

Aus der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie
Direktor: Prof. Dr. Wolfgang Buchalla
Fakultät für Medizin
Universität Regensburg

Die Rolle des Transkriptionsfaktors ZBTB16 bei der osteogenen Differenzierung dentaler Follikelzellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Biomedizinischen Wissenschaften

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Oliver Heinrich Felthaus

2014

Aus der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie
Direktor: Prof. Dr. Wolfgang Buchalla
Fakultät für Medizin
Universität Regensburg

Die Rolle des Transkriptionsfaktors ZBTB16 bei der osteogenen Differenzierung dentaler Follikelzellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Biomedizinischen Wissenschaften

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Oliver Heinrich Felthaus

2014

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

Betreuer: Prof. Dr. Gottfried Schmalz

Tag der mündlichen Prüfung: 16.10.2014

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis.....	1
2	Zusammenfassung.....	4
3	Einleitung	5
3.1	Stammzellen	6
3.2	Mesenchymale Stammzellen.....	9
3.3	Zähne als Quelle mesenchymaler Stammzellen.....	11
3.4	Transkriptionsfaktoren.....	12
3.5	Knochenentwicklung/osteogene Differenzierung	13
3.6	Dentale Follikelvorläuferzellen.....	16
3.7	Der Transkriptionsfaktor ZBTB16	19
4	Zielsetzung.....	21
5	Material und Methoden.....	22
5.1	Isolierung und Kultivierung der dentalen Follikelzellen	22
5.2	Durchflusszytometrie.....	23
5.3	Osteogene Differenzierung.....	23
5.4	Messung der ALP-Aktivität	24
5.5	Alizarin-Färbung.....	24
5.6	Elektronenmikroskopie/EDX-Analyse	25
5.7	RNA-Isolierung.....	26
5.8	Reverse Transkription	27
5.9	RT-PCR	28
5.10	Agarose-Gelelektrophorese.....	29
5.11	Real-Time RT-PCR	30
5.12	Microarray	33
5.13	Transfektion	34
5.13.1	Überexpression.....	34
5.13.2	Inhibition.....	36
5.14	Glucocorticoidrezeptorinhibition.....	37

5.15	Klonierung	37
5.16	Chromatinimmunpräzipitation	39
5.17	Statistische Auswertung	41
6	Ergebnisse	42
6.1	Isolierung und Charakterisierung dentaler Follikelzellen	42
6.1.1	DFCs sind plastikadhärente, Kolonie-bildende, multipotente Stammzellen.....	42
6.1.2	DFCs lassen sich in ODM osteogen differenzieren	43
6.2	Nach Dex-induzierter Differenzierung sind osteogene Marker nicht reguliert.....	45
6.3	Die stöchiometrische Elementverteilung entspricht der von Hydroxylapatit	46
6.4	Die Expression von ZBTB16 und Runx2 kann durch siRNA inhibiert werden	48
6.5	Überexpression von ZBTB16 bewirkt Änderungen in der Expression osteogener Marker und eine Erhöhung der ALP-Aktivität	53
6.6	ZBTB16 Überexpression stellt zum Teil die Expression durch RU486 inhibierter Gene wieder her	54
6.7	ZBTB16-Überexpression bewirkt genomweite Änderungen im Expressionsprofil ...	55
6.8	PTHLH-, aber nicht STC1-Transfektion bewirkte eine Steigerung der ALP-Aktivität.	56
6.9	Nach PTHLH-Transfektion werden weder PTHLH noch osteogene Marker hochreguliert.....	57
6.10	PTHLH-Transfektion bewirkt die endogene PTHLH-Herunterregulation	57
6.11	STC1-Überexpression induziert osteogene Marker	59
6.12	ZBTB16 bindet an den NR4A3- und OSX-, aber nicht den RUNX2-Promotor.....	61
7	Diskussion.....	62
7.1	DFCs sind osteogen differenzierende, biomineralisierende Zellen	62
7.2	RUNX2 ist in DFCs für die Dexamethason-induzierte Differenzierung von untergeordneter Bedeutung	62
7.3	Der Dexamethason-vermittelte Differenzierungsmechanismus in DFCs unterscheidet sich von dem in BM-MSCs und SHED	63
7.4	PTHLH ist kein downstream-Vermittler der ZBTB16-induzierten osteogenen Differenzierung in DFCs.....	66
7.5	STC1 könnte Teil des ZBTB16-abhängigen Differenzierungs-mechanismus sein ..	67
8	Schlussfolgerung.....	69

9	Materialienverzeichnis	70
9.1	Verbrauchsmaterialien	70
9.1.1	Einwegartikel.....	70
9.1.2	Chemikalien	70
9.1.3	Kits.....	71
9.1.4	Antikörper.....	72
9.2	Geräte	72
10	Abkürzungsverzeichnis	73
10.1	Methoden und Geräte	73
10.2	Institutionen.....	73
10.3	Einheiten	73
10.4	Materialien	74
10.5	Zellen	75
10.6	Proteindomänen.....	75
10.7	Gene	75
11	Literaturverzeichnis.....	77
12	Abbildungsverzeichnis	89
13	Tabellenverzeichnis	90
14	Eigene Publikationen	91
15	Danksagung	93
16	Erklärung	94

2 Zusammenfassung

Dentale Follikelzellen (*Dental Follicle Cells*, DFCs) lassen sich durch Stimulation mit den Wachstumsfaktoren BMP2 (*Bone Morphogenetic Protein 2*) oder IGF2 (*Insulin-like Growth Factor 2*) sowie dem Glucocorticoid Dexamethason osteogen differenzieren. Während alle drei Induktoren geeignet sind, die Steigerung der ALP (Alkalische Phosphatase)-Aktivität und die Bildung einer mineralisierten Matrix zu stimulieren, werden zahlreiche typische osteogene Differenzierungsmarker nur nach Behandlung mit BMP2 oder IGF2 hochreguliert. Insbesondere RUNX2 (*Runt-related transcription factor 2*), ein Transkriptionsfaktor, dem eine Schlüsselrolle bei der osteogenen Differenzierung zugeschrieben wird, wird nach Stimulation mit Dexamethason in DFCs nicht reguliert. Der Transkriptionsfaktor ZBTB16 (*Zinc finger and BTB domain-containing protein 16*) wird nach Induktion der Differenzierung mit Dexamethason stark hochreguliert. Osteogene Markergene, die durch Dexamethason nicht hochreguliert werden, werden auch durch Expression von ZBTB16 nicht hochreguliert. Osteogene Markergene, die durch Dexamethason reguliert werden, werden auch durch ZBTB16-Expression hochreguliert. Wird die Wirkung von Dexamethason inhibiert, kann durch Expression von ZBTB16 die durch die Dexamethason-Inhibition verminderte Hochregulation einiger Gene wiederhergestellt werden. Inhibition von RUNX2 bewirkt nur nach BMP2-Stimulation, nicht aber nach Dexamethason-Stimulation eine Verminderung der osteogenen Differenzierung. Inhibition von ZBTB16 hingegen bewirkt eine deutliche Verminderung der Dexamethason-induzierten osteogenen Differenzierung. Es ist daher davon auszugehen, dass RUNX2 bei dem durch Dexamethason vermittelten Differenzierungsmechanismus nur eine untergeordnete Rolle spielt. Ein mögliches Zielgen von ZBTB16 könnte STC1 (Stanniocalcin) sein, da dessen Expression eng mit der Expression von ZBTB16 zusammenhängt und durch STC1 ebenfalls ähnliche Marker hochreguliert werden.

3 Einleitung

Eines der großen Probleme in der Zahnmedizin besteht in der Rückbildung des Kieferknochens nach einem Zahnverlust, wie er durch Traumata, Parodontitis oder kariös bedingt nicht mehr erhalten werden könnende Zähne erfolgen kann. Wird der Kieferknochen nicht mehr belastet, werden Osteoklasten aktiviert, die mittels proteolytischer Enzyme und damit einhergehenden horizontalen und vertikalen Resorptionsprozessen den Knochen abbauen (Buddecke, 1981; Ott, 2003). Dies kann dazu führen, dass nicht mehr genügend Knochensubstanz vorhanden ist, um ein Zahnimplantat setzen zu können. Darüber hinaus kann Knochenabbau nach dem Einbringen eines Zahnimplantats durch Periimplantitis erfolgen (Heitz-Mayfield, 2008). Zahnverlust und Abbau des Kieferknochens stellen weltweit ein gravierendes Gesundheitsproblem dar.

Ein weiteres Indiz dafür, dass Zahnverlust und Abbau des Kieferknochens ein großes und aktuelles Problemfeld in der Gesundheitsversorgung darstellen, ist die steigende Anzahl an Knochenersatzmaterialien, die eingesetzt werden. Seit den grundlegenden Arbeiten zur Knochenimplantation Ende des 19. Jahrhunderts (Barth, 1895) sind verschiedene Materialien zur Behandlung von Knochendefekten eingesetzt worden. Neben allogenen (Kübler et al., 1994) und xenogenen (Mardas et al., 2010) Knochentransplantaten handelt es sich hierbei auch um synthetische Materialien. Hierzu gehören unter anderem Hydroxylapatit (Osborn and Newesely, 1980), beta-Tricalciumphosphat (Wiltfang et al., 2002), verschiedene Polymere (Biswas et al., 2010) und Calciumphosphat-Zemente (Kolk et al., 2012). Eine Weiterentwicklung dieses Ansatzes ist der Einsatz von Knochenersatzmaterialien in Kombination mit Wachstumsfaktoren und/oder lebenden Zellen. Neben dem Einsatz von synthetischen Knochenersatzmaterialien ist der Ersatz des verlorenen Knochens durch autologen Knochen vom Beckenkamm aktuell der Goldstandard (Gerressen et al., 2009; Kolk et al., 2012), da bis heute kein Knochenersatzmaterial zur Verfügung steht, welches autologem Knochen gleichwertig ist (Horch et al., 2006; Smeets et al., 2009).

Da synthetische Materialien nie die volle Funktionalität ersetzen können und eine autologe Transplantation immer mit einer Hebemorbidität verbunden ist, wären alternative Therapieformen wünschenswert. In letzter Zeit wurde viel Hoffnung in das Züchten von Geweben außerhalb des Körpers mithilfe von Stammzellen gesetzt. Bei diesem als *Tissue Engineering* bezeichneten Prozess könnte Knochengewebe durch den gezielten Einsatz bestimmter Zellkulturbedingungen erzeugt werden (Langer and Vacanti, 1993). Um immunbedingte Abstoßungsreaktionen zu vermeiden, sollten die verwendeten Zellen autolog sein, also vom zu behandelnden Patienten stammen. Mesenchymale Knochenmarkstammzellen (*Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells*, BM-MSCs) sind hierfür gut geeignet, können jedoch nur durch einen invasiven Eingriff gewonnen werden. Eine

hervorragende Alternative könnten Stammzellen aus dentalen Geweben darstellen. Dentale Follikelzellen z.B. stammen aus einem Gewebe, das bei der Extraktion von Weisheitszähnen als klinischer Abfall anfällt. Bedenkt man, dass die operative Weisheitszahnentfernung zu den häufigsten durchgeführten operativen Eingriffen zählt (Eklund and Pittmann, 2001; Kunkel et al., 2004), wird das Potential dieses Gewebes als Quelle mesenchymaler Stammzellen deutlich. Trotz großer Fortschritte auf diesem Forschungsgebiet sind die Mechanismen der osteogenen Differenzierung noch nicht bis ins Detail verstanden. Insbesondere mögliche Unterschiede im Differenzierungsmechanismus von Zellen unterschiedlicher entwicklungsgeschichtlicher Herkunft sind noch nicht detailliert untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit soll ein Beitrag für das Verständnis der osteogenen Differenzierung dentaler Follikelzellen geleistet werden. Auch wenn das *Tissue Engineering* selbst oder die Kombination von Stammzellen mit Knochenersatzmaterialien nicht Gegenstand dieser Arbeit sind, so ist es doch ein Ziel, die Kenntnisse über DFCs dahingehend zu erweitern, dass sie eines Tages für therapeutische Zwecke genutzt werden können. Eine wichtige Voraussetzung hierfür ist ein verbesserter Kenntnisstand über die Differenzierung der Stammzellen in die funktionellen Zellen des gewünschten Gewebes. Zunächst soll zum besseren Verständnis der theoretische Hintergrund erläutert werden. Dabei liegt der Fokus, ausgehend von einer allgemeinen Betrachtung, auf den Zelltypen, den Differenzierungswegen und den beteiligten Faktoren, die Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind.

3.1 Stammzellen

Stammzellen sind undifferenzierte Zellen, die sich über zwei Eigenschaften definieren: Selbsterneuerung und Differenzierungspotenzial.

Selbsterneuerung bedeutet, dass nach einer Zellteilung beide (symmetrische Teilung) oder eine (asymmetrische Teilung) der Tochterzellen die gleichen Eigenschaften besitzen wie die Ausgangszelle (Abbildung 1) (Morrison and Kimble, 2006). Wenn mindestens eine der beiden Tochterzellen die gleichen Eigenschaften wie die Ausgangszelle besitzt, bedeutet dies, dass Stammzellen sich theoretisch unter Aufrechterhaltung ihres Stammzellcharakters unbegrenzt teilen können. Dies ist jedoch *in vitro* kaum zu erreichen, da sich Stammzellen im Organismus in ihrer Stammzellnische befinden, die durch benachbarte Zellen, die extrazelluläre Matrix (*Extracellular matrix*, ECM), parakrine Faktoren und mechanische Kräfte definiert wird (Caplan, 2007; Jones and Wagers, 2008; Schofield, 1978), und die *in vitro* noch nicht ausreichend simuliert werden kann.

Als Ergebnis einer asymmetrischen Teilung entsteht neben einer Stammzelle eine Progenitorzelle, die eine begrenzte Anzahl von Teilungsschritten durchlaufen kann (nicht

dargestellt), aber deren Schicksal, sich in eine funktionelle Zelle ihres Gewebes zu differenzieren, bereits feststeht (Beckmann et al., 2007).

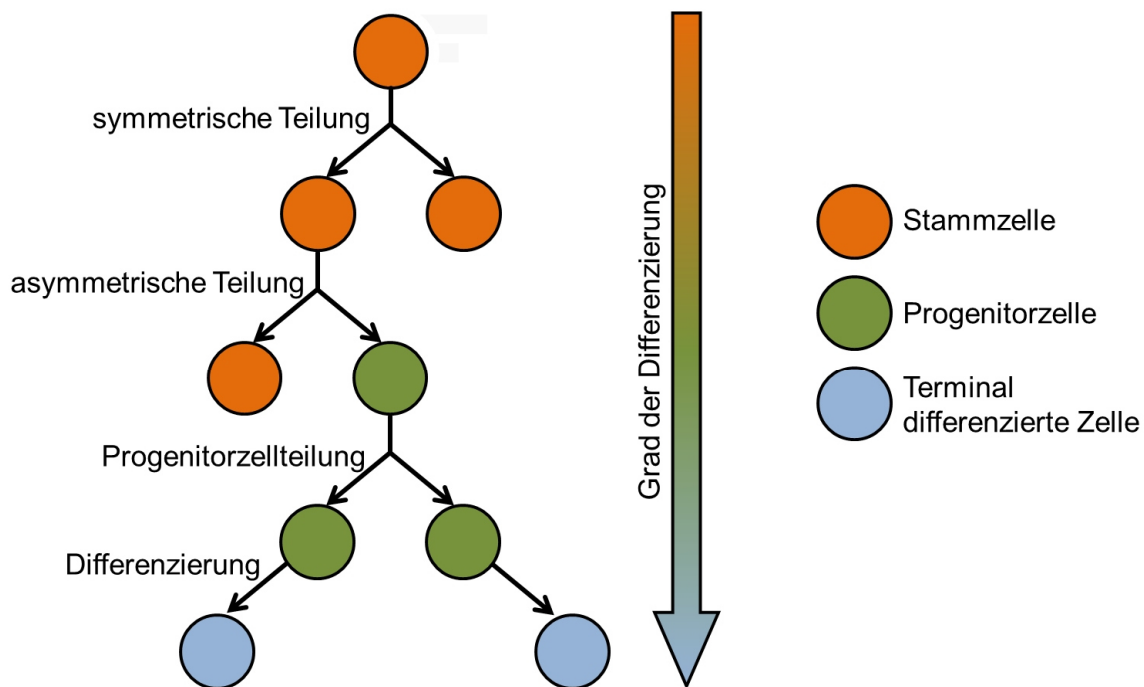


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Selbsterneuerung und Differenzierung von Stammzellen (eigene Darstellung in Anlehnung an http://en.wikipedia.org/wiki/Stem_cell)

Die zweite Stammzeleigenschaft, das Differenzierungspotential, beschreibt die unterschiedlich ausgeprägte Fähigkeit von Stammzellen, sich in funktionale Zellen eines Gewebes zu differenzieren. Es gibt verschiedene Arten von Stammzellen, die sich anhand ihres Differenzierungspotentials unterscheiden lassen (Abbildung 2). Aus totipotenten Stammzellen kann ein kompletter Organismus entstehen. Nur die Zygote sowie deren nicht voneinander unterscheidbaren Tochterzellen der ersten Teilungsschritte (Morula) sind totipotent (Mitalipov and Wolf, 2009). Mit Einsetzen der Blastulation geht eine Polarisierung einher, durch die die Zellen der entstehenden Blastocyste voneinander unterschieden werden können. Die Trophoblasten bilden die äußere Hülle der Blastocyste, dienen der Ernährung des heranwachsenden Embryos und bilden im Laufe der weiteren Entwicklung einen Teil der Placenta. Von den Trophoblasten umschlossen ist das Blastocoel, in dem sich die innere Zellmasse (*Inner cell mass*, ICM) befindet. Bei diesen Zellen handelt es sich um pluripotente embryonale Stammzellen, aus denen sich der eigentliche Embryo entwickelt (Mitalipov and Wolf, 2009). Pluripotent bedeutet, dass diese Zellen sich in jedes Gewebe aller drei Keimblätter des Organismus entwickeln können, also in Gewebe des Endoderms (umfasst unter anderem die Epithelien des Verdauungstraktes), Mesoderms (umfasst unter

anderem die Knochen, Muskulatur, Bindegewebe, Blutgefäße, Lymphgefäße, Nieren) und Ektoderms (umfasst unter anderem Haut, Nervensystem und Sinnesorgane). Pluripotente Stammzellen können jedoch kein extraembryonales Gewebe bilden und somit nicht einen kompletten Organismus entstehen lassen (Rossant, 2001). Die Gewinnung von embryonalen Stammzellen aus der inneren Zellmasse geht mit der Zerstörung der Blastocyste und damit dem Töten des Embryos einher, wodurch die Verwendung dieser Zellen ethische Probleme mit sich bringt. In geringer Anzahl können pluripotente Zellen aus Nabelschnurblut und möglicherweise auch aus dem Knochenmark gewonnen werden (Jiang et al., 2002; Ratajczak et al., 2007).

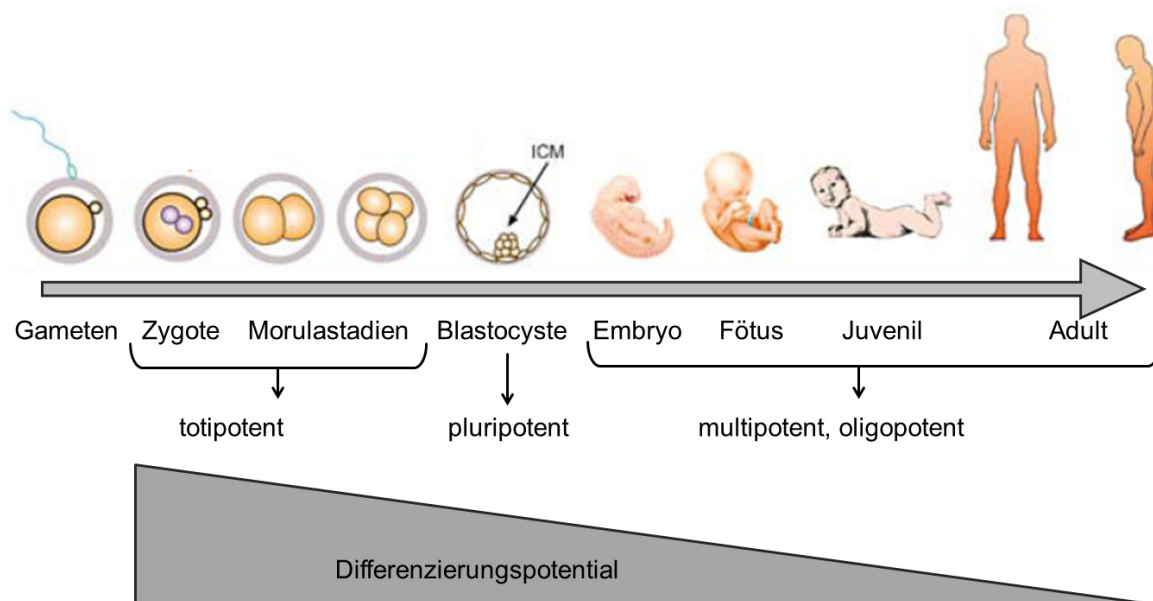


Abbildung 2: Differenzierungspotential von Stammzellen unterschiedlicher Entwicklungsstadien. Mit fortschreitender Entwicklung sinkt das Differenzierungspotential der Stammzellen eines Organismus (verändert nach Mitalipov and Wolf, 2009)

Durch den nächsten Entwicklungsschritt, die Gastrulation (nicht dargestellt), werden die Zellen den drei Keimblättern zugeordnet. Die hierbei entstehenden multipotenten Stammzellen können sich in die funktionalen Zellen vieler verschiedener Gewebe differenzieren, aber nur in die Gewebe des Keimblattes, aus dem sie entstanden sind. Im Gegensatz zu den embryonalen toti- und pluripotenten Stammzellen setzt sich die Existenz multipotenter Stammzellen bis zum adulten Organismus fort (Barrilleaux et al., 2006; Gimble et al., 2007). Mit Einsetzen der Organogenese können weiter spezialisierte Stammzellen entstehen, deren Differenzierungspotential sich auf wenige verschiedene Gewebe (Oligopotente Stammzellen) beschränkt. Bei den hier untersuchten adulten multipotenten Stammzellen handelt es sich um sogenannte mesenchymale Stammzellen (*Mesenchymal stem cells*, MSCs), die im nächsten Abschnitt genauer besprochen werden. Da diese

ursprünglich im Knochenmark entdeckt wurden, ist es wichtig, sie von dem anderen Knochenmark-Stammzelltyp des adulten Organismus, den hämatopoetischen Stammzellen, abzugrenzen. Aus diesen gehen alle Zelltypen des Bluts hervor (Dzierzak and Speck, 2008). MSCs, die andere Oberflächenmarker als hämatopoetische Stammzellen (bei diesen z.B. CD34, CD45) tragen, sind nicht in der Lage, in hämatopoetische Zellen zu differenzieren (Bonnet, 2003).

3.2 Mesenchymale Stammzellen

In der vorliegenden Arbeit kommen nur MSCs zum Einsatz. Hierbei handelt es sich um Zellen, die ihr multipotentes Differenzierungspotential bis zum adulten Organismus beibehalten haben und für die Regeneration adulter Gewebe verantwortlich sind. Das Konzept mesenchymaler Stammzellen geht bis ins 19. Jahrhundert zurück, als Julius Friedrich Cohnheim formulierte, dass Fibroblasten aus dem Knochenmark an der Wundheilung verschiedener Körperregionen beteiligt sind (Cohnheim, 1867). Später konnte Alexander A. Maximow mittels intensiver histologischer Studien die Existenz eines einzelnen Zelltyps zeigen, welcher sich zu verschiedenen Blutzellen entwickeln kann (Maximow, 1924). Auch wenn inzwischen bekannt ist, dass es sich bei diesen Zellen um hämatopoetische Stammzellen handelt, die nicht zu den MSCs gehören, war es Alexander A. Maximow, der den Begriff der Stammzelle geprägt hat. In den sechziger und siebziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts wurde die Isolierung und Charakterisierung der MSCs beschrieben (Friedenstein et al., 1966, 1974, 1976). Dieser Arbeitsgruppe gelang die Isolierung stromaler Zellen aus dem Knochenmark über ihre Fähigkeit der Plastikadhärenz. Darüber hinaus konnte die Fähigkeit dieser Zellen, Kolonien zu bilden und ektopisches Knochengewebe zu formen, nachgewiesen werden. Aufgrund ihrer Eigenschaften wurden diese Zellen als koloniebildende Fibroblasten (*colony-forming unit-fibroblasts*, CFU-f) bezeichnet. In den achtziger und neunziger Jahren des vergangenen Jahrhunderts wurde entdeckt, dass es sich bei den koloniebildenden Zellen aus dem Knochenmark um eine heterogene Zellpopulation handelt, die an der Entwicklung zahlreicher mesenchymaler Gewebe beteiligt ist (Owen, 1988; Owen and Friedenstein, 1988). Außerdem wurden die ersten Oberflächenmarker (*Cluster of differentiation*, CD) zur Identifizierung dieser Zellen (CD73, CD90, CD105) sowie die Möglichkeit, diese Zellen durch geänderte Zellkulturbedingungen in verschiedene Richtungen zu differenzieren, entdeckt (Goshima et al., 1991; Haynesworth et al., 1992a, 1992b; Murphy et al., 2013). Wegen ihrer Verbindung zur Entwicklung mesenchymaler Gewebe während der Embryogenese wurden diese Zellen als mesenchymale Stammzellen bezeichnet (Caplan, 1991). Die in den Anfangsjahren der MSC-Forschung entdeckten Eigenschaften bilden bis heute die Grundlage für die Definition

der MSCs. Die Internationale Gesellschaft für Zelltherapie (*International Society for Cellular Therapy*, ISCT) hat bestimmte Minimalkriterien definiert, die MSCs erfüllen müssen: MSCs sind unter normalen Zellkulturbedingungen plastikadhärente Zellen, die positiv für die Oberflächenmarker CD105, CD73 sowie CD90 und negativ für CD45, CD34 sowie HLA-DR-Marker sind, und sich in Osteoblasten, Chondroblasten und Adipocyten differenzieren lassen (Dominici et al., 2006). Neuere Studien legen nahe, dass frisch isolierte MSCs CD34 exprimieren und diesen Marker erst während der *in vitro*-Kultivierung verlieren (Yoshimura et al., 2006). Unabhängig von dieser Definition sind zahlreiche MSCs in der Lage, sich in Zellen weiterer Gewebe wie z.B. Muskeln zu differenzieren (Abbildung 3 (Bonfield and Caplan, 2010)).

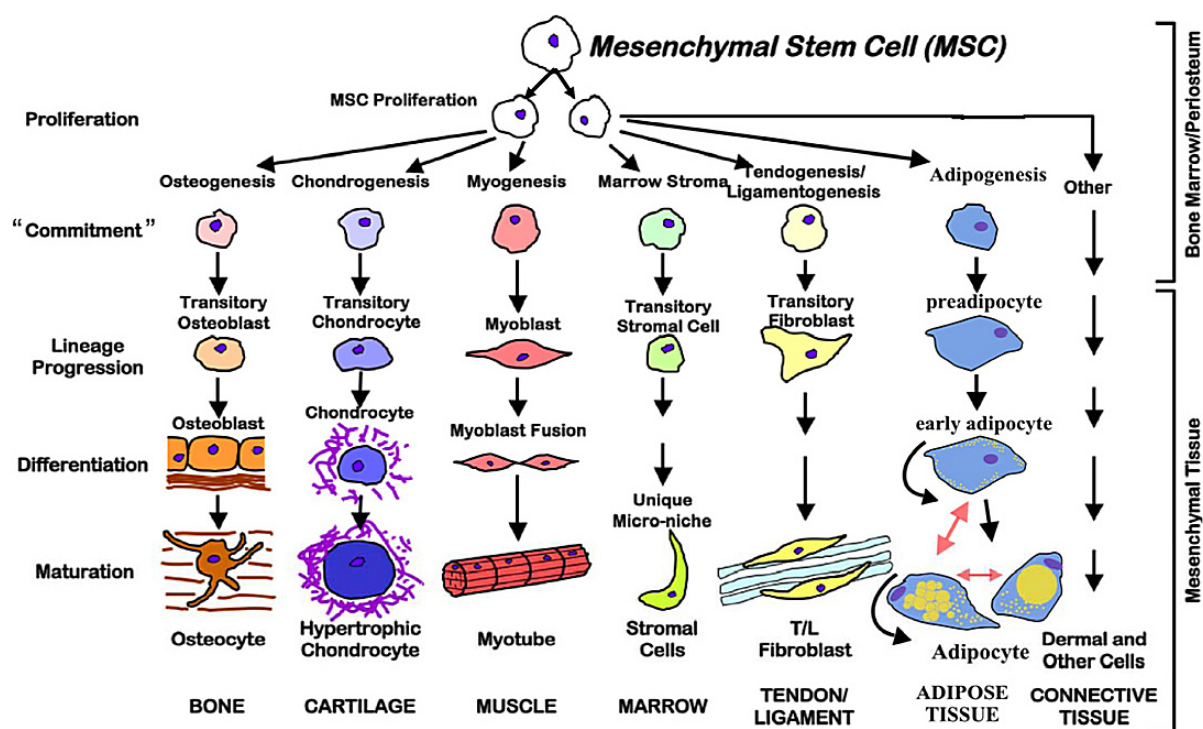


Abbildung 3: Differenzierung mesenchymaler Stammzellen in die funktionalen Zellen verschiedener mesenchymaler Gewebe (aus Bonfield and Caplan, 2010)

Seit ihrer Entdeckung im Knochenmark wurden MSCs in zahlreichen weiteren Geweben gefunden. Da die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zellen aus Zähnen stammen, wird diese Herkunft im folgenden Abschnitt 3.3 genauer besprochen. Neben dem Knochenmark und dentalen Geweben wurden MSCs auch aus Fettgewebe (Zuk et al., 2001), Haut (Wobus and Boheler, 2008) und peripherem Blut (Zvaifler et al., 2000) isoliert. Es ist sehr wahrscheinlich, dass jedes zur Regeneration fähige Gewebe Stammzellen enthält (Murphy et al., 2013). Studien aus der jüngeren Vergangenheit bieten eine Erklärungsmöglichkeit für diese ubiquitäre Verbreitung von MSCs im adulten Organismus. Zahlreiche Beobachtungen deuten darauf hin, dass MSCs perivaskulären Ursprungs sind und von Pericyten

abstammen. Pericyten sind Bindegewebszellen, die Kapillaren umgeben und durch Kontraktion die Durchblutung regulieren können (Peppiatt et al., 2006). Die Gemeinsamkeiten mit MSCs sind so groß, dass postuliert wurde, dass alle MSCs Pericyten sind (Caplan, 2008). Zunächst exprimieren sowohl MSCs als auch Pericyten CD146 und PDGF-R (Platelet-derived growth factor receptor). Darüber hinaus können Pericyten, die nach der Markerkombination CD146⁺, CD34⁻, CD45⁻, CD56⁻ sortiert wurden, osteogen, chondrogen, adipogen und myogen differenziert werden (Caplan, 2008; Crisan et al., 2008). Pericyten, die dieser Oberflächenmarkerkombination entsprechen, exprimieren auch die MSC-Marker CD44, CD73, CD90 und CD105 (Crisan et al., 2008). Durch die Sortierung ausgeschlossen wurden Pericyten, die positiv für den Endothelzellmarker CD34 oder den Marker für hämatopoietische Zellen, CD45, sind. Dies bedeutet im Umkehrschluss auch, dass nicht alle Pericyten MSCs sind. Allerdings ist die Definition der Zelltypen über ihr Oberflächenproteinexpressionsmuster aktuell im Umbruch. Insbesondere die neuen Erkenntnisse über die Unterschiede von frisch isolierten und *in vitro*-kultivierten MSCs bezüglich ihres Oberflächenproteinexpressionsmusters wird eine Anpassung der Definition mesenchymaler Stammzellen in naher Zukunft nötig machen. Die perivaskuläre Herkunft der MSCs könnte weitere Eigenschaften der MSCs erklären. So besitzen MSCs antiapoptotische und immunmodulatorische Eigenschaften, die sie unabhängig von ihrem Differenzierungspotential zu interessanten Forschungsobjekten in der Medizin machen (Phinney and Prockop, 2007; Ryan et al., 2005, 2007). Der positive Einfluss von MSCs und MSC-konditionierter Medien auf andere Zelltypen konnte in zahlreichen Versuchen nachgewiesen werden (Kuo et al., 2013; Song et al., 2014; Verhoekx et al., 2013; Yan et al., 2014). Die MSCs der vorliegenden Arbeit, bei der antiapoptotische und immunmodulatorische Eigenschaften nicht näher untersucht wurden, wurden aus dentalen Geweben isoliert, worauf im folgenden Abschnitt näher eingegangen werden soll.

3.3 Zähne als Quelle mesenchymaler Stammzellen

MSCs lassen sich aus verschiedenen dentalen Geweben isolieren (Morsczeck et al., 2008). Aus der Pulpa von Milchzähnen (dens deciduus) stammen SHED (*Stem cells from Human Exfoliated Deciduous teeth*) (Miura et al., 2003). Aus der Pulpa von Zähnen der zweiten Dentition können DPSCs (*postnatal Dental Pulp Stem Cells*) isoliert werden (Gronthos et al., 2000). Eine weitere Quelle für dentale Stammzellen ist die apikale Papille, aus der SCAP (*Stem Cells from Apical Papilla*) und dNC-PCs (*dental Neural Crest-derived Progenitor Cells*) gewonnen werden können (Degistirici et al., 2008; Sonoyama et al., 2008). Allen genannten vier Stammzelltypen ist gemein, dass sie mit der Zahnpulpa assoziiert sind, wohingegen zwei weitere dentale Stammzelltypen mit dem Zahnhalteapparat assoziiert sind (Morsczeck

et al., 2008). PDLSCs (*PerioDontal Ligament Stem Cells*) stammen aus dem Parodontalligament bereits eruptierter Zähne mit abgeschlossenem Wurzelwachstum (Seo et al., 2004), wohingegen DFCs (*Dental Follicle Cells*) aus dem Follikel von Zähnen, deren Wurzelwachstum noch nicht abgeschlossen ist, isoliert werden können (Morsczeck et al., 2005). Neben den Gemeinsamkeiten der dentalen MSCs mit BM-MSCs gibt es auch einige Unterschiede. So lassen sich die Zellen aus der Pulpa in funktionelle Odontoblasten differenzieren (Couple et al., 2000; Sakai et al., 2010). Die MSCs dentalen Ursprungs stammen aus ectomesenchymalen Geweben und damit entwicklungsgeschichtlich aus der Neuralleiste (*Neural crest-derived*). Dies ist möglicherweise der Grund, warum MSCs aus der Pulpa ein besseres Potential zur neuralen und epithelialen Differenzierung als BM-MSCs besitzen (Karaöz et al., 2011). Auch für DFCs konnte eine neurale Differenzierung gezeigt werden (Ernst et al., 2009; Felthaus et al., 2010). Interessanterweise exprimieren Pulpa- und Follikelstammzellen unterschiedliche neurale Marker nach gleicher Behandlung und unterscheiden sich somit in ihrem neuralen Differenzierungspotential voneinander (Morsczeck et al., 2010). Eine ausführlichere Beschreibung des dentalen Follikels und der aus ihm gewonnenen DFCs, die Gegenstand der Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit waren, folgt in Abschnitt 3.6.

3.4 Transkriptionsfaktoren

Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die über eine DNA-Bindedomäne an die DNA binden und dadurch Einfluss auf die Transkription von Genen nehmen können. Man kann zwischen allgemeinen und spezifischen Transkriptionsfaktoren unterscheiden. Allgemeine Transkriptionsfaktoren sind ubiquitär verbreitet und binden an allgemeine Promotorsequenzen wie die TATA-Box (Reese, 2003). Ihnen kommt nahezu keine regulatorische Funktion zu, da sie unabhängig vom Zelltyp und physiologischem Zustand an jeder Transkription beteiligt sind (Gossen et al., 2004). Ein typisches Beispiel für einen allgemeinen Transkriptionsfaktor sind die RNA-Polymerasen, bei denen es sich um Multi-Enzym-Komplexe handelt (Alberts et al., 2002).

Im Gegensatz zu den allgemeinen Transkriptionsfaktoren dienen spezifische Transkriptionsfaktoren der Regulation der Genexpression. Ihre Expression ist oft spezifisch für bestimmte Zelltypen und sie binden an spezifische Promotorsequenzen (Enhancer/Silencer). Die enorme Bedeutung, die Transkriptionsfaktoren für die Entwicklung und den Stoffwechsel der Zellen haben, wird durch die Tatsache verdeutlicht, dass ca. 10% aller Gene des Menschen für Transkriptionsfaktoren codieren (Babu et al., 2004). Damit stellen Transkriptionsfaktoren die größte Gruppe aller Proteine. Zusätzlich sind weitere Proteine wie Cofaktoren, Histonacetylasen, Histondeacetylasen und Methylasen an der

Regulation der Genexpression beteiligt. Diese gehören jedoch nicht zu den Transkriptionsfaktoren, da sie keine DNA-Bindedomäne besitzen (Brivanlou and Darnell, 2002). Zu den häufigsten Motiven, die Transkriptionsfaktoren zur Bindung an DNA-Sequenzen befähigt, gehören das *Helix-Turn-Helix*-Motiv, das *Helix-Loop-Helix*-Motiv, die Homöodomäne, der Leucin-*Zipper* und das Zink-Finger-Motiv (Alberts et al., 2002). Einige spezifische Transkriptionsfaktoren, die an der Regulation der Knochenentwicklung beteiligt sind, werden im folgenden Abschnitt beschrieben.

3.5 Knochenentwicklung/osteogene Differenzierung

Die meisten Knochen (Röhrenknochen (Ossa longa), Schulterknochen (Scapulae), Beckenknochen (Os sacrum, Os coccygis, Os coxae), Wirbel (Vertebrae)) des menschlichen Körpers entstehen durch einen Prozess, der endochondrale Ossifikation genannt wird (Tickle, 1995). Die Knochen des Schädels (cranium) sowie der Schlüsselbeine (Claviculae) hingegen werden durch intramembranöse Ossifikation gebildet (Mundlos and Olsen, 1997). In beiden Fällen sind undifferenzierte mesenchymale Stammzellen der Ausgangspunkt der Knochenentwicklung und die frühen pränatalen Entwicklungsschritte der Ossifikation sind bei beiden Prozessen identisch. *Tenascin*, *Msx1* (*Msh homeobox*), *Msx2* und *TGFβ* (*Transforming Growth Factor beta*) vermitteln eine Interaktion zwischen Epithel und Mesenchym, woraufhin sich das undifferenzierte Mesenchym verdichtet, so dass die Zellen in unmittelbaren Kontakt zueinander kommen (Hall and Miyake, 1992, Hall and Miyake 1995, Hall and Miyake 2000). Als Folge dieser Zellaggregation und der ermöglichten Zell-Zell-Kommunikation wird *Sox9* hochreguliert (Bell et al., 1997; Ferguson et al., 1998; Wright et al., 1995).

An dieser Stelle nehmen die beiden Prozesse der Knochenentwicklung einen unterschiedlichen Weg. Bei der endochondralen Ossifikation geht der eigentlichen Knochenbildung die Bildung von Knorpelgewebe voraus, weswegen der Vorgang auch als indirekte Ossifikation bezeichnet wird. Durch Aktivierung des *Indian Hedgehog*-Signalwegs wird der Transkriptionsfaktor *Gli1* hochreguliert. Infolgedessen entsteht eine knorpelige Matrix mit Expression der Kollagene II, IX und XI (Mundlos and Olsen, 1997). Das Gewebe, das hauptsächlich aus ruhenden, PTHLH (*Parathyroid Hormone-Like Hormone*) exprimierenden sowie aus hypertrophen, PTHLH-Rezeptor exprimierenden Chondrocyten besteht, ähnelt in seiner äußeren Form bereits dem Knochen, der sich daraus entwickeln wird (Ferguson et al., 1998; Lee et al., 1994; Vortkamp et al., 1996). Tabelle 1 listet einige Unterschiede zwischen der endochondralen und der intramembranösen Ossifikation auf.

Tabelle 1: Unterschiede zwischen der endochondralen und der intramembranösen Ossifikation.

	Endochondral	Intramembranös
Beteiligter Knochentyp	Die meisten Röhrenknochen und Plattenknochen	Knochen des Schädels, Schulterblätter
Beteiligte Stammzellen	Fibroblasten, Chondroblasten, Osteoblasten	Fibroblasten, Osteoblasten
Entwicklung der Gewebetypen	Dichtes Faserbindegewebe → Hyaliner Knorpel → Knochen	Dichtes Faserbindegewebe → Knochen
Knochenmarkraum im adulten Knochen	Wahrscheinlich	Unwahrscheinlich

Die molekularen Mechanismen, die bei der endochondralen Ossifikation zur anschließenden osteogenen Differenzierung führen, sind für BM-MSCs, den typischen Vorläufern der Osteoblasten in den meisten Knochen, gut untersucht (Caetano-Lopes et al., 2007; Ducy et al., 1997). Wachstumsfaktoren aus der Familie der Knochenmorphogenetischen Proteine (*Bone Morphogenetic Proteins*, BMPs), welche zur TGF-Superfamilie gehören, binden an Typ I- und Typ II-Serin/Threoninkinase-Rezeptoren, was zur Aktivierung von Smad-Komplexen und deren Translokation in den Zellkern führt (ten Dijke et al., 2003). Diese induzieren eine Signalkaskade, in deren Verlauf zunächst die Expression bestimmter Transkriptionsfaktoren wie RUNX2 (*Runt-related transcription factor 2*, alternativ Cbfa1, *Core-Binding Factor, runt domain, Alpha subunit 1*), DLX3 (*Distal-Less Homeobox 3*) oder Osterix (SP7, OSX) hochreguliert werden (Bendall and Abate-Shen, 2000; Ducy et al., 1997; Komori et al., 1997; Nakashima et al., 2002) (Abbildung 4).

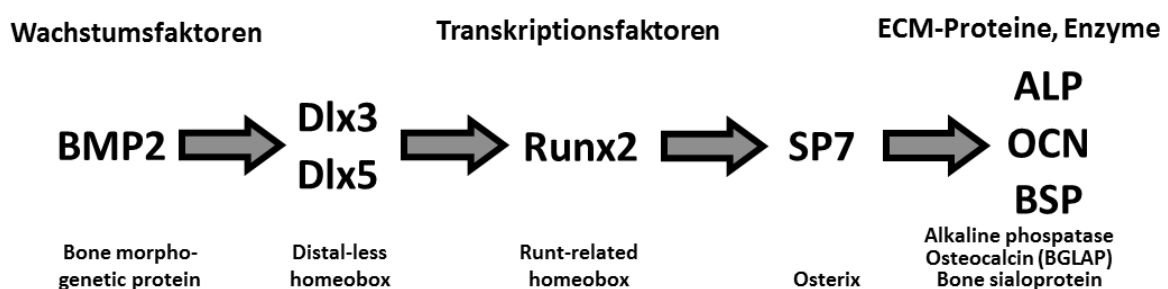


Abbildung 4: Klassischer Signalweg der osteogenen Differenzierung in BM-MSCs (eigene Darstellung)

Diese Transkriptionsfaktoren bewirken ihrerseits *downstream* die Expression weiterer osteogener Marker wie Bone sialoprotein (BSP), Osteocalcin (OCN, BGLAP), Osteopontin (OPN, SPP1) oder Alkalische Phosphatase (ALP) und letztendlich die Mineralisierung des

Gewebes (Bronckers et al., 1987; Ibaraki et al., 1992; Rodan et al., 1988). Zahlreiche Studien an BM-MSCs haben gezeigt, dass dem Transkriptionsfaktor RUNX2 dabei eine Schlüsselrolle zukommt (Ducy et al., 1997; Olsen et al., 2000; Otto et al., 1997). Ebenfalls von großer Bedeutung für die Knochenbildung ist der Wnt-Signalweg (Logan and Nusse, 2004). Wnt-Liganden binden an Rezeptoren der *Frizzled*-Familie und Co-Rezeptoren der LRP5/6-Familie (*Low-density lipoprotein Receptor-related Protein*) und aktivieren somit den kanonischen Wnt-Signalweg. Dabei wird der GSK-3 (*Glycogen Synthase Kinase 3*) vermittelte Abbau von β -Catenin inhibiert und die Aktivierung von LEF/TCF (*Lymphoid Enhancer-binding Factor/ Transcription factor T-Cell specific*) Transkriptionsfaktoren ermöglicht.

In vitro kann die osteogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen sowohl durch Wachstumsfaktoren wie BMP2 oder IGF2 (*Insulin-like Growth Factor 2*) als auch durch das künstliche Glucocorticoid Dexamethason induziert werden (Cheng et al., 1994; Saugspier et al., 2010). Dexamethason bindet wie Cortisol, allerdings mit höherer Affinität, an den Glucocorticoidrezeptor (GR), bewirkt damit dessen Dimerisierung und die anschließende Translokation in den Zellkern, wo der GR als Transkriptionsfaktor wirkt. Die Hochregulation der zuvor genannten osteogenen Marker in BM-MSCs nach Stimulation mit Dexamethason ist auch *in vitro* bestätigt worden (Frank et al., 2002). *In vivo* ist die Verabreichung von Dexamethason mit einem erhöhten Risiko für Osteonekrose und Osteoporose verbunden (Mattano et al., 2012; Weinstein, 2012). Die Bindung von Dexamethason kann durch RU486 (Mifepristone, 17 β -Hydroxy-11 β -(4-dimethylamino-phenyl)-17 α -(1-propinyl)estra-4,9-dien-3-on), welches den GR mit noch höherer Affinität bindet, inhibiert werden (Gallagher and Young, 2006; Nieman et al., 1985). Durch seine Struktur verhindert RU486 eine Dimerisierung des GR und somit dessen Einfluss auf die Genregulation.

Bei der intramembranösen Ossifikation fehlt eine aus Knorpelgewebe bestehende Zwischenstufe. Auf die Kondensation des Mesenchyms folgt eine Vaskularisierung des umgebenden Gewebes und die direkte Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen in Osteoblasten (Mundlos and Olsen, 1997). Auch wenn beide Formen der Knochenbildung Gemeinsamkeiten hinsichtlich ihrer Regulation zeigen, sind insbesondere die molekularen Mechanismen der Osteoblastenvorläufer, die aus der Neuralleiste stammen, noch nicht so gut untersucht wie die osteogene Differenzierung der BM-MSCs. In jedem Fall aber ist eine gesteigerte ALP-Aktivität ein frühes, die Bildung einer mineralisierten Matrix ein spätes Anzeichen für die osteogene Differenzierung (Puchtler et al, 1969, Whyte, 1994).

3.6 Dentale Follikelvorläuferzellen

Der dentale Follikel (Zahnsäckchen) ist ein Gewebe ectomesenchymaler Herkunft, das den Zahnkeim umgibt (Cahill and Marks, 1980; Ten Cate, 1997) und von entscheidender Bedeutung für die Eruption des Zahnes ist. Es stammt entwicklungsgeschichtlich aus der Neuralleiste (Bronner-Fraser, 1994; Noden, 1991). Während der Embryonalentwicklung wandern Zellen aus der Neuralleiste, genauer aus den Rhombomeren 1 und 2 (am dorsalen Ende der Neuralleiste), in den ersten Kiemenbogen und entwickeln sich dort zum Oberkiefer (Maxilla) und Unterkiefer (Mandibula) sowie zu den säugerspezifischen Gehörknöchelchen Hammer (Malleus) und Amboss (Incus) (Noden, 1983). Durch die Interaktion mit epithelialen Geweben wird die Entwicklung der Neuralleistenzellen im Ober- und Unterkiefer zum Organ Zahn bzw. zum Gewebe dentaler Follikel festgelegt (Langille, 1994; Olsen et al., 2000). Aus dem dentalen Follikel entwickelt sich der Zahnhalteapparat (Parodontium), welcher aus Zement (Zementoblasten), Periodontalligament (Fibroblasten) und Alveolarfach (Osteoblasten) besteht (Bosshardt and Schroeder, 1996; Morszeck et al., 2008; Ott, 2003). Abbildung 5a zeigt einen Zahnkeim und die Lage des dentalen Follikels im sich entwickelnden Zahn. Abbildung 5b zeigt einen entwickelten Zahn und den aus dem dentalen Follikel entstandenen Zahnhalteapparat. Auch das Zahnfleisch (Gingiva) wird zum Zahnhalteapparat gezählt, geht jedoch nicht aus dem dentalen Follikel hervor, sondern ist epithelialer Herkunft.

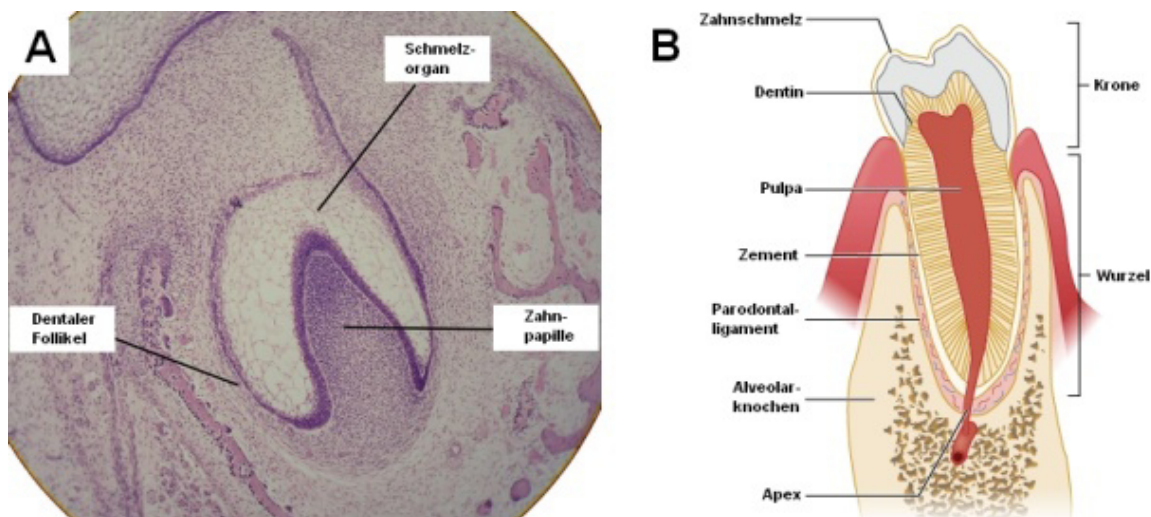


Abbildung 5: A: Zahnkeim (verändert nach Wikipedia (<http://en.wikipedia.org/wiki/File:Toothbud11-19-05labeled.jpg> under creative commons license). B: Zahn (verändert nach Tintinalli et al., 2010).

Die Zahnentwicklung ist ein komplexer Prozess, der durch zahlreiche Signalwege reguliert wird. Wie bei der Entwicklung der meisten Organe (Spemann, 1938) beginnt die Zahnentwicklung mit einer Interaktion von epithelialem mit mesenchymalem Gewebe, welches eine Verdichtung des dentalen Mesenchyms zur Folge hat. Die eigentliche

Zahnentwicklung wird in vier Stadien unterteilt. Das Knospenstadium (*bud stage*) beginnt mit der Einwanderung epithelialer Zellen ins Ectomesenchym des Kiefers. Erst mit dem Kappenstadium (*cap stage*) kann eine Anordnung der Zellen in Schmelzorgan, Papille und Follikel beobachtet werden. Im anschließenden Glockenstadium (*bell stage*) trennt der sich entwickelnde Zahn vom Mundepithel, mit dem er über die dentale Lamina verbunden war. Im Kronenstadium entstehen durch Bildung von Dentin und Zahnschmelz die mineralisierten Gewebe der Zahnkrone (Ten Cate, 1997; Thesleff et al., 1995a; Thesleff et al., 1995b; Thesleff 2003). Abbildung 6 gibt einen Überblick über die verschiedenen Stadien der Zahnentwicklung sowie die beteiligten Wachstumsfaktoren und Signalwege, auf die hier nicht im Einzelnen eingegangen werden soll, da weniger die Zahnentwicklung, sondern die osteogene Differenzierung Gegenstand dieser Studie ist.

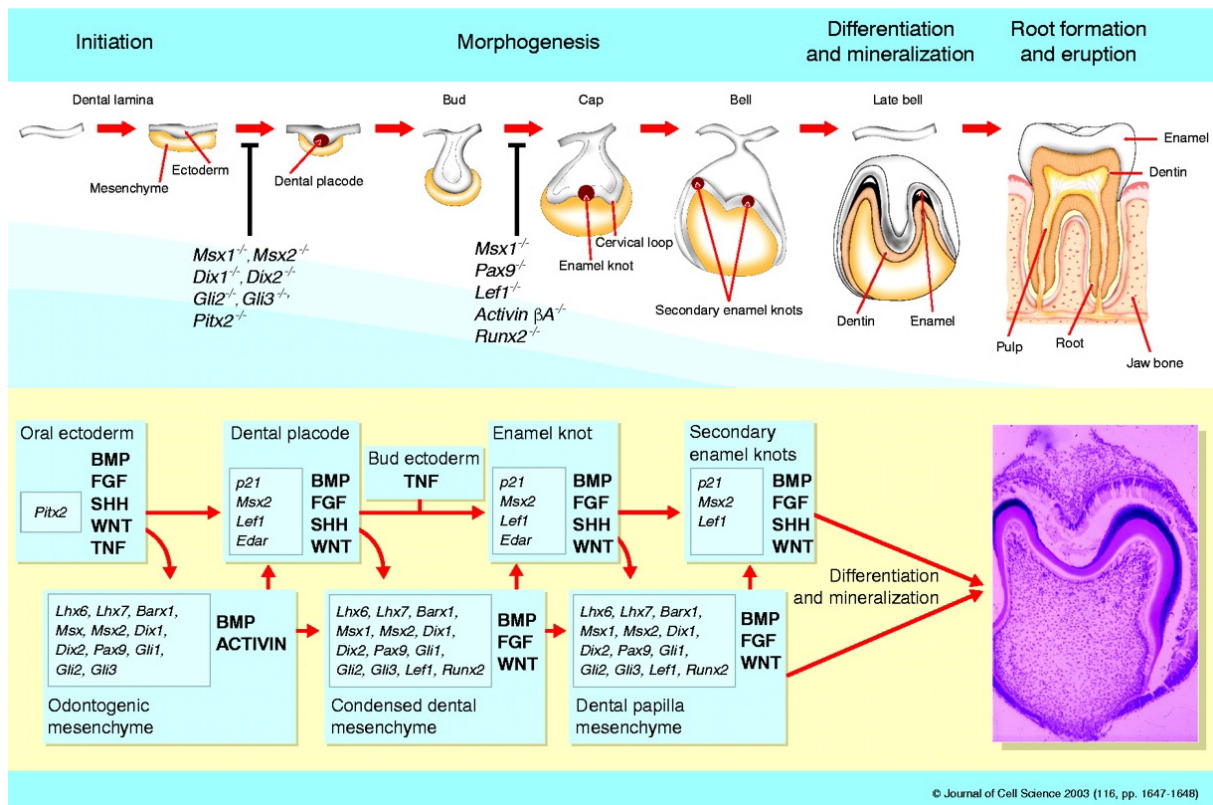


Abbildung 6: Zelluläre Signalwege bei der Zahnentwicklung (aus Thesleff, 2003)

DFCs sind multipotente Stammzellen ectomesenchymaler Herkunft, die aus dem Follikel extrahierter Weisheitszähne isoliert werden können (Morscheck et al., 2005). Wie die meisten Zellen craniofazialer Herkunft und im Gegensatz zu BM-MSCs und der Entwicklung der meisten Skelettknochen durchlaufen DFCs bei der Differenzierung zu Alveolarosteoblasten keine endochondrale Ossifikation sondern eine desmale Ossifikation (intramembranöse Ossifikation) (Mundlos and Olsen, 1997; Honda et al., 2010). Die Wichtigkeit von RUNX2 ist jedoch auch für Osteoblasten craniofazialer Herkunft mit

intramembranöser Ossifikation gezeigt worden (Komori et al., 1997; Otto et al., 1997) und gilt daher als zentraler Regulator der endochondralen und desmalen Ossifikation gleichermaßen (Karsenty, 2013).

Stimulation der DFCs mit den Wachstumsfaktoren BMP2 oder IGF2 bzw. mit dem Glucocorticoid Dexamethason bewirkt eine osteogene Differenzierung mit induzierter Expression osteogener Markergene, gesteigerter ALP-Aktivität und deutlicher Mineralisierung der Matrix. Behandlung mit Dexamethason zeigte sogar die stärkste Mineralisierung (Saugspier et al., 2010). Zahlreiche osteogene Markergene, darunter der *keyplayer* RUNX2, waren jedoch nur nach BMP2- oder IGF2-, nicht jedoch nach Dexamethason-Induktion hochreguliert. Eine Microarray-Analyse derselben Studie hat ergeben, dass ZBTB16 (*Zinc finger and BTB domain-containing protein 16*) der am stärksten hochregulierte Transkriptionsfaktor in DFCs nach Induktion mit Dexamethason ist. Ohne Glucocorticoid-Stimulation ist die Expression von ZBTB16 in DFCs kaum nachweisbar. ZBTB16 als Hauptgegenstand der Untersuchung dieser Arbeit wird im folgenden Abschnitt ausführlicher beschrieben.

Ebenfalls stark hochreguliert war NR4A3 (*Nuclear Receptor subfamily 4, group A, member 3*). Dieser auch als NOR-1 (*Neuron-derived Orphan Receptor 1*) bekannte Transkriptionsfaktor ist ein 623 Aminosäuren (68 kDa) großes Protein aus der Steroid-Thyroid Hormon Retinoid Rezeptor Superfamilie/nukleäre Rezeptorfamilie intrazellulärer Transkriptionsfaktoren. NR4A3 besitzt eine N-terminale ligandenunabhängige Transaktivierungsdomäne, eine aus zwei Zinkfingermotiven bestehende DNA-Bindedomäne und C-terminal eine Ligandenbindedomäne mit einer ligandenabhängigen Transaktivierungsdomäne (Gronemeyer et al., 2004; Zhao and Bruemmer, 2010). Die Expression von NR4A3 kann durch verschiedene Stimuli wie Wachstumsfaktoren, Cytokine, Hormone oder zellulären Stress induziert werden (Maxwell and Muscat, 2006). NR4A3 ist an der Zellproliferation, Differenzierung, Entzündungsreaktionen und der Apoptose beteiligt (Pearen and Muscat, 2010; Zhao and Bruemmer, 2010). Obwohl die Vertreter der NR4-Untergruppe nukleärer Rezeptoren bei einer Vielzahl unterschiedlicher Gewebe, unter anderem Blutgefäßen, Muskel- und Fettgewebe, eine bedeutende Rolle spielen (Maxwell and Muscat, 2006), ist in der Literatur eine Beteiligung von NR4A3 an der osteogenen Differenzierung nur bei der Dexamethason- bzw. Insulin-vermittelten Differenzierung von DFCs beschrieben worden (Morsczech et al., 2009a; Saugspier et al., 2010; Viale-Bouroncle et al., 2013). Da NR4A3 nach Dexamethason-Stimulation in DFCs immer deutlich hochreguliert wird, wird dieses Gen in der vorliegenden Arbeit als Marker für Glucocorticoid-induzierte Differenzierung verwendet.

3.7 Der Transkriptionsfaktor ZBTB16

ZBTB16 ist ein Transkriptionsfaktor aus der Krüppel-like C2H2-Zinkfinger Typ Proteinfamilie. Die genomische Sequenz und die Struktur des Wildtyp-ZBTB16 wurden 1999 aufgeklärt (Zhang et al., 1999). Die komplette DNA-Sequenz (Genlocus: 11q23.1, GenBank: AF060568, Gene ID: 7704) umfasst 201 kb und besteht aus 6 Exons und 5 Introns. Die mRNA der häufigsten Transkriptionsvariante 2 (Reference Sequence: NM_001018011.1) besteht aus 2262 Basenpaaren. Das Protein, für das diese mRNA codiert, besteht aus 673 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht (molecular weight, MW) von 74 kDa. N-terminal besitzt ZBTB16 eine BTB/POZ (*Bric-a-brac/Tramtrack/Broad complex, Poxvirus and Zinc finger*)-Domäne, die der Protein-Protein-Interaktion dient und Co-Faktoren wie HDACs (Histondeacetylasen) bindet. An die BTB/POZ-Domäne schließt sich eine prolinreiche RD2 Repressordomäne an. C-terminal befinden sich neun Krüppel-like C2H2-Zinkfingerdomänen (Abbildung 7). Bei diesem DNA-Bindemotiv wird ein Zinkion (Zn^{2+}) koordinativ von zwei Cystein- und zwei Histidinresten gebunden. Die Expression von ZBTB16 wird durch Glucocorticoide stimuliert (Fahnenstich et al., 2003).

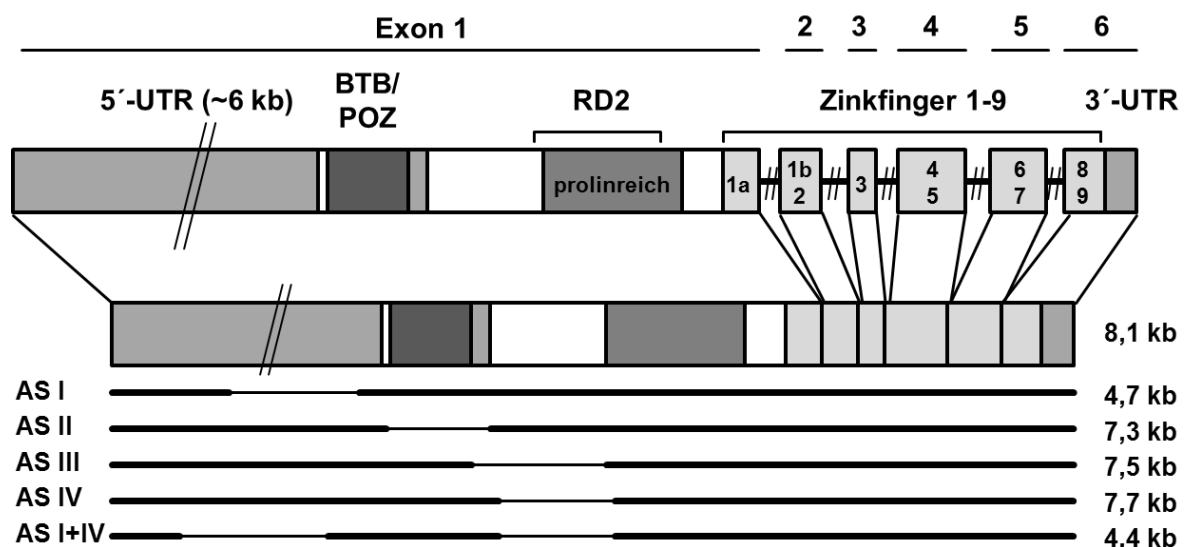


Abbildung 7: Struktur von ZBTB16 mit der ungewöhnlich langen 5'-untranslatierten region, der BTB/POZ-Domäne, der RD2-Repressordomäne sowie den neun C-terminalen Zinkfingern (eigene Darstellung in Anlehnung an Fahnenstich et al., 2003). Ebenfalls dargestellt sind die 5 alternativen Spleißvarianten (AS).

ZBTB16 wurde ursprünglich als Partner einer reziproken Translokation (t(11;17)(q23;q21)) mit dem *Retinoic Acid Receptor α* (RARα) bei der akuten promyelocytären Leukämie (APL) entdeckt (Chen et al., 1993), woher auch der in der Literatur häufig gefundene alternative Name PLZF (*Promyelocytic Leukemia Zinc Finger*) stammt. Eine weitere alternative Bezeichnung ist ZNF145 (*Zinc-Finger protein 145*).

Neben der Tatsache, dass ZBTB16 nach Induktion mit dem osteogene Differenzierung stimulierenden Glucocorticoid Dexamethason stark exprimiert wird (Saugspier et al., 2010), gibt es weitere Hinweise für eine Beteiligung dieses Transkriptionsfaktors an der Knochenbildung. Bei einem zehnjährigen Jungen, der für ZBTB16 eine Deletion auf dem paternalen Chromosom und eine *missense mutation* auf dem maternalen Chromosom aufweist, wurden Symptome schwerer Knochenfehlbildungen festgestellt (Fischer et al., 2008). ZBTB16 spielt eine Rolle bei der Strukturierung des Achsen- und Extremitätenskeletts (Barna et al., 2005). OPLL (*Ossification of the Posterior Longitudinal Ligament*) ist eine vererbare und in Asien verbreitete Krankheit, die durch ektopische Knochenbildung charakterisiert ist. Bei Zellen, die aus OPLL-Patienten isoliert wurden, konnte eine erhöhte ZBTB16-Expression ohne zusätzliche Stimulation nachgewiesen werden (Inoue et al., 2006). Überexpression des Zinktransporters ZIP1 (SLC39A1) in MSCs bewirkte neben einer Hochregulierung der osteogenen Marker ALP, OPN und RUNX2 auch die Hochregulation von ZBTB16 (Tang et al., 2006). Überexpression von ZBTB16 selbst hat in C2C12-Zellen eine Hochregulation der osteogenen Marker RUNX2, COL1A1, OCN und ALP bewirkt (Inoue et al., 2006). Darüber hinaus konnte für BM-MSCs gezeigt werden, dass ZBTB16 ein *upstream*-Regulator des *keyplayers* RUNX2 ist (Ikeda et al., 2005). In einer anderen Studie mit humanen MSCs konnte gezeigt werden, dass ZBTB16 als *upstream*-Regulator von SOX9 die chondrale Differenzierung fördert (Liu et al., 2011).

4 Zielsetzung

Für BM-MSCs und deren – üblicherweise endochondrale – Ossifikation sind die Mechanismen der Differenzierung gut untersucht. Nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren wie BMP2 wird eine Signalkaskade gestartet, die die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren wie RUNX2, DLX3 und OSX umfasst und an deren Ende eine Mineralisierung der Matrix durch Effektorproteine wie ALP, BSP oder OCN steht. Eine BMP2-Stimulation bewirkt bei den aus der Neuralleiste stammenden, eine intramembranöse Ossifikation durchlaufenden DFCs ein ähnliches Regulationsmuster. Die Glucocorticoid-vermittelte Stimulation der osteogenen Differenzierung hingegen führt bei DFCs nicht zu einer Hochregulation von RUNX2. Stattdessen wird der Transkriptionsfaktor ZBTB16 stark exprimiert, welcher nach Glucocorticoid-Induktion auch bei BM-MSCs, allerdings gemeinsam mit RUNX2, reguliert ist. Neben den BM-MSCs zeigen auch Zellen aus der Zahnpulpa, die wie DFCs ectomesenchymaler Herkunft sind, die Regulation von RUNX2 und ZBTB16 nach Glucocorticoid-Stimulation.

Es kann die Hypothese formuliert werden, dass in DFCs ein spezifischer osteogener Differenzierungsmechanismus existiert, bei dem RUNX2 nur eine untergeordnete Rolle spielt, wenn die Ossifikation durch ein Glucocorticoid induziert wird. Dabei könnte ZBTB16 die Rolle des Schlüsselproteins der Differenzierung einnehmen.

Da RUNX2 und weitere klassische osteogene Marker nach Stimulation mit Dexamethason in DFCs nicht reguliert werden, diese Zellen aber trotzdem eine gute osteogene Differenzierung zeigen, soll im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob DFCs einen alternativen, RUNX2-unabhängigen Mechanismus der osteogenen Differenzierung besitzen. Der Einfluss von ZBTB16 als der am stärksten regulierte Transkriptionsfaktor nach Induktion der Differenzierung mit Dexamethason auf die osteogene Differenzierung soll näher untersucht werden.

5 Material und Methoden

5.1 Isolierung und Kultivierung der dentalen Follikelzellen

Das Follikelgewebe stammt von impaktierten Weisheitszähnen junger Patienten, welche extrahiert wurden. Die Ethikkommission des Universitätsklinikums Regensburg wurde über die Isolierung und Verwendung der Stammzellen in *in vitro* Differenzierungsexperimenten informiert. Das Gewebe wurde vom Zahn getrennt, mit einem Skalpell (FEATHER Safety Razor Co., LTD, Osaka, Japan) zerkleinert (ca. 1mm³ Stücke) und anschließend in einer Kollagenase/Hyaluronidase (Roth, Karlsruhe) Lösung für 40 Minuten bei 37°C verdaut. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe serumhaltigen Zellkulturmediums (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* (mit 4,5 g/ml Glucose und L-Glutamin (Sigma-Aldrich)), DMEM, mit 10% fötalem Rinderserum, (*Fetal Bovine Serum*, FBS, Sigma-Aldrich), und 1% einer Penicillin/Streptomycin-Lösung (10.000 *units* Penicillin/ml, 10mg/ml Streptomycin, Sigma-Aldrich), im Folgenden „Zellkulturmedium“ genannt) gestoppt. Mithilfe eines Zellsiebs (Porengröße 70µm, BD Discovery Labware Falcon™, Boston, USA) erhält man aus der Zellsuspension Einzelzellen, die in T75-Zellkulturflaschen (Corning Inc., Lowell, USA) kultiviert wurden. Zusätzlich wurden auch die verbliebenen Gewebestücke in eine Zellkulturflasche mit Zellkulturmedium gegeben, um ein Auswachsen der verbliebenen Zellen aus der Peripherie der Gewebestücke zu ermöglichen.

Die Zellen wurden bis zum Erreichen der Subkonfluenz (ca. 80% des Zellkulturgefäßbodens sind bedeckt) in Zellkulturmedium bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Das Zellkulturmedium wurde alle zwei bis drei Tage gewechselt. Nach Erreichen der Subkonfluenz wurden die Zellen abgelöst und als Zellen der Passage 1 weiterkultiviert. Zur Ablösung der Zellen vom Boden des Zellkulturgefäßes wurden diese mit einer 0,25%igen Trypsinlösung (Sigma-Aldrich) in PBS (*Phosphate Buffered Saline*, phosphatgepufferte Salzlösung, (Sigma-Aldrich)) für 4-7 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend durch die Zugabe von Zellkulturmedium gestoppt. Die erhaltene Zellsuspension wurde für 5 Minuten bei 500 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das erhaltene Zellpellet in Zellkulturmedium resuspendiert. Nach Auszählen der Zellen wurden diese in einer Dichte von 5000 Zellen/cm² ausgesät und die Passagennummer um 1 erhöht. Die Versuche in der vorliegenden Arbeit wurden mit Zellen der Passage 6 durchgeführt.

Zellen, die nicht sofort benötigt wurden, wurden eingefroren. Hierfür wurden die Zellen in Kryomedium, welches aus DMEM, 20% FBS und 10% DMSO (Dimethylsulfoxid, Roth, Karlsruhe) besteht, zunächst auf -80°C heruntergekühlt und anschließend in der Gasphase

eines Behälters mit flüssigem Stickstoff (IN₂, -196°C, Arpege 110, Air Liquide, Düsseldorf) gelagert.

Mikroskopische Aufnahmen wurden mit dem Nikon Eclipse TS100 und einer CCD-Kamera (Nikon DS Fi2) erstellt.

5.2 Durchflusszytometrie

Für die Durchflusszytometrie wurden die DFCs in Passage 6 bis zur Subkonfluenz in Zellkulturmedium kultiviert und mittels Trypsin-Lösung abgelöst. Die DFCs wurden anschließend in PBS mit 0,01% Natriumazid (NaN₃, Roth) gewaschen und je 500.000 Zellen auf 8 *round-bottom tubes* (BD Discovery Labware Falcon™) verteilt. Nach erneutem Abzentrifugieren wurden die DFCs in 45µl PBS mit 0,01% NaN₃, 0.5% BSA (*Bovine Serum Albumin*, Bovines Serumalbumin, Biomol, Hamburg) und 2 mM EDTA (Ethylendiamintetraacetat, Merck, Darmstadt) resuspendiert. 5µl einer fluoreszenzmarkierten Antikörperlösung gegen die Marker CD105 (*anti-human* CD105-APC (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)), CD44 (*anti-human* CD44-FITC (Miltenyi Biotec)), CD146 (*anti-human* CD146-FITC (Miltenyi Biotec)) bzw. Nestin (*anti-human* nestin-PE *Monoclonal Antibody* (R&D Systems, Inc.; Minneapolis; USA)) wurden zugegeben und 1h auf Eis inkubiert. Als Kontrolle wurden entsprechende Isotypkontrollen (Mouse IgG2b-APC *isotype control antibody* (Miltenyi Biotec), *mouse* IgG-FITC (Miltenyi Biotec), *mouse* IgG1 *isotype Control*-PE (R&D Systems, Inc.), *Mouse* IgM, κ *isotype Control*, PE (BioLegend, San Diego, CA, USA)) verwendet. Für die Färbung von Nestin als intrazellulärem Protein wurden die Zellen zusätzlich mit Saponin behandelt. Nach der Inkubation wurden die Zellen erneut mit PBS mit 0,01% NaN₃ gewaschen, in 500µl PBS mit 0,01% NaN₃ resuspendiert und der Durchflusszytometrie zugeführt. Die Messung wurde mithilfe des BD FACSCANTO II (BD) vorgenommen.

5.3 Osteogene Differenzierung

Für die osteogene Differenzierung wurde das Zellkulturmedium mit 10⁻⁷ M Dexamethason, 10 mM β -Glycerophosphat, 100 µM Ascorbinsäurephosphat und 20 mM HEPES Puffer (alle Sigma-Aldrich) supplementiert (=osteogenes Differenzierungsmedium, ODM). In einigen Versuchen wurde zur Kontrolle statt Dexamethason 50 ng/ml BMP2 (rhBMP2, *recombinant human* BMP2, PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA) eingesetzt. In allen Versuchen wurde die osteogene Differenzierung mit Erreichen der Subkonfluenz gestartet und die Zellen wurden für die im jeweiligen Versuch angegebene Zeit im Differenzierungsmedium kultiviert.

5.4 Messung der ALP-Aktivität

Die ALP-Aktivität wurde über einen kolorimetrischen Nachweis gemessen. Diese Methode basiert darauf, dass ALP ein farbloses Substrat (*para*-Nitrophenylphosphate (pNPP)) durch Abspaltung von Phosphat in p-Nitrophenol umwandelt. Dieses wird unter alkalischen Bedingungen zu p-Nitrophenolat deprotoniert, welches eine starke Absorption bei 405nm zeigt. Die Zellen wurden zunächst in 96-*well plates* (Nunc™, über A. Hartenstein GmbH, Würzburg) kultiviert und zum im jeweiligen Versuch angegebenen Zeitpunkt mit 40 µl 0,1% (v/v) Triton-X-100 (Sigma-Aldrich) in PBS lysiert. 25µl des Zelllysats wurden mit 25µl Phosphatase-Substrat (Sigma-Aldrich) und 42µl *Alkaline buffer* (Sigma-Aldrich) vermischt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 42µl 0,3M NaOH gestoppt und anschließend die Absorption bei 405nm in einem Plattenphotometer (Infinite® F200, Tecan, Crailsheim) gemessen.

Mit den verbliebenen 15µl Zelllysats wurde zur Normalisierung der ALP-Aktivität der DNA-Gehalt des Zelllysats bestimmt. Hierzu wurde das Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit (Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA) gemäß den Angaben der Hersteller verwendet. Nach Verdünnung von 0,5µl des fluoreszenten Farbstoffs mit 185µl TE-Puffer (Bestandteil des Kits) wurde die Fluoreszenzintensität (Anregung bei 485nm, Emission bei 535nm) mit dem Infinite® F200 Plattenphotometer gemessen und die Werte der Testgruppen mit den entsprechenden Kontrollen verglichen.

Zusätzlich zur Aktivitätsmessung wurden in einem Versuch die Zellen nach Kultivierung in 6-*well plates* mit BCIP/NBT (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/nitroblue tetrazolium, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) gefärbt. Hierzu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 70% Aceton (Roth) für 10 Minuten fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit ddH₂O gewaschen, für 30 Minuten trocknen gelassen und für 20 Minuten mit BCIP/NBT-Lösung gefärbt. Nach ausgiebigem Waschen mit ddh₂O wurde die Färbung makroskopisch und mikroskopisch (Nikon Eclipse TS100, Chiyoda, Tokyo, Japan) dokumentiert.

5.5 Alizarin-Färbung

Eine 2%ige (w/v) Alizarin Rot S (Sigma-Aldrich) in PBS-Lösung wurde hergestellt und mittels Ammoniumhydroxid (Roth) auf einen pH-Wert von 4,3 eingestellt. Die Zellen wurden zum angegebenen Zeitpunkt nach mehrmaligem Waschen mit PBS mit 70% EtOH für 10 Minuten fixiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit der 2%igen Alizarin-Lösung für 20 Minuten gefärbt. Anschließend wurde überschüssiger Farbstoff durch ausgiebiges Waschen mit ddH₂O entfernt. Alizarin färbt spezifisch Calciumakkumulationen an, so dass die Färbung, makroskopisch und mikroskopisch dokumentiert, ein Maß für die

Mineralisierung der Zellen ist. Zur Quantifizierung wurden die gefärbten Mineralisierungen mithilfe einer 10%igen Cetylpyridiniumchlorid (Sigma-Aldrich) in PBS-Lösung entfärbt und die Absorption der entstandenen Lösung bei 540nm mit dem Infinite® F200 Plattenphotometer gemessen.

Zusätzlich zur Alizarinfärbung wurden in einem Versuch die Zellen nach Kultivierung mit dem OsteoImage™ Bone Mineralization Assay (Lonza, Basel, Schweiz) gemäß den Angaben des Herstellers gefärbt. Hierbei erfolgt der Mineralisierungsnachweis über eine Fluoreszenzmessung. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, mit EtOH für 20 Minuten fixiert und mit ddH₂O gewaschen. Anschließend wurden die Zellen 30 Minuten mit der Färbelösung inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit dem Waschpuffer des OsteoImage-Kits wurde die Fluoreszenzintensität mit dem Infinite® F200 Plattenphotometer gemessen (Anregung bei 485nm, Emission bei 535nm) (Kaivosoja et al., 2012; Shrivats et al., 2014).

5.6 Elektronenmikroskopie/EDX-Analyse

DFCs wurden in einer Dichte von 5000 Zellen/cm² auf Deckgläschen (Roth) ausgesät, die in *24-well plates* (Nunc™) gelegt wurden, und bis zur Subkonfluenz in Proliferationsmedium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für 21 Tage in ODM und zur Kontrolle in Zellkulturmedium kultiviert. Die Zellen wurden in 2,5%iger Glutaraldehyd-Lösung (1,5-Pentandial, Roth) für 20 Minuten fixiert. Die Zellen wurden elektronenmikroskopisch untersucht (Quanta 400 F, Fei, Eindhoven, Niederlande). Darüber hinaus wurden die Zellen einer EDX (*Energy-Dispersive X-ray spectroscopy*)-Analyse unterzogen (EDAX Energy Dispersive Spectrometer, Ametek, München). Bei diesem zur Röntgenspektroskopie gehörenden Verfahren handelt es sich um eine Messmethode der Materialanalytik (Gauglitz and Vo-Dinh, 2003). Das zu untersuchende Material wird mit einem Elektronenstrahl einheitlicher Energie bestrahlt. Dadurch werden (energieärmere) Elektronen aus der inneren Schale des Elements herausgeschlagen. Energiereichere Elektronen aus einer äußeren Schale nehmen den Platz ein und emittieren die Energiedifferenz in Form von Röntgenstrahlung (Abbildung 8). Die Energie dieser Röntgenstrahlung ist für jedes Element charakteristisch, wird von einem Detektor aufgefangen, und ermöglicht so die Identifizierung des bestrahlten Materials. Zusätzlich ist der Detektor in der Lage, das Masseverhältnis der Elemente einer Probe zu bestimmen.

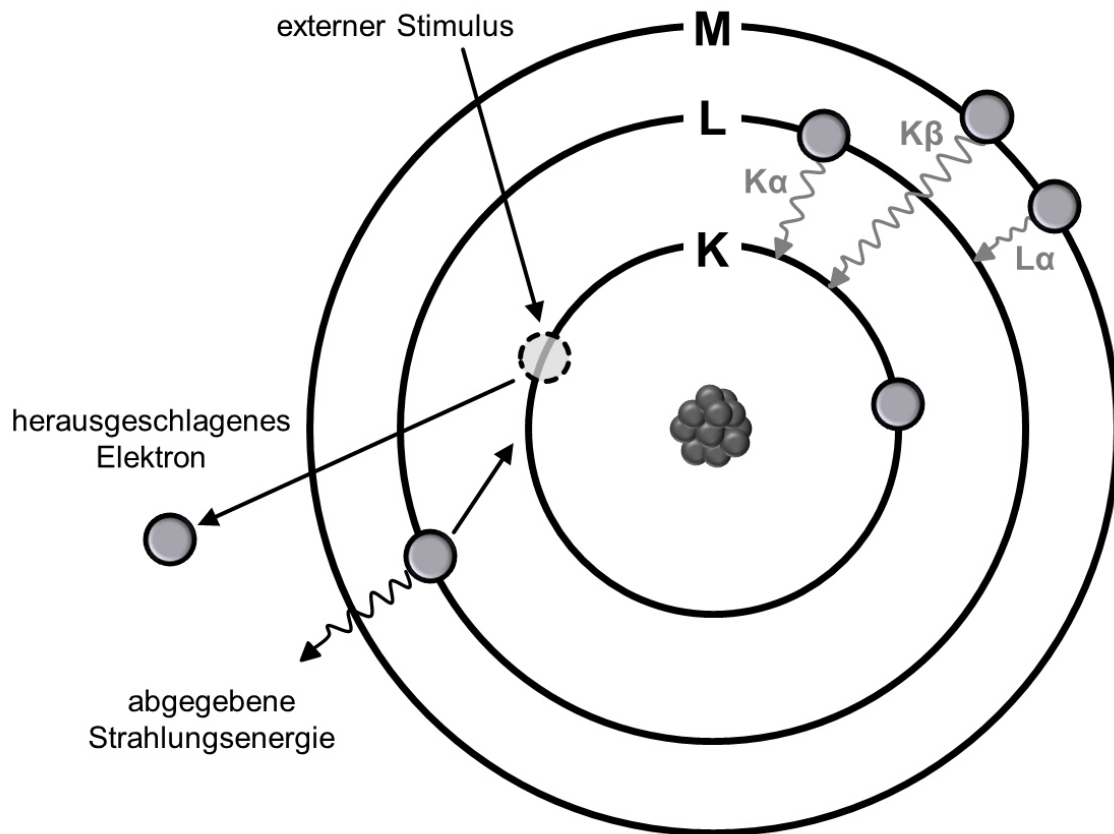


Abbildung 8: Funktionsprinzip der Energiedispersiven Röntgenspektroskopie (eigene Darstellung in Anlehnung an http://en.wikipedia.org/wiki/Energy-dispersive_X-ray_spectroscopy)

5.7 RNA-Isolierung

Um in anschließenden RT-PCRs (*reverse transcription polymerase chain reaction*, Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion) die Genexpression zu bestimmen, muss zunächst die RNA aus den Zellen isoliert werden. Hierfür wurde das RNeasy Plus Mini Kit von Qiagen (Hilden) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Mit Ausnahme des β -Mercaptoethanols (Sigma Aldrich) sowie des Ethanolstammens alle verwendeten Reagenzien sowie die Säulen und Puffer aus diesem Kit.

Für die RNA-Isolierung wurden die Zellen in 6-well plates bis zur Subkonfluenz in Proliferationsmedium kultiviert und anschließend der Versuch (entweder osteogene Differenzierung oder Transfektion mit Expressionsvektoren/sirNAS) gestartet. Zum im jeweiligen Versuch angegebenen Zeitpunkt wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und anschließend in 350 μ l RLT-Lysepuffer (Teil des RNeasy Plus Mini Kits) lysiert. Der Lysepuffer wurde mit 1% β -Mercaptoethanol supplementiert, um die Oxidation der RNA zu minimieren. Das Zelllysat wird in die Erste von insgesamt 3 Zentrifugationssäulen überführt. Die erste Säule (QIAshredder, Qiagen) dient der Homogenisierung der Probe. Große Zellbestandteile wie Zellmembrantrümmer, die die anschließende Bindung der RNA

behindern könnten, werden dabei während der Zentrifugation (13000 rpm (*revolutions per minute*, Umdrehungen pro Minute), für 2 Minuten) von der Membran der Säule zurückgehalten. Der homogenisierte Durchfluss wird in die nächste Zentrifugationssäule (gDNA *Eliminator spin column*) gegeben und erneut zentrifugiert (13000 rpm, 30 Sekunden). Bei diesem Schritt wird die genomische DNA in der Membran der Zentrifugationssäule zurückgehalten. Dies ist wichtig, damit die genomische DNA keine falsch-positiven Ergebnisse in der RT-PCR liefert. Der Durchfluss wird mit 350µl 70% Ethanol (EtOH) gemischt. EtOH ist notwendig für die Bindung der RNA an die Membran im nächsten Schritt. Das Zelllysat wird in die dritte Zentrifugationssäule (*RNeasy spin column*) überführt und für 15 Sekunden bei 13000rpm zentrifugiert, wobei die RNA an die Membran gebunden wird. Der Durchfluss wird verworfen. Die membrangebundene RNA wird nun einmal mit RW1-Waschpuffer und zweimal mit RPE-Puffer gewaschen (15 Sekunden bei 13000rpm). Diese Waschschrte dienen der Entfernung ungewünschter Salze und Proteine. Der Durchfluss wird jeweils verworfen. In einem letzten Schritt wird die RNA mit 30µl Nuklease-freiem Wasser aus der Membran eluiert (13000 rpm, 60 Sekunden) und anschließend deren Konzentration bestimmt. Bis zur weiteren Verwendung wird die RNA anschließend bei -80°C eingefroren.

5.8 Reverse Transkription

Bei den in einer PCR verwendeten Polymerasen handelt es sich um DNA-abhängige DNA-Polymerasen. Das bedeutet, dass diese Polymerasen DNA als Vorlage benötigen. Aus diesem Grund muss die isolierte RNA zunächst in cDNA (*complementary DNA*) umgeschrieben werden. Dies wird durch das Enzym Reverse Transkriptase, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, bewerkstelligt. Für die Reverse Transkription wurde das QuantiTect Reverse Transcription Kit von Qiagen gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Alle verwendeten Puffer und Reagenzien stammen aus diesem Kit.

Das Protokoll des verwendeten Kits ist in zwei Schritte aufgeteilt. Der erste Schritt dient dem Verdau eventuell vorhandener Reste genomischer DNA. Hierfür werden 1µg RNA mit 2µl 7-fach konzentriertem gDNA *Wipeout* Puffer gemischt, mit Nuklease-freiem Wasser auf ein Volumen von 14µl aufgefüllt und anschließend für 2 Minuten bei 42°C inkubiert. Im zweiten Schritt findet die eigentliche Reverse Transkription statt. Zu den 14µl aus der ersten Reaktion werden 4µl 5-fach konzentrierter RT-Puffer, 1µl Reverse Transkriptase und 1µl Primer-Mix hinzupipettiert. Der Primer-Mix enthält Oligo-dT-Primer und Random-Hexamer-Primer (Oligonukleotide von zufälliger Sequenz und 6 Nukleotiden Länge). Während die Oligo-dT-Primer den Poly-A-Schwanz von mRNA binden, binden die Random-Hexamer-Primer an zufällige, komplementäre Sequenzen der RNA. Bei einer Länge von nur 6 Nukleotiden sind

die Primer so unspezifisch, dass sie an verschiedenen Stellen jedes RNA-Moleküls binden können. Der Reaktionsmix wird für 15 Minuten bei 42°C inkubiert, wodurch die gesamte RNA in cDNA umgeschrieben wird. Durch die anschließende zweiminütige Inkubation bei 95°C werden sowohl die Reverse Transkriptase als auch alle doppelsträngigen RNA-DNA-Hybridmoleküle denaturiert. Die erhaltene cDNA wird bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

5.9 RT-PCR

Für die semiquantitativen RT-PCRs wurde der GoTaq® Green Master Mix (Promega, Madison, WI, USA) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. In diesem Reagenz ist die Polymerase, der Polymerase-Puffer, die dNTPs (Deoxyribonukleotidtriphosphate) sowie der Ladepuffer für die Gelelektrophorese bereits enthalten. Die Sequenzen für die spezifischen Primer für die nachzuweisenden Gene wurden mit der *online-software* Primer-Blast auf der NCBI-(*National Center for Biotechnology Information*) Homepage erstellt. Das NCBI gehört zur *United States National Library of Medicine* (NLM), welche wiederum zum *National Institute of Health* (NIH) gehört. Die Software basiert auf dem Programm Primer3 (Koressaar and Remm, 2007; Untergasser et al., 2012) sowie dem BLAST-(*Basic Local Alignment Search Tool*) Algorithmus (Altschul et al., 1990). Nach Möglichkeit wurden die Primer so gewählt, dass sie eine Annealing-Temperatur von 60°C aufweisen und dass einer der beiden Primer eines Primerpaares an eine Exon-Exon-Grenze der cDNA bindet. Hierdurch wird verhindert, dass eventuell verbliebene Reste von genomischer DNA von diesem Primer gebunden werden. Tabelle 2 (Seite 33) zeigt eine Liste aller verwendeten PCR-Primer. Alle verwendeten Primer wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bezogen.

Für alle semiquantitativen PCRs wurden 10 µl zweifach konzentrierter GoTaq® Green Master Mix mit 8µl Nuklease-freiem Wasser (Qiagen), 0,5 µl *forward*-Primer (10 pmol), 0,5 µl *reverse*-Primer (10 pmol), sowie 1µl cDNA (50ng) gemischt. Der MJ Mini Thermal Cycler (BioRad, Hercules, CA, USA) wurde verwendet. Im Folgenden ist der Ablauf des RT-PCR-Programms dargestellt:

PCR-Programm:

Schritt 1 (Denaturierung):	95°C	300s	
Schritt 2 (Denaturierung):	95°C	30s	
Schritt 3 (Annealing):	60°C(*)	45s	
Schritt 4 (Elongation):	72°C	60s	Schleife an Schritt 2
Schritt 5 (Kühlung):	4°C		

(*) Annealingtemperatur variabel, abhängig vom Primer (i.d.R. 60°C)

Der initiale Denaturierungsschritt dient der Aktivierung der Polymerase, bei der es sich um eine sogenannte *Hot-Start*-Polymerase handelt. Das bedeutet, dass die Polymerase zunächst an einen Antikörper gebunden und inaktiviert ist, bevor diese nicht für mehrere Minuten bei 95°C inkubiert wird. Dadurch wird ein unbeabsichtigter vorzeitiger Start der Polymerase-Reaktion verhindert. Die Denaturierung in Schritt 2 dient der Trennung der im Verlauf der folgenden Schritte gebildeten DNA-Doppelstränge. In Schritt 3 lagern sich die Primer an ihre spezifischen, komplementären Sequenzen der cDNA an. Im vierten Schritt synthetisiert die Polymerase ausgehend von den Primern in 5'-3'-Richtung den komplementären Strang. Nach dem vierten Schritt springt das Programm für eine vorgegebene Zyklenzahl, die von der erwarteten Expression des nachzuweisenden Gens abhängt und zwischen 20 und 32 liegt, wieder zu Schritt 2. Nach Durchlaufen der vorgegebenen Zyklenzahl wird der Reaktionsmix bis zur weiteren Verwendung auf 4°C abgekühlt.

5.10 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von PCR-Produkten anhand ihrer Größe. Das Prinzip dieser Auftrennung besteht darin, dass große DNA-Fragmente langsamer durch das molekulare Agarose-Netz wandern als kleine DNA-Fragmente. Mithilfe eines DNA-Standards kann abgeschätzt werden, ob die detektierte DNA-Bande der erwarteten Größe entspricht.

Für die Agarose-Gelelektrophorese wurde das Sub-Cell® GT Agarose Gel Electrophoresis System mit dem Power Pack 3000 verwendet (jeweils BioRad). 0,6 g Agarose (LE Agarose, Biozym. Oldendorf) wurden zu 50 ml TBE-Puffer (Tris-Borate-EDTA Puffer, Sigma-Aldrich) gegeben und durch Erhitzen in einem Mikrowellenherd (Bosch) gelöst (entspricht einer 1,2%igen Lösung). Die heiße Agaroselösung wird in die Gelkammer gefüllt. Mithilfe eines Kamms werden Taschen für die Probenbeladung ausgespart. Nach Abkühlung und damit einhergehender Polymerisation wird das Agarosegel mit TBE-Puffer überschichtet und

anschließend die PCR-Proben sowie der DNA-Standard (GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder, Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA) in die Taschen pipettiert. Nun wird eine Spannung von 120V angelegt, wodurch die negativ geladene DNA zur Anode gezogen wird. Nach ca. 40 Minuten wird das Gel entnommen und in einem Ethidiumbromid-Bad (Sigma Aldrich) für etwa 5 Minuten gefärbt und anschließend mit Wasser gewaschen. Die DNA-Banden wurden mit dem Bio-Vision™ 3000 (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) visualisiert.

5.11 Real-Time RT-PCR

Das Prinzip der quantitativen Real-Time RT-PCR beruht darauf, dass in Abhängigkeit der in jedem PCR-Zyklus neu-synthetisierten DNA die Menge eines detektierbaren fluoreszenten Farbstoffs steigt und die Fluoreszenzintensität somit ein Maß für die Menge an DNA darstellt. Die Menge neu-synthetisierter DNA wiederum ist ein Maß für die DNA-Menge zu Beginn der Reaktion. Die Fluoreszenzintensität kann nach jedem Zyklus gemessen werden, so dass die Amplifikation in Echtzeit (Real-Time) beobachtet werden kann. Für die Real-Time RT-PCRs der vorliegenden Arbeit wurde der Roche Light-Cycler® 2.0 (Roche Diagnostics, Mannheim) verwendet. Es wurden zwei verschiedene fluoreszente Farbstoffe (jeweils Roche) verwendet, die sich in ihrer Methode, neu-synthetisierte DNA zu detektieren, unterscheiden. SYBR®-Green ist ein Farbstoff, der wie Ethidiumbromid in doppelsträngige DNA interkaliert und dann durch UV-Licht zur Fluoreszenz angeregt werden kann. Da am Ende jedes Elongationsschritts, wenn die Fluoreszenzintensität gemessen wird, nur die von den spezifischen Primern flankierten Sequenzen doppelsträngig vorliegen sollten, und da nur in doppelsträngige DNA interkaliertes SYBR Green fluoresziert, ist die Fluoreszenzintensität ein Maß für die neu-synthetisierte DNA. Für die Real-Time RT-PCRs mit SYBR Green als fluoreszentem Farbstoff wurde das LightCycler Fast Start DNA Master Plus Set SYBR® Green (Roche) verwendet. Alternativ kann die Amplifikation der DNA auch über TaqMan-Sonden detektiert werden. Dabei handelt es sich um kurze Nukleotide, die an einem Ende an einen fluoreszenten Farbstoff gekoppelt sind und am anderen Ende an einem sogenannten Quencher. Dabei handelt es sich um ein Molekül, dass die Lichtemission fluoreszenter Farbstoffe unterbinden kann, wenn es sich in räumlicher Nähe befindet. Die Nukleotidsequenz der Sonden ist spezifisch für den zu amplifizierenden Bereich der cDNA. Das Detektionsprinzip nutzt die intrinsische DNase-Aktivität der Polymerase aus. Trifft die Polymerase während der Elongation des Folgestranges auf DNA-Fragmente, die an den Leitstrang gebunden sind, werden diese abgebaut. Dadurch entfernt sich der fluoreszente Farbstoff vom Quencher und die Fluoreszenz kann detektiert werden. Für die Real-Time RT-

PCRs mit Sonden wurde das Light Cycler Taq-Man Master Set verwendet. Die benötigten Kapillaren, in denen die Reaktion stattfinden, sind Bestandteil des jeweiligen Sets.

Wie beim GoTaq® Green Master Mix ist in den beiden Real-Time RT-PCR Reagenzien bereits die Polymerase, der Polymerase-Puffer sowie die dNTPs enthalten. Für alle quantitativen PCRs wurden 4 µl Master Mix mit 13 µl Nuklease-freiem Wasser (Qiagen), 1 µl forward-Primer (10 pmol), 1 µl reverse-Primer (10 pmol), sowie 1 µl cDNA (50 ng) gemischt und in LightCycler-Kapillaren überführt. Im Folgenden ist der Ablauf des Real-Time RT-PCR-Programms dargestellt:

PCR-Programm:

Schritt 1 (Denaturierung):	95°C	600s	
Schritt 2 (Denaturierung):	95°C	10s	
Schritt 3 (Annealing):	60°C(*)	5s	
Schritt 4 (Elongation):	72°C	20s	Schleife an Schritt 2 (44x)
Schritt 5 (Kühlung):	4°C		

(*) Annealingtemperatur variabel, abhängig vom Primer (i.d.R. 60°C)

Die einzelnen Schritte entsprechen denen der semiquantitativen PCR. Die Messung der Fluoreszenzintensität findet am Ende von Schritt 4 statt. Da die Quantifizierung nicht wie bei der semiquantitativen RT-PCR am Ende über die Bandenstärke eines Agarosegels erfolgt, sondern in Echtzeit erfolgt, muss die Zyklenzahl nicht in Abhängigkeit der erwarteten Genexpression gewählt werden. Jeder Real-Time RT-PCR-Lauf umfasste 45 Zyklen. Als Ergebnis erhält man den sogenannten C_t -Wert. Das ist die Zyklenzahl, bei der die gemessene Fluoreszenz einen Schwellenwert überschreitet. Die relative Genexpression wird mithilfe der $\Delta\Delta C_t$ -Methode berechnet (Livak and Schmittgen, 2001; Yuan et al., 2006). Dabei wird die Differenz des C_t -Werts der Testgruppe und der Kontrollgruppe auf die C_t -Wert-Differenz eines sogenannten *housekeeping*-Gens bezogen. Als *housekeeping*-Gen diente GAPDH, ein Gen welches in der Glykolyse die Umwandlung von Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat katalysiert und von dem man annimmt, dass es unabhängig vom Differenzierungs- oder physiologischen Zustand der Zelle exprimiert wird. Dies ist jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht überprüft worden. Unter der Annahme, dass sich die zu amplifizierenden DNA-Sequenzen in jedem Zyklus verdoppeln, bedeutet eine normalisierte Zyklendifferenz von n einen *fold-change* der relativen Genexpression von 2^n .

An das oben dargestellt Real-Time RT-PCR Amplifikationsprogramm schließt sich im Fall der SYBR Green PCRs noch ein Schmelzkurvenprogramm an, das der Verifikation der PCR-

Produkte dient. Da die Produkte einer quantitativen PCR in der Regel nicht auf ein Agarosegel aufgetragen werden, muss anderweitig sichergestellt werden, dass die gemessene Fluoreszenz nur auf das gewünschte Produkt zurückzuführen ist. Hierzu dient die Erstellung einer Schmelzkurve. Dabei wird die Probe zunächst auf 65°C abgekühlt und anschließend langsam erhitzt (0,1°C/Sekunde). Im Gegensatz zum Amplifikationsprogramm wird im Schmelzkurvenprogramm die Fluoreszenzintensität kontinuierlich gemessen. Zunächst enthält die Probe eine hohe Fluoreszenzintensität, da bei der relativ niedrigen Temperatur von 65°C viele DNA-Moleküle auch unspezifisch doppelsträngig vorliegen. Bei steigender Temperatur nimmt die Fluoreszenzintensität ab, da sich mehr und mehr doppelsträngige DNA-Moleküle aufgrund der steigenden thermischen Energie trennen. Dies geschieht jedoch sehr langsam, da von den unspezifisch aneinandergebundenen Molekülen nur sehr wenige Exemplare vorliegen. Bei einer bestimmten Temperatur trennen sich dann auch die gebildeten doppelsträngigen PCR-Produkte. Da diese in sehr hoher Kopienanzahl vorliegen, fällt bei Erreichen der Schmelztemperatur für das PCR-Produkt die Fluoreszenz schlagartig ab. Dies ist die Schmelztemperatur, welche charakteristisch für jede doppelsträngige DNA ist und mit der Moleküllänge sowie dem GC-Anteil steigt (dCTP und dGTP binden mit drei Wasserstoffbrückenbindungen aneinander, wohingegen die Bindung von dATP an dTTP nur zwei Wasserstoffbrückenbindungen aufweist).

Das Erstellen einer Schmelzkurve für SYBR Green PCRs ist angeraten, da SYBR Green unspezifisch in jede doppelsträngige DNA interkaliert und daher unspezifisch für jede doppelsträngige DNA ein Fluoreszenzsignal liefert. Für PCR-Produkte, die mithilfe der TaqMan-Sonden detektiert wurden, ergibt die Erstellung einer Schmelzkurve keinen Sinn, da die gemessene Fluoreszenzintensität unabhängig vom Vorliegen der Produkte in Form eines Doppelstrangs ist. Durch die Sequenzspezifität der Sonden ist aber sichergestellt, dass nur durch Amplifikation des gewünschten Produktes eine Fluoreszenzintensität gemessen werden kann. Primer, für die in Tabelle 2 eine Sondennummer aufgeführt ist, wurden mit dem Light Cycler Taq-Man Master Set verwendet, Primer, für die keine Sondennummer aufgelistet ist, wurden mit dem LightCycler Fast Start DNA Master Plus Set SYBR Green Kit verwendet. Alle Sonden stammen von Roche (Universal ProbeLibrary).

Tabelle 2: Sequenzen für RT-PCR Primer. Für PTHLH wurden 3 verschiedene Primerpaare verwendet. Zur Unterscheidung dient bei der Bezeichnung die erwartete Produktgröße in Basenpaaren (bp)

Gen	Sequenz	Sonde
ALP	5'-CAACCCTGGGGAGGAGAC-3' 5'-GCATTGGTGTGTACGTCTTG-3'	#19
BSP	5'-CAATCTGTGCCACTCACTGC-3' 5'-TCATTTTGGTGATTGCTTCCT-3'	-
GAPDH	5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3' 5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3'	-
NR4A3	5'-GCAGCTGCAACAAAACACC-3' 5'-CGTCCGCTCCTCCTACACT-3'	-
OCN	5'-TGAGAGCCCTCACACTCCTC-3' 5'-ACCTTTGCTGGACTCTGCAC-3'	#81
OPN	5'-GCTTGGTTGTCAGCAGCA-3' 5'-TGCAATTCTCATGGTAGTGA-3'	-
OSX	5'-CATCTGCCTGGCTCCTTG-3' 5'-CAGGGGACTGGAGCCATA-3'	#69
PTHLH (72)	5'-AATCAACTTTCCGGAAGCAA-3' 5'-GTCTCCGCTGCATCGTCT-3'	#82
PTHLH (270)	5'-GGAGACTGGTTCAGCAGTGG-3' 5'-ACGGGGTGGTTCTTTGTGTT-3'	-
PTHLH (400)	5'-GTGTCCCCTAACTCCAAGCC-3' 5'-CGAGACCGAGGAGAGGGTTA-3'	-
RUNX2	5'-GTGCCTAGGCGCATTTCA-3' 5'-GCTCTTCTTACTGAGAGTGGAAGG-3'	#29
STC1	5'-CACTCAGGGAAAAGCATTCTGTC-3' 5'-TGCTGTAGCACTCTTCCTGC-3'	-
ZBTB16	5'-CAAGAAGTTCAGCCTCAAGCA-3' 5'-CACTCAAAGGGCTTCTCACC-3'	#78

5.12 Microarray

Ein Microarray erlaubt die gleichzeitige Analyse vieler tausend (in diesem Fall ca. 30.000) codierender Transkripte mit einer geringen Menge an RNA-Proben und somit die Erstellung eines genomweiten Expressionsprofils. Der Nachweis basiert auf der Hybridisierung der Nukleotidsequenzen an komplementäre Sonden, die auf dem Microarray-Chip auf sehr kleinem Raum aufgebracht sind. Diese Hybridisierung bewirkt ein Fluoreszenzsignal, dessen Intensität ein Maß für Menge an Transkript in der zu untersuchenden Probe ist. Kultivierung, Differenzierung und RNA-Isolierung wurden wie oben beschrieben durchgeführt. Die eigentliche Microarray-Analyse wurde im Kompetenzzentrum für Fluoreszente Bioanalytik (KFB) in Regensburg durchgeführt. Dazu wurde zunächst die RNA-Qualität mithilfe des RNA 6000 Nano LabChip (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) überprüft. Zur Detektion des genomweiten Genexpressionsprofils wurde der Affymetrix Human Gene 1.1 ST Array

(Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) gemäß des Affymetrix-Standardprotokolls eingesetzt. Die Fluoreszenzintensitätsdaten wurden vom KFB mithilfe des NetAffx Analysis Center und dem RMA Algorithmus analysiert (Irizarry et al., 2003). Aus den Fluoreszenzintensitätsdaten (CEL-Dateien) wurden vom KFB mithilfe der Affymetrix Expression Console Software Version 1.0 die relativen Genexpressionsdaten (CHP-Dateien) berechnet und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Eine bioinformatische *Gene Ontology*-Untersuchung mit DAVID (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*) zeigt, in welchen biologischen Prozessen die regulierten Gene überrepräsentiert sind (Dennis et al., 2003; Huang et al., 2009a, 2009b).

5.13 Transfektion

Je nach Versuch wurden die DFCs für die Transfektionsexperimente in *6-well-plates* (RNA-Isolierung, Alizarin-Färbung) oder *96-well-plates* (ALP-Aktivitätsmessung) wie beschrieben kultiviert und differenziert. Zur gezielten Inhibition oder Überexpression von Genen wurden die DFCs transient mit Expressionsvektoren oder siRNA (small interfering RNA) transfiziert. In beiden Fällen wird die in die Zelle einzubringende Nukleinsäure (siRNA oder Plasmid) zunächst mit einem Transfektionsreagenz gemäß den Angaben des Herstellers gemischt. Diese lipophilen Reagenzien gehen einen Komplex mit der Nukleinsäure ein und erlauben es ihnen so, die Plasmamembran der Zelle zu durchqueren.

5.13.1 Überexpression

Der ZBTB16-Expressionsvektor (pCMV6-Entry Vektor, True ORF cDNA clone, Origene, Rockville, MD, USA, Abbildung 9) wurde kommerziell erworben. Die Herstellung der Expressionsvektoren für STC1 und PTHLH wird im Abschnitt Klonierung (5.15) beschrieben. Der Expressionsvektor enthält neben der codierenden Sequenz für ZBTB16 (in der *multiple cloning site*, zwischen den Erkennungssequenzen für die Restriktionsendonukleasen SgfI, AscI und HindIII sowie RsrII, MluI, NotI und XhoI) einen konstitutiv aktiven Promotor (CMV-Promotor) sowie eine Kozak-Sequenz, welche der Steigerung der Expressionseffizienz dient. Hierdurch wird erreicht, dass die transfizierten Zellen unabhängig von äußeren Signalen das transfizierte bGen, hier ZBTB16, stark exprimieren.

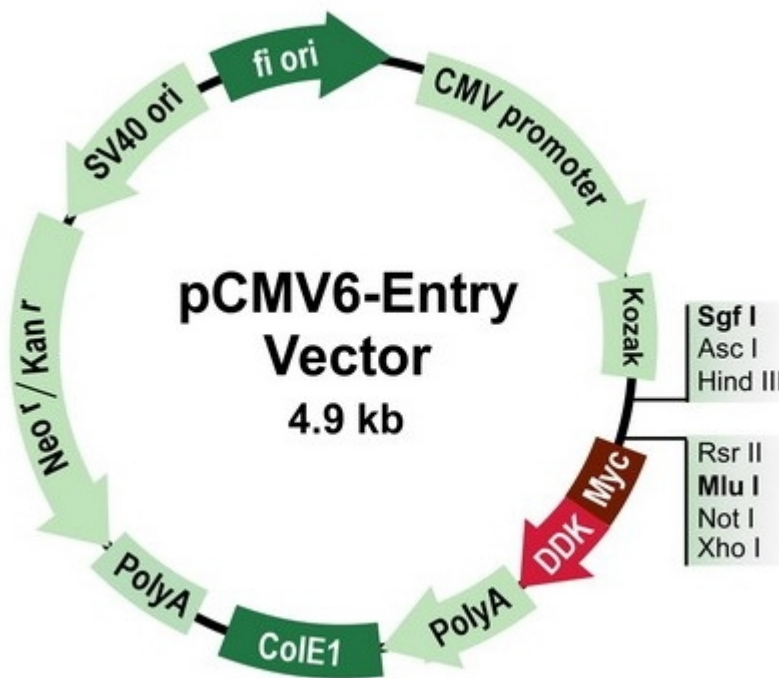


Abbildung 9: Plasmidkarte des ZBTB16-Expressionsvektors (Quelle: OriGene Technologies, (<http://www.origene.com/cdna/trueclone/vectors.msp>))

Weitere Merkmale des Vektors, die aber für die eigentliche Transfektion keine Rolle spielen, sind unter anderem Resistenzgene zur Selektionierung transformierter Bakterien (Neo^r/Kan^r), ein Replikationsursprung zur bakteriellen Vervielfältigung des Plasmids (SV40 ori) und Sequenzen, die der Detektion des rekombinanten Proteins dienen (sogenannte *tags*: DDK, Myc).

Für die Transfektion der Expressionsvektoren wurde das FuGene HD Transfektionsreagenz (Promega, Madison, WI, USA) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet und im Verhältnis 5:2 mit der Plasmid DNA in un-supplementiertem DMEM vermischt. Für die Transfektion der Zellen eines 6-well plates wurden 5 µl FuGene Reagenz mit 2 µg Plasmid-DNA und 100 µl DMEM gemischt und für 15 Minuten inkubiert, um die Bildung der Transfektionskomplexe zu ermöglichen, und anschließend auf die Zellen gegeben (in 2 ml DMEM mit FBS ohne Penicillin und Streptomycin). Als Kontrolle diente ein Vektor, der statt ZBTB16 die codierende Sequenz für GFP (*green fluorescent protein*, ebenfalls pCMV6-Entry Vektor, True ORF cDNA clone, Origene) enthält, dessen Expression keinen Einfluss auf die Differenzierung haben sollte. 24 Stunden nach Transfektion wurde das Medium gewechselt. Je nach Versuchsgruppe wurde dabei das Transfektionsmedium mit normalem Proliferationsmedium oder ODM ersetzt. Die Zellen wurden für die im jeweiligen Versuch angegebene Zeit mit dem angegebenen Medium weiterkultiviert. Dem Flächenverhältnis

entsprechend wurden für die Transfektion von DFCs in 96-*well plates* von allen Reagenzien 1/30 der 6-*well plate* Werte verwendet.

5.13.2 Inhibition

Zur Herunterregulation von Zielgenen wurden siRNAs (small interfering RNA) verwendet. Diese kurzen (20-25bp) doppelsträngigen RNA-Moleküle bewirken in einem RNAi (RNA interference) genannten Prozess durch Bindung an komplementäre RNA-Moleküle den posttranskriptionalen Abbau der codierenden RNA-Moleküle und verhindern somit deren Translation (Agrawal et al., 2003). Alle verwendeten siRNAs stammen von Qiagen. Für RUNX2 und ZBTB16 wurden jeweils drei verschiedene siRNAs getestet. Die in den gezeigten Ergebnissen verwendete siRNA ist grau unterlegt (Tabelle 3).

Zur Transfektion der Zellen mit siRNAs wurde das HiPerFect Transfektionsreagenz (Qiagen) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Für die Transfektion von DFCs in einem 6-*well plate* wurden 12µl HiPerFect Transfektionsreagenz mit 0,6µl der jeweiligen 10µM siRNA Lösung und 100µl DMEM mit 10% FBS gemischt und 15 Minuten inkubiert, um die Bildung der Transfektionskomplexe zu ermöglichen, und anschließend auf die Zellen gegeben (in 2ml Zellkulturmedium). Als Kontrolle diente eine siRNA, die zu keiner bekannten Säugetier-RNA komplementär ist (AllStar Kontroll-siRNA).

Tabelle 3: Liste der zur Inhibition der Genexpression verwendeten siRNAs.

Funktion	siRNA-Bezeichnung
RUNX2-Inhibition	Hs_RUNX2_1 FlexiTube siRNA
	Hs_RUNX2_3 FlexiTube siRNA
	Hs_RUNX2_8 FlexiTube siRNA
ZBTB16-Inhibition	Hs_ZBTB16_1 FlexiTube siRNA
	Hs_ZBTB16_3 FlexiTube siRNA
	Hs_ZBTB16_5 FlexiTube siRNA
unspezifische Kontrolle	AllStar control siRNA

24 Stunden nach Transfektion wurde das Medium gewechselt. Je nach Versuchsgruppe wurde dabei das Transfektionsmedium mit normalem Proliferationsmedium oder ODM ersetzt. Die Zellen wurden für die im jeweiligen Versuch angegebene Zeit mit dem angegebenen Medium weiterkultiviert.

5.14 Glucocorticoidrezeptorinhibition

Um zu überprüfen, ob die durch Dexamethason bewirkten Veränderungen in der Genexpression durch den Glucocorticoidrezeptor (GR) vermittelt werden, wurden die DFCs mit dem Glucocorticoidrezeptorinhibitor RU486 (Mifepristone, 17β -Hydroxy-11 β -(4-dimethylamino-phenyl)-17 α -(1-propinyl)estra-4,9-dien-3-on, Sima Aldrich, Abbildung 10c) behandelt. Dieses synthetische Steroid bindet mit höherer Affinität als Dexamethason an den GR, verhindert aber durch dessen Struktur die Dimerisierung. DFCs wurden wie beschrieben in *6-well plates* kultiviert. Zusätzlich zur DMEM-Kontrolle und der ODM-Behandlung wurde eine zusätzliche Gruppe mit ODM und $1\mu\text{M}$ RU486 behandelt. Die Wirksamkeit dieser Konzentration ist aus der Literatur bekannt (Kimura et al., 2011) und wurde in Vorversuchen auch für DFCs bestätigt. Die DFCs einer weiteren Gruppe wurden mit dem ZBTB16-Expressionsvektor transfiziert.

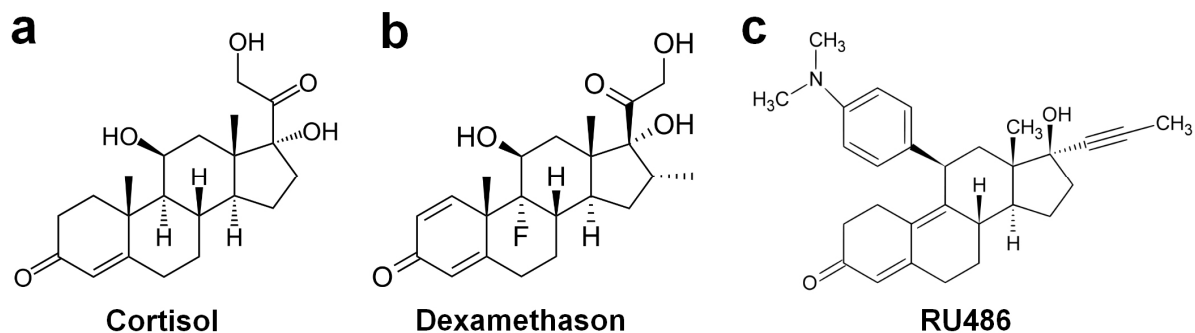


Abbildung 10: Strukturformeln von Cortisol (a), Dexamethason (b) und RU486 (c) (Quelle:Wikipedia)

5.15 Klonierung

Zur Überexpression von PTHLH und STC1 wurden die codierenden Sequenzen dieser Gene in ein Expressionsplasmid kloniert. Hierzu wurde das pcDNA™3.1 Directional TOPO® Expression Kit (Life Technologies) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Hierzu müssen zunächst Primer erstellt werden, die die codierenden Sequenzen dieser Gene flankieren, um die codierenden Sequenzen zu amplifizieren. Zusätzlich muss darauf geachtet werden, dass die forward Primer mit der Sequenz CACC beginnen, um *blunt-end* PCR-Produkte zu erhalten, die über das TOPO-Cloning in den Expressionsvektor, welcher die komplementäre Sequenz GTGG als *overhang sequence* besitzt (Abbildung 11), ligiert werden können. Um eine effiziente Expression zu gewährleisten, müssen die *forward*-Primer außerdem eine Kozak-Sequenz ((G/A)NNATGG) besitzen. Dabei entspricht ATG dem Startcodon. Diese Bedingung wird durch die Verwendung der CACC-Sequenz direkt vor dem Startcodon erfüllt. Beim Erstellen der *reverse*-Primer muss beachtet werden, dass diese am 5'-Ende nicht komplementär zur GTGG- *overhang sequence* sind.

gestellt. Anschließend wurden die Bakterien auf einer selektiven Agarplatte mit 100µg/ml Ampicillin ausgestrichen. Da der Vektor ein Ampicillin-Resistenzgen enthält, können Bakterien, welche das Plasmid aufgenommen haben, auf dieser Platte Kolonien bilden. Nach Inkubation für 24h bei 37°C wurden jeweils 5 Kolonien gepickt und über Nacht in LB-Medium mit 100µg/ml Ampicillin kultiviert. Die Bakterien wurden abzentrifugiert und die Plasmid-DNA mithilfe des QIAprep Spin Miniprep Kits (Qiagen) gemäß den Angaben des Herstellers isoliert. Die Sequenzierung der gewonnenen Plasmid DNA wurde bei der Firma Entelechon, Bad Abbach, durchgeführt (Sequenzierungsprimer: BGH reverse: 5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3', T7: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'). Nachdem überprüft wurde, dass die codierende Sequenz in der richtigen Orientierung vorliegt, wurde die Plasmid-DNA wie im Abschnitt Transfektion – Überexpression beschrieben zur Überexpression von PTHLH bzw. STC1 eingesetzt.

5.16 Chromatinimmunpräzipitation

Mithilfe der Chromatinimmunpräzipitation (ChIP) kann die Bindung von Proteinen an DNA nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurde das Pierce Agarose ChIP Kit (Thermo Fisher Scientific) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Wenn nicht anders vermerkt, sind alle genannten Reagenzien Teil dieses Kits.

Je nach physiologischem Zustand binden Transkriptionsfaktoren an die Promotorregionen von Genen (Abbildung 12a). In diesem Versuch wurden die Zellen für 7 Tage in DMEM bzw. ODM in 10cm-Zellkulturschalen (Greiner Bio-one, Frickenhausen) kultiviert. Mittels 1% Formaldehyd (Roth) wurde die zu diesem Zeitpunkt bestehende Bindung fixiert (Abbildung 12b). Anschließend wurden die Zellen geerntet, lysiert und die DNA mittels DNase verdaut (Abbildung 12c). Ein Teil dieses Lysats wurde für die spätere Verwendung eingefroren. Diese als Input bezeichnete Positivkontrolle enthält alle DNA-Sequenzen der kultivierten Zellen. Zu einem anderen Teil des Lysats wurde ein ZBTB16-spezifischer Antikörper (anti ZBTB16 (PLZF D-9), Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA) zugegeben, der an ZBTB16 und die daran kovalent gebundene DNA-Sequenz bindet (Abbildung 12d). Der verbliebene Teil des Lysats wurde mit einem unspezifischen Antikörper (Normal rabbit IgG, Upstate, Temecula, CA, USA) behandelt und dient als Negativkontrolle. Nach Inkubation mit dem jeweiligen Antikörper wurde den Lysaten Protein A/G-Agarose-beads zugegeben (Abbildung 12e). Protein A/G bindet an die Fc-Region von Antikörpern, wodurch die Präzipitation der gewünschten Transkriptionsfaktoren mit ihren gebundenen DNA-Sequenzen ermöglicht wird. Aufgrund ihrer großen Masse lassen sich die Agarose-beads durch Zentrifugation vom Rest des Lysats trennen. Nach der Präzipitation wird zunächst mithilfe eines Elutionspuffers die Bindung des Antikörpers an das Antigen gelöst (Abbildung 12f). Der Transkriptionsfaktor wird

anschließend mithilfe von Proteinase K verdaut (Abbildung 12g). Am Ende erhält man eine Lösung, die ausschließlich aus DNA-Sequenzen, an die der Transkriptionsfaktor von Interesse gebunden hat, besteht (Abbildung 12h). Diese können nun mittels PCR amplifiziert werden.

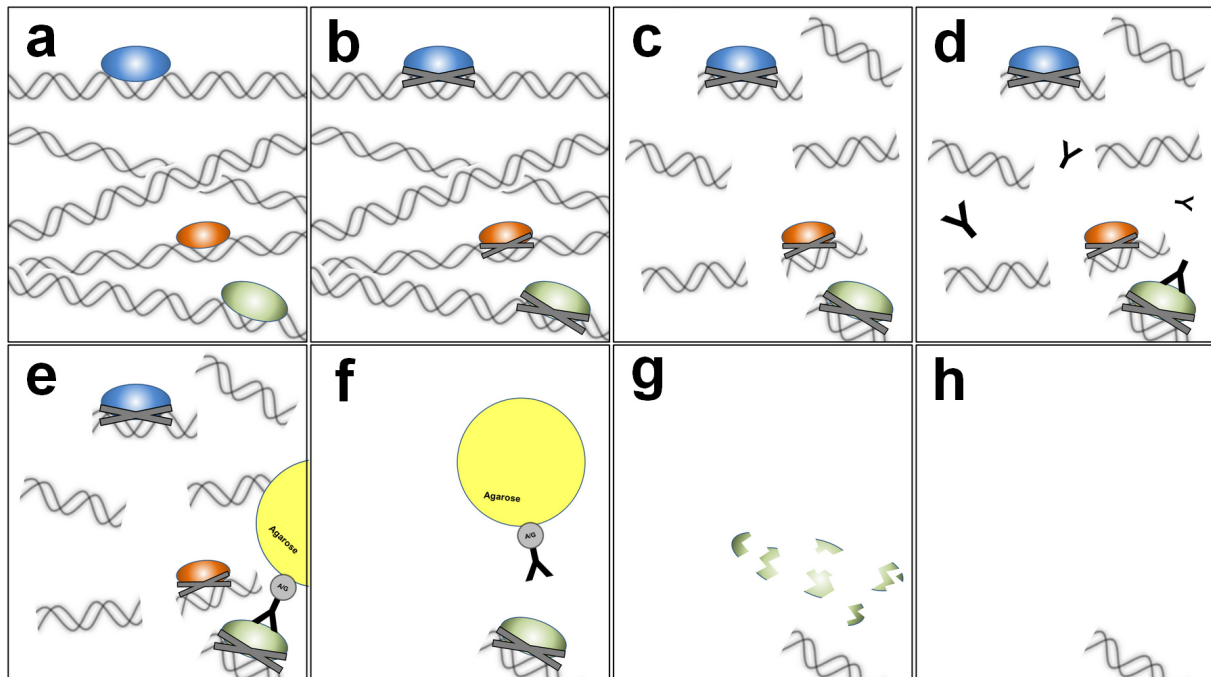


Abbildung 12: Prinzip der Chromatinimmunpräzipitation. Ausführliche Erläuterung im Text (Eigene Darstellung)

Um mögliche Bindestellen von ZBTB16 an die Promotoreregionen von RUNX2, OSX und NR4A3 zu identifizieren wurde das MatInspector/MatBase Programm der Genomatix software suite (Genomatix, München) verwendet (Cartharius et al., 2005; Quandt et al., 1995; Werner, 1999). Tabelle 5 zeigt, welche Sequenzen als mögliche Bindestellen für ZBTB16 identifiziert wurden sowie die PCR-Primersequenzen, mit denen diese Bindestellen amplifiziert werden können.

Tabelle 5: Sequenzen der vorhergesagten ZBTB16-Bindestellen in den Promotorregionen von NR4A3, OSX und RUNX2 und PCR-Primer, die an Sequenzen binden, die diese Bindestellen flankieren

Promotor/Gen	Sequenz Bindestelle	Sequenz PCR-Primer
NR4A3 Promotor (GXP 18723)	5'-GAGTAGAGTTGGAGG-3'	5'-CCTTTCGGAAGAGCTGTCCT-3' 5'-GGGCTTCTCTTTTGCAGCG-3'
OSX Promotor (GXP 232391)	5'-TCCTACAGTCCTACT-3'	5'-TGGCTGTACCCATGTGAGTG-3' 5'-GCTCCCCAGTGTGTCATGTACC-3'
RUNX2 Promotor (GXP 1826089)	5'-TGATACAGTCCAAAG-3'	5'-AGCAGTTTGCAACCAGACCTT-3' 5'-CCTTTCTACTCCCCGCTCAA-3'

Der unspezifische Antikörper der Negativkontrolle sollte keine humanen Proteine binden, damit keine DNA-Sequenzen präzipitieren. Aus der Präzipitation mit dem Negativkontroll-Antikörper sollte daher in der PCR keine Amplifikation zu sehen sein. Der Positivkontroll-Input sollte, da hier nicht präzipitiert wurde, alle DNA-Sequenzen enthalten und daher in der PCR eine deutliche Bande zeigen. Die mit dem ZBTB16-Antikörper präzipitierten DNA-Sequenzen sollten in der PCR nur dann ein Ergebnis zeigen, wenn ZBTB16 an die für das jeweilige Primerpaar spezifische Promotorregion gebunden war.

5.17 Statistische Auswertung

Alle Säulendiagramme zeigen als Ergebnis den Mittelwert \pm die Standardabweichung. Zur Untersuchung der statistischen Signifikanz bei zwei Gruppen wurde der ungepaarte t-Test verwendet (jeweils ein Versuch mit 5 Proben). Die Normalverteilung der Werte wurde mithilfe des Shapiro-Wilk-Tests überprüft. Ein Wert kleiner 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, ns: nicht signifikant). Alle Real Time RT-PCRs wurden mit $n=3$ durchgeführt und keiner statistischen Signifikanzanalyse unterzogen.

6 Ergebnisse

6.1 Isolierung und Charakterisierung dentaler Follikelzellen

6.1.1 DFCs sind plastikadhärente, Kolonie-bildende, multipotente Stammzellen

Nach Extraktion eines impaktierten Weisheitszahnes, dessen noch nicht abgeschlossenes Wurzelwachstum deutlich zu sehen ist, ist der dentale Follikel als fest mit dem Zahn verbundenes Gewebe zu erkennen (Abbildung 13a). Nach Verdau dieses Gewebes und anschließender Zellvereinzelung können die DFCs kultiviert werden, die auf dem Boden des Zellkulturgefäßes adhären und proliferieren. Nach wenigen Tagen zeigen die DFCs die typische fibroblastoide Morphologie mesenchymaler Stammzellen sowie ein Kolonie-bildendes Wachstum (Abbildung 13b). Möglicherweise gehen alle in Abbildung 13b sichtbaren Zellen auf eine proliferierende Zelle zurück. Nach etwa einer Woche sind ca. 80% des Zellkulturgefäßbodens bedeckt, d.h. die Zellen sind subkonfluent (Abbildung 13c). Bei Erreichen dieses Zustands werden die Zellen entweder passagiert oder der Versuch (z.B. osteogene Differenzierung oder Transfektion) wird gestartet. Nach dem Gewebeverdau, durch den nur ein Teil der DFCs als Einzelzellsuspension vorliegt, befinden sich in den verbliebenen Gewebestücken (Abbildung 13d) immer noch Zellen. Nach wenigen Tagen kann das Auswachsen dieser Zellen aus dem Gewebe beobachtet werden (Abbildung 13e, f).

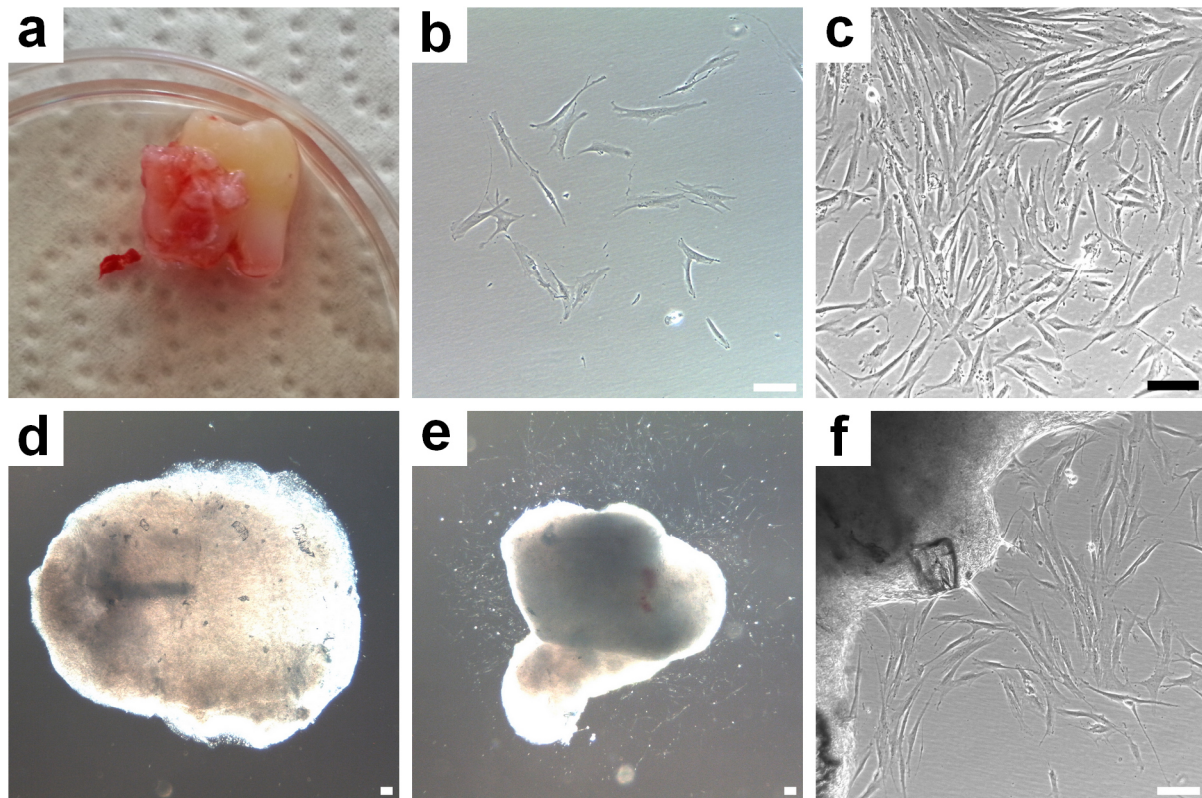


Abbildung 13: Makroskopische Aufnahme eines extrahierten Weisheitszahnes (a) sowie mikroskopische Aufnahmen isolierter Follikelzellen zu verschiedenen Zeitpunkten (b-f) (Balken misst 100µm)

Neben der Plastikadhärenz und der Koloniebildung exprimieren die isolierten DFCs die typischen Marker für MSCs ectomesenchymaler Herkunft. Die DFCs waren stark positiv für CD44, CD105 (Trubiani et al., 2008) und Nestin (Terling et al., 1995), jedoch negativ für CD146 (Abbildung 14).

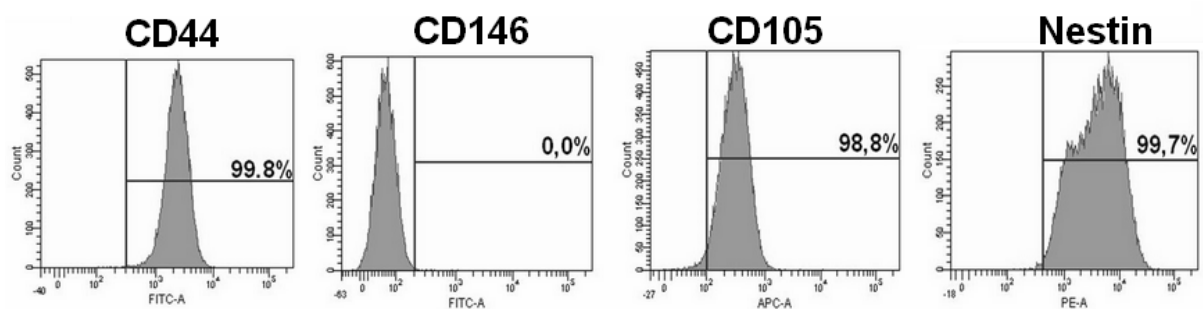


Abbildung 14: FACS-Analyse der DFCs für die Marker CD44, CD146, CD105 und Nestin.

6.1.2 DFCs lassen sich in ODM osteogen differenzieren

Nach 3, 7 und 14 Tagen osteogener Differenzierung war eine deutlich gesteigerte ALP-Aktivität zu sehen. Dabei hatte die ALP-Aktivität als früher Marker der Differenzierung nach 7 Tagen den höchsten Wert erreicht und wurde anschließend wieder schwächer (Abbildung

15a). Der Mineralisierungsassay zeigte, dass die ersten Mineralisierungen, bei denen es sich um späte Anzeichen der Differenzierung handelt, nach drei Wochen beobachtet werden können (Abbildung 15b).

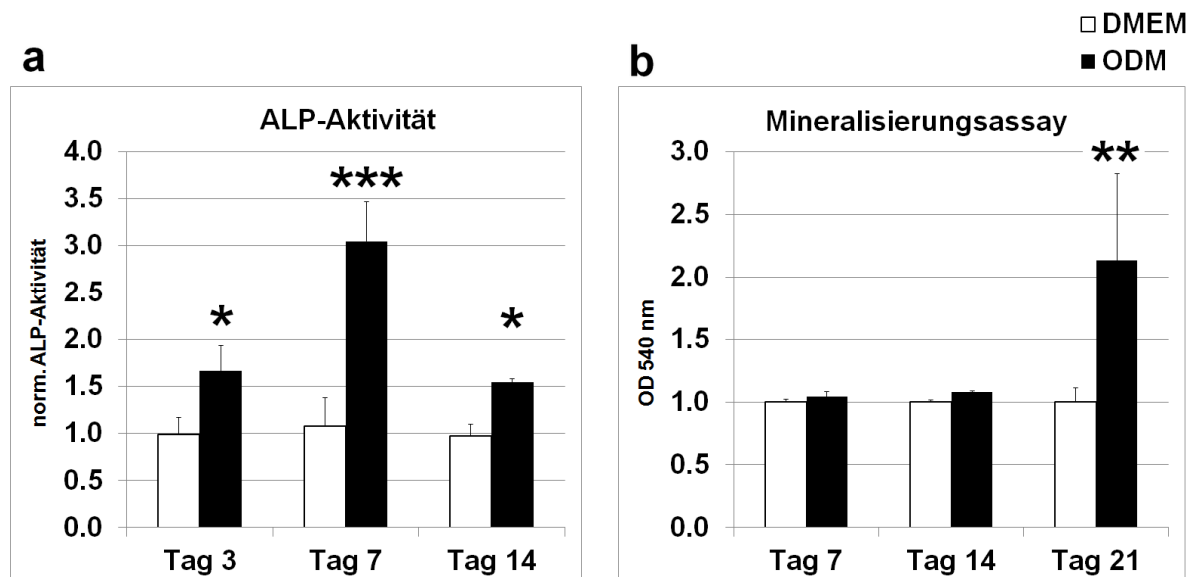


Abbildung 15: ALP-Aktivität (a) und Mineralisierung (b) nach osteogener Differenzierung (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ (ODM gegenüber der DMEM-Kontrolle))

In einem weiteren Versuchsansatz wurden nach 4 Wochen osteogener Differenzierung die gebildeten Mineralisierungen mittels Alizarin sowie ALP mittels BCIP/NBT angefärbt. Der Unterschied zwischen differenzierten Zellen und der Kontrolle war sowohl makroskopisch (Abbildung 16a) als auch mikroskopisch (Abbildung 16b) deutlich zu sehen.

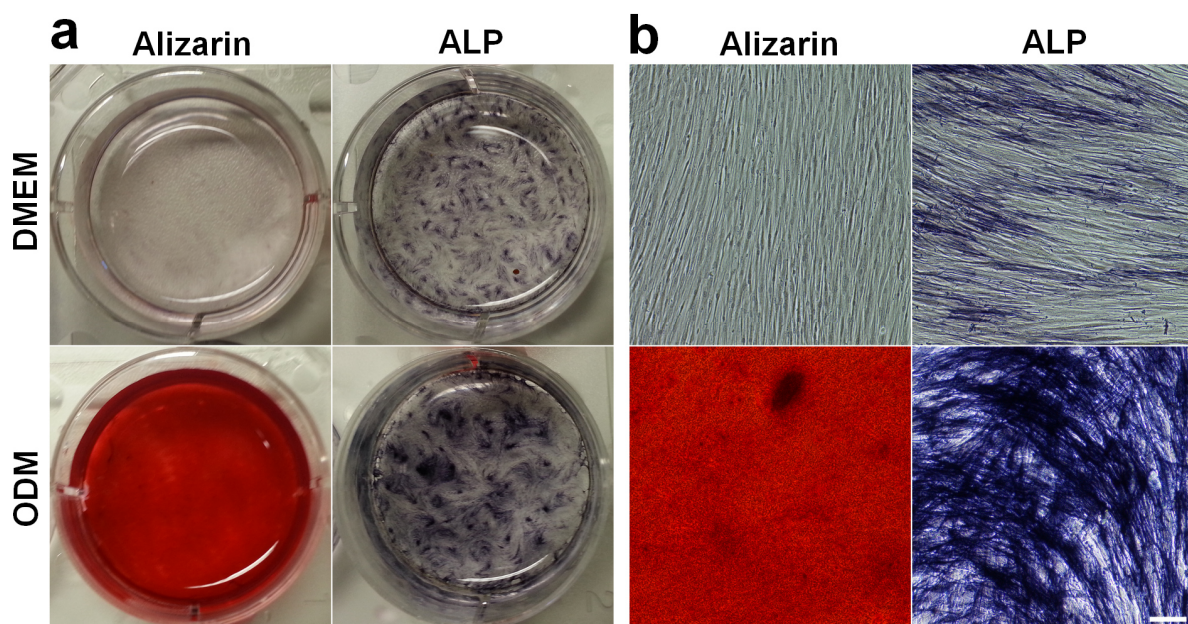


Abbildung 16: Makroskopische (a) und mikroskopische (b) Aufnahmen differenzierter und undifferenzierter DFCs nach Alizarin- bzw. ALP-Färbung (Meßbalken misst 100µm)

6.2 Nach Dexamethason-induzierter Differenzierung sind einige osteogene Marker nicht reguliert

ZBTB16, welches ohne Dexamethason-Simulus kaum nachweisbar ist, zeigt nach 2 bzw. 7 Tagen Kultivierung in ODM eine starke Expression (Abbildung 17a). Die Expression von RUNX2 steigt zwar nach einigen Tagen leicht an, wird aber nicht durch Dexamethason induziert (Abbildung 17b). Auch OCN und OPN werden durch Kultivierung in ODM nicht hochreguliert (Abbildung 17c, d). Andere osteogene Marker wie ALP, OSX, NR4A3, Col1A1 und BSP werden hingegen hochreguliert (Abbildung 17e-i). Während ALP nach 2 Tagen nur eine schwache Hochregulation zeigt, steigt die relative Genexpression in ODM an Tag 7 auf 25 an (Abbildung 17e). Auch die Zellen im Proliferationsmedium zeigen eine verstärkte ALP-Expression. OSX und Col1A1 zeigen an beiden Zeitpunkten eine schwache Hochregulation, wobei die von OSX an Tag 7, die von Col1A1 an Tag 2 ausgeprägter ist (Abbildung 17g, h). Die Expression von NR4A3 ist besonders an Tag 2 gesteigert, aber auch an Tag 7 noch deutlich hochreguliert. BSP konnte an Tag 2 nicht nachgewiesen werden. An Tag 7 ist die BSP-Expression differenzierter DFCs gegenüber der Kontrolle deutlich gesteigert (Abbildung 17i).

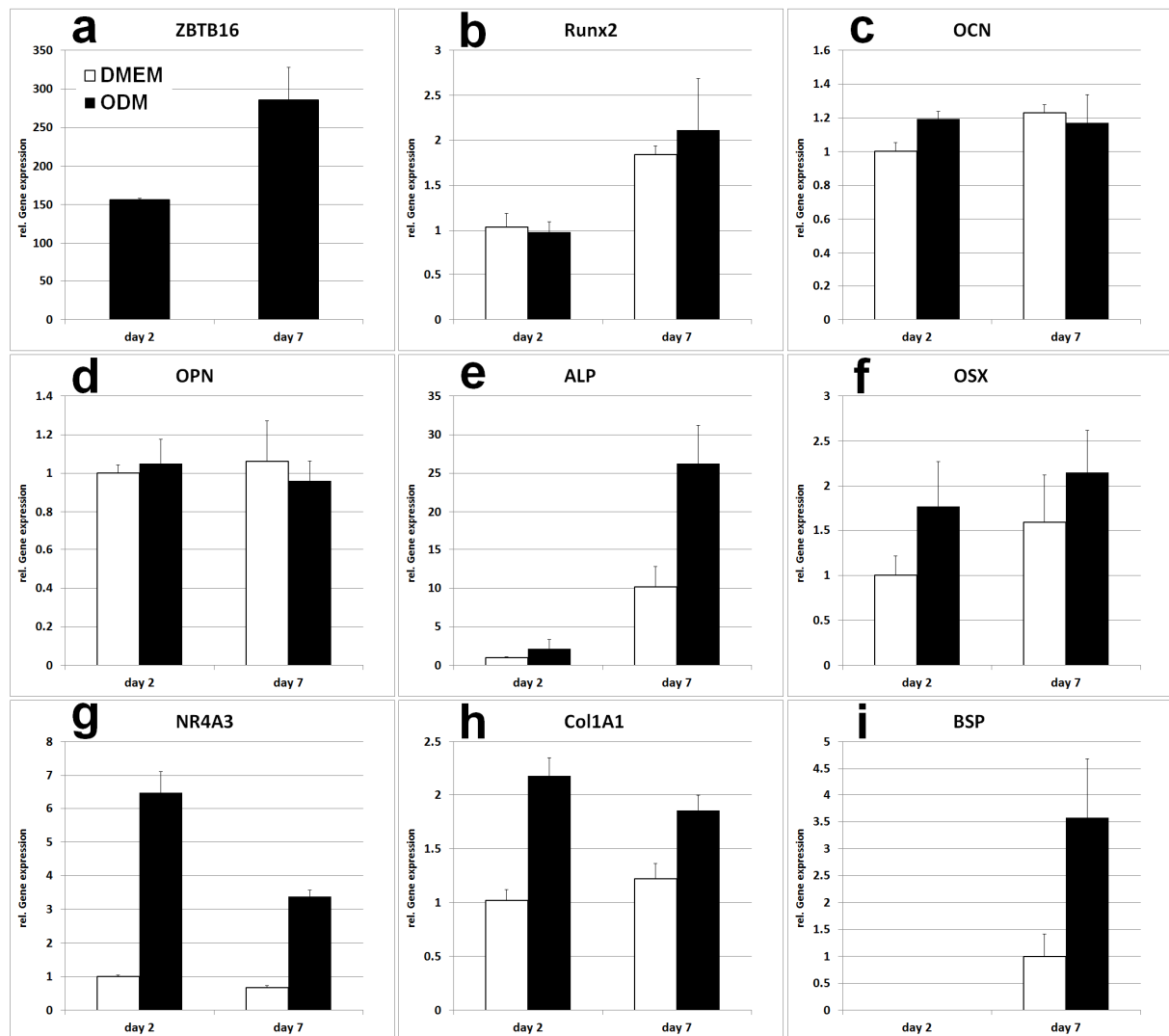


Abbildung 17: Relative Genexpression osteogener Marker nach 2 und 7 Tagen osteogener Differenzierung (3 Wiederholungen, gezeigt sind der Mittelwert und die Standardabweichung)

6.3 Die stöchiometrische Elementverteilung der Mineralisierungen entspricht der von Hydroxylapatit

Die mineralisierten *nodules* können neben dem Lichtmikroskop auch im REM beobachtet werden. Dabei wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von undifferenzierten DFCs (Abbildung 18a, d) und differenzierten DFCs (Abbildung 18b, e) mit differenzierten BM-MSCs (Abbildung 18c, i) nach 3 Wochen verglichen und den entsprechenden lichtmikroskopischen Aufnahmen nach Alizarin-Färbung gegenüber gestellt (DFC DMEM: Abbildung 18d, j; DFC ODM: Abbildung 18e, k; BM-MSC ODM: Abbildung 18f, l). Es ist deutlich zu sehen, dass die DFCs in Differenzierungsmedium mineralisierte Strukturen bilden, die denen der BM-MSC ähneln, die aber im normalen Zellkulturmedium nicht gebildet werden.

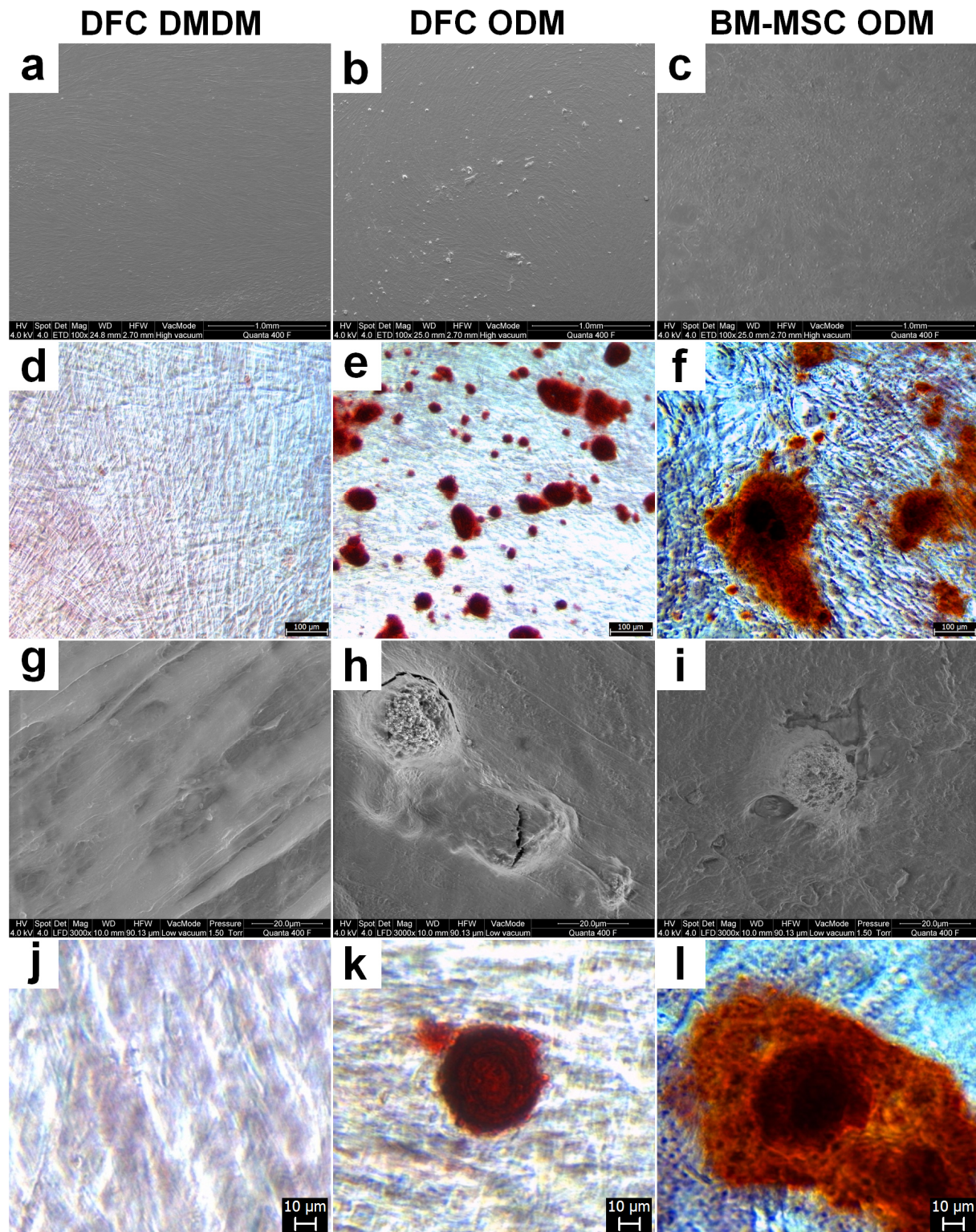


Abbildung 18: Rasterelektronen- (a-c, g-i) und lichtmikroskopische (d-f, j-l) Aufnahmen von undifferenzierten DFCs (a, d, g, j), differenzierten DFCs (b, e, h, k) und differenzierten BM-MSCs (c, f, i, l)

Zusätzlich wurden die mineralisierten Strukturen, die bei differenzierten DFCs denen von differenzierten BM-MSCs ähneln, mittels EDX einer Elementanalyse unterzogen (Abbildung 19). Es ist deutlich zu sehen, dass bei den undifferenzierten DFCs nahezu kein Calcium und nur wenig Phosphor nachgewiesen werden kann, während sowohl bei den differenzierten

DFCs als auch bei den differenzierten BM-MSCs eine starke Akkumulation von Calcium und Phosphor detektiert wird. Das gemessene Calcium zu Phosphor Verhältnis lag bei ca. 1,6 zu 1.

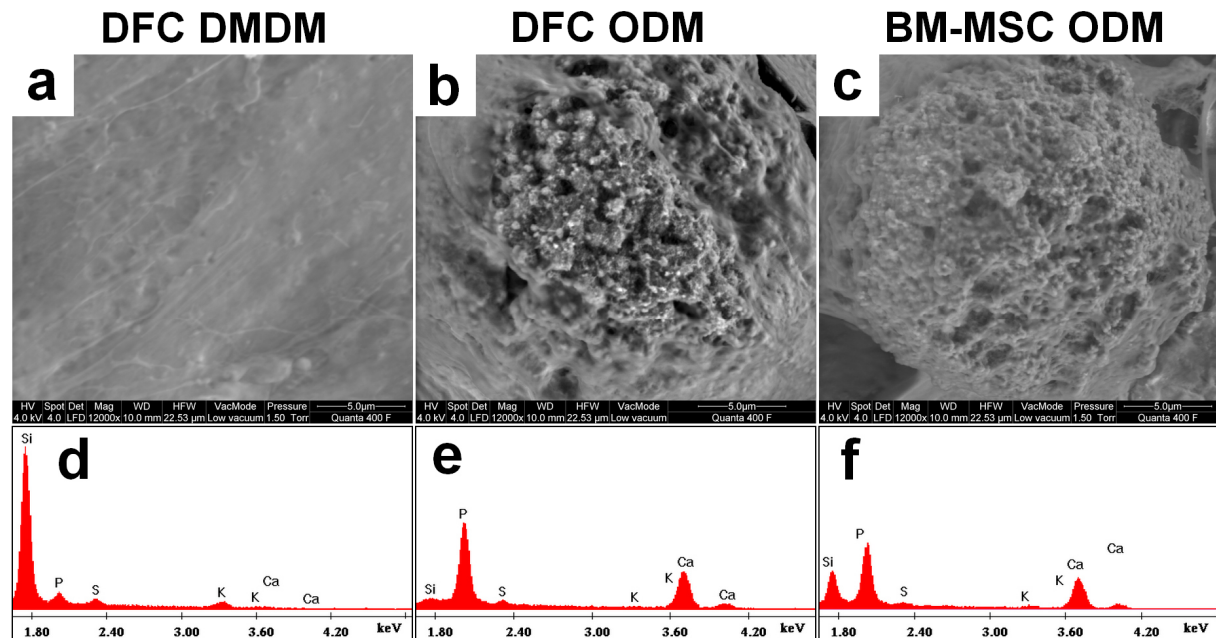


Abbildung 19: EDX-Analyse sowie die dazugehörigen rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Strukturen von undifferenzierten DFCs (a, d), differenzierten DFCs (b, e) und differenzierten BM-MSCs (c, f)

6.4 Die Expression der Transkriptionsfaktoren ZBTB16 und Runx2 kann durch Zugabe einer für das jeweilige Gen spezifischen siRNA inhibiert werden

Transfektion der DFCs mit siRNAs gegen ZBTB6 bzw. RUNX2 bewirkt nach drei Tagen eine deutliche Herunterregulation des entsprechenden Gens. Die Expression von ZBTB16, welche ohne ODM-Stimulus nicht nachgewiesen werden konnte, ist nach Transfektion mit der ZBTB16-siRNA gegenüber der Kontrolle um die Hälfte reduziert. Die Expression von ZBTB16 war nach RUNX2-Inhibition sogar hochreguliert (Abbildung 20a). Die Expression von RUNX2 war nach RUNX2-Inhibition ebenfalls deutlich reduziert. Ebenfalls zu beachten ist, dass RUNX2 durch Dexamethason nicht hochreguliert wird. Inhibition von ZBTB16 hat nahezu keinen Einfluss auf die RUNX2-Expression (Abbildung 20b). Inhibition der Transkriptionsfaktoren RUNX2 bzw. ZBTB16 hat auch Einfluss auf die Regulation anderer Markergene. Während die Expression von OCN unter ODM-Einfluss unabhängig von der Inhibition konstant bleibt, ist sie nach RUNX2-Inhibition sogar hochreguliert (Abbildung 20c). Die Expression von OPN wird durch RUNX2-Inhibition stärker beeinträchtigt als durch ZBTB16-Inhibition (Abbildung 20d). Die Dexamethason-vermittelte Hochregulation von ALP,

OSX, NR4A3 und Col1A1 wurde durch ZBTB16-Inhibition deutlich abgeschwächt, aber nicht oder in geringerem Ausmaß durch RUNX2-Inhibition (Abbildung 20e-h).

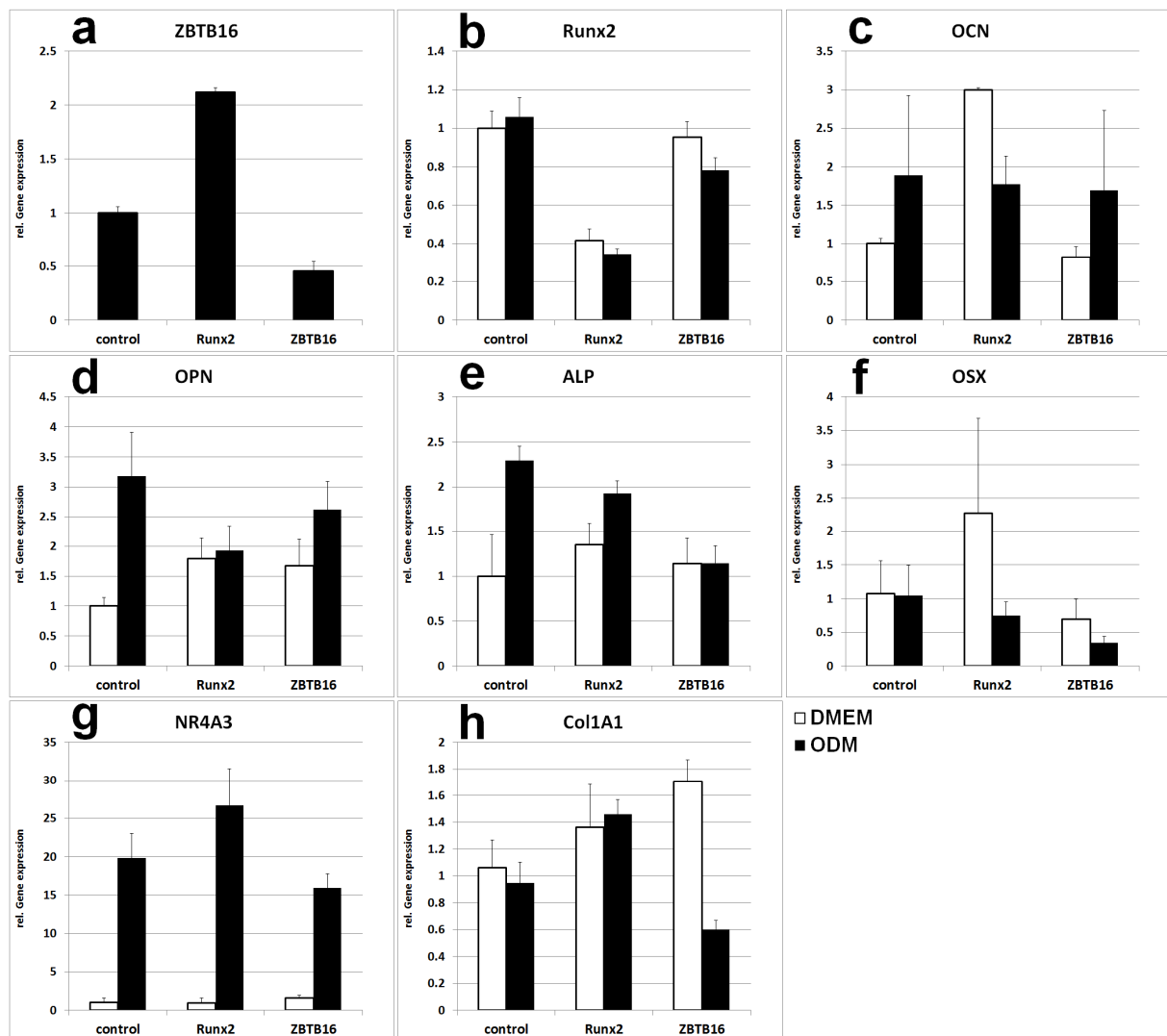


Abbildung 20: Relative Genexpression von ZBTB16 (a), RUNX2 (b), OCN (c), OPN (d), ALP (e), OSX (f), NR4A3 (g) und Col1A1 (h), jeweils in der Kontrolle und nach Inhibition von RUNX2 (mittleres Balkenpaar) bzw. ZBTB16 (rechtes Balkenpaar). Die im Proliferationsmedium sehr schwache Expression von ZBTB16 ist nicht dargestellt.

Neben der Genexpression hat die Inhibition von ZBTB16 bzw. RUNX2 auch Auswirkungen auf die ALP-Aktivität und die Mineralisierung. Die Dexamethason-vermittelte ALP-Aktivitätssteigerung wird durch ZBTB16-Inhibition reduziert (Tag 7, Abbildung 21).

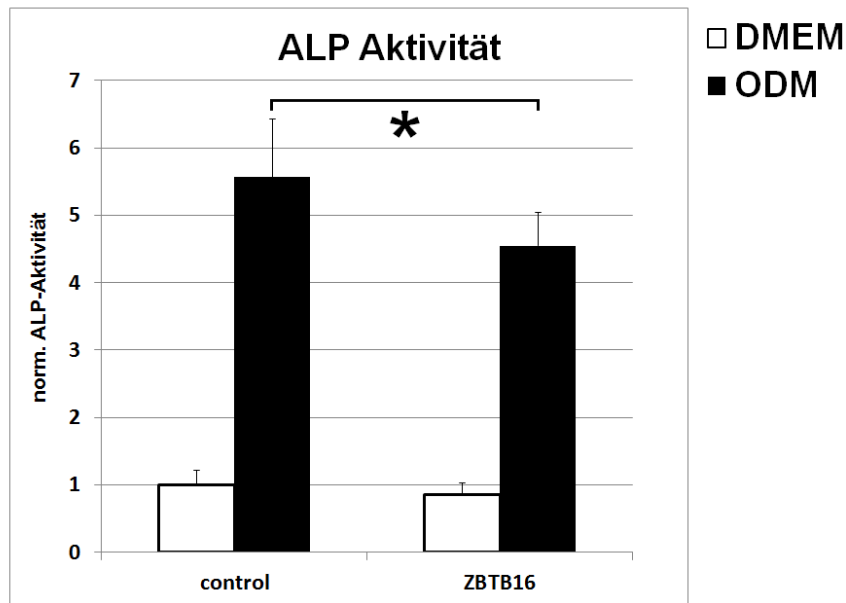


Abbildung 21: ALP-Aktivität nach ZBTB16-Inhibition (*: $p < 0,05$ (ZBTB16-Inhibition gegenüber Kontroll-siRNA jeweils in ODM))

Für die Auswirkungen der RUNX2-Inhibition wurde ein abgewandelter Versuchsansatz gewählt. Da die Vorarbeiten und bisherigen Ergebnisse darauf hindeuten, dass die Dexamethason-vermittelte osteogene Differenzierung in DFCs unabhängig von RUNX2 verläuft, wurden die Zellen für die RUNX2-Inhibition neben Dexamethason auch mit BMP2 stimuliert. Zunächst fällt auf, dass BMP2 und Dexamethasone zu allen drei untersuchten Zeitpunkten eine vergleichbare Steigerung der ALP-Aktivität bewirken. Wird diese ALP-Aktivitätssteigerung durch Dexamethason stimuliert, hat die Inhibition von RUNX2 darauf keinen Einfluss. Wird die ALP-Aktivitätssteigerung hingegen durch BMP2 bewirkt, führt die Behandlung mit RUNX2-spezifischer siRNA zu einer deutlichen Verminderung der ALP-Aktivität (Abbildung 22).

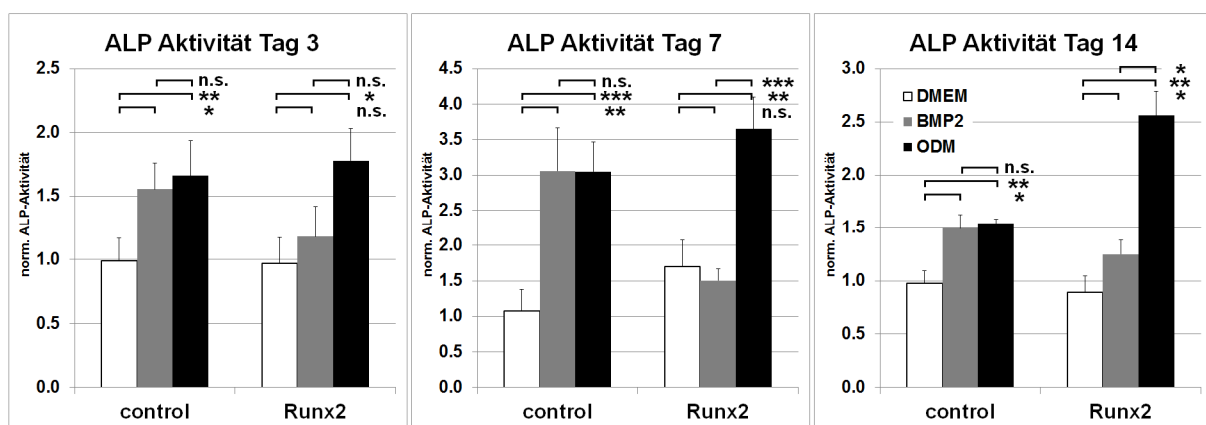


Abbildung 22: ALP-Aktivität nach RUNX2-Inhibition mit Dexamethason (ODM) oder BMP2 als osteogenem Induktor (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, *: $p < 0,001$, ns: nicht signifikant)**

Auch die Alizarin Färbung zeigte bei Dexamethason-induzierter Differenzierung nur für die ZBTB16-, nicht aber für die RUNX2-Inhibition nach 4 Wochen eine verminderte Mineralisierung. Dies ist sowohl makroskopisch (Abbildung 23a) als auch mikroskopisch (Abbildung 23b) deutlich erkennbar und ließ sich quantifizieren (Abbildung 23c).

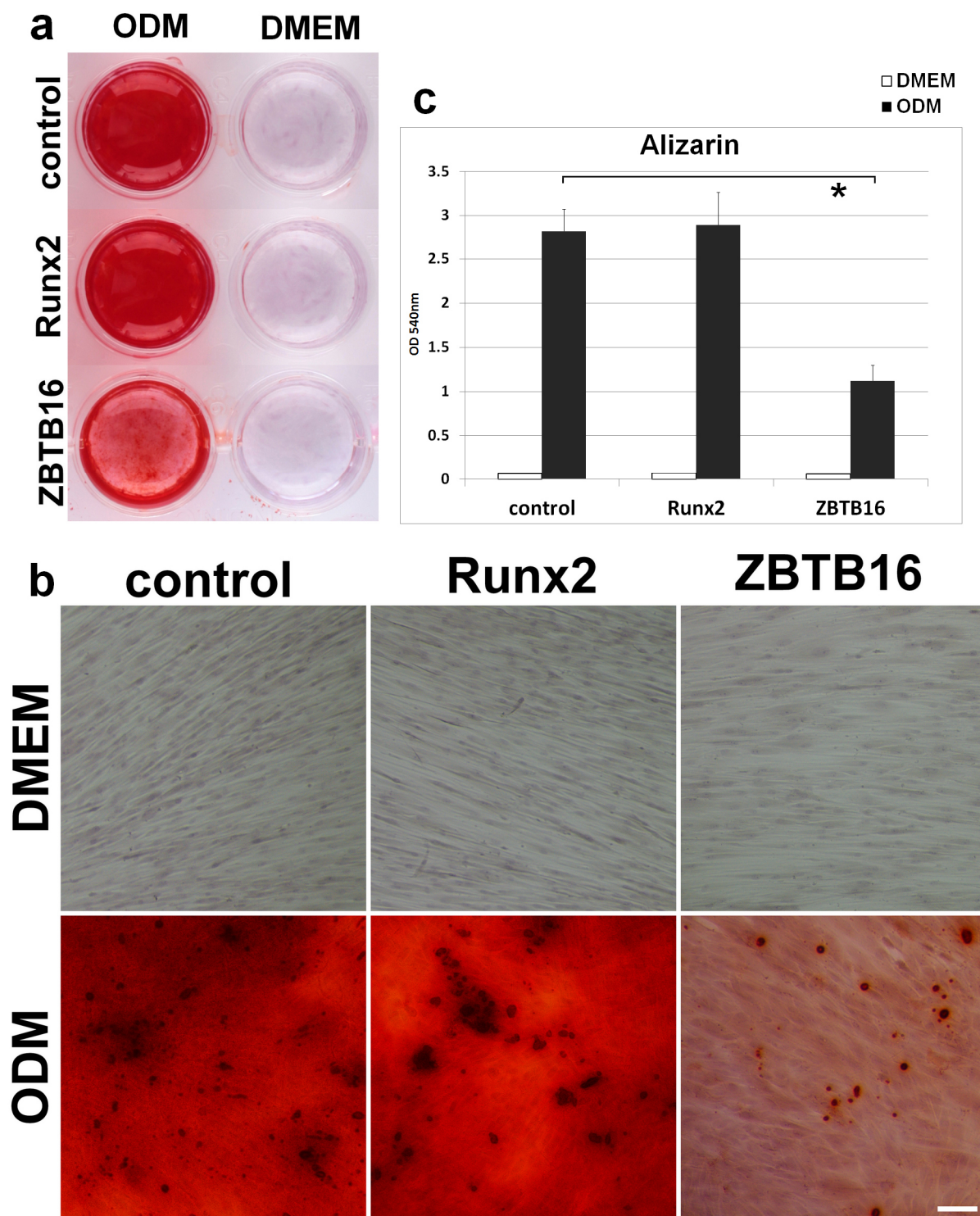


Abbildung 23: Alizarinfärbung makroskopisch (a) und mikroskopisch (b) nach RUNX2- oder ZBTB16-Inhibition (der Meßbalken misst 100µm) sowie Quantifizierung der Alizarinfärbung (c *: $p < 0,05$ (ZBTB16-Inhibition gegenüber Kontroll-siRNA))

6.5 Überexpression von ZBTB16 bewirkt Änderungen in der Expression osteogener Marker und eine Erhöhung der ALP-Aktivität

Nachdem der Einfluss der ZBTB16-Inhibition auf die Dexamethason-induzierte Hochregulation osteogener Markergene und die ALP-Aktivitätssteigerung in DFCs gezeigt werden konnte, sollte nun der Einfluss der ZBTB16-Überexpression untersucht werden. Transfektion mit dem ZBTB16-Expressionsvektor bewirkte eine deutliche Hochregulation von ZBTB16 nach drei Tagen (Abbildung 24a). Auf die Expression von RUNX2, OCN und OPN, bei denen auch die ZBTB16-Inhibition bereits keine oder eine geringere Wirkung als nach RUNX2-Inhibition hatte, hatte ZBTB16-Überexpression nahezu keinen Einfluss (Abbildung 24b-d). ALP, OSX und NR4A3, bei denen die ZBTB16-Inhibition eine stärkere Wirkung als nach RUNX2-Inhibitor gezeigt hatte, waren nach ZBTB16-Überexpression hochreguliert (Abbildung 24e-g). Von den nach ZBTB16-Inhibition herunterregulierten Genen zeigte nur Col1A1 auch nach ZBTB16-Überexpression eine Herunterregulation gegenüber den Zellen, die mit dem Kontrollvektor transfiziert wurden (Abbildung 24h).

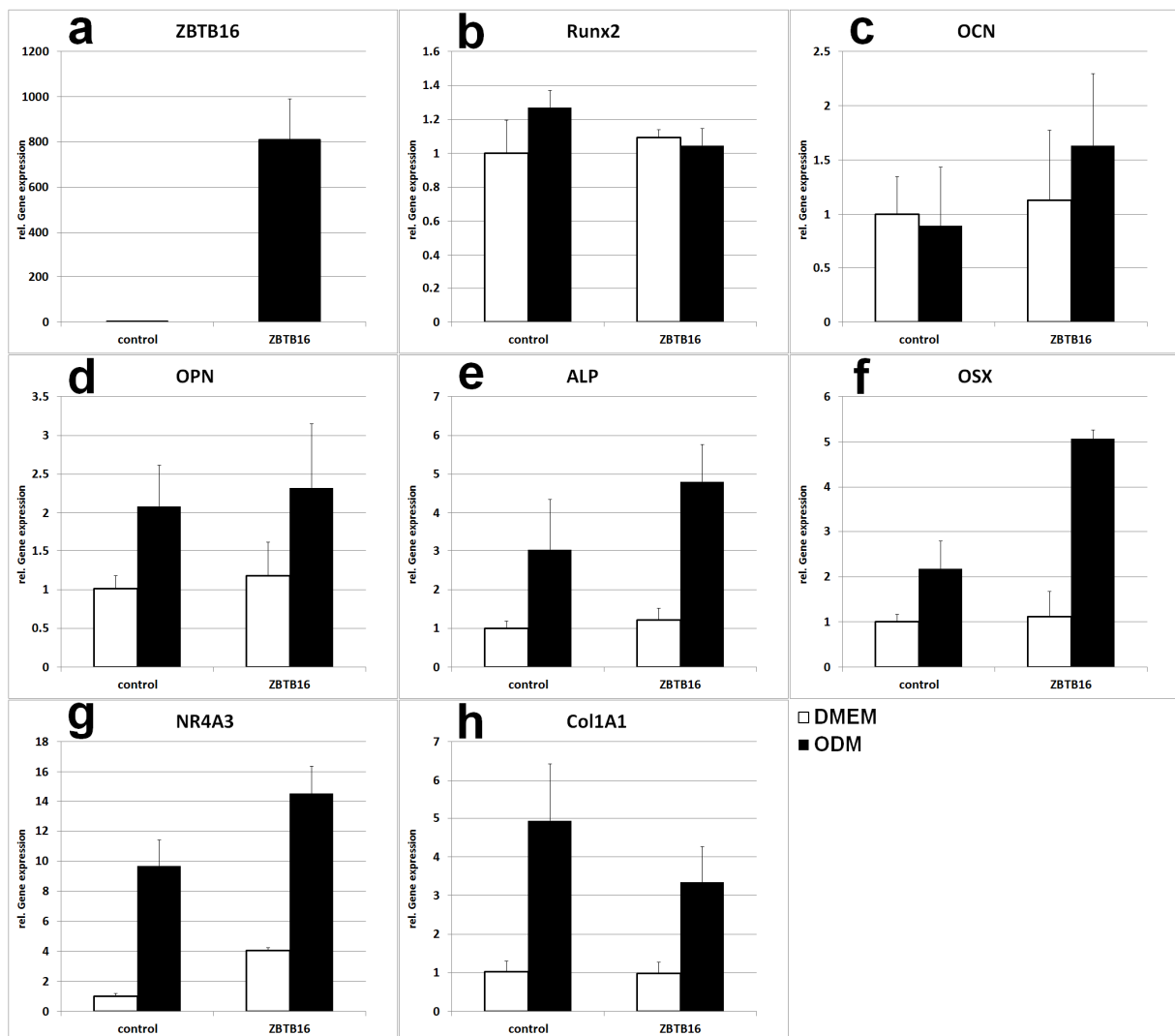


Abbildung 24: Relative Genexpression osteogener Marker nach Überexpression von ZBTB16

ZBTB16-Überexpression führte an Tag 7 in den differenzierten Zellen zu einer leichten Erhöhung der ALP-Aktivität (Abbildung 25). Ohne osteogene Induktion durch Dexamethason konnte kein Anstieg der ALP-Aktivität durch ZBTB16 beobachtet werden.

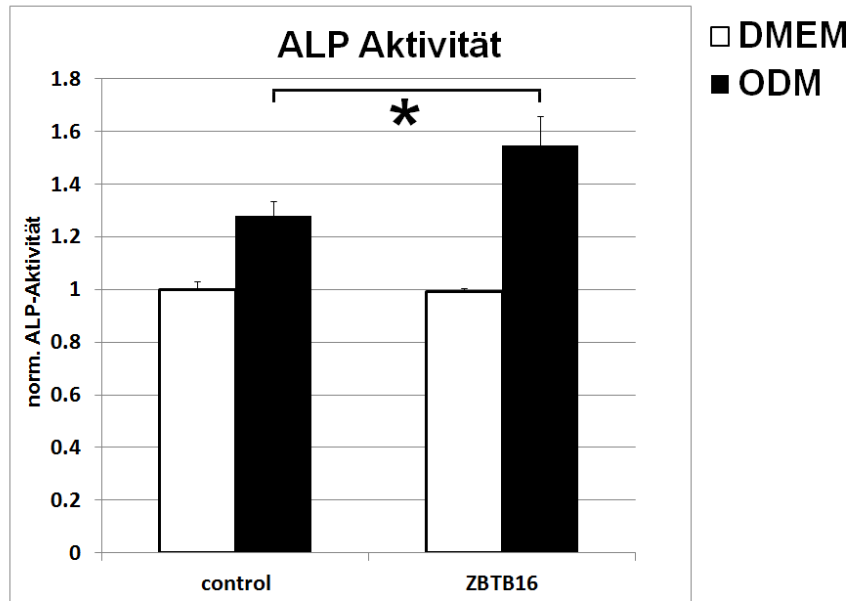


Abbildung 25: ALP-Aktivität nach ZBTB16-Überexpression (*: $p < 0,05$ ZBTB16-Überexpression gegenüber Kontrollvektor, jeweils in ODM)

6.6 ZBTB16 Überexpression stellt zum Teil die Expression durch RU486 inhibierter Gene wieder her

Da die bisherigen Ergebnisse nahelegen, dass ZBTB16-Überexpression die Regulation ähnlicher Gene bewirkt wie Stimulation mit Dexamethason, sollte dieser Zusammenhang näher überprüft werden. DFCs wurden in DMEM, ODM, ODM mit dem Glucocorticoidrezeptorinhibitor RU486 sowie in ODM mit RU486 und einem ZBTB16 Expressionsvektor kultiviert.

Behandlung der DFCs mit RU486 macht nach drei Tagen die Dexamethason-induzierte Hochregulation osteogener Markergene wieder rückgängig. Gleichzeitige Behandlung mit RU486 und einem ZBTB16-Expressionsvektor bewirkt die erneute Hochregulation dieser Gene (Abbildung 26).

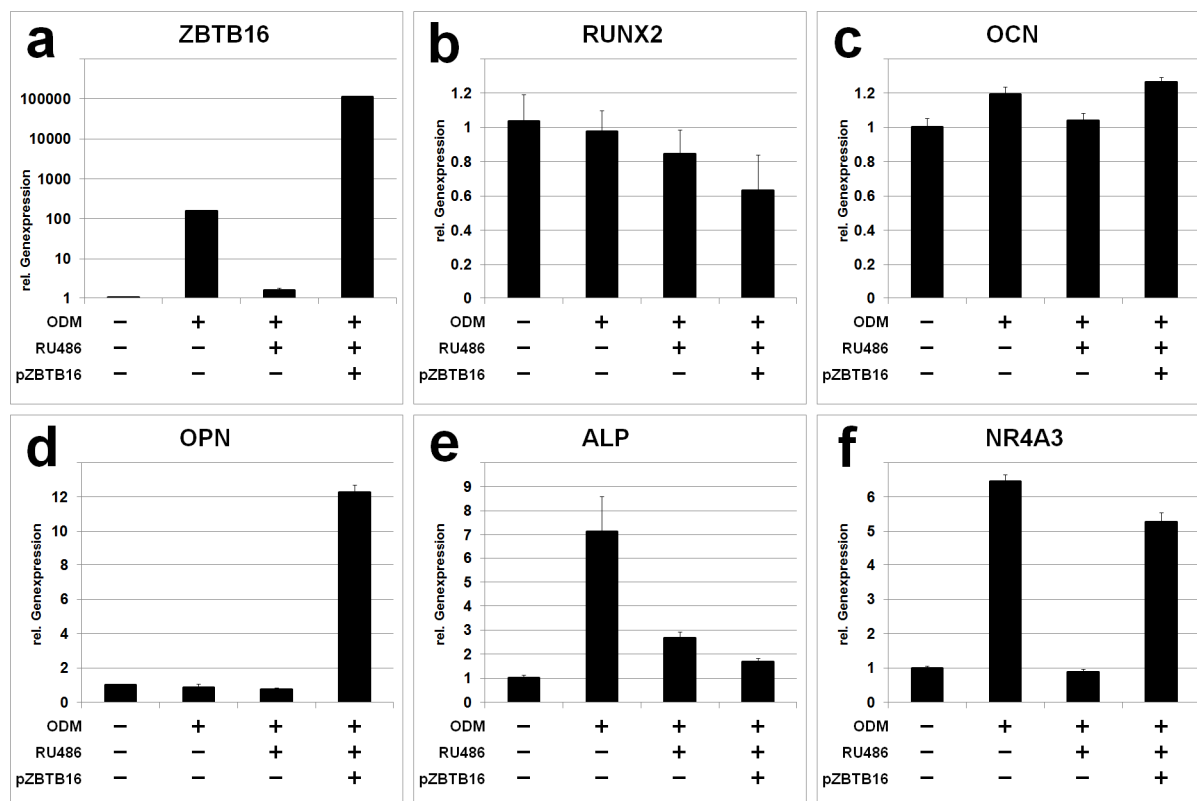


Abbildung 26: Relative Genexpression osteogener Marker nach Behandlung mit ODM, mit RU486 sowie nach Überexpression von ZBTB16

6.7 ZBTB16-Überexpression bewirkt genomweite Änderungen im Expressionsprofil

Um genomweite Genexpressionsprofiländerungen nach ZBTB16-Überexpression aufzudecken, und um mögliche Zielgene von ZBTB16 zu identifizieren, wurde eine Microarray-Analyse durchgeführt.

Nach Überexpression von ZBTB16 wurden an Tag drei 187 Gene signifikant (mindestens 2-fache Veränderung in der Genexpression, $p\text{-value} < 0,05$) hochreguliert und 63 Gene signifikant herunterreguliert. Die signifikant hochregulierten Gene sind in zahlreichen Osteogenese-assoziierten biologischen Prozessen überrepräsentiert, z.B. skeletal system development (GO:0001501), positive regulation of ossification (GO:0045778), bone development (GO:0060348), mesenchymal cell differentiation (GO:0048762), cellular calcium ion homeostasis (GO:0006874), regulation of phosphate metabolic process (GO:0019220), und response to glucocorticoid stimulus (GO:0051384). Eine vollständige Liste der hochregulierten Gene, der herunterregulierten Gene sowie der biologischen Prozesse, in denen die hochregulierten Gene überrepräsentiert sind, kann den *Supplemental materials* der Publikation (Felthaus et al., 2014) entnommen werden.

Durch die Microarray-Analyse haben sich einige interessante Kandidaten, die die osteogene Differenzierung *downstream* von ZBTB16 vermitteln könnten, ergeben. Aus den zahlreichen Genen, die nach ZBTB16-Überexpression hochreguliert waren, wurden PTHLH (parathyroid hormone-like hormone) und STC1 (Stanniocalcin) ausgewählt, da diese in der GeneOntology-Datenbank mit biologischen Prozessen wie skeletal system development assoziiert sind.

Um eine mögliche Beteiligung von PTHLH und STC1 bei der Dexamethason-induzierten osteogenen Differenzierung zu untersuchen, wurden diese Gene in einen Expressionsvektor kloniert, um sie in DFCs überzuexprimieren. Anschließend wurde die ALP-Aktivität sowie die Expression osteogener Markergene untersucht.

6.8 PTHLH-, aber nicht STC1-Transfektion bewirkte ein Steigerung der ALP-Aktivität

Nach Transfektion der dentalen Follikelzellen mit PTHLH konnte an Tag 7 eine stark gestiegene ALP-Aktivität beobachtet werden (Abbildung 27). Diese erhöhte ALP-Aktivität konnte sowohl gegenüber der DMEM-Kontrolle als auch gegenüber der ODM-Kontrolle beobachtet werden.

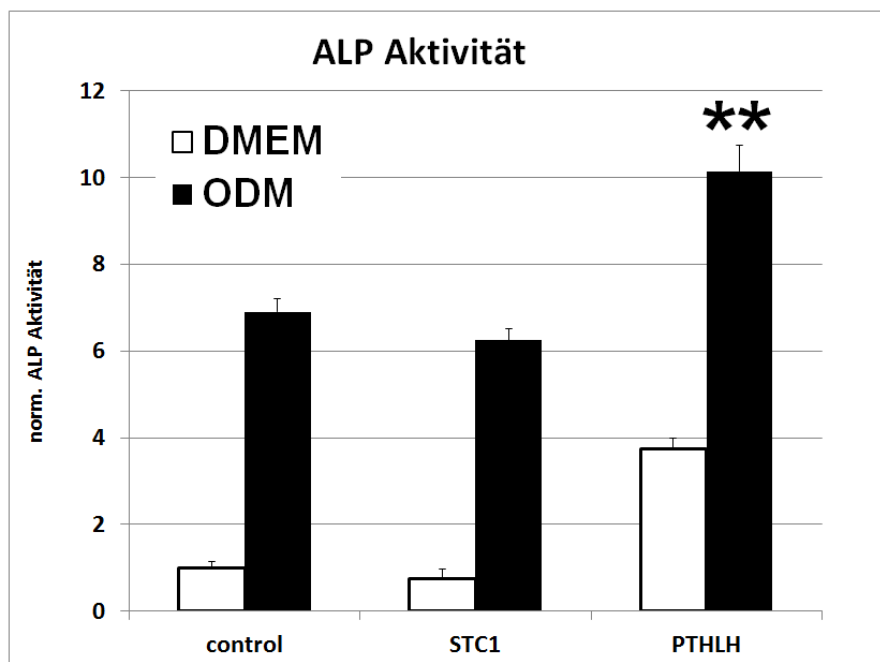


Abbildung 27: ALP-Aktivität 7 Tage nach Transfektion mit dem entsprechenden Transfektionsvektor (**: $p < 0,01$ PTHLH-Transfektion gegenüber Kontrollvektor, jeweils in ODM)

6.9 Nach PTHLH-Transfektion werden weder PTHLH noch osteogene Marker hochreguliert

Obwohl die Transfektion der DFCs mit einem PTHLH-Expressionsvektor zu einer deutlichen Steigerung der ALP-Aktivität geführt hat, konnte diese Transfektion an Tag drei keinen Anstieg in der Expression osteogener Markergene bewirken (Abbildung 28). Die Expression von ZBTB16 (Abbildung 28b), ALP (Abbildung 28c), RUNX2 (Abbildung 28d) und OCN (Abbildung 28f) wurde weder gegenüber der DMEM-Kontrolle noch gegenüber der ODM-Kontrolle gesteigert. Lediglich die Expression von OSX (Abbildung 28e) war gegenüber der DMEM-Kontrolle leicht gesteigert. Interessanterweise war aber PTHLH selbst trotz PTHLH-Transfektion nicht hochreguliert, sondern gegenüber der DMEM-Kontrolle sogar herunterreguliert (Abbildung 28a).

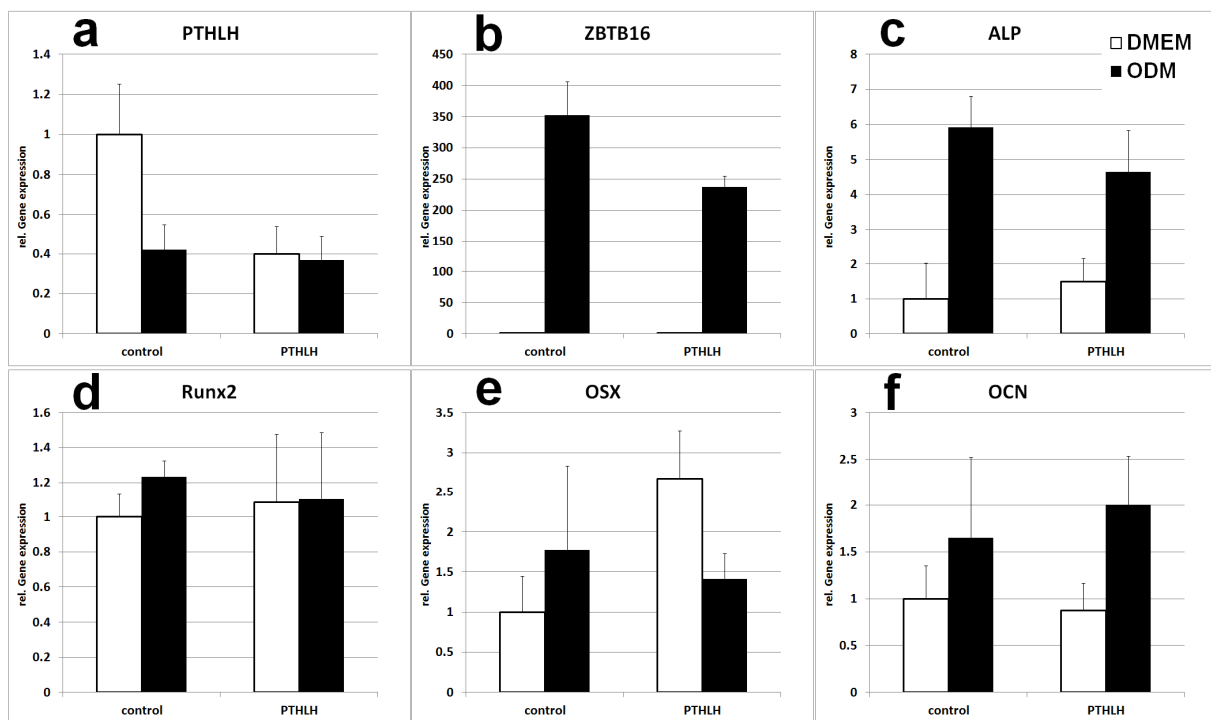


Abbildung 28: Relative Genexpression osteogener Marker nach Transfektion von PTHLH

6.10 Durch die PTHLH-Transfektion wird die endogene PTHLH-Expression herunterreguliert

Um dieses überraschende Ergebnis näher zu untersuchen, wurde überprüft, welcher Teil der cDNA aus der PTHLH-mRNA durch den verwendeten Primer (PTHLH 72) amplifiziert wird. Abbildung 29 zeigt die codierende Sequenz von PTHLH sowie die flankierenden Regionen, wie sie im rekombinanten, transfizierten Gen vorkommen. Dabei entspricht grau der (endogenen) 5'-untranslatierten Region, nach dem Startcodon (davor ist der nicht-endogene,

aus dem Klonierungsprimer stammende CACC-Überhang) schließt sich in blau die codierende Sequenz an. Grün unterlegt ist die vom Expressionsvektor stammende Linker/His-Tag-Region, die mit dem Stop-Codon abschließt. Die Sequenz wird von der 3'-untranslatierten Region abgeschlossen (türkis), die für die weitere Betrachtung keine Rolle spielt.

```

GTTAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCAGTACCCTTCACCATGGAGCGGAGACTGGTTCAGCAGTGG
AGCGTCGCGGTGTTCTGCTGAGCTACGCGGTGCCCTCTGCGGGCGCTCGGTGGAGGGTCTCAGC
CGCCGCCTCAAAGAGCTGTGTCTGAACATCAGCTCCTCCATGACAAGGGGAAGTCCATCCAAGAT
TTACGGCGACGATTCTTCCTTCACCATCTGATCGCAGAAATCCACACAGCTGAAATCAGAGCTACCTC
GGAGGTGTCCCTAACTCCAAGCCCTCTCCAACACAAAGAACCACCCCGTCCGATTGGGTCTGAT
GATGAGGGCAGATACCTAACTCAGGAACTAACAAGGTGGAGACGTACAAAGAGCAGCCGCTCAA
GACACCTGGGAAGAAAAAGAAAGGCAAGCCCGGAAACGCAAGGAGCAGGAAAAGAAAAAAC
GGCGAACTCGCTCTGCCTGGTTAGACTCTGGAGTGAAGTGGGAGTGGGCTAGAAGGGGACCACCTG
TCTGACACCTCCACAACGTCGCTGGAGCTCGATTACGGGAAGGGTCAAGACAATTCTGCAGATATCC
AGCACAGTGGCGGCCGCTCGAGTCTAGAGGGCCCGCGGTTTGAAGGTAAGCCTATCCCTAACCTC
TCCTCGGTCTCGATTCTACGCGTACCGGTATCATCACCATCACCATTGAGTTTAAACCCGCTGATCAG
CCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTGCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGG
AAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGG

```

Abbildung 29: Codierende Sequenz von PTHLH sowie die flankierenden Regionen des rekombinanten, transfizierten Gens. 5'-untranslatierte Region des endogenen PTHLH-Gens (grau), codierende PTHLH-Sequenz (blau), rekombinante Linker-Region (grün) sowie 3'-untranslatierte Region (türkis)

Eine Überprüfung hat ergeben, dass der *forward*-Primer des bisher verwendeten Primerpaares PTHLH 72 in der 5'-untranslatierten Region bindet und somit die transfizierte PTHLH-Variante nicht binden kann. Daher wurden neue Primer generiert: beim Primerpaar PTHLH 270 binden sowohl der *forward* als auch der *reverse* Primer innerhalb der codierenden Sequenz. Dieses Primerpaar bindet sowohl das rekombinante als auch das endogene PTHLH. Beim Primerpaar PTHLH 400 bindet der *reverse* Primer innerhalb der Linker-Region, wodurch dieses Primerpaar nur die rekombinante Variante amplifiziert. Abbildung 30 zeigt das Ergebnis der PCR mit diesen Primern. Es ist deutlich zu sehen, dass nur in den PTHLH-transfizierten Zellen die rekombinante Form amplifiziert wird (Abbildung 30a). Das Primerpaar, das beide Varianten amplifiziert (PTHLH 270) zeigt für DMEM ein ähnliches Ergebnis wie das Primerpaar PTHLH 72, welches nur die endogene Variante bindet. Trotz PTHLH-Transfektion wird PTHLH herunterreguliert. Für ODM zeigt die PTHLH-Transfektion insgesamt eine Hochregulation beider Varianten (Abbildung 30b).

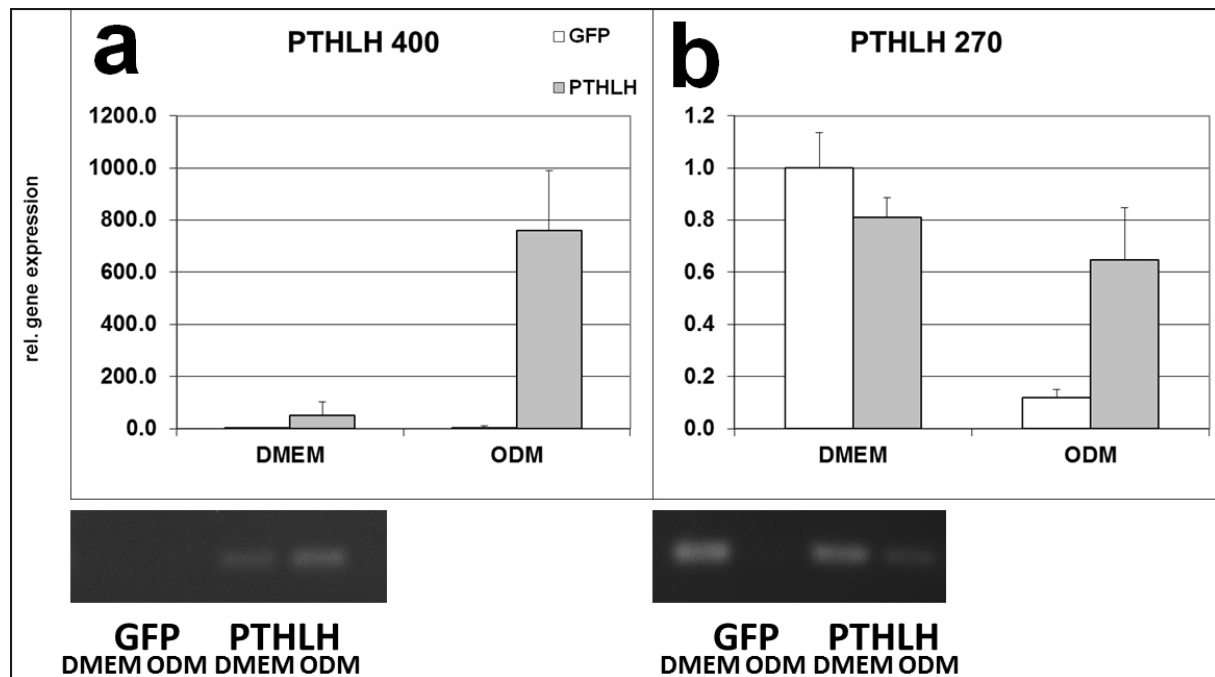


Abbildung 30: Relative Genexpression der rekombinanten (a) Variante von PTHLH sowie beider PTHLH Varianten. Das PCR-Produkt wurde zusätzlich auf ein Agarosegel aufgetragen. Die rekombinante PTHLH-Variante (PTHLH 400) kann – unabhängig von der Differenzierung - nur nach Transfektion mit dem PTHLH-Expressionsvektor nachgewiesen werden. Das Primerpaar, welches sowohl die endogene als auch die rekombinante PTHLH-Variante bindet (PTHLH 270), zeigt, dass PTHLH nach Transfektion mit dem PTHLH-Expressionsvektor insgesamt herunterreguliert wird.

6.11 STC1-Überexpression induziert osteogene Marker

Das zweite durch ZBTB16-Überexpression hochregulierte Gen, das für eine nähere Untersuchung in einen Expressionsvektor kloniert worden ist, ist STC1. Abbildung 31a zeigt, dass STC1 auch nach Dexamethason-vermittelter osteogener Differenzierung nach drei Tagen deutlich hochreguliert wird.

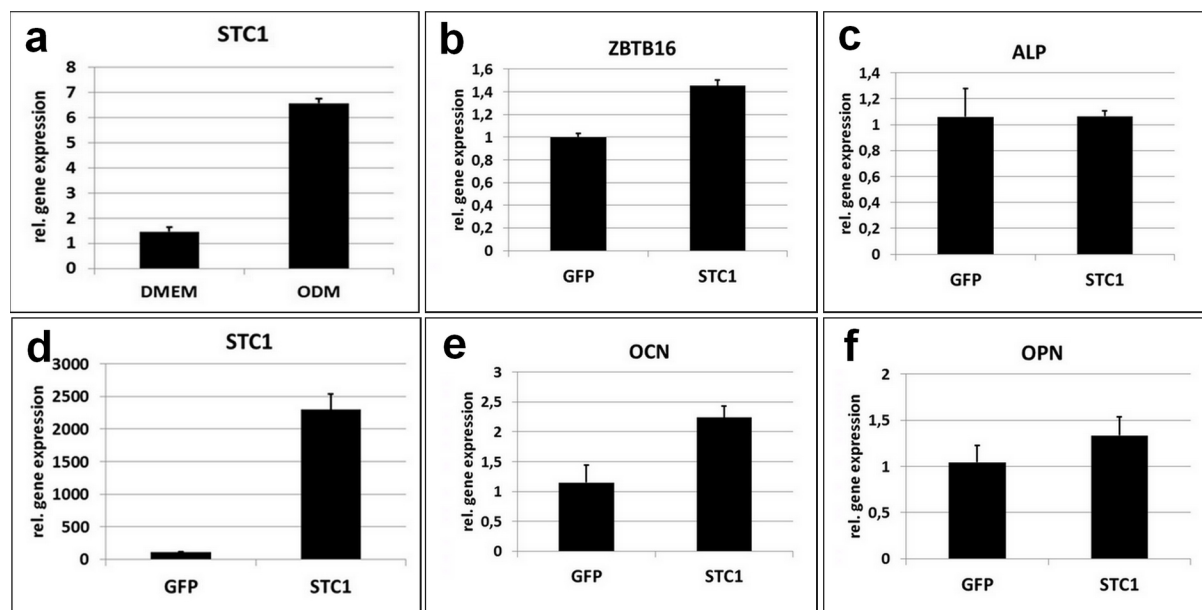


Abbildung 31: Relative Genexpression von STC1 nach osteogener Differenzierung (a) sowie relative Genexpression osteogener Marker nach Transfektion von STC1 nach drei Tagen (b-f)

Nach Transfektion mit dem STC1-Expressionsvektor wird STC1 stark hochreguliert (Abbildung 31d). Osteogene Marker wie ZBTB16, OCN und OPN sind ebenfalls, allerdings nur leicht, hochreguliert (Abbildung 31b, e, f). ALP ist nach STC1 Überexpression nicht reguliert (Abbildung 31c). Inhibiert man den Glucocorticoidrezeptor wird die Dexamethason-vermittelte Hochregulation von STC1 aufgehoben. Überexpression von ZBTB16 macht diesen Effekt wieder rückgängig (Abbildung 32).

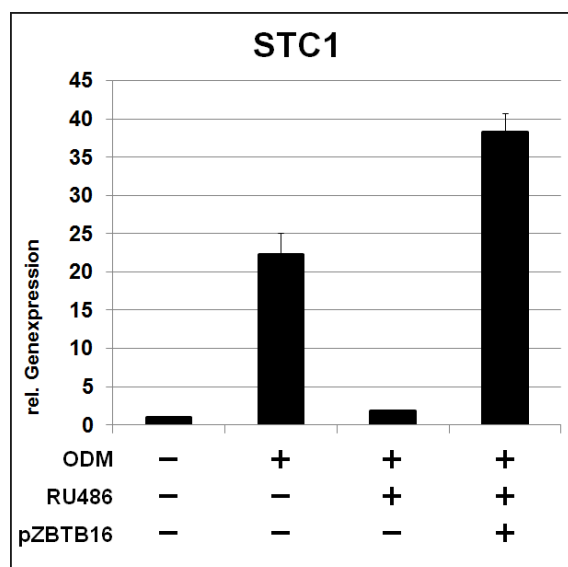


Abbildung 32: Relative Genexpression von STC1 nach Behandlung mit ODM, mit RU486 sowie nach Überexpression von ZBTB16

6.12 In DFCs bindet ZBTB16 an den NR4A3- und OSX-, aber nicht den RUNX2-Promotor

Die ChIP-Analyse hat ergeben, dass ZBTB16 an Tag drei nach Dexamethason-Stimulation an die Promotoren von NR4A3 und OSX bindet. Ohne Induktion der Differenzierung kann diese Bindung nicht gezeigt werden. Eine Bindung an den RUNX2-Promotor ist in keinem Fall nachweisbar (Abbildung 33).

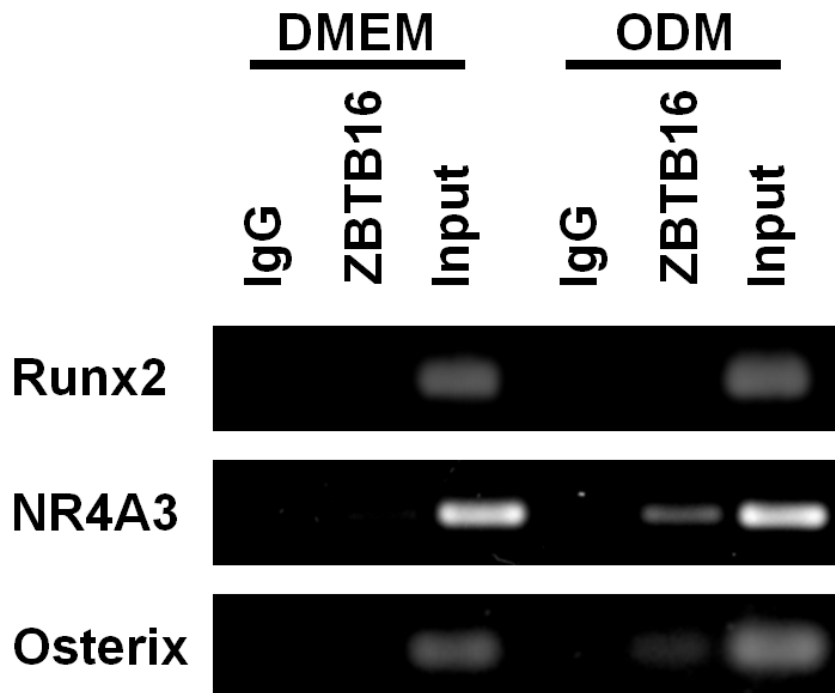


Abbildung 33: Chromatinimmunpräzipitation mit einem ZBTB16 Antikörper sowie einem unspezifischen Kontrollantikörper (IgG) und anschließende PCR der Präzipitate mit Primern gegen die vorhergesagten Bindestellen in den Promotorregionen von RUNX2, NR4A3 und OSX. Der IgG-Antikörper ist die Negativ-, der Input die Positivkontrolle.

7 Diskussion

7.1 DFCs sind osteogen differenzierende, biomineralisierende Zellen

DFCs, die die für multipotente MSCs typischen Oberflächenmarker exprimieren, zeigen nach Stimulation mit Dexamethason eine ausgezeichnete osteogene Differenzierung. Dies zeigt sich neben der gesteigerten ALP-Aktivität vor allem an der Mineralisierung der Matrix. Differenzierte DFCs bilden mineralisierte Strukturen (Knöllchen, *nodules*), die sich mit Alizarin Rot S anfärben lassen und die eine stöchiometrische Elementverteilung ähnlich der von Hydroxylapatit ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$, 1,67:1) zeigen. Gemessen wurde ein Wert von ungefähr 1,6:1. Dieser liegt in etwa in der Mitte zwischen dem stöchiometrischen Verhältnis von Hydroxylapatit und Tricalciumphosphat ($((\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2)$ 1,5:1). Hierbei muss jedoch berücksichtigt werden, dass aufgrund der Phospholipide in der Plasmamembran der Zellen mehr Phosphor gemessen wird als in den mineralisierten Strukturen vorhanden ist und das tatsächliche Verhältnis von Calcium zu Phosphor in den *nodules* noch etwas in Richtung Calcium verschoben ist. Die gesteigerte ALP-Aktivität sowie die durch die DFCs gebildeten Mineralisierungen sind ein deutliches Zeichen für die osteogene Differenzierung der Zellen (Puchtler et al, 1969, Whyte, 1994).

7.2 RUNX2 ist in DFCs für die Dexamethason-induzierte Differenzierung von untergeordneter Bedeutung

Während einige osteogene Markergene wie OSX und ALP die während einer osteogenen Differenzierung zu erwartende Regulation zeigen, werden andere klassische osteogene Markergene wie OPN, OCN und RUNX2 nicht reguliert. Da insbesondere RUNX2 als *keyplayer* der osteogenen Differenzierung gilt, dieses Gen nach Stimulation mit Dexamethason in DFCs aber nicht hochreguliert wird, sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob in DFCs ein RUNX2-unabhängiger Signalweg der osteogenen Differenzierung existiert. Der Fokus der Untersuchungen lag dabei neben RUNX2 auf ZBTB16, da dieser Transkriptionsfaktor während der osteogenen Differenzierung stark reguliert wird und bereits in anderen Studien mit osteogener Differenzierung in Verbindung gebracht worden ist (Barna et al., 2005; Ikeda et al., 2005; Inoue et al., 2006; Tang et al., 2006; Fischer et al., 2008).

Zunächst sollte untersucht werden, wie die osteogene Differenzierung nach Inhibition von RUNX2 oder ZBTB16 beeinflusst wird. Interessanterweise waren Gene, deren Expression durch Dexamethason nicht induziert wird (RUNX2, OPN, OCN), nach Inhibition von RUNX2 stärker beeinträchtigt als nach Inhibition von ZBTB16. Gene hingegen, die nach Stimulation mit Dexamethason hochreguliert wurden (NR4A3, OSX, und ALP), waren nach Inhibition von

ZBTB16 stärker beeinträchtigt als nach Inhibition von RUNX2. Ein ähnliches Ergebnis konnte nach Überexpression von ZBTB16 beobachtet werden. Die Expression der Dexamethason-induzierten Gene konnte nach ZBTB16-Überexpression auch ohne Dexamethason hochreguliert werden wohingegen die durch Dexamethason nicht induzierten Gene auch durch ZBTB16-Überexpression nicht reguliert wurden. Dies legt nahe, dass die Wirkung von Dexamethason auf die zelluläre Genexpression durch ZBTB16 vermittelt wird. Dies wird besonders deutlich, wenn der Glucocorticoidrezeptor inhibiert wird und die Überexpression von ZBTB16 den Zustand der Genexpression nach Dexamethason-Stimulation wiederherstellt.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Inhibition von RUNX2 die Expression von Dexamethason-induzierten Genen nicht beeinträchtigt, sollte der Effekt der RUNX2-Inhibition auf die osteogene Differenzierung in einer allgemeineren Betrachtung untersucht werden: ALP-Aktivität und Mineralisierung. Hierzu wurde die Methode der Induktion osteogener Differenzierung erweitert. Da bereits gezeigt wurde, dass die Expression zahlreicher mit RUNX2 assoziierter Gene nicht durch Dexamethason induziert wird, der RUNX2 abhängige Signalweg aber auch in DFCs aktiviert ist, wenn mit BMP2 stimuliert wird, wurden die DFCs neben Dexamethason auch mit BMP2 stimuliert. Die ALP-Aktivität dentaler Follikelzellen wurde durch Dexamethason in ähnlichem Umfang gesteigert wie durch BMP2. Die ALP-Aktivitätssteigerung konnte aber nur nach BMP2-Stimulation durch RUNX2-Inhibition vermindert werden, nicht jedoch nach Dexamethason-Stimulation. Dies spricht für die Existenz eines RUNX2-unabhängigen Signalwegs. Nach ZBTB16-Inhibition wird auch die Dexamethason-vermittelte ALP-Aktivitätssteigerung vermindert. Der Effekt, dass die Dexamethason-vermittelte Differenzierung durch ZBTB16-, nicht aber durch RUNX2-Inhibition vermindert werden kann, konnte auch durch die Alizarin Rot S-Färbung bestätigt werden. Während die mit RUNX2-spezifischer siRNA behandelten Zellen keinen Unterschied zur Mineralisierung der Kontrollzellen aufzeigten, war bei den Zellen, die mit siRNA spezifisch für ZBTB16 behandelt wurden, eine deutliche Verminderung der Mineralisierung feststellbar. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass in DFCs ein RUNX2-unabhängiger Mechanismus der osteogenen Differenzierung existiert und dieser durch ZBTB16 reguliert wird.

7.3 Der Dexamethason-vermittelte Differenzierungsmechanismus in DFCs unterscheidet sich von dem in BM-MSCs und SHED

Interessanterweise konnte für BM-MSCs gezeigt werden, dass ZBTB16 ein *upstream*-Regulator von RUNX2 ist (Ikeda et al., 2005). In dieser Studie wurden BM-MSCs mit Dexamethason stimuliert und anschließend die Hochregulation von unter anderem auch

RUNX2 beobachtet. In DFCs konnte dieser Effekt hingegen nicht gezeigt werden. Weder nach Dexamethason-Stimulation noch nach ZBTB16-Überexpression wurde RUNX2 hochreguliert. Mehr noch, eine Bindung von ZBTB16 an den RUNX2-Promotor, wie er in BM-MSCs gezeigt wurde (Ikeda et al., 2005), konnte für DFCs nicht bestätigt werden. Eine Bindung an die Promotoren von NR4A3 und OSX hingegen konnte gezeigt werden. Dies legt nicht nur den Schluss nahe, dass DFCs einen RUNX2-unabhängigen Differenzierungsmechanismus besitzen, sondern auch, dass DFCs möglicherweise einen Zelltyp mit spezifischen Eigenschaften darstellen. Andere Studien bestätigen diese Annahme. Die osteogene Differenzierung von BM-MSCs wird durch Kultivierung auf harten Oberflächen mit einer höheren Steifigkeit unterstützt, auf weichen Oberflächen mit geringerer Steifigkeit hingegen inhibiert (Engler et al., 2006). Bei DFCs hingegen unterstützen weiche Oberflächen die osteogene Differenzierung (Viale-Bouroncle et al., 2011). Interessanterweise zeigen Zellen aus einem anderen dentalen Gewebe, der Pulpa, das gleiche Verhalten wie BM-MSCs bezüglich der Oberflächensteifigkeit. Auch bei SHED Zellen wird die osteogene Differenzierung durch harte Oberflächen unterstützt (Viale-Bouroncle et al., 2012a). Die naheliegende Schlussfolgerung, dass es sich bei DFCs um einen Zelltyp handelt, der sich in seinen Differenzierungseigenschaften von anderen Zellen, auch solchen ähnlicher Herkunft, unterscheidet, wird auch durch andere Studien gestützt. Während Zellen aus der Pulpa und der apikalen Papille ein ähnlich gutes osteogenes Differenzierungspotential nach Dexamethason-Stimulation wie DFCs besitzen, wird RUNX2 nur bei SHED und dNC-PCs reguliert (Felthaus et al., 2012) (Gosau et al., 2013) (Viale-Bouroncle et al., 2013). Darüber hinaus besitzen SHED und dNC-PCs ein odontogenes Differenzierungspotential, das DFCs unter gleichen Kulturbedingungen nicht aufweisen. Dies ist zwar nicht überraschend, da aus DFCs keine dentinbildenden Zellen hervorgehen (Ten Cate, 1997), ist aber ein weiteres Anzeichen für eine Sonderrolle der DFCs innerhalb der verschiedenen dentalen Stammzelltypen. Ein weiterer Punkt passt zu den vorhandenen Ergebnissen. In BMSCs fördert ZBTB16 als *upstream*-Regulator von SOX9 die chondrale Differenzierung von BMSCs (Liu et al., 2011). Da DFCs intramembranöse Ossifikation durchlaufen, bei der keine knorpelige Zwischenstufe existiert, ist ein alternativer Differenzierungsweg als in BMSCs naheliegend. Dies gilt zwar auch für SHED, die bezüglich der Genexpression bei osteogener Differenzierung und ihrer Reaktion auf Oberflächensteifigkeiten eher den BMSCs ähneln. Pulpazellen bilden aber in ihrer normalen Entwicklung *in vivo* keine Osteoblasten (Ten Cate, 1997).

Interessanterweise konnten auch schon für andere Prozesse, in denen eine Beteiligung von RUNX2 erwartet wird, RUNX2-unabhängige Mechanismen nachgewiesen werden. So wurde postuliert, dass die Knochenbildung in Osteoblasten aus Lrp5 (Low-density lipoprotein receptor-related protein 5)-defizienten Mäusen über einen RUNX2-unabhängigen Signalweg

verläuft (Kato et al., 2002). Eine andere Studie hat gezeigt, dass in Myofibroblasten die Ossifikation ohne Beteiligung von RUNX2 ablaufen kann (Cheng et al., 2003). Hier war MSX2 der notwendige Faktor. Dass die Induktion von OSX durch BMP2 ohne Beteiligung von RUNX2 verlaufen kann, wurde für verschiedenen Zelltypen gezeigt (Lee et al., 2003). Zusammengenommen legt dies einige grundlegende Prinzipien für die osteogene Differenzierung in DFCs nahe. Die Expression von Genen, die nach Dexamethason-Induktion hochreguliert werden, wird von ZBTB16 kontrolliert. Gene, die nach BMP2-Induktion hochreguliert werden, werden durch RUNX2 reguliert. In beiden Fällen zeigen DFCs eine gute Differenzierung mit ausgeprägter Mineralisierung, so dass manche Gene für diesen Prozess austauschbar zu sein scheinen. Die gleichen Gene, die nach Dexamethason-Induktion hochreguliert werden und deren Expression durch RUNX2-Inhibition nicht vermindert wird, werden auch nach Überexpression von ZBTB16 ohne Glucocorticoid-Stimulation reguliert. Für eines dieser Gene, OSX, konnte die RUNX2-unabhängige Expression auch schon bei der osteogenen Differenzierung von C2C12 Zellen (murine Myoblastenzelllinie) gezeigt werden (Celil et al., 2005). In diesem Fall wurden die Zellen jedoch mit BMP2 stimuliert. Zu einem gegenteiligen Ergebnis ist eine andere Studie gekommen. Dabei wurden MSCs mit Dexamethason stimuliert, was zu einer Regulation von RUNX2, nicht aber von OSX geführt hat (Ito et al., 2007). Interessanterweise konnten diese Zellen aber keine mineralisierte Matrix bilden. Dies spricht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit dafür, dass OSX ein nicht-austauschbarer Faktor bei der osteogenen Differenzierung ist, allerdings durch verschiedene Wege induziert werden kann. Während die Expression osteogener Markergene unabhängig von RUNX2 auch schon für andere Zellen gezeigt werden konnte, konnte in dieser Arbeit für DFCs eine RUNX2-unabhängige Differenzierung mit Mineralisierung nachgewiesen werden. Dabei hat sich gezeigt, dass einige osteogene Markergene je nach Induktion nicht unbedingt notwendig sind, andere hingegen unabdingbar sind. Um einen besseren Einblick in die durch ZBTB16 vermittelte Regulation der osteogenen Differenzierung zu bekommen, wurden Microarray-Analysen durchgeführt. Nach Überexpression von ZBTB16 wurden 187 Gene hochreguliert und 63 Gene wurden herunterreguliert. Eine Gene Ontology Analyse hat ergeben, dass die hochregulierten Gene in zahlreichen biologischen Prozessen mit Bezug zur osteogenen Differenzierung überrepräsentiert sind. Hierzu gehören unter anderem skeletal system development, ossification, bone development und cellular calcium ion homeostasis. Zusätzlich zu den mit Knochenentwicklung assoziierten biologischen Prozessen waren die nach ZBTB16-Überexpression hochregulierten Gene auch im Prozess negative regulation of cell proliferation (GO:0008285) überrepräsentiert. Da Differenzierung und Proliferation sich gegenseitig ausschließende Prozesse sind, ist dies ein weiteres Zeichen dafür, dass ZBTB16 die Differenzierung fördert. Zusätzlich sind die nach ZBTB16-Überexpression

hochregulierten Gene auch im Prozess response to glucocorticoid stimulus (GO:0051384) überrepräsentiert, obwohl keine Glucocorticoid-Stimulation stattgefunden hat. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass die Differenzierungseffekte von Dexamethason durch ZBTB16 vermittelt werden.

7.4 PTHLH ist kein downstream-Vermittler der ZBTB16-induzierten osteogenen Differenzierung in DFCs

Ein weiteres Gen, das nach ZBTB16-Überexpression hochreguliert wird und mit den biologischen Prozessen skeletal system development, ossification und bone development assoziiert ist, ist PTHLH. Expression von PTHLH ist allerdings mit der Inhibition der Knochenentwicklung in Verbindung gebracht worden. Expression von PTHLH hat in MCOs (*murine calvarial osteoblasts*) die Expression von Osteoblastenmarkern inhibiert (Chen et al., 2004). Andererseits bewirkt es in denselben Zellen einen Zellzyklus-Arrest (Datta et al., 2005). Da Proliferation und Differenzierung sich gegenseitig ausschließende Prozesse sind, ist die Wirkung von PTHLH auf die osteogene Differenzierung unklar. So konnten widersprüchliche Dosis-abhängige Effekte von PTHLH beobachtet werden. Während hohe Dosen von PTHLH zu Knochenabbau geführt hat, bewirkte eine geringere Dosis eine Zunahme des Knochenvolumens (Lombardi et al., 2011). Interessanterweise wird dieser Effekt durch Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs vermittelt. Die gefundenen gegensätzlichen Einflüsse von PTHLH könnten durch gegensätzliche Effekte der PTHLH-Regionen erklärt werden. In einer Studie mit verschiedenen Fragmenten von PTHLH wurde dies gezeigt (Casado-Diaz et al., 2010). Während das N-terminale Fragment (Aminosäuren 1-36) die osteogene Differenzierung fördert (und die adipogene Differenzierung inhibiert), konnte eine Behandlung mit einem PTHLH-Fragment aus den Aminosäuren 107-139 den gegenteiligen Effekt hervorrufen. Interessanterweise bewirkte eine Behandlung mit beiden Fragmenten die Induktion osteogener Marker. In der vorliegenden Arbeit hat PTHLH zunächst Rätsel aufgegeben. Da PTHLH zu den am stärksten regulierten Genen nach ZBTB16-Überexpression in der Microarray-Analyse gehörte und mit dem biologischen Prozess skeletal system development assoziiert ist, wurde es für weitere Analysen ausgesucht. Nach Überexpression von PTHLH konnte dann auch eine deutliche Steigerung der ALP-Aktivität beobachtet werden. Zu diesem Zeitpunkt war PTHLH ein interessanter Kandidat, ein wichtiges Gen *downstream* von ZBTB16 im postulierten RUNX2-unabhängigen Signalweg zu sein. Die Analyse der Genexpression osteogener Marker, auch der, die nach ZBTB16-Überexpression oder Dexamethason-Stimulation reguliert waren, zeigte aber, dass diese nicht nur nicht hoch-, sondern eher herunterreguliert waren. Mehr noch, PTHLH selbst schien nach Transfektion mit dem PTHLH-Expressionsvektor herunterreguliert. Dies lag

zunächst einmal aber daran, dass einer der verwendeten PTHLH-Primer in der endogenen 5'-untranslatierten Region bindet und somit das rekombinante transfizierte PTHLH nicht amplifizieren konnte. Durch die Verwendung eines Primers, der nur die rekombinante Form von PTHLH amplifiziert, konnte die Plasmid-induzierte Expression nachgewiesen werden. Benutzt man einen Primer, der beide Formen von PTHLH erkennt, wird aber das erste Ergebnis bestätigt. Trotz Expression der rekombinanten PTHLH-Variante wird PTHLH insgesamt herunterreguliert. Dies spricht für einen negativen Feedback-Mechanismus, bei dem die Zelle auf die Transfektion mit einer Herunterregulation von PTHLH reagiert. Mit dieser Erkenntnis muss auch die durch PTHLH-Transfektion vermittelte deutliche Steigerung der ALP-Aktivität neu bewertet werden. Es spricht vieles dafür, dass PTHLH in humanen DFCs ein negativer Regulator der osteogenen Differenzierung ist. In dem Fall wäre die durch die Transfektion hervorgerufene Herunterregulation des Gesamt-PTHLH Transkripts der Grund für die ALP-Aktivitätssteigerung und durch die Transfektion wurde unbeabsichtigt der Inhibitor der osteogenen Differenzierung inhibiert.

7.5 STC1 könnte Teil des ZBTB16-abhängigen Differenzierungsmechanismus sein

Ein weiteres der hochregulierten Gene, das mit Gene ontology-Prozessen der Knochenentwicklung assoziiert ist, ist Stanniocalcin (STC1) (Felthaus et al., 2013). Es handelt sich um ein 27,6 kDa großes, glycosyliertes Protein, das über Disulfidbrücken ein Homodimer bildet. STC1 wurde nicht nur nach ZBTB16-Überexpression reguliert, sondern auch nach Stimulation mit Dexamethason. BMP2 und IGF2 hingegen, die die osteogene Differenzierung der DFCs über eine Hochregulation von RUNX2, aber nicht von ZBTB16 stimulieren, bewirkten keine Induktion von STC1 (Saugspier et al., 2010). Interessanterweise führte die Überexpression zweier weiterer Gene, die mit der osteogenen Differenzierung in DFCs assoziiert sind, DLX3 und TP53, jeweils ebenfalls zu einer Hochregulation von STC1 (Felthaus et al., 2012; Viale-Bouroncle et al., 2012b). Dies macht STC1 zu einem interessanten Kandidaten für eine wichtige Rolle in dem postulierten, Dexamethason-induzierten, RUNX2-unabhängigen Differenzierungsmechanismus. Interessanterweise wurde für Ratten gezeigt, dass STC1 das longitudinale Knochenwachstum inhibiert (Wu et al., 2006). Dieses widersprüchliche Ergebnis könnte damit erklärt werden, dass Zellen des longitudinalen Knochenwachstums einen anderen Ossifikationsmechanismus als die craniofazialen DFCs besitzen. Hierfür spricht, dass STC1 in der Studie von Wu et al. das longitudinale Knochenwachstum durch die Inhibition der Chondrocyten-Differenzierung der Epiphysenfuge hemmt. Dieser Prozess spielt bei der intramembranösen Ossifikation der DFCs keine Rolle. Dies ist in Übereinstimmung mit einem anderen Gen, das nach ZBTB16-

Überexpression hochreguliert ist und mit dem biologischen Prozess skeletal system development assoziiert ist. WNT5A (Wingless-type MMTV integration site family, member 5A) ist ausschlaggebend für die Differenzierung von murinen calvarialen Osteoblasten (murine calvarial osteoblastic cells, MCOs), die ebenfalls craniofazialer Abstammung sind (Guo et al., 2008; Liu et al., 2008). In Knochenfischen, in denen STC1 auch zuerst entdeckt wurde (Chang et al., 2003), reguliert es die Calciumhomöostase, während für zahlreiche Säugerzellen eine Rolle beim Phosphattransport gezeigt werden konnte (Johnston et al., 2010). Zusätzlich konnte für calvariale Osteoblasten aus der Ratte gezeigt werden, dass Stimulation mit rekombinantem STC1 die Mineralisierung fördert, indem die Expression des $\text{Na}^+\text{-P}_i$ Co-Transporters Pit1/Slc20a1 induziert und damit die Aufnahme von Phosphat gefördert wird (Yoshiko et al., 2007). Dies ist aus mehrfacher Hinsicht interessant. Zum einen ist es ein Indiz für die Beteiligung von STC1 an der Mineralisierung. Außerdem stärkt es die Annahme, dass die zuvor erwähnte Inhibition des longitudinalen Knochenwachstums durch STC1 ein Effekt spezifisch für endochondrale Ossifikation ist. Dies wiederum stärkt die Hypothese, dass bei der Regulation der osteogenen Differenzierung zumindest für einige Gene große Unterschiede zwischen endochondralen und intramembranösen Knochenvorläuferzellen bestehen. Dies spricht für die Möglichkeit eines alternativen, von ZBTB16 regulierten, RUNX-unabhängigen osteogenen Differenzierungsmechanismus. Für humane DFCs sprechen die vorliegenden Daten zusätzlich für eine gegenseitige Induktion von ZBTB16 und STC1, durch die die osteogene Differenzierung gefördert wird.

8 Schlussfolgerung

Die vorliegenden Daten stützen die Hypothese, dass der osteogene Differenzierungsmechanismus in DFCs Unterschiede zu dem von BM-MSCs aufweist. Insbesondere liegt die Schlussfolgerung nahe, dass nach Induktion der Differenzierung durch Dexamethason RUNX2 im Gegensatz zu den BM-MSCs in DFCs nur eine untergeordnete Rolle spielt. Die Effekte von Dexamethason werden in DFCs RUNX2-unabhängig durch ZBTB16 vermittelt. STC1 könnte bei diesem Mechanismus eine wichtige Rolle spielen.

Eine Verwendung von Dexamethason am Patienten ist wegen des Risikos, Osteoporose auszulösen, eher unwahrscheinlich. Zur Züchtung von Knochengewebeersatz außerhalb des Körpers wäre der Einsatz aber denkbar. Für diesen als *Tissue Engineering* bezeichneten Prozeß stellen DFCs eine vielversprechende Quelle adulter mesenchymaler Stammzellen dar, da diese bei einer Vielzahl von Menschen als klinischer Abfall infolge einer Weisheitszahnextraktion anfallen. Sollten Stammzellbanken in Zukunft zu einem etablierten Teil der regenerativen Medizin werden, könnte der dentale Follikel neben Milchzähnen und Fettgewebe zu einer wichtigen Quelle für die Kryokonservierung adulter Stammzellen werden. Eine genaue Kenntnis der Eigenschaften, die diesen Zelltyp von Stammzellen anderer Gewebe unterscheidet, wird dann ein entscheidender Faktor für den Erfolg der zielgerichteten Differenzierung sein. Hinsichtlich der Induktion und des Mechanismus der osteogenen Differenzierung hat diese Studie eine Besonderheit der dentalen Follikelzellen herausgestellt und möchte damit einen ersten Beitrag für die Zelltyp-spezifische Kultivierung von Stammzellen in zukünftigen *Tissue Engineering*-Anwendungen in der regenerativen Medizin leisten.

9 Materialienverzeichnis

9.1 Verbrauchsmaterialien

9.1.1 Einwegartikel

10cm-Zellkulturschalen	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Deckgläschen	Roth, Karlsruhe
Mikroarray-Chip Human Gene 1.1 ST Array	Affymetrix, Santa Clara, CA, USA
Multiwellplatten (6-, 24-, 96-)	Nunc™, über A. Hartenstein GmbH, Würzburg
PCR tubes	Axygen, Corning Inc., Lowell, USA
Pipettenspitzen, gestopft	SafeSeal, Biozym, Oldendorf
RNA 6000 Nano LabChip	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
round-bottom tubes	BD Discovery Labware Falcon™
Serologische Pipetten	Greiner CELLSTAR® Greiner Bio-one, Frickenhausen
Skalpell	FEATHER Safety Razor Co., LTD, Osaka, Japan
T75-Zellkulturflaschen	Corning Inc., Lowell, USA
Zellsieb (70µm)	BD Discovery Labware Falcon™, Boston, USA
Zentrifugenröhrchen (15ml, 50ml)	BD Discovery Labware Falcon™

9.1.2 Chemikalien

2-phospho-L-Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Aceton	Roth, Karlsruhe
Alizarin Rot S	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Alkaline buffer	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ammoniumhydroxid	Roth, Karlsruhe
BCIP/NBT	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
β-Glycerophosphat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
BSA	Biomol, Hamburg
Cetylpyridiniumchlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
DMEM	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
DMSO	Roth, Karlsruhe
EDTA	Merck, Darmstadt

Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Expressionsvektor (ZBTB16)	True ORF cDNA clone, Origene, Rockville, MD, USA
FBS	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Formaldehydlösung, 37%	Roth, Karlsruhe
GeneRuler™ 100bp Plus	Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
Glutaraldehyd	Roth, Karlsruhe
HEPES-Puffer	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Hyaluronidase	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Kollagenase	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
LB-Medium	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
LE Agarose,	Biozym. Oldendorf
Natriumazid	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
PBS	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Phosphatase Substrat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Polymerase Phusion High-Fidelity	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
rhBMP2	PeptoTech, Rocky Hill, NJ, USA
RU486	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
TBE-Puffer	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Transfektionsreagenz HiPerFect	Qiagen, Hilden
Transfektionsreagenz FuGene HD	Promega, Madison, WI, USA
Triton-X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypsin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

9.1.3 Kits

GoTaq® Green MasterMix	Promega Madison, Wi, USA)
LightCycler Fast Start DNA Master Plus Set SYBR® Green	Roche Diagnostics, Mannheim
Light Cycler Taq-Man Master Set	Roche Diagnostics, Mannheim
OsteoImage™ Bone Mineralization Assay	Lonza, Basel, Schweiz
Pierce Agarose ChIP Kit	Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAshredder	Qiagen, Hilden
QuantiTect RT Kit	Qiagen, Hilden
Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA	Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA
RNeasy Plus Mini Kit	Qiagen, Hilden

9.1.4 Antikörper

anti-human CD44-FITC	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
anti-human CD105-APC	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
anti-human CD146-FITC	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
anti-human nestin-PE	R&D Systems, Inc.; Minneapolis; USA
Mouse IgG2b-APC	Miltenyi Biotec
mouse IgG-FITC	Miltenyi Biotec
mouse IgG1-PE	R&D Systems, Minneapolis, USA
Mouse IgM PE	BioLegend, San Diego, CA, USA
Normal rabbit IgG	Upstate, Temecula, CA, USA
Anti ZBTB16 (PLZF D-9)	Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA

9.2 Geräte

Abzug	Airflow Controller AC3 MC6
Agarosegelelektrophoresekammer	Mini-Sub Cell GT Cell, BioRad, Hercules, CA, USA
CCD Kamera	DS Fi2, Nikon Chiyoda, Tokyo, Japan
Durchflusszytometer	BD FACSCANTO II (BD
EDX Detektor	EDAX energy dispersive spectrometer, Ametek, München
Flüssigstickstoffbehälter	Arpege 110, Air Liquide, Düsseldorf
Geldokumentationssystem	Bio-Vision™ 3000 PEQLAB GmbH, Erlangen
Inkubator	HeraCell 150 Heraeus, Hanau
Mikroskop	Nikon Eclipse TS100, Chiyoda, Tokyo, Japan
PCR-Cycler	MJ Mini Thermal Cycler BioRad, Hercules, CA, USA
pH-Meter	Mettler Toledo
Plattenphotometer Infinite® F200	Tecan, Crailsheim
Power Supply	PowerPack 3000 BioRad, Hercules, CA, USA
Rasterelektronenmikroskop	Quanta 400 F, Fei, Eindhoven, Niederlande
Real-Time PCR-Cycler	Light-Cycler® 2.0 Roche Diagnostics, Mannheim
Reinstwassersystem T	KA X-Cad, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
Sicherheitswerkbank	HeraSafe HS12, Heraeus, Hanau
Wasserbad	GFL 1092 GFL, Burgwedel
Zellzähler	Cell Counter TC20 BioRad, Hercules, CA, USA
Zentrifuge	Eppendorf centrifuge 5417R
Zentrifuge	Labofuge 400R Heraeus

10 Abkürzungsverzeichnis

10.1 Methoden und Geräte

BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
ChIP	Chromatin immunoprecipitation (Chromatin-Immunpräzipitation)
DAVID	Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery
EDX	Energy-dispersive X-ray spectroscopy (Energiedispersive Röntgenspektroskopie)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
REM	Rasterelektronenmikroskop
RNAi	RNA interference
RT	Reverse Transkription

10.2 Institutionen

KFB	Kompetenzzentrum für Fluoreszente Bioanalytik (Regensburg)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NLM	United States National Library of Medicine
NIH	National Institute of Health

10.3 Einheiten

bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
cm	Zentimeter
g	Gramm
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
µm	Mikrometer
mm	Millimeter
µM	Mikromol
mM	Millimol
pH	potentia Hydrogenii
pmol	Pikomol
M	Mol

ng	Nanogramm
rpm	Revolutions per minute
v/v	volume per volume
w/v	weight (mass) per volume

10.4 Materialien

APC	Allophycocyanin
BCIP/NBT	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/nitroblue tetrazolium
BSA	bovine serum albumin (Rinderalbumin)
cDNA	Complementary DNA (komplementäre DNA)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddH ₂ O	destilliertes Wasser
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Deoxyribonukleotidtriphosphate
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
FBS	Fetal bovine serum (fötales Rinderserum)
FITC	Fluorescein isothiocyanate
Ig	Immunglobulin
LB	lysogeny broth
LE	low electroendosmosis (Agarose)
mRNA	Messenger RNA (Boten-RNA)
NaN ₃	Natriumazid
NaOH	Natriumhydroxid
ODM	osteogenes Differenzierungsmedium
PBS	phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PE	Phycoerythrin
pNPP	para-Nitrophenylphosphat
rhBMP2	recombinant human BMP2
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)

siRNA	small interfering RNA
TBE-Puffer	Tris-Borate-EDTA Puffer
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer

10.5 Zellen

BM-MSCs	Bone marrow stromal cells (Knochenmarkstammzellen)
CFU-f	Colony-forming unit-fibroblasts
CMV	Cytomegalovirus
DFCs	Dental follicle cells (Dentale Follikelvorläuferzellen)
dNC-PCs	dental neural crest derived progenitor cells (aus der Neuralleiste abstammende dentale Progenitorzellen)
DPSC	Postnatal dental pulp stem cells (postnatale Pulpastammzellen)
ICM	inner cell mass
MCOs	murine calvarial osteoblastic cells (murine Kalotten-Osteoblasten)
MSCs	Mesenchymal stem cells (Mesenchymale Stammzellen)
PDLSC	Periodontal ligament stem cells (Parodontalligamentstammzellen)
SCAP	Stem cells from human exfoliated deciduous teeth
SHED	Stem cells from human exfoliated deciduous teeth (Stammzellen aus humanen Milchzähnen)

10.6 Proteindomänen

BTB	bric-a-brac tramtrack broad complex
Fc	Fragment crystallizable
POZ	poxvirus and zinc finger
RD2	Repressordomäne 2

10.7 Gene

ALP	Alkaline phosphatase (Alkalische Phosphatase)
Bcl2	B-cell lymphoma 2
BGLAP	Bone gamma carboxyglutamate protein (OSC)
BMP2	Bone morphogenetic protein
BMPR1B	Bone morphogenetic protein receptor, type IB
Cbfa1	core-binding factor, runt domain, alpha subunit 1 (RUNX2)
CDKN1A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21)
DLX3	Distal-less homeobox 3

CBF-alpha-1	Core-binding factor subunit alpha-1
GFP	green fluorescent protein
GR	Glucocorticoid receptor (Glucocorticoidrezeptor), (NR3C1)
IGF2	Insulin-like growth factor 2
LEF/TCF	Lymphoid enhancer-binding factor/ transcription factor T-cell specific
LRP	Low-density lipoprotein receptor-related protein
NOR1	neuron-derived orphan receptor 1 (NR4A3)
NR3C1	nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1
NR4A3	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3 (NOR1)
OCN	Osteocalcin (BGLAP)
OPN	Osteopontin (SPP1)
OSX	Osterix (SP7)
PDGF-R	Platelet-derived growth factor receptors ()
PLZF	Promyelocytic leukaemia zinc finger protein (ZBTB16, ZNF145)
PTHrP	Parathyroid hormone-related protein (PTHrP)
PTHrP	Parathyroid hormone related protein (PTHrP)
RAR α	retinoic acid receptor α
RUNX2	Runt-related transcription factor 2 (Cbfa1)
SP1	specificity protein 1
SP7	Sp7 transcription factor (osterix)
SPP1	Secreted phosphoprotein 1 (OPN)
STC1	Stanniocalcin-1
TP53	Tumor protein p53
WNT5A	Wingless-type MMTV integration site family, member 5A
ZBTB16	Zinc finger and BTB domain-containing protein 16 (PLZF, ZNF145)
ZNF145	Zinc-finger protein 145 (PLZF, ZBTB16)

11 Literaturverzeichnis

- Agrawal, N., Dasaradhi, P.V.N., Mohammed, A., Malhotra, P., Bhatnagar, R.K., and Mukherjee, S.K. (2003). RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications. *Microbiol Mol Biol R* 67, 657–685.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2002). *Mol Biol Cell*.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215, 403–410.
- Babu, M.M., Luscombe, N.M., Aravind, L., Gerstein, M., and Teichmann, S.A. (2004). Structure and evolution of transcriptional regulatory networks. *Curr Opin Struc Biol* 14, 283–291.
- Barna, M., Pandolfi, P.P., and Niswander, L. (2005). Gli3 and Plzf cooperate in proximal limb patterning at early stages of limb development. *Nature* 436, 277–281.
- Barrilleaux, B., Phinney, D.G., Prockop, D.J., and O'connor, K.C. (2006). Review: Ex Vivo Engineering of Living Tissues with Adult Stem Cells. *Tissue Eng* 12, 3007–3019.
- Barth, A. (1895). Histologische Untersuchung über Knochenimplantationen. *Beitr Pathol Anat Al* 17, 65–142.
- Beckmann, J., Scheitza, S., Wernet, P., Fischer, J.C., and Giebel, B. (2007). Asymmetric cell division within the human hematopoietic stem and progenitor cell compartment: identification of asymmetrically segregating proteins. *Blood* 109, 5494–5501.
- Bell, D.M., Leung, K.K.H., Wheatley, S.C., Ng, L.J., Zhou, S., Wing Ling, K., Har Sham, M., Koopman, P., Tam, P.P.L., and Cheah, K.S.E. (1997). SOX9 directly regulates the type-II collagen gene. *Nat Genet* 16, 174–178.
- Bendall, A.J., and Abate-Shen, C. (2000). Roles for Msx and Dlx homeoproteins in vertebrate development. *Gene* 247, 17–31.
- Biswas, A., Bayer, I.S., Zhao, H., Wang, T., Watanabe, F., and Biris, A.S. (2010). Design and synthesis of biomimetic multicomponent all-bone-minerals bionanocomposites. *Biomacromolecules* 11, 2545–2549.
- Bonfield, T.L., and Caplan, A.I. (2010). Adult Mesenchymal Stem Cells: An Innovative Therapeutic for Lung Diseases. *Discov Med*. Apr;9(47):337-45.
- Bonnet, D. (2003). Hematopoietic stem cells. *Birth Defects Res C Embryo Today* Aug;69(3):219-29.
- Bosshardt, D.D., and Schroeder, H.E. (1996). Cementogenesis reviewed: a comparison between human premolars and rodent molars. *Anat Rec* 245, 267–292.
- Brivanlou, A.H., and Darnell, J.E. (2002). Signal Transduction and the Control of Gene Expression. *Science* 295, 813–818.
- Bronckers, A.L., Gay, S., Finkelman, R.D., and Butler, W.T. (1987). Developmental appearance of Gla proteins (osteocalcin) and alkaline phosphatase in tooth germs and bones of the rat. *Bone Miner* 2, 361–373.

- Bronner-Fraser, M. (1994). Neural crest cell formation and migration in the developing embryo. *FASEB J* 8, 699–706.
- Buddecke, E. (1981). *Biochemische Grundlagen der Zahnmedizin* (Walter de Gruyter).
- Caetano-Lopes, J., Canhão, H., and Fonseca, J.E. (2007). Osteoblasts and bone formation. *Acta Reumatol Port* 32, 103–110.
- Cahill, D.R., and Marks, S.C., Jr (1980). Tooth eruption: evidence for the central role of the dental follicle. *J Oral Pathol* 9, 189–200.
- Caplan, A.I. (1991). Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 9, 641–650.
- Caplan, A.I. (2007). Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol* 213, 341–347.
- Caplan, A.I. (2008). All MSCs Are Pericytes? *Cell Stem Cell* 3, 229–230.
- Cartharius, K., Frech, K., Grote, K., Klocke, B., Haltmeier, M., Klingenhoff, A., Frisch, M., Bayerlein, M., and Werner, T. (2005). MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* 21, 2933–2942.
- Casado-Diaz, A., Santiago-Mora, R., and Quesada, J.M. (2010). The N- and C-terminal domains of parathyroid hormone-related protein affect differently the osteogenic and adipogenic potential of human mesenchymal stem cells. *Exp Mol Med* 42, 87–98.
- Celil, A.B., Hollinger, J.O., and Campbell, P.G. (2005). Osx transcriptional regulation is mediated by additional pathways to BMP2/Smad signaling. *J Cell Biochem* 95, 518–528.
- Chang, A.C.-M., Jellinek, D.A., and Reddel, R.R. (2003). Mammalian stanniocalcins and cancer. *Endocr-Relat Cancer* 10, 359–373.
- Chen, C., Koh, A.J., Datta, N.S., Zhang, J., Keller, E.T., Xiao, G., Franceschi, R.T., D'Silva, N.J., and McCauley, L.K. (2004). Impact of the mitogen-activated protein kinase pathway on parathyroid hormone-related protein actions in osteoblasts. *J Biol Chem* 279, 29121–29129.
- Cheng, S.L., Yang, J.W., Rifas, L., Zhang, S.F., and Avioli, L.V. (1994). Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro: induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. *Endocrinology* 134, 277–286.
- Cheng, S.-L., Shao, J.-S., Charlton-Kachigian, N., Loewy, A.P., and Towler, D.A. (2003). MSX2 promotes osteogenesis and suppresses adipogenic differentiation of multipotent mesenchymal progenitors. *J Biol Chem* 278, 45969–45977.
- Cohnheim, J.F. (1867). Ueber Entzündung und Eiterung. *Path Anat Physiol Klin Med* 40, 1–79.
- Couple, M.L., Farges, J.C., Bleicher, F., Perrat-Mabillon, B., Boudeulle, M., and Magloire, H. (2000). Odontoblast differentiation of human dental pulp cells in explant cultures. *Calcified Tissue Int* 66, 129–138.
- Crisan, M., Yap, S., Casteilla, L., Chen, C.-W., Corselli, M., Park, T.S., Andriolo, G., Sun, B., Zheng, B., Zhang, L., et al. (2008). A Perivascular Origin for Mesenchymal Stem Cells in Multiple Human Organs. *Cell Stem Cell* 3, 301–313.

- Datta, N.S., Chen, C., Berry, J.E., and McCauley, L.K. (2005). PTHrP signaling targets cyclin D1 and induces osteoblastic cell growth arrest. *J Bone Miner Res.* 20, 1051–1064.
- Degistirici, Ö., Jaquiere, C., Schönebeck, B., Siemonsmeier, J., Götz, W., Martin, I., and Thie, M. (2008). Defining Properties of Neural Crest–Derived Progenitor Cells from the Apex of Human Developing Tooth. *Tissue Eng Pt A* 14, 317–330.
- Dennis, G., Sherman, B.T., Hosack, D.A., Yang, J., Gao, W., Lane, H.C., and Lempicki, R.A. (2003). DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol* 4, P3.
- Ten Dijke, P., Fu, J., Schaap, P., and Roelen, B.A.J. (2003). Signal transduction of bone morphogenetic proteins in osteoblast differentiation. *J Bone Joint Surg Am* 85-A Suppl 3, 34–38.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., and Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315–317.
- Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A.L., and Karsenty, G. (1997). Osf2/Cbfa1: A Transcriptional Activator of Osteoblast Differentiation. *Cell* 89, 747–754.
- Dzierzak, E., and Speck, N.A. (2008). Of lineage and legacy: the development of mammalian hematopoietic stem cells. *Nat Immunol* 9, 129–136.
- Eklund S.A., Pittmann, J.L. (2001). Third molar removal patterns in an insured population. *J Am Dent Assoc* 132:469–475.
- Engler, A.J., Sen, S., Sweeney, H.L., and Discher, D.E. (2006). Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell* 126, 677–689.
- Ernst, W., Saugspier, M., Felthaus, O., Driemel, O., and Morsczeck, C. (2009). Comparison of murine dental follicle precursor and retinal progenitor cells after neural differentiation in vitro. *Cell Biol Int* 33, 758–764.
- Fahnenstich, J., Nandy, A., Milde-Langosch, K., Schneider-Merck, T., Walther, N., and Gellersen, B. (2003). Promyelocytic leukaemia zinc finger protein (PLZF) is a glucocorticoid- and progesterone-induced transcription factor in human endometrial stromal cells and myometrial smooth muscle cells. *Mol Hum Reprod* 9, 611–623.
- Felthaus, O., Ernst, W., Driemel, O., Reichert, T.E., Schmalz, G., and Morsczeck, C. (2010). TGF-beta stimulates glial-like differentiation in murine dental follicle precursor cells (mDFPCs). *Neurosci Lett* 471, 179–184.
- Felthaus, O., Oliver, F., Viale-Bouroncle, S., Driemel, O., Reichert, T.E., Schmalz, G., and Morsczeck, C. (2012). Transcription factors TP53 and SP1 and the osteogenic differentiation of dental stem cells. *Differentiation* 83, 10–16.
- Felthaus, O., Gosau, M., and Morsczeck, C. (2013). ZBTB16 Induces Osteogenic Differentiation Marker Genes in Dental Follicle Cells Independent From RUNX2. *J Periodontol* 1–8.
- Felthaus, O., Gosau, M., Klein, S., Prantl, L., Reichert, T.E., Schmalz, G., and Morsczeck, C. (2014). Dexamethasone-related osteogenic differentiation of dental follicle cells depends on ZBTB16 but not Runx2. *Cell Tissue Res* 1–11.

- Ferguson, C.M., Miclau, T., Hu, D., Alpern, E., and Helms, J.A. (1998). Common Molecular Pathways in Skeletal Morphogenesis and Repair. *Ann NY Acad Sci* 857, 33–42.
- Fischer, S., Kohlhase, J., Böhm, D., Schweiger, B., Hoffmann, D., Heitmann, M., Horsthemke, B., and Wieczorek, D. (2008). Biallelic loss of function of the promyelocytic leukaemia zinc finger (PLZF) gene causes severe skeletal defects and genital hypoplasia. *J Med Genet* 45, 731–737.
- Frank, O., Heim, M., Jakob, M., Barbero, A., Schäfer, D., Bendik, I., Dick, W., Heberer, M., and Martin, I. (2002). Real-time quantitative RT-PCR analysis of human bone marrow stromal cells during osteogenic differentiation in vitro. *J Cell Biochem* 85, 737–746.
- Friedenstein, A.J., Piatetzky-Shapiro, I.I., and Petrakova, K.V. (1966). Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* 16, 381–390.
- Friedenstein, A.J., Chailakhyan, R.K., Latsinik, N.V., Panasyuk, A.F., and 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.
- Friedenstein, A.J., Gorskaja, J.F., and Kulagina, N.N. (1976). Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 4, 267–274.
- Gallagher, P., and Young, A.H. (2006). Mifepristone (RU-486) treatment for depression and psychosis: a review of the therapeutic implications. *Neuropsychiatr Dis Treat* Mar;2(1):33-42.
- Gaughlitz, G., and Vo-Dinh, T. (2003). *Handbook of Spectroscopy* (Weinheim ; Cambridge: Wiley-VCH).
- Gerressen, M., Hermanns-Sachweh, B., Riediger, D., Hilgers, R.-D., Spiekermann, H., and Ghassemi, A. (2009). Purely cancellous vs. corticocancellous bone in sinus floor augmentation with autogenous iliac crest: a prospective clinical trial. *Clin Oral Implants Res* 20, 109–115.
- Gimble, J.M., Katz, A.J., and Bunnell, B.A. (2007). Adipose-Derived Stem Cells for Regenerative Medicine. *Circ Res* 100, 1249–1260.
- Gosau, M., Götz, W., Felthaus, O., Ettl, T., Jäger, A., and Morsczeck, C. (2013). Comparison of the differentiation potential of neural crest derived progenitor cells from apical papilla (dNC-PCs) and stem cells from exfoliated deciduous teeth (SHED) into mineralising cells. *Arch Oral Biol* 58, 699–706.
- Goshima, J., Goldberg, V.M., and Caplan, A.I. (1991). The osteogenic potential of culture-expanded rat marrow mesenchymal cells assayed in vivo in calcium phosphate ceramic blocks. *Clin Orthop Relat R* 298–311.
- Gossen, M., Kaufmann, J., Steven Triezenberg, Akira, S., Asker, E., Assenat, B., Baumann, B., Bohl, D.L., and Corbi, N. (2004). *Transcription factors* (Berlin: Springer).
- Gronemeyer, H., Gustafsson, J.-Å., and Laudet, V. (2004). Principles for modulation of the nuclear receptor superfamily. *Nat Rev Drug Discov* 3, 950–964.
- Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P.G., and Shi, S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *PNAS* 97, 13625–13630.
- Guo, J., Jin, J., and Cooper, L.F. (2008). Dissection of sets of genes that control the character of wnt5a-deficient mouse calvarial cells. *Bone* 43, 961–971.

- Hall, B.K., and Miyake, T. (1992). The membranous skeleton: the role of cell condensations in vertebrate skeletogenesis. *Anat Embryol* 186, 107–124.
- Hall, B.K., and Miyake, T. (1995). Divide, accumulate, differentiate: cell condensation in skeletal development revisited. *Int J Dev Biol*;39:881–893.
- Hall, B.K., and Miyake, T. (2000). All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development. *Bioessays*. Feb;22(2):138-47.
- Haynesworth, S.E., Baber, M.A., and Caplan, A.I. (1992a). Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone* 13, 69–80.
- Haynesworth, S.E., Goshima, J., Goldberg, V.M., and Caplan, A.I. (1992b). Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone* 13, 81–88.
- Heitz-Mayfield, L.J.A. (2008). Peri-implant diseases: diagnosis and risk indicators. *Journal of Clin Periodontol* 35, 292–304.
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., and Harris, C.C. (1991). p53 mutations in human cancers. *Science* 253, 49–53.
- Honda, M.J., Imaizumi M., Tsuchiya S., Morsczeck C. (2010). Dental follicle stem cells and tissue engineering. *J Oral Sci Dec*;52(4):541-52.
- Horch, H.-H., Sader, R., Pautke, C., Neff, A., Deppe, H., and Kolk, A. (2006). Synthetic, pure-phase beta-tricalcium phosphate ceramic granules (Cerasorb) for bone regeneration in the reconstructive surgery of the jaws. *Int J Oral Maxillofac Surg* 35, 708–713.
- Huang, D.W., Sherman, B.T., and Lempicki, R.A. (2009a). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 4, 44–57.
- Huang, D.W., Sherman, B.T., and Lempicki, R.A. (2009b). Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res* 37, 1–13.
- Ibaraki, K., Termine, J.D., Whitson, S.W., and Young, M.F. (1992). Bone matrix mRNA expression in differentiating fetal bovine osteoblasts. *Bone Miner Res* 7, 743–754.
- Ikeda, R., Yoshida, K., Tsukahara, S., Sakamoto, Y., Tanaka, H., Furukawa, K., and Inoue, I. (2005). The promyelotic leukemia zinc finger promotes osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells as an upstream regulator of CBFA1. *J Biol Chem* 280, 8523–8530.
- Inoue, I., Ikeda, R., and Tsukahara, S. (2006). Current topics in pharmacological research on bone metabolism: Promyelotic leukemia zinc finger (PLZF) and tumor necrosis factor- α -stimulated gene 6 (TSG-6) identified by gene expression analysis play roles in the pathogenesis of ossification of the posterior longitudinal ligament. *J Pharmacol Sci* 100, 205–210.
- Irizarry, R.A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y.D., Antonellis, K.J., Scherf, U., and Speed, T.P. (2003). Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostat* 4, 249–264.
- Ito, S., Suzuki, N., Kato, S., Takahashi, T., and Takagi, M. (2007). Glucocorticoids induce the differentiation of a mesenchymal progenitor cell line, ROB-C26 into adipocytes and osteoblasts, but fail to induce terminal osteoblast differentiation. *Bone* 40, 84–92.

- Jiang, Y., Jahagirdar, B.N., Reinhardt, R.L., Schwartz, R.E., Keene, C.D., Ortiz-Gonzalez, X.R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., et al. (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418, 41–49.
- Johnston, J., Ramos-Valdes, Y., Stanton, L.-A., Ladhani, S., Beier, F., and DiMattia, G.E. (2010). Human stanniocalcin-1 or -2 expressed in mice reduces bone size and severely inhibits cranial intramembranous bone growth. *Transgenic Res* 19, 1017–1039.
- Jones, D.L., and Wagers, A.J. (2008). No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 11–21.
- Kaivosoja, E., Sariola, V., Chen, Y., Kontinen, Y.T. The effect of pulsed electromagnetic fields and dehydroepiandrosterone on viability and osteo-induction of human mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng Regen Med* Oct 5.
- Karaöz, E., Demircan, P.C., Sağlam, Ö., Aksoy, A., Kaymaz, F., and Duruksu, G. (2011). Human dental pulp stem cells demonstrate better neural and epithelial stem cell properties than bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Histochem Cell Biol* 136, 455–473.
- Karsenty, G. (2013). Minireview: Transcriptional Control of Osteoblast Differentiation. *Endocrinology* Jul;142(7):2731-3.
- Kato, M., Patel, M.S., Levasseur, R., Lobov, I., Chang, B.H.-J., Glass, D.A., 2nd, Hartmann, C., Li, L., Hwang, T.-H., Brayton, C.F., et al. (2002). Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor. *J Cell Biol* 157, 303–314.
- Kern, S.E., Kinzler, K.W., Bruskin, A., Jarosz, D., Friedman, P., Prives, C., and Vogelstein, B. (1991). Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Science* 252, 1708–1711.
- Kimura, M., Moteki, H., Ogiwara, M. Inhibitory effects of dexamethasone on epidermal growth factor-induced DNA synthesis and proliferation in primary cultures of adult rat hepatocytes (2011). *Biol Pharm Bull* 0;34(5):682-7.
- Kolk, A., Handschel, J., Drescher, W., Rothamel, D., Kloss, F., Blessmann, M., Heiland, M., Wolff, K.-D., and Smeets, R. (2012). Current trends and future perspectives of bone substitute materials – From space holders to innovative biomaterials. *J Cranio Maxill Sur* 40, 706–718.
- Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., Shimizu, Y., Bronson, R.T., Gao, Y.H., Inada, M., et al. (1997). Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89, 755–764.
- Koressaar, T., and Remm, M. (2007). Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* 23, 1289–1291.
- Kruse, J.-P., and Gu, W. (2009). Modes of p53 Regulation. *Cell* 137, 609–622.
- Kübler, N., Reuther, J., Kirchner, T., Priessnitz, B., Michel, C., Eckstein, T., Ordnung, R., Zerdoner, D., and Meier, C. (1994). [Osteoinductive, morphologic and biomechanical properties and clinical use of autolysed, antigen extracted, allogenic bone]. *Fortschr Kiefer Gesichtschir* 39, 28–31.

- Kunkel, M., Morbach, T., Wagner, W. (2004) Wisdom teeth-complications requiring in-patient treatment. A 1-year prospective study. *Mund Kiefer Gesichtschir* Nov;8(6):344-9.
- Kuo, Y.-C., Li, Y.-S.J., Zhou, J., Shih, Y.-R.V., Miller, M., Broide, D., Lee, O.K.-S., and Chien, S. (2013). Human mesenchymal stem cells suppress the stretch-induced inflammatory miR-155 and cytokines in bronchial epithelial cells. *PLoS ONE* 8, e71342.
- Lane, D.P. (1992). p53, guardian of the genome. *Nature* 358, 15–16.
- Langer, R., and Vacanti, J.P. (1993). Tissue engineering. *Science* 260, 920–926.
- Langille, R.M. (1994). Differentiation of craniofacial mesenchyme. In *Differentiation and Morphogenesis of Bone*, (Boca Raton, FL: CRC Press), pp. 1– 63.
- Lee, K., Deeds, J.D., Chiba, S., Un-No, M., Bond, A.T., and Segre, G.V. (1994). Parathyroid hormone induces sequential c-fos expression in bone cells in vivo: in situ localization of its receptor and c-fos messenger ribonucleic acids. *Endocrinology* 134, 441–450.
- Lee, M.-H., Kwon, T.-G., Park, H.-S., Wozney, J.M., and Ryoo, H.-M. (2003). BMP-2-induced Osterix expression is mediated by Dlx5 but is independent of Runx2. *Biochem Bioph Res Co* 309, 689–694.
- Liu, T.M., Guo, X.M., Tan, H.S., Hui, J.H., Lim, B., and Lee, E.H. (2011). Zinc-finger protein 145, acting as an upstream regulator of SOX9, improves the differentiation potential of human mesenchymal stem cells for cartilage regeneration and repair. *Arthritis Rheum* 63, 2711–2720.
- Liu, Y., Rubin, B., Bodine, P.V.N., and Billiard, J. (2008). Wnt5a induces homodimerization and activation of Ror2 receptor tyrosine kinase. *J Cell Biochem* 105, 497–502.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2– $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* 25, 402–408.
- Logan, C.Y., and Nusse, R. (2004). The Wnt Signaling Pathway in Development and Disease. *Annu Rev Cell Dev Bi* 20, 781–810.
- Lombardi, G., Di Somma, C., Rubino, M., Faggiano, A., Vuolo, L., Guerra, E., Contaldi, P., Savastano, S., and Colao, A. (2011). The roles of parathyroid hormone in bone remodeling: prospects for novel therapeutics. *J Endocrinol Invest* 34, 18–22.
- Mardas, N., Chadha, V., and Donos, N. (2010). Alveolar ridge preservation with guided bone regeneration and a synthetic bone substitute or a bovine-derived xenograft: a randomized, controlled clinical trial. *Clin Oral Implan Res* 21, 688–698.
- Matlashewski, G., Lamb, P., Pim, D., Peacock, J., Crawford, L., and Benchimol, S. (1984). Isolation and characterization of a human p53 cDNA clone: expression of the human p53 gene. *EMBO J* 3, 3257–3262.
- Mattano, L.A., Devidas, M., Nachman, J.B., Sather, H.N., Hunger, S.P., Steinherz, P.G., Gaynon, P.S., and Seibel, N.L. (2012). Alternate-Week versus Continuous Dexamethasone Scheduling on the Risk of Osteonecrosis in Acute Lymphoblastic Leukemia: Results from the CCG-1961 Randomized Cohort Trial. *Lancet Oncol* 13, 906–915.
- Maximow, A.A. (1924). Relation of blood cells to connective tissues and endothelium. *Physiol Rev* 533–563.

- Maxwell, M.A., and Muscat, G.E.O. (2006). The NR4A subgroup: immediate early response genes with pleiotropic physiological roles. *Nucl Recept Signal*. 2006;4:e002. Epub 2006 Feb 8.
- May, P., and May, E. (1999). Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene* Dec 13;18(53):7621-36.
- Mitalipov, S., and Wolf, D. (2009). Totipotency, Pluripotency and Nuclear Reprogramming. *Adv Biochem Eng Biot* 114, 185–199.
- Miura, M., Gronthos, S., Zhao, M., Lu, B., Fisher, L.W., Robey, P.G., and Shi, S. (2003). SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *PNAS* 100, 5807–5812.
- Morrison, S.J., and Kimble, J. (2006). Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* 441, 1068–1074.
- Morsczeck, C., Götz, W., Schierholz, J., Zeilhofer, F., Kühn, U., Möhl, C., Sippel, C., and Hoffmann, K.H. (2005). Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol* 24, 155–165.
- Morsczeck, C., Schmalz, G., Reichert, T.E., Völlner, F., Galler, K., and Driemel, O. (2008). Somatic stem cells for regenerative dentistry. *Clin Oral Invest* 12, 113–118.
- Morsczeck, C., Schmalz, G., Reichert, T.E., Völlner, F., Saugspier, M., Viale-Bouroncle, S., and Driemel, O. (2009a). Gene expression profiles of dental follicle cells before and after osteogenic differentiation in vitro. *Clin Oral Invest* 13, 383–391.
- Morsczeck, C., Petersen, J., Völlner, F., Driemel, O., Reichert, T., and Beck, H.C. (2009b). Proteomic analysis of osteogenic differentiation of dental follicle precursor cells. *Electrophoresis* 30, 1175–1184.
- Morsczeck, C., Völlner, F., Saugspier, M., Brandl, C., Reichert, T.E., Driemel, O., and Schmalz, G. (2010). Comparison of human dental follicle cells (DFCs) and stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) after neural differentiation in vitro. *Clin Oral Invest* 14, 433–440.
- Mundlos, S., and Olsen, B.R. (1997). Heritable diseases of the skeleton. Part I: Molecular insights into skeletal development-transcription factors and signaling pathways. *FASEB J* 11, 125–132.
- Murphy, M.B., Moncivais, K., and Caplan, A.I. (2013). Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Exp Mol Med* 45, e54.
- Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Deng, J.M., Behringer, R.R., and de Crombrughe, B. (2002). The Novel Zinc Finger-Containing Transcription Factor Osterix Is Required for Osteoblast Differentiation and Bone Formation. *Cell* 108, 17–29.
- Nieman, L.K., Chrousos, G.P., Kellner, C., Spitz, I.M., Nisula, B.C., Cutler, G.B., Merriam, G.R., Bardin, C.W., and Loriaux, D.L. (1985). Successful Treatment of Cushing's Syndrome with the Glucocorticoid Antagonist RU 486*. *J Clin Endocr Metab* 61, 536–540.
- Noden, D.M. (1983). The role of the neural crest in patterning of avian cranial skeletal, connective, and muscle tissues. *Dev Biol* 96, 144–165.
- Noden, D.M. (1991). Cell movements and control of patterned tissue assembly during craniofacial development. *J Cran Genet Dev Bio* 11, 192–213.

- Olsen, B.R., Reginato, A.M., and Wang, W. (2000). Bone Development. *Annu Rev Cell Dev Bi* 16, 191–220.
- Osborn, J.F., and Newesely, H. (1980). The material science of calcium phosphate ceramics. *Biomaterials* 1, 108–111.
- Ott, R.W. (2003). *Klinik- und Praxisführer Zahnmedizin* (Georg Thieme Verlag).
- Otto, F., Thornell, A.P., Crompton, T., Denzel, A., Gilmour, K.C., Rosewell, I.R., Stamp, G.W., Beddington, R.S., Mundlos, S., Olsen, B.R., et al. (1997). Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 89, 765–771.
- Owen, M. (1988). Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci Suppl* 10, 63–76.
- Owen, M., and Friedenstein, A.J. (1988). Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba F Symp* 136, 42–60.
- Pearen, M.A., and Muscat, G.E.O. (2010). Minireview: Nuclear Hormone Receptor 4A Signaling: Implications for Metabolic Disease. *Mol Endocrinol* 24, 1891–1903.
- Peppiatt, C.M., Howarth, C., Mobbs, P., and Attwell, D. (2006). Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature* 443, 700–704.
- Phinney, D.G., and Prockop, D.J. (2007). Concise Review: Mesenchymal Stem/Multipotent Stromal Cells: The State of Transdifferentiation and Modes of Tissue Repair—Current Views. *Stem Cells* 25, 2896–2902.
- Puchtler, H., Meloan, S.N., Terry, M.S. On the history and mechanism of alizarin and alizarin red S stains for calcium. (1969) *J Histochem Cytochem* Feb;17(2):110-24.
- Quandt, K., Frech, K., Karas, H., Wingender, E., and Werner, T. (1995). MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res* 23, 4878–4884.
- Ratajczak, M.Z., Machalinski, B., Wojakowski, W., Ratajczak, J., and Kucia, M. (2007). A hypothesis for an embryonic origin of pluripotent Oct-4+ stem cells in adult bone marrow and other tissues. *Leukemia* 21, 860–867.
- Reese, J.C. (2003). Basal transcription factors. *Curr Opin Genet Dev* 13, 114–118.
- Rodan, G.A., Heath, J.K., Yoon, K., Noda, M., and Rodan, S.B. (1988). Diversity of the osteoblastic phenotype. *Ciba F Symp* 136, 78–91.
- Rossant, J. (2001). Stem cells from the Mammalian blastocyst. *Stem Cells* 19, 477–482.
- Ryan, J.M., Barry, F.P., Murphy, J.M., and Mahon, B.P. (2005). Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *J Inflamm* 2, 8.
- Ryan, J.M., Barry, F., Murphy, J.M., and Mahon, B.P. (2007). Interferon- γ does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. *Clin Exp Immunol* 149, 353–363.
- Sakai, V.T., Zhang, Z., Dong, Z., Neiva, K.G., Machado, M.A.A.M., Shi, S., Santos, C.F., and Nör, J.E. (2010). SHED differentiate into functional odontoblasts and endothelium. *J Dent Res* 89, 791–796.

Saugspier, M., Felthaus, O., Viale-Bouroncle, S., Driemel, O., Reichert, T.E., Schmalz, G., and Morsczeck, C. (2010). The differentiation and gene expression profile of human dental follicle cells. *Stem Cells Dev* 19, 707–717.

Schofield, R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 4, 7–25.

Seo, B.-M., Miura, M., Gronthos, S., Mark Bartold, P., Batouli, S., Brahimi, J., Young, M., Gehron Robey, P., Wang, C.Y., and Shi, S. (2004). Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 364, 149–155.

Shrivats, A.R., Hsu, E., Averick, S., Klimak, M., Watt, A.C., DeMaio, M., Matyjaszewski, K., Hollinger, J.O. (2014) Cationic Nanogel-mediated Runx2 and Osterix siRNA Delivery Decreases Mineralization in MC3T3 Cells. *Clin Orthop Relat Res* Dec 2.

Smeets, R., Kolk, A., Gerressen, M., Driemel, O., Maciejewski, O., Hermanns-Sachweh, B., Riediger, D., and Stein, J.M. (2009). A new biphasic osteoinductive calcium composite material with a negative Zeta potential for bone augmentation. *Head Face Med* Jun 13;5:13.

Song, L., Guan, X.-J., Chen, X., Cui, Z.-L., Han, F.-F., Guo, X.-J., and Xu, W.-G. (2014). Mesenchymal Stem Cells Reduce Cigarette Smoke-Induced Inflammation and Airflow Obstruction in Rats via TGF- β 1 Signaling. *COPD* Sep;11 (5):582-90.

Sonoyama, W., Liu, Y., Yamaza, T., Tuan, R.S., Wang, S., Shi, S., and Huang, G.T.-J. (2008). Characterization of Apical Papilla and its Residing Stem Cells from Human Immature Permanent Teeth -A Pilot Study. *J Endod* 34, 166–171.

Spemann, H. (1938). *Embryonic Development and Induction*. Yale University Press, New Haven.

Tang, Z., Sahu, S.N., Khadeer, M.A., Bai, G., Franklin, R.B., and Gupta, A. (2006). Overexpression of the ZIP1 zinc transporter induces an osteogenic phenotype in mesenchymal stem cells. *Bone* 38, 181–198.

Ten Cate, A.R. (1997). The development of the periodontium — a largely ectomesenchymally derived unit. *Periodontol* 2000 13, 9–19.

Ten Cate, A.R. (1998). *Oral Histology: development, structure, and function*. 5th Edition

Terling, C., Rass, A., Mitsiadis, T.A., Fried, K., Lendahl, U., and Wroblewski, J. (1995). Expression of the intermediate filament nestin during rodent tooth development. *Int J Dev Biol* 39, 947–956.

Thesleff, I., Vaahtokari, A., Partanen, A.M. (1995a) Regulation of organogenesis. Common molecular mechanisms regulating the development of teeth and other organs. *Int J Dev Biol* Feb;39 (1):35-50

Thesleff, I., Vaahtokari, A., Kettunen, P., Aberg, T. (1995b) Epithelial-mesenchymal signaling during tooth development. *Connect Tissue Res* 32(1-4):9-15.

Thesleff, I. (2003) Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. *J Cell Sci* May 1;116(Pt 9):1647-8.

Tickle, C. (1995). Vertebrate limb development. *Curr Opin Genet Dev*. 5, 478–484.

- Tintinalli, J.E., Stapczynski, J.S., Ma, O.J., Cline, D.M., Cydulka, R.K., Meckler, G.D. (2010) *Tintinalli's Emergency Medicine: A comprehensive Study Guide*, 7th Edition
- Trubiani, O., Isgro, A., Zini, N., Antonucci, I., Aiuti, F., Di Primio, R., Nanci, A., Caputi, S., and Paganelli, R. (2008). Functional interleukin-7/interleukin-7R α , and SDF-1 α /CXCR4 are expressed by human periodontal ligament derived mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* *214*, 706–713.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M., and Rozen, S.G. (2012). Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucl Acids Res* *40*, e115–e115.
- Verhoekx, J.S.N., Mudera, V., Walbeehm, E.T., and Hovius, S.E.R. (2013). Adipose-derived stem cells inhibit the contractile myofibroblast in Dupuytren's disease. *Plast Reconstr Surg* *132*, 1139–1148.
- Viale-Bouroncle, S., Völlner, F., Möhl, C., Küpper, K., Brockhoff, G., Reichert, T.E., Schmalz, G., and Morsczeck, C. (2011). Soft matrix supports osteogenic differentiation of human dental follicle cells. *Biochem Bioph Res Co* *410*, 587–592.
- Viale-Bouroncle, S., Gosau, M., Küpper, K., Möhl, C., Brockhoff, G., Reichert, T.E., Schmalz, G., Ettl, T., and Morsczeck, C. (2012a). Rigid matrix supports osteogenic differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED). *Differentiation* *84*, 366–370.
- Viale-Bouroncle, S., Felthaus, O., Schmalz, G., Brockhoff, G., Reichert, T.E., and Morsczeck, C. (2012b). The transcription factor DLX3 regulates the osteogenic differentiation of human dental follicle precursor cells. *Stem Cells Dev* *21*, 1936–1947.
- Viale-Bouroncle, S., Felthaus, O., Schmalz, G., Reichert, T.E., and Morsczeck, C. (2013). Transcription factors for dental stem cell differentiation. *Int J Oral Max Impl* *28*, e478–486.
- Vortkamp, A., Lee, K., Lanske, B., Segre, G.V., Kronenberg, H.M., and Tabin, C.J. (1996). Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science* *273*, 613–622.
- Weinstein, R.S. (2012). Glucocorticoid-induced osteonecrosis. *Endocrine* *41*, 183–190.
- Werner, T. (1999). Models for prediction and recognition of eukaryotic promoters. *Mamm. Genome* *10*, 168–175.
- Whyte, M.P. (1994) Hypophosphatasia and the role of alkaline phosphatase in skeletal mineralization. *Endocr Rev* Aug;15(4):439-61.
- Wiltfang, J., Merten, H.A., Schlegel, K.A., Schultze-Mosgau, S., Kloss, F.R., Rupprecht, S., and Kessler, P. (2002). Degradation characteristics of alpha and beta tri-calcium-phosphate (TCP) in minipigs. *J Biomed Mater Res* *63*, 115–121.
- Wobus, A.M., and Boheler, K. (2008). *Stem Cells* (Springer).
- Wright, E., Hargrave, M.R., Christiansen, J., Cooper, L., Kun, J., Evans, T., Gangadharan, U., Greenfield, A., and Koopman, P. (1995). The Sry-related gene Sox9 is expressed during chondrogenesis in mouse embryos. *Nat Genet* *9*, 15–20.
- Wu, S., Yoshiko, Y., and De Luca, F. (2006). Stanniocalcin 1 acts as a paracrine regulator of growth plate chondrogenesis. *J Biol Chem* *281*, 5120–5127.

- Yan, Z., Zhuansun, Y., Chen, R., Li, J., and Ran, P. (2014). Immunomodulation of mesenchymal stromal cells on regulatory T cells and its possible mechanism. *Exp Cell Res* 324, 65–74.
- Yoshiko, Y., Candelieri, G.A., Maeda, N., and Aubin, J.E. (2007). Osteoblast Autonomous Pi Regulation via Pit1 Plays a Role in Bone Mineralization. *Mol Cell Biol* 27, 4465–4474.
- Yoshimura, K., Shigeura, T., Matsumoto, D., Sato, T., Takaki, Y., Aiba-Kojima, E., Sato, K., Inoue, K., Nagase, T., Koshima, I., Gonda, K. (2006) Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates. *J Cell Physiol* Jul;208(1):64-76.
- Yuan, J.S., Reed, A., Chen, F., and Stewart, C.N. (2006). Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics* 7, 85.
- Zhang, T., Xiong, H., Kan, L.X., Zhang, C.K., Jiao, X.F., Fu, G., Zhang, Q.H., Lu, L., Tong, J.H., Gu, B.W., et al. (1999). Genomic sequence, structural organization, molecular evolution, and aberrant rearrangement of promyelocytic leukemia zinc finger gene. *PNAS* 96, 11422–11427.
- Zhao, T., and Xu, Y. (2010). p53 and stem cells: new developments and new concerns. *Trends Cell Biol* 20, 170–175.
- Zhao, Y., and Bruemmer, D. (2010). NR4A Orphan Nuclear Receptors: Transcriptional Regulators of Gene Expression in Metabolism and Vascular Biology. *Arterioscl Throm Vas* 30, 1535–1541.
- Zuk, P.A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J.W., Katz, A.J., Benhaim, P., Lorenz, H.P., and Hedrick, M.H. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7, 211–228.
- Zvaifler, N.J., Marinova-Mutafchieva, L., Adams, G., Edwards, C.J., Moss, J., Burger, J.A., and Maini, R.N. (2000). Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res* 2, 477–488.

12 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Selbsterneuerung und Differenzierung von Stammzellen.....	7
Abbildung 2: Differenzierungspotential von Stammzellen	8
Abbildung 3: Differenzierung mesenchymaler Stammzellen	10
Abbildung 4: Klassischer Signalweg der osteogenen Differenzierung in BM-MSCs.....	14
Abbildung 5: A: Zahnkeim B: Zahn	16
Abbildung 6: Zelluläre Signalwege bei der Zahnentwicklung	17
Abbildung 7: Struktur von ZBTB16.	19
Abbildung 8: Funktionsprinzip der Energiedispersiven Röntgenspektroskopie	26
Abbildung 9: Plasmidkarte des ZBTB16-Expressionsvektors.....	35
Abbildung 10: Strukturformeln von Cortisol, Dexamethason und RU486	37
Abbildung 11: Vektorkarte des pcDNA3.1 TOPO-cloning Vektors	38
Abbildung 12: Prinzip der Chromatinimmunpräzipitation.....	40
Abbildung 13: Extrahierter Weisheitszahn sowie isolierte Follikelzellen	43
Abbildung 14: FACS-Analyse der DFCs für die Marker CD44, CD146, CD105 und Nestin...43	
Abbildung 15: ALP-Aktivität und Mineralisierung nach osteogener Differenzierung	44
Abbildung 16: Differenzierte und undifferenzierte DFCs nach Alizarin- bzw. ALP-Färbung...44	
Abbildung 17: Relative Genexpression osteogener Marker	46
Abbildung 18: REM- und lichtmikroskopische Aufnahmen von DFCs und BM-MSCs	47
Abbildung 19: EDX-Analyse von DFCs und BM-MSCs.....	48
Abbildung 20: Relative Genexpression osteogener Marker	49
Abbildung 21: ALP-Aktivität nach ZBTB16-Inhibition	50
Abbildung 22: ALP-Aktivität nach RUNX2-Inhibition	50
Abbildung 23: Alizarinfärbung nach RUNX2- oder ZBTB16-Inhibition.....	52
Abbildung 24: Relative Genexpression nach Überexpression von ZBTB16.....	53
Abbildung 25: ALP-Aktivität nach ZBTB16-Überexpression.....	54
Abbildung 26: Relative Genexpression nach Behandlung RU486	55
Abbildung 27: ALP-Aktivität nach Transfektion mit einem Transfektionsvektor	56
Abbildung 28: Relative Genexpression osteogener Marker nach Transfektion von PTHLH ..57	
Abbildung 29: Codierende Sequenz von PTHLH sowie die flankierenden Regionen	58
Abbildung 30: Relative Genexpression verschiedener PTHLH Varianten.	59
Abbildung 31: Relative Genexpression von STC1 und osteogener Marker.....	60
Abbildung 32: Relative Genexpression von STC1	60
Abbildung 33: Chromatinimmunpräzipitation	61

13 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Unterschiede zwischen endochondraler und der intramembranöser Ossifikation.	14
Tabelle 2: Sequenzen für RT-PCR Primer.....	33
Tabelle 3: Liste der zur Inhibition der Genexpression verwendeten siRNAs.	36
Tabelle 4: Primersequenzen für die Klonierung von PTHLH und STC1	38
Tabelle 5: Sequenzen der vorhergesagten ZBTB16-Bindestellen.....	40

14 Eigene Publikationen

#1

Ernst W, Saugspier M, **Felthaus O**, Driemel O, Morsczeck C.
Comparison of murine dental follicle precursor and retinal progenitor cells after neural differentiation in vitro.
Cell Biol Int. 2009 Jul;33(7):758-64. Epub 2009 Apr 23.

#2

Felthaus O, Ernst W, Driemel O, Reichert TE, Schmalz G, Morsczeck C.
TGF-beta stimulates glial-like differentiation in murine dental follicle precursor cells (mDFPCs).
Neurosci Lett. 2010 Mar 8;471(3):179-84. Epub 2010 Jan 25.

#3

Saugspier M, **Felthaus O**, Viale-Bouroncle S, Driemel O, Reichert TE, Schmalz G, Morsczeck C.
The differentiation and gene expression profile of human dental follicle cells.
Stem Cells Dev. 2010 May;19(5):707-17.

#4

Felthaus O, Ettl T, Gosau M, Driemel O, Brockhoff G, Reck A, Zeitler K, Hautmann M, Reichert TE, Schmalz G, Morsczeck C.
Cancer stem cell-like cells from a single cell of oral squamous carcinoma cell lines.
Biochem Biophys Res Commun. 2011 Apr 1;407(1):28-33. Epub 2011 Feb 20.

#5

Beck HC, Petersen J, **Felthaus O**, Schmalz G, Morsczeck C.
Comparison of neurosphere-like cell clusters derived from dental follicle precursor cells and retinal Müller cells.
Neurochem Res. 2011 Nov;36(11):2002-7. Epub 2011 Jun 23.

#6

Felthaus O, Viale-Bouroncle S, Driemel O, Reichert TE, Schmalz G, Morsczeck C.
Transcription factors TP53 and SP1 and the osteogenic differentiation of dental stem cells.
Differentiation. 2012 Jan;83(1):10-6. doi: 10.1016/j.diff.2011.08.008. Epub 2011 Oct 4.

#7

Viale-Bouroncle S, **Felthaus O**, Schmalz G, Brockhoff G, Reichert TE, Morsczeck C.
The transcription factor DLX3 regulates the osteogenic differentiation of human dental follicle precursor cells.
Stem Cells Dev. 2012 Jul 20;21(11):1936-47. Epub 2012 Feb 7.

#8

Gosau M*, Götz W*, **Felthaus O***, Ettl T, Morsczeck C.
Comparison of the differentiation potential of neural crest derived progenitor cells from apical papilla (dNC-PCs) and stem cells from exfoliated deciduous teeth (SHED) into mineralizing cells
Arch Oral Biol. 2013 Jun;58(6):699-706. doi: 10.1016/j.archoralbio.2012.11.004. Epub 2012 Dec 20.

#9

Felthaus O, Gosau M, Ettl T, Prantl L, Morsczeck C.

Migration of human dental follicle cells in vitro

J Periodontal Res. 2013 May 28. doi: 10.1111/jre.12096. [Epub ahead of print]

#10

Winkler C, Schäfer L, **Felthaus O**, Allerdings J, Hahnel S, Behr M, Bürgers R.

The bacterial adhesion on and the cytotoxicity of various dental cements used for implant-supported fixed restorations

Acta Odontol Scand. 2013 Sep 30. [Epub ahead of print]

#11

Drees J, **Felthaus O**, Gosau M, Morsczeck C.

Butyrate stimulates the early process of the osteogenic differentiation but inhibits the biomineralization in dental follicle cells (DFCs).

Odontology. 2013 Jul 9. [Epub ahead of print]

#12

Viale-Bouroncle S*, **Felthaus O***, Schmalz G, Reichert TE, Morsczeck C.

Transcription factors for dental stem cell differentiation.

Int J Oral Maxillofac Implants. 2013 Nov-Dec;28(6):e478-86. doi: 10.11607/jomi.te28.

#13

Felthaus O, Gosau M, Morsczeck C.

ZBTB16 induces osteogenic differentiation marker genes in dental follicle cells independent from RUNX2

J Periodontol. 2013 Dec 22. [Epub ahead of print]

#14

Press T, Viale-Bouroncle S, **Felthaus O**, Gosau M, Morsczeck C.

EGR1 supports the osteogenic differentiation of dental stem cells

Int Endod J. 2014 Apr 21. doi: 10.1111/iej.12299. [Epub ahead of print]

#15

Schreml S, Meier RJ, Kirschbaum M, Kong S, Gehmert S, **Felthaus O**, Küchler S, Sharpe JR, Wöltje K, Weiß KT, Albert M, Seidl U, Schröder J, Morsczeck C, Prantl L, Duschl C, Pedersen SF, Gosau M, Wolfbeis OS, Landthaler M, Babilas P.

NHE1-Generated Extracellular pH-Gradients Disrupt Epidermal Barrier Repair in Chronic Wounds

Theranostics 2014; 4(7): 721-735. doi: 10.7150/thno.9052

#16

Felthaus O, Gosau M, Klein S, Prantl P, Reichert TE, Schmalz G, Morsczeck C.

The osteogenic differentiation is independent from Runx2 but not from ZBTB16 after induction with dexamethasone in dental follicle cells

Cell Tissue Res. 2014 May 10. [Epub ahead of print]

*: geteilte Erstautorschaft

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse sind in den Publikationen #13 und #16 veröffentlicht.

15 Danksagung

Bei Herrn PD Dr. Christian Morsczech möchte ich mich für die freundliche Überlassung des interessanten Themas, für die Unterstützung bei der Planung der Experimente und für die stete Bereitschaft zur Diskussion der Ergebnisse sowie für die Übernahme der Gutachtertätigkeit bedanken. Bei Prof. Dr. Gottfried Schmalz, dem ich ebenfalls für die Übernahme der Gutachtertätigkeit danke, und Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert bedanke ich mich für die Bereitstellung der Labore, der Infrastruktur und der Finanzierung der Verbrauchsmaterialien, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Bei PD Dr. Dr. Martin Gosau bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit. Prof. Dr. Helmut Schweikl und Prof. Dr. Thomas Langmann danke ich für die Übernahme des Mentorats und ihre Unterstützung in allen Phasen dieser Arbeit. Bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie und der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie bedanke ich mich für die kollegiale Unterstützung. Neben Herrn Andreas Eidt, Frau Carola Bolay, Frau Claudia Waha und Frau Christine Petzel, die ich in allen Fragen bezüglich der Durchführung von Experimenten immer um Rat bitten konnte, danke ich speziell Frau Anja Reck für die Durchführung der FACS-Analysen, Frau Antje Böttinger für ihre Unterstützung bei der Vektorklonierung und Frau Helga Ebensberger und Frau Gerlinde Ferstl für die Unterstützung bei den REM- und EDX-Analysen. Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Lukas Prantl, der es mir ermöglicht hat, diese Arbeit zu schreiben, während ich bereits mit neuen Aufgaben betraut war.

16 Erklärung

Ich, Oliver Heinrich Felthaus, geboren am 31.05.1976 in Haselünne, erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen.

Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar Geld oder geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, Mai 2014

.....

Oliver Felthaus