

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR ORTHOPÄDIE
PROF. DR. H. C. JOACHIM GRIFKA
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

MOLEKULARE CHARAKTERISIERUNG KIEFERBILDENDER PERIOSTZELLEN:
EINFLUSS UND EXPRESSION VERSCHIEDENER LAMININ-ISOFORMEN

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Kora Langedger

2020

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR ORTHOPÄDIE
PROF. DR. H. C. JOACHIM GRIFKA
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

MOLEKULARE CHARAKTERISIERUNG KIEFERBILDENDER PERIOSTZELLEN:
EINFLUSS UND EXPRESSION VERSCHIEDENER LAMININ-ISOFORMEN

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Kora Langedger

2020

Dekan:	Prof. Dr. Dirk Hellwig
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Susanne Grässel
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Wilhelm K. Aicher
Tag der mündlichen Prüfung:	31.07.2020

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	iii
Abbildungsverzeichnis.....	v
Tabellenverzeichnis.....	vi
1 Einleitung	1
1.1 Knochenersatzmaterial.....	1
1.2 Knochengerüste.....	2
1.3 Das Parodontium.....	2
1.4 Stammzellen.....	4
1.5 MSCs.....	5
1.6 JPCs.....	7
1.7 ECM.....	8
1.8 Laminine.....	9
1.9 Ziel der Arbeit.....	11
2 Material	12
2.1 Zelltypen.....	12
2.2 Proteine.....	12
2.3 Antikörper.....	13
2.4 Primer.....	14
2.5 Reagenzien und Lösungen.....	16
2.6 Geräte.....	18
3 Methoden	19
3.1 Verwendete Zellen, immortalisierte Zelllinien und Medien.....	19
3.2 Zellen auftauen.....	20
3.3 Zellen passagieren.....	20
3.4 iPS-Zellen passagieren.....	21
3.5 Zellen einfrieren.....	21
3.6 Zellzahl bestimmen.....	22
3.7 Chamber Slides.....	22
3.8 Immunfluoreszenzfärbung.....	23
3.9 RT-PCR.....	24
3.9.1 RNA-Extraktion mittels RNeasy Kit von Qiagen.....	24
3.9.2 Umschreiben von RNA in cDNA.....	24

3.9.3	Amplifikationseffizienz der Primerpaare	25
3.9.4	Quantitative RT- PCR.....	26
3.10	Zelladhäsionsassay	26
3.11	Zellmigrationsassay	27
3.12	Zellproliferationsassay	28
3.13	Gelelektrophorese der PCR Amplifikate.....	29
3.14	Tris-Azetat-Gel.....	29
3.15	Silberfärbung nach Shevchenko.....	30
4	Ergebnisse	32
4.1	Expression von Lamininen in mesenchymalen Stammzellen.....	32
4.1.1	Quantitative RT-PCR.....	32
4.1.2	Immunfluoreszenz	35
4.1.3	Übereinstimmung und Diskrepanzen	37
4.2	Funktionsanalysen mit unterschiedlichen Laminin-Isoformen	38
4.2.1	Rekombinante Laminine	38
4.2.2	Adhäsionsassay.....	38
4.2.3	Migrationsassay.....	43
4.2.4	Proliferationsassay	45
5	Diskussion	47
5.1	Gen-Expression	47
5.2	Laminine	48
5.3	Funktionsassays.....	49
5.4	Zelltypen	50
5.5	Aussicht	51
6	Zusammenfassung	52
	Literaturverzeichnis	53
	Anhang	59
	Erklärung zum Eigenanteil.....	
	Danksagung	

Abkürzungsverzeichnis

AdSCs	adipose-derived mesenchymal stem cells
BM	Basalmembran
bmMSCs	bone marrow mesenchymal stem cells
bp	Basenpaar/e
BSA	bovine serum albumin
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA, komplementäre DNA
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DFSCs	dental follicle cells
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleid acid, Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	deoxyribose nucleoside triphosphate
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
DPSCs	dental pulp stem cells
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
FCS	Fetales Kälberserum
FFP	fresh frozen plasma
FSCs	follicle stem cells
G418	Gentamycin
h	Stunde/n
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HLA	human leukocyte antigen
HSCs	hematopoietic stem cells
IgG	Immunglobulin G
iPSCs	induced pluripotent stem cells
ISCT	International Society for Cellular Therapy
JPCs	jaw periosteal cells
Lm	Laminin
mA	Milliampere
MACS	magnetic cell separation

MEM	minimum essential medium
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
mM	Millimol
MSCs	mesenchymale Stammzellen
MSCA	mesenchymal stem cell antigen
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NSCs	neural stem cells
PCR	polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PDLs	parodontal ligament cells
Pen/Strep	Penicillin und Streptomycin
RNA	ribonucleid acid, Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SCAP	stem cells from apical papilla
SDS-PAGE	Sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SV40	Simian virus 40
SHED	stem cells isolated from human pulp of exfoliated deciduous teeth
UV	Ultraviolett
V	Volt
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
°C	Grad Celsius

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Querschnitt eines Zahnes und der Alveole.....	3
Abbildung 2: Hierarchie von Stammzellen.....	5
Abbildung 3: Multiples Differenzierungspotential von MSCs	7
Abbildung 4: Struktur verschiedener Laminin-Isoformen.....	10
Abbildung 5: Umwandlung von WST-1 in Formazan.....	28
Abbildung 6: Gelelektrophorese nach RT-PCR.....	33
Abbildung 7: RT-PCR Ergebnisse in der Übersicht.....	34
Abbildung 8: Immunfluoreszenzfärbung	36
Abbildung 9: Silberfärbung der verwendeten rekombinanten Laminine	38
Abbildung 10: Adhäsion der iMSC#3 Zellen an Laminin-Isoformen	39
Abbildung 11: Adhäsion der MSC PKR Zellen an Laminin-Isoformen	39
Abbildung 12: Adhäsion der JPC Zellen an Laminin-Isoformen	40
Abbildung 13: Adhäsion der TAg58 Zellen an Laminin-Isoformen.	40
Abbildung 14: Adhäsion der iPSCs-Zellen an Laminin-Isoformen.....	41
Abbildung 15: Adhäsion von TAg58 an Lm-421.	42
Abbildung 16: Konzentrationsabhängige Bindung an Laminin-332.....	43
Abbildung 17: Migrationsassay mit JPCs	44
Abbildung 18: Migrationsassay mit iMSC#3	45
Abbildung 19: Proliferation Übersicht	46
Abbildung 20: RT- PCR MSC KER.....	59
Abbildung 21: RT-PCR MSC PKR.....	59
Abbildung 22: RT-PCR JPC	60
Abbildung 23: RT-PCR TAg58	60
Abbildung 24: RT-PCR iMSC#3	61
Abbildung 25: RT-PCR iPSC	61

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste der verwendeten Zelllinien	12
Tabelle 2: Liste der rekombinanten humanen Proteine	12
Tabelle 3: Liste der Antikörper.....	13
Tabelle 4: Primerpaare für Laminine	14
Tabelle 5: Liste der Reagenzien und Lösungen	16
Tabelle 6: Liste der verwendeten Geräte	18
Tabelle 7: Übersicht der Ergebnisse der qRT-PCR und Immunfluoreszenzfärbung.	37
Tabelle 8: Übersicht variabler Adhäsionsergebnisse.	42

1 Einleitung

Stammzellen mit osteogenem Potential sind für eine erfolgreiche Geweberegeneration des Knochens von großer Bedeutung (Zhu et al. 2006). „*Jaw periosteal stem cells*“ (JPCs) sind kieferbildende Stammzellen, die aus dem Periost des Kiefers isoliert werden und eine vielversprechende Quelle für die Knochenregeneration in der Oral- und Kieferchirurgie darstellen (Wanner et al. 2017). Knochendefekte in der Mundhöhle können sich stark im Ausmaß und der Ursache unterscheiden. Lokaler Alveolarknochenverlust durch Parodontitis, bis hin zur ausgedehnten Knochenatrophie aufgrund verschiedener Syndrome, sowie Traumata oder Tumore, die mit Knochenresorption einhergehen, führen zum irreversiblen Verlust des Knochengewebes (Janssen et al. 2014). Die daraus resultierende eingeschränkte Kaufunktion, der nachfolgende Sprachverlust und die ästhetische Entstellung bedeuten eine erhebliche Einschränkung der Lebensqualität. Die Geweberegeneration mit Hilfe von Knochenersatzmaterial stellt bei großen Knochendefekten eine enorme Herausforderung dar, vor allem die Sicherstellung der Vaskularisierung bis ins Innere des Gewebes (Kaigler et al. 2010, Fernandez de Grado et al. 2018). Eine therapeutische Alternative sind deshalb isolierte JPCs, sofern eine ausreichende Verfügbarkeit gewährleistet ist.

1.1 Knochenersatzmaterial

Es gibt sowohl biologisch als auch synthetisch gewonnene Knochenersatzmaterialien. Dabei gelten hohe Ansprüche an das Ersatzmaterial. Es muss biokompatibel und biologisch resorbierbar sein, sowohl osteokonduktiv als auch osteoinduktiv wirken und der Struktur des echten Knochens entsprechen, d.h. Porosität und eine hohe mechanische Belastbarkeit aufweisen (Faour et al. 2011). Somit stellt der autologe Knochen den Goldstandard dar, mit dem weiteren Vorteil, dass er immunologisch kompatibel ist und keine Krankheiten übertragen kann (Campana et al. 2014). Jedoch bringt die Verwendung von autologem Knochen eine Komorbidität mit sich, da ein zusätzlicher Eingriff vorgenommen werden muss. Dies birgt ein weiteres Risiko der Anästhesie, einer Infektion und chronischer Schmerzen (Younger und Chapman 1989). Zudem ist autologer Knochen nur begrenzt verfügbar, und eine vollständige mandibuläre Rekonstruktion mit Gefühlswiederherstellung, Bezahnung,

Weichgewebe, Ästhetik und Funktion ist damit nur schwer möglich (Chancharonsook et al. 2014).

Deshalb werden große Hoffnungen in die orale Knochenregeneration mit Hilfe einer Stammzelltherapie gesetzt. Dabei werden autologe Stammzellen in ein Gerüst aus bioaktiven Substanzen gegeben, das je nach Defekt vorgeformt werden kann und somit *in vitro* autologen Knochen nachbildet.

1.2 Knochengerüste

Diese Gerüste dienen als eine Art Leitstruktur und bieten mechanische Unterstützung für die Migration, Proliferation und Aktivität der Zellen, indem eine extrazelluläre Struktur nachgeahmt wird. Die Oberflächenbeschaffenheit, -chemie, und -ladung ist von großer Bedeutung für die Interaktion der Zellen mit dem Gerüst. Die Porosität des Gerüsts fördert das Zellwachstum und die Vaskularisierung (Jones et al. 2007). Nach und nach kann somit das Gerüst abgebaut und durch Knochen ersetzt werden. Auch hier kann das Material sowohl biologisch als auch synthetisch hergestellt sein. Materialien, die aus Kalziumphosphat bestehen, werden am Häufigsten verwendet (Padial-Molina et al. 2014). Das 3-D-Drucken, das sogenannte „Bio-Printing“, ist ein neueres und vielversprechendes Verfahren zur Herstellung solcher Gerüste (Rios et al. 2011).

1.3 Das Parodontium

Als Parodontium wird der gesamte Zahnhalteapparat bezeichnet, der den Zahn im Knochen verankert. Es besteht aus zwei Weichgeweben (Gingiva und Parodontales Ligament) und zwei Hartgeweben (Zement und Alveolarknochen), welche durch ein enges Zusammenspiel ein komplexes, multifunktionelles Organ bilden (Ivanovski 2009). Die Entwicklung des Parodontium beginnt, sobald die Zellen des inneren und äußeren Zahnepithels der Halsschleife des Schmelzorgans proliferieren und somit eine Doppelschicht aus Zellen formen, die sogenannte Hertwig'sche Epithelscheide. Diese Schicht trennt die Zellen der Zahnpapille von den Follikelzellen. Die Papillenzellen differenzieren zu Odontoblasten, die das Wurzeldentin bilden. Zellen der Hertwig'schen Epithelscheide sezernieren Matrixproteine, die sich auf dem gebildeten Wurzeldentin ablagern. Durch Fragmente in der Hertwig'schen Epithelscheide können nun ektomesenchymale Zellen des Follikels an diese

Proteinschicht binden und differenzieren dadurch zu Zementoblasten, die von nun an das Zement der Zahnwurzel bilden (Slavkin et al. 1989, Hammarstrom et al. 1996). In das neugebildete Zement werden Kollagenfaserbündel des Kollagen Typ-I (Steiniger et al. 2010) eingebettet, die sog. „Sharpey Fasern“. Dieser Vorgang fördert die Bildung des parodontalen Ligaments durch Fibroblasten, die dem Zahnfollikel entstammen. Ebenso werden Osteoblasten aktiviert, die den Bündelknochen formen, also den Teil des Knochens, der das Zahnfach bildet. Durch das Einwachsen der Sharpey Fasern in den neugeformten Knochen wird der Verankerungskomplex des Zahnes abgeschlossen (Ten Cate 1975).

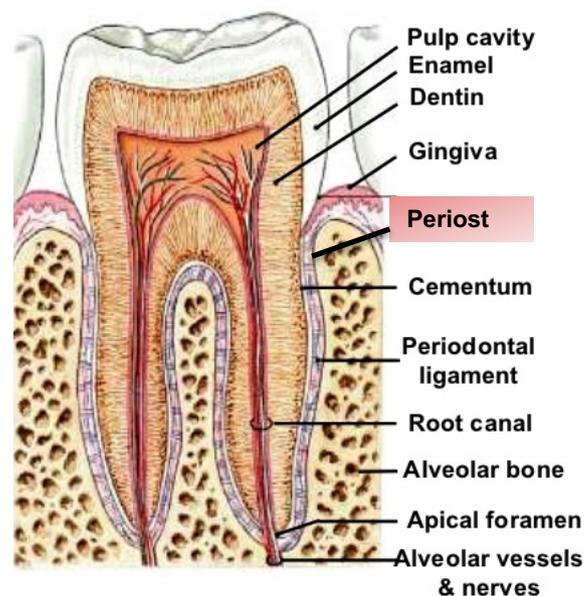


Abbildung 1: Querschnitt eines Zahnes und der Alveole. Lokalisation des Periosts.
Quelle: <https://www.slideshare.net/marisolvirola/periodontium-1183119>

Der Alveolarknochen, in dem der Zahn eingebettet ist, wird von einer Knochenhaut umgeben, dem Periost (s. Abb.1). Dieses ist sehr stark vaskularisiert und dient der Ernährung und Innervation des Knochens. Es lässt sich in drei Schichten einteilen. Die äußere zellarme Schicht, das *Stratum fibrosum*, enthält Kollagenfasern („Sharpey Fasern“), die in den Desmodontalspalt hineinziehen. Die mittlere Schicht besteht hauptsächlich aus Fibroblasten. Die innere, zellreiche Schicht, auch Cambiumschicht genannt, enthält zahlreiche Osteoblasten und Stamm- und Progenitorzellen (u.a. JPCs), die für die Regeneration des umliegenden Gewebes zuständig sind (Aumüller, 2014). Die Struktur des Periosts variiert mit dem Alter. Während bei Kindern das

Periost sehr dick und stark vaskularisiert ist und nur locker am Knochen befestigt, zeigt das dünnere, fest mit dem Knochen verwachsene Periost des Erwachsenen nur noch wenig Aktivität. Trotzdem finden sich auch hier noch Stammzellen, die in der Lage sind, in verschiedene Zelltypen zu differenzieren (Mahajan, 2012).

1.4 Stammzellen

Stammzellen sind Zellen, die sowohl die Fähigkeit zur Differenzierung als auch die Fähigkeit zur Selbsterneuerung besitzen (Smith 2006). Das größte Differenzierungsspektrum weist die totipotente Stammzelle auf, aus welcher die Entwicklung eines ganzen Menschen hervorgeht. Die embryonale Stammzelle ist pluripotent, kann Meso-, Endo- und Ektoderm bilden und besitzt somit die Fähigkeit, in fast alle Zelltypen zu differenzieren. Jedoch bildet sie kein extraembryonales Gewebe aus, was das Entwickeln eines vollständigen Individuums nicht möglich macht (Martin 1981). Als adulte, multipotente Stammzellen werden jene Zellen bezeichnet, die jede Zellen des Gewebes bilden können, in dem sie vorkommen. Diese Zellen weisen ein geringeres Differenzierungs- und Proliferationspotential als embryonale Stammzellen auf, sind jedoch leicht verfügbar, immunkompatibel und sind nicht mit ethischen Bedenken behaftet (Bongso et al. 2008, Lee et al. 2009). Je nach Keimblatt findet man unterschiedliche multipotente Stammzellen. Die „*follicle stem cells*“ (FSCs) kommen sowohl im Endo-, Ekto-, als auch im Mesoderm vor. „*neural stem cells*“ (NSCs) stammen aus dem Ektoderm, „*hematopoietic stem cells*“ (HSCs) und „*mesenchymal stem cells*“ aus dem Mesoderm. Die hämatopoetische Stammzelle ist bis heute die am besten und intensivsten untersuchte Stammzelle. „*Induced pluripotent stem cells*“ (iPSCs) sind induzierte pluripotente Stammzellen, die aus einer differenzierten Zelle zurück in ihre Vorläuferform einer pluripotenten Stammzelle geführt wurde (s. Abb.2).

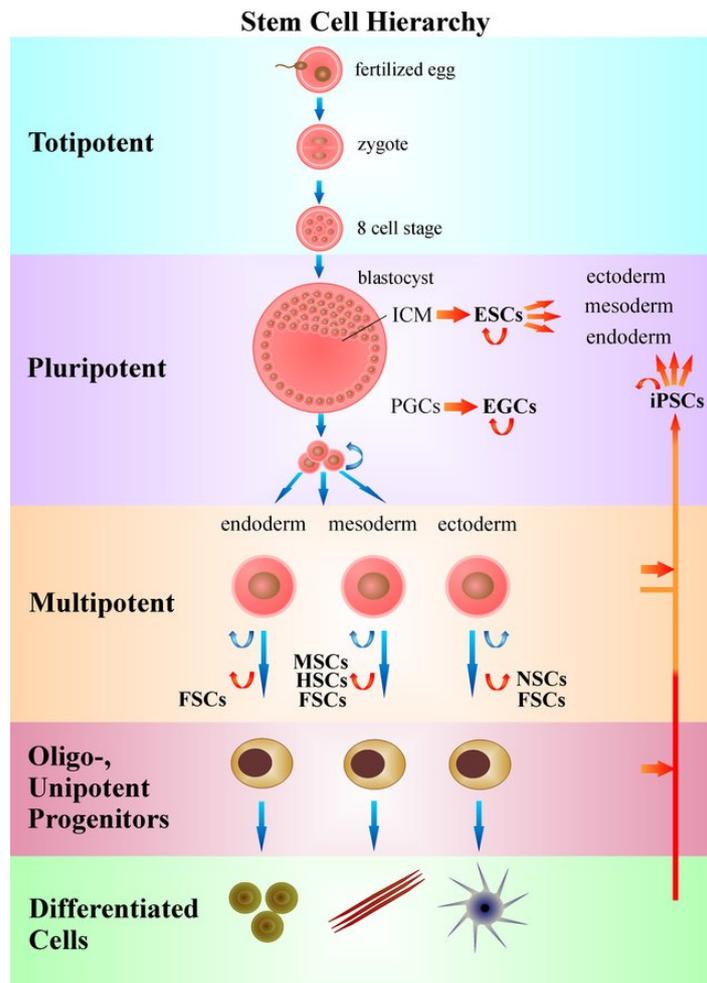


Abbildung 2: Hierarchie von Stammzellen (Forostyak et al. 2016); Zu sehen sind die verschiedenen Stadien von der befruchteten Eizelle bis hin zur einzelnen ausdifferenzierten Zelle. Das Differenzierungspotential der Zellen nimmt von der totipotenten Stammzelle zur differenzierten Zelle hin ab. **ICM**: Embryoblast; **PGC**: Urkeimzelle; **EGC**: Embryonale Keimzelle; **ESC**: Embryonale Stammzelle; **iPSC**: Induzierte pluripotente Stammzelle; **FSC**: Follikelstammzelle; **MSC**: mesenchymale Stammzelle; **HSC**: Hämatopoetische Stammzelle; **NSC**: Neurale Stammzelle

1.5 MSCs

Die mesenchymale Stammzelle (MSC) stammt aus dem Mesoderm und gehört zu den multipotenten Stammzellen. Die Abkürzung „MSC“ wird gleichbedeutend auch für Bezeichnungen „mesenchymale Stromazelle“ und „*medicinal signalling cell*“ verwendet (Caplan and Correa 2011). Sie ist überwiegend im Knochenmark zu finden („*bone marrow MSCs*“, bmMSCs), aber auch in Fettgewebe („*adipose-derived mesenchymal stem cells*“, AdSCs), der Lunge und den Zähnen (Shi et al. 2005). Die „*International Society for Cellular Therapy*“ (ISCT) hat Kriterien für die Definition von mesenchymalen Stammzellen festgelegt (Dominici et al. 2006). Danach muss eine mesenchymale Stammzelle eine Adhärenz zu Plastik aufweisen, ein multipotentes

Differenzierungspotential besitzen und eine Reihe von spezifischen Oberflächenproteinen exprimieren (z.B. CD73, CD90 und CD105). Gleichzeitig dürfen sie nicht CD45, CD34, CD14 oder CD11b, CD79a oder CD19 und HLA-DR produzieren (Padial-Molina et al. 2015, Han et al. 2014). Aufgrund ihres osteogenen, chondrogenen und adipogenen Differenzierungspotentials wurde die mesenchymale Stammzelle frühzeitig Inhalt und Hoffnung für regenerative Stammzelltherapien (Han et al. 2014). Obwohl sie eine kürzere Lebensspanne und ein geringeres Entwicklungspotential als embryonale Stammzellen aufweisen, gibt es für MSCs bisher keine Berichte darüber, *in vivo* spontan Tumore zu bilden, zudem gibt es bei klinischer Verwendung von MSCs kaum ethische Bedenken (Gronthos et al. 2003). Da mesenchymale Stammzellen heute noch hauptsächlich aus dem Knochenmark gewonnen werden und dies eine erschwerte Verfügbarkeit zur Folge hat, wurden als Alternative zahlreiche mesenchymale Stammzellpopulationen aus dem dentalen Bereich isoliert und charakterisiert (Zhai et al. 2019).

„*Jaw periosteal stem cells*“ sind mesenchymale Stammzellen, die aus dem Periost des Kiefers gewonnen werden können und ein hohes osteogenes Potential besitzen. „*Dental pulp stem cells*“ (DPSCs) sind Stammzellen aus der Pulpa, ebenso wie die „*stem cells isolated from human pulp of exfoliated deciduous teeth*“ (SHED), deren Pulpa jedoch aus herausgefallenen Milchzähnen gewonnen wird. Beide Stammzellpopulationen haben zum einen die Fähigkeit Knochen zu bilden, als auch in mesenchymale und nicht- mesenchymale Stammzellen zu differenzieren (Gronthos et al. 2000, Miura et al. 2003, Yasui et al. 2016). „*Stem cells from apical papilla*“ (SCAP) sind Stammzellen, die aus der apikalen Papille von Zähnen isoliert werden, die noch nicht vollständig ausgereift sind (Sonoyama et al. 2006). Durch ihr hohes Proliferations- und Mineralisierungspotential eignen sich diese Stammzellen für die Regeneration von Wurzel dentin (Han et al. 2010). Das Zahnfollikel, das in der Entwicklung den Zahnkeim umgibt, enthält Progenitorzellen („*dental follicle stem cells*“, DFSCs), die sowohl in periodontale Ligament Zellen als auch Osteoblasten differenzieren können (Luan et al. 2006). Damit stellen sie eine interessante Quelle für die Wurzelregeneration dar, vorausgesetzt die Differenzierung kann gezielt geleitet werden (Wu et al. 2008). Die erste Wahl stellen bisher jedoch die „*parodontal ligament cells*“ (PDLs) dar, Stammzellen aus dem parodontalen Ligament (Iwata et al. 2010). Sie können *in vitro* in Osteoblasten-ähnliche Zellen und Adipozyten differenzieren und Kollagen Typ I

synthetisieren (Seo et al. 2004). Sie sind von essentieller Bedeutung für die dynamische Balance und Defektrestitution in parodontalem Gewebe (Zhai et al. 2019). Leider hat diese Stammzellpopulation eine geringe Verfügbarkeit. Dies ist ein limitierender Faktor für die Verwendung dieser Zellen für die regenerative Stammzelltherapie, weswegen sie in der Klinik bisher kaum eingesetzt wurden (Padiá-Molina et al. 2015).

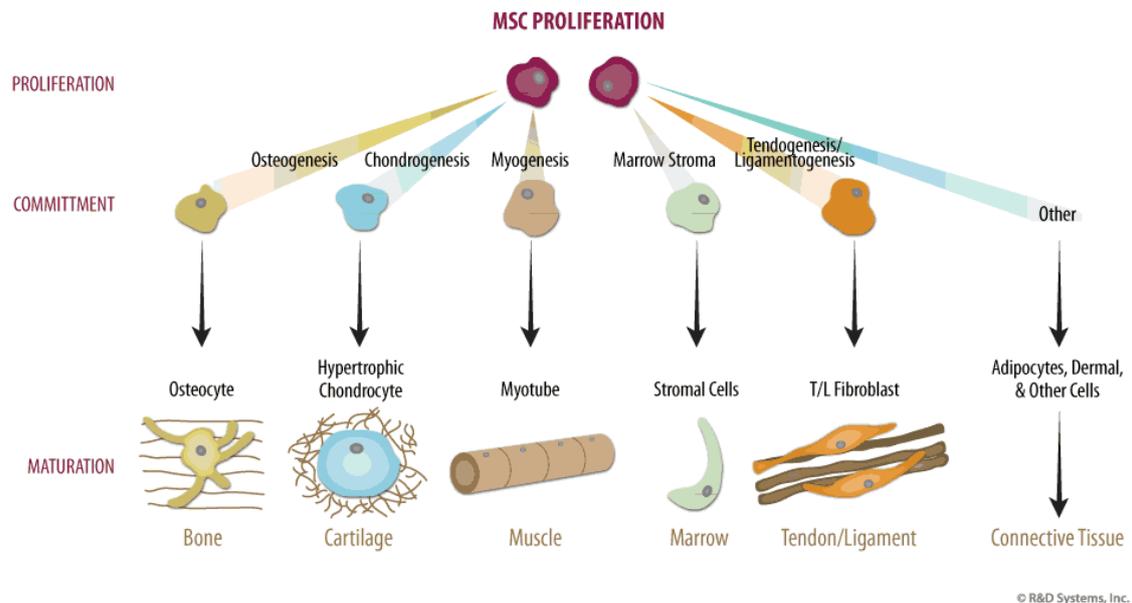


Abbildung 3: **Multiples Differenzierungspotential von MSCs** (Quelle: R&D Systems); Die MSCs differenzieren hauptsächlich in Osteozyten, Chondrozyten und Adipozyten. Bei *in vitro* Kultivierung sind weitere Differenzierungsschritte möglich. Ihr Potential *in vitro* direkt und nicht via iPSCs in quergestreifte Muskelzellen zu differenzieren (vgl. z.B. Dezawa et al. 2005, *Science* 309:314) wird aktuell jedoch sehr kritisch diskutiert.

1.6 JPCs

Das Kieferperiost enthält multipotente mesenchymale Stammzellen mit dem Potential, *in vitro* osteogen, adipogen, myogen und chondrogen zu differenzieren (De Bari et al. 2006). Das Periost besteht aus drei Schichten, wobei die „*jaw periosteal stem cells*“ (JPCs) in der inneren Schicht zu finden sind (Squier et al. 1990). Das Auftrennen der drei Schichten ist sehr schwierig, da das humane Kieferperiost lediglich eine geringe Schichtdicke aufweist. Das Periost, woraus JPCs isoliert werden können, wird während Routineeingriffen in der Kieferchirurgie mit dem Einverständnis der Patienten entnommen. Das Gewebe wird verdaut, kultiviert und die Osteoprogenitorzellen können mit einem MSCA-1 Antikörper markiert und anschließend mit Hilfe der MACS Technologie magnetisch herausgefiltert werden (Olbrich et al. 2012). Durch ihr

osteogenes und regeneratives Potential *in vivo* und die einfache Verfügbarkeit ohne einen zweiten Eingriff sind JPCs eine vielversprechende Quelle für die Regeneration des Kieferknochens. Nichtsdestotrotz stellen limitierte Zellzahlen, verringertes osteogenes Potential *in vitro* und langsames Wachstum in Kultur Hürden dar, die noch zu lösen sind (Umrath et al. 2019, Alexander et al. 2013).

1.7 ECM

Die extrazelluläre Matrix (ECM) beschreibt ein dreidimensionales, makromolekulares Netzwerk, das aus verschiedenen, azellulären Komponenten zusammengesetzt ist und den Interzellularraum ausfüllt. Die makromolekularen Komponenten der ECM sind hauptsächlich Kollagene, Proteoglykane, Elastin, Hyaluronan und verschiedene multiadhäsive Glykoproteine. Die genaue Zusammensetzung und Struktur der ECM richtet sich nach dem Gewebe, in dem sie vorkommt (Aumüller 2014). Kollagene bilden den größten Anteil der ECM (Theocharis et al. 2016). Elastin findet man v.a. in der Haut und in der Lunge und Hyaluronan im Glaskörper des Auges und im Knorpel. Proteoglykane wie z.B. Aggrecan setzen sich aus einem Kernprotein und anhaftenden Glykosaminoglykanketten zusammen und kommen hauptsächlich im Knorpel vor. Den Großteil der Glykoproteine bilden die Familien der Laminine, der Tenascine und das Fibronectin. Doch auch Nidogene und Fibuline sind Bestandteil der ECM. Insgesamt beinhaltet die ECM 1% des gesamten Proteoms des Körpers.

Die ECM hat großen Einfluss auf die Embryonalentwicklung, reguliert Zellfunktionen wie das Wachstum, die Migration und die Differenzierung und sichert durch Signalübertragung und Regulierung der Homöostase das Überleben der Zellen. Sie stellt Wachstumsfaktoren bereit und kann durch Barrierebildung verschiedene Gewebekompartimente trennen. Man kann hauptsächlich zwei Typen der ECM unterscheiden: die interstitielle und die perizelluläre Matrix (Theocharis et al. 2016). Eine spezielle Form der perizellulären Matrix bildet die Basalmembran (BM). Sie ist eine dünne, blattartige Struktur an der basalen Seite von Epithelien und umgibt Endothelien, Muskel- und Nervenzellen (Simon und Bromberg 2017). Sie ist aus zwei individuellen Netzwerken aufgebaut, bestehend aus Kollagen Typ IV und Lamininen. Die genaue Zusammensetzung ist gewebespezifisch. So werden einige Komponenten der BM von unterschiedlichen Zellen beigesteuert. Ihre Funktion besteht in der Trennung von Gewebekompartimenten und der Speicherung und Präsentation von

Wachstumsfaktoren und Chemokinen. Sie enthält spezifische, räumliche und molekulare Informationen und kontrolliert somit die Zellproliferation, -adhäsion, -wanderung und -differenzierung (Theocharis et al. 2016).

1.8 Laminine

Laminine sind eine Familie heterotrimerer Moleküle, die neben Fibronectin und der Tenascinfamilie eine große Gruppe der ECM-Glykoproteine bildet (Durbeej 2010). Sie sind hauptsächlich in der Basalmembran zu finden und bilden dort eines der zwei Netzwerke, aus der die BM besteht. Als Bindepartner für Integrine und andere Rezeptoren stellen Laminine ein wichtiges Ankerprotein dar, das die BM mit den Zellen verbindet (Aumüller 2014, Scharl et al. 2009). Jedes Laminin besteht aus einer α -, β - und γ - Kette, die kreuz- oder T- förmig angeordnet vorliegen (Abb. 4). Bisher wurden im humanen Organismus 5 α , 3 β und 3 γ Ketten charakterisiert. Daraus ergeben sich theoretisch 45 mögliche Isoformen mit unterschiedlichen Funktionen, von denen bisher 16 identifiziert und charakterisiert werden konnten. Die Zusammensetzung der Laminin-Isoformen aus den unterschiedlichen α -, β - und γ - Ketten bestimmt die Nomenklatur der Trimere. So besteht das Laminin-521 z.B. aus einer α 5, β 2 und γ 1 Kette (Aumailley et al. 2005) . Laminin-111, bestehend aus einer α 1, β 1 und γ 1 Kette ist die bisher am besten und intensivsten studierte Isoform (Durbeej 2010, Iorio et al. 2015). Jede Kette besteht aus verschiedenen Domänen mit spezifischer Funktion, die durch stabförmige Zwischenstücke separiert sind. Den langen, helixförmigen Arm eines Laminins, die sogenannte „coiled coil“ Domäne bilden alle 3 Ketten gemeinsam. Das C-terminale Ende besteht aus 5 homologen globulären Domänen der α - Kette. Dadurch ist die Funktion und Verteilung eines Laminins hauptsächlich, aber nicht ausschließlich, durch die variablen Expressionsformen der α -Ketten dominiert.

Laminin ist das erste synthetisierte ECM-Molekül während der Embryonalentwicklung, so kann es bereits im 2-Zell-Stadium detektiert werden (Cooper and Mac Queen 1983). Genetische Manipulation und Mutationen, die ein Ausbleiben bestimmter Lamininketten bewirken, führen zu schwerwiegenden Krankheiten oder zum Tode (Simon and Bromberg 2017). So bewirkt das Fehlen der Lm- α 4-Kette in Mäusen eine Hämorrhagie in der Embryonalentwicklung (Thyboll et al. 2002). Bleibt die Lm- α 5-Kette aus, so sterben die Mäuse bereits in der späten Embryogenese mit multiplen Fehlbildungen, wie Anenzephalie oder Syndaktylie (Miner et al. 1998).

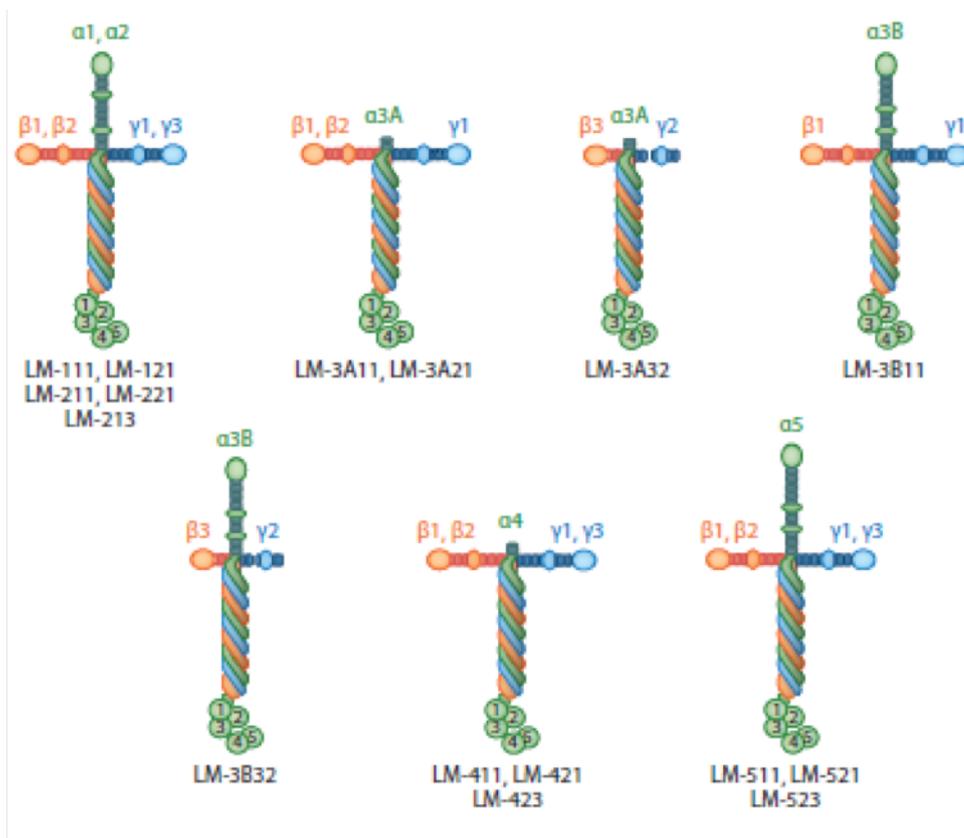


Abbildung 4: Struktur verschiedener Laminin-Isoformen (Abbildung entnommen aus: Domogatskaya et al. 2012). Die Zahlen hinter der Abkürzung „LM“ kennzeichnet die Zusammensetzung der einzelnen Isoformen aus α -, β - und γ - Ketten.

Laminine, v.a. die Isoformen Lm-511 und Lm-521 spielen eine essentielle Rolle bei der Selbsterneuerung embryonaler Stammzellen und induzierter pluripotenter Stammzellen (Domogatskaya et al. 2012). Diese zwei Isoformen scheinen die natürliche Laminin-Isoform der meisten adulten Stammzellen darzustellen (Domogatskaya et al. 2012). Lange galt die Familie der Laminine ausschließlich als Bestandteil der Basalmembran. Kvist und Mitarbeiter konnten aber auch bei Chondrozyten zeigen, dass diese ebenfalls Basalmembrankomponenten wie Laminine synthetisieren können und spekulierten deshalb, dass auch Chondrozyten ein funktionelles Äquivalent zu einer Basalmembran bilden können (Kvist et al. 2008). Später konnten Seeger et al. erstmals die Expression von Lamininen bei MSCs zeigen (Seeger et al. 2015), die selbst keine Basalmembran ausbilden (Sillat et al. 2012). Die Funktion dieser exprimierten Laminine ist bisher noch unklar.

1.9 Ziel der Arbeit

Laminine sind essentiell für verschiedene physiologische Vorgänge und spielen eine große Rolle in unterschiedlichen Geweben. Da mesenchymale Stammzellen jedoch keine Basalmembran ausbilden, wurde dem Einfluss der Laminine auf diese Zellen bisher keine Bedeutung zugesprochen. Neuerdings konnte jedoch gezeigt werden, dass Laminine Einfluss auf die Migration und Adhäsion der bmMSCs haben (Seeger et al. 2015). In der vorliegenden Arbeit sollte nun analysiert werden, ob Laminine die Migration, Adhäsion und Proliferation der JPCs beeinflussen können und ob diese Zellen selbst die Fähigkeit haben, Laminine zu produzieren und freizusetzen. Ein Kenntnis darüber könnte dazu beitragen, bestehende Probleme der *in vitro* Kultivierung der JPCs zu beheben, oder auch für *in vivo* Anwendungen relevant zu werden.

2 Material

2.1 Zelltypen

Tabelle 1: Liste der verwendeten Zelllinien

Zelltyp	Bereitgestellt von
iMSC#3 (immortalisierte Zelllinie aus mesenchymalen Stromazellen des Knochenmarkes; Skårn et al. 2014)	Prof. Dr. Ola Myklebost, Universität Bergen, Norwegen
TAg58 (immortalisierte Zelllinie aus mesenchymalen Stromazellen des Kieferknochens; Alexander et al. 2015)	Prof. Dr. Dorothea Alexander, Zahnklinik Universität Tübingen
JPCs (primäre mesenchymale Stromazellen des Kieferknochens)	Prof. Dr. Dorothea Alexander, Zahnklinik Universität Tübingen
iPSCs (induzierte pluripotente Stammzellen, reprogrammiert aus primären mesenchymalen Stromazellen des Kieferknochens)	Prof. Dr. Dorothea Alexander, Zahnklinik Universität Tübingen
bmMSCs (primäre mesenchymale Stromazellen des Knochenmarkes)	Prof. Dr. Wilhelm K. Aicher, Klinik für Urologie, Universität Tübingen

2.2 Proteine

Tabelle 2: Liste der rekombinanten humanen Proteine

Laminin	Hersteller
Laminin 111 0.10 mg / ml	BioLamina, Sundbyberg, Schweden
Laminin 121 0.10 mg / ml	BioLamina, Sundbyberg, Schweden
Laminin 211 0.10 mg / ml	BioLamina, Sundbyberg, Schweden
Laminin 332 0.10 mg / ml	BioLamina, Sundbyberg, Schweden
Laminin 411 0.10 mg / ml	BioLamina, Sundbyberg, Schweden
Laminin 421 0.10 mg / ml	BioLamina, Sundbyberg, Schweden
Laminin 511 0.10 mg / ml	BioLamina, Sundbyberg, Schweden
Laminin 521 0.10 mg / ml	BioLamina, Sundbyberg, Schweden

2.3 Antikörper

Tabelle 3: Liste der Antikörper

Antikörper	Hersteller
goat-anti-rabbit IgG - Alexa Fluor488	Jackson Immuno Research Laboratories Dianova, Hamburg
goat-anti-mouse IgG (H+L) - Cy3 (Cyanine)	Jackson Immuno Research Laboratories Dianova, Hamburg
LM, anti- α 1-chain, mouse-anti-human, Clone # EB7	Prof. Dr. Ismo Virtanen, Universität Helsinki, Finnland
LM, anti- α 2-chain, rabbit- anti-human	Bioss, Freiburg im Breisgau
LM, anti- α 3-chain, mouse anti-human, Clone # P3H9-2	R&D Systems, Bio-techne GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt
LM, anti- α 4-chain, mouse-anti-human, Clone # 3H2	Dr. Sulev Ingerpuu, Universität Tartu, Estland
LM, anti- α 5-chain, mouse-anti-human, Clone # 4B12	Dr. Sulev Ingerpuu, Universität Tartu, Estland

2.4 Primer

Alle 'Forward'- und 'Reverse'-Primer wurden von Eurofins Genomics (Ebersberg) bezogen und lagen in einer Stammlösung von jeweils 100 pmol / μ l vor. In der Tabelle sind die NCBI-Zugangsnummern, die Primer-Sequenzen, die jeweiligen Bindungsstellen sowie die Größe des zu erwartenden PCR-Produkts angegeben.

Tabelle 4: Primerpaare für Laminine

Primerpaare für Laminine. Referenz: Siler et al. 2000.

LM	EMBL Zugangs-Nr.	Primer-Sequenz 5' → 3'	Bindungs- stellen	Produkt- größe
α 1	X58531	for: TGC AGA GCC GTT TTA CTG G rev: TGC TGT AAT CCT TGA CCA TAC G	3733- 3751 4089- 4068	357 bp
α 2	Z26653	for: CAG CTA CTA CTG GAG CGC G rev: CAG AGC TCA ACC TGA AGA TGG	1789- 1807 2156- 2136	368 bp
α 3	L34156	for: AGC TCA CTG GTC AGC ACA TG rev: CCT GTG TCA GAG GCT TCC TC	116-135 368-349	253 bp
α 4	S78569	for: TGC GGA CTC TCT GAC AAC AC rev: ACT CAC CGC ATC ATA AAT TCG	1780- 1799 2137- 2117	358 bp
α 5	Z95636	for: GAC AGT GCC CTG CTC TAC TAC C rev: CCC CAA ACT GGT AGG AGT CTC	1246- 1267 1807- 1787	562 bp
β 1	M61916	for: TGC TTC TGC TAT GGT CAT GC rev: CCG TGG CCA GGT AAA CAG	928-947 1180- 1163	253 bp

β 2	S77512	for: TGG ACT GGC TCA GGC TTC rev: TCT CAG GCT GGG CAC TTC	1932- 1949 2268- 2251	337 bp
β 3	L25541	for: TTT GGT AGA CTC CCG AAT GC rev: AAG ACT CTC CAG GTC TCT CGG	1909- 1928 2169- 2149	261 bp
γ 1	J03202	for: CAT CTC TCG AGT GGT CCT CTG rev: GCT TCA TGG AGC CTG AAG AC	1866- 1886 2148- 2129	283 bp
γ 2	Z15008	for: ACA GGC TCA TCA CTC AGA TGC rev: CAT TCT GTA AGA GCT GCT GTG C	2276- 2296 2854- 2833	579 bp
γ 3	AF041835	for: CAG TGC GAT GAC ACA GGC rev: CCT TCC AGC CTC AGC TGT CA	1277- 1294 1833- 1814	557 bp

2.5 Reagenzien und Lösungen

Tabelle 5: Liste der Reagenzien und Lösungen

Reagenzien und Lösungen	Hersteller
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldenburg
Accutase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Advanced DMEM/F12	Gibco, Carlsbad, USA
AgNO ₃	Merck, Darmstadt
Ampuwa Spüllösung	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Gel Red Nucleic Acid, Gel Stain	Biotium, Fremont, USA
Borsäure (1M)	Sigma-Aldrich, München
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, München
BSA (bovine serum albumin)	Sigma-Aldrich, München
CaCl ₂ (100mM)	Merck, Darmstadt
Cell Proliferation Reagent WST-1 Kit	Roche, Unterhaching
DAKO Einbettmedium	DAKO, Hamburg
DMSO (Dimethyl sulfoxide)	AppliChem, Darmstadt
DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline)	Gibco, Carlsbad, USA
Dulbeccos Modified Eagle´s Medium DMEM (1X)	Sigma-Aldrich, München
EDTA	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Ethanol	VWR-Chemicals, Darmstadt
Essential 8 Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Essigsäure	Merck, Darmstadt
FCS (Fetal calf serum)	Sigma-Aldrich, München
FFP (Fresh Frozen Plasma)	Merck, Darmstadt
Formaldehyd 37 %	Merck, Darmstadt

GelRed® Nucleic Acid Gel Stain	Biotium, Landing Pkwy, Fremont, USA
Gentamycin (0.25mg/ml)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
GlutaMax 100 x	Gibco, Carlsbad, USA
Glutamin	Lonza, Basel, Schweiz
Glycerol	AppliChem, Darmstadt
Heparin	Braun, Melsungen AG, Deutschland
HEPES sodium salt solution	Sigma-Aldrich, München
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kristallviolett	Sigma-Aldrich, München
MEM Alpha Medium	Gibco, Carlsbad, USA
Methanol	VWR-Chemicals, Darmstadt
MgCl ₂ (100 mM)	Merck, Darmstadt
MnCl ₂	Merck, Darmstadt
Natriumazetat	Sigma-Aldrich, München
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumthiosulfat 0.02 %	Merck, Darmstadt
NuPage™® LDS Sample Buffer, Antioxidant, and Sample Reducing Agent	Invitrogen, Carlsbad, USA
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Carlsbad, USA
PPIA	Qiagen, Hilden
RNeasy Kit	Qiagen, Hilden
Rock Inhibitor Y-27632 (0.1mM)	SelleckChem, München
Supplements	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Tris-Acetate SDS Running Buffer	Novex, Carlsbad, USA
Tris Base (1M)	Sigma-Aldrich, München
Trypan Blau	Sigma-Aldrich, München
Vitronektin	Abcam, Berlin

2.6 Geräte

Tabelle 6: Liste der verwendeten Geräte

Geräte	Beschreibung und Hersteller
96 well Platte, Cellsta	Greiner bio-one GmbH Frickenhausen
6 well Platte	Falcon Multiwell
Zentrifuge 1	Biofuge fresco; Heraeus, Hanau
Zentrifuge 2	Centrifuge 5424R; Eppendorf, Hamburg
ELISA Reader	Thermo Scientific, Karlsruhe
Ibidi Kammern	Ibidi GmbH, Gräfelfing
Inkubator	Thermo Scientific, Karlsruhe
Mikroskop 1	Axiophot; Zeiss, Göttingen
Mikroskop 2	Axiovert 200M; Zeiss, Göttingen
Mikroskop 3	Axiovert 135; Zeiss, Göttingen
Petri dish, culture dish 40, 9.2 cm ²	TPP Cell culture, Trasadingen, Schweiz
Elektrophoresekammer	Pharmacia Biotech, Freiburg
Thermoblock UNO II	Biometra, Biomedizinische Analytik, Göttingen

3 Methoden

3.1 Verwendete Zellen, immortalisierte Zelllinien und Medien

Alle primären Zellen und Zelllinien wurden in einem Inkubator bei 37°C, mit Wasser gesättigter Luft und 5% Kohlenstoffdioxid kultiviert. Dafür wurden Zellkulturflaschen mit einer Größe von 75 cm², oder im Falle der iPS-Zellen 6-Well Platten, verwendet. Für alle verwendeten primären Zellen lag ein positives Ethikvotum der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen vor (AZ: 618/2017BO2; 365/2018BO2).

Die sogenannten '*jaw periosteal cells*' (JPCs) sind primäre Stammzellen, die während der Extraktion eines dritten Molaren mit Einverständnis des Patienten aus dem humanen Periost des Kieferknochens entnommen wurden. Sie wurden in DMEM / F12 Medium kultiviert, das mit 10% FCS, 1% Penicillin / Streptomycin und 1% Glutamin versetzt wurde. Das FCS wurde vor Verwendung bei 56° C für 30 min hitzeinaktiviert und durch einen 0.45 µm Filter sterilfiltriert.

Als Pendant zu den primären JPCs diente eine Zelllinie aus kranialen Periostzellen, die einem gesunden Patienten während einer Operation multipler Frakturen nach einem Trauma entnommen wurden. Diese sogenannten TAg58 Zellen waren durch lentivirale Transduktion mit dem SV40 T Antigen immortalisiert worden (Alexander et al. 2015). Kultiviert wurde diese Zelllinie in demselben Kulturmedium wie die JPCs, es wurde aber zusätzlich 0.5% Gentamycin (G418) hinzugefügt.

Die induzierten, pluripotenten Stammzellen (iPSC) wurden aus den oben genannten JPCs gewonnen. Diese Zellen wachsen als Kolonien und wurden in 6-Well-Platten kultiviert, die zuvor mit 1%-iger Vitronectinlösung (mit sterilem PBS) für 60 min bei Raumtemperatur beschichtet wurden. Das verwendete Essential 8 Medium wurde mit 0.2% Supplements versetzt. Der Rock-Inhibitor Y27632 (0.1%) konnte optional zugegeben werden, um stressbedingtes Sterben der Zellen zu vermindern.

Zum Vergleich zu den bisher beschriebenen Zelllinien aus dem kranialen Bereich dienten zwei weitere mesenchymale Stammzelltypen, die nicht aus kranialen Knochen, sondern aus humanem Knochenmark gewonnen wurden.

Als primäre Zellen wurden dafür zum einen bmMSCs (*bone marrow mesenchymal stem cells*) genutzt, die aus humanem Knochenmark gewonnen worden waren. Dabei wurden in dieser Arbeit bmMSCs Präparationen von drei verschiedenen Spendern (MSC PKR, MSC KER, MSC TNW) verwendet. Zur Kultivierung wurde dem DMEM

Low Glucose Medium 25 mM HEPES zugegeben und dann mit 0.2 % Heparin, 1 % Glutamin und 1 % Penicillin / Streptomycin versetzt. Anschließend wurde 5% FFP (Fresh Frozen Plasma) und 5 % PLL (Plättchenlysat aus der Transfusionsmedizin der Universität Tübingen) hinzugefügt.

Bei der etablierten Zelllinie iMSC#3 handelt es sich um eine immortalisierte mesenchymale Stromazelllinie aus dem Knochenmark (Skårn et al. 2014). Das verwendete Medium besteht aus MEM α Medium, dem 10 % FCS (hitzeinaktiviert und sterilfiltriert), 1 % Penicillin / Streptomycin und 1 % Glutamin hinzugefügt wurde.

3.2 Zellen auftauen

Um in flüssigem Stickstoff eingefrorene Zellen wieder aufzutauen und in Kultur zu bringen, wurde in einem 15 ml Falcon 10 ml des jeweiligen Mediums vorgelegt. Das Gefrierröhrchen (Cryovial) mit den Zellen wurde solange im 37°C Wasserbad aufgetaut, bis nur noch ein kleiner Restanteil gefroren vorlag. Dann wurde die Zellsuspension sofort mit einer 1 ml Pipette in das Falcon überführt und resuspendiert. Damit wurde das DMSO, das in dem Einfriermedium enthalten war und die Zellen in flüssigen Zustand schädigen kann, möglichst schnell verdünnt. Nachdem für 10 min bei 150 x g bei Raumtemperatur abzentrifugiert wurde, wurde der Überstand verworfen. Anschließend wurde das Zellpellet in 5 ml des entsprechenden Mediums resuspendiert und alles in eine kleine Flasche überführt.

3.3 Zellen passagieren

Sobald unter dem Mikroskop die Zellen konfluent erschienen oder angefangen haben, dreidimensional zu wachsen, wurden die Zellen auf neue Flaschen verteilt. Wie schnell die Zellen konfluent wurden, variierte je nach Zelllinie und Dichte, mit der die Zellen ausgesät wurden. Der Zeitraum lag zwischen 2 und 10 Tagen. Um die Zellen zu passagieren, wurde zuerst der Kulturüberstand abgenommen und die Zellen 2 x mit 6 ml PBS gewaschen. Um die Zellen, die adhären am Boden der Flasche wachsen, abzulösen, wurde 1.5 ml Accutase zugegeben und die Flasche für 2-4 min in den Inkubator gestellt. Sobald unter dem Mikroskop sichtbar wurde, dass alle Zellen abgelöst waren, wurde 8.5 ml des jeweiligen Mediums zugegeben und alles in der Flasche resuspendiert, um alle Zellen zu erfassen. Nun wurde die Zellsuspension in ein 15 ml Falcon überführt und für 7 min bei 150 x g und RT abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 10 ml resuspendiert. Anschließend

wurde je nach Mischungsverhältnis das jeweilige Medium in die neuen Flaschen frisch vorgelegt und die ausgerechnete Menge an Zellsuspension zugegeben.

3.4 iPS-Zellen passagieren

Da die iPS-Zellen in Kolonien wachsen, musste beim Passagieren, anders als oben beschrieben, vorgegangen werden, um die Kolonien möglichst nicht aufzulösen und keine Einzelzellsuspension zu erhalten. Dazu wurden die bereits mit Vitronectin (VTN-N) beschichteten 6-Well-Platten und das benötigte Volumen des E8-Mediums auf RT gebracht. Dann wurde der Kulturüberstand von den iPSC-Kulturen abgenommen und mit PBS gespült. Um die Zellen abzulösen, wurde 0.5 mM EDTA-Lösung zugegeben und für 2-4 min inkubiert. Die Lösung wurde vorsichtig abgesaugt und dann das mit dem Rock-Inhibitor Y27632 versetzte E8-Medium zugegeben. Durch vorsichtiges Aufspritzen des E8-Mediums mit einer 2 ml Pipette wurden die Zellen abgelöst und die entsprechende Menge in neue Wells mit vorgelegtem E8-Medium überführt.

3.5 Zellen einfrieren

Zum Einfrieren wurden die Zellen zuerst 2 x mit 6 ml PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen, wie bereits beschrieben, mit 1.5 ml Accutase abgelöst und die Reaktion mit 8.5 ml des jeweiligen Mediums abgestoppt. Im Anschluss wurde die Suspension für 10 min bei 150 x g und RT abzentrifugiert. Die Zellen wurden resuspendiert, mit der Neubauer Zählkammer gezählt und die Zellsuspension auf 2×10^6 Zellen / ml verdünnt. Davon wurden 500 μ l in ein Kryoröhrchen pipettiert und für 5 min auf Eis stehen gelassen. Dann wurde 500 μ l des zellspezifischen Einfriermedium hinzugegeben und resuspendiert. Nach weiteren 20 min auf Eis wurden die Kryoröhrchen in einen mit Isopropanol befüllten Gefrierbehälter (Mr. Frosty, Nalgene; ThermoFisher) gestellt und auf -80 °C gebracht. Damit erfolgte ein kontrollierter Temperaturabfall mit 1°C / min. Für eine langfristige Lagerung wurden die Kryoröhrchen nach frühestens 48 h oder spätestens einer Woche in flüssigen Stickstoff bei -196°C überführt.

Einfriermedium (2X)

20%	DMSO
30%	FCS, inaktiviert und sterilfiltriert
50%	zellspezifisches Medium

3.6 Zellzahl bestimmen

Die adhären wachsenden Zellen wurden mit Accutase abgelöst, in ein 15 ml Falcon überführt und bei 150 x g bei RT für 8 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 10 ml des jeweiligen zellspezifischen Mediums resuspendiert. In einer 96- Well-Platte wurde die Zellsuspension mit Trypanblau im Verhältnis 1:1 gemischt und davon 10 µl auf die Neubauer Zählkammer gegeben. Dann wurde unter dem Mikroskop alle lebenden Zellen in allen vier Eckquadraten ausgezählt und die Zellzahl mit folgender Formel ermittelt:

$$\frac{\text{gezählte Zellzahl}}{4} \times 2 \times 10^4 = \text{Zelldichte} \left[\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} \right]$$

Für die gesamte Zellzahl wurde das Ergebnis mit dem Gesamtvolumen in ml multipliziert.

3.7 Chamber Slides

Um eine Immunfluoreszenzfärbung durchzuführen, wurden die adhären wachsenden Zellen zuerst auf sogenannten 'Chamber Slides' ausgesät. Dafür wurden die Zellen in abgegrenzten Kammern mit einer Fläche von jeweils etwa 0.5 cm² kultiviert, um sie anschließend zu fixieren. Ein 'Slide' umfasst 8 Kammern. Zuerst wurde das Medium aus der Flasche der gewählten Zelllinie abgenommen und 2 x mit 6 ml PBS gewaschen. Dann wurde zum Ablösen der Zellen 1.5 ml Accutase zugegeben und für 2-4 min inkubiert. Anschließend wurde 8.5 ml Medium zugegeben. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Falcon überführt und bei RT und bei 150 x g für 10 min abzentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Zellpellet in 10 ml neuem zellspezifischen Medium resuspendiert. Dann wurden die Zellen mit Hilfe der Neubauer Zählkammer gezählt. Nach Berechnung der gewünschten Anzahl der Zellen pro Kammer (10000- 20000 Zellen) wurde in jede Kammer 400 µl Medium vorgelegt und das errechnete Volumen der Zellsuspension dazu pipettiert. Insgesamt sollte in jeder Kammer ein Volumen zwischen 400-500 µl vorliegen. Nun wurden die Zellen im Inkubator inkubiert, bis etwa 80 % der Fläche bewachsen war. Bei einer langsam wachsenden Zelllinie war gegebenenfalls ein Mediumwechsel nötig. Um die Zellen abschließend zu fixieren, wurde der Kulturüberstand abgenommen, die Zellen mit je 400 µl PBS pro Kammer gewaschen und dieses wieder verworfen. Nun wurde 200 µl

kaltes Methanol in jede Kammer gegeben und für 10 min bei -20°C inkubiert. Nachdem das Methanol verworfen wurde, konnte das 'Slide' bei -20°C bis zur Verwendung gelagert werden.

3.8 Immunfluoreszenzfärbung

Zuerst wurden die 'Chamber Slides' mit 200 µl PBS je Kammer gewaschen. Um die Verdünnungsreihen für die gewählten primären Antikörper herzustellen, wurde das gewünschte Volumen der jeweiligen Antikörpersuspension berechnet, wobei mit 200 µl pro Kammer gerechnet wurde. Die primären Antikörper wurden mit 0.1 % BSA / PBS auf die gewünschte Konzentration gebracht und auf die Kammern verteilt. Zur Kontrolle wurde eine Kammer nur mit 0.1% BSA / PBS inkubiert. Die 'Slides' wurden nun bei RT in einer Feuchtkammer für 60 min inkubiert. Anschließend wurden die Antikörpersuspensionen aus den Kammern verworfen und die 'Slides' dreimal für 3 min mit PBS auf dem Schüttler mit langsamer Umdrehung gereinigt. Währenddessen wurde 4',6-Diamidin-2-phenylindol, kurz DAPI, ein Fluoreszenzfarbstoff, der zur Markierung von DNA eingesetzt wird, auf 1:2000 mit 0.1% BSA / PBS verdünnt. Hierbei wurde darauf geachtet, möglichst im Dunklen zu arbeiten, um ein vorzeitiges Ausbleichen (,fading') der Fluoreszenzfarbstoffe durch Licht zu verhindern.

Die benötigten sekundären Antikörper wurden auf die gewünschte Konzentration mit der DAPI Lösung verdünnt und dann 200 µl der Suspensionen in die entsprechende Kammer pipettiert. Es erfolgte erneut eine 60-minütige Inkubation in der Feuchtkammer bei RT, jedoch dieses Mal unbedingt im Dunklen. Nachdem die 'Slides' dreimal für 3 min mit PBS auf dem Schüttler gewaschen wurden, wurde der aufgesetzte Teil der 'Chamber Slides' abgenommen. Es wurden einige Tropfen des DAKO Einbettmedium auf das 'Slide' gegeben und abschließend das Deckglas möglichst luftblasenfrei aufgelegt. Das Einbettmedium wird über Nacht im Kühlschrank fest, was die notwendige Reinigung der Unterseite des Objektträgers wesentlich erleichtert.

3.9 RT-PCR

3.9.1 RNA-Extraktion mittels RNeasy Kit von Qiagen

Für die RNA-Extraktion wurde das Kit von Qiagen verwendet. Es wurden in eine Zellkulturflasche 1.5×10^5 Zellen/ ml ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert. Die Zellen wurden, wie zuvor beschrieben, abgelöst und abzentrifugiert. Dann wurden die Zellen in 10 ml kaltem PBS aufgenommen und durch Auf- und Ab-Pipettieren gewaschen. Nach Zentrifugation bei $250 \times g$ für 7 min wurde der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde in 350 μ l RLT-Puffer mit β -Mercaptoethanol in einem 15 ml Falcon-Röhrchen resuspendiert und dann über Nacht bei -70°C eingefroren. Nach dem Auftauen bei RT wurde 350 μ l Ethanol hinzugegeben und die Zellen mit einer 3 ml Spritze homogenisiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in eine Säule überführt. Nach einer Zentrifugation für 15 Sekunden bei $9400 \times g$ wurde der Durchfluss verworfen. Dann wurden 350 μ l RW1 auf die Säule gegeben und erneut 15 Sekunden bei $9400 \times g$ zentrifugiert. Der Durchfluss wurde wiederum verworfen. Nun wurde 80 μ l DNase- Gemisch (10 μ l DNase + 70 μ l RDD Puffer) auf die Säule gegeben und für 15 min bei RT inkubiert. Zum Waschen wurde 350 μ l RW1 Puffer dazu pipettiert und bei $9400 \times g$ für 15 Sekunden zentrifugiert. Der Durchfluss wurde mitsamt dem Eppendorf-Gefäß verworfen. Die Säule wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß gestellt. Nun wurde 500 μ l RPE-Puffer darauf gegeben und anschließend bei $9400 \times g$ für 15 Sekunden zentrifugiert. Der Durchfluss wurde wieder verworfen und erneut 500 μ l des RPE-Puffers hinzugefügt. Nun wurde bei $9400 \times g$ für 2 min zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Um die Säule zu trocknen, wurde ein weiteres Mal für 15 Sekunden bei $9400 \times g$ zentrifugiert. Die Säule wurde dann in ein neues, beschriftetes Röhrchen gestellt und 40 μ l RNase- freies Wasser darauf gegeben. Falls wenig RNA vermutet wurde, wurde noch 1 min inkubiert, ansonsten wurde direkt für eine weitere Minute zentrifugiert. Die Säule wurde verworfen, der Durchfluss mit der enthaltenen RNA bei -70°C eingefroren oder direkt weiterverarbeitet.

3.9.2 Umschreiben von RNA in cDNA

Die reverse Transkription wurde mit Hilfe des SuperScript™ III First-Strand Synthesis Systems (Invitrogen) durchgeführt. Alle Reagenzien wurden vor Verwendung aufgetaut, "gevortext", zentrifugiert und auf Eis gestellt. Die RNA wurde auf Eis aufgetaut und mittels Nanodrop von Thermo Scientific die Konzentration bestimmt. Dabei misst

das Gerät bei 260 nm und 280 nm, wobei der Wert der Quotienten über 1.9 liegen sollte, um eine genügend reine RNA zu erhalten. Nun wurde die gewünschte Konzentration und Verdünnung berechnet. Nach der Messung wurden die Eppendorf-Gefäße beschriftet und die berechnete Menge Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltes Wasser vorgelegt. Dann wurde das benötigte Volumen der RNA-Lösung dazu pipettiert, um insgesamt ein Endvolumen von 12.5 µl zu erreichen. Nachdem "gevortext" und zentrifugiert wurde, wurde 1 µl oligo dt Primer dazu gegeben. Dann wurde erneut "gevortext", zentrifugiert und die Proben auf Eis gestellt. Im Thermoblock UNO II wurde der RNA-Primer-Mix nun für 2 min bei 65°C denaturiert. Nachdem der RNA-Primer-Mix auf 4°C abgekühlt war, wurde 6.5 µl des Master-Mixes auf Eis hinzugefügt und die cDNA für 50 min bei 50°C synthetisiert.

Master-Mix

4 µl 5 x Puffer

0.5 µl RNase Inhibitor

1 µl dNTP-Mix

1 µl reverse Transkriptase

Nachdem die Synthese durch nochmaliges Erhitzen auf 85°C für 5 min beendet wurde, konnte die cDNA bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert werden.

3.9.3 Amplifikationseffizienz der Primerpaare

Um die Amplifikationseffizienz der Primer zu bestimmen, wurde an drei Tagen mit einem cDNA-Pool aller in dieser Arbeit verwendeter Zelllinien (iMSC#3, MSC PKR, MSC KER, iPSC, TAg58, JPC) eine Test-PCR durchgeführt. Von dem cDNA-Pool wurde eine Verdünnungsreihe von unverdünnt bis 1:64 hergestellt. Als Positivkontrolle diente eine SMC (smooth muscle cell)-cDNA, die das Transgelin-Gen exprimiert. Hierfür wurde ein Mastermix aus 10 µl SYBR™ Green, 6 µl NTW (non-template water) und 2 µl des Transgelin-Primers hergestellt. Für die elf zu testenden Primerpaare (Lm-α1, Lm-α2, Lm-α3, Lm-α4, Lm-α5, Lm-β1, Lm-β2, Lm-β3, Lm-γ1, Lm-γ2, Lm-γ3) wurde jeweils ein Mastermix aus 36 µl Primer, 180 µl SYBR™ Green und 108 µl NTW gemischt. Als NTC (non- template control) wurde je Primer 2 µl NTW mit 18 µl des

jeweiligen Mastermix verwendet. Dann wurden die Proben in eine 96- Well- Platte gegeben. Pro Well wurde dafür jeweils 2 μ l der cDNA und 18 μ l des Mastermixes des Primers verwendet. Zur Kontrolle wurde jeder Ansatz doppelt pipettiert. Im Anschluss wurde für 1 min bei 170 x g abzentrifugiert. Die RT-PCR erfolgte mit Hilfe des LightCycler[®] 480 II. Die Amplifikationseffizienz der jeweiligen Primerpaare wurde mit der LightCycler[®] 480 II Software (Roche, Mannheim) berechnet und bei den nachfolgenden Amplifikationen verwendet.

3.9.4 Quantitative RT- PCR

Die Amplifikation der cDNA bzw. Effizienz konnte mit dem hier verwendeten Lm- β 3- Primerpaar nicht bestätigt werden. Daher konnten nur die restlichen zehn Primerpaare für die geplanten RT-PCR Untersuchungen verwendet werden. Der Master Mix je Primer bestand aus 150 μ l SYBR[™] Green, 90 μ l NTW und 30 μ l Primer. Es wurden 2 μ l der cDNA der jeweiligen Zelllinie (iMSC#3, MSC PKR, MSC KER, iPSC, TAg58, JPC) unverdünnt verwendet. Als Positivkontrolle und zur relativen Quantifizierung dienten GAPDH und PPIA. Der Mastermix hierfür wurde aus 10 μ l SYBR[™] Green, 6 μ l NTW und 2 μ l Primer zusammengesetzt. Je Primer wurde eine NTC mit 2 μ l NTW und 18 μ l des jeweiligen Mastermix angesetzt. Dann wurden die Proben in eine 96- Well Platte pipettiert. Je 2 μ l cDNA und 18 μ l des jeweiligen Mastermixes der Primer wurden dafür pro Well aufgetragen. Jeder Ansatz wurde zur Kontrolle doppelt pipettiert. Im Anschluss wurde die Platte für 1 min bei 234 x g abzentrifugiert und die RT-PCR mit dem LightCycler[®]480 II konnte gestartet werden. Die Auswertung erfolgte erneut mit der LightCycler[®]480 II Software (Roche, Mannheim).

3.10 Zelladhäsionsassay

Die verwendeten Proteine wurden zuerst mit sterilem PBS auf die gewünschte Konzentration eingestellt. Nachdem die Petrischalen auf der Unterseite mit einem wasserfesten Stift in Sektoren aufgeteilt und durchnummeriert wurden, wurden jeweils 2 μ l der Proteine punktförmig in je einen Sektor aufgetragen und für 60 min unter der Sterilbank bei RT getrocknet. Anschließend wurden die Petrischalen zweimal vorsichtig mit sterilem PBS gewaschen und mit je 1 ml 1 %-BSA / PBS im Inkubator blockiert. Nach 60 min wurde das BSA / PBS abgenommen und erneut 2 x mit sterilem PBS gewaschen. Pro Petrischale wurden 3 x 10⁶ Zellen verwendet. Dafür wurden die

Zellen abgelöst und abzentrifugiert, in 2 ml serumfreien Medium, das mit einem Ionenmix (1 X) versetzt wurde, aufgenommen und vorsichtig in die beschichtete Petrischale pipettiert. Nach 30-60 min Inkubationszeit (je nach Zelllinie) wurden die ungebundenen Zellen durch 2-3 x Waschen mit vorgewärmten PBS und 1 X Ionenmix entfernt. Um eine verbesserte Bildqualität zu erreichen, wurden die Petrischalen mit 1 ml 4 % PFA für 30 min fixiert und anschließend für 10 min mit 1 ml 1 % Kristallviolettlösung gefärbt. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurden die Ergebnisse mit dem Zeiss AxioVision Mikroskop fotografiert.

Ionenmix (100X)

1.47 g $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (100 mM)
2.03 g $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ (100 mM)
40.5 mg $\text{MnCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (2.5 mM)
100 ml dd H_2O

3.11 Zellmigrationsassay

Pro Zelllinie wurde eine 6-Well Platte beschriftet und eine Markierung in Form eines Balkens für die Proteine eingezeichnet. Vor Verwendung wurden alle Laminine "gevortext" und abzentrifugiert. Dann wurde 1 μl der Proteine auf die eingezeichneten Striche aufgetragen und für 24 h offen unter der Sterilbank getrocknet. Um eine Kontamination zu verhindern, wurde anschließend noch 20 min mit UV-Licht bestrahlt. Die sterilen ibidi-Kammern (Culture Insert 2 Well in μdish ; ibidi, Gräfelting) wurden mittig direkt auf die vorgelegten Peptidstreifen platziert. Die Zellen wurden auf 3×10^5 Zellen/ml verdünnt und davon in jede Kammer 70 μl pipettiert. Somit wurden in jede Kammer 20.000 Zellen gegeben. Nach 12-24 h Inkubationszeit wurden die Kammern abgenommen. Um nicht adhärenente Zellen zu entfernen, wurde 2 x mit sterilem PBS gewaschen und anschließend 2 ml mit dem für die Zelllinie spezifischen Medium in jedes Well pipettiert.

Die Migration wurde zu verschiedenen Zeitpunkten mit dem Zeiss AxioVision Mikroskop festgehalten und in Prozent zur Kontrolle beurteilt.

3.12 Zellproliferationsassay

Um die Proliferationsrate von primären Zellen in Kultur oder einer immortalisierten Zelllinie zu bestimmen, wurde das WST-1 Kit (Sigma-Aldrich) benutzt. Dieses Kit beinhaltet ein Tetrazolium Salz, das durch eine mitochondriale Dehydrogenase zu Formazan gespalten wird (Abb. 5). Somit korreliert die Menge an Formazan mit der Anzahl an metabolisch aktiven Zellen. Abhängig von der Zelllinie wurden 2000 bis 20000 Zellen in einem Volumen von 100 μl pro Well in Triplikaten in einer 96-Well Platte kultiviert. Triplikate wurden für alle verschiedenen Zeitintervalle (Tag 0, 1, 2) angesetzt. Es wurden 10 μl der WST-1-Lösung pro Well zugegeben. Anschließend wurde für 2 h bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert. Die Absorption wurde bei 450 nm, und als Referenzwert bei 590 nm, gemessen. Pro zellspezifischem Medium wurde ein "Blank" (ohne Zellen) erstellt. Um den Einfluss der Laminine zu testen, wurde je 1 μl der zu untersuchenden Laminine pro Well zugegeben. Nun wurden die Zellen 24 h und 48 h kultiviert und anschließend, wie zuvor beschrieben, die WST-1-Lösung hinzugefügt. Nach 2 h im Inkubator wurde die Absorption gemessen.

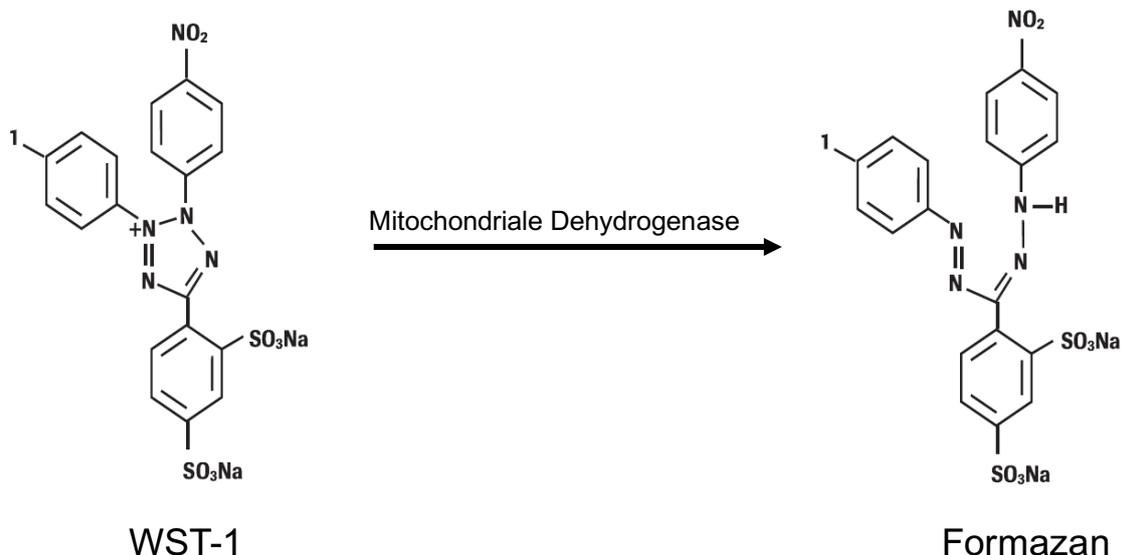


Abbildung 5: Umwandlung von WST-1 in das wasserlösliche, rot-dunkle Formazan.

3.13 Gelelektrophorese der PCR Amplifikate

Für das Gel wurde 1 g Agarose abgewogen und mit 50 ml 1 x TBE- Puffer und einem Magnetfisch in einem Glaskolben gegeben. Der Kolben wurde mit Frischhaltefolie abgedeckt und das Agarose-TBE-Gemisch bei höchster Stufe in der Mikrowelle für 5 min zum Kochen gebracht, bis keine Schlieren mehr zu erkennen waren. Anschließend wurde der Kolben auf einen Magnetrührer gestellt und, nachdem das Gemisch auf etwa 60 °C abgekühlt war, 5µl GelRed® hinzugefügt. Danach wurde das Gel gegossen, es war bei Raumtemperatur nach 20-30 min fest. Dann wurde das Gel mit 1x TBE- Puffer überflutet und die Proben aufgetragen. Für die Gelelektrophorese wurde 3 µl PCR-Produkt mit 10 µl Ladepuffer gemischt. Davon wurden 10 µl in je eine Tasche des Gels gefüllt. Zur Bestimmung der Größe der DNA wurde in eine Tasche 5 µl einer DNA-Leiter (*100 bp ladder*) gefüllt. Nach Anlegen des elektrischen Feldes dauerte es etwa 1-2 h, um die DNA Proben nach ihrer Größe aufzutrennen. Durch das im Ladepuffer enthaltene GelRed® konnte unter UV-Licht die DNA sichtbar gemacht und anschließend fotografiert werden.

TBE- Puffer (20X)

121 g Tris Base (1 M)
61.7 g Borsäure (1 M)
7.44 g EDTA- Na₂ x H₂O (20 mM)
mit H₂O auf 1 Liter auffüllen

100 bp Ladder- Mix

30 µl bp ladder
80 µl Ladepuffer
50 µl ddH₂O

Ladepuffer

5 ml Glycerol
250 µl 40 x TAE- Puffer
1 Spatelspitze Bromophenol blue
3.75 ml H₂O

TAE- Puffer (40X)

193.6 g Tris Base (1.6 M)
108.9 g Na Azetat x H₂O (0.8 M)
7.44 g EDTA-Na₂ x H₂O (20 mM)
pH bis 7.2 mit Essigsäure
mit H₂O auf 1 Liter auffüllen

3.14 Tris-Azetat-Gel

Um Laminine, deren einzelne Ketten alle ein großes Molekulargewicht aufweisen, aufzutrennen und sichtbar zu machen, wurde ein vorgefertigtes 3-8 % Tris-Azetat-Gel

(Invitrogen) verwendet und die Banden anschließend mittels Silberfärbung sichtbar gemacht. Je 100 ng der verwendeten Laminine (Lm-111, Lm-121, Lm-211, Lm-332, Lm-411, Lm-421, Lm-511, Lm-521) wurde mit 1 µl 10 x Red Agent, 2.5 µl Sample Buffer und 5.5 µl Wasser in einem Eppendorfgefäß gemischt. Danach wurden die Proben "gevortext" und abzentrifugiert und 50 min bei RT stehen gelassen. Um die Proteine zu denaturieren, wurden die Proben anschließend für 10 min auf 70 °C erhitzt. Währenddessen wurde die Gelelektrophoreseapparatur „XCell SureLock™" vorbereitet. 700 ml NuPage Buffer (Invitrogen) wurden in die seitlichen Kammern gefüllt, in die Kammer des Gels kamen 200 ml des Puffers, der zuvor mit 500 µl Antioxidant versetzt wurde. Die Taschen des Gels wurden mit 10 µl der Proben gefüllt. Als Größenmarker wurde 5 µl Precision Plus Protein Dual Colours (Bio-Rad, Feldkirchen) verwendet. In die verbleibenden Taschen wurden Blanks gefüllt, damit das Gel gleichmäßig befüllt war. Dann wurde eine Spannung von 150 V und 48 mA solange angelegt, bis die Proben im unteren Viertel angekommen waren.

3.15 Silberfärbung nach Shevchenco

Für die Silberfärbung wurden folgende Lösungen hergestellt:

Fixierlösung

250 ml Methanol
25 ml Essigsäure
225 ml H₂O

Thiosulfatlösung (0.02%)

0.1 g Na-Thiosulfat
500 ml H₂O

Silbernitratlösung (0.1%)

0.1 g Silbernitrat
100 ml H₂O

Entwickler

250 ml H₂O
100 µl Formaldehyd 37 %
5 g Na-Carbonat

Äquilibrierlösung

10 ml Glycerol
20 ml Ethanol
70 ml H₂O

Um das Gel zu fixieren, wurde es, nachdem es vorsichtig von der Platte gelöst wurde, für 20 min in Fixierlösung gelegt. Nach weiteren 10 min in 50 % Methanol wurde das Gel für 10 min in Wasser gelegt, um es zu waschen. Anschließend wurde für 1 min eine 0.02%-ige Thiosulfatlösung darauf gegeben und 2 x für 1 min in Wasser gewaschen. Dann folgte die Inkubation in der bereits vorgekühlten Silbernitratlösung bei 4°C im Dunkeln für 20 min. Danach wurde erneut 2 x für 1 min mit Wasser gewaschen. Das Gel wurde dann mit dem Entwickler bedeckt und so lange stehen gelassen, bis die gewünschte Intensität der Färbung erreicht war. Um die Reaktion abzustoppen, wurde das Gel für 5 min in 5 % Essigsäure gelegt und anschließend für 30 min in der Äquibierlösung inkubiert. Zum Trocknen wurde das Gel zwischen zwei Cellophanfolien gespannt und unter dem Abzug für 1-2 Tage stehen gelassen.

4 Ergebnisse

4.1 Expression der Laminin-Isoformen in mesenchymalen Stammzellen

Um die Expression der einzelnen Lamininketten in den verschiedenen Zelltypen zu testen, wurde eine quantitative RT-PCR durchgeführt. Dabei wurde die RNA der einzelnen Ketten der Laminine und somit deren Transkription nachgewiesen. Zusätzlich wurde die Expression der daraus resultierenden Proteine anhand von Immunfluoreszenzfärbungen mit Lamininketten-spezifischen Antikörpern in den Zellen überprüft und die Ergebnisse der beiden Methoden anschließend verglichen. Ein besonderes Augenmerk lag dabei auf den Lm- α -Ketten, da sie den größten Einfluss auf die Funktion der Laminine haben. Im Vergleich zu den mesenchymalen Stammzellen wurden auch iPSC verwendet, induzierte pluripotente Stammzellen, die aus den JPCs gewonnen wurden (Umrath et al. 2019).

4.1.1 RT-PCR

Die Zelllinien wurden auf alle 5 α , 3 β und 3 γ Ketten überprüft. Zuerst wurde die Wirksamkeit der einzelnen Primerpaare überprüft, indem an drei Tagen eine Test-PCR mit einem cDNA-Pool aller in dieser Arbeit verwendeten Zelltypen durchgeführt wurde. Sämtliche Primerpaare mit einer Ausnahme zeigten eine erfolgreiche Amplifikation (Abb. 6). Nur das Primerpaar für die β 3-Kette ergab kein Amplifikat (Abb. 6) und wurde deshalb bei der anschließenden quantitativen RT-PCR nicht verwendet. Bei den mesenchymalen Stammzellen zeigte sich ein übereinstimmendes Bild der ermittelten Daten (Abb. 7). Es ist eine starke Expression der Lm- α 4 und Lm- α 5 Ketten zu beobachten, wobei die Lm- α 4 Kette außer bei TAg58 etwas höhere Werte erzielt. Die Expression von Lm- α 2 ist bei allen Zelllinien schwach, gefolgt von Lm- α 1 und Lm- α 3, deren Expression kaum vorhanden ist. Die Expression von Lm- γ 1 ist durchgängig am stärksten. Auch die Lm- β 1 und Lm- β 2 Ketten werden stark exprimiert. Lm- γ 2 und Lm- γ 3 werden kaum oder nur schwach exprimiert. Die Ergebnisse der iPSC-Zellen weichen im Vergleich stark ab. Während sich ebenfalls eine starke Expression von Lm- α 5 und Lm- γ 1 zeigt, ist fast keine Expression der restlichen Lm- α Ketten zu sehen. Wie in Abb. 7 ersichtlich, zeigen sich bei MSC KER und MSC PKR - dabei handelt es sich um denselben Zelltyp von unterschiedlichen Patienten - übereinstimmende Ergebnisse.

Auch die iMSC#3, eine Zelllinie, die aus Knochenmark-MSCs gewonnen wurde, entsprechen diesen Ergebnissen. Ebenso lassen sich ähnliche Werte bei JPCs und TAg58 beobachten. iPSCs, die induzierten pluripotenten Stammzellen, zeigen individuelle Resultate, die nicht mit den restlichen Zelltypen übereinstimmen.

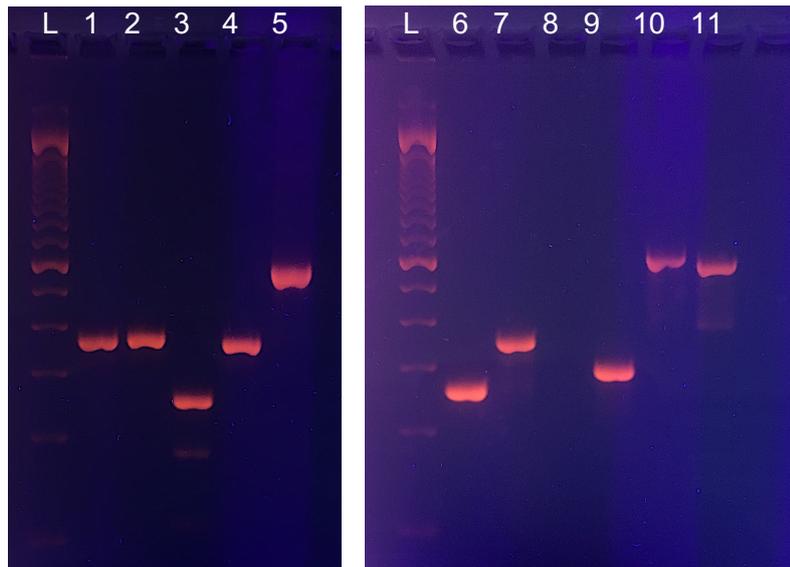


Abbildung 6: **Gelelektrophorese nach RT-PCR.** Von links: Spur L: 100 bp Leiter; Spur 1: Lm- α 1 (357 bp); Spur 2: Lm- α 2 (368 bp); Spur 3: Lm- α 3 (253 bp); Spur 4: Lm- α 4 (358 bp); Spur 5: Lm- α 5 (562 bp); Spur L: 100 bp Leiter; Spur 6: Lm- β 1 (253 bp); Spur 7: Lm- β 2 (337 bp); Spur 8: Lm- β 3 (261 bp); Spur 9: Lm- γ 1 (283 bp); Spur 10: Lm- γ 2 (579 bp) und Spur 11: Lm- γ 3 (557 bp). Die prominente Bande in der 100 bp Leiter ist 600 bp groß

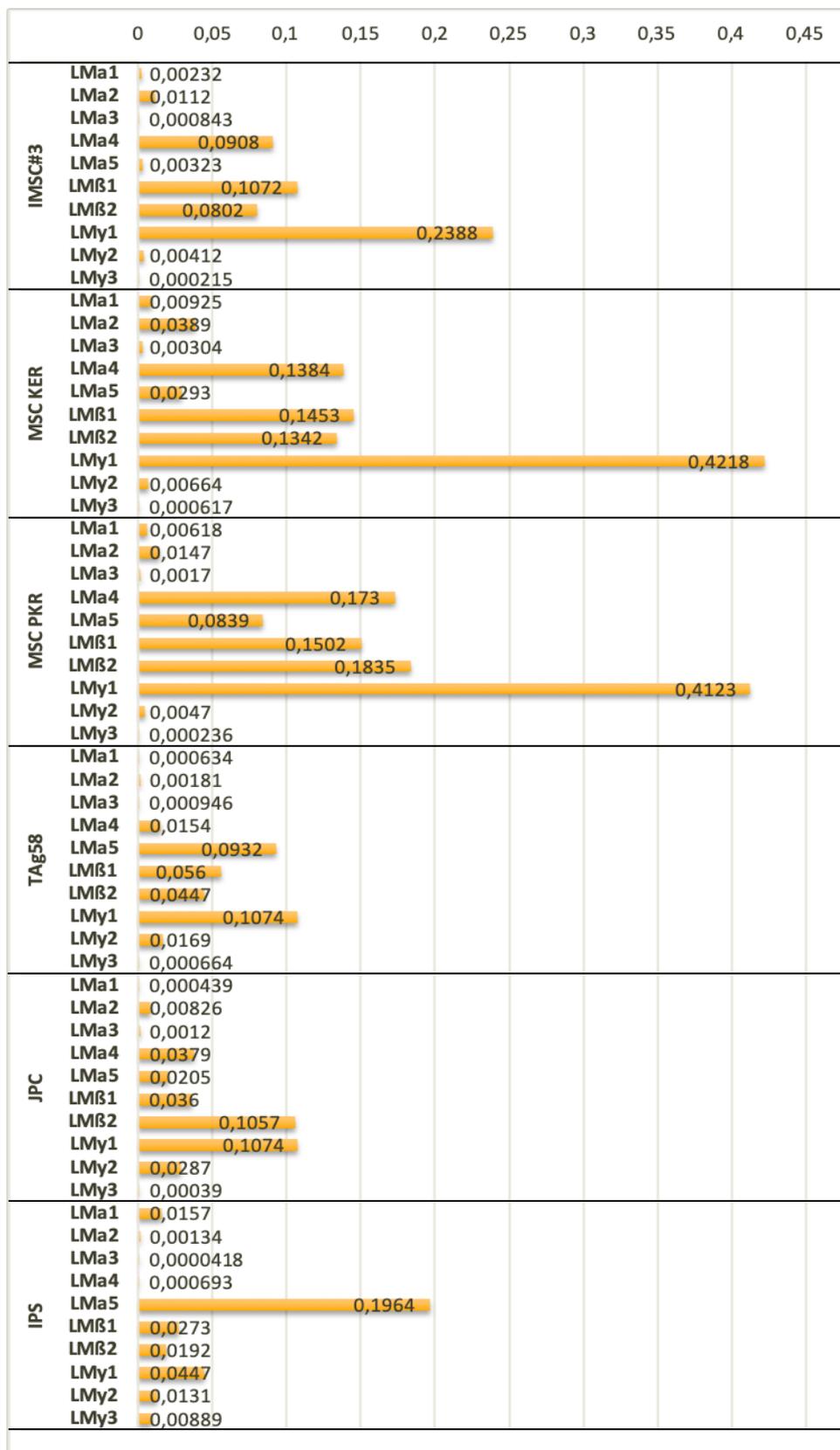


Abbildung 7: **RT-PCR Ergebnisse** in der Übersicht. Die Skala gibt den Quotienten aus Zielgen und Referenzgen an. Diese Analysen wurden jeweils einmal (N=1) durchgeführt. Die detaillierten Einzelergebnisse sind im Anhang aus den Abbildungen 20-25 zu entnehmen.

4.1.2 Immunfluoreszenz

Die unterschiedlichen Zelltypen wurden auf Chamberslides bis zu einer Konfluenz von 60-80% kultiviert. Nach Fixierung wurden die Zellen mit Lamininketten-spezifischen Antikörpern markiert, diese wurden mit Fluorchrom-markierten Zweitantikörpern detektiert. Die Bewertung erfolgte anhand der Anzahl an gefärbten Zellen. Die Differenz zwischen den Signalstärken wurde subjektiv bewertet. Allgemein zeigt sich bei den mesenchymalen Stammzellen eine starke Expression von Lm- α 4 und Lm- α 5, d.h. alle Zellen sind markiert und zeigen ein Signal (Abb. 8). Es zeigt sich eine ausgeprägtere Intensität von Lm- α 5 bei den Zelltypen MSC PKR und MSC KER. Eine Färbung der Lm- α 3 Ketten liegt nur bei vereinzelt Zellen der Zellen MSC PKR, KER und JPCs vor. Lm- α 2 und Lm- α 1 sind durchgehend negativ. Die iPSCs zeigen ein starkes Signal für Lm- α 5, jedoch keines für die restlichen Lm- α Ketten (Abb. 8). Bei Lm- α 4 sind vereinzelte Zellen gefärbt, der Grund dafür sind vermutlich unerwünscht differenzierte Zellen. Im Vergleich zu den anderen Zelllinien erscheint es im Falle der iPSCs, als ob zusätzlich zu dem Cytosol auch noch andere Komponenten angefärbt wurden, so setzen die iPSCs eventuell das Lm- α 5 auch schon in die ECM frei.

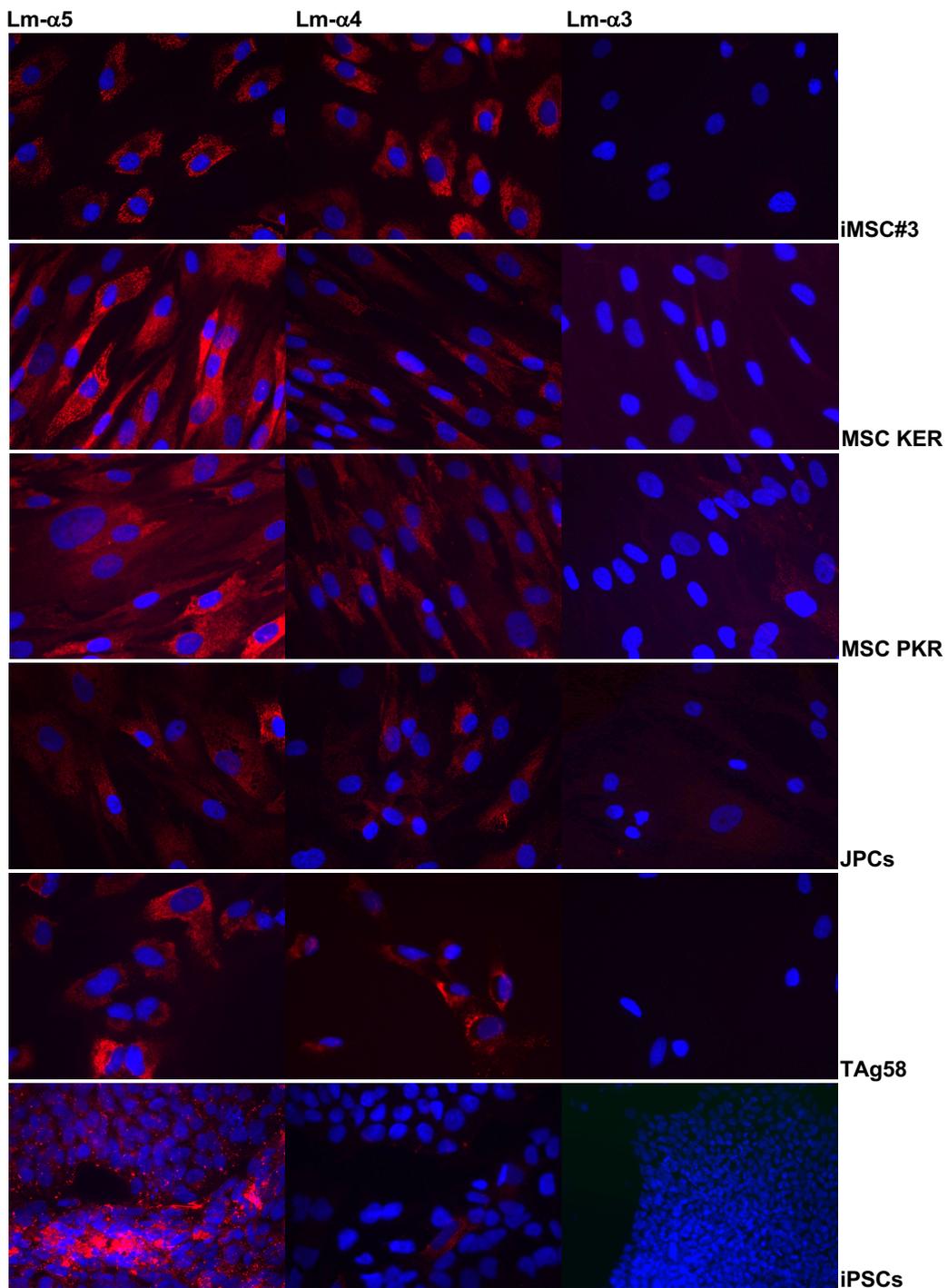


Abbildung 8: **Immunfluoreszenzfärbung mit Lamininketten-spezifischen Antikörpern.** Von links: Lm- α 5, Lm- α 4, Lm- α 3. Zu sehen ist eine starke Expression von Lm- α 5 bei allen Zelltypen. Lm- α 4 wird von allen Zelltypen, außer von den iPSCs gebildet (bei der Zelle, die in der Aufnahme Lm- α 4 der iPSCs angefärbt ist, handelt es sich – mit hoher Wahrscheinlichkeit - um eine differenzierte Zelle). Eine schwache Färbung von Lm- α 3 ist bei vereinzelt Zellen der MSC KER, MSC PKR und JPCs zu erkennen. Alle Vergrößerungen: x 220 (außer Lm- α 3 iPSCs); Vergrößerung Lm- α 3 iPSCs: x 60.

4.2 Funktionsanalysen mit unterschiedlichen Laminin-Isoformen

4.2.1 Rekombinante Laminine

Um die Reinheit der verwendeten rekombinanten Laminin-Isoformen aufzuzeigen, wurden die Proteine mit Hilfe einer Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt und anschließend mit einer Silberfärbung sichtbar gemacht (Abb. 9). Zu sehen ist eine saubere Trennung der Proteine in α - und β/γ - Ketten. Durch das ähnliche Molekulargewicht der β/γ - Ketten, sind diese Banden nicht eindeutig zuzuordnen, jedoch laufen β_1 und γ_1 immer höher als β_2 und γ_1 . Es ist keinerlei Degradation sichtbar. Zusammengefasst handelt es sich um sehr stabile, saubere rekombinante Proteine ohne Verunreinigungen.

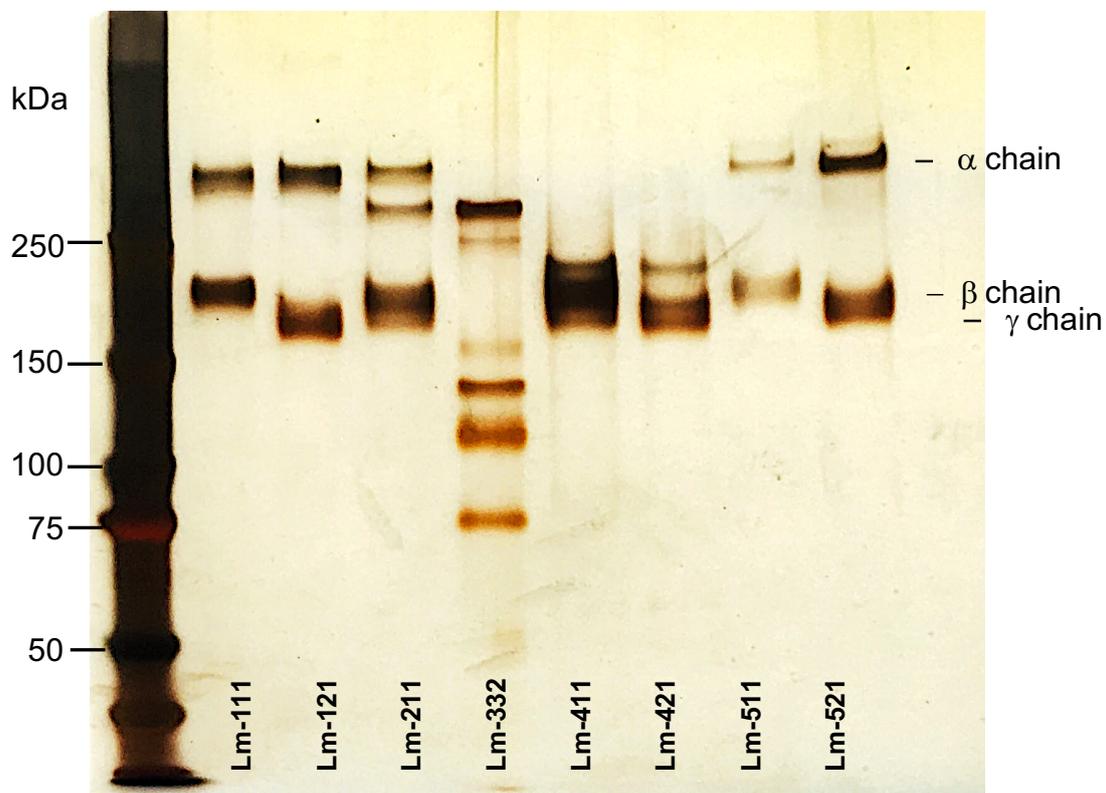


Abbildung 9: Silberfärbung der verwendeten rekombinanten Laminine nach SDS-PAGE. Von links: Lm-111, Lm-121, Lm-211, Lm-332, Lm-411, Lm-421, Lm-511, Lm-521.

4.2.2 Adhäsionsassay

Die Versuche wurden für alle verwendeten Zelltypen mehrmals durchgeführt ($n \geq 3$). Hierbei wurde die Adhäsion an die auf Plastik immobilisierten Laminine getestet. Insgesamt wurden die acht Isoformen verwendet, die im Silbergel in Abb. 9 zu sehen sind. Für die mesenchymalen Stromazellen zeigt sich eine starke Adhäsion bei den

Isoformen LM-332, LM-511 und LM-521. Bei LM-211 ist keinerlei Adhäsion zu sehen (Abb. 10-13). Die restlichen Laminin-Isoformen zeigen bei allen Zelltypen kein konstantes Ergebnis. Der Grund dafür ist noch zu klären.

Adhäsion der iMSC#3:

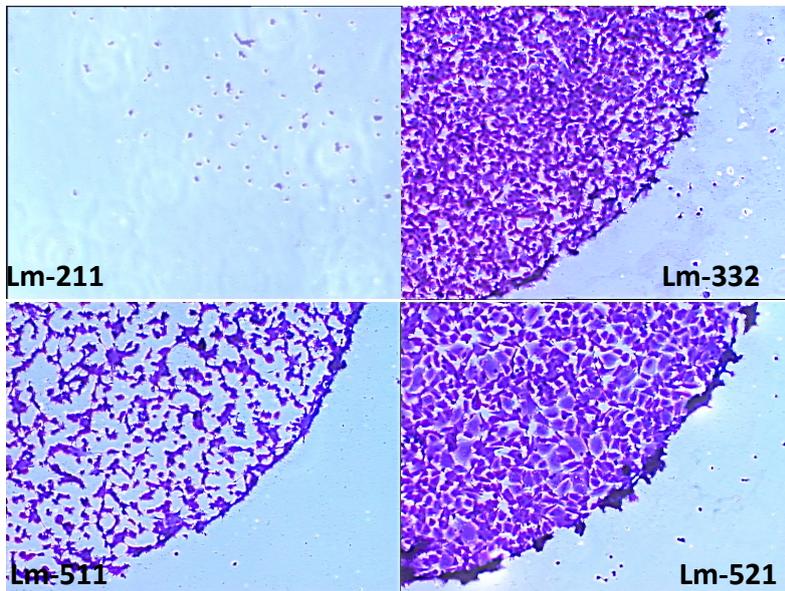


Abbildung 10: **Adhäsion der iMSC#3 Zellen an Laminin-Isoformen.** Die Adhäsion der iMSC#3- Zellen an die Laminine -332, -511 und -521 ist deutlich zu erkennen. An Lm-211 findet keine Anheftung statt. Bei Lm-332 und Lm-521 ist ein deutliches Ausbreiten der Zellen zu beobachten, das sogenannte „Spreading“. Vergrößerung: x 50.

Adhäsion der MSC PKR:

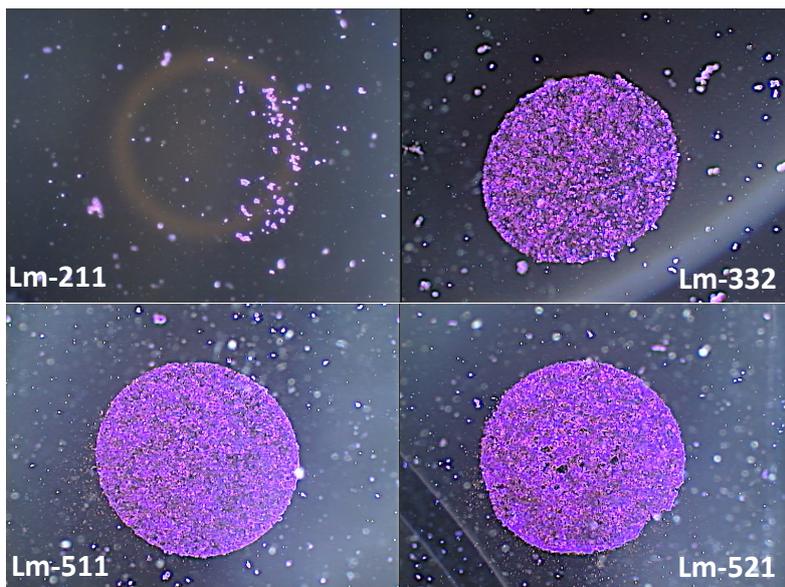


Abbildung 11: **Adhäsion der MSC PKR Zellen an Laminin-Isoformen.** Die Adhäsion der MSC PKR- Zellen an die Laminine -332, -511 und -521 ist deutlich zu erkennen. An Lm-211 findet keine Anheftung statt. Vergrößerung: x 12.5.

Adhäsion der JPCs:

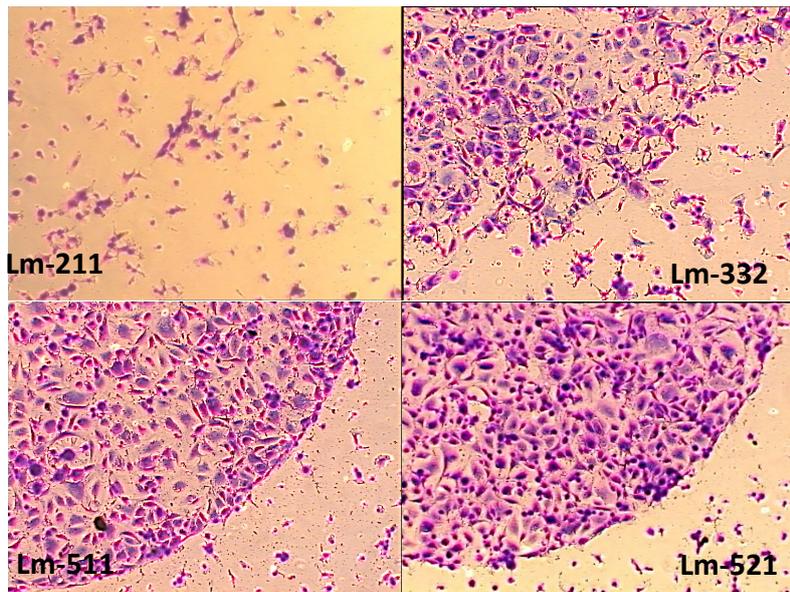


Abbildung 12: **Adhäsion der JPC Zellen an Laminin-Isoformen.** Die Adhäsion der JPC-Zellen an die Laminine -332, -511 und -521 ist deutlich zu erkennen. An Lm-211 findet keine Anheftung statt. Bei Lm-521 ist eine Ausbreitung der Zellen zu sehen, das sogenannte „Spreading“. Vergrößerung: x 50.

Adhäsion der TAg58:

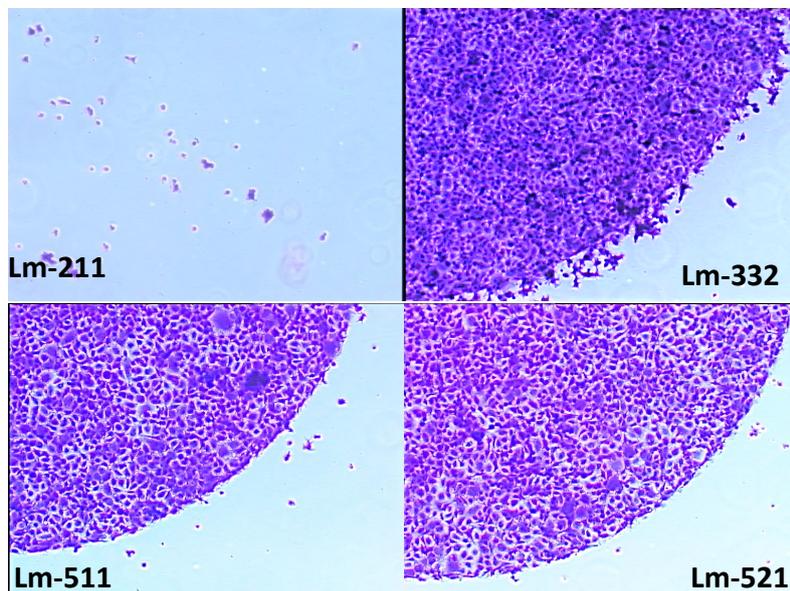


Abbildung 13: **Adhäsion der TAg58 Zellen an Laminin-Isoformen.** Die Adhäsion der TAg58-Zellen an die Laminine -332, -511 und -521 ist deutlich zu erkennen. An Lm-211 findet keine Anheftung statt. Bei Lm-332 ist eine Ausbreitung der Zellen zu sehen, das sogenannte „Spreading“. Vergrößerung: x 50.

Auch bei den iPSCs zeigen Lm-511 und Lm-521 das stärkste Potential. Auch an Lm-332 ist eine Bindung, wenn auch nicht so ausgeprägt wie an Lm-521, zu beobachten. Lm-211 zeigt keinerlei Bindung (Abb. 14).

Adhäsion der iPSCs:

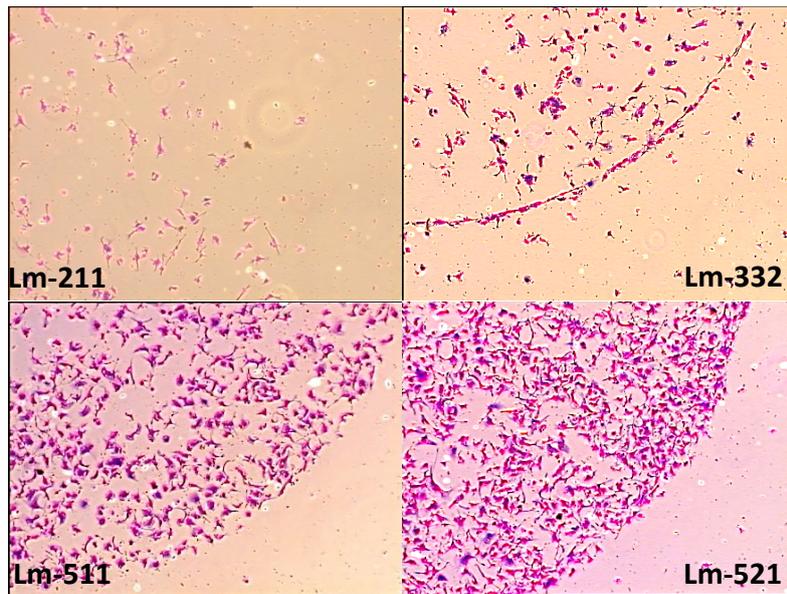


Abbildung 14: **Adhäsion der iPSCs-Zellen an Laminin-Isoformen.** Die Adhäsion der iPSCs-Zellen an die Laminine -332, -511 und -521 ist deutlich zu erkennen. An Lm-211 findet keine Anheftung statt. Vergrößerung: x 50.

Nicht erklärt werden konnte die Interaktion der verschiedenen Zelltypen mit den Laminin-Isoformen, die entweder die $\alpha 1$ oder die $\alpha 4$ Kette beinhalteten. Hier waren in vier unabhängigen Versuchen an verschiedenen Tagen keine konstant reproduzierbaren Ergebnisse zu erzielen (siehe Abb. 15).

In Tabelle 8 sind die variablen Ergebnisse für TAg58 an Lm-111, Lm-121, Lm-411 und Lm-421 als repräsentatives Beispiel in einer Übersicht zu sehen.

Adhäsion von Tag58 an Lm-421:

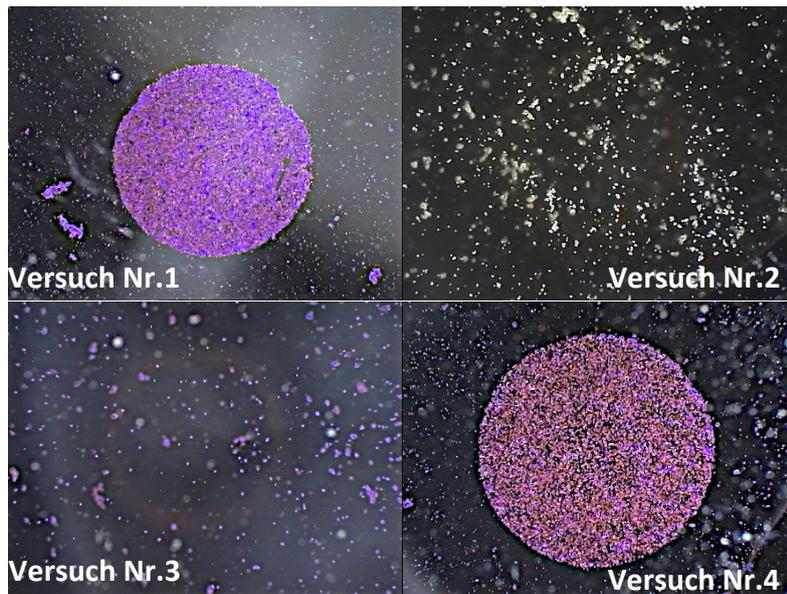


Abbildung 15: **Adhäsion von TAG58 an Lm-421**; Zu sehen sind die Ergebnisse für Lm-421 für die Zelllinie Tag58. Der Adhäsionsversuch wurde mehrmals unter denselben Bedingungen durchgeführt, doch wurden keine konstanten Ergebnisse erhalten. Dies gilt auch für die anderen verwendeten Zelltypen, ebenso für die Laminine -111, -121 und -411. Vergrößerung: x 12.5.

Tabelle 8: Übersicht der variablen Adhäsionsergebnisse für TAG58 an die Laminin-Isoformen Lm-111, Lm-121, Lm-411 und Lm-421.

Laminin-Isoform	Versuch Nr.1	Versuch Nr.2	Versuch Nr.3	Versuch Nr.4
Lm-111	++	+	-	+
Lm-121	++	++	-	+
Lm-411	++	-	++	-
Lm-421	++	+/-	-	++

- keine Bindung +/- vereinzelte Bindung + Bindung ++ starke Bindung

Konzentrationsabhängige Bindung an Laminin-Isoformen

Um die Spezifität der Bindung der Zellen an die einzelnen konstant adhäsiven Laminin-Isoformen aufzuzeigen, wurde eine Verdünnungsreihe der Laminine -332, -511 und -521 aufgetragen. Durchgeführt wurde der Versuch jeweils mit den Zellen iMSC#3, TAG58, JPCs und MSC PKR. Die Abhängigkeit zwischen der Konzentration und der Adhäsion ist für alle getesteten Laminin-Isoformen bei allen verwendeten Zelltypen deutlich zu erkennen. Beispielhaft ist die Adhäsion von iMSC#3 an Lm-332 in Abhängigkeit der Konzentration in Abb. 16 gezeigt.

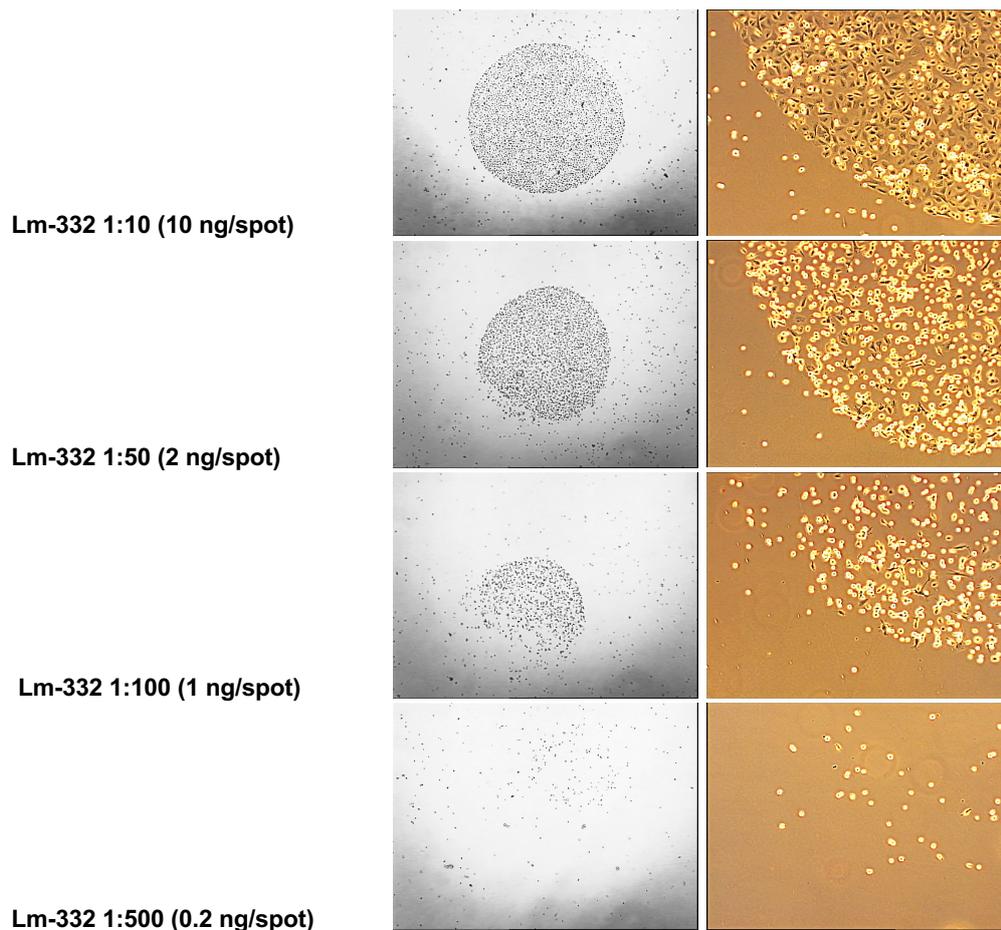


Abbildung 16: **Konzentrationsabhängige Bindung an Laminin-332**; Beispielhaft ist eine Adhäsion von iMSC#3 an Lm-332 in Abhängigkeit der Konzentration gezeigt. Die linke Spalte zeigt die vollständigen Spots, in der rechten Spalte ist vergrößert ca ein Viertel der mit Lm-332 bedeckten Fläche zu sehen. Vergrößerung linke Spalte: x 10; Vergrößerung rechte Spalte: x 40.

4.2.3 Migrationsassay

Ob die unterschiedlichen Laminin-Isoformen Einfluss auf die Wanderung der mesenchymalen Zellen haben, wurde mit einem Migrationsassay überprüft. Es wurde in einer Linie das jeweilige Laminin aufgetragen und mittels einer speziellen Kammer (ibidi Culture insert 2 well) separat rechts und links davon Zellen kultiviert. Nachdem die Zellen in den beiden Kammern einen konfluenten Rasen gebildet hatten, wurde die Kammer abgenommen und das Einwandern auf die Laminin-bedeckte Fläche im Vergleich zu der Migration ohne Laminin beobachtet. Der Versuch wurde mit den Zelllinien iMSC#3 und Tag58 und den primären mesenchymalen Stromazellen MSC PKR und JPC ausgeführt. Die Laminin-Isoformen Lm-332 und Lm-521 wurden ausgewählt, da sie einen starken Einfluss auf die Adhäsion der Zellen haben, das Adhäsionsverhalten an Lm-421 war bisher nicht eindeutig definiert und bei Lm-211 war kein adhäsiver Einfluss zu sehen. Die Migrationsversuche wurden mehrmals unter

denselben Bedingungen durchgeführt ($n \geq 3$). Das Ergebnis wurde subjektiv anhand der Aufnahmen nach 24h und 48h bestimmt. Es wurde bewertet, wie dicht die Besiedlung des Spaltes im Vergleich zur Kontrolle war. Es lässt sich bei allen analysierten Zelllinien ein Einfluss von Lm-332 und Lm-521 auf die Migration vermuten (Abb. 17-18). Bei den JPCs scheint auch Lm-421 die Migration zu fördern. In keinem Fall konnte ein inhibierender Effekt der einzelnen Laminin-Isoformen auf die Migration beobachtet werden.

Migrationsassay JPCs

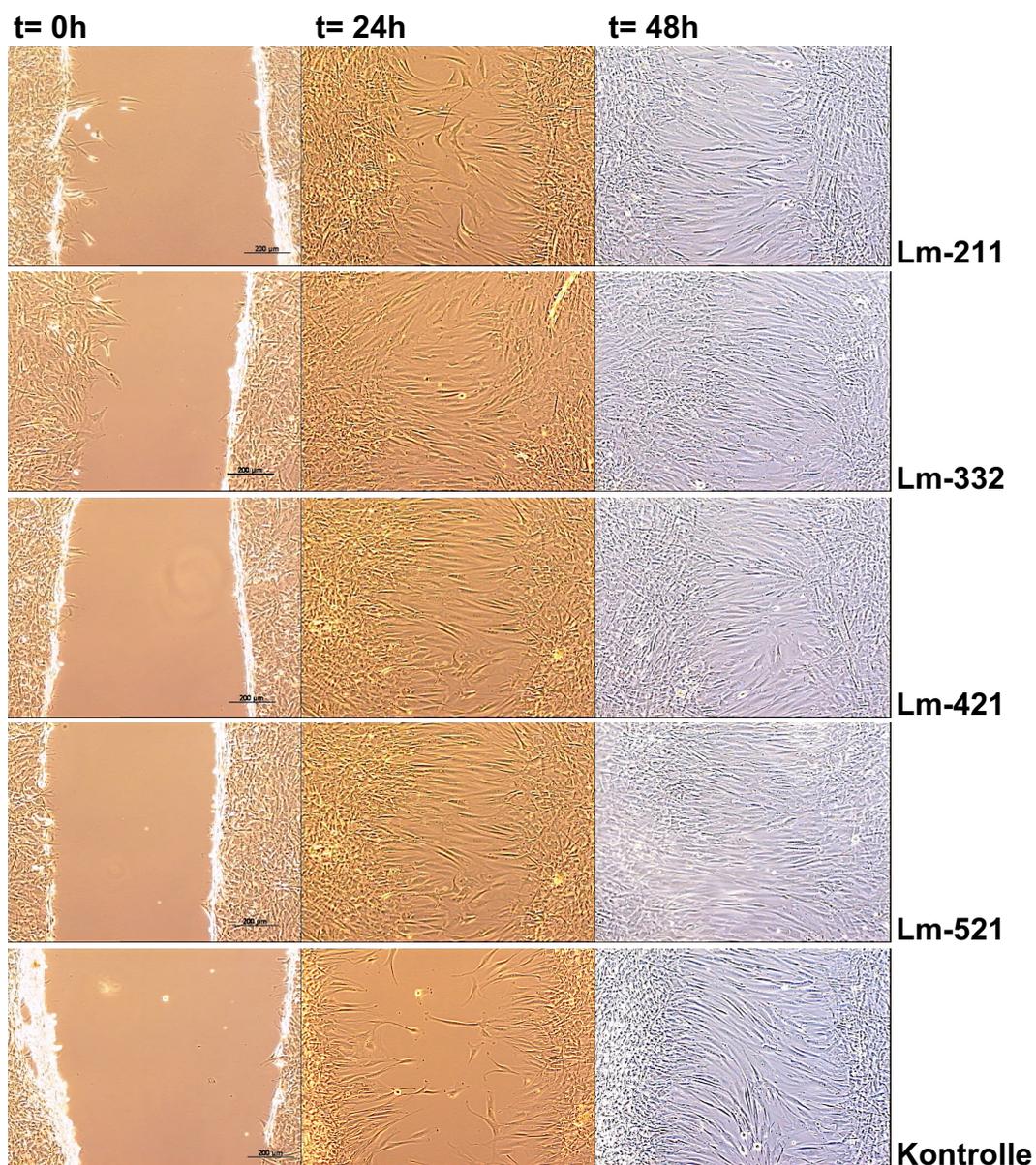


Abbildung 17: **Migrationsassay mit JPCs.** Zu sehen ist das Migrationsverhalten unter Einfluss der Laminine Lm-211, Lm-332, Lm-421, Lm-521 und die Kontrolle ohne Laminin. Die Spalten zeigen die Aufnahmen zu verschiedenen Zeitpunkten (von links: t=0, t=24, t=48). Es lässt sich ein Einfluss von Lm-332, Lm-421 und Lm-521 auf die Migration erkennen. Die Maßstabsbalken entsprechen 200 μm.

Migrationsassay iMSC#3

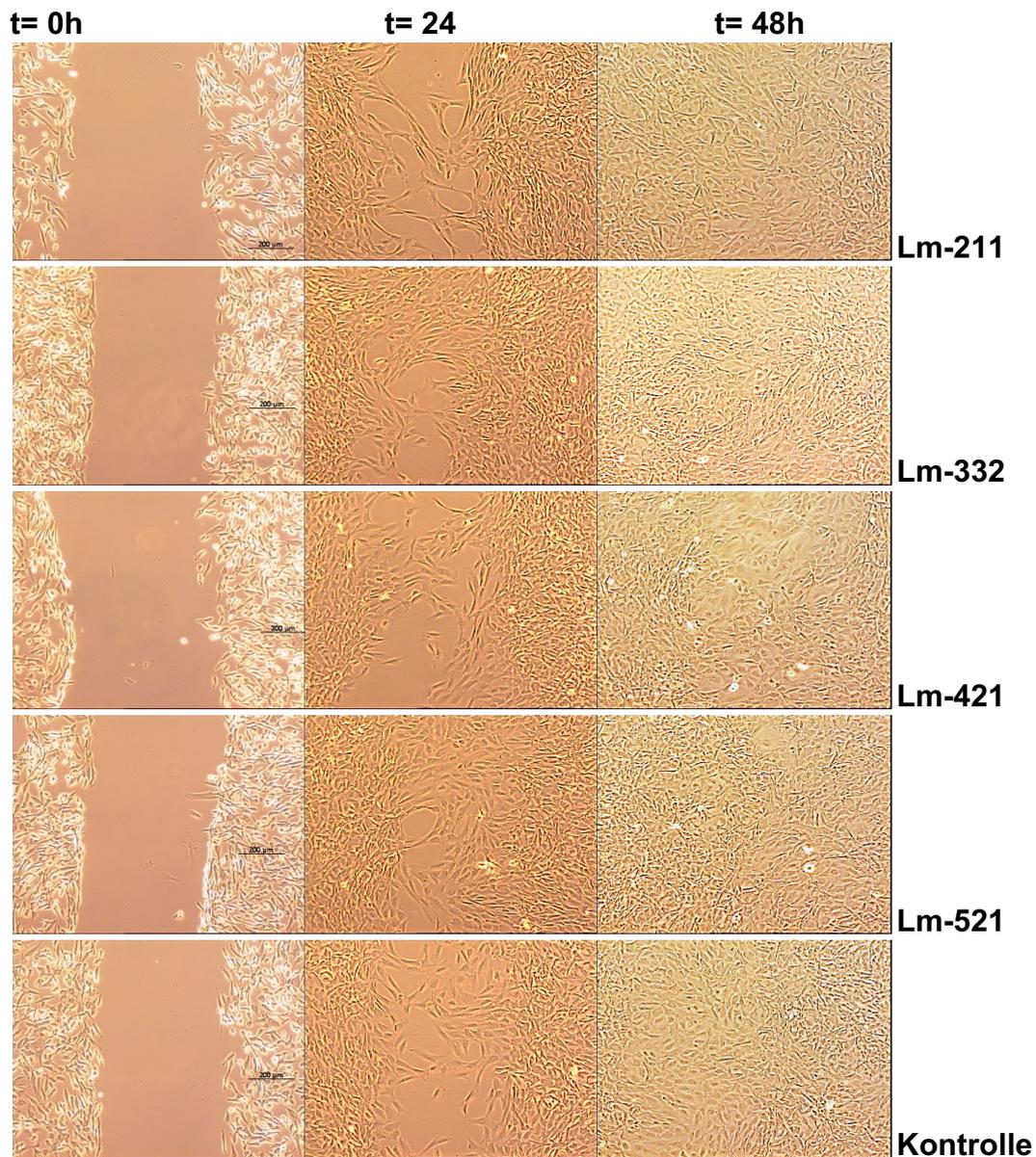


Abbildung 18: **Migrationsassay mit iMSC#3**. Zu sehen ist das Migrationsverhalten unter Einfluss der Laminine Lm-211, Lm-332, Lm-421, Lm-521 und die Kontrolle ohne Laminin. Die Spalten zeigen die Aufnahmen zu verschiedenen Zeitpunkten (von links: t=0, t=24, t=48). Es lässt sich, verglichen mit der Kontrolle, ein schwach positiver Einfluss von Lm-332 und Lm-521 auf die Migration erkennen. Die Maßstabsbalken entsprechen 200 µm.

4.2.4 Proliferationsassay

Um den Einfluss der verschiedenen Laminin-Isoformen auf die Proliferation der mesenchymalen Stromazellen zu testen, wurde in 96-Well-Platten 100 µl der jeweiligen Zellsuspension mit 100 ng des entsprechenden Laminins versetzt und für

24h oder 48h kultiviert. Vor der Messung wurde das Tetrazoliumsalz WST-1 dazugegeben, das nach Umsatz in Formazan durch eine mitochondriale Dehydrogenase die Stoffwechselaktivität angibt und somit mit der Anzahl an vorhandenen Zellen korreliert werden kann. Statistisch abgesicherte, eindeutige Ergebnisse waren aber nicht zu erhalten. Die Lamininzugabe wirkt keinesfalls inhibierend, sondern tendenziell stimulierend. Für die Zelltypen iMSC#3 und JPCs lässt sich eine tendenzielle Stimulation durch Lm-211 und LM-332 um etwa 10-20% beobachten (Abb.20).

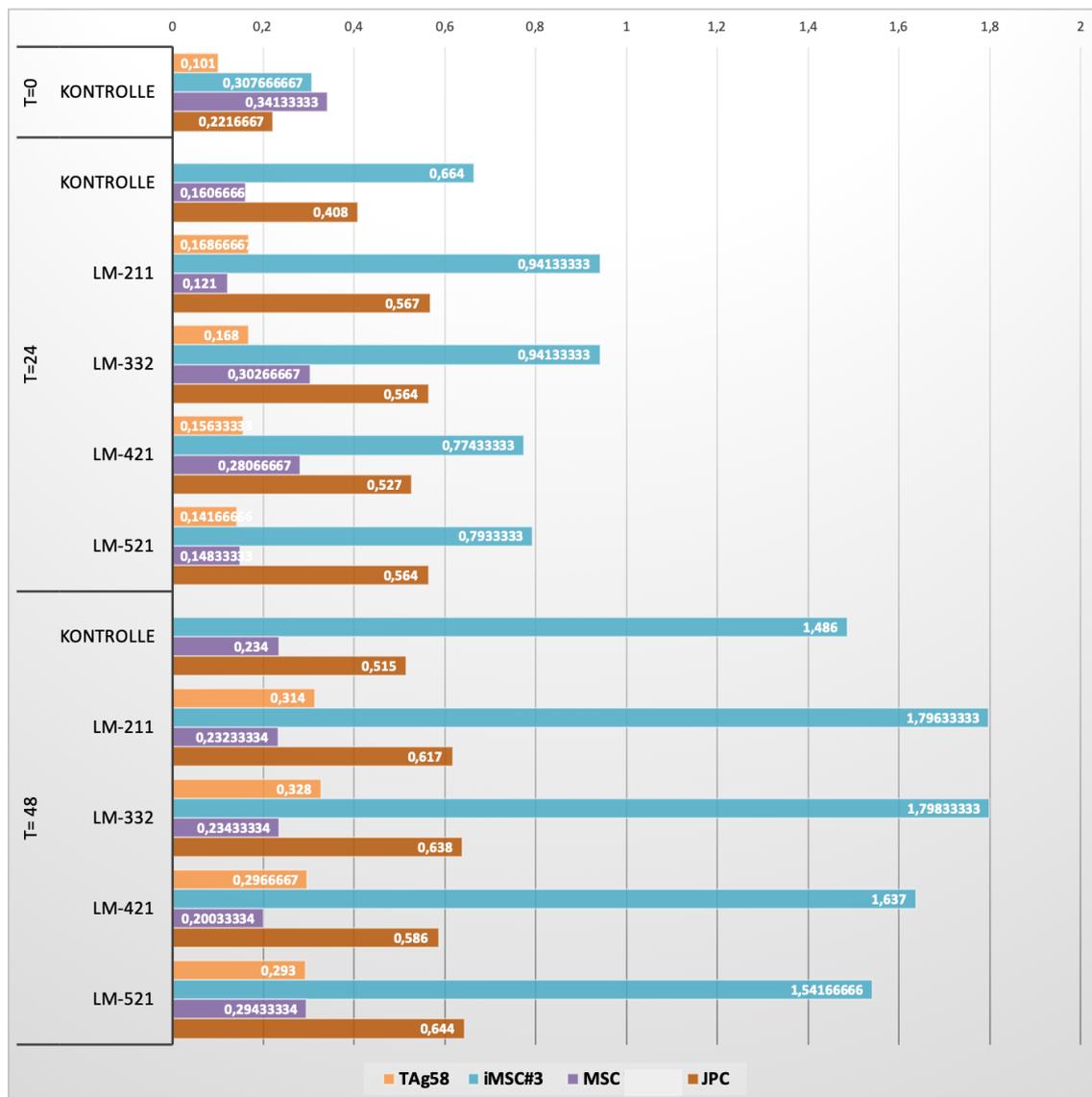


Abbildung 19: **Proliferation Übersicht:** Es wurden vier verschiedene Laminin-Isoformen verwendet. Gemessen wurde nach 0, 24 und 48h. Der Kontrolle wurde kein Laminin zugesetzt. Angegeben sind die Mittelwerte der Triplikate der gemessenen Adsorptionswerte, die in der oben angezeigten Skala (0.0 -2.0) angegeben sind. Der gesamte Versuch (mit Triplikaten) wurde einmal durchgeführt (N=1).

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden mesenchymale Stammzellen aus dem Kieferperiost auf molekularer Ebene charakterisiert. Laminine bilden eine Familie von Glykoproteinen, die in der Basalmembran von Zellen essentiell für deren Funktion und Überleben sind. Seeger et al. (2015) konnten zeigen, dass Laminine jedoch auch bei bmMSCs vorkommen, die selbst keine Basalmembran ausbilden. In dieser Arbeit wurde die Expression von Laminin-Isoformen in JPCs im Vergleich zu MSCs aus dem Knochenmark auf RNA- und Protein-Ebene untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass auch mesenchymale Stammzellen aus dem Kieferperiost verschiedene Laminin-Isoformen bilden können. Funktionell wurden die Zelltypen mit humanen rekombinanten Laminin-Isoformen in verschiedenen Assays analysiert, um die Interaktion der Laminine mit den JPCs zu überprüfen. Da JPCs primäre, heterogene Zellen sind, wurden zum Vergleich eine immortalisierte Zelllinie der JPCs und aus ihnen abgeleitete induzierte pluripotente Stammzellen untersucht. Bei der Migration und Proliferation konnten nur Tendenzen, aber keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden. Bei der Adhäsion zeigte sich, dass definierte Laminin-Isoformen einen stark adhäsiven Charakter für die verwendeten Zelltypen haben.

5.1 Gen-Expression

Die quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) ist eine etablierte Methode für die Quantifizierung der Nukleinsäurenexpression (Rasmussen et al. 1998). Die Bestimmung der Amplifikationseffizienz sollte zwingend zu den ersten Schritten der qRT-PCR gehören. Die Effizienz der Primer kann als Quotient oder in Prozent angegeben werden. Eine Zielsequenz kann theoretisch maximal jeden Zyklus verdoppeln, da die DNA zwei Stränge aufweist. Idealerweise sollte sich daher die Anzahl der DNA-Moleküle pro Zyklus verdoppeln, was einer Amplifikationseffizienz von 100% entspricht. Die Anzahl replizierter Moleküle beträgt jedoch immer weniger als das Doppelte, weil chemische Reaktionen nie mit 100% Effizienz ablaufen. Sinkt die Effizienz aber unter 1.7 (oder 85%), ist dies auf eine nicht optimale Amplifikation zurückzuführen (Primer <> Zielsequenz, Enzym <> Substrate <> Temperatur usw.) und kann bei Werten unter 1.7 zu falschen Ergebnissen der qRT-PCR führen. Die in dieser Arbeit verwendeten Primer erzielten Werte zwischen 1.8 und 2.

Dass Laminine auch von bmMSCs gebildet werden, wurde erstmals 2015 von Seeger et al. beschrieben. Bei der Überprüfung der Primerpaare war für die Primer der Lm- β 3 Kette nicht die erforderliche Effizienz vorhanden und daher konnten diese nicht für die qRT-PCR verwendet werden. Dies war auch bei Seeger et al. (2015) der Fall. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass in der „gepoolten cDNA“ keine cDNA für Lm- β 3 vorhanden ist. Eine bereits erfolgreiche Verwendung des β 3-Primers in einer Endpunkt-PCR ist von Siler et al. (2000) beschrieben. Für alle anderen Laminin-Ketten ist die mRNA bei den getesteten Zelltypen in unterschiedlichem Ausmaß nachzuweisen. Die einzige Laminin-Isoform, die β 3 beinhaltet und in dieser Arbeit für funktionelle Studien verwendet wurde, ist Lm-332 (Uehara et al. 2017). Jedoch zeigen die qRT-PCR Ergebnisse, dass kaum Lm- α 3 exprimiert wurde. Somit ist anzunehmen, dass die Interaktion zwischen Lamininen und Zellen und deren Fähigkeit, diese Laminine selbst zu synthetisieren, in keinem Zusammenhang stehen muss. Die mRNA von Lm- γ 1 wurde von den mesenchymalen Stammzellen am stärksten exprimiert. *In vivo* hat Lm- γ 1 in der Basalmembran u.a. die Aufgabe, an das Glycoprotein Nidogen zu binden, das als Verbindungsglied zwischen Laminin-Netzwerken und Kollagen-Netzwerken dient (Pozzi et al. 2017). Ob MSCs selbst Nidogen exprimieren, ist unbekannt. Die starke Expression der Lm- α 4 und Lm- α 5 Ketten durch die MSCs korreliert mit den Ergebnissen der Immunfluoreszenz. Lm- α 4 und Lm- α 5 sind im adulten Organismus die am häufigsten vorkommenden Laminin-Isoformen (Domogatskaya et al. 2012). Auffällig ist, dass die iPSCs selbst nur Lm- α 5 exprimieren, ihre Abkömmlinge (MSCs) jedoch auch Lm- α 4 enthalten. Im Kieferbereich ist das Verteilungsmuster der Laminine *in vivo* jedoch gänzlich unbekannt, dies müsste an Gewebeschnitten evaluiert werden.

5.2 Laminine

Bevor die Möglichkeit bestand, stabile rekombinante Laminin-Isoformen experimentell zu verwenden, wurden Laminine aus dem EHS (Engelbreth-Holm-Swarm)-Tumor der Maus oder aus humanem Plazenta-Gewebe gewonnen. Durch den enzymatischen Verdau des Gewebes waren einige der so gewonnenen Laminine jedoch nicht vollständig intakt, und auch Mischformen der Laminin-Isoformen waren nicht auszuschließen (Wondimu et al. 2006). Da die Laminine heutzutage rekombinant synthetisiert werden, sind stabile, humane und definierte Laminin-Isoformen verfügbar

(siehe: Biolamina, Sundbyberg, Stockholm, Schweden), deren spezifische Funktionsweisen getrennt voneinander untersucht werden können.

5.3 Funktionsassays

Für ein besseres Verständnis des Einflusses von Lamininen auf JPCs wurden Adhäsions-, Migrations- und Proliferationsversuche durchgeführt.

Eine stark adhäsive Interaktion wurde für die Laminine 332, 511 und 521 beobachtet. Keine offensichtliche Interaktion konnte dagegen mit der Isoform Lm-211 detektiert werden. Das bedeutet, dass die MSCs an Laminine binden können, die sie sowohl selbst synthetisieren (Lm-511, Lm-521), als auch an solche, für die sie keine Genexpression zeigen (Lm-332). Diese Spezifität lässt Rückschlüsse auf die Rezeptoren zu, die die Zellen für die Bindung an Laminine benutzen. Die hauptsächlichen Rezeptoren für Laminine sind Integrine, eine Familie von Heterodimeren, die auf der Membran lokalisiert sind. Zu den wichtigsten Laminin-bindenden Integrinen gehören die Rezeptoren $\alpha3\beta1$, $\alpha6\beta1$, $\alpha6\beta4$ und $\alpha7\beta1$ (Aumailley, 2013). Weitere wichtige Rezeptoren für die Lamininbindung sind Dystroglykan und Lutheran / BCAM (Yousif et al. 2013). Welche dieser Rezeptoren von den JPCs gebildet werden, ist jedoch noch nicht bekannt und sollte auch noch funktionell analysiert werden.

Interessant ist auch, dass Lm-211 keinerlei adhäsive Interaktion mit JPCs zeigt, obwohl diese Isoform von JPCs gebildet wird. Es ist möglich, dass die JPCs daher für diese Laminin-Isoform keinen Rezeptor besitzen. Erwähnt werden muss, dass bei Verwendung von den Laminin-Isoformen Lm-111, Lm-121, Lm-411 und Lm-421 trotz vielfacher Versuche keine verlässlich reproduzierbaren Ergebnisse erzielt werden konnten, obwohl unter konstanten Bedingungen gearbeitet wurde. Der Grund dafür ist unbekannt. Ob es eventuell Schwankungen bei der Rezeptor-Expression gibt, muss noch eruiert werden.

Laminine sind auch aktiv an der Zellmigration beteiligt (Gorfu et al. 2008, Ngyen-Ngof et al. 2012). Vor allem Lm-332, Lm-411 und Lm-511 scheinen einen großen Einfluss auf die Migration verschiedener Zelltypen zu haben. So fördert Lm-332, das aus der Zelllinie „SSC25“ gewonnen wurde, die Migration von reifen Thymozyten durch Bindung an die Integrine $\alpha3\beta1$ und $\alpha6\beta4$ (Vivinus-Nebot et al. 2004). Via Integrin $\alpha3\beta1$ verbessert es sowohl die Adhäsion als auch Migration von Mastzellen (Sime et al.

2009). Mit Plazenta- isoliertem Lm-511 konnte gezeigt werden, dass diese Isoform eine wichtige Rolle bei der Migration von Neutrophilen spielt und ebenfalls die Adhäsion und Migration von Mastzellen fördert (Song et al. 2017, Sime et al. 2009). Im Kontrast dazu kann Lm- α 5 die Migration von „*plasmacytoid dendritic cells*“ (pDCs) ins Endothelium verhindern, während Lm- α 4 einen fördernden Einfluss hat (Simon and Bromberg 2017).

In dieser Arbeit wurden durch technische Schwierigkeiten bei der Versuchsdurchführung des Migrationsassays noch keine signifikanten Ergebnisse erzielt. Da den rekombinanten Lamininen Glycerin zugefügt ist, trocknen diese nach Aufbringen auf der Petrischale nicht vollständig an. Das führt dazu, dass sich nur sehr schwer eine klare Begrenzung in den ibidi-Kammern erreichen lässt. Deshalb kann aus den Versuchen allenfalls ein fördernder Einfluss von Lm-332 und Lm-521 vermutet werden. Die detaillierten Mechanismen, die den Auswirkungen von Lamininen auf die Migration der JPCs zugrunde liegen, sind bislang ungeklärt.

Auch die Proliferation wird von manchen Laminin-Isoformen beeinflusst. So begünstigt z.B. Lm-511 die Selbsterneuerung humaner pluripotenter Stammzellen (Rodin et al. 2010), und auch die Proliferation von Endothelzellen der Cornea bzw. „*limbal epithelial progenitor cells*“ wird durch Lm-511/521 gefördert (Okumura et al. 2015, Poliseti et al. 2017). Und Seeger et al. konnten zeigen, dass MSCs, die myogen differenziert wurden, nach 7 Tagen in Kultur mit Lm-521 eine signifikant erhöhte Proliferationsrate aufweisen. Auch von einer Proliferations-inhibierenden Wirkung der Laminine auf undifferenzierte MSCs wurde berichtet (Seeger et al. 2015). In der vorliegenden Arbeit kann ein tendenziell positiver Einfluss durch Lm-211 und Lm-332 vermutet werden, eine inhibierende Wirkung wird aber in keinem Fall beobachtet.

5.4 Zelltypen

Die in dieser Arbeit verwendeten JPCs wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Alexander aus der Zahnklinik der Universität Tübingen zur Verfügung gestellt. Die JPCs sind primäre Zellen, die bei Routineeingriffen mit dem Einverständnis des Patienten entnommen werden. Dabei ist der Vorgang jedoch nicht standardisiert. Weder die Entnahmestelle im Mundraum noch das Instrument zur Gewebeentnahme oder die Technik der Ärzte wurden festgelegt. Zudem ist es fraglich, ob die Eigenschaften, wie z.B. das Mineralisierungspotential von Periozotten, die einmal

aus der Alveole und ein anderes Mal an der Knochenoberfläche des Kiefers entnommen wurden, übereinstimmen. Auch das Alter und der Gesundheitszustand der Spender und deren Gewohnheiten wie Rauchen und Alkoholkonsum sind oftmals unbekannt. Somit gestaltet es sich schwierig, einheitliche Populationen zu generieren. Auch bereitet es bis heute noch Schwierigkeiten, die aus JPCs gewonnenen iPSCs zu kultivieren, ohne dass einige der Zellen spontan differenzieren (Umrath et al. 2019). Da es nur schwer möglich ist, diese strikt von den iPSCs zu trennen, waren bei den Versuchen mit den iPSCs stets auch differenzierte Zellen dabei, daher ist ein Einfluss dieser Zellen auf die Ergebnisse nicht auszuschließen. Da die JPCs bisher noch nicht so ausführlich analysiert wurden wie die mesenchymalen Stammzellen aus dem Knochenmark, wurden diese zum Vergleich untersucht. Die Ergebnisse zeigen sowohl bei der Synthese als auch bei der Interaktion mit den verwendeten Lamininen sowohl für die primären als auch für die immortalisierten Zelltypen übereinstimmende Ergebnisse.

5.5 Aussicht

Mit dieser Arbeit konnte die Vermutung, dass Laminine auch bei MSCs aus dem Kieferperiost eine Rolle spielen, bestätigt werden. Ein Einfluss von Lamininen auf JPCs wurde nach dem bisherigen Kenntnisstand zum ersten Mal aufgezeigt. Welches Ausmaß die Rolle der Laminine umfasst, und ob andere Faktoren die Funktion der Laminine beeinflussen oder gar ersetzen könnten, muss in nachfolgenden Studien untersucht werden. Interessant wäre es zu analysieren, ob Laminine die osteogene Differenzierung der JPCs fördern könnten. Da eine deutliche Adhäsion der JPCs *in vitro* in dieser Arbeit bestimmt werden konnte, wäre es sinnvoll, den Einfluss der Laminine auf die lokale Verankerung dieser Zellen *in vivo* zu testen. Auch wäre es interessant zu untersuchen, ob Laminin-Isoformen ebenfalls einen Einfluss auf andere Stammzelltypen im Kieferbereich haben können.

6 Zusammenfassung

Mesenchymale Stammzellen mit einem osteogenem Potential sind für eine erfolgreiche Geweberegeneration des Knochens von großer Bedeutung. „*Jaw periosteal stem cells*“ (JPCs) bilden eine Form der mesenchymalen Stammzellen, die aus dem Periost des Kiefers isoliert werden können und eine vielversprechende Quelle für die Knochenregeneration in der Oral- und Kieferchirurgie darstellen. Laminine sind heterotrimere Moleküle, die hauptsächlich in der Basalmembran vorkommen, aber auch in der Stammzellbiologie eine wichtige Rolle spielen, indem sie Proliferation, Adhäsion, Migration und Differenzierung von Stammzellen beeinflussen können. In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von verschiedenen Laminin-Isoformen in JPCs im Vergleich zu bmMSCs dargestellt. Auch aus JPCs abgeleitete induzierte pluripotente Stammzellen (iPSCs) wurden untersucht. Eine starke Expression der Lm- α 5- und Lm- α 4 Ketten in JPCs und bmMSCs sowie von Lm- α 5 von iPSC konnte beobachtet werden. Dies zeigt, dass auch MSCs, die selbst keine Basalmembran ausbilden, verschiedene Laminin-Isoformen synthetisieren können. Funktionell wurden die Zellen in verschiedenen Assays analysiert, um den Effekt von humanen rekombinanten Laminin-Isoformen auf die biologische Aktivität der Zellen, wie Adhäsion, Migration und Proliferation zu untersuchen. Während bei der Migration und Zellproliferation nur geringe Tendenzen zu registrieren sind, konnte eine starke Adhäsion an Lm-332, Lm-511 und Lm-521 von allen mesenchymalen Zellen beobachtet werden. Somit konnte eine spezifische Interaktion von JPCs und den aus ihnen abgeleiteten iPSCs mit Lamininen aufgezeigt werden.

Literaturverzeichnis

- Alexander D**, Rieger M, Klein C, Ardjomandi N, Reinert S. Selection of osteoprogenitors from the jaw periosteum by a specific animal-free culture medium. *PLoS One*, 8(12): e81674, 2013.
- Alexander D**, Biller R, Rieger M, Ardjomandi N, Reinert S. Phenotypic characterization of a human immortalized cranial periosteal cell line. *Cell Physiol Biochem*, 35(6): 2244-2254, 2015.
- Aumailley M**. The laminin family. *Cell Adh Migr*, 7(1): 48-55, 2013.
- Aumailley M**, Bruckner-Tuderman L, Carter WG, Deutzmann R, Edgar D, Ekblom P, Engel J, Engvall E, Hohenester E, Jones JC, Kleinman HK, Marinkovich MP, Martin GR, Mayer U, Meneguzzi G, Miner JH, Miyazaki K, Patarroyo M, Paulsson M, Quaranta V, Sanes JR, Sasaki T, Sekiguchi K, Sorokin LM, Talts JF, Tryggvason K, Uitto J, Virtanen I, von der Mark K, Wewer UM, Yamada Y, Yurchenco PD. A simplified laminin nomenclature. *Matrix Biol*, 24(5): 326-332, 2005.
- Aumüller G**. *Lehrbuch Duale Reihe Anatomie*. Thieme, 2014.
- Bongso A**, Fong CY, Gauthaman K. Taking stem cells to the clinic: major challenges. *J Cell Biochem*, 105: 1352-1360, 2008.
- Campana V**, Milano G, Pagano E, Barba M, Cicione C, Salonna G, Lattanzi W, Logroscino G. Bone substitutes in orthopaedic surgery: from basic science to clinical practice. *J Mater Sci: Mater Med*, 25: 2445-246, 2014.
- Caplan A**, Correa D. The MSC: an injury drug store. *Cell Stem Cell* 9: 11-15, 2011.
- Chanchareonsook N**, Junker R, Jongpaiboonkit L, Jansen J. Tissue-engineered mandibular bone reconstruction for continuity defects: a systematic approach to the literature. *Tissue Eng Part B Rev*, 20(2): 147-162, 2014.
- De Bari C**, Dell'Accio F, Vanlauwe J, Eyckmans J, Khan IM. Mesenchymal multipotency of adult human periosteal cells demonstrated by single-cell lineage analysis. *Arthritis Rheum*, 54: 1209-1221, 2006.
- Dominici M**, Le Blanc K, Müller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4): 315-317, 2006.
- Domogatskaya A**, Rodin S, Tryggvason K. Functional diversity of laminins. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 28: 523-553, 2012.
- Durbeej M**. Laminins. *Cell Tissue Res*, 339(1): 259-268, 2010.
- Faour O**, Dimitriou R, Cousins CA. The use of bone graft substitutes in large cancellous voids: any specific needs? *Injury*, 42: S87-S90, 2011.

- Fernandez de Grado G**, Keller L, Idoux-Gillet Y, Wagner Q, Musset AM, Benkirane-Jessel N, Bornert F, Offner D. Bone substitutes: a review of their characteristics, clinical use, and perspectives for large bone defects management. *J Tissue Eng*, 9: 2041731418776819, 2018.
- Forostyak O**, Dayanithi G, Forostyak S. CNS Regenerative medicine and stem cells. *OM&P*, 10.20388/omp2016.001.0023, 2016.
- Gorfu G**, Virtanen I, Hukkanen M, Lehto VP, Rousselle P, Kenne E, Lindbom L, Kramer R, Tryggvason K, Patarroyo M. Laminin isoforms of lymph nodes and predominant role of alpha5-laminin(s) in adhesion and migration of blood lymphocytes. *J Leukoc Biol*, 84(3): 701-712, 2008.
- Gronthos S**, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97(25): 13625-13630, 2000.
- Gronthos S**, Chen S, Wang CY, Robey PG, Shi S. Telomerase accelerates osteogenesis of bone marrow stromal stem cells by upregulation of CBFA1, osterix, and osteocalcin. *J Bone Miner Res*, 18: 716-722, 2003.
- Hammarstrom L**, Alatlil I, Fong CD. Origins of cementum. *Oral Dis*, 2: 63-69, 1996.
- Han C**, Yang Z, Zhou W, Jin F, Song Y, Wang Y, Huo N, Chen L, Qian H, Hou R, Duan Y, Jin Y. Periapical follicle stem cell: a promising candidate for cementum/periodontal ligament regeneration and bio-root engineering. *Stem Cells Dev*, 19(9): 1405-1415, 2010.
- Han J**, Menicanin D, Gronthos S, Bartold PM. Stem cells, tissue engineering and periodontal regeneration. *Aust Dent J*, 59(1 Suppl): 117-130, 2014.
- Iorio V**, Troughton LD, Hamill KJ. Laminins: roles and utility in wound repair. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 4(4): 250-263, 2015.
- Ivanovski S**. Periodontal regeneration. *Aust Dent J*, 54(Suppl 1): S118-128, 2009.
- Iwata T**, Yamato M, Zhang Z, Mukobata S, Washio K, Ando T, Feijen J, Okano T, Ishikawa I. Validation of human periodontal ligament-derived cells as a reliable source for cytotherapeutic use. *J Clin Periodontol*, 37(12): 1088-1099, 2010.
- Janssen NG**, Weijts WLJ, Koole R, Rosenberg AJWP, Meijer GJ. Tissue engineering strategies for alveolar cleft reconstruction: a systematic review of the literature. *Clin Oral Invest*, 18(1): 219-226, 2014.
- Jones AC**, Arns CH, Sheppard AP, Hutmacher DW, Milthorpe BK, Knackstedt MA. Assessment of bone ingrowth into porous biomaterials using MICRO-CT. *Biomaterials*, 28(15): 2491-2504, 2007.
- Kaigler D**, Pagni G, Park C-H, Tarle SA, Bartel RL, Giannobile WV. Angiogenic and osteogenic potential of bone repair cells for craniofacial regeneration. *Tissue Engin A*, 16(9): 2809-2820, 2010. doi:10.1089/ten.tea.2010.0079

- Kvist** AJ, Nyström A, Hultenby K, Sasaki T, Talts JF, Aspberg A. The major basement membrane components localize to the chondrocyte pericellular matrix--a cartilage basement membrane equivalent? *Matrix Biol.* 27(1): 22-33, 2008.
- Lee** H, Park J, Forget BG, Gaines P. Induced pluripotent stem cells in regenerative medicine: an argument for continued research on human embryonic stem cells. *Regen Med*, 4: 759-769, 2009.
- Luan** X, Ito Y, Dangaria S, Diekwisch TG. Dental follicle progenitor cell heterogeneity in the developing mouse periodontium. *Stem Cells Dev*, 15(4): 595-608, 2006.
- Mahajan** A. Periosteum: a highly underrated tool in dentistry. *Int J Dent*, 2012: 717816, 2012.
- Martin** GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78: 7634-7638, 1981.
- Miner** JH, Cunningham J, Sanes JR. Roles for laminin in embryogenesis: exencephaly, syndactyly, and placentopathy in mice lacking the laminin alpha5 chain. *J Cell Biol*, 143(6): 1713-1723, 1998.
- Miura** M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100(10): 5807-5812, 2003.
- Nguyen-Ngoc** KV, Cheung KJ, Brenot A, Shamir ER, Gray RS, Hines WC, Yaswen P, Werb Z, Ewald AJ. ECM microenvironment regulates collective migration and local dissemination in normal and malignant mammary epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(39): E2595-2604, 2012.
- Okumura** N, Kakutani K, Numata R, Nakahara M, Schlötzer-Schrehardt U, Kruse F, Kinoshita S, Koizumi N. Laminin-511 and -521 enable efficient in vitro expansion of human corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 56(5): 2933-2942, 2015.
- Olbrich** M, Rieger M, Reinert S, Alexander D. Isolation of osteoprogenitors from human jaw periosteal cells: a comparison of two magnetic separation methods. *PLoS One*, 7(10): e47176, 2012.
- Padial-Molina** M, Rios HF. Stem cells, scaffolds and gene therapy for periodontal engineering. *Curr Oral Health Rep*, 1(1): 16-25, 2014.
- Padial-Molina** M, O'Valle F, Lanis A, Mesa F, Dohan Ehrenfest DM, Wang HL, Galindo- Moreno P. Clinical Application of Mesenchymal Stem Cells and Novel Supportive Therapies for Oral Bone Regeneration. *Biomed Res Int*, 2015: 341327, 2015.

- Polisetti** N, Sorokin L, Okumura N, Koizumi N, Kinoshita S, Kruse FE, Schlötzer-Schrehardt U. Laminin-511 and -521-based matrices for efficient ex vivo-expansion of human limbal epithelial progenitor cells. *Sci Rep*, 7(1): 5152, 2017.
- Pozzi** A, Yurchenco PD, Iozzo RV. The nature and biology of basement membranes. *Matrix Biol*, 57-58: 1-11, 2017.
- Rasmussen** RMT, Herrmann M, Wittwer C. Quantitative PCR by continuous fluorescence monitoring of double strand DNA specific binding dye. *Biochemica*, 2: 8-11, 1998.
- Rios** HF, Lin Z, Oh B, Park CH, Giannobile WV. Cell- and gene-based therapeutic strategies for periodontal regenerative medicine. *J Periodont*, 82(9): 1223-1237, 2011.
- Rodin** S, Domogatskaya A, Ström S, Hansson EM, Chien KR, Inzunza J, Hovatta O, Tryggvason K. Long-term self-renewal of human pluripotent stem cells on human recombinant laminin-511. *Nat Biotechnol*, 28(6): 611-615, 2010.
- Schartl** M, Gessler M, von Eckardstein A. *Lehrbuch Biochemie und Molekularbiologie des Menschen*. Urban und Fischer, 2009.
- Seeger** T, Hart M, Patarroyo M, Rolauffs B, Aicher WK, Klein G. Mesenchymal Stromal Cells for Sphincter Regeneration: Role of Laminin Isoforms upon Myogenic Differentiation. *PLoS One*, 10(9): e0137419, 2015.
- Seo** BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, Young M, Robey PG, Wang CY, Shi S. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*, 364(9429): 149-155, 2004.
- Shi** S, Bartold PM, Miura M, Seo BM, Robey PG, Gronthos S. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthodont Craniofacial Res*, 8(3): 191-199, 2005.
- Siler** U, Seiffert M, Puch S, Richards A, Torok-Storb B, Müller CA, Sorokin L, Klein G. Characterization and functional analysis of laminin isoforms in human bone marrow. *Blood*, 96(13): 4194-4203, 2000.
- Sillat** T, Saat R, Pöllänen R, Hukkanen M, Takagi M, Kontinen YT. Basement membrane collagen type IV expression by human mesenchymal stem cells during adipogenic differentiation. *J Cell Mol Med*, 16(7): 1485-1495, 2012.
- Sime** W, Lunderius-Andersson C, Enoksson M, Rousselle P, Tryggvason K, Nilsson G, Harvima I, Patarroyo M. Human mast cells adhere to and migrate on epithelial and vascular basement membrane laminins LM-332 and LM-511 via alpha3beta1 integrin. *J Immunol*, 183(7): 4657-4665, 2009.
- Simon** T, Bromberg J. Regulation of the Immune System by Laminins. *Trends Immunol*, 38(11): 858-871, 2017.

- Skårn M**, Noordhuis P, Wang MY, Veuger M, Kresse SH, Egeland EV, Micci F, Namløs HM, Håkelien AM, Olafsrud SM, Lorenz S, Haraldsen G, Kvalheim G, Meza-Zepeda LA, Myklebost O. Generation and characterization of an immortalized human mesenchymal stromal cell line. *Stem Cells Dev*, 23(19): 2377-2389, 2014.
- Smith A**. A glossary for stem-cell biology. *Nature*, 441: 1060, 2006.
- Slavkin HC**, Bringas P Jr, Bessem C, et al. Hertwig's epithelial root sheath differentiation and initial cementum and bone formation during long-term organ culture of mouse mandibular first molars using serumless, chemically-defined medium. *J Periodontal Res*, 24: 28-40, 1989.
- Song J**, Zhang X, Buscher K, Wang Y, Wang H, Di Russo J, Li L, Lütke-Enking S, Zarbock A, Stadtmann A, Striewski P, Wirth B, Kuzmanov I, Wiendl H, Schulte D, Vestweber D, Sorokin L. Endothelial basement membrane laminin 511 contributes to endothelial junctional tightness and thereby inhibits leukocyte transmigration. *Cell Rep.*, 18(5): 1256-1269, 2017.
- Sonoyama W**, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo BM, Zhang C, Liu H, Gronthos S, Wang CY, Wang S, Shi S. Mesenchymal stem cell- mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS One*, 1(1): e79, 2006.
- Squier CA**, Ghoneim S, Kremenak CR. Ultrastructure of the periosteum from membrane bone. *J Anat*, 171: 233-239, 1990.
- Steiniger B**, Schwarzbach H, Stachniss V. *Lehrbuch Mikroskopische Anatomie der Zähne und des Parodonts*. Thieme, 2010.
- Ten Cate AR**. Formation of supporting bone in association with periodontal ligament organization in the mouse. *Arch Oral Biol*, 20: 137-138, 1975.
- Theocharis AD**, Skandalis SS, Gialeli C, Karamanos NK. Extracellular matrix structure. *Adv Drug Deliv Rev*, 97: 4-27, 2016.
- Thyboll J**, Kortesmaa J, Cao R, Soininen R, Wang L, Iivanainen A, Sorokin L, Risling M, Cao Y, Tryggvason K. Deletion of the laminin $\alpha 4$ chain leads to impaired microvessel maturation. *Mol Cell Biol*, 22: 1194-1202, 2002.
- Uehara N**, Kukita A, Kyumoto-Nakamura Y, Yamaza T, Yasuda H, Kukita T. Osteoblast-derived Laminin-332 is a novel negative regulator of osteoclastogenesis in bone microenvironments. *Lab Invest*, 97(10): 1235-1244, 2017.
- Umrath F**, Steinle H, Weber M, Wendel HP, Reinert S, Alexander D, Avci- Adali M. Generation of iPSCs from jaw periosteal cells using self-replicating RNA. *Int J Mol Sci*, 20(7), 2019.
- Vivinus-Nebot M**, Rousselle P, Breitmayer JP, Cenciarini C, Berrih-Aknin S, Spong S, Nokelainen P, Cottrez F, Marinkovich MP, Bernard A. Mature human thymocytes migrate on laminin-5 with activation of metalloproteinase-14 and cleavage of CD44. *J Immunol*, 172(3): 1397-406, 2004.

- Wanner Y, Umrath F, Waidmann M, Reinert S, Alexander D.** Platelet lysate: the better choice for jaw periosteal cell mineralization. *Stem Cells Int*, 2017:8303959, 2017.
- Wondimu Z, Gorfu G, Kawataki T, Smirnov S, Yurchenco P, Tryggvason K, Patarroyo M.** Characterization of commercial laminin preparations from human placenta in comparison to recombinant laminins 2 ($\alpha 2\beta 1\gamma 1$), 8 ($\alpha 4\beta 1\gamma 1$), 10 ($\alpha 5\beta 1\gamma 1$). *Matrix Biol*, 25(2): 89-93, 2006.
- Wu J, Jin F, Tang L, Yu J, Xu L, Yang Z, Wu G, Duan Y, Jin Y.** Dentin non-collagenous proteins (dNCPs) can stimulate dental follicle cells to differentiate into cementoblast lineages. *Biol Cell*, 100(5): 291-302, 2008.
- Yasui T, Mabuchi Y, Toriumi H, Ebine T, Niibe K, Houlihan DD, Morikawa S, Onizawa K, Kawana H, Akazawa C, Suzuki N, Nakagawa T, Okano H, Matsuzaki Y.** Purified human dental pulp stem cells promote osteogenic regeneration. *J Dent Res*, 95(2): 206-214, 2016.
- Younger EM, Chapman MW.** Morbidity at bone graft donor sites. *J Orthop Trauma*, 3(3): 192-195, 1989.
- Yousif LF, Di Russo J, Sorokin L.** Laminin isoforms in endothelial and perivascular basement membranes. *Cell Adh Migr*, 7(1): 101-110, 2013.
- Zhai Q, Dong Z, Wang W, Li B, Jin Y.** Dental stem cell and dental tissue regeneration. *Front Med*, 13(2): 152-159, 2019.
- Zhu SJ, Choi BH, Huh JY, Jung JH, Kim BY, Lee SH.** A comparative qualitative histological analysis of tissue-engineered bone using bone marrow mesenchymal stem cells, alveolar bone cells, and periosteal cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 101(2): 164-169, 2006.

<https://www.rndsyste.ms.com/resources/posters/improved-expansion-msc-without-loss-differentiation-potential>

<https://www.slideshare.net/marisolvirola/periodontium-1183119>

Anhang

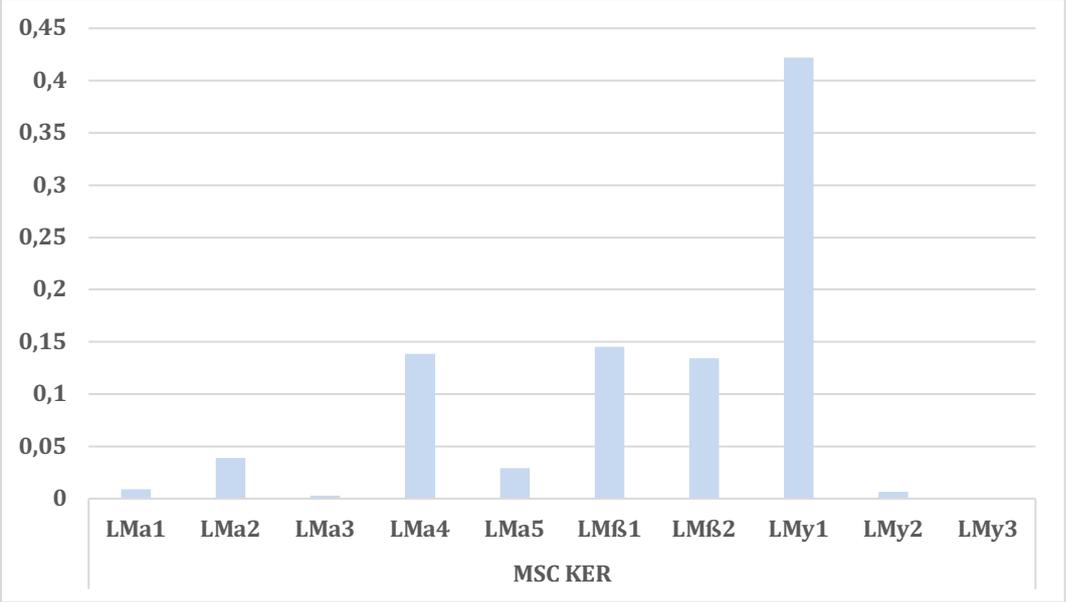


Abbildung 20: RT- PCR MSC KER

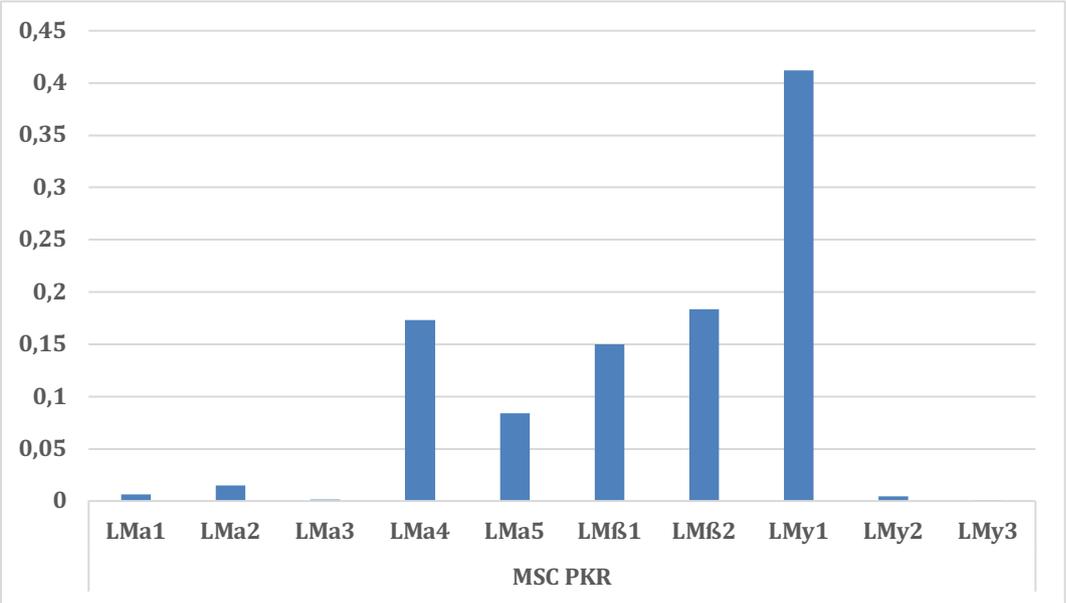


Abbildung 21: RT-PCR MSC PKR

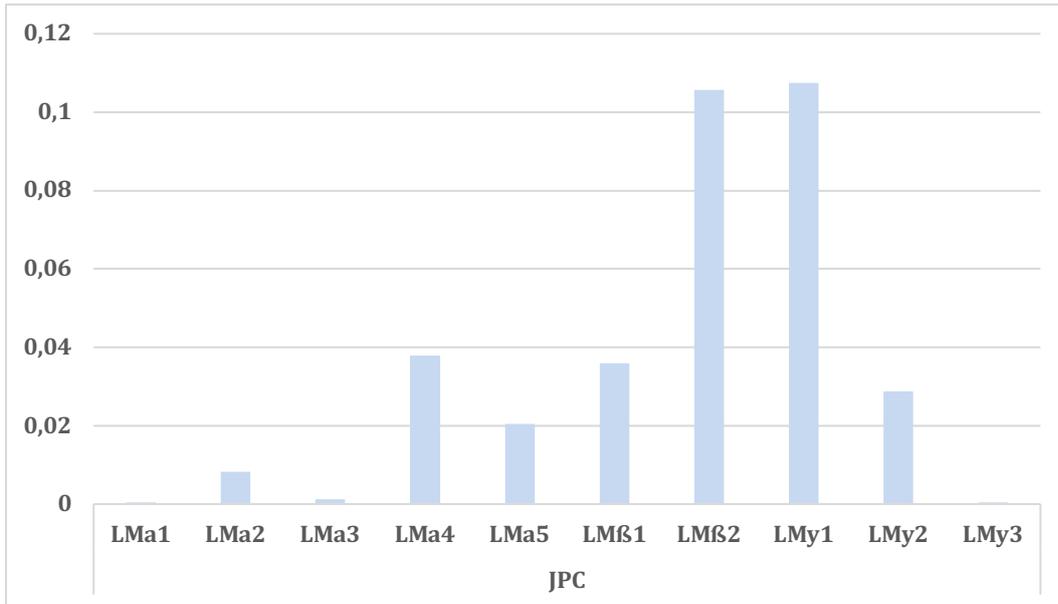


Abbildung 22: RT-PCR JPC

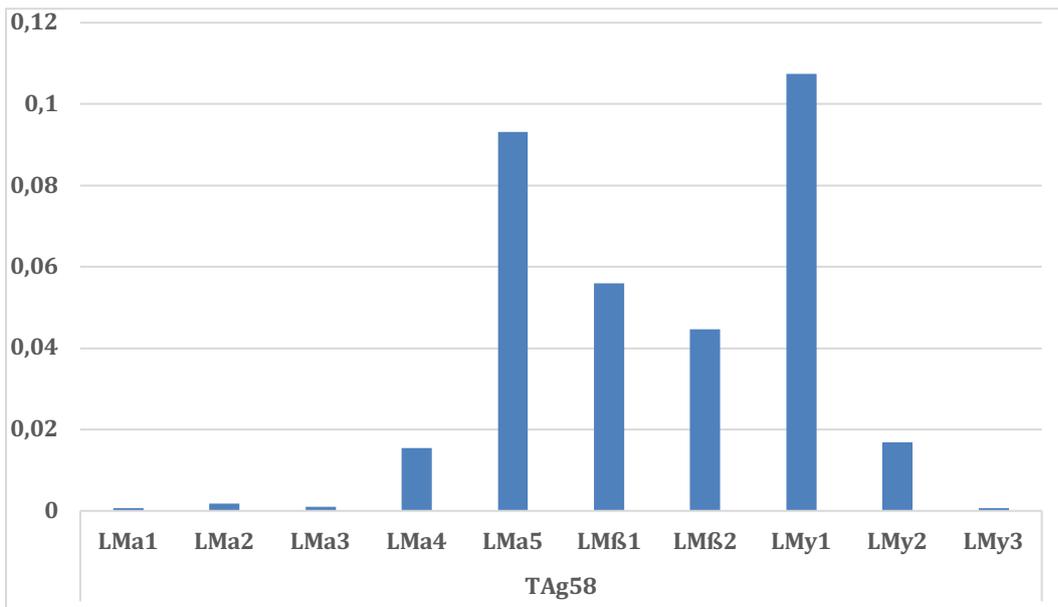


Abbildung 23: RT-PCR TAg58

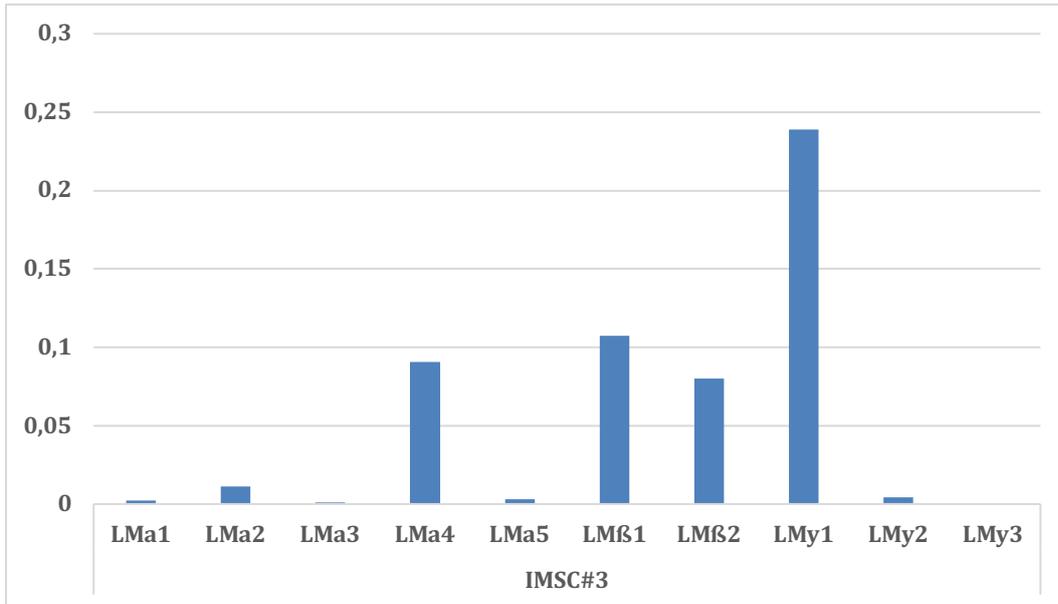


Abbildung 24: RT-PCR iMSC#3

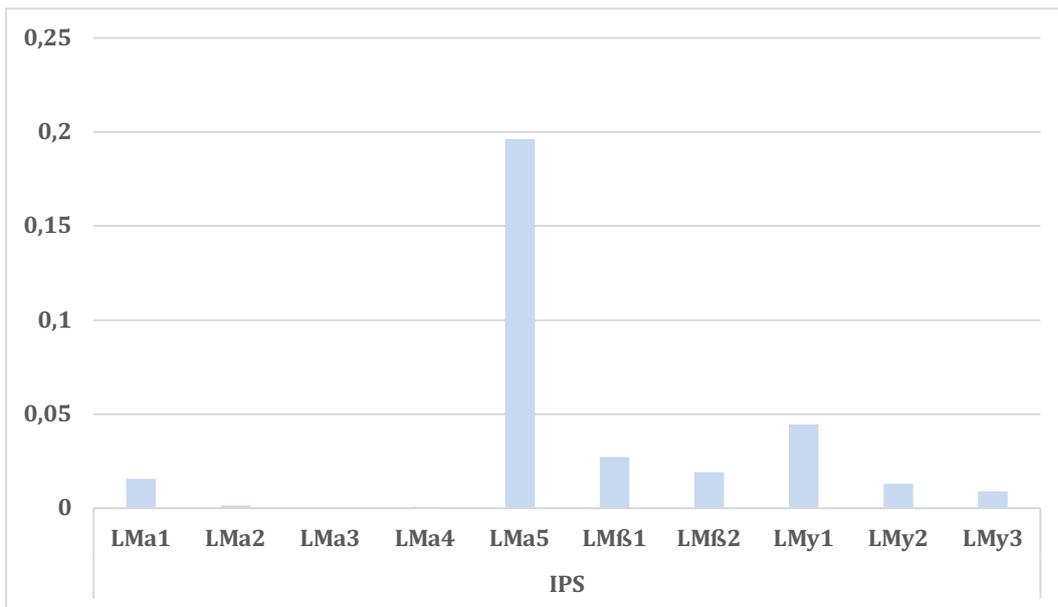


Abbildung 25: RT-PCR iPSC

Erklärung zum Eigenanteil

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.“

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt meinen Betreuern Prof. Dr. Grässel und Prof. Dr. Aicher für Ihre Mühe und Zeit, die diese Arbeit überhaupt möglich gemacht haben.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Alexander, die mir Ihre Zellen für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt und mich sehr unterstützt hat.

Danke an die Arbeitsgruppen Aicher und Klein:

Danke Euch allen für die schöne Zeit. Allen voran Tanja, die sich immer sehr viel Zeit für mich genommen und mir sehr geholfen hat. Svenja, die mir als „*digital immigrant*“ einige Nerven erspart hat. Franzi, für die guten Gespräche und last but not least Dominik für den stärksten Kaffee der Welt.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Papa und seiner schier unendlichen Geduld bedanken. Ohne Dich hätte ich das nicht geschafft. Und das sogar noch vor der Rente!

In diesem Sinne auch ein riesen Dankeschön an die Unterstützung meiner restlichen Familie und an meinen Neffen, der immer eine willkommene Ausrede für Pausen war. Ihr seid die Besten!

Ein riesen Dank an meine Freunde. Marie und Kossi- geteiltes Leid ist halbes Leid. Elli und Paula- zum Glück gibt es keine Telefonrechnungen mehr. Ich bin so froh, Euch zu haben.

