# 4 In-vitro-Untersuchungen

# 4.1 Monolayerkulturen

## Kulturen mit humanen PDL-Zellen

Humane PDL-Zellen wurden von den Wurzeloberflächen von Zähnen isoliert, die aus kieferorthopädischen Gründen extrahiert werden mussten. Die Probanden wurden mündlich und schriftlich über Inhalt und Verlauf der Studie informiert, die von der Ethikkommission der Charité genehmigt wurde. Nach Extraktion wurden unter sterilen Bedingungen aus dem mittleren Wurzeldrittel die parodontalen Ligamentzellen mit einem Skalpell abgelöst und zunächst als Monolayerkulturen in Standardmedium, Dulbeccos modified Eagle Medium (DMEM), mit 10% fetalem Kälberserum (FCS), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2.5 µg/ml Amphotericin B, und 50 µg/ml Ascorbinsäure kultiviert (alle von Biochrom, Berlin). Mediumwechsel erfolgte 2-3-mal wöchentlich. Die Zellen wurden dann für Versuche in der Monolayerkultur oder nach ca. 2-3 Passagen für Versuche im Organoidkulturmodell eingesetzt. Die Abb. 5 zeigt exemplarisch das Wachstum der PDL-Zellen in der Monolayer-Kultur mit Fibroblasten-typischer Morphologie.



Abb. 5: Wachstum der PDL-Fibroblasten nach 4 Tagen in Monolayerkultur. Morphologisch erscheinen die Fibroblasten als langgestreckte, spindelförmige Zellen in dichtem Zellrasen (Vergrößerung x 100).

#### 4.1.1 Zellproliferation

Die Bestimmung der metabolischen Aktivität als Parameter für Zellaktivität und proliferation erfolgte mit einem kommerziellen MTT-Test (Boehringer, Mannheim). 10<sup>3</sup> Zellen wurden in jedem Well einer 96-Well-Microtiterplatte (Nunc, Dänemark) in Standardmedium kultiviert und zunächst über Nacht adhäriert. Am folgenden Tag wurden die Medien durch Testmedien ersetzt, bestehend aus DMEM mit 2% FCS (Kontrolle) oder DMEM mit 2% FCS und verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanzen EMD, Ax, Bx, Cx (100 ug/ml), Fx (50 µg/ml) und rHAM (10 µg/ml). Die optimalen Konzentrationen für die Testsubstanzen wurden in Vorversuchen bestimmt. EMD wurde zuerst in einer Konzentration von 15 mg/ml in Propylen-Glycol-Alginat (PGA, Biora) aufgelöst und dann weiter verdünnt in Kulturmedium. Der Gesamtgehalt an PGA war bei allen Konzentrationen und den Kontrollen identisch. Mindestens 8 Experimente mit jeweils 6 Kulturen parallel wurden durchgeführt. Nach 48 h Kultivierungszeit wurde das Zellwachstum in jedem Well bestimmt durch den Tetrazoliumsalz-Assay (Cell Proliferation Kit I MTT, Boehringer). Die Zellen wurden für zusätzliche 4 h mit Tetrazoliumsalz (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) inkubiert, das bei metabolisch aktiven Zellen durch Dehydrogenaseaktivität zu Formazan reduziert und als Reaktionsprodukt sichtbar wird. Die metabolische Zellaktivität wurde durch Absorption bei 570 nm Wellenlänge mit einem Spektrophotometer (Microplate Reader 3550, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) gemessen. Die MTT-Aktivität wurde jeweils auf den Mittelwert der Kontrollen bei jedem Experiment bezogen und als Prozentwert berechnet. Die statistische Auswertung erfolgte mit Varianzanalyse (ANOVA) und Scheffé-Korrektur für multiple Vergleiche.

## Ergebnisse:

Die Zellproliferation der PDL-Zellen war bei Kokultivierung mit Schmelzmatrixproteinen gegenüber den Kontrollen generell erhöht (Abb. 6). Signifikante Steigerungen fanden sich bei Stimulierungen mit Emdogain<sup>®</sup>, Ax, Fx und rHAM (p<0,01). Der höchste MTT-Umsatz zeigte sich bei Stimulierung mit Emdogain<sup>®</sup>, wobei die Unterschiede zu Ax, rHAM und Fx aber nicht signifikant waren. Die Anwendungen von Bx und Cx ergaben gegenüber der Kontrolle keine signifikanten Änderungen. Zusammenfassend resultierten die Stimulierungen mit Emdogain<sup>®</sup>, Ax, Fx und rHAM in erhöhten Zellproliferationen, gemessen anhand des MTT-Umsatzes (Tab. 3).



Abb. 6: MTT-Umsatz der PDL-Zellen nach 48 h bei Stimulierung mit SMP. \*: Statistisch signifikant zur Kontrolle im ANOVA, p<0,01.

	n	Mittelwert	Std	Median	р
Emdogain <sup>®</sup>	13	148,3	46,2	145,6	<0,001
Ax 12		140,1	42,5	131,2	<0,001
Bx	13	113,8	47,7	97,0	0,76
Сх	8	120,5	20,0	119,1	0,43
rHAM	8	140,3	23,3	140,3	0,001
Fx	12	137,8	38,9	130,9	<0,001

Tab. 3: MTT-Umsatz der PDL-Zellen bezogen auf den Mittelwert der Kontrollen jeden Experiments (Std.: Standardabweichung).

#### 4.1.2 DNA-Synthese

Die Nukleinsäuresynthese der Zellen als weiterer Parameter zur Quantifizierung der Zellproliferation wurde mit Hilfe eines kolorimetrischen Immunoassays (Cell proliferation ELISA, BrdU Kit, Roche Diagnostics, Mannheim) bei 405 nm Wellenlänge bestimmt. Der Test basiert auf dem Einbau des Pyrimidin-analogs BrdU (5-Bromo-2'-deoxyuridine) anstelle von Thymidin in neu synthetisierte DNA replizierender Zellen (2 h Markierungszeit) und dessen Nachweis durch ELISA. Desmodontale Fibroblasten (10<sup>3</sup> pro Well) wurden in DMEM mit 2% FCS kultiviert, mit den in Vorversuchen bestimmten zusammen Konzentrationen der Testsubstanzen in einer 96-Well Mikrotiterplatte. Die Konzentrationen waren 100 µg/ml für EMD, Ax, Bx und Cx, 50 µg/ml für Fx und 10 µg/ml für rHAM. DMEM mit Zusatz von 2% FCS diente als Kontrolle. Die Inkubation erfolgte in feuchter Atmosphäre bei 37°C für 48 h. Nach Entfernung des Mediums wurden die Zellen entsprechend Herstellerangabe fixiert und die DNA denaturiert. Danach wurde ein monoklonaler anti-BrdU-Antikörper (Clone BMG 6H8), markiert mit Peroxidase, für 90 min. inkubiert. Anschließend erfolgte die Detektion der Immunkomplexe anhand einer Substratreaktion mit TMB (Tetramethyl-Benzidin) und die Messung der optischen Dichte (Optical density, O.D.) mit einem Spektrophotometer (Microplate Reader 3550, Bio-Rad) bei 450 nm. Die Resultate basieren auf mindestens 7 separaten Experimenten mit jeweils 6 parallelen Kulturen. Die statistische Auswertung wurde jeweils prozentual auf den Mittelwert der Kontrollen bei jedem Versuch bezogen und erfolgte durch ANOVA mit Scheffé-Korrektur für multiple Vergleiche.

## Ergebnisse:

Die DNA-Synthese der PDL-Zellen nach 48 h wurde durch Stimulierung mit Schmelzmatrixproteinen erhöht, mit der Ausnahme von Cx. Bei Stimulierung mit Emdogain<sup>®</sup>, Ax, rHAM und Fx fanden sich signifikante Steigerungen gegenüber der Kontrolle, wobei die Anwendung von Emdogain<sup>®</sup> die höchste Steigerung ergab. Die Unterschiede zwischen Emdogain<sup>®</sup> und Ax, rHAM und Fx waren aber nicht signifikant. Bx- und Cx-Proteinstimulierungen waren nicht signifikant unterschiedlich zur Kontrolle mit 2% FCS.



Abb. 7: BrdU-Einbau der PDL-Zellen nach 48 h bei Stimulierung mit SMP. \*: Statistisch signifikant zur Kontrolle im ANOVA, p<0,01.

	n	Mittelwert	Std	Median	р
Emdogain <sup>®</sup>	7	158,3	42,2	149,8	<0,001
Ax	9	135,8	29,5	132,6	<0,001
Bx	7	108,5	23,5	107,6	0,61
Сх	7	95,9	20,6	90,8	1,0
rHAM 7		124,4	18,9	124,6	<0,001
Fx	9	128,1	33,1	122,2	<0,001

Tab. 4: DNA-Synthese der PDL-Zellen, gemessen anhand des BrdU-Einbaus und bezogen auf den Mittelwert der Kontrollen jeden Experiments.

#### 4.1.3 Kollagensynthese

Zum histologischen Nachweis der Kollagensynthese und der Zellproliferation wurde eine immunhistologische Darstellung mit semiguantitativer Auswertung im Lichtmikroskop angewendet. Jeweils 10<sup>4</sup> PDL-Zellen wurden auf einer 8-Kammer-Objektträgerplatte (Lab-Tek II, Nunc) in Standardmedium mit 2 % FCS über 2 und 5 Tage inkubiert (0,5 ml einer Zell-Lösung von 2x10<sup>4</sup> Zellen/ml). Die Schmelzmatrixproteine als Testsubstanzen wurden ab dem ersten Tag zusätzlich in das Medium gegeben. Die verwendeten Konzentrationen waren 100 µg/ml für Ax, Bx, Cx und EMD, 50 µg/ml für Fx bzw. 10 µg/ml für rHAM. Jeweils drei Experimente wurden für jeden Zeitpunkt durchgeführt. Die Verwendung der 8ermöglichte in jedem Kammerplatten Experiment den Ansatz aller Testsubstanzen sowie der Kontrollen auf jeweils derselben Platte.

Nach 2 und 5 Tagen erfolgte die immunhistochemische Darstellung mit dem LSAB2 System, Peroxidase (Dako, Carpinteria, CA, USA). Nach Entfernung des Kammeraufsatzes wurden die Kulturen vorsichtig mit PBS gewaschen und anschließend in Ethanol/Aceton (99:1 v/v) für 10 min. fixiert. Dann wurden die Platten mit 0,05 M Tris/HCI-Puffer, pH 7.2-7.6 (Merck, Darmstadt) gewaschen und vorsichtig getrocknet. Zur Blockierung endogener Peroxidasen wurden die Platten 5 min. mit 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde anschließend der primäre Antikörper über eine Zeit von 10 min. eingesetzt. Vor Anwendung wurde der monoklonale anti-Kollagen I-Antikörper (MAB3391, Chemicon, Victoria, Australien) 1:100 in Assaypuffer (0.05 M Tris/HCL Puffer, pH 7.2-7.6, mit 1% BSA (Bayer, Kankakee, IL, USA) verdünnt. Nach dem Waschen der Platten wurde der sekundäre, biotinylierte Link-Antikörper (anti-Maus- und anti-Kaninchen-Immunglobuline, Dako) für 20 min. im Dunkeln bei Raumtemperatur und anschließend Als inkubiert erneut gewaschen. Enzymkonjugat wurde dann Streptavidin, markiert mit Peroxidase (Dako), für 10 min. inkubiert. Nach nochmaligem Waschen erfolgte die Zugabe des Substratchromogens AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol, Dako) für 10 min. Anschließend wurde mit Aqua destillata gewaschen, bevor die Gegenfärbung mit frisch filtriertem Mayer's Hämatoxylin für 5 min. durchgeführt wurde. Die Platten wurden danach noch 10 min. in Aqua dest. gewässert, getrocknet und mit 40°C warmer, wasserbasierter Kaiser's Gelatine (Merck, Darmstadt) eingedeckelt. Die Auswertung der Kollagenfärbungen erfolgte semiguantitativ im Lichtmikroskop

(Axiophot, Zeiss, Oberkochen) bei 25facher Vergrößerung anhand der Mittelwerte von drei zufällig eingestellten Arealen (0,25 x 0,25 mm<sup>2</sup>) nach folgenden Einteilungen (modifiziert nach [12]):

0: keine Expression (keine positive Reaktion)
+: geringe Expression (schwache Färbung, < 15 Zellen/Areal)</li>
++: mittlere Expression (mittlere Färbung, 15-30 Zellen/Areal)
+++: starke Expression (starke Färbung, > 30 Zellen/Areal)

Ergebnisse:

Die immunhistologischen Färbungen zeigten in allen Kulturen Kollagenmarkierungen nach zwei und fünf Tagen. Die Ergebnisse zeigten vor allem nach fünf Tagen eine intensive intra- und extrazelluläre Kollagenmarkierung der PDL-Zellen mit Abgrenzungen der Zellkerne.

In höherer Vergrößerung zeigte sich detailliert die Markierung des Kollagens Typ I in den Fibroblastenkulturen sowie die Darstellung der Zellkerne nach Gegenfärbung mit Hämatoxylin (Abb. 8). Die Fibroblasten erschienen länglich ausgestreckt und in lockerem Zusammenhang mit intensiver Kollagenfärbung im intrazellulären Raum sowie extrazellulär. Die Zellen in dieser Monolayerkultur sind nach 5 Tagen noch nicht konfluent.



Abb. 8: Parodontale Fibroblasten nach 5 Tagen bei Stimulierung mit Emdogain<sup>®</sup>. Das zusammenhängende Wachstum der Fibroblasten, die Zellkerne und das neugebildete Kollagen im intra- und extrazellulären Raum werden deutlich (x 90).

Der Vergleich zwischen zwei und fünf Tagen Kultivierungszeit ergab eine deutlich stärkere Expression der Kollagenmarkierungen und der Zellproliferation nach fünf Tagen, während nach zwei Tagen die Markierungen noch schwach ausgeprägt waren (Tab. 5).

	2 d	5 d
Kontrolle	+	++
Emdogain <sup>®</sup>	++	+++
Ax	++	+++
Bx	+	++
Сх	+	++
rHAM	++	+++
Fx	+	+++

Tab. 5: Kollagensynthese: Immunhistologische Markierung der PDL-Zellen mit anti-Kollagen I-Antikörper nach zwei bzw. fünf Tagen (d) Kultivierungszeit.

+: geringe Expression, ++: mittlere Expression, +++: starke Expression.

Im Vergleich zu den Kontrollkulturen ohne Stimulierung waren bei Kokultivierung mit den SMP, insbesondere bei Stimulierung mit Emdogain<sup>®</sup>, Ax oder Ex, deutliche Steigerungen der Kollagensynthese und Proliferation nach 2 und 5 Tagen erkennbar. Die stärkste Kollagenexpression wurde nach 5 Tagen bei Stimulierungen mit Ax, Emdogain<sup>®</sup>, rHAM und Fx-Stimulierung festgestellt. Die Abb. 9 und 10 zeigen repräsentative Darstellungen (Vergrößerung x 25) der PDL-Zellen nach Inkubation mit dem anti-Kollagen I-Antikörper und Gegenfärbung mit Hämatoxylin.



a: PDL-Zellen (Kontrolle)



b: Behandlung mit Ax





d: Behandlung mit Cx



f: Behandlung mit rHAM

e: Behandlung mit Fx



g : Behandlung mit EMD

Abb. 9a-g: Kollagenmarkierungen der PDL-Zellen nach 2 Tagen Kultivierungszeit.



a: PDL-Zellen (Kontrolle)



b: Behandlung mit Ax



d : Behandlung mit Cx



f : Behandlung mit rHAM



c: Behandlung mit Bx



e: Behandlung mit Fx



g: Behandlung mit EMD

Abb. 10a-g: Kollagenmarkierungen der PDL-Zellen nach 5 Tagen Kultivierung.

### 4.1.4 Bestimmung von Wachstumsfaktoren und Mediatoren

In den PDL-Zellkulturen wurde die Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Mediatoren im Medium bestimmt, um Wirkmechanismen sowie Zellfunktionen bei Stimulierung mit Schmelzmatrixproteinen zu evaluieren.

In einem ersten Schritt wurden über Nacht 6-Well-Platten (Durchmesser 3,5 cm, Fläche ca. 10 cm<sup>2</sup>; Nunc, Dänemark) mit Proteinlösungen beschichtet. Die Proteine wurden in Medium gelöst und in Konzentrationen von 500 µg/ml (EMD, Ax, Bx ,Cx), 100 µg/ml (Fx) und 10 µg/ml (rHAM) eingesetzt. Die Konzentrationen orientierten sich an Literaturangaben [42, 82, 286] und wurden in Vorversuchen getestet. Nach vorsichtigem Absaugen der Überstände wurden in jedes Well 5 ml-Zell-Lösung einer Konzentration von 50.000 Zellen/ml eingesetzt. Das Standardmedium DMEM wurde mit Zusätzen von Vitamin C, β-Glycerophosphat und 2 % FCS verwendet. Zusätzlich zum Proteincoating wurden je nach Testgruppe folgende Konzentrationen der Proteine in das Medium zugesetzt: 100 µg/ml (EMD, Ax, Bx, Cx), 20 µg/ml (Fx) bzw. 2 µg/ml (rHAM). Bei jedem Mediumwechsel wurde das identische Medium mit den jeweiligen Zusätzen verwendet. Die Kultivierungszeiten betrugen zwei, fünf oder neun Tage. Nach diesen Zeiten wurden die Mediumüberstände entnommen und deren Gehalt auf freigesetzte Mediatoren mit ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) getestet. Dabei wurden Parameter für die Synthese von Wachstumsfaktoren (IGF-1, TGF-β), inflammatorischer Zytokine (IL-1), Mineralisations-assoziierter Marker (Osteopontin) sowie Adhäsionsmolekülen (ICAM-1) gemessen. Die Auswertung erfolgte bei jeder Versuchsreihe prozentual bezogen auf den Mittelwert der Kontrollen ohne Schmelzmatrixproteine. Die statistische Auswertung wurde mit Varianzanalyse (ANOVA) und Scheffé-Korrektur für multiple Vergleiche durchgeführt.

Die adhärenten PDL-Zellen in den Kulturen wurden nach Entnahme der Überstände entsprechend dem RNeasy-Verfahren (Qiagen) mit Lysepuffer gelöst und für die spätere Bestimmung der mRNA bei –80°C eingefroren (s. Kap. 4.3).

## 4.1.4.1 ELISA für IGF-1-Bestimmung (Insulin-like growth factor 1)

Zur Methode des ELISA ist die Arbeitsvorschrift für die Bestimmung von IGF-1 (Human IGF-1-Kit, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) im Folgenden kurz dargestellt.

Im ersten Schritt wurden die Mikrotiterplatten (Nunc) mit Maus anti-human IGF1-Antikörpern, die in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) auf eine Konzentration von 4 µg/ml verdünnt wurden, beschichtet. Die Beschichtung erfolgte mit einem Volumen von 100 µl pro Well über Nacht bei Raumtemperatur. Danach wurden die Platten dreimal in Waschpuffer (0,05 % Tween 20 in PBS, pH 7,2-7,4) gewaschen. Als Standard wurde rekombinantes humanes rhIGF-1, ausgehend von einer Konzentration von 2000 pg/ml, in sieben Verdünnungen in Schritten 1:2 jeweils mit einem Volumen von 100 µl/well in Doppelbestimmung eingesetzt und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben aus den Medienüberständen wurden direkt oder nach Verdünnung in Assaypuffer (0,1 % Tween 20 und 1 % bovines Serumalbumin in PBS, pH 7,2-7,4) zusammen mit dem rhIGF-1-Standard für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Platten wieder dreimal in Waschpuffer gewaschen. Der Detektionsantikörper, biotinyliertes anti-human IgG, wurde in Assaypuffer auf eine Konzentration von 80 ng/ml verdünnt und dann 2 h bei Raumtemperatur mit jeweils 100 µl pro Well eingesetzt. Nach erneutem Waschen wurden pro Well 100 µl Streptavidin, markiert mit Peroxidase, für 20 min. bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Platten wieder dreimal in Waschpuffer gewaschen. Die Färbung, d.h. die Aktivitätsbestimmung des gebundenen Enzyms, erfolgte im Dunkeln mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Tetramethylbenzidin (TMB) bzw. mit 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> als Stopplösung. Die optische Dichte wurde bei 450 nm Wellenlänge mit einer Referenzmessung bei 490 nm in einem Mikroplatten-Spektroskop MR 5000 (Dynatech, San Francisco, CA, USA) gemessen und mit Microplate Manager Software (Bio-Rad, München) ausgewertet. Insgesamt wurden mindestens sechs individuelle Experimente jeweils zweifach durchgeführt. Die Resultate wurden jeweils auf die Kontrollwerte bezogen und anhand der ANOVA mit Scheffé-Korrektur für multiple Vergleiche statistisch ausgewertet.

#### Ergebnisse:

IGF-1 konnte in den Kontrollkulturen wie auch in allen stimulierten Kulturen nachgewiesen werden. Die Werte zeigten hohe Variabilität und schwankten zwischen 42 und 1265 pg/ml IGF-1. Tendenziell zeigten die Stimulierungen mit SMP erhöhte IGF-1-Konzentrationen zu allen Zeitpunkten in den Medienüberständen, die aber nicht immer signifikant waren. Signifikante Unterschiede fanden sich bei Stimulierung mit Emdogain<sup>®</sup>und rHAM nach 2 und 9 Tagen sowie mit Ax, Cx und Fx nach 9 Tagen (ANOVA, p<0,05).





\*: statistisch signifikant (ANOVA) mit p<0,05.

	2 d				5 d			9 d				
	n	Mw	Med	Std	n	Mw	Med	Std	n	Mw	Med	Std
EMD	12	200,2	190,5	100,6	10	122,2	48,5	121,8	8	423,6	412,6	260,6
Ax	6	95,9	97,7	10,5	6	75,4	65,9	36,6	6	337,8	325,2	61,5
Bx	6	108,3	111,6	30,5	6	79,5	68,2	38,8	6	162,3	150,2	35,5
Сх	6	111,7	126,6	28,2	6	83,5	80,2	38,7	6	190,1	139,4	102,1
rHAM	6	204,0	128,2	145,2	8	98,1	90,3	50,9	6	366,1	268,7	196,4
Fx	6	128,1	129,5	32,7	8	106,4	81,3	73,7	6	373,9	345,6	228,2

Tab. 6: IGF-1 Konzentration in den Medienüberständen der PDL-Zellen nach Stimulierung mit SMP, prozentual bezogen auf den Mittelwert der Kontrollen jeden Versuchs (Mw: Mittelwert, Med: Median, Std: Standardabweichung).

# **4.1.4.2 ELISA für TGF**- $\beta$ 1-Bestimmung (Transforming growth factor $\beta$ 1)

Die TGF- $\beta$ 1-Konzentration in den Mediumüberständen wurde mit einem TGF- $\beta$ 1-ELISA-Kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) bestimmt. Die Durchführung des ELISA erfolgte im Wesentlichen ähnlich wie die IGF-1-Bestimmung, wobei die TGF- $\beta$ 1-Bestimmung noch einen zusätzlichen Schritt zur Aktivierung des latenten TGF- $\beta$ 1 benötigte. Diese Aktivierung erfolgte für 10 min. bei Raumtemperatur mit 1 N HCl, die dann vor den weiteren Schritten des ELISA mit 1,2 N NaOH neutralisiert wurde. Die quantitative Bestimmung erfolgte an einer Standardkurve ausgehend von 2000 pg/ml mit rekombinantem humanen TGF- $\beta$ 1 entsprechend Arbeitsanweisung in sieben Verdünnungen. Die Versuchsreihe umfasste mindestens sechs Experimente in jeweils zweifacher Ausführung, die mit ANOVA statistisch ausgewertet wurden. Ergebnisse:

Die TGF-β1-Konzentrationen in den Medienüberständen waren nach 2 Tagen bei Stimulierung mit Emdogain<sup>®</sup>und rHAM gesteigert, wobei die Emdogain<sup>®</sup>- Stimulierung statistische Signifikanz zeigte (p<0,05). Nach 5 und 9 Tagen resultierte die Stimulierung mit Emdogain<sup>®</sup> ebenfalls in signifikanten Erhöhungen gegenüber der Kontrolle, während die anderen getesteten SMP keine signifikanten Veränderungen ergaben.



Abb. 12: TGF- $\beta$  Konzentration in den Medienüberständen der PDL-Zellen nach Stimulierung mit SMP. Die gemessenen TGF- $\beta$ -Werte wurden jeweils prozentual auf den Mittelwert der Kontrollen jeden Versuchs bezogen.

\*: statistisch signifikant (ANOVA) mit p<0,05.

	2 d					5 d			9 d			
	n	Mw	Med	Std.	n	Mw	Med	Std	n	Mw	Med	Std
EMD	12	220,5	181,6	124,9	12	156,4	184,6	73,4	12	180,3	154,2	81,3
Ax	6	104,3	100,6	21,0	6	116,6	113,4	32,9	6	111,3	113,3	23,3
Bx	6	97,6	108,0	21,1	6	89,8	84,9	22,0	6	90,4	88,1	14,1
Сх	6	94,7	95,3	27,7	6	96,1	96,8	11,6	6	104,2	102,6	24,7
rHAM	10	132,5	113,6	82,9	10	121,7	93,8	60,8	10	94,1	87,8	36,6
Fx	9	100,1	109,4	23,1	9	108,3	96,8	54,8	9	98,1	107,8	30,1

Tab. 7: TGF- $\beta$  Konzentration in den Medienüberständen der PDL-Zellen nach Stimulierung mit SMP, jeweils prozentual auf den Mittelwert der Kontrollen jeden Versuchs bezogen (Mw: Mittelwert, Med: Median, Std: Standardabweichung).

# 4.1.4.3 ELISA für IL-1β-Bestimmung (Interleukin-1β)

Die Testdurchführung erfolgte mit einem IL-1β-Kit (R&D Systems) entsprechend Herstellerangabe mit einem humanen IL-1β-Standard. Es wurden insgesamt drei Versuchsreihen in Doppelbestimmung gemessen.

Ergebnisse: Die Standardkurven mit rekombinantem humanen IL-1 $\beta$  zeigten im Bereich zwischen 5-250 pg/ml einen linearen Bereich. der den Qualitätsanforderungen des Herstellers entsprach. Die IL-1β-Bestimmungen in den Medienüberständen zeigten zu allen Versuchszeiten bzw. bei Kontrollen und Stimulierungen sehr geringe Werte, die unterhalb der Nachweisgrenze des Tests, d.h. unterhalb von 5 pg/ml blieben. In keinem Versuchsansatz konnten daher auswertbare Meßergebnisse erhoben werden bzw. IL-1-Produktion nicht nachgewiesen werden (Daten nicht dargestellt).

# 4.1.4.4 ELISA für OPN-Bestimmung (Osteopontin)

Die Messung des freigesetzten Osteopontins in den Kulturen wurde mit einem humanen Osteopontin-Kit realisiert (Osteopontin EIA Kit, Immuno-Biological Laboratories IBL, Gunma, Japan). Als Standard wurde hierbei humanes Osteopontin in einem Bereich zwischen 5 und 300 ng/ml eingesetzt. Die Arbeitsschritte entsprachen im Wesentlichen den oben beschriebenen Prinzipien des ELISA. Die Resultate von mindestens sechs Experimenten in doppelter Ausführung sind dargestellt und jeweils auf die Kontrollen prozentual bezogen.

## Ergebnisse:

Die Messungen zeigten zu allen Zeitpunkten geringe Konzentrationen an Osteopontin im Medienüberstand, die im Bereich zwischen 5 und 30 ng/ml lagen. Signifikante Unterschiede zwischen den Kontrollen und den Testgruppen wurden nicht festgestellt.



Abb. 13: Osteopontin-Konzentration in den Medienüberständen der PDL-Zellen nach Stimulierung mit SMP. Die gemessenen Osteopontin-Werte wurden jeweils prozentual auf den Mittelwert der Kontrollen jeden Versuchs bezogen. Statistisch signifikante Unterschiede bestanden nicht (ANOVA).

	2 d				5 d				9 d			
	n	Mw	Med	Std	n	Mw	Med	Std	n	Mw	Med	Std
EMD	6	99,1	99,2	3,0	6	100,5	100,4	4,8	6	99,9	99,9	4,4
Ax	6	108,3	108,1	10,2	6	103,1	103,1	6,4	6	99,1	98,7	5,1
Bx	6	103,6	103,4	3,3	6	104,3	104,1	7,8	6	99,9	97,5	9,3
Сх	6	107,2	107,1	4,0	6	108,6	107,7	8,1	6	97,3	97,5	6,4
rHAM	6	111,7	111,9	3,7	6	102,2	101,5	5,6	6	105,7	105,8	7,0
Fx	6	103,2	103,7	4,7	6	100,0	100,0	3,2	6	99,9	100,1	10,3

Tab. 8: Osteopontin-Konzentration in den Medienüberständen nach Stimulierung mit SMP (Mw: Mittelwert, Med: Median, Std: Standardabweichung).

# 4.1.4.5 Oberflächen-ELISA für ICAM-1-Bestimmung (Intercellular adhesion molecule 1)

Für die Bestimmung des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 auf den PDL-Zellen wurde ein Oberflächen-ELISA in 96-Well-Mikrotiterplatten angewendet.

Die Beschichtung der Platten erfolgte wie oben beschrieben mit den verschiedenen SMP-Fraktionen. Nach Entfernung der Überstände wurden dann in jedes Well 200 µl einer Zell-Lösung von 50.000 Zellen/ml gegeben und 2 Tage lang bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Als Kontrolle wurden wiederum PDL-Zellen mit 2% FCS verwendet. Nach Inkubation wurden die Überstände vorsichtig abgesaugt und die Zellen mit 1% Paraformaldehyd (100 µl/well) mindestens 15 min. bei Raumtemperatur fixiert. Dann wurden die Platten gewaschen und der primäre Antikörper anti-ICAM-1 (R&D Systems, Klon BBIG-I1) in einer Verdünnung von 1:800 für 20 min. bei Raumtemperatur zugegeben. Die Platten wurden anschließend gewaschen und mit dem enzymmarkierten Sekundärantikörper anti-mouse IgG (Amersham, Braunschweig, NA 931) in einer Verdünnung von 1:2500 15 min. lang inkubiert. Die nachfolgende Substratreaktion wurde photometrisch bei 405 nm Wellenlänge gemessen (Dynatech MR 5000) und jeweils auf die Kontrollen bezogen ausgewertet. Insgesamt wurden sechs Experimente in jeweils vierfacher Bestimmung durchgeführt.

Ergebnisse:

ICAM-1-Expression konnte im Oberflächen-ELISA auf den PDL-Zellen sowohl bei den Kontrollen als auch bei Stimulierung mit SMP nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den Kontrollen zeigte sich bei Stimulierung mit Emdogain<sup>®</sup> (p<0,05) ein statistisch signifikanter Unterschied im ANOVA. Die Verwendung von Ax, Bx, rHAM und Fx ergab einen Trend zu erhöhten Werten, der aber nicht signifikant war.



Abb. 14: ICAM-1-Expression der PDL-Zellen im Oberflächen-ELISA nach 48 h bei Stimulierung mit SMP.

\*: Statistisch signifikant zur Kontrolle mit ANOVA, p<0,05.

	n	Mittelwert	Median	Std.
Emdogain <sup>®</sup>	6	168,6	164,7	42,4
Ax	6	142,4	154,4	50,9
Bx	6	128,1	136,8	24,1
Сх	6	85,8	77,7	17,2
rHAM	6	151,4	152,1	58,6
Fx	6	134,9	137,0	36,7

Tab. 9: ICAM-1-Expression der PDL-Zellen im Oberflächen-ELISA nach 48 h bei Stimulierung mit SMP.

### 4.2 Organoidkulturen

Für die Mineralisationsversuche wurden die Zellen als dichte Zellmasse in dreidimensionaler Anordnung als Organoidkultur kultiviert. In der Organoidkultur werden durch intensive Zellkontakte und zellspezifische Mikroumgebung die Voraussetzungen für histiotypische Zelldifferenzierung geschaffen, während Proliferation kaum stattfindet [93, 269].

Zellen der 3. bis 5. Passage wurden abgelöst, gewaschen und sedimentiert durch Zentrifugation bei 600 rpm für 10 Minuten. Jeweils  $10^6$  Zellen (etwa 8 µl) des Zellsediments wurden auf eine Fläche von 5x10 mm eines Membranfilters aus Celluloseacetat, Porengröße 0,2 µm (SM 13113, Sartorius, Göttingen) pipettiert. In einer Vorstudie wurde die höchste Anzahl von adhärierenden Zellen auf der Membran bestimmt und während der Untersuchung verwendet, um optimale interzelluläre Kontakte durch dreidimensionale Zellakkumulation zu gewährleisten. Die Membran wird von einem Edelstahlgitter an der Medium-Luftgrenze gehalten und in einer 35mm-Kulturschale (Falcon) angesetzt. Jede Kulturschale enthielt 2 ml Medium, welches nur die untere Seite des Filters erreichte.

Das Medium bestand aus DMEM/HAM's F 12 (1:1) (Biochrom, Berlin) mit 2% inaktiviertem fetalen Kälberserum (FCS), 50 µg/ml Ascorbinsäure, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 2,5 µg/ml Amphotericin B. Die Zellen wurden in wassergesättigter Atmosphäre bei 37°C mit 5% CO<sub>2</sub> kultiviert; das Medium alle zwei bis drei Tage gewechselt. Ab dem achten Tag wurde 5 mM ß-Glycerophosphat zugesetzt, um Mineralizationsvorgänge zu induzieren.

Die Zellen wurden allein oder mit Zusätzen von Ax, Bx, Cx, rHAM, Fx, oder EMD kultiviert. Wie oben beschrieben, wurden die lyophilisierten SMP in PGA gelöst und in Konzentrationen von 100 µg/ml (EMD, Ax, Bx, Cx), 50 µg/ml (Fx) oder 10 µg/ml (rHAM) bei jedem Mediumwechsel zugesetzt. Die Gesamtmenge an PGA war in allen getesteten Konzentrationen und den Kontrollen mit 2% FCS gleich. Mindestens sechs individuelle Experimente jeweils in vierfacher Ausführung wurden für jede Testgruppe durchgeführt.

#### 4.2.1 Kollagensynthese

Die Bestimmung der Kollagensynthese in der Organoidkultur erfolgte durch Messung des Einbaus von radioaktiv markiertem [<sup>3</sup>H]-Prolin. Nach 14 Tagen Kultivierungszeit wurde 0,2  $\mu$ C/ml [<sup>3</sup>H]-Prolin (Amersham, Braunschweig) zum Medium für zwei Tage zugesetzt. Nach [<sup>3</sup>H]-Prolin-Inkorporation (spezifische Aktivität: 1.67 TBq/mmol) wurde jede Kultur in PBS gewaschen und in 1 ml 1 N NaOH für 24 h bei Raumtemperatur gelöst. Die Proben wurden mit 15 ml Scintillationsflüssigkeit gemischt und die Aktivität mit einem Szintillationszähler (Packard, Meriden, CT, USA) als "counts per minute" (cpm) gemessen. Der Gesamtproteingehalt in den Kulturen wurde mit dem BCA-Proteinassay bestimmt, der auf der Biuret-Reaktion mit BCA (Bicinchoninsäure)-Reagenz basiert (Pierce, Rockford, IL, USA) und zur Berechnung der [<sup>3</sup>H]-Prolin-Aktivität diente (cpm pro Gesamtprotein). Die [<sup>3</sup>H]-Prolin-Aktivität der Kontrollen jeden Versuches bezogen und als Prozentwerte dargestellt.

## Ergebnisse:

Die Werte für die Gesamtproteinsynthese lagen im Bereich von 38 bis 59 µg/ml, wobei keine Unterschiede zwischen den Gruppen auftraten. Die Kollagensynthese in den Organoidkulturen, gemessen als Einbau des radioaktiv markierten Prolins, war bei Stimulierungen mit SMP in gleichem Ausmaß nachweisbar wie in den Kontrollen. Die Mittelwerte der Kontrollkulturen lagen zwischen 198 und 284 cpm/µg Protein. Bei Ax, rHAM und Fx zeigten sich geringe Erhöhungen, die aber nicht statistisch signifikant waren (ANOVA, p>0,05).



Abb. 15: Kollagensynthese ([<sup>3</sup>H]-Prolin-Aktivität/Gesamtprotein) der PDL-Zellen in Organoidkulturen (n=6) bei Stimulierung mit SMP.

#### 4.2.2 Mineralisation

Die Mineralisation wurde bestimmt durch die Kalziumakkumulation in den Kulturen und die Aktivität der alkalischen Phosphatase (ALP). Nach 21 Tagen Kultivierung mit Protein-Zusätzen wurden die Zellen in PBS gewaschen und in 750 µl destilliertem Wasser mit Ultraschall (Ultra-Turrax, IKA, Staufen) für 20 s homogenisiert. Nach Zentrifugation wurde die ALP-Aktivität im Überstand mit 4-Nitrophenyl-Phosphat als Substrat (10 mmol/L) entsprechend der Instruktion des Herstellers bestimmt (ALP-Kit, Roche Diagnostics, Mannheim). Die Menge des freien p-Nitrophenols wurde anhand der Absorption bei 405 nm gemessen. Zur Bestimmung der Kalziumakkumulation in der Organoidkultur wurde das Zellhomogenat in 0,6 M HCI demineralisiert. Nach Zentrifugation wurde die Kalziumkonzentration mittels Flammenphotometrie (Elex 6361, Eppendorf, Hamburg) gemessen und die Konzentration pro Kultur (nM/Kultur) im Vergleich zu Standardkonzentrationen berechnet.

#### Ergebnisse:

Die Aktivität der alkalischen Phosphatase und die Kalziumakkumulation als Mineralisationsparameter ließen sich nach 21 Tagen in den Organoidkulturen regelmäßig nachweisen. Die Werte zeigten hohe Variabilität, sowohl zwischen als auch innerhalb der einzelnen Versuche. Die Mittelwerte der Kontrollkulturen schwankten für die Aktivität der alkalischen Phosphatase zwischen 124 und 1255 mU/Kultur, für die Kalziumakkumulation zwischen 111 und 166 nM/Kultur. Es zeigten sich tendenziell erhöhte Werte bei Stimulierung mit Emdogain<sup>®</sup>, rHAM und Fx, die aber statistisch nicht signifikant waren (ANOVA).



□ ALP-Aktivität [mU/Kultur] I Kalziumgehalt [nM/Kultur]

Abb. 16: Alkalische Phosphatase-Aktivität und Kalziumgehalt der PDL-Zellen in Organoidkultur bei Stimulierung mit SMP. Beide Mineralisationsparameter wurden jeweils prozentual auf den Mittelwert der Kontrollen jeden Versuchs (n=6) bezogen. Statistisch signifikante Unterschiede bestanden nicht (ANOVA).

# 4.2.3 Elektronenmikroskopische Darstellungen

Nach 21 Tagen in Organoidkultur wurden die Kulturen für elektronenmikroskopische Untersuchungen 60 min. mit 1% Glutaraldehyd und 1% Tannin in 0,2 M Phosphatpuffer (pH 7,4) bei Raumtemperatur fixiert. Nach Spülen mit NaCl-Lösung erfolgte die Postfixierung in 1% Osmium-Tetroxid in 0,1 M Phosphatpuffer für eine Stunde bei 4°C. Die Kulturen wurden dann in Ethanol

dehydriert und eingebettet in Epon. Dünnschnitte wurden mit einer Schneidemaschine Ultracut (Reichert-Jung, Bensheim) angefertigt und die Schnitte dann mit Uranylacetat und Bleizitrat gefärbt sowie mittels eines Elektronenmikroskops (Elmiskop 101, Siemens, München) morphologisch beurteilt.

#### Ergebnisse:

In den Kulturen fanden sich überwiegend langgestreckte, fibroblastenähnliche Zellen in dichten Lagen angeordnet. Die eng gepackten Zellen mit zahlreichen Zellkontakten und Zellfortsätzen waren eingebettet in eine Matrix, die viele Kollagenfibrillen aufwies.

Nach 21 Tagen zeigten sich in allen Kulturen um die PDL-Zellen neben der Neubildung von Kollagenfasern deutliche Areale mit Anzeichen von mineralisiertem Gewebe. Die Zellen, die zu den Mineralisationsarealen assoziiert lagen, waren differenziert, meist in eine unterschiedlich dichte kollagene Matrix eingebettet und zeigten Zellorganellen wie ein gut entwickeltes raues endoplasmatisches Retikulum, Mitochondrien und Vesikel mit elektronendichtem Inhalt. Die mineralisierten Areale lagen in enger Beziehung zu den neugebildeten Kollagenfasern, wobei Mineralisationskerne mit angelagerten Kristallen neben größeren Mineralisationsspots zu erkennen waren. Daneben fanden sich teilweise nekrotische Zellen, die auch intrazelluläre Mineralisationsareale präsentierten. Die Morphologien der mit SMP stimulierten Zellen waren im Wesentlichen gleichartig, so dass sich keine relevanten Unterschiede erkennen ließen. Kulturen, die mit SMP stimuliert wurden, wiesen in einigen Schnitten eine erhöhte Anzahl von größeren Mineralisationsspots auf sowie Apposition an bereits kalzifizierte Strukturen. Die mineralisierten Knoten traten hauptsächlich gruppiert auf, umgeben von einer moderat dichten Matrix, die bei den Kontrollkulturen aber ein ähnliches Erscheinungsbild zeigte.

Damit wurde morphologisch die Fähigkeit der PDL-Zellen nachgewiesen, mineralisiertes Gewebe in der Organoidkultur zu bilden, wobei die Stimulierungen mit den verschiedenen SMP keine eindeutigen Veränderungen ergaben.



Abb. 17: Langgestreckte parodontale Fibroblasten nach 21 Tagen in Organoidkultur ohne Kostimulierung, eingebettet in eine kollagenreiche extrazelluläre Matrix mit typischer Querstreifung (x 23.000).

P: PDL-Fibroblast, C: Kollagenmatrix.



Abb. 18: PDL-Fibroblast nach 21 Tagen in Organoidkultur mit quergeschnittenen Kollagenfasern und Mineralisationsherden nach Stimulierung mit Emdogain<sup>®</sup>. Die Kollagenfibrillen gruppieren sich zu Bündeln (x 23.000).

P: PDL-Fibroblast, C: Kollagenmatrix, M: Mineralisationsherde.



Abb. 19: PDL-Fibroblast nach 21 Tagen in Organoidkultur in enger Beziehung zu mineralisierten Arealen. Zellkern, -fortsätze und Zellorganellen sind deutlich erkennbar (x 23.000).



Abb. 20: PDL-Fibroblast (P) mit dichter kollagener Matrix und Mineralisationsarealen (Pfeil) nach Kokultivierung mit SMP. Zellkern und Zytoplasma mit vielen Zellorganellen sind erkennbar (x 23.000).



Abb. 21: PDL-Fibroblasten nach Stimulierung mit rHAM in engem Zellkontakt mit Zellfortsätzen und größeren Mineralisationsspots. Auf den Zelloberflächen sind angelagerte, mineralisierte Areale erkennbar  $(\rightarrow)$  (x 23.000).



Abb. 22: PDL-Fibroblasten unterschiedlicher Morphologie und Kollagendarstellung ( $\rightarrow$ ). Neben der typischen langgestreckten Morphologie zeigen sich ovale oder polygonale Zellformen. Die Kollagenmatrix am unteren, linken Rand erscheint mehrlagig ohne eindeutige Orientierung (x 23.000).



Abb. 23: Langgestreckte Fibroblasten mit Vesikeln und zahlreichen Zellkontakten ordnen sich nach Stimulierung mit Fx in mehreren Lagen an. An der Zelle sind mineralisierte Areale zu beobachten, in anderen Bereichen eine unregelmäßig dichte extrazelluläre Matrix (x 23.000).

#### 4.3 Bestimmungen der mRNA

#### 4.3.1 RNA-Isolierung aus PDL-Zellkulturen

Die Isolierung der mRNA erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden). Nach Vorbereitung des Lysepuffers mit  $\beta$ -Mercaptoethanol ( $\beta$ -ME) (10  $\mu$ l  $\beta$ -ME pro 1 ml RLT-Puffer) wurden jeweils 175 µl RLT-Puffer pro Well verwendet und die Zellen mit einem Gummi-Zellschaber abgelöst. Anschließend wurden die Zellen bei -70°C in RLT-Puffer gelagert. Das Zell-Lysat wurde später in QIA Shredder-Röhrchen unter dem Abzug eingefüllt, zum Homogenisieren bei maximaler Drehzahl (13.000) in der Mikrozentrifuge für 2 min. zentrifugiert und die RNA im unteren Teil weiterverwendet. Jeweils 175 µl Ethanol 70% wurden dann zum RNA-Teil zugegeben und durch Pipettieren vermischt. Der gesamte Inhalt der Probe wurde in ein RNeasy Spin Column in einem 2 ml Röhrchen gegeben und bei 10.000 rpm 15s lang zentrifugiert. Der Filter mit der RNA wurde weiterbenutzt, 700 µl RW1-Puffer zugefügt und erneut für 15 s bei 10.000 rpm zentrifugiert. Danach erfolgte zum Waschen des Filters eine Zentrifugation mit 500 µl RPE-Puffer für 15 s bei 10.000 rpm, danach eine zweite für 2 min. bei maximaler Drehzahl. Der trockene Filter wurde danach vorsichtig entfernt und in ein neues 1,5 ml Röhrchen unter Eiskühlung eingesetzt. Die Eluierung der RNA erfolgte abschließend mit 30 µl Rnase-freiem Wasser durch Zentrifugation bei 10.000 rpm für 1 min. Der Gehalt an RNA wurde bestimmt durch Messung am Spektrophotometer (Uvikon 922, Bio-Tek Kontron) mit Quarzküvetten bei 260 nm mit einer Kontrollmessung bei 280 nm. Die Berechnung anhand der Formel: OD x 4 = RNA [ $\mu$ g/ $\mu$ l] wurde dann auf  $\mu$ l pro  $\mu$ g umgerechnet, d.h. 1/RNA (entspricht:  $\mu$ l pro 1 µg RNA). Für die folgende RT-PCR wurde das errechnete Volumen mit Aqua tridest. jeweils auf 11,5 µl aufgefüllt, so dass für die RT-PCR immer 1 µg RNA/11,5 µl Volumen eingesetzt wurde.

## 4.3.2 Reverse Transkriptase (RT)

Die RT-Reaktion wandelt zunächst die RNA in komplementäre DNA (cDNA) um, die dann in einem zweiten Schritt in der PCR eingesetzt wird. Jeweils 11,5 µl der RNA-Lösung (= 1 µg RNA) wurden in einem dünnwandigen 0,5 ml Röhrchen für die Reaktion eingesetzt, wobei immer ein Röhrchen mit 11,5 µl Aqua als NegativKontrolle diente. Alle Röhrchen wurden im Thermocycler (Tpersonal, Biometra) zunächst ohne Puffer platziert und die erste Inkubation bei 70°C für 5 min. gestartet. Währenddessen wurde der folgende Master-Mix (zunächst ohne Inhibitoren bzw. Enzyme) zubereitet, von dem erst nach Abkühlen des Thermoblocks auf 42°C jeweils 8,5 µl dazu pipettiert wurden. Erst unmittelbar vor Start der Reaktion werden der Rnase-Inhibitor RNasin<sup>®</sup> (Promega, Madison, USA) und die Reverse Transkriptase direkt aus dem Gefrierschrank (-20°C) zugegeben. Zusammensetzung des Master-Mix:

-	AMV-Puffer (5x)	4	µl (Promega)
-	Nukleotide (dNTP), (10 mM)	2	µl (Promega)
-	Hexamer-Primer (0,2 µg/µl)	1	µl (Roche)
-	RNasin <sup>®</sup>	0,75	µl (Promega)
-	AMV RT	0,75	µl (Promega)

Das RT-Programm hielt die Temperatur während 60 min. Inkubation bei 42°C und beendete die RT-Reaktion durch Erhitzen auf 95°C für 5 min. Anschließend erfolgte eine kurze Zentrifugation und die Zugabe von 80  $\mu$ l Wasser. Die cDNA wurde dann aliquotiert (je 5  $\mu$ l/PCR), bei –20°C gelagert bzw. zur PCR eingesetzt.

# 4.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase chain reaction, PCR)

Zu jeweils 5 µl der verdünnten cDNA aus der RT-Reaktion wurden 20 µl des folgenden Master-Mix pipettiert und in dünnwandigen Röhrchen im Thermocycler inkubiert:

-	Ammonium-PCR-Puffer (10x)	2,5	µl (Sigma, St. Louis, USA)
-	Nukleotide (dNTP), (10 mM)	0,5	µl (Promega)
-	Primer (0,5 µg/µl)	0,25 +	· 0,25 μl FW/RV (TIB, Berlin)
-	Aqua tridest.	15,25	μl (Promega)
-	RedTaq-Polymerase	1,25	µl (Sigma)

Die Taq-Polymerase wurde wiederum erst unmittelbar vor der Anwendung zugegeben. Zur Kontrolle eines konstant exprimierten Gens wurde in der PCR jeweils auch die cDNA mit Primern für GAPDH (Glyceraldehydphosphatdehydrogenase) inkubiert. Eine Negativkontrolle erfolgte, indem in der RT-Reaktion immer eine Probe mit molekularbiologischem Wasser (Roth, Karlsruhe) eingesetzt wurde, die dann wie die Testproben in der PCR mit den spezifischen Primern inkubiert wurde.

Die PCR erfolgte über 28-32 Zyklen bei 60°C Annealing Temperatur und einer Gesamtdauer von etwa 2 h. Im einzelnen wurden folgende Bedingungen eingestellt: nach einmaliger Inkubation bei 94°C über 3 min. erfolgten die Zyklen mit Denaturierung bei 94°C für 1 min., Annealing bei 60°C für 1 min. und Extension bei 72°C für 1 min., abschließend die finale Extension bei 72°C für 5 min.

Die PCR-Primer wurden vor Gebrauch mit Aqua tridest. auf die Endkonzentration von 0,5 µg/µl gelöst und aliquotiert. Als Primer wurden folgende Nukleotidsequenzen eingesetzt (alle von TIB Molbiol, Berlin):

- Collagen I FW (5'-AAgAAggCggCAAAggTC; Seq. Nr. 208224),
   Collagen I RV (5'-ggACCTTgTTTgCCAggT; Seq. Nr. 208225).
- BSP FW (5'-CAACAgCACAgAggCAgAAA; Seq. Nr. 472752)
   BSP RV (5'-AggTTCCCCgTTCTCACTTT; Seq. Nr. 472753)
- Osteonektin FW (5'-TgCCTgATgAgACAgAggTg; Seq. Nr. 472748)
   Osteonektin RV (5'-AAgTggCAggAAgAgTCgAA; Seq. Nr. 472749)
- Osteopontin FW (5'-CATCACCTgTgCCATACCAg; Seq. Nr. 472750)
   Osteopontin RV (5'-ACACTATCACCTCggCCATC; Seq. Nr. 472751)
- Osteocalcin FW (5'-ggCAgCgAggTAgTgAAgAg; Seq. Nr. 472754)
   Osteocalcin RV (5'-CTggAgAggAgCAgAACTgg; Seq. Nr. 472755)
- GAPDH FW (5'-CCACCCATggCAAATTCCATggCA, Seq. Nr. 476215), GAPDH RV (5'-TCTAgACggCAggTCAggTCCACC, Seq. Nr. 476216)

Nach Ablauf der PCR wurden dann jeweils 10 µl der PCR-Produkte zur Elektrophorese in einem Minigel-System (Biometra, Whatman) auf ein 1,5% Agarose-Gel (Promega) mit Ethidiumbromid in TAE-Puffer geladen. Es wurde mindestens eine DNA-Standardreihe (DNA Ladder, Invitrogen, Karlsruhe) zum Vergleich der PCR-Produkte eingesetzt. Die Elektrophorese wurde für 1 h bei 100 V Spannung durchgeführt und anschließend die Banden im UV-Licht visualisiert.

# Ergebnisse:

Qualitativ zeigte sich in der PCR, dass die PDL-Zellen nach fünf Tagen auf RNA-Ebene wichtige Mediatoren exprimierten, die mit Knochenheilung und Regeneration assoziiert sind. Dazu zählten Kollagen Typ I, Bone Sialoprotein (BSP), Osteonektin und Osteopontin. Relevante Unterschiede zwischen den Stimulierungen mit SMP wurden nicht evident. Im Einzelnen resultierten folgende RNA-Nachweise.

# 1. Kollagen Typ I

Die Proben ergaben jeweils deutliche Banden im Bereich der erwarteten Produktgrößen für GAPDH bei 595 bp und für Kollagen I bei 253 bp. Eindeutige Unterschiede in der mRNA-Expression von Kollagen Typ I zwischen den mit SMP stimulierten Zellen waren nicht vorhanden.



Abb. 24: Ethidiumbromid-Gel mit PCR-Produkten (Primer für GAPDH, Produktgröße: 595 bp und Kollagen I, Produktgröße: 253 bp) zum mRNA-Nachweis aus PDL-Zellkulturen nach SMP-Stimulierungen.

DNA: DNA-Standards; Ko: Kontrolle; A: Ax-Protein; C: Cx-Protein; EM: Emdogain<sup>®</sup>; E: rHAM; F: Fx-Protein; -: negative Kontrolle (Wasser).

# 2. Bone Sialoprotein (BSP)

Die mRNA-Expression von GAPDH (595 bp) zeigte reproduzierbare Ergebnisse in allen stimulierten Zellen und der Kontrolle. Für BSP zeigten sich in der Elektrophorese deutliche Banden im Bereich der errechneten Produktgrößen von 313 bp, die auf das Vorhandensein von spezifischer mRNA aus allen Zellkulturen hinwiesen. Die Bande bei Emdogain<sup>®</sup>-Stimulierung erschien etwas schwächer als bei den anderen SMP, vor allem in Relation zur stark ausgeprägten Bande der GAPDH-Expression.



Abb. 25: Gel mit PCR-Produkten (Primer für GAPDH, Produktgröße: 595 bp und BSP, Produktgröße: 313 bp) zum mRNA-Nachweis aus PDL-Zellkulturen nach SMP-Stimulierungen.

DNA: DNA-Standards; Ko: Kontrolle; A: Ax-Protein; C: Cx-Protein; EM: Emdogain<sup>®</sup>, E: rHAM, F: Fx-Protein; -: negative Kontrolle (Wasser).

## 3. Osteonektin und Osteocalcin

Osteonektin-Expression zeigte sich auf RNA-Ebene in allen PDL-Zellkulturen bei unterschiedlichen Stimulierungen mit SMP. Die Banden bei Emdogain<sup>®</sup>und Fx-Protein erschienen etwas stärker ausgeprägt, obwohl auch die anderen Proben deutliche Banden präsentierten. Osteocalcin-Expression war in den PDL-Zellen nicht nachzuweisen, weder in der Kontrolle noch in den stimulierten Kulturen.

	Osteonektin		Osteocalcin
Eest.			
DNA Ko	A C EM E F -	DNA Ko	A C EM E F -

Abb. 26: Gel mit PCR-Produkten nach 28 Zyklen (Primer für Osteonektin, Produktgröße: 304 bp und Osteocalcin, Produktgröße: 230 bp) zum mRNA-Nachweis aus PDL-Zellkulturen nach SMP-Stimulierungen.

DNA: DNA-Standards; Ko: Kontrolle, A. Ax-Protein; C: Cx-Protein; EM: Emdogain<sup>®</sup>, E: rHAM, F: Fx-Protein; -: negative Kontrolle (Wasser).

# 4. Osteopontin

Osteopontin spezifische mRNA war in allen PDL-Zellkulturen mit bzw. ohne Stimulierung mit SMP vorhanden. Die Banden zeigten unterschiedliche Intensität, wobei speziell nach Stimulierungen mit Ax- und Cx-Protein starke Banden auftraten. Die PCR-Produkte nach Inkubation mit GAPDH-Primern waren identisch zu früheren Versuchen. Die negativen Kontrollen ergaben mit keinem Primer eine sichtbare Bande.



Abb. 27: Gel mit PCR-Produkten (Primer für GAPDH, Produktgröße: 595 bp und Osteopontin, Produktgröße: 411 bp) zum mRNA-Nachweis aus PDL-Zellkulturen nach SMP-Stimulierungen.

DNA: DNA-Standards; Ko: Kontrolle; A: Ax-Protein; C: Cx-Protein; EM: Emdogain, E: rHAM, F: Fx-Protein; -: negative Kontrolle (Wasser).