

**Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

**Expression und Regulation von Dentinsialophosphoprotein und Maspin in  
dentalen Pulpastammzellen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Zahnmedizin (Dr. med. dent.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Antje Diederich

geboren am 17.03.1988 in Magdeburg

Betreuer: apl. Prof. Christian Ralf Gernhardt

Gutachter: Prof. Dr. Kertin Galler, Regensburg

Prof. Dr. Christian Hannig, Dresden

apl. Prof. Dr. Christian Ralf Gernhardt

17.12.2019

08.06.2020

## Referat

**Zielsetzung:** Ziel dieser Arbeit war es, die Expression von Dentinsialophosphoprotein und Maspin bei verschiedenen Zellpopulationen der dentalen Pulpa auf RNA- und Proteinebene nach Stimulation mehrerer Signalkaskaden durch verschiedene Stimulanzen zu untersuchen. Auch die Aktivität der alkalischen Phosphatase (ALP) sollte in beiden Zellgruppen gemessen werden.

**Methoden:** Aus den Pulpen extrahierter dritter Molaren wurden Zellen isoliert, die mittels FACS in DPSC und DPC- sortiert wurden. Die Zellen wurden mit PMA, EGF, b-FGF, Forskolin und TGF  $\beta_1$  über 24, 48 und 72 Stunden stimuliert. Die Expression von DSPP und Maspin wurde mittels qPCR und Western Blots untersucht. Nach 4 und 5 Tagen Stimulation erfolgte die Messung der ALP-Aktivität.

**Ergebnisse:** Die Stimulation mit PMA, EGF und b-FGF zeigte sowohl bei den DPSC als auch bei den DPC nach 24 Stunden eine verringerte DSPP-Expression, sowohl auf RNA als auch auf Proteinebene. Dieser Effekt war nach 48 Stunden nicht mehr nachweisbar. Ein signifikanter Einfluss von TGF  $\beta_1$  und Forskolin konnte innerhalb des Versuchszeitraums nicht gezeigt werden. Eine Expression von Maspin konnte weder auf RNA-Ebene noch Proteinebene nachgewiesen werden. Die DPC- zeigten insgesamt eine höhere ALP-Aktivität. Die ALP-Aktivität der DPSC stieg während des Versuches bei allen Stimulanzen und der Kontrolle an.

**Schlussfolgerungen:** In Limitation eines in-vitro-Versuches lässt die RNA- und Proteinexpression der stimulierten Zellen auf einen hemmenden Einfluss der PLC $\gamma$ -Aktivität und eine Steigerung durch Aktivierung des MAPK-Signalweges auf die Expression von DSPP schließen. Die Stimulation der DPSC beeinflusste den Differenzierungsgrad der Zellen, was durch eine erhöhte ALP-Aktivität bestätigt werden konnte. Der hohe Anteil an differenzierten Zellen bei den DPC- führte zu einer hohen ALP-Aktivität und diese konnte durch die Stimulation nicht mehr beeinflusst werden.

**Inhalt**

Referat .....	I
Abkürzungsverzeichnis .....	IV
1 Einleitung .....	1
1.1 Dentale Stammzellen .....	2
1.2 STRO-1 positive und STRO-1 negative Pulpazellen .....	4
1.3 Stimulantien .....	5
1.4 DSPP .....	9
1.5 Maspin .....	9
1.6 ALP .....	10
2 Zielstellung .....	11
3 Material und Methoden .....	12
3.1 Chemikalien, Geräte und Hilfsmittel .....	12
3.1.1 Chemikalien (alphabetische Reihenfolge) .....	12
3.1.2 Geräte (alphabetische Reihenfolge) .....	14
3.1.3 Hilfsmittel, Primer und Antikörper (alphabetische Reihenfolge) .....	15
3.2 Zellkultur .....	16
3.2.1 Zellisolation und Proliferation .....	16
3.2.2 Zellsortierung .....	18
3.2.3 MTT-Assay .....	18
3.2.4 Stimulation .....	19
3.3 Isolation der RNA, RT-Herstellung und q-PCR .....	19
3.3.1 Isolation der RNA .....	19
3.3.2 RT-Herstellung und q-PCR .....	19
3.4 Isolation der Proteine und Western Blot .....	20
3.4.1 Isolation der Proteine .....	20
3.4.2 Western Blot .....	21
3.4.3 Proteindetektion .....	22
3.5 ALP Assay .....	22
3.6 Statistische Auswertung .....	23
3.7 Ethikvotum .....	23
4 Ergebnisse .....	24
4.1 FACS .....	24
4.2 MTT-Assay .....	25
4.3 DSPP .....	25

4.3.1	RNA-Expression .....	25
4.3.2	Proteinexpression.....	26
4.4	Maspin .....	28
4.4.1	RNA-Expression .....	28
4.4.2	Proteinexpression.....	28
4.5	ALP-Aktivität .....	29
5	Diskussion .....	31
5.1	Methoden .....	31
5.1.1	Zellauswahl und Isolation .....	31
5.1.2	FACS-Sortierung mit STRO-1.....	31
5.2	Ergebnisse.....	32
5.2.1	DSPP.....	32
5.2.2	Maspin .....	33
5.2.3	ALP .....	34
5.3	Schlussfolgerung und Ausblick .....	35
6	Zusammenfassung.....	36
	Literatur .....	37
	Thesen .....	42
	Anlagen.....	43
	Abbildungsverzeichnis.....	43
	Tabellenverzeichnis .....	43
	Ergebnisse qPCR .....	44
	Ergebnisse Western Blot .....	53
	Erklärungen .....	VIII
	Selbstständigkeitserklärung .....	VIII
	Erklärung über frühere Promotionsversuche.....	VIII
	Tabellarischer Lebenslauf.....	IX
	Danksagung .....	X

**Abkürzungsverzeichnis**

%	Prozent
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µU	Mikrounit
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
A	Ampere
AC	Adenylatcyclase
ALP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Aqua bidest.	Bidestilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
α-MEM	Alpha Minimum Essentiell Medium
b-FGF	basic Fibroblast Growth Factor
BMSC	Bone Marrow Stem Cells
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	Clusters of Differentiation
cDNA	complementary DNA
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
DAG	1,2-Diacylglycerine
DFCS	Dental Follicle Stem Cells
DGP	Dentinglykoprotein
DMP-1	Dentinmatrixprotein 1
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure

dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DPC	Dental Pulp Cells
DPC-	non-stemcell DPC
DPP	Dentinphosphoprotein
DPSC	Dental Pulp Stem Cells
DSP	Dentinsialoprotein
DSPP	Dentinsialophosphoprotein
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FBS	fetal bovine serum
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HCl	Salzsäure
HRP	Horseradish Peroxidase
IgG	Immunglobulin G
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-trisphosphat
kDa	Kilo-Dalton
l	Liter
M	Molar
mA	Milliampere

MACS	Magnetic Activated Cell Separation
MAP	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEPE	Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein
Min	Minute
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MM	Massenmarker
mM	Millimolar
MMP	Matrixmetalloprotease
mRNA	messenger Ribonucleinacid
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
n.s.	nicht signifikant
OPN	Osteopontin
PBS	Phosphat Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphat
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PLC $\gamma$	Phospholipase C $\gamma$
PMA	Phorbol-12-Myristate-13-Acetate
PVDF	Polyvinylidendifluorid
qPCR	quantitative Polymerase Chain Reaction
RPM	Rounds per Minute
RNA	Ribonukleinsäure

RNasen	Ribonukleinsäuren-abbauende Enzyme
R-SMAD	Rezeptor-SMAD
RT	Reverse Transkriptase
sec	Sekunde
SCAP	Stem Cells from the Apical Papilla
SDS	Natriumdodecylsulfat
SHED	Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous teeth
SIBLING	Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoproteins
SMAD	Kombination aus SMA (Small Body Size) und MAD (Mother Against Decapentaplegic)
STRO-1	Stromal Antigen-1 (Stammzellmarker)
TBS	Tris-buffered saline
TBS-T	Tris-buffered saline with Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF $\alpha$	Transforming Growth Factor $\alpha$
TGF $\beta_1$	Transforming Growth Factor $\beta_1$
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Tween	Polyoxyethylene Sorbitan Monolaureate
U	Unit
u.a.	unter anderem
V	Volt
z.B.	zum Beispiel

## 1 Einleitung

Eine der großen therapeutischen Disziplinen in der Zahnmedizin ist die Endodontie. Das Ziel ist die vollständige Entfernung des entzündeten Pulpagewebes und eine effektive Reduzierung der vorhandenen Mikroflora unter Erhalt gesunden apikalen Gewebes oder die Ausheilung einer periapikalen Entzündung (European Society of Endodontology, 2006). Je nach vorrangegangener Diagnose erzielen endodontische Behandlungen eine Erfolgsrate von bis zu 95% über 5 Jahre (Weiger et al. 2001). Negative Folgen des Verlusts des vitalen Pulpa-Dentin-Komplexes sind u.a. eine fehlende Abwehrleistung, eine reduzierte Propriozeption und verbunden mit dem Substanzabtrag, eine erhöhte Frakturgefahr (Galler et al. 2016).

Vitalerhaltende Maßnahmen bieten im Rahmen der Traumatologie und konservierenden Therapie Möglichkeiten eine Wurzelbehandlung zu vermeiden (Schwendicke et al. 2017; Duncan et al. 2019). Allerdings sind die Maßnahmen auf eine minimale Entzündung des Pulpagewebes im Rahmen einer reversiblen Pulpitis begrenzt (Galler et al. 2016). Bei vorangeschrittenem Entzündungslauf und einer umfangreichen Gewebsnekrose, ist die gesamte Entfernung des Weichgewebes unvermeidlich (Hülsmann und Schäfer 2005).

Eine Alternative, die sowohl auf die Beseitigung des infizierten Gewebes und die Regeneration vitalen reaktionsfähigen Gewebes abzielt, ist das Teilgebiet der regenerativen Endodontie und erlangt in den letzten Jahren immer größere Bedeutung (Diogenes et al. 2013). Hierbei wurden bisher mesenchymale Stammzellen aus umliegenden Geweben wie der apikalen Papille als Quelle genutzt. Die mittlerweile etablierte Methode der Revaskularisation bei Zähnen der zweiten Dentition mit nicht abgeschlossenem Wurzelwachstum erzielt unter definierten Bedingungen eine ähnliche Erfolgsrate wie die Apexifikation (Alobaid et al. 2014). Bei der Revaskularisation folgt auf die vollständige Entfernung des ursprünglichen Pulpagewebes und Desinfektion der Hartgewebsstrukturen die Induktion einer Blutung aus dem apikalen Gewebe und damit die Einwanderung regenerationsfähiger Stammzellen (Stem Cells from the Apical Papilla, SCAP) (Galler 2016).

Nach Abschluss des Wurzelwachstums ist der Umfang der apikalen Papille wesentlich kleiner und durch die physiologische apikale Konstriktion schlecht bis gar nicht erreichbar. Eine Revaskularisation bei Zähnen mit abgeschlossenem Wurzelwachstum nach der oben genannten Methode hat dadurch eine deutlich schlechtere Erfolgsaussicht.

Um trotzdem die Bildung eines regenerationsfähigen Gewebes in der Pulpenhöhle zu induzieren, sind andere Quellen für mesenchymale Stammzellen denkbar

Mögliche Quellen wären die Pulpen anderer bleibender Zähne (DPSC), Milchzähne (SHED, Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous teeth) oder das Knochenmark (BMSC, Bone Marrow Stem Cells).

### 1.1 Dentale Stammzellen

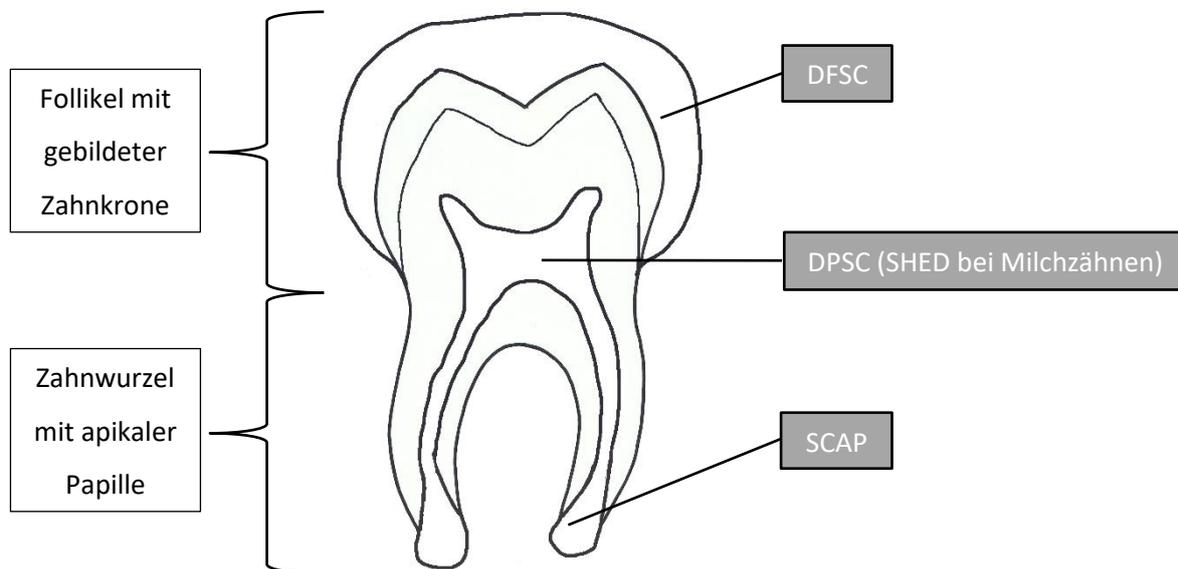


Abbildung 1: Darstellung der Entnahmeregionen für dentale Stammzellen

Abbildung 1 ist eine schematische Darstellung der Gewebestrukturen aus denen verschiedene dentale Stammzellpopulationen entnommen werden können. Aus dem Follikelsäckchen, das die schmelzbildenden Ameloblasten enthält, können DFSC (Dental Follicle Stem Cells) entnommen werden. Diese Zellen sind die einzigen dentalen Stammzellen ektodermalen Ursprungs.

Beim physiologischen Zahndurchbruch geht dieser Follikel verloren und darin enthaltene Strukturen zu Grunde. Auch bei der Extraktion von retinierten Zähnen mit noch erhaltenem Follikel wird dieses Gewebe meist so sehr geschädigt, dass eine Isolation von DFSC kaum noch möglich ist. Die erschwerte Entnahme und schwierige Kultivierung ist wahrscheinlich ein Grund, warum derzeit die Studienlage über DFSC noch wesentlich geringer ist als die über DPSC oder SHED.

Die Pulpenhöhle bleibender Zähne oder Milchzähne bietet dem darin enthaltenen Weichgewebe auch bei der Extraktion Schutz, so dass aus diesem Gewebe entweder DPSC bei bleibenden oder SHED bei Milchzähnen isoliert werden können.

Während des Wurzelwachstums ist auch an der Wurzelspitze noch eine Weichgewebsstruktur erhalten, deren Zellen Wurzeldentin und Wurzelzement bilden. Aus dieser Region entnommene Stammzellen werden als SCAP bezeichnet. Die Zellen sollen bei der oben genannten Revaskularisierung angeregt werden, in die Wurzel einzuwandern um ein reparatives Weichgewebe zu bilden.

Bei diesen Zellarten (außer DFSC) handelt es sich um multipotente adulte Stammzellen, die einer Determinierung auf mesenchymale Gewebearten wie z.B. Knochen- und Bindegewebe unterliegen (Liu et al. 2015). Bei der Proliferation multipotenter Stammzellen kommt es zu einer asymmetrischen Teilung, wobei eine der Tochterzellen den Stammzellcharakter vollständig verliert (Abbildung 2)(He et al. 2009).

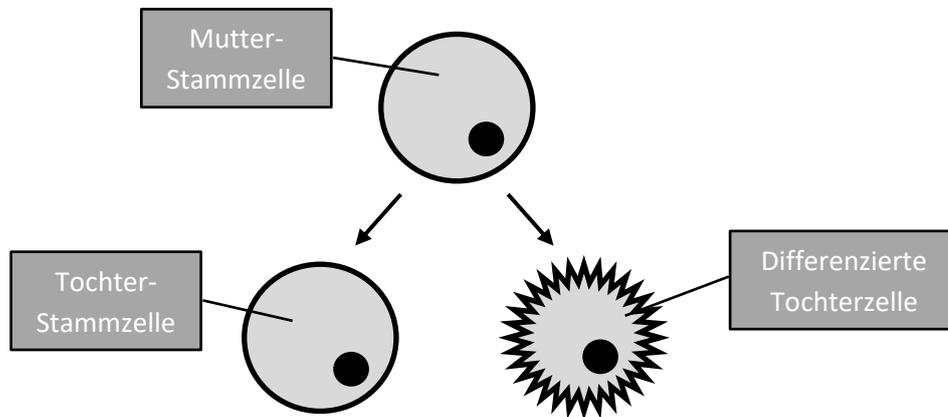


Abbildung 2: asymmetrische Teilung einer Stammzelle

Die Differenzierung mesenchymaler Stammzellen läuft schrittweise über Progenitorzellen ab (Abbildung 3), die ebenfalls noch teilungsfähig, aber gewebetypisch vordeterminiert sind. In manchen Geweben kann die letzte Differenzierungsstufe, durch Reparaturvorgänge nicht mehr erreicht werden. Bei der Reparatur der Odontoblastenschicht kommt es nur zur Bildung von odontoblastenähnlichen Zellen, da die vollständige Differenzierung durch die Vorgänge der Odontogenese beeinflusst wird (Smith et al. 2005).

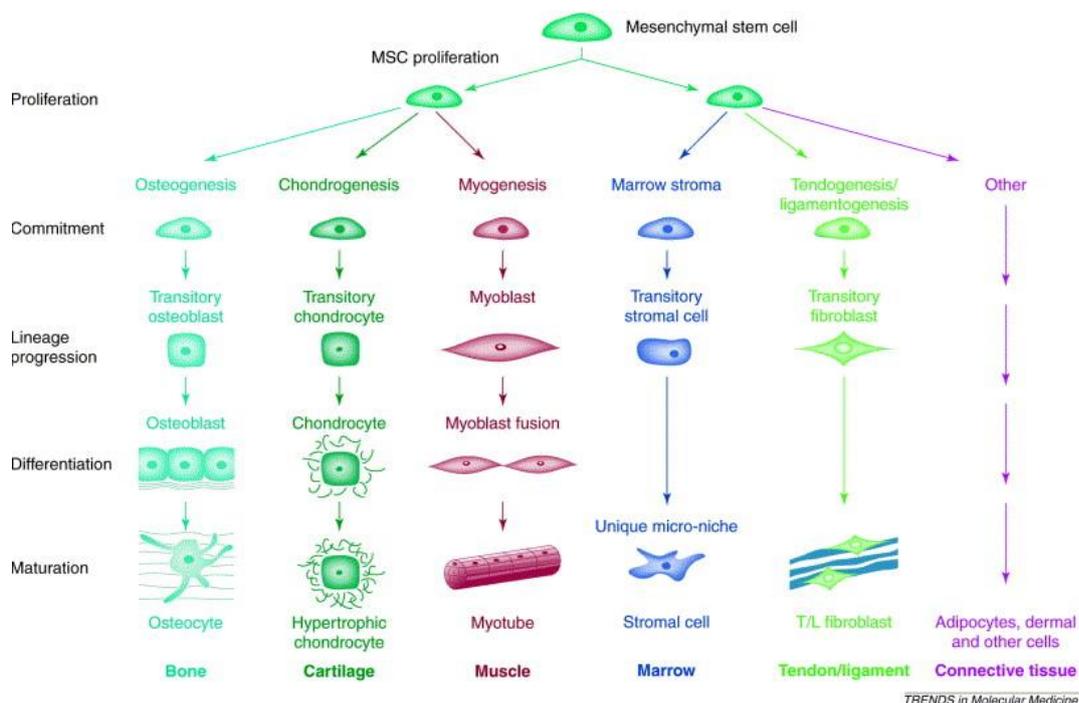


Abbildung 3: Darstellung der Differenzierungswege mesenchymaler Stammzellen (Caplan und Bruder 2001)

## 1.2 STRO-1 positive und STRO-1 negative Pulpazellen

Das Pulpengewebe setzt sich aus verschiedenen Zellarten wie z.B. Odontoblasten, Endothelzellen, Fibroblasten, Nervenzellen und mesenchymalen Stammzellen zusammen (Matthews et al. 1959). Dentale Pulpastammzellen dienen der physiologischen Regeneration des Pulpa-Dentin-Komplexes nach Abschluss des Zahnwachstums. Nach Bildung der regulären formgebenden Dentinstrukturen (Primärdentin) wird zeitlebens von Odontoblasten Sekundärdentin an der Innenseite des Pulpencavums gebildet. Durch Reize (z.B. Karies oder Traumata) kann diese Odontoblastenschicht geschädigt werden und die Zellen gehen zu Grunde. Ruhende mesenchymale Stammzellen aus dem Pulpagewebe treten daraufhin an die Stelle der Odontoblasten und bilden als odontoblast-like Cells Tertiärdentin oder auch Reizdentin (Goldberg und Smith 2004).

Nach der Isolierung von Zellen aus dem Pulpagewebe extrahierter Zähne, können diese durch FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting) in STRO-1 positive DPSC und STRO-1 negative DPC- sortiert werden.

Das Protein STRO-1 ist ein etablierter Oberflächenmarker für mesenchymale dentale Stammzellen (Gronthos et al. 2003; Simmons et al. 1994). Es gehört zu den CD-Markern (Clusters of Differentiation) und ist ein Trypsin-resistentes Antigen. Die Sortierung mit STRO-1 ermöglicht die Bildung von Zellpopulationen mit einem hohen Anteil an mesenchymalen dentalen Stammzellen. Die STRO-1 negativ sortierten Populationen enthalten Zellen, die ihren Stammzellcharakter zum größten Teil verloren haben und in ihrer Differenzierung weit vorangeschritten sind. Sie sorgen *in vivo* für die Ernährung (Kapillargefäße), dienen als Rezeptoren oder bilden das bindegewebige Gerüst (Fibroblasten).

Allein der Kontakt zu Dentinoberflächen kann die Differenzierung der DPSC in die osteogene bzw. odontogene Richtung beeinflussen (Liu et al. 2016), allerdings beeinflusst auch die Länge der Kultivierung der Zellen nach der Isolation das Differenzierungspotenzial (Kanafi et al. 2013). Die Signalwege der verschiedenen Differenzierungen von DPSC sind bisher nicht geklärt. DPSC und DPC- wachsen *in vitro* adhärent und sind morphologisch Fibroblasten ähnlich. Ihr Wachstumsmuster unterscheidet sich in den unteren Passagen (Abbildung 4).

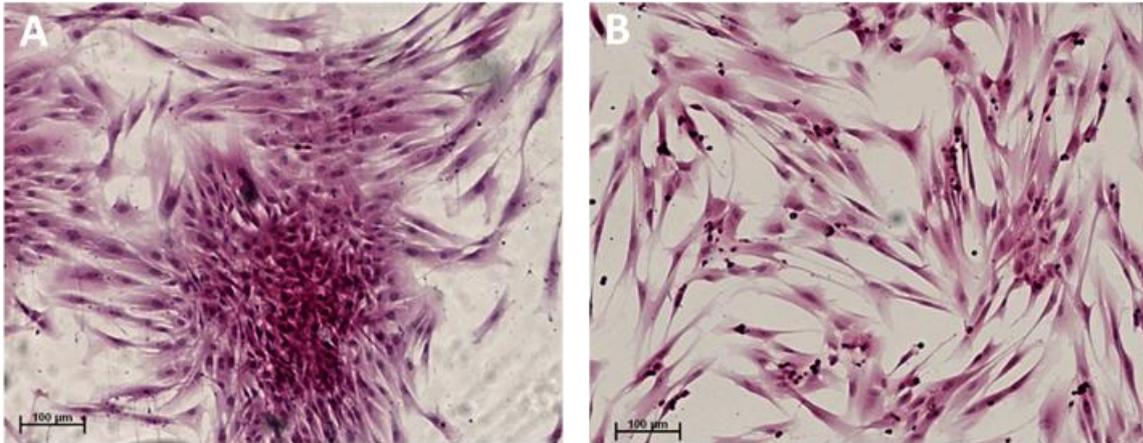


Abbildung 4: Wachstumsmuster humaner Pulpazellen, STRO-1 positiv sortierte Zellen (A) und negativ sortierte Zellen (B), HE-Färbung

### 1.3 Stimulantien

Um Einfluss auf die Differenzierung von Zellen zu nehmen, können bei *in vitro*-Versuchen dem Zellmedium verschieden Zusätze beigegeben werden. Als Stimulanz eignen sich z.B.

Wachstumsfaktoren, Botenstoffe oder Enzymsubstrate um optimale Umstände zu generieren oder Interaktion mit umliegenden Geweben zu simulieren.

#### EGF

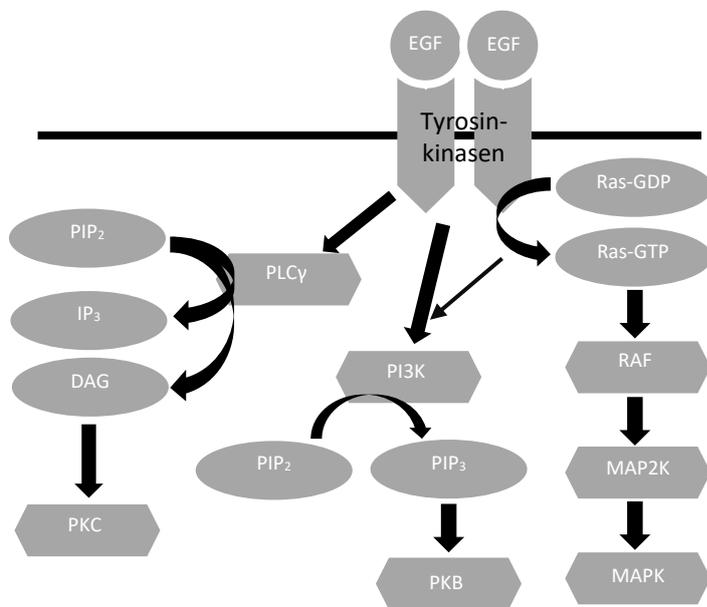


Abbildung 5: Signalkaskaden von EGF

Der Epidermale Wachstumsfaktor bindet als einer von vielen verschiedenen Liganden (bspw. TGF  $\alpha$ , Amphiregulin, etc.) an einen spezifischen Transmembranrezeptor von denen vier Typen bekannt sind

(EGFR1-4, Epidermal Growth Factor Receptor). Zwei benachbarte Rezeptoren bilden eine dimere Struktur und aktivieren so gegenseitig ihre intrinsische Tyrosinkinaseaktivität. Dadurch werden mehrere Signalkaskaden ausgelöst (Abbildung 5).

Durch die Phosphorylierung von Ras-GDP zu Ras-GTP wird die MAP-3-Kinase RAF (Mitogen-aktivierte Proteinkinase-kinase-kinase) aktiviert, die ihrerseits weitere Kinasen in einer Phosphorylierungskaskade aktiviert, die als Transkriptionsfaktoren im Zellkern Wachstum und Differenzierung beeinflussen (Oda et al. 2005).

Eine andere Signalkaskade verläuft über die Aktivierung von Phospholipase C (PLC $\gamma$ ) die das Phospholipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP $_2$ ) in Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP $_3$ ) und Diacylglycerin (DAG) spaltet. IP $_3$  setzt über Rezeptoren Ca $^{2+}$ -Ionen aus intrazellulären Speichern frei, die daraufhin zusammen mit DAG die Proteinkinase C (PKC) aktivieren. Proteinkinase C beeinflusst das Zellwachstum, eine übermäßige Aktivierung kann zu Tumorbildung und diabetischen Komplikationen führen (Koya und King 1998).

Auch Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) werden durch die Tyrosinkinasen der EGFR oder auch durch Ras-GTP aktiviert. PI3K phosphorylieren PIP $_2$  zur Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat (PIP $_3$ ), welches an Proteinkinase B (PKB) bindet und diese so aktiviert. Proteinkinase B hemmt die Apoptose und steigert die Proliferation und wirkt so auch proonkogen (Bader und Vogt 2005).

### b-FGF

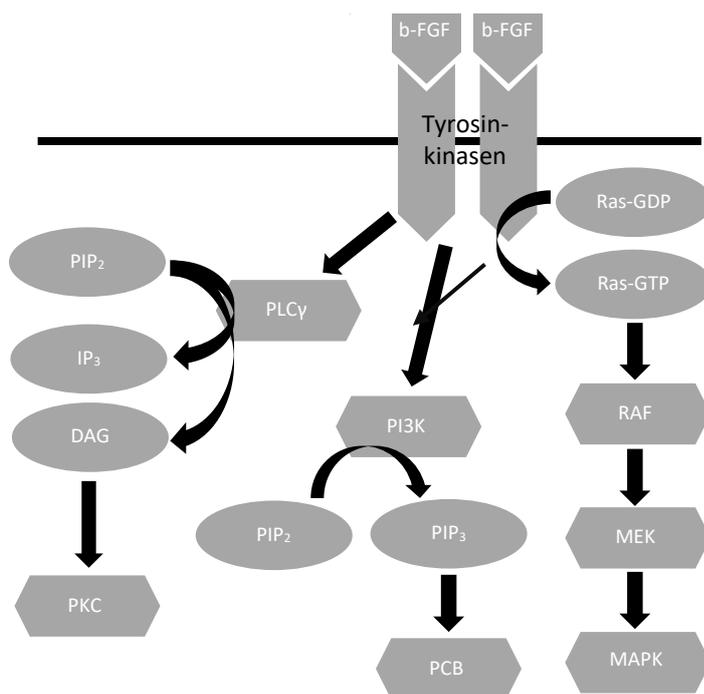


Abbildung 6: Signalkaskaden von b-FGF

Bisher sind 23 verschiedene Fibroblastenwachstumsfaktoren bekannt. b-FGF (auch FGF2) bindet an einen der vier verschiedenen Rezeptoren (FGFR 1-4, Fibroblast Growth Factor Receptors 1-4). Da es sich bei den FGFR ebenfalls um Tyrosinkinassen handelt werden die gleichen Signalkaskaden ausgelöst wie bei der Aktivierung des EGFR durch EGF (Dalton 2013)(Abbildung 6). FGF stimulieren ebenfalls das Zellwachstum und spielen bei der Organ- und Skelettentwicklung eine wichtige Rolle (Teven et al. 2014).

### PMA

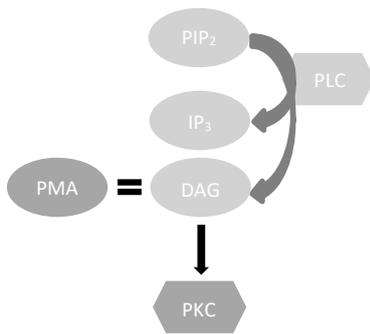


Abbildung 7: Signalweg von PMA

Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) gehört zur Gruppe der Phorbolster. Da seine Molekülstruktur der Struktur von DAG ähnelt, aktiviert PMA direkt das Enzym Proteinkinase C (Castagna et al. 1982). PMA ermöglicht einen speziellen Signalweg ohne Umwege über Rezeptoren zu stimulieren (Abbildung 7). Eine Änderung des Expressionsverhaltens oder der Morphologie nach Inkubation mit PMA kann also einen Rückschluss darauf ermöglichen, dass diese Veränderung durch eine Aktivierung der Phospholipase C beeinflusst wird.

### Forskolin

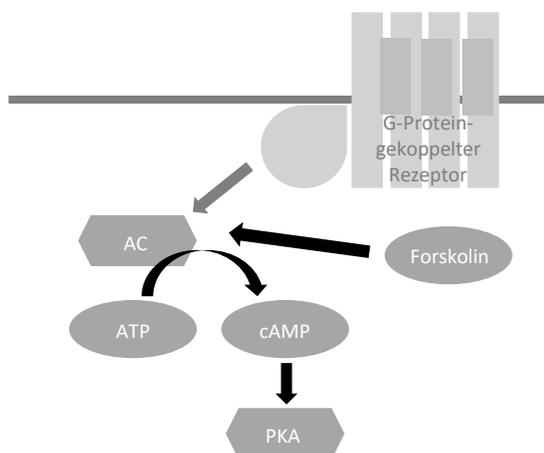


Abbildung 8: Signalweg von Forskolin

Forskolin ist ein Diterpen, das direkt mehrere Formen der Adenylatcyclase (AC) aktiviert. Das aktivierte Enzym bildet durch Abspaltung von Pyrophosphat aus ATP den sekundären Botenstoff cAMP. Intrazellulär vorhandenes cAMP aktiviert das Enzym Proteinkinase A (**Abbildung 3**Abbildung 8), das durch Phosphorylierung die Aktivität weiterer Enzyme und Regulatorproteine beeinflusst. So wie auch die Stimulaton mit PMA umgeht eine Stimulation mit Forskolin den Signalweg über spezifische Rezeptoren, so dass direkt der Einfluss von PKA bewertet werden kann. PKA ist an der Regulation einer Vielzahl zellulärer Prozesse wie Entwicklung, Differenzierung, Apoptose, Immunantwort und Gedächtnisbildung beteiligt. (Skalhegg und Tasken 2000)

### TGF $\beta_1$

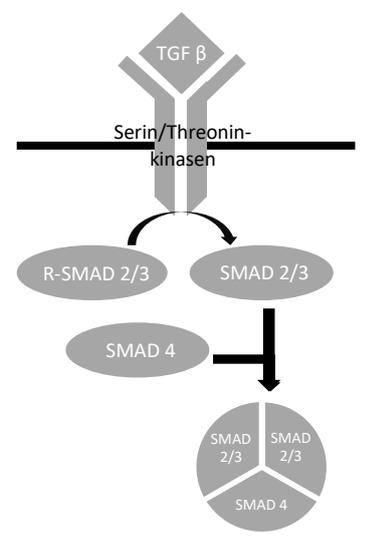


Abbildung 9: Signalkaskade von TGF $\beta_1$

TGF  $\beta_1$  gehört zur Familie der Transforming Growth Factors. Es gibt 22 verschiedene Liganden und vier verschiedene Rezeptoren. Die Rezeptoren sind membrangebundene Serin/Threoninkinasen und phosphorylieren nach Ligandenbindung die R-SMADs 2 und 3 (Abbildung 9). Diese aktivierten Varianten bilden mit SMAD 4 einen Komplex, der im Zellkern aktiv Genexpression verstärken kann (Horbelt et al. 2012). Die TGF  $\beta$ -Isomere wirken über ihre Signalkaskade antiproliferativ und fördern die Differenzierung. Außerdem hat TGF  $\beta$  eine immunmodulierende Wirkung auf T-Zellen (Rahman et al. 2015; Gorelik und Flavell 2002).

Bei der Differenzierung zu Odontoblasten kommt es zeitabhängig zur Expression verschiedener Proteine. Eine Verstärkung der Expression dieser Proteine kann also ein Hinweis auf die Differenzierung der Zellen zu odontoblastenähnlichen Zellen sein. Zu diesen Proteinen gehören u.a. DSPP und ALP.

#### 1.4 DSPP

Dentinsialophosphoprotein gehört zur Gruppe der SIBLING-Proteine (Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoproteins), die zur Matrix bei der Mineralisierung von Knochen- und Dentingewebe gehören. Außer DSPP gehören OPN (Osteopontin), BSP (Bone Sialoprotein), DMP 1 (Dentin Matrix Protein 1) und MEPE (Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein) dazu (Wu und Wang 2019). DSPP wird als ein großes Glycoprotein translatiert und danach proteolytisch in drei Untereinheiten gespalten (Abbildung 10). Die Untereinheiten sind Dentinsialoprotein (DSP), Dentinglycoprotein (DGP) und Dentinphosphoprotein (DPP) (Gu et al. 2000).

Zuerst folgt die Abspaltung des ca. 98-100 kDa großen DPP, danach werden DSP und DGP durch Proteasen getrennt. Abhängig von der aktiven Matrixmetalloprotease (MMP-2 oder MMP-20) entstehen verschiedene Spaltprodukte von DSP und DGP. Dies führt zu einer größeren Streuung in der Proteingröße von 100-280 kDa bei DSP und 16-22 kDa bei DGP (Yamakoshi 2009). Die sich aus DSPP ableitenden Proteine und Kollagen Typ I bilden den größten Anteil an Proteinen in humanem Dentin. DPP ist unter den nicht-kollagenen Matrixproteinen das Häufigste (Arnold 2006).

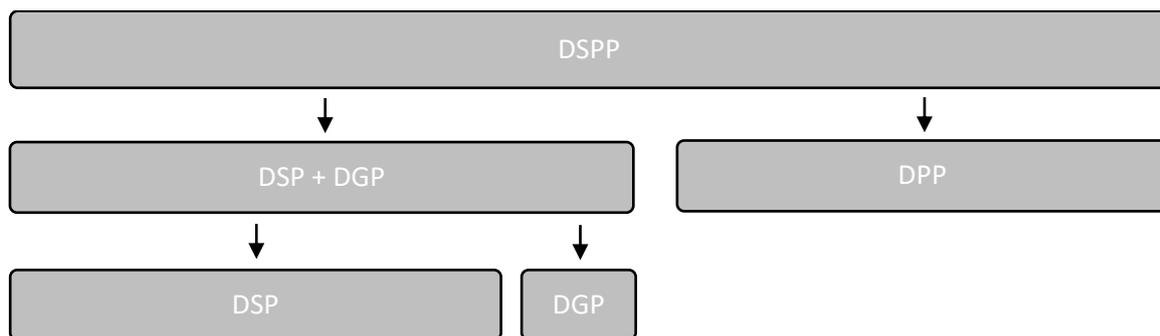


Abbildung 10: Schema der proteolytischen Spaltung von DSPP (Fujisawa und Tamura 2012)

#### 1.5 Maspin

Maspin (mammary serpin) gehört zur Gruppe der nicht inhibierenden Serine-Protease-Inhibitoren und wurde erstmals 1994 aus Mammakarzinom-Zelllinien isoliert (Sager et al. 1994). Seitdem wurde Maspin in vielen anderen Tumoren nachgewiesen. Auch in Ameloblastomen und während der physiologischen Zahnentwicklung wurde die Expression von Maspin nachgewiesen (Kumamoto und Ooya 2007; Davaadorj et al. 2010). Die genaue Funktionsweise von Maspin ist bisher ungeklärt. In vielen Studien wurde eine Tumorsuppressive Wirkung durch die Drosselung der Angiogenese und Stabilisierung extrazellulärer Matrices vermutet, allerdings entwickelten sich Maspin-Knockout-Mäuse annähernd normal (Teoh et al. 2014).

## 1.6 ALP

Alkalische Phosphatasen sind ubiquitär exprimierte Enzyme, die bei erhöhtem pH-Wert die Hydrolyse von Phosphorsäureestern katalysieren. Im menschlichen Körper kommen vier gewebespezifische Isoformen vor, die Plazenta-ALP (PL ALP), die intestinale ALP (I ALP) die Keimzell-ALP (GC ALP) und die nicht-gewebespezifische alkalische Phosphatase, die vermehrt in Leber-, Knochen und Nierengewebe vorkommt. Diese Isoform wird auch als L/B/K ALP (Liver/Bone/Kidney ALP) oder TN ALP (tissue-nonspecific ALP) bezeichnet (Sharma et al. 2014). Die durch ALP freiwerdenden Phosphatgruppen bilden mit Calcium Hydroxylapatit und werden für die Mineralisation von Geweben wie Knochen und Zahn benötigt (Obermayer-Pietsch und Schwetz 2016).

TN ALP ist bei verändertem Knochenstoffwechsel (z.B. bei physiologischem Wachstum oder Knochentumoren) auch im Blut nachweisbar und dient klinisch zur Diagnostik.

Verstärkte Aktivität von ALP ist auch während der Zahnentwicklung sowohl im Schmelzorgan als auch in der direkten Nähe der Odontoblastenschicht nachweisbar (Woltgens et al. 1995). Eine hohe Expression von ALP lässt also auf eine erhöhte Kalzifikation schließen, so kann ALP als Kalzifizierungsmarker *in vitro* und *in vivo* verwendet werden (Golub und Boesze-Battaglia 2007).

## 2 Zielstellung

Die regenerative Endodontie könnte eine Alternative zur konventionellen Endodontie werden. Der Erhalt der Vitalität würde sich positiv auf die mechanischen Eigenschaften des Zahnes auswirken. Dies würde in einer gesteigerten Überlebensrate resultieren (Widbiller 2019).

Die Determinierung der zu verwendenden Zellen durch Wachstumsfaktoren könnte die Bildung eines reparationsfähigen Pulpagewebes positiv beeinflussen. Da die Studienlage hierzu noch unvollständig ist, muss weiteres Wissen über die genauen Differenzierungsvorgänge und die verantwortlichen Signalwege durch neue Studien gewonnen werden.

Ziel dieser Arbeit war es die Expression von DSPP bei DPSC und DPC- auf RNA- und Proteinebene nach Stimulation mehrerer Signalkaskaden durch die Stimulantien PMA, EGF, b-FGF, Forskolin und TGF  $\beta_1$  zu untersuchen. Eine Regulation der Expression von DSPP nach der Stimulation kann Rückschlüsse auf die bei der Dentinogenese wirkenden Signalwege zulassen.

Die Studienlage für die Expression für Maspin in odontogenen Geweben ist sehr gering. In dieser Arbeit sollte die Expression von Maspin in DPSC und DPC- beurteilt werden, eine Regulation durch die durchgeführte Stimulation würde ebenfalls auf die zur Expression führenden Signalwege schließen lassen.

Die reine Expression von Genen und Proteinen ist nur eine Sicht um Differenzierungsvorgänge zu beurteilen. Zusätzlich zeigen differenzierte Zellen eine erhöhte Aktivität gewebespezifischer Enzyme. Für diese Arbeit wurde die alkalische Phosphatase als Marker für die Bildung mineralisierten Gewebes ausgewählt und die Aktivität der ALP sollte nach der Stimulation der Signalkaskaden gemessen werden.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Chemikalien, Geräte und Hilfsmittel

##### 3.1.1 Chemikalien (alphabetische Reihenfolge)

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller, Ort, Land</b>
5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix	Solis BioDyne OÜ, Tartu, Estonia
Ammoniumperoxodisulfat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Amphotericin B	Gibco™, Paisley, Scotland
Pen Strep (Penicillin 10000U/ml, Streptomycin 10mg/ml)	Gibco™, Paisley, Scotland
bFGF Recombinant Human Protein	Gibco™, Paisley, Scotland
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad, München, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Collagenase Type I	Gibco™, Paisley, Scotland
Chloroform	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
CHAPS	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Dispase II	Gibco™, Paisley, Scotland
Dithiothreitol	Carl Roth GmbH + Co KG Karlsruhe, Deutschland
dNTP Set	Invitek Molecular GmbH, Berlin, Deutschland
EGF Recombinant Human Protein	Gibco™, Paisley, Scotland
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Forskolin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Fetal Bovine Serum	Gibco™, Paisley, Scotland
Glycine	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
HBSS	Gibco™, Paisley, Scotland
Human TGF β1 Recombinant Protein, eBioscience™	Invitrogen™, Carlsbad, USA

Isopropylalkohol	Carl Roth GmbH + Co KG Karlsruhe, Deutschland
L-Ascorbinsäure-2-phosphat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
L-Glutamin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Magermilchpulver	TSI GmbH & Co. KG, Zeven, Deutschland
MEM $\alpha$ , no nucleosides	Gibco™, Paisley, Scotland
Methanol	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
MTT	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Phorbol-12-myristate-13-acetate	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Phosphat Buffered Saline	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Random Primer	Invitrogen™, Carlsbad, USA
RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor	Invitrogen™, Carlsbad, USA
Rothiphorese NF-Acrylamid/Bis- Lösung 30% (29:1)	Carl Roth GmbH + Co KG Karlsruhe, Deutschland
SuperScript™ II Reverse Transcriptase	Invitrogen™, Carlsbad, USA
SDS	GE Healthcare, Chicago, USA
Tetramethylethylendiamin	Bio-Rad, München, Deutschland
Thiourea	GE Healthcare, Chicago, USA
Trishydroxymethylaminomethan	Carl Roth GmbH + Co KG Karlsruhe, Deutschland
TRizol Reagent	Invitrogen™, Carlsbad, USA
Trypsin-EDTA 0,05, phenol red%	Gibco™, Paisley, Scotland
Tween20	SERVA, Heidelberg, Deutschland
UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water	Carl Roth GmbH + Co KG Karlsruhe, Deutschland
Urea	GE Healthcare, Chicago, USA

### 3.1.2 Geräte (alphabetische Reihenfolge)

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller, Ort, Land</b>
BD FACS Aria™ II	BD Biosciences, San Jose, USA
Brutschrank Cytoperm 2	Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland
ChemiDoc™ Touch Imaging System	Bio-Rad, München, Deutschland
Mikroplatten-Reader Sunrise™	TECAN Group AG, Männedorf, Schweiz
Heizblockthermostat 133	Haep Labor Consult, Bovenden, Deutschland
Mikroskop Axiovert 25	ZEISS, Jena, Deutschland
Minigelkammer Protean II	Bio-Rad, München, Deutschland
Pipette Pipetus	Hirschman Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Pipetten Multipette plus	Eppendorf-Netheter-Hinz, Hamburg, Deutschland
PowerPAC 200	Bio-Rad, München, Deutschland
PowerPAC 300	Bio-Rad, München, Deutschland
Reinraumbank HERAsafe HS	Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland
Rotor-Gene Q 2plex Platform	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Orbital Schüttel-Misch-Gerät 3005	GFL, Burgwedel, Deutschland
T3 Thermocycler	Biometra, Göttingen, Deutschland
Trans-Blot® Cell	Bio-Rad, München, Deutschland
UV-Visible Spectrophotometer UV-1602	Shimadzu, Kyoto, Japan
Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Waage SP32 O2 S	Sartorius Basic, Göttingen, Deutschland
Zentrifuge Biofuge primo R	Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland
Zentrifuge Galaxy 7D	VWR International, Darmstadt, Deutschland
Zentrifuge Rotanta/AP	Hettich AG, Bäch, Schweiz
Wasserbad WB 14	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Deutschland

### 3.1.3 Hilfsmittel, Primer und Antikörper (alphabetische Reihenfolge)

Hilfsmittel	Hersteller, Ort, Land
Amersham ECL Full-Range Rainbow Molecular Weight Markers	GE Healthcare, Chicago, USA
ECL Western Blotting Substrate	Pierce Biotechnology, Rockford, USA
Eppendorf-Röhrchen	Eppendorf-Netheter-Hinz, Hamburg, Deutschland
Amersham Hybond P 0.45 PVDF blotting membrane	GE Healthcare, Chicago, USA
Zellkulturflaschen (75cm <sup>2</sup> )	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
BD Falcon Cell Strainer, 70 µm	BD Biosciences, San Jose, USA
Zentrifugenröhrchen (15ml, 50ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland

**Tabelle 1: Primersequenzen für qPCR**

Primer		Sequenz 5'-3'	Basenpaare	Annealing Temperatur
DSPP	sense	TTC CGA TGG GAG TCC TAG TG	144	60°C
	antisense	TCT TCT TTC CCA TGG TCC TG		58°C
GAPDH	sense	ACC CAG AAG ACT GTG GAT GG	232	60°C
	antisense	TTC TAG ACG GCA GGT CAG GT		60°C
Maspin	sense	GGC AAT GTC CTC TTC TCT CCA A	72	62°C
	antisense	GTC ACC TTT AGC ACC CAC TT		58°C

**Tabelle 2: Antikörper für Western Blot**

Antikörper	Zielspezies	Ursprungsspezies	Hersteller	Puffer
Anti- $\beta$ -Actin-IgG	Human	Maus	Sigma	PBS
Anti-DSPP-IgG (LFMb-21)	Human	Maus	santa cruz biotechnology, Dallas, USA	TBS
Anti-Maspin-IgG (H-130)	Human	Kaninchen	santa cruz biotechnology, Dallas, USA	TBS
Anti-Mouse-IgG-HRP	Maus	Ziege	santa cruz biotechnology, Dallas, USA	PBS
Anti-Mouse IgG-R-Phycoerythrin	Maus	Ziege	MERCK KGaA, Darmstadt, Deutschland	
Anti-Rabbit-IgG-HRP	Kaninchen	Ziege	santa cruz biotechnology, Dallas, USA	TBS
Anti-STRO-1 IgM	Human	Maus	R&D Systems Inc., Minneapolis, USA	

### 3.2 Zellkultur

#### 3.2.1 Zellisolation und Proliferation

Die verwendeten Zähne wurden den Patienten bei indizierten operativen Weisheitszahnentfernungen entnommen. Die Patienten wurden aufgeklärt und gaben ihr Einverständnis zur experimentellen Verwendung. Umgehend nach Entnahme des Gewebes wurde es in HBSS transportiert.

Die Isolation erfolgte durch enzymatischen Verdau. Dafür wurde der Zahn geteilt und das entnommene Gewebe mit einem Skalpell zerkleinert (Abbildung 11). Das Weichgewebe wurde mit Collagenase I (3mg/ml) und Dispase (4mg/ml) für 90 Min. bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

Nach dem Verdau wurde das Gewebe durch ein Zellsieb filtriert und für 10 Min. bei 10U/min zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in  $\alpha$ -MEM ausgesät, wobei das Medium mit 10% FBS, L-Glutamin (289mg/l) und Ascorbinsäure (292mg/l) versetzt wurde.



Abbildung 11: eröffnete Zahn mit entnommener Pulpa

Dem Medium wurde primär Penicillin, Streptomycin und Amphotericin B beigefügt (Tabelle 3). Nach Etablierung der Kultur wurde das Antibiotikum reduziert und Amphotericin B nicht mehr verwendet (Tabelle 4).

**Tabelle 3: Isolationsmedium**

	Menge/Volumen
MEM $\alpha$ , no nucleosides	900ml
FBS	100ml
Pen Strep (Penicillin 10000U/ml, Streptomycin 10mg/ml)	15ml
L-Glutamin	0,2mM
L-Ascorbinsäure-2-phosphat	1mM
Amphotericin B	1,250mg/l

**Tabelle 4: Wachstumsmedium**

	Menge/Volumen
MEM $\alpha$ , no nucleosides	900ml
FBS	100ml
Pen Strep (Penicillin 10000U/ml, Streptomycin 10mg/ml)	5ml
L-Glutamin	0,2mM
L-Ascorbinsäure-2-phosphat	1mM

### 3.2.2 Zellsortierung

Nach ausreichender Vermehrung wurden die kultivierten Zellen per FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) in DPSC und DPC- getrennt. Als Primärantikörper zur Sortierung wurde der Stammzellmarker STRO-1 ausgewählt.

Die Zellen wurden trypsiniert und mit PBS gewaschen und resuspendiert. Danach wurde der primäre Antikörper hinzugegeben und die Zellen 30 Min. auf Eis inkubiert. Um unspezifische Bindungen zu reduzieren wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen. Als zweiter und fluoreszierender Antikörper wurde Phycoerythrin gewählt, ebenfalls mit den Zellen 30 Min. auf Eis inkubiert und danach gewaschen.

Nach der Sortierung wurde dem Zellmedium bis zur ersten Passage wieder die erhöhte Menge Antibiotikum und Fungizid beigegeben.

### 3.2.3 MTT-Assay

Für die Kultivierung von Zellen *in vitro* wird dem Zellmedium oft ein tierisches Serum wie FBS zugesetzt um durch die damit verbundene Beigabe verschiedener Wachstumsfaktoren und Proteine die Proliferation und Adhäsion zu steigern. Die genaue Zusammensetzung des FBS ist stark chargenabhängig und die genauen Konzentrationen der Proteine meistens unbekannt

Um für die Stimulation reproduzierbare Bedingungen zu schaffen sollte unter Erhalt einer geeigneten Proliferationsrate der Serumanteil im Medium auf die geringstmögliche Konzentration reduziert werden.

Diese Konzentration sollte mit einem MTT-Assay bestimmt werden. MTT ist ein gelbes Tetrazoliumsalz, das von den Zellen aufgenommen wird und von aktiv metabolisierenden Zellen zu einem violetten wasserunlöslichen Formazanfarbstoff reduziert wird. Dieser verbleibt in den Zellen und wird dann durch eine Lyse freigesetzt. Die Menge an umgesetztem MTT wird durch die Messung der Absorption bestimmt und steht mit der Anzahl an metabolisch aktiven Zellen in Korrelation (Gerlier und Thomasset 1986).

96-Well-Platten wurden mit  $3 \times 10^4$  Zellen in 200µl pro Well beimpft. Nach 24 Stunden mit Wachstumsmedium waren die Zellen adhärent. Darauf folgten weitere 24 Stunden mit serumfreien Medium und bis zu 72 Stunden Stimulationsmedium, wobei nach jeweils 24 Stunden ein Mediumwechsel erfolgte.

Zur Messung der Zellviabilität wurden die Zellen mit 20µl MTT-Lösung (5mg MTT in 5ml HBSS) für 4 Stunden inkubiert. Der Flüssigkeitsüberstand wurde entfernt und der Rückstand in je 100µl DMSO gelöst.

Die Absorption wurde mit dem Mikroplatten-Reader Sunrise™ der Firma TECAN Group AG bei 570nm Wellenlänge (Referenzwellenlänge 630nm) gemessen.

### 3.2.4 Stimulation

Für die Stimulation der verschiedenen Zelllinien wurden  $3 \times 10^5$  Zellen mit 12ml Wachstumsmedium in Zellkulturflaschen mit 75cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche ausgesät und bis zu einer Zellkonfluenz von ca. 70% inkubiert. Für 24 Stunden wurde das Medium auf  $\alpha$ -MEM ohne FBS gewechselt, die anderen Zusätze blieben wie bisher verwendet. Separate Stimulationsmedien wurden nach Tabelle 5 hergestellt und jeweils nach 24 Stunden erneuert. Für die Kontrollkultur wurde weiterhin das Medium ohne FBS verwendet.

**Tabelle 5: Stimulantien und Konzentrationen**

Stimulantien	Konzentration im Medium
EGF Recombinant Human Protein	1ng/ml
bFGF Recombinant Human Protein	10ng/ml
Forskolin	10 $\mu$ M
Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA)	10ng/ml
Human TGF $\beta$ 1 Recombinant Protein	10ng/ml

### 3.3 Isolation der RNA, RT-Herstellung und q-PCR

#### 3.3.1 Isolation der RNA

Die RNA wurde mit TRIzol™ Reagent (Thermo Fischer Scientific, USA) isoliert. Die Zellen wurden für 5 Min. bei Raumtemperatur mit der Lösung inkubiert, danach erfolgte nach Zugabe von Chloroform die Phasenbildung durch Zentrifugation mit 12.000g für 15 Min. bei 4°C. Es folgte eine Fällung der wässrigen Phase mit Isopropylalkohol für 10 Min. bei Raumtemperatur und ein erneuter Zentrifugationsschritt bei 12.000g für 10 Min. bei 4°C. Das so entstandene RNA-Pellet wurde zweimal mit 70%-igem Ethanol gewaschen, getrocknet und dann für 10 Min. bei 60°C in RNA-freiem Wasser gelöst. Die Proben wurden bei -80°C gelagert. Die Konzentration der RNA wurde photometrisch mit dem UV-Visible Spectrophotometer UV-1602 der Firma Shimadzu bestimmt.

#### 3.3.2 RT-Herstellung und q-PCR

Jeweils 1 $\mu$ g der isolierte RNA wurde in 10 $\mu$ l RNAasefreiem Wasser gelöst. Die so verdünnte RNA wurde gevortext, kurz zentrifugiert und im Thermocycler bei 75°C für drei Minuten denaturiert. Im Anschluss wurde die RNA mit SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen™, USA) nach modifiziertem

Produktprotokoll in cDNA umgewandelt (Tabelle 6). Mit der entstandenen cDNA konnte die Expression mit quantitativer PCR bestimmt werden. Für die qPCR wurde der 5x HOT FirePol® EvaGreen® qPCR Mix Plus (no ROX) der Firma Solis BioDyne genutzt und nach Herstellerangaben mit dem Rotor-Gene Q 2plex der Firma Quiagen angewandt.

**Tabelle 6: RT-Mix nach SuperScript™ II Reverse Transcriptase**

Komponente	Volumen
5 x RT-Puffer	5µl
12,5 mM dNTP-Mix	1µl
100 ng/µl Random Primer	3µl
0,1 M DTT	2,5µl
RNasin (40 U/µl)	0,5µl
Superscript II (200 µl)	0,3µl
DEPC-H <sub>2</sub> O	2,7µl

### 3.4 Isolation der Proteine und Western Blot

#### 3.4.1 Isolation der Proteine

Die Zellen wurden trypsiniert und mit PBS gewaschen, danach wurden die Proteine mit Lysepuffer (Tabelle 7) gelöst, zentrifugiert und bei -80°C gelagert. Die Vermessung der Proteinkonzentration erfolgte photometrisch nach der Bradford-Methode bei 480nm Wellenlänge. Verwendet wurde das Bio-Rad Protein Assay der Firma Bio-Rad und das UV-Visible Spectrophotometer UV-1602 der Firma Shimadzu.

**Tabelle 7: Lysispuffer**

Chemikalie	Menge
7M Urea	4,2g
2M Thiourea	1,524g
4% CHAPS	0,4g
40mM DTT	0,0616g
cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail	1 Tablette
in 10ml Aqua bidest	

### 3.4.2 Western Blot

Die Proteine wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Gele auf Acrylamidbasis wurden nach Tabelle 8 und Tabelle 9 gegossen. Die Proben wurden mit Ladepuffer (Tabelle 10) versetzt, bei 95°C für 5 min im Heizblockthermostat 133 der Firma Haep Labor Consult denaturiert und zusammen mit einem Full Range Marker aufgetragen. Die angelegte Stromstärke betrug maximal 40mA pro Gel mit dem Labornetzgerät PowerPAC 200 der Firma Biorad.

**Tabelle 8: Sammelgel**

<b>Sammelgel 4%</b>	<b>2 ml</b>
Aqua bidest.	1,4 ml
Rothiphorese NF-Acrylamid/Bis- Lösung 30% (29:1)	0,33 ml
1 M Tris (pH 6,8)	0,25 ml
10% SDS	0,02 ml
10% APS	0,02 ml
TEMED	0,002 ml

**Tabelle 9: Trenngel**

<b>Trenngel 12%</b>	<b>10 ml</b>
Aqua bidest.	3,3 ml
Rothiphorese NF-Acrylamid/Bis- Lösung 30% (29:1)	4,0 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5 ml
10% SDS	0,1 ml
10 % APS	0,1 ml
TEMED	0,004 ml

Beim Blottvorgang erfolgte der Nasstransfer der Proteine vom Gel auf eine PVDF Membran mit der Trans-Blot® Cell bei 6°C mit einer angelegten Stromstärke von 1A über 2 Stunden mit dem Labornetzgerät PowerPAC 300 der Firma Biorad. Dafür wurde der in Tabelle 11 beschriebene Transferpuffer verwendet.

**Tabelle 10: Ladepuffer**

Chemikalie	Menge/Volumen
Tris/HCl 1M pH 6,8	2,4ml
Glycin	4ml
SDS	0,8g
40mM DTT	0,154g
in 10ml Aqua bidest, danach 0,01% Bromphenolblau zugeben	

**Tabelle 11: Transferpuffer**

Chemikalie	Menge/Volumen
Glycin	42 g
Tris	9 g
Methanol	600ml
in 2l Aqua bidest.	

### 3.4.3 Proteindetektion

Im Anschluss an den Blottvorgang wurden die unspezifischen Bindungsstellen mit einer 5%igen Milchpulverlösung für 1 Stunde geblockt und die Membran mit dem spezifischen Antikörper (Tabelle 2) über Nacht bei 4°C inkubiert. Am Folgetag wurde die Membran mit einer antikörperabhängigen Pufferlösung (z.B. TBS-T) dreimal für 10 Min. gewaschen und danach mit einem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper für 1 Stunde inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde wieder durch Waschen mit Pufferlösung entfernt. Als Substrat für HRP wurde die Membran für 1 Min. mit ECL inkubiert und die Chemolumineszenz mit dem ChemiDoc™ Touch Imaging System der Firma Bio-Rad gemessen. Die Grauwertbestimmung der Banden erfolgte mit dem Programm Alpha View SA der Firma ProteinSimple. Zur Normalisierung wurde die Chemolumineszenz bei Inkubation mit einem Anti-β-Aktin-Antikörper bestimmt.

### 3.5 ALP Assay

Als funktioneller Assay wurde das Amplitude™ Colorimetric Alkaline Phosphatase Assay Kit \*Yellow Color\* der Firma AAT Bioquest® genutzt. Das Kit wurde mit adhärenenten Zellen in 96-Well-Platten verwendet. Die Zellen wurden über 4 und 5 Tage stimuliert. Nach 60 Min. Inkubationszeit bei 37°C erfolgte die Messung der Absorption mit dem Mikroplatten-Reader Sunrise™ der Firma TECAN Group

AG bei 400nm Wellenlänge. Anhand einer Standardkurve konnte dann die Aktivität der alkalischen Phosphatase in mU/ml bestimmt werden.

### **3.6 Statistische Auswertung**

Um signifikante Unterschiede zwischen den Messwerten der verschiedenen Assays zu beurteilen erfolgte die statistische Auswertung der Ergebnisse mittels zweiseitigem t-Test. Es wurde ein Signifikanzniveau von  $\alpha=0,05$  verwendet. Dementsprechend wurden Ergebnisse mit einem p-Wert kleiner als 0,05 als statistisch signifikant erachtet.

### **3.7 Ethikvotum**

Das Forschungsprojekt „Tissue Engineering der Zähne“, zu dem diese Arbeit zählt, erhielt am 13.01.2010 ein positives Votum der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 FACS

Nach der Isolierung der Pulpazellen aus den extrahierten Zellen wurden Zellen vermehrt und in einer geringen Passage (vor der vierten Passage) durch Durchflusszytometrie sortiert. Abbildung 12 zeigt das Ergebnis einer Sortierung.

Die verschiedenen ausgerichteten Laser des Durchflusszytometers ermöglichen die Beurteilung der Zellgröße durch Unterbrechung des Lichtstrahls (Forward Scatter, FSC-A) und Beurteilung der Zellkörnigkeit durch Streuung des Lichtstrahls (Side Scatter, SSC-A). Nach Messung der Autofluoreszenz (ohne Abbildung) wurden die Zellen anhand der Signalstärke des konjugierten Farbstoffs Phycoerythrin (PE-A) in Abhängigkeit von der Zellgröße und Zellkörnigkeit in STRO-1 negative (P1) und STRO-1 positive Zellen (P2) unterteilt. Für diese Beispielprobe ergab sich eine Verteilung von 70,5% STRO-1 negativen und 2,5% STRO-1 positiven Zellen. In allen sortierten Proben ergaben sich Werte von 0,5-3% an DPSC.

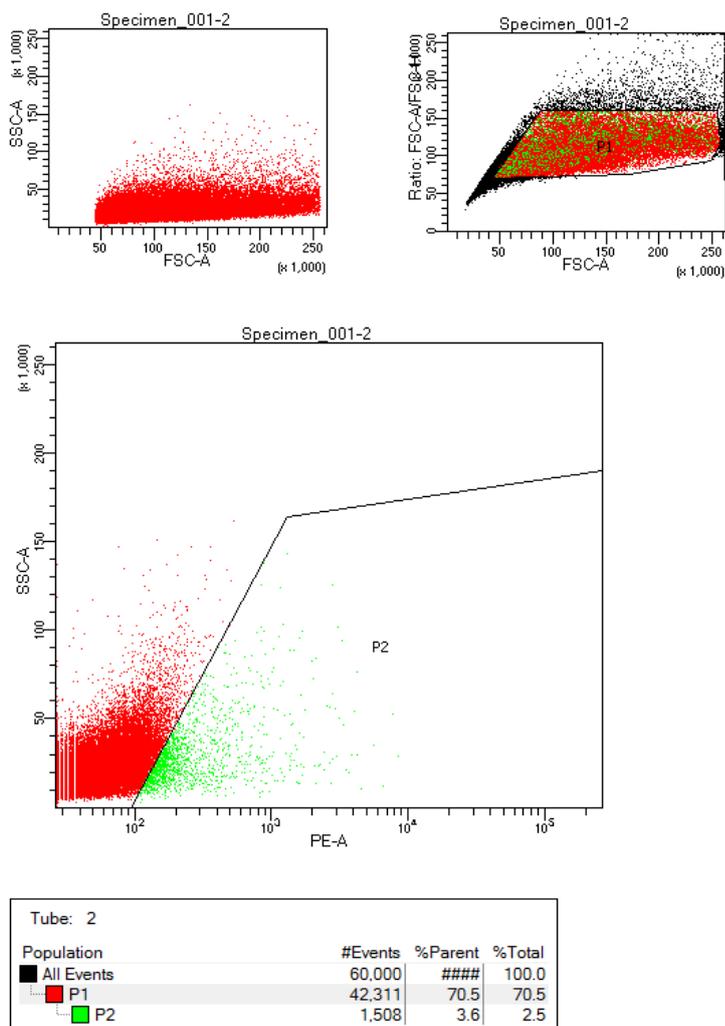


Abbildung 12: Ergebnisse einer Sortierung von DPC mit STRO-1 mittels Durchflusszytometrie

## 4.2 MTT-Assay

Die Absorptionsmessung des MTT-Assays mit FBS-Konzentrationen von 0-10% über 24, 48 und 72 Stunden ergab mit Erhöhung der FBS-Konzentration eine gesteigerte Proliferationsrate. Allerdings zeigte auch die Kultur ohne FBS-Zusatz eine stabile Zellzahl mit geringer Proliferationsrate, so dass für die Zeit der Stimulation auf FBS im Medium verzichtet werden konnte. Die Zellen wurden 24h vor der Stimulation auf serumfreies Medium umgestellt (Abbildung 13).

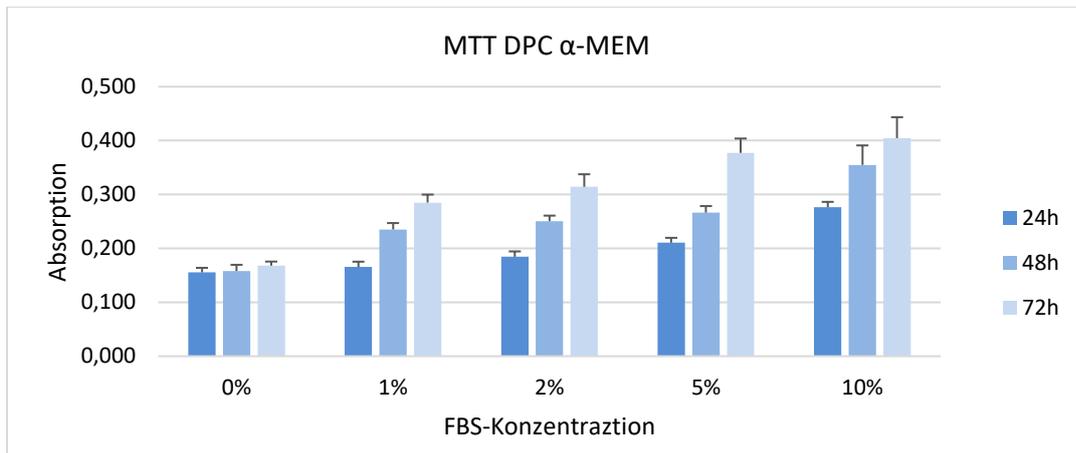


Abbildung 13: MTT-Assay von DPC mit verschiedenen FBS-Konzentrationen im Medium

## 4.3 DSPP

### 4.3.1 RNA-Expression

Die nach 24, 48 und 72 Stunden isolierte RNA wurde durch reverse Transkriptase in cDNA umgewandelt und dann mittels q-PCR auf die Expression des Gens DSPP untersucht. Zur Normalisierung der Ergebnisse wurde die RNA-Expression von GAP-DH bestimmt und herangezogen (Abbildung 14).

Im Verlauf der Stimulation ergab sich für die Kontrollzellen der Zellpopulationen von DPSC und DPC-keine Veränderung in der Expression des Gens. Auch bei der Stimulation mit TGF  $\beta_1$  kam es zu keiner Veränderung der Expression.

Bei anderen Stimulantien kam es zu einer Regulation der DSPP-Genexpression.

Eine signifikante Verringerung der Expression fand bei der Stimulation von DPSC mit PMA ( $p=0,016$ ) und EGF ( $p=0,023$ ) über 24 Stunden statt. Diese anfängliche Reduktion der Expression durch PMA und EGF in Bezug auf die unstimulierte Kontrolle war nach 72 Stunden nicht mehr nachweisbar, es kam sogar zu einer Steigerung der Expression über die Zeit.

Die anderen Stimulantien zeigten ebenfalls eine Regulation der DSPP-Expression bei DPSC, b-FGF zeigte einen ähnlichen Verlauf wie PMA, EGF und Forskolin löste nach 24 Stunden einen Anstieg der Expression aus, der nach 48 Stunden allerdings wieder das Niveau der unstimulierten Kontrolle erreichte.

Die Resonanz auf die Stimulation war die DSPP-Expression im Ganzen bei den DPSC stärker ausgeprägt als bei den DPC-. Ein hemmender Effekt von PMA war auch bei DPC- sichtbar, dieser war allerdings erst nach 48 Stunde signifikant ( $p=0,035$ ). EGF und Forskolin senkten die Expression, TGF  $\beta_1$  zeigte keine Veränderung in Versuchszeitraum.

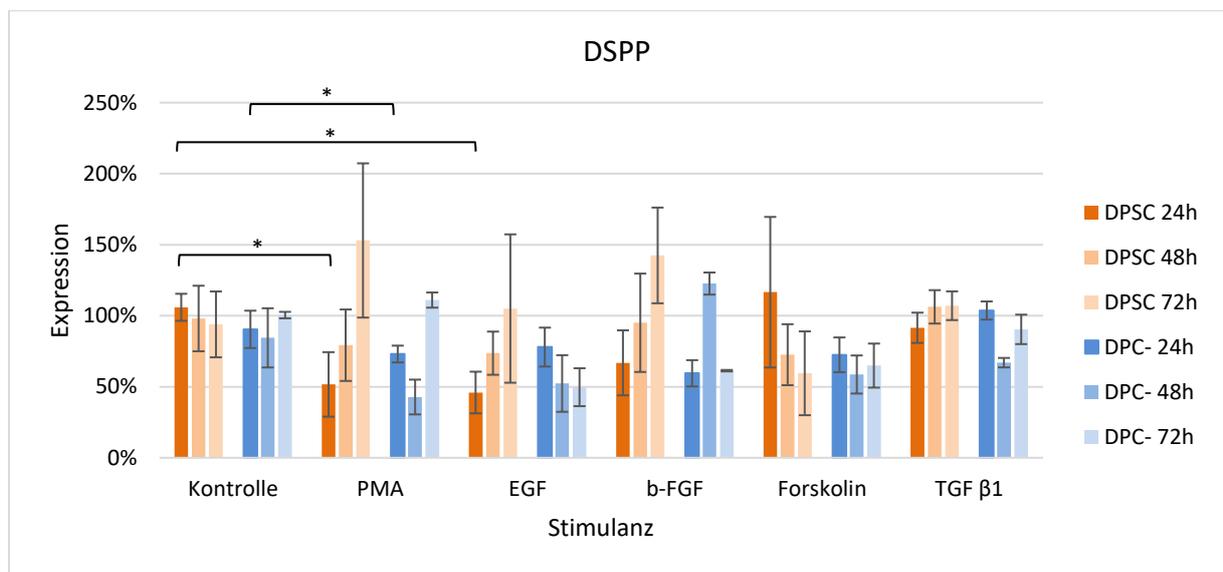


Abbildung 14: RNA-Expression von DSPP in Prozent zur unstimulierten Kontrolle

#### 4.3.2 Proteinexpression

Die Proteindetektion von DSPP führte zu der Darstellung mehrerer Banden im Western Blot im Bereich von 100-130 kDa (Abbildung 15). Die Banden werden einerseits durch die verschiedenen Proteine DSPP, DPP und DSP, als auch durch mehrere proteolytische Stadien der Teilung von DSPP in DPP, DSP und DGP erzeugt. Für die Auswertung wurden die Regionen aller Banden herangezogen. Die Auswertung bezieht sich auf die mitgeführte unstimulierte Kontrolle der gleichen Inkubationszeit.

Die in Abbildung 16 dargestellten normalisierten Expressionswerte bestätigen die Werte der RNA-Expression. Auch auf Proteinebene war bei den DPSC durch die Inkubation mit PMA, EGF und b-FGF eine reduzierte Expression im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle messbar. Diese anfängliche Verringerung ist nach 48 Stunden nicht mehr nachweisbar. Die Expression bei den STRO-1 positiven Zellen war bei allen Populationen nach 72 Stunden ungefähr auf einem Niveau.

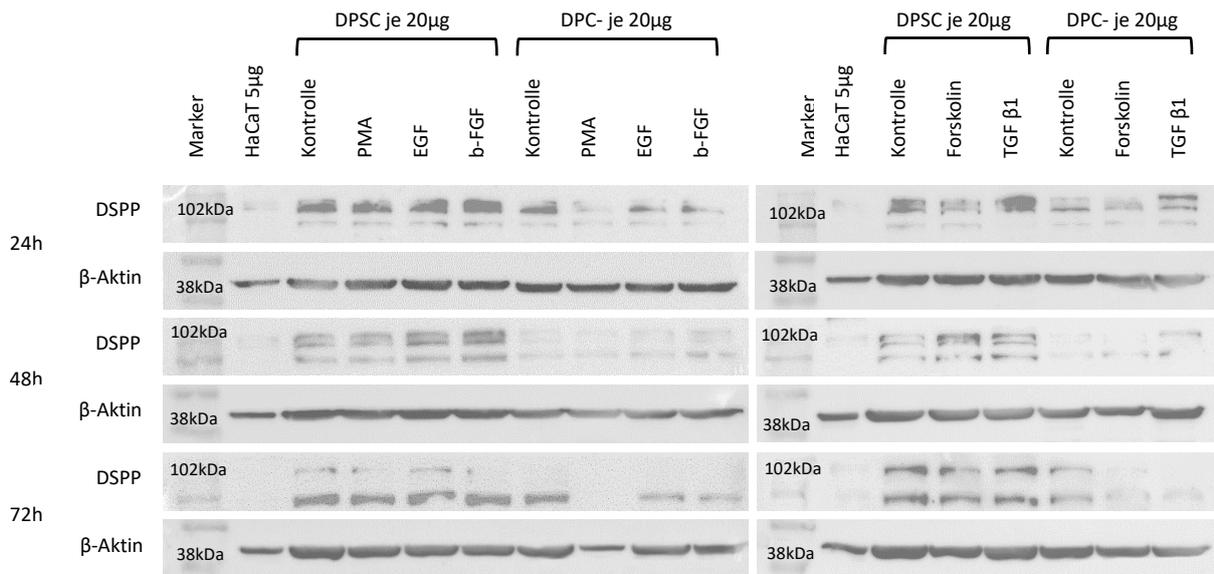


Abbildung 15: Western Blot mit DSPP 1:100

Bei den STRO-1 negativen Zellen führt die Stimulation mit Forskolin über den gesamten Versuchszeitraum zu einer Reduzierung der Expression. Generell kommt es nach 72 Stunden zu einer verringerten Expression von DSPP in DPC-.

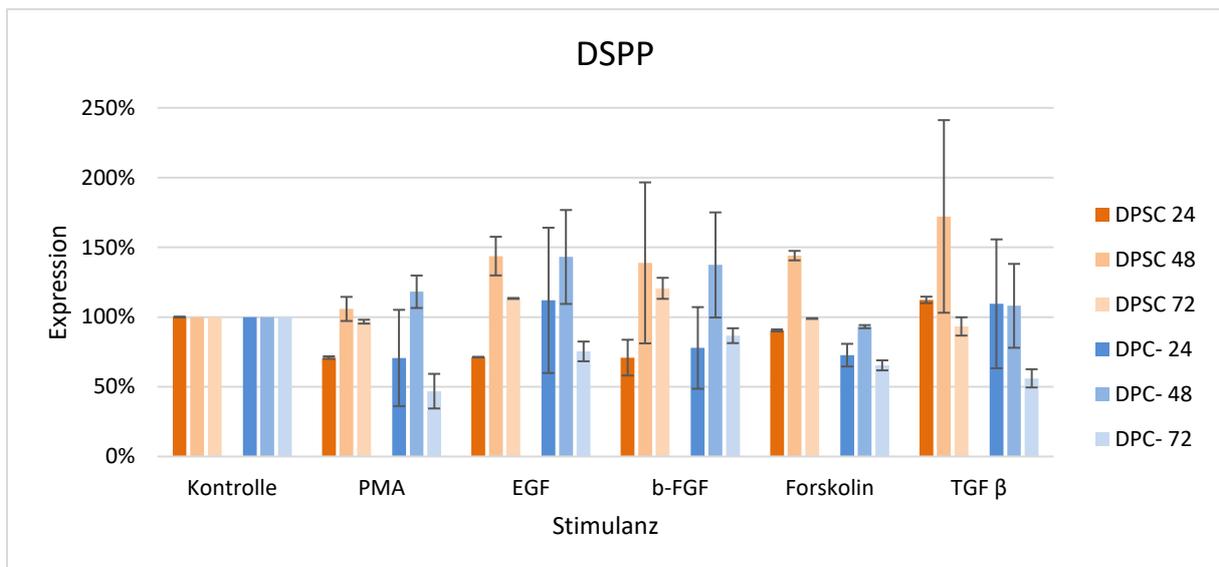


Abbildung 16: Proteinexpression von DSPP in Prozent zur unstimulierten Kontrolle

## 4.4 Maspin

### 4.4.1 RNA-Expression

In dieser Arbeit konnte nach Isolation der RNA keine Expression von Maspin während der Stimulation nachgewiesen werden, da die gemessenen Werte sich alle unter der Nachweisgrenze befanden. Die Schmelzkurven der quantitativen PCR und die vergleichende Quantifizierung sind in Abbildung 17 dargestellt.

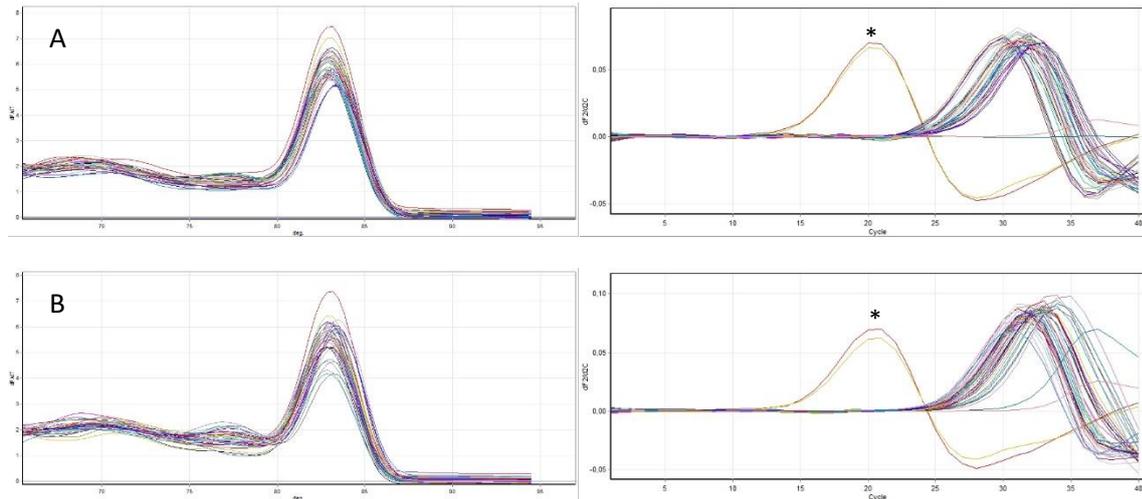


Abbildung 17: Schmelz und vergleichende Quantifizierung der RNA-Expression von Maspin bei DPSC (A) und DPC- (B), \* markiert die Positivkontrolle (HaCaT)

### 4.4.2 Proteinexpression

Auch auf Proteinebene war keine Expression von Maspin in DPSC und DPC- nachweisbar. Im Vergleich mit der Positivkontrolle aus HaCaT-Zellen von der nur 5µg Proteine aufgetragen wurden, ist keine spezifische Bande in den Proben sichtbar, so dass keine Auswertung erfolgen konnte (Abbildung 18).

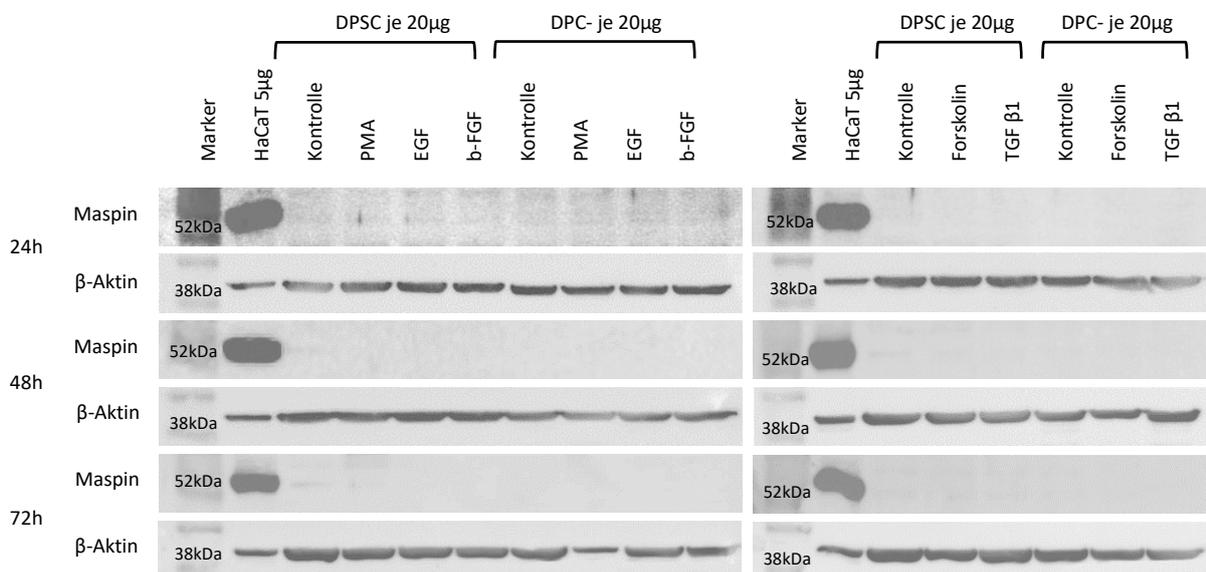


Abbildung 18: Western Blot mit Maspin 1:100

#### 4.5 ALP-Aktivität

Nach der Stimulation über 4 und 5 Tage erfolgte die Aktivitätsmessung der Alkalischen Phosphatase. Die Standardkurven der jeweiligen Messung sind in Abbildung 19 dargestellt. Anhand der Absorptionswerte einer mitgeführten Verdünnungsreihe konnte der Anstieg berechnet werden und damit die ALP-Aktivität der stimulierten Zellen in mU/ml.

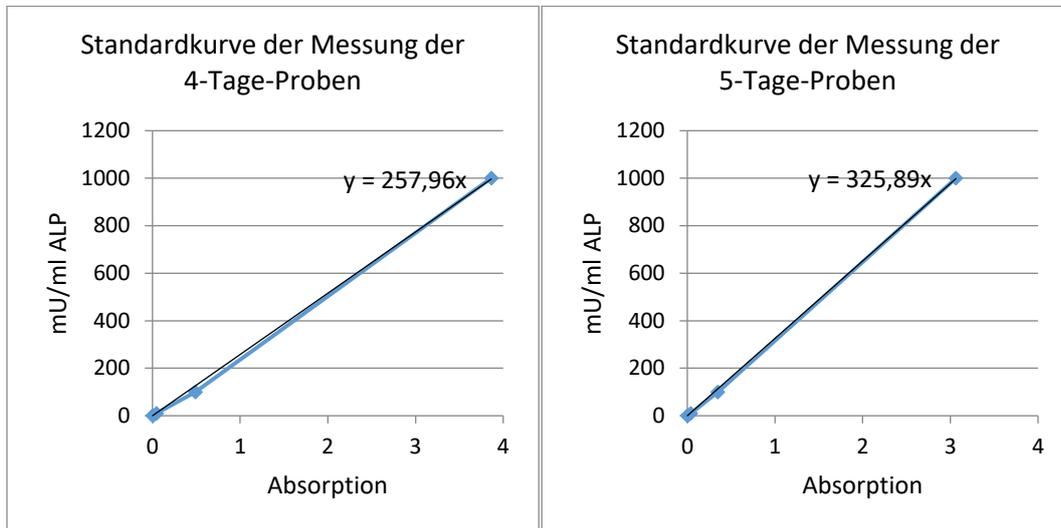


Abbildung 19: Standardkurven für die Bestimmung der ALP-Aktivität nach 4 und 5 Tagen

Nach 4 Tagen Stimulation der DPSC zeigte EGF eine signifikante Steigerung ( $p=0,028$ ) der ALP-Aktivität im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Bei allen DPSC-Populationen kam es im Versuchszeitraum zur Erhöhung der Aktivität. Bei der Stimulation mit EGF ( $p=0,0006$ ), b-FGF ( $p=0,0002$ ) und Forskolin ( $p=0,0007$ ) und der Kontrolle ( $p=0,005$ ) war diese Erhöhung signifikant.

Die Aktivität der alkalischen Phosphatase war bei den DPC- insgesamt höher. Die Stimulantien PMA ( $p=0,022$ ), b-FGF ( $p=0,002$ ) und TGF  $\beta_1$  ( $p=0,021$ ) zeigten eine signifikante Verringerung, EGF ( $p=0,013$ ) und Forskolin ( $p=0,009$ ) eine signifikante Steigerung der Aktivität. Die über 4 Tage erzielten Effekte führten bei den DPC- zu keiner signifikanten Veränderung nach 5 Tagen (Abbildung 20).

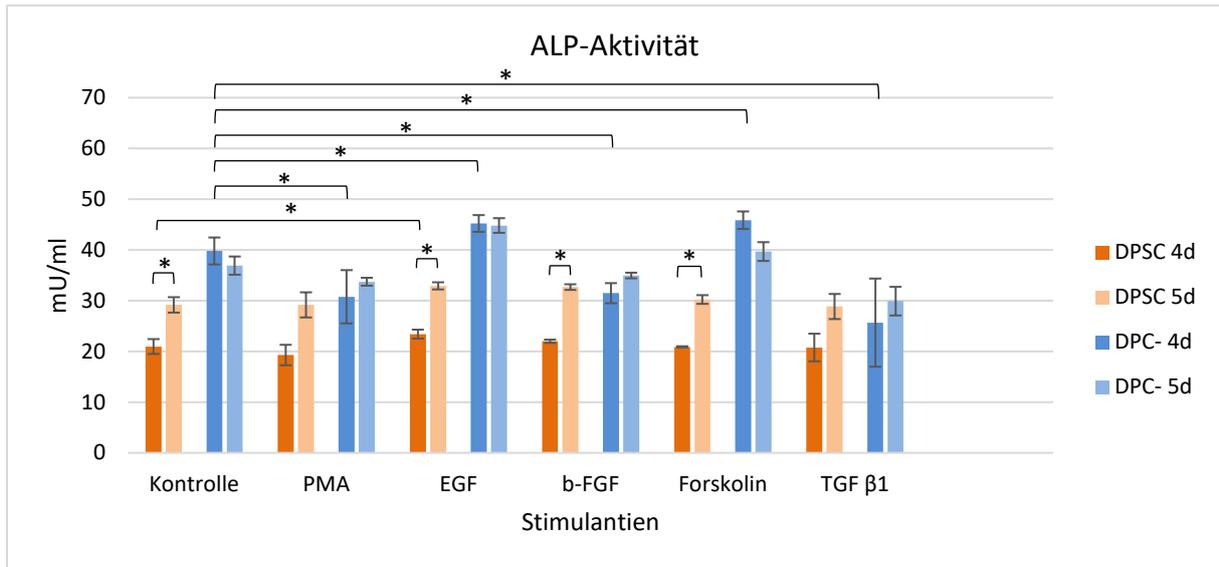


Abbildung 20: ALP-Aktivität nach 4 und 5 Tage Stimulation

## **5 Diskussion**

### **5.1 Methoden**

#### **5.1.1 Zellauswahl und Isolation**

Der Bedarf von reimplantierten Stammzellen ergibt sich erst mit abgeschlossenem Zahnwachstum, da vorher die ortständigen Stammzellen der apikalen Papille über den noch großen Apex erreicht werden können. Dies ist etwa ab dem Alter von 14 Jahren der Fall. In diesem Alter können physiologisch keine Milchzähne mehr als autologe Quelle für SHED verwendet werden. Eventuell persistierende Milchzähne sind in diesem Alter schon ca. 13 Jahre den Reizen der Mundhöhle ausgesetzt. Selbst in einem kariesfreien Milchzahngewebiss findet, ausgelöst durch die physiologische Abrasion und die physikalischen Reize der Ernährung eine Reizdentinbildung statt. Die Menge des Pulpengewebes nimmt ab.

Bei der Isolierung von SHED greift man auf Milchschnidezähne mit min. 2/3 noch vorhandener Wurzellänge zurück (Bakopoulou et al. 2011). Diese Zahnlänge ist nur bis zum Alter von 4-5 Jahren vorhanden, danach ist die Resorption der Wurzel durch das Wachstum des bleibenden Frontzahns zu weit fortgeschritten. Das Zeitfenster zur Entnahme von SHED ist also zwischen dem ersten und dem fünften Lebensjahr. Außerdem muss der Zahn vor dem physiologischen Zahnverlust aktiv extrahiert werden. Die meisten Studien arbeiten in ihren Versuchen mit der vollständigen entnommenen Zellpopulation ohne weitere Überprüfung von Stammzellmarkern (Miura et al. 2003; Bakopoulou et al. 2011)

DPSC wurden in dieser Arbeit aus retinierten Weisheitszähnen entnommen, die Zellen waren bis zur Extraktion den Reizen der Mundhöhle nicht ausgesetzt. Die Entnahme erfolgte im Alter von 18-22 Jahren, ein Alter in dem der Bedarf an autologen Stammzellen zur Vitalerhaltung bei Patienten absehbar sein kann.

#### **5.1.2 FACS-Sortierung mit STRO-1**

Die Separierung der Zellen in STRO-1 positive DPSC und STRO-1 negative DPC- erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Die vorbehandelten Zellen werden in einem Flüssigkeitsstrom an bis zu fünf verschiedenen Lasern vorbeigeführt und je nach Fluoreszenzverhalten sortiert. Die verschiedenen erhobenen Werte geben nicht nur vorhandene Oberflächenmarker an, sondern lassen auch eine Beurteilung der Größe und Zellkörnung zu. Die Unterbrechung des Lichtstrahls lässt eine Beurteilung der Zellgröße und die Streuung des Lichtstrahls die Beurteilung der Zellkörnung zu. Die Werte können Hinweise auf die Vitalität der Zellen geben, da eine erhöhte Körnung bei geringer Zellgröße ein Zeichen für Apoptosevorgänge ist.

Zudem können falsche Positivsortierungen von negativen Zellen, die an positiven haften durch die Bewertung des Verhältnisses von Fluoreszenz zu Größe vermieden werden.

Da eine sehr geringe Population von STRO-1 positiven Zellen zu erwarten war, zeigte sich diese Methode als geeigneter als beispielsweise eine Sortierung per MACS (Magnetic Activated Cell Separation). Diese Methode sortiert die Zellen durch eine mit Magneten umgebene Säule. Die Zellen werden mit einem ersten spezifischen Antikörper markiert und an diesen bindet ein mit einem Magnetbead gekoppelter zweiter Antikörper. Die positiven Zellen verbleiben durch die Anziehung der Magneten in der Säule. Um diese positive Population zu gewinnen, muss die Säule danach ohne Magnete gespült werden, so dass die positiven Zellen ausgewaschen werden. Bei dieser Technik ist die negative Sortierung vorzuziehen, da diese Population die größte Reinheit aufweist (Liao et al. 2016; Frauchiger et al. 2019). Zusätzlich ist es bei der MACS nicht möglich nach anderen Kriterien zu Sortieren. Die FACS-Methode ermöglicht zusätzlich eine Beurteilung der Zellgröße und Granularität und schließt so eine Positivsortierung von zwei aneinander haftenden unterschiedlichen Zellen aus.

Der Marker STRO-1 hat sich als ein stabiler Stammzellmarker für dentale und ossäre Zellen erwiesen. STRO-1 positive Zellen zeigten in vielen Studien ein erhöhtes Potenzial zur odontogenen oder osteogenen Differenzierung (Yu et al. 2010; Bakopoulou et al. 2013; Ercal et al. 2017). In früheren Versuchen konnte zudem eine hohe Expression weiterer CD-Marker in STRO-1 positiven Zellen nachgewiesen werden. STRO-1 positive Zellen zeigten eine verstärkte Expression von CD29, CD44, CD90, CD105 und CD146 (Schenk et al. 2015). Auch in dieser Untersuchung zeigte sich bei den DPSC im Allgemeinen eine stärkere Reaktion auf die Stimulation als bei DPC-. Die verringerte Wirkung der Stimulantien auf die DPC- wird wahrscheinlich durch den höheren Anteil an vollständig differenzierten Zellen bedingt.

## **5.2 Ergebnisse**

### **5.2.1 DSPP**

Die anfängliche Verringerung der RNA-Expression von DSPP durch PMA, EGF und b-FGF (in dieser Arbeit signifikant bei PMA und EGF) lässt auf eine Hemmung der Expression durch eine Aktivierung der Proteinkinase C schließen. Die RNA-Ergebnisse zeigen, dass die anfängliche Reduzierung der Expression nach 48 Stunden wieder kompensiert und nach 72 Stunden DSPP auf RNA-Ebene sogar verstärkt exprimiert wird.

Die PKC wird durch DAG aktiviert, dieses wird durch Phospholipase C $\gamma$  aus PIP<sub>2</sub> gespalten. Die PLC $\gamma$  wird durch die rezeptorgebundenen Tyrosinkinasen der EGF- und FGF-Rezeptoren aktiviert. PMA entspricht der Molekülstruktur von DAG und reagiert deshalb auch ohne Rezeptoren direkt mit PKC.

Die Aktivierung der meisten Signalkaskaden führt auch zu einer negativen Rückkopplung durch die Endprodukte und Inaktivierung vorheriger Stufen dieser Kaskaden. Zusätzlich phosphorylieren Rezeptoren häufig mehrere sekundäre Botenstoffe und auch diese fungieren als Hemmer auf andere gleichzeitig aktivierte Signalwege. Die Kompensation der Hemmung durch PLC $\gamma$  nach 48 Stunden kann also auf die Hemmung der PLC $\gamma$  durch die Aktivierung anderer Signalwege zurückzuführen sein.

Eine Studie mit Pulpazellen zeigte eine erhöhte Expression von DSPP nach Stimulation mit Leptin, die durch Hemmung des MAP-Kinaseweges wieder herunter reguliert werden konnte (Martín-González et al. 2019). Eine verzögerte Aktivierung des MAP-Kinaseweges könnte also die Hemmung der Expression durch PKC wieder kompensiert haben. Auch die Dauer der Aktivierung der Signalwege schwankt. So bleibt der MAP-Kinaseweg, wenn er durch FGF-Rezeptoren ausgelöst wird länger aktiv (Yamada et al. 2004).

Eine Reduzierung der Expression von DSPP durch Inkubation mit PMA war in dieser Arbeit auch auf Proteinebene nachweisbar. Diese Ergebnisse bestätigen die RNA-Ergebnisse. Das Gen für DSPP wird nicht nur transkribiert, sondern auch translatiert und das Protein DSPP kann auch als matrixbildendes Protein wirksam werden.

Die Spaltung von DSPP in DSP, DPP und DGP kann enzymatisch durch MMP (Yamakoshi et al. 2006) oder autolytisch (Godovikova und Ritchie 2007) stattfinden. Der Nachweis von DSPP auf Proteinebene bezieht verschiedene Stadien dieser Spaltungsvorgänge ein. Daraus ergeben sich meist mehrere spezifische Banden nach der Gelelektrophorese (Koli et al. 2015; Muromachi et al. 2015; Zhang et al. 2019). Es können mehrere verschiedene MMP bei der Lyse beteiligt sein, bekannt sind z.B. MMP 2 und MMP 20. Je nach MMP kommt es zu verschiedenen Schnittstellen und so zu geringen Größenunterschieden der entstehenden Fragmente (Yamakoshi 2009), die die spezifische Bindungsstelle für den Antikörper aufweisen.

Die auf RNA-Ebene gezeigte Steigerung der Expression nach 72 Stunden, konnte auf Proteinebene nicht bestätigt werden. Nach der anfänglichen Hemmung bei der Stimulation mit PMA, EGF und b-FGF wurden nach 48 Stunden wieder ähnliche Werte wie bei der unstimulierten Population erreicht.

### **5.2.2 Maspin**

Der Nachweis von Maspin im Rahmen der Zahnentwicklung wurde bisher in Geweben mittels Immunhistochemie und in einer immortalisierten Epithelzelllinie aus apikalen Papillen von Rattenzähne (HAT-7) untersucht (Kumamoto und Ooya 2007; Davaadorj et al. 2010). In dieser Arbeit wurde erstmals die Expression von Maspin per qPCR und Western Blot in Pulpazellen untersucht.

Weitere Arbeiten zu Maspin wie Teoh et al. 2014 haben gezeigt, dass die bisher angenommene Funktion von Maspin in der Entwicklung überdacht werden muss.

Die positiven Ergebnisse bei immortalisierten Epithelzellen, können auf eine Dedifferenzierung dieser Zellen bei der Immortalisierung hinweisen. Immortalisierte Zellen sind Tumorzellen sehr ähnlich. Eine hohe Expression von Maspin in Tumorzellen wurde sehr oft nachgewiesen (Berardi et al. 2013).

Eventuell ist die Expression in Odontoblasten bei der Odontogenese ein Produkt gewebespezifischer Wechselwirkungen, die *in vitro* bisher nicht erreicht werden konnten. Die in den immunhistochemischen Versuchen beobachtete Expression von Maspin in Geweben könnten durch benachbarte Strukturen wie matrixsezernierende Ameloblasten bedingt worden sein.

### 5.2.3 ALP

Eine verstärkte Expression der alkalischen Phosphatase gilt als Marker für die Differenzierung der Zellen. Volldifferenzierte Zellen aus mineralisierten Geweben wie Osteo- oder Chondroblasten zeigen zu Beginn der Differenzierung eine hohe ALP-Aktivität (Burch et al. 1985; Millán 2013). Da sich bei den DPC- zu einem hohen Anteil um differenzierte Zellen, wie z.B. Fibroblasten handelt, ist auch eine hohe Grundaktivität der ALP zu erwarten. Der hohe Differenzierungsgrad führt zu einer schwächeren Reaktion auf die Stimulation, damit verbunden kaum Unterschiede zwischen den verschiedenen Proben.

Der Anstieg der ALP-Aktivität über den Zeitraum der Stimulation bei allen DPSC geht auf den Beginn der Differenzierung der Zellen zurück. Dass auch bei den Kontrollzellen ein signifikanter Anstieg gemessen werden konnte, erklärt sich aus dem Einfluss der Zellkulturmethoden und eine mögliche spontane Differenzierung (Yu et al. 2010). Ein Kontakt mit artifiziellen Oberflächen und die Dauer der Kultivierung führt auch ohne spezifische Stimulation zur Differenzierung von Zellen (Karamzadeh et al. 2012).

Die positivsortierten Zellen zeigten in allen Versuchen eine stärkere Reaktion auf die Stimulation als die STRO-1 negativen Zellen. Die verringerte Reaktion dieser Zellen kann durch einen großen Anteil an Zellen mit hohem Differenzierungsgrad beeinflusst sein, worauf die hohe ALP-Aktivität bei diesen Zellen hinweist.

### 5.3 Schlussfolgerung und Ausblick

In Limitation einer experimentellen in-vitro-Untersuchung konnten die verschiedenen Zellpopulationen der dentalen Pulpa besser charakterisiert werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen einen Einfluss verschiedener Signalwege auf die Expression von DSPP bei DPSC und DPC- auf RNA- und Proteinebene. Die Regulation der Expression von DSPP nach der Stimulation mit PMA, EGF und b-FGF lässt auf eine Beteiligung des MAP-Kinaseweges bei der Dentinogenese schließen. Um diese Ergebnisse zu validieren wären weitere Versuche mit einer Spezifizierung auf die verschiedenen Rezeptortypen der Tyrosinkinase Rezeptoren eine Möglichkeit.

Ein gerichteter Einfluss von TGF- $\beta_1$  und Forskolin konnte nicht gezeigt werden.

Die Ergebnisse der bisher vorliegenden geringen Studienlage für den Einfluss von Maspin in der Entwicklung von odontogenen Geweben konnten hier nicht bestätigt werden. Dies könnte an der Auswahl der Zellen liegen, da es sich um Zellen eines fast vollständig entwickelten Zahnes handelte. Ein Versuchsaufbau mit anderen bei der Zahnentwicklung aktiven Zellen wie Ameloblasten könnte andere Ergebnisse zeigen.

## 6 Zusammenfassung

Ziel dieser experimentellen in-vitro-Untersuchung war es die Expression von DSPP und Maspin bei verschiedenen Zellpopulationen der dentalen Pulpa zu vergleichen. Auch die Aktivität der alkalischen Phosphatase sollte in beiden Zellgruppen gemessen werden.

Nach Isolation der Zellen aus extrahierten dritten Molaren wurden die Zellen mittels FACS in STRO-1 positive DPSC und STRO-1 negative DPC- sortiert und die kultivierten Zellen mit PMA, EGF, b-FGF, Forskolin und TGF  $\beta_1$  stimuliert.

Die Stimulation mit PMA, EGF und b-FGF zeigte auf RNA- und Proteinebene sowohl bei den DPSC als auch bei den DPC- eine verringerte DSPP-Expression. Diese reduzierte Expression stieg nach 48 Stunden auf das Niveau der Kontrollgruppe an. Forskolin und TGF  $\beta_1$  zeigten nach 72h Stunden keinen eindeutigen Einfluss auf die DSPP-Expression.

Eine Expression von Maspin konnte weder auf RNA-Ebene noch Proteinebene nachgewiesen werden.

Die DPC- zeigten durch ihren hohen Anteil an vollständig differenzierten Zellen insgesamt eine höhere ALP-Aktivität, die durch die Stimulation nicht beeinflusst werden konnte. Die ALP-Aktivität der DPSC stieg während des Versuches bei allen Stimulanzen und der Kontrolle an.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen auf einen hemmenden Einfluss der PLC $\gamma$ -Aktivität und eine Steigerung durch Aktivierung des MAPK-Signalweges auf die Expression von DSPP hin.

Die Stimulation der DPSC beeinflusste den Differenzierungsgrad der Zellen, was durch eine erhöhte ALP-Aktivität bestätigt werden konnte.

## Literatur

- Alobaid AS, Cortes LM, Lo J, Nguyen TT, Albert J, Abu-Melha AS, Lin LM, Gibbs JL (2014) Radiographic and clinical outcomes of the treatment of immature permanent teeth by revascularization or apexification: a pilot retrospective cohort study. *Journal of endodontics* 40:1063–1070. doi:10.1016/j.joen.2014.02.016
- Arnold WH (2006) Mikromorphologie und Molekularbiologie der Dentinogenese und Amelogenese. *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift* 61:524–534
- Bader AG, Vogt PK (2005) Inhibition of protein synthesis by Y box-binding protein 1 blocks oncogenic cell transformation. *Molecular and cellular biology* 25:2095–2106. doi:10.1128/MCB.25.6.2095-2106.2005
- Bakopoulou A, Leyhausen G, Volk J, Tsiftoglou A, Garefis P, Koidis P, Geurtsen W (2011) Assessment of the impact of two different isolation methods on the osteo/odontogenic differentiation potential of human dental stem cells derived from deciduous teeth. *Calcified tissue international* 88:130–141. doi:10.1007/s00223-010-9438-0
- Bakopoulou A, Leyhausen G, Volk J, Koidis P, Geurtsen W (2013) Comparative characterization of STRO-1(neg)/CD146(pos) and STRO-1(pos)/CD146(pos) apical papilla stem cells enriched with flow cytometry. *Archives of oral biology* 58:1556–1568. doi:10.1016/j.archoralbio.2013.06.018
- Berardi R, Morgese F, Onofri A, Mazzanti P, Pistelli M, Ballatore Z, Savini A, Lisa M de, Caramanti M, Rinaldi S, Pagliaretta S, Santoni M, Pierantoni C, Cascinu S (2013) Role of maspin in cancer. *Clinical and Translational Medicine* 2:8. doi:10.1186/2001-1326-2-8
- Caplan AI, Bruder SP (2001) Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends in molecular medicine* 7:259–264
- Castagna M, Takai Y, Kaibuchi K, Sano K, Kikkawa U, Nishizuka Y (1982) Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *The Journal of biological chemistry* 257:7847–7851
- Dalton S (2013) Signaling networks in human pluripotent stem cells. *Current opinion in cell biology* 25:241–246. doi:10.1016/j.ceb.2012.09.005
- Davaadorj P, Tokuyama R, Ide S, Tadokoro S, Kudoh K, Satomura K (2010) Possible involvement of maspin in tooth development. *Histochemistry and cell biology* 134:603–614. doi:10.1007/s00418-010-0756-0
- Diogenes A, Henry MA, Teixeira FB, Hargreaves KM (2013) An update on clinical regenerative endodontics. *Endod Topics* 28:2–23. doi:10.1111/etp.12040
- Duncan HF, Galler KM, Tomson PL, Simon S, El-Karim I, Kundzina R, Krastl G, Dammaschke T, Fransson H, Markvart M, Zehnder M, Bjorndal L (2019) European Society of Endodontology position statement: Management of deep caries and the exposed pulp. *International endodontic journal* 52:923–934. doi:10.1111/iej.13080
- Ercal P, Pekozer GG, Gumru OZ, Kose GT, Ramazanoglu M (2017) Influence of STRO-1 selection on osteogenic potential of human tooth germ derived mesenchymal stem cells. *Archives of oral biology* 82:293–301. doi:10.1016/j.archoralbio.2017.06.028
- European Society of E. (2006) Quality guidelines for endodontic treatment: consensus report of the European Society of Endodontology. *International endodontic journal* 39:921–930

- Frauchiger DA, Tekari A, May RD, Dzafo E, Chan SCW, Stoyanov J, Bertolo A, Zhang X, Guerrero J, Sakai D, Schol J, Grad S, Tryfonidou M, Benneker LM, Gantenbein B (2019) Fluorescence-Activated Cell Sorting Is More Potent to Fish Intervertebral Disk Progenitor Cells Than Magnetic and Beads-Based Methods. *Tissue engineering. Part C, Methods* 25:571–580. doi:10.1089/ten.TEC.2018.0375
- Fujisawa R, Tamura M (2012) Acidic bone matrix proteins and their roles in calcification. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* 17:1891–1903. doi:10.2741/4026
- Galler KM (2016) Clinical procedures for revitalization: current knowledge and considerations. *International endodontic journal* 49:926–936. doi:10.1111/iej.12606
- Galler KM, Krastl G, Simon S, van Gorp G, Meschi N, Vahedi B, Lambrechts P (2016) European Society of Endodontology position statement: Revitalization procedures. *International endodontic journal* 49:717–723. doi:10.1111/iej.12629
- Gerlier D, Thomasset N (1986) Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *Journal of Immunological Methods* 94:57–63. doi:10.1016/0022-1759(86)90215-2
- Godovikova V, Ritchie HH (2007) Dynamic processing of recombinant dentin sialoprotein-phosphoryn protein. *The Journal of biological chemistry* 282:31341–31348. doi:10.1074/jbc.M702605200
- Goldberg M, Smith A (2004) Cells and Extracellular Matrices of Dentin and Pulp: A Biological Basis for Repair and Tissue Engineering
- Golub EE, Boesze-Battaglia K (2007) The role of alkaline phosphatase in mineralization. *Current Opinion in Orthopaedics* 18:444–448. doi:10.1097/BCO.0b013e3282630851
- Gorelik L, Flavell RA (2002) Transforming growth factor-beta in T-cell biology. *Nature reviews. Immunology* 2:46–53. doi:10.1038/nri704
- Gronthos S, Zannettino ACW, Hay SJ, Shi S, Graves SE, Kortessidis A, Simmons PJ (2003) Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *Journal of cell science* 116:1827–1835. doi:10.1242/jcs.00369
- Gu K, Chang S, Ritchie HH, Clarkson BH, Rutherford RB (2000) Molecular cloning of a human dentin sialophosphoprotein gene. *European journal of oral sciences* 108:35–42. doi:10.1034/j.1600-0722.2000.00765.x
- He S, Nakada D, Morrison SJ (2009) Mechanisms of stem cell self-renewal. *Annual review of cell and developmental biology* 25:377–406. doi:10.1146/annurev.cellbio.042308.113248
- Horbelt D, Denkis A, Knaus P (2012) A portrait of Transforming Growth Factor  $\beta$  superfamily signalling: Background matters. *The international journal of biochemistry & cell biology* 44:469–474. doi:10.1016/j.biocel.2011.12.013
- Hülsmann MI, Schäfer E (2005) Stellungnahme des Endodontie-Beirats der DGZ „Good clinical practice“: Die Wurzelkanalbehandlung. *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift* 60
- Kanafi MM, Pal R, Gupta PK (2013) Phenotypic and functional comparison of optimum culture conditions for upscaling of dental pulp stem cells. *Cell biology international* 37:126–136. doi:10.1002/cbin.10021
- Koli K, Saxena G, Ogbureke KUE (2015) Expression of Matrix Metalloproteinase (MMP)-20 and Potential Interaction with Dentin Sialophosphoprotein (DSPP) in Human Major Salivary Glands. *The*

journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society 63:524–533. doi:10.1369/0022155415580817

Koya D, King GL (1998) Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes* 47:859–866. doi:10.2337/diabetes.47.6.859

Kumamoto H, Ooya K (2007) Immunohistochemical detection of uPA, uPAR, PAI-1, and maspin in ameloblastic tumors. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology* 36:488–494. doi:10.1111/j.1600-0714.2007.00554.x

Liao X, Makris M, Luo XM (2016) Fluorescence-activated Cell Sorting for Purification of Plasmacytoid Dendritic Cells from the Mouse Bone Marrow. *Journal of visualized experiments : JoVE*. doi:10.3791/54641

Liu G, Xu G, Gao Z, Liu Z, Xu J, Wang J, Zhang C, Wang S (2016) Demineralized Dentin Matrix Induces Odontoblastic Differentiation of Dental Pulp Stem Cells. *Cells, tissues, organs* 201:65–76. doi:10.1159/000440952

Martín-González J, Pérez-Pérez A, Cabanillas-Balsera D, Vilariño-García T, Sánchez-Margalet V, Segura-Egea JJ (2019) Leptin stimulates DMP-1 and DSPP expression in human dental pulp via MAPK 1/3 and PI3K signaling pathways. *Archives of oral biology* 98:126–131. doi:10.1016/j.archoralbio.2018.11.019

Matthews JL, Dorman HL, Bishop JG (1959) Fine Structures of the Dental Pulp. *Journal of dental research* 38:940–946. doi:10.1177/00220345590380052401

Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S (2003) SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:5807–5812. doi:10.1073/pnas.0937635100

Muromachi K, Kamio N, Matsuki-Fukushima M, Nishimura H, Tani-Ishii N, Sugiya H, Matsushima K (2015) CCN2/CTGF expression via cellular uptake of BMP-1 is associated with reparative dentinogenesis. *Oral diseases* 21:778–784. doi:10.1111/odi.12347

Obermayer-Pietsch B, Schwetz V (2016) Biochemische Marker des Knochenstoffwechsels und ihre Bedeutung. *Zeitschrift für Rheumatologie* 75:451–458. doi:10.1007/s00393-016-0083-5

Oda K, Matsuoka Y, Funahashi A, Kitano H (2005) A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling. *Molecular systems biology* 1:2005.0010. doi:10.1038/msb4100014

Rahman MS, Akhtar N, Jamil HM, Banik RS, Asaduzzaman SM (2015) TGF- $\beta$ /BMP signaling and other molecular events: regulation of osteoblastogenesis and bone formation. *Bone Research* 3:15005-. doi:10.1038/boneres.2015.5

Sager R, Sheng S, Anisowicz A, Sotiropoulou G, Zou Z, Stenman G, Swisshelm K, Chen Z, Hendrix MJ, Pemberton P (1994) RNA genetics of breast cancer: maspin as paradigm. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 59:537–546. doi:10.1101/sqb.1994.059.01.060

Schenk U, Prenzel H, Magnucki G, Hoang-Vu C, Schaller HG, Diederich A, Gernhardt C, Dietze K, Navarrete Santos A, Niehues SM, Jung F, Hiebl B (2015) Non-autologous endodontic pulp regeneration approach in molar teeth of the rat. *JCB* 1:27–35. doi:10.3233/jcb-15003

- Schwendicke F, Splieth C, Schulte A (2017) Behandlung kariöser Läsionen: Konsensempfehlungen zu Terminologie und Entfernung kariösen Gewebes. *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift* 72
- Sharma U, Pal D, Prasad R (2014) Alkaline phosphatase: an overview. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 29:269–278. doi:10.1007/s12291-013-0408-y
- Simmons PJ, Gronthos S, Zannettino A, Ohta S, Graves S (1994) Isolation, characterization and functional activity of human marrow stromal progenitors in hemopoiesis. *Progress in clinical and biological research* 389:271–280
- Skalhegg BS, Tasken K (2000) Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 5:D678-93. doi:10.2741/skalhegg
- Smith AJ, Patel M, Graham L, Sloan AJ, Cooper PR (2005) Dentine Regeneration: Key Roles for Stem Cells and Molecular Signalling. *Oral Biosciences & Medicine*:127–132
- Teoh SSY, Vieusseux J, Prakash M, Berkowicz S, Luu J, Bird CH, Law RHP, Rosado C, Price JT, Whisstock JC, Bird PI (2014) Maspin is not required for embryonic development or tumour suppression. *Nat Commun* 5:1–9. doi:10.1038/ncomms4164
- Teven CM, Farina EM, Rivas J, Reid RR (2014) Fibroblast growth factor (FGF) signaling in development and skeletal diseases. *Genes & diseases* 1:199–213. doi:10.1016/j.gendis.2014.09.005
- Weiger R, Geurtsen W, Heidemann D, Löst C, Petschelt A, Raab W, Schäfer E, Hickel R (2001) Zur Prognose von Wurzelkanalbehandlungen. *Wissenschaftliche Stellungnahme der Deutschen Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde (DGZMK)*. *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift* 56:206–207
- Widbiller M (2019) Regenerative Endodontie: Die Revitalisierung von Zähnen. *der junge zahnarzt* 10:14–17. doi:10.1007/s13279-019-0005-4
- Woltgens JH, Lyaruu DM, Bronckers AL, Bervoets TJ, van Duin M (1995) Biomineralization during early stages of the developing tooth in vitro with special reference to secretory stage of amelogenesis. *The International journal of developmental biology* 39:203–212
- Wu J, Wang X (2019) Isolation of SIBLING Proteins from Bone and Dentin Matrices. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1922:211–218. doi:10.1007/978-1-4939-9012-2\_21
- Yamada S, Taketomi T, Yoshimura A (2004) Model analysis of difference between EGF pathway and FGF pathway. *Biochemical and biophysical research communications* 314:1113–1120. doi:10.1016/j.bbrc.2004.01.009
- Yamakoshi Y (2009) Dentinogenesis and Dentin Sialophosphoprotein (DSPP). *Journal of Oral Biosciences* 51:134. doi:10.2330/joralbiosci.51.134
- Yamakoshi Y, Hu JC-C, Iwata T, Kobayashi K, Fukae M, Simmer JP (2006) Dentin sialophosphoprotein is processed by MMP-2 and MMP-20 in vitro and in vivo. *The Journal of biological chemistry* 281:38235–38243. doi:10.1074/jbc.M607767200
- Yu J, He H, Tang C, Zhang G, Li Y, Wang R, Shi J, Jin Y (2010) Differentiation potential of STRO-1+ dental pulp stem cells changes during cell passaging. *BMC cell biology* 11:32. doi:10.1186/1471-2121-11-32

Zhang Y, Yuan L, Meng L, Fang M, Guo S, Wang D, Ma J, Wang L (2019) Guanine and nucleotide binding protein 3 promotes odonto/osteogenic differentiation of apical papilla stem cells via JNK and ERK signaling pathways. *International journal of molecular medicine* 43:382–392.  
doi:10.3892/ijmm.2018.3984

## Thesen

1. Es konnten erfolgreich STRO-1 positive Zellen aus extrahierten dritten Molaren isoliert werden.
2. Die Stimulation mit PMA, EGF und b-FGF führte bei den DPSC nach 24 Stunde zu einer verringerten DSPP-Expression.
3. Nach 72 Stunde kam es durch PMA, EGF und b-FGF zu einer Steigerung der Expression von DSPP.
4. Forskolin und TGF  $\beta_1$  zeigten keinen signifikanten Einfluss auf die Expression von DSPP.
5. Die Expression von Maspin konnte in DPSC und DPC- nicht nachgewiesen werden.
6. Die ALP-Aktivität von DPC- war im Vergleich zu DPSC generell erhöht.
7. Die ALP-Aktivität stieg in allen DPSC-Versuchsgruppen während des Versuchszeitraums an.
8. Die ALP-Aktivität der DPC- wurde durch die Stimulanzen im Versuchszeitraum nicht beeinflusst.

## Anlagen

### Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung der Entnahmeregionen für dentale Stammzellen .....	2
Abbildung 2: asymmetrische Teilung einer Stammzelle .....	3
Abbildung 3: Darstellung der Differenzierungswege mesenchymaler Stammzellen (Caplan und Bruder 2001).....	3
Abbildung 4: Wachstumsmuster humaner Pulpazellen. STRO-1 positiv sortierte Zellen (A) und negativ sortierte Zellen (B), HE-Färbung .....	5
Abbildung 5: Signalkaskaden von EGF.....	5
Abbildung 6: Signalkaskaden von b-FGF .....	6
Abbildung 7: Signalweg von PMA.....	7
Abbildung 8: Signalweg von Forskolin.....	7
Abbildung 9: Signalkaskade von TGF $\beta_1$ .....	8
Abbildung 10: Schema der proteolytischen Spaltung von DSPP (Fujisawa und Tamura 2012) .....	9
Abbildung 11: eröffneter Zahn mit entnommener Pulpa .....	17
Abbildung 12: Ergebnisse einer Sortierung von DPC mit STRO-1 per Durchflusszytometrie .....	24
Abbildung 13: MTT-Assay von DPC mit verschiedenen FBS-Konzentrationen im Medium .....	25
Abbildung 14: RNA-Expression von DSPP in Prozent zur unstimulierten Kontrolle.....	26
Abbildung 15: Western Blot mit DSPP 1:100.....	27
Abbildung 16: Proteinexpression von DSPP in Prozent zur unstimulierten Kontrolle .....	27
Abbildung 17: Schmelz und vergleichende Quantifizierung der RNA-Expression von Maspin bei DPSC (A) und DPC- (B), * markiert die Positivkontrolle (HaCaT) .....	28
Abbildung 18: Western Blot mit Maspin 1:100 .....	28
Abbildung 19: Standardkurven für die Bestimmung der ALP-Aktivität nach 4 und 5 Tagen .....	29
Abbildung 20: ALP-Aktivität nach 4 und 5 Tage Stimulation.....	30
Abbildung 21: Schmelzkurve DSPP-Primer mit DPSC RNA-Proben .....	44
Abbildung 22: Schmelzkurve GAP-DH-Primer mit DPSC RNA-Proben .....	44
Abbildung 23: Schmelzkurve DSPP-Primer mit DPC- RNA-Proben.....	44
Abbildung 24: Schmelzkurve GAP-DH-Primer mit DPC- RNA-Proben .....	44

### Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Primersequenzen für qPCR.....	15
Tabelle 2: Antikörper für Western Blot .....	16
Tabelle 3: Isolationsmedium .....	17
Tabelle 4: Wachstumsmedium.....	17
Tabelle 5: Stimulantien und Konzentrationen .....	19
Tabelle 6: RT-Mix nach SuperScript™ II Reverse Transcriptase .....	20
Tabelle 7: Lysispuffer.....	20
Tabelle 8: Sammelgel .....	21
Tabelle 9: Trenngel .....	21
Tabelle 10: Ladepuffer.....	22
Tabelle 11: Transferpuffer.....	22

## Ergebnisse qPCR

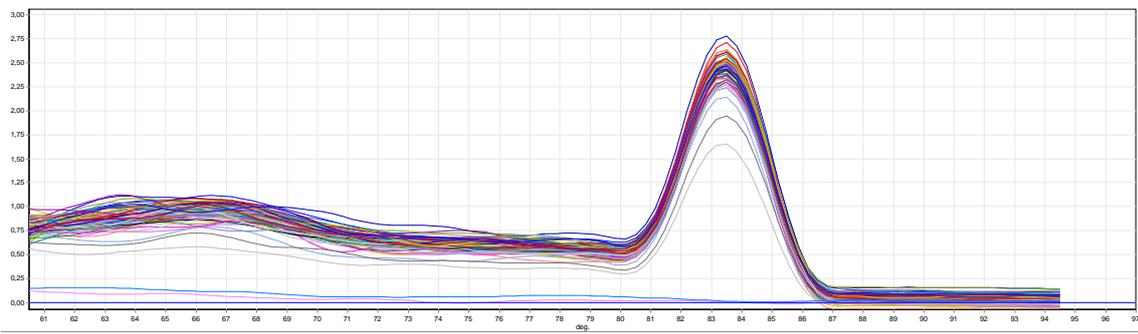


Abbildung 21: Schmelzkurve DSPP-Primer mit DPSC RNA-Proben

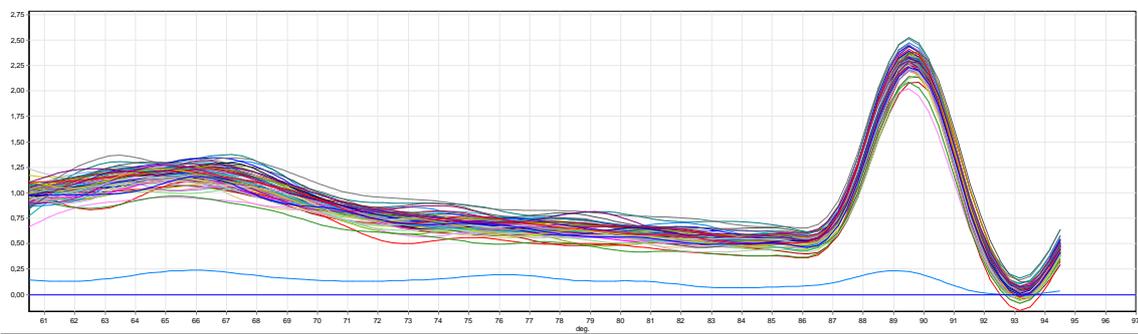


Abbildung 22: Schmelzkurve GAP-DH-Primer mit DPSC RNA-Proben

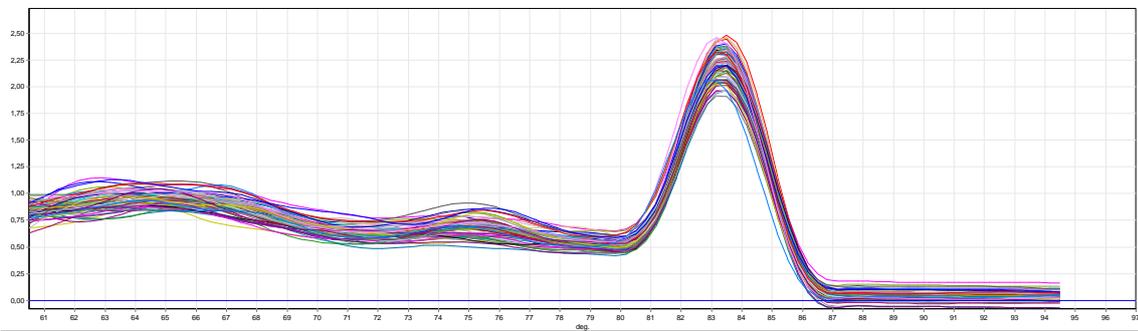


Abbildung 23: Schmelzkurve DSPP-Primer mit DPC-RNA-Proben

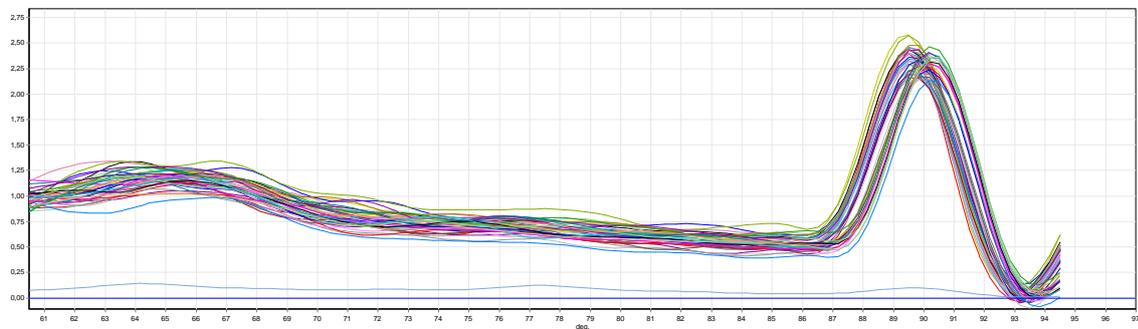


Abbildung 24: Schmelzkurve GAP-DH-Primer mit DPC-RNA-Proben

RT-PCR_Nr.	Stammzelle	Name	Zeit	Stimulanz	Protein	Rep. Conc. norm	Rep. Conc. Rel 2 control
1	1	24h Kontrolle DSPP	24	Kontrolle	DSPP	0,186	1,000
1	1	24h Kontrolle DSPP	24	Kontrolle	DSPP	0,227	1,218
1	1	24h PMA DSPP	24	PMA	DSPP	0,150	0,803
1	1	24h PMA DSPP	24	PMA	DSPP	0,126	0,679
1	1	24h EGF DSPP	24	EGF	DSPP	0,083	0,443
1	1	24h EGF DSPP	24	EGF	DSPP	0,099	0,531
1	1	24h TGF $\beta$ DSPP	24	TGF $\beta$	DSPP	0,197	1,060
1	1	24h TGF $\beta$ DSPP	24	TGF $\beta$	DSPP	0,167	0,898
1	1	24h Forskolin DSPP	24	Forskolin	DSPP	0,199	1,069
1	1	24h Forskolin DSPP	24	Forskolin	DSPP	0,194	1,041
1	1	24h b-FGF DSPP	24	b-FGF	DSPP	0,150	0,807
1	1	24h b-FGF DSPP	24	b-FGF	DSPP	0,168	0,900
1	1	48h Kontrolle DSPP	48	Kontrolle	DSPP	0,361	1,000
1	1	48h Kontrolle DSPP	48	Kontrolle	DSPP	0,446	1,236
1	1	48h PMA DSPP	48	PMA	DSPP	0,397	1,098
1	1	48h PMA DSPP	48	PMA	DSPP	0,398	1,103
1	1	48h EGF DSPP	48	EGF	DSPP	0,288	0,799
1	1	48h EGF DSPP	48	EGF	DSPP	0,306	0,848
1	1	48h TGF $\beta$ DSPP	48	TGF $\beta$	DSPP	0,369	1,021
1	1	48h TGF $\beta$ DSPP	48	TGF $\beta$	DSPP	0,446	1,234
1	1	48h Forskolin DSPP	48	Forskolin	DSPP	0,312	0,865
1	1	48h Forskolin DSPP	48	Forskolin	DSPP	0,308	0,852
1	1	48h b-FGF DSPP	48	b-FGF	DSPP	0,469	1,299
1	1	48h b-FGF DSPP	48	b-FGF	DSPP	0,430	1,192
1	1	72h Kontrolle DSPP	72	Kontrolle	DSPP	0,185	1,000
1	1	72h Kontrolle DSPP	72	Kontrolle	DSPP	0,226	1,217
1	1	72h PMA DSPP	72	PMA	DSPP	0,347	1,869
1	1	72h PMA DSPP	72	PMA	DSPP	0,345	1,861
1	1	72h EGF DSPP	72	EGF	DSPP	0,202	1,090
1	1	72h EGF DSPP	72	EGF	DSPP	0,218	1,175
1	1	72h TGF $\beta$ DSPP	72	TGF $\beta$	DSPP	0,188	1,014
1	1	72h TGF $\beta$ DSPP	72	TGF $\beta$	DSPP	0,205	1,105
1	1	72h Forskolin DSPP	72	Forskolin	DSPP	0,126	0,681
1	1	72h b-FGF DSPP	72	b-FGF	DSPP	0,228	1,230
1	1	72h b-FGF DSPP	72	b-FGF	DSPP	0,195	1,052
1	1	24h Kontrolle Maspin	24	Kontrolle	Maspin	0,006	1,000
1	1	24h Kontrolle Maspin	24	Kontrolle	Maspin	0,004	0,671
1	1	24h PMA Maspin	24	PMA	Maspin	0,005	0,754
1	1	24h PMA Maspin	24	PMA	Maspin	0,004	0,666
1	1	24h EGF Maspin	24	EGF	Maspin	0,003	0,462
1	1	24h EGF Maspin	24	EGF	Maspin	0,002	0,376
1	1	24h TGF $\beta$ Maspin	24	TGF $\beta$	Maspin	0,003	0,566
1	1	24h TGF $\beta$ Maspin	24	TGF $\beta$	Maspin	0,004	0,684

1	1	24h Forskolin Maspin	24	Forskolin	Maspin	0,005	0,796
1	1	24h Forskolin Maspin	24	Forskolin	Maspin	0,005	0,870
1	1	24h b-FGF Maspin	24	b-FGF	Maspin	0,004	0,592
1	1	24h b-FGF Maspin	24	b-FGF	Maspin	0,004	0,617
1	1	48h Kontrolle Maspin	48	Kontrolle	Maspin	0,012	1,000
1	1	48h Kontrolle Maspin	48	Kontrolle	Maspin	0,010	0,825
1	1	48h PMA Maspin	48	PMA	Maspin	0,011	0,895
1	1	48h PMA Maspin	48	PMA	Maspin	0,010	0,819
1	1	48h EGF Maspin	48	EGF	Maspin	0,006	0,513
1	1	48h EGF Maspin	48	EGF	Maspin	0,007	0,588
1	1	48h TGF $\beta$ Maspin	48	TGF $\beta$	Maspin	0,010	0,773
1	1	48h TGF $\beta$ Maspin	48	TGF $\beta$	Maspin	0,009	0,703
1	1	48h Forskolin Maspin	48	Forskolin	Maspin	0,009	0,703
1	1	48h Forskolin Maspin	48	Forskolin	Maspin	0,008	0,688
1	1	48h b-FGF Maspin	48	b-FGF	Maspin	0,008	0,667
1	1	48h b-FGF Maspin	48	b-FGF	Maspin	0,010	0,840
1	1	72h Kontrolle Maspin	72	Kontrolle	Maspin	0,005	1,000
1	1	72h Kontrolle Maspin	72	Kontrolle	Maspin	0,004	0,813
1	1	72h PMA Maspin	72	PMA	Maspin	0,008	1,800
1	1	72h PMA Maspin	72	PMA	Maspin	0,010	2,158
1	1	72h EGF Maspin	72	EGF	Maspin	0,004	0,847
1	1	72h EGF Maspin	72	EGF	Maspin	0,004	0,963
1	1	72h TGF $\beta$ Maspin	72	TGF $\beta$	Maspin	0,005	1,215
1	1	72h TGF $\beta$ Maspin	72	TGF $\beta$	Maspin	0,005	1,096
1	1	72h Forskolin Maspin	72	Forskolin	Maspin	0,003	0,765
1	1	72h Forskolin Maspin	72	Forskolin	Maspin	0,003	0,688
1	1	72h b-FGF Maspin	72	b-FGF	Maspin	0,005	1,165
1	1	72h b-FGF Maspin	72	b-FGF	Maspin	0,005	1,194
2	1	24h Kontrolle Maspin	24	Kontrolle	Maspin	0,132	1,000
2	1	24h Kontrolle Maspin	24	Kontrolle	Maspin	0,123	0,932
2	1	24h PMA Maspin	24	PMA	Maspin	0,314	2,369
2	1	24h PMA Maspin	24	PMA	Maspin	0,330	2,497
2	1	24h EGF Maspin	24	EGF	Maspin	0,655	4,947
2	1	24h EGF Maspin	24	EGF	Maspin	0,646	4,884
2	1	24h TGF $\beta$ Maspin	24	TGF $\beta$	Maspin	0,578	4,364
2	1	24h TGF $\beta$ Maspin	24	TGF $\beta$	Maspin	0,508	3,838
2	1	24h Forskolin Maspin	24	Forskolin	Maspin	0,425	3,213
2	1	24h Forskolin Maspin	24	Forskolin	Maspin	0,340	2,567
2	1	48h Kontrolle Maspin	48	Kontrolle	Maspin	6,139	1,000
2	1	48h Kontrolle Maspin	48	Kontrolle	Maspin	6,697	1,091
2	1	48h PMA Maspin	48	PMA	Maspin	2,342	0,381
2	1	48h PMA Maspin	48	PMA	Maspin	2,986	0,486
2	1	48h EGF Maspin	48	EGF	Maspin	2,544	0,414
2	1	48h EGF Maspin	48	EGF	Maspin	3,335	0,543
2	1	48h TGF $\beta$ Maspin	48	TGF $\beta$	Maspin	5,987	0,975
2	1	48h TGF $\beta$ Maspin	48	TGF $\beta$	Maspin	7,070	1,152
2	1	48h Forskolin Maspin	48	Forskolin	Maspin	5,148	0,839

2	1	48h Forskolin Maspin	48	Forskolin	Maspin	5,340	0,870
2	1	72h Kontrolle Maspin	72	Kontrolle	Maspin	0,190	1,000
2	1	72h Kontrolle Maspin	72	Kontrolle	Maspin	0,216	1,137
2	1	72h PMA Maspin	72	PMA	Maspin	0,222	1,167
2	1	72h PMA Maspin	72	PMA	Maspin	0,210	1,103
2	1	72h EGF Maspin	72	EGF	Maspin	0,590	3,103
2	1	72h EGF Maspin	72	EGF	Maspin	0,534	2,808
2	1	72h TGF ? Maspin	72	TGF $\beta$	Maspin	0,249	1,306
2	1	72h TGF ? Maspin	72	TGF $\beta$	Maspin	0,220	1,156
2	1	72h Forskolin Maspin	72	Forskolin	Maspin	0,186	0,979
2	1	72h Forskolin Maspin	72	Forskolin	Maspin	0,188	0,989
3	1	24h Kontrolle Maspin	24	Kontrolle	Maspin	0,104	1,000
3	1	24h Kontrolle Maspin	24	Kontrolle	Maspin	0,115	1,107
3	1	24h PMA Maspin	24	PMA	Maspin	0,103	0,998
3	1	24h PMA Maspin	24	PMA	Maspin	0,119	1,152
3	1	24h EGF Maspin	24	EGF	Maspin	0,089	0,861
3	1	24h EGF Maspin	24	EGF	Maspin	0,085	0,820
3	1	24h TGF $\beta$ Maspin	24	TGF $\beta$	Maspin	0,295	2,843
3	1	24h TGF $\beta$ Maspin	24	TGF $\beta$	Maspin	0,286	2,762
3	1	24h Forskolin Maspin	24	Forskolin	Maspin	0,189	1,821
3	1	24h Forskolin Maspin	24	Forskolin	Maspin	0,173	1,670
3	1	24h b-FGF Maspin	24	b-FGF	Maspin	0,146	1,410
3	1	24h b-FGF Maspin	24	b-FGF	Maspin	0,132	1,273
3	1	48h Kontrolle Maspin	48	Kontrolle	Maspin	0,235	1,000
3	1	48h Kontrolle Maspin	48	Kontrolle	Maspin	0,223	0,949
3	1	48h PMA Maspin	48	PMA	Maspin	0,261	1,108
3	1	48h PMA Maspin	48	PMA	Maspin	0,280	1,191
3	1	48h EGF Maspin	48	EGF	Maspin	0,248	1,057
3	1	48h EGF Maspin	48	EGF	Maspin	0,224	0,953
3	1	48h TGF $\beta$ Maspin	48	TGF $\beta$	Maspin	0,411	1,751
3	1	48h TGF $\beta$ Maspin	48	TGF $\beta$	Maspin	0,443	1,885
3	1	48h Forskolin Maspin	48	Forskolin	Maspin	0,186	0,791
3	1	48h Forskolin Maspin	48	Forskolin	Maspin	0,163	0,692
3	1	48h b-FGF Maspin	48	b-FGF	Maspin	0,294	1,250
3	1	48h b-FGF Maspin	48	b-FGF	Maspin	0,265	1,127
3	1	72h Kontrolle Maspin	72	Kontrolle	Maspin	0,183	1,000
3	1	72h Kontrolle Maspin	72	Kontrolle	Maspin	0,177	0,968
3	1	72h PMA Maspin	72	PMA	Maspin	0,424	2,323
3	1	72h PMA Maspin	72	PMA	Maspin	0,430	2,356
3	1	72h EGF Maspin	72	EGF	Maspin	0,187	1,026
3	1	72h EGF Maspin	72	EGF	Maspin	0,164	0,899
3	1	72h TGF $\beta$ Maspin	72	TGF $\beta$	Maspin	0,173	0,947
3	1	72h TGF $\beta$ Maspin	72	TGF $\beta$	Maspin	0,191	1,047
3	1	72h Forskolin Maspin	72	Forskolin	Maspin	0,073	0,397
3	1	72h Forskolin Maspin	72	Forskolin	Maspin	0,137	0,749
3	1	72h b-FGF Maspin	72	b-FGF	Maspin	0,188	1,031
3	1	72h b-FGF Maspin	72	b-FGF	Maspin	0,173	0,946

3	1	24h Kontrolle DSPP	24	Kontrolle	DSPP	0,318	1,000
3	1	24h Kontrolle DSPP	24	Kontrolle	DSPP	0,361	1,137
3	1	24h PMA DSPP	24	PMA	DSPP	0,085	0,267
3	1	24h PMA DSPP	24	PMA	DSPP	0,078	0,247
3	1	24h EGF DSPP	24	EGF	DSPP	0,203	0,640
3	1	24h EGF DSPP	24	EGF	DSPP	0,078	0,246
3	1	24h TGF $\beta$ DSPP	24	TGF $\beta$	DSPP	0,285	0,898
3	1	24h TGF $\beta$ DSPP	24	TGF $\beta$	DSPP	0,255	0,803
3	1	24h Forskolin DSPP	24	Forskolin	DSPP	0,236	0,743
3	1	24h Forskolin DSPP	24	Forskolin	DSPP	0,171	0,539
3	1	24h b-FGF DSPP	24	b-FGF	DSPP	0,125	0,394
3	1	24h b-FGF DSPP	24	b-FGF	DSPP	0,182	0,573
3	1	48h Kontrolle DSPP	48	Kontrolle	DSPP	0,268	1,000
3	1	48h Kontrolle DSPP	48	Kontrolle	DSPP	0,147	0,550
3	1	48h PMA DSPP	48	PMA	DSPP	0,200	0,748
3	1	48h PMA DSPP	48	PMA	DSPP	0,182	0,682
3	1	48h EGF DSPP	48	EGF	DSPP	0,233	0,870
3	1	48h EGF DSPP	48	EGF	DSPP	0,217	0,812
3	1	48h TGF $\beta$ DSPP	48	TGF $\beta$	DSPP	0,259	0,968
3	1	48h TGF $\beta$ DSPP	48	TGF $\beta$	DSPP	0,274	1,025
3	1	48h Forskolin DSPP	48	Forskolin	DSPP	0,114	0,427
3	1	48h Forskolin DSPP	48	Forskolin	DSPP	0,268	1,001
3	1	48h b-FGF DSPP	48	b-FGF	DSPP	0,188	0,704
3	1	48h b-FGF DSPP	48	b-FGF	DSPP	0,162	0,606
3	1	72h Kontrolle DSPP	72	Kontrolle	DSPP	0,265	1,000
3	1	72h Kontrolle DSPP	72	Kontrolle	DSPP	0,137	0,516
3	1	72h PMA DSPP	72	PMA	DSPP	0,559	2,110
3	1	72h PMA DSPP	72	PMA	DSPP	0,424	1,600
3	1	72h EGF DSPP	72	EGF	DSPP	0,337	1,270
3	1	72h EGF DSPP	72	EGF	DSPP	0,486	1,834
3	1	72h TGF $\beta$ DSPP	72	TGF $\beta$	DSPP	0,317	1,195
3	1	72h TGF $\beta$ DSPP	72	TGF $\beta$	DSPP	0,256	0,967
3	1	72h Forskolin DSPP	72	Forskolin	DSPP	0,199	0,752
3	1	72h Forskolin DSPP	72	Forskolin	DSPP	0,252	0,950
3	1	72h b-FGF DSPP	72	b-FGF	DSPP	0,463	1,746
3	1	72h b-FGF DSPP	72	b-FGF	DSPP	0,442	1,669
1	0	24h Kontrolle DSPP	24	Kontrolle	DSPP	0,189	1,000
1	0	24h Kontrolle DSPP	24	Kontrolle	DSPP	0,169	0,894
1	0	24h PMA DSPP	24	PMA	DSPP	0,135	0,712
1	0	24h PMA DSPP	24	PMA	DSPP	0,138	0,730
1	0	24h EGF DSPP	24	EGF	DSPP	0,161	0,853
1	0	24h EGF DSPP	24	EGF	DSPP	0,148	0,781
1	0	24h TGF $\beta$ DSPP	24	TGF $\beta$	DSPP	0,187	0,992
1	0	24h TGF $\beta$ DSPP	24	TGF $\beta$	DSPP	0,204	1,082
1	0	24h Forskolin DSPP	24	Forskolin	DSPP	0,137	0,727
1	0	24h Forskolin DSPP	24	Forskolin	DSPP	0,167	0,885
1	0	24h b-FGF DSPP	24	b-FGF	DSPP	0,125	0,660

1	0	24h b-FGF DSPP	24	b-FGF	DSPP	0,100	0,529
1	0	48h Kontrolle DSPP	48	Kontrolle	DSPP	0,246	1,000
1	0	48h Kontrolle DSPP	48	Kontrolle	DSPP	0,201	0,817
1	0	48h PMA DSPP	48	PMA	DSPP	0,074	0,300
1	0	48h PMA DSPP	48	PMA	DSPP	0,085	0,346
1	0	48h EGF DSPP	48	EGF	DSPP	0,190	0,770
1	0	48h EGF DSPP	48	EGF	DSPP	0,147	0,596
1	0	48h TGF $\beta$ DSPP	48	TGF $\beta$	DSPP	0,159	0,646
1	0	48h TGF $\beta$ DSPP	48	TGF $\beta$	DSPP	0,171	0,693
1	0	48h Forskolin DSPP	48	Forskolin	DSPP	0,119	0,482
1	0	48h Forskolin DSPP	48	Forskolin	DSPP	0,113	0,459
1	0	48h b-FGF DSPP	48	b-FGF	DSPP	0,288	1,172
1	0	48h b-FGF DSPP	48	b-FGF	DSPP	0,315	1,281
1	0	72h Kontrolle DSPP	72	Kontrolle	DSPP	0,266	1,000
1	0	72h Kontrolle DSPP	72	Kontrolle	DSPP	0,276	1,036
1	0	72h PMA DSPP	72	PMA	DSPP	0,312	1,172
1	0	72h PMA DSPP	72	PMA	DSPP	0,303	1,137
1	0	72h EGF DSPP	72	EGF	DSPP	0,142	0,534
1	0	72h EGF DSPP	72	EGF	DSPP	0,177	0,665
1	0	72h TGF $\beta$ DSPP	72	TGF $\beta$	DSPP	0,221	0,831
1	0	72h TGF $\beta$ DSPP	72	TGF $\beta$	DSPP	0,260	0,977
1	0	72h Forskolin DSPP	72	Forskolin	DSPP	0,214	0,806
1	0	72h Forskolin DSPP	72	Forskolin	DSPP	0,201	0,755
1	0	72h b-FGF DSPP	72	b-FGF	DSPP	0,162	0,609
1	0	72h b-FGF DSPP	72	b-FGF	DSPP	0,164	0,617
1	0	24h Kontrolle Maspin	24	Kontrolle	Maspin	0,004	1,000
1	0	24h Kontrolle Maspin	24	Kontrolle	Maspin	0,004	1,003
1	0	24h PMA Maspin	24	PMA	Maspin	0,003	0,930
1	0	24h PMA Maspin	24	PMA	Maspin	0,002	0,703
1	0	24h EGF Maspin	24	EGF	Maspin	0,005	1,354
1	0	24h EGF Maspin	24	EGF	Maspin	0,004	1,107
1	0	24h TGF $\beta$ Maspin	24	TGF $\beta$	Maspin	0,004	1,081
1	0	24h TGF $\beta$ Maspin	24	TGF $\beta$	Maspin	0,004	1,204
1	0	24h Forskolin Maspin	24	Forskolin	Maspin	0,003	0,729
1	0	24h Forskolin Maspin	24	Forskolin	Maspin	0,003	0,860
1	0	24h b-FGF Maspin	24	b-FGF	Maspin	0,003	0,862
1	0	24h b-FGF Maspin	24	b-FGF	Maspin	0,001	0,364
1	0	48h Kontrolle Maspin	48	Kontrolle	Maspin	0,005	1,000
1	0	48h Kontrolle Maspin	48	Kontrolle	Maspin	0,005	0,960
1	0	48h PMA Maspin	48	PMA	Maspin	0,003	0,496
1	0	48h PMA Maspin	48	PMA	Maspin	0,002	0,435
1	0	48h EGF Maspin	48	EGF	Maspin	0,004	0,704
1	0	48h EGF Maspin	48	EGF	Maspin	0,004	0,734
1	0	48h TGF $\beta$ Maspin	48	TGF $\beta$	Maspin	0,003	0,612
1	0	48h TGF $\beta$ Maspin	48	TGF $\beta$	Maspin	0,003	0,623
1	0	48h Forskolin Maspin	48	Forskolin	Maspin	0,003	0,677
1	0	48h Forskolin Maspin	48	Forskolin	Maspin	0,003	0,611

1	0	48h b-FGF Maspin	48	b-FGF	Maspin	0,006	1,250
1	0	48h b-FGF Maspin	48	b-FGF	Maspin	0,006	1,185
1	0	72h Kontrolle Maspin	72	Kontrolle	Maspin	0,005	1,000
1	0	72h Kontrolle Maspin	72	Kontrolle	Maspin	0,006	1,043
1	0	72h PMA Maspin	72	PMA	Maspin	0,007	1,292
1	0	72h PMA Maspin	72	PMA	Maspin	0,005	1,001
1	0	72h EGF Maspin	72	EGF	Maspin	0,004	0,772
1	0	72h EGF Maspin	72	EGF	Maspin	0,004	0,698
1	0	72h TGF $\beta$ Maspin	72	TGF $\beta$	Maspin	0,004	0,786
1	0	72h TGF $\beta$ Maspin	72	TGF $\beta$	Maspin	0,004	0,708
1	0	72h Forskolin Maspin	72	Forskolin	Maspin	0,003	0,482
1	0	72h Forskolin Maspin	72	Forskolin	Maspin	0,005	0,856
1	0	72h b-FGF Maspin	72	b-FGF	Maspin	0,004	0,705
1	0	72h b-FGF Maspin	72	b-FGF	Maspin	0,004	0,733
4	0	24h Kontrolle DSPP	24	Kontrolle	DSPP	0,124	1,000
4	0	24h Kontrolle DSPP	24	Kontrolle	DSPP	0,089	0,721
4	0	24h PMA DSPP	24	PMA	DSPP	0,083	0,669
4	0	24h PMA DSPP	24	PMA	DSPP	0,101	0,810
4	0	24h EGF DSPP	24	EGF	DSPP	0,073	0,586
4	0	24h EGF DSPP	24	EGF	DSPP	0,111	0,896
4	0	24h Forskolin DSPP	24	Forskolin	DSPP	0,073	0,589
4	0	24h Forskolin DSPP	24	Forskolin	DSPP	0,087	0,698
4	0	48h Kontrolle DSPP	48	Kontrolle	DSPP	0,157	1,000
4	0	48h Kontrolle DSPP	48	Kontrolle	DSPP	0,088	0,560
4	0	48h PMA DSPP	48	PMA	DSPP	0,084	0,534
4	0	48h PMA DSPP	48	PMA	DSPP	0,083	0,531
4	0	48h EGF DSPP	48	EGF	DSPP	0,061	0,389
4	0	48h EGF DSPP	48	EGF	DSPP	0,053	0,337
4	0	48h Forskolin DSPP	48	Forskolin	DSPP	0,109	0,695
4	0	48h Forskolin DSPP	48	Forskolin	DSPP	0,112	0,709
4	0	72h Kontrolle DSPP	72	Kontrolle	DSPP	0,197	1,000
4	0	72h Kontrolle DSPP	72	Kontrolle	DSPP	0,194	0,982
4	0	72h PMA DSPP	72	PMA	DSPP	0,212	1,073
4	0	72h PMA DSPP	72	PMA	DSPP	0,209	1,059
4	0	72h EGF DSPP	72	EGF	DSPP	0,071	0,358
4	0	72h EGF DSPP	72	EGF	DSPP	0,085	0,430
4	0	72h Forskolin DSPP	72	Forskolin	DSPP	0,097	0,489
4	0	72h Forskolin DSPP	72	Forskolin	DSPP	0,108	0,545
4	1	24h Kontrolle DSPP	24	Kontrolle	DSPP	0,119	1,000
4	1	24h Kontrolle DSPP	24	Kontrolle	DSPP	0,119	1,000
4	1	24h PMA DSPP	24	PMA	DSPP	0,075	0,629
4	1	24h PMA DSPP	24	PMA	DSPP	0,056	0,473
4	1	24h EGF DSPP	24	EGF	DSPP	0,040	0,339
4	1	24h EGF DSPP	24	EGF	DSPP	0,066	0,557
4	1	24h Forskolin DSPP	24	Forskolin	DSPP	0,220	1,852
4	1	24h Forskolin DSPP	24	Forskolin	DSPP	0,208	1,748
4	1	48h Kontrolle DSPP	48	Kontrolle	DSPP	0,197	1,000

4	1	48h Kontrolle DSPP	48	Kontrolle	DSPP	0,216	1,097
4	1	48h PMA DSPP	48	PMA	DSPP	0,100	0,507
4	1	48h PMA DSPP	48	PMA	DSPP	0,122	0,617
4	1	48h EGF DSPP	48	EGF	DSPP	0,102	0,515
4	1	48h EGF DSPP	48	EGF	DSPP	0,113	0,573
4	1	48h Forskolin DSPP	48	Forskolin	DSPP	0,122	0,616
4	1	48h Forskolin DSPP	48	Forskolin	DSPP	0,117	0,592
4	1	72h Kontrolle DSPP	72	Kontrolle	DSPP	0,206	1,000
4	1	72h Kontrolle DSPP	72	Kontrolle	DSPP	0,186	0,900
4	1	72h PMA DSPP	72	PMA	DSPP	0,152	0,737
4	1	72h PMA DSPP	72	PMA	DSPP	0,207	1,001
4	1	72h EGF DSPP	72	EGF	DSPP	0,099	0,481
4	1	72h EGF DSPP	72	EGF	DSPP	0,093	0,451
4	1	72h Forskolin DSPP	72	Forskolin	DSPP	0,046	0,222
4	1	72h Forskolin DSPP	72	Forskolin	DSPP	0,076	0,370
4	1	24h Kontrolle Maspin	24	Kontrolle	Maspin	0,006	1,000
4	1	24h Kontrolle Maspin	24	Kontrolle	Maspin	0,005	0,789
4	1	24h PMA Maspin	24	PMA	Maspin	0,002	0,359
4	1	24h PMA Maspin	24	PMA	Maspin	0,002	0,262
4	1	24h EGF Maspin	24	EGF	Maspin	0,001	0,250
4	1	24h EGF Maspin	24	EGF	Maspin	0,002	0,259
4	1	24h Forskolin Maspin	24	Forskolin	Maspin	0,007	1,191
4	1	24h Forskolin Maspin	24	Forskolin	Maspin	0,006	0,993
4	1	48h Kontrolle Maspin	48	Kontrolle	Maspin	0,011	1,000
4	1	48h Kontrolle Maspin	48	Kontrolle	Maspin	0,007	0,710
4	1	48h PMA Maspin	48	PMA	Maspin	0,005	0,476
4	1	48h PMA Maspin	48	PMA	Maspin	0,003	0,327
4	1	48h EGF Maspin	48	EGF	Maspin	0,004	0,414
4	1	48h EGF Maspin	48	EGF	Maspin	0,004	0,373
4	1	48h Forskolin Maspin	48	Forskolin	Maspin	0,005	0,471
4	1	48h Forskolin Maspin	48	Forskolin	Maspin	0,006	0,571
4	1	72h Kontrolle Maspin	72	Kontrolle	Maspin	0,005	1,000
4	1	72h Kontrolle Maspin	72	Kontrolle	Maspin	0,007	1,368
4	1	72h PMA Maspin	72	PMA	Maspin	0,007	1,238
4	1	72h PMA Maspin	72	PMA	Maspin	0,006	1,134
4	1	72h EGF Maspin	72	EGF	Maspin	0,004	0,674
4	1	72h EGF Maspin	72	EGF	Maspin	0,005	0,993
4	1	72h Forskolin Maspin	72	Forskolin	Maspin	0,002	0,363
4	1	72h Forskolin Maspin	72	Forskolin	Maspin	0,002	0,370
4	0	24h Kontrolle Maspin	24	Kontrolle	Maspin	0,005	1,000
4	0	24h Kontrolle Maspin	24	Kontrolle	Maspin	0,004	0,941
4	0	24h PMA Maspin	24	PMA	Maspin	0,002	0,354
4	0	24h PMA Maspin	24	PMA	Maspin	0,002	0,335
4	0	24h EGF Maspin	24	EGF	Maspin	0,004	0,797
4	0	24h EGF Maspin	24	EGF	Maspin	0,003	0,752
4	0	24h Forskolin Maspin	24	Forskolin	Maspin	0,006	1,245
4	0	24h Forskolin Maspin	24	Forskolin	Maspin	0,004	0,916

4	0	48h Kontrolle Maspin	48	Kontrolle	Maspin	0,002	1,000
4	0	48h Kontrolle Maspin	48	Kontrolle	Maspin	0,003	1,125
4	0	48h PMA Maspin	48	PMA	Maspin	0,003	1,179
4	0	48h PMA Maspin	48	PMA	Maspin	0,002	0,836
4	0	48h EGF Maspin	48	EGF	Maspin	0,001	0,256
4	0	48h EGF Maspin	48	EGF	Maspin	0,001	0,285
4	0	48h Forskolin Maspin	48	Forskolin	Maspin	0,004	1,569
4	0	48h Forskolin Maspin	48	Forskolin	Maspin	0,002	0,880
4	0	72h Kontrolle Maspin	72	Kontrolle	Maspin	0,002	1,000
4	0	72h Kontrolle Maspin	72	Kontrolle	Maspin	0,002	0,906
4	0	72h PMA Maspin	72	PMA	Maspin	0,002	0,803
4	0	72h PMA Maspin	72	PMA	Maspin	0,002	0,635
4	0	72h EGF Maspin	72	EGF	Maspin	0,001	0,576
4	0	72h EGF Maspin	72	EGF	Maspin	0,002	0,726
4	0	72h Forskolin Maspin	72	Forskolin	Maspin	0,004	1,797
4	0	72h Forskolin Maspin	72	Forskolin	Maspin	0,003	1,402
5	1	24h Kontrolle DSPP	24	Kontrolle	DSPP	3,174	1,000
5	1	24h Kontrolle DSPP	24	Kontrolle	DSPP	3,055	0,962
5	1	24h PMA DSPP	24	PMA	DSPP	2,582	0,813
5	1	24h PMA DSPP	24	PMA	DSPP	3,422	1,078
5	1	24h EGF DSPP	24	EGF	DSPP	2,874	0,905
5	1	24h EGF DSPP	24	EGF	DSPP	3,492	1,100
5	1	24h b-FGF DSPP	24	b-FGF	DSPP	2,051	0,646
5	1	24h b-FGF DSPP	24	b-FGF	DSPP	2,479	0,781
5	1	24h Forskolin DSPP	24	Forskolin	DSPP	6,109	1,924
5	1	24h Forskolin DSPP	24	Forskolin	DSPP	5,377	1,694
5	1	24h TGF $\beta$ DSPP	24	TGF $\beta$	DSPP	8,793	2,770
5	1	24h TGF $\beta$ DSPP	24	TGF $\beta$	DSPP	7,568	2,384
5	1	48h Kontrolle DSPP	48	Kontrolle	DSPP	5,287	1,000
5	1	48h Kontrolle DSPP	48	Kontrolle	DSPP	5,333	1,009
5	1	48h PMA DSPP	48	PMA	DSPP	5,505	1,041
5	1	48h PMA DSPP	48	PMA	DSPP	4,149	0,785
5	1	48h EGF DSPP	48	EGF	DSPP	4,200	0,794
5	1	48h EGF DSPP	48	EGF	DSPP	3,059	0,578
5	1	48h b-FGF DSPP	48	b-FGF	DSPP	8,721	1,649
5	1	48h b-FGF DSPP	48	b-FGF	DSPP	7,814	1,478
5	1	48h Forskolin DSPP	48	Forskolin	DSPP	4,417	0,835
5	1	48h Forskolin DSPP	48	Forskolin	DSPP	4,173	0,789
5	1	48h TGF $\beta$ DSPP	48	TGF $\beta$	DSPP	7,536	1,425
5	1	48h TGF $\beta$ DSPP	48	TGF $\beta$	DSPP	8,112	1,534
5	1	72h Kontrolle DSPP	72	Kontrolle	DSPP	3,599	1,000
5	1	72h Kontrolle DSPP	72	Kontrolle	DSPP	2,740	0,761
5	1	72h PMA DSPP	72	PMA	DSPP	4,735	1,316
5	1	72h PMA DSPP	72	PMA	DSPP	4,847	1,347
5	1	72h EGF DSPP	72	EGF	DSPP	2,105	0,585
5	1	72h EGF DSPP	72	EGF	DSPP	1,898	0,527
5	1	72h b-FGF DSPP	72	b-FGF	DSPP	5,683	1,579

5	1	72h b-FGF DSPP	72	b-FGF	DSPP	4,365	1,213
5	1	72h Forskolin DSPP	72	Forskolin	DSPP	2,861	0,795
5	1	72h Forskolin DSPP	72	Forskolin	DSPP	3,167	0,880
5	1	72h TGF $\beta$ DSPP	72	TGF $\beta$	DSPP	2,831	0,786
5	1	72h TGF $\beta$ DSPP	72	TGF $\beta$	DSPP	2,729	0,758
5	0	24h Kontrolle DSPP	24	Kontrolle	DSPP	6,834	1,000
5	0	24h Kontrolle DSPP	24	Kontrolle	DSPP	5,907	0,864
5	0	24h PMA DSPP	24	PMA	DSPP	2,447	0,358
5	0	24h PMA DSPP	24	PMA	DSPP	2,751	0,403
5	0	24h EGF DSPP	24	EGF	DSPP	5,022	0,735
5	0	24h EGF DSPP	24	EGF	DSPP	5,286	0,774
5	0	24h b-FGF DSPP	24	b-FGF	DSPP	5,478	0,802
5	0	24h b-FGF DSPP	24	b-FGF	DSPP	5,478	0,802
5	0	24h Forskolin DSPP	24	Forskolin	DSPP	1,189	0,174
5	0	24h Forskolin DSPP	24	Forskolin	DSPP	0,857	0,125
5	0	24h TGF $\beta$ DSPP	24	TGF $\beta$	DSPP	3,410	0,499
5	0	24h TGF $\beta$ DSPP	24	TGF $\beta$	DSPP	3,571	0,523
5	0	72h Kontrolle DSPP	72	Kontrolle	DSPP	10,294	1,000
5	0	72h Kontrolle DSPP	72	Kontrolle	DSPP	11,324	1,100
5	0	72h PMA DSPP	72	PMA	DSPP	8,955	0,870
5	0	72h PMA DSPP	72	PMA	DSPP	11,493	1,116
5	0	72h EGF DSPP	72	EGF	DSPP	10,548	1,025
5	0	72h EGF DSPP	72	EGF	DSPP	8,543	0,830
5	0	72h b-FGF DSPP	72	b-FGF	DSPP	12,339	1,199
5	0	72h b-FGF DSPP	72	b-FGF	DSPP	10,242	0,995
5	0	72h Forskolin DSPP	72	Forskolin	DSPP	3,854	0,374
5	0	72h Forskolin DSPP	72	Forskolin	DSPP	3,822	0,371
5	0	72h TGF $\beta$ DSPP	72	TGF $\beta$	DSPP	7,127	0,692
5	0	72h TGF $\beta$ DSPP	72	TGF $\beta$	DSPP	7,052	0,685

## Ergebnisse Western Blot

24h

Proben	BC SUM DSPP		BC SUM $\beta$ -Aktin	
HaCat	68.560	59460	94839	196046
Kontrolle	258.186	105922	117.568	351.893
PMA	244.145	87656	158.191	406.961
EGF	278.253	107046	178.308	497.978
bFGF	301.163	78860	171471	423698
Kontrolle	221.339	86694	170102	453707
PMA	95.977	75557	159428	415930
EGF	145.421	102832	148.797	361.699
bFGF	129.407	93512	174.042	496.623

HaCat	34.210	50.550	109.857	324.876
Kontrolle	75.047	97.411	183.459	474.881
Forskolin	68.920	93.918	187.443	503.591
TGF $\beta$	85.072	108.708	182.542	478.971
Kontrolle	81.901	98.881	175.365	380.993
Forskolin	50.253	72.473	160.741	356.084
TGF $\beta$	78.045	100.586	117.552	504.382

48h

Proben	BC SUM DSPP		BC SUM $\beta$ -Aktin	
HaCat	32.720	36.567	106810	294863
Kontrolle	141.020	58.002	176.519	499.019
PMA	130.296	59.477	163.579	457.176
EGF	196.972	82.933	184.127	464.814
bFGF	250.556	61.312	174581	538013
Kontrolle	52.265	49.957	136750	429802
PMA	40.816	59.454	97159	404770
EGF	54.009	76.867	118.490	396.261
bFGF	74.661	74.116	176.446	388.833
HaCat	52.626	72.636	83.413	297.574
Kontrolle	148.327	98.735	157.404	515.126
Forskolin	239.978	115.348	173.891	424.882
TGF $\beta$	207.251	165.022	178.379	389.653
Kontrolle	56.386	95.964	126.963	390.384
Forskolin	58.531	96.918	140.319	426.971
TGF $\beta$	105.573	114.714	183.845	537.724

72h

Proben	BC SUM DSPP		BC SUM $\beta$ -Aktin	
HaCat	46.926	72.081	247580	246356
Kontrolle	224.162	270.553	497.291	525.531
PMA	188.690	235.649	437.384	468.629
EGF	211.826	252.974	413.764	434.516
bFGF	218.775	246.101	385398	414717

Kontrolle	181.923	218.434	396912	442962
PMA	40.025	68.620	229292	250117
EGF	121.482	157.752	376.696	398.071
bFGF	126.748	165.097	333.716	370.312
HaCat	50.772	141.645	272.416	281.490
Kontrolle	395.727	478.420	547.149	576.295
Forskolin	318.057	397.595	445.309	483.074
TGF $\beta$	317.664	426.709	495.520	525.004
Kontrolle	240.877	347.115	490.504	515.497
Forskolin	137.809	193.265	413.174	456.970
TGF $\beta$	89.291	166.670	353.348	407.898

## **Erklärungen**

### **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertationsarbeit ohne unzulässige Hilfsmittel oder unzulässige Hilfestellung dritter Personen und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel erstellt habe. Daten aus anderen Quellen wurden entsprechend gekennzeichnet.

Halle, den \_\_\_\_\_

(Antje Diederich)

### **Erklärung über frühere Promotionsversuche**

Hiermit erkläre ich, dass keine früheren Promotionsversuche mit der gleichen oder einer anderen Dissertationsarbeit erfolgt sind. Die vorliegende Arbeit wurde von mir nur an der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg eingereicht.

Halle, den \_\_\_\_\_

(Antje Diederich)

**Tabellarischer Lebenslauf**

seit 14.04.2014	wissenschaftliche Mitarbeiterin und Zahnärztin an der Universitätspoliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
30.12.2013	Approbation als Zahnärztin
5.11.2013	Staatsexamen Zahnmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
seit 2012	Mitarbeiterin in der Arbeitsgruppe Experimentelle und Chirurgische Onkologie unter Prof. Dr. Cuong Hoang-Vu mit dem Schwerpunkt „Regenerative Zahnmedizin“
2008	Immatrikulation an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg im Studiengang Zahnmedizin
2007	Studium an der Bauhausuniversität Weimar Studiengang Architektur
2007	Abitur
1998-2007	Besuch des Norbertusgymnasiums in Magdeburg
1994-1998	Besuch der Grundschule Witzlebenstraße in Magdeburg
17.03.1988	geboren in Magdeburg
	Eltern: Ellen Diederich
	Diplomingenieurin für Hoch- und Ingenieurbauten
	Uwe Karl-Franz Diederich
	Architekt und Diplomingenieur für Hoch- und Ingenieurbauten

## **Danksagung**

Hiermit danke ich Prof. Dr. Cuong Hoang-Vu und Prof. Christian Gernhardt für die Betreuung dieser Arbeit.

Ebenfalls möchte ich meinem Chef Prof. Hans-Günter Schaller danken, dass er mich jederzeit in der Zusammenarbeit mit dem ECHO-Labor unterstützt hat.

Herzlich danke ich auch Frau Kathrin Hammje und Dr. Bogusz Trojanowicz für Ihre Hilfe und Unterstützung.

Zusätzlich danke ich Dr. Alexander Navarrete Santos für die Möglichkeit der Sortierung der Zellen mittels Durchflusszytometrie.

Diese Arbeit wurde im ECHO-Labor der Universitätsklinik und Poliklinik Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie der MLU durchgeführt.