

# **Vorläuferzellen in Zahngewebe**

## **Charakterisierung anhand von Subpopulationen**

Dissertation

zur Erlangung des

naturwissenschaftlichen Doktorgrades

(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Biologie

Universität Bielefeld

vorgelegt von

Marlies Brinkmann

im Februar 2009



---

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>VI</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Biologischer Hintergrund.....	1
1.1.1 Adulte Stammzellen.....	1
1.1.2 Ursprung der dentalen Zellen - die Neuralleiste .....	2
1.1.3 Zahnentwicklung.....	5
1.1.4 Dentale Zellen aus Zahnkeimen des dritten Molaren .....	7
1.2 Arbeitsziel.....	10
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>12</b>
2.1 Archivierung der Zahngewebe (Datenbank).....	12
2.1.1 Erhobene Daten.....	12
2.1.2 Strukturierung der Tabellen .....	12
2.1.3 Organisation der Datenbank.....	13
2.1.4 Datenbank-Abfragen .....	14
2.2 Zelllinien.....	15
2.2.1 Primärkulturen aus Patientenspenden .....	15
2.2.1.1 Isolierung der Zellen aus Zahngewebe .....	15
2.2.1.2 Isolierung von Knochenmarkzellen .....	18
2.2.2 Referenz-Zelllinien .....	19
2.3 Zellkultivierung.....	20
2.3.1 Kulturmedien .....	20
2.3.2 Passagieren der Zellen .....	21
2.3.3 Kryokonservierung.....	21
2.3.4 Bestimmung zellspezifischer Parameter .....	22
2.4 Differenzierung der Zellen.....	22

---

2.4.1	Osteogene Differenzierung .....	22
2.4.2	Neurogene Differenzierung.....	23
2.5	Einzelzellkulturen .....	23
2.5.1	Limiting Dilution .....	23
2.5.2	Einzelzellablage (FACS-Gerät) .....	24
2.6	Analysemethoden.....	25
2.6.1	Bestimmung der Zellzahl .....	25
2.6.1.1	Trypanblau-Methode invasiv (Neubauer-Zählkammer).....	25
2.6.1.2	Nicht invasive Bestimmung der Zellzahl.....	25
2.6.2	Kalziumnachweis .....	26
2.6.2.1	Qualitativer Nachweis.....	27
2.6.2.2	Quantitativer Nachweis.....	27
2.6.3	Durchflusszytometrie (FACS-Gerät) .....	27
2.6.3.1	Messprinzip und Grundausstattung.....	27
2.6.3.2	Charakterisierung der Zellen.....	28
2.6.3.3	Sortierung der Zellen .....	29
2.6.4	mRNA-Analyse.....	30
2.6.4.1	RNA Isolation und cDNA-Synthese.....	30
2.6.4.2	PCR (Polymerase Chain Reaction).....	30
2.6.4.3	Real-time PCR .....	31
2.7	Charakterisierung der Zelloberflächenproteine - Antikörper .....	32
2.8	Untersuchung der Genexpression – Primer .....	33
2.9	Material.....	33
2.9.1	Medien .....	33
2.9.2	Medienzusätze und Wachstumsfaktoren.....	33
2.9.3	Geräte und Gebrauchsmaterial.....	34
2.9.4	Chemikalien .....	35
2.9.5	Verbrauchsmaterial .....	36

<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>37</b>
3.1	Archivierung der Zahngewebe (Datenbank).....	37
3.1.1	Abfrage mit direkter Auflistung.....	37
3.1.2	Abfrage mit einer Auswahlabfrage.....	39
3.1.3	Abfrage mit zwei kombinierten Auswahlabfragen.....	40
3.1.4	Auswertung der Datenabfragen.....	41
3.2	Osteogene Differenzierung dentaler Primärkulturen.....	43
3.2.1	Kalzifizierung dentaler Primärkulturen.....	43
3.2.2	Vergleich verschiedener dentaler Primärkulturen.....	45
3.2.2.1	Gegenüberstellung der Kalzifizierung.....	45
3.2.2.2	Gegenüberstellung der Genexpression.....	48
3.2.2.2.1	Bonesialoprotein ( <i>IBSP</i> ).....	49
3.2.2.2.2	Osteokalzin ( <i>BGLAP</i> ).....	53
3.2.2.2.3	Runt related transkription factor 2 ( <i>RUNX2</i> ).....	55
3.2.2.2.4	Alkalische Phosphatase ( <i>ALPL</i> ).....	60
3.3	Neurogene Differenzierung dentaler Primärkulturen.....	66
3.3.1	Morphologie und Proliferationsverhalten, Einfluss der Mediumkomponenten.....	66
3.3.1.1	Dentale Primärzellen DZB-202p5.....	66
3.3.1.1.1	Reaktion auf neurogenes Differenzierungsmedium.....	67
3.3.1.1.2	Einfluss der Mediumkomponenten.....	69
3.3.1.2	Dentale Primärzellen DZB-403p5.....	73
3.3.1.2.1	Reaktion auf neurogenes Differenzierungsmedium.....	73
3.3.1.2.2	Reaktion bei Zusatz osteogener Differenzierungskomponenten ..	75
3.3.1.3	Dentale Primärzellen DZB-404p7.....	78
3.3.1.3.1	Reaktion auf „neurogenen Shift“ von 5 Tagen.....	78
3.3.1.4	Dentale Primärzellen DZB-404p5.....	80
3.3.1.4.1	Reaktion auf „neurogenen Shift“ von vier Tagen.....	80
3.3.1.5	Gesamtdarstellung der Proliferation in unterschiedlichen Medien.....	83
3.3.2	Genexpression, Einfluss der Mediumkomponenten.....	84
3.3.2.1	Dentale Primärkultur DZB-403p5.....	84
3.3.2.1.1	Neurofilament-H ( <i>NEFH</i> ).....	85

3.3.2.1.2	Neurofilament-L ( <i>NEFL</i> ).....	86
3.3.2.1.3	Myelin Basic Protein ( <i>MBP</i> ).....	86
3.3.2.2	Dentale Primärkultur DZB-404p5 .....	87
3.3.2.2.1	Genexpression von Neuromarkern .....	88
3.3.2.2.2	Genexpression von Osteomarkern .....	90
3.4	Subpopulationen und Einzelzellen aus dentalen Primärkulturen.....	93
3.4.1	Granularität und Größe der Zellen aus Subpopulationen.....	93
3.4.1.1	Dentale Primärzellen DZB-201p8 .....	93
3.4.1.2	Dentale Primärzellen DZB-202p8 .....	96
3.4.2	Analyse von Subpopulationen P1 und P2 der Primärkulturen.....	98
3.4.2.1	Oberflächenproteine der dentalen Primärzellen DZB-201 .....	99
3.4.2.2	Oberflächenproteine der dentalen Primärzellen DZB-202 .....	102
3.4.3	Vereinzelung aus Mischpopulationen.....	104
3.4.4	Proliferationsuntersuchung der vereinzelt Primärkulturen .....	105
3.4.4.1	Einzelzellen aus der dentalen Primärkultur DZB-201p8.....	105
3.4.4.2	Einzelzellen aus der dentalen Primärkultur DZB-202p8.....	106
3.4.5	Selektion CD13-markierter Zellen aus DZB-201p8 .....	107
3.4.6	Charakterisierung der Klone .....	109
3.4.6.1	Oberflächenproteine eines Klons (FACS-Untersuchung) .....	109
3.4.6.2	Osteogene Differenzierung der Klone .....	110
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>115</b>
4.1	Archivierung der Zahngewebe (Datenbank).....	115
4.2	Osteogene Differenzierung dentaler Primärkulturen .....	116
4.3	Neurogene Differenzierung dentaler Primärkulturen .....	124
4.4	Subpopulationen und Einzelzellen dentaler Primärkulturen.....	128
4.5	Schlussbetrachtung .....	134
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>135</b>

---

## **Anhang**

Abkürzungsverzeichnis.....	i
Tabellenverzeichnis.....	iv
Abbildungsverzeichnis.....	v

## **Danksagung**

## **Erklärung**

## Zusammenfassung

Zahngewebe enthält adulte Stamm- bzw. Vorläuferzellen, welche zunehmend Bedeutung gewinnen in der biologischen und medizinischen Forschung, sowie neue Therapieansätze ermöglichen. Ziel dieser Arbeit war eine Charakterisierung der isolierten dentalen Zellen mit Hilfe unterschiedlicher experimenteller Ansätze, um eine Einschätzung der Potenz hinsichtlich ihres Proliferations- und Differenzierungsvermögens vorzunehmen.

Aus dem apikalen Weichgewebe nicht-eruptierter menschlicher Weisheitszähne wurden primäre Zellkulturen angelegt und unter definierten Kulturbedingungen expandiert. Eine Einordnung der Potenz dieser Primärzellkulturen erfolgte über die Bewertung der osteogenen und neurogenen Differenzierbarkeit. Die Untersuchungen wurden sowohl an Primärzellkulturen als auch an deren abgeleiteten Subpopulationen vorgenommen. Der Zustand der kultivierten Zellen und der Prozess ihrer Differenzierung wurden über eine qualitative und quantitative Bestimmung von Markern erfasst. Die Bestimmung der Marker erfolgte auf mRNA- und Proteinebene und ermöglichte es, die unterschiedlichen Kulturen zu beurteilen.

Bei osteogenem Stimulus reagierten die verschiedenen dentalen Primärzellkulturen mit jeweils unterschiedlich stark ausgeprägten Kalzifizierungen. Sie zeigten zudem eine hohe Variabilität und Diversität bei der Expression einiger Markergene. Die Expression von Bonesialoprotein und Osteokalzin wurde nur schwach reguliert und eignete sich nicht zur Darstellung des Differenzierungsverlaufes. Eine signifikante Korrelation konnte zwischen der Expression von alkalischer Phosphatase und dem Kalzifizierungsvermögen der jeweiligen Primärkultur festgestellt werden. Bereits vor der Durchführung der osteogenen Differenzierung ist somit eine Potenzeinschätzung des Kalzifizierungsvermögens einzelner dentaler Primärzellkulturen möglich.

Nach neurogenem Stimulus zeigten die dentalen Zellen erhöhte Expressionswerte für neurogene Markergene. Die Zellen reagierten mit morphologischen Veränderungen und bei längerem Kulturverlauf mit Zellsterben.

Die Selektion und Charakterisierung von Subpopulationen unterschiedlicher Granularität und Größe zeigte bei den Zellen unterschiedliche Expressionen einiger Oberflächenproteine. Die



Kultivierung dieser Zellen führte nur aus einer der beiden Subpopulationen zu Proliferation und bestätigte somit die gefundenen Unterschiede in der Expression.

Bei der Vereinzlung der dentalen Mischpopulationen konnten Zellen nachgewiesen werden, die als Einzelzelle ohne das Umfeld anderer Zellen überlebten. Einige waren zudem in der Lage zu proliferieren und Klone auszubilden.

Klone derselben Primärkultur kalzifizierten bei osteogener Differenzierung. Sie wiesen jeweils unterschiedliche Kalzifizierungsmuster auf, wobei die parallel differenzierten Zellen desselben Klons vergleichbare charakteristische Strukturen besaßen. Bei der Gegenüberstellung der Oberflächenproteine eines Klons mit denen der entsprechenden Mischpopulation konnten wiederum Unterschiede festgestellt werden. Die unterschiedliche Proliferationsleistung einzelner Zellklone kombiniert mit jeweils verschiedenartiger Kalzifizierung unterstreicht die variierende Potenz, die den einzelnen Zellen einer Mischpopulation zukommt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Techniken zur Isolation und Charakterisierung von Subpopulationen der Stamm- bzw. Vorläuferzellen eingesetzt. Damit konnte gezeigt werden, dass Zellkulturen aus Zahngewebe als Mischpopulationen zu verstehen sind. Erstmals wurden Einzelzellkulturen detailliert beschrieben. Inwieweit diese Zellen für therapeutische Anwendungen in Frage kommen, ist in weiteren Studien zu klären.

# 1 Einleitung

## 1.1 Biologischer Hintergrund

### 1.1.1 Adulte Stammzellen

Stammzellen sind Körperzellen, die noch nicht vollständig ausdifferenziert sind und sich somit in ihrer Entwicklung noch spezialisieren können. Im adulten Organismus wurden in vielen Geweben Stammzellen mit einem hohen Grad an Erneuerungs- oder Regenerationspotential nachgewiesen (Young, Black, Jr., 2004).

So wurden Stammzellen aus Knochenmark, Haut, Pankreas, Skelettmuskeln, Herz, dem zentralen Nervensystem und den Testis dokumentiert (Rickard et al., 1996; Toma et al., 2001; Jankowski et al., 2002; Quaini et al., 2002; Gage, 2000; Conrad et al., 2008). Desweiteren erfolgten Untersuchungen dentaler Gewebe (Gronthos et al., 2002; Miura et al., 2003; Kerkis et al., 2006; Ivanovski et al., 2006).

Adulte Stammzellen haben im Organismus die Aufgabe der Reparatur und Regeneration. Die menschliche Leber ist ein Beispiel für ein Gewebe, bei dem die Regenerationsmechanismen sehr stark ausgeprägt sind. Unter normalen Umständen besitzt die Leber bei einem großen Hepatocyten-Verlust die Möglichkeit, durch eine starke regenerative Antwort eine vollständige Wiederherstellung des hepatischen Zellverbandes zu erreichen (Taub, 2004).

Die adulten Stammzellen haben definierte Aufenthaltsorte mit definierten Bedingungen, die als Nischen bezeichnet werden. Das Umfeld einer Stammzelle ist so charakteristisch wie die Zelle selbst (Spradling et al., 2001; Watt, Hogan, 2000; Nishimura et al., 2002). Es ergibt sich eine gewebespezifische Situation mit den sogenannten Nischenfaktoren des lokalen Umfeldes, welches es den Stammzellen unter anderem ermöglicht, undifferenziert zu bleiben. Werden die Stammzellen im Organismus benötigt, können sie durch entsprechende Stimuli mobilisiert werden (FUCHS ET AL., 2004). Als Beispiel beschreibt Thesleff die epitheliale Stammzellnische bei Nagetierzähnen, welche ein kontinuierliches Wachstum der Incisivi ermöglicht (Thesleff et al., 2007). Auch die Freisetzung von Blutstammzellen aus dem Kno-

chenmark wie auch umgekehrt die Einnistung von Blutstammzellen in das Knochenmark, das sogenannte „Homing“, sind wichtige Vorgänge im Organismus und für Transplantationen eine wesentliche Voraussetzung (Whetton, Graham, 1999).

Unter definierten Kulturbedingungen *in vitro* lassen sich die adulten Stammzellen in verschiedene Gewebe differenzieren (Risbud, Shapiro, 2005; Tuan et al., 2003). Jedoch hat es sich als schwierig erwiesen, die aus ihren Nischen im Organismus isolierten adulten Stammzellen zu vermehren. Aufgrund der starken Veränderung des Umfeldes und der resultierenden Anpassungsleistung differenzieren sie leicht aus und verlieren dabei ihre Stammzeleigenschaften (Sherley, 2002).

Bei Transplantation adulter Stammzellen in Maus- oder Hühnerembryonen differenzieren sie in Gewebe aus allen drei Keimblättern (Bronner-Fraser et al., 1980; Clarke et al., 2000) und sind damit pluripotent (Pittenger et al., 1999; Martin-Rendon, Watt, 2003; Prockop, 2003).

Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass es sich bei der beobachteten Plastizität zuweilen auch um Artefakte handeln könnte (Raff, 2003; Raff, 2003; Wagers, Weissman, 2004). So wurde nachgewiesen, dass in Muskeln ansässige hämatopoetische Zellen als Muskelstammzellen fehlgedeutet wurden (Kinney-Freeman et al., 2002).

Eine weitere interessante Erkenntnis ist das Wirken von Stammzellen mancherorts allein durch ihre Anwesenheit. Dentale Pulpa-Zellen exprimieren neurotrophen Faktoren und sind ferner dazu befähigt, als Implantat die Regeneration verletzter Spinalnerven zu unterstützen (Nosrat et al., 2001).

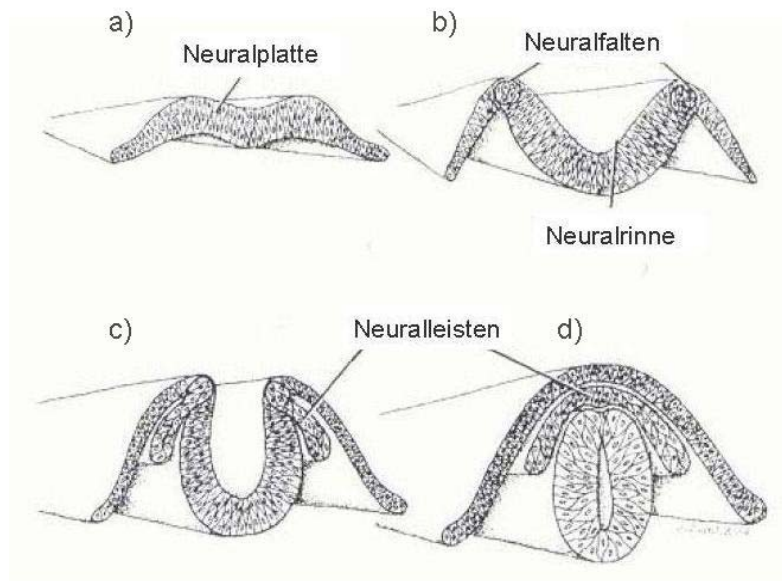
Zu dem Potential dentaler Zellen bleiben noch viele Fragen unbeantwortet. Im nächsten Kapitel wird der entwicklungsbiologische Kontext dieser Zellen dargestellt.

### **1.1.2 Ursprung der dentalen Zellen - die Neuralleiste**

Der Ursprung der dentalen Zellen liegt in der Neuralleiste, einer vorübergehenden Struktur in dem sich entwickelnden Embryo. Diese wurde von Wilhelm His 1868 erstmals bei bebrüteten Hühnereiern beschrieben und in seinen Zeichnungen „Zwischenstrang“ benannt (His, 1868). Die Neuralleisten sind charakteristisch für Vertebraten und verfügen über eine außergewöhnliche Differenzierungsfähigkeit. Die Stamm- oder Progenitor-Zellen der Neuralleisten wur-

den unter anderem im Darm, in Haarfollikeln und in der Haut nachgewiesen (Kruger et al., 2002; Sieber-Blum et al., 2004; Toma et al., 2001; Le Douarin, Kalcheim, 1999).

Während der Bildung des Neuralrohres löst sich eine Gruppe Zellen vom Neuroektoderm. Diese transiente Struktur der Neuralleisten ist bei der Entwicklung von Vogelembryonen gut erkennbar und mit der von menschlichen Embryonen vergleichbar.



**Abb. 1:** Entwicklung des Neuralrohres und der Neuralleisten beim Vogelembryo (verändert nach Avery, 2002).

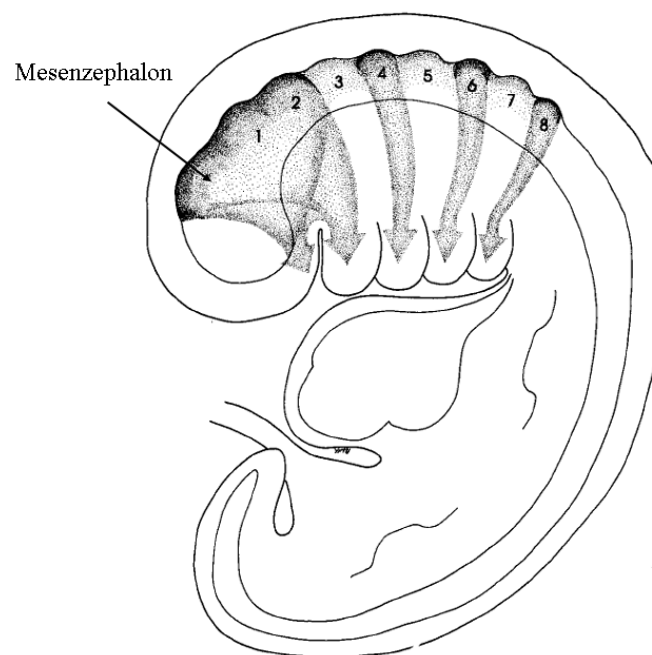
Die Bildung des Neuralrohres wird in der Abb. 1 mittels vier Einzelabbildungen gezeigt. Während der Neurulation bildet die Neuralplatte (1a) die Neuralfalten und die dazwischenliegende Neuralrinne aus (1b). An den Spitzen der Neuralfalten bilden sich die Neuralleistenzellen (1c). In der letzten Einzelabbildung (1d) sind die Neuralfalten wieder verbunden und die einstige Neuralrinne hat sich zum Neuralrohr ausgebildet. Die Neuralleistenzellen liegen zwischen diesen beiden Strukturen. Sie entstehen im Grenzbereich zwischen Ektoderm und Neuroektoderm und durchlaufen dabei eine sogenannte „Epithelial Mesenchymal Transsition“ (Duong, Erickson, 2004; Boyer et al., 2000).

Bei diesem Prozess ändern sich die zelladhäsiven Anteile und die Organisation des Cytoskeletts. Nur so ist es den Neuralleistenzellen möglich sich zu lösen und durch Migration von dem Neuralrohr zu entfernen (Nieto, 2001). Stemple und Anderson isolierten 1992 erste prä-migratorische Neuralleistenzellen aus Säugerzellen und kultivierten sie *in vitro* (Stemple, Anderson, 1992). Die Neuralleistenzellen zeichnen sich durch eine extreme Wanderungsakti-

vität aus und migrieren auf vorgegebenen spezifischen Routen (Bronner-Fraser, Stern, 1991). Die Spezifizierung der Neuralleistenzellen hängt vom Zeitpunkt der Migration und ihrer Herkunft ab. Schließlich bestimmen Signale aus dem Zielgewebe die endgültige Differenzierung der Neuralleistenzellen.

Kopfneuralleistenzellen sind grundlegend bei der craniofazialen Entwicklung der Vertebraten (Trainor, 2005; Nanci, 2007). Zellen der Neuralleiste wandern aus unterschiedlichen rostro-caudalen Regionen während verschiedener Stadien der Entwicklung wie auch auf unterschiedlichen Wanderwegen in den ersten Kiemenbogen ein.

Verschiedene Zellpopulationen erreichen hierbei definierte Bereiche im ersten Kiemenbogen (Nichols, 1981; Osumi-Yamashita et al., 1994; Imai et al., 1996). Die Migrationsrichtung der Neuralleistenzellen läßt sich in der Abb. 2 nachvollziehen:



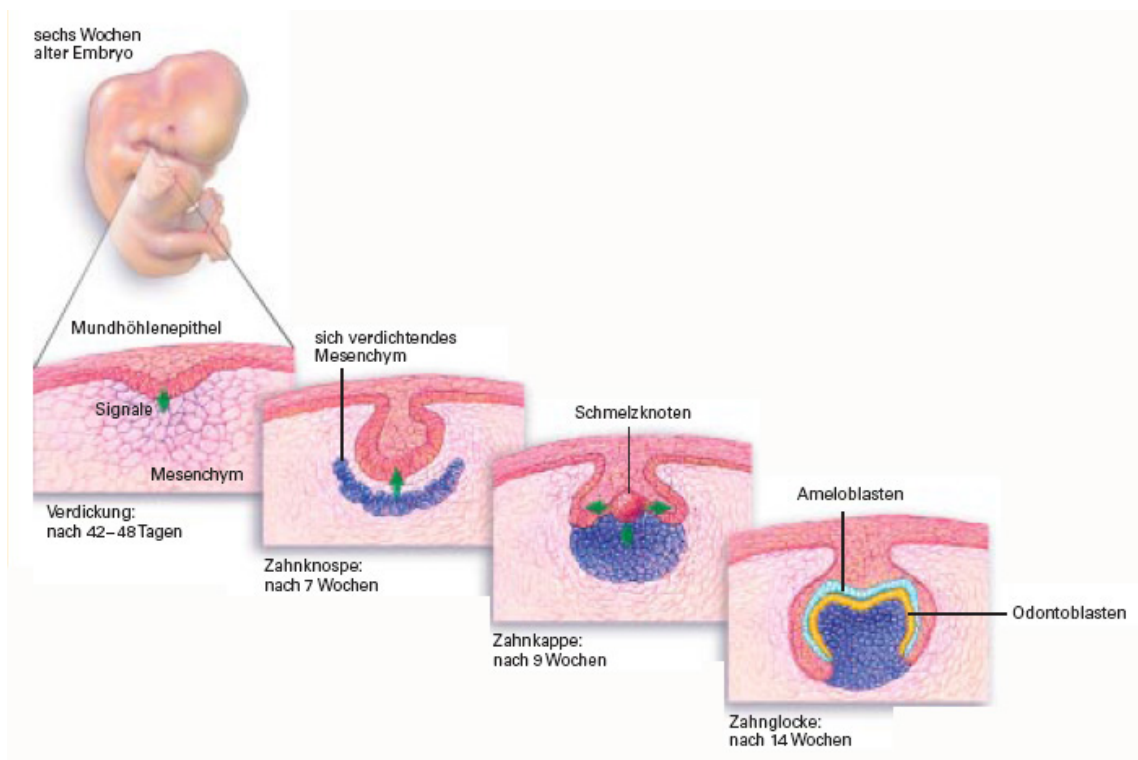
**Abb. 2:** Neuralleistenzellen migrieren in das sich entwickelnde Gesicht und in die Branchialbögen eines Embryos (verändert nach Nanci, 2007). Dem Mesenzephalon schließt sich das Rhombenzephalon mit acht deutlich erkennbaren Rhombomere an.

Neuralleistenzellen, die sich aus dem caudalen Mesenzephalon und den Rhombomere 1 und 2 ableiten (siehe Abb. 2), sind unter anderem für die Zahnentwicklung zuständig (Lumsden, 1988).

### 1.1.3 Zahnentwicklung

Die Entwicklung eines Säugetierzahnes (wie auch die Entwicklung anderer Organe) resultiert aus aufeinanderfolgenden epithelialen und mesenchymalen Interaktionen, beginnend in der frühen embryonalen Phase. Das macht die Odontogenese zu einem attraktiven Modell für Untersuchungen der Organentwicklung und Zelldifferenzierung im Allgemeinen. Die Odontogenese beginnt beim Menschen etwa in der sechsten Woche der Embryonalentwicklung.

Die definierten Stadien der embryonalen Zahnentwicklung werden in Abb. 3 schematisch dargestellt:



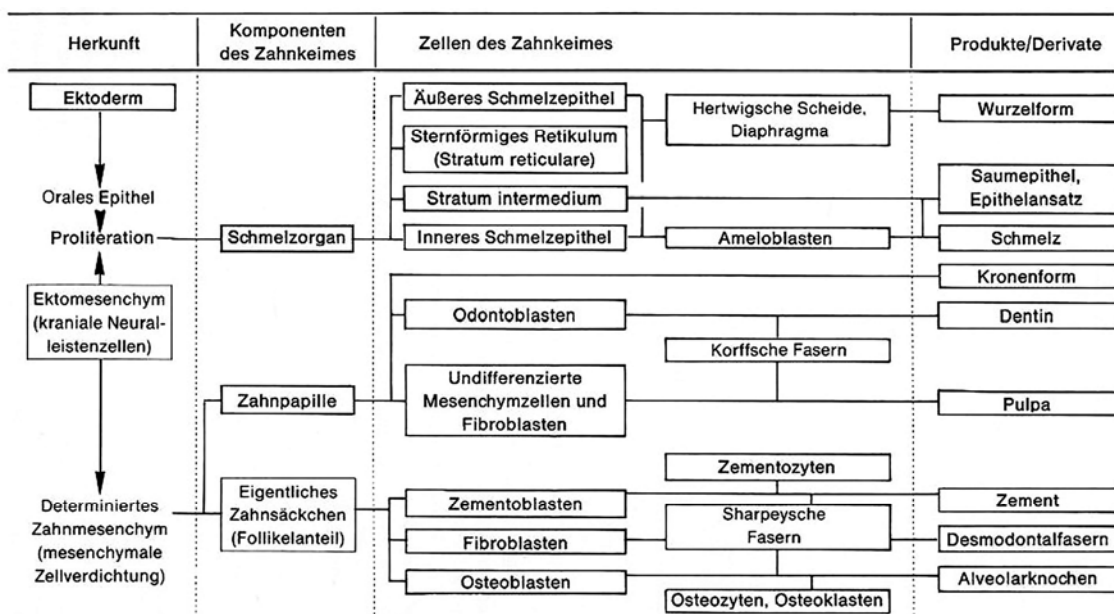
**Abb. 3:** Entwicklung des Zahnkeimes im Embryo (nach Sharpe, Young, 2006).

Der erste morphologische Hinweis für den Beginn der Zahnentwicklung ist eine Verdickung des oralen Epithels (MacKenzie et al., 1992; Vainio, Thesleff, 1992). Die darunterliegenden ektomesenchymalen Zellen (in Abb. 3 in blau dargestellt) verdichten sich an der entstehenden Zahnknospe. Das Epithel proliferiert und stülpt sich um die ektomesenchymalen Zellen. Im Kapfenstadium bildet sich an der Spitze der Epithelzellen der Schmelzknoten, ein vorübergehendes Zentrum der Signalstoffbildung (Jernvall et al., 1994; Thesleff, Jernvall, 1997). Das starke Wachstum der Epithelzellen um die kondensierten ektomesenchymalen Zellen der

Zahnpapille führt zu einem glockenförmigen Zahnkeim. An der Grenzfläche differenzieren die Epithelzellen zu Ameloblasten und die ektomesenchymalen Zellen zu Prä-Odontoblasten (Thesleff, Aberg, 1997; Ruch et al., 1995). Schließlich beginnen die Ameloblasten mit der Bildung von Zahnschmelz, die Odontoblasten sezernieren das Prädentin, welches sich durch Einlagerung von Kalk zu Dentin formiert.

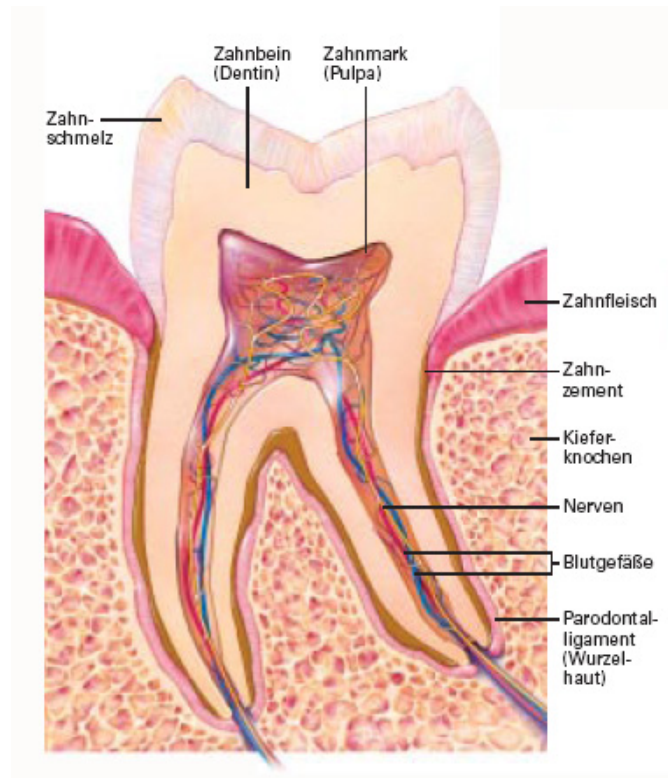
Die aufeinander abgestimmten Prozesse der Odontogenese werden durch den komplexen Austausch zahlreicher Signale realisiert. In diesem Netzwerk zeitlicher und räumlicher Expression von Signalstoffen der Zahnentwicklung konnte eine Vielzahl bereits identifiziert werden (Thesleff, Sharpe, 1997; Nosrat et al., 2002; Tucker, Sharpe, 2004).

In der folgenden Tabelle (Tab. 1) werden die einzelnen Gewebekomponenten der Zahnentwicklung dargestellt.



**Tab. 1:** Zellen und Gewebe des Zahnkeimes und ihre Produkte (nach Schroeder, 2000).

In obiger Tabelle sind die jeweilige Herkunft der Gewebekomponenten und die weitere Ausdifferenzierung mit den hieraus resultierenden Produkten bzw. Gewebederivaten dargestellt. Der Schmelz (Spalte *Produkte/Derivate*) ist ein Produkt der Ameloblasten, also der Zellen des inneren Schmelzepithels aus dem Schmelzorgan, mit der Herkunft „Ektoderm“. Dentin (Spalte *Produkte /Derivate*) ist ein Produkt der Odontoblasten, also der Zellen der Zahnpapille, und entstammt dem „determinierten Zahnmesenchym“. Im vollständig ausgebildeten Zahn (Abb. 4) lassen sich die ausgebildeten Gewebekomponenten erkennen:



**Abb. 4:** Vollständig ausgebildeter Zahn bei Mamalia (nach Sharpe, Young, 2006).

In Abb. 4 ist der generelle Aufbau eines Zahnes gezeigt. Der in einem Gebiss sichtbare Teil des Zahnes ist die Zahnkrone aus Zahnschmelz. Die Zahnkrone sitzt wie eine Kappe auf einer weiteren Hartsubstanz, dem Dentin. Das Zahnbein bzw. der Zahnkörper besteht aus Dentin. Im Inneren des Zahnes befindet sich die Zahnpulpa, ein Weichgewebe mit Blutgefäßen, Nervenzellen und extrazellulärer Matrix.

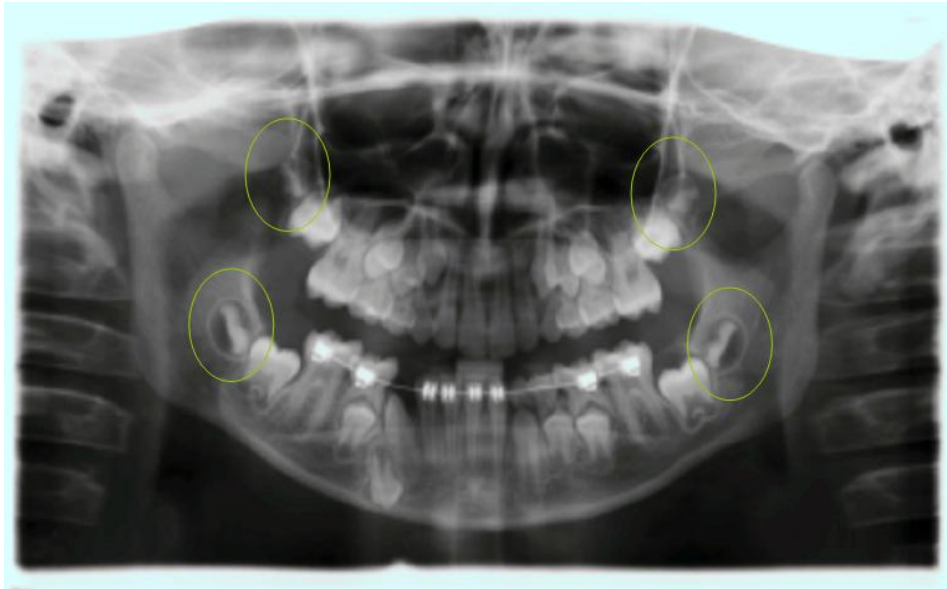
Das menschliche Gebiss setzt sich aus vier verschiedenen Zahnformen zusammen, deren definierte Positionen bereits im frühen Entwicklungsstadium feststehen (Tucker, Sharpe, 1999). Die Zahnformen Incisivi, Canini, Prämolaren und Molaren weisen entsprechend ihrer Funktion jeweils unterschiedliche Kronen und Wurzelformen auf und befinden sich an unterschiedlichen Positionen im Gebiss (Cobourne, Mitsiadis, 2006). Der Aufbau des Gebisses mit den unterschiedlichen Zahnpositionen wird in dem FDI-Schema (fr. Fédération Dentaire Internationale) dargestellt.

#### 1.1.4 Dentale Zellen aus Zahnkeimen des dritten Molaren

Die vollständige Entwicklung der dritten Molaren bzw. Weisheitszähne im menschlichen Gebiss erfolgt mit etwa 12 bis 19 Jahren (Demisch, Wartmann, 1956). Diese Besonderheit



der verzögerten Zahnentwicklung ermöglicht gezielte Untersuchungen der weiteren Ausdifferenzierung. In einer Röntgenaufnahme (Abb. 5) sind die Zahnkronen aus Zahnschmelz und die Zahnkörper aus Dentin deutlich erkennbar:



**Abb. 5:** Röntgenaufnahme eines jugendlichen Gebisses. Weisheitszähne grün eingekreist.

Die Röntgenaufnahme der Abb. 5 zeigt außerdem die Weisheitszähne während ihrer Entwicklung (grün eingekreist). Erkennbar sind die bereits vorliegenden Zahnkronen aus Zahnschmelz. Die Molaren des Unterkiefers sind bereits weiter entwickelt als die Molaren des Oberkiefers. Dieser Status der Zahnentwicklung, in dem noch keine Ansätze der Wurzelbildung aus Dentin vorliegen, wird von Kieferchirurgen als Stadium I definiert.

Die Weisheitszähne junger Menschen werden häufig aufgrund von Korrekturmaßnahmen der Zahnstellung operativ entfernt (Abb. 6). Die Zahngewebe sind daher gut zugänglich. Die Tatsache, dass es sich bei den Zahnkeimen um noch nicht ausdifferenzierte Organe handelt, legt das Vorhandensein pluripotenter Zellen und auch von Stammzellen sehr nahe.



**Abb. 6:** Foto eines soeben entnommenen Weisheitszahnes. Zur besseren Erkennbarkeit der verschiedenen Gewebekomponenten wurde der Weisheitszahn in der Mitte geteilt.

Dieses Foto der Abb. 6 zeigt einen soeben extrahierten Weisheitszahn im Stadium I. Durch die Teilung wird der innere Gewebeanteil der Zahnpapille sichtbar. Die Zahnpapille ist für die spätere Ausbildung der Pulpa und des Zahnbeins aus Dentin zuständig. Die weiße Hartsubstanz in der Mitte wird als Zahnschmelz bezeichnet und bildet die spätere Zahnkrone. Der Zahnkeim ist umgeben von dem sogenannten Zahnfollikel. Die verschiedenen Gewebekompartimente wurden anhand ihrer Genexpression charakterisiert (Schoenebeck et al., 2008).

## 1.2 Arbeitsziel

In der Arbeitsgruppe für „dentale Zellbiologie“ im Forschungsinstitut caesar Bonn, wurden Gewebe und deren Zellabkömmlinge aus dritten Molaren gesunder menschlicher Probanden *in vitro* untersucht.

Um eine strukturierte Ablage der anfallenden Daten zu gewährleisten, war es zunächst erforderlich eine Datenbank zu erstellen. Diese sollte insbesondere die Archivierung der Daten von Spendern der dentalen Gewebe gewährleisten, sowie die Abfragbarkeit der Kryopositionen resultierender Zellen ermöglichen.

Bei den Spendern handelt es sich um jugendliche Kandidaten, deren Weisheitszähne noch nicht vollständig ausdifferenziert sind.

Aufgrund dieser Tatsache konnte davon ausgegangen werden, dass Teile der isolierten Weichgewebe Zellen enthalten, die den Vorläufer- oder Stammzellen zuzuordnen sind.

Zunächst stellt sich die Frage, ob Zellen menschlicher dritter Molare *in vitro* kultiviert werden können und ob es sich hierbei um eine homogene oder eine gemischte Zellpopulation in Kultur handelt.

Um die Potenz dieser Zellkulturen in ihren entwicklungsbiologischen Kontext einordnen zu können und auf eine mögliche spätere Verwendbarkeit in der regenerativen Medizin zu überprüfen, sollte den beiden folgenden Fragen nachgegangen werden:

- Wie ist die Differenzierungsleistung hinsichtlich osteogener und neurogener Stimuli einzuschätzen?
- Gibt es Expressionsmarker die eine Differenzierung belegen oder gar eine frühzeitige Potenzeinschätzung des Differenzierungsvermögens einzelner Primärzellkulturen erlauben?

Um zu klären, ob die Wachstums- und Differenzierungsleistungen der Mischkultur auf die Beteiligung einzelner Subpopulationen bzw. Einzelzellen zurückzuführen sind, sollten folgende Versuche durchgeführt werden:

- Die Isolierung von Subpopulationen und Klonen und deren Charakterisierung.
- Testen von Differenzierungsleistungen dieser Subpopulationen.

Somit war es abschließend Ziel der Arbeit, auf der Grundlage der gewonnenen Daten das Potenzial isolierbarer Zellen aus Weisheitszahnkeimen einzuschätzen. Weiterhin sollten die ermittelten Markerprofile und Differenzierungsleistungen in den Kontext von Knochen- und Zahnentwicklung gestellt werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Archivierung der Zahngewebe (Datenbank)

Zur Erfassung der 464 dentalen Gewebeproben von 135 Patienten und den 1590 möglichen Kryopositionen in den Stickstofftanks wurde eine Datenbank in Microsoft Office Access 2003 (11.6566.8122 SP2) erstellt. Anhand dieser Datenbank mit dem Namen „DZB Zähne und Zellen“ lässt sich herausfinden, auf welcher Kryoposition die gesuchten Zellen zu lokalisieren sind. Es lassen sich Profile über die gespendeten Gewebe erstellen und gegebenenfalls statistische Auswertungen von Informationen anfertigen. Des Weiteren soll diese Datenbank eine ausbaufähige Grundlage für erhobene Daten aus Untersuchungen bieten. Große Datenmengen können dadurch auf verschiedene Parameter untersucht werden.

#### 2.1.1 Erhobene Daten

Die Arbeitsgruppe Dentale Zellbiologie (Forschungsinstitut caesar, Bonn) untersuchte das Gewebe von extrahierten Zähnen. Dabei handelte es sich ausschließlich um die dritten Molaren, die auf Grund von Fehlstellungen oder Behinderung anderer Zähne im meist jugendlichen Alter entfernt wurden.

Die Informationen über das vorliegende Untersuchungsmaterial, die Patientendaten, die weitere Behandlung des Untersuchungsmaterials und die Kryokonservierung von Zellen wurden in vier Bereiche gefasst und in Form von Tabellen notiert.

#### 2.1.2 Strukturierung der Tabellen

Die vier Tabellen wurden folgendermaßen definiert:

Tabelle 1 „DZBNummerZahn“:

Jedem im Labor entgegengenommene Zahngewebe, wurde eine Kennung zugewiesen. Entsprechend der Arbeitsgruppe bekam diese Kennung den Namen „DZB – Nummer“. Sie bildete den Bezugspunkt weiterer erhobener Daten und ist der Primärschlüssel der Tabelle. Die-

se Tabelle für das vorliegende Untersuchungsmaterial beinhaltet zudem eine Kennung für den Patienten, das Datum der Operation, die Zahnposition und der Entwicklungszustand des Zahnes (gemäß Abb. 7).

#### Tabelle 2 „Patientendaten“:

Zu den Zähnen wurden Erfassungsbögen mit der Einwilligung der Patienten geliefert. Auf diesen wurden die Kennung für den Patient (PatientID), die von der Zahnklinik vergeben wurde, Alter und Geschlecht vermerkt. In der Tabelle 2 bildete „PatientID“ der Zahnklinik den Primärschlüssel.

#### Tabelle 3 „Eingangsmaterial“:

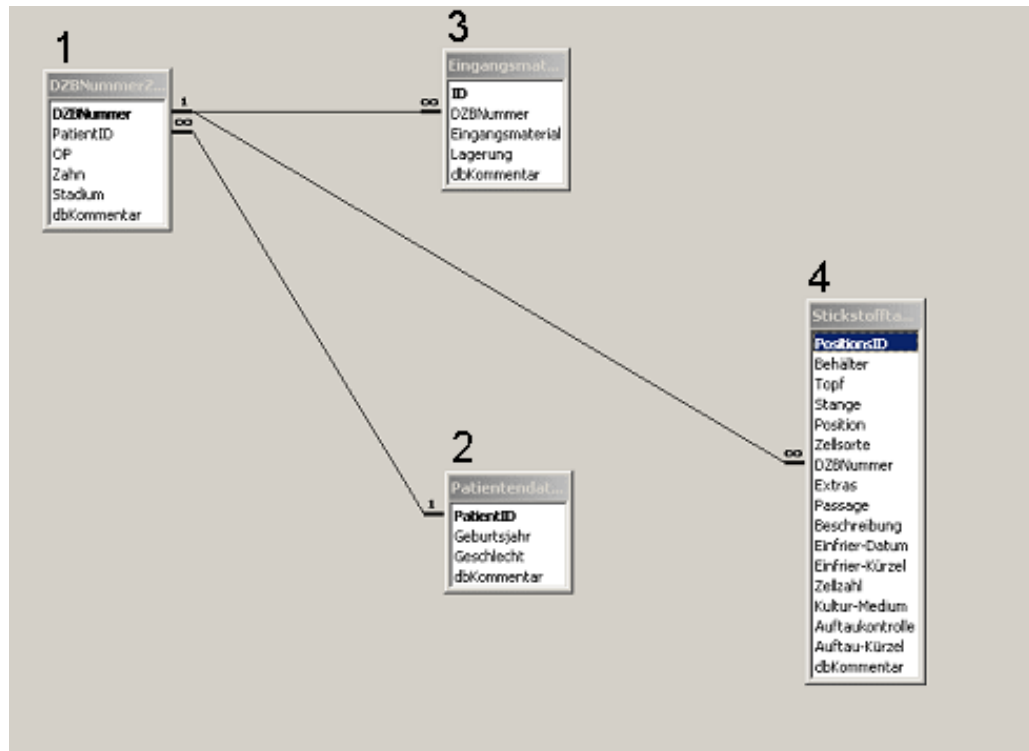
Hier wurde das weitere Vorgehen mit dem Zahngewebe vermerkt. Für verschiedene Gewebeanteile oder unterschiedliche Lagerung durch Medium für Zellkultur oder Formalin für histologische Schnitte gibt es eigene Datensätze. Da jeder Datensatz eindeutig identifizierbar sein muss, vergibt das Programm an dieser Stelle eine automatische ID. An dieser Stelle ist die Möglichkeit weiterer Verknüpfungen gegeben.

#### Tabelle 4 „Kryotanks“:

Zur praktischen Nutzung wurde in der Datenbank die Belegung des Stickstofftanks, in denen die Kryokonserven lagern, aufgenommen. Die drei Stickstofftanks bekommen für jede Kryoposition eine „Positions ID“. Damit kann jede Kryokonserven im Stickstofftank zugeordnet und wiedergefunden werden.

### **2.1.3 Organisation der Datenbank**

Die Eingabe der Daten erfolgte in Microsoft Excel-Tabellen, die anschließend in die Microsoft Access Datenbank importiert wurden. In der Datenbank wurden für die Tabellen die Feldeigenschaften und der Felddateityp festgelegt, welche auch bei Eingabe der Daten in die Excel-Tabelle berücksichtigt werden mussten. Wichtig ist hier die Anlage von eindeutigen Schlüsseln. Die vier Tabellen stehen in der Datenbank über die Primärschlüssel miteinander in Verbindung (Abb. 7):



**Abb. 7:** Organisation der Datenbank, Strukturierung der Daten in Tabellen.

Man erkennt, dass die Tabellen 3 und 4 die DZB-Nummer aus Tabelle 1 referenzieren. Das bedeutet, dass in der Tabelle 1 (DZBNummerZahn) nur jeweils eine DZB-Nummer vorliegt und Primärschlüssel ist. In den Tabellen 3 und 4 (Eingangsmaterial und Stickstofftank) können die DZB-Nummern hingegen beliebig oft ( $\infty$ ) vorliegen. Die Tabelle 1 hat außerdem eine Verknüpfung mit der Tabelle 2 über PatientID. Diese PatientID wurde von der Zahnklinik für jeden Patienten vergeben. In der Tabelle „Patientendaten“ ist die PatientID der Primärschlüssel. Dagegen ist in der Tabelle „DZBNummerZahn“ die PatientID ein Fremdschlüssel und kann beliebig oft auftreten, wenn z.B. einem Patient alle Weisheitszähne entfernt und dem Labor zur Verfügung gestellt wurden. Das wären dann die Zähne der Zahnpositionen 18, 28, 38 und 48, die jeweils eine eigene DZB-Nummer und die gleiche PatientID bekommen.

### 2.1.4 Datenbank–Abfragen

Um definierte, standardisierte Informationen über die Daten zu erhalten, wurden Abfragen programmiert. Bei Auswahlabfragen werden dem Nutzer Masken vorgegeben, in der die Fragestellungen konkretisiert werden.

## **2.2 Zelllinien**

In dieser Arbeit wurden Primärzellkulturen aus Patientenspenden angelegt und untersucht. Als Referenz wurden bei einigen Versuchen Zelllinien von anderen Arbeitsgruppen zur Verfügung gestellt bzw. hinzugekauft.

### **2.2.1 Primärkulturen aus Patientenspenden**

Von den aus humanen Zahnkeimen isolierten Zellen wurden Primärkulturen angelegt. Zusätzlich wurden von der Arbeitsgruppe Dentale Zellbiologie Primärzellen aus Knochenmark als Referenzzellen eingesetzt.

#### **2.2.1.1 Isolierung der Zellen aus Zahngewebe**

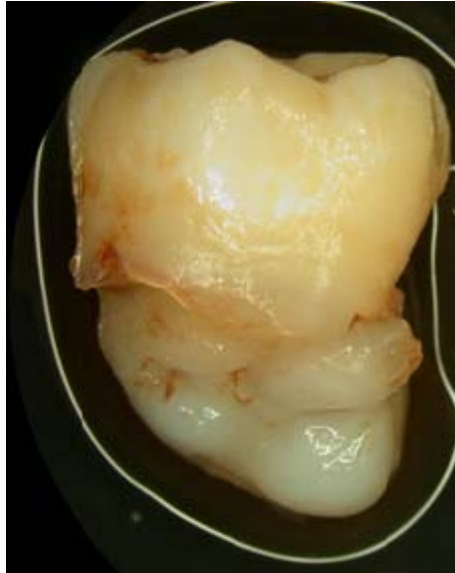
Die Zahngewebe wurden von Patienten der Zahnklinik Medeco (Bonn) gespendet. Alle Spender gaben diesbezüglich eine schriftliche Einverständniserklärung ab. In der Zahnklinik erfolgte die operative Entfernung der Weißheitszähne. Die extrahierten Zähne wurden dort direkt in ein Röhrchen mit Transportmedium (siehe Kap. 2.3.1 A) überführt und zur Aufarbeitung in das Labor der Dentalen Zellbiologie (Institut caesar, Bonn) gebracht. In der folgenden Tab. 2 sind die in dieser Arbeit verwendeten Gewebe mit den dazugehörigen Daten aufgelistet:



Tab. 2: Datenliste verwendeter dentaler Gewebe in dieser Arbeit.

DZB Nr.	OP	Patienten ID	Erfassungsb.	Gewebespende			Stadium	Lage Gewebe	Geburtsjahr	Geschlecht
				Lagerung	Zahnposition	Zahnposition				
83	14.04.2004	112031	vorhanden	Medium	28	II	apikal	1987	m	
153	14.07.2004	66888	vorhanden	Medium	18	I	apikal	1988	w	
171	21.07.2004	76695	vorhanden	Medium	48	I	apikal	1993	m	
175	21.07.2004	114214	vorhanden	Medium	48	I	apikal	1991	m	
178	06.10.2004	115156	vorhanden	Medium	18	II	apikal	1988	w	
182	13.10.2004	115708	vorhanden	Medium	18	I	apikal	1989	w	
198	27.10.2004	116028	vorhanden	Medium	18	I	apikal	1990	w	
201	27.10.2004	116028	vorhanden	Medium	48	I	apikal	1990	w	
202	27.10.2004	116620	vorhanden	Medium	18	I	apikal	1990	w	
226	17.11.2004	116163	vorhanden	Medium	28	II	apikal	1988	w	
242	26.01.2005	117796	vorhanden	Medium	38	I	apikal	1990	m	
243	16.02.2005	113593	vorhanden	Medium	48	II	apikal	1990	w	
403	29.06.2005	120549	vorhanden	Medium	38	I	komplett	1993	w	
404	29.06.2005	120549	vorhanden	Medium	48	I	komplett	1993	w	

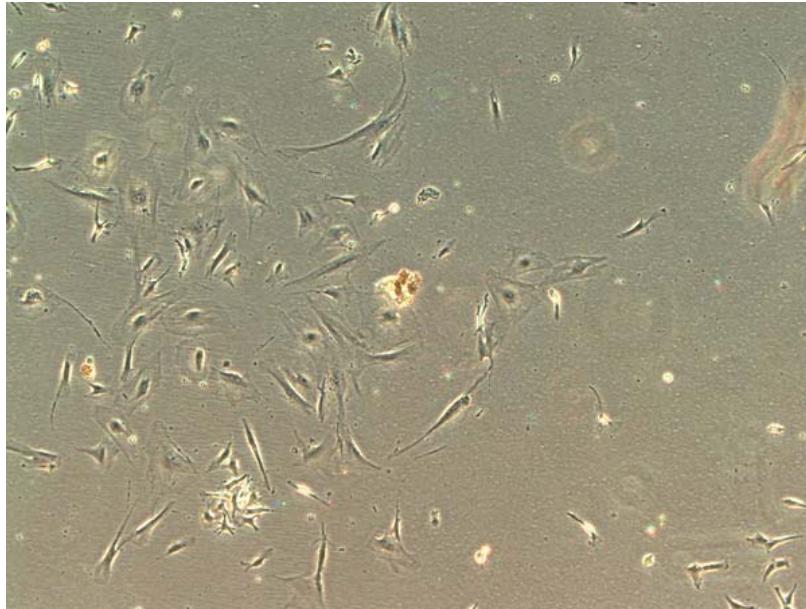
Im Labor erfolgte die Reinigung der Gewebe in sterilem Umfeld unter der Sterilbank mit PBS + 1% PenStrep. Der bereits gebildete harte Zahnanteil aus Schmelz und Dentin wurde entfernt. Das Foto der folgenden Abb. 8 zeigt einen humanen dritten Molar direkt nach der operativen Entfernung:



**Abb. 8:** Extrahierter humaner dritter Molar (Weisheitszahn) mit Zahnkrone aus Zahnschmelz und erster Dentinbildung. Der Wurzelapparat ist noch nicht vorhanden. Stattdessen liegt an dieser Stelle Weichgewebe vor, welches die weitere Entwicklung des Zahnes vollzogen hätte.

Von diesen weichen Gewebeanteilen wurde die Zahnpapille isoliert, mit einem Skalpell zerkleinert und in Collagenase Dispase- bzw. Hyaluronidase-Lösung überführt. Bei einer Inkubationszeit von 1,5 Stunden bei 37 °C wurde die extrazelluläre Matrix durch den enzymatischen Prozess gelockert. Während dieser Zeit wurden die Ansätze alle 20 Minuten gevortext. Anschließend wurde die Enzymlösung abzentrifugiert und die gelösten Zellen sowie die noch verbliebenen Gewebestückchen in einer T-25 Zellkulturflasche mit Standardmedium in Kultur genommen (siehe Zellkultivierung Kap. 2.3).

Nach einigen Tagen konnten auf der Grundfläche der Zellkulturflaschen adhärente Zellen beobachtet werden. Mit dem Mikroskop wurde bei 40-facher Vergrößerung das folgende Foto der Abb. 9 aufgenommen.



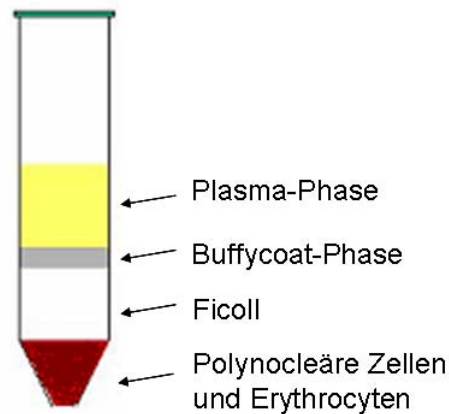
**Abb. 9:** Primärkultur aus Zahnzellen sechs Tage nach Isolierung aus dem Zahngewebe. Deutliche Unterschiede in der Morphologie der Zellen sind zu sehen.

Das Foto (Abb. 9) zeigt die Zellen sechs Tage nachdem sie aus dem Gewebe isoliert wurden. Diese morphologisch unterschiedlichen Zellen weisen auf eine heterogene Zellpopulation hin. Die Zellen sind über einen Zeitraum von etwa einem Monat proliferiert. Bei Erreichen der Konfluenz von etwa 90% wurden die Zellen passagiert und in zwei T-175 Zellkulturflaschen gesetzt. Wenn auch die Zellen in diesen beiden Flaschen zu einer Konfluenz von etwa 90% gelangten, wurden sie mit Trypsin gelöst und kryokonserviert (Kap. 2.3.3). Auf diese Weise wurde Zellmaterial von verschiedenen Patienten angelegt, welches für weitere Untersuchungen zur Verfügung stand.

### **2.2.1.2 Isolierung von Knochenmarkzellen**

Das Knochenmark wurde im Johanniter Unfallkrankenhaus (Bonn) operativ entnommen. Um eine Gerinnung zu vermeiden, wurde es bei der Entnahme direkt in Citrat-Röhrchen überführt und so in das Labor der Dentalen Zellbiologie transportiert.

Jeweils 5mL Knochenmark wurden auf 10mL Ficoll geschichtet und für 25 Minuten bei 400g ohne Bremse bei Raumtemperatur zentrifugiert. Es ergaben sich definierte Phasen entsprechend folgender Darstellung in Abb. 10:



**Abb. 10:** Schema Ficollgradient nach Zentrifugation der Knochenmarkszellen.

Die obere Plasma-Phase wurde verworfen, die Buffycoat-Phase wurde mit PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und anschließend in Standard Kulturmedium mit 10% FCS in Multiterplatten mit sechs Wells kultiviert.

Die Kultivierung dieser Zellen wurde bis zur starken Vermehrung von Kolonien mit kugligen Zellen fortgeführt. Diese Kolonien wurden sodann „gepickt“ und in zwei T-75 Zellkulturflaschen vermehrt, um sie anschließend bis zur Verwendung als Kryokonserven im Stickstofftank zu lagern.

### 2.2.2 Referenz-Zelllinien

Für den Vergleich der dentalen Zellen mit Zellen anderen Ursprungs dienten bei den Differenzierungen zum Teil Referenzzellen als negative wie auch als positive Kontrolle.

EU2A            Hautfibroblasten isoliert aus Patienten-Biopsien, Universitätsklinik Tübingen, Prof. Rodemann

hBMSC        humane Knochenmarkszellen (PT-2501 Lonza)

## 2.3 Zellkultivierung

Die verschiedenen Zelltypen wurden in entsprechenden Kulturmedien und Kulturgefäßen bei konstanter Temperatur von 37 °C und einem Kohlendioxidanteil von 5% im Brutschrank kultiviert.

### 2.3.1 Kulturmedien

Die Zusammensetzungen der unterschiedlichen Kulturmedien werden nachfolgend aufgeführt:

#### A) Transportmedium

96 mL	DMEM with Glucose 1g/L
1 mL	Penicillin-Streptomycin-Glutamin Mixtur
2 mL	HEPES 1M
1 mL	Amphoterecin

#### B) Standardmedium

89 mL	DMEM with Glucose 1g/L
10 mL	FCS
1 mL	Penicillin-Streptomycin-Glutamin Mixtur

#### C) Einfriermedium

69 mL	DMEM with Glucose 1g/L
20 mL	FCS
1 mL	Penicillin-Streptomycin-Glutamin Mixtur
10 mL	Dimethylsulfoxid (DMSO)

#### D) Osteogenes Differenzierungsmedium

	Standardmedium
+ 10 nM	Dexamethason
+ 10 mM	Glycerolphosphat
+ 50 µM	Ascorbinsäure

#### E) Neurobasalmedium

99 mL	Neurobasalmedium
+ 1 mL	Penicillin-Streptomycin-Glutamin Mixtur
+ 1:50	B 27
+ 40 ng/mL	bFGF
+ 20 ng/mL	EGF

**F) Neurogenes Differenzierungsmedium**

84 mL	DMEM
+ 15 mL	FCS
+ 1 mL	Penicillin-Streptomycin-Glutamin Mixtur
+ 10 $\mu$ M	Retinoic Acid
+ 0,5 mM	IBMX
+ 50 ng/mL	NGF
+ 20 ng/mL	bFGF
+ 1 mM	cAMP

**2.3.2 Passagieren der Zellen**

Zeigte sich bei den adhären wachsenden Zellen eine Konfluenz von etwa 90% des Kulturgefäßbodens, wurden die Zellen gelöst und mit einer geringeren Zelldichte (von etwa 5000 Zellen/mL) in einem neuen Kulturgefäß eingesetzt. Zur Lösung der Zellen vom Kulturgefäß wurden die Proteinverbindungen mit Trypsin EDTA (bzw. Accutase) enzymatisch gespalten. Dieser Prozess wurde durch Zugabe von FCS-haltigem Medium oder FCS-haltigem PBS gestoppt, die Zelldichte bestimmt (siehe Analysemethoden Zellzahlbestimmung, Kap. 2.6.1.1) und zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in der entsprechenden Menge frischem Kulturmedium aufgenommen und in ein neues Kulturgefäß überführt, oder die Zellen wurden kryokonserviert.

**2.3.3 Kryokonservierung**

Zellen, die nicht permanent in Gebrauch waren, wurden nach Standardverfahren (Lindl, 2002) eingefroren und konnten so gelagert werden. Bei Bedarf wurden sie wieder aufgetaut und erneut kultiviert.

Die Kryokonservierung erfolgte bei den adhären Zellen direkt nach dem Passagieren. Die Zellen wurden mit einer Dichte von mindestens  $4 \times 10^6$  Zellen/mL langsam in kaltes Einfriermedium überführt. Dem Einfriermedium (Kap. 2.3.1 C) wurde zur Verminderung der Eiskristallbildung Dimethylsulfoxid (DMSO) zugesetzt. So wurden die Zellen zu jeweils 1 mL Aliquots in Kryoröhrchen mit einem Mr-Frosty-Behälter in einem Gefrierschrank bei  $-80$  °C. Nach einem Tag erfolgte die Überführung in einen Stickstofftank (flüssiger Stickstoff, Temperatur von  $-196$  °C). Mit dieser schrittweisen Vorgehensweise der Zwischenlagerung wurde gewährleistet, dass die Temperatur nicht schneller als  $1$  °C/min sank und somit die Zellschädigung weitestgehend gering gehalten wurde.

Kryokonservierte Zellen wurden möglichst schnell aufgetaut und mit kaltem Medium (bzw. PBS mit 20% FCS) gewaschen. Die sich anschließende Zentrifugation der Zellsuspension führte zu einer Trennung von Zellen und DMSO. Somit konnte eine Schädigung der Zellen durch das Zellgift vermieden werden. Dann wurden die Zellen mit vorgewärmtem Medium zu einer Endkonzentration von ca.  $3 \times 10^5$  Zellen/mL in ein Kulturgefäß überführt.

### 2.3.4 Bestimmung zellspezifischer Parameter

Die Zellen wurden in Zellkultivierungsflaschen oder Mikrotiterplatten kultiviert. Für die Bestimmung und Vergleichbarkeit lassen sich folgende Parameter berechnen:

Zelldichte: 
$$x(t) = x_0 \cdot e^{\mu \cdot t}$$

Spezifische Wachstumsrate: 
$$\mu = \frac{1}{x} \cdot \frac{\Delta x}{\Delta t}$$

mit:	$\mu$	spezifische Wachstumsrate [ $d^{-1}$ ]
	$x$	Zellzahl, Zelldichte [Zellen /mL]
	$t$	Zeit [d]

## 2.4 Differenzierung der Zellen

Die Zellen der Zahnkeime bilden später das Dentin, die Knochen, die Nervenzellen, sowie das Stütz- und Bindegewebe. Um die Potenz der Zellen *in vitro* zu testen, wurden die Zellen in die folgenden zwei verschiedenen Richtungen differenziert: osteogen und neurogen.

### 2.4.1 Osteogene Differenzierung

Damit die Zellen zu knochenbildenden Zellen differenzieren wurden jeweils  $1 \times 10^4$  Zellen/Well in eine Multiwellplatte mit 24 Wells eingesetzt und in osteogenem Differenzierungsmedium kultiviert (Bruder et al., 1997). Der Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage. Bei Erreichen einer Konfluenz der Zellen von etwa 80% wurde für 21 Tage mit osteogenem Differenzierungsmedium kultiviert (siehe Kap. 2.3.1 D). Zum Abschluss der Differenzierung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für den qualitativen Kalziumnachweis

mit PFA fixiert (siehe Kap. 2.6.2.1). Für eine quantitative Aussage wurden die Zellen in 0,5M HCl gelöst. Im Weiteren folgte ein biochemischer Nachweis der Kalziummenge (siehe Kap. 2.6.2.2).

## 2.4.2 Neurogene Differenzierung

Zur Differenzierung der Zellen zu Nervenzellen, wurden sie gemäß dem Verfahren bei Nabelschnurblutzellen (Kogler et al., 2004; Degistirici et al., 2008) zunächst bis zum Erreichen einer hohen Konfluenz in T-Flaschen kultiviert. Nach Vereinzelung der Zellen aus dem Zellverband wurden sie mit einer Dichte von  $2 \times 10^4$  Zellen/mL in Neurobasalmedium (siehe Kap. 2.3.1 E) aufgenommen und in Multiwellplatten überführt. Durch die Verwendung von Kulturgefäßen für Suspensionskulturen konnten in diesem Schritt die Zelladhäsion an den Kulturgefäßen verringert und eine Spheroidbildung begünstigt werden. Bei erfolgter Spheroidbildung wurden die Zellen nach 4-7 Tagen abermals geerntet und vereinzelt. Anschließend erfolgte bei einer Zelldichte von  $5-10 \times 10^3$  Zellen/cm<sup>2</sup> in neurogenem Differenzierungsmedium die Überführung in PDL beschichtete Chamber Slides. Die Kultivierung in neurogenem Differenzierungsmedium verlief über 14 Tage. In diesem Zeitraum wurde alle 2-3 Tage das Medium gewechselt. Der Nachweis der neuronalen Stimulation erfolgte über die Immunocytochemie und Messungen der Genexpression.

## 2.5 Einzelzellkulturen

Aus den heterogenen Mischpopulationen der Primärkulturen wurden unter Anwendung unterschiedlicher Verfahren Einzelzellkulturen angelegt. Die jeweiligen Verfahren werden nachfolgend beschrieben.

### 2.5.1 Limiting Dilution

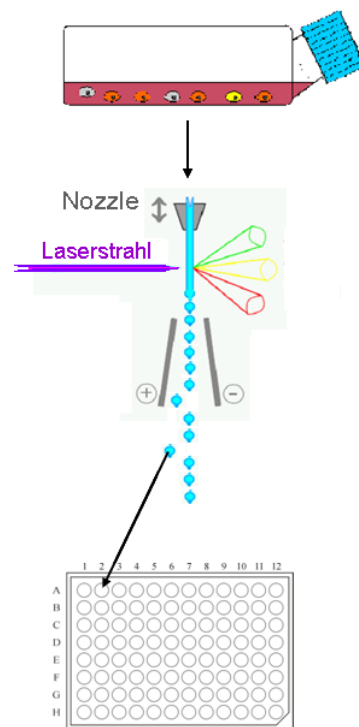
Mit einer Zellsuspension von berechneten 0,3 Zellen pro Well wurden 96-Well-Mikrotiterplatten befüllt. Es wurden 300 Wells mit je 200µL befüllt und so 100 Zellen verteilt. Nach acht und nach vierzehn Tagen wurden die adhärennten Zellen gezählt. Vor Erreichen der Konfluenz der Grundfläche von  $0,33 \text{ cm}^2$  des Wellbodens wurden sie passagiert und ihre



Kultivierung für weitere Untersuchungen in entsprechend größeren Kulturgefäßen fortgesetzt.

### 2.5.2 Einzelzellablage (FACS-Gerät)

Zur Herstellung von Einzelzellkulturen wurden mit einem FACS-Aria (s. Kap. 2.6.3) einzelne Zellen direkt in die Wells der Mikrotiterplatten gebracht. In der folgenden Abbildung wird dieses Verfahren schematisch dargestellt.



**Abb. 11:** Schematische Darstellung der Zellvereinzlung durch die Einzelablage des FACS-Gerätes.

Die Zellen aus der Kultur werden als Zellsuspension in das FACS-Gerät aufgenommen (Abb. 11) und in einen Flüssigkeitsstrom geleitet. Hier werden die Zellen vereinzelt und können so in der Messküvette detektiert werden. Zellen, die den eingestellten Parametern in Größe Granularität und Fluoreszenz entsprechen, werden aus dem feinen Flüssigkeitsstrom gezielt abgelenkt und in die vorbereitete Mikrotiterplatte gestrahlt (Kap. 2.6.3). Auch hier wurden die adhärennten Zellen nach acht und nach vierzehn Tagen gezählt. Vor Erreichen der Konfluenz wurden diese Zellen passagiert und in andere Kulturgefäße überführt.

## 2.6 Analysemethoden

Zur Untersuchung der Zellen und zum Nachweis der Differenzierungsleistungen der Zellen werden verschiedene Parameter gemessen.

### 2.6.1 Bestimmung der Zellzahl

Anhand der Zellzahl bzw. der Zelldichte einer Kultur kann das Proliferationsverhalten beobachtet werden, welches Hinweise auf den Zustand der Zellen gibt. Die Zellzahlen wurden durch verschiedene Methoden ermittelt.

#### 2.6.1.1 Trypanblau-Methode invasiv (Neubauer-Zählkammer)

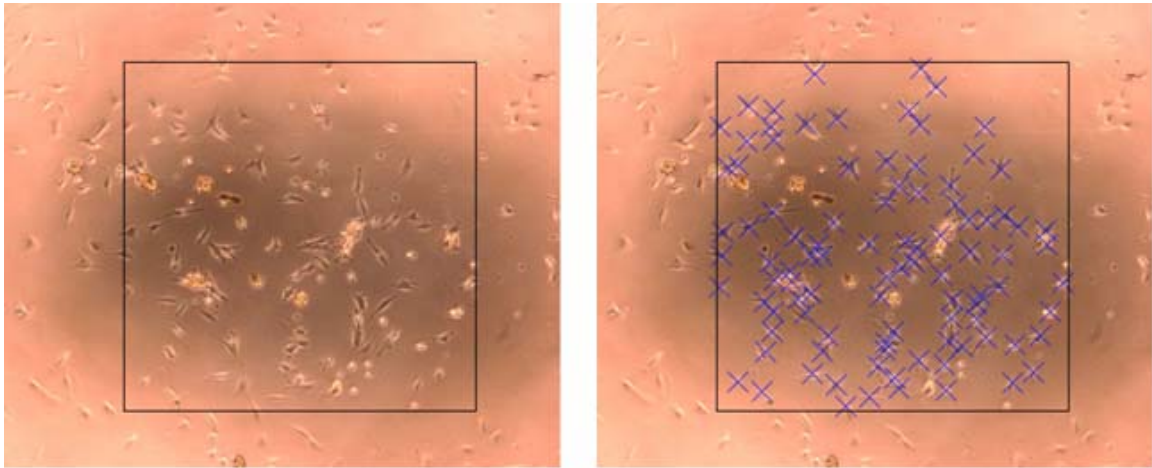
Die Bestimmung der Zellzahl mit der Trypanblau-Methode erfolgte mit einem Hämocytometer (Neubauer-Zählkammer) unter einem Lichtmikroskop (Lindl, 2002). Hieraus resultierte ein invasiver Eingriff, da die Zellen nach der Messung absterben und nicht weiter kultiviert werden konnten. Bei dem Hämocytometer handelt es sich um einen Objektträger mit eingeschliffener Gitterteilung und einem definierten Volumen unter dem Deckglas. Der Farbstoff kann bei toten Zellen durch die geschädigte Membran diffundieren und färbt diese intensiv blau. Die lebenden Zellen mit intakter Zellmembran bleiben ungefärbt. Durch Kapillarkräfte gelangt die Zellsuspension zwischen die beiden Glasflächen. Es handelt sich um einen Viabilitätstest, bei dem die Anzahl toter und lebendiger Zellen bestimmt werden kann (Tennant, 1964; Boiadjeva et al., 1984). Der Trypanblau-Farbstoff ist toxisch und infolgedessen kommt es nach einiger Zeit zur Zerstörung der intakten Zellen.

#### 2.6.1.2 Nicht invasive Bestimmung der Zellzahl

Für die Zellzählung während des Kulturverlaufes wurden die Zellkulturen mit einem Inversmikroskop bei 50-facher Vergrößerung fotografiert und beurteilt.

Zur Generierung mikroskopischer Fotos des kompletten Wells wurden mit dem Cellscreen Gerät (Brinkmann et al., 2002) in einem automatisierten Verfahren alle Wells einer Mikrotiterplatte systematisch fotografiert. Für die passgenaue Zusammensetzung dieser Fotos zu einem Gesamtbild wurde im Institut caesar ein eigenes Programm entwickelt. Die anschließende Auswertung der Gesamtbilder erfolgte mit dem Programm „Photoshop“ (Adobe Vers 6.0). Dieses Programm ermöglicht auf einer zusätzlichen Ebene die manuelle Markierung der erkennbaren Zellen mit einem Kreuz und deren Auszählung.

Bei der manuellen Mikroskopie der Chamber Slides wurde der mittlere Teil der Kammer fotografiert.



**Abb. 12:** Bestimmung der Zellzahl während des Kulturverlaufes mittels Auszählen der Zellen in definierten Bereichen der mikroskopischen Fotos.

Die Kammern der Chamber Slides verfügen über eine rechteckige Grundfläche von  $0,7 \text{ cm}^2$ . Da das Medium oberhalb der adhärennten Zellen einen Meniskus bildet, ließ sich an den Rändern keine Fokusebene finden. Lediglich in der Mitte, die sich als abgedunkelter Bereich zeigte, ließen sich die Zellen fokussieren. Diese Fotos wurden ebenfalls mit dem Programm Photoshop ausgewertet. Auf einer extra Ebene wurde den Fotos um den abgedunkelten Bereich der Kammermitte ein  $1 \times 1 \text{ mm}$  großer Rahmen gesetzt und alle Zellen innerhalb ausgezählt. Die Zellkulturen wurden mehrmals während des Kulturverlaufes fotografiert und somit der Proliferationsverlauf dokumentiert.

Bei den Fotos im Ergebnisteil wurde für eine günstigere Darstellungsform mit dem Programm „Photoshop“ die Farbtonsättigung auf schwarz/weiß heruntergeregelt und mit einem Hochpassfilter bearbeitet.

### 2.6.2 Kalziumnachweis

Das Kalzium dient vor allem bei der osteogenen Differenzierung als Nachweis für die Veränderung der Zellen. Der Nachweis erfolgte mit einem qualitativen Farbnachweis und einem quantitativen biochemischem Nachweis.

### 2.6.2.1 Qualitativer Nachweis

Alizarinrot lagert sich direkt an das Kalzium und erlaubt so mit einer deutlichen Rotfärbung eine schnelle Beurteilung von Anreicherung und Aggregation des Kalziums.

Die Zellen wurden hierfür mit 4% -igem Paraformaldehyd fixiert und der Zellrasen mit der angesetzten Alizarinrot Lösung überschichtet. Nach etwa 5 Minuten wurden die Zellen gründlich gewaschen, für zwei Minuten mit 80%-iger Ethanol fixiert und abschließend mit destilliertem Wasser überschichtet.

### 2.6.2.2 Quantitativer Nachweis

Die „Randox Calcium Colorimetric Method“ mit dem RAND OX Kit® ist ein biochemischer Nachweis mit dem die Kalziumkonzentration anhand der optischen Dichte bestimmt wird.

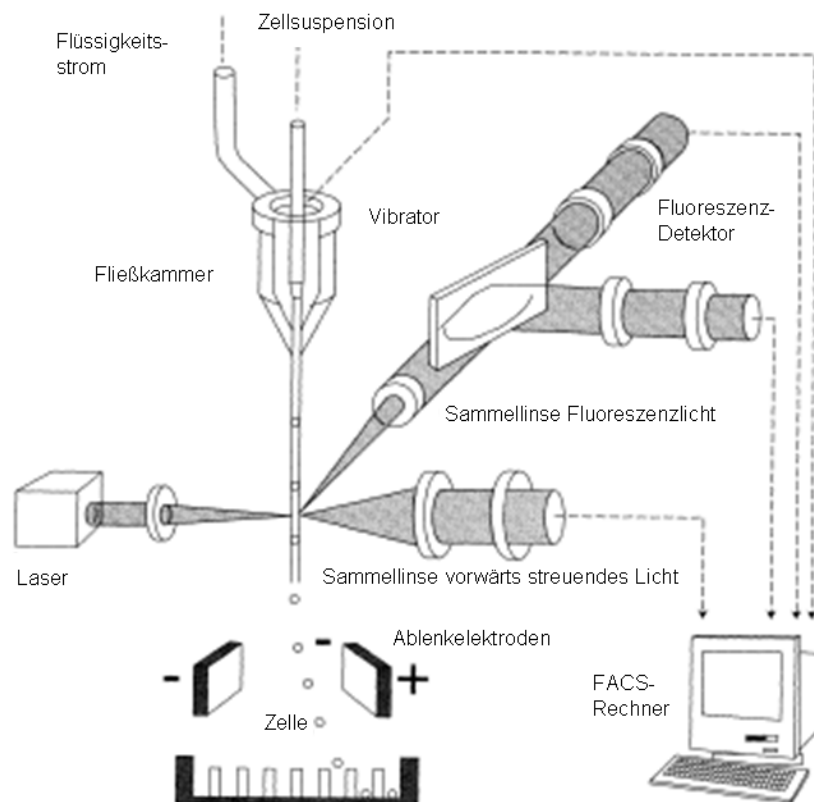
Dazu wurde der zu untersuchende Zellrasen jeweils in 0,5 M HCl gelöst und für 12 Stunden auf einem Thermoschüttler bei 4 °C geschüttelt. Entsprechend den Anweisungen des Herstellers wurde vorerst mit Reagenz X und Reagenz Y ein Substrat-Reagenz gebildet und in diesem durch verschiedene Konzentrationsstufen des Kalziumstandard-Reagenz eine Eichgerade erstellt. Von den zu messenden Proben wurden jeweils 10 µL zusammen mit 190 µL Randox Substrat in eine 96 Well Platte pipettiert und mit einem ELISA-Reader die Absorption bei 590 nm gemessen. Anhand der Eichgerade konnte die optische Dichte einer Probe der jeweiligen Kalziumkonzentration zugeordnet werden.

## 2.6.3 Durchflusszytometrie (FACS-Gerät)

### 2.6.3.1 Messprinzip und Grundausstattung

Eine weitere Form der Charakterisierung wurde mit Hilfe eines FACS-Aria Gerätes (Fluorescence Activated Cell Sorting) vorgenommen. Mit dem Verfahren der Durchflusszytometrie können Partikel in Suspension quantitativ und statistisch vermessen werden. Ein im Laserstrahl erfasster Partikel verursacht Beugung und Reflexion, welche detektiert wird und eine Aussage über Granularität und Größe des Partikels erlaubt. Anhand des Vorwärtsstreulichtes (FSC = Forward Scatter ) kann über die Beugung des Lichtes die Zellgröße und anhand des Seitwärtsstreulichtes (SSC = Side Scatter) über die Brechung des Lichtes ein Maß für die Granularität ermittelt werden. Zudem besteht die Möglichkeit, Fluoreszenzen zu detektieren.

Die zu untersuchenden adhärennten Zellen sind z.T. größer als 15  $\mu\text{m}$ . Aus diesem Grund wurde für die Messungen eine 100 $\mu\text{m}$  Düse (Nozzle) eingesetzt und bei einem Flüssigkeitsdruck von 20 psi (290 bar) gearbeitet. In dem Flüssigkeitsstrahl werden die Zellen vereinzelt und durch die Meßküvette geleitet (siehe Abb. 13).



**Abb. 13:** Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers (nach Lindl, 2002).

In dieser schematischen Darstellung der Abb. 13 wird die Stelle der Messung deutlich, an welcher der Laser auf den Flüssigkeitsstrahl trifft. Über die Detektoren werden die auftretenden Signale für Licht und Fluoreszenz verstärkt, im Computer verrechnet und auf dem Bildschirm dargestellt.

### 2.6.3.2 Charakterisierung der Zellen

Eine spezifische Charakterisierung der Zellen wird durch eine gezielte Markierung von Oberflächenproteinen bzw. Oberflächenantigenen oder auch intrazellulären Proteinen mittels Antikörpern möglich. Die eingesetzten Antikörper sind entweder direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt oder wurden mit Sekundäntikörpern detektiert, die mit einem Fluores-

zenzfarbstoff gekoppelt sind. Als Referenz wurden Isotypenkontrollen gemessen. Diese zeigen die Fluoreszenz aufgrund unspezifischen Bindevhaltens der Antikörper und sind somit von der Gesamt-Fluoreszenz abgezogen worden.

Bislang konnte kein einzelnes Protein ausfindig gemacht werden, welches ausschließlich spezifisch bei Vorläufer- oder Stammzellen in dentalem Gewebe vorliegt. Daher erfolgte eine Testung mit einem Panel von Antikörpern, die in ihrer Kombination die zu untersuchende Zellpopulation charakterisierte. Durch die Verwendung verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe waren Mehrfachmarkierungen an Zellen möglich. Die Laser in Verbindung mit optischen Filtersystemen führen zu unterschiedlichen Anregungswellenlängen und erlauben so die Detektion verschiedener Antikörper auf einer Zelle. Bei allen Messungen mit Mehrfachfärbungen wurde eine Kompensation vorgenommen, um eine Zuordnung der emittierten Fluoreszenzen bei überschneidenden Bereichen zu gewährleisten.

Die detektierten Fluoreszenzwerte werden in einem Multiplier in elektrische Werte umgewandelt und graphisch dargestellt. Die Verstärkung der Lichtsignale an den verschiedenen Photomultiplier wurde für jeden Messdurchgang an die Intensität der jeweiligen Fluoreszenz angepasst. Bei der Messung der dentalen Zellen entsteht ein hohes Maß an Streulicht, so dass die Spannung für den Forwardscatter (Streulicht) für die hier vorliegenden Messungen auf 0 Volt voreingestellt wurde.

Die verwendeten Antikörper zur Charakterisierung der Zelloberflächenproteine sind in Kap. 2.7 Tab. 3 aufgelistet.

### **2.6.3.3 Sortierung der Zellen**

Optional wurden per Durchflusszytometrie fluoreszenzmarkierte und unmarkierte Zellen selektiv sortiert. Das wird möglich, indem der Flüssigkeitsstrahl mit den vereinzelt Zellen durch Schwingungen der Nozzle mit 30 000 Hz zur Tropfenbildung veranlasst wird. Dieser feine Strahl aus Tropfen fällt durch Ablenkelektroden ( $U = 6000 \text{ V}$ ), die im berechneten Moment den Tropfen mit der gewählte Zelle durch einen Impuls ablenken, so dass er in einem gesonderten Auffangbehälter gesammelt wird. Für diese Berechnung musste mithilfe von Calibrier Beats die Zeitspanne bis zum Tropfenabriss (Drop Delay) für jeden Messdurchgang bestimmt werden. Mit einer optischen Kontrolle wird die Einstellung mit 100% iger Ablenkung der Beats ermittelt. Für die Klon- Analysen wurden auf diesem Wege einzelne Zellen direkt in eine 96-Well Platte abgelegt.

### 2.6.4 mRNA-Analyse

Die Untersuchung der mRNA Expression ermöglicht eine Charakterisierung der Zellen und die Darstellung von Unterschieden bei Zelldifferenzierungen.

#### 2.6.4.1 RNA Isolation und cDNA-Synthese

Zur Isolation von gesamt-RNA wurden Zellkulturen aus 24-Well Mikrotiterplatten kurz mit PBS gespült und anschließend durch mehrmaliges Spülen in 1ml Qiazol Lysis Reagent® aufgenommen. Anschließend wurden die Proben in einem Qiagen TissueLyser® mit rostfreien Stahlkugeln für 5 bis 10 Minuten bei 25 Hz bis zur Homogenisierung der Zellen geschüttelt. Nach kurzer Inkubationszeit von drei Minuten bei Raumtemperatur wurden 200 µL Chloroform zugegeben und die Suspension erneut durchmischt. Die gelöste RNA wurde durch Zentrifugieren bei 12000g und 4 °C für 15 Minuten von der DNA und Zellresten getrennt. Die obere RNA-haltige Phase wurde abgenommen und mit gleichem Volumen 70% Ethanol/DEPC-Wasser versetzt. Es folgte eine ausgiebige Mischung der Ansätze und eine Aufreinigung mittels Qiagen Miniprep® Säulen nach Angaben des Herstellers. Die RNA-Konzentration der eluierten Proben wurden mit Hilfe von NanoDrop bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt.

Die anschließende cDNA-Synthese erfolgte entsprechend den Anweisungen von RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit®. Dabei wurde für einen einfachen Syntheseansatz der RNA-Eintrag auf jeweils 500 ng normiert.

#### 2.6.4.2 PCR (Polymerase Chain Reaction)

Zur Vermehrung der gesuchten cDNA Sequenzen werden diese gezielt durch Primer in einer PCR transkribiert.

Die PCR-Reaktionen (50µl- Ansätze) wurden in einem Eppendorf Mastercycler durchgeführt. Die Ansätze wurden entsprechend Taq PCR Master Mix Kit unter Zugabe von je 4 µl 5'- bzw. 3' Primern und der zuvor synthetisierten cDNA als Matrize zusammen pipettiert. Die PCR wurde gestartet mit einer initialen Denaturierung bei 95 °C für 15 min, gefolgt von 30s bei 95 °C, 30s Primeranlagerung (Annealing) bei 55 °C und anschließender Elongation von 1 min. bei 72 °C. Insgesamt wurden 35 Zyklen für die Amplifikation durchlaufen. Zur Stabilisierung der Amplifikate wurde eine 3 - minütige Elongationszeit nach dem letzten Zyklus eingehalten.

Als Nachweis wurden die Proben anschließend auf einem 1%-igen, Ethidiumbromid-haltigen Agarosegel elektrophoretisch bei 100 V ( $\Rightarrow$  100 mA) getrennt. Das Auftragen einer Referenzleiter diente zur Größenordnung der PCR-Banden. Als Referenz wurde zu allen Proben ein entsprechendes Amplifikat von Glycerinaldehyd-3-phosphat gebildet und aufgetragen. Die PCR-Produkte wurden schließlich mit Hilfe des Gel Doc 2000 Systems unter UV-Licht sichtbar gemacht und digitalisiert.

#### **2.6.4.3 Real-time PCR**

Der semi-quantitative Nachweis von PCR-Fragmenten (sqPCR) erfolgte mittels QuantiTect Primer Assays in einem DNA Engine Opticon Realtime Cycler mit SYBR Green Fluoreszenz-Detektion. Für die sqPCR wurde der 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix benutzt. Jeder PCR Reaktionsansatz wurde bei einem Gesamtvolumen von 40 $\mu$ L mit 5 $\mu$ l vorverdünnten QuantiTect Primer Assays (laut Angaben des Herstellers) durchgeführt.

Die Reaktion wurde durch eine 15-minütige Inkubation bei 95 °C zur Aktivierung der HotStarTaq DNA Polymerase gestartet. Die folgenden 39 Temperaturzyklen begannen jeweils mit 15 Sekunden bei 94 °C zur Trennung der Doppelstränge in Einzelstränge. Die anschließende Annealing-Temperatur betrug 55 °C für 30 Sekunden und die Verlängerungsphase erfolgte bei 72 °C für 30 Sekunden. Nach dem letzten Zyklus wurden alle Proben in definierten Temperaturschritten erhitzt, um so die exakten Schmelztemperaturen der vorliegenden, vermehrten DNA nachzuweisen. Ein Schwellenzyklus wurde determiniert, bei dem alle Amplifikate, sofern nachweisbar, in den Anfangsbereich der logarithmischen Amplifikation übergingen.

Durch Projektion des Schnittpunktes der Amplifikationskurve mit dem Schwellenzyklus auf die x-Achse wurde vom Rechner der sogenannte CT-Wert (threshold cycle) ermittelt. Durch nachfolgenden direkten Vergleich der CT-Werte mit denen des mitgeführten Housekeepers (GAPDH) konnte mit Hilfe der DDCT-Methode (Pfaffl, 2001) die relative Expressionsstärke der einzelnen Proben ermittelt werden.



## 2.7 Charakterisierung der Zelloberflächenproteine - Antikörper

Die Zelloberflächenproteine sind charakteristisch für die jeweiligen Zellpopulationen. Zur Untersuchung der Kombination exprimierten Oberflächenproteine dentaler Primärzellen, wurde diese jeweils mit einem Panel Antikörper (Tab. 3) markiert und mit dem FACS-Gerät gemessen:

Name	clone	Linked	Host	AK-Klasse
<b>CD 009</b>	M-L13	PE	mouse	IgG 1 κ
<b>CD 010</b>	HI10a	PE	mouse	IgG 1 κ
<b>CD 013</b>	WM15	APC	mouse	IgG 1 κ
<b>CD 014</b>	M5E2	APC	mouse	IgG 2a, κ
<b>CD 029</b>	MAR4	PE	mouse	IgG 1 κ
<b>CD 031</b>	WM -59	PE	mouse	IgG 1 κ
<b>CD 034</b>	581	FITC	mouse	IgG 1 κ
<b>CD 044</b>	G44-26	FITC	mouse	IgG 2b, κ
<b>CD 045</b>	HI30	APC	mouse	IgG 1 κ
<b>CD 049 b</b>	AK-7	FITC	mouse	IgG 1 κ
<b>CD 049 d</b>	9F10	PE	mouse	IgG 1 κ
<b>CD 049 e</b>	IIA1	PE	mouse	IgG 1 κ
<b>CD 051/CD 061</b>	23C6	FITC	mouse	IgG 1 κ
<b>CD 054</b>	HA58	APC	mouse	IgG 1 κ
<b>CD 056</b>	B159	APC	mouse	IgG 1 κ
<b>CD 073</b>	AD2	PE	mouse	IgG 1 κ
<b>CD 090</b>	5 E 10	FITC	mouse	IgG 1 κ
<b>CD 105</b>	SN6	FITC	mouse	IgG 1
<b>CD 106</b>	51-10C9	FITC	mouse	IgG 1 κ
<b>CD 117</b>	104D2	PE	mouse	IgG 1 κ
<b>CD 133</b>	AC133	PE	mouse	IgG1
<b>CD 140 a</b>	α R1	PE	mouse	IgG2a
<b>CD 140 b</b>	28 D4	PE	mouse	IgG2a κ
<b>CD 147</b>	HIM6	FITC	mouse	IgG 1 κ
<b>CD 166</b>	3A6	PE	mouse	IgG 1 κ
<b>Cytokeratin 14,15,16+19</b>	KA4	FITC	mouse	IgG 1 κ
<b>HLA-A,B,C</b>	G46-2.6	APC	mouse	IgG 1 κ
<b>HLA-DR</b>	TÜ36	APC	mouse	IgG 2b, κ
<b>CD 271</b>	ME20.4-1.H4	APC	mouse	IgG 1
<b>S100</b>	4C4.9	purified	mouse	IgG2a
<b>STRO-1</b>	STRO-1	purified	mouse	IgM

**Tab. 3:** Antikörper, Charakterisierung Zelloberflächenproteine (FACS-Gerät).

## 2.8 Untersuchung der Genexpression – Primer

Die mRNA Expression ist charakteristisch für jeweilige Zellpopulationen und auch für einige Differenzierungen der Zellen. Zur Untersuchung der Differenzierung wurde die Expressionsstärke mit folgenden Primern (Tab. 4) in einer semi quantitativen PCR gemessen:

<b>Primer</b>	<b>Protein</b>	<b>Amplifikationslänge [bp]</b>	<b>Accession Nr</b>
<b>BGLAP</b>	bone gamma carboxy glutamate proteine	90	NM_199173
<b>IBSP</b>	integrin binding bone sialoproteine	109	NM_004967
<b>ALPL</b>	alkaline phosphatase liver/bone/kidney	110	NM_000478
<b>RUNX2</b>	runt related transkription factor 2	101	NM_001015051
<b>NEFH</b>	neurofilament heavy polypeptide	97	NM_021076
<b>NEFL</b>	neurofilament light polypeptide	99	NM_006158
<b>MBP</b>	myelin basic protein	60	NM_001025081
<b>TUBB3</b>	tubulin, beta 3	78	NM_006086

**Tab. 4:** Primer zur Untersuchung der Genexpression (sq-PCR).

## 2.9 Material

### 2.9.1 Medien

DMEM 3.7 g l-1 NaHCO <sub>3</sub> , 1.0 g l-1 D-Glucose	Biochrom KG, Berlin
DMEM w/1,0g/l L-Glucose	Biochrom KG, Berlin
DMEM w/o L-Glutamin 500ml	Lonza (Belgien)
Neurobasalmedium	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe

### 2.9.2 Medienzusätze und Wachstumsfaktoren

Accutase	PAA, Cölbe
Amphotericin B	Sigma, Deisenhofen
B-27 Supplement	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
bFGF	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
BMP-2 human Recombinant	BioTrend, Köln
BMP-4	Sigma Aldrich, Taufkirchen
BMP-6 human Recombinant	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Collagenase / Dispase	Roche, Mannheim
Collagenase Hyaluronidase	CellSystems, St. Katharinen
Dibutyryl-cAMP	Sigma Aldrich, Taufkirchen
EGF	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
FCS fötales Kälber Serum	Biochrom KG, Berlin
Fibronectin, human Fibroblast	Merck, Darmstadt

Gamma Interferon human Recombinant,	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Goat Serum	Sigma Aldrich, Taufkirchen
IBMX	Merck Bioscience, Darmstadt
Laminin	Becton Dickenson, Heidelberg
L-Glutamin solution	Biochrom KG, Berlin
NGF $\beta$ protein	ABCAM, Cambridge (UK)
PDGF	Becton Dickenson, Heidelberg
Pen./Strep/L-Glutamin mixture	Lonza, Belgien
Penicillin 25,000 units / Streptomycin 25,000 $\mu$ g /	
L-Glutamin 29,2 mg/mL	
Poly-D-Lysin 20mg	Becton Dickenson, Heidelberg
TGF $\beta$ 1	Acris, Hiddenhausen
TGF $\beta$ 1 human Recombinant	Sigma Aldrich, Taufkirchen
TGF $\beta$ 3 human Recombinant	Sigma Aldrich, Taufkirchen
VEGF	Sigma Aldrich, Taufkirchen

### 2.9.3 Geräte und Gebrauchsmaterial

Cellscreen	Innovatis AG, Bielefeld
DNA Engine Opticon, Realtime Cycler	
m. SYBR Green Fluoreszenzdetektion	Rio Rad Laboratories, München
FACS-Aria	Becton Dickenson (USA)
Gel Doc 2000 Systems	Rio Rad Laboratories, München
Gewindeflaschen	Carl Roth Karlsruhe
Glaswaren	Schott, VWR international GmbH, Darmstadt
Heizblock	Stuart Scientific, Redhill, Surrey (UK)
Herafreeze HFU 486 (-80 oC)	Heraeus instruments, Langenselbold
Inkubator BBD-6220 (37 oC)	Heraeus instruments, Langenselbold
Kühlschrank +4 °C,	Liebherr, Ochsenhausen
Laminar flow hood (Bio-II-A)	Heraeus instruments, Langenselbold
Micro pipette (Reference)	Eppendorf, Hamburg
Microfuge galaxy mini	VWR international GmbH, Darmstadt
Mikroskop (Axiovert 200)	Zeiss AG, Oberkochen
Mikroskop (Eclipse TS-100)	Nikon, Düsseldorf
Mikroskop Kamera (DXM 1200)	Nikon, Düsseldorf
Multipette	Eppendorf, Hamburg
Multiplate reader (Fusion)	Packard Bioscience, Rodgau-Jügesheim
Nanodrop	Wilmington (USA)
PH-Meter (Sevенеasy)	Mettler Toledo, Giessen
Pipettensatz Eppendorf (Research)	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe	Integra, Wallisellen (Schweiz)
Qiagen Tissue Lyser	Qiagen, Hilden
SchüttlerVortex (Genie 2)	Scientific Industries, Bohemia, New York (USA)
Sterilwerkbank Zellkultur Herasafe KS12	Kendro Heraeus instruments, Langenselbold
Stickstoff Lagerbehälter	Kisker, Steinfurt
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Tiefkühlschrank -20 °C (1037 <i>comfort</i> )	Liebherr, Ochsenhausen
Vakuum pumpe system	Vaccubrand GmbH, Wertheim
Wasserbad (1083)	GFL, Burgwedel
Zählkammer, Neubauer	Brand GmbH, Wertheim
Zentrifuge (Megafuge 2.0 R)	Heraeus instruments, Langenselbold
Zentrifuge (Microfuge 22 R)	Beckmann Coulter, Krefeld

### 2.9.4 Chemikalien

1,2-Propandiol (99,5% z. Synthese)	Carl Roth, Karlsruhe
2-Propanol 99,5%	Carl Roth, Karlsruhe
5-Br-4-Cl-3-Ind-P, Di-Na	Roche Diagnostics, Mannheim
Accudrop Beads	Becton Dickenson, Heidelberg
Agarose	Serva, Heidelberg
Albumin Fraktion V	Carl Roth, Karlsruhe
Alizarinrot	Merck, Darmstadt
All-Trans-Retinoic Acid	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Ammoniumacetat	Carl Roth, Karlsruhe
Antikörper FACS (sieh Kap. 2.7)	Becton Dickenson, Heidelberg
BCA Protein ssay Kit	Merck, Darmstadt
BD Pharmingen™	Becton Dickenson, Heidelberg
cDNA Synthesis kit	Fermentas, Burlington (Kanada)
D(+)-Saccharose	Carl Roth, Karlsruhe
DEPC	biomol, Hamburg
Dexamethason (10-7)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Dextran Sulfat	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid p.A	Carl Roth, Karlsruhe
Di-Natriumhydrogenphosphat- Dihydrat	Carl Roth, Karlsruhe
Dntp Mix 2mM	Fermentas, St.Leon-Roth
Ethanol 70%, 96%, 99,8% p.A	Carl Roth, Karlsruhe
Ethylenglykol	Carl Roth, Karlsruhe
FACS Flow	Becton Dickenson, Heidelberg
Ficoll	Biochrom, KG Berlin
Formaldehyd min. 37%	Carl Roth, Karlsruhe
GeneRuler Ladder Mix	Fermentas, St.Leon-Roth
Glutardialdehyd	Carl Roth, Karlsruhe
Glycerin	Carl Roth, Karlsruhe
HEPES buffer	Biochrom KG Berlin
Hot Star Taq DNA-Polymerase	Qiagen, Hilden
Kaliumhydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe
Kalzium	Randox, Krefeld
Kalziumchlorid	Sigma, Deisenhofen
L-Ascorbinsäure 2-Phosphat 50µM	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Litiumchlorid	VWR International GmbH, Langenfeld
Magnesiumsulfate heptahydrate	Merck, Darmstadt
MOPS Puffer	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhypochloridlösung (12% Cl)	Carl Roth, Karlsruhe
Natronlauge 1Mol/L	Carl Roth, Karlsruhe
Nitroblautetrazoliumchlorid	Roche Diagnostics, Mannheim
Osteocalzin N-MID human ELISA	OSTEOmedical, Bünde
PBS w/o Mg <sup>2+</sup> , w/o Ca <sup>2+</sup>	Biochrom KG, Berlin
PCR Master Mix Kit	Qiagen, Hilden
PKH 26 Red Fluoreszez Kit	Sigma Aldrich, Taufkirchen
P-Nitrophenyl Phosphate Liquid Substrat	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Primer (s. Kap 2.8 Tab. 4)	Qiagen, Hilden
Proteinase K	Merck, Darmstadt
Qiazol Lysis Reagent	Qiagen, Hilden
Quanti Tect Primer Assays	Qiagen, Hilden
Quanti Tect Primer SYBR Green PCR Master Mix	Qiagen, Hilden

RevertAid cDNA Synthese Kit	Fermentas, St.Leon-Roth
RNase Inhibitor	Promega, Mannheim
Rotiphenol	Carl Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Sodim cacodylate	Merck, Darmstadt
$\beta$ -2 Glycerophosphat 10mM	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Tri-Natriumcitrat Dihydrat p.A	Carl Roth, Karlsruhe
Trypsin/EDTA Biochrom (0.04 % Trypsin, 0.5 mM EDTA-NaCl)	Biochrom KG, Berlin

### 2.9.5 Verbrauchsmaterial

Chamber Slides, Biocoat Laminin/PDL 8-well	Falcon®, Becton-Dickinson, Heidelberg
Combi Tipps	Eppendorf, Hamburg
Cryo röhren	Nunc , Germany
Cryoröhren	Carl Roth, Karlsruhe
Hybond Membran	Amersham Bioscience, Freiburg
Mikrotom Einweg klingen	medite GmbH, Burgdorf
Multipette Tipps	Eppendorf, Hamburg
Multi-well plates	Falcon®, Becton-Dickinson, Heidelberg
Multiwellplatten versch. Kavitäten	Nunc, Thermo Fisher Scientific, Langenselbold,
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Skalpel (Cutfix No. 10)	Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen
Spritzen (Plastipak)	Beckon-Dickinson, Heidelberg
Spritzen (steril 5, 10, 25ml)	VWR international GmbH, Darmstadt
Sterilfilter (Milliex GV 0.22 $\mu$ m)	Millipore, Molsheim, France
Zellkulturflaschen versch. Größen	Falcon®, Becton-Dickinson, Heidelberg
Zellschaber	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellschaber	Falcon®, Becton-Dickinson, Heidelberg
Zellsieb(70/100 $\mu$ m)	Falcon®, Becton-Dickinson, Heidelberg
Zentrifugenröhren	Eppendorf, Hamburg
Zentrifugenröhren (15/50ml)	VWR international GmbH, Darmstadt

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Archivierung der Zahngewebe (Datenbank)

Zur Erfassung der 464 dentalen Gewebeproben von 135 Patienten und den 1590 möglichen Kryopositionen in den Stickstofftanks wurde eine Datenbank angelegt (Kap. 2.1).

Anhand dieser Datenbank lässt sich herausfinden, auf welcher Kryoposition die gesuchten Zellen zu finden sind. Es lassen sich Profile über die gespendeten Gewebe erstellen und gegebenenfalls statistische Auswertungen von Informationen anfertigen. Des Weiteren soll diese Datenbank eine ausbaufähige Grundlage für erhobene Daten aus Untersuchungen bieten. Große Datenmengen können dadurch auf verschiedene Parameter untersucht werden.

Von den hauptsächlich genutzten Abfragen werden in diesem Ergebnisteil drei verschiedene Formen jeweils als Beispiel vorgestellt. Abschließend werden von dem letzten Beispiel Auswertungen der Daten des Patientenmaterials gezeigt.

#### 3.1.1 Abfrage mit direkter Auflistung

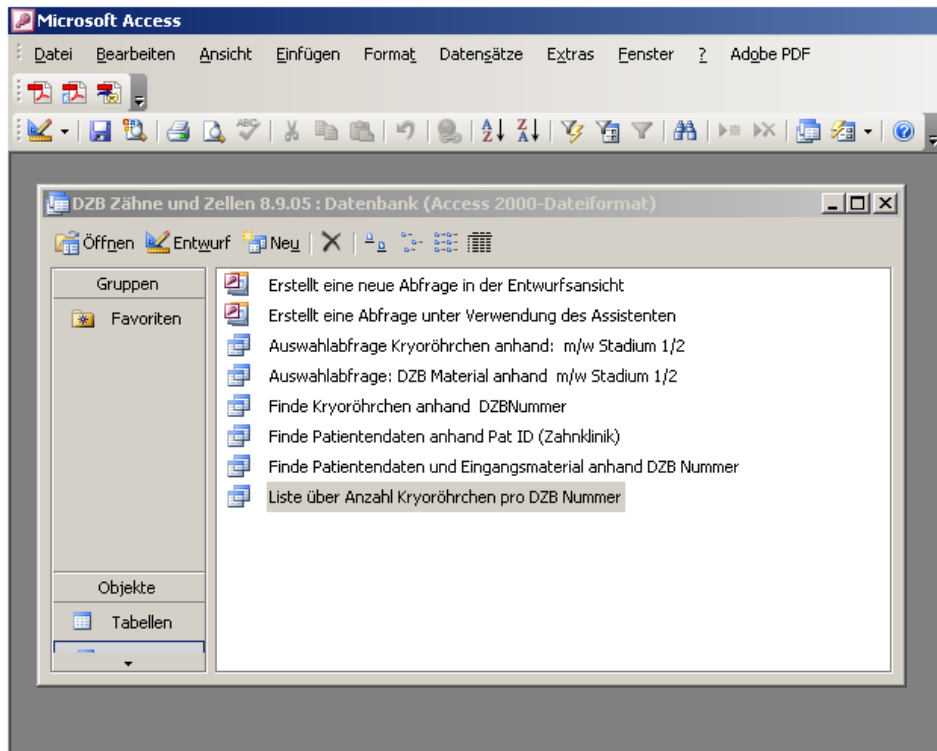
Bei der direkten Auflistung wird durch Anklicken der Abfrage direkt das Ergebnis aufgelistet, welches dem aktuellen Stand der Datenbank entspricht.

In dem gezeigten Beispiel (Abb. 14) wurde in einem Fenster der Oberfläche der Access Datenbank die Abfrage: „Liste über Anzahl Kryoröhrchen pro “ ausgewählt. Dieser Abfrage liegt folgende SQL Programmierung zugrunde:

---

```
SELECT [Stickstofftank_A_B_C].[DZBNummer], Count([Stickstofftank_A_B_C].[PositionsID])
AS [Anzahl Kryoröhrchen] FROM Stickstofftank_A_B_C
GROUP BY [Stickstofftank_A_B_C].[DZBNummer]
ORDER BY [Stickstofftank_A_B_C].[DZBNummer];
```

---



**Abb. 14:** Fenster mit aufgelisteten Abfragen. Grau hinterlegt die gewählte Abfrage: zur direkten Auflistung der DZB-Nummern bzw. Zahngewebe mit der entsprechenden Anzahl Kryoröhren im Stickstofftank.

Diese SQL Eingaben veranlassen die Access Datenbank direkt bei anklicken der Abfrage das Ergebnis auf der Benutzeroberfläche anzuzeigen.

The screenshot shows the query result window titled 'Liste über Anzahl Kryoröhren pro DZB Nummer : Auswahlabfrage'. The table has two columns: 'DZBNummer' and 'Anzahl Kryoröhren'. The data is as follows:

DZBNummer	Anzahl Kryoröhren
	567
101	1
103	9
104	8
105	5
123	5
125	6
126	11
127	1
128	7
131	5
132	4
133	4
135	7
136	4
137	6
139	2
...	...

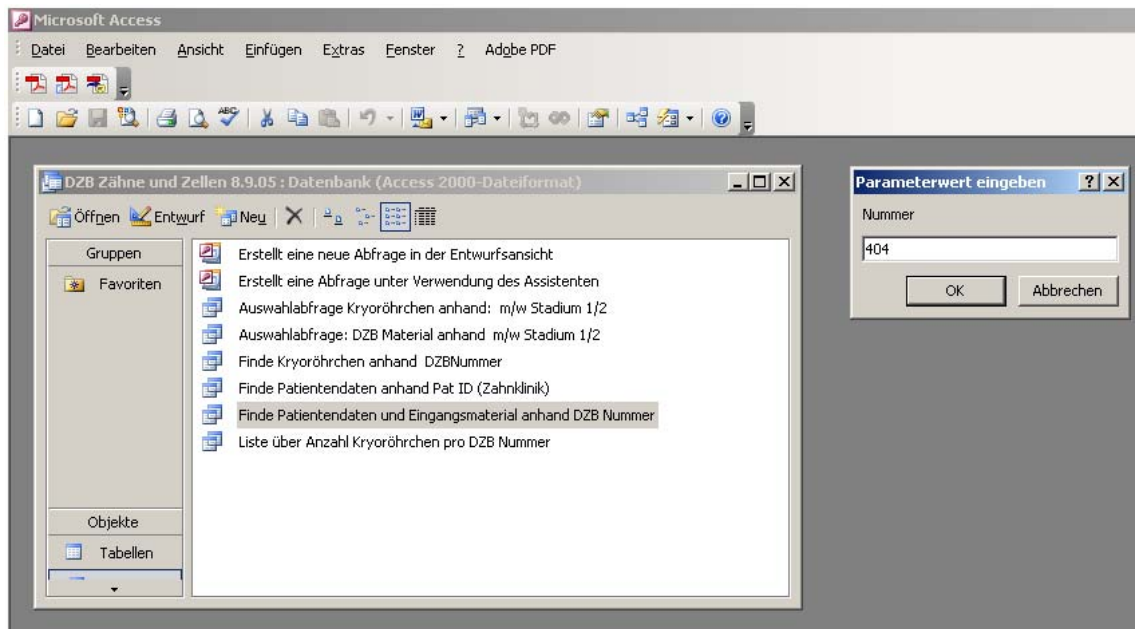
The status bar at the bottom indicates 'Datensatz: 1 von 145'.

**Abb. 15:** Auszug aus der Ergebnis Auflistung der DZB-Nummern bzw. Zahngewebe mit der entsprechenden Anzahl Kryoröhren im Stickstofftank.

In dem Auszug der Ergebnisauflistung ist erkennbar, dass von 145 verschiedenen DZB-Nummern 567 Kryoröhren in Stickstofftanks vorliegen. Die Anzahl der vorhandenen Kryoröhren ist für jede gelistete DZB-Nummer aufgeführt. In diesem Ausschnitt sind für DZB-126 beispielsweise 11 Kryoröhren im Stickstofftank.

### 3.1.2 Abfrage mit einer Auswahlabfrage

Durch eine Auswahlabfrage werden vor der Ergebnisdarstellung die abrufbaren Daten auf einen Parameterwert (DZB-Nummer) eingegrenzt.



**Abb. 16:** Links Abfrage: Finde Patientendaten und Eingangsmaterial anhand DZB-Nummer. Rechts Fenster in dem die entsprechende DZB-Nummer eingegeben wird.

Die SQL Version der Programmierung dieser Abfrage lautet:

---

```
SELECT Stickstofftank_A_B_C.*
FROM Stickstofftank_A_B_C
WHERE ((([Stickstofftank_A_B_C].[DZBNummer]]=[Nummer]));
```

---

In das rechte Fenster wird die Nummer der gesuchten Zahn bzw. Gewebe ID eingegeben, für dieses Beispiel 404. Nach drücken der Ok Taste erscheint die Ergebnistabelle auf der Bildschirmoberfläche, die für DZB-404 folgendermaßen aussehen würde:

The screenshot shows a table with the following data:

DZBNummerZahn.DZBNummer	DZBNummerZahn.PatientID	Geburtsjahr	Geschlecht	OP	Zahn	Stadium	Eingangsmaterial	Lagerung
404	120549	1993	w	29.06.2005	48	1	komplett	Medium

Below the table, the status bar shows 'Datensatz: 1 von 1'.

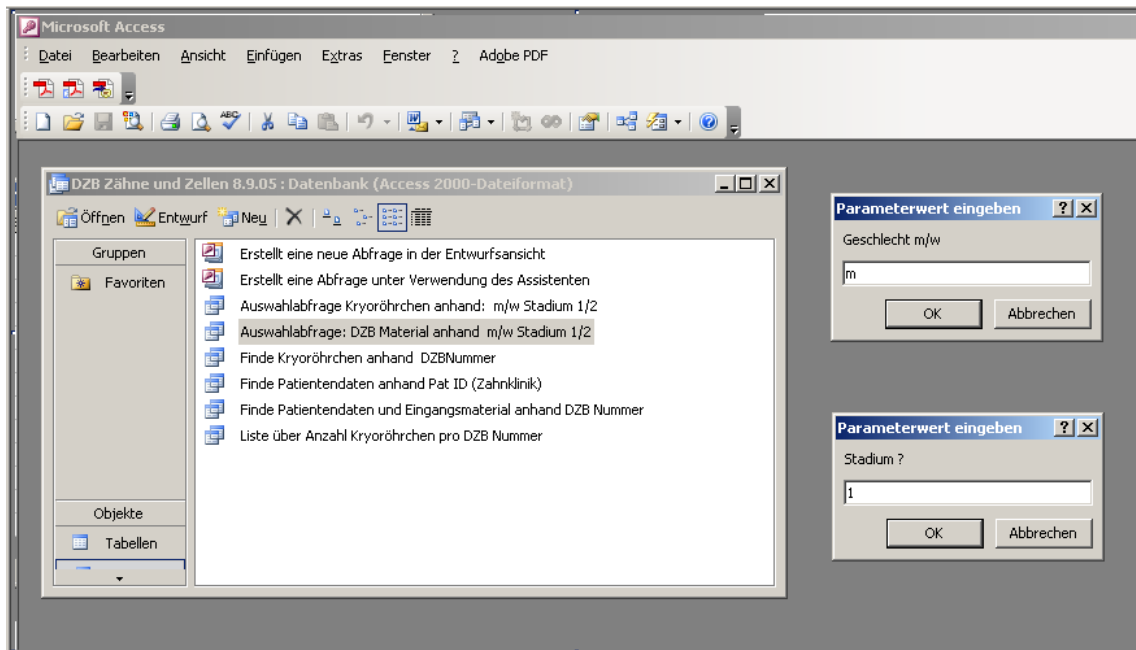
**Abb. 17:** Ergebnistabelle der Abfrage: Finde Patientendaten und Eingangsmaterial anhand DZB-Nummer.



Die Ergebnistabelle wurde definiert über die Spalten: DZB-Nummer, Patienten ID, Geburtsjahr, Geschlecht, Zahnposition, Zahnstadium, Gewebeanteile und die Lagerungsform.

### 3.1.3 Abfrage mit zwei kombinierten Auswahlabfragen

Die in den Abfragefunktionen eingesetzten Parameter ermöglichen eine weitere Spezifizierung der Suche. Ziel der Abfrageoptionen ist es einerseits, die Planung von Experimenten durch direkte Einsicht von Gewebe- und Probenanzahl zu erleichtern. Weiterhin soll die Zuordnung weiterer erhobener Daten zu definierten Gruppen ermöglicht werden. So wird in dem folgenden Beispiel mit den zwei kombinierten Auswahlabfragen der Parameter Geschlecht „männlich“ und „Zahnstadium I“ der Datenbestand geprüft.



**Abb. 18:** Auswahlabfrage: DZB Material anhand der Parameter m/w und Entwicklungsstadium 1/2. Rechts Fenster für die Eingabe Parameter.

Dieser Abfrage besteht aus folgender SQL Programmierung:

---

```
SELECT Patientendaten.*, DZBNummerZahn.*
FROM Patientendaten INNER JOIN DZBNummerZahn ON Patientenda-
ten.PatientID=DZBNummerZahn.PatientID
WHERE (((Patientendaten.Geschlecht)=[Geschlecht m/w]) And ((DZBNummer-
Zahn.Stadium)=[Stadium ?]));
```

---

Entsprechend der Parametereingabe wurde in diesem Beispiel nach Zahngewebe gesucht, welches von männlichen Patienten stammt und dem Zahnstadium 1 zugeordnet wurde. Zahngewebe die diesen beiden Parametern entsprachen wurden in der folgenden Tabelle dargestellt:

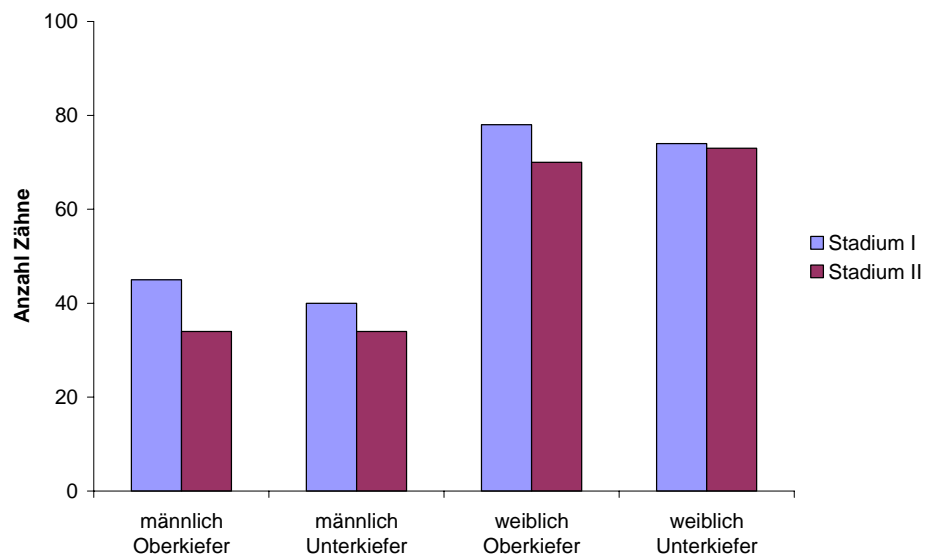
DZBNummer	Patientendaten.PatientID	Geburtsjahr	Geschlecht	OP	Zahn	Stadium
22	111531	1990	m	31.03.2004	18	1
23	111531	1990	m	31.03.2004	28	1
24	111531	1990	m	31.03.2004	38	1
25	111531	1990	m	31.03.2004	48	1
107	112855	1990	m	19.05.2004	18	1
108	112855	1990	m	19.05.2004	28	1
109	112855	1990	m	19.05.2004	48	1
149	112056	1991	m	14.07.2004	18	1
150	112056	1991	m	14.07.2004	28	1
151	112056	1991	m	14.07.2004	38	1
152	112056	1991	m	14.07.2004	48	1
168	76695	1993	m	21.07.2004	18	1
169	76695	1993	m	21.07.2004	28	1
170	76695	1993	m	21.07.2004	38	1
171	76695	1993	m	21.07.2004	48	1
172	114214	1991	m	21.07.2004	18	1
173	114214	1991	m	21.07.2004	28	1
174	114214	1991	m	21.07.2004	38	1

**Abb. 19:** Auszug der Ergebnistabelle der DZB-Nummern die der kombinierten Auswahlabfrage mit den Parametern „Geschlecht männlich“ und „Zahnstadium I“ entsprachen.

Auf dem Auszug der Ergebnisliste ist zu sehen, dass es für die Kombination beider Parameter 85 Einträge gab. Also wurden 85 Zahngewebe dieser Art in unserem Labor bis zu diesem Zeitpunkt angenommen.

### 3.1.4 Auswertung der Datenabfragen

Die Ergebnistabellen können zur weiteren Auswertung in Exceltabellen exportiert und dort als Vorlage für Grafiken genutzt werden.



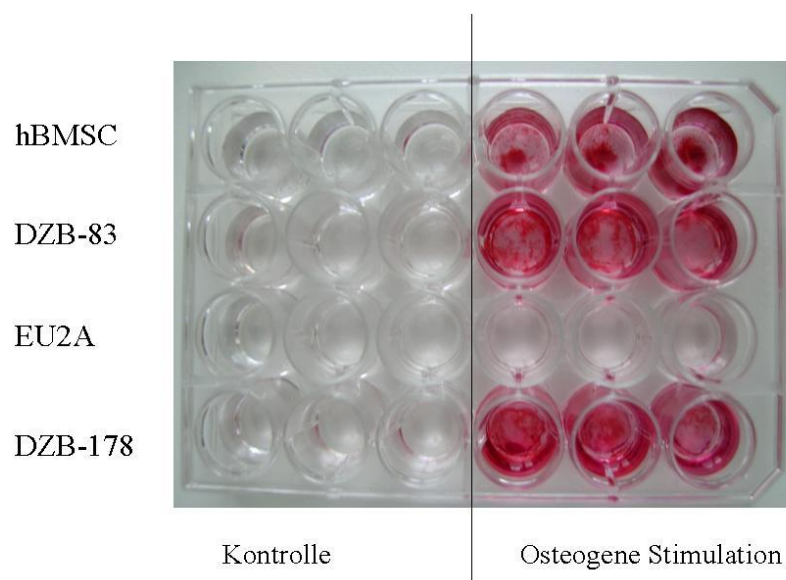
**Abb. 20:** Mit Programm Excel erstelltes Diagramm über das Profil der Gewebespende anhand der aus Access exportierten Ergebnistabellen der kombinierten Abfragen.

In der Abb. 20 wurde das Spenderprofil der 464 Zahngewebe graphisch dargestellt. Diese Darstellung ist exemplarisch und für weitere Analysen nicht geeignet.

## 3.2 Osteogene Differenzierung dentaler Primärkulturen

### 3.2.1 Kalzifizierung dentaler Primärkulturen

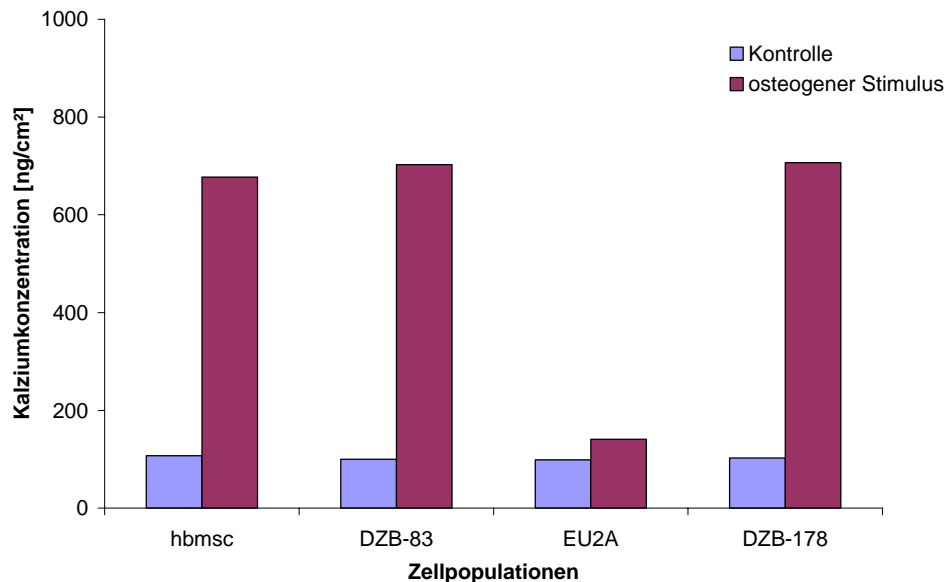
Für den Nachweis der osteogenen Differenzierbarkeit dentaler Zellen wurden die Primärkulturen DZB-83 und DZB-178 (siehe Tab. 2 Kap. 2.2.1) getestet. Als Positivkontrolle wurden humane Knochenmarkszellen (human Bone Marrow Stroma Cells, hBMSC) und als Negativkontrolle eine Hautfibroblastenlinie (EU2A) parallel kultiviert. Nach der Differenzierungsphase von drei Wochen in osteogenem Differenzierungsmedium, wurden ein qualitativer Kalziumnachweis mit Alizarinrot und ein quantitativer Kalziumnachweis biochemisch durchgeführt (s. Kap.2.6.2).



**Abb. 21:** Foto Mikrotiterplatte, qualitativer Kalziumnachweis mit Alizarinrot nach osteogener Differenzierung von hBMSC, DZB-83, EU2A und DZB-178 Zellpopulationen.

Für den qualitativen Kalziumnachweis wurden alle fixierten Zellen in der Mikrotiterplatte mit Alizarinrot gefärbt. Die osteogen differenzierten dentalen Zellen und die Knochenmarkszellen bildeten einen roten Farbkomplex aus Kalzium und Alizarinrot. Auf dem Foto der Mikrotiterplatte in Abb. 21 sind diese Farbnachweise der Kalzifizierungen deutlich sichtbar. Bei Kultivierung der Zellen in Kontrollmedium zeigte keine der Populationen eine rote Färbung. Die Hautfibroblasten zeigten auch nach osteogenem Stimulus keine rote Färbung.

Parallel zu dem qualitativen Kalziumnachweis erfolgte ein quantitativer Kalziumnachweis mit dem RAND OX Kit®. Die ermittelten Kalziumkonzentrationen der unterschiedlichen Zellpopulationen werden in der Abb. 22 dargestellt:



**Abb. 22:** Quantitativer biochemischer Kalziumnachweis mit RAND OX Kit®, nach der osteogenen Differenzierung von hBMSC, DZB-83, EU2A und DZB-178 Zellpopulationen.

Die Primärzellen DZB-83 wiesen bei Kultivierung in osteogenem Differenzierungsmedium eine 7-fach erhöhte Kalziummenge von 703 ng/cm<sup>2</sup> im Vergleich zur Kontrolle (100 ng/cm<sup>2</sup>) auf. Die Primärkultur DZB-178 zeigte nach osteogenem Stimulus eine 6,9-fach erhöhte Kalziumkonzentration von 707 ng/cm<sup>2</sup> im Vergleich zur Kontrolle (103 ng/cm<sup>2</sup>). Die Knochenmarkzellen hBMSC zeigten 6,3-fach erhöhte Werte für die osteogen differenzierten Zellen, aus der sich eine Kalziumkonzentration von 677 ng/cm<sup>2</sup> berechnen ließ. Die Kalziumkonzentration der entsprechenden Kontrolle betrug 107 ng/cm<sup>2</sup>. Die Hautfibroblasten EU2A erzielten im osteogenen Differenzierungsmedium eine 1,4-fache Kalziumkonzentration von 141 ng/cm<sup>2</sup> und beim Kontrollmedium von 99 ng/cm<sup>2</sup>.

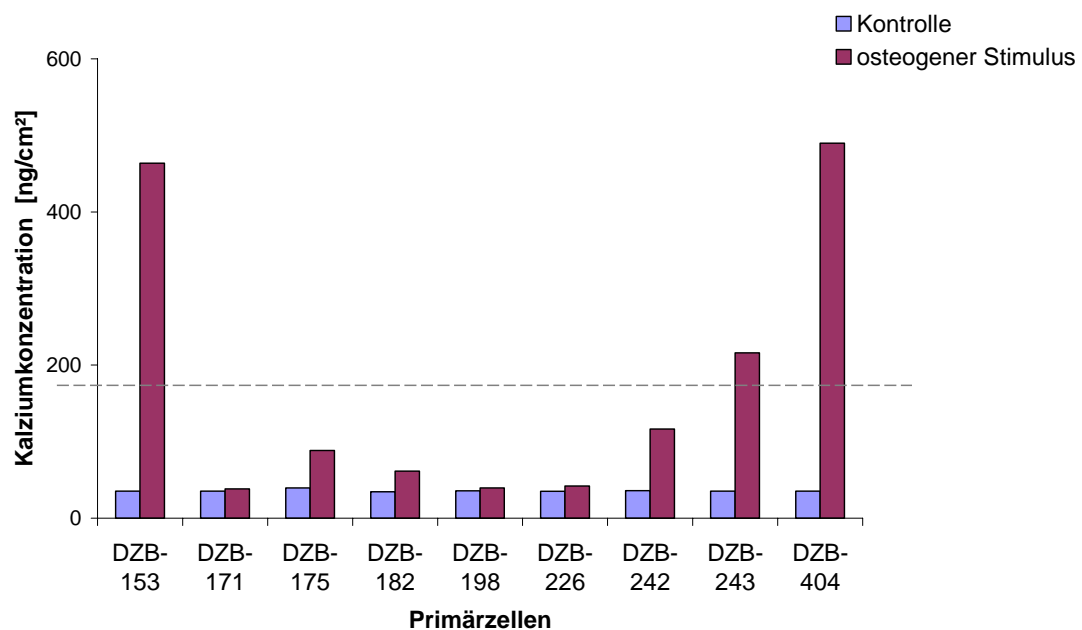
Sowohl der quantitative als auch der qualitative Test zeigten, dass in Primärkulturen dentaler Zellen sowie Knochenmarkzellen durch osteogene Stimmulierung eine Kalzifizierung induziert werden konnte. Damit wurde bei den dentalen Zellen die generelle Potenz zu kalzifizieren nachgewiesen.

### 3.2.2 Vergleich verschiedener dentaler Primärkulturen

Zur Unterstützung der in Kap. 3.2.1 erlangten Ergebnisse, wurden unterschiedliche Primärkulturen dentaler Zellen bei osteogenem Stimulus verglichen, um auf diese Weise eventuelle individuelle Unterschiede einzubeziehen. Es wurden verschiedene kryokonservierte Primärzellpopulationen (siehe Tab. 2 Kap. 2.2.1) der dritten Passage in Kultur genommen. Von neun dieser unterschiedlichen Zahnzellpopulationen wurden auf 24-Well-Platten parallele Mehrfachansätze mit einer Startzelldichte von  $1 \times 10^4$  Zellen/mL kultiviert und 21 Tage osteogen differenziert. Die Kalzifizierung sowie die Genexpression der verschiedenen Zellkulturen wurden gegenübergestellt.

#### 3.2.2.1 Gegenüberstellung der Kalzifizierung

In der folgenden Abb. 23 wurde die gemessene Kalzifizierung verschiedener dentaler Primärkulturen nach Kultivierung in osteogenem Differenzierungsmedium aufgetragen.



**Abb. 23:** Quantitativer, biochemischer Kalziumnachweis mit RAND OX Kit®, verschiedener Zahnzellkulturen nach osteogener Differenzierung. Eingezeichnete definierte Grenze für kalzifizierte und nicht kalzifizierte Zellpopulationen.

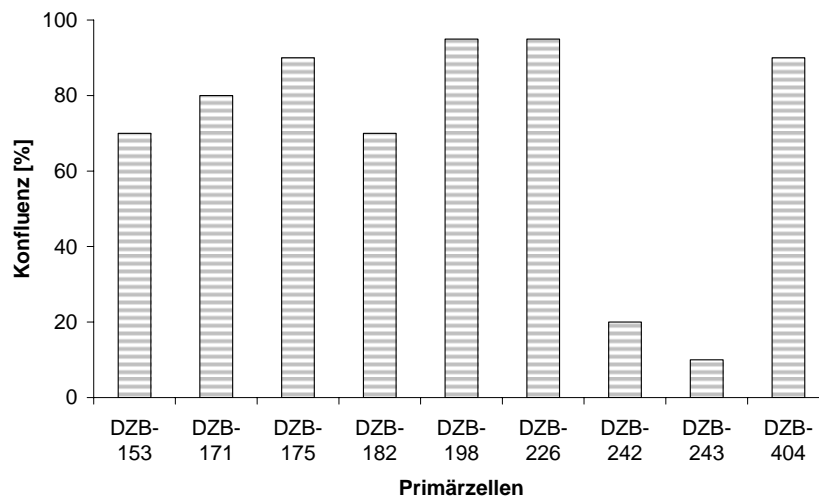
Alle Zahnzellpopulationen hatten über den Kultivierungsverlauf den Boden des Kulturgefäßes konfluent überwachsen. Es zeigten sich dennoch deutlich unterschiedliche Intensitäten der Kalzifizierung. Die höchste Kalzifizierung wurde bei der differenzierten Primärkultur

DZB-404 mit  $490 \text{ ng/cm}^2$  gemessen. Der Kalziumgehalt war damit vierzehnfach erhöht zu der Kontrolle mit  $35 \text{ ng/cm}^2$ . Dieser Wert wurde dicht gefolgt von der Primärkultur DZB-153, mit einer Kalziummenge von  $464 \text{ ng/cm}^2$ . Hier lag eine dreizehnfache Erhöhung zu der Kontrolle mit  $35 \text{ ng/cm}^2$  vor. Die niedrigste Kalziummenge mit  $38 \text{ ng/cm}^2$  wies die differenzierte Primärkultur von DZB-171 auf, also die 1,1-fache Menge Kalzium der Kontrolle mit  $35 \text{ ng/cm}^2$ . Die Kalziumkonzentrationen bei den undifferenzierten Zellen lagen zwischen  $34 \text{ ng/cm}^2$  und  $40 \text{ ng/cm}^2$ .

Während alle getesteten Primärkulturen in Standardmedium einheitlich niedrige Kalziumwerte aufwiesen, zeigten sich bei den getesteten Primärkulturen in osteogenem Differenzierungsmedium große Differenzen der Kalzifizierung zwischen den verschiedenen Primärzellpopulationen.

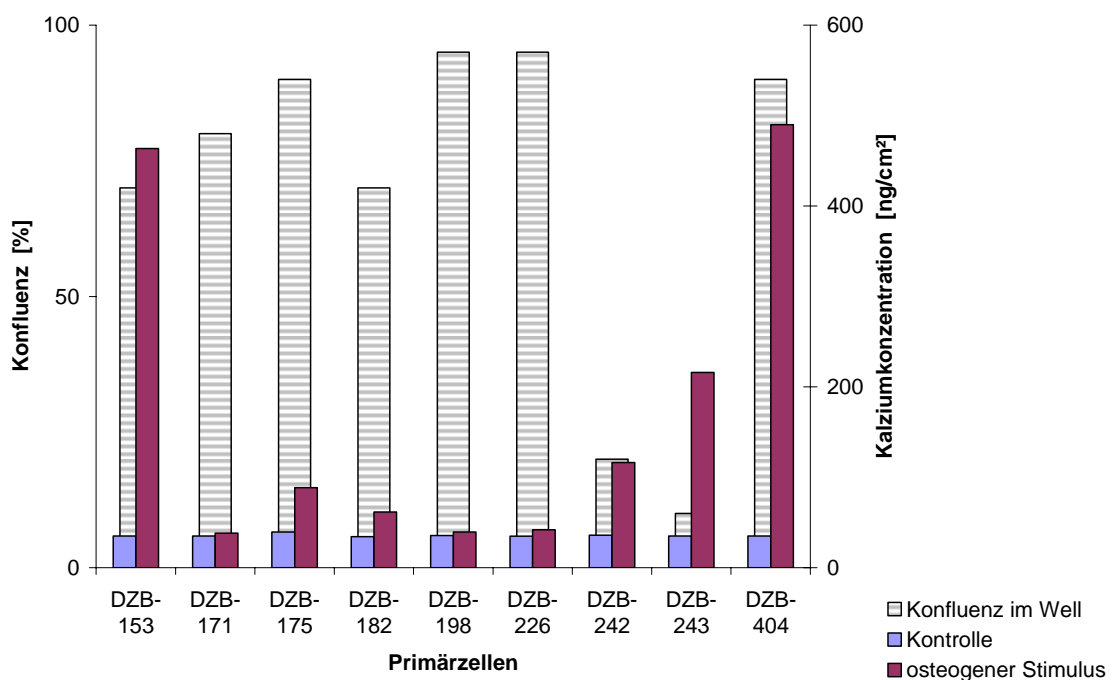
Das arithmetische Mittel der Kalzifizierung mit  $173 \text{ ng/cm}^2$  (grau gestrichelte Linie in der Abb. 23) wurde als Grenze für die weitere Einteilung der kalzifizierten Zellen definiert. Die Primärzellen mit einer Kalzifizierung oberhalb dieses Wertes (DZB-153, DZB-243 und DZB-404) wurden demzufolge der Gruppe „kalzifiziert“ zugeordnet. Das arithmetische Mittel ist für die vorliegende Gruppeneinteilung nur mäßig repräsentativ. Bei alternativer Nutzung des Median wären beispielsweise DZB-242 und DZB-175 ebenfalls noch als „kalzifiziert“ zu klassifizieren. Die verbleibenden Primärzellen DZB-171, DZB-175, DZB-182, DZB-198, DZB-226 und DZB-242 lagen unterhalb des Kalzifizierungswertes von  $173 \text{ ng/cm}^2$ . Sie wurden der Gruppe „nicht kalzifiziert“ zugeordnet. Diese Einteilung wird bei nachfolgenden Darstellungen zur Genexpression herangezogen (Kap. 3.2.2.1).

Die Primärkulturen wurden mit jeweils  $1 \times 10^5$  Primärzellen pro Well gestartet. Nach drei Tagen in Standardmedium erfolgte die Kultivierung in osteogenem Differenzierungsmedium. Eine mikroskopische Einschätzung der Konfluenzen der Zellpopulationen beim Differenzierungsstart ist in Abb. 24 zu sehen.



**Abb. 24:** Konfluenz der verschiedenen dentalen Primärkulturen zu Beginn der osteogenen Differenzierung.

Die Zellpopulationen von DZB-198 und DZB-226 besaßen zu Beginn der osteogenen Differenzierung eine Konfluenz von 95%. Aufgrund dieser maximalen Konfluenz wurde die osteogene Differenzierung gestartet. Zu diesem Zeitpunkt lag bei den Primärzellen DZB-242 mit 20% Konfluenz und DZB-243 mit 10% Konfluenz eine mit Abstand niedrigere Zelldichte vor.



**Abb. 25:** Konfluenz der verschiedenen dentalen Primärkulturen zu Beginn der osteogenen Differenzierung (Bezug Primäre Y-Achse). Kalziumkonzentration in den dentalen Primärkulturen nach der osteogenen Differenzierung (Bezug Sekundäre Y-Achse).



In Abb. 25 wurde die Konfluenz der verschiedenen dentalen Primärkulturen zu Beginn der osteogenen Differenzierung auf die primäre Y-Achse aufgetragen. Die Kalziumkonzentrationen, welche nach der osteogenen Differenzierungsphase in den Wells nachgewiesen wurden, beziehen sich in dieser Darstellung auf die sekundäre Y-Achse. Die Primärkulturen DZB-153 und DZB-404 mit der stärksten Kalzifizierung nach osteogenem Stimulus, hatten zu Beginn der Differenzierung eine Konfluenz von 70% und 90%. Die Primärkultur DZB-171 mit der niedrigsten Kalzifizierung hatte beim Differenzierungsstart eine Konfluenz von 80%. Die Primärzellen mit der niedrigsten Konfluenz von 10% bei Differenzierungsbeginn waren DZB-242 und DZB-243, bei denen leicht erhöhte Kalziumkonzentrationen nach der osteogenen Differenzierung vorlagen.

Eine Kalzifizierung war bei Zellpopulationen mit hoher und mit niedriger Zelldichte generell möglich. Ebenso gab es Zellpopulationen die nicht kalzifizierten, obwohl sie zu Beginn der osteogenen Differenzierung eine ausreichend hohe Zelldichte aufwiesen. Zwischen der Zelldichte zu Beginn der osteogenen Differenzierung und der entsprechenden Kalzifizierung nach der Differenzierung lässt sich kein Zusammenhang erkennen. Damit blieb diese Vermutung unbestätigt.

### 3.2.2.2 Gegenüberstellung der Genexpression

Neben dem Nachweis zur Kalzifizierung der Zahnzellen wurde die Genexpression an fünf Messpunkten des Kulturverlaufes der jeweils neun verschiedenen Zahnzellpopulationen gemessen. Dazu wurde der Versuch mit 126 Parallelkulturen gestartet und während der osteogenen Differenzierungsphase von 21 Tagen in regelmäßigen Abständen von vier Tagen Zellproben entnommen.

Die Zellproben wurden auf die Expression von Bonesialoprotein (*IBSP*), Osteokalzin (*BGLAP*), dem Transkriptionsfaktor *RUNX2* (Runt-related transkription factor 2, oder auch Cbfa1) und alkalischer Phosphatase (*ALPL*) untersucht.

Gesucht wurde sowohl ein charakteristischer Unterschied in der Genexpression bei der Kultivierung in Kontrollmedium und osteogenem Differenzierungsmedium, als auch ein Unterschied bei der Genexpression der kalzifizierten bzw. nicht kalzifizierten Zellen. Dabei wurde die Expression von Bonesialoprotein und Osteokalzin als zusätzliche Parameter hinsichtlich erfolgter Kalzifizierung untersucht. Bei der Genexpression von Runt-related transkription factor 2 und der alkalischen Phosphatase, wurde außerdem nach Informationen geforscht, die

vor der osteogenen Differenzierung der jeweiligen Zellen eine Einschätzung über die Potenz zu kalzifizieren erlaubt.

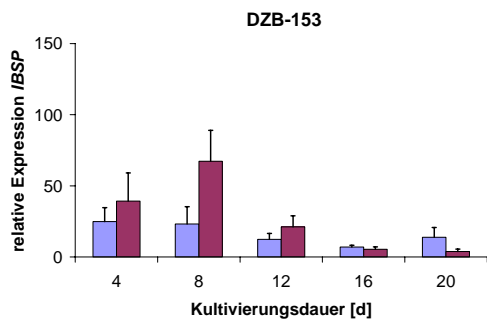
Für die Normierung der Berechnungen waren die Expressionen von Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (*GAPDH*) die eingesetzte Bezugsgröße. Der kleinste gemessene Wert über alle Proben des jeweiligen Messlaufes wurde auf den Wert 1 normiert. Es lag ausreichend Zellmaterial vor, alle Ansätze auf die Expression der fünf Gene zu untersuchen. Zudem wurde für Bonesialoprotein (*IBSP*) exemplarisch eine Dreifachbestimmung durchgeführt, um auf diese Weise eine Einschätzung zu erhalten, in welchem Rahmen sich die Messschwankungen bewegen. Damit wird vorab eine Abschätzung der Präzision gegeben, welche eine Bewertung der ermittelten Expressionswerte der darauffolgenden Einfachbestimmungen vier weiterer Gene erlaubt.

#### **3.2.2.2.1 Bonesialoprotein (*IBSP*)**

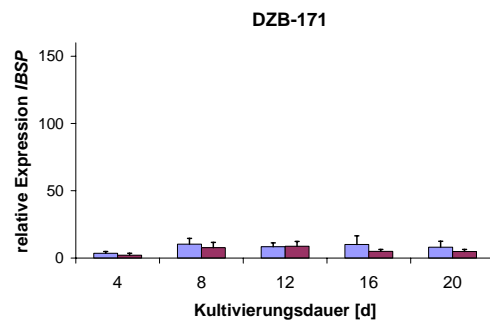
Die dreimalige Messung von 90 Messproben ergab für Bonesialoprotein (*IBSP*) einen mittleren Variationskoeffizienten von 0,01 und für *GAPDH* einen mittleren Variationskoeffizienten von 0,02. Daher kann von einem Messfehler von 1 – 2 % innerhalb eines Messlaufes ausgegangen werden. Für die Berechnung (DDCT Methode s. Kap. 2.6.4.3) der relativen Expression von *IBSP* dienten die Werte für *GAPDH* als direkte Bezugsgröße. Somit ergaben die drei Einzelmessungen von *IBSP* und von *GAPDH* für jede Probe neun mögliche Kombinationen, deren Variationskoeffizienten getrennt voneinander ermittelt wurden. Anschließend wurde der Mittelwert aller neun Kombinationsmöglichkeiten der 90 Proben gebildet. Hieraus ergab sich ein durchschnittlicher Variationskoeffizient von 0,41. Somit muss insgesamt von einer mittleren Schwankung von 41% der relativen Expressionswerte ausgegangen werden.

Die Diagramme in Abb. 26 a bis i veranschaulichen diesen Sachverhalt. Sie zeigen die Genexpression von Bonesialoprotein über den Differenzierungsverlauf der jeweils neun verschiedenen Zahnzellpopulationen.

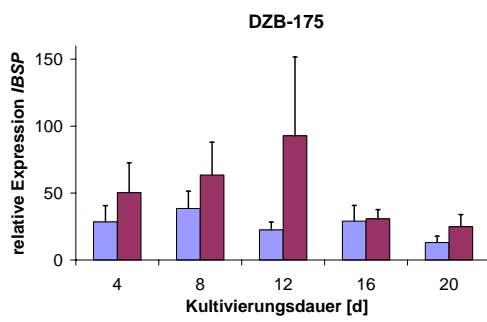
a)



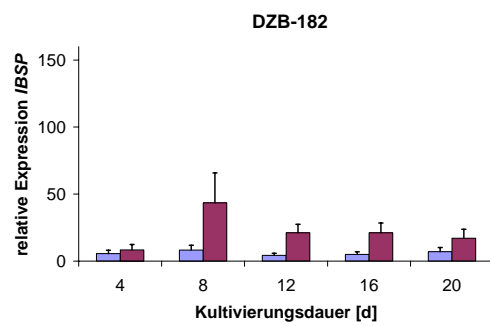
b)



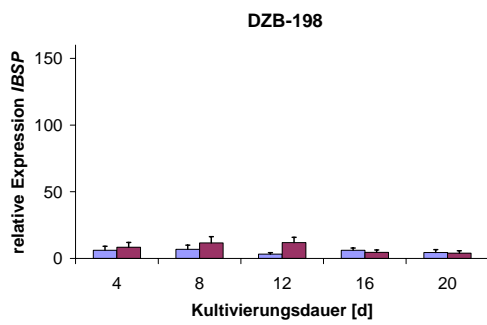
c)



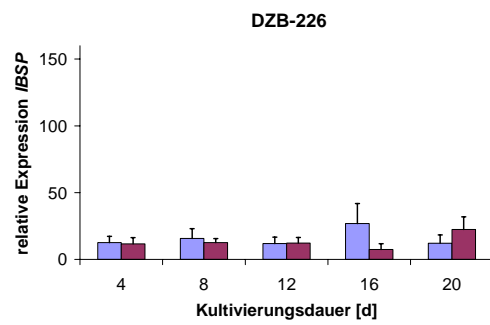
d)



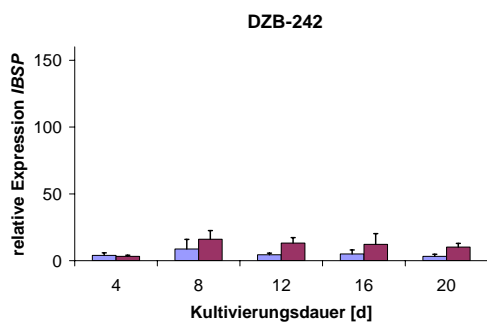
e)



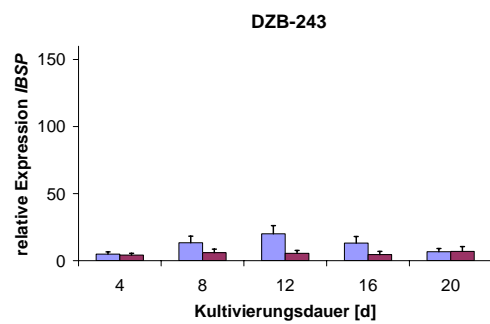
f)



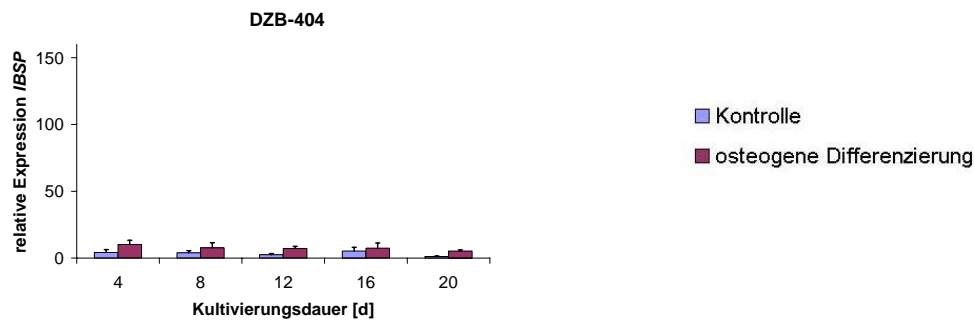
g)



h)



i)



**Abb. 26:** Q-PCR, Dreifachbestimmung des relativen Expressionslevels von Bonesialoprotein (*IBSP*), dargestellt in x-fach, über den Verlauf der osteogenen Differenzierung von neun verschiedenen Primärkulturen (a-i).

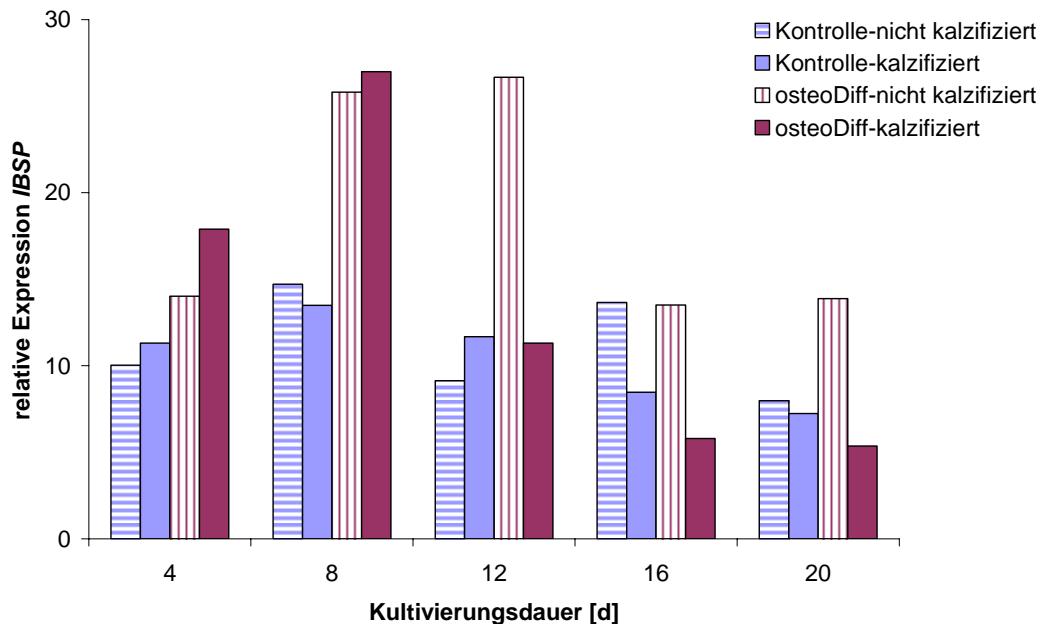
Die relative Expression von Bonesialoprotein (*IBSP*) wurde für die neun verschiedenen Primärkulturen jeweils auf die Y-Achse aufgetragen. Dabei wurde für die jeweiligen Messungen der Mittelwert in Bezug zur geringsten ermittelten Expression dargestellt, welche auf 1 normiert wurde. Die 5 Messungen wurden den jeweils entsprechenden Zeitpunkten auf der X-Achse zugeordnet, auf der die Kulturdauer abgezeichnet ist.

Die neun Zellkulturen wiesen vorwiegend Expressionen auf, die unterhalb einer 30-fachen Erhöhung lagen. DZB-182 (Abb. 26d) zeigte am achten Kulturtag in osteogenem Differenzierungsmedium mit 43-facher Erhöhung eine etwas stärkere Expression. DZB-153 (Abb. 26a) weist am achten Kultivierungstag in osteogenem Differenzierungsmedium mit einer 67-fachen Erhöhung eine stärkere Expression auf. Die stärkste Expression mit einer 93-fachen Erhöhung wird von DZB-175 (Abb. 26c) am zwölften Tag in osteogenem Differenzierungsmedium erreicht.

Bei Rückblick auf die Kalzifizierung (Abb. 23) wird deutlich, dass DZB-153 (Abb. 26a) und DZB-404 (Abb. 26i) kalzifiziert sind. Bei DZB-153 ist die Expression von Bonesialoprotein erhöht, bei DZB-404 nicht. Die beiden Proben DZB-182 (Abb. 26d) und DZB-175 (Abb. 26c) bei denen eine höhere Expression von Bonesialoprotein auftrat, wiesen jedoch keine Kalzifizierung auf.

Damit wiesen einzelne Primärzellkulturen in osteogenem Differenzierungsmedium erhöhte Expressionswerte für *IBSP* auf, diese waren jedoch unabhängig von der Kalzifizierung der differenzierten Zellen.

Um eventuelle Beziehungen zwischen der ermittelten Genexpression und der Kalzifizierung aufzudecken, wurden die Daten entsprechend der Definition „kalzifiziert“ bzw. „nicht kalzifiziert“ (definiert in Kap. 3.2.2.1) neu geordnet.



**Abb. 27:** Q-PCR, Expression von Bonesialoprotein (*IBSP*) bei Primärzellkulturen im Differenzierungsverlauf, die jeweils den Gruppen „kalzifiziert“ (n=3) und „nicht kalzifiziert“ (n=6) zugeordnet sind.

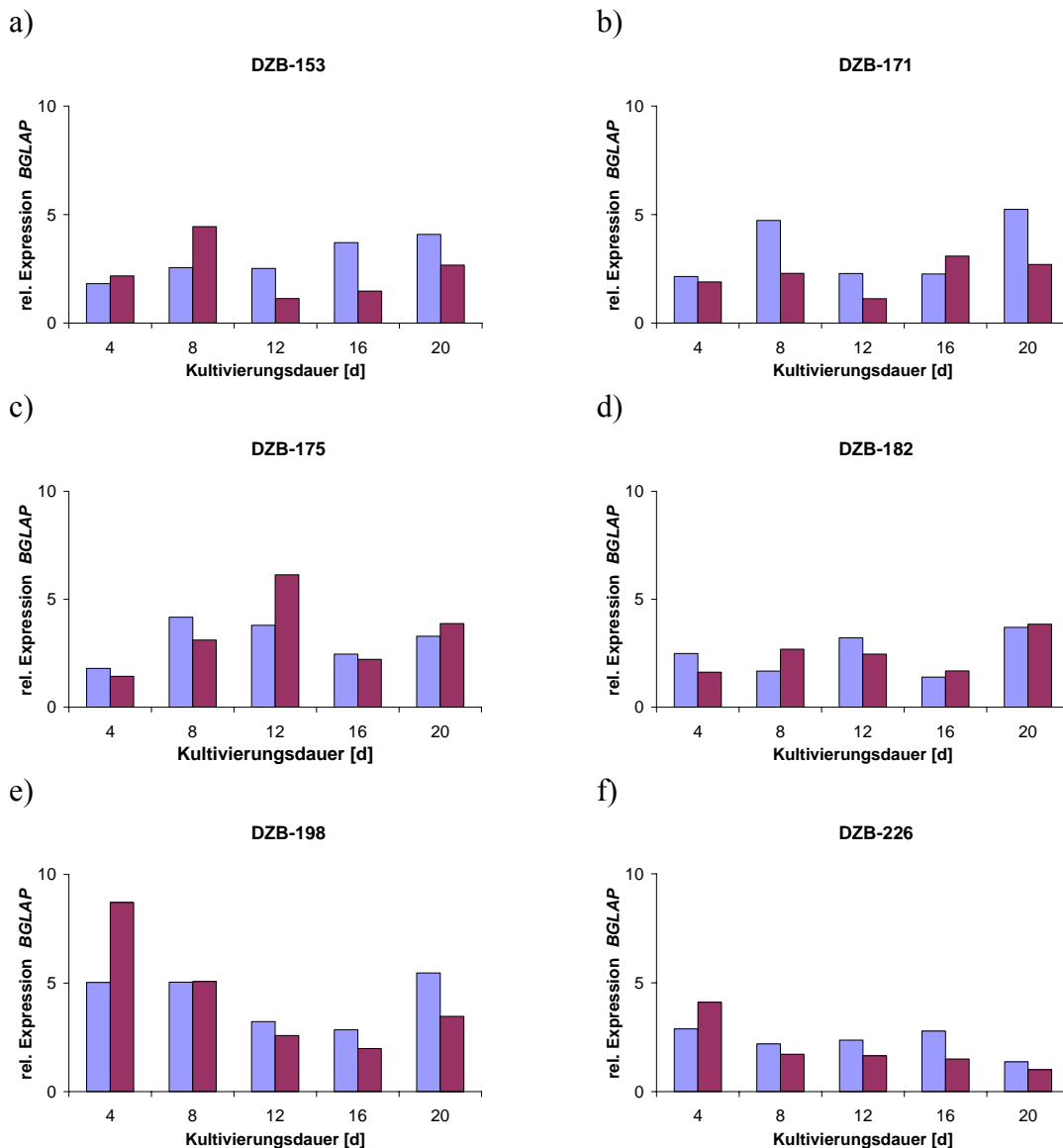
Die maximale Expression von *IBSP* wurde von den Zellen der Gruppe „osteoDiff-kalzifiziert“ am achten Tag mit einem Wert von 27,0 erreicht. In dieser Eingruppierung erreichten diese Zellpopulationen auch die durchschnittlich niedrigste Expression von 5,4 am 20. Tag. Die Zellen der Gruppe „osteoDiff-nicht kalzifiziert“ erreichten ihre maximale Expression von 26,7 am 12. Tag. Die Primärzellen der Gruppe „Kontrolle-nicht kalzifiziert“ erreichten das Maximum von 14,7 am achten Tag, die Gruppe „Kontrolle-kalzifiziert“ das Maximum 13,5 ebenfalls am achten Tag.

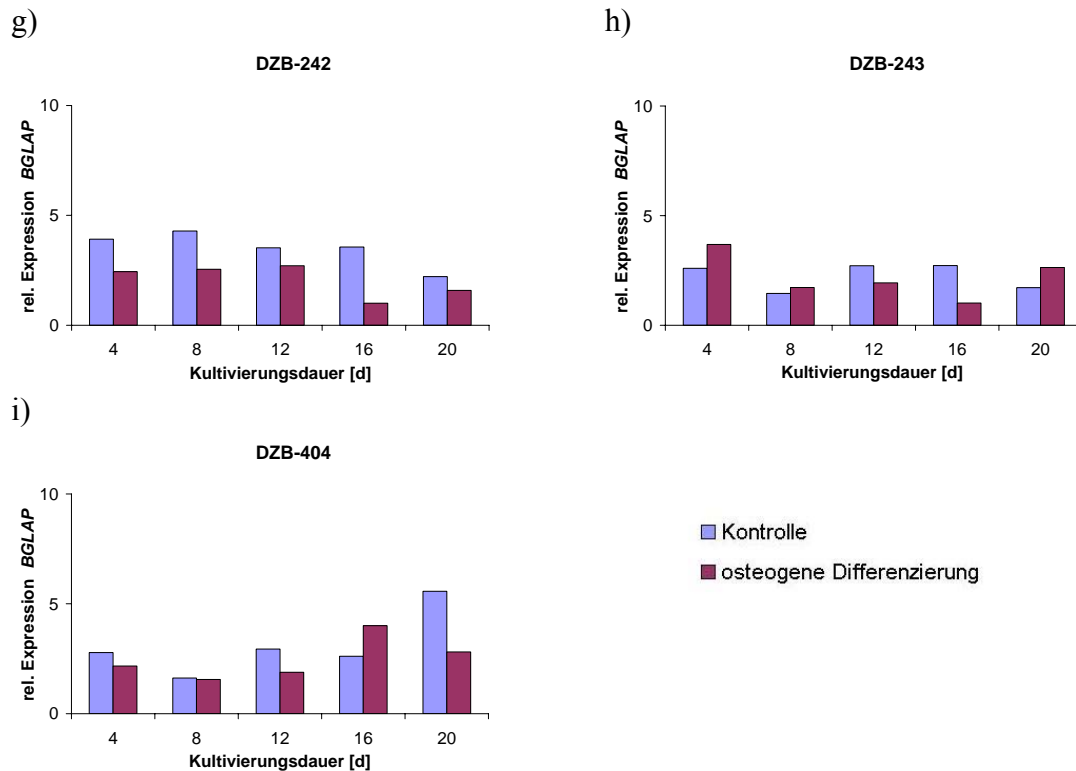
Der Darstellung in Abb. 27 liegen für die einzelnen Gruppen mehrere Messungen bzw. mehrere Proben zu Grunde. Daher könnten auch die tendentiellen Verläufe der *IBSP* Expression über den Kulturverlauf informativ sein. Bei allen Gruppen starten die Verläufe mit einem niedrigeren Wert, steigen auf ein Maximum an, um dann wieder abzusinken. Bei der Gruppe „Kontrolle-nicht kalzifiziert“ gibt es am zwölften Tag einen kleinen Einbruch.

Die Zellen in Differenzierungsmedium erreichten jeweils etwas höhere Expressionen als die entsprechenden Zellen in Kontrollmedium. Die Expression der Gruppe „osteodiff-kalzifiziert“ steigt von allen Gruppen am steilsten an, erreicht den Maximalwert und fällt auch auf den niedrigsten Expressionswert stärker ab. Werden Gruppen zusammengefasst, ließen sich Tendenzen der höheren Expression in den differenzierten und kalzifizierten Primärkulturen nachweisen. Der Expression stieg während des Kulturverlaufes bis zu einem Maximum im zweiten Abschnitt an und fiel dann wieder ab.

### 3.2.2.2.2 Osteokalzin (*BGLAP*)

Die Expression von Osteokalzin (*BGLAP*) wurde über den Differenzierungsverlauf der neun verschiedenen Zahnzellpopulationen untersucht.

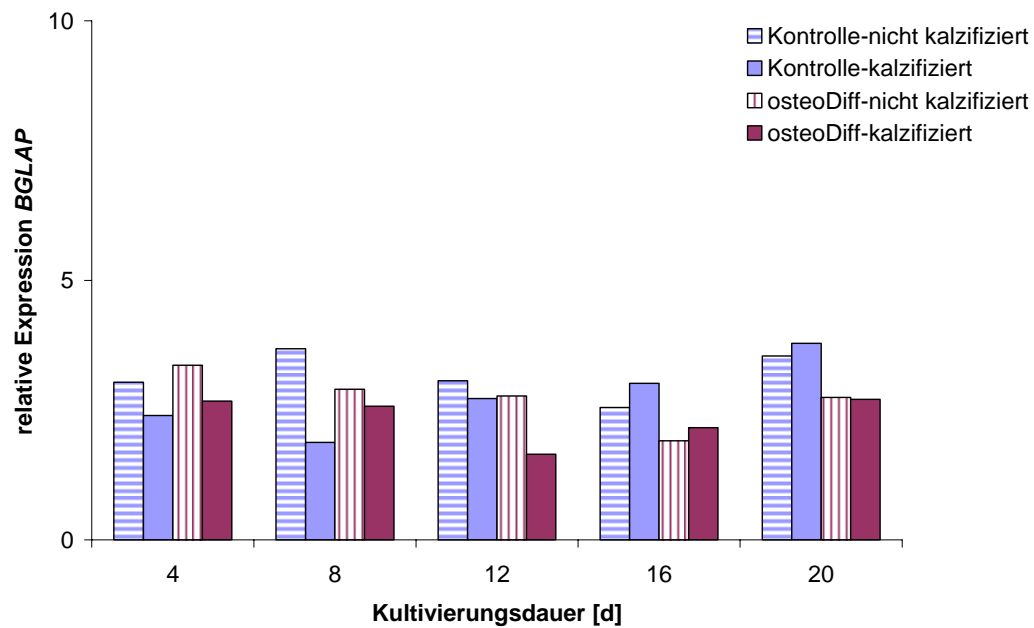




**Abb. 28:** Q-PCR, Bestimmung des relativen Expressionslevels von Osteokalzin bzw. *BGLAP* ( $n=1$ ), dargestellt in x-fach, über den Verlauf der osteogenen Differenzierung von neun verschiedenen Primärkulturen (a-i).

Die Expression von Osteokalzin zeigte über den Kultivierungszeitraum der neun verschiedenen Primärzellkulturen eine recht geringe Schwankungsbreite. Die höchste Osteokalzinexpression wurde für DZB-198 (Abb. 28e) am 4. Tag mit 8,7 ermittelt. Mit wenigen Ausnahmen lagen die Expressionswerte für Osteokalzin bei den Messproben unterhalb einer fünffachen Erhöhung.

Die Darstellung der Osteokalzinexpression in Gruppen entsprechend der Kalzifizierung (Kap. 3.2.2.1) führte zu einem Ausgleich der Werte und einer noch geringeren Schwankungsbreite (siehe Abb. 29):



**Abb. 29:** Q-PCR, Expression von Osteokalzin (*BGLAP*) bei Primärzellkulturen im Differenzierungsverlauf, die jeweils den Gruppen „kalzifiziert“ (n=3) und „nicht kalzifiziert“ (n=6) zugeordnet sind.

Die vier Gruppen haben relativ gleichförmige, niedrige Expressionen von Osteokalzin. Die ermittelte maximale Expression von Osteokalzin wurde von den Zellen in der Gruppe „Kontrolle-kalzifiziert“ am 20. Tag, mit einem Wert von 3,8 erreicht. Bei der Gruppe „osteoDiff-kalzifiziert“ lag der maximale Wert bei 2,7 am zwanzigsten und am vierten Tag. Die Zellen der Gruppe „osteoDiff-nicht kalzifiziert“ erreichten ihre maximale Expression von 3,4 am vierten Tag. Bei der Gruppe „Kontrolle-nicht kalzifiziert“ erreichten die Zellen eine maximale Expression von 3,7 am achten Tag. Die durchschnittlich niedrigste Expression wurde mit einem Wert von 1,7 für den 12. Tag bei den Zellen der Eingruppierung: „osteoDiff-kalzifiziert“ ermittelt.

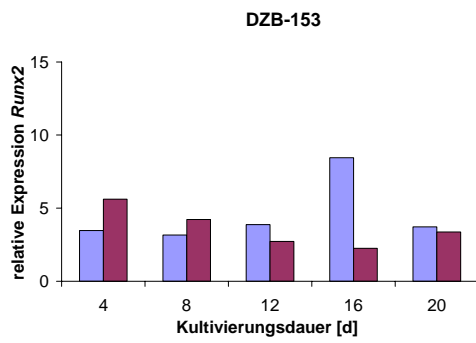
Die Expression von Osteokalzin zeigte bei den neun verschiedenen Primärzellkulturen in Differenzierungsmedium als auch in Kontrollmedium keine großen Expressionsschwankungen.

### 3.2.2.2.3 Runt related transkription factor 2 (*RUNX2*)

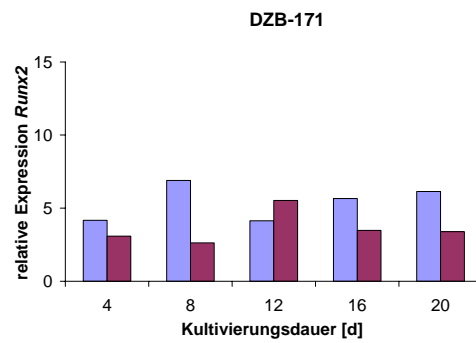
Die *RUNX2* Expressionen zeigten bei den verschiedenen Primärkulturen folgende Werte während der Kultivierungsdauer:



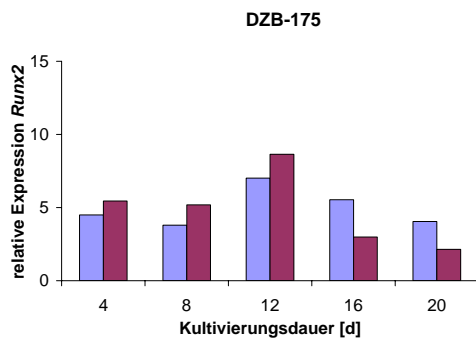
a)



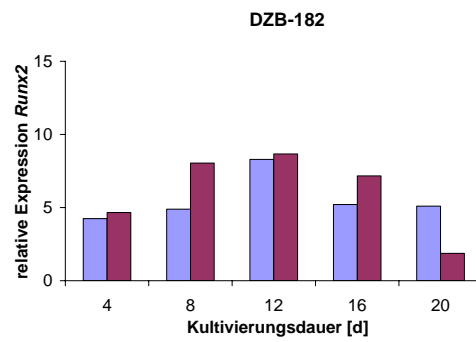
b)



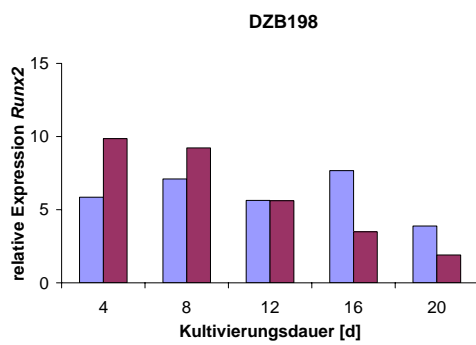
c)



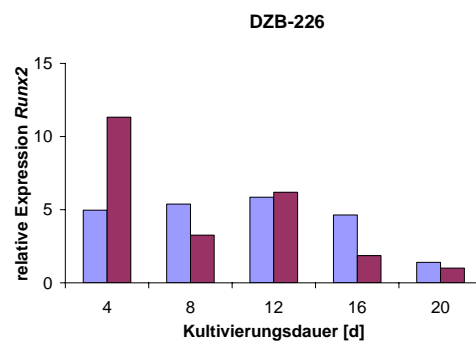
d)



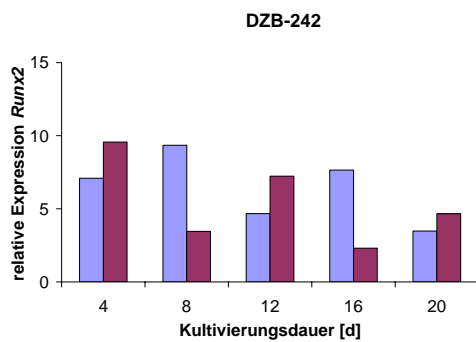
e)



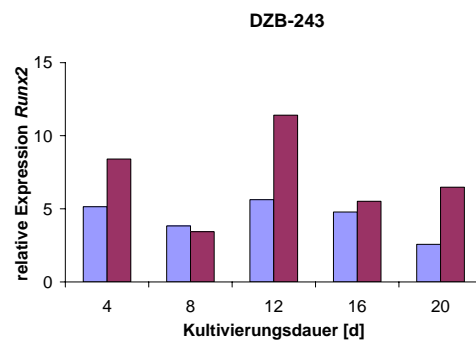
f)



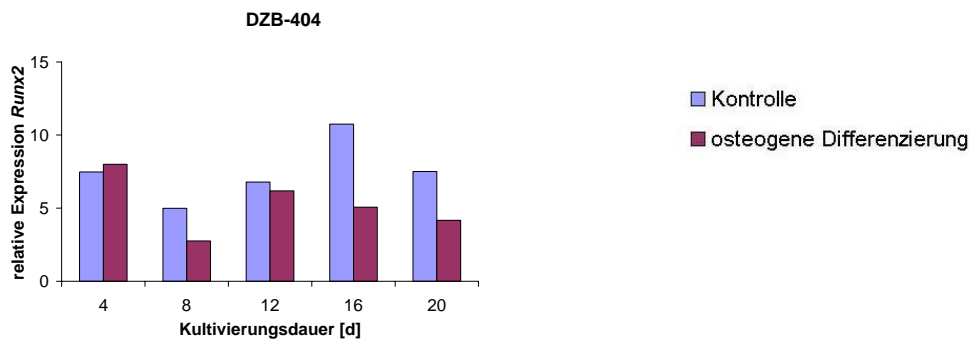
g)



h)



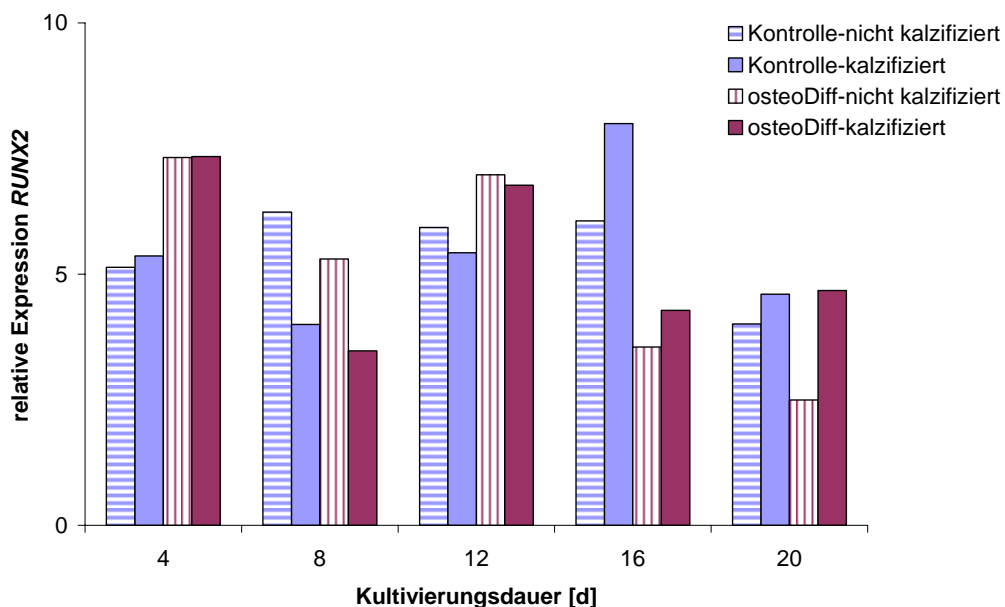
i)



**Abb. 30:** Q-PCR, relatives Expressionslevel von *RUNX2*, dargestellt in x-fach, über den Verlauf der osteogenen Differenzierung von neun verschiedenen Primärkulturen (a-i).

Die Unterschiede in der *RUNX2* Expression lagen bei den Primärkulturen in diesem Versuch etwa gleichförmig niedrig. Mit einer *RUNX2*-Expression von 11,4 am 12. Tag erreichte DZB-243 den maximalen Wert. Die geringste Expression wurde bei DZB-226 am 20. Tag gemessen und damit als 1 definiert. Die Messungen ließen keine auffälligen Unterschiede bei der *RUNX2* Expression erkennen.

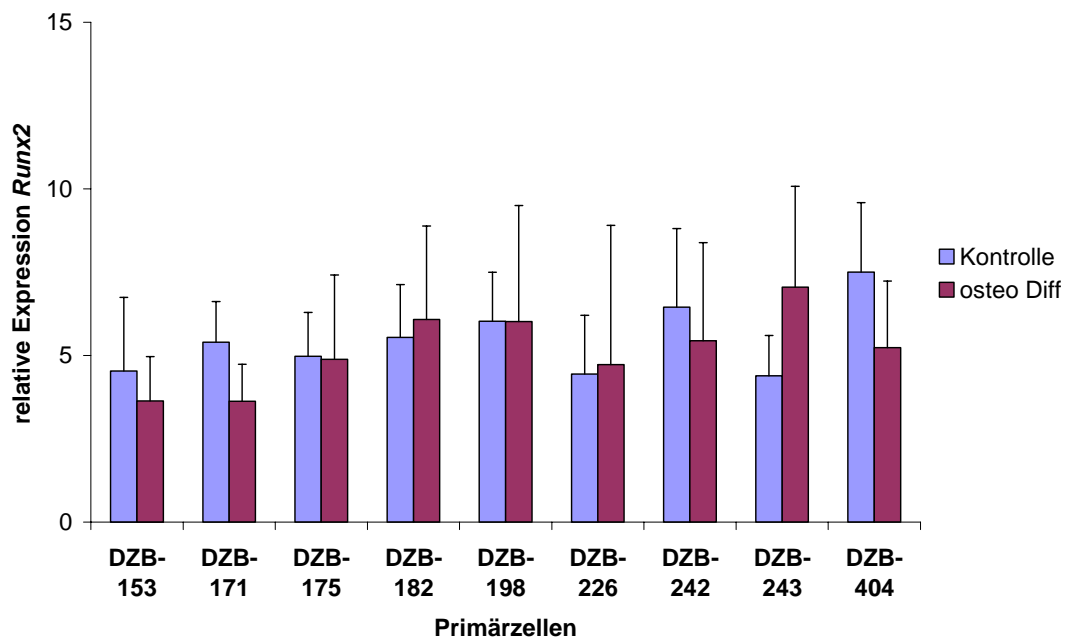
Die Darstellung der Messungen entsprechend der Gruppeneinteilung nach ihrem Kalzifizierungsgrad (Abb. 31) zeigt ebenfalls relativ gleichbleibende Expressionen von *RUNX2*.



**Abb. 31:** Q-PCR, Expression von *RUNX2* bei Primärzellkulturen im Differenzierungsverlauf, die jeweils den Gruppen „kalzifiziert“ (n=3) und „nicht kalzifiziert“ (n=6) zugeordnet sind.

Die ermittelte maximale Expression von *RUNX2* wurde von den Zellen in der Gruppe „Kontrolle-kalzifiziert“ am 16. Tag, mit einem Wert von 8,0 erreicht. Bei der Gruppe „osteodiff-kalzifiziert“ lag der maximale Wert bei 7,3 am vierten Tag. Die Zellen der Gruppe „osteodiff-nicht kalzifiziert“ erreichten ebenfalls eine maximale Expression von 7,3 am vierten Tag. Bei der Gruppe „Kontrolle-nicht kalzifiziert“ erreichten die Zellen eine maximale Expression von 6,2 am achten Tag. Die durchschnittlich niedrigste Expression mit 2,5 facher Erhöhung lag am 20. Tag bei den Zellen der Eingruppierung: „osteodiff-nicht kalzifiziert“. Es lassen sich für die Expression von *RUNX2* über den Kulturverlauf, wenn überhaupt, nur schwache Tendenzen erkennen.

Die Untersuchung der *RUNX2* Expression hinsichtlich der Potenz einzelner Primärkulturen zur Kalzifizierung, wird an den nun folgenden Darstellungen gezeigt. Zunächst wurden die neun verschiedenen Primärkulturen mit ihrer jeweilig durchschnittlichen Expression für *RUNX2* aufgeführt.



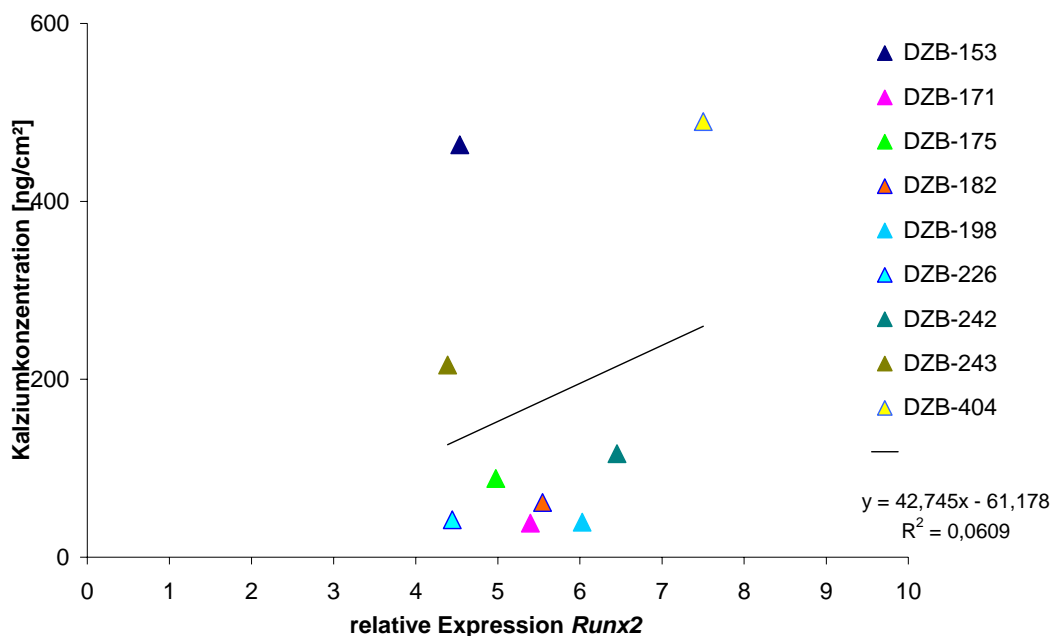
**Abb. 32** Q-PCR Gesamtexpression *RUNX2* der jeweiligen Primärkulturen (n=5).

In der Abb. 32 erreichten die Primärzellen DZB-243 in osteogenem Differenzierungsmedium den höchsten durchschnittlichen Expressionswert von 7,1. Die niedrigste Expression wurde für DZB-153 und DZB-171 mit 3,6 für die differenzierten Zellen ermittelt. Bei den Zellen in Kontrollmedium wurde die höchste *RUNX2* Expression von 7,5 bei der Primärkultur DZB-

404 gemessen. Das Expressionsminimum von 4,4 für Primärzellen in Kontrollmedium wurde bei DZB-243 gemessen.

Es zeigten sich jedoch keine starken Expressionsunterschiede zwischen den Primärkulturen. Alle Primärkulturen wiesen in diesem Versuch eine etwa vergleichbare Expression von *RUNX2* auf.

In der nun folgenden Darstellung wurde die durchschnittliche Genexpression von *RUNX2* der einzelnen Primärkulturen gegen die entsprechende Kalzifizierung aufgetragen. Da nach einer Vorinformation zu dem Kalzifizierungsvermögen der jeweiligen Zellen gesucht wurde, wurden die hier die Werte der Zellen in Kontrollmedium eingesetzt.



**Abb. 33:** Q-PCR Gesamtexpression *RUNX2* der jeweiligen Primärkulturen (n=5) in Standardmedium. Eingezeichnete Ausgleichsgerade und Bestimmtheitsmaß.

Die maximale *RUNX2* Expression von 7,5 wurde für die Zellen der Primärkultur DZB-404 ( $\triangle$ ) gemessen. Bei dieser Primärkultur wurde nach der osteogenen Differenzierung auch die höchste Kalziumkonzentration von 490 ng/cm<sup>2</sup> gemessen. Die niedrigste *RUNX2* Expression wurde bei der Primärkultur DZB-243 mit 4,4 facher Erhöhung hier lag die Kalziumkonzentration bei 216 ng/cm<sup>2</sup>.

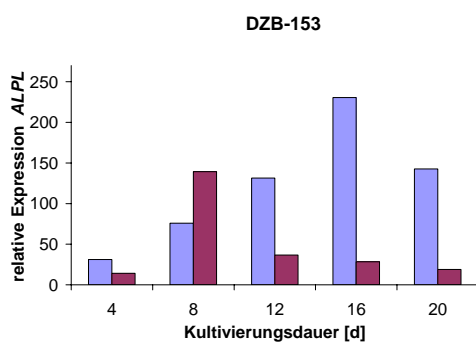
Für die Ausgleichsgerade wurde ein Bestimmtheitsmaß von  $R^2=0,0609$  angegeben. Daraus lässt sich ein Korrelationskoeffizient von  $R=0,25$  berechnen. Um die Nullhypothese verwer-

fen zu können, müsste laut Tabelle A10 in dem Buch Statistische Methoden (Sachs, 1980) der Korrelationskoeffizient mindestens einen Wert von  $|R|=0,6664$  erreichen. Demzufolge besteht bei den jeweiligen Primärzellkulturen keine Korrelation zwischen der Kalzifizierung und der Expression von *RUNX2*.

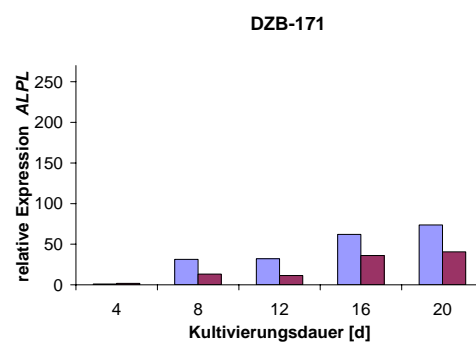
#### 3.2.2.2.4 Alkalische Phosphatase (*ALPL*)

Für die Expression der alkalischen Phosphatase (*ALPL*) zeigten sich über den Kulturverlauf folgende Werte:

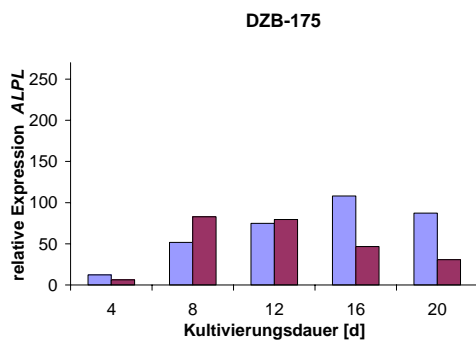
a)



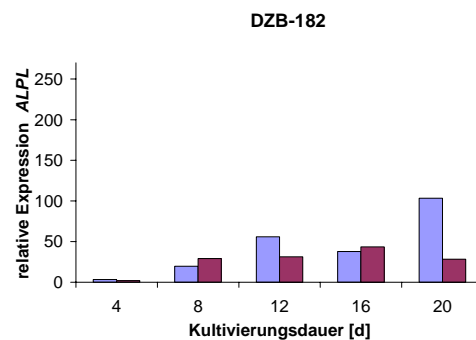
b)



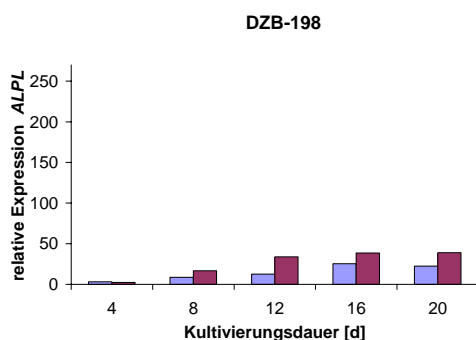
c)



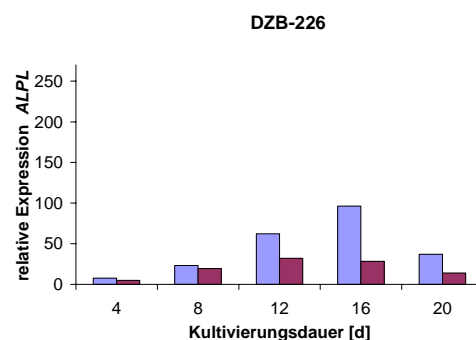
d)

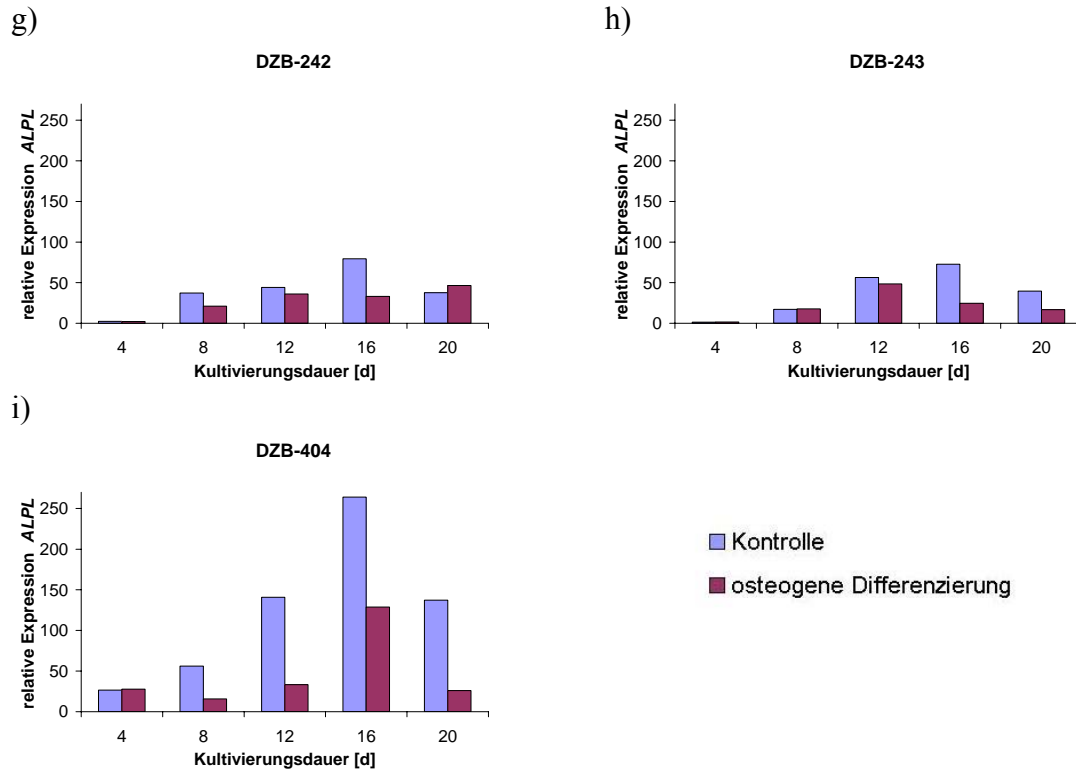


e)



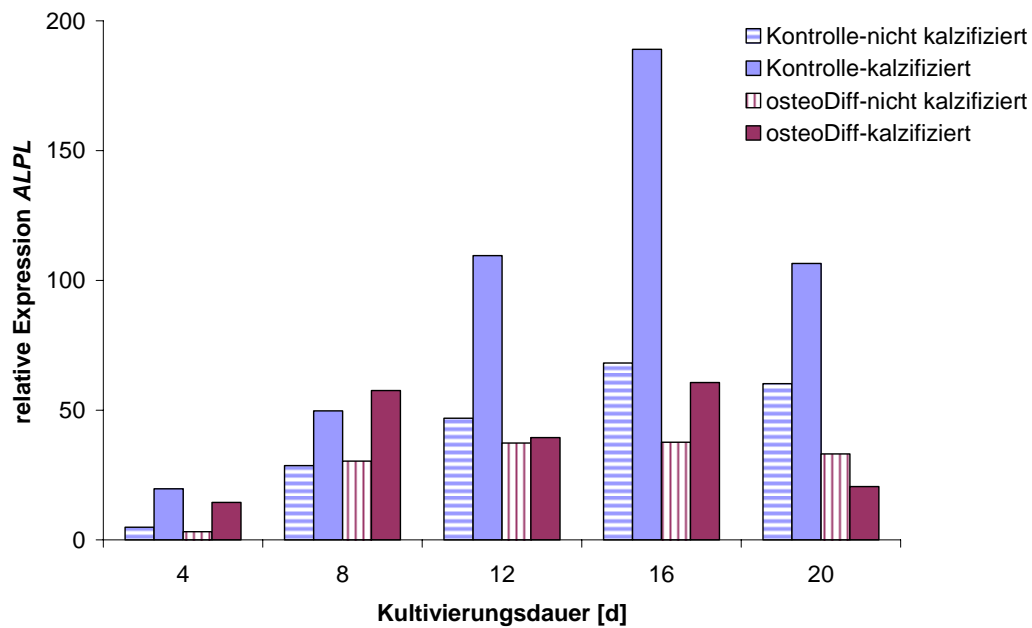
f)





**Abb. 34:** Q-PCR, relative Expressionslevel von *ALPL*, dargestellt in x-fach, über den Verlauf der osteogenen Differenzierung von neun verschiedenen Primärkulturen (a-i).

Die Spanne der relativen Expressionsunterschiede von alkalischer Phosphatase war größer, als die der zuvor gezeigten relativen Expressionen von Osteokalzin und *RUNX2*. Generell fiel die Expression bei den Zellen in Kontrollmedium höher aus, als bei den Zellen in osteogenem Differenzierungsmedium. Die höchste Expression alkalischer Phosphatase mit einer 264-fachen Erhöhung zum Normwert, wurde am sechzehnten Tag bei der Primärzellkultur DZB-404 in Kontrollmedium gemessen. Die geringste Expression wurde am vierten Kultivierungstag bei der Primärzellkultur DZB-171 in Kontrollmedium gemessen und damit als „eins“ definiert. Die Expressionen von *ALPL* lagen bei den meisten Messproben unterhalb einer hundertfachen Erhöhung. Die beiden Primärzellkulturen DZB-153 und DZB-404 fielen mit mehreren Messungen deutlich über der hundertfachen Erhöhung besonders auf. Das zeigte sich insbesondere bei den Zellen in Kontrollmedium.

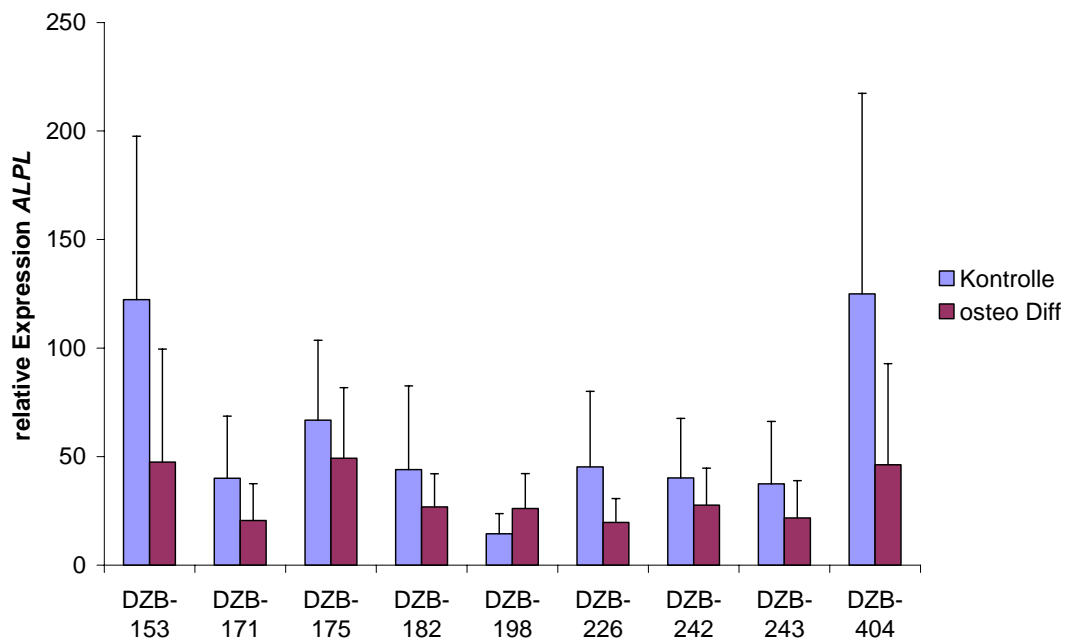


**Abb. 35:** Q-PCR, Expression von alkalischer Phosphatase (*ALPL*) bei Primärzellkulturen im Differenzierungsverlauf, die jeweils den Gruppen „kalzifiziert“ (n=3) und „nicht kalzifiziert“ (n=6) zugeordnet sind.

Die maximale Expression der alkalischen Phosphatase wurde von allen Gruppen am sechzehnten Tag erreicht. Bei der Gruppe „Kontrolle-kalzifiziert“ mit einem Wert von 189,1 bei der Gruppe „Kontrolle-nicht kalzifiziert“ mit 68,2 bei der Gruppe „osteoDiff-kalzifiziert“ mit 60,6 und bei der Gruppe „osteoDiff-nicht kalzifiziert“ mit einem Wert von 37,7.

Alle Gruppen hatten am ersten Messpunkt, dem vierten Tag der Kultivierung, die niedrigste Expression. Die Werte stiegen bis zum 16. Tag auf den jeweils maximalen Wert und fielen dann wieder ab. Die Gruppe „osteoDiff-kalzifiziert“ hatte lediglich am 12. Tag eine abweichend niedrige Expression.

In der folgenden Abb. 36 wird die durchschnittliche Expression von alkalischer Phosphatase für die jeweiligen Primärkulturen über den Kulturverlauf gezeigt:



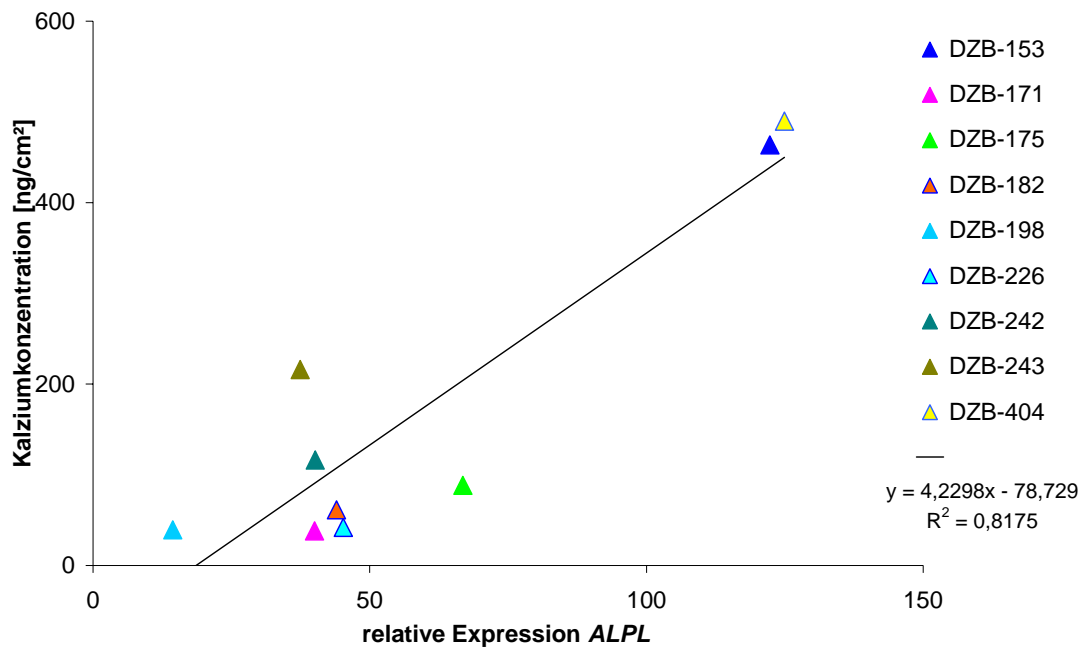
**Abb. 36:** Q-PCR der durchschnittlichen Expression von *ALPL* der jeweiligen Primärkulturen (Standardabweichung n=5).

Die durchschnittlich höchste relative Expression der alkalischen Phosphatase von 125 wurde bei der Primärzellkultur DZB-404 in Kontrollmedium gemessen. Dieser Wert wurde mit 122,3 dicht gefolgt von den Primärzellen DZB-153 in Kontrollmedium. Die niedrigste Expression wies die Primärzellkultur DZB-198 mit 14,4 in Kontrollmedium auf. Bei den differenzierten Zellen wurde die höchste Expression von 49,2 bei der Primärkultur DZB-175 ermittelt.

Die Expression von alkalischer Phosphatase war (wie auch bei der Darstellung des Kulturverlaufes in Abb. 34 und Abb. 35) generell bei den Kontrollzellen in Standardmedium höher als bei den entsprechenden Zellen in Differenzierungsmedium. Das galt für alle Primärkulturen in diesem Versuch bis auf die Ausnahme der Primärzellen von DZB-198.

In der folgenden Abb. 37 wird die Beziehung von der Genexpression alkalischer Phosphatase und der entsprechenden Kalzifizierung der jeweiligen Primärkulturen genauer untersucht.





**Abb. 37:** Q-PCR Gesamtexpression *ALPL* der jeweiligen Primärkulturen (n=5) in Standardmedium. Eingezeichnete Ausgleichsgerade und Bestimmtheitsmaß.

Bei dem Vergleich der relativen Expression alkalischer Phosphatase mit der Kalzifizierung fielen vor allem die Primärkulturen DZB-153 und DZB-404 ( $\blacktriangle$   $\blacktriangle$ ) ins Auge. Mit Durchschnittswerten von 122 und 125 für die relative Expression der alkalischen Phosphatase (aufgetragen auf der x-Achse) lagen sie sehr viel höher als alle anderen Primärzellkulturen, die relative Expressionen zwischen 14,4 und 66,8 aufwiesen. Da diese beiden Primärkulturen auch die stärkste Kalzifizierung in osteogenem Differenzierungsmedium gebildet hatten, lagen sie mit 490 ng/cm<sup>2</sup> für DZB-404 und mit 464 ng/cm<sup>2</sup> für DZB-153 höher als alle anderen Primärzellkulturen.

Für die Ausgleichsgerade wurde ein Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,8175$  ermittelt. Daraus lässt sich ein Korrelationskoeffizient von  $R = 0,9042$  berechnen. Für den Test der Nullhypothese (Korrelationskoeffizient gleich Null) ist bei zweiseitiger Fragestellung durch Korrelationskoeffizienten mit Werten  $|R| > 0,8983$  laut Tabelle A10 in dem Buch Statistische Methoden (Sachs, 1980), ein Signifikanzniveau von 0,001 erreicht. Deshalb kann mit einer Restunsicherheit von 0,1% die Gegenhypothese angenommen werden: Es gab bei den dentalen Primärzellen eine Korrelation zwischen der Kalzifizierung und der Expression von alkalischer Phosphatase (*ALPL*).

Für diese Aussage wurden alle fünf Messungen über den Kultivierungszeitraum einbezogen. Die relative Expression von *ALPL* wies jedoch leichte Schwankungen auf. Beispielsweise zeigten sich bei allen Primärkulturen niedrige Expressionswerte bei Kulturbeginn. Betrachtet man die Korrelation zwischen *ALPL*-Expression und Kalzifizierung gesondert für jeden einzelnen Tag der Messreihe, so ergibt sich für jeden Zeitpunkt ein signifikantes Ergebnis:

Messung	Geradengleichung	Bestimmtheitsmaß	Korrelationskoeffizient	Restunsicherheit
Tag		R <sup>2</sup>	R	[%]
4	$y = 13,92x + 35,822$	0,7674	0,8760	1
8	$y = 6,1948x - 47,983$	0,5547	0,7448	5
12	$y = 3,8452x - 87,809$	0,8210	0,9061	0,1
16	$y = 2,0155x - 45,768$	0,8573	0,9259	0,1
20	$y = 2,9475x - 50,106$	0,5386	0,7339	5

**Tab. 5:** Korrelationskoeffizient Kalzifizierung / Expression *ALPL*.

Die Signifikanzschranken für 5% Restunsicherheit liegt bei einem Korrelationskoeffizient  $|R| > 0,6664$ ; die 1% Schranke liegt bei  $|R| > 0,7977$  und die 0,1% Schranke bei  $|R| > 0,8983$ .

Beim ersten Messzeitpunkt am vierten Tag, mit auffällig niedriger Expression, erreichte der Korrelationskoeffizient dennoch die 1% Schranke. An den Messtagen 12 und 16 kann die Nullhypothese zu einem Signifikanzniveau von 0,001 verworfen werden. Für die Korrelation von Kalzifizierung und Expression von alkalischer Phosphatase (*ALPL*) verbleibt hier also noch eine Restunsicherheit von 0,1% und ist damit hoch signifikant.

### **3.3 Neurogene Differenzierung dentaler Primärkulturen**

Für den Nachweis der neurogenen Potenz dentaler Zellen wurden die Primärzellen nach einem neurogenen Differenzierungsprotokoll kultiviert (Kogler et al., 2004; Degistirici et al., 2008). Zunächst bildeten die Zellen in einer ersten Phase in Neurobasalmedium Sphäroide, dann wurden sie in neurogenem Differenzierungsmedium kultiviert. Während dieser zweiten Phase wurden die Morphologie und das Proliferationsverhalten von vier Primärzellpopulationen dokumentiert. Zwei Primärzellkulturen wurden zusätzlich nach der Differenzierungsphase hinsichtlich ihrer Genexpression untersucht.

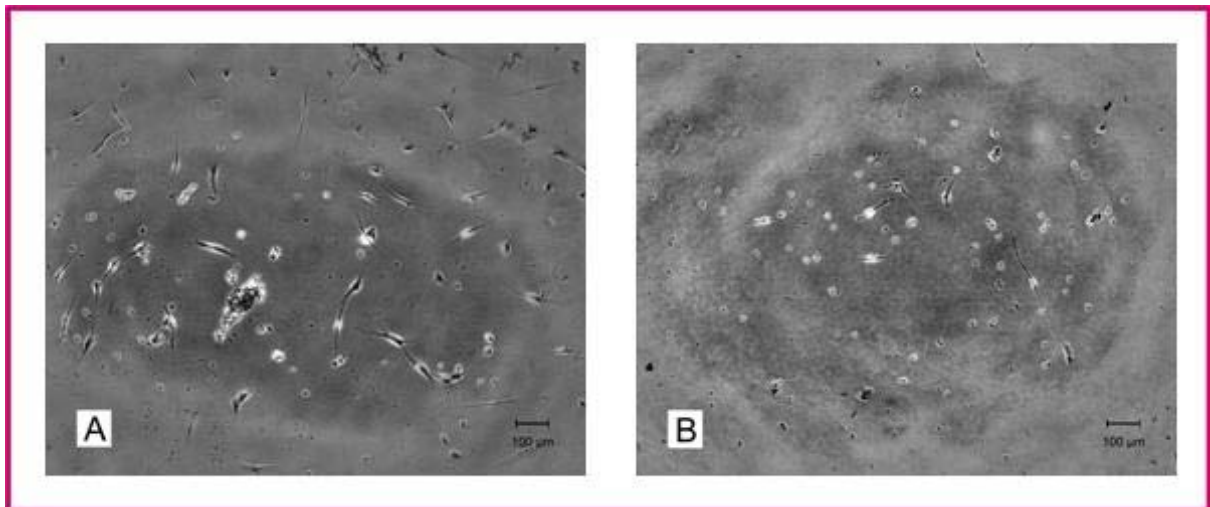
#### **3.3.1 Morphologie und Proliferationsverhalten, Einfluss der Mediumkomponenten**

Die Auswirkung der Differenzierungsmedien auf die Primärzellkulturen wird zunächst anhand mikroskopischer Fotos bei fünfzigfacher Vergrößerung jeweils zu Beginn und zum Abschluss der Differenzierungsphase gezeigt. Dabei wird jeweils der Mittelpunkt der Kavität betrachtet, da außen liegende Bereiche aufgrund der Meniskusbildung des flüssigen Kulturmediums undeutlich sind (siehe Kap. 2.6.1.2). Die Bezeichnung der dentalen Primärkulturen erfolgt in diesem Kapitel mit der Kennzeichnung der Passagenzahl hinter der DZB-Nummer.

##### **3.3.1.1 Dentale Primärzellen DZB-202p5**

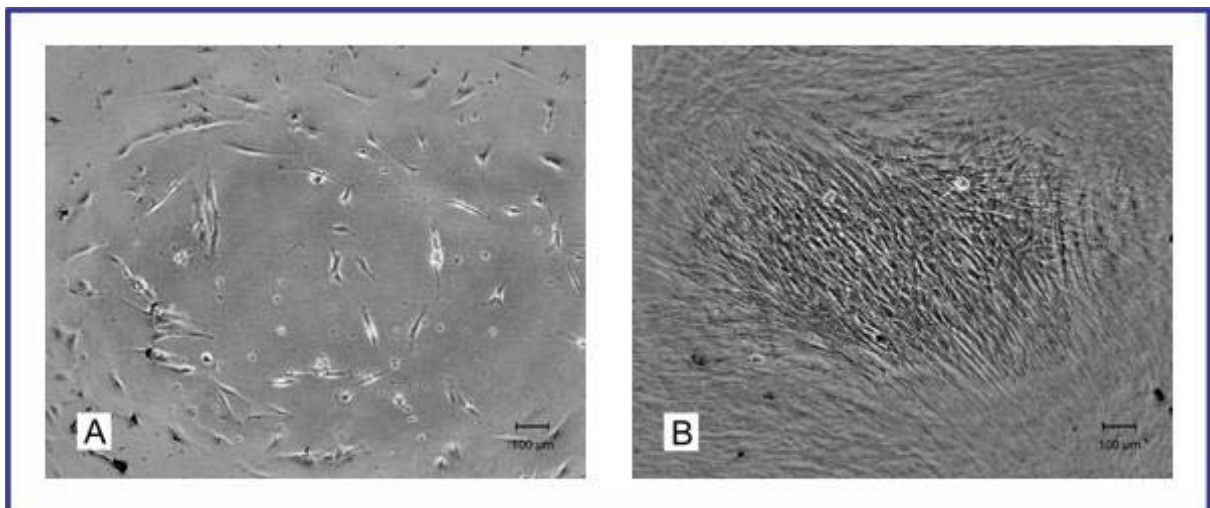
Anhand mikroskopischer Fotos und einer Quantifizierung der Zellen über den Kulturverlauf wird die Auswirkung von Differenzierungsmedien auf die Primärkultur DZB-202p5 gezeigt. Dabei wird zunächst der Effekt von neurogenem Differenzierungsmedium und anschließend bei Veränderung der Mediumkomponenten dargestellt.

### 3.3.1.1.1 Reaktion auf neurogenes Differenzierungsmedium



**Abb. 38:** Mikroskopische Fotos der Primärzellen DZB-202p5 in neurogenem Differenzierungsmedium. Foto A zeigt die Zellen am Tag eins, Foto B am Tag 13 der Kultivierung.

Bei Kultivierungsbeginn sind einige lang ausgezogene Zellen zu sehen (Abb. 38A). Zum Abschluss der Kultivierung sind deutlich weniger Zellen erkennbar (Abb. 38B). Im Vergleich dazu die mikroskopischen Fotos der Zellen in Kontrollmedium (Abb. 39):

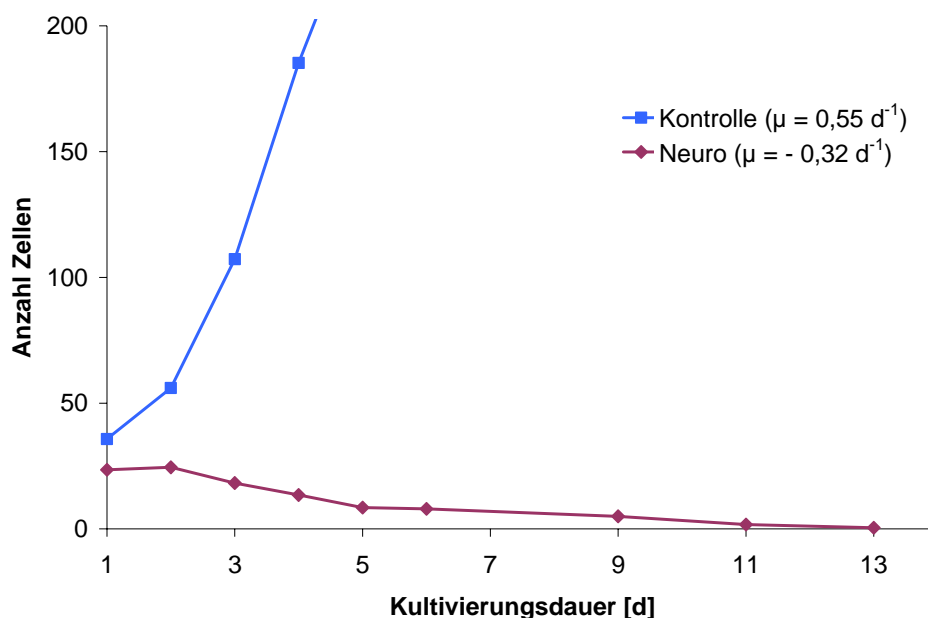


**Abb. 39:** Mikroskopische Fotos der Primärzellen DZB-202p5 in Kontrollmedium. Foto A zeigt die Zellen am Tag eins, Foto B am Tag 13 der Kultivierung.

Bei Kulturbeginn befanden sich wenige Zellen im Standard-Kontrollmedium (Abb. 39A). Am dreizehnten Tag hatten die Zellen die Grundfläche des Kulturgefäßes konfluent überwachsen und mehrere Zellschichten gebildet (Abb. 39B). Von der ersten bis zu der letzten

mikroskopischen Aufnahme ist ein starker Anstieg der Zellzahl in Kontrollmedium zu erkennen.

Anhand der mikroskopischen Fotos wurden jeweils in einem definierten Bereich die Zellzahlen ermittelt (siehe Kap. 2.6.1.2). Es handelt sich bei diesem Verfahren um eine nicht invasive Zellzahlbestimmung, da so die Kultur der Zellen nicht maßgeblich beeinträchtigt wird. In dem folgenden Diagramm wurden die ermittelten Zellzahlen als Graph dargestellt und so das Proliferationsverhalten der Zellen dokumentiert (die Farbe der Graphen entspricht der Rahmenfarbe bei den mikroskopischen Fotos).



**Abb. 40:** Proliferationsverhalten der Zellen DZB-202p5 in neurogenem Differenzierungsmedium im Vergleich zu den gleichen Zellen in Kontrollmedium.

Die ersten adhärenen Zellen wurden am Tag nach Versuchsstart gezählt. Die Startzellmenge in neurogenem Differenzierungsmedium ergab durchschnittlich 25 adhärenen Zellen (pro  $\text{mm}^2$ ) im Zählausschnitt. Die Zellzahl sank über den Kultivierungszeitraum kontinuierlich ab. Nach 13 Tagen war durchschnittlich noch eine Zelle in dem Zählausschnitt auszumachen. Damit ergab sich für die Zellen in neurogenem Differenzierungsmedium eine spezifische Wachstumsrate (Kap. 2.3.4) von  $\mu = -0,32 \text{ d}^{-1}$ . Die Startzellmenge im Kontrollmedium betrug durchschnittlich 36 Zellen pro  $\text{mm}^2$ . Die Zellzahl stieg an und am vierten Tag befanden sich 185 Zellen im Zählausschnitt. Damit ergab sich bis zum vierten Tag eine spezifische

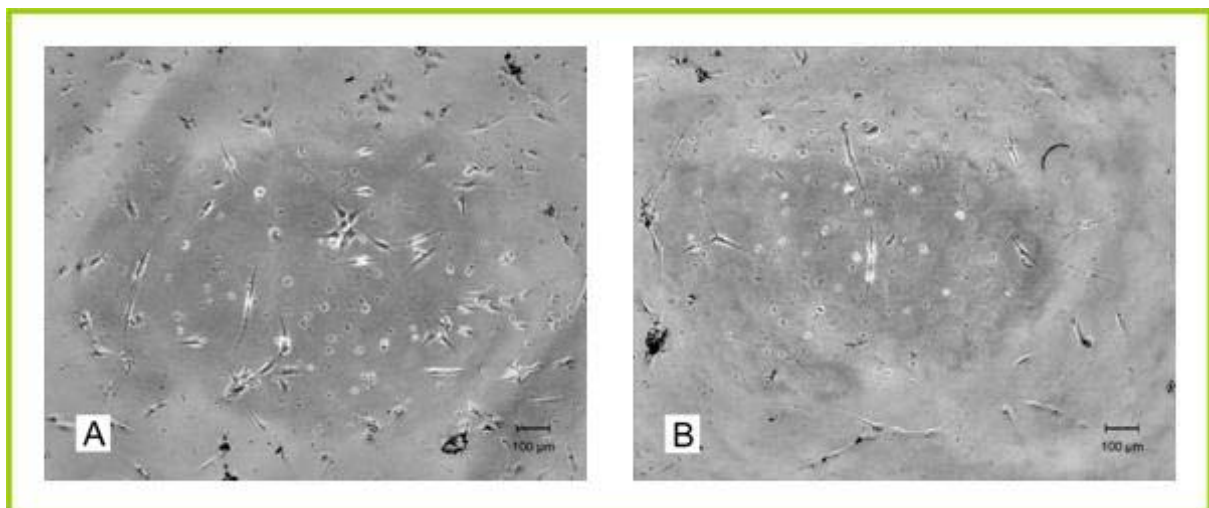
Wachstumsrate von  $\mu = 0,55 \text{ d}^{-1}$ . Aufgrund der hohen Zelldichte waren in dieser Kavität spätere Zählungen nicht möglich.

In Kontrollmedium vermehrten sich die Zellen, während in neurogenem Differenzierungsmedium viele Zellen abstarben. Der Proliferationsverlauf der Zellpopulationen ist in den beiden Kulturmedien demzufolge gegensätzlich.

### 3.3.1.1.2 Einfluss der Mediumkomponenten

Es wurde zudem die Wirkung der Mediumkomponenten IBMX (3 Isobutyl-1-Methyl Xanthin), Dexamethason und  $\beta$ -Glycerolphosphat auf die Zellkulturen untersucht.

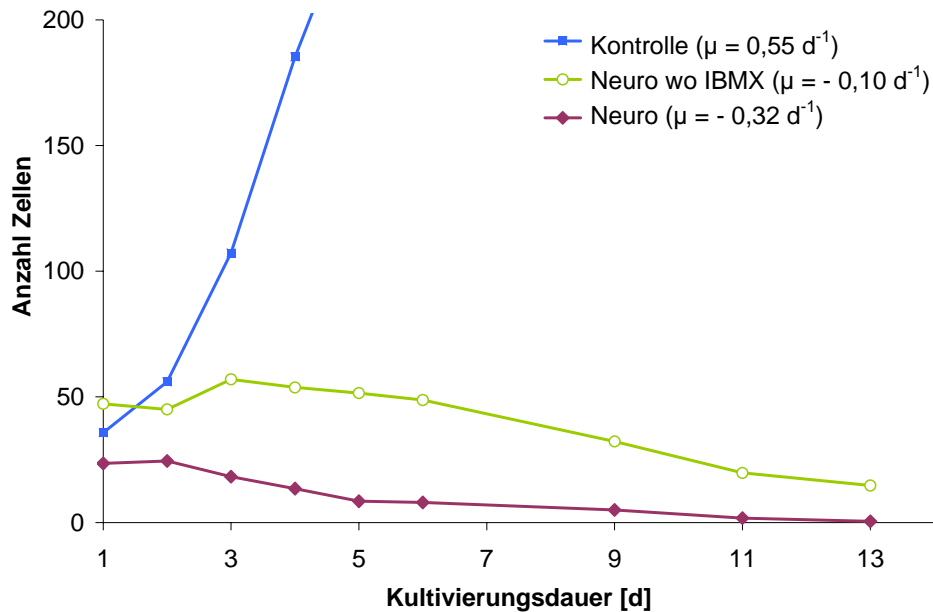
Dabei wurde zunächst der Effekt der Komponente IBMX auf das Proliferationsverhalten der Zellen untersucht, indem die Zellen in neurogenem Differenzierungsmedium mit und ohne IBMX untersucht wurden.



**Abb. 41:** Mikroskopische Fotos der Primärzellen DZB-202p5 in neurogenem Differenzierungsmedium ohne die Mediumkomponente IBMX. Foto A zeigt die Zellen am Tag eins, Foto B am Tag 13 der Kultivierung.

Auf dem mikroskopischen Foto zu Kulturbeginn sind einige Zellen in neurogenem Differenzierungsmedium ohne IBMX zu sehen (Abb. 41A). Am 13. Tag zum Abschluss der Kultivierung sind weniger Zellen erkennbar (Abb. 41B). Auch in neurogenem Differenzierungsmedium ohne IBMX sanken die Zellzahlen vom zweiten bis zum vierzehnten Tag. Dennoch sind am Kultivierungsende einige wenige Zellen erkennbar.

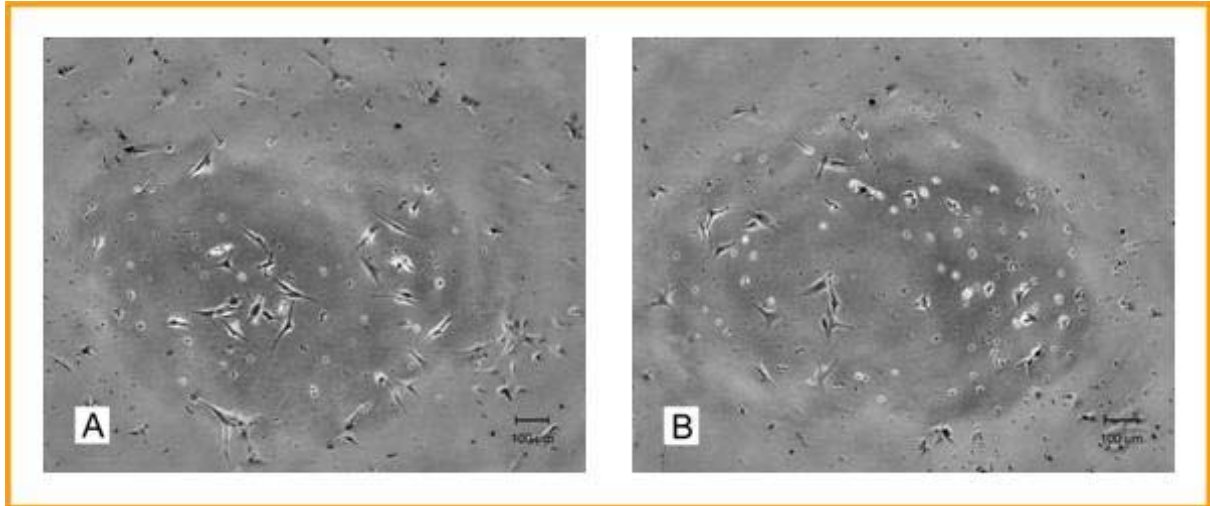
Die Quantifizierung der jeweils vier Parallelkulturen zeigte folgendes Proliferationsverhalten:



**Abb. 42:** Proliferationsverhalten der Zellen DZB-202p5 in neurogenem Differenzierungsmedium ohne IBMX (3 Isobutyl-1-Methyl Xanthan) im Vergleich zu den Zellen in vollständigem neurogenem Differenzierungsmedium und in Kontrollmedium.

In der Abb. 42 wurden zum Vergleich wiederum die Proliferationsverläufe der Zellen in Standardmedium und in neurogenem Differenzierungsmedium aus der Abb. 40 eingetragen. Die Startzelldichte in neurogenem Differenzierungsmedium ohne IBMX betrug 47 Zellen im Zählausschnitt. Nach einem leichten Anstieg sank die Zellzahl auf 15 Zellen/mm<sup>2</sup>. Die ermittelte spezifische Wachstumsrate von  $\mu = -0,10 \text{ d}^{-1}$  lag höher als in dem neurogenem Differenzierungsmedium mit  $\mu = -0,32 \text{ d}^{-1}$ . Auch bei nicht absolut gleicher Startzelldichte ist damit deutlich, dass die Absterberate der Zellen in neurogenem Differenzierungsmedium schwächer ist, wenn es ohne IBMX zubereitet wurde.

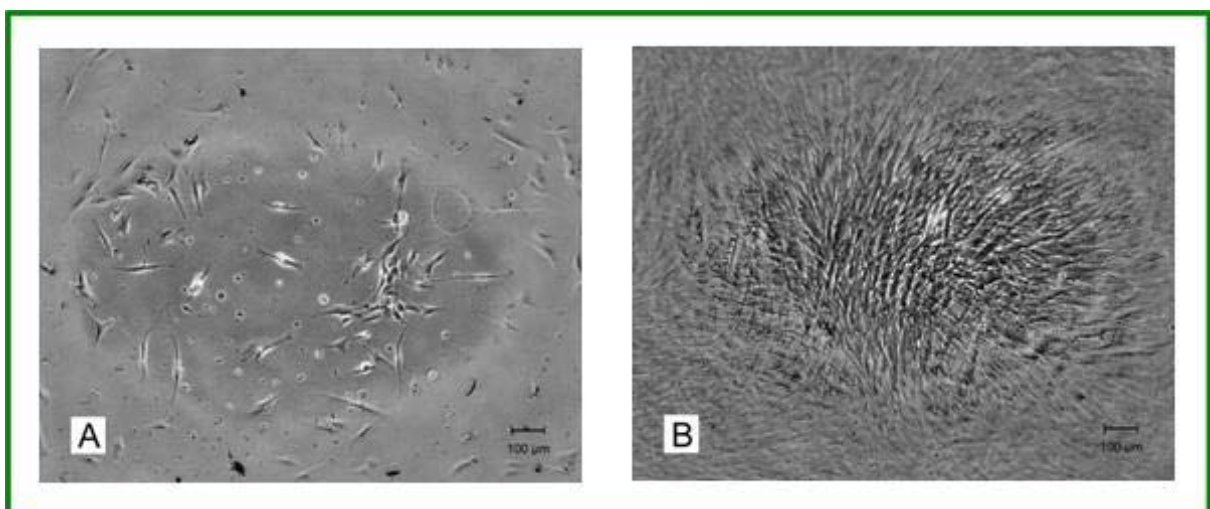
Überdies wurde untersucht, ob die dentalen Zellen bei einem kombinierten Stimulus in der Lage sind, ihr Wachstums- und Differenzierungspotential zu verbessern. Dazu wurden die dentalen Zellen in neurogenem Differenzierungsmedium kultiviert, welchem die Reagenzien für eine osteogene Differenzierung (Dexamethason,  $\beta$ -Glycerolphosphat und L-Ascorbinsäure) zugesetzt wurden.



**Abb. 43:** Mikroskopische Fotos der Primärzellen DZB-202p5 in neuro-/osteogenem Differenzierungsmedium. Foto A zeigt die Zellen am Tag eins, Foto B am Tag 13 der Kultivierung.

Bei Kulturbeginn hatten wenige Zellen im neuro-/osteogenen Differenzierungsmedium adhärirt (Abb. 43A). Am 13. Tag, also am Ende der Differenzierung, konnten im neurogenem Differenzierungsmedium mit Zusatz der Komponenten für die osteogene Differenzierung noch einige adhärenente Zellen gezählt werden (Abb. 43B). Die Zellen proliferierten zwar nicht, dennoch sank die Zellzahl nicht so drastisch ab wie bei den Zellen in reinem neurogenem Differenzierungsmedium.

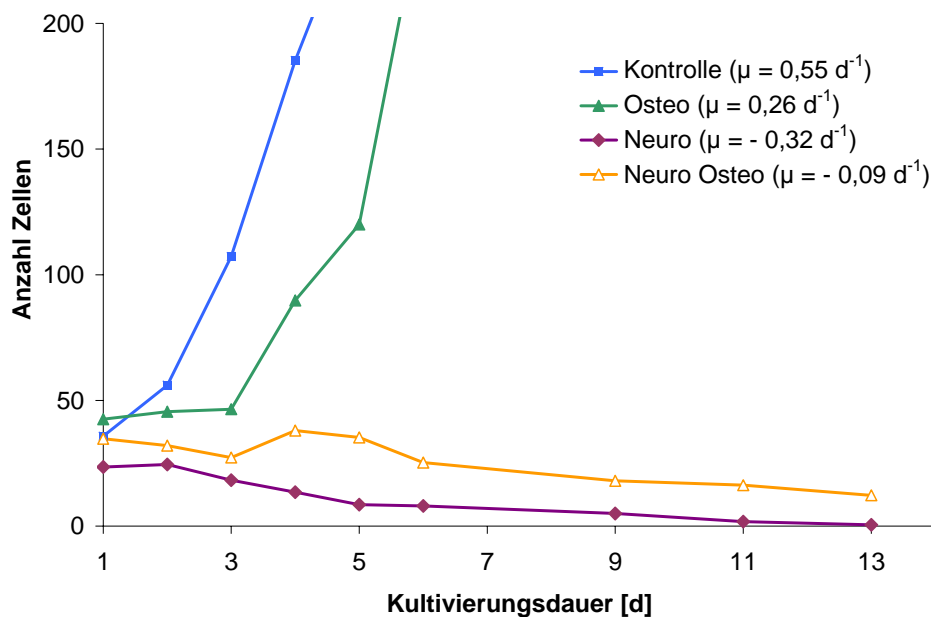
Zum Vergleich dazu wurden die Zellen in reinem osteogenem Differenzierungsmedium kultiviert und gezählt. Die Zellen am Kultivierungsstart und am Kultivierungsende sahen folgendermaßen aus:



**Abb. 44:** Mikroskopische Fotos der Primärzellen DZB-202p5 in osteogenem Differenzierungsmedium. Foto A zeigt die Zellen am Tag eins, Foto B am Tag 13 der Kultivierung.



Zu Beginn der Kultur befanden sich wenige Zellen im osteogenen Differenzierungsmedium (Abb. 44A). Am 13. Tag haben die Zellen die Grundfläche des Kulturgefäßes konfluent überwachsen und mehrere Zellschichten gebildet (Abb. 44B). Vom 1. zum 13. Tag ist auf den mikroskopischen Aufnahmen ein starker Anstieg der Zellzahlen in osteogenem Differenzierungsmedium zu erkennen. Die auf den Fotos ausgezählten Zellen zeigten folgende Proliferationsverläufe:



**Abb. 45:** Proliferationsverhalten der Zellen DZB-202p5 in neuro-/osteogenem Differenzierungsmedium im Vergleich zu den gleichen Zellen in osteogenem Differenzierungsmedium und in Kontrollmedium.

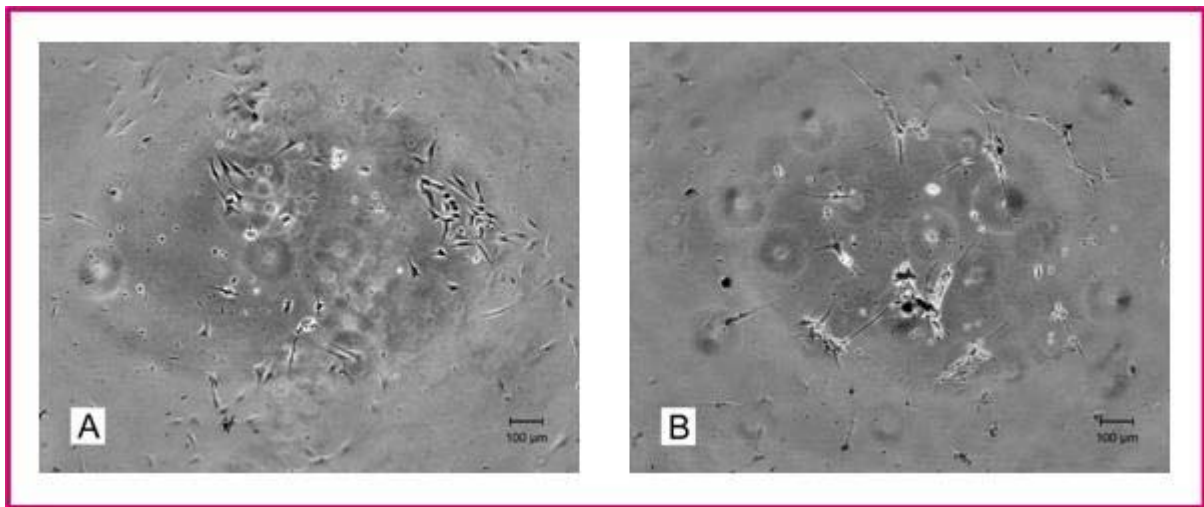
Zum Vergleich sind die Proliferationsverläufe der Zellen in Standardmedium und in neurogenem Differenzierungsmedium aus der Abb. 40 in der Darstellung in Abb. 42 eingetragen. Die Zellen in neuro-/osteogenem Differenzierungsmedium hatten zu Beginn der Kultivierung eine Zellzahl von 35. Diese sank über den Verlauf der Differenzierung leicht ab. Am Differenzierungsende konnten noch durchschnittlich 12 adhärenente Zellen in den Zählausschnitten der Parallelansätze ermittelt werden. Die entsprechende spezifische Wachstumsrate beträgt  $\mu = -0,09 \text{ d}^{-1}$ . In dem rein osteogenen Differenzierungsmedium wurde eine Startzellzahl von 43 ausgemacht. Die Zellen proliferierten stark, so dass noch am 5. Kultivierungstag 120 Zellen im Zählausschnitt ermittelt werden konnten und an den folgenden Tagen aufgrund der hohen Zelldichte keine weiteren Zählungen möglich waren. Die entsprechende spezifische Wachstumsrate der Zellen beträgt in osteogenem Differenzierungsmedium  $\mu = 0,26 \text{ d}^{-1}$ .

### 3.3.1.2 Dentale Primärzellen DZB-403p5

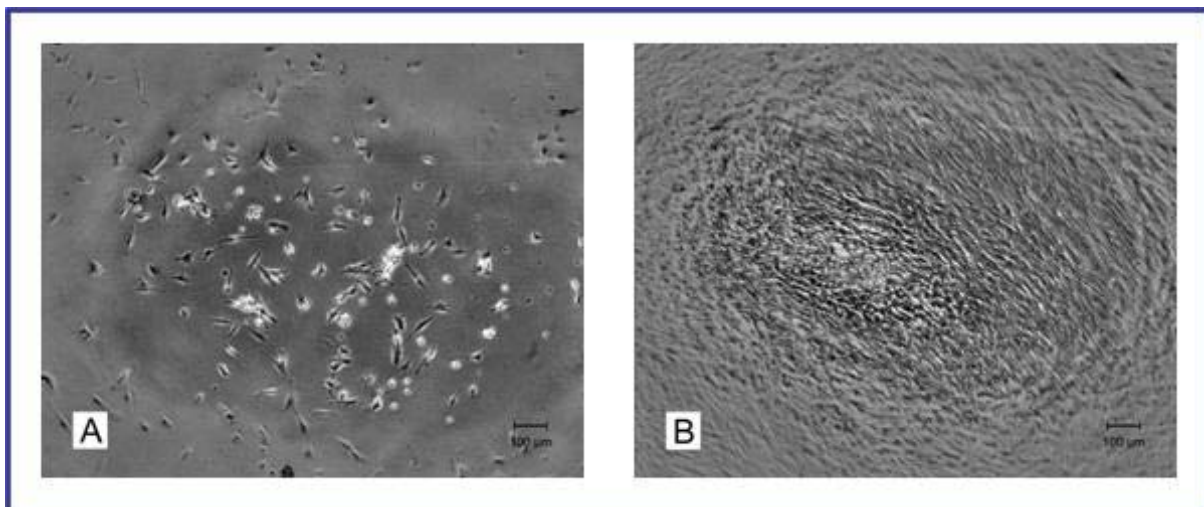
Anlässlich der Variabilität verschiedener Primärkulturen wurden weitere Primärpopulationen getestet. Zur besseren Erfassbarkeit werden die Proliferationsverläufe der verschiedenen Primärkulturen einzeln dargestellt und zum Abschluss die spezifischen Wachstumsraten in den jeweiligen Medien in einer Grafik zusammengefasst.

#### 3.3.1.2.1 Reaktion auf neurogenes Differenzierungsmedium

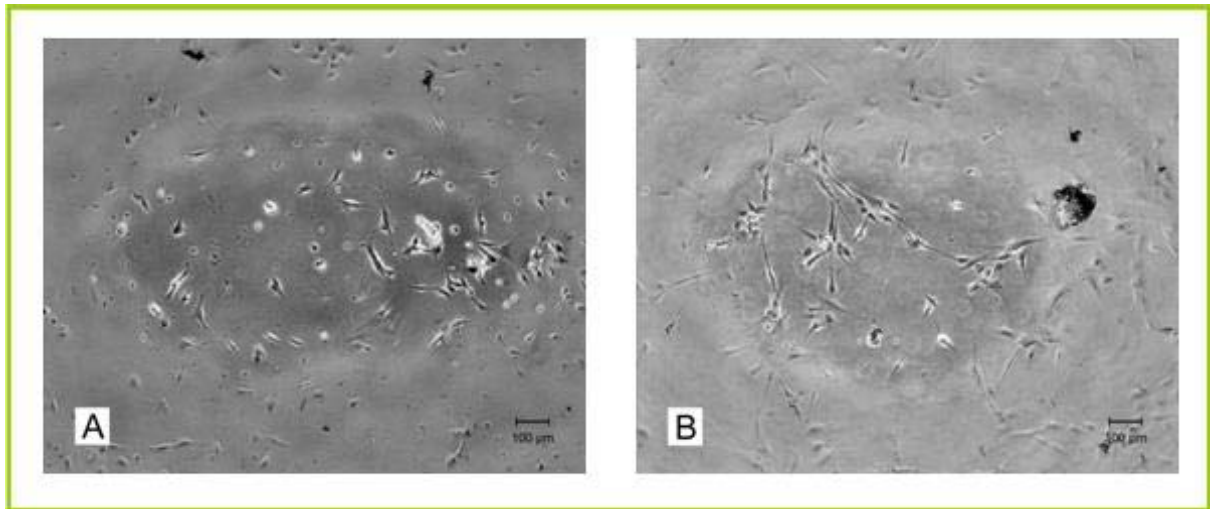
Die Zellen DZB-403p5 zeigten sich bei Kultivierung in unterschiedlichen Medien folgendermaßen:



**Abb. 46:** Mikroskopische Fotos der Primärzellen DZB-403p5 in neurogenem Differenzierungsmedium. Foto A zeigt die Zellen am Tag eins, Foto B am Tag 13 der Kultivierung.

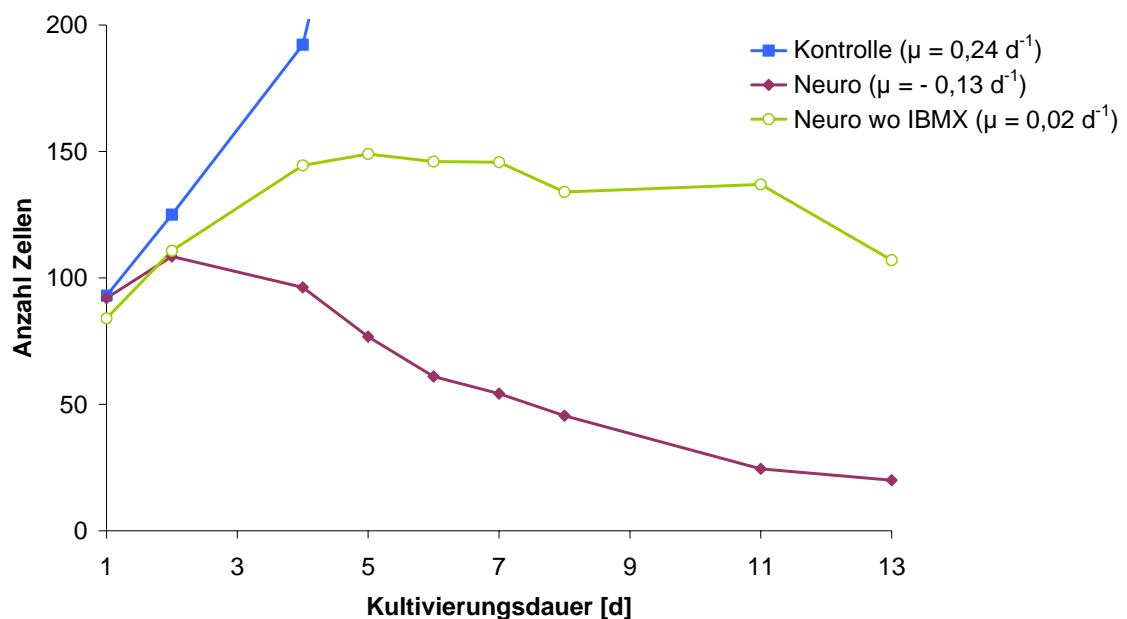


**Abb. 47:** Mikroskopische Fotos der Primärzellen DZB-403p5 in Standardmedium. Foto A zeigt die Zellen am Tag eins, Foto B am Tag 13 der Kultivierung.



**Abb. 48:** Mikroskopische Fotos der Primärzellen DZB-403p5 in neurogenem Differenzierungsmedium ohne die Komponente IBMX (Abkürzung). Foto A zeigt die Zellen am Tag eins, Foto B am Tag 13 der Kultivierung.

Die Zellen der aus DZB-403 (Abb. 46 bis Abb. 48) zeigten folgendes Proliferationsverhalten:



**Abb. 49:** Proliferationsverhalten der Zellen DZB-403p5 in neurogenem Differenzierungsmedium ohne IBMX im Vergleich zu den gleichen Zellen in vollständigem neurogenem Differenzierungsmedium und in Kontrollmedium.

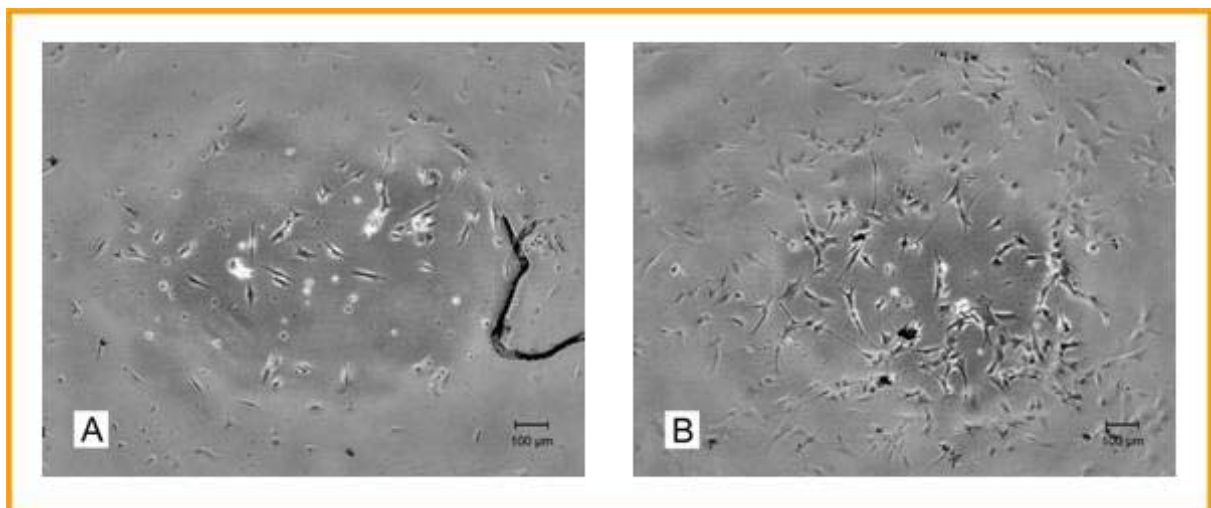
Die Zellzahl zu Beginn der Kultivierung in neurogenem Differenzierungsmedium betrug 92 Zellen. Über den Kulturverlauf sank die Anzahl auf 20 Zellen ab. Die daraus folgende spezifische Wachstumsrate beträgt  $\mu = -0,13 \text{ d}^{-1}$ . Im Kontrollmedium stieg die Zellzahl von an-

fänglich 93 Zellen am vierten Tag bereits auf 192 Zellen. Die spezifische Wachstumsrate lag bei  $\mu = 0,24 \text{ d}^{-1}$ . An den folgenden Tagen war die Anzahl der Zellen zu hoch für eine Auszählung im Messrahmen. Im neurogenen Differenzierungsmedium ohne die Komponente IBMX, wurden am ersten Tag 84 Zellen gezählt. Am 13. bzw. letzten Tag konnten noch 107 Zellen ausgezählt werden. Daraus resultierte eine spezifische Wachstumsrate von  $\mu = 0,02 \text{ d}^{-1}$ .

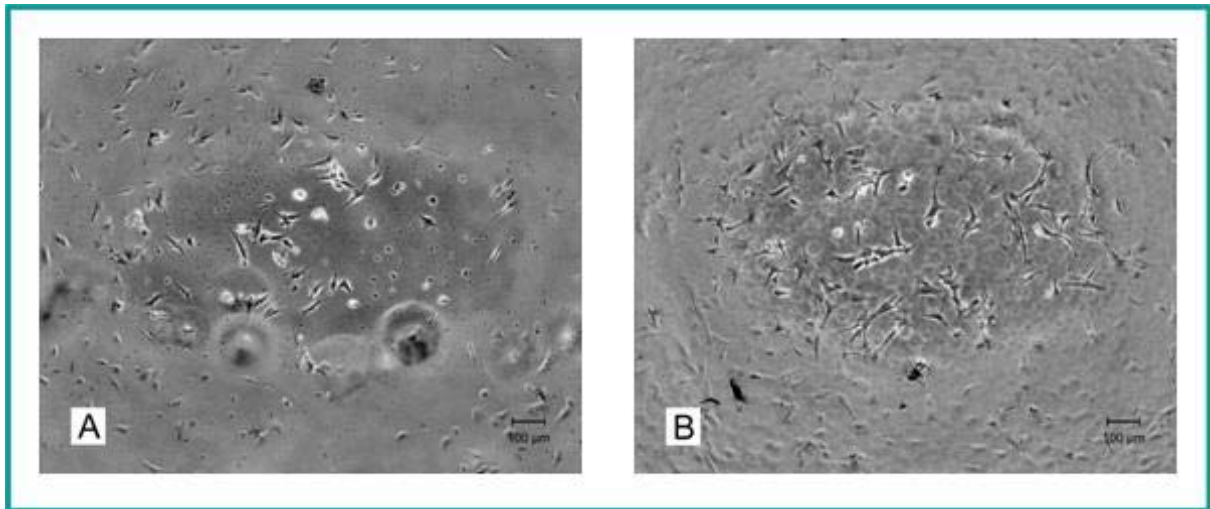
Damit wird bestätigt, dass auch von den Primärzellen DZB-403p5 nur ein geringer Anteil der Zellen bis zum Kultivierungsende in neurogenem Differenzierungsmedium überleben konnte. Das neurogene Differenzierungsmedium stellte auch bei diesen Primärzellen ohne die Komponente IBMX eine günstigere Lebens- und Proliferationsgrundlage dar.

### 3.3.1.2.2 Reaktion bei Zusatz osteogener Differenzierungskomponenten

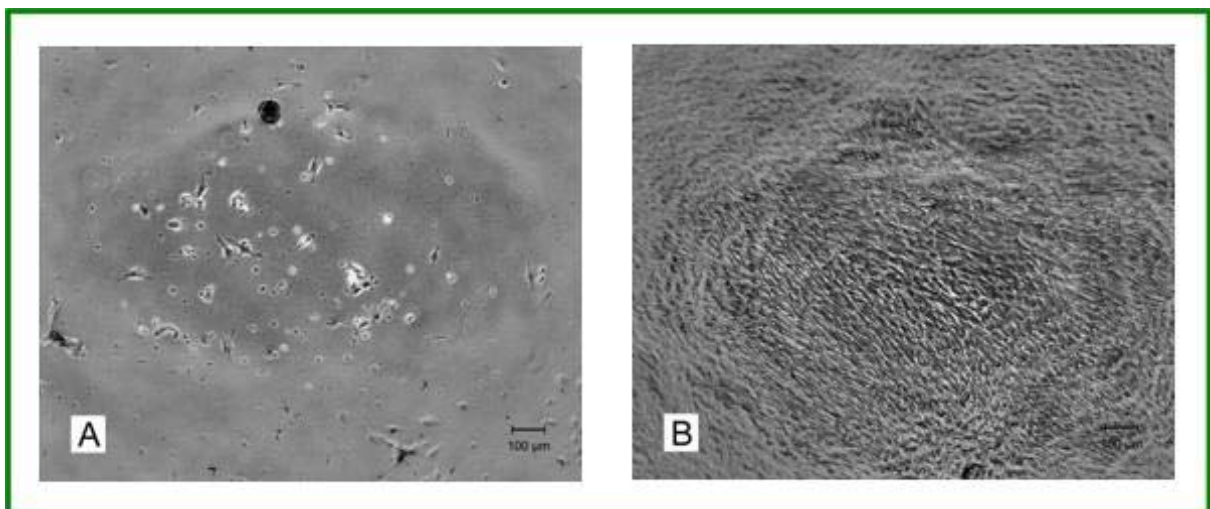
Die Primärzellen von DZB-403p5 wurden ebenso in Medien mit osteogenen Komponenten getestet. Die mikroskopischen Fotos von Kultivierungsbeginn und Kultivierungsabschluss in neurogenem Differenzierungsmedium + Dexamethason +  $\beta$ -Glycerolphosphat + Ascorbinsäure und in neuronalem Differenzierungsmedium + Dexamethason + Ascorbinsäure und osteogenem Differenzierungsmedium (Standardmedium + Dexamethason +  $\beta$ -Glycerolphosphat + Ascorbinsäure) werden in den Abb. 50 bis Abb. 52 dargestellt:



**Abb. 50:** Mikroskopische Fotos der Primärzellen DZB-403p5 in neurogenem Differenzierungsmedium mit dem Zusatz der osteogenen Komponenten  $\beta$ -Glycerol-Phosphat, Ascorbat, Dexamethason. Foto A zeigt die Zellen am Tag eins, Foto B am Tag 13 der Kultivierung.

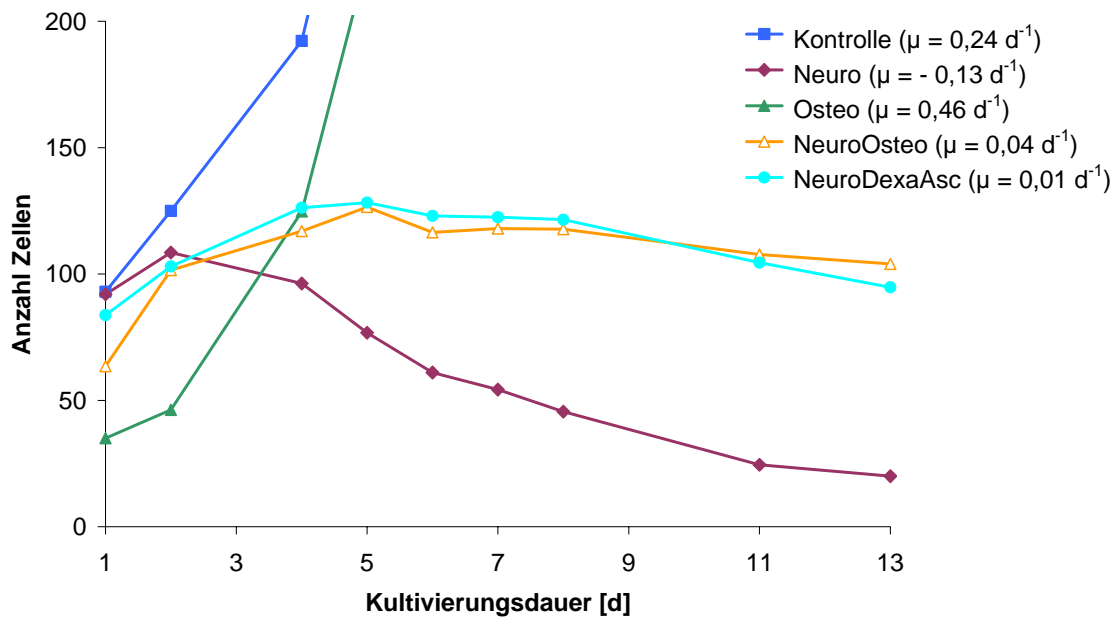


**Abb. 51:** Mikroskopische Fotos der Primärzellen DZB-403p5 in neurogenem Differenzierungsmedium mit dem Zusatz der osteogenen Komponenten, Ascorbat, Dexamethason. Foto A zeigt die Zellen am Tag eins, Foto B am Tag 13 der Kultivierung.



**Abb. 52:** Mikroskopische Fotos der Primärzellen DZB-403p5 in osteogenem Differenzierungsmedium. Foto A zeigt die Zellen am Tag eins, Foto B am Tag 13 der Kultivierung.

Die Quantifizierung der Zellen und die daraus resultierenden Proliferationsverläufe wurden in der folgenden Abb. 53 als Graphen dargestellt:



**Abb. 53:** Proliferationsverhalten der Zellen DZB-403p5 in neurogenem Differenzierungsmedium + osteogen stimulierenden Komponenten (Dexametason+ $\beta$ -Glycerolphosphat + Ascorbat) im Vergleich die Zellen DZB-403p5 in osteogenem Differenzierungsmedium, in Kontrollmedium und in neurogenem Differenzierungsmedium. Außerdem Zellen in neurogenem Differenzierungsmedium + Dexametason + Ascorbat.

In der Abb. 53 sind zum Vergleich die Graphen von den Zellen in Standardkontrollmedium und in neurogenem Differenzierungsmedium aus der Abb. 49 gezeigt. Zu Beginn der Kultivierung in neurogenem Differenzierungsmedium + Dexamethason +  $\beta$ -Glycerolphosphat + Ascorbinsäure befanden sich im Zählausschnitt 64 Zellen. Über den Verlauf der Differenzierung stieg die Zellzahl leicht an bis zu einem Maximum am fünften Kultivierungstag von 127 Zellen und sank dann wiederum leicht ab. Am Differenzierungsende konnten noch durchschnittlich 104 adhärente Zellen in dem Zählausschnitt ermittelt werden. Die daraus berechnete spezifische Gesamtwachstumsrate beträgt  $\mu = 0,01 \text{ d}^{-1}$ . Die Zellen in neurogenem Differenzierungsmedium denen nur Ascorbinsäure und Dexamethason zugegeben wurden, hatten einen sehr ähnlichen Proliferationsverlauf. Auf den Fotos zu Beginn der Differenzierung wurden durchschnittlich 84 Zellen gezählt. Über den Differenzierungsverlauf ergab sich dann ein leichter Anstieg der Zellzahl bis zu einem Maximum am 5. Kultivierungstag mit 128 Zellen und wieder einem leichten Absinken auf 95 Zellen am Kultivierungsende. Aufgrund der niedrigeren Startzellichte errechnet sich daraus eine spezifische Gesamtwachstumsrate von  $\mu = 0,04 \text{ d}^{-1}$ .

In osteogenes Differenzierungsmedium wurden dem Standardmedium die Komponenten  $\beta$ -Glycerol-Phosphat, L-Ascorbinsäure und Dexamethason zugegeben. In dem rein osteogenen Differenzierungsmedium wurde eine Startzellzahl von 35 ausgemacht. Die Zellen proliferierten stark, so dass noch am 5. Kultivierungstag 125 Zellen im Zählausschnitt ermittelt werden konnten und an den folgenden Tagen aufgrund der hohen Zelldichte keine weiteren Zählungen möglich waren. Die bis dahin berechenbare spezifische Wachstumsrate betrug  $\mu = 0,46 \text{ d}^{-1}$ .

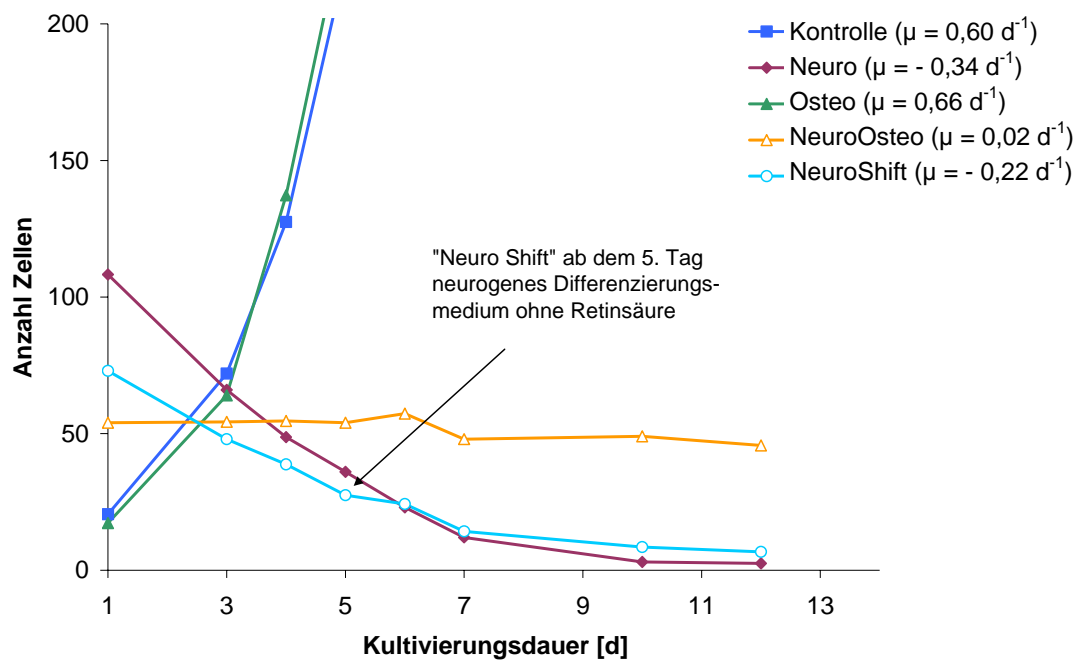
### **3.3.1.3 Dentale Primärzellen DZB-404p7**

Als weitere dentale Primärzellkultur wurde bei DZB-404p7 die Wirkung unterschiedlicher Differenzierungsmedien untersucht. Dazu wurden von den Zellen in unterschiedlichen Medien zunächst die mikroskopischen Fotos und anschließend alle Quantifizierungen als Proliferationsverläufe in einer Gesamtdarstellung gezeigt.

#### **3.3.1.3.1 Reaktion auf „neurogenen Shift“ von 5 Tagen**

Zunächst wird bei der neurogenen Differenzierung der Effekt einer Methode gezeigt, bei der die Zugabe von Retinsäure als „Shift“ durchgeführt wurde.

Widera berichtet in seiner Veröffentlichung über eine Methode, die neurogene Differenzierung als „Shift“ bei den dentalen Zellen einzusetzen (Widera, 2007). Bei diesem Verfahren werden die Zellen anfänglich in dem vollständigen neurogenen Differenzierungsmedium mit der Komponente Retinsäure kultiviert. Dieser kürzere Einsatz von Retinsäure wurde in dem folgenden Versuch getestet, indem ab dem 5. Tag das neurogene Differenzierungsmedium für die Zellen „Neuro Shift“ ohne Retinsäure angesetzt wurde.



**Abb. 54:** Proliferationsverhalten der Zellen DZB-404p7 in neurogenem Differenzierungsmedium + osteogen stimulierenden Komponenten (Dexametason +  $\beta$ -Glycerolphosphat + Ascorbat) im Vergleich die Zellen DZB-404p7 in osteogenem Differenzierungsmedium, in Kontrollmedium und in neurogenem Differenzierungsmedium. Zusätzlich werden Zellen in neurogenem Differenzierungsmedium „Neuro Shift“ ab dem fünften Tag ohne die Komponente Retinsäure kultiviert.

Die Proliferationsverläufe der Zellen in den unterschiedlichen Medien wurden in der Graphik der Abb. 54 gemeinsam dargestellt. Die Zellen im „Neuro Shift“-Medium hatten eine Startzellzahl von 73 Zellen. Am 5. Tag wurden noch 28 Zellen gezählt. Ab diesem Zeitpunkt wurde für die Zellen „Neuro Shift“ das neurogene Medium ohne Retinsäure angesetzt. Die Zellzahl sank dennoch weiterhin ab auf eine Endzellzahl von sieben Zellen am zwölften und letzten Kulturtag. Die daraus resultierende spezifische Gesamtwachstumsrate betrug  $\mu = -0,22 \text{ d}^{-1}$ . Die Startzellzahl in neurogenem Differenzierungsmedium betrug 108 Zellen. Über den Verlauf der Kultur sank die Zellzahl ab. Am Ende der Differenzierung am 12. Tag wurden durchschnittlich 3 Zellen gezählt. Die daraus berechenbare spezifische Wachstumsrate betrug  $\mu = -0,34 \text{ d}^{-1}$ . Analog zu den bisherigen Versuchsläufen zeigte sich auch hier, dass die Zellen in neurogenem Differenzierungsmedium die ungünstigsten Lebensbedingungen hatten. Im Kontrollmedium wurden zu Beginn der Kultivierung 18 Zellen gezählt. Über den Kulturverlauf stieg die Zellzahl. Am sechsten Tag konnten noch 309 Zellen gezählt werden. In den folgenden Fotos hatten die Zellen auf dem Boden des Kulturgefäßes einen verhältnismäßig konfluenten Zellrasen gebildet. Damit waren die einzelnen Zellen nicht mehr zählbar. Die bis

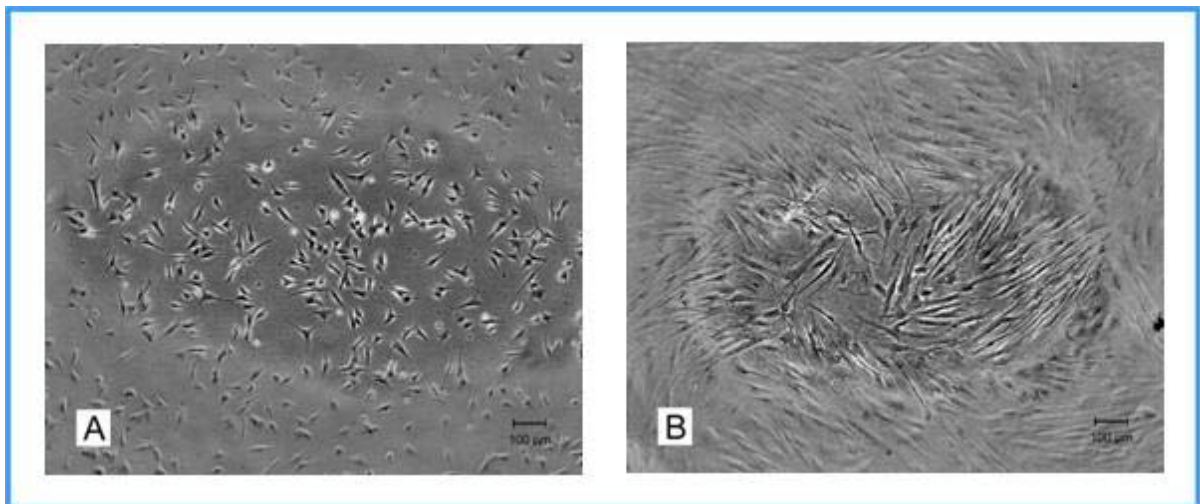


zum sechsten Tag berechenbare spezifische Wachstumsrate betrug  $\mu = 0,60 \text{ d}^{-1}$ . In neurogenem Differenzierungsmedium + Dexamethason +  $\beta$ -Glycerolphosphat + Ascorbinsäure betrug die Startzellzahl 54 Zellen. Über den Kulturverlauf sank die Zellzahl bis zum Ende der Differenzierung leicht ab auf 46 Zellen. Daraus resultiert eine spezifische Wachstumsrate von  $\mu = -0,02 \text{ d}^{-1}$ . Die Zellen in osteogenem Differenzierungsmedium hatten eine Startzellzahl von 15 Zellen. Am fünften Tag konnten 161 Zellen gezählt werden. Auf den Fotos der darauf folgenden Kulturtag waren die einzelnen Zellen aufgrund der Konfluenz nicht mehr zählbar. Die spezifische Wachstumsrate betrug bis dahin  $\mu = 0,66 \text{ d}^{-1}$ . In dem osteogenem Differenzierungsmedium sind die Zellen bei diesem Versuchslauf am stärksten proliferiert.

### 3.3.1.4 Dentale Primärzellen DZB-404p5

#### 3.3.1.4.1 Reaktion auf „neurogenen Shift“ von vier Tagen

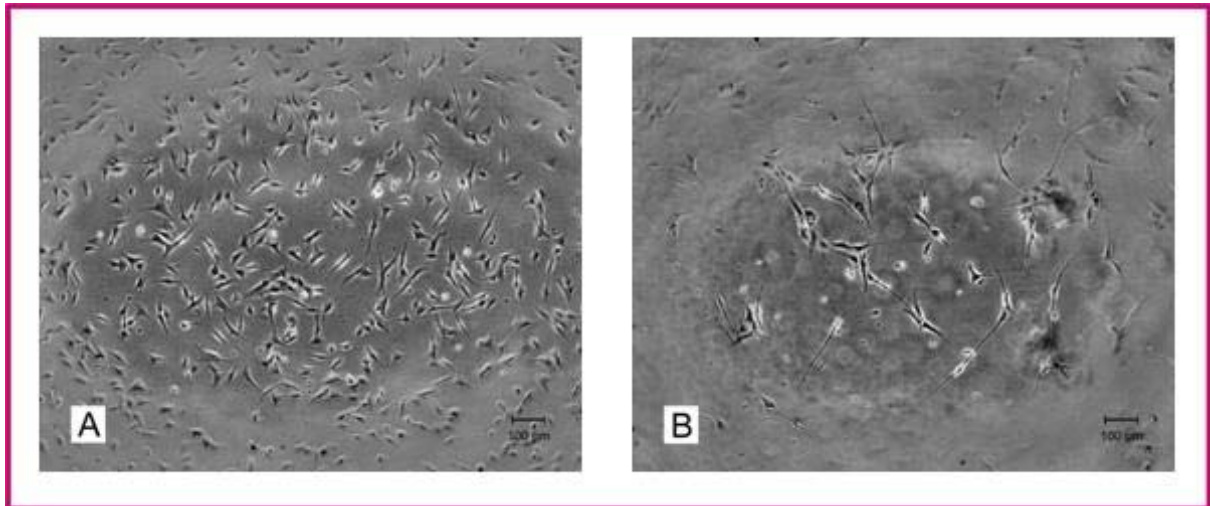
Dieser Versuch folgt dem Prinzip des Versuches (Kap. 3.3.1.3). Jedoch wurden die Zellen „neuro Shift“ hier vier Tage in neurogenem Differenzierungsmedium kultiviert. Ab dem vierten Tag wurde die Kultivierung fortgesetzt mit neurogenem Differenzierungsmedium ohne Retinsäure und ohne IBMX.



**Abb. 55:** Mikroskopische Fotos der Primärzellen DZB-404p5 in neurogenem Differenzierungsmedium („Neuro Shift“), welches nach fünf Tagen ohne Retinsäure und ohne IBMX angesetzt wurde. Foto A zeigt die Zellen am Tag eins, Foto B am Tag 13 der Kultivierung.

Der Kultivierungsbeginn erfolgte mit vitalen Zellen und einer etwas höheren Zelldichte (Abb. 55A). Die Zellen hatten aufgrund ihrer längeren Zellausläufer eine etwas langezogene Form. Durch eine Adhärerung auf dem Gefäßboden mit geringer Kontaktfläche, wirken die

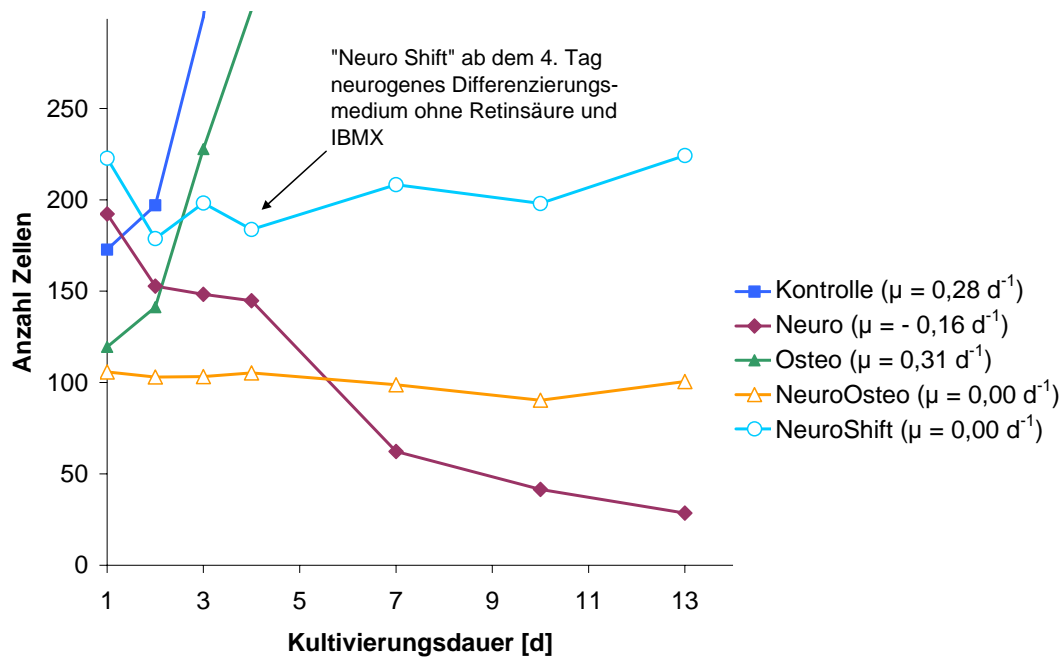
Zellen erhöht. Auch bei Kultivierungsende lagen viele vitale Zellen vor, die großflächig adhären und dadurch abgeflacht wirken (Abb. 55B).



**Abb. 56:** Mikroskopische Fotos der Primärzellen DZB-404p5 in neurogenem Differenzierungsmedium. Foto A zeigt die Zellen am Tag eins, Foto B am Tag 13 der Kultivierung.

Der Kultivierungsbeginn erfolgte ebenfalls mit vitalen Zellen und einer etwas höheren Zelldichte (Abb. 56A). Bis zum vierten Tag lagen bei den Zellen in neurogenem Differenzierungsmedium und den Zellen der Gruppe „neuro Shift“ identische Kulturbedingungen vor. So weisen die Zellen „Neuro Diff“ und „Neuro Shift“ zu Kultivierungsbeginn die gleiche Morphologie auf. Analog zu den vorangegangenen Kultivierungsläufen in neurogenem Differenzierungsmedium (Kap. 3.3.1.1 bis Kap. 3.3.1.3), waren am Kultivierungsende nur noch vergleichsweise wenige Zellen anwesend (Abb. 56B). Diese bildeten vor allem spitze Ausläufer. Morphologisch unterschieden sich die Zellen in neurogenem Differenzierungsmedium am Kultivierungsende deutlich zu den Zellen der Gruppe „Neuro Diff“.

In der Abb. 57 sind die Proliferationsverläufe der dentalen Zellen DZB-404p5 in verschiedenen Medien als Graphen dargestellt:



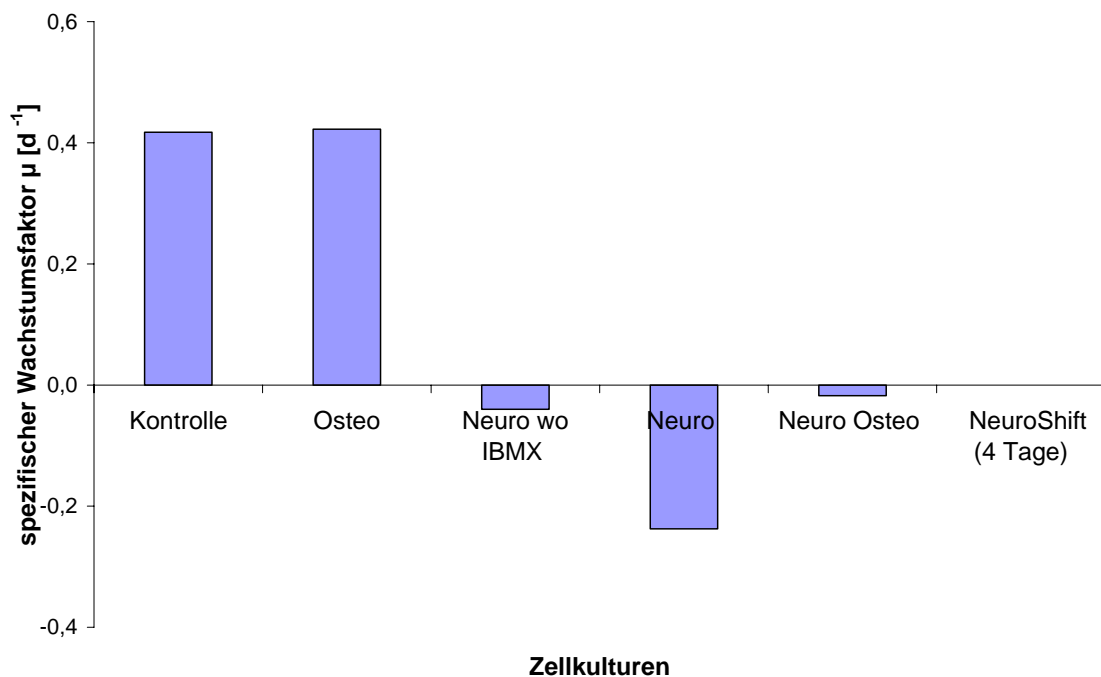
**Abb. 57:** Proliferationsverhalten der Zellen DZB-404p5 in neurogenem Differenzierungsmedium + osteogen stimulierenden Komponenten (Dexametason +  $\beta$ -Glycerolphosphat + Ascorbat) im Vergleich die Zellen DZB-404p5 in osteogenem Differenzierungsmedium, in Kontrollmedium und in neurogenem Differenzierungsmedium. Zusätzlich werden Zellen in neurogenem Differenzierungsmedium „Neuro Shift“ ab dem vierten Tag ohne die Komponenten Retinsäure und IBMX kultiviert.

In der Graphik der Abb. 57 wurden alle Proliferationsverläufe der Zellen in den unterschiedlichen Medien zusammen dargestellt. Die Zellen im „Neuro Shift“- Medium hatten eine Startzellzahl von 223 Zellen. Am vierten Tag konnten 221 Zellen gezählt werden. Ab diesem Zeitpunkt wurde für die Zellen „Neuro Shift“ das neurogene Medium ohne Retinsäure und IBMX angesetzt. Die Zellzahl blieb in etwa konstant bis zum vierzehnten und letzten Kulturtag mit einer Endzellzahl von 225 Zellen. Die daraus berechenbare spezifische Gesamtwachstumsrate beträgt  $\mu = 0,0 \text{ d}^{-1}$ . Es hat demzufolge bei den Zellen in diesem Medium weder Absterben noch Proliferation stattgefunden, bzw. zu gleichen Teilen. Die Startzellzahl in neurogenem Differenzierungsmedium betrug 192 Zellen. Über den Verlauf der Kultur sank die Zellzahl ab. Am Ende der Differenzierung am 13. Tag wurden durchschnittlich 29 Zellen gezählt und daraus eine spezifische Wachstumsrate von  $\mu = -0,16 \text{ d}^{-1}$  berechnet. Im Kontrollmedium wurden zu Beginn der Kultivierung 173 gezählt. Am zweiten Tag konnten noch 197 Zellen ermittelt werden. Am dritten Tag hatte sich bereits ein nahezu konfluenten Zellrasen gebildet, die einzelnen Zellen waren nicht mehr zählbar. Die bis dahin berechenbare spezifische Gesamtwachstumsrate betrug  $\mu = 0,28 \text{ d}^{-1}$ . Die Startzellzahl in neuro-/osteogenem

Differenzierungsmedium betrug 106 Zellen. Auch hier blieb die Zellzahl mit einer spezifischen Wachstumsrate  $\mu = 0,0 \text{ d}^{-1}$  in etwa konstant bis zum Ende der Differenzierung mit 101 Zellen. Im rein osteogenen Differenzierungsmedium betrug die Startzellzahl 120 Zellen. Am dritten Tag wurden noch 304 Zellen ausgezählt, danach waren Einzelzellen nicht mehr erkennbar. Es ließ sich bis dahin eine spezifische Gesamtwachstumsrate von  $\mu = 0,31 \text{ d}^{-1}$  berechnen.

### 3.3.1.5 Gesamtdarstellung der Proliferation in unterschiedlichen Medien

Abschließend folgt eine Gesamtdarstellung der berechneten Wachstumsraten der Zellproliferation in den unterschiedlichen Medien aller Versuchsläufe (Kap. 3.3.1.1 bis Kap. 3.3.1.4).



**Abb. 58:** Spezifische Wachstumsrate  $\mu$  der Zellen in unterschiedlichen Medien, Gesamtdarstellung aus allen Versuchsläufen („Kontrolle“, „Osteo“, und „Neuro“  $n=4$ ; „Neuro ohne IBMX“, „Neuro Osteo“ und „Neuro Shift“  $n=1$ ).

In dieser Darstellungsform (Abb. 58) wird das Proliferationsverhalten der Zellen in den unterschiedlichen Medien noch einmal sehr deutlich. Während sich die Zellen im Kontrollmedium durch Proliferation mit einer durchschnittlich positiven Wachstumsrate von  $\mu = 0,42 \text{ d}^{-1}$  vermehrt haben, sank die Zellzahl in neurogenem Differenzierungsmedium („Neuro“) ab. Hier lag die durchschnittliche spezifische Wachstumsrate bei  $\mu = -0,24 \text{ d}^{-1}$ . In osteogenem

Differenzierungsmedium proliferierten die Zellen stark. Auch hier betrug die berechnete spezifische Wachstumsrate  $\mu = 0,42 \text{ d}^{-1}$ .

Im Vergleich zum neurogenen Differenzierungsmedium sanken die Zellzahlen in den abgewandelten neurogenen Differenzierungsmedien nur schwach. Die durchschnittliche spezifische Wachstumsrate lag bei  $\mu = -0,04 \text{ d}^{-1}$  für die Zellen „Neuro ohne IBMX“. Die Zellen „Neuro Osteo“ hatten eine spezifische Wachstumsrate von  $\mu = -0,02 \text{ d}^{-1}$  und bei „Neuro Shift“ über vier Tage eine spezifische Wachstumsrate von  $\mu = -0,00 \text{ d}^{-1}$ .

### 3.3.2 Genexpression, Einfluss der Mediumkomponenten

Neben der Dokumentation des Proliferationsverhaltens der Zahnzellen während der Differenzierung, wurde abschließend bei den Primärkulturen DZB-403p5 und DZB-404p5 mittels Q-PCR die Expression von Markergenen der Neurodifferenzierung gemessen.

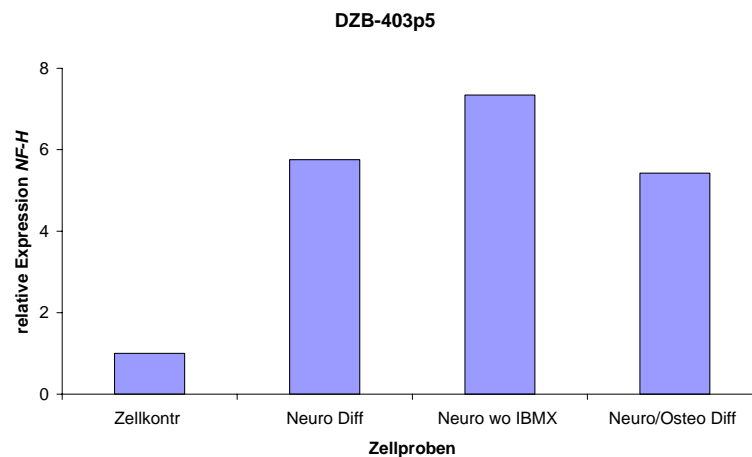
#### 3.3.2.1 Dentale Primärkultur DZB-403p5

Die Zellen DZB-403p5 (Kap. 3.3.1.2) wurden über 13 Tage in unterschiedlichen Medien kultiviert und im Anschluss hinsichtlich ihrer Genexpression untersucht. Für die neurogene Differenzierung erfolgte eine parallele Kultivierung von 20 Kulturgefäßen. Dies war notwendig, um eine Zellmenge zu erhalten, die für die Q-PCR Analyse mehrerer Gene ausreichend war. Untersucht wurden die Gene Neurofilament-H (*NEFH*), Neurofilament-L (*NEFL*), Myelinbasicprotein (*MBP*).

Für die Normierung der Berechnungen waren die Expressionen von Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) die eingesetzte Bezugsgröße. Der kleinste gemessene Wert über alle Proben des jeweiligen Messlaufes wurde auf den Wert 1 normiert.

### 3.3.2.1.1 Neurofilament-H (*NEFH*)

Bei den Zellen der Primärkultur DZB-403p5 wurde die Expression des Neuromarkers Neurofilament-H (*NEFH*) gemessen (Abb. 59).

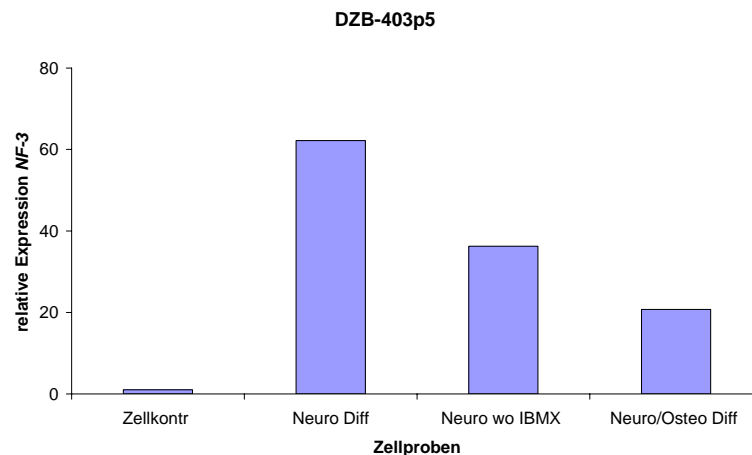


**Abb. 59:** Q-PCR der Expression von Neurofilament-H (*NEFH*) bei den dentalen Primärzellen von DZB-403p5 kultiviert in verschiedenen Mediumzusammensetzungen n=1.

Die maximale Expression von Neurofilament-H (*NEFH*) wurde bei den Zellen in neurogenem Differenzierungsmedium ohne IBMX gemessen, diese war im Vergleich zur Zellkontrolle 7,3-fach erhöht. Die Zellpopulation in Kontrollmedium wies bei diesem Messdurchgang die niedrigste Expression auf und wurde auf 1 normiert. Alle drei Modifikationen der neurogenen Differenzierungsmedien wiesen im Vergleich zur Zellkontrolle höhere Werte auf. Trotz der Tatsache, dass durch diese Einzeldarstellung keine signifikanten Unterschiede vorgestellt werden konnten, ist zu betonen, dass alle neuronal konditionierten Medien eine Expressionssteigerung von *NEFH* zeigten. Dieser Befund ließ sich auch für die Analyse von Neurofilament L (*NEFL*) bestätigen.

### 3.3.2.1.2 Neurofilament-L (*NEFL*)

Im Detail sahen die Expressionswerte für *NEFL* der Zellen in verschiedenen Medien wie folgt aus (Abb. 60):

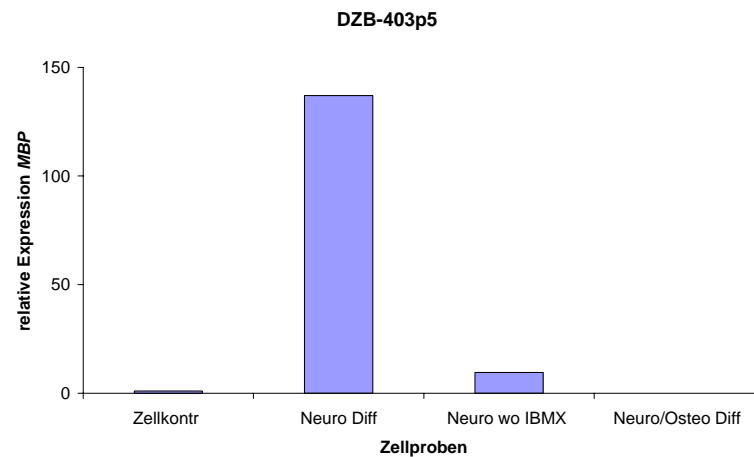


**Abb. 60:** Q-PCR der Expression von Neurofilament-L (*NEFL*) bei den dentalen Primärzellen von DZB-403p5 kultiviert in verschiedenen Mediumzusammensetzungen n=1.

Die maximale Expression von Neurofilament-L (*NEFL*) wurde bei den Zellen in neurogenem Differenzierungsmedium gemessen. Diese war 62 – fach erhöht zu der Zellkontrolle, welche auch bei diesem Messdurchgang die niedrigste Expression aufwies und auf 1 normiert wurde. Bei *NEFL* wiesen die drei Modifikationen der neurogenen Differenzierungsmedien zur Zellkontrolle tendenziell stärkere Expressionsunterschiede auf. Auch die verstärkte Expression von *NEFL* in allen drei Modifikationen der neurogenen Differenzierungsmedien unterstützt und unterstreicht die neurogene Wirkung auf die dentalen Primärzellen.

### 3.3.2.1.3 Myelin Basic Protein (*MBP*)

Bei den Primärzellen DZB-403p5 wurde zudem die Genexpression von *MBP* (Myelinbasiscprotein) untersucht (Abb. 61).



**Abb. 61:** Q-PCR der Expression von Myelinbasicprotein (MBP) bei den dentalen Primärzellen von DZB-403 kultiviert in verschiedenen Mediumzusammensetzungen n=1.

Die maximale Expression von *MBP* (Myelinbasicprotein) wurde bei den Zellen in neurogenem Differenzierungsmedium gemessen. Diese war 137-fach erhöht zur Zellkontrolle, welche auch bei diesem Messdurchgang die niedrigste Expression aufwies und auf 1 normiert wurde. Die Expression der Zellen im neurogenen Differenzierungsmedium ohne IBMX war mit einer 10-fachen Erhöhung deutlich schwächer. Bei dem neurogenem Differenzierungsmedium mit Zugabe der osteogenen Komponenten  $\beta$ -Glycerolposphat, Ascorbinsäure und Dexametason (neuro/Osteo-Diff) war die Expression von *MBP* nach vierzig Zyklen bei der Q-PCR nicht messbar.

Bemerkenswert war die sehr hohe Expression von *MBP* der Zellen in neurogenem Differenzierungsmedium. Alle anderen untersuchten Zellpopulationen hatten *MBP* Expressionen, die in einem weit niedrigeren Bereich lagen.

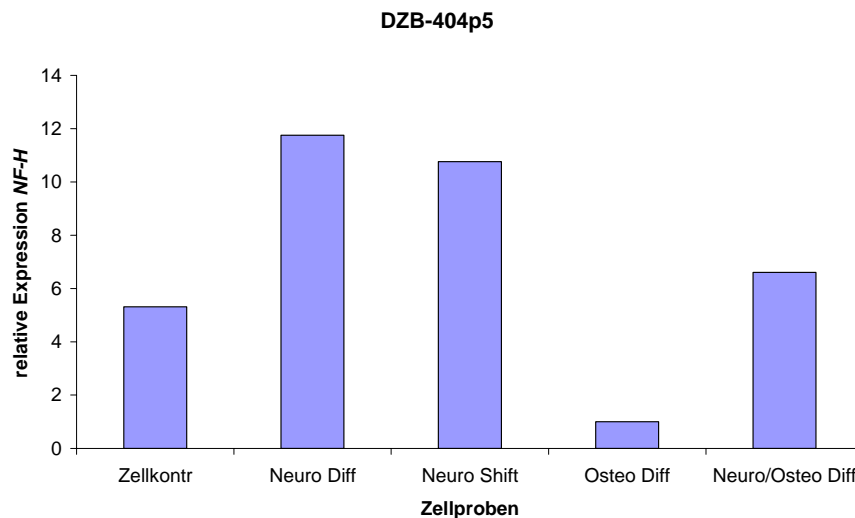
### 3.3.2.2 Dentale Primärkultur DZB-404p5

Die Zellen DZB-404p5 (Kap. 3.3.1.4) wurden ebenfalls im Anschluss zur neurogenen Differenzierung hinsichtlich ihrer Genexpression untersucht. Neben der Expression von Neuromarkern wurde zudem die Expression von Osteomarkern gezeigt und so die neurogene und osteogene Differenzierung der Zellen anhand der Genexpression dargestellt. Daher wurden bei diesem Versuchslauf auch Zellen in osteogenem Differenzierungsmedium untersucht. Außerdem gab es die Zellpopulation „neuro Shift“, bei der das neurogene Differenzierungsmedium ab dem vierten Tag keine Retinsäure und IBMX mehr enthielt.



### 3.3.2.2.1 Genexpression von Neuromarkern

Die Expression der Neuromarker *NEFH*, *NEFL* und *TUBB3* ( $\beta$ 3 - Tubulin) wurde für die Zellen in unterschiedlichem Medium ermittelt. Zunächst die Darstellung der Expression von Neurofilament-H (*NEFH*) (Abb. 62):

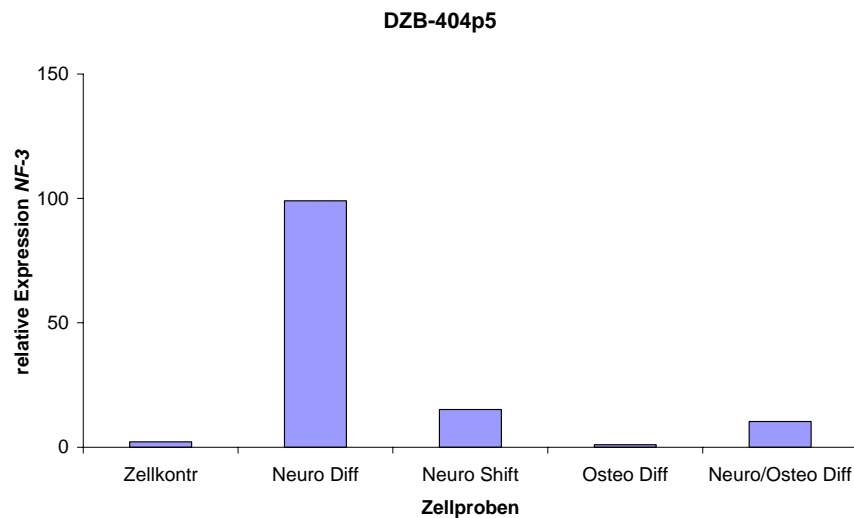


**Abb. 62:** Q-PCR der Expression von *NEFH* bei den dentalen Primärzellen von DZB-404p5 kultiviert in verschiedenen Mediumzusammensetzungen n=1.

Die niedrigste Expression von *NEFH* wurde bei den Zellen in osteogenem Differenzierungsmedium („Osteo Diff“) gemessen und damit als Bezugspunkt der relativen Expression als 1 definiert. Die höchste Expression von *NEFH* wurde bei den Zellen in neurogenem Differenzierungsmedium mit einer 12-fachen Erhöhung gemessen. Die Zellen in Kontrollmedium hatten im Vergleich zu den Zellen in osteogenem Differenzierungsmedium eine 5-fach erhöhte Expression. Vergleicht man die Expression der Zellen in Kontrollmedium mit der Expression der Zellen in neurogenem Differenzierungsmedium, so ist diese um den Faktor 2,4-fach erhöht.

Die Zellen von DZB-404p5 hatten, wie die Zellen DZB-403p5, eine höhere Expression von *NEFH* nach der Kultivierung in neurogenem Differenzierungsmedium. Bei den Zellen in osteogenem Differenzierungsmedium war bei DZB-404p5 eine niedrige Expression von *NEFH* zu sehen.

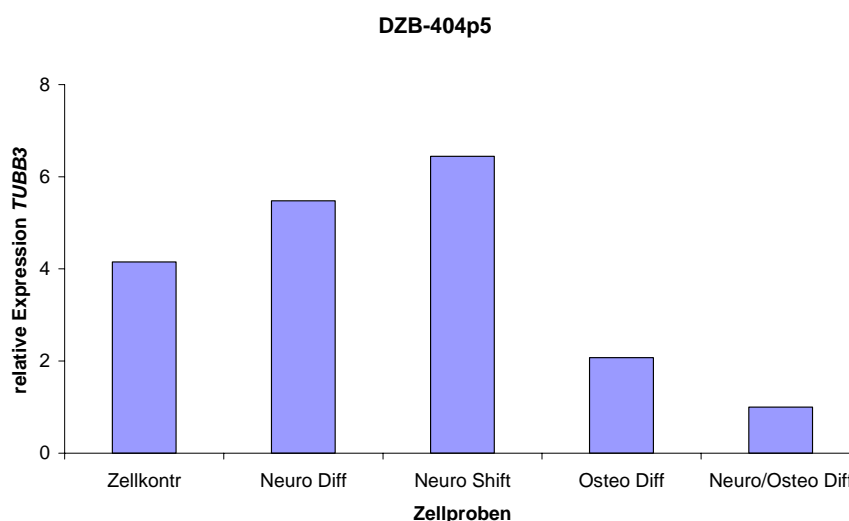
Die Primärzellen DZB-404p5 wurden nach der Kultivierung in unterschiedlichen Medien ebenfalls auf die Expression von Neurofilament-H (*NEFL*) untersucht (Abb. 63):



**Abb. 63:** Q-PCR der Expression von NEFL bei den dentalen Primärzellen von DZB-404p5 kultiviert in verschiedenen Mediumzusammensetzungen n=1.

Die höchste Expression von *NEFL* wurde bei den Zellen in neurogenem Differenzierungsmedium („Neuro Diff“) gemessen, mit einer 99-fachen Erhöhung im Vergleich zu den Zellen in osteogenem Differenzierungsmedium mit der niedrigsten Expression. In Kontrollmedium („Zellkontr“) lag eine 2-fach höhere Expression im Vergleich zu den osteogen differenzierten Zellen vor. Bezogen auf die Zellen in Kontrollmedium belegten die Zellen in neurogenem Differenzierungsmedium („Neuro Diff“) damit eine 45-fache Expressionserhöhung.

Als weiterer Neuromarker wurde bei den Primärzellen DZB-404p5 nach der Kultivierung die Expression von *TUBB3* ( $\beta$ 3-Tubulin) untersucht (Abb. 64):



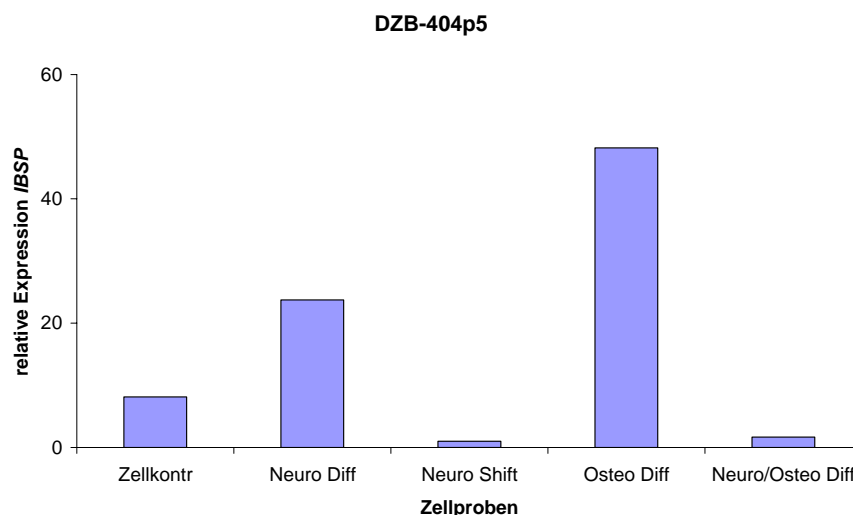
**Abb. 64:** Q-PCR der Expression von TUBB3 ( $\beta$ 3-Tubulin) bei den dentalen Primärzellen von DZB-404 kultiviert in verschiedenen Mediumzusammensetzungen n=1.

Die höchste Expression von *TUBB3* ( $\beta$ 3-Tubulin) wurde bei den Zellen in „Neuro Shift“ Differenzierungsmedium gemessen (Abb. 64). Es lag eine 6,4-fache Erhöhung der Expression im Vergleich zu den Zellen in neuro-/osteogenem Differenzierungsmedium vor. Zu den Zellen in Kontrollmedium die eine 4,2-fache Expression aufwiesen, war die maximale Expression von *TUBB3* 1,5-fach erhöht.

Die Kulturen mit osteogenen stimulierenden Komponenten im Medium, also „osteo Diff“ und „Neuro /Osteo Diff“ wiesen eine erniedrigte Expression von  $\beta$ 3-Tubulin auf.

### 3.3.2.2.2 Genexpression von Osteomarkern

Die Kulturmedien enthielten zum Teil osteogen stimulierende Komponenten, somit wurden zusätzlich die Expressionen von den osteogenen Markergene *IBSP*, *BGLAP* und *ALPL* untersucht. Zunächst die Darstellung der Expression von *IBSP* (Abb. 65):

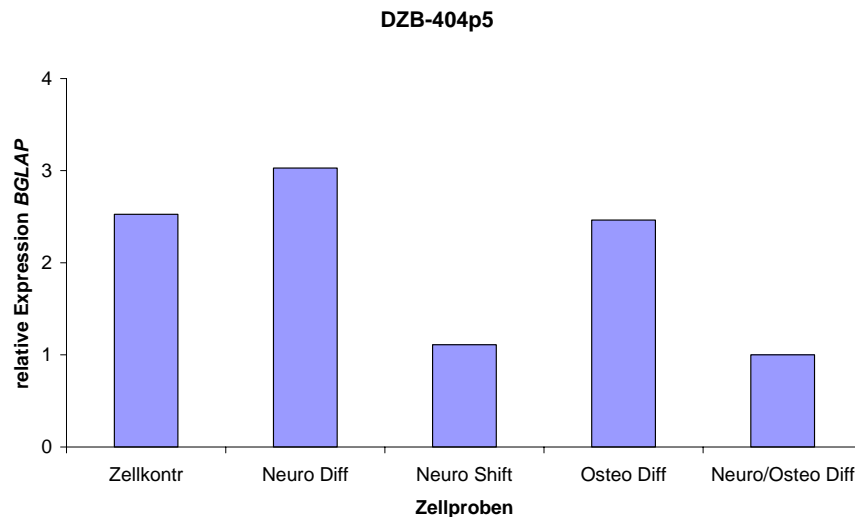


**Abb. 65:** Q-PCR der Expression von *IBSP* bei den dentalen Primärzellen von DZB-404p5 kultiviert in verschiedenen Mediumzusammensetzungen n=1.

Die niedrigste *IBSP*-Expression wurde bei den Zellen „Neuro Shift“ und die höchste Expression mit einer 48-fachen Erhöhung bei den Zellen in „osteogeno Diff“ gemessen. Mit Bezug zur Kontrolle mit einer Expression von 8,1 war die Expression von den Zellen in osteogenem Differenzierungsmedium („Osteo Diff“) 6-fach erhöht.

Es zeigte sich ein inverser Expressionsstatus bei *IBSP* für die Gruppe „Osteo Diff“ im Vergleich zu den Neuromarkern *NEFH* und *NEFL*. Die Expression von *IBSP* der neurogen differenzierten Proben lagen alle unterhalb der Expression von der Gruppe „Osteo Diff“.

Als weiterer Osteomarker wurde die Expression von Osteocalcin (*BGLAP*) bei den Primärzellen DZB-404p5 untersucht (Abb. 66):

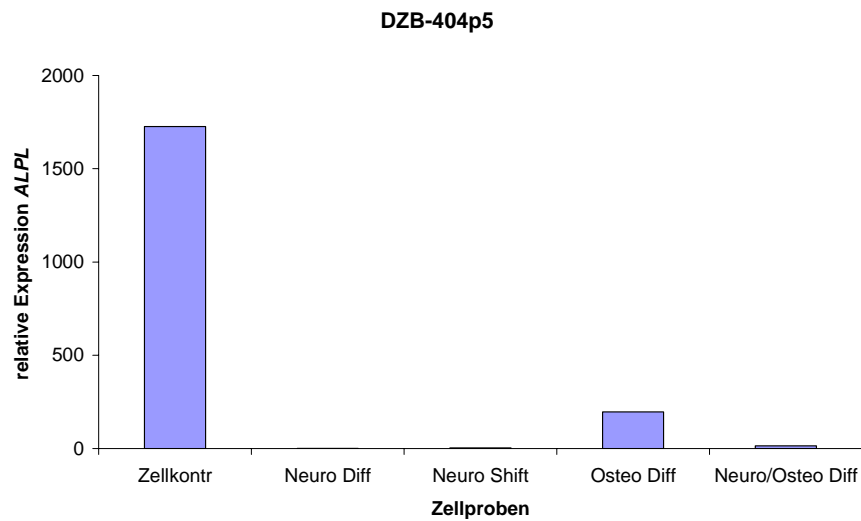


**Abb. 66:** Q-PCR der Expression von *BGLAP* bei den dentalen Primärzellen von DZB-404 kultiviert in verschiedenen Mediumzusammensetzungen n=1.

Die niedrigste Expression wurde bei den Zellen in neurogenem Differenzierungsmedium mit dem Zusatz osteogener Agentien („Neuro-/Osteo Diff“) gemessen und als Bezugspunkt des relativen Expressionslevels als 1 definiert. Die höchste *BGLAP* Expression mit einer 3-fachen Erhöhung liegt bei den Zellen in osteogenem Differenzierungsmedium vor. Mit Bezug zur Kontrolle mit einer Expression von 2,5 war die Expression von den Zellen in neurogenem Differenzierungsmedium 1,2-fach erhöht.

Die Expression von *BGLAP* zeigte bei den untersuchten Zellpopulationen keine große Schwankungsbreite durch hohe Expressionsunterschiede. Die Expressionsunterschiede waren aus diesem Grund nicht so gewichtig wie bei *IBSP*.

Die Expression von alkalischer Phosphatase stellte sich bei den Zellen in verschiedenen Kulturmedien folgendermaßen dar (Abb. 67):



**Abb. 67:** Q-PCR der Expression von ALPL bei den dentalen Primärzellen von DZB-404 kultiviert in verschiedenen Mediumzusammensetzungen n=1.

In Bezug auf die Zellen in neurogenem Differenzierungsmedium mit dem niedrigsten Expressionslevel von alkalischer Phosphatase zeigte sich die maximale, 1726-fache Expression bei den Zellen in Standard-Kontrollmedium. Die Expression der Zellen in osteogenem Differenzierungsmedium war 196-fach erhöht im Vergleich zu den Zellen in neurogenem Differenzierungsmedium und damit etwa 1/9 der Expression von den Zellen in Kontrollmedium.

Von den bislang untersuchten Markern lag bei *ALPL* die größte Spannbreite bei der Expression der verschiedenen Kulturen vor.

Die Expression von *ALPL* wurde bei allen Differenzierungsgruppen reduziert. Das zeigte sich bei der Expression der Zellen in osteogenem Differenzierungsmedium und noch deutlicher bei den Zellen, die in Medium mit Komponenten der neurogenen Differenzierung kultiviert wurden. Insgesamt ließ sich auch für diesen Marker ein inverses Expressionsbild zu den neuronalen Markern verzeichnen.

## **3.4 Subpopulationen und Einzelzellen aus dentalen**

### **Primärkulturen**

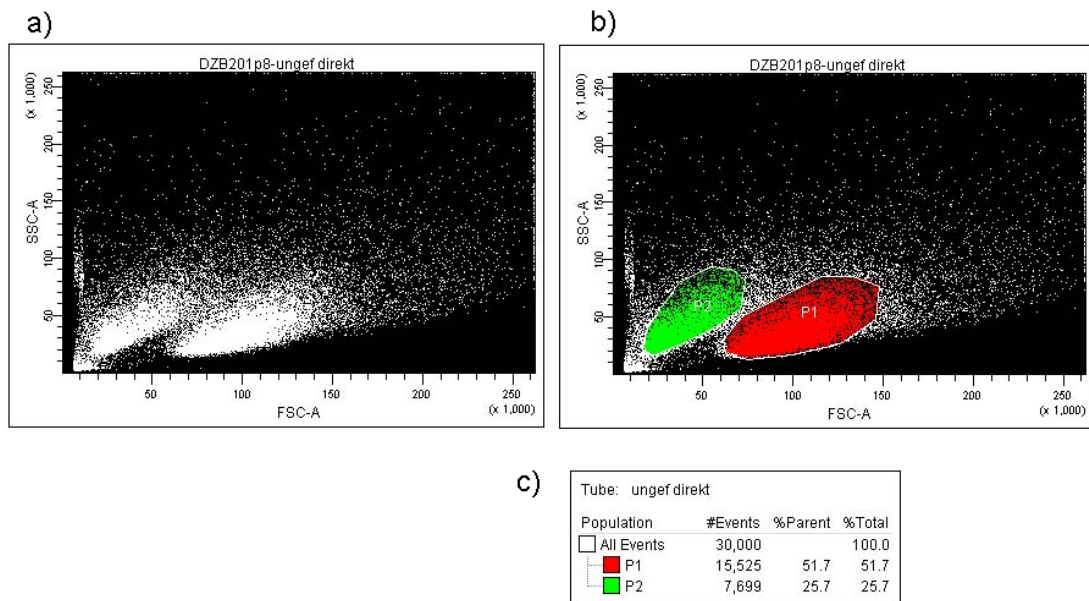
Die für die Primärkulturen isolierten Zellen aus Zahngewebe stellten sich *in vitro* als Mischpopulationen dar. Allein mikroskopisch lassen sich unterschiedliche Morphologien der Zellen ausmachen, wie exemplarisch in Kap. 2.2.1.1, Abb. 9 zu sehen. Für Informationen über die Zusammensetzung der Mischpopulation wurden Subpopulationen der Primärkulturen untersucht. Zum einen wurden Populationsanteile mit definierter Größe und Granularität oder definierten Oberflächenproteinen mit Hilfe des FACS-Gerätes untersucht. Zum anderen lieferten die beobachteten Einzelzellen (als kleinste beobachtete Subpopulationen) Hinweise darüber, welche Potenz den einzelnen Zellen der Mischpopulation zu kommen.

#### **3.4.1 Granularität und Größe der Zellen aus Subpopulationen**

Die durchflusszytometrische Messung von Größe und Granularität der Zellen wird beim FACS-Gerät als „Dot Blot“ dargestellt (Kap. 2.6.3). Auf dem Dot Blot für die dentalen Zellen zeigten sich Regionen definierter Größe und Granularität, in denen häufiger Zellen vermessen wurden. Für die Primärzellen DZB 201p8 und die Primärzellen DZB 202p8 sind Zellen definierter Größe und Granularität genauer hinsichtlich ihrer Proliferation untersucht worden.

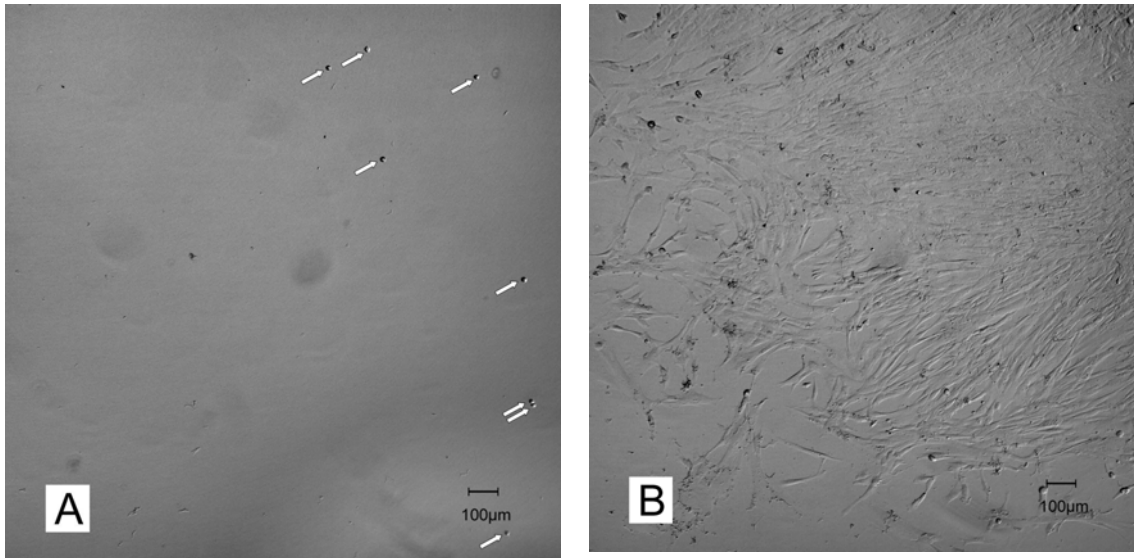
##### **3.4.1.1 Dentale Primärzellen DZB-201p8**

Die Messergebnisse des FACS-Gerätes für die Granularität und Größe der dentalen Primärkultur DZB-201p8 werden in der folgenden Abb. 68 als Screenshot gezeigt:

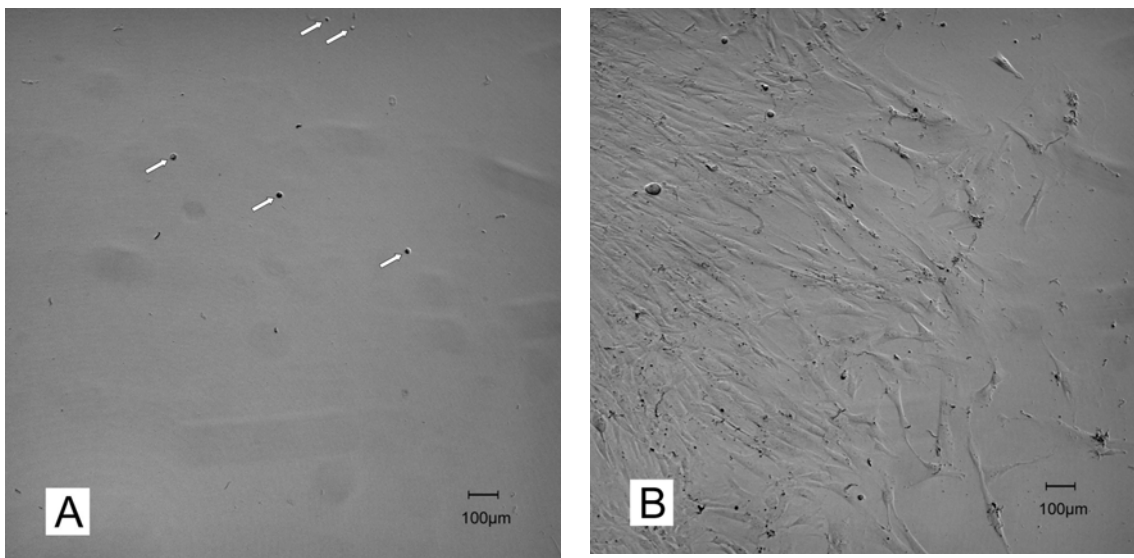


**Abb. 68:** Darstellung der Primärzellpopulation DZB-201p8 beim FACS-Gerät als Dotplot, durch Größe auf der X-Achse (FSC-A, Forwardscatter) und Granularität auf der Y-Achse (SSC-A, Sidewardscatter). Anhand des Dotplots a) mit den vermessenen Zellen wurden im Dotplot b) die Populationen P1 (in rot) und P2 (in grün) definiert. Darunter in c) die absolute und die prozentuale Auswertung der Populationen.

Die 30 000 gemessenen Zellen der Primärkultur DZB 201p8 zeigten bei der Darstellung als Dotplot Bereiche definierter Granularität und Größe in denen vermehrt Zellen detektiert wurden (Abb. 68a). Diese Bereiche wurden in Abb. 68b definiert in Population 1 (P1 in rot) und in Population 2 (P2 in grün). Abb. 68c zeigt die anteilige Zusammensetzung der Populationen P1 (in rot) 51,7% der Zellen und P2 (in grün) 25,7% der Zellen. Jeweils 100 Zellen aus P1 und P2 wurden mit Hilfe des FACS-Gerätes in Wells von Mikrotiterplatten sortiert und als Parallelansätze kultiviert.



**Abb. 69:** Proliferation der Zellen DZB-201p8 aus der Population P1 der Dotplot Darstellung (Abb. 68b). Mikroskopisches Foto des Ausschnitts eines Wells A) Tag 0 B) Tag 14. Die einzelnen Zellen wurden jeweils mit Pfeilen markiert.



**Abb. 70:** Proliferation der Zellen DZB201p8 aus der Population P2 der Dotplot Darstellung (Abb. 68b). Mikroskopisches Foto des Ausschnitts eines Wells A) Tag 0 B) Tag 14. Die einzelnen Zellen wurden jeweils mit Pfeilen markiert.

Das Foto der Abb. 69A zeigt exemplarisch einen Ausschnitt des Wells mit einigen abgekugelten Zellen der Primärkultur DZB-201p8 aus der definierten Population P1 (Abb. 68B) am ersten Tag. Für eine leichtere Erkennbarkeit, wurden die vorhandenen acht Zellen mit einem Pfeil versehen. Derselbe Ausschnitt wird auf dem Foto der Abb. 69B nach 14 Tagen gezeigt.

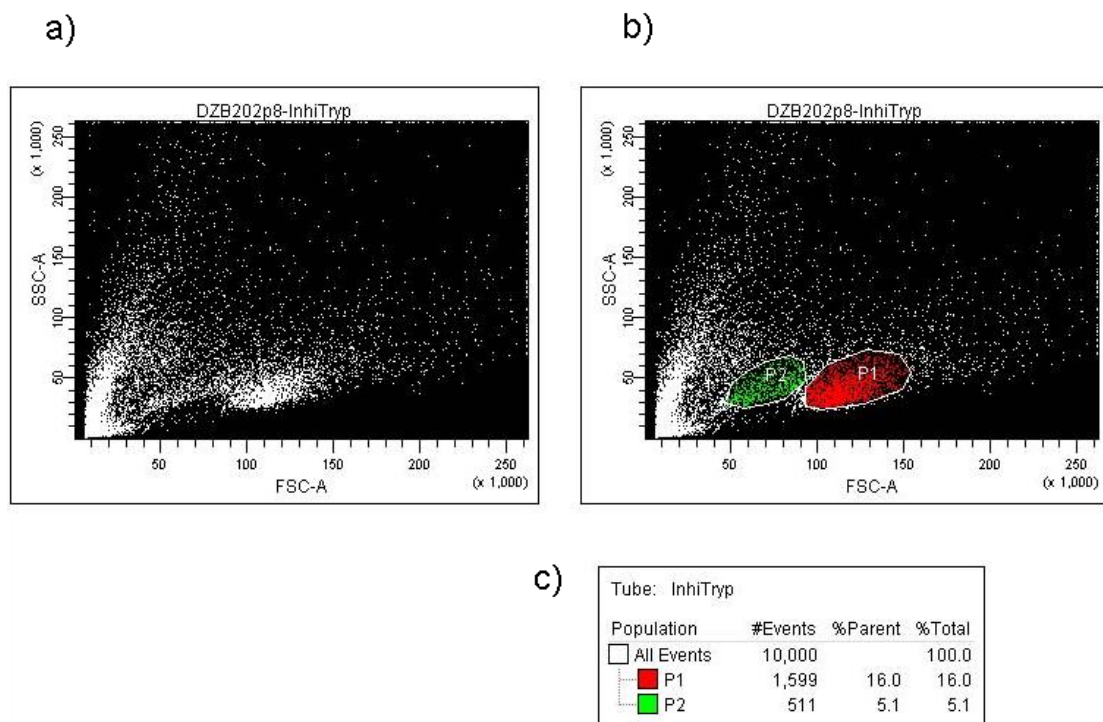


Die Zellen waren mittlerweile stark proliferiert und haben zum Teil den Wellboden dicht bewachsen.

Das Foto der Abb. 70A zeigt exemplarisch einen Ausschnitt des Wells mit abgekugelten Primärzellen DZB-201p8 aus der definierten Population P2 (Abb. 68B) am ersten Tag. Dieser Ausschnitt zeigt nach 14 Tagen in Abb. 70B ebenfalls eine starke Proliferation der Zellen aus der Population P2. Der Boden des Wells ist teilweise von den Zellen konfluent überwachsen.

### 3.4.1.2 Dentale Primärzellen DZB-202p8

Die dentale Primärkultur DZB-202p8 wird bei der Messung von Granularität und Größe durch das FACS-Gerät entsprechend des Screenshots in der folgenden Abb. 71 dargestellt:

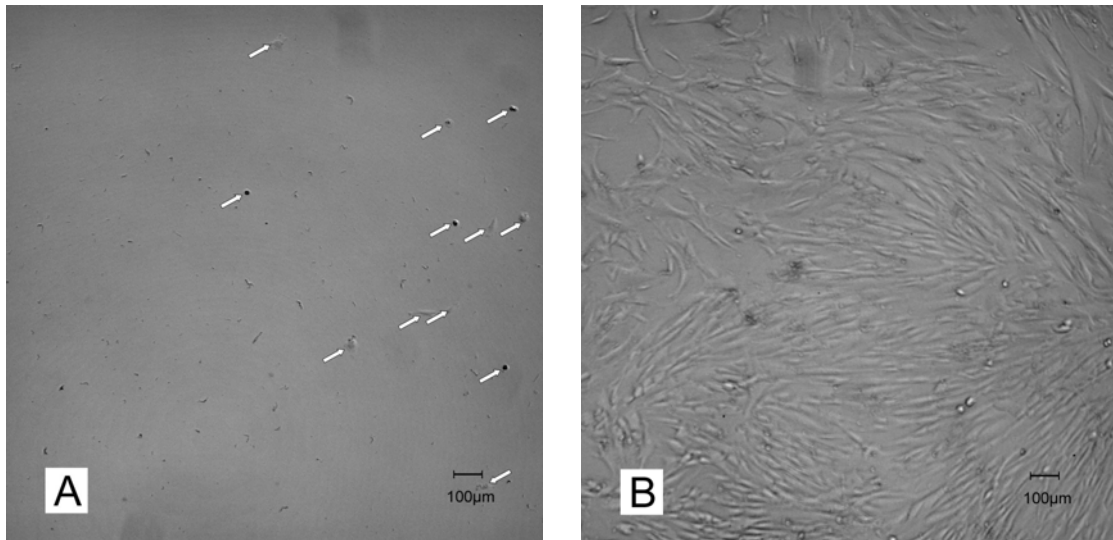


**Abb. 71:** Darstellung der Primärzellpopulation DZB-202p8 beim FACS-Gerät als Dotplot, durch Größe auf der X-Achse (FSC-A, Forwardscatter) und Granularität auf der Y-Achse (SSC-A, Sidewardscatter). Anhand des Dotplots a) mit den vermessenen Zellen, wurden im Dotplot b) die Populationen P1 (in rot) und P2 (in grün) definiert. Darunter in c) die absolute und die prozentuale Auswertung der Populationen.

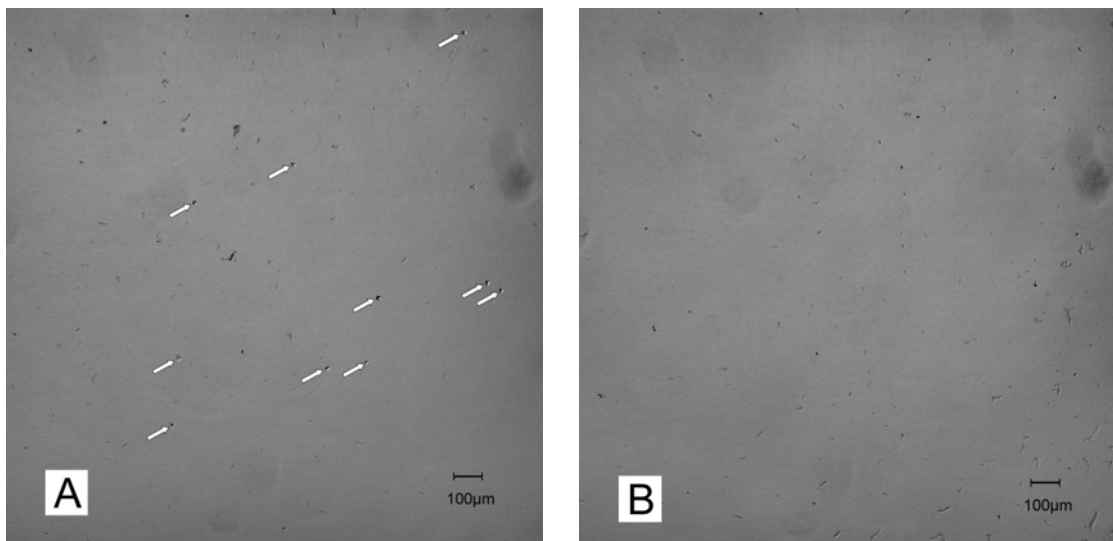
Bei 10 000 gemessenen Zellen zeigten sich für die gemessenen Zellen der Primärkultur DZB-202p8 Bereiche definierter Granularität und Größe in denen vermehrt Zellen detektiert wurden (Abb. 71a). Nach dem gleichen Verfahren wurden zwei Populationen definiert. Ins-

besondere die Subpopulation P1 (rot) war deutlich erkennbar, wohingegen die Subpopulation P2 (grün) sich nur schwach andeutete (Abb. 71b).

Von allen gemessenen Zellen lagen 16 % innerhalb P1 und 5,1 % der Zellen innerhalb P2 (Abb. 71c). In jedes Well wurden mit Hilfe des FACS Gerätes 100 Zellen der jeweiligen Population selektiert und als Parallelansätze kultiviert.



**Abb. 72:** Proliferation der Zellen DZB202p8 aus der Population P1 der Dotplot Darstellung (Abb. 71). Mikroskopisches Foto des Ausschnitts eines Wells A) Tag 0 B) Tag 14. Die einzelnen Zellen wurden jeweils mit Pfeilen markiert.



**Abb. 73 :** Proliferation der Zellen DZB202p8 aus der Population P2 der Dotplot Darstellung (Abb. 71). Mikroskopisches Foto des Ausschnitts eines Wells A) Tag 0 B) Tag 14. Die einzelnen Zellen wurden jeweils mit Pfeilen markiert.

Das Foto in der Abb. 72A zeigt exemplarisch einen Ausschnitt des Wells mit den Primärzellen DZB-202p8 aus der definierten Population P1 am ersten Tag. Einige der identifizierten Zellen hatten bereits adhäriert und sind aufgrund des schwachen Kontrastes schwer erkennbar. Dieser Wellausschnitt wird auf dem Foto der Abb. 72B nach 14 Tagen gezeigt. Die Zellen sind stark proliferiert.

Abb. 73A zeigt exemplarisch einen Ausschnitt des Wells mit den Primärzellen DZB202p8 aus der definierten P2 am ersten Tag. Die identifizierten Zellen lagen in kugeliger Suspensionsform vor. Nach 14 Tagen war kein Wachstum erkennbar (Abb. 73B). In den zehn parallel kultivierten Wells befanden sich in Randbereichen Zellen der Population P2 noch immer in zusammen gekugelter Form vor oder kamen sehr vereinzelt als adhärente Zellen vor. Diese betrug anzahlmäßig jedoch deutlich unter 100 Zellen. Somit hatte keine Proliferation stattgefunden.

Es lassen sich über die Messung von Granularität und Größe der Zellen Subpopulationen in den beiden Primärkulturen unterscheiden. Die Populationen stellen sich unterschiedlich dar. Während bei DZB-201 beide Subpopulationen (P1 und P2) proliferieren, wachsen bei DZB-202 die Zellen nur aus der Subpopulation P1. Das schlechte Wachstum der Zellen aus der Subpopulation P2 kann nicht in dem mengenmäßig verminderten Zellvorkommen in dem Bereich begründet liegen, da auch aus diesem Bereich jeweils 100 Zellen in die Wells sortiert wurden.

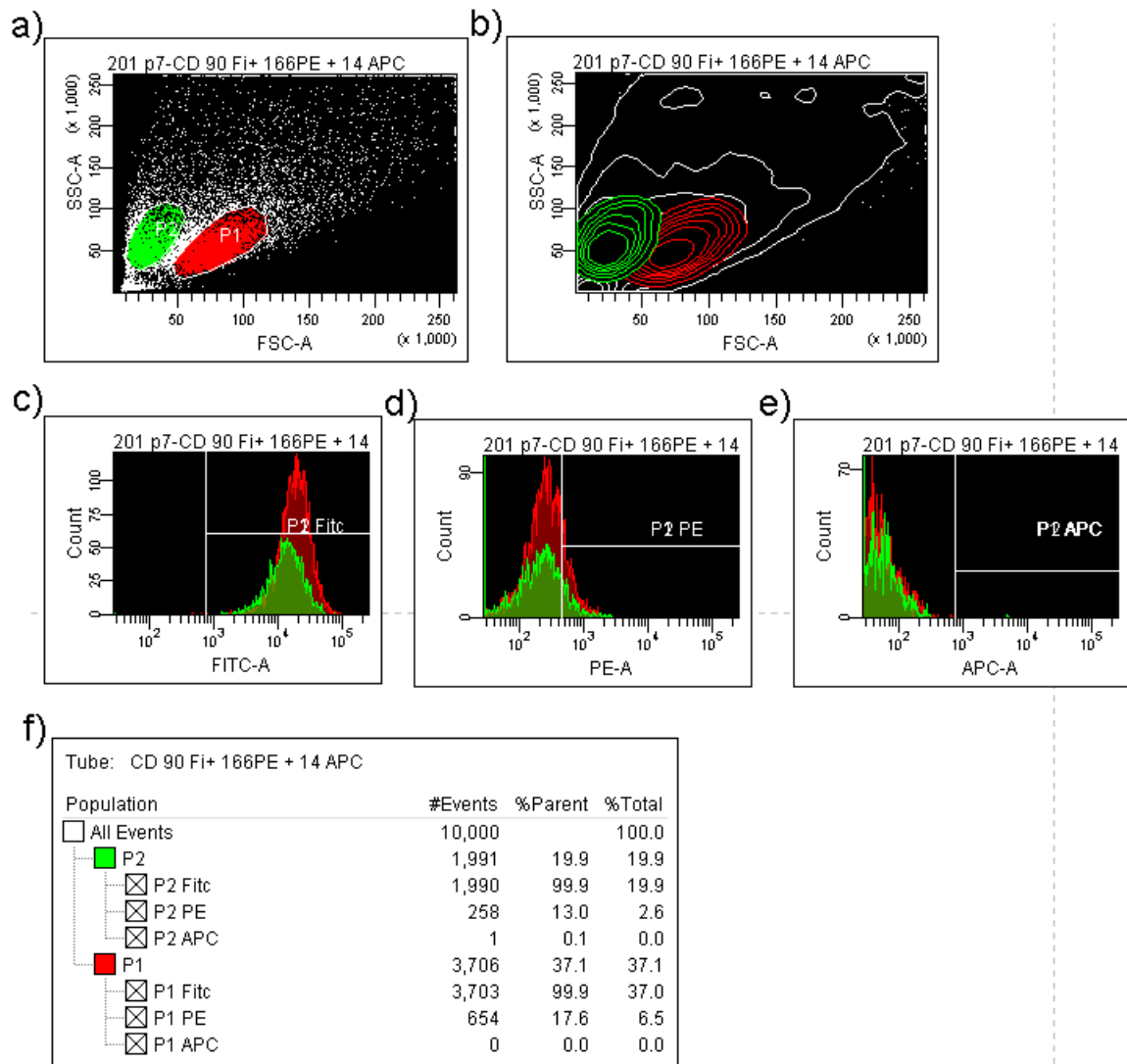
Weitergehende Untersuchungen wurden in dem folgenden Kapitel vorgenommen.

### **3.4.2 Analyse von Subpopulationen P1 und P2 der Primärkulturen**

Neben durchflusszytometrischer Messung des FACS Gerätes auf Größe und Granularität der Zellen, können außerdem Fluoreszenzen gelabelter Oberflächenproteine dargestellt werden. Für die Primärzellen DZB-201p8 und die Primärzellen DZB-202p8 wurden Subpopulationen definiert und hinsichtlich 32 Oberflächenproteine gegenübergestellt. Gleichzeitiges Labeln der Oberflächenproteine mit drei verschiedenen Antikörpern, die jeweils mit den Fluoreszenzfarbstoffen FITC, PE oder APC konjugiert waren, ermöglichte dreifache Bestimmung unterschiedlicher Oberflächenmarker eines Probenansatzes. Als Bezugsprobe dienten die jeweiligen Isotypenkontrollen.

### 3.4.2.1 Oberflächenproteine der dentalen Primärzellen DZB-201

Die Messergebnisse des FACS-Gerätes für die dentale Primärkultur DZB-201p7 wird in der folgenden Abb. 74 exemplarisch als Screenshot gezeigt.



**Abb. 74:** Darstellung der Primärzellpopulation DZB-201p7 beim FACS-Gerät (Screenshot). Anhand Dotplot a) wurden mit den vermessenen Zellen die Populationen P1 (in rot) und P2 (in grün) definiert. Abb. b) zeigt die Zentren der jeweiligen Populationen auf. Fluoreszenzmessungen für FITC (Abb. c), PE (Abb. d) und APC (Abb. e). Aufgetragen jeweils die Anzahl Zellen auf die Fluoreszenzintensität. Der eingezeichnete Balken definiert die Grenze zwischen ungelabelten Zellen (links) und fluoreszenzmarkierten positiven Zellen (rechts). Abb.f): Auflistung absolute und die prozentuale Auswertung der positiven Zellen der Populationen P1 und P2.

Die Abb. 74 zeigt exemplarisch einen Screenshot des FACS Gerätes bei der Messung der Zellpopulation DZB-201p7. Über die Granularität und Größe der Zellen (Feld a) wurden die beiden Populationen P1 und P2 definiert. Feld c) zeigt bei der Messung der Zellen die Intensitäten der Fluoreszenz von FITC. In diesem Beispiel waren auf den Zelloberflächen die Oberflächenproteine CD90 mit FITC markiert. Da alle Zellen eine intensivere Fluoreszenz für FITC aufwiesen, die höher waren, als das definierte Minimum beim eingetragenen Balken, exprimieren alle Zellen das Oberflächenprotein CD90. Im Feld f) sind für P1 und P2 bei „% Parent“ 99,9 % für FITC (in diesem Fall CD90) angegeben. In Feld d) waren die meisten Zellen negativ für PE. Also nur ein geringer Teil der Zellen hat CD166 als Oberflächenprotein exprimiert. Im Feld f) wurden für P1 13% und für P2 17,6% der Zellen als PE gefärbt, also CD166 positiv angegeben. Feld e) zeigte alle Zellen negativ für APC und damit für das Oberflächenprotein CD14. Feld f) zeigt für P1 0,1 % und für P2 0% der Zellen positiv für APC bzw. für CD14 an.

Die auf diese Weise gemessenen Oberflächenproteine wurden für die Primärkultur DZB-201 von den drei unterschiedlichen Passagen p7, p12 und p17 untersucht und in der folgenden Tabelle die prozentualen Anteile der Zellen (Abb. 74 f, % Parent) aus den Subpopulationen aufgeführt.

Oberflächenprotein + Fluoreszenzfarbstoff	DZB-201p7		DZB-201p12		DZB-201p17	
	P1 [%]	P2 [%]	P1 [%]	P2 [%]	P1 [%]	P2 [%]
CD 90Fi	99,9	99,9	100,0	100,0	100,0	99,8
CD 34Fi	0,0	0,1	0,0	0,0	0,1	0,1
CD 49b Fi	77,5	70,5	84,5	73,8	95,8	82,7
CD 105 Fi	7,1 ↑	5,8 ↓	20,7 ↑	13,3 ↓	37,1 ↑	21,2 ↓
CK Fi	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
CD 44 Fi	56,7	54,3	99,8	98,3	99,9	98,1
CD 51/61 Fi	0,1	0,1	0,0	0,2	0,1	0,2
CD 147 Fi	86,3	88,2	99,3	97,8	98,6	95,5
CD 106 Fi	3,3	4,0	1,2	0,9	0,3	0,4
S-100 (GAM Fi)	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,2
Stro-1 (GAM Fi)	0,1	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0
CD 90 (GAM Fi)	88,3	86,3	99,9	99,9	97,2	97,4
CD 166 PE	17,6 ↑	13,0 ↓	28,0 ↑	14,1 ↓	50,2 ↑	26,7 ↓
CD 140a PE	86,2	67,4	98,2	95,9	90,5	77,0
CD 10 PE	84,5	85,5	87,4	81,2	82,6	66,0
CD 49e PE	98,1	96,5	98,6	97,8	99,1	96,7
CD 49d PE	48,8 ↑	30,1 ↓	14,0 ↑	7,1 ↓	17,8 ↑	6,0 ↓
CD 9 PE	7,1	12,0	5,1	3,5	12,2	10,2
CD 29 PE	97,6	96,0	98,9	97,7	99,8	97,8
CD 117 PE	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0
CD 133 PE	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,4
CD 31 PE	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,2
CD 73 PE	84,1	77,1	86,1	76,0	40,2	56,2
CD 140b PE	76,4	64,3	98,1	94,7	34,6	49,7
CD 14 APC	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,3
CD 56 APC	2,4	3,0	0,4	0,8	0,1	0,3
CD 13 APC	15,9	17,7	30,7	29,5	28,5	28,8
HLA DR APC	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2
CD 271 APC	0,1	0,2	0,0	0,1	0,0	0,3
CD 54 APC	5,7	7,5	1,7	2,4	1,1	1,3
HLA ABC APC	24,1	34,0	9,6	15,6	22,2	22,0
CD 45 APC	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1

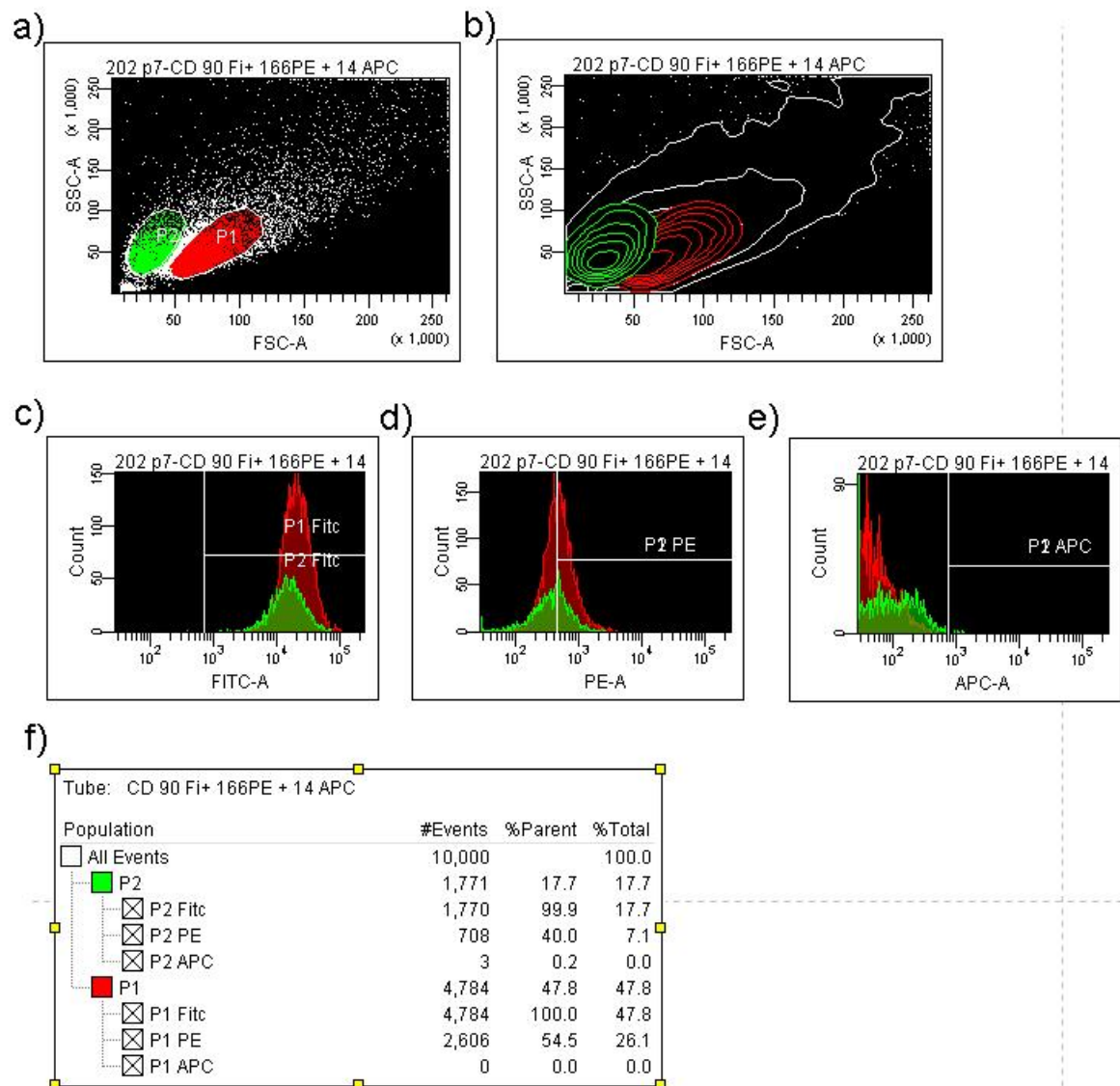
**Tab. 6:** Oberflächenproteine DZB-201 (FACS Untersuchung).

In der Tab. 6 sind Oberflächenproteine aufgelistet, die bei mehr als 80% der Zellen exprimiert sind, sowohl in P1 als auch in P2. Die entsprechenden Zeilen der Tabelle wurden in türkis hinterlegt: CD90, CD147, CD140a, CD10, CD49e, CD29. Zu beachten ist auch CD44. Einige Oberflächenproteine wurden in beiden Populationen (P1 und P2) nicht exprimiert bzw. bei weniger als 1 % der Zellen. Entsprechende Zeilen wurden grau hinterlegt: CD34, CK, CD51/61, S100, Stro-1, CD117, CD133, CD31, CD14, HLA DR, CD271, CD45.

Zudem gab es Oberflächenproteine, die jeweils höher in P1 exprimiert wurden als in P2. Diese wurden jeweils mit einem Pfeil hinter dem prozentualen Wert versehen: CD105, CD166, CD49d. Es zeigte sich, dass zwischen den Zellen durchaus Unterschiede hinsichtlich der Oberflächenproteine bestehen.

### 3.4.2.2 Oberflächenproteine der dentalen Primärzellen DZB-202

Die Oberflächenproteine wurden auch bei DZB-202 mit Antikörpern markiert um weitergehende Informationen zu dem Proliferationsverhalten der beiden Subpopulationen zu erhalten. Die resultierenden Messergebnisse des FACS-Gerätes für die dentale Primärkultur DZB-202p7 wird in der folgenden Abb. 75 exemplarisch als Screenshot gezeigt:



**Abb. 75:** Darstellung der Primärzellpopulation DZB-202p7 beim FACS-Gerät (Screenshot). Anhand Dotplot a) wurden mit den vermessenen Zellen die Populationen P1 (in rot) und P2 (in grün) definiert. Abb. b) zeigt die Zentren der jeweiligen Populationen auf. Fluoreszenzmessungen für FITC (Abb. c), PE (Abb. d) und APC (Abb. e). Aufgetragen jeweils die Anzahl Zellen auf die Fluoreszenzintensität. Der eingezeichnete Balken definiert die Grenze zwischen ungelabelten Zellen (links) und fluoreszenzmarkierten positiven Zellen (rechts). Abb.f): Auflistung absolute und die prozentuale Auswertung der positiven Zellen der Populationen P1 und P2.

In der folgenden Tabelle wurde der Anteil Zellen mit markierten Oberflächenproteinen prozentual aufgelistet. Die Populationen P1 und P2 wurden für die Primärkultur DZB-201 bei drei unterschiedlichen Passagen p7, p12 und p17 untersucht.

Oberflächenprotein + Fluoreszenzfarbstoff	DZB-202p7		DZB-202p12		DZB-202p17	
	P1 [%]	P2 [%]	P1 [%]	P2 [%]	P1 [%]	P2 [%]
CD 90Fi	100,0	99,9	100,0	99,8	100,0	100,0
CD 34Fi	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0
CD 49b Fi	39,1	28,2	54,3	40,8	35,6	21,8
CD 105 Fi	19,1 ↑	12,4 ↓	44,2 ↑	32,7 ↓	43,0 ↑	25,0 ↓
CK Fi	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,2
CD 44 Fi	100,0	99,3	99,9	99,3	99,9	98,7
CD 51/61 Fi	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,3
CD 147 Fi	99,7	97,8	99,4	98,2	99,1	95,8
CD 106 Fi	1,0	0,9	0,1	0,0	0,1	0,3
S-100 (GAM Fi)	0,1	0,0	0,0	0,1	0,2	0,4
Stro-1 (GAM Fi)	0,3	0,1	0,2	0,3	0,2	0,4
CD 90 (GAM Fi)	99,9	99,9	99,7	99,3	100,0	99,7
CD 166 PE	54,5 ↑	40,0 ↓	41,0 ↑	21,4 ↓	54,7 ↑	21,3 ↓
CD 140a PE	97,9	89,9	90,7	84,0	90,3	76,8
CD 10 PE	99,5	98,6	92,6	87,2	92,8	86,9
CD 49e PE	99,8	99,0	99,7	98,4	100,0	98,6
CD 49d PE	74,9 ↑	59,8 ↓	45,3 ↑	31,6 ↓	31,7 ↑	19,8 ↓
CD 9 PE	25,4	15,1	27,9	19,3	47,3	29,5
CD 29 PE	99,7	98,2	99,1	97,4	99,8	97,8
CD 117 PE	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1
CD 133 PE	0,0	0,3	0,0	0,2	0,0	0,2
CD 31 PE	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1
CD 73 PE	97,9	94,8	93,9	90,7	97,3	94,7
CD 140b PE	99,1	96,2	98,8	96,2	99,5	97,6
CD 14 APC	0,0	0,2	0,1	0,1	0,0	0,1
CD 56 APC	6,7	9,6	0,2	0,4	0,0	0,2
CD 13 APC	40,9	49,7	12,4	18,8	16,2	24,0
HLA DR APC	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
CD 271 APC	0,1	0,5	0,1	0,1	0,0	0,2
CD 54 APC	1,6	2,9	0,2	0,4	0,2	0,7
HLA ABC APC	46,2	64,7	19,7	30,7	32,4	52,6
CD 45 APC	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,2

**Tab. 7:** Oberflächenproteine DZB-202 (FACS Untersuchung).

In der Tab. 7 ist die Expression der Oberflächenproteine von DZB-202 aufgelistet. Oberflächenproteine, die sowohl in P1 als auch in P2 bei mehr als 80% der Zellen exprimiert sind, wurden in türkis hinterlegt: CD90, CD44, CD147, CD140a, CD10, CD49e, CD29. Im Vergleich zu der Expression der Oberflächenproteine bei den Zellen aus DZB-201 lag bei DZB-202 auch die Expression von CD73 und CD140b sehr hoch. Die Expression folgender Oberflächenproteine war bei den beiden Populationen (P1 und P2) nicht nachweisbar bzw. weni-



ger als 1 %: CD34, CK, CD51/61, S100, CD106, Stro-1, CD117, CD133, CD31, CD14, HLA DR, CD271, CD45 (grau hinterlegt).

Auch bei DZB-202 gab es Oberflächenproteine, die jeweils höher in P1 exprimiert wurden als in P2. Diese wurden jeweils mit einem Pfeil hinter dem prozentualen Wert versehen: CD105, CD166, CD49d.

Damit waren bei DZB-202 und bei DZB-201 die gleiche Oberflächenproteine nicht bzw. sehr niedrig exprimiert und die gleichen Oberflächenproteine in P1 höher exprimiert als in P2.

### 3.4.3 Vereinzlung aus Mischpopulationen

Für erste Informationen der Lebensfähigkeit einzelner Zellen aus dentalem Gewebe, wurden die heterogenen Gesamtpopulationen der Primärkulturen durch zwei unterschiedliche Verfahren vereinzelt (Tab. 8). Nach vier Wochen erfolgte eine abschließende Beurteilung anhand der Auswertung von adhärenenten und proliferierenden Zellen.

Methode	Anzahl Einzelzellkulturen DZB-201p8/DZB-202p8	Anzahl Zellen nach 4 Wochen	
		DZB-201p8	DZB-202p8
Limiting Dilution	je 100 Zellen in 300 wells	5x1 Zelle	1x1 Zelle
		1x2 Zellen	
		1x10 Zellen	1x~100 Zellen
		2x~ 20 Zellen	1x Well konfluent besiedelt
FACS Vereinzlung	je 154 Einzelzellen	1x Well 25% besiedelt	2x Well konfluent besiedelt

**Tab. 8:** Vereinzlung der Zellen, Proliferationskontrolle nach 4 Wochen.

In Tab. 8 werden erste Ergebnisse zur Zellvereinzlung durch „Limiting Dilution“ und durch Einzelzellablage (FACS-Gerät) für die beiden Primärkulturen DZB-201 und DZB-202 gezeigt. Nach vier Wochen lagen für beide Methoden und bei beiden Primärkulturen, einige vereinzelt wachsende Zellen und auch stark proliferierende Zellen vor.

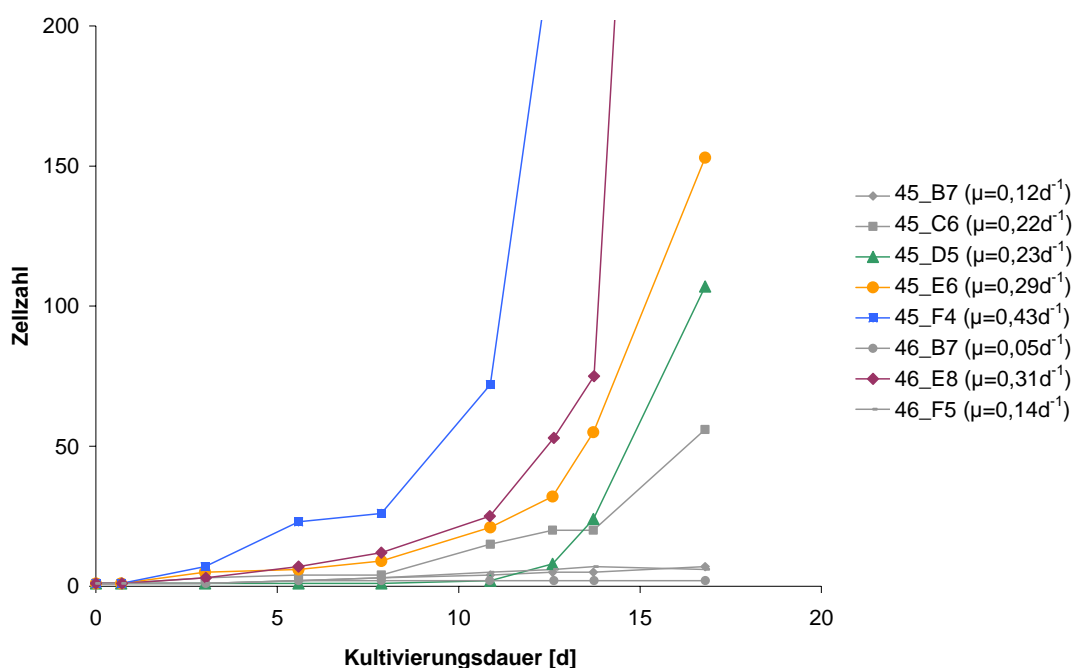
In den Mischpopulationen waren somit offenbar Zellen vorhanden, denen es gelang zu adhärenieren, die jedoch nicht mehr in der Lage waren, zu proliferieren. Zudem gab es offenkundig Zellen, die als Einzelzelle in der Lage waren zu adhärenieren und zu proliferieren. Genauere Zahlen dazu konnten in weitergehenden Versuchen im nun folgenden Kapitel ermittelt werden.

### 3.4.4 Proliferationsuntersuchung der vereinzelt Primärkulturen

Mikroskopische Aufnahmen der vollständigen Wells (Cellscreen Gerät, Kap. 2.6.1.2) während des Kulturverlaufes ermöglichten eine Zählung der Zellen und damit den Nachweis des Proliferationsverhaltens der vereinzelt Zellen aus Primärkulturen. Zudem konnte auf diese Weise der Einzelzellstatus zu Beginn der Kultur besser kontrolliert werden.

#### 3.4.4.1 Einzelzellen aus der dentalen Primärkultur DZB-201p8

Bei der Vereinzeltung der Primärkultur DZB-201p8 wurden 50 einzelnen Zellen in die Wells sortiert. Davon waren 16 Zellen (32%) in der Lage zu adhären. Etwa 16 % der Zellen (50% der adhären Zellen) hatten die Potenz zu proliferieren. Die spezifische Wachstumsrate variierte von  $\mu = 0.00 \text{ d}^{-1}$  bis  $\mu = 0.43 \text{ d}^{-1}$ .



**Abb. 76:** Proliferation der Klone aus der Primärkultur DZB-201p8.

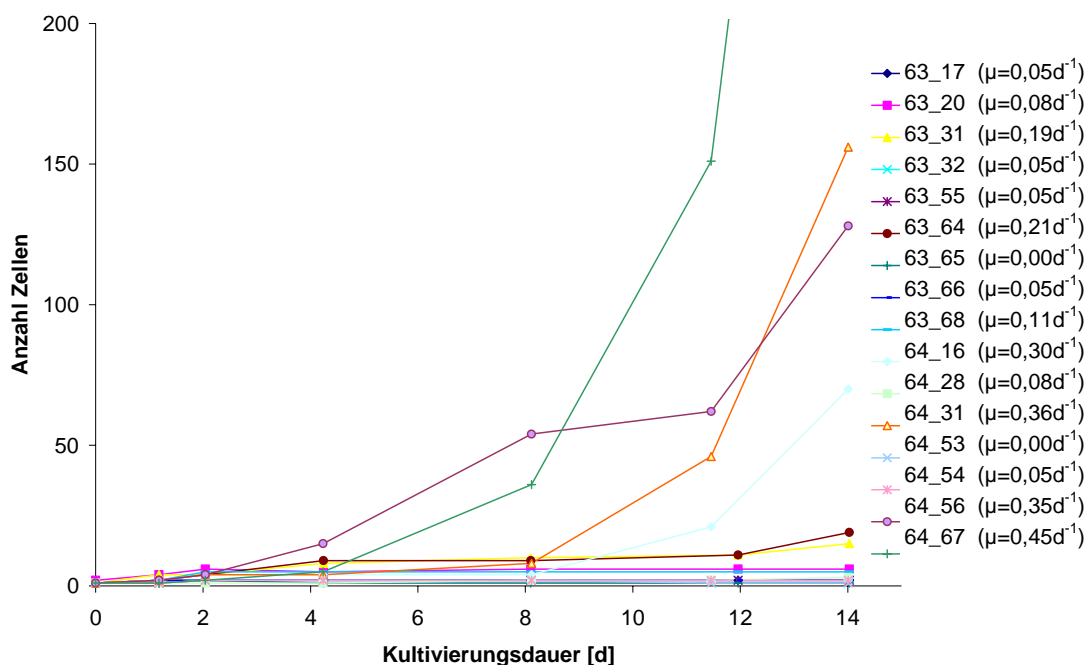
Die Grafik der Abb. 76 zeigt die einzelnen Zellen, welche in der Lage waren zu adhären und zu proliferieren. Der Proliferations- bzw. Wachstumsverlauf wurde für 17 Tage dokumentiert. Von den einzelnen Zellen, welche in der Lage waren zu adhären und zu proliferieren, zeigte sich das größte Wachstum bei dem Klon 45\_F4 mit einer spezifischen Wachstumsrate  $\mu = 0,43 \text{ d}^{-1}$ . Die niedrigste Proliferation wies die Einzelzelle 45\_B7 mit einer spezifischen Wachstumsrate von  $\mu = 0,12 \text{ d}^{-1}$  auf.

Die 50 einzelnen Zellen besaßen durchaus unterschiedliches Vermögen zu überleben und auch die weitere Teilungsfähigkeit war unterschiedlich stark ausgeprägt.

Klone mit einer spezifischen Wachstumsrate  $\mu > 0,23 \text{ d}^{-1}$  konnten weiter proliferiert und zum Teil differenziert werden (siehe Kap. 3.4.6.).

### 3.4.4.2 Einzelzellen aus der dentalen Primärkultur DZB-202p8

Von 50 vereinzelt Zellen DZB-202p8 waren 26 Zellen (52 %) in der Lage zu adhären. Etwa 32% der Zellen (61,5 % der adhären Zellen) hatten die Potenz zu proliferieren. Die spezifische Wachstumsrate variierte von  $\mu = 0 \text{ d}^{-1}$  bis  $\mu = 0,45 \text{ d}^{-1}$ .



**Abb. 77:** Proliferation der Klone aus der Primärkultur DZB-202p8.

Die Grafik der Abb. 77 zeigt die einzelnen Zellen, welche in der Lage waren zu adhären und zu proliferieren. Der Proliferations- bzw. Wachstumsverlauf wurde für 14 Tage dokumentiert. Die höchste spezifische Wachstumsrate von  $\mu = 0,45 \text{ d}^{-1}$  zeigt sich in dem Well 64\_67. Das geringste Wachstum zeigten die beiden Einzelzellen 63\_65 und 64\_53 mit einer spezifischen Wachstumsrate von  $\mu = 0 \text{ d}^{-1}$  auf. Sie hatten sich zwar jeweils einmal geteilt, jedoch war von den resultierenden beiden Zellen nach einiger Zeit jeweils eine der Zellen nicht weiter als lebende Zelle identifizierbar bzw. auffindbar.

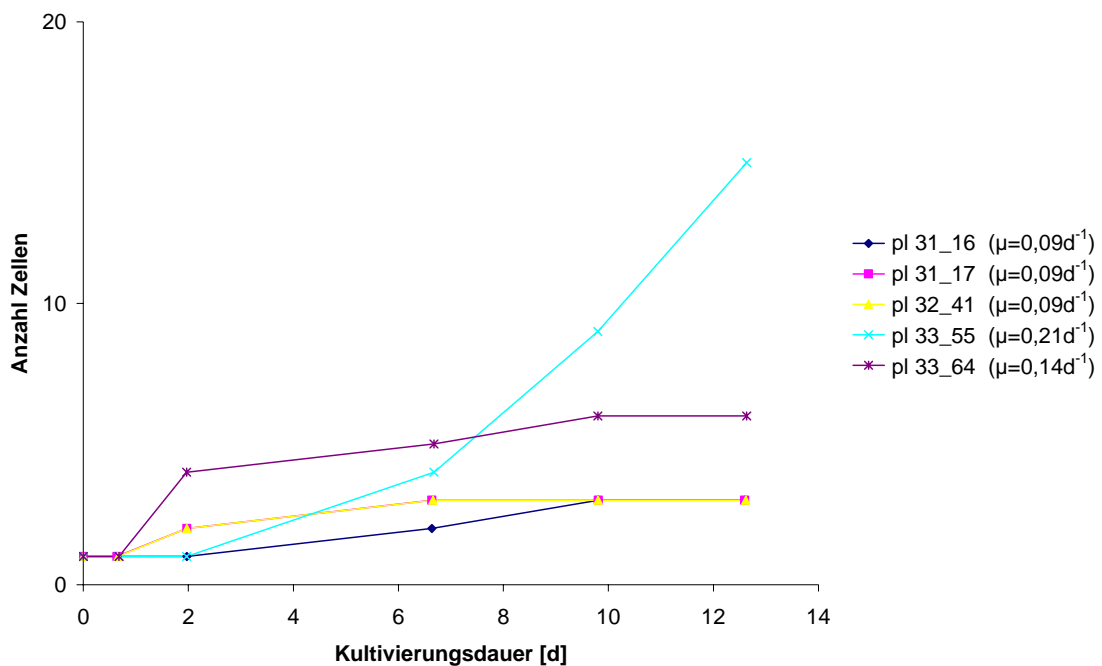
Auch die Einzelzellen aus der Primärkultur DZB-202 stellten sich hinsichtlich ihres Proliferationsvermögens unterschiedlich dar.

Klone mit einer spezifischen Wachstumsrate  $\mu > 0,23 \text{ d}^{-1}$  wurden ebenfalls weiter proliferiert und zum Teil differenziert (siehe Kap. 3.4.6.).

### 3.4.5 Selektion CD13-markierter Zellen aus DZB-201p8

Neben den unmarkierten Einzelzellen wurden auch Zellkulturen mit markierten Einzelzellen angelegt. Zu diesem Zwecke wurden Primärkulturen mit dem Antikörper CD13 markiert und durch Einzelzellablage mit dem FACS-Gerät in die Wells gebracht.

Von 90 angelegten Wells konnten in 30 Wells Zellen adhären. In 19 (21%) dieser Wells hatten die Zellen die Potenz zu proliferieren. In 5 Wells (5,6%) startete die Kultur mit einer Einzelzelle.

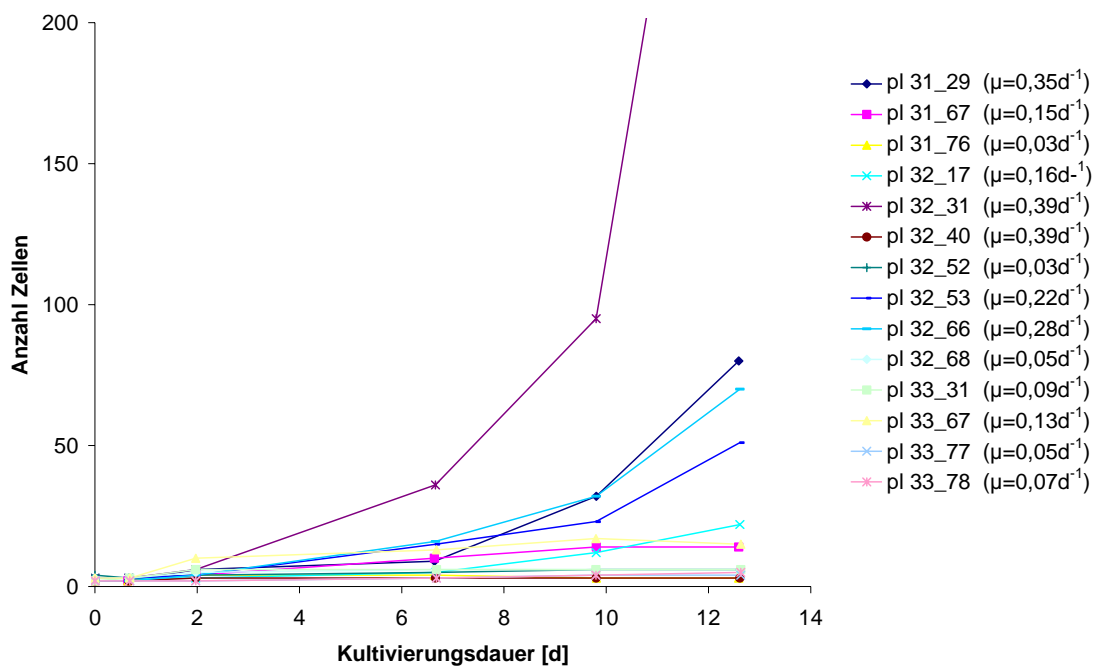


**Abb. 78:** Proliferation der CD13 gelabelten Klone der Primärkultur DZB201p8.

Die Grafik der Abb. 78 zeigt die fünf einzelnen Zellen, welche in der Lage waren zu adhären und zu proliferieren. Der Proliferations- bzw. Wachstumsverlauf wurde für 12,6 Tage dokumentiert. Das größte Wachstum zeigte sich bei dem Klon 33\_55. Dort lagen zum Zeitpunkt der letzten Messung im Well 15 Zellen vor. Es lässt sich eine spezifische Wachstums-

rate  $\mu = 0,21 \text{ d}^{-1}$  berechnen. Drei der Einzelzellen proliferierten bis zur letzten Messung auf jeweils drei Zellen. Damit wiesen sie die niedrigste Proliferation auf, mit einer spezifischen Wachstumsrate von jeweils  $\mu = 0,09 \text{ d}^{-1}$ . Für weitere Proliferation und möglicherweise nachfolgender Differenzierung war die spezifische Wachstumsrate zu niedrig.

In 15,6 % der 90 Wells wurden mehrere Zellen bzw. Aggregate einsortiert. Damit kann bei diesen Wells nicht mehr von Klonen aus Einzelzellen gesprochen werden.



**Abb. 79:** Proliferation der CD13 gelabelten Zellen der Primärzellpopulation DZB201p8 ( $n > 1$ ).

In der Grafik der Abb. 79 ist der Wachstumsverlauf der Wells aufgezeigt, in denen die Kultur mit mehr als einer Zelle ( $n > 1$ ) gestartet hat. Das größte Wachstum zeigte sich in dem Well 32\_31 mit einer spezifischen Wachstumsrate von  $\mu = 0,39 \text{ d}^{-1}$ . Zum ersten Messzeitpunkt wurden in diesem Well drei Zellen nachgewiesen. Nach zehn Tagen waren bereits 95 Zellen gezählt worden und bei den folgenden Messzeitpunkten war die Zelldichte so hoch, dass sie nicht mehr bestimmt werden konnte. Die niedrigste Proliferation wies das Well 32\_68 mit einer spezifische Wachstumsrate von  $\mu = 0,05 \text{ d}^{-1}$  auf. In diesem Well waren zum ersten Messzeitpunkt zwei Zellen erkennbar, denen es innerhalb der 12,6 Tage gelang, auf sechs Zellen zu proliferieren.

### 3.4.6 Charakterisierung der Klone

Einzelzellen mit hoher Teilungsaktivität und somit hoher spezifischer Wachstumsrate wurden bei Erreichen der Konfluenz im Well passagiert und weiterhin proliferiert, bis aus den jeweiligen Einzelzellen ausreichend Zellmasse vorlag, um weitere Versuche durchzuführen.

#### 3.4.6.1 Oberflächenproteine eines Klons (FACS-Untersuchung)

Die Vereinzelnung der Primärkultur DZB-202p8 (Abb. 77) führte zu der Isolierung des Klones 64\_B4 (64\_16) mit einer spezifischen Wachstumsrate von  $\mu = 0,30 \text{ d}^{-1}$ . Nach einer Proliferationsphase von 93 Tagen hatte der Klon die Bodenfläche von  $2 \times 175 \text{ cm}^2$  Gewebekulturflaschen konfluent überwachsen. Mit dieser Zellmasse wurde eine ausführliche FACS-Untersuchung durchgeführt, indem die Proteine der Zelloberfläche mit Antikörpern gelabelt wurden, welche mit Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert waren. Als Bezugsprobe dienten die jeweiligen Isotypenkontrollen. Für jede Messung wurden jeweils 10.000 Zellen im FACS-Gerät untersucht.

Oberflächenprotein +Fluoreszenzfarbstoff	Primärkultur DZB- 202p4 Anteil [%]	Klon 64_B4 DZB202p12 Anteil [%]	Differenz [%]
CD90+Fi	99,98	99,92	-0,06
CD34+Fi	0,04	0,07	0,03
CD49b+Fi	31,99	30,41	-1,58
CD105+Fi	18,92	7,45	-11,47
CK+Fi	0,02	0,12	0,1
CD44+Fi	99,78	99,51	-0,27
CD51/61+Fi	0	0,07	0,07
CD147+Fi	99,84	97,99	-1,85
CD106+Fi	0,17	0,13	-0,04
Stro 1+GAM Fi	1,13	1,55	0,42
CD90+GAM Fi	97,61	99,49	1,88
CD166+PE	99,98	99,33	-0,65
CD140a+PE	98,08	98,19	0,11
CD10+PE	97,24	93,91	-3,33
CD49e+PE	99,68	98,76	-0,92
CD49d+PE	19,91	10,01	-9,9
CD9+PE	91,32	88,55	-2,77
CD29+PE	99,93	93,07	-6,86
CD31+PE	0,14	0,36	0,22
CD73+PE	98,04	99,05	1,01
CD14+APC	0,02	0,04	0,02
CD56+APC	1,71	0,43	-1,28
CD13+APC	75,6	89,34	13,74
HLA DR+APC	0,08	0,08	0
CD54+APC	10,58	42,44	31,86
HLA ABC+APC	62,68	44,28	-18,4
CD45+PE	0,21	0,23	0,02

Tab. 9: Oberflächenproteine Klon 64\_B4 (FACS-Untersuchung)

Die Untersuchung einiger Oberflächenproteine des Klons 64\_B4 wurden in der Tab. 9 einer Mischkultur der Primärzellen DZB-202p4 gegenübergestellt.

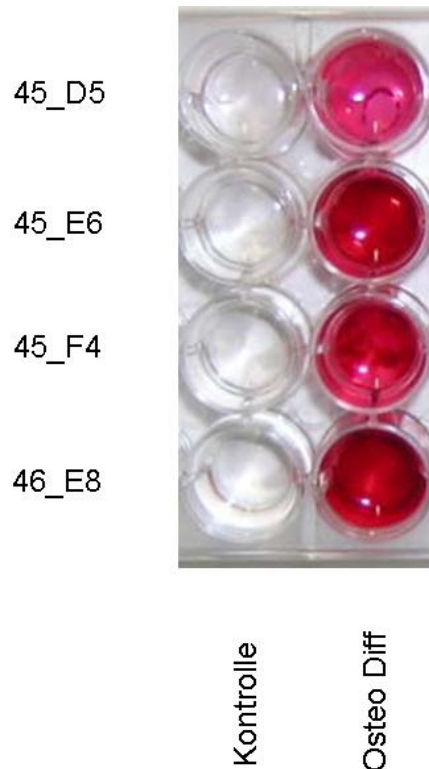
Folgende Oberflächenproteine waren bei mehr als 80% der Zellen exprimiert (in türkis hinterlegt): CD90, CD44, CD147, CD166, CD140a, CD10, CD49e, CD9, CD29, CD73. Diese hohen prozentualen Anteile lagen für die Mischpopulation DZB-202p4 als auch für den Klon 64\_B4 vor. Auch die niedrigen Expressionen der Oberflächenproteine mit weniger als 1 % der Zellen (in grau hinterlegt) galten für beide gemessenen Gruppen: CD34, CK, CD51/61, CD106, CD14, HLA DR, CD45.

Auffällig waren Abweichungen bei den Oberflächenproteinen CD105 und CD54. Die Expression von CD105 war im Vergleich zur Mischpopulation der Primärzellen DZB-202p4 bei dem Klon 64\_B4 etwa auf die Hälfte reduziert und von CD54 bei dem Klon etwa vierfach erhöht.

#### **3.4.6.2 Osteogene Differenzierung der Klone**

Bei der Vereinzlung der Primärkultur DZB-201p8 (Abb. 76) waren vier Klone ausreichend proliferiert für eine osteogene Differenzierung. Klon 45\_F4 mit einer spezifischen Wachstumsrate  $\mu = 0,43 \text{ d}^{-1}$ , Klon 46\_E8 mit einer spezifischen Wachstumsrate von  $\mu = 0,31 \text{ d}^{-1}$ , Klon 45\_E6 mit einer spezifischen Wachstumsrate  $\mu = 0,29 \text{ d}^{-1}$  und Klon 45\_D5 mit einer spezifische Wachstumsrate von  $\mu = 0,23 \text{ d}^{-1}$ .

Sobald die Klone den Wellboden konfluent bewachsen hatten, wurden sie passagiert und als Parallelansätze weiterhin proliferiert. Nachdem aus den jeweiligen Einzelzellen ausreichend Zellmasse entstanden war, erfolgte über 28 Tage die osteogene Differenzierung mit abschließender Alizarinrot-Färbung als Kalziumnachweis. Der Zeitraum von der Vereinzlung der Zellen bis zur Abschlussuntersuchung betrug bei diesem Versuch 69 Tage.



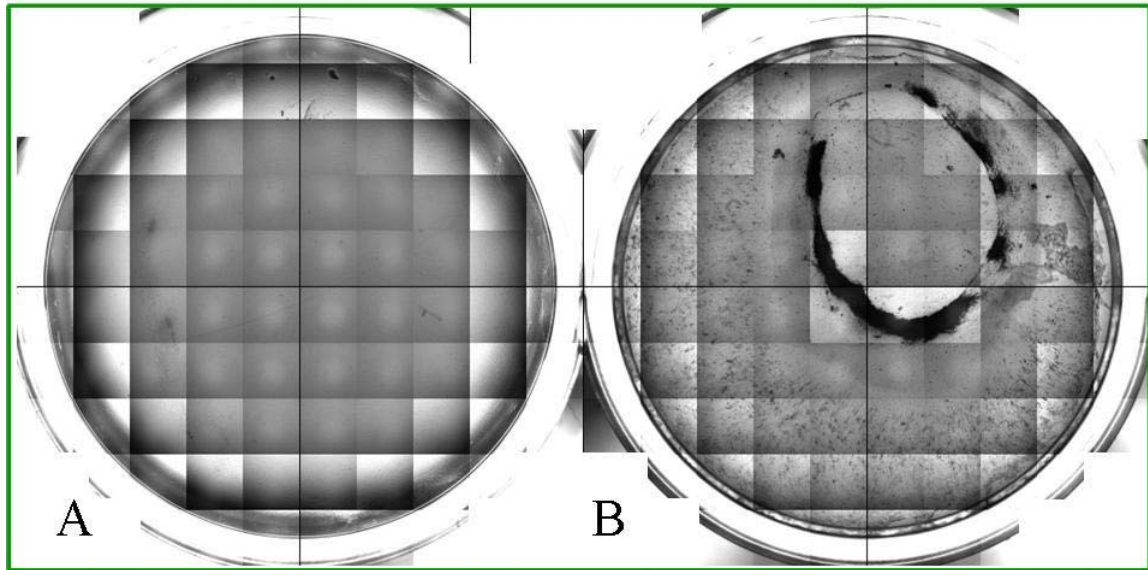
**Abb. 80:** Kalziumnachweis mit Alizarinrot der Klone aus der Primärkultur DZB-201p8. Rechte Reihe der Wells Zellen in osteogenem Differenzierungsmedium, linke Reihe der Wells Zellen in Standardmedium als Kontrolle.

Das Foto der Abb. 80 zeigt den Ausschnitt einer Multiwellplatte mit der Alizarinrot-Färbung nach der osteogenen Differenzierung der vier unterschiedlichen Klone aus der Primärkultur DZB-201p8. Die Zellen in den Wells der linken Seite wurden in Standardmedium, die Zellen der Wells auf der rechten Seite wurden in osteogenem Differenzierungsmedium kultiviert. Es war eine deutliche Rotfärbung in den Wells der osteogen differenzierten Zellen zu sehen. Bei den Kontrollen lag keine rote Färbung vor.

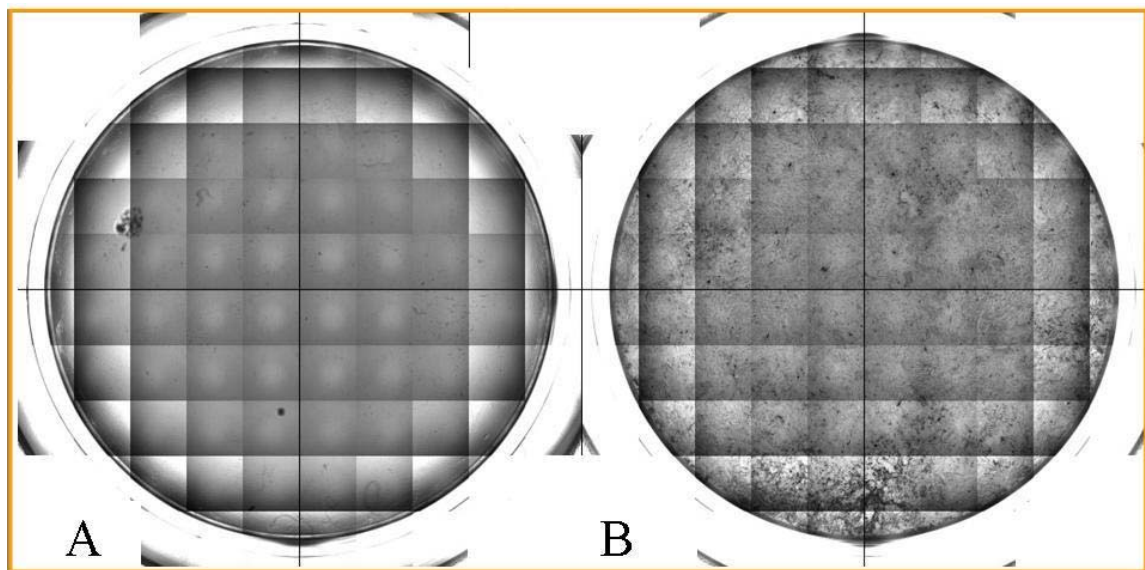
Alle vier osteogen differenzierten Zellen der Primärkultur DZB-201p8 hatten die Potenz zu kalzifizieren.

Die Muster der Mineralisierungszonen lassen sich auf den mikroskopischen Fotos erkennen. Diese Gesamtdarstellungen der Wells sind aus jeweils 88 Einzelfotos zusammengesetzt. Die Rahmenfarben entsprechen den Farben der Graphen in Abb. 76. Links sind jeweils die Zellen nach Kultivierung in Standardmedium, rechts sind die Zellen nach Kultivierung in osteogenem Differenzierungsmedium gezeigt.

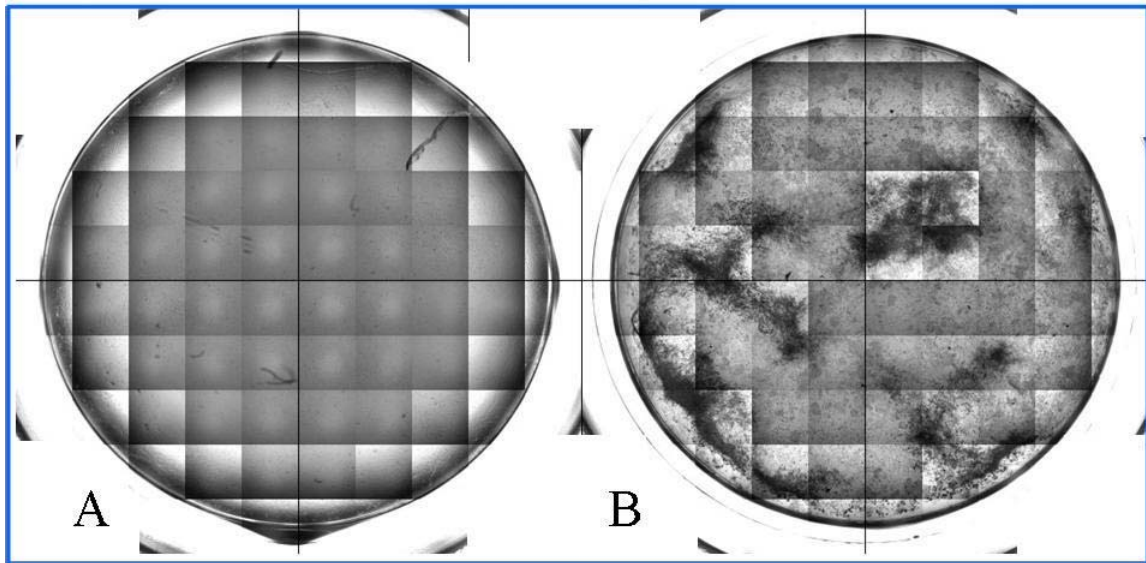




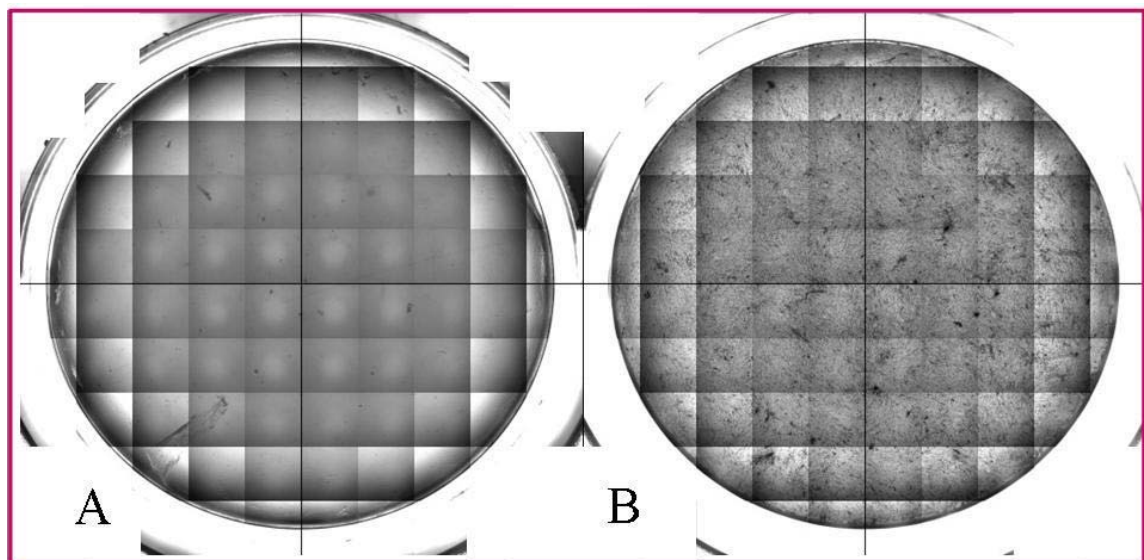
**Abb. 81:** Klon 45\_D5 aus Primärkultur DZB-201p8 A kultiviert in Standardmedium, B kultiviert in osteogenem Differenzierungsmedium. Anschließender Kalziumnachweis mit Alizarinrot.



**Abb. 82:** Klon 45\_E6 aus Primärkultur DZB-201p8 A kultiviert in Standardmedium, B kultiviert in osteogenem Differenzierungsmedium. Anschließender Kalziumnachweis mit Alizarinrot.



**Abb. 83:** Klon 45\_F4 aus Primärkultur DZB-201p8 A kultiviert in Standardmedium, B kultiviert in osteogenem Differenzierungsmedium. Anschließender Kalziumnachweis mit Alizarinrot.



**Abb. 84:** Klon 46\_E8 aus Primärkultur DZB-201p8 A kultiviert in Standardmedium, B kultiviert in osteogenem Differenzierungsmedium. Anschließender Kalziumnachweis mit Alizarinrot.

Die Fotos der Abb. 81 bis Abb. 84 zeigen die Klone jeweils in Kontrollmedium (A) und in osteogenem Differenzierungsmedium (B). Die Klone wiesen in osteogenem Differenzierungsmedium jeweils Kalzifizierungsstrukturen, welche sich deutlich von den Strukturen der anderen Klone unterscheiden. So hatte sich der Zellverband des differenzierten Klons 45\_D5 bereits an den Rändern zusammengezogen und so einen ringförmigen Wulst gebildet (Abb. 81 B). Vorwiegend in diesem Bereich lokaler starker Zellüberlagerungen lagen Kalzifizie-

rungen vor. In Standardmedium zeigten die Zellen gleichmäßiges Wachstum in mehreren Zelllagen (Abb. 81 A). Es war keine Kalzifizierung nachweisbar.

Klon 45\_E6 zeigte im Gegensatz dazu eine relativ gleichmäßige Zellbesiedelung des Wellbodens (Abb. 82 B). Kleine Bereiche waren etwas stärker kalzifiziert, ansonsten lag eine gleichmäßige Kalziueinlagerung vor. In Standardmedium zeigten die Zellen gleichmäßiges Wachstum in mehreren Zelllagen (Abb. 82 A). Es war keine Kalzifizierung nachweisbar.

Klon 45\_F4 hatte in seiner gleichmäßigen Zellbesiedlung wellenförmige Kalziueinlagerungen (Abb. 83 B). Bei der Zellkontrolle fiel im Vergleich zu den Zellkontrollen der anderen Klone ein geringeres Wachstum auf (Abb. 83 A). Es hatte sich dort nur eine einfache unkalzifizierte Lage mit abgerundeten Zellen gebildet.

Klon 46\_E8 wies bei gleichmäßiger Zellbesiedlung wiederum gleichmäßige Kalzifizierung auf (Abb. 84 B). In Standardmedium zeigen die Zellen bei gleichmäßigem Wachstum in mehreren Zelllagen keine Kalzifizierung (Abb. 84 A).

Die einzelnen Zellen derselben Mischpopulation zeigten deutliche Unterschiede bei der Ausbildung von Zellverbänden und in der Intensität und Verteilung von Kalziueinlagerungen.

## 4 Diskussion

### 4.1 Archivierung der Zahngewebe (Datenbank)

Die erstellte Datenbank konnte die Organisation und Erfassung der 464 dentalen Gewebeproben von 135 Patienten und den 1590 möglichen Kryopositionen in den Stickstofftanks erheblich erleichtern (Kap. 2.1).

Datenbanksysteme dienen der elektronischen Datenverwaltung. Ihre wesentliche Aufgabe besteht darin, große Datenmengen effizient, widerspruchsfrei und dauerhaft zu speichern und benötigte Teilmengen in unterschiedlichen, bedarfsgerechten Darstellungsformen für Benutzer und Anwendungsprogramme bereitzustellen (Kemper, Eickler, 2006).

So kommen sie u. a. bei der Suche nach geeigneten Organspendern (Young et al., 1994) oder bei Nabelschnurblutbanken (Gluckman, Rocha, 2004) zum Einsatz. Bei der Datenbank „AREVIR“ beispielsweise, lassen sich über die Eingabe der erfolgten Medikation und dem Krankheitsverlauf von Aidspatienten die vorraussichtlichen Resistenzen des Virus abschätzen. Die weitere Behandlung kann aufgrund dieser Information gezielter mit Kombinationspräparaten fortgesetzt werden, welche auf die einzelnen Patienten abgestimmt sind (Beerenwinkel et al., 2005).

Im Ergebnisteil der Datenbank „DZB Zähne und Zellen“ dieser Arbeit, wurde anhand der vorwiegend genutzten Abfragen der Datenbank ihre Funktion dargestellt. Dabei wurden die drei verschiedenen Formen der Abfragen jeweils mit einem Beispiel erläutert. Die Ergebnisdarstellung der Abfragen erfolgt in Tabellenform (Abb. 19). Sie ermöglichen jeweils einen strukturierten Einblick auf die aktuellen Bestände, aufgelistet nach erfragten bzw. geforderten Parametern. Im letzten Beispiel wurde eine mögliche Auswertung der Daten des Patientenmaterials gezeigt (Abb. 20). Für graphische Auswertungen können die Ergebnislisten in ein Tabellenkalkulationsprogramm wie z.B. Excel exportiert werden und dort in Form von Diagrammen dargestellt werden.

Beim Einfügen, Löschen oder Ändern von Daten in der Datenbank, werden diese Daten nach Integritätsbedingungen geprüft. So wird sichergestellt, dass fehlerfreie und nicht widersprüchliche Daten vorliegen. Die genaue Festlegung der Datenstruktur und Form ermöglicht eine strukturierte Archivierung aller Datensätze. Zudem besteht über die Abfragen die Möglichkeit, die Daten auf verschiedene Parameter zu untersuchen.

Ein nächster Schritt wäre, die generierten Versuchsdaten zur Kalzifizierung, Genexpression oder das Profil der Oberflächenmarker der Zellen in die bereits bestehende Datenbank einzupflegen. Diese Parameter würden in entsprechenden weiteren Tabellen definiert und über Primärschlüssel mit den bereits vorhandenen Tabellen in Verbindung gebracht. Dies würde bei einem ausreichend großen Datensatz schließlich Abschätzungen und Voraussagen über die Kalzifizierungswahrscheinlichkeit bzw. zum Differenzierungsvermögen einzelner Primärzellkulturen erlauben.

Diese Datenbank stellt die Grundlage für die Archivierung von Spenderdaten der dentalen Gewebe. Über die Integration der Kryopositionen bietet sie die Möglichkeit der organisatorischen Nutzung im Laboralltag und bei der Versuchsplanung. Für weiterführende Eingaben von Versuchsergebnissen ist diese Datenbank beliebig skalierbar.

## 4.2 Osteogene Differenzierung dentaler Primärkulturen

Die Fähigkeit bzw. die Potenz der Zellen in verschiedene Zelltypen zu differenzieren, wird *in vitro* unter anderem anhand der osteogenen Differenzierbarkeit nachgewiesen. Entsprechend dem Konzept von Bruder bzw. Jaiswal (Bruder et al., 1997; Jaiswal et al., 1997) wurde die osteogene Differenzierbarkeit von Nabelschnurblut (Goodwin et al., 2001), Knochenmarkzellen (Tuan et al., 2003), Stammzellen aus peripherem Blut (Kuznetsov et al., 2001) und auch Zellen aus Zahngewebe (Gronthos et al., 2000; Aliot-Licht et al., 2005; Zhang et al., 2006) bereits gezeigt.

Wie in den Ergebnissen dieser Arbeit beschrieben (Kap. 3.2.1, Abb. 21 und Abb. 22) konnte bei dentalen Primärzellen aus apikaler Zahnpapille durch osteogenes Differenzierungsmedium eine Kalzifizierung induziert werden. Die als Positivkontrolle parallel kultivierten humanen Knochenmarkzellen hBMSC wiesen ebenfalls Kalzifizierungen auf. Als Negativkontrol-

le wurden in dem Experiment Hautfibroblasten EU2A verwendet. Die Kultivierung in Medium mit Dexamethason hatte bei diesen Zellen nicht zu Kalzifizierungen geführt und bildete somit in diesem Versuch eine geeignete Negativkontrolle. Dentale Zellen, wie auch Knochenmarkzellen tragen im Verlauf ihrer Differenzierung im Organismus zur Bildung von Hartgewebe in Form von Knochen bzw. Dentin bei (Nanci, 2007; Deng et al., 2005). Knochen befinden sich in einem ständigen Umbauprozess und sind imstande, bei Knochenbrüchen zu regenerieren. Odontoblasten reagieren bei Gewebeschaden und Karies mit der Bildung von tertiärer Dentinmatrix (Smith et al., 1995).

In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass die dentalen Zellen bzw. eingesetzte Implantate in Nacktmäusen in der Lage sind, Hartgewebe zu bilden (Degistirici et al., 2008). Es wäre noch zu beachten, dass für Knochenbildung und Knochenerhalt mechanische Belastung des Gewebes ein wichtiger Faktor ist (Hughes-Fulford, 2004; Klein-Nulend et al., 2005; Charras, Horton, 2002). Im Weichgewebe ist zwar die Nährstoffversorgung der implantierten Zellen gewährleistet, jedoch wird das Gewebe an dieser Position nicht mechanisch belastet. Für eine funktionelle Bestätigung der osteogen differenzierten Zellen wären weitere Untersuchungen erforderlich, in denen die Zellen in defekte Knochen eingesetzt werden und sich dort auch unter mechanischer Belastung einfügen. Entsprechende Versuche sind bereits mit differenziertem Knochenmark (Srouji, Livne, 2005; Oshima et al., 2005), Nabelschnurblut (Jager et al., 2007) und auch anhand Stammzellen aus Fett (Peterson et al., 2005) gezeigt worden.

Für eine Kalzifizierung der extrazellulären Matrix *in vitro* ist Dexamethason im Differenzierungsmedium unerlässlich (Rickard et al., 1996). Das ist insofern erstaunlich, als das Glukokorticoide *in vivo* zu einer Verringerung der Knochenmasse führen (Canalis, 1996). Ein mögliches Erklärungsmodell für die Kalzifizierung *in vitro* basiert u.a. auf der Eigenschaft von Dexamethason, die Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase zu steigern. Diese kann in Anwesenheit von  $\beta$ -Glycerolphosphat als Phosphatdonor zu einer Kalzifizierung der extrazellulären Matrix führen (Bellows et al., 1990). Die osteoinduktiven Voraussetzungen überwiegen möglicherweise *in vitro* gegenüber solchen des Knochenabbaus.

Bei dem Vergleich von neun unterschiedlichen dentalen Primärkulturen zeigte sich jedoch, dass nicht alle Kulturen in osteogenem Differenzierungsmedium kalzifizieren konnten (Kap. 3.2.2.1, Abb. 23). Das unterschiedliche Vermögen zu kalzifizieren kann verschiedene Ursachen haben.

Der unterschiedliche Zustand der Zahnkeime bei der operativen Entnahme aus dem Gesamtorganismus könnte hierbei zur Geltung gekommen sein. Die Zellen wurden zwar jeweils aus Zahnkeimen des dritten Molar isoliert, dennoch könnten Unterschiede der Zellen in den Faktoren Aktivität, Proliferation, Differenzierung oder der Konstellation der Wachstumsfaktoren zum Zeitpunkt der Zahnextraktion bestanden haben.

Die komplexen Zusammenhänge der Zahnentwicklung bei Mammalia wurden unter anderem von Thesleff beschrieben (Thesleff, 2003; Tucker, Sharpe, 1999). Die an den Entwicklungsstadien der Mäuse erforschten Faktoren lassen sich zum größten Teil auch auf die humane Zahnentwicklung übertragen.

Für die Zahnentwicklung des Menschen existieren Normwerte (Sato, Ogiwara, 1971; Anderson et al., 1976; Demisch, Wartmann, 1956), dennoch kommt eine hohe Individuum– abhängige Variabilität der Gewebespender hinzu. Bei der schon länger etablierten Knochenmarkspende offenbarten sich Unterschiede aufgrund des unterschiedlichen Alters und Geschlechts der Patienten (Muschler et al., 2001). Auch die in dieser Arbeit verwendeten Zahngewebe wurden gespendet von Patienten unterschiedlichen Alters und Geschlecht. Die Zähne befanden sich in unterschiedlichen Entwicklungsstadien und kamen von unterschiedlichen Zahnpositionen. Die Daten mit den entsprechenden Parametern der dentalen Gewebe, welche in dieser Arbeit verwendetet wurden finden sich in Kap. 2.2.1, Tab. 2.

Isolierte Zellen aus Zahnfollikel von Mäusen hatten sich als heterogene Mischpopulationen dargestellt (Luan et al., 2006). Demgemäß ist bei den isolierten Zellen aus humanen Zahnkeimen ebenfalls eine Mischpopulation zu erwarten. Die Isolierung verschiedener Zellen aus dem Gewebe und der anschließenden Proliferation führt voraussichtlich zu einer unterschiedlichen Zusammensetzung der Primärpopulationen. Bei der Proliferation wird vornehmlich auf proliferierende Zellen selektioniert. Demzufolge können sich bereits beim Anlegen der dentalen Primärkulturen Ungleichheiten ausgebildet haben, wie es auch schon bei der Isolierung von Knochenmarkzellen beschrieben wurde (Jonsson et al., 1999).

Unterschiedliche Bedingungen in den verschiedenen Zellpopulationen zu Beginn der osteogenen Differenzierung könnten ein weiterer Grund für die unterschiedliche Kalzifizierung sein. In den Untersuchungen dieser Arbeit ist es bei Primärkulturen sowohl mit hoher als auch mit sehr niedriger Zelldichte zu Beginn der osteogenen Differenzierung zu Kalzifizierungen gekommen (Abb. 25). Abschließend kann also davon ausgegangen werden, dass in

diesem Experiment die Zelldichte der dentalen Zellen bei Beginn der Differenzierung keine direkte Auswirkung auf das Kalzifizierungsvermögen der Zellen hatte.

Als Nachweis der osteogenen Differenzierung der dentalen Zellen wurden neben dem abschließenden Kalziumnachweis die Genexpression von Bonesialoprotein (*IBSP*), Osteocalcin (*BGLAP*), dem Transkriptionsfaktor *RUNX2* und alkalischer Phosphatase (*ALPL*) während des osteogenen Differenzierungsverlaufes untersucht.

Bei der Expression von Bonesialoprotein und Osteocalcin wurde nach einem zusätzlichen Parameter gesucht, der mit der Kalzifizierung korreliert.

Die Expression von *RUNX2* und alkalischer Phosphatase sollte überdies auch Hinweise liefern, die die Möglichkeit der Voraussagbarkeit einer Mischkultur zur Kalzifizierung bietet.

Das stark glykosilierte und sulfatierte Phosphoprotein Bonesialoprotein spielt eine wichtige Rolle in mineralisierendem Gewebe (Ganss et al., 1999) und ist ein Marker der Osteoblasten-Entwicklung (Aubin et al., 1995; Bianco et al., 1993). In dem Hartgewebe Dentin übernimmt das Dentin Sialoprotein diese Rolle. Entsprechend wird es dort von Odontoblasten sezerniert. Die mRNA von Bonesialoprotein und Dentinsialoprotein ist identisch. Das Vorläuferprotein wird vermutlich durch posttranslatorische Modifikation mittels gewebespezifischer Proteasen zu dem jeweilig gewebespezifischen Protein prozessiert (Butler et al., 2003).

Anhand der Ergebnisse (Kap. 3.2.2.2) wird deutlich, dass Bonesialoprotein von den dentalen Zellen im differenzierten und im undifferenzierten Zustand exprimiert wurde (Abb. 26a-i). Dabei war die Höhe der Expression bei den verschiedenen Primärzellen deutlich unterschiedlich. Neben einer vorwiegend niedrigen Expression, traten bei wenigen Zellen in osteogenem Differenzierungsmedium im Vergleich erhöhte Expressionslevel von Bonesialoprotein auf. Diese erhöhte Expression von Bonesialoprotein war bei den Proben jedoch unabhängig von der Kalzifizierung. Bei Gruppierung der dentalen Zellen in „kalzifizierte“ und „nicht kalzifizierte“ Zellen (Abb. 27) wiesen die beiden Gruppen in osteogenem Differenzierungsmedium im Vergleich zu den Zellen in Kontrollmedium erhöhte Expressionswerte auf.

Der zunächst ansteigende, dann abfallende Expressionsverlauf von Bonesialoprotein bei der Kalzifizierung findet sich in der Literatur wieder. Stein beschreibt die Expression von Bonesialoprotein als frühen Marker der osteogenen Differenzierung (Stein et al., 1996). Bei den



vorliegenden Ergebnissen dieser Arbeit zeigte sich dieser Expressionsverlauf jedoch ebenfalls bei nicht kalzifizierten Zellen und in abgeschwächter Form sogar bei den Zellen in Kontrollmedium. Die osteogene Differenzierung kann also in der Mittelwertsbetrachtung vieler Proben eine erhöhte Expression von Bonesialoprotein zeigen, die dann in der hohen Expression weniger „Ausreißer“ begründet liegen. Für einzelne Primärkulturen ist die Messung der Expression von Bonesialoprotein als molekularbiologischer Marker für die osteogene Differenzierung jedoch nicht geeignet.

Osteocalcin (bone  $\gamma$ -carboxylglutamic acid-containing protein, kurz BGP) wurde 1975 von Hauschka entdeckt (Hauschka et al., 1975) und kommt ebenfalls in mineralisiertem Gewebe vor. Es wird von Osteoblasten sezerniert und ist mit einem Anteil von ca. 1-2% das in höchster Konzentration vorkommende Nichtkollagenprotein des Knochens. Zudem wird es direkt von kalziumregulierenden Hormonen (Calcitonin, Parathormon, Vitamin D) beeinflusst (Yu, Chandrasekhar, 1997; Hauschka, 1986; Young, 2003). Bei dentalen Zellen aus Pulpagewebe konnte die Expression von Osteocalcin nachgewiesen werden (Gronthos et al., 2000; d'Aquino et al., 2007).

Die Ergebnisdarstellung in Kap. 3.2.2.2, Abb. 28 (a-i) zeigt ebenfalls eine Expression von Osteocalcin. Über den Kulturverlauf der einzelnen Primärkulturen zeigten sich jedoch keine großen Schwankungen bei der Expression. Die neun Primärzellkulturen exprimierten über die gesamte Kulturdauer in etwa gleiche Mengen Osteocalcin. Auch bei der Darstellung der Expression den Gruppen „kalzifiziert“ und „nicht kalzifiziert“ zugeordnet konnten keine erhöhten Werte für die differenzierten oder undifferenzierten Zellen über den Kulturverlauf festgestellt werden (Abb. 29).

In der Literatur (Gronthos et al., 1999; Kasai et al., 1994; Malaval et al., 1994) wird Osteocalcin als später Marker der osteoblastären Differenzierungskaskade beschrieben. Dieser wird nur von reifen Osteoblasten und Osteozyten exprimiert. Ein solcher Differenzierungsverlauf war bei dem Versuchsaufbau dieser Arbeit anhand der Osteocalcin Expression nicht erkennbar. Es ist davon auszugehen, dass Osteocalcin in dentalen Primärzellkulturen anders reguliert wird als in Zelllinien bzw. als Osteoblasten oder Odontoblasten *in vivo*. Als molekularbiologischen Kandidat zum Nachweis der osteogenen Differenzierung, der isolierten dentalen Zellen aus apikaler Zahnpapille, ist Osteocalcin bei den Versuchsbedingungen dieser Arbeit nicht geeignet.

Der Transkriptionsfaktor *RUNX2* spielt eine wichtige Rolle in der osteogenen Differenzierung. Unter anderem wird durch diesen die Expression verschiedener weiterer osteoblastärer Marker wie Osteocalcin, Osteopontin und Typ1-Collagen reguliert (Ducy, Karsenty, 1998; Aubin et al., 2002).

Die untersuchten dentalen Primärzellkulturen aus apikalem Zahnfollikel zeigten alle grundsätzlich eine Expression von *RUNX2* (Abb. 30 a-i) und damit eine generelle Potenz für eine osteogene Differenzierbarkeit. Bei geringer Schwankungsbreite der relativen Expression von *RUNX2* zeigten sich keine wirklich auffälligen Expressionsunterschiede zwischen den Zellen in Differenzierungsmedium und den Zellen in Standardmedium bzw. den einzelnen Primärkulturen. Damit ließen sich auch bei der Zusammenfassung in Gruppen über den Kulturverlauf, wenn überhaupt, nur schwache Tendenzen bei den Expressionen erkennen (Abb. 31).

In der Abb. 33 wurde die *RUNX2*-Expression der Kalzifizierung gegenüber gestellt. Zwar weist die Primärzellkultur mit der höchsten Expression von *RUNX2* auch die stärkste Kalzifizierung auf, jedoch lassen sich diese Zusammenhänge bei den anderen Primärkulturen nicht herstellen. Entsprechend fiel das Bestimmtheitsmaß der Ausgleichsgerade nicht ausreichend hoch aus, um die Nullhypothese zu verwerfen. Damit lag keine Korrelation zwischen Kalzifizierungsvermögen und Expression alkalischer Phosphatase vor.

*RUNX2* ist für eine Aussage zur osteogenen Differenzierbarkeit einzelner Primärkulturen, wie auch als Nachweis für die Auswirkung von osteogenem Differenzierungsmedium auf die dentalen Zellen nicht geeignet. *RUNX2* ist zwar ein notwendiger, jedoch nicht alleiniger Faktor. Da alle untersuchten Proben der dentalen Primärzellen *RUNX2* exprimiert haben, müsste die ausbleibende Kalzifizierung demnach durch andere Faktoren begründet sein (Lian, Stein, 2003).

Die alkalische Phosphatase ist ein membranständiges homodimeres Enzym, welches in den verschiedenen Geweben als unterschiedliche Isoform vorkommt (Millan, 2006). Die in den Knochen vorliegende Isoform des Enzyms spielt eine wichtige Rolle bei der Mineralisierung der extrazellulären Matrix (Cheng et al., 1994; Pereira et al., 2002), sowie bei der Mineralisierung der dentalen Zellen (Gronthos et al., 1999).

Die Ergebnisse der durchgeführten Versuche zeigten, dass die Expression von alkalischer Phosphatase generell bei den Kontrollzellen in Standardmedium höher war, als bei den entsprechenden Zellen in Differenzierungsmedium (Abb. 34 a-i).

Die Gruppen „kalzifiziert“ und „nicht kalzifiziert“ (Abb. 35) hatten über den Kultivierungszeitraum jeweils synchrone Expressionsverläufe von alkalischer Phosphatase, mit einem Maximum in der zweiten Hälfte der Kultur. Bei den Zellen der Gruppe „Kontrolle-kalzifiziert“ ist dieser Verlauf am stärksten ausgeprägt. Sie wiesen eine auffällig höhere Expression von alkalischer Phosphatase auf. Bei der Gegenüberstellung von Genexpression und der Kalziumkonzentration (Abb. 37) wiesen Primärzellkulturen mit hoher ALPL Expression in Standardmedium nach osteogener Differenzierung hohe Kalziumkonzentrationen auf. Das legt den Schluss nahe, dass es sich hier um einen Nachweis der Potenz von den jeweiligen Zahnzellpopulationen handelt.

Über die Expression alkalischer Phosphatase und der entsprechenden Kalzifizierung der jeweiligen Primärkulturen ergab sich das Bestimmtheitsmaß der Ausgleichsgerade. Umgerechnet in den Korrelationskoeffizienten konnte anhand Tabelle A 10 der „Statistischen Methoden“ (Sachs, 1980) eine hohe Signifikanz festgestellt werden. Mit einer Restunsicherheit von 0,1 % konnte die Nullhypothese verworfen und die Gegenhypothese angenommen werden: Bei den dentalen Primärzellen liegt eine Korrelation zwischen der Kalzifizierung und der Expression von alkalischer Phosphatase (*ALPL*) vor.

Eine zusätzliche Nachweismöglichkeit der Differenzierung parallel zur Kalzifizierung ist durch die Untersuchung der Expression von alkalischer Phosphatase nicht gegeben. Ein hoher Expressionslevel von alkalischer Phosphatase bei Primärzellkulturen in Kontrollmedium kann jedoch einen Hinweis auf die Differenzierungs- bzw. Kalzifizierungswahrscheinlichkeit bei osteogenem Stimulus geben.

Hohe Aktivität alkalischer Phosphatase wird auch in der Literatur mit einem hohen Potential der Zellen in Zusammenhang gebracht (Berstine et al., 1973; Pittenger et al., 1999; Kuznetsov et al., 2001).

Bei der Untersuchung von mRNA aus der Zellkultur sind die Möglichkeiten Parallelansätze zu kultivieren und zu untersuchen sehr begrenzt. Mehrfachmessungen der Proben wären sicherlich wünschenswert, sind jedoch nicht immer praktikabel, da eine Abhängigkeit besteht,

---

von der für die Untersuchung zur Verfügung stehenden Zellmasse als Probenmenge und der Machbarkeit, vergleichbare Ansätze parallel anzulegen und zu bearbeiten.

Die jeweils dreimalige Messung von 90 Messproben ergab für Bonesialoprotein eine Messschwankung von 1-2% (Kap.3.2.2.2.1). Das zeigt sich nach Berechnung der Expression über die DDCT-Methode (Pfaffl, 2001) mit einem durchschnittlichen Variationskoeffizienten von 0,41. Somit muss von einer mittleren Schwankung von 41% der relativen Expressionswerte ausgegangen werden. Bei den Messungen sollten kleinere Differenzen beim Vergleich von Mittelwerten der Untersuchungsgruppen aus diesem Grund nicht so stark gewichtet werden.

In anderen Arbeitsgruppen (Gronthos et al., 2000; Seo et al., 2004) wurde eine größere Zellmasse für die Untersuchungen geschaffen, indem die Zellproben gepoolt, also vereint wurden. Die rein rechnerisch gebildeten Gruppen (Kap. 3.2.2.1) stellen ebenfalls eine Vereinigung mehrerer Proben dar. Je höher die Stichprobengröße, desto genauere Aussagen kann zu der Genexpression unter bestimmten Bedingungen gemacht werden. Werden jedoch die Zellproben gepoolt, können einige Fragestellungen, vor allem die zu den Expressionsunterschieden verschiedener Zahnkeime, nicht untersucht werden.

Ein definierter Verlauf der osteogenen Differenzierung ließ sich anhand der Expression der vier verschiedenen Marker nicht nachweisen. Eine mögliche Erklärung ist das Vorliegen von Mischpopulationen unterschiedlicher Differenzierungszustände der Zellen. Die Reduktion dieser Prozesse auf einfache Schemata ist leider nicht möglich. Bereits Aubin und Pereira wiesen in ihren Untersuchungen zu Primärkulturen aus Knochenmarkzellen darauf hin (Aubin, 1998; Pereira et al., 2001).

Auch eine Selektion der Primärzellen auf definierte Oberflächenproteine vor der Differenzierung ergibt nicht die gewünschte Homogenität (Gronthos et al., 1999).

In den dentalen Primärzellen wurden die untersuchten vier Gene ohnehin exprimiert. Die unterschiedliche Kalzifizierung der Primärkulturen könnte in der unterschiedlichen Aktivität der Proteine oder der Interaktion mit anderen Faktoren begründet liegen.

Es stellt sich die Frage, inwieweit die Kalzifizierung *in vitro* tatsächlich mit der Osteogenese *in vivo* vereinbar ist (siehe Diskussion zu Subpopulationen und Einzelzellen, Kap. 4.4.).

### 4.3 Neurogene Differenzierung dentaler Primärkulturen

Die neurogene Differenzierbarkeit der untersuchten Primärzellen liefert weitere Informationen über ihre Potenz. Sowohl stromale Knochenmarkzellen (BMSC) von Nagetieren (Woodbury et al., 2000; Kohyama et al., 2001) wie auch solche humanen Ursprungs (Reyes, Verfaillie, 2001; Sanchez-Ramos et al., 2000; Deng et al., 2001) konnten in neurale Zelllinien differenziert werden. Später gelang die neuronale Differenzierung humaner Hautzellen (Joannides et al., 2004) und bei Zellen aus humanem Nabelschnurblut (Park et al., 2006).

Die Umsetzung der neurogenen Differenzierung erfolgte jeweils mit unterschiedlichen Protokollen. So wurde die Differenzierung u.a. mit  $\beta$ -Mercaptoethanol + DMSO induziert (Woodbury et al., 2000), als auch mit IBMX + Dibutyryl cAMP (Deng et al., 2001) oder durch Retinsäure + NGF bzw. + BDNF (Sanchez-Ramos et al., 2001).

Das im Rahmen der Untersuchungen verwendete neurogene Differenzierungsmedium beinhaltete IBMX + Dibutyryl cAMP + Retinsäure + NGF und wurde ursprünglich für die neuronale Differenzierung von Stammzellen aus Nabelschnurblut etabliert (Kogler et al., 2004; Degistirici et al., 2008).

Zunächst wurde im Ergebnisteil Kap. 3.3.1 die Morphologie und das Proliferationsverhalten der dentalen Zellen in neurogenem Differenzierungsmedium beschrieben. Bei den drei getesteten dentalen Primärzellkulturen zeigten sich morphologische Veränderungen in neurogenem Differenzierungsmedium. Die Zellkörper waren klein und zusammengezogen mit wenigen feinen Ausläufern. Neben der neuronartigen Zellmorphologie war auch ein starkes Zellsterben zu beobachten. Im Kontrollmedium waren die Zellen stark proliferiert. Diese Verhältnismäßigkeiten waren anhand der mikroskopischen Fotos vom Kultivierungsstart und Kultivierungsende gut erkennbar (Abb. 38, Abb. 39). Das gegensätzliche Proliferationsverhalten wurde durch die durchgeführte Quantifizierung besonders deutlich (Abb. 40, Abb. 58).

Eine Komponente in dem verwendeten neurogenen Differenzierungsmedium war Retinsäure. Retinsäuren (Vitamin-A-Säure) üben durch entsprechende Rezeptoren Einfluss auf Wachstum und die Zelldifferenzierung aus (Chambon, 1996). Diese Mechanismen spielen bei der Embryogenese und der Tumorentstehung eine wichtige Rolle. Die Retinsäure wurde auch für

die neuronale Differenzierung in der Zellkultur entdeckt (Jones-Villeneuve et al., 1982; Rohwedel et al., 1999). So wurde bei embryonalen Mausstammzellen die unterstützende Wirkung von Retinsäure zur Expression neuronaler Gene postuliert (Bain et al., 1995). Zudem wurde die gleichzeitig hemmende Wirkung auf die mesodermale Genexpression nachgewiesen (Bain et al., 1996). Über den Retinsäure Rezeptor wird bei verschiedenen Zelltypen die Transkription von p21 aktiviert (Liu et al., 1996). Es handelt sich bei p21 um einen universellen Inhibitor von Cyclin-CDK-Komplexen. Die Fortsetzung des Zellzyklus wird unterbrochen und die Zelle bleibt in der G1-Phase (Knippers, 1999). Zudem wurde eine Retinsäure induzierte Apoptose nachgewiesen, welche Retinsäure-Rezeptor unabhängig über den MEK/ERK/1/2-Weg zur Caspase-3 Aktivierung führt (Zanotto-Filho et al., 2008).

Parallel zu den neurogenen Differenzierungsmedien wurden bei der Versuchsdurchführung Medienbestandteile getestet. So zeigte sich eine günstigere Lebens- und Proliferationsgrundlage der Primärzellen in neurogenem Differenzierungsmedium ohne die Mediumkomponente IBMX (Abb. 42). Bei Zugabe von Dexamethason in das Kulturmedium konnte der Effekt des Zellrückgangs über den Kulturverlauf deutlich gemindert werden (Abb. 53).

IBMX (3-Isobutyl-1-Methylxanthin) ist ein Inhibitor der Phosphodiesterase (Ashcroft et al., 1972) und führt in Kombination mit Dibutyryl cAMP zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration (Deng et al., 2001). Die morphologische Veränderung der Zellen in neurogenem Differenzierungsmedium kann auch das Resultat der Toxizität von IBMX in Kombination mit Dibutyryl cAMP sein (Zwart et al., 2008).

Dexamethason ist ein synthetisches Glucocorticoid, welches durch die Zellmembranen diffundiert und seine biologische Wirkung hauptsächlich durch die Bindung an intrazelluläre Glucocorticoidrezeptoren entfaltet (Distelhorst, 1989). Glucocorticoidrezeptoren wurden erstmalig 1968 in den Thymuszellen von Ratten beschrieben (Munck, Brinck-Johnsen, 1968). Intrazelluläre Steroidhormonrezeptoren, zu denen der Glucocorticoid-, Östrogen-, Progesteron-, Androgen-, Mineralkortikoid-, Vitamin-D3 und Ecdysonrezeptor zählen, gehören in die Multigen-Familie der Kern-Rezeptoren, zu denen auch der Thyroidhormon- und der Retinsäurerezeptor zählen (Hollenberg et al., 1985; Evans, 1988). Die Zugabe von Dexamethason ins Medium verhindert die Apoptose (Song et al., 2008). Die genaue Wirkung von Dexamethason konnte noch nicht geklärt werden. Bei der Darlegung der verschiedenen Effekte von Dexamethason sollten auch die multiplen Faktoren in den mitochondrialen und

den Rezeptor-Apoptose Signaltransduktionswegen in Betracht gezogen werden (Dlamini et al., 2004).

Versuchsergebnisse mit verbesserter Überlebensrate der Zellen zeigten sich bei der Durchführung eines „Neurogenen Shifts“. Bei dieser Kultur wurde nach 5 Tagen neurogenem Differenzierungsmedium das Agens Retinsäure ausgelassen (Abb. 54). Bei einem Shift von 4 Tagen (Abb. 57) und der anschließenden Kultivierung ohne Retinsäure und ohne IBMX blieb die Zellzahl stabil (Abb. 55). Diese Beobachtung wurde auch in der Literatur beschrieben. Widera hatte einen viertägigen „Neuro Shift“ bereits mit dentalen Zellen aus dem Parodontalen Ligament (PDL) durchgeführt, welche mit einer minimal invasiven Methode isoliert wurden (Widera et al., 2007). Das Protokoll zur neurogenen Differenzierung war an die Veröffentlichung von Bibel angelehnt (Bibel et al., 2004).

Neben den Untersuchungen zur Morphologie und dem Proliferationsverhalten der dentalen Primärzellen in neurogenem Differenzierungsmedium wurden auch Genexpressionsuntersuchungen durchgeführt (Kap. 3.3.2). Die Effekte des neurogenen Differenzierungsmediums und der verschiedenen Mediumkomponenten auf die Zellen, wurde anhand der Genexpression der Neuromarker *NEFH* (Neurofilament heavy), *NEFL* (Neurofilament light), *MBP* (Myelin basic protein) und *TUBB3* ( $\beta$ 3-Tubulin) gezeigt.

Von den drei beschriebenen Neurofilamenten hat *NEFH* das höchste Molekulargewicht. Dieses stark phosphorylierte Intermediärfilament kommt in den Axonen der Neurone vor (Fliegner, Liem, 1991). Das Neurofilament mit dem geringsten Molekulargewicht wird entsprechend *NEFL* (Neurofilament light) genannt. Die Funktion von Neurofilamenten wurde von Perrot zusammengefasst und die mögliche Beteiligung bei neurodegenerativen Erkrankungen dargestellt (Perrot et al., 2008).

Myelin basic protein *MBP* stellt einen großen Proteinanteil der Myelinmembran im Zentralen Nervensystem dar. Es gibt verschiedene Isotypen und posttranslationale Modifikationen des Proteins, welche Auswirkungen auf das Bindungsverhalten und Interaktionen von *MBP* besitzen (Roth et al., 1987; Boggs, 2006). Offensichtlich kommt es bei der Ausdifferenzierung der Ameloblasten und der Odontoblasten *in vivo* für einen kurzen Zeitraum, zumindest bei Ratten zur Expression von *MBP* (Kim et al., 2008).

Ergebnisse zu den Untersuchungen der Neuromarker *NEFH* (Neurofilament heavy), *NEFL* (Neurofilament light), *MBP* (Myelin basic protein) und *TUBB3* ( $\beta$ 3 Tubulin) zeigten jeweils erhöhte Expressionen für die neurogenen Differenzierungsmedien. Osteogene Differenzierungsmedien und die Kontrolle wiesen jeweils niedrigere Expressionen auf (siehe Abb. 59 bis Abb. 64).

Bei dem Osteomarker *IBSP* zeigte sich ein inverser Expressionsstatus für die Gruppe „Osteo Diff“ im Vergleich zu den Neuromarkern. Die Expression von *IBSP* der neurogen differenzierten Proben lagen alle unterhalb der Expression von der Gruppe „Osteo Diff“ (Abb. 65).

Die Expression von *BGLAP* zeigte bei den untersuchten Zellpopulationen keine große Schwankungsbreite durch hohe Expressionsunterschiede. Die Expressionsunterschiede waren aus diesem Grund nicht so gewichtig wie bei *IBSP* (Abb. 66).

Die Expression von *ALPL* zeigte von allen bislang untersuchten Markern die mit Abstand größte Spannbreite (Abb. 67). In Differenzierungsmedium wiesen die Zellen eine reduzierte Expression von *ALPL* auf. Das zeigte sich bei der Expression der Zellen in osteogenem Differenzierungsmedium und noch deutlicher bei den Zellen, die in Medium mit Komponenten der neurogenen Differenzierung kultiviert wurden.

Für die Untersuchung unterschiedlicher Kultivierungsmedien, bei zum Teil sehr niedriger Zelldichte, waren viele Parallelansätze erforderlich. Eine gleiche Zelldichte ließ sich in den Parallelansätzen nur schwer herstellen. Die Zellen verhielten sich bereits bei Kultivierungsstart in den verschiedenen Medien unterschiedlich. Dafür gab es verschiedene Ursachen: die Umstellung und die Wirkung des Mediums auf die Vitalität, die Proliferation und das Vermögen der Zellen zu adhären. So lagen bereits bei der ersten Zählung am Tag nach dem Versuchsstart leicht unterschiedliche Zellzahlen vor. Abgesehen von der unterschiedlichen Zelldichte zu Beginn der Zählungen waren die unterschiedlichen Tendenzen beim Proliferationsverhalten der Zellen in den verschiedenen Medien eindeutig.

Die Auszählung des definierten Zählausschnitts stellte sich als ein geeignetes Hilfsmittel dar, mit dem die Zellzahlen und damit das Proliferationsverhalten veranschaulicht werden konnten. Jedoch musste bei den Proliferationsverläufen berücksichtigt werden, dass nicht immer eine absolute Gleichverteilung der Zellen bestand und die dentalen Zellen migrierten. Somit konnte es zu leichten Schwankungen bzw. Ungenauigkeiten bei den Zellzahlen kommen. Je höher die Zellzahl in dem Zählrahmen, desto schwieriger erkennbar waren die einzelnen Zel-



len. Da allerdings jeweils der gleiche Ausschnitt untersucht wurde, konnten starke Abweichungen oder Schwankungen direkt lokalisiert und berücksichtigt werden.

Das Protokoll für die neurogene Differenzierung wurde ursprünglich für Nabelschnurblutzellen konzipiert (Kogler et al., 2004; Degistirici et al., 2008). Eine Optimierung dieses Differenzierungsmediums auf die dentalen Zellen könnte hilfreich sein.

In Protokollen aus anderen Veröffentlichungen (Bain et al., 1996; Sanchez-Ramos et al., 2000) wurden zur neurogenen Differenzierung zumeist Konzentrationen von 5  $\mu\text{M}$  RA eingesetzt. In dem Protokoll für Nabelschnurblut wurde eine auffällig hohe RA-Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  eingesetzt. In welcher Konzentration und für welchen Zeitraum RA bei den dentalen Zellen den optimalen Effekt hat, müsste noch weitergehend untersucht werden. Dazu wären Untersuchungen über den Kulturverlauf aussagekräftig. Für derartige Nachforschungen wäre jedoch die Q-PCR nicht die geeignete Methode, da zu wenig Zellmasse vorliegt.

Zum Nachweis der Differenzierung sollten möglichst weitere Methoden zum Einsatz kommen, beispielsweise der Nachweis charakteristischer Proteine mittels Antikörper. Diese Färbungen wären noch aussagekräftiger, wenn gleichzeitig Positiv- und Negativkontrollen dieser entsprechenden Proteine mitgefärbt werden könnten. Vorteilhaft wäre eine jeweils den Antikörpern entsprechende Zelllinie die diese Proteine entweder auf jeden oder auf keinen Fall exprimiert und damit als geeignete positiv- oder negativ-Kontrolle vorliegt.

#### **4.4 Subpopulationen und Einzelzellen dentaler Primärkulturen**

Isolierte Zellen aus dem Zahngewebe stellten sich *in vitro* als Mischpopulation dar. Diese Gegebenheit wurde bereits bei der Isolierung von Primärzellen aus anderen Geweben mehrfach beobachtet (Gronthos et al., 1999; Luan et al., 2006).

Informationen über die Zusammensetzung der Mischpopulation wären zugleich auch Hinweise über die Eigenschaften der gesamten Zellpopulation. Aus diesem Motiv heraus wurden durch Selektion und Charakterisierung der Subpopulationen zwei verschiedene dentale Primärzellkulturen hinsichtlich ihrer Zusammensetzung untersucht.

Erste durchflusszytometrische Untersuchungen der Primärkulturen mit dem FACS-Gerät stellten die Mischpopulationen anhand von Granularität und Größe der Zellen als Dotplot dar (Abb. 68). Bei dieser Darstellungsform fielen zwei Bereiche definierter Granularität und Größe auf, in denen vermehrt Zellen detektiert wurden. Diese Bereiche wurden definiert als Population P1 und Population P2. Die Zellen aus den beiden Populationen wurden mit dem FACS-Gerät sortiert und kultiviert. Nach ersten Analysen zeigte sich, dass bei beiden Primärkulturen die Zellen aus der Population P1 das Vermögen aufwiesen zu proliferieren (Abb. 69, Abb. 72). Die Zellen aus der Population P2 waren nur bei einer der beiden Primärzellkulturen gewachsen (Abb. 70, Abb. 73). Eine weitergehende Charakterisierung der beiden Populationen wurde über FACS-Messungen anhand von 31 Oberflächenproteinen erstellt (Tab. 6, Tab. 7). Von diesen Oberflächenproteinen waren für die Subpopulationen P1 und P2 bei beiden Primärzellkulturen der verschiedenen Passagen viele jeweils gleich hoch bzw. niedrig exprimiert. Auffällige Abweichungen zeigten sich bei CD105, CD166, CD49d. Sie waren in der Population P1 bei beiden Primärzellpopulationen jeweils höher exprimiert als bei der Population P2.

CD105 steht für Endoglin, einem transmembranen Glycoprotein, welches am häufigsten bei Endothelzellen exprimiert wird (Gougos, Letarte, 1990). Endoglin wird jedoch zudem bei der Entstehung von Tumoren stärker exprimiert (Burrows et al., 1995) und dient als Marker bei der Identifizierung von Stammzellen (Chen et al., 2002).

CD49d gehört zur Integrin-Familie und bildet assoziiert mit CD29 das VLA-4 (engl. Very Late Antigens), einen Rezeptor, der Fibronectin und VCAM-1 (engl. Vascular cell adhesion molecule) bindet und auf der Oberfläche vieler Zelltypen exprimiert wird (Hemler, 1990).

CD166 oder ALCAM (engl. activated leucocyte cell adhesion molecule) gehört zur Immunoglobulin Superfamilie und interagiert mit CD6, einem Rezeptor der SRCR Familie (engl. Scavenger Receptor Cystein-Rich), welche gekennzeichnet ist durch Proteinsubdomänen, die sequenzspezifisch positionierte Cysteinreste enthalten (Bowen et al., 2000; Aruffo et al., 1997).

Die unterschiedliche Expression der Oberflächenproteine CD105, CD166, CD49d weist auf andersartige Zellen jeweils in der Population P1 bzw. Population P2 hin. Diese Unterschiede in der jeweiligen Zusammensetzung der Populationen in P1 und P2 der dentalen Zellen konnten durch die FACS-Untersuchungen festgestellt werden. Da diese Unterschiede jedoch glei-

chermaßen bei beiden Primärkulturen auftraten, lieferte diese Untersuchung keinen Hinweis darauf, warum die Zellen bei DZB-201 aus P2 proliferiert sind und die Zellen bei DZB-202 aus P2 nicht proliferiert sind.

In einem nächsten Schritt wurden die beiden Mischkulturen vereinzelt und beobachtet, ob einzelne Zellen in Kultur überleben und sich vermehren können. Dazu wurden einige Methoden ausgetestet. Die Vereinzelnung weniger Zellen in einer großen Petrischale erwies sich bei den dentalen Zellen als ungeeignet, da die Zellen zum Teil stark migriert sind. Bei der daraus resultierenden Gleichverteilung war die Zugehörigkeit einzelner Zellen zu den Klonen nicht mehr feststellbar. Zweckmäßiger erwiesen sich für die Vereinzelnung der Zellen die Limiting-Dilution-Methode und die Einzelzellablage des FACS-Gerätes (s. Kap. 2.5.2).

Bei beiden Verfahren gab es Zellen, die sowohl nach der Vereinzelnung adhärirt und überlebt haben, als auch Zellen die sich vermehrt haben (siehe Kap. 3.4.3, Tab. 8). In den Primärkulturen befanden sich also nachweislich Zellen, die sowohl als Einzelzelle ohne das Umfeld anderer Zellen überleben als auch in der Lage sind zu proliferieren und Klone auszubilden.

Die Ergebnisse der Proliferationsuntersuchung zeigten jeweils unterschiedliche prozentuale Anteile der vereinzeln Zellen für DZB-201 und DZB-202, die das Vermögen hatten sich zu teilen (Abb. 76, Abb. 77). Dabei traten variierende Teilungsgeschwindigkeiten der proliferierenden Zellen beider Primärkulturen auf. Die jeweils höchste spezifische Wachstumsrate bei beiden Primärzellkulturen war dennoch vergleichbar.

Ein weiterer Ansatz war die Kultivierung von markierten Einzelzellen. So wurden CD13-markierte Einzelzellen in die Wells sortiert und kultiviert. CD13 steht für das Oberflächenprotein Aminopeptidase N, einer membranassoziierten Metalloprotease. CD13 ist einer der Marker, der in Kombination mit anderen Markern mit pluripotenten Zellen oftmals in Verbindung gebracht wird (Jiang et al., 2002; Kirshenbaum et al., 1999; Young et al., 1999).

Leider proliferierten die Einzelzellen nicht ausreichend für nachfolgende Untersuchungen (Abb. 78). Zudem traten neben Einzelzellen viele Wells auf, in denen mehrere Zellen sortiert wurden (Abb. 79). Möglicherweise handelte es sich dabei um durch CD13 verursachte Aggregationen der Zellen (Mina-Osorio et al., 2006), die das Sortieren von Einzelzellen erheblich behinderten.

Für die Durchführung weitergehender Untersuchungen an Zellklonen waren jeweils größere Zellmengen erforderlich. So konnten die aus den Einzelzellen resultierenden Klone mit einer spezifischen Wachstumsrate  $\mu > 0,23 \text{ d}^{-1}$  weiter proliferiert und zum Teil differenziert werden.

Der Klon 64\_B4 (64\_16) der Primärzellen DZB-202 konnte nach einer Proliferationsphase von 93 Tagen in einer FACS-Messung den jüngeren Zellen einer früheren Passage DZB-202 p4 (Mischkultur) gegenübergestellt werden. Von den 27 untersuchten Oberflächenproteinen zeigten sich bei CD105 und CD54 auffällige Abweichungen (Tab. 9). Die Expression von CD105 war im Vergleich zur Mischpopulation der Primärzellen DZB-202p4 bei dem Klon 64\_B4 auf weniger als die Hälfte reduziert und von CD54 bei dem Klon etwa vierfach erhöht.

CD105 oder Endoglin war bereits bei der Charakterisierung der beiden Populationen P1 und P2 aufgefallen. Dieses transmembrane Glycoprotein wird bei der Entstehung und Vaskularisierung von Tumoren stark exprimiert (Burrows et al., 1995) und dient als Marker bei der Identifizierung von Stammzellen (Chen et al., 2002). Bei dem Klon war die Expression von Endoglin niedriger als in der Mischpopulation. Entweder lag die niedrige Expression in der Expression der Einzelzelle aus welcher die Klonzellen entstanden waren begründet oder über den langen Kulturverlauf des Klones hatte sich eine niedrigere Expression von Endoglin eingestellt. Letztlich befanden sich jedenfalls anteilig mehr Zellen in der Mischpopulation, die Endoglin exprimierten und ein stärkeres Wachstum bzw. eine Vaskularisierung angezeigt haben.

CD54 ist eine andere Bezeichnung für ICAM-1 (engl. Intercellular Cell Adhesion Molecule), ein integrales Membran-Glycoprotein aus der Immunglobulin Superfamilie (Springer, 1990), welches ebenfalls vornehmlich auf Endothelzellen exprimiert wird. ICAMs interagieren mit Integrinen (Yamada, Miyamoto, 1995) und vermitteln und unterstützen auf diese Weise u.a. die Migration von Leucocyten zu inflammatorischen Bereichen (Lehmann et al., 2003). Die FACS-Untersuchung zeigte eine dreifache höhere Expression von ICAM-1 bei den Zellen des Klones. Eine mögliche Begründung dafür könnte die Eigenheit des Klones sein, die daher resultiert, dass bereits die vereinzelte Ursprungszelle des Klones eine erhöhte Expression von ICAM-1 aufgewiesen hat.

Ob sich die unterschiedliche Expression von Genen im Vergleich zur Mischpopulation auf die Eigenheit der jeweiligen Klone zurückführen lässt oder eher eine Veränderung der Expression über den langen Kulturverlauf war, ließe sich am besten bei direkten Vergleichen von Klonen herausfinden. Aufgrund der unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeit wird eine ausreichende Zellmasse für FACS-Untersuchungen nicht gleichzeitig erreicht. Die Möglichkeit der parallelen Untersuchungen gestaltet sich zudem als schwierig, da sich die Zellen nicht mehr kryokonservieren ließen. Langzeitkulturen von DZB-201 und DZB-202 haben gezeigt, dass kryokonservierte Primärzellen (Mischpopulationen) der Passage 4, also einem Alter von etwa 2 Monaten, sich noch etwa 3,5 Monate kultivieren lassen. Dieses Alter hatten die Klone im Rahmen des Experiments definitiv erreicht.

Für die Durchführung einer osteogenen Differenzierung war weniger Zellmasse erforderlich als für eine FACS-Untersuchung. Bei der Vereinzelung der Primärkultur DZB-201p8 (Abb. 76) waren vier Klone ausreichend proliferiert um diesen Vergleich durchzuführen. Der Zeitraum von der Vereinzelung der Zellen über die Differenzierung bis zur abschließenden Alizarinrot-Färbung betrug hier 69 Tage.

Alle vier osteogen differenzierten Klone der Primärkultur DZB-201p8 hatten die Potenz zu kalzifizieren (Abb. 80). Dabei wiesen die vier Klone jeweils unterschiedliche Kalzifizierungsmuster auf (Abb. 81 bis Abb. 84). Die parallel differenzierten Wells mit Zellen desselben Klones besaßen gleiche Strukturen.

Diese Kalzifizierungsmuster könnten auf unterschiedliches Proliferationsverhalten der Klone zurückzuführen sein. Während bei einigen Kulturen beispielsweise gleichmäßig starke Proliferation im Well stattfanden (Abb. 81), waren es bei anderen Kulturen bestimmte Regionen, in denen noch eine stärkere Teilungsaktivität vorlag (Abb. 83). Es könnte auch die Möglichkeit bestehen, dass die verschiedenen Klone unterschiedliche extrazelluläre Matrix produziert haben.

Aus diesem Versuch konnte man darauf schließen, dass alle stark proliferierenden Zellen die Potenz zu kalzifizieren hatten und dennoch Unterschiede in Wachstum und Form der Kalzifizierung aufwiesen.

Neben der physiologischen Kalzifizierung des Knochenauf- und -umbaus, werden auch degenerative Kalzinosen in der Literatur beschrieben. Verletzte und apoptotische Zellen weisen

---

anormale Kalzium- und Phosphatverhältnisse auf. Diese nekrotischen und apoptotischen Zellen bilden Zellvesikel und Matrixvesikel, in denen die Konzentrationen von Kalzium und Phosphat ebenfalls erhöht sind und die offensichtlich die Kalzifizierung initiieren (Kim, 1995). Diese Vesikel fand man auch bei Gefäßverkalkungen. Auch hier wurden sie mit Apoptose in Verbindung gebracht und daher als Apoptosekörperchen betitelt (Proudfoot et al., 2000). Der Aufbau dieser Vesikel ist vergleichbar zu Vesikeln beim Knochenaufbau (Anderson, 1995).

So wäre es auch möglich, dass die Kalzifizierung der Zellen nach osteogenem Stimulus *in vitro* eher eine Form der Entsorgung ausgedienter Zellen darstellte.

Bis bei diesen Versuchen durch Zellteilung eine ausreichende Zellmasse für weitere Untersuchungen zur Verfügung stand, waren die Zellen sehr gealtert und zudem sehr wahrscheinlich ausdifferenziert (Sherley, 2002). Der Nachweis einer hohen Differenzierungspotenz der Zellen an dieser Stelle ist somit fragwürdig.

Die Prozesse „organisierter Knochenaufbau“ und „degenerierender Zellverband“ lassen sich nicht immer klar abgrenzen. Noch schwieriger dürfte diese Unterscheidung *in vitro* sein. Bezüglich eines Gesamtorganismus bestehen in den Zellkulturen sehr reduzierte Bedingungen, zu denen unter anderem auch die fehlende effektive Phagozytose zählt.

Ein Lösungsansatz für die Etablierung der unterschiedlichen Untersuchungsmethoden und als geeignete Referenz ist die Generierung immortalisierter Zelllinien aus dentalen Zellen. Wenn zusätzlich auch GFP in die Zellen eingebracht wird, könnte neben der ausführbaren Qualitätskontrolle auch die Erkennbarkeit der einzelnen Zellen erheblich verbessert werden und einige Arbeitsschritte automatisiert werden. Zum Beispiel wäre dann durch Mustererkennung eine automatisierte Zellzählung bei der Mikroskopie möglich.

## 4.5 Schlussbetrachtung

Aus dentalen Geweben menschlicher Weisheitszahnkeime ließen sich Primärzellkulturen herstellen. Diese besaßen die Fähigkeit, auf osteogene und neurogene Stimuli mit jeweils veränderter Genexpression, Morphologie bzw. Kalzifizierung zu reagieren. Der Vergleich der verschiedenen Primärzellkulturen in Hinblick auf die jeweilige Differenzierungspotenz zeigte eine hohe Variabilität. Untersuchungen mit einem größeren Stichprobenumfang wären daher hilfreich, um die Ergebnisse dieser Arbeit und Hinweise auf Korrelationen zwischen Genexpression und Kalzifizierung weiter zu verifizieren. Die Untersuchung weiterer Markergene für neuronale oder osteogene Differenzierung in Kombination mit zusätzlichen Untersuchungsmethoden wie der Lokalisierung der Proteine durch Cytoimmunofluoreszenz o.Ä. wären sinnvolle ergänzende Ansätze zur Charakterisierung der dentalen Primärkulturen.

In der erstellten Datenbank wurden bislang die Spenderdaten der dentalen Gewebe archiviert und ermöglichen in dieser Form strukturierte Abfragen der Daten. Durch die Erweiterung der Datenbank mit den Einträgen der Versuchsergebnisse würde ferner die Möglichkeit entstehen, große Datenmengen auf verschiedene Parameter bzw. nach weiteren Korrelationen zu untersuchen.

Auch an einigen Klonen ließ sich ein osteogenes Differenzierungspotential nachweisen. Die für Untersuchungen der Differenzierungspotenz erforderlichen Zellmassen waren bei klonaler Expansion über lange Proliferationsphasen möglich. Diese Langzeitkulturen bringen ein kontinuierliches Altern und Ausdifferenzieren der Zellen mit sich. Weitere Informationen zu Differenzierungsleistungen von Einzelzellen der dentalen Mischpopulationen wären durch die Generierung immortalisierter Zelllinien erreichbar. Diese könnten als stabile Bezugsgrößen eingesetzt werden und begünstigen zudem die Etablierung neuer Untersuchungsmethoden.

Die extrahierten Weisheitszahnkeime erwiesen sich als geeignetes Gewebematerial zur Darstellung der Differenzierungspotenz *in vitro*. Zudem erlaubten die dentalen Primärkulturen grundlegende Untersuchungen zu dem Proliferations- und Differenzierungsvermögen abgeleiteter klonaler Kulturen. In weiterführenden Versuchen wäre die Differenzierungspotenz einzelner Zellen und klonaler Kulturen bezüglich weiterer Differenzierungsrichtungen zu untersuchen.

## 5 Literaturverzeichnis

- Aliot-Licht, B.; Bluteau, G.; Magne, D.; Lopez-Cazaux, S.; Lieubeau, B.; Daculsi, G.; Guicheux, J.** Dexamethasone stimulates differentiation of odontoblast-like cells in human dental pulp cultures.  
*Cell Tissue Res.* (2005) 321:391-400
- Anderson, D. L.; Thompson, G. W.; Popovich, F.** Age of attainment of mineralization stages of the permanent dentition.  
*J.Forensic Sci.* (1976) 21:191-200
- Anderson, H. C.** Molecular biology of matrix vesicles.  
*Clin.Orthop.Relat Res.* (1995)266-280
- Aruffo, A.; Bowen, M. A.; Patel, D. D.; Haynes, B. F.; Starling, G. C.; Gebe, J. A.; Bajorath, J.** CD6-ligand interactions: a paradigm for SRCR domain function?  
*Immunol.Today.* (1997) 18:498-504
- Ashcroft, S. J.; Randle, P. J.; Taljedal, I.** Cyclic nucleotide phosphodiesterase activity in normal mouse pancreatic islets.  
*FEBS Lett.* (1972) 20:263-266
- Aubin, J. E.** Bone stem cells.  
*J.Cell Biochem.Suppl.* (1998) 30-31:73-82
- Aubin, J. E.; Liu, F.; Candelieri, G. A.** Single-cell PCR methods for studying stem cells and progenitors.  
*Methods Mol.Biol.* (2002) 185:403-415
- Aubin, J. E.; Liu, F.; Malaval, L.; Gupta, A. K.** Osteoblast and chondroblast differentiation.  
*Bone.* (1995) 17:77S-83S
- Avery, J. K.** Oral Development and Histology.  
3 ed. Stuttgart, Georg Thieme Verlag, (2002)
- Bain, G.; Kitchens, D.; Yao, M.; Huettner, J. E.; Gottlieb, D. I.** Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro.  
*Dev.Biol.* (1995) 168:342-357



- Bain, G.; Ray, W. J.; Yao, M.; Gottlieb, D. I.** Retinoic acid promotes neural and represses mesodermal gene expression in mouse embryonic stem cells in culture.  
*Biochem.Biophys.Res.Commun.* (1996) 223:691-694
- Beerenwinkel, N.; Sing, T.; Lengauer, T.; Rahnenfuhrer, J.; Roomp, K.; Savenkov, I.; Fischer, R.; Hoffmann, D.; Selbig, J.; Korn, K.; Walter, H.; Berg, T.; Braun, P.; Fatkenheuer, G.; Oette, M.; Rockstroh, J.; Kupfer, B.; Kaiser, R.; Daumer, M.** Computational methods for the design of effective therapies against drug resistant HIV strains.  
*Bioinformatics.* (2005) 21:3943-3950
- Bellows, C. G.; Heersche, J. N.; Aubin, J. E.** Determination of the capacity for proliferation and differentiation of osteoprogenitor cells in the presence and absence of dexamethasone.  
*Dev.Biol.* (1990) 140:132-138
- Berstine, E. G.; Hooper, M. L.; Grandchamp, S.; Ephrussi, B.** Alkaline phosphatase activity in mouse teratoma.  
*Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* (1973) 70:3899-3903
- Bianco, P.; Riminucci, M.; Bonucci, E.; Termine, J. D.; Robey, P. G.** Bone sialoprotein (BSP) secretion and osteoblast differentiation: relationship to bromodeoxyuridine incorporation, alkaline phosphatase, and matrix deposition.  
*J.Histochem.Cytochem.* (1993) 41:183-191
- Bibel, M.; Richter, J.; Schrenk, K.; Tucker, K. L.; Staiger, V.; Korte, M.; Goetz, M.; Barde, Y. A.** Differentiation of mouse embryonic stem cells into a defined neuronal lineage.  
*Nat.Neurosci.* (2004) 7:1003-1009
- Boggs, J. M.** Myelin basic protein: a multifunctional protein.  
*Cell Mol.Life Sci.* (2006) 63:1945-1961
- Boiadjieva, S.; Hallberg, C.; Hogstrom, M.; Busch, C.** Methods in laboratory investigation. Exclusion of trypan blue from microcarriers by endothelial cells: an in vitro barrier function test.  
*Lab Invest.* (1984) 50:239-246
- Bowen, M. A.; Aruffo, A. A.; Bajorath, J.** Cell surface receptors and their ligands: in vitro analysis of CD6-CD166 interactions.  
*Proteins.* (2000) 40:420-428
- Boyer, B.; Valles, A. M.; Edme, N.** Induction and regulation of epithelial-mesenchymal transitions.  
*Biochem.Pharmacol.* (2000) 60:1091-1099

- Brinkmann, M.; Lutkemeyer, D.; Gudermann, F.; Lehmann, J.** New technologies for automated cell counting based on optical image analysis ;The Cellscreen'.  
*Cytotechnology.* (2002) 38:119-127
- Bronner-Fraser, M.; Sieber-Blum, M.; Cohen, A. M.** Clonal analysis of the avian neural crest: migration and maturation of mixed neural crest clones injected into host chicken embryos.  
*J.Comp Neurol.* (1980) 193:423-434
- Bronner-Fraser, M.; Stern, C.** Effects of mesodermal tissues on avian neural crest cell migration.  
*Dev.Biol.* (1991) 143:213-217
- Bruder, S. P.; Jaiswal, N.; Haynesworth, S. E.** Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation.  
*J.Cell Biochem.* (1997) 64:278-294
- Burrows, F. J.; Derbyshire, E. J.; Tazzari, P. L.; Amlot, P.; Gazdar, A. F.; King, S. W.; Letarte, M.; Vitetta, E. S.; Thorpe, P. E.** Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: implications for diagnosis and therapy.  
*Clin.Cancer Res.* (1995) 1:1623-1634
- Butler, W. T.; Brunn, J. C.; Qin, C.** Dentin extracellular matrix (ECM) proteins: comparison to bone ECM and contribution to dynamics of dentinogenesis.  
*Connect.Tissue Res.* (2003) 44 Suppl 1:171-178
- Canalis, E.** Clinical review 83: Mechanisms of glucocorticoid action in bone: implications to glucocorticoid-induced osteoporosis.  
*J.Clin.Endocrinol.Metab.* (1996) 81:3441-3447
- Chambon, P.** A decade of molecular biology of retinoic acid receptors.  
*FASEB J.* (1996) 10:940-954
- Charras, G. T.; Horton, M. A.** Single cell mechanotransduction and its modulation analyzed by atomic force microscope indentation.  
*Biophys.J.* (2002) 82:2970-2981
- Chen, C. Z.; Li, M.; de, G. D.; Monti, S.; Gottgens, B.; Sanchez, M. J.; Lander, E. S.; Golub, T. R.; Green, A. R.; Lodish, H. F.** Identification of endoglin as a functional marker that defines long-term repopulating hematopoietic stem cells.  
*Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* (2002) 99:15468-15473

**Cheng, S. L.; Yang, J. W.; Rifas, L.; Zhang, S. F.; Avioli, L. V.** Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro: induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone.

*Endocrinology.* (1994) 134:277-286

**Clarke, D. L.; Johansson, C. B.; Wilbertz, J.; Veress, B.; Nilsson, E.; Karlstrom, H.; Lendahl, U.; Frisen, J.** Generalized potential of adult neural stem cells.

*Science.* (2000) 288:1660-1663

**Cobourne, M. T.; Mitsiadis, T.** Neural crest cells and patterning of the mammalian dentition.

*J.Exp.Zoolog.B Mol.Dev.Evol.* (2006) 306:251-260

**Conrad, S.; Renninger, M.; Hennenlotter, J.; Wiesner, T.; Just, L.; Bonin, M.; Aicher, W.; Buhning, H. J.; Mattheus, U.; Mack, A.; Wagner, H. J.; Minger, S.; Matzkies, M.; Reppel, M.; Hescheler, J.; Sievert, K. D.; Stenzl, A.; Skutella, T.** Generation of pluripotent stem cells from adult human testis.

*Nature.* (2008)

**d'Aquino, R.; Graziano, A.; Sampaolesi, M.; Laino, G.; Pirozzi, G.; De, R. A.; Papaccio, G.** Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endothelial cells: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation.

*Cell Death.Differ.* (2007)

**Degistirici, O.; Jaquier, C.; Schonebeck, B.; Siemonsmeier, J.; Gotz, W.; Martin, I.; Thie, M.** Defining properties of neural crest-derived progenitor cells from the apex of human developing tooth.

*Tissue Eng Part A.* (2008) 14:317-330

**Demisch, A.; Wartmann, P.** Calcification of the mandibular third molar and its relation to skeletal and chronological age in children.

*Child Dev.* (1956) 27:459-473

**Deng, H.; Liu, Y.; Guo, C.** Current Topics in Bone Biology.

*New Jersey, World Scientific,* (2005)

**Deng, W.; Obrocka, M.; Fischer, I.; Prockop, D. J.** In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP.

*Biochem.Biophys.Res.Commun.* (2001) 282:148-152

**Distelhorst, C. W.** Recent insight into the structure and function of the glucocorticoid receptor.

*J.Lab Clin.Med.* (1989) 113:404-412

- Dlamini, Z.; Mbita, Z.; Zungu, M.** Genealogy, expression, and molecular mechanisms in apoptosis.  
*Pharmacol.Ther.* (2004) 101:1-15
- Ducy, P.; Karsenty, G.** Genetic control of cell differentiation in the skeleton.  
*Curr.Opin.Cell Biol.* (1998) 10:614-619
- Duong, T. D.; Erickson, C. A.** MMP-2 plays an essential role in producing epithelial-mesenchymal transformations in the avian embryo.  
*Dev.Dyn.* (2004) 229:42-53
- Evans, R. M.** The steroid and thyroid hormone receptor superfamily.  
*Science.* (1988) 240:889-895
- Fliegner, K. H.; Liem, R. K.** Cellular and molecular biology of neuronal intermediate filaments.  
*Int.Rev.Cytol.* (1991) 131:109-167
- Fuchs, E.; Tumber, T.; Guasch, G.** Socializing with the neighbors: stem cells and their niche.  
*Cell.* (2004) 116:769-778
- Gage, F. H.** Mammalian neural stem cells.  
*Science.* (2000) 287:1433-1438
- Ganss, B.; Kim, R. H.; Sodek, J.** Bone sialoprotein.  
*Crit Rev.Oral Biol.Med.* (1999) 10:79-98
- Gluckman, E.; Rocha, V.** Cord blood transplantation for children with acute leukaemia: a Eurocord registry analysis.  
*Blood Cells Mol.Dis.* (2004) 33:271-273
- Goodwin, H. S.; Bicknese, A. R.; Chien, S. N.; Bogucki, B. D.; Quinn, C. O.; Wall, D. A.** Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat, and neural markers.  
*Biol.Blood Marrow Transplant.* (2001) 7:581-588
- Gougos, A.; Letarte, M.** Primary structure of endoglin, an RGD-containing glycoprotein of human endothelial cells.  
*J.Biol.Chem.* (1990) 265:8361-8364
- Gronthos, S.; Brahim, J.; Li, W.; Fisher, L. W.; Cherman, N.; Boyde, A.; DenBesten, P.; Robey, P. G.; Shi, S.** Stem cell properties of human dental pulp stem cells.  
*J.Dent.Res.* (2002) 81:531-535

- Gronthos, S.; Mankani, M.; Brahim, J.; Robey, P. G.; Shi, S.** Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo.  
*Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* (2000) 97:13625-13630
- Gronthos, S.; Zannettino, A. C.; Graves, S. E.; Ohta, S.; Hay, S. J.; Simmons, P. J.** Differential cell surface expression of the STRO-1 and alkaline phosphatase antigens on discrete developmental stages in primary cultures of human bone cells.  
*J.Bone Miner.Res.* (1999) 14:47-56
- Hauschka, P. V.** Osteocalcin: the vitamin K-dependent Ca<sup>2+</sup>-binding protein of bone matrix.  
*Haemostasis.* (1986) 16:258-272
- Hauschka, P. V.; Lian, J. B.; Gallop, P. M.** Direct identification of the calcium-binding amino acid, gamma-carboxyglutamate, in mineralized tissue.  
*Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* (1975) 72:3925-3929
- Hemler, M. E.** VLA proteins in the integrin family: structures, functions, and their role on leukocytes.  
*Annu.Rev.Immunol.* (1990) 8:365-400
- His, W.** Untersuchungen über die erste Anlage des Wirbeltierleibes.  
*Leipzig, Verlag von F. C. W. Vogel,* (1868)
- Hollenberg, S. M.; Weinberger, C.; Ong, E. S.; Cerelli, G.; Oro, A.; Lebo, R.; Thompson, E. B.; Rosenfeld, M. G.; Evans, R. M.** Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA.  
*Nature.* (1985) 318:635-641
- Hughes-Fulford, M.** Signal transduction and mechanical stress.  
*Sci.STKE.* (2004) 2004:RE12
- Imai, H.; Osumi-Yamashita, N.; Ninomiya, Y.; Eto, K.** Contribution of early-emigrating midbrain crest cells to the dental mesenchyme of mandibular molar teeth in rat embryos.  
*Dev.Biol.* (1996) 176:151-165
- Ivanovski, S.; Gronthos, S.; Shi, S.; Bartold, P. M.** Stem cells in the periodontal ligament.  
*Oral Dis.* (2006) 12:358-363
- Jager, M.; Degistirici, O.; Knipper, A.; Fischer, J.; Sager, M.; Krauspe, R.** Bone healing and migration of cord blood-derived stem cells into a critical size femoral defect after xenotransplantation.  
*J.Bone Miner.Res.* (2007) 22:1224-1233

- Jaiswal, N.; Haynesworth, S. E.; Caplan, A. I.; Bruder, S. P.** Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro.  
*J.Cell Biochem.* (1997) 64:295-312
- Jankowski, R. J.; Deasy, B. M.; Huard, J.** Muscle-derived stem cells.  
*Gene Ther.* (2002) 9:642-647
- Jernvall, J.; Kettunen, P.; Karavanova, I.; Martin, L. B.; Thesleff, I.** Evidence for the role of the enamel knot as a control center in mammalian tooth cusp formation: non-dividing cells express growth stimulating Fgf-4 gene.  
*Int.J.Dev.Biol.* (1994) 38:463-469
- Jiang, Y.; Jahagirdar, B. N.; Reinhardt, R. L.; Schwartz, R. E.; Keene, C. D.; Ortiz-Gonzalez, X. R.; Reyes, M.; Lenvik, T.; Lund, T.; Blackstad, M.; Du, J.; Aldrich, S.; Lisberg, A.; Low, W. C.; Largaespada, D. A.; Verfaillie, C. M.** Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow.  
*Nature.* (2002) 418:41-49
- Joannides, A.; Gaughwin, P.; Schwiening, C.; Majed, H.; Sterling, J.; Compston, A.; Chandran, S.** Efficient generation of neural precursors from adult human skin: astrocytes promote neurogenesis from skin-derived stem cells.  
*Lancet.* (2004) 364:172-178
- Jones-Villeneuve, E. M.; McBurney, M. W.; Rogers, K. A.; Kalnins, V. I.** Retinoic acid induces embryonal carcinoma cells to differentiate into neurons and glial cells.  
*J.Cell Biol.* (1982) 94:253-262
- Jonsson, K. B.; Frost, A.; Nilsson, O.; Ljunghall, S.; Ljunggren, O.** Three isolation techniques for primary culture of human osteoblast-like cells: a comparison.  
*Acta Orthop.Scand.* (1999) 70:365-373
- Kasai, R.; Bianco, P.; Robey, P. G.; Kahn, A. J.** Production and characterization of an antibody against the human bone GLA protein (BGP/osteocalcin) propeptide and its use in immunocytochemistry of bone cells.  
*Bone Miner.* (1994) 25:167-182
- Kemper, A.; Eickler, A.** Datenbanksysteme -Eine Einführung.  
*6th ed. Oldenbourg,* (2006)
- Kerkis, I.; Kerkis, A.; Dozortsev, D.; Stukart-Parsons, G. C.; Gomes Massironi, S. M.; Pereira, L. V.; Caplan, A. I.; Cerruti, H. F.** Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers.  
*Cells Tissues.Organs.* (2006) 184:105-116

- Kim, J. B.; Zaehres, H.; Wu, G.; Gentile, L.; Ko, K.; Sebastiano, V.; rauzo-Bravo, M. J.; Ruau, D.; Han, D. W.; Zenke, M.; Scholer, H. R.** Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors.  
*Nature.* (2008)
- Kim, K. M.** Apoptosis and calcification.  
*Scanning Microsc.* (1995) 9:1137-1175
- Kinney-Freeman, S. L.; Jackson, K. A.; Camargo, F. D.; Ferrari, G.; Mavilio, F.; Goodell, M. A.** Muscle-derived hematopoietic stem cells are hematopoietic in origin.  
*Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* (2002) 99:1341-1346
- Kirshenbaum, A. S.; Goff, J. P.; Semere, T.; Foster, B.; Scott, L. M.; Metcalfe, D. D.** Demonstration that human mast cells arise from a progenitor cell population that is CD34(+), c-kit(+), and expresses aminopeptidase N (CD13).  
*Blood.* (1999) 94:2333-2342
- Klein-Nulend, J.; Bacabac, R. G.; Mullender, M. G.** Mechanobiology of bone tissue.  
*Pathol.Biol.(Paris).* (2005) 53:576-580
- Knippers, R.** Molekulare Genetik.  
8 ed. Stuttgart, Georg Thieme Verlag, (1999)
- Kogler, G.; Sensken, S.; Airey, J. A.; Trapp, T.; Muschen, M.; Feldhahn, N.; Liedtke, S.; Sorg, R. V.; Fischer, J.; Rosenbaum, C.; Greschat, S.; Knipper, A.; Bender, J.; Degistirici, O.; Gao, J.; Caplan, A. I.; Colletti, E. J.; meida-Porada, G.; Muller, H. W.; Zanjani, E.; Wernet, P.** A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential.  
*J.Exp.Med.* (2004) 200:123-135
- Kohyama, J.; Abe, H.; Shimazaki, T.; Koizumi, A.; Nakashima, K.; Gojo, S.; Taga, T.; Okano, H.; Hata, J.; Umezawa, A.** Brain from bone: efficient "meta-differentiation" of marrow stroma-derived mature osteoblasts to neurons with Noggin or a demethylating agent.  
*Differentiation.* (2001) 68:235-244
- Kruger, G. M.; Mosher, J. T.; Bixby, S.; Joseph, N.; Iwashita, T.; Morrison, S. J.** Neural crest stem cells persist in the adult gut but undergo changes in self-renewal, neuronal subtype potential, and factor responsiveness.  
*Neuron.* (2002) 35:657-669
- Kuznetsov, S. A.; Mankani, M. H.; Gronthos, S.; Satomura, K.; Bianco, P.; Robey, P. G.** Circulating skeletal stem cells.  
*J.Cell Biol.* (2001) 153:1133-1140

- Le Douarin, N. M.; Kalcheim, C.** The Neural Crest.  
*2 ed. Cambridge University Press, (1999)*
- Lehmann, J. C.; Jablonski-Westrich, D.; Haubold, U.; Gutierrez-Ramos, J. C.; Springer, T.; Hamann, A.** Overlapping and selective roles of endothelial intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and ICAM-2 in lymphocyte trafficking.  
*J.Immunol.* (2003) 171:2588-2593
- Lian, J. B.; Stein, G. S.** The temporal and spatial subnuclear organization of skeletal gene regulatory machinery: integrating multiple levels of transcriptional control.  
*Calcif.Tissue Int.* (2003) 72:631-637
- Lindl, T.** Zell- und Gewebekultur.  
*5 ed. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag, (2002)*
- Liu, M.; Iavarone, A.; Freedman, L. P.** Transcriptional activation of the human p21(WAF1/CIP1) gene by retinoic acid receptor. Correlation with retinoid induction of U937 cell differentiation.  
*J.Biol.Chem.* (1996) 271:31723-31728
- Luan, X.; Ito, Y.; Dangaria, S.; Diekwisch, T. G.** Dental follicle progenitor cell heterogeneity in the developing mouse periodontium.  
*Stem Cells Dev.* (2006) 15:595-608
- Lumsden, A. G.** Spatial organization of the epithelium and the role of neural crest cells in the initiation of the mammalian tooth germ.  
*Development.* (1988) 103 Suppl:155-169
- MacKenzie, A.; Ferguson, M. W.; Sharpe, P. T.** Expression patterns of the homeobox gene, Hox-8, in the mouse embryo suggest a role in specifying tooth initiation and shape.  
*Development.* (1992) 115:403-420
- Malaval, L.; Modrowski, D.; Gupta, A. K.; Aubin, J. E.** Cellular expression of bone-related proteins during in vitro osteogenesis in rat bone marrow stromal cell cultures.  
*J.Cell Physiol.* (1994) 158:555-572
- Martin-Rendon, E.; Watt, S. M.** Exploitation of stem cell plasticity.  
*Transfus.Med.* (2003) 13:325-349
- Millan, J. L.** Alkaline Phosphatases : Structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes.  
*Purinergic.Signal.* (2006) 2:335-341



- Mina-Osorio, P.; Shapiro, L. H.; Ortega, E.** CD13 in cell adhesion: aminopeptidase N (CD13) mediates homotypic aggregation of monocytic cells.  
*J.Leukoc.Biol.* (2006) 79:719-730
- Miura, M.; Gronthos, S.; Zhao, M.; Lu, B.; Fisher, L. W.; Robey, P. G.; Shi, S.** SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth.  
*Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* (2003) 100:5807-5812
- Munck, A.; Brinck-Johnsen, T.** Specific and nonspecific physicochemical interactions of glucocorticoids and related steroids with rat thymus cells in vitro.  
*J.Biol.Chem.* (1968) 243:5556-5565
- Muschler, G. F.; Nitto, H.; Boehm, C. A.; Easley, K. A.** Age- and gender-related changes in the cellularity of human bone marrow and the prevalence of osteoblastic progenitors.  
*J.Orthop.Res.* (2001) 19:117-125
- Nanci, A.** Ten Cate's Oral Histologie : development, structure, and function.  
7 ed. St. Louis, MO, Mosby, Inc., and affiliate of Elsevier Inc., (2007)
- Nichols, D. H.** Neural crest formation in the head of the mouse embryo as observed using a new histological technique.  
*J.Embryol.Exp.Morphol.* (1981) 64:105-120
- Nieto, M. A.** The early steps of neural crest development.  
*Mech.Dev.* (2001) 105:27-35
- Nishimura, E. K.; Jordan, S. A.; Oshima, H.; Yoshida, H.; Osawa, M.; Moriyama, M.; Jackson, I. J.; Barrandon, Y.; Miyachi, Y.; Nishikawa, S.** Dominant role of the niche in melanocyte stem-cell fate determination.  
*Nature.* (2002) 416:854-860
- Nosrat, I.; Seiger, A.; Olson, L.; Nosrat, C. A.** Expression patterns of neurotrophic factor mRNAs in developing human teeth.  
*Cell Tissue Res.* (2002) 310:177-187
- Nosrat, I. V.; Widenfalk, J.; Olson, L.; Nosrat, C. A.** Dental pulp cells produce neurotrophic factors, interact with trigeminal neurons in vitro, and rescue motoneurons after spinal cord injury.  
*Dev.Biol.* (2001) 238:120-132
- Oshima, Y.; Watanabe, N.; Matsuda, K.; Takai, S.; Kawata, M.; Kubo, T.** Behavior of transplanted bone marrow-derived GFP mesenchymal cells in osteochondral defect as a simulation of autologous transplantation.  
*J.Histochem.Cytochem.* (2005) 53:207-216

- Osumi-Yamashita, N.; Ninomiya, Y.; Doi, H.; Eto, K.** The contribution of both forebrain and midbrain crest cells to the mesenchyme in the frontonasal mass of mouse embryos.  
*Dev.Biol.* (1994) 164:409-419
- Park, K. S.; Lee, Y. S.; Kang, K. S.** In vitro neuronal and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood.  
*J.Vet.Sci.* (2006) 7:343-348
- Pereira, R. C.; Delany, A. M.; Canalis, E.** Effects of cortisol and bone morphogenetic protein-2 on stromal cell differentiation: correlation with CCAAT-enhancer binding protein expression.  
*Bone.* (2002) 30:685-691
- Pereira, R. M.; Delany, A. M.; Canalis, E.** Cortisol inhibits the differentiation and apoptosis of osteoblasts in culture.  
*Bone.* (2001) 28:484-490
- Perrot, R.; Berges, R.; Bocquet, A.; Eyer, J.** Review of the multiple aspects of neurofilament functions, and their possible contribution to neurodegeneration.  
*Mol.Neurobiol.* (2008) 38:27-65
- Peterson, B.; Zhang, J.; Iglesias, R.; Kabo, M.; Hedrick, M.; Benhaim, P.; Lieberman, J. R.** Healing of critically sized femoral defects, using genetically modified mesenchymal stem cells from human adipose tissue.  
*Tissue Eng.* (2005) 11:120-129
- Pfaffl, M. W.** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.  
*Nucleic Acids Res.* (2001) 29:e45
- Pittenger, M. F.; Mackay, A. M.; Beck, S. C.; Jaiswal, R. K.; Douglas, R.; Mosca, J. D.; Moorman, M. A.; Simonetti, D. W.; Craig, S.; Marshak, D. R.** Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.  
*Science.* (1999) 284:143-147
- Prockop, D. J.** Further proof of the plasticity of adult stem cells and their role in tissue repair.  
*J.Cell Biol.* (2003) 160:807-809
- Proudfoot, D.; Skepper, J. N.; Hegyi, L.; Bennett, M. R.; Shanahan, C. M.; Weissberg, P. L.** Apoptosis regulates human vascular calcification in vitro: evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies.  
*Circ.Res.* (2000) 87:1055-1062

- Quaini, F.; Urbanek, K.; Beltrami, A. P.; Finato, N.; Beltrami, C. A.; Nadal-Ginard, B.; Kajstura, J.; Leri, A.; Anversa, P.** Chimerism of the transplanted heart.  
*N.Engl.J.Med.* (2002) 346:5-15
- Raff, M.** Adult stem cell plasticity: fact or artifact?  
*Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* (2003) 19:1-22
- Reyes, M.; Verfaillie, C. M.** Characterization of multipotent adult progenitor cells, a sub-population of mesenchymal stem cells.  
*Ann.N.Y.Acad.Sci.* (2001) 938:231-233
- Rickard, D. J.; Kassem, M.; Hefferan, T. E.; Sarkar, G.; Spelsberg, T. C.; Riggs, B. L.** Isolation and characterization of osteoblast precursor cells from human bone marrow.  
*J.Bone Miner.Res.* (1996) 11:312-324
- Risbud, M. V.; Shapiro, I. M.** Stem cells in craniofacial and dental tissue engineering.  
*Orthod.Craniofac.Res.* (2005) 8:54-59
- Rohwedel, J.; Guan, K.; Wobus, A. M.** Induction of cellular differentiation by retinoic acid in vitro.  
*Cells Tissues.Organs.* (1999) 165:190-202
- Roth, H. J.; Kronquist, K. E.; Kerlero de, R. N.; Crandall, B. F.; Campagnoni, A. T.** Evidence for the expression of four myelin basic protein variants in the developing human spinal cord through cDNA cloning.  
*J.Neurosci.Res.* (1987) 17:321-328
- Ruch, J. V.; Lesot, H.; Begue-Kirn, C.** Odontoblast differentiation.  
*Int.J.Dev.Biol.* (1995) 39:51-68
- Sachs, L.** Statistische Methoden.  
*6 ed. Berlin, Springer Verlag,* (1980)
- Sanchez-Ramos, J.; Song, S.; Cardozo-Pelaez, F.; Hazzi, C.; Stedeford, T.; Willing, A.; Freeman, T. B.; Saporta, S.; Janssen, W.; Patel, N.; Cooper, D. R.; Sanberg, P. R.** Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro.  
*Exp.Neurol.* (2000) 164:247-256
- Sanchez-Ramos, J. R.; Song, S.; Kamath, S. G.; Zigova, T.; Willing, A.; Cardozo-Pelaez, F.; Stedeford, T.; Chopp, M.; Sanberg, P. R.** Expression of neural markers in human umbilical cord blood.  
*Exp.Neurol.* (2001) 171:109-115
- Sato, S.; Ogiwara, Y.** Biostatistic study of the eruption order of deciduous teeth.  
*Bull.Tokyo Dent.Coll.* (1971) 12:45-76

**Schoenebeck, B.; Hartschen, H. J.; Schindel, M.; Degistirici, O.; Siemonsmeier, J.; Goetz, W.; Thie, M.** Molecular Characterization of Human Impacted Third Molars: Diversification of Compartments.  
*Cells Tissues.Organs.* (2008)

**Schroeder, H.** Orale Strukturbiologie.  
*5 ed. Stuttgart, Germany, Georg Thieme Verlag,* (2000)

**Seo, B. M.; Miura, M.; Gronthos, S.; Bartold, P. M.; Batouli, S.; Brahim, J.; Young, M.; Robey, P. G.; Wang, C. Y.; Shi, S.** Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament.  
*Lancet.* (2004) 364:149-155

**Sharpe, P. T.; Young, C. S.** Neue Zähne aus der Retorte.  
*Spektrum der Wissenschaft.* (2006) Mai:

**Sherley, J. L.** Asymmetric cell kinetics genes: the key to expansion of adult stem cells in culture.  
*Stem Cells.* (2002) 20:561-572

**Sieber-Blum, M.; Grim, M.; Hu, Y. F.; Szeder, V.** Pluripotent neural crest stem cells in the adult hair follicle.  
*Dev.Dyn.* (2004) 231:258-269

**Smith, A. J.; Cassidy, N.; Perry, H.; Begue-Kirn, C.; Ruch, J. V.; Lesot, H.** Reactionary dentinogenesis.  
*Int.J.Dev.Biol.* (1995) 39:273-280

**Song, I. H.; Caplan, A. I.; Dennis, J. E.** Dexamethasone inhibition of confluence-induced apoptosis in human mesenchymal stem cells.  
*J.Orthop.Res.* (2008)

**Spradling, A.; Drummond-Barbosa, D.; Kai, T.** Stem cells find their niche.  
*Nature.* (2001) 414:98-104

**Springer, T. A.** Adhesion receptors of the immune system.  
*Nature.* (1990) 346:425-434

**Srouji, S.; Livne, E.** Bone marrow stem cells and biological scaffold for bone repair in aging and disease.  
*Mech.Ageing Dev.* (2005) 126:281-287

**Stein, G. S.; Lian, J. B.; Stein, J. L.; van Wijnen, A. J.; Montecino, M.** Transcriptional control of osteoblast growth and differentiation.  
*Physiol Rev.* (1996) 76:593-629

- Stemple, D. L.; Anderson, D. J.** Isolation of a stem cell for neurons and glia from the mammalian neural crest.  
*Cell.* (1992) 71:973-985
- Taub, R.** Liver regeneration: from myth to mechanism.  
*Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* (2004) 5:836-847
- Tennant, J.** Evaluation of the Trypan Blue Technique for Determination of Cell Viability.  
*Transplantation.* (1964) 2:685-694
- Thesleff, I.** Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis.  
*J.Cell Sci.* (2003) 116:1647-1648
- Thesleff, I.; Aberg, T.** Tooth morphogenesis and the differentiation of ameloblasts.  
*Ciba Found.Symp.* (1997) 205:3-12
- Thesleff, I.; Jernvall, J.** The enamel knot: a putative signaling center regulating tooth development.  
*Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* (1997) 62:257-267
- Thesleff, I.; Sharpe, P.** Signalling networks regulating dental development.  
*Mech.Dev.* (1997) 67:111-123
- Thesleff, I.; Wang, X. P.; Suomalainen, M.** Regulation of epithelial stem cells in tooth regeneration.  
*C.R.Biol.* (2007) 330:561-564
- Toma, J. G.; Akhavan, M.; Fernandes, K. J.; Barnabe-Heider, F.; Sadikot, A.; Kaplan, D. R.; Miller, F. D.** Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin.  
*Nat.Cell Biol.* (2001) 3:778-784
- Trainor, P. A.** Specification and patterning of neural crest cells during craniofacial development.  
*Brain Behav.Evol.* (2005) 66:266-280
- Tuan, R. S.; Boland, G.; Tuli, R.** Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering.  
*Arthritis Res.Ther.* (2003) 5:32-45
- Tucker, A.; Sharpe, P.** The cutting-edge of mammalian development; how the embryo makes teeth.  
*Nat.Rev.Genet.* (2004) 5:499-508

- Tucker, A. S.; Sharpe, P. T.** Molecular genetics of tooth morphogenesis and patterning: the right shape in the right place.  
*J.Dent.Res.* (1999) 78:826-834
- Vainio, S.; Thesleff, I.** Sequential induction of syndecan, tenascin and cell proliferation associated with mesenchymal cell condensation during early tooth development.  
*Differentiation.* (1992) 50:97-105
- Wagers, A. J.; Weissman, I. L.** Plasticity of adult stem cells.  
*Cell.* (2004) 116:639-648
- Watt, F. M.; Hogan, B. L.** Out of Eden: stem cells and their niches.  
*Science.* (2000) 287:1427-1430
- Whetton, A. D.; Graham, G. J.** Homing and mobilization in the stem cell niche.  
*Trends Cell Biol.* (1999) 9:233-238
- Widera, D.; Grimm, W. D.; Moebius, J. M.; Mikenberg, I.; Piechaczek, C.; Gassmann, G.; Wolff, N. A.; Thevenod, F.; Kaltschmidt, C.; Kaltschmidt, B.** Highly efficient neural differentiation of human somatic stem cells, isolated by minimally invasive periodontal surgery.  
*Stem Cells Dev.* (2007) 16:447-460
- Woodbury, D.; Schwarz, E. J.; Prockop, D. J.; Black, I. B.** Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons.  
*J.Neurosci.Res.* (2000) 61:364-370
- Yamada, K. M.; Miyamoto, S.** Integrin transmembrane signaling and cytoskeletal control.  
*Curr.Opin.Cell Biol.* (1995) 7:681-689
- Young, H. E.; Black, A. C., Jr.** Adult stem cells.  
*Anat.Rec.A Discov.Mol.Cell Evol.Biol.* (2004) 276:75-102
- Young, H. E.; Steele, T. A.; Bray, R. A.; Detmer, K.; Blake, L. W.; Lucas, P. W.; Black, A. C., Jr.** Human pluripotent and progenitor cells display cell surface cluster differentiation markers CD10, CD13, CD56, and MHC class-I.  
*Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* (1999) 221:63-71
- Young, J. B.; Naftel, D. C.; Bourge, R. C.; Kirklin, J. K.; Clemson, B. S.; Porter, C. B.; Rodeheffer, R. J.; Kenzora, J. L.** Matching the heart donor and heart transplant recipient. Clues for successful expansion of the donor pool: a multivariable, multiinstitutional report. The Cardiac Transplant Research Database Group.  
*J.Heart Lung Transplant.* (1994) 13:353-364

- 
- Young, M. F.** Bone matrix proteins: their function, regulation, and relationship to osteoporosis.  
*Osteoporos.Int.* (2003) 14 Suppl 3:S35-S42
- Yu, X. P.; Chandrasekhar, S.** Parathyroid hormone (PTH 1-34) regulation of rat osteocalcin gene transcription.  
*Endocrinology.* (1997) 138:3085-3092
- Zanotto-Filho, A.; Cammarota, M.; Gelain, D. P.; Oliveira, R. B.; gado-Canedo, A.; Dalmolin, R. J.; Pasquali, M. A.; Moreira, J. C.** Retinoic acid induces apoptosis by a non-classical mechanism of ERK1/2 activation.  
*Toxicol.In Vitro.* (2008) 22:1205-1212
- Zhang, W.; Walboomers, X. F.; Shi, S.; Fan, M.; Jansen, J. A.** Multilineage Differentiation Potential of Stem Cells Derived from Human Dental Pulp after Cryopreservation.  
*Tissue Eng.* (2006)
- Zwart, I.; Hill, A. J.; Girdlestone, J.; Manca, M. F.; Navarrete, R.; Navarrete, C.; Jen, L. S.** Analysis of neural potential of human umbilical cord blood-derived multipotent mesenchymal stem cells in response to a range of neurogenic stimuli.  
*J.Neurosci.Res.* (2008) 86:1902-1915

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ALCAM	Activated leucocyte cell adhesion molecule (engl.)
<i>ALPL</i>	Alkaline phosphatase liver/bone/kidney (engl.)
APC	Allophycocyanin (Fluoreszenzfarbstoff)
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor (engl.)
bFGF	Basic fibroblast growth factor (engl.)
<i>BGLAP</i>	Bone gamma carboxy glutamate protein (engl.)
BGP	Bone $\gamma$ -carboxylglutamic acid-containing protein (engl.)
BMSC	Bone marrow stroma cells (engl.)
bzw.	Beziehungsweise
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CD	Cluster of Differentiation (engl.)
CDK	Cyclin dependent kinase (engl.)
cDNA	Complementary desoxyribonucleic acid (engl.)
cm	Zentimeter
CT-Wert	Cycle Threshold (engl.)
d	Day (engl.)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Diff	Differenzierung
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DZB	Dentale Zellbiologie
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (engl.)
et al.,	Et alii, et aliae, et alia (lat.)
evtl.	Eventuell
FACS	Fluorescence activated cell sorting (engl.)
FCS	Fetal calf serum (engl.)
FDI	Fédération Dentaire Internationale (frz.)
FGF	Fibroblast growth factor (engl.)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat (Fluoreszenzfarbstoff)
FSC	Forward scatter (engl.)
G1-Phase	Gap (engl.), (Phase im Zellzyklus)
<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyd-3-phosphat dehydrogenase (engl.)
GFP	Green fluorescent protein (engl.)
ggf.	Gegebenenfalls
GLN	Glutamin
h	Hour (engl.)
hBMSC	Human Bone Marrow Stroma Cells (engl.)
HCl	Chlorwasserstoff (Salzsäure)
Hrsg.	Herausgeber



---

Hz	Hertz
IBMX	3 Isobutyl-1-Methyl Xanthan
<i>IBSP</i>	Integrin binding bone sialoproteine (engl.)
ICAM	Intercellular Cell Adhesion Molecule (engl.)
ID	Identification (engl.)
Kap.	Kapitel
<i>MBP</i>	Myelin basic protein (engl.)
min.	Minute
mL	Milliliter
mRNA	Messenger ribonucleic acid (engl.)
<i>NEFH</i>	Neurofilament heavy polypeptide (engl.)
<i>NEFL</i>	Neurofilament light polypeptide (engl.)
neuro	Neurogen
ng	Nanogramm
NGF	Nerve Growth Factor (engl.)
o. Ä.	Oder Ähnliches
osteo	Osteogen
p	Passage
p21	Protein p21
PBS	Phosphate buffered saline (engl.)
PCR	Polymerase Chain Reaction (engl.)
PDL	Parodontales Ligament
PE	Phytoerythrin B (Fluoreszenzfarbstoff)
PFA	Paraformaldehyd
QBE	Query by Example (engl.)
RA	Retinoic acid (engl.)
RNA	Ribonucleid acid (engl.)
<i>RUNX2</i>	Runt-related transkription factor 2 (engl.)
s.	Siehe
sq	Semi quantitativ
SQL	Structured Query Language (engl.)
SRCR	Scavenger Receptor Cystein-Rich (engl.)
SSC	Sideward scatter (engl.)
SYBR	Cyanin-Farbstoff (zum Nachweis doppelsträngiger DNA)
T-25	Tissueflask (engl.), Bodenfläche 25 cm <sup>2</sup>
Tab.	Tabelle
TGF	Transforming growth factor (engl.)
THR	Threonin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
<i>TUBB3</i>	β3 Tubulin
TYR	Tyrosin
U	Unit (engl.)
u. a.	Unter anderem

ü. N.	Über Nacht
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1 (engl.)
VEGF	Vascular endothelial cell growth factor (engl.)
Vers.	Version
vgl.	Vergleiche
VLA-4	Very Late Antigens (engl.)
Z	Zellen
z. B.	Zum Beispiel
z. T.	Zum Teil

---

## Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1:</b>	Zellen und Gewebe des Zahnkeims und ihre Produkte.	<b>6</b>
<b>Tab. 2:</b>	Datenliste verwendeter dentaler Gewebe in dieser Arbeit.	<b>16</b>
<b>Tab. 3:</b>	Antikörper, Charakterisierung Zelloberflächenproteine (FACS-Gerät).	<b>32</b>
<b>Tab. 4:</b>	Primer zur Untersuchung der Genexpression (sq-PCR).	<b>33</b>
<b>Tab. 5:</b>	Korrelationskoeffizient Kalzifizierung/Expression <i>ALPL</i> .	<b>65</b>
<b>Tab. 6:</b>	Oberflächenproteine DZB-201 (FACS Untersuchung).	<b>101</b>
<b>Tab. 7:</b>	Oberflächenproteine DZB-202 (FACS Untersuchung).	<b>103</b>
<b>Tab. 8:</b>	Vereinzelung der Zellen, Proliferationskontrolle nach vier Wochen.	<b>104</b>
<b>Tab. 9:</b>	Oberflächenproteine Klon 64_B4 (FACS Untersuchung).	<b>109</b>

---

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1:</b> Entwicklung des Neuralrohres und der Neuralleisten beim Vogelembryo	<b>3</b>
<b>Abb. 2:</b> Migrierende Neuralleistenzellen bei embryonaler Entwicklung	<b>4</b>
<b>Abb. 3:</b> Entwicklung des Zahnkeims im Embryo	<b>5</b>
<b>Abb. 4:</b> Vollständig ausgebildeter Zahn bei Mamalia	<b>7</b>
<b>Abb. 5:</b> Weisheitszähne bei Röntgenaufnahme eines jugendlichen Gebisses	<b>8</b>
<b>Abb. 6:</b> Foto eines soeben entnommenen Weisheitszahns	<b>9</b>
<b>Abb. 7:</b> Organisation der Datenbank, Strukturierung der Daten in Tabellen	<b>14</b>
<b>Abb. 8:</b> Extrahierter humaner dritter Molar (Weisheitszahn)	<b>17</b>
<b>Abb. 9:</b> Primärzellkultur nach Isolierung aus dem Zahngewebe	<b>18</b>
<b>Abb. 10:</b> Schema Ficollgradient nach Zentrifugation der Knochenmarkzellen	<b>19</b>
<b>Abb. 11:</b> Schematische Darstellung der Einzelablage FACS-Gerät	<b>24</b>
<b>Abb. 12:</b> Bestimmung der Zellzahl während Kulturverlaufes anhand von Fotos	<b>26</b>
<b>Abb. 13:</b> Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers (FACS-Gerät)	<b>28</b>
<b>Abb. 14:</b> Aufgelistete Abfragen der Datenbank	<b>38</b>
<b>Abb. 15:</b> Auflistung der Ergebnisse einer Datenbankabfrage (Auszug)	<b>38</b>
<b>Abb. 16:</b> Abfrage mit Auswahlabfrage	<b>39</b>
<b>Abb. 17:</b> Ergebnistabelle der Auswahlabfrage	<b>39</b>
<b>Abb. 18:</b> Abfrage mit zwei kombinierten Auswahlabfragen	<b>40</b>
<b>Abb. 19:</b> Ergebnistabelle der kombinierten Auswahlabfragen (Auszug)	<b>41</b>

---

<b>Abb. 20:</b> Beispiel zur Auswertung einer Datenbankabfrage als Excel Diagramm	<b>42</b>
<b>Abb. 21:</b> Osteogene Differenzierung, Kalziumnachweis mit Alizarinrot (Foto)	<b>43</b>
<b>Abb. 22:</b> Kalziumkonzentrationen verschiedener Zellpopulationen nach osteo Diff	<b>44</b>
<b>Abb. 23:</b> Vergleich der Kalziumkonzentration dentaler Primärzellen nach osteo Diff	<b>45</b>
<b>Abb. 24:</b> Konfluenz der verschiedenen dentalen Primärkulturen bei osteo Diff	<b>47</b>
<b>Abb. 25:</b> Konfluenz / Kalzifizierung der verschiedenen dentalen Primärkulturen	<b>47</b>
<b>Abb. 26:</b> Expression Bonesialoprotein ( <i>IBSP</i> ) bei osteo Diff	<b>51</b>
<b>Abb. 27:</b> Expression <i>IBSP</i> in Gruppen kalzifiziert/ nicht kalzifiziert	<b>52</b>
<b>Abb. 28:</b> Expression von Osteokalzin ( <i>BGLAP</i> ) bei osteo Diff	<b>54</b>
<b>Abb. 29:</b> Expression <i>BGLAP</i> in Gruppen kalzifiziert/ nicht kalzifiziert	<b>55</b>
<b>Abb. 30:</b> Expression von runt related protein 2 ( <i>RUNX2</i> ) bei osteo Diff	<b>57</b>
<b>Abb. 31:</b> Expression <i>RUNX2</i> in Gruppen kalzifiziert/ nicht kalzifiziert	<b>57</b>
<b>Abb. 32:</b> Gesamtexpression <i>RUNX2</i> der jeweiligen Primärkulturen	<b>58</b>
<b>Abb. 33:</b> Gesamtexpression <i>RUNX2</i> / Kalzifizierung dentaler Primärkulturen	<b>59</b>
<b>Abb. 34:</b> Expression von alkalischer Phosphatase ( <i>ALPL</i> ) bei osteo Diff	<b>61</b>
<b>Abb. 35:</b> Expression <i>ALPL</i> in Gruppen kalzifiziert/ nicht kalzifiziert	<b>62</b>
<b>Abb. 36:</b> Gesamtexpression <i>ALPL</i> der jeweiligen Primärkulturen	<b>63</b>
<b>Abb. 37:</b> Gesamtexpression <i>ALPL</i> / Kalzifizierung dentaler Primärkulturen	<b>64</b>
<b>Abb. 38:</b> Fotos Primärzellen DZB-202p5 in neuro Diff Medium	<b>67</b>
<b>Abb. 39:</b> Fotos Primärzellen DZB-202p5 in Kontrollmedium	<b>67</b>

---

<b>Abb. 40:</b> Proliferationsverhalten der Zellen in neuro Diff Medium	<b>68</b>
<b>Abb. 41:</b> Fotos der Primärzellen DZB-202p5 in neuro Diff ohne IBMX	<b>69</b>
<b>Abb. 42:</b> Proliferationsverhalten DZB-202p5 in neuro Diff ohne IBMX	<b>70</b>
<b>Abb. 43:</b> Fotos Primärzellen DZB-202p5 in neuro/osteo Diff Medium	<b>71</b>
<b>Abb. 44:</b> Fotos der Primärzellen DZB-202p5 in osteo Diff Medium	<b>71</b>
<b>Abb. 45:</b> Proliferationsverhalten DZB-202p5 in verschiedenen Medien	<b>72</b>
<b>Abb. 46:</b> Fotos der Primärzellen DZB-403p5 in neuro Diff Medium	<b>73</b>
<b>Abb. 47:</b> Fotos der Primärzellen DZB-403p5 in Standardmedium	<b>73</b>
<b>Abb. 48:</b> Fotos der Primärzellen DZB-403p5 in neuro Diff Medium ohne IBMX	<b>74</b>
<b>Abb. 49:</b> Proliferationsverhalten DZB-403p5 in verschiedene Medien	<b>74</b>
<b>Abb. 50:</b> Fotos der Primärzellen DZB-403p5 in neuro/osteo Diff Medium	<b>75</b>
<b>Abb. 51:</b> Fotos DZB-403p5 in neuro/osteo Diff ohne $\beta$ -Glycerol-P	<b>76</b>
<b>Abb. 52:</b> Fotos Primärzellen DZB-403p5 in osteo Diff Medium	<b>76</b>
<b>Abb. 53:</b> Proliferationsverhalten Zellen DZB-403p5 in verschiedene Medien	<b>77</b>
<b>Abb. 54:</b> Proliferationsverhalten DZB-404p7 in verschiedene Medien	<b>79</b>
<b>Abb. 55:</b> Fotos DZB-404p5 in neuro Diff Medium („Neuro Shift“)	<b>80</b>
<b>Abb. 56:</b> Fotos Primärzellen DZB-404p5 in neuro Diff Medium	<b>81</b>
<b>Abb. 57:</b> Proliferationsverhalten der Zellen DZB-404p5	<b>82</b>
<b>Abb. 58:</b> Gesamtdarstellung spezifischer Wachstumsraten in unterschiedlichen Medien	<b>83</b>
<b>Abb. 59:</b> Expression <i>NEFH</i> bei DZB-403p5 in unterschiedlichen Medien	<b>85</b>

---

<b>Abb. 60:</b> Expression <i>NEFL</i> bei DZB-403p5 in unterschiedlichen Medien	<b>86</b>
<b>Abb. 61:</b> Expression <i>MBP</i> bei DZB-403p5 in unterschiedlichen Medien	<b>87</b>
<b>Abb. 62:</b> Expression <i>NEFH</i> bei DZB-404p5 in unterschiedlichen Medien	<b>88</b>
<b>Abb. 63:</b> Expression <i>NEFL</i> bei DZB-404p5 in unterschiedlichen Medien	<b>89</b>
<b>Abb. 64:</b> Expression <i>TUBB3</i> bei DZB-404p5 in unterschiedlichen Medien	<b>89</b>
<b>Abb. 65:</b> Expression <i>IBSP</i> bei DZB-404p5 in unterschiedlichen Medien	<b>90</b>
<b>Abb. 66:</b> Expression <i>BGLAP</i> bei DZB-404p5 in unterschiedlichen Medien	<b>91</b>
<b>Abb. 67:</b> Expression <i>ALPL</i> bei DZB-404p5 in unterschiedlichen Medien	<b>92</b>
<b>Abb. 68:</b> Subpopulationen bei Granularität / Größe DZB-201p8 (FACS-Gerät)	<b>94</b>
<b>Abb. 69:</b> Proliferation der Zellen DZB-201p8 aus der Population P1	<b>95</b>
<b>Abb. 70:</b> Proliferation der Zellen DZB-201p8 aus der Population P2	<b>95</b>
<b>Abb. 71:</b> Subpopulationen bei Granularität / Größe DZB-202p8 (FACS-Gerät)	<b>96</b>
<b>Abb. 72:</b> Proliferation der Zellen DZB-202p8 aus der Population P1	<b>97</b>
<b>Abb. 73:</b> Proliferation der Zellen DZB-202p8 aus der Population P2	<b>97</b>
<b>Abb. 74:</b> Charakterisierung Oberflächenproteine DZB-201p7 (FACS-Gerät)	<b>99</b>
<b>Abb. 75:</b> Charakterisierung Oberflächenproteine DZB-202p7 (FACS-Gerät)	<b>102</b>
<b>Abb. 76:</b> Proliferation der Klone aus der Primärkultur DZB-201p8	<b>105</b>
<b>Abb. 77:</b> Proliferation der Klone aus der Primärkultur DZB-202p8	<b>106</b>
<b>Abb. 78:</b> Proliferation CD13 markierter Klone DZB201p8	<b>107</b>
<b>Abb. 79:</b> Proliferation CD13 markierter Klone DZB201p8 n>1	<b>108</b>

<b>Abb. 80:</b> Kalziumnachweis nach osteogener Diff der Klone aus DZB-201p8	<b>111</b>
<b>Abb. 81:</b> Klon 45_D5 aus Primärkultur DZB-201p8	<b>112</b>
<b>Abb. 82:</b> Klon 45_E6 aus Primärkultur DZB-201p8	<b>112</b>
<b>Abb. 83:</b> Klon 45_F4 aus Primärkultur DZB-201p8	<b>113</b>
<b>Abb. 84:</b> Klon 46_E8 aus Primärkultur DZB-201p8	<b>113</b>



## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe „Dentale Zellbiologie“ im Forschungsinstitut caesar (Bonn) angefertigt und in der Fakultät für Biologie an der Universität Bielefeld geprüft.

Herrn Prof. Dr. H. Hinssen danke ich für die freundliche Übernahme der Betreuung meiner Promotion und damit der Möglichkeit, an der Universität Bielefeld zu promovieren.

Herrn PD Dr. M. Thie danke ich für die Bereitstellung des interessanten Themas und die Ermöglichung dieser Promotion im Forschungszentrum caesar. Ich bedanke mich für seine fachliche Unterstützung.

Herrn Dr. Dr. J. Siemonsmeier der Zahnklinik Medeco danke ich für die Bereitstellung der gespendeten Zahngewebe.

Meinen Dank möchte ich außerdem der Firma Innovatis aussprechen, die mir das Cellscreen-Gerät zur Verfügung gestellt hat und Herrn Dr. G. Emde, der mich bei der Organisation unterstützt hat.

Ein herzliches „Danke“ den Mitarbeitern des Instituts caesar und besonders der Arbeitsgruppe „Dentale Zellbiologie“. Hierbei danke ich vor allem Herrn Dr. B. Schönebeck.

Meinen Freunden außerhalb des Institutes ein großes „Danke“. Sie haben mir in jeder Situation und Verfassung zur Seite gestanden.

Meiner Familie, ganz besonders meinen Eltern, danke ich für ihre Unterstützung in jeder Hinsicht.

**Ich danke allen, die mir diese Promotion ermöglicht haben !**

## **Erklärung**

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine weiteren Hilfsmittel und Quellen als die hier angegebenen verwendet zu haben.

Marlies Brinkmann

Bonn, im Februar 2009