

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

Expressionsprofil der Toll-like-Rezeptoren von Stamm-/Vorläuferzellen aus der apikalen Zahnpapille

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

vorgelegt von
Christian Fehrmann
aus Preetz

Kiel 2021

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

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

Tag der mündlichen Prüfung: 05.05.2022

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 18.01.2022
gez.: Prof. Dr. Franziska Theilig
(Vorsitzende der Prüfungskommission)

Inhaltsverzeichnis

I.	Abkürzungen	IV
II.	Abbildungsverzeichnis.....	VI
III.	Tabellenverzeichnis	VI
1.	Einleitung.....	1
1.1	Die Pulpa.....	1
1.1.1	Anatomie und Funktionen.....	1
1.1.2	Rolle während Zahnentwicklung	2
1.1.3	Die apikale Papille	3
1.1.4	Regenerative Endodontologie (RET)	4
1.2	Immunabwehr	5
1.2.1	Die angeborene/unspezifische Immunabwehr	6
1.2.2	Die adaptive/spezifische Immunabwehr.....	7
1.3	Humane Mesenchymale Stamm-/Progenitorzellen (MSCs).....	8
1.3.1	Allgemeines	8
1.3.2	Immunregulative Funktionen von MSCs	9
1.3.3	Quellen von MSCs.....	9
1.3.3.1	Übersicht: orale MSCs	10
1.3.3.2	Stammzellen der apikalen Papille (SCAPs)	10
1.4	Toll-like Rezeptoren (TLRs).....	12
1.4.1	Allgemeines	12
1.4.2	Die verschiedenen Toll-like Rezeptoren.....	12
1.4.3	Aktivierung und Signalwege	14
1.4.4	TLRs und MSCs.....	17
1.5	Zielsetzung dieser Arbeit.....	19
2.	Material und Methoden	20
2.1	Gewinnung und Kultivierung der Stammzellen.....	20
2.1.1	Ethikvotum	20
2.1.2	Gewinnen von Gewebe und Kultivierung von Zellen	20
2.1.3	Zellpassage	21
2.1.4	Isolierung der Stammzellen: magnetic-activated cell-sorting (MACS).....	21
2.1.4.1	Vorbereitung	21
2.1.4.2	Antikörperbindung: STRO-1 und Microbeads	21
2.1.4.3	Sortierung.....	22

2.1.5	Isolierung einzelner Kolonien	22
2.2	Nachweis der Stammzeleigenschaften	22
2.2.1	Kolonie-bildende Einheiten (KBE).....	22
2.2.2	Multilineare Differenzierung der Stammzellen und Färbung der differenzierten Zellkulturen	23
2.2.2.1	Osteogene Differenzierung	23
2.2.2.2	Adipogene Differenzierung	23
2.2.2.3	Chondrogene Differenzierung.....	24
2.2.3	Messung MSCs-spezifischer Oberflächenantigene mittels Durchflusszytometrie (fluorescence-activated cell-sorting, FACS).....	24
2.3	Entzündungsmedium.....	25
2.4	TLR-Expressionsprofil	25
2.4.1	Expressionsprofil auf m-RNA-Ebene.....	25
2.4.1.1	RNA-Extraktion	25
2.4.1.2	RNA-Messung	26
2.4.1.3	cDNA-Synthese durch Reverse Transkription (RT)	26
2.4.1.4	Durchführung Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (real-time polymerase chain reaction, rt-PCR)	27
2.4.2	Expressionsprofil auf Proteinebene (Durchflusszytometrie)	28
2.4.2.1	Messung der extrazellulären TLRs.....	28
2.4.2.2	Messung der intrazellulären TLR.....	28
2.5	Statistische Auswertung.....	29
3.	Ergebnisse	30
3.1	Zellwachstum aus Gewebefragmenten.....	30
3.2	Nachweis der Stammzeleigenschaften der MACS-positiven Zellen.....	30
3.2.1	Nachweis der Kolonie-bildenden Einheiten (KBE).....	30
3.2.2	Expression der CD-Oberflächenantigene	31
3.2.3	Multilineare Differenzierung	31
3.2.3.1	Osteogene Differenzierung	32
3.2.3.2	Adipogene Differenzierung	32
3.2.3.3	Chondrogene Differenzierung.....	33
3.3	Expressionsprofil der Toll-like-Rezeptoren auf mRNA-Ebene	34
3.4	Expressionsprofil der Toll-like-Rezeptoren auf Proteinebene	36
4.	Diskussion.....	38
4.1	Methoden.....	38
4.1.1	Gewebegewinnung und Zellkultivierung.....	38
4.1.2	Isolierung der SCAPs durch „magnetic-activated cell-sorting“ (MACS)	39

4.1.3	Feststellung der Stammzeleigenschaften.....	40
4.1.3.1	CD-Oberflächenmarker	40
4.1.3.2	Multilineare Differenzierungspotential.....	41
4.1.3.3	Kolonienbildung: KBE-Assay	41
4.1.4	Analyse der TLR-Expression.....	42
4.1.4.1	Stimulation mit Entzündungsmedium.....	42
4.1.4.2	Analyse auf mRNA-Ebene mittels quantitativer Echtzeit-PCR	42
4.1.4.3	Analyse auf Proteinebene mittels Durchflusszytometrie.....	43
4.2	Ergebnisse	43
5.	Zusammenfassung.....	48
6.	Literaturverzeichnis.....	49
7.	Anhang	65
7.1	Übersicht Material.....	65
7.1.1	Verbrauchsmaterial: Kultur- und Reagenzgefäße, Einmalprodukte	65
7.1.2	Medien und Reagenzien.....	65
7.1.3	Antikörper	66
7.1.4	Reaktionssysteme.....	67
7.1.5	Primer	67
7.1.6	Geräte.....	68
7.2	Ethikvotum	69
7.3	Vorlage Einwilligungsbogen	70
8.	Danksagung	72

Anmerkung: Für eine bessere Lesbarkeit wird im folgenden Text darauf verzichtet, geschlechtsspezifische Formulierungen zu verwenden. Es wird die Sprachform des generischen Maskulinums verwendet, welches gleichermaßen auf Angehörige aller Geschlechter bezogen werden soll.

I. Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Complementary DNA (komplementäre DNS)
CFU (KBE)	Colony forming unit (Kolonie-bildende Einheit)
DPSC	Dental pulpal stem cells (MSC der Pulpa)
dsRNA	Double-stranded RNA (doppelsträngige RNA)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EZM	Extrazellulärmatrix
FACS	Fluorescence-activated cell-sorting (Durchflusszytometrie)
FBS/FCS	Fetal bovine serum/fetal calf serum (fetales Kälberserum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
gDNA	Genomische DNA
GMSC	Gingival margin-derived stem cell (MSCs der Gingiva)
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN	Interferon
IGF	Insuline-like growth factor (Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor)
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	Leucin-rich repeat (Leucin-reiche Wiederholung)
MACS	Magnetic-activated cell-sorting
MEM	Minimum Essential Medium
MHC	major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
mRNA	Messenger RNA
MSCs	Mesenchymal stem/stromal cell (mesenchymale Stammzelle)
MTA	Mineraltrioxidaggregat
NK-Zellen	Natural killer cells (natürliche Killerzellen)
NO	Stickstoffmonoxid
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns (Pathogen-assoziierte molekulare Muster)

PRR	Pattern recognition receptors (Mustererkennungsrezeptoren)
PBS	Phosphate-buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PE	Phycoerythrin
RET	Regenerative endodontics treatment (regenerative Endodontologie)
RT	Reverse Transkription/Transkriptase
RT-PCR	Real-time polymerase chain reaction (Echtzeit-Polymerasekettenreaktion)
SCAP (-i)	Stem cells of the apical papilla (-inflammation) (Stammzellen der apikalen Papille (unter Entzündung))
ssRNA	Single-stranded RNA (einzelsträngige RNA)
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
UPM	Umdrehungen pro Minute

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Unfertig ausgebildeter Weisheitszahn mit apikaler Papille.....	3
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Immunabwehr-Komponenten	6
Abbildung 3: Schematische Darstellung von Quellen oraler MSCs	10
Abbildung 4: Schematische Darstellung der TLR-Signalwege	15
Abbildung 5: Zahn mit abgetrennten apikalen Papillen.....	20
Abbildung 6: Gewebe und auswachsende Zellen	30
Abbildung 7: Kolonienbildung der ausgesäten SCAPs nach Färbung.....	30
Abbildung 8: FACS-Analyse der CD-Oberflächenmarker von SCAPs (x-Achse: Fluoreszenzintensität, y-Achse: relative Zellzahl, grüne Kurve Isotypkontrolle).....	31
Abbildung 9: Färbeergebnis nach osteogener Differenzierung (A) bzw. Kontrolle (B).....	32
Abbildung 10: Färbeergebnis nach adipogener Differenzierung (A) bzw. Kontrolle (B).....	32
Abbildung 11: Färbeergebnis nach chondrogener Differenzierung (A) bzw. Kontrolle (B)	33
Abbildung 12: Grafische Darstellung der relativen TLR-Expression auf mRNA-Ebene unter normalen (A) und entzündlichen (B) Umgebungsbedingungen, Median/Q25/Q75, n=8, rot/grün: verringerte/erhöhte Expression, * signifikante Änderung, o Ausreißer	35
Abbildung 13: Grafische Darstellung der relativen TLR-Expression auf Protein-Ebene unter normalen (A) und entzündlichen (B) Umgebungsbedingungen, Median/Q25/Q75, n=8, rot/grün: verringerte/erhöhte Expression, * signifikante Änderung, o Ausreißer	37

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TLR-Expression verschiedener MSCs	17
Tabelle 2: Protokoll FACS CD-Marker	25
Tabelle 3: Reaktionsansatz Eliminierung gDNA.....	26
Tabelle 4: Reaktionsansatz RT	27
Tabelle 5: Reaktionsansatz PCR.....	27
Tabelle 6: Protokoll FACS TLR extrazellulär	28
Tabelle 7: Protokoll FACS TLR intrazellulär.....	29
Tabelle 8: Relative TLR-Expression auf mRNA-Ebene von SCAP und SCAP-i, Median; Q25/Q75, n=8 .	34
Tabelle 9: Relative TLR-Expression auf Proteinebene von SCAP und SCAP-i, Median; Q25/Q75, n=8 .	36

1. Einleitung

1.1 Die Pulpa

1.1.1 Anatomie und Funktionen

Unter den Zahnhartsubstanzen Schmelz und Dentin befindet sich die Pulpa, der weichgewebige Kern der Zähne, und füllt die Pulpakammer sowie das Wurzelkanalsystem aus. Sie ist mesenchymalen Ursprungs und steht in engem Kontakt zum Dentin. Aufgrund dieser engen Beziehung wird der Pulpadentin-Komplex als eine funktionelle Einheit angesehen [Goldberg/Lasfargues, 1995]. Zum Parodontium kommuniziert die Pulpa hauptsächlich über das Foramen apicale. Weiterhin können auch akzessorische Seitenkanäle oder Furkationskanäle vorkommen [Cohen/Hargreaves, 2006; Lowman et al., 1973]. Auf histologischer Ebene betrachtet zeigt die Pulpa einen geschichteten Aufbau. Richtung zentral liegen unter dem Dentin die Zellkörper der Odontoblasten, eine zellarme Zone („Weil-Zone“), eine zellreiche Zone sowie ein Nerven- und Gefäß-Plexus [Cohen/Hargreaves, 2006].

Insgesamt besteht die Pulpa aus einer bindegewebigen Grundsubstanz, in die Zellen, Blutgefäße und Nervenfasern eingelagert sind. Die Grundsubstanz ist aus Kollagen Typ I und II aufgebaut, zusammen mit Fibronectin sowie einen großen Anteil an Proteoglykanen, welche sich aus verschiedenen Glykosaminoglykanen zusammensetzen. Diese Extrazellulärmatrix (EZM) verändert sich in ihrer Zusammensetzung mit fortschreitender Zahnentwicklung [Mangkornkarn/Steiner, 1992; Linde, 1985]. Eingebettet in diese Grundsubstanz sind viele verschiedene Zellen: An der Grenze zum Dentin liegen die Odontoblasten, welche sich mit ihren Ausläufern ins Dentin erstrecken und zeitlebens Dentin produzieren. Zahlenmäßig am stärksten vertreten sind Fibroblasten, welche in der Pulpa für den Umsatz der EZM zuständig sind [Cohen/Hargreaves, 2006]. Daneben finden sich diverse Zellen der Immunabwehr, was die Pulpa zur Initiierung von Immunantworten befähigt [Jontell et al., 1998]: Makrophagen, dendritische Zellen, T-Lymphozyten und Mastzellen [Cohen/Hargreaves, 2006]. Weiterhin gibt es mit den dentalen pulpalen Stammzellen (DPSCs) in der Pulpa eine Population von mesenchymalen Stammzellen [Gronthos et al., 2000]. Am Apex treten viele Axone unterschiedlicher Myelinisierung in den Zahn ein [Johnsen/Johns, 1978]. Hierbei handelt es sich hauptsächlich um sensorische A- δ - und C-Fasern, welche durch sympathische Fasern ergänzt werden. Nachdem sie durch den Wurzelkanal die Kronenpulpa erreichen, bilden sie nahe des Odontoblastensaumes den „Raschkow-Plexus“ und ziehen teilweise bis zu 100 μ m in die Dentinkanälchen hinein [Cohen/Hargreaves, 2006]. Neben Nervenfasern ziehen auch Blutgefäße am Apex in die Pulpa. Als Endstromgebiet ist die Pulpa zur Versorgung auf die an der Wurzelspitze eintretenden Arteriolen angewiesen. Diese stehen in engem Kontakt zu Nerven des vegetativen Nervensystems [Cohen/Hargreaves, 2006] und reagieren sensibel auf vasoaktive Substanzen [Yu et al., 2002]. Daneben

ist die Blutzufuhr über arterio-venöse Anastomosen regulierbar, was den Ausgleich von Blutdruckschwankungen ermöglicht. In der Kronenpulpa bilden die Blutgefäße ein Kapillarnetzwerk unterhalb der Odontoblasten [Takahashi et al., 1982].

Analog zu seinen verschiedenen Bestandteilen erfüllt das Pulpagewebe diverse Funktionen: (1) Die Odontoblasten haben als hartschubstanzbildende Zellen eine formative Aufgabe. Sie bilden während der Odontogenese das Primärdentin und lebenslang Sekundärdentin [Bleicher, 2014]. (2) Kommt es zu einer kariösen oder traumatisch bedingten Schädigung eines Zahnes, zeigt sich die defensive Funktion der Pulpa. Es entsteht ein entzündliches Milieu (Pulpitis) mit Einwirken von zellulären und humoralen Abwehrkomponenten (s.o.) [Jontell et al., 1998]. Weiterhin reagieren die Odontoblasten auf einen Reiz mit der lokalen Sklerosierung der Dentinkanälchen sowie der Bildung von irregulärem Tertiärdentin [Stanley et al., 1983]. (3) Über die hauptsächlich apikal eintretenden Gefäße wird die nutritive Funktion der Pulpa sichergestellt. Unter den oralen Geweben weist die Pulpa den höchsten Blutfluss auf [Cohen/Hargreaves, 2006]. (4) Die afferenten Nervenfasern dienen der sensorischen Funktion, welche potentielle Schäden am Zahn fortleiten und daneben für die Regulierung des Blutflusses zuständig sind [Cohen/Hargreaves, 2006].

1.1.2 Rolle während Zahnentwicklung

In der sechsten Embryonalwoche kommt es lokalisiert durch Proliferation des oralen Ektoderms zur Bildung des odontogenen Epithels. Von diesem nimmt die Bildung der Zähne ihren Ausgang. Beginnend mit einer Epithelaussprossung bilden sich verschiedene Stadien (Knospe, Kappe, Glocke) des Schmelzorgans (spätere Zahnkrone), welche mit fortschreitendem Wachstum die mesenchymale Zahnpapille (spätere Zahnpulpa) umschließen. Das Schmelzorgan wird durch das innere und äußere Schmelzepithel begrenzt. Um dieses ganze Gebilde herum entsteht das Zahnsäckchen, welches den späteren Zahnhalteapparat formen wird. In die Zahnpapille wachsen von apikal Blutgefäße und Nervenfasern ein. Induziert durch die Papille entwickeln sich die Zellen des inneren Schmelzepithels zu Vorläufern der Ameloblasten (Schmelzbildner). Sie sind von der Papille durch eine Basalmembran getrennt. Durch die Basalmembran induziert ordnen sich die Zellen nahe des Schmelzorgans zu Vorläufern der Odontoblasten (Dentinbildner) an. Mit dem Beginn der Dentinogenese durch diese Zellen wird die Papille zur Pulpa. Die Prä-Ameloblasten differenzieren zu sekretorischen Ameloblasten und beginnen mit der Amelogenese [Jernvall/Thesleff, 2012; Cohen/Hargreaves, 2006; Linde/Goldberg, 1993].

Insgesamt liegen, wie bei der Frühentwicklung der Zähne, auch der Bildung der Zahnkrone eine Kette von verschiedenen wechselseitigen Induktionsvorgängen zwischen Schmelzorgan und Zahnpapille

zugrunde [Lan et al., 2014]. Die Zellen der Zahnpapille (spätere Pulpa) sind hierbei vielfältig eingebunden und stellen die Quelle der Odontoblasten dar, was im fertig ausgebildeten Zahn als enge funktionelle Verbindung von Dentin und Pulpa im Pulpa-Dentin-Komplex (s. 1.1.1) wiederzufinden ist.

Die Bildung der Wurzel beginnt mit dem Abschluss der Kronenbildung. Äußeres und inneres Schmelzepithel wachsen aneinander liegend als Hertwigsche Epithelscheide in Richtung der prospektiven Wurzelspitze und trennen dabei die dentale Papille vom Zahnsäckchen. Induziert durch die Wurzelscheide differenzieren die Zellen der Papille entlang dieser zu Odontoblasten und beginnen mit der Bildung von Wurzeldentin. Bald danach beginnt die Epithelscheide Lücken auszubilden. Dies hat zur Folge, dass die Zellen des Zahnsäckchens mit dem bereits gebildeten Wurzeldentin in Kontakt treten, was sie zur Bildung von Zement und Desmodontalfasern induziert [Huang/Chai, 2012; Sonoyama et al., 2007].

Durch die fortschreitende Dentinogenese wird die mesenchymale Zahnpapille zur Pulpa des entstehenden Zahnes. Die Lokalisation der Zahnpapille wird deshalb und durch das von koronal nach apikal fortschreitende Zahnwachstum bedingt immer weiter nach apikal verschoben.

1.1.3 Die apikale Papille

Die apikale Papille ist der während des Wurzelwachstums noch nicht zur Pulpa gewordene Anteil der ursprünglichen Zahnpapille. Sie stellt sich als glattes Weichgewebe dar, welches sich am Apex der sich entwickelnden Zahnwurzel befindet (Abb. 1). Histologisch betrachtet ist sie von der im Wurzelkanal befindlichen Pulpa durch eine zellreiche Schicht getrennt. Im Vergleich zur Pulpa weist die apikale Papille weniger Blutgefäße und zelluläre Komponenten auf [Sonoyama et al., 2008]. Eine Bedeutung der apikalen Papille zeigt sich nach Entfernen derselben während der Wurzelbildung: Ohne apikale Papille wird das Wurzelwachstum nicht vollendet. Allerdings ist unklar, ob dies alleine durch das Entfernen der Papille hervorgerufen wird oder im Zusammenhang mit der Hertwigsche Epithelscheide steht [Huang et al., 2008].



Abbildung 1: Unfertig ausgebildeter Weisheitszahn mit apikaler Papille

Die apikale Papille ist Quelle einer Population mesenchymaler Stammzellen („stem cells of the apical papilla“, SCAP, s. 1.3.3.2). Als ein sich noch in der Entwicklung befindliches Gewebe ist die apikale Papille für die Stammzellisolation und -forschung besonders interessant und weist gegenüber anderen

Gewebe dieser Art einen entscheidenden Vorteil auf. Sie ist relativ einfach erreichbar, typischerweise im Rahmen der Weisheitszahnentfernung bei noch unvollständig abgeschlossenem Wurzelwachstum [Sonoyama et al., 2006]. Kommt es aufgrund einer kariösen Läsion oder eines Traumas zu einer Pulpitis oder einer Nekrose der Pulpa, so werden aufgrund der engen anatomischen Beziehung auch die apikale Papille sowie die darin befindlichen SCAPs (s. 1.3.3.2) mit beeinflusst. Besonders irreversible Pulpitiden und Nekrosen führen in der Papille zu einer starken Reduktion der Zelldichte, während reversible Pulpitiden die apikalen Gewebe in dieser Hinsicht nicht affektieren [Ricucci et al., 2017].

1.1.4 Regenerative Endodontologie (RET)

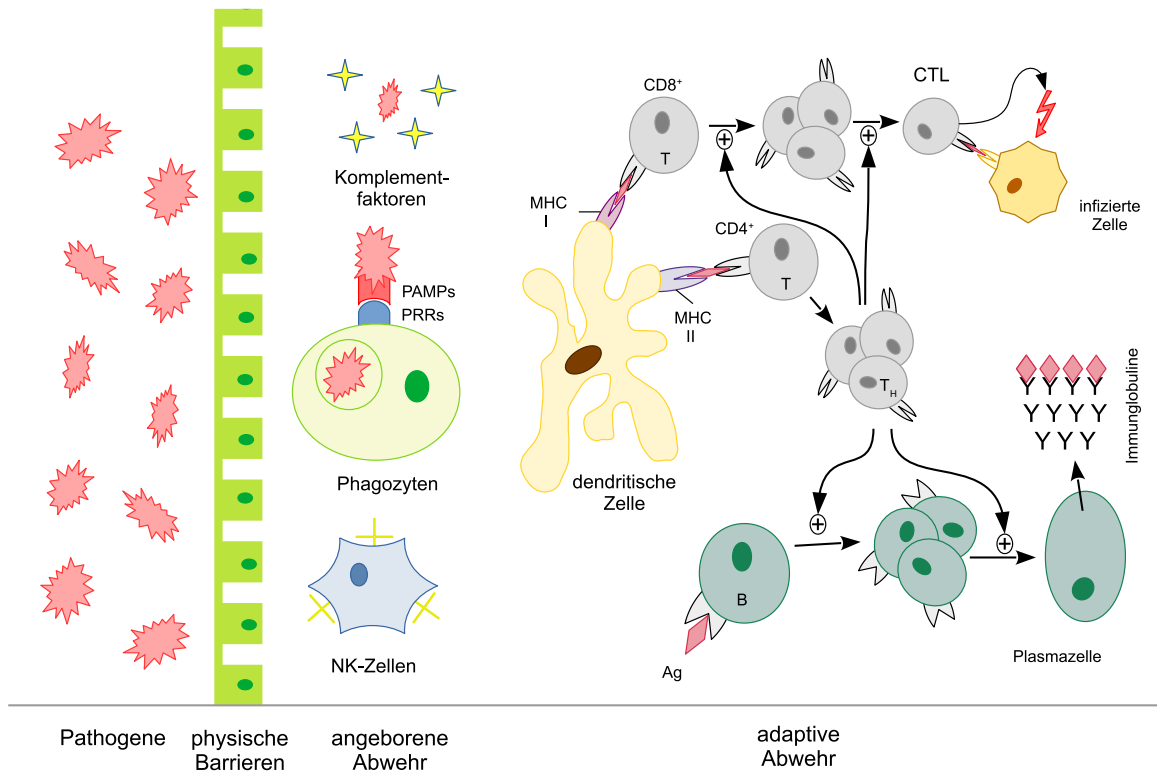
Die standardisierte therapeutische Maßnahme bei nekrotischen Zähnen ohne abgeschlossenes Wurzelwachstum ist die Apexifikation mit anschließender Wurzelfüllung. Hierbei wird am apikalen Ende des Wurzelkanalsystems typischerweise durch eine zu wechselnde Einlage aus Kalziumhydroxid eine Hartgewebsbildung induziert oder Mineraltrioxidaggregat (MTA) eingebracht, um den Apex zu verschließen [Chala et al., 2011; Rafter, 2005]. Nachteilig hierbei ist, dass das Wurzelwachstum nicht vollendet wird und der betroffene Zahn devital bleibt. Eine Apexifikation und die damit verbundenen Nachteile zu umgehen, ist der Gedanke der regenerativen Endodontologie (RET). Hierbei soll das kranke Pulpagewebe entfernt und durch gesundes Gewebe ersetzt werden, um den Zahn zu revitalisieren [Murray et al., 2007], indem idealerweise der Pulpa-Dentin-Komplex wiederhergestellt wird. Dabei sind die Ziele, dass (1) alle Symptome verschwinden und der apikale Knochen heilt, (2) die Wurzel in Länge und Wandstärke zunimmt und (3) ein Sensibilitätstest ein positives Ergebnis hat [American Association of Endodontists AAE, 2016]. Damit unterscheidet sich die RET in den Punkten zwei und drei von der konventionellen Therapie. Die für die RET verwendeten Komponenten basieren dabei auf dem Konzept des „Tissue Engineering“, namentlich Wachstumsfaktoren, ein biomimetisches Gerüst sowie Stamm-/Vorläuferzellen [Nakashima/Akamine, 2005]. Eine mögliche klinische Anwendung beschreibt dabei die Desinfektion des Kanalsystems mit anschließender Überinstrumentierung über den Apex hinaus, um ein Einbluten in den Kanal und damit ein Einschwemmen von mesenchymalen Stammzellen aus der periapikalen Region [Lovelace et al., 2011] zu erzeugen [American Association of Endodontists AAE, 2016]. Zusammen mit diesen würden im Blut enthaltene Wachstumsfaktoren („platelet-derived growth factors“) in das Kanalsystem gelangen [Lubkowska et al., 2012]. Ergänzend dazu könnte das entstehende Blutkoagulum als Matrix dienen [Thibodeau et al., 2007], während eine Spülung der Kanäle mit EDTA durch die hervorgerufene Demineralisierung des Dentins dort eingebettete Wachstumsfaktoren freisetzt [Galler et al., 2015]. Mit Stammzellen, Wachstumsfaktoren und einer Matrix sind so alle nötigen Bausteine für eine Geweberegeneration gegeben [Saoud et al., 2016].

In Studien konnte dabei die Bildung von dentin-/pulpaähnlichem Gewebe aufgezeigt werden [Huang et al., 2010]. Histologisch zeigte sich in klinischen Studien jedoch immer die Bildung von knochen- und zementähnlichen Geweben, [Nosrat et al., 2015; Torabinejad et al., 2014], was für eine Produktion durch Zellen des Zahnhalteapparates spricht.

1.2 Immunabwehr

Das Immunsystem verteidigt unseren Körper gegen verschiedenste pathogene Einflüsse von außen oder innen. Dabei erfüllt es die Aufgabe vom Erkennen von Pathogenen und Vernichtung dieser bei gleichzeitiger Selbsttoleranz [Beutler, 2004]. Die weitverzweigten Interaktionen dieses Systems beruhen auf dem Zusammenspiel zwischen lymphatischen Organen, zellulären Mechanismen, humoralen Faktoren und Zytokinen. Abhängig von Geschwindigkeit und Spezifität lassen sich die verschiedenen Funktionen in zwei Gruppen einteilen: die angeborene und die adaptive Immunabwehr (Abb. 2). Die Mechanismen der angeborenen Abwehr bieten mit wenig spezifischen Maßnahmen eine unverzügliche Reaktion auf Pathogene, während die adaptive Abwehr für ihre sehr spezifischen Reaktionen Tage bis Wochen braucht. Gleichzeitig verfügt sie über ein Gedächtnis, welches die sofortige spezifische Bekämpfung bekannter Pathogene bei erneutem Kontakt ermöglicht [Parkin/Cohen, 2001]. Insgesamt arbeiten beide Systeme nicht einzeln füreinander, sondern eng miteinander zusammen. Zur Erkennung von Pathogenen nutzt die angeborene Abwehr diverse Mechanismen und aktiviert die verschiedenen Antworten der adaptiven Abwehr über dendritische Zellen als Antigen-präsentierende Zellen (APZ) [Iwasaki/Medzhitov, 2015].

Die vielen Effekte dieser Systeme werden oftmals erst dann bemerkbar, wenn es z.B. aufgrund von Allergien, Immunschwäche oder Autoimmunerkrankungen zu einer Fehlregulation kommt.



- | | |
|----------------|---|
| Ag | Antigene |
| CTL | Zytotoxische T-Zellen |
| MHC | Haupthistokompatibilitätskomplex („major histocompatibility complex“) |
| NK-Zellen | Natürliche Killerzellen |
| PAMPs | Pathogen-assoziierte molekulare Muster („Pathogen-associated molecular patterns“) |
| PRRs | Mustererkennungsrezeptoren („Pattern-Recognition-Rezeptoren“) |
| T _H | T(-Helfer) -Zellen |
- [Seifert/Küppers, 2016; Iwasaki/Medzhitov, 2015; Bonilla/Oettgen, 2010; Chaplin, 2010; Le Friec/Kemper, 2009; Lanier, 2005; Medzhitov/Janeway, 2000; Miller/Mitchell, 1968]

Abbildung 2: Schematische Darstellung der Immunabwehr-Komponenten

1.2.1 Die angeborene/unspezifische Immunabwehr

Die erste Hürde für eindringende Pathogene stellen physische Barrieren wie Epithelien und der teilweise darauf befindliche Schleim dar [Chaplin, 2010]. Weiterhin stehen humorale Komponenten wie das Komplementsystem zur Opsonierung und Lyse von Keimen bereit [Le Friec/Kemper, 2009]. Neben diesen Komponenten besitzt die angeborene Abwehr auch durch Abwehrzellen die Möglichkeit, Pathogene über charakteristische Strukturen wie z.B. bakterielle Lipopolysaccharide, Peptidoglykane, Lipoteichonsäure, bakterielle DNA oder doppelsträngige RNA, welche nicht im eigenen Körper vorkommen, zu erkennen. Diese Strukturen werden als „Pathogen-assoziierte molekulare Muster“ („Pathogen-associated molecular patterns“, PAMPs) bezeichnet und sie werden von „Mustererkennungsrezeptoren“ („Pattern-Recognition-Rezeptoren“ (PRRs)) erkannt [Medzhitov/Janeway, 2000]. PRRs sind Gen-codierte Rezeptoren und werden beispielsweise auf

Phagozyten wie Makrophagen und Neutrophilen Granulozyten oder den dendritischen Zellen als Bindeglied zur adaptiven Abwehr exprimiert. Eine Familie innerhalb der PRRs sind die Toll-like-Rezeptoren (TLRs) (s. 1.4). Die Aktivierung all dieser Rezeptoren führt zur Produktion proinflammatorischer Zytokine und Interferone sowie zur Induktion von Phagozytose. Auf diese Weise wird die angeborene Abwehr aktiviert und zur Beseitigung der Pathogene stimuliert sowie die adaptive Abwehr beeinflusst [Brubaker et al., 2015; Drummond/Brown, 2011]. So führt die PAMP-Bindung bei dendritischen Zellen zur Reifung und verstärkten Produktion co-stimulierender Moleküle, was sie zu potenten Aktivatoren der T-Zell-Antworten macht [Clark/Kupper, 2005]. Weitere Zellen in den Diensten der angeborenen Abwehr sind die Natürlichen Killer- (NK-) Zellen, welche auch anhand von Gen-codierten Oberflächenrezeptoren erkrankte Zellen erkennen können. Im Gegensatz zu Makrophagen handelt es sich hierbei allerdings nicht um PRRs, sondern um Rezeptoren für MHC-Moleküle [Lanier, 2005].

1.2.2 Die adaptive/spezifische Immunabwehr

Die adaptive Abwehr reagiert im Vergleich zur angeborenen Abwehr deutlich präziser, aber langsamer. Die zellulären Komponenten dieses Systems sind die B- und T-Lymphozyten, welche in den lymphatischen Organen (Knochenmark und Thymus) gebildet werden. Im Unterschied zu den PRRs der angeborenen Abwehr sind ihre Antigen-Rezeptoren hoch-spezifisch für verschiedene Pathogene. Dies wird durch eine Rekombination der Antigen-Rezeptor-Gene erreicht und ermöglicht bis zu 10^{18} verschiedene Rezeptoren [Bonilla/Oettgen, 2010; Clark/Kupper, 2005; Medzhitov/Janeway, 2000]. T-Zellen lassen sich in die CD4-positiven T-Helfer-Zellen (T_H) und die CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen (CTL) unterteilen. Ihre Aktivierung benötigt die Mitwirkung einer APZ, welche das pathogene Antigen mittels eines MHC-Moleküls präsentieren. In der Folge erkennen die CTL nun infizierte Zellen, die die präsentierten Antigene auf ihrer Oberfläche tragen und töten sie ab. Die T_H -Zellen produzieren nach passender Antigenpräsentation diverse Zytokine, welche die Immunantwort unterstützen [Bonilla/Oettgen, 2010]. Für die Produktion der humoralen Abwehrkomponente sind die B-Zellen zuständig. Die Aktivierung dieser B-Zellen erfordert keine APZs aber ggf. die Mithilfe durch T_H -Zellen (T_H -abhängige Antwort [Miller/Mitchell, 1968]). Nach ihrer Aktivierung produzieren sie als Plasmazellen große Mengen an Antikörpern. Diese können Antigene direkt neutralisieren, dienen zur Opsonierung von Pathogenen und erleichtern somit die Phagozytose oder führen zur Aktivierung des Komplementsystems. Daneben können sie an Phagozyten der angeborenen Abwehr andocken und deren Phagozytose sowie T-Zell-Stimulation verstärken [Clark/Kupper, 2005]. Wie Zellen der angeborenen Abwehr besitzen auch B-Zellen TLRs, welche bei Aktivierung die Zellen hinsichtlich Differenzierung, Zytokin-Produktion und Antigen-Präsentation beeinflussen [Hua/Hou, 2013]. Von

allen Lymphozyten werden nach dem ersten Kontakt mit einem Antigen Gedächtniszellen gebildet, welche bei einer erneuten Infektion eine schnellere Immunantwort einleiten können [Seifert/Küppers, 2016; Bonilla/Oettgen, 2010].

1.3 Humane Mesenchymale Stamm-/Progenitorzellen (MSCs)

1.3.1 Allgemeines

Mesenchymale Stammzellen (MSCs) sind als multipotente Zellen in der Lage, sich zu verschiedenen Zellen weiterzuentwickeln [Pittenger et al., 1999], wobei sie nicht nur Zellen des Mesoderms, sondern auch der anderen beiden Keimblätter bilden können [Sato et al., 2005; Kopen et al., 1999]. Daneben besitzen sie die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, welche entweder durch symmetrische (aus einer Stammzelle werden zwei) oder asymmetrische (eine Tochterzelle bleibt im Vorrat, eine wird zur Progenitorzelle) Teilung erreicht wird [He et al., 2009].

Als adulte Stammzellen werden MSCs in der Forschung oft verwendet. Demgegenüber bieten die pluripotenten embryonalen Stammzellen zwar ausgezeichnete Möglichkeiten in der Forschung, sind aber aufgrund ethischer Fragestellungen oder einer durch die prinzipielle Unsterblichkeit dieser Zellen möglichen Tumorigenizität [Blum/Benvenisty, 2008] nicht unumstritten.

Erstmals erwähnt wurden MSCs 1974 als plastik-adhärenz, koloniebildende mesenchymale Vorläuferzellen des Knochenmarkes nicht hämatopoetischen Ursprungs [Friedenstein et al., 1974a]. Später etablierte sich der Begriff „Mesenchymale Stammzellen“ [Caplan, 1991]. Dieser Begriff ist allerdings nach Ansicht der „Internationalen Gesellschaft für Zelltherapie“ (International Society for Cellular Therapy (ISCT)) unpräzise. Stattdessen schlägt sie „Multipotente mesenchymale Stromazellen“ vor [Horwitz et al., 2005]. Heutzutage werden beide Begriffe oftmals synonym verwendet. Aufgrund der guten Verfügbarkeit (MSCs kommen praktisch in allen Organen vor [da Silva Meirelles et al., 2006], s.a. 1.3.3) wurde und wird mit MSCs viel geforscht, wodurch viele verschiedene Methoden entwickelt und Resultate erzeugt wurden. Zur besseren Vergleichbarkeit von Studien und Vereinheitlichung von Arbeitsschritten hat ein Komitee des ISCT in 2006 drei Kriterien veröffentlicht, welche MSCs in Labor- und vorklinischer Forschung erfüllen müssen [Dominici et al., 2006].

Demnach müssen MSCs (1) plastik-adhärenz sein, (2) bestimmte Marker an ihrer Oberfläche exprimieren (CD73, CD90, CD105) oder eben nicht (CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45, CD79 α , HLA-DR), sowie (3) ein multilineares Differenzierungspotenzial in osteogene, adipogene und chondrogene Richtung aufweisen. Unabhängig von dieser Vorgabe ist auch die Koloniebildung als Eigenschaft immer noch ein wichtiger Nachweis von MSCs [Pochampally, 2008].

1.3.2 Immunregulative Funktionen von MSCs

Neben ihren Fähigkeiten zur multilinearen Differenzierung besitzen MSCs auch immunregulative Funktionen. Induziert durch inflammatorische Zytokine wie TNF- α , IL-1 β , freie Radikale und Leukotriene sind sie in der Lage, verschiedene Wachstumsfaktoren zu exprimieren (z.B. EGF, FGF, PDGF, VEGF), welche einen wichtigen Beitrag zur Gewebereparatur und -regeneration leisten [Ma et al., 2014]. Während man früher davon ausging, dass zur Gewebereparatur eine größere Anzahl von MSCs in verletztem Gewebe vorhanden sein muss, so steht heute der Einfluss exprimierter parakriner Faktoren und Vesikel im Sinne einer „Hit and Run“-Theorie im Vordergrund [Prockop, 2017]. Daneben sind sie in der Lage, auf verschiedene Immunzellen regulierend einzuwirken. MSCs können die Proliferation von B-, T- und NK-Zellen inhibieren sowie Einfluss auf die Differenzierung zu Plasmazellen und die Zytokinproduktion/-sekretion nehmen [Uccelli et al., 2006]. Stimuliert durch die Entzündungsfaktoren schütten die MSCs große Mengen an Chemokinen und Adhäsionsmolekülen aus, wodurch Immunzellen in räumliche Nähe gebracht werden [Ren et al., 2010], sodass zur Suppression ausgeschüttete Moleküle (Spezies-different: in der Maus NO, beim MenschenIDO [Ren et al., 2009]) in hoher Konzentration wirken können [Ren et al., 2008].

Insgesamt müssen zur immunsuppressiven Wirkung die MSCs höheren Konzentrationen von Entzündungsfaktoren ausgesetzt sein. Ist dies nicht der Fall, können sie durch ungenügende NO-Synthese auch positiven Einfluss auf die Lymphozytenproliferation haben und damit unterstützen auf die Immunreaktion wirken [Li et al., 2012]. Auf diese Weise können MSCs auf unterschiedliche Umgebungseinflüsse mit verschiedenen immunregulativen Maßnahmen reagieren, sodass beispielsweise orale MSCs eine weitverzweigte Interaktion mit ihrem möglicherweise entzündlich veränderten Umfeld aufweisen [Zhou et al., 2020]. Einen bedeutenden Einfluss auf diese Eigenschaften kann die Bindung entsprechender Liganden an die TLRs hervorrufen (s.1.4.4).

Neben diesen immunregulativen Prozessen ist es bemerkenswert, dass MSCs bei allogener Transplantation eine nur geringe Immunogenität aufweisen [Le Blanc et al., 2003], was sie interessant in der Behandlung von Autoimmun- oder entzündlichen Krankheiten wie z.B. Lupus erythematoses [Wang et al., 2013] oder „Graft vs. Host“-Reaktionen [Godoy et al., 2019] macht.

1.3.3 Quellen von MSCs

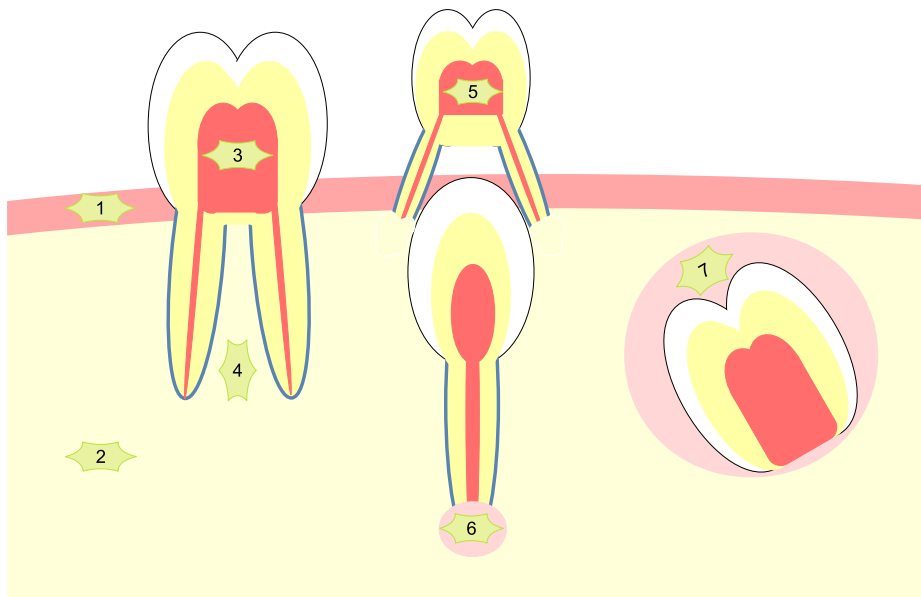
Wie erwähnt, gibt es neben dem Knochenmark, welches noch immer die Hauptquelle für MSCs darstellt, diverse weitere Quellen. MSCs können ebenfalls aus dem Fettgewebe [Zannettino et al., 2008], der Plazenta [Battula et al., 2008], der Lunge [Martin et al., 2008], der Nabelschnur [Montanucci et al., 2011], dem Nabelschnurblut [Jin et al., 2010] oder dem fetalen Pankreas [Hu et al., 2003]

gewonnen werden. Weitere vielfältige Vorkommen zur Gewinnung mesenchymaler Stamm-/Progenitorzellen stellen die oralen Gewebe dar [Fawzy El-Sayed et al., 2013](s. u.).

Insgesamt bilden MSCs keine homogene Einheit. Vielmehr ist es so, dass sie abhängig von ihrem Ursprungsgewebe unterschiedliche Eigenschaften aufweisen können [Sakaguchi et al., 2005].

1.3.3.1 Übersicht: orale MSCs

Im Bereich der oralen Gewebe sind mögliche Quellen für MSCs die Gingiva (Nr.1 in Abbildung 3, GMSCs) [El-Sayed et al., 2015], der Alveolarfortsatzknochen (Nr.2) [Fawzy El-Sayed et al., 2012], die Pulpa (Nr.3, DPSCs) [Gronthos et al., 2000], der Zahnfollikel (Nr.7, DFSCs) [Morsczeck et al., 2005], exfoliierte Milchzähne (Nr. 5, SHEDs) [Miura et al., 2003], die Mukosa [Marynka-Kalmani et al., 2010], das parodontale Ligament (Nr.4, PDLSCs) [Seo et al., 2004] und die apikale Papille (Nr. 6, SCAPs, s. u.). Sie haben den Vorteil der leichten Zugänglichkeit, stehen in vielfältiger Weise mit den sie umgebenden Geweben in Kontakt und können sowohl auf lokale (z.B. Parodontitis) als auch systemische Erkrankungen Einfluss nehmen [Zhou et al., 2020].



Gingiva (1), Alveolarfortsatzknochen (2), Pulpa (3), Ligamentfasern (4), Milchzahnpulpa (5), apikale Papille (6), Zahnfollikel (7) [Fawzy El-Sayed et al., 2013]

Abbildung 3: Schematische Darstellung von Quellen oraler MSCs

1.3.3.2 Stammzellen der apikalen Papille (SCAPs)

Die Gewinnung von Stammzellen aus der apikalen Papille (SCAPs) wurden erst in der jüngeren Vergangenheit beschrieben. Dabei waren sie in der Lage, aufgebracht auf einen Träger aus

Hydroxylapatit/Trikalziumphosphat, in einem Tiermodell ein dentinähnliches Gebilde zu formen [Sonoyama et al., 2006]. Hierzu wurde die apikale Papille an der Wurzelspitze von Weisheitszähnen mit unfertigem Wurzelwachstum entfernt und untersucht. Dabei zeigten die Zellen eine Expression des MSCs-Markers STRO-1 und verglichen mit DPSCs ein ähnlich osteogenes aber geringeres adipogenes Differenzierungspotenzial. Stimulation mit neurogenem Medium führte zur Expression neurogener Marker [Sonoyama et al., 2008]. SCAPs werden als Quelle der primären Odontoblasten angesehen, während die DPSCs als Quelle von Ersatz-Odontoblasten betrachtet werden [Huang et al., 2008; Sonoyama et al., 2008]. Sie ähneln in der Expression verschiedener Marker den DPSCs [Huang et al., 2009], weisen allerdings eine signifikant höhere Proliferationsrate sowie ein stärkeres Mineralisationspotenzial auf [Bakopoulou et al., 2011]. Insgesamt zeigen die SCAPs gegenüber den DPSCs ein höheres Potenzial zur Geweberegeneration, was durch den Status der Papille als noch in der Entwicklung befindliches Gewebe begründet sein könnte [Sonoyama et al., 2006]. Weiterhin haben SCAPs im Vergleich zu DPSCs längere Telomere und eine erhöhte Telomeraseaktivität [Jeon et al., 2011]. Unter einem längeren Einwirken der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β wird die Mineralisation sowie die osteo-/dentinogene Genexpression inhibiert [Liu et al., 2016]. Obwohl Knochen und Dentin mit Typ I Kollagen und Hydroxylapatit generell einen ähnlichen Aufbau haben, kann eine Stimulation mit Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) im Sinne eines Umschalters die osteogene Differenzierungskapazität von SCAPs in vivo fördern, während gleichzeitig die Fähigkeit zur dentinogenen Differenzierung reduziert wird [Wang et al., 2012].

Des Weiteren wurde gezeigt, dass SCAPs in der Lage sind, in einem leeren Wurzelkanal eine Regeneration von pulpa- und dentinähnlichem Gewebe zu produzieren [Huang et al., 2010]. Daneben gibt es einige Fallberichte, bei denen Zähne mit nicht abgeschlossenem Wurzelwachstum bei nicht vitaler Pulpa und periapikaler Parodontitis nach Therapie trotzdem eine Apexogenese erfahren [Chueh/Huang, 2006; Iwaya et al., 2001]. Begünstigt könnte dies durch die apikale Lage der Papille und die damit verbundene bessere Blutversorgung sein, was ein Überleben der Papille/SCAPs auch bei Nekrose der Pulpa ermöglichen könnte [Huang et al., 2008]. Selbst bei einer Pulpanekrose und vorhandener apikaler Parodontitis konnten in der apikalen Papille lebende SCAP gefunden werden [Chrepa et al., 2017]. Sie können einen Einfluss auf die Angiogenese nehmen [Hilkens et al., 2014], wobei die Mikroumgebung dabei einen entscheidenden Faktor für die Balance zwischen dem angiogenen Potential und der Kapazität zur Hartgewebsbildung darstellt [Hilkens et al., 2017]. Weiterhin haben SCAPs wie auch andere MSCs immunregulative Fähigkeiten: So sind sie z.B. in der Lage, in vitro bei geringer Immunogenität die Proliferation von T-Zellen zu supprimieren [Ding et al., 2010]. Insgesamt sind SCAPs eine heterogene Zellgruppe, welche verschiedene Unterpopulationen

enthält, die sich in ihren Eigenschaften wie Proliferationsrate und Differenzierungspotenzial unterscheiden [Bakopoulou et al., 2013].

1.4 Toll-like Rezeptoren (TLRs)

1.4.1 Allgemeines

Toll-like Rezeptoren (TLRs) sind eine Untergruppe der PRRs. Das Toll-Gen wurde 1985 in der Fliege *Drosophila melanogaster* entdeckt und als beeinflussender Faktor bei ihrer Embryonalentwicklung identifiziert [Anderson et al., 1985]. Nach der Erkenntnis, dass das Gen dort für ein Transmembranprotein codiert [Hashimoto et al., 1988] und es auch einen Einfluss auf die Reaktion der Fliege bei einer Pilzinfektion hat [Lemaitre et al., 1996], wurde bald danach ein entsprechendes Protein im Menschen gefunden, welches als Rezeptor eine Rolle in der Aktivierung des Immunsystems spielt [Medzhitov et al., 1997]. Heute sind verschiedene Rezeptoren bekannt (s. 1.4.2), welche alle durch Mustererkennung („pattern recognition“) verschiedene mikrobielle Strukturen erfassen können [Takeda et al., 2003]. Die TLRs sind entweder extrazellulär oder intrazellulär angeordnet und weisen dabei einen zytoplasmatischen und einen extrazellulären bzw. endosomalen Anteil auf. Die intrazelluläre Partie zeigt eine starke Ähnlichkeit mit der korrespondierenden Partie der Interleukin-1-Rezeptorfamilie und wird deshalb als Toll/IL-1 Rezeptor (TIR)-Domäne bezeichnet. Extrazellulär unterscheiden sich beide Rezeptortypen strukturell (Immunglobulin-ähnlich vs. LRR-Motiv („leucine-rich repeat“)) [Takeda/Akira, 2005]. TLRs sind neben Zellen des Immunsystems wie Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Zellen auch bei nicht zum Immunsystem gehörigen Zellen wie Fibroblasten, Epithelzellen [Akira et al., 2006] oder auch MSCs (s. 1.4.4) zu finden.

1.4.2 Die verschiedenen Toll-like Rezeptoren

Bis heute sind bei Säugetieren 13 verschiedene TLRs bekannt, von denen zehn im Menschen exprimiert werden [Hopkins/Sriskandan, 2005]. TLR11 ist zwar beim Menschen codiert, die entsprechende Sequenz enthält aber Stopcodons, die darauf schließen lassen, dass TLR11 im Menschen, ggf. auch durch einen genetischen Polymorphismus bedingt, nicht exprimiert wird [Zhang et al., 2004]. Die TLRs 1, 2, 4, 5, 6 und 10 befinden sich an der Zelloberfläche, während die TLRs 3, 7, 8 und 9 intrazellulär exprimiert werden [Akira/Takeda, 2004]. Anhand ihrer Primärsequenzen lassen sich die TLRs in mehrere Untergruppen einteilen [Takeda et al., 2003].

TLR2 Subgruppe: *TLR1, TLR2, TLR6, TLR10*

TLR1 ist funktionell an eine Kopplung mit TLR2 gebunden [Wyllie et al., 2000] und kann Triacyl-Lipopeptide erkennen [Takeuchi et al., 2002]. TLR2 kann eine Vielzahl von verschiedenen Pathogenen erfassen, darunter Lipoproteine von gram-negativen Bakterien, Peptidoglycane und Lipoteichonsäure gram-positiver Bakterien, Zymosan aus Pilzen und Lipoarabinomannan von Mykobakterien. Dieses weite Spektrum lässt sich durch die Interaktion mit anderen TLRs (1 und 6) erklären [Takeda/Akira, 2015; Hajjar et al., 2001]. Auch TLR6 ist funktionell an TLR2 gekoppelt und dient der Erkennung von Lipopeptiden, in diesem Fall vom Diacyl-Typ [Takeuchi et al., 2001]. Durch die Dimerbildung ist TLR2 in der Lage, den subtilen Unterschied zwischen Diacyl- und Triacyl-Lipopeptiden auszumachen [Takeda et al., 2002]. TLR10 ist bis jetzt wenig erforscht, lange war kein Ligand bekannt. Erst in jüngerer Vergangenheit wurde gezeigt, dass TLR10 im Gegensatz zu den anderen TLRs einen inhibitorischen bzw. antiinflammatorischen Effekt aufweist [Jiang et al., 2016; Oosting et al., 2014]. Neuere Forschung zeigt gp41 aus dem HI-Virus als einen möglichen Liganden [Henrick et al., 2019].

TLR3 Subgruppe:

TLR3 erkennt doppelsträngige RNA [Alexopoulou et al., 2001] und aktiviert den Transkriptionsfaktor NF- κ B unabhängig von dem Adapterprotein MyD88 [Kawai/Akira, 2007].

TLR4 Subgruppe:

TLR4 bindet bakterielle Lipopolysaccharide (LPS, Wandkomponente gram-negativer Bakterien) [Hoshino et al., 1999]. Dazu wird das zusätzliche Molekül MD-2 benötigt, welches mit TLR4 auf der Zelloberfläche assoziiert ist [Shimazu et al., 1999]. Weiterhin sind das LPS-bindende Protein (LBP) sowie CD14 involviert [Akashi-Takamura/Miyake, 2008]. Abhängig von der Dreidimensionalität verschiedener LPS triggern einige LPS allerdings weniger TLR4 als TLR2 [Netea et al., 2002]. Als ein weiterer Ligand fungieren endogene Hitzeschutzproteine [Ohashi et al., 2000]. Auch TLR4 kann wie alle TLRs außer TLR3 den Transkriptionsfaktor NF- κ B über das Adaptorprotein MyD88 aktivieren, ist allerdings auch zur MyD88-unabhängigen Aktivierung befähigt [Kawai/Akira, 2007; Kawai et al., 1999].

TLR5 Subgruppe:

TLR5 ermöglicht, Flagellin (Bestandteil bakterieller Geißeln) durch eine physikalische Interaktion zu detektieren [Smith et al., 2003; Hayashi et al., 2001]. Das Vorkommen auf der basolateralen Seite

intestinaler [Gewirtz et al., 2001] sowie pulmonaler Epithelzellen [Hawn et al., 2003] zeigten die wichtige Rolle dieses TLR bei der Erkennung von entsprechenden Pathogenen an Schleimhautoberflächen.

TLR9 Subgruppe: *TLR7, TLR8, TLR9*

TLR7 kann durch Bindung von organischen Substanzen wie Imiquimod oder Resiquimod eine Immunantwort durch Ausschüttung inflammatorischer Zytokine auslösen [Hemmi et al., 2002]. Weiterhin erlaubt TLR7, einzelsträngige RNA (ssRNA) von Viren zu erkennen [Diebold et al., 2004]. Durch die Lokalisation des Rezeptortyps auf der endosomalen Membran wird die physiologisch im Körper produzierte ssRNA durch TLR 7 nicht erkannt, da sie nur außerhalb der Endosomen zu finden ist. Das TLR8 Gen ist in großem Maße identisch zu dem TLR7 Gen, sodass TLR8 die gleichen Liganden wie TLR7 bindet [Takeda/Akira, 2015; Heil et al., 2004]. TLR9 dient der Erkennung bakterieller DNA. Diese weist im Vergleich zu humanen Zellen einen deutlich erhöhten Anteil von unmethylierten Cytosin-Guanin Dinukleotiden auf, welche durch TLR9 erkannt werden [Hemmi et al., 2000; Krieg et al., 1995].

1.4.3 Aktivierung und Signalwege

Als PRRs werden TLRs durch mikrobielle Komponenten als Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs, „pathogen-associated molecular patterns“) aktiviert [Akira et al., 2006]. Solche PAMPs können in Form von Nukleinsäuren, Kohlenhydraten, Lipiden oder Proteinen als Liganden fungieren. Auf diese Weise können pathogen-spezifische Bestandteile wie Lipopolysaccharide, Peptidoglycane, Lipopeptide sowie DNA und RNA erkannt werden, was meist zur Aktivierung derselben Moleküle führt, die auch in der Signalkaskade der IL-1-Rezeptoren aktiviert werden [Kumar et al., 2009; Akira/Takeda, 2004]. Bei fast allen TLRs wird das Adapterprotein MyD88 in der nach Ligandenbindung induzierten Signalkaskade benutzt, welches als zentraler Knotenpunkt die TLRs mit IL-1R-assoziierten Kinasen (IRAK) verknüpft [Deguine/Barton, 2014; Medzhitov et al., 1998] und so letztendlich in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B gipfelt. Auf diese Weise wird eine inflammatorische Antwort durch beispielsweise proinflammatorische Zytokine oder Leukozytenregulation geregelt [Lawrence, 2009].

Eine Übersicht über alle Signalwege zeigt die untenstehende Grafik (Abb. 4):

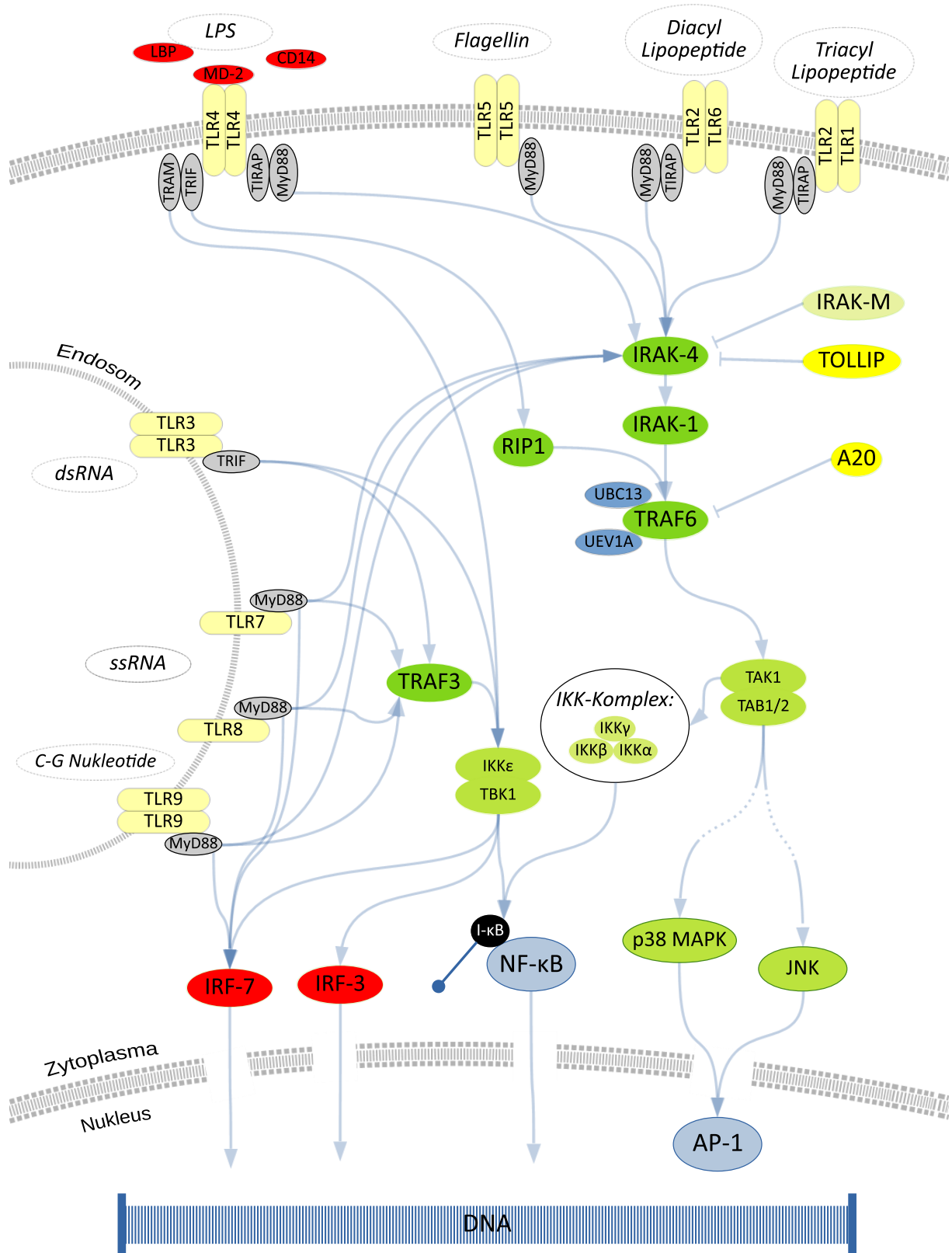


Abbildung 4: Schematische Darstellung der TLR-Signalwege

Extrazelluläre TLRs: Durch Bindung der spezifischen Liganden rekrutiert MyD88 IRAK-4, was zur Phosphorylierung von IRAK-1 führt. Das aktivierte IRAK-1 assoziiert mit TRAF6. Nach Bindung von UBC13 und UEV1A folgt die Aktivierung des TAK-Komplexes, wodurch zwei Signalwege aktiviert werden können:

- 1) Transkription durch AP-1 nach MAP-Kinasen-Aktivierung (JNK, p38 MAPK)
- 2) Aktivierung des IKK-Komplexes, dadurch Deaktivierung von I- κ B (Inhibitor der NF- κ B-Kinasen), wodurch der Transkriptionsfaktor NF- κ B aktiviert wird.

A20, TOLLIP und IRAK-M dienen als Negativ-Regulatoren.

TIRAP dient als Adaptorprotein zwischen der TIR-Domäne und MyD88 (TLR 1, 2, 4, 6).

Die intrazellulären TLRs (außer TLR3) können über MyD88 ebenfalls IRF-7 oder über TRAF3 den IKK ϵ /TBK1-Komplex aktivieren.

TLR3 kann unabhängig von MyD88 durch TRIF direkt oder indirekt über TRAF3 IKK ϵ /TBK1 aktivieren, was zur Aktivierung der IRF führt.

TLR4 kann sowohl den MyD88-abhängigen Weg als auch über TRIF und TRAM den MyD88-unabhängigen Weg aktivieren (IRF3 Aktivierung über TBK1 oder NF- κ B-Aktivierung über RIP1).

[Cell Signaling Technology, 2020; Takeda/Akira, 2015; Kawai/Akira, 2010; Akira/Takeda, 2004]

<i>IKK-Komplex</i>	<i>I-κB Kinase-Komplex, besteht aus IKK α, β, γ</i>
<i>IRAK</i>	<i>IL-1R-assoziierte Kinasen</i>
<i>IRF</i>	<i>Interferon-Regulierungsfaktor, Transkriptionsfaktor Interferone</i>
<i>MyD88</i>	<i>„myeloid differentiation primary-response protein 88“, Adaptermolekül zur Rekrutierung IRAK</i>
<i>NF-κB</i>	<i>„nuclear factor ‚kappa-light-chain-enhancer‘ of activated B-cells“, Transkriptionsfaktor</i>
<i>RIP1</i>	<i>„receptor-interacting protein 1“</i>
<i>TAB1/2</i>	<i>TAK1-Bindungsprotein, dienen als Aktivator und Adaptor von TAK1</i>
<i>TAK1</i>	<i>„TGF-β-activated kinase 1“</i>
<i>TBK1</i>	<i>ist wie IKKϵ nicht-kanonische IKKs</i>
<i>TIRAP</i>	<i>„TIR-domain-containing adaptor protein“, Adapterprotein für MyD88 an TLR2/4</i>
<i>TOLLIP</i>	<i>„Toll-interacting protein“, Inhibitor der IRAK</i>
<i>TRAF</i>	<i>„TNF receptor-associated factor“</i>
<i>TRAM</i>	<i>„TRIF-related adaptor molecule“, Adapterprotein für TRIF an TLR4</i>
<i>TRIF</i>	<i>„TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN-β“</i>
<i>UBC13</i>	<i>„ubiquitin-conjugating enzyme 13“</i>
<i>UEV1A</i>	<i>„ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1“</i>

1.4.4 TLRs und MSCs

Neben Zellen der Abwehr und Epithelzellen kommen TLRs auch bei verschiedenen mesenchymalen Stammzellen vor (s. Tab.1), sodass diese durch Kontakt mit den entsprechenden Liganden beeinflusst werden. Insgesamt sind allerdings weder die TLR-Expression noch andere funktionelle Aspekte bei allen MSCs gleich, vielmehr gibt es abhängig von ihrem Quellgewebe Unterschiede [Raicevic et al., 2011]. Daneben verändert sich das Expressionsmuster unter entzündlichen Umgebungsbedingungen [Raicevic et al., 2010], sodass unter Entzündung die Fähigkeit zur Pathogenerkennung durch MSCs abgewandelt ist. Gleichzeitig kann eine Stimulation der TLRs durch endogene Liganden einen Einfluss auf das therapeutische Potenzial von MSCs nehmen [Delarosa/Lombardo, 2010]. Eine Übersicht über die TLRs in verschiedenen Geweben bieten TLR-Expressionsprofile, welche in vielfältiger Weise Gegenstand aktueller Forschung sind:

MSCs	TLR-Expression (relativ unter Entzündung)	Quelle
AB-MSCs	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10	[Fawzy El-Sayed et al., 2017]
DPSCs	1(-), 2(+), 3(+), 4(+), 5(+), 6(-), 7(-), 8(+), 9(-), 10(-)	[Fawzy El-Sayed et al., 2016a]
G-MSCs	1(+), 2(+), 3, 4(+), 5(+), 6(-), 7(+), 10(+)	[Fawzy-El-Sayed et al., 2016b]
DFSCs	2, 3, 4	[Tomic et al., 2011] [Chatzivasileiou et al., 2013]
BM-MSCs	1, 2, 3(+), 4(+), 5, 6, 9	[Raicevic et al., 2011]
AT-BMSCs	1, 2, 3(+), 4, 5, 6, 9	[Raicevic et al., 2011]
WJ-MSCs	1, 2, 3(+)*, 5, 6, 9	[Raicevic et al., 2011]
Nabelschnur- blut-MSCs	1, 3, 4, 5, 6, 9	[van den Berk et al., 2009]

AB: Alveolarknochen (alveolar bone proper), AT: Fettgewebe (adipose tissue), BM: Knochenmark (bone marrow), DF: Zahnfollikel (dental follicle), DP: Pulpa (dental pulp), G: Gingiva (gingival), WJ: Wharton-Sulze (Wharton's jelly)
(+)/(-): gesteigerte/verminderte Expression nach Stimulation durch entzündlich veränderte Umgebungsbedingungen
**ohne Triggerung der Expression/Sekretion verschiedener Zytokine*

Tabelle 1: TLR-Expression verschiedener MSCs

Das Vorhandensein der TLRs ermöglicht den MSCs eine direkte Interaktion mit ggf. angetroffenen Pathogenen ohne das Einwirken von Immunzellen als Mediator [Fawzy El-Sayed et al., 2019]. Die TLR-Aktivierung kann bei den MSCs Änderungen hinsichtlich Migration, Invasion und Sekretion immunmodulierender Stoffe bewirken. Spezifische TLR-Aktivierung (3&4) kann MSCs in verschiedene Phänotypen mit unterschiedlichen Eigenschaften (proinflammatorisch vs. immunsuppressiv)

polarisieren [Waterman et al., 2010]. So werden beispielsweise gingivale MSCs durch Bindung von TLR-Liganden (außer TLR3) zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine angeregt, TLR3-Aktivierung hingegen unterstützt eine anti-inflammatorische Wirkung [Mekhemar et al., 2018]. TLR3-Stimulation führt auch bei DFSCs und DPSCs zu einer Verstärkung der suppressiven Wirkung durch TGF- β - und IL-6-Sekretion, während die von TLR4 in DFSCs den gleichen Effekt, in DPSCs mit der Inhibition der TGF- β -Produktion und der Sekretion von IDO (vgl. 1.3.2) aber einen gegenteiligen Effekt hat [Tomic et al., 2011]. Daneben wirkt eine TLR(3/4)-Aktivierung teilweise auch auf die Befähigung zur Rekrutierung und Migration von BM-MSCs ein [Tomchuck et al., 2008].

Grundsätzlich sind die Effekte der TLR-Liganden auf MSCs verschiedener Quellen auch hinsichtlich des Differenzierungspotenzials durch andere Expressionsmuster unterschiedlich [Raicevic et al., 2012]. So wird die Differenzierung von MSCs aus Fettgewebe und Knochenmark in osteogene Richtung durch Aktivierung von TLR2, 3 und 4 verstärkt [Lombardo et al., 2009; Mo et al., 2008; Hwa Cho et al., 2006], während die von TLR9 zur Inhibierung [Nørgaard et al., 2010; Hwa Cho et al., 2006] führt. Durch die fehlende Expression von TLR4 in MSCs des gallertartigen Bindegewebes (s.o.) kann bei einer Stimulation mit dem entsprechenden Liganden dort kein Effekt erzielt werden. Weiteren Einfluss auf die Differenzierungskapazität von MSCs hat das Alter des Spender-Individuums: So hat die Aktivierung von TLR3/4 bei BM-MSCs von jüngeren Leuten eine stärkere osteogene Differenzierung zur Folge als bei älteren Spendern [Shirjang et al., 2017].

Weiterhin zeigt neue Forschung, dass die Aktivierung des TLR3 bei G-MSCs zur Beeinflussung der Stammzeleigenschaften führt, sodass weniger koloniebildende Einheiten gebildet und Pluripotenz-Transkriptionsfaktoren exprimiert werden. Gleichzeitig kommt es zu einer erhöhten Expression MSC-spezifischer Oberflächenmarker sowie einem verstärkten multilinearen (besonders osteogenen, aber konträr zu anderen Studien (s.o.) auch leicht adipogenen) Differenzierungspotenzial, sodass eine Ligation des TLR3 die regenerativen Eigenschaften beeinflussen könnte [Mekhemar et al., 2020].

Die Effekte von TLRs auf die therapeutischen Effekte von MSCs in vivo sind Gegenstand zahlreicher Forschungen. So gibt es mehrere Studien, die in Tiermodellen von einem positiven Einfluss LPS-stimulierter MSCs bei einer Sepsis oder LPS-induzierter akuter Lungenschädigung berichten [Mei et al., 2010; Nemeth et al., 2010; Mei et al., 2007]. Die dabei beschriebenen antiinflammatorischen Effekte unter vorheriger Stimulation bei hohen LPS-Konzentrationen stehen allerdings im Widerspruch zu dem von Waterman et al. in vitro festgestellten Polarisierungsprozess (s.o.), bei dem TLR4 eine Polarisierung der MSCs Richtung eines proinflammatorischen Profils induziert. Im Bereich des Herzschutzes gibt es konträre Ergebnisse bezüglich der MSCs-Einwirkung nach TLR-Modulation. Verstärkte therapeutische Effekte konnten nach LPS-Präkonditionierung in einem Ratten-Herzinfarkt-Modell durch verbessertes

Zell-Überleben und Regeneration sowie erhöhter Sekretion von VEGF gezeigt werden [Yao et al., 2009]. Im Gegensatz dazu wurde in einer anderen Studie gezeigt, dass TLR4-defiziente Maus-BM-MSCs einen erhöhten Herzschutz aufwiesen [Wang et al., 2010].

Zusammen betrachtet zeigen die TLRs eine große Bandbreite an Fähigkeiten und möglichen therapeutischen Einsatzgebieten. Die vielfältigen Modulationen von verschiedenen Liganden an MSCs unterschiedlichen Ursprungs machen weiterführende Untersuchungen notwendig, um das therapeutische Potenzial von MSCs unter Berücksichtigung ihrer TLRs verbessern zu können [Shirjang et al., 2017].

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Arbeit hat das Ziel, zum ersten Mal ein Expressionsprofil der Toll-like-Rezeptoren von Stammzellen aus der apikalen Papille (SCAPs) unter normalen und entzündlichen Bedingungen zu erstellen. Stammzellbasierte Therapien stellen im Bereich der regenerativen Medizin eine vielversprechende Option für die Behandlung diverser Krankheiten dar [Fitzsimmons et al., 2018]. Verglichen mit pulpalen Stammzellen, mit denen SCAPs über das apikale Foramen in direktem anatomischen Kontakt stehen, werden SCAPs als Vorläuferzellen mit primitiveren Entwicklungsstadien angesehen, womit bessere Geweberegenerationsfähigkeiten und höhere Expressionen des antiapoptotischen Proteins Survivin sowie Telomerase einhergehen [Nada/El Backly, 2018; Huang et al., 2008]. Für SCAPs gibt es verschiedene interessante wissenschaftliche Ansätze im Bereich der Geweberegeneration [Nada/El Backly, 2018].

MSCs, zu denen SCAPs eingeordnet werden, interagieren in vielfältiger Weise mit ihrer Umgebung. Hierbei spielen auch ihre TLRs eine Rolle. Kommt es bei einem unfertig ausgebildeten Zahn zu einer Pulpitis (beispielsweise in Folge einer kariösen Läsion oder eines Traumas), so ist auch die apikale Papille in dieses entzündliche Milieu involviert und SCAPs könnten über TLRs direkt mit den sie umgebenden PAMPs interagieren. Kenntnis über die TLR-Expression sowie deren Veränderung unter entzündlichen Verhältnissen der SCAP kann somit helfen, das erwägenswerte therapeutische Potenzial dieser Zellen hinsichtlich möglicher Geweberegeneration zu verbessern.

2. Material und Methoden

2.1 Gewinnung und Kultivierung der Stammzellen

2.1.1 Ethikvotum

Dieses Projekt wurde vor Aufnahme der Forschungsarbeiten durch die Ethikkommission der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel genehmigt (D 513/17). Alle Patienten, die Proben bereitstellten, wurden über Ziel und Zweck aufgeklärt und erteilten ihre schriftliche Erlaubnis.

2.1.2 Gewinnen von Gewebe und Kultivierung von Zellen

Zur Gewebegewinnung wurden kariesfreie Weisheitszähne vor Abschluss des Wurzelwachstums von acht gesunden Patienten (n=8, m/w: 3/5, Alter 16-22 Jahre) gesammelt. Nach operativer Entfernung wurde jeder Zahn sofort in ein 50 ml Falcon-Röhrchen (Sarstedt AG, Nürnberg, Deutschland) gelegt, welches vorher mit einem Nährmedium befüllt wurde. Dieses bestand aus Minimum Essential Medium Eagle Alpha Modification (α -MEM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), welches mit 1% Amphotericin (Biowest, Nuaille, Frankreich), 1% Antibiotikum (10.000 U/ml Penicillin, 10.000 μ g/ml Streptomycin) (Gibco, Carlsbad, USA), 1% L-Glutamin (200 mM) (Sigma-Aldrich) sowie 15% fetalem Kälberserum (Sigma-Aldrich) ergänzt wurde. Anschließend wurden unter einer Sicherheitswerkbank (Thermo Electron Corp., Waltham, USA) die apikalen Papillengewebe mit einem Skalpell von den unfertig ausgebildeten Zahnwurzeln abgetrennt (Abb. 5) und in einem neuen sterilen Falcon-Röhrchen mehrfach mit einer



Abbildung 5: Zahn mit abgetrennten apikalen Papillen

phosphatgepufferten Salzlösung (phosphate-buffered saline, PBS) (Pan Biotech, Aidenbach, Deutschland), Amphotericin sowie Antibiotikum gewaschen.

Das abgetrennte Gewebe wurde nun in kleine Stückchen von ca. 1-2 mm³ zerteilt und auf Petrischalen (Sarstedt AG) verteilt. Dazu wurden die Gewebestücke auf die Petrischalen gelegt und zur leichten Adhäsion kurz antrocknen gelassen. Nun konnte Nährmedium auf die Schalen gegeben und diese in den Inkubator (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) bei 37°C sowie 5% CO₂ gestellt

werden. Ab der zweiten Woche wurde dreimal wöchentlich das Medium gewechselt. Unter dem Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) wurde die Kultur regelmäßig kontrolliert und das Zellwachstum beobachtet.

2.1.3 Zellpassage

Nach Erreichen einer Konfluenz von 80% wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das Nährmedium aus dem Zellkulturgefäß abgesaugt (IBS Integra Biosciences, Biebertal, Deutschland) und die Zellen mehrmals mit 10ml PBS gewaschen. Anschließend wurden 10 ml einer Accutase-Lösung (1ml Accutase (Pan Biotech) in 9 ml PBS) auf die Zellen gegeben und das Gefäß für 20 min in den Inkubator gestellt. Die Zellen lösten sich vom Boden und wurden durch zusätzliches leichtes Schütteln weiter in Lösung gebracht, sodass sie aus dem Gefäß pipettiert werden konnten. Die Suspension wurde in ein steriles Falcon-Röhrchen gegeben und 10 min bei 1700 UPM zentrifugiert (Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Danach konnte der Flüssigkeitsüberstand unter Schutz des entstandenen Zellpellets abgesaugt werden. Nach Resuspension konnten die Zellen für Versuche verwendet oder zur weiteren Vermehrung in neue Zellkulturflaschen (Sarstedt AG) und Petrischalen verteilt werden.

2.1.4 Isolierung der Stammzellen: magnetic-activated cell-sorting (MACS)

2.1.4.1 Vorbereitung

Die gemischte Zellkultur wurde entsprechend 2.1.3 aus ihrem Kulturgefäß herausgelöst und durch ein Zellsieb (Sarstedt AG) gegeben. Nach Zentrifugieren (10 min, 1700 UPM) und Resuspension wurde die Zellzahl mithilfe einer Neubauer-Zählkammer (Brand, Wertheim, Deutschland) bestimmt. Der zur späteren Sortierung benötigte MACS-Puffer, bestehend aus PBS mit 2 mM EDTA (Merck, Darmstadt, Deutschland) sowie 2% FBS, wurde angesetzt.

2.1.4.2 Antikörperbindung: STRO-1 und Microbeads

Nach dem Zählen wurde die Zellsuspension erneut zentrifugiert und in 80 µl des angesetzten MACS-Puffers resuspendiert. Es folgte die Zugabe von FcR-Blocking Reagent (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) sowie eine an die Zellzahl angepasste Menge von STRO-1 (PE)- (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA) und Anti-PE Microbeads-Antikörpern (Miltenyi Biotec) (jeweils 20 µl pro 10^7 Zellen). Ordentlich resuspendiert folgte für 10 min die Inkubation bei 4°C im Kühlschrank. Anschließend wurden 2 ml PBS zugegeben und die Zellsuspension erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde unter Schutz des Zellpellets abgesaugt und in 1 ml MACS-Puffer resuspendiert.

2.1.4.3 Sortierung

Alle Komponenten des MACS-Systems wurden mit 70%igem Ethanol (Th. Geyer GmbH, Renningen, Deutschland) wischdesinfiziert, der MACS-Separator (Miltenyi Biotec) wurde der Herstellerbeschreibung entsprechend an den MACS-Multistand (Miltenyi Biotec) geheftet und mit einer neuen Sortiersäule (MACS Collum) (Miltenyi Biotec) bestückt. Nun wurde die Säule mit 1 ml MACS-Puffer gefüllt. Sobald der erste Tropfen Puffer unten aus der Säule austrat, wurde oben die Zellsuspension nachgegeben. Der nun unten austretende Puffer wurde mit den darin enthaltenen (MACS-negativen) Zellen in einem 15 ml Falcon-Röhrchen (Sarstedt AG) aufgefangen, die MACS-positiven Zellen verblieben in der Säule. Nach Durchlaufen der kompletten Suspension und anschließendem Spülen mit MACS-Puffer wurde 1 ml Puffer auf die Säule gegeben, die Säule dem MACS-Separator entnommen und außer Reichweite des Magnetfeldes gebracht. Anschließend wurde mit dem der Säule beiliegenden Stempel der zuletzt eingefüllte Puffer durch die Säule in ein neues 15 ml Falcon-Röhrchen gedrückt, um auf diese Weise die MACS-positiven Zellen auszuspülen. Für diese Zellen wurde der oben geschilderte Vorgang der Sortierung wiederholt, um die Ausbeute an MACS-positiven Zellen zu erhöhen. Nach abschließendem Zentrifugieren und Resuspendieren im Nährmedium wurden die MACS-positiven Zellen in Zellkulturflaschen zum weiteren Wachstum ausgesät. Die MACS-negativen Zellen wurden verworfen.

2.1.5 Isolierung einzelner Kolonien

Nach dem Aussähen der STRO-1-sortierten Zellen begannen diese, in den Kulturflaschen Kolonien zu bilden. Bevor diese ineinander wuchsen, wurden nun zur weiteren Aufreinigung der Kultur gezielt einige Kolonien mit einem Zellschaber (Sarstedt AG) aus den Kulturflaschen gelöst, abpipettiert und in neuen Flaschen ausgesät.

2.2 Nachweis der Stammzeleigenschaften

2.2.1 Kolonie-bildende Einheiten (KBE)

Zur Darstellung der Fähigkeit der Stammzellen Kolonien zu bilden, wurde ein Teil dieser mit einer Dichte von 5 Zellen/cm² auf eine Petrischale aufgebracht. Hierzu wurden die Zellen - wie unter 2.1.3 beschrieben - aus ihrem Kulturgefäß entnommen und nach Resuspension in 1 ml Nährmedium mithilfe einer Neubauerzählkammer gezählt. Schließlich wurde aus der Zell-Lösung eine der gewünschten Zelldichte entsprechende Menge der Suspension entnommen und mit 10 ml Medium auf einer Petrischale kultiviert. Zwölf Tage lang wurde dreimal wöchentlich das Nährmedium gewechselt und anschließend die entstandene Zellkultur mit einer Kristallviolett-Lösung (3g Kristallviolett (Merck) /1l dest. Wasser

(Fresenius Kabi, Sèvres, Frankreich)) gefärbt. Dafür wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 10 min lang mit eiskaltem 70%igem Ethanol fixiert. Es folgte 10 min lang die Färbung mit der Kristallviolett-Lösung. Nach Auswaschen der überschüssigen Färbung mit destilliertem Wasser konnte das Resultat unter dem Mikroskop betrachtet und auch makroskopisch fotografiert (Sigma, Kawasaki, Japan) werden.

2.2.2 Multilineare Differenzierung der Stammzellen und Färbung der differenzierten Zellkulturen

Zur Darstellung der Differenzierungsfähigkeit der gewonnenen Stammzellen wurden Proben dieser in drei verschiedenen Differenzierungsreihen spezifischen Stimulationsmedien (alle PromoCell, Heidelberg, Deutschland) ausgesetzt. Nach Abschluss wurde das Differenzierungsergebnis der entstandenen Zellkulturen mit speziellen Färbungen sichtbar gemacht.

2.2.2.1 Osteogene Differenzierung

Die Stammzellen wurden auf einer 6-Well-Platte (Sarstedt AG) kultiviert. Nach Erreichen einer Konfluenz von 80% wurde für 14 Tage 2 ml eines osteogenen Differenzierungsmediums auf einige Wells gegeben. Andere Wells wurden zur Kontrolle mit normalem Nährmedium versorgt. Jedes Medium wurde dreimal wöchentlich ausgetauscht.

Die Färbung der Zellkulturen erfolgte mit einer Alizarin-rot-Lösung (1 g Alizarin rot (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) auf 50 ml dest. Wasser, pH-Wert auf 4,1-4,2 eingestellt). Nach Waschen der Zellen mit PBS und Fixieren mit eiskaltem Ethanol 70% für 5 min wurde für weitere 5 min die Färbelösung in die Wells gegeben. Nach der folgenden Spülung mit destilliertem Wasser zur Entfernung der überschüssigen Farbe konnte das Ergebnis unter dem Mikroskop begutachtet sowie mit der Mikroskopkamera (Zeiss) zur qualitativen Auswertung fotografiert werden.

2.2.2.2 Adipogene Differenzierung

Die Stimulation der Stammzellen in adipogene Richtung lief analog zur osteogenen Reihe ab, mit dem Unterschied, dass die Stimulationsdauer 3 Wochen betrug.

Die Färbung der Zellkulturen erfolgte in diesem Fall mit einer Oil-Red-O Lösung. Nach Waschen mit PBS, 5 min Fixieren mit 60% Isopropanol (Fisher BioReagents, Pittsburgh, USA) und Ansetzen der Farbe (125 mg Oil Red (Sigma-Aldrich) in 25 ml Isopropanol, 10 ml destilliertes Wasser plus 15 ml Oil-Red-O, Zentrifugieren 10 min bei 1700 UPM, Filtrierung durch Membranpapier (Schleicher & Schuell GmbH,

Dassel, Deutschland)) wurde diese für 10 min auf die Zellen gegeben und anschließend mit destilliertem Wasser die Überschüsse ausgewaschen. Jetzt konnte das Ergebnis unter dem Mikroskop in Hinsicht auf gebildete Lipidtröpfchen begutachtet sowie mit der Mikroskopkamera zur qualitativen Auswertung fotografiert werden.

2.2.2.3 Chondrogene Differenzierung

Für die chondrogene Differenzierungsreihe wurden jeweils Stammzellen aus ein bis zwei Kulturflaschen benötigt. Diese wurden aus den Kulturflaschen in 1,5 ml Tubes (Sarstedt AG) transferiert. In die Gefäße wurde anschließend chondrogenes Stimulationsmedium bzw. normales Nährmedium (als Kontrolle) pipettiert. Fünf Wochen lang wurde dreimal wöchentlich das Medium gewechselt. Vor und nach jedem Mediumwechsel wurden die Gefäße zentrifugiert. Es bildete sich ein Zellpellet aus, welches gefärbt wurde. Unter Schutz des Zellpellets wurde das Medium aus den Tubes abgesaugt. Es folgten mehrere Waschgänge mit PBS. Anschließend wurde zur Fixierung der Pellets ein Glutaraldehyd/Formaldehyd-Gemisch (Merck) für zwei Stunden dazugegeben und die Proben in den Kühlschrank gestellt. Nach Ablauf der Fixierzeit wurde das Fixiermittel mit PBS in mehreren Gängen ausgewaschen und die Proben im Entwässerungsautomaten (MEDITE Medical GmbH, Burgdorf, Deutschland) und im Paraffineinbettautomaten (MEDITE Medical GmbH) weiterverarbeitet. Die ausgehärteten Paraffinblöckchen konnten nun im Mikrotom (Thermo Scientific) geschnitten werden, für die Proben wurde eine Schnittdicke von ca. 4 µm gewählt. Jetzt folgte die Überführung der Schnitte in eine Wanne mit destilliertem Wasser und aus dieser auf einen beschrifteten Objektträger (Thermo Scientific). Anschließend wurden die Schnitte mit Alcianblau (Carl Roth GmbH) gefärbt: Die Objektträger durchliefen nacheinander Xylolbäder, eine absteigende Alkoholreihe und ein Wasserbad. Die Färbung erfolgte für 60 min mit 1% Alcianblau und 3% Essigsäure (Merck), die Gegenfärbung für 5 min mit Kernechtrot (Merck). Nach abgeschlossener Färbung wurden die Schnitte auf dem Träger gedeckelt und konnten unter dem Mikroskop begutachtet und zur qualitativen Auswertung fotografiert werden.

2.2.3 Messung MSCs-spezifischer Oberflächenantigene mittels Durchflusszytometrie (fluorescence-activated cell-sorting, FACS)

Zur Messung der MSCs-spezifischen Oberflächenantigene wurden einige Zellen den Zellkulturflaschen entnommen und die Zellsuspension durch ein Zellsieb gegeben. Nach Zentrifugieren und Resuspension sowie unter Verwendung von FcR Blocking Reagent wurden die Zellen auf acht FACS-Röhrchen

(Sarstedt AG) verteilt. Es folgte die Zugabe der benötigten Antikörper (Bezugsquellen s. 7.1.3) gemäß der untenstehenden Tabelle (Tab. 2):

Probe 1	CD14 FITC	CD146 PE	CD45 APC
Probe 2	CD90 FITC	CD73 PE	IgG2a APC
Probe 3	CD105 FITC	STRO-1 PE	
Probe 4	CD34 PE		
Probe 5	IgG2a PE		
Probe 6	IgG1 PE		
Probe 7	REA Control FITC	IgM PE	
Probe 8	REA Control PE		

Tabelle 2: Protokoll FACS CD-Marker

Nach Bindung der Antikörper für 10 min bei 4°C im Kühlschrank, anschließendem Waschen mit PBS, Zentrifugieren und Resuspendierung in 4% Paraformaldehyd (Merck) erfolgte die Auswertung mit FACSCalibur E6370 und der FACSCComp 5.1.1 Software (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA).

2.3 Entzündungsmedium

Zur Stimulation der Hälfte aller Zellkulturen (n=8; SCAP-i) vor Bestimmung des TLR-Expressionsprofils wurden dem normalen Nährmedium 25 ng/ml IL-1 β , 50 ng/ml TNF- α , 3×10^3 U/ml IFN- α und 1×10^3 U/ml IFN- γ (alle Peprotech, Hamburg, Deutschland) hinzugefügt. Das so veränderte Medium wurde 24 Stunden lang anstelle des normalen Nährmediums auf die Zellen gegeben.

2.4 TLR-Expressionsprofil

2.4.1 Expressionsprofil auf m-RNA-Ebene

Es wurde ein TLR-Expressionsprofil sowohl für die unstimulierten (SCAP) als auch für die vorher mit Entzündungsmedium stimulierten Zellen (SCAP-i) bestimmt. Dazu wurden die Zellen in 6-Well-Platten kultiviert und stimuliert.

2.4.1.1 RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion erfolgte für alle Proben mit dem „RNeasy Mini Kit“ (Qiagen, Hilden, Deutschland). Hierfür wurde das Medium aus den Well-Platten abgesaugt und alle Wells doppelt mit PBS gewaschen. Nun wurden 300 μ l frisch angesetzter RLT-Puffer (10 μ l β -Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich) auf 1 ml

„RLT-Puffer“) auf die Zellen gegeben. Nach Ablösen mit einem Zellschaber führte dies zur Lyse der Zellen. Danach wurden 300 µl Ethanol (70%) hinzupipettiert, gut vermischt und in ein zum Kit zugehöriges „Spin collum“ gegeben, welches vorher in ein passendes 2 ml „Collection Tube“ gesteckt wurde. Nach Zentrifugieren (20 sec, 10.000 UPM) (Eppendorf) wurde die aus dem „Spin tube“ herausgedrückte und im „Collection Tube“ aufgefangene Flüssigkeit verworfen und 700 µl „RW1-Puffer“ auf die „Spin collum“ pipettiert. Im Anschluss an ein weiteres Zentrifugieren wurden zweimal hintereinander 500 µl „RBE Puffer“ hinzugegeben und zentrifugiert. Zur Trocknung erfolgte nun ein weiterer Zentrifugierungsschritt ohne eingefüllten Puffer.

Die so behandelten „Spin collum“ wurden nun in neue 1,5 ml Eppendorf Gefäße transferiert, mit 25 µl RNase-freiem Wasser bestückt und für 1 min bei 10.000 UPM zentrifugiert.

2.4.1.2 RNA-Messung

Die Quantifizierung der erhaltenen RNA wurde mithilfe der „µDrop Plate“ (Thermo Scientific) entsprechend den Herstellervorgaben photometrisch durchgeführt: Die Platte wurde pro Probe mit jeweils 2 µl aus 2.4.1.1 bestückt, um anschließend im Photometer (Thermo Scientific) die Absorption bei 260 bzw. 320 nm zu messen und gemäß der vorgegebenen Formel

$$c = (A_{260} - A_{320}) * \frac{40 \mu\text{g/ml}}{\text{Pfadlänge der Platte in cm (0,051)}}$$

die Konzentration c [µg/ml] der RNA zu bestimmen.

2.4.1.3 cDNA-Synthese durch Reverse Transkription (RT)

Die cDNA wurde mittels reverser Transkriptase aus der RNA von 2.4.1.1 erzeugt (< 1µg RNA pro Probe). Dazu wurde das „QuantiTect Reverse Transcription Kit“ (Qiagen) entsprechend der Herstellervorgaben benutzt, alle Reagenzien wurden außerhalb der Inkubationszeiten auf Eis gekühlt. Dabei wurde zuerst eventuell vorhandene genomische DNA entfernt und anschließend die RT durchgeführt. Zur Eliminierung wurde die RNA mit folgenden Komponenten angesetzt (Tab. 3):

„gDNA Wipeout Buffer“:	2 µl
RNA:	8 µl
RNase-freies Wasser:	4 µl
Gesamtvolumen:	14 µl

Tabelle 3: Reaktionsansatz Eliminierung gDNA

Der Ansatz wurde für 2 min bei 42°C inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. Währenddessen wurde der „RT-Mastermix“ angesetzt, dem schließlich der komplette erste Ansatz zupipettiert wurde, sodass alle zur RT benötigten Komponenten zusammengefügt waren (Tab. 4):

<i>RT-Mastermix</i>	
• Quantiscript Reverse Transkriptase:	1 µl
• Quantiscript RT-Puffer:	4 µl
• RT-Primer Mischung:	1 µl
Kompletter vorheriger Ansatz mit RNA:	14 µl
Gesamtvolumen:	20 µl

Tabelle 4: Reaktionsansatz RT

Dieser Ansatz wurde zuerst für 15 min bei 42°C inkubiert, gefolgt von 3 min bei 95°C zur Deaktivierung der reversen Transkriptase.

2.4.1.4 Durchführung Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (real-time polymerase chain reaction, rt-PCR)

Die Echtzeit-PCR wurde gemäß den Herstellervorgaben mit einem LightCycler 96 (Roche, Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Jede Probe wurde gemäß dem untenstehenden Schema (Tab. 5) vorbereitet und auf die PCR-96-Well-Platte (Roche) gegeben:

LightCycler Probes Master Mix:	10 µl
RNase-freies Wasser:	4 µl
Primer (s. 7.1.5):	1 µl
cDNA:	5 µl
Gesamtvolumen:	20 µl

Tabelle 5: Reaktionsansatz PCR

Die so bestückte Platte wurde in das Gerät eingesetzt. Folgender Programmablauf wurde gestartet:

Zur Vorinkubation lief ein Zyklus mit 95°C für 10 min, gefolgt von 40 Amplifikationszyklen bestehend aus Denaturierung (95°C, 10 sec.), Annealing (60°C, 30 sec.) und Elongation (72°C, 1 sec.). Anschließend wurde die Platte für 30 sec auf 37°C abgekühlt. Während der Zyklen wurde kontinuierlich die entstehende Fluoreszenz gemessen und relativ zur Expression des Haushaltgens PGK1 ausgewertet.

2.4.2 Expressionsprofil auf Proteinebene (Durchflusszytometrie)

Wie auf mRNA-Ebene wurde auch auf Proteinebene ein Expressionsprofil für nicht-stimulierte (SCAP) und vorher mit Entzündungsmedium (vgl. 2.3) stimulierte (SCAP-i) Stamm-/Vorläuferzellen für die Expression von TLR1 bis 10 (Bezugsquellen Antikörper s. 7.1.3) erstellt.

Die Vorbereitung bei der Bestimmung von extra- und intrazellulären TLRs wurde wie in 2.4.2.1/2 beschrieben durchgeführt. Nach der Inkubation bei 4°C und Bindung der Antikörper, anschließendem Waschen mit PBS, Zentrifugieren und Resuspendierung in 4% Paraformaldehyd erfolgte die Auswertung mit FACSCalibur E6370 und der FACSComp 5.1.1 Software.

2.4.2.1 Messung der extrazellulären TLRs

Die Vorbereitungen zur Messung der extrazellulären TLR-Expression verliefen analog zu 2.2.3. Nach Aufteilung der gelösten Zellen auf die FACS-Röhrchen wurden folgende Antikörper dazu gegeben (Tab. 6):

Probe 1	TLR1 PE	5 µl = 1 µg
	TLR2 FITC	5 µl = 0,5 µg
Probe 2	Mouse IgG1 PE	20 µl = 1 µg
	Mouse IgG2a FITC	10 µl = 1 µg
Probe 3	TLR4 FITC	1 µl = 1 µg
	TLR10 PE	5 µl = 0,25 µg
Probe 4	Mouse IgG2a FITC	20 µl = 1 µg
	Mouse IgG1 PE	5 µl = 0,25 µg
Probe 5	TLR5 Alexa Fluor488	5 µl = 0,5 µg
	TLR6 PE	5 µl = 1 µg
Probe 6	Alexa Fluor488 Isotype Control	5 µl = 0,5 µg
	Mouse IgG1k PE	5 µl = 1 µg

Tab. 6: Protokoll FACS TLR extrazellulär

2.4.2.2 Messung der intrazellulären TLR

Nach Waschen, Lösen und Sammeln der Zellen in einem Falcon-Röhrchen folgte die Permeabilisierung dieser mit dem „Cytofix/Cytoperm™ Kit“ (Becton Dickinson) entsprechend der Herstellervorgaben. Nach Auswaschen mit dem beiliegenden Waschpuffer erfolgte die Aufteilung in die FACS-Röhrchen und Zugabe der entsprechenden Antikörper (Tab. 7):

Probe 1	Rat IgG1k PE, 1:10 verdünnt mit Aqua dest.	2,5 µl = 0,05 µg
Probe 2	Rat IgG1k PE	5 µl = 1 µg
Probe 3	TLR3 PE	5 µl = 1 µg
Probe 4	TLR7 PE	1 µl = 0,05 µg
Probe 5	TLR8 PE	2 µl = 1 µg
Probe 6	Mouse IgG2a PE	5 µl = 1 µg
Probe 7	TLR9 PE	5 µl = 1 µg

Tabelle 7: Protokoll FACS TLR intrazellulär

2.5 Statistische Auswertung

Der Shapiro-Wilk-Test wurde zum Testen der Normalverteilung der Ergebnisse benutzt. Die Daten waren nicht normalverteilt, so dass als Lagemaß der Median und als Streumaß das untere (Q25) sowie obere (Q75) Quartil berechnet wurden. Der Vergleich der TLR-Expression auf Protein- und mRNA-Ebene von SCAP und SCAP-i erfolgte mit dem nichtparametrischen Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test durch die Software SPSS (SPSS Version 23, IBM Corp, Armonk, NY), wobei das Signifikanzlevel auf $p=0,05$ gesetzt wurde.

3. Ergebnisse

3.1 Zellwachstum aus Gewebefragmenten

Nach dem Ansetzen der Proben in den Petrischalen kam es einige Tage später zu einem Auswachsen von Zellen aus dem Gewebestückchen. Diese ordneten sich adhärent am Schalenboden radiär um die Gewebe an (Abb. 6).



Abbildung 6: Gewebe und auswachsende Zellen

3.2 Nachweis der Stammzeleigenschaften der MACS-positiven Zellen

3.2.1 Nachweis der Kolonie-bildenden Einheiten (KBE)

Die spärlich in einer Petrischale ausgesäten Zellen zeigten nach zwölf Tagen und anschließender Färbung eine Anordnung in Kolonien (Abb. 7).

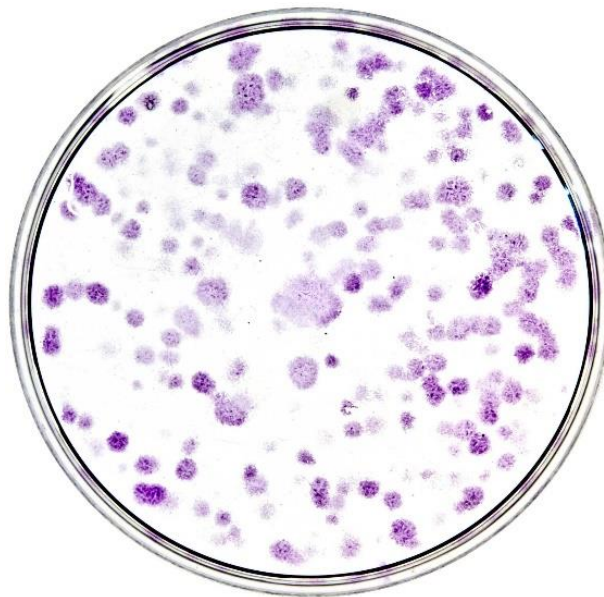


Abbildung 7: Kolonienbildung der ausgesäten SCAPs nach Färbung

3.2.2 Expression der CD-Oberflächenantigene

Die FACS-Analyse der spezifischen CD-Oberflächenantigene wies die hohe Expression der MSCs-Marker CD73, CD90 und CD105 an der Zelloberfläche nach. Demgegenüber wurde keine oder nur eine sehr geringe Expression von CD14, CD34 und CD45 gemessen (Abb. 8).

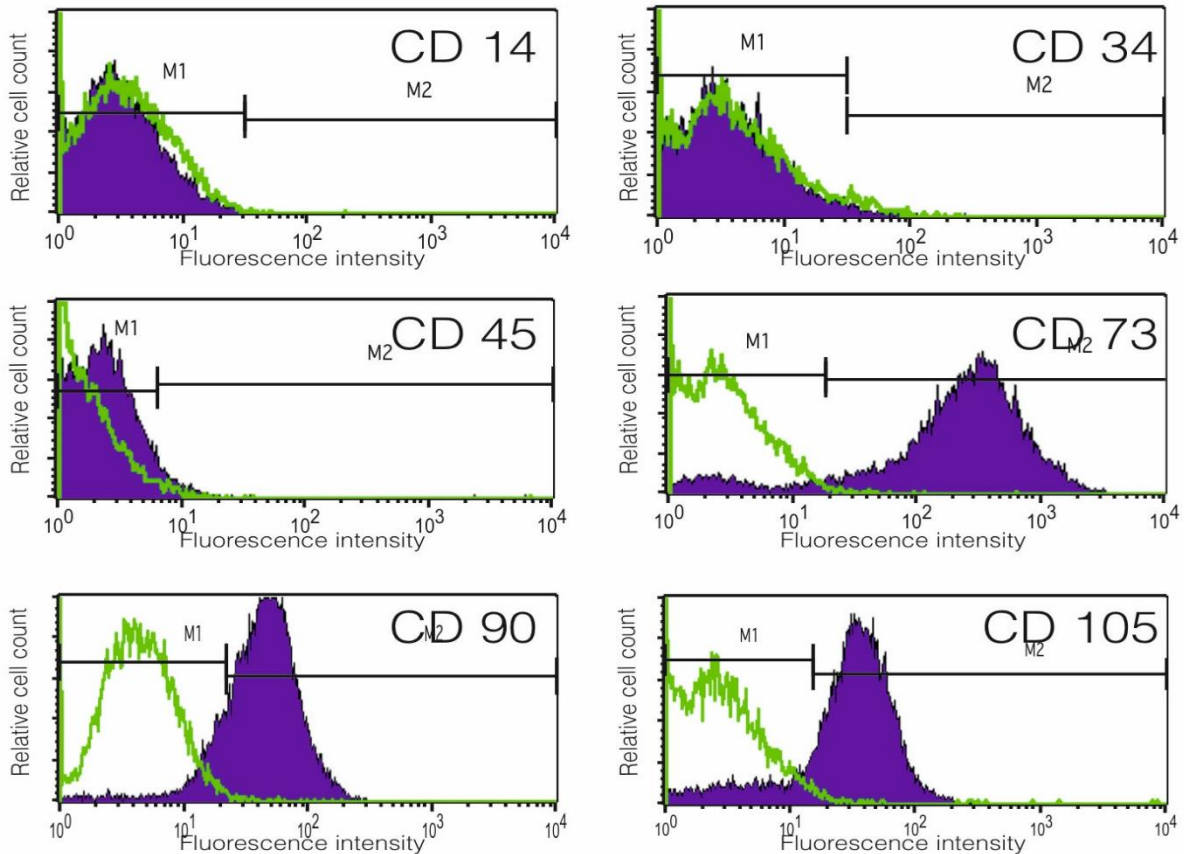


Abbildung 8: FACS-Analyse der CD-Oberflächenmarker von SCAPs (x-Achse: Fluoreszenzintensität, y-Achse: relative Zellzahl, grüne Kurve Isotypkontrolle)

3.2.3 Multilineare Differenzierung

Nach abgeschlossener Differenzierungszeit und anschließenden Färbungen ließ sich im Vergleich zu mit normalem Nährmedium versorgten Stammzellen in alle Richtungen eine spezifische Färbereaktion erzeugen und somit eine Differenzierung der ursprünglichen Zellen qualitativ darstellen.

3.2.3.1 Osteogene Differenzierung

Nach Abschluss der Differenzierungszeit und Färbung der entstandenen Kultur konnten bei den mit osteogenem Medium stimulierten Zellen Alizarin-Rot gefärbte Bereiche beobachtet werden, welche Kalzifizierungen in der Kultur beschreiben und somit das osteogene Potenzial der ursprünglichen Stammzellen aufzeigen (Abbildung 9A). Im Vergleich dazu zeigten die über die Differenzierungszeit mit normalem Nährmedium versorgten Zellen keine Alizarin-Rot positiven Bereiche bzw. Kalzifizierungen (Abbildung 9B).

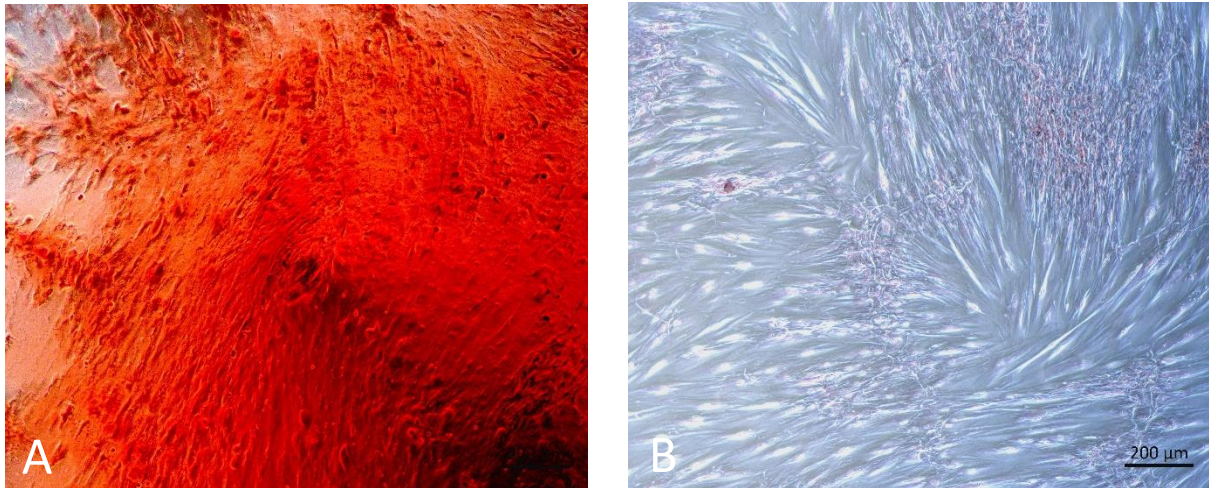


Abbildung 9: Färberegebnis nach osteogener Differenzierung (A) bzw. Kontrolle (B)

3.2.3.2 Adipogene Differenzierung

Nach Abschluss der Differenzierungszeit und Färbung der entstandenen Kultur konnten bei den mit adipogenem Medium stimulierten Zellen Oil-Red-O gefärbte Lipidtröpfchen beobachtet werden und somit das adipogene Potenzial der SCAP aufgezeigt werden (Abbildung 10A). Im Gegensatz dazu ließen sich bei den unstimulierten Zellen keine gefärbten Bereiche bzw. Lipidinklusionen erkennen (Abbildung 10B).

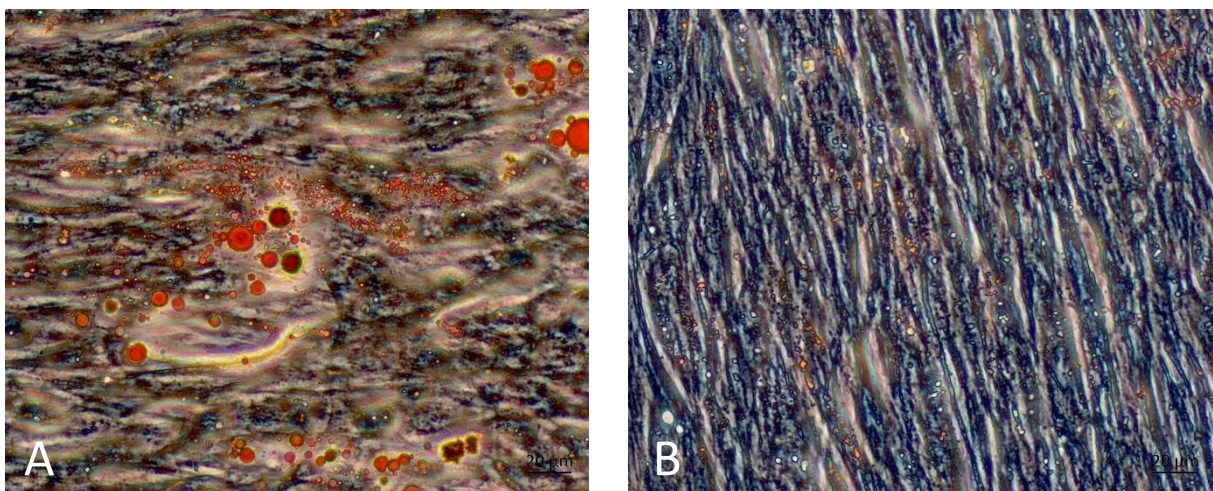


Abbildung 10: Färberegebnis nach adipogener Differenzierung (A) bzw. Kontrolle (B)

3.2.3.3 Chondrogene Differenzierung

Nach Abschluss der Differenzierungszeit sowie Fixierung und Färbung der entstandenen Zellpellets konnte bei den mit chondrogenem Medium stimulierten Zellen eine deutliche Färbung mit Alcian-Blau erzielt werden. Dies zeigt die Bildung von Glykosaminoglykanen und damit das chondrogene Potenzial der SCAPs (Abbildung 11A). Die unstimulierten Zellen hingegen wiesen eine deutlich schwächere Blaufärbung auf und zeigten insgesamt eine weniger kompakte Gestalt des Zellpellets (Abbildung 11B).

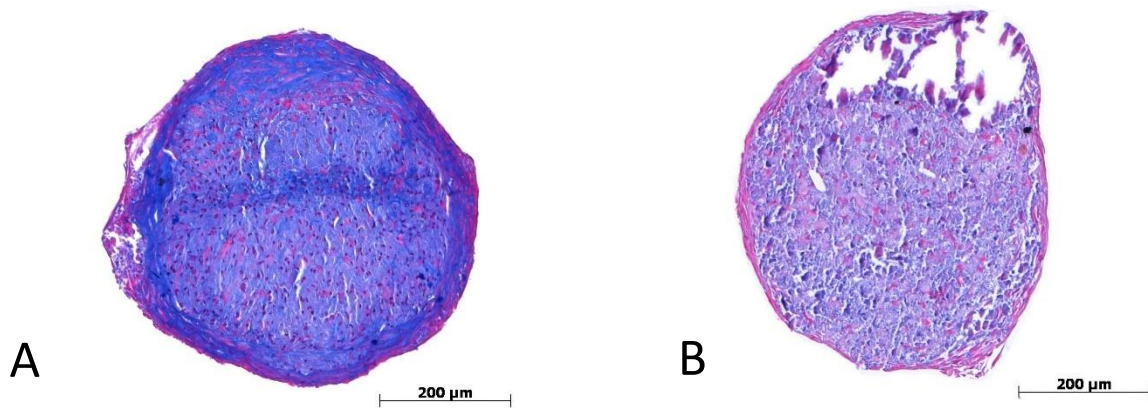


Abbildung 11: Färberegebnis nach chondrogener Differenzierung (A) bzw. Kontrolle (B)

3.3 Expressionsprofil der Toll-like-Rezeptoren auf mRNA-Ebene

Die Auswertung der TLRs-Expression auf m-RNA-Ebene mittel Echtzeit-PCR lieferte zusammengefasst folgende Ergebnisse.

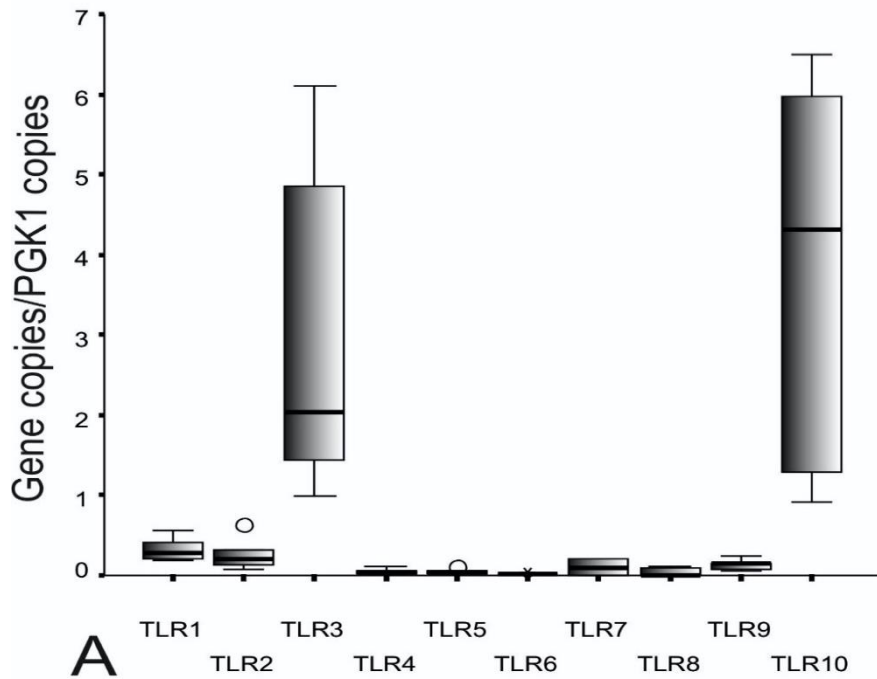
Unter normalen Kulturbedingungen exprimieren SCAP die Toll-Like-Rezeptoren 1-10 in unterschiedlichen Quantitäten. Besonders stark ist die Expression von TLR10 und TLR3, während die Expression der übrigen Rezeptoren deutlich darunter liegt. Stimulation der Zellen durch das mit den Entzündungsfaktoren ergänzte Nährmedium führen zu einer signifikanten Erhöhung der Expression der TLRs 1, 2 und 9, während die Expression von TLR3 und 4 signifikant gesenkt wird. Ohne Signifikanz ist die Steigerung der TLRs 5 und 6 sowie die Herabregulation von TLR 7, 8 und 10.

Unten aufgeführt (Tab. 8) sind die relativen Expressionen der verschiedenen TLRs im Median sowie dem ersten (Q25) und dritten (Q75) Quartil inklusive des p-Wertes (* bei signifikanten Änderungen) der Expression nach Stimulierung mit Entzündungsmedium.

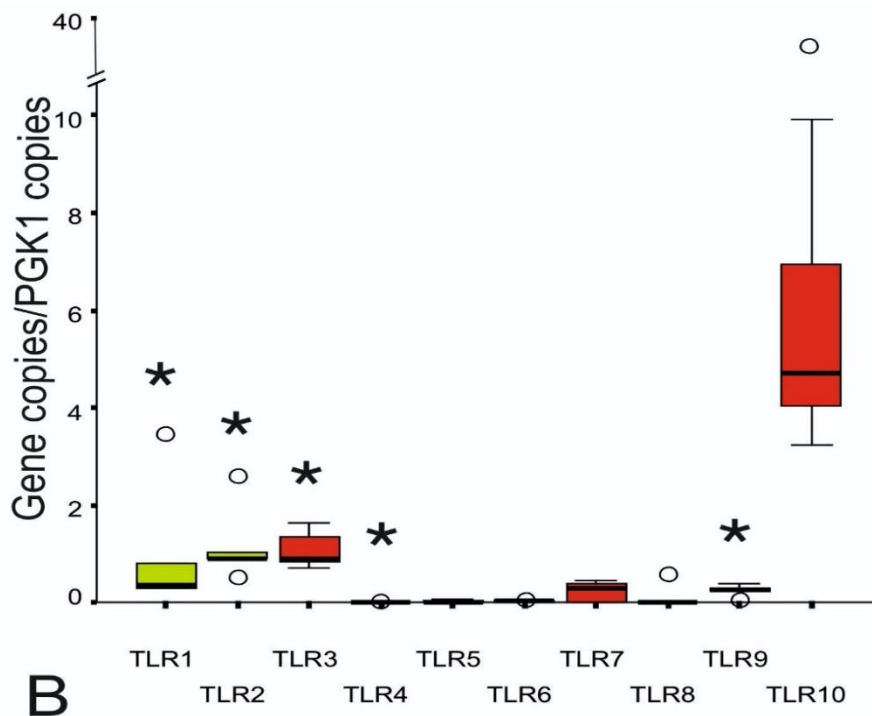
TLR	Expression SCAP (Median; Q25/Q75)	Expression SCAP-i (Median; Q25/Q75)	p-Wert
1	0,2795; 0,1970/0,3793	0,4435; 0,2920/0,7858	*0,012
2	0,1750; 0,1210/0,2935	0,9590; 0,7713/1,7975	*0,012
3	1,4800; 1,1275/4,2825	0,8890; 0,7423/1,5675	*0,012
4	0,0298; 0,0218/0,0602	0,0185; 0,0145/0,0354	*0,021
5	0,0401; 0,0172/0,0764	0,0178; 0,0020/0,0429	0,21
6	0,0191; 0,0129/0,0344	0,0256; 0,0137/0,0562	0,21
7	0,0620; 0,0000/0,1928	0,3243; 0,0148/0,5033	0,063
8	0,0000; 0,0000/0,0754	0,0163; 0,0000/0,3667	0,35
9	0,1092; 0,0576/0,1448	0,2415; 0,0973/0,3170	*0,025
10	24,8000; 20,1750/31,6250	19,6900; 14,4242/47,8893	0,74

Tabella 8: Relative TLR-Expression auf mRNA-Ebene von SCAP und SCAP-i, Median; Q25/Q75, n=8

Folgende Diagramme (Abb. 12) stellen die TLR-Expression der SCAP auf mRNA-Ebene grafisch dar. Zusätzlich zu den Boxplots mit Median/Q25/Q75 sind Ausreißer (o) dargestellt. Das Diagramm der SCAP-i zeigt zusätzlich farblich markiert die Änderung unter Einfluss des Entzündungsmediums (grün: erhöhte Expression, rot: verringerte Expression) sowie das Vorhandensein einer signifikanten Änderung (*).



SCAP



SCAP-i

Abbildung 12: Grafische Darstellung der relativen TLR-Expression auf mRNA-Ebene unter normalen (A) und entzündlichen (B) Umgebungsbedingungen, Median/Q25/Q75, n=8, rot/grün: verringerte/erhöhte Expression, * signifikante Änderung, o Ausreißer

3.4 Expressionsprofil der Toll-like-Rezeptoren auf Proteinebene

Die Auswertung der TLRs-Expression auf Proteinebene mittel Durchflusszytometrie lieferte zusammengefasst folgende Ergebnisse.

Unter normalen Kulturbedingungen exprimieren SCAP die Toll-Like-Rezeptoren 1-10 in unterschiedlichen Quantitäten. Besonders stark ist die Expression von TLR8 und TLR10, während die Expression der übrigen Rezeptoren deutlich darunter liegt. Stimulation der Zellen durch das mit den Entzündungsfaktoren ergänzte Nährmedium führt zu einer signifikanten Senkung der TLR3-Expression, während die Erhöhung der Expression der TLRs 1, 2, 4, 5, 6 und 9 sowie die Verringerung bei TLR 7, 8 und 10 nicht signifikant ist.

Unten aufgeführt (Tab. 9) sind die relativen Expressionen der verschiedenen TLRs im Median sowie dem ersten (Q25) und dritten (Q75) Quartil inklusive des p-Wertes bei (* signifikanten Änderungen) der Expression nach Stimulierung mit Entzündungsmedium.

TLR	Expression SCAP	Expression SCAP-i	p-Wert
1	1,78; 1,15/3,62	3,83; 3,48/4,44	0,237
2	1,92; 0,19/3,15	2,99; 1,04/4,12	0,141
3	1,2; 0,87/2,72	0,77; 0,42/1,06	*0,012
4	0,83; 0,09/1,04	1,29; 0,26/1,66	0,161
5	1,96; 1,24/2,64	3,98; 2,52/8,23	0,069
6	0,41; 0,25/1,28	1,26; 0,48/2,61	0,183
7	0,83; 0,65/1,15	0,81; 0,42/1,17	0,779
8	6,68; 3,29/14,99	2,52; 1,37/5,28	0,123
9	0,8; 0,67/2,14	0,83; 0,60/1,29	0,889
10	3,99; 1,32/10,81	2,39; 1,57/5,65	0,091

Tabelle 9: Relative TLR-Expression auf Proteinebene von SCAP und SCAP-i, Median; Q25/Q75, n=8

Folgende Diagramme (Abb. 13) stellen die TLR-Expression der SCAP auf Protein-Ebene grafisch dar. Zusätzlich zu den Boxplots mit Median/Q25/Q75 sind Ausreißer (o) dargestellt. Das Diagramm der SCAP-i zeigt zusätzlich farblich markiert die Änderung unter Einfluss des Entzündungsmediums (grün: erhöhte Expression, rot: verringerte Expression) sowie das Vorhandensein einer signifikanten Änderung (*).

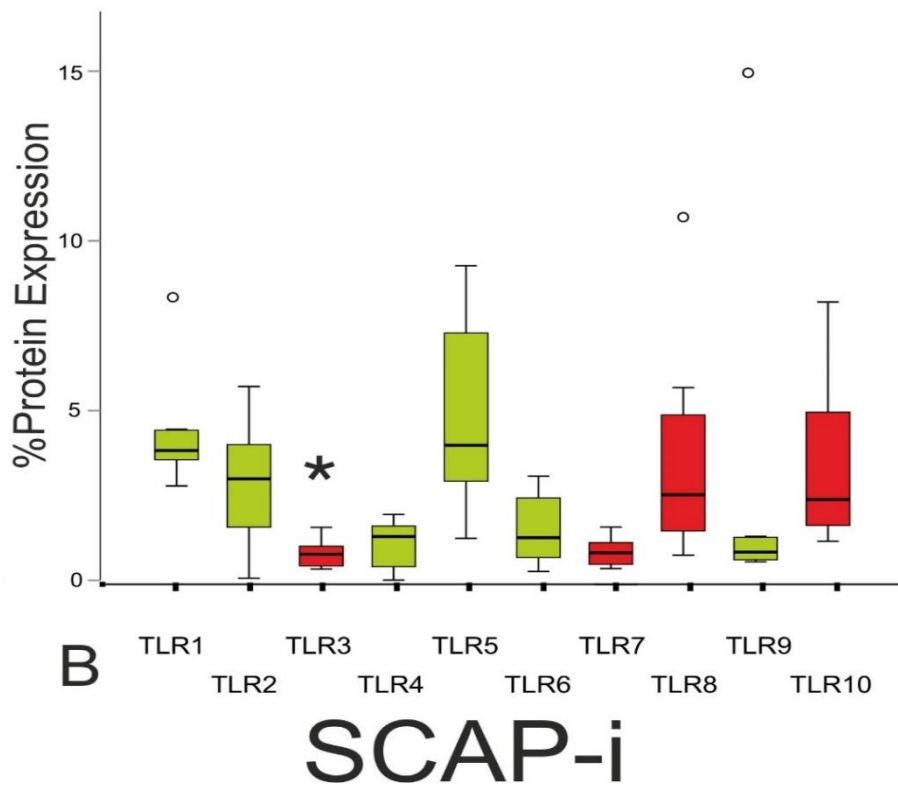
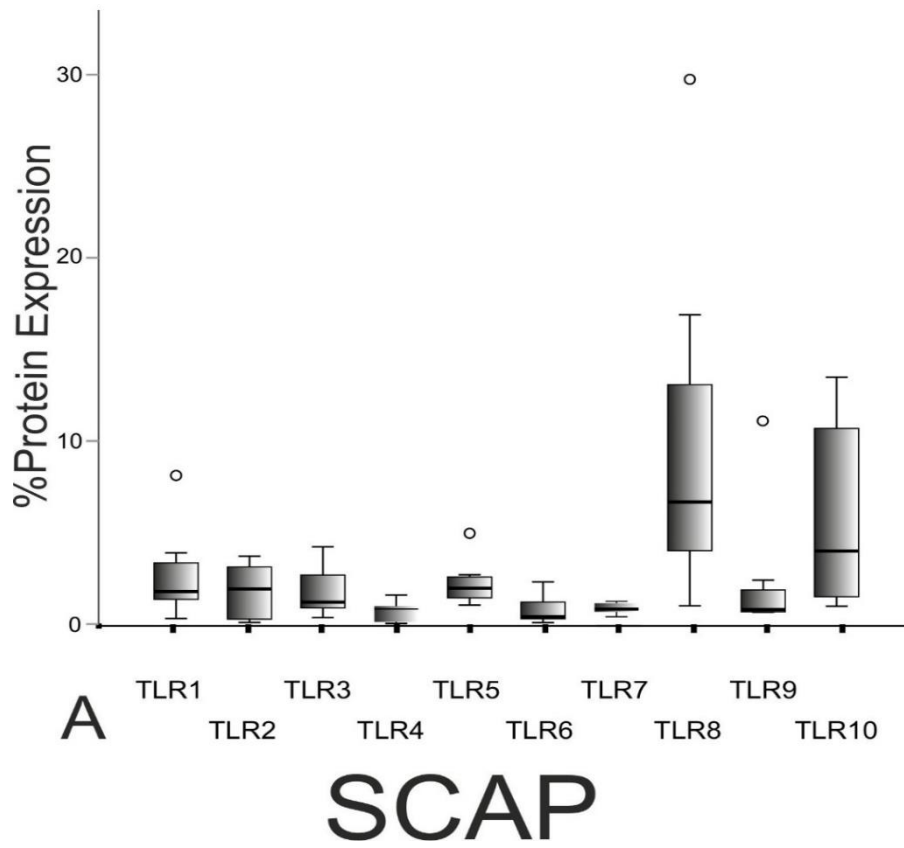


Abbildung 13: Grafische Darstellung der relativen TLR-Expression auf Protein-Ebene unter normalen (A) und entzündlichen (B) Umgebungsbedingungen, Median/Q25/Q75, n=8, rot/grün: verringerte/erhöhte Expression, * signifikante Änderung, o Ausreißer

4. Diskussion

In der Endodontologie liegen große Hoffnungen auf stammzellbasierten regenerativen Therapieansätzen. Allerdings muss dies in der Mundhöhle immer in Präsenz von Mikroorganismen und somit unter potenziell entzündlichen Verhältnissen gelingen. Eine Untersuchung der TLR-Expression ist wichtig, um die Umstände einer erfolgreichen Regeneration besser verstehen zu können. Für das Ergebnis spielen allerdings auch immer die Rahmenbedingungen des Experiments eine entscheidende Rolle, weshalb im Folgenden zunächst die dieser Arbeit zugrundeliegenden Methoden und anschließend ihre Ergebnisse diskutiert werden.

4.1 Methoden

4.1.1 Gewebegewinnung und Zellkultivierung

Bei MSCs verschiedener Quellen konnte gezeigt werden, dass mit steigendem Alter des Spenders die gewonnenen Zellen in vielfältiger Weise an Potenz verloren [Wu et al., 2015; Wu et al., 2014]. Aufgrund des Abschlusses des Wurzelwachstums im jungen Erwachsenenalter stehen SCAP ohnehin nur bis zu diesem Zeitpunkt für eine Gewinnung zur Verfügung, da sich die Papille fortlaufend zur Pulpa weiterentwickelt. Ein Zugriff auf diese Zellen ist wegen ihrer Lokalisation an der im Kieferknochen befindlichen Wurzelspitze nicht ohne weiteres möglich. Relativiert wird dieser Umstand in der Weise, dass die operative Weisheitszahnentfernung in Deutschland zu den am häufigsten ambulant durchgeführten Eingriffen zählt. Ist die Indikation zur Entfernung (etwa bei Verlagerung oder Retention) gegeben, so wird diese laut Leitlinie im Laufe der Zahnwurzelentwicklung empfohlen [Kunkel, 2019]. Dies hat die gleichzeitige Entfernung der apikalen Papille zur Konsequenz. Insgesamt betrachtet wird also zur Gewebegewinnung ein sowieso indizierter Eingriff am Gewebespende durchgeführt, der durch die Spende auch nicht invasiver ausfällt. Aufgrund der ständig praktizierten Durchführung der Weisheitszahnentfernung kann man im Vergleich zu anderen MSCs mit einem geringen Aufwand Gewebe junger Spender erhalten.

In der Literatur werden zwei mögliche Varianten beschrieben, mit denen die Zellen aus den Papillen gewonnen werden können: Bei einer Variante werden nach dem Abtrennen und Zerkleinern der Papille die Gewebefragmente in einer Lösung aus Kollagenase und Dispase verdaut. In Folge wird die erhaltene Zellsuspension auf ein Zellsieb gegeben, um die Zellen voneinander zu trennen und sie anschließend zu kultivieren [Sonoyama et al., 2008]. Eine weitere Möglichkeit zur Zellgewinnung ist, die abgetrennte Papille in kleine Stückchen zerschnitten in ein Kulturgefäß aufzubringen und die Zellen auswachsen zu lassen [Abe et al., 2008]. Auch wenn die erste Variante hauptsächlich angewendet wird, so wurde in vorliegender Arbeit auf die zweite Möglichkeit zurückgegriffen, um das Gewebe und die

darin enthaltenen Zellen nicht unnötig durch die enzymatische Verdauung und das anschließende Filtern zu stressen. Beim anschließenden Auswachsen und bei weiteren Passagen wurden nicht adhärente Zellen immer zusammen mit dem Nährmedium entfernt.

4.1.2 Isolierung der SCAPs durch „magnetic-activated cell-sorting“ (MACS)

Aufgrund der Heterogenität verschiedener Subpopulationen innerhalb der SCAP mit unterschiedlichen Eigenschaften wurden die isolierten Zellen über das Verfahren des „magnetic-activated cell-sorting (MACS)“ weiter aufgereinigt. Sortiert wurde anhand des Oberflächenantigens STRO-1. Dieses Antigen gilt als Marker von mesenchymalen Stammzellen [Ning et al., 2011], auch wenn es nicht als General-Marker von MSCs verstanden wird [Kolf et al., 2007]. STRO-1 sortierte Zellen z.B. aus der Gingiva weisen typische MSCs-Eigenschaften auf (vgl. 4.1.3) [Fawzy El-Sayed et al., 2012]. In diesem Sinne zeigen STRO-1 positive Subpopulationen von SCAP in Studien eine stärkere KBE-Bildung und Expression mesenchymaler Stammzellmarker sowie ein verbessertes Differenzierungspotenzial [Bakopoulou et al., 2013].

Das „magnetic-activated cell-sorting“ ist eine etablierte Methode zur Zellsortierung, welche im Vergleich zu anderen Techniken wie beispielsweise dem „panning“ oder der „Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung (FACS)“ einfach und effektiv durchzuführen ist [Miltenyi et al., 1990]. Hierbei werden die zu sortierenden und entsprechend vorbereiteten Zellen mit einem spezifischen Antikörper sowie den „Microbeads“ genannten magnetischen, nanometer-kleinen Partikeln inkubiert, infolgedessen die Antikörper die gewünschten Zellen binden. Durch den Einsatz des „FcR Blocking Reagent“ wurden unerwünschte Bindungen zu Nicht-Zielzellen reduziert. Die „Microbeads“ binden an die Antikörper, wodurch die zu sortierenden Zellen nun magnetisch markiert sind. Eingefüllt in eine Sortiersäule („MACS-Collum“), welche eine Matrix aus ferromagnetischen Kugeln enthält und eingesetzt in den „MACS-Separator“ dessen magnetisches Feld tausendfach verstärkt, werden die markierten Zellen in der Säule zurückgehalten, während die unsortierten Zellen hindurchlaufen und verworfen werden. Nach Entfernen der Säule aus dem Magnetfeld können die in der Säule verbliebenen Zellen ausgespült werden [Miltenyi Biotec, 2020].

In dieser Arbeit wurden die Zellen nach dem Lösen aus ihren Kulturgefäßen und vor der Antikörperzugabe durch ein Zellsieb gegeben, um möglicherweise verklumpte Zellkonglomerate zu trennen. So wurde eine regelrechte Antikörperbindung ermöglicht und ein Verstopfen der Sortiersäule konnte vermieden werden. Die zugegebenen STRO-1-Antikörper sind mit einem Phycoerythrin (PE)-Farbstoff konjugiert, welchen die folgenden „Microbeads“ banden. Um den Anteil der positiven Zellen

zu erhöhen, wurden nach dem Sortiervorgang die Suspension der ausgewaschenen Zellen auf eine neue Säule gegeben und eine zweite Sortierung durchgeführt.

Neben den vielen Vorteilen, die diese Art der Zellsortierung bietet, sind auch die Grenzen zu beachten. So ist auch bei fehlerfreier Durchführung des „magnetic-activated cell-sorting“ eine absolute Reinheit der sortierten Population nicht zu erreichen. Durch das gezielte Herauslösen von Kolonien aus MACS-positiven Zellen konnte die Kultur weiter aufgereinigt werden.

4.1.3 Feststellung der Stammzeleigenschaften

Grundlage zur Kontrolle der gewonnenen und sortierten SCAP hinsichtlich ihrer Stammzeleigenschaften sind die Bestimmungen der „Internationalen Gesellschaft für Zelltherapie“ (International Society for Cellular Therapy (ISCT)) [Dominici et al., 2006]. Hiernach müssen die Zellen eine Plastik-Adhärenz aufweisen. Daneben müssen sie an ihrer Oberfläche die typischen Marker CD73, CD90 und CD105 exprimieren, während CD14, CD34 und CD45 nicht oder nur minimal exprimiert werden dürfen. Weiterhin ist nach Stimulation mit entsprechenden Stimulationsmedien mindestens eine trilineare Differenzierung in osteogene, adipoge und chondrogene Richtung vorgeschrieben. Zusätzlich zu diesen Kriterien müssen die Zellen eine Kolonienbildung aufweisen.

4.1.3.1 CD-Oberflächenmarker

Die Feststellung der Oberflächenexprimierung der CD-Antigene erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Bei dieser hochpräzisen und dennoch schnellen Messung werden Zellen, welche vorher mit fluoreszierenden Antikörpern (z.B. PE, FITC, APC) verbunden werden, in einer Trägerflüssigkeit suspendiert und einzeln in den Messbereich eines Laserstrahls geführt. Dieses Laserlicht wird von den Zellen gebrochen („Scatter“) und gleichzeitig werden ggf. vorhandene fluoreszierende Substanzen zur Lichtemission in einer anderen Wellenlänge angeregt. Die Intensität dieser spezifischen Emission wird hinter entsprechenden Lichtfiltern detektiert. Durch die Verwendung mehrerer verschiedenfarbiger Filter lassen sich mit unterschiedlichen Fluorochromen gleichzeitig verschiedene Fluoreszenzintensitäten messen, wodurch die Zahl der benötigten Zellen eines Versuches sowie die Anzahl der insgesamt benötigten Proben gesenkt werden kann. Zusammen lassen sich durch gemessene Streustrahlung und die emittierte Fluoreszenzintensität Rückschlüsse auf Zellform und Zellgröße bzw. Bindung von fluorochrom-konjugierten Antikörpern ziehen [Picot et al., 2012].

Trotz der Genauigkeit der Messung können die Ergebnisse durch ungewünschte Bindungen verfälscht werden. Hierbei binden die markierten Antikörper unspezifisch an Fc-Rezeptoren der Zielzellen und

sorgen für ein Hintergrundsignal. In vorliegender Arbeit wurden deshalb für alle Antikörper passende Isotypkontrollen in der Durchflusszytometrie mit ausgewertet. Diese gleichen den spezifischen Antikörpern in ihrer Klasse und verursachen die gleiche unspezifische Bindung, wodurch diese sich herausrechnen lässt. Zusätzlich wurden die unspezifischen Bindungen durch den Einsatz des „*FcR Blocking Reagent*“ reduziert.

Durch eine niedrige bzw. fehlende Expression der Marker CD14, CD34 und CD45 kann eine Verunreinigung der Kultur ausgeschlossen werden, da diese auf MSCs regelrecht nicht exprimiert werden. CD14 findet sich normalerweise auf Zellen der angeborenen Abwehr, z.B. Monozyten und Makrophagen sowie Granulozyten [Schütt, 1999]. CD34 wird mit frühen hämatopoetischen Vorläuferzellen assoziiert [Furness/McNagny, 2006], während CD45 auf allen kernhaltigen Zellen des hämatopoetischen Systems zu finden ist [Rheinländer et al., 2018].

4.1.3.2 Multilineare Differenzierungspotential

Eine der wichtigsten biologischen Eigenschaften, welche MSCs ausmachen, ist ihr Differenzierungspotenzial. Um dieses Potenzial aufzuzeigen, werden Zellen in Konformität mit der Literatur von Dominici et al. nach Standardprotokollen mit induktiven Medien versorgt. Zur qualitativen Darstellung des Differenzierungsergebnisses und somit zum Beweis der Differenzierungsfähigkeit in die drei erwähnten Richtungen werden die Kulturen im Anschluss gefärbt. Hierbei dient eine Färbung mit Alizarin-Rot der Darstellung mineralisierter Knoten als Ergebnis einer erfolgreichen osteogenen Differenzierung, während die adipogene bzw. chondrogene Differenzierung mithilfe Oil-Red-O gefärbter Lipidtröpfchen respektive Alcian-Blau gefärbter Glykosaminoglykane in den Zellpellet-Querschnitten aufgezeigt werden kann.

4.1.3.3 Kolonienbildung: KBE-Assay

Auch wenn die Fähigkeit zur Kolonienbildung im Grundsatzpapier von Dominici et al. nicht für MSCs gefordert wird, so ist ein KBE-Assay ein deutlicher Beweis für eine MSCs-Population. Ursprünglich als Fibroblasten-ähnliche kolonienbildende Zellen beschrieben [Friedenstein et al., 1974b], zeigen dünn ausgesäte MSCs im CFU-Assay im Vergleich zu normalen Fibroblasten eine Kolonienbildung [Pochampally, 2008]. Eine Kolonie wächst dabei aus einer MSCs heran und zeigt so deren Fähigkeit auf, gleiche Tochterzellen zu generieren.

4.1.4 Analyse der TLR-Expression

4.1.4.1 *Stimulation mit Entzündungsmedium*

MSCs zeigten in Studien Sensitivität gegenüber einem entzündlichen Umgebungsmilieu [Hemeda et al., 2010]. Da bekannt ist, dass MSCs unter dem Einfluss eines in dieser Weise veränderten Milieus eine veränderte TLR-Expression aufweisen können, wurden die SCAP vor der Bestimmung mit Echtzeit-PCR und Durchflusszytometrie in einer Gruppe (SCAP-i) verschiedenen Entzündungsfaktoren ausgesetzt. Die Mediatoren Interleukin-1 β , Tumornekrosefaktor- α , Interferon- α und Interferon- γ sind dabei häufig vorkommende Zytokine [Raicevic et al., 2010], eine Kombination dieser wurde in ähnlichen MSCs-Studien ebenfalls verwendet [Fawzy El-Sayed et al., 2017; Fawzy El-Sayed et al., 2016a; Fawzy El-Sayed et al., 2016b].

4.1.4.2 *Analyse auf mRNA-Ebene mittels quantitativer Echtzeit-PCR*

Die Polymerasekettenreaktion ist eine Methode zur Amplifizierung einer bestimmten DNA-Sequenz in vitro. Katalysiert durch eine DNA-abhängige DNA-Polymerase wird aus einzelsträngiger DNA ein selektiver DNA-Bereich über mehrere Zyklen von Denaturierung, Annealing und Elongation exponentiell vermehrt (2^n doppelsträngige DNA-Moleküle nach n Replikationszyklen). Dies funktioniert durch Verwendung spezifischer Primer, welche sich in der gewünschten Zielregion an der zu amplifizierenden Sequenz anlagern und so den Startpunkt der DNA-Polymerisation festlegen. Dadurch ist es möglich, in einer Probe selbst kleinste Mengen vorhandener DNA zu detektieren. Um die mRNA zu bestimmen, muss diese vorher einer reversen Transkriptase zugeführt werden, welche aus der mRNA komplementäre DNA synthetisiert.

In dieser Arbeit wurde zur Quantifizierung der mRNA auf eine Echtzeit-PCR zurückgegriffen, welche mit einem LightCycler 96 durchgeführt wurde. Diese erlaubt es, die Menge der generierten DNA in Echtzeit zu messen, indem die Fluoreszenz gebundener LightCycler-Sonden (fluoreszierende Oligonukleotide, die sequenzspezifisch die DNA binden) in jedem Zyklus detektiert wird. Mit fortschreitenden Zyklen steigt die Menge des PCR-Produktes und damit die Fluoreszenzintensität. Abhängig von der ursprünglichen Konzentration sind mehr oder weniger Zyklen nötig, bis ein eindeutig detektierbares Fluoreszenzsignal als Schwellenwert überschritten ist. Die gemessene Expression wird im Sinne einer relativen Quantifizierung dabei mit der Expression eines unreguliert exprimierten Haushaltsgens („housekeeping gene“) ins Verhältnis gesetzt, sodass mögliche Fehler innerhalb einer Probe Ziel- und Haushaltsgen gleichermaßen betreffen [Pfaffl, 2001].

4.1.4.3 Analyse auf Proteinebene mittels Durchflusszytometrie

Die Messung der TLR-Expression erfolgte analog zur Bestimmung der CD-Oberflächenantigene mittels Durchflusszytometrie (vgl. 4.1.3.1). Wie die rt-PCR zur mRNA-Bestimmung wird diese Technik bei der Bestimmung der TLR-Expression auf Proteinebene regelhaft benutzt [Fawzy El-Sayed et al., 2017; Fawzy El-Sayed et al., 2016a; Fawzy-El-Sayed et al., 2016b]. Im Vergleich zu anderen Zellen scheint die Expression bei MSCs allerdings eher gering, was eine Detektion mit der Durchflusszytometrie schwierig machen kann [Delarosa et al., 2012]. Für die Analyse der intrazellulären TLRs mussten die Zellen permeabilisiert werden. Wie in den vorhergehenden Studien wurde dies mit einem entsprechenden Fix&Perm-Kit durchgeführt.

Insgesamt ergänzt sich die Durchflusszytometrie sinnvoll mit der PCR in der Hinsicht, dass bedingt durch verschiedene Faktoren Unterschiede in der Genexpression auf mRNA- und Proteinebene bestehen können [Maier et al., 2009].

4.2 Ergebnisse

Wie in vorhergehenden Studien [Sonoyama et al., 2008] zeigten die isolierten SCAPs das ganze Repertoire an MSCs-Eigenschaften [Sonoyama et al., 2008; Dominici et al., 2006]. Neben einer Plastik-Adhärenz wiesen die Zellen nach Stimulation mit den entsprechenden Medien eine trilineare Differenzierung in osteogene, adipogene und chondrogene Richtung mit eindeutigem qualitativen Färbeergebnis auf. Weiterhin exprimierten sie die Oberflächenmarker CD73, CD90 und CD105, während die Marker CD14, CD34 und CD45 nicht oder nur sehr schwach exprimiert wurden. Außerdem demonstrierten sie eine ausgeprägte Fähigkeit zur Kolonienbildung.

Für die gewonnenen SCAPs konnte ein eindeutiges TLR-Expressionsprofil erstellt werden: Auf mRNA-Ebene exprimierten die SCAPs unter normalen Kulturbedingungen die TL-Rezeptoren 1-10. Geordnet nach der höchsten medianen Expression wurden TLR10 und danach TLR3 am stärksten exprimiert, mit Abstand gefolgt von den anderen TLRs. Im Vergleich dazu wurden auf Proteinebene TLR8 am stärksten exprimiert, gefolgt von TLR10, 5, 2, 1, 3, 9, 7, 4 und 6. Dabei fällt auf, dass die Proteinexpression in der Messung mittels Durchflusszytometrie, wie bereits teilweise bei anderen MSCs festgestellt [Delarosa et al., 2012], relativ niedrig ist.

Als Bestandteil jeder initialen Heilung folgt eine entzündliche Veränderung der Umgebung jeder Gewebeverletzung und beeinflusst die angrenzenden Zellen. Frühere Studien demonstrierten bereits eine Sensitivität von SCAPs gegenüber einer solchen veränderten Mikroumgebung, wobei der Effekt auf die Zellen abhängig von der Dauer der Einwirkung ist. Eine kurze Stimulation kann förderlich auf

reparative und regenerative Prozesse wirken, während ein längeres Konfrontieren mit den Faktoren die Differenzierungsfähigkeiten bremst [Nada/El Backly, 2018; Chrepa et al., 2017; Liu et al., 2016]. (Patho-)Physiologische Ursachen dafür stellen Vorgänge wie apikale Parodontitis, Revaskularisierungsprozesse oder Apexogenese dar.

Auch in dieser Arbeit hatte die Stimulation durch das mit den Entzündungsfaktoren ergänzte Nährmedium einen Einfluss auf das TLR-Expressionsprofil der Zellen. Die Expression aller TLRs veränderte sich, nicht immer signifikant, nach der Stimulation mit Entzündungsmedium qualitativ meist kongruent auf mRNA- und auf Proteinebene. Auf mRNA-Ebene wurde die Expression von TLR1, 2 und 9 signifikant erhöht sowie die Expression von TLR3 und 4 signifikant verringert. Nach der höchsten medianen Expression geordnet, wurde ebenso wie unter normalen Umgebungsbedingungen TLR10 am stärksten exprimiert, mit Abstand gefolgt von den anderen TLRs. Im Vergleich dazu wurde auf Proteinebene nur die Expression von TLR3 signifikant reduziert. Zusätzlich kam es auch zu einer Veränderung der Reihenfolge in der quantitativen Expression, sodass nun TLR5 am stärksten exprimiert wurde, gefolgt von den TLRs 1, 2, 10, 4, 6, 8, 9, 7 und 3.

Die Ausstattung mit TLRs auf und in Stammzellen aus der apikalen Papille lässt darauf schließen, dass neben Zellen des Immunsystems auch diese Zellen in der Lage sein könnten, PAMPs verschiedener Mikroorganismen zu erkennen und somit wahrscheinlich in unfertig ausgebildeten Zähnen an der Immunantwort mitwirken. Das hier zusammengestellte TLR-Expressionsprofil mit seinen Veränderungen unter entzündlichen Bedingungen könnte die Reaktion der SCAPs auf entsprechende Liganden der Rezeptoren in vivo verständlich machen. Es scheint eine direkte Beziehung zwischen dem Expressionslevel verschiedener TLRs und der zellulären Sensitivität zu den korrespondierenden Liganden zu geben [Zarembler/Godowski, 2002]. Physiologisch kommen SCAPs durch ihre anatomische Lage bedingt allerdings im Vergleich mit z.B. gingivalen MSCs nicht mit diesen Liganden in Kontakt. Da der Zahndurchbruch jedoch vor dem Abschluss des Wurzelwachstums erfolgt, können Mikroorganismen durch kariöse Läsionen, Frakturen oder insuffiziente Restaurationen bis zur Pulpa vordringen und sich von dort bis zur apikalen Papille ausbreiten. Auf diese Weise könnten PAMPs von gram-positiven und -negativen Bakterien mit den SCAPs in Kontakt treten. Die durch diese Bindung ausgelöste Signalkaskade führt zur Aktivierung verschiedener Faktoren (IRF, NF- κ B, AP-1), welche die Transkription von Chemo- und Zytokinen steuern, sodass die SCAPs in modulatorischer Weise auf die Zellen des Immunsystems beispielweise durch Rekrutierung einwirken könnten. Weiterhin führt die Bindung verschiedener Liganden zu einer spezifisch verstärkten Phagozytose von Bakterien [Doyle et al., 2004].

Mittlerweile wurden bereits für verschiedene orale Vorläufer-/Stammzellpopulationen spezifische TLR-Expressionsprofile aufgestellt: Die TLRs 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9 und 10 werden in MSCs des parodontalen Ligaments [Li et al., 2014] sowie der Pulpa [Fawzy El-Sayed et al., 2016a] exprimiert. Zellen des Alveolarfortsatzes besitzen Rezeptoren vom Typ TLR1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 und 10 bei fehlender TLR9-Expression [Fawzy El-Sayed et al., 2017] und gingivale MSCs demonstrieren eine Expression von TLR1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 und 10 [Fawzy-El-Sayed et al., 2016b]. Auch bei diesen Zellen führt die Wirkung einer entzündlich veränderten Umgebung abhängig von ihrer Herkunft zu einer Veränderung des Expressionsprofils. Gingivale MSCs regulierten die Expression der TLRs 1, 2, 4, 5, 7 und 10 hoch und stoppten die von TLR6 [Fawzy-El-Sayed et al., 2016b]. Pulpale MSCs unter denselben Bedingungen erhöhten die Expression von TLR2, 3, 4, 5 und 8 und senkten die der TLRs 1, 6, 7, 9 und 10 [Fawzy El-Sayed et al., 2016a]. Hierbei ist vor allem ein Vergleich mit den anatomisch nahe gelegenen und auch entwicklungsgeschichtlich verwandten SCAPs interessant.

Wie bei diesen [Fawzy El-Sayed et al., 2016a] führt das entzündliche Milieu bei den SCAP-i zu einer Hochregulation von TLR2 und 4, sodass eine prinzipiell bessere Sensitivität gegenüber deren Liganden (Lipoteichonsäure, LPS) eine gesteigerte Identifikation gram-positiver und -negativer pulpaler und periapikaler Pathogene bewirken könnte. Weiterhin würde wie bei den DPSCs die gesteigerte TLR5-Expression eine verbesserte Erkennung von bakteriellem Flagellin ermöglichen. Konträr zu den DPSCs wird auch die Expression der Lipoprotein-sensitiven TLRs 1 und 6 verstärkt sowie die von TLR9, welche der Wahrnehmung bakterieller unmethylierter CpG Nukleotide dienen. Demgegenüber steht eine niedrigere Expression der Rezeptoren TLR3, 7 und 8, was eine schlechtere Sensitivität der Zellen gegenüber einzel- und doppelsträngiger RNA entsprechender Viren bewirken könnte [Xagorari/Chlichlia, 2008].

Zusammengefasst könnte das entzündlich veränderte Umgebungsmilieu die Erkennung bakterieller Bestandteile verbessern, während die viraler PAMPs reduziert wird. Das Einwirken der PAMPs auf die TLRs ist allerdings keine einfache bidirektionale Wechselwirkung, sodass eine direkte PAMP-TLR-Beziehung eher zurückhaltend zu betrachten ist. Ein Grund dafür ist, dass mögliche Co-Aktivierungen verschiedener TLRs mögliche Interaktionen deutlich verkomplizieren können. In diesem Zusammenhang wurde bereits gezeigt, dass eine solche Kombination die Identifikation bestimmter PAMPs sowohl verbessern als auch inhibieren kann [Hajjar et al., 2001; Wyllie et al., 2000]. Dies könnte darauf hindeuten, dass zelluläre Antworten auf PAMPs von dem ganzen Expressionsprofil an TLRs sowie weiterer Cofaktoren und auch der Menge an PAMPs abhängen [Zarembek/Godowski, 2002]. Hinzu kommt, dass die Rezeptoren TLR1 und 6 als Co-Rezeptoren von TLR2 funktionieren, wodurch auch die Verteilung verschiedener TLRs einer Zelle ihre Antwort auf entsprechende Liganden modifizieren könnte [Hajjar et al., 2001].

Während die hauptsächlich praktizierte Therapie irreversibel entzündeter oder nekrotischer Zähne mit unvollständigem Wurzelwachstum eine Apexifikation [Rafter, 2005] und anschließend die komplette Aufbereitung des Kanalsystems mit folgender Obturation durch eine Wurzelfüllung vorsieht, verfolgt die regenerative Endodontologie (RET) einen anderen Weg, um die Nachteile dieser Therapie zu umgehen. So kann eine lange Applikation von Kalziumhydroxid in den Wurzelkanal den behandelten Zahn schwächen [Andreasen et al., 2002] und das Risiko von cervikalen Frakturen erhöhen [Cvek, 1992]. Diese Nachteile treten bei einer alternativen apikalen Einlage aus MTA zwar nicht auf, das grundsätzliche Problem des gestoppten Wurzelwachstums sowie der Devitalisierung bleibt jedoch bestehen. Ziel der RET hingegen ist die Füllung des Kanallumens nach erfolgter Desinfektion mit körpereigenem vitalen Gewebe [Saoud et al., 2016]. Dabei stellt das Einbluten in den Kanal durch eine iatrogen hervorgerufene Überinstrumentierung eine entscheidende Maßnahme dar [Saoud et al., 2016], um das Einschwemmen von mesenchymalen Vorläuferzellen aus der periapikalen Region zu erreichen [Lovelace et al., 2011]. Bisher konnte in klinischen Studien bei Menschen und Tieren nur Bildung von knochen- und zementähnlichen Geweben nach RET nachgewiesen werden, was für eine Produktion durch eingeschwemmte Zellen aus dem parodontalen Ligament spricht. Auf diese Weise wird die ursprüngliche Funktion der Pulpa jedoch nicht wiederhergestellt [Kim et al., 2018]. Eine Produktion dentinähnlichen Gewebes wäre nur durch Odontoblasten-ähnliche Zellen möglich, zu denen sich SCAPs differenzieren können. Abseits klinischer Bedingungen ist eine Dentin-Bildung durch diese möglich [Huang et al., 2010], was eine echte Dentin-Bildung im Zuge einer RET prinzipiell möglich erscheinen lässt. Ein großer Unterschied in den Studien mit parodontal-verbundenen und dentinähnlichen Geweben als Ergebnis sind die Umgebungsbedingungen (klinisch vs. modellhaft).

Die Konfrontation von SCAPs mit Pathogenen in Zähnen mit nicht abgeschlossenem Wurzelwachstum und infiziertem Kanalsystem könnte das therapeutische Potential dieser bei möglichen in-vivo-Anwendungen tangieren. So führen irreversible Pulpitiden und Nekrosen zu einer Verringerung der Zelldichte im apikalen Gewebe [Ricucci et al., 2017] und selbst nach antimikrobieller endodontischer Behandlung verbleiben auch in Zähnen mit nicht abgeschlossenem Wurzelwachstum Bakterien im Kanalsystem [Latham et al., 2016; Sakamoto et al., 2007; Chávez De Paz et al., 2003], welche auf diese Weise potenziell auf vorhandene SCAPs einwirken. So konnte gezeigt werden, dass persistierende Infektionen in unfertig ausgebildeten Zähnen einen negativen Einfluss auf die Wurzelbildung haben [Verma et al., 2017]. Dies könnte durch den direkten Einfluss von Pathogenen und ihren PAMPs begründet sein. Neben der möglichen Beeinflussung des Immunsystems scheint das Vorhandensein der TLRs auf und in SCAPs einen direkten Effekt verschiedener PAMPs auf diese zu ermöglichen. Zur Beeinflussung von LPS auf das Differenzierungsverhalten dieser gibt es unterschiedliche Untersuchungen. Die Anwesenheit eines *Enterococcus faecalis*-Biofilms führt zu einer Herabregulation

dentinogener Gene und einer Hochregulation osteogener Gene. Insgesamt wird die Mineralisierungskapazität durch die Anwesenheit des Biofilms und seiner Nebenprodukte aber signifikant inhibiert [Vishwanat et al., 2017]. Einerseits konnte eine Vorbehandlung mit LPS aus *Porphyromonas gingivalis* die Mineralisierungsfähigkeiten nicht affizieren [Lertchirakarn/Aguilar, 2017]. Demgegenüber konnte jedoch gezeigt werden, dass die Konfrontation mit PAMPs anderer endodontopathogener Keime (*Streptococcus oralis* and *Actinomyces naeslundii*) die Mineralisation TLR-abhängig hemmt. Sind sie bakteriellen Stimuli ausgesetzt, geraten die SCAPs in einen eher immunologischen als mineralisierenden Phänotypen. Hierbei scheint TLR2 über die nachgeschaltete „TGF- β -activated kinase 1 (TAK1)“ der hauptsächlich regulierende Faktor zu sein. Eine Inhibierung eines dieser proinflammatorischen Mediatoren (TLR2 oder TAK1) konnte die Mineralisierungskapazitäten der SCAPs wiederherstellen [Petridis et al., 2018]. Daneben induziert eine Stimulation der TLR4-Rezeptoren durch LPS in den SCAPs eine inflammatorische Antwort mit Synthese der Zytokine IL-6, IL-8 und TNF- α [Zhang et al., 2013]. Als ein möglicher Gegenspieler bakterieller Stoffwechselprodukte könnte der Transkriptionsfaktor *nuclear factor I C (NFIC)* funktionieren, welcher eine wichtige Rolle in der Wurzelentwicklung spielt [Wang/Feng, 2017]. Dieser ist bei einer Überexpression in der Lage, die inflammatorische Antwort der SCAPs und somit die durch LPS initiierte initiale Immunantwort zu supprimieren. Auf diese Weise könnte *NFIC* bei der endodontischen Behandlung von Zähnen mit nicht abgeschlossenem Wurzelwachstum von Bedeutung sein [Zhang et al., 2013].

Um die Funktionen und Auswirkungen nach Aktivierung der Toll-like-Rezeptoren, einzeln oder in verschiedenen Kombinationen, mit oder ohne gebundene PAMPs besser verstehen zu können, ist weitere Forschung notwendig. Auf diese Weise könnte man das mögliche immunmodulatorische sowie therapeutische Potenzial der SCAPs weiter präzisieren. Regenerative endodontische Therapieansätze könnten von einem besseren Verständnis der Konsequenzen einer TLR-Aktivierung bei SCAPs profitieren.

5. Zusammenfassung

Die apikale Papille ist das während der Zahnentwicklung am apikalen Wurzelbereich befindliche Gewebe. Aus ihr geht mit fortschreitendem Wurzelwachstum die Zahnpulpa hervor, und sie ist Quelle einer eigenen Population von mesenchymalen Stamm-/Vorläuferzellen (SCAPs). Diese Zellen zeigen bemerkenswerte regenerative Eigenschaften und können in vielfältiger Art und Weise mit ihrer Umgebung interagieren oder durch sie beeinflusst werden. Toll-like Rezeptoren (TLRs) sind als Pattern-Recognition-Rezeptoren Bestandteil der angeborenen Immunabwehr und ermöglichen die Erkennung bestimmter Muster an Pathogenen. Im menschlichen Körper sind bisher 10 unterschiedliche TLRs bekannt, die intra- und extrazellulär auch bei verschiedenen Populationen von Stamm-/Vorläuferzellen vorkommen. Das Ziel dieser Studie war, ein Expressionsprofil der TLRs von Stammzellen der apikalen Papille unter normalen sowie entzündlichen Bedingungen zu erstellen.

Dazu wurden von unfertig ausgebildeten Weisheitszähnen die apikalen Papillen entfernt. Die herauswachsenden Zellen wurden mit einem STRO-1-Antikörper immunomagnetisch sortiert und anschließend hinsichtlich ihrer Stammzellcharakteristika untersucht. Nach einer Inkubation in normalem oder mit Entzündungsfaktoren (IL-1 β , IFN- γ , TNF- α , IFN- α) angereichertem Medium wurde mittels quantitativer Echtzeit-PCR und Durchflusszytometrie die TLR-Expression von SCAPs unter normalen und entzündlichen Bedingungen auf mRNA- bzw. Proteinebene festgestellt.

Dabei demonstrierten die SCAPs alle geforderten Eigenschaften. Nach Stimulation mit entsprechenden Medien differenzierten sie in osteogene, adipogene und chondrogene Richtung. Dünn ausgesät zeigten sie eine deutliche Kolonienbildung. Daneben exprimierten sie an ihrer Oberfläche die Antigene CD73, CD90 und CD105, während die Antigene CD14, CD34 und CD45 nicht oder nur sehr schwach exprimiert wurden.

Unter dem normalen Basismedium exprimieren die Stammzellen aus der apikalen Papille die TLRs 1 bis 10. Unter dem Einfluss einer entzündlichen Umgebung wird die Expression der TLRs 1, 2, 4, 5, 6 und 9 hochreguliert, während die der TLRs 3, 7, 8 und 10 herunterreguliert wird.

Zusammengefasst wurde in dieser Arbeit zum ersten Mal ein komplettes Expressionsprofil der Toll-like-Rezeptoren von Stamm-/Vorläuferzellen aus der apikalen Zahnpapille unter normalen und entzündlich veränderten Umgebungsbedingungen erstellt. Diese Kenntnisse können einen Einfluss auf das Potenzial bei der Verwendung solcher Zellen unter regenerativen Bedingungen in vivo haben. Weitere Forschung ist nötig, um die Funktion nach Aktivierung der Rezeptoren - einzeln oder in Kombination - zu beschreiben und das immunmodulatorische sowie therapeutische Potenzial der SCAPs weiter zu präzisieren.

6. Literaturverzeichnis

- Abe, S., Yamaguchi, S., Watanabe, A., Hamada, K., Amagasa, T. (2008): Hard tissue regeneration capacity of apical pulp derived cells (APDCs) from human tooth with immature apex. in: *Biochem Biophys Res Commun*, 371, 1, S. 90–93.
- Akashi-Takamura, S., Miyake, K. (2008): TLR accessory molecules. in: *Curr Opin Immunol*, 20, 4, S. 420–25.
- Akira, S., Takeda, K. (2004): Toll-like receptor signalling. in: *Nat Rev Immunol*, 4, 7, S. 499–511.
- Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O. (2006): Pathogen recognition and innate immunity. in: *Cell*, 124, 4, S. 783–801.
- Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R., Flavell, R.A. (2001): Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. in: *Nature*, 413, 6857, S. 732–38.
- American Association of Endodontists AAE (2016): Clinical Considerations for a Regenerative Procedure. <https://www.aae.org/specialty/wp-content/uploads/sites/2/2017/06/currentregenerativeendodonticconsiderations.pdf> (17.7.21)
- Anderson, K.V., Bokla, L., Nüsslein-Volhard, C. (1985): Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo, The induction of polarity by the Toll gene product. in: *Cell*, 42, 3, S. 791–98.
- Andreasen, J.O., Farik, B., Munksgaard, E.C. (2002): Long-term calcium hydroxide as a root canal dressing may increase risk of root fracture. in: *Dent Traumatol*, 18, 3, S. 134–37.
- Bakopoulou, A., Leyhausen, G., Volk, J., Koidis, P., Geurtsen, W. (2013): Comparative characterization of STRO-1(neg)/CD146(pos) and STRO-1(pos)/CD146(pos) apical papilla stem cells enriched with flow cytometry. in: *Arch Oral Biol*, 58, 10, S. 1556–68.
- Bakopoulou, A., Leyhausen, G., Volk, J., Tsiftoglou, A., Garefis, P., Koidis, P., Geurtsen, W. (2011): Comparative analysis of in vitro osteo/odontogenic differentiation potential of human dental pulp stem cells (DPSCs) and stem cells from the apical papilla (SCAP). in: *Arch Oral Biol*, 56, 7, S. 709–21.
- Battula, V.L., Trembl, S., Abele, H., Bühring, H.-J. (2008): Prospective isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human placenta using a frizzled-9-specific monoclonal antibody. in: *Differentiation*, 76, 4, S. 326–36.
- Beutler, B. (2004): Innate immunity, An overview. in: *Mol Immunol*, 40, 12, S. 845–59.
- Bleicher, F. (2014): Odontoblast physiology. in: *Exp Cell Res*, 325, 2, S. 65–71.
- Blum, B., Benvenisty, N. (2008): The tumorigenicity of human embryonic stem cells. in: *Adv Cancer Res*, 100, S. 133–58.

Bonilla, F.A., Oettgen, H.C. (2010): Adaptive immunity. in: *J Allergy Clin Immunol*, 125, 2 Suppl 2, S33-40.

Brubaker, S.W., Bonham, K.S., Zanoni, I., Kagan, J.C. (2015): Innate immune pattern recognition, A cell biological perspective. in: *Annu Rev Immunol*, 33, S. 257–90.

Caplan, A.I. (1991): Mesenchymal stem cells. in: *J Orthop Res*, 9, 5, S. 641–50.

Cell Signaling Technology (2020): Toll-like Receptor Signaling.
<https://www.cellsignal.com/contents/science-cst-pathways-immunology-inflammation/toll-like-receptor-signaling/pathways-trl> (17.07.2021)

Chala, S., Abouqal, R., Rida, S. (2011): Apexification of immature teeth with calcium hydroxide or mineral trioxide aggregate, Systematic review and meta-analysis. in: *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 112, 4, e36-42.

Chaplin, D.D. (2010): Overview of the immune response. in: *J Allergy Clin Immunol*, 125, 2 Suppl 2, S3-23.

Chatzivasileiou, K., Lux, C.A., Steinhoff, G., Lang, H. (2013): Dental follicle progenitor cells responses to *Porphyromonas gingivalis* LPS. in: *J Cell Mol Med*, 17, 6, S. 766–73.

Chávez De Paz, L.E., Dahlén, G., Molander, A., Möller, A., Bergenholtz, G. (2003): Bacteria recovered from teeth with apical periodontitis after antimicrobial endodontic treatment. in: *Int Endod J*, 36, 7, S. 500–08.

Chrepa, V., Pitcher, B., Henry, M.A., Diogenes, A. (2017): Survival of the Apical Papilla and Its Resident Stem Cells in a Case of Advanced Pulpal Necrosis and Apical Periodontitis. in: *J Endod*, 43, 4, S. 561–67.

Chueh, L.-H., Huang, G.T.-J. (2006): Immature teeth with periradicular periodontitis or abscess undergoing apexogenesis, A paradigm shift. in: *J Endod*, 32, 12, S. 1205–13.

Clark, R., Kupper, T. (2005): Old meets new, The interaction between innate and adaptive immunity. in: *J Invest Dermatol*, 125, 4, S. 629–37.

Cohen, S., Hargreaves, K.M. (Hrsg.) (2006): *Pathways of the pulp*. 9. Aufl., St. Louis, Mo.

Cvek, M. (1992): Prognosis of luxated non-vital maxillary incisors treated with calcium hydroxide and filled with gutta-percha. A retrospective clinical study. in: *Endod Dent Traumatol*, 8, 2, S. 45–55.

da Silva Meirelles, L., Chagastelles, P.C., Nardi, N.B. (2006): Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. in: *J Cell Sci*, 119, Pt 11, S. 2204–13.

Deguine, J., Barton, G.M. (2014): MyD88, A central player in innate immune signaling. in: *F1000Prime Rep*, 6, S. 97.

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

Delarosa, O., Lombardo, E. (2010): Modulation of adult mesenchymal stem cells activity by toll-like receptors, Implications on therapeutic potential. in: *Mediators Inflamm*, 2010, S. 865601.

Diebold, S.S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S., Reis e Sousa, C. (2004): Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. in: *Science*, 303, 5663, S. 1529–31.

Ding, G., Liu, Y., An, Y., Zhang, C., Shi, S., Wang, W., Wang, S. (2010): Suppression of T cell proliferation by root apical papilla stem cells in vitro. in: *Cells Tissues Organs (Print)*, 191, 5, S. 357–64.

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., Horwitz, E. (2006): Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. in: *Cytotherapy*, 8, 4, S. 315–17.

Doyle, S.E., O'Connell, R.M., Miranda, G.A., Vaidya, S.A., Chow, E.K., Liu, P.T., Suzuki, S., Suzuki, N., Modlin, R.L., Yeh, W.-C., Lane, T.F., Cheng, G. (2004): Toll-like Receptors Induce a Phagocytic Gene Program through p38. in: *Journal of Experimental Medicine*, 199, 1, S. 81–90.

Drummond, R.A., Brown, G.D. (2011): The role of Dectin-1 in the host defence against fungal infections. in: *Curr Opin Microbiol*, 14, 4, S. 392–99.

El-Sayed, K.M.F., Paris, S., Graetz, C., Kassem, N., Mekhemar, M., Ungefroren, H., Fandrich, F., Dorfer, C. (2015): Isolation and characterisation of human gingival margin-derived STRO-1/MACS(+) and MACS(-) cell populations. in: *Int J Oral Sci*, 7, 2, S. 80–88.

Fawzy El-Sayed, K.M., Boeckler, J., Dörfer, C.E. (2017): TLR expression profile of human alveolar bone proper-derived stem/progenitor cells and osteoblasts. in: *J Craniomaxillofac Surg*, 45, 12, S. 2054–60.

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

Fawzy El-Sayed, K.M., Elahmady, M., Adawi, Z., Aboushadi, N., Elnaggar, A., Eid, M., Hamdy, N., Sanaa, D., Dörfer, C.E. (2019): The periodontal stem/progenitor cell inflammatory-regenerative cross talk, A new perspective. in: *J Periodont Res*, 54, 2, S. 81–94.

Fawzy El-Sayed, K.M., Klingebiel, P., Dörfer, C.E. (2016a): Toll-like Receptor Expression Profile of Human Dental Pulp Stem/Progenitor Cells. in: *J Endod*, 42, 3, S. 413–17.

Fawzy El-Sayed, K.M., Paris, S., Becker, S., Kassem, N., Ungefroren, H., Fändrich, F., Wiltfang, J., Dörfer, C. (2012): Isolation and characterization of multipotent postnatal stem/progenitor cells from human alveolar bone proper. in: *J Craniomaxillofac Surg*, 40, 8, S. 735–42.

Fawzy-El-Sayed, K., Mekhemar, M., Adam-Klages, S., Kabelitz, D., Dorfer, C. (2016b): TIR expression profile of human gingival margin-derived stem progenitor cells. in: *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 21, 1, e30-8.

Fitzsimmons, R.E.B., Mazurek, M.S., Soos, A., Simmons, C.A. (2018): Mesenchymal Stromal/Stem Cells in Regenerative Medicine and Tissue Engineering. in: *Stem Cells Int*, 2018, S. 8031718.

Friedenstein, A.J., Chailakhyan, R.K., Latsinik, N.V., Panasyuk, A.F., Keiliss-Borok, I.V. (1974a): Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. in: *Transplantation*, 17, 4, S. 331–40.

Friedenstein, A.J., Deriglasova, U.F., Kulagina, N.N., Panasuk, A.F., Rudakowa, S.F., Luriá, E.A., Ruadkow, I.A. (1974b): Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. in: *Exp Hematol*, 2, 2, S. 83–92.

Furness, S.G.B., McNaghy, K. (2006): Beyond mere markers, Functions for CD34 family of sialomucins in hematopoiesis. in: *Immunol Res*, 34, 1, S. 13–32.

Galler, K.M., Buchalla, W., Hiller, K.-A., Federlin, M., Eidt, A., Schiefersteiner, M., Schmalz, G. (2015): Influence of root canal disinfectants on growth factor release from dentin. in: *J Endod*, 41, 3, S. 363–68.

Gewirtz, A.T., Navas, T.A., Lyons, S., Godowski, P.J., Madara, J.L. (2001): Cutting edge, Bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. in: *J Immunol*, 167, 4, S. 1882–85.

Godoy, J.A.P., Paiva, R.M.A., Souza, A.M., Kondo, A.T., Kutner, J.M., Okamoto, O.K. (2019): Clinical Translation of Mesenchymal Stromal Cell Therapy for Graft Versus Host Disease. in: *Front Cell Dev Biol*, 7, S. 255.

Goldberg, M., Lasfargues, J.-J. (1995): Pulpo-dentinal complex revisited. in: *Journal of Dentistry*, 23, 1, S. 15–20.

Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P.G., Shi, S. (2000): Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. in: *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 25, S. 13625–30.

Hajjar, A.M., O'Mahony, D.S., Ozinsky, A., Underhill, D.M., Aderem, A., Klebanoff, S.J., Wilson, C.B. (2001): Cutting edge, Functional interactions between toll-like receptor (TLR) 2 and TLR1 or TLR6 in response to phenol-soluble modulins. in: *J Immunol*, 166, 1, S. 15–19.

Hashimoto, C., Hudson, K.L., Anderson, K.V. (1988): The Toll gene of drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. in: *Cell*, 52, 2, S. 269–79.

Hawn, T.R., Verbon, A., Lettinga, K.D., Zhao, L.P., Li, S.S., Laws, R.J., Skerrett, S.J., Beutler, B., Schroeder, L., Nachman, A., Ozinsky, A., Smith, K.D., Aderem, A. (2003): A common dominant TLR5 stop codon polymorphism abolishes flagellin signaling and is associated with susceptibility to legionnaires' disease. in: *J Exp Med*, 198, 10, S. 1563–72.

Hayashi, F., Smith, K.D., Ozinsky, A., Hawn, T.R., Yi, E.C., Goodlett, D.R., Eng, J.K., Akira, S., Underhill, D.M., Aderem, A. (2001): The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. in: *Nature*, 410, 6832, S. 1099–103.

He, S., Nakada, D., Morrison, S.J. (2009): Mechanisms of stem cell self-renewal. in: *Annu Rev Cell Dev Biol*, 25, S. 377–406.

Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H., Bauer, S. (2004): Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. in: *Science*, 303, 5663, S. 1526–29.

Hemeda, H., Jakob, M., Ludwig, A.-K., Giebel, B., Lang, S., Brandau, S. (2010): Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha differentially affect cytokine expression and migration properties of mesenchymal stem cells. in: *Stem Cells Dev*, 19, 5, S. 693–706.

Hemmi, H., Kaisho, T., Takeuchi, O., Sato, S., Sanjo, H., Hoshino, K., Horiuchi, T., Tomizawa, H., Takeda, K., Akira, S. (2002): Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. in: *Nat Immunol*, 3, 2, S. 196–200.

Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., Akira, S. (2000): A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. in: *Nature*, 408, 6813, S. 740–45.

Henrick, B.M., Yao, X.-D., Zahoor, M.A., Abimiku, A.'l., Osawe, S., Rosenthal, K.L. (2019): TLR10 Senses HIV-1 Proteins and Significantly Enhances HIV-1 Infection. in: *Front Immunol*, 10, S. 482.

Hilkens, P., Bronckaers, A., Ratajczak, J., Gervois, P., Wolfs, E., Lambrichts, I. (2017): The Angiogenic Potential of DPSCs and SCAPs in an In Vivo Model of Dental Pulp Regeneration. in: *Stem Cells Int*, 2017, S. 2582080.

Hilkens, P., Fanton, Y., Martens, W., Gervois, P., Struys, T., Politis, C., Lambrichts, I., Bronckaers, A. (2014): Pro-angiogenic impact of dental stem cells in vitro and in vivo. in: *Stem Cell Res*, 12, 3, S. 778–90.

Hopkins, P.A., Sriskandan, S. (2005): Mammalian Toll-like receptors, To immunity and beyond. in: *Clin Exp Immunol*, 140, 3, S. 395–407.

Horwitz, E.M., Le Blanc, K., Dominici, M., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F.C., Deans, R.J., Krause, D.S., Keating, A. (2005): Clarification of the nomenclature for MSC, The International Society for Cellular Therapy position statement. in: *Cytotherapy*, 7, 5, S. 393–95.

Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K., Akira, S. (1999): Cutting edge, Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. in: *J Immunol*, 162, 7, S. 3749–52.

Hu, Y., Liao, L., Wang, Q., Ma, L., Ma, G., Jiang, X., Zhao, R.C. (2003): Isolation and identification of mesenchymal stem cells from human fetal pancreas. in: *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 141, 5, S. 342–49.

Hua, Z., Hou, B. (2013): TLR signaling in B-cell development and activation. in: *Cell Mol Immunol*, 10, 2, S. 103–06.

Huang, G.T.-J., Gronthos, S., Shi, S. (2009): Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources, Their biology and role in regenerative medicine. in: *J Dent Res*, 88, 9, S. 792–806.

Huang, G.T.-J., Sonoyama, W., Liu, Y., Liu, H., Wang, S., Shi, S. (2008): The hidden treasure in apical papilla, The potential role in pulp/dentin regeneration and bioroot engineering. in: *J Endod*, 34, 6, S. 645–51.

Huang, G.T.-J., Yamaza, T., Shea, L.D., Djouad, F., Kuhn, N.Z., Tuan, R.S., Shi, S. (2010): Stem/progenitor cell-mediated de novo regeneration of dental pulp with newly deposited continuous layer of dentin in an in vivo model. in: *Tissue Eng Part A*, 16, 2, S. 605–15.

Huang, X.-F., Chai, Y. (2012): Molecular regulatory mechanism of tooth root development. in: *Int J Oral Sci*, 4, 4, S. 177–81.

Hwa Cho, H., Bae, Y.C., Jung, J.S. (2006): Role of toll-like receptors on human adipose-derived stromal cells. in: *Stem Cells*, 24, 12, S. 2744–52.

Iwasaki, A., Medzhitov, R. (2015): Control of adaptive immunity by the innate immune system. in: *Nat Immunol*, 16, 4, S. 343–53.

Iwaya, S.I., Ikawa, M., Kubota, M. (2001): Revascularization of an immature permanent tooth with apical periodontitis and sinus tract. in: *Dent Traumatol*, 17, 4, S. 185–87.

Jeon, B.-G., Kang, E.-J., Kumar, B.M., Maeng, G.-H., Ock, S.-A., Kwack, D.-O., Park, B.-W., Rho, G.-J. (2011): Comparative analysis of telomere length, telomerase and reverse transcriptase activity in human dental stem cells. in: *Cell Transplant*, 20, 11-12, S. 1693–705.

Jernvall, J., Thesleff, I. (2012): Tooth shape formation and tooth renewal, Evolving with the same signals. in: *Development*, 139, 19, S. 3487–97.

- Jiang, S., Li, X., Hess, N.J., Guan, Y., Tapping, R.I. (2016): TLR10 Is a Negative Regulator of Both MyD88-Dependent and -Independent TLR Signaling. in: *J Immunol*, 196, 9, S. 3834–41.
- Jin, H.J., Nam, H.Y., Bae, Y.K., Kim, S.Y., Im, I.R., Oh, W., Yang, Y.S., Choi, S.J., Kim, S.W. (2010): GD2 expression is closely associated with neuronal differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. in: *Cell Mol Life Sci*, 67, 11, S. 1845–58.
- Johnsen, D., Johns, S. (1978): Quantitation of nerve fibres in the primary and permanent canine and incisor teeth in man. in: *Arch Oral Biol*, 23, 9, S. 825–29.
- Jontell, M., Okiji, T., Dahlgren, U., Bergenholtz, G. (1998): Immune defense mechanisms of the dental pulp. in: *Crit Rev Oral Biol Med*, 9, 2, S. 179–200.
- Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K., Akira, S. (1999): Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. in: *Immunity*, 11, 1, S. 115–22.
- Kawai, T., Akira, S. (2007): Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. in: *Trends Mol Med*, 13, 11, S. 460–69.
- Kawai, T., Akira, S. (2010): The role of pattern-recognition receptors in innate immunity, Update on Toll-like receptors. in: *Nat Immunol*, 11, 5, S. 373–84.
- Kim, S.G., Malek, M., Sigurdsson, A., Lin, L.M., Kahler, B. (2018): Regenerative endodontics, A comprehensive review. in: *Int Endod J*, 51, 12, S. 1367–88.
- Kolf, C.M., Cho, E., Tuan, R.S. (2007): Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells, Regulation of niche, self-renewal and differentiation. in: *Arthritis Res Ther*, 9, 1, S. 204.
- Kopen, G.C., Prockop, D.J., Phinney, D.G. (1999): Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. in: *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 19, S. 10711–16.
- Krieg, A.M., Yi, A.K., Matson, S., Waldschmidt, T.J., Bishop, G.A., Teasdale, R., Koretzky, G.A., Klinman, D.M. (1995): CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. in: *Nature*, 374, 6522, S. 546–49.
- Kumar, H., Kawai, T., Akira, S. (2009): Toll-like receptors and innate immunity. in: *Biochem Biophys Res Commun*, 388, 4, S. 621–25.
- Kunkel, M. (2019): Operative Entfernung von Weisheitszähnen, S2k-Leitlinie.
https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/007-003l_S2k_Weisheitszahnentfernung_2019-08.pdf (17.7.21)
- Lan, Y., Jia, S., Jiang, R. (2014): Molecular patterning of the mammalian dentition. in: *Semin Cell Dev Biol*, 25-26, S. 61–70.
- Lanier, L.L. (2005): NK cell recognition. in: *Annu Rev Immunol*, 23, S. 225–74.

- Latham, J., Fong, H., Jewett, A., Johnson, J.D., Paranjpe, A. (2016): Disinfection Efficacy of Current Regenerative Endodontic Protocols in Simulated Necrotic Immature Permanent Teeth. in: *J Endod*, 42, 8, S. 1218–25.
- Lawrence, T. (2009): The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. in: *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1, 6, a001651.
- Le Blanc, K., Tammik, C., Rosendahl, K., Zetterberg, E., Ringdén, O. (2003): HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. in: *Exp Hematol*, 31, 10, S. 890–96.
- Le Friec, G., Kemper, C. (2009): Complement, Coming full circle. in: *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 57, 6, S. 393–407.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.-M., Hoffmann, J.A. (1996): The Dorsoventral Regulatory Gene Cassette *spätzle/Toll/cactus* Controls the Potent Antifungal Response in *Drosophila* Adults. in: *Cell*, 86, 6, S. 973–83.
- Lertchirakarn, V., Aguilar, P. (2017): Effects of Lipopolysaccharide on the Proliferation and Osteogenic Differentiation of Stem Cells from the Apical Papilla. in: *J Endod*, 43, 11, S. 1835–40.
- Li, C., Li, B., Dong, Z., Gao, L., He, X., Liao, L., Hu, C., Wang, Q., Jin, Y. (2014): Lipopolysaccharide differentially affects the osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells and bone marrow mesenchymal stem cells through Toll-like receptor 4 mediated nuclear factor κ B pathway. in: *Stem Cell Res Ther*, 5, 3, S. 67.
- Li, W., Ren, G., Huang, Y., Su, J., Han, Y., Li, J., Chen, X., Cao, K., Chen, Q., Shou, P., Zhang, L., Yuan, Z.-R., Roberts, A.I., Shi, S., Le, A.D., Shi, Y. (2012): Mesenchymal stem cells, A double-edged sword in regulating immune responses. in: *Cell Death Differ*, 19, 9, S. 1505–13.
- Linde, A. (1985): The extracellular matrix of the dental pulp and dentin. in: *J Dent Res*, 64 Spec No, S. 523–29.
- Linde, A., Goldberg, M. (1993): Dentinogenesis. in: *Crit Rev Oral Biol Med*, 4, 5, S. 679–728.
- Liu, C., Xiong, H., Chen, K., Huang, Y., Yin, X. (2016): Long-term exposure to pro-inflammatory cytokines inhibits the osteogenic/dentinogenic differentiation of stem cells from the apical papilla. in: *Int Endod J*, 49, 10, S. 950–59.
- Lombardo, E., Delarosa, O., Mancheño-Corvo, P., Menta, R., Ramírez, C., Büscher, D. (2009): Toll-like receptor-mediated signaling in human adipose-derived stem cells, Implications for immunogenicity and immunosuppressive potential. in: *Tissue Eng Part A*, 15, 7, S. 1579–89.

Lovelace, T.W., Henry, M.A., Hargreaves, K.M., Diogenes, A. (2011): Evaluation of the delivery of mesenchymal stem cells into the root canal space of necrotic immature teeth after clinical regenerative endodontic procedure. in: *J Endod*, 37, 2, S. 133–38.

Lowman, J.V., Burke, R.S., Pelleu, G.B. (1973): Patent accessory canals, Incidence in molar furcation region. in: *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 36, 4, S. 580–84.

Lubkowska, A., Dolegowska, B., Banfi, G. (2012): Growth factor content in PRP and their applicability in medicine. in: *J Biol Regul Homeost Agents*, 26, 2 Suppl 1, 3S-22S.

Ma, S., Xie, N., Li, W., Yuan, B., Shi, Y., Wang, Y. (2014): Immunobiology of mesenchymal stem cells. in: *Cell Death Differ*, 21, 2, S. 216–25.

Maier, T., Güell, M., Serrano, L. (2009): Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. in: *FEBS Lett*, 583, 24, S. 3966–73.

Mangkornkarn, C., Steiner, J.C. (1992): In vivo and in vitro glycosaminoglycans from human dental pulp. in: *J Endod*, 18, 7, S. 327–31.

Martin, J., Helm, K., Ruegg, P., Varella-Garcia, M., Burnham, E., Majka, S. (2008): Adult lung side population cells have mesenchymal stem cell potential. in: *Cytotherapy*, 10, 2, S. 140–51.

Marynka-Kalmani, K., Treves, S., Yafee, M., Rachima, H., Gafni, Y., Cohen, M.A., Pitaru, S. (2010): The lamina propria of adult human oral mucosa harbors a novel stem cell population. in: *Stem Cells*, 28, 5, S. 984–95.

Medzhitov, R., Janeway, C. (2000): Innate immunity. in: *N Engl J Med*, 343, 5, S. 338–44.

Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Janeway, C.A. (1997): A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. in: *Nature*, 388, 6640, S. 394–97.

Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Kopp, E., Stadlen, A., Chen, C., Ghosh, S., Janeway, C.A. (1998): MyD88 Is an Adaptor Protein in the hToll/IL-1 Receptor Family Signaling Pathways. in: *Molecular Cell*, 2, 2, S. 253–58.

Mei, S.H.J., Haitsma, J.J., Dos Santos, C.C., Deng, Y., Lai, P.F.H., Slutsky, A.S., Liles, W.C., Stewart, D.J. (2010): Mesenchymal stem cells reduce inflammation while enhancing bacterial clearance and improving survival in sepsis. in: *Am J Respir Crit Care Med*, 182, 8, S. 1047–57.

Mei, S.H.J., McCarter, S.D., Deng, Y., Parker, C.H., Liles, W.C., Stewart, D.J. (2007): Prevention of LPS-induced acute lung injury in mice by mesenchymal stem cells overexpressing angiopoietin 1. in: *PLoS Med*, 4, 9, e269.

Mekhemar, M., Tölle, J., Dörfer, C., Fawzy El-Sayed, K. (2020): TLR3 ligation affects differentiation and stemness properties of gingival mesenchymal stem/progenitor cells. in: *J Clin Periodontol*, 47, 8, S. 991–1005.

Mekhemar, M.K., Adam-Klages, S., Kabelitz, D., Dörfer, C.E., Fawzy El-Sayed, K.M. (2018): TLR-induced immunomodulatory cytokine expression by human gingival stem/progenitor cells. in: *Cell Immunol*, 326, S. 60–67.

Miller, J.F., Mitchell, G.F. (1968): Cell to cell interaction in the immune response. I. Hemolysin-forming cells in neonatally thymectomized mice reconstituted with thymus or thoracic duct lymphocytes. in: *J Exp Med*, 128, 4, S. 801–20.

Miltenyi, S., Müller, W., Weichel, W., Radbruch, A. (1990): High gradient magnetic cell separation with MACS. in: *Cytometry*, 11, 2, S. 231–38.

Miltenyi Biotec (2020): Magnetic cell separation.
https://www.miltenyibiotec.com/_Resources/Persistent/b5349effdd595b72195e588aff033be3e24706bd/IM0020021.pdf (17.7.21)

Miura, M., Gronthos, S., Zhao, M., Lu, B., Fisher, L.W., Robey, P.G., Shi, S. (2003): SHED, Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. in: *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 10, S. 5807–12.

Mo, I.F.Y., Yip, K.H.K., Chan, W.K., Law, H.K.W., Lau, Y.L., Chan, G.C.F. (2008): Prolonged exposure to bacterial toxins downregulated expression of toll-like receptors in mesenchymal stromal cell-derived osteoprogenitors. in: *BMC Cell Biol*, 9, S. 52.

Montanucci, P., Basta, G., Pescara, T., Pennoni, I., Di Giovanni, F., Calafiore, R. (2011): New simple and rapid method for purification of mesenchymal stem cells from the human umbilical cord Wharton jelly. in: *Tissue Eng Part A*, 17, 21-22, S. 2651–61.

Morszeck, C., Götz, W., Schierholz, J., Zeilhofer, F., Kühn, U., Möhl, C., Sippel, C., Hoffmann, K.H. (2005): Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. in: *Matrix Biol*, 24, 2, S. 155–65.

Murray, P.E., Garcia-Godoy, F., Hargreaves, K.M. (2007): Regenerative endodontics, A review of current status and a call for action. in: *J Endod*, 33, 4, S. 377–90.

Nada, O.A., El Backly, R.M. (2018): Stem Cells From the Apical Papilla (SCAP) as a Tool for Endogenous Tissue Regeneration. in: *Front Bioeng Biotechnol*, 6.

Nakashima, M., Akamine, A. (2005): The application of tissue engineering to regeneration of pulp and dentin in endodontics. in: *J Endod*, 31, 10, S. 711–18.

Nemeth, K., Mayer, B., Mezey, E. (2010): Modulation of bone marrow stromal cell functions in infectious diseases by toll-like receptor ligands. in: *J Mol Med*, 88, 1, S. 5–10.

Netea, M.G., van Deuren, M., Kullberg, B.J., Cavaillon, J.-M., van der Meer, J.W.M. (2002): Does the shape of lipid A determine the interaction of LPS with Toll-like receptors? in: *Trends in Immunology*, 23, 3, S. 135–39.

Ning, H., Lin, G., Lue, T.F., Lin, C.-S. (2011): Mesenchymal stem cell marker Stro-1 is a 75 kd endothelial antigen. in: *Biochem Biophys Res Commun*, 413, 2, S. 353–57.

Nørgaard, N.N., Holien, T., Jönsson, S., Hella, H., Espevik, T., Sundan, A., Standal, T. (2010): CpG-oligodeoxynucleotide inhibits Smad-dependent bone morphogenetic protein signaling, Effects on myeloma cell apoptosis and in vitro osteoblastogenesis. in: *J Immunol*, 185, 6, S. 3131–39.

Nosrat, A., Kolahdouzan, A., Hosseini, F., Mehrizi, E.A., Verma, P., Torabinejad, M. (2015): Histologic Outcomes of Uninfected Human Immature Teeth Treated with Regenerative Endodontics, 2 Case Reports. in: *J Endod*, 41, 10, S. 1725–29.

Ohashi, K., Burkart, V., Flohé, S., Kolb, H. (2000): Cutting edge, Heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. in: *J Immunol*, 164, 2, S. 558–61.

Oosting, M., Cheng, S.-C., Bolscher, J.M., Vestering-Stenger, R., Plantinga, T.S., Verschuere, I.C., Arts, P., Garritsen, A., van Eenennaam, H., Sturm, P., Kullberg, B.-J., Hoischen, A., Adema, G.J., van der Meer, J.W.M., Netea, M.G., Joosten, L.A.B. (2014): Human TLR10 is an anti-inflammatory pattern-recognition receptor. in: *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 42, E4478-84.

Parkin, J., Cohen, B. (2001): An overview of the immune system. in: *The Lancet*, 357, 9270, S. 1777–89.

Petridis, X., van der Sluis, L.W.M., Dijkstra, R.J.B., Brinker, M.G.L., van der Mei, H.C., Harmsen, M.C. (2018): Secreted products of oral bacteria and biofilms impede mineralization of apical papilla stem cells in TLR-, species-, and culture-dependent fashion. in: *Sci Rep*, 8, 1, S. 12529.

Pfaffl, M.W. (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. in: *Nucleic Acids Res*, 29, 9, e45.

Picot, J., Guerin, C.L., van Kim, C., Boulanger, C.M. (2012): Flow cytometry, Retrospective, fundamentals and recent instrumentation. in: *Cytotechnology*, 64, 2, S. 109–30.

Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., Marshak, D.R. (1999): Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. in: *Science*, 284, 5411, S. 143–47.

Pochampally, R. (2008): Colony forming unit assays for MSCs. in: *Methods Mol Biol*, 449, S. 83–91.

Prockop, D.J. (2017): The exciting prospects of new therapies with mesenchymal stromal cells. in: *Cytotherapy*, 19, 1, S. 1–8.

Rafter, M. (2005): Apexification, A review. in: *Dent Traumatol*, 21, 1, S. 1–8.

Raicevic, G., Najjar, M., Pieters, K., Bruyn, C. de, Meuleman, N., Bron, D., Toungouz, M., Lagneaux, L. (2012): Inflammation and Toll-like receptor ligation differentially affect the osteogenic potential of

human mesenchymal stromal cells depending on their tissue origin. in: *Tissue Eng Part A*, 18, 13-14, S. 1410–18.

Raicevic, G., Najar, M., Stamatopoulos, B., Bruyn, C. de, Meuleman, N., Bron, D., Toungouz, M., Lagneaux, L. (2011): The source of human mesenchymal stromal cells influences their TLR profile as well as their functional properties. in: *Cell Immunol*, 270, 2, S. 207–16.

Raicevic, G., Rouas, R., Najar, M., Stordeur, P., Boufker, H.I., Bron, D., Martiat, P., Goldman, M., Nevessignsky, M.T., Lagneaux, L. (2010): Inflammation modifies the pattern and the function of Toll-like receptors expressed by human mesenchymal stromal cells. in: *Hum Immunol*, 71, 3, S. 235–44.

Ren, G., Su, J., Zhang, L., Zhao, X., Ling, W., L'huillie, A., Zhang, J., Lu, Y., Roberts, A.I., Ji, W., Zhang, H., Rabson, A.B., Shi, Y. (2009): Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression. in: *Stem Cells*, 27, 8, S. 1954–62.

Ren, G., Zhang, L., Zhao, X., Xu, G., Zhang, Y., Roberts, A.I., Zhao, R.C., Shi, Y. (2008): Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. in: *Cell Stem Cell*, 2, 2, S. 141–50.

Ren, G., Zhao, X., Zhang, L., Zhang, J., L'Huillier, A., Ling, W., Roberts, A.I., Le, A.D., Shi, S., Shao, C., Shi, Y. (2010): Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression. in: *J Immunol*, 184, 5, S. 2321–28.

Rheinländer, A., Schraven, B., Bommhardt, U. (2018): CD45 in human physiology and clinical medicine. in: *Immunol Lett*, 196, S. 22–32.

Ricucci, D., Siqueira, J.F., Loghin, S., Lin, L.M. (2017): Pulp and apical tissue response to deep caries in immature teeth, A histologic and histobacteriologic study. in: *Journal of Dentistry*, 56, S. 19–32.

Sakaguchi, Y., Sekiya, I., Yagishita, K., Muneta, T. (2005): Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues, Superiority of synovium as a cell source. in: *Arthritis Rheum*, 52, 8, S. 2521–29.

Sakamoto, M., Siqueira, J.F., Rôças, I.N., Benno, Y. (2007): Bacterial reduction and persistence after endodontic treatment procedures. in: *Oral Microbiol Immunol*, 22, 1, S. 19–23.

Saoud, T.M.A., Ricucci, D., Lin, L.M., Gaengler, P. (2016): Regeneration and Repair in Endodontics-A Special Issue of the Regenerative Endodontics-A New Era in Clinical Endodontics. in: *Dent J (Basel)*, 4, 1.

Sato, Y., Araki, H., Kato, J., Nakamura, K., Kawano, Y., Kobune, M., Sato, T., Miyanishi, K., Takayama, T., Takahashi, M., Takimoto, R., Iyama, S., Matsunaga, T., Ohtani, S., Matsuura, A., Hamada, H., Niitsu,

- Y. (2005): Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. in: *Blood*, 106, 2, S. 756–63.
- Schütt, C. (1999): CD14. in: *Int J Biochem Cell Biol*, 31, 5, S. 545–49.
- Seifert, M., Küppers, R. (2016): Human memory B cells. in: *Leukemia*, 30, 12, S. 2283–92.
- Seo, B.-M., Miura, M., Gronthos, S., Bartold, P.M., Batouli, S., Brahim, J., Young, M., Robey, P.G., Wang, C.-Y., Shi, S. (2004): Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. in: *Lancet*, 364, 9429, S. 149–55.
- Shimazu, R., Akashi, S., Ogata, H., Nagai, Y., Fukudome, K., Miyake, K., Kimoto, M. (1999): MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. in: *J Exp Med*, 189, 11, S. 1777–82.
- Shirjang, S., Mansoori, B., Solali, S., Hagh, M.F., Shamsasenjan, K. (2017): Toll-like receptors as a key regulator of mesenchymal stem cell function, An up-to-date review. in: *Cell Immunol*, 315, S. 1–10.
- Smith, K.D., Andersen-Nissen, E., Hayashi, F., Strobe, K., Bergman, M.A., Barrett, S.L.R., Cookson, B.T., Aderem, A. (2003): Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. in: *Nat Immunol*, 4, 12, S. 1247–53.
- Sonoyama, W., Liu, Y., Fang, D., Yamaza, T., Seo, B.-M., Zhang, C., Liu, H., Gronthos, S., Wang, C.-Y., Wang, S., Shi, S. (2006): Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. in: *PLoS ONE*, 1, e79.
- Sonoyama, W., Liu, Y., Yamaza, T., Tuan, R.S., Wang, S., Shi, S., Huang, G.T.-J. (2008): Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth, A pilot study. in: *J Endod*, 34, 2, S. 166–71.
- Sonoyama, W., Seo, B.-M., Yamaza, T., Shi, S. (2007): Human Hertwig's epithelial root sheath cells play crucial roles in cementum formation. in: *J Dent Res*, 86, 7, S. 594–99.
- Stanley, H.R., Pereira, J.C., Spiegel, E., Broom, C., Schultz, M. (1983): The detection and prevalence of reactive and physiologic sclerotic dentin, reparative dentin and dead tracts beneath various types of dental lesions according to tooth surface and age. in: *J Oral Pathol*, 12, 4, S. 257–89.
- Takahashi, K., Kishi, Y., Kim, S. (1982): A scanning electron microscope study of the blood vessels of dog pulp using corrosion resin casts. in: *J Endod*, 8, 3, S. 131–35.
- Takeda, K., Akira, S. (2005): Toll-like receptors in innate immunity. in: *Int Immunol*, 17, 1, S. 1–14.
- Takeda, K., Akira, S. (2015): Toll-like receptors. in: *Curr Protoc Immunol*, 109, 14.12.1-14.12.10.
- Takeda, K., Kaisho, T., Akira, S. (2003): Toll-like receptors. in: *Annu Rev Immunol*, 21, S. 335–76.

Takeda, K., Takeuchi, O., Akira, S. (2002): Recognition of lipopeptides by Toll-like receptors. in: *J Endotoxin Res*, 8, 6, S. 459–63.

Takeuchi, O., Kawai, T., Mühlradt, P.F., Morr, M., Radolf, J.D., Zychlinsky, A., Takeda, K., Akira, S. (2001): Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. in: *Int Immunol*, 13, 7, S. 933–40.

Takeuchi, O., Sato, S., Horiuchi, T., Hoshino, K., Takeda, K., Dong, Z., Modlin, R.L., Akira, S. (2002): Cutting edge, Role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. in: *J Immunol*, 169, 1, S. 10–14.

Thibodeau, B., Teixeira, F., Yamauchi, M., Caplan, D.J., Trope, M. (2007): Pulp revascularization of immature dog teeth with apical periodontitis. in: *J Endod*, 33, 6, S. 680–89.

Tomchuck, S.L., Zvezdaryk, K.J., Coffelt, S.B., Waterman, R.S., Danka, E.S., Scandurro, A.B. (2008): Toll-like receptors on human mesenchymal stem cells drive their migration and immunomodulating responses. in: *Stem Cells*, 26, 1, S. 99–107.

Tomic, S., Djokic, J., Vasilijic, S., Vucevic, D., Todorovic, V., Supic, G., Colic, M. (2011): Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells derived from dental pulp and dental follicle are susceptible to activation by toll-like receptor agonists. in: *Stem Cells Dev*, 20, 4, S. 695–708.

Torabinejad, M., Faras, H., Corr, R., Wright, K.R., Shabahang, S. (2014): Histologic examinations of teeth treated with 2 scaffolds, A pilot animal investigation. in: *J Endod*, 40, 4, S. 515–20.

Uccelli, A., Moretta, L., Pistoia, V. (2006): Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. in: *Eur J Immunol*, 36, 10, S. 2566–73.

van den Berk, L.C.J., Jansen, B.J.H., Siebers-Vermeulen, K.G.C., Netea, M.G., Latuhihin, T., Bergevoet, S., Raymakers, R.A., Kögler, G., Figdor, C.C., Adema, G.J., Torensma, R. (2009): Toll-like receptor triggering in cord blood mesenchymal stem cells. in: *J Cell Mol Med*, 13, 9B, S. 3415–26.

Verma, P., Nosrat, A., Kim, J.R., Price, J.B., Wang, P., Bair, E., Xu, H.H., Fouad, A.F. (2017): Effect of Residual Bacteria on the Outcome of Pulp Regeneration In Vivo. in: *J Dent Res*, 96, 1, S. 100–06.

Vishwanat, L., Duong, R., Takimoto, K., Phillips, L., Espitia, C.O., Diogenes, A., Ruparel, S.B., Kolodrubetz, D., Ruparel, N.B. (2017): Effect of Bacterial Biofilm on the Osteogenic Differentiation of Stem Cells of Apical Papilla. in: *J Endod*, 43, 6, S. 916–22.

Wang, D., Zhang, H., Liang, J., Li, X., Feng, X., Wang, H., Hua, B., Liu, B., Lu, L., Gilkeson, G.S., Silver, R.M., Chen, W., Shi, S., Sun, L. (2013): Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in severe and refractory systemic lupus erythematosus, 4 years of experience. in: *Cell Transplant*, 22, 12, S. 2267–77.

Wang, J., Feng, J.Q. (2017): Signaling Pathways Critical for Tooth Root Formation. in: *J Dent Res*, 96, 11, S. 1221–28.

Wang, S., Mu, J., Fan, Z., Yu, Y., Yan, M., Lei, G., Tang, C., Wang, Z., Zheng, Y., Yu, J., Zhang, G. (2012): Insulin-like growth factor 1 can promote the osteogenic differentiation and osteogenesis of stem cells from apical papilla. in: *Stem Cell Res*, 8, 3, S. 346–56.

Wang, Y., Abarbanell, A.M., Herrmann, J.L., Weil, B.R., Manukyan, M.C., Poynter, J.A., Meldrum, D.R. (2010): TLR4 inhibits mesenchymal stem cell (MSC) STAT3 activation and thereby exerts deleterious effects on MSC-mediated cardioprotection. in: *PLoS ONE*, 5, 12, e14206.

Waterman, R.S., Tomchuck, S.L., Henkle, S.L., Betancourt, A.M. (2010): A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm, Polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype. in: *PLoS ONE*, 5, 4, e10088.

Wu, L.W., Wang, Y.-L., Christensen, J.M., Khalifian, S., Schneeberger, S., Raimondi, G., Cooney, D.S., Lee, W.P.A., Brandacher, G. (2014): Donor age negatively affects the immunoregulatory properties of both adipose and bone marrow derived mesenchymal stem cells. in: *Transpl Immunol*, 30, 4, S. 122–27.

Wu, W., Zhou, J., Xu, C.-T., Zhang, J., Jin, Y.-J., Sun, G.-L. (2015): Derivation and growth characteristics of dental pulp stem cells from patients of different ages. in: *Mol Med Rep*, 12, 4, S. 5127–34.

Wyllie, D.H., Kiss-Toth, E., Visintin, A., Smith, S.C., Boussouf, S., Segal, D.M., Duff, G.W., Dower, S.K. (2000): Evidence for an accessory protein function for Toll-like receptor 1 in anti-bacterial responses. in: *J Immunol*, 165, 12, S. 7125–32.

Xagorari, A., Chlichlia, K. (2008): Toll-like receptors and viruses, Induction of innate antiviral immune responses. in: *Open Microbiol J*, 2, S. 49–59.

Yao, Y., Zhang, F., Wang, L., Zhang, G., Wang, Z., Chen, J., Gao, X. (2009): Lipopolysaccharide preconditioning enhances the efficacy of mesenchymal stem cells transplantation in a rat model of acute myocardial infarction. in: *J Biomed Sci*, 16, S. 74.

Yu, C.Y., Boyd, N.M., Cringle, S.J., Su, E.N., Alder, V.A., Yu, D.Y. (2002): An in vivo and in vitro comparison of the effects of vasoactive mediators on pulpal blood vessels in rat incisors. in: *Arch Oral Biol*, 47, 10, S. 723–32.

Zannettino, A.C.W., Paton, S., Arthur, A., Khor, F., Itescu, S., Gimble, J.M., Gronthos, S. (2008): Multipotential human adipose-derived stromal stem cells exhibit a perivascular phenotype in vitro and in vivo. in: *J Cell Physiol*, 214, 2, S. 413–21.

Zarembek, K.A., Godowski, P.J. (2002): Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. in: *J Immunol*, 168, 2, S. 554–61.

Zhang, D., Zhang, G., Hayden, M.S., Greenblatt, M.B., Bussey, C., Flavell, R.A., Ghosh, S. (2004): A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. in: *Science*, 303, 5663, S. 1522–26.

Zhang, J., Zhang, Y., Lv, H., Yu, Q., Zhou, Z., Zhu, Q., Wang, Z., Cooper, P.R., Smith, A.J., Niu, Z., He, W. (2013): Human stem cells from the apical papilla response to bacterial lipopolysaccharide exposure and anti-inflammatory effects of nuclear factor I C. in: *J Endod*, 39, 11, S. 1416–22.

Zhou, L.-L., Liu, W., Wu, Y.-M., Sun, W.-L., Dörfer, C.E., Fawzy El-Sayed, K.M. (2020): Oral Mesenchymal Stem/Progenitor Cells, The Immunomodulatory Masters. in: *Stem Cells Int*, 2020, S. 1327405.

7. Anhang

7.1 Übersicht Material

7.1.1 Verbrauchsmaterial: Kultur- und Reagenzgefäße, Einmalprodukte

Produkt	Hersteller/Bezugsquelle
6-Well-Platten	Sarstedt AG, Nürnberg, Deutschland
96-well-Platte PCR	Roche, Mannheim, Deutschland
Tubes 1,5ml	Sarstedt AG, Nürnberg, Deutschland
FACS-Röhrchen	Sarstedt AG, Nürnberg, Deutschland
Falcon-Röhrchen 15 ml	Sarstedt AG, Nürnberg, Deutschland
Falcon-Röhrchen 50 ml	Sarstedt AG, Nürnberg, Deutschland
MACS-Collum	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Membranpapier	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel, Deutschland
Objektträger	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Petrischale	Sarstedt AG, Nürnberg, Deutschland
Zellkulturflasche	Sarstedt AG, Nürnberg, Deutschland
Zellschaber	Sarstedt AG, Nürnberg, Deutschland
Zellsieb	Sarstedt AG, Nürnberg, Deutschland

7.1.2 Medien und Reagenzien

Produkt	Hersteller/Bezugsquelle
adipogenes Differenzierungsmedium	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Accutase	Pan Biotech, Aidenbach, Deutschland
Alcianblau	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Alizarinrot	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Amphotericin	Biowest, Nuaille, Frankreich
Aqua Dest.	Fresenius Kabi, Sèvres, Frankreich
Biofreeze	Bio&Sell, Feucht, Deutschland
Chondrogenes Differenzierungsmedium	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
EDTA	Merck, Darmstadt, Deutschland
Entzündungsfakt. (IL-1 β , TNF- α , IFN- α , IFN- γ)	Peptotech, Hamburg, Deutschland
Essigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Th. Geyer GmbH, Renningen, Deutschland
FcR Blocking Reagent	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

FBS/FCS	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Formaldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glutaraldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Fisher BioReagents, Pittsburgh, USA
L-Glutamin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Kernechtrot-Färbung	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kristallviolett-Färbung	Merck, Darmstadt, Deutschland
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Minimum Essential Medium	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Oil-Red-O-Färbung	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ostogenes Differenzierungsmedium	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
PBS Dulbecco	Pan Biotech, Aidenbach, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Carlsbad, USA

7.1.3 Antikörper

Antikörper	Hersteller/Bezugsquelle
anti TLR1 PE	eBiosciences, San Diego, USA
anti TLR2 FITC	Enzo Life Sciences Inc., Lörrach, Deutschland
anti TLR3 PE	eBiosciences, San Diego, USA
anti TLR4 FITC	Enzo Life Sciences Inc., Lörrach, Deutschland
anti TLR5 Alexa Fluor 488	R&D Systems, Minneapolis, USA
anti TLR6 PE	Biolegend, San Diego, USA
anti TLR7 PE	Invitrogen, Carlsbad, USA
anti TLR8 PE	Enzo Life Sciences Inc., Lörrach, Deutschland
anti TLR9 PE	eBiosciences, San Diego, USA
anti TLR10 PE	Life Technologies Corp., Carlsbad, USA
anti CD14 FITC	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
anti CD34 PE	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
anti CD45 APC	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
anti CD73 PE	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
anti CD90 FITC	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
anti CD105 PE	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
anti CD146 PE	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

anti STRO1 PE	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
anti-PE Microbeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

Isotypkontrolle	Hersteller/Bezugsquelle
Mouse IgG1 PE	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Mouse IgG2a PE	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Mouse IgG2a FITC	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Mouse IgG2a APC	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Mouse IgG1 Alexa Fluor 488	R&D Systems, Minneapolis, USA
Rat IgG1 PE	Invitrogen, Carlsbad, USA
Mouse IgM PE	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
REA Control (S) PE	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
REA Control (S) FITC	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

7.1.4 Reaktionssysteme

Produkt	Hersteller/Bezugsquelle
BD Cytotfix/Cytoperm	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland

7.1.5 Primer

Primer	Assay ID	Identifikationsnummer	Hersteller/Bezugsquelle
TLR1 H. sapiens	111000	ENST00000308979	Roche, Mannheim, Deutschland
TLR2 H. sapiens	145617	ENST00000260010	Roche, Mannheim, Deutschland
TLR3 H. sapiens	111008	ENST00000296795	Roche, Mannheim, Deutschland
TLR4 H. sapiens	135752	ENST00000355622	Roche, Mannheim, Deutschland
TLR5 H. sapiens	103674	ENST00000366881	Roche, Mannheim, Deutschland
TLR6 H. sapiens	111018	ENST00000381950	Roche, Mannheim, Deutschland
TLR7 H. sapiens	111012	ENST00000380659	Roche, Mannheim, Deutschland
TLR8 H. sapiens	103816	ENST00000218032	Roche, Mannheim, Deutschland
TLR9 H. sapiens	143252	ENST00000360658	Roche, Mannheim, Deutschland
TLR10 H. sapiens	141065	NM_001017388	Roche, Mannheim, Deutschland
PKG1 H. sapiens	102083	ENST00000373316	Roche, Mannheim, Deutschland

7.1.6 Geräte

Gerät	Hersteller
Absauger	IBS Integra Biosciences, Biebertal, Deutschland
Entwässerungsautomat	MEDITE Medical GmbH, Burgdorf, Deutschland
FACSCalibur	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Inkubator	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Kamera	Sigma, Kawasaki, Japan
LightCycler	Roche, Mannheim, Deutschland
MACS-Multistand	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
MACS-Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Mikroskop	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Mikroskopkamera	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
µDrop™ Plate	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Mikrotom	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Photometer	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Neubauerzählkammer	Brand, Wertheim, Deutschland
Paraffineinbettautomat	MEDITE Medical GmbH, Burgdorf, Deutschland
Sicherheitswerkbank	Thermo Electron Corp., Waltham, USA
Zentrifuge groß	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge klein	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

7.2 Ethikvotum

**MEDIZINISCHE FAKULTÄT
DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL**



ETHIK-KOMMISSION

Hilfsstraße 4/4a Klinik Gebäude Weg 20 · D-24105 Kiel

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

Postadresse:
Arnold-Helfer-Straße 2 / Haus 26
D-24105 Kiel
Telefon: 0431 / 500-14181
Telefax: 0431 / 500-14185
ethik@uksh-kiel.de

Datum: **07. August 2017**

AZ: D 513/f7 (bitte stets angeben)
Studienplan: **In-vitro Untersuchung der Wirkung verschiedener Biomoleküle und Entzündung auf gingivale Stammzellen**
Basisformular v. 18.07.17; Studienprotokoll und/oder: 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)**

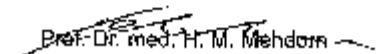
Sehr geehrter Herr Kollege El-Sayed,

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 **mus**s 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 Gilnicke
Geschäftsführung der Ethik-Kommission

AZ: 18.12.17_07_Aug17

1

7.3 Vorlage 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 öffentlichen Rechts
Zentrum Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
Klinik für Zahnerhaltung und Parodontologie
Direktor: Prof. Dr. C. Dörfer



8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich sehr herzlich bedanken bei Herrn Prof. Dr. Christof Dörfer, Direktor der Klinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein am Campus Kiel, für die Möglichkeit, in seiner Abteilung diese Arbeit durchführen zu können und sein Interesse am Fortschreiten dieser.

Des Weiteren möchte ich meinen besonderen Dank Herrn PD Dr. Karim Mohamed Fawzy El-Sayed, Leiter des Forschungsbereiches der Klinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie, für die Überlassung des Themas sowie seine fortlaufende Unterstützung auch abseits der Forschungsarbeit aussprechen. Sein Engagement hat zur Konzeption und zum Fertigstellen dieser Arbeit deutlich beigetragen und ich bin froh über unsere Zusammenarbeit.

Daneben danke ich Frau Mojgan Paymard-Stolz und Frau Regina Marquardt für ihre großartige technische Hilfe in diversen Angelegenheiten mit vielen Tipps und Tricks, ihre aufmunternden Worte bei Rückschlägen sowie die sehr vielen netten Stunden in den Laboren der Zahnklinik. Auch in stressigen Phasen der Forschung oder des Studiums habe ich immer gerne Zeit dort verbracht.

Frau Kerstin Marx möchte ich sehr herzlich für die unkomplizierte Hilfe bei der Analyse der vielen FACS-Proben danken. Dies hat meine Arbeit stark erleichtert.

Der Praxis Kerscher und Körner danke ich für die schnelle Probensammlung.

Zum Schluss geht ein sehr großes Dankeschön an meine Eltern und Schwestern für ihre Unterstützung während der Erstellung dieser Arbeit sowie des ganzen Studiums. Sie waren in allen Lebenslagen immer für mich da und haben mir Kraft gegeben und Mut zugesprochen.