

AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR MUND-, KIEFER- UND GESICHTSCHIRURGIE  
PROFESSOR DR. DR. TORSTEN E. REICHERT  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Die Evaluation von Seneszenzmarkern in der Kultur von dentalen  
Follikelvorläuferzellen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Zahnmedizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Jan Gresser

2016



AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR MUND-, KIEFER- UND GESICHTSCHIRURGIE  
PROFESSOR DR. DR. TORSTEN E. REICHERT  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Die Evaluation von Seneszenzmarkern in der Kultur von dentalen  
Follikelvorläuferzellen**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Zahnmedizin

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Jan Gresser

2016

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

1. Berichterstatter: PD Dr. rer. nat. Christian Morsczeck

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Peter Proff

Tag der mündlichen Prüfung: 31. Mai 2016

## I. Inhaltsverzeichnis

<b>I. Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>II. Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>III</b>
<b>III. Abbildungsverzeichnis und Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Der Begriff der Stammzelle im historischen Kontext</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Charakterisierung von Stammzellen</b> .....	<b>2</b>
1.2.1 Begriffsklärung und Definition .....	2
1.2.2 Kategorisierung von Stammzellen .....	2
<b>1.3 Dentale Stammzellen (DSCs)</b> .....	<b>3</b>
1.3.1 Odontogenese .....	3
1.3.2 Das Potential dentaler Stammzellen.....	4
1.3.3 Verschiedene Arten DSCs und ihre Kategorisierung.....	5
1.3.4 Probleme bei der Verwendung DSCs.....	7
<b>1.4 Seneszenz</b> .....	<b>8</b>
1.4.1 Definition zellulärer Seneszenz.....	8
1.4.2 Replikative und vorzeitige zelluläre Seneszenz.....	9
1.4.3 Zelluläre Seneszenz – Signalwege, physiologische Prozesse und Marker.....	11
1.4.3.1 Molekulare Mechanismen – Signalwege und Trigger.....	12
1.4.3.2 Physiologische Prozesse und Marker .....	14
1.4.4 Seneszenz embryonaler, induzierter und dentaler Stammzellen.....	15
<b>1.5 Ziel der vorgelegten Arbeit</b> .....	<b>17</b>
<b>2. Materialien und Methoden</b> .....	<b>18</b>
<b>2.1 Materialien</b> .....	<b>18</b>
2.1.1 Untersuchte Zellart.....	18
2.1.2 Zellkultur, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien.....	18
2.1.3 Zellkulturmedien, Puffer und Lösungen .....	19
2.1.4 Geräte und Software.....	21
2.1.5 Kits .....	23
2.1.6 Antikörper.....	24
2.1.7 Primer .....	24
<b>2.2 Methoden</b> .....	<b>25</b>
2.2.1 Kultivierung dentaler Follikelvorläuferzellen.....	25
2.2.2 $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal) Färbung und Zellmorphologie.....	26

2.2.2.1 $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal) Färbung .....	26
2.2.2.2 Zellmorphologie .....	27
2.2.2.3 Statistische Auswertung .....	27
2.2.3 Untersuchung der Telomerlänge .....	28
2.2.3.1 DNA Isolierung .....	28
2.2.3.2 Southern Blot .....	29
2.2.3.3 Real-Time PCR .....	31
2.2.4 Protein-Analyse und osteogene Differenzierbarkeit.....	33
2.2.4.1 Western Blot .....	33
2.2.4.2 Alizarin Färbung .....	34
2.2.4.3 Quantifizierung und statistische Auswertung.....	35
2.2.5 Stammzellmarker-Analyse mit der FACS-Durchflusszytometrie.....	35
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>37</b>
3.1 $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal) Färbung und Zellmorphologie .....	37
3.2 Untersuchung der Telomerlänge .....	41
3.3 Protein-Analyse und osteogene Differenzierbarkeit .....	42
3.4 Stammzellmarker-Analyse mit der FACS-Durchflusszytometrie .....	45
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>47</b>
4.1 Diskussion von Methodik und Ergebnissen .....	47
4.1.1 $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal) Färbung und Zellmorphologie.....	47
4.1.2 Untersuchung der Telomerlänge .....	48
4.1.3 Protein-Analyse und osteogene Differenzierbarkeit.....	49
4.1.4 Stammzellmarker-Analyse mit der FACS-Durchflusszytometrie.....	50
4.2 Schlussfolgerung und Ausblick.....	51
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>52</b>
<b>6. Referenzen.....</b>	<b>54</b>
<b>7. Danksagung .....</b>	<b>69</b>
<b>8. Erklärung .....</b>	<b>70</b>

## II. Abkürzungsverzeichnis

AK	<i>Antikörper</i>
ALP	alkaline phosphatase / <i>Alkalische Phosphatase</i>
ASCs	adult stem cells / <i>adulte Stammzellen</i>
ASK1	apoptosis-signal-regulating kinase 1
ATM	ataxia-telangiectasia mutated
ATR	ataxia-telangiectasia and Rad3-related
BER	base excision repair
BMSCs	bone marrow stem cells / <i>Knochenmarksstammzellen</i>
BSA	bovine serum albumin / <i>Rinderalbumin</i>
CDK	cyclin-dependent kinase / <i>Cyclin-abhängige Kinase</i>
CHK1	checkpoint kinase 1
CHK2	checkpoint kinase 2
CTGF	connective tissue growth factor
DFPCs	dental follicle precursor cells / <i>dentale Follikelvorläuferzellen, siehe DFVs</i>
DFVs	<i>dentale Follikelvorläuferzellen</i>
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium
DMF	<i>N-N-Dimethylformamid</i>
DMSO	<i>Dimethylsulfoxid</i>
dNTPs	<i>desoxyribose-Nukleosidtriphosphate, Nukleotide</i>
DPaSCs	dental papilla stem cells (siehe SCAP)
DPSCs	<i>dentale Pulpastammzellen</i>
DSBs	double strand breaks / <i>Doppelstrangbrüche</i>
DSCs	dental stem cells / <i>dentale Stammzellen</i>
ESC	embryonic stem cell / <i>embryonale Stammzelle</i>
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FBS	fetal bovine serum / <i>fötales Rinderserum</i>
FSC	fetal stem cell / <i>fötale Stammzelle</i>
HR	homologous recombination
HSCs	hematopoietic stem cells / <i>hematopoetische Stammzellen</i>
<u>HSCs</u>	hepatic stellate cells / <i>hepatische Sternzellen</i>
hTERT	human telomerase reverse transcriptase
hTR	human telomerase RNA
iPSCs	induced pluripotent stem cells / <i>induzierte pluripotente Stammzellen</i>
MAP	mitogen-activated protein / <i>mitogen-aktiviertes Protein</i>
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MKK3	<i>MAP-Kinase-Kinase 3</i>

MKK6	<i>MAP-Kinase-Kinase 6</i>
MKP	<i>MAP-Kinase Phosphatase</i>
MMR	mismatch repair
MSCs	mesenchymal stem cells / <i>mesenchymale Stammzellen</i>
NER	nucleotide excision repair
NHEJ	non-homologous end-joining
NK-Zellen	<i>natürliche Killerzellen</i>
NOV	Nephroblastoma overexpressed gene
NTC	no template control
OPN	<i>Osteopontin</i>
P	<i>Passage</i>
PBS	phosphate buffered saline / <i>phosphatgepufferte Salzlösung</i>
PCR	polymerase chain reaction / <i>Polymerase Kettenreaktion</i>
PDLSCs	<i>dentale Stammzellen aus dem parodontalen Ligament</i>
PFA	<i>Paraformaldehyd</i>
PIS (Pen/Strep)	<i>Penicillin-Streptomycin</i>
Ras	rat sarcoma
rpm	revolutions per minute / <i>Umdrehungen pro Minute</i>
RT	<i>Raumtemperatur</i>
RT-PCR	Real-Time PCR / <i>Echtzeit-PCR</i>
RTK	receptor tyrosine kinase
RUNX2	runt-related transcription factor 2
SA- $\beta$ -Gal	<i>senescence-associated beta galactosidase / Seneszenz- assoziierte beta Galaktosidase</i>
SASP	senescence-associated secretory phenotype / <i>Seneszenz-assoziiertes sekretorischer Phänotyp</i>
SCAP	<i>dentale Stammzellen von der apikalen Papille</i>
SDS	sodium dodecyl sulfate / <i>Natriumdodecylsulfat</i>
SDS-PAGE	<i>SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese</i>
SGC	single-gene copy / <i>Einzel-Gen Kopie</i>
SHED	<i>dentale Stammzellen aus exfoliativen Milchzähnen</i>
STELA	single telomere length analysis
TRF	terminal restriction fragment
TS	<i>Tumorsuppressor</i>

### III. Abbildungsverzeichnis und Tabellenverzeichnis

- Abbildung 1: Seneszenz-Signalkaskaden
- Abbildung 2: Nachweis von  $\beta$ -Gal Aktivität und Morphologie bei DFVs nach Kultivierung bis Passage 18:  
A):  $\beta$ -Gal Aktivität und Morphologie von DFVs der Passagen 10-18 im Vergleich zu Zellen der Passage 6. Vergrößerung: 100-fach.  
B): Vergleich von DFVs der Passagen 8 und 14 mit veränderter Zellmorphologie und  $\beta$ -Gal Aktivität. Vergrößerung: 200-fach.
- Abbildung 3: Grafik der Anzahl gefärbter Zellen/ Zellgröße über die Passagen hinweg (inklusive Statistik).  
A): Boxplot, der die Zunahme  $\beta$ -Gal gefärbter Zellen bei steigender Passagenzahl zeigt  
B): Boxplot, der die Größenveränderung der Zellen bei zunehmender Passagenzahl darstellt  
A)/B): Passagen, die die Nullhypothese bestätigen (Mann-Whitney-U) sind zueinander gruppiert
- Abbildung 4: Telomerlängen-Analyse von Zellen nach Kultivierung bis Passage 18.  
Southern Blot (A) und Real-Time PCR (B) zeigen Veränderungen der Telomerlänge von kultivierten DFVs
- Abbildung 5: Protein Analyse von osteogen differenzierten DFVs der Passagen 8 und 14.  
A): Western Blot  
B) Quantifizierung des Western Blots mit unterschiedlicher Proteinexpression der Passagen 8 und 14.  
A) und B): Zellen der höheren Passage (14) exprimierten weniger TEP1, zeigten Herunterregulierung des osteogenen Differenzierungsmarkers OPN und keine Induktion des osteogenen Differenzierungsmarkers RUNX2.  $\beta$ -Aktin diente als Kontrolle.
- Abbildung 6: Alizarin-Färbung (mikroskopisch) osteogen differenzierter DFVs mit Quantifizierung.  
Stärkere Alizarinfärbung von Zellen der Passage 8 (6A) im Gegensatz zu Zellen der Passage 14 (6B). Kultivierung erfolgte mit osteogenem Differenzierungsmedium und Zellkulturmedium zur Kontrolle.  
6C) zeigt Quantifizierung der Alizarinfärbung mit signifikantem Unterschied (T-Test) zwischen P8\_ODM und P14\_ODM.
- Abbildung 7: FACS-Analyse der DFVs (Passagen 7 und 18) für die Marker CD44, CD146, CD105, Nestin und Stro1.
- Tabelle 1: PCR – Light Cycler Laufprotokoll
- Tabelle 2: relative Quantifizierung der Genexpression –  $\Delta\Delta C_T$ -Methode

# 1. Einleitung

## 1.1 Der Begriff der Stammzelle im historischen Kontext

Im 20. und 21. Jahrhundert haben Fortschritte auf dem Gebiet der Stammzellenforschung gleichermaßen Medizin und Wissenschaft, aber auch Gesellschaft geprägt. Die „Stammzelle“ wird bereits 1868 in einer Publikation Ernst Haeckels erwähnt. Hier steht sie für den Ursprung im Stammbaum aller mehrzelligen Organismen (1). Später überträgt er die Stammzellenhypothese auf die Embryologie und bezeichnet die befruchtete Tiereizelle, die Cytula, als Stammzelle (2). In diesem Zusammenhang steht der Begriff für den Ursprung aller Zellen eines Organismus. In der Embryologie wurde Ende des 19. Jahrhunderts die Stammzellentheorie bei der Erforschung von Tierkeimzellen weitergeführt und modifiziert. Theodor Boveri spezifizierte hier Haeckels` Definition von Stammzellen. Er limitierte den Begriff auf Zellen, die heute als primordiale Keimzellen und Keimbahnstammzellen bezeichnet werden (3).

Parallel dazu formulierte Artur Pappenheim in der Hämatologie die Verwandtschaft der roten und weißen Blutzellen und deren Abstammung von einer gemeinsamen Stammzelle (4,5). Alexander Maximow übernahm 1909 die Stammzellentheorie in seiner Beschreibung des Lymphozyten (6) und gilt heute als Begründer des hämatopoetischen Stammzellenkonzepts (5–7). Eine eindeutige Charakterisierung und Isolierung hämatopoetischer Stammzellen war 1961 bzw. 1963 möglich. Hier präsentierten Till und McCulloch eine Methode zur quantitativen Erfassung kontinuierlich proliferierender Zellen und beschrieben deren Differenzierbarkeit (3,8,9). Seitdem wurden viele neue, gewebsspezifische Stammzellen entdeckt, darunter die dentalen Stammzellen. Sie bilden eine vielversprechende Grundlage für zukünftige Therapiemöglichkeiten in der Zahnmedizin.

## 1.2 Charakterisierung von Stammzellen

### 1.2.1 Begriffsklärung und Definition

Laut heutigem Verständnis haben Stammzellen zwei wichtige Eigenschaften, die sie von anderen Zellen unterscheiden. Zum einen sind sie undifferenzierte Zellen mit der Fähigkeit zur kontinuierlichen Selbsterneuerung mittels Zellteilung. Zum anderen besitzen sie die Fähigkeit zur Differenzierung in spezialisierte Effektorzellen und transiente Vorläuferzellen, die auch Progenitorzellen genannt werden (10). Letztere beschreiben proliferative Zellen, die nur in eine Zellart differenzieren und deren Fähigkeit zur Selbsterneuerung limitiert ist (11,12). Das Differenzierungspotential einer Stammzelle muss mindestens zwei unterschiedliche Zelltypen umfassen (13).

Stammzellen sind in Gewebearealen lokalisiert, die als Stammzellnischen (stem cell niches) bezeichnet werden (14). Diese Gewebebereiche verankern Stammzellen mittels Adhäsionsmolekülen und generieren extrinsische Faktoren zur Regulierung von Zellzahl, Zellfunktion und Zellschicksal (15). Sie bilden dadurch auch eine Kontrollinstanz zum Schutz vor Zellüberproliferation (16).

### 1.2.2 Kategorisierung von Stammzellen

Dem Differenzierungspotential nach können totipotente, pluripotente, multipotente, oligopotente und unipotente Stammzellen unterschieden werden. Ein Beispiel für eine totipotente Stammzelle, welche das größte Differenzierungspotential hat, ist die befruchtete Eizelle. Aus ihr gehen weiter spezialisierte, pluripotente und multipotente Stammzellen hervor (17). Pluripotente Stammzellen differenzieren zu Zellen aller drei Keimblätter, wohingegen multipotente Stammzellen zu Geweben eines einzelnen Keimblatts differenzieren (18). Laut Kolios differenzieren oligopotente Stammzellen zu zwei oder mehr Zelllinien innerhalb eines Gewebes, unipotente Stammzellen haben die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und differenzieren nur zu Zellen einer Zelllinie (18).

Embryonale Stammzellen (ESCs) und induzierte pluripotente Stammzellen (iPSCs) gehören zu den pluripotenten Stammzellen. Zu den multipotenten Stammzellen zählen mesenchymale und hämatopoetische Stammzellen, die eine Gruppe der adulten Stammzellen (ASCs) bilden (18,19). Die iPSCs entstehen durch Reprogrammierung von adulten somatischen Zellen mittels Transkriptionsfaktoren (20,21). Sie stellen eine vielversprechende Alternative dar, da sie die Vorteile von ESCs und ASCs zu nutzen scheinen, ohne deren Nachteile zu übernehmen. Weitere

Methoden zur Gewinnung von iPSCs sind die Überführung von Nuklei somatischer Zellen in Oozyten und die Fusion somatischer Zellen mit ESCs (22). Für die regenerative Zahnmedizin haben iPSCs offenbar großes Potential, der klinische Einsatz ist bisher aber nicht absehbar. Teng et al. sieht hier noch grundlegende Probleme und Unklarheiten im Umgang mit iPSCs. So ist deren Herstellung noch zeitaufwändig, teuer und mit Qualitäts- und genetischen Stabilitätsschwankungen verbunden (23). Außerdem wurde eine gesteigerte kanzerogene Entartung von iPSCs auf die für die Reprogrammierung genutzten Retroviren und Transkriptionsfaktoren zurückgeführt (23,24).

Die ethische Problematik der embryonalen Stammzellenforschung ist bereits weitläufig bekannt und viel diskutiert. Die Zerstörung des Embryos bei der Isolierung dieser Stammzellen ist nicht die einzige Schwierigkeit im Umgang mit ESCs. Weitere Hürden sind ihre Ähnlichkeit zu Tumorzellen und ihr tumorbildendes Potential, was zu teratomartigen Tumoren führen kann. Diese eingeschränkte Kontrollierbarkeit von Zellwachstum und Zelldifferenzierung stellt eine große Herausforderung für die Transplantationsmedizin dar (25,26).

Die drei Keimblätter, aus welchen alle Arten menschlichen Gewebes entstehen, sind Zellschichten während der Embryonalentwicklung und heißen Ektoderm, Mesoderm und Endoderm (18). Die Odontogenese beruht dabei auf Interaktionen zwischen dem Ektoderm und dem Ektomesenchym der Neuralleiste (27,28), welche in der Literatur auch als viertes Keimblatt bezeichnet wird (29). Mit Ausnahme der Ameloblasten gehen alle dentalen Zellen aus dem ektomesenchymalen Gewebe der Neuralleiste hervor, weshalb dentale Stammzellen zur Gruppe der Neuralleistenstammzellen gezählt werden (28,30). Ameloblasten sind die einzigen dentalen Zellen aus dem ektodermalen Epithelgewebe und gehen während des Zahndurchbruchs beim Menschen verloren. Daher können keine humanen dentalen epithelialen Stammzellen isoliert werden (31).

## **1.3 Dentale Stammzellen (DSCs)**

### **1.3.1 Odontogenese**

Die Odontogenese beginnt ab der fünften Embryonalwoche. Es wird zunächst eine primäre Zahnleiste im ersten Kiemenbogen des Embryos gebildet. Dafür stülpt sich Epithelgewebe des Ektoderms in das darunter liegende Gewebe der Neuralleiste (Ektomesenchym) (31,32). Aus dieser primären Zahnleiste geht sowohl die erste Dentition (Milchzähne) hervor als auch eine laterale, sekundäre Zahnleiste. Letztere stellt den Ursprung der zweiten Dentition dar (33). Die

Zahnbildung wird ihrem Verlauf nach in Knospen-, Kappen- und Glockenstadium unterteilt. Das Knospenstadium ist durch eine lose Zellansammlung charakterisiert. Dies sind ektodermale und ektomesenchymale Zellen. Im Kappen- und Glockenstadium steht Wachstum eines Zahnkeimes und dessen Mineralisierung im Mittelpunkt (27). Das geschieht durch Zellorganisation. Der Zahnkeim besteht aus dem Schmelzorgan, der Zahnpapille und dem Zahnfollikel (34). Aus dem Schmelzorgan (ektodermale Epithelzellen) gehen schmelzbildende Ameloblasten hervor. Von der Zahnpapille stammen Pulpazellen und dentinbildende Odontoblasten. Aus dem Zahnfollikel bildet sich parodontales Gewebe wie Zementoblasten, Osteoblasten und Fibroblasten (34). Der Zahnfollikel ist außerdem essenziell für die Steuerung des Zahndurchbruchs (35). Er ist ein loser Gewebesack, der den nicht durchgebrochenen Zahn umgibt und undifferenzierte DSCs beherbergt (35). Da die Entwicklung der Weisheitszähne erst postnatal erfolgt (36), können undifferenzierte Stammzellen bei der Extraktion retinierter dritter Molaren unkompliziert gewonnen werden.

Die zu isolierenden DSCs können ihrem primären Differenzierungspotential nach in zwei große Gruppen unterteilt werden. DSCs, die mit dem Gewebe der dentalen Pulpa assoziiert sind und DSCs, die sich zu parodontalem Gewebe entwickeln (32).

### **1.3.2 Das Potential dentaler Stammzellen**

DSCs sind im Gegensatz zu ESCs leicht zu isolieren und ethisch unbedenklich, da sie aus retinierten Weisheitszähnen oder Milchzähnen nach Extraktion gewonnen werden. Dieses Zahngewebe ist klinisch nicht relevant und wird ansonsten entsorgt. Die Isolierung kann nicht bei Bedarf erfolgen, sondern ist nur in einer bestimmten Zeitspanne möglich. Diese ist nach Zahnextraktion oder Zahnwechsel verstrichen. Es ist deshalb unumgänglich, DSCs vorzeitig zu isolieren und sie in Stammzellbanken mittels Kältekonserverung zu lagern, bis sie gebraucht werden. Von Vorteil ist, dass diese autologen (körpereigenen) Zellen ein Höchstmaß an Biokompatibilität versprechen. Bei Geweberegeneration/Defektdeckung könnten sie somit den Einsatz körperfremder Materialien obsolet machen. Zu den nicht autologen Materialien gehören beispielsweise Knochenersatzmaterialien xenogener (Tierknochen: Bio-Oss vom Rind (37)) oder alloplastischer (synthetisch hergestellt: Kalziumkarbonat, Hydroxylapatit (37)) Herkunft. Der Abbau und Verlust osteogener Strukturen ist in der Zahnmedizin ein wichtiges Thema. So ist die fortgeschrittene Parodontitis durch generalisierten Knochenabbau gekennzeichnet. Darüber hinaus erschweren Verlust des Alveolarknochens nach Zahnextraktion und Kieferkammatrophy beim zahnlosen Patienten dessen prothetische Versorgung. Für den Einsatz DSCs zur parodontalen Geweberegeneration spricht, dass sie die Stammzellen für dieses Gewebe sind. Das eröffnet neue Perspektiven des dentalen, oralen und kraniofazialen Gewebemanagements und bietet innovative Behandlungsansätze für aktuelle Probleme der Zahngesundheit. Neue

Therapiekonzepte umfassen neben der Parodontologie auch den Einsatz in der Endodontie zur Revaskularisierung (32,38,39).

### 1.3.3 Verschiedene Arten DSCs und ihre Kategorisierung

DSCs sind, mit Ausnahme der nicht isolierbaren Ameloblasten-Stammzellen, multipotente, mesenchymale Stammzellen (MSCs) (40). Sie gehören zu den somatischen Stammzellen (SSCs), die mit den Keimbahnstammzellen die Gruppe der ASCs bilden. Multipotente ASCs sind stärker spezialisiert als pluripotente ESCs und differenzieren daher nicht in Zellen aller drei Keimblätter, sondern sind auf Gewebe eines Keimblattes beschränkt. Hier erneuern sie differenzierte Zellen, die durch Trauma oder Apoptose verloren gingen. Dieses eingeschränkte Differenzierungspotential multipotenter Stammzellen wird in englischsprachiger Fachliteratur als „lineage restriction“ benannt (41). Jüngere Publikationen berichten, dass auch eine gewebsübergreifende Differenzierbarkeit von ASCs möglich ist (42,43). Das wird als Plastizität bezeichnet und mit Transdifferenzierung oder Zell-Zell Verschmelzungen erklärt (42,43). Eine aktuelle Studie zeigt die Transdifferenzierung von ASCs (dentale Stammzellen aus dem parodontalen Ligament, siehe nächster Abschnitt) zu retinalen Ganglienzellen (44). Bei pathologischen Veränderungen der Retina könnte dies eine neue, stammzellbasierende Therapiemethode darstellen (44).

Die zwei großen Gruppen DSCs bestehen aus fünf unterschiedlichen DSC-Arten. Die erste Gruppe, die mit dem Gewebe der dentalen Pulpa assoziiert ist, beinhaltet dentale Pulpastammzellen (DPSCs), DSCs aus exfoliativen Milchzähnen (SHED) und DSCs von der apikalen Papille (SCAP). Die zweite Gruppe, deren Zellen sich zu parodontalem Gewebe differenzieren, bilden Stammzellen aus dem parodontalen Ligament (PDLSCs) und dentale Follikelvorläuferzellen (DFPCs) (32). In Nagetierzähnen konnte eine weitere Art DSCs untersucht werden. Diese dentalen epithelialen Stammzellen sind mit der konstanten Regeneration von Schneidezähnen assoziiert, beim Menschen aber wie erwähnt nach Zahndurchbruch nicht mehr vorhanden (32,45). Aus diesem Grund werden sie hier nicht näher thematisiert.

Im Jahr 2000 isolierte Gronthos et al. die ersten dentalen Stammzellen aus der Pulpa von extrahierten Weisheitszähnen erwachsener Menschen (46). Er nannte sie dentale Pulpastammzellen (DPSCs) und verglich sie mit bereits charakterisierten menschlichen, mesenchymalen Knochenmarksstammzellen (BMSCs). Es wurde dargelegt, dass DPSCs klonogene, proliferierende Zellen sind und eine ähnliche Stammzellmarkerexpression wie Knochenmarksstammzellen (BMSCs) aufweisen, darunter STRO-1 und CD146. In vitro bilden sie kalzifizierte Ablagerungen und im Tierversuch dentin- und pulpaähnliche Strukturen (46). Ihr Differenzierungspotential umfasst neben Odontoblasten und Osteoblasten auch Muskelzellen, Fettzellen, Neuronen, Chondrozyten und sogar Hepatozyten (47–50). In einer in vivo Studie mit

menschlichen Probanden konnte 2009 bereits die Bildung von Kieferknochen zur Regeneration von Extraktionsdefekten nachgewiesen werden. Dies geschah mit einem Biokomplex aus Kollagenschwamm und autologen DPSCs (51,52).

Im Laufe der Zeit wurden weitere DSCs in unterschiedlichen Regionen menschlichen Zahngewebes entdeckt. So isolierte Miura et al. DSCs aus exfoliativen Milchzähnen (SHED) (53). Er charakterisierte sie als stark proliferierende, klonogene Zellen mit gutem Differenzierungspotential, welches in vitro neuronale Zellen, Odontoblasten und Adipozyten umfasst. Nach Transplantation in Mäusen differenzieren SHED in vivo zu Dentin und neuem Knochengewebe. Sie exprimieren ähnlich wie DPSCs die frühen mesenchymalen Stammzellmarker STRO-1 und CD146 (53).

Eine weitere Art DSCs wurde von der apikalen Papille (SCAP) der Wurzel menschlicher Zähne isoliert (54). Viele der von DPSCs exprimierten Oberflächenmarker werden auch von SCAP exprimiert, darunter Stro-1 und CD146. Laut Sonoyama et al. sind SCAP eine eigenständige Population und können eindeutig von DPSCs unterschieden werden, da sie im undifferenzierten Stadium CD24 als spezifischen Oberflächenmarker besitzen. Des Weiteren zeigen sie größere Fähigkeit zur Geweberegeneration und höhere Telomerase-Aktivität. Um die Geweberegeneration zu untersuchen, wurden SCAP zusammen mit PDLSCs im Schweine-Tierversuch transplantiert. Ziel war es, neues wurzel- und parodontartiges Gewebe zu generieren. Laut Sonoyama et al. bildete sich ein Gewebeblock, der weniger Druckfestigkeit hatte als das ursprüngliche Gewebe, aber dennoch in der Lage war eine Porzellankrone zu stützen und die Zahnfunktion wieder herzustellen (54). Aus Nagetierzähnen isolierte SCAP konnten in vitro zu Odontoblasten differenziert werden (55). In anderen Studien wurde belegt, dass SCAP aus menschlichen Molaren nach Kryolagerung weiterhin ihr Differenzierungspotential besitzen (56) und in vitro osteogen differenziert werden können (56,57).

Menschliche Stammzellen aus dem parodontalen Ligament (PDLSCs) wurden erstmals von Seo et al. isoliert und charakterisiert (58). Er stellte dar, dass PDLSCs Stammzellmarker Stro-1 und CD146 exprimieren und in vitro zu Zementoblasten, Adipozyten und kollagenbildenden Zellen differenzieren. Im in vivo Tierversuch besitzen PDLSCs die Fähigkeit zur Bildung und Regeneration parodontalen Gewebes (58). Andere Studien bestätigen in Tierversuchen mit Mäusen und Schweinen die in vivo Differenzierung von PDLSCs zu parodontalem Gewebe (59,60). Mit der Isolierung von PDLSCs aus kryokonserviertem, parodontalem Gewebe wurde darüber hinaus bewiesen, dass lebensfähige, adulte dentale Stammzellen aus konservierten Gewebeproben isoliert werden können, welche zur Lagerung eingefroren wurden (61).

Die fünfte Gruppe menschlicher DSCs wurde erstmals von Morsczeck et al. isoliert und charakterisiert. Dies sind Stammzellen aus dem Zahnfollikel, welche dentale Follikelzellen oder dentale Follikelvorläuferzellen genannt werden (DFVs/DFCs/DFPCs) (62). Sie werden als fibroblastenartige, osteogene Vorläuferzellen beschrieben, die wie BMSCs mittels Plastik-Anhaftung isoliert werden können und koloniebildende Eigenschaften aufweisen. Humane DFVs

exprimieren die Stammzellmarker Notch-1 und Nestin (62). Die beiden werden als geeignete Marker für dentale Stammzellen angesehen (62,63). Notch-1 gilt auch als Marker für neurale Stammzellen (62,64). Bei der tierischen Odontogenese inhibiert Notch-1 die Ameloblasten-Bildung (65). Eine Herunterregulierung von Notch-1 hat somit aktivierende Wirkung bei der Differenzierung epithelialer Zellen zu Ameloblasten (66). Nestin wird in undifferenzierten, neuralen Vorläuferzellen exprimiert, lässt sich während der Odontogenese in Odontoblasten nachweisen und wird als Odontoblastenmarker postuliert (62,67,68). In vitro Untersuchungen zeigen die Differenzierung von DFVs in Zementoblasten, Osteoblasten und neurale Zellen. Im in vivo Tierversuch konnte neben gesteigerter Expression von Osteoblastenmarkern eine Differenzierung zu Zement und parodontalem Ligament nachgewiesen werden (62,69–73).

### **1.3.4 Probleme bei der Verwendung DSCs**

In der Allgemeinmedizin sind adulte Stammzellen als Therapieform in vielen Bereichen bereits Routine. So werden hämatopoetische Stammzellen mittels Bluttransfusion bei der Sichelzellanämie oder bei der Therapie von Leukämie eingesetzt (74). Weitere etablierte stammzellbasierende Therapieformen sind die Transplantation künstlicher Haut aus Keratinozyten (75,76) und die Transplantation kornealer, epithelialer Stammzellen aus dem limbus corneae zur Therapie eines Ulkus der Cornea (75,77). Die autologe Transplantation von Chondrozyten bei geschädigtem Knorpelgewebe ist ebenfalls eine auf Zelltransplantation beruhende, klinisch relevante Therapieform (75,78). Die hier transplantierten Chondrozyten sind allerdings keine Stammzellen, sondern bereits differenzierte Zellen. Auch bei anderen Erkrankungen wie Parkinson, Diabetes, Multiple Sklerose, kardiovaskuläre Erkrankungen und Autoimmunerkrankungen werden stammzellbasierende Therapiekonzepte untersucht (75,79).

Im Gegensatz dazu kommt man in der Zahnmedizin langsamer voran. Obgleich DSCs seit einigen Jahren intensiv erforscht werden, sind stammzellbasierte Therapien noch nicht im klinischen Alltag angekommen.

Das Stammzellenbanking mittels Kryokonservierung ist die etablierte Methode zur Lagerung von DSCs (80), birgt für den klinischen Einsatz aber noch Probleme. So ist die Verwendung eines für Zellen und Patienten nicht-toxischen Konservierungsmediums wichtig, welches hohe Zellüberlebensraten garantiert und eine sofortige Verwendung der Zellen ohne vorherige Waschgänge ermöglicht. Der noch häufig eingesetzte Kryoprotektor Dimethylsulfoxid (DMSO) kann für Patienten jedoch toxisch sein und macht zellstrapazierende Waschgänge unumgänglich (80–82). Menschliche und tierische Serumproteine sind ebenfalls problematisch, da die Gefahr der Kontamination mit Viren und die Übertragung von Prionen oder anderen Allergie-auslösenden Pathogenen besteht (80). Es gibt bereits positive Studien zu serumfreien

Konservierungsmedien, die aber über eine erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen berichten oder noch geringe Mengen DMSO verwenden (83,84).

Ähnlich wie Blutpräparate müssen DSCs für zukünftige Einsätze am Patienten transportiert und bei Bedarf bis zur Anwendung eingelagert werden. Dies erfordert eine sachgerechte Verpackung, die Kontamination vermeidet und die Zellen über einen unbestimmten Zeitraum am Leben hält (85). Um den Einsatz dentaler Stammzelltherapien in der Zahnarztpraxis zu ermöglichen, muss ein Weg gefunden werden, die Zellen gebrauchsfertig und sofort applizierbar zu liefern (80). Müssen Stammzellen erst aufgetaut, gewaschen und vorbereitet werden, kann die Behandlung aus organisatorischen Gründen somit nur im Krankenhaus erfolgen.

Studien und klinische Einsatzformen benötigen mehrere Millionen Zellen pro Anwendung, die in dieser Menge nicht isoliert werden können. Ein Populationsausbau mittels in vitro Zellkultivierung ist somit unumgänglich. Fragestellungen in Bezug auf Kosteneffizienz, Automatisierung, Standardisierung und Herstellung klinisch relevanter, hochqualitativer Zellmengen sind noch offen (86). Laut Kirouac et al. fehlen Strategien und Richtlinien, um groß angelegte Zellexpansionen kosteneffizient und auf gleichbleibendem Qualitätsniveau durchzuführen (87). Die verwendeten Materialien und Methoden zur Zellkultivierung wie zweidimensionale (2D) und statische Kultivierungssysteme, Well-Platten und Flasks werden diesen Anforderungen nicht gerecht. Das liegt unter anderem an einer begrenzten Wachstumsfläche pro Volumeneinheit und der Kontaminierungsgefahr bei Verwendung mehrerer Flasks (82,86). Zur Umgehung dieser Probleme liegt der Fokus auf den in der Pharmazie verwendeten Bioreaktoren mit dreidimensionaler, bewegter Zellkulturumgebung (86).

Problematisch ist, dass die Anzahl an möglichen Zellteilungen in Zellkulturen unter Standardbedingungen limitiert ist (88). Der Grund hierfür ist, dass humane MSCs in einen zellalterungsähnlichen Zustand übergehen, der als Seneszenz bezeichnet wird. Gezeigt wurde dies zum Beispiel bei MSCs aus menschlichem Knochenmark (89) oder bei dentalen Stammzellen wie DPSCs und SCAP (90).

## **1.4 Seneszenz**

### **1.4.1 Definition zellulärer Seneszenz**

In vitro kultivierte mesenchymale Stammzellen proliferieren nicht unbegrenzt und weisen eine limitierte Lebenserwartung auf, vergleichbar mit einfachen somatischen Zellen (91). Dieses Phänomen wurde bereits in den sechziger Jahren bei der in vitro Expansion menschlicher

Primärzellen entdeckt, was zunächst mit technischen Problemen bei der Kultivierung assoziiert wurde (92). Es konnten jedoch charakteristische Modifikationen des Zellprofils dokumentiert werden, die unabhängig von Laborparametern waren. So beschrieb Hayflick den Verlauf dieser Veränderungen anhand eines reproduzierbaren Dreiphasenmodells (92,93). Aus menschlichem Gewebe isolierte, diploide Primärzellen weisen dabei Konfluenz in Phase I auf und eine außerordentliche Steigerung der Proliferationskapazität in Phase II. Bleiben Einflüsse aus, die zur Immortalisierung der Zellen führen, erfolgt der Übergang zur Phase III. Jene geht mit dem stetigen Abbau der Zellaktivität einher. So zeigen Zellen in diesem Stadium verlängerte Generationszeiten, allmählichen Stillstand mitotischer Aktivität, Anhäufung zellulären Debris und eine Degenerierung der Zellkultur. Hayflick interpretierte dieses Phänomen als Alterungsprozess oder Seneszenz auf zellulärem Level (92,93). Basierend auf Hayflicks Thesen versteht man heute unter zellulärer Seneszenz einen kontinuierlichen Alterungsprozess, welcher in einem irreversiblen Stopp des Zellzyklus in der G1 Phase kulminiert, was schließlich zum Verlust der proliferativen Fähigkeiten führt (94). Der Zellzyklus eukaryontischer Zellen besteht aus Interphase und Mitose (M-Phase). Die Interphase stellt 95% des Zyklus dar und wird in G1-, S- und G2-Phase unterteilt (95). G1- und G2-Phase sind Lücken- und Wachstums-Phasen (Gap-/Growth-Phases) mit Kontrollpunkten, in denen Zellwachstum und die Vorbereitung auf S-Phase und Mitose im Mittelpunkt stehen (95,96). Zellen, die den Zyklus verlassen, treten von der G1- in die G0-Phase (95,96). Die S-(Synthese) Phase steht für die DNA-Replikation (95,96). In der M-Phase erfolgt die Zweiteilung der Chromosomen (Mitose) und des Zellkerns (Karyokinese) mit anschließender Teilung der Zelle (Cytokinese) (97).

Die M-Phase wird unterteilt in:

- Prophase (Chromosomen-Kondensation)
- Prometaphase (Auflösung der Kernhülle und Bildung des Spindelapparates)
- Metaphase (Aufreihung der Chromosomen in der Äquatorialebene)
- Anaphase (Teilung der Chromatiden eines Chromosoms und Transport dieser Tochterchromosomen zu den entgegengesetzten Zellpolen)
- Telophase (Bildung von Kernhüllen und Zellkern-Nukleoli, Auflösung des Spindelapparates und Dekondensierung der Chromosomen)

Die Bildung zweier identischer Tochterzellen ist mit der Zellteilung (Cytokinese) abgeschlossen (97).

### **1.4.2 Replikative und vorzeitige zelluläre Seneszenz**

Die Einschränkung der Zell-Teilungsfähigkeit trat bei Hayflicks untersuchten Zellen nach vierzig bis sechzig Zellteilungen auf, was heute als Hayflick Limit bezeichnet wird (92,93,98). Da dies

durch Replikationsvorgänge erreicht wird, heißt diese Form replikative zelluläre Seneszenz und ist charakterisiert durch eine kontinuierliche Verkürzung von Telomeren (99). Das wird als eine Art Timerfunktion (mitotic clock) zur Limitierung der Anzahl möglicher Zellteilungen interpretiert (100). Beim Menschen haben Telomere eine Größe von bis zu 14 Kilobasenpaaren (kbp), das Hayflick-Limit liegt bei ungefähr 7 kbp (101,102). Telomere sind Endsegmente (end-caps) von Chromosomen, verhindern die Fusion mit anderen Chromosomenenden und sorgen für Unversehrtheit und Stabilität. So gewährleisten sie einen korrekten Replikationsablauf (101,103). Sie bestehen aus repetitiven, doppelsträngigen Basenpaarsequenzen (TTAGGG) und Proteinen (101,104). Bei jedem Replikationsdurchgang verkürzen sich die Endsegmente, da die DNA-Polymerase sie nicht synthetisieren kann. Das führt zum Verlust von Erbinformation und wird als End-Replikations-Problem (end-replication problem) bezeichnet (104). Bei der Replikation entspiralisiert das Enzym Topoisomerase zuerst die DNA-Doppelhelix und die Helikase trennt die Basenpaare durch Auflösung der Wasserstoffbrücken (105,106). Dabei entstehen zwei einzelne DNA-Stränge mit entgegengesetzten 5'- und 3'-Enden. Sie werden Leit- und Folgestrang genannt. Für die Bildung neuer DNA-Abschnitte fungieren sie als Matrize und geben so die Nukleotid-Reihenfolge der neuen Komplementärstränge vor (107). Dafür dockt die DNA-Polymerase an das 3'-Ende des Matrizenstranges an. Sie synthetisiert den Komplementärstrang beginnend an seinem 5'-Ende (107). Ein RNA-Primer ermöglicht die Polymerase-Matrizen-Bindung durch Bereitstellung einer OH-Gruppe (108). Am Leitstrang wird dieser Primer nur zu Beginn der Synthese benötigt, weil die Laufrichtung von Helikase und DNA-Polymerase identisch ist. Die DNA-Synthese erfolgt daher kontinuierlich ohne abzusetzen. Am Folgestrang laufen DNA-Polymerase und Helikase entgegengesetzt. Die DNA-Synthese ist somit nur abschnittsweise möglich, ähnlich der Rückstichttechnik beim Nähen. Mit Hilfe des Primers dockt die Polymerase dabei wiederholt an und ab (109). Die synthetisierten DNA-Abschnitte zwischen den Primern heißen Okazaki-Fragmente (108). Nach Herausschneiden aller Primer erfolgt der Lückenschluss mittels DNA-Polymerase. Anschließend verbindet eine Ligase diese Abschnitte. Am Telomerabschnitt, an dem sich der endständige Primer befand, wird wegen fehlender OH-Gruppe keine neue DNA synthetisiert, was der Grund für die Telomerverkürzung ist (107). Um dieses Problem zu umgehen, wird Telomerase benötigt. Sie umfasst die Untereinheiten hTR (human telomerase RNA) und hTERT (human telomerase reverse transcriptase). Die hTR bildet ein RNA-Template, welches das Ende der Telomerasequenz am Matrizenstrang erkennt und dort andockt. Anschließend verlängert hTERT die Matrizenenden komplementär zum RNA-Template (110). An diese Erweiterung setzt ein RNA-Primer an und stellt die fehlende OH-Gruppe zur Verfügung. Nun kann eine Polymerase neue DNA komplementär zum Telomer-Endstück synthetisieren. Beim Menschen ist das Telomerase-Enzym in den meisten Zellen nicht oder in zu geringen Mengen vorhanden um kontinuierlicher Telomerverkürzung entgegenzuwirken (111,112).

Mittlerweile sind weitere Umstände bekannt, die Seneszenz *in vitro* und *in vivo* induzieren, bevor Telomerverkürzungen auftreten. In der Literatur wird das als vorzeitige zelluläre Seneszenz

bezeichnet (113). Es handelt sich um stressinduzierte und onkogeninduzierte Seneszenz sowie Seneszenz durch Verlust von Tumorsuppressorfunktionen.

Stressinduzierte Seneszenz bezieht sich auch auf die Anpassung von frisch isolierten Zellen an eine künstliche in vitro Umgebung. Hier führen Stressfaktoren zu einem Kulturschock, was in vorzeitiger Seneszenz kulminiert (114). Zu diesen zählen veränderte Konzentrationen von Nährstoffen und Wachstumsfaktoren, das Fehlen von extrazellulären Matrixkomponenten und umgebenden Zellarten sowie erhöhter Sauerstoffgehalt (113). Letzterer führt in der Zelle zu oxidativem Stress. Das bedeutet ein Ungleichgewicht zwischen reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS, reactive oxygen species) und antioxidativen Schutzmechanismen (115,116). Beispiele für ROS sind Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), Superoxid-Anionenradikal ( $O_2^-$ ) und das Hydroxyl (OH)-Radikal (115,116).

Der Verlust von Tumorsuppressoren kann ebenfalls vorzeitige Seneszenz induzieren. In einer Studie wurde verdeutlicht, dass die Inaktivierung des Tumorsuppressors PTEN, ein Phosphatase-Enzym bei Signaltransduktionen zur Steuerung der Zellproliferation, zelluläre Seneszenz triggert (117,118).

Auch die onkogen induzierte Seneszenz (OIS) ist ein Tumorsuppressor-Mechanismus. Onkogene stören die kontrollierte Zellproliferation und sind tumorfördernd (119,120). Ein Beispiel dafür ist das zum Onkogen mutierte Protoonkogen Ras. Protoonkogene sind Gene, die Proteine zur Regulierung der Zellproliferation kodieren und bei einer Mutation zu Onkogenen werden (121). Im Falle von Ras führt diese sogenannte gain-of-function Mutation zur Kodierung eines Proteins, das die Zellproliferation unkontrolliert promotet (121). Die dadurch aktivierten Tumorsuppressoren (Beschreibung im folgenden Kapitel) führen zu Seneszenz (122,123). Bei diesen Seneszenz-Prozessen spielen die Proteine 53 (p53), 16 (p16) und RB (pRB; Retinoblastom) eine zentrale Rolle, was im folgenden Kapitel erläutert wird.

### **1.4.3 Zelluläre Seneszenz – Signalwege, physiologische Prozesse und Marker**

Seneszenz ist eine wichtige Komponente in komplexen physiologischen Prozessen mit sowohl zuträglicher als auch schädigender Wirkung. Dieser paradoxe Umstand wird mit der Entwicklungstheorie des Alterungsprozesses erklärt und als „antagonistische Pleiotropie“ bezeichnet (124,125). Dabei haben biologische Prozesse wie Seneszenz in jungen Organismen positive Effekte wie Tumorsuppression und Geweberegeneration. In gealterten Geweben kommt Seneszenz jedoch gehäuft vor und spielt hier eine Rolle bei der Tumorpromotion, beim Alterungsprozess und bei Krankheiten (124–127). Dieser negativ-fördernde Einfluss wurde gezeigt bei Melanomen, Brust-, Prostata-, Haut- und Schleimhauttumoren (128–131), beim altersbedingten Muskelschwund (Sarkopenie) (132–134), bei Adipositas und beim Typ II-

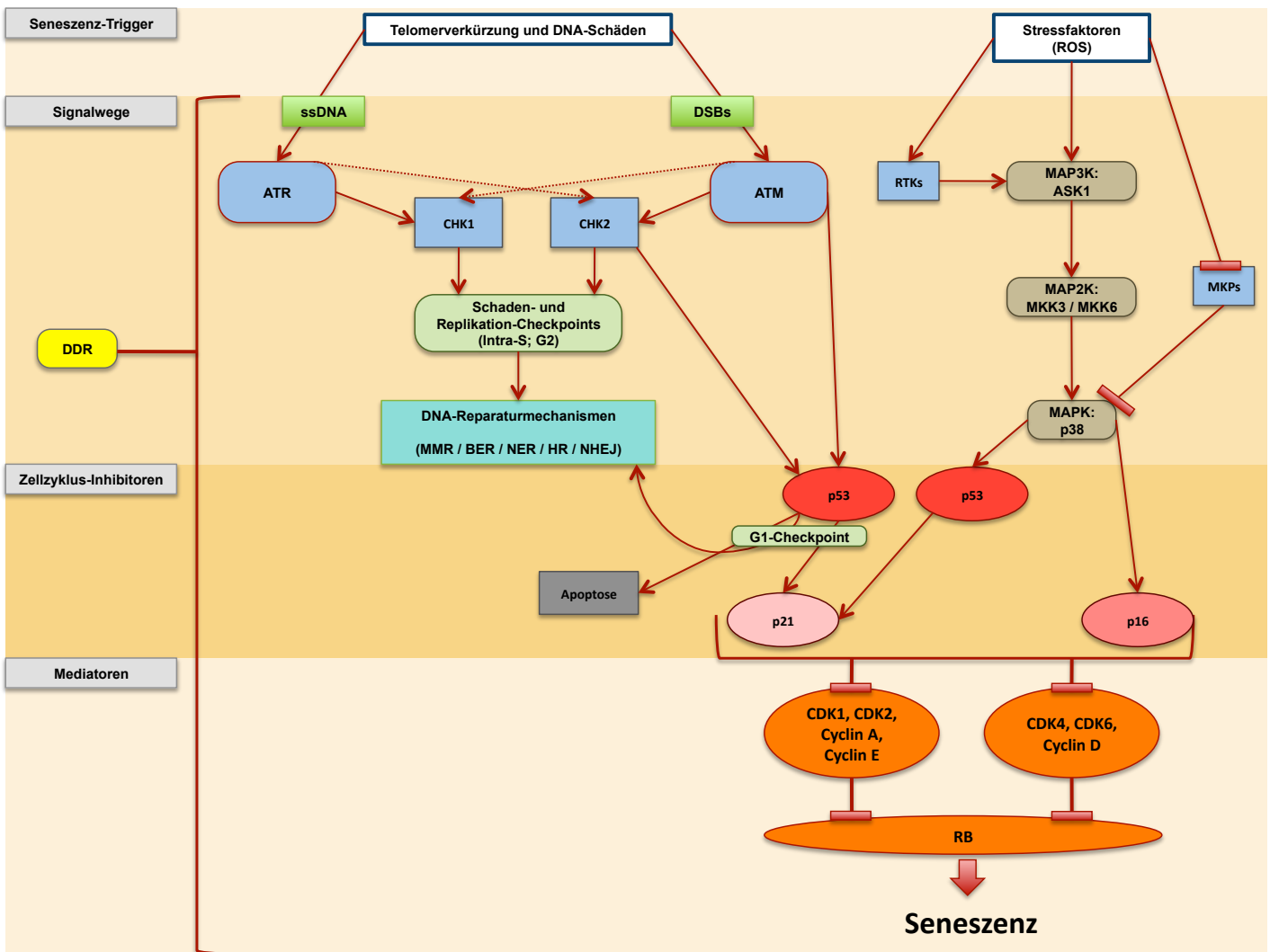
Diabetes (122,135–137). Auch bei Alzheimer, Arthrose und Parkinson sind seneszente Zellen nachgewiesen, wobei ihre Rolle dort noch zu klären ist (122,138–141). Mittlerweile sind fünf Seneszenz-Signalwege dokumentiert, die auf DNA- und Zellschaden beruhen. Ihre Trigger sind unter anderem die in Kap. 1.4.2 beschriebenen Induktoren replikativer und vorzeitiger Seneszenz (122). Diese Auslöser-Faktoren aktivieren Zellzyklus-Inhibitoren, welche wiederum Mediatoren und das Tumorsuppressor-Protein RB (TS-pRB) steuern. Letzteres induziert als zentraler Zyklusinhibitor Seneszenz (122) (Abb. 1). Dabei reguliert das TS-Protein 53 (p53) in mehreren Signalkaskaden den Zellzyklus. Es agiert als Seneszenz-Mediator, indem es ein weiteres TS-Protein (p21) aktiviert, beeinflusst Reparaturmechanismen und leitet bei irreparablen DNA-Schäden Apoptose ein (122,142) (Abb. 1). Im Gegensatz zur Seneszenz ist Apoptose ein programmierter Selbstmord der Zelle (143). In Seneszenz-Pathways spielt auch p16 (p16/INK4A) eine wichtige Rolle, das neben p53 zu den zentralen Tumorsuppressoren gehört (122). Die inhibitorische Funktion der TS-Proteine beruht bei Seneszenz-Kaskaden auf der Hemmung von Cyclinen und Cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs) (Abb.1). Dadurch unterbleibt die Phosphorylierung von pRB, wodurch der Übergang von G1- zur S-Phase inhibiert wird und die Zellen seneszent werden (144,145). Zum besseren Verständnis dieser Mechanismen werden im folgenden ausgewählte Signalkaskaden und physiologische Prozesse näher erläutert.

#### **1.4.3.1 Molekulare Mechanismen – Signalwege und Trigger**

Die Gründe für Mutationen und DNA-Schäden sind vielfältig. Dazu gehören Telomerverkürzung und Fehler bei der Replikation, genomische Instabilität bei Tumorzellen und externe Einflüsse wie Radiatio oder UV-Strahlen (122,146). Die Zellantwort darauf ist eine Signaltransduktionskette namens DDR (DNA damage response). Als sensorisches Netzwerk erkennt es DNA-Läsionen wie DSBs (double strand breaks; Doppelstrangbrüche) und ssDNA (single stranded DNA; Einzelstränge). Das geschieht mittels Proteinkinasen-Pathways ATM-CHK2 und ATR-CHK1, wobei Crosstalk zwischen beiden Wegen vermutet wird (146–148) (Abb.1). Diese Signalwege steuern Zellzyklus-Checkpoints (Intra-S; G2), welche Stopps für Reparaturmechanismen initiieren können. Das p53 wird vom ATM-CHK2-Pathway aktiviert (Abb.1). Als G1-Checkpoint-Mechanismus induziert es Seneszenz über p21 oder Apoptose und beeinflusst die Reparaturabläufe (149,150). Je nach Art des DNA-Schadens kommen fünf verschiedene Reparatur-Mechanismen zum Einsatz (151–153): Bei Replikations-Fehlern mit falsch eingefügten Basen werden diese Stellen mit MMR (mismatch repair) entfernt und repariert. Bei kleineren Läsionen entfernt und ersetzt BER (base excision repair) geschädigte DNA-Basen mit ihren dazugehörigen Nukleotiden. NER (nucleotide excision repair) kommt bei größeren Schäden mit Veränderung der DNA-Helix zum Einsatz. Es ist mit über dreißig beteiligten Reparatur-Proteinen komplexer als BER, wobei sich Störungen im NER-Komplex in Erkrankungen wie Xeroderma

picmentosum manifestieren (151). Werden DSBs repariert, geschieht dies entweder mit HR (homologous recombination) oder NHEJ (non-homologous end-joining). Der HR-Pathway nutzt zur Reparatur die genetische Information des unbeschädigten Tochterchromatids. Bei der NHEJ-Methode werden DSBs durch direkte Verbindung der Bruchendstücke beseitigt.

Zellen sind verschiedensten Stress-Formen ausgesetzt, darunter chemotherapeutische Medikamente, Onkogene (tumorfördernde Gene), Zellkulturstress, Entzündungsprozesse, Telomerverkürzung und andere DNA-Schäden. Viele davon triggern Seneszenz-Pathways, wobei ihnen ein erhöhtes Level an reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS) gemein ist (122,154). Wird ROS nicht von antioxidativen Mechanismen neutralisiert, löst es über einen MAP-Kinase- (MAPK; mitogen-activated protein kinase) Pathway auch in vivo Seneszenz aus (155,156). Dabei spielt es nicht nur bei der DDR eine Rolle und aktiviert den p53-Pathway. ROS steuert auch den wichtigen TS p16 an (Abb.1). MAP-Kinasen sind Enzyme, die Serin und Threonin (Aminosäuren) phosphorylieren und so Signale von der Zelloberfläche zum Zellkern weiterleiten (157,158). Es gibt drei große MAPK-Gruppen, darunter die p38 MAP-Kinase (159). Die Signalweiterleitung erfolgt über eine dreistufige Phosphorylierungskaskade, beginnend mit einer MAP3K (MAP-Kinase-Kinase-Kinase). Sie aktiviert MAP2K, welche MAPK reguliert (158,160). Es wird vermutet, dass ROS den p38-MAPK-Weg auf drei Arten durch oxidative Veränderungen beeinflusst (158,161): Aktivierung von Wachstumsfaktor-Rezeptoren (RTKs), Aktivierung von MAP3Ks wie ASK1 (apoptosis-signal-regulating kinase 1) und Hemmung von Dephosphorylierung durch MKPs (MAPK-Phosphatase) (Abb.1). Dadurch werden MAP2Ks (MKK3/MKK6) hochreguliert, die spezifisch die MAPK-p38 aktivieren (162). Letztere reguliert p53 und p16 (Abb.1).



**Abbildung 1: Seneszenz-Signalkaskaden**

Graphische Darstellung zweier Seneszenz-Signalkaskaden: Trigger (Telomerverkürzung/DNA-Schäden und Stressfaktoren/ROS) aktivieren Zellzyklus-Inhibitoren, die über Mediatoren Seneszenz induzieren. Siehe Kap 1.4.3.1

### 1.4.3.2 Physiologische Prozesse und Marker

Die Tumorsuppressor-Eigenschaft von Seneszenz beruht auf den zentralen TS-Pathways p53, p16/INK4A und pRB. Sie werden in Tumoren wie beispielsweise Brustkrebs (p53) oft mutiert oder funktionslos vorgefunden (163,164). Des Weiteren ist Seneszenz in präkanzerogenen Hepatozyten nachgewiesen, was eine Zellexpansion und potentielle maligne Entartung dieser Zellen verhindert (122,165). Der dabei eintretende Wachstumsstopp (growth arrest) gilt als charakteristischer Seneszenz-Marker (166). Weiterhin bewirkt die Induktion von Seneszenz mittels p53-Hochregulierung einen therapeutischen Effekt bei bereits ausgebildeten, malignen

Tumoren, was mit der Tumor-Rückbildung des hepatozellulären Karzinoms belegt wurde (167). Seneszenz scheint bei Wundheilungsprozessen und Fibrosen einen positiven Effekt für den Organismus zu haben (122). Hepatische Sternzellen (HSCs, hepatic stellate cells) proliferieren bei chronischem Leberschaden als Myofibroblasten. Unreguliert verursachen sie im Zuge des Wundheilungsprozesses exzessive Leberfibrosen, die Vorstufe der Leberzirrhose (168,169). Seneszenz limitiert diese Reaktion und führt zur stabilen fibrotischen Narbe und Aktivierung von NK (natural killer) -Zellen zur Beseitigung seneszenten Myofibroblasten (122,168,169). Das extrazelluläre Matrixprotein CCN1, auch als CYR61 bezeichnet, gehört zur CCN-Familie (CYR61:cysteine-rich protein 61 /CTGF: connective tissue growth factor /NOV: Nephroblastoma overexpressed gene). CCN1 ist assoziiert mit Gewebeumbau und Reparaturmechanismen verletzten Gewebes (169,170). Dabei induziert es Seneszenz in HSCs über den ROS- und DDR-Pathway und einen weiteren Seneszenz-Pathway (SASP; hier nicht näher erläutert) (169,170). Neben der dadurch hochregulierten TS p53, p16 und p21 wurde bei tierischen und humanen HSCs die Expression von Seneszenz-assoziiertes  $\beta$ -Galaktosidase (SA- $\beta$ -Gal) gezeigt (168,169). SA- $\beta$ -Gal gilt als etablierter Biomarker für zelluläre Seneszenz in vitro und in vivo. Studien belegen, dass  $\beta$ -Galaktosidase in seneszenten Zellen exprimiert wird, nicht aber in präseneszenten, ruhenden, enddifferenzierten oder immortalisierten Zellen (171). Auch bei der Leberzirrhose mit progressiver Fibrose sind Telomerverkürzung und SA- $\beta$ -Gal-Expression der Hepatozyten dokumentiert (172).

Die dermale Fibrose wird bei Heilungsprozessen kutaner Wunden durch Fibroblasten-Seneszenz limitiert, wobei Induktion ebenfalls über CCN1 erfolgt (173,174). Daher sind Seneszenz-Pathways von Leberfibrosen und dermalen Fibrosen identisch (173,174). Die seneszenten Fibroblasten weisen eine vergrößerte, flache Zellmorphologie auf, was ein wichtiger Seneszenzmarker ist (174). Auch bei der oralen submukösen Fibrose wird eine hemmende Wirkung von seneszenten humanen Fibroblasten bestätigt. Dabei wird Seneszenz unter anderem über ROS, DDR und gesteigerter p16-Expression gesteuert (122,175). Die orale submuköse Fibrose ist eine Präkanzerose und wird durch Kautabak oder das Kauen von Betelnüssen ausgelöst (176).

#### **1.4.4 Seneszenz embryonaler, induzierter und dentaler Stammzellen**

In vitro Studien zu humanen ESCs und Maus-ESCs zeigen, dass diese nicht seneszent werden und sie ihr Differenzierungspotential bei Langzeitkultivierung beibehalten (177–179). Die für Seneszenz verantwortlichen Pathways sind auch bei ESCs vorhanden, scheinen jedoch stärker reguliert zu sein. So exprimieren Maus-ESCs den für Seneszenz wichtigen Zellzyklusinhibitor p53. Ein p53-abhängiger Zellzyklusstopp wird bei ESCs jedoch nicht beobachtet (177). Außerdem sind aktive Zellproliferation, unveränderter Karyotyp und hohe Telomeraseaktivität mit beinahe gleichbleibenden Telomerlängen trotz Langzeitkultivierung zu beobachten (178). Im

Gegensatz zu somatischen Zellen werden Maus-ESCs auch bei oxidativem Stress in Zellkultur nicht seneszent (179).

Bei humanen iPSCs gibt es bereits Studien im Zusammenhang mit Zellalterungsprozessen. Im Zuge der Reprogrammierung seneszenter Zellen zu iPSCs wird eine Zellverjüngung mit Telomerverlängerung und Genexpression ähnlich ESCs dokumentiert (180). Eine andere Studie zeigt jedoch iPSCs mit Telomerverkürzung und reduzierter Telomeraseaktivität (181). Im Gegensatz zu ESCs-Nachkommen weisen auch Zellnachkommen von iPSCs vorzeitige Seneszenz mit Einschränkung der Zellexpansion auf (182,183). Weitere Studien mit einheitlichen Reprogrammierungsprotokollen/ Ausgangszellarten werden zur Verifizierung dieser Ergebnisse noch benötigt (183).

Bei DPSCs und SCAP konnte replikative zelluläre Seneszenz beobachtet werden, was zum Abbau des odontogenen Differenzierungspotentials führte. Dabei wurden kontinuierlicher Verlust telomerischer DNA und gesteigerte p16-Aktivität dokumentiert (90). PDLSCs wurden in einer aktuellen Studie aus Weisheitszähnen junger und älterer Probanden isoliert und miteinander verglichen (184). Hier wiesen PDLSCs älterer Patienten eine Steigerung der SA- $\beta$ -Gal Expression auf sowie ein geringeres osteogenes Differenzierungspotential. Auch Verringerung von Proliferation und Expression pluripotenz-assoziiierter Transkriptionsfaktoren wurden beobachtet (184). Eine weitere Studie erforschte den Effekt von Radiatio auf PDLSCs (185). Es stellte sich heraus, dass die Zellen nicht apoptotisch sondern seneszent wurden. Dies zeigte sich als Zellzyklusstopp in der G2-Phase mit gesteigerter Expression von p16 und SA- $\beta$ -Gal (185).

Eine aktuelle Studie zu DFVs untersuchte Telomerlängen nach 20 Passagen Langzeitkultivierung (186). Es konnten tendenzielle Veränderungen der Telomerlänge festgestellt werden (186). Weiterhin ergab eine mikroskopische Untersuchung der Zellmorphologie ebenso tendenzielle Veränderungen (186).

## 1.5 Ziel der vorgelegten Arbeit

Seneszenzmarker von DFVs sind bisher nicht genau untersucht. Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Veränderung der Telomerlängen von DFVs genauer zu untersuchen, wozu Fesahat et al. bereits erste Erkenntnisse lieferte. Southern Blot und Real-Time PCR dienten dabei zur Analyse der Telomerlängen. Die Expression von telomerase-assoziiertem TEP1 wurde mittels Western Blot beurteilt. Ein zweites Ziel dieser Arbeit bestand darin, weitere Seneszenzmarker bei DFVs zu analysieren, um zu prüfen, ob diese Zellen in hohen Passagen seneszent werden. So wurden SA- $\beta$ -Gal-Aktivität und Zell-Morphologie untersucht und das osteogene Differenzierungspotential mittels Western Blot und Alizarin-Färbung analysiert. Außerdem diente eine FACS-Analyse zur Überprüfung der Stammzellmarker-Expression von DFVs.

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Untersuchte Zellart

Zellen	Bezeichnung/Abkürzung	Quelle
Dentale Follikelvorläuferzellen	DFVs	kryokonservierte DFVs; isoliert aus impaktierten Weisheitszähnen

#### 2.1.2 Zellkultur, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

Bezeichnung	Beschreibung / Hersteller
Trypsin	<i>Gibco</i>
PBS (Dulbecco`s phosphate buffered saline)	<i>Sigma</i>
DMSO (Dimethylsulfoxid)	<i>Thermo Scientific</i>
FBS (fetal bovine serum / <i>fötales Rinderserum</i> )	<i>Sigma</i>
Pen-Strep (PIS, Penicillin-Streptomycin)	<i>Sigma</i>
T75-Zellkulturflaschen (mit Filterkappe, 75cm <sup>2</sup> )	<i>Corning</i>
T162-Zellkulturflaschen (mit Filterkappe, 162cm <sup>2</sup> )	<i>Corning</i>
Zentrifugenröhrchen (15ml/ 50ml bluecap conical tubes)	<i>BD Falcon / Greiner bio-one</i>
Kryoröhrchen (Cryopure 1,6ml)	<i>Sarstedt</i>
Glasobjektträger mit 4-Kammer-Unterteilung (Lab-Tek Chamberslide)	<i>Thermo-Scientific, Nunc</i>
destilliertes Wasser (dH <sub>2</sub> O)	<i>Millipore</i>
DMF (N-N-Dimethylformamid)	<i>Sigma</i>

Mikrozentrifugen-Tube (1,5ml)	<i>Eppendorf</i>
Agarose (LE Agarose)	<i>Biozym</i>
Nylonmembran, positiv geladen	<i>Roche</i>
Blot-Filterpapier	<i>BioRad</i>
Hybridisierungstasche (hybridization bag)	<i>Roche</i>
Röntgenfilm (Amersham Hyperfilm ECL)	<i>GE Healthcare</i>
Light Cycler Kapillaren	<i>Roche</i>
6-well Platten	<i>Thermo-Scientific, Nunc</i>
Alizarin Rot S	<i>Sigma-Aldrich</i>
Ammoniumhydroxid	<i>Roth</i>
0,2 µm Filter (Pore PTE-Membran)	<i>Corning</i>
Zellkulturschalen	<i>Greiner Bio One</i>
Zellschaber	<i>Sarstedt</i>
NaF	<i>Sigma-Aldrich</i>
NP-40	<i>Sigma-Aldrich</i>
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	<i>Sigma-Aldrich</i>
NaCl	<i>Sigma-Aldrich</i>
Phosphatase-Inhibitor-Cocktail	<i>Sigma-Aldrich</i>
Protease-Inhibitor-Cocktail	<i>Roche</i>
SDS-Polyacrylamid Gel NuPAGE® Novex® (4-12% Bis-Tris-Gel)	<i>Invitrogen</i>
Protein-Größenstandard SeeBlue® Plus2 (Prestained Standard)	<i>Invitrogen</i>
Nitrocellulosemembran	<i>Whatman</i>
Whatman-Papier	<i>BioRad</i>
Eppendorf-Gefäß	<i>Eppendorf</i>

### 2.1.3 Zellkulturmedien, Puffer und Lösungen

<b>Bezeichnung</b>	<b>Beschreibung / Hersteller</b>
DMEM	<i>Sigma</i>
Zellkulturmedium	DMEM (500ml-Flasche) 10% FBS

	1% PIS
Kryomedium	DMEM 20% FBS 10% DMSO
$\beta$ -Galaktosidase Färbelösung	93% 1x Färbelösung 5% X-Gal-DMF Lösung 1% Staining Supplement A 1% Staining Supplement B
TAE-Pufferlösung (Tris-Acetat-EDTA-Puffer)	0,04 M Tris-Acetat 0,001 M EDTA pH 8,0
HCl-Lösung	0,25 M HCl
Denaturierungslösung (denaturation solution)	0,5 M NaOH 1,5 M NaCl
Neutralisierungslösung (neutralization solution)	0,5 M Tris-HCl 3 M NaCl pH 7,5
Transferpufferlösung (20x SSC transfer buffer)	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat pH 7,0
Stringent Waschpuffer I	2x SSC 0,1% SDS
Stringent Waschpuffer II	0,2x SSC 0,1% SDS
Lysispuffer-Stocklösung	0,02 M Tris 0,137 M NaCl 0,048 M NaF 1% NP-40 10% Glycerol in dH <sub>2</sub> O
Bolt™ LDS Sample Buffer, 4x (Ladepuffer)	<i>Invitrogen</i>
Laufpuffer MES SDS Running Buffer, 20x	<i>Invitrogen</i>

Transferpuffer (Western Blot)	10ml 10x Towbinpuffer 10ml Methanol 80ml dH <sub>2</sub> O
Towbinpuffer	250 mM Tris 1,9 M Glycin mit dH <sub>2</sub> O auf 500ml aufgefüllt pH 8,5
Blockierlösung (Western Blot)	5% Magermilchpulver gelöst in TBST-Waschpuffer
TBST-Waschpuffer	TBS (150 mM NaCl; 10 mM Tris/ HCl; pH 8) 0,05% Tween
Entwicklerlösung ECL (Amersham™ ECL Plus Western Blotting Detection System)	<i>GE Healthcare</i>
FACS-Färbepuffer	2 nM EDTA 0,5% BSA
FACS-Stammlösung für intrazelluläre Färbung	1% BSA 2% Saponin in PBS angesetzt: 10ml PBS mit 0,1g BSA und 0,2g Saponin
FACS-Waschpuffer	1:10 Verdünnung der Saponin- Stammlösung mit PBS
FACS-Permeabilitätspuffer	1:5 Verdünnung der Saponin- Stammlösung mit PBS
Re-Blot Plus Mild Lösung, 10x (Western Blot)	1:10 verdünnt mit dH <sub>2</sub> O

### 2.1.4 Geräte und Software

Bezeichnung	Beschreibung / Hersteller
Flüssig-Stickstoff Tank (Kryotank)	<i>Arpege, Air Liquide Medical</i>
Thermo-Wasserbad/Schüttler	<i>GFL</i>
Brutschrank I (CO <sub>2</sub> -Inkubator HERAccl150)	<i>Thermo Scientific</i>

Brutschrank II (CO <sub>2</sub> -freier Inkubator, Function Line)	<i>Heraeus</i>
Lamina Flow Abzug (Sicherheitswerkbank;Herasafe HS 12)	<i>Heraeus</i>
Zentrifuge Labofuge 400 R (kühlbar) Function Line	<i>Heraeus</i>
Tischschüttler REAX top	<i>Heidolph</i>
Zellzähler TC 20 (automatisiert)	<i>BioRad</i>
Mikroskopbeleuchtung (Netzgerät)	<i>Leitz</i>
Mikroskop I Diavert	<i>Leitz</i>
Zählkammer	<i>nach Neubauer</i>
Mikroskop II BX45	<i>Olympus</i>
Tisch pH-Meter	<i>Mettler Toledo</i>
Mikroskopkamera SC30	<i>Olympus</i>
Feinwaage	<i>Denver Instrument</i>
Bild-Analyseprogramm AxioVision	<i>Zeiss</i>
Statistiksoftware SPSS Statistics	<i>IBM</i>
Excel	<i>Microsoft</i>
Nanodrop ND 1000 Spektrophotometer	<i>Thermo Scientific</i>
Mikrozentrifuge 5417R	<i>Eppendorf</i>
Heizblock / Thermomixer compact	<i>Eppendorf</i>
Elektrophorese-Kammer (horizontal)	<i>VWR Collection</i>
Elektrophorese-Netzteil Power Pac 3000	<i>BioRad</i>
Mikrowelle	<i>Bosch</i>
Kleinschüttler KM 2	<i>Bühler</i>
GS Gene Linker UV Chamber	<i>BioRad</i>
Light Cyclers	<i>Roche</i>
Plattenreader	<i>Tecan</i>
Rührer, magnetisch	<i>Variomag</i>
FACS-CANTO Durchflusszytometer	<i>Becton Dickinson Biosciences</i>
Photoshop	<i>Adobe Systems</i>
ImageJ	<i>Open Source</i>

## 2.1.5 Kits

Kit	Inhalt / Beschreibung
$\beta$ -Galaktosidase Färbekit ( $\beta$ -Gal Färbekit, Senescence $\beta$ -Galactosidase Staining Kit) ( <i>Cell Signaling Technology</i> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>- X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-<math>\beta</math>D-galactopyranoside powder)</li> <li>- Staining Supplement A (500mM potassium ferrocyanide)</li> <li>- Staining Supplement B (500mM potassium ferricyanide)</li> <li>- Fixierlösung</li> <li>- Färbelösung</li> </ul>
QIAamp DNA Mini Kit (QDNA-Kit) ( <i>Qiagen</i> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>- QIAGEN Protease</li> <li>- AL-Puffer</li> <li>- Zentrifugen-Säule (QIAamp Mini spin column)</li> <li>- Eppendorf-Gefäß (collection tube, 2ml)</li> <li>- AW1-Puffer</li> <li>- AW2-Puffer</li> <li>- AE-Puffer</li> </ul>
Telo TAGGG Telomere Length Assay Kit ( <i>TTTLA-Kit</i> ) ( <i>Roche</i> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Kontroll-DNA</li> <li>- Enzym Hinf I</li> <li>- Enzym Rsa I</li> <li>- Verdaupuffer (digestion buffer, 10x)</li> <li>- Ladepuffer (loading buffer, 5x)</li> <li>- DIG-Molekulargewichtsmarker (DIG molecular weight marker)</li> <li>- Wasser (nukleasefrei)</li> <li>- telomerspezifische digoxigenin (DIG)-markierte Sonde (DIG Easy Hyb Granules)</li> <li>- Telomersonde</li> <li>- Bindender Waschpuffer I und II (stringent wash buffer)</li> <li>- Waschpuffer, 10x (washing buffer)</li> <li>- Blockpuffer, 10x (blocking buffer)</li> <li>- Maleinsäurepuffer, 10x (maleic acid buffer)</li> <li>- Anti-DIG-AP</li> <li>- Nachweispuffer, 10x (detection buffer)</li> </ul>
Light Cycler FastStart DNA Master <sup>PLUS</sup> SYBR Green Kit (LC-SYBR-Kit) ( <i>Roche</i> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>- „cap a“ (Light Cycler Fast Start Enzyme)</li> <li>- „cap b“ (Light Cycler Fast Start Reaction Mix SYBR Green I)</li> <li>- MgCl<sub>2</sub> (als 50mM Stocklösung vorgelegen)</li> <li>- PCR grade H<sub>2</sub>O</li> </ul>
STEMPRO Kit, osteogenes Differenzierungsmedium ( <i>Gibco Invitrogen cell culture</i> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 1x Osteocyte/Chondrocyte Differentiation Basal Medium</li> <li>- 1x Osteogenesis Supplement</li> </ul>

### 2.1.6 Antikörper

primärer Antikörper	Firma	Verdünnung primärer AK	sekundärer AK (Verdünnung)
TEP1	abcam	1:500 in BSA	anti-rabbit (1:1.000 in Milch)
OPN	Abnova/Biozol	1:1.000 in BSA	anti-mouse (1:4.000 in Milch)
RUNX2	Santa Cruz	1:750 in BSA	anti-rabbit (1:2.000 in Milch)
β-Actin	Novus Biologicals	1:10.000 in Milch	anti-mouse (1:10.000 in Milch)

Antikörper	Firma	Isotyp-Kontrolle	Verdünnung
CD105-APC	Miltenyi Biotec	Mouse IgG2b	1:10 (5µl AK + 45µl Puffer)
CD146-FITC	Miltenyi Biotec	Mouse IgG1	1:10 (5µl AK + 45µl Puffer)
CD44-FITC	Miltenyi Biotec	Mouse IgG1	1:10 (5µl AK + 45µl Puffer)
anti human Nestin - PE	R&D Systems	IgG	1:10 (10µl AK + 200µl Puffer)
anti human STRO-1-FITC	Bio Legend	Mouse IgMλ	1:20 (5µl AK + 95µl Puffer)

### 2.1.7 Primer

Primer	Sequenz (5' → 3')
te11b (forward Telomer-Primer)	CGGTTTGTGGTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTT
te12b (reverse Telomer-Primer)	GGCTTGCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCT
36B4u (forward Einzelgen-Primer)	CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC
36B4d (reverse Einzelgen-Primer)	CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Kultivierung dentaler Follikelvorläuferzellen

Für Experimente wurden kryokonservierte dentale Follikelvorläuferzellen (DFVs) aufgetaut und kultiviert. Sie stammen aus extrahierten und zuvor impaktierten Weisheitszähnen junger Patienten. Ihre Isolierung für in vitro Versuchsreihen erfolgte 2007 nach den Richtlinien der Ethikkommission des Regensburger Universitätsklinikums.

Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen (T75 und T162, *Corning*) mit Zellkulturmedium ausgesät und im Brutschrank I (CO<sub>2</sub>-Inkubator HERAcell150, *Thermo Scientific*) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt kultiviert. Das Zellkulturmedium wurde angesetzt mit DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, *Sigma*), 10% FBS (fötales Rinderserum, fetal bovine serum, *Sigma*) und 1% einer Penicillin/Streptomycin-Lösung (Pen-Strep, PIS, *Sigma*). Mediumwechsel inklusive Waschung mit PBS (Dulbecco's phosphate buffered saline, *Sigma*) erfolgte alle zwei bis drei Tage. Sobald die Zellen Subkonfluenz (ca. 80% Konfluenz) erreichten, wurden sie in die nächsthöhere Passage überführt. Dabei wurden die Zellen nach Abzug des Zellkulturmediums mit PBS gewaschen und nach Zugabe von 5ml (T75) / 10ml (T162) einer 0,25%igen Trypsinlösung (*Gibco*) (1:10 Verdünnung von 2,5% Trypsin) für ca. 4-8 Minuten im Brutschrank I inkubiert. Das Ablösen der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche wurde mit dem Mikroskop (Diavert mit Mikroskopbeleuchtung, *Leitz*) kontrolliert. Daraufhin wurde die Trypsin-Reaktion mit entsprechender Menge Zellkulturmedium abgestoppt. Die Zellsuspension wurde in Zentrifugenröhrchen (50ml/15ml bluecap conical tubes, *Falcon, Greiner bio one*) überführt und für 5 Minuten bei 1000 rpm abzentrifugiert (Zentrifuge Labofuge 400 R, Function Line, *Heraeus*). Der Überstand wurde abgezogen, neues Zellkulturmedium zugegeben und das Zellpellet mit dem Tischschüttler (REAX top, *Heidolph*) resuspendiert. Nach Zählung der Zellen (Zählkammer *nach Neubauer* und automatisierter Zellzähler TC 20, *BioRad*) erfolgte das Aussäen in neuen Zellkulturflaschen (5000 Zellen/cm<sup>2</sup>), die mit der nächsthöheren Passagenzahl beschriftet wurden. Dies wurde bis Passage 18 wiederholt. Zellkulturmedium, PBS und Trypsin wurden vor Zellkontakt im Thermo-Wasserbad (*GFL*) auf 37°C erwärmt. Mediumwechsel, Waschung, Trypsinierung und Aussäen der Zellen erfolgte unter dem Lamina Flow Abzug (Sicherheitswerkbank, Herasafe HS 12, *Heraeus*).

Überzählige Zellen wurden für spätere Verwendung eingefroren, indem sie in Kryoröhrchen (Cryopure 1,6ml, *Sarstedt*) mit Kryomedium auf -80°C abgekühlt und anschließend im Flüssig-

Stickstoff Tank (Kryotank, Arpege, *Air Liquide Medical*) bei  $-195^{\circ}\text{C}$  gelagert wurden. Das Kryomedium wurde angesetzt mit DMEM, 20% FBS und 10% DMSO (Dimethylsulfoxid, *Thermo Scientific*). Um kryokonservierte Zellen in Kultur zu nehmen, wurden sie dem Kryotank entnommen, im  $37^{\circ}\text{C}$  Thermo-Wasserbad schnell aufgetaut und in eine T75-Flasche mit 20ml Zellkulturmedium überführt. Mediumwechsel erfolgte am Tag darauf.

In der vorliegenden Arbeit kamen zwei primäre Zelllinien von DFVs zum Einsatz. Die  $\beta$ -Galaktosidase Färbung und morphologische Untersuchung wurden mit DFVs einer Zelllinie durchgeführt. Da die Zellen dieser Zelllinie für weitere Untersuchungen nicht ausreichten, wurde eine zweite Zelllinie verwendet für Southern Blot, Telomerlängen-PCR, Western Blot, Alizarin Färbung und FACS-Analyse. Nachdem der Versuchsaufbau keiner komparativen Studie entspricht, wird in der vorliegenden Arbeit nicht auf einen Vergleich zweier Zelllinien eingegangen.

Zellen der Passagen 8, 10, 12, 14, 16 und 18 wurden für  $\beta$ -Gal Färbung, morphologische Untersuchung, Southern Blot und Telomerlängen-PCR verwendet (Abbildung 2A zeigt Zellen der Passage 6 als Kontrollpassage für  $\beta$ -Galaktosidase Färbung und Morphologie). Beim Western Blot wurden Zellen der Passagen 8 und 14 untersucht, die FACS-Analyse wurde mit Zellen der Passagen 7 und 18 durchgeführt. Für osteogene Differenzierung (Alizarin-Färbung/ Western Blot) wurde das STEMPRO Kit (*Gibco, Invitrogen cell culture*) verwendet.

## 2.2.2 $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal) Färbung und Zellmorphologie

### 2.2.2.1 $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal) Färbung

Für den Nachweis von  $\beta$ -Gal Aktivität wurden Zellen der untersuchten Passagen auf Glasobjektträgern mit 4-Kammer-Unterteilung (Lab-Tek Chamberslide, *Thermo-Scientific, Nunc*) kultiviert. Der  $\beta$ -Galaktosidase Nachweis erfolgte mit einem  $\beta$ -Galaktosidase Färbekit (Senescence  $\beta$ -Galactosidase Staining Kit, *Cell Signaling Technology*), im folgenden als  $\beta$ -Gal Färbekit bezeichnet. In jede der  $1,8\text{cm}^2$ -Kammern eines Chamberslides wurden 10000 Zellen ausgesät. Nach Kultivierung im Brutschrank I inklusive PBS-Waschung und Wechsel des Zellkulturmediums erfolgte die Färbung mit dem  $\beta$ -Gal Färbekit. Die Zellen wurden dafür nach Abzug des Zellkulturmediums mit PBS gewaschen und anschließend mit 1:10 verdünnter Fixierlösung ( $\beta$ -Gal Färbekit) ( $400\mu\text{l}$  je Kammer; Verdünnung mit destilliertem Wasser  $\{\text{dH}_2\text{O}\}$ ) bedeckt. Die Einwirkzeit bei Raumtemperatur (RT) betrug 10-15min. Nach Abzug der Fixierlösung und erneuter zweimaliger PBS-Waschung wurde eine frisch angesetzte  $\beta$ -Gal Färbelösung zugegeben ( $380\mu\text{l}$  je Kammer). Für den Ansatz der  $\beta$ -Gal Färbelösung wurde eine 20x Stocklösung von X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ D-galactopyranoside powder,  $\beta$ -Gal Färbekit, *Cell Signaling Technology*) vorbereitet, indem 20mg X-gal in 1ml DMF (*Sigma*) gelöst wurden. Das X-gal Pulver wurde

mit einer Feinwaage (*Denver Instrument*) abgemessen. Die Lagerung der Stocklösung erfolgte lichtgeschützt bei  $-20^{\circ}\text{C}$ . Die  $\beta$ -Gal Färbelösung wurde entsprechend dem Kit-Protokoll angesetzt und setzt sich zusammen aus 93% einer 1x Färbelösung ( $\beta$ -Gal Färbekit, *Cell Signaling Technology*), 5% X-gal-DMF Lösung und je 1% von Staining Supplement A (500mM potassium ferrocyanide,  $\beta$ -Gal Färbekit, *Cell Signaling Technology*) und B (500mM potassium ferricyanide,  $\beta$ -Gal Färbekit, *Cell Signaling Technology*). Der pH-Wert des Ansatzes sollte dabei im Bereich pH 6 liegen, was mit dem Tisch pH-Meter (*Mettler Toledo*) kontrolliert wurde. Die mit  $\beta$ -Gal Färbelösung bedeckten Zellen wurden über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Brutschrank II ( $\text{CO}_2$ -freier Inkubator, Function Line, *Heraeus*) inkubiert. Die Auszählung  $\beta$ -Gal-positiver Zellen erfolgte unter dem Mikroskop II (BX45, *Olympus*). Dabei wurden in jeder Kammer 100 Zellen auf Färbung untersucht. Das wurde viermal pro Kammer wiederholt. Aus den Durchschnittsmengen gefärbter Zellen je Kammer wurde ein Gesamtdurchschnitt für die jeweilige Passage gebildet.

### 2.2.2.2 Zellmorphologie

Mit der Mikroskopkamera SC30 (*Olympus*) wurden Fotos der  $\beta$ -Gal-positiven Zellen erstellt, um ihren Zellumfang zu untersuchen. Dieser wurde in einem Bild-Analyseprogramm (AxioVision, *Zeiss*) markiert und vermessen. Für jede untersuchte Passage wurden so zwischen 32 und 51 Zellumfänge dokumentiert.

### 2.2.2.3 Statistische Auswertung

Eine statistische Analyse erfolgte mit Mann-Whitney-U Test und Kruskal-Wallis Test. Diese wurden mit der Statistiksoftware SPSS Statistics (*IBM*) durchgeführt. Dabei wurde untersucht, ob sich Passagen in Bezug auf Zellgrößenveränderung und Anzahl  $\beta$ -Gal-positiver Zellen statistisch signifikant unterscheiden. Das Signifikanzniveau wurde mit 0,05 (5%) festgelegt. Die Nullhypothese war, dass die Verteilung der Messwerte über alle Passagen identisch ist. Demnach kann die Nullhypothese abgelehnt werden, wenn statistische Analysen ein Signifikanzniveau  $<0,05$  ergeben.

Boxplots wurden für alle untersuchten Passagen erstellt (in Excel, *Microsoft*), um die Verteilung morphologischer Änderungen und  $\beta$ -Gal-gefärbter Zellen grafisch darzustellen.

## 2.2.3 Untersuchung der Telomerlänge

### 2.2.3.1 DNA Isolierung

Die Telomerverkürzung ist ein charakteristisches Merkmal replikativer Seneszenz. Um sie mittels Southern Blot und Real-Time PCR untersuchen zu können, muss zuerst die genomische DNA (gDNA) der langzeitkultivierten Zellen isoliert werden. Das wurde mit dem QIAamp DNA Mini Kit (*Qiagen*) umgesetzt, was im folgenden mit „QDNA-Kit“ abgekürzt wird. Lagerung, Verwendung und Verarbeitung der Kit-Bestandteile erfolgte gemäß den Vorgaben des Herstellers.

DFVs der Passagen 8, 10, 12, 14, 16 und 18 wurden für gDNA-Isolierung in T75 Flaschen mit Zellkulturmedium kultiviert. Nach Erreichen der Subkonfluenz und PBS-Waschung wurden die Zellen mit Trypsin-Lösung abgelöst und mit Zellkulturmedium in 1,5ml Mikrozentrifugen-Tubes (*Eppendorf*) überführt (max  $5 \times 10^6$  Zellen). Mit der Mikrozentrifuge 5417R (*Eppendorf*) wurden die Tubes für 5min bei Raumtemperatur und 400 rpm (revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgezogen und das Zellpellet mit PBS auf ein Endvolumen von 200µl resuspendiert. Dem wurden 20µl QIAGEN-Protease (QDNA-Kit) und 200µl AL-Puffer (QDNA-Kit) zugegeben. Die Tubes wurden mit dem Tischschüttler (REAX top, *Heidolph*) 15s lang gevortext und anschließend für eine maximale DNA-Ausbeute im Heizblock/Thermomixer compact (*Eppendorf*) bei 56°C für 10min inkubiert. Darauf folgte eine kurze Zentrifugation der Tubes und die Zugabe von 200µl Ethanol. Es wurde nochmals gevortext (für 15s) und erneut kurz zentrifugiert, um Flüssigkeitsrückstände an der Deckelinnenseite zu beseitigen. Nun konnte die Suspension in eine Zentrifugen-Säule (QIAamp Mini spin column, QDNA-Kit) mit 2ml Eppendorf-Gefäß (collection tube, QDNA-Kit) überführt und bei 8000 rpm abzentrifugiert werden (1min). Dabei passiert das Lysat die Membran der Zentrifugensäule und wird im Eppendorf-Gefäß aufgefangen. Die DNA verbleibt an der Membran und wird so von anderen Bestandteilen des Lysats gefiltert. Das Eppendorf-Gefäß mitsamt dem Filtrat wurde entsorgt und die Zentrifugen-Säule in einem neuen Eppendorf-Gefäß platziert. Dieser Prozess wurde zweimal wiederholt, zuerst mit 500µl AW1-Puffer (QDNA-Kit), dann mit 500µl AW2-Puffer (QDNA-Kit). Die Zentrifugation bei letzterem wurde zweimal mit maximaler Geschwindigkeit (14000 rpm) durchgeführt ( 3min, 1min). Abschließend wurde die Zentrifugen-Säule in einem 1,5ml Mikrozentrifugen-Tube platziert und die DNA mit 200µl AE-Puffer (QDNA-Kit) aus der Membran eluiert (Inkubation bei Raumtemperatur für 1-5 min und Zentrifugation mit 8000 rpm für 1min). Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte mit dem Nanodrop ND 1000 Spektrophotometer (*Thermo Scientific*). Das DNA-Puffer Eluat wurde für die spätere Verwendung beim Southern Blot bei -20°C gelagert.

### 2.2.3.2 Southern Blot

Für die Untersuchung von Telomerlängen wurde ein Southern Blot durchgeführt. Dafür wurde das Telo TAGGG Telomere Length Assay Kit von *Roche* verwendet, was im folgenden „TTTLA-Kit“ abgekürzt wird. Herstellung und Lagerung von Aliquots und Arbeitslösungen (working solutions) sowie Verarbeitung, Verdünnung und Lagerung von Stocklösungen erfolgte gemäß Kit-Protokoll. Beim Pipettieren und Ansetzen der Lösungen wurde mit Eis gekühlt. Das Experiment wurde wiederholt durchgeführt mit sieben gDNA-Proben: Eine Kontroll-DNA des Kits (TTTLA-Kit) und die isolierte DNA der sechs Passagen. Das Versuchsprinzip umfasst drei Abschnitte. Im ersten Schritt wird DNA durch Restriktionsenzyme verdaut. Im zweiten Teil werden die DNA-Fragmente aufgetrennt und mittels Southern Blot auf eine Membran übertragen. Im letzten Abschnitt erfolgt eine Hybridisierung der Fragmente mit einer telomerspezifischen digoxigenin (DIG)-markierten Sonde. Darauf wird ein DIG-spezifischer Antikörper inkubiert, der an ALP gebunden ist. Abschließend wird ein chemilumineszentes Substrat zugegeben, das von der ALP des Antikörpers metabolisiert wird und so eine Farbreaktion auslöst. Dieses visuelle Signal macht die Lage der Telomersonde und somit das TRF (terminal restriction fragment) sichtbar, was auf Röntgenfilm konserviert werden kann.

Für den DNA-Verdau wurde ein Mix angesetzt aus den Enzymen Hinf I (TTTLA-Kit) und Rsa I (TTTLA-Kit) (1:1). Jeder gDNA-Probe (17µl im Mikrozentrifugen-Tube mit gleicher DNA-Menge) wurden 1µl Enzym-Mix und 2µl Verdaupuffer (10x digestion buffer, TTTLA-Kit) zugegeben. Der Ansatz wurde bei +37°C inkubiert (2h im Brutschrank I). Die Restriktionsenzyme sind sequenzspezifisch. Daher werden nicht-telomerische DNA Sequenzen zu niedermolekularen Fragmenten gespalten, Telomerabschnitte bleiben unberührt. Die Reaktion wurde mit 5µl Ladepuffer (5x loading buffer, TTTLA-Kit) abgestoppt. Dieser wird für die Gel-Elektrophorese benötigt, welche die DNA-Fragmente nach Größe (molekularem Gewicht) trennt. Es wurde ein 0,8%iges Agarose-Gel hergestellt mit 200ml 1x TAE-Pufferlösung (Tris-Acetat-EDTA-Puffer; 0,04 M TRIS-Acetat, 0,001 M EDTA, pH 8,0) und 1,6g Agarose (LE Agarose, *Biozym*). Agarose wurde mit der Pufferlösung in einer Mikrowelle (*Bosch*) erhitzt, bis eine klare Lösung erkennbar war. Die DNA-Proben wurden zu gleichen Mengen in die Gelbahnen pipettiert. Für die Messung der Lauflänge wurde ein Mix erstellt aus 4µl DIG-Molekulargewichtsmarker (DIG molecular weight marker, TTTLA-Kit), 12µl nukleasefreiem Wasser (TTTLA-Kit) und 4µl Ladepuffer. Der Mix wurde auf zwei Gelbahnen geladen (je 10µl), welche die DNA-Proben auf beiden Seiten flankierten. Das Gel lief in einer mit TAE-Puffer gefüllten, horizontalen Elektrophorese-Kammer (*VWR Collection*) mit 5 V/cm (Elektrophorese-Netzteil Power Pac 3000, *BioRad*), bis die Trackingfarbe des Ladepuffers (Bromophenol) 10-13 cm vom Startpunkt entfernt war. Beim Anlegen von Spannung wandern die geladenen DNA-Fragmente durch das Gel. Sie werden voneinander getrennt, da sie sich aufgrund unterschiedlicher Größe verschieden schnell bewegen. Das Gel wurde daraufhin in Lösungen inkubiert, was bei RT auf dem Kleinschüttler KM2 (*Bühler*) durchgeführt wurde: Zuerst

in HCl-Lösung (0,25 M HCl) bis ein Farbumschlag der Bromophenolbanden von blau nach gelb ersichtlich war (5-10min). HCl bewirkt eine Depurinierung (Herausschneiden der Purin-Basen). Dadurch entstehen kleinere DNA-Fragmente, wodurch der Membran-Transfer erleichtert wird. Bromophenol fungierte dabei als pH-Indikator (gelb:  $\text{pH} \leq 3,0$ ). Es folgte die Inkubation mit Denaturierungslösung (denaturation solution, 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) für 2 x 15min mit Lösungswechsel. Hier trennt NaOH doppelsträngige DNA-Abschnitte, was zu blotbaren Einzelsträngen führt.

Die letzte Inkubation wurde unter gleichen Bedingungen mit Neutralisierungslösung (neutralization solution; 0,5 M Tris-HCl, 3M NaCl, pH 7,5) durchgeführt, um den pH-Wert auszugleichen. Zwischen den Inkubationsschritten wurde das Gel mit  $\text{dH}_2\text{O}$  gewaschen. Darauf folgte der Southern Blot: Auf das Gel wurde eine positiv geladene Nylonmembran (*Roche*) gelegt. Dieses Sandwich wurde auf Blot-Filterpapier (*BioRad*) platziert, das in einen Behälter mit Transferpufferlösung (20x SSC transfer buffer, 3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0) reichte. Oberhalb der Nylonmembran wurde Filter- und Absorbierpapier geschichtet und dieses Sandwich beschwert. Durch die Schwammwirkung des Filterpapiers wurde die Transfer-Pufferlösung durch das Gel/die Membran gezogen und die DNA-Fragmente mittels Kapillar-Transfer vom Gel auf die Membran übertragen. Am Folgetag wurde die DNA mittels UV-Crosslinking (120mJ, GS Gene Linker UV Chamber, *BioRad*) auf der Membran fixiert. Alle folgenden Schritte wurden, wenn nicht anders hervorgehoben, im Thermo-Wasserbad (*GFL*) mit Schüttelbewegung durchgeführt. Die Membran befand sich dabei in einer Hybridisierungstasche (hybridization bag, *Roche*). Nach Prähybridisierung (siehe TTTLA-Kit Protokoll) wurden die DNA Fragmente mit telomer-spezifischer Hybridisierungslösung inkubiert (3h bei  $+42^\circ\text{C}$ ). Sie besteht aus einer digoxigenin (DIG)-markierten Sonde (DIG Easy Hyb Granules, TTTLA-Kit) und einer Telomersonde (telomere probe, TTTLA-Kit). Es folgten Waschdurchgänge mit stringent Waschpuffer I (2x SSC, 0,1% SDS) (2x außerhalb des Thermo-bades, 5min), stringent Waschpuffer II (0,2x SSC, 0,1% SDS) (2x, 15-20min bei  $+50^\circ\text{C}$ ) und abschließend mit 1x Waschpuffer (10x washing buffer, TTTLA-Kit, 1:10 mit  $\text{dH}_2\text{O}$ ). Inkubation mit 1:10 verdünnter Blockpufferlösung (10x blocking buffer, TTTLA-Kit, verdünnt mit 1x Maleinsäurepuffer {10x maleic acid buffer, TTTLA-Kit, 1:10 mit  $\text{dH}_2\text{O}$ }) wurde bei RT (30min) gemacht. Die Membran wurde dann mit einem DIG-spezifischen Antikörper inkubiert, der an ALP gebunden ist (Anti-DIG-AP, TTTLA-Kit) (30min bei RT). Nach weiterer Waschung mit 1x Waschpuffer (2x 15min bei RT) wurde der Membran 1x Nachweis-puffer (10x detection buffer, TTTLA-Kit, 1:10 mit  $\text{dH}_2\text{O}$ ) zugegeben und bei RT inkubiert (2-5 min). Der Nachweis-puffer wurde abgezogen, die Membran in eine neue Hybridisierungstasche gelegt und 40 Tropfen einer chemilumineszenten Substratlösung (TTTLA-Kit) zugegeben. Das wurde für 5min bei RT inkubiert (außerhalb des Thermo-Wasserbades). Nun konnte die Lumineszenz auf einem Röntgenfilm (Amersham Hyperfilm ECL, *GE Healthcare*) sichtbar gemacht / konserviert werden.

### 2.2.3.3 Real-Time PCR

Die PCR (polymerase chain reaction, Polymerase Kettenreaktion) ist eine Labormethode zur exponentiellen Vervielfältigung bestimmter DNA-Sequenzen. Dazu wird ein Thermocycler verwendet. Jeder PCR-Zyklus besteht aus drei Abschnitten mit charakteristischen Temperatureinstellungen. Schritt eins ist die Denaturierung (Melting) des DNA-Doppelstranges, bei der Wasserstoffbrücken gebrochen werden. Das führt zu DNA-Einzelsträngen. Darauf folgt die Hybridisierung (annealing), bei der sich zwei Primer (f: forward/ r: reverse) an den Matrizenstrang anlagern. Die dabei eingestellte Temperatur (annealing temperature) ist primerspezifisch. Im dritten Abschnitt (Elongation, Amplifikation) amplifizieren thermostabile DNA-Polymerasen den DNA-Abschnitt zwischen den Primern durch Synthese der Komplementärsequenz. Der Zyklus wird in einem Loop wiederholt.

Cawthon etablierte ein Protokoll zur Beurteilung von Telomerlängen, basierend auf der Real-Time PCR (RT-PCR) (187). Bei dieser PCR-Methode wird ein fluoreszierender Farbstoff wie SYBR-Green zugegeben. Er lagert sich in doppelsträngige DNA-Abschnitte neu amplifizierter DNA ein. Mit zunehmender DNA-Menge steigt somit auch die Fluoreszenzintensität. Diese kann am Ende eines Zyklus gemessen werden und ermöglicht so eine Kontrolle der DNA-Amplifikation in Echtzeit (real time).

Das Cawthon-Protokoll umfasst zwei RT-PCR-Durchgänge. Im ersten werden Telomerabschnitte (telomere repeats) amplifiziert und im zweiten eine Einzel-Gen Kopie (single-gene copy, SGC), die als quantitative Kontrolle dient.

In der vorliegenden Arbeit diente der Light Cycler von *Roche* als Thermocycler für die RT-PCR. Das verwendete Protokoll ist eine für dieses Gerät modifizierte Version des Cawthon-Protokolls und wurde von Gil und Coetzer erstellt (188). Die PCRs wurden mit den bereits im Southern Blot untersuchten gDNA-Proben durchgeführt, um die Blotergebnisse zu verifizieren. In beiden PCR-Durchgängen lagen die DNA-Proben als Dublikate vor. Die Oligonukleotid-Sequenzen der eingesetzten Primer wurden dem Protokoll entnommen und bei der Firma Eurofins MWG Operon bestellt:

- Telomer-Primer\_f: te11b: 5'-CGGTTTGTGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTT-3'
- Telomer-Primer\_r: te12b: 5'GGCTTGCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCT-3'
- Einzelgen-Primer\_f: 36B4u: 5'-CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC-3'
- Einzelgen-Primer\_r: 36B4d: 5'-CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA-3'

Der Mastermix für Telomer- und Einzelgen-Primer wurde angesetzt mit dem Light Cycler Fast Start DNA Master<sup>PLUS</sup> SYBR Green Kit (*Roche*), im folgenden „LC-SYBR-Kit“ abgekürzt:

- 4µl Kit-Mastermix (Ansatz: pipettiert wurden 14µl aus „cap a“ {Light Cycler Fast Start Enzyme, LC-SYBR-Kit} in „cap b“ {Light Cycler Fast Start Reaction Mix SYBR Green I, LC-

SYBR-Kit}). Der Mix enthält SYBR Green, die Taq DNA-Polymerase, Nukleotide (dNTPs) und Reaktionspuffer.

- 0,2 mM forward und reverse Telomer-Primer bzw. 0,3 mM forward und reverse SGC-Primer
- 3 mM MgCl<sub>2</sub>(LC-SYBR-Kit)
- 12,35µl PCR grade H<sub>2</sub>O (LC-SYBR-Kit)

In jede Light Cycler Kapillare (Roche) wurden 18µl Mastermix einpipettiert und anschließend 2µl der jeweiligen DNA-Proben zugegeben. Als NTC (no template control) wurde eine weitere Kapillare mit PCR grade H<sub>2</sub>O gefüllt. Nach Abzentrifugieren wurde der Lauf gestartet, wobei das RT-PCR-Programm dem Protokoll gemäß eingestellt wurde:

Tabelle 1: PCR – Light Cycler Laufprotokoll

<b><u>RT-PCR Schritte</u></b>	<b><u>Telomer-PCR</u></b>	<b><u>SGC-PCR</u></b>
(A) Denaturierung 1:	95°C (10 min)	95°C (10 min)
(B) Denaturierung 2:	95°C (05 s)	95°C (05 s)
(C) Annealing:	56°C (10 s)	58°C (10 s)
(D) Amplifikation:	72°C (60 s)	72°C (40 s)

Der Zyklus wurde ab Schritt (B) geloopt (45 Zyklen). Die Übergangintervalle (transition rates) zwischen den Abschnitten betragen 20°C/s, mit Ausnahme des Annealing-Übergangintervalles (04°C/s). Mit der Fluoreszenzmessung wurde der C<sub>t</sub>-Wert für jede Probe bestimmt. Dieser gibt an, bei welcher Zykluszahl die Fluoreszenz eine bestimmte Intensität erreicht (Schwellenwert).

Mit der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode erfolgte eine relative Quantifizierung der Genexpression. Dabei wurden von allen Passagen die C<sub>t</sub>-Werte der Telomer-Primer-PCR mit den C<sub>t</sub>-Werten der Einzel-Gen-Kontroll-PCR verrechnet. Von diesem  $\Delta C_t$ -Wert wurde der  $\Delta C_t$ -Wert eines Kalibrators abgezogen. Als Kalibrator diente die niedrigste Passage (8), mit der alle anderen Passagen verglichen wurden:

Tabelle 2: relative Quantifizierung der Genexpression –  $\Delta\Delta C_t$ -Methode

$\Delta$ :	C <sub>t</sub> (SGC) – C <sub>t</sub> (Telomer)
$\Delta\Delta$ :	$\Delta C_t$ (Telomer-Probe) – $\Delta C_t$ (Kalibrator)
Relative Genexpression:	$2^{-\Delta\Delta C_t}$

## 2.2.4 Protein-Analyse und osteogene Differenzierbarkeit

### 2.2.4.1 Western Blot

In Zellkulturschalen (*Greiner Bio One*) kultivierte DFVs der Passagen 8 und 14 (mit osteogenem Differenzierungsmedium STEMPRO {*Gibco, Invitrogen cell culture*} und Zellkulturmedium zur Kontrolle) wurden für Protein-Isolierung mit PBS gewaschen, danach mit eisgekühltem PBS bedeckt und für 2-4 Minuten auf Eis gestellt. Mit einem Zellschaber (*Sarstedt*) wurden die Zellen eingesammelt und nach zweimaligem Waschen mit eisgekühltem PBS in ein 50ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Bei 4°C wurde mit 4000 rpm für 3min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 300µl Lysispuffer für 10min auf Eis resuspendiert und aufgeschlossen. Der Lysispuffer bestand aus der Lysispuffer-Stocklösung (0,02 M Tris; 0,137 M NaCl; 0,048 M NaF; 1% NP-40; 10% Glycerol; in dH<sub>2</sub>O) und Zusätzen (2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>; Phosphatase-Inhibitor-Cocktail und Protease-Inhibitor-Tablette). Die Proteine wurden abzentrifugiert (13000 rpm; 10min; 4°C) und bei -20°C für den nächsten Schritt gelagert.

Die Proteintrennung wurde mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. SDS (sodium dodecyl sulfate, Natriumdodecylsulfat) sorgt für die Proteinentfaltung, was zu einem proportionalen Verhältnis von negativer Ladung und Proteinmasse führt. Das ermöglicht die Trennung im Polyacrylamidgel mit angelegter Spannung. Dafür erfolgte nach Zugabe eines Ladepuffers (4x Bolt™ LDS Sample Buffer, *Invitrogen*) die Denaturierung der Proteine bei 95°C im Heizblock/Thermomixer compact (*Eppendorf*) mit 550 rpm Schüttlerbewegung für 5min. Daraufhin wurden die Proben schnell auf Eis gestellt und anschließend in Slots eines 4-12%igen Bis-Tris-Gels (SDS-Polyacrylamid Gel NuPAGE® Novex®, *Invitrogen*) pipettiert, nachdem ein Laufpuffer (380ml dH<sub>2</sub>O + 20ml Laufpuffer MES SDS Running Buffer, *Invitrogen*) in die Gelkammer eingebracht wurde. Als Protein-Größenstandard wurde SeeBlue® Plus2 (*Invitrogen*) verwendet. Das Gel wurde bei 165V für ungefähr 30min gefahren.

Mit Hilfe einer elektrischen Blottingkammer wurden die aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran (*Whatman*) übertragen (geblottet). Es wurde zunächst Transferpuffer (10ml 10x Towbinpuffer; 10ml Methanol; 80ml dH<sub>2</sub>O) angesetzt und die Membran für 20-30 min sowie Filterpapier (*Whatman-Papier, BioRad*) für 10min darin eingelegt. Der Towbinpuffer wurde angesetzt mit 250 mM Tris, 1,9 M Glycin, mit dH<sub>2</sub>O auf 500ml aufgefüllt, pH 8,5. Im Anschluss daran wurde ein Sandwich erstellt (*Whatmanpapier-Gel-Membran-Whatmanpapier*) und dieses in die Blottingkammer eingebracht. Geblottet wurde bei 100mA für eine Stunde.

Im nächsten Schritt wurden die zu untersuchenden Proteine mit zwei Antikörperreaktionen detektiert und sichtbar gemacht (Details zu den Antikörpern siehe Kapitel 2.1.6). Der primäre

Antikörper (AK) findet charakteristische Aminosäuresequenzen des gesuchten Proteins und bindet an diese an. Der sekundäre AK besitzt eine Markierung und erkennt / bindet spezifisch den primären AK. Über die Markierung ist eine lumineszierende Nachweisreaktion möglich. Dazu wurde die Membran zuerst für eine Stunde in Blockierlösung inkubiert (auf dem Tischschüttler), um unspezifische Proteinbindungen zu vermeiden. Die Blockierlösung bestand aus 5% Magermilchpulver gelöst in TBST-Waschpuffer (TBS {150 mM NaCl; 10 mM Tris/HCl; pH 8}; 0,05% Tween). Nachfolgend wurde die Membran mit in Milch/ BSA (bovine serum albumin) verdünntem Primärantikörper inkubiert (über Nacht auf Schüttler im Kühlschrank bei 4°C). Am Folgetag wurden Waschdurchgänge (dreimal TBST für 10min) durchgeführt und die Membran für eine Stunde mit verdünntem Sekundärantikörper inkubiert. Hierauf wurde die Membran erneut mit TBST/PBS/TBS (2x 10 min/ 1x 5-10 min/ 1x 5min) gewaschen und anschließend mit Entwicklerlösung (ECL-Lösung, *GE Healthcare*) inkubiert. Dadurch emittiert der Protein-AK-Marker Komplex Licht (Chemilumineszenz), was einen aufgelegten Röntgenfilm (Amersham Hyperfilm ECL, *GE Healthcare*) schwärzte und die Proteinbanden so sichtbar machte. Dieser Vorgang konnte mit dem nächsten Antikörper wiederholt werden, nachdem die Membran gestriipt wurde: Dafür erfolgte mehrmalige Waschung mit PBS und anschließend Inkubation mit Re-Blot Plus Mild Lösung (10x; 1ml+9ml dH<sub>2</sub>O) für 15min auf dem Tisch-Schüttler. Nach zweimaliger PBS-Waschung (10min) wurde die Membran erneut in Blockierlösung (Zusammensetzung siehe Seite 21 oder 34 Zeile 5) inkubiert. Dies geschah für eine Stunde auf dem Tischschüttler. Danach konnte die Membran mit dem nächsten primären AK inkubiert werden (über Nacht auf Schüttler im Kühlschrank bei 4°C).

#### 2.2.4.2 Alizarin Färbung

Zur Beurteilung des osteogenen Differenzierungspotentials wurden DFVs der Passagen 8 und 14 in 48-well Platten (*Thermo-Scientific, Nunc*) ausgesät und mit Zellkulturmedium (Kontrolle) und osteogenem Differenzierungsmedium (STEMPRO Kit, *Gibco, Invitrogen cell culture*) kultiviert. Letzteres wurde angesetzt mit 90ml 1x Osteocyte/Chondrocyte Differentiation Basal Medium (STEMPRO Kit), 10ml 1x Osteogenesis Supplement (STEMPRO Kit) und 50µl Pen-Strep (*Sigma*). Nach drei Wochen in Kultur wurden die Zellen mit einer Alizarin Rot S (*Sigma-Aldrich*) Lösung behandelt. Dabei färbt Alizarin Kalziumablagerungen rot ein und macht auf diese Weise die Mineralisierung von Zellen sichtbar. Es wurde eine 2%ige Alizarin Rot S Lösung mit dH<sub>2</sub>O angesetzt. Der pH-Wert wurde unter Rühren (magnetischer Rührer, *Variomag*) mit Ammoniumhydroxid (Roth) auf 4,2 eingestellt und mit dem Tisch pH-Meter (*Mettler Toledo*) kontrolliert. Anschließend wurde die Lösung durch einen 0,2 µm Filter (*corning*) filtriert.

Vor Zugabe der Färbelösung wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, mit eisgekühltem 70% Ethanol fixiert (10min) und nochmals dreimal mit dH<sub>2</sub>O gewaschen. Die Zellfärbung mit

2%iger Alizarin Rot S Lösung erfolgte für 10-15 min bei Raumtemperatur. Im Anschluss daran wurden die Zellen gründlich mit PBS gewaschen und die gefärbten Kalziumareale mit der Mikroskopkamera SC30 dokumentiert.

### 2.2.4.3 Quantifizierung und statistische Auswertung

Die Westernblot-Gel-Aufnahmen wurden zunächst invertiert (Photoshop, *Adobe Systems*). Anschließend erfolgte die Subtraktion des Backgrounds und die Quantifizierung der Bandenintensität mit ImageJ (*Open Source*).

Um die Alizarin-Färbung zu quantifizieren, wurden die Alizarinkristalle durch Einwirken von 10%iger Cetylpyridiniumchloridmonohydrat Lösung aufgelöst (30min bei RT) und die Absorption der resultierenden Lösung bei einer Wellenlänge von 540nm gemessen. Das wurde mit dem Plattenreader von Tecan gemacht. Die Prüfung auf statistische Signifikanz erfolgte mit dem T-Test mit einem Signifikanzniveau von 0,05.

### 2.2.5 Stammzellmarker-Analyse mit der FACS-Durchflusszytometrie

Zellen der Passagen 7 und 18 wurden für eine Analyse von Stammzellmarkern mit fluoreszenzmarkierten, markerspezifischen AKs versehen und mittels FACS (fluorescence-activated cell sorting)-Durchflusszytometrie untersucht.

DFVs wurden aus Zellkulturflaschen entnommen (abgelöst mit Trypsin-Lösung), mit 1x PBS gewaschen und für 5min mit 1200 rpm abzentrifugiert. Für jeden zu untersuchenden Marker wurden 500.000 Zellen in 45µl Färbepuffer (2 nM EDTA, 0,5% BSA) resuspendiert. Zellen, bei denen STRO-1 untersucht werden sollte, wurden mit 90µl Färbepuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 5µl Antikörper-Lösung gegen die Marker CD44/ CD146/ CD105 und Stro-1 (Details zu den Antikörpern siehe Kapitel 2.1.6) wurde gevortext und anschließend im Dunkeln auf Eis inkubiert (45min). Die verwendeten Isotyp-Kontrollen sind ebenfalls im Kapitel 2.1.6 aufgelistet. Nach Inkubation wurde nochmals 1ml Färbepuffer zugegeben und für 5min bei 1200 rpm abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 0,5ml Färbepuffer resuspendiert und anschließend mit dem FACS-CANTO Durchflusszytometer (*Becton Dickinson Biosciences*) analysiert.

Um das intrazelluläre Protein Nestin durchflusszytometrisch zu untersuchen, erfolgte eine intrazelluläre Färbung. Dazu wurde eine Stammlösung mit 1% BSA und 2% Saponin in PBS angesetzt (10ml PBS mit 0,1g BSA und 0,2g Saponin). Die Zellen wurden mit 2% Paraformaldehyd (PFA, verdünnt mit dH<sub>2</sub>O) im Kühlschrank für 15min fixiert. Nach Zugabe von 1ml Waschpuffer (1:10 Verdünnung der Saponin-Stammlösung mit PBS) wurde abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Bei Raumtemperatur folgte für 15min die Resuspension in 200µl Permeabilitätspuffer

(1:5 Verdünnung der Saponin-Stammlösung mit PBS). Die Zellsuspension wurde erneut gewaschen (1ml Waschpuffer) und der Überstand nach Zentrifugation abgekippt. Der Antikörper gegen Nestin (Details zu den Antikörpern siehe Kapitel 2.1.6) wurde in Waschpuffer angesetzt (200µl + 10µl AK) und mit den Zellen (0,8µl pro Tube) für eine Stunde im Kühlschrank inkubiert. Anschließend wurde erneut 1ml Waschpuffer zugegeben und das Zellpellet nach Zentrifugation (Überstand abgekippt) in Färbepuffer resuspendiert. Die Analyse erfolgte ebenfalls mit dem FACS-CANTO Durchflusszytometer.

## 3. Ergebnisse

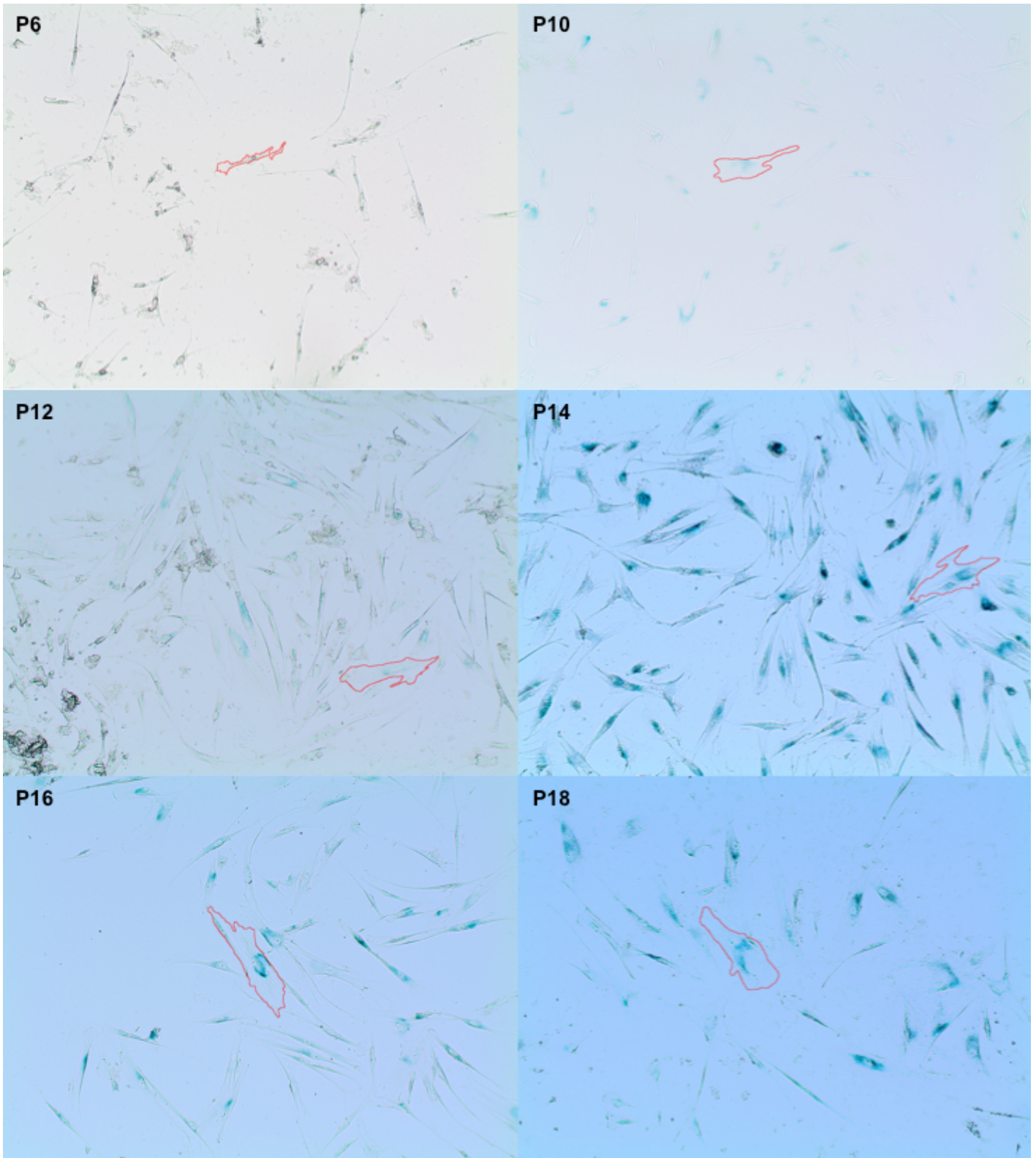
### 3.1 $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal) Färbung und Zellmorphologie

Veränderte Zellmorphologie und  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal) Aktivität gelten als charakteristische Eigenschaften seneszenten Zellen. In der vorliegenden Arbeit wurde  $\beta$ -Gal-Aktivität bei langzeitkultivierten DFVs mittels Färbenachweis gezeigt. In Passage 8 konnte vereinzelt leichte Färbung beobachtet werden. Mit steigender Passagenzahl nahm Farbintensität und Anzahl gefärbter Zellen deutlich zu, was besonders bei Passage 14 erkennbar war (Abbildungen 2A/B und 3A). Dennoch zeigten Zellen der Passagen 16 und 18 stagnierende oder sogar leicht abnehmende  $\beta$ -Gal-Aktivität (Abbildung 3A). Die morphologische Untersuchung  $\beta$ -Gal-positiver Zellen ergab zunehmend vergrößerte Zellformen (Abbildungen 2A/B und 3B), wobei geringe Veränderungen zwischen Passage 8 und 10 festgestellt wurden. Eine deutliche Zunahme des Zellumfanges zeigte sich bei Passage 12/ 14. Bei Zellen der höchsten Passagen war eine weite Streuung von Messwerten erkennbar (Abbildung 3B).

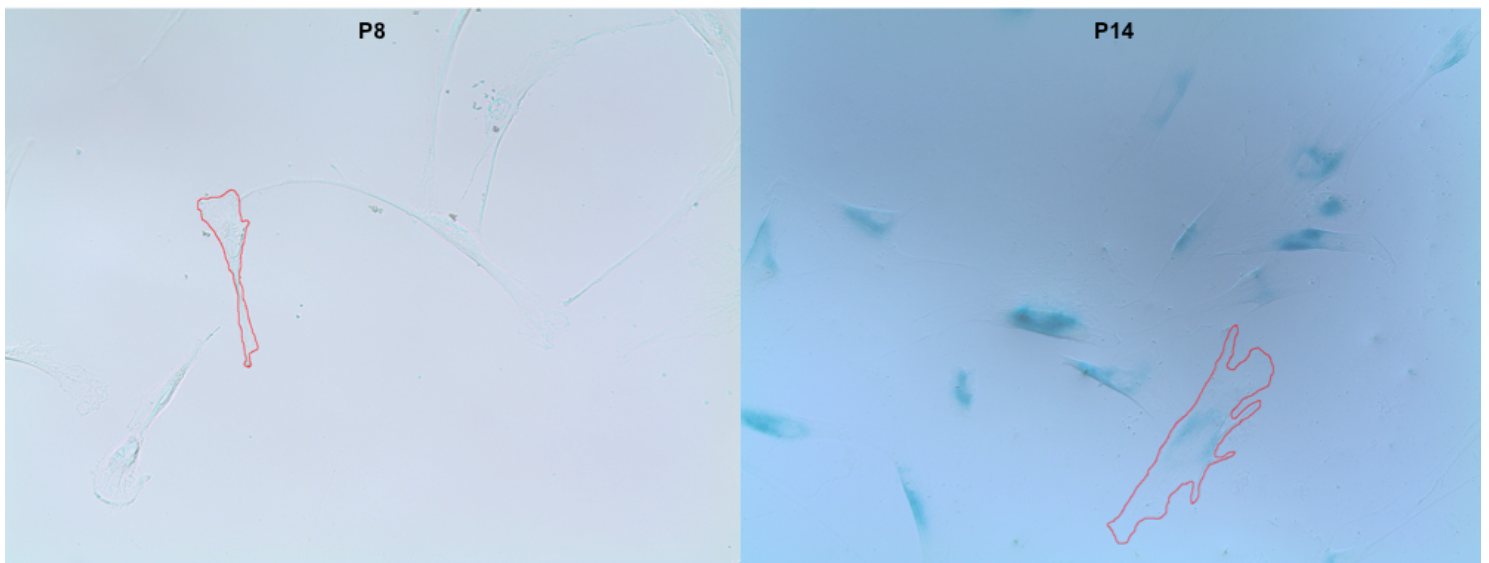
Die Werteverteilung von veränderter Zellmorphologie und  $\beta$ -Gal Färbung wurde, wie im Methodenteil beschrieben, geprüft: Der Kruskal-Wallis Test bestätigte bei beiden die statistische Signifikanz der über alle Passagen verteilten Werte. Die Nullhypothese (= die Werteverteilung über Passagen ist gleich) konnte somit abgelehnt werden.

Mit dem Mann-Whitney-U Test wurden die Werte der einzelnen Passagen untereinander auf statistische Signifikanz geprüft. Die Parameter (Nullhypothese, Signifikanzniveau) blieben dabei unverändert. Für die Zellmorphologie wurde die Nullhypothese bestätigt bei Vergleichen niedriger Passagen untereinander (8-10) und bei Vergleichen hoher Passagen untereinander (14-16-18). Beim Vergleich der Passagen 10-12 und 12-14 wurde die Nullhypothese abgelehnt (Abbildung 3B). Die Werteverteilung war auch signifikant, wenn niedrige Passagen mit höheren Passagen in Relation zueinander gesetzt wurden (z.B. 8-12; 8-14; 10-14; 10-16). Bei der  $\beta$ -Gal Färbung bestätigte die Werteverteilung zwischen Passagen 10-12 und 16-18 die Nullhypothese. Alle anderen Vergleiche zeigten signifikante Veränderungen (Abbildung 3A).

A)



B)

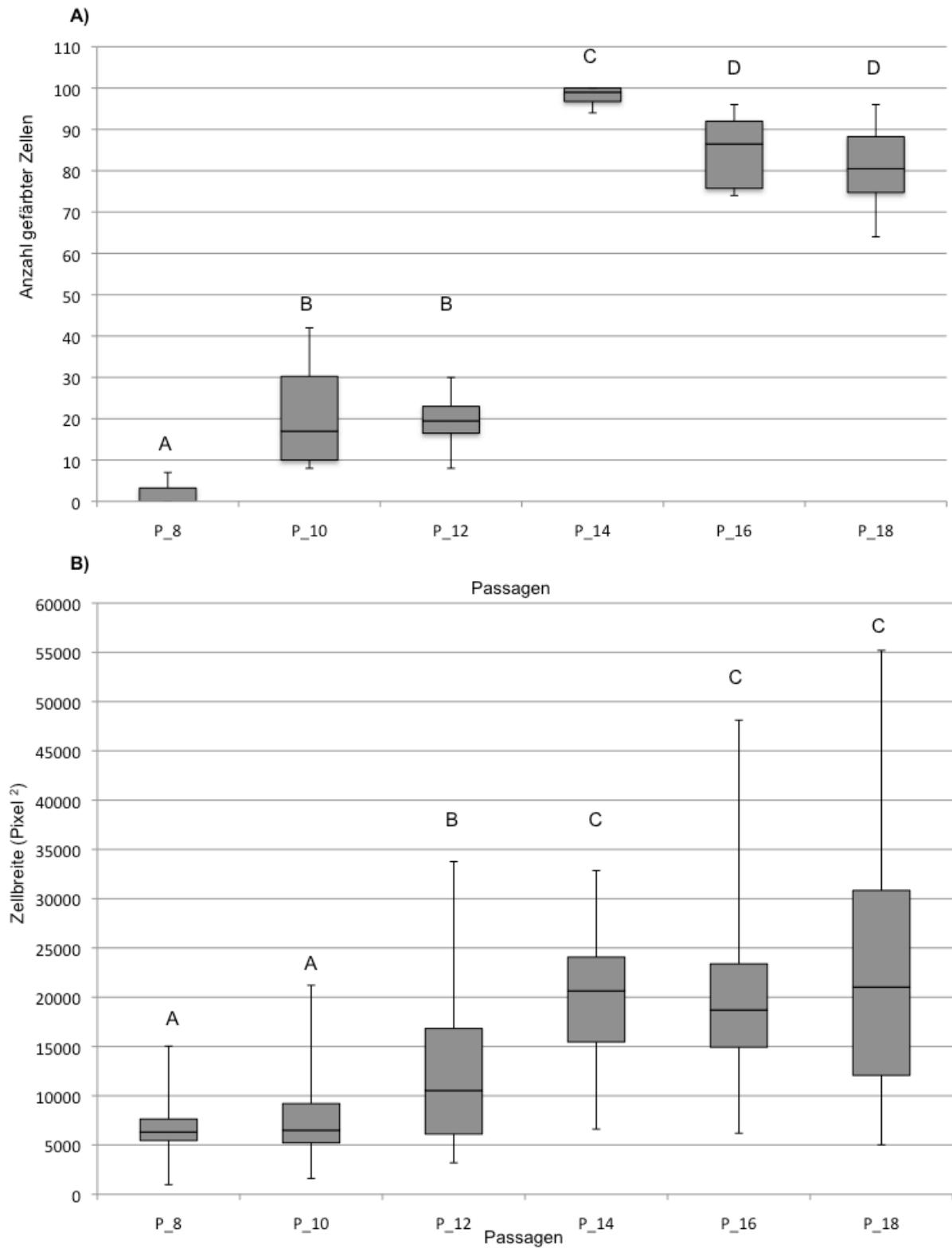


**Abbildung 2: Nachweis von  $\beta$ -Gal Aktivität und Morphologie bei DFVs nach Kultivierung bis Passage 18.**

Anfärbung der  $\beta$ -Galaktosidase Aktivität zeigt Zunahme von Färbintensität und -quantität, besonders in Passage 14. Morphologische Veränderungen während der Kultivierung stellen sich in Form vergrößerter Zellumfänge dar.

A):  $\beta$ -Gal Aktivität und Morphologie von DFVs der Passagen 10-18 im Vergleich zu Zellen der Passage 6. Vergrößerung: 100-fach.

B): Vergleich von DFVs der Passagen 8 und 14 mit veränderter Zellmorphologie und  $\beta$ -Gal Aktivität. Vergrößerung: 200-fach.



**Abbildung 3: Grafik der Anzahl gefärbter Zellen/ Zellgröße über die Passagen hinweg (inklusive Statistik).**

A): Boxplot, der die Zunahme  $\beta$ -Gal gefärbter Zellen bei steigender Passagenzahl zeigt

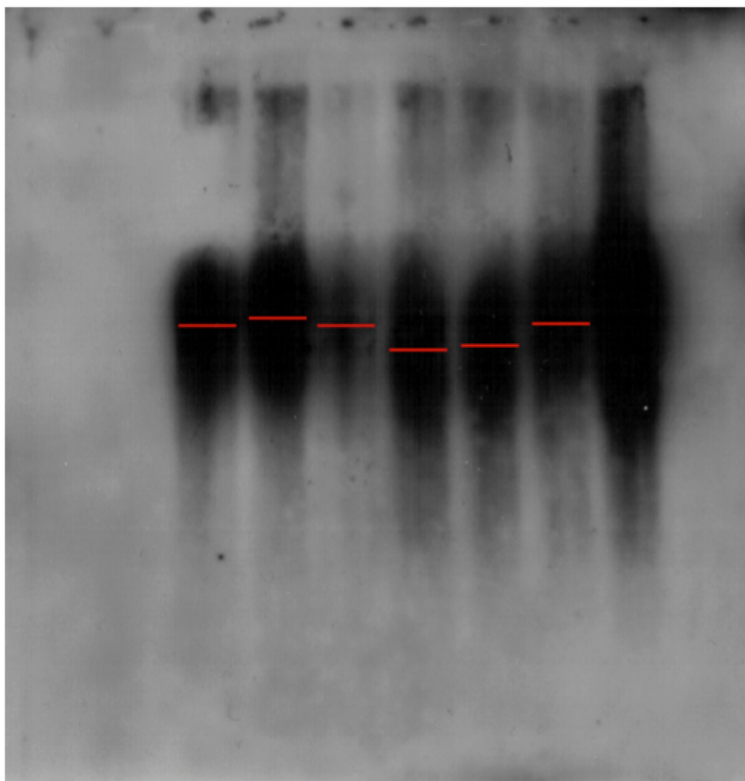
B): Boxplot, der die Größenveränderung der Zellen bei zunehmender Passagenzahl darstellt

A) und B): Passagen, die die Nullhypothese bestätigen (Mann-Whitney-U) sind zueinander gruppiert

### 3.2 Untersuchung der Telomerlänge

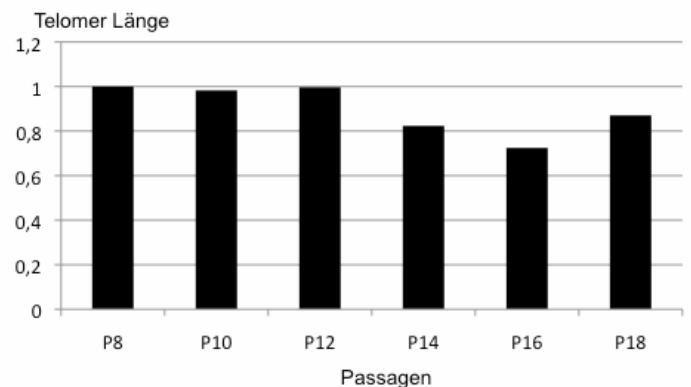
Die Telomerlänge der DFVs aus den Passagen 8 bis 18 wurde mit Southern Blot und Real-Time PCR untersucht. Beim Southern Blot zeigten die Banden der Gelelektrophorese, dass Telomere der Passage 14 und 16 den weitesten Weg im Gel zurücklegten (Abbildung 4A). Daraus konnte gefolgert werden, dass sie aufgrund verringerter Größe schneller und weiter durch das Gel wanderten. Der Southern Blot zeigte somit verkürzte Telomere in den Passagen 14 und 16 im Vergleich zu niederen Passagen. Dieses Ergebnis wurde mit der Real-Time PCR bestätigt. Sie dokumentierte verkürzte Telomerlängen ab Passage 14 (Abbildung 4B). Die Unterschiede der Telomerlängen korrelieren mit den Ergebnissen der vorangegangenen histologischen und morphologischen Untersuchung. Die ist ein weiteres Indiz für die Tendenz zur Seneszenz ab Passage 14.

A)



P8 P10 P12 P14 P16 P18 Ctr.

B)



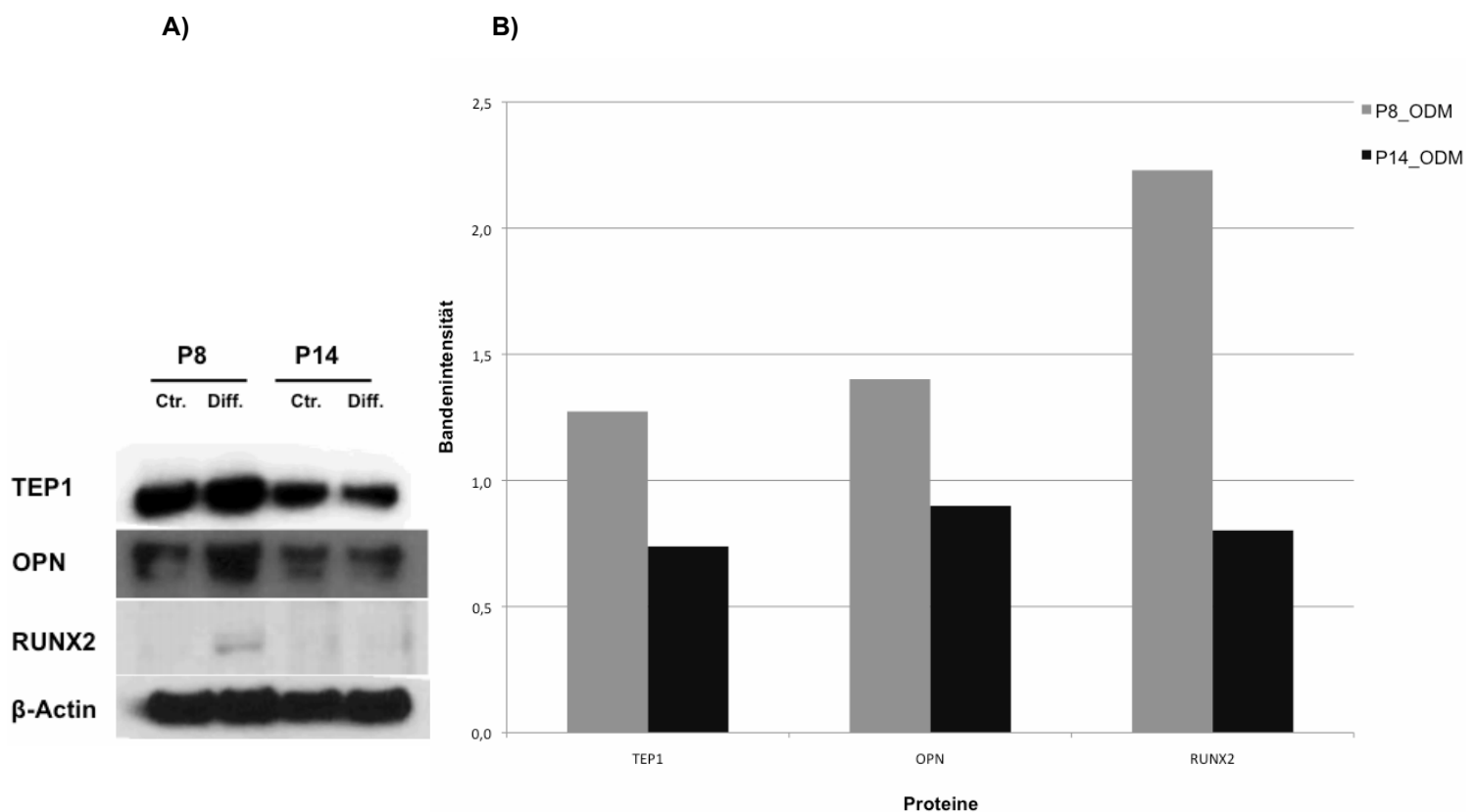
**Abbildung 4: Telomerlängen-Analyse von Zellen nach Kultivierung bis Passage 18.**

Southern Blot (A) und Real-Time PCR (B) zeigen Veränderungen der Telomerlänge von kultivierten DFVs.

### 3.3 Protein-Analyse und osteogene Differenzierbarkeit

Die bisherigen Ergebnisse stellten stärkere Veränderungen ab Passage 14 dar. Um das osteogene Differenzierungspotential von Zellen dieser Passage beurteilen zu können, erfolgte eine Analyse osteogener Marker via Western Blot (Abbildung 5) und Alizarinfärbung (Abbildung 6).

Die Proteine von osteogen differenzierten Zellen der Passagen 8 und 14 wurden mittels Western Blot untersucht. Dabei wurden TEP1 (telomerase associated proteine) und die osteogenen Differenzierungsmarker OPN (Osteopontin) und RUNX2 analysiert.  $\beta$ -Aktin diente zur Kontrolle. Die Zellen der hohen Passage zeigten verringerte TEP1-Expression, Herunterregulation von OPN (Osteopontin) und keine Induktion des osteogenen Differenzierungsmarkers RUNX2 (Abbildung 5A/B).



**Abbildung 5: Protein Analyse von osteogen differenzierten DFVs der Passagen 8 und 14.**

A): Western Blot

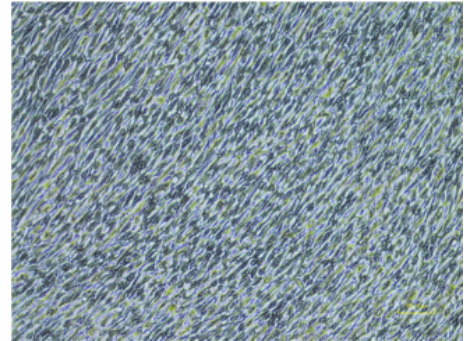
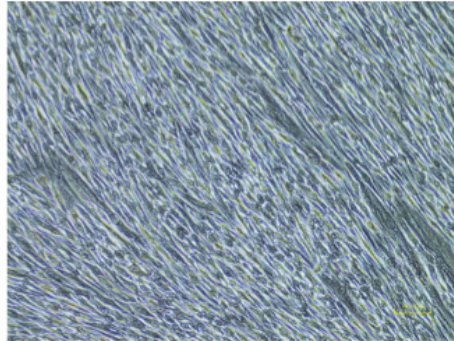
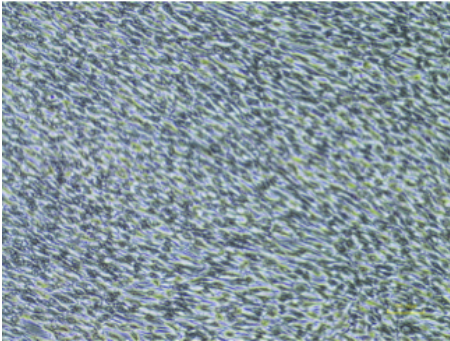
B) Quantifizierung des Western Blots mit unterschiedlicher Proteinexpression der Passagen 8 und 14.

A) und B): Zellen der höheren Passage (14) exprimierten weniger TEP1, zeigten Herunterregulation des osteogenen Differenzierungsmarkers OPN und keine Induktion des osteogenen Differenzierungsmarkers RUNX2.  $\beta$ -Aktin diente als Kontrolle.

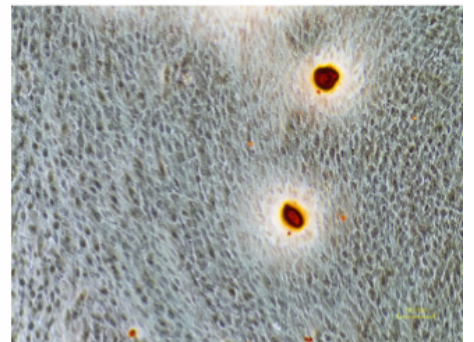
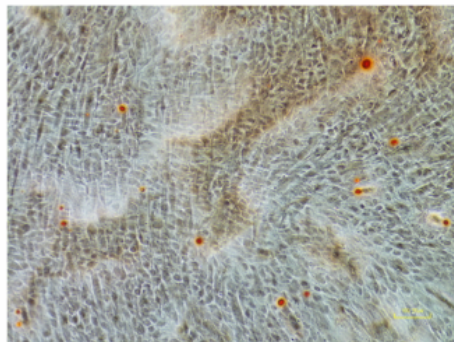
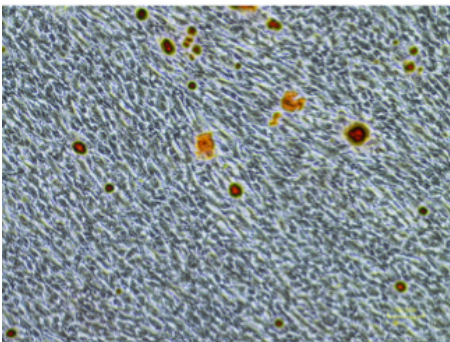
Mit der Alizarin-Färbung wurde der Nachweis erbracht, dass Zellen der Passage 8 mehr Kalziumablagerungen nach osteogener Differenzierung besaßen als Zellen der Passage 14. Unter Mikroskopkontrolle zeigten Zellen der Passage 8 eine zwar dezente aber stärkere Rotfärbung im Vergleich zu Zellen der Passage 14 (Abbildungen 6A, 6B). Das bestätigte die Quantifizierung der Färbung (Abbildung 6C). Die Kalziumablagerungen waren in Passage 14 signifikant verringert (T-Wert: 0,024) (Abbildung 6C). Nach Protein-Analyse und Alizarin-Färbung scheinen DFVs in höheren Passagen ein geringeres osteogenes Differenzierungspotential zu besitzen.

**A) Passage 8**

**DMEM**

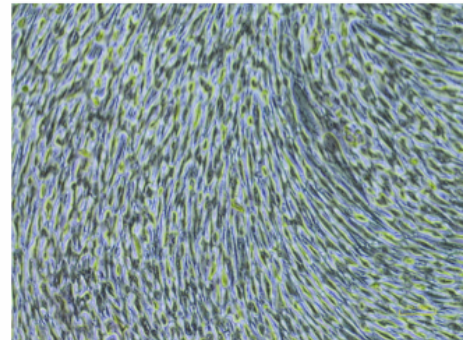
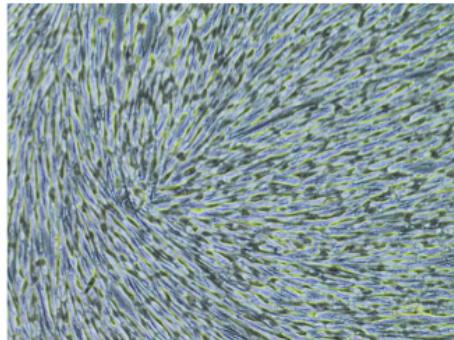
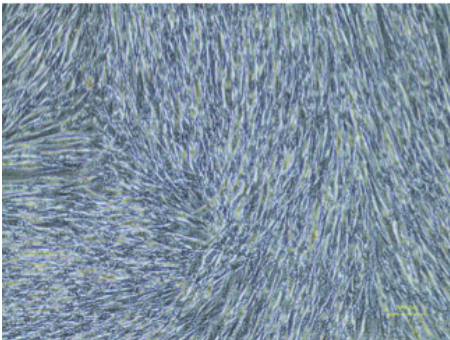


**ODM**

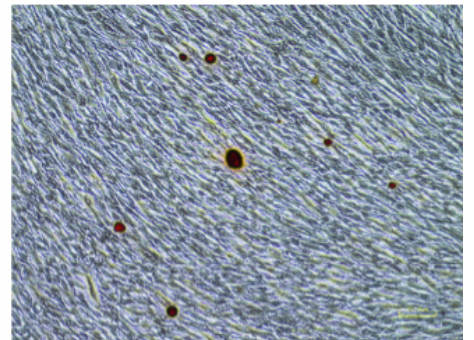
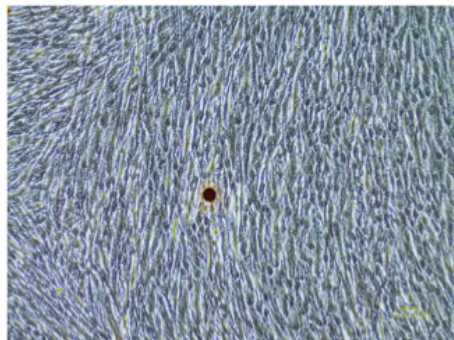
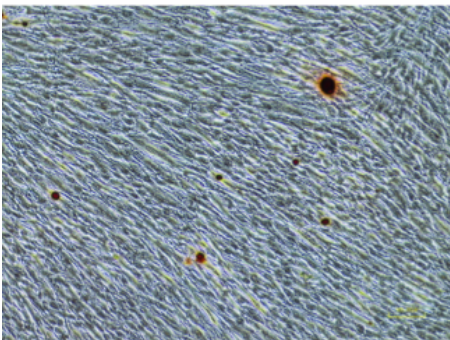


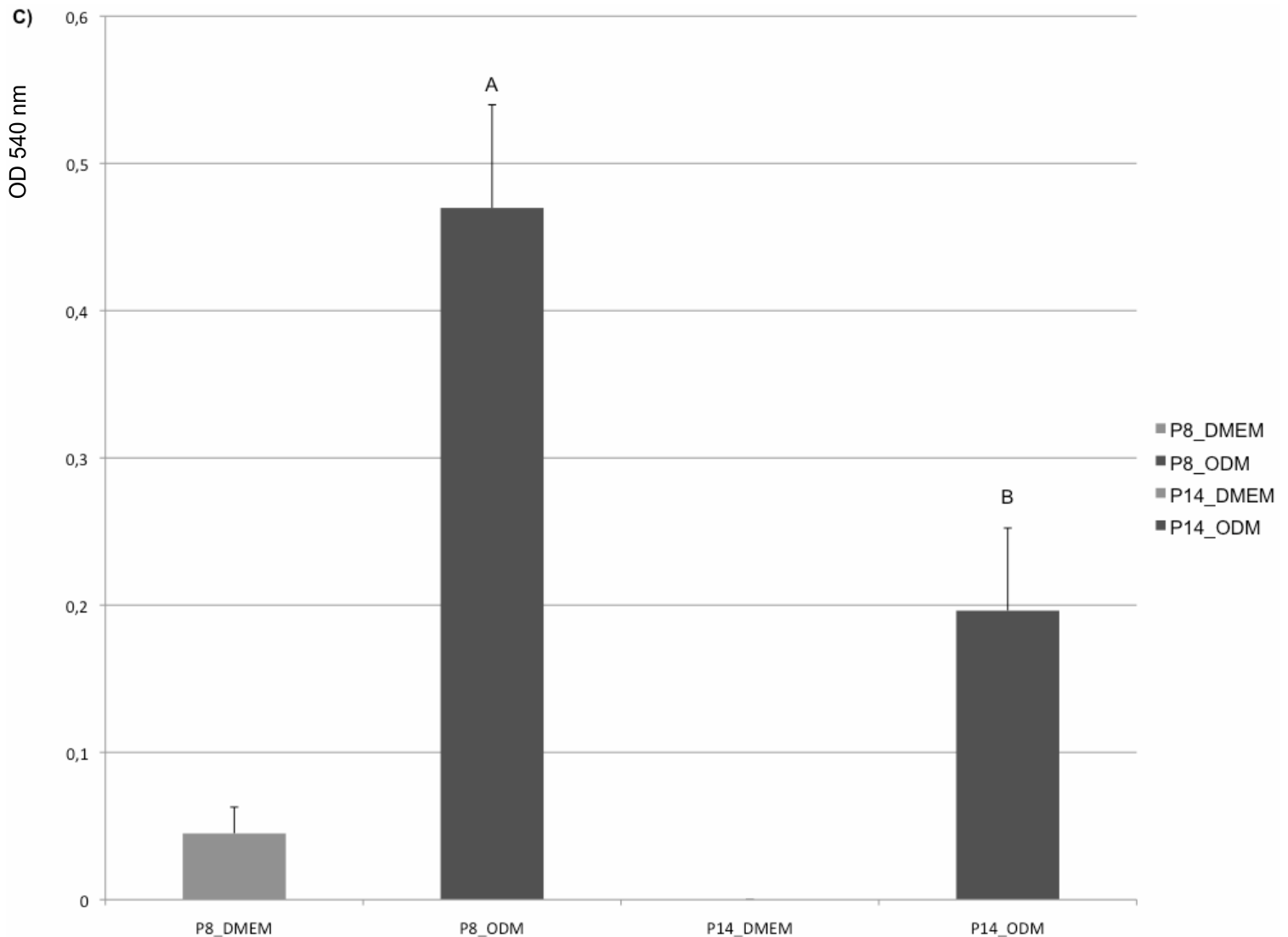
**B) Passage 14**

**DMEM**



**ODM**





**Abbildung 6: Alizarin-Färbung (mikroskopisch) osteogen differenzierter DFVs mit Quantifizierung.**

Stärkere Alizarinfärbung von Zellen der Passage 8 (6A) im Gegensatz zu Zellen der Passage 14 (6B). Kultivierung erfolgte mit osteogenem Differenzierungsmedium und Zellkulturmedium zur Kontrolle.

6C) zeigt Quantifizierung der Alizarinfärbung mit signifikantem Unterschied (T-Test) zwischen P8\_ODM und P14\_ODM.

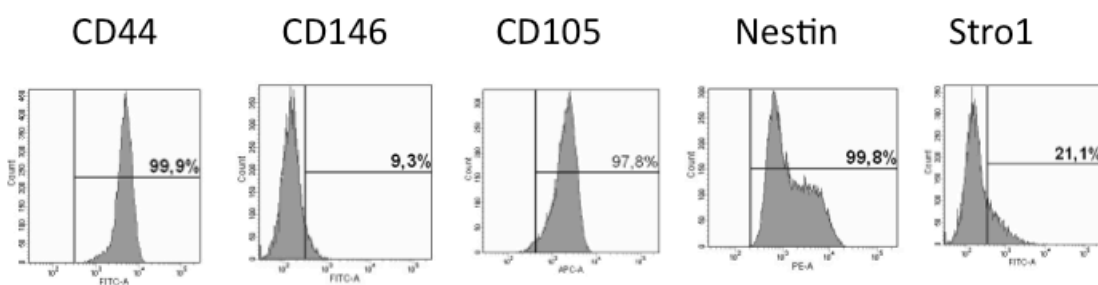
### 3.4 Stammzellmarker-Analyse mit der FACS-Durchflusszytometrie

Mit der FACS-Durchflusszytometrie wurden Stammzellmarker von DFVs untersucht. Dabei exprimierten Zellen der Passagen 7 und 18 die mesenchymalen Stammzellmarker CD44, CD105

und Nestin mit 97,8% - 99,9% positiver Zellen (Abbildung 7). Die Expression von CD146 und Stro1 war allgemein niedrig, aber unterschied sich im Passagenvergleich. Interessanterweise nahm die Zahl positiver Zellen für CD146 und Stro1 mit steigender Passage zu. Dies geschah deutlich bei CD146 und weniger deutlich bei Stro1 (Abbildung 7).

Darüber hinaus gab es keinen deutlichen Unterschied zwischen den Passagen bei der Expression von Nestin. Trotzdem konnten 2 charakteristische Peaks bei der Nestinproduktion in hochpassagierten Zellen beobachtet werden.

### Charakterisierung von hDFCs in Passage 7



### Charakterisierung von hDFCs in Passage 18

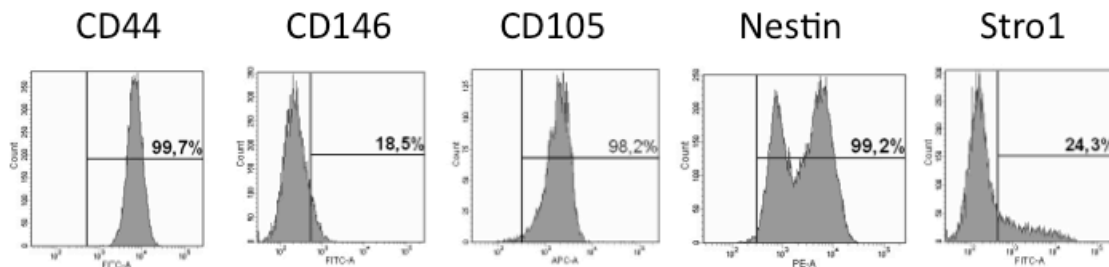


Abbildung 7: FACS-Analyse der DFVs (Passagen 7 und 18) für die Marker CD44, CD146, CD105, Nestin und Stro1)

## 4. Diskussion

### 4.1 Diskussion von Methodik und Ergebnissen

#### 4.1.1 $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal) Färbung und Zellmorphologie

SA- $\beta$ -Galaktosidase wird von dem GLB1-Gen als lysosomale  $\beta$ -Galaktosidase kodiert (189,190). Sie spaltet glykosidische Bindungen (Abspaltung endständiger Zuckerreste) von Glykokonjugaten wie Glykoproteinen (189,190). Die  $\beta$ -Gal Expression gilt als etablierter Biomarker für zelluläre Seneszenz in vitro und in vivo (191). Die in dieser Studie untersuchten Zellen zeigten vereinzelt dezente  $\beta$ -Gal Färbung in P8. Mit steigender Passagenzahl erhöhte sich die Farbtintensität und Anzahl gefärbter Zellen, besonders deutlich in P14. Stagnation oder sogar leichte Abnahme der  $\beta$ -Gal Aktivität war in P16 und P18 zu erkennen. Laut Dimri et al. wurde  $\beta$ -Gal Expression nur bei seneszenten Zellen nachgewiesen, nicht aber bei präseneszenten, ruhenden, enddifferenzierten oder immortalisierten Zellen (171). Dem entgegen beschreiben andere Studien  $\beta$ -Gal Expression auch bei nicht-seneszenten Zellen (113,192). Eine SA- $\beta$ -Gal Färbung scheint daher keine alleinige (stand-alone) Methode zur Identifizierung von Seneszenz zu sein. Gemäß Ma et al. beeinflussen scheinbar auch verschiedene Fixierlösungen der  $\beta$ -Gal Färbekits das Färbeergebnis: Eine Kombi-Lösung mit Glutaraldehyd lieferte beständige Färbeergebnisse, wohingegen Paraformaldehyde und Formaldehyde nur bei 4°C fixierten und Carnoy's Lösung die  $\beta$ -Gal Aktivität sogar störte (193). Das in der vorliegenden Arbeit angewandte Kit beinhaltet die Kombi-Fixierlösung (2% Glutaraldehyd , 20% Formaldehyd) und beruht auf einer zytochemischen Methode zur Anfärbung der  $\beta$ -Gal Aktivität. In einer Studie von Debacq-Chainiaux et al. wird diese mit einer fluoreszenz-basierenden Färbemethode verglichen (191). Laut der Studie ist letztgenannte Methode sensitiver und bietet in Verbindung mit Durchflusszytometrie eine quantitative Messung der  $\beta$ -Gal Aktivität pro Zelle. Bei der zytochemischen Methode wird die Auszählung 'manuell' mit Mikroskop durchgeführt, was aufwändig und subjektiv ist. Eine vergrößerte, flache Zellmorphologie ist ebenfalls ein wichtiger Seneszenzmarker (94). Steigende Passagenzahl ergab zunehmend vergrößerte Zellformen mit geringen Veränderungen zwischen P8 und P10 aber deutlicher Zunahme bei P12/ P14. Die Werteverteilung der Zellgrößen war in den höchsten Passagen weit gestreut. Bei der Markierung von Umfängen  $\beta$ -Gal gefärbter Zellen war die Erkennung von Zellgrenzen schwierig, wenn Zellen dichtgewachsen waren oder

sich überlagerten. Das begünstigte Messungenauigkeiten. Die Zahl der vermessenen Zellen wurde erhöht, um den Einfluss von Messungenauigkeiten auf das Ergebnis zu minimieren. Die statistisch signifikante Änderung von  $\beta$ -Gal Färbung/Aktivität und Morphologie über alle Passagen gesehen (Kruskal-Wallis-Test) zeigt, dass DFVs in höheren Passagen zwei typische Seneszenz-Eigenschaften besitzen. Eine wichtige Rolle scheint dabei Passage 14 zu spielen. Ab hier war eine intensive Blaufärbung nahezu aller Zellen erkennbar, was auf einen sprunghaften Anstieg der  $\beta$ -Gal Aktivität hindeutete. Das gehäufte Auftreten vergrößerter Zellen in P14 stützt diese These. Außerdem ist in P16 und P18 auffällig, dass Zellgrößen weit gestreut sind und sowohl Größenzuwachs als auch  $\beta$ -Gal Aktivität stagnieren oder leicht abfallen. Ursache dafür könnte eine Immortalisierung der Zellen sein, ausgelöst durch Mutation während der Langzeitkultivierung. Das würde die These von Dimri et al. stützen, dass immortale Zellen keine  $\beta$ -Gal-Expression aufweisen (171). Interessante Parallelen zu den hier präsentierten Ergebnissen von DFVs zeigt eine aktuelle Studie zur  $\beta$ -Gal Aktivität bei dentalen Pulpastammzellen. Dort stoppt die Zellteilung in P14, nachdem in P13 eine maximale Anzahl seneszenten Zellen erreicht wurde (194). Bei einer anderen DPSC-Zelllinie dieser Studie proliferieren Zellen über P14 hinaus und zeigen in den Folgepassagen ebenfalls einen Abfall der  $\beta$ -Gal Aktivität, das auch dort mit spontaner Immortalisierung interpretiert wurde (194).

#### 4.1.2 Untersuchung der Telomerlänge

In der heutigen Literatur werden verschiedene Verfahren für die Analyse von Telomerlängen aufgeführt (195). Der Southern Blot (TRF-Analyse) ist die älteste Methode und gilt als Goldstandard (196). In der vorliegenden Arbeit gehörte er zur gewählten Methode. Nachteilig ist seine hohe Komplexität und der Bedarf großer Probenmengen, weshalb sich laut einer aktuellen Studie die RT-PCR als neue Methode der Wahl etabliert hat (197). Beide Verfahren scheinen ähnliche Reproduzierbarkeit zu besitzen, was aber noch umstritten ist (197–199). Die RT-PCR wurde hier ergänzend zum Southern Blot durchgeführt und deren Ergebnisse miteinander verglichen. Dabei ergab der Southern Blot verkürzte Telomere in P14 und P16 im Vergleich zu niederen Passagen. Die RT-PCR dokumentierte verkürzte Telomerlängen ab P14. Beide Methoden erbrachten übereinstimmende Ergebnisse und wiesen P14 als kritischen Zeitrahmen aus. Im Einklang mit  $\beta$ -Gal Färbung und morphologischer Untersuchung bestärkte die Telomeranalyse somit eine Tendenz zur Seneszenz ab P14. Auch zeigten beide Methoden eine Zunahme der Telomerlänge in P18. Die Ursache dafür könnte in der Immortalisierung der Zellen mit Hochregulierung von Telomeraseaktivität liegen (200). Bei niedrig passagierten DFVs (P3) ist nach Jeon et al. die relative Telomeraseaktivität im Vergleich zu anderen DSCs signifikant gering (201). DPaSCs (SCAP) ließen laut deren Studie die größte Telomeraseaktivität erkennen. Jeon et al. erstellte auch einen

Vergleich der Telomerlängen von niedrig passagierten DFVs, DPaSCs (SCAP), DPSCs und MSCs des Knochenmarks, was aber keine signifikanten Unterschiede hervorbrachte (201).

In der vorliegenden Arbeit wurden Telomerlängen von DFVs verschiedener Passagen untersucht. Trotz deutlich erkennbarer Veränderungen waren die Telomerunterschiede nicht so stark ausgeprägt, wie das nach den vorangegangenen Versuchen zu vermuten gewesen wäre. Damit bestätigten beide Methoden die von Fesahat et al. durchgeführte Southern-Blot-Telomer-Analyse, die ebenfalls tendenzielle Änderungen ergab (186). Grund dafür könnte beim Southern Blot ein dokumentiertes Bindungsproblem zwischen sehr kurzen Telomeren und der Hybridisierungsprobe sein (196). Das klingt plausibel, erklärt aber nicht das übereinstimmende Ergebnis der Zweitmethode (RT-PCR). Zukünftige Studien könnten daher erforschen, ob dieses Ergebnis methodenbedingt ist oder ob andere Ursachen vorliegen. Dafür würde sich die STELA-Methode (single telomere length analysis) anbieten, da sie im Gegensatz zu Southern Blot und RT-PCR einzelne, individuelle Telomerlängen misst (195,196).

#### **4.1.3 Protein-Analyse und osteogene Differenzierbarkeit**

Die Signalstärke/Bandenintensität des Western Blots erscheint besonders bei der  $\beta$ -Actin-Kontrolle zu stark, was einer zu hohen AK-Konzentration geschuldet sein könnte. Die Auswertbarkeit des Western Blots wurde dadurch aber nicht beeinträchtigt. Die Zellen der hohen Passage zeigten verringerte TEP1-Expression, Herunterregulation von OPN (Osteopontin) und keine Induktion des osteogenen Differenzierungsmarkers RUNX2. Die TEP1-Expression der DFVs wurde untersucht, da Telomerase eine wichtige Rolle bei dem Erhalt der Telomerlänge spielt. TEP1 interagiert mit den Telomerase-Untereinheiten hTR und hTERT (202). Obwohl Liu et al. die Beteiligung von TEP1 bei der in vivo Telomerase-Aktivität bezweifelt (203), verdeutlichte Li et al., dass nicht nur TERT sondern auch TEP1 essenziell ist für den Telomerase-Komplex in humanen Tumorzellen (204). Die herunterregulierte TEP1-Expression in P14 kann somit zur Verringerung der Telomeraseaktivität beitragen was in Telomerverkürzung kulminiert. Die Studie von Simonsen et al. weist hin auf die Bedeutung von Telomerase für das Hinauszögern von Seneszenz. Hier verhindert die Telomerase-Expression in hMSCs eine seneszenz-assoziierte Einschränkung der Osteoblastenfunktion (205). OPN ist in vielen physiologischen und pathologischen Prozessen involviert (206,207). Die Hemmung von OPN bewirkt Einschränkung von Zellwachstum und Tumorbildung (208). Pazolli et al. berichtete, dass OPN das Zellwachstum präneoplastischer Zellen fördert (209). In dieser Arbeit ergaben DFVs in hoher Passage eine Herunterregulierung von OPN, was als Folge von tumorsuppressiver Seneszenz interpretiert werden könnte. Dementgegen zeigte Pazolli et al. aber seneszente Fibroblasten mit erhöhten OPN Werten (209). Eine wichtige Funktion hat OPN als osteogener Differenzierungsmarker. Die Herunterregulierung von OPN lässt auf ein verringertes osteogenes Differenzierungspotential von

DFVs in P14 schließen. Die fehlende/ kaum erkennbare RUNX2-Expression in P14 stützt diese These. RUNX2 ist für Osteoblasten-Differenzierung essenziell (210). Auch bei seneszenten hPDLFs (human periodontal ligament fibroblasts) ist RUNX2 herunterreguliert (211).

Bei der Alizarin-Färbung zeigte die Mikroskopkontrolle eine dezente aber stärkere Rotfärbung von Zellen aus P8 im Vergleich zu Zellen aus P14. Die Quantifizierung der Alizarin-Färbung ließ eine eindeutige Reduzierung des osteogenen Differenzierungspotentials bei Zellen höherer Passage erkennen. Der T-Test bestätigte den signifikanten Unterschied der erhaltenen Werte. Das Ergebnis der Alizarin-Färbung stützte somit die Aussagen der vorangegangenen Versuche. Mit der Bindung an Kalziumablagerungen macht Alizarin die späten Differenzierungsanzeichen sichtbar, weshalb die Alizarin-Färbung in der vorliegenden Arbeit nach drei Wochen osteogener Differenzierung durchgeführt wurde. In einer Studie verzeichnete Feldhaus et al. die ersten späten Differenzierungs-Anzeichen frühestens nach drei Wochen (212). In einem weiteren Versuchsansatz setzte er die Alizarin-Färbung nach 4 Wochen an, wobei beide Versuchsansätze mit Zellen (DFVs) der Passage 6 durchgeführt wurden (212). Demnach besteht die Möglichkeit, dass höher passagierte DFVs eine längere Differenzierungszeit als drei Wochen benötigen, um Kalziumablagerungen zu bilden.

Ein Vorteil der Färbemethode mit Alizarin Rot ist, dass der Farbstoff der quantitativen Kalziumkomplex-Anfärbung zur anschließenden Quantifizierung herausgelöst werden kann. Dazu wurde Cetylpyridiniumchloridmonohydrat-Lösung verwendet. Für diese Standardmethode postuliert Gregory et al. eine Modifikation, die besonders bei schwacher Färbung vorteilhaft sein soll und eine 3-fach höhere Sensitivität gegenüber der Standardmethode verspricht: Das Auslösen des Farbstoffes geschieht dabei mit 10%iger Essigsäure, der Ausgleich des pH-Wertes erfolgt mit Amoniumhydroxyd (213).

#### **4.1.4 Stammzellmarker-Analyse mit der FACS-Durchflusszytometrie**

Die für Durchflusszytometrie ausgewählten Stammzellmarker werden typischerweise von mesenchymalen Stammzellen exprimiert und verdeutlichen so die Zusammengehörigkeit der MSC-Zellarten (214). Die Expression der Marker Nestin, Stro1, CD44 und CD105 ist bei DFVs bereits dokumentiert (62,215,216) und belegt Stammzellzugehörigkeit (‘stemness’). In einer aktuellen Studie wurden DFVs der niedrigen Passage 6 (Nestin: Passage 4) ebenfalls mit der FACS-Durchflusszytometrie (im selben Labor) analysiert (217). Untersucht wurden dabei die Marker CD44, CD146, CD105, Nestin und Stro1. In der hier vorliegenden Arbeit zeigten DFVs der niedrigen Passage (P7) vergleichbare Werte für CD44, CD105 und Nestin. Stro1 und CD146 sind hier stärker exprimiert, obgleich CD146 in beiden Studien ein sehr geringes Expressionsniveau hat. Die vorliegende Arbeit verdeutlicht, dass auch nach Langzeitkultivierung keine merklichen Unterschiede bei der Expression von Stro1, CD44 und CD105 vorliegen. Die

Nestin-Expression wies keinen deutlichen Unterschied auf zwischen P7 und P18. Dennoch ergab sie zwei charakteristische Peaks in P18, die in P7 nicht zu erkennen waren. Es wird berichtet, dass herunterreguliertes Nestin in Stresssituationen wieder hochreguliert wird (218). Das passt zu dem hier dargestellten Expressionsmuster und verdeutlicht den Zellstress bei tendenziell seneszenten Zellen. In einer früheren Studie waren DFVs negativ für CD146 (216). Interessant ist, dass in der vorliegenden Arbeit zum einen CD146 nachgewiesen werden konnte und zum anderen, dass sich die Expression in P18 nahezu verdoppelt hat. Die Hypothese, dass Seneszenz CD146-abhängig ist, kann somit aufgestellt werden. Welche Rolle CD146 dabei spielt, könnte Gegenstand zukünftiger Studien sein.

## 4.2 Schlussfolgerung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit liefert neue Erkenntnisse zur Seneszenz von langzeitkultivierten dentalen Follikelvorläuferzellen. So scheint Passage 14 eine kritische Phase bei der Ausbildung seneszenten Tendenzen bei DFVs zu sein. Dies wird bekräftigt durch: Aktivität der  $\beta$ -Galaktosidase, morphologische Zellveränderungen, vermindertes osteogenes Differenzierungspotential sowie Herunterregulierung von osteogenen Markern und Telomerase-assoziiertem TEP1. Die Untersuchung der Telomerlängen zeigt ebenfalls Telomerverkürzung ab Passage 14. Im Passagenvergleich sind Telomerverkürzungen tendenziell, was die von Fesahat et al. (186) postulierten Ergebnisse bekräftigt. Weiterhin lässt sich nach Stammzellmarker-Analyse die Hypothese aufstellen, dass CD146 eine Rolle bei der Entstehung von seneszenten DFVs spielt. DFVs weisen bis Passage 18 somit keine stark ausgeprägte, zellzyklushemmende Seneszenz auf. Der Fokus zukünftiger Studien sollte daher auf Passagen größer 18 liegen. Hier könnten Zellzyklusanalysen und Proliferationsstudien Aussagen über die Teilungsfähigkeit von hochpassagierten DFVs machen. Ebenso sind weiterführende Studien nötig, welche die Bedeutung von CD146 für die Entstehung von Seneszenz untersuchen.

## 5. Zusammenfassung

Die Seneszenz und ihre Auswirkung auf zellulärer Ebene wurde bereits in vielen Studien untersucht. Sie spielt eine wichtige Rolle in physiologischen Prozessen und bei der in vitro Zellkultivierung. So hat Seneszenz Einfluss auf den Alterungsprozess des Organismus, gilt aber auch als wichtiger Tumorsuppressor-Mechanismus. Bei der in vitro Zellexpansion von adulten Stammzellen ist Seneszenz ein limitierender Faktor, da sie zu begrenzter Lebenserwartung, Einschränkung der Differenzierungsfähigkeit und verringertem Proliferationspotential führt. In der modernen Zahnmedizin stellen adulte dentale Stammzellen wie DFVs vielversprechende zukünftige Behandlungsalternativen dar, beispielsweise für die Regeneration parodontalen Gewebes. Eine in vitro Expansion dieser Zellen ist jedoch unumgänglich, wobei Seneszenzmarker von DFVs bisher noch nicht genau untersucht sind.

Daher war es ein Ziel dieser Arbeit, die Veränderung von Telomerlängen bei DFVs genauer zu untersuchen, wozu Fesahat et al. bereits erste Erkenntnisse lieferte. Ein zweites Ziel bestand darin, weitere Seneszenzmarker zu analysieren, um zu prüfen, ob DFVs in hohen Passagen seneszent werden.

Für die Versuche wurden DFVs bis P18 hochpassagiert. Southern Blot und Real-Time PCR dienten zur Analyse der Telomerlänge. Beide Methoden zeigten Telomerverkürzung ab P14. Die Telomerunterschiede waren im Passagenvergleich aber nicht deutlich ausgeprägt. Das Enzym Telomerase spielt eine wichtige Rolle bei dem Erhalt der Telomerlänge. Telomerase-assoziiertes TEP1 wurde mittels Western Blot untersucht. Dabei zeigten Zellen von P14 eine Herunterregulation von TEP1. Die Prüfung weiterer Seneszenzmarker umfasste die Untersuchung von SA- $\beta$ -Gal-Aktivität und Zell-Morphologie. Bei der  $\beta$ -Gal Färbung erhöhte sich mit steigender Passagenzahl die Farbintensität und Anzahl gefärbter Zellen, besonders deutlich in P14. Stagnation oder sogar leichte Abnahme der  $\beta$ -Gal Aktivität war in P16 und P18 zu erkennen. Die steigende Passagenzahl ergab auch zunehmend vergrößerte Zellformen, besonders bei P12/P14. In den höchsten Passagen war die Werteverteilung zudem weit gestreut. Die Analyse des osteogenen Differenzierungspotentials erfolgte mit Western Blot und Alizarin-Färbung. Western Blot verdeutlichte Herunterregulation (OPN) sowie keine Induktion (RUNX2) dieser osteogenen Differenzierungsmarker in P14. Bei der Alizarin-Färbung zeigte sich eine dezente aber stärkere Rotfärbung von Zellen aus P8 im Vergleich zu Zellen aus P14. Ihre Quantifizierung belegte eine eindeutige Reduzierung des osteogenen Differenzierungspotentials bei Zellen höherer Passage. Der T-Test bestätigte den signifikanten Unterschied der erhaltenen Werte. Mit der FACS-Analyse wurde die Stammzellmarker-Expression untersucht. Nach Langzeitkultivierung lagen keine

merklichen Unterschiede bei der Expression von Stro1, CD44 und CD105 vor. Auch die Nestin-Expression wies keinen deutlichen Unterschied auf. Dennoch ergab sie zwei charakteristische Peaks in P18, die in P7 nicht zu erkennen waren. Interessant ist, dass CD146 nachgewiesen werden konnte und dass sich die Expression in P18 nahezu verdoppelt hat.

Die vorliegende Arbeit liefert neue Erkenntnisse zur Seneszenz von langzeitkultivierten dentalen Follikelvorläuferzellen. So scheint P14 eine kritische Phase bei der Ausbildung seneszenten Tendenzen bei DFVs zu sein. Die Telomerverkürzungen sind tendenziell, was die von Fesahat et al. (186) postulierten Ergebnisse bekräftigt. Weiterhin lässt sich nach Stammzellmarker-Analyse die Hypothese aufstellen, dass CD146 eine Rolle bei der Entstehung von seneszenten DFVs spielt.

DFVs zeigen bis Passage 18 somit keine stark ausgeprägte, zellzyklushemmende Seneszenz. Der Fokus zukünftiger Studien sollte daher auf Passagen größer 18 liegen. Die Teilungsfähigkeit hochpassagierter DFVs könnte mit Zellzyklusanalysen und Proliferationsstudien analysiert werden. Ebenso sind weiterführende Studien nötig, welche die Bedeutung von CD146 für die Entstehung von Seneszenz untersuchen.

## 6. Referenzen

1. Haeckel EHPA. Natürliche Schöpfungsgeschichte. Gemeinverständliche wissenschaftliche Vorträge über die Entwicklungslehre im Allgemeinen und diejenige von Darwin, Goethe, und Lamarck im Besonderen .. [Internet]. Berlin: Reimer; 1868 [cited 2014 Oct 20]. 618 p. Available from: <http://archive.org/details/natrlichesch1868haec>
2. Haeckel E. Biologische Studien: Studien zur Gastraea-Theorie. Dufft; 1877. 99 p.
3. Ramalho-Santos M, Willenbring H. On the origin of the term “stem cell.” *Cell Stem Cell*. 2007 Jun 7;1(1):35–8.
4. Der Beitrag Artur Pappenheims zur Hämatologie um die Jahrhundertwende [Internet]. 2001. Available from: <http://www-brs.ub.ruhr-uni-bochum.de/netahtml/HSS/Diss/DinserRicarda/diss.pdf>
5. Calegari F, Waskow C. *Stem Cells: From Basic Research to Therapy: Basic Stem Cell Biology, Tissue Formation during Development, and Model Organisms*. CRC Press; 2014. 672 p.
6. Maximow AA. The lymphocyte as a stem cell, common to different blood elements in embryonic development and during the post-fetal life of mammals. *Cell Ther Transplant*.
7. Konstantinov IE. In Search of Alexander A. Maximow: The Man Behind the Unitarian Theory of Hematopoiesis. *Perspect Biol Med*. 2000;43(2):269–76.
8. Till JE, McCulloch EA. A Direct Measurement of the Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells. *Radiat Res*. 2010 Dec 8;175(2):145–9.
9. Becker AJ, McCULLOCH EA, Till JE. Cytological Demonstration of the Clonal Nature of Spleen Colonies Derived from Transplanted Mouse Marrow Cells. *Nature*. 1963 Feb 2;197(4866):452–4.
10. Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. *Cell*. 2004 Mar 5;116(5):639–48.
11. Potten CS, Loeffler M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Dev Camb Engl*. 1990 Dec;110(4):1001–20.
12. Seaberg RM, van der Kooy D. Stem and progenitor cells: the premature desertion of rigorous definitions. *Trends Neurosci*. 2003 Mar;26(3):125–31.
13. Mao JJ. Stem cells and the future of dental care. *N Y State Dent J*. 2008 Mar;74(2):20–4.
14. Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T. Stem cells find their niche. *Nature*. 2001 Nov 1;414(6859):98–104.
15. Li L, Xie T. Stem cell niche: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2005;21:605–31.
16. Scadden DT. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature*. 2006 Jun 29;441(7097):1075–9.

17. Tomás Y Garrido GM, López Moratalla N. [From the totipotency of the zygote to mature stem cells and reserve cells]. *Cuad Bioét Rev Of Asoc Esp Bioét Ética Médica*. 2009 Dec;20(70):317–31.
18. Kolios G, Moodley Y. Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respir Int Rev Thorac Dis*. 2013;85(1):3–10.
19. Shilpa PS, Kaul R, Sultana N, Bhat S. Stem cells: Boon to dentistry and medicine. *Dent Res J*. 2013;10(2):149–54.
20. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*. 2007 Nov 30;131(5):861–72.
21. Kim D, Kim C-H, Moon J-I, Chung Y-G, Chang M-Y, Han B-S, et al. Generation of Human Induced Pluripotent Stem Cells by Direct Delivery of Reprogramming Proteins. *Cell Stem Cell*. 2009 Jun 5;4(6):472–6.
22. Yamanaka S. Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2007 Jun 7;1(1):39–49.
23. Teng S, Liu C, Krettek C, Jagodzinski M. The Application of Induced Pluripotent Stem Cells for Bone Regeneration: Current Progress and Prospects. *Tissue Eng Part B Rev*. 2013 Oct 9;
24. Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol*. 2008 Jan;26(1):101–6.
25. Denker H-W. Potentiality of embryonic stem cells: an ethical problem even with alternative stem cell sources. *J Med Ethics*. 2006 Nov;32(11):665–71.
26. Resnik DB. Embryonic stem cell patents and human dignity. *Health Care Anal HCA J Health Philos Policy*. 2007 Sep;15(3):211–22.
27. Yen AH-H, Sharpe PT. Regeneration of teeth using stem cell-based tissue engineering. *Expert Opin Biol Ther*. 2006 Jan;6(1):9–16.
28. Morsczeck C, Reichert TE, Völlner F, Gerlach T, Driemel O. Stand der humanen dentalen Stammzellforschung. *Mund Kiefer Gesichtschir*. 2007 Nov 1;11(5):259–66.
29. Hall BK. Germ Layers and the Germ-Layer Theory Revisited. In: Hecht MK, Macintyre RJ, Clegg MT, editors. *Evolutionary Biology* [Internet]. Springer US; 1998 [cited 2015 Aug 15]. p. 121–86. Available from: [http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4899-1751-5\\_5](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4899-1751-5_5)
30. Teng L, Labosky PA. Neural crest stem cells. *Adv Exp Med Biol*. 2006;589:206–12.
31. Ulmer FL, Winkel A, Kohorst P, Stiesch M. Stem cells—prospects in dentistry. *Schweiz Monatsschrift Für Zahnmed Rev Mens Suisse Odonto-Stomatol Riv Mens Svizzera Odontol E Stomatol SSO*. 2010;120(10):860–83.
32. Morsczeck C, Schmalz G, Reichert TE, Völlner F, Galler K, Driemel O. Somatic stem cells for regenerative dentistry. *Clin Oral Investig*. 2008 Jun;12(2):113–8.

33. Koch PDMJ. Entwicklung der Zähne. *Med Genet.* 2007 Nov 1;19(4):392–8.
34. Premkumar S. *Textbook of Craniofacial Growth.* JP Medical Ltd; 2011. 397 p.
35. Yao S, Pan F, Prpic V, Wise GE. Differentiation of Stem Cells in the Dental Follicle. *J Dent Res.* 2008 Aug 1;87(8):767–71.
36. Volponi AA, Pang Y, Sharpe PT. Stem cell-based biological tooth repair and regeneration. *Trends Cell Biol.* 2010 Dec;20-206(12-6):715–22.
37. Knochenersatzmaterialien in der oralen Implantologie [Internet]. ZWP online - Das Nachrichtenportal für die Dentalbranche. [cited 2015 Dec 31]. Available from: <http://www.zwp-online.info/de/fachgebiete/implantologie/gtr-und-gbr/knochenersatzmaterialien-der-oralen-implantologie>
38. Bartold PM, Shi S, Gronthos S. Stem cells and periodontal regeneration. *Periodontol* 2000. 2006;40(1):164–72.
39. Rai S, Kaur M, Kaur S. Applications of Stem Cells in Interdisciplinary Dentistry and Beyond: An Overview. *Ann Med Health Sci Res.* 2013;3(2):245–54.
40. Huang GT-J, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Tissues vs. Those from Other Sources. *J Dent Res.* 2009 Sep;88(9):792–806.
41. Hemmat S, Lieberman DM, Most SP. An introduction to stem cell biology. *Facial Plast Surg FPS.* 2010 Oct;26(5):343–9.
42. Fortier LA. Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications. *Vet Surg VS.* 2005 Oct;34(5):415–23.
43. Eisenberg LM, Eisenberg CA. Stem cell plasticity, cell fusion, and transdifferentiation. *Birth Defects Res Part C Embryo Today Rev.* 2003 Aug;69(3):209–18.
44. Ng TK, Yung JSY, Choy KW, Cao D, Leung CKS, Cheung HS, et al. Transdifferentiation of periodontal ligament-derived stem cells into retinal ganglion-like cells and its microRNA signature. *Sci Rep.* 2015;5:16429.
45. Chang JYF, Wang C, Jin C, Yang C, Huang Y, Liu J, et al. Self-renewal and multilineage differentiation of mouse dental epithelial stem cells. *Stem Cell Res.* 2013 Nov;11(3):990–1002.
46. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Dec 5;97(25):13625–30.
47. Kerkis I, Kerkis A, Dozortsev D, Stukart-Parsons GC, Gomes Massironi SM, Pereira LV, et al. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. *Cells Tissues Organs.* 2006;184(3-4):105–16.
48. Arthur A, Rychkov G, Shi S, Koblar SA, Gronthos S. Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues. *Stem Cells Dayt Ohio.* 2008 Jul;26(7):1787–95.
49. Cheng P-H, Snyder B, Fillos D, Ibegbu CC, Huang AH, Chan AW. Postnatal stem/progenitor

- cells derived from the dental pulp of adult chimpanzee. *BMC Cell Biol.* 2008 Apr 22;9(1):20.
50. Ishkitiev N, Yaegaki K, Calenic B, Nakahara T, Ishikawa H, Mitiev V, et al. Deciduous and permanent dental pulp mesenchymal cells acquire hepatic morphologic and functional features in vitro. *J Endod.* 2010 Mar;36(3):469–74.
  51. d’Aquino R, De Rosa A, Lanza V, Tirino V, Laino L, Graziano A, et al. Human mandible bone defect repair by the grafting of dental pulp stem/progenitor cells and collagen sponge biocomplexes. *Eur Cell Mater.* 2009;18:75–83.
  52. Lymperi S, Ligoudistianou C, Taraslia V, Kontakiotis E, Anastasiadou E. Dental Stem Cells and their Applications in Dental Tissue Engineering. *Open Dent J.* 2013;7:76–81.
  53. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 May 13;100(10):5807–12.
  54. Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo B-M, Zhang C, et al. Mesenchymal Stem Cell-Mediated Functional Tooth Regeneration in Swine. *PLoS ONE [Internet].* 2006 Dec 20 [cited 2013 Oct 17];1(1). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1762318/>
  55. Kikuchi H, Suzuki K, Sakai N, Yamada S. Odontoblasts induced from mesenchymal cells of murine dental papillae in three-dimensional cell culture. *Cell Tissue Res.* 2004 Aug;317(2):173–85.
  56. Ikeda E, Hirose M, Kotobuki N, Shimaoka H, Tadokoro M, Maeda M, et al. Osteogenic differentiation of human dental papilla mesenchymal cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Apr 21;342(4):1257–62.
  57. Park B-W, Hah Y-S, Choi M-J, Ryu Y-M, Lee S-G, Kim DR, et al. In vitro osteogenic differentiation of cultured human dental papilla-derived cells. *J Oral Maxillofac Surg Off J Am Assoc Oral Maxillofac Surg.* 2009 Mar;67(3):507–14.
  58. Seo B-M, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet.* 2004 Jul 10;364(9429):149–55.
  59. Fujii S, Maeda H, Wada N, Tomokiyo A, Saito M, Akamine A. Investigating a clonal human periodontal ligament progenitor/stem cell line in vitro and in vivo. *J Cell Physiol.* 2008 Jun;215(3):743–9.
  60. Liu Y, Zheng Y, Ding G, Fang D, Zhang C, Bartold PM, et al. Periodontal ligament stem cell-mediated treatment for periodontitis in miniature swine. *Stem Cells Dayt Ohio.* 2008 Apr;26(4):1065–73.
  61. Seo B-M, Miura M, Sonoyama W, Coppe C, Stanyon R, Shi S. Recovery of stem cells from cryopreserved periodontal ligament. *J Dent Res.* 2005 Oct;84(10):907–12.
  62. Morsczeck C, Götz W, Schierholz J, Zeilhofer F, Kühn U, Möhl C, et al. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol J Int Soc Matrix Biol.* 2005 Apr;24(2):155–65.
  63. Harada H, Kettunen P, Jung HS, Mustonen T, Wang YA, Thesleff I. Localization of putative

- stem cells in dental epithelium and their association with Notch and FGF signaling. *J Cell Biol.* 1999 Oct 4;147(1):105–20.
64. Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisén J. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell.* 1999 Jan 8;96(1):25–34.
65. Borkosky SS, Nagatsuka H, Orita Y, Tsujigiwa H, Yoshinobu J, Gunduz M, et al. Sequential expressions of Notch1, Jagged2 and Math1 in molar tooth germ of mouse. *Biocell Off J Soc Latinoam Microsc Electron Al.* 2008 Dec;32(3):251–8.
66. Mitsiadis TA, Lardelli M, Lendahl U, Thesleff I. Expression of Notch 1, 2 and 3 is regulated by epithelial-mesenchymal interactions and retinoic acid in the developing mouse tooth and associated with determination of ameloblast cell fate. *J Cell Biol.* 1995 Jul;130(2):407–18.
67. About I, Laurent-Maquin D, Lendahl U, Mitsiadis TA. Nestin expression in embryonic and adult human teeth under normal and pathological conditions. *Am J Pathol.* 2000 Jul;157(1):287–95.
68. About I, Bottero MJ, de Denato P, Camps J, Franquin JC, Mitsiadis TA. Human dentin production in vitro. *Exp Cell Res.* 2000 Jul 10;258(1):33–41.
69. Kémoun P, Laurencin-Dalieux S, Rue J, Farges J-C, Gennero I, Conte-Auriol F, et al. Human dental follicle cells acquire cementoblast features under stimulation by BMP-2/-7 and enamel matrix derivatives (EMD) in vitro. *Cell Tissue Res.* 2007 Aug;329(2):283–94.
70. Völlner F, Ernst W, Driemel O, Morsczeck C. A two-step strategy for neuronal differentiation in vitro of human dental follicle cells. *Differ Res Biol Divers.* 2009 Jun;77(5):433–41.
71. Wu J, Jin F, Tang L, Yu J, Xu L, Yang Z, et al. Dentin non-collagenous proteins (dNCPs) can stimulate dental follicle cells to differentiate into cementoblast lineages. *Biol Cell Auspices Eur Cell Biol Organ.* 2008 May;100(5):291–302.
72. Yokoi T, Saito M, Kiyono T, Iseki S, Kosaka K, Nishida E, et al. Establishment of immortalized dental follicle cells for generating periodontal ligament in vivo. *Cell Tissue Res.* 2007 Feb;327(2):301–11.
73. Handa K, Saito M, Tsunoda A, Yamauchi M, Hattori S, Sato S, et al. Progenitor cells from dental follicle are able to form cementum matrix in vivo. *Connect Tissue Res.* 2002;43(2-3):406–8.
74. Stem Cells; understanding stem cells\_an overview of the science and issues from the national academies [Internet]. [cited 2015 May 5]. Available from: <http://nas-sites.org/stemcells/>
75. Sánchez A, Schimmang T, García-Sancho J. Cell and tissue therapy in regenerative medicine. *Adv Exp Med Biol.* 2012;741:89–102.
76. Llames S, García E, García V, del Río M, Larcher F, Jorcano JL, et al. Clinical results of an autologous engineered skin. *Cell Tissue Bank.* 2006;7(1):47–53.
77. Yang X, Moldovan NI, Zhao Q, Mi S, Zhou Z, Chen D, et al. Reconstruction of damaged

- cornea by autologous transplantation of epidermal adult stem cells. *Mol Vis*. 2008 Jun 5;14:1064–70.
78. Steinwachs M, Kreuz PC. Autologous chondrocyte implantation in chondral defects of the knee with a type I/III collagen membrane: a prospective study with a 3-year follow-up. *Arthrosc J Arthrosc Relat Surg Off Publ Arthrosc Assoc N Am Int Arthrosc Assoc*. 2007 Apr;23(4):381–7.
79. Ranganath SH, Levy O, Inamdar MS, Karp JM. Harnessing the mesenchymal stem cell secretome for the treatment of cardiovascular disease. *Cell Stem Cell*. 2012 Mar 2;10(3):244–58.
80. Harel, Harel. Cryopreservation and Cell Banking for Autologous Mesenchymal Stem Cell-Based Therapies. *Cell Tissue Transplant Ther*. 2013 Feb;1.
81. Thirumala S, Goebel WS, Woods EJ. Clinical grade adult stem cell banking. *Organogenesis*. 2009 Jul;5(3):143–54.
82. Thirumala S, Goebel WS, Woods EJ. Manufacturing and banking of mesenchymal stem cells. *Expert Opin Biol Ther*. 2013 May;13(5):673–91.
83. Thirumala S, Gimble JM, Devireddy RV. Cryopreservation of stromal vascular fraction of adipose tissue in a serum-free freezing medium. *J Tissue Eng Regen Med*. 2010 Mar;4(3):224–32.
84. Thirumala S, Gimble JM, Devireddy RV. Evaluation of methylcellulose and dimethyl sulfoxide as the cryoprotectants in a serum-free freezing media for cryopreservation of adipose-derived adult stem cells. *Stem Cells Dev*. 2010 Apr;19(4):513–22.
85. Woods EJ, Thirumala S. Packaging Considerations for Biopreservation. *Transfus Med Hemotherapy Off Organ Dtsch Ges Transfusionsmedizin Immunhamatologie*. 2011;38(2):149–56.
86. Placzek MR, Chung I-M, Macedo HM, Ismail S, Mortera Blanco T, Lim M, et al. Stem cell bioprocessing: fundamentals and principles. *J R Soc Interface R Soc*. 2009 Mar 6;6(32):209–32.
87. Kirouac DC, Zandstra PW. The systematic production of cells for cell therapies. *Cell Stem Cell*. 2008 Oct 9;3(4):369–81.
88. Estrada JC, Torres Y, Benguria A, Dopazo A, Roche E, Carrera-Quintanar L, et al. Human mesenchymal stem cell-replicative senescence and oxidative stress are closely linked to aneuploidy. *Cell Death Dis*. 2013 Jun;4(6):e691.
89. Wagner W, Horn P, Castoldi M, Diehlmann A, Bork S, Saffrich R, et al. Replicative Senescence of Mesenchymal Stem Cells: A Continuous and Organized Process. *PLoS ONE [Internet]*. 2008 May 21 [cited 2013 Oct 17];3(5). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2374903/>
90. Mehrazarin S, Oh JE, Chung CL, Chen W, Kim RH, Shi S, et al. Impaired odontogenic differentiation of senescent dental mesenchymal stem cells is associated with loss of Bmi-1

- expression. *J Endod.* 2011 May;37(5):662–6.
91. Bonab MM, Alimoghaddam K, Talebian F, Ghaffari SH, Ghavamzadeh A, Nikbin B. Aging of mesenchymal stem cell in vitro. *BMC Cell Biol.* 2006 Mar 10;7(1):14.
  92. Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* 1965 Mar;37(3):614–36.
  93. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* 1961 Dec;25(3):585–621.
  94. Sethe S, Scutt A, Stolzing A. Aging of mesenchymal stem cells. *Ageing Res Rev.* 2006 Feb;5(1):91–116.
  95. Cooper GM. *The Eukaryotic Cell Cycle.* 2000 [cited 2015 Sep 20]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9876/>
  96. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *An Overview of the Cell Cycle.* 2002 [cited 2015 Sep 19]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26869/>
  97. Wink M. *Molekulare Biotechnologie: Konzepte, Methoden und Anwendungen.* John Wiley & Sons; 2011. 689 p.
  98. Shay JW, Wright WE. Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000 Oct;1(1):72–6.
  99. Campisi J. The biology of replicative senescence. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. 1997 Apr;33(5):703–9.
  100. Chiu CP, Harley CB. Replicative senescence and cell immortality: the role of telomeres and telomerase. *Proc Soc Exp Biol Med Soc Exp Biol Med N Y N.* 1997 Feb;214(2):99–106.
  101. Dahse R, Fiedler W, Ernst G. Telomeres and telomerase: biological and clinical importance. *Clin Chem.* 1997 May;43(5):708–14.
  102. Haendeler J, Hoffmann J, Rahman S, Zeiher AM, Dimmeler S. Regulation of telomerase activity and anti-apoptotic function by protein-protein interaction and phosphorylation. *FEBS Lett.* 2003 Feb 11;536(1-3):180–6.
  103. Saldanha SN, Andrews LG, Tollefsbol TO. Assessment of telomere length and factors that contribute to its stability. *Eur J Biochem FEBS.* 2003 Feb;270(3):389–403.
  104. Okabe J, Eguchi A, Masago A, Hayakawa T, Nakanishi M. TRF1 is a critical trans-acting factor required for de novo telomere formation in human cells. *Hum Mol Genet.* 2000 Nov 1;9(18):2639–50.
  105. Xu Y, Her C. Inhibition of Topoisomerase (DNA) I (TOP1): DNA Damage Repair and Anticancer Therapy. *Biomolecules.* 2015;5(3):1652–70.
  106. Chu WK, Hickson ID. RecQ helicases: multifunctional genome caretakers. *Nat Rev Cancer.* 2009 Sep;9(9):644–54.
  107. Harley CB. Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat Res.* 1991 Nov;256(2-6):271–82.
  108. Lingner J, Cooper JP, Cech TR. Telomerase and DNA end replication: no longer a lagging

- strand problem? *Science*. 1995 Sep 15;269(5230):1533–4.
109. Ohki R, Tsurimoto T, Ishikawa F. In Vitro Reconstitution of the End Replication Problem. *Mol Cell Biol*. 2001 Sep;21(17):5753–66.
  110. Cohen SB, Graham ME, Lovrecz GO, Bache N, Robinson PJ, Reddel RR. Protein composition of catalytically active human telomerase from immortal cells. *Science*. 2007 Mar 30;315(5820):1850–3.
  111. Shay JW, Wright WE. Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase. *Carcinogenesis*. 2005 May;26(5):867–74.
  112. Colgin LM, Reddel RR. Telomere maintenance mechanisms and cellular immortalization. *Curr Opin Genet Dev*. 1999 Feb;9(1):97–103.
  113. Kuilman T, Michaloglou C, Mooi WJ, Peeper DS. The essence of senescence. *Genes Dev*. 2010 Nov 15;24(22):2463–79.
  114. Sherr CJ, DePinho RA. Cellular senescence: mitotic clock or culture shock? *Cell*. 2000 Aug 18;102(4):407–10.
  115. Halliwell B. Oxidative stress in cell culture: an under-appreciated problem? *FEBS Lett*. 2003 Apr 10;540(1-3):3–6.
  116. Halliwell B. Cell culture, oxidative stress, and antioxidants: avoiding pitfalls. *Biomed J*. 2014 Jun;37(3):99–105.
  117. PTEN - phosphatase and tensin homolog [Internet]. Genetics Home Reference. 2015 [cited 2015 Aug 19]. Available from: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/PTEN>
  118. Chen Z, Trotman LC, Shaffer D, Lin H-K, Dotan ZA, Niki M, et al. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature*. 2005 Aug 4;436(7051):725–30.
  119. Courtois-Cox S, Jones SL, Cichowski K. Many roads lead to oncogene-induced senescence. *Oncogene*. 2008 Jan 14;27(20):2801–9.
  120. Chandek C, Mooi WJ. Oncogene-induced cellular senescence. *Adv Anat Pathol*. 2010 Jan;17(1):42–8.
  121. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. *Molecular Cell Biology*. 4th ed. W. H. Freeman; 2000.
  122. Muñoz-Espín D, Serrano M. Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014 Jul;15(7):482–96.
  123. Maya-Mendoza A, Ostrakova J, Kosar M, Hall A, Duskova P, Mistrik M, et al. Myc and Ras oncogenes engage different energy metabolism programs and evoke distinct patterns of oxidative and DNA replication stress. *Mol Oncol*. 2015 Mar;9(3):601–16.
  124. Campisi J. Cellular senescence: putting the paradoxes in perspective. *Curr Opin Genet Dev*. 2011 Feb;21(1):107–12.
  125. Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Sep;8(9):729–40.

126. Balducci L, Ersler WB. Cancer and ageing: a nexus at several levels. *Nat Rev Cancer*. 2005 Aug;5(8):655–62.
127. Rodier F, Campisi J. Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol*. 2011 Feb 21;192(4):547–56.
128. Coppé J-P, Desprez P-Y, Krtolica A, Campisi J. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol*. 2010;5:99–118.
129. Parrinello S, Coppe J-P, Krtolica A, Campisi J. Stromal-epithelial interactions in aging and cancer: senescent fibroblasts alter epithelial cell differentiation. *J Cell Sci*. 2005 Feb 1;118(3):485–96.
130. Choi J, Shendrik I, Peacocke M, Peehl D, Buttyan R, Ikeguchi EF, et al. Expression of senescence-associated beta-galactosidase in enlarged prostates from men with benign prostatic hyperplasia. *Urology*. 2000 Jul;56(1):160–6.
131. Sun P, Yoshizuka N, New L, Moser BA, Li Y, Liao R, et al. PRAK is essential for ras-induced senescence and tumor suppression. *Cell*. 2007 Jan 26;128(2):295–308.
132. Sousa-Victor P, Gutarra S, García-Prat L, Rodríguez-Ubrea J, Ortet L, Ruiz-Bonilla V, et al. Geriatric muscle stem cells switch reversible quiescence into senescence. *Nature*. 2014 Feb 20;506(7488):316–21.
133. Cosgrove BD, Gilbert PM, Porpiglia E, Mourkioti F, Lee SP, Corbel SY, et al. Rejuvenation of the muscle stem cell population restores strength to injured aged muscles. *Nat Med*. 2014 Mar;20(3):255–64.
134. Bernet JD, Doles JD, Hall JK, Kelly Tanaka K, Carter TA, Olwin BB. p38 MAPK signaling underlies a cell-autonomous loss of stem cell self-renewal in skeletal muscle of aged mice. *Nat Med*. 2014 Mar;20(3):265–71.
135. Tchkonja T, Morbeck DE, von Zglinicki T, van Deursen J, Lustgarten J, Scrbble H, et al. Fat tissue, aging, and cellular senescence. *Aging Cell*. 2010 Oct;9(5):667–84.
136. Tavana O, Zhu C. Too many breaks (brakes): pancreatic  $\beta$ -cell senescence leads to diabetes. *Cell Cycle Georget Tex*. 2011 Aug 1;10(15):2471–84.
137. Sone H, Kagawa Y. Pancreatic beta cell senescence contributes to the pathogenesis of type 2 diabetes in high-fat diet-induced diabetic mice. *Diabetologia*. 2005 Jan;48(1):58–67.
138. Bhat R, Crowe EP, Bitto A, Moh M, Katsetos CD, Garcia FU, et al. Astrocyte senescence as a component of Alzheimer's disease. *PLoS One*. 2012;7(9):e45069.
139. Martin JA, Brown TD, Heiner AD, Buckwalter JA. Chondrocyte senescence, joint loading and osteoarthritis. *Clin Orthop*. 2004 Oct;(427 Suppl):S96–103.
140. Price JS, Waters JG, Darrah C, Pennington C, Edwards DR, Donell ST, et al. The role of chondrocyte senescence in osteoarthritis. *Aging Cell*. 2002 Oct;1(1):57–65.
141. Chinta SJ, Lieu CA, Demaria M, Laberge R-M, Campisi J, Andersen JK. Environmental stress, ageing and glial cell senescence: a novel mechanistic link to Parkinson's disease? *J Intern Med*. 2013 May;273(5):429–36.

142. Amaral JD, Xavier JM, Steer CJ, Rodrigues CM. The role of p53 in apoptosis. *Discov Med*. 2010 Feb;9(45):145–52.
143. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. apoptosis - *Molecular Biology of the Cell* - NCBI Bookshelf [Internet]. 2002 [cited 2015 Aug 30]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21052/def-item/A4839/>
144. Bartek J, Bartkova J, Lukas J. The retinoblastoma protein pathway in cell cycle control and cancer. *Exp Cell Res*. 1997 Nov 25;237(1):1–6.
145. Alexander K, Yang H-S, Hinds PW. pRb Inactivation in Senescent Cells Leads to an E2F-Dependent Apoptosis Requiring p731 1 NIH grant AG20208. Note: K.A. and H.-S.Y. contributed equally to this work. *Mol Cancer Res*. 2003 Aug 1;1(10):716–28.
146. Smith J, Tho LM, Xu N, Gillespie DA. The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. *Adv Cancer Res*. 2010;108:73–112.
147. Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*. 2009 Oct 22;461(7267):1071–8.
148. Stracker TH, Usui T, Petrini JHJ. Taking the time to make important decisions: the checkpoint effector kinases Chk1 and Chk2 and the DNA damage response. *DNA Repair*. 2009 Sep 2;8(9):1047–54.
149. Sengupta S, Harris CC. p53: traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005 Jan;6(1):44–55.
150. Zannini L, Delia D, Buscemi G. CHK2 kinase in the DNA damage response and beyond. *J Mol Cell Biol*. 2014 Dec;6(6):442–57.
151. Dexheimer TS. DNA Repair Pathways and Mechanisms. In: Mathews LA, Cabarcas SM, Hurt EM, editors. *DNA Repair of Cancer Stem Cells* [Internet]. Springer Netherlands; 2013 [cited 2015 Sep 12]. p. 19–32. Available from: [http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-007-4590-2\\_2](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-007-4590-2_2)
152. Lord CJ, Ashworth A. The DNA damage response and cancer therapy. *Nature*. 2012 Jan 19;481(7381):287–94.
153. Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kaçmaz K, Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem*. 2004;73:39–85.
154. Passos JF, Simillion C, Hallinan J, Wipat A, von Zglinicki T. Cellular senescence: unravelling complexity. *Age Dordr Neth*. 2009 Dec;31(4):353–63.
155. McCubrey JA, Lahair MM, Franklin RA. Reactive oxygen species-induced activation of the MAP kinase signaling pathways. *Antioxid Redox Signal*. 2006 Oct;8(9-10):1775–89.
156. Torres M, Forman HJ. Redox signaling and the MAP kinase pathways. *BioFactors Oxf Engl*. 2003;17(1-4):287–96.
157. Signaling through Enzyme-Linked Cell-Surface Receptors - *Molecular Biology of the Cell* - NCBI Bookshelf [Internet]. [cited 2015 Sep 8]. Available from:

- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26822/#A2858>
158. Son Y, Cheong Y-K, Kim N-H, Chung H-T, Kang DG, Pae H-O, et al. Mitogen-Activated Protein Kinases and Reactive Oxygen Species: How Can ROS Activate MAPK Pathways?, Mitogen-Activated Protein Kinases and Reactive Oxygen Species: How Can ROS Activate MAPK Pathways? *J Signal Transduct J Signal Transduct*. 2011 Feb 6;2011, 2011:e792639.
  159. Debacq-Chainiaux F, Boilan E, Dedessus Le Moutier J, Weemaels G, Toussaint O. p38(MAPK) in the senescence of human and murine fibroblasts. *Adv Exp Med Biol*. 2010;694:126–37.
  160. Han J, Sun P. The pathways to tumor suppression via route p38. *Trends Biochem Sci*. 2007 Aug;32(8):364–71.
  161. Guyton KZ, Liu Y, Gorospe M, Xu Q, Holbrook NJ. Activation of mitogen-activated protein kinase by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Role in cell survival following oxidant injury. *J Biol Chem*. 1996 Feb 23;271(8):4138–42.
  162. Raingeaud J, Whitmarsh AJ, Barrett T, Dérjard B, Davis RJ. MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol Cell Biol*. 1996 Mar;16(3):1247–55.
  163. Campisi J, Andersen J, Kapahi P, Melov S. Cellular senescence: a link between cancer and age-related degenerative disease? *Semin Cancer Biol*. 2011 Dec;21(6):354–9.
  164. Gasco M, Shami S, Crook T. The p53 pathway in breast cancer. *Breast Cancer Res BCR*. 2002;4(2):70–6.
  165. Kang T-W, Yevsa T, Woller N, Hoenicke L, Wuestefeld T, Dauch D, et al. Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature*. 2011 Nov 24;479(7374):547–51.
  166. Campisi J. Aging, Cellular Senescence, and Cancer. *Annu Rev Physiol*. 2013;75:685–705.
  167. Xue W, Zender L, Miething C, Dickins RA, Hernando E, Krizhanovsky V, et al. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature*. 2007 Feb 8;445(7128):656–60.
  168. Krizhanovsky V, Yon M, Dickins RA, Hearn S, Simon J, Miething C, et al. Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell*. 2008 Aug 22;134(4):657–67.
  169. Kim K-H, Chen C-C, Monzon RI, Lau LF. Matricellular protein CCN1 promotes regression of liver fibrosis through induction of cellular senescence in hepatic myofibroblasts. *Mol Cell Biol*. 2013 May;33(10):2078–90.
  170. Borkham-Kamphorst E, Schaffrath C, Van de Leur E, Haas U, Tihaa L, Meurer SK, et al. The anti-fibrotic effects of CCN1/CYR61 in primary portal myofibroblasts are mediated through induction of reactive oxygen species resulting in cellular senescence, apoptosis and attenuated TGF- $\beta$  signaling. *Biochim Biophys Acta*. 2014 May;1843(5):902–14.
  171. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995

- Sep 26;92(20):9363–7.
172. Wiemann SU, Satyanarayana A, Tsahuridu M, Tillmann HL, Zender L, Klempnauer J, et al. Hepatocyte telomere shortening and senescence are general markers of human liver cirrhosis. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2002 Jul;16(9):935–42.
  173. Jun J-I, Lau LF. Cellular senescence controls fibrosis in wound healing. *Aging.* 2010 Sep;2(9):627–31.
  174. Jun J-I, Lau LF. The matricellular protein CCN1 induces fibroblast senescence and restricts fibrosis in cutaneous wound healing. *Nat Cell Biol.* 2010 Jul;12(7):676–85.
  175. Pitiyage GN, Slijepcevic P, Gabrani A, Chianea YG, Lim KP, Prime SS, et al. Senescent mesenchymal cells accumulate in human fibrosis by a telomere-independent mechanism and ameliorate fibrosis through matrix metalloproteinases. *J Pathol.* 2011 Apr;223(5):604–17.
  176. Reichart PDPA, Philipsen HP. Orale submuköse Fibrose bei einer 31-jährigen Inderin. *Mund Kiefer Gesichtschir.* 2006 Mar 28;10(3):192–6.
  177. Miura T, Mattson MP, Rao MS. Cellular lifespan and senescence signaling in embryonic stem cells. *Aging Cell.* 2004 Dec;3(6):333–43.
  178. Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS, Chiu C-P, Harris CP, Waknitz MA, et al. Clonally Derived Human Embryonic Stem Cell Lines Maintain Pluripotency and Proliferative Potential for Prolonged Periods of Culture. *Dev Biol.* 2000 Nov 15;227(2):271–8.
  179. Guo Y-L, Chakraborty S, Rajan SS, Wang R, Huang F. Effects of oxidative stress on mouse embryonic stem cell proliferation, apoptosis, senescence, and self-renewal. *Stem Cells Dev.* 2010 Sep;19(9):1321–31.
  180. Lapasset L, Milhavel O, Prieur A, Besnard E, Babled A, Ait-Hamou N, et al. Rejuvenating senescent and centenarian human cells by reprogramming through the pluripotent state. *Genes Dev.* 2011 Nov 1;25(21):2248–53.
  181. Vaziri H, Chapman KB, Guigova A, Teichroeb J, Lacher MD, Sternberg H, et al. Spontaneous reversal of the developmental aging of normal human cells following transcriptional reprogramming. *Regen Med.* 2010 May;5(3):345–63.
  182. Feng Q, Lu S-J, Klimanskaya I, Gomes I, Kim D, Chung Y, et al. Hemangioblastic derivatives from human induced pluripotent stem cells exhibit limited expansion and early senescence. *Stem Cells Dayt Ohio.* 2010 Apr;28(4):704–12.
  183. Rohani L, Johnson AA, Arnold A, Stolzing A. The aging signature: a hallmark of induced pluripotent stem cells? *Aging Cell.* 2014 Feb 1;13(1):2–7.
  184. Wu R-X, Bi C-S, Yu Y, Zhang L-L, Chen F-M. Age-related decline in the matrix contents and functional properties of human periodontal ligament stem cell sheets. *Acta Biomater.* 2015 Aug;22:70–82.
  185. Cmielova J, Havelek R, Soukup T, Jiroutová A, Visek B, Suchánek J, et al. Gamma radiation induces senescence in human adult mesenchymal stem cells from bone marrow

- and periodontal ligaments. *Int J Radiat Biol.* 2012 May 1;88(5):393–404.
186. Fesahat F, Sheikhha MH, Rasti A, Nodoshan FS, Zare-Zardini H, Navabazam AR. An Investigation on Mitochondrial DNA Deletions and Telomere Shortening during Multiple Passages of Adult Stem Cells. *Avicenna J Med Biotechnol.* 2014 Jul;6(3):156–62.
187. Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res.* 2002 May 15;30(10):e47.
188. Gil ME, Coetzer TL. Real-time quantitative PCR of telomere length. *Mol Biotechnol.* 2004 Jun;27(2):169–72.
189. Lee BY, Han JA, Im JS, Morrone A, Johung K, Goodwin EC, et al. Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell.* 2006 Apr;5(2):187–95.
190. Wagner J, Damaschke N, Yang B, Truong M, Guenther C, McCormick J, et al. Overexpression of the novel senescence marker  $\beta$ -galactosidase (GLB1) in prostate cancer predicts reduced PSA recurrence. *PloS One.* 2015;10(4):e0124366.
191. Debacq-Chainiaux F, Erusalimsky JD, Campisi J, Toussaint O. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat Protoc.* 2009;4(12):1798–806.
192. Severino J, Allen RG, Balin S, Balin A, Cristofalo VJ. Is  $\beta$ -Galactosidase Staining a Marker of Senescence in Vitro and in Vivo? *Exp Cell Res.* 2000 May 25;257(1):162–71.
193. Ma W, Rogers K, Zbar B, Schmidt L. Effects of Different Fixatives on  $\beta$ -Galactosidase Activity. *J Histochem Cytochem.* 2002 Oct 1;50(10):1421–4.
194. Urraca N, Memon R, El-Iyachi I, Goorha S, Valdez C, Tran QT, et al. Characterization of neurons from immortalized dental pulp stem cells for the study of neurogenetic disorders. *Stem Cell Res.* 2015 Nov;15(3):722–30.
195. Aubert G, Hills M, Lansdorp PM. Telomere length measurement-caveats and a critical assessment of the available technologies and tools. *Mutat Res.* 2012 Feb 1;730(1-2):59–67.
196. Montpetit AJ, Alhareeri AA, Montpetit M, Starkweather AR, Elmore LW, Filler K, et al. Telomere length: a review of methods for measurement. *Nurs Res.* 2014 Aug;63(4):289–99.
197. Martin-Ruiz CM, Baird D, Roger L, Boukamp P, Krunic D, Cawthon R, et al. Is Southern blotting necessary to measure telomere length reproducibly? Authors' Response to: Commentary: The reliability of telomere length measurements. *Int J Epidemiol.* 2015 Sep 24;dyv169.
198. Martin-Ruiz CM, Baird D, Roger L, Boukamp P, Krunic D, Cawthon R, et al. Reproducibility of telomere length assessment: an international collaborative study. *Int J Epidemiol.* 2015 Oct;44(5):1673–83.
199. Verhulst S, Susser E, Factor-Litvak PR, Simons MJ, Benetos A, Steenstrup T, et al. Commentary: The reliability of telomere length measurements. *Int J Epidemiol.* 2015 Sep 24;dyv166.
200. Lee M, Hills M, Conomos D, Stutz MD, Dagg RA, Lau LMS, et al. Telomere extension by

- telomerase and ALT generates variant repeats by mechanistically distinct processes. *Nucleic Acids Res.* 2013 Nov 12;
201. Jeon B-G, Kang E-J, Kumar BM, Maeng G-H, Ock S-A, Kwack D-O, et al. Comparative Analysis of Telomere Length, Telomerase and Reverse Transcriptase Activity in Human Dental Stem Cells. *Cell Transplant.* 2011 Nov 1;20(11-12):1693–705.
  202. Kickhoefer VA, Stephen AG, Harrington L, Robinson MO, Rome LH. Vaults and Telomerase Share a Common Subunit, TEP1. *J Biol Chem.* 1999 Nov 12;274(46):32712–7.
  203. Liu Y, Snow BE, Hande MP, Baerlocher G, Kickhoefer VA, Yeung D, et al. Telomerase-associated protein TEP1 is not essential for telomerase activity or telomere length maintenance in vivo. *Mol Cell Biol.* 2000 Nov;20(21):8178–84.
  204. Li H, Zhao L, Yang Z, Funder JW, Liu J-P. Telomerase Is Controlled by Protein Kinase C $\alpha$  in Human Breast Cancer Cells. *J Biol Chem.* 1998 Dec 11;273(50):33436–42.
  205. Simonsen JL, Rosada C, Serakinci N, Justesen J, Stenderup K, Rattan SIS, et al. Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells. *Nat Biotechnol.* 2002 Jun;20(6):592–6.
  206. Wang KX, Denhardt DT. Osteopontin: role in immune regulation and stress responses. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2008 Dec;19(5-6):333–45.
  207. Ginaldi L, Benedetto MCD, Martinis MD. Osteoporosis, inflammation and ageing. *Immun Ageing.* 2005 Nov 4;2(1):14.
  208. El-Tanani MK, Campbell FC, Kurisetty V, Jin D, McCann M, Rudland PS. The regulation and role of osteopontin in malignant transformation and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2006 Dec;17(6):463–74.
  209. Pazolli E, Luo X, Brehm S, Carbery K, Chung J-J, Prior JL, et al. Senescent Stromal-Derived Osteopontin Promotes Preneoplastic Cell Growth. *Cancer Res.* 2009 Feb 1;69(3):1230–9.
  210. Komori T. Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *J Cell Biochem.* 2006;99(5):1233–9.
  211. Konstantonis D, Papadopoulou A, Makou M, Eliades T, Basdra EK, Kletsas D. Senescent human periodontal ligament fibroblasts after replicative exhaustion or ionizing radiation have a decreased capacity towards osteoblastic differentiation. *Biogerontology.* 2013 Dec;14(6):741–51.
  212. Felthaus OH. Die Rolle des Transkriptionsfaktors ZBTB16 bei der osteogenen Differenzierung dentaler Follikelzellen [Internet]. 2015 [cited 2016 Jan 5]. Available from: <http://epub.uni-regensburg.de/31520/>
  213. Gregory CA, Grady Gunn W, Peister A, Prockop DJ. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal Biochem.* 2004 Jun 1;329(1):77–84.
  214. Ponnaiyan D. Do dental stem cells depict distinct characteristics? — Establishing their

- “phenotypic fingerprint.” *Dent Res J.* 2014;11(2):163–72.
215. Morsczeck C, Völlner F, Saugspier M, Brandl C, Reichert TE, Driemel O, et al. Comparison of human dental follicle cells (DFCs) and stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) after neural differentiation in vitro. *Clin Oral Investig.* 2010 Aug;14(4):433–40.
216. Felthaus O, Gosau M, Ettl T, Prantl L, Morsczeck C. Migration of human dental follicle cells in vitro. *J Periodontal Res.* 2014 Apr;49(2):205–12.
217. Press T, Viale-Bouroncle S, Felthaus O, Gosau M, Morsczeck C. EGR1 supports the osteogenic differentiation of dental stem cells. *Int Endod J.* 2015 Feb 1;48(2):185–92.
218. Michalczyk K, Ziman M. Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organisation. *Histol Histopathol.* 2005 Apr;20(2):665–71.

## 7. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich herzlichst bedanken bei Herrn PD Dr. Christian Morsceck für die Überlassung des interessanten Themas, für die Bereitschaft, mir mit Rat und Unterstützung zur Seite zu stehen und für die Übernahme der Erstgutachtertätigkeit.

Für die freundliche Bereitstellung der Laborräumlichkeiten, Gerätschaften und Materialien, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre, bedanke ich mich bei Herrn PD Dr. Christian Morsceck und Herrn Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert.

Mein aufrichtiger Dank gilt auch Frau Anja Reck für die Unterstützung im Labor bei der Durchführung der Western Blots und FACS-Analysen. Besonderen Dank ebenfalls an die gesamte Forschungsgruppe für die Hilfsbereitschaft und harmonische Arbeitsatmosphäre.

Ein großes Dankeschön gebührt Herrn Prof. Dr. Dr. Peter Proff, der sich bereit erklärt hat die Zweitgutachtertätigkeit zu übernehmen und mir damit den Abschluss der Arbeit mit ermöglicht hat.

Danken möchte ich ebenfalls Herrn PD. Dr. Dr. Tobias Ettl, der mich auf die Arbeitsgruppe von PD Dr. Morsceck und deren Tätigkeitsfeld aufmerksam gemacht hat.

Abschließend möchte ich mich noch im besonderen Maße bei meinen Eltern, meiner Freundin und meinen Freunden für die Motivation und uneingeschränkte Unterstützung sowie für die entgegengebrachte Nachsicht während der Promotionsphase bedanken.

## 8. Erklärung

Ich, Jan Ernst Wilhelm Gresser, geboren am 11.07.1984 in Bayreuth, 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 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 im Januar 2016

.....  
Jan Gresser