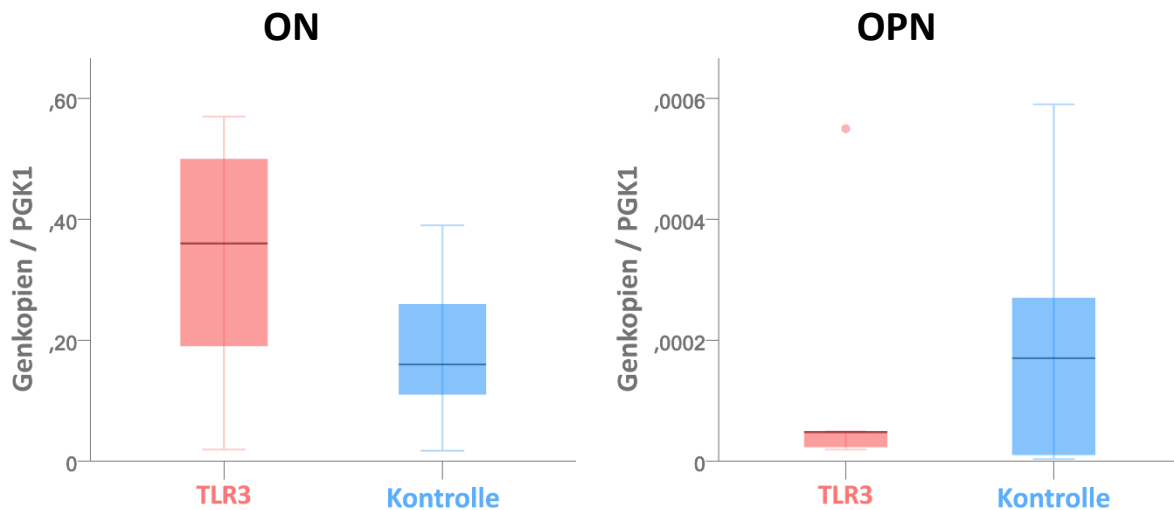


Abbildung 32 ON und OPN Expression nach osteogener Differenzierung unter Poly(I:C) Stimulation

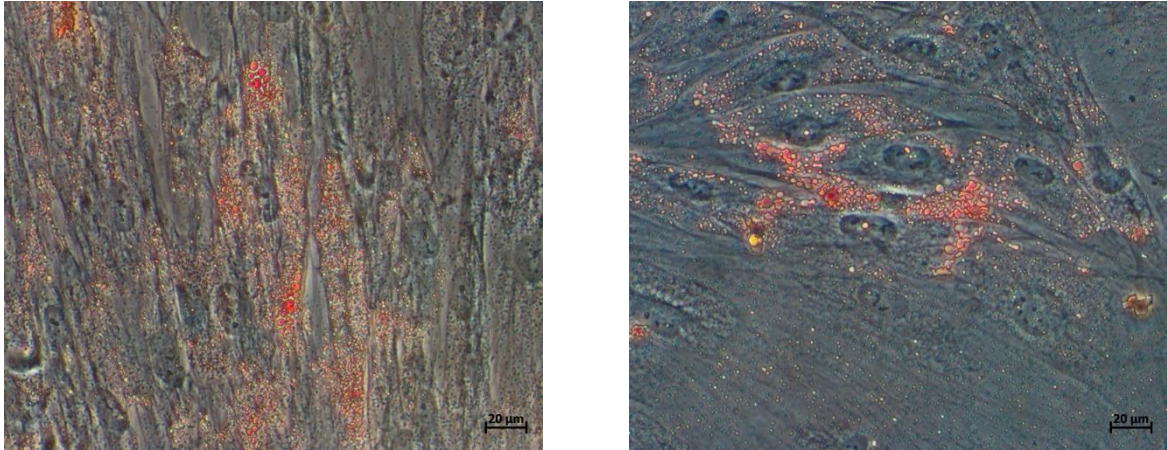
Vergleich der Genexpression zwischen MACS<sup>+</sup> sortierten Kulturen nach dreiwöchiger osteogener Differenzierung mit und ohne Poly(I:C) Stimulation

Links: *Osteonektin*; rechts: *Osteopontin*

Die Expression von RUNX2 [mediane Genexpression/PGK1 (Q25/Q75)] war nach Stimulation mit Poly(I:C) [0,0190 (0,0080/0,0300)] im Vergleich zur Kontrollgruppe [0,0210 (0,0155/0,0775)] reduziert. Ebenfalls vermindert transkribiert wurden ALP [0,0025 (0,0007/0,0106)]/[0,0068 (0,0022/0,0140)] und OPN [0,000048 (0,000021/0,0002995)]/[0,00017 (0,0000066/0,00043)], ON hingegen wurde erhöht [0,36 (0,1045/0,535)]/[0,16 (0,0635/0,325)].

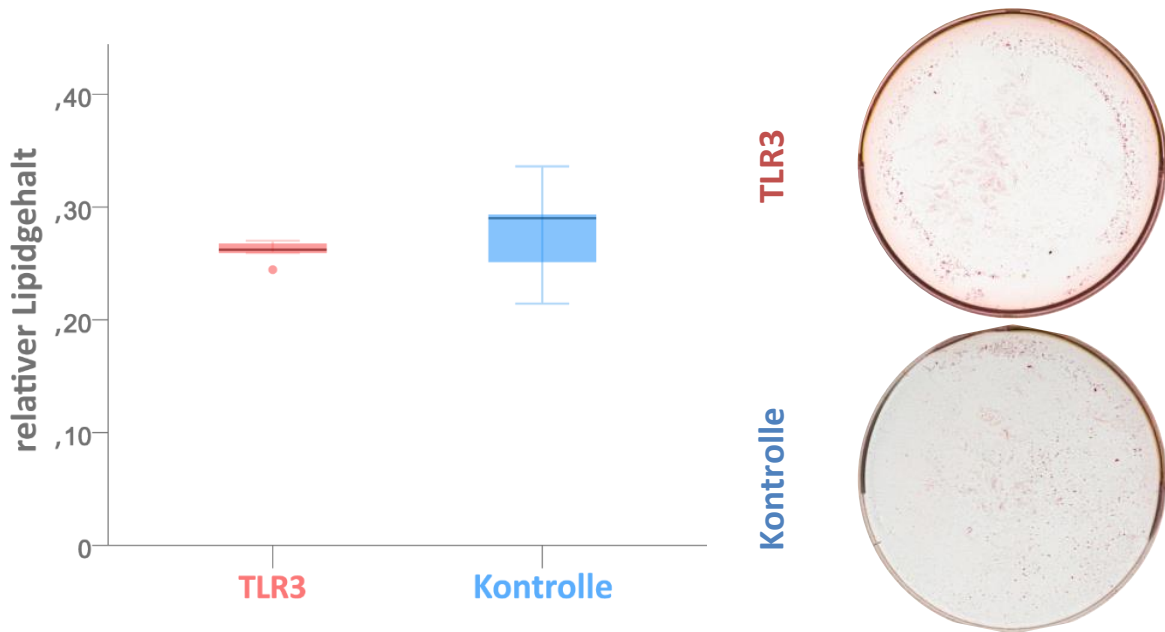
### 3.4.4.2. Adipogene Differenzierung

Zur Vorbereitung der adipogenen Differenzierung erfolgte die Kultivierung von 4 Proben je  $3 \times 10^4$  MACS<sup>+</sup> Zellen auf 6-Well-Platten. Nachdem diese eine Konfluenz von 80% erreicht hatten folgte die Stimulation mittels adipogenem Differenzierungsmedium in Supplementierung mit Poly(I:C) (10 µg/ml) und schierem Differenzierungsmedium zur Kontrolle. Nach 4 Wochen wurden die Lipidtröpfchen von 2 der Proben mit Ölrot gefärbt. Der Farbstoff wurde extrahiert und die Konzentration relativ zu einem Standard photometrisch bestimmt. Die mRNA der verbleibenden Proben wurde extrahiert und durch reverse Transkription und *LightCycling* mit Sonden quantifiziert.



**Abbildung 33 Adipogene Differenzierung MACS+ sortierter Zellen unter Poly(I:C) Stimulation**

Zytologische Ölrot Färbung MACS+ Kulturen nach vierwöchiger adipogener Differenzierung; links: Stimulation mit Poly(I:C); rechts: Kontrolle



**Abbildung 34 Ölrot Quantifizierung nach vierwöchiger adipogener Differenzierung mit Poly(I:C) Stimulation**

Vergleich der Ölrot Quantifizierung Poly(I:C) stimulierter und unstimulierter MACS+ Zellen nach vierwöchiger adipogener vierwöchiger adipogener Differenzierung; oben: Ölrot Färbung nach adipogener Differenzierung unter Poly(I:C) Stimulation; unten: Ölrot Färbung nach adipogener Differenzierung ohne Poly(I:C) Stimulation (Kontrolle)

Die Ölrot Färbung [medianer relativer Lipidgehalt (Q25/Q75)] nach adipogener Differenzierung wurde unter Stimulation mit Poly(I:C) [0,2623 (0,2519/0,2689)] geringfügig im Vergleich zur Kontrolle [0,2902 (0,2329/0,3147)] vermindert.

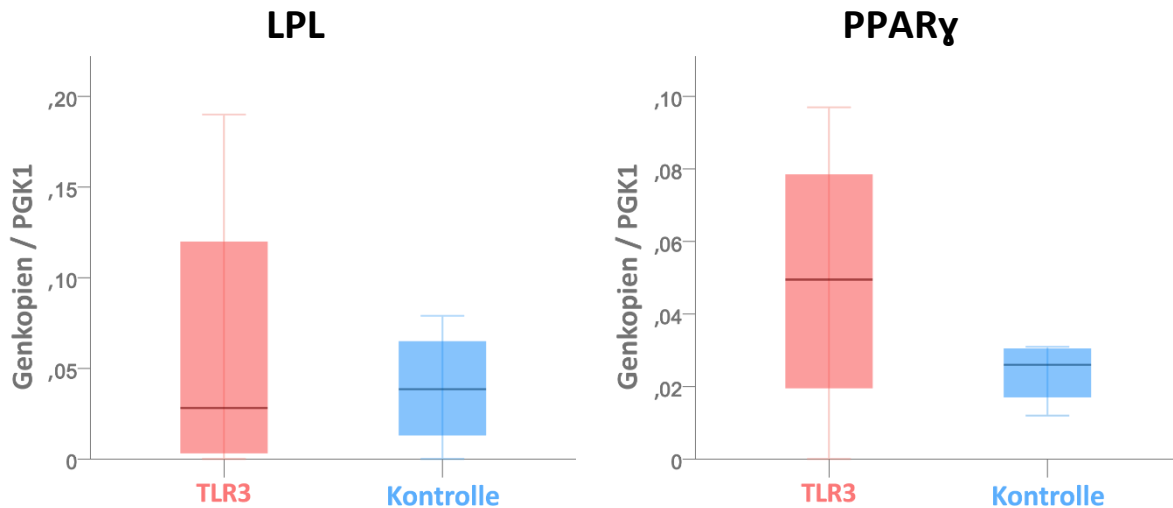


Abbildung 35 LPL und PPAR $\gamma$  Expression MACS<sup>+</sup> Zellen nach osteogener Differenzierung unter Poly(I:C) Stimulation

Vergleich der Genexpression zwischen MACS<sup>+</sup> sortierten Kulturen nach vierwöchiger adipogener Differenzierung mit und ohne Poly(I:C) Stimulation

Links: *Lipoproteinlipase*; rechts: peroxisome proliferator-activated receptor gamma

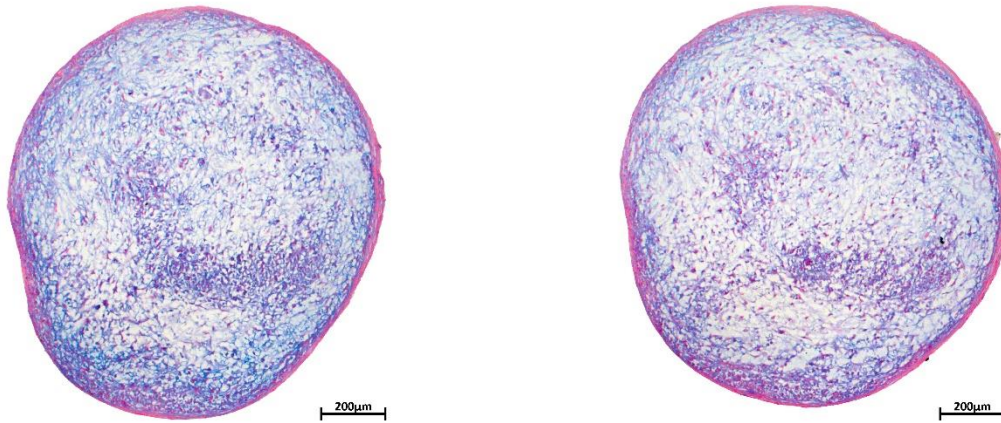
Korrespondierend zur Färbung wurde die Transkription von LPL [mediane Genexpression/PGK1 (Q25/Q75)] durch Poly(I:C) Stimulation [0,0282 (0,0016/0,1550)] im Vergleich zur Kontrolle [0,0385 (0,0065/0,0720)] vermindert. Die Transkription von PPAR $\gamma$  wurde hingegen erhöht [0,0495 (0,0098/0,0878)]/[0,0260 (0,0145/0,0308)].

### 3.4.4.3. Chondrogene Differenzierung

Die Kultivierung der Zellen zur chondrogenen Differenzierung fand in 1,5ml Röhrcchen statt. Je Patient wurden 4 Proben von  $3 \times 10^4$  Zellen verwendet, welche nach Zentrifugation mit Poly(I:C) supplementiertem chondrogenem Differenzierungsmedium (10 $\mu$ g/ml) stimuliert wurden. Die Kontrollen erhielten reines chondrogenes Differenzierungsmedium. Nach 5 Wochen wurde die Hälfte der Proben fixiert und nach Herstellung histologischer Schnitte mit Alzianblau und Kernechtrot gefärbt. Die rot und blau gefärbten Bereiche wurden mittels *Automated Digital Image Quantification* quantifiziert. Die übrigen Proben wurden mittels Ultraschallimpulsen lysiert und ihre mRNA extrahiert und quantifiziert.



## Ergebnisse

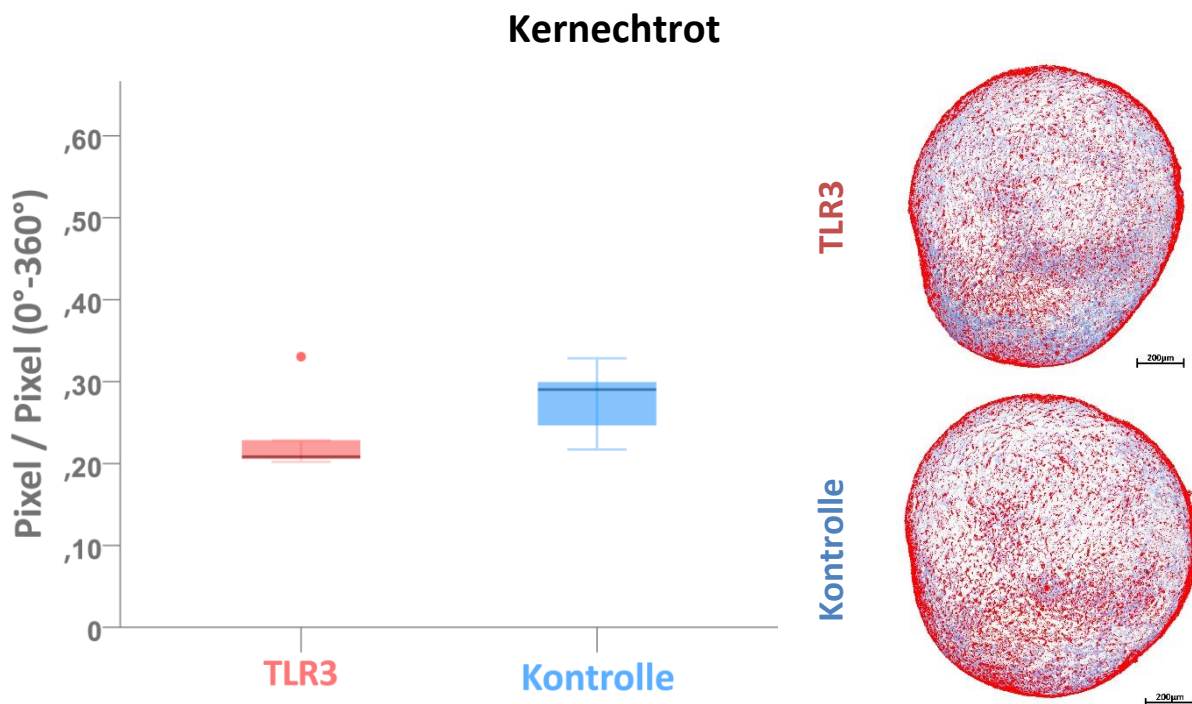


**Abbildung 36 Chondrogene Differenzierung MACS+ sortierter Zellen unter Poly(I:C) Stimulation**

Histologisch aufbereitete, Alzianblau/Kernechtrot gefärbte MACS+ Mikromassen nach fünfwöchiger chondrogener Differenzierung; Links: Stimulation mit Poly(I:C); rechts: Kontrolle

## Alzianblau und Kernechtrot Quantifizierungen

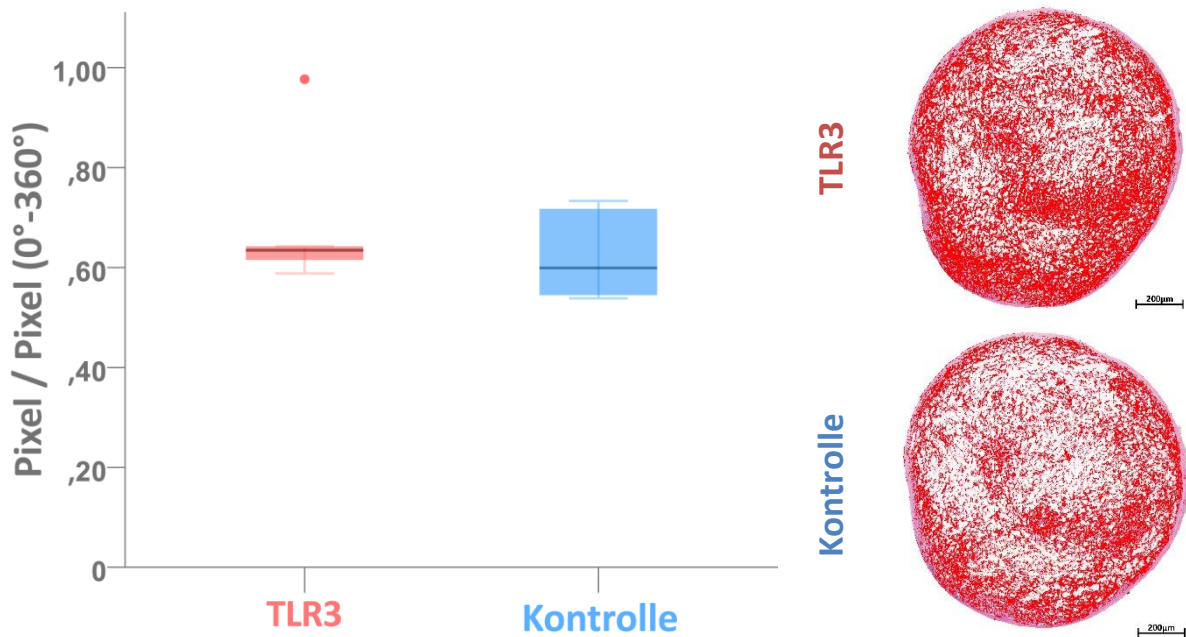
Die Alzianblau und Kernechtrot Quantifizierungen erfolgten unter Anwendung der zuvor definierten Standards: Alzianblau 135° bis 272°, Kernechtrot 273° bis 73°, Helligkeit 0% bis 61%. Zur Kompensation der Geometrie der Anschnitte wurden alle Präparate ausgewertet.



**Abbildung 37 Kernechtrot Quantifizierung nach chondrogener Differenzierung unter Poly(I:C) Stimulation**

Links: Vergleich der Kernechtrot gefärbten Anteile Poly(I:C) stimulierter und unstimulierter MACS+ Mikromassen nach fünfwöchiger chondrogener Differenzierung; oben: Kernechtrot Färbung nach chondrogener Differenzierung unter Poly(I:C) Stimulation; unten: Kernechtrot Färbung nach chondrogener Differenzierung ohne Poly(I:C) Stimulation (Kontrolle)

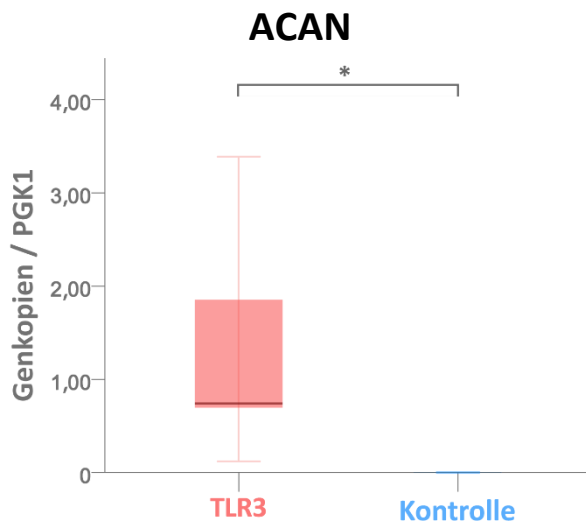
### Alzianblau



**Abbildung 38 Kernechtrot Quantifizierung nach Chondrogene Differenzierung unter Poly(I:C) Stimulation**

Links: Vergleich der Alzianblau gefärbten Anteile Poly(I:C) stimulierter und unstimulierter MACS<sup>+</sup> Mikromassen nach fünfwöchiger chondrogener Differenzierung; oben: Alzianblau Färbung nach chondrogener Differenzierung unter Poly(I:C) Stimulation; unten: Alzianblau Färbung nach chondrogener Differenzierung ohne Poly(I:C) Stimulation (Kontrolle)

Die Kernechtrot Färbung [mediane relative Pixel (Q25/Q75)] wurde nach chondrogener Differenzierung und Poly(I:C) Stimulation [0,208 (0,204/0,279)] weniger stark retiniert als durch die Kontrolle [0,290 (0,232/0,313)]. Die Alzianblau Färbung verhielt sich mit einer geringen Erhöhung nach Stimulation [0,635 (0,602/0,810)] im Vergleich zur Kontrolle [0,599 (0,542/0,725)] komplementär.



**Abbildung 39 ACAN Expression MACS<sup>+</sup> Zellen nach chondrogener Differenzierung unter Poly(I:C) Stimulation**

Vergleich der ACAN Expression zwischen MACS<sup>+</sup> sortierten Kulturen nach fünfwöchiger chondrogener Differenzierung mit und ohne Poly(I:C) Stimulation. Signifikante Ergebnisse ( $p < 0,05$ ; Wilcoxon Rangsummentest) wurden mit \* markiert.

Die ACAN Transkription [mediane Genexpression/PGK1 (Q25/Q75)] nach chondrogener Differenzierung konnte durch Stimulation mit Poly(I:C) [ ,7423 ( ,4086/2,6201)] im Vergleich zur Kontrolle [ ,0014 ( ,0001/,0033)] signifikant ( $p=0,043$ ; Wilcoxon) gesteigert werden.

### 3.4.5. mRNA Transkriptionsprofile

Von jedem Patienten wurden je zwei Proben von  $3 \times 10^5$  MACS<sup>+</sup> Zellen der dritten Passage auf eine 6-Well-Platte überführt. Nach Erreichen einer 80%igen Konfluenz wurde eine Probe mit Poly(I:C) supplementiertem Medium (10 $\mu$ g/ml) und die Kontrolle mit Basisnährmedium für 24h stimuliert. Es folgten die Extraktion der RNA, eine reverse Transkription sowie die Quantifizierung der mRNA mittels LightCycling unter Verwendung von DNA-Sonden.

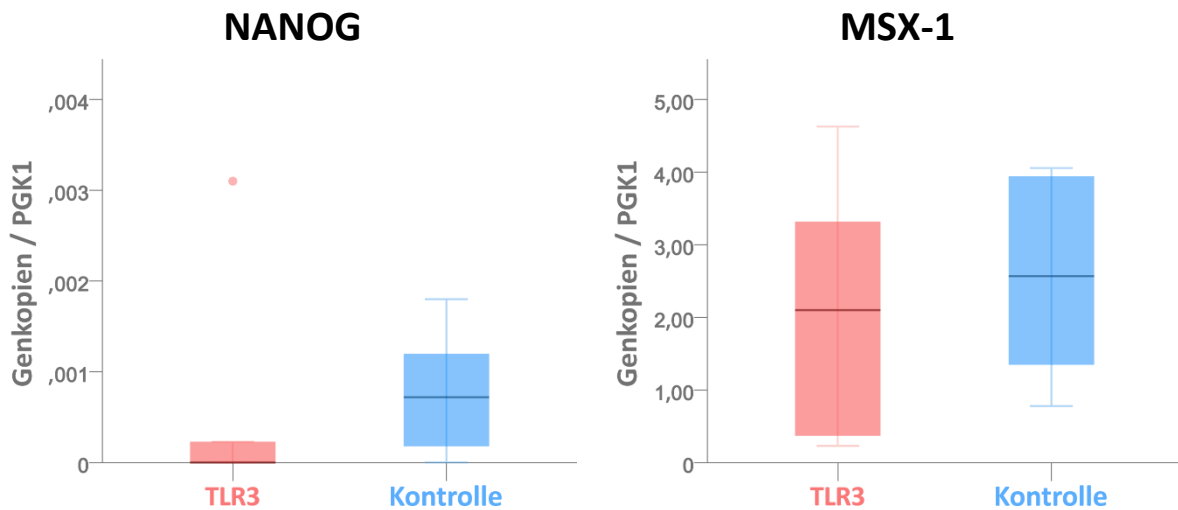


Abbildung 40 Genexpression (NANOG/MSX-1) MACS<sup>+</sup> sortierter Zellen nach Poly(I:C) Stimulation  
Vergleich der Genexpression zwischen Poly(I:C) stimulierten und unstimulierten MACS<sup>+</sup> Kulturen  
Links: NANOG Homeobox; rechts: MSH-homeobox 1

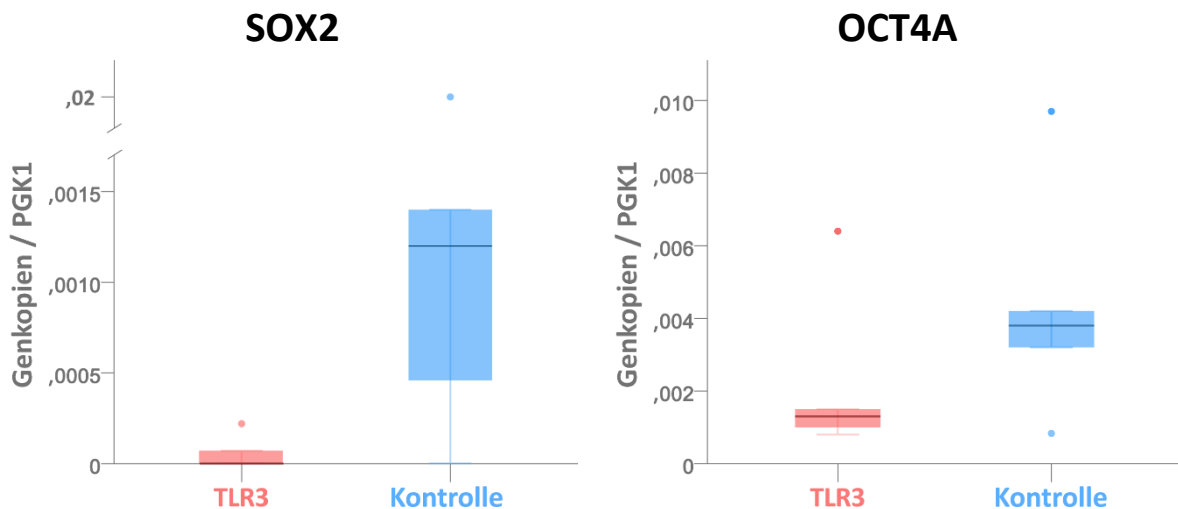


Abbildung 41 Genexpression (SOX2/OCT4A) MACS<sup>+</sup> sortierter Zellen nach Poly(I:C) Stimulation  
Vergleich der Genexpression zwischen Poly(I:C) stimulierten und unstimulierten MACS<sup>+</sup> Kulturen  
Links: sex determining region Y- box 2; rechts: octamer- binding transcription factor 4



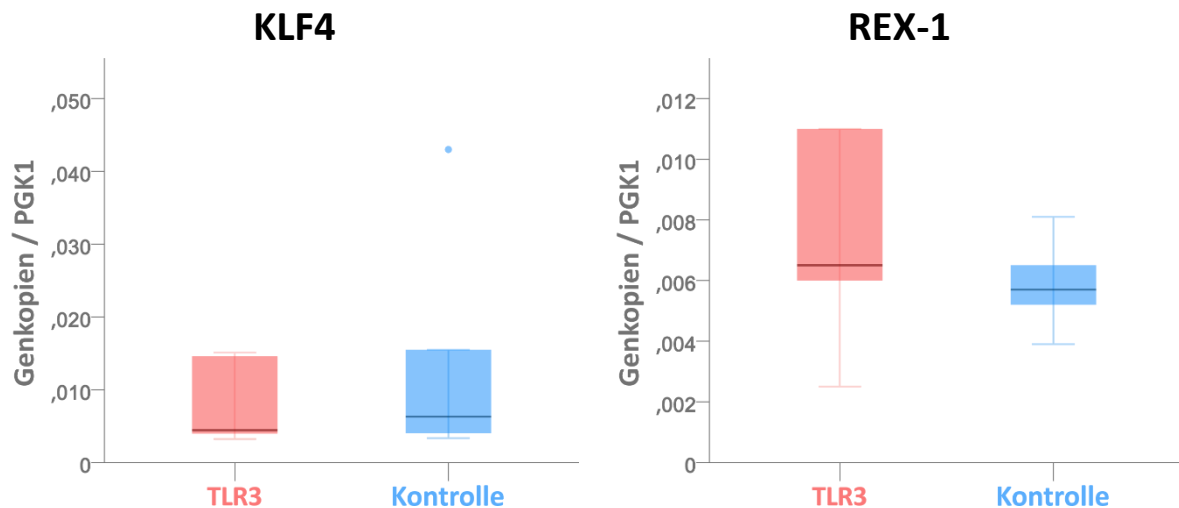


Abbildung 42 Genexpression (SOX2/OCT4A) MACS+ sortierter Zellen nach Poly(I:C) Stimulation

Vergleich der Genexpression zwischen Poly(I:C) stimulierten und unstimulierten MACS<sup>+</sup> Kulturen

links: *Kruppel like factor 4*; rechts: *RNA exonuclease 1 homolog*

Die Transkription [mediane Genexpression/PGK1 (Q25/Q75)] von REX-1 wurden nach 24h Stimulation mit Poly(I:C) [0,0065 (0,0043/0,0110)] im Vergleich zur Kontrolle [0,0057 (0,0046/0,0073)] leicht erhöht. Die Gene NANOG [0,0000 (0,0000/0,0017)]/[0,0007 (0,0001/0,0015)], SOX2 [0,0000 (0,0000/0,0001)]/[0,0012 (0,0002/0,0107)], OCT4A [0,0013 (0,0009/0,0040)]/[0,0038 (0,0020/0,0070)], KLF4 [0,0044 (0,0036/0,0149)]/[0,0063 (0,0037/0,0293)] und MSX-1 [2,0994 (2,2985/3,9720)]/[2,5669 (1,0632/4,0004)] wurden hingegen vermindert transkribiert.

### 3.4.6. Expression MSC spezifischer Oberflächenmarker

Die Expression der zuvor beschriebenen charakteristischen Marker mesenchymaler Stammzellen wurde durch Durchflusszytometrie ermittelt. Dabei wurde die Expression der Marker CD14, CD34, CD45, CD73, CD90, CD105 und CD146 nach 24h Stimulation des TLR3 mit Poly(I:C) und ohne Stimulation (Kontrolle) gemäß definierten Vorgaben [153, 171] quantifiziert.

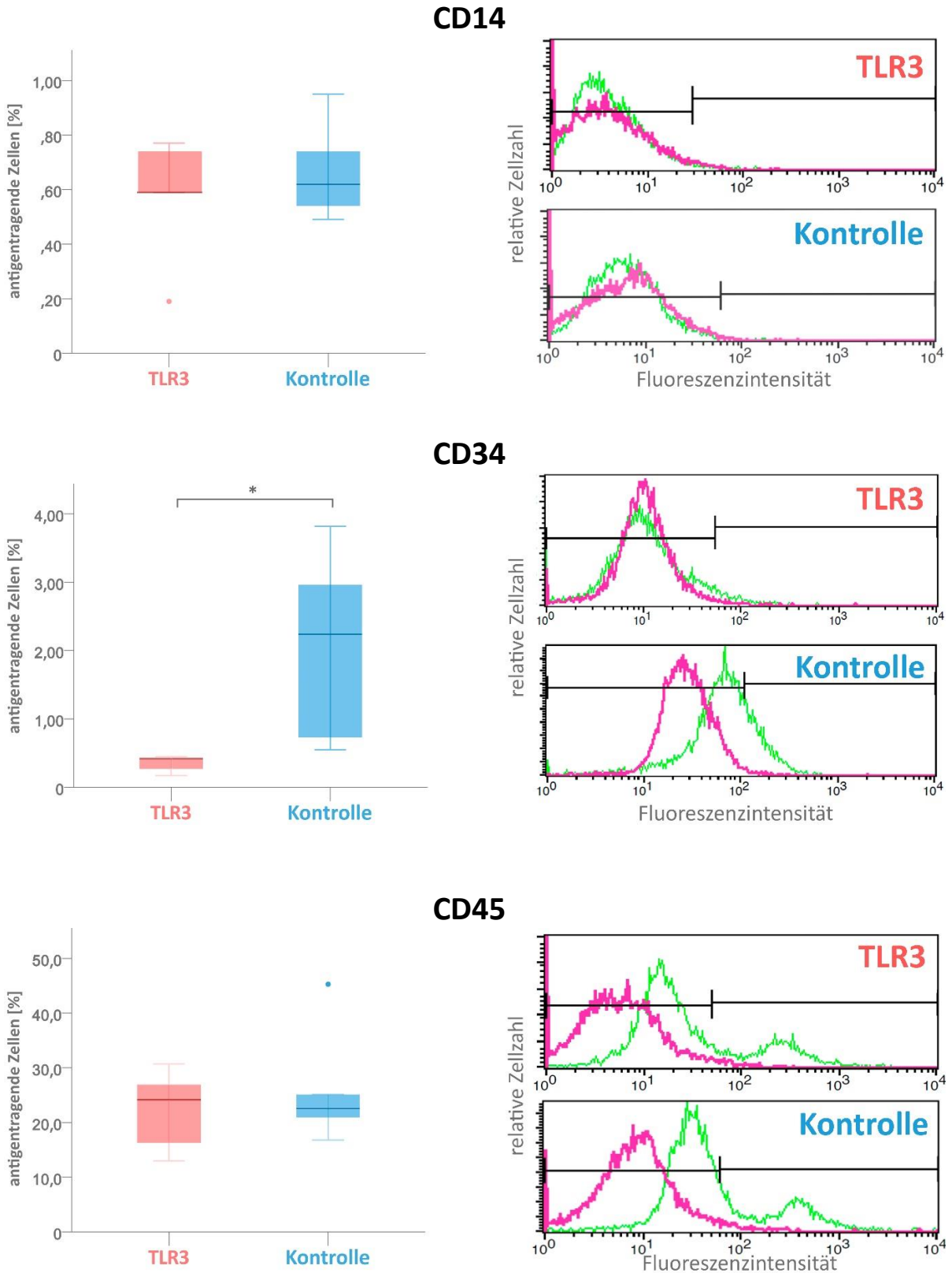
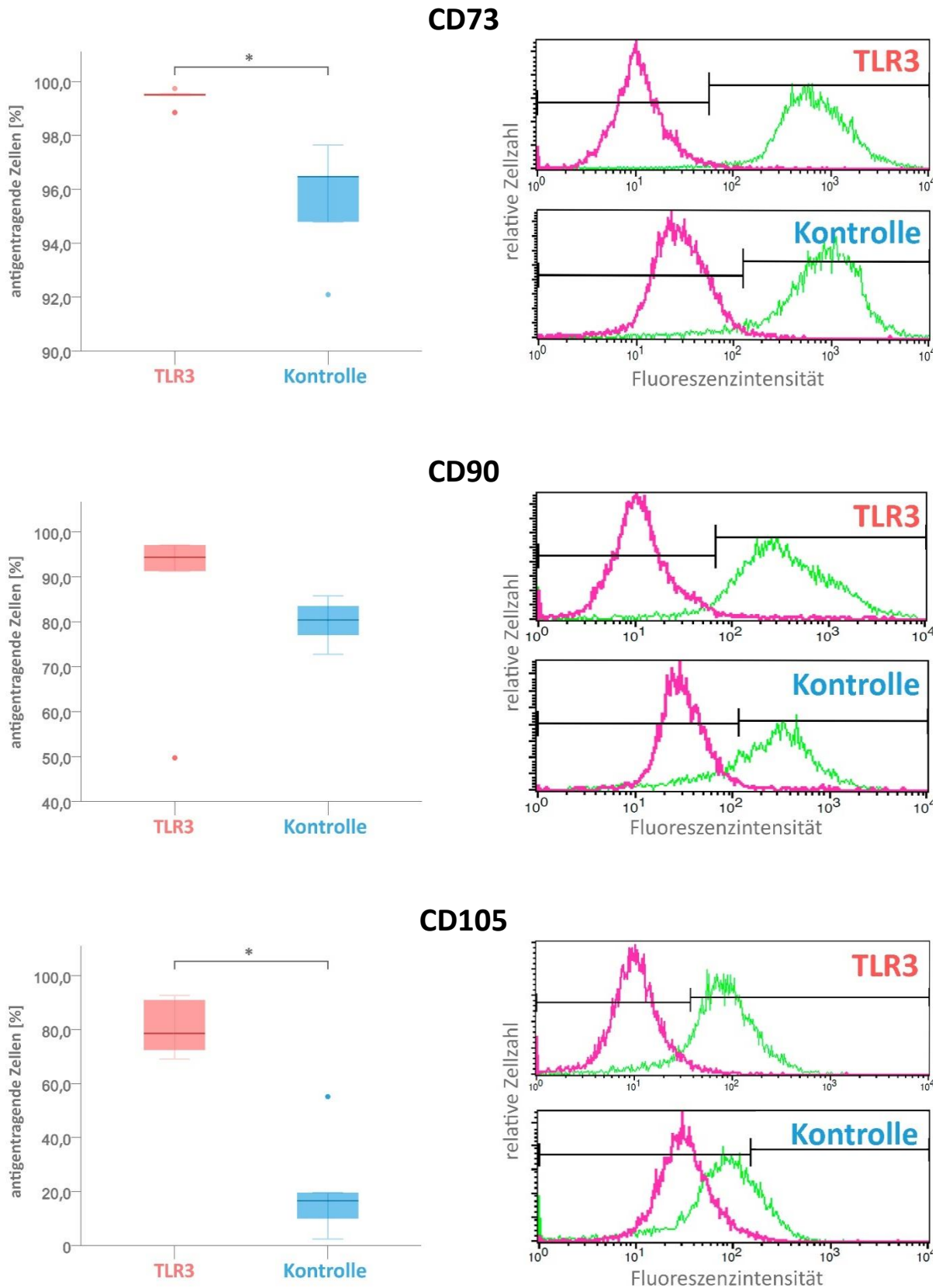
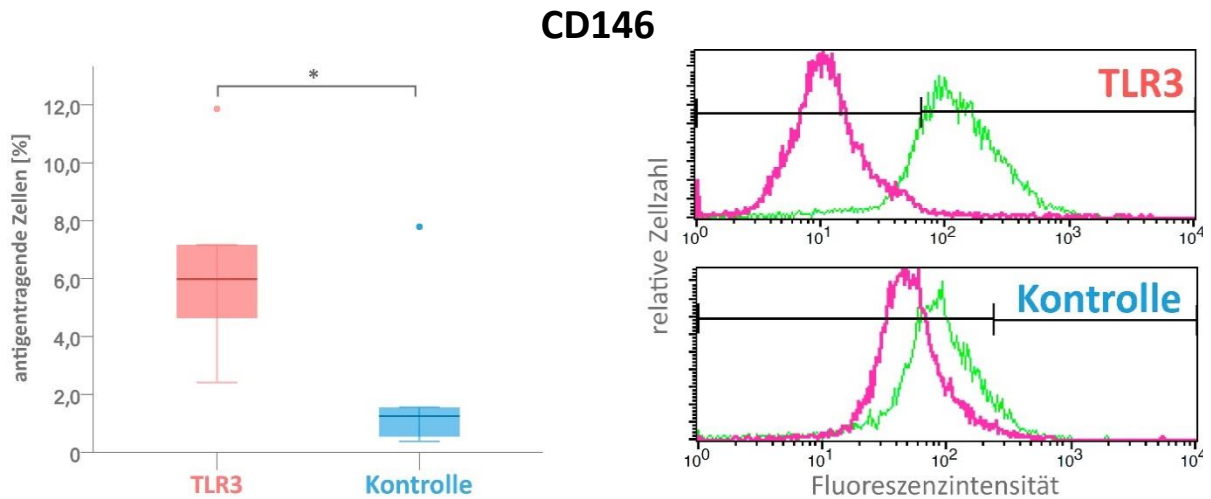


Abbildung 43 CD14, CD34 und CD45 Expression MACS+ sortierter Zellen nach Poly(I:C) Stimulation

Links: durchflusszytometrischer Vergleich der Expression von CD14 (oben), CD34 (Mitte) und CD45 (unten) zwischen Poly(I:C) stimulierten und unstimulierten MACS<sup>+</sup> Kulturen; rechts: histogrammische Darstellung der Markerexpression. *Signifikante Ergebnisse ( $p < 0,05$ ; Wilcoxon Rangsummentest) wurden mit \* markiert.*



**Abbildung 44 CD73, CD90 und CD105 Expression MACS+ sortierter Zellen nach Poly(I:C) Stimulation**  
 Links: durchflusszytometrischer Vergleich der Expression von CD73 (oben), CD90 (Mitte) und CD105 (unten) zwischen Poly(I:C) stimulierten und unstimulierten MACS<sup>+</sup> Kulturen; rechts: histogrammische Darstellung der Markerexpression. *Signifikante Ergebnisse ( $p \leq 0,05$ ; Wilcoxon Rangsummentest) wurden mit \* markiert.*



**Abbildung 45 CD146 Expression MACS+ sortierter Zellen nach Poly(I:C) Stimulation**

Links: durchflusszytometrischer Vergleich der Expression von CD146 zwischen Poly(I:C) stimulierten und unstimulierten MACS<sup>+</sup> Kulturen; rechts: histogrammische Darstellung der Markerexpression. *Signifikante Ergebnisse* ( $p \leq 0,05$ ; Wilcoxon Rangsummentest) wurden mit \* markiert.

Die Expression [mediane Fluoreszenzintensität (Q25/Q75)] von CD34 wurde durch Stimulation mit Poly(I:C) [4,20 (2,220/4,35)] im Vergleich zur Kontrolle [2,240 (1,640/3,390)] signifikant ( $p=0,43$ ; Wilcoxon) vermindert. Nahezu identisch blieben die Expressionen von CD14 [5,90 (3,390/7,55)]/[6,20 (5,515/8,45)] und CD45 [24,140 (14,635/28,795)]/[22,510 (18,860/35,200)]. Eine verstärkte Expression erfuhren CD73 [99,500 (99,160/99,645)]/[96,470 (93,440/97,075)] ( $p=0,043$ ), CD90 [94,340 (70,475/97,075)]/[80,400 (74,905/84,660)], CD105 [78,580 (70,800/91,880)]/[16,530 (6,150/37,370)] ( $p=0,043$ ) und CD146 [5,980 (3,520/9,515)]/[1,250 (0,460/4,675)] ( $p=0,043$ ).

## 4. Diskussion

Die Expression von Toll-like Rezeptoren durch mesenchymale Stammzellen einschließlich gingivaler mesenchymaler Stammzellen konnte durch El-Sayed et al. bereits nachgewiesen werden [76]. Die individuelle Expression verschiedener TLR hing insbesondere vom Ursprung der Populationen und den inflammatorischen Bedingungen ab [224]. Die variierende Expressionsrate lässt auf eine enge Vergesellschaftung und eine Veränderung der MSC spezifischen Eigenschaften unter Einflussnahme eines inflammatorischen Mikromilieus schließen [76, 213, 214]. Auf der anderen Seite ist auch der (pro-)inflammatorische Phänotyp der MSCs durch Aktivierung spezifischer TLR zu induzieren, wodurch ein komplexer Zusammenhang dieser Rezeptorklasse im Rahmen inflammatorischer Prozesse offensichtlich wird [225, 226]. Gerade die Aktivierung von Toll-like Rezeptor 3 als Bestandteil der initialen Immunantwort [227] wird mit epigenetischen Veränderungen assoziiert, welche eine veränderte Differenzierung und „Programmierung“ der Zellen bewirken können und derzeit als wichtiger Bestandteil transflammatorischer Überlegungen gilt [228, 229]. Besonders zur therapeutischen (Re-)Aktivierung ausdifferenzierter Keratinozyten und Fibroblasten über TLR3 zur Verbesserung der Wundheilung epidermaler Defekte wird derzeit geforscht [230, 231]. Neben den immunomodulatorischen Funktionen der MSCs [232, 233] spielt ihre Pluripotenz eine wesentliche Rolle zur Definition der gewebsspezifischen regenerativen Kapazitäten [3]. Studien an MSCs verschiedenen Ursprungs haben eine enge Vergesellschaftung der Aktivierung von TLR mit ihrer Pluripotenz gezeigt [234, 235]. Bei Stimulation des TLR3 von BMSC mittels Poly(I:C) konnte über die Aktivierung der MAP Kinase und topische Faktoren eine Steigerung der IL-6 Sekretion mit einhergehendem erhöhtem therapeutischem Outcome bewirkt werden [236]. Versuche an G-MSCs und Stammzellen der Nabelschnur lassen eine TLR3 vermittelte Immunsuppression vermuten, welche durch Expression antiinflammatorischer Faktoren und Inhibition von microRNA-143 zustande kommt [237, 238]. G-MSCs exprimieren TLR1-7 und TLR10 in unterschiedlicher Quantität, wobei die genauen Einflüsse dieser Rezeptoren auf das Zellverhalten und den Zellzyklus noch weitestgehend unbekannt sind [76]. Diese Studie beschreibt erstmals die Veränderung der pluripotenten Eigenschaften gingivaler mesenchymaler Stammzellen bei TLR3 Ligation mit *high molecular weight Poly(I:C)* in vitro.

## 4.1. Erklärung und Diskussion der Methodik

### 4.1.1. Isolation MACS<sup>+</sup> Zellen

Die Isolation und Charakterisierung der G-MSCs erfolgte gemäß des 2015 durch *El-Sayed et al.* beschriebenen Verfahrens [153]. Dabei wurden die chirurgisch gewonnenen Gingivaexzisate zunächst unselektiv kultiviert und jene Zellen, welche adhäsive Eigenschaften an der PMMA Oberfläche der Petrischalen besaßen [239], mittels *Magnetic Activated Cell Sorting* über den pluripotenzassoziierten Stro-1 Marker selektiert.

#### 4.1.1.1. Magnetic Activated Cell Sorting

Unter den verschiedenen Möglichkeiten, Zellen aus einer Suspension zu selektieren, hat sich in vorausgegangenen Arbeiten das *Magnetic Activated Cell Sorting* (MACS) am meisten bewährt. Die Selektion hier erfolgt mittels extrazellulärer plasmalemmaler Strukturen. Diese werden durch spezifische Antikörper gebunden und mittels komplementärer Antikörper an ferromagnetisch aktive *MicroBeads* gekoppelt [240]. Nun durchläuft die Zellsuspension eine Säule. Durch das Anlegen eines starken magnetischen Feldes werden die markierten Zellen retiniert (MACS<sup>+</sup> Fraktion), wohingegen alle übrigen Zellen das Magnetfeld ungehindert passieren können (MACS<sup>-</sup> Fraktion). Nach Entfernung des magnetischen Feldes werden die MACS<sup>+</sup> Zellen aus der Säule gespült [241].

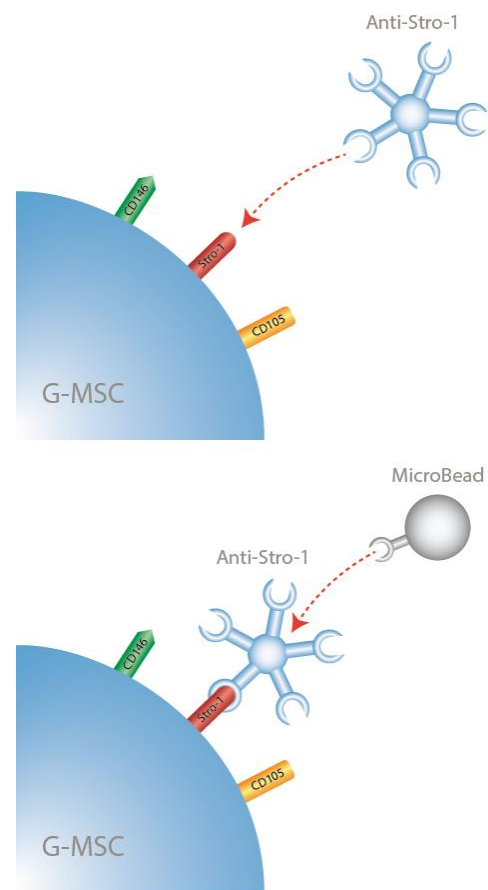


Abbildung 46 IgM vermittelte Bindung von MicroBeads an MACS<sup>+</sup> Zellen

Oben: Bindung des primären Antikörpers (Anti-Stro-1); unten: Bindung des MicroBeads

#### Stro-1

Die Zellidentifikation der G-MSCs erfolgte durch das Stro-1 Antigen [209]. Stro-1 ist ein extrazellulär lokalisierter Marker mit einer molekularen Masse von 75kd [242], welcher 1991 erstmals über einen Antikörper vom Typ IgM zur Isolation von Knochenmarksstammzellen

verwendet wurde [242, 243]. Stro-1 wird von mesenchymalen Stammzellen multiplen Ursprungs exprimiert und findet sich u.a. auf G-MSCs [204], DPSC [244], SCAP [245], aber auch extraoral gelegenen MSCs wie jenen des Rücken- [246] oder Knochenmarks [247]. Dabei konnte eine enge Vergesellschaftung MSC-spezifischer Charakteristika mit Stro-1<sup>+</sup> Zellen im Vergleich zu Stro-1<sup>-</sup> Zellen festgestellt werden [153, 204, 245]. Immer wieder wird die Eignung von Stro-1 zur Selektion mesenchymaler Stammzellen kritisch hinterfragt. Gerade MacArthur et al. (2006) kritisierten eine eher heterogene Beschaffenheit der isolierten Zellen [248]. Auch verglichen Gothard et al. die Eigenschaften CD105/CD146 und Stro-1 selektierter Zellpopulationen, konnten jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen feststellen, auch wenn diese sich nicht zu 100% identisch darstellten [249]. Die potentiell heterogen sortierte MACS<sup>+</sup> Population wurde vor Durchführung weiterer Schritte veredelt und zunächst auf MSC Charakteristika untersucht, bevor die Stimulationen begonnen wurden.

#### **4.1.1.2. Auswahl monoklonaler Kolonien**

Zur weiteren Veredelung der gewonnenen MACS<sup>+</sup> Zellfraktion wurden die koloniebildenden Eigenschaften mesenchymaler Stammzellen [154] im Sinne einer nachträglichen Kolonie-Isolationsmethode genutzt [250]. Dabei wurden MACS<sup>+</sup> sortierte Zellen bei geringer Dichte [251] ausgesät und die Bildung monoklonaler Kolonien beobachtet. Im Vergleich zu fibroblastischen Kolonien sind MSC Kolonien deutlich schärfer begrenzt und weisen eine hohe Reinheit sowie einen geringen Differenzierungsgrad auf [252], sodass sie selektiv abgelöst und als Basis aller weiteren Investigationen kultiviert werden konnten.

#### **4.1.1.3. Standardbedingungen zur Kultivierung MACS<sup>+</sup> Zellen**

Die MACS<sup>+</sup> Zellen wurden in Zellkulturflaschen aus PMMA kultiviert, welche eine Adhäsion mesenchymaler Stammzellen gewährleisten [239]. Die Wahl des Basismährmediums erfolgte früheren Investigationen entsprechend [153] und bestand aus  $\alpha$ -MEM, supplementiert mit fetalem Kälberserum [253], 200mmol/ml L-Glutamin, Antibiotika (100U/ml Penicillin, 100 $\mu$ g/ml Streptomycin) und Antimykotika (1% Amphotericin). L-Glutamin diente der Modulation und Suppression einer akzidentiellen Inflammation mit einhergehenden Veränderungen in den Eigenschaften der G-MSCs [253]. Aus demselben Grund wurde die

Konzentration in Gewährleistung der Vergleichbarkeit identisch zu vorhergegangenen Studien gewählt [76, 213, 214, 218, 220, 254]. Die Antibiotika und das Antimykotikum halfen, die Kulturen frei von bakteriellen und fungalen Infektionen zu halten [255]. Die Inkubation erfolgte konstant in einer Atmosphäre von 5%igen CO<sub>2</sub> bei Körpertemperatur (37°C). Der Sauerstoffgehalt der Atmosphäre konnte in Versuchen an pulpalen Stammzellen und BMSCs direkt mit der Aufrechterhaltung von pluripotenten Eigenschaften assoziiert werden. Eine Atmosphäre von 3% Sauerstoff bewirkte die Beibehaltung der SC Eigenschaften, höhere Konzentrationen hingegen die rasche Differenzierung [256, 257].

#### 4.1.2. Durchflusszytometrie

Die Charakterisierung einzelner Zellen durch Durchflusszytometrie wurde in den frühen 1970er Jahren eingeführt und bietet die Möglichkeit, den Phänotyp einzelner Zellen anhand ihrer Oberflächenmarkerexpression zu quantifizieren [258], aber auch Zellgemische anhand ihrer Marker zu trennen (*Fluorescence Activated Cell Sorting*, FACS). Die Antigene werden über Fluorochrom-gekoppelte monoklonale Antikörper gebunden. Das individuell genutzte Fluorochrom wird durch einen speziell abgestimmten Laser stimuliert und emittiert beim Abfallen der angeregten Elektronen auf das ursprüngliche Energieniveau Photonen einer längeren Wellenlänge. Diese werden durch den *Bandpass Filter* des Geräts erkannt. Zum Beispiel können die Fluorochrome PE und FITC unter Verwendung eines Argon-Lasers ( $\lambda=488\text{nm}$ ) stimuliert werden, wobei das Emissionsmaximum bei  $\lambda=525\text{nm}$  (FITC) und  $\lambda=575\text{nm}$  (PE) liegt. APC Fluorochrome können hingegen durch Dye oder HeNe Laser ( $\lambda=595\text{nm}$  bzw.  $\lambda=632\text{nm}$ ) stimuliert werden und emittieren bei  $\lambda=660\text{nm}$ . Die verschiedenen Emissionsmaxima erlauben die Analyse mehrerer Marker in einem Vorgang [259]. Um das Hintergrundrauschen durch unspezifische Fc-Rezeptorbindung zu reduzieren, wurde ein *Fc-blocking reagent* verwendet [260, 261]. Die weitere Elimination artifizierlicher Bindungen des Fluorochroms erfolgte durch Messung der Phänotypen gegen eine komplementäre Isotyp Kontrolle, die in Fluorochrom, Ig Subtyp und Spezies dem verwendeten Antikörper entsprach [261].



#### 4.1.2.1. MSC spezifische Oberflächenmarker

Gemäß der Leitlinie der *International Society for Cellular Therapy* (ISCT), welche sich im Wesentlichen auf die Arbeiten der Autoren Dominici et al. und Bartold et al. stützt, sollte eine Kultur von G-MSCs negativ für die Marker CD14, CD34 und CD45 sowie positiv für CD73, CD90, CD105 und CD146/MUC18 [262] sein.

CD14 ist ein Differenzierungsmarker myeloider Zelllinien, der daher auch unter der Bezeichnung *monocyte/macrophage differentiation antigen* bekannt ist. Immense Bedeutung kommt diesem in der Detektion von LPS in Verbindung mit TLR4 und der Induktion inflammatorischer Signalkaskaden zu [263], allerdings ist CD14 auch mit der Reifung der tragenden Zellen eng assoziiert. Da CD14 in erster Instanz ein Merkmal myelomonozytischer Zellen darstellt, ist die Expression auf mesenchymalen Stammzellen gering [264].

CD34 ist ein mit Mucin verwandtes Glycoprotein hämatopoetischer Stamm-/Progenitorzellen das die E-/P-Selektin abhängige Bindung von Knochenmarkzellen vermittelt. Es wird angenommen, die Verminderung der Expression von CD34 stelle den ersten notwendigen Schritt zur Migration und schließlich Differenzierung dar. Dabei sind CD34<sup>+</sup> Zellen durch eine höhere metabolische Aktivität und einen verstärkten Eintritt in den Zellzyklus gekennzeichnet [265].

CD45 (*leucocyte common antigen*) wird von allen hämatopoetischen Zellen exprimiert, abgesehen von Thrombozyten und Erythrozyten. Von diesem Marker gibt es eine Vielzahl an Isotypen, die durch alternatives Spleißen gebildet werden [266]. Die Veränderung der Expression von CD45 wurde insbesondere im Kontext der akuten lymphatischen Leukämie untersucht. Ann Hendrickx und Xavier Bossuyt (2001) waren im Rahmen klinischer Studien in der Lage, die Malignität der B-Lymphozyten mit der fallenden CD45 Expression zu assoziieren [267]. Einen Schritt weiter gingen Bipasha Bose et al. mit der direkten Verbindung altersbedingten Verlustes an Pluripotenz in Begleitung einer steigenden CD45 Expression [268].

Im Gegensatz zu den o.g. Clustern zeigen MSCs eine hohe Expression von CD73. CD73 besitzt Ekto-5'-Nucleotidaseaktivität und ermöglicht so die Metabolisierung extrazellulärer Nucleotide. Auf diese Weise beeinflussen MSCs als CD73 tragende Zellen über einen purinergen Signalweg die Differenzierung in endo-/exogener Weise [269]. CD73 vermittelt

NFκB abhängige immunomodulatorische Eigenschaften, welche lokale Inflammation beeinflussen können [270]. Der Cluster ist außerdem sehr bekannt als Differenzierungsmarker und wird als prognostischer Marker in der Tumordiagnostik diskutiert [271].

CD90 (Thy-1) ist ein Marker der Zellmigration und Viabilität und ist damit ebenfalls ein prognostischer Marker der Onkologie [272]. Zhenzhen Pan et al. konnten bei Versuchen an adipogenen Stammzellen feststellen, dass eine Inhibition von CD90 zur Reduktion der zellulären Proliferation führt, ein hohes CD90 hingegen zur AKT-1 abhängigen Verstärkung der mitotischen Aktivität [273].

CD105 (Endoglin) ist ein primär endothelial exprimierter homodimerisierender Marker mit TGF-β rezeptiven Eigenschaften [274]. Die exprimierenden Zellen weisen im Konsens mehrerer Beobachter pluripotente Eigenschaften auf. Insbesondere an Zellen des Fettgewebes und Knochenmarks offenbarte die CD105 selektive Sortierung Zellpopulationen mit bemerkenswertem Differenzierungsvermögen [249].

Ebenso wie CD105 ist auch CD146 primär endothelial lokalisiert und kann zur Isolation mesenchymaler Stammzellen genutzt werden [249]. Der Marker wurde in der Vergangenheit mit angiogenen, sowie mineralisationsfördernden Eigenschaften assoziiert [275]. Auf der anderen Seite ist CD146 ein potenter Tumormarker, der ein besonders aggressives Wachstum und einen geringeren Differenzierungsgrad anzeigt. Ergänzend konnte durch einen CD146 Knock-down bzw. dessen Inhibition die AKT-1 induzierte Mitoserate vermindert und gleichzeitig die Apoptoserate gesteigert werden [276].

#### **4.1.2.2. Intrazellulärer TLR3-Nachweis**

Die intrazelluläre Expression von TLR3 in G-MSCs wurde bereits nachgewiesen [76]; zur zusätzlichen Kontrolle des verwendeten Patientenguts und als notwendige Voraussetzung der Rezeptorstimulation mittels Poly (I:C) wurde sie analog zur vorherigen Versuchsreihe durch Durchflusszytometrie verifiziert. Die Antigenbindung von Anti-TLR3-Fluoreszent an den intrazellulär-endosomal gelegenen Rezeptor erfordert dessen Diffusion in die Zelle und damit die Penetration der Plasmamembran. Die Antigenbindung wurde daher erst durch Permeabilisierung des Plasmalemmas möglich [277]. Der große Nachteil, welcher in der

Zerstörung plasmalemaler Epitope besteht, konnte durch die Separierung extra- und intrazellulärer Nachweise eliminiert werden [278]. Die Messung erfolgte gegen die vom Hersteller definierte Isotyp Kontrolle und zusätzlich unter Anwendung einer Fc-Rezeptor-blockierenden Substanz, die die Präzision der Messung durch Reduktion des Hintergrundrauschens weiter erhöht hat.

### 4.1.3. Koloniebildung

Die Zellteilung mesenchymaler Stammzellen kann auf zwei Arten differenziert werden: homolog und heterolog. Im Falle der homologen Zellteilung gehen aus einer Mutterstammzelle zwei identische Tochterstammzellen hervor [201]. Im Falle einer heterologen Zellteilung teilt sich die Mutterzelle hingegen in eine Stammzelle und eine differenziertere Zelle, oft fibroblastischer Linie [164]. Die Unterscheidung der heterogenen Tochterzellen kann über die Koloniemorphologie erfolgen.

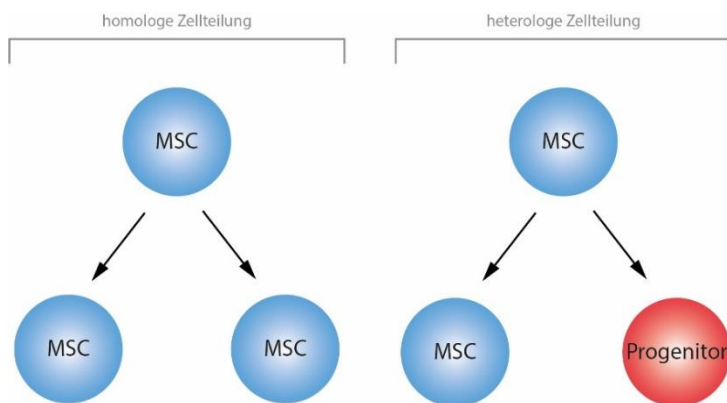


Abbildung 47 Homologe und heterologe Zellteilung

Links: homologe Zellteilung mit zwei identischen Tochterzellen; rechts: Heterologe Zellteilung mit einer Stammzelle und einer weiter differenzierteren Progenitorzelle

Fibroblastische Zellen verlieren im Vergleich zu MSCs die Tendenz zur Koloniebildung und zeigen eine höhere Streuung bei geringerer Schärfe.

Die Koloniebildung der MSCs hat neben dem rein qualitativen Nachweis monoklonaler homologer Zellteilung unter Regeneration der Stammpopulation auch quantitative Aussagekraft durch die Größe und Anzahl gebildeter Kolonien [279]. Wie Friedenstein et al. (1970) bereits postulierte, ist die Anzahl der gebildeten Kolonien ausgehend von derselben Anzahl an Zellen gemäß einer Poisson'schen Verteilung [280] zu beschreiben. Bei Veränderung der Eigenschaften der Stammpopulation kommt es somit zu einer unterschiedlichen Koloniezahl nach einem definierten Intervall. Das Verfahren kann zum Vergleich verschiedener MSCs Linien [281] oder – wie im vorliegenden Fall – zum Vergleich

verschiedener Kultivierungsbedingungen [220] bzw. Stimulationen [282] herangezogen werden.

#### 4.1.4. Metabolische Aktivität (MTT)

Der MTT Test ist ein Verfahren zur Untersuchung des Zellstoffwechsels, der Zellviabilität und Zellaktivität unter Nachweis der Glykolyseaktivität. Zu diesem Zweck wird den Zellkulturen ein Oxidationsmittel [MTT; 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid] zugegeben [283]. Das Oxidans wird über metabolische Reduktionsmittel [z.B.  $\text{NAD(P)H} + \text{H}_3\text{O}^+$ ] reduziert, sodass es zum Farbumschlag kommt. Dieser kann mittels Spektrophotometrie gemessen werden. Je größer die metabolische Aktivität einer Kultur ist, desto mehr MTT wird umgesetzt und desto höher ist schließlich die optische Dichte des Lysats [284]. Die MTT analysiert durch die tetrazoliumbasierte Visualisierung der metabolischen Aktivität das Zellüberleben und die Proliferationsrate von MSC quantitativ [285].

##### Reduktion von MTT

MTT ist ein Tetrazoliumsalz, welches im sauren Milieu unter Übertragung von zwei Elektronen und eines Wasserstoffprotons durch Spaltung des zentralen Tetrazolrings in ein Formazan umgewandelt wird.

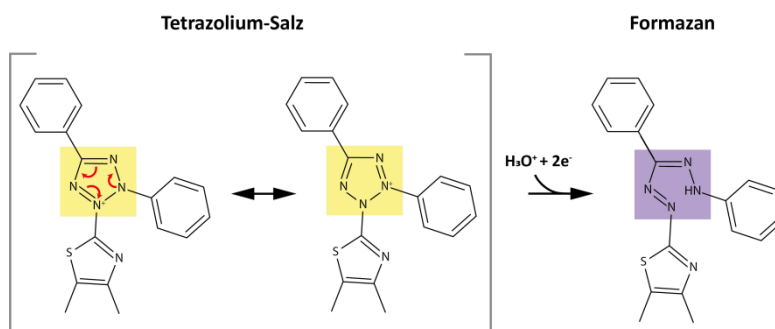


Abbildung 48 Mesomere Grenzformeln und Reduktion mit Farbumschlag von MTT

Links: Oxidiertes Tetrazolium-Salz, Darstellung mittels zweier mesomerer Grenzformeln; rechts: Reduziertes Formazan. Die mesomeren Zentren sind im vorliegenden Farbton hervorgehoben.

Dabei kommt es durch Veränderung des delokalisierten Elektronensystems zur Verschiebung des Absorbtionsspektrums, sodass ein Farbumschlag vom farblosen Oxidans zur reduzierten roten Leuko-Stufe stattfindet. Durch die regional unterschiedliche Verfügbarkeit reduzierender Substrate kommt es zu unterschiedlich starker Rötung der Areale, wodurch eine Differenzierung anhand der metabolischen Aktivität ermöglicht wird [286].

#### 4.1.5. Proliferationskurve

Die Messung der Zellzahl an aufeinanderfolgenden Tagen mittels Neubauer-Zählkammer stellt die wohl einfachste und direkteste Methode zur Darstellung der Proliferation einer Zellpopulation dar. Im Gegensatz zur Messung der metabolischen Aktivität wird dieses Verfahren nicht durch die Stoffwechselaktivität der einzelnen Zellen beeinflusst und ermöglicht somit als Ergänzung der MTT, zwischen veränderter Zellaktivität und realer Zellvermehrung zu unterscheiden [287].

#### 4.1.6. Real-Time-Polymerasekettenreaktion

Die Genexpression ist zusammengesetzt aus der Transkription und der Translation, wobei der Umsatz an mRNA und Proteinen sowie deren Korrelation den Ausschlag in der Verhaltensweise bzw. Entwicklung von Zellpopulation geben [288]. Neben der in der durchflusszytometrischen Analyse bestimmten Einflüsse von TLR3 Aktivierung und dem Phänotyp der G-MSC war somit die Ermittlung stimulationsbedingter Veränderungen in der Transkription pluripotenzassoziierter mRNA zur komplexeren Interpretation des Stimulationseffektes sowie des Nachweises zur Expression von TLR3 zwingend notwendig [289].

##### Reverse Transkription

Um eine PCR von mRNA durchführen zu können, muss diese zunächst mittels Reverser Transkription (RT) in cDNA überführt werden. Das entscheidende Enzym ist die retroviral vorkommende Reverse Transkriptase. Hier wird unter Bildung eines Poly-T-Primers am Poly-A-Ende der mRNA und gleichzeitiger Hydrolyse des RNA-Stranges ein DNA-Monostrang gebildet, welcher im nächsten Schritt durch selbiges Enzym zu doppelsträngiger cDNA komplementär ergänzt wird [290].

##### Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine Technik zur DNA-Vermehrung. Dabei werden die DNA-Doppelstränge durch Erhitzung auf 90°C in zwei Einzelstränge aufgespalten (*Denaturierung*). Nach Abkühlen auf 50-60°C können die komplementären DNA-Stränge nun durch Bindung sequenzspezifischer Primer (*Annealing*) durch eine hitzestabile DNA-abhängige DNA-Polymerase in Anwesenheit von Desoxyribonukleotidphosphaten selektiv repliziert werden. Nach Abschluss der Folge

kann ein weiterer Zyklus durch erneute Denaturierung begonnen werden. Bei ausreichender Substratmenge und genügend Primern nimmt die DNA-Menge so exponentiell mit jedem Zyklus zu [290].

#### **DNA-Quantifizierung mittels LightCycler Sonden**

DNA-Sonden sind spezielle sequenzspezifische DNA-Fragmente, die an ihren 5' bzw. 3' Ende mit je einem Donor- und einem Akzeptor- Fluorochrom gekoppelt sind. Durch die räumliche Nähe der Fluorochrome kommt es über den Förster-Energieresonanztransfer zur Elimination der Donor-Fluoreszenz.

Die modifizierten DNA-Fragmente binden die zur quantifizierende DNA-Sequenz. Durch die 5'-Exonuclease Aktivität der DNA-abhängigen DNA-Polymerase werden diese während der Replikation zerschnitten und so die Fluorochrome getrennt. Dies geschieht repetitiv über mehrere Zyklen, bis es zu einem starken exponentiellen Anstieg der Fluoreszenz im Reaktionsgemisch kommt. Über die Anzahl benötigter Zyklen kann mittels der  $\Delta\Delta\text{CP}$ -Methode auf die Menge an ursprünglich vorhandener mRNA geschlossen werden [285].

#### **4.1.6.1. TLR3 Nachweis**

In Ergänzung der durchflusszytometrisch nachgewiesenen TLR3 Expression wurden alle Proben auf die Transkription TLR3 codierender mRNA untersucht. Das Verfahren folgte dem von El-Sayed et al. etablierten Verfahren zum Nachweis verschiedener TLR in G-MSC [76].

#### **4.1.6.2. MSC-assoziierte Transkriptionsfaktoren**

Die G-MSC wurden auf die mRNA Expression der Gene NANOG, MSX-1, SOX2, OCT4A, REX-1 und KLF4 untersucht [238, 291, 292]. Die Aktivierung pluripotenter Zellen aus differenziertem Zellgut (ursprünglich embryonale und adulte Fibroblasten) gelang Yamanaka et al. erstmals durch Transfer nukleärer Bestandteile oder durch Fusion mit embryonalen Stammzellen [293]. Zur näheren Klassifizierung wurden die Sequenzen verschiedener Transkriptionsfaktoren mittels retroviraler Vektoren in embryonale Fibroblasten von Mäusen implantiert. Dabei zeigten sich insbesondere die Faktoren Oct3/4[294], Sox2 [295] und Klf4 als essenziell und nicht ersetzbar zur Induktion der Pluripotenz. Klf4 steigert die Pluripotenz und Karzinogenese durch direkte Hemmung p53-abhängiger Kontroll- und Regulationsmechanismen [296], sowie

c-Myc-induzierter Apoptose [158]. In verschiedenen Zelllinien konnte nachgewiesen werden, dass KLF4 einen direkten Einfluss auf die Proliferation und Differenzierung der Zellen besitzt, wobei gerade KLF4 mit der Invasivität und Metastasierung verschiedener Tumoren assoziiert wird [297]. KLF4 steht in engster Verbindung zu OCT4 und SOX2 und besitzt in dieser Kombination größte Bedeutung für die Umprogrammierung und Induktion nativer Zellen zu Tumorzellen [298]. SOX2 wird insbesondere im onkologischen Kontext mit Zellmigration und Pluripotenz assoziiert. Ein Zusammenhang zwischen der Wirkung von SOX2 über den Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweg wird diskutiert [299]. Nanog trägt in seiner dimeren Form zur Aufrechterhaltung der zellulären Selbsterneuerung und Pluripotenz embryonaler wie adulter Stammzellen bei. [300, 301]. Der Knockout des Faktors in Stammzellen des Fettgewebes führte zur Arretierung des Zellzyklus am G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> Übergang und damit einhergehend zur verminderten Proliferation [302]. NANOG fördert weiter die Hemmung differenzierungsspezifischer Gene durch Reduktion oxidativen Stresses zur Homöostase [300]. Die Regulation erfolgt hauptsächlich an seiner proximalen Promotorregion und ist über seinen Oct-Sox-Verstärker an die Aktivität anderer Transkriptionsfaktoren geknüpft [303]. Von Nanog existieren zwei Transkripte (NANOG1/NANOG2); da diese jedoch in der Funktion identisch sind, wurde diese Ungenauigkeit vernachlässigt [220].

Die genauen Prozesse im Rahmen der posttranslationalen Modifikation und der damit einhergehenden Steuerung sind bislang noch ungeklärt, jedoch fällt dabei auf, dass die Expression je nach Kulturbedingungen und Medium variieren kann [304]. Die Oct4 Expression ist stark vergesellschaftet mit der von REX-1. Dabei führen sowohl ein Anstieg, als auch ein Abfall der Oct4 Aktivität zur Reduktion von REX-1, welches die ektodermale und mesodermale Differenzierung embryonaler Stammzellen triggert. Weiter konnte die Expression beider Faktoren mit dem Differenzierungspotential humaner MSC assoziiert werden [305]. Das Homeobox Protein MSX-1 nimmt eine zentrale Rolle in der Entwicklung des Zahnkeimes (im Knospenstadium) ein. Dabei zeigten Versuche an Knock-out-Mäusen eine Korrelation der MSX-1 Expression mit der Wnt/ $\beta$ -Catenin abhängigen BMP2, BMP4 und LEF1 induzierten Differenzierung von Odontoblasten. Dabei wurde die Differenzierung bei hoher Expression gehemmt und bei geringer Expression gefördert [306]. Auf Grund der differenzierten Einflüsse singulärer und kombinierter Transkriptionsfaktoren war die vorgenommene multifaktorielle Betrachtung des Genexpressionsprofils unbedingt erforderlich.

#### 4.1.7. In vitro Differenzierung

Im Vergleich der Eigenschaften von mesenchymalen Stammzellen [201] zu Fibroblasten fallen viele Ähnlichkeiten im Verhalten (Koloniebildung) auf. Im Phänotyp sind beide Populationen schwer zu unterscheiden [307]. Elementares Element zur Unterscheidung der verschiedenen Zellentitäten sind die Differenzierungslinien. Fibroblasten weisen begrenzte Potenz zu Differenzierung auf, so können Gewebefibroblasten im Rahmen inflammatorischer Prozesse zur myogenen Differenzierung und Bildung glatter Muskulatur stimuliert werden (Myofibroblasten) [308]. Mesenchymale Stammzellen weisen hingegen echte Multipotenz auf, die durch Erprobung der osteogenen, adipogenen und chondrogenen Differenzierungslinien untersucht wurde [174].

Eine osteogene Differenzierung wird durch Zugabe von Dexamethason,  $\beta$ -Glycerophosphat und Ascorbinsäure induziert [309]. Dabei bewirkt Dexamethason eine Aktivierung des osteogenen RUNX2 Gens und Ascorbinsäure die Produktion von Kollagen Typ I.  $\beta$ -Glycerophosphat dient als Phosphatlieferant zur Mineralisation der knöchernen Matrix [310], welche nach dreiwöchiger Stimulation mit *Alizarin Rot* gefärbt werden kann [311].

Das Medium zur adipogenen Differenzierung enthält Dexamethason, Insulin, 1-Methyl-3-Isobutylxantin und Indomethacin. Dexamethason und Indomethacin bewirken die Aktivierung von PPAR $\gamma$ , dem Hauptregulator der Adipogenese [312, 313]. 1-Methyl-3-Isobutylxantin bewirkt über die Aktivierung der Proteinkinase A explizit die Differenzierung zu braunem Fettgewebe [314]. Insulin ist das bislang einzige bekannte Hormon, welches einen differenzierenden und proliferativen Einfluss zur Differenzierung von Adipozyten im Sinne einer anabolen Reaktion unter Bildung von Lipidtröpfchen nach Nahrungsaufnahme besitzt [315]. Nach einer Stimulationszeit von 4 Wochen können die Lipidtröpfchen mit Ölrot gefärbt werden [316].

##### 4.1.7.1. Färbung und Quantifizierung

Untersucht wurden die osteogene und adipogene Differenzierungslinien mittels Absorptionsmessung. Das Verfahren hat den Nachteil, dass es durch das notwendige Lösen des Farbstoffes destruktiv für das Präparat ist. Als Alternative wird derzeit die *automated digital image quantification* (DOI) diskutiert [317]. Das Verfahren hat gegenüber der



etablierten Methodik einige Vorteile, da es non-destruktiv funktioniert. Allerdings funktioniert die DOI über die Auszählung einzelner Pixel des jeweiligen zweidimensionalen Bildes. Insbesondere die osteogene Differenzierungslinie ist stark dreidimensional angelegt. Vor allem der am Rand der Schale entstehende Knochenring würde so durch Vernachlässigung der Dreidimensionalität verfälscht [318].

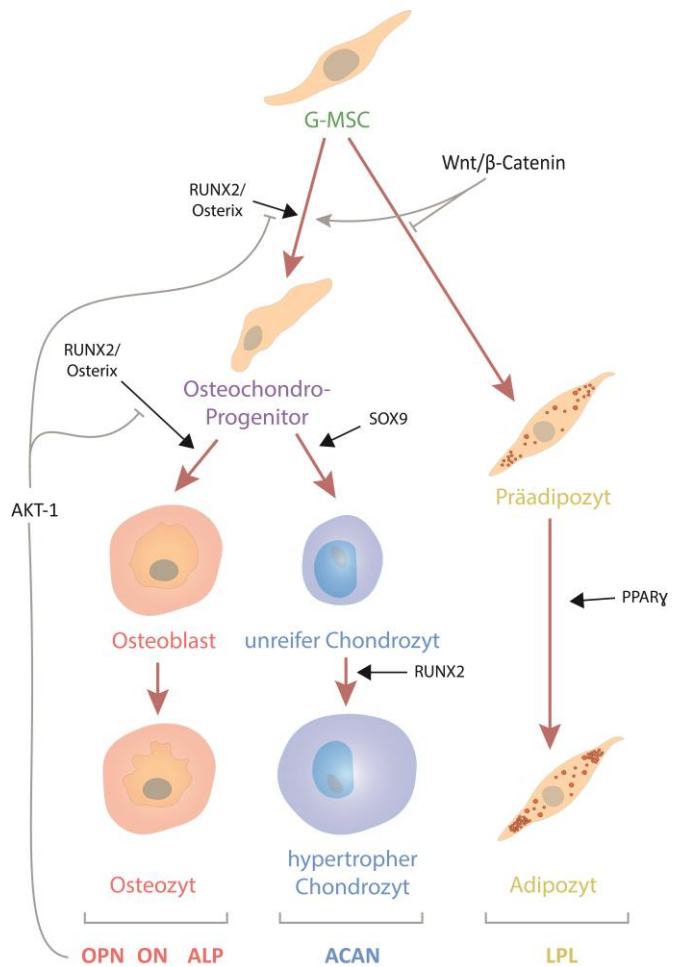
Die Lösung des Alzianblau Farbstoffes nach chondrogener Differenzierung ist zwar durch hochkonzentrierte salpetrige Säure möglich, dies resultiert allerdings auch in einer Destruktion des delokalisierten Elektronensystems unter Verlust der färbenden Eigenschaften [319], sodass das zuvor beschriebene Verfahren hier nicht zur Anwendung kommen konnte.

Auf Grund dieser Eigenschaften und Kultivierungsbedingungen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmalig eine dreidimensionale quantitative Analyse der Alzianblau und Kernechtrot gefärbten Mikromassen durchgeführt. Nach Kompensation aufnahmebedingter Unregelmäßigkeiten, welche eine homogene Analyse der Präparate verhindert hätten, wurden die farbstoffassoziierten Farbspektren unter Verwendung der Software ImageJ mittels geometrischer Verdünnungsreihen der Färbebäder definiert. Die dabei ermittelten Werte wurden streng anhand der entsprechenden Positiv- bzw. Negativkontrolle kalibriert. Da es zu dem hier angewandten Verfahren in der Literatur keine direkte Referenz gibt, wurde das Verfahren unter der Annahme einer positiven und einer negativen Differenzierung nach Stimulation mit chondrogenem Differenzierungsmedium und Kontrollmedium an n=5 G-MSK mit signifikantem Ergebnis verifiziert und damit für die weitere Analyse freigegeben.

#### **4.1.7.2. Genexpression**

Neben den Färbungen wurden im Weiteren auch differenzierungs-spezifische Transkripte quantifiziert. Nach osteogener Differenzierung wurden die Faktoren ALP (*Alkalische Phosphatase*), RUNX2 (*Runt-related transcription factor 2*), ON (*Osteonektin*) und OPN (*Osteopontin*) untersucht, nach adipogener Stimulation LPL (*Lipoproteinlipase*) und PPAR $\gamma$  (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma*), sowie ACAN (*Aggrecan*) nach chondrogener Differenzierung.

Osteozyten und Chondrozyten besitzen einen gemeinsamen Vorläufer: Zunächst differenzieren die MSCs zu einer Osteochondro-Progenitorzelle, welche erst im zweiten Schritt in osteogener bzw. chondrogener Richtung differenziert [320]. Alle Differenzierungswege stehen in engster Verbindung zu extrinsischen Stimuli. Die osteogene Differenzierung wird maßgeblich durch die RUNX2/Osterix abhängige Transkription differenzierungsspezifischer DNA Sequenzen induziert [321]. Dabei üben insbesondere der Wnt-/ $\beta$ -Catenin Signalweg, sowie die BMP (*bone morphogenic protein*) Stimulation einen positiven Effekt auf die Transkription aus. Im Verlauf der



**Abbildung 49 Transkriptome der multilinearen Differenzierung**  
 Von links nach rechts: Osteogene Differenzierung (rot), chondrogene Differenzierung (blau) und adipogene Differenzierung (gelb).

Transkription und Translation werden knochenspezifische und matrixbildende Bestandteile wie das Glycoprotein Osteopontin, Osteonektin und die Alkalische Phosphatase gebildet [322]. Die Funktion von ALP ist noch nicht abschließend geklärt; die vermehrte Expression von ALP ist allerdings verbunden mit einer erhöhten Osteoblastenaktivität [321]. Osteonektin ist zentraler Bestandteil der Kalzifizierung und wird unterstützt vom matrixstabilisierenden Osteopontin, welches an Integrine vernetzt, allerdings auch einen AKT-1 abhängigen Signalweg aktiviert, der die RUNX2/Osterix abhängige Transkription im Sinne einer negativen Rückkopplung rekurrent hemmt [323].

Im Kontrast zur osteogenen Differenzierung wirkt die Aktivierung des Wnt-/ $\beta$ -Catenin Signalwegs hemmend auf die PPAR $\gamma$  abhängige Transkription adipogener Gensequenzen [323-326]. Das im Folgenden vermehrt gebildete Enzym Lipoproteinlipase stellt einen Marker

adipogenen Gewebes dar und erfüllt essenzielle Funktionen in der Spaltung der Esterbindungen aufgenommener Triacylglyceride zur Gewinnung von Fettsäuren [327].

Neben der osteogenen Differenzierung kann die Osteochondro-Progenitorzelle SOX9 vermittelt zu einem frühen Chondrozyt reifen, welcher durch RUNX2 Aktivierung zu einem Matrix-sezernierenden Chondroblasten reift [328]. Einer der sezernierten Stoffe ist Aggrecan, ein Proteoglycan, das mit Hyaluronsäure über ein *link*-Protein verbunden wird und prominenter Strukturgeber der extrazellulären Matrix innerhalb der Knorpelarchitektur ist [329].

#### **4.1.8. Stimulation von TLR3**

TLR3 ist ein Mustererkennungsrezeptor, welcher seine Signaltransduktion durch Bindung von viraler dsRNA aktiviert [96]. Zur Stimulation dieses Effektes wurden die MACS<sup>+</sup> Zellen mittels *Polyinosinedeoxycytidylsäure* [Poly(I:C)] stimuliert [97, 186, 231, 330]. Poly(I:C) ist als synthetische dsRNA ein künstliches Substrat des TLR3 Rezeptors und ist in seiner Wirkung der natürlichen dsRNA gleich. Da die Rezeptoraffinität mit der Molekülmasse zunimmt, wurde ein Substrat mit hoher molekularer Masse [Poly(I:C) HMW] ausgewählt [187].

#### **4.1.9. Statistische Auswertung**

In der statistischen Auswertung der erhobenen Messwerte wurde zunächst die Normalverteilung der Ergebnisse getestet. Der hierzu herangezogene *Shapiro-Wilk-Tests* gab an, dass die Werte nicht normalverteilt sind. Daraus und aus der geringen Fallzahl (n=5) ergab sich die Konsequenz einer nicht-parametrischen Testung gepaarter (verbundener) Stichproben. Die nichtparametrische Testung hat gegenüber der parametrischen Testung den Vorteil einer gesteigerten Validität durch Vermeidung inkorrektter Schlüsse und Annahmen, diese wird jedoch zum Preis einer geringeren Auswahl an Testverfahren und verminderter Interpretationsmöglichkeiten der vorhandenen Ergebnisse erkaufte [331]. Der wesentliche Unterschied in der Durchführung parametrischer und nicht parametrischer Tests ist, dass erstere direkte Analysen der erhobenen Werte darstellen, nichtparametrische Tests hingegen über ihre Werte korrespondierende Parameter definieren (z.B. Ränge), die dann weiter

interpretiert werden. Die Voraussetzungen zur Durchführung eines t-Tests waren durch das Fehlen einer Normalverteilung nicht gegeben, sodass auf den Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test ausgewichen wurde [332, 333]. Beim Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test werden die Differenzen der gepaarten Messwerte gebildet ( $R_i = X_1 - X_2$ ) und nach ihrem Betrag  $|R_i|$  und Vorzeichen aufsteigend in Rängen sortiert. Nun werden die Ränge mit ihrem Vorzeichen multipliziert und die Absolutwerte der positiven und negativen Ränge summiert, sodass die Prüfgrößen  $W^+$  und  $W^-$  resultieren. Aus den genauen Prüfwerten kann unter Berücksichtigung der Stichprobengröße ( $n$ ) der exakte p-Wert berechnet werden. Die Nullhypothese trifft zu, wenn die Summe der negativen absoluten Rangwerte gleich der Summe der positiven absoluten Rangwerte ist. Der  $\alpha$ -Fehler wurde für die vorliegende Untersuchung als  $\alpha = 0,05$  festgelegt [334], welches einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% entspricht. Im Falle von  $p < \alpha$  wird die Nullhypothese ( $H_0$ ) verworfen und die Alternativhypothese ( $H_1$ ) wird angenommen [331]. Die zentrale Tendenz der Gruppen (Median) wurde zur Bestimmung der Effektrichtungen herangezogen [333]. Zur Erleichterung der Berechnungen wurde die Software „SPSS“ zur Hilfe genommen.

## 4.2. Diskussion der Ergebnisse

### 4.2.1. Charakterisierung der MACS<sup>+</sup> Zellen

MACS<sup>+</sup> sortierte Zellen erschienen lichtmikroskopisch charakteristisch fibroblastenähnlich und hafteten 24h nach Transfer an den PMMA Oberflächen der Zellkulturflaschen. Unter standardisierten Bedingungen wiesen alle Proben rasche Proliferation und scharf abgegrenzte Koloniebildung nach 12 Tagen auf.

Phänotypisch exprimierten die Zellen geringe Mengen von CD14 und CD34 bei gleichzeitig hoher Expression von CD73, CD90 und CD105. CD45 wurde schwach exprimiert. Die CD45 Expression ist stark und sehr sensibel mit dem Alter der Stammzellen assoziiert [268]. Es ist anzunehmen, dass durch die große Zellmenge zur Durchführung aller Versuche ein geringer Alterungsvorgang vonstattengegangen sein könnte. Sato et al. publizierten weiter die Entkopplung von Stemness und CD45 unter Nachweis von CD45<sup>+</sup> Zelltypen mit pluripotenten Eigenschaften im peripheren Blut [335]. Die genauen Auswirkungen einer isolierten Erhöhung von CD45 an MSCs sind bislang noch nicht abschließend geklärt. Weitere Untersuchungen des Faktors in dieser Arbeit sollen nur der Vollständigkeit halber geschehen, die Interpretation der Veränderung von CD45 muss jedoch unbedingt zurückhaltend ausfallen. Verstärkt wird diese Annahme durch die positive Expression der leitenden pluripotenzassoziierten Transkriptome NANOG, SOX2 und OCT4A [336]. Die Untersuchung der multilinearen Differenzierung zeigte deutliche Veränderungen in zytologischer/histologischer Darstellung und Genexpression. Alle Proben wiesen bemerkenswertes multilineares Differenzierungspotential sowie signifikante Verstärkung der Transkription von ALP, RUNX, LPL und PPAR $\gamma$  auf. Zusammenfassend wich CD45 zwar leicht von der Norm ab, dennoch bestätigten alle weiteren Untersuchungen die hohe Qualität aller Zelllinien, sodass die untersuchten MACS<sup>+</sup> Zellen in Einklang mit den Kriterien der *International Society for Cellular Therapy* im Folgenden als G-MSCs bezeichnet werden [171].

### 4.2.2. Nachweis der Expression von TLR3

Die Expression von TLR3 wurde als Grundlage der Stimulation mittels Durchflusszytometrie und RT-qPCR nachgewiesen und liegt höher als die zuvor von El-Sayed et al. publizierten Ergebnisse [76]. Die kultivierten G-MSCs sind somit zur Stimulation mittels Poly(I:C) geeignet.

### 4.2.3. TLR3 vermittelte Pluripotenz gingivaler Stammzellen

Toll-like Rezeptoren wurden bereits durch viele Autoren als potente Akteure inflammatorischer Erkrankungen wie der virusinduzierten Encephalitis [337] und kardiovaskulärer Erkrankungen [338], aber auch parodontaler Leiden [339] identifiziert. Dabei korreliert die zelluläre TLR Expression mit der altersbedingt steigenden Inzidenz parodontaler Destruktion [340]. Allgemein werden TLR3 klinisch positive Effekte auf regenerative Prozesse zugeschrieben; so konnte durch TLR3 Aktivierung die Rekonvaleszenz spinal traumatisch geschädigter Patienten verbessert werden [341]. TLR3 wird eine wichtige Rolle in der Beeinflussung der immunomodulatorischen Einflüsse und Pluripotenz verschiedener MSCs zugeschrieben. Besonders auffällig ist die NFκB vermittelte Regulation der Zytokin Sekretion [342]. Aktuelle Studien an Zellen des parodontalen Ligaments zeigen einen anti-inflammatorischen Einfluss von Poly(I:C) auf Zellen des parodontalen Ligaments und dies wird als Möglichkeit der Einschränkung entzündlich bedingter parodontaler Destruktion diskutiert [343]. Dabei konnte TLR3 als Schlüsselfaktor der CPP-induzierten Umprogrammierung von Fibroblasten identifiziert werden. Diese Fähigkeit wurde durch die Hemmung des Rezeptors reduziert, durch die Poly(I:C) induzierte Aktivierung hingegen gesteigert [228]. Verschiedene Autoren postulierten eine Beeinflussung der pluripotenten Eigenschaften in MSCs [344], Keratinozyten [345] und Fibroblasten [346]. Der Erforschung der Einflüsse von TLR3 auf die Eigenschaften von G-MSCs kommt somit eine Schlüsselrolle im Verständnis der destruktiv/regenerativen Balance Parodontitis-supprimierten Gewebes zu.

TLR3 aktivierte Zellen zeigten signifikant verminderte Proliferation und geringere Koloniebildungen über einen Zeitraum von 12 Tagen. Ursache dieser Entwicklung können zwei Faktoren sein: Einerseits kann die Neubildung von Zellen durch TLR3 reduziert sein, zum anderen wäre es möglich, dass TLR3 eine pro-apoptotische Wirkung auf die Zellen entfaltet. Poly(I:C) wird bereits unter dem Handelsnamen Ampligen™ in klinischen Studien zu Brustkrebs [347] und unter dem Namen Rintatolimod™ in einer doppel-verblindeten, Placebo-kontrollierten Studie gegen chronische Fettsucht [348] angewandt. In beiden Fällen bewirkte der Wirkstoff signifikante Veränderungen der pathogenen Zellmasse, welche sich durch die autologe Zerstörung der Tumorzellen und eine verminderte Gesamtkörpermasse auswies. Die von den Autoren beschriebenen Einflüsse auf das Immunsystem gehen sogar noch weiter, sodass eine Langzeitwirkung über die Impfung der Patienten mit dem Wirkstoff

diskutiert wird. Verantwortlich für die anti-proliferative Wirkung könnte die TLR3 induzierte Aktivierung des IRF3 Signalwegs sein (siehe unten), welcher bereits in Studien mit dem Analogon Bufalin<sup>TM</sup> an Zellen des hepatozellulären Karzinoms nachgewiesen werden konnte [349]. Die hier explizit erwähnte Chemotaxis wird durch die signifikant verminderte Aktivität nach 6 und 12 Tagen im MTT Assay unterstrichen. Neben der Aktivierung von IRF3 beschrieben Yoneda et al. (2008) einen weiteren Signalweg. Sie fanden heraus, dass die Poly(I:C) induzierte Aktivierung von TLR3 über den NFκB Signalweg in denselben Zellen einen differenzierenden Stimulus erzeugte [350]. Auch die in dieser Studie differenzierten G-MSCs zeigten eine Steigerung der Potenz zur multilinearen Differenzierung, allerdings nur in osteogener und chondrogener Linie. Bei genauerer Vergrößerung der Differenzierung von MSCs zu Osteozyten, Adipozyten und Chondrozyten (s.o.) fällt auf, dass Osteozyten und Chondrozyten initial identisch zu einer gemeinsamen Osteochondro-Progenitorzelle differenzieren [320]. Dieser Schritt wird durch die Transkription differenzierungsspezifischer Gene durch den RUNX2/Osterix Transkriptionsfaktorkomplex vermittelt. Mehrere Autoren haben eine Verbindung zwischen der RUNX2 Aktivität und der Aktivierung des Wnt/β-Catenin Signalwegs mit Steigerung der Osteogenese [351], sowie Dentin [352]- und Zementneubildung [352] beschrieben. Zum Zeitpunkt der Messung war das RUNX2 Level wieder auf einem ähnlichen Niveau wie ohne osteogene Stimulation. Eindeutig mit dieser Beobachtung korrelierend exprimierten die differenzierten Osteozyten verminderte Mengen an OPN und erhöhte Mengen an ON. Da ON ein wichtiger Faktor zu Kalzifizierung der osteogenen Matrix ist [322], kann man es als genetisches Analogon zur calcium-/phosphatselektiven Alizarin Rot-Färbung werten. Die verminderte Expression von OPN zeugt weiterhin von den Nachwirkungen schneller osteogener Formation, stellt es doch sonst AKT-1 vermittelt eine negative Rückkopplung der RUNX2/Osterix Aktivierung dar [323].

RUNX2 als ein Frühmarker der osteogenen Differenzierung ist ein Indikator der aktiven osteogenen Differenzierung [322]. Es ist anzunehmen, dass RUNX2 nach Abschluss mit abnehmendem Stimulus rückläufig ist. Über die Antwort auf die Frage, ob die RUNX2 Expression bei Persistenz differenzierbarer Zellen höher wäre als nach Abschluss, kann diese Studie keine Aussage treffen. Zur vorherigen Argumentation passend, stellte sich auch die chondrogene Differenzierung sowohl in der Alzianblau Quantifizierung, als auch der Expression von ACAN stärker als in der Kontrolle dar. Auch in der Differenzierung ist die zuvor beschriebene Bildung der Osteochondro-Progenitorzelle essentiell und auch in der Reifung

unreifer Chondrozyten zu hypertrophen Chondrozyten besetzt RUNX2 eine Schlüsselfunktion. Im Gegensatz zu den beiden anderen Differenzierungen besitzen Adipozyten und Osteo-/Chondrozyten keinen gemeinsamen Progenitor [353]. Die Differenzierung von G-MSCs zu Präadipozyten wird von dem Transkriptionsfaktor PPAR $\gamma$  vermittelt. Liang et al zeigten bei ihren Untersuchungen zur Rolle des Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalweges eine inhibitorische Funktion hoher  $\beta$ -Catenin Level, welches in einer verminderten Adipogenese mündete [354]. Die Ergebnisse zeigen hingegen trotz ausbleibendem adipogenem Phänotyp (Ölrot Färbung) hohe PPAR $\gamma$  Level bei geringeren LPL Expressionen, verglichen zur Kontrolle. Im Falle der Wnt/ $\beta$ -Catenin abhängigen Hemmung wäre auch die Expression von PPAR $\gamma$  bereits reduziert. Dies weist auf eine Unterbrechung des Signalweges zu einem späteren Zeitpunkt hin. Die genaue immunologische Kaskade stellt eine Besonderheit der G-MSCs dar und muss Ausgangspunkt weiterer Investigationen sein.

Interessanterweise ist der Marker ALP, welcher üblicherweise mit der Aktivität von Osteoblasten assoziiert wird, im Vergleich zur Kontrolle vermindert. Im Parodont liegen sowohl ALP<sup>+</sup>, als auch ALP<sup>-</sup> Stammzellen vor. Im Vergleich der Eigenschaften beider Subpopulationen konnten Yu et al. eine Verminderung pluripotenzassoziierter Merkmale von ALP PDLSCs verzeichnen. Insbesondere ist dies mit der Verminderung der Transkripte für NANOG, OCT4A und SOX2 verbunden [355]. Bei der Quantifizierung pluripotenzassoziierter Transkripte wurde nach TLR3 Aktivierung eine vergleichbare Verminderung der mRNA für NANOG, MSX-1, SOX2, OCT4A und in geringem Maße KLF4 gemessen. Einzig REX-1 war leicht erhöht. In embryonalen Stammzellen wurden schon sehr früh Interaktionen zwischen den Pluripotenzmarkern OCT3/4 und REX-1 festgestellt. Explizit beschrieben Ben-Shushan et al. Verminderung der REX-1 Expression durch Blockade der Promotorregion durch OCT3/4 [356]. Dieser Erklärung folgend, wäre eine reflektorische Erhöhung von REX-1 nach Verminderung der Inhibition durch OCT4A denkbar.

Die TLR3 Aktivierung führte zu einer Veränderung des zuvor beschriebenen Phänotyps. CD34 wurde signifikant vermindert, begleitet durch die Erhöhung von CD73, CD90, CD105 und CD146. Die Veränderungen von CD14 und CD45 waren minimal. Im Rahmen von Versuchen mit HSPC wurde entdeckt, dass CD34<sup>+</sup> auf Zellen über die Bindung von E-/P-Selektinen zu einer Aktivierung des Zellzyklus führen [265]. Diese Erkenntnis deckt sich mit der in unserem Fall verzeichneten Reduktion in Proliferation, Koloniebildung und metabolischen Aktivität. Auf der

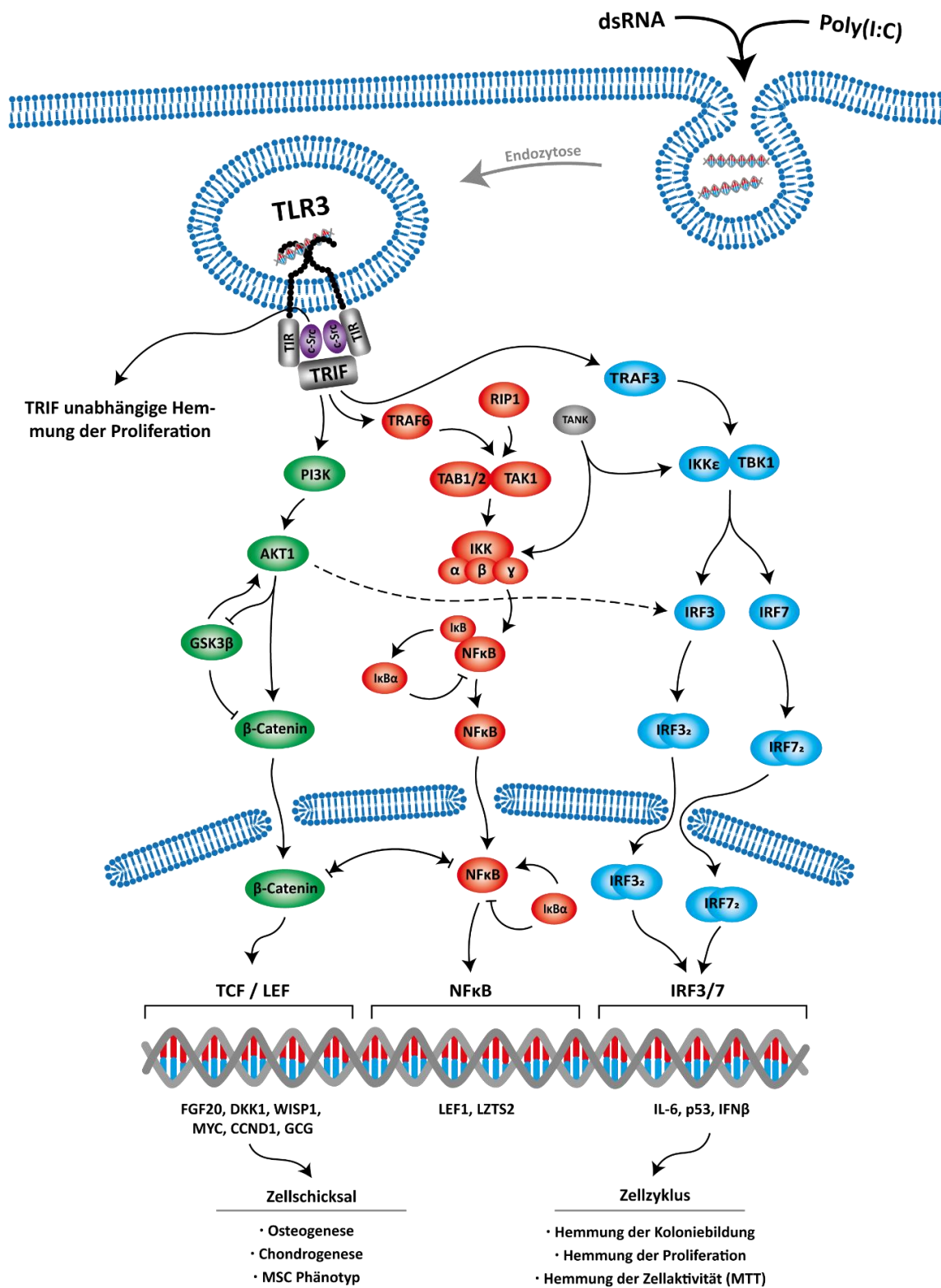


anderen Seite wurden die Marker CD73, CD90, CD105 und CD146 erhöht. Diese Marker sind im Wesentlichen mit einer Steigerung der Pluripotenz assoziiert [273, 276]. Auch wurden bei Kulturen mit hohen Expressionen von CD73, CD105 und CD146 starkes Differenzierungsvermögen und für CD146 im Speziellen mineralisationsfördernde Eigenschaften nachgewiesen [249, 269, 275]. Dennoch stellt die Erhöhung dieser Marker im Vergleich zur verminderten Expression der meisten pluripotenz-assoziierten Transkriptome ein scheinbares Paradoxon dar.

Bei genauerer Betrachtung der TLR3 induzierten Signaltransduktion fällt auf, dass fast alle Kaskaden (Wnt/ $\beta$ -Cateinin, NF $\kappa$ B, IRF3/7) über das Adaptermolekül TRIF vermittelt werden. Diesem entgegen, beschrieben Yamashita et al. einen TRIF unabhängigen, über das Proto-Onko-Protein c-Src („*cellular-sarcoma*“), eine Tyrosinkinase, vermittelten Signalweg. Die beschriebene „biphasische“ Reaktion virusinfizierter Zellen nach Infektion mit dsRNA wäre eine Erklärung der meisten Beobachtungen. Initial beschrieben sie die drastische Erhöhung der Zelladhäsion, metabolischer Aktivität und Proliferation, direkt gefolgt von starker Inhibition. [125]. Auch in dieser Studie konnte eine geringfügig gesteigerte Proliferation nach 24h beobachtet werden, diese Aussage ist unter Betrachtung der Proliferation allein aber kaum haltbar. Ganz anders verhält es sich jedoch, wenn die initial signifikant gesteigerte metabolische Aktivität in die Überlegung mit einbezogen wird.

Die Unterschiede zwischen der Genexpression und der Veränderung des Phänotyps sind durch Beachtung der Latenz zwischen den Ebenen verständlich, dennoch weisen beide Merkmale der Dynamik auf. REX-1 ist auf der mRNA Ebene allein bei Messung weiterhin erhöht, da hier zunächst die Hemmung durch OCT4A verfällt, und phänotypisch weist die Erhöhung von CD34 schon auf die mittelfristig abnehmende Pluripotenz hin. Die Argumentation stützend, zeigt sich auch die Proliferation der Zellen an Tag 1 in der Poly(I:C) stimulierten Gruppe minimal erhöht, obwohl der Vergleich zu diesem frühen Zeitpunkt vorsichtig ausfallen muss. Deutlich aussagekräftiger war der MTT Assay, welcher nach 24h eine signifikante Vergrößerung der Zellaktivität aufzeigte. Waren die Ergebnisse, welche unmittelbar nach Stimulation erhoben wurden, vielfältig interpretierbar, so ließen sich im weiteren Verlauf klare Tendenzen erkennen. Proliferation, Koloniebildung und metabolische Aktivität zeigten sich signifikant vermindert, Differenzierungsmarker in osteo-/chondrogener Differenzierung hingegen

deutlich erhöht. Dies weist auf einen vermehrten Differenzierungsreiz innerhalb der Kulturen mit abnehmender Pluripotenz hin.



**Abbildung 50 TLR3 spezifische Aktivierung rezeptorassoziiierter Gene und Beeinflussung von Phänotyp und Zellzyklus**  
 TLR3 induzierte intrazelluläre Signaltransduktion. Von links nach rechts: PI3K/AKT1 abhängige Aktivierung von β-Catenin (grün), TRAF3 abhängige Induktion der Transkriptionsfaktoren IRF3<sub>2</sub> und IRF7<sub>2</sub> (blau), TRAF6 abhängige Aktivierung von NF-κB (rot). Weiter angedeutet ist eine TRIF unabhängige und c-Src abhängige Kaskade (violett).

## 5. Zusammenfassung

Die *Parodontitis* ist eine lokal entzündliche Erkrankung mit progressivem Verlauf bis hin zum vollständigen Abbau parodontalen Attachments. Mit einer Morbidität von 95% aller bezahnten Menschen stellt die Parodontitis eine der häufigsten Erkrankungen weltweit dar, sodass der Behandlung und Regeneration des verlorenen Knochens größte Bedeutung zukommt [14, 357]. Parodontale Stammzellen sind der Ausgangspunkt der lokalen zellulären Regeneration. Prominente Vertreter dieser Gruppe sind die gingivalen mesenchymalen Stammzellen (G-MSCs), welche eine einfach zugängliche Stammzellreserve im adulten Organismus bilden. Sie bewiesen *in vivo* und *in vitro* bemerkenswerte pluripotente Eigenschaften in Form der Selbsterneuerung und Differenzierbarkeit in multiple Zellentitäten wie Knochen-, Fett- und Knorpelgewebe. Des Weiteren konnten diverse Mustererkennungsrezeptoren in und an den Zellen nachgewiesen werden. Ein prominenter Vertreter dieser Rezeptoren ist Toll-like Rezeptor 3 (TLR3), der intrazellulär/endosomal gelegen durch virale dsRNA aktiviert wird. TLR3 greift über verschiedene Signalwege (Wnt/ $\beta$ -Catenin, NF- $\kappa$ B, IRF3/7) in die Genexpression der Zelle sowie die Expression inflammatorischer Zytokine ein. Ziel dieser Studie war es, den Einfluss der Aktivierung von TLR3 mittels des dsRNA Analogon Poly(I:C) HMW auf die pluripotenten Charakteristika der G-MSCs zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde Mischgewebe aus Gingivaexzisaten (n=5) gesunder Patienten kultiviert und G-MSCs via *immunomagnetischer Säulenseparation* über den Stro-1 Rezeptor isoliert. Nach Charakterisierung gemäß den Richtlinien der *International Society for Cellular Therapy* (ISCT) und Nachweis der Expression von TLR3 wurden die Kulturen mit Poly(I:C) stimuliert und in Genexpression (RT-qPCR), Phänotyp (Durchflusszytometrie), Zellaktivität (MTT), Koloniebildung (CFU), Proliferation und multilinearer Differenzierung verglichen. Die Aktivierung von TLR3 führte nach 24h zu einer vermehrten Expression von CD73, CD90, CD105 und CD146 sowie höherer metabolischer Aktivität und REX-1 Expression. Die Transkripte für NANOG, OCT4A, SOX2, MSX-1 und KLF4 wurden hingegen vermindert und auch CD34 verstärkt exprimiert. CFU und Proliferation waren über 12 Tage vermindert, genau wie die MTT an Tag 6 und 12. Die osteo-/ chondrogenen Differenzierungslinien wurden verstärkt. Wir schließen aus den Erkenntnissen, dass Poly(I:C) initial einen steigernden Einfluss auf die Pluripotenz besitzt, dieser Effekt verschwindet jedoch schnell zugunsten eines starken

Differenzierungsimpulses, der besonders die Differenzierung in osteo-chondraler Richtung fördert.

Die gewonnenen Erkenntnisse bieten uns einen weiterführenden Einblick in die immunomodulatorischen Verknüpfungen gingivaler Stammzellen und die enge Vergesellschaftung des Mikroenvironments mit dem zellulären regenerativen Potential lokaler Stammzellpopulationen. Langfristig könnte es möglich sein, diese Erkenntnisse zu nutzen, um die parodontale Regeneration durch exogene oder endogene Stimuli zu verstärken und den Gewebeumsatz zugunsten der Regeneration präventiv zu erhöhen.

## 6. Literatur

### Artikel aus Zeitschriften

1. Ramirez, K., et al. (2013): Dentogingival complex: dimension based on biotypes. *P R Health Sci J*, 32(4): 182-186
2. Moutsopoulos, N.M. and J.E. Konkel (2018): Tissue-Specific Immunity at the Oral Mucosal Barrier. *Trends Immunol*, 39(4): 276-287
3. Fawzy El-Sayed, K.M. and C.E. Dorfer (2016): Gingival Mesenchymal Stem/Progenitor Cells: A Unique Tissue Engineering Gem. *Stem Cells Int*, 2016: ID 7154327
4. Cho, M.I. and P.R. Garant (2000): Development and general structure of the periodontium. *Periodontol 2000*, 24: 9-27
5. Hirashima, S., et al. (2016): Three-dimensional ultrastructural analysis of cells in the periodontal ligament using focused ion beam/scanning electron microscope tomography. *Sci Rep*, 6: 39435
6. Lekic, P. and C.A. McCulloch (1996): Periodontal ligament cell population: the central role of fibroblasts in creating a unique tissue. *Anat Rec*, 245(2): 327-341
7. de Jong, T., et al. (2017): The intricate anatomy of the periodontal ligament and its development: Lessons for periodontal regeneration. *J Periodontal Res*, 52(6): 965-974
8. Ho, S.P., et al. (2007): The tooth attachment mechanism defined by structure, chemical composition and mechanical properties of collagen fibers in the periodontium. *Biomaterials*, 28(35): 5238-5245
9. Sugaya, T., et al. (2016): Influence of enamel matrix derivative on healing of root surfaces after bonding treatment and intentional replantation of vertically fractured roots. *Dent Traumatol*, 32(5): 397-401
10. Jiang, Q., et al. (2014): Morphological and functional characteristics of human gingival junctional epithelium. *BMC Oral Health*, 14: 14-30
11. Hassell, T.M. (1993): Tissues and cells of the periodontium. *Periodontol 2000*, 3: 9-38
13. J, G.C., et al. (2018): A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Clin Periodontol*, 45 Suppl 20: 1-8
14. Holtfreter, B., et al. (2010): Prevalence of periodontal disease and treatment demands based on a German dental survey (DMS IV). *J Clin Periodontol*, 37(3): 211-219
15. Tran, D.T., et al. (2014): Assessment of partial-mouth periodontal examination protocols for periodontitis surveillance. *J Clin Periodontol*, 41(9): 846-852
16. Diaz, P.I., A. Hoare, and B.Y. Hong (2016): Subgingival Microbiome Shifts and Community Dynamics in Periodontal Diseases. *J Calif Dent Assoc*, 44(7): 421-435

17. Abusleme, L., et al. (2013): The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *ISME J*, 7(5): 1016-1025
18. Dorfer, C., et al. (2017): The relationship of oral health with general health and NCDs: a brief review. *Int Dent J*, 67 Suppl 2: 14-18
19. Bawaskar, H.S. and P.H. Bawaskar (2020): Oral diseases: a global public health challenge. *Lancet*, 395(10219): 185-186
20. Groeger, S.E. and J. Meyle (2015): Epithelial barrier and oral bacterial infection. *Periodontol 2000*, 69(1): 46-67
21. Fine, D.H., et al. (2013): A consortium of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Streptococcus parasanguinis*, and *Filifactor alocis* is present in sites prior to bone loss in a longitudinal study of localized aggressive periodontitis. *J Clin Microbiol*, 51(9): 2850-61
22. Hoare, A., et al. (2019): Chronic Inflammation as a Link between Periodontitis and Carcinogenesis. *Mediators Inflamm*, 2019: ID 1029857
23. Groeger, S. and J. Meyle (2019): Oral Mucosal Epithelial Cells. *Front Immunol*, 10: 208
24. Acquier, A.B., et al. (2017): Parameters of oxidative stress in saliva from patients with aggressive and chronic periodontitis. *Redox Rep*, 22(3): 119-126
25. Franco, C., et al. (2017): Matrix Metalloproteinases as Regulators of Periodontal Inflammation. *Int J Mol Sci*, 18(2): 1-12
26. Yin, W.T., Y.P. Pan, and L. Lin (2016): Association between IL-1alpha rs17561 and IL-1beta rs1143634 polymorphisms and periodontitis: a meta-analysis. *Genet Mol Res*, 15(1): 1-8
27. Kinane, D.F., P.G. Stathopoulou, and P.N. Papapanou (2017): Periodontal diseases. *Nat Rev Dis Primers*, 3: 17038
28. Graziani, F., et al. (2017): Nonsurgical and surgical treatment of periodontitis: how many options for one disease? *Periodontol 2000*, 75(1): 152-188
29. Aljateeli, M., et al. (2014): Surgical periodontal therapy with and without initial scaling and root planing in the management of chronic periodontitis: a randomized clinical trial. *J Clin Periodontol*, 41(7): 693-700
30. Bosshardt, D.D. (2018): The periodontal pocket: pathogenesis, histopathology and consequences. *Periodontol 2000*, 76(1): 43-50
31. Frandsen, E.V., et al. (1994): Effect of local metronidazole application on periodontal healing following guided tissue regeneration. Microbiological findings. *J Periodontol*, 65(10): 921-8
32. Sheikh, Z., et al. (2017): Natural graft tissues and synthetic biomaterials for periodontal and alveolar bone reconstructive applications: a review. *Biomater Res*, 21: 9
33. Wyganowska-Swiatkowska, M., et al. (2017): Effects of enamel matrix proteins on adherence, proliferation and migration of epithelial cells: A real-time in vitro study. *Exp Ther Med*, 13(1): 160-168
34. Kimura, Y., et al. (2014): Recruitment of bone marrow-derived cells to periodontal tissue defects. *Front Cell Dev Biol*, 2: 19

35. Yamaguchi, H., et al. (2017): Ultrasound microbubble-mediated transfection of NF-kappaB decoy oligodeoxynucleotide into gingival tissues inhibits periodontitis in rats in vivo. *PLoS One*, 12(11): e0186264
36. Fawzy El-Sayed, K.M., et al. (2019): The periodontal stem/progenitor cell inflammatory-regenerative cross talk: A new perspective. *J Periodontal Res*, 54(2): 81-94
37. Wu, D., et al. (2018): Prediction of loss to follow-up in long-term supportive periodontal therapy in patients with chronic periodontitis. *PLoS One*, 13(2): e0192221
38. Kakudate, N., et al. (2010): Association between self-efficacy and loss to follow-up in long-term periodontal treatment. *J Clin Periodontol*, 37(3): 276-82
39. Riera Romo, M., D. Perez-Martinez, and C. Castillo Ferrer (2016): Innate immunity in vertebrates: an overview. *Immunology*, 148(2): 125-39
41. Sonnenberg, G.F. and M.R. Hepworth (2019): Functional interactions between innate lymphoid cells and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*:
42. Brubaker, S.W., et al. (2015): Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective. *Annu Rev Immunol*, 33: 257-90
43. Eisen, H.N. (2014): Affinity enhancement of antibodies: how low-affinity antibodies produced early in immune responses are followed by high-affinity antibodies later and in memory B-cell responses. *Cancer Immunol Res*, 2(5): 381-92
44. Hoffmann, J. and S. Akira (2013): Innate immunity. *Curr Opin Immunol*, 25(1): 1-3
45. Ternullo, S., et al. (2017): Going skin deep: A direct comparison of penetration potential of lipid-based nanovesicles on the isolated perfused human skin flap model. *Eur J Pharm Biopharm*, 121: 14-23
46. Shimazaki, Y. and A. Takahashi (2018): Antibacterial activity of lysozyme-binding proteins from chicken egg white. *J Microbiol Methods*, 154: 19-24
47. Schoch, J.J., et al. (2019): The infantile cutaneous microbiome: A review. *Pediatr Dermatol*:
48. Morris, C.F. (2019): The antimicrobial properties of the puroindolines, a review. *World J Microbiol Biotechnol*, 35(6): 86
49. Dinarello, C.A. (2018): Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol Rev*, 281(1): 8-27
50. Brodzikowska, A., R. Gorska, and J. Kowalski (2019): Interleukin-1 Genotype in Periodontitis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*:
51. Jakubzick, C.V., G.J. Randolph, and P.M. Henson (2017): Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. *Nat Rev Immunol*, 17(6): 349-362
52. Kumar, S., et al. (2019): Dendritic Cell-Mediated Th2 Immunity and Immune Disorders. *Int J Mol Sci*, 20(9):
53. Constantino, J., et al. (2017): Dendritic cell-based immunotherapy: a basic review and recent advances. *Immunol Res*, 65(4): 798-810

54. Ozinsky, A., et al. (2000): The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(25): 13766-71
55. Janeway, C.A., Jr. and R. Medzhitov (2002): Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*, 20: 197-216
56. Gong, M., et al. (2019): Pattern recognition receptor-mediated innate immune responses in seminal vesicle epithelial cell and their impacts on cellular function. *Biol Reprod*:
57. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi (2006): Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124(4): 783-801
58. Joffre, O., et al. (2009): Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity. *Immunol Rev*, 227(1): 234-47
59. Osawa, M., et al. (1996): Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science*, 273(5272): 242-5
60. Shuai, Z., et al. (2016): Adaptive immunity in the liver. *Cell Mol Immunol*, 13(3): 354-68
61. Cerny, J. and I. Striz (2019): Adaptive innate immunity or innate adaptive immunity? *Clin Sci (Lond)*, 133(14): 1549-1565
62. Ralph, D.K. and F.A.t. Matsen (2019): Per-sample immunoglobulin germline inference from B cell receptor deep sequencing data. *PLoS Comput Biol*, 15(7): e1007133
63. Wilson, I.A. and K.C. Garcia (1997): T-cell receptor structure and TCR complexes. *Curr Opin Struct Biol*, 7(6): 839-48
64. Kerstein, A., et al. (2018): Circulating CD4+CD8+ double-positive T-cells display features of innate and adaptive immune function in granulomatosis with polyangiitis. *Clin Exp Rheumatol*, 36 Suppl 111(2): 93-98
65. Hall, B.M. (2015): T Cells: Soldiers and Spies--The Surveillance and Control of Effector T Cells by Regulatory T Cells. *Clin J Am Soc Nephrol*, 10(11): 2050-64
66. Chan, O.T. and M.J. Shlomchik (2000): Cutting edge: B cells promote CD8+ T cell activation in MRL-Fas(lpr) mice independently of MHC class I antigen presentation. *J Immunol*, 164(4): 1658-62
67. Cooper, L., et al. (2018): Assessing the role of the T-box transcription factor Eomes in B cell differentiation during either Th1 or Th2 cell-biased responses. *PLoS One*, 13(12): e0208343
68. Poland, G.A., I.G. Ovsyannikova, and R.B. Kennedy (2018): Personalized vaccinology: A review. *Vaccine*, 36(36): 5350-5357
69. Toskala, E. (2014): Immunology. *Int Forum Allergy Rhinol*, 4 Suppl 2: S21-7
70. Owens, D.E., 3rd and N.A. Peppas (2006): Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int J Pharm*, 307(1): 93-102
71. Mamidi, S., S. Hone, and M. Kirschfink (2017): The complement system in cancer: Ambivalence between tumour destruction and promotion. *Immunobiology*, 222(1): 45-54



72. Stein, D., et al. (1991): The polarity of the dorsoventral axis in the *Drosophila* embryo is defined by an extracellular signal. *Cell*, 65(5): 725-35
73. Anderson, K.V., L. Bokla, and C. Nusslein-Volhard (1985): Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: the induction of polarity by the Toll gene product. *Cell*, 42(3): 791-8
74. Lemaitre, B., et al. (1996): The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, 86(6): 973-83
75. Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, and C.A. Janeway, Jr. (1997): A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 388(6640): 394-7
76. Fawzy-El-Sayed, K., et al. (2016): TLR expression profile of human gingival margin-derived stem progenitor cells. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 21(1): e30-8
77. Leifer, C.A. and A.E. Medvedev (2016): Molecular mechanisms of regulation of Toll-like receptor signaling. *J Leukoc Biol*, 100(5): 927-941
78. Ippagunta, S.K., et al. (2018): Identification of Toll-like receptor signaling inhibitors based on selective activation of hierarchically acting signaling proteins. *Sci Signal*, 11(543):
79. Guo, S., et al. (2015): Lipopolysaccharide Regulation of Intestinal Tight Junction Permeability Is Mediated by TLR4 Signal Transduction Pathway Activation of FAK and MyD88. *J Immunol*, 195(10): 4999-5010
80. Volpi, C., et al. (2013): High doses of CpG oligodeoxynucleotides stimulate a tolerogenic TLR9-TRIF pathway. *Nat Commun*, 4: 1852
81. Zambirinis, C.P., et al. (2015): TLR9 ligation in pancreatic stellate cells promotes tumorigenesis. *J Exp Med*, 212(12): 2077-94
82. Kawasaki, T., T. Kawai, and S. Akira (2011): Recognition of nucleic acids by pattern-recognition receptors and its relevance in autoimmunity. *Immunol Rev*, 243(1): 61-73
83. Robinet, M., et al. (2017): Review on Toll-Like Receptor Activation in Myasthenia Gravis: Application to the Development of New Experimental Models. *Clin Rev Allergy Immunol*, 52(1): 133-147
84. Green, N.M., et al. (2012): Activation of autoreactive B cells by endogenous TLR7 and TLR3 RNA ligands. *J Biol Chem*, 287(47): 39789-99
85. Park, B.S., et al. (2009): The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature*, 458(7242): 1191-5
86. Yang, J., et al. (2016): Cellular uptake of exogenous calcineurin B is dependent on TLR4/MD2/CD14 complexes, and CnB is an endogenous ligand of TLR4. *Sci Rep*, 6: 24346
87. Raieli, S., et al. (2019): TLR1/2 orchestrate human plasmacytoid dendritic cell response to gram+ bacteria. *PLoS Biol*, 17(4): e3000209
88. Brencicova, E. and S.S. Diebold (2013): Nucleic acids and endosomal pattern recognition: how to tell friend from foe? *Front Cell Infect Microbiol*, 3: 37

89. Theofilopoulos, A.N., D.H. Kono, and R. Baccala (2017): The multiple pathways to autoimmunity. *Nat Immunol*, 18(7): 716-724
90. Motoi, Y., et al. (2014): Lipopeptides are signaled by Toll-like receptor 1, 2 and 6 in endolysosomes. *Int Immunol*, 26(10): 563-73
91. Brownlie, R. and B. Allan (2011): Avian toll-like receptors. *Cell Tissue Res*, 343(1): 121-30
92. Funderburg, N., et al. (2007): Human  $\alpha$ -defensin-3 activates professional antigen-presenting cells via Toll-like receptors 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(47): 18631-5
93. Underhill, D.M., et al. (1999): The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature*, 401(6755): 811-5
94. O'Neill, L.A. and A.G. Bowie (2007): The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, 7(5): 353-64
95. Lundberg, A.M., et al. (2013): Toll-like receptor 3 and 4 signalling through the TRIF and TRAM adaptors in haematopoietic cells promotes atherosclerosis. *Cardiovasc Res*, 99(2): 364-73
96. Helminen, O., et al. (2017): Localization of nucleic acid-sensing toll-like receptors in human and mouse pancreas. *APMIS*, 125(2): 85-92
97. Alexopoulou, L., et al. (2001): Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- $\kappa$ B by Toll-like receptor 3. *Nature*, 413(6857): 732-8
98. Zhou, Y., et al. (2013): TLR3 activation efficiency by high or low molecular mass poly I:C. *Innate Immun*, 19(2): 184-92
99. Tanimura, N., et al. (2008): Roles for LPS-dependent interaction and relocation of TLR4 and TRAM in TRIF-signaling. *Biochem Biophys Res Commun*, 368(1): 94-9
100. Fitzgerald, K.A., et al. (2001): Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature*, 413(6851): 78-83
101. Agier, J., et al. (2016): Expression of surface and intracellular Toll-like receptors by mature mast cells. *Cent Eur J Immunol*, 41(4): 333-338
102. Bates, J.T., et al. (2011): Enhanced antigen processing of flagellin fusion proteins promotes the antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cell response independently of TLR5 and MyD88. *J Immunol*, 186(11): 6255-62
103. Choi, Y.J., et al. (2010): TRIF mediates Toll-like receptor 5-induced signaling in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem*, 285(48): 37570-8
104. Nakao, Y., et al. (2005): Surface-expressed TLR6 participates in the recognition of diacylated lipopeptide and peptidoglycan in human cells. *J Immunol*, 174(3): 1566-73
105. Zhang, K., et al. (2019): gga-miR-146c Activates TLR6/MyD88/NF- $\kappa$ B Pathway through Targeting MMP16 to Prevent *Mycoplasma Gallisepticum* (HS Strain) Infection in Chickens. *Cells*, 8(5): 1-18
106. Saha, B., et al. (2017): Circulating and Exosome-Packaged Hepatitis C Single-Stranded RNA Induce Monocyte Differentiation via TLR7/8 to Polarized Macrophages and Fibrocytes. *J Immunol*, 198(5): 1974-1984

107. Hipp, M.M., et al. (2015): The Processed Amino-Terminal Fragment of Human TLR7 Acts as a Chaperone To Direct Human TLR7 into Endosomes. *J Immunol*, 194(11): 5417-25
108. Cervantes, J.L., et al. (2012): TLR8: the forgotten relative revindicated. *Cell Mol Immunol*, 9(6): 434-8
109. Papaioannou, A.I., et al. (2017): The role of endosomal toll-like receptors in asthma. *Eur J Pharmacol*, 808: 14-20
110. Ablasser, A., et al. (2009): Selection of molecular structure and delivery of RNA oligonucleotides to activate TLR7 versus TLR8 and to induce high amounts of IL-12p70 in primary human monocytes. *J Immunol*, 182(11): 6824-33
111. Ashino, S., et al. (2008): CpG-ODN inhibits airway inflammation at effector phase through down-regulation of antigen-specific Th2-cell migration into lung. *Int Immunol*, 20(2): 259-66
112. Puttur, F., et al. (2016): Conventional Dendritic Cells Confer Protection against Mouse Cytomegalovirus Infection via TLR9 and MyD88 Signaling. *Cell Rep*, 17(4): 1113-1127
113. Hasan, U., et al. (2005): Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88. *J Immunol*, 174(5): 2942-50
114. Jiang, S., et al. (2016): TLR10 Is a Negative Regulator of Both MyD88-Dependent and -Independent TLR Signaling. *J Immunol*, 196(9): 3834-41
115. Murakami, Y., et al. (2014): Roles of the cleaved N-terminal TLR3 fragment and cell surface TLR3 in double-stranded RNA sensing. *J Immunol*, 193(10): 5208-17
116. Pohar, J., et al. (2014): The ectodomain of TLR3 receptor is required for its plasma membrane translocation. *PLoS One*, 9(3): e92391
117. Choe, J., M.S. Kelker, and I.A. Wilson (2005): Crystal structure of human toll-like receptor 3 (TLR3) ectodomain. *Science*, 309(5734): 581-5
118. Wang, Y., et al. (2010): Dimerization of Toll-like receptor 3 (TLR3) is required for ligand binding. *J Biol Chem*, 285(47): 36836-41
119. Zhang, S.Y., et al. (2013): TLR3 immunity to infection in mice and humans. *Curr Opin Immunol*, 25(1): 19-33
120. Liu, L., et al. (2008): Structural basis of toll-like receptor 3 signaling with double-stranded RNA. *Science*, 320(5874): 379-81
121. Gosu, V., et al. (2019): Insights into the dynamic nature of the dsRNA-bound TLR3 complex. *Sci Rep*, 9(1): 3652
122. Seya, T., et al. (2005): TICAM-1 and TICAM-2: toll-like receptor adapters that participate in induction of type 1 interferons. *Int J Biochem Cell Biol*, 37(3): 524-9
123. Tatematsu, M., et al. (2010): A molecular mechanism for Toll-IL-1 receptor domain-containing adaptor molecule-1-mediated IRF-3 activation. *J Biol Chem*, 285(26): 20128-36
124. Ullah, M.O., et al. (2016): TRIF-dependent TLR signaling, its functions in host defense and inflammation, and its potential as a therapeutic target. *J Leukoc Biol*, 100(1): 27-45

125. Yamashita, M., et al. (2012): A TRIF-independent branch of TLR3 signaling. *J Immunol*, 188(6): 2825-33
126. Raicevic, G., et al. (2017): Comparison and immunobiological characterization of retinoic acid inducible gene-I-like receptor expression in mesenchymal stromal cells. *Sci Rep*, 7(1): 2896
127. Kinsella, S., et al. (2018): Increased A20-E3 ubiquitin ligase interactions in bid-deficient glia attenuate TLR3- and TLR4-induced inflammation. *J Neuroinflammation*, 15(1): 130
128. Abujamra, A.L., et al. (2006): Leukemia virus long terminal repeat activates NFkappaB pathway by a TLR3-dependent mechanism. *Virology*, 345(2): 390-403
129. Leite, F.G.G., et al. (2017): c-Jun integrates signals from both MEK/ERK and MKK/JNK pathways upon vaccinia virus infection. *Arch Virol*, 162(10): 2971-2981
130. Balasubramanian, A., R.K. Ganju, and J.E. Groopman (2003): Hepatitis C virus and HIV envelope proteins collaboratively mediate interleukin-8 secretion through activation of p38 MAP kinase and SHP2 in hepatocytes. *J Biol Chem*, 278(37): 35755-66
131. Fang, D., et al. (2007): Phosphorylation of beta-catenin by AKT promotes beta-catenin transcriptional activity. *J Biol Chem*, 282(15): 11221-9
132. Matsumoto, T., et al. (2018): TGF-beta-mediated LEFTY/Akt/GSK-3beta/Snail axis modulates epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell properties in ovarian clear cell carcinomas. *Mol Carcinog*, 57(8): 957-967
133. Gantner, B.N., et al. (2012): The Akt1 isoform is required for optimal IFN-beta transcription through direct phosphorylation of beta-catenin. *J Immunol*, 189(6): 3104-11
134. Duan, P. and L.F. Bonewald (2016): The role of the wnt/beta-catenin signaling pathway in formation and maintenance of bone and teeth. *Int J Biochem Cell Biol*, 77(Pt A): 23-29
135. Miller, R.K., et al. (2013): Beta-catenin versus the other armadillo catenins: assessing our current view of canonical Wnt signaling. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 116: 387-407
136. Yuan, M.M., et al. (2015): TLR3 expression correlates with apoptosis, proliferation and angiogenesis in hepatocellular carcinoma and predicts prognosis. *BMC Cancer*, 15: 245
137. Bugge, M., et al. (2017): Surface Toll-like receptor 3 expression in metastatic intestinal epithelial cells induces inflammatory cytokine production and promotes invasiveness. *J Biol Chem*, 292(37): 15408-15425
138. Armstrong, L., et al. (2012): Editorial: Our top 10 developments in stem cell biology over the last 30 years. *Stem Cells*, 30(1): 2-9
139. Ramalho-Santos, M. and H. Willenbring (2007): On the origin of the term "stem cell". *Cell Stem Cell*, 1(1): 35-8
140. T., B. (1892): Merkel F.S. Bonnet R. Ergebnisse der Anatomie und Entwicklungsgeschichte. Joseph Friedrich Bergmann: 386-485
141. Driesch, H. (1891): Entwicklungsmechanische Studien. I–II, Der Wert der beiden ersten Furchungszellen in der Echinodermententwicklung. Experimentelle Erzeugung von Teil- und Doppelbildungen. *Z. wiss. Zool.*, 53

142. Konstantinov, I.E. (2000): In search of Alexander A. Maximow: the man behind the unitarian theory of hematopoiesis. *Perspect Biol Med*, 43(2): 269-76
143. Till, J.E. and E.A. McCulloch (2012): A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. 1961. *Radiat Res*, 178(2): AV3-7
144. Friedenstein, A.J. (1976): Precursor cells of mechanocytes. *Int Rev Cytol*, 47: 327-59
145. Boris V. Afanasyev, E.E.E., Axel R. Zander (2009): A. J. Friedenstein, founder of the mesenchymal stem cell concept. *Cellular Therapy and Transplantation Vol. 1, No. 3*:
146. Martin, G.R. (1981): Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78(12): 7634-8
147. Thomson, J.A., et al. (1998): Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282(5391): 1145-7
148. Gearhart, J. (1998): New potential for human embryonic stem cells. *Science*, 282(5391): 1061-2
149. Miller, F.J. and F.E. Bloom (1998): Publishing controversial research. *Science*, 282(5391): 1045
150. Gronthos, S., et al. (2000): Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(25): 13625-30
151. Li, T., et al. (2015): Human umbilical cord mesenchymal stem cells: an overview of their potential in cell-based therapy. *Expert Opin Biol Ther*, 15(9): 1293-306
152. Honda, M., M. Sato, and T. Toriumi (2017): Characterization of Coronal Pulp Cells and Radicular Pulp Cells in Human Teeth. *J Endod*, 43(9S): S35-S39
153. El-Sayed, K.M., et al. (2015): Isolation and characterisation of human gingival margin-derived STRO-1/MACS(+) and MACS(-) cell populations. *Int J Oral Sci*, 7(2): 80-8
154. Crane, G.M., E. Jeffery, and S.J. Morrison (2017): Adult haematopoietic stem cell niches. *Nat Rev Immunol*, 17(9): 573-590
155. Schofield, R. (1978): The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*, 4(1-2): 7-25
156. Lim, W.F., et al. (2013): Hematopoietic cell differentiation from embryonic and induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res Ther*, 4(3): 71
157. Gurdon, J.B. (1962): The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J Embryol Exp Morphol*, 10: 622-40
158. Takahashi, K. and S. Yamanaka (2006): Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4): 663-76
160. Wu, G., L. Lei, and H.R. Scholer (2017): Totipotency in the mouse. *J Mol Med (Berl)*, 95(7): 687-694
161. De Los Angeles, A., et al. (2015): Hallmarks of pluripotency. *Nature*, 525(7570): 469-78
162. Tavassoli, M. and W.H. Crosby (1968): Transplantation of marrow to extramedullary sites. *Science*, 161(3836): 54-6

163. Friedenstein, A.J., R.K. Chailakhyan, and U.V. Gerasimov (1987): Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet*, 20(3): 263-72
164. He, S., D. Nakada, and S.J. Morrison (2009): Mechanisms of stem cell self-renewal. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 25: 377-406
165. Yang, Y.K., et al. (2018): Changes in phenotype and differentiation potential of human mesenchymal stem cells aging in vitro. *Stem Cell Res Ther*, 9(1): 131
166. Owen, M. and A.J. Friedenstein (1988): Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp*, 136: 42-60
167. Bianco, P., P.G. Robey, and P.J. Simmons (2008): Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell*, 2(4): 313-9
168. Mushahary, D., et al. (2018): Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells. *Cytometry A*, 93(1): 19-31
169. Caplan, A.I. (2017): Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name! *Stem Cells Transl Med*, 6(6): 1445-1451
170. Prockop, D.J. (1997): Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*, 276(5309): 71-4
171. Dominici, M., et al. (2006): Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4): 315-7
172. Janson, I.A., Y.P. Kong, and A.J. Putnam (2014): Nanotopographic substrates of poly (methyl methacrylate) do not strongly influence the osteogenic phenotype of mesenchymal stem cells in vitro. *PLoS One*, 9(3): e90719
173. Ozdemir, T., A.M. Higgins, and J.L. Brown (2015): Molecular mechanisms orchestrating the stem cell response to translational scaffolds. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 2015: 1749-52
174. Pittenger, M.F., et al. (1999): Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284(5411): 143-7
175. Chamberlain, G., et al. (2007): Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*, 25(11): 2739-49
176. Tuan, R.S., G. Boland, and R. Tuli (2003): Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Res Ther*, 5(1): 32-45
177. Lv, F.J., et al. (2014): Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 32(6): 1408-19
178. Pal, B. and B. Das (2017): In vitro Culture of Naive Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells: A Stemness Based Approach. *Front Cell Dev Biol*, 5: 69
179. Spees, J.L., R.H. Lee, and C.A. Gregory (2016): Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function. *Stem Cell Res Ther*, 7(1): 125

180. Fu, Y., et al. (2017): Trophic Effects of Mesenchymal Stem Cells in Tissue Regeneration. *Tissue Eng Part B Rev*, 23(6): 515-528
181. Heissig, B., et al. (2015): Role of mesenchymal stem cell-derived fibrinolytic factor in tissue regeneration and cancer progression. *Cell Mol Life Sci*, 72(24): 4759-70
182. Zhang, S., et al. (2018): MSC exosomes mediate cartilage repair by enhancing proliferation, attenuating apoptosis and modulating immune reactivity. *Biomaterials*, 156: 16-27
183. Smith, T.D., et al. (2016): Regulation of macrophage polarization and plasticity by complex activation signals. *Integr Biol (Camb)*, 8(9): 946-55
184. Wheat, W.H., et al. (2017): Suppression of Canine Dendritic Cell Activation/Maturation and Inflammatory Cytokine Release by Mesenchymal Stem Cells Occurs Through Multiple Distinct Biochemical Pathways. *Stem Cells Dev*, 26(4): 249-262
185. Hong, J.W., et al. (2017): Immune Tolerance of Human Dental Pulp-Derived Mesenchymal Stem Cells Mediated by CD4(+)CD25(+)FoxP3(+) Regulatory T-Cells and Induced by TGF-beta1 and IL-10. *Yonsei Med J*, 58(5): 1031-1039
186. Di Nicola, M., et al. (2002): Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*, 99(10): 3838-43
187. Ryu, D.B., et al. (2016): Induction of Indoleamine 2,3-dioxygenase by Pre-treatment with Poly(I:C) May Enhance the Efficacy of MSC Treatment in DSS-induced Colitis. *Immune Netw*, 16(6): 358-365
188. Healy, M.E., et al. (2015): Mesenchymal stromal cells protect against caspase 3-mediated apoptosis of CD19(+) peripheral B cells through contact-dependent upregulation of VEGF. *Stem Cells Dev*, 24(20): 2391-402
189. Nitzsche, F., et al. (2017): Concise Review: MSC Adhesion Cascade-Insights into Homing and Transendothelial Migration. *Stem Cells*, 35(6): 1446-1460
190. Wang, Y., et al. (2017): TNF-alpha-induced LRG1 promotes angiogenesis and mesenchymal stem cell migration in the subchondral bone during osteoarthritis. *Cell Death Dis*, 8(3): e2715
191. Harvestine, J.N., et al. (2016): Extracellular Matrix-Coated Composite Scaffolds Promote Mesenchymal Stem Cell Persistence and Osteogenesis. *Biomacromolecules*, 17(11): 3524-3531
192. Cheng, X., et al. (2018): Mesenchymal stem cells deliver exogenous miR-21 via exosomes to inhibit nucleus pulposus cell apoptosis and reduce intervertebral disc degeneration. *J Cell Mol Med*, 22(1): 261-276
193. Montali, M., et al. (2016): Growth Factor Content in Human Sera Affects the Isolation of Mesangiogenic Progenitor Cells (MPCs) from Human Bone Marrow. *Front Cell Dev Biol*, 4: 114
194. Honda, M.J., et al. (2013): Mesenchymal dental stem cells for tissue regeneration. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 28(6): e451-60
195. Lu, L., et al. (2019): The therapeutic role of bone marrow stem cell local injection in rat experimental periodontitis. *J Oral Rehabil*:

196. Tatullo, M., et al. (2019): Strategic Tools in Regenerative and Translational Dentistry. *Int J Mol Sci*, 20(8):
197. Venkatesh, D., K.P.M. Kumar, and J.B. Alur (2017): Gingival mesenchymal stem cells. *J Oral Maxillofac Pathol*, 21(2): 296-298
198. Fawzy El-Sayed, K.M., et al. (2019): The dental pulp stem/progenitor cells-mediated inflammatory-regenerative axis. *Tissue Eng Part B Rev*:
199. Boink, M.A., et al. (2016): Different wound healing properties of dermis, adipose, and gingiva mesenchymal stromal cells. *Wound Repair Regen*, 24(1): 100-9
200. Rouabhia, M. and P. Allaire (2010): Gingival mucosa regeneration in athymic mice using in vitro engineered human oral mucosa. *Biomaterials*, 31(22): 5798-804
201. Zhao, N., et al. (2015): Characteristics and Tissue Regeneration Properties of Gingiva-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 25(2): 135-44
202. Heng, B.C., et al. (2016): An Overview of Protocols for the Neural Induction of Dental and Oral Stem Cells In Vitro. *Tissue Eng Part B Rev*, 22(3): 220-50
203. Xu, Q.C., et al. (2014): Systemically transplanted human gingiva-derived mesenchymal stem cells contributing to bone tissue regeneration. *Int J Clin Exp Pathol*, 7(8): 4922-9
204. Ranga Rao, S. and R. Subbarayan (2019): Passage-dependent expression of STRO-1 in human gingival mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem*, 120(3): 2810-2815
205. Jia, L., et al. (2019): Comparative analysis of lncRNA and mRNA expression profiles between periodontal ligament stem cells and gingival mesenchymal stem cells. *Gene*, 699: 155-164
206. Van Pham, P., et al. (2016): Vitamin C stimulates human gingival stem cell proliferation and expression of pluripotent markers. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 52(2): 218-27
207. Li, N., et al. (2013): Inflammatory environment induces gingival tissue-specific mesenchymal stem cells to differentiate towards a pro-fibrotic phenotype. *Biol Cell*, 105(6): 261-75
208. Tomasello, L., et al. (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
209. Tang, L., et al. (2011): Characterization of mesenchymal stem cells from human normal and hyperplastic gingiva. *J Cell Physiol*, 226(3): 832-42
210. Hynes, K., et al. (2014): Generation of functional mesenchymal stem cells from different induced pluripotent stem cell lines. *Stem Cells Dev*, 23(10): 1084-96
211. Gu, Y. and S. Shi (2016): Transplantation of gingiva-derived mesenchymal stem cells ameliorates collagen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther*, 18(1): 262
212. Grawish, M.E. (2018): Gingival-derived mesenchymal stem cells: An endless resource for regenerative dentistry. *World J Stem Cells*, 10(9): 116-118
213. Fawzy El-Sayed, K.M., P. Klingebiel, and C.E. Dorfer (2016): Toll-like Receptor Expression Profile of Human Dental Pulp Stem/Progenitor Cells. *J Endod*, 42(3): 413-7



214. Fawzy El-Sayed, K.M., J. Boeckler, and C.E. Dorfer (2017): TLR expression profile of human alveolar bone proper-derived stem/progenitor cells and osteoblasts. *J Craniomaxillofac Surg*, 45(12): 2054-2060
215. Villar, C.C. and D.L. Cochran (2010): Regeneration of periodontal tissues: guided tissue regeneration. *Dent Clin North Am*, 54(1): 73-92
216. Suaid, F.F., et al. (2011): Autologous periodontal ligament cells in the treatment of class II furcation defects: a study in dogs. *J Clin Periodontol*, 38(5): 491-8
217. Khorsand, A., et al. (2013): Autologous dental pulp stem cells in regeneration of defect created in canine periodontal tissue. *J Oral Implantol*, 39(4): 433-43
218. Fawzy El-Sayed, K.M., et al. (2012): Periodontal regeneration employing gingival margin-derived stem/progenitor cells: an animal study. *J Clin Periodontol*, 39(9): 861-70
219. Gauthier, P., et al. (2017): Cementogenic genes in human periodontal ligament stem cells are downregulated in response to osteogenic stimulation while upregulated by vitamin C treatment. *Cell Tissue Res*, 368(1): 79-92
220. Fawzy El-Sayed, K.M., D. Hein, and C.E. Dorfer (2019): Retinol/inflammation affect stemness and differentiation potential of gingival stem/progenitor cells via Wnt/beta-catenin. *J Periodontal Res*, 54(4): 413-423
221. Zhang, F., et al. (2017): IL-1/TNF-alpha Inflammatory and Anti-Inflammatory Synchronization Affects Gingival Stem/Progenitor Cells' Regenerative Attributes. *Stem Cells Int*, 2017: 1349481
222. Zhu, Y., et al. (2019): TLR activation inhibits the osteogenic potential of human periodontal ligament stem cells through Akt signaling in a Myd88- or TRIF-dependent manner. *J Periodontol*, 90(4): 400-415
223. Yusop, N., et al. (2018): Isolation and Characterisation of Mesenchymal Stem Cells from Rat Bone Marrow and the Endosteal Niche: A Comparative Study. *Stem Cells Int*, 2018: 6869128
224. Raicevic, G., et al. (2011): The source of human mesenchymal stromal cells influences their TLR profile as well as their functional properties. *Cell Immunol*, 270(2): 207-16
225. Romieu-Mourez, R., et al. (2009): Cytokine modulation of TLR expression and activation in mesenchymal stromal cells leads to a proinflammatory phenotype. *J Immunol*, 182(12): 7963-73
226. Li, X., et al. (2016): Lung tumor exosomes induce a pro-inflammatory phenotype in mesenchymal stem cells via NFkappaB-TLR signaling pathway. *J Hematol Oncol*, 9: 42
227. Zhang, L., et al. (2015): The role of Toll-like receptor 3 and 4 in regulating the function of mesenchymal stem cells isolated from umbilical cord. *Int J Mol Med*, 35(4): 1003-10
228. Liu, C., F. Himmati, and N. Sayed (2017): Paying the Toll in Nuclear Reprogramming. *Front Cell Dev Biol*, 5: 70
229. Meng, S., et al. (2017): Transflammation: Innate immune signaling in nuclear reprogramming. *Adv Drug Deliv Rev*, 120: 133-141

230. Lei, H., et al. (2017): TLR3 activation induces S100A7 to regulate keratinocyte differentiation after skin injury. *Sci China Life Sci*, 60(2): 158-167
231. Fang, F., et al. (2013): A synthetic TLR3 ligand mitigates profibrotic fibroblast responses by inducing autocrine IFN signaling. *J Immunol*, 191(6): 2956-66
232. Gao, F., et al. (2016): Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. *Cell Death Dis*, 7: e2062
233. Najar, M., et al. (2016): Mesenchymal stromal cells and immunomodulation: A gathering of regulatory immune cells. *Cytotherapy*, 18(2): 160-71
234. Raicevic, G., et al. (2012): Inflammation and Toll-like receptor ligation differentially affect the osteogenic potential of human mesenchymal stromal cells depending on their tissue origin. *Tissue Eng Part A*, 18(13-14): 1410-8
235. Delarosa, O., W. Dalemans, and E. Lombardo (2012): Toll-like receptors as modulators of mesenchymal stem cells. *Front Immunol*, 3: 182
236. Mastri, M., et al. (2012): Activation of Toll-like receptor 3 amplifies mesenchymal stem cell trophic factors and enhances therapeutic potency. *Am J Physiol Cell Physiol*, 303(10): C1021-33
237. Zhou, L., et al. (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
238. Lu, Y., et al. (2018): Toll-like Receptors and Inflammatory Bowel Disease. *Front Immunol*, 9: 72
239. Mathot, F., et al. (2019): Adhesion, distribution, and migration of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells (MSCs) seeded on nerve allografts. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*:
240. Molday, R.S. and D. MacKenzie (1982): Immunospecific ferromagnetic iron-dextran reagents for the labeling and magnetic separation of cells. *J Immunol Methods*, 52(3): 353-67
241. Miltenyi, S., et al. (1990): High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry*, 11(2): 231-8
242. Ning, H., et al. (2011): Mesenchymal stem cell marker Stro-1 is a 75 kd endothelial antigen. *Biochem Biophys Res Commun*, 413(2): 353-7
243. Simmons, P.J. and B. Torok-Storb (1991): Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood*, 78(1): 55-62
244. Qiu, Z., et al. (2019): Involvement of miR-146a-5p/neurogenic locus notch homolog protein 1 in the proliferation and differentiation of STRO-1(+) human dental pulp stem cells. *Eur J Oral Sci*, 127(4): 294-303
245. Bakopoulou, A., et al. (2013): Comparative characterization of STRO-1(neg)/CD146(pos) and STRO-1(pos)/CD146(pos) apical papilla stem cells enriched with flow cytometry. *Arch Oral Biol*, 58(10): 1556-68

246. Harris, L. and C.T. Vangsness, Jr. (2018): Mesenchymal Stem Cell Levels of Human Spinal Tissues. *Spine (Phila Pa 1976)*, 43(9): E545-E550
247. Stiehler, M., et al. (2016): In vitro characterization of bone marrow stromal cells from osteoarthritic donors. *Stem Cell Res*, 16(3): 782-9
248. MacArthur, B.D., et al. (2006): A non-invasive method for in situ quantification of subpopulation behaviour in mixed cell culture. *J R Soc Interface*, 3(6): 63-9
249. Gothard, D., et al. (2014): Prospective isolation of human bone marrow stromal cell subsets: A comparative study between Stro-1-, CD146- and CD105-enriched populations. *J Tissue Eng*, 5: 1-17
250. Kawashima, N., et al. (2017): Properties of Dental Pulp-derived Mesenchymal Stem Cells and the Effects of Culture Conditions. *J Endod*, 43(9S): S31-S34
251. Antebi, B., et al. (2019): Bench-to bedside optimization of mesenchymal stem cell isolation, processing, and expansion for in vivo administration. *Regen Med*, 14(4): 279-293
252. Li, Z., et al. (2019): Comparison of different methods for the isolation and purification of rat nucleus pulposus-derived mesenchymal stem cells. *Connect Tissue Res*: 1-9
253. Hemeda, H., B. Giebel, and W. Wagner (2014): Evaluation of human platelet lysate versus fetal bovine serum for culture of mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*, 16(2): 170-80
254. Fawzy El-Sayed, K.M., et al. (2015): Periodontal regeneration employing gingival margin-derived stem/progenitor cells in conjunction with IL-1ra-hydrogel synthetic extracellular matrix. *J Clin Periodontol*, 42(5): 448-57
255. Martin, P.G., et al. (2012): Isolation and characterization of the environmental bacterial and fungi contamination in a pharmaceutical unit of mesenchymal stem cell for clinical use. *Biologicals*, 40(5): 330-7
256. Berniakovich, I. and M. Giorgio (2013): Low oxygen tension maintains multipotency, whereas normoxia increases differentiation of mouse bone marrow stromal cells. *Int J Mol Sci*, 14(1): 2119-34
257. Iida, K., et al. (2010): Hypoxia enhances colony formation and proliferation but inhibits differentiation of human dental pulp cells. *Arch Oral Biol*, 55(9): 648-54
258. Herzenberg, L.A., et al. (2002): The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford. *Clin Chem*, 48(10): 1819-27
259. Baumgarth, N. and M. Roederer (2000): A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. *J Immunol Methods*, 243(1-2): 77-97
260. Andersen, M.N., et al. (2016): Elimination of erroneous results in flow cytometry caused by antibody binding to Fc receptors on human monocytes and macrophages. *Cytometry A*, 89(11): 1001-1009
261. Okino, C.H., et al. (2019): Elimination of erroneous results related to bovine mononuclear cell immunophenotyping by antibodies binding to Fc receptors. *Vet Immunol Immunopathol*, 213: ID 109889

262. Nery, A.A., et al. (2013): Human mesenchymal stem cells: from immunophenotyping by flow cytometry to clinical applications. *Cytometry A*, 83(1): 48-61
263. Tsukamoto, H., et al. (2018): Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein stimulates CD14-dependent Toll-like receptor 4 internalization and LPS-induced TBK1-IKK-IRF3 axis activation. *J Biol Chem*, 293(26): 10186-10201
264. Zamani, F., et al. (2013): Induction of CD14 Expression and Differentiation to Monocytes or Mature Macrophages in Promyelocytic Cell Lines: New Approach. *Adv Pharm Bull*, 3(2): 329-332
265. AbuSamra, D.B., et al. (2017): Not just a marker: CD34 on human hematopoietic stem/progenitor cells dominates vascular selectin binding along with CD44. *Blood Adv*, 1(27): 2799-2816
266. Zhang, T., et al. (2020): Estradiol regulates the expression of CD45 splicing isoforms in lymphocytes. *Mol Biol Rep*, 47(4): 3025-3030
267. Hendrickx, A. and X. Bossuyt (2001): Quantification of the leukocyte common antigen (CD45) in mature B-cell malignancies. *Cytometry*, 46(6): 336-9
268. Bose, B. and P.S. Shenoy (2016): Aging induced loss of stemness with concomitant gain of myogenic properties of a pure population of CD34(+)/CD45(-) muscle derived stem cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 70: 1-12
269. Iser, I.C., et al. (2014): Mesenchymal stem cells from different murine tissues have differential capacity to metabolize extracellular nucleotides. *J Cell Biochem*, 115(10): 1673-82
270. Shin, E.Y., et al. (2018): Adenosine Production by Biomaterial-Supported Mesenchymal Stromal Cells Reduces the Innate Inflammatory Response in Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *J Am Heart Assoc*, 7(2): e006949
271. Choi, H.R., et al. (2020): Expression of CD73 is associated with tumor progression and intratumoral inflammation in breast cancer. *Asia Pac J Clin Oncol*:
272. Lobba, A.R.M., et al. (2018): High CD90 (THY-1) expression positively correlates with cell transformation and worse prognosis in basal-like breast cancer tumors. *PLoS One*, 13(6): e0199254
273. Pan, Z., et al. (2019): CD90 serves as differential modulator of subcutaneous and visceral adipose-derived stem cells by regulating AKT activation that influences adipose tissue and metabolic homeostasis. *Stem Cell Res Ther*, 10(1): 355
274. Levi, B., et al. (2011): CD105 protein depletion enhances human adipose-derived stromal cell osteogenesis through reduction of transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) signaling. *J Biol Chem*, 286(45): 39497-509
275. Matsui, M., T. Kobayashi, and T.W. Tsutsui (2018): CD146 positive human dental pulp stem cells promote regeneration of dentin/pulp-like structures. *Hum Cell*, 31(2): 127-138
276. Nodomi, S., et al. (2016): CD146 is a novel marker for highly tumorigenic cells and a potential therapeutic target in malignant rhabdoid tumor. *Oncogene*, 35(40): 5317-5327

277. Tay, S.P., et al. (1999): Comparative analysis of three permeabilization methods for cytofluorometric evaluation of cytoplasmic myeloperoxidase. *Malays J Pathol*, 21(1): 37-43
278. Dzangue-Tchoupou, G., et al. (2018): Analysis of cell surface and intranuclear markers on non-stimulated human PBMC using mass cytometry. *PLoS One*, 13(3): e0194593
279. Peiffer, I., et al. (2007): A sub-population of high proliferative potential-quiescent human mesenchymal stem cells is under the reversible control of interferon alpha/beta. *Leukemia*, 21(4): 714-24
280. Friedenstein, A.J., R.K. Chailakhjan, and K.S. Lalykina (1970): The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*, 3(4): 393-403
281. Heo, J.S., et al. (2016): Comparison of molecular profiles of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, umbilical cord blood, placenta and adipose tissue. *Int J Mol Med*, 37(1): 115-25
282. Jauregui, C., S. Yoganarasimha, and P. Madurantakam (2018): Mesenchymal Stem Cells Derived from Healthy and Diseased Human Gingiva Support Osteogenesis on Electrospun Polycaprolactone Scaffolds. *Bioengineering (Basel)*, 5(1): 1-16
284. Mosmann, T. (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65(1-2): 55-63
285. Tsai, A.C. and T. Ma (2016): Expansion of Human Mesenchymal Stem Cells in a Microcarrier Bioreactor. *Methods Mol Biol*, 1502: 77-86
286. Ried, D.W. (1952): Formazane und Tetrazoliumsalze, ihre Synthesen und ihre Bedeutung als Reduktionsindikatoren und Vitalfarbstoffe. *Angewandte Chemie*, 14: 391-396
287. Greenfield, E.A. (2019): Myeloma and Hybridoma Cell Counts and Viability Checks. *Cold Spring Harb Protoc*, 2019(10): 689-690
288. Schwanhauser, B., et al. (2011): Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature*, 473(7347): 337-42
289. Ross, J. (1996): Control of messenger RNA stability in higher eukaryotes. *Trends Genet*, 12(5): 171-5
291. Yeh, D.W., et al. (2016): Interplay between Inflammation and Stemness in Cancer Cells: The Role of Toll-Like Receptor Signaling. *J Immunol Res*, 2016: ID 4368101
292. Pierantozzi, E., et al. (2011): Pluripotency regulators in human mesenchymal stem cells: expression of NANOG but not of OCT-4 and SOX-2. *Stem Cells Dev*, 20(5): 915-23
294. Shi, G. and Y. Jin (2010): Role of Oct4 in maintaining and regaining stem cell pluripotency. *Stem Cell Res Ther*, 1(5): 39
295. Wuebben, E.L. and A. Rizzino (2017): The dark side of SOX2: cancer - a comprehensive overview. *Oncotarget*, 8(27): 44917-44943
296. Park, C.S., et al. (2019): A KLF4-DYRK2-mediated pathway regulating self-renewal in CML stem cells. *Blood*, 134(22): 1960-1972

297. Wang, G., et al. (2013): Critical regulation of miR-200/ZEB2 pathway in Oct4/Sox2-induced mesenchymal-to-epithelial transition and induced pluripotent stem cell generation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(8): 2858-63
298. Wei, Z., et al. (2009): Klf4 interacts directly with Oct4 and Sox2 to promote reprogramming. *Stem Cells*, 27(12): 2969-78
299. Tang, L., D. Wang, and D. Gu (2018): Knockdown of Sox2 Inhibits OS Cells Invasion and Migration via Modulating Wnt/beta-Catenin Signaling Pathway. *Pathol Oncol Res*, 24(4): 907-913
300. Solari, C., et al. (2019): The pluripotency transcription factor Nanog represses glutathione reductase gene expression in mouse embryonic stem cells. *BMC Res Notes*, 12(1): 370
301. Gong, S., et al. (2015): Regulation of NANOG in cancer cells. *Mol Carcinog*, 54(9): 679-87
302. Pitrone, M., et al. (2019): Knockdown of NANOG Reduces Cell Proliferation and Induces G0/G1 Cell Cycle Arrest in Human Adipose Stem Cells. *Int J Mol Sci*, 20(10):
303. Saunders, A., F. Faiola, and J. Wang (2013): Concise review: pursuing self-renewal and pluripotency with the stem cell factor Nanog. *Stem Cells*, 31(7): 1227-36
304. Miranda, C.C., et al. (2016): Scaling up a chemically-defined aggregate-based suspension culture system for neural commitment of human pluripotent stem cells. *Biotechnol J*, 11(12): 1628-1638
305. Roche, S., M.J. Richard, and M.C. Favrot (2007): Oct-4, Rex-1, and Gata-4 expression in human MSC increase the differentiation efficiency but not hTERT expression. *J Cell Biochem*, 101(2): 271-80
306. Feng, X.Y., et al. (2018): Homeobox protein MSX-1 inhibits expression of bone morphogenetic protein 2, bone morphogenetic protein 4, and lymphoid enhancer-binding factor 1 via Wnt/beta-catenin signaling to prevent differentiation of dental mesenchymal cells during the late bell stage. *Eur J Oral Sci*, 126(1): 1-12
307. Denu, R.A., et al. (2016): Fibroblasts and Mesenchymal Stromal/Stem Cells Are Phenotypically Indistinguishable. *Acta Haematol*, 136(2): 85-97
308. Warsinske, H.C., et al. (2015): Identifying Mechanisms of Homeostatic Signaling in Fibroblast Differentiation. *Bull Math Biol*, 77(8): 1556-82
309. Langenbach, F. and J. Handschel (2013): Effects of dexamethasone, ascorbic acid and beta-glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro. *Stem Cell Res Ther*, 4(5): 117
310. Fiorentini, E., et al. (2011): Effects of osteogenic differentiation inducers on in vitro expanded adult mesenchymal stromal cells. *Int J Artif Organs*, 34(10): 998-1011
311. Moester, M.J., et al. (2014): Validation of a simple and fast method to quantify in vitro mineralization with fluorescent probes used in molecular imaging of bone. *Biochem Biophys Res Commun*, 443(1): 80-5

312. Pu, Y. and A. Veiga-Lopez (2017): PPARgamma agonist through the terminal differentiation phase is essential for adipogenic differentiation of fetal ovine preadipocytes. *Cell Mol Biol Lett*, 22: 6
313. Zhan, W., et al. (2017): Indomethacin Enhances Fat Graft Retention by Up-Regulating Adipogenic Genes and Reducing Inflammation. *Plast Reconstr Surg*, 139(5): 1093e-1104e
314. Wang, Y.L., et al. (2016): Concomitant beige adipocyte differentiation upon induction of mesenchymal stem cells into brown adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 478(2): 689-95
315. Pfutzner, A., et al. (2017): Mesenchymal Stem Cell Differentiation into Adipocytes Is Equally Induced by Insulin and Proinsulin In Vitro. *Int J Stem Cells*, 10(2): 154-159
316. Escorcia, W., et al. (2018): Quantification of Lipid Abundance and Evaluation of Lipid Distribution in *Caenorhabditis elegans* by Nile Red and Oil Red O Staining. *J Vis Exp*, (133):
317. Eggerschwiler, B., et al. (2019): Automated digital image quantification of histological staining for the analysis of the trilineage differentiation potential of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther*, 10(1): 69
318. Leong, D.T., et al. (2006): Characterization of osteogenically induced adipose tissue-derived precursor cells in 2-dimensional and 3-dimensional environments. *Cells Tissues Organs*, 182(1): 1-11
319. JA, K. (2006): Dyes and other colorants in microtechnique and biomedicalresearch. *Color Technol.*:
320. Tam, W.L., F.P. Luyten, and S.J. Roberts (2018): From skeletal development to the creation of pluripotent stem cell-derived bone-forming progenitors. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 373(1750):
321. Pokrovskaya, L.A., et al. (2020): Expression of RUNX2 and Osterix in Rat Mesenchymal Stem Cells during Culturing in Osteogenic-Conditioned Medium. *Bull Exp Biol Med*, 169(4): 571-575
322. Lopes, D., et al. (2018): Bone physiology as inspiration for tissue regenerative therapies. *Biomaterials*, 185: 240-275
323. Chen, Q., et al. (2016): Fate decision of mesenchymal stem cells: adipocytes or osteoblasts? *Cell Death Differ*, 23(7): 1128-39
324. Zolocinska, A. (2018): The expression of marker genes during the differentiation of mesenchymal stromal cells. *Adv Clin Exp Med*, 27(5): 717-723
325. Xu, C., et al. (2016): Cross-Talking Between PPAR and WNT Signaling and its Regulation in Mesenchymal Stem Cell Differentiation. *Curr Stem Cell Res Ther*, 11(3): 247-54
326. Wu, L., et al. (2013): Regeneration of articular cartilage by adipose tissue derived mesenchymal stem cells: perspectives from stem cell biology and molecular medicine. *J Cell Physiol*, 228(5): 938-44
327. Kontush, A. (2020): HDL and Reverse Remnant-Cholesterol Transport (RRT): Relevance to Cardiovascular Disease. *Trends Mol Med*:

328. Matthews, B.G., et al. (2016): Osteogenic potential of alpha smooth muscle actin expressing muscle resident progenitor cells. *Bone*, 84: 69-77
329. Zhao, Y., et al. (2020): Mesenchymal stem cells regulate inflammatory milieu within degenerative nucleus pulposus cells via p38 MAPK pathway. *Exp Ther Med*, 20(5): 22
330. Chen, X., et al. (2014): Characterization of mesenchymal stem cells under the stimulation of Toll-like receptor agonists. *Dev Growth Differ*, 56(3): 233-44
331. Nahm, F.S. (2016): Nonparametric statistical tests for the continuous data: the basic concept and the practical use. *Korean J Anesthesiol*, 69(1): 8-14
334. Wissing, D.R. and D. Timm (2012): Statistics for the nonstatistician: Part I. *South Med J*, 105(3): 126-30
335. Sato, T., et al. (2020): A Novel Type of Stem Cells Double-Positive for SSEA-3 and CD45 in Human Peripheral Blood. *Cell Transplant*, 29: 963689720923574
336. Cheng, N.C., et al. (2013): Short-term spheroid formation enhances the regenerative capacity of adipose-derived stem cells by promoting stemness, angiogenesis, and chemotaxis. *Stem Cells Transl Med*, 2(8): 584-94
337. Partanen, T., et al. (2020): Heterozygous TLR3 Mutation in Patients with Hantavirus Encephalitis. *J Clin Immunol*:
338. de Vicente, L.G., et al. (2020): Role of TLR4 in physical exercise and cardiovascular diseases. *Cytokine*, 136: 155273
339. Qi, W., et al. (2019): TLR4 gene in the regulation of periodontitis and its molecular mechanism. *Exp Ther Med*, 18(3): 1961-1966
340. Akkaoui, J., et al. (2020): Contribution of Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide to experimental periodontitis in relation to aging. *Geroscience*:
341. Gollmann-Tepekoylu, C., et al. (2020): Shock waves promote spinal cord repair via TLR3. *JCI Insight*, 5(15): 1-15
342. Jafari, M., et al. (2020): Priming TLR3 and TLR4 in human adipose- and olfactory mucosa-derived mesenchymal stromal cells and comparison of their cytokine secretions. *Cytotechnology*, 72(1): 57-68
343. Chaikawkaew, D., V. Everts, and P. Pavasant (2020): TLR3 activation modulates immunomodulatory properties of human periodontal ligament cells. *J Periodontol*: 1225-1236
344. Jia, D., et al. (2015): beta-Catenin and NF-kappaB co-activation triggered by TLR3 stimulation facilitates stem cell-like phenotypes in breast cancer. *Cell Death Differ*, 22(2): 298-310
345. Nelson, A.M., et al. (2015): dsRNA Released by Tissue Damage Activates TLR3 to Drive Skin Regeneration. *Cell Stem Cell*, 17(2): 139-51
346. Lee, J., et al. (2012): Activation of innate immunity is required for efficient nuclear reprogramming. *Cell*, 151(3): 547-58
347. Le Naour, J., et al. (2020): Trial watch: TLR3 agonists in cancer therapy. *Oncoimmunology*, 9(1): ID 1771143



348. Strayer, D.R., et al. (2012): A double-blind, placebo-controlled, randomized, clinical trial of the TLR-3 agonist rintatolimod in severe cases of chronic fatigue syndrome. *PLoS One*, 7(3): e31334
349. Feng, Y., et al. (2018): Bufalin Suppresses Migration and Invasion of Hepatocellular Carcinoma Cells Elicited by Poly (I:C) Therapy. *Oncoimmunology*, 7(5): e1426434
350. Yoneda, K., et al. (2008): Dual topology of functional Toll-like receptor 3 expression in human hepatocellular carcinoma: differential signaling mechanisms of TLR3-induced NF-kappaB activation and apoptosis. *Int J Oncol*, 33(5): 929-36
351. Shin, H.R., et al. (2016): Pin1-mediated Modification Prolongs the Nuclear Retention of beta-Catenin in Wnt3a-induced Osteoblast Differentiation. *J Biol Chem*, 291(11): 5555-65
352. Han, N., et al. (2014): beta-catenin enhances odontoblastic differentiation of dental pulp cells through activation of Runx2. *PLoS One*, 9(2): e88890
353. Rostovskaya, M., et al. (2018): Clonal Analysis Delineates Transcriptional Programs of Osteogenic and Adipogenic Lineages of Adult Mouse Skeletal Progenitors. *Stem Cell Reports*, 11(1): 212-227
354. Liang, K., et al. (2020): Contrary Roles of Wnt/beta-Catenin Signaling in BMP9-Induced Osteogenic and Adipogenic Differentiation of 3T3-L1 Preadipocytes. *Cell Biochem Biophys*, 78(3): 347-356
355. Yu, Z., et al. (2015): Differential Properties of Human ALP(+) Periodontal Ligament Stem Cells vs Their ALP(-) Counterparts. *J Stem Cell Res Ther*, 5(7):
356. Ben-Shushan, E., et al. (1998): Rex-1, a gene encoding a transcription factor expressed in the early embryo, is regulated via Oct-3/4 and Oct-6 binding to an octamer site and a novel protein, Rox-1, binding to an adjacent site. *Mol Cell Biol*, 18(4): 1866-78
357. Peres, M.A., et al. (2019): Oral diseases: a global public health challenge. *Lancet*, 394(10194): 249-260

### **Bücher**

12. Eickholz, P. (2013): Parodontologie von A bis Z - Grundlagen für die Praxis. Quintessenz Verlags-GmbH: Berlin. p. 282
40. Kenneth Murphy, C.W. (2018): Janeway Immunologie. 9, Springer Spektrum: Berlin, Heidelberg. p. 1205
159. Lüllmann-Rauch, R. (2012): Taschenlehrbuch Histologie. 4. Auflage, Georg Thieme Verlag: Stuttgart. p. 680
290. PC Heinrich, M.M., L Graeve (2014): Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. 9. Auflage, Springer Verlag: Heidelberg. p. 1073
293. Pham, P. (2020): Tissue Engineering and Regenerative Medicine. 1084, Springer Nature: Zürich. p. 236

332. M Messer, G.S. (2019): Statistik - Theorie und Praxis im Dialog. Springer Spektrum: Heidelberg.  
p. 186
333. M Eid, M.G., M Schmitt (2015): Statistik und Forschungsmethoden. 4. Auflage, Beltz Verlag:  
Weinheim p. 1088

**Dissertationen**

283. Ott, J. (2012): Vergleich der Anwendbarkeit unterschiedlicher Tetrazoliumsalze in  
Biotoxizitätsassays in Anwesenheit von Nickel- und Kupferionen. Zahn Med. Dissertation, Kiel

## 7. Anhang

### 7.1. Abbildungen

Abbildung 1 Aufbau des Parodonts.....	1
Abbildung 2 Physiologische und pathologische Anatomie des Parodonts .....	3
Abbildung 3 TLR3 spezifische Transkriptionsfaktoraktivierung .....	14
Abbildung 4 Stammbaum humaner Stammzellen .....	16
Abbildung 5 Lokalisation dentaler Stammzellen.....	20
Abbildung 6 Histologische Darstellung des Ursprungs oraler MSC im adulten Individuum .....	24
Abbildung 7 Mikromasse vor chondrogener Differenzierung.....	40
Abbildung 8 Gingivaexzissat und Präparation zur Kultivierung gingivalen Mischgewebes .....	45
Abbildung 9 Kultivierung gingivalen Mischgewebes .....	45
Abbildung 10 MACS <sup>+</sup> sortierte Zellen .....	46
Abbildung 11 Adhäsion MACS <sup>+</sup> Zellen an PMMA Oberflächen .....	46
Abbildung 12 Osteogene Differenzierung MACS <sup>+</sup> sortierter Zellen .....	48
Abbildung 13 Genexpression MACS <sup>+</sup> sortierter Zellen nach osteogener Differenzierung .....	48
Abbildung 14 Adipogene Differenzierung MACS <sup>+</sup> sortierter Zellen .....	49
Abbildung 15 Genexpression MACS <sup>+</sup> sortierter Zellen nach osteogener Differenzierung .....	49
Abbildung 16 Chondrogene Differenzierung MACS <sup>+</sup> sortierter Zellen.....	50
Abbildung 17 Kernechtrot und Alzianblau spezifische Farbspekten im HSB Farbraum.....	51
Abbildung 18 Kalibrierung der Alzianblau und Kernechtrot spezifischen Spektren mittels ImageJ .....	51
Abbildung 19 Digitale Quantifizierung der Kernechtrot Färbung nach chondrogener Differenzierung MACS <sup>+</sup> Zellen.....	52
Abbildung 20 Digitale Quantifizierung der Alzianblau Färbung MACS <sup>+</sup> Zellen nach chondrogener Differenzierung .....	52
Abbildung 21 Genexpression MACS <sup>+</sup> sortierter Zellen nach chondrogener Differenzierung.....	53
Abbildung 22 Histogrammische Darstellung der Expression MSC-spezifischer Oberflächenmarker MACS <sup>+</sup> Zellen	54
Abbildung 23 Nachweis der Expression von TLR3 auf MACS <sup>+</sup> sortierten Zellen .....	54
Abbildung 24 Koloniebildungen nach 12-tägiger Stimulation mit Poly(I:C) .....	55
Abbildung 25 Metabolische Aktivität nach 1 Tag unter Poly(I:C) Stimulation .....	56
Abbildung 26 Metabolische Aktivität nach 6 Tagen unter Poly(I:C) Stimulation .....	57
Abbildung 27 Metabolische Aktivität nach 6 Tagen unter Poly(I:C) Stimulation .....	57
Abbildung 28 Proliferationskurve unter Poly(I:C) Stimulation .....	58
Abbildung 29 Osteogene Differenzierung MACS <sup>+</sup> sortierter Zellen unter Poly(I:C) Stimulation .....	59
Abbildung 30 Alizarin Rot Quantifizierung nach dreiwöchiger osteogener Differenzierung mit Poly(I:C) Stimulation.....	60
Abbildung 31 RUNX2 und ALP Expression nach osteogener Differenzierung unter Poly(I:C) Stimulation .....	60
Abbildung 32 ON und OPN Expression nach osteogener Differenzierung unter Poly(I:C) Stimulation .....	61

Abbildung 33 Adipogene Differenzierung MACS+ sortierter Zellen unter Poly(I:C) Stimulation .....	62
Abbildung 34 Ölrot Quantifizierung nach vierwöchiger adipogener Differenzierung mit Poly(I:C) Stimulation ..	62
Abbildung 35 LPL und PPAR $\gamma$ Expression MACS+ Zellen nach osteogener Differenzierung unter Poly(I:C) Stimulation .....	63
Abbildung 36 Chondrogene Differenzierung MACS+ sortierter Zellen unter Poly(I:C) Stimulation.....	64
Abbildung 37 Kernechtrot Quantifizierung nach chondrogener Differenzierung unter Poly(I:C) Stimulation .....	64
Abbildung 38 Kernechtrot Quantifizierung nach Chondrogene Differenzierung unter Poly(I:C) Stimulation .....	65
Abbildung 39 ACAN Expression MACS+ Zellen nach chondrogener Differenzierung unter Poly(I:C) Stimulation	65
Abbildung 40 Genexpression (NANOG/MSX-1) MACS+ sortierter Zellen nach Poly(I:C) Stimulation.....	66
Abbildung 41 Genexpression (SOX2/OCT4A) MACS+ sortierter Zellen nach Poly(I:C) Stimulation .....	66
Abbildung 42 Genexpression (SOX2/OCT4A) MACS+ sortierter Zellen nach Poly(I:C) Stimulation .....	67
Abbildung 43 CD14, CD34 und CD45 Expression MACS+ sortierter Zellen nach Poly(I:C) Stimulation.....	68
Abbildung 44 CD73, CD90 und CD105 Expression MACS+ sortierter Zellen nach Poly(I:C) Stimulation.....	69
Abbildung 45 CD146 Expression MACS+ sortierter Zellen nach Poly(I:C) Stimulation.....	70
Abbildung 46 IgM vermittelte Bindung von MicroBeads an MACS+ Zellen .....	72
Abbildung 47 Homologe und heterologe Zellteilung .....	77
Abbildung 48 Mesomere Grenzformeln und Reduktion mit Farbumschlag von MTT .....	78
Abbildung 49 Transkriptome der multilinearen Differenzierung.....	84
Abbildung 50 TLR3 spezifische Aktivierung rezeptorassoziierter Gene und Beeinflussung von Phänotyp und Zellzyklus .....	92

## 7.2. Tabellen

Tabelle 1 Liste humaner Toll-like Rezeptoren.....	11
Tabelle 2 Minimale Kriterien zur Definition mesenchymaler Stammzellen [1] .....	18
Tabelle 3 TLR Expression oraler MSCs und der Einfluss proinflammatorischen Mediums in vitro .....	22
Tabelle 4 Reaktionsgemisch zur reversen Transkription.....	31
Tabelle 5 Primerliste zum Nachweis TLR3 assoziierter mRNA Transkription.....	31
Tabelle 6 Thermocycling im LightCycler bei RT-qPCR .....	32
Tabelle 7 Antikörper zur durchflusszytometrischen Bestimmung der G-MSK Marker .....	33
Tabelle 8 Primerliste zur Analyse MSC spezifischer mRNA Transkription.....	34
Tabelle 9 Ablauf der Paraffineinbettung der Mikromassen nach chondrogener Differenzierung .....	41
Tabelle 10 Färbeprotokoll nach chondrogener Differenzierung.....	41
Tabelle 11 Primerliste zur Analyse differenzierungsspezifischer mRNA Transkription .....	44
Tabelle 12 Statistische Auswertung der Zellzahl in 12 tägiger Stimulation mit Poly(I:C).....	59

### 7.3. Abkürzungen

<b>AAP</b>	<b>American Academy of Periodontology</b>
<b>AB-MSC</b>	<b>Alveolarbone proper stem/progenitor Cell</b>
<b>ACAN</b>	<b>Aggrecan;</b>
<b>ALP</b>	<b>alkaline phosphatase</b>
<b>AMP</b>	<b>Antimikrobielles Peptid</b>
<b>AP-1</b>	<b>Activator-Protein-1</b>
<b>ASC</b>	<b>Adulte Stammzellen</b>
<b>Asp</b>	<b>Asparagin</b>
<b>ATP</b>	<b>Adenosintriphosphat</b>
<b>BMP</b>	<b>Bone morphogenic protein</b>
<b>CD</b>	<b>Cluster of Differentiation</b>
<b>CDC</b>	<b>Centers of Disease Control and Prevention</b>
<b>CFU</b>	<b>Colony-forming Units</b>
<b>CLR</b>	<b>C-Typ Lectin Rezeptor</b>
<b>COX-2</b>	<b>Cyclooxygenase-2</b>
<b>CpG-ODN</b>	<b>CpG-Oligodesoxynukleotide</b>
<b>c-Src</b>	<b>cellular sarcoma</b>
<b>DFPC</b>	<b>Dental Follicle Progenitor Cells</b>
<b>DNA</b>	<b>Desoxyribonucleinsäure</b>
<b>DPSC</b>	<b>Dental Pulp Stem Cells</b>
<b>dsRNA</b>	<b>Doppelstrang RNA</b>
<b>ECD</b>	<b>Extrazelluläre Domäne</b>
<b>ELISA</b>	<b>Enzyme-linked Immunosorbent Assay (Spektrometrisches Verfahren)</b>
<b>EV</b>	<b>Extrazelluläre Vesikel</b>
<b>F<sub>ab</sub>-Region</b>	<b>Antigen bindende Antikörperregion</b>
<b>FADD</b>	<b>Fas-Associating Death Domain-Containing Protein</b>
<b>FasR</b>	<b>Rezeptortyp der TNF Klasse</b>
<b>F<sub>c</sub>-Region</b>	<b>Konstante Antikörperregion</b>
<b>GBR</b>	<b>Guided Bone Regeneration</b>
<b>gDNA</b>	<b>genome DNA</b>
<b>Glu</b>	<b>Glutamin</b>
<b>G-MSC</b>	<b>Gingival Mesenchymal Stem Cell</b>

## Anhang

<b>hESC</b>	<b>H</b> umane <b>e</b> mbrionale <b>S</b> tammzellen
<b>HPSC</b>	<b>H</b> ämatopoetische <b>S</b> tammzellen
<b>IFN</b>	<b>I</b> nterferon
<b>IgG</b>	<b>I</b> mmunglobulin <b>G</b>
<b>IKK(i/γ/ε)</b>	<b>I</b> κB <b>K</b> inase ( <b>i/γ/ε</b> )
<b>IL</b>	<b>I</b> nterleukin
<b>IL1-RA</b>	<b>I</b> nterleukin- <b>1</b> - <b>R</b> ezeptor- <b>A</b> ntagonist
<b>IRF</b>	<b>I</b> FN <b>r</b> egulatory <b>f</b> actor
<b>IκB</b>	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor
<b>JNK</b>	c-Jun <b>N</b> -terminal kinase
<b>KLF4</b>	<b>K</b> ruppel like factor <b>4</b>
<b>LEF1</b>	<b>L</b> ymphoid <b>E</b> nhancer <b>B</b> inding <b>F</b> actor <b>1</b>
<b>LPL</b>	lipoprotein lipase
<b>LPS</b>	<b>L</b> ipopolysaccharide (=Endotoxin)
<b>LRR</b>	<b>L</b> euclin <b>r</b> eiche <b>S</b> equenzen
<b>Lys</b>	<b>L</b> ysin
<b>MACS</b>	<b>M</b> agnetic <b>A</b> ctivated <b>C</b> ell <b>S</b> orting
<b>MAP-Kinase</b>	<b>m</b> itogen-activated <b>p</b> rotein kinase
<b>MD2</b>	Lymphocyte antigen 96
<b>M-G-MSC</b>	<b>M</b> esodermale <b>g</b> ingivale <b>m</b> esenchymale <b>S</b> tammzelle
<b>MHC I</b>	<b>m</b> ajor <b>h</b> istocompatibility complex class <b>I</b>
<b>MHC II</b>	<b>m</b> ajor <b>h</b> istocompatibility complex class <b>II</b>
<b>MKK</b>	<b>M</b> itogen-activated protein kinase kinase
<b>MMP</b>	<b>M</b> atrix <b>m</b> etalloproteinasen
<b>MPS</b>	<b>M</b> ononucleär- <b>p</b> hagozytäres <b>S</b> ystem
<b>MSC</b>	<b>M</b> esenchymale <b>S</b> tromazelle
<b>MSX-1</b>	<b>m</b> sh homeobox <b>1</b>
<b>MTT</b>	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
<b>MyD88</b>	<b>m</b> yeloid <b>d</b> ifferentiation primary response gene <b>88</b>
<b>NANOG</b>	<b>N</b> ANOG Homeobox
<b>NDP-SC</b>	<b>N</b> atal <b>D</b> ental <b>P</b> ulp <b>S</b> tem <b>C</b> ells
<b>NF-κB</b>	nuclear factor <b>κ</b> appa light-chain-enhancer of activated <b>B</b> cells
<b>N-G-MSC</b>	<b>G</b> ingivale <b>m</b> esenchymale <b>S</b> tammzelle der <b>N</b> euralleiste

<b>NDCs</b>	<b>non-communicable diseases</b>
<b>NK-Zellen</b>	<b>Natürliche-Killerzellen</b>
<b>NLR</b>	<b>Nod-like Receptor</b>
<b>NTD</b>	<b>N-terminale Domäne</b>
<b>Oct4</b>	<b>octamer- binding transcription factor 4</b>
<b>ON</b>	<b>Osteonektin</b>
<b>OPN</b>	<b>Osteopontin</b>
<b>P<sub>2</sub>YR<sub>1</sub></b>	<b>P<sub>2</sub>Y Purinrezeptor 1</b>
<b>p38</b>	<b>p38 mitogen-activated protein kinases</b>
<b>PA</b>	<b>Parodontitis</b>
<b>PAMPs</b>	<b>pathogen-associated molecular patterns;</b>
<b>PBS</b>	<b>Phosphatgepufferte Salzlösung</b>
<b>PCR</b>	<b>Polymerase-Kettenreaktion</b>
<b>PDL</b>	<b>Parodontales Ligament</b>
<b>PDLSC</b>	<b>Periodontal Ligament Stem Cells</b>
<b>PGE<sub>2</sub></b>	<b>Prostaglandin E<sub>2</sub></b>
<b>PGK-1</b>	<b>Phosphoglycerate kinase 1</b>
<b>Poly(I:C)</b>	<b>Polyinosinedeoxytydyllic Acid</b>
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	<b>peroxisome proliferator-activated receptor <math>\gamma</math></b>
<b>PRF</b>	<b>Platelet Rich Fibrin</b>
<b>PRR</b>	<b>Pattern-Recognition Receptor</b>
<b>qPCR</b>	<b>Real-Time-Quantification-Polymerase-Kettenreaktion</b>
<b>REX-1</b>	<b>RNA exonuclease 1 homolog</b>
<b>RHIM</b>	<b>RIP homotypic interaction motif</b>
<b>RIP</b>	<b>Receptor-interactin-protein</b>
<b>RLR</b>	<b>RIG-like-Receptor</b>
<b>RNA</b>	<b>Ribonukleinsäure</b>
<b>RT</b>	<b>Reverse Transkription</b>
<b>RT-qPCR</b>	<b>Real-Time-Quantification-Polymerase-Chainreaction</b>
<b>RUNX-2</b>	<b>Runt-related transcription factor 2</b>
<b>SC</b>	<b>Stammzellen</b>
<b>SCAP</b>	<b>Stammzellen der apikalen Papille</b>
<b>SHED</b>	<b>Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth</b>
<b>SOX</b>	<b>sex determining region Y- box containing gene</b>

<b>ssRNA</b>	Einzelstrang <b>RNA</b>
<b>StZG</b>	<b>Stammzellgesetz</b>
<b>TBK1</b>	<b>TANK Binding Kinase 1</b>
<b>T<sub>H</sub>-Zellen</b>	<b>T-Helferzellen</b>
<b>TIR</b>	<b>Toll/Interleukin-1 Rezeptor homologe Domäne</b>
<b>TIRAP</b>	<b>Toll-Interleukin-1 Rezeptor-Adapter-Protein</b>
<b>TLR</b>	<b>Toll-like Rezeptor</b>
<b>TRAF</b>	<b>TNF receptor associated factor</b>
<b>TRAM</b>	<b>TRIF-related adaptor molecule</b>
<b>TRIF</b>	<b>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-<math>\beta</math></b>
<b>T<sub>Zyt</sub>-Zellen</b>	<b>Zytotoxische T-Zellen</b>
<b>UCMSC</b>	<b>Umbilical cord mesenchymal stem cell</b>
<b>UPT</b>	<b>Unterstützende Parodontale Therapie</b>



## 7.4. Ethikvotum

MEDIZINISCHE FAKULTÄT  
DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL

ETHIK-KOMMISSION



A.D. 1665

Universitäts-Kinderklinik · Schwanenweg 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,

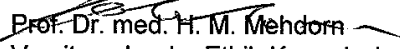
wir bestätigen den Eingang des obengenannten Antrages zur Beratung gemäß § 15 Berufsordnung (BO) der Ärztekammer Schleswig-Holstein. Nach Durchsicht der Unterlagen durch die Geschäftsstelle und durch mich als Vorsitzenden der Ethik-Kommission bestehen gegen die Durchführung der Studie keine berufsethischen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

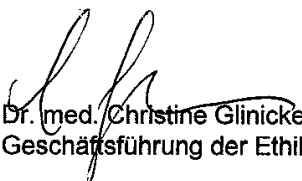
**Die im Folgenden aufgeführten Hinweise müssen beachtet werden:**

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

## 7.5. Einwilligungsbogen



Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
PD Dr. Karim Mohamed Fawzy El-Sayed, Klinik für Zahnerhaltung und Parodontologie  
Arnold-Heller Str. 3, Haus 26, 24105 Kiel, Tel. (+49)431/500-26210  
eMail: fawzyelsayed@konspar.uni-kiel.de

→ UNIVERSITÄTSKLINIKUM  
Schleswig-Holstein

Campus Kiel  
Klinik für Zahnerhaltung und  
Parodontologie  
Direktor: Prof. Dr. C. Dörfer

\_\_\_\_\_  
Name Patient

\_\_\_\_\_  
Geburtsdatum

### Informationsblatt und Einverständniserklärung für wissenschaftliche Untersuchungen an körpereigenem Material

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

nach Artikel 1 und 2 des Grundgesetzes haben Sie ein sogenanntes Informationelles Selbstbestimmungsrecht. Das bedeutet für die Medizin, dass wir wissenschaftliche Untersuchungen an körpereigenem Material nur durchführen dürfen, wenn Sie damit einverstanden sind und wenn wir Sie vorher darüber aufgeklärt haben. Diese Untersuchungen dienen der Erforschung von Krankheiten und der Entwicklung neuer Therapien und werden zum Nutzen von Patienten durchgeführt, auch wenn Sie im Einzelfall persönlich keinen Vorteil davon haben.

Wir bearbeiten in der Klinik, in der Sie behandelt werden, folgende wissenschaftliche Projekte:

- Untersuchungen zur Expression antimikrobieller Peptide und entzündungsrelevanter Gene im Parodontium (Zahnhalteapparat) und Endodont (Zahnmark)
- Untersuchungen zu parodontalen Stammzellen

Wir möchten aus gezogenen oder operativ entfernten Zähnen, sowie den Geweben des Zahnhalteapparates folgende biologische Bestandteile untersuchen: Schmelz, Dentin, Zahnmark, parodontale Gewebe.

Für die Entnahme der Proben erfolgt kein zusätzlicher Eingriff, sondern wir verwenden Material, das Ihnen im Rahmen der Diagnostik und Therapie sowieso entnommen wird. Wir untersuchen Persönlichkeitsmerkmale und Gene, die für Ihre Krankheit von Bedeutung sein könnten. Wir untersuchen jedoch keine Gene von Erbkrankheiten, die sich erst im späteren Leben zeigen. Alle Untersuchungen unterliegen streng dem Datenschutz und der ärztlichen Schweigepflicht, sind also für Unbefugte nicht zugänglich. Behörden, Versicherungen und "interessierte Institutionen" bekommen keine Auskunft. Ihre Gewebeproben und persönlichen Daten werden durch die Vergabe von Probennummern pseudonymisiert, so dass keine Zuordnung der von Ihnen gespendeten Körpermaterialien und Ihrer Daten zu Ihrer Person möglich ist. Da in der Medizin die Forschung in Netzwerken erfolgt, versenden wir die Proben eventuell auch an andere Labore, Institutionen und an die forschende Industrie. Auch dort wird der Datenschutz streng eingehalten. Aus der Teilnahme an dem Forschungsprojekt können Sie keine finanziellen Ansprüche ableiten. Die Gewebe werden höchstens 10 Jahre aufbewahrt und dann vernichtet. Wir danken Ihnen für die Unterstützung unserer Forschungsvorhaben!

-----

Ich wurde über das Vorhaben von einer Zahnärztin/einem Zahnarzt umfassend informiert und aufgeklärt und gebe mein Einverständnis freiwillig. Wenn ich nicht zustimme, habe ich keine Nachteile. Ich kann jederzeit ohne Angabe von Gründen meine Zustimmung widerrufen, In diesem Fall werden noch nicht anonymisierte Proben und Daten zu meiner Person vernichtet.

- Falls möglich, möchte ich über das Ergebnis der Untersuchungen informiert werden.
- Ich bin gegen eine Nutzung der Daten durch die Arzneimittelforschung.
- Wenn später andere als hier beschriebene Untersuchungen durchgeführt werden, möchte ich informiert werden und gebe dann eventuell erneut meine Zustimmung.

Kiel, den \_\_\_\_ . \_\_\_\_ . \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Unterschrift Patient/Patientin

\_\_\_\_\_  
Unterschrift Zahnarzt/Zahnärztin

Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Anstalt des öffentliche Rechts  
Zentrum Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde  
Klinik für Zahnerhaltung und Parodontologie  
Direktor: Prof. Dr. C. Dörfer



## 8. Danksagung

Es ist an der Zeit, Danke zu sagen:

An erster Stelle möchte ich meinem Abteilungsleiter Herrn Prof. Dr. Christof Dörfer für die Schaffung optimaler Rahmenbedingungen und eines offenen Arbeitsklimas danken.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Karim Mohamed Fawzy El-Sayed für die persönliche Förderung sowie viele Lektionen zur wissenschaftlichen Praxis, die stets Anregung und Inspiration waren.

Im Weiteren möchte ich meinem Betreuer Herrn Dr. Mohamed Mekhemar danken, dessen fachliche wie freundschaftliche Unterstützung mich während des gesamten Projektes begleitet haben.

Ohne die Hilfe von Frau Mojgan Paymard-Stolz, Frau Regina Marquard und Frau Kerstin Marx wäre diese Arbeit nicht durchführbar gewesen. Ihre Erfahrung und ihr Rat stellten einen unschätzbaren Wert dar.

Für die Beschaffung des Patientenmaterials und die freundliche Unterstützung gilt mein Dank außerdem Herrn Dr. Dr. Andreas Kerscher.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern Dr. Elisabeth Temmen-Tölle und Dr. Franz Heinrich Tölle, meinem Bruder Christian Tölle sowie meinen Freunden danken, deren Unterstützung und Zuspruch stets einen wesentlichen Quell für Motivation und Zielstrebigkeit dargestellt haben. Mein erweiterter Dank gilt meinem Großvater Dr. Gustav Temmen, der zwar nicht mehr die Möglichkeit hatte, direkten Einfluss auf die Arbeit auszuüben, dessen histologische Präparate aber dennoch als Illustrationen Einzug in diese Arbeit erhielten.

## 9. Akademischer Lebenslauf

### Persönliche Angaben

Name: Johannes Tölle  
geboren am: 29.04.1994  
Geburtsort: Münster

### Bildungsweg

#### 2004 - 2013 Gymnasium Dionysianum Rheine

2010 Auslandsaufenthalt: Rossall School, Fleadwood, GB  
2013 Abschluss der Schule unter Erlangung der allgemeinen Hochschulreife

#### 2013 - 2018 Studium der Zahnmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

2014 Naturwissenschaftliche Vorprüfung (Primus)  
2016 Zahnärztliche Vorprüfung  
seit 2017 Promotion an der Klinik für Zahnerhaltung und Parodontologie des UKSH  
2018 Staatsexamen (Primus)

#### seit 2019 Promotionsstudium an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

seit 2019 Unterstützung der Doktorandenbetreuung

#### seit 2019 Studium der Medizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

### Beruflicher Werdegang

seit 2020 **Assistenz Zahnarzt** in der Klinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie Universitätsklinikum Schleswig-Holstein-Campus Kiel, Christian-Albrecht-Universität zu Kiel, Leiter Prof. Dr. C. Dörfer

seit 2020 **Wissenschaftlicher Mitarbeiter** in der Klinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie Universitätsklinikum Schleswig-Holstein-Campus Kiel, Christian-Albrecht-Universität zu Kiel, Leiter Prof. Dr. C. Dörfer; Laborleiter: PD Dr. K.M.F. El-Sayed

### Ehrenamtliche Tätigkeiten

seit 2013 Organisationsmitglied des "Teddybärkrankenhaus Kiel"

## 10. Publikationen

### **TLR3-Mediated Stemness Regulation in Gingival Stem Cells**

Mohamed Mekhemar\*, Johannes Tölle, Mojgan Paymard-Stolz, Christof Dörfer, Karim Mohamed Fawzy El-Sayed

*Journal of Clinical Periodontology: Volume 45, Issue S19, Special Issue: Abstracts of EuroPerio 9 Amsterdam, the Netherlands, 20-23 June, 2018, DOI: 10.1111/jcpe.39\_12914*

### **CFUs and Proliferation Regulation in Poly (I:C)-ligated Gingival Stem Cells**

Mohamed Mekhemar\*, Johannes Tölle, Mojgan Paymard-Stolz, Christof Dörfer, Karim Mohamed Fawzy El-Sayed

*Journal of Dental Research: Special Issue 98A: ID3392, IADR/AADR/CADR 97<sup>th</sup> General Session, Vancouver, BC, Canada, June 19-22, 2019*

### **TLR3 ligation affects differentiation and stemness properties of gingival mesenchymal stem/progenitor cells**

Mohamed Mekhemar\*, Johannes Tölle\*, Mojgan Paymard-Stolz, Christof Dörfer, Karim Mohamed Fawzy El-Sayed

*J Clin Periodontol. 2020 Aug;47(8):991-1005. doi: 10.1111/jcpe.13323. Epub 2020 Jun 11. PMID: 32473038*

### **Hyperbaric oxygen and inflammation human G-MSCs properties**

Johannes Tölle\*, Dirk Finger, Mojgan Paymard-Stolz, Dominik Schulte, Andreas Koch, Christian Graetz, Christof Dörfer, Mohamed Fawzy El-Sayed

*Journal of Dental Research: Special Issue 99A: ID2685, IADR/AADR/CADR General Session 98<sup>th</sup> General Session, Washington D.C., USA, March 18-21, 2020*

### **Im Druck**

#### **Toll-Like Receptor 3: A Multifunctional Regulator of MSCs**

Mohamed Mekhemar\*, Johannes Tölle\*, Karim Mohamed Fawzy El-Sayed

*Stem cells: From Promise to Realism Vol. 2, Chapter-45: Toll-like receptor 3: a multifunctional regulator of Mesenchymal Stem Cells, 2021*

### **Im Review**

#### **Three-dimensional image quantification: A novel perspective on G-MSC characterization?**

Johannes Tölle\*, Mohamed Mekhemar, Regina Marquard, Mojgan Paymard-Stolz, Christof Dörfer, Karim Mohamed Fawzy El-Sayed

*IADR/AADR/CADR General Session 99<sup>th</sup> General Session, Boston, USA, July 21-24, 2021*

### **Aktuelle Projekte**

#### **Effect of hyperbaric oxygen and inflammation on human G-MSCs regenerative properties**

Johannes Tölle\*, Dirk Finger\*, Andreas Koch\*, Dominik Schulte\*, Christian Graetz, Wataru Kaehler, Kristina Schlicht, Christof Dörfer, Karim Fawzy El-Sayed

#### **Thymoquinone depending TLR expression on human gingival mesenchymal stem cells**

Mohamed Mekhemar\*, Johannes Tölle\*, Christof Dörfer, Mohamed Fawzy El-Sayed

*(Erstautorschaften/Präsentatoren sind mit \* gekennzeichnet)*

## **11. Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere hiermit an Eides Statt, dass meine Dissertation, abgesehen von Ratschlägen meines Betreuers/meiner Betreuerin und meiner sonstigen akademischen Lehrer, nach Form und Inhalt meine eigene Arbeit ist, dass ich keine anderen als die in der Arbeit aufgeführten Quellen und Hilfsmittel benutzt habe, und dass meine Arbeit bisher keiner anderen akademischen Stelle als Dissertation vorgelegen hat, weder ganz noch in Teilen.

---

Datum, Unterschrift Doktorand