

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

**Einfluss von Ascorbinsäure und Entzündungszytokinen auf die
Eigenschaften gingivaler mesenchymaler Stammzellen**

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

vorgelegt von
Nhung Nguyen
aus Berlin

Kiel 2022

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

2. Berichterstatterin: Priv.-Doz. Dr. med. dent. Nicole Passia,
Klinik für Zahnärztliche Prothetik, Propädeutik und
Werkstoffkunde

Tag der mündlichen Prüfung: 14.07.2022

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 21.04.2022

gez.: Priv.-Doz. Dr. Karim Mohamed Fawzy El-Sayed
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Für meine Familie

A Inhaltsverzeichnis

A	Inhaltsverzeichnis	I
B	Abkürzungsverzeichnis	III
C	Tabellenverzeichnis	V
D	Abbildungsverzeichnis	VI
E	Gender Erklärung	VII
1.	Einleitung	1
1.1	<i>Parodontitis und ihre Klassifikation</i>	1
1.2	<i>Ätiologie und Pathogenese</i>	3
1.3	<i>Wundheilung</i>	6
1.4	<i>Therapie</i>	8
1.5	<i>Gingivale mesenchymale Stammzellen (G-MSCs)</i>	9
1.6	<i>Ascorbinsäure (AS)</i>	11
1.7	<i>Zielsetzung</i>	12
2.	Material und Methoden	13
2.1	<i>Material</i>	13
2.1.1	Verbrauchsmaterialien	13
2.1.2	Geräte	14
2.1.3	Chemikalien und Reagenzien	15
2.1.4	CD-Antigene und Antikörper	17
2.2	<i>Methodik</i>	18
2.2.1	Zellbiologische Verfahren	18
2.2.1.1	Ethikantrag	18
2.2.1.2	Zellgewinnung, Kultivierung	18
2.2.1.3	Isolation G-MSCs	19
2.2.1.4	Passage	21
2.2.1.5	Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauerzählkammer	22
2.2.1.6	Experimentelle Gruppen	22
2.2.1.6.1	Kontrollgruppe	22
2.2.1.6.2	AS-Gruppe	23
2.2.1.6.3	Entzündungsgruppe	23
2.2.1.6.4	EM/AS-Gruppe	23
2.2.1.7	KBE – Koloniebildende Einheiten	24
2.2.1.8	Proliferationskurven über 14 Tage	24
2.2.1.9	Differenzierungsreihe	25
2.2.1.9.1	Osteogene Differenzierung und Färbung	26
2.2.1.9.2	Quantitative Analyse der osteogenen Differenzierungsreihe	26
2.2.1.9.3	Adipogene Differenzierung und Färbung	27
2.2.1.9.4	Quantitative Analyse der adipogenen Differenzierungsreihe	28
2.2.1.9.5	Chondrogene Differenzierungsreihe und Färbung	28

2.2.2	Biochemische Verfahren	30
2.2.2.1	Bestimmung der intrazellulären β -Catenin Konzentration mittels ELISA.....	30
2.2.2.2	Bestimmung der Viabilität der G-MSCs mittels MTT	32
2.2.2.3	Durchflusszytometrie	34
2.2.3	Molekularbiologische Verfahren	35
2.2.3.1	Vorbereitung zur Extraktion der RNA	35
2.2.3.2	RNA Extraktion mittels RNeasy mini KIT	36
2.2.3.3	cDNA-Synthese.....	37
2.2.3.4	Polymerase-Kettenreaktion	37
2.2.4	Statistische Auswertung	39
3.	Ergebnisse	40
3.1	<i>Charakterisierung der G-MSCs</i>	<i>40</i>
3.1.1	Koloniebildende Einheiten	40
3.1.2	FACS-Analyse	41
3.1.3	Differenzierungspotential.....	41
3.1.3.1	Osteogene Differenzierung	42
3.1.3.2	Adipogene Differenzierung	42
3.1.3.3	Chondrogene Differenzierung.....	42
3.2	<i>ELISA</i>	<i>44</i>
3.3	<i>Zell Proliferations- und KBE-Assay</i>	<i>44</i>
3.4	<i>mRNA Expression von Pluripotenzmarkern</i>	<i>46</i>
3.5	<i>Differenzierungsreihe und ihre typische mRNA Expression</i>	<i>48</i>
4.	Diskussion	54
4.1	<i>Diskussion der Methodik</i>	<i>54</i>
4.1.1	Isolierung und Kultivierung G-MSCs mit MACS	54
4.1.2	Identifikation der isolierten Zellen als Stammzellen	54
4.1.2.1	KBE	55
4.1.2.2	FACS	55
4.1.2.3	Zelldifferenzierung	56
4.1.3	RT-PCR	56
4.1.4	ELISA zur Bestimmung von β -Catenin.....	57
4.1.5	MTT, Proliferationskurve	57
4.2	<i>Diskussion der Ergebnisse.....</i>	<i>59</i>
5.	Zusammenfassung	67
6.	Literaturverzeichnis	69
7.	Ethikantrag	75
8.	Danksagung	76
9.	Lebenslauf	77

B Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
<i>5hmC</i>	5-Hydroxymethylcytosin
<i>5mC</i>	5-Methylcytosin
<i>AB-MSCs</i>	Stammzellen aus dem Alveolarknochen
<i>AG</i>	Antigen
<i>AK</i>	Antikörper
<i>ALP</i>	Alkalische Phosphatase
<i>AO</i>	Antioxidans
<i>AS</i>	Ascorbinsäure
<i>ELISA</i>	Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay
<i>EM</i>	Entzündungsmedium
<i>ERK</i>	Extracellular-signal Regulated Kinases
<i>FACS</i>	Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung, engl.: fluorescence-activated cell sorting/scanning
<i>Fas</i>	TNF Rezeptors superfamily member 6
<i>G-MSCs</i>	Gingivale mesenchymale Stammzellen
<i>GSK3</i>	Glykogen-Synthase-Kinase 3
<i>IFN-γ</i>	Interferon- γ
<i>IL-1β</i>	Interleukin-1 β
<i>IL-4</i>	Interleukin-4
<i>IL-6</i>	Interleukin-6
<i>KBE</i>	Koloniebildende Einheiten, engl.: Colony Forming Unit
<i>LEF1</i>	Lymphoid enhancer-binding factor 1
<i>LPL</i>	Lipoproteinlipase
<i>LPS</i>	Lipopolysaccharide
<i>MACS</i>	Magnetisch aktivierte Zellsortierung, engl.: magnetic activated cell sorting
<i>MACS (-)</i>	MACS negativ
<i>MACS (+)</i>	MACS positiv
<i>MAPK</i>	Mitogen-activated protein Kinase

<i>MHC</i>	Haupthistokompatibilitätskomplex, engl.: major histocompatibility complex
<i>MSCs</i>	Mesenchymale Stammzellen
<i>MTT</i>	(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
<i>PCR</i>	Polymerase-Kettenreaktion
<i>PDSLCS</i>	Stammzellen aus dem parodontalen Ligament
<i>PMNs</i>	Polymorphkernige Granulozyten
<i>PPARγ</i>	Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor- γ
<i>RANKL</i>	Receptor Activator of NF- κ B Ligand
<i>ROS</i>	Reaktive Sauerstoffspezies, engl.: Reactive oxygen species
<i>RT</i>	Reverse Transkription
<i>RUNX2</i>	Runt-verwandter-Transkriptionsfaktor 2, engl.: runt-related transcription factor 2
<i>SCAP</i>	Stammzellen aus der apikalen Papille
<i>Sox2</i>	Geschlechtsbestimmende Region Y-Box 2, engl.: sex determining region Y-box 2
<i>TET</i>	Ten-eleven-translocation
<i>TNF-α</i>	Tumornekrosefaktor- α

C Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Tabellarische Darstellung der neuen Klassifikation „Parodontaler und Peri-implantärer Erkrankungen“	2
Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	13
Tabelle 3: Verwendete Laborgeräte	14
Tabelle 4: Verwendete Chemikalien und Reagenzien	15
Tabelle 5: Verwendete CD-Antigene und Antikörper	17
Tabelle 6: Übersicht zur Zusammensetzung der experimentellen Gruppen.....	23
Tabelle 7: Verwendete Primer für die Real-Time PCR	39

D **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Schematische und vereinfachte Darstellung zellulärer Prozesse in einer beginnenden gingivalen Entzündung	6
Abbildung 2: Schematische Darstellung oraler Gewebe und die dort befindlichen mesenchymalen Stammzellen.....	10
Abbildung 3: Schematische Darstellung der MACS Separation.....	21
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Differenzierungsreihe für je einen Patienten. ...	25
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Tissue Processor TPC 15 Duo.....	29
Abbildung 6: Schematische Darstellung des Grundprinzips von ELISA zur Ermittlung der β -Catenin Konzentration.....	31
Abbildung 7: Pipettierschema der 96-Well Platte für ELISA.....	32
Abbildung 8: Reaktiver Hintergrund zur Ermittlung der Zellviabilität mittels MTT.....	32
Abbildung 9: Pipettierschema der 96-Well Platte für MTT	33
Abbildung 10: Vereinfachte Darstellung der Durchflusszytometrie.....	35
Abbildung 11: Untersuchung der G-MSCs auf stammzelltypische Charakteristika: Adhärenz und KBE.....	40
Abbildung 12: Untersuchung der G-MSCs auf stammzelltypische Charakteristika: Oberflächenmarker.....	41
Abbildung 13: Untersuchung der G-MSCs auf stammzelltypische Charakteristika: multilineare Differenzierung.....	43
Abbildung 14: Ergebnisse von ELISA für den Wnt/ β -Catenin Signalweg und der Zellzahl mittels MTT nach einstündiger Stimulation in den experimentellen Gruppen.....	44
Abbildung 15: Proliferationskurven über 14 Tage.....	45
Abbildung 16: Ergebnisse der Zellproliferation und KBE nach Stimulation in den experimentellen Gruppen.....	46
Abbildung 17: Darstellung der Expression von typischen Oberflächenmarkern nach einer Stimulation in den experimentellen Gruppen.....	47
Abbildung 18: Darstellung des osteogenen Differenzierungspotentials der G-MSCs nach fünf-tägiger Stimulation in den experimentellen Gruppen.....	49
Abbildung 19: Darstellung des adipogenen Differenzierungspotentials der G-MSCs nach fünf-tägiger Stimulation in den experimentellen Gruppen.....	51
Abbildung 20: Darstellung des chondrogenen Differenzierungspotentials der G-MSCs nach fünf-tägiger Stimulation in den experimentellen Gruppen.....	53
Abbildung 21: Vereinfachte Darstellung des MAPK Signalwegs.....	63

E Gender Erklärung

Aus Gründen der besseren Lesbarkeit und zur Erhaltung des Leseflusses wird in der vorliegenden Arbeit die maskuline Sprachform bei personenbezogenen Substantiven und Pronomen verwendet. An dieser Stelle wird darauf hingewiesen, dass dies keinesfalls als eine Benachteiligung des weiblichen Geschlechts zu verstehen sein soll. Die männliche Sprachform soll im folgenden Text als geschlechtsneutral gelten und dient zur sprachlichen Vereinfachung.

1. Einleitung

1.1 Parodontitis und ihre Klassifikation

Parodontitis ist eine entzündliche Erkrankung des Mundbereichs, die mit einer bakteriellen Dysbiose assoziiert ist. Sie betrifft den gesamten Zahnhalteapparat, darunter der Alveolarknochen, das parodontale Ligament und die Gingiva. Typische klinische Erscheinungen der Parodontitis sind: Zahnfleischbluten, Knochenverlust und die daraus resultierende Zahnlockerung und der Zahnverlust (Graves, 1999; Silva et al., 2009). Für eine Parodontitis sind etliche Risikofaktoren erwiesen, welche die Entstehung, den Schweregrad und den Verlauf dieser Erkrankung beeinflussen können. Besonders im fortschreitenden Alter, ab der vierten Lebensdekade, steigt das Risiko an Parodontitis zu erkranken. Weitere Risikofaktoren sind außerdem Nikotinkonsum und schlecht eingestellte systemische Erkrankungen, insbesondere Diabetes mellitus (Alagl and Bhat, 2015). Selbst Umweltfaktoren, wie Stress oder lokale Faktoren, wie die Zahnstellung sind Modulatoren einer Parodontitis (Wakai et al., 1999).

Parodontitis erfährt in der Deutschen Mundgesundheitsstudie (DMS) aus dem Jahre 2016, im Vergleich zu früheren Jahren einen Rückgang in allen Altersgruppen. Die Verteilung der entzündlichen Erkrankung bleibt jedoch besonders im fortgeschrittenen Alter weit verbreitet. Mehr als jeder Zweite (65%) im Alter zwischen 65 bis 74 Jahren leidet unter einer parodontalen Erkrankung. Betrachtet man die Bevölkerung ab 75 Jahren verstärkt sich diese Tendenz. Neun von zehn Menschen in dieser Altersgruppe leiden unter einer Parodontitis (Jordan and Micheelis, 2016).

Im Juni 2018 wurde auf der internationalen Tagung „EuroPerio9“ in Amsterdam, Niederlande die neue Klassifikation „Parodontaler und Peri-implantärer Erkrankungen“ vorgestellt (Caton et al., 2018, Chapple et al., 2018). Dabei werden Erkrankungen des Zahnhalteapparats in zwei Klassen beschrieben. Definiert sind diese in „Parodontale Erkrankungen und Zustände“ und „Peri-implantäre Erkrankungen und Zustände“. Parodontitis gehört demnach neben den „Nekrotisierenden parodontalen Erkrankungen“ und der „Parodontitis als Manifest systemischer Erkrankungen“ zu den drei Hauptklassen parodontaler Erkrankungen, welche des Weiteren engmaschiger definiert werden. Diese Klassifizierung wird in Tabelle 1

aufgeführt. Erstmals wurden in dieser Einteilung „Peri-implantäre Erkrankungen und Zustände“, im Vergleich zur früheren Klassifikation von 1999 (Armitage, 1999), definiert.

Tabelle 1: Tabellarische Darstellung der neuen Klassifikation „Parodontaler und Peri-implantärer Erkrankungen“

Parodontale Erkrankungen und Zustände			
Parodontale Gesundheit	Parodontitis		Andere das Parodont betreffende Zustände
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Parodontale Gesundheit und gingivale Gesundheit ▪ Gingivitis: Biofilminduziert ▪ Gingivale Erkrankungen: Nicht-Biofilminduziert 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Nekrotisierende parodontale Erkrankungen ▪ Parodontitis ▪ Parodontitis als Manifest systemischer Erkrankungen 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Systemische Erkrankungen und Zustände mit Einfluss auf das Parodontium ▪ Parodontale Abszesse und Endo-Paro-Läsionen ▪ Mukogingivale Deformitäten und Zustände ▪ Traumatische okklusale Kräfte ▪ Zahn- und Zahnersatzbezogene Faktoren 	

Peri-implantäre Erkrankungen und Zustände			
Peri-implantäre Gesundheit	Peri-implantäre Mukositis	Peri-implantitis	Peri-implantäre Weich- und Hartgewebsdefizite

Eine weitere Neuerung besteht darin, dass Parodontitis für den Patienten nun genauer systematisiert werden kann. Hierfür wird das „Staging and Grading“ als Kernstück zur individuellen Kategorisierung der Patienten angewandt. Dabei erschließt sich mit Hilfe des „Stagings“ der Schweregrad der Erkrankung anhand von klinischen und röntgenologischen Parametern. Hierzu gehören beispielsweise der Knochenabbau anhand eines aktuellen Röntgenbildes, der Furkationsgrad, der Attachmentverlust und Sondierungstiefen. Der Patientenzustand wird in den Stadien I bis IV erfasst, welche eine initiale, moderate, schwere oder fortgeschrittene Parodontitis definieren. Das „Grading“ dient der Erkennung der Krankheitsprogression unter Betrachtung verschiedener systemischer Aspekte, wie z.B. Diabetes mellitus, Nikotinkonsum und, wenn möglich, den Vergleich zu einem früheren Zeitpunkt aufgenommenen, klinischen Parametern. Hierbei wird zwischen den Progressionsgraden A, B oder C unterschieden, welche die Progression in langsam, moderat und schnell repräsentativ einteilen. Beide Komponenten, das „Staging“ und das „Grading“, ermöglichen die Diagnose der Parodontitis und die Erfassung von Faktoren, die eine patientenbezogene Progression und Therapie erlauben (Caton et al., 2018, Tonetti et al., 2018).

1.2 Ätiologie und Pathogenese

Lang und Bartold definieren die parodontale Gesundheit als ein klinisch gesundes Parodont, welches durch das Fehlen einer nachweisbaren Entzündung charakterisiert ist (Lang and Bartold, 2018). Dies kann sowohl in einem intakten Parodontium aufgefunden werden, d.h. ohne jegliche Anzeichen der Parodontitis-typischen Kriterien, als auch in einem bereits reduzierten Parodontium. Eine klare Definition ist für die Effektivität therapeutischer Maßnahmen essenziell und ermöglicht die realistische Zielsetzung bei der Behandlung des Patienten. Ferner sind die Kontrolle des Immunsystems und das Erreichen der parodontalen Homöostase wichtige Komponenten eines klinisch gesunden Parodonts. Lokale und systemische Risikofaktoren sollten patientenorientiert gut eingestellt bzw. verbessert werden. Unter anderem sollten systemische Erkrankungen, Einnahme von Medikamenten, die Ernährung oder zahnbezogene Gegebenheiten, wie Karies, insuffiziente Restaurationen und ähnliches, entsprechend optimiert werden. All diese Faktoren können unbehandelt den Immunstatus negativ beeinflussen und die Regenerationsfähigkeit des Parodontiums reduzieren (Herbert F. Wolf, 2004).

Physiologisch besteht eine natürliche Symbiose zwischen Wirt und den im Mund befindlichen Bakterien (Nibali, Donos and Henderson, 2009). Etabliert sich jedoch ein dauerhaftes Ungleichgewicht zwischen der Bakterienanzahl und -zusammensetzung und/oder dem Immunsystem des Wirts, besteht die Gefahr, dass sich eine gewebeabbauende Parodontitis manifestiert (Gemmell, Marshall and Seymour, 1997) .

Zu Beginn jeder Parodontitis steht die persistierende, bakterielle Plaque, die sich in Nischen des Parodonts befindet. Socransky definiert verschiedene Bakterienspezies, die eine zentrale Rolle bei der Entstehung der Parodontitis spielen. Unter der Komplextheorie werden Bakterien gemäß ihrer Pathogenität und der Reihenfolge ihres Auftretens in verschiedene Komplexe klassifiziert. So wird verdeutlicht welche Bakterien mit dem Beginn und dem Fortschreiten der Parodontitis assoziiert sind. Es wird zwischen dem roten Komplex (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*), dem orangenen Komplex (*Prevotella intermedia*, *Parvimonas micra*, *Fusobacterium nucleatum*), dem Aa-Komplex (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*), dem grünen Komplex (*Eikenella corrodens*, *Capnocytophaga spec.*) und dem orange-assoziierten Komplex (*Campylobacter rectus*, *Eubacterium nodatum*) unterschieden, welche eng miteinander verbunden sind und

zusammen eine geeignete Umgebung für den Verlauf der Erkrankung bilden (Socransky et al., 2004). Bakterien aus dem grünen und orange-assoziierten Komplex werden mit dem Beginn einer Parodontitis in Verbindung gebracht. Sie besiedeln die Zahnoberfläche und dienen für die weitere Adhäsion von Bakterien. Bei Verschlechterung des Krankheitszustandes folgt der orangene Komplex, der als Brückenglied für den Aa-Komplex und den roten Komplex fungiert. Besonders der Aa-Komplex und der rote Komplex wurden als potente parodontalpathogene Bakterien beschrieben. Sie sind selten dazu fähig, den Zahn ohne die vorherige Adhäsion der zuvor genannten Komplexe zu besiedeln, und führen bei einem Erfolg zu der Parodontitis-typischen Entzündung und Destruktion des Zahnhalteapparats (Socransky et al., 2004).

Zunächst ist eine Entzündung eine physiologische Reaktion des Körpers auf einen bakteriellen Reiz. Idealerweise dient sie als Immunreaktion der Bekämpfung von Pathogenen (Gemmell, Marshall and Seymour, 1997). Sie beinhaltet die Erkennung der Virulenzfaktoren als Antigene (AG), wie z.B. auf der Bakterienoberfläche exprimierten Lipopolysaccharide (LPS), und initiieren die angeborene Immunantwort. Bakterien können unter anderem durch zytotoxische Substanzen (z.B. Amine, Ammoniak, Säuren, Schwefelwasserstoff) und bakterielle Enzyme (z.B. Phosphatasen, Kollagenasen) direkt das Gewebe schädigen, indirekt aber auch durch die Aktivierung verschiedener Zellen. Dabei sind unter anderem Makrophagen, gefäßnahe Mastzellen und Zellen des gingivalen Saumepithels involviert, die verstärkt proinflammatorische Zytokine (z.B. Interleukin-1 β (IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)) freisetzen. IL-8 wirkt chemotaktisch und induziert die Rekrutierung von polymorphkernigen Granulozyten (PMN), welche dem Zytokingradienten folgend zum Zentrum der Entzündung wandern. Durch zahlreiche Lysosom-Entzündungsmediatoren kommt es zur Bekämpfung der Pathogene. Zeitgleich kommt es zu einer Erhöhung der Permeabilität der Gefäßwand durch Substanz P aus den Immunzellen, welches indirekt durch die Histaminausschüttung der Mastzellen ansteigt (Lundy and Linden, 2004, Cekici et al., 2014). Ferner steigt die Adhärenz von PMNs. Beides begünstigt eine schnellere Erreichbarkeit der Immunzellen an den Zielort. Klinisch spricht man zu diesem Zeitpunkt von einer Gingivitis. Sind die PMNs in der Lage die Pathogene zu bekämpfen, so kommt es zur Eindämmung der Entzündung (Herbert F. Wolf, 2004, Socransky et al., 2004). Bei Abwesenheit einer täglichen und adäquaten Mundhygiene, verbleibt der Biofilm an der Zahnoberfläche und ermöglicht eine andauernde Infiltration von pathogenen Bakterien in das

Parodontalgewebe. Was zunächst als Verteidigungsmechanismus gegen den bakteriellen Biofilm beginnt, entwickelt sich bei einer Persistenz von Bakterien schließlich zu einer Parodontitis. Das komplexe Geflecht aus Zytokinen und Mediatoren treibt die übermäßige Entzündung im Wirtsorganismus weiter voran (Graves and Cochran, 2003, Cekici et al., 2014, Fawzy El-Sayed et al., 2019). Dabei spielen IL-1 β und TNF- α eine maßgebliche Rolle beim Fortschreiten des Krankheitsverlaufs. Beide sind für die Aktivierung weiterer Zellen, wie z.B. Endothelzellen, Osteoklasten und Lymphozyten involviert. Interferon- γ (IFN- γ) wird hauptsächlich von T-Lymphozyten ausgeschüttet und ist somit nach der Aktivierung der zellulären Immunabwehr in hoher Konzentration in der entzündlichen Läsion vorzufinden (Cekici et al., 2014). Die primäre Funktion von IFN- γ liegt in der Aktivierung von weiteren Makrophagen. Bei einer erhöhten Konzentration von IFN- γ wird die Produktion von weiteren Entzündungsmediatoren angetrieben. Sie unterstützt des Weiteren die T-Lymphozyten bei der Antigenpräsentation über die vermehrte Expression von Haupthistokompatibilitätskomplexe (engl. major histocompatibility complex, MHC) (Carnaud et al., 1999). TNF- α nimmt die Rolle eines Multieffektors ein. Durch TNF- α wird unter anderem die Zellmigration in Richtung Zentrum der Entzündung unterstützt. Zusätzlich wird in den dortigen Vorläuferzellen direkt die Osteoklastengnese eingeleitet. TNF- α wirkt außerdem fördernd auf die Sekretion von Osteoklasten-induzierenden Faktoren, wie Matrixmetalloproteinasen und Receptor Activator of NF- κ B Ligand (RANKL). RANKL wird von Osteoblasten, Fibroblasten und Lymphozyten gebildet und bindet an Receptor Activator of NF- κ B (RANK) auf der Oberfläche von Osteoklasten und Osteoklastenvorläuferzellen. Der veränderte Knochenstoffwechsel zugunsten der Osteoklastenaktivität, ohne eine zeitgleiche Zunahme der Knochenbildung, führt zu dem Attachmentverlust im Parodont (Gemmell et al., 2001, Chang et al., 2002).

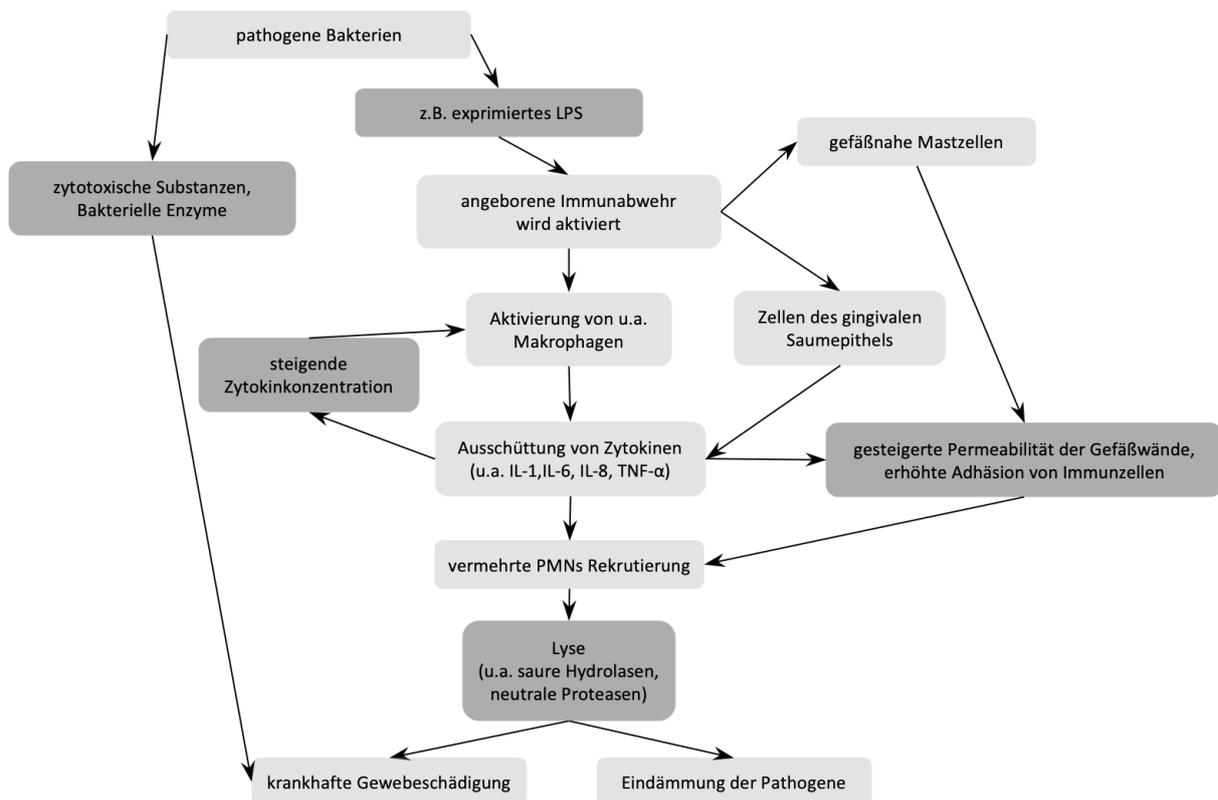


Abbildung 1: Schematische und vereinfachte Darstellung zellulärer Prozesse in einer beginnenden gingivalen Entzündung. Die Erkennung bakterieller Virulenzfaktoren (z.B. LPS) initiiert die angeborene Immunantwort. Direkte Schädigung des Parodontalgewebes durch bakterielle zytotoxische Substanzen, wie Amine, Ammoniak, Säure, Schwefelwasserstoff und bakterielle Enzyme (z.B. Phosphatasen, Kollagenasen). Indirekte Schädigungen durch zelluläre Ereignisse: Aktivierung von Makrophagen, Mastzellen und Zellen des gingivalen Saumepithels führen zur Expression proinflammatorischer Zytokine (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α). Chemotaktische Aktivierung von PMNs, Steigerung der Permeabilität zur Rekrutierung weiterer Immunzellen zur Bekämpfung von Pathogenen. Lyse der Bakterien führt zu einer Eindämmung der Pathogenese bei erfolgreicher Immunantwort oder zu krankhaften Gewebeschädigung bei Misserfolg.

1.3 Wundheilung

Als Wundheilung bezeichnet man den körpereigenen Prozess zur Wiederherstellung der Integrität und Funktionsfähigkeit des Gewebes nach einer Verletzung (Miloró and Peterson, 2012). Die Wundheilung ist ein komplexes Zusammenspiel, welches die Interaktion von verschiedenen Zelltypen beinhaltet und aus drei Phasen besteht. Die aufeinanderfolgenden Phasen sind überlappend und werden in Entzündung, Zellproliferation und das Remodelling des Gewebes (Wang and Tatakis, 2017) eingeteilt. Speziell auf das Parodont bezogen, definieren Fawzy El-Sayed und Dörfer die Phasen der Wundheilung im Parodont genauer als eine erhöhte Proliferation von Stamm- und Vorläuferzellen, Migration und Homing, Differenzierung und Endreifung der Zellen (Fawzy El-Sayed and Dorfer, 2017). Außerdem wird bei der Wundheilung zwischen der Reparatur und der Regeneration des Gewebes differenziert

(Melcher, 1985). Die Unterscheidung hat einen maßgeblichen Einfluss auf das Resultat der Wundheilung.

Bei dem Vorgang der Reparatur wird die Kontinuität des Gewebes wiederhergestellt, wodurch jedoch ihre Funktion und ursprüngliche Struktur verloren gehen. Eine Parodontistherapie induziert normalerweise eine epitheliale Wundheilung bzw. die Bildung eines langen Saumepithels, welches den parodontalen Defekt füllt (Susin and Wikesjo, 2013), jedoch die Funktion des Parodonts nicht vollständig wiederherstellen kann. Daraus folgt ein fehlendes restitutio ad integrum. Die Regeneration wird als Erneuerung des ursprünglichen Gewebes definiert. Dies betrifft sowohl die Architektur als auch die Funktion, sodass alle Komponenten des Parodonts bei einer erfolgreichen regenerativen Wundheilung wiederhergestellt werden (Melcher, 1985). Setzt man sich dies zum Ziel, werden verschiedene, voneinander abhängige Prozesse vorausgesetzt. Betrachtet man die vier Phasen der Wundheilung (Fawzy El-Sayed and Dörfer, 2016), und damit das Remodelling des Gewebes, trifft man diese auch in einem entzündeten Parodont an, das bei der parodontalen Erkrankung einer bestimmten Mikroumgebung unterliegt. Die Entzündung ist somit Bestandteil der Wundheilung (Wang and Tatakis, 2017). Betrachtet man die einzelnen Phasen genauer, so regulieren verschiedene Zytokine, die im Rahmen der Entzündungsreaktion des Körpers von Immunzellen ausgeschüttet und von erkrankten Zellen exprimiert werden, den Verlauf der entzündlichen Parodontitis. Zusätzlich sind diese Zytokine in der Lage eine mögliche reparative oder regenerative Heilung zu initiieren (Graves, 1999; Silva et al., 2009). Sie unterstützen somit die Heilung des Gewebes. Es wird beschrieben, wie Zytokine die Migration von Zellen aus dem gesunden Parodontium in das geschädigte Gewebe einleiten können (Park et al., 2011; Lee et al., 2017). Ferner werden undifferenzierte Progenitorzellen aus dem umliegenden gesunden Gewebe und aus parodontalen Nischen angelockt, die ins geschädigte Gewebe einwandern und sich dort niederlassen. Dieses „Homing“ kann gleichzeitig unter Einfluss von verschiedenen Zytokinen gefördert werden, wobei die genaue Funktionsweise nicht endgültig geklärt ist. Dieser Prozess verlangt noch weitere Studien, welche den Effekt von Zytokinen untersuchen. Ziel sollte es sein, die Kontrolle über eine erfolgreiche parodontale Wundheilung zu erlangen (Whetton and Graham, 1999; Lee et al., 2017). Es stellt sich nun die Frage, welche Maßnahmen bei der Therapie getroffen werden sollten, um eine Regeneration im Parodont zu unterstützen.

1.4 Therapie

Es gibt zahlreiche Therapieansätze, um die Genesung und Regeneration des Parodonts zu unterstützen. Es ist essenziell, dass das Gewebe zurück in seine ursprüngliche Homöostase überführt wird, welche durch die Abwesenheit jeglicher entzündlichen Vorgänge definiert ist (Cekici et al., 2014).

Aktuelle Therapieansätze setzen sich zum Ziel, die Bakterienlast zu reduzieren und somit eine angemessene Infektionskontrolle zu etablieren. Strategien für die Verbesserung der Mundhygiene liegen sowohl in den Händen des behandelnden Arztes als auch in denen des Patienten. Die grundlegende Maßnahme ist die Sensibilisierung des Patienten für eine entsprechend bessere Mundhygiene. Die Aufklärung durch den Arzt soll dem Patienten ermöglichen eine adäquate, supragingivale Plaquekontrolle selbst durchzuführen und diese aufrechtzuerhalten. Zudem sollten Lebensgewohnheiten, die als Risikofaktoren und Modulatoren für eine Parodontitis gelten, wie beispielsweise Nikotinkonsum oder die therapeutische Behandlung von Grunderkrankungen (wie Diabetes mellitus), optimiert werden (Heitz-Mayfield and Lang, 2013, Suvan et al., 2019). Ergänzend zu einer selbstständigen Mundhygiene soll ab dem Staging II eine subgingivale Instrumentierung und die Reinigung von unzugänglichen Zahnoberflächen erfolgen. Die Unterbrechung des entstandenen Biofilms und die Entfernung harter Auflagerungen im Sinne eines Debridements führen zu einer Unterdrückung des Entzündungsgeschehens im Weichgewebe. Ziel dieser Therapie ist zunächst das Arretieren der destruktiven Prozesse im Zahnhalteapparat. Ferner können bei einer konventionellen Behandlung natürliche und/oder synthetische Materialien zum Auffüllen von parodontalen Defekten verwendet werden. Diese Methodik soll die Wundheilung des Parodonts unterstützen (Karring et al., 1993).

Ein möglicher Therapieansatz ist die Zugabe von Ascorbinsäure (AS) als unterstützender Faktor in der parodontalen Wundheilung. Es hat sich gezeigt, dass AS die Proliferation von gingivalen mesenchymalen Stammzellen (G-MSCs) steigert und besonders für die ersten Phasen der reparativen und regenerativen Wundheilung eine ausreichende Zellzahl sicherstellen kann. Ferner ist der positive Effekt von AS auf die Pluripotenz der G-MSCs ausschlaggebend für neue Ansätze in der Parodontaltherapie (Van Pham et al., 2016). In dieser Studie wurde dieser Ansatz aufgegriffen und die Wirkung von AS auf G-MSCs genauer untersucht.

1.5 Gingivale mesenchymale Stammzellen (G-MSCs)

MSCs sind Zellen, welche sich durch die Eigenschaften zur Selbsterneuerung und der gezielten Differenzierung definieren. Ihre Fähigkeit sich unter geeigneten Bedingungen in eine Variation von Zelltypen zu differenzieren, bietet eine ausgezeichnete Therapiegrundlage zur Regeneration von Geweben (Han et al., 2019). Anders als embryonale Stammzellen sind adulte Stammzellen erhöht verfügbar. Zudem ist ihre Verwendung in der Wissenschaft nicht durch ethische Bedenken eingeschränkt (Fischbach and Fischbach, 2004). Adulte Stammzellen findet man in verschiedenen Geweben und Organen wie z.B. im Knochenmark oder Fettgewebe, aus denen sie isoliert werden können (Dominici et al., 2006, Gao et al., 2014). Dominici et al. etablierte bestimmte Charakteristika einer Zelle, die als MSC definiert werden, was eine Einheitlichkeit der MSCs unterschiedlichen Geweben erlaubt. Dabei werden die Adhärenz an Plastik, die Expression der Oberflächenmarker CD90, CD73, CD105 und gleichzeitiger Abwesenheit von CD14, CD34 und CD45, sowie ihre Fähigkeit zur multilinearen Differenzierung beschrieben (Dominici et al., 2006). Auch in der orofazialen Region sind verschiedene MSCs mit besagten Qualitäten aufzufinden. Sie sind unter Fibroblasten, Endothelzellen, Epithelzellen, Zementoblasten, Osteoblasten, Myoepithelzellen, Neuroblasten und anderen nur eine kleine Population der Mundhöhle, jedoch wegen ihrer bemerkenswerten reparativen und regenerativen Eigenschaften vorteilhaft für die orale Wundheilung (Fawzy El-Sayed et al., 2012, 2015; Yu et al., 2013). Ihre Resistenz gegenüber Entzündungsreizen (Fawzy El-Sayed and Dorfer, 2016) und ihre immunregulatorischen Eigenschaften (Zhang et al., 2017) wirken sich unterstützend auf eine Reparatur oder Regeneration des Parodonts aus. MSCs sind in der Lage eine osteogene, adipogene oder chondrogene Differenzierung einzugehen und werden daher therapeutisch zur Wundheilung verwendet (Li, Sun and Pang, 2015). Die gezielte Anwendung dieser Zellen ist somit essenziell für den Erfolg einer regenerativen Parodontaltherapie.

Unter den oralen Stammzellen unterscheidet man diejenigen aus dem parodontalen Ligament (PDSLC), aus der apikalen Papille (SCAP), aus der Gingiva (G-MSC) und dem Alveolarknochen (AB-MSC), welche in der folgenden Abbildung 2 dargestellt sind (Fawzy El-Sayed et al., 2019).

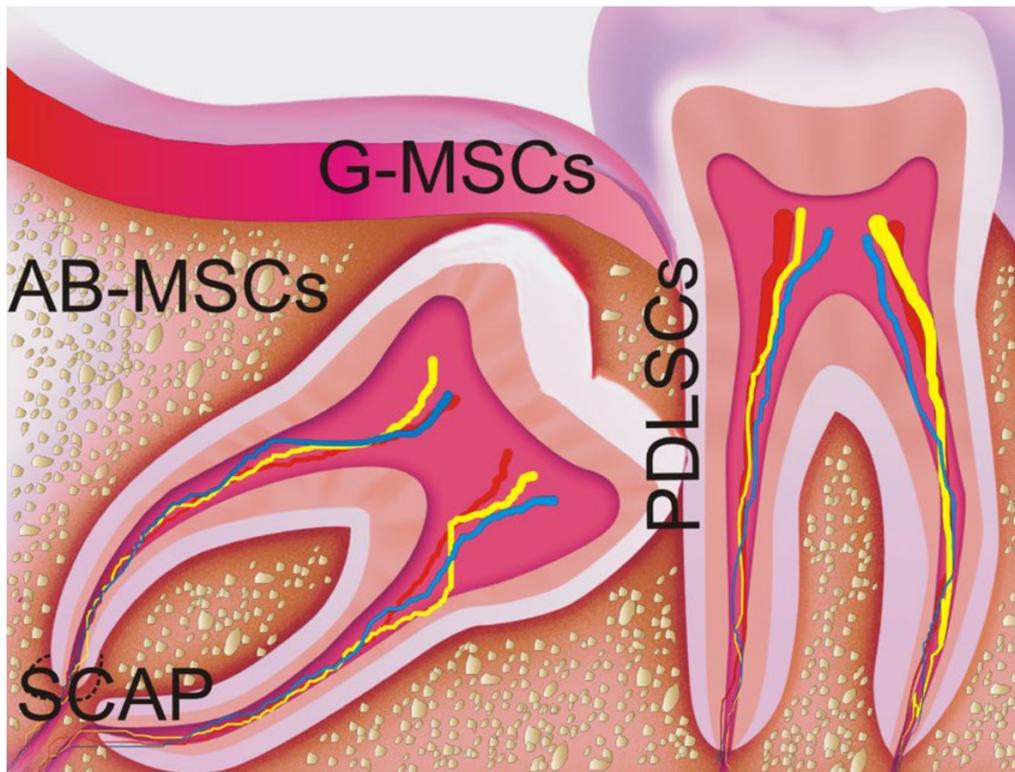


Abbildung 2: Schematische Darstellung oraler Gewebe und die dort befindlichen mesenchymalen Stammzellen. MSCs aus dem parodontalen Ligament (PDLSC), aus der apikalen Papille (SCAP), aus der Gingiva (G-MSC) und dem Alveolarknochen (AB-MSC), Quelle: (Fawzy El-Sayed et al., 2019)

G-MSCs stellen attraktivere Alternativen zu anderen oralen MSCs dar (Fawzy El-Sayed et al., 2012, El-Sayed et al., 2015). Im Praxisalltag gilt die klinisch resezierte Gingiva als Nebenprodukt, das, z.B. bei der Extraktion eines impaktierten Zahnes, verworfen wird. Aus dieser Gingiva können vorhandene G-MSCs isoliert werden, sodass sich das Gewebe als eine einfache zugängliche Quelle für MSCs erweist (Gao et al., 2014). Die Anzahl verfügbarer MSCs, darunter auch G-MSCs, im Gewebe ist jedoch limitiert (Van Pham et al., 2016). Besonders mit fortschreitendem Alter verringert sich die Anzahl von Stammzellnischen (Tomasello et al., 2017). Einige Studien zielen darauf ab, die Verfügbarkeit von MSCs zu erhöhen, indem unter anderem das Proliferationspotential verbessert wird. Es wurde gezeigt, dass unabhängig davon, ob G-MSCs aus einem entzündeten oder einem gesunden Gewebe entstammen, diese ein ähnliches Potential für die Differenzierung und Regeneration haben (Tang et al., 2011; Ge et al., 2012). Weitere Studien zeigten sogar einen Zusammenhang zwischen einer kurzandauernden entzündlichen Stimulation von G-MSCs und einem dadurch induzierten erhöhten Differenzierungs- und Proliferationspotential (Zhang et al., 2017). Besonders in

Bezug auf die parodontale Therapie, genauer einer regenerativen therapeutischen Lösung, spielen daher MSCs eine außerordentlich wichtige Rolle.

1.6 Ascorbinsäure (AS)

AS ist ein wasserlösliches Vitamin, welches der Körper nicht selbst synthetisieren kann und demnach ist kein Depot im Körper vorhanden. AS können wir jedoch mit der Nahrung aufnehmen, es findet sich in Obst und Gemüse, wie z.B. in Ananas, Grapefruit, Zitrusfrüchten, Mango, Tomaten und Brokkoli (Alagl and Bhat, 2015). Es ist bereits bekannt, dass AS in einem engen Zusammenhang mit der parodontalen Gesundheit steht. So wurde gezeigt, dass ein langanhaltender AS-Mangel (klinisch manifest als Skorbut) zur ulzerierenden Gingivitis und parodontale Taschenentwicklung mit Knochen- und Zahnverlust führt (Nishida et al., 2000a, Alagl and Bhat, 2015). In Bezug auf die parodontale Gesundheit wurden die vorteilhaften Effekte von AS an adulten (Wei et al., 2014, Yu et al., 2014, Bae et al., 2015), embryonalen (Gao et al., 2015) und induzierten pluripotenten (Esteban and Pei, 2012) Stamm- und Progenitorzellen untersucht. Es wird diskutiert, ob eine Ergänzung mit AS sich ebenfalls positiv auf das Ergebnis bei einer parodontalen reparativen und regenerativen Therapie auswirkt. Ein wichtiger Aspekt ist die antioxidative Wirkung von AS auf das umliegende Gewebe. In parodontalen Läsion besteht ein Ungleichgewicht zugunsten freier Radikale, den sogenannten reaktiven Sauerstoffspezies (engl.: reactive oxygen species, ROS), was die Gewebsdestruktion vorantreibt. Unter dem Einfluss von ROS, darunter auch Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Hypochlorige Säure (HClO) und Molekularer Sauerstoff (1O_2), zeigen Studien die reduzierte Transkription von Pluripotenzmarkern, wie *Nanog*, *octamer binding transcription factor 4 (Oct4)* und *sex determining region Y (SRY)-box 2 (Sox2)* (Ji et al., 2010). Weitere Forschungen zeigen die vorteilhafte Eigenschaft von AS als Antioxidans (AO) zu wirken. Somit können freie Radikale eliminiert und die Transkription verschiedener Marker unterstützt werden. Klinische Studien bei Parodontitispatienten mit einer Supplementation der Therapie mit AS führten zu einer Verbesserung der gemessenen Parameter, darunter das Niveau des Attachments und die parodontalen Taschentiefen (Abou Sulaiman and Shehadeh, 2010, Chitsazi et al., 2017). Ferner wurde bei PDSLCS unter dem Einfluss von AS die Aktivität der Alkalischen Phosphatase (ALP) untersucht (Ishikawa et al., 2004), welches in den frühen Stadien des Knochenstoffwechsels beteiligt ist und ein Indiz für die Differenzierung mesenchymaler

Stammzellen ist. Ishikawa et al. zeigte, dass AS die ALP-Aktivität durch die Produktion von Kollagen Typ-I in PDSLCs erhöht. AS induziert in vielen Zelltypen eine Prokollagen-Hydroxylierung gefolgt von einer Kollagensynthese. Die Typ-I-Kollagenproduktion ist einer der frühen Marker für die osteoblastische Differenzierung und essenziell für die Knochen- und Bindegewebsbildung (Ishikawa et al., 2004). Unter dem Einfluss von AS wurde eine erhöhte Zellproliferation, eine herabgesetzte Apoptose und eine vermehrte Expression von Pluripotenzmarkern, wie *Nanog*, *Oct4* und *Sox2*, festgestellt. AS ist ebenfalls ein wichtiger Bestandteil in der Biosynthese von Kollagen und der Extrazellulärmatrix (Nishida et al., 2000b, Yu et al., 2014) und nimmt eine wichtige Rolle bei der parodontalen Wundheilung und der Gewebsregeneration ein (Rubin, 1984).

Die Vorzüge von AS in Bezug auf den parodontalen Krankheitsverlauf werden deutlich. So dass mit Hilfe einer Supplementation von AS der Verlauf der Parodontitis modifiziert werden und die regenerative Behandlung in der Parodontologie unterstützt werden könnte.

1.7 Zielsetzung

Bereits in früheren Studien hat sich ein positiver Effekt von AS auf die Eigenschaften von Stammzellen herauskristallisiert (Gao et al., 2015, Van Pham et al., 2016). Die Expression von Pluripotenzmarkern, die Verbesserung der Differenzierung und die Unterstützung der Zellproliferation sind nur einige Vorzüge von AS. Diese Arbeit befasst sich mit dem Verhalten von G-MSCs in Bezug auf die Beständigkeit des Stammzellcharakters unter einem Parodontitis-ähnlichen Zytokinmilieu und zusätzlicher AS-Supplementierung. Die zu untersuchende Annahme ist, dass unter dem Einfluss von AS ein pluripotentes Stadium in G-MSCs aufrechterhalten und darüber hinaus die Differenzierungskapazität und die Proliferation stimuliert werden kann. Diese Aspekte können dann als Ausgangspunkt für eine verbesserte parodontale reparative und regenerative Wundheilung festgehalten werden. Dafür werden gingivale Stammzellen isoliert und ihr Verhalten unter dem Einfluss von einem Parodontitis-ähnlichen Entzündungsmilieu mit und ohne Ergänzung von AS untersucht. Diese Studie soll frühere Ergebnisse unterstützen und zum ersten Mal auch den Effekt isoliert und in Kombination mit einem Entzündungsmilieu erfassen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Produkt	Bezugsquelle
6-Well Platte	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
96-Well Hard Shell Platte	Roche, Mannheim, Deutschland
Bio Cassette	Bio Optica, Mailand, Italien
Bio Pads	Bio Optica, Mailand, Italien
Biosphere Quality Tips (100-1000µl)	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Biosphere Quality Tips (100µl)	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Biosphere Quality Tips (10µl)	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Eppendorf Reaktionsgefäß (1,5ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäß (50ml)	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Kryoröhrchen	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Membranfilterpapier	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Mikrotom-Einmalklinge	PFM Medical, Köln, Deutschland
Neubauerzählkammer	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Objektträger	Thermo Scientific, Darmstadt, Deutschland
Pasteurpipetten	Assistent, Sondheim v. d. Rhön, Deutschland
Petrischalen	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Rundbodenröhren (5ml) für FACS	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten (10ml)	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten (25ml)	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland

Skalpell	Hu-Friedy, Frankfurt am Main, Deutschland
Zahnärztliche Pinzetten	Hu-Friedy, Frankfurt am Main, Deutschland
Zellkulturflaschen	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Zellschaber	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland

2.1.2 Geräte

Tabelle 3: Verwendete Laborgeräte

Geräte	Hersteller
Axiovision HRc	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Brutschrank	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Easypet Pipette Dispenser	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
FACSCALIBUR	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Begasungsbrutschrank, Hera Celle	Thermo Scientific, Waltham, USA
Light Cycler	Roche Life Science, Prenzlberg, Deutschland
MACS® MultiStand	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank, Hera Safe	Thermo Scientific, Waltham, USA
Mikrotom	Thermo Scientific, Waltham, USA
Mini Star Zentrifuge	neoLab, Heidelberg, Deutschland
Multiskan™ FC Mikrotiterplatten-Photometer	Thermo Scientific, Waltham, USA
Paraffinstreckbad	Medax, Neumünster, Deutschland
pH Meter	WTW, Weilheim, Deutschland
Pipette 0, 1 -2, 5µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipette 100-1000µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipette 10µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Pipette 20-100µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Rotamax	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Sartorius AC210S Waage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Spiegelreflexkamera	Canon, Tokio, Japan
Tissue Processor TPC 15 Duo	Medite Medizintechnik, Burgdorf, Deutschland
Vacusaft Comfort	IBS Integra Biosciences, Chur, Schweiz
Vakuklav 24	Melag, Berlin, Deutschland
Vortex Genie 2	Bender&Holbein AG, Bruchsal, Deutschland
Wachseinbettmaschine	Medite Medizintechnik, Burgdorf, Deutschland
Wasserbad	GFL, Burgwedel, Deutschland
Zeiss Axiovert 40C	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Bezugsquelle
Accutase	Biochrom, Berlin, Deutschland
Adipogenes Differenzierungsmedium	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Alcainblau	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Alizarin Rot S	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumhydroxid	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Amphotericin	BioWest, Nuaille, Frankreich
Aqua Dest	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Langenhagen, Deutschland

Biofreeze	Biochrom, Berlin, Deutschland
Bovin Serum Albumin	Biochrom, Berlin, Deutschland
Chondrogenes Differenzierungsmedium	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Essigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
FACS Puffer	PBS, 0,5-1,0% BSA, 0,1% Sodium Acid
FcR Blocking Reagent	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Fetales Kälberserum (FBS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Formaldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glutamin	Lonza, Basel, Schweiz
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glutaraldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kernechtrot	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Kristallviolett färbung	Merck, Darmstadt, Deutschland
L-Ascorbic acid 2-phosphate	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
MACS-Puffer	PBS, 0,5mM EDTA, 0,5% BSA
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Minimum Essential Medium Eagle	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Natriumhypochlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Oil Red O	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Osteogenes Differenzierungsmedium	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Paraffin	McCormick, Sparks, USA

PBS Dulbecco	Biochrom, Berlin, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin, Deutschland
Sodium Acid	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Xylol	Büfa Chemie, Oldenburg, Deutschland

2.1.4 CD-Antigene und Antikörper

Tabelle 5: Verwendete CD-Antigene und Antikörper

Antigen/Antikörper	Bezugsquelle
anti-human APC CD45	Biologend, San Diego, USA
anti-human FITC CD14	Biologend, San Diego, USA
anti-human PE CD105	Biologend, San Diego, USA
anti-human PE CD34	Biologend, San Diego, USA
anti-human PE CD73	Biologend, San Diego, USA
anti-human PE CD90	Biologend, San Diego, USA
IgG2aAPC, κ Isotyp Ctrl	Biologend, San Diego, USA
IgG2aFITC, κ Isotyp Ctrl	Biologend, San Diego, USA
IgM Alexa 647	Biologend, San Diego, USA
Mouse IgG1aPE, κ Isotyp Ctrl	Biologend, San Diego, USA
Mouse IgG2aPE, κ Isotyp Ctrl	Biologend, San Diego, USA
Rat IgG1 κ PE, Isotype Control	Biologend, San Diego, USA
STRO-1 ALEXA 647	Biologend, San Diego, USA

2.2 Methodik

Um eine Kontamination der Zellen und den verwendeten Materialien zu vermeiden, erfolgt die Arbeit unter einer sterilen Sicherheitswerkbank (Thermo Scientific, Waltham, USA). Ferner wurden grundsätzlich sterile Medien, Lösungen und Gefäße verwendet. Wenn möglich, wurden Materialien für 45 min bei 134,0 °C und 2 bar sterilisiert, um eine genügende Keimfreiheit zu schaffen. Gegenstände, die keine Hitzebeständigkeit aufweisen, wurden mit 70 %igem Ethanol (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) für 20 s desinfiziert.

Die Kultivierung der Zellen erfolgt im Begasungsbrutschank (Thermo Scientific, Waltham, USA) in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit einem CO₂ Gehalt von 5,0 % bei 37,0 °C.

2.2.1 Zellbiologische Verfahren

2.2.1.1 Ethikantrag

Die aktuelle Studie wurde von der Ethikkommission der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel genehmigt (IRB D513/17). Vor der Gewebeentnahme wurde von jedem der fünf Patienten (n = 5) eine Einverständniserklärung eingeholt.

2.2.1.2 Zellgewinnung, Kultivierung

In dieser Studie wurden G-MSCs bei der chirurgischen Extraktion von Weisheitszähnen aus dem Weichgebe isoliert. Zur Gewinnung von G-MSCs wurden bereits etablierte Studien herangezogen, welche die Isolierung von Stammzellen aus Biopsien der Gingiva und dem Alveolarknochen ermöglichen (Fawzy El-Sayed et al., 2012, El-Sayed et al., 2015). In darauffolgenden in vivo Untersuchungen an Schweinen wurde das regenerative Potential für die gewonnen G-MSCs deutlich dargestellt (Fawzy El-Sayed et al., 2012).

Im Labor wurden die Proben mit PBS im Wechsel mit 75 %igem Ethanol gespült, um Oberflächenkeime zu entfernen. Anschließend folgt ein letzter Spülgang mit dem Basisnährmedium. Die Gingiva wurde dann auf Petrischalen (Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland) verteilt. Dabei war zu beachten, dass die Proben des gleichen Patienten jeweils in dieselbe Petrischale überführt werden. Mit Hilfe eines Skalpell (Hu-Friedy, Frankfurt am Main, Deutschland) wurde die Gingiva deepithelialisiert und in 1 mm x 1 mm große Segmente

portioniert. Diese wurden dann so auf dem Boden der Petrischale verteilt, dass ein Abstand von ca. 1 cm zur nächsten Probe verblieb. Die Petrischalen wurden anschließend für 30 min offen in der Sicherheitsbank belassen, sodass eine Adhäsion des Gewebes auf dem Petrischalenboden stattfinden konnte. Abschließend wurde die Petrischale vorsichtig mit 10 ml Basalnährmedium befüllt und in den Begasungsbrutschank (5,0 % CO₂, 37,0 °C) gegeben. Die Dauer der Inkubation wurde vom Durchmesser der aus dem Gewebe herauswachsenden Zellen gewählt. Dabei wurde die Isolation der vermuteten G-MSCs bei einer Größe von 5 cm durchgeführt.

2.2.1.3 Isolation G-MSCs

Die aus den gingivalen Biopsien herauswachsenden Zellen hafteten adhärent am Petrischalenboden. Bei den proliferierenden Zellen handelt es sich um ein Zellgemisch. In dieser Studie wurde das magnetic activated cell sorting (MACS) Separation Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) verwendet. Das Prinzip besteht darin, dass G-MSCs einen spezifischen Marker (STRO-1) auf ihrer Zelloberfläche exponieren. Durch die Zugabe von spezifischen anti-STRO-1 Antikörpern (AK) und zusätzlich magnetisch gekennzeichneten AKs (anti-IgM MircoBeads AK) ist es möglich, die G-MSCs zu markieren und von der restlichen Zellsuspension zu trennen (MACS (+)). Im weiteren Verfahren werden diese, unter Verwendung eines Magnetfeldes von den AK-ungebundenen Zellen (MACS (-)) separiert (Abbildung 3).

Zu Beginn wurden zunächst die gingivalen Biopsien mit einer Pinzette entfernt. Mithilfe eines Zellschabers (Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland) wurden die Zellen gelöst, in eine Suspension überführt und in die Zentrifuge (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) (1700 UPM, 10 min) gegeben. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet am Boden des Reaktionsgefäß belassen. Nach Ermittlung der Zellzahl (siehe 2.2.1.5), und somit der Menge der zu verwendeten AK, wurde das Zellpellet erneut isoliert und mit 80 µl MACS-Puffer resuspendiert. Pro 1×10^7 Zellen wurden 20 µl anti-STRO-1 AK (BioLegend, San Diego, USA) und 20 µl anti-IgM MircoBeads AK (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) zum Reaktionsgefäß hinzugeführt. Die Suspension wurde mit dem Vortex Genie 2 gründlich durchmischt und für einen Zeitraum von 15 min bei 4,0 °C im Kühlschrank gelagert. Anschließend wurde zur Suspension im Reaktionsgefäß die 10-fache Menge PBS (1200 µl)

hinzugefügt und diese erneut gründlich durchmischt, bei 1700 UPM für 10 min zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Dies wurde zweimal wiederholt. Das Zellpellet wurde zuletzt mit 5 ml MACS Puffer resuspendiert.

Um nun die G-MSCs zu isolieren, wurde der MACS-Multistand (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland), welches ein starkes Magnetfeld darstellt, mit 70 %igem Alkohol desinfiziert und zur weiteren Verwendung unter die Sicherheitswerkbank platziert. Anschließend wurde die MACS Säule, die zum Auffangen der MACS (+) Zellen dient, an dem Multistand eingehängt und darunter ein Rundbodenröhrchen (Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland) zur Aufnahme MACS (-) Zellen platziert. In der Säule wird das Magnetfeld des Multistands verstärkt und ist in der Lage die MicroBeads gekoppelten Zellen darin zu halten. MACS (-) Zellen laufen ungehindert durch die Säule in das darunterliegende Rundbodenröhrchen. Die Säule wurde so lange in 500 µl Schüben befüllt, bis die Zellsuspension des Patienten aufgebraucht wurde.

Die MACS (+) Zellen wurden, so lange das magnetische Feld bestand, in der Säule gehalten. Um diese nun zu lösen, wurde die Säule aus dem Multistand entnommen. Der Multistand wurde aus der Sicherheitsbank entfernt und zügig in den benachbarten Raum platziert, damit jeglicher magnetische Einfluss auf die MicroBeads verhindert wurde. Ein neues Reaktionsgefäß wurde unter die Säule platziert und mit 1 ml MACS Puffer und dem zur Säule dazugehörigen Stempel durchgedrückt. Die MACS (+) Zellen wurden somit mit dem durchlaufenden Puffer im Röhrchen aufgefangen.

Die isolierten MACS (+) Zellen, welche G-MSCs entsprechen, wurden anschließend in eine Kulturflasche mit 25 ml Basismedium überführt und im Begasungsbrutschank (5,0 % CO₂, 37,0 °C) kultiviert.

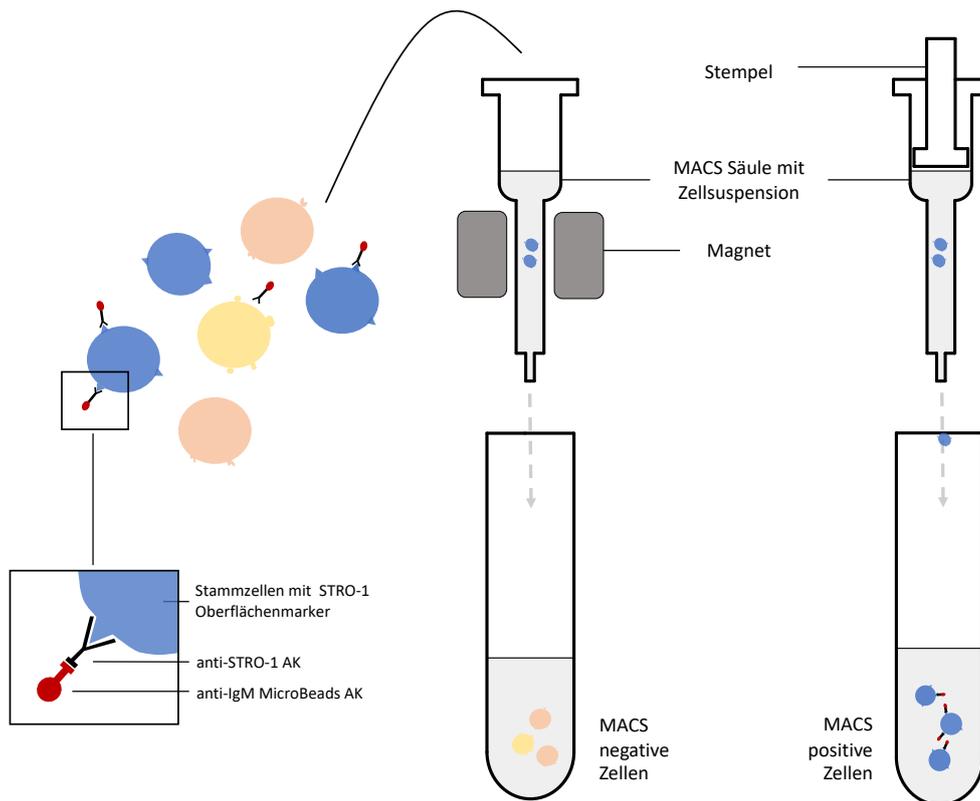


Abbildung 3: Schematische Darstellung der MACS Separation. Binden die anti-STRO-1 AK und die anti-IgM MicroBeads AK an den Zellen, die STRO-1 an der Zelloberfläche exprimieren, werden diese für die MACS Separation markiert. Über das potenzierte Magnetfeld werden die magnetisch gekennzeichneten MACS (+) Zellen in der MACS Säule gehalten, während MACS (-) Zellen ungehindert in das Rundbodenröhrchen aufgefangen werden. Wird das Magnetfeld entfernt, können die MACS (+) Zellen mithilfe des Stempels in ein neues Rundbodenröhrchen überführt werden und anschließend in einer Zellkulturflasche kultiviert werden.

2.2.1.4 Passage

Um eine ausreichende Zellzahl für die Versuche zu erhalten, wurden die Zellen unter einem Basalnährmedium in Zellkulturflaschen (Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland) kultiviert. Bei einer Konfluenz von 70-80 % wurden die Flaschen auf weitere Zellkulturflaschen aufgeteilt.

Für die Passage der Zellkulturen wurde zum Ablösen der Zellen 5 %ige Accutase (Biochrom, Berlin, Deutschland) frisch angesetzt. Dabei wurde das Restmedium entfernt und die Flaschen zweimal mit PBS gespült. Anschließend wurde 10 ml der Accutase-Lösung in die Kulturflaschen gegeben und für 10 min in den Begasungsbrutschrank (5,0 % CO₂, 37,0 °C) gegeben. Nach der Inkubationszeit wurden die Flaschen entnommen und die Zellen mittels leichten Klopfens gegen die Seitenwand der Kulturflaschen gelöst. Anschließend wurde 5 ml der Zellsuspension auf eine neue Zellkulturflasche überführt und jede Zellkulturflasche mit weiteren 20 ml des

Basisnährmediums aufgefüllt. Zur weiteren Kultivierung der Zellen wurden diese im Begasungsbrutschrank (5,0 % CO₂, 37,0 °C) gelagert.

2.2.1.5 Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauerzählkammer

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Neubauerzählkammer (Roth, Karlsruhe, Deutschland; 0,0025 mm²/Kästchen bei einer Tiefe von 0,1 mm) und das mit 70 %igem Alkohol desinfizierte Deckglas verwendet. Die Zellen wurden mit Hilfe von 5 %iger Accutase vom Flaschenboden abgelöst und in ein 50 ml Reaktionsgefäß (Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland) überführt. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße bei 1700 UPM für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Reaktionsgefäß mit dem verbliebenen Zellpellet mit 10 ml PBS resuspendiert. Die Suspension wurde gründlich mit dem Vortex Genie 2 (Bender&Holbein AG, Bruchsal, Deutschland) durchmischt, um eine homogene Verteilung der Zellen in der Flüssigkeit zu gewährleisten.

Um die Zellen auszuzählen wurden 10 µl aus der Suspension mittels einer Eppendorf Pipette (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) entnommen und zwischen Deckglas und Neubauerzählkammer blasenfrei hinein pipettiert. Unter dem Mikroskop wurden dann die Zellen in vier 1 mm² große Quadrate bestimmt. Pro Patient wurde das Auszählen dreimal wiederholt und der Mittelwert bestimmt. Dieser wurde mit dem Faktor 10⁴ multipliziert, welches dann einer Zellzahl pro Milliliter entspricht.

2.2.1.6 Experimentelle Gruppen

Insgesamt wurden G-MSCs aus der zweiten Passage verwendet, welche für die Hauptstudie von fünf Patienten (n = 5) entnommen wurden. Sie wurden, wie folgend beschrieben, mit vier verschiedenen Medien in den experimentellen Gruppen kultiviert und täglich lichtmikroskopisch begutachtet.

2.2.1.6.1 Kontrollgruppe

Für die Kontrollgruppe (M1-Gruppe) wurde ein Kontrollmedium zusammengestellt. Dieses besteht aus 500 ml Minimum Essential Medium Eagle + 75 ml FBS (Biochrom, Berlin, Deutschland) + 10 ml Amphotericin (BioWest, Nuaille, Frankreich), 10 ml Streptomycin

(Biochrom, Berlin, Deutschland), 10 ml L-Glutamin (Lonza, Basel, Schweiz). Die Lagerung erfolgte nach dem Ansetzen stets im Kühlschrank bei 8,0 °C.

2.2.1.6.2 AS-Gruppe

Das für die AS-Gruppe verwendete Medium wurde durch Erweiterung des Kontrollmediums (siehe 2.2.1.6.1) zusammengestellt. Dabei wurde AS (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) in einer Konzentration von 250 µmol/l (Van Pham et al., 2016) hinzugegeben. Dieses wurde vor Anwendung stets frisch angesetzt.

2.2.1.6.3 Entzündungsgruppe

Die Entzündungsgruppe (EM-Gruppe) wurde mit einem Entzündungsmedium (EM) stimuliert, Dieses wurde durch Erweiterung des Kontrollmediums (siehe 2.2.1.6.1) zusammengestellt, indem diesem IL-1β (1 ng/ml), TNF-α (10 ng/ml) und IFN-γ (100 ng/ml) (Zhang et al., 2017) hinzugefügt wurden. Die Lagerung erfolgte nach dem Ansetzen im Kühlschrank bei 8,0 °C.

2.2.1.6.4 EM/AS-Gruppe

Für die EM/AS-Gruppe wurde das EM (siehe 2.2.1.6.3) mit AS in einer Konzentration von 250 µmol/l ergänzt. Dieses wurde vor Anwendung stets frisch angesetzt.

Tabelle 6: Übersicht zur Zusammensetzung der experimentellen Gruppen

Experimentelle Gruppe	Medium
M1-Gruppe	Kontrollmedium
AS-Gruppe	Kontrollmedium ergänzt mit 250 µmol/l
EM-Gruppe	Kontrollmedium ergänzt mit IL-1β (1 ng/ml), TNF-α (10 ng/ml) und IFN-γ (100 ng/ml)
EM/AS-Gruppe	Entzündungsmedium ergänzt mit 250 µmol/l

2.2.1.7 KBE – Koloniebildende Einheiten

Mit dem Prinzip der Koloniebildenden Einheiten (KBE) wird bestimmt, ob die isolierten G-MSCs in der Lage sind neue Kolonien zu bilden. Für die Charakterisierung nach Dominici et al. wurden die isolierten Zellen ausschließlich in einem Kontrollmedium kultiviert. Im Hauptversuch wurde die Veränderung ihrer KBE Fähigkeit nach Einfluss von EM und AS und ihrer Kombination untersucht. Dabei wurde das verwendete Medium entsprechend ihrer experimentellen Gruppen (siehe 2.2.1.6) für 14 Tage verwendet. Der Versuchsablauf ist für die Charakterisierung nach Dominici et al. und den Hauptversuch analog geschehen. Unterschieden wird dabei zwischen den verschiedenen Medien, in denen die Zellen kultiviert werden.

Hierzu wurden pro Patient und je Probe 3×10^3 G-MSCs in Petrischalen mit 10 cm Durchmesser für 14 Tage kultiviert. Ein Mediumwechsel wurde alle zwei bis drei Tage durchgeführt. Am Tag 14 wurde das Restmedium abgesaugt und die heranwachsenden Kolonien mit je 2 ml eiskaltem Ethanol für 5 min fixiert. Für die darauffolgenden Färbung wurde das Ethanol verworfen und je 800 µl Kristallviolett Lösung (0,03 g/10 ml; Merck, Darmstadt, Deutschland) in jede Petrischale dazu gegeben. Das Färbemittel wurde über 10 min in den Petrischalen belassen, so dass der Boden vollkommen bedeckt wurde. Anschließend wurden die Petrischalen so lange mit destilliertem Wasser (Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Langenhagen, Deutschland) gespült bis sich die Spüllösung nicht mehr anfärben ließ. Abschließend wurden die Petrischalen offen bei Raumtemperatur zum Trocknen belassen und fotografiert.

2.2.1.8 Proliferationskurven über 14 Tage

Für die Erstellung von Proliferationskurven der G-MSCs, die mittels der vier experimentellen Gruppen (siehe 2.2.1.6) über den Zeitraum von 14 Tagen stimuliert wurden, wurde die Zellzahl täglich bestimmt. Für jeden Auszählungszyklus wurde eine 24-Well Platte (Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland) verwendet. Dafür wurde pro Well 2×10^4 Zellen ausgesät. Alle Platten wurden mit Datum der Auszählung beschriftet und vor der Stimulation für 24 h in den Begasungsbrutschrank (5,0 % CO₂, 37,0 °C) gegeben. Nach Adhärenz der Zellen wurde das Medium abgesaugt und durch die vier Medien der experimentellen Gruppen ersetzt. Bis zur Auszählung wurden die Zellen in den Begasungsbrutschrank (5,0 % CO₂, 37,0 °C) gegeben. Das

Medium wurde alle zwei bis drei Tage gewechselt. Die Zellzahl wurde täglich zu gleicher Uhrzeit bestimmt (siehe 2.2.1.5) und die Ergebnisse der doppelt aufgeführten Proben gemittelt.

2.2.1.9 Differenzierungsreihe

Charakteristisch für MSCs ist ihre Fähigkeit sich in verschiedenen Gewebezellen auszudifferenzieren. Adipozyten, Osteozyten und Chondrozyten sind nur ein Teil der Möglichkeiten. Für die Charakterisierung der isolierten Zellen nach Dominici et al. wurden diese ausschließlich mit dem Differenzierungsmedium kultiviert. In der Hauptstudie wurde zum Vergleich ihres veränderten Differenzierungsverhaltens eine vorherige Stimulation entsprechend ihren experimentellen Gruppen für fünf Tage durchgeführt. Anschließend wurde das Medium dekantiert und durch das jeweilige Differenzierungsmedium ersetzt. Die Färbung wurde sowohl für die Charakterisierung der Stammzellen als auch für die Hauptstudie analog durchgeführt.

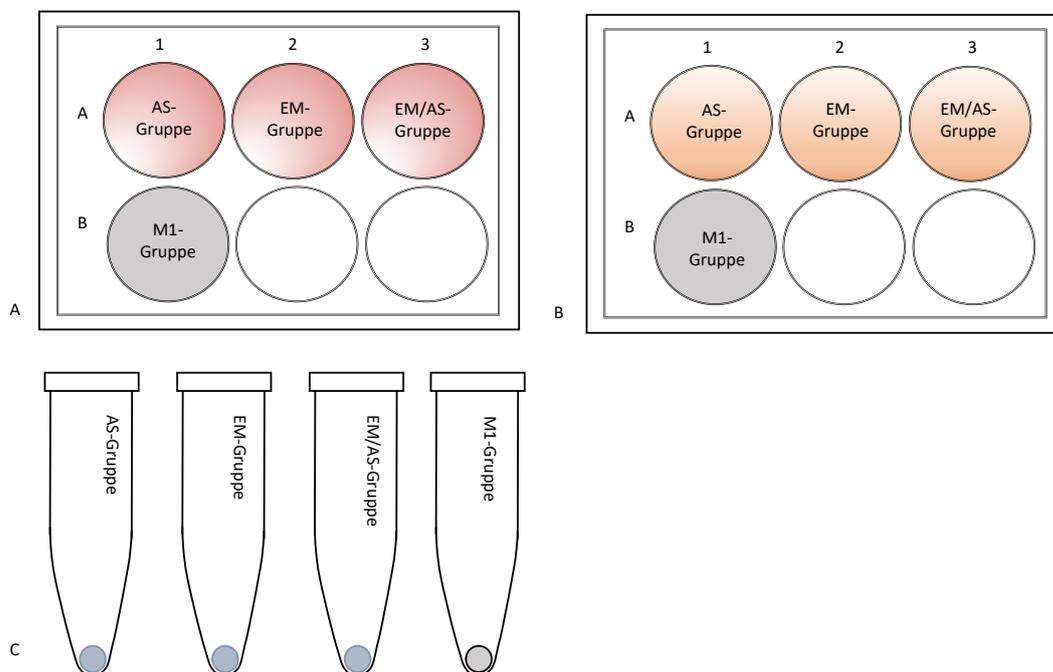


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Differenzierungsreihe nach dem Einfluss von EM und AS für je einen Patienten. (A) 6-Well Platte für die 21-tägige osteogene Differenzierung der G-MSCs. (B) 6-Well Platte für die 28-tägige adipogene Differenzierung der G-MSCs. (C) Chondrogene Differenzierungsreihe in 1,5ml Eppendorf Reaktionsgefäßen der isolierten G-MSCs für fünf Wochen.

2.2.1.9.1 Osteogene Differenzierung und Färbung

Für die osteogene Differenzierungsreihe wurden 6-Well Platten verwendet und pro Well 2×10^4 Zellen ausgesät. Nach der Zelladhäsion am Wellboden wurden die Zellen mit einem osteo-induktiven Medium (PromoCell, Heidelberg, Deutschland) stimuliert. Über einen Zeitraum von 14 Tagen wurden die Zellen mit diesem Medium ernährt, welches alle zwei bis drei Tage durch ein frisches ersetzt wurde.

Nach der osteogenen Stimulation wurden die Zellen mittels einer zuvor angesetzten Alizarin Rot Lösung (Roth, Karlsruhe, Deutschland) gefärbt. Das Ansetzen der Färbelösung wurde unter einem Abzug unter Verwendung von Handschuhen und Mundschutz durchgeführt. Dafür wurde 1,0 g Alizarin Rot abgewogen und daraufhin in ein 50 ml Reaktionsgefäß gegeben. Es wurden 50 ml destilliertes Wasser hinzugefügt, die dann mit Hilfe des Vortex Genie 2 gemischt wurden. Mittels eines pH-Meters (WTW, Weilheim, Deutschland) wurde durch Zugabe von Natriumhypochlorid (Merck, Darmstadt, Deutschland) bzw. Essigsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland) ein pH-Wert zwischen 4,1 und 4,2 eingestellt. Abschließend wurde die Färbelösung filtriert, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem Deckel verschlossen bis die Färbung beginnen konnte.

Die Vorbereitung der Zellen beinhaltete ein dreimaliges Spülen mit PBS und eine darauffolgende Fixierung mit 1 ml eiskaltem 70 %igen Ethanol pro Well. Nach 5 min wurde das Ethanol abgesaugt. In jedem Well wurde 2 ml der Alizarin Rot Lösung hinzugegeben und für weitere 5 min inkubiert. Anschließend wurde das Färbemittel abpipettiert und die Platten mehrmals mit destilliertem Wasser gespült, so lange bis die Spülflüssigkeit klar wurde. Ob Ansammlungen von Osteozyten zu erkennen sind, wurde lichtmikroskopisch untersucht und fotografisch festgehalten.

2.2.1.9.2 Quantitative Analyse der osteogenen Differenzierungsreihe

Für die quantitative Analyse wurde eine vorherige Färbung mittels Alizarin Rot durchgeführt (siehe 2.2.1.9.1). Für die Analyse wurde jedem Well 200 μ l 10 %ige Essigsäure hinzugegeben und diese für 30 min auf dem Rotamax (Heidolph, Schwabach, Deutschland) belassen. Unter Verwendung eines Zellschabers wurden die Zellen vorsichtig vom Boden der Wells abgelöst und in Reaktionsgefäße mit 1,5 ml Fassungsvermögen hinein pipettiert. Dabei ist zu beachten, dass der Überstand aus Essigsäure ebenfalls ins Gefäß überführt wurde. Daraufhin wurden die

Proben für 30 s mit dem Vortex Genie 2 vermischt und diese bei 85,0 °C für 10 min erwärmt. Um ein Verdunsten zu verhindern, wurden die Reaktionsgefäße mit Parafilm verdichtet. Nach dem Erwärmen folgte ein fünf-minütiges Abkühlen auf Eis. Nach vollständigem Abkühlen wurden die Proben bei 20.000 UPM für 15 min zentrifugiert. Anschließend wurde 200 µl von dem Überstand in ein neues Reaktionsgefäß umpepittiert. Mittels 75 µl 10 %iger Ammoniumhydroxid Lösung (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) wurde der pH-Wert in dem Reaktionsgefäß neutralisiert. Bei Erreichen eines Ziel-pH-Werts zwischen 4,1 und 4,5 wurden 50 µl aus jeder Probe in die Wells einer 96-Well Platte (Roche, Mannheim, Deutschland) hinein pipettiert. Als Standard wurde eine Verdünnungsreihe mit der Alizarin Rot Lösung auf die Platte hinzu pipettiert. Nach einer kurzen Inkubation auf dem Rotamix wurde die optische Dichte mittels eines Photometers (Thermo Scientific, Waltham, USA) bei einer Wellenlänge von 405 nm bestimmt.

2.2.1.9.3 Adipogene Differenzierung und Färbung

Für die adipogene Differenzierung der G-MSCs wurden 3×10^5 Zellen pro Well in 6-Well Platten ausgesät. Sie wurde mit einem adipogenen Differenzierungsmedium (PromoCell, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt, das alle zwei bis drei Tage regelmäßig gewechselt wurde. Der Differenzierungszeitraum betrug 21 Tage.

Nach Beendigung der Differenzierung wurden die Zellen unter Zuhilfenahme von Oil Red O (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) angefärbt. Dafür wurde 0,125 g Oil Red O abgewogen und in 25 ml 99 %igen Isopropanol (Merck, Darmstadt, Deutschland) vermengt. Die Lösung wurde für 5 min auf dem Rotamax belassen, danach 10 ml destilliertes Wasser hinzugegeben und mit dem Vortex gemischt. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß für 10 min zentrifugiert (1700 UPM). Die Lösung wurde mit einem Membranpapier (Sartorius, Göttingen, Deutschland) filtriert und für den späteren Einsatz zur Seite gelegt.

Zur eigentlichen Färbung wurden die Zellen drei Mal mit PBS gespült. Daraufhin mit 1 ml eiskaltem 60 %igen Isopropanol für 5 min fixiert, welches anschließend abgesaugt wurde. Jedem Well wurde 1 ml der Oil Red O Lösung hinzugegeben und die Well Platte für 10 min auf dem Rotamix inkubiert. Das Färbemittel wurde abgeschüttet und die Zellen so lange mit destilliertem Wasser gewaschen bis die Spüllösung klar wurde. Eine darauffolgende

Beurteilung der intrazellulären Lipidvakuolen wurde dann lichtmikroskopisch durchgeführt und anschließend fotografisch dokumentiert.

2.2.1.9.4 Quantitative Analyse der adipogenen Differenzierungsreihe

Nach der Färbung (siehe 2.2.1.9.3) und der darauffolgenden Fotodokumentation wurde in jedem Well 1 ml Isopropanol hinzugegeben und die Well Platte für 15 min auf den Rotamix gestellt. Anschließend wurden 100 µl des Überstands aus jeder Probe entnommen und in eine neue 96-Well Platte umpepittiert. Als Standard wurde ein Well mit der Oil Red O Lösung befüllt. Die Platte wurden mit einem Photometer bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen.

2.2.1.9.5 Chondrogene Differenzierungsreihe und Färbung

Für die chondrogene Differenzierungsreihe wurden Eppendorf Reaktionsgefäße verwendet. Pro 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden 3×10^4 Zellen in 1 ml Kontrollmedium hinzugegeben. Vor der Stimulation wurden die Zellen für 24 h in den Begasungsbrutschrank (5,0 % CO₂, 37,0 °C) gegeben. Die Zellen wurden dann mit einem chondrogenen Differenzierungsmedium (PromoCell, Heidelberg, Deutschland) stimuliert. Beim Mediumwechsel wurden die Reaktionsgefäße zentrifugiert, um eine Akkumulation der Zellen an der Spitze zu gewährleisten. Ferner wurde darauf geachtet, dass beim Absaugen des Mediums das gebildete Zellpellet im Reaktionsgefäß verbleibt. Der Stimulationszeitraum betrug dabei fünf Wochen, wobei ein regelmäßiger Mediumwechsel stattgefunden hat. Nach Beendigung der chondrogenen Stimulation wurde das Medium abgesaugt. Die Zellpellets wurden dreimal gründlich mit PBS gewaschen. Für die Fixierung wurde über 24 h eine Fixierlösung aus 10 ml 25 % Glutaraldehyd (Merck, Darmstadt, Deutschland), 4 ml 37 % Formaldehyd (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 100 ml Phosphatpuffer verwendet. Anschließend wurden die Pellets erneut mit PBS gründlich gewaschen und die überschüssige Flüssigkeit abgesaugt. Die Pellets wurden mit einer Pinzette von den Reaktionsgefäßen auf Biopsy Pads in die Bio-Cassetten (Bio Optica, Mailand, Italien) gelegt. Ein weiteres Biopsy Pad (Bio Optica, Mailand, Italien) wurde den Zellpellets aufgelegt, sodass diese vollkommen vom Schaumstoff der Pads umschlossen waren. Daraufhin wurde die Bio-Cassette geschlossen und in den Tissue Processor TPC 15 Duo (Medite Medizintechnik, Burgdorf, Deutschland) gegeben. Das

Einbettprogramm beinhaltet dabei verschiedene Bäder mit unterschiedlichen Temperaturen, aufsteigender Ethanolkonzentration, das Wiedereinlegen in Xylol (Büfa Chemie, Oldenburg, Deutschland) und das abschließende Einbetten in Paraffin (McCormick, Sparks, USA) (Abbildung 5).

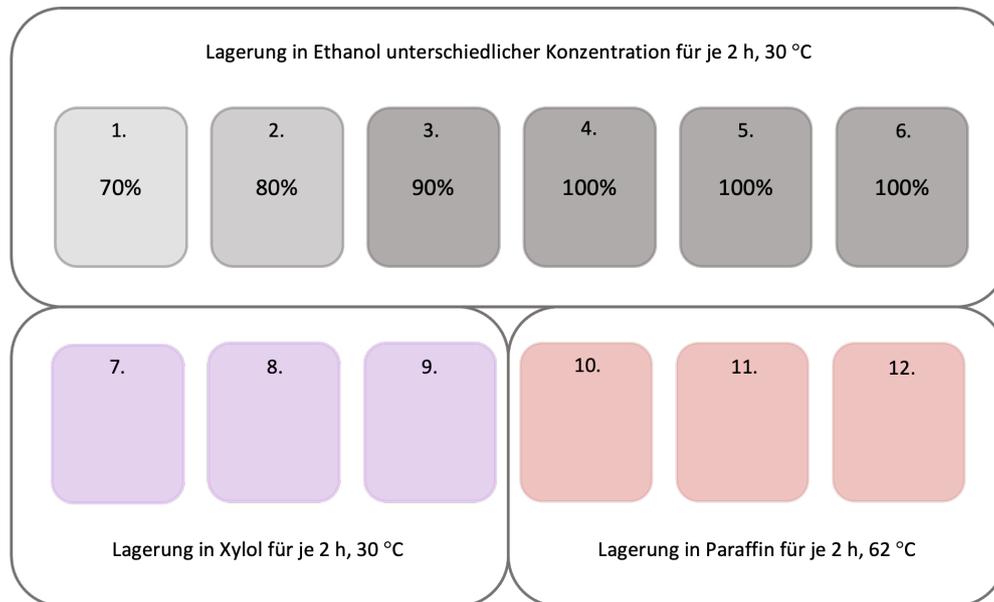


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Tissue Processor TPC 15 Duo. Das Einbettprogramm beinhaltet verschiedene Bäder mit unterschiedlichen Temperaturen, aufsteigender Ethanol Konzentration, das Wiedereinlegen in Xylol und das abschließende Einbetten in Paraffin.

Nach 24 h wurde das Einbettprogramm abgeschlossen, die Zellpellets aus der Bio-Cassette ausgebettet und in Metallträger überführt. In diese Metallträger wurde flüssiges Einbettwachs gefüllt und der Deckel der Bio Cassette verwendet, um die Pellets auf die noch flüssige Wachsoberfläche zu legen. Zur Trocknung wurden die Metallträger über Nacht im Kühlschrank bei 8,0 °C gelagert. Anschließend konnte man nun die Proben mittels eines Schnittmikrotoms (Thermo Scientific, Waltham, USA) in 5 µm dicke Schichten schneiden. Jeder Schnitt wurde dann in das Paraffinstreckbad hineingegeben und mit heißem Wasser gestreckt. Eine weitere Trocknung folgte dann über einen Zeitraum von 8 h in einem 30,0 °C warmen Begasungsbrutschrank.

Die Färbung wurde dann mit Alcainblau (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) und einer Gegenfärbung mit Kernechtrot (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) durchgeführt. Dafür wurden die einzelnen Schnitte auf Objektträger in einen Trägerkorb aus Glas gelegt. Der

gesamte Färbeprozess beinhaltete 15 Schritte. In Bad 1-3 wurden die Objektträger für je 5 min in ein Xylol Bad gehängt. Daraufhin wurden die Proben für jeweils 2 min in Ethanolbäder gelegt, die eine absteigende Konzentration von 96 %, 70 % und 60 % aufwiesen. Anschließend folgte ein Bad im destillierten Wasser. Die eigentliche Färbung wurde mit 1 % Alcainblau und 3 % Essigsäure durchgeführt, die 60 min beanspruchte. Nach dem Anfärben wurden die Objektträger für 5 min mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Gegenfärbung erfolgte mit 0,1 % Kernechtrot für 5 min, woraufhin die Proben für 1 min mit destilliertem Wasser gewaschen wurden. Anschließend wurden die Objektträger zweimal für jeweils 2 min in 100 % Ethanol gehängt. Zum Abschluss des Färbeprozesses wurden sie erneut für 5 min in ein Xylolbad gegeben. Die einzelnen Schnitte wurden zum Schutz mit einem Xylol haltigen Eindeckmittel gedeckelt.

2.2.2 Biochemische Verfahren

2.2.2.1 Bestimmung der intrazellulären β -Catenin Konzentration mittels ELISA

Mit Hilfe des phosphoELISA KITs (Invitrogen, CA, USA) wurde die intrazelluläre β -Catenin Konzentration, in den zuvor stimulierten G-MSCs (siehe 2.2.1.6), ermittelt. Das Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) ist ein antikörperbasierendes Nachweisverfahren, welches enzymatisch einen Farbumschlag verursacht. Das Prinzip beruht auf Bindung mehrerer spezifischer AK an der zu untersuchenden Komponente (hier: intrazelluläres β -Catenin). Eines dieser AK ist enzymgebunden (hier: anti-Rabbit IgG horseradish peroxidase (HRP)), welches durch darauffolgende Zugabe eines Substrates diesen katalysiert und eine Farbveränderung von transparent zu gelb initiiert.

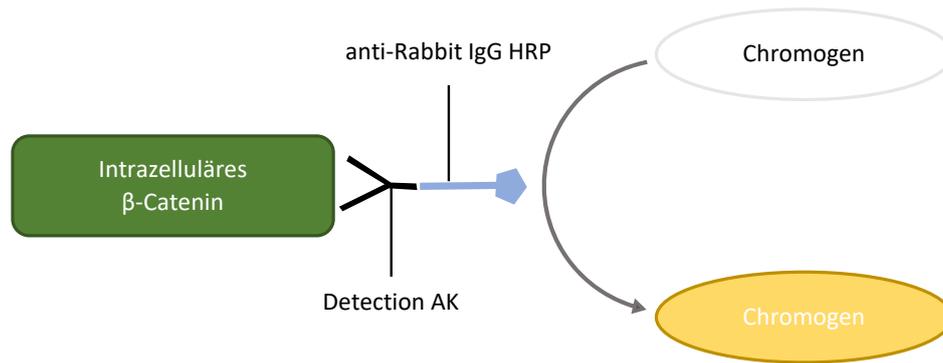


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Grundprinzips von ELISA zur Ermittlung der β-Catenin Konzentration. Bei Zugabe des spezifischen Detektions-AK bindet dieser an β-Catenin. Durch Ergänzung der Lösung mit anti-Rabbit IgG HRP AK findet eine weitere Bindung, nun am β-Catenin-gebundenen Detektions-AK, statt. Die Konjugation des 2. AK gewährleistet bei Zugabe des Chromogens einen enzymatischen Farbumschlag der Lösung von transparent zu gelb.

Hierfür wurden die G-MSCs mit einer Dichte von 8×10^4 Zellen/Well in 6-Well Platten ausgesät und in den experimentellen Gruppen (siehe 2.2.1.6) stimuliert. Nach der einstündigen Inkubationszeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen und je 350 μ l des Lysepuffers in die Wells hinzugegeben. 50 μ l aus jeder untersuchten Gruppe wurden daraufhin auf eine 96-Well Platten verteilt. Zusätzlich wurden 100 μ l des β-Catenin (Total) Detektions-AK hinzugefügt. Es folgte eine einstündige Inkubationszeit bei Raumtemperatur. Folgend wurden 100 μ l der anti-Rabbit IgG HRP Working Solution hinzugefügt. Diese AK sind mit HRP konjugiert – sie binden am Detektions-AK und sollen nach Zugabe des Chromogens den gewünschten Farbumschlag initiieren. Die Farbveränderung ist direkt proportional zu der β-Catenin Konzentration. Nach darauffolgender Waschung mit PBS und daraus resultierender Entfernung aller ungebundenen Reaktionskomponenten wurde 100 μ l des Stabilized Chromogen pro Well hinzugefügt. Die nächste Inkubationszeit dauerte 30 min an und erfolgte im Dunkeln bei Raumtemperatur. Anschließend wurde 100 μ l einer Stop Solution hinzugegeben, welche die enzymatische Reaktion unterbindet. Eine darauffolgende photometrische Messung wurde unter einer OD von 450 nm (MultiskanGO Microplate Spectrometer, ThermoFischer, Langenselbold, Deutschland) durchgeführt. Als Standardkurve wurde eine Verdünnungsreihe aufgestellt und der Farbumschlag der Proben mit der Verdünnungsreihe ins Verhältnis gesetzt.

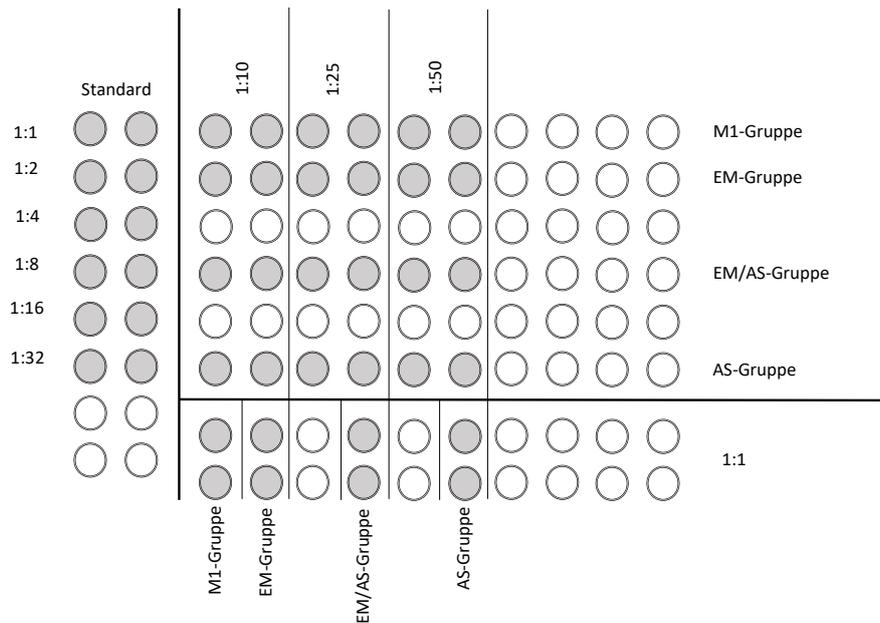


Abbildung 7: Pipettierschema der 96-Well Platte für ELISA

2.2.2.2 Bestimmung der Viabilität der G-MSCs mittels MTT

Mit dem MTT-Test kann anhand der metabolischen Aktivität der Zellen Rückschluss auf ihre Viabilität gezogen werden. Die Methode beruht dabei auf die Reduktion des namensgebenden gelben Farbstoffes (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zu einem blau-violetten Salz, dem Formazan. Es ist mit Hilfe eines Photometers möglich das gebildete Salz bei einer Wellenlänge zwischen 550 und 600nm nachzuweisen. Die Bildung von Formazan geschieht hauptsächlich durch Dehydrogenasen unter Bildung der Reduktionsäquivalenten NADH und NADPH. Diese Reaktion kann nur von Zellen mit einer regsamen mitochondrialen Aktivität durchgeführt werden, sodass die Farbintensität mit der Viabilität der Zellen korreliert.

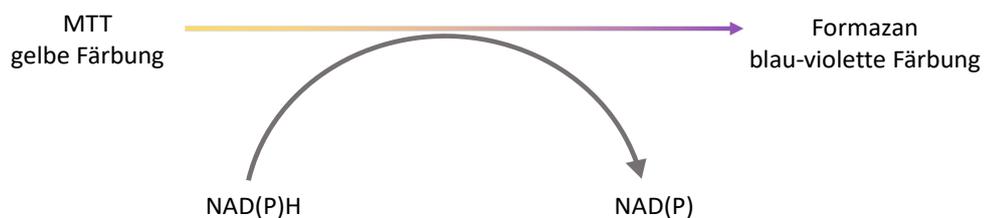


Abbildung 8: Reaktiver Hintergrund zur Ermittlung der Zellviabilität mittels MTT. Bei der Reduktion des gelben Farbstoffes MTT entsteht das blau-violette Salz, das Formazan. Dies geschieht hauptsächlich durch Dehydrogenasen unter Bildung der Reduktionsäquivalenten NADH und NADPH. Ein Farbumschlag von gelb auf blau-violett ist zu beobachten und kann photometrisch gemessen werden.

Hierzu wurden drei 96-Well Platten verwendet, um die Viabilität der Zellen nach 24 h, 48 h und 72 h zu ermitteln. Pro Platte wurden zu jedem Patienten vier doppelt aufgeführte (d.h. acht) Wells mit je 3×10^3 Zellen ausgesät, sodass eine Gesamtzellzahl von $2,4 \times 10^4$ Zellen pro Platte pro Patient benötigt wurde. Dafür wurden Zellen in Kulturflaschen kultiviert, bei einer Konfluenz von 70-80 % gelöst, in ein Zellpellet überführt und ausgezählt (siehe 2.2.1.5). Die Zellen wurden in ein zusätzliches Reaktionsgefäß überführt, vorher mit Basismedium befüllt, so dass eine Zelldichte von 3×10^3 Zellen/100 μ l erreicht wurde. Anschließend wurde die Suspension mit dem Vortex gut durchgemischt und mithilfe einer Eppendorf Pipette auf der Well Platte ausgesät. Abschließend wurden die Platten zur Adhäsion für 24 h in den Begasungsbrutschrank (5,0 % CO₂, 37,0 °C) gelegt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Basismedium abgesaugt und entsprechend der experimentellen Gruppen mit den verschiedenen Medien aufgefüllt. Anschließend wurden die Platten für einen Zeitraum von 24 h, 48 h und 72 h in den Begasungsbrutschrank (5,0 % CO₂, 37,0 °C) gegeben. Ein Mediumwechsel erfolgte alle zwei bis drei Tage. Nach der Inkubationszeit wurden 10 μ l des MTT labeling reagent mit einer Konzentration von 0,5 mg/ml in jedem Well hinein pipettiert und für weitere 4 h inkubiert. Danach wurden 100 μ l des Solubilisationsreagenz zu jedem Well hinzugefügt und über Nacht im Begasungsbrutschrank (5,0 % CO₂, 37,0 °C) belassen. Zur Auswertung wurden die Suspensionen in den Wells einzeln durchgemischt und abschließend die Extinktion bei einer Wellenlänge von 570 nm photometrisch bestimmt.

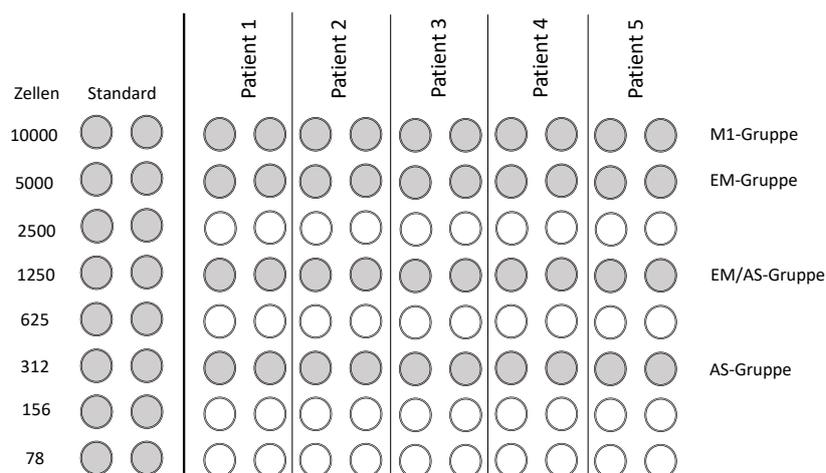


Abbildung 9: Pipettierschema der 96-Well Platte für MTT

2.2.2.3 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie, auch (fluorescence-activated cell sorting/scanning (FACS))-Analyse, dient der quantitativen Analyse von einzelnen Fluoreszenz-markierten Zellen. Diesbezüglich wird die Zellsuspension in eine Messkammer mit spitz zulaufender Düse mittig in eine Trägerflüssigkeit injiziert. Zwischen dem sogenannten Hüllstrom und der Zellsuspension liegt ein Druckunterschied vor, zudem bewegen sich diese, im Gerät mit unterschiedlicher Geschwindigkeit, sodass sie sich trotz gleicher Fließrichtung nicht vermischen. Der Hüllstrom fokussiert die Probe so, dass die Zellen als Einzelzellsuspension aus der Düse austreten. Nach dem Austritt wird die Suspension von Lasern angestrahlt. Es entsteht Streulicht, dessen verschiedene Strahlrichtungen und -qualitäten Aussage über die Eigenschaften jeder einzeln angestrahlt Zelle gibt. Das Vorwärtsstreulicht korreliert mit der Zellgröße, wogegen das Seitwärtsstreulicht mit der Granularität der Zelle zusammenhängt. Werden beide Aspekte nun zusammen in Betracht gezogen, kann bereits eine Unterscheidung zwischen verschiedenen Zelltypen stattfinden. Wurden die Zellen zusätzlich mit Fluorochromen markiert, so können diese nach Anregung durch Licht einer bestimmten Wellenlänge detektiert werden. Hier beruht das Prinzip auf der Absorption und der darauffolgenden Emission von Licht in einer anderen Frequenz. Dieser Frequenzunterschied kann ebenfalls analysiert und graphisch dargestellt werden.

Die gesamten Daten wurden in Histogrammen dargestellt, wobei die X- und Y-Achsenstellen die Messung von zwei unterschiedlichen Emissionen veranschaulicht. So repräsentiert die X-Achse die Intensität des ausgestrahlten Lichtes, die Y-Achse dagegen stellt die Anzahl der Zellen dar.

Für die Charakterisierung der G-MSCs wurden diese kultiviert und eine Zellzahl von 1×10^6 pro Probe benötigt, die mit 100 μ l PBS in ein FACS Röhrchen resuspendiert wurden. FACS wurde unter der Verwendung von CD14, CD34, CD45, CD73, CD90 und CD105 AK (BioLegend, San Diego, USA), CD146/MUC18 (eBioscience, NatuTec, GmbH) und STRO-1 (Biolegend, San Diego, USA) durchgeführt. Analog zu Standardprotokollen wurde, nach Bindung der primären AK und ihren Isotypenkontrollen, der Zellsuspension 5 μ l/100 μ l des FcR Blocking Reagent (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) hinzugegeben und anschließend mit dem Vortex durchmischt. Nach einer 30-minütigen, lichtgeschützten Lagerung im Kühlschrank wurde zu jeder Probe 2 ml PBS hinzugegeben, anschließend gründlich vermischt und bei 1700 UPM für

7 min bei 4,0 °C zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde dekantiert, das Zellpellet aufgenommen und in 200 µl FACS Puffer eines neuen FACS Röhrchen überführt. Die Analyse der Proben hat mit Hilfe des BD FACSCALIBUR (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) und FACSComp 5.1.1 Software (BEcton Dickinson Bioscience, Franklin Lakes, NJ) stattgefunden.

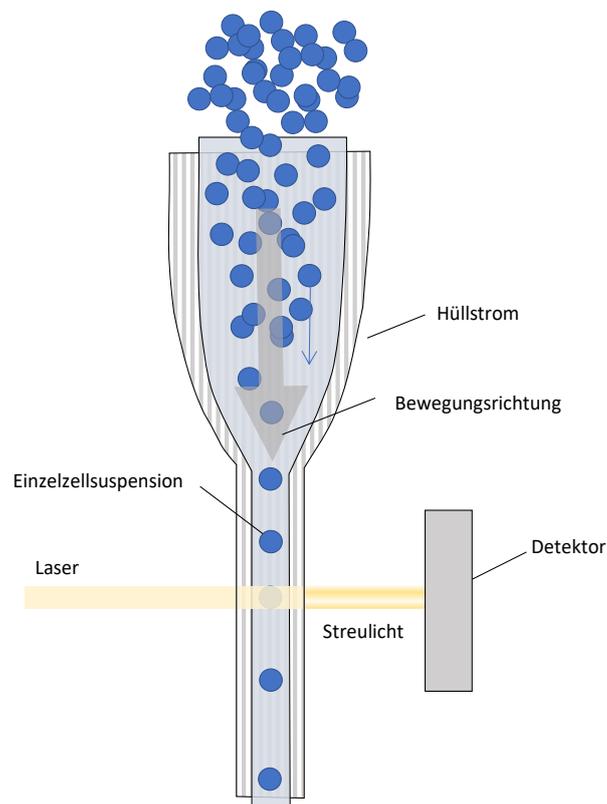


Abbildung 10: Vereinfachte Darstellung der Durchflusszytometrie. Die durch den Hüllstrom konzentrierte Einzelzellsuspension tritt aus der Düse und wird vom Laser angestrahlt. Es entsteht Streulicht dessen verschiedene Strahlrichtungen und Qualitäten Aussage über die Eigenschaften jeder einzeln angestrahnten Zelle gibt.

2.2.3 Molekularbiologische Verfahren

2.2.3.1 Vorbereitung zur Extraktion der RNA

Für die Extraktion der RNA mit darauffolgender Polymerase-Kettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction = PCR) wurden 24-Well Platten verwendet und die G-MSCs darin ausgesät. Es wurden dabei mehrere Platten verwendet, damit eine RNA Extraktion und PCR nach einem Stimulationszeitraum von T0 = ohne Stimulation, T1 = 24 h, T3 = 72 h und T5 = 120 h erfolgen konnte. Für diesen Versuch wurde eine Zellzahl von 3×10^3 Zellen/pro Well benötigt. Die Platten wurden nach der Aussaat für 24 h im Begasungsbrutschrank belassen, um zu gewährleisten, dass die Zellen eine Adhärenz zum Boden der Wells entwickeln. Das

Medium wurde anschließend gemäß der experimentellen Gruppen ersetzt. Nach Beendigung der jeweiligen Stimulationszeiträume (T0, T1, T3, T5) wurde das Restmedium abgesaugt. Die Gesamt-RNA wurde mit Hilfe eines RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) aus den stimulierten Zellen extrahiert. Diese wurden durch die Real-Time PCR (RT-PCR) amplifiziert und mittels LightCycler 96 Real-Time PCR System von Roche Molecular Biochemicals (Indianapolis, Indiana, USA) ausgewertet. Auf die einzelnen Versuchskomponenten wird im Folgenden weiter eingegangen. Ziel war es die Expression von verschiedenen Pluripotenzmarkern und deren Veränderung nach unterschiedlichen Stimulationszeiten zu untersuchen. Darunter zählen *Nanog*, *Oct4A* und *Sox2*. Bezüglich der Expression von typischen Proteinen bei der osteogenen, adipogenen und chondrogenen Differenzierung wurden ebenfalls Proben parallel mitgeführt. Dabei wurden *Alkalische Phosphatase (ALP)* und *runt-related transcription factor 2 (RUNX2)* nach 14 Tagen bei der osteogenen Differenzierung untersucht. Bei der adipogenen Differenzierung wurden *Lipoproteinlipase (LPL)* und *Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor gamma (PPAR γ)* nach 21 Tagen beobachtet. Ferner wurde bei der chondrogenen Differenzierungsreihe *Aggrecan (ACAN)* nach fünf Wochen untersucht.

2.2.3.2 RNA Extraktion mittels RNeasy mini KIT

Die RNA Extraktion wurde unter zu Hilfenahme des RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen durchgeführt. An T0 = ohne Stimulation, T1 = 24 h, T3 = 72 h und T5 = 120 h wurde die RNA der G-MSCs entsprechend nach Anleitung des Herstellers extrahiert. Demnach wurde nach Kultivierung und Stimulation der Überstand in den Well Platten entfernt und zwei Mal mit PBS gewaschen. Es wurde darauf geachtet, dass nach dem zweiten Spülgang keine PBS Reste in den Well verblieben. Zur Isolierung der RNA wurde 300 μ l frisch angesetzter RLT Puffer als Lysepuffer pro Well hinzugegeben und mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden gelöst. Anschließend wurden je 300 μ l 70 %iges Ethanol hinzugegeben, die Suspension homogenisiert und in die „spin collums“ überführt. Danach wurden die Säulen für 21 s bei 10.000 UPM zentrifugiert. Mit Hilfe von den herstellerseitig beigefügten Waschpuffern (RW1-, RPE-Buffer) wurden die Säulen von Resten von Zuckern, Salzen, Proteinen und Fettsäuren gereinigt. Um dies zu erreichen, wurde die Säule zunächst mit 700 μ l RW1 Puffer aufgefüllt, zentrifugiert (21 s, 10.000 UPM) und der Durchfluss verworfen. Des Weiteren

wurden je 500 µl RPE Puffer hinzugefügt und erneut zentrifugiert (15 s, 10.000 UPM). Eine trockene Zentrifugation folgte, welche eine Entfernung restlicher Puffer-Rückstände in der Säule ermöglichte. Die Sammeleinheit wurde mit dem aufgefangenen Eluat verworfen und durch ein neues Mikrogefäß ersetzt. Nun wurde 25 µl RNase-freies Wasser direkt auf die Membran der „spin collums“ pipettiert und für 1 min bei 10.000UPM zentrifugiert. Das Eluat enthielt die isolierte RNA. Im Anschluss konnten die Mikrogefäße mit der enthaltenen RNA bei -70,0 °C gelagert werden bis die darauffolgender PCR stattfinden konnte.

2.2.3.3 cDNA-Synthese

Um die gewonnene, einsträngige RNA für die PCR verwenden zu können, muss diese in cDNA umgeschrieben werden. Dies wird mit einer sogenannten Reverse Transkription (RT) durchgeführt, welches unter Verwendung von QuantiTect-Reverse-Transcription Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) stattgefunden hat. Zuvor wurden die benötigten Komponenten aufgetaut und auf Eis gelegt. Anschließend wurde der Mastermix zur reversen Transkription angesetzt. Dieser enthält pro RNA Probe 1 µl Quantiscript Reverse Transcriptase, 4 µl Quantiscript RT Buffer und 1 µl RT Primer Mix und wurde entsprechend der Probenanzahl multipliziert. Der RT Puffer besteht aus Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs), die die Ergänzung der RNA in cDNA gewährleistet. Der RT Primer Mix beinhaltet random-oligo (dT), die eine hohe Sensitivität bei der cDNA-Synthese gewährleistet. Durch das große Spektrum der transkribierten RNA entsteht cDNA, die aus unterschiedlich langen Sequenzen besteht. Für die Eliminierung genomischer DNA wurde zunächst ein Mastermix entsprechend der Probenanzahl angesetzt. Dabei wurden pro Probe 8 µl der RNA, 2 µl gDNA Wipeout Buffer und 4 µl des RNase-freien Wassers in einem 50 ml Reaktionsgefäß zusammengegeben. Anschließend folgt eine Inkubation bei 42,0 °C für 2 min und eine sofortige Abkühlung auf Eis. Danach wurde 6 µl des RT Mastermix der RNA Suspension hinzugegeben und für weitere 15 min bei 42,0 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Temperatur für 3 min auf 95,0 °C erhöht, welche die Inaktivierung der Transkriptase zur Folge hat.

2.2.3.4 Polymerase-Kettenreaktion

In dieser Versuchsreihe wurde eine RT-PCR unter Verwendung des LightCycler 96 Real-Time PCR System durchgeführt. Es wurden hierfür pro Probe 10 µl Fast Start-DNA Probes Master,

4 µl RNase-freies Wasser, 1 µl Primer (siehe Tabelle 7) und 5 µl cDNA zusammengefügt. Die Proben wurden dann in eine 96-Well hard shell PCR-Platte hinein pipettiert, mit der Folie versiegelt und für die Analyse in den Lightcycler gegeben.

Die Methodik gewährleistet, dass Nukleinsäuren exponentiell amplifiziert werden können. Durch drei, sich während der PCR wiederholende, Teilabschnitte kann somit eine Quantifizierung der ursprünglich exprimierten mRNA aus den G-MSCs ermöglicht werden. Diese Zyklen bestehen aus der Denaturierung, der Primerhybridisierung und der Elongation. Beginnend mit der Denaturierung der cDNA werden die Doppelstrangbindungen aus Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb von 3 s bei 95,0 °C aufgelöst. Ergebnis des ersten Teilabschnitts sind zwei einsträngige DNA-Teile, welche zur Vorlage der zukünftigen Amplifikation dienen. Im Anschluss erfolgt die Primerhybridisierung, die bei einer Temperatur von 65,0 °C und einem Zeitraum von etwa 30 s stattfindet. Bei der Primerhybridisierung können die selektierten Primer eine Bindung mit den Einzelsträngen eingehen, welche den Start- und Stoppunkt für die DNA-Polymerase markieren. Die spezifischen Primer dienen einer selektiven Untersuchung der cDNA Abschnitte, welche für die Transkriptionsfaktoren von Pluripotenzmarkern zuständig sind. Die verwendeten Primer können aus der Tabelle 7 entnommen werden. Die darauffolgende Elongation findet bei einer Temperatur von 72,0 °C statt, dies erlaubt eine optimale Arbeitstemperatur der DNA-Polymerase, welche, vom Primer ausgehend, die Einzelstränge komplementär zu neuen Doppelsträngen komplettiert. Ein neuer Zyklus kann nach Beendigung der Elongation stattfinden. Als Referenz wurde das Housekeeping Gen *Phosphoglyceratkinase-1 (PGK-1)* benutzt. Die Quantifizierung der Genexpression wurde mit Hilfe der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode durchgeführt. Alle Experimente wurden dreifach durchgeführt und gemittelt.

Tabelle 7: Verwendete Primer für die Real-Time PCR

Gen	Assay ID	Gen Symbol	Accession ID
<i>PGK-1</i>	102083	PGK1 H.sapiens	ENST00000373316
<i>RUNX2</i>	113380	RUNX2 H.sapiens	ENST00000359524
<i>ALP</i>	103448	ALP H.sapiens	ENST00000374840
<i>PPARγ</i>	110607	PPAR γ H.sapiens	ENST00000287820
<i>LPL</i>	113230	LPL H.sapiens	ENST00000311322
<i>ACAN</i>	138057	ACAN H.sapiens	ENST00000439576
<i>Nanog</i>	148147	Nanog H.sapiens	ENST00000229307
<i>Oct4A</i>	113034	Oct4A H.sapiens	ENST00000259915
<i>Sox2</i>	111867	Sox2 H.sapiens	ENST00000325404

RT-PCR: reverse transcription-polymerase chain reaction; PGK-1: Phosphoglycerate kinase; RUNX2: Runt related transcription factor 2; ALP: alkaline phosphatase; PPAR γ : proliferator-activated receptor gamma, LPL: lipoprotein lipase; ACAN: Aggrecan; Nanog; Sox2: sex determining region Y-box 2; Oct4A: octamer-binding transcription factor 4

2.2.4 Statistische Auswertung

Bei der statistischen Analyse wurde die Normalverteilung via des Shapiro-Wilk-Tests getestet. Die Unterschiede bei der intrazellulären β -Catenin Konzentration, MTT, mRNA Expression und der quantitativen Auswertung bei der adipogenen, osteogenen und chondrogenen Differenzierungsreihe zwischen den experimentellen Gruppen wurden mittels des Friedmann Tests bestimmt. Ferner wurden Unterschiede zu verschiedenen Zeitpunkten bei MTT und mRNA Expression mithilfe des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (SPSS 11.5, IBM, Chicago, IL, USA) ausgewertet. Die statistische Signifikanz wurde bei $p = 0,05$ festgelegt.

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der G-MSCs

Als Grundlage dieser Studie wurden nach Dominici et al. die isolierten Zellen ($n = 5$) in Bezug auf ihr Stammzellcharakter geprüft. Dies beinhaltete die Fähigkeit zur Plastikadhärenz, ihr multilineares Differenzierungspotential und der Expression von den Oberflächenmarkern CD73, CD90 und CD105 und gleichzeitiger Abwesenheit von CD14, CD34 und CD45 (Dominici et al., 2006).

3.1.1 Koloniebildende Einheiten

Zur Untersuchung der Fähigkeit zur Bildung von KBE wurden die MACS (+) G-MSCs für 14 Tage beobachtet. Pro Patient wurden 3×10^3 Zellen in Petrischalen mit 10 cm Durchmesser ausgesät und in einem Kontrollmedium kultiviert. Eine Adhäsion an Plastik wurde bestätigt und wird in Abbildung 11A dargestellt. Nach Kultivierung der G-MSCs bildeten diese fibroblastenartige Ballen. Die Zellen zeigten die Fähigkeit zur Bildung von KBE (Abbildung 11B, Kennzeichnung einzelner KBE mit Pfeil), welche mit einer Fixierung durch Ethanol und einer darauffolgenden Kristallviolett färbung verdeutlicht wurden.

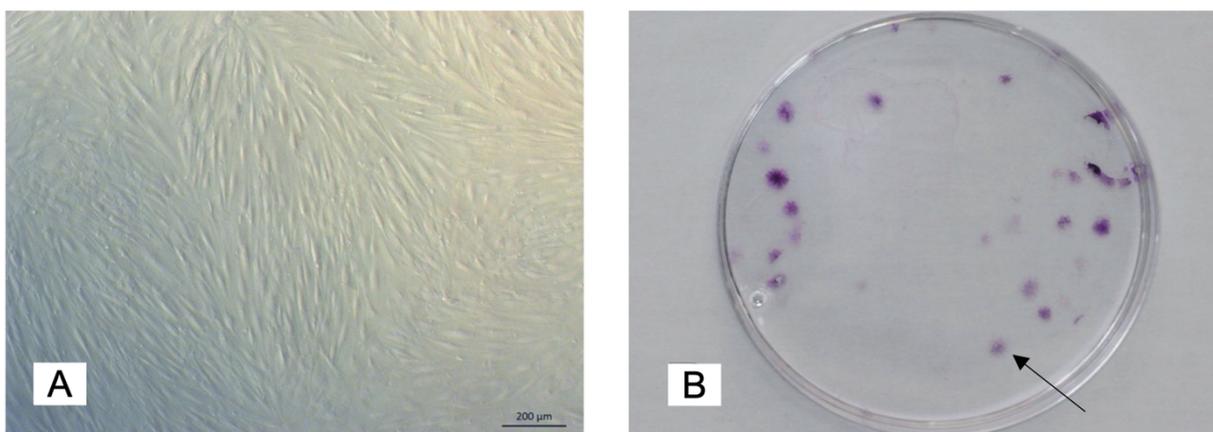


Abbildung 11: Untersuchung der G-MSCs auf stammzelltypische Charakteristika: Adhärenz und KBE. (A) Phasenmikroskopische Darstellung von adhärennten G-MSCs am Plastikboden. (B) Darstellung der KBE der G-MSCs, diese wurden bei einer Zelldichte von $3 \times 10^3/10$ ml ausgesät und über 14 Tage kultiviert, bis eine Fixierung und anschließender Färbung mit Kristallviolett stattgefunden hat. Eine einzelne KBE wird mit einem Pfeil markiert.

3.1.2 FACS-Analyse

In der FACS-Analyse wurden G-MSCs auf ihre exponierten Oberflächenmarker nach Kultivierung mit einem Kontrollmedium begutachtet. Von besonderer Bedeutung sind dabei CD14, CD34, CD45, CD73, CD90 und CD105. In Abbildung 12 wird das repräsentative Ergebnis eines Patienten gezeigt. Die Darstellung erfolgt in Histogrammen, in denen auf der X-Achse die Intensität der Fluoreszenz und auf der Y-Achse die relative Anzahl der G-MSCs dargestellt werden. Bei der Auswertung wurde die Anzahl der vorhandenen Bindungsstellen der Fluoreszenzmarker (grün) im Vergleich zu ihren Isotypenkontrollen (rot) verdeutlicht. Eine erhöhte Anzahl der Bindungsstellen resultiert in einer höheren detektierten Lichtintensität bei Bestrahlung des Lasers. Zum Nachweis und der Identifikation der isolierten Zellen als G-MSCs, zeigten diese ein positives Ergebnis in Bezug auf CD73, CD90 und CD105. Ein negatives Ergebnis konnte bei CD14, CD34 und CD45 beobachtet werden.

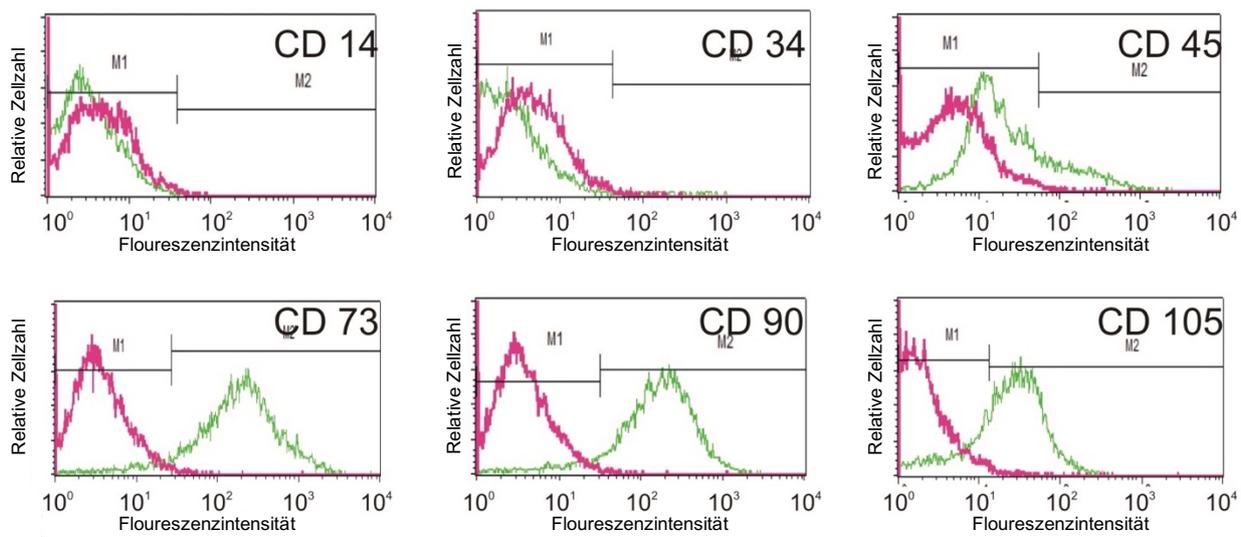


Abbildung 12: Untersuchung der G-MSCs auf stammzelltypische Charakteristika: Oberflächenmarker. Repräsentatives Ergebnis eines Patienten. Die Ergebnisse der FACS-Analyse wurden mittels Histogramme dargestellt, in denen die relative Zellzahl gegenüber der emittierten Fluoreszenz dargestellt ist. Sie zeigen das Expressionsverhalten der G-MSCs bezüglich ihrer stammzelltypischen Oberflächenmarker CD14, CD34, CD45, CD75, CD90, CD105. Grün = Oberflächenmarker, rot = Isotypkontrollen

3.1.3 Differenzierungspotential

G-MSCs besitzen als Stammzellen die Fähigkeit sich in verschiedene Zelltypen auszudifferenzieren. Dieses Differenzierungspotential wurde unter der Aufstellung von Differenzierungsreihen untersucht. Dabei wurden G-MSCs zunächst unter einem Kontrollmedium kultiviert. Anschließend unterlagen sie einem osteogenen, adipogenen und

chondrogenen Induktionsmedium. Nach entsprechendem Stimulationszeitraum wurden die Zellen angefärbt und phasenmikroskopisch ausgewertet.

3.1.3.1 Osteogene Differenzierung

Als Nachweis der osteogenen Differenzierung zeigten sich, im Gegensatz zur Kontrollgruppe, kalzifizierte Ablagerungen. Diese wurden mit Alizarin Rot angefärbt. In der Kontrollgruppe konnte keine osteogene Differenzierung festgestellt werden, da dort keine gefärbten Ablagerungen aufgefunden wurden (Abbildung 13A, B).

3.1.3.2 Adipogene Differenzierung

Eine erfolgreiche Differenzierung konnte im Gegensatz zu ihren Kontrollen beobachtet werden. Dies zeigte sich durch die angefärbten Ansammlungen von Lipidvakuolen in den Zellen. In den Kontrollen wurde keine adipogene Differenzierung festgestellt, da keine intrazelluläre Akkumulation von Oil Red O zu erkennen war (Abbildung 13C, D).

3.1.3.3 Chondrogene Differenzierung

Die erfolgreiche chondrogene Differenzierung von G-MSCs führte im Gegensatz zu der Kontrolle zur Bildung von Glykosaminoglykanablagerungen. Diese wurden mit Alcainblau und einer Gegenfärbung mit Kernechtrot erfolgreich markiert (Abbildung 13E, F).

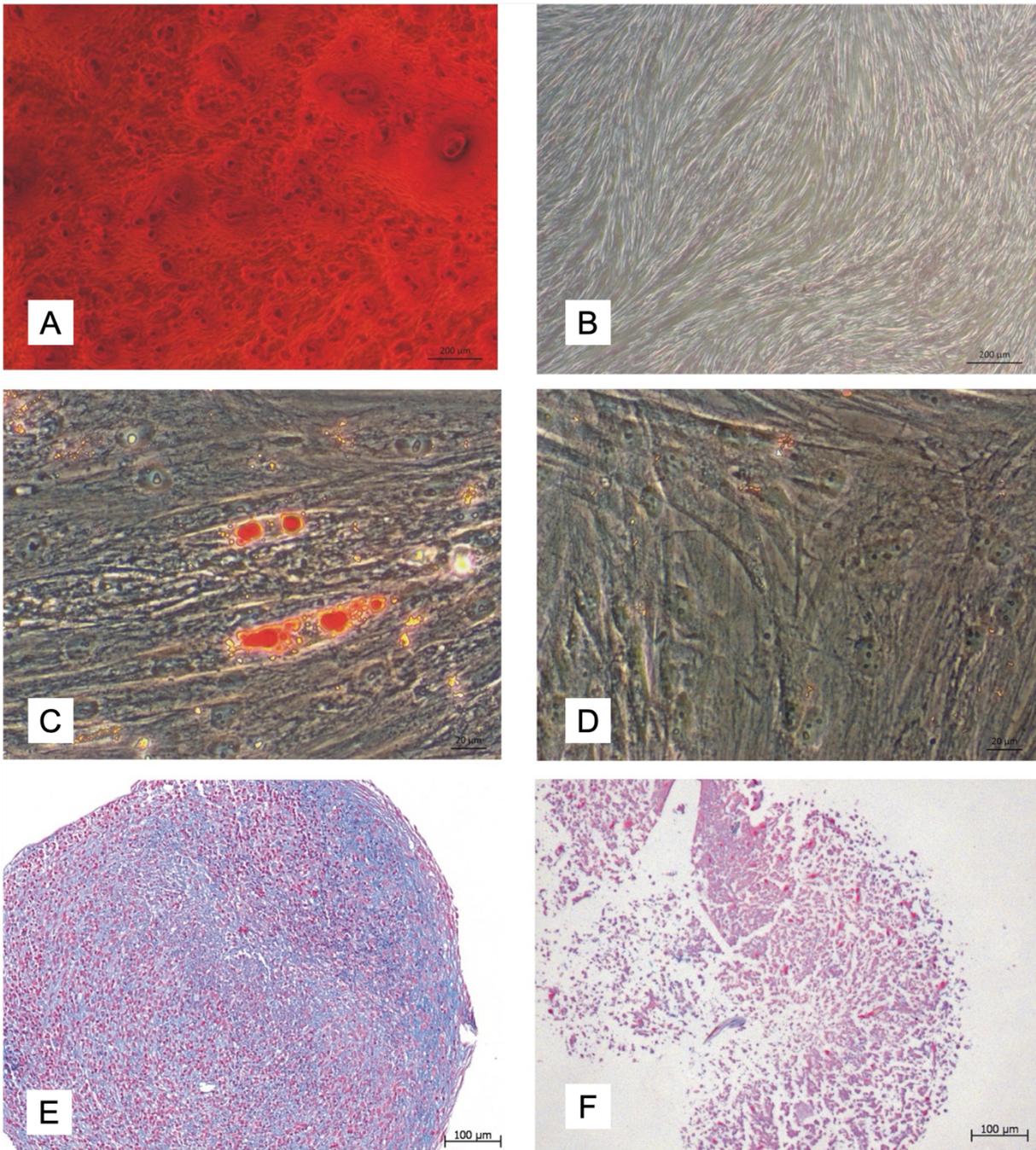


Abbildung 13: Untersuchung der G-MSCs auf stammzelltypische Charakteristika: multilineare Differenzierung. (A) Dargestellt werden die mit Alizarin Rot gefärbten G-MSCs, die zuvor über 14 Tage eine osteogene Stimulation widerfahren haben. Mittels eines Phasenkontrastmikroskops wurden kalzifizierte Ablagerungen der stimulierten G-MSCs im Vergleich zu (B) ihren Kontrollen aufgenommen. (C) Dargestellt werden die mit Oil Red O gefärbten G-MSCs, die zuvor über 21 Tage eine adipogene Stimulation widerfahren haben. Mittels eines Phasenkontrastmikroskops wurden die Lipidvakuolen im Zellinneren der G-MSCs im Vergleich zu (D) ihren Kontrollen aufgenommen. (E) Dargestellt werden Alcainblau und Kernechtrot gefärbten G-MSCs, die zuvor über fünf Wochen eine chondrogene Stimulation widerfahren haben. Mittels eines Phasenkontrastmikroskops wurden die Glykosaminoglykanablagerungen im Zellinneren der G-MSCs im Vergleich zu (F) ihren Kontrollen aufgenommen.

3.2 ELISA

Nach der gruppenspezifischen Stimulierung (siehe 2.2.1.6) der G-MSCs wurden unterschiedliche β -Catenin Konzentration ersichtlich. Dargestellt wurden die Ergebnisse in Box-und-Whisker Plots in Median und Quartilwerten. Nach einstündiger Stimulation in den jeweiligen experimentellen Gruppen ist die intrazelluläre Expression von β -Catenin in allen Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich zurückgegangen. Entsprechend war der β -Catenin Gehalt in der Kontrollgruppe am höchsten (Median% Expression zum Stammlysat normalisiert, Q25 / Q75) (12,8 %, 11,9 / 16,3) gefolgt von der AS-Gruppe (11,8 %, 10,4 / 14,6), der EM/AS-Gruppe und zum Schluss der EM-Gruppe (11,7 %, 11,0 / 14,6; $p = 0,002$, Friedman-Test, Abbildung 14).

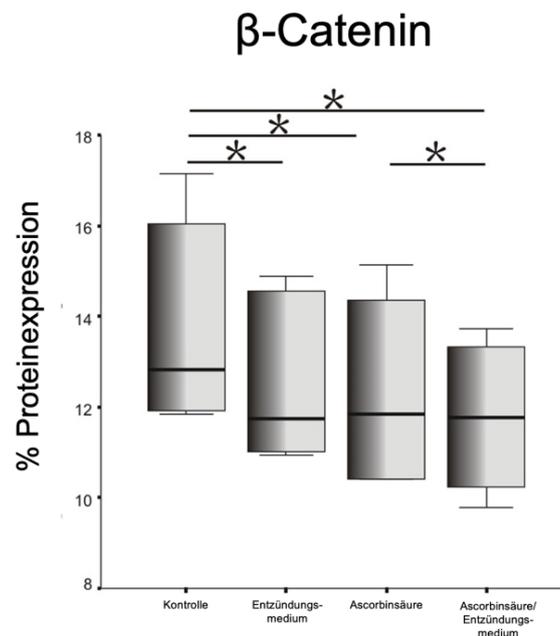


Abbildung 14: Ergebnisse von ELISA für den Wnt/ β -Catenin Signalweg und der Zellzahl mittels MTT nach einstündiger Stimulation in den experimentellen Gruppen. Dargestellt sind Box-und-Whisker Plots in Median und Quartilwerten. Mittels ELISA wurde der Wnt/ β -Catenin Signalweg untersucht. Dabei wurde der intrazelluläre Gesamt- β -Catenin-Gehalt in Prozent (%) nach voriger Stimulation der G-MSCs mit EM und AS bzw. ihrer Kombination ermittelt. Signifikante Unterschiede sind mit Hilfe von Sternchen markiert ($n = 5$, $p < 0.01$; Wilcoxon-signed-quartiles).

3.3 Zell Proliferations- und KBE-Assay

Zur Erstellung von Proliferationskurven wurde über einen Zeitraum von 14 Tagen eine tägliche Zellzählung, während der Kultivierung mit den gruppenspezifischen Medien (siehe 2.2.1.6), durchgeführt. An Tag 14 war die Höchstzellzahl in der AS-Gruppe (Median Zellzahl, Q25 / Q75)

(71667, 49583/96250) zu beobachten, gefolgt von der EM/AS-Gruppe (58750, 40624/78750), der EM-Gruppe (56250, 40417/77708) und der Kontrollgruppe (54583, 39792/73750; $p < 0,001$, Friedman-Test, Abbildung 15).

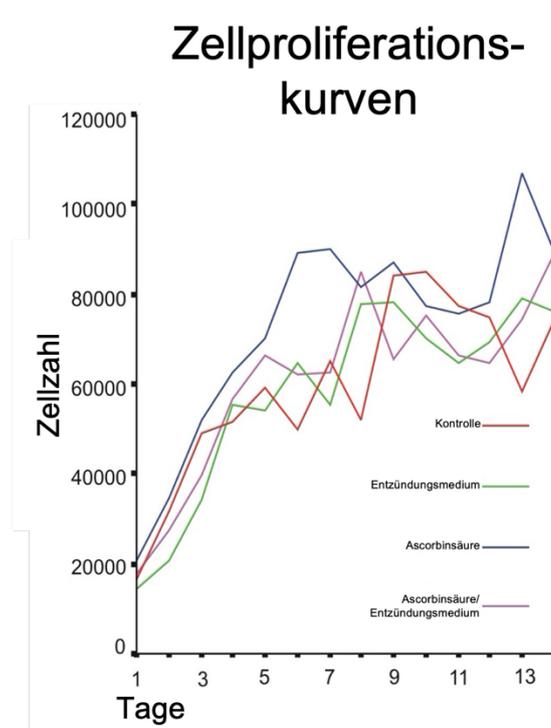


Abbildung 15: Proliferationskurven über 14 Tage. Dargestellt ist das Zellproliferationsverhalten, das über einen Zeitraum von 14 Tagen täglich für jede der vier experimentellen Gruppen ermittelt worden ist. Rot = Kontrolle, grün = EM-Gruppe, blau = AS-Gruppe, violett = EM/AS-Gruppe

Nach 24 h und 72 h zeigte sich mit Hilfe des MTT Assays die höchste Zellzahl in der Kontrollgruppe (6109, 4457/7290), gefolgt von der EM-Gruppe (5558, 4444/6815), der EM/AS-Gruppe (5116, 4055/6434) und schließlich die AS-Gruppe (4083, 3466/4845; $p = 0,004$, Friedman-Test, Abbildung 16A)

Die KBE betreffend wurde deutlich, dass sich zum 14. Tag bei der AS-Gruppe die meisten Kolonien gebildet haben (40, 15/50), darauffolgend die Kontrollgruppe (12, 5/32). Sowohl in der EM-Gruppe als auch in der EM/AS-Gruppe sind zum Tag 14 keine KBE von signifikanter Größe zu beobachten ($p = 0,002$, Friedman-Test, Abbildung 16B).

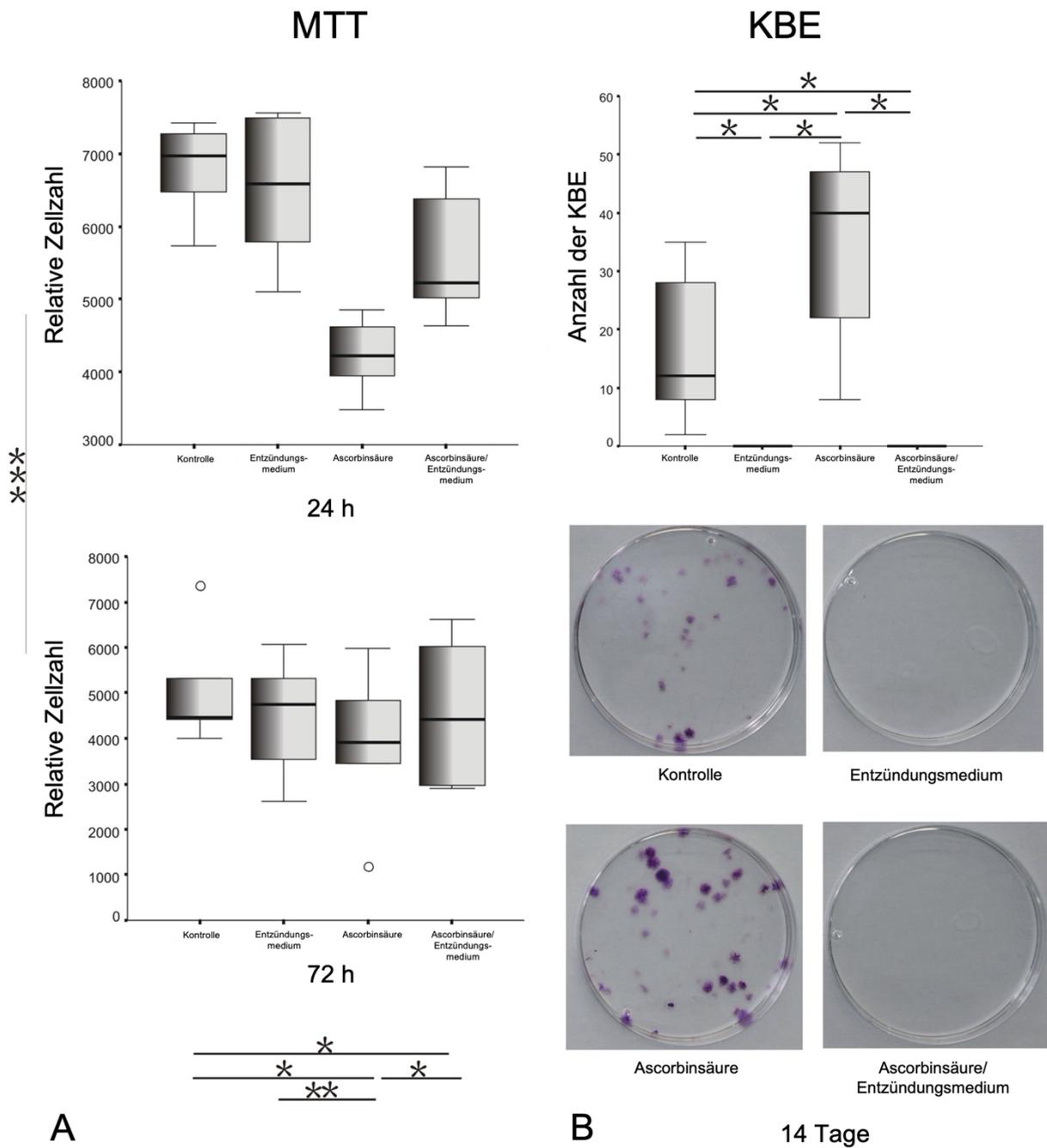


Abbildung 16: Ergebnisse der Zellproliferation und KBE nach Stimulation in den experimentellen Gruppen. (A) Die Box- und Whisker Plots (in Median und Quartilwerten) stellen die relative Zellzahl der G-MSCs ohne und mit Stimulation mit EM, AS und ihrer Kombination nach 24 h und 72 h dar. (B) Dargestellt sind die KBE der G-MSCs nach 14 Tagen Stimulationszeit. Im Box- und Whisker Plot (in Median und Quartilwerten) sind signifikante Unterschiede mit Hilfe von Sternchen markiert ($n = 5$, $p < 0,01$; Wilcoxon-signed-quartiles).

3.4 mRNA Expression von Pluripotenzmarkern

Die Ergebnisse zur Ermittlung von verschiedenen Pluripotenzmarkern, wie *Nanog*, *Oct4A* und *Sox2*, sind in Abbildung 17 dargestellt. Dabei ist eine signifikant höhere Expression von *Sox2* über den Zeitraum von 72 h zu beobachten (Median-Genkopien/*PGK-1*, Q25/Q75).

Diesbezüglich wurden Werte von (0,00006, 0,00000/0,00019) bis (0,00041, 0,00000/0,00014; $p = 0,04$, Friedman-Test) festgestellt. Gleichmaßen wurde eine auffällig höhere Expression von *Nanog* in der AS-Gruppe aufgezeichnet (0,0006, 0,0002/0,0007), gefolgt von der EM-Gruppe (0,0004, 0,0001/0,008), der Kontrollgruppe (0,0002, 0,0000/0,0005) und schließlich der EM/AS-Gruppe (0,00006, 0,0000/0,0002; $p < 0,001$, Friedman-Test). *Oct4A* und *Sox2* betreffend wurden die Höchstwerte der Expressionen bei der EM/AS-Gruppe (0,0002, 0,0001/0,0006) und (0,0002, 0,0000/0,0004) beobachtet (Abbildung 17).

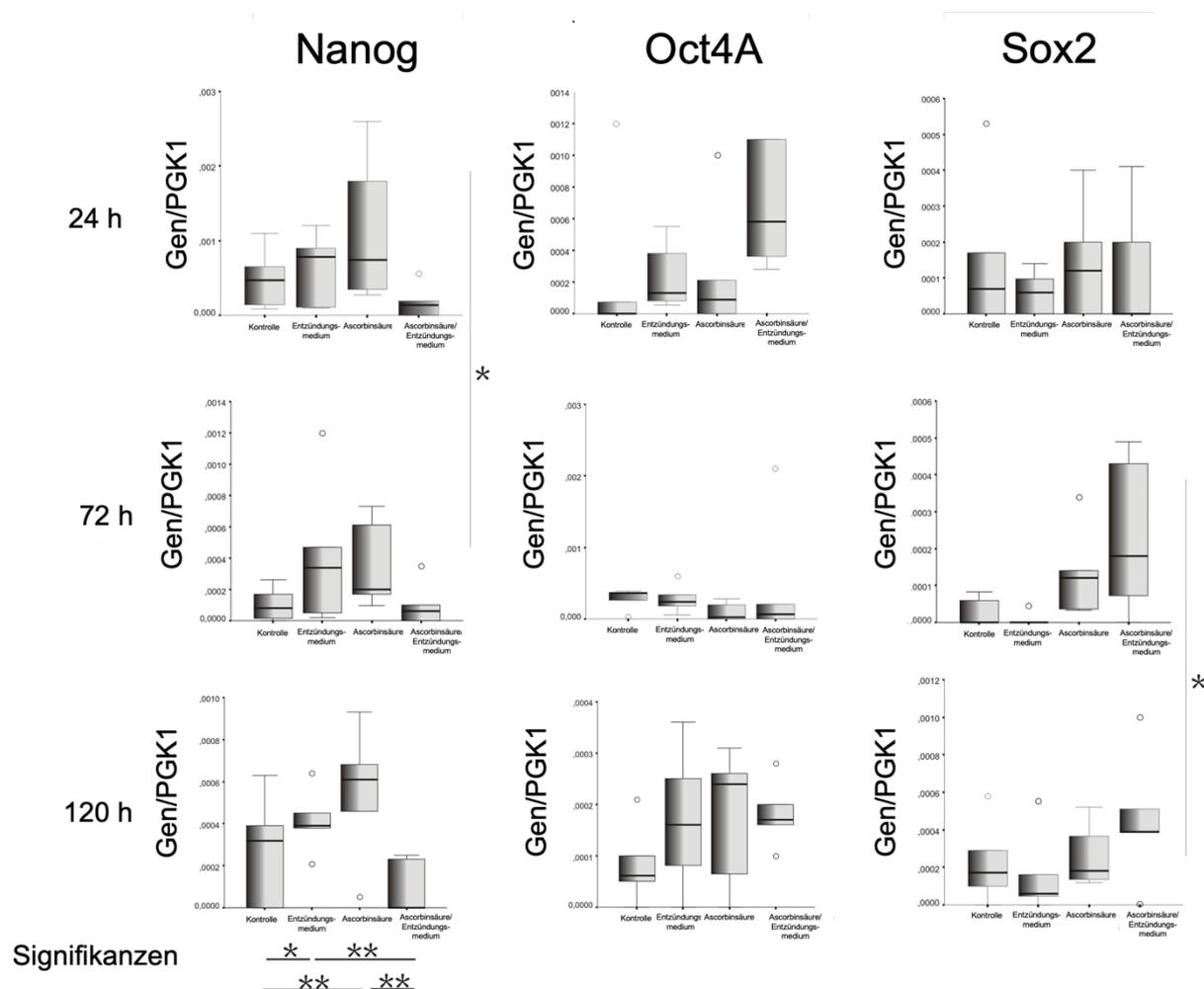


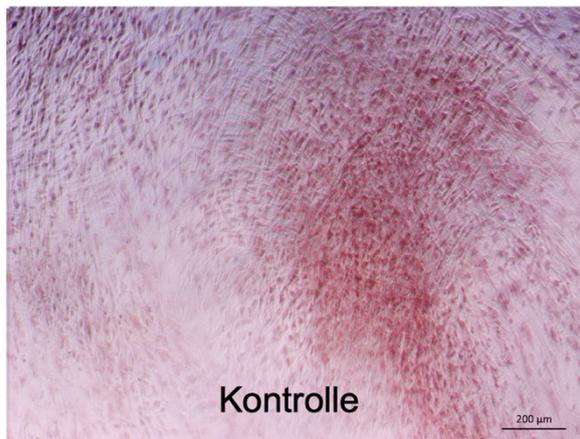
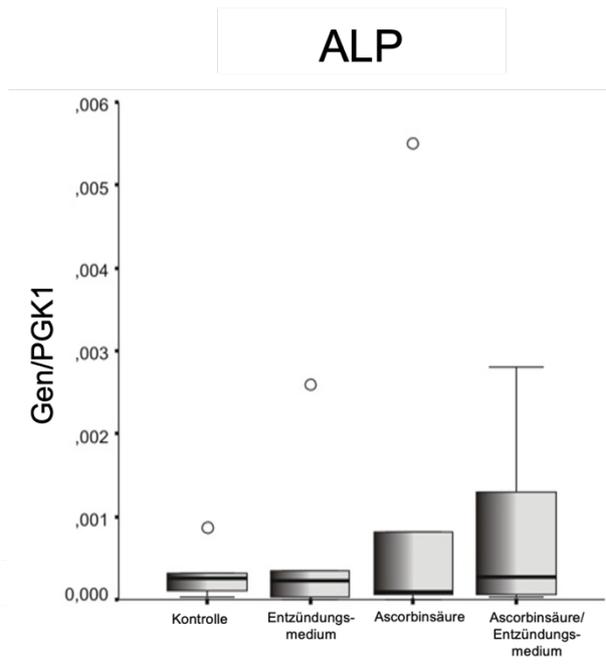
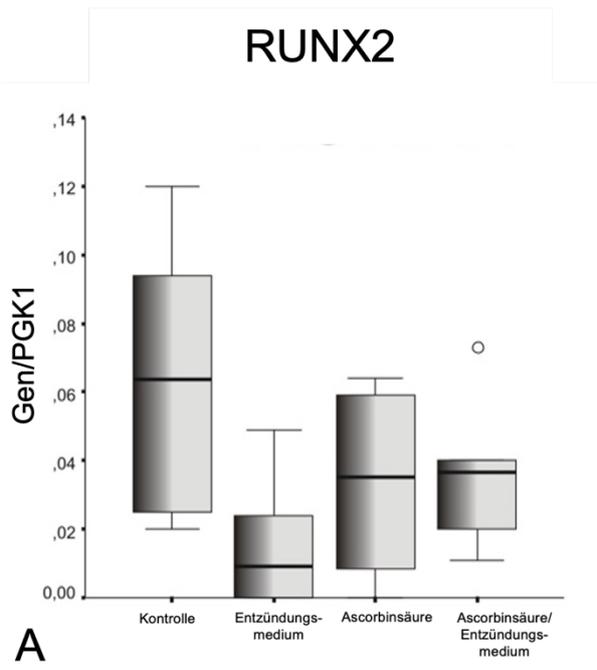
Abbildung 17: Darstellung der Expression von typischen Oberflächenmarkern nach einer Stimulation in den experimentellen Gruppen. Dargestellt sind die Transkriptionsfaktoren, die charakteristisch für die Pluripotenz der MSCs sind. Die Expression für *Nanog*, *Oct4A* und *Sox2* wurden nach einem Stimulationszeitraum von 24 h, 72 h und 120 h erfasst und in Box- und Whisker Plots mit Median und Quartilwerten dargestellt. Signifikante Unterschiede zum Zeitpunkt 24h und 72 h bei *Nanog* und bei *Sox2* zwischen 72 h und 120 h wurden mit Hilfe von Sternchen markiert ($n = 5$, $*p < 0,05$, $**p < 0,01$; Wilcoxon-signed-rank-test).

3.5 Differenzierungsreihe und ihre typische mRNA Expression

Die G-MSCs, aus den vier unterschiedlich behandelten Gruppen (siehe 2.2.1.6), haben ein bemerkenswertes Differenzierungspotential gezeigt. Um dieses weiter zu untersuchen, wurden Transkriptionsfaktoren, die charakteristisch für ihre spezifische Differenzierung sind, bestimmt. Dabei wurde die mRNA für *RUNX2* und *ALP* bei der osteogenen, *PPAR γ* und *LPL* bei der adipogenen und *ACAN* bei der chondrogenen Differenzierung ermittelt. Hierfür wurden die G-MSCs, nach einer fünf-tägigen, gruppenspezifischen Vorstimulation, für den Zeitraum ihrer Differenzierungsreihe stimuliert. Die Ergebnisse zur Ermittlung der Transkriptionsfaktoren ist unter Zuhilfenahme einer RT-PCR erfolgt.

Es zeigte sich eine höhere Expression von *ALP* in der AS- und EM/AS-Gruppe. Abgesehen davon wurden keine signifikanten Veränderungen bezüglich der Expression von *RUNX2* nach 14 Tagen, von *LPL* und *PPAR γ* nach 21 Tagen oder von *ACAN* nach fünf Wochen beobachtet.

Die nach der Differenzierungsreihe durchgeführte histochemische Färbung zeigte nach der osteogenen Differenzierung die Bildung von kalzifizierenden Ballen. Außerdem konnten in der adipogenen Differenzierungsreihe Ansammlungen von Lipidvakuolen mit Oil Red O positiv angefärbt werden. Ferner konnten nach der chondrogenen Differenzierung der G-MSCs Ablagerungen von Glykosaminoglykanen angefärbt werden. Obwohl keine signifikanten Unterschiede für das Färbungsquantifizierungsverfahren festgestellt wurden, hat sich ein konstantes Muster gezeigt, bei dem die EM/AS-Gruppe das höchste Differenzierungspotential mit der größten Kalzium- und Lipidablagerung demonstrierte, gefolgt von der EM-Gruppe (Abbildungen 18, 19 und 20).



B

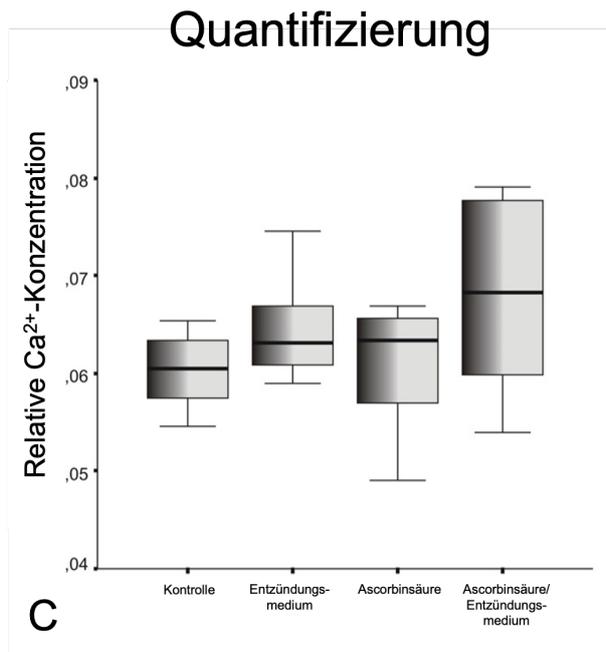
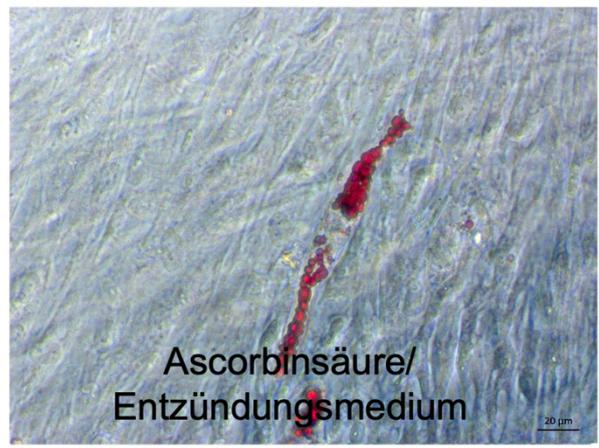
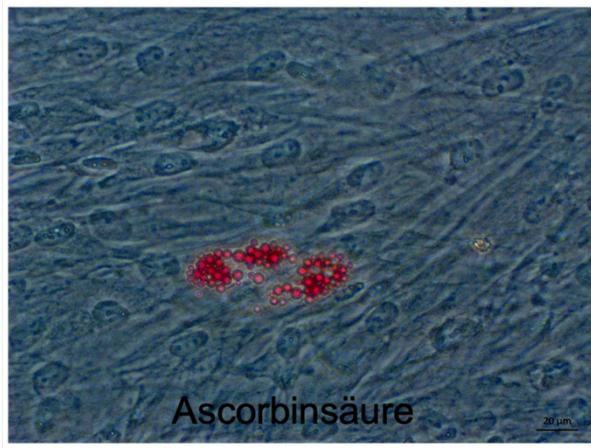
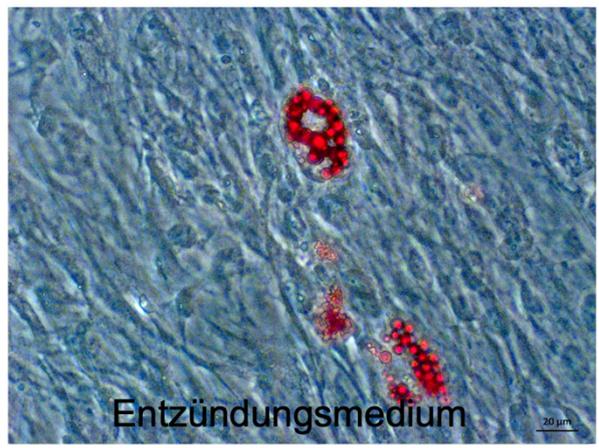
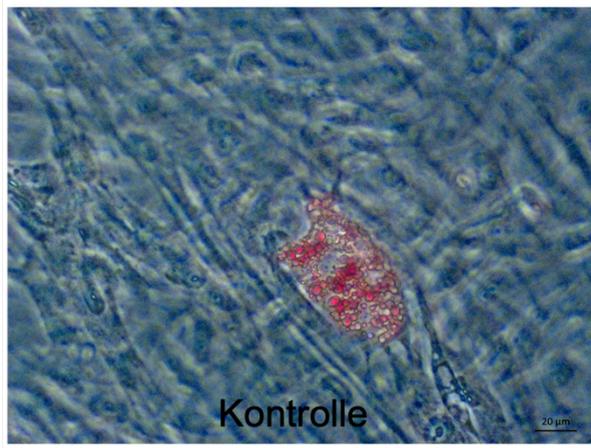
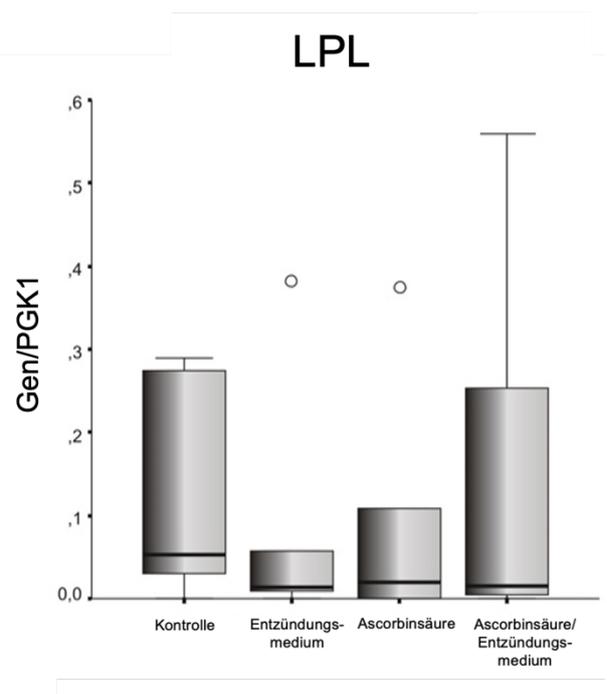
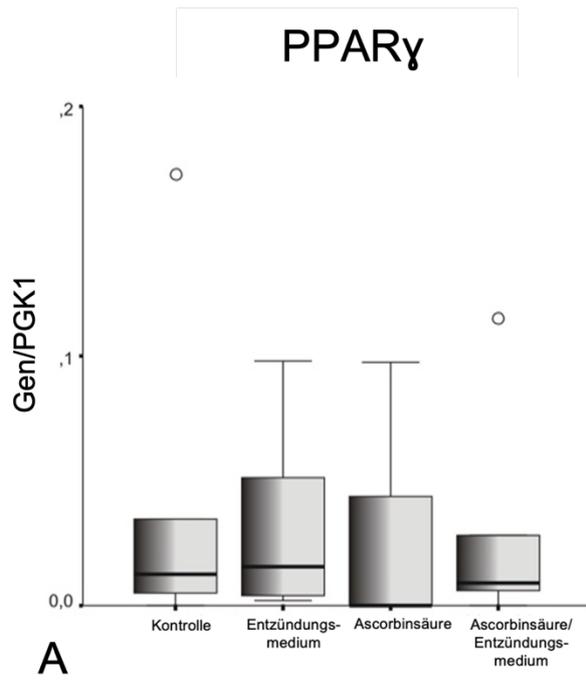


Abbildung 18: Darstellung des osteogenen Differenzierungspotentials der G-MSCs nach fünf-tägiger Stimulation in den experimentellen Gruppen. (A) Gezeigt wird die Genexpression von RUNX2 und ALP nach einer 14-tägigen Stimulation mit einem osteo-induktiven Medium. RUNX2 und ALP sind typische Transkriptionsfaktoren, die bei einer osteogenen Differenzierung exprimiert werden. Dargestellt werden die Ergebnisse in Box-und-Whisker Plots (mit Median und Quartilwerten). (B) Die Abbildungen zeigen die vier verschiedenen Stimulationsgruppen nach 14-tägiger osteogenen Differenzierung und Färbung mit Alizarin Rot. (C) Eine quantitative Analyse von Ca²⁺ ist in einem Box-und-Whisker Plot dargestellt (mit Median und Quartilwerten).



B

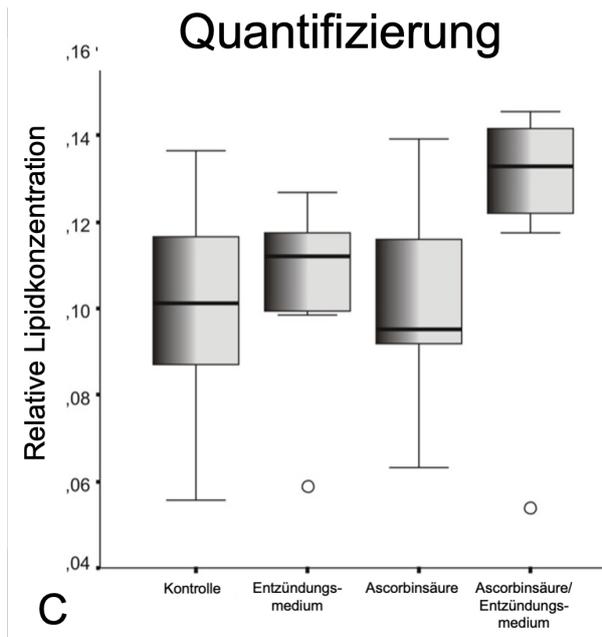


Abbildung 19: Darstellung des adipogenen Differenzierungspotentials der G-MSCs nach fünf-tägiger Stimulation in den experimentellen Gruppen. (A) Gezeigt wird die Genexpression von PPAR γ und LPL nach einer 21-tägigen adipogenen Stimulation. Die Genexpression wird in Box-und-Whisker Plots dargestellt (mit Median und Quartilwerten). (B) Die Darstellung zeigt die Oil Red O Färbung und eine quantitative Analyse der Lipidkonzentration in einem Box-und-Whisker Plot (mit Median und Quartilwerten).

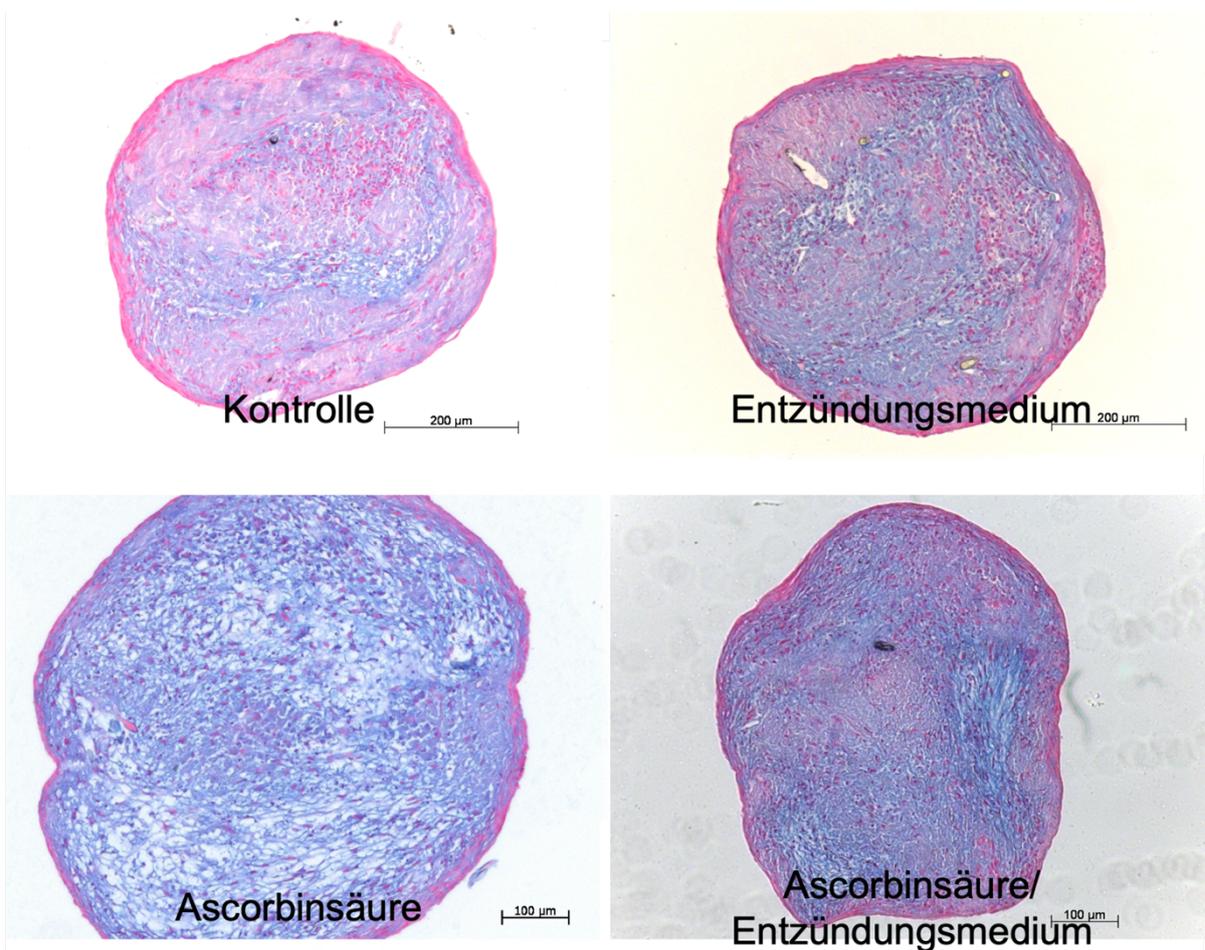
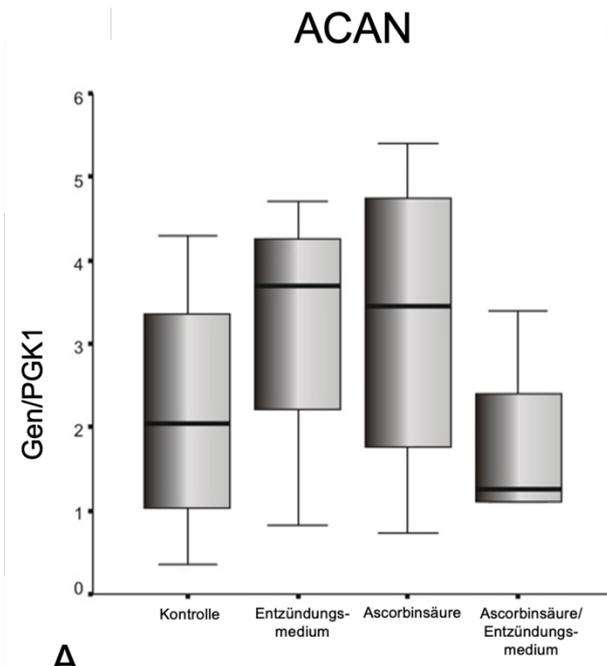


Abbildung 20: Darstellung des chondrogenen Differenzierungspotentials der G-MSCs nach fünf-tägiger Stimulation in den experimentellen Gruppen. (A) Der Box-und-Whisker Plot (mit Median und Quartilwerten) stellt die ACAN Expression der G-MSCs nach erfolgter Vorstimulation mit EM und AS und einer fünf-wöchigen chondrogenen Differenzierung dar. (B) zeigt die Differenzierung der G-MSCs mittels einer Alcainblau Färbung gezeigt.

4. Diskussion

4.1 Diskussion der Methodik

4.1.1 Isolierung und Kultivierung G-MSCs mit MACS

Mithilfe von MACS wurde ein flexibles, einfaches und zeitsparendes Zellsortierungssystem etabliert, das zur Trennung von einer großen Zellzahl nach spezifischen Oberflächenmarkern dient (Miltenyi et al., 1990). In dieser Studie wurden während der Extraktion von impaktierten dritten Molaren Gingiva-Proben entnommen. Analog zu Fawzy El-Sayed et al. zeigte dieses Verfahren eine minimalinvasive Möglichkeit zur Gewinnung von MSCs aus der Gingiva (Fawzy El-Sayed et al., 2012). Dabei binden magnetische Anti-IgM-Microbead-AK spezifisch auf der Oberfläche exponierten STRO-1 an. Mit der Aufstellung eines starken Magnetfeldes ist es möglich diese, von den AK-ungebundenen Zellen, zu trennen und sie anschließend zu kultivieren. STRO-1 erweist sich als spezifischer Marker für einige MSCs, unter anderem aus dem Knochenmark (Simmons and Torok-Storb, 1991, Gronthos and Zannettino, 2008) oder der Gingiva (Fawzy El-Sayed et al., 2012). Ähnliche Studien zeigten den Erfolg dieses Verfahrens bei Proben aus der Gingiva und dem Alveolarknochen, vorausgesetzt, dass alle restlichen Zellen eine Abwesenheit von STRO-1 aufwiesen (Fawzy El-Sayed et al., 2012). Herausforderung dabei ist, dass die Expression von STRO-1 bei andauernder Kultivierung abnimmt (Simmons and Torok-Storb, 1991, Boxall and Jones, 2012). Eine reduzierte Konzentration von STRO-1 erschwert die Bindung der AK und kann die Reinheit der gewonnenen Zellkultur verringern. Um sicherzustellen, dass es sich um multipotente MSCs handelt, ist die Prüfung typischer Stammzellcharakteristika nach Separation und Kultivierung vor Studienbeginn unabdinglich. So wird eine ausreichende Reinheit der Zellkulturen einerseits und die Vergleichbarkeit zu anderen Studien andererseits garantiert.

4.1.2 Identifikation der isolierten Zellen als Stammzellen

Grundlage dieser Studie ist die Identifikation der gewonnenen und stimulierten Zellen als Stammzellen. Es wurden Kriterien von Dominici et al. herangezogen, um die isolierten Zellen eindeutig auf MSCs Eigenschaften zu untersuchen (Dominici et al., 2006). Hierzu diskutierte Dominici et al. standardisierte Merkmale von MSCs, um eine Einheitlichkeit von Kriterien zu etablieren, welche eine Vergleichbarkeit von MSCs unabhängig vom Ursprungsgewebe

gewährleistet. Die drei Charakteristika beinhalten die An- bzw. Abwesenheit bestimmter Oberflächenmarker, die Adhärenz an Plastik mit ihrer Fähigkeit zur Bildung von KBEs und das Potential einer multilinearen Differenzierung (Dominici et al., 2006). Ferner wurde mithilfe der PCR auf molekularer Ebene die Expression typischer Transkriptionsfaktoren analysiert.

4.1.2.1 KBE

Zum Nachweis von MSCs wird ihre Plastikadhärenz und ihre Fähigkeit zur Koloniebildung überprüft. Dabei werden die ausgesäten Zellen in Petrischalen kultiviert. Jede einzelne MSC ist in der Lage in Form von klar abgegrenzten Ballen heranzuwachsen und somit eine KBE zu bilden. Dabei zeigen sie ihre signifikante Fähigkeit der Selbstreplikation und ihre Bildung von klonalen Tochterzellen (El-Sayed et al., 2015). Studien zeigen, dass Fibroblasten, welche MSCs in ihrer Morphologie ähneln, diese Fähigkeit unter gleichen Kultivierungsbedingungen nicht aufweisen (Friedenstein et al., 1974).

4.1.2.2 FACS

Die FACS-Analyse ist eine Methode, die eine Erfassung verschiedener Eigenschaften jeder einzelnen Zelle, unter anderem ihrer Größe, Form und Fluoreszenzen ermöglicht. Die zu untersuchenden Zellen werden mit fluoreszierenden AK gekoppelt, die in Form einer Einzelzellsuspension vom Laser bestrahlt werden. Die Messung basiert auf der Detektion von Streu- bzw. emittiertem Licht, welches durch Deflektion des auftreffenden Lasers entsteht (siehe 2.2.2.3). In dieser Versuchsreihe wird die Expression bestimmter Oberflächenmarker nachgewiesen, welche, basierend auf Dominici et al., ein Identifikationskriterium für Stammzellen darstellen. In dieser Studie wurde an den isolierten Zellen die Expression der Oberflächenmarker CD90, CD73, CD105 unter der FACS-Analyse sichergestellt, gleichzeitig wurde die Abwesenheit von CD14, CD34 und CD45 nachgewiesen. Diese müssen bei mindestens 95% der Zellen aufzufinden sein, um eine Kontamination mit anderen Zellen auszuschließen. Typische Zellpopulationen, welche CD14 exprimieren, sind Monozyten und Makrophagen (Simmons et al., 1989). CD34 ist charakteristisch für hämatopoetische Vorläuferzellen (Furness and McNagny, 2006), während CD45 auf unterschiedlichen, bereits differenzierten Zellen der Hämatopoese (Hermiston et al., 2003) anzutreffen ist. Durch die

Ergebnisse in der FACS-Analyse ist davon auszugehen, dass es sich, bei den isolierten Zellen der Gingiva, um MSCs mit auszeichnender Reinheit handeln.

4.1.2.3 Zelldifferenzierung

Ein weiteres Kriterium, für eine klare Identifikation von MSCs, ist ihre Multipotenz. Sie sind in der Lage sich in verschiedene Linien der mesenchymalen Gewebedifferenzierung zu begeben. Unter bestimmten Stimuli haben sie die Fähigkeit sich gezielt zu Osteoblasten, Adipozyten und Chondroblasten zu differenzieren (Pittenger et al., 1999). Versuchsreihen nach Standardprotokoll wurden aufgestellt, bei denen die Zellen einem Differenzierungsmedium unterlagen, welches die Differenzierung in die jeweilige Zellpopulation initiierte. Die Beurteilung des Versuchserfolges wurde nach einer passenden Färbung nach Dominici et al. begutachtet (Dominici et al., 2006). Zum Nachweis wurden bei einer osteogenen Differenzierung kalzifizierende Ablagerungen mittels Alizarin Rot angefärbt. Bei der adipogenen Differenzierungsreihe sollten durch eine Oil Red O Färbung intrazelluläre Lipidvakuolen verdeutlicht werden. Des Weiteren sollten bei der chondrogenen Differenzierung gefärbte extrazelluläre Glykosaminoglykane mit Alcainblau zu sehen sein (Dominici et al., 2006, El-Sayed et al., 2015). Die in dieser Studie verwendeten G-MSCs spiegelten jene Multipotenz wieder und unterlagen allen Identifikationskriterien von Dominici et al..

4.1.3 RT-PCR

Die RT-PCR ist eine Methode zur Quantifizierung der mRNA-Expression, welche aus drei sich wiederholenden Teilschritten besteht. Jeder Zyklus beginnt mit der Denaturierung der doppelsträngigen DNA, gefolgt von dem Annealing und der Elongation (Bustin et al., 2005). Die Primer, welche als Start- und Endpunkt der DNA-Polymerase und somit die zu Vervielfältigende DNA-Abschnitte definieren, werden gründlich selektiert. Mit Hilfe der RT-PCR, unter Verwendung des LightCycler 96 Real-Time PCR Systems von Roche Molecular Biochemicals (Indianapolis, Indiana, USA), wird das Genexpressionsprofil der G-MSCs bestimmt. Das Expressionsverhalten wurde in dieser Studie zum einen mit vorheriger Stimulation mit EM und AS, sowie ihrer Kombination durchgeführt. In dieser Studie wird besonderes Augenmerk auf *Nanog*, *Oct4A* und *Sox2* gelegt. Diese sind essenziell für den Erhalt der Selbsterneuerung und für das spätere Entwicklungspotential der Stammzellen (Swain et

al., 2020). Ferner wurde bei der Differenzierungsreihe der G-MSCs das Expressionsverhalten typischer Marker untersucht. Charakteristische Transkriptionsfaktoren, wie *ALP* und *RUNX2* für die osteogene, *PPAR γ* und *LPL* für die adipogene und *ACAN* für die chondrogene Differenzierungsreihe wurden im Rahmen dieser Arbeit ermittelt.

Bei der RT-PCR werden fluoreszierende Farbstoffe verwendet, um die Produktion von der amplifizierten DNA während der Zyklen zu detektieren und in Echtzeit aufzuzeichnen. Die Einfachheit, Spezifität und Sensitivität der RT-PCR, zusammen mit ihrem Potenzial für einen hohen Durchsatz und die fortlaufende Zugabe neuer Chemikalien, stellen gegenüber der konventionellen PCR einen großen Vorteil dar. Voll automatisiert bietet sie eine bessere quantitative und qualitative Auswertung, da nach jedem Zyklus eine Messung erfolgen kann. Dies ermöglicht sowohl die Amplifikation als auch den Nachweis der Nukleinsäure in einem homogenen Assay und macht den nachträglichen Nachweis von Amplifikationsprodukten überflüssig (Bustin et al., 2005).

4.1.4 ELISA zur Bestimmung von β -Catenin

ELISA ist ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren, welches den Nachweis von einem Ziel-AG sensitiv und reproduzierbar erlaubt. Hierzu wird ein enzymgebundener AK an den nachzuweisende bzw. durch einen zwischengeschalteten Erstantikörper gebunden. Durch zusätzliche Zugabe eines Substrates, wird dieser katalysiert. Es kommt zu einer Farbveränderung (Engvall and Perlmann, 1971, Schuurs and van Weemen, 1980). Das standardisierte Verfahren hat sich bei der Analytik als Goldstandard etabliert. ELISA zeigt eine große Vielseitigkeit in der Verwendung. Sie kann sowohl direkt, indirekt oder als Sandwich Verfahren angewandt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das PhosphoELISA-KIT (Invitrogen, CA, USA) herangezogen, welches unabhängig von phosphorylierungszustand, die β -Catenin Konzentration bestimmt. Durch Verwendung von zwei AK, wird eine hohe Spezifität zur Bestimmung von β -Catenin sichergestellt. Der Erstantikörper bindet direkt an β -Catenin. Der Zweitantikörper ruft mittels Konjugation mit HRP enzymatisch einen Farbumschlag hervor. Anschließend wird Enzymaktivität photometrisch bei OD450 ausgelesen.

4.1.5 MTT, Proliferationskurve

Zur Bestimmung der Viabilität der G-MSCs sollte idealerweise ein kolometrischer Test herangezogen werden, dessen Farbreaktion es ermöglicht, einen Rückschluss auf die Anzahl

lebensfähiger Zellen zu ziehen. Die Methode beruht dabei auf Reduktion des namensgebenden gelben Farbstoffes MTT zu einem blau-violetten Salz, dem Formazan (siehe 2.2.2.2). Seine Konzentration ist direkt proportional zur zellulären Stoffwechselaktivität und schließt auf die Viabilität von Zellen zurück. Studien zeigen, dass das Substrat von lebenden Zellen mit mitochondrialer Aktivität, jedoch nicht von toten Zellen, umgewandelt werden kann. Dies wurde bei der Untersuchung von Blutzellen unterstützt, welche keine metabolische Aktivität aufweisen. Diese bildeten bei gleichem Versuchsaufbau nahezu kein Formazan (Mosmann, 1983). Entsprechend interferieren tote Zellen, beziehungsweise Zellen ohne mitochondriale Aktivität, nicht bei der Messung. Als Standardprotokoll (Ng et al., 2015) und unter Berücksichtigung des verwendeten Nährmediums kann ein Rückschluss auf die Viabilität der Zellen gezogen werden. Ein normales Nährmedium besitzt Phenolrot als pH-Indikator. Es ist darauf zu achten, dass ein Nährmedium ohne solche Indikatoren verwendet wird, da diese das Ergebnis durch Interferenz verfälschen. Mit Hilfe eines ELISA-Readers ist es möglich das gebildete Salz bei einer Wellenlänge zwischen 550 und 600nm nachzuweisen. Der ELISA-Reader gewährleistet eine hohe Präzision der Messung und ermöglicht zusätzlich eine gleichzeitige Auslese einer großen Anzahl von Proben (Mosmann, 1983).

Als weiterführende Methodik zur Einschätzung des Proliferationspotentials wurden in dieser Studie sogenannte Zellwachstumskurven erstellt. Für jede experimentelle Gruppe wurde über einen Zeitraum von 14 Tagen ihre Proliferation dokumentiert und täglichen ausgezählt (siehe 2.2.1.5). Wegen der großen Anzahl von Arbeitsschritten und Mengen von Proben, ist dieses Verfahren anfällig für Ungenauigkeiten. Um Fehlerquellen zu minimieren, wurde die Bestimmung stets um dieselbe Uhrzeit und unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Somit konnte gewährleistet werden, dass die Zeitspanne der zu vervielfältigenden Zellen einen einheitlichen Abstand erfuhr. Ferner wurde die Zählkammer stets desinfiziert und die Zellen für eine genaue Zählung blasenfrei einpipetiert. Ein weiterer Aspekt, die die Genauigkeit des Verfahrens gewährleistet, sind die doppelt aufgeführten Proben, welche schließlich gemittelt wurden (Assanga, 2013, Mizuno et al., 2019). Dieses einfache Verfahren ermöglicht die Einschätzung der Proliferation jeglicher Zellen, ist jedoch zeitaufwändig und fehleranfällig, was in zukünftigen Studien durch Digitalisierung der Zählung vermieden werden kann.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Reparative und regenerative Ansätze in der Parodontologie orientieren sich an den Kernphasen der Wundheilung, welche auf eine erhöhte Proliferation von Stamm- und Vorläuferzellen, der Migration und dem Homing, der Differenzierung und der Endreifung basieren (Fawzy El-Sayed and Dorfer, 2017). Bei einer parodontalen Reparatur und/oder Regeneration laufen diese Stadien auch in einem lokal entzündeten Gewebe ab; dabei orchestrieren Zytokine den Verlauf des Geschehens. Sie modulieren unter anderem die Stärke und das Fortschreiten der parodontalen Erkrankung (Silva et al., 2007, Cekici et al., 2014). Aus diesem Grund stellen Untersuchungen von Stamm- und Vorläuferzellen unter einem kontrollierten Zytokineinfluss eine wichtige Bedeutung für die parodontale Wundheilung dar. Entzündungen gelten zwar als Ursache für parodontale Gewebeschäden, sind aber auch eine grundlegende Voraussetzung für die frühen Stadien des Heilungsprozesses (Wang and Tatakis, 2017). Wie kürzlich in Studien gezeigt, wurde durch eine lokale entzündliche Mikroumgebung das reparative und regenerative Potential in MSCs gesteigert (Zhang et al., 2017, Zhou et al., 2017, Fawzy El-Sayed et al., 2019). Dabei wurden ihre Eigenschaften zur klonalen Zellproliferation (Zhang et al., 2017) und der Expression bestimmter Pluripotenzmarker, wie *Nanog*, *Oct4* und *Sox2*, unter einem entzündlichen Mikromilieu aufgezeichnet (Tomasello et al., 2017).

Eine anfängliche, kurzzeitige Entzündungsphase zeigte sich als besonders vorteilhaft für die Proliferation der G-MSCs. Jedoch kippt eine langanhaltende Entzündung diese Vorzüge und beeinflusst das Verhalten von G-MSCs negativ (Zhang et al., 2017, Zhou et al., 2017, Fawzy El-Sayed et al., 2019). Obwohl die Entzündung für die parodontale Wundheilung und ihre Phasen essenziell scheint, sollte diese durch eine anti-entzündliche Phase aufgehoben werden, um die Differenzierung und Proliferation der Stammzellen, und somit die Regeneration des Gewebes optimal zu unterstützen.

Bereits in früheren Studien zeigten G-MSCs bemerkenswerte regenerative und entzündungsresistente Eigenschaften (Zhang et al., 2017, Zhou et al., 2017). G-MSCs, die sich durch eine einfache Isolierung und ein vorhersagbares in-vitro-Expansionspotential auszeichnen, gelten als ideale, minimalinvasive Quellen für adulte MSCs mit auffallend positiven regenerativen Eigenschaften (Fawzy El-Sayed and Dorfer, 2016).

Auch in dieser Studie wurden G-MSCs untersucht. Sie unterlagen in der EM- und EM/AS-Gruppe einer Stimulation aus IFN- γ , TNF- α und IL-1 β . Diese Zytokine etablieren sich unter anderem als Botenstoffe in parodontalen Läsionen und sind somit maßgebliche Initiatoren für resorptive und destruktive Prozesse (Silva et al., 2007, Zhang et al., 2017).

Ferner wurden die Zellen unter dem Einfluss von AS ausgesetzt. AS besitzt eine wichtige Rolle in Bezug auf die parodontale Wundheilung, der Geweberegeneration (Rubin, 1984) und der Kollagensynthese von Knochen, Zähnen und Gingiva (Nishida et al., 2000a).

Ein nicht zu vernachlässigender Aspekt ist die Eigenschaft von AS als AO zu fungieren. ROS sind eng in der Pathogenese der Parodontitis involviert (Rubin, 1984). Aufgrund des Einflusses von ROS auf die Integrität der DNA, und die darauffolgenden Proteinschädigungen in den gingivalen Hyaluronsäuren und Proteoglykanen kommt es zum Fortschreiten des destruktiven Prozesses (Bartold et al., 1984). Ferner beeinflussen ROS die Expression von Entzündungszytokinen (Chapple, 1997) und führen zu einer Potenzierung des entzündlichen Geschehens. Als AO wirkt AS dem oxidativen Stress entgegen und verhilft zur Etablierung des ursprünglichen Gleichgewichts im Gewebe.

Außerdem besitzt AS einen positiven immunregulatorischen Einfluss auf die Expression von IL-1 α , IL-1 β und beeinflusst sowohl den Verlauf der Parodontitis als auch das Ergebnis ihrer Behandlung positiv (Majewicz et al., 2005, Tomofuji et al., 2009). AS moduliert dosisabhängig ebenfalls die Proliferation und Expression von Pluripotenzmarkern in adulten Stammzellen (Wei et al., 2014, Kim et al., 2014, Van Pham et al., 2016). Van Pham et al. beschreibt, dass AS bis zu einer Konzentration von 250 μ M eine unterstützende Wirkung auf die Proliferation und den Stammzellcharakter von G-MSCs besitzt. Bei Konzentrationen über 250 μ M wurde das G-MSCs Wachstum teilweise oder sogar vollständig gehemmt (Van Pham et al., 2016). In richtiger Konzentration zeigt AS ihre Wirkung auf MSCs, da sie nicht nur Einfluss auf den Stammzellcharakter hat, sondern auch als immunregulatorischer Modulator im entzündlichen Milieu fungiert. Dabei könnte die Zellzahl durch eine verstärkte Proliferation angehoben werden und gleichzeitig die Beständigkeit des Stammzellcharakters aufrechterhalten werden.

Für die Phasen der Wundheilung sind Stammzellen unabdinglich. MSCs verlassen sich dabei unter anderem auf ihren Stammzellcharakter, um den Verlauf der parodontal-reparativen oder regenerativen Heilung einzugehen (Fawzy El-Sayed et al., 2019). Essenziell dabei sind die Proliferation und die Fähigkeit zur Differenzierung in das Endgewebe. In dieser Studie wurde

auf molekulargenetischer Ebene ihr Verhalten in Bezug auf die Expression nuklearer Marker, genauer *Nanog*, *Oct4A* und *Sox2*, nach einem Zeitraum von 24 h, 72 h, 120 h unter dem Einfluss von AS und EM begutachtet. Die Aufrechterhaltung eines Pluripotenzstadiums in Stammzellen wurde unter anderem diesen drei Markern zugeschrieben (Cekici et al., 2014, Swain et al., 2020). Das Vorhandensein dieser beeinflusst die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Differenzierung der G-MSCs (Yu et al., 2014). Ähnlich wie in bereits erfolgten Studien wurde die Aussage bestätigt, dass die Expression von *Nanog*, *Oct4A* und *Sox2* in den stimulierten G-MSCs mit AS (Gao et al., 2013, Van Pham et al., 2016) und EM (Tomasello et al., 2017) erhöht war. In dieser Studie wurden die höchsten Expressionswerte von *Oct4A* und *Sox2* in der EM/AS-Gruppe beobachtet, was auf den synergetischen Effekt beider Komponenten hinweist. Es scheint demnach, als könnte die Kombination von AS mit der Entzündungskomponente die Beständigkeit des Stammzellcharakters der G-MSCs durch die Expression dieser spezifischen nuklearen Marker erhöhen. Die AS-induzierte vermehrte Expression von *Oct4A* und *Nanog* könnte einer Fähigkeit von AS zugeschrieben werden, dass AS die Aktivierung der Demethylierung durch ten-eleven-translocation (TET) Enzyme initiiert (Young et al., 2015, Hore et al., 2016, Hore, 2017). Während der Entwicklung einer differenzierten Zelle verliert diese zunehmend ihren Stammzellcharakter – es entsteht, unter anderem durch DNA-Methylierung, ein epigenetisches Gedächtnis. Es ist möglich, bei bereits differenzierten Zellen, einen naiven Zustand zu rekonstruieren, wobei induzierte pluripotente Zellen entstehen. Sie entstehen durch die aktive Entfernung des erworbenen Gedächtnisses. Der erhöhte TET-Spiegel durch AS und die ebenfalls erhöhte TET-Aktivität fördern die Reprogrammierung differenzierter Zellen in einen naiven Zustand, indem die DNA-Methylierung aktiv beseitigt werden (Mikkelsen et al., 2008, Hore et al., 2016, Hore, 2017). Die Enzyme von TET erreichen dies durch Oxidation von 5-Methylcytosin (5mC) zu 5-Hydroxymethylcytosin (5hmC) und weiteren oxidierten Derivaten, wodurch das erworbene Gedächtnis entfernt wird. AS wirkt dabei als Modulator für TET und ihrer Aktivität (Hore et al., 2016, Hore, 2017). Der Stammzellcharakter der G-MSCs könnte demnach gehalten werden. Es zeigt sich in dieser Studie der synergetische Effekt von AS und EM in Bezug auf die Expression von Pluripotenzmarkern bei G-MSCs. In Kombination scheinen sie eine verstärkende Wirkung zu veranlassen, denn die höchste Konzentration von der *Oct4A*- und *Sox2*- Expression wurde in der EM/AS-Gruppe erfasst.

Eine hohe Proliferation gewährleistet zu Beginn eine ausreichende Zellzahl für die Phasen der Migration und des Homings und zur funktionellen Gewebedifferenzierung (Fawzy El-Sayed and Dorfer, 2017). Somit könnte sich die Etablierung einer ausreichenden Zellzahl vorteilhaft auf regenerative Prozesse im Parodont auswirken. Hierfür ist die Zellproliferation eine Kernvoraussetzung dafür und wird unter anderem mit Hilfe der Fähigkeit von Stamm- und Vorläuferzellen zur klonalen Selbsterneuerung gewährleistet (Fawzy El-Sayed and Dorfer, 2017). Im Studienverlauf wird dies mit der Fähigkeit von KBEs demonstriert. Unter dem Einfluss von EM ist eine Reduzierung der Anzahl von KBEs nach 14 Tagen zu erkennen. Im Gegensatz dazu wird unter der täglichen Auszählung der Zellen in den 14-tägigen Proliferationskurven gezeigt, dass die anfängliche Stimulation mit EM nach 72 h das Proliferationspotential der G-MSCs, und sogar ihre metabolische Aktivität, gegenüber den Kontrollen verbessert ist. In Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen von Zhang et al. scheint es, als würde eine anfängliche kurzfristige Entzündungsphase auf die Proliferation von G-MSCs stimulierend wirken. Jedoch kippt diese bei andauernder Stimulation und scheint die Zellteilung der G-MSCs negativ zu beeinflussen (Zhang et al., 2017).

Überraschenderweise zeigt sich im weiteren Verlauf der Stimulation mit AS eine Abschwächung des proliferativen Effekts und sogar der metabolischen Aktivität. Die AS-Stimulation scheint zunächst die zelluläre Stoffwechselaktivität in der frühen Phase der Stimulation zu verringern und sogar die anfängliche, fördernde Wirkung des Entzündungsreizes abzuschwächen. Dies ist an der geringen Zellproliferation in der Kombinationsgruppe (EM/AS-Gruppe) zu sehen. Diese beobachtete Minderung der Proliferation und der metabolischen Aktivität wurde bereits in früheren Studien beschrieben und wird mit verschiedenen Wirkungsweisen von AS erklärt. Dabei sollte ein besonderes Augenmerk auf die Fähigkeit von AS gerichtet werden, auf molekularer Ebene die Expression von verschiedenen Genen zu beeinflussen (Tomofuji et al., 2009). Einerseits kann der andauernde Einfluss von AS die Expression von Genen reduzieren, die das Zellwachstum durch *DNA-damage-inducible 45α (Gadd45α)* stoppen, ferner können Gene betroffen sein, die die Apoptose durch Caspase1 beeinflussen. Andererseits ist es möglich, dass der Zusatz von AS eine fördernde Wirkung auf proliferationsstimulierende Gene, wie *proliferating cell nuclear antigen (Pcna)* besitzt (Tomofuji et al., 2009), welches das gegensätzliche Verhalten bezüglich des Proliferationsverhaltens der G-MSCs erklären könnte. Außerdem besitzt AS die Fähigkeit,

eine Erhöhung von Extracellular-signal Regulated Kinases (ERK) 1 - und -2-Proteinen im Zellinneren hervorzurufen, ohne eine direkte Aktivierung des mitogen-activated protein kinase (MAPK) Signalwegs zu initiieren (Kim et al., 2014). ERK, das zum MAPK-Signalweg zugehörig ist, ist in der Lage mehrere Transkriptionsfaktoren der Genexpression zu beeinflussen. Zu diesen Transkriptionsfaktoren gehören z.B. Mitglieder der AP-1 Familie Fos und Jun, die durch Translokation in den Zellkern als Heterodimer an der DNA binden. Dies führt zu einer Steigerung der Zellproliferation und kann für die verlängerte Lebensdauer der MSCs sorgen. (Abbildung 22)

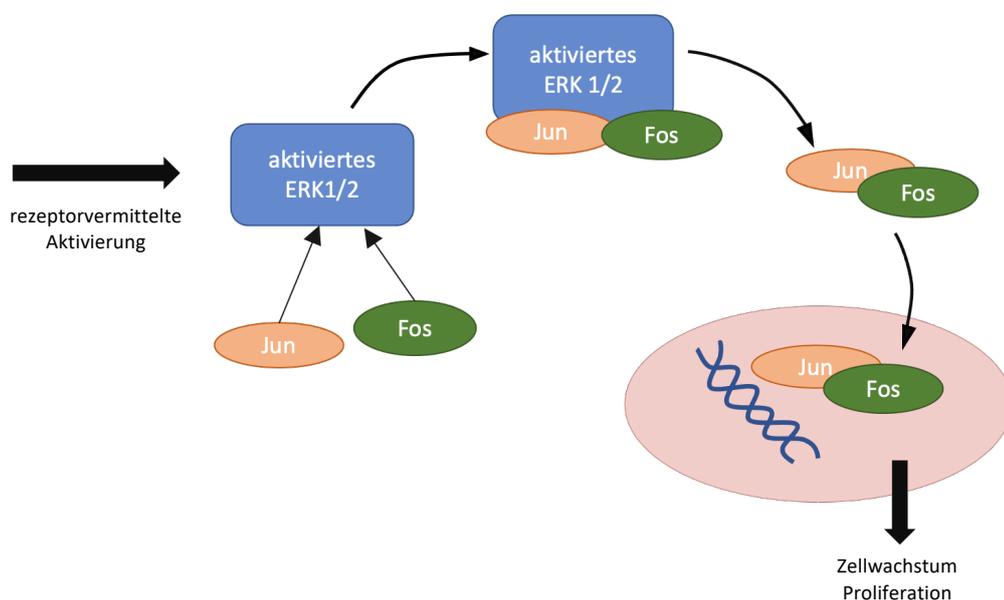


Abbildung 21: Vereinfachte Darstellung des MAPK Signalwegs. Durch eine rezeptorvermittelte Aktivierung kommt es zu einer intrazellulären Signalkaskade, in der ERK1/2 aktiviert werden und die darauffolgende Aktivierung von Transkriptionsfaktoren der AP-1 Familie (Jun, Fos) hervorruft. Es kommt zu einer Translokation von Jun und Fos als Heterodimer in den Zellkern und zu einer Bindung an die Zielgene. Es folgt eine Induktion des Zellwachstums und der Proliferation.

Sowohl AS als auch EM scheinen gegensätzliche biphasische Auswirkungen auf die kurz- und langanhaltende Proliferation zu besitzen. Ähnlich wie in vorherigen Studien zeigt AS in dieser Versuchsreihe ein reversibles und verzögertes langzeit-proliferatives Potential über 14 Tage (Choi et al., 2008, Potdar and D'Souza, 2010), und signifikant höhere KBE. In vitro leiden Stammzellen mit zunehmender Passageanzahl unter einer vorzeitigen Zellalterung und Inaktivität (Potdar and D'Souza, 2010). Mit dem Aufstellen der 14-tägigen

Proliferationskurven, unter anderem unter AS-Einfluss, ist eine Verzögerung des Effekts zu beobachten (Choi et al., 2008, Potdar and D'Souza, 2010). Dies könnte in erster Linie auf eine Zunahme der AS-vermittelten Hochregulation des proliferationsbezogenen Fos-Transkriptionsfaktors zurückzuführen sein (Kim et al., 2014). In Kontrast dazu, könnte die getestete entzündliche Mikroumgebung bei den G-MSCs bei einer länger anhaltenden Stimulation zur Seneszenz (Zhou et al., 2017) führen, welches den Stillstand des Zellwachstums nach der Zellteilung beschreibt. Dies könnte die hohe Zellzahl unter AS und die reduzierte β -Catenin Konzentration erklären.

Ferner kann die andauernde Stimulation, insbesondere mit TNF- α , die Selbst-Seneszenz von Stamm- und Progenitorzellen unterstützen. Besonders in Gegenwart von IFN- γ und einer Kultivierung in geringer Zelldichte, welches in der KBE deutlich wurde, ist dies beschrieben. Obwohl die IFN- γ -induzierte Umwandlung der nicht-apoptotischen Form des TNF-Rezeptors superfamily member 6 (Fas) eine Caspase3 und Caspase8 abhängige pro-apoptotische Kaskade einleitet und zu einem vermehrten Zelltod führt, konnte eine direkte Induktion der Caspase-Kaskade nicht festgestellt werden. Unklar ist, wie IFN- γ die Fas-Expression erhöht. Eine Vermutung ist, dass ein synergetischer Effekt von TNF- α und IFN- γ für eine erhöhte Fas-Expression auftritt (Liu et al., 2011b). Denn auch in dieser Studie wurde unter Verwendung beider Zytokine ein vermehrter Zelltod der G-MSCs in der EM-Gruppe beobachtet.

Wird jedoch ein kurzzeitiger Entzündungsstimulus betrachtet, so stellt sich die Vermutung auf, dass durch die Aktivierung des Wnt/ Ca^{2+} Signalwegs eine höhere Zellproliferation (Liu et al., 2011a) induziert wird. Dies wurde durch die Reduzierung der β -Catenin Konzentration in den experimentellen Gruppen deutlich. Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg ist für die Regulation der Knochenbildung und ihrer Homöostase zuständig. Studien untersuchten den Signalweg unter verschiedenen modulierenden Einflüssen, wie z.B. verschiedene Zytokine oder AS (Liu et al., 2011a, Kong et al., 2013). Liu et al. lieferte Hinweise darauf, dass eine Aktivierung des intrazellulären β -Catenins zu einer höheren Proliferationsrate führt, jedoch zu einer Reduktion der osteogenen Differenzierung unter einem Entzündungsmillieu. Dies war in unseren Studien nur bedingt zu beobachten, denn unter einem kombinierten Einfluss von AS und EM wurde sowohl die Proliferation als auch das osteogene Potential gesteigert. Dies ist an der erhöhten ALP-Expression in der PCR und der erhöhten Kalzium-Konzentration in der Quantifizierung der Zellen nach Differenzierung zu sehen.

Ferner wurde vermutet, dass TNF- α in entzündlichen Prozessen ein Schlüsselmediator ist, der die Osteogenese von MSCs in einer entzündlichen Mikroumgebung hemmt (Kong et al., 2013). Durch die Deaktivierung des β -Catenin-degradierenden Enzyms Glykogen-Synthase-Kinase (GSK3) wird eine intrazelluläre Akkumulation von β -Catenin und die anschließende Translokation zum Zellkern induziert. Dies führt des Weiteren zu einer Aktivierung von lymphocyte enhancer-binding factor-1 (LEF1) und Inhibition der *RUNX2/Osterix* assoziierten Osteogenese (Kong et al., 2013). LEF1 ist ein nuklearer Effektor des Wnt-Signalwegs. Es wird angenommen, dass LEF1 unter Wechselwirkung mit β -Catenin als Regulator für *RUNX2* fungiert und somit Einfluss auf die Proliferation von Osteoblasten besitzt. Dabei führt eine β -Catenin verstärkte LEF1-abhängige *RUNX2*-Unterdrückung zu einer Minderung der Osteogenese (Kahler and Westendorf, 2003, Kong et al., 2013).

Hingegen wird durch die Aktivierung des Signalwegs durch AS, eine intrazelluläre Kaskade ausgelöst, in der die Translokation von β -Catenin in den Zellkern zu einer Expression von Wnt-Zielgenen die Folge ist. Sie führen zu einer Beeinflussung des Wachstums der Zelle und ihrer Proliferation. Ist ein geringer β -Catenin Spiegel im Zytosol aufzufinden, so kann sich dieser stimulierend bei der Knochenregeneration und -reparatur (Liu et al., 2011a) und der Differenzierung von G-MSCs (Kong et al., 2013) auswirken.

AS ist allgemein dafür bekannt, nicht nur das Zellwachstum, den zellulären Stoffwechsel und die Morphogenese während der Osteogenese (Ishikawa et al., 2004, Carinci et al., 2005) zu beeinflussen, sondern auch die Produktion der Extrazellulärmatrix zu modulieren (Yu et al., 2014). Ishikawa et al. stellte fest, dass AS eine erhöhte ALP-Aktivität über die Typ-1-Kollagen Produktion in PDSLCs induziert (Ishikawa et al., 2004, Carinci et al., 2005). Ferner erhöht AS die Expression von $\alpha 2\beta 1$ -Integrin, welches die Bindung von Zellen zueinander und an Extrazellulärmatrix erleichtert. Diese Komponenten führen zu einer Regulierung von zellulären Funktionen, welche unter anderem ihre Proliferationsfähigkeit als auch ihre Differenzierung und Apoptose beinhalten. Es wurde gezeigt, dass AS die osteoblastische Differenzierung von PDSLCs durch die Interaktion zwischen Typ-1-Kollagen und $\alpha 2\beta 1$ -Integrin fördert. Parallelen zu den Ergebnissen von Ishikawa et al. konnten wir in der aktuellen Versuchsreihe feststellen. Unabhängig davon, ob AS isoliert oder in Kombination mit dem EM verwendet wird, zeigt sich eine verbesserte osteogene, adipogene und chondrogene

Differenzierung der Zellen durch die Stimulation. Jedoch erscheint besonders die Kombination mit beiden Komponenten vorteilhaft für die multilineare Differenzierung der G-MSCs.

Zusammenfassend weisen die aktuellen Ergebnisse in einer kontrollierten, geringgradigen, entzündlichen Mikroumgebung auf verbesserte Eigenschaften von G-MSCs hin, besonders in Gegenwart von AS. Die beobachteten Veränderungen bezüglich der Proliferation scheinen mit der Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges zusammen zu hängen. Daher würde die festgestellte intrazelluläre Reduzierung der β -Catenin Konzentration, neben einer verstärkten Proliferation, die Differenzierungskapazität der G-MSCs erhöhen. Bemerkenswerterweise zeigte sich die größte multilineare Differenzierungsfähigkeit in der EM/AS-Gruppe, was wiederum, ähnlich ihren Auswirkungen auf die Beständigkeit des Stammzellcharakters, auf eine mögliche vorteilhafte Wirkung ihrer kombinierten Anwendung deutet.

Ähnlich wie in früheren Studien könnte eine präzise Mikroumgebung mit Entzündungszytokinen die Zellproliferation in der frühen Phase der Wundheilung fördern, während die Zugabe von AS eine Verstärkung bei der Proliferation in Langzeitkulturen aufweist. Ferner kann das kontrollierte entzündliche Milieu als auch AS die Expression von Pluripotenzmarkern sowie das Differenzierungspotential von G-MSCs unterstützen. Die kombinierte Supplementierung zeigte ihre vorteilhafte synergetische Wirkung.

Schlussfolgernd zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass besonders während einer frühen anfänglichen Entzündung, die von einer langanhaltenden AS-Anreicherung abgelöst wird und schließlich die Kombination beider Komponenten in der Endphase der Differenzierung von Erfolg verspricht. Dies ist eine Systematik, die die Eigenschaften von Stamm- und Vorläuferzellen, genauer die Proliferation und Differenzierung, fördern kann. AS und EM bieten beide vorteilhafte, unterstützende Effekte für die Kernphasen der Wundheilung und können für parodontale regenerative Therapieansätze ausschlaggebende Ergänzungen sein.

5. Zusammenfassung

Parodontitis ist eine entzündliche Erkrankung des gesamten Zahnhalteapparates, die mit einer bakteriellen Dysbiose assoziiert ist. Ihre klinischen Charakteristika sind: Zahnfleischbluten, Knochenverlust, und die daraus resultierende Zahnlockerung, und der Zahnverlust. Die kennzeichnende Entzündung dient primär der Immunabwehr; klingt sie jedoch im Krankheitsgeschehen nicht ab und wird verstärkt, führt dies zur Parodontitis. Dabei sind in der Entzündung besonders Interleukin-1 β (IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8) und Tumornekrose Faktor- α (TNF- α) typische Zytokine, welche ihren Werdegang orchestrieren.

Gingivale mesenchymale Stammzellen haben in den letzten Jahren ihre vielversprechenden regenerativen und immunmodulatorischen Eigenschaften gezeigt. Sie sind im Gegensatz zu anderen adulten mesenchymalen Stamm-/Vorläuferzellzellen reichlich vorhanden, leicht zugänglich und durch minimalinvasive Zellisolierungstechniken leicht zu beziehen.

Ascorbinsäure als Antioxidans hat bereits erwiesenermaßen einen modulierenden Einfluss auf das entzündliche Milieu. Ferner zeigt Ascorbinsäure ihre Wirksamkeit in Bezug auf die Proliferation von Stamm- und Progenitorzellen, der Beständigkeit ihres Stammzellcharakters und ihres Differenzierungspotentials. Außerdem hat Ascorbinsäure Einfluss auf intrazelluläre Signalwege, das Zellwachstum und die Apoptose.

In dieser Studie wurden mesenchymale Stammzellen aus resezierter Gingiva (n = 5) mit Hilfe von magnetic activated cell sorting isoliert und kultiviert. Als Grundlage dieser Studie wurden nach Dominici et al. die isolierten Zellen in Bezug auf ihren Stammzellcharakter geprüft. Dies beinhaltet unter anderem ihre Fähigkeit zur Plastikadhärenz, die Bildung von koloniebildenden Einheiten über 14 Tage, ihr multilineares Differenzierungspotential und die Expression von den Oberflächenmarkern CD73, CD90 und CD105 anhand der Durchflusszytometrie.

Die Kernuntersuchung befasst sich mit dem Verhalten von gingivalen mesenchymalen Stammzellen unter dem Einfluss von einem Entzündungsstimulus und Ascorbinsäure – dies isoliert und in Kombination. Unterteilt in vier experimentelle Gruppen unterliegen sie einem Kontrollmedium (M1-Gruppe), der Erweiterung des Kontrollmediums durch Zugabe von 1 ng/ml IL-1 β , 10 ng/ml TNF- α und 100 ng/ml IFN- γ als Entzündungsmedium (EM), einem Kontrollmedium mit 250 μ mol/l Ascorbinsäure als AS-Gruppe und einer Ergänzung des

Entzündungsmediums mit 250 µmol/l Ascorbinsäure (EM/AS-Gruppe). Nach Stimulation der gingivalen mesenchymalen Stammzellen wurden die intrazelluläre β -Catenin Konzentration nach 1 h, ihre Genexpression für Pluripotenzmarker *Nanog*, *Oct4* und *Sox2* nach 24 h, 72 h und 120 h, sowie die Fähigkeit zur Formung von koloniebildenden Einheiten und ihre zelluläre Proliferation über 14 Tage hinweg untersucht. Die Differenzierung mehrerer Abstammungslinien wurde durch Aufstellung von einer osteogenen, adipogenen und chondrogenen Differenzierungsreihe begutachtet. Diese wurden mittels qualitativer und quantitativer Histochemie sowie der Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion bewertet.

Die Ergebnisse zeigen eine signifikante Reduktion von intrazellulären β -Catenin in den Versuchsgruppen. Die Zellzahlen sind anfänglich in der M1- und EM-Gruppe höher, gefolgt von der AS-Gruppe. Die höchste Anzahl von koloniebildenden Einheiten nach 14 Tagen sind in der AS-Gruppe zu sehen. Eine signifikant höhere *Nanog*-Expression wurde in der AS-Gruppe beobachtet. Ein signifikante multilineares Differenzierungspotential wurde von der EM/AS-Gruppe demonstriert.

Schlussfolgernd führt der Einfluss von kontrollierten Entzündungs- und Ascorbinsäurestimuli zu einer Verbesserung des Stammzellcharakters sowie Proliferations- und Differenzierungspotentials von gingivalen mesenchymalen Stammzellen. Dabei zeigt die Kombination des entzündlichen Milieus und Ascorbinsäure synergetische Effekte, die mit der Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs verbunden sind. Eine temporäre kurzfristige Entzündungs- und Ascorbinsäurestimulation könnte ein neues Schema zur Verfeinerung der Eigenschaften von gingivaler mesenchymaler Stammzellen in regenerativen Ansätzen bieten.

6. Literaturverzeichnis

- ABOU SULAIMAN, A. E. & SHEHADEH, R. M. 2010. Assessment of total antioxidant capacity and the use of vitamin C in the treatment of non-smokers with chronic periodontitis. *J Periodontol*, 81, 1547-54.
- ALAGL, A. S. & BHAT, S. G. 2015. Ascorbic acid: new role of an age-old micronutrient in the management of periodontal disease in older adults. *Geriatr Gerontol Int*, 15, 241-54.
- ARMITAGE, G. C. 1999. Development of a Classification System for Periodontal Diseases and Conditions. *Ann Periodontol*.
- ASSANGA, I. 2013. Cell growth curves for different cell lines and their relationship with biological activities. *International Journal for Biotechnology and Molecular Biology Research*.
- BAE, S. H., RYU, H., RHEE, K. J., OH, J. E., BAIK, S. K., SHIM, K. Y., KONG, J. H., HYUN, S. Y., PACK, H. S., IM, C., SHIN, H. C., KIM, Y. M., KIM, H. S., EOM, Y. W. & LEE, J. I. 2015. L-ascorbic acid 2-phosphate and fibroblast growth factor-2 treatment maintains differentiation potential in bone marrow-derived mesenchymal stem cells through expression of hepatocyte growth factor. *Growth Factors*, 33, 71-8.
- BARTOLD, P. M., WIEBKIN, O. W. & THONARD, J. C. 1984. The effect of oxygen-derived free radicals on gingival proteoglycans and hyaluronic acid. *J Periodontal Res*, 19, 390-400.
- BOXALL, S. A. & JONES, E. 2012. Markers for characterization of bone marrow multipotential stromal cells. *Stem Cells Int*, 2012, 975871.
- BUSTIN, S. A., BENES, V., NOLAN, T. & PFAFFL, M. W. 2005. Quantitative real-time RT-PCR--a perspective. *J Mol Endocrinol*, 34, 597-601.
- CARINCI, F., PEZZETTI, F., SPINA, A. M., PALMIERI, A., LAINO, G., DE ROSA, A., FARINA, E., ILLIANO, F., STABELLINI, G., PERROTTI, V. & PIATTELLI, A. 2005. Effect of Vitamin C on pre-osteoblast gene expression. *Arch Oral Biol*, 50, 481-96.
- CARNAUD, C., LEE, D., DONNARS, O., PARK, S. H., BEAVIS, A., KOEZUKA, Y. & BENDELAC, A. 1999. Cutting edge: Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells. *J Immunol*, 163, 4647-50.
- CATON, J. G., ARMITAGE, G., BERGLUNDH, T., CHAPPLE, I. L. C., JEPSEN, S., KORNMAN, K. S., MEALEY, B. L., PAPAPANOU, P. N., SANZ, M. & TONETTI, M. S. 2018. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. *Journal of Periodontology*, 89, S1-S8.
- CEKICI, A., KANTARCI, A., HASTURK, H. & VAN DYKE, T. E. 2014. Inflammatory and immune pathways in the pathogenesis of periodontal disease. *Periodontol 2000*, 64, 57-80.
- CHANG, Y. C., YANG, S. F., LAI, C. C., LIU, J. Y. & HSIEH, Y. S. 2002. Regulation of matrix metalloproteinase production by cytokines, pharmacological agents and periodontal pathogens in human periodontal ligament fibroblast cultures. *J Periodontal Res*, 37, 196-203.
- CHAPPLE, I. L. 1997. Reactive oxygen species and antioxidants in inflammatory diseases. *Journal of Clinical Periodontology*, 24, 287-296.
- CHAPPLE, I. L. C., MEALEY, B. L., VAN DYKE, T. E., BARTOLD, P. M., DOMMISCH, H., EICKHOLZ, P., GEISINGER, M. L., GENCO, R. J., GLOGAUER, M.,

- GOLDSTEIN, M., GRIFFIN, T. J., HOLMSTRUP, P., JOHNSON, G. K., KAPILA, Y., LANG, N. P., MEYLE, J., MURAKAMI, S., PLEMONS, J., ROMITO, G. A., SHAPIRA, L., TATAKIS, D. N., TEUGHEL, W., TROMBELLI, L., WALTER, C., WIMMER, G., XENOUDI, P. & YOSHIE, H. 2018. Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol*, 89 Suppl 1, S74-S84.
- CHITSAZI, M., FARAMARZIE, M., SADIGHI, M., SHIRMOHAMMADI, A. & HASHEMZADEH, A. 2017. Effects of adjective use of melatonin and vitamin C in the treatment of chronic periodontitis: A randomized clinical trial. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*, 11, 236-240.
- CHOI, K. M., SEO, Y. K., YOON, H. H., SONG, K. Y., KWON, S. Y., LEE, H. S. & PARK, J. K. 2008. Effect of ascorbic acid on bone marrow-derived mesenchymal stem cell proliferation and differentiation. *J Biosci Bioeng*, 105, 586-94.
- DOMINICI, M., LE BLANC, K., MUELLER, I., SLAPER-CORTENBACH, I., MARINI, F., KRAUSE, D., DEANS, R., KEATING, A., PROCKOP, D. & HORWITZ, E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8, 315-7.
- EL-SAYED, K. M., 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. *Int J Oral Sci*, 7, 80-8.
- ENGVALL, E. & PERLMANN, P. 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8, 871-4.
- ESTEBAN, M. A. & PEI, D. 2012. Vitamin C improves the quality of somatic cell reprogramming. *Nature Genetics*, 44, 366-367.
- FAWZY EL-SAYED, K. M. & DORFER, C. E. 2016. Gingival Mesenchymal Stem/Progenitor Cells: A Unique Tissue Engineering Gem. *Stem Cells Int*, 2016, 7154327.
- FAWZY EL-SAYED, K. M. & DORFER, C. E. 2017. (*) Animal Models for Periodontal Tissue Engineering: A Knowledge-Generating Process. *Tissue Eng Part C Methods*, 23, 900-925.
- FAWZY EL-SAYED, K. M., ELAHMADY, M., ADAWI, Z., ABOUSHADI, N., ELNAGGAR, A., EID, M., HAMDY, N., SANAA, D. & DORFER, C. E. 2019. The periodontal stem/progenitor cell inflammatory-regenerative cross talk: A new perspective. *J Periodontol Res*, 54, 81-94.
- FAWZY EL-SAYED, K. M., PARIS, S., BECKER, S. T., NEUSCHL, M., DE BUHR, W., SALZER, S., WULFF, A., ELREFAI, M., DARHOUS, M. S., EL-MASRY, M., WILTFANG, J. & DORFER, C. E. 2012. Periodontal regeneration employing gingival margin-derived stem/progenitor cells: an animal study. *J Clin Periodontol*, 39, 861-70.
- FISCHBACH, G. D. & FISCHBACH, R. L. 2004. Stem cells: science, policy, and ethics. *J Clin Invest*, 114, 1364-70.
- FRIEDENSTEIN, A. J., CHAILAKHYAN, R. K., LATSINIK, N. V., PANASYUK, A. F. & KEILISS-BOROK, I. V. 1974. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation*, 17, 331-40.
- FURNESS, S. G. & MCNAGNY, K. 2006. Beyond mere markers: functions for CD34 family of sialomucins in hematopoiesis. *Immunol Res*, 34, 13-32.

- GAO, Y., HAN, Z., LI, Q., WU, Y., SHI, X., AI, Z., DU, J., LI, W., GUO, Z. & ZHANG, Y. 2015. Vitamin C induces a pluripotent state in mouse embryonic stem cells by modulating microRNA expression. *FEBS J*, 282, 685-99.
- GAO, Y., YANG, L., CHEN, L., WANG, X., WU, H., AI, Z., DU, J., LIU, Y., SHI, X., WU, Y., GUO, Z. & ZHANG, Y. 2013. Vitamin C facilitates pluripotent stem cell maintenance by promoting pluripotency gene transcription. *Biochimie*, 95, 2107-13.
- GAO, Y., ZHAO, G., LI, D., CHEN, X., PANG, J. & KE, J. 2014. Isolation and multiple differentiation potential assessment of human gingival mesenchymal stem cells. *Int J Mol Sci*, 15, 20982-96.
- GEMMELL, E., CARTER, C. L. & SEYMOUR, G. J. 2001. Chemokines in human periodontal disease tissues. *Clin Exp Immunol*, 125, 134-41.
- GRAVES, D. T. & COCHRAN, D. 2003. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol*, 74, 391-401.
- GRONTHOS, S. & ZANNETTINO, A. C. 2008. A method to isolate and purify human bone marrow stromal stem cells. *Methods Mol Biol*, 449, 45-57.
- HAN, Y., LI, X., ZHANG, Y., HAN, Y., CHANG, F. & DING, J. 2019. Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Medicine. *Cells*, 8.
- HEITZ-MAYFIELD, L. J. & LANG, N. P. 2013. Surgical and nonsurgical periodontal therapy. Learned and unlearned concepts. *Periodontol 2000*, 62, 218-31.
- HERBERT F. WOLF, E. M. R., KLAUS H. RATEITSCHAK 2004. Parodontologie. Deutschland: Thieme.
- HERMISTON, M. L., XU, Z. & WEISS, A. 2003. CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annu Rev Immunol*, 21, 107-37.
- HORE, T. A. 2017. Modulating epigenetic memory through vitamins and TET: implications for regenerative medicine and cancer treatment. *Epigenomics*, 9, 863-871.
- HORE, T. A., VON MEYENN, F., RAVICHANDRAN, M., BACHMAN, M., FICZ, G., OXLEY, D., SANTOS, F., BALASUBRAMANIAN, S., JURKOWSKI, T. P. & REIK, W. 2016. Retinol and ascorbate drive erasure of epigenetic memory and enhance reprogramming to naive pluripotency by complementary mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113, 12202-12207.
- ISHIKAWA, S., IWASAKI, K., KOMAKI, M. & ISHIKAWA, I. 2004. Role of Ascorbic Acid in Periodontal Ligament Cell Differentiation. *Journal of Periodontology*, 75, 709-716.
- JI, A. R., KU, S. Y., CHO, M. S., KIM, Y. Y., KIM, Y. J., OH, S. K., KIM, S. H., MOON, S. Y. & CHOI, Y. M. 2010. Reactive oxygen species enhance differentiation of human embryonic stem cells into mesendodermal lineage. *Exp Mol Med*, 42, 175-86.
- JORDAN, R. & MICHEELIS, W. 2016. Fünfte Deutsche Mundgesundheitsstudie (DMS V) - Kurzfassung. Institut der Deutschen Zahnärzte im Auftrag von Bundeszahnärztekammer und Kassenzahnärztlicher Bundesvereinigung.
- KAHLER, R. A. & WESTENDORF, J. J. 2003. Lymphoid enhancer factor-1 and beta-catenin inhibit Runx2-dependent transcriptional activation of the osteocalcin promoter. *J Biol Chem*, 278, 11937-44.
- KARRING, T., NYMAN, S., GOTTLAW, J. & LAURELL, L. 1993. Development of the biological concept of guided tissue regeneration--animal and human studies. *Periodontol 2000*, 1, 26-35.
- KIM, J. H., KIM, W. K., SUNG, Y. K., KWACK, M. H., SONG, S. Y., CHOI, J. S., PARK, S. G., YI, T., LEE, H. J., KIM, D. D., SEO, H. M., SONG, S. U. & SUNG, J. H. 2014. The molecular mechanism underlying the proliferating and preconditioning effect of vitamin C on adipose-derived stem cells. *Stem Cells Dev*, 23, 1364-76.

- KONG, X., LIU, Y., YE, R., ZHU, B., ZHU, Y., LIU, X., HU, C., LUO, H., ZHANG, Y., DING, Y. & JIN, Y. 2013. GSK3beta is a checkpoint for TNF-alpha-mediated impaired osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in inflammatory microenvironments. *Biochim Biophys Acta*, 1830, 5119-29.
- LANG, N. P. & BARTOLD, P. M. 2018. Periodontal health. *J Periodontol*, 89 Suppl 1, S9-S16.
- LIU, N., SHI, S., DENG, M., TANG, L., ZHANG, G., LIU, N., DING, B., LIU, W., LIU, Y., SHI, H., LIU, L. & JIN, Y. 2011a. High levels of beta-catenin signaling reduce osteogenic differentiation of stem cells in inflammatory microenvironments through inhibition of the noncanonical Wnt pathway. *J Bone Miner Res*, 26, 2082-95.
- LIU, Y., WANG, L., KIKUIRI, T., AKIYAMA, K., CHEN, C., XU, X., YANG, R., CHEN, W., WANG, S. & SHI, S. 2011b. Mesenchymal stem cell-based tissue regeneration is governed by recipient T lymphocytes via IFN-gamma and TNF-alpha. *Nat Med*, 17, 1594-601.
- LUNDY, F. T. & LINDEN, G. J. 2004. Neuropeptides and Neurogenic Mechanisms in Oral and Periodontal Inflammation. *Crit Rev Oral Biol Med*, 15, 82-98.
- MAJEWICZ, J., RIMBACH, G., PROTEGGENTE, A. R., LODGE, J. K., KRAEMER, K. & MINIHAINE, A. M. 2005. Dietary vitamin C down-regulates inflammatory gene expression in apoE4 smokers. *Biochem Biophys Res Commun*, 338, 951-5.
- MELCHER, A. H. 1985. Cells of Periodontium - Their Role in the Healing of Wounds. *Annals of the Royal College of Surgeons of England*, 67, 130-131.
- MIKKELSEN, T. S., HANNA, J., ZHANG, X., KU, M., WERNIG, M., SCHORDERET, P., BERNSTEIN, B. E., JAENISCH, R., LANDER, E. S. & MEISSNER, A. 2008. Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature*, 454, 49-55.
- MILORO, M. & PETERSON, L. J. 2012. *Peterson's Principles of Oral and Maxillofacial Surgery*, People's Medical Publishing House-USA.
- MILTENYI, S., MULLER, W., WEICHEL, W. & RADBRUCH, A. 1990. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry*, 11, 231-8.
- MIZUNO, M., KATANO, H., SHIMOZAKI, Y., SANAMI, S., OZEKI, N., KOGA, H. & SEKIYA, I. 2019. Time-lapse image analysis for whole colony growth curves and daily distribution of the cell number per colony during the expansion of mesenchymal stem cells. *Sci Rep*, 9, 16835.
- MOSMANN, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65, 55-63.
- NG, T. K., HUANG, L., CAO, D., YIP, Y. W., TSANG, W. M., YAM, G. H., PANG, C. P. & CHEUNG, H. S. 2015. Cigarette smoking hinders human periodontal ligament-derived stem cell proliferation, migration and differentiation potentials. *Sci Rep*, 5, 7828.
- NISHIDA, M., GROSSI, S. G., DUNFORD, R. G., HO, A. W., TREVISAN, M. & GENCO, R. J. 2000a. Dietary vitamin C and the risk for periodontal disease. *J Periodontol*, 71, 1215-23.
- NISHIDA, M., GROSSI, S. G., DUNFORD, R. G., HO, A. W., TREVISAN, M. & GENCO, R. J. 2000b. Dietary Vitamin C and the Risk for Periodontal Disease. *Journal of Periodontology*, 71, 1215-1223.
- 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. *Science*, 284, 143-7.

- POTDAR, P. D. & D'SOUZA, S. B. 2010. Ascorbic acid induces in vitro proliferation of human subcutaneous adipose tissue derived mesenchymal stem cells with upregulation of embryonic stem cell pluripotency markers Oct4 and SOX 2. *Hum Cell*, 23, 152-5.
- RUBIN, M. B. 1984. Vitamins and wound healing. *Plast Surg Nurs*, 4, 16-9.
- SCHUURS, A. H. & VAN WEEMEN, B. K. 1980. Enzyme-immunoassay: a powerful analytical tool. *J Immunoassay*, 1, 229-49.
- SILVA, T. A., GARLET, G. P., FUKADA, S. Y., SILVA, J. S. & CUNHA, F. Q. 2007. Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. *J Dent Res*, 86, 306-19.
- SIMMONS, D. L., TAN, S., TENEN, D. G., NICHOLSON-WELLER, A. & SEED, B. 1989. Monocyte antigen CD14 is a phospholipid anchored membrane protein. *Blood*, 73, 284-9.
- SIMMONS, P. J. & TOROK-STORB, B. 1991. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood*, 78, 55-62.
- SOCRANSKY, S. S., HAFFAJEE, A. D., SMITH, C., MARTIN, L., HAFFAJEE, J. A., UZEL, N. G. & GOODSON, J. M. 2004. Use of checkerboard DNA-DNA hybridization to study complex microbial ecosystems. *Oral Microbiol Immunol*, 19, 352-62.
- SUSIN, C. & WIKESJO, U. M. 2013. Regenerative periodontal therapy: 30 years of lessons learned and unlearned. *Periodontol 2000*, 62, 232-42.
- SUVAN, J., LEIRA, Y., MORENO, F., GRAZIANI, F., DERKS, J. & TOMASI, C. 2019. Subgingival Instrumentation for Treatment of Periodontitis. A Systematic Review. *Journal of Clinical Periodontology*.
- SWAIN, N., THAKUR, M., PATHAK, J. & SWAIN, B. 2020. SOX2, OCT4 and NANOG: The core embryonic stem cell pluripotency regulators in oral carcinogenesis. *J Oral Maxillofac Pathol*, 24, 368-373.
- TOMASELLO, L., MAUCERI, R., COPPOLA, A., PITRONE, M., PIZZO, G., CAMPISI, G., PIZZOLANTI, G. & GIORDANO, C. 2017. Mesenchymal stem cells derived from inflamed dental pulpal and gingival tissue: a potential application for bone formation. *Stem Cell Res Ther*, 8, 179.
- TOMOFUJI, T., EKUNI, D., SANBE, T., IRIE, K., AZUMA, T., MARUYAMA, T., TAMAKI, N., MURAKAMI, J., KOKEGUCHI, S. & YAMAMOTO, T. 2009. Effects of vitamin C intake on gingival oxidative stress in rat periodontitis. *Free Radic Biol Med*, 46, 163-8.
- TONETTI, M. S., GREENWELL, H. & KORNMAN, K. S. 2018. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Periodontol*, 89 Suppl 1, S159-S172.
- VAN PHAM, P., TRAN, N. Y., PHAN, N. L., VU, N. B. & PHAN, N. K. 2016. Vitamin C stimulates human gingival stem cell proliferation and expression of pluripotent markers. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 52, 218-27.
- WAKAI, K., KAWAMURA, T., UMEMURA, O., HARA, Y., MACHIDA, J., ANNO, T., ICHIHARA, Y., MIZUNO, Y., TAMAKOSHI, A., LIN, Y., NAKAYAMA, T. & OHNO, Y. 1999. Associations of medical status and physical fitness with periodontal disease. *J Clin Periodontol*, 26, 664-72.
- WANG, Y. & TATAKIS, D. N. 2017. Human gingiva transcriptome during wound healing. *J Clin Periodontol*, 44, 394-402.
- WEI, C., LIU, X., TAO, J., WU, R., ZHANG, P., BIAN, Y., LI, Y., FANG, F. & ZHANG, Y. 2014. Effects of vitamin C on characteristics retaining of in vitro-cultured mouse adipose-derived stem cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 50, 75-86.

- YOUNG, J. I., ZUCHNER, S. & WANG, G. 2015. Regulation of the Epigenome by Vitamin C. *Annu Rev Nutr*, 35, 545-64.
- YU, J., TU, Y.-K., TANG, Y.-B. & CHENG, N.-C. 2014. Stemness and transdifferentiation of adipose-derived stem cells using l-ascorbic acid 2-phosphate-induced cell sheet formation. *Biomaterials*, 35, 3516-3526.
- ZHANG, F., SI, M., WANG, H., MEKHEMAR, M. K., DORFER, C. E. & FAWZY EL-SAYED, K. M. 2017. IL-1/TNF-alpha Inflammatory and Anti-Inflammatory Synchronization Affects Gingival Stem/Progenitor Cells' Regenerative Attributes. *Stem Cells Int*, 2017, 1349481.
- ZHOU, L., DORFER, C. E., CHEN, L. & FAWZY EL-SAYED, K. M. 2017. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharides affect gingival stem/progenitor cells attributes through NF-kappaB, but not Wnt/beta-catenin, pathway. *J Clin Periodontol*, 44, 1112-1122.

7. Ethikantrag

MEDIZINISCHE FAKULTÄT
DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL

ETHIK-KOMMISSION



Universitäts-Kinderklinik · Schwanenweg 20 · 24105 Kiel

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

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

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

Datum: 07. August 2017

AZ: D 513/17 (bitte stets angeben)
Studienplan: **In-vitro Untersuchung der Wirkung verschiedener Biomoleküle und Entzündung auf gingivale Stammzellen**
Basisformular v. 18.07.17; Studienprotokoll undatiert; Informationsblatt und Einverständniserklärung für wissenschaftliche Untersuchungen an körpereigenem Material
Antragsteller und Studienleiter: PD Dr. Karim Fawzy El-Sayed, Dr. Mohamed Mekhemar, Klinik für Zahnerhaltung und Parodontologie, UKSH Kiel
Antrag vom: 3. Juni 2017 (Eingang: 20. Juli 2017)

Sehr geehrter Herr Kollege El-Sayed,

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

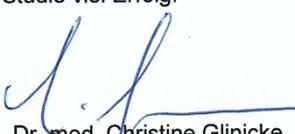
Die im Folgenden aufgeführten Hinweise müssen beachtet werden:

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

Wir wünschen Ihnen für die Durchführung der Studie viel Erfolg.

Mit freundlichen kollegialen Grüßen


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


Dr. med. Christine Glinicke
Geschäftsführung der Ethik-Kommission

AZ_D513/17_Aug17

1

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. Christof Dörfer, dem Direktor der Klinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie, für die Möglichkeit, meine Promotionsforschung in seiner Klinik durchzuführen, bedanken.

Ein großer Dank gilt auch meinem Doktorvater, PD Dr. Karim Fawzy El-Sayed, der mir dieses innovative und komplexe Thema anvertraut hat. Ferner danke ich ihm für seine professionelle und intensive Betreuung, sowohl während der experimentellen Phase als auch des Schreibens. Seine konstruktive Kritik ermöglichte mir das bestmögliche Ergebnis dieser Arbeit.

Des Weiteren möchte ich ein großes Dankeschön an die professionelle Hilfe von Frau Mojgan Paymard-Stolz, Frau Regina Marquart und Frau Kerstin Marx aussprechen, die mir im Labor stets kompetent und tief unter die Arme griffen. Besonderen Dank möchte ich dabei Frau Paymard-Stolz aussprechen.

Von ganzem Herzen bedanke ich mich bei Daniela Hein, die mich nicht nur als Doktorandenpartnerin sondern auch als gute Freundin Stück für Stück bis zum Erreichen der Doktorwürde begleitete. Außerdem danke ich meinen Freund*innen aus der Berliner Heimat und dem Kieler Studium, die mir immer ein offenes Ohr schenkten.

Zuletzt danke ich meinen Eltern und meinen drei Schwestern, die mir seit klein auf stets zur Seite standen, mir niemals den Rücken zuehrten und mich ermutigten, den Weg der Doktorwürde einzugehen. *Cảm ơn Mẹ* – ihnen ist diese Arbeit gewidmet.

9. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht veröffentlicht.