

Aus dem Lehrstuhl
für Zahnerhaltung und Parodontologie
Prof. Dr. Wolfgang Buchalla
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

**Das Amnionepithel:
Eine mögliche Stammzellquelle
für die regenerative Endodontie?**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Ella Ohlsson

2022

Aus dem Lehrstuhl
für Zahnerhaltung und Parodontologie
Prof. Dr. Wolfgang Buchalla
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

**Das Amnionepithel:
Eine mögliche Stammzellquelle
für die regenerative Endodontie?**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Ella Ohlsson

2022

Dekan:	Prof. Dr. Dirk Hellwig
1. Berichterstatter:	PD Dr. Matthias Widbiller
2. Berichterstatter:	PD Dr. Agnes Schröder
Tag der mündlichen Prüfung:	30.03.2023

Für Erika und Walter Schäfer

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	2
1 Einleitung	4
2 Literaturübersicht	6
2.1 Der Pulpa-Dentin-Komplex	6
2.2 Regenerative Medizin und Tissue Engineering.....	10
2.3 Stammzellen	13
2.4 Gerüstmaterialen.....	21
2.5 Signalmoleküle	22
3 Zielsetzung	26
4 Material und Methoden	27
4.1 Verwendete Nährmedien und Chemikalien.....	27
4.2 Verwendete Materialien und Geräte	29
4.3 Inhaltsstoffe der Medien	32
4.4 Vorbereitung der DPSC	33
4.5 Vorbereitung der HAEC	35
4.6 Isolation der eDMP.....	38
4.7 Untersuchung der Morphologie	42
4.8 Untersuchung der Genexpression	42
4.9 Untersuchung der Mineralisation	52
5 Ergebnisse	53
5.1 Charakterisierung der HAEC.....	53
5.2 Morphologie	56
5.3 Genexpression	57
5.4 Mineralisation	62
6 Diskussion	64
6.1 Morphologie und Mineralisation	64
6.2 Genexpression	66
6.3 Einfluss der Kulturbedingungen	69
6.4 Ausblick.....	70
7 Zusammenfassung	72
Literaturverzeichnis	74
Statistik	88
Danksagung	89
Lebenslauf	90

Abkürzungsverzeichnis

APC	Allophycocyanin
BGLAP	Bone Gamma-Carboxyglutamate Protein
BMP	Bone Morphogenic Protein
BSA	Bovines Serumalbumin
BSP	Bone Sialoprotein
CD	Cluster of Differentiation
COL1A1	Collagen Typ 1 A1
Ct	Cycle Threshold, Schwellenwertzyklus
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DFSC	Dental Follicle Stem Cells
DGP	Dentin Glykoprotein
DLX3	Distal-less Homebox 3
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMP	Dentinmatrixproteine
DMP-1	Dentin Matrix Acidic Phosphoprotein- 1
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPP	Dentin Phosphoprotein
DPSC	Dental Pulp Stem Cells
DSP	Dentin Sialoprotein
dUTP	Deoxyuridine Triphosphate
eDMP	Extrahierte Dentinmatrixproteine
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EMT	Epithelial-Mesenchymale Transition
FBS	Fetales Kälberserum
FGF-2	Fibroblast Growth Factor 2
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSP1	Fibroblast-Specific Protein 1
GPX3	Glutathione Peroxidase 3
HAEC	Human Amniotic Epithelial Cells
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HLA	Humane Leukozytenantigene
HNF-3 β	Hepatocyte Nuclear Factor 3 beta
HRP	Meerrettichperoxidase
IBSP	Integrin Binding Sialoprotein
IGF	Insulin-like Growth Factor
IGFBP2	Insulin-like Growth Factor Binding Protein 2
IL	Interleukin

iPSC	Induzierte Pluripotente Stammzellen
Klf4	Krüppel-like Factor 4
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
MEM α	Minimum Essential Medium α
MEPE	Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein
MSC	Mesenchymale Stammzellen
MTA	Mineral Trioxid Aggregat
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NES	Nestin
Oct3/4	Oktamer-bindender Transkriptionsfaktor 3/4
OD	Optische Dichte
OPN	Osteopontin
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PDGF	Platelet-derived Growth Factor
PDLSC	Periodontal Ligament Stem Cells
PE	Phycoerythrin
Pen-Strep	Penicillin und Streptomycin
PerCP-Cyanine 5.5	Peridinin Chlorophyll Protein-Cyanine 5.5
PIGF	Placenta Growth Factor
PRR	Pattern Recognition Receptor
REP	Regenerative Endodontic Procedure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPS18	Ribosomal Protein S18
RT-qPCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
S100A4	S100 Calcium Binding Protein A4
SCAP	Stem Cells from the Apical Papilla
SHED	Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth
SIBLING	Small Integrin Binding Ligand
SLRP	Small Leucin Rich Proteoglycans
TGF- β	Transforming Growth Factor β
TMB	Chromogen Tetramethylvenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
TRP	Transient Receptor Potential
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

1 Einleitung

Seit der Entdeckung der dentalen Stammzellen im Jahre 2000 durch Gronthos und seine Mitarbeiter (Gronthos et al., 2000), hat auch die Zahnmedizin begonnen, die möglichen Anwendungsgebiete der Stammzellforschung und des Tissue Engineering in Hinblick auf Reparation und Regeneration dentaler Strukturen zu erforschen.

Die American Association of Endodontics definiert die Regenerative Endodontie als „biologisch basiertes Verfahren mit dem Ziel Strukturen wie Dentin, Zahnwurzeln und Zellen des Pulpa-Dentin-Komplexes zu ersetzen“ (Sedgley et al., 2013). Im Rahmen der Regenerativen Endodontie gilt es also, die heute übliche Wurzelkanalbehandlung durch ein Verfahren zu ersetzen, das den Zahn nicht avital und geschwächt zurücklässt. Es gilt jedoch nicht nur einen Ersatz von Gewebe, in Form einer Reparatur, sondern ein „Restitutio ad integrum“ durch eine echte Regeneration zu erreichen.

Schon heute gibt es Versuche, *in vitro* und im Tiermodell, durch das Zusammenbringen von Stammzellen, einem geeigneten Gerüstmaterial und Wachstumsfaktoren, die Entstehung von pulpaähnlichem Gewebe anzustoßen. Dieses soll sowohl im histologischen Aufbau wie auch in der Funktion dem Originalgewebe gleichen. Dafür werden bis dato hauptsächlich dentale Stammzellen verwendet.

Aus der begrenzten Verfügbarkeit, sowie der schwierigen und kostspieligen Kultivierung der Zellen, ergibt sich die Überlegung, eine alternative Stammzellquelle für die Regenerative Endodontie zu finden.

Als Untersuchungsgrundlage bieten sich die humanen Amnionepithelzellen an. Sie können in großer Menge aus gespendeten Plazentas isoliert werden und ihre breite Differenzierungsfähigkeit wird bereits in anderen Forschungszweigen genutzt.

In dieser Dissertation wird untersucht, ob sich Amnionepithelzellen, analog zu Stammzellen der dentalen Pulpa, odontogen differenzieren lassen und so zukünftig für die Regenerative Endodontie nutzbar sind.

Die Erkenntnisse dieser Dissertation wurden ebenfalls in einer wissenschaftlichen Publikation veröffentlicht, die im März 2022 im International Journal of Molecular Sciences erschienen ist. Sie trägt den Titel:

Bucchi, C.; Ohlsson, E.; de Anta, J.; Woelflick, M.; Galler, K.; Manzanares-Cespedes, M.C.; Widbiller, M.

Human Amnion Epithelial Cells: A Potential Cell Source for Pulp Regeneration?

Int. J. Mol. Sci. 2022, 23, 2830. <https://doi.org/10.3390/ijms23052830>

2 Literaturübersicht

2.1 Der Pulpa-Dentin-Komplex

Obwohl auch ein denervierter Zahn in der Mundhöhle überleben kann, trägt eine gesunde Pulpa doch zum Zahnerhalt bei (Caplan et al., 2005). Deshalb ist ihre Regeneration erstrebenswert.

2.1.1 Aufbau

Die Zahnpulpa entwickelt sich, wie auch andere kraniofaziale Gewebe, aus der Neuralleiste. Die Pulpa besteht aus hochspezialisiertem, mesenchymalem Gewebe. Eine gallertartige Matrix, die sich hauptsächlich aus Glykosaminoglykanen zusammensetzt, bildet den Grundbestandteil. Bindegewebsfasern, produziert von Fibroblasten, durchziehen die Pulpa netzartig. Neben den Fibroblasten sind Makrophagen, Lymphozyten und Immunzellen, wie beispielsweise dendritische Zellen, B-Lymphozyten oder Granulozyten, vorhanden. Am Foramen apicale gelangen Blutgefäße und Nervenfasern in die Pulpakammer und versorgen und innervieren so den Komplex (Galler et al., 2021; Hellwig et al., 2018). Ob die Pulpa ein ausgebildetes Lymphsystem besitzt, ist noch nicht endgültig erforscht (Stefański, 2013).

Mineralisierte Matrix umgibt die Pulpa. Diese wird während der Zahnentwicklung als Prädentin von den Odontoblasten gebildet und dann durch die Ablagerung von Hydroxylapatit zu reifem Dentin umgewandelt. Dentin besteht zu ca. 70 Gew-% aus anorganischem Material, wie Kalzium und Phosphat und zu 20 Gew-% aus organischen Kollagenverbindungen. Es besitzt eine tubuläre Struktur, die sich durch die enge räumliche Beziehung von Odontoblasten zu ihrer Matrix ergibt. Mit der Ablagerung von Primärdentin ziehen sich die Odontoblasten weiter ins Zahninnere zurück, belassen aber dabei ihre Zellfortsätze, dann Tomessche Fasern genannt, in den Dentinkanälchen. Dieser so entstandene, untrennbare Verbund aus Pulpa und Dentin wird auch als Pulpa-Dentin-Komplex bezeichnet (Baumann et al., 2008; Hellwig et al., 2018).

Odontoblasten sind postmitotische Zellen, die nicht proliferieren, aber viele Jahrzehnte alt werden können (Smith et al., 2012). Sie sind etwa 50 µm lang und säulenförmig (Couve et al., 2013). Die Zellen besitzen einen polarisierten Zellkörper in dem sich, in ihrem sekretorischen Zustand, ein hoch entwickeltes, raues endoplasmatisches Retikulum und zahlreiche Sekretionsvakuolen befinden. Ein gealterter Odontoblast stellt

sich flacher und mit geringerer Zellgröße dar, die Zellorganellen sind weniger dicht gepackt (MacDougall und Javed, 2010; Smith et al., 2012). Tight junctions, Gap junctions und Desmosomen verbinden die Zellen und ermöglichen den interzellulären Informationsaustausch. So kleiden die Odontoblasten palisadenförmig die Pulpakammer aus und bilden eine Barriere zwischen mineralisiertem Gewebe und dem Weichgewebe der Pulpa (Baumann et al., 2008; Bleicher, 2014).

Subodontoblastisch liegt ein stark verzweigtes Kapillarnetz, das für die Versorgung der Zellen zuständig ist. Hier findet man auch den Raschkow'schen Plexus, von dem aus Nervenfasern den Odontoblastenfortsätzen in die Dentinkanälchen folgen und so Dentin zu einem innervierten Gewebe machen (Baumann et al., 2008).

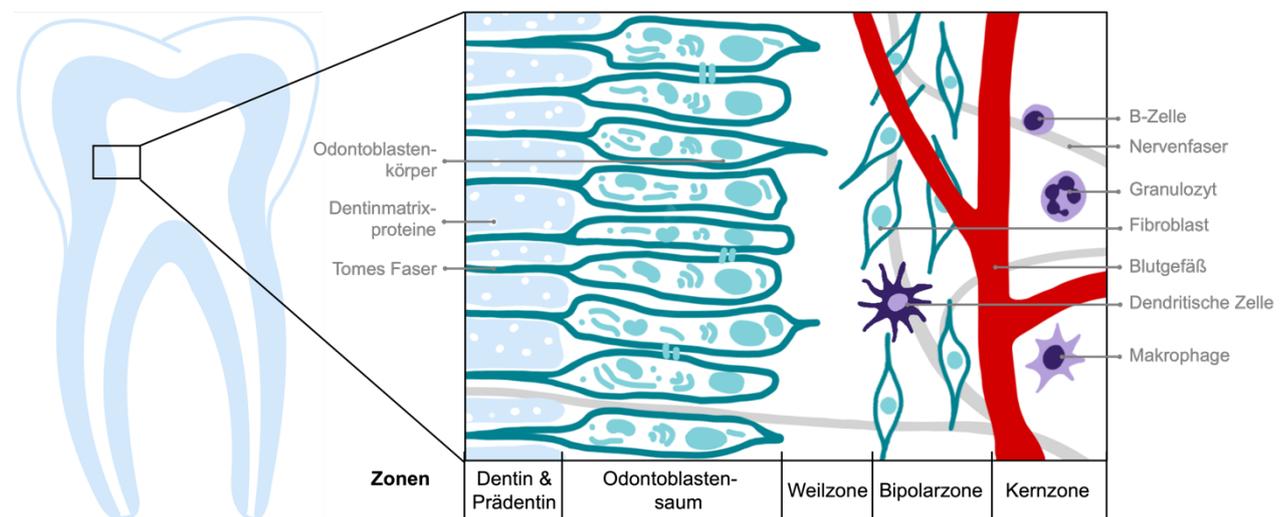


Abbildung 1: Aufbau des Pulpa-Dentin-Komplexes

2.1.2 Funktion

Mit der Entfernung der Pulpa, wie es beispielsweise bei der Wurzelkanalbehandlung üblich ist, gehen auch die vorteilhaften Funktionen der Pulpa verloren. Es lassen sich vier Grundfunktionen definieren:

- die formative Funktion
- die nutritive Funktion
- die sensorische Funktion
- die defensive Funktion

2.1.2.1 Die formative Funktion

Die Odontoblasten der Pulpa synthetisieren Dentin, Kollagen Typ-I und -III und nicht-kollagene Proteine wie Proteoglykane, Glykosaminoglykane, Glykoproteine, Phosphoproteine und Osteocalcin (Hellwig et al., 2018).

Auch besitzen sie zeitlebens die Fähigkeit zur Mineralisation. Noch nach dem Durchbruch der Zahnkrone, ist die Pulpa an der Vollendung der Wurzelbildung beteiligt (Hülsmann, 2008). Es werden drei verschiedene Dentinarten unterschieden. Während der Zahnentwicklung sezernieren sie Primärdentin in einer Geschwindigkeit von 4 µm/Tag (Couve et al., 2013). Nach dem Zahndurchbruch verlangsamt sich die Produktion auf 0,4 µm/Tag. Dieses sekundäre Dentin wird hauptsächlich im Inneren der Dentinkanälchen oder um die Pulpa angelagert und führt über die Jahre zu einer Verkleinerung der Pulpakammer und Dentintubuli (Smith et al., 2012).

Tertiärdentin, auch Reparaturdentin genannt, wird dahingegen im Rahmen defensiver Prozesse sezerniert (Couve et al., 2013).

2.1.2.2 Die nutritive Funktion

Durch ihre Blutversorgung ernährt die Pulpa das Dentin. Die Zahnpulpa ist vor allem während der primären Dentinogenese stark vaskularisiert, die Arterien bilden hier ein kapillares Endstromgebiet (Hellwig et al., 2018).

Es kann ein Rückgang der Vaskularisierung während der Sekundärdentinbildung beobachtet werden. Bei der Bildung von Tertiärdentin werden jedoch durch die Freisetzung von proangiogenetischen Faktoren erneut vermehrt Blutgefäße gebildet um den erhöhten Bedarf an Nährstoffen, Sauerstoff und Abtransport von Metaboliten zu decken (Smith et al., 2012).

2.1.2.3 Die sensorische Funktion

Die Pulpa ist reich innerviert. Durch die afferenten Nervenfasern des Nervus Trigemini werden Schmerzempfindungen weitergeleitet (Hellwig et al., 2018). Für die Dentinempfindlichkeit sind überwiegend A-Fasern verantwortlich. Sie begleiten die Odontoblastenfortsätze in den Dentintubuli bis zur Schmelz-Dentin-Grenze und bilden stellenweise Synapsen mit ihnen aus (Carda und Peydró, 2006). Durch Flüssigkeitsbewegungen in den Dentinkanälchen, wie sie z. B. durch thermische Reize entstehen,

werden sie stimuliert (Bleicher, 2014). Auch autonome, sympathische Nervenfasern, die die Vasokonstriktion der Pulpa steuern, sind vorhanden (Hildebrand et al., 1995).

Odontoblasten sind auch direkt an der Sinneswahrnehmung beteiligt. Auf der Odontoblastenmembran wurden mehrere Ionenkanäle der Transient Receptor Potential-Familien (TRP) nachgewiesen. Diese werden stimuliert durch thermale, mechanische und chemische Reize. Bereits feine pH-Fluktuationen in der Dentinflüssigkeit können detektiert werden (Bleicher, 2014; W. L. O. da Rosa et al., 2018). Weitere mechanosensitive Rezeptoren scheinen vor allem auf dem primären Cilium der Odontoblasten lokalisiert zu sein. Dieses kann als Sinnesorganelle der Zelle bezeichnet werden (Magloire et al., 2009; Thivichon-Prince et al., 2009).

2.1.2.4 Die defensive Funktion

Zähne sind einer intensiven mechanischen, thermischen und chemischen Belastung ausgesetzt. Auch bakterielle Metabolite können die Pulpa schädigen. In einem gesunden Zahn wird sie durch eine Schicht Zahnschmelz vor dem Eindringen von Mikroorganismen geschützt. Ist der Schmelz jedoch beschädigt, können Bakterien aus der Mundhöhle die Dentinkanälchen besiedeln (Galler et al., 2021).

Diese Reize können eine Irritation auslösen, auf die die Pulpa mit einer entzündlichen Gewebereaktion antwortet, die Pulpitis genannt wird. Prinzipiell verläuft die Pulpitis wie Entzündungen in anderen Bindegeweben, die Topografie der Pulpa erschwert jedoch den Prozess. Durch die Hartgewebsschale des Zahns und die beschränkte Blutversorgung ist die Infektionsbekämpfung des Immunsystems beeinträchtigt. Anfänglich kann diese Reaktion noch vollständig reversibel sein, bei bestehenden Noxen geht sie jedoch in einen irreversiblen Zustand über. Es kommt zur Gewebnekrose (Galler et al., 2021; Hahn und Liewehr, 2007).

Der Pulpa-Dentin-Komplex besitzt verschiedene Schutzmechanismen, wie zum Beispiel die Fähigkeit zur Tertiärdentinbildung. Auf externe Reize hin, wie beginnende Karies oder leichte Verletzungen, können Odontoblasten, als peripherste Zellen, reaktiv tertiäre Dentinmatrix sezernieren (Sloan und Waddington, 2009). Ein größeres Trauma jedoch, wie fortgeschrittene Karies, können zum Absterben der Odontoblasten führen. Um diese zu ersetzen, werden Progenitorzellen an die Verletzungsstelle rekrutiert. Dort differenzieren sie zu odontoblastenähnliche Zellen und können ein atubuläres, knochenähnliches Tertiärdentin produzieren. Dieses Osteodentin bildet somit eine

Abschirmung gegen den äußeren Reiz, die darunterliegende Pulpa ist geschützt (Sloan und Waddington, 2009).

Durch die Pattern Recognition Rezeptoren (PRR), können Odontoblasten, Pulpa-fibroblasten und Leukozyten mikrobielle PAMP (Pathogen Associated Molecular Patterns) detektieren und beispielsweise proinflammatorische Zytokine sezernieren, die eine angeborene Immunantwort induzieren (Bleicher, 2014; Yumoto et al., 2018). Des Weiteren können von den Odontoblasten β -Defensine sezerniert werden, die eine immunmodulatorische Funktion erfüllen, die Membranintegrität von Mikroorganismen stören und chemotaktische Wirkungen aufweisen. Rekrutiert werden neutrophile Granulozyten, Makrophagen, T-Zellen, B-Zellen und Plasmazellen (Galler et al., 2021; Staquet et al., 2008). Auch neurovaskuläre Komponenten tragen zur Immunreaktion bei. Neuropeptide üben stimulierende Effekte auf odontoblastenähnliche Zellen aus und erhöhen so die Tertiärdentinproduktion (Galler, 2019). Die Fibroblasten unterstützen die fortlaufende Immunreaktion, unter anderem durch die Produktion von Faktoren des Komplementsystems (Galler et al., 2021).

2.2 Regenerative Medizin und Tissue Engineering

Die regenerative Medizin ist ein sehr breites Forschungsfeld und befasst sich mit dem Versuch beschädigtes Gewebe biologisch zu ersetzen (Harrison et al., 2014; Mason und Dunnill, 2008). Mit dem Überbegriff der Regenerativen Medizin eng verbunden ist der des Tissue Engineerings. Dieser zielt eher auf die technische Konstruktion verschiedener Gewebe ab (Widbiller und Schmalz, 2021). Derzeit können bereits Haut, Knochen, Blutgefäße, Knorpel und Bestandteile des Nervensystems erzeugt werden, aber auch ganze Organe, wie die Trachea, die Blase oder der Pankreas (Rouwkema et al., 2008; Scarrit, 2015).

Das Ziel des klassischen Tissue Engineering ist eine Geweberegeneration durch Stammzelltransplantation zu bewirken. Dafür sind drei Komponenten von Bedeutung:

- Stammzellen
- Gerüstmaterial
- Signalmoleküle

Auch in die zahnmedizinische Forschung hat das Tissue Engineering Einzug gehalten.

2.2.1 Regenerative Endodontie

Weist ein Zahn eine irreversible Pulpitis auf, so ist die Standardtherapie die Wurzelkanalbehandlung. Im Zuge dieser, wird das Weichgewebe im Zahninneren komplett entfernt, der Wurzelkanal mit Feilen erweitert und desinfiziert, um ihn im Anschluss mit Materialien, meist Guttapercha und Sealern, zu füllen (Hülsmann, 2008). Nach der Obturation des Kanalsystems ist die Pulpa somit entfernt und kann ihre wichtigen Funktionen nicht mehr ausüben. Auch der mit der Behandlung einhergehende Verlust an Dentin führt zu einer mechanischen Schwächung (Baumann et al., 2008). Dies hat besonders bei Zähnen mit noch nicht abgeschlossenem Wurzelwachstum Bedeutung. Die kurzen Wurzeln und dünnen Dentinwände erleiden oft Frakturen und der weit offene Apex erschwert den Erfolg einer herkömmlichen endodontischen Behandlung (Talati et al., 2007; Yan et al., 2019).

Zwar ist durch die Wurzelkanalbehandlung der Zahnerhalt in über 90% der Fälle möglich (Fleming et al., 2010), doch sechs Monate nach dem Eingriff berichten 10% der Patienten weiterhin von Schmerzen (Nixdorf et al., 2016). Zudem kann es durch einen undichten koronalen Verschluss oder bestehende apikalen Entzündungen zu Reinfektionen kommen (Siqueira et al., 2014).

Obwohl es bei dem Versuch, die Pulpa in einem avitalen Zahn zu regenerieren gewisse erschwerende Faktoren gibt, wurde bereits im Tiermodell bestätigt, dass der Ansatz des Tissue Engineering für die Pulparegeneration vielversprechend ist (Goodis et al., 2012). In mehreren Versuchen konnte durch die Einbringung von Stammzellen, Wachstumsfaktoren und Gerüstmaterial in Wurzelzylinder und die anschließende Transplantation subkutan in immunkomprimierte Mäuse, die Regeneration eines pulpaähnlichen Gewebes bewirkt werden. Die Beschaffenheit dieses Gewebes, gut vaskularisiert, mit Anlagerung dentinähnlicher Depositionen und mit odontoblastenähnlichem Zellsaum, könnte histologisch nachgewiesen werden (Galler et al., 2012; G. T.-J. Huang et al., 2009; V. Rosa et al., 2013). Auch die *in vivo* Transplantation von Stammzellen in pulpotomierte Hundezähne gelang nach diesem Schema (Iohara et al., 2013, 2011; Nakashima und Iohara, 2011). In ersten klinischen Studien konnten durch Magnetresonanztomographie, digitale Volumetomographie und Sensibilitätstestung die Bildung von Gewebe nach Implantation von autologen Stammzellen in pulpotomierte Zähne nachgewiesen werden (Brizuela et al., 2020; Nakashima et al., 2017; Xuan et al., 2018).

Jedoch ist die Stammzelltransplantation mit mehreren Problemen behaftet, unter anderem Graft-vs-Host-Reaktionen, die begrenzte Verfügbarkeit von autologen Stammzellen, die arbeits- und kostenintensive Zellernte und -expansion sowie die regulatorischen Hürden für die Zulassung und klinische Umsetzung (Galler et al., 2011; Mao et al., 2012; Murray et al., 2002; Widbiller et al., 2022).

2.2.2 Cell-Homing

Der Ansatz des Cell-Homings kommt ganz ohne *ex vivo* kultivierte Stammzellen aus. Dieser wird auch als *in situ* Tissue Engineering klassifiziert (Widbiller und Schmalz, 2021). Die Idee ist, einen pulpotomierten oder pulpektomierten und gereinigten Wurzelkanal mit endogenen, in einem Gerüstmaterial eingebetteten Wachstums- und Homing-Faktoren, zu füllen. Diese sollen ansässige Stammzellen aus dem verbleibenden Pulpagewebe oder aus der periapikalen Region rekrutieren und so zu einer Geweberegeneration führen. Diese Herangehensweise gilt es momentan *in vivo* zu prüfen (Galler und Widbiller, 2017, 2017; Schmalz et al., 2020; Widbiller und Schmalz, 2021). Im ektopischen Mausmodell ist dies bereits gelungen (Widbiller et al., 2018).

2.2.3 Revitalisierung

Ein regeneratives endodontisches Verfahren, das schon heute Teil der klinischen Praxis ist, ist die Revitalisierung.

Im englischsprachigen Raum spricht man von „Regenerative Endodontic Procedure“ (REP), in diesem Text wird „Regenerative Endodontie“ jedoch als Überbegriff für verschiedene regenerative, endodontische Verfahren verwendet.

Die Revitalisierung kann bei Zähnen mit noch nicht abgeschlossenem Wurzelwachstum erfolgen. Dafür wird nach der Trepanation, Vitalexirpation, sanfter Desinfektion und EDTA-Konditionierung, eine Einblutung in den Wurzelkanal provoziert. Koronal wird der Zahn mit einem bioaktiven Trikalziumsilikatzement abgedeckt und bakterien dicht verschlossen. Mit dem Blut werden Stammzellen aus der apikalen Papille eingeschwemmt und das Blutkoagel kann als Gerüst für zelluläres Attachment und Migration dienen (Galler, Krastl, et al., 2016).

Ziele, die mit diesem Verfahren erreicht werden können, sind das Wiedererlangen der Kälteempfindlichkeit der revitalisierten Zähne, das Abklingen von periapikalen Entzündungen, die Maturation der Wurzel und die Zunahme der Dentinschichtstärke (Chan

et al., 2017). Für diese Behandlung wird zwar von einer hohen Überlebensrate berichtet (100% nach 12 Monaten) (L. Li et al., 2017; Saoud et al., 2014), Tierversuche und histologische Aufbereitung klinischer Fälle zeigen jedoch auch, dass es selten zu einer Regeneration mit dem für die Pulpa typischen Aufbau kommt. Oft wird nur eine Reparatur durch ektopisches Gewebe, wie Zement oder Osteodentin, beobachtet (Schmalz et al., 2020). Der Wunsch, die Faktoren der Regeneration besser kontrollieren zu können, ist ein Grund das Tissue Engineering weiter zu verfolgen (Diogenes et al., 2016).

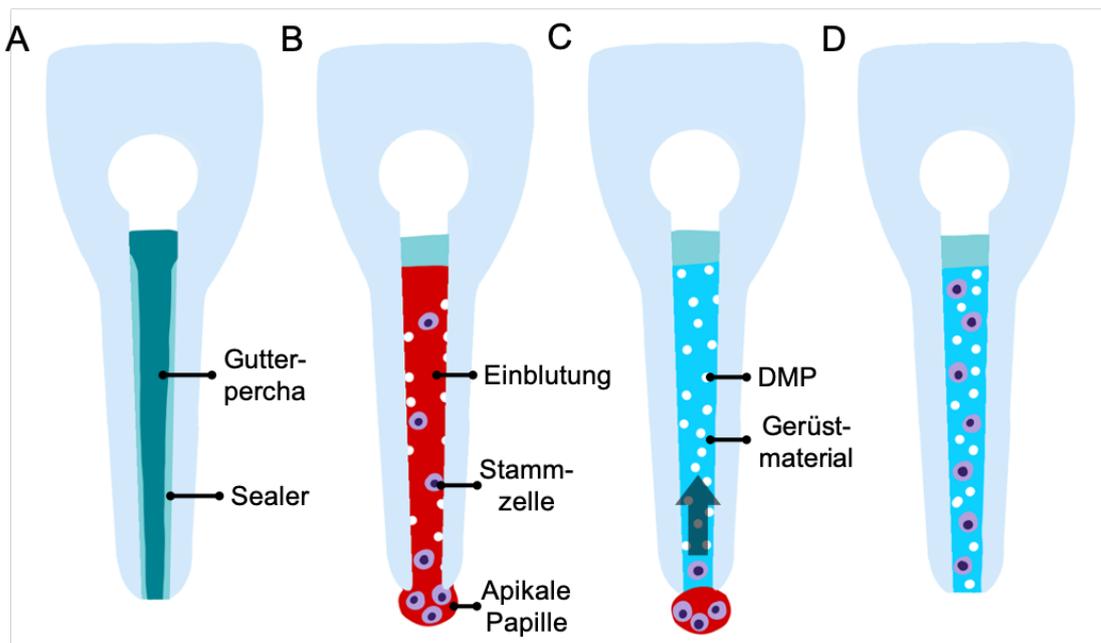


Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung endodontischer Verfahren: A) konventionelle Wurzelkanalfüllung; B) Revitalisierung C) Cell-Homing D) Stammzelltransplantation; Abbildung modifiziert aus Widbiller und Schmalz, 2021

2.3 Stammzellen

Als Stammzellen werden undeterminierte Zellen bezeichnet, die sowohl zur Selbsterneuerung als auch zur Differenzierung in verschiedene Zelllinien fähig sind (Fortier, 2005).

Die Stammzellfunktion einer Zelle wird durch ihre Umgebung und dort exprimierte Wachstums- und Regulationsfaktoren beeinflusst. Dieses anatomische Kompartiment wird auch als Stammzellnische bezeichnet. Hier sind undifferenzierte adulte Stammzellen ansässig, die eine wichtige Rolle bei Regenerations- und Reparatursprozessen spielen. In der Mitte der Stammzellnische sitzt die Mutterzelle, die ein fast unerschöpfliches Selbsterneuerungspotential aufweist. Bei der Mitose teilt sie sich asymmetrisch

in eine neue Mutterzelle und eine Tochter- oder Progenitorzelle, die dann einen spezifischen Differenzierungsweg einschlägt. Rundherum sitzen Stromazellen, die sie bei der Aufrechterhaltung ihrer Stammzellfunktion unterstützen (Jones und Wagers, 2008).

Man unterscheidet verschiedene Stammzellen, z.B. nach ihrer Differenzierungsfähigkeit. Totipotente Stammzellen sind in der Lage einen kompletten Organismus, einschließlich des extraembryonalen Gewebes, zu reproduzieren, wie es die befruchtete Eizelle bis zum 8-Zellen-Stadium der Morula kann. Pluripotente Stammzellen haben die Fähigkeit Gewebe aller drei Keimblätter zu bilden; des Endoderms, Mesoderms und Ektoderms (Fortier, 2005). Marker für Pluripotenz sind unter anderem Oct4, Sox2 und Nanog (Y. Zhang et al., 2019). Können Zellen sich nur innerhalb eines Keimblattes differenzieren, so werden sie als multipotent bezeichnet (Berg et al., 2018). Zellen gelten als unipotent, wenn sie sich nur in einen Zelltyp differenzieren lassen, wie z. B. die Basalzellen der Epidermis, die zur Hauterneuerung beitragen (Müller und Hassel, 2006).

Stammzellen können auch nach der Abstammung des Gewebes, aus dem sie isolierbar sind, definiert werden (Abbildung 3).

2.3.1 Embryonale Stammzellen

Die Gewinnung embryonaler Stammzellen wird oft von ethischen Bedenken begleitet, da die Isolierung mit der Zerstörung der Blastozyste und damit eines Embryos, einhergeht. In Deutschland wird die embryonale Stammzellforschung durch das Embryonenschutzgesetz und das Stammzellgesetz reguliert (Brewer, 2006).

Marker, die mit diesen Stammzellen assoziiert werden, sind SSEA-3, SSEA-4, Tra-1-60, Tra-1-81, Oct4 und Nanog. Die embryonalen Stammzellen besitzen zwar meist eine sehr hohe Differenzierungsfähigkeit, lassen sich aber auch schwer in Kultur halten (Hanna et al., 2010; Miki et al., 2005).

Auch die perinatalen Stammzellen werden den embryonalen Stammzellen zugeordnet. Namensgebend ist ihre Isolation aus den perinatalen Geweben, wie der Nabelschnur, der Plazenta oder dem Amnion. Ihre Differenzierungsfähigkeit ist geringer als die der embryonalen, jedoch höher als die der adulten Stammzellen. Dazu besitzen sie ein größeres Expansionspotential. Da diese Zellen aus Geweben gewonnen werden, die normalerweise nach der Geburt entsorgt werden, umgeht man bei der

Anwendung perinataler Stammzellen viele ethische Debatten (Abbaspanah et al., 2018; Y. Zhang et al., 2019).

2.3.2 iPSC

Die induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSC) bilden eine weitere Art der Stammzellen. Sie können aus somatischen Zellen durch künstliche Revertierung erzeugt werden. Durch die Kultivierung von Fibroblasten mit den Transkriptionsfaktoren Oct3/4, Sox2, c-Myc und Klf4, können Zellen erzeugt werden, die morphologisch, in ihrer Genexpression und Differenzierbarkeit Stammzellen gleichen.

In ihren Eigenschaften ähneln sie stark den embryonalen Stammzellen, ihnen wird jedoch ein erhöhtes onkogenes Potential nachgesagt. Nichtsdestotrotz gibt es Bestrebungen iPSC in der Zukunft zur autologen Stammzelltransplantation oder zum individuellen Arzneimittelscreening zu nutzen, um so negative Immunreaktionen zu vermeiden (Mitalipov und Wolf, 2009; Takahashi und Yamanaka, 2006).

2.3.3 Adulte, mesenchymale Stammzellen

Stammzellen werden adult genannt, wenn sie aus postnatalen Geweben, wie Knochenmark, Muskel- oder Fettgewebe gewonnen werden. Eine Art der adulten Stammzellen sind die mesenchymalen Stammzellen (MSC). Sie sind sowohl zur Selbsterneuerung als auch zur multilinearen Differenzierung fähig. Die „International Society for Cellular Therapy“ definiert Kriterien, die von Zellen für die Klassifizierung als MSC erfüllt werden müssen. Darunter fallen das adhärente Wachstum, die Expression von CD105, CD73 und CD90 und die Abwesenheit der Expression von CD45, CD34, CD14 oder CD11, CD79 α oder CD19 und HLA-DR (Dominici et al., 2006).

Die ersten isolierten MSC waren die Bone Marrow MSC. Diese können als multipotente Stammzellen sowohl in Osteoblasten, Chondrozyten, Adipozyten als auch in fibröses Stroma differenzieren (Kalervo Väänänen, 2005).

Den MSC werden gewisse immunsuppressive Eigenschaften nachgesagt. So werden zwar xenogene MSC-Transplantate vom Wirt abgestoßen, allogene Transplantate dagegen gut vertragen. Der Grund hierfür soll die Fähigkeit der MSC sein, Immunreaktionen, welche von T- und B-Zellen, dendritischen Zellen und natürlichen Killerzellen vermittelt werden, herunterzuregulieren. Die Details der Immunantwort bei

Transplantation und die Graft-vs.-Host-Interaktionen sind jedoch noch nicht endgültig erforscht (G. T.-J. Huang et al., 2009).

2.3.4 Dentale Stammzellen

Bei den dentalen Stammzellen handelt es sich, mit Ausnahme der Ameloblasten, die aus dem Kopfektoderm stammen, ebenfalls um mesenchymale Stammzellen. Die Identifikation der MSC erfolgt durch den Nachweis des Oberflächenproteins STRO-1 und weiterer spezifischer Oberflächenantigene wie CD29, CD37, CD90 und CD105. Auf Grund der embryonalen Abstammung der Zähne aus der Neuralleiste können dentale Stammzellen Eigenschaften besitzen, die sonst Neuralleistenzellen zugeschrieben werden (G. T.-J. Huang et al., 2009).

Die Identifizierung und Isolierung dentaler Stammzellen gelang erstmals im Jahr 2000 durch Gronthos et al. Sie klassifizierten die DPSC und verglichen sie mit den bis dato schon erforschten Knochenmarkstammzellen. Beide Zelltypen exprimieren ähnliche Oberflächenmarker, wie CD44, CD106, CD146, 3G5 und STRO-114 und Marker wie Alkaline Phosphatase, Osteocalcin und Osteopontin, die mit Mineralisierung assoziiert sind. Allerdings besitzen die DPSC eine um 30% höhere Proliferationsrate und ein höheres Wachstumspotential. Durch die Transplantation beider Zelltypen in immun-komprimierte Mäuse, konnten die DPSC eine dentinähnliche Matrix generieren, während die Knochenmarkstammzellen eher laminaren Knochen produzierten (Sloan und Waddington, 2009). *In vitro* können DPSC zu odontoblastenähnlichen Zellen differenziert werden (About et al., 2000; Couble et al., 2000).

In den folgenden Jahren wurden weitere humane, dentale Stammzellen isoliert, heute spricht man von fünf verschiedenen Arten:

- DPSC – Dental Pulp Stem Cells (Gronthos et al., 2000)
- SHED – Stem cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth, aus der Pulpa von Milchzähnen (Miura et al., 2003)
- PDLSC – Periodontal Ligament Stem Cells (Gay et al., 2007)
- SCAP – Stem Cells from the Apical Papilla
- DFSC – Dental Follicle Stem Cells, bisher nur Isolation der Precursorzellen möglich (Casagrande et al., 2011; Huang et al., 2009; Sloan und Waddington, 2009)

Für den Versuchsaufbau dieser Dissertation wurden DPSC wegen ihrer vorteilhaften Eigenschaften verwendet. Sie können auf eine relativ non-invasive Art gewonnen werden, z. B. aus extrahierten dritten Molaren die sonst entsorgt werden, oder *in situ* belassenen, pulpektomierten Zähnen (Jain und Bansal, 2015). Die Charakterisierung dieser Zellen als Stammzellen ist durch den Nachweis des STRO-1 Oberflächenproteins und weiterer Oberflächenmarker wie CD29, CD37, CD90 und CD105 möglich (Sloan und Waddington, 2009).

Die Stammzellnische der DPSC wurde über Färbung mit Antikörpern gegen STRO-1 und CD146 lokalisiert. Sie befindet sich im perivaskulären und perineuralen Bereich der Pulpa (Shi und Gronthos, 2003; Sumita et al., 2009).

Ausgesät auf Dentinscheiben bilden sie odontoblastenähnliche Zellen aus, das heißt, Zellen mit polarisiertem Zellkörper und langen Zellfortsätzen, die mit den Dentintubuli interagieren (Baldión et al., 2018; G. T.-J. Huang et al., 2006). Analog zum Aufbau des natürlichen Zahnes können sie pulpaähnliches Weichgewebe, umgeben von einem Saum aus odontoblastenähnlichen Zellen, bilden (Batouli et al., 2003).

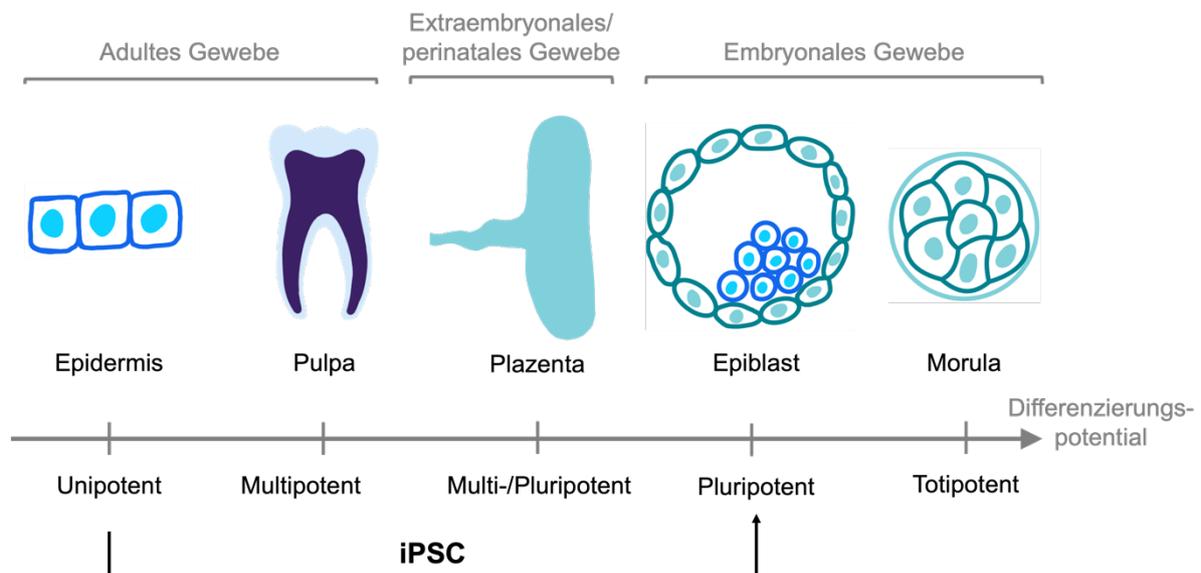


Abbildung 3: Beispielhafte Übersicht über Gewebe, aus denen Stammzellen extrahiert werden können und deren Differenzierungspotential

2.3.5 Amnionepithelzellen

Um den Bedarf an dentalen Stammzellen zu reduzieren, stellt die Verwendung einer alternativen Stammzellquelle für die Regenerative Endodontie einen interessanten Forschungsansatz dar. In dieser Arbeit wird die Möglichkeit beleuchtet,

Amnionepithelzellen zum Tissue Engineering von Pulpagewebe zu verwenden. Diese besitzen ein breites Differenzierungspotential, immunmodulatorische Eigenschaften, parakrine Funktionen, eine fehlende Tumorigenität und eine leichte Zugänglichkeit (Zhang und Lai, 2020).

Die Plazenta besteht aus zwei Teilen, der mütterlichen Decidua und dem fetalen Chorion. Auf dem Chorion liegt die Amnionhaut, die sich 8 Tage nach Befruchtung aus dem Epiblasten entwickelt (Mamede et al., 2012).

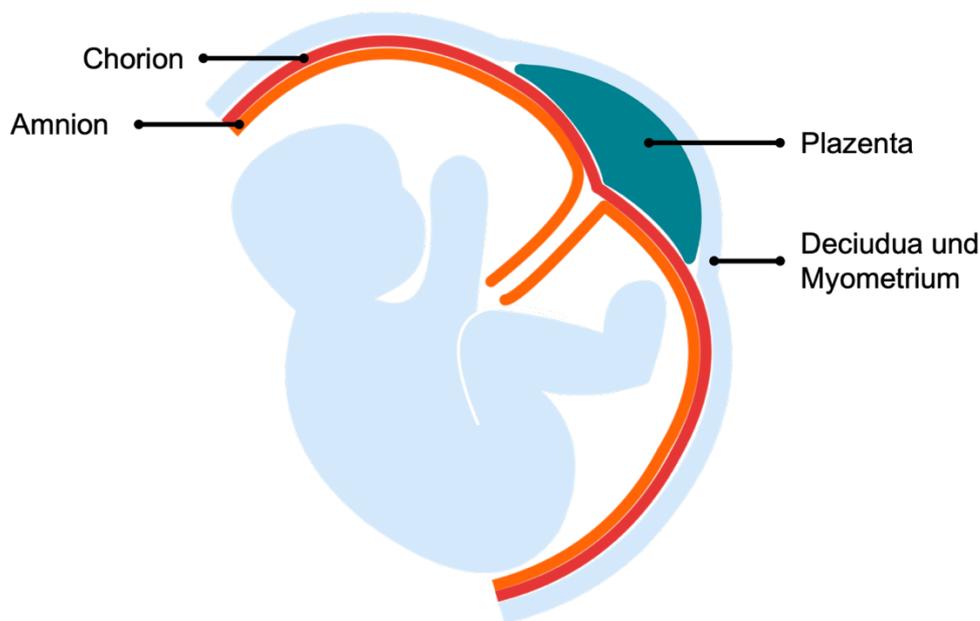


Abbildung 4: Plazenta und extraembryonale Häute

Die Amnionhaut ist eine transluzente Membran, avaskular, ohne Nerven und Muskeln. Sie umgibt den Embryo vollständig, kleidet die Amnionhöhle aus und iberzieht die Nabelschnur. Ernährt wird sie durch Diffusion des Fruchtwassers und der fetalen Oberflachengefae. Ihre Funktion besteht in dem Transport von Wasser, der Produktion bioaktiver Stoffe, wie z. B. Wachstumsfaktoren oder Zytokinen und der Aufrechterhaltung eines pH-Werts von 7,1 (Mamede et al., 2012). Sie hat eine ungefähre Dicke von 0,02-0,5 mm und besteht histologisch aus drei Schichten: der Epithelschicht, der dicken Basalmembran und dem mesenchymalen Stroma (Leal-Marín et al., 2020; Mamede et al., 2012).

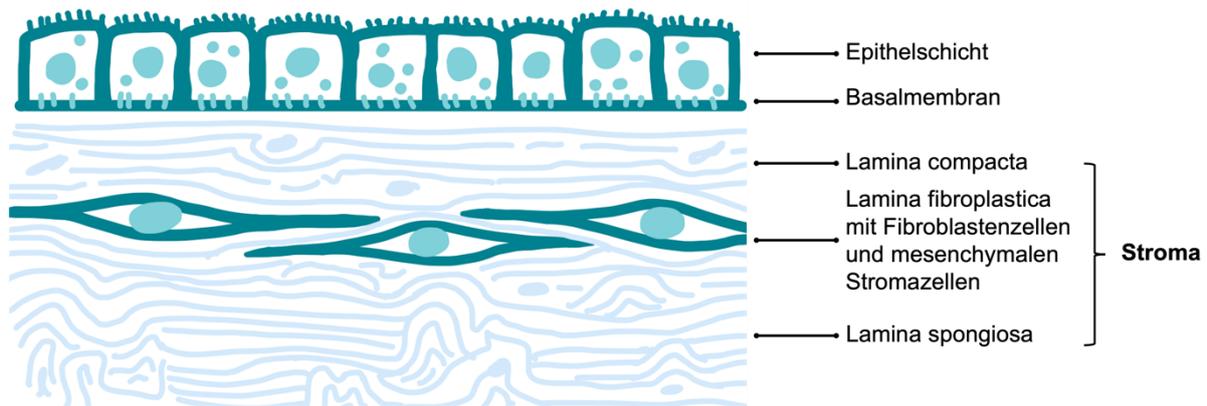


Abbildung 5: Vereinfachte Darstellung des histologischen Aufbaus der Amnionhaut

Das Epithel ist kubisch und einschichtig, fest mit der Basalmembran verwachsen und weist viele Mikrovilli auf. Die einzelnen Zellen sind untereinander durch Desmosomen verbunden und besitzen einen großen, homogen geformten Zellkern (Gramignoli et al., 2016). Diese Epithelstammzellen können in einem simplen Prozess isoliert und in eine Zellkultur überführt werden (Mamede et al., 2012).

Da der Epiblast die Quelle aller Keimschichten des Embryos ist, können die Human Amniotic Epithelial Cells (HAEC) in Zelltypen aller drei Schichten differenzieren. So sind HAEC *in vitro* z.B. in Hepatozyten, Kardiomyozyten, Chondrozyten, beta-Zellen des Pankreas und neuronale Zellen differenziert worden. Sie exprimieren mehrere Stammzellmarker wie HNF-3 β , Nestin, Nanog und auch Oct-4. Somit werden sie den pluripotenten Stammzellen zugeordnet (Sakuragawa et al., 1996; Toda et al., 2007).

Amnionepithelzellen betreiben eine potente parakrine Sekretion und produzieren unter anderem eine Vielzahl entzündungshemmender Faktoren, wie IL-1- und IL-2-Rezeptorantagonisten und IL-10. Auch FAS-Liganden, die die Zellen immunprivilegiert machen und eine Zerstörung durch das Immunsystem verhindern und β -Defensine, die z. B. gegen *Candida albicans* und Gram-negative Bakterien wirken, werden von den HAEC produziert (Q.-W. Liu et al., 2021; Toda et al., 2007). Auf Grund der Sekretion von Endostatin, welches die Proliferation von Endothelzellen, die Angiogenese und das Tumorwachstum hemmt, werden HAEC als nicht tumorigen eingestuft. Auch exprimiert das Amnionepithel keine HLA-II Antigene und nur geringe Mengen an HLA-I. Dadurch sind allogene Transplantationen möglich. In einer Studie wurden freiwilligen Testpersonen HAEC in den Unterarm transplantiert. Auch hier konnte keine

immunologische oder tumorigene Reaktion beobachtet werden (Akle et al., 1981; Li et al., 2005; Mamede et al., 2012; Miki und Strom, 2006).

HAEC können aus gespendeten Plazentas isoliert werden, wobei aus einer voll ausgebildeten Placenta im Schnitt 80-300 Millionen vitale Zellen gewonnen werden können. Um bakterielle Kontamination zu verringern, empfiehlt es sich nur per Kaiserschnitt entnommene Plazentas zu verwenden (Gramignoli et al., 2016). Auch ein Screening gegen Infektionskrankheiten wie HIV, Hepatitis B und C und Syphilis wird empfohlen (Leal-Marín et al., 2020). Die zukünftige Aufbewahrung von HAEC in Zellbanken ist denkbar (Parolini et al., 2008). Da die Plazenta nach der Geburt normalerweise entsorgt wird, birgt die Verwendung zur Isolation von Stammzellen im Vergleich zur Isolation anderer embryonaler Stammzellen keine ethischen Bedenken. Trotzdem sollte eine Zustimmung der zuständigen Ethikkommission und das Einverständnis der Mutter vorliegen (Miki und Strom, 2006).

Amnionepithelzellen wurden erstmals 2005 beschrieben und sind noch nicht vollends erforscht (Miki et al., 2005). Die Verwendung der HAEC in Tierversuchen zeigt jedoch schon vielversprechende Einsatzmöglichkeiten. So wurden sie zum Beispiel verwendet, um periphere Nervenschädigungen zu behandeln. Auch dopaminproduzierende Zellen, die *in vivo* zur Heilung des Parkinson-Syndroms eingesetzt wurden, konnten herangezüchtet werden. Implantiert in die Leber von immundefizienten Mäusen, wurde das Entstehen von hepatozytenähnlichen Zellen beobachtet, die humanes Albumin, Glykogen und Alpha-1-Antitrypsin produzierten (Miki und Strom, 2006). Die Verwendung am Menschen wird in einer Vielzahl klinischer Studien getestet, unter anderem zur Heilung von Leukämie, spastisch zerebraler Lähmung, Bronchialfisteln, Knochenbrüchen, weiblicher Unfruchtbarkeit und genetischen Augenerkrankungen (Liu et al., 2021; Zhang und Lai, 2020). Differenzierte Zellen werden zudem bei Testung der Kardiotoxizität neuer Arzneistoffe verwendet (De Coppi und Atala, 2019).

Die meist deepithelialisierte Amnionmembran findet schon seit den 50er Jahren regelmäßig Anwendung in der Klinik z. B. bei der Behandlung von Hautverletzungen wie akuten Verbrennungen. Hier wird sie als Wundabdeckung verwendet, trägt zur Schmerzreduzierung bei, wirkt feuchtigkeitsspeichernd, initiiert Epithelialisierung durch die Produktion von Wachstumsfaktoren und reguliert die Immunreaktion. In der Augen Chirurgie wird sie als Gewebeersatz bei der Rekonstruktion der Augenoberfläche verwendet. Ein Vorteil ist die Vermeidung von Narben durch Inhibition der TGF- β

Rezeptoren in Fibroblasten. In der regenerativen Medizin findet sie Verwendung als Gerüstmaterial, das entzündungshemmende, antivirale, antibakterielle und immunmodulatorische Eigenschaften besitzt (Inge et al., 1991; Toda et al., 2007).

2.4 Gerüstmaterialien

Gerüstmaterialien, wie sie für das Tissue Engineering verwendet werden, sollten für einen begrenzten Zeitraum als extrazelluläre Matrix und räumliche Stütze für die Stammzellen dienen (Galler et al., 2018).

Als mögliche Gerüstmaterialien wurden sowohl natürliche Polymere wie Alginate, Fibrin oder Kollagen, untersucht, als auch synthetische, beispielsweise selbstorganisierende Peptide oder Polyethylenglykol. Anforderungen an Gerüstmaterialien für die regenerative Endodontie sind, dass sie die extrazelluläre Matrix der Pulpa imitieren, biologisch durch die Pulpazellen abbaubar sein müssen und es sollten auch bioaktive Proteine inkorporiert werden können, die dann langsam freigesetzt werden. Eine leichte Anwendbarkeit ist eine weitere Voraussetzung, ein Stoff muss beispielsweise in den Wurzelkanal injizierbar sein. Dazu darf er die Proliferation und Differenzierung der Pulpastammzellen nicht hemmen (Schmalz et al., 2016). Auch nimmt die Steifigkeit einer Kulturmatrix Einfluss auf die Differenzierung der in ihr enthaltenen Zellen, steife Matrices begünstigen beispielsweise eine osteogene Differenzierung (Bellas und Chen, 2014; Lv et al., 2017).

Obwohl synthetische Stoffe eine höhere Kontrolle über die physiochemischen Materialeigenschaften, wie den Polymerisationsprozess, die Degenerationsgeschwindigkeit, die Mikrostruktur und mechanische Stabilität aufweisen, zeichnen sich doch die natürlichen Materialien in Tierversuchen durch bessere biologische Ergebnisse aus. So wird vielerorts Kollagen verwendet (Iohara et al., 2011; V. Rosa et al., 2013), doch die Anwendung von Fibrin überzeugt mit der Preiswertigkeit des Produkts, der hohen Zytokompatibilität und der leichten Zugänglichkeit zu bereits klinisch zugelassenen Präparaten (Demarco et al., 2011; Galler et al., 2018). Im Vergleich zwischen Kollagen, Fibrin, Peptiden und Polyethylenglycol ermöglicht Fibrin am besten die Generation pulpaähnlichen Gewebes (Galler et al., 2018).

Darüber hinaus werden Ansätze verfolgt, biologisches Gewebe, wie dezellularisiertes Pulpagewebe (Song et al., 2017) oder auch die Amnionmembran (Leal-Marín et al., 2020) als Gerüstmaterialien zu verwenden.

2.5 Signalmoleküle

Wachstumsfaktoren und Signalmoleküle sind Proteine, Steroide oder andere organische Moleküle, die an spezifische Membranrezeptoren binden und verschiedene Transduktionswege anstoßen. Sie spielen schon bei der Embryonalentwicklung eine wichtige Rolle, indem sie den Differenzierungsweg von Zellen diktieren und so die Entstehung von Gewebe und Organe regulieren. In ähnlicher Weise agieren sie auch bei der physiologischen Geweberegeneration, wie zum Beispiel der Wundheilung (Plattner et al., 2017).

In vitro werden diese bioaktiven Proteine beispielsweise beim Tissue Engineering zur Lenkung der Stammzelldifferenzierung eingesetzt (Casagrande et al., 2011). Sie können rekombinant hergestellt werden, doch da es sich um labile Moleküle handelt, bereitet die Lagerung und Bereitstellung oft Schwierigkeiten. Eine Alternative ist, bioaktive Moleküle für das Tissue Engineering zu nutzen, die schon im Zielgewebe vorhanden sind. In der Pulparegeneration kann man sich die im Dentin sequestrierten Dentinmatrixproteine zunutze machen (Smith et al., 2016).

2.5.1 Dentinmatrixproteine

Dentin ist ein Reservoir für Signalmoleküle. Bei der Dentinogenese werden neben dem kristallinen Hydroxylapatit auch bioaktive Moleküle von den Odontoblasten sezerniert und in die Kollagenmatrix eingelagert (Butler, 1998; Butler et al., 2002). Diese Dentinmatrixproteine (DMP) machen 10% der organischen Matrix des Dentins aus. Die restlichen 90% setzen sich aus Kollagen Typ 1, 3 und 5 zusammen (Goldberg et al., 2011).

Bis dato sind 813 verschiedene Proteine aus Dentin extrahiert und kategorisiert worden (Widbiller, Schweikl, et al., 2019).

Einige DMP, wie TGF- β , sind durch spezifische Bindung an Decorin oder Biglycan fixiert, andere Moleküle jedoch durch unspezifische Bindung an Proteoglykane, Fibronectin oder Kollagen (da Rosa et al., 2018; Widbiller, Bucchi, et al., 2019). Diese Bindung verleiht ihnen trotz ihrer kurzen Halbwertszeit eine verlängerte biologische Wirksamkeit, sie sind in der Zahnhartsubstanz fossilisiert (Widbiller, Eidt, Lindner, et al., 2018).

Durch die Auflösung des Dentins werden die Proteine freigesetzt. Die Matrix kann beispielsweise durch Milchsäure, entstehend in kariösen Läsionen, gelöst werden (Butler und Ritchie, 1995; Casagrande et al., 2011). Studien zeigen auch, dass dentale

Werkstoffe wie Kalziumhydroxid oder Mineral Trioxid Aggregate (MTA) durch ihr alkalisches Milieu in der Lage sind, diese Proteine freizusetzen. Auch der Chelatligand EDTA, der in endodontischen Verfahren Verwendung findet, kann durch den Entzug von Kalzium aus dem Kalzium-Phosphat-Gitter, DMP aus der Mineralmatrix herauslösen (Smith et al., 2012; Verdelis et al., 1999).

Werden die DMP frei, können sie ihre Wirkung wieder entfalten. In toto modulieren sie die Immunreaktion, üben chemotaktische Effekte aus, stimulieren die Angiogenese und beeinflussen die Zellproliferation und -differenzierung. So regulieren und fördern sie auch die Regeneration und Reparatur, beispielsweise im Zuge der Tertiärdentinbildung (Galler, 2019; Lee et al., 2015; Smith et al., 2012; Widbiller, Eidt, Lindner, et al., 2018; Widbiller, Eidt, Wölflick, et al., 2018).

Obwohl es viele Studien zu den individuellen Effekten der einzelnen DMP gibt, wird heute angenommen, dass alle DMP synergistisch agieren und so einen anderen Wirkungsrahmen als separat aufweisen können (Smith et al., 2016). Trotzdem wird in der Tabelle 1 kurz auf die bekannten Wirkungen eingegangen.

Tabelle 1: Auflistung der wichtigsten DMP mit ihren jeweiligen Funktionen

SIBLING (Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoproteins):	
<ul style="list-style-type: none"> • Dentin Sialophosphoprotein (DSPP), wird durch Matrix-Metalloproteinasen gespalten zu: <ul style="list-style-type: none"> ○ Dentin Sialoprotein (DSP) ○ Dentin Phosphoprotein (DPP) ○ Dentin Glykoprotein (DGP) (M. MacDougall et al., 1997) 	<p>DSPP ist das am meisten vorkommende nicht-kollagene Protein der Dentinmatrix (Yamamoto et al., 2015) und spielt gemeinsam mit seinen Spaltprodukten eine wichtige Rolle in der Mineralisation von Primärdentin (Qin et al., 2001; Smith et al., 2012). Auch entzündungsfördernde Eigenschaften weisen sie auf und beeinflussen die Migration von Immunzellen (Hunter und Goldberg, 1993; Silva et al., 2005; Suzuki et al., 2009).</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Bone Sialoprotein (BSP) 	<p>Es sind gegensprüchliche Wirkungen von BSP beobachtet worden. Obwohl es an der initialen Hydroxylapatitformation beteiligt ist, inhibiert es auch das Kristallwachstum (Qin et al., 2004)</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Dentin Matrix Acidic Phosphoprotein- 1 (DMP-1) 	<p>DMP ist neben der Dentinreifung auch an inflammatorischen Prozessen wie der Synthese von IL-6 und -8 durch</p>

	Pulpa-fibroblasten beteiligt (Abd-Elmeguid et al., 2012; He et al., 2003).
<ul style="list-style-type: none"> • Osteopontin (OPN) 	OPN kann die Hydroxylapatitkristallisation inhibieren (Boskey et al., 1993). Es spielt auch eine Rolle in der Initiation von Entzündungsprozessen (Goldberg et al., 2011).
<ul style="list-style-type: none"> • Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein (MEPE) 	MEPE wirkt als Inhibitor der Mineralisation in Knochen (Gowen et al., 2003). Auch fördert es die Differenzierung von Pulpastammzellen (Goldberg et al., 2011)
Wachstumsfaktoren:	
<ul style="list-style-type: none"> • Transforming Growth Factor β1 (TGF-β1) 	Kann über verschiedene Signalwege sowohl die Differenzierung von Pulpastammzellen verhindern, als auch die Differenzierung in odontoblastenähnliche Zellen initiieren (Smith et al., 2012). Es aktiviert den SMAD Signalweg welcher Proliferation, Kollagenproduktion und Differenzierung beeinflusst (W. L. O. da Rosa et al., 2018). Auch reguliert er die Dentinmineralisation (Melin et al., 2000; Unterbrink et al., 2002).
<ul style="list-style-type: none"> • Bone Morphogenic Protein 2 (BMP-2) 	BMP-2 induziert die Tertiärdentinbildung <i>in vivo</i> , beeinflusst auch die Bildung von DSPP und fördert die Odontoblastendifferenzierung (W. L. O. da Rosa et al., 2018; Iohara et al., 2004).
<ul style="list-style-type: none"> • Insulin-like Growth Factor 1 und 2 (IGF-1/ -2) 	IGF 1 und 2 fördern die Proliferation und die Differenzierung von Pulpastammzellen in odontoblastenähnliche Zellen und induzieren Tertiärdentinbildung (Wang et al., 2012).
<ul style="list-style-type: none"> • Placenta Growth Factor (PIGF) • Platelet-derived Growth Factor (PDGF) • Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) 	Angiogene Wachstumsfaktoren sind für den Transport von Zellen und Nährstoffen im Rahmen von Regenerations- und Reparaturprozessen von großer Bedeutung (da Rosa et al., 2018; Sloan und Waddington, 2009).
SLRP (Small Leucin-Rich-Proteoglycans):	
<ul style="list-style-type: none"> • Biglycan • Decorin 	SLRPs können Kalzium binden und sind für die Fixation der bioaktiven Moleküle verantwortlich (Butler, 1998).

2.5.1.1 Experimentelle Nutzung

Schon in einer 1995 veröffentlichten Studie wurde gezeigt, dass Dentinmatrixproteine auf freigelegter Pulpa Mineralisation hervorrufen, zu der Vollendung des Wurzelwachstums beitragen können und chemotaktische Effekte aufweisen (Tziafas et al., 1995; Widbiller, Eidt, Lindner, et al., 2018).

Für die experimentelle Nutzung können die DMP heute nach einem etabliertem Protokoll aus extrahierten Zähnen isoliert und aufkonzentriert werden (Widbiller, Eidt, Lindner, et al., 2018). Die so gewonnenen eDMP (extrahierte Dentinmatrixproteine) können anstelle von rekombinant hergestellten bioaktiven Proteinen eingesetzt werden, um in Stammzellen eine odontogene Differenzierung zu induzieren (Casagrande et al., 2010; Galler, Widbiller, et al., 2016; Schmalz et al., 2017; Smith et al., 2016). Auch *in vivo* konnte die Cell-Homing Fähigkeit von eDMP nachgewiesen werden (Chrepa et al., 2015; Lovelace et al., 2011). Inkorporiert in ein Gerüstmaterial fördern sie die Migration von Stammzellen in das Innere eines Wurzelkanals im Mausmodell (Widbiller, Driesen, et al., 2018).

Die Konzentration der mit den Pulpazellen in Kontakt kommenden Dentinmatrixkomponenten ist von Bedeutung. In niedrigen Dosen stimulieren sie die Proliferation, in höheren können sie apoptotisch wirken. Mengen von eDMP die mehr als 500 pg TGF- β 1 pro ml entsprechen, wirken antiproliferierend (Smith et al., 2012).

Auch wurde demonstriert, dass während eines herkömmlichen endodontischen Eingriffs, durch die Ultraschallaktivierung von Kochsalzlösung nach einer EDTA-Behandlung, eDMP aus dem Dentin in einer Menge freigesetzt werden können, die zu chemotaktischen Effekten oder der Induktion von Differenzierung führen kann (Widbiller et al., 2017).

3 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit besteht darin zu untersuchen, ob sich Amnionepithelzellen (HAEC) für den Einsatz in der Pulparegeneration eignen und analog zu Pulpastammzellen (DPSC) durch Kultivierung mit Dentinmatrixproteinen (eDMP) odontogen differenzieren.

Um dies zu überprüfen, werden folgende Aspekte untersucht:

1. Die Änderung der Morphologie der Zellen nach der Differenzierung
2. Die Genexpression während des Differenzierungsprozesses
3. Die Fähigkeit der Zellen zur Mineralisation

Die Hypothese besteht, dass sich Amnionepithelzellen in Verbindung mit eDMP in odontoblastenähnliche Zellen differenzieren.

4 Material und Methoden

Die einzelnen Versuchsteile decken sich in ihren Grundzügen. Es werden sowohl DPSC als auch HAEC mit drei verschiedenen Zusätzen zu ihren Medien kultiviert: 10% FBS, 10 % FBS und eDMP und 10% FBS und StemPro.

Dabei stellt das Medium mit 10% FBS als einzigen Zusatz die Negativkontrolle dar, eDMP soll die Zellen in Richtung odontogener Differenzierung leiten und StemPro ist ein Zellkulturmedium, das aus MSC unreife und reife Osteozyten generieren soll.

In die Medien, die für die Kultivierung von HAEC bestimmt waren, wurde jeweils epidermaler Wachstumsfaktor (EGF) hinzugefügt. Die genaue Zusammensetzung der einzelnen Medien ist unter 4.3 zu finden. Ein Medienwechsel erfolgte alle zwei Tage.

Die drei Versuchsteile unterscheiden sich neben dem grundlegenden Detektionsziel in der Zellaussaat, ihrer Inkubationszeit und den Messzeitpunkten.

4.1 Verwendete Nährmedien und Chemikalien

- Alizarinrot S (0348.1, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
- AutoMACS Rinsing (130-091-222, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland)
- BSA-Puffer (Bovines Serum Albumin, 01400, Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland)
- Chloramin-T Lösung (0,5% Chloramin-T trihydrate, 0271.3, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- DAPI (D8417-1MG, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA)
- Dimethylsulfoxid (DMSO 99,9%, D/4121/PB15; Lot: 1862992, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, high Glucose, Pyruvate, 11995-065, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- EDTA (10%, pH 7, 268 mM, 25200-072, Disodium Salt Dihydrate, BioChemica, AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- EGF (Epidermal Growth Factor, 78006.1, StemCell Technologies, Vancouver, Kanada)
- Eindeckmedium (ProLong Glass Antifade Mountant with NucBlue Stain, P36983, Invotrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)

- ELISA (Human TGF- β 1 Quantikine® ELISA Kit, DB100B, Fa. R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland)
- FBS (Fetale Bovine Serum, 10500 -064, Gibco®, Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA)
- Formalin (37%, 1.04003.1000, Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland)
- Gentamycin (G1397, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA)
- L-Glutamine (200 mM Cell Culture Tested, G7513, Sigma Aldrich®, St. Louis, MO, USA)
- MACS BSA Stock (130-091-376, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland)
- Master Mix (TaqMan Fast Advanced Master Mix, 4444557, Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- MEM α (11900-073, Gibco®, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- Mercapthoethanol (S4136340 436, Ref: 4022536387246, Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland)
- Monoklonaler Mausantikörper gegen humanes CD105 (PerCP-CY 5.5; 562245, DB Biosciences, San Jose, USA)
- Monoklonaler Mausantikörper gegen humanes CD326 (FITC; 347197, DB Biosciences, San Jose, USA)
- Monoklonaler Mausantikörper gegen humanes CD44 (APC, 560890, DB Biosciences, San Jose, USA)
- Monoklonaler Rattenantikörper gegen humanes CD49f (PE; 561894, DB Biosciences, San Jose, USA)
- MTT-Lösung (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA)
- Natriumhydrogencarbonat (1.06329.1000, Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland)
- Natriumpyruvat (113-24-6, Lot: 0234J5431 Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA)
- Paraformaldehyd (32%, 15714, Lot: 200121-18, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, USA)
- PBS (Dulbecco Phosphate Buffered Saline ohne Ca $^{2+}$, Mg $^{2+}$, 9,55 g/l, 182-05, Biochrome GmbH, Berlin, Deutschland)

- Penicillin-Streptomycin (Pen-Strep, P0781-100ML, Sigma Aldrich®, St. Louis, MO, USA)
- Ringer-Acetat Lösung (pH 6,5, 009368-14957, Baxter, Deerfield, IL, USA)
- RNase-Free Water (ohne DEPC, 129112, QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland)
- StemPro® Osteogenesis Differentiation Kit (A10072-01, Gibco®, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- TaqMan® Gene Expression Assays (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- Triton X-100 Tensid (9002-93-1, Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA)
- Trypan Blue (0,40% SDS, 1450021, Bio-Rad Laboratories Inc., Feldkirchen, Deutschland)
- Trypsin-EDTA (0,25%, 25300-054, Gibco®, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)
- Dimethylsulfoxid (DMSO, 20-139, Lot: 3112585, Merck Millipore Ltd., Billerica, MA, USA)

4.2 Verwendete Materialien und Geräte

- 12-Well Platten (665980, Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich)
- 24-Well Platten (662960, Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich)
- Amicon® Tube (Amicon® Ultra-15, 3 kDa, 900324, Merck Millipore Ltd., Billerica, MA, USA)
- Blau- und Rotfilter (BP 445/5; BP 605/70, Set 43, Carl Zeiss Microscopy, Jena, Deutschland)
- Color Camera (ZEISS Axiocam 503, Carl Zeiss Microscopy, Jena, Deutschland)
- Counting Slides (Dual Chamber for Cell Counter, 145-0011, Bio-Rad Laboratories Inc., Feldkirchen, Deutschland)
- Coverslips (Corning BioCoat Poly-L-Lysine Cellware 12 mm round, 354085 Lot 8009027, Thermo Fisher Scientific Inc.)

- Diamantinstrumente (Komet®-Dental, Gebr. Brasseler GmbH, Lemgo, Deutschland)
- Eppendorf Tube® (3810x, 1,5ml, Katalog-Nr. 0030125215, Eppendorf GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland)
- FACSCanto™ Durchflusszytometer (BD Biosciences, San Jose, USA)
- FlowJo™ Analysesoftware für die Durchflusszytometrie (Version 10.8, BD Biosciences, San Jose, USA)
- GraphPad Prism Statistiksoftware (Graphpad Software Inc., San Diego, USA)
- Inkubator (C150, Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland)
- Inverses Mikroskop (Axio Vert.A1, Carl Zeiss Microscopy, Jena, Deutschland)
- Kimwipes (Science Brand, Kimberly Clark Professionell, Koblenz, Deutschland)
- Kryobox (Nalgene Cryo 1°C Freezing Container, Cat. No. 5100-0001, filled with Alcohol)
- Kryoröhrchen (121263, CRYO.S®, 2ml, PP, Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich)
- Kühlzentrifuge (Rotina 420 R, Andreas Hettich GmbH & Co.KG)
- MACS Separation Columns (130-042-201, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland)
- MicroAmp® Fast 96-Well Reaction Plate (0,1 ml, PCR Compatible, DNA/RNA/ Rnase Free, 4346907, Applied Biosystems, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland)
- Nano Drop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- Objektträger (ProLong Glass Antifade Mountant, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- Omniscript® RT Kit (20511, Lot: 163044798, QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland)
- Optical Adhesive Covers (PCR Compatible, DNA/Rnase/PCR Inhibitors Free, 4360954, Applied Biosystems, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland)
- Orbitalschüttler (Miniature Shaker KM 2, Edmund Bühler® GmbH, Hechingen, Deutschland)

- PH-Meter (InoLab® pH 7110, WTW, Xylem Analytics, Weilheim, Deutschland)
- Photometer (Infinite® 200, Tecan, Männedorf, Switzerland)
- Pipetten (Eppendorf Research plus, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Pipettenspitzen (REF: 70.760.002, Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland)
- QIAshredder (79654, Lot: 163040830, QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland)
- QuantStudios Design & Analysis Software (v1.5.1, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- RNeasy Kits® (74104, Lot: 163045854, QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland)
- Röhrchen (Cellstar® Tube 15ml, 188 271, Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich)
- Röhrchen (Cellstar® Tube 50ml, 227 261, Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich)
- Schwingmühle (Mixer Mill MM 200, RETSCH® GmbH, Haan, Deutschland)
- Spritzen (Plastipak, 50mL, Luer Lok Syringe, 300912, BD, Franklin Lakes, NJ, USA)
- Stickstoffbehälter (IN2, -196°C, Arpege 110, Air Liquide, Düsseldorf, Deutschland)
- Thermoblock (Biometra TRIO- Thermoblock, Biotron, Göttingen, Deutschland)
- Thermocycler (QuantStudio 3, 6.508.1, 272312047, Applied Biosystems, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland)
- Vakuumsterilfilter (Filteraufsatz 250 ml, 99255, TPP, Trasadingen, Schweiz)
- Vorfilter 0,2 µm (Acrodisc® Syringe Filters with Supor® Membrane, 4652, Pall Corporation, Port Washington, NY, USA)
- Vorfilter 0,45 µm (Filtropur S 0.45, 83.1826; Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
- Vorfilter 1,2 µm (Acrodisc® Syringe Filters with Supor® Membrane, 4656, Pall Corporation, Port Washington, NY, USA)
- Zählgerät (TC20 automated cell counter, 1450102, Bio-Rad Laboratories Inc., Deutschland)

- Zellkulturflasche T75 (Cellstar®, 250ml, 75 cm², 658175, Greiner Bio-One GmbH)
- ZEN Software for Microscopy and imaging (v 3.1, Carl Zeiss Microscopy, Jena, Deutschland)
- Zentrifuge (Hettich Universal 320, 1401, Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen, Deutschland)

4.3 Inhaltsstoffe der Medien

4.3.1.1 Standardmedium der HAEC

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High Glucose
- 1 mM Natrium Pyruvat
- 2 mM L-Glutamin
- 10 % FBS
- 1% Pen-Strep: 100 U Penicillin; 0,1 mg Streptomycin
- 10 ng/ml EGF frisch dazugeben

4.3.1.2 Standardmedium der DPSC

- Minimum Essential Mediums α (MEM α)
- 10% FBS
- 1% Pen-Strep: 100 U Penicillin; 0,1 mg Streptomycin

4.3.1.3 eDMP – Kulturmedium mit endogenen Dentinmatrixproteinen, zur odontogenen Differenzierung

- Standardmedium des jeweiligen Zelltyps
- eDMP entsprechend 500 pg/ml TGF- β 1, frisch dazugeben
- bei den HAEC: 10 ng/ml EGF frisch dazugeben

4.3.1.4 StemPro – Kulturmedium zur osteogenen Differenzierung

Zusammensetzung für 1 Liter

- 90 ml StemPro osteocyte/chondrocyte differentiation basal medium
- 10 ml StemPro osteogenesis supplement
- 10 μ l Gentamycin
- bei den HAEC: EGF 10 ng/ml frisch dazugeben

4.3.1.5 Einfriermedium – zur Erstellung von Kryokulturen

- Standardmedium des jeweiligen Zelltyps
- 10 % Dimethylsulfoxid

4.4 Vorbereitung der DPSC

4.4.1 Primärkultur

Die dentalen Stammzellen wurden aus den dritten Molaren von 15-20-jährigen Patienten isoliert.

Direkt nach der Extraktion wurden die Zähne in MEM α überführt und so ins Labor transportiert. Zwischen zwei sterilen Tüchern wurde dort der extrahierte Zahn mit Hilfe eines Bolzenschneiders gespalten, sodass die Pulpa zugänglich war. Diese wurde mit einer Pinzette entfernt und unter sterilen Bedingungen in einer Petrischale mit PBS und 10-fach Antibiotikum-Antimykotikum (Anti-Anti) für 10 min inkubiert. Nach einer Wiederholung dieses Vorgangs mit frischer Lösung, folgte ein Waschgang mit PBS ohne Antibiotikum.

Mit Hilfe eines Skalpells wurde die Pulpa nun in etwa 1 mm große Stücke zerschnitten, welche, um das Gewebe aufzuweichen, in einem Eppendorf Cup mit 1 ml Trypsin-EDTA für 20 min im Inkubator verdaut wurden.

Diese Stücke wurden nun in die Wells einer 6-Well-Platte überführt und durften hier 10-15 min an der Luft verweilen, bis die Ränder sichtbar trocken waren, die Mitte aber noch feucht glänzte.

Die angetrockneten Stücke wurden danach vorsichtig mit 2 ml Medium mit Antibiotikum und Antimykotikum überschichtet und unbewegt für 4-7 Tage im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit erfolgte der Medienwechsel alle drei Tage. Abgeschwommene Gewebeteilchen wurden entfernt, sobald unter dem Mikroskop ersichtlich war, dass Zellen ausgesprosst waren.

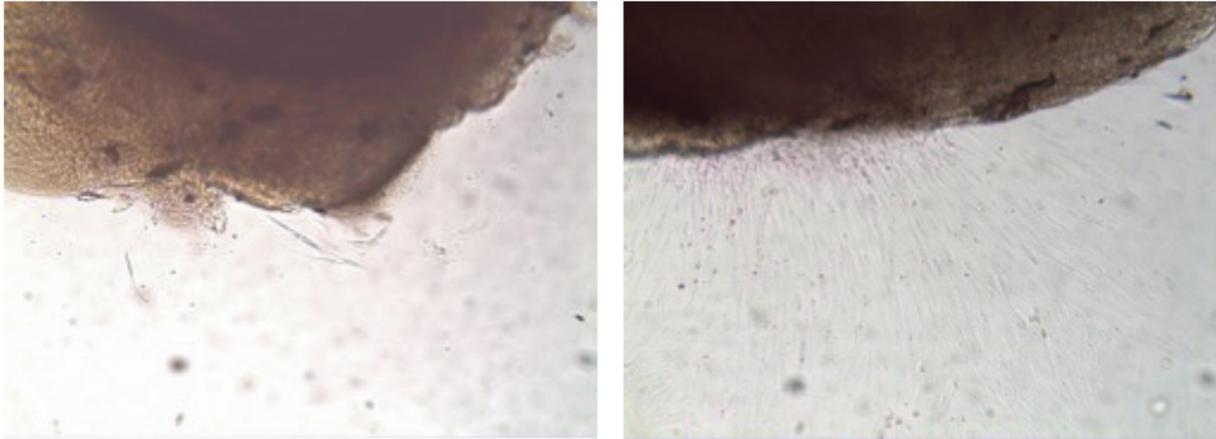


Abbildung 6: Repräsentative Aufnahmen mit einem inversen Mikroskop; Aussprossen der Zellen

4.4.2 Zellexpansion

Die gewonnenen, adhärenenten Zellen wurden durch kurzen Verdau in Zellkulturflaschen überführt, bis zu 80%igen Konfluenz kultiviert und zur Zellexpansion passagiert.

Dazu wurden die Zellen aus der Zellkulturflasche durch Zugabe von Trypsin-EDTA gelöst. Der Grad der Ablösung wurde unter dem inversen Mikroskop kontrolliert. War das Ergebnis zufriedenstellend, wurde der Trypsinverdau gestoppt. Die Zellsuspension wurde nun in ein 15 ml Röhrchen überführt und bei 100 G für 6 min zentrifugiert, der Überstand dekantiert, um das Zellpellet anschließend in 1 ml Medium zu resuspendieren.

Anschließend erfolgte das Ermitteln der Zellzahl mittels eines Zählgerätes. Dafür wurden 20 µl der Zellsuspension mit 20 µl 0,4 % Trypan-Blau-Farbstoff, welcher tote Zellen dunkel einfärbt, vermengt, jeweils 10 µl der Mischung in jede Seite der Einmalzählkammer pipettiert und beide Duplikate maschinell ausgezählt. Hiervon wurde der Mittelwert gebildet.

Im Versuch kamen DPSC der Passage 7 zum Einsatz. Isoliert wurden Sie am 06.07.2017.

4.4.3 MACS

Um sicher zu stellen, dass sich nur mesenchymale Stammzellen in der Kultur befinden, wurden die Pulpazellen durch das „Magnetic Activated Cell Sorting“-System (MACS) sortiert (Abbildung 7). Dafür wurden die Zellen aus der Zellkulturflasche gelöst und in Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Ermittlung der genauen Zellzahl konnte die

passende Menge Primärantikörper hinzugegeben werden. Hierbei handelt es sich um einen Antikörper, der an das auf allen mesenchymalen Zellen exprimierte STRO-1 Oberflächenprotein bindet. Nach dreißigminütiger Inkubation bei 4°C, erneuter Zentrifugation und einem zweiten Waschvorgang, wurde der Sekundärantikörper hinzugegeben. Dieser markierte den Primärantikörper magnetisch. Um die Bindung der Antikörper zu festigen, folgte eine weitere Inkubation von 15 min bei 4°C und eine dritte Zentrifugation und Wäsche mit PBS.

Für das tatsächliche Sortieren der Zellen wurde die MACS-Säule in das Magnetfeld eines Dauermagneten gebracht und mit BSA-Puffer äquiliert. Die Zellsuspension wurde in die Säule gefüllt. Beim Durchlaufen der Lösung wurden nun die mit Antikörpern markierten Zellen in der Säule zurückgehalten. Durch Entfernen des Magneten und spülen der Säule mit BSA, konnten die Stammzellen in ein untergesetztes Zentrifugenröhrchen eluiert werden. Nach Zentrifugation und Resuspension des Zellpellets im Standardmedium wurden diese Stammzellen erneut in eine Zellkulturflasche überführt.

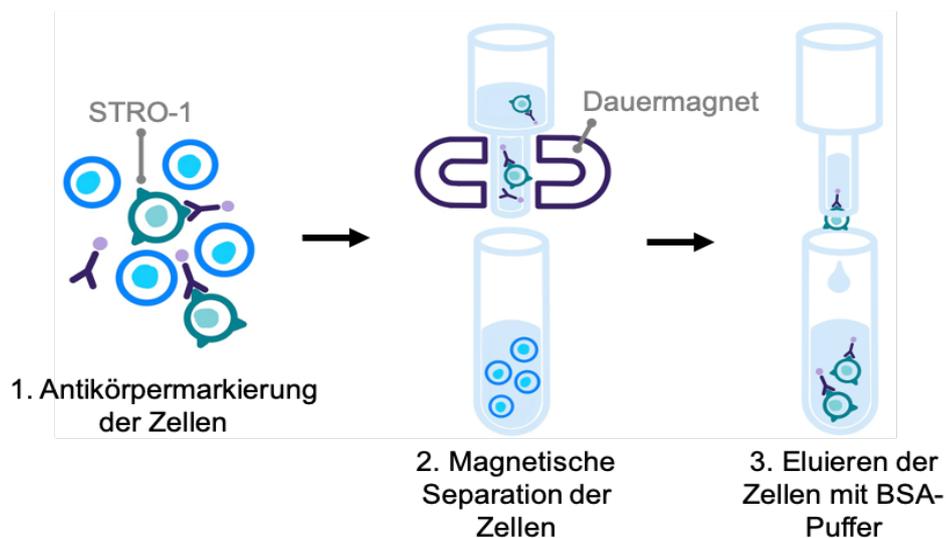


Abbildung 7: Funktionsweise des MACS

4.5 Vorbereitung der HAEC

4.5.1 Primärkultur

Die Plazentas entstammten der Kaiserschnittentbindungen zweier gesunder Spenderinnen und wurden mit Zustimmung des zuständigen Ausschusses der Universität von Barcelona (Institutional Review Board 0003099) zur Gewinnung der HAEC verwendet.

Die Isolierung erfolgte nach bereits etabliertem Protokoll (Gramignoli et al., 2016). Dafür wurde unter sterilen Bedingungen durch stumpfe Präparation die Amnionhaut vom darunterliegenden Chorion getrennt und verbleibende Blutpartikel zuerst mit 200 ml Ringer-Acetat Lösung (pH 6,5) und dann mit 200 ml PBS entfernt. Um die Zellen von der Amnionmembran abzulösen, wurden 2 g des Gewebes in einem Falcon-Tube mit 20 ml Trypsin-Lösung bei 37°C auf einem Rüttler (35 rpm) für 30 min anverdaut. Dieser Schritt wurde anschließend mit frischer Enzymlösung wiederholt (Abbildung 8). Der Überstand beider Digestionen wurde bei 300 G für 10 min zentrifugiert und das Zellpellet in DMEM 10% FBS resuspendiert.



Abbildung 8: Isolation der HAEC; A: stumpfe Präparation der Amnionhaut, B: Waschen in PBS, C: erster Trypsinverdau

4.5.2 Zellexpansion

Die gewonnenen Zellen wurden in T-75-Zellkulturflaschen überführt und bei 37° und 5% CO₂ bis zum Erreichen einer 80%igen Konfluenz inkubiert. Nach dem Splitten und Versorgen mit frischem Medium, wurden die Zellen bei Raumtemperatur an die Universitätsklinik Regensburg versandt, wo sie nach einem Tag Reisedauer direkt in DMEM und Dimethylsulfoxid bei -80 °C gelagert und am nächsten Tag in Flüssigstickstoff gegeben wurden. Vor Beginn des Versuchs wurden die Zellen aufgetaut und erneut in T-75-Flaschen kultiviert. Im Versuch kamen dann Zellen der Passage 2 zum Einsatz.

4.5.3 Charakterisierung

4.5.3.1 Durchflusszytometrie

Um das Antigenprofil der isolierten Zellen zu bestimmen und so die Reinheit der Stammzellen zu bestätigen, wurde eine Analyse der immunophänotypischen Oberflächenmerkmale mittels Durchflusszytometrie durchgeführt.

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren bei dem verschiedene Oberflächenmerkmale der Zellen durch Antikörper-Antigenreaktionen mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden. Durch hydrodynamische Fokussierung werden die markierten Zellen einzeln an einem Laserstrahl vorbeigeleitet, der zu einer Anregung dieser Fluoreszenzfarbstoffe führt. Photonen werden emittiert und dessen Emissionsspektrum kann gemessen und interpretiert werden (Abbildung 9) (Renz und Gierten, 2019).

Für den Versuch wurden die HAEC der zwei Spenderinnen im Standardmedium bis zur 80%igen Konfluenz kultiviert. Anschließend wurde eine Zellsuspension von 2×10^5 Zellen in 81 μl Medium in Triplikaten mit 2 μl monoklonalen Mäuseantikörper gegen humanes CD44, 5 μl Mäuseantikörper gegen humanes CD105, 8 μl Mäuseantikörpern gegen humanes CD326 und 4 μl Rattenantikörper gegen humanes CD49f versetzt. Die Antikörper waren mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert: CD44 mit Allophycocyanin (APC) welches Licht der Wellenlänge 680 nm emittiert, CD49f mit Phycoerythrin (PE), 578 nm, CD105 mit Peridinin chlorophyll protein-Cyanine 5.5 (PerCP-Cyanine 5.5), 690 nm und CD326 mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC), 519 nm. Die Durchflusszytometrie wurde dann mit 10.000 Ereignissen pro Probe durchgeführt. Angeregt wurden die Fluoreszenzfarbstoffe mit Laserlicht der Wellenlänge 488 nm. Die Ergebnisse wurden mit der Software „FlowJo“ analysiert. Hierfür wurden durch das Setzen von Gates Debris und abgestorbene Zellen aus dem Datensatz ausgeschlossen. Der unspezifische Hintergrund wurde durch die Verwendung von Isotypenkontrollen identifiziert und positive Ereignisse wurden in univariablen Histogrammen dargestellt. Außerdem konnte der prozentuale Anteil an positiv gefärbten Zellen ermittelt werden.

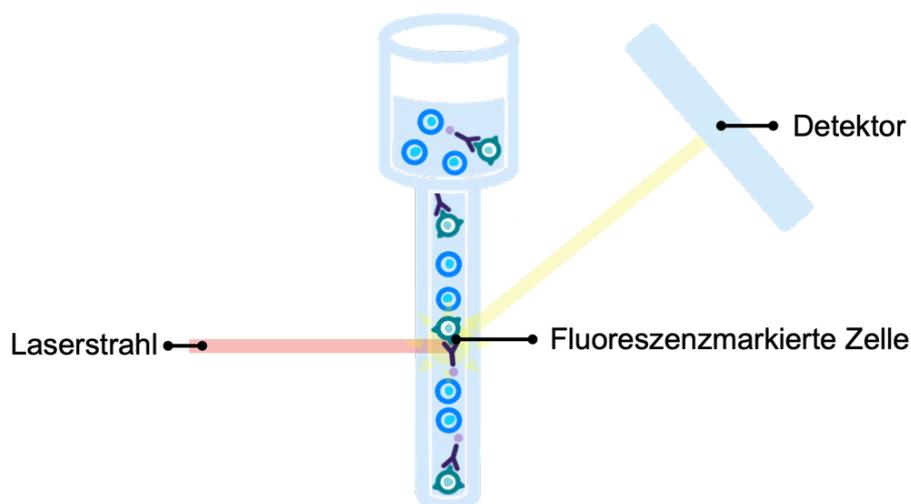


Abbildung 9: Vereinfachtes Schema zur Funktionsweise der Durchflusszytometrie

4.5.3.2 Zellviabilität

Da HAEC als Zelllinie wenig beschrieben und charakterisiert sind, wurde die Viabilität der HAEC mit einem MTT-Test geprüft, um diese anschließend mit dem Überleben der DPSC vergleichen zu können.

Bei MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) handelt es sich um einen gelben, wasserlöslichen Tetrazolium-Farbstoff. Er kann von metabolisch aktiven Zellen zu dunkelviolettem, unlöslichen Formazan reduziert werden. Verantwortlich dafür ist unter anderen die mitochondriale NADH und NADPH. Somit entspricht die Umsetzrate des MTT ungefähr der Glykolyserate der Zellen. Ein Lösen des Formazans und die photometrische Bestimmung der Farbreaktion gibt dann eine Auskunft über die Viabilität der Zellen (Berridge und Tan, 1993).

Um den MTT-Test durchzuführen, wurden $3,2 \times 10^3$ HAEC bzw. DPSC in den drei verschiedenen Kulturmedien in 96-Well-Platten ausgesät und kultiviert bis sie eine 80%-ige Konfluenz erreichten (n=8). Der Nachweis der Zellviabilität erfolgte nach 2, 4 und 8 Tagen. Für den MTT-Test wurde das Kulturmedium jedes Wells abgezogen und die adhären Zellen mit 100 µl einer Lösung, die 0,5 mg/ml MTT enthielt, versetzt. Nach 60-minütiger Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ konnte das auskristallisierte Formazan durch den Zusatz von 200 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) pro Well durch 10 min Bewegung auf einem Rüttler (540 rpm) in Lösung gebracht werden. Nach Überführung der Lösung in eine Mikrotiterplatte konnten die optischen Dichten (OD) bei einer Wellenlänge von 540 nm durch ein Photometer durchgeführt werden.

4.6 Isolation der eDMP

4.6.1 Herauslösen der Proteine

Die eDMP wurden nach bereits etabliertem Protokoll von Widbiller et al. extrahiert (Widbiller, Eidt, Lindner, et al., 2018).

Verwendet wurden hierfür extrahierte Weisheitszähne von Patienten in einem Alter von 15 bis 25 Jahren, gelagert bei 4°C in 0,5% Chloramin-T.

Zur Vorbereitung wurden sie für 24h in PBS überführt, um das Chloramin zu neutralisieren. Danach wurde Zahnschmelz und -zement mit Hilfe einer diamantierten Walze entfernt und die verbleibenden Dentinstücke zwischen zwei sterilen Tüchern mit einem

Stahlhammer auf eine Größe von weniger als 3 mm zerkleinert. Die Pulpa wurde mit einer Pinzette entfernt. In ca. 200 µl PBS wurden die Dentinstücke in einer gekühlten Schwingmühle für 90 s bei 25 Schwüngen pro Sekunde gemahlen, für 60 s auf Eis gelagert und erneut für 90 s gemahlen. Diese Schritte wurden für alle Zähne wiederholt. Aus 10 Zähnen entstanden so ungefähr 10 g Dentinmehl.

Das Gemisch aus Dentinmehl und PBS wurde für 2 min bei 3000 G zentrifugiert und nach Abnehmen des Überstandes in 15 ml 10%-iger EDTA-Lösung resuspendiert. Um die oberflächliche Demineralisation der feinen Dentinpartikel durch den Chelatliganden EDTA zu fördern, wurde die Suspension in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen für 30 min auf Eis auf einem Orbitalrüttler gelegt. Der, die Proteine enthaltende Überstand wurde abgenommen, zentrifugiert und erneut von Niederschlag befreit. Dieser Schritt wurden mindestens viermalig wiederholt.

Um anschließend das EDTA und das restliche Ca^{2+} aus dem Zentrifugat zu entfernen und die Lösung aufzukonzentrieren, wurde sie zuerst steril filtriert. Dies ging mit 25% Volumenverlust einher. Darauf folgend wurde der Überstand in 50 ml Einwegspritzen aufgezogen und durch verschiedene Vorfilter mit absteigenden Porengrößen von 1,2 µl, 0,45 µl und 0,2 µl gepresst um danach jeweils 15 ml des Filtrats in einem Amicon Tube für 30 min bei 4000-facher Gravitation und 4°C zu zentrifugieren.

Beim Amicon Tube (Abbildung 11) handelt es sich um einen durch eine Zellulosemembran in zwei Kammern geteilten Tube. Bei der durch die Zentrifugation induzierten Kraft werden Moleküle bis zu einer Größe von 3000 Da in das untere Reservoir gepresst, die eDMPs verbleiben jedoch in der oberen Kammer.

Nach diesen 30 min wurden nochmals 5 ml des Filtrats nachgelegt, der Durchlaufbehälter geleert und das Röhrchen erneut für 15 min bei 4000 G und 4°C zentrifugiert.

Dieser Vorgang wurde 4-fach wiederholt. Um das unphysiologische Lösemittel EDTA zu ersetzen, wurde PBS hinzugegeben und erneut zwei Mal für 5 min zentrifugiert. Nach erneuter Sterilfiltration wurde das Konzentrat in Aliquoten von 100 µl bei -80° gelagert (Abbildung 10).

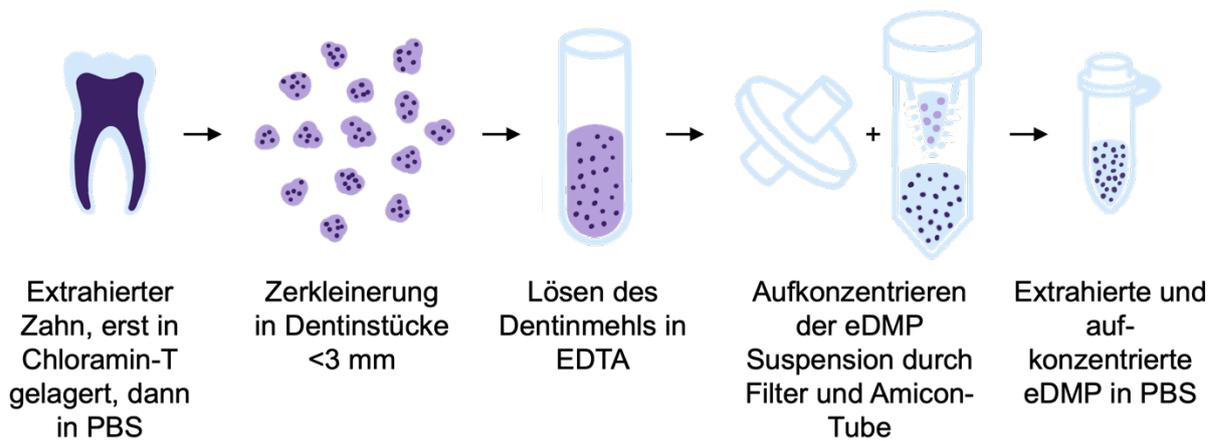


Abbildung 10: Prozess der eDMP-Extraktion

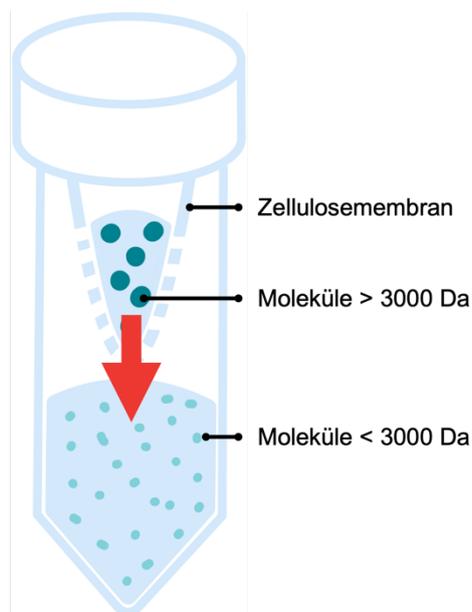


Abbildung 11: Funktionsweise des Amicon Tube

4.6.2 ELISA

In vorherigen Versuchen zeigte sich, dass die Konzentration an TGF- β 1 im festen Verhältnis zu den Konzentrationen der anderen Dentinmatrixproteine steht und somit als Referenzwert zur Qualitätssicherung und Bestimmung der Gesamtproteinmenge verwendet werden kann. Die Menge des Wachstumsfaktors wurde mit Hilfe eines Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) bestimmt und die eDMP-Lösung im Anschluss auf eine Konzentration von 500 pg TGF- β pro ml verdünnt.

Der Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ist eine immunologische Detektionsmethode durch eine enzymatische Farbreaktion. Dafür wurde das Human TGF- β 1 Quantikine® ELISA Kit eingesetzt.

Es wurde eine 96-Well-Platte verwendet, die mit immobilisierten, monoklonalen Antikörpern gegen TGF- β 1 beschickt war. In jedes Well wurden 50 μ l der gewonnenen eDMP-Lösung gefüllt. Hinzu kamen 50 μ l des Assay Diluent RD1-21, einer proteinhaltigen Lösung zur Stabilisierung der Wachstumsfaktoren. Das Antigen (TGF- β 1) konnte nun also an den primären Antikörper binden. Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden bei Raumtemperatur wurde die Platte dreimalig mit einem Waschpuffer gewaschen und getrocknet, um noch freie Antigene zu entfernen. Dann wurde je 100 μ l der TGF- β 1-Conjugate-Lösung hinzugegeben, die einen, an Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelten, sekundären Antikörper enthält. Nach zwei weiteren Inkubationsstunden erfolgte eine erneute Waschung. Mit der Zugabe von je 100 μ l Color-Reagent-Lösung kam es zu einem Farbumschlag ins Blaue. Das im Substrat enthaltenen Chromogen Tetramethylbenzidin (TMB) wurde durch das am Sekundärantikörper fixierte HRP gespalten und so aktiviert. Die Farbreaktion war somit proportional zur TGF- β 1-Menge. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit im Dunkeln wurde die Farbreaktion durch Zugabe von je 100 μ l Chlorwasserstoffsäure gestoppt, es fand ein Farbumschlag ins Gelbe statt. Im Photometer, bei einer Wellenlänge von 450 nm, konnte nun die Intensität der Farbreaktion gemessen und mit den Referenzwerten einer Verdünnungsreihe mit bekannten Konzentrationen verglichen werden.

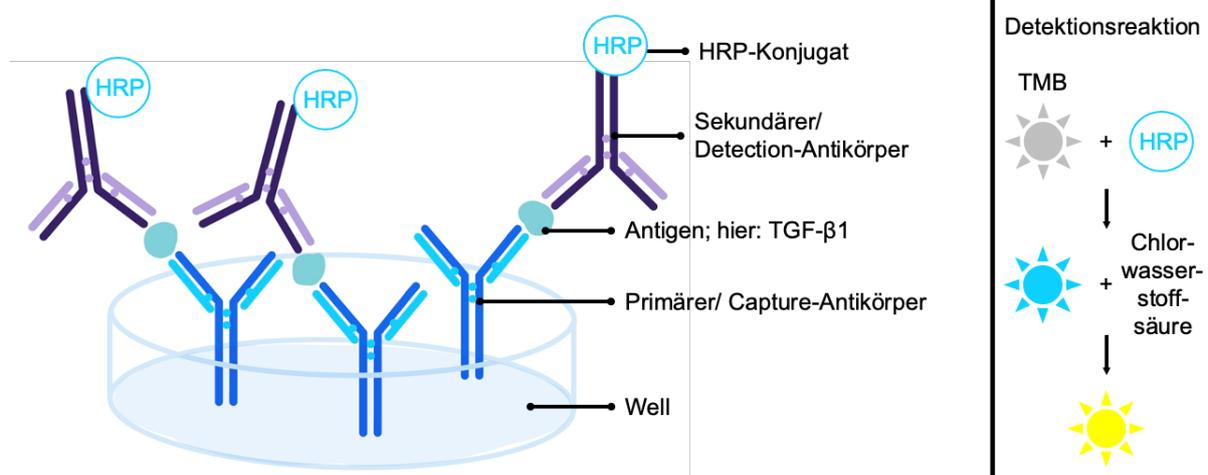


Abbildung 12: Funktionsweise eines ELISA

4.7 Untersuchung der Morphologie

4.7.1 Zellaussaat

Die Zellaussaat erfolgte auf je zwei 12 mm Poly-L-Lysine Coverslips in 12-Well Platten. Dafür wurden von den DPSC 10.000 Zellen in 300 µl Medium ausgebracht und für die HAEC 15.000 Zellen in 300 µl Medium, jeweils 150 µl pro Coverslip. Den Zellen wurden eine Stunde zum Adhärenen auf den Coverslips gegeben, bevor die Wells vorsichtig mit den jeweiligen Medien auf 1.500 µl aufgefüllt wurden. Die Kultivierung mit den jeweiligen Medien erfolgte für 7 Tage.

4.7.2 Färbung

Es wurden pro Zelltyp und Medium 2 Wells gefärbt.

Dafür wurden die Zellen nach Absaugen des Mediums zuerst zweifach mit je 1,5 ml vorgewärmten PBS gewaschen und im Anschluss für 10 min mit Formalin (4%) bei Raumtemperatur fixiert. Danach folgten nochmals zwei Waschgänge mit PBS.

Mit Triton X (0,1%) wurden die Zellen 5 min lang permeabilisiert. Gefärbt wurden sie zuerst mit 750 µl Phalloidin Texas Red, je Coverslip, für 30 min bei Raumtemperatur in Dunkelheit, um danach wieder gewaschen zu werden.

Zuletzt wurden die Zellen mit 750 µl DAPI (1:10.000) je Coverslip für eine Minute gefärbt und zweifach mit destilliertem Wasser gewaschen.

Die Coverslips wurden getrocknet und im Anschluss mit Eindeckmedium auf einen Objektträger aufgebracht. Es wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop und Blau- und Rotfiltern (BP 445/5; BP 605/70) Aufnahmen erstellt und digital überlagert.

4.8 Untersuchung der Genexpression

Der Versuch wurde in zwei getrennten Wiederholungen durchgeführt, die Ergebnisse nachher zusammengefasst. Im Folgenden wird jeweils das Vorgehen für eine Wiederholung beschrieben.

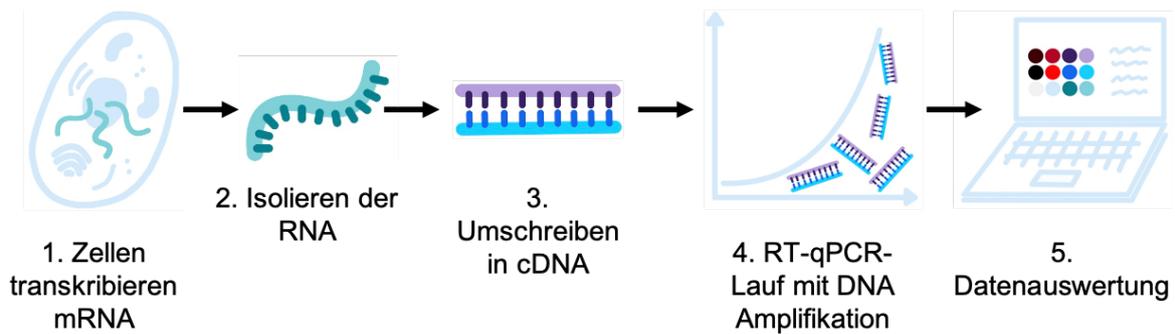


Abbildung 13: Ablauf einer RT-qPCR Analyse

Die Zellaussaat erfolgte in 12-Well Platten, beide Zellarten wurden mit den 3 Medien kultiviert. Für jede Versuchsgruppe wurden 3 Wells gefüllt, die Proben jedoch später gepoolt.

Es wurden jeweils 1,5 ml Zellsuspension verwendet. Von den DPSC wurden 49.000 Zellen pro Well eingesetzt und von den HAEC 75.000 Zellen pro Well. Die Kultivierung erfolgte für einen, sieben und 14 Tage.

4.8.1 RNA isolieren

Die Isolation der RNA, die nach einen Tag, einer Woche und zwei Wochen erfolgte, wurde mit Hilfe des RNeasy Kits® von QIAGEN durchgeführt. Es wurde durchgängig unter Kühlung auf Eis gearbeitet.

Zur Vorbereitung wurde hierfür der mitgelieferte RLT Puffer im Verhältnis 1:10 mit Mercapthoethanol versetzt und der RPE Puffer mit 44 ml Ethanol (99,9%) aufgefüllt.

Die in PBS gewaschenen Zellen wurden zunächst durch Zugabe von je 400 µl RLT Puffer pro Well lysiert und die Nukleinsäuren linearisiert. Das Mercapthoethanol bewirkt dabei die Inaktivierung der RNasen. Anschließend wurden die Proben aus den 3 Wells kombiniert.

Jeweils 1200 µl der Probe wurde in eine Shreddersäule (QIAshredder, QIAGEN) überführt und für 2 min bei 1000 G zentrifugiert, um so homogenisiert zu werden. Ziel dieses Homogenisierungsschrittes war es, die Viskosität des Lysats durch das Zurückhalten hochmolekularer Zellkomponenten zu reduzieren.

Im nächsten Schritt wurde der Durchfluss im Mischungsverhältnis 1+1 mit Ethanol (70%) versetzt, um ideale Bedingungen für die selektive Bindung der RNA an der RNeasy-Membran zu schaffen. Jeweils 600 µl des Durchflusses wurde nun in die Mini

Spin Säulen des RNeasy Kits übertragen und für 15 s bei 10.000 Umdrehungen in einer Tischzentrifuge zentrifugiert, wobei die RNA an der Silica-Membran der Säulen zurückgehalten wurde. Der Unterstand konnte also nun entfernt werden. Durch weiteres Zentrifugieren mit RW1 Puffer (15 s), RPE Puffer (15 s) und RPE Puffer (2 min) wurden weitere Verunreinigungen entfernt.

Die mini Spin Säule wurde nun in ein neues 2 ml Röhrchen hinübersetzt und zwei Minuten trocken zentrifugiert, bevor die RNA dann durch einminütiges Zentrifugieren mit 30 µl RNA-freiem Wasser in ein 1,5 ml Tube eluiert wurde (Abbildung 14).

Die gewonnene RNA-Menge musste nun für jede Probe per Nano-Drop bestimmt werden. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde die RNA bei -80°C gelagert.

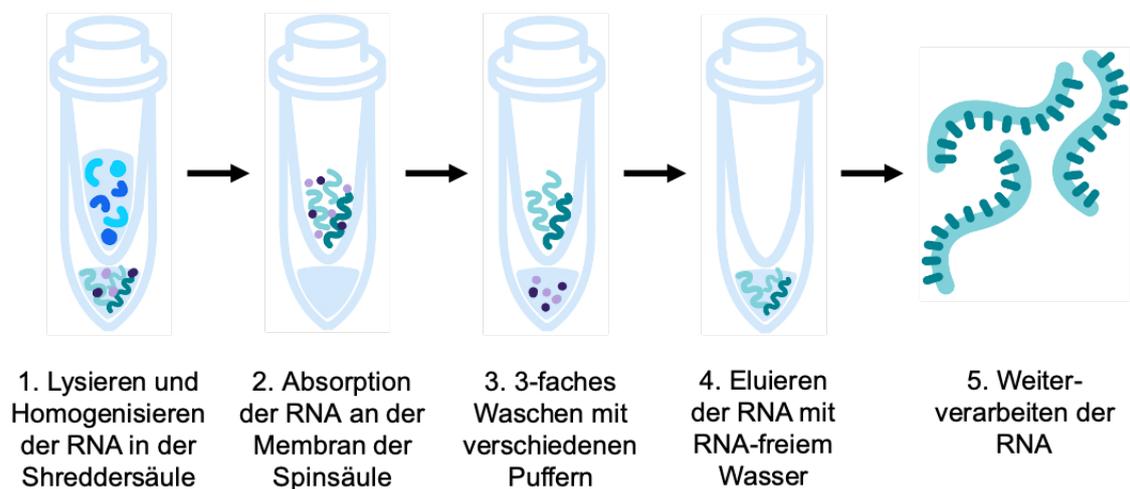


Abbildung 14: Isolation der RNA

4.8.2 Synthese von cDNA

Das Umschreiben der im ersten Schritt isolierten RNA in cDNA erfolgte mit dem Omniscript® Reverse Transcription Kit von QIAGEN.

Auch diese Reaktionen wurden, um vorzeitige cDNA-Synthese zu vermeiden und das Risiko eines RNA-Abbaus zu minimieren, auf Eis durchgeführt.

Die Proben der einzelnen Wiederholungen wurden separat umgeschrieben.

Für die Transkription der RNA wurde eine Template Menge von 12 µl pro Umschreibereaktion mit einer RNA-Menge von 500 ng benötigt. Die aufgetaute RNA muss also im ersten Schritt, in dem in der

Tabelle 2 errechneten Verhältnis, vorverdünnt werden, um dann im zweiten Schritt durch Pipettieren der in der Tabelle angeben RNA-Menge und Menge an RNase freiem Wasser in die gewünschte Konzentration von 500 ng RNA/ 12 µl gebracht zu werden.

Tabelle 2: Errechnete Verdünnungen der RNA

Probe	OD 260/280	OD 260/230	RNA-Konz. ng/µl	Vorverdünnungsfaktor	RNA-Konz. nach Vorverdünnung	RNA in µl	H2O in µl
DPSC 10 % D1 Wdh 1	2,03	2,04	323,4	2	161,7	3,09	8,91
DPSC 10 % D7 Wdh 1	2,03	2,12	626,5	5	125,3	3,99	8,01
DPSC 10 % D14 Wdh 1	1,99	2,23	805,2	5	161,04	3,10	8,90
DPSC eDMP D1 Wdh 1	2,03	1,88	284,3	2	142,15	3,52	8,48
DPSC eDMP D7 Wdh 1	2,01	2,12	656,1	5	131,22	3,81	8,19
DPSC eDMP D14 Wdh 1	2,01	1,85	514,3	5	102,86	4,86	7,14
DPSC SP D1 Wdh 1	2,03	1,88	314,3	2	157,15	3,18	8,82
DPSC SP D7 Wdh 1	2,03	2,09	1039,1	5	207,82	2,41	9,59
DPSC SP D14 Wdh 1	2,01	2,13	894,3	5	178,86	2,80	9,20
HAEC 10 % D1 Wdh 1	2,03	2,05	234,6	2	117,3	4,26	7,74
HAEC 10 % D7 Wdh 1	2,03	1,81	315,8	2	157,9	3,17	8,83
HAEC 10 % D14 Wdh 1	2,03	1,88	267,2	2	133,6	3,74	8,26
HAEC eDMP D1 Wdh 1	2,04	1,93	197,1	2	98,55	5,07	6,93
HAEC eDMP D7 Wdh 1	2,02	1,51	221,3	2	110,65	4,52	7,48
HAEC eDMP D14 Wdh 1	2,02	1,72	102,7	1	102,7	4,87	7,13
HAEC SP D1 Wdh 1	2,03	2,14	202,3	2	101,15	4,94	7,06
HAEC SP D7 Wdh 1	2,02	2,08	401,7	2	200,85	2,49	9,51
HAEC SP D14 Wdh 1	1,97	2,18	567,7	5	113,54	4,40	7,60
DPSC 10 % D1 Wdh 2	2,02	2,12	391,9	2	195,95	2,55	9,45
DPSC 10 % D7 Wdh 2	2,01	2,06	910,9	5	182,18	2,74	9,26

Die befüllten Cups wurden für 60 Minuten im Thermoblock bei 37°C inkubiert, um den Umschreibevorgang durch die Reverse Transkriptase zu ermöglichen und direkt im Anschluss wieder auf 4°C heruntergekühlt.

Zur Aufbewahrung bis zur Durchführung der PCR wurde die gewonnene cDNA in den 0,5 ml Cups bei -20°C gelagert.

4.8.3 PCR

Die Polymerase-Chain-Reaction (PCR), im Jahre 1983 von dem amerikanischen Biochemiker Kary Mullis etabliert, ist ein labortechnisches Verfahren in dem einzelne DNA-Segmente durch die Zugabe von Primern, einer Polymerase und dNTPs (Desoxynukleosidtriphosphate) dupliziert werden.

Verwendet wird meist die thermostabile DNA-Polymerase des *Thermus-aquaticus*-Bakteriums, dessen Temperaturoptimum bei 72°C liegt. So wird es möglich, die Reaktion durch Temperaturveränderungen in Zyklen zu steuern. Ein Primer ist ein kurzes DNA-Oligonukleotid, das als Ansatzpunkt für die Taq-Polymerase fungiert und so in beide Richtungen das Amplikon definiert (Forward und Reverse Primer).

Die Reagenzien werden in einen Thermocycler gegeben. Die eigentliche PCR Reaktion läuft in drei Phasen ab: In der Denaturierungsphase wird die Temperatur auf ca. 94°C erhöht, um die beiden DNA-Stränge voneinander zu trennen. In der Annealing Phase wird die Temperatur gesenkt, sodass sich die Primer an ihre spezifischen Stellen anlagern können und in der Elongationsphase, bei der die Temperatur der Idealtemperatur der Polymerase entspricht, wird der fehlende DNA-Strang aus den freien dNTPs polymerisiert. Da jeder DNA-Strang pro Zyklus dupliziert wird, liegt eine exponentielle Vermehrung der Ziel-DNA vor (Domingues, 2017; Müller und Prange, 2016).

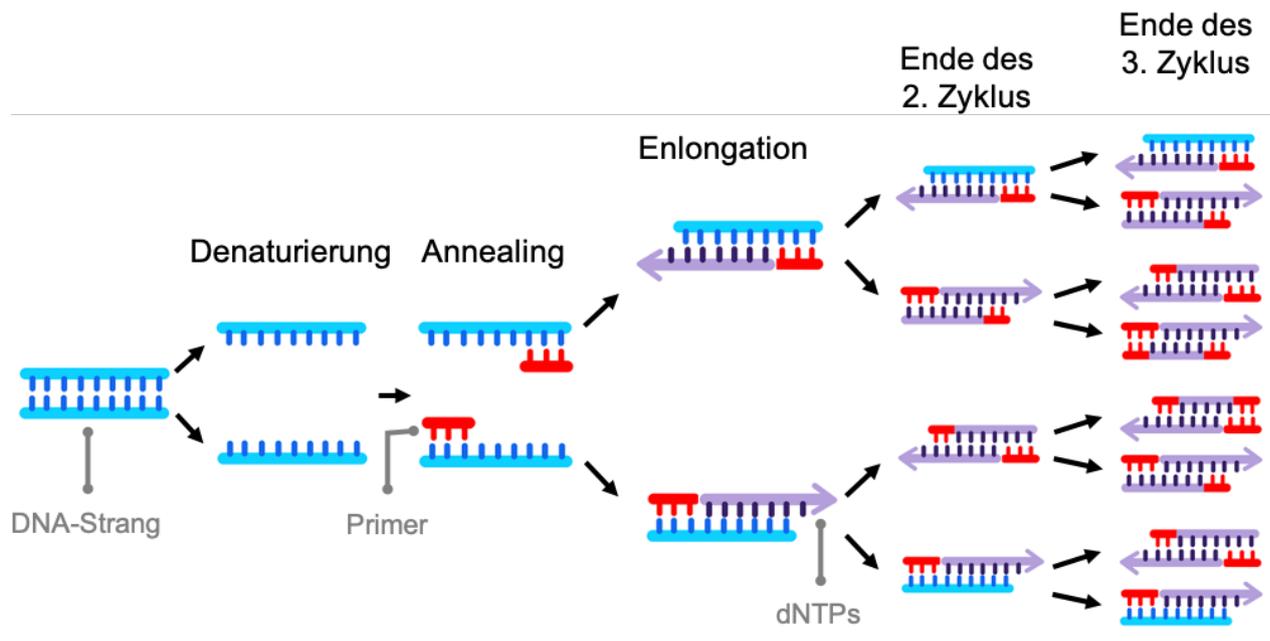


Abbildung 15: Ablauf einer PCR-Reaktion

4.8.3.1 RT-qPCR

Die quantitative Reverse-Transkriptase-PCR (RT-qPCR) dient nicht der Replikation von DNA-Segmenten, sondern der Quantifizierung von DNA-Mengen. Bei jeder Replikation des Segments wird ein fluoreszierender Farbstoff in die DNA eingebaut und die Stärke dieses Signals kann in Echtzeit durch den Thermocycler registriert werden. So lässt sich bestimmen, ab welchem Zyklus ein bestimmter Schwellenwert überschritten ist und so können Rückschlüsse auf die anfängliche DNA-Menge getroffen werden.

4.8.3.2 TaqMan-PCR

Die TaqMan-PCR ist eine Sonderform dieser RT-qPCR, die als spezifischer gilt. Hier wird der zu amplifizierende DNA-Bereich nicht nur durch Primer definiert, sondern ebenfalls durch eine Sonde, die spezifisch in diesem Bereich binden kann. Am 3' Ende der Sonde ist ein fluoreszierender Reporterfarbstoff befestigt, am 5' Ende ein Quencher. Dies ist ein Fluorochrome der durch das Prinzip des Förster-Resonanzenergietransfers die Fluoreszenz des Reporters unterdrückt, solange beide sich in enger räumlicher Nähe zueinander befinden. Wird der DNA-Strang nun durch die Polymerase synthetisiert, spaltet die Taq-Polymerase durch ihre 5'-3'-Exonuclease-Aktivität die Sonde, wodurch Quencher und Reporter in räumliche Distanz zueinander geraten und ein Fluoreszenzsignal freigesetzt wird. Hier wird das Signal also nicht durch die Interkalierung

eines Farbstoffes in die DNA-Struktur erzeugt, sondern erst spezifisch durch die Duplikation des gewünschten DNA-Segments.

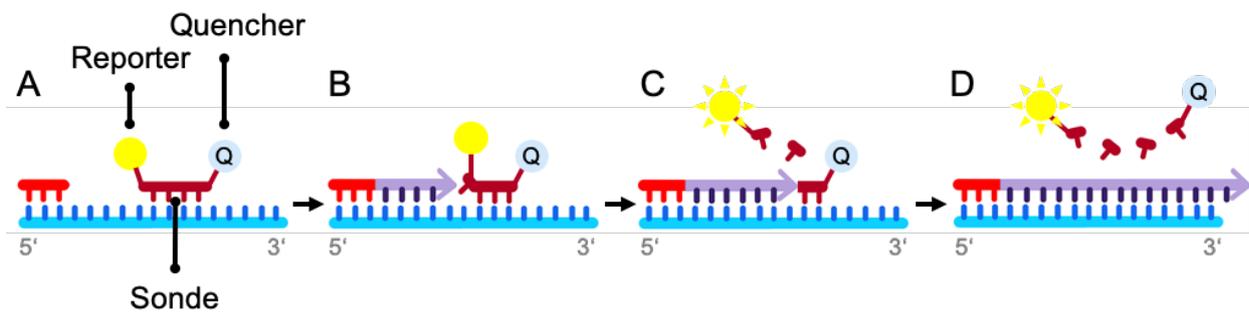


Abbildung 16: Reporterfreisetzung einer TaqMan-PCR

4.8.3.3 Durchführung

Die cDNA wurden vor Einsatz um den Faktor 20 verdünnt, wodurch eine Konzentration von 1,25 ng/µl vorlag.

Für die PCR-Reaktion wurden neben den cDNA Proben auch der ReactionMix benötigt. Dieser setzt sich aus folgenden Bestandteilen zusammen:

- TaqMan Fast Advanced MasterMix (2x) 10 µl
- TaqMan Assay (20x) 1 µl
- Nuclease Free Water 7 µl

Im Fast Advanced MasterMix ist neben der DNA-Polymerase, dNTPS und dUTP auch der passive Fluoreszenzfarbstoff ROX enthalten, der Pipetierungenauigkeiten und Well-zu-Well-Unterschiede normieren soll, sowie eine Uracil-DNA-Glykosidase (UNG), die Kontamination des Reaktionsgemisches durch, zum Beispiel, Carry-Over-DNA verhindern soll.

Bei den TaqMan Assays handelt es sich um Primer und Sonden zur Ermittlung der Expression der zu betrachtenden Gene. Diese können der Tabelle 3 entnommen werden.

Tabelle 3: Untersuchte Gene und verwendete Assays

Name	Kürzel	Funktion	Assay ID
Collagen Typ 1 A1	COL1A1	Mineralisation	Hs01029144_m1
Integrin Binding Sialoprotein	IBSP	Mineralisation	Hs00913377_m1
Bone Gamma-Carboxyglutamate Protein	BGLAP	Mineralisation/ Osteogenese	Hs01587814_g1
Bone Morphogenetic Protein 4	BMP4	Mineralisation/ Osteogenese	Hs00370078_m1
Transforming Growth Factor B1	TGFB1	Dentinogenese	Hs00998133_m1
Nestin	NES	Dentinogenese	Hs04187831_g1
Glutathione Peroxidase 3	GPX3	Schutz vor oxidativem Stress	Hs01078668_m1
Insulin-like Growth Factor binding Protein 2	IGFBP2	Proliferation/ EMT	Hs01040719_m1
S100 Calcium binding Protein A4	S100A4	Proliferation/ EMT	Hs00243202_m1
Ribosomal Protein S18	RPS18	Haushaltsgen	Hs99999901_s1

In jedes Well der MicroAmp® Fast 96-Well Reaction Plate (0,1ml) wurde zuerst 2 µl der Template cDNA gegeben und dann 18 µl des ReactionMix hinzugefügt. Jede cDNA-Probe wurde mit jedem Assay untersucht und jede Paarung wurde in Duplikaten ausgeführt. So ergaben sich acht einzelne PCR-Läufe.

Die Platten wurden mit einer Klebeabdeckung versiegelt und bei 3000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Im Anschluss wurden die fertigen Platten entweder gekühlt zwischengelagert oder der PCR-Lauf im Thermocycler wurde direkt gestartet. Dem Laufprotokoll (Abbildung 17) können die genauen Zeiten und Temperaturen entnommen werden.



Abbildung 17: Laufprotokoll; in der Hold Stage wird zuerst die UNG aktiviert und dann denaturiert; die PCR Stage wird in 40 Zyklen durchgeführt; das Kamerasymbol entspricht der Fluoreszenzmessung am Ende jeder Elongationsphase

4.8.4 Datenauswertung

Das Plattendesign, die Aufzeichnung und Auswertung der PCR-Läufe erfolgte mit der QuantStudios Design & Analysis Software. Als Confidence-Level wurde ein RQ Min/Max- Wert von 95% ausgegeben.

Die statische Analyse und Erstellung der Graphen erfolgte im Programm Prism Graph-Pad. Zur Signifikanztestung der unabhängigen Stichproben wurde der Mann-Whitney U-Test mit einem Signifikanzniveau von $P \leq 0,05$ eingesetzt.

Angegeben wurde der Fold Change, der sich mit der $\Delta\Delta Ct$ –Methode berechnet. Dafür wurden die Ct -Werte (Cycle Threshold, Schwellenwertzyklus) durch das Haushaltsgen RPS18 normiert ($=\Delta Ct$), in Bezug gesetzt zur Referenzexpression, der Genexpression der DPSC in 10% FBS am Tag 1 ($=\Delta\Delta Ct$) und durch Einsetzen in die Formel $2^{-\Delta\Delta Ct}$ wurde die Veränderung der Genexpression im Verhältnis zur Referenzexpression berechnet ($=\text{Fold Change}$).

4.9 Untersuchung der Mineralisation

4.9.1 Zellaussaat

Die Zellen wurden getrennt nach Zellart in zwei 24-Well Platten ausgesät und mit den drei Medien kultiviert. Für jedes Medium wurden 6 Wells gefüllt, eingesetzt wurden $2,4 \times 10^4$ Zellen pro Well von den DPSC und $3,7 \times 10^3$ Zellen pro Well der HAEC. Nach 21 Tagen Kultivierung wurde die Zellen mit Alizarin angefärbt, um Kalziumablagerungen zu visualisieren.

4.9.2 Färbung

Die 40 mM Färbelösung dafür wurde am Vortag hergestellt indem 1,095 g Alizarinrot-S in 40 ml Aqua dest. gelöst wurden. Im Anschluss wurde durch Zugabe von Ammoniumhydroxid, bestehend aus 40 ml Aqua dest. und 320 μ l 25%-igem Ammoniak, ein pH von 4,2 eingestellt. Die Lösung wurde mit Aqua dest. auf eine Gesamtmenge von 80 ml aufgefüllt und der pH-Wert erneut überprüft.

Vor dem Färben wurden die Zellen zweifach mit PBS gewaschen, um dann mit 30 μ l 10% Paraformaldehyd pro Well für 20 min fixiert zu werden. Im Anschluss wurden Sie mit 30 μ l der Färbelösung für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Reste des Alizarins mit Aqua dest. abgewaschen, bis der Überstand klar blieb.

Mit einem inversen Mikroskop wurden die Wells unter Aqua dest. analysiert und Aufnahmen erstellt.

5 Ergebnisse

5.1 Charakterisierung der HAEC

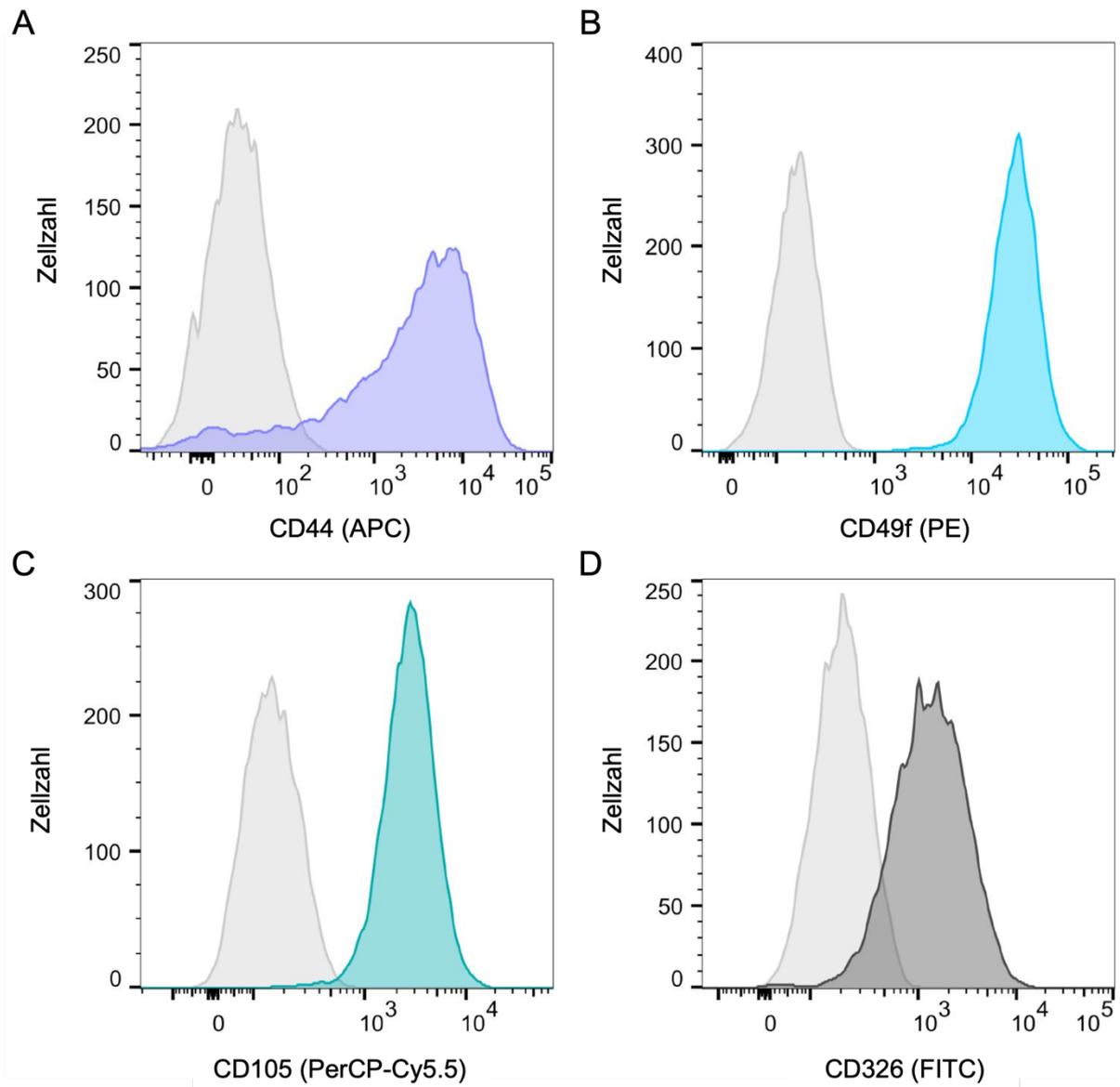


Abbildung 18: Ergebnisse der Durchflusszytometrie; dargestellt in Einzelparameter-Histogrammen; auf der X-Achse wird die Signalintensität des ausgewählten Parameters wiedergegeben

Die Durchflusszytometrie wurde eingesetzt, um auf den HAEC vorhandenen Oberflächenmarker zu untersuchen und so die Zellen zu charakterisieren.

Die hellgrau hinterlegte Kurve der Einzelparameter-Histogramme stellt die Isotypkontrolle dar (Abbildung 18, A bis D). Sie wird zur Bestimmung der unspezifischen Antikörperbindung eingesetzt. Die geringe Überlappung der beiden Kurven zeigt, dass hier nur eine geringe unspezifische Bindung stattfindet.

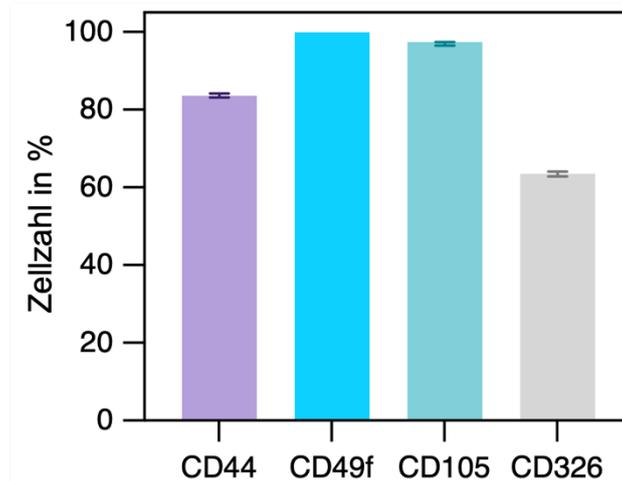


Abbildung 19: Ergebnisse der Durchflusszytometrie; prozentuale Darstellung der untersuchten Oberflächenmarker

Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie zeigen, dass alle getesteten Oberflächenmarker vorhanden sind. Die HAEC weisen sowohl epitheliale (CD49f und CD326) als auch mesenchymale (CD105, CD44) Oberflächenantigene auf. Die Anteile mit denen die Marker von den Zellen exprimiert werden, sind Abbildung 19 zu entnehmen.

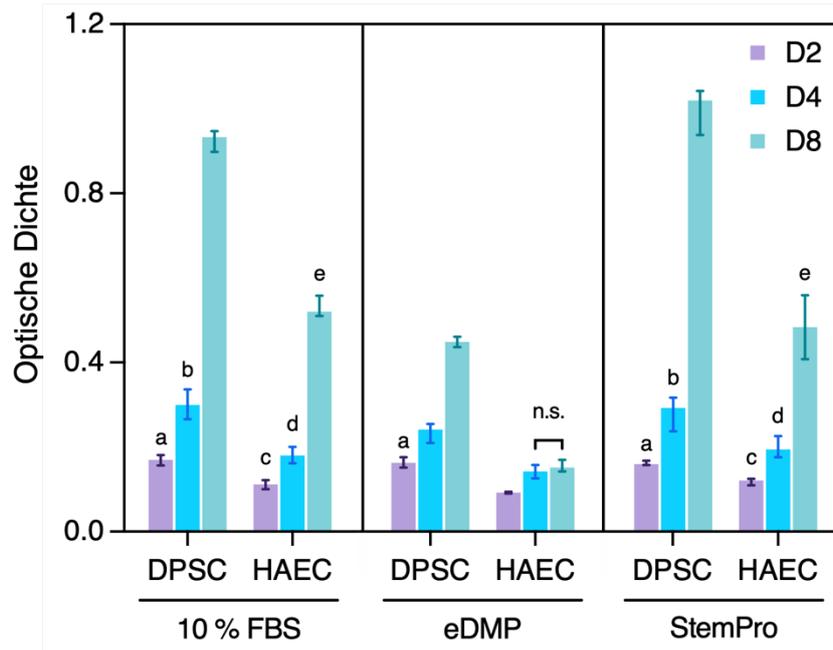


Abbildung 20: Ergebnisse des MTT-Tests

Mit dem MTT-Test wird die metabolische Aktivität der Zellen visualisiert. Somit kann er als Viabilitätstest gedeutet werden. Eine höhere OD geht dabei mit einer höheren Viabilität einher. Die HAEC weisen in allen Medien eine geringere metabolische Aktivität auf als die DPSC. In 10% FBS und StemPro steigt diese über den Beobachtungszeitraum (Tag 2 bis Tag 8) stetig an. In eDMP gibt es dahingegen von Tag 2 bis 4 einen sehr geringen und von Tag 4 bis Tag 8 keinen signifikanten Anstieg der OD.

5.2 Morphologie

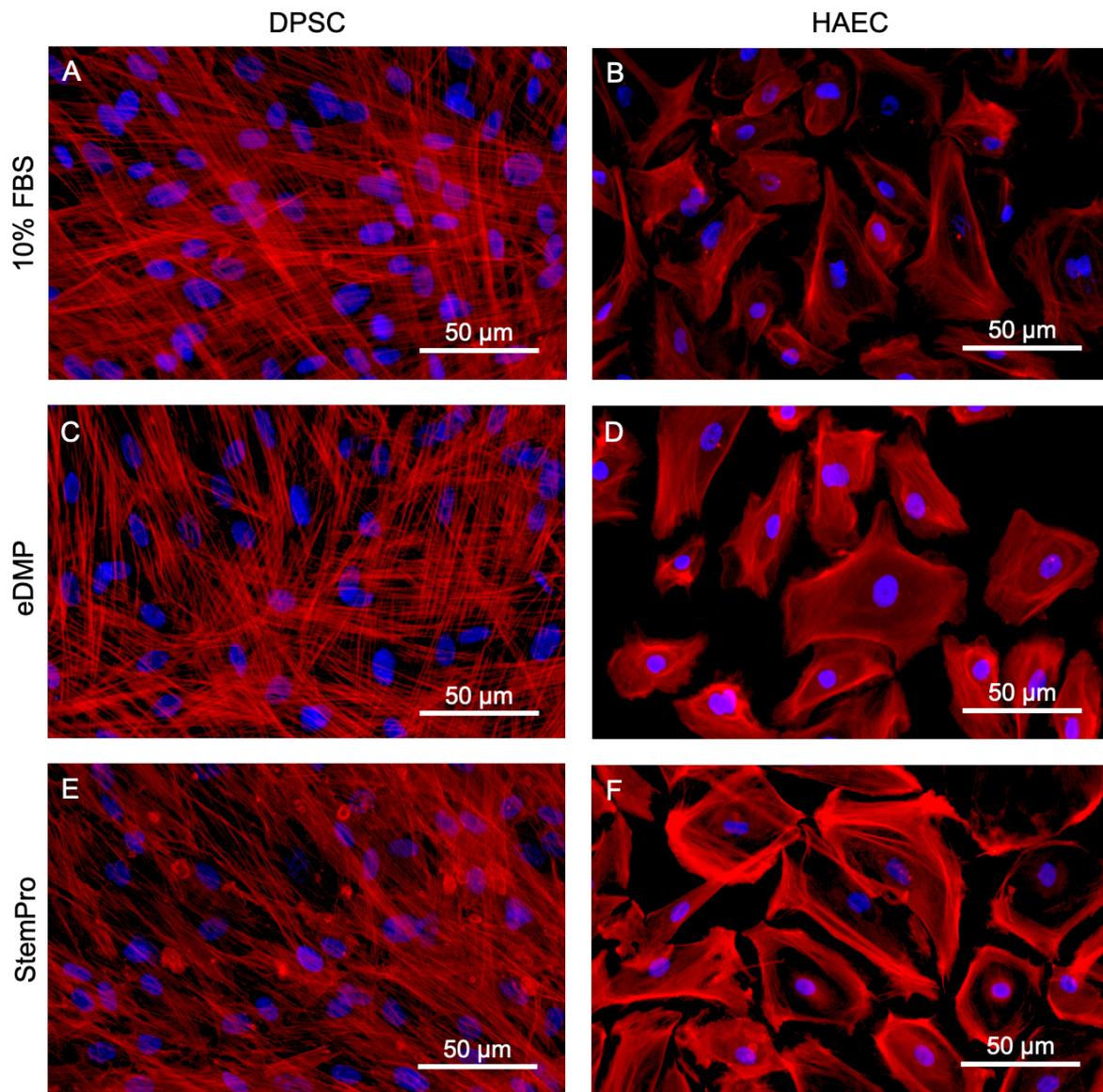


Abbildung 21: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Zellen

Der Farbstoff Phalloidin Texas Red markiert das Strukturprotein F-Aktin des Zytoskeletts. Dieses ist rot dargestellt. DAPI lagert sich in AT-reiche Regionen der DNA ein, stellt also den Zellkern blau dar. Auf den überlagerten Aufnahmen lässt sich somit die Morphologie der Zellen abbilden.

Die DPSC stellen sich als spindelförmige, uniforme, fibroblastenähnliche Zellen mit langen Zellfortsätzen und oft ovalem Zellkern dar (Abbildung 21A). Die HAEC besitzen mit rund 50x25 µm deutlich größere Zellkörper und weisen eine polygonale, eher stellate Form auf (Abbildung 21A).

Bei beiden Zelltypen lassen sich weder durch die Kultur mit eDMP noch mit StemPro Unterschiede hinsichtlich der Zellmorphologie feststellen.

5.3 Genexpression

Die Ergebnisse werden in Abbildung 22 bis Abbildung 26 dargestellt. Für jedes Gen ist ein separater Graph gezeichnet. Auf der y-Achse ist der Fold Change aufgetragen, auf der horizontalen Achse sind, nach Medium getrennt, die zwei Zellarten aufgeführt. Die unterschiedlichen Farben der Balken markieren dabei die drei Zeitpunkte der DNA-Isolation und PCR-Untersuchung, nach einem Tag (D1), nach einer Woche (D7) und nach zwei Wochen (D14).

Die Referenzexpression mit dem Wert 1 (Expression der DPSC in 10% FBS an Tag 1) ist in jedem Graphen durch eine horizontale Linie gekennzeichnet. Expressionsniveaus der beiden Zelltypen im selben Medium, die nach statistischem Test ($P < 0,05$) keine signifikanten Unterschiede aufweisen, sind mit dem gleichen Buchstaben gekennzeichnet (für genaue Signifikanzniveaus siehe Tabelle 4).

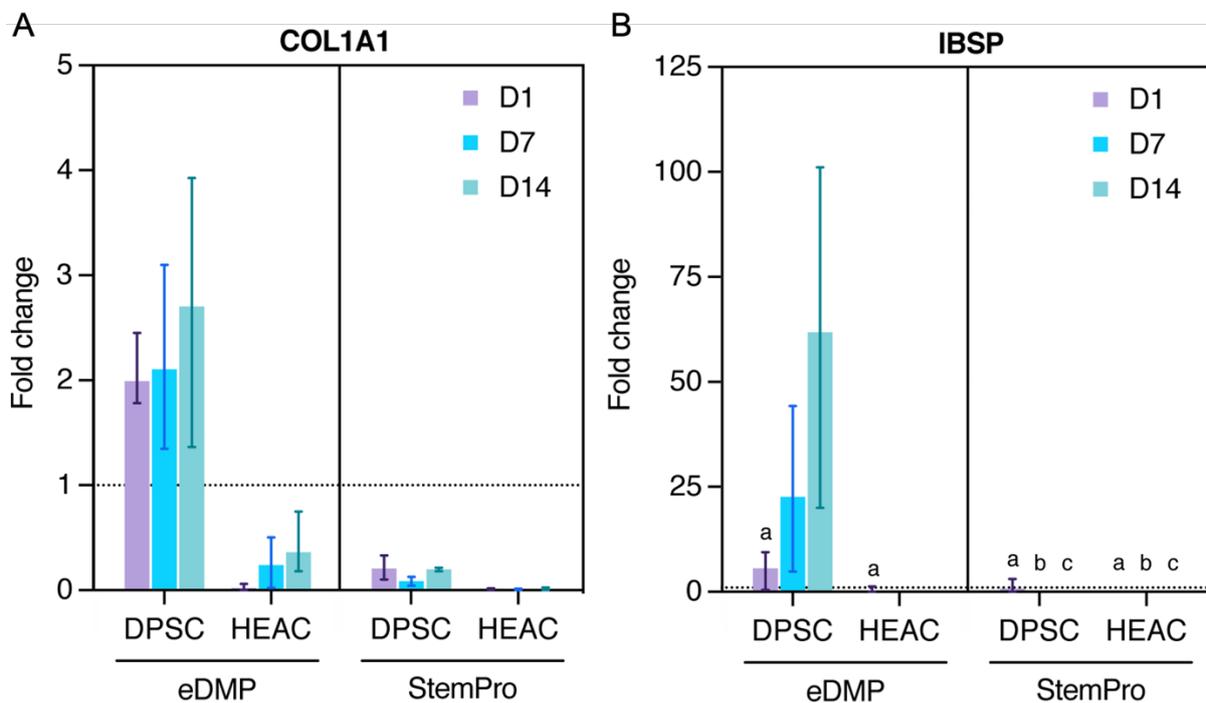


Abbildung 22: RT-qPCR Ergebnisse von COL1A1 (Collagen Typ 1 A1) und IBSP (Integrin Binding Sialoprotein), Gene assoziiert mit Mineralisation

Die Gene COL1A1 und IBSP werden als Marker der Mineralisation von osteo- und odontogenen Zellen beschrieben.

Dem Graphen ist abzulesen, dass DPSC zu jedem Zeitpunkt und in beiden Differenzierungsansätzen eine höhere Kollagenexpression aufweisen als HAEC. Über den Zeitverlauf von Tag 1 bis Tag 14 (D1-D14) führt eDMP zu einem Anstieg der COL1A1-Expression. Das osteogene Differenzierungsmedium bewirkt jedoch eine Reduktion im Vergleich zur Referenzexpression (Abbildung 22A). Eine deutliche Änderung zeigt auch die Expression des Matrixproteins Osteopontin (IBSP). Beispielsweise ist diese für die DPSC in eDMP am Tag 14 auf das hundertfache erhöht (Abbildung 22B).

Beide Gene werden in HAEC nicht oder in signifikant geringerem Maße exprimiert als in DPSC.

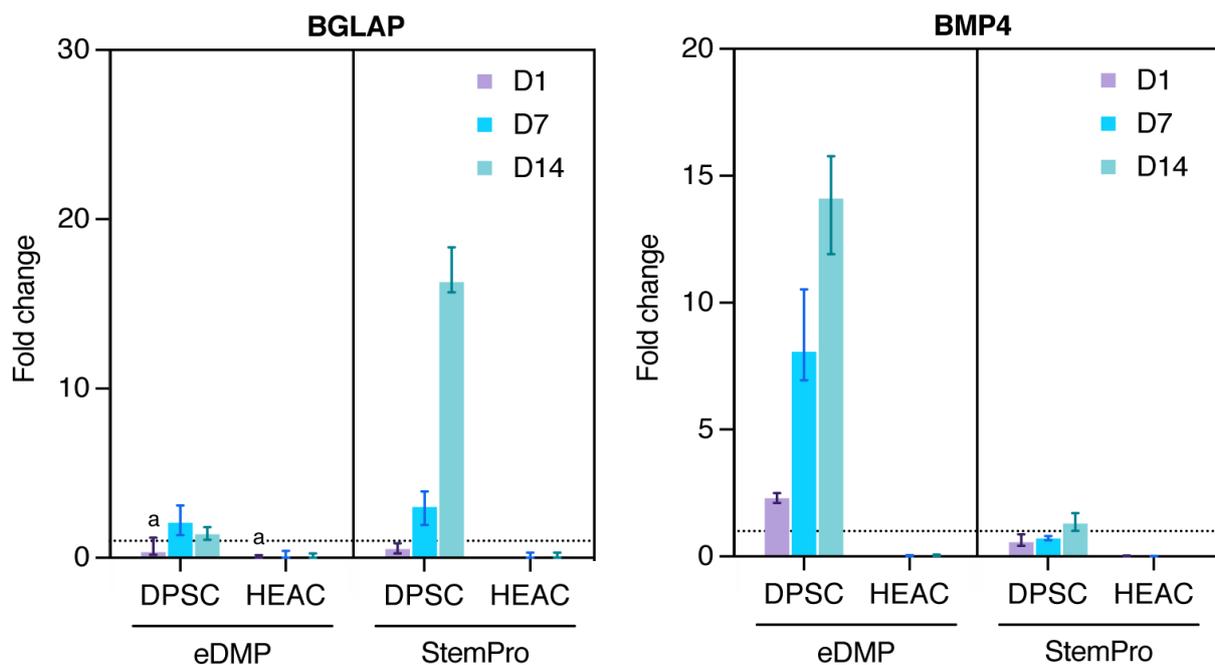


Abbildung 23: RT-qPCR Ergebnisse von BGLAP (Bone Gamma-Carboxyglutamate Protein) und BMP4 (Bone Morphogenic Protein 4); Gene assoziiert mit Osteogenese

BGLAP und BMP können als Marker der Osteogenese gewertet werden.

Osteocalcin (BGLAP) wird im osteogenen Differenzierungsmedium stärker exprimiert, jedoch hauptsächlich von den DPSC (Abbildung 23A). Am Tag 14 steigt die Expression ungefähr auf das 17-fache des Referenzwertes an. BMP4 wird ebenfalls durch die DPSC vermehrt exprimiert und steigt über den Zeitverlauf an, jedoch im

odontogenen Medium (siehe Abbildung 23B). Hier liegt die Expression nach 14 Tagen ungefähr 14-fach höher als der Referenzwert.

Beide Marker scheinen in HAEC keine veränderte Expression aufzuweisen.

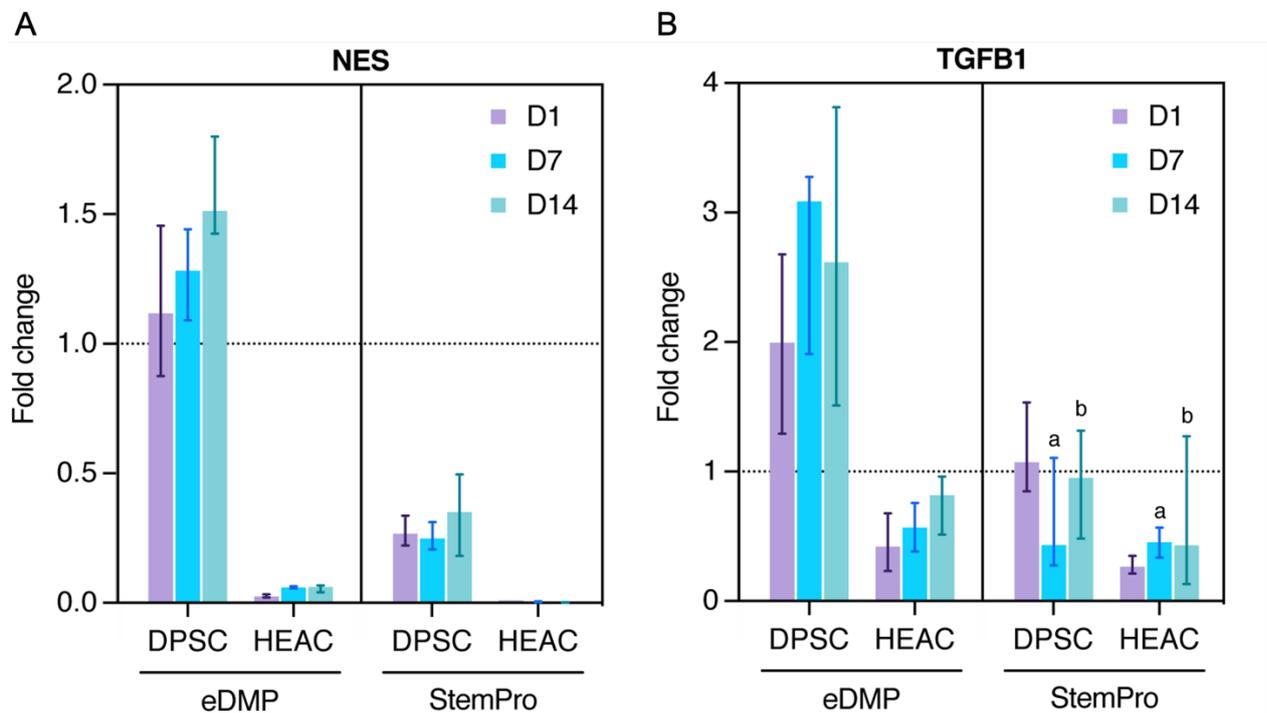


Abbildung 24: RT-qPCR Ergebnisse von NES (Nestin) und TGFB1 (Transforming Growth Factor B1); Gene assoziiert mit Dentinogenese

NES und TGFB1 wurden als Marker der Dentinogenese untersucht. Die DPSC exprimieren beide Gene im Medium mit eDMP stärker als im Medium mit StemPro.

Die NES-Expression steigt für DPSC in eDMP über den Zeitverlauf gleichmäßig an, in StemPro schwankt die Expression um das 0,3-0,4-fache des Referenzwertes. NES wird von den HAEC zu keinem Zeitpunkt und in keinem Medium in ähnlich hohem Maße wie in der Referenzsituation exprimiert (Abbildung 24A).

Das TGFB1-Gen wird durch die DPSC in eDMP am Tag 1 vermehrt exprimiert, ungefähr im doppelten Maße. Die Expression steigt am Tag 7 weiter an, um dann am Tag 14 wieder leicht reduziert zu werden. Im StemPro hingegen liegt die Expression am Tag 1 auf Höhe des Referenzwertes, fällt im Verlauf weiter ab, um am Tag 14 wieder anzusteigen (Abbildung 24B).

Die HAEC in eDMP exprimieren NES, verglichen zu unregulierten DPSC, im geringen Maße. Dahingegen kann in StemPro keine messbare Expression festgestellt werden (Abbildung 24A).

Die Expression von TGFB1 durch die HAEC, kultiviert mit odontogenem Differenzierungsmedium, liegt ebenfalls unter dem Referenzwert, steigt über den Zeitverlauf jedoch gleichmäßig an, um am Tag 14 ungefähr das Referenzniveau zu erreichen. Im osteogenen Differenzierungsmedium hingegen, schwankt die Expression im zeitlichen Verlauf stärker, bleibt unter dem Referenzniveau und unterliegt stärkeren Streuungen (Abbildung 24B).

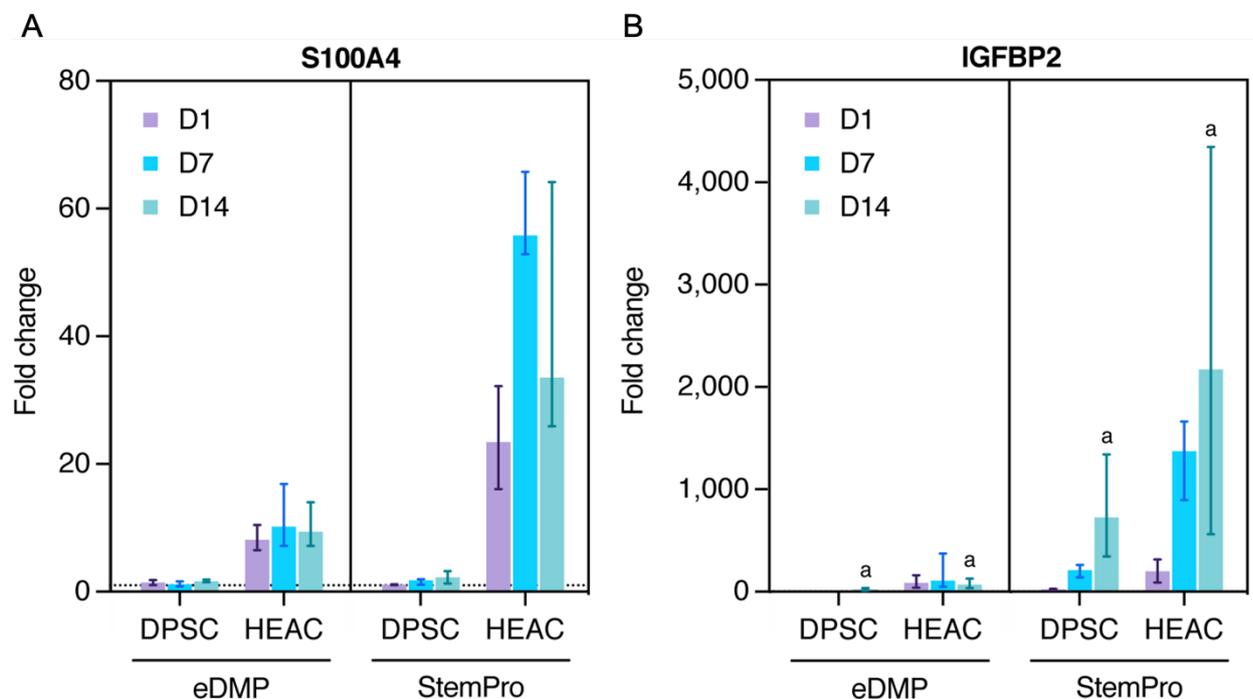


Abbildung 25: RT-qPCR Ergebnisse von S100A4 (S 100 Calcium binding Protein 2) und IGFBP2 (Insulin-like Growth Factor Binding Protein 2); Gene assoziiert mit Proliferation/ EMT

S100A4 und IGFBP2 können als Marker für Proliferation jedoch auch für eine Epithelial-Mesenchymale Transition gesehen werden.

Die Expression von S100A4 durch DPSC fällt schwach aus. HAEC dahingegen exprimieren in beiden Differenzierungsmedien vermehrt S100A4. Am Tag 7 liegt die Expression im StemPro ungefähr 60-fach höher als der Referenzwert.

Auch die IGFBP2-Expression ist in StemPro erhöht, jedoch durch beide Zelltypen. Über den Zeitverlauf exprimieren die DPSC vermehrt IGFBP2 um am Tag 14 eine ca. 900-fache Expression zu erreichen. Für HAEC in StemPro steigt die Expression ebenfalls über den Zeitverlauf an. Schon am Tag 1 liegt sie bei einem Fold-Change von ca. 200 und am Tag 14 beträgt die Expression das 2.000-fache der Vergleichsexpression (Abbildung 25B).

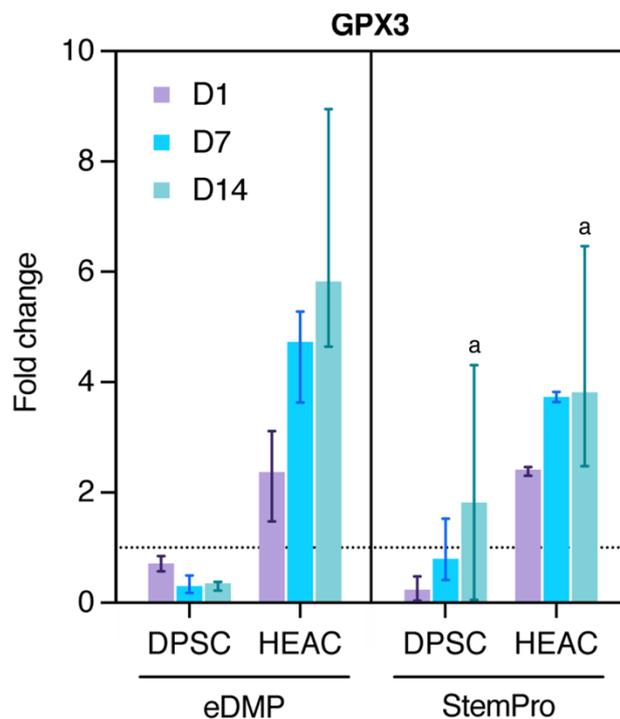


Abbildung 26: RT-qPCR Ergebnisse von GPX3 (Glutathione Peroxidase 3); assoziiert mit Schutz vor oxidativem Stress

Die Expression des Gens GPX3, welches Zellen vor oxidativem Stress schützen soll, ist in beiden Medien ähnlich, jedoch für die Amnion- im Vergleich zu den Pulpastammzellen stets vermehrt. Hier scheint sie auch im Verlauf des Experimentes anzusteigen. Während DPSC in eDMP weniger GPX3 exprimieren als die Referenz, liegt die Expression der HAEC am Tag 14 bei einem Fold-Change von 6. Im StemPro ist ähnliches zu beobachten, jedoch liegt hier die Expression am Tag 14 bei einem Wert von 4 (Abbildung 26).

5.4 Mineralisation

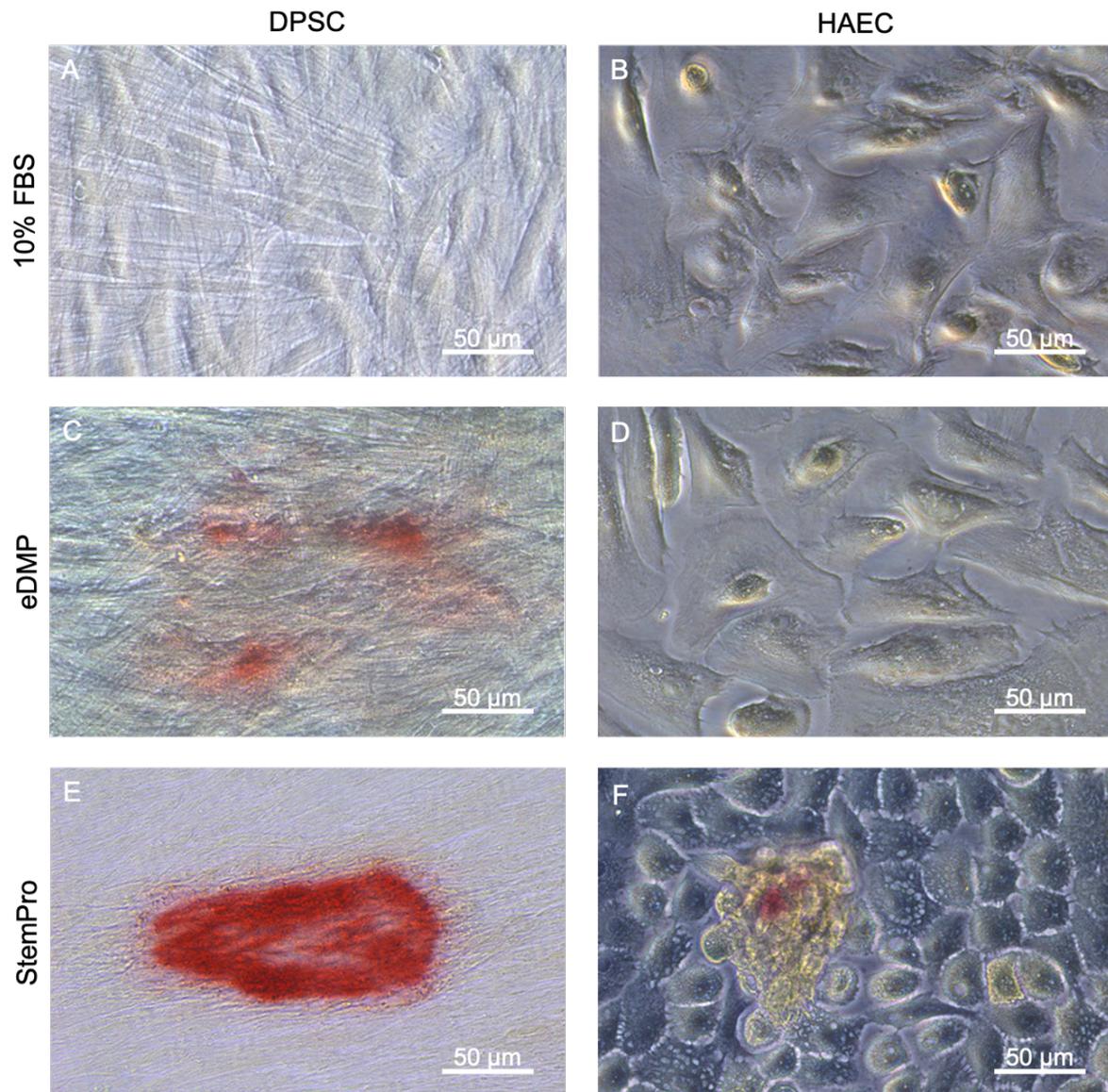


Abbildung 27: Alizarin gefärbte Zellen

Die in der Mineralisationsphase der Dentinogenese und Osteogenese gebildeten Kristallisationskeime bestehen aus Hydroxylapatit (HAP). Die Summenformel des HAP lautet $\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3$ (Bowes und Murray, 1936). Durch die Färbung des im HAP enthaltenen Kalziums durch Alizarin kann die Fähigkeit der differenzierten Zellen, Hartgewebe zu bilden, nachgewiesen werden. Der Farbstoff Alizarin bildet mit Kalzium schwer lösliche Salze und so werden durch die Alizarinfärbung Kalziumablagerungen rot dargestellt. Hier sind für beide Zelltypen und alle Medien repräsentative Aufnahmen dargestellt.

Wieder ist die unterschiedliche Morphologie der Zellen zu beobachten.

Im Standardmedium 10% FBS sind weder bei den Pulpastamm- noch den Amnionepithelzellen Kalziumablagerungen zu erkennen.

Die DPSC zeigen jedoch nach 21 Tagen Kultur mit eDMP deutliche, sporadisch angeordnete Mineralisationsknoten und in der StemPro-Kultur sogar großflächig rot gefärbte Bereiche.

Bei den HAEC in eDMP dahingegen, lässt sich keine Verfärbung erkennen. Nur im StemPro äußert sich die Mineralisation in Gestalt kleiner Knötchen innerhalb der Zellen.

6 Diskussion

Ansätze der regenerativen Medizin werden vermehrt auch in der Zahnheilkunde etabliert. Verfahren wie die Revitalisierung, können im klinischen Alltag mit guten Ergebnissen überzeugen. Jedoch wird dabei nur eine Reparatur durch ektopisches Gewebe erzielt, nicht die Regeneration der Pulpa (L. Li et al., 2017; Saoud et al., 2014; Schmalz et al., 2020). Deshalb wird auch weiter der Ansatz der Stammzelltransplantation verfolgt, der bereits in einigen klinischen Studien umgesetzt worden ist und eine erfolgreiche Alternative zur konventionellen Wurzelkanalfüllung zu sein scheint (Widbiller et al., 2022). Zum Einsatz kommen dabei häufig autologe, dentale Stammzellen, die aus extrahierten (Milch-)Zähnen gewonnen werden (Nakashima et al., 2017; Xuan et al., 2018) und somit nur begrenzt verfügbar sind (Galler et al., 2014). Dies stellt einen limitierenden Faktor des Ansatzes dar. Eine alternative Stammzellquelle für die Regenerative Endodontie nutzen zu können, würde den Weg zur Pulparegeneration vereinfachen.

Zu Beginn der Dissertation bestand die Annahme, dass humane Amnionepithelzellen sich für diesen Zweck eignen, da sie auf Grund ihrer Pluripotenz ein breites Differenzierungspotential aufweisen (De Coppi und Atala, 2019; Miki und Strom, 2006). *In vitro* sind sie bereits in viele verschiedene Zelltypen differenziert worden, beispielsweise in Hepatozyten (Marongiu et al., 2011), Osteoblasten (Jiawen et al., 2014) und Kardiomyozyten (Iop et al., 2008). Sie können verwendet werden, um Haut *in vitro* zu generieren oder *in vivo* die Wundheilung zu beschleunigen (Yu et al., 2015; Zhao et al., 2017). Auch werden ihnen immunmodulatorische Eigenschaften zugesprochen. Sie sind in großer Menge verfügbar und erlauben allogene Transplantationen (Akle et al., 1981; H. Li et al., 2005).

In dieser Studie wurde der Versuch unternommen, Amnionepithelzellen odontogen zu differenzieren. Dafür wurden sie mit Dentinmatrixproteinen kultiviert. Vergleichend wurden DPSC auf dieselbe Art behandelt.

6.1 Morphologie und Mineralisation

Mit der funktionellen Veränderung einer Zelle gehen auch reproduzierbare Änderungen ihrer Morphologie einher (Prasad und Alizadeh, 2019). Es gibt regulatorische Zusammenhänge zwischen der Form einer Zelle und der Transkription ihrer Gene (Bellas und Chen, 2014). Durch künstliche Intelligenz und maschinelles Lernen sind Verfahren

entwickelt worden, die durch die Analyse der morphologischen Änderung einer Zelle den osteogenen Differenzierungsgrad, später durch Kalziumfärbung verifiziert, bestimmen konnten (Matsuoka et al., 2013). Eine auf diese Weise getätigte Vorhersage der Mineralisation von MSC war von höherer Genauigkeit als die Analyse der Expression Alkaliner Phosphatase (Marklein et al., 2016). Die Morphologie einer Zelle zu betrachten, ist also ein sinnvolles Unterfangen wenn es darum geht, ihre Differenzierung zu beurteilen.

Die in diesem Versuch verwendeten DPSC sind, wie andere MSC, in ihrem undifferenzierten Zustand spindelförmige, adhärent wachsende Zellen und ähneln Fibroblasten (Kolf et al., 2007). Selten sind sie polarisiert (Gallorini et al., 2021). Amnionepithelzellen sind anatomisch und histologisch als spezialisierte Epithelzellen einzuordnen und stellen sich so auch morphologisch dar; als flache, kubische Zellen mit viel Zytoplasma (Miki et al., 2005; Tabatabaei et al., 2014).

Odontoblasten sind *in vivo* elongierte, adhärent wachsende Zellen mit einem langen Zellfortsatz. Die Zellkörper weisen eine Größe von bis zu 40 µm auf (Linde und Goldberg, 1993). Präodontoblasten nach der Mitose sind uniforme, runde oder ovale Zellen, die bereits Zell-Zell-Kontakte miteinander ausbilden und einen apikalen Fortsatz aufweisen. Sie enthalten einen großen Zellkern, wenig Zytoplasma und wenige Lysosomen (Linde und Goldberg, 1993). Die Polarität der Odontoblasten ist eine Voraussetzung für die Bildung von tubulärem Dentin (Chang et al., 2019). Die Form der Zelle wird durch kontraktile Aktin-Fasern, verbunden mit einem Gerüst aus Mikrotubuli, erzeugt (Prasad und Alizadeh, 2019).

In vitro, dahingegen, bilden differenzierende DPSC oft clusterähnliche Strukturen aus und beginnen zu mineralisieren. Die Entstehung eines polaren Odontoblasten ist nicht zu erwarten. Adhärenz Zellen passen ihre Morphologie der extrazellulären Matrix an und für die Entstehung eines odontoblastenähnlichen Phänotyps sind Dentinkanälchen von Bedeutung (Bellas und Chen, 2014; Lv et al., 2017). Diese gab es in diesem Versuch nicht.

Die Ausgangsmorphologie der DPSC verändert sich im Verlauf den lichtmikroskopischen Bildern nach nicht beobachtbar (Abbildung 21A, C und E). Bei der Alizarinfärbung lassen sich jedoch sowohl in der eDMP- als auch in der StemPro-Kultur mineralisierte Bereiche nachweisen (Abbildung 27C und E). Dass DPSC in der Lage sind, durch eDMP und auch durch osteogenes Differenzierungsmedium, zu einem

mineralisierenden Phänotyp zu differenzieren, ist bekannt (Gronthos et al., 2000; Widbiller, Eidt, Lindner, et al., 2018) und wird durch unsere Versuche erneut bestätigt.

Die Morphologie der HAEC ändert sich in den lichtmikroskopischen Untersuchungen ebenfalls nicht. Die Alizarinfärbung zeigt jedoch in StemPro die Entstehung von Mineralisationsclustern. Dies steht im Einklang mit vorherigen Studien (Miki et al., 2005; Miki und Strom, 2006; Parolini et al., 2008). Die Mineralisationsknötchen waren jedoch im Vergleich zu den DPSC klein und spärlich verteilt. Ilancheran et al. beschreiben, wie sich die HAEC bei Kultivierung in osteogenem Differenzierungsmedium initial zwei- bis dreifach vergrößerten und teilweise zwei Zellkerne aufwiesen (Ilancheran et al., 2007). Auch dies konnte hier nicht beobachtet werden.

Im odontogenen Differenzierungsmedium ist keine Mineralisation zu beobachten (Abbildung 27D). In den hier verwendeten Mengen scheint eDMP also keine differenzierende Wirkung, die mit Mineralisation einher geht, auf die HAEC zu haben.

6.2 Genexpression

6.2.1 Wahl des Haushaltgens, RPS18

Die RT-qPCR ist ein sensibles Verfahren zur Quantifizierung von Veränderungen der Genexpression von Zellen. Die fehlende Standardisierung ist jedoch ein Problem. Die Qualität der RNA-Extraktion, die Enzymaktivität und die Transkriptionseffizienz sind Faktoren, die einer starken Variabilität unterliegen. Die Normalisierung der Werte gegen ein Referenzgen, auch interne Kontrolle oder Haushaltgen genannt, gehört deshalb zur guten wissenschaftlichen Praxis. Als Haushaltgen eignen sich Gene, die unabhängig der Rahmenbedingungen des Experiments, des Zelltyps oder des Spenders gleichbleibend exprimiert werden. Häufig verwendet werden beispielsweise Beta Actin, TATA oder GAPDH (Rienzo et al., 2013).

In diesem Versuch wurde das Ribosomal Protein S18 auf Grund guter Erfahrungen in vorhergehenden Experimenten gewählt. RPS18 programmiert ein Protein, das Teil der 40S Untereinheit des menschlichen Ribosomen ist. Die Genexpression durch die Zelle liegt also auf einem stabilen Niveau. So auch in diesem Versuch, die Standardabweichung der Ct-Werte des RPS18 beträgt nur 0,79.

6.2.2 Odontogene Differenzierung der HAEC

Odontogene und osteogene Differenzierung ähneln sich in vielen Punkten. Sowohl in der Dentinogenese als auch der Osteogenese wird zuerst durch Odontoblasten/ Osteoblasten ein Netzwerk, hauptsächlich bestehend aus Kollagen Typ 1 Alpha 1, sezerniert, welches Prädentin oder Osteoid genannt wird. In der Mineralisationsphase geben die Osteoblasten dann, ähnlich den Odontoblasten, Matrixvesikel ab, die Kalziumphosphatkristalle enthalten. Diese werden freigesetzt und lagern sich als Kristallisationskeime an das Kollagenetzwerk an. Die Keime vergrößern sich und werden zu Hydroxylapatitkristallen (Ulfig, 2011). Mit der Einlagerung von HAP entsteht reifes Dentin und mineralisierter Knochen (Linde und Goldberg, 1993).

So ähnelt sich auch die Genexpression der beiden Prozesse. COL1A1-RNA gilt als Marker für junge Odontoblasten, es ist aber auch eine kontinuierliche Expression in älteren Odontoblasten nachgewiesen worden (Braut et al., 2003; Dacic et al., 2001; W. Huang et al., 2007). Auch von Osteoblasten wird es exprimiert (Kaneto et al., 2016). Das Integrin Binding Sialoprotein (IBSP, in der Literatur auch oft BSP genannt) ist an der Kristallisation beteiligt (Smith et al., 2012) und kommt ebenfalls in beiden Zelltypen vor (Simon et al., 2009). So wird es in einigen wissenschaftlichen Artikeln als Marker des mittelzeitigen Mineralisationsprozesses bezeichnet (Dacic et al., 2001). Das Bone Gamma-Carboxyglutamate Protein (BGLAP) ist auch unter dem Namen Osteocalcin (OCN) bekannt. Es findet sich ebenfalls in Knochen und Dentin und kann aktiv Kalzium binden. So ist es zum Beispiel für die Schmelzmaturation zuständig und gilt als Marker der späten odontogenen und osteogenen Differenzierung (Dacic et al., 2001; W. Huang et al., 2007; Simon et al., 2009; Widbiller, Eidt, Lindner, et al., 2018). Desweiteren beeinflusst BGLAP die für die Dentinogenese so wichtige Expression von DSPP in menschlichen Zähnen (Bleicher et al., 1999; Papagerakis et al., 2002). Das Zytokin „Bone Morphogenic Protein 4“ wurde durch seine Eigenschaft, die Knochenbildung anzustoßen, entdeckt (Kishigami und Mishina, 2005). Es ein Mitglied der TGF β Familie (W. Huang et al., 2007). *In Vitro* wurde beschrieben, dass BMP4 die Expression von COL1A1 und Alkaliner Phosphatase, einem Protein wichtig für die beginnende Osteoblastendifferenzierung, stimuliert und so ebenfalls eine wichtige regulatorische Rolle einnimmt (Nakashima et al., 1994).

Betrachtet man spezifisch die odontogene Differenzierung, so ist Nestin von Interesse. Das Nestin-Gen codiert für ein Intermediärfilament und wird von Zellen der Neuralleiste

exprimiert (Zhang et al., 2020). So gilt es als spezifischer Marker für primäre, aktive Odontoblasten, die dem Ektomesenchym entstammen (Quispe-Salcedo et al., 2012). Bei der osteogenen Differenzierung von MSC dahingegen, wird keine Veränderung der NES-Expression festgestellt (Wong et al., 2014). Auch der Transforming Growth Factor beta 1 wird als zahnspezifischer Marker in der Literatur erwähnt, obwohl er als multifunktionales Protein auch in Regulation und Wachstum vieler verschiedener Zelltypen involviert ist (Bruce et al., 2012). Er fungiert als Schlüsselregulator der terminalen Odontoblastendifferenzierung durch Aktivierung des SMAD-Pathways (Smith et al., 2012).

Die odontogene Differenzierbarkeit von DPSC ist bereits nachgewiesen worden (G. T.-J. Huang et al., 2006; G. Liu et al., 2016) und wurde in diesem Versuch durch die Hochregulation typischer Marker der Mineralisation und odontogener Differenzierung, wie COL1A1, IBSP, BGLAP, BMP4, NES und TGFB1 bestätigt. Da den HAEC eine breite Differenzierbarkeit zugeschrieben wird, vermuteten wir ähnliche Ergebnisse für die HAEC in eDMP.

Hier konnte jedoch keine signifikante Hochregulation von odontogenen Markern durch die HAEC festgestellt werden. Auch die Mineralisationsmarker waren nicht verändert exprimiert. Dies steht im Konflikt mit der in 6.1 beschriebenen Kalziumapposition der HAEC im StemPro-Medium. Hier kann der zeitliche Verlauf Einfluss gehabt haben; die qPCR fand am Tag 14 statt, die Mineralisierung wurde am Tag 21 untersucht. Doch auch in der Literatur wird von einer Hochregulation von Mineralisationsmarkern durch die Kultivierung von HAEC mit Differenzierungsmedium, ähnlich StemPro, nach 14 Tagen berichtet (Jiawen et al., 2014; Mattioli et al., 2012). In beiden Quellen wurde jedoch die weniger spezifische SYBR Green qPCR verwendet. Auch wurden teilweise andere Marker, die eher der Osteogenese zugeordnet werden, wie beispielsweise Alkaliner Phosphatase oder Osterix (Jiawen et al., 2014), untersucht. Unser Augenmerk lag jedoch auf der odontogenen Differenzierung.

Schlussfolgernd lässt sich also sagen, dass die DPSC mit eDMP in odontogene Zellen differenzierten, dies wurde durch ihre Genexpression und ihre Mineralisationsfähigkeit nachgewiesen. Die HAEC mineralisierten zwar im StemPro, dem osteogenen Differenzierungsmedium, eine odontogene Differenzierung konnte jedoch durch die qPCR nicht bestätigt werden. Folglich konnte unsere Hypothese, dass sich HAEC in Kontakt mit eDMP in odontoblastenähnliche Zellen differenzieren, weder durch die

Betrachtung der Morphologie, der Genexpression, noch durch die Alizarinfärbung nachgewiesen werden.

6.3 Einfluss der Kulturbedingungen

HAEC werden in der Literatur als ein hochsensibler Zelltyp beschrieben und die Kultivierung unter Beibehaltung ihrer pluripotenten Eigenschaften ist herausfordernd (Stadler et al., 2008). Dokumentiert ist, dass nach 2-6 Passagen die Proliferation dieser Zellen *in vitro* eingestellt wird (Parolini et al., 2008). Für diese Versuchsreihe wurden Zellen der Passage 2 verwendet. Auch wird die Expression von Stammzellmarkern, wie Oct-4, Sox-2 und Nanog, durch die Zellen *in vitro* herunterreguliert (Simat et al., 2008). Es lässt sich also spekulieren, dass die reduzierte Differenzierbarkeit der HAEC durch die *in vitro* Kultur bedingt war. Dafür gibt es mehrere Indizien.

Der MTT-Test zeigt für die HAEC in eDMP eine geringe metabolische Aktivität (Abbildung 20). Dies kann auf eine verringerte Proliferation schließen lassen.

Glutathione Peroxidase 3 wirkt bei der Reduktion und Entgiftung von Wasserstoffperoxid mit. Die Expression von GPX3 ist Bestandteil der zellulären Abwehr gegen oxidativen Stress, wie er durch den Zellmetabolismus entsteht. *In vitro* kann der so genannte "Kulturschock" beobachtet werden, der sich unter anderen durch die ungewohnten Kulturbedingungen ergibt und mit erhöhten GPX3-Werten einher geht (Halliwell, 2003; Stolzing et al., 2006). Die HAEC zeigen in jedem Medium hohe GPX3-Werte, die im zeitlichen Verlauf der Kultivierung ansteigen (Abbildung 26). Auch dies kann als Zeichen gedeutet werden, dass HAEC außerhalb ihrer Stammzellnische nicht prosperieren und kann einen möglichen Grund der reduzierten Differenzierbarkeit der HAEC darstellen.

Ein weiterer Erklärungsansatz ist, dass die HAEC eine Epithelial-Mesenchymale Transition (EMT) durchlaufen haben können, die ebenfalls mit einer verminderten Differenzierbarkeit assoziiert wird. Im Laufe dieses Übergangs verlieren Epithelzellen Charakteristika wie Polarisation oder Zell-Zell-Verbindungen und ändern ihren Phänotypen zu dem mesenchymaler Zellen (Alcaraz et al., 2013; Ambartsumian et al., 2019). Dieser Prozess läuft physiologisch bei embryonaler Entwicklung, Entzündungsvorgängen, Wundheilung und Fibrose ab, aber auch pathologisch in der Tumorgenese (Cargnoni et al., 2018; Okada et al., 1997). Auch in kultivierten Zellen wird dieser Übergang beobachtet (Hay, 1995; Okada et al., 1997). Dies ist auf unsere Zellen übertragbar. Frisch

isolierte HAEC weisen keine mesenchymalen Oberflächenmarker, so wie CD105 oder CD44 auf, sondern hauptsächlich epitheliale, beispielsweise CD49f und CD326 (Gramignoli et al., 2016; Murphy et al., 2014; Pratama et al., 2011; Tabatabaei et al., 2014). In Übereinstimmung mit länger kultivierten Zellen, exprimierten die HAEC in diesem Versuch jedoch sowohl epitheliale als auch mesenchymale Marker (Abbildung 19). Dies kann durch eine dem Kulturprotokoll geschuldete Selektion weg vom epithelialen und hin zum mesenchymalen Phänotyp verursacht worden sein. Zellen, die kein CD44 exprimieren haften schlechter auf der Oberfläche der Zellkulturflasche und werden so beim Medienwechsel verworfen (Stadler et al., 2008).

Des Weiteren ist S100A4, ein Kalzium bindendes Protein, welches von den HAEC vermehrt exprimiert wird, als Marker für die EMT beschrieben worden (Abbildung 25) (Ambartsumian et al., 2019). Auch IGFBP2, von den HAEC in StemPro um das 4000-fache hochreguliert, wurde als EMT-Marker klassifiziert und weist auf eine Transition hin (T. Li et al., 2020).

Laut einer Studie ist die autokrine Sekretion von TGF- β am Übergang der HAEC von einem epithelialen zu einem mesenchymalen Phänotyp beteiligt. Die Zellen sprechen auch auf rekombinantes EGF und TGF- β an und synergetisch soll der EMT-Prozess angestoßen werden (Alcaraz et al., 2013; Zavadil & Böttinger, 2005). Das in eDMP enthaltene TGF- β , kombiniert mit dem EGF des Mediums, könnte bei uns ähnliche Vorgänge ausgelöst haben.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass HAEC eine verminderte Differenzierbarkeit aufweisen und weitere Untersuchungen nötig sind, um die Gründe hierfür vollends zu verstehen.

6.4 Ausblick

DPSC eignen sich im Vergleich zu anderen Stammzellen, beispielsweise BMSC, durch ihre erhöhte Produktion von dentinspezifischen Proteinen, derzeit am besten zur Regeneration dentaler Strukturen (Sloan und Waddington, 2009). Doch das Problem der erschwerten Beschaffung von dentalen Stammzellen besteht. HAEC sind jedoch keine mögliche Stammzellquelle für die Regenerative Endodontie.

Soll die Suche nach alternativen Stammzellquellen fortgesetzt werden, könnten andere Stammzellen für diese Zwecke erforscht werden. Es wird beispielsweise der Einsatz mesenchymaler Nabelschnurstammzellen untersucht (S. Zhang et al., 2020).

Auch die Lagerung autologer, dentaler Stammzellen aus Milchzähnen in Zellbanken ist ein Ansatz, der in Japan und Indien bereits verfolgt wird. Allerdings gilt es hier weitere Hürden, wie technische Aspekte, hohe Kosten, ethische Bedenken und adäquate Lagerung zu überwinden (Ohkoshi et al., 2018; Zeitlin, 2020).

Desweiteren könnte die Verwendung von iPSC, dessen Potential noch nicht vollends erforscht ist, in Betracht gezogen werden (Mitalipov und Wolf, 2009; Takahashi und Yamanaka, 2006).

7 Zusammenfassung

Die zentrale Frage dieser Arbeit ist, ob das Amnionepithel eine alternative Stammzellquelle für die Regenerative Endodontie darstellen kann.

Im Gegensatz zur klassischen Wurzelkanalbehandlung hat die regenerative Endodontie zum Ziel, irreversibel geschädigtes Pulpagewebe biologisch zu ersetzen.

Dabei bietet das Tissue Engineering vielversprechende Möglichkeiten, durch die Transplantation von Zellen in einem Trägermaterial, eine Neubildung der Pulpa zu erreichen. Einen wichtigen Baustein stellen dabei biologische Signalmoleküle dar, die das Verhalten der Zellen determinieren. Neben rekombinanten Wachstumsfaktoren können hierbei auch endogene, bioaktive Proteine der Dentinmatrix (eDMP) verwendet werden.

Erste klinische Studien zeigen, dass eine Regeneration der Zahnpulpa durch Transplantation multipotenter Pulpastammzellen (DPSC) möglich ist. Sie werden aus extrahierten gesunden Zähnen gewonnen und ihre Verfügbarkeit und Menge ist somit stark begrenzt. Eine Alternative stellen dahingegen pluripotente Amnionepithelzellen (HAEC) dar, die in großer Zahl aus der menschlichen Plazenta gewonnen werden können und bereits Erfolge beim Einsatz in der Regeneration anderer Gewebe und Organe zeigen.

Um diese Möglichkeit zu überprüfen, kultivierten wir sowohl DPSC als auch HAEC mit eDMP um eine odontogene Differenzierung zu erreichen. Die Kultur mit StemPro, rekombinanten Wachstumsfaktoren, sollte vergleichend eine osteogene Differenzierung anstoßen.

Ziel war es folgende Aspekte zu untersuchen:

1. Die Änderung der Morphologie der Zellen nach der Differenzierung. Dafür führten wir Fluoreszenzfärbungen der kultivierten Zellen durch.
2. Die Genexpression während des Differenzierungsprozesses. Hier untersuchten wir mit Hilfe einer RT-qPCR die Regulation verschiedener mit osteogener und odontogener Differenzierung assoziierter Marker an drei Zeitpunkten.
3. Die Fähigkeit der Zellen zur Mineralisation. Um diese aufzuzeigen, färbten wir sie mit Alizarin, um eine mögliche Kalziumablagerung darstellen zu können.

Wir konnten feststellen, dass keine morphologische Veränderung der HAEC erfolgte, dass Gene typischer Signalmoleküle der Dentinogenese hauptsächlich von DPSC

exprimiert wurden, während die pluripotenten HAEC eine vermehrte Expression von Genen, assoziiert mit einer EMT, aufwiesen und dass die Mineralisation bei den Amnionzellen lediglich nach osteogener Differenzierung erfolgte.

Während DPSC also unter odontogenen und osteogenen Kulturbedingungen differenzierten und mineralisierten, differenzierten HAEC lediglich osteogen.

Somit lässt sich schlussfolgern, dass obwohl sie regelmäßige Verwendung in vielen medizinischen Therapiebereichen finden und viele Vorteile mit sich bringen, die HAEC in der verwendeten Form keine realisierbare Alternative als Stammzellquelle für die regenerative Endodontie darstellen.

Literaturverzeichnis

- Abbaspanah, B., Momeni, M., Ebrahimi, M., & Mousavi, S. H. (2018). Advances In Perinatal Stem Cells Research: A Precious Cell Source For Clinical Applications. *Regenerative Medicine*, 13(5), 595–610. <https://doi.org/10/gjh4sz>
- Abd-Elmeguid, A., Yu, D. C., Kline, L. W., Moqbel, R., & Vliagoftis, H. (2012). Dentin Matrix Protein-1 Activates Dental Pulp Fibroblasts. *Journal of Endodontics*, 38(1), 75–80. <https://doi.org/10/cc7zr9>
- About, I., Bottero, M.-J., de Denato, P., Camps, J., Franquin, J.-C., & Mitsiadis, T. A. (2000). Human Dentin Production in Vitro. *Experimental Cell Research*, 258(1), 33–41. <https://doi.org/10/dk5sxc>
- Akle, C. A., Welsh, K. I., Adinolfi, M., Leibowitz, S., & Mccoll, I. (1981). Immunogenicity of Human Amniotic Epithelial Cells After Transplantation into Volunteers. *The Lancet*, 318(8254), 1003–1005. <https://doi.org/10/ft9jvg>
- Alcaraz, A., Mrowiec, A., Insausti, C. L., García-Vizcaíno, E. M., Ruiz-Canada, C., López-Martínez, M. C., Moraleda, J. M., & Nicolás, F. J. (2013). Autocrine TGF- β Induces Epithelial to Mesenchymal Transition in Human Amniotic Epithelial Cells. *Cell Transplantation*, 22(8), 1351–1367. <https://doi.org/10/f46sqj>
- Ambartsumian, N., Klingelhöfer, J., & Grigorian, M. (2019). The Multifaceted S100A4 Protein in Cancer and Inflammation. In C. W. Heizmann (Hrsg.), *Calcium-Binding Proteins of the EF-Hand Superfamily* (Bd. 1929, S. 339–365). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9030-6_22
- Baldión, P. A., Velandia-Romero, M. L., & Castellanos, J. E. (2018). Odontoblast-Like Cells Differentiated from Dental Pulp Stem Cells Retain Their Phenotype after Subcultivation. *International Journal of Cell Biology*, 2018, 1–12. <https://doi.org/10/gdcspj>
- Batouli, S., Miura, M., Brahim, J., Tsutsui, T. W., Fisher, L. W., Gronthos, S., Robey, P. G., & Shi, S. (2003). Comparison of Stem-cell-mediated Osteogenesis and Dentinogenesis. *Journal of Dental Research*, 82(12), 976–981. <https://doi.org/10/b8vxsr>
- Baumann, M. A., Beer, R., Arnold, M., & Wolf, H. F. (Hrsg.). (2008). *Farbatlantzen der Zahnmedizin: Endodontologie* (2.). Thieme.
- Bellas, E., & Chen, C. S. (2014). Forms, forces, and stem cell fate. *Current Opinion in Cell Biology*, 31, 92–97. <https://doi.org/10/gjj296>
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Gatto, G. J., & Stryer, L. (2018). *Stryer Biochemie*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-54620-8>
- Berridge, M. V., & Tan, A. S. (1993). Characterization of The Cellular Reduction of 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 303(2), 474–482. <https://doi.org/10.1006/abbi.1993.1311>
- Bleicher, F. (2014). Odontoblast Physiology. *Experimental Cell Research*, 325(2), 65–71. <https://doi.org/10/f58kgq>
- Bleicher, F., Couble, M. L., Farges, J. C., Couble, P., & Magloire, H. (1999). Sequential Expression of Matrix Protein Genes in Developing Rat Teeth. *Matrix Biology*, 18(2), 133–143. <https://doi.org/10/df63pk>

- Boskey, A. L., Maresca, M., Ullrich, W., Doty, S. B., Butler, W. T., & Prince, C. W. (1993). Osteopontin-Hydroxyapatite Interactions in Vitro: Inhibition of Hydroxyapatite Formation and Growth In A Gelatin-Gel. *Bone and Mineral*, 22(2), 147–159. <https://doi.org/10/fqm3x7>
- Bowes, J. H., & Murray, M. M. (1936). The Chemical Composition of Teeth. *Biochemical Journal*, 30(6), 977–984. <https://doi.org/10.1042/bj0300977>
- Braut, A., Kollar, E. J., & Mina, M. (2003). Analysis of The Odontogenic and Osteogenic Potentials of Dental Pulp in Vivo Using A Col1a1-2.3-GFP Transgene. *The International Journal of Developmental Biology*, 47(4), 281–292.
- Brewe, M. (2006). *Embryonenschutz und Stammzellgesetz: Rechtliche Aspekte der Forschung mit embryonalen Stammzellen*. Springer.
- Brizuela, C., Meza, G., Urrejola, D., Quezada, M. A., Concha, G., Ramírez, V., Angelopoulos, I., Cadiz, M. I., Tapia-Limonchi, R., & Khoury, M. (2020). Cell-Based Regenerative Endodontics for Treatment of Periapical Lesions: A Randomized, Controlled Phase I/II Clinical Trial. *Journal of Dental Research*, 99(5), 523–529. <https://doi.org/10.1177/0022034520913242>
- Bruce, D. L., Macartney, T., Yong, W., Shou, W., & Sapkota, G. P. (2012). Protein Phosphatase 5 Modulates SMAD3 Function In The Transforming Growth Factor-B Pathway. *Cellular Signalling*, 24(11), 1999–2006. <https://doi.org/10/f39csd>
- Butler, W. T. (1998). Dentin Matrix Proteins. *European Journal of Oral Sciences*, 106(S1), 204–210. <https://doi.org/10/gjffzm>
- Butler, W. T., Brunn, J. C., Qin, C., & McKee, M. D. (2002). Extracellular Matrix Proteins and the Dynamics of Dentin Formation. *Connective Tissue Research*, 43(2–3), 301–307. <https://doi.org/10/bb2dnm>
- Butler, W. T., & Ritchie, H. (1995). The Nature and Functional Significance of Dentin Extracellular Matrix Proteins. *The International Journal of Developmental Biology*, 39(1), 169–179.
- Caplan, D. J., Cai, J., Yin, G., & White, B. A. (2005). Root Canal Filled Versus Non-Root Canal Filled Teeth: A Retrospective Comparison of Survival Times. *Journal of Public Health Dentistry*, 65(2), 90–96. <https://doi.org/10/bcf82h>
- Carda, C., & Peydró, A. (2006). Ultrastructural Patterns of Human Dentinal Tubules, Odontoblasts Processes and Nerve Fibres. *Tissue and Cell*, 38(2), 141–150. <https://doi.org/10/ddrjqb>
- Cargnoni, A., Farigu, S., Cotti Piccinelli, E., Bonassi Signoroni, P., Romele, P., Vanosi, G., Toschi, I., Cesari, V., Barros Sant'Anna, L., Magatti, M., Silini, A. R., & Parolini, O. (2018). Effect of Human Amniotic Epithelial Cells on Pro-Fibrogenic Resident Hepatic Cells In A Rat Model of Liver Fibrosis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 22(2), 1202–1213. <https://doi.org/10/gcvvmp>
- Casagrande, L., Cordeiro, M. M., Nör, S. A., & Nör, J. E. (2011). Dental Pulp Stem Cells in Regenerative Dentistry. *Odontology*, 99(1), 1–7. <https://doi.org/10/bcf5fg>
- Casagrande, L., Demarco, F. F., Zhang, Z., Araujo, F. B., Shi, S., & Nör, J. E. (2010). Dentin-Derived BMP-2 and Odontoblast Differentiation. *Journal of Dental Research*, 89(6), 603–608. <https://doi.org/10/cfqthc>

- Chan, E. K. M., Desmeules, M., Cielecki, M., Dabbagh, B., & Ferraz dos Santos, B. (2017). Longitudinal Cohort Study of Regenerative Endodontic Treatment for Immature Necrotic Permanent Teeth. *Journal of Endodontics*, 43(3), 395–400. <https://doi.org/10/f9znps>
- Chang, B., Svoboda, K. K. H., & Liu, X. (2019). Cell polarization: From Epithelial Cells To Odontoblasts. *European Journal of Cell Biology*, 98(1), 1–11. <https://doi.org/10/gjj3bc>
- Chrepa, V., Henry, M. A., Daniel, B. J., & Diogenes, A. (2015). Delivery of Apical Mesenchymal Stem Cells into Root Canals of Mature Teeth. *Journal of Dental Research*, 94(12), 1653–1659. <https://doi.org/10/f7zqts>
- Couble, M.-L., Farges, J.-C., Bleicher, F., Perrat-Mabillon, B., Boudeulle, M., & Magloire, H. (2000). Odontoblast Differentiation of Human Dental Pulp Cells in Explant Cultures. *Calcified Tissue International*, 66(2), 129–138. <https://doi.org/10/fd5txs>
- Couve, E., Osorio, R., & Schmachtenberg, O. (2013). The Amazing Odontoblast: Activity, Autophagy, and Aging. *Journal of Dental Research*, 92(9), 765–772. <https://doi.org/10/f46s76>
- da Rosa, W. L. O., Piva, E., & da Silva, A. F. (2018). Disclosing The Physiology of Pulp Tissue For Vital Pulp Therapy. *International Endodontic Journal*, 51(8), 829–846. <https://doi.org/10/gc54w8>
- Dacic, S., Kalajzic, I., Visnjic, D., Lichtler, A. C., & Rowe, D. W. (2001). Col1a1-Driven Transgenic Markers of Osteoblast Lineage Progression. *Journal of Bone and Mineral Research*, 16(7), 1228–1236. <https://doi.org/10/fbrx4x>
- De Coppi, P., & Atala, A. (2019). Stem Cells From the Amnion. In *Principles of Regenerative Medicine* (S. 133–148). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809880-6.00009-6>
- Demarco, F. F., Conde, M. C. M., Cavalcanti, B. N., Casagrande, L., Sakai, V. T., & Nör, J. E. (2011). Dental Pulp Tissue Engineering. *Brazilian Dental Journal*, 22(1), 3–13. <https://doi.org/10/gg3wsr>
- Diogenes, A., Ruparel, N. B., Shiloah, Y., & Hargreaves, K. M. (2016). Regenerative Endodontics: A Way Forward. *The Journal of the American Dental Association*, 147(5), 372–380. <https://doi.org/10/f8k2kv>
- Domingues, L. (Hrsg.). (2017). *PCR: Methods and Protocols* (Bd. 1620). Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7060-5>
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., & Keating, D. J. (2006). *Minimal Criteria For Defining Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. The International Society For Cellular Therapy Position Statement.* <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Fleming, C. H., Litaker, M. S., Alley, L. W., & Eleazer, P. D. (2010). Comparison Of Classic Endodontic Techniques Versus Contemporary Techniques On Endodontic Treatment Success. *Journal of Endodontics*, 36(3), 414–418. <https://doi.org/10/crpbpk>
- Fortier, L. A. (2005). Stem Cells: Classifications, Controversies, and Clinical Applications. *Veterinary Surgery*, 34(5), 415–423. <https://doi.org/10/d4rqnh>

- Galler, K. M. (2019). Biological Basis for Endodontic Repair and Regeneration. In D. Ørstavik (Hrsg.), *Essential Endodontology* (1. Aufl., S. 237–251). Wiley.
- Galler, K. M., Brandl, F. P., Kirchhof, S., Widbiller, M., Eidt, A., Buchalla, W., Göpferrich, A., & Schmalz, G. (2018). Suitability of Different Natural and Synthetic Biomaterials for Dental Pulp Tissue Engineering. *Tissue Engineering Part A*, 24(3–4), 234–244. <https://doi.org/10/gbn8bx>
- Galler, K. M., D'Souza, R. N., Federlin, M., Cavender, A. C., Hartgerink, J. D., Hecker, S., & Schmalz, G. (2011). Dentin Conditioning Codetermines Cell Fate in Regenerative Endodontics. *Journal of Endodontics*, 37(11), 1536–1541. <https://doi.org/10/cr4t6j>
- Galler, K. M., Eidt, A., & Schmalz, G. (2014). Cell-free Approaches for Dental Pulp Tissue Engineering. *Journal of Endodontics*, 40(4), S41–S45. <https://doi.org/10/gg2bn8>
- Galler, K. M., Hartgerink, J. D., Cavender, A. C., Schmalz, G., & D'Souza, R. N. (2012). A Customized Self-Assembling Peptide Hydrogel for Dental Pulp Tissue Engineering. *Tissue Engineering Part A*, 18(1–2), 176–184. <https://doi.org/10/cvnnpp>
- Galler, K. M., Krastl, G., Simon, S., Van Gorp, G., Meschi, N., Vahedi, B., & Lambrechts, P. (2016). European Society of Endodontology position statement: Revitalization procedures. *International Endodontic Journal*, 49(8), 717–723. <https://doi.org/10/gg3qh9>
- Galler, K. M., Weber, M., Korkmaz, Y., Widbiller, M., & Feuerer, M. (2021). Inflammatory Response Mechanisms of the Dentine–Pulp Complex and the Periapical Tissues. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 1480. <https://doi.org/10.3390/ijms22031480>
- Galler, K. M., & Widbiller, M. (2017). Perspectives for Cell-homing Approaches to Engineer Dental Pulp. *Journal of Endodontics*, 43(9), S40–S45. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2017.06.008>
- Galler, K. M., Widbiller, M., Buchalla, W., Eidt, A., Hiller, K.-A., Hoffer, P. C., & Schmalz, G. (2016). EDTA Conditioning of Dentine Promotes Adhesion, Migration and Differentiation of Dental Pulp Stem Cells. *International Endodontic Journal*, 49(6), 581–590. <https://doi.org/10/f8kw2m>
- Gallorini, M., Krifka, S., Widbiller, M., Schröder, A., Brochhausen, C., Cataldi, A., Hiller, K.-A., Buchalla, W., & Schweikl, H. (2021). Distinguished Properties of Cells Isolated From The Dentin-Pulp Interface. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*, 234, 151628. <https://doi.org/10/gjg5nd>
- Gay, I., Chen, S., & MacDougall, M. (2007). Isolation and Characterization of Multipotent Human Periodontal Ligament Stem Cells. *Orthodontics & Craniofacial Research*, 10(3), 149–160. <https://doi.org/10/d9z48c>
- Goldberg, M., Kulkarni, A. B., Young, M., & Boskey, A. (2011). Dentin: Structure, Composition and Mineralization. *Frontiers in Bioscience (Elite Edition)*, 3, 711–735. <https://doi.org/10/db5wfd>
- Goodis, H. E., Kinaia, B. M., Kinaia, A. M., & Chogle, S. M. A. (2012). Regenerative Endodontics and Tissue Engineering. *Dental Clinics of North America*, 56(3), 677–689. <https://doi.org/10/f376dk>

- Gowen, L. C., Petersen, D. N., Mansolf, A. L., Qi, H., Stock, J. L., Tkalcevic, G. T., Simmons, H. A., Crawford, D. T., Chidsey-Frink, K. L., Ke, H. Z., McNeish, J. D., & Brown, T. A. (2003). Targeted Disruption of the Osteoblast/Osteocyte Factor 45 Gene (OF45) Results in Increased Bone Formation and Bone Mass. *Journal of Biological Chemistry*, 278(3), 1998–2007. <https://doi.org/10/bcqhng>
- Gramignoli, R., Srinivasan, R. C., Kannisto, K., & Strom, S. C. (2016). Isolation of Human Amnion Epithelial Cells According to Current Good Manufacturing Procedures. *Current Protocols in Stem Cell Biology*, 37(1). <https://doi.org/10/f3t879>
- Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P. G., & Shi, S. (2000). Postnatal Human Dental Pulp Stem Cells (Dpscs) in Vitro and in Vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(25), 13625–13630. <https://doi.org/10/fkckd7>
- Hahn, C., & Liewehr, F. (2007). Relationships between Caries Bacteria, Host Responses, and Clinical Signs and Symptoms of Pulpitis. *Journal of Endodontics*, 33(3), 213–219. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2006.11.008>
- Halliwell, B. (2003). Oxidative Stress in Cell Culture: An Under-Appreciated Problem? *FEBS Letters*, 540(1–3), 3–6. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)00235-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)00235-7)
- Hanna, J., Cheng, A. W., Saha, K., Kim, J., Lengner, C. J., Soldner, F., Cassady, J. P., Muffat, J., Carey, B. W., & Jaenisch, R. (2010). Human Embryonic Stem Cells With Biological and Epigenetic Characteristics Similar To Those of Mouse Escs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(20), 9222–9227. <https://doi.org/10.1073/pnas.1004584107>
- Harrison, R. H., St-Pierre, J.-P., & Stevens, M. M. (2014). Tissue Engineering and Regenerative Medicine: A Year in Review. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 20(1), 1–16. <https://doi.org/10/f5w26s>
- Hay, E. D. (1995). An Overview of Epithelio-Mesenchymal Transformation. *Cells Tissues Organs*, 154(1), 8–20. <https://doi.org/10/d86464>
- He, G., Dahl, T., Veis, A., & George, A. (2003). Nucleation of Apatite Crystals In Vitro by Self-Assembled Dentin Matrix Protein 1. *Nature Materials*, 2(8), 552–558. <https://doi.org/10/bbnk8n>
- Hellwig, E., Schäfer, E., Klimek, J., & Attin, T. (2018). *Einführung in die Zahnerhaltung: Prüfungswissen Kariologie, Endodontologie und Parodontologie*. Deutscher Zahnärzte Verlag. <https://doi.org/10.47420/9783769136791>
- Hildebrand, C., Fried, K., Tuisku, F., & Johansson, C. S. (1995). Teeth and tooth Nerves. *Progress in Neurobiology*, 45(3), 165–222. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(94\)00045-J](https://doi.org/10.1016/0301-0082(94)00045-J)
- Huang, G. T.-J., Gronthos, S., & Shi, S. (2009). Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Tissues vs Those from Other Sources: Their Biology and Role in Regenerative Medicine. *Journal of Dental Research*, 88(9), 792–806. <https://doi.org/10/c85rmz>
- Huang, G. T.-J., Shagrananov, K., & Chan, S. W. (2006). Formation of Odontoblast-Like Cells from Cultured Human Dental Pulp Cells on Dentin in Vitro. *JOE*, 32(11), 2. <https://doi.org/10/cjpr8w>

- Huang, W., Yang, S., Shao, J., & Li, Y.-P. (2007). Signaling and Transcriptional Regulation in Osteoblast Commitment and Differentiation. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, 12, 3068–3092. <https://doi.org/10/fc8r4j>
- Hülsmann, M. (2008). *Endodontie*. Thieme.
- Hunter, G. K., & Goldberg, H. A. (1993). Nucleation of Hydroxyapatite by Bone Sialoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(18), 8562–8565. <https://doi.org/10/fgf3rx>
- Ilancheran, S., Michalska, A., Peh, G., Wallace, E. M., Pera, M., & Manuelpillai, U. (2007). Stem Cells Derived from Human Fetal Membranes Display Multilineage Differentiation Potential. *Biology of Reproduction*, 77(3), 577–588. <https://doi.org/10/fjj8vg>
- Inge, E., Talmi, Y. P., Sigler, L., Finkelstein, Y., & Zohar, Y. (1991). Antibacterial Properties of Human Amniotic Membranes. *Placenta*, 12(3), 285–288. <https://doi.org/10/cd2rbk>
- Iohara, K., Imabayashi, K., Ishizaka, R., Watanabe, A., Nabekura, J., Ito, M., Matsushita, K., Nakamura, H., & Nakashima, M. (2011). Complete Pulp Regeneration After Pulpectomy by Transplantation of CD105+ Stem Cells with Stromal Cell-Derived Factor-1. *Tissue Engineering Part A*, 17(15–16), 1911–1920. <https://doi.org/10/dfd9qg>
- Iohara, K., Murakami, M., Takeuchi, N., Osako, Y., Ito, M., Ishizaka, R., Utunomiya, S., Nakamura, H., Matsushita, K., & Nakashima, M. (2013). A Novel Combinatorial Therapy With Pulp Stem Cells and Granulocyte Colony-Stimulating Factor for Total Pulp Regeneration. *STEM CELLS Translational Medicine*, 2(7), 521–533. <https://doi.org/10/gjf2xg>
- Iohara, K., Nakashima, M., Ito, M., Ishikawa, M., Nakasima, A., & Akamine, A. (2004). Dentin Regeneration by Dental Pulp Stem Cell Therapy with Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein 2. *Journal of Dental Research*, 83(8), 590–595. <https://doi.org/10/dd978c>
- Iop, L., Chiavegato, A., Callegari, A., Bollini, S., Piccoli, M., Pozzobon, M., Rossi, C. A., Calamelli, S., Chiavegato, D., Gerosa, G., De Coppi, P., & Sartore, S. (2008). Different Cardiovascular Potential of Adult- and Fetal-Type Mesenchymal Stem Cells in a Rat Model of Heart Cryoinjury. *Cell Transplantation*, 17(6), 679–694. <https://doi.org/10.3727/096368908786092739>
- Jain, A., & Bansal, R. (2015). Current Overview on Dental Stem Cells Applications in Regenerative Dentistry. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine*, 6(1), 29. <https://doi.org/10/gg3zbn>
- Jiawen, S., Jianjun, Z., Jiewen, D., Dedong, Y., Hongbo, Y., Jun, S., Xudong, W., Shen, S. G. F., & Lihe, G. (2014). Osteogenic Differentiation of Human Amniotic Epithelial Cells and Its Application in Alveolar Defect Restoration: Osteogenesis of hAECs in Vitro and in Vivo. *STEM CELLS Translational Medicine*, 3(12), 1504–1513. <https://doi.org/10/gjrfhh>
- Jones, D. L., & Wagers, A. J. (2008). No Place Like Home: Anatomy and Function of the Stem Cell Niche. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(1), 11–21. <https://doi.org/10/dc23mh>
- Kalervo Väänänen, H. (2005). Mesenchymal Stem Cells. *Annals of Medicine*, 37(7), 469–479. <https://doi.org/10/cfzhhw>

- Kaneto, C. M., Lima, P. S. P., Zanette, D. L., Oliveira, T. Y. K., de Assis Pereira, F., Lorenzi, J. C. C., dos Santos, J. L., Prata, K. L., Neto, J. M. P., de Paula, F. J. A., & Silva, W. A. (2016). Osteoblastic Differentiation of bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells in Bruck Syndrome. *BMC Medical Genetics*, 17(1), 38. <https://doi.org/10/f8m93r>
- Kishigami, S., & Mishina, Y. (2005). BMP Signaling and Early Embryonic Patterning. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 16(3), 265–278. <https://doi.org/10/fhr62h>
- Kolf, C. M., Cho, E., & Tuan, R. S. (2007). Biology of adult Mesenchymal Stem Cells: Regulation of Niche, Self-Renewal and Differentiation. *Arthritis Research & Therapy*, 9(1), 204. <https://doi.org/10.1186/ar2116>
- Leal-Marin, S., Kern, T., Hofmann, N., Pogozhykh, O., Framme, C., Börgel, M., Figueiredo, C., Glasmacher, B., & Gryshkov, O. (2020). Human Amniotic Membrane: A Review On Tissue Engineering, Application, and Storage. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, jbm.b.34782. <https://doi.org/10/gjfx42>
- Lee, C. P., Colombo, J. S., Ayre, W. N., Sloan, A. J., & Waddington, R. J. (2015). Elucidating The Cellular Actions of Demineralised Dentine Matrix Extract On A Clonal Dental Pulp Stem Cell Population In Orchestrating Dental Tissue Repair. *Journal of Tissue Engineering*, 6, 204173141558631. <https://doi.org/10/gjfkv>
- Li, H., Niederkorn, J. Y., Neelam, S., Mayhew, E., Word, R. A., McCulley, J. P., & Alizadeh, H. (2005). Immunosuppressive Factors Secreted by Human Amniotic Epithelial Cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 46(3), 900. <https://doi.org/10/c674j8>
- Li, L., Pan, Y., Mei, L., & Li, J. (2017). Clinical and Radiographic Outcomes in Immature Permanent Necrotic Evaginated Teeth Treated with Regenerative Endodontic Procedures. *Journal of Endodontics*, 43(2), 246–251. <https://doi.org/10/f9vn2k>
- Li, T., Forbes, M. E., Fuller, G. N., Li, J., Yang, X., & Zhang, W. (2020). IGFBP2: Integrative Hub of Developmental and Oncogenic Signaling Network. *Oncogene*, 39(11), 2243–2257. <https://doi.org/10/gjk9jg>
- Linde, A., & Goldberg, M. (1993). Dentinogenesis. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 4(5), 679–728. <https://doi.org/10/gjkkfn>
- Liu, G., Xu, G., Gao, Z., Liu, Z., Xu, J., Wang, J., Zhang, C., & Wang, S. (2016). Demineralized Dentin Matrix Induces Odontoblastic Differentiation of Dental Pulp Stem Cells. *Cells Tissues Organs*, 201(1), 65–76. <https://doi.org/10/gjtsqn>
- Liu, Q.-W., Huang, Q.-M., Wu, H.-Y., Zuo, G.-S.-L., Gu, H.-C., Deng, K.-Y., & Xin, H.-B. (2021). Characteristics and Therapeutic Potential of Human Amnion-Derived Stem Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), 970. <https://doi.org/10/gjrd8d>
- Lovelace, T. W., Henry, M. A., Hargreaves, K. M., & Diogenes, A. (2011). Evaluation of the Delivery of Mesenchymal Stem Cells into the Root Canal Space of Necrotic Immature Teeth after Clinical Regenerative Endodontic Procedure. *Journal of Endodontics*, 37(2), 133–138. <https://doi.org/10/b5h46w>

- Lv, H., Wang, H., Zhang, Z., Yang, W., Liu, W., Li, Y., & Li, L. (2017). Biomaterial Stiffness Determines Stem Cell Fate. *Life Sciences*, 178, 42–48. <https://doi.org/10/gbh34n>
- MacDougall, M. J., & Javed, A. (2010). Dentin and Bone: Similar Collagenous Mineralized Tissues. In F. Bronner, M. C. Farach-Carson, & H. I. (Trudy) Roach (Hrsg.), *Bone and Development* (S. 183–200). Springer London. https://doi.org/10.1007/978-1-84882-822-3_11
- MacDougall, M., Simmons, D., Luan, X., Nydegger, J., Feng, J., & Gu, T. T. (1997). Dentin Phosphoprotein and Dentin Sialoprotein Are Cleavage Products Expressed from a Single Transcript Coded by a Gene on Human Chromosome 4. *Journal of Biological Chemistry*, 272(2), 835–842. <https://doi.org/10/dt6cb6>
- Magloire, H., Couble, M.-L., Thivichon-Prince, B., Maurin, J.-C., & Bleicher, F. (2009). Odontoblast: A Mechano-Sensory Cell. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 312B(5), 416–424. <https://doi.org/10/dtnf9f>
- Mamede, A. C., Carvalho, M. J., Abrantes, A. M., Laranjo, M., Maia, C. J., & Botelho, M. F. (2012). Amniotic Membrane: From Structure and Functions to Clinical Applications. *Cell and Tissue Research*, 349(2), 447–458. <https://doi.org/10/f3674z>
- Mao, J. J., Kim, S. G., Zhou, J., Ye, L., Cho, S., Suzuki, T., Fu, S. Y., Yang, R., & Zhou, X. (2012). Regenerative Endodontics: Barriers and Strategies for Clinical Translation. *Dental Clinics of North America*, 56(3), 639–649. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2012.05.005>
- Marklein, R. A., Lo Surdo, J. L., Bellayr, I. H., Godil, S. A., Puri, R. K., & Bauer, S. R. (2016). High Content Imaging of Early Morphological Signatures Predicts Long Term Mineralization Capacity of Human Mesenchymal Stem Cells upon Osteogenic Induction: Early MSC Shape Predicts Mineralization Capacity. *STEM CELLS*, 34(4), 935–947. <https://doi.org/10/f8xmhn>
- Marongiu, F., Gramignoli, R., Dorko, K., Miki, T., Ranade, A. R., Paola Serra, M., Doratiotto, S., Sini, M., Sharma, S., Mitamura, K., Sellaro, T. L., Tahan, V., Skvorak, K. J., Ellis, E. C. S., Badylak, S. F., Davila, J. C., Hines, R., Laconi, E., & Strom, S. C. (2011). Hepatic Differentiation of Amniotic Epithelial Cells. *Hepatology*, 53(5), 1719–1729. <https://doi.org/10.1002/hep.24255>
- Mason, C., & Dunnill, P. (2008). A Brief Definition of Regenerative Medicine. *Regenerative Medicine*, 3(1), 1–5. <https://doi.org/10/dqgf4j>
- Matsuoka, F., Takeuchi, I., Agata, H., Kagami, H., Shiono, H., Kiyota, Y., Honda, H., & Kato, R. (2013). Morphology-Based Prediction of Osteogenic Differentiation Potential of Human Mesenchymal Stem Cells. *PLoS ONE*, 8(2), e55082. <https://doi.org/10/f4nhm5>
- Mattioli, M., Gloria, A., Turriani, M., Mauro, A., Curini, V., Russo, V., Tetè, S., Marchisio, M., Pierdomenico, L., Berardinelli, P., Colosimo, A., Muttini, A., Valbonetti, L., & Barboni, B. (2012). Stemness Characteristics and Osteogenic Potential of Sheep Amniotic Epithelial Cells. *Cell Biology International*, 36(1), 7–19. <https://doi.org/10.1042/CBI20100720>
- Melin, M., Joffre-Romeas, A., Farges, J.-C., Couble, M.-L., Magloire, H., & Bleicher, F. (2000). Effects of TGF β 1 on Dental Pulp Cells in Cultured Human Tooth

- Slices. *Journal of Dental Research*, 79(9), 1689–1696.
<https://doi.org/10/c7s5p7>
- Miki, T., Lehmann, T., Cai, H., Stolz, D. B., & Strom, S. C. (2005). Stem Cell Characteristics of Amniotic Epithelial Cells. *Stem Cells*, 23(10), 1549–1559.
<https://doi.org/10/dmx86b>
- Miki, T., & Strom, S. C. (2006). Amnion-derived Pluripotent/Multipotent Stem Cells. *Stem Cell Reviews*, 2, 9. <https://doi.org/10/d5hw4k>
- Mitalipov, S., & Wolf, D. (2009). Totipotency, Pluripotency and Nuclear Reprogramming. In U. Martin (Hrsg.), *Engineering of Stem Cells* (S. 185–199). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/10_2008_45
- Miura, M., Gronthos, S., Zhao, M., Lu, B., Fisher, L. W., Robey, P. G., & Shi, S. (2003). SHED: Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(10), 5807–5812. <https://doi.org/10/cxb35m>
- Müller, H.-J., & Prange, D. R. (2016). *PCR - Polymerase-Kettenreaktion*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-48236-0>
- Müller, W. A., & Hassel, M. (2006). *Entwicklungsbiologie und Reproduktionsbiologie von Mensch und Tieren: Ein einführendes Lehrbuch* (4.). Springer.
- Murphy, S. V., Kidyoor, A., Reid, T., Atala, A., Wallace, E. M., & Lim, R. (2014). Isolation, Cryopreservation and Culture of Human Amnion Epithelial Cells for Clinical Applications. *Journal of Visualized Experiments*, 94, 52085.
<https://doi.org/10/gjqnfk>
- Murray, P. E., Stanley, H. R., Matthews, J. B., Sloan, A. J., & Smith, A. J. (2002). Age-related Odontometric Changes of Human Teeth. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, 93(4), 474–482.
<https://doi.org/10/dvfpmp>
- Nakashima, M., & Iohara, K. (2011). Regeneration of Dental Pulp by Stem Cells. *Advances in Dental Research*, 23(3), 313–319. <https://doi.org/10/bh355x>
- Nakashima, M., Iohara, K., Murakami, M., Nakamura, H., Sato, Y., Ariji, Y., & Matsu-shita, K. (2017). Pulp Regeneration by Transplantation of Dental Pulp Stem Cells in Pulpitis: A Pilot Clinical Study. *Stem Cell Research & Therapy*, 8(1), 61. <https://doi.org/10/ghqzfq>
- Nakashima, M., Nagasawa, H., Yamada, Y., & Reddi, A. H. (1994). Regulatory Role of Transforming Growth Factor- β , Bone Morphogenetic Protein-2, and Protein-4 on Gene Expression of Extracellular Matrix Proteins and Differentiation of Dental Pulp Cells. *Developmental Biology*, 162(1), 18–28.
<https://doi.org/10/c7bfc5>
- Nixdorf, D. R., Law, A. S., Lindquist, K., Reams, G. J., Cole, E., Kanter, K., Nguyen, R. H. N., & Harris, D. R. (2016). *Frequency, Impact, and Predictors of Persistent Pain After Root Canal Treatment: A National Dental PBRN study*. 157(1), 7.
- Ohkoshi, S., Hirono, H., Nakahara, T., & Ishikawa, H. (2018). Dental Pulp Cell Bank as a Possible Future Source of Individual Hepatocytes. *World Journal of Hepatology*, 10(10), 702–707. <https://doi.org/10.4254/wjh.v10.i10.702>

- Okada, H., Danoff, T. M., Kalluri, R., & Neilson, E. G. (1997). Early Role of Fsp1 in Epithelial-Mesenchymal Transformation. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 273(4), F563–F574. <https://doi.org/10/gjrpbw>
- Papagerakis, P., Berdal, A., Mesbah, M., Peuchmaur, M., Malaval, L., Nydegger, J., Simmer, J., & Macdougall, M. (2002). Investigation of Osteocalcin, Osteonectin, and Dentin Sialophosphoprotein in Developing Human Teeth. *Bone*, 30(2), 377–385. <https://doi.org/10/bdw5fd>
- Parolini, O., Alviano, F., Bagnara, G. P., Bilic, G., Bühring, H.-J., Evangelista, M., Hennerbichler, S., Liu, B., Magatti, M., Mao, N., Miki, T., Marongiu, F., Nakajima, H., Nikaido, T., Portmann-Lanz, C. B., Sankar, V., Soncini, M., Stadler, G., Surbek, D., ... Strom, S. C. (2008). Concise Review: Isolation and Characterization of Cells from Human Term Placenta: Outcome of the First International Workshop on Placenta Derived Stem Cells. *Stem Cells*, 26(2), 300–311. <https://doi.org/10/bwkzdv>
- Plattner, H., & Hentschel, J. (2017). *Zellbiologie* (5. überarbeitete Auflage). Georg Thieme Verlag. <https://doi.org/10.1055/b-004-139120>
- Prasad, A., & Alizadeh, E. (2019). Cell Form and Function: Interpreting and Controlling the Shape of Adherent Cells. *Trends in Biotechnology*, 37(4), 347–357. <https://doi.org/10/gjjz5m>
- Pratama, G., Vaghjiani, V., Tee, J. Y., Liu, Y. H., Chan, J., Tan, C., Murthi, P., Gargett, C., & Manuelpillai, U. (2011). Changes in Culture Expanded Human Amniotic Epithelial Cells: Implications for Potential Therapeutic Applications. *PLoS ONE*, 6(11), e26136. <https://doi.org/10/fkqrcz>
- Qin, C., Baba, O., & Butler, W. T. (2004). Post-Translational Modification of SIBLING Proteins and their Roles in Osteogenesis and Dentinogenesis. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 15(3), 126–136. <https://doi.org/10/dcz3rd>
- Qin, C., Brunn, J. C., Jones, J., George, A., Ramachandran, A., Gorski, J. P., & Butler, W. T. (2001). A Comparative Study of Sialic Acid-Rich Proteins in Rat Bone and Dentin: Sialic Acid-Rich Proteins in Bone and Dentin. *European Journal of Oral Sciences*, 109(2), 133–141. <https://doi.org/10/c3jn65>
- Quispe-Salcedo, A., Ida-Yonemochi, H., Nakatomi, M., & Ohshima, H. (2012). Expression Patterns of Nestin and Dentin Sialoprotein during Dentinogenesis in Mice. *Biomedical Research*, 33(2), 119–132. <https://doi.org/10/f3xv2c>
- Renz, H., & Gierten, B. (2019). Durchflusszytometrie. In A. M. Gressner & T. Arndt (Hrsg.), *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik* (S. 735–735). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-48986-4_945
- Rienzo, M., Schiano, C., Casamassimi, A., Grimaldi, V., Infante, T., & Napoli, C. (2013). Identification of Valid Reference Housekeeping Genes for Gene Expression Analysis in Tumor Neovascularization Studies. *Clinical and Translational Oncology*, 15(3), 211–218. <https://doi.org/10/gjkwch>
- Rosa, V., Zhang, Z., Grande, R. H. M., & Nör, J. E. (2013). Dental Pulp Tissue Engineering in Full-length Human Root Canals. *Journal of Dental Research*, 92(11), 970–975. <https://doi.org/10/f5ddqn>
- Rouwkema, J., Rivron, N. C., & van Blitterswijk, C. A. (2008). Vascularization in tissue Engineering. *Trends in Biotechnology*, 26(8), 434–441. <https://doi.org/10/ctpdm>

- Sakuragawa, N., Thangavel, R., Mizuguchi, M., Hirasawa, M., & Kamo, I. (1996). Expression of markers for both Neuronal and Glial Cells in Human Amniotic Epithelial Cells. *Neuroscience Letters*, *209*(1), 9–12. <https://doi.org/10/dcbptn>
- Saoud, T. M. A., Zaazou, A., Nabil, A., Moussa, S., Lin, L. M., & Gibbs, J. L. (2014). Clinical and Radiographic Outcomes of Traumatized Immature Permanent Necrotic Teeth after Revascularization/Revitalization Therapy. *Journal of Endodontics*, *40*(12), 1946–1952. <https://doi.org/10/f6tfdw>
- Scarrit, M. E. (2015). A review of cellularization strategies for tissue engineering of whole organs. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *3*. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00043>
- Schmalz, G., Widbiller, M., & Galler, K. (2016). Material Tissue Interaction—From Toxicity to Tissue Regeneration. *Operative Dentistry*, *41*(2), 117–131. <https://doi.org/10/f8mk8b>
- Schmalz, G., Widbiller, M., & Galler, K. M. (2017). Signaling Molecules and Pulp Regeneration. *Journal of Endodontics*, *43*(9), S7–S11. <https://doi.org/10/gdcscn>
- Schmalz, G., Widbiller, M., & Galler, K. M. (2020). Clinical Perspectives of Pulp Regeneration. *Journal of Endodontics*, *46*(9), S161–S174. <https://doi.org/10/gjg5ng>
- Sedgley, C. M., Cherkas, P., Chogle, S. M. A., Geisler, T. M., Hargreaves, K. M., Paranjpe, vina K., & Valerie Tom-Kun Yamagishi. (2013). AAE - Regenerative Endodontics. *Colleagues for Excellence*, *8*.
- Shi, S., & Gronthos, S. (2003). Perivascular Niche of Postnatal Mesenchymal Stem Cells in Human Bone Marrow and Dental Pulp. *Journal of Bone and Mineral Research*, *18*(4), 696–704. <https://doi.org/10/czg866>
- Silva, T. A., Lara, V. S., Silva, J. S., Oliveira, S. H. P., Butler, W. T., & Cunha, F. Q. (2005). Macrophages and Mast Cells Control the Neutrophil Migration Induced by Dentin Proteins. *Journal of Dental Research*, *84*(1), 79–83. <https://doi.org/10/fwdn32>
- Simat, S. F., Chua, K. H., Abdul Rahman, H., Tan, A. E., & Tan, G. C. (2008). The Stemness Gene Expression of Cultured Human Amniotic Epithelial Cells in Serial Passages. *The Medical Journal of Malaysia*, *63 Suppl A*, 53–54.
- Simon, S., Smith, A. J., Lumley, P. J., Berdal, A., Smith, G., Finney, S., & Cooper, P. R. (2009). Molecular Characterization of Young and Mature Odontoblasts. *Bone*, *45*(4), 693–703. <https://doi.org/10/dkcjxc>
- Siqueira, J. F., Rôças, I. N., Ricucci, D., & Hülsmann, M. (2014). Causes and Management of Post-Treatment Apical Periodontitis. *British Dental Journal*, *216*(6), 305–312. <https://doi.org/10/f5wb3c>
- Sloan, A. J., & Waddington, R. J. (2009). Dental pulp stem cells: What, Where, How? *International Journal of Paediatric Dentistry*, *19*(1), 61–70. <https://doi.org/10/fbb6bn>
- Smith, A. J., Duncan, H. F., Diogenes, A., Simon, S., & Cooper, P. R. (2016). Exploiting the Bioactive Properties of the Dentin-Pulp Complex in Regenerative Endodontics. *Journal of Endodontics*, *42*(1), 47–56. <https://doi.org/10/f746pj>

- Smith, A. J., Scheven, B. A., Takahashi, Y., Ferracane, J. L., Shelton, R. M., & Cooper, P. R. (2012). Dentine as a Bioactive Extracellular Matrix. *Archives of Oral Biology*, *57*(2), 109–121. <https://doi.org/10/d8fm8b>
- Song, J. S., Takimoto, K., Jeon, M., Vadakekalam, J., Ruparel, N. B., & Diogenes, A. (2017). Decellularized Human Dental Pulp as a Scaffold for Regenerative Endodontics. *Journal of Dental Research*, *96*(6), 640–646. <https://doi.org/10/f9qnh8>
- Stadler, G., Hennerbichler, S., Lindenmair, A., Peterbauer, A., Hofer, K., van Griensven, M., Gabriel, C., Redl, H., & Wolbank, S. (2008). Phenotypic Shift of Human Amniotic Epithelial Cells in Culture is Associated with reduced Osteogenic Differentiation In Vitro. *Cytotherapy*, *10*(7), 743–752. <https://doi.org/10/bxrvvx>
- Staquet, M.-J., Durand, S. H., Colomb, E., Roméas, A., Vincent, C., Bleicher, F., Lebecque, S., & Farges, J.-C. (2008). Different Roles of Odontoblasts and Fibroblasts in Immunity. *Journal of Dental Research*, *87*(3), 256–261. <https://doi.org/10/cvbvb8>
- Stefański, T. (2013). Lymphatic System of the Dental Pulp—Systematic Review of Literature. *Journal of Stomatology (Czasopismo Stomatologiczne)*, *66*, 202–220. <https://doi.org/10.5604/00114553.1035086>
- Stolzing, A., Sethe, S., & Scutt, A. M. (2006). Stressed Stem Cells: Temperature Response in Aged Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells and Development*, *15*(4), 478–487. <https://doi.org/10/bdgb3k>
- Sumita, Y., Tsuchiya, S., Asahina, I., Kagami, H., & Honda, M. J. (2009). The Location and Characteristics of two Populations of Dental Pulp Cells Affect Tooth Development. *European Journal of Oral Sciences*, *117*(2), 113–121. <https://doi.org/10/fnnqqf>
- Suzuki, S., Sreenath, T., Haruyama, N., Honeycutt, C., Terse, A., Cho, A., Kohler, T., Müller, R., Goldberg, M., & Kulkarni, A. B. (2009). Dentin Sialoprotein and Dentin Phosphoprotein Have Distinct Roles in Dentin Mineralization. *Matrix Biology*, *28*(4), 221–229. <https://doi.org/10/b2cjhq>
- Tabatabaei, M., Mosaffa, N., Nikoo, S., Bozorgmehr, M., Ghods, R., Kazemnejad, S., Rezania, S., Keshavarzi, B., Arefi, S., Ramezani-Tehrani, F., Mirzadegan, E., & Zarnani, A.-H. (2014). Isolation and Partial Characterization of Human Amniotic Epithelial Cells: The Effect of Trypsin. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, *6*(1), 10–20.
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, *126*(4), 663–676. <https://doi.org/10/b8jfff>
- Talati, A., Disfani, R., Javidi, M., Afshar, A., & Rastegar, A. F. (2007). *Finite Element Evaluation of Stress Distribution in Mature and Immature Teeth*. *2*(2), 7.
- Thivichon-Prince, B., Couble, M. L., Giamarchi, A., Delmas, P., Franco, B., Romio, L., Struys, T., Lambrichts, I., Ressenkoff, D., Magloire, H., & Bleicher, F. (2009). Primary Cilia of Odontoblasts: Possible Role in Molar Morphogenesis. *Journal of Dental Research*, *88*(10), 910–915. <https://doi.org/10/cx67rj>

- Toda, A., Okabe, M., Yoshida, T., & Nikaido, T. (2007). The Potential of Amniotic Membrane/Amnion-Derived Cells for Regeneration of Various Tissues. *Journal of Pharmacological Sciences*, *105*(3), 215–228. <https://doi.org/10/d7pkvv>
- Tziafas, D., Alvanou, A., Panagiotakopoulos, N., Smith, A. J., Lesot, H., Komnenou, A., & Ruch, J. V. (1995). Induction of Odontoblast-Like Cell Differentiation in Dog Dental Pulp after in Vivo Implantation of Dentine Matrix Components. *Archives of Oral Biology*, *40*(10), 883–893. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(95\)00069-2](https://doi.org/10.1016/0003-9969(95)00069-2)
- Ulfig, N. (2011). *Kurzlehrbuch Histologie* (3., überarb. Aufl). Thieme.
- Unterbrink, A., O’Sullivan, M., Chen, S., & MacDougall, M. (2002). TGFβ-1 Downregulates DMP-1 and DSPP in Odontoblasts. *Connective Tissue Research*, *43*(2–3), 354–358. <https://doi.org/10/fvtdk3>
- Verdelis, K., Eliades, G., Oviir, T., & Margelos, J. (1999). Effect of Chelating Agents on the Molecular Composition and Extent of Decalcification at Cervical, Middle and Apical Root Dentin Locations. *Endodontics & Dental Traumatology*, *15*(4), 164–170. <https://doi.org/10/b4bnms>
- Wang, S., Mu, J., Fan, Z., Yu, Y., Yan, M., Lei, G., Tang, C., Wang, Z., Zheng, Y., Yu, J., & Zhang, G. (2012). Insulin-like Growth Factor 1 Can Promote the Osteogenic Differentiation and Osteogenesis of Stem Cells from Apical Papilla. *Stem Cell Research*, *8*(3), 346–356. <https://doi.org/10/fox5np>
- Widbiller, M., Bucchi, C., Rosendahl, A., Spanier, G., Buchalla, W., & Galler, K. M. (2019). Isolation of Primary Odontoblasts: Expectations and Limitations. *Australian Endodontic Journal*, *45*(3), 378–387. <https://doi.org/10/ggzw4t>
- Widbiller, M., Driesen, R. B., Eidt, A., Lambrichts, I., Hiller, K.-A., Buchalla, W., Schmalz, G., & Galler, K. M. (2018). Cell Homing for Pulp Tissue Engineering with Endogenous Dentin Matrix Proteins. *Journal of Endodontics*, *44*(6), 956–962.e2. <https://doi.org/10/gdrds6>
- Widbiller, M., Eidt, A., Hiller, K.-A., Buchalla, W., Schmalz, G., & Galler, K. M. (2017). Ultrasonic Activation of Irrigants Increases Growth Factor Release From Human Dentine. *Clinical Oral Investigations*, *21*(3), 879–888. <https://doi.org/10/f94mct>
- Widbiller, M., Eidt, A., Lindner, S. R., Hiller, K.-A., Schweikl, H., Buchalla, W., & Galler, K. M. (2018). Dentine Matrix Proteins: Isolation and Effects on Human Pulp Cells. *International Endodontic Journal*, *51*, e278–e290. <https://doi.org/10/ggzw38>
- Widbiller, M., Eidt, A., Wölflick, M., Lindner, S. R., Schweikl, H., Hiller, K.-A., Buchalla, W., & Galler, K. M. (2018). Interactive Effects of LPS and Dentine Matrix Proteins on Human Dental Pulp Stem Cells. *International Endodontic Journal*, *51*(8), 877–888. <https://doi.org/10/ggzw37>
- Widbiller, M., Knüttel, H., Meschi, N., & Durán-Sindreu Terol, F. (2022). Effectiveness of Endodontic Tissue Engineering in Treatment of Apical Periodontitis: A Systematic Review. *International Endodontic Journal*, *ie.j.13784*. <https://doi.org/10.1111/iej.13784>
- Widbiller, M., & Schmalz, G. (2021). Endodontic regeneration: Hard Shell, Soft Core. *Odontology*, *109*(2), 303–312. <https://doi.org/10/gjg5nf>

- Widbiller, M., Schweikl, H., Bruckmann, A., Rosendahl, A., Hochmuth, E., Lindner, S. R., Buchalla, W., & Galler, K. M. (2019). Shotgun Proteomics of Human Dentin with Different Prefractionation Methods. *Scientific Reports*, 9(1), 4457. <https://doi.org/10/ggzw32>
- Wong, A., Ghassemi, E., & Yellowley, C. E. (2014). Nestin Expression in mesenchymal Stromal Cells: Regulation by Hypoxia and Osteogenesis. *BMC Veterinary Research*, 10, 173. <https://doi.org/10/f6dcqh>
- Xuan, K., Li, B., Guo, H., Sun, W., Kou, X., He, X., Zhang, Y., Sun, J., Liu, A., Liao, L., Liu, S., Liu, W., Hu, C., Shi, S., & Jin, Y. (2018). Deciduous Autologous Tooth Stem Cells Regenerate Dental Pulp after Implantation into Injured Teeth. *Science Translational Medicine*, 10(455), eaaf3227. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf3227>
- Yamamoto, R., Oida, S., & Yamakoshi, Y. (2015). Dentin Sialophosphoprotein–derived Proteins in the Dental Pulp. *Journal of Dental Research*, 94(8), 1120–1127. <https://doi.org/10/f7kgsc>
- Yan, W., Montoya, C., Øilo, M., Ossa, A., Paranjpe, A., Zhang, H., & Arola, D. D. (2019). Contribution of Root Canal Treatment to the Fracture Resistance of Dentin. *Journal of Endodontics*, 45(2), 189–193. <https://doi.org/10/gn32gh>
- Yu, S.-C., Xu, Y.-Y., Li, Y., Xu, B., Sun, Q., Li, F., & Zhang, X.-G. (2015). Construction of Tissue Engineered Skin With Human Amniotic Mesenchymal Stem Cells and Human Amniotic Epithelial Cells. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 19(23), 4627–4635.
- Yumoto, H., Hirao, K., Hosokawa, Y., Kuramoto, H., Takegawa, D., Nakanishi, T., & Matsuo, T. (2018). The Roles of Odontoblasts in Dental Pulp Innate Immunity. *Japanese Dental Science Review*, 54(3), 105–117. <https://doi.org/10/gd39d6>
- Zavadil, J., & Böttinger, E. P. (2005). TGF- β and Epithelial-To-Mesenchymal Transitions. *Oncogene*, 24(37), 5764–5774. <https://doi.org/10/bh2jtg>
- Zeitlin, B. D. (2020). Banking on teeth – Stem Cells and the Dental Office. *Biomedical Journal*, 43(2), 124–133. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2020.02.003>
- Zhang, Q., & Lai, D. (2020). Application of human Amniotic Epithelial Cells in Regenerative Medicine: A Systematic Review. *Stem Cell Research & Therapy*, 11(1), 439. <https://doi.org/10/gjqwr9>
- Zhang, S., Zhang, W., Li, Y., Ren, L., Deng, H., Yin, X., Gao, X., Pan, S., & Niu, Y. (2020). Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Differentiation Into Odontoblast-Like Cells and Endothelial Cells: A Potential Cell Source for Dental Pulp Tissue Engineering. *Frontiers in Physiology*, 11, 593. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00593>
- Zhang, Y., Li, Z., & Liu, N. (2019). The Stemness of Perinatal Stem Cells. In Z. C. Han, T. A. Takahashi, Z. Han, & Z. Li (Hrsg.), *Perinatal Stem Cells* (S. 27–37). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-2703-2_3
- Zhao, B., Zhang, Y., Han, S., Zhang, W., Zhou, Q., Guan, H., Liu, J., Shi, J., Su, L., & Hu, D. (2017). Exosomes Derived from Human Amniotic Epithelial Cells Accelerate Wound Healing and Inhibit Scar Formation. *Journal of Molecular Histology*, 48(2), 121–132. <https://doi.org/10/f93hwj>

Statistik

Tabelle 4: Statistik der Genexpression, grau entspricht einem signifikanten Unterschied (P<0,05)

	<i>TGFB1</i>	<i>NES</i>	<i>IGFBP2</i>	<i>S100A4</i>	<i>GPX3</i>	<i>COL1A1</i>	<i>BMP4</i>	<i>BGLAP</i>	<i>IBSP</i>
	P value	P value	P value	P value	P value	P value	P value	P value	P value
10 % FBS D1: DPSC-HAEC	0,0571	0,0286	0,0286	0,3429	0,0286	0,0286	0,0286	0,0286	0,0286
10 % FBS D7: DPSC-HAEC	0,6857	0,0286	0,0286	0,0286	0,0286	0,0286	0,0286	0,0286	0,0286
10 % FBS D14: DPSC-HAEC	0,0286	0,0286	0,0286	0,0286	0,0286	0,3429	0,0286	0,0286	0,0286
eDMP D1: DPSC-HAEC	0,0286	0,0286	0,0286	0,0286	0,0286	0,0286	0,0286	0,0571	0,1429
eDMP D7: DPSC-HAEC	0,0286	0,0286	0,0286	0,0286	0,0286	0,0286	0,0286	0,0286	0,0286
eDMP D14: DPSC-HAEC	0,0286	0,0286	0,1143	0,0286	0,0286	0,0286	0,0286	0,0286	0,0286
StemPro D1: DPSC-HAEC	0,0286	0,0286	0,0286	0,0286	0,0286	0,0286	0,0286	0,0286	0,4286
StemPro D7: DPSC-HAEC	>0,999	0,0286	0,0286	0,0286	0,0286	0,0286	0,0286	0,0286	>0,999
StemPro D14: DPSC-HAEC	0,6857	0,0286	0,3429	0,0286	0,3429	0,0286	0,0286	0,0286	>0,999
10 % FBS DPSC: D1-D7	0,4857	0,0286	0,0286	0,0286	0,3429	0,8857	0,0286	0,0286	0,0286
10 % FBS DPSC: D1-D14	0,0286	0,0286	0,0286	0,8857	0,3429	>0,999	0,0286	0,0286	0,8857
10 % FBS DPSC: D7-D14	0,0286	0,6857	0,3429	0,0286	>0,999	>0,999	0,3429	0,8857	0,0286
10 % FBS HAEC: D1-D7	0,8857	0,0286	0,6857	0,6857	0,1143	0,0571	0,9714	0,7714	>0,999
10 % FBS HAEC: D1-D14	0,2000	0,0286	0,3429	0,0286	0,0286	0,0286	0,0286	0,9143	>0,999
10 % FBS HAEC: D7-D14	0,4857	0,8857	0,3429	0,2000	0,0286	0,2000	0,0571	0,9143	>0,999
eDMP DPSC: D1-D7	0,1143	0,6857	0,2000	0,6857	0,0286	0,6857	0,0286	0,0571	0,3429
eDMP DPSC: D1-D14	0,4857	0,1143	0,0286	0,6857	0,0286	>0,999	0,0286	0,1143	0,0286
eDMP DPSC: D7-D14	0,8857	0,0571	0,0286	0,2000	0,8857	0,6857	0,0286	0,3429	0,3429
eDMP HAEC: D1-D7	0,4857	0,0286	0,6857	0,4857	0,0286	0,3429	0,3714	0,9143	>0,999
eDMP HAEC: D1-D14	0,1143	0,0286	0,8857	0,3429	0,0286	0,0286	0,0286	0,4857	>0,999
eDMP HAEC: D7-D14	0,2000	0,8857	0,4857	0,8857	0,3429	0,4857	0,3429	0,7143	>0,999
StemPro DPSC: D1-D7	0,2000	0,8857	0,0286	0,3429	0,1143	0,3429	0,3429	0,0286	0,4286
StemPro DPSC: D1-D14	0,6857	>0,999	0,0286	0,1143	0,6857	>0,999	0,0286	0,0286	0,4286
StemPro DPSC: D7-D14	0,3429	0,8857	0,0286	0,4857	>0,999	0,0286	0,0286	0,0286	>0,999
StemPro HAEC: D1-D7	0,1143	0,0286	0,0286	0,0286	0,0286	0,4857	0,3429	0,4286	>0,999
StemPro HAEC: D1-D14	>0,999	0,0286	0,0286	0,2000	0,2000	0,6857	0,3429	0,1429	>0,999
StemPro HAEC: D7-D14	>0,999	0,0571	>0,999	0,3429	>0,999	0,8857	0,7714	0,6571	>0,999
DPSC D1: 10 % FBS-eDMP	0,0571	0,6857	0,6857	0,3429	0,0286	0,0286	0,0286	0,1143	0,3429
DPSC D1: 10 % FBS-StemPro	0,8857	0,0286	0,0286	>0,999	0,0286	0,0286	0,1143	0,3429	0,8000
DPSC D1: eDMP-StemPro	0,1143	0,0286	0,0286	0,3429	0,0286	0,0286	0,0286	0,8857	0,3143
DPSC D7: 10 % FBS-eDMP	0,0571	0,0286	0,0286	0,0286	0,0571	0,4857	0,0286	0,0286	0,0571
DPSC D7: 10 % FBS-StemPro	0,3429	0,0571	0,0286	0,1143	0,8857	0,0286	0,0286	0,0286	0,0286
DPSC D7: eDMP-StemPro	0,0286	0,0286	0,0286	0,4857	0,1143	0,0286	0,0286	0,3429	0,0286
DPSC D14: 10 % FBS-eDMP	0,0286	0,0286	0,4857	0,0286	0,0286	0,6857	0,3429	0,0286	0,0286
DPSC D14: 10 % FBS-StemPro	0,0571	>0,999	0,0286	0,0571	>0,999	0,0286	0,0286	0,8857	0,0286
DPSC D14: eDMP-StemPro	0,0286	0,0286	0,0286	0,4857	>0,999	0,0286	0,0286	0,0286	0,0286
HAEC D1: 10 % FBS-eDMP	0,3429	0,0571	0,4857	>0,999	>0,999	>0,999	0,2286	0,9714	>0,999
HAEC D1: 10 % FBS-StemPro	0,0571	0,0286	0,3429	0,0286	0,4857	>0,999	0,6857	0,1429	>0,999
HAEC D1: eDMP-StemPro	0,3429	0,0286	0,2000	0,0286	>0,999	>0,999	0,1143	0,1429	>0,999
HAEC D7: 10 % FBS-eDMP	0,8857	>0,999	0,8857	0,6857	0,6857	>0,999	0,9714	0,4857	>0,999
HAEC D7: 10 % FBS-StemPro	>0,999	0,0286	0,0286	0,0286	0,3429	0,0286	0,7714	0,6571	>0,999
HAEC D7: eDMP-StemPro	0,6857	0,0286	0,0286	0,0286	0,3429	0,0286	0,5429	>0,999	>0,999
HAEC D14: 10 % FBS-eDMP	0,3429	0,6857	0,1143	0,0286	0,8857	0,6857	0,3429	0,7143	>0,999
HAEC D14: 10 % FBS-StemPro	0,4857	0,0286	0,0286	0,6857	0,2000	0,0286	0,0286	>0,999	>0,999
HAEC D14: eDMP-StemPro	0,4857	0,0286	0,0286	0,0286	0,3429	0,0286	0,0286	0,3714	>0,999

Danksagung

Mein größter Dank gilt Dr. Matthias Widbiller für die Überlassung des Themas, der ausgezeichneten Betreuung und die großartige Einführung in die zahnmedizinische Forschung. Seine Ideen, Vorschläge und fachliche Kompetenz beflügeln mich bei jedem Gespräch. Ich weiß seine fortlaufende Unterstützung sehr zu schätzen.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Buchalla danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Lehrstuhl durchführen zu können und für die Bereitstellung von Mitteln und Laboren. Auch für die Anstellung als wissenschaftliche Mitarbeiterin und die Ermöglichung weiterer Forschungsprojekte möchte ich mich sowohl bei Prof. Buchalla, Dr. Widbiller als auch bei Prof. Kerstin Galler bedanken.

Herzlichen Dank auch an Andreas Rosendahl und Melanie Wölflick für die Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten im Labor und die angenehme Zusammenarbeit.

Zuletzt gilt der Dank meiner Familie und meiner Freunde, die mich während der Anfertigung dieser Arbeit immerzu unterstützt und motiviert haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Ella Ohlsson
Geburtsdatum / -ort: 05.08.1995, Soest
Staatsangehörigkeit: deutsch/ schwedisch

Schulbildung

ab 2002 Selmigerheideschule, Hamm
ab 2006 Gymnasium Hammonense, Hamm
Jun 2014 Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung

SoSe 2015 - SoSe 2016 Studium der Betriebswirtschaftslehre an der
OTH Regensburg
WiSe 16/17 - WiSe 21/22 Studium der Zahnmedizin an der
Universität Regensburg
SoSe 2021 - SoSe 2022 Studium der Molekularen Medizin an der
Universität Regensburg
Nov 2021 Staatsexamen und Approbation als Zahnärztin
Aug 2022 Bachelor of Science in Molekularer Medizin

Beruf

Feb 2022 – Jul 2022 Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Poliklinik für
Zahnerhaltung und Parodontologie, Uniklinikum Re-
gensburg

Seit Aug 2022

Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Zahnklinik 1 -
Zahnerhaltung und Parodontologie, Uniklinikum Erlangen

Tagungsbeiträge und Auszeichnungen

- Feb 2021 Posterpräsentation und Gewinn des Posterpreises des 2. Regensburger Symposiums Zahnmedizin mit dem Poster „Das Amnionepithel: Eine mögliche Stammzellquelle für die Regenerative Endodontie?“
- Sep 2021 Posterpräsentation und Gewinn des „My First Research Poster Award“ beim 2021 CED-IADR/NOF Oral Health Research congress in Brüssel mit dem Poster “Amniotic Epithelium - A Possible Stem Cell Source for Pulp Regeneration?”
- Nov 2021 Stipendium des Vereins der ehemaligen Zahnmedizinstudenten Regensburg e.V.
- Sep 2022 Kurzvortrag am 7. Tag der Wissenschaft der DGZ in Würzburg mit dem Titel „Zytotoxizität dentaler selbstadhäsiver Füllungsmaterialien“
- Sep 2022 Gewinn der Kulzer-Start Forschungsförderung der DGR²Z für das Projekt „Zytotoxizität dentaler selbstadhäsiver Füllungsmaterialien: Eluat vs. Dentinbarriere-Kultur“

Veröffentlichungen

- Bucchi, C.; Ohlsson, E.; de Anta, J.; Woelflick, M.; Galler, K.; Manzanares-Cespedes, M.C.; Widbiller, M.
“Human Amnion Epithelial Cells: A Potential Cell Source for Pulp Regeneration?”.
Int. J. Mol. Sci. 2022, 23, 2830. <https://doi.org/10.3390/ijms23052830>
- Ohlsson, E.; Galler, K.; Widbiller, M.
„A Compilation of Study Models for Dental Pulp Regeneration“. Int. J. Mol. Sci. 2022, 23, 14361. <https://doi.org/10.3390/ijms232214361>