

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR
MUND- KIEFER- GESICHTSCHIRURGIE
DIREKTOR: PROF. DR. DR. TORSTEN E. REICHERT
FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Die Rolle von miRNAs bei der osteogenen Differenzierung in
humanen dentalen Follikelzellen**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Consuela Codrin

2016

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR
MUND- KIEFER- GESICHTSCHIRURGIE
DIREKTOR: PROF. DR. DR. TORSTEN E. REICHERT
FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Die Rolle von miRNAs bei der osteogenen Differenzierung in
humanen dentalen Follikelzellen**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Consuela Codrin

2016

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

1. Berichterstatter: PD Dr. Christian Morscheck

2. Berichterstatter: PD Dr. Gerhard Liebisch

Tag der mündlichen Prüfung: 09. Juni 2016

INHALT

1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	3
1.1	EINHEITEN	3
1.2	MATERIALIEN.....	3
1.3	ZELLEN.....	4
1.4	GENE.....	5
2	EINLEITUNG	6
2.1	PARODONTITIS	6
2.2	REGENERATIVE ZAHNMEDIZIN UND STAMMZELLBIOLOGIE.....	7
2.2.1	Herkunft	8
2.2.2	Grad des Differenzierungspotenzials	8
2.2.3	Stammzelllinie	9
2.2.4	ES-Zellen	10
2.2.5	Adulte Stammzellen	11
2.2.5.1	Mesenchymale Stammzellen (MSCs)	11
2.2.6	Induzierte pluripotente Stammzellen (iPSCs).....	11
2.3	DENTALE STAMMZELLEN.....	12
2.3.1	Stammzellen aus dem dentalen Follikel (DFSCs).....	13
2.3.2	Stammzellen aus der dentalen Pulpa (DPSCs).....	14
2.3.3	Stammzellen aus der Milchzahnpulpa nach Exfoliation (SHED).....	14
2.3.4	Stammzellen aus dem Parodontalen Ligament (PDLSCs).....	15
2.3.5	Stammzellen aus der apikalen Papille (SCAPs).....	15
2.4	KNOCHENENTWICKLUNG.....	16
2.5	OSTEOGENE DIFFERENZIERUNG.....	17
2.6	MIKRO-RNAs UND IHRE FUNKTION	17
2.7	MIRNAs BEI DER OSTEOGENEN DIFFERENZIERUNG	20
3	ZIEL DER ARBEIT.....	22
4	MATERIAL UND METHODEN.....	23
4.1	VERBRAUCHSMATERIALIEN UND GERÄTE	23
4.1.1	Einwegartikel	23
4.1.2	Chemikalien.....	23
4.1.3	Kits.....	24
4.1.4	Geräte.....	24
4.1.5	PCR-Primer	26
4.2	METHODEN	27

4.2.1	Zellisolierung und Zellkultivierung	27
4.2.2	Zelldifferenzierung	28
4.2.3	RNA-Isolierung.....	28
4.2.4	Reverse Transkription (RT) für miRNA-Array und miRNA-Assays.....	30
4.2.5	Real-time-RT-PCR	31
4.2.5.1	miRNA Array	31
4.2.5.2	miRNA PCR	32
4.2.5.3	mRNA PCR	33
4.2.6	Transfektion von DFSCs	35
4.2.7	ALP-Aktivität und Alizarin-S-Rotfärbung	35
4.2.8	Statistik.....	36
5	ERGEBNISSE	37
5.1	MISCRIPT MIRNA PCR ARRAY	37
5.2	MIRNA PRIMER ASSAYS PCRS.....	40
5.3	MIRNA UND MRNA PCRS.....	41
5.4	ALP-AKTIVITÄTSMESSUNG	43
5.5	ALIZARIN-S-ROTFÄRBUNG.....	44
6	DISKUSSION	46
7	ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSSFOLGERUNG.....	50
8	LITERATURVERZEICHNIS	51
9	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	59
10	TABELLENVERZEICHNIS.....	61
11	FORMELVERZEICHNIS	61
12	DANKSAGUNG	62
13	ERKLÄRUNG	63

1 Abkürzungsverzeichnis

1.1 Einheiten

°C:	Grad Celsius
cm:	Zentimeter
Ct:	cycle threshold
d:	day
g:	Gramm
h:	hour
min:	Minute
µl:	Mikroliter
ml:	Milliliter
µm:	Mikrometer
mm:	Millimeter
µM:	Mikromol
mM:	Millimol
l:	Liter
pH:	potentia Hydrogenii
pmol:	Pikomol
M:	Mol
ng:	Nanogramm
rpm:	Rounds per minute
sek:	Sekunde
U:	Unit

1.2 Materialien

ATPase:	Adenosintriphosphatase
cDNA:	Complementary DNA (komplementäre DNA)
CO ₂ :	Kohlenstoffdioxid
CpG:	Cytosin-Phosphat-Guanin
dATP:	Desoxyadenosintriphosphat

dCTP:	Desoxycytidintriphosphat
dGTP:	Desoxyguanosintriphosphat
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA:	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DNase:	Desoxyribonuklease
dNTP:	Deoxyribonukleotidtriphosphate
dsDNA:	double stranded Deoxyribonucleic acid
dTTP:	Desoxythymidintriphosphat
EDTA:	Ethylendiamintetraacetat
FBS:	Fetal bovine serum (fötales Rinderserum)
HEPES:	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
mRNA:	Messenger Ribonucleic acid
miRNA:	micro Ribonucleic acid
miRTC:	micro (Ribonucleic acid) reverse transcription control
NTC:	no template control
NaOH:	Natriumhydroxid
ODM:	osteogenes Differenzierungsmedium
PBS:	phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PPC:	positive Polymerase chain reaction control
RNA:	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNase:	Ribonuklease
siRNA:	small interfering RNA
snoRNA:	small nucleolar ribonucleic acid
snRNA:	small nuclear ribonucleic acid
TBE-Puffer:	Tris-Borate-EDTA Puffer
TE-Puffer:	Tris-EDTA-Puffer

1.3 Zellen

ADSCs:	Adipose-tissue-derived stem cells (Stammzellen aus dem Fettgewebe)
BMMSCs:	Bone marrow mesenchymal stem cells (Knochenmark-Stammzellen)
DFSCs:	Dental follicle cells (dentale Follikelzellen)

DPSCs:	Postnatal dental pulp stem cells (postnatale Pulpa-Stammzellen)
iPSCs:	Induced pluripotent stem cell (induzierte pluripotente Stammzellen)
MSCs:	Mesenchymal stem cells (Mesenchymale Stammzellen)
PDLSCs:	Periodontal ligament stem cells (Stammzellen aus dem parodontalen Ligament)
SCAPs:	Stem cells from apical papilla (Stammzellen aus der apikalen Papille)
SHED:	Stem cells from human exfoliated deciduous teeth (Stammzellen aus humanen Milchzähnen)

1.4 Gene

ALP:	Alkaline phosphatase (Alkalische Phosphatase)
BAMBI:	BMP and activin membrane-bound inhibitor homolog
BMP2:	Bone morphogenetic protein
BMPRI1A:	Bone morphogenetic protein receptor, type IB
Crim1:	Cysteine-rich motor neuron 1 protein
DLX2:	Distal-less homeobox 2
DLX3:	Distal-less homeobox 3
DLX5:	Distal-less homeobox 5
MST4:	mammalian sterile-20-like-kinase 4
Oct-4:	Octamer binding transcription factor 4
PLAP-1:	Periodontal ligament-associated protein-1
PPAR γ :	peroxisome proliferator-activated receptor gamma
RUNX2:	Runt-related transcription factor 2 (Cbfa1)
SMAD1:	small body size mothers against decapentaplegic homolog 1
SMAD3:	small body size mothers against decapentaplegic homolog 3
SMAD6:	small body size mothers against decapentaplegic homolog 6
Smurf1:	SMAD ubiquitination regulatory factor-1

2 Einleitung

2.1 Parodontitis

Heutzutage sind besonders in Industriestaaten Erkrankungen des Zahnhalteapparates (Parodontitis) weit verbreitet. In Deutschland leiden etwa zwei Drittel der Bevölkerung an Parodontitis, die abhängig von ihrem Schweregrad mittelfristig zu Zahnverlust führt (1). Diese chronische Entzündung des Parodonts folgt aus der Abwehrreaktion des Wirtes auf parodontopathogene Bakterien (2). Drei interagierende Hauptfaktoren sind für die Entstehung dieser Inflammation verantwortlich: Die begünstigende Zusammensetzung der Mikroflora aufgrund unzureichender Mundhygiene, die Immunantwort des Wirtes auf parodontopathogene Keime und die genetische Prädisposition an Parodontitis zu erkranken (3).

Ätiologisch entsteht eine Parodontitis aus einer Gingivitis mit anfänglicher ödematöser Schwellung der Gingiva. Wird in diesem Stadium keine konsequente Mundhygiene betrieben, dringen Bakterien weiter in das Saumepithel und den umgebenden Halteapparat ein. Durch Anregung der körpereigenen Abwehr folgt Entzündung und Verlust von hartem und weichem Gewebe (2). (Abb.1)

Klassische Therapieansätze, wie offene und geschlossene KÜRretagen sowie Wurzelglättungen in Kombination mit spezifischer Antibiotikagabe, resultieren selten in einer restitutio ad integrum des Parodonts, sodass regenerative Ansätze sinnvoll erscheinen (2).

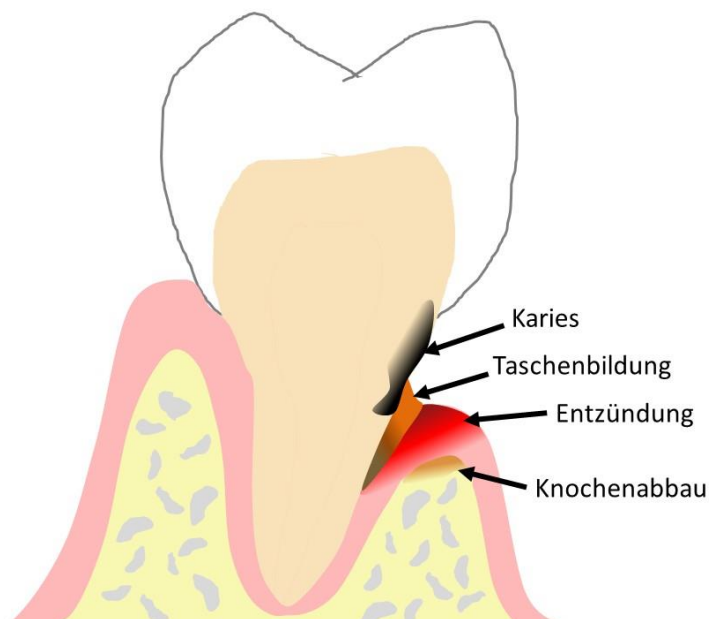


Abb. 1: Schematische Darstellung eines parodontal-geschädigten Zahnes (Eigene Darstellung)

2.2 Regenerative Zahnmedizin und Stammzellbiologie

Ziel der regenerativen Parodontitis-Therapie ist, vorhersagbar Strukturen des Zahnhalteapparates neu zu bilden und zu erhalten. Zu diesem Zwecke werden besonders dentale Stammzellen zunehmend erforscht. Im Sinne des Tissue Engineering erlangten Stammzellen in den letzten Jahren einen exponentiellen Aufschwung in der zahnmedizinischen Literatur. Im Jahr 2000 kam es zu ersten Veröffentlichungen zum Thema Identifizierung und Isolierung dentaler Stammzellen in internationalen Wissenschafts-Journals zum Beispiel Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS) und Calcified Tissue international. Seit 2001 werden für neue Produkte zahlreiche Applikationsmethoden dentaler Stammzellen vorgestellt und patentiert (4).

Stammzellen sind undifferenzierte Zellen, die folgende Eigenschaften in sich tragen:

- Die Fähigkeit der Selbsterneuerung (*self-renewal*): Stammzellen behalten nach Zellteilung ihr undifferenziertes Stadium bei (5).
- Die Fähigkeit, sich in spezialisierte Zelltypen gewebespezifisch zu differenzieren, z. B. in Haut-, Muskel- und Nervenzellen (*differentiation*) (5).

Nach der Herkunft und nach dem Grad ihres Differenzierungspotenzials werden Stammzellen unterteilt (6).

2.2.1 Herkunft

Umgangssprachlich wird zwischen adulten und embryonalen Stammzellen unterschieden. Adulte Stammzellen werden auch als somatische oder postnatale Stammzellen bezeichnet. Embryonale Stammzellen sind nach ihrer Herkunft zu unterteilen:

- EC-Zellen (embryonic carcinoma cells) aus embryonalen Tumorzellen
- EG-Zellen (embryonic germ cells) aus fötalen Vorläuferzellen der Geschlechtszellen
- ES-Zellen (embryonic stem cells) aus der inneren Zellmasse (Embryoblast) der Blastozyste (6, 7)

Zu den adulten Stammzellen zählen unter anderem mesenchymale Stammzellen (mesenchymal stem cells – MSCs; Vorläuferzellen des Bindegewebes) (8), neurale Stammzellen (9) und hämatopoetische Stammzellen (Vorläuferzellen des Blutes). Mesenchymale Stammzellen wurden aus Fettgewebe, Muskeln, dentalen Geweben, der Nabelschnur und vielen weiteren Geweben isoliert (10).

Neben diesen natürlich gewonnenen Stammzellarten reihen sich seit 2006 die genetisch manipulierten Zellen mit ein. Sie werden als induzierte pluripotente Stammzellen bezeichnet (induced pluripotent stem cells – iPSCs) (11).

2.2.2 Grad des Differenzierungspotenzials

Des Weiteren unterteilt man Stammzellen nach ihrem Potenzial, sich in verschiedene Zelltypen zu differenzieren, sodass Stammzellen wie folgt bezeichnet werden können:

- *omnipotent/totipotent*: Aus diesen Zellen kann ein neuer Organismus gebildet werden (z. B. befruchtete Eizelle) (6, 12).
- *pluripotent*: Die Stammzelle kann zu allen Zelltypen der drei Keimblätter differenzieren, allerdings kann sie kein extraembryonales Gewebe bilden (z. B. ES-Zellen) (6, 12).

- *multipotent*: Die Stammzelle kann zu zahlreichen verschiedenen Zelltypen innerhalb eines Keimblatts differenzieren (z.B. Blutzellen) (6, 12).
- *oligopotent*: Die Stammzelle kann zu wenigen Zelltypen innerhalb eines Keimblattes differenzieren (13).
- *unipotent*: Die Stammzelle kann nur zu Zellen des gleichen Zelltyps differenzieren (z. B. Fibroblasten) (6, 12).
- *induziert pluripotent*: Die multipotente Stammzelle wird durch Transkriptionsfaktoren zu einer pluripotenten Stammzelle manipuliert (z. B. iPSCs) (11).

2.2.3 Stammzelllinie

Damit die Stammzeleigenschaften erhalten bleiben, muss mindestens eine der Tochterzellen einer Stammzellteilung die gleichen Eigenschaften wie die Ausgangszelle besitzen. Hierbei können zwei Arten der Zellteilung unterschieden werden: Die symmetrische und die asymmetrische Zellteilung (5).

Bei der symmetrischen Zellteilung entstehen aus einer Stammzelle zwei identische Kopien der Originalstammzelle mit denselben Eigenschaften oder zwei Progenitorzellen (Vorläuferzellen). (Abb. 2 A) Aus einer asymmetrischen Replikation geht nur eine Tochterzelle hervor, die der Ausgangszelle entspricht. Die zweite entstandene Tochterzelle stellt eine Progenitorzelle dar. Sie wird sich nach unbestimmter Anzahl von Teilungsschritten in einen spezifischen Zelltypus ihres Gewebes differenzieren (5, 14). (Abb. 2 B)

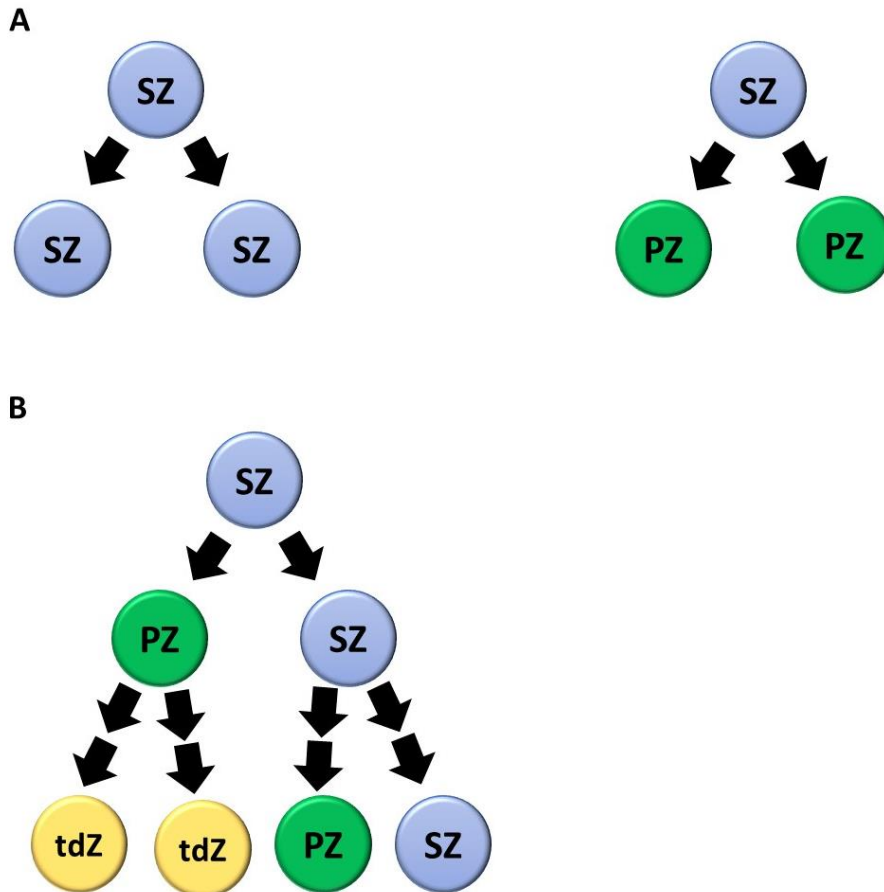


Abb. 2: Schematische Darstellung der Stammzellendifferenzierung und –Selbst-Erneuerung. A: symmetrische Zellteilung; B: asymmetrische Zellteilung; SZ: Stammzelle; PZ: Progenitorzelle; tdZ: terminal differenzierte Zelle (Eigene Darstellung in Anlehnung an (5))

2.2.4 ES-Zellen

ES-Zellen sind pluripotente Stammzellen. Sie können zu Zellen des Entoderms (z. B. Bildung der Epithelien von Atmungsstrakt, Leber), Ektoderms (z.B. Bildung von Zähnen, Nerven, Sinnesorgane) und Mesoderms (z.B. Bildung von Knochen, Herz, Blutgefäße) differenzieren. ES-Zellen können im Entwicklungsstadium der Blastozyste gewonnen werden (15). Zurzeit sind diese Zellen ethisch kontrovers diskutiert und in der Laborarbeit daher schwierig handzuhaben. In Deutschland darf nach dem Embryonenschutzgesetz und dem Stammzellgesetz von 2002 (2008 aktualisiert) nur an importierten embryonalen Stammzellen mit besonderen Einschränkungen geforscht werden (16, 17).

2.2.5 Adulte Stammzellen

Zurzeit relevanter für die zahnmedizinische Wissenschaft sind *adulte* Stammzellen, da sie, anders als ES-Zellen, ethisch weniger bedenklich aus humanem Gewebe entnommen werden können (4). Diese Stammzellen sind im Gegensatz zu pränatalen Zellen nicht pluripotent sondern multipotent. Folglich besitzen sie ein eingeschränktes Differenzierungspotenzial. Sie sind für das Erneuern, Reparieren und den Erhalt von Geweben verantwortlich (15).

2.2.5.1 Mesenchymale Stammzellen (MSCs)

MSCs sind adulte multipotente und gewebespezifische Stroma-Zellen, die zu einer Vielzahl von Zelltypen differenzieren können. Hierzu zählt beispielsweise die Differenzierung zu Osteoblasten, Adipozyten, Chondrozyten und Myozyten (18, 19).

MSCs können unter anderem aus dem Knochenmark (bone-marrow-derived mesenchymal stem cells – BMMSCs oder bone-marrow-derived stromal stem cells – BMSSCs), aus dem Fettgewebe (adipose-tissue-derived stem cells – ADSCs) und aus Zahn-/Parodontium-bildenden Geweben isoliert werden (20). Sie sind fähig, sich auch zu dentalen Zellen, beispielsweise zu Odontoblasten und Ameloblasten, zu differenzieren (21, 22). Aus diesem Grund stellen MSCs eine vielversprechende Quelle für regenerative Therapien in der Zahnmedizin dar.

Ursprünglich wurden MSCs aus dem Knochenmark gewonnen. Somit stellen BMMSCs die am besten untersuchten Stammzellen dar. Folglich wurden und werden alle weiteren erforschten Stammzellen aus unterschiedlichen Geweben mit BMMSCs verglichen (23-25).

2.2.6 Induzierte pluripotente Stammzellen (iPSCs)

Eine dritte Zellart könnte für die zahnmedizinische Forschung bedeutsam werden: induzierte pluripotente Stammzellen (iPSCs oder iPS). Hierbei werden gewebespezifische multipotente Zellen in pluripotente Stammzellen durch Manipulation mit spezifischen Transkriptionsfaktoren re-programmiert. Ihre Eigenschaften sind denen von embryonalen Stammzellen ähnlich (26).

2006 wurden erstmals von Kazutoshi Takahashi und Shinya Yamanaka (Universität Kyoto) gewebespezifische Stammzellen in ein pluripotentes Stadium zurückversetzt. Diese iPSCs entstanden in dieser Studie durch Transduktion adulter Mausstammzellen mit den

Transkriptionsfaktoren Oct-3/4, Sox-2, c-Myc und Klf-4 unter Kulturbedingungen für embryonale Stammzellen (27). Durch die virale Zellveränderung könnten manipulierte Zellen Tumoreigenschaften entwickeln. Folglich wurde die klinische Relevanz von iPSCs zurückhaltend eingeschätzt. Seit ein paar Jahren ist es nun möglich, die Expression jener Transkriptionsfaktoren als Fusionsproteine in gewebespezifischen Zellen zu induzieren. Retroviren werden hierbei nicht verwendet (28).

2.3 Dentale Stammzellen

Dentale Stammzellen sind mesenchymale Stammzellen. Das Ektomesenchym, aus dem dentale Stammzellen gewonnen werden, entstammt entwicklungsgeschichtlich aus der Neuralleiste. Aus diesem Grund können dentale Stammzellen nicht nur zu odontogenen/osteogenen und adipogenen Zellen sondern auch zu neurogenen Zellen differenzieren (19, 22, 29).

Kultiviert werden dentale Stammzellen – je nach Kulturbedingungen – entweder wie BMMSCs fibroblastoid und plastikadhärent oder wie neurale Stammzellen als Sphäroide (20).

Für das „tooth tissue engineering“ relevant sind humane gewebespezifische dentale Stammzellen, die aus der Pulpa (dental pulp derived stem cells – DPSCs), aus dem parodontalen Ligament (periodontal ligament stem cells – PDLSCs), aus der apikalen Papille (stem cells from apical papilla – SCAPs) und aus dem dentalen Follikel (dental follicle stem cells – DFSCs) isoliert werden können. Zudem können aus Resten der Milchzahnpulpa nach Exfoliation Stammzellen gewonnen werden (stem cells of human exfoliated deciduous teeth – SHED) (15). (Abb. 3)

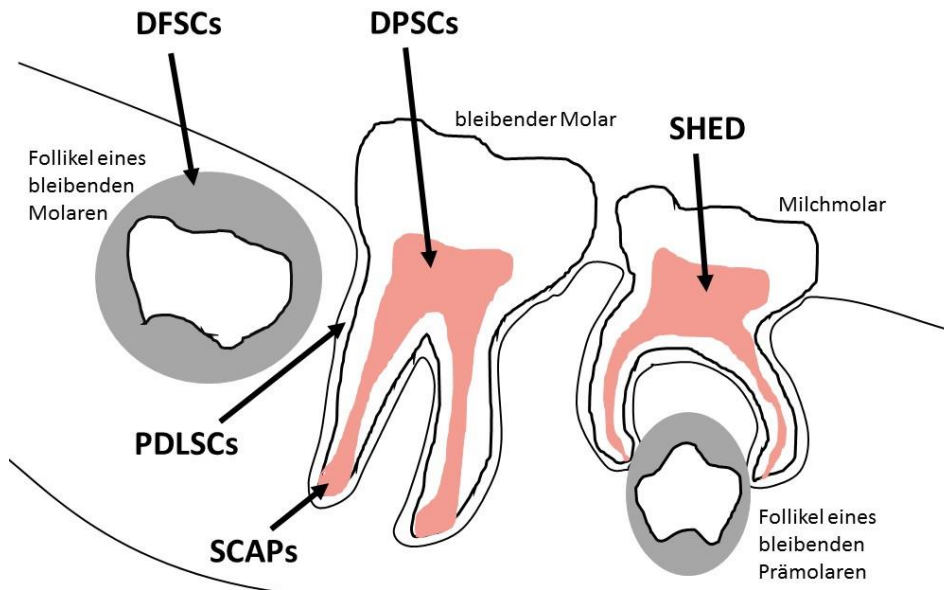


Abb. 3: Schematische Darstellung der Quellen humaner dentaler Stammzellen (Eigene Darstellung in Anlehnung an (30))

2.3.1 Stammzellen aus dem dentalen Follikel (DFSCs)

In dieser Arbeit wurden ausschließlich Stammzellen aus dem dentalen Follikel verwendet. Der dentale Follikel ist ein lockeres ektomesenchymales Bindegewebe. Er umgibt den Zahnkeim bis zur vollständigen Entwicklung des Zahnes. Zudem koordiniert der dentale Follikel die Zahneruption (31).

Multipotente dentale Follikel-Stammzellen (dental follicle stem cells – DFSCs) formen die Bestandteile des Parodonts (Wurzelszement, Alveolarknochen und parodontales Ligament) (4, 31-33). Folglich differenzieren DFSCs zu Zementoblasten, Odontoblasten und Fibroblasten (34).

2005 isolierten Morscheck et al. DFSCs aus humanen impaktierten Weisheitszähnen mit unvollständigem Wurzelwachstum, welche folgende Eigenschaften aufzeigten (34): Sie sind plastik-adhärenz und bilden Kolonien wie DPSCs (34). DFSCs exprimieren typische mesenchymale Stammzell-Marker (Nestin, Notch-1, collagen type I, bone sialoprotein (BSP), osteocalcin (OCN)) und besitzen eine Fibroblasten-ähnliche Morphologie (34). Des Weiteren können DFSCs in vitro sowohl robustes Bindegewebe-ähnliches Gewebe als auch kalzifizierte Cluster mit Knochen-/Zement-ähnlichen Eigenschaften bilden (34). Zudem sind sie im bovinen Studienmodell fähig, sich in vitro zu osteogenen, adipogenen und PDL-ähnlichen Zellen zu entwickeln (35).

In einigen Studien wurde gezeigt, dass humane sowie tierische DFSCs in Kombination mit einem Gerüst aus Hydroxylapatit-Trikalzium-Phosphat (HA/TCP) oder ähnlichen keramischen Substanzen mineralisiertes Knochen- oder Zement-ähnliches Gewebe in immunsupprimierten Nagern bilden können (36-38).

2.3.2 Stammzellen aus der dentalen Pulpa (DPSCs)

Im Jahr 2000 wurden die ersten adulten pulpalen Stammzellen von Gronthos et al. aus der Pulpa von impaktierten Weisheitszähnen isoliert (39). Die Isolierung erfolgte zu späteren Zeitpunkten auch aus entzündetem pulpalem Gewebe, natalen und überzähligen Zähnen (40-42). Anatomisch befinden sich DPSCs in der perivaskulären Nische inmitten des pulpalen Gewebes (43). Sie besitzen eine hohe Proliferationsrate und sind in der Lage, in vitro mineralisierte Cluster zu bilden (4, 39). Durch die Cluster-Formationen zeigen DPSCs, dass sie potenziell am (Wieder-)Aufbau ossären Gewebes beteiligt sein könnten. Aufgrund ihrer Multipotenz können sie sich des Weiteren zu neuronalen Zellen, Adipozyten, Chondrozyten, Hepatozyten und Myoblasten-ähnlichen Zellen entwickeln (44-46).

In-vivo-Untersuchungen stützen die These, dass DPSCs in der regenerativen Endodontie erfolgreich eingesetzt werden können (47-49). Nach Injektion humaner DPSCs in immunsupprimierte Mäuse kam es zur Bildung eines Pulpa-Dentin-ähnlichen Gewebekomplexes (47, 49).

2.3.3 Stammzellen aus der Milchzahnpulpa nach Exfoliation (SHED)

Nach natürlicher Exfoliation der Milchzähne können aus Pulparesten SHED gewonnen werden. Diese Vorgehensweise stellt eine für den Patienten schonende und einfach zugängliche Variante der Stammzellgewinnung dar (50).

SHED zeigen multipotente Eigenschaften mit Differenzierung zu zahlreichen mesenchymalen Zelllinien, wie Adipozyten, Odontoblasten, Chondrozyten, Osteoblasten und Myozyten (51). Obwohl SHED auch aus der Pulpa stammen, weisen sie zu DPSCs Unterschiede auf. Zum Beispiel ist die Proliferationsrate von SHED höher als diejenige von DPSCs unter in-vitro-Bedingungen. Außerdem differenzieren SHED eher zu knochenbildenden Zellen als DPSCs (51). In immungeschwächten Mäusen wurde gezeigt, dass SHED ein Pulpa-ähnliches Gewebe

zusammen mit vaskulären Anastomosen bilden können (50, 52). Zusätzlich beeinflussen SHED das Immunsystem, indem sie die Menge an T-Helfer-Zellen regulieren (53).

2.3.4 Stammzellen aus dem Parodontalen Ligament (PDLSCs)

2004 wurden PDLSCs als weitere Kategorie dentaler ektomesenchymaler Stammzellen von Seo et al. als erstes beschrieben und isoliert (54). Sie wurden aus der Wurzeloberfläche extrahierter Zähne gewonnen. Verglichen zu BMMSCs besitzen sie eine schnellere Proliferation und ein höheres Potenzial, adhärenente Kolonien zu bilden. Obwohl PDLSCs in vitro multipotente Fähigkeiten zeigen, ist bei BMMSCs und DPSCs die osteogene Differenzierung ausgeprägter. Nichtsdestotrotz können sie zu Chondrozyten, Osteoblasten, Zementoblasten und Adipozyten differenzieren (54-56).

In einigen Studien wurde beobachtet, dass PDLSCs aus entzündetem Gewebe ähnliche Proliferations- und Differenzierungseigenschaften besitzen wie gesunde PDLSCs, migrieren jedoch stärker (57, 58).

In vivo wurden humane PDLSCs mit HA/TCP-Partikeln vermengt. Hierbei wurde die Generierung eines Zement-PDL-ähnlichen Komplexes nach Transplantation in einen murinen parodontalen Defekt beobachtet (54).

2.3.5 Stammzellen aus der apikalen Papille (SCAPs)

Die apikale Papille ist definiert als das Weichgewebe am Apex sich entwickelnder Zähne. Somit ist dieses Gewebe mit der Wurzelbildung assoziiert (59). Aus der zellreichen apikalen Zone zwischen apikaler Papille und Pulpa können SCAPs gewonnen werden (60). Sonoyama et al. fanden diese Zellen 2006 an unvollständig ausgewachsenen Wurzeln impaktierter humaner Weisheitszähne und charakterisierten sie (59). SCAPs werden aus Gewebe gewonnen, das noch nicht ausgereift ist, und repräsentieren somit Vorläuferzellen (19). Sie sind fähig, sich zu Odontoblasten, Osteoblasten, glatten Muskelzellen, Adipozyten, Chondrozyten und zu neuronalen Zellen in vitro zu entwickeln (61-63). Folglich stellen SCAPs eine vielversprechende Population für regenerative Therapien dar (19).

2.4 Knochenentwicklung

Ober- und Unterkieferknochen entstehen genauso wie die Schädelkalotte und die Klavikula durch desmale Osteogenese. Die meisten Knochen werden jedoch chondral gebildet.

Durch die desmale Osteogenese entwickelt sich das Mesenchym direkt zu Knochen ohne das Knorpelstadium zu durchschreiten. Im embryonalen Stadium verdichten sich Mesenchymzellen an gefäßreichen Ossifikationspunkten und differenzieren kontinuierlich zu Osteoblasten. Diese Zellen synthetisieren eine noch unkalzifizierte Matrix, das Osteoid. Es enthält vor allem Kollagen Typ I, Proteoglykane und Glykoproteine. Anschließend fällt Kalziumphosphat in Form von Hydroxylapatit aus, so dass die Mineralisierung eingeleitet wird. Die sogenannten Osteoidspangen werden nun zu Knochenspangen (64, 65). Somit bildet sich ein Netzwerk aus feinen Knochenbälkchen, der Geflechtknochen. Hier liegt Kollagen ungeordnet vor. Osteoklasten, Zellen des Knochenabbaus, und Osteoblasten, Zellen der Knochenbildung, befinden sich im Gleichgewicht, da im Stadium des Geflechtknochens rege Abbau-, Umbau-, und Wachstumsprozesse stattfinden (64, 65). Geflechtknochen wird bis zum 10. Lebensjahr durch Lamellenknochen ersetzt (64).

Die chondrale Osteogenese beginnt wie die desmale, indem sich undifferenzierte Mesenchymzellen konzentrieren und eine ausgeprägte Zell-Zell-Kommunikation ermöglicht wird (66). Nun werden zukünftige Röhrenknochen zuerst knorpelig angelegt und später infolge komplexer Umbauten durch Knochengewebe ersetzt. Somit kommt es indirekt zur Knochenbildung. Der chondrale Mechanismus setzt sich aus der anfänglichen perichondralen Ossifikation und der abschließenden enchondralen Ossifikation zusammen.

Im ersten Abschnitt bildet sich eine Knochenmanschette um den knorpeligen Schaft (Diaphyse) des Skelettstückes. Die Knochenmanschette entsteht desmal und stützt den Knorpel, der zu einem hypertrophen Blasenknorpel degeneriert. Die Mineralisierung der Umgebungsmatrix wird durch die Blasenknorpelzellen eingeleitet, die als Folge dessen absterben. Nun sprossen Blutgefäße ein und leiten zur enchondralen Phase über (64, 65).

Die enchondrale Ossifikation ist charakterisiert durch den kontinuierlichen Knorpelabbau durch Chondroblasten, den Abbau von extrazellulärer Matrix und den damit geschaffenen Platz für mesenchymale Zellen, die sich zu Osteoblasten differenzieren (64, 65).

2.5 Osteogene Differenzierung

In BMMSCs, die typische Progenitorzellen von Osteoblasten darstellen, sind die molekularen Mechanismen der Osteogenese gut untersucht worden (67). Sie verläuft wie folgt: Wachstumsfaktoren aus der Familie der Knochenmorphogenetischen Proteine (Bone morphogenic proteins – BMPs) binden an Typ I und Typ II Serin/Threoninkinase-Rezeptoren. Diese aktivierten BMP-Rezeptoren (z. B. BMPRII) phosphorylieren R-SMADs (receptor-regulated- small body size-mothers against decapentaplegic homologs) – SMAD1, 5 und 8 –, die an SMAD4 binden. Dieser gebildete SMAD-Komplex löst zunächst eine Signal-Kaskade von Transkriptionsfaktoren aus, wie DLX5 und DLX3 (distal-less homeobox 5 und 3), RUNX2 (runt-related transcription factor 2; synonym: Cbfa1, core-binding factor, runt domain, alpha subunit 1) und Osterix (synonym: SP7, OSX) (68). Die Auslösung dieser Signalkaskade führt zur gesteigerten Genexpression genannter Transkriptionsfaktoren. Hierbei ist RUNX2 von besonderem Interesse, da er eine Schlüsselrolle in der osteogenen Differenzierung einnimmt (69-71). Diese Hochregulation steigert im weiteren Verlauf das Expressionsprofil von anderen osteogenen Markern wie OCN (Osteocalcin) und ALP (Alkalische Phosphatase). Die Kaskade endet mit Bildung biomineralisierter Cluster (72).

2.6 Mikro-RNAs und ihre Funktion

Mikro-RNAs (micro-Ribonucleic acids; Synonym: miRNAs) sind kurze RNA-Einzelstränge, die 19 bis 24 Nukleotide beinhalten und gehören zur Klasse der nicht-kodierenden endogenen RNAs. miRNAs inhibieren die Genexpression (Gen-Silencing), indem sie an das untranslatierte 3'-Ende (3'-UTR) der messenger-RNA (mRNA) von Zielgenen binden (73, 74). Diese Zielgene werden post-transkriptional entweder an der Translation gehemmt oder durch Zerschneiden (Degradation) abgebaut (75). miRNAs leiten sich von einer Vorläufer-miRNA (pre-miRNA) mit Haarnadelstruktur aus etwa 70 Nukleotiden ab und wurden in einer Vielzahl von Organismen (Pflanzen, Tiere, Menschen) gefunden. Nach der Transkription werden die miRNA-Vorläufer im Nukleus gespalten und vom Protein Exportin-5 in das Zytoplasma exportiert. Durch die Endoribonuklease Dicer wird die Vorläufer-miRNA zur reifen kurzsträngigen miRNA gespalten (74). Bei diesem Vorgang entstehen zwei

komplementäre Stränge als Duplex – miRNA und miRNA* (76). Nur einer der beiden Stränge wird in den RISC (RNA induced silencing complex) integriert und kann an unvollständig komplementären Bindesequenzen innerhalb der 3'-UTR von Zielgenen binden. Diese Bindung ermöglicht die Regulierung dieser Zielgene durch den reifen miRNA-Strang (guide-Strang) (77). Dieser guide-Strang wird aufgrund seiner geringeren Basenpaarungs-Stabilität von 2-4 nt am 5'-Ende der Duplex ausgewählt und in den aktiven RISC eingegliedert. Hierbei sind Argonaut-(Ago)-Proteine beteiligt, die als Ribonukleasen die mRNA des miRNA-Zielgens zerschneiden und somit degradieren können (78).

Um die Funktion einer spezifischen und reifen miRNA in vitro zu erforschen, wird die ausgewählte miRNA als miRNA-mimic durch Transfektion in der Zelle überexprimiert. Folglich ersetzt der miRNA-mimic die reife miRNA im Zytoplasma im Sinne des guide-Stranges (74). (Abb. 4)

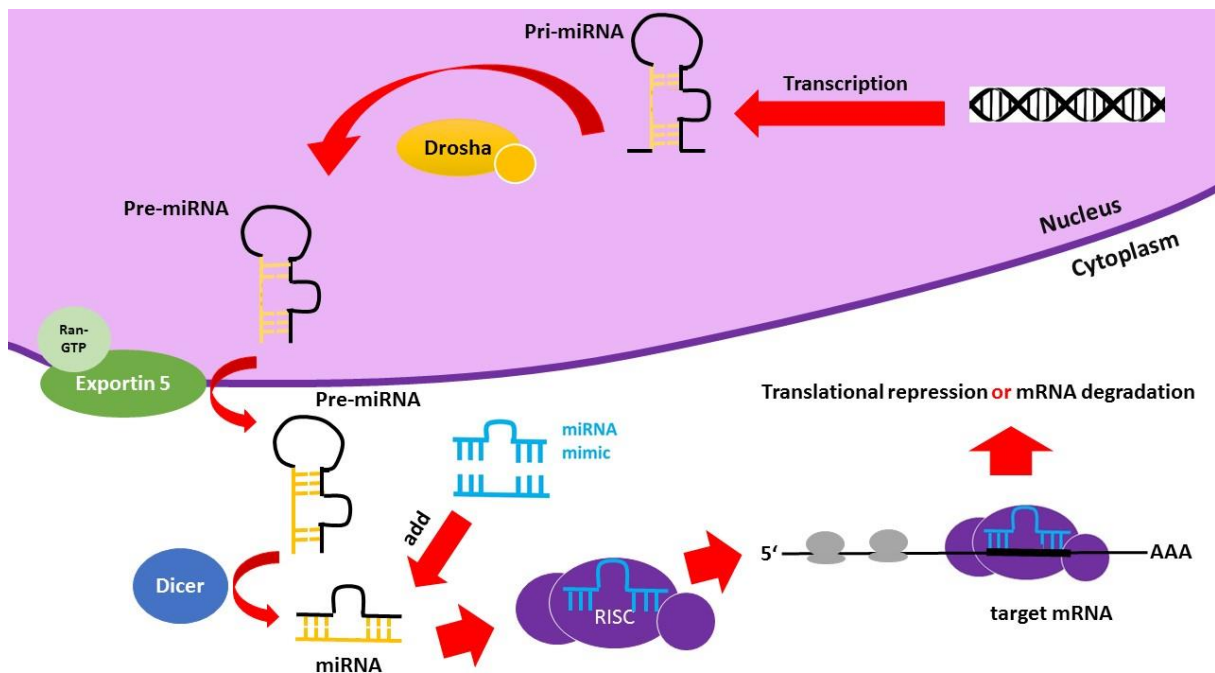


Abb. 4: Schema der Entstehung und Funktion der reifen miRNA, die durch einen miRNA-mimic ersetzt werden kann. (Eigene Darstellung in Anlehnung an (74))

miRNA-mimics sind chemisch modifizierte, doppel-strängige miRNA-ähnliche RNAs. Ihr 5'-Ende ist partiell komplementär zu dem 3'-Ende ihres Zielgens, sodass dieser miRNA-mimic wie die endogene miRNA an die mRNA des Zielgens binden kann (79). (Abb. 5)

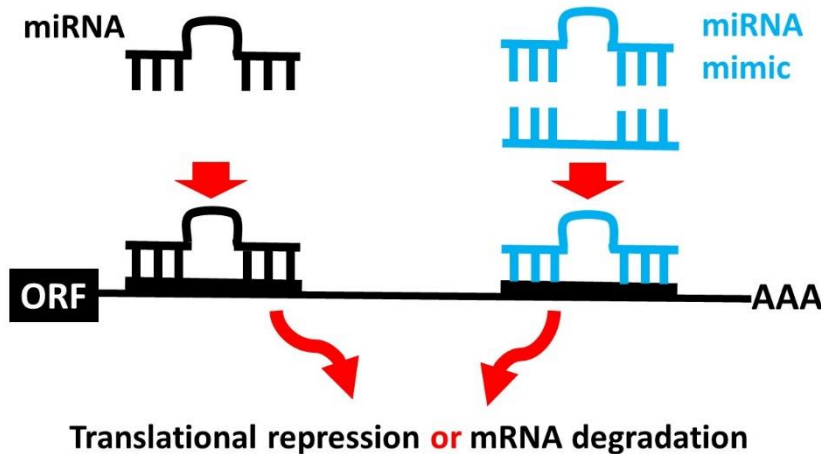


Abb. 5: Funktionsweise reifer miRNA und synthetisch hergestelltem miRNA mimic; ORF=open reading frame (Eigene Darstellung in Anlehnung an (79))

Die Schlüsselrolle von miRNAs als aktive Regulatoren in der Stammzellentwicklung hat sich in den letzten Jahren anhand zahlreicher Beobachtungen gezeigt (80, 81). In embryonalen Stammzellen sind sie maßgebend für die Selbsterneuerung verantwortlich (82). In mesenchymalen Stammzellen sind sie an der Zelldifferenzierung beteiligt (83, 84). In beinahe allen Zellen, Organen und Geweben von Säugetieren befinden sich miRNAs. Hier sind sie in der Apoptose, Zellproliferation, Zellteilung und/oder hematopoetischen Differenzierung involviert. Zudem beeinflussen miRNAs die Entwicklung von Nerven, Muskeln und Herz (73, 85).

An jedem Schritt der Knochenentwicklung sind miRNAs beteiligt (86-88). Sie beeinflussen Wachstum und Differenzierung von Osteoblasten, Osteoklasten-induzierte Knochenresorptionen und Knochen-Homöostase. Somit können miRNAs als Knochen-regulierend bezeichnet werden (86). Auch modulieren sie das Gleichgewicht zwischen Proto-Onkogenen und Tumor Suppressor Genen. Sowohl Mutationen von miRNAs sowie Dysregulationen in ihrer Biogenese als auch Mutationen der Transkripte ihrer Zielgene können zu einer Vielzahl von Krankheiten, im äußersten Fall zu Tumoren, führen (89).

In Wirbellosen wird die Anzahl an miRNA-Genen auf 120 geschätzt. Säugetiere beherbergen mindestens 222 Gene dieser Art. (90-92) Im humanen Genom wurden mehr als 2000 reife miRNAs identifiziert (93). Es ist sehr wahrscheinlich, dass miRNAs in einem komplexen funktionalen Netzwerk agieren, in dem eine einzige miRNA tausende Gene in ihrer

Expression reguliert, während ein Gen von einer Vielzahl miRNAs reguliert werden kann (91, 94). Interessant ist zudem, dass miRNAs Transkriptionsfaktoren als Zielgene bevorzugen (95). Des Weiteren ist bekannt, dass zwischen 40% und 90% der humanen Protein-kodierenden-Gene unter dem Einfluss von miRNAs stehen (96).

2.7 miRNAs bei der osteogenen Differenzierung

Studien zeigen, dass miRNAs am komplexen ossären Auf- und Umbau beteiligt sind, da sie sowohl die anabolischen Aktivitäten der Osteoblasten als auch die katabolischen Vorgänge der Osteoklasten beeinflussen (86, 97). Beobachtungen zeigen des Weiteren ihre Schlüsselrolle bei der osteogenen Differenzierung in verschiedenen Zelltypen (ADSCs, MC3T3-E1 Zellen, ST2 Zellen) (98-100).

Zu der Rolle von miRNAs bei der osteogenen Differenzierung in DFSCs ist weit weniger bekannt (101) als in anderen (Stamm-)Zellarten:

miRNAs, wie miR-20a, -21, -24, -101 und -138, die die Osteogenese unterstützen, inhibieren unterschiedliche Marker. Eine Überexpression von miR-20a in MSCs reguliert den BMP-Signalweg durch Herunterregulierung ihrer Zielgene PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma), BAMBI (BMP and activin membrane-bound inhibitor homolog) und Crim1 (Cysteine-rich motor neuron 1 protein). Durch Inhibition dieser drei Antagonisten des BMP-Signalweges kommt es zur Aktivierung der Osteogenese (102).

miR-12 und miR-101 unterstützen die osteogene Differenzierung durch Inhibition des Zielgens PLAP-1 (periodontal ligament associated protein-1). PLAP-1 ist ein spezifischer Marker in PDLSCs, der die Osteogenese unterdrückt.

Ebenso zeigten einige Studien inhibitorische Aktivitäten von miRNAs auf die Osteogenese in humanen und murinen mesenchymalen Zellen, indem miRNAs beispielweise die Genexpression von einzelnen Transkriptionsfaktoren des BMP-Signalweges herunterregulierten (80, 103). Hierzu zeigten Li et al. 2008 eine wichtige Erkenntnis für die Osteoblastogenese auf: BMP2 inhibiert die Expression von anti-osteogenen miRNAs, sodass die Osteogenese über den BMP-Signalweg nicht eingeschränkt wird. Folglich fördert BMP2 direkt als auch indirekt die osteogene Differenzierung (103).

miR-133 und miR-135 beispielweise sind Inhibitoren der osteogenen Differenzierung. Beide unterdrücken die Expression von SMAD5 und RUNX2. Somit fördert BMP2 die Osteogenese

beispielsweise durch Inhibition von miR-133 und miR-135 und folglich durch indirekte Hochregulierung von SMAD5 und RUNX2 (103).

MiR-26a, auch ein Inhibitor der osteogenen Differenzierung, hemmt die Genexpression von SMAD1 in humanen ADSCs. Dies führt zur Herunterregulierung von ALP, OCN und Collagen Typ 1 (99). Weitere anti-osteogene miRNAs sind unter anderem miR-9-3p, -10a, -10b, -19b, -27a, -124a, -125b, -181a, -206, -218 und -489 (100, 104-107).

Es wurden zudem miRNAs erforscht, die sowohl die osteogene Differenzierung aktivieren als auch inhibieren (98, 108-110). miR-29b beispielsweise unterdrückt die Produktion von Collagen Typ 1, 4 und 5. Somit werden die Biosynthese der extrazellulären Matrix und die Mineralisation inhibiert. Auf der anderen Seite wird durch Kontrolle der Wnt-, TGF β 3 (Transforming growth factor beta 3)-, MAPK (Mitogen-activated protein kinases)-Signalwege und epigenetischer Mechanismen die Osteoblastogenese unterstützt. Hierbei werden durch miR-29b inhibitorische Osteogenese-Marker (z. B. TGF- β 3) herunterreguliert (98).

3 Ziel der Arbeit

Der Einfluss von bestimmten miRNAs auf die osteogene Differenzierung in DFSCs soll in dieser Studie näher untersucht werden. Mithilfe eines miRNA-Arrays sollten miRNAs gefunden werden, die im Rahmen der osteogenen Differenzierung hochreguliert sind. Bei den am stärksten hochregulierten miRNAs sollte daraufhin in unterschiedlichen Versuchen geprüft werden, ob und in welchem Ausmaß diese an der osteogenen Differenzierung von DFSCs beteiligt sind. Hierfür wurden mithilfe von miRNA-mimics die regulierenden Eigenschaften natürlicher miRNAs nachgeahmt. ALP-Aktivitätsmessungen, Alizarin-Rot-Färbungen und das Expressionsverhalten osteogener Marker durch real-time RT-PCRs validierten den osteogenen Einfluss ausgewählter miRNA-mimics in transfizierten DFSCs. Mithilfe dieser Methoden wurde versucht, bestimmte miRNAs hinsichtlich ihres osteogenen Potenzials zu identifizieren und zu charakterisieren.

4 Material und Methoden

4.1 Verbrauchsmaterialien und Geräte

4.1.1 Einwegartikel

- BD Microlance 3™ Kanülen: BD, Heidelberg
- Omnifix®-F-Spritze (1ml): B. Braun Melsungen AG, Melsungen
- PCR tubes: Axygen, Corning Inc., Lowell, USA
- Pipettenspitzen, gestopft: SafeSeal, Biozym, Hessisch Oldendorf
- RNeasy MinElute spin column: Qiagen, Hilden
- round-bottom tubes: BD Discovery Labware Falcon™
- Safe-Lock Tubes (0,5 MI, 2 MI): Eppendorf GmbH, Wesseling-Berzdorf
- Serologische Pipetten: Greiner CELLSTAR® Greiner Bio-one, Frickenhausen
- T75-Zellkulturflaschen: Corning Inc., Lowell, USA
- Zentrifugenröhrchen (15ml, 50ml): BD Discovery Labware Falcon™, USA

4.1.2 Chemikalien

- 2-phospho-L-Ascorbinsäure: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
- Aceton: Roth, Karlsruhe
- Alizarin Rot S: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
- Alkaline buffer (pH: 10,3; 1,5M) Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
- Ammoniumhydroxid: Roth, Karlsruhe
- β-Glycerophosphat: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
- β-Mercaptoethanol: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
- Cetylpyridiniumchlorid: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
- DMEM: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
- EDTA: Merck, Darmstadt
- Ethanol: Roth, Karlsruhe
- Ethidiumbromid: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
- FBS: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
- Formaldehydlösung, 37%: Roth, Karlsruhe

- Glutaraldehyd: Roth, Karlsruhe
- HEPES-Puffer: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
- Natriumhydroxid: Roth, Karlsruhe
- PBS: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
- Phosphatase Substrat: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
- TBE-Puffer: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
- Transfektionsreagenz HiPerFect: Qiagen, Hilden
- Triton-X-100: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
- Trypsin: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

4.1.3 Kits

- LightCycler® Fast Start DNA
Master ^{PLUS} SYBR Green I Kit: Roche Diagnostics, Mannheim
- Light Cycler® Taq-Man Master Set: Roche Diagnostics, Mannheim
- miRNeasy mini Kit: Qiagen, Hilden
- miScript II RT Kit: Qiagen, Hilden
- miScript SYBR Green PCR Kit: Qiagen, Hilden
- Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA: Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA

4.1.4 Geräte

- Abzug: Airflow Controller AC3 MC6
- Durchflusssytometer: BD FACSCANTO II (BD)
- Flüssigstickstoffbehälter: Arpege 110, Air Liquide, Düsseldorf
- Inkubator: HeraCell 150 Heraeus, Hanau
- Mikroskop: Nikon Eclipse TS100, Chiyoda, Tokyo, Japan
- NanoDrop 2000: Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
- PCR-Cycler: MJ Mini Thermal Cycler BioRad, Hercules, CA, USA
- pH-Meter: Mettler Toledo
- Plattenphotometer: Infinite® F200 Tecan, Crailsheim
- Power Supply: PowerPack 3000 BioRad, Hercules, CA, USA

- Real-Time PCR-Cycler: LightCycler® 2.0 Roche Diagnostics, Mannheim
7900HT Cycler, Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
- Reinstwassersystem T: KA X-Cad, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA
- Sicherheitswerkbank: HeraSafe HS12, Heraeus, Hanau
Scientific Inc., Waltham, MA, USA
- Wasserbad: GFL 1092 GFL, Burgwedel
- Zellzähler: Neubauer Zählkammer, LO-Laboroptik GmbH,
Friedrichsdorf
- Zentrifugen:
 - centrifuge 5417R, Eppendorf AG, Hamburg
 - Heraeus™ Labofuge™ 400 Centrifuge, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA

4.1.5 PCR-Primer

Tabelle 1: Primer-Sequenzen aufgeteilt in forward und reverse primer für die real-time PCR

Gene	Forward primer	Reverse Primer	TaqMan-Sonde
GAPDH	5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3'	5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3'	
BMP2	5'-CGGACTGCGGTCTCCTAA-3'	5'-GGAAGCAGCAACGCTAGAAG-3'	
BMPRI1A	5'-GGACGAAAGCCTGAACAAAA-3'	5'-GCA ATT GGT ATT CTT CCA CGA-3'	
RUNX2	5'-GTGCCTAGGCGCATTTC-3'	5'-GCTCTTCTTACTGAGAGTGAAGG-3'	#29
ALP	5'-CAACCCTGGGGAGGAGAC-3'	5'-GCATTGGTGTGTACGTCTTG-3'	#19
Osterix	5'-CATCTGCCTGGCTCCTTG-3'	5'-CAGGGGACTGGAGCCATA-3'	
DLX3	5'-GAGCCTCCTACCGCAATAC-3'	5'-TCCTCCTTCACCGACACTG-3'	
DLX5	5'-CTACAACCGCGTCCAAG-3'	5'-GCCATTACCACTTCTCACCT-3'	
Collagen1	5'-GGGATTCCCTGGACCTAAAG-3'	5'-GGAACACCTCGCTCTCCAG-3'	
SMAD1	5'-TGTGTACTATACGTATGAGCTTTGTGA-3'	5'-TAACATCCTGGCGGTGGTA-3'	#32
SMAD3	5'-GTCTGCAAGATCCCACCAG-3'	5'-AGCCCTGGTTGACCGACT-3'	#79
SMAD6	5'-TCCGCCACCTCCCTACT-3'	5'-ACATGCTGGCGTCTGAGAAT-3'	
Smurf1	5'-CGACCCAGGATACCAAGA-3'	5'-CTCCCAGAACTGTACTTCTGACTT-3'	#64
Noggin2	5'-AAGCTGCGGAGGAAGTTACA-3'	5'-GTACAGCACGGGGCAGAA-3'	
VEGFA	5'-GCAGCTTGAGTTAAACGAACG-3'	5'-GGTTCCCGAAACCCTGAG-3'	#69
PPARγ	5'-GTGGCCGCAGAAATGACCA-3'	5'-GGAGATGCAGGCTCCACTTT-3'	
CRIM1	5'-GTGGAATGCCCTCCTGTTCA-3'	5'-GCACTCGCATCTTGTGGC-3'	
BAMBI	5'-GCTGCTCACCAAAGGTGAAAT-3'	5'-CTTGCAAGAGAGTCCAGGCA-3'	

4.2 Methoden

4.2.1 Zellisolierung und Zellkultivierung

Die Isolierung von humanen dentalen Follikel-Vorläuferzellen wird von Morsczeck et al. 2005 ausführlich beschrieben (34). In der vorliegenden Arbeit wurden bereits isolierte und eingefrorene Zellen für alle Versuche verwendet.

Diese plastik-adhärenenten Spindel-ähnlichen Zellen wurden in T75-Zellkulturflaschen bei einer Temperatur von 37 °C und einem CO₂-Anteil von 5% kultiviert. Für das Zellwachstum waren diese Flaschen mit 10 ml Standard-Kultivierungsmedium befüllt, das sich aus DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, 4,5 g/l High Glucose), 10% fötalem Rinderserum (FBS) und 1% Penicillin/Streptomycin (10.000 units Penicillin/ml, 10mg/ml Streptomycin) zusammensetzte (im weiteren Verlauf als Standardmedium bezeichnet). Nicht an die Plastikoberfläche der Kultivierungsflasche anhaftende Zellen wurden durch Wechseln des Standardmediums entfernt. Das Medium wurde alle 2 bis 3 Tage gewechselt. Um eine höhere Anzahl an Zellen zu erreichen, wurden sie passagiert und auf mehrere T75-Flaschen aufgeteilt.

Das Passagieren verlief wie folgt: Das Standardmedium wurde abgezogen und die Zellen wurden mit 10-20 ml PBS gewaschen. PBS wurde im nächsten Schritt abgezogen. Durch Zugabe von 5 ml 37°C warmem Trypsin wurden DFSCs von ihrer Plastikoberfläche gelöst. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5% CO₂ für 5 bis 8 Minuten inkubiert. Die Ablösungsreaktion wurde mit 5 ml Standardmedium gestoppt. Die erzielte Zellsuspension wurde in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 bis 8 Minuten bei 1000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Das Medium wurde abgezogen und das gebildete Pellet am Boden des Zentrifugenröhrchens wurde in 1 ml Standardmedium resuspendiert. Auf ein Endvolumen von 10 ml wurde Standardmedium hinzugefügt. Die Zellen wurden mittels Zählkammer unter dem Mikroskop gezählt. Zirka 375000 Zellen wurden in einer T75-Flasche mit 10 ml Standardmedium ausplattiert. Für alle folgenden Versuche wurden DFSCs in Passage 6 verwendet.

4.2.2 Zelldifferenzierung

Damit DFSCs zu mineralisierenden Zellen differenzieren, wurde das Standardmedium durch osteogenes Differenzierungsmedium (ODM) ersetzt. Zu diesem Zeitpunkt erreichten die Zellen zirka 90% Konfluenz. ODM setzte sich aus DMEM, 10% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin, 10^{-7} M Dexamethason, 100 μ M phospho-Ascorbinsäure, 10 mM β -Glycerophosphat und 20 mM HEPES-Puffer zusammen. DFSCs wurden für die in den jeweiligen Versuchen angegebene Zeit mit ODM kultiviert.

4.2.3 RNA-Isolierung

Die Isolierung totaler RNA von DFSCs wurde nach 24 Stunden, 3, 7, 14 und 28 Tagen durchgeführt. Hierzu wurde das miRNeasy mini Kit unter Zuhilfenahme des mitgelieferten Handbuches verwendet. (Tabelle 2)

Tabelle 2: Anleitung der RNA-Isolierung

1. 700µl Lyse-Reagenz pro 6-Well hinzufügen	9. wenn Rest in Tubes verbleibt, Schritt 8 wiederholen
2. In Mikroreaktionsgefäß (1,5 ml) überführen und homogenisieren (1 ml Spritze); 5 min ruhen lassen	10. 700µl RWT Puffer hinzufügen; 15 sek bei Raumtemp. zentrifugieren; Durchfluss wegschütten
3. Chloroform 140µl/6-Well hinzufügen; 15 sek kräftig schütteln	11. 500µl RPE Puffer hinzufügen; 15 sek bei Raumtemp. zentrifugieren; Durchfluss wegschütten
4. 2-3 min ruhen lassen	12. 500µl RPE Puffer hinzufügen; 2 min bei Raumtemp. zentrifugieren; Durchfluss wegschütten
5. 15 min bei 4°C zentrifugieren (14 000 rpm)	13. Mini column in neues 2 ml Tube geben (ohne Zugabe); 1 min bei Raumtemp. zentrifugieren
6. Oberste Phase abziehen (ca. 350µl) & in 2 ml Tubes überführen	14. 2 ml Tube entsorgen; Mini column in Mikroreaktionsgefäß geben
7. 1,5-faches Volumen (525µl) von 100% Ethanol hinzufügen; vorsichtig mischen durch Pipettieren	15. mit 40 µl RNase-freiem Wasser eluieren; 1 min bei Raumtemp. zentrifugieren
8. 700µl in Mini column überführen; 15 sek bei Raumtemp. zentrifugieren; Durchfluss wegschütten	16. Mini column entsorgen; Mikroreaktionsgefäß auf Eis legen

4.2.4 Reverse Transkription (RT) für miRNA-Array und miRNA-Assays

Für die RT wurde das miScript II RT Kit eingesetzt. Es beinhaltet den miScript Reverse Transcriptase Mix, 10x Nucleics Mix, 5x miScript HiSpec Buffer und den 5x miScript HiFlex Buffer. Mithilfe des 5x miScript HiSpec Buffer wird die reife miRNA in cDNA umgewandelt. Mithilfe des 5x miScript HiFlex Buffer wird sowohl reife miRNA als auch Vorläufer-miRNA, mRNA und nicht-kodierende RNA in cDNA umgewandelt. Dieser Buffer enthält den oligo-dt-Primer und den Random-Hexamer-Primer. (Abb. 6)

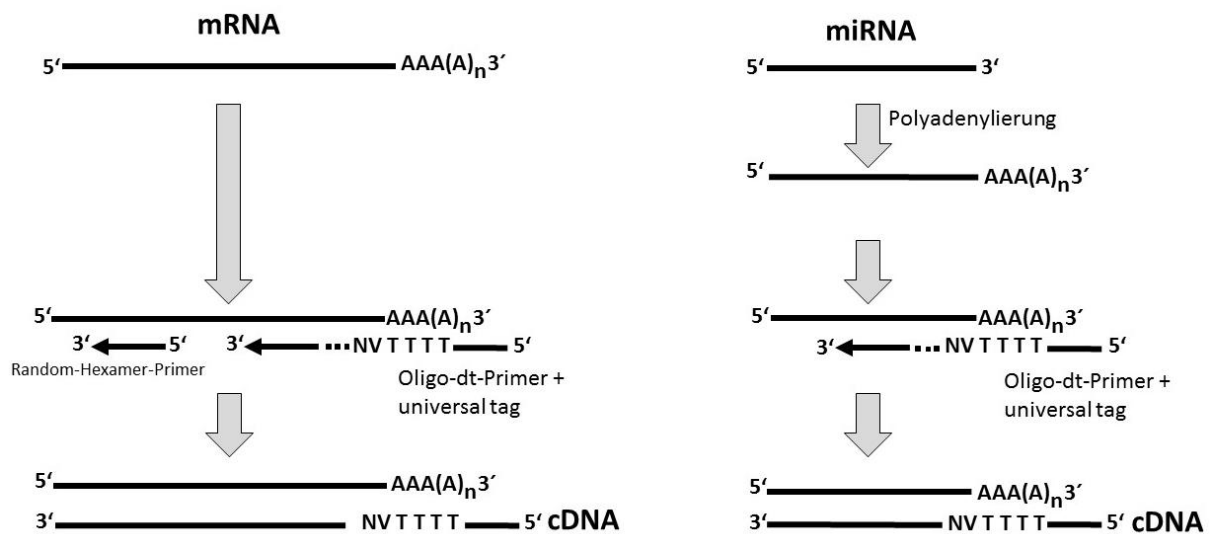


Abb. 6: RT von mRNA und miRNA (Eigene Darstellung in Anlehnung an miScript PCR System Handbook, Qiagen) V: Base A, C oder G; N: Base A, C, G oder T

Reife miRNA ist im Gegensatz zur mRNA nicht polyadenyliert. Deswegen läuft parallel zur RT die Polyadenylierung durch die Poly-(A)-Polymerase ab. Die RT wird eingeleitet durch den oligo-dT-Primer, der an den Poly-A-Schwanz der Vorläufer-miRNA bindet. Durch die Reverse Transkriptase wird der komplementäre cDNA-Strang synthetisiert. Der oligo-dT-Primer besitzt an seinem 5'-Ende eine universale Anhängersequenz (universal tag), an welche der Universal Primer bei der späteren real-time RT-PCR bindet. Hierdurch kann eine ordnungsgemäße Amplifizierung der reifen miRNA bei der späteren real-time Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR – polymerase chain reaction) ausgeführt werden. (Abb. 6)

Der RT Master Mix beinhaltet 4 µl entweder 5x miScript HiFlex oder 5x miScript HiSpec Buffer, 2µl 10x miScript Nucleics Mix und 2 µl miScript Reverse Transcriptase Mix. Zum RT

Master Mix kam ein maximales RNA-Volumen von 12 µl hinzu mit einem maximalen RNA-Gehalt von 1 µg. Der tatsächlich hinzugefügte RNA-Gehalt wurde anhand der zuvor berechneten RNA-Konzentration für jede Probe durch das NanoDrop-Spektrometer ermittelt. Alle Proben wurden auf die ermittelte minimale RNA-Konzentration kalibriert. Mit einem variablen Volumen RNase-freien Wassers für jede Probe wurde auf ein Endvolumen von 20 µl des RT-Reagenzes aufgefüllt.

In der ersten Phase der RT wurden die Reagenzien im Thermocycler bei einer Temperatur von 37°C für 60 Minuten inkubiert. Hier wurde die gesamte RNA in cDNA umgeschrieben. Im zweiten Schritt wurden durch Inkubation für 5 Minuten bei 95°C die miScript Reverse Transcriptase und RNA-DNA-Hybridmoleküle denaturiert. Nach abgeschlossener RT wurden die Proben mit RNase-freiem Wasser verdünnt, um auf eine maximale cDNA-Konzentration von 1,5 ng/µl zu kommen. Die Proben wurden bei -20°C gelagert.

4.2.5 Real-time-RT-PCR

4.2.5.1 miRNA Array

Um herauszufinden, welche miRNAs bei der osteogenen Differenzierung der DFSCs eine Rolle spielen, wurde die relative Genexpression von 84 miRNAs, mithilfe des miScript miRNA PCR Array Human Cell Development & Differentiation (MIHS-103Z) von Qiagen untersucht. Die restlichen Wells enthielten Kontrollen. Zu den Kontrollen gehörten miR-39 miScript Primer Assay, 6 snoRNA/snRNA miScript Primer Assays, miRNA reverse transcription control (miRTC) und positive PCR control (PPC).

Durchgeführt wurde die real-time PCR des miScript miRNA Arrays mit dem 7900HT Cycler. Hierzu wurde das miScript SYBR® Green PCR Kit verwendet.

Der Reaktionsmix für den gesamten Array bestand aus 550 µl 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, 110 µl 10x miScript Universal Primer, 340 µl RNase-freiem Wasser und 100 µl Template cDNA. Nach Hinzufügen der cDNA wurde der Array für eine Minute bei 1000 g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Folgendes PCR-Amplifikations-Programm wurde durchgeführt:

Tabelle 3: PCR-Amplifizierungs-Programm für das miScript SYBR® Green PCR Kit (Quelle: miScript miRNA PCR Array Handbook 10/2011)

Schritt	Zeit	Temperatur	Kommentar
Initiale Aktivierung	15 min	95 °C	Aktivierung der HotStarTaq DNA-Polymerase
Denaturierung	15 sek	94 °C	
Annealing	30 sek	55 °C	
Extension	30 sek	70 °C	Messung der Fluoreszenzintensität

Die Ergebnisse der real-time PCR wurden mittels einer miScript miRNA PCR Array Web-basierten Software ausgewertet, die auf <http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/mirna> verfügbar war. Die relative Genexpression wurde von dieser Datenanalyse-Software mittels $\Delta\Delta C_T$ -Methode ermittelt (111).

4.2.5.2 miRNA PCR

Alle real-time RT-PCRs wurden mit dem LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics, Mannheim) durchgeführt. Für die Detektion der relativen Genexpression von miR-101 und miR-124 in transfizierten DFSCs wurde das miScript SYBR® Green PCR Kit verwendet.

Tabelle 4: Vorbereitungen für real-time PCRs auf miRNA-Ebene

1. Verdünnen des cDNA-Gehalts auf 3ng mit Nuklease-freiem Wasser
2. Inhalt der Proben:
- 10 µl 2xQuantiTect SYBR Green PCR Master Mix
- 2 µl 10x miScript Universal Primer
- 4 µl Nuklease-freies Wasser
- 2 µl 10x miScript Primer Assay (miR-101-3p, miR-124-3p, RNU6-2_1 (Housekeeper))
- 2 µl Template cDNA (für NTC: Nuklease-freies Wasser)

Das PCR-Amplifikationsprogramm enthält dieselben Einstellungen wie jenes für den miScript miRNA Array, wie oben geschrieben.

4.2.5.3 mRNA PCR

Um die relative mRNA-Genexpression in transfizierten DFSCs zu untersuchen, wurden zwei andere Kits verwendet: Das Light Cycler® Fast Start DNA Master^{PLUS} SYBR Green I Kit und das Light Cycler® TaqMan Master Kit.

Tabelle 5: Kapillareninhalt bei Verwendung von zwei unterschiedlichen Kits für real-time PCRs auf mRNA-Ebene

<p>1. Probeninhalt (Light Cycler® Fast Start DNA Master^{PLUS} SYBR® Green I Kit):</p> <ul style="list-style-type: none"> - 19 µl Mastermix (13 µl Nuklease-freiem Wasser, 1µl forward primer (10pmol), 1µl reverse primer (10 pmol), 4 µl SYBR® Green-Mix) - 1 µl cDNA (50 ng); für NTC 1 µl Nuklease-freies Wasser
<p>2. Probeninhalt (Light Cycler® TaqMan Master Kit):</p> <ul style="list-style-type: none"> - 19 µl Mastermix (13 µl Nuklease-freiem Wasser, 1µl forward primer (10pmol), 1µl reverse primer (10 pmol), 4 µl TaqManMix) - 1 µl cDNA (50 ng); für NTC 1 µl Nuklease-freies Wasser - 0,1 µl TaqMan-Sonde

Für beide Kits galt dasselbe PCR-Amplifizierungs-Programm für 45 Zyklen:

Tabelle 6: PCR- Amplifizierungsprogramm für das Light Cycler® Fast Start DNA Master^{PLUS} SYBR® Green I Kit und das Light Cycler® TaqMan Master Kit

Schritt	Zeit	Temperatur	Kommentar
Denaturierung	10 min	95 °Celsius	
Denaturierung	20 sek	95 °Celsius	
Annealing	5 sek	58-60 °Celsius	Primer-abhängig
Elongation	20 sek	72 °Celsius	Messung der Fluoreszenzintensität
Kühlung	30 sek	40 °Celsius	Nach 45 Zyklen

Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green lagert sich zwischen doppelsträngiger DNA unspezifisch an und kann zur Fluoreszenz angeregt werden. Am Ende jedes Elongationsschrittes wird die Fluoreszenz gemessen. Hierbei sollte nur die gewünschte Sequenz, die von den Primern flankiert ist, doppelsträngig vorliegen. Folglich ist die Fluoreszenzintensität ein direktes Maß für neu-synthetisierte DNA. Um das PCR-Produkt zu verifizieren, folgt dem Amplifikationsprogramm ein Schmelzkurvenprogramm. Hierbei wird die Probe auf 65°C abgekühlt und langsam erwärmt. Bei 65°C liegt eine hohe Fluoreszenzintensität vor, da DNA-Moleküle doppelsträngig vorliegen. Mit steigender Temperatur verringert sich die Fluoreszenzintensität, da immer mehr DNA-Moleküle denaturieren. Wird eine bestimmte Temperatur erreicht, trennen sich auch die gewünschten PCR-Produkte. Bei diesem Schritt fällt die Fluoreszenz schlagartig ab. Für jede doppelsträngige DNA kann eine charakteristische Schmelztemperatur bestimmt werden.

Bei Verwendung von TaqMan-Sonden ist eine Schmelzkurvenanalyse nicht erforderlich. TaqMan-Sonden sind Oligonukleotide, deren Sequenz spezifisch für den zu amplifizierenden Bereich der cDNA ist. An einem Ende ist die TaqMan-Sonde an einem fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt, an dem anderen Ende ein Quencher. Dieses Quencher-Molekül hindert den fluoreszierenden Farbstoff Licht zu emittieren, wenn sich beide in räumlicher Nähe befinden. Durch eine intrinsische DNase-Aktivität der Polymerase werden während der Elongation des komplementären Stranges die Nucleotide der TaqMan-Sonde abgebaut. Hierdurch entfernt sich der Quencher nun vom fluoreszierenden Farbstoff. Die Fluoreszenz kann nun gemessen werden.

Nach der Schmelzkurvenanalyse wird der C_T -(Cycle threshold-)Wert für Berechnungen der relativen Genexpression verwendet. Er beschreibt die PCR-Zyklenzahl, bei der die Fluoreszenzintensität einen Schwellenwert überschreitet. Je höher die Zyklenzahl, umso schwächer ist die Genexpression. Mithilfe der $2^{\Delta\Delta C_T}$ -Methode wird die relative Genexpression des jeweiligen Zielgens in Excel bestimmt (112). (Formel 1) Als Kalibrator wurde der C_T -Mittelwert der Triplikate verwendet, deren RNA sofort nach Transfektion isoliert wurde.

Formel 1: Zustandekommen des $2^{\Delta\Delta Ct}$ Wertes (112)

$$\Delta Ct = Ct(Housekeeper) - Ct(Zielgen)$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(Probe) - \Delta Ct(Kalibrator)$$

$$\text{relative Genexpression} = 2^{\Delta\Delta Ct}$$

4.2.6 Transfektion von DFSCs

DFSCs in Passage 6 wurden nach Erreichen der Subkonfluenz mit miRNA-mimics von Qiagen transient transfiziert. Für die Transfektion wurden die erworbenen mimics hsa_miR-101-3p und hsa_miR-miR-124-3p (5nM) verwendet. Die Transfektion ist aus dem Handbuch „Guidelines of miRNA mimic and inhibitor experiments (Qiagen)“ entnommen worden und verlief wie folgt:

Tabelle 7: Transfektionsanleitung von DFSCs

1. Medium abziehen und Zellen mit PBS waschen
2. Mediumwechsel (Standardmedium)
3. Transfektionsreagenz hergestellt: <ul style="list-style-type: none"> - Für mimics: DMEM + mimic + HiPerfect Reagenz - Für AllStar siRNA: Standardmedium mit 10% FBS + AllStar siRNA + HiPerfect Reagenz
4. Inkubation des Transfektionsreagenz für 5-10 min bei Raumtemperatur (15-25°C)
5. Tröpfchenweises Hinzugeben des Transfektionsreagenz auf DFSCs
6. Nach 24 h Mediumwechsel

4.2.7 ALP-Aktivität und Alizarin-S-Rotfärbung

Mithilfe der ALP-Aktivitätsmessung und Alizarin-Rotfärbung wurde die osteogene Differenzierung von DFSCs evaluiert.

Zum Nachweis der ALP-Aktivität wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit 40 µl 0,1% Triton-X 100 pro Well lysiert. 15 µl des Lysats des Wells kamen in ein jeweils neues Well einer neuen 96-Well-Platte für eine spätere DNA-Quantifizierung. Zu diesen 15 µl

kamen je 100µl TE-Puffer/Pico-Green (Verhältnis 200:1) und 85µl TE-Puffer hinzu. Mit dem Tecan-Plattenphotometer wurde die Fluoreszenz (Anregung bei 485nm, Emission bei 535nm) gemessen.

Zu den verbliebenen 25 µl der ursprünglichen 40 µl pro Well wurden 25 µl Alkalischer Puffer und 41,6 µl einer Phosphatase-Substrat-Lösung hinzugefügt. Im Anschluss wurde diese Mischung für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach Inkubation wurde die Reaktion jeweils durch Zugabe von 41,6 µl NaOH (0,3 M) gestoppt. Die optische Dichte bei 405 nm wurde mit dem Tecan-Plattenphotometer gemessen. Die ALP-Aktivität wurde zum DNA-Gehalt, der mithilfe des Quant-It Pico Green dsDNA Assay Kits gemessen wurde, normalisiert.

Um Kalzium-Depositionen zu zeigen, wurden die Zellen mit je 500 µl PBS gewaschen, mit kaltem 70 prozentigem Ethanol für 20 Minuten fixiert und nochmals mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden für 20 Minuten mit einer 2-prozentigen Alizarin-Lösung (pH: 4,3) angefärbt, die aus Alizarin-Red-Pulver und PBS hergestellt worden war. Zum makroskopischen und mikroskopischen Nachweis der Kalzifikationen wurden die Zellen mehrmals mit PBS gewaschen.

Für den quantitativen Nachweis der biomineralisierten Cluster wurden die Zellen mit einer 10-prozentigen Cetylpyridinium-Chlorid-Monohydrat-Lösung entfärbt. Nach Inkubation für 30 Minuten wurde die Absorption bei 540nm mit dem Tecan-Plattenphotometer gemessen.

4.2.8 Statistik

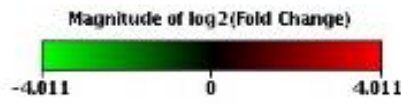
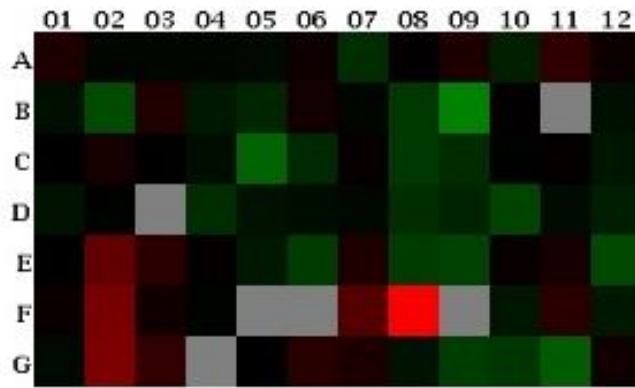
Statistische Auswertungen von jeweils zwei zu vergleichenden Gruppen wurden mithilfe des Student's t-Test vollzogen ($n \geq 3$) und ihre Signifikanz dadurch ausgewertet. Als signifikant wurden p-Werte kleiner als 0,05 angenommen (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$). Alle Säulendiagramme veranschaulichen Mittelwert-Ergebnisse mit positiver Standardabweichung.

5 Ergebnisse

5.1 miScript miRNA PCR Array

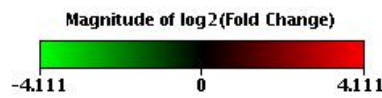
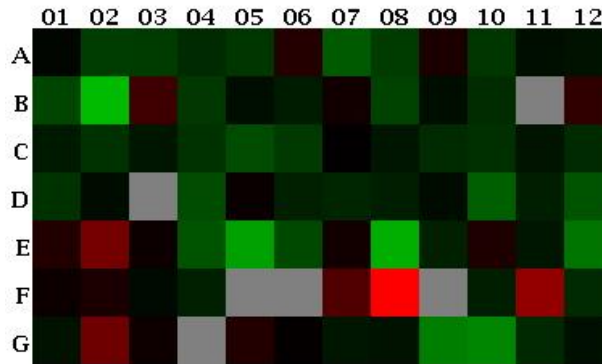
Abb. 7 zeigt in einer sogenannten heat map Darstellung mittels Farbskala die Regulation aller 84 untersuchten miRNAs nach 24 Stunden (Abb. 7 A) und nach sieben Tagen (Abb. 7 B) nach osteogener Differenzierung. Als Kalibrator beider Zeitpunkte nach ODM-Induktion dienten die Ergebnisse nach 24-stündiger Kultivierung der Zellen in Standardmedium. Die miRNAs hsa-miR-33a-5p, -101-3p, -124-3p, -130a-3p und -205-5p waren nach 24 Stunden am stärksten hochreguliert. hsa-miR-33a-5p, -101-3p, -124-3p, -130a-3p und -150-5p waren nach 7 Tagen am stärksten hochreguliert. Die miRNAs hsa-miR-9-5p, -146a-5p, -182-5p, -196a-5p und -218-5p waren nach 24 Stunden am stärksten herunterreguliert. Nach 7 Tagen waren hsa-miR-7-5p, -96-5p, -182-5p, -223-3p und -375 am stärksten herunterreguliert. Die korrespondierenden Tabellen zeigen die relative Genexpression aller 84 untersuchten miRNAs nach 24 Stunden (Abb. 7 A) und sieben Tagen (Abb. 7 B). miR-101 und miR-124, die zu beiden Zeitpunkten hochreguliert waren, wurden für weitere Untersuchungen ausgewählt.

A



Layout	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	hsa-miR-106b-5p 1.37 OKAY	hsa-let-7e-5p -1.06 OKAY	hsa-miR-20b-5p -1.07 OKAY	hsa-miR-125a-5p -1.07 OKAY	hsa-miR-125b-5p -1.12 OKAY	hsa-miR-122-5p 1.16 B	hsa-miR-155-5p -1.66 OKAY	hsa-miR-126-3p 1.02 OKAY	hsa-miR-22-3p 1.39 OKAY	hsa-miR-92a-3p -1.41 OKAY	hsa-miR-141-3p 1.69 B	hsa-miR-378a-3p 1.13 OKAY
B	hsa-miR-10a-5p -1.20 OKAY	hsa-miR-182-5p -2.29 B	hsa-miR-302a-3p 1.45 B	hsa-miR-93-5p -1.31 OKAY	hsa-miR-1 -1.51 B	hsa-miR-181a-5p 1.25 OKAY	hsa-miR-146b-5p -1.06 OKAY	hsa-let-7f-5p -1.84 OKAY	hsa-miR-196a-5p -4.26 B	hsa-miR-301a-3p 1.02 OKAY	hsa-miR-488-3p 1.21 C	hsa-miR-215a-5p -1.19 B
C	hsa-miR-24-3p 1.00 OKAY	hsa-miR-192-5p 1.28 OKAY	hsa-miR-18a-5p 1.00 OKAY	hsa-miR-100-5p -1.17 OKAY	hsa-miR-9-5p -3.00 B	hsa-miR-137 -1.53 OKAY	hsa-miR-15a-5p 1.08 OKAY	hsa-miR-134-5p -1.85 OKAY	hsa-miR-103a-3p -1.61 OKAY	hsa-miR-424-5p -1.02 OKAY	hsa-miR-20a-5p 1.05 OKAY	hsa-let-7i-5p -1.27 OKAY
D	hsa-miR-222-3p -1.20 OKAY	hsa-miR-99a-5p -1.02 OKAY	hsa-miR-206 1.21 C	hsa-miR-195-5p -1.67 OKAY	hsa-miR-132-3p -1.21 OKAY	hsa-miR-16-5p -1.14 OKAY	hsa-miR-23b-3p -1.10 OKAY	hsa-miR-214-3p -1.64 OKAY	hsa-miR-21-5p -1.49 OKAY	hsa-miR-18b-5p -2.09 OKAY	hsa-miR-345-5p -1.13 OKAY	hsa-let-7c-5p -1.39 OKAY
E	hsa-miR-26a-5p -1.01 OKAY	hsa-miR-101-3p 2.94 OKAY	hsa-miR-17-5p 1.59 OKAY	hsa-miR-129-5p 1.05 OKAY	hsa-miR-96-5p -1.30 B	hsa-miR-183-5p -1.94 B	hsa-miR-210-3p 1.39 OKAY	hsa-miR-223-3p -1.93 B	hsa-let-7a-5p -2.06 OKAY	hsa-miR-518b 1.09 B	hsa-miR-194-5p 1.26 OKAY	hsa-miR-218-5p -2.24 OKAY
F	hsa-let-7d-5p 1.11 OKAY	hsa-miR-205-5p 3.67 B	hsa-miR-10b-5p 1.22 B	hsa-miR-185-5p -1.04 OKAY	hsa-miR-133b 1.21 C	hsa-miR-520g-3p 1.21 C	hsa-miR-33a-5p 2.53 OKAY	hsa-miR-124-3p 16.12 A	hsa-miR-208a-3p 1.21 C	hsa-miR-142-5p -1.28 B	hsa-miR-150-5p 1.60 B	hsa-miR-128-3p -1.29 OKAY
G	hsa-miR-15b-5p -1.11 OKAY	hsa-miR-130a-3p 3.93 OKAY	hsa-miR-127-5p 1.72 OKAY	hsa-miR-498 1.21 C	hsa-let-7b-5p -1.00 OKAY	hsa-miR-302c-3p 1.53 B	hsa-miR-219a-5p 1.37 OKAY	hsa-let-7g-5p -1.21 OKAY	hsa-miR-375 -1.98 A	hsa-miR-7-5p -1.82 OKAY	hsa-miR-146a-5p -2.73 OKAY	hsa-miR-142-3p 1.19 B

B



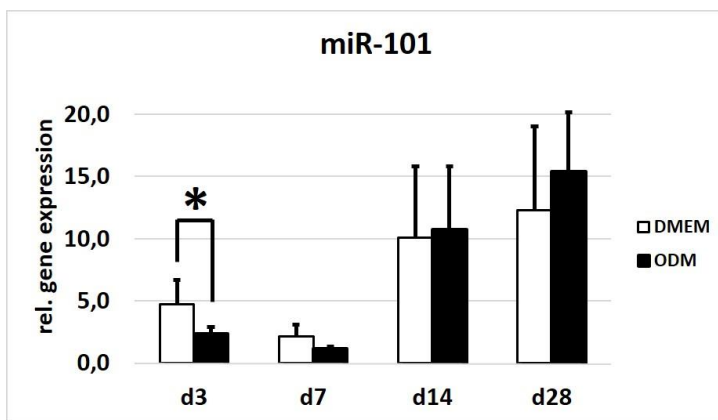
Layout	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	hsa-miR-106b-5p -1.08 OKAY	hsa-let-7e-5p -2.02 OKAY	hsa-miR-20b-5p -1.96 OKAY	hsa-miR-125a-5p -1.60 OKAY	hsa-miR-125b-5p -1.81 OKAY	hsa-miR-122-5p 1.49 B	hsa-miR-155-5p -2.72 OKAY	hsa-miR-126-3p -1.97 OKAY	hsa-miR-22-3p 1.35 OKAY	hsa-miR-92a-3p -1.82 OKAY	hsa-miR-141-3p -1.17 B	hsa-miR-378a-3p -1.22 OKAY
	hsa-miR-10a-5p -2.21 OKAY	hsa-miR-182-5p -8.16 B	hsa-miR-302a-3p 2.02 B	hsa-miR-93-5p -1.87 OKAY	hsa-miR-1 -1.17 B	hsa-miR-181a-5p -1.37 OKAY	hsa-miR-146b-5p 1.24 OKAY	hsa-let-7f-5p -2.11 OKAY	hsa-miR-196a-5p -1.18 B	hsa-miR-301a-3p -1.63 OKAY	hsa-miR-488-3p 1.57 C	hsa-miR-215-5p 1.69 B
C	hsa-miR-24-3p -1.33 OKAY	hsa-miR-192-5p -1.74 A	hsa-miR-18a-5p -1.27 OKAY	hsa-miR-100-5p -1.75 OKAY	hsa-miR-9-5p -2.33 B	hsa-miR-137 -1.91 OKAY	hsa-miR-15a-5p 1.02 OKAY	hsa-miR-134-5p -1.28 OKAY	hsa-miR-103a-3p -1.61 OKAY	hsa-miR-424-5p -1.71 OKAY	hsa-miR-20a-5p -1.25 OKAY	hsa-let-7i-5p -1.60 OKAY
	hsa-miR-222-3p -1.75 OKAY	hsa-miR-99a-5p -1.16 OKAY	hsa-miR-206 1.57 C	hsa-miR-195-5p -2.36 OKAY	hsa-miR-132-3p 1.11 OKAY	hsa-miR-16-5p -1.41 OKAY	hsa-miR-23b-3p -1.54 OKAY	hsa-miR-214-3p -1.41 OKAY	hsa-miR-21-5p -1.14 OKAY	hsa-miR-18b-5p -2.91 OKAY	hsa-miR-345-5p -1.39 OKAY	hsa-let-7c-5p -2.58 OKAY
E	hsa-miR-26a-5p 1.46 OKAY	hsa-miR-101-3p 3.68 OKAY	hsa-miR-17-5p 1.15 OKAY	hsa-miR-129-5p -2.55 A	hsa-miR-96-5p -6.06 B	hsa-miR-183-5p -2.29 B	hsa-miR-210-3p 1.21 OKAY	hsa-miR-223-3p -7.18 B	hsa-let-7a-5p -1.44 OKAY	hsa-miR-518b 1.40 B	hsa-miR-194-5p -1.26 OKAY	hsa-miR-218-5p -3.74 OKAY
	hsa-let-7d-5p 1.14 OKAY	hsa-miR-205-5p 1.32 B	hsa-miR-10b-5p -1.13 B	hsa-miR-185-5p -1.42 OKAY	hsa-miR-133b 1.57 C	hsa-miR-520g-3p 1.57 C	hsa-miR-33a-5p 2.45 OKAY	hsa-miR-124-3p 17.27 A	hsa-miR-208a-3p 1.57 C	hsa-miR-142-5p -1.40 B	hsa-miR-150-5p 5.18 B	hsa-miR-128-3p -1.58 OKAY
G	hsa-miR-15b-5p -1.23 OKAY	hsa-miR-130a-3p 3.43 OKAY	hsa-miR-127-5p 1.16 OKAY	hsa-miR-498 1.57 C	hsa-let-7b-5p 1.45 OKAY	hsa-miR-302c-3p 1.04 B	hsa-miR-219a-5p -1.28 A	hsa-let-7g-5p -1.21 OKAY	hsa-miR-375 -4.07 A	hsa-miR-7-5p -4.59 OKAY	hsa-miR-146a-5p -1.58 OKAY	hsa-miR-142-3p -1.19 B

Abb. 7: heat maps des analysierten miScript miRNA PCR Arrays mit den korrespondierenden fold change-Werten nach 24 Stunden (A) und nach 7 Tagen (B) nach ODM-Induktion. Als Kalibrator für beide Zeitpunkte wurden DFSCs nach 24-stündiger Kultivierung in Standardmedium verwendet. Rote Umrahmungen verdeutlichen die am stärksten hochregulierten miRNAs. Grüne Umrahmungen zeigen die am stärksten herunterregulierten miRNAs. Dieser Versuch wurde mit Unikaten (n=1) durchgeführt.

5.2 miRNA Primer Assays PCRs

Zunächst sollte die im miScript miRNA PCR Array gefundene Regulation von miR-101 und miR-124 in einzelnen PCRs überprüft werden. Hierfür wurde die Expression nach 3, 7, 14 und 28 Tagen untersucht. miR-124 und miR-101 wurden an Tag 7 verglichen zum Standardmedium nicht hochreguliert. miR-101 zeigte an Tag 3 eine signifikante Herunterregulierung. Im Vergleich zum Kalibrator (d0=1) weisen beide miRNAs ab Tag 7 (ODM) eine stetige Erhöhung der Genexpression auf. (Abb. 8 A und B)

A



B

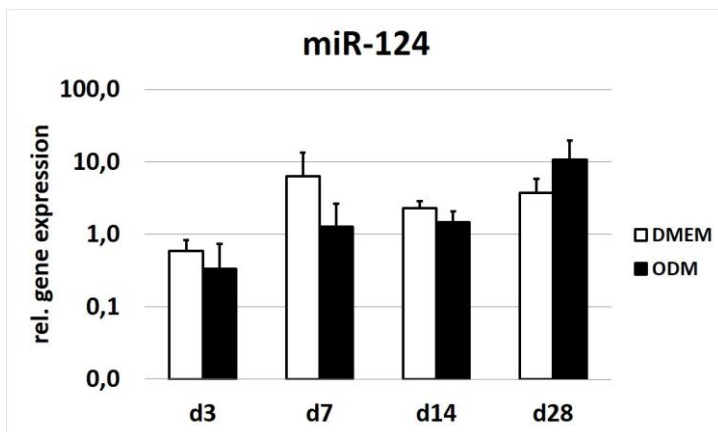


Abb. 8: real-time PCR-Auswertung von miR-101 und miR-124 an den Tagen 3, 7, 14 und 28. Als Kontrolle und statistischer Gegenüberstellung dienten DFSCs in Standardmedium. Dieser Versuch wurde mit Triplikaten und Quadruplikaten durchgeführt (n=3, n=4). Als Kalibrator diente Tag 0 nach Kultivierung in Standardmedium (d0=1). Die Säulen zeigen Mittelwert + SAW (Standardabweichung). *: p<0,05.

5.3 miRNA und mRNA PCRs

Um herauszufinden, ob miR-124 und miR-101 die osteogene Differenzierung fördern, wurde die relative Genexpression verschiedener osteogener Marker nach Überexpression von miR-124 und miR-101 untersucht. Nach Überexpression von miR-101, welches weder zu einer erhöhten ALP-Aktivität noch zu einer gesteigerten Mineralisierung geführt hat, war kein osteogenes Markergen signifikant hochreguliert. Während die miR-101 Überexpression keinen signifikanten Einfluss auf die Expression der meisten osteogenen Marker hatte, war DLX3 sogar herunterreguliert. Nach miR-124-Überexpression hingegen waren mehrere osteogene Markergene signifikant hochreguliert. Hierzu zählen BMP2 und dessen Rezeptor BMPR1A, ALP und DLX5. Weitere Gene, die nach miR-124-Überexpression hochreguliert waren, sind SMAD1, SMAD3, SMAD6 (gehören zum BMP-Signalweg), RUNX2, DLX3, Osterix, Collagen1, Smurf1, BAMBI, CRIM1 und PPAR γ . (Abb. 9)

ERGEBNISSE

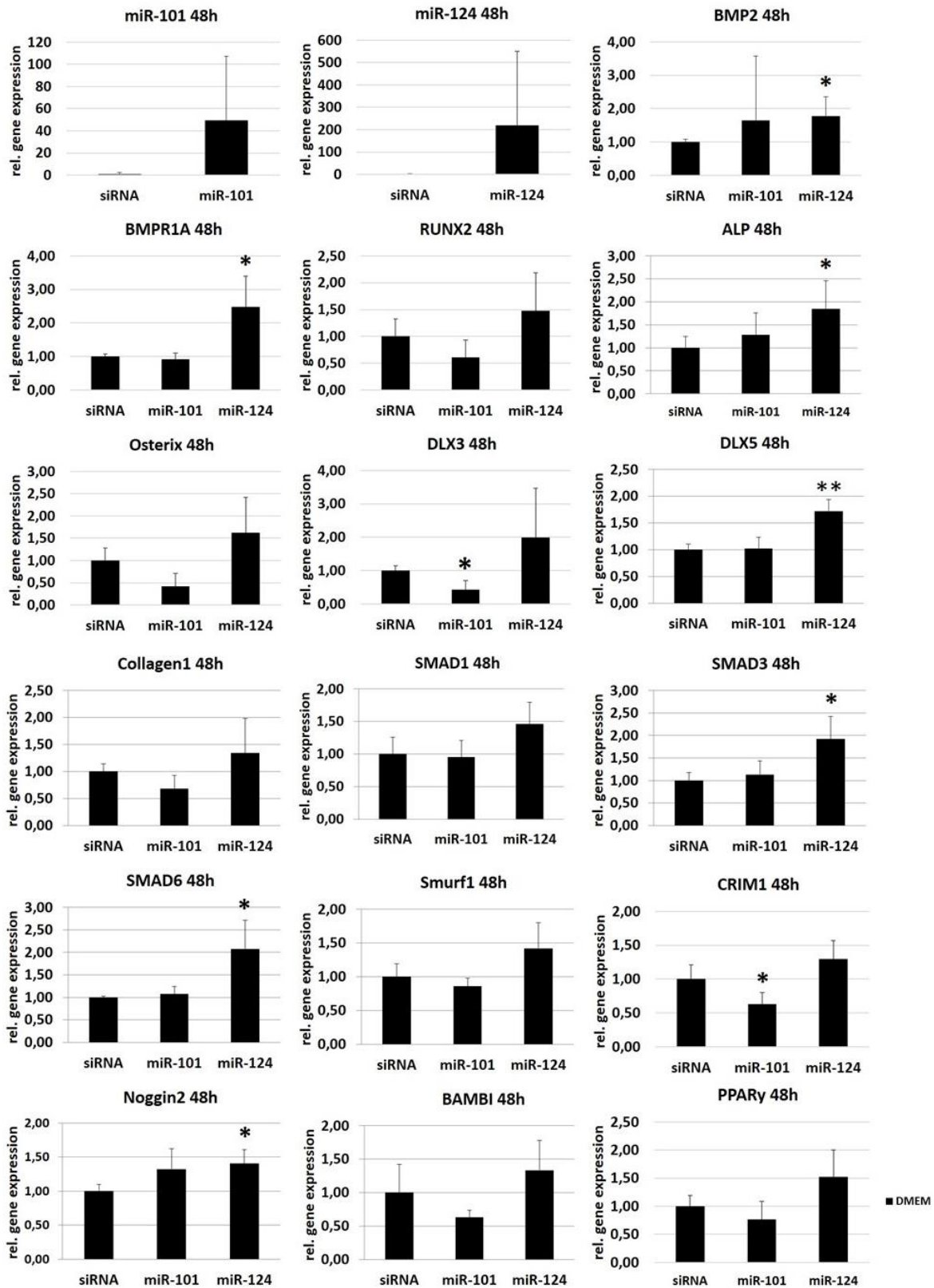
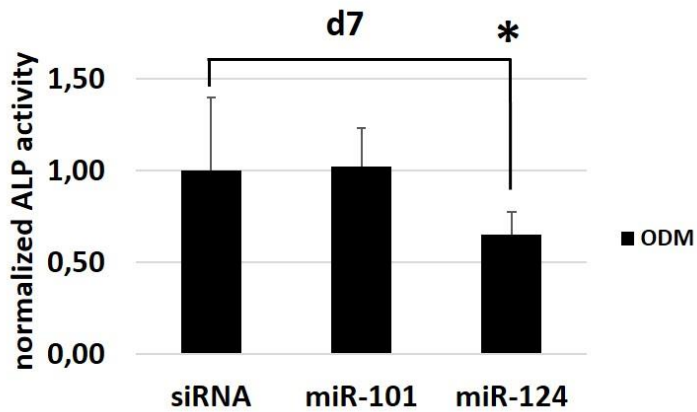


Abb. 9: real-time-RT-PCRs von osteogenen Markern 48 Stunden nach Transfektion mit miR-101-3p und miR-124-3p mimic. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$. Alle Versuche wurden mit Triplikaten durchgeführt (n=3) außer der Osterix-Versuch (n=2). Die Säulen zeigen Mittelwert + SAW.

5.4 ALP-Aktivitätsmessung

Um den Einfluss von miR-101 und miR-124 auf die osteogene Differenzierung näher zu untersuchen, wurden die DFSCs mit miRNA mimics transfiziert, die eine Überexpression beider miRNAs bewirken. Die transfizierten DFSCs wurden anschließend mit und ohne ODM weiter kultiviert. Anschließend wurde die ALP-Aktivität als Parameter für die osteogene Differenzierung an den Tagen 7 und 10 nach ODM-Induktion gemessen. (Abb. 10) Während die Transfektion mit miR-101 zu keiner signifikanten Änderung der ALP-Aktivität geführt hat, bewirkte die Überexpression von miR-124 einen signifikanten Anstieg der ALP-Aktivität nach 10 Tagen und nach 7 Tagen eine signifikante Herunterregulierung.

A



B

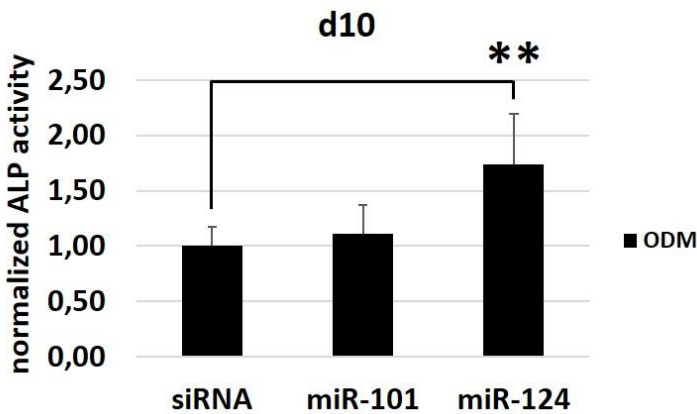


Abb. 10: Quantitative Auswertung der ALP-Aktivität von miR-101 und miR-124 nach ODM-Induktion an Tag 7 (A) und Tag 10 (B). Als Kontrolle wurde AllStar-siRNA eingesetzt. Dieser Versuch wurde mit 5 Replikaten durchgeführt (n=5). *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$. Die Säulen zeigen Mittelwert + SAW.

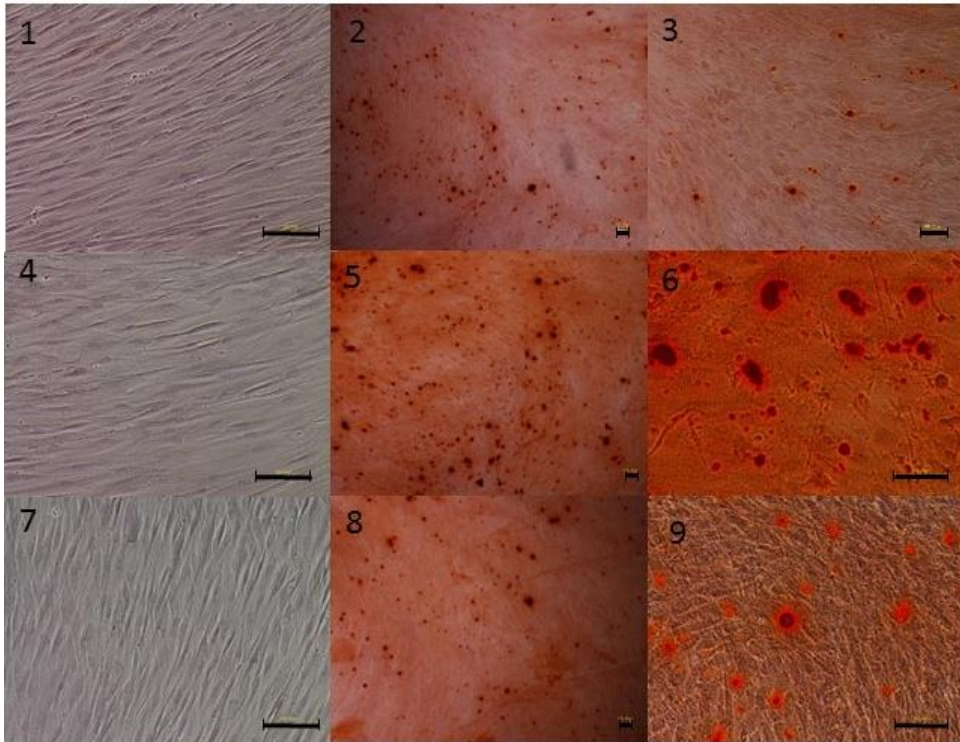
5.5 Alizarin-S-Rotfärbung

Als weiterer Parameter der osteogenen Differenzierung wurde die Mineralisierung der DFSCs nach Transfektion mit miR-101 und miR-124 mittels Alizarin-S-Rotfärbung bestimmt. Während nach Induktion mit ODM-Medium die Transfektion mit miR-101 zu keiner erhöhten Mineralisierung gegenüber der Kontrolle geführt hat (Abb. 11 A 2,3), war in den miR-124-transfizierten Zellen eine gesteigerte Mineralisierung zu sehen. (Abb. 11 A 5,6)

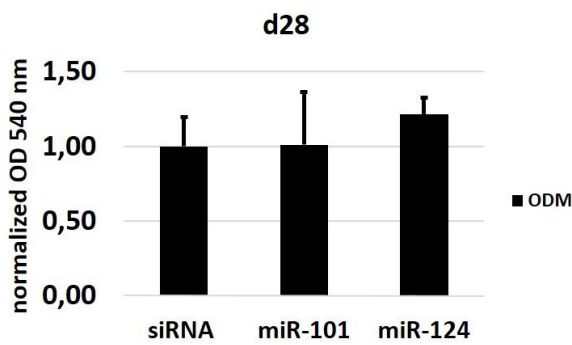
Die quantitative Auswertung des Mineralisierungspotenzials durch Entfärbung mit Cetylpyridinium-Chlorid-Monohydrat zeigte keine signifikante Regulierung von miR-101 und

miR-124. (Abb. 11 B, C) Dieser Versuch wurde zur Überprüfung der ersten Ergebnisse (Abb. 11 B) mit denselben DFSCs einmal wiederholt. (Abb. 11 C)

A



B



C

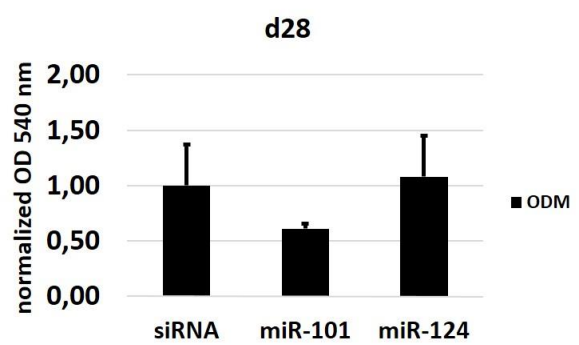


Abb. 11: Mikroskopische Darstellung der Mineralisierung von miR-101-3p- und miR-124-3p transfizierten DFSCs nach 28 Tagen ODM-Induktion (A) und quantitative Auswertung zweier identischer Versuche durch Entfärbung mit Ceylpyridinium-Chlorid-Monohydrat (B, C). Als Kontrolle und Kalibrator diente die AllStar siRNA. Der schwarze Balken in jedem Bild entspricht 100 μ m. Dieser Versuch wurde mit Duplikaten durchgeführt (n=2). Die Säulen zeigen Mittelwert + SAW.

6 Diskussion

Über die Bedeutung von miRNAs bei der osteogenen Differenzierung in DFSCs ist wenig bekannt (101). In der vorgelegten Arbeit wurde der Einfluss von spezifischen miRNAs auf die Osteogenese in DFSCs evaluiert. Von Interesse waren miRNAs, die osteogene Prozesse fördern. Mithilfe eines miScript miRNA PCR Arrays (Human Cell Development & Differentiation) wurden die am stärksten hochregulierten miRNAs ermittelt und in weiteren Versuchen näher untersucht.

Um die Konzentration von spezifischen miRNAs in der Zelle zu regulieren, können sowohl miRNA-mimics als auch miRNA-Inhibitoren (anti-miRNAs) eingesetzt werden. Beide Formen werden über eine transiente Transfektion in die Zellen eingebracht. In der vorgelegten Arbeit wurden lediglich miRNA-mimics eingesetzt, damit hochregulierte osteogene Prozesse direkt veranschaulicht werden können. Zusätzliche Versuche mit anti-miRNAs hätten die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit verifizieren können. Weitere Studien sind somit wünschenswert.

ALP-Aktivitätsmessungen, Alizarin-S-Rotfärbungen und das Expressionsverhalten osteogener Marker mittels real-time RT-PCRs validierten den osteogenen Einfluss ausgewählter miRNA-mimics in transfizierten DFSCs.

Die fördernde Rolle der Alkalischen Phosphatase bei der Knochenbildung konnte in den letzten Jahren durch zahlreiche Studien bestätigt werden, sodass die Ergebnisse der ALP-Versuche in der vorgelegten Arbeit aussagekräftig sind (113-116).

Für die mikroskopische Veranschaulichung von Kalziumdepositionen wurden die transfizierten Zellen mit Alizarin-S-Rot angefärbt. Mittels anschließender Entfärbung mit Cetylpyridinium-Chlorid-Monohydrat wurden quantitativ durch Messung der optischen Dichte vorhandene Mineralisierungen ermittelt. Die Detektion von mikrokristallinen Kalziumphosphatsalzen durch die Alizarin-S-Rotfärbung wird seit Jahrzehnten als eines der Standardverfahren verwendet. Folglich können die Ergebnisse in der vorgelegten Arbeit als vertrauenswürdig angesehen werden (117, 118).

miR-101 und miR-124 zählten zu den am stärksten hochregulierten miRNAs im miScript miRNA PCR Array. Diese beiden miRNAs wurden auf ihr osteogenes Potenzial in DFSCs hin evaluiert und versucht zu charakterisieren.

miR-101 wird als Tumor-Suppressor-miRNA bezeichnet und ist involviert in der Zellproliferation, Zellinvasion, Apoptose und Angiogenese (119, 120). Wenig ist zu miR-101 in Verbindung mit osteogener Differenzierung bekannt. 2012 wurde von Li et al. herausgefunden, dass eine Überexpression von miR-101 den Inhibitor osteogener Differenzierung PLAP-1 (periodontal ligament associated protein-1) in PDLSCs herunterreguliert und folglich die Osteogenese fördert (121).

In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch keine Förderung der Osteogenese durch miR-101 nachgewiesen werden. Obwohl der untersuchte miRNA PCR Array eine Hochregulation von miR-101 nach ODM-Induktion zeigte, haben die meisten folgenden Versuche entweder eine Herunterregulierung oder keine Regulation von miR-101 gezeigt. Diese Diskrepanz der Ergebnisse kann am Vergleich PCR-Array/PCR-Assay erklärt werden. Da der Array nur in Unikaten durchgeführt und die Einzel-PCR-Assays in Triplikaten, ist das Ergebnis des Einzel-PCR-Assays aussagekräftiger. Zudem wurden für beide Versuche unterschiedliche Zellchargen verwendet. Es ist bekannt, dass Zellen derselben Linie den gleichen Signalweg auf unterschiedliche Weise regulieren können (122). Folglich sind widersprüchliche Ergebnisse nicht auszuschließen. Trotz dieser Erkenntnis deuten in der vorgelegten Arbeit nahezu alle Auswertungen daraufhin, dass miR-101 die Osteogenese in DFSCs nicht unterstützt. miR-101-mimic transfizierte DFSCs beeinflusste beispielsweise weder die ALP-Aktivität an Tag 7 und Tag 10 noch Mineralisierungsprozesse nach 28 Tagen positiv.

Zu beobachten war dennoch, dass miR-101 im Einzel-PCR-Assay mit zunehmendem Zeitpunkt verglichen zum Kalibrator (d0=1) stärker exprimiert wurde. Dies trifft sowohl in Standardmedium als auch in ODM besonders an Tag 14 und Tag 28 zu. Somit kann gezeigt werden, dass miR-101 im direkten Vergleich Standardmedium zu ODM überwiegend keine Regulierung aufweist, jedoch im Zeitverlauf Medium-unabhängig verstärkt exprimiert wird. Eine Autodifferenzierung von miR-101 könnte der Grund für diese zeitabhängige, aber Medium-unabhängige Hochregulierung sein.

Dieselbe Beobachtung gilt auch für miR-124. Die Expression von miR-124 nimmt von Tag 7 bis Tag 28 Medium-unabhängig zu, obgleich schwächer als bei miR-101. Ob durch diese eventuelle Autodifferenzierung beider miRNAs die osteogene Differenzierung in DFSCs unterstützt wird, ist unklar.

Auch unklar ist die Rolle von miR-124 in der Osteogenese von DFSCs nach Auswertungen aller Versuche innerhalb dieser Arbeit. Eine erhöhte Genexpression von miR-124 an Tag 7 nach ODM-Induktion im Einzel-PCR-Assay verglichen zum Kalibrator wurde beobachtet. Dieses Ergebnis stützt vor allem die Auswertung des miScript miRNA PCR Arrays an Tag 7. Denn hier wurden als Kalibrator Werte nach 24 Stunden Kultivierung in Standardmedium verwendet. Trotzdem kam es in DFSCs nach zeitgleicher Induktion mit ODM und Kultivierung in Standardmedium zu keinem Zeitpunkt zu einer signifikanten Hochregulierung von miR-124. In diesem PCR-Array-Versuch scheint ODM besonders zu späten Zeitpunkten eine untergeordnete Rolle zu spielen. Alle weiteren Ergebnisse nach Transfektion der DFSCs mit miR-124 sind uneinheitlich.

Die ALP-Aktivität an Tag 7 wurde in transfizierten DFSCs signifikant herunterreguliert, an Tag 10 jedoch hochreguliert. Zudem zeigten Messungen der Alizarin-S-Rot-Entfärbung, dass die miR-124-transfizierten Zellen nur tendenziell die Mineralisierung unterstützen. Die Alizarin-S-Rotfärbung der transfizierten DFSCs lässt mehr Mineralisierungen erkennen als untransfizierte Zellen. Die Genexpression einiger osteogener Marker des BMP-Signalweges wurde induziert. Alle Ergebnisse lassen vermuten, dass miR-124 die Osteogenese in DFSCs beeinflusst.

Im Rahmen der osteogenen Differenzierung ist in der Literatur wenig zu miR-124 bekannt. In einer Studie von Qadir et al. (2014) wurde in murinen Zellen (mouse bone marrow-derived MSCs, MC3T3-E1 und C2C12 Zellen) gezeigt, dass bei Überexpression von miR-124 DLX2, DLX3, DLX5 sowie osteogene Marker (ALP, RUNX2, OCN und Osterix) herunterreguliert wurden. Infolge dieser Untersuchungen kann miR-124 als Inhibitor der osteogenen Differenzierung angesehen werden (123). miR-124 spielt eine Schlüsselrolle in der Neurogenese (124) und stimuliert die Adipogenese und Chondrogenese (125). Als Tumor-Suppressor-miRNA reguliert miR-124 onkogenetische Prozesse (126). Eine Überexpression dieser miRNA mindert akuten Stress durch Inhibition des Mineralocorticoid-Rezeptors (127).

In der vorliegenden Arbeit deuten jedoch einige Ergebnisse darauf hin, dass miR-124 in DFSCs die osteogene Differenzierung unterstützen könnte. Beispielsweise waren nach 48-stündiger Transfektion mit miR-124-mimic BMP2, BMPR1A, ALP, DLX3 und DLX5 signifikant hochreguliert. Im Gegensatz dazu waren in der Studie von Qadir et al. die letzten beiden genannten Gene herunterreguliert (123). Grund für dieses gegensätzliche Ergebnis könnte sein, dass die Osteogenese in humanen DFSCs vermutlich anders reguliert wird als in murinen Vorläufer-Osteoblasten.

In vergangenen Studien wurde gezeigt, dass DFSCs im Rahmen der osteogenen Differenzierung wahrscheinlich eine Sonderrolle einnehmen. In Studien von Viale-Bouroncle et al. (2011, 2012) beispielsweise wurde festgestellt, dass im Gegensatz zu BMMSCs und SHED eine niedrigere Oberflächensteifigkeit in DFSCs die osteogene Differenzierung unterstützt (128) (129). Zudem veranschaulichte kürzlich Felthaus et al., dass die osteogene Differenzierung von DFSCs einem alternativen Mechanismus folgen kann als in BMMSCs. Ein RUNX2-unabhängiger Differenzierungsweg ist sehr wahrscheinlich (130). In der vorgelegten Arbeit war RUNX2 nicht reguliert, so dass vermutlich auch miRNAs die Osteogenese über alternative Wege beeinflussen könnte. Weitere Studien sind notwendig, um die Sonderrolle der DFSCs unter Einfluss von miRNAs auf ihre osteogene Differenzierung näher zu beleuchten.

7 Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Aufgrund der Auswertung des miScript miRNA PCR Arrays wurden miR-101 und miR-124 als potenzielle Initiatoren der osteogenen Differenzierung in DFSCs für weitere Versuchsreihen ausgewählt. Um die Rolle beider miRNAs im osteogenen Prozess näher zu beleuchten, wurden DFSCs mit zugehörigen miRNA-mimics transfiziert. Nach Transfektion der Zellen wurde über ALP-Aktivitätsmessungen, Alizarin-S-Rotfärbungen und Ermittlungen der relativen Genexpression osteogener Marker der osteogene Einfluss von miR-101 und miR-124 ermittelt.

Die initiale Suche nach miRNAs, welche die osteogene Differenzierung von DFSCs fördern, war im Rahmen der vorliegenden Arbeit nur teilweise erfolgreich. miR-101 zeigte in nahezu allen Versuchen keine Regulation der Osteogenese in DFSCs. Somit kann vermutet werden, dass miR-101 in osteogenen Prozessen in DFSCs eine untergeordnete Rolle spielt.

Ob miR-124 die Osteogenese induziert oder inhibiert, konnte in der vorgelegten Arbeit nicht eindeutig veranschaulicht werden. Tendenziell kann anhand der vorliegenden Ergebnisse vermutet werden, dass miR-124 die osteogene Differenzierung unterstützt. Weitere Studien sind jedoch notwendig, um miR-101 und miR-124 im Rahmen der Osteogenese von DFSCs besser zu charakterisieren. Hierzu könnte beispielsweise der zusätzliche Einsatz von miRNA-Inhibitoren unter Verwendung identischer Zellchargen besseren Einblick in die osteogene Regulation von miR-101 und miR-124 geben. Für aussagekräftigere Statistiken wäre eine höhere Anzahl an Replikaten sinnvoll.

8 Literaturverzeichnis

1. Geerts SO, Legrand V, Charpentier J, Albert A, Rompen EH. Further evidence of the association between periodontal conditions and coronary artery disease. *Journal of periodontology* 2004;75:1274-1280.
2. Hellwig E, Klimek J., Attin T.; Einführung in die Zahnerhaltung: Deutscher Zahnärzterverlag, 2009.
3. Ji S, Choi YS, Choi Y. Bacterial invasion and persistence: critical events in the pathogenesis of periodontitis? *Journal of periodontal research* 2014.
4. Morsczeck C, Frerich B, Driemel O. Dental stem cell patents. *Recent patents on DNA & gene sequences* 2009;3:39-43.
5. Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell* 1997;88:287-298.
6. Lin NH, Gronthos S, Bartold PM. Stem cells and periodontal regeneration. *Australian dental journal* 2008;53:108-121.
7. Andrews PW. From teratocarcinomas to embryonic stem cells. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 2002;357:405-417.
8. Barrilleaux B, Phinney DG, Prockop DJ, O'Connor KC. Review: ex vivo engineering of living tissues with adult stem cells. *Tissue engineering* 2006;12:3007-3019.
9. Reynolds BA, Rietze RL. Neural stem cells and neurospheres--re-evaluating the relationship. *Nature methods* 2005;2:333-336.
10. Lakshmi U, Hart RP. Concise review: MicroRNA expression in multipotent mesenchymal stromal cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 2008;26:356-363.
11. Chari S, Mao S. Timeline: iPSCs-The First Decade. *Cell stem cell* 2016;18:294.
12. Mariano ED, Teixeira MJ, Marie SK, Lepski G. Adult stem cells in neural repair: Current options, limitations and perspectives. *World journal of stem cells* 2015;7:477-482.
13. Kolios G, Moodley Y. Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration; international review of thoracic diseases* 2013;85:3-10.
14. Morrison SJ, Kimble J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* 2006;441:1068-1074.
15. Bossu M, Pacifici A, Carbone D, Tenore G, Ierardo G, Pacifici L, et al. Today Prospects for Tissue Engineering Therapeutic Approach in Dentistry. *TheScientificWorldJournal* 2014;2014:151252.
16. Bundestag D. Gesetz zur Sicherstellung des Embryonenschutzes im Zusammenhang mit Einfuhr und Verwendung menschlicher embryonaler Stammzellen (Stammzellgesetz – StZG) - Vom 28. Juni 2002. In: 42 BJTIN (ed), 2002:2277-2280.
17. Bundestag D. Gesetz zur Änderung des Stammzellgesetzes - Vom 14. August 2008. In: 37 BJTIN (ed), 2008:1708.
18. Beyer Nardi N, da Silva Meirelles L. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. *Handbook of experimental pharmacology* 2006:249-282.
19. Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *Journal of dental research* 2009;88:792-806.

-
20. Morsczeck Cea. Stammzellbiologie und regenerative Zahnmedizin. *DZZ* 2009;65:479-487.
 21. Hu B, Unda F, Bopp-Kuchler S, Jimenez L, Wang XJ, Haikel Y, et al. Bone marrow cells can give rise to ameloblast-like cells. *Journal of dental research* 2006;85:416-421.
 22. Ohazama A, Modino SA, Miletich I, Sharpe PT. Stem-cell-based tissue engineering of murine teeth. *Journal of dental research* 2004;83:518-522.
 23. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Experimental hematology* 1976;4:267-274.
 24. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 1991;9:641-650.
 25. Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortesis A, et al. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *Journal of cell science* 2003;116:1827-1835.
 26. Cai Y, Dai X, Zhang Q, Dai Z. Gene expression of OCT4, SOX2, KLF4 and MYC (OSKM) induced pluripotent stem cells: identification for potential mechanisms. *Diagnostic pathology* 2015;10:35.
 27. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;126:663-676.
 28. Zhou H, Wu S, Joo JY, Zhu S, Han DW, Lin T, et al. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell stem cell* 2009;4:381-384.
 29. Shi S, Robey PG, Gronthos S. Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis. *Bone* 2001;29:532-539.
 30. Saito MT, Silverio KG, Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH, Jr. Tooth-derived stem cells: Update and perspectives. *World journal of stem cells* 2015;7:399-407.
 31. Wise GE, Frazier-Bowers S, D'Souza RN. Cellular, molecular, and genetic determinants of tooth eruption. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists* 2002;13:323-334.
 32. Cahill DR, Marks SC, Jr. Tooth eruption: evidence for the central role of the dental follicle. *Journal of oral pathology* 1980;9:189-200.
 33. Ten Cate AR. The development of the periodontium--a largely ectomesenchymally derived unit. *Periodontology 2000* 1997;13:9-19.
 34. Morsczeck C, Gotz W, Schierholz J, Zeilhofer F, Kuhn U, Mohl C, et al. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 2005;24:155-165.
 35. Honda MJ, Imaizumi M, Suzuki H, Ohshima S, Tsuchiya S, Satomura K. Stem cells isolated from human dental follicles have osteogenic potential. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* 2011;111:700-708.
 36. Handa K, Saito M, Yamauchi M, Kiyono T, Sato S, Teranaka T, et al. Cementum matrix formation in vivo by cultured dental follicle cells. *Bone* 2002;31:606-611.
 37. Tsuchiya S, Honda MJ, Shinohara Y, Saito M, Ueda M. Collagen type I matrix affects molecular and cellular behavior of purified porcine dental follicle cells. *Cell and tissue research* 2008;331:447-459.
 38. Yagyuu T, Ikeda E, Ohgushi H, Tadokoro M, Hirose M, Maeda M, et al. Hard tissue-forming potential of stem/progenitor cells in human dental follicle and dental papilla. *Archives of oral biology* 2010;55:68-76.
-

39. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000;97:13625-13630.
40. Alongi DJ, Yamaza T, Song Y, Fouad AF, Romberg EE, Shi S, et al. Stem/progenitor cells from inflamed human dental pulp retain tissue regeneration potential. *Regenerative medicine* 2010;5:617-631.
41. Karaoz E, Dogan BN, Aksoy A, Gacar G, Akyuz S, Ayhan S, et al. Isolation and in vitro characterisation of dental pulp stem cells from natal teeth. *Histochemistry and cell biology* 2010;133:95-112.
42. Huang AH, Chen YK, Lin LM, Shieh TY, Chan AW. Isolation and characterization of dental pulp stem cells from a supernumerary tooth. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology* 2008;37:571-574.
43. Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 2003;18:696-704.
44. Zhang W, Walboomers XF, Van Kuppevelt TH, Daamen WF, Van Damme PA, Bian Z, et al. In vivo evaluation of human dental pulp stem cells differentiated towards multiple lineages. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* 2008;2:117-125.
45. Gronthos S, Brahimi J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *Journal of dental research* 2002;81:531-535.
46. 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. *Journal of endodontics* 2010;36:469-474.
47. Prescott RS, Alsanea R, Fayad MI, Johnson BR, Wenckus CS, Hao J, et al. In vivo generation of dental pulp-like tissue by using dental pulp stem cells, a collagen scaffold, and dentin matrix protein 1 after subcutaneous transplantation in mice. *Journal of endodontics* 2008;34:421-426.
48. Iohara K, Murakami M, Nakata K, Nakashima M. Age-dependent decline in dental pulp regeneration after pulpectomy in dogs. *Experimental gerontology* 2014;52:39-45.
49. Batouli S, Miura M, Brahimi J, Tsutsui TW, Fisher LW, Gronthos S, et al. Comparison of stem-cell-mediated osteogenesis and dentinogenesis. *Journal of dental research* 2003;82:976-981.
50. Cordeiro MM, Dong Z, Kaneko T, Zhang Z, Miyazawa M, Shi S, et al. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. *Journal of endodontics* 2008;34:962-969.
51. Wang X, Sha XJ, Li GH, Yang FS, Ji K, Wen LY, et al. Comparative characterization of stem cells from human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells. *Archives of oral biology* 2012;57:1231-1240.
52. Casagrande L, Demarco FF, Zhang Z, Araujo FB, Shi S, Nor JE. Dentin-derived BMP-2 and odontoblast differentiation. *Journal of dental research* 2010;89:603-608.
53. Yamaza T, Kentaro A, Chen C, Liu Y, Shi Y, Gronthos S, et al. Immunomodulatory properties of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Stem cell research & therapy* 2010;1:5.
54. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 2004;364:149-155.

55. Gay IC, Chen S, MacDougall M. Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells. *Orthodontics & craniofacial research* 2007;10:149-160.
56. Xu J, Wang W, Kapila Y, Lotz J, Kapila S. Multiple differentiation capacity of STRO-1+/CD146+ PDL mesenchymal progenitor cells. *Stem cells and development* 2009;18:487-496.
57. Park JC, Kim JM, Jung IH, Kim JC, Choi SH, Cho KS, et al. Isolation and characterization of human periodontal ligament (PDL) stem cells (PDLSCs) from the inflamed PDL tissue: in vitro and in vivo evaluations. *Journal of clinical periodontology* 2011;38:721-731.
58. Widera D, Grimm WD, Moebius JM, Mikenberg I, Piechaczek C, Gassmann G, et al. Highly efficient neural differentiation of human somatic stem cells, isolated by minimally invasive periodontal surgery. *Stem cells and development* 2007;16:447-460.
59. Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, et al. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *Journal of endodontics* 2008;34:166-171.
60. Rubio D, Garcia-Castro J, Martin MC, de la Fuente R, Cigudosa JC, Lloyd AC, et al. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer research* 2005;65:3035-3039.
61. Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo BM, Zhang C, et al. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PloS one* 2006;1:e79.
62. Abe S, Hamada K, Miura M, Yamaguchi S. Neural crest stem cell property of apical pulp cells derived from human developing tooth. *Cell biology international* 2012;36:927-936.
63. Bakopoulou A, Leyhausen G, Volk J, Tsiftoglou A, Garefis P, Koidis P, et al. Comparative analysis of in vitro osteo/odontogenic differentiation potential of human dental pulp stem cells (DPSCs) and stem cells from the apical papilla (SCAP). *Archives of oral biology* 2011;56:709-721.
64. Aumüller Gea. MLP Duale Reihe, Anatomie. Thieme Verlag, 2007:53-56.
65. Welsch U. Lehrbuch Histologie. Urban & Fischer Verlag, 2006:141-146.
66. Ferguson CM, Miclau T, Hu D, Alpern E, Helms JA. Common molecular pathways in skeletal morphogenesis and repair. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1998;857:33-42.
67. Caetano-Lopes J, Canhao H, Fonseca JE. Osteoblasts and bone formation. *Acta reumatologica portuguesa* 2007;32:103-110.
68. ten Dijke P, Fu J, Schaap P, Roelen BA. Signal transduction of bone morphogenetic proteins in osteoblast differentiation. *The Journal of bone and joint surgery American volume* 2003;85-A Suppl 3:34-38.
69. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 1997;89:747-754.
70. Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, et al. The novel zinc finger-containing transcription factor *osterix* is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 2002;108:17-29.
71. Bendall AJ, Abate-Shen C. Roles for *Msx* and *Dlx* homeoproteins in vertebrate development. *Gene* 2000;247:17-31.
72. Bronckers AL, Gay S, Finkelman RD, Butler WT. Developmental appearance of *Gla* proteins (osteocalcin) and alkaline phosphatase in tooth germs and bones of the rat. *Bone and mineral* 1987;2:361-373.

-
73. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116:281-297.
 74. Ling H, Fabbri M, Calin GA. MicroRNAs and other non-coding RNAs as targets for anticancer drug development. *Nature reviews Drug discovery* 2013;12:847-865.
 75. Nilsen TW. Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation in animal cells. *Trends in genetics : TIG* 2007;23:243-249.
 76. Karathanasis N, Tsamardinos I, Poirazi P. MiRduplexSVM: A High-Performing MiRNA-Duplex Prediction and Evaluation Methodology. *PloS one* 2015;10:e0126151.
 77. Berardi E, Pues M, Thorrez L, Sampaolesi M. miRNAs in ESC differentiation. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 2012;303:H931-939.
 78. Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 2003;115:199-208.
 79. Small EM, Olson EN. Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology. *Nature* 2011;469:336-342.
 80. Guo L, Zhao RC, Wu Y. The role of microRNAs in self-renewal and differentiation of mesenchymal stem cells. *Experimental hematology* 2011;39:608-616.
 81. Ivey KN, Srivastava D. MicroRNAs as regulators of differentiation and cell fate decisions. *Cell stem cell* 2010;7:36-41.
 82. Singh SK, Kagalwala MN, Parker-Thornburg J, Adams H, Majumder S. REST maintains self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. *Nature* 2008;453:223-227.
 83. Stadler BM, Ruohola-Baker H. Small RNAs: keeping stem cells in line. *Cell* 2008;132:563-566.
 84. Zhang B, Pan X, Anderson TA. MicroRNA: a new player in stem cells. *Journal of cellular physiology* 2006;209:266-269.
 85. Fang S, Deng Y, Gu P, Fan X. MicroRNAs Regulate Bone Development and Regeneration. *International journal of molecular sciences* 2015;16:8227-8253.
 86. Lian JB, Stein GS, van Wijnen AJ, Stein JL, Hassan MQ, Gaur T, et al. MicroRNA control of bone formation and homeostasis. *Nature reviews Endocrinology* 2012;8:212-227.
 87. Palmieri A, Pezzetti F, Brunelli G, Zollino I, Scapoli L, Martinelli M, et al. Differences in osteoblast miRNA induced by cell binding domain of collagen and silicate-based synthetic bone. *Journal of biomedical science* 2007;14:777-782.
 88. Jing D, Hao J, Shen Y, Tang G, Li ML, Huang SH, et al. The role of microRNAs in bone remodeling. *International journal of oral science* 2015;7:131-143.
 89. Xu S. microRNA expression in the eyes and their significance in relation to functions. *Progress in retinal and eye research* 2009;28:87-116.
 90. Bentwich I, Avniel A, Karov Y, Aharonov R, Gilad S, Barad O, et al. Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nature genetics* 2005;37:766-770.
 91. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005;120:15-20.
 92. Xie X, Lu J, Kulbokas EJ, Golub TR, Mootha V, Lindblad-Toh K, et al. Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals. *Nature* 2005;434:338-345.
 93. Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic acids research* 2008;36:D154-158.
-

94. Miranda KC, Huynh T, Tay Y, Ang YS, Tam WL, Thomson AM, et al. A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes. *Cell* 2006;126:1203-1217.
95. Croft L, Szklarczyk D, Jensen LJ, Gorodkin J. Multiple independent analyses reveal only transcription factors as an enriched functional class associated with microRNAs. *BMC systems biology* 2012;6:90.
96. Hu R, Li H, Liu W, Yang L, Tan YF, Luo XH. Targeting miRNAs in osteoblast differentiation and bone formation. *Expert opinion on therapeutic targets* 2010;14:1109-1120.
97. Taipaleenmaki H, Bjerre Hokland L, Chen L, Kauppinen S, Kassem M. Mechanisms in endocrinology: micro-RNAs: targets for enhancing osteoblast differentiation and bone formation. *European journal of endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 2012;166:359-371.
98. Li Z, Hassan MQ, Jafferji M, Aqeilan RI, Garzon R, Croce CM, et al. Biological functions of miR-29b contribute to positive regulation of osteoblast differentiation. *The Journal of biological chemistry* 2009;284:15676-15684.
99. Luzi E, Marini F, Sala SC, Tognarini I, Galli G, Brandi ML. Osteogenic differentiation of human adipose tissue-derived stem cells is modulated by the miR-26a targeting of the SMAD1 transcription factor. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 2008;23:287-295.
100. Mizuno Y, Yagi K, Tokuzawa Y, Kanesaki-Yatsuka Y, Suda T, Katagiri T, et al. miR-125b inhibits osteoblastic differentiation by down-regulation of cell proliferation. *Biochemical and biophysical research communications* 2008;368:267-272.
101. Chen P, Wei D, Xie B, Ni J, Xuan D, Zhang J. Effect and possible mechanism of network between microRNAs and RUNX2 gene on human dental follicle cells. *Journal of cellular biochemistry* 2014;115:340-348.
102. Zhang JF, Fu WM, He ML, Xie WD, Lv Q, Wan G, et al. MiRNA-20a promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by co-regulating BMP signaling. *RNA biology* 2011;8:829-838.
103. Li Z, Hassan MQ, Volinia S, van Wijnen AJ, Stein JL, Croce CM, et al. A microRNA signature for a BMP2-induced osteoblast lineage commitment program. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008;105:13906-13911.
104. Okamoto H, Matsumi Y, Hoshikawa Y, Takubo K, Ryoke K, Shiota G. Involvement of microRNAs in regulation of osteoblastic differentiation in mouse induced pluripotent stem cells. *PloS one* 2012;7:e43800.
105. Gay I, Cavender A, Peto D, Sun Z, Speer A, Cao H, et al. Differentiation of human dental stem cells reveals a role for microRNA-218. *Journal of periodontal research* 2014;49:110-120.
106. Schoolmeesters A, Eklund T, Leake D, Vermeulen A, Smith Q, Force Aldred S, et al. Functional profiling reveals critical role for miRNA in differentiation of human mesenchymal stem cells. *PloS one* 2009;4:e5605.
107. Inose H, Ochi H, Kimura A, Fujita K, Xu R, Sato S, et al. A microRNA regulatory mechanism of osteoblast differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009;106:20794-20799.

108. Du F, Wu H, Zhou Z, Liu YU. microRNA-375 inhibits osteogenic differentiation by targeting runt-related transcription factor 2. *Experimental and therapeutic medicine* 2015;10:207-212.
109. Cao Y, Lv Q, Lv C. MicroRNA-153 suppresses the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by targeting bone morphogenetic protein receptor type II. *International journal of molecular medicine* 2015;36:760-766.
110. Li H, Yang F, Wang Z, Fu Q, Liang A. MicroRNA-21 promotes osteogenic differentiation by targeting small mothers against decapentaplegic 7. *Molecular medicine reports* 2015;12:1561-1567.
111. Yuan JS, Reed A, Chen F, Stewart CN, Jr. Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC bioinformatics* 2006;7:85.
112. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-(\Delta\Delta C(T))}$ Method. *Methods (San Diego, Calif)* 2001;25:402-408.
113. Whyte MP. Hypophosphatasia and the role of alkaline phosphatase in skeletal mineralization. *Endocrine reviews* 1994;15:439-461.
114. Benoit DS, Durney AR, Anseth KS. Manipulations in hydrogel degradation behavior enhance osteoblast function and mineralized tissue formation. *Tissue engineering* 2006;12:1663-1673.
115. George J, Kuboki Y, Miyata T. Differentiation of mesenchymal stem cells into osteoblasts on honeycomb collagen scaffolds. *Biotechnology and bioengineering* 2006;95:404-411.
116. Roostaeian J, Carlsen B, Simhaee D, Jarrahy R, Huang W, Ishida K, et al. Characterization of growth and osteogenic differentiation of rabbit bone marrow stromal cells. *The Journal of surgical research* 2006;133:76-83.
117. Paul H, Reginato AJ, Schumacher HR. Alizarin red S staining as a screening test to detect calcium compounds in synovial fluid. *Arthritis and rheumatism* 1983;26:191-200.
118. Puchtler H, Meloan SN, Terry MS. On the history and mechanism of alizarin and alizarin red S stains for calcium. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 1969;17:110-124.
119. Semaan A, Qazi AM, Seward S, Chamala S, Bryant CS, Kumar S, et al. MicroRNA-101 inhibits growth of epithelial ovarian cancer by relieving chromatin-mediated transcriptional repression of p21(waf(1)/cip(1)). *Pharmaceutical research* 2011;28:3079-3090.
120. Huang F, Lin C, Shi YH, Kuerban G. MicroRNA-101 inhibits cell proliferation, invasion, and promotes apoptosis by regulating cyclooxygenase-2 in Hela cervical carcinoma cells. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* 2013;14:5915-5920.
121. Li C, Li C, Yue J, Huang X, Chen M, Gao J, et al. miR-21 and miR-101 regulate PLAP-1 expression in periodontal ligament cells. *Molecular medicine reports* 2012;5:1340-1346.
122. Prateetongkum E, Klingelhoffer C, Morsczech C. The influence of the donor on dental apical papilla stem cell properties. *Tissue & cell* 2015;47:382-388.
123. Qadir AS, Um S, Lee H, Baek K, Seo BM, Lee G, et al. miR-124 Negatively Regulates Osteogenic Differentiation and In Vivo Bone Formation of Mesenchymal Stem Cells. *Journal of cellular biochemistry* 2014.

124. Cao X, Pfaff SL, Gage FH. A functional study of miR-124 in the developing neural tube. *Genes & development* 2007;21:531-536.
125. Laine SK, Alm JJ, Virtanen SP, Aro HT, Laitala-Leinonen TK. MicroRNAs miR-96, miR-124, and miR-199a regulate gene expression in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Journal of cellular biochemistry* 2012;113:2687-2695.
126. Suomi S, Taipaleenmaki H, Seppanen A, Ripatti T, Vaananen K, Hentunen T, et al. MicroRNAs regulate osteogenesis and chondrogenesis of mouse bone marrow stromal cells. *Gene regulation and systems biology* 2008;2:177-191.
127. Mannironi C, Camon J, De Vito F, Biundo A, De Stefano ME, Persiconi I, et al. Acute stress alters amygdala microRNA miR-135a and miR-124 expression: inferences for corticosteroid dependent stress response. *PloS one* 2013;8:e73385.
128. Viale-Bouroncle S, Vollner F, Mohl C, Kupper K, Brockhoff G, Reichert TE, et al. Soft matrix supports osteogenic differentiation of human dental follicle cells. *Biochemical and biophysical research communications* 2011;410:587-592.
129. Viale-Bouroncle S, Gosau M, Kupper K, Mohl C, Brockhoff G, Reichert TE, et al. Rigid matrix supports osteogenic differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED). *Differentiation; research in biological diversity* 2012;84:366-370.
130. Felthaus O, Gosau M, Morscheck C. ZBTB16 induces osteogenic differentiation marker genes in dental follicle cells independent from RUNX2. *Journal of periodontology* 2014;85:e144-151.

9 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung eines parodontal-geschädigten Zahnes (Eigene Darstellung)	7
Abb. 2: Schematische Darstellung der Stammzelldifferenzierung und –Selbst-Erneuerung. A: symmetrische Zellteilung; B: asymmetrische Zellteilung; SZ: Stammzelle; PZ: Progenitorzelle; tdZ: terminal differenzierte Zelle (Eigene Darstellung in Anlehnung an (5))	10
Abb. 3: Schematische Darstellung der Quellen humaner dentaler Stammzellen (Eigene Darstellung in Anlehnung an (30))	13
Abb. 4: Schema der Entstehung und Funktion der reifen miRNA, die durch einen miRNA-mimic ersetzt werden kann. (Eigene Darstellung in Anlehnung an (74))	18
Abb. 5: Funktionsweise reifer miRNA und synthetisch hergestelltem miRNA mimic; ORF=open reading frame (Eigene Darstellung in Anlehnung an (79)).....	19
Abb. 6: RT von mRNA und miRNA (Eigene Darstellung in Anlehnung an miScript PCR System Handbook, Qiagen) V: Base A, C oder G; N: Base A, C, G oder T.....	30
Abb. 7: heat maps des analysierten miScript miRNA PCR Arrays mit den korrespondierenden fold change-Werten nach 24 Stunden (A) und nach 7 Tagen (B) nach ODM-Induktion. Als Kalibrator für beide Zeitpunkte wurden DFSCs nach 24-stündiger Kultivierung in Standardmedium verwendet. Rote Umrahmungen verdeutlichen die am stärksten hochregulierten miRNAs. Grüne Umrahmungen zeigen die am stärksten herunterregulierten miRNAs. Dieser Versuch wurde mit Unikaten (n=1) durchgeführt.	39
Abb. 8: real-time PCR-Auswertung von miR-101 und miR-124 an den Tagen 3, 7, 14 und 28. Als Kontrolle und statistischer Gegenüberstellung dienten DFSCs in Standardmedium. Dieser Versuch wurde mit Triplikaten und Quadruplikaten durchgeführt (n=3, n=4). Als Kalibrator diente Tag 0 nach Kultivierung in Standardmedium (d0=1). Die Säulen zeigen Mittelwert + SAW (Standardabweichung). *: p<0,05.....	40
Abb. 9: real-time-RT-PCRs von osteogenen Markern 48 Stunden nach Transfektion mit miR-101-3p und miR-124-3p mimic. *: p<0,05, **: p<0,01. Alle Versuche wurden mit	

	Triplikaten durchgeführt (n=3) außer der Osterix-Versuch (n=2). Die Säulen zeigen Mittelwert + SAW.....	42
Abb. 10:	Quantitative Auswertung der ALP-Aktivität von miR-101 und miR-124 nach ODM-.....	44
Abb. 11:	Mikroskopische Darstellung der Mineralisierung von miR-101-3p- und miR-124-3p transfizierten DFSCs nach 28 Tagen ODM-Induktion (A) und quantitative Auswertung zweier identischer Versuche durch Entfärbung mit Ceylpyridinium-Chlorid-Monohydrat (B, C). Als Kontrolle und Kalibrator diente die AllStar siRNA. Der schwarze Balken in jedem Bild entspricht 100 µm. Dieser Versuch wurde mit Duplikaten durchgeführt (n=2). Die Säulen zeigen Mittelwert + SAW.	45

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Primer-Sequenzen aufgeteilt in forward und reverse primer für die real-time PCR	26
Tabelle 2: Anleitung der RNA-Isolierung	29
Tabelle 3: PCR-Amplifizierungs-Programm für das miScript SYBR® Green PCR Kit (Quelle: miScript	32
Tabelle 4: Vorbereitungen für real-time PCRs auf miRNA-Ebene	32
Tabelle 5: Kapillareninhalt bei Verwendung von zwei unterschiedlichen Kits für real-time PCRs auf.....	33
Tabelle 6: PCR- Amplifizierungsprogramm für das Light Cycler® Fast Start DNA Master ^{PLUs} SYBR®	33
Tabelle 7: Transfektionsanleitung von DFSCs.....	35

11 Formelverzeichnis

Formel 1: Zustandekommen des $2^{\Delta\Delta C_T}$ Wertes (112)	35
--	----

12 Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn PD Dr. Christian Morszeck für die Auswahl dieses spannenden Themas und für seine stete Unterstützung und Bereitschaft, Experimente, Ergebnisse und Organisatorisches gemeinsam zu diskutieren.

Bei Herrn Dr. Oliver Felthaus möchte ich mich für die tatkräftige Unterstützung und Unterweisung im Labor bedanken, ohne die Einiges nicht funktioniert hätte.

Mein Dank gilt auch Anja Reck und Sandra Viale-Bouroncle, die stets ein offenes Ohr für meine Fragen hatten.

Ich danke der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie für die finanzielle Unterstützung dieser vorliegenden Dissertation und der Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie für die Erlaubnis der Mitbenutzung ihrer Laborgeräte.

Ich danke zudem allen Personen, die an mich glauben und mich im Laufe dieser Arbeit unterstützt haben.

13 Erklärung

Ich, Consuela Codrin, geboren am 05.11.1987 in Cluj-Napoca (Rumänien), erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

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

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

Regensburg, Februar 2016

.....

Consuela Codrin