

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

**Expressionsprofil der Toll-like-Rezeptoren von humanen
Stammzellen aus Milchzähnen**

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

Vorgelegt von
Antonia Maria Rudert
aus Hannover

Kiel 2023

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Karim Mohamed Fawzy El-Sayed

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. dent. Aydin Gülses

Tag der mündlichen Prüfung: 06.12.2024

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 21.08.2024

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

Inhaltsverzeichnis

I.	Abkürzungsverzeichnis	IV
II.	Abbildungsverzeichnis	VI
III.	Tabellenverzeichnis	VII
1.	Einleitung	1
1.1.	Die Pulpa	1
1.1.1.	Bedeutung der Pulpa	1
1.1.2.	Pulpitis	2
1.1.3.	Unterschiede der Pulpa zwischen Milch- und Erwachsenengebiss	3
1.2.	Stammzellen	3
1.2.1.	Aktueller Kontext	3
1.2.2.	Einteilung der Stammzellen	4
1.2.3.	Charakterisierung und Marker	4
1.3.	Toll-like-Rezeptoren (TLR)	6
1.3.1.	Definition und Funktion	6
1.3.2.	Extrazelluläre Rezeptoren	7
1.3.3.	Intrazelluläre Rezeptoren	8
1.4.	Zielsetzung der Studie	10
2.	Materialien und Methoden	11
2.1.	Materialien	11
2.1.1.	Verbrauchsmaterialien	11
2.1.2.	CD-Antigene und Antikörper	12
2.1.3.	Primer	13
2.1.4.	Geräte	14
2.1.5.	Labormaterial	15
2.2.	Methoden	16
2.2.1.	Gewebeentnahme	16
2.2.2.	Kultivierung des pulpalen Gewebes	16
2.2.3.	Passagieren der Zellen	17
2.2.4.	Magnetic activated cell sorting (MACS)	17
2.2.5.	Einfrieren der Zellen	18

2.2.6. Nachweis der typischen Merkmale von Stammzellen	18
2.2.6.1. Colony forming unit (CFU) assay	18
2.2.6.2. Differenzierung der SHED mit Stimulationsmedium	18
2.2.6.3. Osteogene Differenzierung	18
2.2.6.4. Adipogene Differenzierung	19
2.2.6.5. Chondrogene Differenzierung	19
2.2.6.6. Ermittlung SHED-spezifischer Oberflächenantigene mit der Durchflusszytometrie	20
2.2.7. Ribonukleinsäure (RNA) Extraktion	21
2.2.7.1. RNA-Messung	21
2.2.8. cDNA-Synthese	21
2.2.9. Quantitative Polymerase-Chain-Reaction (qPCR)	22
2.2.10. Extrazelluläre FACS-Analyse	22
2.2.11. Intrazelluläre FACS-Analyse	23
2.2.12. Statistische Analyse	24
3. Ergebnisse	25
3.1. Gewinnung und Kultivierung pulpaler Zellen	25
3.2. Nachweis der Stammzeleigenschaften	26
3.2.1. Anheftung am Plastikboden der Nährmediumflasche	26
3.2.2. Colony forming units (CFU)	27
3.2.3. Differenzierung der SHED	27
3.2.4. Nachweis Stammzell-spezifischer Oberflächenantigene	32
3.3. TLR-Expression der SHED auf mRNA-Ebene	34
3.4. TLR-Expression der SHED auf Proteinebene	37
4. Diskussion	39
4.1. Diskussion der Methodik	39
4.1.1. Gewebeentnahme und Kultivierung	39
4.1.2. Magnetic activated cell sorting (MACS)	40
4.1.3. Nachweis der typischen Merkmale von Stammzellen	40
4.1.3.1. Fähigkeit der Plastikadhärenz	41
4.1.3.2. Durchflusszytometrie	41
4.1.3.3. Differenzierungspotential der SHED	42
4.1.3.4. Colony forming unit (CFU) assay	42
4.1.4. Intra- und extrazelluläre TLR-Expression	42

4.1.4.1. Entzündungsmedium	42
4.1.4.2. Dokumentation der TRL-Expression mittels Quantitativer Polymerase-Chain-Reaction (qPCR)	43
4.1.4.3. Dokumentation der TLR-Expression mittels Durchflusszytometrie	44
4.2. Diskussion der Ergebnisse	44
4.2.1. Expression der Toll-like Rezeptoren im Nährmedium	45
4.2.2. Expression der Toll-like Rezeptoren im entzündlichen Medium	45
4.2.3. Schlusswort der Diskussion	46
5. Zusammenfassung	48
6. Literaturverzeichnis	50
7. Anhang	56
7.1. Ethikvotum	56
7.2. Einwilligungsbogen	57
8. Danksagung	59
9. Eidesstattliche Versicherung	60

I. Abkürzungsverzeichnis

ABKÜRZUNG	BEDEUTUNG
APC	Allophycocyanin
AQUA DEST.	Destilliertes Wasser
CD	Cluster of Differentiation
CDNA	Komplementäre DNA (complementary desoxyribonucleic acid)
CFU	Koloniebildende Einheit (Colony forming unit)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPSC	Dentale pulpare Stammzellen (dental pulp stem cells)
DSRNA	Doppelsträngige Ribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Durchflusszytometrie (Fluorescence activated cell sorting)
FCS	Fetales Kälberserum
GDNA	Genomische DNA
HPV1	Herpes-simplex-Viren Typ 1
IFN	Interferon
IG	Immunglobulin
IL	Interleukin
IRF	Interferon regulatorische Faktoren
LBP	Lipopolysaccharid bindendes Protein
LPS	Lipopolysaccharide
MACS	Magnetisch aktivierte Zellsortierung (magnetic activated cell sorting)
MRNA	Messenger ribonucleic acid
MSC	Mesenchymale Stammzellen
MYD88	Myeloid differentiation primary response protein
NF- κ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster (Pathogen-associated molecular patterns)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
PGE2	Prostaglandin E2
PGK1	Phosphoglycerat Kinase 1
PRRS	Mustererkennungsrezeptoren (Pattern recognition receptors)

QPCR	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
SCAP	Stammzellen der apikalen Papille
SHED	Dentale pulpale Stammzellen aus Milchzähnen (stem cells from human exfoliated deciduous teeth)
STRO-1	Mesenchymaler Stammzellmarker
TIRAP	Toll-interleukin 1 receptor domain containing adaptor protein
TLR	Toll-like-Receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TRIF	TIR-domain containing adapter-inducing interferon- β
UPM	Umdrehungen pro Minute
ZNS	Zentrales Nervensystem

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: PAMP Erkennung durch TLRs an der Zelloberfläche (eigene Darstellung nach Fehrmann, 2021; Kawai & Akira, 2010).....	8
Abbildung 2: PAMP Erkennung durch intrazelluläre TLRs (eigene Darstellung nach Fehrmann, 2021; Kawai & Akira, 2010)	9
Abbildung 3: Aufgebrochener Zahn mit entfernter Pulpa	25
Abbildung 4: Gewebefragment und auswachsende Zellen	25
Abbildung 5: Adhärenz Zellen an Zellkulturflasche (2. Woche).....	26
Abbildung 6: Koloniebildung der SHED nach Färbung mit Kristallviolett-Lösung	27
Abbildung 7: Osteogene Differenzierung – Färbung: Alizarin Rot	28
Abbildung 8: Kontrolle – Färbung: Alizarin Rot	28
Abbildung 9: Adipogene Differenzierung – Färbung: Oil-Red-O-Lösung	29
Abbildung 10: Kontrolle – Färbung: Oil-Red-O-Lösung	30
Abbildung 11: Chondrogene Differenzierung – Färbung: Alcianblau und Kernechtrot	31
Abbildung 12: Kontrolle – Färbung: Alcianblau und Kernechtrot	31
Abbildung 13: FACS-Analyse der negativen CD-Oberflächenantigene von SHED	32
Abbildung 14: FACS-Analyse der positiven CD-Oberflächenantigene von SHED.....	33
Abbildung 15: TLR-Expression der SHED und SHED-i auf mRNA-Ebene gemessen mit quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion. mRNA-Expression der TLRs 1-10 in nicht entzündlichem Medium	35
Abbildung 16: TLR-Expression der SHED und SHED-i auf mRNA-Ebene gemessen mit quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion. mRNA-Expression der TLRs 1-10 in entzündlichem Medium	36
Abbildung 17: TLR-Expression der SHED und SHED-i auf Proteinebene gemessen mittels Durchflusszytometrie. %Proteinexpression von TLR 1-10 in nicht entzündlichem Medium ..	37
Abbildung 18: TLR-Expression der SHED und SHED-i auf Proteinebene gemessen mittels Durchflusszytometrie. %Proteinexpression von TLR 1-10 in entzündlichem Medium	38

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Cluster of differentiation (CD) der mesenchymalen Stammzellen (MSC)	6
Tabelle 2: Toll-like-Rezeptoren und deren PAMPs aus Fawzy El-Sayed et al., 2018.....	7
Tabelle 3: Medien und Chemikalien	12
Tabelle 4: Antigene und Antikörper	13
Tabelle 5: Primer	13
Tabelle 6: Geräte.....	14
Tabelle 7: Labormaterial	15
Tabelle 8: Protokoll CD-Marker FACS.....	20
Tabelle 9: Light Cycler™ Programm zur qPCR.....	22
Tabelle 10: Versuchsprotokoll der extrazellulären TLR FACS-Analyse	23
Tabelle 11: Versuchsprotokoll der intrazellulären TLR FACS-Analyse	23

1. Einleitung

1.1. Die Pulpa

Die Pulpa ist ein gallertartiges Gewebe innerhalb des Zahnes und umgeben von Dentin. Diese Pulpa-Dentin-Einheit wird an der Zahnkrone von Schmelz und im Bereich der Wurzel von Zement bedeckt. Die Pulpa befindet sich somit in der Pulpahöhle, welche sich aus dem Kronenkavum und den Wurzelkanälen zusammensetzt (Lüllmann-Rauch & Asan, 2019). Die Pulpa besteht zu ca. 25 % aus organischer Substanz und zu 75 % aus Wasser (Hellwig et al., 2018). Die organische Matrix beinhaltet Zellen, Kollagenfasern, Nervenfasern sowie Blut- und Lymphgefäße. Zu den Zellen der Pulpa gehören neben den Odontoblasten auch Fibroblasten, undifferenzierte Mesenchymzellen und Zellen der Abwehr. Die häufigsten Zellen in der Pulpa sind die Fibroblasten. Diese bilden die Kollagenfasern und produzieren die Grundsubstanz der Pulpa (Lüllmann-Rauch & Asan, 2019). Die Odontoblasten sind nach Abschluss der Odontogenese nicht mehr teilungsfähig und können Dentin bilden. Die undifferenzierten Mesenchymzellen gelten als multipotent und sind als dentale pulpale Stammzellen für die Forschung besonders interessant. Unter dem Überbegriff Zellen der Abwehr versteht man verschiedene Zellen der spezifischen und unspezifischen zellulären Abwehr. Dazu zählen Makrophagen, dendritische Zellen, Granulozyten sowie T- und B-Lymphozyten (Hellwig et al., 2018; Lüllmann-Rauch & Asan, 2019).

1.1.1. Bedeutung der Pulpa

Die vier Funktionen der Pulpa sind die Ernährung, Sensorik, Abwehr und Bildung von Dentin. Das Dentin wird durch die Odontoblasten gebildet. Hierbei unterscheidet man zwischen physiologischem Primärdentin, alterungsbedingtem Sekundärdentin und Tertiärdentin, welches auch Reizdentin genannt wird und sich nach Irritationen, wie zum Beispiel durch Karies, bildet (Hellwig et al., 2018). Die sensiblen Fasern im Pulpagewebe bilden, anliegend an den Odontoblasten, den Raschkowschen Plexus. Durch diese sensible Innervation werden thermische, chemische, osmotische und mechanische Reize registriert. Sie üben dadurch eine wichtige Schutzfunktion gegen äußere Einflüsse für den Zahn aus (Lehmann et al., 2015). Die Gefäßversorgung des Zahnes und die Ernährung der Zellen sind über die vaskularisierte Pulpa gewährleistet. Die Arteriolen und Venolen gelangen apikal über das Foramen apicale an der Wurzelspitze in das Pulpakavum und bilden in der Kronenpulpa einen Kapillarplexus, der die Pulpazellen mit Nährstoffen versorgt. Durch dieses Foramen gelangen auch die Nervenfasern für die sensible Innervation in den Zahn (Lehmann et al., 2015).

1.1.2. Pulpitis

Die Pulpitis ist die Entzündung der Pulpa als Reaktion auf einen Reiz. Besonders häufig ist dafür Karies verantwortlich. Eine kariöse Läsion muss die Pulpa nicht erreicht haben, um eine Reaktion hervorzurufen, sondern es reichen bereits Stoffwechselprodukte der Bakterien in einer tiefen Karies dafür aus (Bergenholtz, 1981).

Man unterscheidet eine reversible von einer irreversiblen Pulpitis. Eine reversible Pulpitis äußert sich symptomatisch darin, dass ein durch Kälte provozierte Schmerz seiner Reizdauer entspricht und somit nach der Provokation aufhört. Dieser Schmerz, ausgehend von myelinisierten A δ -Fasern, ist häufig von Patienten genau auf einen Zahn lokalisierbar und tritt nicht spontan, also ohne Auslöser, auf. Zudem tritt keine Perkussionsempfindlichkeit auf (Hellwig et al., 2018; Steiniger et al., 2010).

Die Empfehlung der Deutschen Gesellschaft für Endodontologie und zahnärztliche Traumatologie rät nach der Diagnose einer reversiblen Pulpitis zu vitalerhaltenden Maßnahmen (Damaschke et al., 2019). Die Behandlung besteht darin, die kariösen Läsionen zu restaurieren und die Zahnstruktur wieder herzustellen. Anschließend werden die Symptome des Patienten weiter beobachtet. Die irreversible Pulpitis zeichnet sich symptomatisch dadurch aus, dass der Schmerz als Reaktion auf Kälte oder Wärme länger als der Reizauslöser andauert und auch spontan auftreten kann. Zudem kann der Zahn perkussionsempfindlich reagieren und röntgenologisch können tiefe Läsionen sichtbar sein (Dabuleanu, 2013; Damaschke et al., 2019; Hellwig et al., 2018). Häufig ist dieser Schmerz undifferenziert und kann vom Patienten nicht konkret lokalisiert werden. Diese Beschwerden werden durch marklose C-Fasern hervorgerufen (Steiniger et al., 2010). Therapeutisch ist eine Wurzelkanalbehandlung mit anschließender Wurzelfüllung angeraten (Damaschke et al., 2019).

Die Pulpa besitzt verschiedene Möglichkeiten der Abwehr. Sobald Antigene, ausgehend von Bakterien in kariösen Läsionen, die Pulpa erreichen, werden diese von dendritischen Zellen erkannt und phagozytiert. Diese kommunizieren mit T-Zellen und eine spezifische Immunantwort wird ausgelöst. Einen weiteren Zelltyp der Abwehr in der Pulpa stellen die Makrophagen dar. Auch sie dienen der Phagozytose, werden von T-Helferzellen erkannt und können zudem Zytokine sezernieren. Diese Zytokine unterstützen die Immunantwort, indem sie die Migration und Entwicklung der dendritischen Zellen fördern und somit auch die B- und T-Zell-Aktivierung anregen (Trowbridge, 2003).

Eine entzündete Pulpa weist im Vergleich zu einer nicht entzündeten Pulpa zudem eine veränderte Antikörperexpression auf. So sind in ihr die Antikörper Immunglobulin (Ig) G, IgM, IgA sowie das Elastase-Level und PGE₂ signifikant erhöht. Nakanishi und Matsuo (1995) konnten in ihrer Studie zeigen, dass die unterschiedlichen Level an IgG, IgA, IgM, Elastase

und PGE2 als Indikatoren für den Entzündungsgrad der Pulpa dienen können. Auf Basis weiterer Studien, so die Schlussfolgerung der Autoren, kann anhand dieser Parameter eine reversible von einer irreversiblen Pulpitis abgegrenzt werden und damit die Behandlungsoptionen ausgewählt werden (Nakanishi et al., 1995).

1.1.3. Unterschiede der Pulpa zwischen Milch- und Erwachsenengebiss

Die Pulpa des Milchgebisses zeigt eine höhere Proliferationsrate der Zellen sowie eine höhere Bereitschaft der Zellen zur Apoptose, d.h. dem programmierten Zelltod, als die Pulpa der bleibenden Zähne (Okai et al., 2012). Zusätzlich können Zellen der Milchzahn-Pulpa besser Dentin bilden und ihre Stammzellen besitzen eine erhöhte Fähigkeit zur Knochenbildung im Vergleich zu den Stammzellen der adulten Pulpa. Dies deutet auf eine mögliche Beteiligung der Milchzähne bei der Knochenformatierung während des Durchbruchs der bleibenden Zähne hin (Wang et al., 2012). Ein weiterer Unterschied besteht in der Vaskularität. Milchzähne besitzen eine signifikant höhere Durchblutung im mittleren koronalen Bereich der Pulpa als bleibende Zähne (Rodd & Boissonade, 2005). Weitere Studien postulieren, dass die Pulpa von kariösen Milchzähnen schneller entzündlich reagiert als die von bleibenden Zähnen. Dies mag an den anatomischen Gegebenheiten des dünneren Schmelzmantels und der geringeren Mineralisation liegen (Rayner & Southam, 1979).

1.2. Stammzellen

1.2.1. Aktueller Kontext

Stammzellen nehmen in der aktuellen Forschungslandschaft einen äußerst wichtigen Platz ein und werden in vielen unterschiedlichen medizinischen Bereichen untersucht. Von der Stammzellmedizin erhofft man sich Heilung bzw. Verbesserung von schweren Krankheiten wie zum Beispiel Tumoren (Najafi et al., 2021), kardiovaskulären Erkrankungen (Miao et al., 2017) oder Lungenerkrankungen (Omar et al., 2022).

Auch in der Zahnmedizin erwartet man sich ein erweitertes Behandlungsspektrum durch die Stammzellforschung. Die Fähigkeit der Stammzellen sich in neues, spezifisches Gewebe zu differenzieren, möchte man auch hier weiter untersuchen und nutzen. Anwendungsbeispiele sind die Behandlung von Knochendefekten (De Mendonça Costa et al., 2008; Jahanbin et al., 2016), Geweberegeneration (Fawzy El-Sayed et al., 2012) und Parodontitis (Fawzy El-Sayed et al., 2015; Fu et al., 2014).

1.2.2. Einteilung der Stammzellen

Die wichtigste Eigenschaft der Stammzellen ist die Fähigkeit zur Selbsterneuerung. Sie besitzen einen langsamen Zellzyklus und einen niedrigen Differenzierungsgrad. Unterschieden werden sie als: (1) Totipotente Stammzellen, die in der Embryonalentwicklung bis zum 8-Zell-Stadium vorkommen, (2) pluripotente Stammzellen in der frühen embryonalen Entwicklung ab Tag 4/5 nach Imprägnation, (3) multipotente Stammzellen, die postnatal entstehen wie beispielsweise mesenchymale Stammzellen und zudem (4) oligopotente Stammzellen, welche nur wenige Zelltypen generieren (Lüllmann-Rauch & Asan, 2019).

In dieser Studie werden die multipotenten mesenchymalen Stammzellen aus der dentalen Milchzahnpulpa näher betrachtet. Diese Stammzellen sind in der Literatur als „stem cells from human exfoliated deciduous teeth“ (SHED) bekannt und können sich in vivo zu Odontoblasten, Neuronen, Adipozyten sowie zu osteoinduktiven und endothelähnlichen Zellen entwickeln. In vitro besitzen sie die Fähigkeit zur Differenzierung in odontogene, osteogene, adipogene, chondrogene und neuronale Zellen (Miura et al., 2003; Ulmer et al., 2010).

In permanenten Zähnen werden die pulpalen Stammzellen als dental pulp stem cells (DPSCs) bezeichnet. Laut einer Studie von Wang et al. (2012) bestehen signifikante Unterschiede zwischen SHED und DPSCs. SHED zeigen demnach eine höhere Kapazität der osteogenen und adipogenen Differenzierung als DPSCs, insgesamt eine höhere Proliferationsrate und eine verstärkte Befähigung zur Koloniebildung, einem weiteren charakteristischen Merkmal der Stammzellen (Lee et al., 2011). Auf Grund ihrer besseren Fähigkeit zur osteogenen Differenzierung, könnten SHED somit im Gegensatz zu DPSCs vielversprechend für die weitere Forschung im Bereich mineralisierter Gewebe, wie beispielsweise Knochen, sein (Wang et al., 2012). Ein weiterer Unterschied besteht in der Interleukin-6 (IL-6) Expression. In SHED besteht ein signifikant höheres Niveau von IL-6, welches als optimaler Wachstumsfaktor für Stammzellen angesehen wird und somit die These der höheren Proliferationsrate der SHED untermauert (Wang et al., 2012).

1.2.3. Charakterisierung und Marker

Mesenchymale Stammzellen (MSCs) besitzen spezifische Marker (Oberflächenantigene) anhand deren eine Identifizierung und Charakterisierung möglich ist. Das Oberflächenantigen „STRO-1“ ist der bekannteste Marker der mesenchymalen Stammzellen. Er besitzt eine Größe von 75 kd und ist ein endotheliales Protein (Lin et al., 2011). Besonders in Verbindung mit Magnetic activated cell sorting (MACS) ist STRO-1 ein aussagekräftiger Marker (Fawzy El-Sayed, Klingebiel, et al., 2016). MACS ist eine zeiteffiziente Methode zur Sortierung von Zellen. Mit Hilfe von spezifischen Antikörpern, in diesem Fall mit STRO-1 Antikörpern und

Microbeads, können die gewünschten Zellen magnetisch herausgefiltert werden (Miltyi, 2017). Zur weiteren Differenzierung lassen sich die Zellen in Unterscheidungsgruppen (Cluster of Differentiation (CD)) durch spezifische membrangebundene Glykoproteine, sogenannte CD-Moleküle, zuordnen. Für humane mesenchymale Stammzellen können bestimmte Marker in vorhanden (positiv) und nicht vorhanden (negativ) eingeteilt werden. So sollen die Expressionsprofile sowohl von CD45, dem Marker für hämatopoetische Zellen, als auch von CD34, dem Marker für hämatopoetische Stammzellen, negativ sein. CD14, ein Oberflächenprotein, welches auf Monozyten zu finden ist und als Toll-like-Co-Rezeptor fungiert, soll ebenfalls negativ gemessen werden (Wu et al., 2019). CD73 (engl. lymphocyte-vascular adhesions protein-2), eine 5'-Nucleotidase, muss dagegen positiv sein, um als aussagekräftiger Marker für MSCs zu gelten (Kolf et al., 2007).

Weitere CD-Moleküle, deren Expression positiv gemessen werden sollen, sind CD90, CD146 und CD105. CD90 (engl. Thymocyte differentiation antigen-1 (Thy-1)) ist ein Glykoprotein auf der Zelloberfläche. Es wird auf verschiedenen MSCs und hämatopoetischen Stammzellen (HSCs) exprimiert (Kisselbach et al., 2009). Wachstumsfaktoren, Zytokine, extrazelluläre Matrix-Komponenten und Entzündungsprozesse sowie Wundheilung werden von CD90 beeinflusst (Saalbach et al., 2000). CD146 ist ein Adhäsionsmolekül und ein Protein der Immunglobulin-Superfamilie, welche eine Gruppe von Oberflächenantigenen zusammenfasst, die von Immunglobulin ähnlichen Domänen geprägt ist (Alais et al., 2001; Shih, 1999). Bisher sind drei verschiedene Formen des CD146 näher bekannt: Zwei transmembrane Isoformen und eine lösliche Form, die im Plasma nachweisbar ist. CD146 steht im Zusammenhang mit Gefäßfunktionen, Angiogenese und Entzündungsprozessen. Zudem scheint CD146 einen möglichen Angriffspunkt in der Therapie von Gefäßerkrankungen dazustellen (Leroy et al., 2019). In einer Studie von Leroy et al. (2019) wird zudem darauf hingewiesen, dass das lösliche CD146 postischämisch eine neue Vaskularisation fördert und somit als Vorbehandlung in der regenerativen Medizin Anwendung finden könnte. Ein weiteres Cluster of Differentiation ist CD105, welches auch Endoglin genannt wird. Endoglin ist ein transmembranes Glykoprotein, welches auf aktivierten Endothelzellen exprimiert wird (Liu et al., 2021). CD105 wird als Marker bei verschiedenen Tumorerkrankungen diskutiert, da es das Zellwachstum beeinflusst und möglicherweise eine entscheidende Rolle in der Angiogenese von Tumoren spielt (Fonsatti & Maio, 2004; Liu et al., 2021).

Ein weiterer wichtiger Marker der MSCs ist die Erzeugung von koloniebildenden Einheiten (engl. Colony forming units (CFUs)) (Kolf et al., 2007). Einzelne Zellen werden dafür in geringer Dichte beispielsweise in Petrischalen eingebracht. Nach zwei bis drei Wochen können die Kolonien, jeweils von einer Zelle ausgehend, mit einer Färbung sichtbar gemacht werden. Diese Fähigkeit zu einer Koloniebildung wird als eine der prominentesten Fähigkeiten der MSCs angesehen (Friedenstein et al., 1974; Penforis & Pochampally, 2016).

CD-Molekül	Expressionsprofil auf MSC
CD14	negativ
CD34	negativ
CD45	negativ
CD73	positiv
CD90	positiv
CD105	positiv
CD146	positiv

Tabelle 1: Cluster of differentiation (CD) der mesenchymalen Stammzellen (MSC)

1.3. Toll-like-Rezeptoren (TLR)

1.3.1. Definition und Funktion

Toll-ähnliche Rezeptoren (engl. toll-like-receptors (TLRs)) werden unter anderem auf Makrophagen, Monozyten und Granulozyten exprimiert und spielen für das natürliche Immunsystem eine wichtige Rolle. So werden beispielsweise Bakterienbestandteile spezifisch an diesen Rezeptoren erkannt und leiten eine angeborene Reaktion des Abwehrsystems ein (Schmidt & Lang, 2007). Toll-like-Rezeptoren gehören zudem zu den „pattern recognition receptors“ (PRRs) und erkennen sogenannte „pathogen-associated molecular patterns“ (PAMPs) wie Bakterien, Viren, Pilze und Protozoen (Akira et al., 2006). Derzeit sind zehn verschiedene Toll-like-Rezeptoren beim Menschen bekannt (TLR1-10). Diese lassen sich anhand ihrer Lokalisation in extrazellulär, auf der Zelloberfläche auftretend, und intrazellulär einteilen. So befinden sich TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 extrazellulär, TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 dagegen intrazellulär (Kawai & Akira, 2010) (Tabelle 1). Jeder dieser TLRs hat – abhängig von seinen PAMPs und der daraufhin ausgelösten Immunreaktion – seine eigene konkrete Funktion (Akira et al., 2006).

TLR	Lokalisation	PAMPs-Agonist
1	extrazellulär	Triacyllipoprotein
2	extrazellulär	Lipoproteine, Lipoteichonsäure, Zymosan
3	intrazellulär	virale doppelsträngige RNA
4	extrazellulär	Lipopolysaccharide, Hitzeschockproteine
5	extrazellulär	Flagellin
6	extrazellulär	Lipoteichonsäure, Triacyllipoprotein, Zymosan
7	intrazellulär	virale einzelsträngige RNA

8	intrazellulär	virale einzelsträngige RNA
9	intrazellulär	unmethylierte CpG-DNA
10	extrazellulär	unbekannt

Tabelle 2: Toll-like-Rezeptoren und deren PAMPs aus Fawzy El-Sayed et al., 2018

1.3.2. Extrazelluläre Rezeptoren

TLR1, 2, 6 und 10 sind eng miteinander verwandt und bilden die TLR2-Subfamilie. TLR1 und TLR6 bilden mit TLR2 Heterodimere (Basith et al., 2012). In Form dieser Heterodimere sind TLR2-TLR1 in der Lage Triacyllipoproteine auf Gram-negativen Bakterien zu erkennen und proinflammatorische Zytokine zu exprimieren. Der TLR2-TLR6 Komplex erkennt hingegen Diacyllipoproteine und somit Gram-positive Bakterien und Mykoplasmen (Kawai & Akira, 2010). Auf der Oberfläche vieler Bakterien befinden sich Peptidoglykane, die von TLR2 gebunden und daraufhin Entzündungszellen aktiviert werden (Schmidt & Lang, 2007). Ein weiterer extrazellulärer Rezeptor, TLR4, wirkt zusammen mit CD14. LPS (Lipopolysaccharide), die auf Oberflächen von Bakterien exprimiert werden, werden von CD14 erkannt und gebunden. Daraufhin wird TLR4 von CD14 aktiviert und es werden verschiedene Entzündungsproteine und Zytokine freigesetzt. Durch diese Kaskade kann der wichtige Abwehrmechanismus des Immunsystems in Gang gesetzt werden, ohne den eine viel höhere Anfälligkeit für bestimmte Infektionskrankheiten bestehen würde (Schmidt & Lang, 2007). TLR5 unterstützt die Immunabwehr, indem es Flagellin von Gram-positiven und -negativen Bakterien erkennt und anschließend die Produktion des Tumor-nekrose-Faktor-alpha (TNF- α) und die Sekretion des proinflammatorischen Zytokin stimuliert (Hayashi et al., 2001) (Abbildung 1). Der Rezeptor TLR10 ist bis heute der am wenigsten erforschte TLR. In einer Studie von Lee et al. (2014) wird allerdings auf die Auffälligkeit der erhöhten Expression von TLR10 nach einer Influenzainfektion und einer anschließenden Zytokin-Expression hingewiesen. TLR10 spielt somit anscheinend als Sensor für virale Infektionen sowie für die Immunabwehr eine wichtige Rolle. Der Rezeptor kann einerseits proinflammatorische Zytokine induzieren, indem er homodimere mit sich selbst oder heterodimere mit beispielsweise TLR1 bildet. Andererseits kann er entzündungshemmend wirken, wenn er zusammen mit TLR2 exprimiert wird. TLR10 ist somit gegebenenfalls der einzige Rezeptor der Toll-like-Rezeptoren der entzündungshemmend wirken könnte (Su et al., 2021)

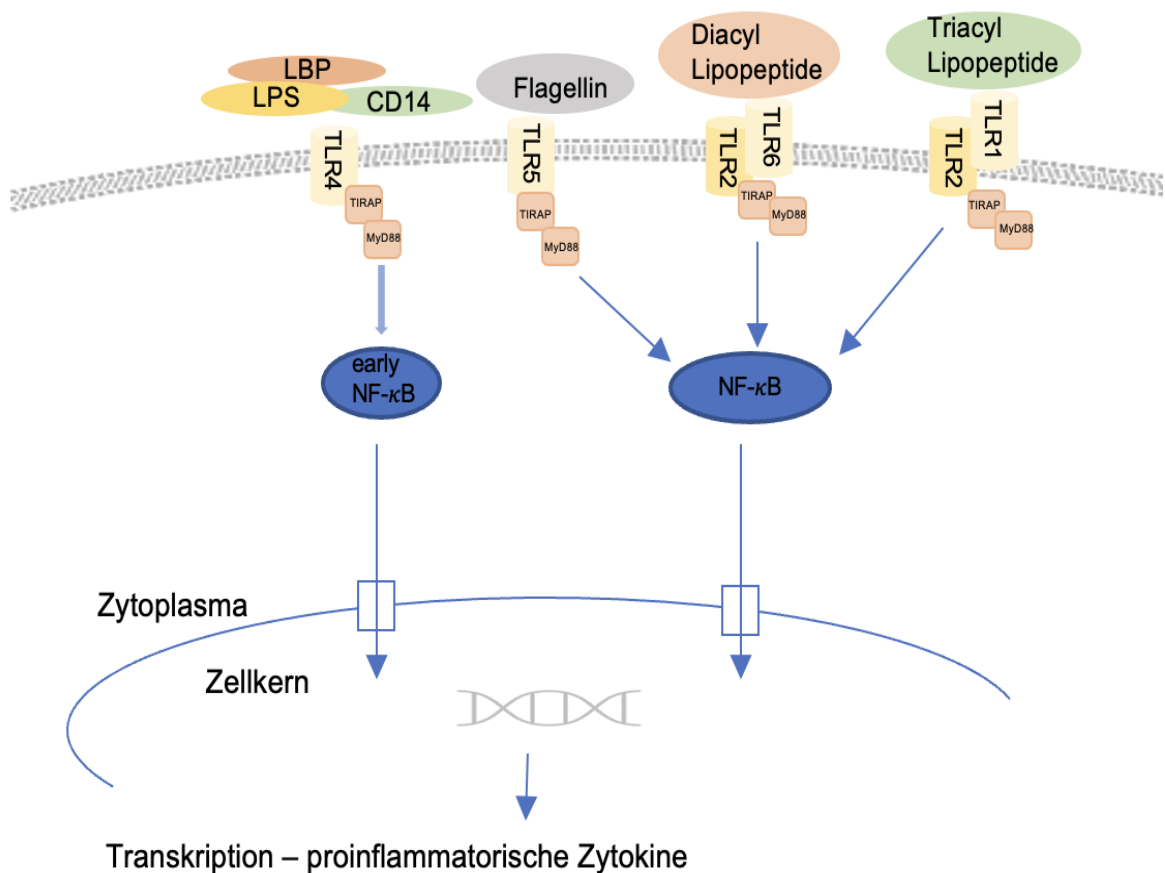


Abbildung 1: PAMP Erkennung durch TLRs an der Zelloberfläche (eigene Darstellung nach Fehrmann, 2021; Kawai & Akira, 2010)

1.3.3. Intrazelluläre Rezeptoren

Neben extrazellulären TLRs sind auch intrazelluläre TLRs vorhanden. Diese werden hauptsächlich auf endosomalen/lysosomalen Kompartimenten und dem Endoplasmatischen Retikulum exprimiert. Sie erkennen Nukleinsäuren, die vorher, beispielsweise durch Endozytose, in die Zelle aufgenommen wurden (Akira et al., 2006; Basith et al., 2012). Auch die intrazellulären TLRs besitzen individuelle Funktionen. TLR3 erkennt doppelsträngige Ribonukleinsäure (RNA), die während einer Infektion von RNA-Viren auftreten (Alexopoulou et al., 2001). Es induziert die Sekretion von Interferon Typ 1 und proinflammatorischen Zytokinen, die eine bedeutenden Rolle in der Abwehr von Virusinfektionen darstellen (Kawai & Akira, 2010). Ein TLR3 Defekt bringt anscheinend eine erhöhte Anfälligkeit für Herpes-simplex-Viren Typ 1 (HSV1) im zentralen Nervensystem (ZNS) mit sich (Zhang et al., 2007).

TLR7 und TLR8 erkennen einsträngige RNA, sind sich genetisch sehr ähnlich und werden beide auf Membranen von Endosomen exprimiert.

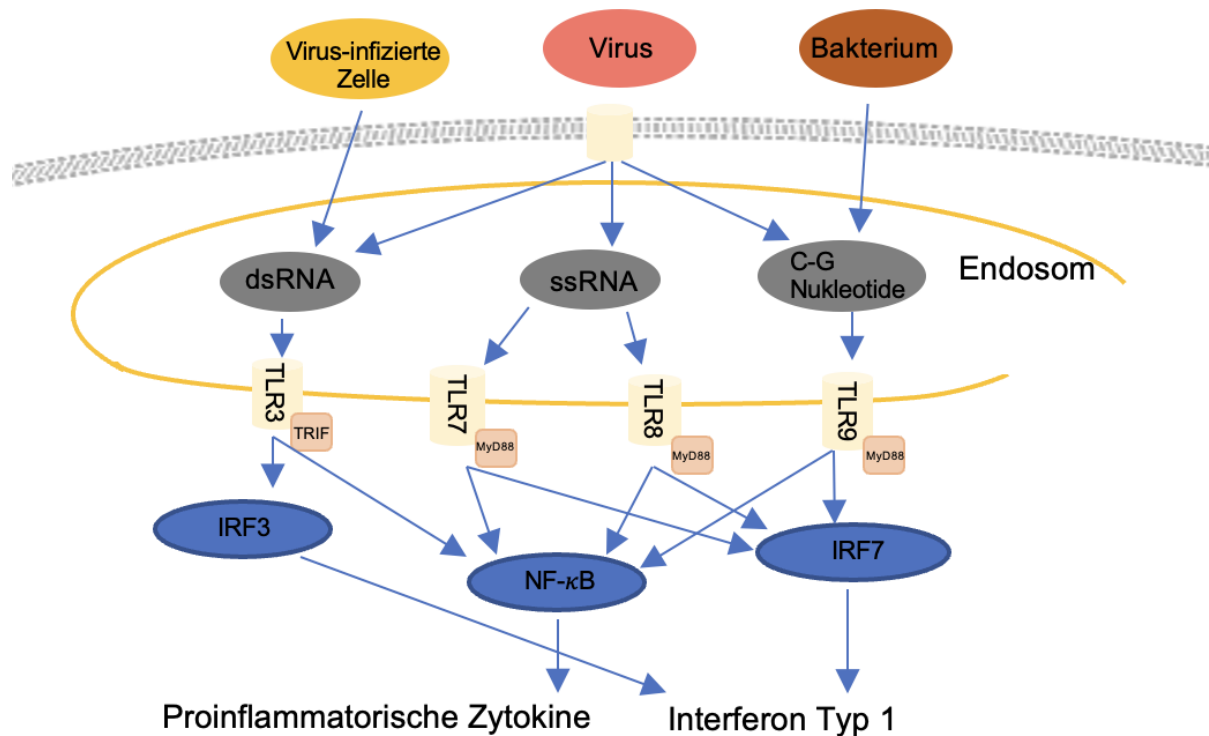


Abbildung 2: PAMP Erkennung durch intrazelluläre TLRs (eigene Darstellung nach Fehrmann, 2021; Kawai & Akira, 2010)

Viele behüllte Viren erreichen die Zelle über das Endosomale Kompartiment und können somit direkt erkannt werden (Akira et al., 2006). Sowohl Bakterien als auch bestimmte Viren können anhand ihrer DNA, speziell an unmethylierter CpG-Desoxyribonukleinsäure, von TLR9 erkannt werden (Akira et al., 2006; Kawai & Akira, 2010). Eine Besonderheit von TLR9 ist die Notwendigkeit einer proteolytischen Spaltung von TLR9 durch zelluläre Proteasen zur Aktivierung des Rezeptors für eine weitere Signaltransduktion mit anschließender Freisetzung von Interferon Typ 1 und proinflammatorischer Zytokine (Kawai & Akira, 2010) (Abbildung 2).

1.4. Zielsetzung der Studie

TLRs gehören zur angeborenen Immunabwehr und spielen eine wichtige Rolle in der Erkennung von Bakterien, Viren, Pilze und Protozoen. Außerdem sind sie ein wichtiger Teil des Entzündungsgeschehens im Körper (Akira et al., 2006). Die Untersuchung von Toll-like-Rezeptoren ist aus den beschriebenen Gründen in der gegenwärtigen Forschung ein hochaktuelles Thema. Folglich werden TLRs in zahlreichen medizinischen Fachgebieten erforscht.

Auch die Pulpa wird bakteriellen Angriffen ausgesetzt. Dabei ist der Übergang der reversiblen zur irreversiblen Pulpitis meist klinisch nicht exakt zu definieren. Momentan ist die Behandlung der Wahl bei einer irreversiblen Pulpitis eine Wurzelkanalbehandlung (Dammaschke et al., 2019). Verschiedene Studien geben 5-Jahres Erfolgsraten von Wurzelkanalbehandlungen von 75-90 % an (Asgary et al., 2015; Friedman et al., 2003). Einhergehend mit dieser Behandlung sind der Verlust des propriozeptiven Schutzmechanismus durch die Pulpa, der Substanzverlust des Zahnes und somit eine größere Frakturgefahr. Weitere mögliche Folgen sind zudem Zahnverfärbungen und eine erhöhte Kariesanfälligkeit (Dammaschke et al., 2019). Die Vitalerhaltung der Pulpa stellt somit eine hohe Priorität dar und eine ausführliche Diagnostik sollte durchgeführt werden.

Das Ziel dieser Untersuchung ist es, erstmalig Erkenntnisse über das Expressionsprofil der Toll-like-Rezeptoren von pulpalen Stammzellen aus Milchzähnen in entzündlichem und nicht entzündlichem Medium zum ersten Mal zu erlangen. Die Ergebnisse können einen wichtigen Beitrag zu neuen Therapie- und Regenerationsmöglichkeiten der Pulpa leisten.

2. Materialien und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Verbrauchsmaterialien

Medien und Chemikalien	Firma
Accutase	Biochrom, Berlin, Deutschland
Alcianblau	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Alcianblau 8GS	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Amphotericin	BioWest, Nuaillé, Frankreich
Aqua Dest	Fresenius Kabi, Langenhagen, Deutschland
autoMACS Rinsing Solution	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
BD Cytotfix/Cytoperm™	BD Biosciences, Fanklin Lakes, USA
Biocassettes	Bio-Optica, Mailand, Italien
Biofreeze	Biochrom, Berlin, Deutschland
Bio mold	Bio-Optica, Mailand, Italien
Biopsy pads	Bio-Optica, Mailand, Italien
Bovin Serum Albumin	Biochrom, Berlin, Deutschland
Differenzierungsmedium adipogen	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Differenzierungsmedium chondrogen	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Differenzierungsmedium osteogen	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Essigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
FACS-Puffer	PBS, 0,5-1,0% BSA, 0,1% Sodium Acid
FcR Blocking Reagent	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
fetales Kälberserum	Biochrom, Berlin, Deutschland
Formaldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glutamin	Lonza, Basel, Schweiz
Glutaraldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
Interferon-Gamma	Peprotec, Waltham, USA (lot 101227)
Interleukin-1 beta	Peprotec, Waltham, USA
Isopropanol	Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Kernechtrot	Waldeck, Münster, Deutschland
Kristallviolett färbung	Merck, Darmstadt, Deutschland
MACS BSA stock solution	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland

MACS Cell Separation Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
MACS-Puffer	PBS, 0,5mM EDTA, 0,5% BSA
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Methylethylketon	Behr Labortechnik, Düsseldorf, Deutschland
MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Minimum Essential Medium Eagle	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Oil Red O	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Paraffin	McCormick, Sparks, USA
PBS Dulbecco	Biochrom, Berlin, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin, Deutschland
QuantiTect® Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy® Protect Mini Kit (250)	Qiagen, Hilden, Deutschland
Sodium Acid	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Tumornekrosefaktor-alpha	Peptotec, Waltham, USA
Xylol	Büfa Chemie, Oldenburg, Deutschland

Tabelle 3: Medien und Chemikalien

2.1.2. CD-Antigene und Antikörper

Antigene/Antikörper	Firma
anti TLR1	eBioscience, San Diego, USA
anti TLR2	Enzo Life Sciences, Lörrach, Deutschland
anti TLR3	eBioscience, San Diego, USA
anti TLR4	Enzo Life Sciences, Lörrach, Deutschland
anti TLR5	R&D Systems, Minneapolis, USA
anti TLR6	BioLegend, San Diego, USA
anti TLR7	Perbio Science, Bonn, Deutschland
anti TLR8	Enzo Life Sciences, Lörrach, Deutschland
anti TLR9	eBioscience, San Diego, USA
anti TLR10	Acris Antibodies, Herford, Deutschland
anti-human APC CD45	BioLegend, San Diego, USA
anti-human FITC CD14	BioLegend, San Diego, USA
anti-human PE CD105	BioLegend, San Diego, USA
anti-human PE CD34	BioLegend, San Diego, USA
anti-human PE CD73	BioLegend, San Diego, USA

anti-human PE CD90	BioLegend, San Diego, USA
IgG2aAPC, κ Isotyp Ctrl	BioLegend, San Diego, USA
IgG2aFITC, κ Isotyp Ctrl	BioLegend, San Diego, USA
IgM Alexa 647	BioLegend, San Diego, USA
Mouse IgG1aPE, κ Isotyp Ctrl	BioLegend, San Diego, USA
Mouse IgG2aPE, κ Isotyp Ctrl	BioLegend, San Diego, USA
Rat IgG1 κ PE, Isotype Control	BioLegend, San Diego, USA
STRO-1 Alexa 647	BioLegend, San Diego, USA

Tabelle 4: Antigene und Antikörper

2.1.3. Primer

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

Tabelle 5: Primer

2.1.4. Geräte

Gerät	Firma
Axiovision HRc	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Brutschrank	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Easypet Pipette Dispenser	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Entwässerungsautomat TPC 15	Medite Medical, Burgdorf, Deutschland
FACS Calibur	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Inkubator, Hera Cell	Thermo Scientific, Waltham, USA
Light Cycler	Roche Life Science, Prenzberg, Deutschland
Microm	Thermo Scientific, Waltham, USA
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank, Herasafe	Thermo Scientific, Waltham, USA
Paraffinstreckbad	Medax, Neumünster, Deutschland
pH-Meter	WTW, Weilheim, Deutschland
Photometer	Thermo Scientific, Waltham, USA
Pipette 0, 1-2, 5µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipette 10µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipette 20-100µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipette 100-1000µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Rotamax	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Sartorius AC210S Waage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Spiegelreflexkamera	Canon, Tokio, Japan
Tissue Processor	Medite Medizintechnik, Burgdorf, Deutschland
TESS 99 Paraffineinbettssystem	Medite Medizintechnik, Burgdorf, Deutschland
Vacunsafe Comfort	IBS Integra Biosciences, Chur, Schweiz
Vakuklav 24	Melag, Berlin, Deutschland
Vortex Genie 2	Bender&Holbein, Bruchsal, Deutschland
Wasserbad	GFL, Burgwedel, Deutschland
Zeiss Axiovert 40C	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Tabelle 6: Geräte

2.1.5. Labormaterial

Material	Hersteller
Bio Cassette	Bio Optica, Mailand, Italien
Bio Pads	Bio Optica, Mailand, Italien
Biosphere Quality Tips (10µl)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Biosphere Quality Tips (100µl)	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Biosphere Quality Tips (100-1000µl)	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Eppendorf Tubes	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Falcon Röhrchen (50ml)	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Haftfolie für PCR-Platten	Thermo Scientific, Waltham, USA
Kryoröhrchen	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Membranfilterpapier	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Microtome Blade	PFM Medical, Köln, Deutschland
Neubauerzählkammer	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Objektträger	Thermo Scientific, Waltham, USA
Pasteurpipetten	Assistent, Sondheim v. d. Rhön, Deutschland
Petrischalen	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Röhren (5ml) für FACS	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten (10ml)	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten (25ml)	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Skalpell	Hu-Friedy, Frankfurt am Main, Deutschland
Zahnärztliche Pinzetten	Hu-Friedy, Frankfurt am Main, Deutschland
Zellkulturflaschen	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Zellschaber	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
6-Well-Platten	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
96-Well Hard Shell Platte	Roche, Mannheim, Deutschland

Tabelle 7: Labormaterial

2.2. Methoden

2.2.1. Gewebeentnahme

Bevor mit der Sammlung des Gewebes begonnen wurde, hat die Ethikkommission ihr Einverständnis für diese wissenschaftliche Tätigkeit gegeben (Genehmigungsnummer D 513/17). Zunächst wurden für diese Studie Milchzähne von 10 Patienten (n = 10) mit möglichst geringem Kariesbefall gesammelt, die aufgrund verschiedener Ursachen, wie Kieferorthopädie oder weiteren nicht erhaltungswürdigen Gründen der Zähne, extrahiert wurden. Die Zähne wurden direkt nach der Extraktion in je ein 50 ml Falcon Röhrchen (Sarstedt) in 15 ml Nährmedium für eine Stunde im Kühlschrank (4 °C) gelagert. Die folgenden Arbeitsschritte wurden unter der mikrobiologischen Sicherheitswerkbank Herasafe (Thermo Scientific) durchgeführt. Das Nährmedium wurde aus α -Minimum Essential Medium Eagle (Sigma - Aldrich), Penicillin (100 U/ml) (Biochrom), Streptomycin (100 μ g) (Biochrom), 1 % Amphotericin (BioWest), 5 ml Glutamin (Lonza) und 100 ml fetalem Kälberserum (FCS) (Biochrom) angesetzt.

Die Milchzähne wurden, in je eine Petrischale aufgeteilt (Sarstedt AG), vorsichtig mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) (Biochrom) und 70 % Alkohol gereinigt. Anheftendes Gewebe und Knochen wurde mit einem sterilen Skalpell (Hu-Friedy) entfernt. Nach der Reinigung wurde unter sterilen Bedingungen die Pulpa entfernt. Die Zähne wurden mechanisch aufgebrochen und mit sterilen Pinzetten (Hu-Friedy) und Skalpellen wurde die Pulpa entfernt.

2.2.2. Kultivierung des pulpalen Gewebes

Nach der Entfernung aus dem Pulpenkavum wurde die Pulpa mit einem Skalpell in ca. 1 mm³ große Stücke zerkleinert und mit auf 37 °C erwärmten Nährmedium benetzt. Je 3 Fragmente mit einem Abstand von ca. 5 cm wurden in eine 75 ml Kulturflasche (Sarstedt) eingebracht. Zur Anheftung der Pulpafragmente an der Plastikoberfläche blieben die Kulturflaschen unverschlossen für 10 Minuten unter der Sicherheitswerkbank. Daraufhin wurden 20 ml von 37 °C warmen Nährmedium vorsichtig in die Kulturflaschen pipettiert. Bei diesem Schritt musste besonders auf die Anhaftung der Pulpafragmente geachtet werden, damit diese sich nicht wieder ablösen. Die Flaschen wurden nun für eine Woche im Inkubator (Thermo Scientific) bei 37 °C und 5 % CO₂ belassen und möglichst wenig bewegt. Nach einer Woche wurden das Gewebe und die daraus wachsenden Zellen unter dem Mikroskop dokumentiert. Das Nährmedium und abgelöstes Gewebe wurden vorsichtig abgesaugt und 20 ml neues Nährmedium in die Flasche pipettiert. Jeden zweiten Tag wurde nun das Medium gewechselt.

2.2.3. Passagieren der Zellen

Die Zellen wurden bei jedem Mediumwechsel unter dem Mikroskop kontrolliert und bei einer Konfluenz von 80-85 % konnten die Zellen passagiert werden. Dafür wurde das Medium aus der Zellkulturflasche abgesaugt, zweimal 10 ml PBS zum Waschen der Zellen in die Flaschen pipettiert und abgesaugt. Anschließend wurden 15 ml einer Worksolution aus Accutase (Biochrom) und PBS (1:10) auf die Zellen gegeben und für 15 Minuten bei 37 °C in einem Inkubator gelagert. Danach wurde unter dem Mikroskop kontrolliert, ob die Zellen sich vollständig vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst haben. Die Zellsuspension wurde nun durch ein Strainer (Sieb) in ein 50 ml Falcon Röhrchen gegeben, mit 10 ml PBS nachgespült und bei 1700 UPM bei 37 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Supernatant wurde abgesaugt und die Zellen konnten nun für weitere Versuche benutzt werden.

2.2.4. Magnetic activated cell sorting (MACS)

Die passagierten Zellen konnten nun mit Hilfe des MACS Systems (Miltenyi Biotec) weiter sortiert werden. Hierfür wurden pro 10^7 Zellen 100 µl MACS Puffer mit 2 % frisch hinzugefügtem FCS, 20 µl anti IgGk (1:50 verdünnt), 20 µl Stro-1 Antikörper (1:50 verdünnt) (BioLegend) und 20 µl MicroBeads (Miltenyi Biotec) hinzugegeben und vorsichtig vermengt. Diese Falcon-Röhrchen wurden dann im Dunkeln für 15 Minuten bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. In dieser Zeit banden die Antikörper an den spezifischen Antigenen auf der Stammzelloberfläche. Anschließend wurde zweifach mehr PBS hinzugegeben, die Suspension gevortext und bei 17000 UPM bei 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Der MACS Versuchsaufbau wurde nun mit Alkohol gereinigt, mit Columns bestückt und mit 500 µl MACS-Puffer gespült. Währenddessen wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen mit 3 ml MACS-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde nun in eine mit ferromagnetischer Stahlwolle gefüllte Säule pipettiert, welche vorab innerhalb eines magnetischen Feldes positioniert wurde. Dadurch wurden die Zellen magnetisch sortiert. Die nicht markierten Zellen blieben nicht in der Stahlwolle hängen und konnten am Ende der Säule als MACS-negative Zellen aufgefangen werden. Die Säule wurde noch zweimal mit 500 µl MACS-Puffer gespült. Im Anschluss konnten die markierten Stammzellen, außerhalb des magnetischen Feldes, aus der Säule mit 1 ml MACS-Puffer mit einem dazugehörigen Stempel in ein 15 ml Tube gepresst werden. Diese Zellen wurden nun als MACS-positiv benannt. Der Vorgang des Sortierens wurde mit den MACS-positiven Zellen wiederholt, um ein sauberes Ergebnis zu erhalten. Die MACS-positiven Zellen (SHED) wurden nun mit 10 ml auf 37 °C erwärmtes Nährmedium vermengt und in neue Zellkulturflaschen mit 15 ml Nährmedium gegeben. Die Zellen

verblieben für eine Woche im Inkubator bei regelmäßiger Kontrolle unter dem Mikroskop. Die MACS-negativen Zellen wurden zentrifugiert (10 min., 1700 UPM, 4 °C) und eingefroren.

2.2.5. Einfrieren der Zellen

Die Möglichkeit des Einfrierens der Zellen ist von großem Nutzen, um Zellen für spätere Versuche zu erhalten. Dies ist zum Beispiel möglich, nachdem die Zellen passagiert wurden. Das Zellpellet wurde mit 1 ml Einfriermedium (Biofreeze, Biochrom) vermischt, in Kryoröhrchen (Sarstedt) pipettiert und bei -70 °C in einem Isopropanolbad gelagert.

2.2.6. Nachweis der typischen Merkmale von Stammzellen

2.2.6.1. Colony forming unit (CFU) assay

Um die Kolonie bildenden Fähigkeiten der Stammzellen darzustellen, wurde mit Hilfe einer Neubauzählkammer die Zellzahl bestimmt, um anschließend 5 Zellen/cm² auf einer Petrischale mit 10 ml Nährmedium zu kultivieren. Nun wurde für 12 Tage jeden dritten Tag das Medium gewechselt. Abschließend folgten die Fixation und Färbung. Hierfür wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit 2 ml kaltem 70 %igem Ethanol fixiert. Indem nun 800 µl Kristallviolett-Lösung (3g/Liter) für 10 Minuten auf die Petrischalen gegeben wurde und anschließend mit destilliertem Wasser die Lösung ausgespült wurde, konnten die Kolonien sichtbar gemacht werden.

2.2.6.2. Differenzierung der SHED mit Stimulationsmedium

Für die Differenzierung der Zellen in Osteozyten, Adipozyten und Chondrozyten wurden die Stammzellen wie in 2.2.3. erläutert passagiert. Die Zellen wurden nun mit verschiedenen Stimulationsmedien von PromoCell individuell stimuliert und anschließend gefärbt.

2.2.6.3. Osteogene Differenzierung

Für die osteogene Differenzierung wurden die Zellen in 12-Well Platten kultiviert und bei einer Konfluenz von 80 % wurde mit der Stimulation mit 2 ml osteogenem Differenzierungsmedium begonnen. Als Kontrolle wurde eine Reihe mit Nährmedium und ohne Differenzierungsmedium verwendet. Das Medium wurde dreimal die Woche für 12 Tage gewechselt. Anschließend

konnte mit einer Alzarin-Rot-Lösung (1 g auf 50 ml destilliertem Wasser, pH 4,1-4,2) gefärbt werden. Die Wells wurden zweimal mit PBS gewaschen und mit gekühltem 70 %igem Ethanol fixiert. Die Alzarin-Rot-Lösung wurde auf die Zellen gegeben und nach 5 Minuten wurde die überschüssige Farbe mit destilliertem Wasser abgespült.

2.2.6.4. Adipogene Differenzierung

Für die adipogene Differenzierung fand ebenfalls die Kultivierung in 12-Well Platten mit zwei Versuchsreihen statt. Es wurde eine Reihe mit adipogenem Differenzierungsmedium und eine Kontrollreihe mit Nährmedium durchgeführt. Die Medien wurden dreimal die Woche für 14 Tage gewechselt und wurden abschließend mit Oil-Red-O-Lösung angefärbt. Die Zellen wurden hierfür zweimal mit PBS gewaschen und mit 60 % Isopropanol (Fisher BioReagents) für 5 Minuten fixiert. Die Farbe wurde mit 125 mg Oil Red (Sigma-Aldrich), 25 ml Isopropanol, 10 ml destilliertem Wasser plus 15 ml Oil-Red-O angesetzt, 10 Minuten bei 1700 UPM zentrifugiert und durch Membranpapier (Sartorius) filtriert. Diese Lösung wurde für 10 Minuten auf die 12-Well Platten gegeben und die Farbüberschüsse wurden mit destilliertem Wasser abgewaschen. Nun konnten die Lipidtröpfchen unter dem Mikroskop begutachtet und mit der Mikroskopkamera festgehalten werden.

2.2.6.5. Chondrogene Differenzierung

Für die chondrogene Differenzierung wurden die Stammzellen einer Zellkulturflasche in Eppendorf-Röhrchen überführt. Anschließend wurde für 21 Tage chondrogenes Differenzierungsmedium beziehungsweise Nährmedium für die Kontrollgruppe hinzugegeben und alle drei Tage nach Zentrifugation gewechselt. Das nun entstandene Zellpellet wurde mit einem Glutaraldehyd/Formaldehydgemisch (4 ml Glutaraldehyd 25 %, 10 ml Formaldehyd 37 %, 86 ml Phosphatpuffer pH 7,4) für 24 h im Kühlschrank fixiert. Das Fixiermittel wurde fünfmal mit PBS ausgewaschen und die Proben wurden für die Paraffineinbettung vorbereitet. Jede Probe wurde in eine Biokassette (Bio-optica) zwischen zwei Unterlagen aus Polyurethan platziert. Die Kassetten wurden in den Entwässerungsautomaten TPC 15 DUO (Medite) eingebracht, nach einer Zwischenlagerung in 70 % Ethanol startete der Automat mit der Entwässerung für 24 h und nach Ablauf der Zeit endete das Programm in flüssigem, 60 °C warmen Paraffin. Danach konnten die Biokassetten und die Unterlagen entfernt werden sowie das gelbliche Pellet mit einer Präpariernadel entnommen werden. Das Pellet wurde in einer Edelstahlform mit flüssigem Wachs überschichtet und auf einer Kühlplatte abgekühlt. Daraufhin folgte das Schneiden des Paraffinblockes mit Hilfe des Messers Feather N35H in

einer Schnittdicke von 5-10µm. Die Schnitte wurden auf Objektträger gebracht und für 12 h in Brutschrank bei 37 °C getrocknet. Abschließend wurden die Präparate mit Alcianblau (Roth) (1 % Alcianblau in 3 % Essigsäure) und Kernechtrot (Waldeck) als Gegenfärbung gefärbt.

2.2.6.6. Ermittlung SHED-spezifischer Oberflächenantigene mit der Durchflusszytometrie

Für die Messung der spezifischen Oberflächenantigene der SHED wurden die Zellen aus der Zellkulturflasche mittels Accutase gelöst und durch einen Cell-Strainer in 50 ml Falcon-Tubes filtriert. Nach Zentrifugation und Resuspension in 700 µl PBS wurde 7 µl Viability Fixable Dye hinzugeben, gevortext und die Proben für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 1 ml PEB-Puffer (MACS BSA stock solution, autoMACS rinsing solution 1:20) hinzugegeben, zentrifugiert, der Supernatant abgesaugt und in 900 µl PBS resuspendiert. 45 µl FcR Blocking Reagent (Milteny Biotec) wurde zu den Zellen hinzugegeben und es wurden je 100 µl der Suspension in 8 FACS-Röhrchen pipettiert. Die Antikörper (s. Tabelle 8) wurden hinzugegeben und für 30 Minuten bei 4 °C im Dunkeln inkubiert.

Probe	Antikörper		
1	CD14 (FITC) (2µl)	CD146 (PE) (10µl)	CD45 (APC) (10µl)
2	CD90 (FITC) (2µl)	CD73 (PE) (2µl)	IgG2a (APC) (10µl)
3	STRO-1 (PE) (5µl)	CD105 (FITC) (2µl)	
4	CD34 (PE) (2µl)		
5	IgG2a (PE) (20µl)		
6	IgG1 (PE) (20µl)		
7	REA Control (FITC) (2µl)	IgM (PE) (5µl)	
8	REA Control (PE) (2µl)		

Tabelle 8: Protokoll CD-Marker FACS

Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal mit 1ml PBS gewaschen, zentrifugiert, in 150 µl Paraformaldehyd (4 %) resuspendiert und auf eine 96-Well-Platte pipettiert. Die Zellen konnten nun für die Fluoreszenz aktivierte Zell Sortierung verwendet werden (engl. Fluorescence activated cell sorting, FACS) mittels FACSCalibur E6370 und der Software FACSCComp 5.1.1.

2.2.7. Ribonukleinsäure (RNA) Extraktion

Für die RNA-Extraktion wurden die Stammzellen in 6 Well-Platten kultiviert, bei einer Konfluenz von 80 % wurde von jedem Patienten je ein Well für 24 h mit Entzündungsmedium stimuliert und ein Well weiterhin mit Nährmedium benetzt. Für das Entzündungsmedium wurde zu dem angesetzten Nährmedium 1 ng/ml Interleukin-1 beta (IL-1 β), 10 ng/ml Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) und 100 ng/ml Interferon-Gamma (IFN- γ) von der Firma Peprotec hinzugefügt. Anschließend wurde der Versuch mit Hilfe des RNeasy Mini Kit (Qiagen) durchgeführt. Es wurde zweimal mit PBS gespült und 250 μ l Lysis Puffer (1 ml RLT + 10 μ l β -mercaptoethanol) hinzugefügt. Die Zellen wurden nun mit einem Scraper von den Well-Platten gelöst und es wurde 70 % Ethanol hinzugegeben. Anschließend wurde die Suspension in Zentrifugenröhrchen mit integriertem Filter bei 10000 UPM für 20 Sekunden zentrifugiert. Die Elution wurde verworfen und 700 μ l RW1 hinzu pipettiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 10000 UPM für 20 Sekunden wurde die Elution wieder verworfen und 500 μ l RPE-Puffer hinzugegeben. Nach zwei weiteren Zentrifugationsdurchläufen wurden die „spin columns“ in neue 1,5 ml Röhrchen überführt und 25 μ l RNase freies Wasser hinzugegeben. Es folgte eine weitere Zentrifugation der Röhrchen bei 10000 UPM für eine Minute.

2.2.7.1. RNA-Messung

Die Bestimmung der RNA-Menge wurde photometrisch mit Hilfe der „ μ Drop Plate“ (Thermo Scientific) durchgeführt. Es wurden je 2 μ l der zuvor gewonnenen Suspension mit RNA auf die Platte gebracht und bei 260 bzw. 320 nm die Absorption im Photometer (Thermo Scientific) gemessen. Die Konzentration c [μ g/ml] der RNA wurde anschließend mit folgender Formel bestimmt.

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

2.2.8. cDNA-Synthese

Die cDNA wurde aus der vorher gewonnenen RNA mittels des „Quanti Tect Reverse Transcription Kit“ (Qiagen) hergestellt. Die RNA (<1 μ g RNA/Probe) wurde vor dem Gebrauch auf Eis gelagert. Pro Probe wurde, zur Elimination von eventuell vorhandener genomischer DNA, 2 μ l „gDNA Wipeout Buffer“ auf 8 μ l RNA und 4 μ l RNA-freies Wasser in PCR-Röhrchen pipettiert, für zwei Minuten bei 42 °C inkubiert und sofort auf Eis gelegt. Anschließend wurde der Reverse Transcriptase Master Mix angesetzt, bestehen aus: 4 μ l „RT-Buffer“, 1 μ l „RT Primer Mix“ und 1 μ l „Reverse Transkription Quantiscript“. Das Gemisch des „Wipeout Buffer“

und der Master Mix wurden vermengt. Es folgte eine Inkubation für 15 Minuten bei 42 °C und weitere drei Minuten bei 95 °C zur Deaktivierung der reversen Transkriptase.

2.2.9. Quantitative Polymerase-Chain-Reaction (qPCR)

Die Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion wurde mit dem Light Cycler™ (96 Roche) durchgeführt. Es wurde nach den Herstellerangaben vorgegangen und als Housekeeping Gen wurde das Phosphoglycerat Kinase 1 Gen (PGK1) verwendet. Pro Probe wurde 10 µl „Fast Start-DNA Probes Master“, 4 µl RNase-freies Wasser, 1 µl Primer und 5 µl cDNA vermengt. Zusätzlich wurde je eine Probe no-RT und eine Probe DNase-freies Wasser verwendet. Es wurden je 20 µl in eine 96-Well hard shell PCR-Platte (Roche) pipettiert, welche anschließend mit einer Folie (Thermo Fisher Scientific) verschlossen wurde. Die Platte wurde in den Light-Cycler eingebracht und folgendes Programm wurde gestartet (Tabelle 9):

		Dauer (Sekunden)	Temperatur (°C)	Zyklenanzahl
I. Vorinkubation		600	95	1
II. Amplifikation	1. Denaturierung	10	95	40
	2. Annealing	30	60	
	3. Elongation	1	72	
III. Abkühlung		30	37	1

Tabelle 9: Light Cycler™ Programm zur qPCR

2.2.10. Extrazelluläre FACS-Analyse

Die Extrazelluläre FACS-Analyse wurde durchgeführt, um auch auf Proteinebene ein Profil der TLR 1-10 Expression von SHED in entzündlichem und nicht entzündlichem Medium darzustellen. Die Zellen wurden wie unter 2.2.6.6. beschrieben passagiert und es wurde „Viability Staining“ durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen in 700 µl PBS resuspendiert, 350 µl FcR Blocking Reagent hinzugeben und auf FACS-Röhrchen aufgeteilt. Die Antikörper wurden, wie in Tabelle 10 aufgelistet, hinzugegeben und bei 4 °C für 30 Minuten im Dunklen inkubiert. Die Proben wurden zweimal mit 1ml PBS gewaschen, bei 17000 UPM für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert und der Supernatant verworfen. Abschließend wurde das Zellpellet in 150 µl Paraformaldehyd (4 %) resuspendiert. Es folgte die Auswertung mit FACSCalibur E6370 und der FACSCComp 5.1.1 Software.

Probe	Antikörper
1	Anti TLR1 PE (5 µl) Anti TLR2 FITC (5 µl)
2	Mouse IgG1 PE (20 µl) Mouse IgG2a FITC (10 µl)
3	Anti TLR4 FITC (1 µl) Anti TLR10 PE (5 µl)
4	Mouse IgG2a FITC (20 µl) Mouse IgG1 PE (5 µl)
5	Anti TLR5 Alexa Fluor488 (5 µl) Anti TLR6 PE (5 µl)
6	Alexa Fluor488 conj. Isotype CTRL (5 µl) IgG1 k PE, Isotype Control (5 µl)

Tabelle 10: Versuchsprotokoll der extrazellulären TLR FACS-Analyse

2.2.11. Intrazelluläre FACS-Analyse

Für die Analyse der TLR-Expression intrazellulär wurde die Zellwand für markierte Antikörper permeabel gemacht. Nach Passagierung und „Staining“, wie unter 2.2.6.6. beschrieben, erfolgte die Permeabilisierung mit dem Cytotfix/Cytoperm™ Kit (Becton Dickinson) wie vom Hersteller vorgegeben. Anschließend wurde zweimal mit je 1ml „Wash Buffer“ gewaschen, zentrifugiert (1700 UPM, 10 Minuten, 4 °C) und der Supernatant abgesaugt. Nach der Resuspendierung in 400 µl „Wash Buffer“ wurden die Proben in die FACS-Röhrchen pipettiert und die Antikörper (s. Tabelle 11) hinzugegeben. Es folgte die Inkubation für 30 Minuten bei 4 °C im Dunklen und zweimaliges Waschen mit „Wash Buffer“. Nach erneuter Zentrifugation wurde abschließend in 150 µl Paraformaldehyd (4 %) resuspendiert.

Probe	Antikörper
1	Rat IgG1k PE (2,5 µl) (1:10 verdünnt mit Aqua dest.)
2	Rat IgG1k PE (5 µl)
3	Anti TLR3 PE (5 µl)
4	Anti TLR7 PE (1 µl)
5	Anti TLR8 PE (8 µl)
6	Mouse IgG2a k PE (5 µl)
7	Anti TLR9 PE (5 µl)

Tabelle 11: Versuchsprotokoll der intrazellulären TLR FACS-Analyse

2.2.12. Statistische Analyse

Für die statistische Auswertung wurde zu Beginn mittels Shapiro-Wilk-Test auf eine Normalverteilung der Daten hin überprüft. Da die Daten nicht normal verteilt waren, wurde zur Analyse der unterschiedlichen TLR-Expression auf Protein und mRNA- Ebene von SHED im entzündlichen und nicht entzündlichen Medium der verteilungsfreie Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test verwendet. Hierfür wurde die Software SPSS (SPSS Software Version 27, SPSS, Chicago, IL, USA) genutzt und das Signifikanzlevel auf $p = 0.05$ gesetzt.

3. Ergebnisse

3.1. Gewinnung und Kultivierung pulpaler Zellen

Nach schonender Entfernung der Pulpa (Abb. 3) und der erfolgreichen Adhäsion der Gewebefragmente der Pulpa wuchsen nach ungefähr einer Woche die Zellen aus dem Gewebestück. Das radiäre Wachstum um das Gewebestück ließ sich Mikroskopisch festhalten (Abb. 4).



Abbildung 3: Aufgebrochener Zahn mit entfernter Pulpa

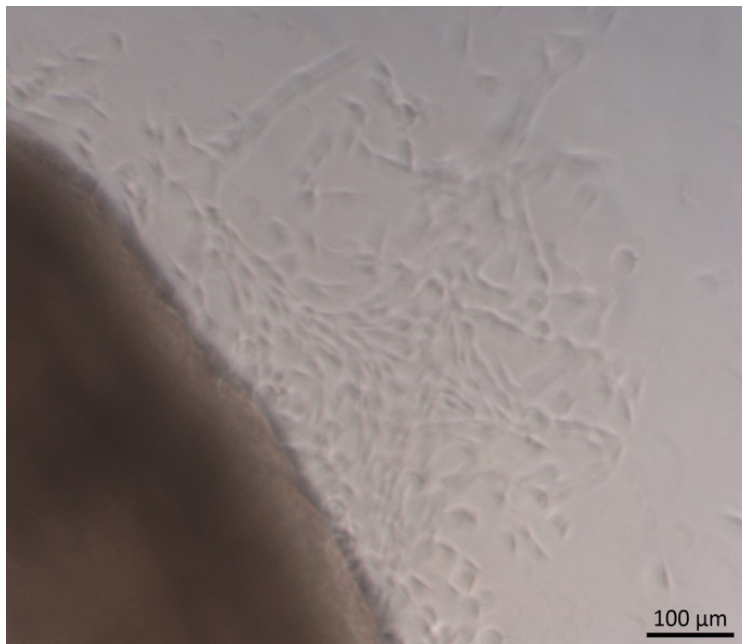


Abbildung 4: Gewebefragment und auswachsende Zellen

3.2. Nachweis der Stammzeleigenschaften

3.2.1. Anheftung am Plastikboden der Nährmediumflasche

In Abbildung 5 sind die adhärenenten Zellen an der Plastikoberfläche der Zellkulturflaschen nach Nährmediumwechsel sichtbar. Nicht angeheftete Zellen wurden beim Mediumwechsel und Waschung mit PBS ausgespült.

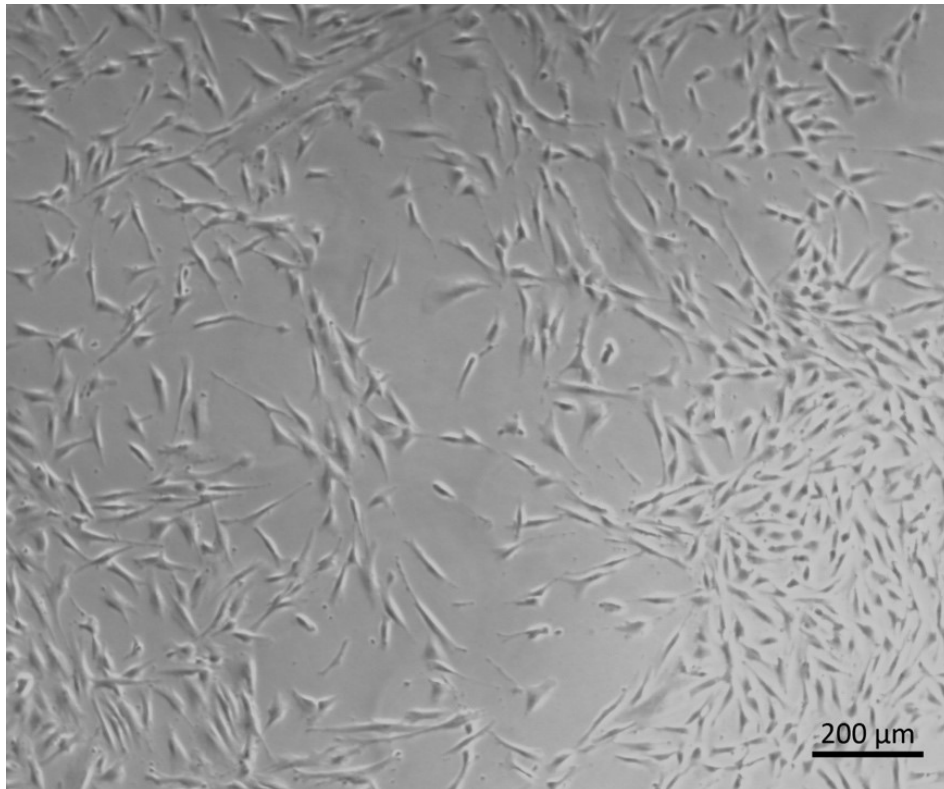


Abbildung 5: Adhärenente Zellen an Zellkulturflasche (2. Woche)

3.2.2. Colony forming units (CFU)

Die Koloniebildung der Stammzellen wurde nach zwölf Tagen durch eine Färbung sichtbar gemacht (Abb. 6).

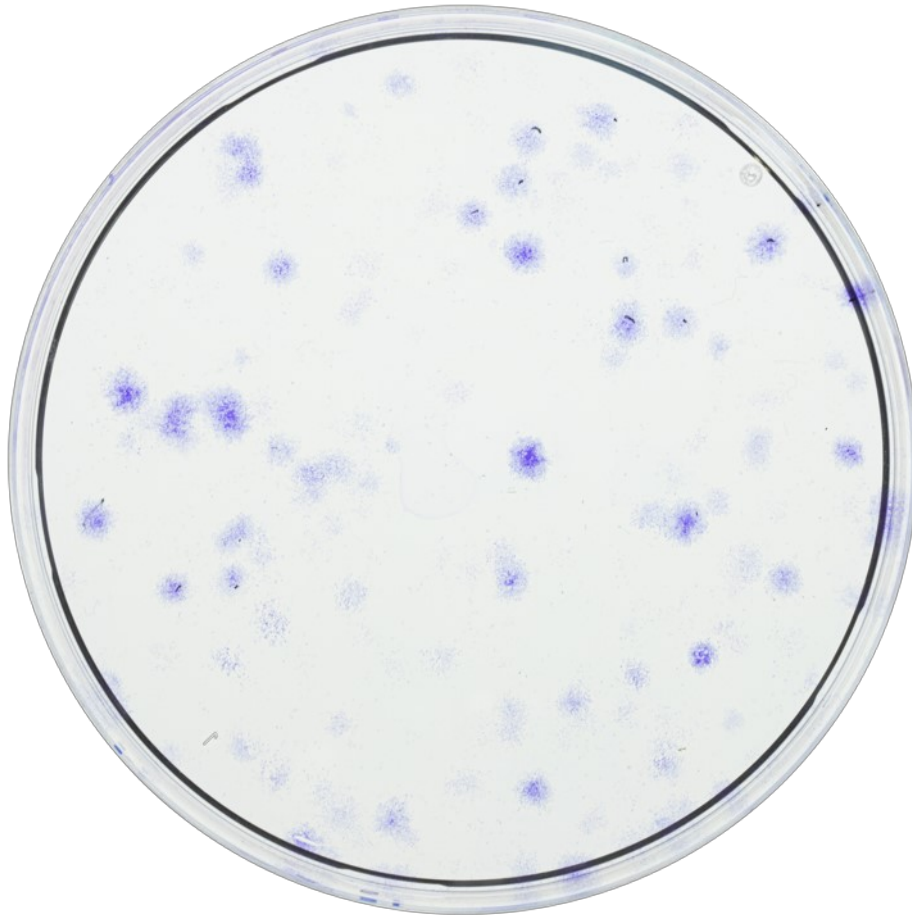


Abbildung 6: Koloniebildung der SHED nach Färbung mit Kristallviolett-Lösung

3.2.3. Differenzierung der SHED

Nach Stimulation mit Osteogenem Stimulationsmedium konnten kalzifizierte Bereiche mit Alzarin-Rot angefärbt werden. Somit konnte das osteogene Differenzierungspotential der Stammzellen dargestellt werden (Abb. 7). Im Vergleich wurde eine Kontrollgruppe ebenfalls angefärbt, die im vorherigen Verlauf kein Stimulationsmedium bekommen hatte. Hier waren keine kalzifizierten Bereiche nachweisbar (Abb. 8).

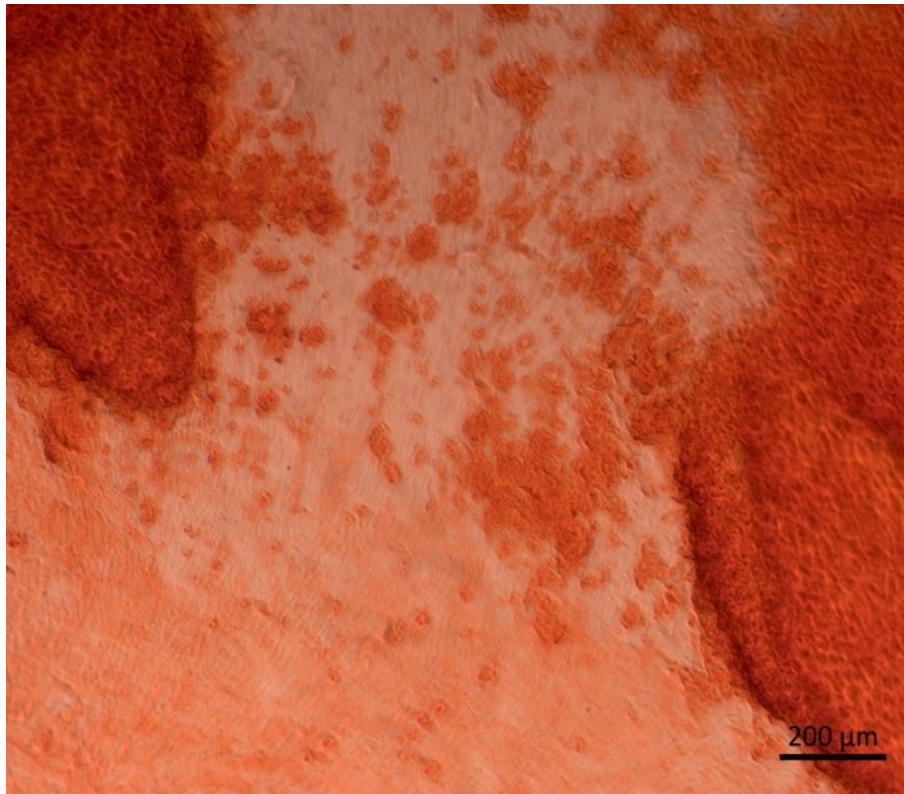


Abbildung 7: Osteogene Differenzierung – Färbung: Alizarin Rot

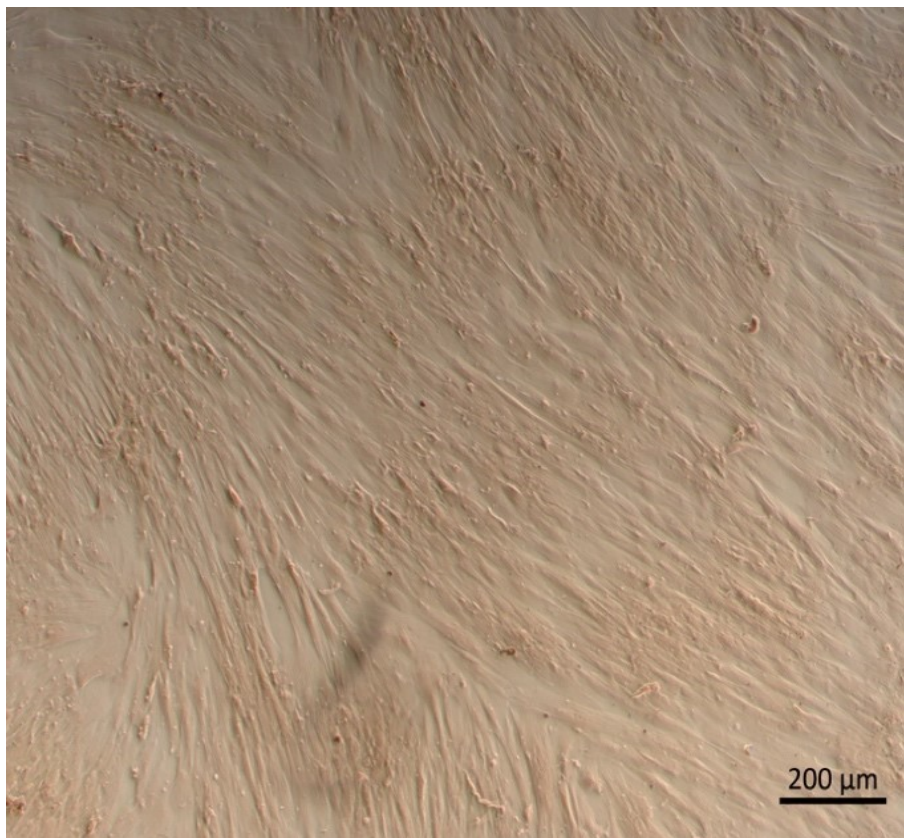


Abbildung 8: Kontrolle – Färbung: Alizarin Rot

Für den Nachweis der adipogenen Differenzierung konnten, nach Kultivierung der Stammzellen mit adipogenem Stimulationsmedium und Färbung mit Oil-Red-O-Lösung, Lipidtröpfchen nachgewiesen werden. Somit konnte das adipogene Differenzierungspotential der SHED dargestellt werden (Abb. 9). In der Kontrollgruppe, ohne adipogenem Stimulationsmedium, konnten durch die Färbung keine Lipidtröpfchen aufgezeigt werden (Abb. 10).

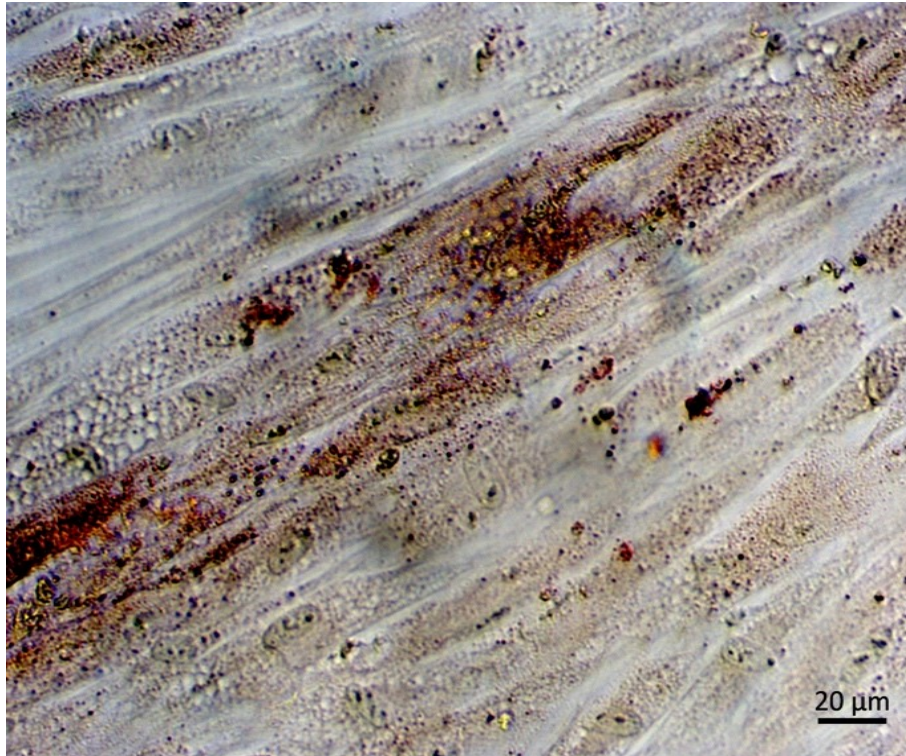


Abbildung 9: Adipogene Differenzierung – Färbung: Oil-Red-O-Lösung

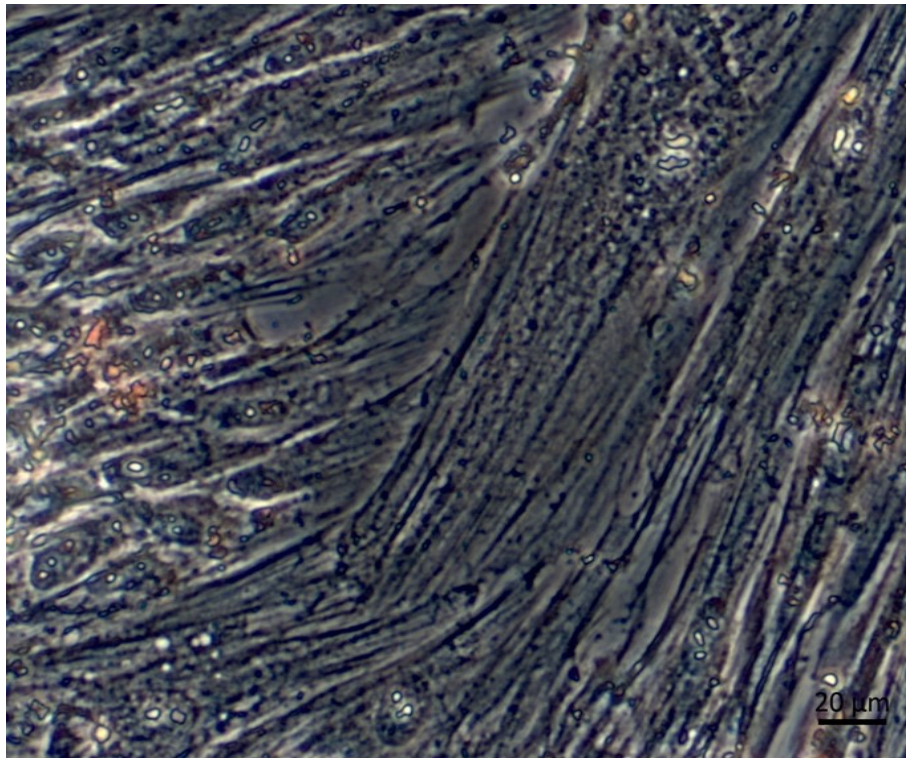


Abbildung 10: Kontrolle – Färbung: Oil-Red-O-Lösung

Nach Stimulation der SHED mit chondrogenem Differenzierungsmedium und Färbung mit Alcianblau und Kernechtrot konnte die Bildung von Glukosaminoglykanen aufgezeigt werden (Abb. 11). Dies stellt somit die chondrogene Differenzierungsfähigkeit der SHED bildlich dar. In der Kontrollgruppe ohne Differenzierungsmedium ist eine deutlich geringere Anfärbung sowie eine weniger homogene Form des Zellpellets sichtbar (Abb. 12).

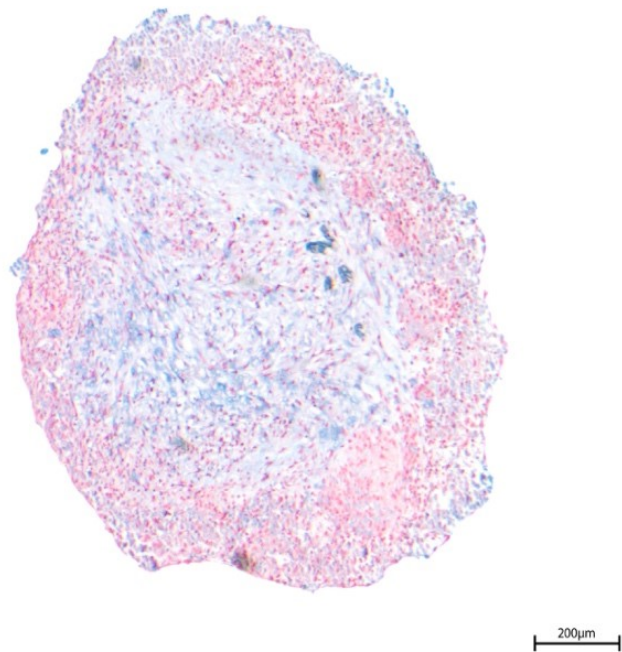


Abbildung 11: Chondrogene Differenzierung – Färbung: Alcianblau und Kernechtrot

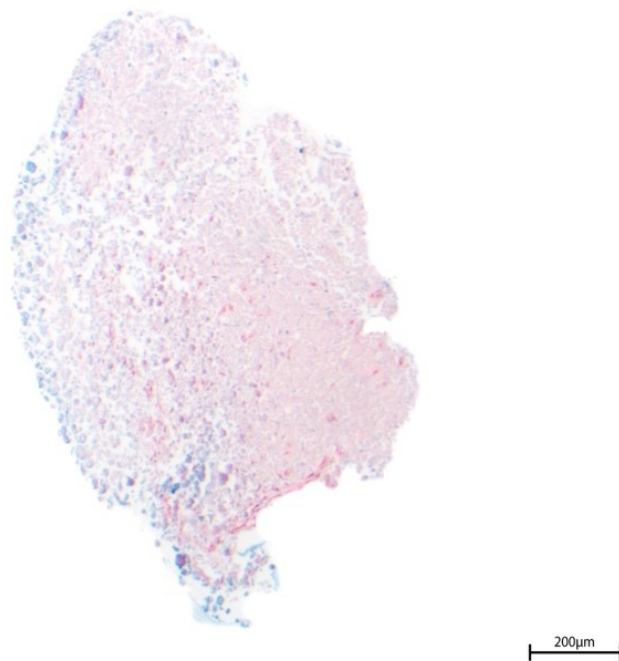


Abbildung 12: Kontrolle – Färbung: Alcianblau und Kernechtrot

3.2.4. Nachweis Stammzell-spezifischer Oberflächenantigene

Mit Hilfe der FACS-Analyse wurde die Expression der CD-Oberflächenantigene auf den SHED dargestellt.

Gemessen wurde eine erhöhte Expression der MSCs-Marker CD73, CD90, CD105 und CD146 an der Zelloberfläche (Abb. 14). CD14, CD34 und CD45 wiesen dagegen keine oder eine sehr geringe Expression auf (Abb. 13).

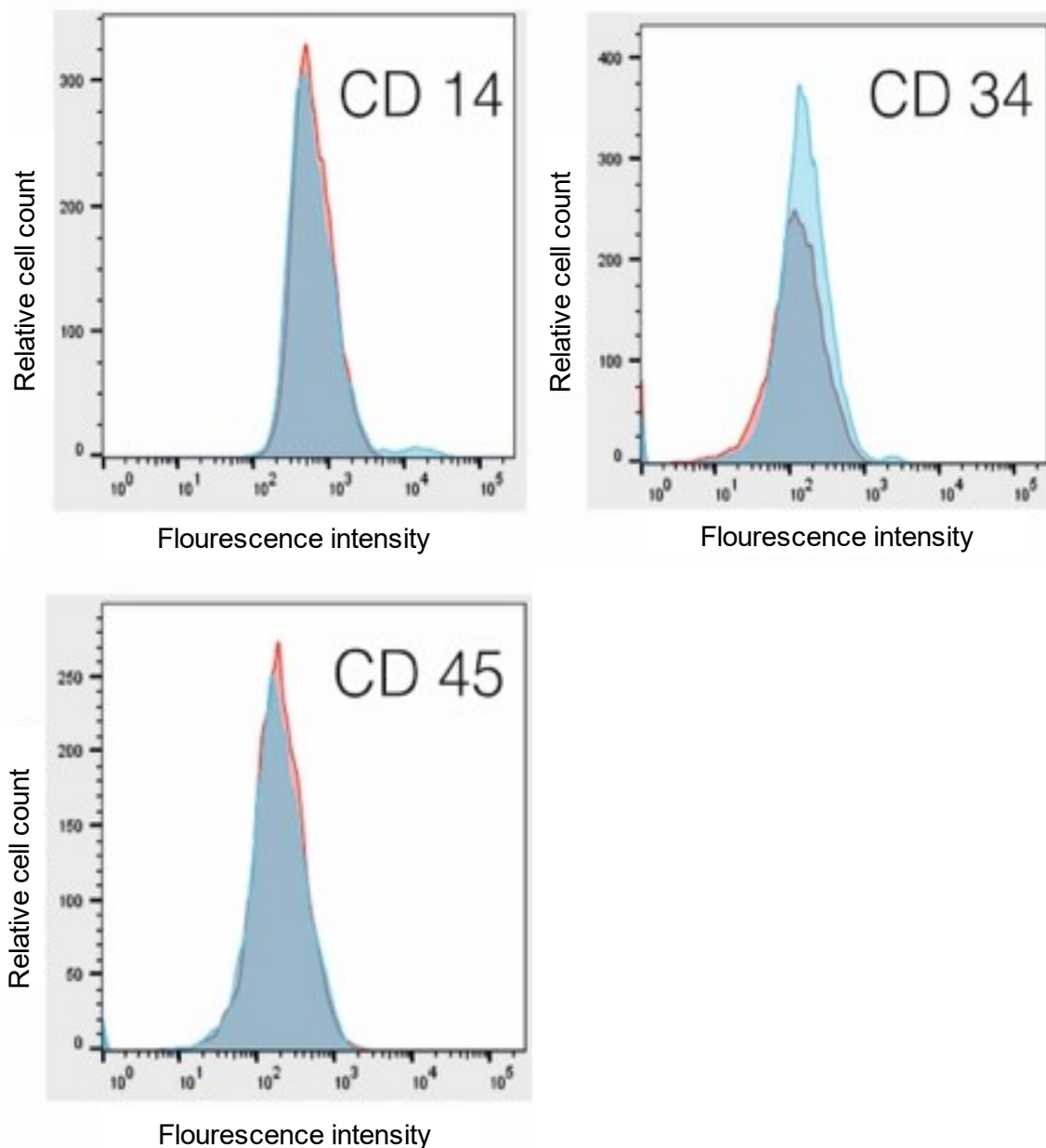


Abbildung 13: FACS-Analyse der negativen CD-Oberflächenantigene von SHED
x-Achse: Fluoreszenzintensität, y-Achse: relative Zellzahl, blaue Kurve: Isotypkontrolle

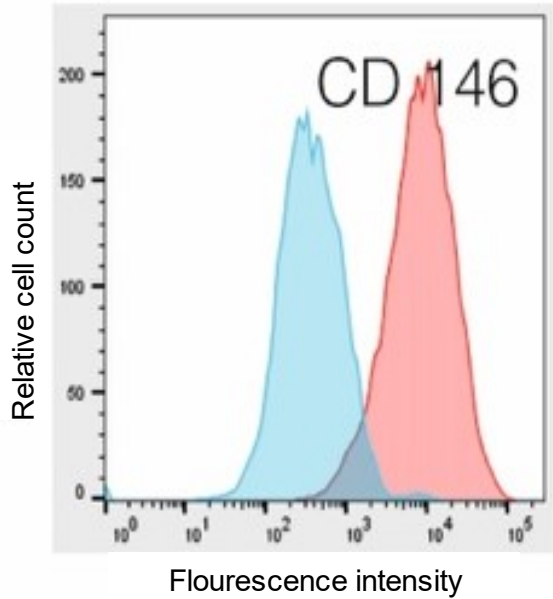
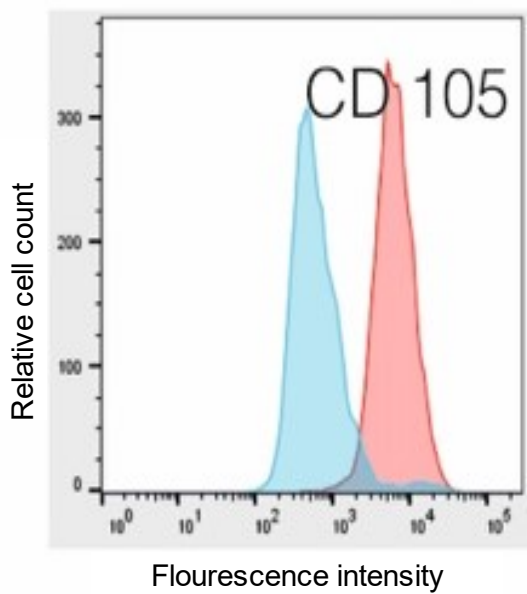
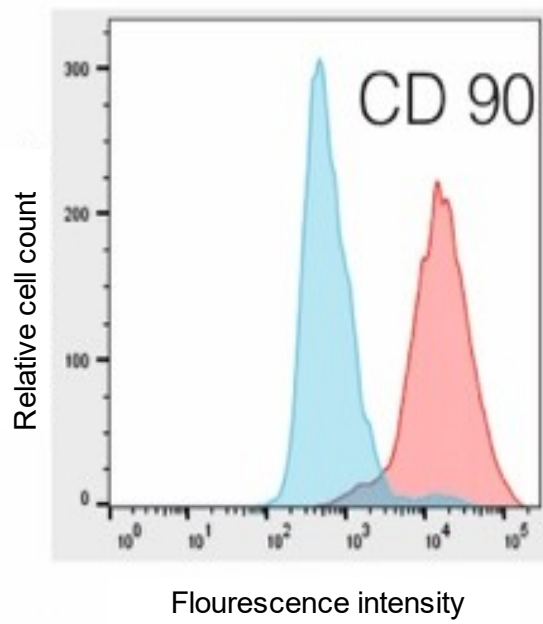
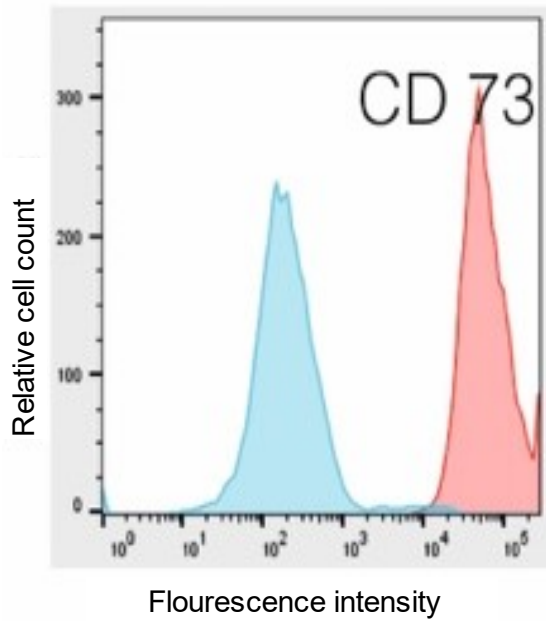
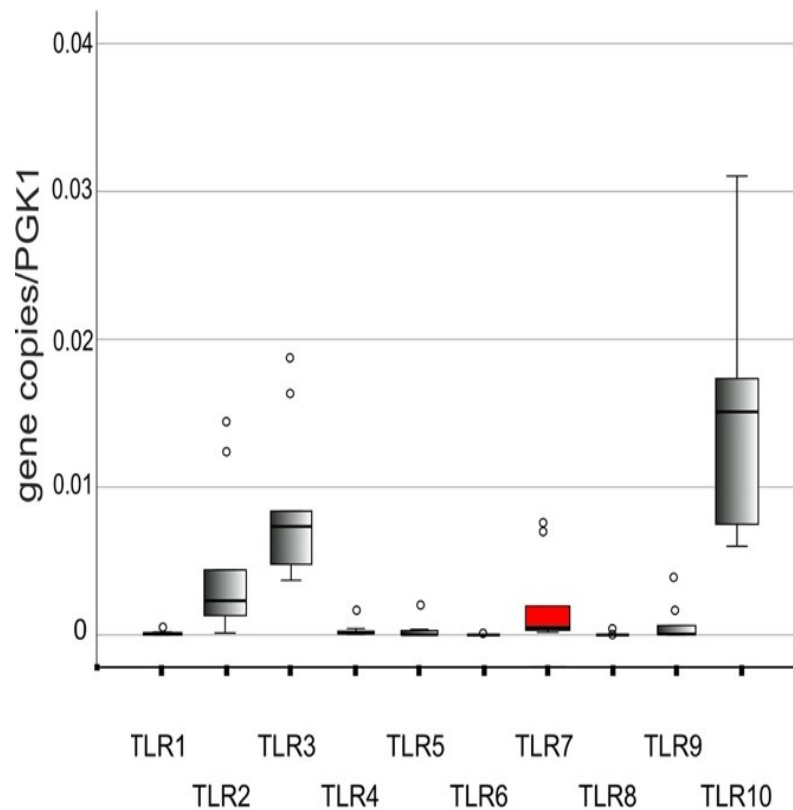


Abbildung 14: FACS-Analyse der positiven CD-Oberflächenantigene von SHED
 x-Achse: Fluoreszenzintensität, y-Achse: relative Zellzahl, blaue Kurve: Isotypkontrolle

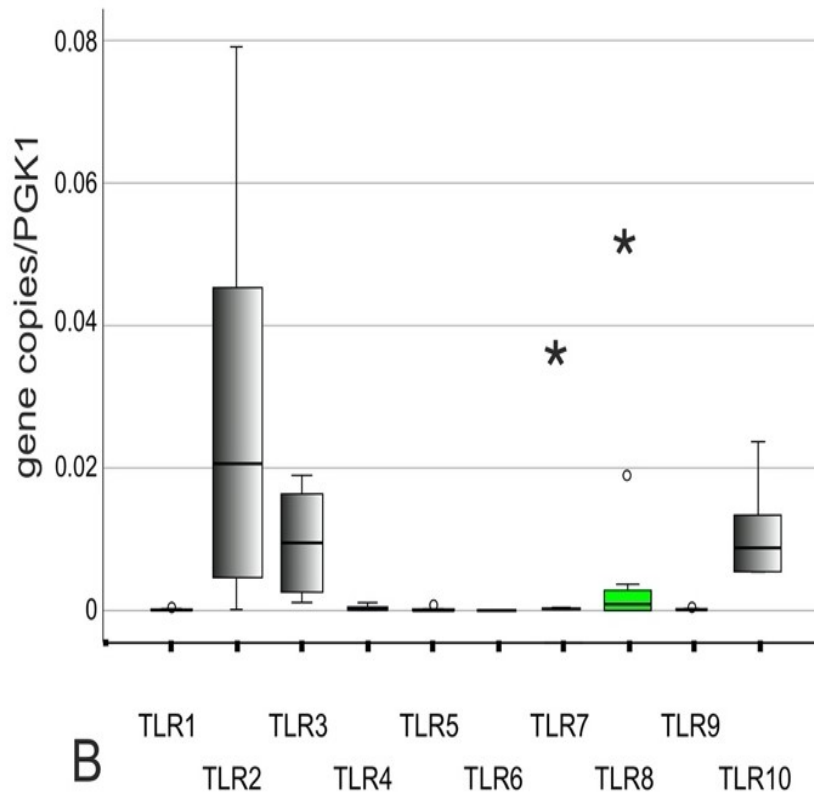
3.3. TLR-Expression der SHED auf mRNA-Ebene

Die TLR-Expression auf mRNA-Ebene wurde mit der quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion bestimmt. In nicht-entzündlichen Nährmedium verhielt sich die TLR-Expression der SHED folgendermaßen (Mediane Genkopien/PGK1 Kopien, Interquartilbereiche): TLR1 (0.0001, 0.0000/0.0002), TLR2 (0.0025, 0.0011/0.0129), TLR3 (0.0073, 0.0048/0.0103), TLR4 (0.0002, 0.0001/0.0004), TLR5 (0.0001, 0.0000/0.0008), TLR7 (0.0004, 0.0002/0.0032), TLR9 (0.0001, 0.0000/0.0009), TLR10 (0.0151, 0.0072/0.0184). TLR6 und TLR8 wurden demnach nicht exprimiert (Abb. 15). Im entzündlichen Medium wurde dagegen die Expression von TLR8 auf mRNA-Ebene signifikant erhöht sowie TLR7 vermindert exprimiert ($p < 0.05$). TLR1 (0.0001, 0.0000/0.0003), TLR2 (0.0206, 0.0015/0.0663), TLR3 (0.0075, 0.0032/0.0161), TLR4 (0.0001, 0.0001/0.0004), TLR5 (0.0000, 0.0000/0.0003), TLR7 (0.0002, 0.0001/0.0003), TLR8 (0.0010, 0.0000/0.0075), TLR9 (0.0001, 0.0001/0.0002), TLR10 (0.0088, 0.0054/0.0150) (Abb. 16).



SHED

Abbildung 15: TLR-Expression der SHED und SHED-i auf mRNA-Ebene gemessen mit quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion. mRNA-Expression der TLRs 1-10 in nicht entzündlichem Medium (n = 10; Box- und Whisker-Plots mit Medianen und Quartilen). Die grüne Box stellt die signifikante Erhöhung und die rote Box die signifikante Verminderung der Expression der TLR in entzündlichem Medium dar (statistische Signifikanz mit Asterisk markiert, *: $p < 0.05$; Wilcoxon-Signed-Rank-Test).



SHED-i

Abbildung 16: TLR-Expression der SHED und SHED-i auf mRNA-Ebene gemessen mit quantitativer Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion. mRNA-Expression der TLRs 1-10 in entzündlichem Medium (n = 10; Box- und Whisker-Plots mit Medianen und Quartilen). Die grüne Box stellt die signifikante Erhöhung und die rote Box die signifikante Verminderung der Expression der TLRs in entzündlichem Medium dar (statistische Signifikanz mit Asterisk markiert, *: $p < 0.05$; Wilcoxon-Signed-Rank-Test).

3.4. TLR-Expression der SHED auf Proteinebene

Die TLR-Expression der SHED auf Proteinebene wurde mit Hilfe der Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung aufgezeichnet. Die Expression der TLR in nicht-entzündlichem Medium betrug: (Mediane Δ -Fluoreszenz-Intensität, Interquartilbereiche) TLR1 (0.9600, 0.4675/2.0150), TLR2 (9.4000, 6.8750/15.1500), TLR3 (22.6950, 5.8050/50.4750), TLR4 (4.7500, 1.9250/7.7500), TLR6 (0.0600, 0.0000/0.4600), TLR8 (27.7950, 11.1000/35.9025), TLR9 (0.0200, 0.0000/1.2925) und TLR10 (0.6400, 0.2150/1.0050). TLR5 und TLR7 wurden nicht exprimiert (Abb. 17). Im Vergleich dazu wurde im entzündlichen Medium die TLR6 und TLR9 Expression herunterreguliert sowie die TLR8-Expression signifikant gesteigert ($p < 0.05$). TLR1 (1.9400, 1.5950/3.5925), TLR2 (9.1000, 7.7925/18.2750), TLR3 (21.7900, 12.4025/28.4500), TLR4 (6.2500, 3.2175/13.2250), TLR8 (43.8200, 30.1175/46.4750), TLR10 (0.7350, 0.4750/2.0300) (Abb. 18).

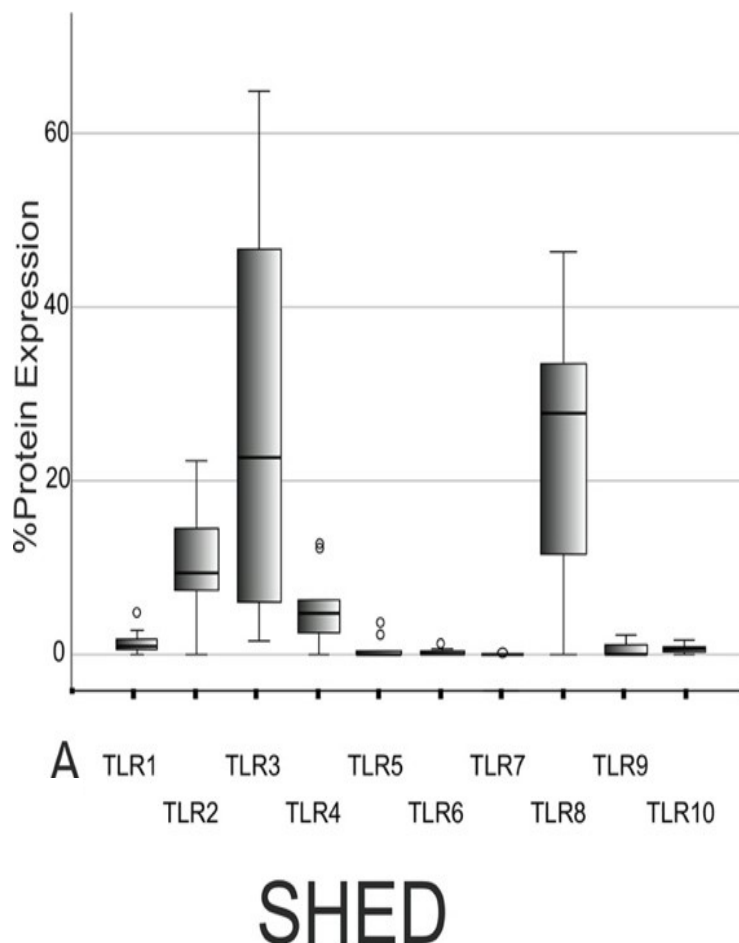
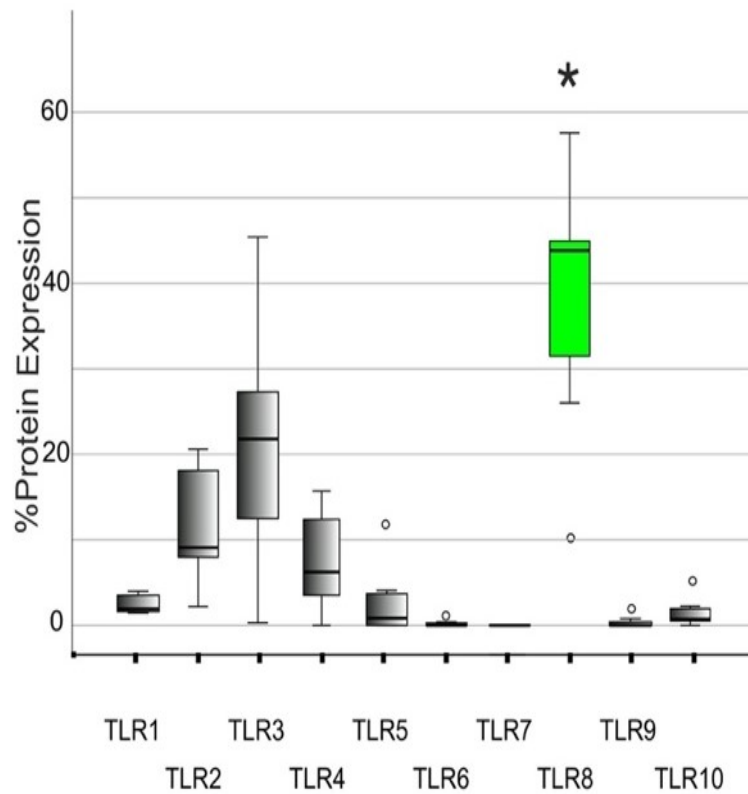


Abbildung 17: TLR-Expression der SHED und SHED-i auf Proteinebene gemessen mittels Durchflusszytometrie. %Proteinexpression von TLR 1-10 in nicht entzündlichem Medium (n = 10; Box- und Whisker-Plots mit Medianen und Quartilen).



SHED-i

Abbildung 18: TLR-Expression der SHED und SHED-i auf Proteinebene gemessen mittels Durchflusszytometrie. %Proteinexpression von TLR 1-10 in entzündlichem Medium (n = 10; Box- und Whisker-Plots mit Medianen und Quartilen). Die grüne Box zeigt eine signifikante Erhöhung der %Proteinexpression in entzündlichem Medium (statistische Signifikanz mit Asterisk markiert, *: $p < 0.05$; Wilcoxon-Signed-Rank-Test).

4. Diskussion

Das Ziel dieser Untersuchung ist es Erkenntnisse über das Expressionsprofil der Toll-like-Rezeptoren von SHED unter entzündlichen und nicht entzündlichen Bedingungen zu erlangen. Diese gewonnenen Erkenntnisse über die Expressionsprofile der TLRs könnten ein wichtiger Baustein für die Entwicklung neuer Therapie- und Regenerationsmöglichkeiten von entzündeter Pulpa werden. In dieser Studie wurde mit SHED gearbeitet, da sich diese durch ihre einfache Gewinnung aus exfolierten Milchzähnen, ihre ausgezeichnete Proliferationsrate und ihre hohe Differenzierungsfähigkeit auszeichnen (Okai et al., 2012; Wang et al., 2018).

4.1. Diskussion der Methodik

4.1.1. Gewebeentnahme und Kultivierung

Für die Gewebegewinnung wurden Milchzähne von Kindern extrahiert, die möglichst wenig kariöse Läsionen aufwiesen. Auf Grund der bakteriellen Kontamination der Mundhöhle und der Provokation von Blutungen ist keine sterile Umgebung während der Extraktion zu erreichen. Da die Zähne direkt nach der Extraktion in einer Nährmediumlösung mit Antibiotika aufbewahrt wurden, ist die Übertragung einer bakteriellen Infektion in die Zellkulturflaschen minimiert worden. Einige Proben mussten allerdings auf Grund von Pilzinfektionen, wahrscheinlich bereits intraoral infiziert, verworfen werden. Bei MSCs wurde erforscht, dass mit zunehmendem Alter der Probanden die Qualität und Teilungsfähigkeit vermindert sind (Wu et al., 2015). Milchzähne bieten sich daher besonders an, da sie von jungen Patienten gewonnen werden und häufig Extraktionsindikationen wie Karies oder Kieferorthopädie gegeben sind. Zur Zellkultivierung von MSCs – und in diesem Fall von SHED – sind verschiedene Varianten bekannt. Zum einen wird die Methode der Verdauung angewendet. So werden die zerkleinerten Pulpafragmente in einer Kollagenase Typ 1 und Dispase Lösung aufgelöst, durch ein Zellsieb zur Trennung der einzelnen Zellen gegeben und anschließend in Nährmedium kultiviert (Miura et al., 2003). Zum anderen ist eine weitere Methode der Kultivierung, die Pulpa in kleine Fragmente zu schneiden und diese in einer Zellkulturflasche mit Nährmedium wachsen zu lassen (Fawzy El-Sayed, Klingebiel et al., 2016). In dieser Studie wurde letztere Methode verwendet, um möglichst schonend mit dem Gewebe umzugehen und die Zellen nicht durch enzymatische Verdauung und Filterungen zu stressen. Durch regelmäßiges Waschen mit PBS und beim Passagieren wurden nicht adhärente Zellen herausgespült.

4.1.2. Magnetic activated cell sorting (MACS)

Zur Sortierung der Zellen wurden mit Hilfe von STRO-1-Antikörpern die Stammzellen markiert und magnetisch herausfiltriert (MACS-positive Zellen; SHED). Der STRO-1-Antikörper ist der bekannteste mesenchymale Stammzell-Marker, auch wenn dieser nicht als allgemeiner MSCs-Marker angesehen wird, da er nicht exklusiv auf MSCs exprimiert wird (Lin et al., 2011). In Kombination mit weiteren Indikatoren, wie der Bestimmung der Oberflächenantigene, ist er ein sehr guter Marker (Kolf et al., 2007). Es wurde diese Methode verwendet, da – wie bereits in der Literatur beschrieben – erwiesenermaßen die Fähigkeit zur Koloniebildung der MACS-positiven Zellen erhöht ist und im Gegensatz zu den MACS-negativen Zellen die definierten Oberflächenmarker für Stammzellen exprimiert werden (Fawzy El-Sayed et al., 2015). MACS ist eine weit verbreitete Methode zur Sortierung von Zellen. Ein großer Vorteil dieser ist ihre Zeiteffizienz (Bacon et al., 2020). Bei der magnetischen Zellsortierung werden die zu sortierenden Zellen vorbereitet, indem sie mit spezifischen Antikörpern und „Microbeads“ – magnetischen Partikeln, die einen Nanometer groß sind – inkubiert werden. Die hier verwendeten Microbeads sind gut geeignet, da sie ein schnelles Bindungsvermögen und eine geringe Verklumpung aufweisen. Zudem aktivieren sie nicht die Zellen und führen zu keiner Beeinflussung der weiteren Versuche, wodurch sie nach dem Sortieren nicht entfernt werden müssen (Miltenyi et al., 1990). Die Antikörper binden an die gesuchten Zellen und die Microbeads wiederum an die Antikörper. Die gewünschten Zellen sind somit magnetisiert. Um Fehlbindungen zu anderen Zellen in der Suspension zu vermindern, wurde zusätzlich ein „FcR Blocking Reagent“ verwendet. Selbst bei sehr gewissenhafter Arbeit mit der MACS-Collum ist keine reine MACS-positive Zellsuspension zu erwarten. Daher wurde der Vorgang des MACS zweimal wiederholt, um doppelt sortierte Zellen zu erhalten und eine Zellsuspension zu gewinnen, die möglichst MACS-negativ frei ist.

4.1.3. Nachweis der typischen Merkmale von Stammzellen

In dieser Studie wurde mit mesenchymalen Stammzellen gearbeitet. Wie bereits beschrieben wurden die Zellen mit Hilfe von MACS sortiert und die SHED heraus filtriert. Anschließend ließ sich an den typischen Merkmalen beweisen, dass es sich um mesenchymale Stammzellen handelte. Hierbei wurde sich an der Richtlinie der „Internationalen Gesellschaft für Zelltherapie“ (International Society for Cellular Therapy) orientiert. Demnach wurde erstens vorausgesetzt, dass die Zellen die Fähigkeit der Plastikadhärenz besitzen. Zweitens mussten sie die Oberflächenmarker CD105, CD73 und CD90 exprimieren sowie negativ auf CD45, CD34 und CD14 getestet werden. Drittens mussten sie ein Differenzierungspotential nach

Stimulierung in Osteoblasten, Adipozyten und Chondrozyten in vitro aufweisen (Dominici et al., 2006). Alle diese Merkmale wurden in dieser Forschungsarbeit aufgezeigt. Zusätzlich wurde zur weiteren Gewissheit der Oberflächenmarker CD146 als positiv überprüft. Dies ist möglicherweise einer der aussagekräftigsten Marker für mesenchymale Stammzellen, da er bereits in MSCs-Populationen aus unterschiedlichsten Geweben gefunden werden konnte (Lv et al., 2014). Außerdem wurden die Zellen auf ihre Fähigkeit der Koloniebildung hin getestet.

4.1.3.1. Fähigkeit der Plastikadhärenz

Ein wichtiges Kriterium der MSCs nach Dominici et al. (2006) ist die Adhärenz der Zellen an einer Plastikoberfläche wie einer Zellkulturflasche. Dieses lässt sich nachweisen indem nach Zellkultivierung und anschließender Phase der Zellproliferation die Zellen mehrmalig mit PBS gewaschen werden (Colter et al., 2000). Die nicht adhärenen Zellen werden somit herausgespült und zudem werden Zellreste und Stoffwechselprodukte aus der Zellkulturflasche gereinigt.

4.1.3.2. Durchflussszytometrie

Die Durchflussszytometrie oder auch Fluoreszenz aktivierte Zell Sortierung (FACS) ist eine bedeutende Methode zur Sortierung und Definition von Stammzellpopulationen. Sie zeichnet sich durch ihre Schnelligkeit und vor allem Genauigkeit aus. Die zu sortierenden Zellen werden mit fluoreszierenden Antikörpern wie beispielsweise APC oder PE inkubiert und innerhalb einer Trägerflüssigkeit in einen Laserstrahl eingebracht. Das Laserlicht bricht an den Zellen (engl. „Scatter“) und fluoreszierende Substanzen werden zur Lichtemission angeregt. Diese spezifischen Emissionen befinden sich in anderen Wellenlängen, weshalb die Intensitäten mit Hilfe von Lichtfiltern aufgezeichnet werden können. Da mehrere verschiedenfarbige Filter parallel verwendet werden können, lassen sich mit unterschiedlichen Fluorochromen zur selben Zeit mehrere Fluoreszenzintensitäten messen. Dadurch kann die Anzahl der Proben reduziert werden. Durch das Messen der Streustrahlung und der Fluoreszenzintensität lässt sich die Zellform und Zellgröße sowie die Bindung zu fluoreszierenden Antikörpern bestimmen (Johnson et al., 2007; Picot et al., 2012). Eine zu beachtende Fehlerquelle dieser Methode ist die mögliche Fehlbindung der markierten Antikörper. Die Antikörper binden hierbei unspezifisch an die Fc-Rezeptoren der Zellen und führen zu ungenauen Signalen im Hintergrund. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit für die Antikörper passende Isotypkontrollen innerhalb der FACS mit ausgewertet. Durch deren Fähigkeit dieselbe

unspezifische Bindung einzugehen, lassen sich somit die Hintergrundsignale herausrechnen. Zur weiteren Prävention vor Fehlbindungen wurde mit „FcR-Blocking Reagent“ gearbeitet (Fehrmann, 2021). Mit Hilfe der Durchflusszytometrie konnten in dieser Arbeit die typischen CD-Oberflächenantigene für mesenchymale Stammzellen nachgewiesen werden.

4.1.3.3. Differenzierungspotential der SHED

Eine besondere Eigenschaft der MSCs ist ihre Fähigkeit zur Differenzierung. Zur Darstellung dieser wurden nach Standardprotokollen die Zellen mit Stimulationsmedien zur Differenzierung in Osteoblasten, Adipozyten und Chondrozyten angeregt (Dominici et al., 2006). Zur bildlichen Veranschaulichung wurden die Zellen und deren durch Stimulierung hervorgerufenen intrazellulären Veränderungen, wie beispielsweise Lipidtröpfchen, nach adipogener Differenzierung durch Färbungen sichtbar gemacht. Somit konnten die drei Differenzierungswege dargestellt und belegt werden.

4.1.3.4. Colony forming unit (CFU) assay

Auch wenn in den Richtlinien der „Internationalen Gesellschaft für Zelltherapie“ und bei Dominici et al. (2006) der Nachweis der Fähigkeit zur Koloniebildung von MSCs nicht vorgegeben ist, wurde in der vorliegenden Arbeit dieser Aspekt untersucht. Eine einzelne menschliche mesenchymale Zelle ist befähigt zur Bildung einer Kolonie (Penfornis & Pochampally, 2016). Daher wurde die Zellzahl bestimmt und die SHED in einer geringen Dichte von 5 Zellen/cm² ausgesät. Nach einer Färbung mit Kristallviolett-Lösung konnte somit eindrücklich die Koloniebildung der SHED dargestellt werden.

4.1.4. Intra- und extrazelluläre TLR-Expression

4.1.4.1. Entzündungsmedium

Es ist bekannt, dass verschiedene Entzündungsfaktoren wie IFN- γ oder TNF- α einen deutlichen Effekt auf MSCs haben. So wurde in verschiedenen Studien die Auswirkung eines entzündlichen Milieus auf MSCs erforscht (Fawzy El-Sayed, Elahmady, et al., 2019; Fawzy El-Sayed, Elsalawy, et al., 2019). Daraus ergibt sich beispielsweise die Erkenntnis, dass aus Fettgewebe von Mäusen gewonnene MSCs unter Einfluss von IFN- γ und TNF- α eine erhöhte Wachstumsrate aufweisen (Mohammadpour et al., 2016). In dieser Forschungsarbeit wurde

die Expression der TLRs der SHED im entzündlichen Medium unter der Verwendung der bekannten Entzündungsfaktoren IL-1 β , TNF- α und IFN- γ betrachtet (Fawzy El-Sayed, Klingebiel, et al., 2016; Fawzy El-Sayed, Mekhemar, et al., 2016; Fehrmann et al., 2020).

4.1.4.2. Dokumentation der TRL-Expression mittels Quantitativer Polymerase-Chain-Reaction (qPCR)

Zur Dokumentation der TLR-Expression auf mRNA-Ebene wurde die Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion verwendet. Der Unterschied zur normalen PCR ist, dass direkt während der Reaktion Messungen der amplifizierten DNA stattfinden können und nicht erst im Anschluss. Für die Durchführung der qPCR wurde vorher die RNA extrahiert und in cDNA überführt. Diese Versuchsschritte wurden nach standardisierten Protokollen und Baukästen von Qiagen durchgeführt. Dadurch ist die Ausführung der Versuche reproduzierbar und die potenziellen Fehlerquellen der Laborarbeit, wie Verunreinigungen, werden minimiert. Die qPCR gilt in vielen Forschungsbereichen als gute und genaue Form der Datenerhebung in Bezug auf Erkennung und Messung von Nukleinsäuren. Dennoch gibt es auf Grund der sensiblen Messungsmethodik Fehlerquellen, die es zu beachten gibt: So sind Pipettierfehler infolge der kleinen zu pipettierenden Flüssigkeitsmengen möglichst auszuschließen. Hierfür hat es sich bewährt, wenn möglich einen „Master Mix“ und dadurch größere Pipettiermengen zu erstellen. Ein weiterer Fehleraspekt ist die Verunreinigung durch unerwünschte Nukleinsäuren. Zum Ausschluss dessen wurde in der vorliegenden Arbeit zusätzlich mit „No-Template-Kontrollen“ in Form von DNase freiem Wasser statt „Template“ gearbeitet. Zudem sind „noRTs“ Proben ohne reverse Transkription verwendet worden, um mögliche Kontaminationen durch DNA zu dokumentieren die bereits vor der RT vorlagen (Taylor et al., 2019). Da die Proben für die qPCR sensibel auf Veränderungen und unterschiedliche Handhabungen reagieren, wurde streng nach Protokoll gearbeitet. Um eine relative Expression von Zielgenen bestimmen zu können, ist das Festlegen eines Referenzgens notwendig, welches von den Zielzellen unreguliert exprimiert wird. Dieses sogenannte „Housekeeping Gen“ muss individuell abhängig von der experimentellen Studie, Gewebe- und Probentyp ausgewählt werden (Thellin et al., 1999). In dieser Studie wurde das Housekeeping Gen PGK1 ausgewählt. Das PGK1 Gen kodiert für das glykolytische Enzym Phosphoglyceratkinase 1 und ist in allen Geweben des menschlichen Körpers zu finden (National-Center-for-Biotechnology-Information, 2022). Dieses Gen wurde bereits erfolgreich in weiteren Studien als Referenz im Zusammenhang mit TLRs und intraoralem Gewebe wie Gingiva oder apikale Papille verwendet (Fawzy El-Sayed, Mekhemar, et al., 2016; Fehrmann, 2021). Die PCR ermöglicht es auch kleine Mengen an genetischem Material zu detektieren. Dies ist möglich, indem durch

eine DNA abhängige DNA-Polymerase bestimmte Abschnitte einer einzelsträngigen DNA, die vorher mit Primern markiert wurden, in mehreren Zyklen von Denaturierung, Annealing und Elongation vermehrt werden. Durch die exponentielle Vermehrung ist es dann möglich die ursprünglich kleinen, nicht messbaren Mengen, zu dokumentieren. In dieser Arbeit wurde der Light Cycler 96 verwendet, wodurch eine Auswertung mittels Fluoreszenz genutzt wurde. Hierfür wurden, zusätzlich zu den Primern, sequenzspezifische Hybridisierungssonden eingebracht. Nach Anregung der gebundenen Sonden über die Emissionsdiode des Light Cyclers wurde nun die Fluoreszenz derer in Echtzeit nach jedem Zyklus gemessen. Die Intensität der Fluoreszenz ist als proportional zu der Menge an DNA anzusehen (Krause et al., 2012).

4.1.4.3. Dokumentation der TLR-Expression mittels Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie zur Analyse der TLR-Expression auf Proteinebene wurde äquivalent zur CD-Oberflächenantigen Betrachtung, wie unter 4.1.3.2. beschrieben, durchgeführt. Für die Dokumentation der intrazellulären TLR-Expression mussten die Zellen mit Hilfe eines Fix&Perm Kits permeabel gemacht werden. Diese Methodik ist, ebenso wie die bereits genannten Versuchsaufbauten, bereits in mehreren Studien erfolgreich verwendet worden (Fawzy El-Sayed, Mekhemar, et al., 2016; Fehrmann et al., 2020). Die Durchflusszytometrie stellt eine weitere wichtige Aussagekraft bezüglich der Expression der TLRs dar. Die alleinige Begutachtung auf mRNA-Ebene mit der qPCR gibt keine Auskunft darüber, ob die mRNA in ein Protein translatiert wird (Gygi et al., 1999). Auf Grund dessen wurde in der vorliegenden Arbeit beides einzeln analysiert und anschließend verglichen.

4.2. Diskussion der Ergebnisse

Die in dieser Arbeit untersuchten Zellen wurden nach den Richtlinien der „Internationalen Gesellschaft für Zelltherapie“ und nach Dominici et al. (2006) überprüft, um davon ausgehen zu können, dass mit den richtigen Zellen, in diesem Fall mesenchymalen Stammzellen aus der Pulpa von Milchzähnen, gearbeitet wurde. Die kultivierten Zellen wurden daher auf ihre Plastikadhärenz getestet sowie die positive Expression der Oberflächenantigene CD105, CD73, CD90 und negative Expression von CD45, CD34 und CD14 nachgewiesen. Zudem mussten sie Koloniebildung aufzeigen und nach Stimulierung die Fähigkeit zur Differenzierung in Osteoblasten, Adipozyten und Chondrozyten in vitro aufweisen. All diese Kriterien konnten erfolgreich dargestellt werden. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass mit

mesenchymalen Stammzellen, gewonnen aus der Pulpa von Milchzähnen (engl. stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED)), gearbeitet wurde.

4.2.1. Expression der Toll-like Rezeptoren im Nährmedium

Bei der Analyse der Toll-like-Rezeptor Expression auf mRNA-Basis im Nährmedium ohne entzündliche Stimulation konnten die TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7, TLR9 und TLR10 in den SHED nachgewiesen werden. TLR6 und TLR8 wurden somit nicht exprimiert. In vorherigen Studien wurde bereits gezeigt, dass in nicht stimulierendem Medium auf pulpalen Stammzellen permanenter Zähne (DPSCs) die TLRs 1, 2, 3, 4, 5, 6 und 10 exprimiert wurden (Fawzy El-Sayed, Klingebiel, et al., 2016). In mesenchymalen Stammzellen aus der Gingiva (G-MSCs) hingegen wurden TLR 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 und 10 auf mRNA-Basis exprimiert (Fawzy El-Sayed, Mekhemar, et al., 2016). Auf Proteinebene wurde in Nährmedium besonders TLR 2, 3, 4 und 8 als auch weniger ausgeprägt TLR 1, 6, 9, 10 exprimiert. TLR5 und 7 wurden auf Proteinebene nicht gemessen. Der Rezeptor TLR8, welcher für die Erkennung von einsträngiger RNA befähigt ist, wurde am stärksten exprimiert, gefolgt von TLR3, TLR2, TLR4, TLR1, TLR10, TLR6 und TLR9. In einer Studie, in der TLRs von Stammzellen der apikalen Papille (SCAP) untersucht wurden, zeigte sich ebenfalls eine erhöhte Expression des Rezeptors TLR8 auf Proteinebene, gefolgt von TLR 10, 5, 2, 1, 3, 9, 7, 4 und 6 (Fehrmann, 2021). Die Untersuchung der TLRs in G-MSCs zeigte hingegen eine Expression von TLR 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 und 10 ohne TLR8 und TLR9 auf (Fawzy El-Sayed, Mekhemar, et al., 2016). Die TLR-Expression ist scheinbar abhängig von der Herkunft der Stammzellen und kann somit stark variieren.

Wie bereits in vorherigen Studien beleuchtet, ist eine reine Messung der Expression von Rezeptoren auf mRNA-Basis nicht ausreichend, um eine Aussage über die Expression auf Proteinebene machen zu können. Wie in der vorliegenden Studie sind Abweichungen der getrennten Messungen zu beobachten. Diese häufig beobachtete Diskrepanz erklären Li et al (2014) durch möglicherweise auftretende posttranslationale Mechanismen wie die Translationskontrolle oder die Proteinhalbwertszeit.

4.2.2. Expression der Toll-like Rezeptoren im entzündlichen Medium

Ein weiterer Aspekt in dieser Arbeit ist die TLR-Expression im entzündlichen Medium. SHED werden in situ mit entzündlichen Faktoren konfrontiert, ausgelöst beispielsweise durch kariöse Läsionen und einhergehende Pulpitiden. Interessant ist somit die Auswirkung von Entzündungsfaktoren in Nährmedium auf das Expressionsprofil der TLR. Sowohl auf

Proteinebene als auch auf mRNA-Ebene erhöhte sich signifikant die Expression von TLR8 im entzündlichen Medium, ohne die oben genannte sequenzielle Reihenfolge der TLR-Expression zu verändern. Zudem wurde auf mRNA-Ebene die Expression von TLR7 und auf Proteinebene TLR6 und TLR9 signifikant herunter reguliert. Durch die vermehrte TLR8 Expression, ist von einer erhöhten Sensitivität für die Erkennung einsträngiger RNA auszugehen. Die genaue Auswirkung dessen bleibt allerdings noch zu erforschen. Wie die Expression in Nährmedium unterscheidet sich auch die Expression in entzündlichem Medium abhängig vom Gewebeursprung. So veränderte sich das Expressionsprofil von SCAPs bei Zugabe von Entzündungsfaktoren durch eine erhöhte Expression von TLR1, 2 und 9 sowie durch Verringerung von TLR 3 und 4 auf mRNA-Ebene. Auf Proteinebene hingegen wurde eine Verringerung der TLR3 Expression aufgezeigt. Zudem veränderte sich die Reihenfolge der quantitativen Expression (Fehrmann, 2021). Das Expressionsprofil der DPSCs veränderte sich unter entzündlichen Bedingungen indem TLR 1, 2 und 3 auf mRNA-Ebene signifikant erhöht und TLR6 auf mRNA und Proteinebene signifikant vermindert auftraten (Fawzy El-Sayed, Klingebiel, et al., 2016). Die SHED zeigen im Gegensatz dazu eine Besonderheit darin, dass durch die entzündliche Stimulation die Expression einiger TLRs signifikant beeinflusst wurde, die Reihenfolge der quantitativen Expression allerdings nicht verändert wurde. Dieses Erkenntnis unterstreicht die entzündungsresistenten Eigenschaften der SHED (Qiao et al., 2019; Werle et al., 2016).

4.2.3. Schlusswort der Diskussion

Es ist davon auszugehen, dass eine direkte Verbindung zwischen dem Expressionslevel der TLR und der Sensitivität der Zellen in Bezug auf die Agonisten ihrer pathogen-assoziierten molekularen Muster (PAMPs) besteht (Zarembek & Godowski, 2002). Zukünftig ist es von Interesse die therapeutischen Möglichkeiten weiter zu erforschen. So wurde bereits in Studien untersucht, dass durch die Blockierung von TLR4 und damit den anschließenden NF- κ B-Signalweg der Alveolarknochenabbau, verursacht durch LPS, verhindert werden kann (Li et al., 2014). Zudem wurde beispielsweise ein potentiell positiver Einfluss von TLR8 auf natürliche Killerzellen im Zusammenhang mit der Krebsforschung detektiert (Veneziani et al., 2022).

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen zum ersten Mal die einzigartige TLR-Expression von SHED im entzündlichen und nicht entzündlichen Medium. Durch die daraus gewonnenen Erkenntnisse lässt sich schlussfolgern, dass SHED als Stammzellressourcen dienen können und die Veränderungen der TLR-Expression eine immunologische Einbeziehung und regenerative Fähigkeiten der SHED erwarten lassen (DelaRosa &

Lombardo, 2010). Zukünftig kann es von Interesse sein, TLR direkt über Liganden oder Rezeptor-Blockaden anzusprechen und damit therapeutische Ergebnisse zu verbessern. Es ist weiterhin explizite Forschung notwendig, um die genauen Zusammenhänge und Beziehungen der Rezeptoren und deren spezifischen PAMPs sowie die zellulären Antworten in Bezug auf entzündliche Reaktionen aufzuzeichnen.

5. Zusammenfassung

Die Pulpa ist ein Gewebe, dass sich im Zahninneren befindet und für die Ernährung, Sensorik, Abwehr und Bildung von Dentin zuständig ist. Die Pulpa, in diesem Fall von Milchzähnen, dient zudem als Ressource von mesenchymalen Stammzellen (stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED)). Die Besonderheit von Stammzellen ist die Fähigkeit zur Differenzierung in odontogene, osteogene, adipogene, chondrogene und neuronale Zellen nach Stimulation, welche man sich in der Forschung und als Therapiemöglichkeiten zunutze machen möchte. SHED, die besondere regenerative und entzündungsresistente Eigenschaften besitzen, kommunizieren über vielfältige Wege mit ihrer Umgebung und werden durch diese beeinflusst. Ein wichtiger Aspekt in diesem Zusammenspiel sind die Toll-like-Rezeptoren (TLRs). TLRs gehören zu den Pattern recognition receptors (PRRs), erkennen anhand sogenannter Muster Bakterien, Viren, Pilze und Protozoen und dienen somit der angeborenen Immunabwehr. Im Menschen sind zehn verschiedene TLRs (TLR 1-10) bekannt, wovon jeder Rezeptor seine eigene Funktion besitzt. Ziel dieser Studie war es, ein Expressionsprofil der TLRs von Stammzellen aus der Milchzahnpulpa in normalen und entzündlichen Umgebungen auf Protein- und mRNA-Ebene zu erstellen.

Hierfür wurde Pulpa von extrahierten Milchzähnen gewonnen und die Zellen daraus kultiviert. Anschließend wurden die Stammzellen mit Hilfe von STRO-1-Antikörpern immunomagnetisch heraus sortiert und auf ihre charakteristischen Stammzeleigenschaften hin untersucht. Die SHED wurden daraufhin in normalem Medium und in entzündlichem Medium (IL-1 β , IFN- γ , und TNF- α) kultiviert und die TLR-Expression mit Hilfe von Durchflusszytometrie und Polymerase-Kettenreaktion bestimmt.

Die SHED wiesen typische Stammzellcharakteristika auf: Die Fähigkeit zur Differenzierung in osteogene, adipogene und chondrogene Zellen, die Fähigkeit zur Koloniebildung sowie die positive Expression der Oberflächenmarker CD73, CD105 und CD146 als auch die fehlende Expression von CD14, CD34 und CD45. In normalem Medium exprimierten die SHED TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR6, TLR8, TLR9 und TLR10. In entzündlichem Medium wurde hingegen die TLR7 Expression auf Proteinebene signifikant gesenkt und TLR8 sowohl auf Proteinebene als auch auf mRNA-Ebene signifikant erhöht.

Die vorliegende Arbeit stellt zum ersten Mal das Expressionsprofil der TLRs in SHED im entzündlichen und nicht entzündlichen Milieu dar. Aus den Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass SHED als Stammzellressourcen relevant sind und eine immunologische Einbeziehung vorliegt. Zukünftig mag dies für weitere Forschungsarbeiten in Bezug auf Reaktionen der SHED in entzündlicher Umgebung und damit verbundener regenerativer

Vorgehensweisen in vivo von Bedeutung sein. Weitere Forschung ist notwendig, um fortführende Auswirkungen der Rezeptoren und deren Zusammenspiel zu begutachten sowie um das große therapeutische Potential der SHED zu konkretisieren.

6. Literaturverzeichnis

- Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O. (2006): Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124, 783-801.
- Alais, S., Allioi, N., Pujades, C., Duband, J. L., Vainio, O., Imhof, B. A., Dunon, D. (2001): HEMCAM/CD146 downregulates cell surface expression of beta1 integrins. *J Cell Sci*, 114, 1847-1859.
- Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R., Flavell, R. A. (2001): Recognition of double-stranded rna and activation of nf-kappaB by toll-like receptor 3. *Nature*, 413, 732-738.
- Asgary, S., Eghbal, M. J., Fazlyab, M., Baghban, A. A., Ghoddusi, J. (2015): Five-year results of vital pulp therapy in permanent molars with irreversible pulpitis: a non-inferiority multicenter randomized clinical trial. *Clin Oral Investig*, 19, 335-341.
- Bacon, K., Lavoie, A., Rao, B. M., Daniele, M., Menegatti, S. (2020): Past, present, and future of affinity-based cell separation technologies. *Acta Biomater*, 112, 29-51.
- Basith, S., Manavalan, B., Yoo, T. H., Kim, S. G., Choi, S. (2012): Roles of toll-like receptors in cancer: a double-edged sword for defense and offense. *Arch Pharm Res*, 35, 1297-1316.
- Bergenholtz, G. (1981): Inflammatory response of the dental pulp to bacterial irritation. *J Endod*, 7, 100-104.
- Colter, D. C., Class, R., DiGirolamo, C. M., Prockop, D. J. (2000): Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97, 3213-3218.
- Dabuleanu, M. (2013): Pulpitis (reversible/irreversible). *J Can Dent Assoc*, 79.
- Dammaschke, T., Galler, K., Krastl, G. (2019): Aktuelle Empfehlungen zur Vitalerhaltung der Pulpa. *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift*, 74, 54-63
- De Mendonça Costa, A., Bueno, D. F., Martins, M. T., Kerkis, I., Kerkis, A., Fanganiello, R. D., Cerruti, H., Alonso, N., Passos-Bueno, M. R. (2008): Reconstruction of large cranial defects in nonimmunosuppressed experimental design with human dental pulp stem cells. *J Craniofac Surg*, 19, 204-210.
- DelaRosa, O., Lombardo, E. (2010): Modulation of adult mesenchymal stem cells activity by toll-like receptors: implications on therapeutic potential. *Mediators Inflamm*, 2010.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D. J., Horwitz, E. (2006): Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy*, 8, 315-317.

- Fawzy El-Sayed, K. M., Elahmady, M., Adawi, Z., Aboushadi, N., Elnaggar, A., Eid, M., Hamdy, N., Sanaa, D., Dörfer, C. E. (2018): The periodontal stem/progenitor cell inflammatory-regenerative cross talk: A new perspective. *J Periodontal Res*, 54, 81-94.
- Fawzy El-Sayed, K. M., Klingebiel, P., Dörfer, C. E. (2016): Toll-like receptor expression profile of human dental pulp stem/progenitor cells. *J Endod*, 42, 413-417.
- Fawzy El-Sayed, K. M., Mekhemar, M., Adam-Klages, S., Kabelitz, D., Dörfer, C. E. (2016): TLR expression profile of human gingival margin-derived stem progenitor cells. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 21, 30-38.
- Fawzy El-Sayed, K. M., Paris, S., Becker, S. T., Neuschl, M., De Buhr, W., Sälzer, S., Wulff, A., Elrefai, M., Darhous, M. S., El-Masry, M., Wiltfang, J., Dörfer, C. E. (2012): Periodontal regeneration employing gingival margin-derived stem/progenitor cells: an animal study. *J Clin Periodontol*, 39, 861-870.
- Fawzy El-Sayed, K. M., Paris, S., Graetz, C., Kassem, N., Mekhemar, M., Ungefroren, H., Fändrich, F., Dörfer, C. E. (2015): Isolation and characterisation of human gingival margin-derived STRO-1/MACS(+) and MACS(-) cell populations. *Int J Oral Sci*, 7, 80-88.
- Fehrmann, C. (2021): Expressionsprofil der Toll-like-Rezeptoren von Stamm-/Vorläuferzellen aus der apikalen Zahnpapille. *Med. Dent. Diss.*, Kiel.
- Fehrmann, C., Dörfer, C. E., Fawzy El-Sayed, K. M. (2020): Toll-like receptor expression profile of human stem/progenitor cells from the apical papilla. *J Endod*, 46, 1623-1630.
- Fonsatti, E., Maio, M. (2004): Highlights on endoglin (CD105): from basic findings towards clinical applications in human cancer. *J Transl Med*, 2, 18.
- Friedenstein, A. J., Chailakhyan, R. K., Latsinik, N. V., Panasyuk, A. F., Keiliss-Borok, I. V. (1974): Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation*, 17, 331-340.
- Friedman, S., Abitbol, S., Lawrence, H. P. (2003): Treatment outcome in endodontics: the Toronto Study. Phase 1: initial treatment. *J Endod*, 29, 787-793.
- Fu, X., Jin, L., Ma, P., Fan, Z., Wang, S. (2014): Allogeneic stem cells from deciduous teeth in treatment for periodontitis in miniature swine. *J Periodontol*, 85, 845-851.
- Gygi, S. P., Rochon, Y., Franza, B. R., Aebersold, R. (1999): Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol*, 19, 1720-1730.
- Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R., Yi, E. C., Goodlett, D. R., Eng, J. K., Akira, S., Underhill, D. M., Aderem, A. (2001): The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by toll-like receptor 5. *Nature*, 410, 1099-1103.
- Hellwig, E., Schäfer, E., Klimek, J., Attin, T. (2018): Einführung in die Zahnerhaltung. Deutscher Zahnärzte Verlag, Köln.

- Jahanbin, A., Rashed, R., Alamdari, D. H., Koohestanian, N., Ezzati, A., Kazemian, M., Saghafi, S., Raisolsadat, M. A. (2016): Success of maxillary alveolar defect repair in rats using osteoblast-differentiated human deciduous dental pulp stem cells. *J Oral Maxillofac Surg*, 74, 829.
- Johnson, K. W., Dooner, M., Quesenberry, P. J. (2007): Fluorescence activated cell sorting: a window on the stem cell. *Curr Pharm Biotechnol*, 8, 133-139.
- Kawai, T., Akira, S. (2010): The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on toll-like receptors. *Nat Immunol*, 11, 373-384.
- Kisselbach, L., Merges, M., Bossie, A., Boyd, A. (2009): CD90 Expression on human primary cells and elimination of contaminating fibroblasts from cell cultures. *Cytotechnology*, 59, 31-44.
- Kolf, C. M., Cho, E., Tuan, R. S. (2007): Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther*, 9, 204.
- Krause, G., Scherer, G., Müller, M., Weiß, T. (2004): Grundlagen der Polymerasekettenreaktion (PCR). In: Greim, H. (Hrsg.), *The MAK-Collection for Occupational Health and Safety*, Bd. 16, S 321-355, Wiley-VCH, New Jersey.
- Lee, S., An, S., Kang, T. H., Kim, K. H., Chang, N. H., Kang, S., Kwak, C. K., Park, H. S. (2011): Comparison of mesenchymal-like stem/progenitor cells derived from supernumerary teeth with stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Regen Med*, 6, 689-699.
- Lee, S. M., Kok, K. H., Jaume, M., Cheung, T. K., Yip, T. F., Lai, J. C., Guan, Y., Webster, R. G., Jin, D. Y., Peiris, J. S. (2014): Toll-like receptor 10 is involved in induction of innate immune responses to influenza virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 3793-3798.
- Lehmann, K. M., Hellwig, E., Wenz, H. J. (2015): *Zahnärztliche Propädeutik. Einführung in die Zahnheilkunde*. Deutscher Zahnärzte Verlag, Köln.
- Leroyer, A. S., Blin, M. G., Bachelier, R., Bardin, N., Blot-Chabaud, M., Dignat-George, F. (2019): CD146 (cluster of differentiation 146). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 39, 1026-1033.
- Li, C., Li, B., Dong, Z., Gao, L., He, X., Liao, L., Hu, C., Wang, Q., Jin, Y. (2014): Lipopolysaccharide differentially affects the osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells and bone marrow mesenchymal stem cells through toll-like receptor 4 mediated nuclear factor κ B pathway. *Stem Cell Res Ther*, 5, 67.
- Lin, G., Liu, G., Banie, L., Wang, G., Ning, H., Lue, T. F., Lin, C. S. (2011): Tissue distribution of mesenchymal stem cell marker Stro-1. *Stem Cells Dev*, 20, 1747-1752.

- Liu, D., Kumar, S., Ashworth, J., Ali, K., Fadel, A., Guo, B., Slevin, M. (2021): CD105 (Endoglin): A potential anticancer therapeutic inhibits mitogenesis and map kinase pathway activation. *Anticancer Res*, 41, 1219-1229.
- Lv, F. J., Tuan, R. S., Cheung, K. M., Leung, V. Y. (2014): Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 32, 1408-1419.
- Lüllmann-Rauch, R., Asan, E. (2019): Taschenlehrbuch Histologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Miao, C., Lei, M., Hu, W., Han, S., Wang, Q. (2017): A brief review: the therapeutic potential of bone marrow mesenchymal stem cells in myocardial infarction. *Stem Cell Res Ther*, 8, 242.
- Miltenyi S. (2017): MACS cell separation. Miltenyi Biotec. Retrieved 01.05.2022 from https://www.miltenyibiotec.com/_Resources/Persistent/b5349effdd595b72195e588aff033be3e24706bd/IM0020021.pdf.
- Miltenyi, S., Müller, W., Weichel, W., Radbruch, A. (1990): High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry*, 11, 231-238.
- Miura, M., Gronthos, S., Zhao, M., Lu, B., Fisher, L. W., Robey, P. G., Shi, S. (2003): SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 5807-5812.
- Mohammadpour, H., Pourfathollah, A. A., Nikougoftar Zarif, M., Hashemi, S. M. (2016): Increasing proliferation of murine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells by TNF- α plus IFN- γ . *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 38, 68-76.
- Najafi, M., Majidpoor, J., Toolee, H., Mortezaee, K. (2021): The current knowledge concerning solid cancer and therapy. *J Biochem Mol Toxicol*, 35.
- Nakanishi, T., Matsuo, T., Ebisu, S. (1995): Quantitative analysis of immunoglobulins and inflammatory factors in human pulpal blood from exposed pulps. *J Endod*, 21, 131-136.
- National-Center-for-Biotechnology-Information. (2022): PGK1 phosphoglycerate kinase 1 [Homo sapiens (human)]. National Library of Medicine. Retrieved 06.06.2022 from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=5230>.
- Okai, Y., Harada, K., Ohura, K., Arita, K. (2012): Study on apoptosis in human deciduous tooth pulp cells. *J Hard Tissue Biol*, 21, 413-420.
- Omar, S. A., Abdul-Hafez, A., Ibrahim, S., Pillai, N., Abdulmageed, M., Thiruvengataramani, R. P., Mohamed, T., Madhukar, B. V., Uhal, B. D. (2022): Stem-cell therapy for bronchopulmonary dysplasia (BPD) in newborns. *Cells*, 11, 1275.
- Penfornis, P., Pochampally, R. (2016): Colony forming unit assays. In Gneccchi, M. (Hrsg.) *Mesenchymal Stem Cells. Methods in molecular biology*, Bd. 1416, S. 159-169, Humana Press, New York.

- Picot, J., Guerin, C. L., Le Van Kim, C., Boulanger, C. M. (2012): Flow cytometry: retrospective, fundamentals and recent instrumentation. *Cytotechnology*, 64, 109-130.
- Qiao, Y. Q., Zhu, L. S., Cui, S. J., Zhang, T., Yang, R. L., Zhou, Y. H. (2019): Local administration of stem cells from human exfoliated primary teeth attenuate experimental periodontitis in mice. *Chin J Dent Res*, 22, 157-163.
- Rayner, J. A., Southam, J. C. (1979): Pulp changes in deciduous teeth associated with deep carious dentine. *J Dent*, 7, 39-42.
- Rodd, H. D., Boissonade, F. M. (2005): Vascular status in human primary and permanent teeth in health and disease. *Eur J Oral Sci*, 113, 128-134.
- Saalbach, A., Haustein, U., Anderegg, U. (2000): A ligand of human Thy-1 is localized on polymorphonuclear leukocytes and monocytes and mediates the binding to activated Thy-1-positive microvascular endothelial cells and fibroblasts. *J Invest Dermatol*, 115, 882-888.
- Schmidt, R. F., Lang, F. (2007): *Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie*, Aufl. 30. Springer, Berlin.
- Shih, D.-M. (1999): The role of CD146 (Mel-CAM) in biology and pathology. *J Pathol*, 189, 4-11.
- Steiniger, B., Schwarzbach, H., Stachniss, V. (2010): *Mikroskopische Anatomie der Zähne und des Parodonts*. Thieme, Stuttgart.
- Su, S. B., Tao, L., Deng, Z. P., Chen, W., Qin, S. Y., Jiang, H. X. (2021): TLR10: Insights, controversies and potential utility as a therapeutic target. *Scand J Immunol*, 93.
- Taylor, S. C., Nadeau, K., Abbasi, M., Lachance, C., Nguyen, M., Fenrich, J. (2019): The ultimate qpcr experiment: Producing publication quality, reproducible data the first time. *Trends in biotechnology*, 37, 761-774.
- Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., De Borman, B., Coumans, B., Hennen, G., Grisar, T., Igout, A., Heinen, E. (1999): Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol*, 75, 291-295.
- Trowbridge, H. O. (2003): Pulp biology: progress during the past 25 years. *Aust Endod J*, 29, 5-12.
- Ulmer, F. L., Winkel, A., Kohorst, P., Stiesch, M. (2010): Stammzellen - eine Perspektive der Zahnmedizin. *Schweiz Monatsschr Zahnmed*, 120, 873-883.
- Veneziani, I., Alicata, C., Pelosi, A., Landolina, N., Ricci, B., D'Oria, V., Fagotti, A., Scambia, G., Moretta, L., Maggi, E. (2022): Toll-like receptor 8 agonists improve NK-cell function primarily targeting CD56^{bright} CD16⁻ subset. *J immunother cancer*, 10.

- Wang, H., Zhong, Q., Yang, T., Qi, Y., Fu, M., Yang, X., Qiao, L., Ling, Q., Liu, S., Zhao, Y. (2018): Comparative characterization of SHED and DPSCs during extended cultivation in vitro. *Mol Med Rep*, 17, 6551-6559.
- Wang, X., Sha, X. J., Li, G. H., Yang, F. S., Ji, K., Wen, L. Y., Liu, S. Y., Chen, L., Ding, Y., Xuan, K. (2012): Comparative characterization of stem cells from human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells. *Arch Oral Biol*, 57, 1231-1240.
- Werle, S. B., Lindemann, D., Steffens, D., Demarco, F. F., Borba de Araujo, F., Pranke, P., Casagrande, L. (2016): Carious deciduous teeth are a potential source for dental pulp stem cells. *Clin Oral Investig*, 20, 75-81.
- Wu, W., Zhou, J., Xu, C. T., Zhang, J., Jin, Y. J., Sun, G. L. (2015): Derivation and growth characteristics of dental pulp stem cells from patients of different ages. *Mol Med Rep*, 12, 5127-5134.
- Wu, Z., Zhang, Z., Lei, Z., Lei, P. (2019): CD14: Biology and role in the pathogenesis of disease. *Cytokine Growth Factor Rev*, 48, 24-31.
- Zarembek, K. A., Godowski, P. J. (2002): Tissue expression of human toll-like receptors and differential regulation of toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J Immunol*, 168, 554-561.
- Zhang, S. Y., Jouanguy, E., Ugolini, S., Smahi, A., Elain, G., Romero, P., Segal, D., Sancho-Shimizu, V., Lorenzo, L., Puel, A., Picard, C., Chapgier, A., Plancoulaine, S., Titeux, M., Cognet, C., von Bernuth, H., Ku, C. L., Casrouge, A., Zhang, X. X., Barreiro, L., Leonard, J., Hamilton, C., Lebon, P., Héron, B., Vallée, L., Quintana, Murci, L., Hovnanian, A., Rozenberg, F., Vivier, E., Geissmann, F., Tardieu, M., Abel, L., Casanova, J. L. (2007): TLR3 deficiency in patients with herpes simplex encephalitis. *Science*, 317, 1522-1527.

7. Anhang

7.1. Ethikvotum

MEDIZINISCHE FAKULTÄT
DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT ZU KIEL

ETHIK-KOMMISSION



Ethik-Kommission · Schwanenweg 20 · 24105 Kiel

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

Postadresse:
Arnold-Heller-Straße 3 / Haus U 27
D-24105 Kiel
Telefon 0431 / 500-14 191
Telefax 0431 / 500-14 195
ethikkomm@email.uni-kiel.de

Datum: 08. Februar 2021

AZ: D 513/17 (bitte stets angeben)
Studienplan: In-vitro Untersuchung der Wirkung verschiedener Biomoleküle und Entzündung auf gingivale Stammzellen
Antragsteller und Studienleiter: PD Dr. Karim Fawzy El-Sayed, Dr. Mohamed Mekhemar, Klinik für Zahnerhaltung und Parodontologie, UKSH Kiel
Amendment vom: 04. Februar 2021 (Eingang: 05. Februar 2021)
In-vitro Untersuchung der Wirkung verschiedener Biomoleküle und Entzündung auf orale Stammzellen
Basisformular v. 04.02.21; Studienprotokoll 2021; Informationsblatt und Einverständniserklärung für wissenschaftliche Untersuchungen an körpereigenem Material

Sehr geehrter Herr Kollege El-Sayed, sehr geehrter Herr Kollege Mekhemar,

wir bestätigen den Eingang und die Kenntnisnahme des Amendments zu oben genannter Studie. Nach Durchsicht der Unterlagen durch die Geschäftsstelle und durch mich als Vorsitzenden der Ethik-Kommission bestehen gegen das Amendment und die Fortführung der Studie keine berufsethischen und berufsrechtlichen Bedenken.

Wir bitten jedoch um Beachtung der im Folgenden aufgeführten Hinweise:

Bitte ergänzen Sie in der Information die Vorgaben gemäß Informationspflichten gemäß DSGVO und reichen Sie entsprechend geänderte Versionen per E-Mail nach.
Wir weisen darauf hin, dass datenschutzrechtliche Aspekte von Forschungsvorhaben durch die Ethik-Kommission grundsätzlich nur cursorisch geprüft werden. Diese Bewertung ersetzt nicht die Konsultation des zuständigen Datenschutzbeauftragten.

Wir wünschen Ihnen für die Durchführung der Studie weiterhin viel Erfolg.

Mit freundlichen kollegialen Grüßen


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


Dr. med. Christine Glinicke
Geschäftsführung der Ethik-Kommission

7.2. Einwilligungsbogen



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

→ UNIVERSITÄTSKLINIKUM
Schleswig-Holstein

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

Name Patient

Geburtsdatum

Informationsblatt und Einverständniserklärung für wissenschaftliche Untersuchungen an körpereigenem Material

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

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

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

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

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

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

Wir danken Ihnen für die Unterstützung unserer Forschungsvorhaben!

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

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

Kiel, den ____ . ____ . _____

Unterschrift Patient/Patientin

Unterschrift Zahnarzt/Zahnärztin

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



8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen Dank an Herrn Prof. Dr. Christof Dörfer, Direktor der Klinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein am Campus Kiel, richten, der mir die Arbeit in seiner Abteilung ermöglicht hat und stets interessiert war am Fortschreiten dieser Arbeit.

Insbesondere möchte ich Herrn Prof. Dr. Karim Mohamed Fawzy El-Sayed, Leiter des Forschungsbereiches der Klinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie, für das Forschungsthema sowie die fortwährende Unterstützung danken. Durch ihn konnte ich viel Erfahrung im Bereich der wissenschaftlichen Forschung sammeln.

Ein besonderer Dank geht an Frau Dr. Antje Geiken und Herrn Dr. Johannes Tölle, die mich stets tatkräftig unterstützt und viel Zeit investiert haben. Von Ihnen konnte ich Einiges lernen und Ihr Engagement hat viel zum Fertigstellen dieser Arbeit beigetragen.

Zudem danke ich herzlich Frau Mojgan Paymard-Stolz und Frau Regina Marquardt für die vielen gemeinsamen Stunden, beruhigenden Worte und technische Hilfe in allen Situationen. Sie waren mir stets eine große Stütze. Es war eine Freude mit Ihnen zusammen zu arbeiten.

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

Mein großer Dank geht an meine Eltern und meinen Verlobten für Ihre Unterstützung. Sie standen sowohl während dieser Forschungsarbeit als auch während des ganzen Studiums mit Rat und Tat an meiner Seite und hatten immer aufmunternde Worte parat.

9. Eidesstattliche Versicherung

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

30.07.2023



Datum, Unterschrift Doktorandin