

AUS DEM LEHRSTUHL
für MUND-KIEFER und GESICHTSCHIRURGIE
Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

EVALUATION ADIPOGENER STAMMZELLEN (ADSCS) FÜR DIE DIFFERENZIERUNG
IN ALVEOLÄRE OSTEOLASTEN BZW. ZEMENTOLASTEN

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Julia Schalk

2019

AUS DEM LEHRSTUHL
für MUND-KIEFER und GESICHTSCHIRURGIE
Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

EVALUATION ADIPOGENER STAMMZELLEN (ADSCS) FÜR DIE DIFFERENZIERUNG
IN ALVEOLÄRE OSTEOLASTEN BZW. ZEMENTOLASTEN

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Julia Schalk

2019

Dekan:

Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Christian Morsczech

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Stephan Schreml

Tag der mündlichen Prüfung: 15.05.2019

INHALTSVERZEICHNIS	I-III
1. EINLEITUNG.....	1
1.1 Parodontale Erkrankungen	1
1.2 Herkömmliche Therapien parodontaler Erkrankungen am Beispiel der Parodontitis.....	2
1.3 Stammzellen als Therapieoption parodontaler Erkrankungen	3
1.3.1 Charakterisierung von Stammzellen	3
1.3.2 Vergleich adulter Stammzellen verschiedener Gewebelokalisationen	4
1.3.3 Osteogenese mesenchymaler Stammzellen	4
1.3.3.1 Supplemente und Signalwege zur Induktion der osteogenen Differenzierung.....	7
1.3.3.1.1 <i>Bone Morphogenetic Protein (BMP)</i> -Signalweg	7
1.3.3.1.2 <i>Wnt</i> -Signalweg	9
1.3.3.1.3 <i>Dexamethason (Dexa)</i>	11
1.3.3.2 Osteogene Differenzierungsmechanismen dentaler Follikelstammzellen (DFSCs)	12
1.3.3.3 Osteogene Differenzierungsmechanismen der ADSCs.....	14
1.3.4 Einsatz adipogener Stammzellen zur Therapie parodontaler Erkrankungen.....	16
1.4 Fragestellung und Ziele der Arbeit	17
2. MATERIAL UND METHODEN	18
2.1 Materialien.....	18
2.1.1 Zellen	18
2.1.2 Zellkulturmedien und Zusätze	18
2.1.3 Allgemeine Materialien	19
2.1.4 Chemikalien und Reagenzien	20
2.1.5 Puffer und Lösungen für FACS- und Western Blot- Analysen	21
2.1.6 Antikörper für die FACS - Analysen	22
2.1.7 Isotypenkontrollen der FACS-Analysen	22
2.1.8 Faktoren der osteogenen Differenzierung	22
2.1.9 Zusammensetzung der Medien	23
2.1.10 Antikörper für Western Blot-Analysen.....	23
2.1.11 Primer für Reverse Transkription mit nachfolgender Echtzeit Polymerase (RT- qPCR)	24
2.1.12 Kits.....	24
2.1.13 Geräte und Software	25

2.2	Methoden.....	26
2.2.1	Steriles Arbeiten.....	26
2.2.2	Zellkultur und Differenzierung	26
2.2.2.1	Passagieren und Zellzahlbestimmung	26
2.2.2.2	Einfrieren und Auftauen der Zellen	27
2.2.2.3	Osteogene Differenzierungsprotokolle.....	28
2.2.3	Messung der alkalischen Phosphatase (ALP) -Aktivität	30
2.2.4	FACS-Durchflusszytometrie von Stammzellmarkern.....	31
2.2.5	Biochemische und analytische Methoden	32
2.2.5.1	Proteinisolierung	32
2.2.5.2	Bicinchoninsäure (BCA) Protein Assay.....	32
2.2.5.3	Western Blot mit BOLT®- System.....	33
2.2.6	Genetische und molekularbiologische Methoden	36
2.2.6.1	RNA (Ribonukleinsäure)-Isolierung	36
2.2.6.2	Bestimmung von Menge und Reinheit der RNA	37
2.2.6.3	Reverse Transkription	37
2.2.6.4	RT-qPCR	38
2.2.7	Alizarin-Rot-Färbung	40
2.2.8	Statistische Auswertung	41
3.	DARSTELLUNG DER EIGENEN UNTERSUCHUNGEN.....	42
3.1	Stammzellmarker-Analyse mit der FACS-Durchflusszytometrie.....	42
3.2	ALP-Messungen	42
3.2.1	Osteogene Differenzierungsmedien	42
3.2.2	Manipulation des BMP- bzw. Wnt- Signalweges	44
3.2.2.1	BMP- Signalweg	44
3.2.2.2	Wnt- Signalweg.....	46
3.2.2.3	Aktivierung und Inhibierung des BMP- und Wnt-Signalweges	48
3.2.3	Der Einfluss von Dexamethason.....	49
3.2.3.1	BMP- Signalweg	49
3.2.3.2	Wnt-Signalweg.....	49
3.2.4	Kombination aus Dexa, DKK1 und BMP2	51
3.2.4.1	DKK1 und Wnt3a-Wechsel innerhalb von Protokoll 1.....	52

3.2.4.2	Vergleich von Prot. 1 mit DFSC-konditioniertem Medium (Prot. 2) und zusätzlicher DKK1 Supplementation (Prot.2+)	53
3.3	Quantitative real time Polymerase-Kettenreaktionen (RT-qPCRs)	54
3.4	Western Blot Analysen	56
3.5	Nachweis der Mineralisierungsfähigkeit	56
4.	DISKUSSION VON METHODIK UND ERGEBNISSEN	57
4.1	Einordnung der adipogenen Stammzellen	57
4.2	Methoden zur Evaluation der osteogenen Differenzierung	58
4.3	Manipulation des BMP- Signalweges	59
4.4	Manipulation des Wnt-Signalweges	60
4.5	Dexamethason als zusätzlicher Faktor	61
4.6	Kombination mehrerer Faktoren	62
4.7	AUSBLICK	64
5.	ZUSAMMENFASSUNG	65
6.	ANHANG	68
6.1	Abkürzungsverzeichnis	68
6.2	Abbildungsverzeichnis	71
6.3	Tabellenverzeichnis	72
7.	LITERATURVERZEICHNIS	73
8.	DANKSAGUNG	
9.	LEBENS LAUF	

1. Einleitung

1.1 Parodontale Erkrankungen

Parodontale Erkrankungen sind hochprävalent und betreffen bis zu 90% der weltweiten Bevölkerung (1). Unter parodontalen Erkrankungen versteht man vererbte oder erworbene Störungen des Zahnhalteapparates, dem sogenannten Parodont. Hauptvertreter dieser Erkrankungen ist die Parodontitis, eine bakteriell verursachte Entzündung des Parodonts. Die schwere Form der Parodontitis steht auf Platz 6 der hochprävalenten Erkrankungen weltweit und stellt den Hauptgrund für einen Zahnverlust bei Erwachsenen dar (1).

In Deutschland wird der Behandlungsbedarf der Parodontitis aufgrund der demografischen Entwicklung prognostisch ansteigen (2). Die in der Fünften Deutschen Mundgesundheitsstudie (DMS V) durchgeführten Untersuchungen zur Parodontitis legen nahe, dass Parodontalerkrankungen altersassoziiert sind. Moderate und schwere Parodontalerkrankungen bei jüngeren Erwachsenen, also 35- bis 44-Jährigen liegen heute bei 51,6 Prozent und bei jüngeren Senioren, also 65- bis 74-Jährigen bei 64,6 Prozent. Bei den älteren Senioren (75- bis 100-Jährige) verstärkt sich diese Tendenz. Hier weisen neun von zehn Menschen eine moderate bis schwere Parodontitis auf. Trotz insgesamt abnehmender Prävalenzen ist daher mit einer Zunahme des parodontalen Behandlungsbedarfs zu rechnen (2).

Es wird ein kausaler Zusammenhang zwischen Parodontitis und anderen hochprävalenten Erkrankungen vermutet. Parodontitis soll in Zusammenhang mit der Entstehung von Erkrankungen, wie Diabetes, kardiovaskulären Erkrankungen, chronischen Nierenerkrankungen und pulmonalen Infektionen stehen (3). Auch systemische Erkrankungen können das Parodont befallen und zu Schäden führen. Zu diesen Erkrankungen zählen Hepatitis und andere virale Infektionen, dermatologische Erkrankungen, wie Lichen ruber planus, bullöses Pemphigoid und Pemphigus vulgaris. Auch hämatologische Erkrankungen, wie Leukämie und Neutropenie, oder granulomatöse Erkrankungen wie Tuberkulose und Granulomatose mit Polyangiitis, sowie primäre und metastasierende Karzinome können das Parodont schädigen (1).

Die Prävalenz, als auch die Inzidenz parodontaler Erkrankungen ist sowohl weltweit, als auch in Deutschland, steigend. Parodontale Erkrankungen sind mit einer Einschränkung der Lebensqualität verbunden und es entsteht ein großer Leidensdruck aufgrund von Schmerzen. In schlimmeren Fällen können sie zum Zahnverlust führen. Dabei entstehen hohe Kosten für das Gesundheitssystem. Aus diesen Gründen ist es wichtig, an geeigneten

Therapien zu forschen, die eine Progredienz verhindern und darüber hinaus eine Regeneration des Gewebes ermöglichen.

1.2 Herkömmliche Therapien parodontaler Erkrankungen am Beispiel der Parodontitis

Mit heutigen Maßnahmen ist ein Aufhalten der Krankheitsprogression gut möglich. Bei einer leichten Krankheitsform genügt die Eindämmung des pathogenen Biofilms durch eine Konkremententfernung oder Wurzelglättung. Bei schwereren Formen der Parodontitis bedient man sich konventioneller chirurgischer Maßnahmen wie dem Lappendebridement, das die Sanierung des Wundbettes zum Ziel hat (4). Eine weitere Behandlungsmethode findet sich in der Knochenchirurgie. Diese stellt ein resektives Verfahren dar, bei dem Teile des Zahns und der Zahnwurzel entfernt werden, um die Entzündung zu begrenzen und die Zugänglichkeit zu verbessern. Die meisten Komplikationen, die mit resektiven Eingriffen einhergehen, sind nicht auf eine Progression der Erkrankung, sondern auf ein Versagen der Reperation des Parodonts zurückzuführen (5).

Ein ideales Behandlungsergebnis wäre eine Wiederherstellung aller parodontalen Gewebe (Alveolarknochen, Zement, parodontales Ligament und Gingiva) und ihrer Funktionen. Dies wird durch regenerative und augmentative Verfahren angestrebt. Dazu zählen die geführte Knochenregeneration und der Einsatz von Knochentransplantaten, Wachstumsfaktoren, sowie anderen modulierenden Faktoren (6). Bei der geführten Knochenregeneration soll eine künstliche Abgrenzung die langsam regenerierenden Zellen des parodontalen Ligaments (PDL) und des Alveolarknochens von den umgebenden, erheblich schneller regenerierenden Epithelzellen trennen. Dabei geht man von der Vermutung aus, dass diese die Regeneration stören (7). Ein Beispiel für den Einsatz von modulierenden Faktoren und Wachstumsfaktoren ist die Kombination von Enamel-Matrix-Derivaten (EMD) und dem rekombinanten humanen thrombozytären Wachstumsfaktor-BB mit β -Tricalciumphosphat (7). Die Kombinationen regenerativer und augmentativer Verfahren zeigten zwar klinische Erfolge, allerdings konnte noch keine komplette Regeneration des parodontalen Gewebes erreicht werden (8, 9).

1.3 Stammzellen als Therapieoption parodontaler Erkrankungen

1.3.1 Charakterisierung von Stammzellen

Stammzellen haben das Potential zur Rekonstruktion des parodontalen Gewebes (10–12). Sie besitzen zwei wichtige Eigenschaften, die sie von anderen Zellen unterscheiden: zum einen die Fähigkeit zur kontinuierlichen Selbsterneuerung mittels Zellteilung, und zum anderen die Fähigkeit zur Differenzierung in spezialisierte Effektorzellen, die auch Progenitorzellen genannt werden (13–15). Letztere beschreiben proliferative Zellen, die nur noch in eine Zelllinie differenzieren und deren Fähigkeit zur Selbsterneuerung limitiert ist. Das Differenzierungspotential einer Stammzelle muss mindestens zwei unterschiedliche Zelltypen umfassen (6). Lokalisiert sind sie in Gewebearealen, die als Stammzellnischen bezeichnet werden (16, 17). Dort sind sie mittels Adhäsionsmolekülen verankert und generieren extrinsische Faktoren zur Regulation der Proliferation und Differenzierung (18).

Es gibt ganz grundsätzlich embryonale Stammzellen und adulte Stammzellen (13, 15). Embryonale Stammzellen der befruchteten Eizelle zeichnen sich durch die Fähigkeit aus, in alle drei Keimblätter sowie in extraembryonales Gewebe differenzieren zu können (13). Die drei Keimblätter, aus welchen alle Arten menschlichen Gewebes entstehen, setzen sich zusammen aus dem Entoderm, dem Mesoderm und dem Ektoderm (19). Embryonale Stammzellen aus der inneren Zellmasse der Blastozyste sind pluripotent. Pluripotente Stammzellen besitzen die Fähigkeit, sich in alle drei Keimblätter, aber nicht mehr in extraembryonales Gewebe differenzieren zu können (6, 13). Der Einsatz embryonaler Stammzellen in der Forschung ist mit ethischen Bedenken, sowie Gefahren der Immunogenität und Tumorigenität verbunden (20), daher wird bevorzugt mit adulten Stammzellen gearbeitet (21).

Adulte Stammzellen findet man postnatal im menschlichen Körper als natürliche Ressource zur Regeneration des Gewebes (16). Sie können sich nur noch in die Zelllinien eines Keimblattes differenzieren. Friedenstein et al. entdeckten 1970 die ersten adulten Stammzellen im Knochenmark (15). Diese werden zu den mesenchymalen Stammzellen gezählt (MSCs). Sie leiten sich vom Mesenchym ab und können auch aus Geweben wie dem Knochenmark, dem Blut und dem Fettgewebe isoliert werden (22–30). Zur Vereinheitlichung stellte die *International Society for Cellular Therapy* allgemeine Kriterien zur Definition mesenchymaler Stammzellen auf:

- Plastikadhärenz bei Kultivierung unter Standardbedingungen

- Expression der Marker: CD105, CD73 und CD90 und keine Expression der Marker hämatopoetischer Zellen, wie CD45, CD34, CD14 oder CD11b, CD79 α oder CD19 und HLA-DR
- die Fähigkeit sich in Osteoblasten, Adipozyten und Chondroblasten in vitro zu differenzieren (31).

Ein weiterer Marker für mesenchymale Stammzellen (MSCs) ist der monoklonale Antikörper STRO-1 (32–35).

1.3.2 Vergleich adulter Stammzellen verschiedener Gewebelokalisationen

Im Unterschied zu den mesenchymalen Stammzellen leiten sich die dentalen Stammzellen von der Neuralleiste ab (36). Diese wurden bisher in fünf unterschiedlichen Lokalisationen gefunden: der dentalen Pulpa (37, 38), dem parodontalen Ligament (39), herausgefallenen Milchzähnen (40), dem dentalen Follikel (41) und der apikalen Wurzelspitze (42). Von besonderem Interesse sind die DFSCs (dentalen Follikelstammzellen), da sie die natürlichen Progenitorzellen der alveolaren Osteoblasten, Zementoblasten und Fibroblasten sind. Diese Zellen bilden das parodontale Gewebe. Sie können jedoch nur aus retinierten Weisheitszähnen gewonnen werden (43).

Im Vergleich zu den dentalen Stammzellen und den Stammzellen des Knochenmarks (BMSCs) stellen die adipogenen Stammzellen (ADSCs) eine abundante, autologe Stammzellquelle dar. Diese multipotente Stammzellpopulation mit der Fähigkeit, sich nach exogener Stimulation in osteogene, chondrogene, adipogene und neurogene Zelllinien zu differenzieren wurden erstmals 2001 beschrieben (44, 45). Sie werden aus Lipoaspirat gewonnen, das leicht unter Lokalanästhesie in ausreichenden Mengen entnommen werden kann. Eine Knochenmarksbiopsie hingegen ist sehr schmerzhaft und geht mit einem nicht zu unterschätzenden periinterventionellen Risiko für den Patienten einher. Es liefert nur eine geringe Menge an Material, wenn Folgeerscheinungen wie Anämien vermieden werden sollen (46). Aus einem Gramm Fettgewebe kann man ca. 5×10^3 Stammzellen isolieren, etwa 500 mal so viel wie aus einem Gramm Knochenmark (47).

1.3.3 Osteogenese mesenchymaler Stammzellen

Die Osteogenese mesenchymaler Stammzellen beschreibt die Differenzierung von multipotenten Stammzellen über Progenitorzellen bis hin zu reifen Osteoblasten. Die Differenzierungsstadien werden durch das Expressionsmuster von Transkriptionsfaktoren geleitet (48).

Die Osteogenese kann grob in eine frühe und eine späte Phase mit eigenen Transkriptionsfaktoren, aktivierten Signalwegen und Funktionen unterteilt werden. Für die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen in Osteoblasten sind die Transkriptionsfaktoren *Runx-related transcription factor 2* (RUNX2), Osterix, and β -Catenin entscheidend (49).

In der frühen Phase wird durch RUNX2 die osteogene Differenzierung festgelegt und sowohl die adipogene, als auch die chondrogene Differenzierung inhibiert. RUNX2 induziert die Expression von Genen, die für Knochenmatrixproteine kodieren, wie Kollagen I, Osteopontin (OPN), Bone Sialoprotein (BSP), und Osteocalcin (Synonym: bone γ -carboxylglutamic acid-containing protein (BGLAP)) und hält die Präosteoblasten in einem unreifen Stadium (49). Zudem scheint in diesem Stadium β -Catenin notwendig zu sein (49). Es verstärkt die RUNX2-Expression und Promotor-Aktivität (49). Ein früher RUNX2-vermittelter Marker für die Induktion der Osteogenese ist die ALP (alkalische Phosphatase)-Aktivität (50).

In der späten Phase leitet Osterix, ein Zielgen von RUNX2, die Reifung von Präosteoblasten zu Osteoblasten, die Knochenmatrixproteine produzieren, ein. Ab dieser Phase ist eine Mineralisierung messbar (49).

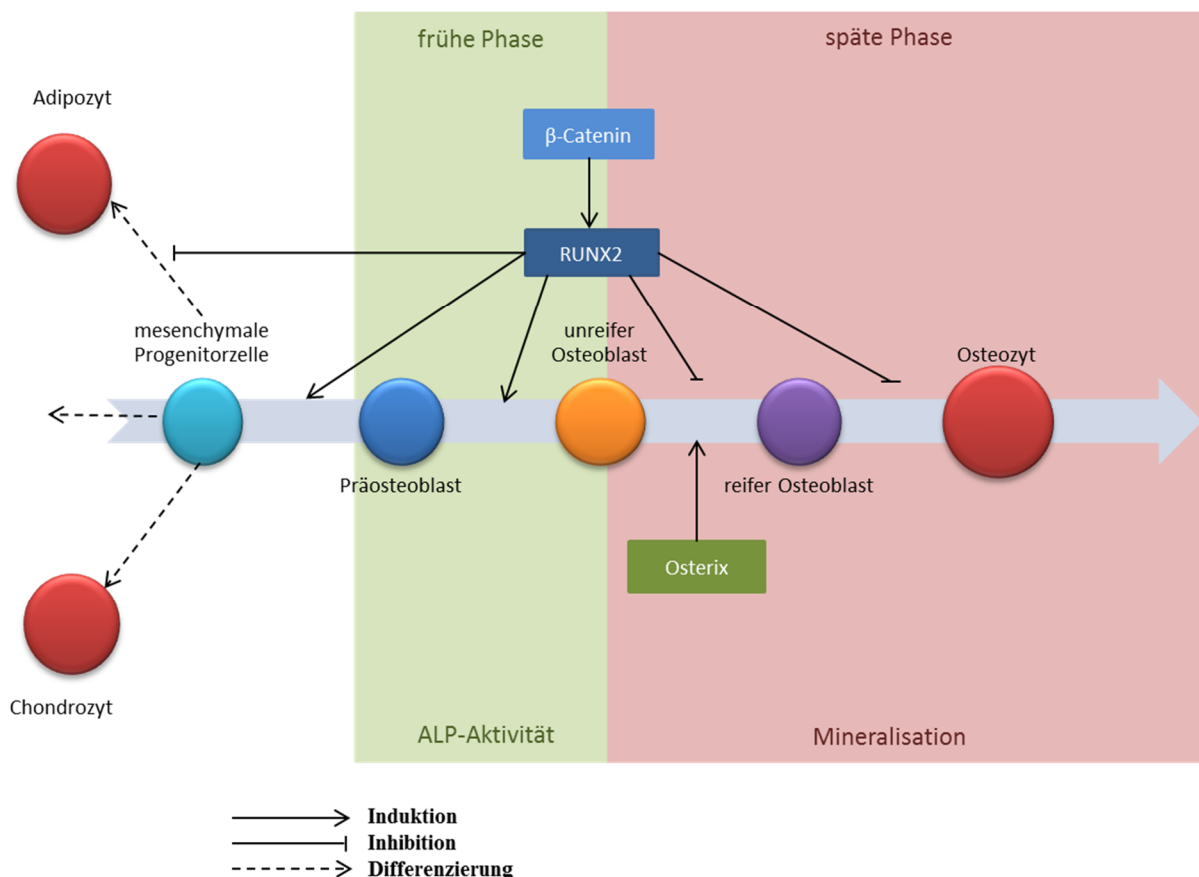


Abbildung 1: Festlegung der osteogenen Differenzierung mesenchymaler Stammzellen durch die Transkriptionsfaktoren RUNX2, Osterix und β -Catenin (49, 50).

RUNX2 wird durch Phosphorylierung oder durch Interaktion mit Partnerproteinen wie DLX5 aktiviert, was zu einer Erhöhung der Transkriptionsaktivität führt (51).

Die Phosphorylierung und somit Aktivierung von RUNX2 kann durch verschiedene Signalwege eingeleitet werden. Dazu zählt der ERK/MAP-Kinase (*extracellular signal-regulated kinases/ mitogen-activated protein kinases*)-Signalweg (52) und der BMP (*Bone Morphogenetic Protein*)-Signalweg (53). Der Transkriptionsfaktor β -Catenin wird unter anderem durch den Wnt-Signalweg reguliert (54,55).

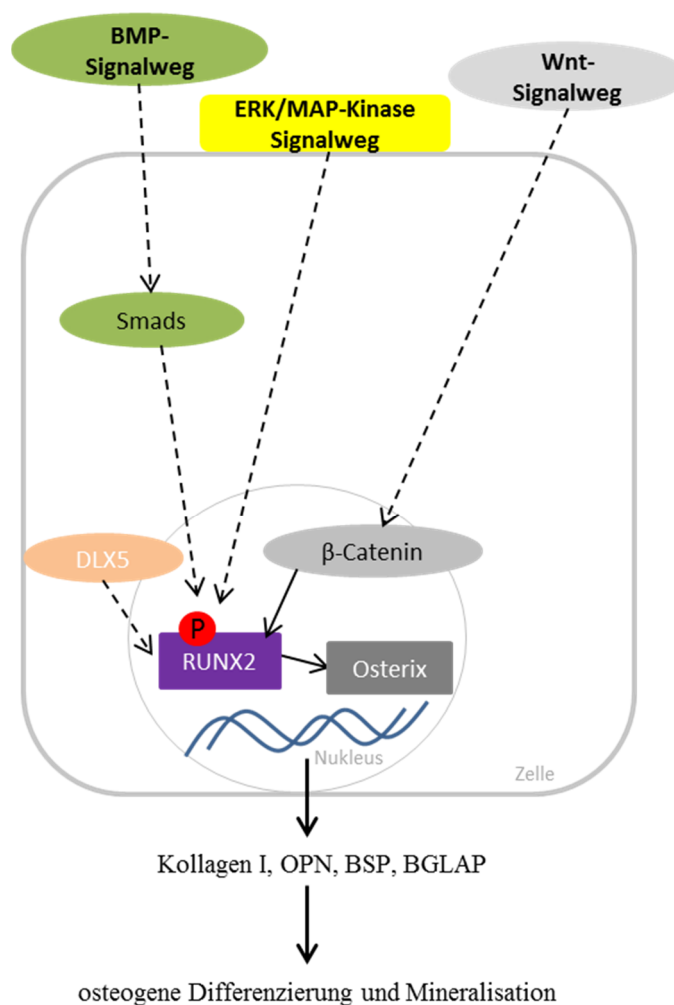


Abbildung 2: Modulation der Transkriptionsfaktoren durch den BMP-, Wnt-, und ERK/MAP-Kinase Signalweg. Diese Signalwege kontrollieren über die Modulation der Transkriptionsfaktoren die Genexpression von Genen, die für Knochenmatrixproteine wie Kollagen I, OPN, BSP, und BGLAP kodieren und leiten dadurch die osteogene Differenzierung und die Mineralisierung ein (51).

1.3.3.1 Supplemente und Signalwege zur Induktion der osteogenen Differenzierung

1.3.3.1.1 *Bone Morphogenetic Protein (BMP)-Signalweg*

Initial wurden BMPs durch ihre Knochenaufbau induzierende Fähigkeit entdeckt (56). BMPs gehören zur Familie der Transforming Growth Factor (TGF) - β , die eine entscheidende Rolle in der Regulation des Zellwachstums, der Differenzierung und der Entwicklung in vielen biologischen Systemen spielen (57). Es sind mehr als 15 strukturell ähnliche BMPs bekannt, wobei BMP2 eine unverzichtbare Rolle für die Osteogenese spielt (58–60). In vielen Studien wurde der Faktor BMP2 eingesetzt, um die osteogene Differenzierung von Stammzellen, wie DFSCs, BMSCs und ADSCs, *in vitro* zu induzieren (61–69).

Der BMP-Signalweg startet durch die Bindung von BMP2 an den BMPR-II (BMP-Rezeptor-Typ II), was zur Transphosphorylierung des BMPR-I (BMP-Rezeptor-Typ I) führt. Der dadurch aktivierte Serin/Threoninkinase-Rezeptor phosphoryliert den intrazellulären Rezeptor-Smad (Smad1/5/8). Dieser kann nun zusammen mit den Co-Smad (Smad 4) einen Komplex bilden, in den Nukleus translozieren und dort mit anderen Transkriptionsfaktoren interagieren (68). Hierbei wird die Expression von Transkriptionsfaktoren, wie RUNX2 und DLX (distal-less homeobox) 3 induziert (61, 70). Moduliert wird der BMP-Signalweg über extrazelluläre Faktoren wie Noggin, einem Inhibitor des Signalweges, und intrazelluläre Faktoren wie inhibitorische-Smads (Smad6/7) und Co-Rezeptoren (71, 72). Die Expression von Smad6/7 wird ebenfalls durch den BMP-Signalweg reguliert (68).

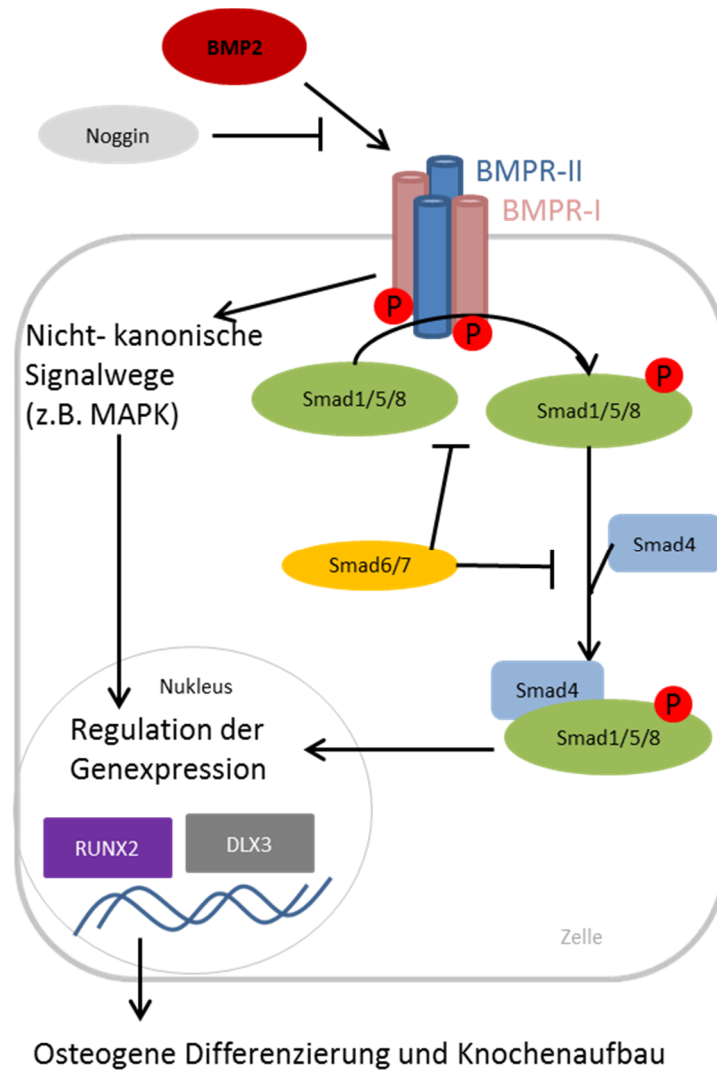


Abbildung 3: Der BMP-Signalweg. BMP2 kann neben dem kanonischen BMP-Signalweg, der über Smad-Proteine abläuft, nicht-kanonische Signalwege, wie den MAPK (Mitogen-activated protein kinase)-Signalweg, aktivieren. Noggin ist ein extrazellulärer Faktor, der die Bindung von BMPs und somit Aktivierung des Signalweges inhibiert (68).

1.3.3.1.2 Wnt-Signalweg

Der BMP-Signalweg steht in Interaktion mit dem Wnt-Signalweg (70, 73–75). Dieser ist wichtig für die Expansion und Differenzierung von Stammzellen und spielt eine entscheidende Rolle bei der Zahnentwicklung (54, 76–78). Die Bezeichnung des Signalweges nach seinem Liganden „Wnt“ beruht auf seiner Entdeckung durch mutierte Zielgene. Das „Wnt“ setzt sich zusammen aus Wg für *Wingless* und *Int-1*. Die Bezeichnung *Wingless-type* stammt aus Beobachtungen von der Taufliege *Drosophila Melanogaster*, in der Mutationen im *wingless*-Gen zu einer flügellosen Variante führen. Das *Int*-Gen fördert bei Mäusen die Entwicklung von Brustkrebs, wenn seine Expression durch die Integration des Maus-Mammatumovirus (MMTV), eines Retrovirus in der Nähe des *Int1*-Gens, aktiviert wird (55).

Bei den Wnt-Proteinen handelt es sich um sezernierte Glykoproteine, welche an Rezeptoren der Frizzled Familie und verschiedenen Korezeptoren wie Lipoprotein-related Protein- Rezeptoren binden (55, 79). Es sind 19 Mitglieder der Wnt-Familie und 10 Frizzled Transmembrane Rezeptoren (FRZ) bekannt (80). Über eine Rezeptoraktivierung wird der Wnt- Signalweg in Gang gesetzt, was zu einer Translokation von β -Catenin in den Nukleus führt und dort die Genexpression reguliert. Während des nicht-aktivierten Signalweges wird β -Catenin kontinuierlich abgebaut (55, 78, 80).

Wnt3a führt zu einer Assoziation des heterodimeren Rezeptors, bestehend aus FZD und dem LRP (*Low-density-lipoprotein-related Protein*). Der so gebundene Rezeptor aktiviert im Zytoplasma das Phosphoprotein *dsh* (*dishevelled*). Dies hat den Zerfall des Proteinkomplexes, der aus den Stützproteinen Axin, APC (*Adenomatous-polyposis-coli-Protein*) und den Kinasen CK1 (Cyclinkinase 1) und GSK3 (Glycogensynthetasekinase 3) besteht, zur Folge. Durch den Zerfall des Abbaukomplexes kommt es zu einem Anstieg des β -Catenin im Zellkern. β -Catenin reguliert die Genexpression im Zellkern und das mit Hilfe des Transkriptionsfaktors Lef/Tcr (*Lymphoid enhancer-binding factor/T-cell-specific transcription factor*). (75, 81, 82)

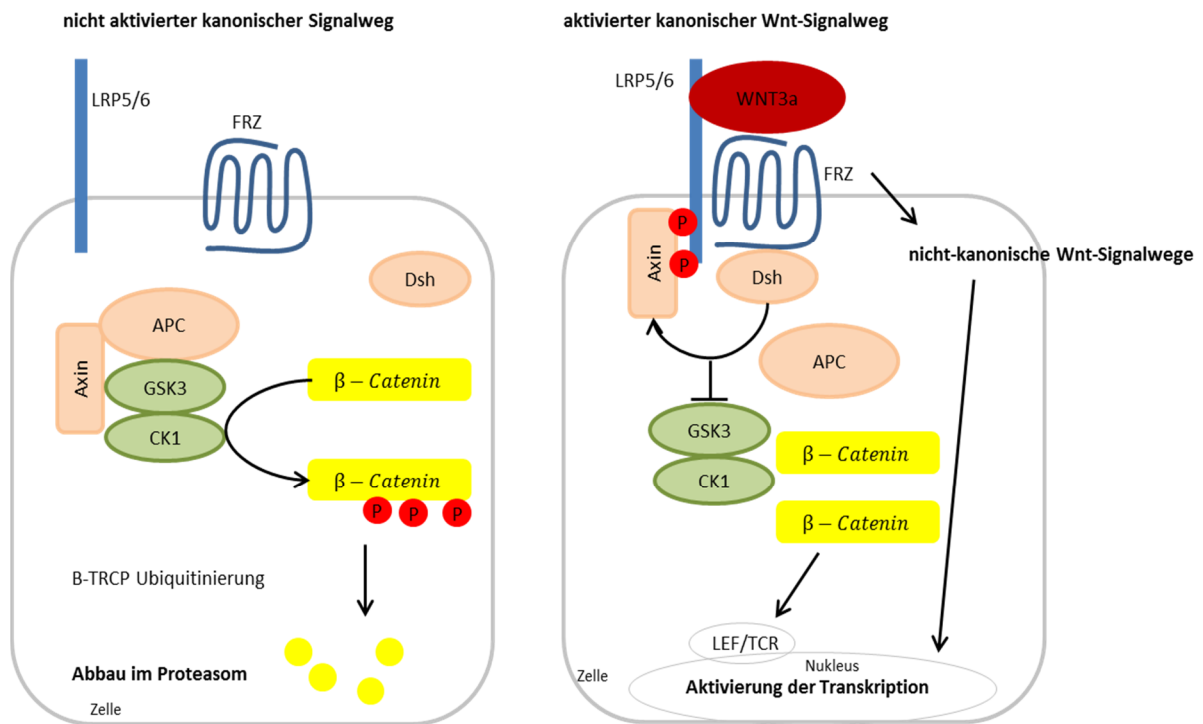


Abbildung 4: Der Wnt-Signalweg (75, 81, 82).

Zielgene sind unter anderem auch Mitglieder des Wnt-Signalweges selbst, was auf eine Rückkopplung schließen lässt. Zudem wird der Wnt-Signalweg auf unterschiedlichen Ebenen durch Co-Rezeptoren, extrazellulären und intrazellulären Faktoren wie zum Beispiel Dickkopf 1 (DKK1) moduliert (75). DKK1 inhibiert den Wnt-Signalweg, indem es zu einer Inaktivierung des Rezeptors führt (78).

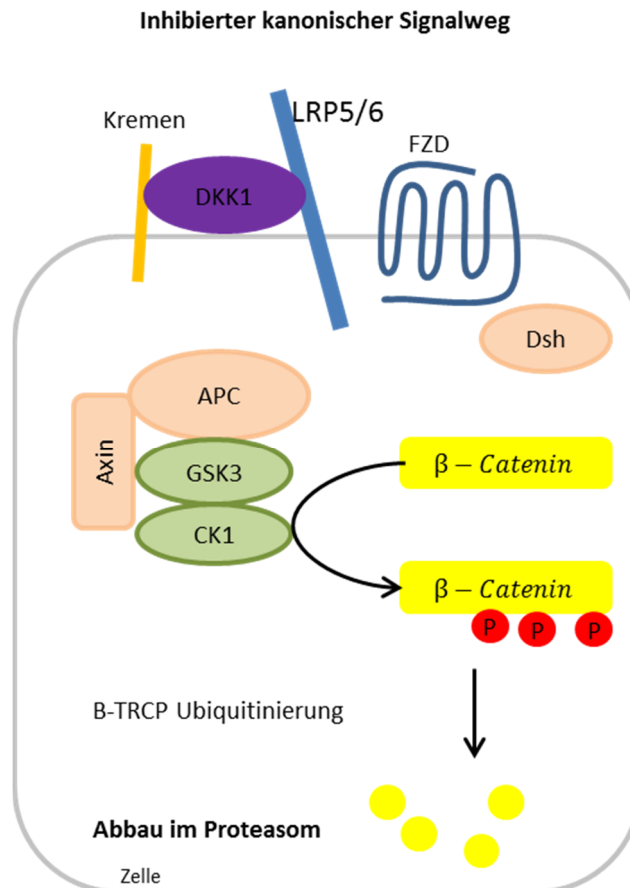


Abbildung 5: Inhibition des Wnt-Signalweges mit DKK (Dickkopf)1. Der extrazelluläre Antagonist DKK1 führt mit Hilfe von Kremen zu einer steirischen Hinderung des LRP5/6 (Lipoprotein- Related-Protein 5/6) (78).

1.3.3.1.3 Dexamethason (Dexa)

In vielen in vitro Studien wird das Glukokortikoid Dexamethason zur Induktion der osteogenen Differenzierung von Stammzellen, wie DFSCs, BMSCs und ADSCs, eingesetzt (43, 64, 83–86). Die Supplementation des Mediums mit Dexamethason und den unterstützenden Faktoren Ascorbinsäure und β -Glycerophosphat wird als ODM (osteogenes Differenzierungsmedium) bezeichnet (86) (siehe auch Kapitel 2.1.9). Es wurde initial zur osteogenen Differenzierung von BMSCs entwickelt (86,87), aber mittlerweile gilt es als osteogenes Standardmedium (88–91).

1.3.3.2 Osteogene Differenzierungsmechanismen dentaler Follikelstammzellen (DFSCs)

Als natürliche Vorläuferzellen des Parodonts sind die DFSCs und ihre Differenzierungsmechanismen von besonderem Interesse. Über Proteome und Transkriptome entschlüsselte man die molekularen Prozesse während ihrer Differenzierung (92, 93). Diese Studien zeigten, dass der BMP- und der Wnt-Signalweg eine entscheidende Rolle spielt (92).

Über den BMP-Signalweg wird die Genexpression der Transkriptionsfaktoren DLX3 und RUNX2 induziert und dadurch die osteogene Differenzierung gefördert (67, 70). Der BMP-Signalweg steht in Wechselwirkung mit dem Wnt-Signalweg, er aktiviert unter anderem Wnt-Inhibitoren, wie DKK1 (94, 95).

Der Wnt-Signalweg spielt eine Schlüsselrolle für die Differenzierung von Zementoblasten und alveolären Osteoblasten (73, 96). In DFSCs ist die Expression von β -Catenin notwendig für die von DLX3 induzierte Expression von RUNX2 und ALP (70, 73, 97). Es wird durch BMP2 über eine PKA (Proteinkinase A) aktiviert. Wnt3a inhibiert die osteogene Differenzierung, möglicherweise über eine Inhibition der PKA (70).

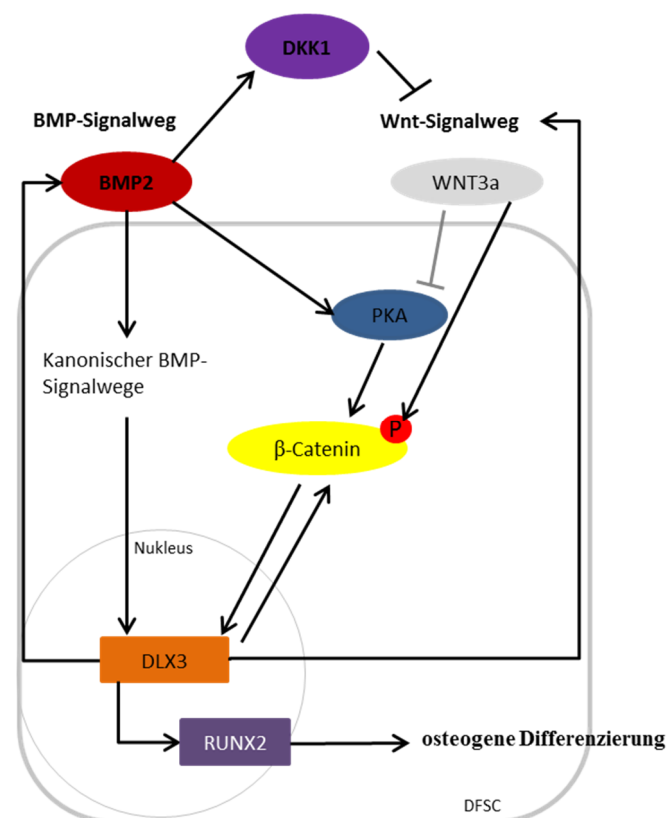


Abbildung 6: Wechselwirkungen des BMP- und des Wnt-Signalweges in DFSCs. BMP2 unterliegt einem Feedbackmechanismus mit DLX3. Auch zwischen DLX3 und β -Catenin besteht eine Rückkopplungsschleife. (67,70,94).

Die essentielle Rolle des BMP- und Wnt-Signalweges für die osteogene Differenzierung der DFSCs ist allgemein anerkannt. Aktuelle Studien zeigen einen alternativen molekularen Prozess für die osteogene Differenzierung von DFSCs (84, 98). Hierbei übernimmt der Transkriptionsfaktor ZBTB16 (*zink finger and BTB domain containing protein 16*) eine Schlüsselrolle. Dieser wird unabhängig von dem BMP-Signalweg exprimiert und kann nur durch eine Dexamethason-Supplementation induziert werden (84, 98, 98, 99). Die Differenzierungsmechanismen laufen unabhängig von RUNX2 ab (93, 100).

ZBTB16 induziert die Genexpression und Proteinsekretion von STC1 (*Stanniocalcin 1*), PTHrP (*Parathyroid hormone related peptide*) und BGLAP (84). Zwischen STC1 und ZBTB16 besteht ein Rückkopplungsmechanismus (98). Möglicherweise interagiert STC1 mit der SENP (SUMO1/sentrin/SMT3 specific peptidase) 3 Ligase (101). Diese wiederum kontrolliert die osteogene Differenzierung über eine Aktivierung des MLL1/MLL2 (myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 1/2) Methyltransferase Komplexes, der die Expression von DLX3 induziert (102). ZBTB16 hat ebenso eine Bindungsstelle am DLX3 Promoter und kann die Expression von BMP2 induzieren, worüber die osteogene Differenzierung gefördert wird (67,98).

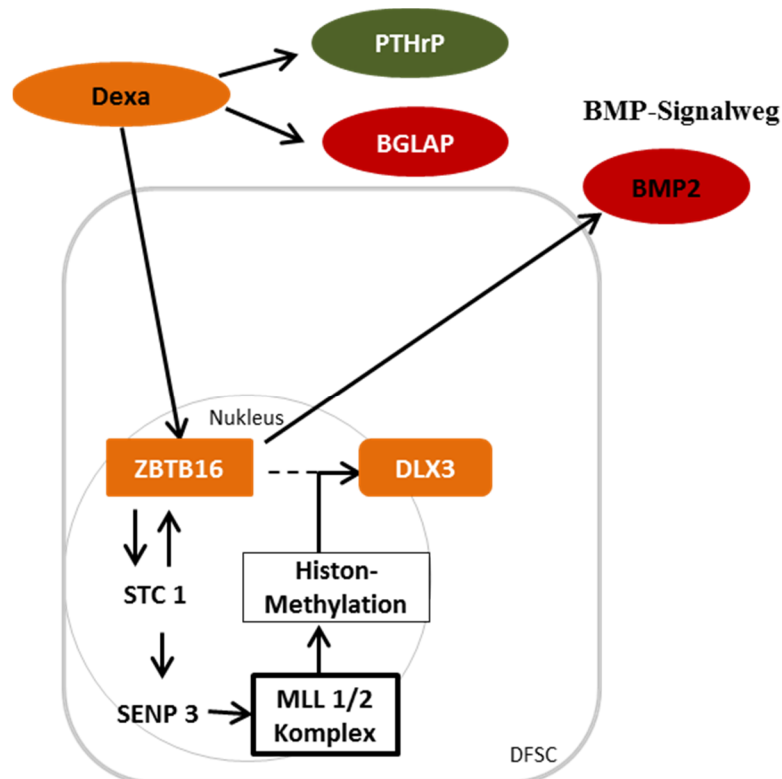


Abbildung 7: Differenzierungsmechanismus von Dexamethason in DFSCs (67,84,102)

1.3.3.3 Osteogene Differenzierungsmechanismen der ADSCs

Für die Induktion der osteogenen bzw. zementogenen Differenzierung von ADSCs sind exogene Faktoren notwendig (45). In vielen Studien wurden hierfür ODM, das in Kapitel 1.3.3.1.3 ausgeführt wurde oder BMP2 eingesetzt (103–107). ADSCs exprimieren BMP-Rezeptoren, und der Faktor BMP2 kann den Smad-abhängigen kanonischen Signalweg dosisabhängig induzieren (66, 105). Über den BMP-Signalweg wird die Expression von DLX3 und RUNX2 gesteuert und somit die osteogene Differenzierung induziert und die Mineralisierung gefördert (103, 105). Im Gegensatz zu den DFSCs wird in ADSCs eine duale Funktion des BMP-Signalweges beschrieben. Neben der osteogenen Differenzierung kann auch die adipogene Differenzierung induziert werden (66, 105). Eine Schlüsselrolle soll die Induktion von PPAR γ (*Peroxisome proliferator-activated receptor γ*) und C/EBAP α (CCAAT/enhancer binding Protein α) spielen (105). Diese Transkriptionsfaktoren sind die Hauptregulatoren der adipogenen Differenzierung (108).

Ein weiterer entscheidender Signalweg für die Festlegung der osteogenen Differenzierung ist der ERK-Signalweg, der zu den MAPK-Signalwegen zählt (106). Dieser Signalweg kann dosisabhängig durch eine Dexa-Supplementation aktiviert werden (106). Wie während der Osteogenese mesenchymaler Stammzellen beobachtet, soll der aktivierte ERK-Signalweg auch in den ADSCs RUNX2 induzieren (51). Zudem wird durch den aktivierten ERK-Signalweg PPAR γ über eine Phosphorylierung inhibiert, was eine adipogene Differenzierung unterbindet (109).

In Zementoblasten wurde beobachtet, dass der Wnt-Signalweg die Differenzierung über eine Herabregulation von RUNX2 inhibierte. DKK1 hingegen, als Inhibitor des Wnt-Signalweges, förderte die Differenzierung über eine Erhöhung der RUNX2-Expression (96). In ADSCs konnte durch DFSCs-konditioniertes Medium β -Catenin herabreguliert werden und so die Differenzierung in mineralisierende Zellen, wie Zementoblasten oder alveoläre Osteoblasten induzieren werden (97, 110). Aufgrund dieser Beobachtung wurde vermutet, dass eine Inhibition des Wnt-Signalweges ursächlich war. Diese Vermutung wurde bestätigt, da eine zusätzliche Supplementation mit DKK1 die Differenzierung förderte, wohingegen zusätzliches Wnt3a die Differenzierung inhibierte (97).

In der Literatur gibt es kontroverse Aussagen über die Funktionsweise des Wnt-Signalweges. Laut anderer Studien sollte die Aktivierung des Wnt-Signalweges die adipogene Differenzierung von ADSCs inhibieren und über eine Stabilisierung von β -Catenin RUNX2 induzieren, und dadurch die osteogene Differenzierung fördern (111). Exogenes DKK1 hingegen sollte die adipogene Differenzierung durch eine Hochregulation von PPAR- γ und

C/EBP- α induzieren und die osteogene Differenzierung über eine Herabregulation von Wnt3a, Wnt10b und β -Catenin inhibieren (112).

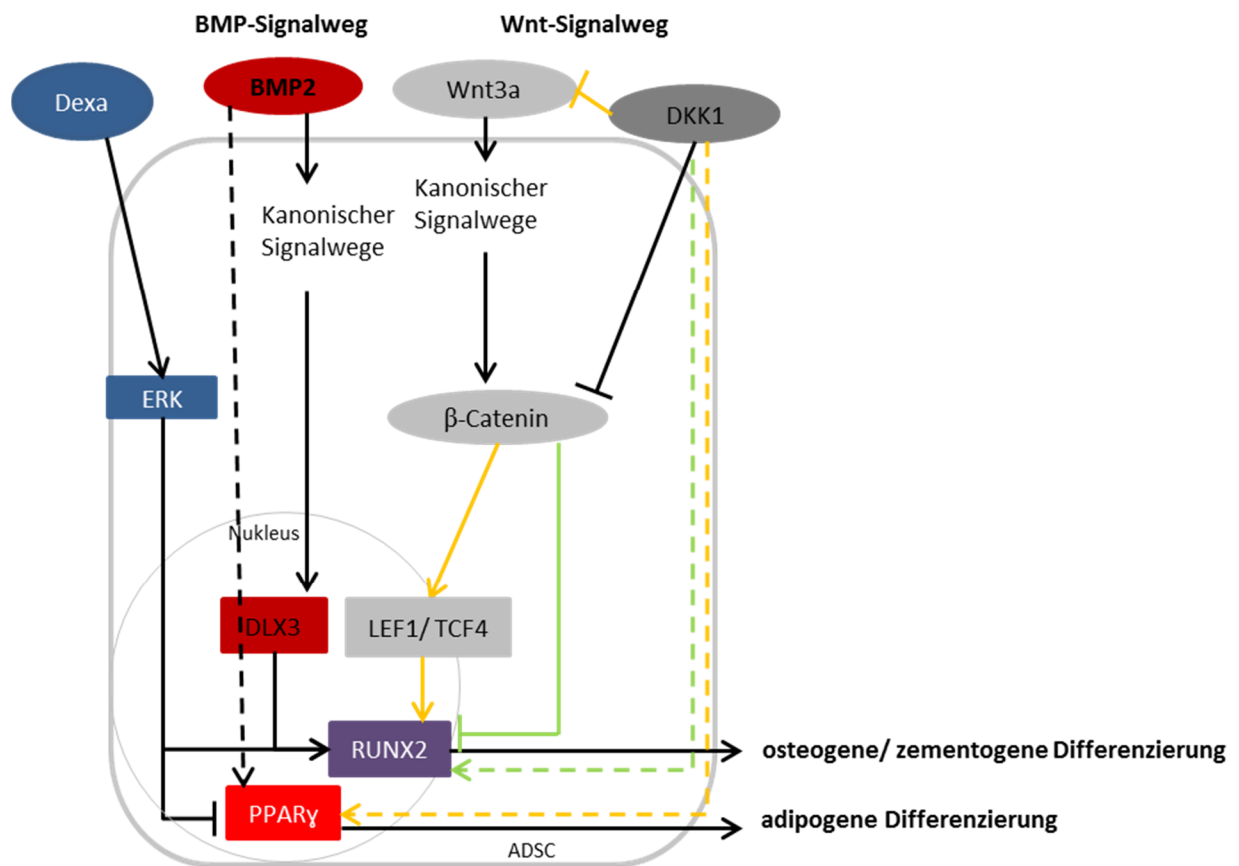


Abbildung 8: Osteogene und adipogene Differenzierungsmechanismen der ADSCs. Dexa und BMP2 besitzen eine duale Funktion (103,105,106). Der Wnt-Signalweg reguliert das β -Catenin Level, das die osteogene oder die adipogene Differenzierung unterstützt. Grün markiert sind die Mechanismen, über welche eine Inhibition des Wnt-Signalweges die osteogene Differenzierung unterstützt (97,110). Die orangenen Pfeile stellen eine Förderung der osteogenen Differenzierung durch eine Aktivierung des Wnt-Signalweges dar (97,112).

1.3.4 Einsatz adipogener Stammzellen zur Therapie parodontaler Erkrankungen

In Tierversuchen wurden adipogene Stammzellen bereits erfolgreich zur Unterstützung der Regeneration parodontaler Defekte eingesetzt (12,113,114). Von Ratten isolierte ADSCs wurden mit plättchenreichem Plasma vermischt und in künstlich erzeugte parodontale Defekte eingebracht (114). Dieses Experiment konnte auch schon erfolgreich mit Hasen wiederholt werden (12). In einem künstlich erzeugten Parodontitis-Mausmodell wurden ADSCs auf einem Kollagenträger eingebracht, wobei die Ergebnisse eine signifikante Verbesserung der Regeneration belegen konnten (113).

Aktuell wird eine randomisierte klinische Studie (Nummer: NCT02449005) durchgeführt, die sich mit der Sicherheit und Effektivität der regenerativen Behandlung parodontaler Defekte mit autologen BMSCs auseinandersetzt. Diese Zellen werden mit Fibrinkleber angereichert, auf einem Kollagenträger in einen durch Parodontitis hervorgerufenen Defekt eingebracht.

Auch zur Überprüfung der Sicherheit und Effektivität der Transplantation von autologen ADSCs für die Regeneration von parodontalem Gewebe wurde eine randomisierte klinische Studie (Nummer: UMIN000007698) gestartet und das in Japan. Nach Aspiration von abdominalem Fettgewebe sollen die dabei gewonnen ADSCs im Rahmen von parodontaler Chirurgie in den Defekt eingebracht werden.

Eine bestehende grundsätzliche Problematik hierbei ist, dass ADSCs ein geringeres osteogenes bzw. zementogenes Differenzierungspotential als BMSCs aufweisen (115). Sie besitzen die Tendenz eher adipogen zu differenzieren (116). Es wäre ein großer Vorteil für weitere klinische Studien die osteogene bzw. zementogene Differenzierbarkeit der ADSCs steuern zu können.

1.4 Fragestellung und Ziele der Arbeit

Ein besseres Verständnis der osteogenen bzw. zementogenen Differenzierungsmechanismen der ADSCs ist notwendig, um eine zielgerichtete Differenzierung zu ermöglichen und letztendlich die Effektivität des Einsatzes von ADSCs als Therapieansatz für parodontale Erkrankungen wie die Parodontitis zu steigern.

Durch gezielte Aktivierung und/oder Inaktivierung des Wnt- und BMP-Signalweges sollte die osteogene bzw. zementogene Differenzierbarkeit im Vergleich zu dem Standardprotokoll mit ODM untersucht werden. Die Signalwege wurden auf aktuellen Studien basierend ausgewählt. In einer dieser Arbeiten konnte die Differenzierung von ADSCs in alveoläre Osteoblasten bzw. Zementoblasten durch ein DFSCs-konditioniertes Medium über eine vermutete Inhibition des Wnt-Signalweges unterstützt und mit zusätzlicher DKK1-Supplementation noch weiter gefördert werden (97, 110). Allgemein anerkannt in der Literatur ist, dass der BMP-Signalweg eine zentrale Rolle für die osteogene Differenzierung spielt (66, 103, 105, 107, 117, 118).

Mit kommerziell erworbenen ADSCs sollten dabei verschiedene Protokolle getestet werden. Diese sollten sich aus einzelnen Faktoren der ausgewählten Signalwege, oder Kombinationen dieser, in unterschiedlichen Konzentrationen zusammensetzen. Zur Evaluation der Differenzierung sollte die ALP-Aktivität, welcher ein früher Marker der osteogenen Differenzierung ist, bestimmt werden. Mit dieser Methode kann zuerst eine große Anzahl an ausgewählten Protokollen in relativ kurzer Zeit untersucht werden, um anschließend von ausgewählten Protokollen die Expression osteoblasten- bzw. zementoblastentypischer Gene und Proteine zu bestimmen. Darüber hinaus sollten Alizarin-Rot-Färbungen durchgeführt werden, um die Mineralisierung als späten Marker zu untersuchen.

Ziel dieser Arbeit ist es die Bedeutung des BMP- bzw. Wnt-Signalweges für die osteogene bzw. zementogene Differenzierung der ADSCs besser zu verstehen und darüber hinaus zu untersuchen, ob durch eine gezielte Manipulation dieser Signalwege die Ausbeute an osteogen bzw. zementogen differenzierenden Zellen erhöht werden kann.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Zellen

Die humanen **ADSCs** wurden kryokonserviert in Passage 2 von der Firma Thermo Fisher (USA) bezogen. Die Zellen wurden aus dem Lipoaspirat gesunder Spender gewonnen und anschließend einer Qualitätskontrolle bezüglich Zellvitalität, Sterilität, Infektiösität und Homogenität unterzogen. P2 oder P3 musste $\geq 95\%$ positive Expression der Oberflächenmarker CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 und CD166 zeigen, zudem sollte die CD14, CD31 und CD45 Expression $< 2\%$ sein.

Die humanen **MSCs** wurden ebenfalls von der Firma Thermo Fisher (USA) erworben. Sie wurden aus menschlichem Knochenmark gewonnen und kryokonserviert in Passage 4 erhalten.

Die humanen **DFSCs** wurden von der Firma AllCells (USA) bezogen und in Passage 5 und 7 eingesetzt.

Die Versuche der unterschiedlichen Zellen wurden unter gleichen Bedingungen durchgeführt.

2.1.2 Zellkulturmedien und Zusätze

Medien/ Zusätze:	Hersteller:
β -Glycerophosphat Dinatriumsalz-Hydrat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dexamethason 1,6 G solid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DMEM high Glucose (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) mit 4,5 g/ml Glucose und L-Glutamin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DMSO-Lösung (Dimethylsulfoxid)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
FBS (Fetal Bovine Serum)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
HEPES-Puffer (1M), pH 7	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Penicillin/Streptomycin-Lösung 10.000 Units Penicillin/ml, 10mg/ml Streptomycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
2-Phospho-L-Ascorbinsäure Trinatrium Salz, (AscPO ₄)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

2.1.3 Allgemeine Materialien

Allgemeine Materialien:	Hersteller:
Counting Slides, Dual Chamber for Cell Counter	BioRad, Hercules, CA, USA
FACS- Röhrchen	BD Biosciences, Bedford, USA
Falcon-Röhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Filterpapier (extra thick blot paper)	BioRad, Hercules, CA, USA
Kryoröhrchen	Bioenzym, Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate 0,2 mL	Applied Bioscience incooperated by ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
MicroAmp™ 8-Cap strip	Applied Bioscience incooperated by ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
Multiwellplatten	Corning Inc., Lowell, USA
Nitrocellulosemembran Protran B85; 0,2 µm; 300mm x 3 m	Whatman, Maidstone, UK
Pipettenspitzen	Nerbe Plus, Winsen, Deutschland
Pipettierhelfer, accu-jet pro	Brand, Wertheim, Deutschland
QIAshredder	Quiagen, Hilden, Deutschland
Spritzen, 10ml	BD, Franklin Lakes, NY, USA
Steriler Filter	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Deutschland
Stripetten	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Whatman-Papier	BioRad, Hercules, CA, USA
Zellkulturflaschen	Corning Inc., Lowell, USA
Zellschaber	Falcon, Corning Inc., Lowell, USA

2.1.4 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien und Reagenzien:	Hersteller:
Aceton	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Alkalische Phosphatase	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Alizarin Rot S	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ammoniumhydroxid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
β -Mercaptoethanol	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Bovine Serum Albumin 30%ig (BSA)	Bio- Rad Medical Diagnostics GmbH, Dreieich, Deutschland
Essigsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
GoTaq® Green Master Mix	Promega, Madison, Wisconsin, USA
4x Lämmli (BOLT®-System)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Methanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
NaOH (1 M)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
NaCl	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
NaF	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Na ₃ VO ₄	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
N-P40	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
PBS	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ponceau-Pulver	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Phosphatase inhibitor cocktail 3	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Phosphatase Substrat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
2-Phospho-L-Ascorbinsäure Trinatrium Salz	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
2-Propanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Basel, Schweiz
Reducing Agent (BOLT®- System)	Invitrogen, Carlsbad, USA
TritonX-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypanblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypsin 2,5 %	Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA
Trypsin- EDTA 0,25% Gibco®, phenol red	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Tween ®20 viscous liquid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

2.1.5 Puffer und Lösungen für FACS- und Western Blot- Analysen

Puffer und Lösungen:	Zusammensetzung:
Entwicklerlösung (ECL-Lösung)	Clarity™ Western ECL Substrate, BioRad, Hercules, CA, USA
Färbepuffer für FACS-Analyse	- PBS mit 0,01% Natriumazid - 2 mM Na-EDTA und 0,5% BSA
Ladepuffer	4XBolt™ LDS Sample Buffer, lithium dodecyl sulfate (LDS), Invitrogen, Carlsbad, USA
Laufpuffer	20XBolt® MES SDS Running Buffer, Invitrogen, Carlsbad, USA
Lysis Buffer, Stocklösung	- 0,02 M Tris - 0,137 M NaCl - 0,048 M NaF - 1% NP-40 - 10% Glycerol in dH ₂ O
Lysis Buffer	- 250µl Phosphatase inhibitor cocktail - 500µl 2mM Na - 1 Tablette Protease Inhibitor Cocktail - 24,25 ml Lysispuffer, Stocklösung
Poncau S-Lösung	- 0,1g Ponceau-Pulver in - 47,5 ml dH ₂ O - 2,5 ml Essigsäure
Re-Blot Plus Mild Lösung	Solution 10x; 1:10 verdünnt mit dH ₂ O, Merck Millipore, Massachusetts, USA
10XToubin-Puffer	- 250 mM Tris > 15,2 g - 1,9 M Glycin > 72,2 g auf 500 ml mit dH ₂ O auffüllen, pH 8,5
Transferpuffer	- 10 ml 10XToubin Puffer, - 10 ml Methanol, 80 ml dH ₂ O
Waschpuffer: TBST	- 150 mM NaCl - 10 mM Tris/ HCL pH 8 - 0,05% Tween

2.1.6 Antikörper für die FACS - Analysen

Antikörper:	Hersteller:
CD 44 (anti-human CD44-FITC (Fluorescein))	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD 146 (anti-human CD146-APC (Allophycocyanin))	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD 105 (anti-human CD105-APC)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
anti-human Stro-1, FITC	BioLegend, San Diego, USA
Mouse IgG2b-APC isotype control antibody	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Mouse IgG1-FITC	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Mouse IgG1 isotype Control, PE (Phycoerythrine)	R&D Systems, Minneapolis, USA
Mouse IgM, κ isotype Control, PE	BioLegend, San Diego, CA, USA

2.1.7 Isotypenkontrollen der FACS-Analysen

Antikörper:	Isotyp-Kontrolle:	Verdünnung:
CD 44	Mouse IgG1-FITC	1:10 (5 μ l AK + 45 μ l Puffer)
CD 146	Mouse IgG1, PE	1:10 (5 μ l AK + 45 μ l Puffer)
CD 105	Mouse IgG2b-APC	1:10 (5 μ l AK + 45 μ l Puffer)
Stro-1	Mouse IgM, κ isotype Control, PE	1:19 (5 μ l AK + 90 μ l Puffer)

2.1.8 Faktoren der osteogenen Differenzierung

Faktoren der osteogenen Differenzierung:	Hersteller:
Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP2), human recombinant (rHuBMP-2)	BIOMOL GmbH, Hamburg, Deutschland
Noggin	R&D Systems, Inc, Minneapolis, USA
Recombinant Human DKK1	R&D Systems, Inc, Minneapolis, USA
Recombinant Human Wnt-3a	R&D Systems, Inc, Minneapolis, USA

2.1.9 Zusammensetzung der Medien

Medium:	Zusammensetzung:
DMEM	DMEM, 2% FBS, 1% Penicillin/ Streptomycin-Lösung
Osteogenes Grundmedium (OG)	DMEM, 2% FBS, 1% Penicillin/ Streptomycin-Lösung, 0,01% 1 M β -Glycerophosphat Dinatriumsalz –Hydrat, 0,01 % 1 M 2-Phospho-L-Ascorbinsäure Trinatrium Salz, 2% HEPES
Osteogenes Differenzierungsmedium (ODM)	DMEM, 2% FBS, 1% Penicillin/ Streptomycin-Lösung, 0,01% 1 M β -Glycerophosphat Dinatriumsalz–Hydrat, 0,01 % 1 M 2-Phospho-L-Ascorbinsäure Trinatrium Salz, 2% HEPES, 10^{-7} M Dexamethason
Kryo-Konservierungsmedium	DMEM, 30% FBS, 10% DMSO-Lösung

2.1.10 Antikörper für Western Blot-Analysen

Primär-AK:	Hersteller:	Verdünnung:	Sekundär-AK:	Verdünnung:
RUNX2	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Texas, USA	1:750 in TBST mit 3% BSA	Anti-Rabbit	1:2000 in 10ml TBST mit 0,5g Milchpulver
β -Actin	Novus Biologicals, Colorado, USA	1:10.000 in 10ml TBST mit 0,5g Milchpulver	Anti-Mouse	1:10.000 in 10ml TBST mit 0,5g Milchpulver

2.1.11 Primer für Reverse Transkription mit nachfolgender Echtzeit Polymerase (RT-qPCR)

Gen:	Hersteller:	Assay-ID:	Assay-Typ:
ALPL (alkaline phosphatase, liver/bone/kidney)	BioRad, Hercules, CA, USA	qHsaCID0010031	SYBR® Green
CEMP1 (cementum protein 1)	BioRad, Hercules, CA, USA	qHsaCED0038353	SYBR® Green
RUNX2 (runt-related transcription factor 2)	BioRad, Hercules, CA, USA	qHsaCID0006726	SYBR® Green

2.1.12 Kits

Kit:	Hersteller:	Anleitung:
BCA Protein Assay	Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA	2014
SsoAdvanced™ SYBR® Green Supermix	BioRad, Hercules, CA, USA	2015
iScript™ cDNA Synthesis Kit	BioRad, Hercules, CA, USA	2000, INST-653 Ver D
RNeasy Plus Mini	Quiagen, Hilden, Deutschland	Dezember 2014

2.1.13 Geräte und Software

Gerät/ Software:	Hersteller:
Bild Analyseprogramm, AxioVision	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
CCD Kamera	DS Fi2, Nikon Chiyoda, Tokyo, Japan
ChemiDoc™ Touch Imaging System	BioRad, Hercules, CA, USA
FACS Canto-Durchflusszytometer	Becton Dickinson Biosciences, Franklin Lakes, USA
Flüssigstickstoffbehälter	Arpege 110, Air Liquide, Düsseldorf
Gelapparatur (BOLT®- System)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Gelelektrophorese Kammer	BioRad, Hercules, CA, USA
iMark Platten-Reader	BioRad, Hercules, CA, USA
Image Lab™ Software	BioRad, Hercules, CA, USA
Inkubator	HeraCell 150 Heraeus, Hanau
Kleinschüttler KM-2	Edmund Bühler GmbH, Echingen, Deutschland
LightCycler	Roche Deutschland Holding GmbH
Mikroskopkamera SC30	Olympus Europa, Hamburg
Nanodrop ND 1000	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Novex Bolt Mini Gel Tank	Invitrogen, Carlsbad, USA
PCR-Maschine: StepOnePlus	Applied Bioscience incooperated by ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA
Rührer, magnetisch	Variomag, Daytona Beach, FL, USA
Schüttelgerät Typ Reax top	Heidolph, Schwabach
Sicherheitswerkbank	HeraSafe HS12, Heraeus, Hanau
Stickstofftank	LN ₂ , -196°C, Arpege 110, Air Liquide, Düsseldorf
Tisch pH-Meter	METTLER TOLEDO, Ohio, USA
Thermocycler	BioRad, Hercules, CA, USA
Wasserbad	GFL 1092 GFL, Burgwedel
Zellzähler	Cell Counter TC20 BioRad, Hercules, CA, USA
Zentrifugen:	
- Eppendorf centrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg
- Labofuge 400R	Heraeus, Hanau

2.2 Methoden

2.2.1 Steriles Arbeiten

Zur Vermeidung von Kontaminationen, aber auch zum Eigenschutz wurden die Zellen ausschließlich unter sterilen Bedingungen kultiviert und differenziert. Dafür wurden alle Versuche an einer sterilen Werkbank durchgeführt. Zusätzlich war gründliches Händewaschen vor Arbeitsbeginn, das Tragen von Handschuhen und die Händedesinfektion mit Ethanol 70 % essentiell. Zu Beginn und zum Abschluss der Tätigkeit wurden die Flächen der Werkbank sowie alle verwendeten Materialien mit Ethanol 70 % abgesprüht. Nicht sterile Lösungen, die mit den Zellen in Kontakt kamen, wurden entweder steril filtriert oder autoklaviert.

2.2.2 Zellkultur und Differenzierung

2.2.2.1 Passagieren und Zellzahlbestimmung

Die Zellen wurden in DMEM bei 37 °C und 5 % CO₂ in einem Brutschrank kultiviert. Ein Wechsel des Mediums fand alle drei bis vier Tage statt. Das Passagieren der Zellen erfolgte bei einer Zellkonfluenz von ca. 90 %. Hierfür wurde das Medium abgesaugt und die anhaftenden Zellen mit PBS gewaschen. Nach der Zugabe von 5 ml 0,25 %iger Trypsin/EDTA-Lösung (1:10 Verdünnung von 2,5 % Trypsin) in eine T-75 Flasche folgte eine fünfminütige Inkubationszeit bei 37 °C. Zum Lösen von noch am Plastik adhärenen Zellen wurde vorsichtig mit der Handinnenfläche gegen die Seitenwände geklopft. Im Anschluss wurde mikroskopisch kontrolliert, ob alle Zellen eine kugelige Form angenommen hatten und frei in der Flüssigkeit schwammen. Dies sind sichere Zeichen, dass sich die Zellen vom Boden lösten. War dies nicht der Fall, musste die Inkubationszeit um bis zu 5 Minuten verlängert werden. Hatten sich die Zellen komplett gelöst, wurde die Reaktion mit 5 ml DMEM abgestoppt. Die abgelösten Zellen wurden in ein Falcon Röhrchen überführt und 5 Minuten bei 1200rpm (4 °C) zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes und Resuspension des Zellpellets in 1 ml warmem Zellkulturmedium wurden die Zellen gezählt und auf neue Flaschen oder Schalen verteilt. Die Aussaat erfolgte in einer Dichte von 5000 Zellen/cm².

Um Zellen in einer definierten Dichte aussäen oder einfrieren zu können, wurde die Zellzahl mit Hilfe des TC20-Zellzählers bestimmt. Von dem zuvor in 1 ml resuspendierten Zellpellet wurden 10 µl mit 10 µl Trypanblau Lösung (0,5 % (w/v) Trypanblau in PBS)

vermischt. Davon pipettierte man 10 μl in eine Zählkammer, die in den Zellzähler gesteckt wurde. Der TC20-Zellzähler detektierte die Zellzahl, sowie den Anteil der vitalen und der toten Zellen. Die Unterscheidung beruht darauf, dass vitale Zellen in der Lage sind den Farbstoff auszuschließen und daher hell erscheinen, während tote Zellen diesen behalten und sind tiefblau gefärbt. Anschließend wurde die entsprechende Menge der Zellsuspension mit Medium verdünnt, um die gewünschte Zellzahl zu bekommen.

Dazu dient folgende Formel: Zellkonzentration = Zellzahl/Volumen des Mediums ($c = N/V$).

2.2.2.2 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Überzählige Zellen wurden für eine spätere Verwendung eingefroren. Zum Einfrieren wurden die Zellen abgelöst, zentrifugiert und die Zellzahl bestimmt. Nach nochmaligem Zentrifugieren für 5 bis 8 Minuten bei 1200rpm (4 °C) wurde der Überstand abgesaugt und durch Kryomedium ersetzt. Ca. 1 Mio. Zellen wurden in 1 ml Kryomedium resuspendiert und in die Kryoröhrchen verteilt. Zunächst wurden sie für 24 Stunden bei -80 °C heruntergekühlt. Zur dauerhaften Lagerung wurden sie in flüssigen Stickstoff überführt.

Um Zellen in Kultur zu nehmen, wurden die Kryoröhrchen 1-2 Minuten im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Sofort überführte man die Zellen bei 37 °C in eine T75 Flasche mit 10 ml DMEM. Nach 24 Stunden wurde ein Mediumwechsel vorgenommen.

2.2.2.3 Osteogene Differenzierungsprotokolle

Für die unterschiedlichen osteogenen Differenzierungsprotokolle wurden ADSCs in Passage 3 bzw. 4 in 24-Well Platten mit DMEM bis zur Subkonfluenz kultiviert. Eine 24-Well-Platte repräsentierte einen Versuch. Die in einer 24-Well Platte kultivierten Zellen stammten aus einer Charge (Zellen eines Spenders). Nach Erreichen der Subkonfluenz wurde die Differenzierung mit den unterschiedlichen Protokollen gestartet, wie Tabelle 2 und 3 genauer darstellt. Ein Triplikat mit DMEM (Kontrolle) wurde belassen und ein weiteres Triplikat mit ODM (Standardprotokoll) wurde zeitgleich als Kontrolle mit den getesteten Differenzierungsprotokollen gestartet. Von jedem Protokoll, das eine untersuchte Kombination der Faktoren beschreibt, wurden Triplikate auf einer Platte angelegt.

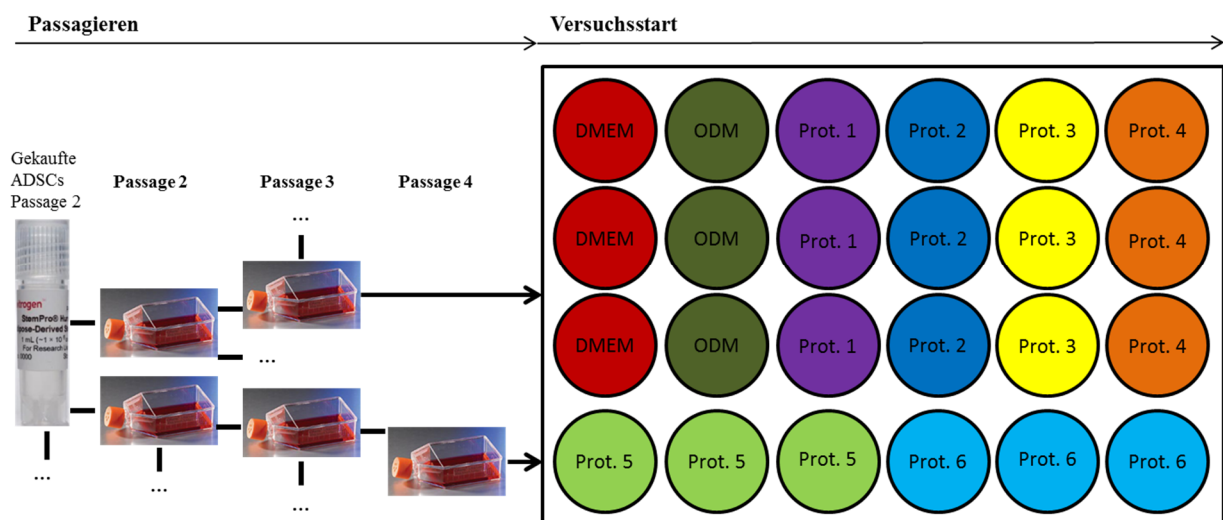


Abbildung 9: Osteogene Differenzierungsprotokolle. Linkes Bild: Passagierung der kommerziell erworbenen ADSCs bis Passage 3 (oben) oder Passage 4 (unten) vor Beginn der Differenzierung. Rechtes Bild: Differenzierungsstart, Beispiel einer 24-Well-Platte, bestehend aus Triplikaten mit DMEM (Kontrolle), ODM (Standard) und verschiedenen Protokollen (siehe Tabelle 1 und 2), die einen Versuch darstellt.

Für die Protokolle wurden dem osteogenen Grundmedium (OG) unterschiedliche Faktoren in unterschiedlichen Kombinationen (Tabelle 1) und Konzentrationen (Tabelle 2) hinzugesetzt: BMP2 als Aktivator und Noggin als Inhibitor des BMP-Signalweges, Wnt3a als Aktivator und DKK1 als Inhibitor des Wnt-Signalweges. Darüber hinaus wurden Dexamethason und ein DFSCs-konditioniertes Medium untersucht. Als Basis für das DFSCs-konditionierte Medium wurde der Überstand der DFSCs in der Passage 7 abgenommen, anschließend steril filtriert und 1:1 mit frischem OG vermischt. Die Ergebnisse und Abbildungen der Messungen sind in Kapitel 3.2 dargestellt.

BMP2:	Noggin:	Wnt3a:	DKK1:	Dexa:	Überstand DFSCs:	Abbildung:
x						17,26
x	x					17
		x				18
			x			18
		x	x			19
x		x				20
x			x			20
x				x		21
		x		x		22
			x	x		22
x			x	x		23, 25, 26, 27
x		x	x	x		24
					x	25, 21
			x		x	25

Tabelle 1: Getestete Kombinationen der Faktoren.

Faktor:	Konzentration:	Abbildung:
BMP2	10 ng/ml	17, 20, 21, 23, 24, 25, 26, 27
BMP2	25 ng/ml	17
BMP2	50ng/ml	17, 26
Noggin	200 µg/ml	17
DKK1	20 ng/ml	20, 22, 25, 26
DKK1	50ng/ml	18,19, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27
DKK1	100 ng/ml	18
Wnt3a	10 ng/ml	18, 22
Wnt3a	25 ng/ml	18, 19, 22, 24
Wnt3a	100 ng/ml	18
Dexa	10 ⁻⁸ M	21, 22
Dexa	10 ⁻⁷ M	21, 22, 23, 24, 25, 26
Überstand der DFSCs	1:1 mit DMEM	19,21, 25

Tabelle 2: Getestete Konzentrationen der Faktoren.

2.2.3 Messung der alkalischen Phosphatase (ALP) -Aktivität

Die alkalische Phosphatase ist ein in Leber, Knochen und Plazenta produziertes Enzym und kann vor allem im wachsenden Knochen und in Gallenflüssigkeit in hohen Konzentrationen nachgewiesen werden (119). Der Reaktionsmechanismus beruht auf einer Phosphatabspaltung durch die alkalische Phosphatase. Das farblose Substrat 4-Nitrophenolphosphat (pNPP) wird in das gelb gefärbte 4-Nitrophenol (pNP) umgesetzt. Die Aktivität der alkalischen Phosphatase ist proportional zu dieser Umsetzung. Da das Produkt pNP gelb erscheint, absorbiert es im violett-blauen Bereich (Komplementärfarbe) bei ca. 415 nm und wurde photometrisch detektiert (120).

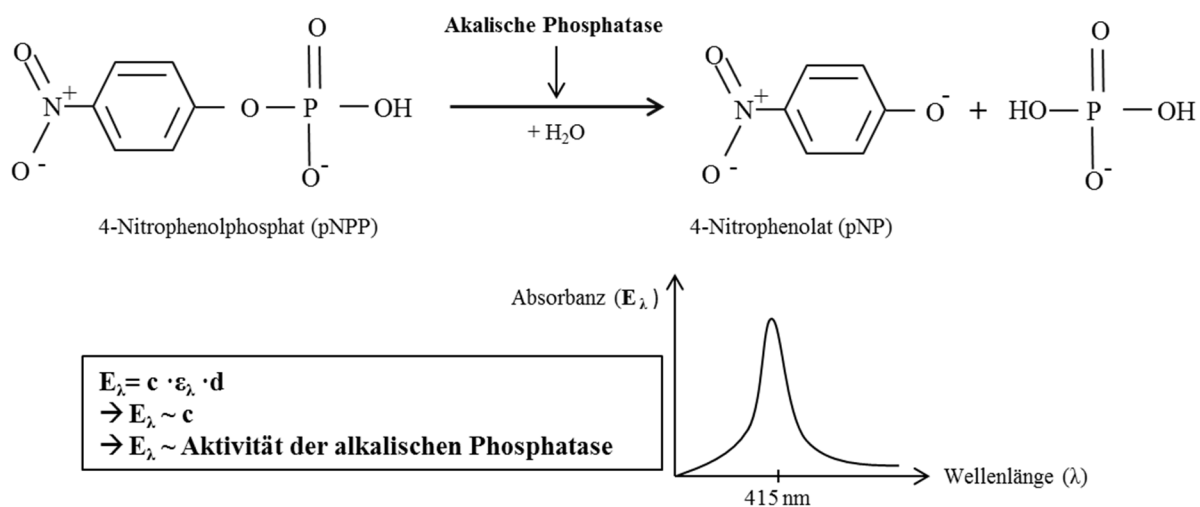


Abbildung 10: Messung der ALP-Aktivität (120). Laut Lambert-Beerschem Gesetz gilt die Extinktion (E_{λ} = Absorbanz des Materials für Licht der Wellenlänge λ) ist gegeben durch:

$$E_{\lambda} = c \cdot \epsilon_{\lambda} \cdot d \rightarrow E_{\lambda} \sim c, E_{\lambda} \sim \text{ALP-Aktivität, mit}$$

- c : Konzentration der absorbierenden Substanz in der Flüssigkeit [$\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$]
- ϵ_{λ} : natürlicher molarer Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge λ . Dieser ist eine für die absorbierende Substanz spezifische Größe [$\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$].
- d : Weglänge des Lichtes im Material [cm] (121).

Zur Normalisierung der ALP-Werte wurde der Proteingehalt der Proben mit Hilfe des Bicinchoninsäure (BCA)-Assay (siehe 2.2.5.1) bestimmt und die ALP-Werte darauf bezogen. Zur Durchführung der ALP-Messung wurde das Medium aus den Wells abgesaugt und die Zellen anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Zum Lösen der Zellen wurde 60 μl PBS mit 0,1 % Triton-X pro Well eingesetzt. Für den BCA-Protein Assay wurden 25 μl abpipettiert und auf einer 24-Well-Platte verteilt (weiteres Vorgehen siehe Kapitel 2.2.5.2).

Zur ALP-Messung wurde das restliche Zellysat auf eine 96-Well-Platte übertragen. Durch die Zugabe von 40µl Alkaline Phosphate Yellow Liquid Substrat pro Well wurde die Reaktion gestartet. Gleichzeitig wurde Alkaline Phosphate Yellow Liquid Substrat ohne Zellen zur Ermittlung des Blindwertes als negative Kontrolle inkubiert.

Nach einer Stunde im Inkubator wurde die Reaktion mit 40µl 3M NaOH pro Well abgestoppt. Die Absorption wurde bei 415 nm im Plattenreader gemessen.

Zur Berechnung wurde der Mittelwert der Leerwerte von den Einzelmesswerten abgezogen und anschließend der Quotient von ALP-Aktivität zur BCA-Messung gebildet. Alle Messungen wurden in Triplikaten angelegt und sind mit Standardabweichung angegeben.

2.2.4 FACS-Durchflusszytometrie von Stammzellmarkern

Die kommerziell erworbenen ADSCs wurden mit fluoreszenzmarkierten, Marker-spezifischen Antikörpern (AK) versehen, um anschließend mittels FACS (*fluorescence-activated cell sorting*)-Durchflusszytometrie untersucht werden zu können. Der primäre AK bindet an den gesuchten Oberflächenmarker und der sekundäre AK bindet wiederum spezifisch den primären AK. Der sekundäre AK ist mit einem fluoreszierenden Farbstoff versehen, welcher in der Durchflusszytometrie detektiert wird.

Als fluoreszierende Stoffe wurden Phycoerythrin (PE) mit Absorptionsmaximum bei 488 nm und Emissionsmaximum bei 578nm (122), Fluoreszein (FITC), dessen Absorptionsmaximum bei 495 nm zu finden ist und ein Emissionsmaximum im Bereich des grünen Lichts bei 525 nm hat (123), eingesetzt. Ein dritter Farbstoff ist Allophycocyanin (APC), der bei 470 nm angeregt wird und Licht der Wellenlänge 680 nm emittiert (124). Der Abstand zwischen der Wellenlänge mit maximaler Lichtenergieabsorption und dem Emissionsmaximum in einem langwelligeren Bereich wird als *Stokes-Verschiebung* bezeichnet (125). Die Farbstoffe weisen einen unterschiedlichen Abstand zwischen Anregungs- und Emissionswellenlänge auf. Der Abstand der Wellenlängen ermöglicht die Verwendung von mehreren Farbstoffen zur gleichzeitigen Messung und Korrelation verschiedener Parameter bei Einsatz nur eines Lasers.

Zur Durchführung der FACS-Durchflusszytometrie wurden die ADSCs in Passage 4 bis zur Konfluenz in DMEM kultiviert. Nach der Ablösung mittels Trypsin-Lösung (PBS mit 90% Trypsin) wurden die ADSCs mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen 5 Minuten bei 1200U/Min. (4°C) abzentrifugiert und ausgezählt. Für die Bestimmung von CD44, CD146 und CD105 wurden 500.000 Zellen in 45µl Färbepuffer resuspendiert. Für STRO-1 wurden 1 Mio. Zellen mit 90µl Färbepuffer versetzt. Nach der Überführung in

FACS-Röhrchen gab man 5 µl der fluoreszenzmarkierten Antikörperlösung für die Marker CD44/ CD146/ CD105 und Stro-1 (Details zu den Antikörpern siehe Kapitel 2.1.6) hinzu. Die Suspension wurde ca. 45 Min. gevortext und anschließend auf Eis im Dunkeln inkubiert. Nach der Zugabe von je 1 ml Färbepuffer wurde erneut für 5 Minuten bei 1200 U/Min. (4 °C) abzentrifugiert und anschließend mit jeweils 0,5 ml Färbepuffer resuspendiert. Bei den jeweiligen Isotypenkontrollen (Details zu den Isotypenkontrollen siehe Kapitel 2.1.7) wurde analog vorgegangen. Dann folgte die Messung mit dem FACSCanto- II Flow Cytometer (BD Biosciences). Die Messungen der Isotypenkontrollen wurden als Leerwerte abgezogen. (Isotypkontrollen sind Negativkontrollen, die das Ausmaß an Hintergrundsignal des Primärantikörpers aufzeigen. Als Isotypenkontrollen verwendet man Antikörper des gleichen Subtyps, wie der spezifische AK. Jedoch sind diese gegen ein Antigen gerichtet, von dem angenommen wird, dass es in den untersuchten Zellen nicht auftritt).

2.2.5 Biochemische und analytische Methoden

2.2.5.1 Proteinisolierung

Für die Proteinisolierung wurden die ADSCs auf 9-Well Platten ausgesät und in Triplikaten entsprechend der Protokolle (siehe Kapitel 2.2.2.3) behandelt.

Zuerst wurde das Differenzierungsmedium abgesaugt und dann zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden ca. 100 µl Lysis-Buffer auf die Zellen gegeben und diese mit dem Zellschaber sanft vom Boden abgelöst. Die Suspension aus je 3 Wells einer 9-Well Platte mit identischem Differenzierungsmedium wurde in ein Cup überführt und 5 Min. bei 14.000 rpm (4 °C) abzentrifugiert. Den Überstand überführte man in einen Cup, der anschließend bei - 20 °C gelagert wurde.

2.2.5.2 Bicinchoninsäure (BCA) Protein Assay

Für eine quantitative Konzentrationsbestimmung der Proteine wurde der Bicinchoninsäure (BCA)-Protein Assay verwendet. Dieser Assay beruht auf der kolorimetrischen Methode nach Biuret, wobei Peptidbindungen Cu^{2+} -Ionen zu Cu^+ reduzieren und diese wiederum einen farbigen Komplex mit BCA bilden. Durch die Bildung eines violetten Farbkomplexes kann die Proteinkonzentration spektrometrisch bei 490 nm bestimmt werden (126). Zur Quantifizierung wurde bei jeder Messung als Standard eine BSA-Eichgerade (dH₂O als Leerwert, sowie 0,2–0,4–0,6–0,8 und 1,0 mg/ml an BSA) durch lineare Regression erstellt.

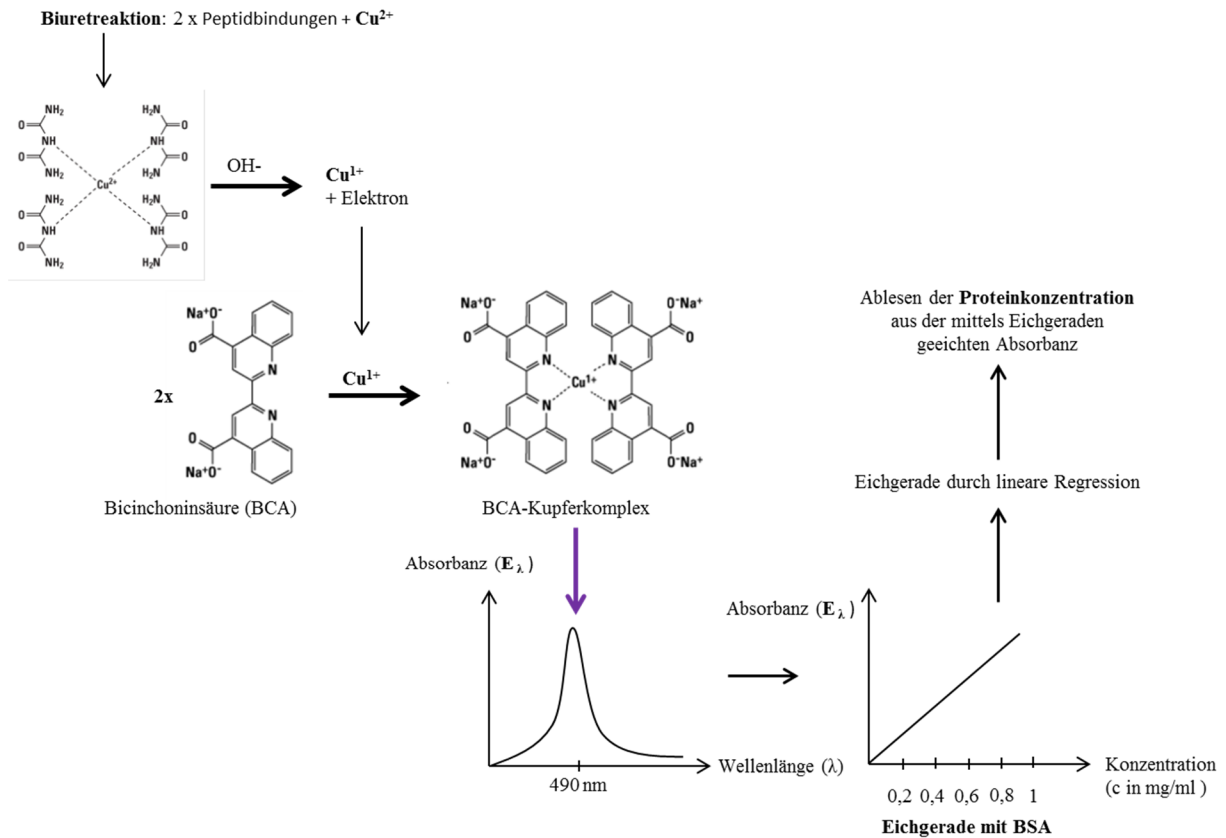


Abbildung 11: Bicinchoninsäure (BCA) Proteinassay (127). Über das Lambert-Beersche Gesetz können nach Erstellung einer Eichgerade die Proteinkonzentration über die gemessene Absorbanz abgelesen werden (121).

Die Messungen wurden in 96-Well-Zellkulturplatten durchgeführt. Dazu wurden $5\ \mu\text{l}$ der zu bestimmenden Proteinlösung 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt. Nach Zugabe von $100\ \mu\text{l}$ der BCA-Reaktionslösung pro Well und 30 Min. Inkubation bei $37\ ^\circ\text{C}$ erfolgte die Messung bei 490 nm durch den Plattenreader. Mit Hilfe der Eichgerade konnten die Konzentrationen der Proteine berechnet werden.

2.2.5.3 Western Blot mit BOLT®- System

Zur Proteinanalyse wurde das BOLT®- System (Invitrogen) verwendet. Dabei wurde die Proteintrennung mittels Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. SDS bzw. Lithium-Dodecylsulphat (LDS) sorgen für die Proteinentfaltung (Denaturierung durch Auflösung der Tertiär- und Quartärstruktur). Zudem lagern sie sich aufgrund ihrer negativen Ladung an die Proteine an. Die negative Ladung ist proportional zur Proteinmasse. Dies ermöglicht die Trennung der Proteine nach ihrer Masse durch Elektrophorese. Darauf folgt das Blotting der Proteine auf eine Membran, um die gesuchten Proteine spezifizieren und quantifizieren zu können. Die Spezifizierung erfolgte

über eine fluoreszenzmarkierte Antigen-Antikörper-Reaktion und die Quantifizierung über Ermittlung der relativen Graustufen der Chemilumineszenz.

Zur Durchführung des Western Blots wurden zuerst die Proteine mit 4xLämmli und dem Reducing Agent bei 95 °C für 5Min. unter gleichzeitigem Schütteln bei 550 rpm denaturiert. Die vorbereiteten Proben wurden sofort auf Eis gestellt.

Proteinmenge:	4x Lämmli:	Reducing Agent:	dH ₂ O:	Gesamtvolumen:
18µg	6µl	2,4µl	variabel	24µl

Tabelle 3: Zusammensetzung der Proben für den Western Blot.

Die Proben wurden in Slots eines 4-12%igen Bis-Tris-Gels pipettiert und der Laufpuffer (siehe Kapitel 2.1.5) in die Gelkammer eingebracht. Als Protein-Größenstandard wurde SeeBlue®Plus2 (Invitrogen) verwendet. Die Elektrophorese wurde bei 165 Volt für ca. 35Min. durchgeführt. Die Übertragung der Proteine erfolgte elektrophoretisch in einer Western-Blot-Kammer und mittels eines Semi-Dry Verfahrens. Zur Vorbereitung wurde die für den Transfer benötigte Membran zusammen mit den Filterpapieren im Transferpuffer (siehe Kapitel 2.1.5) für 20Min. inkubiert. Anschließend wurden oben und unten Filterpapiere, dazwischen das Gel zur Kathode und die Membran zur Anode in die Transferapparatur geschichtet.

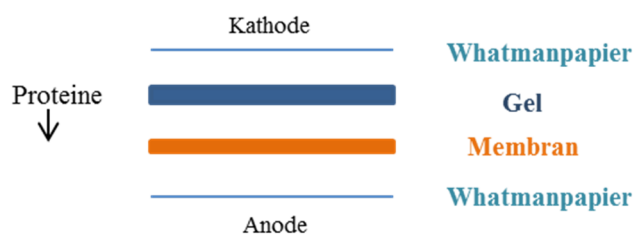


Abbildung 12: Schichtung in der Transferapparatur. Die Proteine wandern aufgrund ihrer negativen Ladung zur Anode und werden so auf die Membran geblottet.

Zum Blotten wurde für eine Stunde ein elektrisches Feld angelegt, sodass die Stromdichte konstant bei 2,5 mA/cm² war. Mit Hilfe einer Poncau-Färbung wurde anschließend kontrolliert, ob die Proteine geblottet wurden.

Im nächsten Schritt detektierte man die zu untersuchenden Proteine in der Membran mit zwei Antikörperreaktionen. Der primäre Antikörper (AK) findet charakteristische Aminosäuresequenzen des gesuchten Proteins und bindet an diese. Der sekundäre AK besitzt eine Markierung und bindet spezifisch den primären AK. Über die Markierung ist eine lumineszierende Nachweisreaktion möglich (Details zu den AK siehe Kapitel 2.1.10).

Um unspezifische Proteinbindungen zu vermeiden wurde die Membran zuerst mit einer Blockierlösung (0,5 g Milchpulver gelöst in 10 ml TBST) für eine Stunde auf dem Schüttler inkubiert. Der primäre AK (siehe 2.1.10) wurde über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank oder für 2 Stunden bei RT (Raumtemperatur) inkubiert. Am nächsten Tag bzw. nach 2 Stunden wurde der primäre AK abgenommen, mit dH₂O ausgespült und die Membran dreimal für 10 Min. mit TBST gewaschen. Anschließend inkubierte man den sekundären AK (siehe 2.1.10) für eine Stunde auf dem Schüttler. Nach Ende der Inkubation wurde die Membran zweimal mit TBST und einmal mit PBS gewaschen.

Die Proteine wurden mittels Chemilumineszenz sichtbar gemacht und semiquantitativ über errechnete Graustufen ausgewertet. Dafür inkubierte man die Membran zunächst in einer Entwicklerlösung (ECL-Lösung). Das emittierte Lichtsignal der markierten Proteine wurde mit dem Chemi DocTM Touch Imaging System (Bio-Rad) aufgenommen. Mittels Image LabTM Software (Bio-Rad) wurde das Lichtsignal in Graustufen umgerechnet, welche die quantitative Proteinkonzentration darstellen.

Mit diesem Vorgang konnten bis zu drei Proteine auf einer Membran ausgewertet werden. Dazwischen musste die Membran gestrippt werden. Hierfür wurde die Membran mehrmals mit PBS gewaschen und anschließend in der Re-Blot Plus Mild Lösung für 15 Min. auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde sie erneut zweimal für 10 Min. mit PBS gereinigt und mit 0,5 g Milchpulver gelöst in 10 ml TBST über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank oder für eine Stunde bei RT geblockt. Anschließend konnte der nächste primäre AK auf die Membran gegeben werden. Als letztes Protein wurde β -Actin auf der Membran als Positivkontrolle für die zuvor untersuchten Proteine detektiert.

2.2.6 Genetische und molekularbiologische Methoden

2.2.6.1 RNA (Ribonukleinsäure)-Isolierung

Für die Bestimmung der Genexpression durch die RT-qPCRs (reverse Transkription mit nachfolgender Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion) musste zunächst die RNA (Ribonukleinsäure) aus den Zellen isoliert werden. Hierfür wurde das RNeasy Plus Mini Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Mit Ausnahme des β -Mercaptoethanols, sowie des Ethanol sind alle verwendeten Reagenzien Bestandteile des Kits. Während der gesamten Isolation wurde unter dem Abzug gearbeitet, da einige der verwendeten Substanzen gesundheitsschädlich sind.

Für die RNA-Isolierung kultivierte man die Zellen in 6-Well-Platten bis zur Subkonfluenz in DMEM. Anschließend wurden die Protokolle in Triplikaten gestartet, wie in Kapitel 2.2.2.3 bereits besprochen wurde. Nach vier bzw. sieben Tagen wurde die RNA isoliert. Dazu wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und anschließend in 350 μ l RLT-Lysepuffer lysiert (Teil des RNeasy Plus Mini Kits). Zuvor wurde der Lysepuffer mit 1% β -Mercaptoethanol supplementiert, um die Oxidation der RNA zu minimieren. Zur RNA-Isolation wurde das Zelllysat nacheinander in **drei Zentrifugationssäulen** überführt.

Die **erste Säule (QIAshredder)** diente der Homogenisierung der Probe. Während der Zentrifugation (10000rpm, 2 Minuten) wurden große Zellbestandteile, wie Zellmembrantrümmer von der Membran der Säule zurückgehalten.

Anschließend wurde der homogenisierten Durchfluss in die **zweite Zentrifugationssäule (gDNA Eliminator spin column)** überführt und erneut zentrifugiert (10000rpm, 30 Sekunden). Dadurch wurde die genomische DNA in der Membran der Zentrifugationssäule zurückgehalten. Der Durchfluss wurde mit 350 μ l 70% Ethanol (EtOH) gemischt. EtOH war notwendig für die Bindung der RNA an die Membran im nächsten Schritt.

Die **dritte Zentrifugationssäule (RNeasy spin column)** wurde für 15 Sekunden bei 13000rpm zentrifugiert. Das führte zur Bindung der RNA an die Membran.

Der Durchfluss wurde verworfen und die membrangebundene RNA einmal mit RW1-Waschpuffer (700 μ l) und zweimal mit RPE-Puffer (500 μ l) gewaschen. Dazwischen wurde jeweils für 15 S bei 10000rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Nach dem letzten Waschschrift wurde für 120 S bei 10000rpm zentrifugiert. Die Waschschrift dienten der Entfernung ungewünschter Salze und Proteine. Abschließend wurde die RNA mit 30 μ l Nuklease-freiem Wasser aus der Membran eluiert (13000rpm, 60 Sekunden). Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei -80 °C eingefroren.

2.2.6.2 Bestimmung von Menge und Reinheit der RNA

Die Menge und Reinheit der RNA wurde mit dem Nanodrop ND 1000 Spektrometer bestimmt. Vor Messbeginn musste das Spektrometer geeicht werden. Dazu ermittelte man den Blindwert von destilliertem Wasser. Anschließend wurde je 1 µl der zu messenden Probe aufgetragen und zeitgleich die optische Dichte bei 230, 260 und 280 nm gemessen.

Das Programm bildet folgende Quotienten:

- **260/280**: Diesen Quotienten nennt man auch primären Reinheitsparameter. Der Richtwert für reine DNA liegt bei 1,8 und für reine RNA bei 2,0. Liegen diese Werte niedriger, spricht dies für eine Verunreinigung durch Proteine, Phenol oder andere Stoffe, die bei 280 nm absorbieren.
- **260/230**: Dieser Quotient repräsentiert den sekundären Reinheitsparameter. Der Sollwert liegt zwischen 1,8 bis 2,2. Niedrigere Werte können z.B. durch eine Verunreinigung mit Kohlenhydraten und / oder Phenol verursacht sein.

Zusätzlich berechnete das Programm über eine modifizierte Beer-Lambert Gleichung die RNA-Menge in ng/µl.

2.2.6.3 Reverse Transkription

Da bei einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) DNA-abhängige Polymerasen verwendet werden, musste die isolierte RNA zunächst in die c (komplementäre) DNA umgeschrieben werden. Dies wurde durch das Enzym Reverse Transkriptase, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, erreicht. Für die reverse Transkription wurde das iScript™ cDNA Synthesis Kit gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Alle verwendeten Puffer und Reagenzien stammen aus diesem Kit.

Reagenz:	Menge:
RNA	~ 500 ng
Reverse Transkriptase	1 µl
Primer-Mix	4 µl
Nuklease-freies Wasser	variabel
Gesamtvolumen	20 µl

Tabelle 4: Zusammensetzung der Proben für die reverse Transkription.

Der Primer-Mix enthält Oligo-dT-Primer und Random-Hexamer-Primer (Oligonukleotide von zufälliger Sequenz und 6 Nukleotiden Länge). Während die Oligo-dT-Primer an den Poly-A-Schwanz von mRNA binden, binden die Random-Hexamer-Primer an zufällige,

komplementäre Sequenzen der RNA (Priming). Bei einer Länge von nur 6 Nukleotiden sind die Primer so unspezifisch, dass sie an verschiedenen Stellen jedes RNA-Moleküls binden können. Die modifizierte Moloney Maus Leukämie Virus (MMLV) reverse Transkriptase setzt an den Primern an und schreibt die mRNA in cDNA um (reverse Transkription).

Priming	5 Min. bei 25 °C
Reverse Transkription	20 Min. bei 46 °C
Inaktivierung der reversen Transkription	1 Min. bei 95 °C
Optional	zum Verweilen bei 4 °C

Tabelle 5: Zeit- und Temperatureinstellung am Thermocycler für die reverse Transkription.

Anschließend wurde die erhaltene cDNA bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren.

2.2.6.4 RT-qPCR

Die durch reverse Transkription generierte cDNA (siehe 2.2.6.3) konnte nun mit Hilfe dieser Labormethode in Echtzeit exponentiell vervielfältigt und quantifiziert werden. Dazu wurde die PCR-Maschine StepOnePlus von Applied Biosystems verwendet.

Zur Durchführung der RT-qPCR wurde der SsoAdvancedTM SYBR[®] Green Supermix von BioRad nach Angaben des Herstellers verwendet.

Reagenz:	Menge:
SYBR Green Mix	10 µl
Nuklease-freies Wasser	4 µl
Primer	1 µl
cDNA (1:5 verdünnt)	5 µl (ca. 50 ng)
Gesamtvolumen	20 µl

Tabelle 6: Zusammensetzung der Proben für die RT-qPCR.

Alle aufgelisteten Zusätze wurden in spezielle RNase-freie Reaktionsgefäße pipettiert, wobei darauf zu achten war, dass sowohl die verwendeten Substanzen als auch der hergestellte Ansatz stets auf Eis zu lagern waren. Die verwendeten Primer sind unter 2.1.12 zusammengefasst. Die befüllten Kapillaren wurden abzentrifugiert und der PCR-Zyklus gestartet. Jeder PCR-Zyklus bestand aus **4 Schritten** mit charakteristischen Temperatureinstellungen.

Zur Aktivierung der Polymerase diente die erste Denaturierung (**Schritt 1**). Die Polymerase war zunächst an einen Antikörper gebunden und inaktiviert, wodurch ein vorzeitiger Start der Polymerase-Reaktion verhindert wurde.

Die folgende Denaturierung (**Schritt 2**) trennte die DNA-Doppelstränge. Dies führte zu DNA-Einzelsträngen. Darauf folgte die Hybridisierung (**Schritt 3**), bei der sich die Primer an ihre spezifischen, komplementären Sequenzen der cDNA anlagerten.

Dann konnte die DNA-Polymerase ausgehend von den Primern in 5'-3'-Richtung den komplementären Strang amplifizieren (**Schritt 4**).

Nach dem vierten Schritt sprang das Programm für die vorgegebene Zyklenzahl wieder zu Schritt 2. Nach Durchlaufen der vorgegebenen 45 Zyklen wurde der Reaktionsmix bis zur weiteren Verwendung auf 4°C abgekühlt (**Schritt 5**).

Schritt 1 (Denaturierung)	95 °C, 600s
Schritt 2 (Denaturierung)	95 °C, 10s
Schritt 3 (Annealing)	60 °C(*), 5 s
Schritt 4 (Elongation):	72 °C, 20s
Schleife an Schritt 2	(45x)
Schritt 5 (Kühlung):	4 °C

Tabelle 7: Ablauf des RT-qPCR Programms (*) Annealingtemperatur variabel, abhängig vom Primer (i.d.R. 60 °C).

Die Quantifizierung ermöglichte der fluoreszierende Farbstoff SYBR-Green. Er lagert sich in doppelsträngige DNA-Abschnitte neu amplifizierter DNA ein. Mit zunehmender DNA-Menge steigt somit auch die Fluoreszenzintensität. Diese kann am Ende eines Zyklus gemessen werden und ermöglicht eine Kontrolle der DNA-Amplifikation in Echtzeit (*real time*).

Die Datenerfassung erfolgte mit der zugehörigen Software (StepOne™ Software v2.0) nach Vorgaben des Herstellers. Die Messung der Fluoreszenzintensität fand am Ende von Schritt 4 statt. Mit der Fluoreszenzmessung wurde der Ct-Wert für jede Probe bestimmt. Dieser gibt an, bei welcher Zykluszahl die Fluoreszenz eine bestimmte Intensität erreicht (Schwellenwert).

Die relative Quantifizierung der Genexpression erfolgte nach der $\Delta\Delta$ Ct-Methode (128). Dabei wurde die Differenz des Ct-Werts der Testgruppe (osteogene Differenzierungsprotokolle) und der Kontrollgruppe (DMEM) auf den Ct-Wert eines

sogenannten Housekeeping-Gens (Kalibrator) bezogen. Als Housekeeping-Gen diente GAPDH, welches in der Glykolyse die Umwandlung von Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat katalysiert und von dem man annimmt, dass es unabhängig vom Differenzierungs- oder physiologischen Zustand der Zelle exprimiert wird. Die Testgruppe und die Kontrollgruppe wurden in Triplikaten gemessen.

Δ :	Ct (DMEM) – Ct (Protokoll)
$\Delta\Delta$:	$\Delta\text{Ct (Protokoll-DMEM)} - \Delta\text{Ct (Kalibrator)}$
Relative Genexpression:	$2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$

Tabelle 8: Relative Quantifizierung der Genexpression - $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode.

An das RT-qPCR Amplifikationsprogramm schloss sich ein Schmelzkurvenprogramm an, das zur Verifikation der PCR-Produkte dient. Zur Sicherstellung, dass die gemessene Fluoreszenz nur auf das gewünschte Produkt zurückzuführen war, wurde die Schmelzkurve mit der von BioRad für den spezifischen Primer vorgegebenen Schmelzkurven verglichen.

2.2.7 Alizarin-Rot-Färbung

Mit Hilfe der Alizarin-Rot-Färbung sollte die osteogene Differenzierung nachgewiesen werden. Zellen, die sich entweder in einem fortgeschrittenen Stadium der osteogenen Differenzierung befinden, oder auch terminal differenzierte Osteoblasten stellen extrazelluläre Matrixproteine her, in die sich schließlich Calciumphosphat einlagert. Dies wird für den Nachweis der osteogenen Differenzierung herangezogen, da mit Alizarin-Rot eben diese Einlagerungen sichtbar gemacht werden können.

Als Grundlage wurde eine 2%ige Alizarin Rot S Lösung mit dH_2O angesetzt. Mittels eines pH-Meters wurde der pH-Wert unter Zugabe von NaOH bzw. HCl auf 4,1 eingestellt und die Lösung anschließend steril filtriert.

Zur Durchführung wurden ADSCs in 6-Well Platten ausgesät und mit DMEM kultiviert. Nach Erreichen einer Subkonfluenz wurden die ausgewählten Protokolle sowie das Standardprotokoll mit ODM gestartet. Nach drei Wochen in Kultur wurden die Zellen mit einer Alizarin Rot S Lösung behandelt. Vor Zugabe der Färbelösung wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, mit eisgekühltem 70% igem Ethanol fixiert (10Min.) und anschließend dreimal mit dH_2O gewaschen. Die Zellfärbung mit 2% iger Alizarin Rot S Lösung erfolgte für 10-15 Min. bei Raumtemperatur. Im Anschluss daran wurden die Zellen

gründlich mit PBS gewaschen. Sobald kein Farbabgang mehr sichtbar war, konnten die gefärbten Kalziumareale unter dem Mikroskop ausgewertet werden.

2.2.8 Statistische Auswertung

Alle Säulendiagramme im folgenden Kapitel 3. Darstellung der eigenen Untersuchungen zeigen als Ergebnis den Mittelwert \pm Standardabweichung. Die statistischen Analysen wurden mit dem Programm IBM SPSS Statistics 24 ausgewertet.

Zur Untersuchung der statistischen Signifikanz bei zwei Protokollen wurde der One Way ANOVA Test und bei einem Vergleich mehrerer Protokolle zusätzlich der Post-Hoc Test durchgeführt. Ein Protokoll wurde immer in Triplikaten angelegt.

Es wurde untersucht, ob sich die relativen ALP-Werte/Genexpressionen zwischen den getesteten Protokollen innerhalb eines Versuches statistisch signifikant unterschieden. Das Signifikanzniveau wurde mit 0,05 (5%) festgelegt. Die Nullhypothese war, dass die festgestellten Unterschiede zwischen den relativen ALP-Werten/ Genexpressionen der Protokolle zufällig zustande gekommen sind. Die Alternativhypothese besagte, dass zwischen mindestens zwei Protokollen ein Unterschied bestand. Demnach konnte die Nullhypothese abgelehnt werden, wenn statistische Analysen ein Signifikanzniveau $\leq 0,05$ ergaben. Ein Wert kleiner 0,05 war statistisch signifikant (*: $p \leq 0,05$), ein Wert größer 0,05 war nicht statistisch signifikant ($p \geq 0,05$: nicht signifikant).

3. Darstellung der eigenen Untersuchungen

3.1 Stammzellmarker-Analyse mit der FACS-Durchflusszytometrie

Anfänglich wurden die kommerziell erworbenen ADSCs mittels FACS-Durchflusszytometrie charakterisiert und anschließend wurden Untersuchungen zur Ermittlung der osteogenen Differenzierung durchgeführt (siehe Kapitel 3.3, 3.4, 3.5).

Die FACS-Durchflusszytometrie diente der Untersuchung der Stammzellmarker CD44, CD 146, CD105 und Stro-1, die zu den allgemeinen Kriterien zur Definition mesenchymaler Stammzellen zählen (31–35).

Die Zelllinie exprimierte nach zweimaligem Passagieren und der Kultivierung in DMEM die untersuchten Oberflächenmarker in nachweisbarem Prozentsatz. Allerdings wurde STRO-1 nur mit 12,6% und CD146 nur mit 12,2% exprimiert (Abb.: 13).

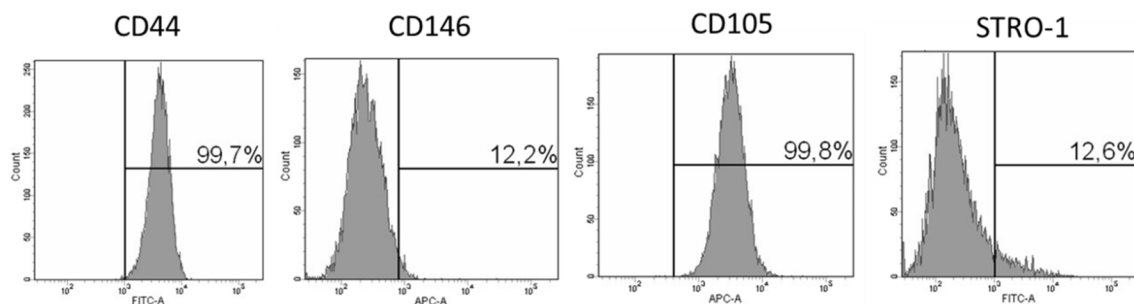


Abbildung 13: Ergebnisse der FACS-Analyse der ADSCs P4. Angabe des prozentualen Anteils der Zellen, die den jeweiligen Marker exprimieren.

3.2 ALP-Messungen

3.2.1 Osteogene Differenzierungsmedien

Die Messung der relativen ALP-Aktivität wurde in dieser Arbeit als repräsentativer Marker der osteogenen Differenzierung eingesetzt. Sie ist ein Maß für die Präsenz von Osteoblasten und für die Knochenneubildung (129).

Zuerst wurden die Stammzellen unterschiedlicher Quellen (MSCs, DFSCs, ADSCs) hinsichtlich ihres osteogenen Differenzierungspotentials untersucht. Die drei unterschiedlichen Zelllinien zeigten nach der Kultivierung in osteogenem Differenzierungsmedium (ODM) eine signifikante Steigerung der ALP-Aktivität im Vergleich zu DMEM (Abb.:14). Nimmt man die relative ALP-Aktivität als quantitativen Marker für die osteogene Differenzierung, hatten die ADSCs das geringste Differenzierungspotential. Betrachtete man den Wert der relativen ALP-Aktivität von ODM bezogen auf DMEM, zeigten alle untersuchten Zelllinien ein vergleichbares Potential (Abb.:

14).

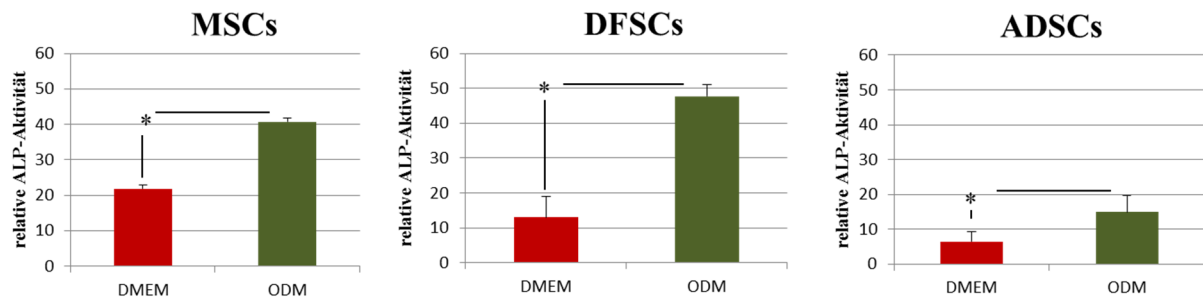


Abbildung 14: Vergleich der relativen ALP-Aktivitäten der unterschiedlichen Zelllinien (MSCs P5, DFSCs P5, ADSCs P3/4) an Tag 7. Dargestellt sind die Mittelwerte aller durchgeführten Messungen, bei den MSCs Passage 5 (P5) und DFSCs Passage 5 (P5), jeweils aus einem Versuch und bei den ADSCs Passage 3/4 (P3/4) aus 15 Versuchen (*: einfaktorische ANOVA $P < 0,05$).

Initial wurden Messungen an Tag vier, sieben und zehn nach Differenzierungsstart durchgeführt, um den Tag mit der maximalen ALP-Aktivität zu ermitteln. Die höchsten Messwerte für die relative ALP-Aktivität wurden an Messtag sieben und zehn erreicht (Abb.: 15). Messtag sieben wurde daher für alle weiteren Versuche ausgewählt, da sich hier die höchsten absoluten Werte zeigten.

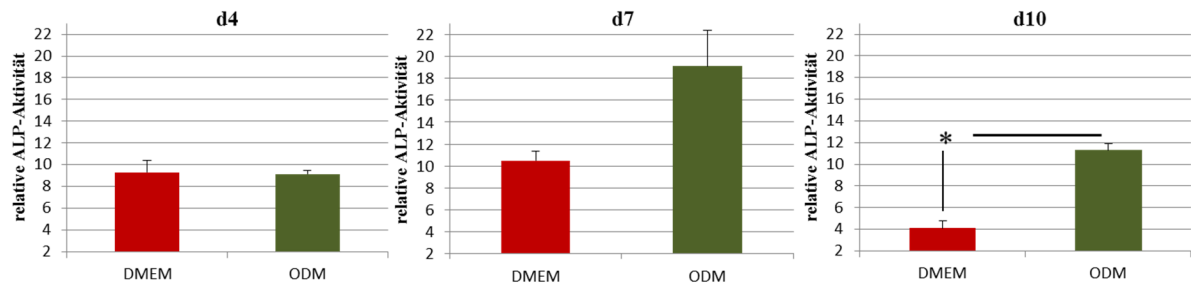


Abbildung 15: Messung der relativen ALP-Aktivität der ADSCs P3 nach 4, 7 und 10-tägiger Kultivierung in DMEM bzw. ODM. Die Mittelwerte der ALP-Aktivitäten sind aus jeweils einem Versuch (*: einfaktorische ANOVA $P < 0,05$).

Die Messwerte der ALP-Aktivität nach Kultivierung in dem ODM waren in jedem Versuch an Tag sieben höher als die Messwerte von DMEM (Abb.: 14, 15, 16). Somit konnte davon ausgegangen werden, dass in jedem Versuch eine Induktion der osteogenen Differenzierung stattgefunden hatte. Verglich man Passage 3 und Passage 4 miteinander, so waren die Messwerte der ALP-Aktivität in Passage 3 in jedem Versuch höher. Der relative ALP-Wert von ODM zu DMEM war jedoch in Passage 3 ($ODM/DMEM \approx 2$) etwas niedriger als in Passage 4 ($ODM/DMEM \approx 3$) (Abb.: 16).

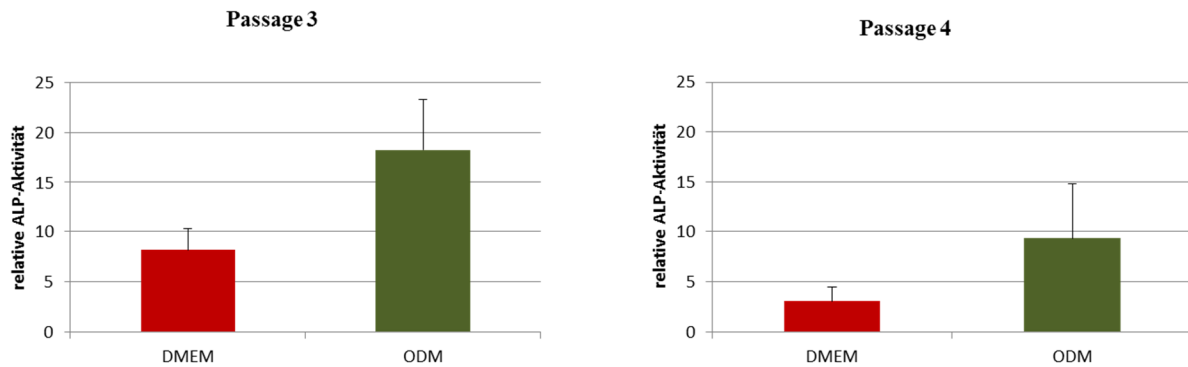


Abbildung 16: Vergleich der Passagen 3 und 4. Messung der relativen ALP-Aktivität an Tag 7.

In allen folgenden Versuchen wurden Protokolle mit DMEM (Kontrolle) und mit dem ODM (Standardprotokoll) als Referenz verwendet. Für die getesteten Differenzierungsprotokolle wurde das osteogene Grundmedium (OG) mit verschiedenen Faktoren der zu modulierenden Signalwege (BMP2 und Wnt3a- Signalweg) und Dexamethason versehen (siehe Kapitel: 2.2.2.3). Vergleiche und statistische Auswertungen wurden nur innerhalb eines Versuchs, der auf eine Zelllinie zurückzuführen ist, durchgeführt.

3.2.2 Manipulation des BMP- bzw. Wnt- Signalweges

3.2.2.1 BMP- Signalweg

Ziel war es, die osteogenen Differenzierungsmechanismen der ADSCs zu untersuchen und darüber hinaus das Differenzierungspotential zu steigern. Da der BMP-Signalweg eine wesentliche Rolle für die Osteogenese spielt wurde der Einfluss der Faktoren BMP2 und Noggin auf die relative ALP-Aktivität der ADSCs untersucht.

Es wurden steigende Konzentrationen an BMP2 eingesetzt mit der Annahme, dass eine höhere Konzentration mit einer steigenden ALP-Aktivität verbunden sei. In Passage 3 (A) konnten ab BMP 25 ng/ml signifikant höhere ALP-Werte gegenüber BMP 10 ng/ml erreicht werden (Abb.: 17). Eine höhere Konzentration als 25 ng/ml führte zu keiner signifikanten Änderung der ALP-Messwerte (Abb.: 17).

Aufgrund der Vermutung, dass ein aktivierter BMP-Signalweg wichtig für die Initiation der Osteogenese und im Verlauf eher für eine Inaktivierung des Signalweges förderlich sei, wurden Wechselprotokolle von BMP2 zu Noggin durchgeführt. In Passage 3 (A) zeigte ein Wechsel zu Noggin bei 10 ng/ml BMP2 eine höhere ALP-Aktivität gegenüber 10 ng/ml BMP2 alleine (Abb.: 17, A). Dies konnte in Passage 4 nicht reproduziert werden (Abb.: 17, B).

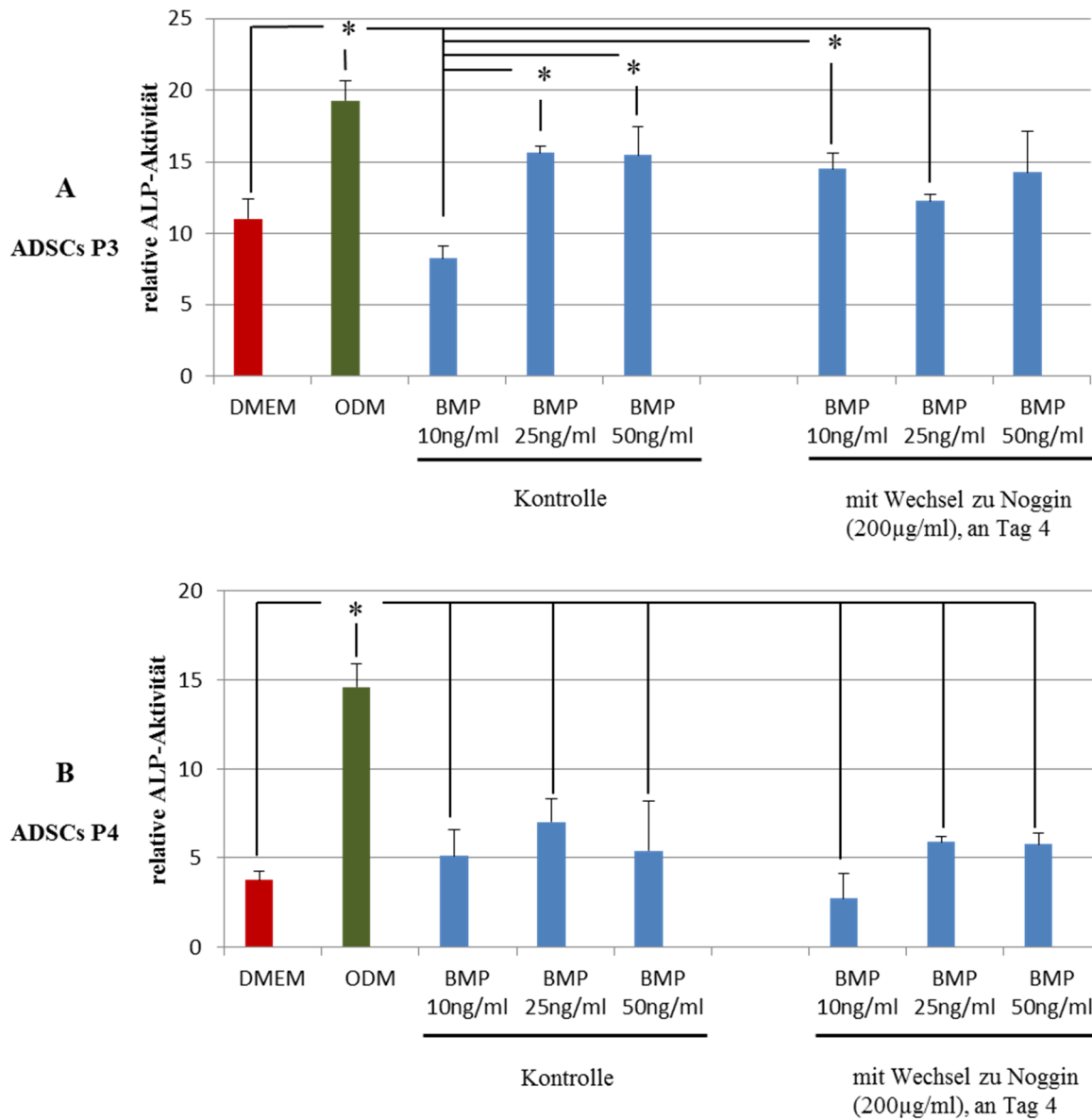


Abbildung 17: Der Einfluss von BMP2 und Noggin auf die osteogene Differenzierung der ADSCs. Dargestellt sind zwei unabhängige Versuche mit Messung an Tag 7 (*: Post-Hoc-Test $P < 0,05$).

3.2.2.2 Wnt- Signalweg

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, spielt der Wnt-Signalweg eine entscheidende Rolle für die osteogene Differenzierung und interagiert mit dem BMP-Signalweg. Daher wurde im nächsten Schritt der Einfluss der Faktoren Wnt3a und DKK1 untersucht. Es konnte weder mit der Unterstützung von Wnt3a noch von DKK1 eine gesteigerte ALP-Aktivität gegenüber dem Standardprotokoll erreicht werden. In Passage 3 zeigten sich trotz geringerer Konzentration der Faktoren höhere ALP-Werte (Abb.:18, A). Passage 4 hatte niedrige ALP-Werte, wobei Wnt3a 100 ng/ml die niedrigsten ALP-Messwerte besitzt und mit der Kontrolle vergleichbar ist (Abb.18, B).

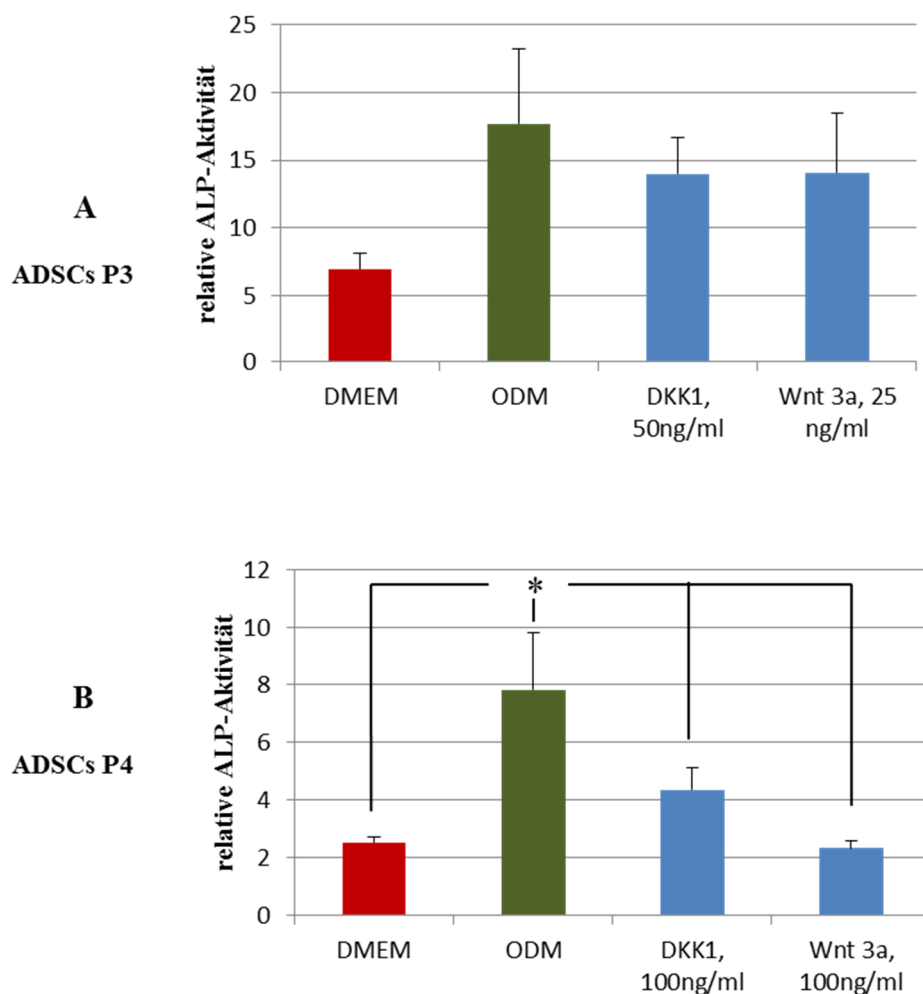


Abbildung 18: DKK1 und Wnt3a in unterschiedlichen Konzentrationen. Zwei unabhängige Versuche nach 7-tägiger Differenzierung (*: Post-Hoc-Test $P < 0,05$).

Da in der Literatur unterschiedliche Ansichten über den Einfluss des Wnt-Signalweges vorliegen, wurden inhibierende (DKK1) und aktivierende (Wnt3a) Faktoren (Abb.: 18), sowie ein Wechsel dieser (Abb.:19) untersucht. Im Folgenden wurden die Faktoren DKK1 und

Wnt3a nicht wie im vorherigen Versuch verglichen, sondern es fand ein Wechsel innerhalb eines Protokolls es statt. Der Wechsel wurde an Tag vier oder an Tag fünf vollzogen. Es wurde von DKK1 zu Wnt3a und im Vergleich von Wnt3a zu DKK1 gewechselt. Der Wechsel der Faktoren führte in keinem der Versuche zu einer signifikanten Änderung. Die ALP-Aktivitäten in Passage 4 waren mit DMEM vergleichbar, was auf keine differenzierende Wirkung schließen lässt (Abb.: 18, B). Die Protokolle mit dem Wechsel von DKK1 zu Wnt3a in Passage 3 haben, unabhängig vom Tag des Wechsels, die höchsten relativen ALP-Messwerte im Vergleich der getesteten Protokolle innerhalb dieses Versuches gezeigt (Abb.:19, A).

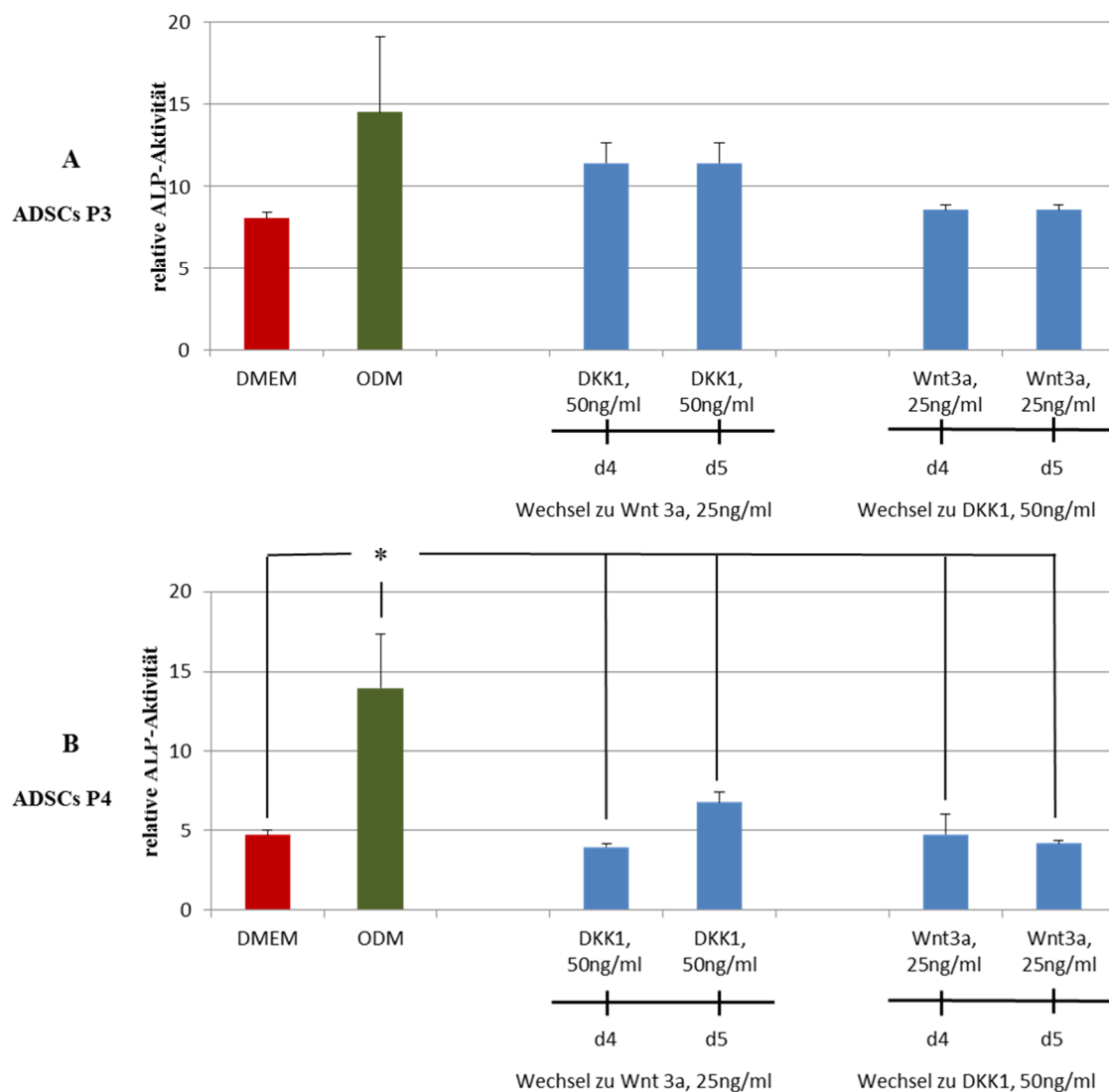


Abbildung 19: Wechsel zwischen DKK1 und Wnt3a während der osteogenen Differenzierung. Unabhängige ALP-Aktivitätsmessungen nach 7-tägiger Differenzierung (*: Post-Hoc-Test P < 0,05).

3.2.2.3 Aktivierung und Inhibierung des BMP- und Wnt-Signalweges

Die einzelnen Faktoren (BMP2, Noggin, DKK1, Wnt3a) und deren zeitlicher Wechsel (BMP2 -> Noggin, DKK1 -> Wnt3a und Wnt3a -> DKK1) konnten die osteogene Differenzierung im Vergleich zu dem Standardprotokoll bisher nicht verbessern. Daher wurden im nächsten Schritt BMP2 und Wnt3a bzw. BMP2 und DKK1 zeitgleich zur Differenzierung eingesetzt.

In Passage 3 hatte die Kombination aus DKK1 und BMP2 vergleichbare ALP-Messwerte mit dem ODM, die Kombination aus Wnt3a und BMP2 zeigte niedrigere Messwerte (Abb.:20, A). In Passage 4 waren die ALP-Werte der untersuchten Protokolle niedriger als die Werte von DMEM. Daher ist von keiner Differenzierung auszugehen (Abb.:20, B).

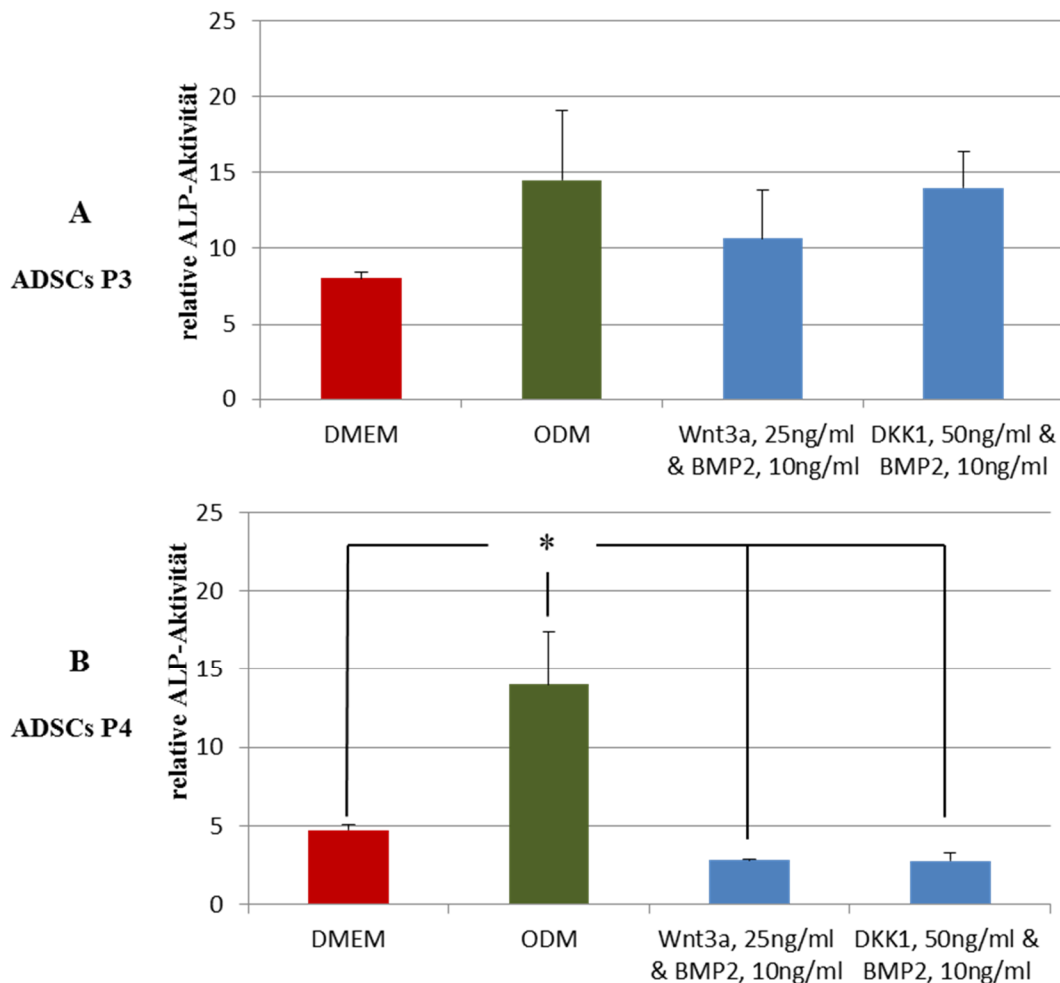


Abbildung 20: BMP2 und DKK1 bzw. Wnt3a in Kombination. Unabhängige ALP-Aktivitätsmessungen der ADSCs an Tag 7 nach Differenzierungsbeginn (*: Post-Hoc-Test $P < 0,05$).

3.2.3 Der Einfluss von Dexamethason

3.2.3.1 BMP- Signalweg

Da das Standardprotokoll bis zu diesem Zeitpunkt die höchsten ALP-Messwerte erreichte, wurde in den folgenden Versuchen Dexamethason (Dexa), ein wesentlicher Bestandteil des ODMs, mit bisher eingesetzten Faktoren (BMP2, DKK1, Wnt3a) kombiniert.

Zuerst wurden verschiedene Kombinationen aus BMP2 und Dexa untersucht, wobei die höchsten relativen ALP-Werte durch die Kombination aus BMP2 10ng/ml und Dexa 10^{-8} M (mol/l) erreicht werden konnten (Abb.: 21). Insgesamt zeigte kein Protokoll eine höhere ALP-Aktivität als das ODM.

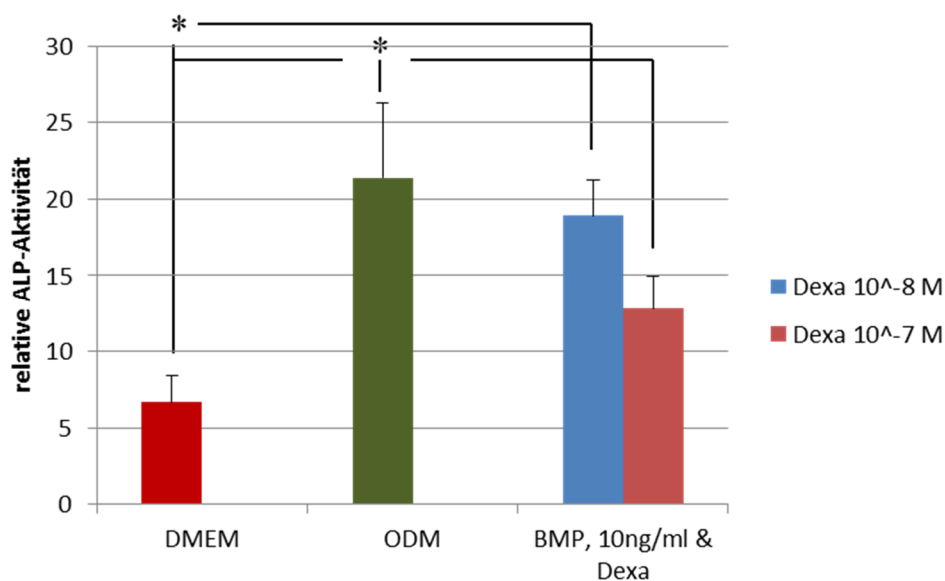


Abbildung 21: BMP2 und Dexamethason zur Unterstützung der osteogenen Differenzierung. ALP-Aktivitätsmessung der ADSCs P3 an Tag 7 nach Differenzierungsbeginn (*: Post-Hoc-Test $P < 0,05$).

3.2.3.2 Wnt-Signalweg

Des Weiteren wurden die Kombination aus Wnt3a und Dexa bzw. DKK1 und Dexa getestet. Die Kombination aus Wnt3a und Dexa erzielte mit der Konzentration von Wnt3a 10 ng/ml höhere ALP-Messwerte als mit einer Konzentration von 25 ng/ml (Abb.: 22). Die Messwerte der ALP-Aktivität von Wnt3a 25 ng/ml und Dexa war signifikant erniedrigt gegenüber ODM (Abb.: 22, A). Wnt ohne Dexa mit der Konzentration 25 n/ml hatte in den vorherigen Versuchen vergleichbare ALP-Werte zu ODM (Abb.: 18).

Das getestete Wechselprotokoll Wnt3a 25 ng/ml \rightarrow DKK1 50 ng/ml (Abb.: 19) und die Kombination von Wnt3a 25 ng/ml und BMP2 10 ng/ml (Abb.: 20) hatten keinen unterstützenden Effekt auf die ALP-Aktivität und somit auf die osteogene Differenzierung.

Die Kombination aus DKK1 und Dexa zeigte in jeder getesteten Konzentration (20ng/ml bzw. 50ng/ml) hohe ALP-Messwerte (Abb.: 22). DKK1 ohne Dexa mit der Konzentration 50 ng/ml (Abb.: 18), sowie die Kombination aus DKK1 50ng/ml mit BMP2 10ng/ml (Abb.: 20) hatten in vorherigen Versuchen hohe ALP-Aktivitäten. Im Vergleich dazu zeigte DKK1 100ng/ml ohne Dexa (Abb.: 18), sowie die Kombination aus DKK1 und BMP2 10ng/ml (Abb.: 20) niedrigere ALP-Werte. Auch das Wechselprotokoll DKK1 50ng/ml -> Wnt3a 25 ng/ml hatte niedrige ALP-Werte im Vergleich (Abb.: 19).

Zusammenfassend sind die ALP-Messwerte der Protokolle mit DKK1 (50ng/ml, 20ng/ml) und Dexa sowie Wnt3a 10ng/ml und Dexa vergleichbar mit dem Standardprotokoll, jedoch wurde es von keinem Protokoll übertroffen.

Bei der Zugabe von Dexa war kein großer Unterschied zwischen den zwei getesteten Konzentrationen, wobei Dexa 10^{-8} M eine geringfügig höhere ALP-Aktivität erreichte (Abb.: 22).

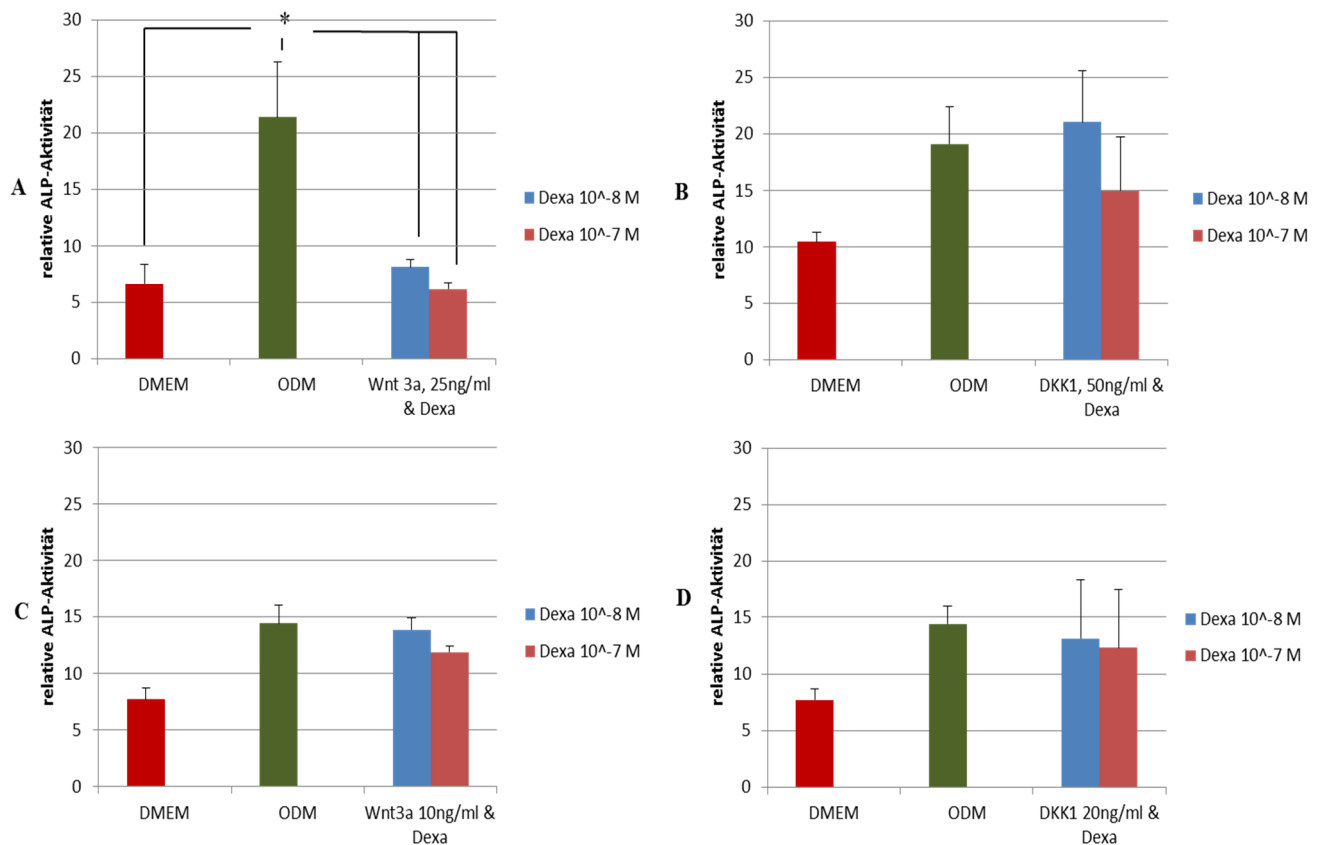


Abbildung 22: Wnt3a bzw. DKK1 und Dexamethason zur Unterstützung der osteogenen Differenzierung. Die ALP-Aktivitätsmessungen der ADSC P3 am 7. Tag nach der Differenzierung in OG (*: Post-Hoc-Test $P < 0,05$).

3.2.4 Kombination aus Dexa, DKK1 und BMP2

Da in den bisherigen Versuchen kein Protokoll gefunden wurde, das die ALP-Messwerte des Standardprotokolls übertreffen konnte, wurde versucht die Faktoren Dexa, BMP2 und DKK1 in unterschiedlichen Konzentrationen zu kombinieren, um möglicherweise einen additiven Effekt zu erreichen. Das Protokoll 1 (Prot. 1) bestehend aus Dexa 10^{-7} M, BMP2, 10ng/ml und DKK1, 50ng/ml erreichte die bisher höchste ALP-Aktivität. Dieses Protokoll zeigte eine signifikante Steigerung der ALP-Aktivität im Vergleich zu DMEM in den unabhängigen Messungen an d7 und d10, an d7 sowohl in P 3 als auch P 4. Prot. 1 war das erste Protokoll, das ein besseres Ergebnis als ODM lieferte. An Tag 7 zeigte es die höchste ALP-Aktivität, sowohl in Passage 3 als auch Passage 4 (Abb.: 23).

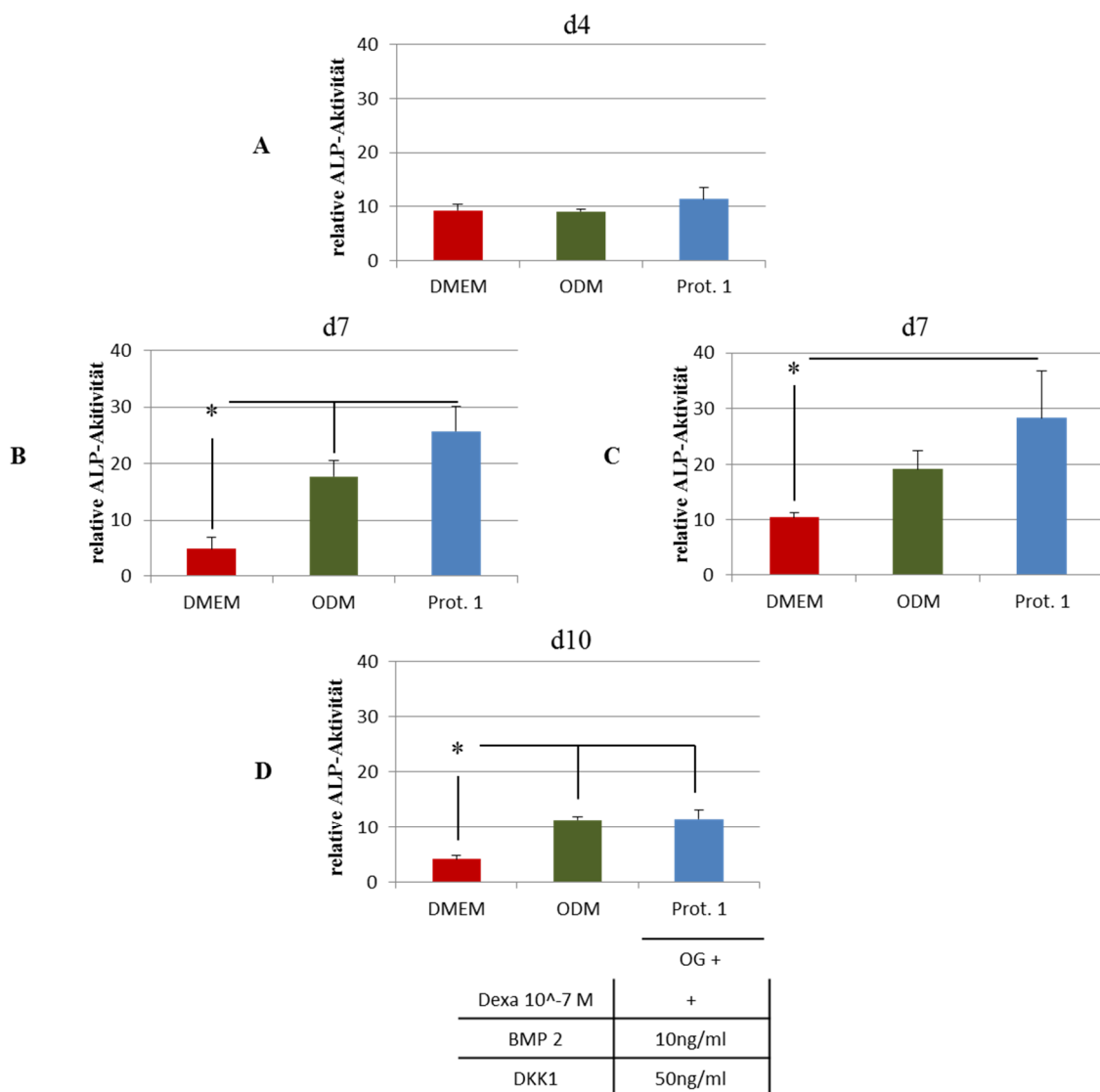
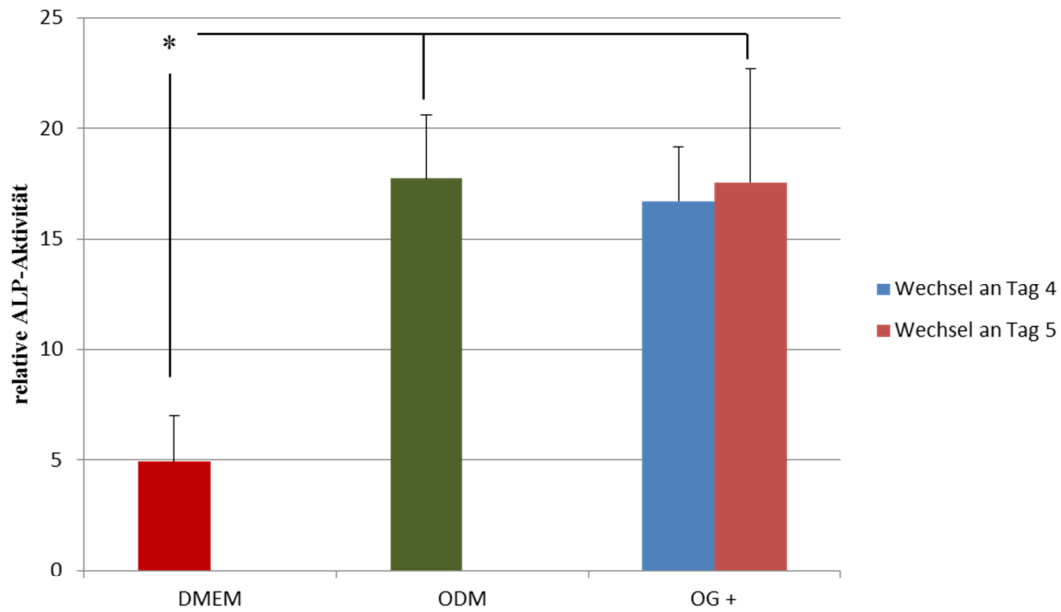


Abbildung 23: Das Protokoll 1, eine Kombination aus BMP2, DKK1 und Dexa. ALP-Aktivitätsmessungen der ADSCs P3 (B) und P4 (A, C, D) an Tag 4 (d4) (A), Tag 7 (d7) (B, C) und Tag 10 (d10) (D) (*: Post-Hoc-Test $P < 0,05$).

3.2.4.1 DKK1 und Wnt3a-Wechsel innerhalb von Protokoll 1

Darüber hinaus wurde untersucht, ob das Prot. 1 durch einen Wechsel von DKK1 zu Wnt3a verbessert werden kann. An Tag 4 und an Tag 5 wurde von DKK1 zu Wnt3 gewechselt. Der Wechsel von DKK1 zu Wnt3a an Tag 5 zeigte eine signifikant gesteigerte ALP-Aktivität im Vergleich zu DMEM (Abb.: 23). Jedoch war kein ALP-Messwert der Protokolle höher als der des ODMs (Abb.: 24).



	vor Wechsel	nach Wechsel
Dexa 10 ⁻⁷	+	+
BMP2	10ng/ml	10ng/ml
DKK1	50ng/ml	-
Wnt 3a	-	25ng/ml

Abbildung 24: DKK1 und Wnt3a-Wechsel in Protokoll 1. Relative ALP-Aktivitätsmessung der ADSCs P3 an Tag 7 (*: Post-Hoc-Test P < 0, 05).

3.2.4.2 Vergleich von Prot. 1 mit DFSCs-konditioniertem Medium (Prot. 2) und zusätzlicher DKK1 Supplementation (Prot.2+)

Die osteogene Differenzierung der ADSCs konnte in anderen Studien mit einem DFSCs-konditioniertem Medium unterstützt werden (97,110). Das Protokoll 2 zeigt die ALP-Messwerte der ADSCs in Passage 4 in einem selbst hergestellten DFSCs-konditioniertem Medium (Abb.: 25). In einem weiteren Schritt wurde getestet, ob auch die zusätzliche DKK1-Supplementation zu dem DFSCs-konditioniertem Medium (Prot.: 2+) einen weiteren Vorteil bieten könnte (97). In diesem Versuch erreichten alle getesteten Protokolle eine signifikante Steigerung der ALP-Aktivität gegenüber DMEM (Abb.: 25). Die zusätzliche Supplementation von DKK1 (100ng/ml) zu dem DFSCs-konditioniertem Medium führte zu keiner weiteren Steigerung der ALP-Aktivität (Abb.: 25). Das bisher am besten differenzierende Prot. 1 und das Prot. 2 hatten vergleichbare Ergebnisse (Abb.: 25).

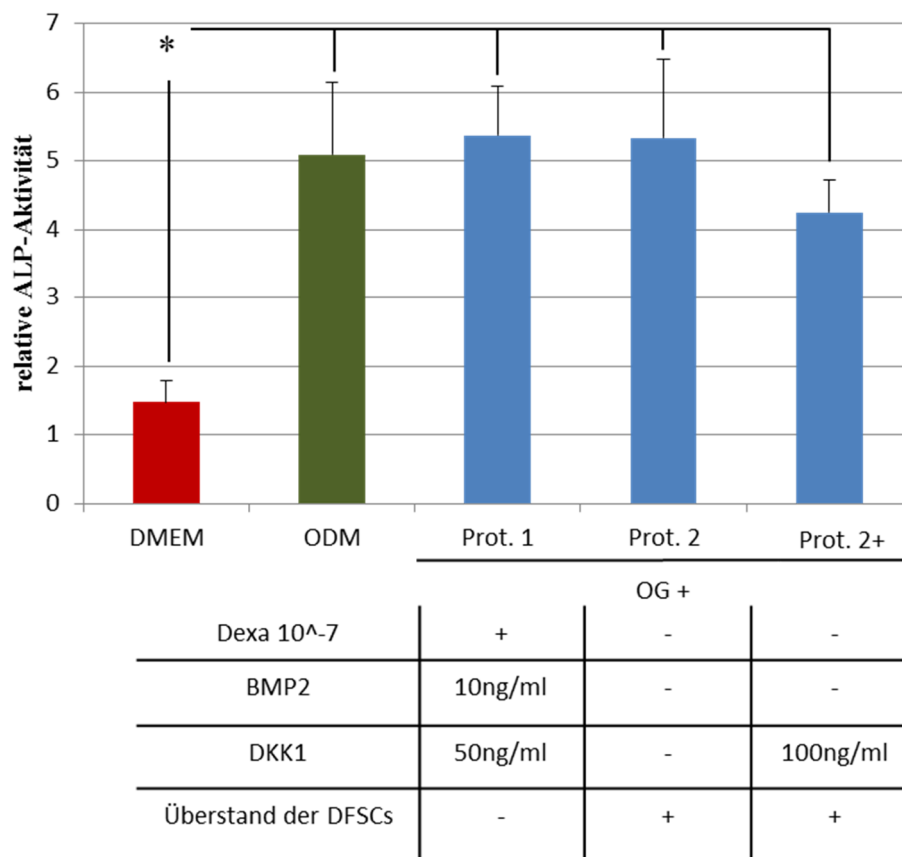


Abbildung 25: Vergleich von Protokoll 1 mit der Differenzierung in DFSCs-konditioniertem Medium und DFSCs-konditioniertem Medium mit DKK1 versetzt. Relative ALP-Aktivitätsmessung der ADSCs P4 an Tag 7 (*: Post-Hoc-Test $P < 0,05$).

3.3 Quantitative real time Polymerase-Kettenreaktionen (RT-qPCRs)

Zur Bestätigung und Ergänzung der relativen ALP-Messungen wurden RT-qPCRs durchgeführt und ausgewertet. Nach vier- bzw. siebentägiger osteogener Differenzierung wurden die Expressionslevel von ALP, RUNX2 und CEMP1 bestimmt.

ALP ist ein genereller Marker der osteogenen Differenzierung (119,130–132). RUNX2 wird durch den Wnt- und BMP-Signalweg beeinflusst (133,134) und CEMP1 ist ein Zementoblastenmarker (135).

Das Protokoll 1 zeigte eine signifikante RUNX2-Expression an Tag 4, mit einem leichten Rückgang an Tag 7 (Abb.: 26, A, D), wohingegen ALP an Tag 7, aber nicht an Tag 4 exprimiert wurde (Abb.: 26, B, E). Die CEMP1-Expression hatte einem Abfall von Tag 4 zu Tag 7 (Abb.: 26, C, F).

Das Protokoll 4 (BMP2 50 ng/ml) führte an Tag 4 zu einem signifikanten Anstieg der ALP- und RUNX2- Expression und zu einem Rückgang dieser Marker an Tag 7 (Abb.: 26, A, B, D, E). CEMP1 wurde im Vergleich zu den anderen Protokollen sowohl an Tag 4 als auch an Tag 7 am höchsten exprimiert (Abb.: 26, C, F).

Alle Marker konnten in Protokoll 3 an Tag 4 gemessen werden, jedoch nicht erhöht im Vergleich zum Standardprotokoll. An Tag 7 zeigte sich ein Abfall, so dass die Expression aller Marker mit DMEM vergleichbar war (Abb.: 26, D, E, F).

ODM hatte die niedrigste ALP, RUNX2 und CEMP1-Expression an Tag 4 im Vergleich zu den anderen Protokollen (Abb.: 26, A, B, C). An Tag 7 wurde die Expression von ALP, RUNX2 und CEMP1 nach oben reguliert (Abb.: 26, D, E, F).

Insgesamt konnten die höchsten Messwerte mit Protokoll 1 und Protokoll 4 an Tag 4 für die Expression von ALP, RUNX2 und CEMP1 erzielt werden (Abb.: 26, A, B, C). An Tag 7 zeigte ODM die höchste Expression von ALP und RUNX2 und das Protokoll 4 von CEMP1 (Abb.: 26, D, E, F).

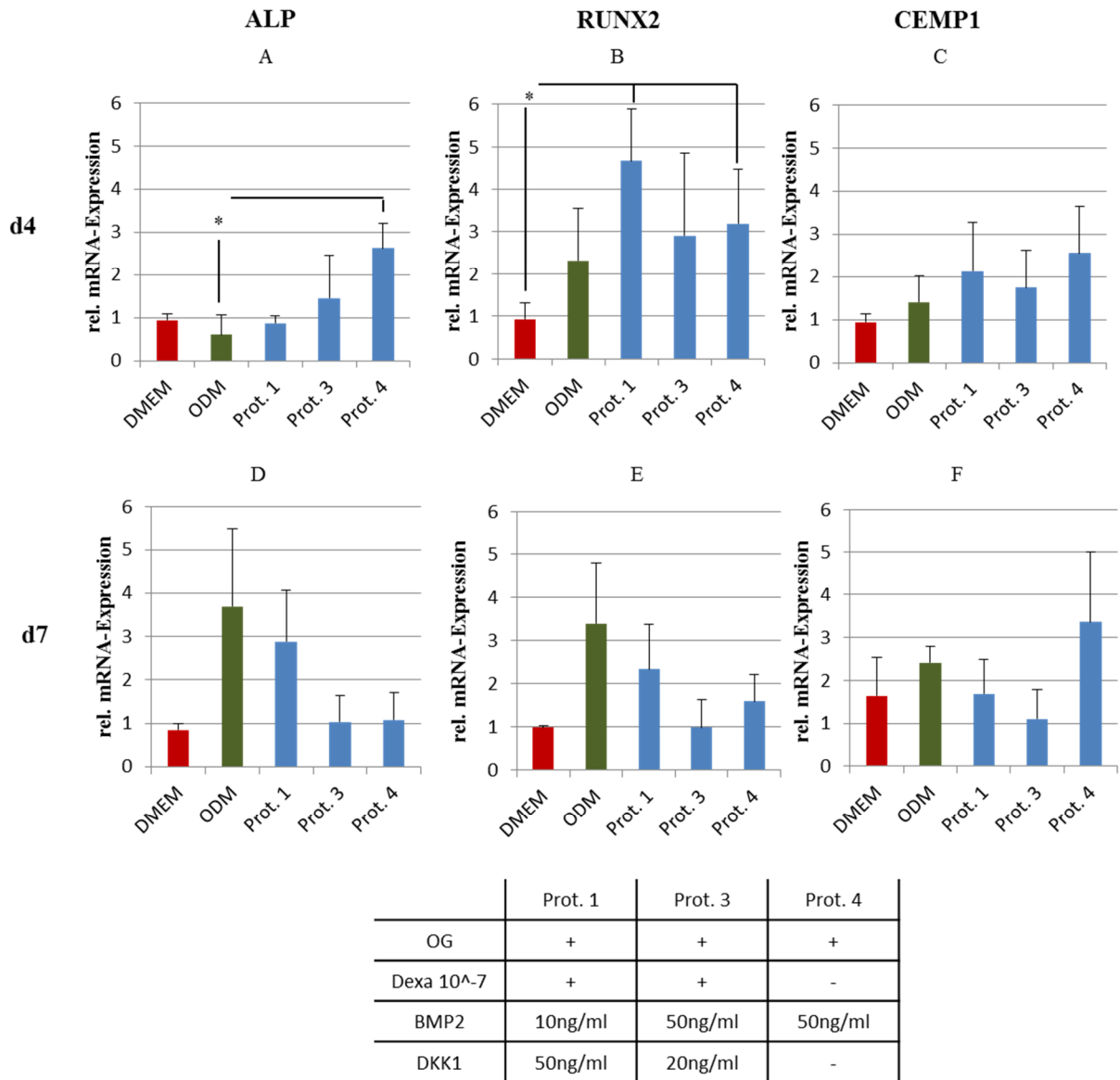


Abbildung 26: Relative mRNA-Expression osteogener bzw. zementoblastärer Marker der ADSCs P4 nach 4- bzw. 7-tägiger Differenzierung (n=3, +/- SEM). Detektiert wurde mittels RT-qPCR, als Kalibrator diente ein DMEM-Wert. GAPDH diente als Referenzen (*: Post-Hoc-Test P < 0,05).

3.4 Western Blot Analysen

Die Proteinmenge von RUNX2 des Protokolls 1 wurde nun untersucht. RUNX2 hat eine Schlüsselfunktion in der Zahnentwicklung und ist essentiell für die Induktion der osteogenen Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen (136). An Tag 7 wurde RUNX2 im Gesamtzelllysate mit Hilfe von Western Blot Analysen detektiert. RUNX2 konnte in allen Proben nachgewiesen werden. Die Differenzierung im Standardprotokoll und Prot. 1 zeigte eine niedrigere Proteinmenge an RUNX2 als die Kontrolle (Abb.: 27).

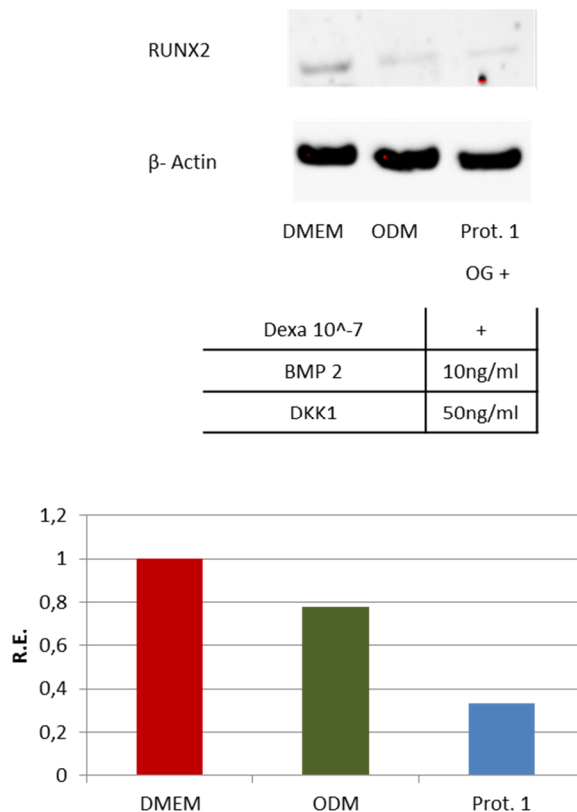


Abbildung 27: Western Blot-Analysen nach RUNX2 mit dem Gesamtzelllysate von ADSCs P4 nach 7-tägiger Differenzierung. β -Actin diente als Ladekontrolle.

3.5 Nachweis der Mineralisierungsfähigkeit

Durch die Alizarin-Rot-Färbung sollte ermittelt werden, ob eines der ausgewählten Protokolle die Mineralisierung der extrazellulären Matrix induzieren konnte. Mit dem Nachweis der Mineralisierungsfähigkeit ließ sich darüber hinaus der Differenzierungsgrad beurteilen, da die Zellen erst in einem späteren Differenzierungsstadium dazu im Stande sind. Im Rahmen dieser Arbeit konnte weder das Standardprotokoll noch eines der getesteten Protokolle dieses Stadium erreichen, da keine Mineralisierung an Tag 28 gezeigt werden konnte (Ergebnisse nicht aufgeführt).

4. Diskussion von Methodik und Ergebnissen

In dieser Arbeit wurde untersucht, wie sich die Supplementierung verschiedener Faktoren des BMP- und Wnt-Signalweges auf die osteogene bzw. zementogene Differenzierung von Stammzellen des Fettgewebes (ADSCs) auswirkte. Der Einfluss auf die Differenzierung wurde anhand der ALP-Aktivität gemessen und zur Kontrolle einzelner Protokolle wurden RT-qPCRs und WB-Analysen angefertigt.

4.1 Einordnung der adipogenen Stammzellen

Die aus dem Fettgewebe gewonnenen Stammzellen sind eine heterogene, multifforme Zellpopulation (44, 45, 137) unterschiedlicher Differenzierungsstufen und -potentiale (138, 139). Zur Vereinheitlichung der Definition mesenchymaler Stammzellen, zu denen die ADSCs gezählt werden, wurden Minimal Kriterien festgelegt (31). Ein Kriterium dabei ist die Charakterisierung mittels Oberflächenmarkern. Im Rahmen dieser Arbeit wurde repräsentativ die Expression der Oberflächenmarker CD146, CD44, Stro-1 und CD105 bestimmt. Die untersuchte Zelllinie exprimiert alle Oberflächenmarker in nachweisbarem Prozentsatz (Abb.: 13), was generell mit einem typischen Expressionsmuster für ADSCs zu vereinbaren ist (140, 141). Verglichen mit anderen Studien, die einen ähnlichen Ansatz verfolgten, zeigten sich Unterschiede in der Stro-1 und CD146 Expression (97, 142). So wurde in Morszeck et al., 2017 von den eingesetzten ADSCs Stro-1 mit 0,0% und CD146 mit 2,8% exprimiert (142). Darüber hinaus zeigte eine weitere Studie an von Ratten isolierten ADSCs eine Stro-1-Expression von 24,7% und eine CD146-Expression von 31,2%, (97). Dagegen waren die jeweiligen Messungen der CD44- und CD105-Expression vergleichbar (97, 142).

Das CD-Expressionsmuster der ADSCs unterliegt einem Wechsel abhängig von der Passagenzahl. Nach Passage 4 nehmen hämatopoetisch-assoziierte Marker ab und die MSC-assoziierten Marker wie CD44 signifikant zu (143, 144).

Die Oberflächenmarker mesenchymaler Stammzellen weisen abhängig vom Ursprungsgewebe eine Variabilität auf. BMSCs exprimieren CD146 doppelt so häufig wie ADSCs (145); CD34 und CD36 dagegen werden von ADSCs, aber nicht von BMSCs exprimiert (146).

Außerdem fanden Levi et al., 2011 Assoziationen zwischen Oberflächenmarkern und dem osteogenen Differenzierungspotential von ADSCs (147). CD105, das in der durchgeführten FACS-Durchflusszytometrie von 99,8% der Zellen exprimiert wurde (Abb.:13), scheint über den TGF- β 1- Signalweg inhibitorisch auf die osteogene Differenzierung zu wirken (147). Im Vergleich zu BMSCs und DFSCs hatten auch in dieser Arbeit ADSCs ein geringeres

osteogenes Differenzierungspotential (Abb.: 14). ADSCs besitzen die Tendenz eher adipogen als osteogen zu differenzieren (116). Auch in anderen Studien zeigten ADSCs im Vergleich zu BMSCs nach osteogener Differenzierung eine niedrigere ALP-Aktivität, weniger Matrixmineralisierung und eine geringere Expression von BGLAP und OPN (148–150). Allerdings sind auch gegenteilige Ergebnisse mit einer signifikant höheren ALP-Aktivität (44) oder keinem signifikanten Unterschied der ALP-Aktivitäten und der Mineralisierung (91) im Vergleich zu BMSCs bekannt. Ursächlich könnte eine Heterogenität der Stammzellen der unterschiedlichen Populationen sein (151). Darüber hinaus ist in Betracht zu ziehen, dass das Proliferations- und Differenzierungspotential auch von dem Ursprungsgewebe und der Methode der Gewinnung der Stammzellen, sowie von Lebensbedingungen und Alter des Spenders abhängig ist (152, 153).

Zudem nimmt das osteogene Differenzierungspotential mit zunehmender Passagenzahl ab und eine Zellseneszenz wird induziert (154–157). In dieser Arbeit zeigte sich ein deutlicher Abfall der ALP-Aktivität von Passage 3 zu Passage 4 (Abb.: 15).

4.2 Methoden zur Evaluation der osteogenen Differenzierung

Zur Auswertung der osteogenen Differenzierung wurde die Aktivität der alkalischen Phosphatase bestimmt. Dabei handelt es sich um eine unspezifische Hydrolase, die in jedem Gewebe zu finden ist und Monophosphatesterverbindungen unter alkalischem pH-Wert hydrolysiert (119). ALP ist notwendig, um den biologischen Prozess der Mineralisierung zu initiieren (131, 132). Außerdem ist es ein Maß für die Präsenz von Osteoblasten und die Knochenneubildung (129). Wie in Kapitel 1.3.3 bereits erläutert, gilt die ALP-Aktivität als früher Marker der osteogenen Differenzierung (50). Bereits ab Tag 7 zeigte sich ein deutlicher Unterschied der ALP-Werte zwischen Standard- und Kontrollmedium (Abb.: 14). Dies liegt in guter Übereinstimmung mit Wen X et al., 2011 (110), die den ALP-Verlauf über elf Tage dokumentierten und an Tag sieben ein Maximum feststellten.

Als später Marker wurde die Mineralisierung an Tag 28 mit Hilfe der Alizarin-Rot-Färbung untersucht (Ergebnisse nicht aufgeführt, siehe Kapitel 3.5). Von ausgewählten Protokollen wurde zusätzlich die Gen- und Proteinexpression bestimmt, um Hinweise für die Bedeutung der Signalwege auf die Differenzierungsmechanismen zu gewinnen. Es ist zu beachten, dass alle verwendeten Methoden mit einer Zerstörung der Zellen verbunden sind. Dies könnte beispielsweise durch die alleinige Messung der BGP-Sekretion im Medium vermieden werden (158). Jedoch ermöglicht nur die Kombination aller eingesetzten Methoden (ALP-

Messung, RT-qPCRs, WB-Analysen, Alizarin-Rotfärbung) eine komplexe Analyse der osteogenen Differenzierung (159).

4.3 Manipulation des BMP- Signalweges

Der osteoinduktive Effekt von BMP2 *in vitro* und *in vivo* wird in zahlreichen Publikationen proklamiert (61, 63, 64, 66, 67, 104, 160).

In dieser Arbeit konnte die BMP2-Supplementation ab einer Konzentration von 25 ng/ml in Passage 3 die osteogene Differenzierung induzieren. Das Standardprotokoll wurde dabei allerdings nicht übertroffen (Abb.: 12, 24). Der nur schwache osteoinduktive Effekt von BMP2 wurde in anderen Arbeiten belegt (90, 161). Cruz konnte durch die BMP2-Supplementation zwar eine erhöhte Smad 1/5/8 Aktivierung induzieren, allerdings wurde die ALP-Aktivität nicht gesteigert. Es wurde vermutet, dass der BMP-Signalweg aufgrund von endogener BMP4 und BMP7 Produktion so stark aktiviert wurde, dass exogenes BMP2 zu keiner weiteren Steigerung führen konnte (161). Ein ähnlicher Mechanismus könnte den in dieser Arbeit nur schwachen osteoinduktiven Effekt erklären. Allerdings könnte auch die in Kapitel 1.3.3.3 diskutierte duale Funktion des BMP-Signalweges eine Ursache sein (66, 105). Hierbei wurde vermutet, dass die adipogene oder osteogene Differenzierung abhängig von der verwendeten Zelllinie induziert wird (66, 103, 105). Generell ist zu unterscheiden, dass in vielen Publikationen (103, 104, 107, 160, 162) die BMPs durch Überexpression in den Zellen selbst ihre Wirkung entfalten konnten, in unserem Versuchsansatz jedoch auf rekombinantes BMP2 zurückgegriffen wurde.

Des Weiteren scheint die osteoinduktive Wirkung der BMP2-Supplementation dosisabhängig zu sein. Durch Erhöhung der Konzentration von 10ng/ml auf 25 ng/ml konnte eine deutliche Zunahme der ALP-Aktivität erreicht werden. Eine weitere Steigerung auf 50ng/ml erzielte jedoch keinen zusätzlichen Effekt (Abb.: 17). Eine dosisabhängige Wirkung konnte auch in anderen Studien gezeigt werden (66, 105).

Im Gegensatz zu den niedrigen ALP-Messwerten war die ALP- und RUNX2-Expression an Tag vier signifikant erhöht (Protokoll 4, Abb.: 26, A, B). Daher kann angenommen werden, dass der BMP-Signalweg eine induzierende Wirkung auf die osteogene Differenzierung hat, wie in BMSCs gezeigt werden konnte (49). Im weiteren Verlauf scheint jedoch die alleinige BMP2-Supplementation nicht ausreichend zu sein, was sich an einem Abfall der ALP- und RUNX2- Expression (Protokoll 4, Abb.: 26, D, E), sowie den niedrigen ALP-Messwerten (Abb.: 17) an Tag 7 zeigte.

Aufgrund der Vermutung, dass der Übergang in die späte Phase der osteogenen Differenzierung durch den BMP-Signalweg unterbunden wird, könnte eine Inhibition dessen förderlich sein (49). Daher wurde neben der alleinigen BMP2-Supplementation auch ein Wechsel von BMP2 zu Noggin an Tag vier untersucht (Abb.: 17). Dadurch konnte die osteogene Differenzierung schon mit einer BMP2-Konzentration von 10ng/ml induziert werden (Abb.: 17). Andere Studien konnten zeigen, dass auch eine alleinige Noggin-Supplementation vergleichbare ALP-Messwerte liefern könnte (64, 142).

In DFSCs wurde ein komplexer Mechanismus des BMP-Signalweges und die Wechselwirkung mit anderen Signalwegen, wie dem Wnt-Signalweg gezeigt (117). Dies könnte auch ursächlich für die dosisabhängige Wirkung von BMP2 und die unterstützende Funktion von Noggin in ADSCs sein.

4.4 Manipulation des Wnt-Signalweges

Wegen vermuteter Wechselwirkungen zwischen Wnt- und BMP-Signalweg, sowie Genanalysen, die eine entscheidende Rolle des Wnt-Signalweges für die osteogene Differenzierung belegten (163), wurde auch dieser untersucht. Es wurde von der Annahme ausgegangen, dass eine Inhibition des Wnt-Signalweges die osteogene bzw. zementogene Differenzierung der ADSCs fördert (97, 110). Im Rahmen dieser Arbeit konnte DKK1 in jeder Dosierung hohe ALP-Messwerte erreichen, jedoch das Standardprotokoll nicht übertreffen (Abb.: 18).

Wie in Kapitel 1.3.3.3 erwähnt liegen unterschiedliche Aussagen über die Funktionsweise des Wnt-Signalweges vor. So förderte die DKK1-Supplementation in einer anderen Studie die adipogene Differenzierung durch Hochregulation von PPAR- γ und C/EBP- α und Herabregulation von Wnt3a, Wnt10b und β -Catenin (112). Entgegen der Ergebnisse von Liu et al., 2014 und Wen et al., 2011 (97,110) zeigten Li et al., 2008 (111), dass eine Stabilisierung des zytoplasmatischen β -Catenins die adipogene Differenzierung unterdrückte und die Osteogenese stimulierte, wohingegen eine Herabregulation des β -Catenins die adipogene Differenzierung über eine C/EBP α - und PPAR γ - Induktion unterstützte.

Im Rahmen dieser Arbeit zeigte Wnt3a in einer Konzentration von 25 ng/ml oder der Wechsel von Wnt3a zu DKK1 an Tag vier oder fünf in Passage 3 eine induzierende Wirkung (Abb.: 18, 19). Insgesamt wurde durch die Wnt3a-Supplementation allerdings kein besseres Ergebnis als mit dem Standardprotokoll erreicht. Darüber hinaus konnten weder

durch Wnt3a in einer Konzentration von 100 ng/ml noch durch den Wechsel zu DKK1 an Tag vier oder fünf in Passage 4 eine osteogene Differenzierung induziert werden (Abb.: 18, 19). Die Passagen-abhängigen Ergebnisse der Wechselprotokolle könnten auch auf die in Kapitel 4.1 besprochene Zellseneszenz zurückgeführt werden.

Generell spiegeln die Ergebnisse dieser Arbeit die unterschiedlichen Aussagen über die Funktionsweise des Wnt-Signalweges wieder. Sowohl DKK1, als auch Wnt3a, konnten die osteogene Differenzierung induzieren, wobei Wnt3a eine dosisabhängige Wirkung zeigte (Abb.: 18, 19). Hierfür könnte ein Rückkopplungsmechanismus des Signalweges verantwortlich sein (164). Darüber hinaus könnte wie in Kapitel 1.3.3.2 in DFSCs besprochen eine Wechselwirkung mit anderen Signalwegen, wie dem BMP-Signalweg eine Rolle spielen (70, 73–75).

Die vermutete Wechselwirkung des BMP- und Wnt-Signalweges wurde im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal in ADSCs untersucht. Die zeitgleiche Manipulation beider Signalwege erreichte in der Kombination aus DKK1 und BMP2 in Passage 3 etwas höhere ALP-Aktivitäten als Wnt3a und BMP2 (Abb.: 20). Daher könnte bei aktiviertem BMP-Signalweg eher die Inhibition des Wnt-Signalweges vorteilhaft für die osteogene Differenzierung sein.

4.5 Dexamethason als zusätzlicher Faktor

Da weder die Manipulation des Wnt- oder des BMP-Signalweges, noch eine Kombination beider die ALP-Aktivität des Standardprotokolls übertraf, wurde im nächsten Schritt Dexamethason mit Faktoren der Signalwege kombiniert (Kapitel: 3.2.3). Als entscheidender Bestandteil des Standardprotokolls (ODMs) sollte Dexamethason die osteogene Differenzierung der ADSCs möglicherweise über den ERK-Signalweg fördern (106). Die hohe RUNX2-Expression, sowohl an Tag vier als auch an Tag sieben, könnte ein Hinweis darauf sein (Abb.: 26, B, E). Darüber hinaus widerlegten diese Ergebnisse eine RUNX2-unabhängige Differenzierung durch Dexamethason. Dies konnte bereits in DFSCs beschrieben werden (84, 98).

In Übereinstimmung mit der Literatur (85) zeigten alle Kombinationen mit Dexamethason 10^{-8} M etwas höhere ALP-Aktivitäten als die mit 10^{-7} M (Abb.: 20, 21). Jedoch konnte in der vorliegenden Arbeit keine Kombination mit Dexamethason 10^{-8} M die ALP-Messwerte eines 10^{-7} M enthaltenden ODMs übertreffen (Abb.: 21, 22).

Mit Ausnahme der Kombination aus Wnt3a 25 ng/ml und Dexamethason konnte unter Zugabe von Dexamethason zu BMP2, DKK1 oder Wnt3a die osteogene Differenzierung induziert

werden (Abb.: 20, 21). Ursächlich für den unterstützenden Effekt auf die BMP2-Supplementation könnte eine synergistische Induktion von RUNX2 sein (Abb.: 12, 20) (104,106). Allerdings sind in der Literatur widersprüchliche Ergebnisse zu finden. Bei Lee et al., 2014 förderte die Kombination aus BMP2 und Dexa die adipogene Differenzierung und inhibierte die osteogene Differenzierung durch eine vermehrte PPAR- γ -Expression (105). Dieser Effekt wurde auf einen durch BMP2 induzierten Mechanismus zurückgeführt. Dabei ist zu beachten, dass in dieser Arbeit eine zehnfach höhere BMP2-Konzentration verwendet wurde (100 ng/ml) (105). Daher könnte die Funktion des BMP-Signalweges in Kombination mit Dexamethason dosisabhängig sein. Eine niedrige Konzentration an BMP2 könnte die osteogene und eine hohe eher die adipogene Differenzierung unterstützen.

Wnt3a 25 ng/ml inhibierte die durch Dexamethason induzierte osteogene Differenzierung (Abb.: 22). Wie in MSCs gezeigt (165), könnte auch hier die Inhibition der Dexamethason-induzierten Expression osteogener Marker durch Wnt3a eine mögliche Ursache sein. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von (142, 165), die eine erhöhte ALP-Aktivität mit fehlender Herabregulation adipogener Marker zeigten. In dieser Arbeit konnte letztendlich durch eine Erniedrigung der Wnt3a-Konzentration auf 10 ng/ml die osteogene Differenzierung induziert werden (Abb.: 21). Hierbei könnte der Effekt von Wnt3a so gering sein, dass es mit der Dexamethason-induzierten Differenzierung nicht mehr interveniert.

Zusammenfassend erzielten BMP2 bzw. Wnt3a in Kombination mit Dexa kontroverse Ergebnisse. Die Diskrepanz zu anderen Studien könnte auch im Zusammenhang einer dualen Funktion von Dexa stehen (106). Bei einem inaktiviertem ERK-Signalweg sollte Dexa über eine PPAR γ -Induktion die adipogene Differenzierung und bei aktivierten ERK-Signalweg die osteogene Differenzierung unterstützen (106).

Die Kombination aus DKK1 und Dexamethason hingegen konnte in jeder für DKK1 gewählten Konzentration vergleichbare Ergebnisse zum Standardprotokoll erreichen (Abb.: 22). Daher könnte in Kombination mit Dexamethason, wie schon in Kapitel 4.5 in der Kombination mit BMP2 besprochen, eine Inhibition und somit Senkung des β -Catenin-Spiegels förderlich für die osteogene Differenzierung sein.

4.6 Kombination mehrerer Faktoren

Da die Kombinationen aus BMP2 und DKK1 (Abb.: 20) bzw. Dexamethason und DKK1 (Abb.: 22) gute ALP-Messwerte und konstantere Ergebnisse als die jeweiligen Kombinationen mit Wnt3a zeigten, wurden die Faktoren BMP2, DKK1 und Dexamethason kombiniert (Protokoll 1). Dies lieferte die höchsten ALP-Messwerte dieser Arbeit und

übertraf die Messwerte des Standardprotokolls (Abb.: 22). Dieses Ergebnis konnten in den RT-qPCRs nicht reproduziert werden, jedoch zeigte sich an Tag sieben eine vergleichbare Tendenz (Abb.: 26) zu den ALP-Messungen (Abb.: 22). Zudem erreichte die RUNX2-Expression an Tag vier den höchsten Wert im Vergleich zu den anderen Protokollen (Abb.: 26). Die RUNX2-Expression im Western Blot an Tag sieben war jedoch herabreguliert (Abb.: 27). Dies wäre mit einem Übergang in die späte Phase der osteogenen Differenzierung vereinbar, da RUNX2 deren Induktion inhibiert (49).

Es ist davon auszugehen, dass die in Protokoll 1 manipulierten Signalwege in Wechselwirkung miteinander stehen. Mögliche Mechanismen der einzelnen Faktoren sind untersucht (97,104–106,110,134), die Wechselwirkungen mehrerer Faktoren sind jedoch weitgehend unklar. Bekannt ist, dass DKK1 den Wnt-Signalweg inhibiert und so das β -Catenin-Level senkt (97, 110), BMP2 über eine Smad-Aktivierung RUNX2 induziert (104, 105, 134) und Dexamethason ebenfalls die RUNX2-Expression über den ERK-Signalweg unterstützt (106). Scheinbar steuert ein komplexes Netzwerk die Differenzierung. Erst die Manipulation beider Signalwege und die zusätzliche Dexamethason-Supplementation konnten die ALP-Aktivität erhöhen. Dadurch wurde die Effektivität der Differenzierung, aber auch die Komplexität des Systems gesteigert und eine gezielte Kontrolle erschwert.

4.7 Ausblick

In der Literatur liegen keine einheitlichen Informationen über die Differenzierungsmechanismen der ADSCs vor und auch in dieser Arbeit zeigten sich widersprüchliche Ergebnisse bei der Manipulation des BMP- bzw. Wnt- Signalweges. Eine Erhöhung der Ausbeute an osteogen bzw. zementogen differenzierenden Zellen gegenüber dem Standardprotokoll, die in anderen Studien (97, 103, 105, 110, 142) erreicht wurde, konnte nicht bestätigt werden. Ursächlich könnte ein unterschiedliches Ansprechen der verschiedenen Zelllinien auf die verwendeten Supplemente (105) oder ein mangelndes osteogenes Differenzierungspotential der untersuchten Zelllinie sein. Denn keines der geprüften Protokolle, einschließlich des Standardprotokolls, konnte eine Mineralisierung zeigen (siehe Kapitel 3.5). Patricia Zuk, 2011 begründete eine ähnliche Beobachtung mit einem fehlenden Potential der Zelllinie zur osteogenen Differenzierung (90). Eine homogenere Zellpopulation könnte durch eine bessere Sortierung der Zellen mittels Expressionsmuster der Stammzellmarker ermöglicht werden, wie bereits von Kalinina et al., 2015 gezeigt wurde (167). Die Zelllinien mehrerer Spender zu poolen könnte einen weiteren Ansatz darstellen, um eine bessere Vergleichbarkeit der einzelnen Studien zu gewährleisten.

Ein weiterer Ansatz wäre ein besseres Verständnis des komplexen Differenzierungsnetzwerkes unter Berücksichtigung möglicher Rückkopplungsmechanismen, Wechselwirkungen und weiterer involvierter noch unbekannter Mechanismen zu gewinnen. Basierend auf dieser Arbeit scheinen die Differenzierungsmechanismen von Dexamethason und die Wechselwirkungen der Signalwege interessante Aspekte für weitere Studien zu sein. Laut Liu et al., 2009 läuft die Dexamethason-induzierte Differenzierung über den ERK-Signalweg (106). Darüber hinaus könnte untersucht werden, ob dadurch RUNX2 induziert wird, wie in MSCs beschrieben wurde (51) oder noch weitere Mechanismen involviert sind. Die Wechselwirkung des Wnt- bzw. BMP-Signalweges könnte beispielsweise durch eine Messung der Zwischenprodukte der einzelnen Signalwege, wie β -Catenin und Smad-Proteine, genauer analysiert werden.

Kürzlich wurde gezeigt, dass auch die R-Spondin (Rsop) Proteine, eine weitere Gruppe von Wnt/ β -Catenin-Signalweg Agonisten (168,169) eine Rolle in der osteogenen Differenzierung von ADSCs spielen. Rspo3 soll die Osteogenese über einen LGR4-ERK-Signalweg regulieren (170). Möglicherweise könnten durch diese Mechanismen die widersprüchlichen Ergebnisse der Manipulation des Wnt-Signalweges erklärt werden.

5. Zusammenfassung

In der modernen Zahnmedizin stellen aus Fett gewonnene Stammzellen (ADSCs) eine vielversprechende Grundlage für zukünftige Behandlungsalternativen parodontaler Defekte dar. Diese Stammzellen lassen sich komplikationsarm und in großer Anzahl aus Lipoaspirat gewinnen. Da sie jedoch die Tendenz besitzen ohne exogene Stimulation adipogen zu differenzieren, ist die Steigerung der Effektivität der osteogenen bzw. zementogenen Differenzierung durch eine geeignete Supplementation Gegenstand aktueller Forschung. Dadurch soll zukünftig ein breiter klinischer Einsatz zur Regeneration parodontalen Gewebes ermöglicht werden.

Auf Grundlage von (66, 97, 166) wurde in dieser Arbeit durch Supplementation die zielgerichtete Aktivierung und/oder Inhibition des BMP- bzw. Wnt-Signalweges von kommerziell erworbenen ADSCs getestet. Dazu wurden Protokolle verschiedener Kombinationen und Konzentrationen der Supplemente erstellt (siehe Tabelle 1 und 2). Im Rahmen dieser Versuche wurden darüber hinaus Hinweise auf mögliche Differenzierungsmechanismen gewonnen. Die Bewertung des osteogenen Differenzierungspotentials erfolgte dabei durch die ALP-Aktivität. Zusätzlich wurden von ausgewählten Protokollen RT-qPCRs und Western Blot Analysen angefertigt.

Das Standardprotokoll ODM mit dem Hauptbestandteil Dexamethason konnte die osteogene Differenzierung in allen Versuchen induzieren und diente jeweils als Referenz des getesteten Protokolls. Dabei wurde generell ein Abfall der ALP-Aktivität von Passage 3 zu Passage 4 beobachtet, was ein Hinweis auf Zellseneszenz sein könnte. Darüber hinaus war in Passage 4 bis auf wenige Ausnahmen kein osteoinduktiver Effekt mit den durchgeführten Protokollen sichtbar. Daher wurden die meisten der folgenden Erkenntnisse aus Passage 3 gewonnen.

Zunächst wurde die Manipulation der einzelnen Signalwege untersucht. Dabei zeigte die alleinige BMP2-Supplementation eine dosisabhängige Induktion der osteogenen Differenzierung, jedoch ohne das Standardprotokoll an Tag sieben zu übertreffen (Abb.: 17, 26). Zwar erreichte das Protokoll mit BMP2 50ng/ml an Tag vier im Vergleich zu den anderen getesteten Protokollen die höchste ALP- und RUNX2-Expression (Abb.: 26, B, C, Protokoll 4), an Tag sieben war die RUNX2- und ALP-Expression allerdings wieder herabreguliert (Abb.: 26., E, F, Protokoll 4). Die ALP-Messungen an Tag sieben konnten erst ab einer Konzentration von 25 ng/ml die osteogene Differenzierung induzieren, wobei eine Steigerung auf 50 ng/ml keinen zusätzlichen Effekt zeigte (Abb.: 17). Durch einen Wechsel von BMP2 zu dem Inhibitor Noggin ab Tag vier konnten schon mit der Supplementation von 10ng/ml BMP2 vergleichbare Ergebnisse zum Standardprotokoll erreicht werden (Abb.: 17).

Aufgrund dieser Beobachtungen ist zu vermuten, dass die BMP2-Supplementation, wie bei MSCs, zwar die Osteogenese induziert (49), aber in späteren Phasen der Differenzierung eher inhibierend wirken könnte. Wie in einer anderen Studie (161) vermutet, könnte dies auf eine endogene BMP4 und BMP7 Produktion zurückgeführt werden, wodurch der BMP-Signalweg schon maximal aktiviert wäre und eine zusätzliche BMP2-Supplementation keinen oder sogar einen negativen Effekt haben könnte. Aufgrund der dualen Funktion des BMP-Signalweges könnte auch die adipogene statt der osteogenen Differenzierung im Verlauf gefördert werden (66, 105). Darüber hinaus könnten in DFSCs vermutete komplexe Wechselwirkungen des BMP-Signalweges mit beispielsweise dem Wnt-Signalweg verantwortlich sein (117).

Aufgrund dieser Wechselwirkung wurde in der vorliegenden Arbeit die Kombination mit Faktoren anderer Signalwege analysiert. Da zudem unterschiedliche Aussagen über die Funktionsweise des Wnt-Signalweges in der Literatur vorliegen (112, 142, 166) wurde zunächst die Inhibition und Aktivierung des Wnt-Signalweges untersucht.

Die alleinige Wnt3a-Supplementation (Aktivator) konnte nur in der Konzentration von 25 ng/ml die osteogene Differenzierung induzieren DKK1 (Inhibitor) hingegen konnte die Differenzierung in allen getesteten Konzentrationen fördern (Abb.: 18). Auch ein Wechsel von DKK1 zu Wnt3a oder der inverse Vorgang an Tag vier oder an Tag fünf konnten mit dem Standardprotokoll vergleichbare Ergebnisse erzielen (Abb.: 19). Hierfür könnte ein Rückkopplungsmechanismus des Signalweges verantwortlich sein, da Zielgene auch Mitglieder des Wnt-Signalweges selbst sind (75). Darüber hinaus könnte auch hier eine Wechselwirkung zwischen den Signalwegen eine Rolle spielen (70, 73–75).

Diese Wechselwirkung zwischen BMP- und Wnt-Signalweg wurde im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal in ADSCs untersucht. Hierfür wurde BMP2 in Kombination mit DKK1 oder Wnt3a getestet. Die Kombination mit DKK1 zeigte dabei die höchste ALP-Aktivität (Abb.: 20). Da jedoch mit diesen Protokollen das Standardprotokoll auch nicht übertroffen werden konnte, wurde eine Kombination der Faktoren (BMP2, DKK1, Wnt3a) mit Dexamethason untersucht. Dies konnte ebenso zu keiner deutlichen Steigerung der ALP-Aktivitäten im Vergleich zum Standardprotokoll führen (Abb.: 21, 22). Entgegen einer anderen Studie (142) inhibierte zusätzliches Wnt3a 25 ng/ml sogar die Dexamethason-induzierte Osteogenese (Abb.: 22). Wie in MSCs gezeigt, könnte auch hier die Inhibition der Dexamethason-induzierten Expression osteogener Marker durch Wnt3a eine Ursache sein (165).

Letztendlich zeigte DKK1 sowohl in Kombination mit BMP2, als auch Kombination mit Dexamethason bessere Ergebnisse als Wnt3a. Daher könnte in diesen Kombinationen eine Inhibition und somit Senkung des β -Catenin-Spiegels förderlich für die osteogene

Differenzierung sein. Basierend auf diesen Beobachtungen wurde im nächsten Schritt DKK1 mit BMP2 und Dexamethason kombiniert, wodurch etwas höhere ALP-Messwerte als mit dem Standardprotokoll erreicht werden konnten. Dabei ist zu erwähnen ist, dass die RT-qPCRs und der WB diese Ergebnisse nicht eindeutig bestätigen konnten (Abb.: 26, 27). Dieses Protokoll 1 setzte sich zusammen aus DKK1 50 ng/ml, BMP2 10 ng/ml und Dexa 10^{-7} M (Abb.: 23).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Kombination aus BMP2, DKK1 und Dexamethason (Protokoll 1) sehr vielversprechende Ergebnisse zeigte. Es liegt nahe, dass eine gleichzeitige Aktivierung des BMP-Signalweges und Inhibition des Wnt-Signalweges die osteogene Differenzierung unterstützen kann, wobei ein durch Dexamethason induzierter Mechanismus größere Bedeutung für die Differenzierung haben könnte und eine Wechselwirkung zwischen den Signalwegen besteht.

6. Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

ADSCs	Adipose tissue-derived stem cells (adipogene Stammzellen)
AK	Antikörper
ALP	Alkalische Phosphatase
APC-Protein	Adenomatosis polyposis coli protein
BCA	Bicinchoninsäure
BGLAP	Osteocalcin (Synonym: bone γ -carboxylglutamic acid-containing protein")
BMP	Bone morphogenetic protein
BMPR-I/ BMPR-II	BMP-Rezeptor I/ BMP-Rezeptor II
BMSCs	Bone marrow stromal cells (Knochenmarkstammzellen)
CCK1	Cyclinkinase 1
CD	Cluster of Differentiation (Unterscheidungsgruppen)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
C/EBAP α	CCAAT/Enhancer-Binding-Protein α
Ct	Cycle of threshold
d	Tag
Dexa	Dexamethason
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DKK1	Dickkopf 1
DLX3	Distal less homeobox 3
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyriobonukleosidtriphosphat
Dsh	Dishevelled
DFSCs	dentale Follikel-Stammzellen
DSCs	dentale Stammzellen
ECL	Enhanced Chemiluminescence-Lösung
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
ERK	Extrazelluläre Signal-regulierte Kinase
Et al.	Et alii (lat.: und andere)

EtOH	Ethanol
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	Fluorescence activated cell sorter(Durchflusszytometrie)
FAK	Fokale Adhäsionskinase
FRZ	Frizzled transmembrane Rezeptor
GSK3	Glykogensynthase-Kinase 3
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure (Puffersubstanz)
Koll I	Kollagen Typ I
LRP	Low-density lipoprotein-related Protein-Rezeptor
LEF/ TCR	Lymphoid enhancer-binding factor/ T-cell specific transcription factor
M	Molar, "mol/l"
MAP-K	Mitogen-activated protein-kinase
Min.	Minute
MLL1/MLL2	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia 1/2
MMTV	Maus-Mammatumovirus
mRNA	Messenger ribonucleic acid (Boten-RNA)
MSCs	Mesenchymal stem cells(mesenchymale Stammzellen)
NaCl	Natriumchlorid
ODM	Osteogenes Differenzierungsmedium
OG	Osteogenes Grundmedium
OPN	Osteopontin
P	Passage
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PKA	Proteinkinase A
PPAR γ	Peroxisome proliferator-activated receptor γ
PTHrP	Parathyroid hormon related peptide
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	Real Time Quantitative Polymerasekettenreaktion
Rpm	Rounds per minute
RUNX2	Runt-related transcription factor 2
S	Sekunde

SENP3	SUMO1/sentrin/SMT3 specific peptidase 3
STC1	Stanniocalcin 1
TGF- β	Transforming growth factor- β
WB	Western Blot
ZBTB16	Zinc finger and BTB domain containing 16

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Festlegung der osteogenen Differenzierung mesenchymaler Stammzellen durch die Transkriptionsfaktoren RUNX2, Osterix und β -Catenin	5
Abbildung 2: Modulation der Transkriptionsfaktoren durch den BMP-, Wnt-, und ERK/MAP-Kinase Signalweg.	6
Abbildung 3: Der BMP-Signalweg.	8
Abbildung 4: Der Wnt-Signalweg.	10
Abbildung 5: Inhibition des Wnt-Signalweges mit DKK (Dickkopf)1.	11
Abbildung 6: Wechselwirkungen des BMP- und des Wnt-Signalweges in DFSCs.	12
Abbildung 7: Differenzierungsmechanismus von Dexa in DFSCs.	13
Abbildung 8: Osteogene und adipogene Differenzierungsmechanismen der ADSCs.	15
Abbildung 9: Osteogene Differenzierungsprotokolle.	28
Abbildung 10: Messung der ALP-Aktivität.	30
Abbildung 11: Bicinchoninsäure (BCA) Proteinassay.	33
Abbildung 12: Schichtung in der Transferapparatur.	34
Abbildung 13: Ergebnisse der FACS-Analyse der ADSCs P4.	42
Abbildung 14: Vergleich der relativen ALP-Aktivitäten der unterschiedlichen Zelllinien (MSCs P5, DFSCs P5, ADSCs P3/4) an Tag 7.	42
Abbildung 15: Messung der relativen ALP-Aktivität der ADSCs P3 nach 4, 7 und 10-tägiger Kultivierung in DMEM bzw. ODM.	43
Abbildung 16: Vergleich der Passagen 3 und 4. Messung der relativen ALP-Aktivität an Tag 7.	44
Abbildung 17: Der Einfluss von BMP2 und Noggin auf die osteogene Differenzierung der ADSCs.	45
Abbildung 18: DKK1 und Wnt3a in unterschiedlichen Konzentrationen.	46
Abbildung 19: Wechsel zwischen DKK1 und Wnt3a während der osteogenen Differenzierung.	47
Abbildung 20: BMP2 und DKK1 bzw. Wnt3a in Kombination.	48
Abbildung 21: BMP2 und Dexamethason zur Unterstützung der osteogenen Differenzierung.	49
Abbildung 22: Wnt3a bzw. DKK1 und Dexamethason zur Unterstützung der osteogenen Differenzierung.	50
Abbildung 23: Das Protokoll 1, eine Kombination aus BMP2, DKK1 und Dexa.	51
Abbildung 24: DKK1 und Wnt3a-Wechsel in Protokoll 1.	52

Abbildung 25: Vergleich von Protokoll 1 mit der Differenzierung in DFSCs-konditioniertem Medium und DFSCs-konditioniertem Medium mit DKK1 versetzt.	53
Abbildung 26: Relative mRNA-Expression osteogener bzw. zementoblastärer Marker der ADSCs P4 nach 4- bzw. 7-tägiger Differenzierung (n=3, +/- SEM).....	55
Abbildung 27: Western Blot-Analysen nach RUNX2 mit dem Gesamtzelllysat von ADSCs P4 nach 7-tägiger Differenzierung.....	56

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Getestete Kombinationen der Faktoren.....	29
Tabelle 2: Getestete Konzentrationen der Faktoren.	29
Tabelle 3: Zusammensetzung der Proben für den Western Blot.....	34
Tabelle 4: Zusammensetzung der Proben für die reverse Transkription.....	37
Tabelle 5: Zeit- und Temperatureinstellung am Thermocycler für die reverse Transkription.	38
Tabelle 6: Zusammensetzung der Proben für die RT-qPCR.	38
Tabelle 7: Ablauf des RT-qPCR Programms.....	39
Tabelle 8: Relative Quantifizierung der Genexpression - $\Delta\Delta C_t$ -Methode.....	40

7. Literaturverzeichnis

1. Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *Lancet Lond Engl.* 2005 Nov 19;366(9499):1809–20.
2. Institut der Deutschen Zahnärzte, im Auftrag von Bundeszahnärztekammer, und Kassenzahnärztlicher Bundesvereinigung. Zusammenfassung_DMS_V.html [Internet]. https://www.bzaek.de/fileadmin/PDFs/dms/Zusammenfassung_DMS_V.pdf. [cited 2017 Apr 19]. Available from: https://www.bzaek.de/fileadmin/PDFs/dms/Zusammenfassung_DMS_V.pdf
3. Scannapieco FA. Systemic Effects of Periodontal Diseases. *Dent Clin.* 2005 Jul 1;49(3):533–50.
4. Gängler P, Hoffmann T, Willershausen B. Konservierende Zahnheilkunde und Parodontologie: 66 Tabellen. Georg Thieme Verlag; 2010. 424 p.
5. Cortellini P, Carnevale G, Sanz M, Tonetti MS. Treatment of deep and shallow intrabony defects. A multicenter randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol.* 1998 Dec;25(12):981–7.
6. Bassir SH, Wisitrasameewong W, Raanan J, Ghaffarigarakani S, Chung J, Freire M, et al. Potential for Stem Cell-Based Periodontal Therapy. *J Cell Physiol.* 2015 Jun 8;
7. Karring T, Nyman S, Gottlow J, Laurell L. Development of the biological concept of guided tissue regeneration — animal and human studies. *Periodontol 2000.* 1993 Feb 1;1(1):26–35.
8. Inglehart MR. Enhancing periodontal health through regenerative approaches: a commentary on the need for patient-reported outcomes. *J Periodontol.* 2015 Feb;86(2 Suppl):S4–7.
9. Sculean A, Nikolidakis D, Nikou G, Ivanovic A, Chapple ILC, Stavropoulos A. Biomaterials for promoting periodontal regeneration in human intrabony defects: a systematic review. *Periodontol 2000.* 2015 Jun 1;68(1):182–216.
10. Hasegawa N, Kawaguchi H, Hirachi A, Takeda K, Mizuno N, Nishimura M, et al. Behavior of transplanted bone marrow-derived mesenchymal stem cells in periodontal defects. *J Periodontol.* 2006 Jun;77(6):1003–7.

11. Liu Y, Zheng Y, Ding G, Fang D, Zhang C, Bartold PM, et al. Periodontal ligament stem cell-mediated treatment for periodontitis in miniature swine. *Stem Cells Dayt Ohio*. 2008 Apr;26(4):1065–73.
12. Tobita M, Uysal CA, Guo X, Hyakusoku H, Mizuno H. Periodontal tissue regeneration by combined implantation of adipose tissue-derived stem cells and platelet-rich plasma in a canine model. *Cytotherapy*. 2013 Dec 1;15(12):1517–26.
13. Weissman IL. Stem Cells: Units of Development, Units of Regeneration, and Units in Evolution. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):157–68.
14. Lin N-H, Gronthos S, Bartold PM. Stem cells and future periodontal regeneration. *Periodontol 2000*. 2009;51:239–51.
15. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*. 1970 Oct;3(4):393–403.
16. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999 Apr 2;284(5411):143–7.
17. Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T. Stem cells find their niche. *Nature*. 2001 Nov 1;414(6859):98–104.
18. Li L, Xie T. Stem cell niche: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2005;21:605–31.
19. Solnica-Krezel L, Sepich DS. Gastrulation: making and shaping germ layers. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2012;28:687–717.
20. Master Z, McLeod M, Mendez I. Benefits, risks and ethical considerations in translation of stem cell research to clinical applications in Parkinson's disease. *J Med Ethics*. 2007 Mar;33(3):169–73.
21. Kørbling M, Estrov Z. Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? *N Engl J Med*. 2003 Aug 7;349(6):570–82.

22. Rogers I, Casper RF. Umbilical cord blood stem cells. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2004 Dec;18(6):893–908.
23. Bieback K, Klüter H. Mesenchymal stromal cells from umbilical cord blood. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2007 Dec;2(4):310–23.
24. Xu Y, Malladi P, Wagner DR, Longaker MT. Adipose-derived mesenchymal cells as a potential cell source for skeletal regeneration. *Curr Opin Mol Ther.* 2005 Aug;7(4):300–5.
25. Tsai M-S, Lee J-L, Chang Y-J, Hwang S-M. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Hum Reprod Oxf Engl.* 2004 Jun;19(6):1450–6.
26. Bi Y, Ehrichou D, Kilts TM, Inkson CA, Embree MC, Sonoyama W, et al. Identification of tendon stem/progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche. *Nat Med.* 2007 Oct;13(10):1219–27.
27. Igura K, Zhang X, Takahashi K, Mitsuru A, Yamaguchi S, Takashi TA. Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. *Cytotherapy.* 2004;6(6):543–53.
28. De Bari C, Dell’Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum.* 2001 Aug;44(8):1928–42.
29. Crisan M, Deasy B, Gavina M, Zheng B, Huard J, Lazzari L, et al. Purification and long-term culture of multipotent progenitor cells affiliated with the walls of human blood vessels: myoendothelial cells and pericytes. *Methods Cell Biol.* 2008;86:295–309.
30. Bosio A, Bissels U, Miltenyi S. Characterization and Classification of Stem Cells. In: Steinhoff G, editor. *Regenerative Medicine* [Internet]. Springer Netherlands; 2011 [cited 2016 Jun 30]. p. 149–67. Available from: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-90-481-9075-1_6

31. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315–7.
32. Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther*. 2007;9(1):204.
33. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2008 Sep;8(9):726–36.
34. Dennis JE, Carbillet J-P, Caplan AI, Charbord P. The STRO-1+ marrow cell population is multipotential. *Cells Tissues Organs*. 2002;170(2-3):73–82.
35. Gronthos S, Zannettino ACW, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortessidis A, et al. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci*. 2003 May 1;116(Pt 9):1827–35.
36. Thesleff I, Mikkola M. The role of growth factors in tooth development. *Int Rev Cytol*. 2002;217:93–135.
37. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Dec 5;97(25):13625–30.
38. Honda MJ, Nakashima F, Satomura K, Shinohara Y, Tsuchiya S, Watanabe N, et al. Side population cells expressing ABCG2 in human adult dental pulp tissue. *Int Endod J*. 2007 Dec;40(12):949–58.
39. Seo B-M, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet Lond Engl*. 2004 Jul 10;364(9429):149–55.
40. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 May 13;100(10):5807–12.

41. Yao S, Pan F, Prpic V, Wise GE. Differentiation of stem cells in the dental follicle. *J Dent Res*. 2008 Aug;87(8):767–71.
42. 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. *J Endod*. 2008 Feb;34(2):166–71.
43. Morsczeck C, Götz W, Schierholz J, Zeilhofer F, Kühn U, Möhl C, et al. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol J Int Soc Matrix Biol*. 2005 Apr;24(2):155–65.
44. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001 Apr;7(2):211–28.
45. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *Mol Biol Cell*. 2002 Dec;13(12):4279–95.
46. Bain BJ. Bone marrow biopsy morbidity and mortality. *Br J Haematol*. 2003 Jun;121(6):949–51.
47. Coleman SR. Structural fat grafting: more than a permanent filler. *Plast Reconstr Surg*. 2006 Sep;118(3 Suppl):108S – 120S.
48. D'Amour KA, Bang AG, Eliazer S, Kelly OG, Agulnick AD, Smart NG, et al. Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*. 2006 Nov;24(11):1392–401.
49. Komori T. Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *J Cell Biochem*. 2006 Dec 1;99(5):1233–9.
50. Hoshiba T, Kawazoe N, Tateishi T, Chen G. Development of stepwise osteogenesis-mimicking matrices for the regulation of mesenchymal stem cell functions. *J Biol Chem*. 2009 Nov 6;284(45):31164–73.
51. Franceschi RT, Ge C, Xiao G, Roca H, Jiang D. Transcriptional regulation of osteoblasts. *Cells Tissues Organs*. 2009;189(1-4):144–52.

52. Ge C, Xiao G, Jiang D, Yang Q, Hatch NE, Roca H, et al. Identification and functional characterization of ERK/MAPK phosphorylation sites in the Runx2 transcription factor. *J Biol Chem*. 2009 Nov 20;284(47):32533–43.
53. Afzal F, Pratap J, Ito K, Ito Y, Stein JL, van Wijnen AJ, et al. Smad function and intranuclear targeting share a Runx2 motif required for osteogenic lineage induction and BMP2 responsive transcription. *J Cell Physiol*. 2005 Jul;204(1):63–72.
54. Ling L, Nurcombe V, Cool SM. Wnt signaling controls the fate of mesenchymal stem cells. *Gene*. 2009 Mar 15;433(1-2):1–7.
55. Logan CY, Nusse R. The wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2004 Oct 8;20(1):781–810.
56. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science*. 1965 Nov 12;150(3698):893–9.
57. Urist MR. Bone Morphogenetic Protein: The Molecularization of Skeletal System Development. *J Bone Miner Res*. 1997 Mar 1;12(3):343–6.
58. Cheng H, Jiang W, Phillips FM, Haydon RC, Peng Y, Zhou L, et al. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg Am*. 2003 Aug;85-A(8):1544–52.
59. Mueller TD, Nickel J. Promiscuity and specificity in BMP receptor activation. *FEBS Lett*. 2012 Jul 4;586(14):1846–59.
60. Shu B, Zhang M, Xie R, Wang M, Jin H, Hou W, et al. BMP2, but not BMP4, is crucial for chondrocyte proliferation and maturation during endochondral bone development. *J Cell Sci*. 2011 Oct 15;124(Pt 20):3428–40.
61. Phimphilai M, Zhao Z, Boules H, Roca H, Franceschi RT. BMP signaling is required for RUNX2-dependent induction of the osteoblast phenotype. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2006 Apr;21(4):637–46.
62. Rawadi G, Vayssière B, Dunn F, Baron R, Roman-Roman S. BMP-2 controls alkaline phosphatase expression and osteoblast mineralization by a Wnt autocrine loop. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. 2003 Oct;18(10):1842–53.

63. Rickard DJ, Sullivan TA, Shenker BJ, Leboy PS, Kazhdan I. Induction of rapid osteoblast differentiation in rat bone marrow stromal cell cultures by dexamethasone and BMP-2. *Dev Biol.* 1994 Jan;161(1):218–28.
64. Saugspier M, Felthaus O, Viale-Bouroncle S, Driemel O, Reichert TE, Schmalz G, et al. The differentiation and gene expression profile of human dental follicle cells. *Stem Cells Dev.* 2010 May;19(5):707–17.
65. Sekiya I, Larson BL, Vuoristo JT, Reger RL, Prockop DJ. Comparison of effect of BMP-2, -4, and -6 on in vitro cartilage formation of human adult stem cells from bone marrow stroma. *Cell Tissue Res.* 2005 May;320(2):269–76.
66. Vanhatupa S, Ojansivu M, Autio R, Juntunen M, Miettinen S. Bone Morphogenetic Protein-2 Induces Donor-Dependent Osteogenic and Adipogenic Differentiation in Human Adipose Stem Cells. *Stem Cells Transl Med.* 2015 Dec;4(12):1391.
67. Viale-Bouroncle S, Felthaus O, Schmalz G, Brockhoff G, Reichert TE, Morszeck C. The transcription factor DLX3 regulates the osteogenic differentiation of human dental follicle precursor cells. *Stem Cells Dev.* 2012 Jul 20;21(11):1936–47.
68. Wang RN, Green J, Wang Z, Deng Y, Qiao M, Peabody M, et al. Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases. *Genes Dis.* 2014 Sep;1(1):87–105.
69. Wozney JM. The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. *Mol Reprod Dev.* 1992 Jun 1;32(2):160–7.
70. Viale-Bouroncle S, Klingelhöffer C, Ettl T, Reichert TE, Morszeck C. A protein kinase A (PKA)/ β -catenin pathway sustains the BMP2/DLX3-induced osteogenic differentiation in dental follicle cells (DFCs). *Cell Signal.* 2015 Mar;27(3):598–605.
71. Heldin C-H, Moustakas A. Role of Smads in TGF β signaling. *Cell Tissue Res.* 2012 Jan;347(1):21–36.
72. Walsh DW, Godson C, Brazil DP, Martin F. Extracellular BMP-antagonist regulation in development and disease: tied up in knots. *Trends Cell Biol.* 2010 May;20(5):244–56.

73. Silvério KG, Davidson KC, James RG, Adams AM, Foster BL, Nociti FH, et al. Wnt/ β -catenin pathway regulates bone morphogenetic protein (BMP2)-mediated differentiation of dental follicle cells. *J Periodontal Res.* 2012 Jun;47(3):309–19.
74. Nakashima A, Katagiri T, Tamura M. Cross-talk between Wnt and bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) signaling in differentiation pathway of C2C12 myoblasts. *J Biol Chem.* 2005 Nov 11;280(45):37660–8.
75. Baron R, Kneissel M. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nat Med.* 2013 Feb;19(2):179–92.
76. Gong Y, Slee RB, Fukai N, Rawadi G, Roman-Roman S, Reginato AM, et al. LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell.* 2001 Nov 16;107(4):513–23.
77. Chang J, Sonoyama W, Wang Z, Jin Q, Zhang C, Krebsbach PH, et al. Noncanonical Wnt-4 signaling enhances bone regeneration of mesenchymal stem cells in craniofacial defects through activation of p38 MAPK. *J Biol Chem.* 2007 Oct 19;282(42):30938–48.
78. Grumolato L, Liu G, Mong P, Mudbhary R, Biswas R, Arroyave R, et al. Canonical and noncanonical Wnts use a common mechanism to activate completely unrelated coreceptors. *Genes Dev.* 2010 Nov 15;24(22):2517–30.
79. Kestler HA, Kühl M. From individual Wnt pathways towards a Wnt signalling network. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 2008 Apr 12;363(1495):1333–47.
80. Rao TP, Kühl M. An Updated Overview on Wnt Signaling Pathways A Prelude for More. *Circ Res.* 2010 Jun 25;106(12):1798–806.
81. Moon RT. Wnt/ β -Catenin Pathway. *Sci STKE.* 2005 Feb 15;2005(271):cm1–cm1.
82. Moon RT, Kohn AD, De Ferrari GV, Kaykas A. WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nat Rev Genet.* 2004 Sep;5(9):691–701.
83. Cheng SL, Yang JW, Rifas L, Zhang SF, Avioli LV. Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro: induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. *Endocrinology.* 1994 Jan 1;134(1):277–86.

84. Felthaus O, Gosau M, Klein S, Prantl L, Reichert TE, Schmalz G, et al. Dexamethasone-related osteogenic differentiation of dental follicle cells depends on ZBTB16 but not Runx2. *Cell Tissue Res.* 2014 Sep;357(3):695–705.
85. de Girolamo L, Sartori MF, Albisetti W, Brini AT. Osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells: comparison of two different inductive media. *J Tissue Eng Regen Med.* 2007 Mar 1;1(2):154–7.
86. Langenbach F, Handschel J. Effects of dexamethasone, ascorbic acid and β -glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro. *Stem Cell Res Ther.* 2013;4(5):117.
87. Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem.* 1997 Feb;64(2):295–312.
88. Egusa H, Iida K, Kobayashi M, Lin TY, Zhu M, Zuk PA, et al. Downregulation of extracellular matrix-related gene clusters during osteogenic differentiation of human bone marrow- and adipose tissue-derived stromal cells. *Tissue Eng.* 2007 Oct;13(10):2589–600.
89. Giusta MS, Andrade H, Santos AV, Castanheira P, Lamana L, Pimenta AMC, et al. Proteomic analysis of human mesenchymal stromal cells derived from adipose tissue undergoing osteoblast differentiation. *Cytotherapy.* 2010 Jul;12(4):478–90.
90. Patricia Zuk Y-FC. Adipose-derived Stem cells and BMP2: Part 2. BMP2 may not influence the osteogenic fate of human adipose-derived stem cells. *Connect Tissue Res.* 2011;52(2):119–32.
91. De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, et al. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs.* 2003;174(3):101–9.
92. Morszeck C, Schmalz G. Transcriptomes and proteomes of dental follicle cells. *J Dent Res.* 2010 May;89(5):445–56.

93. Morsczeck C, Schmalz G, Reichert TE, Völlner F, Saugspier M, Viale-Bouroncle S, et al. Gene expression profiles of dental follicle cells before and after osteogenic differentiation in vitro. *Clin Oral Investig*. 2009 Dec;13(4):383–91.
94. Silvério KG, Davidson KC, James RG, Adams AM, Foster BL, Nociti FH, et al. Wnt/ β -catenin pathway regulates bone morphogenetic protein (BMP2)-mediated differentiation of dental follicle cells. *J Periodontol Res*. 2012 Jun;47(3):309–19.
95. Viale-Bouroncle S, Klingelhöffer C, Ettl T, Morsczeck C. The WNT inhibitor APCDD1 sustains the expression of β -catenin during the osteogenic differentiation of human dental follicle cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015 Feb 13;457(3):314–7.
96. Nemoto E, Koshikawa Y, Kanaya S, Tsuchiya M, Tamura M, Somerman MJ, et al. Wnt signaling inhibits cementoblast differentiation and promotes proliferation. *Bone*. 2009 May;44(5):805–12.
97. Liu N, Gu B, Liu N, Nie X, Zhang B, Zhou X, et al. Wnt/ β -Catenin Pathway Regulates Cementogenic Differentiation of Adipose Tissue-Deprived Stem Cells in Dental Follicle Cell-Conditioned Medium. *PLoS ONE* [Internet]. 2014 May 7 [cited 2015 Sep 8];9(5). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4012947/>
98. Felthaus O, Gosau M, Morsczeck C. ZBTB16 induces osteogenic differentiation marker genes in dental follicle cells independent from RUNX2. *J Periodontol*. 2014 May;85(5):e144–51.
99. Ikeda R, Yoshida K, Tsukahara S, Sakamoto Y, Tanaka H, Furukawa K, et al. The promyelotic leukemia zinc finger promotes osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells as an upstream regulator of CBFA1. *J Biol Chem*. 2005 Mar 4;280(9):8523–30.
100. Morsczeck C. Gene expression of runx2, Osterix, c-fos, DLX-3, DLX-5, and MSX-2 in dental follicle cells during osteogenic differentiation in vitro. *Calcif Tissue Int*. 2006 Feb;78(2):98–102.

101. Santos MT dos, Trindade DM, Gonçalves K de A, Bressan GC, Anastassopoulos F, Yunes JA, et al. Human stanniocalcin-1 interacts with nuclear and cytoplasmic proteins and acts as a SUMO E3 ligase. *Mol Biosyst.* 2011 Jan;7(1):180–93.
102. Nayak A, Viale-Bouroncle S, Morszeck C, Muller S. The SUMO-specific isopeptidase SENP3 regulates MLL1/MLL2 methyltransferase complexes and controls osteogenic differentiation. *Mol Cell.* 2014 Jul 3;55(1):47–58.
103. Chen X-D, Deng M, Zhou J-S, Xiao Y-Z, Zhou X-S, Zhang C-C, et al. Bone Morphogenetic Protein-2 regulates in vitro osteogenic differentiation of mouse adipose derived stem cells. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2015;19(11):2048–53.
104. Dragoo JL, Choi JY, Lieberman JR, Huang J, Zuk PA, Zhang J, et al. Bone induction by BMP-2 transduced stem cells derived from human fat. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc.* 2003 Jul;21(4):622–9.
105. Lee SY, Lee JH, Kim JY, Bae YC, Suh KT, Jung JS. BMP2 increases adipogenic differentiation in the presence of dexamethasone, which is inhibited by the treatment of TNF- α in human adipose tissue-derived stromal cells. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol.* 2014;34(4):1339–50.
106. Liu Q, Cen L, Zhou H, Yin S, Liu G, Liu W, et al. The role of the extracellular signal-related kinase signaling pathway in osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells and in adipogenic transition initiated by dexamethasone. *Tissue Eng Part A.* 2009 Nov;15(11):3487–97.
107. Qing W, Guang-Xing C, Lin G, Liu Y. The Osteogenic Study of Tissue Engineering Bone with BMP2 and BMP7 Gene-Modified Rat Adipose-Derived Stem Cell. *BioMed Res Int [Internet].* 2012 Jun 21 [cited 2017 Apr 19];2012. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2012/410879/abs/>
108. Rosen ED, Walkey CJ, Puigserver P, Spiegelman BM. Transcriptional regulation of adipogenesis. *Genes Dev.* 2000 Jun 1;14(11):1293–307.
109. Jaiswal RK, Jaiswal N, Bruder SP, Mbalaviele G, Marshak DR, Pittenger MF. Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is

- regulated by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*. 2000 Mar 31;275(13):9645–52.
110. Wen X, Nie X, Zhang L, Liu L, Deng M. Adipose tissue-deprived stem cells acquire cementoblast features treated with dental follicle cell conditioned medium containing dentin non-collagenous proteins in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Jun 10;409(3):583–9.
111. Li H-X, Luo X, Liu R-X, Yang Y-J, Yang G-S. Roles of Wnt/beta-catenin signaling in adipogenic differentiation potential of adipose-derived mesenchymal stem cells. *Mol Cell Endocrinol*. 2008 Sep 10;291(1-2):116–24.
112. Lu H, Li X, Mu P, Qian B, Jiang W, Zeng L. Dickkopf-1 promotes the differentiation and adipocytokines secretion via canonical Wnt signaling pathway in primary cultured human preadipocytes. *Obes Res Clin Pract*. 2016 Aug;10(4):454–64.
113. Lemaitre M, Monsarrat P, Blasco-Baque V, Loubières P, Burcelin R, Casteilla L, et al. Periodontal Tissue Regeneration Using Syngeneic Adipose-Derived Stromal Cells in a Mouse Model. *Stem Cells Transl Med*. 2017 Feb;6(2):656–65.
114. Tobita M, Uysal AC, Ogawa R, Hyakusoku H, Mizuno H. Periodontal tissue regeneration with adipose-derived stem cells. *Tissue Eng Part A*. 2008 Jun;14(6):945–53.
115. Im G-I. Bone marrow-derived stem/stromal cells and adipose tissue-derived stem/stromal cells: Their comparative efficacies and synergistic effects. *J Biomed Mater Res A [Internet]*. 2017 Apr 1 [cited 2017 Apr 26]; Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jbm.a.36089/abstract>
116. Bionaz M, Monaco E, Wheeler MB. Transcription Adaptation during In Vitro Adipogenesis and Osteogenesis of Porcine Mesenchymal Stem Cells: Dynamics of Pathways, Biological Processes, Up-Stream Regulators, and Gene Networks. *PloS One*. 2015;10(9):e0137644.
117. Morszeck C. Molecular mechanisms in dental follicle precursor cells during the osteogenic differentiation. *Histol Histopathol*. 2015 Oct;30(10):1161–9.

118. Viale-Bouroncle S, Klingelhöffer C, Ettl T, Reichert TE, Morszeck C. A protein kinase A (PKA)/ β -catenin pathway sustains the BMP2/DLX3-induced osteogenic differentiation in dental follicle cells (DFCs). *Cell Signal*. 2014 Dec 19;
119. Farley JR, Baylink DJ. Skeletal alkaline phosphatase activity as a bone formation index in vitro. *Metabolism*. 1986 Jun;35(6):563–71.
120. Thompson RQ, Barone GC, Halsall HB, Heineman WR. Comparison of methods for following alkaline phosphatase catalysis: spectrophotometric versus amperometric detection. *Anal Biochem*. 1991 Jan;192(1):90–5.
121. Meyer-Arendt J. [Comments on E. Rottmann's article on deviations of Lambert-Beer's law in the spectrophotometry]. *Acta Histochem*. 1954;1(3):95–6.
122. Heath OVS. *Physiologie der Photosynthese*. Stuttgart: Thieme; 1972. 314 p.
123. Rotman B, Zderic JA, Edelstein M. Fluorogenic substrates for beta-D-galactosidases and phosphatases derived from fluorescein (3,6-dihydroxyfluoran) and its monomethylether. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1963 Jul;50:1–6.
124. Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D. *Der Experimentator: Immunologie*. 4., vollständig überarbeitete und korrigierte Auflage. Berlin Heidelberg: Springer Spektrum; 2014. 299 p. (Der Experimentator).
125. Meister E. *Grundpraktikum Physikalische Chemie: Theorie und Experimente*. vdf Hochschulverlag AG; 2006. 493 p.
126. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 1985 Oct;150(1):76–85.
127. Gornall AG, Bardawill CJ, David MM. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem*. 1949 Feb;177(2):751–66.
128. 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 Dec;25(4):402–8.

129. Kuru L, Griffiths GS, Petrie A, Olsen I. Alkaline phosphatase activity is upregulated in regenerating human periodontal cells. *J Periodontal Res.* 1999 Feb;34(2):123–7.
130. Abzhanov A, Rodda SJ, McMahon AP, Tabin CJ. Regulation of skeletogenic differentiation in cranial dermal bone. *Dev Camb Engl.* 2007 Sep;134(17):3133–44.
131. Ram VS, Parthiban, Sudhakar U, Mithradas N, Prabhakar R. Bonebiomarkers in Periodontal Disease: A Review Article. *J Clin Diagn Res JCDR.* 2015 Jan;9(1):ZE07–10.
132. Sugawara Y, Suzuki K, Koshikawa M, Ando M, Iida J. Necessity of enzymatic activity of alkaline phosphatase for mineralization of osteoblastic cells. *Jpn J Pharmacol.* 2002 Mar;88(3):262–9.
133. Gaur T, Lengner CJ, Hovhannisyan H, Bhat RA, Bodine PVN, Komm BS, et al. Canonical WNT Signaling Promotes Osteogenesis by Directly Stimulating Runx2 Gene Expression. *J Biol Chem.* 2005 Sep 30;280(39):33132–40.
134. Hassan MQ, Tare RS, Lee SH, Mandeville M, Morasso MI, Javed A, et al. BMP2 commitment to the osteogenic lineage involves activation of Runx2 by DLX3 and a homeodomain transcriptional network. *J Biol Chem.* 2006 Dec 29;281(52):40515–26.
135. Hoz L, Romo E, Zeichner-David M, Sanz M, Nuñez J, Gaitán L, et al. Cementum protein 1 (CEMP1) induces differentiation by human periodontal ligament cells under three-dimensional culture conditions. *Cell Biol Int.* 2012 Feb;36(2):129–36.
136. Camilleri S, McDonald F. Runx2 and dental development. *Eur J Oral Sci.* 2006 Oct;114(5):361–73.
137. Piłkuła M, Marek-Trzonkowska N, Wardowska A, Renkielska A, Trzonkowski P. Adipose tissue-derived stem cells in clinical applications. *Expert Opin Biol Ther.* 2013 Oct;13(10):1357–70.
138. Sen A, Lea-Currie YR, Sujkowska D, Franklin DM, Wilkison WO, Halvorsen YD, et al. Adipogenic potential of human adipose derived stromal cells from multiple donors is heterogeneous. *J Cell Biochem.* 2001 Mar 26;81(2):312–9.

139. Varma MJO, Breuls RGM, Schouten TE, Jurgens WJFM, Bontkes HJ, Schuurhuis GJ, et al. Phenotypical and functional characterization of freshly isolated adipose tissue-derived stem cells. *Stem Cells Dev.* 2007 Feb;16(1):91–104.
140. Grottkau BE, Lin Y. Osteogenesis of Adipose-Derived Stem Cells. *Bone Res.* 2013 Jun;1(2):133–45.
141. Xiaoxiao Cai. Osteogenesis of Adipose-Derived Stem Cells. In: Xiaoxia Su, editor. *Osteogenesis* [Internet]. Rijeka: IntechOpen; 2012 [cited 2018 Dec 7]. p. Ch. 6. Available from: <https://doi.org/10.5772/34025>
142. Morszeck C, Reck A, Reichert TE. WNT3A and the induction of the osteogenic differentiation in adipose tissue derived mesenchymal stem cells. *Tissue Cell* [Internet]. 2017 May [cited 2017 Jun 4]; Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0040816617300617>
143. McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Mitchell JB, Floyd ZE, Hammill L, et al. The immunogenicity of human adipose-derived cells: temporal changes in vitro. *Stem Cells Dayt Ohio.* 2006 May;24(5):1246–53.
144. Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Floyd ZE, Kloster A, et al. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells Dayt Ohio.* 2006 Feb;24(2):376–85.
145. Dmitrieva RI, Minullina IR, Bilibina AA, Tarasova OV, Anisimov SV, Zaritsky AY. Bone marrow- and subcutaneous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: differences and similarities. *Cell Cycle Georget Tex.* 2012 Jan 15;11(2):377–83.
146. Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz AJ, March KL, et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy.* 2013 Jun;15(6):641–8.
147. Levi B, Wan DC, Glotzbach JP, Hyun J, Januszyk M, Montoro D, et al. CD105 protein depletion enhances human adipose-derived stromal cell osteogenesis through reduction

- of transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) signaling. *J Biol Chem*. 2011 Nov 11;286(45):39497–509.
148. Im G-I, Shin Y-W, Lee K-B. Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? *Osteoarthritis Cartilage*. 2005 Oct;13(10):845–53.
149. Shafiee A, Seyedjafari E, Soleimani M, Ahmadbeigi N, Dinarvand P, Ghaemi N. A comparison between osteogenic differentiation of human unrestricted somatic stem cells and mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. *Biotechnol Lett*. 2011 Jun;33(6):1257–64.
150. Vishnubalaji R, Al-Nbaheen M, Kadalmani B, Aldahmash A, Ramesh T. Comparative investigation of the differentiation capability of bone-marrow- and adipose-derived mesenchymal stem cells by qualitative and quantitative analysis. *Cell Tissue Res*. 2012 Feb;347(2):419–27.
151. Strioga M, Viswanathan S, Darinkas A, Slaby O, Michalek J. Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. *Stem Cells Dev*. 2012 Sep 20;21(14):2724–52.
152. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells Dayt Ohio*. 2006 May;24(5):1294–301.
153. Varghese J, Griffin M, Mosahebi A, Butler P. Systematic review of patient factors affecting adipose stem cell viability and function: implications for regenerative therapy. *Stem Cell Res Ther*. 2017 Feb 28;8(1):45.
154. Chen H-T, Lee M-J, Chen C-H, Chuang S-C, Chang L-F, Ho M-L, et al. Proliferation and differentiation potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells isolated from elderly patients with osteoporotic fractures. *J Cell Mol Med*. 2012 Mar;16(3):582–93.
155. Morsczeck C, Gresser J, Ettl T. The induction of cellular senescence in dental follicle cells inhibits the osteogenic differentiation. *Mol Cell Biochem*. 2016 Jun;417(1-2):1–6.

156. Shi Y-Y, Nacamuli RP, Salim A, Longaker MT. The osteogenic potential of adipose-derived mesenchymal cells is maintained with aging. *Plast Reconstr Surg*. 2005 Nov;116(6):1686–96.
157. Wu W, Niklason L, Steinbacher DM. The effect of age on human adipose-derived stem cells. *Plast Reconstr Surg*. 2013 Jan;131(1):27–37.
158. Nakamura A, Dohi Y, Akahane M, Ohgushi H, Nakajima H, Funaoka H, et al. Osteocalcin secretion as an early marker of in vitro osteogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part C Methods*. 2009 Jun;15(2):169–80.
159. Wang L, Li Z, Wang Y, Wu Z, Yu B. Dynamic Expression Profiles of Marker Genes in Osteogenic Differentiation of Human Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells. *Chin Med Sci J Chung-Kuo Hsueh Ko Hsueh Tsa Chih*. 2015 Jun;30(2):108–13.
160. Dragoo JL, Lieberman JR, Lee RS, Deugarte DA, Lee Y, Zuk PA, et al. Tissue-engineered bone from BMP-2-transduced stem cells derived from human fat. *Plast Reconstr Surg*. 2005 May;115(6):1665–73.
161. Cruz ACC, Silva ML, Caon T, Simões CMO. Addition of bone morphogenetic protein type 2 to ascorbate and β -glycerophosphate supplementation did not enhance osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. *J Appl Oral Sci Rev FOB*. 2012 Dec;20(6):628–35.
162. Alden TD, Beres EJ, Laurent JS, Engh JA, Das S, London SD, et al. The use of bone morphogenetic protein gene therapy in craniofacial bone repair. *J Craniofac Surg*. 2000 Jan;11(1):24–30.
163. Zhao X, Liang M, Li X, Qiu X, Cui L. Identification of key genes and pathways associated with osteogenic differentiation of adipose stem cells. *J Cell Physiol*. 2018 Aug 5;
164. Baron R, Kneissel M. WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nat Med*. 2013 Feb;19(2):179–92.
165. de Boer J, Siddappa R, Gaspar C, van Apeldoorn A, Fodde R, van Blitterswijk C. Wnt signaling inhibits osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Bone*. 2004 May;34(5):818–26.

166. Santos A, Bakker AD, de Bleeck-Hogervorst JMA, Klein-Nulend J. WNT5A induces osteogenic differentiation of human adipose stem cells via rho-associated kinase ROCK. *Cytotherapy*. 2010 Nov;12(7):924–32.
167. Kalinina N, Kharlampieva D, Loguinova M, Butenko I, Pobeguts O, Efimenko A, et al. Characterization of secretomes provides evidence for adipose-derived mesenchymal stromal cells subtypes. *Stem Cell Res Ther*. 2015 Nov 11;6:221.
168. Friedman MS, Oyserman SM, Hankenson KD. Wnt11 promotes osteoblast maturation and mineralization through R-spondin 2. *J Biol Chem*. 2009 May 22;284(21):14117–25.
169. Sharma AR, Choi B-S, Park J-M, Lee D-H, Lee J-E, Kim H-S, et al. Rspo 1 promotes osteoblast differentiation via Wnt signaling pathway. *Indian J Biochem Biophys*. 2013 Feb;50(1):19–25.
170. Zhang M, Zhang P, Liu Y, Lv L, Zhang X, Liu H, et al. RSPO3-LGR4 Regulates Osteogenic Differentiation Of Human Adipose-Derived Stem Cells Via ERK/FGF Signalling. *Sci Rep*. 2017 21;7:42841.
171. Cho HH, Kim YJ, Kim SJ, Kim JH, Bae YC, Ba B, et al. Endogenous Wnt signaling promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation in human adipose derived stromal cells. *Tissue Eng*. 2006 Jan;12(1):111–21.

8. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wäre ohne den Rat und die Unterstützung anderer nicht möglich gewesen. Zuerst möchte ich Herrn Prof. Dr. Christian Morszeck für die Möglichkeit danken, in der Abteilung für Mund- Kiefer und Gesichtschirurgie an der Universität Regensburg zu forschen. Ihm gilt mein herzlicher Dank für die Bereitstellung des Themas der vorliegenden Dissertation, sowie für die stetige Begleitung und Unterstützung bei der Bearbeitung. Die zahlreichen Diskussionen waren sehr bereichernd, nicht nur im Zusammenhang mit dieser Arbeit, sondern auch für meine persönliche Weiterentwicklung.

Für die freundliche Bereitstellung der Labore inklusive Gerätschaften und Materialien, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre, bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Christian Morszeck und Herrn Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert. Zudem wurde mir Dank Ihrer ermöglicht, auf dem Congress on Regenerative Medicine 2016 in Leipzig einen Teil dieser Arbeit vorzustellen.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Anja Reck, die mich geduldig in die experimentelle Forschung eingearbeitet hat und mir jederzeit bei fachlichen und technischen Fragestellungen zur Seite stand.

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

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern, Josef und Gertrud, meinem Bruder Josef, meinem Partner Thomas, sowie meinen Freunden, insbesondere Dr. Nikolaus Schmitt und Lena Krottenthaler bedanken, dass sie immer an meiner Seite standen und es mir durch ihre Unterstützung ermöglicht haben, die vorliegende Dissertation zu erstellen.

Vielen Dank!