

**AUS DEM INSTITUT FÜR KLINIK UND POLIKLINIK FÜR MUND-,
KIEFER- UND GESICHTSCHIRURGIE**

LEHRSTUHLINHABER: PROF. DR. DR. TORSTEN E. REICHERT

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**EVALUATION DER MOLEKULAREN MECHANISMEN VON DLX3 IN DENTALEN
FOLLIKEL-VORLÄUFERZELLEN**

**Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Biomedizinischen Wissenschaften**

**der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg**

vorgelegt von

Sandra Denisse Viale Bouroncle

2014

**AUS DEM INSTITUT FÜR KLINIK UND POLIKLINIK FÜR MUND-
KIEFER- UND GESICHTSCHIRURGIE**

LEHRSTUHLINHABER: PROF. DR. DR. TORSTEN E. REICHERT

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**EVALUATION DER MOLEKULAREN MECHANISMEN VON DLX3 IN DENTALEN
FOLLIKEL-VORLÄUFERZELLEN**

**Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Biomedizinischen Wissenschaften**

**der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg**

**vorgelegt von
*Sandra Denisse Viale Bouroncle***

2014

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

Betreuer: PD Dr. Christian Morszeck

Tag der mündlichen Prüfung: 04.03.2015

Inhaltsverzeichnis

I Abkürzungsverzeichnis	V
II Abbildungsverzeichnis.....	VII
III Tabellenverzeichnis	IX
Zusammenfassung	1
1 Einleitung	5
1.1 Somatische Stammzellen.....	5
1.2 Dentale Stammzellen.....	5
1.3 Dentale Follikel-Vorläuferzellen	6
1.4 Knochenentwicklung.....	7
1.5 Regulation der osteogenen Differenzierung	8
1.5.1 Extrazelluläre Matrix.....	9
1.5.2 Signalwege	11
1.5.2.1 Knochenmorphogenetisches Protein (BMP)-Signalweg	11
1.5.2.2 WNT-Signalweg	13
1.5.2.3 Der NOTCH-Signalweg	16
1.5.3 Transkriptionsfaktoren.....	17
1.5.3.1 DLX-Familie	18
1.5.3.2 DLX3.....	19
1.5.3.2.1 Regulatorische Funktionen von DLX3.....	21
1.5.3.2.2 Regulation von DLX3	22
1.5.3.2.3 DLX3 in DFVs	23
2 Aufgabenstellung und Zielsetzung	24
3. Materialien und Methoden	25
3.1 Materialien	25
3.1.1 Zellen.....	25
3.1.2 Zellkulturmedien	25
3.1.3 Allgemeine Materialien	26
3.1.4 Chemikalien	26
3.1.5 Puffer und Lösungen	28
3.1.6 Enzyme, rekombinante Proteine und kleine Moleküle.....	29
3.1.7 Plasmide und siRNAs.....	29
3.1.8 Oligonukleotide	30
3.1.9 Kits	32
3.1.10 Antikörper.....	33
3.1.11 Geräte und Software	34
3.2 Methoden.....	35

3.2.1 Kultivierung von dentalen Follikelzellen	35
3.2.1.1 Induktion der osteogenen Differenzierung	36
3.2.1.2 Zellkultivierung mit kleinen Molekülen oder rekombinanten Proteinen	36
3.2.1.3 Modifikationen der Zellkulturoberflächen mit extrazellulären Matrixproteinen	37
3.2.2 Transfektion von DFV-Zellen.....	37
3.2.2.1 Transfektion von DFV-Zellen mit Plasmiden.....	37
3.2.2.2 Transfektion von DFV-Zellen mit siRNA	38
3.2.3 Nachweis biologischer Funktionen	38
3.2.3.1 Nachweis der Zellmorphologie und Adhäsion mittels Fluoreszenzfärbungen des Zytoskeletts und Zellkerns.....	38
3.2.3.2 Nachweis der Proliferation	39
3.2.3.3 Nachweis der Zellvitalität/Apoptose mittels der FITC-Annexin-V-Analyse	39
3.2.3.4 Nachweise der osteogenen Differenzierung und Mineralisierung.....	40
3.2.3.4.1 Bestimmung der Aktivität der alkalischen Phosphatase.....	40
3.2.3.4.2 Alizarin-Red S-Färbung und Quantifizierung	41
3.2.3.4.3 Hydroxylapatit-Nachweis.....	41
3.2.4 Genetische und Molekularbiologische Methoden	42
3.2.4.1 RNA Isolierung.....	42
3.2.4.2 Reverse Transkription (cDNA-Synthese).....	42
3.2.4.3 Amplifikation von DNA-Fragmenten mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion.....	42
3.2.4.4 Agarosegelelektrophorese	43
3.2.4.5 Quantitative Real Time PCR	44
3.2.4.6 DNA-Microarray	45
3.2.5 Biochemische und analytische Methoden	45
3.2.5.1 Protein-Isolierung.....	45
3.2.5.1.1 Isolierung von Proteinen	45
3.2.5.1.2 Isolierung von Proteinen aus dem Zellkern.....	46
3.2.5.2 Bicinchoninsäure (BCA) Proteinassay	46
3.2.5.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	47
3.2.5.4 Elektrotransfer der Proteine.....	47
3.2.5.5 Immunologischer Nachweis	47
3.2.5.6 Immunfluoreszenz Färbung.....	48
3.2.5.7 Chromatin-Immunopräzipitation.....	48
3.2.5.8 Immunopräzipitation	50
3.2.5.9 PKA-Aktivitätstest	50
3.2.5.10 Messung der Luciferase-Aktivität	51
4. Ergebnisse	53
4.1 Induktion der osteogenen Differenzierung durch den BMP2/SMAD1-Signalweg.....	53

4.2 Regulatorische Funktion des DLX3-Transkriptionsfaktors in DFVs.....	55
4.2.1 Einfluss von DLX3 auf die Morphologie, Proliferation und Zellvitalität in DFVs.....	55
4.2.2 Einfluss von DLX3 auf die Expression der osteogenen Differenzierung.....	57
4.2.3 Feedbackmechanismus zwischen DLX3 und dem BMP2/SMAD1-Signalweg.....	61
4.3 Weitere an der Regulation der DLX3/BMP- induzierten osteogenen Differenzierung beteiligte Signalwege	63
4.3.1 WNT-Signalweg	64
4.3.1.1 Einfluss des WNT-Signalweges auf die osteogene Differenzierung in DFVs	65
4.3.1.2 BMP2 induziert die Bindung von LEF1 am DLX3 Promotor.....	66
4.3.1.3 Einfluss des β -Catenins auf die osteogene Differenzierung in DFVs	68
4.3.1.4 BMP2 induziert β -Catenin durch den PKA-Signalweg.....	69
4.3.1.5 DLX3 induziert den WNT/ β -Catenin-Signalweg in DFVs	71
4.3.1.6 APCDD1 moduliert die osteogene Differenzierung in DFVs	72
4.3.2 NOTCH-Signalweg.....	74
4.3.2.1 Einfluss des NOTCH-Signalweges auf die osteogene Differenzierung in DFVs	75
4.3.3 Einfluss des extrazellulären Matrix/fokaler Adhäsionskinase-Signalweges auf die Differenzierung in DFVs	77
4.3.3.1 Einfluss der EZM-Proteine Kollagen I und Laminin auf die Adhäsion und Proliferation	80
4.3.3.2 Kollagen I induziert die Expression früherer osteogenen Markern.....	81
4.3.3.3 Regulation von ALP und OPN durch Kollagen I auf unterschiedlichen Signalwegen.....	82
4.3.3.4 Laminin inhibiert ALP und induziert späteren osteogene Marker sowie die Mineralisierung	83
4.3.3.5 Beteiligung des Integrins-alpha 2/-beta 1 (ITGA2B1) an der durch Laminin regulierten osteogenen Differenzierung	85
5. Diskussion	87
5.1 Der Einfluss von DLX3 auf die osteogene Differenzierung in DFVs.....	87
5.2 Regulation der osteogenen Differenzierung durch einen DLX3/BMP2-Feedbackmechanismus	88
5.3 Einfluss des WNT-Signalweges in humanen DFVs	88
5.4 Einfluss von APCDD1 auf die Differenzierung in DFVs.....	90
5.5 Einfluss des NOTCH-Signalweges in humanen DFVs	92
5.6 Einfluss des EZM/fokalen Adhäsion-Signalweges auf die osteogene Differenzierung in DFVs.....	93
5.6.1 Kollagen I.....	93
5.6.2 Laminin	95
5.7 Schlussfolgerung und Ausblick.....	96
IV Literaturverzeichnis.....	98
V Anhang.....	115
VI Eigene Publikationen	124

I Abkürzungsverzeichnis

ADM	adipogenes Differenzierungsmedium
AK	Antikörper
ALP	alkalische Phosphatase
APCDD1	<i>adenomatosis polyposis coli down-regulated 1</i> <i>bone morphogenetic protein</i> (knochenmorphogenetisches Protein)
BMP	
BMSCs	<i>bone marrow stromal cells</i> (Knochenmarkstammzellen)
bp	Basenpaar
BR	BMP-Rezeptor
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderalbumin)
BSP	Bonesialoprotein
CBF1	<i>C promoter binding factor 1</i> (C Promotor Bindungsfaktor 1)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DFVs	dentale Follikel-Vorläuferzellen
DLX3	<i>Distal less Homeobox 3</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPSCs	<i>dental pulp stem cells</i> (dentale Pulpa-Stammzellen)
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i> -Lösung
EDTA	Ethylendinitrietetraessigsäure
ERK	extrazelluläre Signal-regulierte Kinase
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (lat.: und andere)
EZM	extrazelluläre Matrix
FACS	<i>fluorescence activated cell sorter</i> (Durchflusszytometrie)
FAK	fokale Adhäsionskinase
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GKS3β	Glykogensynthase Kinase 3 β
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure (Puffersubstanz)
HES1	<i>Hairy/enhancer of split 1</i>
HEY1	<i>Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1</i>
HOX	Homöobox
IgG	Immunglobulin G
ITGA2	Integrine alpha 2
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Koll I	Kollagen Typ I
M	Molar
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> (Boten-RNA)
MSCs	<i>mesenchymal stem cells</i> (mesenchymale Stammzellen)
NaCl	Natriumchlorid
OC	Osteokalzin
OD	optische Dichte
OPN	Osteopontin
ODM	osteogenes Differenzierungsmedium
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese

PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PDLSCs	<i>Periodontal ligament stem cells</i> (Stammzellen aus dem paradontalen Ligament)
PG	Proteoglykanen
Pi	anorganisches Phosphat
PKA	Proteinkinase A
PPi	Pyrophosphat
RLU	<i>relative light units</i> (relative Lichteinheiten)
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	<i>quantitative real time PCR</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfat</i> (Natriumdodecylsulphat)
SEM	<i>Standard error of the mean</i> (Standardabweichung des Mittelwertes)
SHED	<i>stem cells from human exfoliated deciduous teeth</i> (Stammzellen aus der Zahnpulpa ausgefallener Milchzähne)
SCAPs	<i>stem cells from apical root</i> (Stammzellen aus der dentalen Papille)
siRNA	<i>small interference RNA</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	<i>Tris-buffered Saline</i> -Puffer
TCF	T-Zell-Faktor
TF	Transkriptionsfaktor
TGF- β	<i>transforming growth factor beta</i>
ÜN	Über Nacht
WNT	<i>Wingless-type MMTV integration site</i> -Familie

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Stammzeleigenschaften der DFVs.

Abbildung 2: Die Aktivierung von FAK.

Abbildung 3: Schematische Darstellung des BMP-Signalweges.

Abbildung 4: Schematische Darstellung des WNT-Signalweges.

Abbildung 5: Manifestationen beim DLX3-trichodentoosseous(TDO) Syndrom.

Abbildung 6: Beteiligung des BMP2/SMAD-Signalweges an der osteogenen Differenzierung in DFVs.

Abbildung 7: DLX3 Expression bzw. Überexpression in DFVs.

Abbildung 8: Einfluss von DLX3 auf die Zellmorphologie und -Vitalität der DFVs.

Abbildung 9: Einfluss von DLX3 auf die Zellvitalität bzw. Apoptose der DFVs.

Abbildung 10: Einfluss von DLX3 auf die Regulation von apoptotischen bzw. antiapoptotischen Markern.

Abbildung 11: Einfluss von DLX3 auf die osteogene Differenzierung der DFVs.

Abbildung 12: Regulation von osteogenen Markern durch DLX3.

Abbildung 13: Induktion des BMP2/SMAD-Signalweges mit DLX3.

Abbildung 14: Interaktion von DLX3 und BMP2 während der osteogenen Differenzierung in DFVs.

Abbildung 15: BMP2/DLX3-Feedbackmechanismus.

Abbildung 16: Microarray-Analyse der DFVs nach DLX3/BMP2-induzierter osteogener Differenzierung.

Abbildung 17: Aktivierung des WNT-Signalweges in DFVs.

Abbildung 18: Negativer Einfluss des kanonischen WNT-Signalweges auf die osteogene Differenzierung in DFVs.

Abbildung 19: BMP2 induziert die DLX3-Expression via β -Actin.

Abbildung 20: Einfluss des BMP2-induzierten β -Catenins auf die osteogene Differenzierung in DFVs.

Abbildung 21: Einfluss der Proteinkinase A (PKA) auf die osteogene Differenzierung über β -Catenin.

Abbildung 22: Aktivierung des WNT/ β -Catenin-Signalweges über DLX3.

Abbildung 23: Einfluss von APCDD1 auf den WNT-Signalweg in DFVs.

Abbildung 24: Einfluss von APCDD1 auf die osteogene Differenzierung in DFVs.

Abbildung 25: DLX3 induziert den NOTCH-Signalweg.

Abbildung 26: Induktion des NOTCH-Signalweges in DFVs.

Abbildung 27: Negativer Einfluss des NOTCH-Signalweges auf den BMP2/DLX3-Signalweg.

- Abbildung 28: Einfluss des NOTCH-Signalweges auf die osteogene Differenzierung in DFVs.
- Abbildung 29: Expression von Kollagen I während der osteogenen Differenzierung.
- Abbildung 30: Expression von Laminin, Integrin- alpha 2 und -beta 1 während der osteogenen Differenzierung.
- Abbildung 31: Adhäsion und Proliferation/Vitalität der auf Kollagen I bzw. Laminin kultivierten DFVs.
- Abbildung 32: Kollagen I unterstützt die frühe Phase der osteogenen Differenzierung.
- Abbildung 33: Kollagen I induziert den FAK/ERK-Signalweg in DFVs.
- Abbildung 34: Kollagen I reguliert die Expression von osteogenen Markern via FAK/ERK.
- Abbildung 35: Einfluss von Laminin auf die osteogene Differenzierung und die Mineralisierung.
- Abbildung 36: Einfluss von Integrin-alpha 2/-beta 1 auf die Laminin-induzierte osteogene Differenzierung.
- Abbildung 37: Aktivierung des FAK/ERK-Signalweges durch Laminin.
- Abbildung 38: Schematische Darstellung der Regulation der osteogenen Differenzierung durch DLX3 via eines BMP2/ β -Catenin-Feedbackmechanismus.
- Abbildung 39: Schematische Übersicht der durch Kollagen I angewendeten Signale während der osteogenen Differenzierung in DFVs.
- Abbildung 40: Schematische Übersicht der durch Laminin angewendeten Signale während der osteogenen Differenzierung in DFVs.

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Regulatorische Mechanismen von DLX3 in verschiedenen Geweben bzw. Zelltypen.

Tabelle 2: Verwendete Oligonukleotid-Primer für RT-qPCR-, PCR- und ChIP-Analyse.

Tabelle 3: Angewendete Antikörper.

Tabelle 4: Konzentrationen verwendeter Moleküle/Proteine/Antikörper.

Zusammenfassung

Die aus dem Zahnfollikel isolierten Stammzellen, die dentalen Follikel-Vorläuferzellen (DFVs), können sich *in vitro* in Zellen des parodontalen Ligaments, des Alveolarknochens bzw. des Zahnzements differenzieren. Die DFVs stellen demzufolge ein ideales Modell für *In-vitro*-Studien bezüglich der Differenzierung in mineralisierendes Gewebe bzw. Zellen im Parodont dar. Wie in anderen mineralisierenden Zellen wird DLX3 in DFVs exprimiert. Das Distal-less Homeobox 3 (DLX3)-Protein ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor der Skelettentwicklung von Wirbeltieren und könnte deshalb eine wichtige Rolle bei der Differenzierung der DFVs spielen. Über die regulatorischen Funktionen von DLX3 in DFVs ist jedoch wenig bekannt. Diese Studie befasste sich daher mit der Untersuchung der molekularen Mechanismen von DLX3 während der osteogenen Differenzierung in DFVs.

Durch gezielte Regulation von DLX3 in DFVs wurde gezeigt, dass Zellmorphologie, Proliferation und Vitalität/Apoptose durch die DLX3-Expression beeinflusst werden. Beispielsweise erhöhte sich nach DLX3-Inhibition die Anzahl an apoptotischen Zellen in DFVs. DLX3 stimuliert zudem die Expression von osteogenen Markern wie RUNX2 sowie die Aktivität der alkalischen Phosphatase (ALP) und die Matrixmineralisierung.

Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass DLX3 durch einen dosisabhängigen BMP2-Feedbackmechanismus reguliert wird. Infolgedessen ist die osteogene Differenzierung vom Gleichgewicht zwischen DLX3 und BMP2 abhängig. Auch weitere Signalwege wie WNT oder NOTCH scheinen an dieser Regulation durch *Crosstalk Networks* beteiligt zu sein.

Obwohl der kanonische WNT-Signalweg einen negativen Einfluss auf die osteogene Differenzierung hat, ist die Aktivierung von β -Catenin via BMP2/PKA für die Regulation von DLX3 und somit für die osteogene Differenzierung in humanen DFVs essenziell. BMP2 leitet eine Wechselwirkung zwischen SMAD4/LEF1/ β -Catenin und der Bindung von LEF1 an den DLX3-Promotor in DFVs ein. Eine Behandlung mit einem Induktor des WNT-Signalweges, WNT3A, inhibierte diese Wechselwirkung. Dies deutet darauf hin, dass ein *Crosstalk* zwischen dem WNT- und dem BMP2-Signalweg die osteogene Differenzierung nach der Expression von DLX3 reguliert.

Es wurde zum ersten Mal nachgewiesen, dass DLX3 ähnlich wie BMP2 den WNT-/ β -Catenin-Signalweg induzieren kann. DLX3 sowie BMP2 stimulieren die Phosphorylierung von β -Catenin an Serin 675 durch PKA und induzieren somit die Aktivierung von β -Catenin. Zielgene des WNT-Signalweges, wie *APCDD1*, wurden während der über DLX3/BMP2 induzierten osteogenen Differenzierung ebenfalls hochreguliert. Mittels einer APCDD1-Silencing-Analyse wurde nachgewiesen, dass APCDD1 in DFVs an der Expression von β -Catenin beteiligt ist, obwohl es als WNT-Inhibitor bekannt ist. Zudem zeigten die Daten, dass APCDD1 ebenfalls die osteogene Differenzierung in DFVs unterstützt.

DLX3 induziert ebenfalls die Expression von Genen des NOTCH-Signalweges. Allerdings hatte die Aktivierung des NOTCH-Signalweges eine negative Wirkung auf die DLX3-Expression und auf die

osteogene Differenzierung. Dies deutet auf einen negativen Feedbackmechanismus zwischen DLX3 und dem NOTCH-Signalweg hin.

Darüber hinaus ist DLX3 an der Regulation von EZM-Molekülen wie Kollagen I und Laminin beteiligt. Während Kollagen I die Expression von frühen osteogenen Markern unterstützt, werden späte osteogene Marker und der Zementblastenmarker sowie die Matrixmineralisierung durch Laminin induziert. Es wurde nachgewiesen, dass der Rezeptor Integrin-alpha 2 durch Laminin induziert wird und dass er über die Aktivierung des FAK/ERK-Signalweges osteogene/zementogene Marker hochreguliert. Allerdings werden die osteogenen Marker ALP und OPN auf Kollagen I jeweils durch FAK und ERK unabhängig voneinander reguliert.

Zusammenfassend bestätigte diese Studie den Einfluss von DLX3 auf die osteogene Differenzierung in DFVs und brachte neue Erkenntnisse über die regulatorischen Mechanismen von DLX3 hervor. Ein genaueres Verständnis von DLX3 in DFVs könnte es ermöglichen, diese Zellen zukünftig für therapeutische Zwecke gezielt in biomineralisiertes Gewebe zu differenzieren.

Summary

The stem cells of the dental follicle (DFCs) can differentiate *in vitro* into cells of the parodontal-ligament, alveolar osteoblasts, and cementoblasts. DFCs are therefore an ideal model for *in vitro* studies concerning differentiation of mineralized tissue/cells in the periodontium.

DLX3 was expressed differentially during osteogenic differentiation in DFCs, similar than in other mineralising cells. The Distal-less Homeobox 3 (DLX3) protein is an essential transcription factor for bone development of vertebrates, hence it might play an important role in the differentiation of DFCs. However, the regulatory effects of DLX3 are unknown; therefore this work investigated the molecular mechanisms of DLX3 in DFCs.

Through the directed regulation of DLX3 could be here demonstrated that cell morphology, proliferation, and viability/apoptosis are directly influenced by the expression of DLX3, for example, the amount of apoptotic cells in DFCs was increased after DLX3 silencing. Furthermore, DLX3 induces the expression of osteogenic markers such as RUNX2 as well as the alkaline phosphatase (ALP)-activity and the matrix-mineralization in DFCs.

Moreover, DLX3 is regulated via a dose-dependent BMP2-feedback-mechanism and the osteogenic differentiation is influenced consequently by the balance between DLX3 and BMP2. Further signaling pathways such as WNT and NOTCH seem to collaborate through crosstalks with this regulatory DLX3/BMP2-feedback-mechanism.

Although the canonical WNT-signaling pathway influence negatively the osteogenic differentiation, the activation of β -Catenin via BMP2/Proteinkinase A (PKA) is essential for regulation of DLX3 and hence for osteogenic differentiation in human DFCs. This work shows that BMP2 induces the formation of a LEF1/SMAD4/ β -Catenin complex and the binding of LEF1 to the DLX3 promoter, while these interactions were inhibited after a treatment with the WNT-inductor, WNT3A. These results suggest that a crosstalk between the canonical WNT/ β -Catenin and the BMP2/SMAD-signaling pathways regulates the expression of DLX3 and consequently directs the osteogenic differentiation.

For the first time could be shown, that DLX3 can induce similarly to BMP2 the WNT/ β -Catenin pathway. BMP2 as well as DLX3 induce the phosphorylation of β -Catenin at Ser-675 via PKA and hence activate β -Catenin. Furthermore, WNT-target genes such as *APCDD1* were up-regulated during DLX3/BMP2-induced osteogenic differentiation. APCDD1-Silencing analysis revealed that albeit APCDD1 is known as a WNT-inhibitor, it participates in the regulation of β -Catenin-expression in DFCs. Besides, we prove that APCDD1 also sustains the osteogenic differentiation in DFCs.

DLX3 induces also the expression of genes from the NOTCH-signaling pathway. However, the activation of the NOTCH-pathway inhibits the DLX3-expression and osteogenic differentiation. These results suggest a negative feedback-mechanism between DLX3 and the NOTCH-pathway. In addition, DLX3 regulates extracellular matrix (ECM) molecules such as collagen I and laminin. While collagen I supports the

expression of early osteogenic markers, late osteogenic and cementogenic markers as well as biomineralization are supported by laminin. Interestingly, the receptor, integrin-alpha 2, is induced through laminin and it up-regulates the expression of osteogenic/cementogenic markers via the FAK/ERK-pathway. Moreover, collagen I induces the expression of the osteogenic markers, ALP and OPN using the FAK- and ERK-signals independently from each other.

In conclusion, this study confirms the influence of DLX3 on the osteogenic differentiation of DFCs and discloses unknown mechanisms about the regulatory functions of DLX3. A better knowledge about DLX3 in DFCs should allow in future a directly differentiation of this cells in mineralized tissue for therapeutic purpose.

1 Einleitung

Bereits Ende der 60er Jahre wurden Stammzellen in Embryonen (Blastozysten) und im Knochenmark nachgewiesen (Haskill and Moore, 1970; Paran *et al.*, 1970). Im Allgemeinen werden Stammzellen als undifferenzierte bzw. nicht spezialisierte Zellen bezeichnet. Sie besitzen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Bildung spezialisierter Zellen (Differenzierung; Burns and Zon, 2002).

Stammzellen unterscheiden sich anhand ihres Differenzierungspotenzials. Man spricht von totipotenten bzw. pluripotenten Zellen, wenn sie bis zum 8-Zell-Stadium der Embryonalentwicklung zu allen bzw. zu fast allen Zelltypen differenzieren. Multipotent nennt man Zellen, die zu allen Zelltypen differenzieren, allerdings nur keimblattspezifisch.

Seit ihrer Isolierung (Caplan, 2007) wird die Nutzung von Stammzellen als Quelle für die regenerative Medizin diskutiert. Besonders die pluripotenten embryonalen Stammzellen würden sich als Quelle eignen. Jedoch gilt deren Verwendung als ethisch bedenklich. Die ethisch unbedenklichen somatischen (adulten) Stammzellen kommen folglich als Quelle ebenfalls in Frage.

1.1 Somatische Stammzellen

Somatische Zellen haben die Aufgabe, in adulten Organismen abgestorbene Zellen organspezifisch zu erneuern (Prockop, 2003). Für die Regeneration des Dentins sind beispielsweise Odontoblasten-Vorläuferzellen zuständig (Gronthos *et al.*, 2000).

Zu den am besten charakterisierten adulten Stammzellen gehören die Knochenmarkstammzellen (BMSCs). Die Isolation aus dem Knochenmark gelang aufgrund ihrer Eigenschaft, auf Plastikoberflächen zu adhären. Zum Beispiel gelang es Kuznetsov *et al.* (1997) und Friedenstein *et al.* (1976) aus Einzelzellkolonien von Fibroblasten des Knochenmarks Stammzellen zu isolieren. Auch aus weiteren Geweben bzw. Zellen wie z. B. Fettzellen wurden adulte Stammzellen gewonnen (Zuk *et al.*, 2002). Dentales Gewebe ist gleichfalls eine Quelle für die Isolierung von Stammzellen. Darauf wird in den folgenden Kapiteln näher eingegangen.

1.2 Dentale Stammzellen

Adulte dentale Stammzellen wurden aus der dentalen Pulpa (engl.: dental pulp stem cells, DPSCs), der Zahnpulpa ausgefallener Milchzähne (engl.: stem cells from human exfoliated deciduous teeth, SHED), der dentalen Papille (engl.: stem cells from apical root, SCAPs), dem paradontalen Ligament (PDLSCs) sowie dem Zahnfollikel (DFVs) gewonnen (Gronthos *et al.*, 2000, 2006; Morsczeck *et al.*, 2005a; Sonoyama *et al.*, 2006).

Die DPSCs besitzen ein hohes Proliferationspotenzial und ähnliche Eigenschaften wie mesenchymale Stammzellen (engl.: mesenchymal stem cells, MSCs) (Gronthos *et al.*, 2000; Shi *et al.*, 2001). Diese können

sich *in vitro* und *in vivo* zu Dentin produzierenden Zellen, die sogenannten Odontoblasten, differenzieren. Die multipotenten SHED lassen sich ebenfalls nach Induktion mit verschiedenen Differenzierungsprotokollen zu Odontoblasten, neuronalen Zellen sowie zu Adipozyten differenzieren (Miura *et al.*, 2003). Die SCAPs besitzen ein ähnliches oder sogar stärkeres Potenzial als SHED in Odontoblasten zu differenzieren (Sonoyama *et al.*, 2006, 2008).

Die PDLSCs haben eine hohe Proliferationsrate, können Kolonien bilden und weisen eine erhöhte Expression des ligament- bzw. sehnenspezifischen Transkriptionsfaktors Scleraxis auf. Sie besitzen zudem das Potenzial, *in vitro* in Zahnzement sowie in paradontales Ligament zu differenzieren (Seo *et al.*, 2004).

Mittels einer Kombination von SCAPs und PDLSCs wurde bereits ein künstlicher Zahnhalteapparat gebildet (Sonoyama *et al.*, 2006). Zudem wurde an einem Parodontitis-Minischwein-Modell gezeigt, dass PDLSCs die neue Bildung von Zement und Sharpey's Fasern sowie die Regeneration des Parodonts induzieren können (Liu *et al.*, 2008b; Seo *et al.*, 2004). Diese *In-vivo*-Studien unterstützen die Bedeutung der dentalen Stammzellen als potentielle Quelle von Geweben bzw. Zellen für die regenerative Medizin, insbesondere für die Oralmedizin.

1.3 Dentale Follikel-Vorläuferzellen

In 2005 wurden die dentalen Follikel-Vorläuferzellen zum ersten Mal aus menschlichen Follikeln des dritten Molar isoliert (Morsczeck *et al.*, 2005a). Der Zahnfollikel enthält Vorläuferzellen der alveolaren Osteoblasten, Zementoblasten und Zellen des paradontalen Ligaments, welche für die Bildung des Parodonts zuständig sind (Ten Cate, 1997; Morsczeck *et al.*, 2005b).

Mittels der Methode der Einzelzellsuspension konnten DFVs als auf Plastik adhärent wachsende Zellen kultiviert werden (Morsczeck *et al.*, 2009a). Die isolierten DFVs zeigten Stammzelleneigenschaften wie das Potenzial zur Selbsterneuerung (nachgewiesen mittels Bromodeoxyuridine), Klonogenität (siehe Abbildung 1A) und eine fibroblastenähnliche Morphologie (siehe Abbildung 1A) (Morsczeck *et al.*, 2005a). Sie hatten eine hohe Proliferationsrate (Luan *et al.*, 2006; Saugspier *et al.*, 2010) und exprimierten die Stammzellmarker Nestin, Notch1, CD44, CD145 und STRO1 (Morsczeck *et al.*, 2005a; Viale-Bouroncle *et al.*, 2011).

Ähnlich wie MSCs besitzen sie ein multipotentes Potenzial und können z. B. in odontoblasten-, in neuralen- sowie in fettähnlichen Zellen (siehe Abbildung 1A, C) differenzieren (Guo *et al.*, 2009; Völlner *et al.*, 2009). Nach Induktion mit diversen Differenzierungsprotokollen wie Dexamethason (siehe Abbildung 1B), Insulin und BMP2 wurde auch ihr osteogenes Differenzierungspotenzial *in vitro* nachgewiesen (Kémoun *et al.*, 2007a; Morsczeck *et al.*, 2005b; Saugspier *et al.*, 2010). *In-vivo*-Studien belegten das Potenzial der DFVs, zu alveolaren osteoblastenähnlichen Zellen zu differenzieren (Morsczeck *et al.*, 2005a).

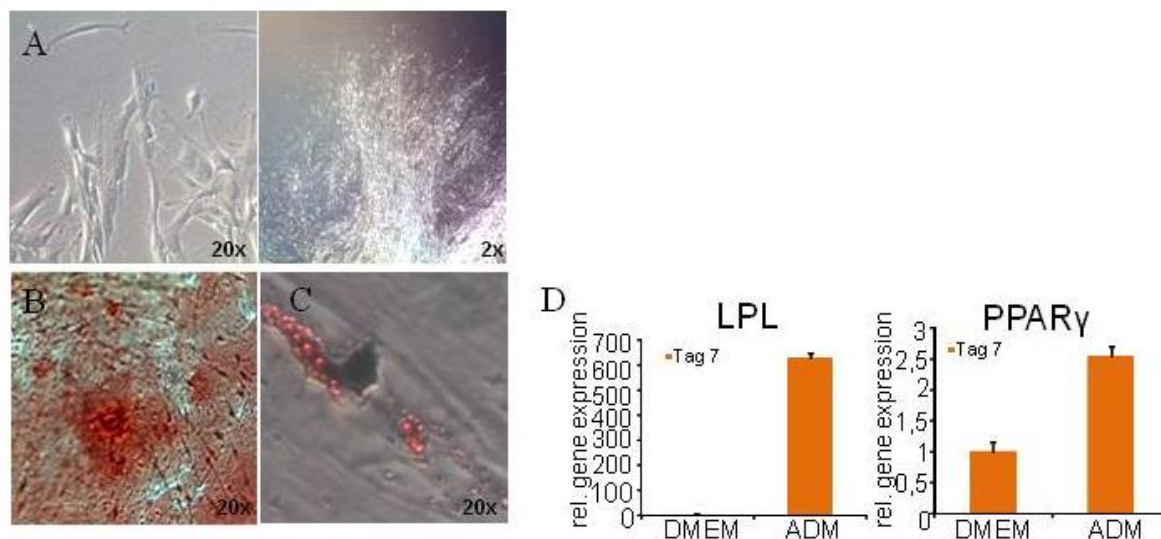


Abbildung 1: Stammzeleigenschaften der DFVs.

(A) Die aus impaktierten Weisheitszähnen isolierten Zellen wuchsen adhärent auf Kunststoffoberflächen und bildeten dabei Kolonien (Vergrößerung: links 200-fach, rechts 20-fach).

(B) 200-fache Vergrößerung der Alizarin-Red-Färbung einer Langzeitzellkultur im osteogenen Differenzierungsmedium ODM.

(C) 200-fache Vergrößerung einer Oil-Red-O-Färbung nach zwei Wochen Induktion der DFVs mit adipogenem Differenzierungsmedium ADM.

(D) RT-qPCR-Analyse der adipogenen Marker, LPL und PPAR γ in mit ADM für 7 Tage kultivierten DFVs.

Zur Normalisierung wurde der Mittelwert der Kontrolle (DMEM) verwendet. Alle gezeigten Ergebnisse stammen von eigenen, noch nicht publizierten Experimenten.

1.4 Knochenentwicklung

Knochen setzen sich hauptsächlich aus Osteoblasten und extrazellulärer Matrix zusammen. Die extrazelluläre Matrix besteht aus anorganischen (~ 60 %) und aus organischen Substanzen (~ 30 %), aus Wasser (~ 7,5 %) und aus Lipiden (< 2,5 %). Der anorganische Anteil besteht größtenteils aus Hydroxylapatit(HA)-Kristallen $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$. Der organische Anteil besteht zu ~ 90 % aus Kollagen I (Koll I) und in geringeren Mengen aus Kollagenen der Typen III und V sowie zu ~ 10 % aus nicht kollagenartigen Proteinen wie Osteopontin (OPN), Phosphoproteinen, Glykoproteinen, Proteoglykanen (PG), Albumin und weiteren Proteinen, die hauptsächlich in den Knochen synthetisiert werden (Clarke, 2008; Gorski, 1998).

Die Knochenentwicklung unterteilt sich in eine chondrale und die direkte desmale Ossifikation. Die aus Neuralleistenzellen abgeleiteten Knochenstrukturen - wie z. B. der Alveolarknochen - entstehen zum großen Teil direkt aus dem Mesenchym (Candeliere *et al.*, 2001; Hall and Miyake, 1992). Weil Transkriptionsfaktoren (TF) und Gene aus der direkten desmalen Ossifikation Gegenstände dieser Arbeit sind, wird diese näher beschrieben.

Bei der desmalen Ossifikation entsteht zunächst das Osteoid. Dies ist eine zusammenhängende Schicht, die von Osteoblasten auf bereits entstandenen Knochenanlagen meistens durch appositionelles Wachstum gebildet wird. Die so eingeleitete Bildung von Geflechtknochen bewegt sich von isoliert gelegenen Zentren zur Außenseite vorwärts. Es entstehen Knochenbälkchen, die miteinander in Verbindung treten und eine Spongiosa bilden. Als letztes wird die äußere und innere Knochenschale gebildet. Fast gleichzeitig mit dem Knochenwachstum beginnen auch Umbauvorgänge durch Osteoklasten sowie die Ersetzung der zuerst angelegten Geflechtknochen durch Lamellenknochen (Ogata and Uthoff, 1990).

Im Folgenden wird zunächst auf die regulatorischen Mechanismen während der osteogenen Differenzierung, insbesondere der desmalen Knochenbildung, näher eingegangen.

1.5 Regulation der osteogenen Differenzierung

Die Entstehung vielzelliger Organismen wird durch vier Grundprozesse, nämlich Zellproliferation, -differenzierung, -interaktion und Zellbewegung geleitet.

Die osteogene Differenzierung beispielsweise der DFVs wird durch verschiedene Faktoren, die sich in der Stammzellnische befinden, wie Chemokine und Wachstumsfaktoren sowie mechanische Faktoren reguliert (Thesleff and Mikkola, 2002). Im Allgemeinen wird die osteogene Differenzierung in drei Phasen unterteilt: die Proliferation, die Reifephase der extrazellulären Matrix und die Mineralisierung (Shalhoub *et al.*, 1989).

In der Proliferationsphase werden bis zum Erreichen der Konfluenz hauptsächlich Zellwachstums- und Zellzyklusgene wie z. B. H1-Histon-Gene, *c-Myc* und *c-Fos* exprimiert (Shalhoub *et al.*, 1989). Den Anfang des Differenzierungsprozesses bildet die Interaktion von Signalkaskaden, die hauptsächlich durch Morphogene induziert werden. Die Zahnentwicklung beruht beispielsweise auf die Interaktion zwischen dem oralen Ektoderm und dem aus der kranialen Neuralleistenzellen abgeleiteten Mesenchym. Signalmoleküle innerhalb des oralen Ektoderms wie BMP, WNT, TGF- β und FGF steuern die Expression von Homöobox enthaltende Gene wie *Lhx* und *Dlx*, die innerhalb der kranialen Neuralleistenzellen des Mesenchyms liegen, um in einem frühen Stadium Polarität zu erzeugen und das Wachstumsmuster des Mandibularbogens zu induzieren (Chai and Maxson, 2006; Thesleff and Mikkola, 2002). In frühen Phasen der osteogenen Differenzierung resultiert die Signalkaskade unter anderem in der Induktion des Transkriptionsfaktors RUNX2. Dieser aktiviert die Expression von knochenspezifischen extrazellulären Matrixproteinen (Ducy *et al.*, 1997). Die Regulation dieser osteogenen Marker wird in Kapitel 1.5.3 näher beschrieben. Ebenfalls werden in der Proliferationsphase verstärkt diejenigen Gene exprimiert, die das Kollagen vom Typ I synthetisieren.

In der Reifephase der Matrixproduktion werden hingegen osteoblastentypische Gene exprimiert, die zur Bildung des Osteoids benötigt werden, wie beispielsweise alkalische Phosphatase. Die gewebeunspezifische ALP ist ein membranständiges Glykoprotein, welches extrazelluläres Pyrophosphat (PPi) zu anorganischem Phosphat (Pi) hydrolysiert (Murshed *et al.*, 2005). Die Homöostase der

extrazellulären Konzentrationen von PPI und Pi ist für die lokale Regulation der mineralisierten Gewebekonstruktion wichtig (Harmey *et al.*, 2004). Die kontrollierte Koexpression von fibrillärem Koll I mit ALP fördert direkt die Ablagerung von HA in der Knochenmatrix (Murshed *et al.*, 2005).

Schließlich findet in der Phase der Mineralisierung die Osteocytogenese statt. Dieser Prozess der Differenzierung von Osteoblasten in Osteozyten wird begleitet durch die Herunterregulation vieler zuvor exprimierter Knochenmarker inklusive ALP und Koll I und der Hochregulation von Genen, welche die nicht kollagenartigen Proteine der Knochenmatrix wie OPN, Osteokalzin (OC), Bonesialoprotein (BSP) oder Dentin Matrix Protein 1 (DMP1) kodieren (Franz-Odenaal *et al.*, 2006).

Die extrazelluläre Matrix, Signalwege und Transkriptionsfaktoren sind somit notwendig für die richtige Bildung der Knochenstrukturen. Sie werden in den nachfolgenden Kapiteln ausführlicher beschrieben. Davon abgesehen wird die Regulation der osteogenen Differenzierung auch durch weitere Faktoren moduliert, wie z. B. mittels epigenetischer Modifikationen (Cho *et al.*, 2014; Nayak *et al.*, 2014).

1.5.1 Extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix erfüllt sowohl strukturelle als auch biologische Funktionen. Die Zellen sezernieren Kollagene, PG, Adhärenzproteine und Polysacchariden, die ein komplexes Netzwerk bilden. Darüber hinaus werden auch Wachstumsfaktoren wie Zytokine und Chemokine in der EZM gespeichert, die ihrerseits Signalkaskaden induzieren können (Hynes, 2009).

Die EZM erhält darüber hinaus die Zellpolarität aufrecht und begünstigt die Zelladhäsion (Hynes, 2009). In somatischen Stammzellen hat sie eine wichtige Funktion für die Migration, die Proliferation, die Morphogenese und die Differenzierung (Holle and Engler, 2011; Hynes, 2009; Watt and Huck, 2013). Außerdem ist sie an der Zellvitalität beteiligt und schützt die Zellen vor Anoikis (eine Art der Apoptose, die durch das Ablösen der Zellen von der Matrix eingeleitet wird; Frisch and Francis, 1994).

Signale der EZM werden hauptsächlich über Integrine vermittelt (Hynes *et al.*, 2002). Integrine sind heterodimere Rezeptoren für Moleküle an der Zelloberfläche und an EZM-Proteinen. Verschiedene α - und β -Untereinheiten sind hierbei in limitierten Kombinationen exprimiert. Diese weisen verschiedene Ligandenspezifisierungen auf. Beispielsweise können Integrine- $\alpha 2$ - $\beta 1$ an Kollagen und Laminin binden (Stupack and Chersesh, 2002). Zudem können Integrine das Spektrum an EZM-Komponenten steuern, mit denen die Zelle interagiert. Dieselben Integrine bzw. EZM-Komponenten können an verschiedene Liganden binden bzw. von mehr als einem Integrin erkannt werden. Dies ermöglicht eine kompetitive oder kooperative Signalleitung und Bindung zwischen verschiedenen Heterodimeren von Integrinen (Geiger *et al.*, 2001; Koo *et al.*, 2002; Stupack and Chersesh, 2002).

Um das durch die EZM erzeugte Signal weiterzuleiten, erstrecken sich die Integrine zwischen Matrixproteinen und der Zelloberfläche an eng nebeneinander liegenden Standorten; dies wird als fokale Adhäsion bezeichnet (Burrige *et al.*, 1987). Mehrere fokale Adhäsionsproteine werden als Reaktion auf die

vom Integrin vermittelte Adhäsion am Tyrosinrest phosphoryliert. Dadurch wird unter anderem der Non-Rezeptor Tyrosinkinase aus der Gruppe der fokalen Adhäsionskinase (FAK) oder aus der Src-Familie aktiviert (siehe Abbildung 2 zur Aktivierung von FAK). Diese Tyrosinkinasen leiten Signale direkt weiter, welche die Aktivierung vieler Hauptzellsignalwege induzieren. Diese regulieren dann über die Signalkaskaden u. a. die Differenzierung der Zellen (Mitra *et al.*, 2005; Romer *et al.*, 1994). Darüber hinaus wirken auch die mechanischen Eigenschaften der EZM, wie die Steifigkeit und die Verformbarkeit, am Schicksal der Zelle mit (Engler *et al.*, 2006).

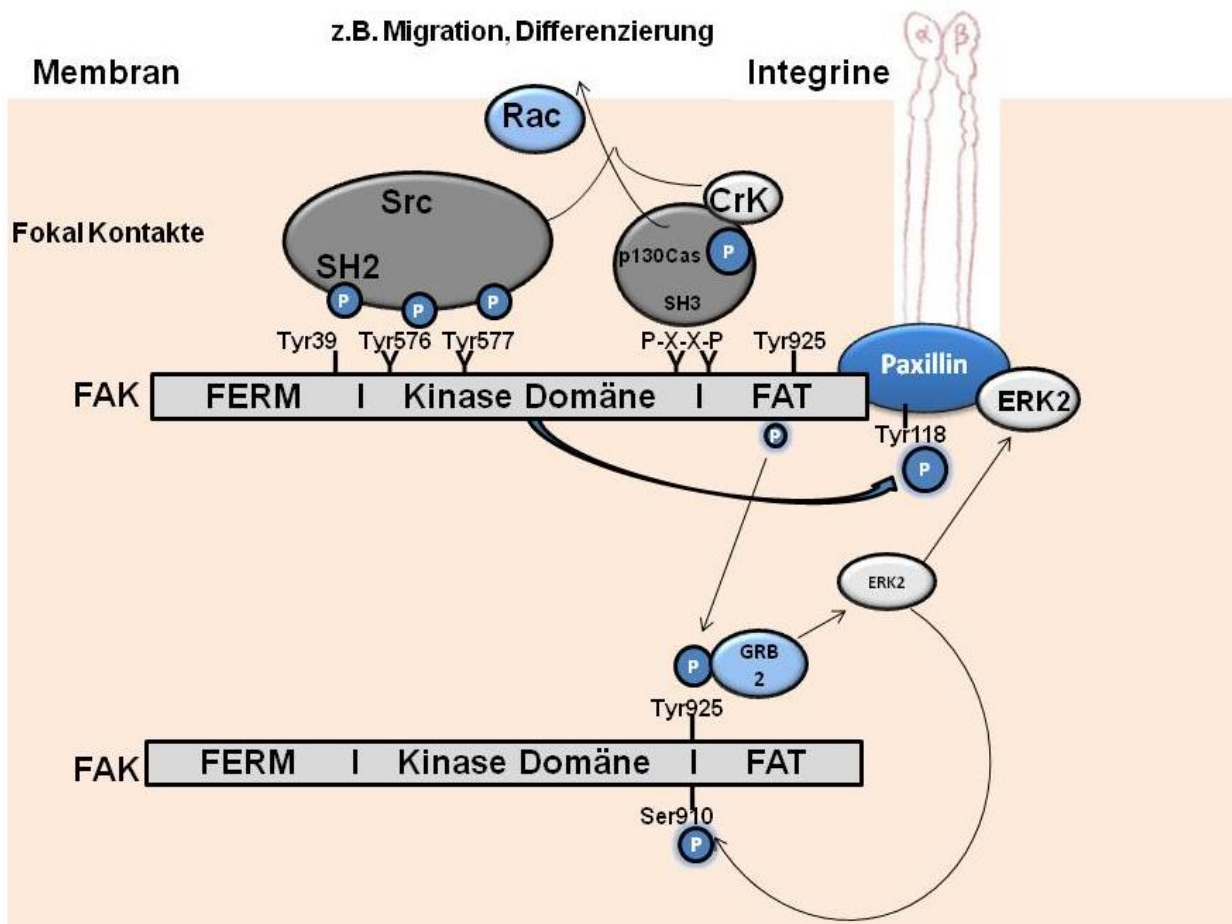


Abbildung 2: Die Aktivierung von FAK.

FAK wird durch Integrin-Clustering an Tyr 397 autophosphoryliert, welches eine Bindungsstelle für die Familie der Src-Kinasen ist. Die Bindung von Kinasen der Src-Familie führt zur Phosphorylierung der Tyrosinreste 407, 576 und 577 in der katalytischen Domäne und der Tyrosinreste 871 und 925 im carboxyterminalen Bereich der FAK bzw. in der FAK fokalen Adhäsions-Erkennungsdomäne (FAT). Die Phosphorylierung von Tyr 925 erzeugt letztlich eine Bindungsstelle für die *Growth factor receptor-bound protein 2* (Grb2)/*Src Homology 2*-(SH2)-Domäne und löst eine Ras-abhängige Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges aus (Aus Mitra *et al.*, 2005).

Diverse Studien zeigten, dass Komponenten der EZM wie Laminin und/oder Kollagen über Integrine reguliert werden und die osteogene Differenzierung der MSCs über FAK induzieren (Klees *et al.*, 2005; Mittag *et al.*, 2012; Salasnyk *et al.*, 2007). Eine Transkriptom-Analyse des in DFV-überexprimierten DLX3 zeigte in Vorarbeiten für die vorliegende Dissertation, dass dieser TF an der Regulation von Genen der EZM beteiligt ist (Viale-Bouroncle *et al.*, 2012).

1.5.2 Signalwege

Eine Signaltransduktion tritt auf, wenn ein spezifischer Rezeptor auf der Zelloberfläche durch ein Signalmolekül aktiviert wird. Dieser Rezeptor löst wiederum einen oder mehrere intrazelluläre Signalwege aus, in denen eine Reihe von Signalproteinen eine biochemische Kette von Ereignissen vermittelt und letztlich eine Reaktion in der Zelle entsteht (Alberts, 2008). In Abhängigkeit von der Zelle löst diese Reaktion eine Veränderung des Stoffwechsels, der Form, der Genexpression oder der Fähigkeit der Zelle, sich zu teilen, aus (Krauss, 2008).

Das extrazelluläre Signalmolekül wird auch als Morphogen bezeichnet. Im einfachsten Fall entsteht ein Signalkonzentrationsgradient durch Diffusion im Signalzentrum. Durch die Wechselwirkung dieser Morphogene differenzieren z. B. die Zellen des oralen Ektoderms im Zahnknospenstadium zum inneren Schmelzepithel (Jussila and Thesleff, 2012). Möglicherweise sind im Zahnfollikel auf diese Weise verschiedene Signalwege und Zielgene an der Entwicklung des Zahns und des Parodonts beteiligt. Hauptsignalwege, wie der BMP-, WNT- und NOTCH-Signalweg wurden bereits in dentalen Stammzellen während der osteogenen Differenzierung nachgewiesen (Liu *et al.*, 2009). Auf diese Signalwege wird zunächst näher eingegangen.

1.5.2.1 Knochenmorphogenetisches Protein (BMP)-Signalweg

Die Familie der *bone morphogenetic proteins* (BMPs) gehört der *transforming growth factor* (TGF)- β -Superfamilie an. Bis heute sind mehr als 30 dem BMP ähnliche Proteine bekannt. Zu ihnen gehören u. a. die *osteogenic proteins* (Ops), die *growth and differentiation factors* (GDFs) und die BMPs (Balemans and Van Hul, 2002).

Die BMPs werden als große Präproteine (400 - 500 Aminosäuren) synthetisiert. Diese enthalten einer Prodomäne, ein C-terminales reifes Peptid mit der Cystin-Knoten-Domäne und ein N-terminales Signalpeptid zur Sekretion (Sieber *et al.*, 2009; Xiao *et al.*, 2007). Eine Signalkaskade wird nach Bindung von BMPs an BMP-Rezeptoren (BR) initiiert. Die BMP-Rezeptoren gehören zu den Transmembran-Serin/Threonin Kinase-Rezeptoren und werden in Typ I (BRI)- und Typ II (BRII)-Rezeptoren unterscheiden (Koenig *et al.*, 1994). Zu den BRI-Rezeptoren zählen die *activin receptor-like kinases* (ALK): ALK1 (Acvr11), ALK2 (ActRI), ALK3 (BRIa), ALK4 (ActRIb) und ALK6 (BRIb) und zu den BRII-Rezeptoren zählen die Aktivin-Rezeptoren (Act): BRII, ActRIIa, und ActRIIb (Ehrlich *et al.*, 2011; Nohe *et al.*, 2004).

Nach Bindung des BMP-Liganden, als Homo- oder Heterodimer, erfolgt eine Transphosphorylierung des BRI-Rezeptors durch den aktivierten BRII-Rezeptor (Allendorph *et al.*, 2006). Nachdem der BRI-Rezeptor am Serin/Threonin-Rest phosphoryliert wurde, wird das Signal zu einer Substrat-Phosphorylierung der *smad and mad related* (SMADs)-Proteine an einem konservierten Motiv innerhalb des Carboxy-Terminus weitergeleitet (Shi *et al.*, 1999). Die Phosphorylierung löst eine Aktivierung und Oligomerisierung von regulatorischen SMADs (SMAD1/5/8) aus, die im Komplex mit SMAD4 im Nukleus als

Transkriptionsfaktoren wirken und anschließend die Transkription von osteogenen Markern induzieren (siehe Abbildung 3) (Shi *et al.*, 1999). Zu den BMP-Zielgenen zählen u. a. Differenzierungsgene wie *DLX3*, *RUNX2* und *Osterix* (Hassan *et al.*, 2006).

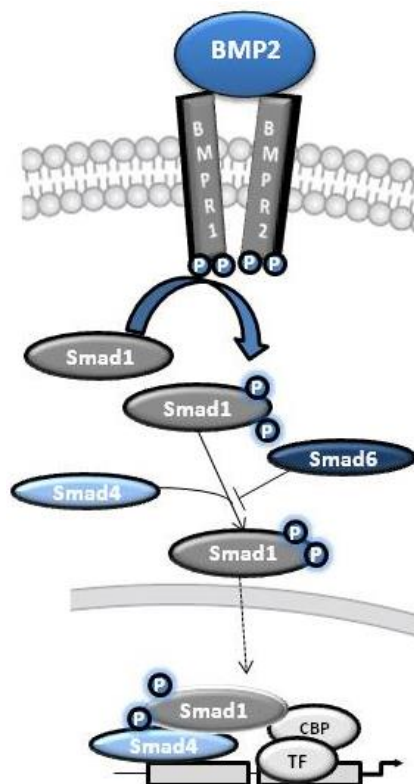


Abbildung 3: Schematische Darstellung des BMP-Signalweges.

BMP2 löst nach Bindung an dem BMP-Rezeptor eine Signalkaskade durch die Phosphorylierung des SMAD1-Proteins aus. Die Phosphorylierung führt zu einer Aktivierung und Oligomerisierung von regulatorischen SMADs (SMAD1/5/8). Im Nukleus wirken die SMADs im Komplex mit SMAD4 als Transkriptionsfaktoren und sie induzieren letztlich die Transkription von osteogenen Markern (modifiziert aus Shi *et al.*, 1999).

Neben dem SMAD1/5/8-Signalweg gibt es auch diverse SMAD-unabhängige Signalwege. Diese alternativen Signalkaskaden erstrecken sich über mitogene aktivierte Kinasen wie Erk und p38 MAPK (Kozawa *et al.*, 2002; Moustakas and Heldin, 2003).

Darüber hinaus regulieren extrazelluläre lösliche Inhibitoren wie z. B. Noggin, Follistatin und Gremlin die BMP-Aktivität (Groppe *et al.*, 2003; Sneddon *et al.*, 2006; Sylva *et al.*, 2011). Zudem kann der BMP-Signalweg über negativ wirkende Pseudorezeptoren wie *BMP and Activin membrane-bound inhibitor* (BAMBI) inhibiert werden (Wrighton *et al.*, 2009). Ein negativer BMP-Regulationsmechanismus erfolgt ebenfalls in vielen Zelltypen über die Expression der inhibitorischen SMADs6/7 (Topper *et al.*, 1998). Berghorn *et al.* (2006) zeigten zum Beispiel, dass der Repressor SMAD6 die transkriptionelle Aktivität von *DLX3* durch Inhibition der DNA-Bindung unterdrückt.

Die BMPs fungieren als Wachstumsfaktoren, welche in spezifischem Gewebe exprimiert werden und unter anderem die Knochenbildung induzieren (Urist *et al.*, 1977). Während der Entwicklung des Parodonts in der Maus werden BMPs und die phosphorylierte Form von SMAD1 unterschiedlich exprimiert. BMP2 und BMP7 wurden in *Hertwig's epithelial root sheath*-Zellen und im Zahnfollikel nachgewiesen und zu späteren Zeitpunkten auch in differenzierten parodontalen Ligamentzellen. Zudem wurde BMP3 am 13. Tag der parodontalen Entwicklung exprimiert. BR1b, BR1I, ActR1 und die phosphorylierte Form von SMAD1 wurden am 6. Tag im Zahnfollikel und den *Hertwig's epithelial root sheath*-Zellen detektiert und danach auch diffus im Parodont. Gleichzeitig war die Expression von BR1a in den Alveolarknochen eingeschränkt (Kémoun *et al.*, 2007b). Zudem wurde festgestellt, dass harmonische Interaktionen zwischen dem BMP-Inhibitor Noggin und BMPs für eine korrekte Entwicklung des Parodonts essenziell sind (Kim *et al.*, 2007). In DFVs wurde die Expression von BMP2 und BMP3 in Verbindung mit TNF-alpha gebracht (Yao *et al.*, 2010). Zudem wurde gezeigt, dass BMP2, BMP6, BMP7 und BMP9 die Differenzierung der DFVs zu osteoblasten- oder zementoblastenähnlichen Zellen induzieren (Kémoun *et al.*, 2007a; Li *et al.*, 2012; Saugspier *et al.*, 2010; Takahashi *et al.*, 2013).

1.5.2.2 WNT-Signalweg

Der WNT-Signalweg ist nach seinem Liganden „WNT“ (zusammengesetzt aus Wg für Wingless und Int-1 für Integrator 1) benannt (Nusse *et al.*, 1991). Die Bezeichnung Wingless geht auf Beobachtungen von Mutationen im *Wingless*-Gen der schwarzbäuchigen Taufliege (*Drosophila melanogaster*), welche flügellose Fliegen zur Folge hatten. Währenddessen begünstigt das *Int*-Gen bei Mäusen die Entwicklung von Mammakarzinomen, wenn seine Expression durch die Integration des Mammatumovirus (MMTV) aktiviert wird (Nusse *et al.*, 1985).

Der klassische WNT-Signalweg ist von β -Catenin und WNT abhängig (Miller *et al.*, 1999). Üblicherweise befindet sich die WNT-Signaltransduktionskaskade in einem unstimulierten oder negativen Zustand, wenn der Ligand WNT nicht vorhanden ist. β -Catenin wird dann durch den β -Catenin-Abbaukomplex, bestehend aus dem Protein Axin1, dem Adenomatöse Poliposis Coli Genprodukt (APC) und der Kinasen Glycogen-Synthase-Kinase 3 β (GSK3 β) und Casein-Kinase 1 (CK1) zur Ubiquitinierung markiert und anschließend proteolytisch abgebaut (Hart *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2009; Nelson and Nusse, 2004; siehe Abbildung 4A). CK1 leitet die Phosphorylierung an die Aminosäure Ser 45 des β -Catenins weiter. Diese Phosphorylierung legt ein Erkennungsmotiv für GSK3 β fest, welches nachfolgend Thr 41, Ser 37 und Ser 33 an β -Catenin phosphoryliert (Rubinfeld *et al.*, 1996). Inhibitoren des WNT-Signalweges wirken zum einen, wenn diese an den WNT-Ligand oder die WNT-Rezeptoren binden und um die Bindungsstelle konkurrieren. Shimomura *et al.* (2010) bewiesen, dass das membrangebundene Glykoprotein APCDD1 (engl.: Adenomatous polyposis coli down-regulated 1) mit LRP5 und WNT3A wechselwirkt und in Haarfollikelzellen den WNT-Signalweg inhibiert (Shimomura *et al.*, 2010).

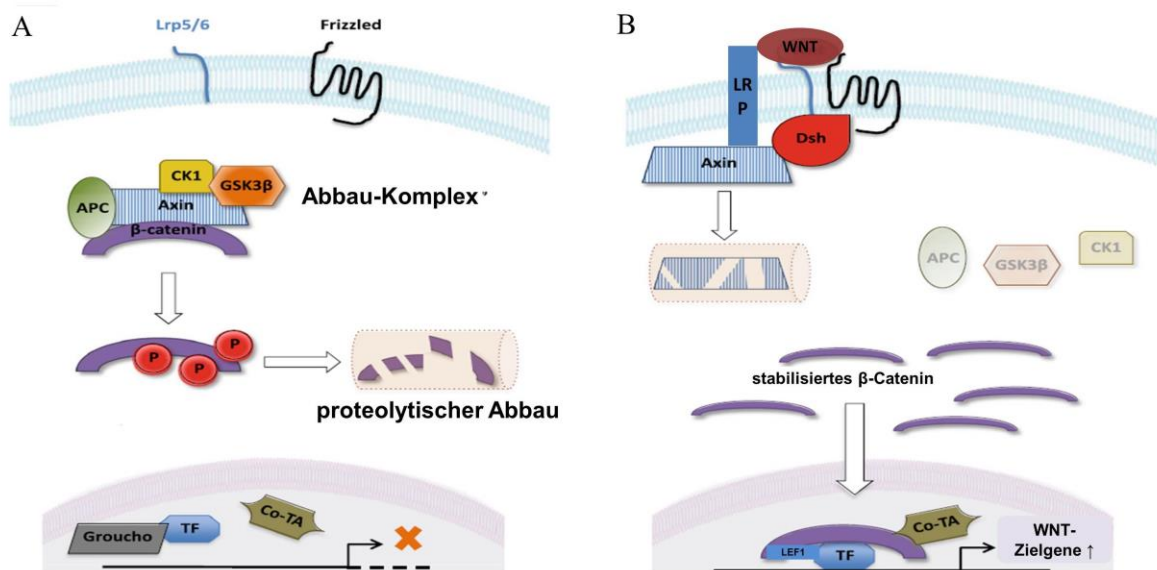


Abbildung 4: Schematische Darstellung des WNT-Signalweges.

(A) Der klassische WNT-Signalweg befindet sich üblicherweise in einem unstimulierten Zustand. In Anwesenheit eines WNT-Ligands, z. B. WNT3A, wird β -Catenin durch einen β -Catenin-Abbaukomplex zur Ubiquitinierung markiert und anschließend proteolytisch abgebaut. Der β -Catenin-Abbaukomplex besteht aus dem Protein Axin1, der Glycogen-Synthase-Kinase 3 β (GSK3 β), Casein-Kinase 1 α (CK1 α) und dem Adenomatöse Poliposis Coli Genprodukt (APC) (Hart *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2000; Nelson and Nusse, 2004). Die Translokation von β -Catenin in den Zellkern wird somit verhindert. Folglich werden die durch β -Catenin induzierten Transkriptionsfaktoren T Zell-Faktor (TCF) und Lymphoid-Enhancer-Faktor (LEF) von Koaktivatoren (Co-AT) aufgelöst und an den Repressor Groucho gebunden (Daniels and Weis, 2005). Die Expression der WNT-Zielgene bleibt dadurch unterdrückt.

(B) In dem aktivierten WNT-Signalweg bindet WNT an seinen Rezeptor Frizzled (FZD) und den Korezeptor Lipoprotein Rezeptor Protein (LRP) (Bhanot *et al.*, 1996; Dann *et al.*, 2001; Nelson and Nusse, 2004). Diese Rezeptoren leiten das Signal zu den Proteinen DVL (Dishevelled) und Axin weiter. In der Folge wird der β -Catenin-Abbaukomplex inhibiert. β -Catenin wird freigesetzt, was zur Stabilisierung und Akkumulation von β -Catenin im Zytoplasma führt. Anschließend transloziert β -Catenin in den Zellkern und bindet dort zusammen mit anderen Proteinen wie Co-AT und CBP zusammen an TCF-LEF. Dieser β -Catenin-TCF-LEF-Komplex aktiviert folglich spezifische Zielgene des WNT-Signalweges (modifiziert aus Ring *et al.*, 2014).

Im aktivierten WNT-Signalweg bindet WNT andererseits an seinen Rezeptor Frizzled und den Korezeptor Lipoprotein Rezeptor Protein 5/6 (LRP-5/6; Bhanot *et al.*, 1996; Dann *et al.*, 2001; Nelson and Nusse, 2004). Diese Rezeptoren leiten das Signal zu den Proteinen Dishevelled (DVL) und Axin weiter, die den β -Catenin-Abbaukomplex inhibieren. Darauf hin wird β -Catenin freigesetzt, stabilisiert und im Zytoplasma akkumuliert. Anschließend transloziert es in den Zellkern und bindet dort mit anderen Proteinen sowohl an Transkriptionsfaktoren der T-Zell Transkriptionsfaktor (engl.: T cell-transcription factor, TCF) als auch der Lymphoid-Enhancer-Faktor (engl.: lymphoid enhancer factor, LEF) Familie zusammen. Letztlich werden spezifische Zielgene des WNT-Signalweges aktiviert (siehe Abbildung 4B und auch unter: http://www.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/target_genes; Behrens *et al.*, 1996; Nusse, 2005; Tolwinski *et al.*, 2003).

Der kanonische WNT-Signalweg ist an der Regulation von zahlreichen Prozessen während der Embryonalentwicklung beteiligt wie zum Beispiel an der Induktion der Organogenese (Logan and Nusse, 2004). Er spielt eine essenzielle Rolle bei der Erhaltung der Homöostase in adulten Geweben sowie bei der Regulation der Differenzierung und Selbsterneuerung von Stammzellen (Logan and Nusse, 2004; Nusse, 2005; Nusse *et al.*, 2008). Genetische Defekte innerhalb des WNT-Signalweges sind häufig mit der Entwicklung von Krebs verbunden, sind aber auch mit anderen Krankheiten wie Diabetes, Störungen des Fettstoffwechsels und Osteoarthritis assoziiert (Christodoulides *et al.*, 2006; Giles *et al.*, 2003; Grant *et al.*, 2006; Moon *et al.*, 2004).

In MSCs ist der WNT-Signalweg an der Festlegung des Zellschicksals und der Regulation der osteogenen Differenzierung beteiligt (Etheridge *et al.*, 2004). Es gibt jedoch widersprüchliche Ergebnisse. Einige Studien beschrieben den WNT-Signalweg als einen positiven Regulator der osteogenen Differenzierung in MSCs (Day *et al.*, 2005; Kato *et al.*, 2002), während andere die negative Wirkung des WNT-Signalweges auf die osteoblastäre Differenzierung aufzeigten. So wurde z. B. durch Zugabe von WNT3A die Zellproliferation induziert, die osteogene Differenzierung in MSCs jedoch inhibiert (Boland *et al.*, 2004; de Boer *et al.*, 2004).

Neben dem kanonischen WNT/ β -Catenin-Signalweg sind mindestens drei weitere β -Catenin-unabhängige, nicht-kanonische WNT-Signalwege beschrieben. Diese beinhalten die Aktivierung der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen-Proteinkinase II (CamKII), der Proteinkinase C (PKC), der Jun-N-terminal Kinase (JNK) und den kleinen GTP-bindenden Proteinen durch den planaren Zellpolarität-Signalweg (engl.: Planar Cell Polarity, PCP) sowie die Rekrutierung von Heterotrimeren GTP-bindenden Proteinen, welche die Phospholipase C (PLC) und eine Phosphodiesterase (PDE) aktivieren (Ahumada *et al.*, 2002; Kohn and Moon, 2005; Mikels and Nusse, 2006; Saneyoshi *et al.*, 2002; Sheldahl *et al.*, 2003).

Darüber hinaus bindet β -Catenin unabhängig vom WNT an E-Cadherin und beteiligt sich an der Zelladhäsion an der Plasmamembran (Brembeck *et al.*, 2006). Mitogene Faktoren wie z. B. MAPK und Akt1 können den β -Catenin-Signalweg durch die Inhibition von GSK3 β mittels Autophosphorylierung an Ser 9 aktivieren (Dajani *et al.*, 2001). Unabhängig von GSK3 β kann β -Catenin ebenfalls durch PKA an Ser 552 und Ser 675 phosphoryliert werden. Die Phosphorylierung durch PKA induziert die transkriptionelle Aktivität (TCF/LEF-Transaktivierung) von β -Catenin und die Interaktion von β -Catenin mit seinem transkriptionellen Koaktivator, dem CREB-Bindeprotein (engl.: CREB-binding protein, CBP; Hino *et al.*, 2005; Taurin *et al.*, 2006). Eine Studie in BMSCs zeigte zudem, dass BMP2 die osteogene Differenzierung durch β -Catenin über den PI3K/Akt-Signalweg moduliert (Lee *et al.*, 2010).

Mehrere Stadien der Zahnentwicklung werden durch den WNT/ β -Catenin-Signalweg und dessen Interaktion mit weiteren Signalwegen wie dem BMP/SMAD4 gesteuert (Li *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2008a). Während der Zahnentwicklung werden WNT-Liganden hauptsächlich im oralen Epithel differenziell exprimiert. Beispielweise ist WNT3 im oralen Epithel, und im Schmelzknoten exprimiert (Sarkar and Sharpe, 1999). Hingegen wird im dentalen Mesenchym ausschließlich WNT5A exprimiert (Sarkar and

Sharpe, 1999). WNT5A kann den WNT-Signalweg durch nicht-kanonische Signalwege inhibieren (Lin *et al.*, 2011). Der Frizzled Rezeptor FZD6 wurde im oralen Epithel, im Schmelzknoten und im äußeren Schmelzepithel nachgewiesen. Die WNT-Antagonisten MFrzb1, Mfrp2 und Dkk1 wurden im dentalen Mesenchym detektiert (Fjeld *et al.*, 2005; Sarkar and Sharpe, 1999). Transkriptomstudien von humanen DFVs wiesen eine signifikante Herunterregulation von WNT1 nach osteogener Differenzierung nach, während weitere Zielgene des WNT-Signalweges wie z. B. *FZD8* und *FRZB1* signifikant hochreguliert wurden (Morszeck *et al.*, 2009b; Saugspier *et al.*, 2010).

Obwohl ein zu starkes WNT-Signal die Mineralisierung und Zahnwurzelbildung stört (Aurrekoetxea *et al.*, 2012; Bae *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2007), ist β -Catenin wichtig für die Odontogenese und Bildung des Zements (Kim *et al.*, 2012b; Zhang *et al.*, 2013). Ähnliches wurde für Stammzellen aus der Pulpa und DFVs von Nagern gezeigt: Der WNT-Signalweg hatte eine negative Wirkung auf die osteogene Differenzierung (Du *et al.*, 2012; Silvério *et al.*, 2012), obwohl das endogene β -Catenin für die BMP2-induzierte Osteogenese in DFVs notwendig zu sein scheint (Silvério *et al.*, 2012).

1.5.2.3 Der NOTCH-Signalweg

Der NOTCH-Signalweg ist ein evolutionär konservierter Signalmechanismus, welcher in *Drosophila melanogaster* entdeckt wurde. Der Name stammt von einer dominanten Mutation, die in der schwarzbäuchigen Taufliege eine Einbuchtung (engl.:notch) am Ende der Außenkanten der Flügel verursachte (Lardelli *et al.*, 1995; Mohr, 1919).

Dieser Signalweg vermittelt die Kommunikation zwischen benachbarten Zellen, die entweder den Rezeptor NOTCH oder einen membrangebundenen NOTCH-Ligand, Jagged/Delta-like, exprimieren. Von Säugetieren sind die vier NOTCH-Rezeptoren NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3 und NOTCH4 und verschiedene NOTCH-Liganden bekannt. Letztere werden in die Delta-like (DLL1, DLL3, DLL4)- und Jagged (JAG1, JAG2)-Familie unterteilt (Tien *et al.*, 2009). Nach der Interaktion zwischen dem NOTCH-Rezeptor und den NOTCH-Liganden wird der NOTCH-Rezeptor nach proteolytischer Spaltung des NOTCH-Proteins mittels γ -Sekretase aktiviert und aufgelöst. Anschließend wird die intrazelluläre Domäne von NOTCH (NICD) in den Zellkern transloziert (Okochi *et al.*, 2002; Struhl and Greenwald, 1999). Dort bindet NICD an den Transkriptionsfaktor C Promotor Bindungsfaktor 1 (CBF1) und induziert die Transkription von Zielgenen wie *Hairy/Enhancer of split (HES)* und *HES related with YRPW motif (HEY)*; Fischer and Gessler, 2007; Maier and Gessler, 2000; Ohtsuka *et al.*, 1999).

Der NOTCH-Signalweg spielt eine zentrale Rolle bei Kommunikationsmechanismen und somit werden extrazelluläre Signale weitergeleitet. Diese Signale induzieren ein Genexpressionsmuster, das über den Differenzierungszustand einer Zelle Aufschluss geben kann (Lardelli *et al.*, 1995). Der NOTCH-Signalweg spielt eine wichtige Rolle bei der Koordination der Proliferation und der Differenzierung der MSCs. Engin *et al.* (2008) zeigten, dass die Wiederherstellung der Funktion (engl.: gain of function) von NOTCH1 in transgenen Mäusen eine schwere Osteosklerose verursachte. Andererseits wurde durch Deletion

von Presenilin1 und 2 in den Knochen der NOTCH-Signalweg unterbunden, was die Autoren mit der altersbedingten Osteoporose assoziierten. Die Mineralisierung in den Knochen wurde demzufolge sowohl bei einer Signalwegverstärkung als auch einer Unterbindung inhibiert.

In dentalen Stammzellen nimmt der NOTCH-Signalweg an einer molekularen Kaskade von Ereignissen teil, welche die Zahnentwicklung in Menschen und Nagern steuert (Cai *et al.*, 2011). So zeigten Zhang *et al.* (2008), dass die Überexpression von JAG1 oder NICD1 die odontogene Differenzierung in DPSCs inhibiert. Die NOTCH1-Konzentration ist besonders hoch in undifferenzierten DFVs und wird deshalb auch als indirekter Nachweis für Stammzellen benutzt. Während der osteogenen Differenzierung sind die Gene *NOTCH1* und *HES1* des NOTCH-Signalweges differenziell reguliert (Morsczech, 2006; Morsczech *et al.*, 2005a, 2005b).

1.5.3 Transkriptionsfaktoren

Transkriptionsfaktoren steuern molekulare Prozesse wie Proliferation und Differenzierung. Die Transkription von Genen erfolgt durch RNA-Polymerasen. In Eukaryonten existieren drei Typen von RNA-Polymerasen. Die RNA-Polymerase I synthetisiert ribosomale RNA (rRNA (18S, 5,8S, 28S)) im Zellkern als Transkript. Die Transkripte prä-mRNA, snRNA (engl.: small nuclear RNA), sonRNA (engl.: small nucleolar RNA) sowie microRNA werden durch die Polymerase II, die transfer RNA (tRNA), sowie die 5S-rRNA werden durch die Polymerase III im Zellkern synthetisiert (Grummt, 1999; Lee *et al.*, 2004; Willis, 1993). Weil die Expression von mRNA eine starke Regulation benötigt, braucht RNA-Polymerase II mehrere DNA-bindende Proteine, um an den Promotor zu binden und die Transkription zu initiieren (Bhargava and Chatterji, 1992). Wegen ihrer Schlüsselfunktion werden die DNA-bindenden Proteine deshalb als TF bezeichnet.

Man unterscheidet zwischen allgemeinen und spezifischen TFs. Allgemeine TFs werden ubiquitär exprimiert, und obwohl sie für die Transkription obligatorisch sind, sind sie nicht an der Genregulation beteiligt. Andererseits werden genregulatorische Proteine (spezifische TFs) in spezifischen Geweben exprimiert und regulieren die Expressionsmuster verschiedener Zelltypen. Sie binden direkt an TF-Bindungsstellen auf dem Promotor und können die Expression eines Gens entweder fördern (Aktivatoren) oder hemmen (Repressoren). Ein TF enthält typischerweise drei Domänen: Eine DNA-Bindedomäne, mit welcher der TF an spezifische Promotorsequenzen andockt, eine Transaktivierungsdomäne, an die koregulatorische Proteine binden und eine Signalsensordomäne, mit der der TF aktiviert werden kann (Latchman, 1997).

Bei Wirbeltieren ist die Regulation der Osteogenese hoch konserviert und wird durch eine relativ kleine Anzahl an TF gesteuert (Flores *et al.*, 2004). Beispielsweise wurde erkannt, dass RUNX2 (engl.: runt-related transcription factor 2) das zentrale Protein ist, das die Osteogenese reguliert (Komori, 2010). Das Fehlen von RUNX2 führt zu verschiedenen Knochendysplasien, bestehend aus genetisch festgelegten Störungen in der Skelettstruktur (Marie, 2008). So verursacht z. B. die Haploidinsuffizienz von RUNX2 eine

Cleidocranial-Dysplasia, die sich in einem verzögerten Schließen der Schädelnähte sowie einer hypoplastischen oder aplastischen Clavicula und multiplen dentalen Missbildungen niederschlägt (Mundlos *et al.*, 1997). An der Regulation der Knochenentwicklung sind weitere wichtige TF aus der DLX-Familie beteiligt. Beispielsweise können DLX5 und DLX3 RUNX2 direkt regulieren (Hassan *et al.*, 2004).

1.5.3.1 DLX-Familie

Die *DLX*-Genfamilie gehören wie die *HOX*-Gene zu den homöotischen Genen, deren Name sich von Homöobox (*HOX*) ableitet. *DLX* sind mit dem *Distal-less(Dll)*-Gen der schwarzbäuchigen Taufliege (*Drosophila melanogaster*) verwandt. Wie der Name andeutet, ist *Distal-less* (lat. *distare*: sich entfernen) für die Entwicklung der Gliedmaßen zuständig. *Drosophila*-Mutanten, denen das *Dll* fehlt, verlieren oft die Gliedmaßen (Gorfinkiel *et al.*, 1997; Panganiban, 2000).

Zur *Distal-less* Familie gehören 6 *DLX* (*DLX1* - *DLX6*)-Gene, welche paarweise organisiert sind (Dollé *et al.*, 1992; Stock *et al.*, 1996). Sie liegen auf dem Chromosom in der Nähe der Gene Homöobox. Bei Menschen liegen die Gene *DLX3* und *DLX4* (7) auf Chromosom 17q21, wo auch das Gencluster *HOXB* liegt (Nakamura *et al.*, 1996; Samee *et al.*, 2007).

Verschiedene Arbeiten wiesen nach, dass die Paare gekoppelter *DLX*-Gene cis-wirkende Sequenzen teilen und die gekoppelten Gene sehr ähnliche, jedoch nicht identisches Expressionsmuster besaßen (Ghanem *et al.*, 2003; Samee *et al.*, 2007; Sumiyama *et al.*, 2002). Während der frühen Entwicklung der Kiemenbögen, der Körpergliederungen und des Gehirns werden *DLX*-Gene gleichzeitig im selben Gewebe exprimiert. Beispielsweise wird das Paar *DLX1/2* im Ektomesenchym, das sich aus der kranialen Neuralleiste entwickelt und in der proximalen und distalen Region der Kiemenbögen stark exprimiert, während die Expression von *DLX5/6* und *DLX3/4* (7) auf der distalen Region des Kiemenbogens beschränkt ist (Depew *et al.*, 2005). Robinson und Mahon (1994) wiesen nach, dass in Mäusen *DLX2* und *DLX3* in den Kiemenbögen und deren Derivate eine zeitlich und räumlich unterschiedliche Expression hatten. In späten Entwicklungsstadien zeigten diese beiden Gene sowohl komplementäre als auch überlappende Expressionsmuster in Regionen, deren Entwicklung in Abhängigkeit von epithelialer- mesenchymaler Interaktion steht, wie Mittelohr und Innenohr, Zähne und Haarfollikel.

DLX-Gene können sich selbst sowie andere *DLX*-Gene regulieren und somit deren Expressionsmuster kontrollieren (Depew *et al.*, 2005). Die von ihnen kodierten Transkriptionsfaktoren sind an der Spezifikation der Skelettmorphogenese und an den frühen Stadien der Kopfmorphogenese und der Dentition bei Wirbeltieren beteiligt (Qiu *et al.*, 1997; Samee *et al.*, 2007; Thomas *et al.*, 1997). *DLX1* und *DLX2* sind vor allem an der Zahn- und der kraniofazialen Knochenentwicklung beteiligt (Thomas *et al.*, 1997). *DLX5* und *DLX6* werden insbesondere in Skelettgewebe exprimiert und spielen eine essenzielle Rolle bei der Reifung der Osteoblasten (Depew *et al.*, 1999; Robledo *et al.*, 2002; Ryoo *et al.*, 1997). *DLX4* (7) wird in einem aus Mesoderm entstandenen Gewebe (hematopoietischen Zellen) exprimiert und ist dort an der Proliferation und dem Zellüberleben beteiligt (Shimamoto *et al.*, 1997).

1.5.3.2 DLX3

Der TF DLX3 (31,6 kDa) ist essenziell für die embryonale Entwicklung und wurde in der Neurealleiste sowie im ersten und zweiten Kiemenbogen und deren Abkömmlinge, den Kraniofazialknochen detektiert (Robinson and Mahon, 1994). Außerdem wurde DLX3 in Strukturen nachgewiesen, welche die epitheliale- mesenchymale Interaktion einbeziehen, wie Zahnkeim und Haarfollikel, sowie in den Extremitätenknospen in der Haut, Ohr- und olfaktorischen Plakoden (Beanan and Sargent, 2000; Hassan *et al.*, 2004; Morasso and Radoja, 2005; Morasso *et al.*, 1996).

Mittels einer Doppelmutation im *DLX3*-Gen von Mäusen wurde festgestellt, dass das Fehlen des TFs DLX3 in der Plazenta im Embryonalstadium E. 9.5 - 10 letal ist und infolgedessen DLX3 für eine normale Morphogenese der Plazenta essenziell ist (Morasso *et al.*, 1999). Darüber hinaus reguliert DLX3 die Differenzierung der plazentaren Throphoblasten (Chui *et al.*, 2013).

Mutationen in *DLX3* (genomischer Lokus: 17q21.3-q22) korrelieren mit den autosomal-dominanten Störungen trichodontoosseous(TDO) Syndrom und *Amelogenesis imperfecta* (hereditäre Schmelzentwicklungsstörung) (Choi *et al.*, 2008). Die hauptklinischen Manifestationen bei TDO sind anormale Haare, Taurodontismus, erhöhte Knochendicke und -dichte (siehe Abbildung 5A), aber geringere Dicke des Dentins (siehe Abbildung 5B) (Choi *et al.*, 2010; Kula *et al.*, 1996; Lichtenstein *et al.*, 1972). In der Basallamina lösten Expressionsfehler des *DLX3*-Gens einen anormalen Hautphänotyp aus, der durch eine verminderte Zellproliferation und eine verfrühte Differenzierung der Basalzellen gekennzeichnet war. Dies deutet auf eine regulatorische Rolle des DLX3 bei der epidermalen Differenzierung hin (Morasso *et al.*, 1996). Darüber hinaus wurde anhand einer gezielten *DLX3*-Ablation in der Epidermis ein sehr starker Haarausfall ermittelt. Die Alopezie wurde durch Missbildungen des Haarschafts und der inneren Schicht der Haarwurzel ausgelöst. Diese Missbildungen wiederum wurden von einer anormalen Differenzierung des Cortex verursacht (Hwang *et al.*, 2008).

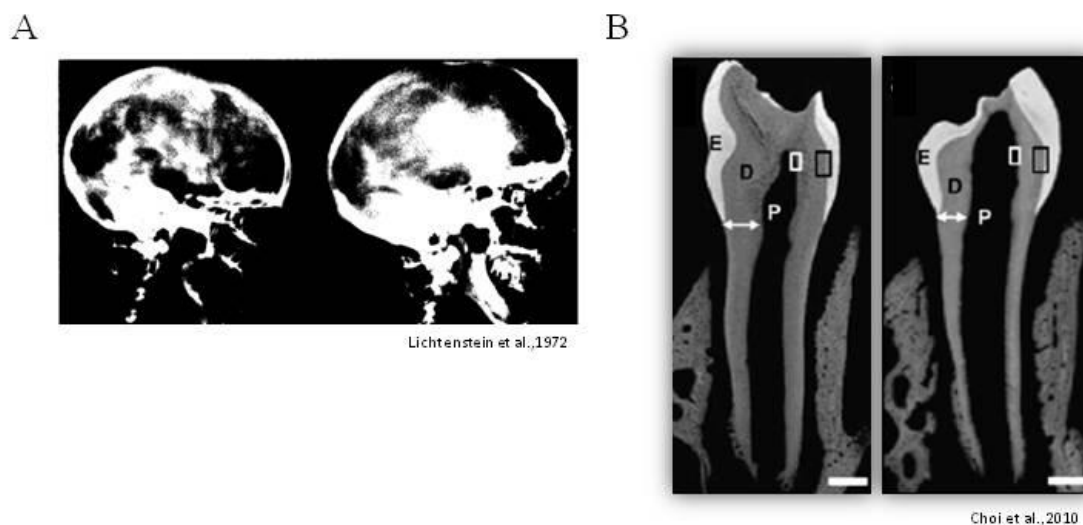


Abbildung 5: Manifestationen beim DLX3- trichodentoosseo(TDO) Syndrom.

(A) Die Röntgenbilder des Schädels zeigen eine erhöhte Knochendichte mit Verdickung des Kraniums, aber ein sklerotisches Mastoid mit wenigen Luftzellen. Ein 15-jähriger hat einen etwas verkürzten Unterkieferast (Ramus mandibulae) und der Kieferkamm ist fast gerade (Rechts). Ein 21-jähriger Mann hat den Unterkieferwinkel deutlich schief und der Ramus mild verkürzt (links) (Aus Lichtenstein *et al.*, 1972).

(B) Frontalschnitt der unteren ersten Molaren mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM). Wildtyp Maus (rechts), transgene Maus, welche eine durch 2.3 Col1A1 Mauspromotor erzeugte DLX3-Mutation enthält (links). Die Dicke des Dentins ist sowohl in der Krone als auch in der Wurzel des ersten unteren Molars in der 6 Wochen alten transgenen Maus reduziert (Links). Vergrößerung = 200 μm . (modifiziert aus Choi *et al.*, 2010).

Darüber hinaus wird DLX3 in mineralisierenden Geweben bzw. Zellen wie Odontoblasten, Ameloblasten, Osteoblasten und Chondroblasten exprimiert. Das selektive Expressionsmuster von DLX3 ändert sich aber in einzelnen Gewebereichen und über die Zeit hinweg; dies deutet auf unterschiedliche Funktionen hin (Ghoul-Mazgar *et al.*, 2005; Hassan *et al.*, 2006).

Duverger *et al.* (2013a) erzeugten einen nicht letalen Phänotyp der DLX3-Doppelmutante (*Dlx3*^{-/-}) im kraniofazialen Knochen, indem sie DLX3 nach Rekombination einer transgenen *Wnt1-Cre*- mit einer Floxed-*Dlx3*-Maus in der Neuralleiste deletierten. Hierbei zeigte der *Dlx3*^{-/-} Kraniofazialphänotyp morphologische Veränderungen in der Kalotte. Allerdings konnten in diesem Mausphänotyp keine großen Musterdefekte bei der Geburt nachgewiesen werden. Darüber hinaus zeigten die mutierten Mäuse eine verstärkte Expression osteogener Marker sowie eine erhöhte Mineralisierung des Stirnknochens und im Unterkiefer. Unterkiefer und Schädeldecke der erwachsenen Tiere hatten dagegen eine verminderte Knochendichte und die Zunahme der Knochenporosität war signifikant. Anhand einer in das *DLX3*-Gen eingefügten 4-bp-Mutation, durch einen *Col1A1*-Promotor, wurde allerdings nachgewiesen, dass dieser TF in der Femura eine wichtige Funktion bei der Knochenresorption und Differenzierung der Osteoklasten hat (Choi *et al.*, 2008).

Auch bei der Zahnentwicklung, insbesondere bei der Matrixmineralisierung, scheint DLX3 eine wichtige Funktion zu haben (Ghoul-Mazgar *et al.*, 2005). Choi *et al.* (2010) zeigten mittels Rasterelektronenmikroskopie, dass in den unteren ersten Molaren einer DLX3-mutierten Maus die Dicke des mineralisierten Dentins (siehe Abbildung 5B) und die Anzahl der Dentintubuli im benachbarten Raum der Dentin-Schmelz-Grenze reduziert waren. Im Vergleich zur Kontrolle blieb die Orientierung der Dentintubuli irregulär und unorganisiert.

1.5.3.2.1 Regulatorische Funktionen von DLX3

Viele Arbeiten über die regulatorischen Mechanismen und die Regulation von DLX3 wurden in Keratinozyten, Haarfollikelzellen und an der Plazenta durchgeführt (Bryan and Morasso, 2000; Hwang *et al.*, 2008; Park and Morasso, 1999). Anhand von Mutationen im *DLX3* war die regulatorische Funktion von DLX3 in mineralisierendem Gewebe bzw. Zellen wie Osteoblasten, Odontoblasten und Ameloblasten untersucht worden (Choi *et al.*, 2008; Duverger *et al.*, 2008, 2013b). Ein zusätzliches Modell könnten Stammzellen wie die DFVs darstellen. Tabelle 1 gibt einen Überblick über Arbeiten, in denen die Regulation des TFs DLX3 in unterschiedlichen Organismen bzw. Geweben untersucht wurde.

DLX3 wird in dem Plazentalabyrinth exprimiert und kann die Expression des Homöoboxgens, *ESX1* sowie des Plazenta-Wachstumsfaktors (engl.: placental growth factor, PGF) direkt regulieren (Berghorn *et al.*, 2005; Han *et al.*, 2007; Morasso *et al.*, 1999). Darüber hinaus reguliert DLX3 wichtige Gene, u. a. *GATA2* und *PPAR γ* , für die Differenzierung von Trophoblasten (Chui *et al.*, 2013). In epidermalen Geweben ist DLX3 zuständig für den Abbau des TP63 Produktes $\Delta np63\alpha$, welches mit Hautdefekten assoziiert wird (Di Costanzo *et al.*, 2011). In den Haarfollikel-Zellen induziert DLX3 die Expression der Keratin-Gene u. a. *Krt 25* und die Regulation von TF wie HOXC13 und GATA13, die sich an der Differenzierung der Haarfollikel beteiligen (Hwang *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2012a).

In Osteoblasten spielt DLX3 zusammen mit DLX5 eine Hauptrolle in der transkriptionellen Aktivität des OC-Promotors sowie in der Induktion der BMP2-vermittelten Expression des TFs RUNX2 (Hassan *et al.*, 2004). Hassan *et al.* (2009) zeigten mittels Chromatin-Immunpräzipitation, dass die Expression von osteogenen Markern während der verschiedenen Phasen der osteogenen Differenzierung durch ein Netzwerk von molekularen Schaltern reguliert wird. Die Schalter bestehen aus den Homöodomänen-Proteinen HOXA10, MSX2, DLX3 und DLX5 in Assoziation mit dem knochenspezifischen OC-Gen. Die Transkription der TF OC und RUNX2 wird durch MSX2 in proliferierenden Osteoblasten inhibiert, während DLX3, DLX5 und RUNX2 nach Proliferation rekrutiert werden, um die Transkription von OC und RUNX2 zu induzieren. In reifen Osteoblasten wird die Bindung von DLX5 am OC- und RUNX2-Promotor durch Interaktion mit DLX3 gefördert (Hassan *et al.*, 2009). Gleichzeitig bindet die RNA-Polymerase II am OC- und RUNX2-Promotor.

Tabelle 1: Regulatorische Mechanismen von DLX3 in verschiedenen Geweben bzw. Zelltypen.

Gewebe bzw. Zellen	Reguliert	Publikationen
Haarfollikeln	<i>Gata3</i> , <i>Hoxc13</i> ; Keratin Gene wie <i>Krt 25</i> , <i>27</i> , <i>28</i> und <i>71</i>	Hwang <i>et al.</i> , 2008; Kim <i>et al.</i> , 2012
Epidermis	Abbau des TP63- Produktes, $\Delta np63\alpha$	Di Constanzo <i>et al.</i> , 2009
Keratinocyten	Bindet an MSX1 durch einem nuklearen Lokalisationssignal (NLS)	Park & Morasso, 1999; Bryan & Morasso, 2000
Plazentalabyrinth; Plazenta Trophoblasten; Zellen der Trophoblasten; villosus Zyto-Trophoblasten	<i>ESX1</i> und <i>PGF</i> ; <i>GATA2</i> <i>PPARγ</i> und <i>MMP9</i> ; <i>syncytin</i> , <i>3βHSD</i> und <i>βhCG</i>	Morasso <i>et al.</i> , 1999; Berghorn <i>et al.</i> , 2005; Han <i>et al.</i> , 2007; Chui <i>et al.</i> , 2013
Osteoblasten; Osteoblastäre MC3T3-E1 Zellen	OC; RUNX2	Hassan <i>et al.</i> , 2004; Hassan <i>et al.</i> , 2006; Choi <i>et al.</i> , 2012; Yang <i>et al.</i> , 2014
Frontal Knochen und Mandibel	Sost, Mepe, Bglap, Alp, Ibsp, Agt; Lect1 und Calca	Duverger <i>et al.</i> , 2013
Femur	IFN-gamma	Choi <i>et al.</i> , 2008
DPSCs; Odontoblasten	DMP1, ALP, Nes und direkte Regulation des Dentinsialophosphoproteins (DSPP); Runx2, Wnt 10A, und TBC1D19; Inhibition des Caspase-3 Proteins	Li <i>et al.</i> , 2012; Duverger <i>et al.</i> , 2012; Choi <i>et al.</i> , 2010

DLX3 kann die Transkription von Genen sowohl positiv als auch negativ regulieren. Beispielsweise stimuliert die DLX3-Protein-DNA-Wechselwirkung die Aktivität des OC-Promotors in Osteoblasten, während die DLX3-RUNX2 Protein-Protein-Wechselwirkung die RUNX2-vermittelte Transkription verringert (Hassan *et al.*, 2004).

Studien mit einer osteoblastären Zelllinie der RUNX2-Nullmutanten zeigten, dass DLX3 und DLX5 unabhängig von RUNX2 die Expression wichtiger Faktoren der Osteogenese, wie z. B. ALP, induzieren können. Die Zugabe exogener RUNX2 verursachte allerdings eine leichte Inhibition der ALP-Expression (Hassan *et al.*, 2006). Diese Ergebnisse stützen die Annahme, dass DLX3 sowie DLX5 eine von RUNX2-unabhängige regulatorische Funktion haben.

1.5.3.2.2 Regulation von DLX3

Das Expressionsmuster von DLX3 wird durch verschiedene regulatorischen Mechanismen moduliert.

DLX3 wird prinzipiell durch den BMP/SMAD-Signalweg reguliert. In Epithelien bzw. Haarfollikelzellen aktiviert BMP2 die Phosphorylierung des SMAD1/5/8 Proteins, was letztlich die Bindung von SMAD1/SMAD4 an den DLX3-Promotor stimuliert (Hwang *et al.*, 2008; Park and Morasso, 2002). In

Osteoblasten kann BMP2 die Expression von DLX3 über den P38/SMAD5-Signalweg induzieren (Yang *et al.*, 2014).

Darüber hinaus kann DLX3 auch über den WNT-Signalweg reguliert werden (Hwang *et al.*, 2008). In Keratinozyten wird es über PKC am Serinrest 138 phosphoryliert und dadurch seine regulatorische Aktivität erhöht (Park *et al.*, 2001).

Frühere Studien zeigten, dass DLX3 durch das SUMO1-Protein (von engl. small ubiquitin-like modifiers) ebenfalls reguliert wird (Duverger *et al.*, 2011). Dieses induziert die SUMOylierung von DLX3, wodurch sich dessen Aktivität erhöht. Vermutlich spielt die SUMOylierung von DLX3 eine essenzielle Rolle bei der Regulation der Zahn-, Haar-, sowie Knochenentwicklung (Duverger *et al.*, 2011).

1.5.3.2.3 DLX3 in DFVs

Morszeck (2006) zeigte, dass DLX3 während der mit Insulin bzw. Dexamethason induzierten osteogenen Differenzierung von DFVs verstärkt exprimiert wird, während andere osteogene Marker wie z. B. Osterix und RUNX2 kaum reguliert wurden.

Interessanterweise wurden für die osteogene Differenzierung in DFVs auch Hinweise auf zwei voneinander unabhängige Wege gefunden: ein RUNX2-abhängiger, durch BMP2 induzierter Weg, und ein RUNX2-unabhängiger, durch Dexamethason induzierter Weg (Felthaus *et al.*, 2014a; Felthaus *et al.*, 2014b; Morszeck *et al.*, 2009b; Saugspier *et al.*, 2010).

Darüber hinaus wurde in den Vorarbeiten für diese Promotion nach Überexpression von DLX3 das Transkriptom von DFVs untersucht. Hier waren u. a. *IL8*, *EGR1*, *JUN*, *Hes1*, *BMP2* und *ALP* signifikant hochreguliert, während *Col3A1*, *VCAM1*, *Integrin alpha 8* und *Integrin beta 8* nach DLX3-Transfektion signifikant herunterreguliert wurden. Eine bioinformatische Analyse der Microarraydaten deutete auf einen Einfluss von DLX3 auf die osteogene Differenzierung, die Proliferation/Zellvitalität und auf das Remodeling der extrazellulären Matrix in DFVs hin (Viale-Bouroncle *et al.*, 2012).

2 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Im Rahmen dieser Dissertation wurde die Regulation der Osteogenese während der Differenzierung von DFVs auf transkriptioneller Ebene untersucht. Die Entscheidung darüber, welche Aspekte im Detail untersucht wurden, basierte auch auf Ergebnissen von Experimenten zur Überexpression des Transkriptionsfaktors DLX3 in DFVs, die bereits vor dem offiziellen Beginn der Promotion durchgeführt worden waren (Viale-Bouroncle *et al.*, 2012). Diese Ergebnisse deuteten auf eine entscheidende Rolle von DLX3 für die osteogene Differenzierung von DFVs hin sowie auf seine Bedeutung für die Zellvitalität und das Remodeling der extrazellulären Matrix (EZM). Im Einzelnen wurden folgende Aspekte untersucht:

1. Einfluss der differentiellen Expression von DLX3 in DFVs; Auswirkungen auf die Vitalität/Apoptose und die Zellmorphologie (verwendete Methoden: Transfektion mit Expressionsplasmid und siRNA; Durchflusszytometrie und Fluoreszenzfärbung des Zytoskeletts und Zellkerns).
2. Wirkung von DLX3 auf die osteogene Differenzierung und Aktivierung des BMP-Signalweges (verwendete Methoden: kolorimetrische Bestimmung der Aktivität der alkalischen Phosphatase, RT-qPCR und Western-Blots).
3. Regulation des DLX3 durch den BMP/SMAD-Signalweg. Dafür wurde das Transkriptom der DFVs nach DLX3-Überexpression und Induktion mit BMP2 analysiert (verwendete Methode: DNA-Microarray).
4. Weil es Hinweise auf eine Beteiligung des WNT- und NOTCH-Signalweges an der osteogenen Differenzierung in DFVs gab (Morsczeck *et al.*, 2005a; Morsczeck *et al.*, 2005b; Morsczeck *et al.*, 2009), wurde die Funktion des DLX3 auch im Hinblick auf diese Signalwege untersucht (verwendete Methoden: Luciferase-Reporterassay, Chromatin-Immunopräzipitation, RT-qPCR und Western-Blots). Zur Analyse des Einflusses des NOTCH-Signalweges auf die osteogene Differenzierung wurde zudem die intrazelluläre Domäne von NOTCH in DFVs überexprimiert (Transfektion mit Expressionsplasmid).
5. Darüber hinaus wurde die Beteiligung der EZM-Proteine Kollagen I und Laminin an der osteogenen Differenzierung der DFVs analysiert (verwendete Methoden: Blockade des EZM-Rezeptors, Integrin-alpha 2 mit einem spezifischen Antikörper und Inhibition der fokalen Adhäsionskinase, mit einem spezifischen Inhibitor).

3. Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Zellen

Nach den Richtlinien der Ethikkommission des Universitätsklinikums Regensburg wurden die DFV-Zellen aus sechs verschiedenen Patienten isoliert und angewendet.

Bezeichnung	Eigenschaften	Quelle
DFVs (# 1 - 6)	Primäre Zellen	Humaner Zahnfollikel

3.1.2 Zellkulturmedien

Bezeichnung	Zusammensetzung/ Hersteller
DMEM high Glucose (Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium)	Sigma
Isolierungsmedium	DMEM high Glucose (4,5 g/l) 20 % FBS 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin 1 % Amphotericin 50 µg/ml Gentamycin
DMEM	DMEM high Glucose (4,5 g/l) 1 % FBS (fetales Rinder-Serum) 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin
Grundmedium	DMEM high Glucose (4,5 g/l) 1 % FBS (fetales Rinder-Serum) 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin 100 µM 2-Phospho-L-Ascorbinsäure Trinatrium Salz 10 mM β-Glycerol-2-phosphat 20 mM HEPES
Opti-MEM	Erhalten von der Firma Gibco (Invitrogen)
Osteogenes Differenzierungsmedium mit 1 % FBS (ODM, 1 % FBS)	DMEM high Glucose (4,5 g/l) 1 % FBS (fetales Rinder-Serum) 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin 100 µM 2-Phospho-L-Ascorbinsäure Trinatrium Salz 10 mM β-Glycerol-2-phosphat 20 mM HEPES 1 x 10 ⁻⁷ Mol/l
Osteogenes Differenzierungsmedium mit 10 % FBS (ODM, 10 % FBS)	DMEM high Glucose (4,5 g/l) 10 % FBS (fetales Rinder-Serum) 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin 100 µM 2-Phospho-L-Ascorbinsäure Trinatrium Salz 10 mM β-Glycerol-2-phosphat 20 mM HEPES 1 x 10 ⁻⁷ Mol/l

Bezeichnung	Zusammensetzung/ Hersteller
BMP2	DMEM high Glucose (4,5 g/l) 1 % FBS (fetales Rinder-Serum) 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin 100 µM 2-Phospho-L-Ascorbinsäure Trinatrium Salz 10 mM β-Glycerol-2-phosphat 20 mM HEPES 10 / 50 ng/ml BMP2
Adipogenes Differenzierungsmedium (ADM)	STEMPRO Adipogenesis Differentiation- Kit, erhalten von der Firma Gibco (Invitrogen)
Kryo-Konservierungsmedium	DMEM high Glucose (4,5 g/l) 30 % FBS (fetales Rinder-Serum) 10 % DMSO-Lösung

3.1.3 Allgemeine Materialien

Allgemeine Materialien	Hersteller
Agarose	Biozym
Amersham Hyperfilm™ ECL (18 x 24 cm)	GE Healthcare
Protran B85 Nitocellosemembran 0,2 µm; 300 mm x 3 m	Whatman
QIAshredder	Qiagen
SDS-polyacrylamide electrophoresis in NuPAGE® Novex® 4 - 12 % Bis-Tris Gelen	Invitrogen
T-25 Zellkulturflasche (25 cm²)	Nunc
96-Well-Zellkulturplatten, weiß, lichtundurchlässig	BD, Falcon
96-Well-,48-Well- und 6-Well-Zellkulturplatten	Costar-Corning
Whatman-Papier	Bio-Rad
10-cm Zellkulturschale	Costar-Corning
15 ml und 50 ml Zentrifugenröhrchen	Falcon
Zellscharber	Falcon
70 µm Zellstrainer	Corning

3.1.4 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Alizarin Red S	Sigma-Aldrich
Alkaline Buffer Solution 1,5 M	Sigma-Aldrich
Amersham™ ECL Plus Western Blotting Detection System	GE Healthcare
Ammoniak	Roth

Chemikalien	Hersteller
Amphotericin B	Roth
Aceton	Roth
Dexamethason	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Essigsäure	Sigma-Aldrich
Ethidiumbromid	AppliChem
37 % Formaldehyd	Roth
FUGEN®HD	Promega
β-Glycerol- 2 -phosphat	Sigma-Aldrich
GoTaq® Green Master Mix	Promega
Hoechst 33258	AppliChem
1 kb Plus/100 bp Plus Ladders	Promega
Lithium-Chlorid	Sigma-Aldrich
Lipofectamin 2000	Invitrogen
β-Mercaptoethanol	AppliChem
Methanol	Sigma-Aldrich
Protran B85 Nitocellosemembran 0,2 µm; 300 mm x 3 m	Whatman
Mounting-Lösung, ProLong® Gold Antifade Reagent	Life Thecnologies
NaF	Sigma-Aldrich
NaOH (1 M)	Sigma-Aldrich
NaCl	Sigma-Aldrich
Na ₃ VO ₄	Sigma-Aldrich
NP- 40	Sigma-Aldrich
Phosphatase inhibitor cocktail 3	Sigma-Aldrich
Phosphatase Substrat	Sigma-Aldrich
2-Phospho-L-Ascorbinsäure Trinatrium Salz (AscPO ₄)	Sigma-Aldrich
2-Propanol	Merck
Protease Inhibitor Cocktail tablet	Roche
Oil-Red-O	Sigma-Aldrich
Protein-Größenstandard, SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard	Invitrogen
TritonX-100	Sigma-Aldrich
Tween ® 20 viscous liquid	Sigma-Aldrich
Sonden	Roche
WST-1	Roche

3.1.5 Puffer und Lösungen

Alle hier nicht aufgeführten Puffer und Lösungen sind unter der Methode, bei der sie eingesetzt wurden, beschrieben.

Puffer/Lösung	Hersteller	Zusammensetzung/Verdünnung
Bindingpuffer		100 mM HEPES (pH7,4) 1,5 M NaCl 50 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 18 mM CaCl ₂
4X Bolt™ LDS Sample Buffer (Ladepuffer)	Invitrogen	lithium dodecyl sulfate (LDS) DTT
HEPES-Puffer (1M), pH 7	Sigma-Aldrich	
20X Bolt® MES SDS Running Buffer (Laufpuffer)	Invitrogen	
Lysispuffer, Stocklösung		0,02 M Tris 0,137 M NaCl 0,048 M NaF 1 % NP- 40 10 % Glycerol in dH ₂ O
1X PBS-Puffer	Sigma-Aldrich	
PKA-Extraktionspuffer		25 mM Tris-HCl (pH 7,4) 0,5 mM EDTA 0,5 mM EGTA 10 mM β-mercaptoethanol 1 µg/ml leupeptin 1 µg/ml aprotinin
0,2%igen Ponceau S-Lösung		0,1 g Ponceau- Pulver in 47,5 ml dH ₂ O 2,5 ml Essigsäure (100 % > Eisessig)
1X TBE-Puffer	Sigma-Aldrich	0,1 mg in 10 ml dH ₂ O 9,1 mM Borsäure 9,1 mM Tris 4 mM EDTA (pH = 8) in dH ₂ O
TBS-Puffer		150 mM NaCl 10 mM Tris/ HCl, pH 8
TBST-Puffer		150 mM NaCl 10 mM Tris/ HCL pH 8 0,05 % Tween

Puffer/Lösung	Hersteller	Zusammensetzung/Verdünnung
10X Toubin-Puffer		250 mM Tris > 15,2 g 1,9 M Glycin > 72,2 g auf 500 ml mit dH ₂ O auffüllen pH 8,5
Transferpuffer		10 ml 10X Toubin Puffer, 10 ml Methanol, 80 ml dH ₂ O

3.1.6 Enzyme, rekombinante Proteine und kleine Moleküle

Enzym/Protein/Molekül	Hersteller
BMP2, rekombinant aus Human	Biomol
BMP6	Biomol
Albumin bovine (BSA) Fraction V	Biomol
Collagen I, aus Ratten- Schwanz (Flüssig)	Sigma-Aldrich
Camphotecin	MBL
DNase 1	Roche
DKK1, Rekombinant aus Human	R&D
Hyaluronidase	Sigma-Aldrich
Kollagenase	Sigma-Aldrich
Laminin, aus der Maus	BD
PD98059, (inhibiert MEK1)	Calbiochem
PKA Inhibitor 6 - 22 Amide	Calbiochem
PF573228 Inhibitor (inhibiert die Phosphorylierung von FAK)	Tocris
Trypsin/EDTA (10X)	Sigma-Aldrich
Rhodamine Phalloidin	Cytoskeleton
WNT3A, Rekombinant aus Human	R&D

3.1.7 Plasmide und siRNAs

Plasmid/ siRNA	Hersteller/Herkunft	Beschreibung
pCMV-V5-DLX3 (pDLX3)	Freundlicherweise wurde von Dr. Maria I. Morasso (National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland) zur Verfügung gestellt (Duverger <i>et al.</i> , 2008).	Enthält einen CMV Promotor, der für die konstitutive Genexpression verantwortlich ist.
pTAN1-cDNA	Freundlicherweise von Dr. Herbert Chen, Wisconsin Universität, zur Verfügung gestellt (Kunnimalaiyaan <i>et al.</i> , 2006).	Enthält die intrazelluläre Domäne von <i>NOTCH1</i> (NICD- Fragment).

Plasmid/ siRNA	Hersteller/Herkunft	
pCDNA3.1 (+) (pEV)	Invitrogen	
pCMV-AC-GFP	Invitrogen	
siRNA DLX3.5	Qiagen	
siRNA DLX3.7	Qiagen	
siRNA APCDD1.1	Qiagen	
siRNA APCDD1.4	Qiagen	
siRNA CTNBB1.5	Qiagen	

3.1.8 Oligonukleotide

In Tabelle 2 sind die angewendeten Oligonukleotide und ihre entsprechenden Sondennummern (Universal Probe Library, Roche) aufgeführt, welche für die ChIP-Analyse (Tabelle 2A) sowie für die quantitative real time PCR-Analyse (RT-qPCR) (Tabelle 2B) eingesetzt wurden.

Alle Primer wurden mit den Programmen Primer Blast (NCBI) und Universal Probe Library (Roche) generiert. Die Primer wurden von der Firma MWG, Operon erhalten, auf eine Konzentration von 100 µM eingestellt und bei -20 °C gelagert.

Tabelle 2: Verwendete Oligonukleotid-Primer für RT-qPCR-, PCR- und ChIP-Analyse.

A) Primer für ChIP-Analyse.

Bindestelle für	Foreward 5' → 3'	Reverse 5' → 3'	Promotor
LEF1	ACTTATCTGGGCTGGAGCTA	TGCCTTCCAGGCAAACACGCT	DLX3
DLX3	TTGAAAAGAAGAAAACCATTTGC	AGCTTGTTGGGATTCCAAAC	RUNX2
DLX3	TACTCTCAGCATCCCTGGCT	TCAACCACTACAACATGCC	ZBTB16

B) Primer für RT-qPCR.

Gen	Foreward 5' → 3'	Reverse 5' → 3'	„Accession“- Nummer	Sonden- Nummer
<i>alkalische Phosphatase (ALP)</i>	CAACCCTGGGGAGGAGAC	GCATTGGTGTGTACGTCCTG	NM_0004 78.3	19
<i>adenomatous polyposis coli down-regulated 1 (APCDD1)</i>	GGAGGGCCACTACTACCAC	GTTGAACAGCAGATAGCGCC	NM_1530 00.4	SYBR Green
<i>BCL2-related protein A1 (BCL2A1)</i>	GCTCTCCACCAGGCAGAAGA	AGGTTCAAACCTTCTTTACAAAG CCA	NM_0040 49.3	SYBR Green
<i>bone morphogenetic protein 2 (BMP2)</i>	CGGACTGCGGTCTCCTAA	GGAAGCAGCAACGCTAGAAG	NM_0012 00.2	SYBR Green
<i>bone morphogenetic protein receptor, type IB (BMPRII)</i>	ATCAGGCCTCCCTCTGCT	CACTTTCACAGCTACCTTTTCG	NM_0012 56794.1	SYBR Green
<i>bone sialoprotein (BSP)</i>	ACTGCCAGAGGCTCACTCC	TCATTTTGGTGATTGCTTCTT	NM_0049 67.2	SYBR Green
<i>cadherin-associated protein CTNNB1 (β-Catenin)</i>	GCTTTCAGTTGAGCTGACCAA	CAAGTCCAAGATCAGCAGTCTC	XM_0052 64888.1	SYBR Green
<i>Collagen 1 (COL1A1)</i>	TGCTGGCAAAGAAGGCGGCA	ACC AGG AGC CCC CTC ACG TC	XM_0052 57059.1	SYBR Green
<i>Collagen 3 (COL3A1)</i>	CCGTGGTCCACAAGGATTAC	GCCTGGTTCTCCAGGTTTT	NM_0000 90.3	SYBR Green
<i>cementoblastoma-derived protein (CP23)</i>	CTAGCCCTGTGGACCAACC	CCAGTCCAGAGCTGGTGAG	AY584596	53
<i>death-associated protein kinase 1 (DAPK1)</i>	AGAGACGCCCTCCTGAC	GGCAATGTGTCCGTCCTT	NM_0049 38	53
<i>dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1 (DKK1)</i>	GCCTGCAGGAAGCGCCGAAA	CCGGCAAGACAGACCTTCTCCA T	NM_0122 42.2	SYBR Green
<i>distal-less homeobox 3 (DLX3)</i>	GAGCCTCCTACCGCAATAC	TCCTCCTTACCGACTG	NM_0052 20.2	SYBR Green
<i>early growth response 1 (EGR1)</i>	AGCCCTACGAGCACCTGAC	GGTTTGGCTGGGGTAACTG	NM_0019 64.2	SYBR Green
<i>frizzled-related protein (FRZB)</i>	CGGGACACTGTCAACCTCTAT	GCTATAGAGCCTTCCACCAAGA	NM_0014 63.3	34
<i>frizzled class receptor 8 (FRZ8)</i>	TGGGGTTACCTGTTGGAAGTG ACC	CGCGCTCGTCCTGGCTGAAAA	NM_0318 66.2	SYBR Green
<i>glyceraldehyd-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH)</i>	AGCCACATCGCTCAGACAC	GCCCAATACGACCAAATCC	NM_0020 46	SYBR Green
<i>hairy and enhancer of split 1, (Drosophila) (HES1)</i>	AGTGAAGCACCTCCGGAAC	CGTTCATGCACTCGCTGA	NM_0055 24.3	SYBR Green
<i>integrin alpha-2 (ITGA2)</i>	GCAGGACAGAAATCACAGTT A	GCAACAAAAGTGAGTGCTTTCTC	NM_0022 03	5
<i>laminin alpha-1 (LAMA1)</i>	TGGGTTTCATACGGCACAA	CCTGAACCCAGGTCAGTCAT	NM_0055 59.3	53

Gen	Foreward 5' → 3'	Reverse 5' → 3'	„Accession“- Nummer	Sonden -Nummer
<i>laminin alpha-2 (LAMA2)</i>	GAAGAGGAAGAAGATACAGA ACGTG	GGCTGTGCTGATGCTCAAG	NM_0004 26.3	78
<i>laminin alpha-5 (LAMA5)</i>	GAGGCCCAGGAGCTCAAC	GACAGCTCCTGCTTCCTTTG	NM_0055 60.3	69
<i>lipoprotein lipase (LPL)</i>	ATGTGGCCCGGTTTATCA	CTGTATCCCAAGAGATGGACATT	NM_0002 37.1	SYBR Green
<i>low density lipoprotein receptor-related protein 6 (LRP6)</i>	GGCACTTACTTCCCTGCAAT	CAAATTCATAGTGAATGTGAT CG	XM_0067 19078.1	SYBR Green
<i>v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog (MYC)</i>	TTTTTCGGGTAGTGAAAACC	TTCTGTTGGTGAAGCTAACG	NM_0024 67.4	SYBR Green
<i>Intrazelluläre Domäne von Notch1 (NICD1)</i>	GCCCGTGGTTCTGCCTGACC	CCCAGTGCAGGGCGGACTTG	NM_0176 17.3	SYBR Green
<i>Notch 1 (NOTCH1)</i>	CGCACAAAGGTGTCTCCAG	AGGATCAGTGGCGTCGTG	NM_0176 17.3	SYBR Green
<i>osteocalcin (OC)</i>	TGAGAGCCCTCACACTCCTC	ACCTTTGCTGGACTCTGCAC	NM_1991 73.4	81
<i>osteopontin (OPN)</i>	GAATCTCCTAGCCCCACAGAA TGC	TTCGGTTGCTGGCAGGTCCG	NM_0010 40058.1	SYBR Green
<i>PPARγ2</i>	GACCTGAAACTCAAGAGTAC CAAA	TGAGGCTTATTGTAGAGCTGAG TC	D83233.1	SYBR Green
<i>runt-related transcription factor 2 (RUNX2)</i>	CACCATGTCAGAAAACTTCT T	TCACGTCGCTCATTTTGC	<u>NM_0010</u> <u>50513</u>	29
<i>vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM1)</i>	TGGAGGCTGGGAAGCCGATC AC	GGGGTCCAGGGGAGATCTCAAC AG	NM_0010 78.3	SYBR Green
<i>signal transducer and activator of transcription 5A (STAT5)</i>	GCGCAGAACTGTTCACAA C	TGCCAGAAGGTGTAGTTCCA	NM_0031 52	83
<i>vascular endothelial growth factor A (VEGFA)</i>	GCAGCTTGAGTTAAACGAAC G	GGTCCCGAAACCCTGAG	NM_0010 25366	69
<i>zinc finger and BTB domain containing 16 (ZBTB16)</i>	CAAGAAGTTCAGCCTCAAGC A	CACTCAAAGGGCTTCTCACC	NM_0060 06.4	78

3.1.9 Kits

Kit	Hersteller
Alkalische Phosphatase Färbekit	Sigma-Aldrich
Annexin V-FITC Apoptose Detektionskit I	Becton Dickinson
Dual-Luciferase® Reporter Assay System	Promega
BCA Protein Assay	Thermo Scientific
Light Cycler Fast Start DNA Master Plus Set SYBR Green	Roche

Kit	Hersteller
Light Cycler Taq Man Master	Roche
PepTag® Assay für nicht radioaktive Detektion der cAMP-abhängigen Proteinkinasen (PKA)	Promega
Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay	Invitrogen
Pierce G-Agarose CHIP	Thermo Scientific
Protein G Agarose Immunoprecipitation	Abnova
OsteoImage™ Mineralization Assay	Lonza
QuantiTect Reverse Transcriptase	Qiagen
NE-PER Reagenzien für Proteinkernextraktion	Thermo Scientific
RNeasy Plus Mini	Qiagen

3.1.10 Antikörper

In Tabelle 3 sind alle Antikörper (AK) aufgelistet, die sowohl zum Immunnachweis von Proteinen als auch zur Immunpräzipitation eingesetzt wurden.

Tabelle 3: Angewendete Antikörper.

Antikörper	Hersteller	Methode	Verdünnung
Anti- V5- FITC Antibody	Invitrogen	Immunfluoreszenz Färbung Western Blot	1 : 500
Aktive- β - Catenin	Millipore	Western Blot	1 : 1000
APCDD1	abcam	Western Blot	1 : 1500
Bax	Cell Signaling	Western Blot	1 : 1000
Bcl- 2	Cell Signaling	Western Blot	1 : 1000
BMP2	R&D	Blockade	1 : 500
c- Notch1	Cell Signaling	Western Blot	1 : 1000
Collagen I	Abcam	Western Blot	1 : 2000
CP23	Freundlicherweise von Dr. Higinio Hazarte, Mexiko, zur Verfügung gestellt.	Western Blot	1 : 750
DLX3	Novus Biologicals Abnova	Western Blot	1 : 1000 1 : 500
FAK	Cell Signaling	Western Blot	1 : 1000
FAK, phospho (Tyr397)	Cell Signaling	Western Blot	1 : 1000
FAK, phospho (Tyr576/577)	Cell Signaling	Western Blot	1 : 1000
GSK- 3 β , phospho (Ser9) (5B3)	Cell Signaling	Western Blot	1 : 1000

Antikörper	Hersteller	Methode	Verdünnung
Immunoglobulin (IgG) (Kontrolle)	R&D	Blockade (Kontrolle)	Für Zellkultur (Siehe Tabelle 4)
Integrin-beta1	Cell Signaling	Western Blot	1 : 1000
Integrin-alpha 2	Epitomics	Western Blot	1 : 2000
Integrin-alpha 2 beta1 (ITGA2B1)	Abcam	Blockade	Für Zellkultur (Siehe Tabelle 4)
Lamin A/C	Cell Signaling	Western Blot	1 : 1000
Laminin	abcam	Western Blot	1 : 1500
MAPK, p44/42 (Erk1/2)	Cell Signaling	Western Blot	1 : 1000
MAPK, phospho p44/42	Cell Signaling	Western Blot	1 : 1000
Notch1	Cell Signaling	Western Blot	1 : 1000
OPN bzw. SPP1	Novus Biologicals	Western Blot	1 : 1000
Phospho-(Ser/Thr) PKA Substrate	Cell Signaling	Western Blot, IP	1 : 1000
Runx2	Santa Cruz	Western Blot	1 : 750
SMAD1/5, phospho	Cell Signaling	Western Blot	1 : 1000
SMAD4	Thermo Scientific	IP	1 : 200
LEF1	Thermo Scientific	ChIP,IP	1 : 200
β- Actin	Novus Biologicals	Western Blot	1 : 10000
β- Catenin	Cell Signaling	IP,Western Blot	1 : 1000
β- Catenin, phospho (Ser 675) (D2F1)	Cell Signaling	IP, Western Blot, Immunfluoreszenz Färbung	1 : 100- 1 : 1000

3.1.11 Geräte und Software

Gerät/Software	Hersteller
Bild Analyseprogramm, AxioVision	Zeiss
Brutschrank, CO ₂ - Inkubator HERA cell® 150	Thermoscientific
Fluoreszenz Mikroskop, AxioScope	Zeiss
FACS Canto-Durchflusszytometer	Becton Dickinson Biosciences
Gelelektrophorese Kammer	BioRAD
ImageJ Software	Freies Java Bild Bearbeitungsprogramm
Kleinschüttler KM-2	Edmund Bühler GmbH
LightCycler	Roche
MatInspector/MatBase Programm	Genomatix
Mikroskop Eclipse TS 100	Nikon
Nanodrop ND 1000 Spektrophotometers	Thermo Scientific
Novex Bolt Mini Gel Tank	Invitrogen

Gerät/Software	Hersteller
Platten Reader	TECAN
Power Supply, Power PAC 3000	BioRAD
Schüttelgerät Typ Reax top	Heidolph
Sicherheitswerkbank Herasafe HS 12 Kpl.	Heraeus
Stickstofflager-Behälter	Air LIQUIDE Medical
Thermocycler	BioRAD
Tisch PH-Meter	METTLER TOLEDO
Thermomixer Compact	Eppendorf
Zellzähler, TC20 TM	BioRAD
Zentrifuge Labofuge 400 gekühlt	ENDRO, FunctionLine, Heraeus
Zentrifuge 5417R	Eppendorf
Wasserbad, Schüttler, 1092	GFL

3.2 Methoden

3.2.1 Kultivierung von dentalen Follikelzellen

Dentale Follikel-Vorläuferzellen wurden aus impaktierten Weisheitszähnen mit Einwilligung des Patienten isoliert. Zum Ablösen der DFVs wurden je 100 µl Kollagenase (1 mg/ml) und Hyaluronidase (2 mg/ml) sowie 15 µl DNase (0,3 mg/ml) zugegeben und der Ansatz bei 37 °C für 30 min bei 100 rpm im Thermomixer geschüttelt.

Die Verdauungsreaktion wurde durch Zugabe vom 1 ml Isolierungsmedium beendet. Zum Abtrennen der Zellen wurde die Zellsuspension auf einem 70 µm Zellstrainer, welcher auf einem 50 ml Zentrifugenröhrchen lag, gegeben und mehrmals mit 1 ml Isolierungsmedium gespült. Anschließend wurde die Zellsuspension 6 min, 1000 rpm und bei Raumtemperatur (RT) abzentrifugiert, um die Zellen zu pelletieren. Das Pellet wurde in 10 ml Isolierungsmedium mit den entsprechenden Antibiotika aufgenommen und in eine T-25-Zellkulturflasche überführt. Es wurden 6×10^3 Zellen pro 1 cm² Oberfläche ausgesät und im Standard Zellkulturmedium (DMEM) bei 37 °C, 5 % CO₂ und bei annähernd 100 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Das Medium wurde jeden 3. Tag gewechselt. Als die adhärennten Zellen etwa 80 % Subkonfluenz zeigten, wurden sie mit 1X Trypsin/EDTA-Lösung passagiert. Die Zellen wurden in der Regel in Passage 5 oder 6 für einen Versuch verwendet. Die übrigen Zellen wurden in der Gasphase flüssigen Stickstoffs (-195 °C) gelagert. Dafür mussten die Zellsuspension zunächst abzentrifugiert (6 min, 1000 rpm, RT) werden und die DFV-Zellen wurden in das DMSO enthaltenden Kryokonservierungsmedium überführt.

3.2.1.1 Induktion der osteogenen Differenzierung

Die Versuche zur osteogenen Differenzierung wurden in 48-Well- und 6-Well-Zellkulturplatten und in 10-cm Zellkulturschalen mit Zellen der Passage 5 bis 6 durchgeführt. 6×10^3 Zellen wurden pro 1cm^2 in DMEM ausgesät und bis zur Subkonfluenz angezogen. Anschließend wurde die Differenzierung mit 10 ng/ml oder 50 ng/ml BMP2 oder Dexamethason enthaltenden osteogenen Differenzierungsmedien (jeweils BMP2 oder ODM) eingeleitet. Die osteogene Differenzierung von DFVs wurde ebenfalls mit BMP6 (50 ng/ml) induziert. Die Komposition der angewendeten Differenzierungsmedien ist im Kapitel 3.1.2 aufgelistet. Jeden zweiten Tag wurde das Medium gewechselt.

Die Induktion der osteogenen Differenzierung wurde mittels des Nachweises des frühen osteogenen Markers ALP (siehe 3.2.3.4.1) in DFVs am 7., 10. oder 14. Tag nach osteogener Induktion bestimmt. Darüber hinaus wurde das Ausmaß der Matrixmineralisierung in Langzeitkulturen mittels „Alizarin-Red-S“ (für Kalzium, siehe Kapitel 3.2.3.4.2) und Osteolmage™ (für die HA-Anlagerungen, siehe Kapitel 3.2.3.4.3) bestimmt. Zudem wurde die Expression osteogener Marker mittels RT-qPCR oder Western-Blot-Analyse ermittelt.

3.2.1.2 Zellkultivierung mit kleinen Molekülen oder rekombinanten Proteinen

Die BMP/SMAD-, WNT-, PKA-, FAK- und ERK- Signalwege sowie Integrin (ITGA2B1) wurden durch Zugabe verschiedener spezifischer Moleküle näher untersucht. Bei den verwendeten kleinen Molekülen handelt es sich um Camptothecin, PKA-(Amide 6-22), FAK-(PF573228) und den MEK1-Inhibitor (PD98059) und bei den rekombinanten Proteinen um Noggin, WNT3A und Dkk1. Sie wurden entweder zum DMEM oder zum Differenzierungsmedium (BMP2/ODM) zugegeben und die Zellen für 2, 6 und 24 h direkt nach Zelladhäsion bzw. für 1, 10, 14 oder 28 Tage nach osteogener Induktion kultiviert. Zudem wurde die Blockade von BMP2 und ITGA2B1 mittels spezifischen AK (siehe Tabelle 4) eingeleitet. Als negative Kontrolle des neutralisierenden Antikörpers wurde Immunglobulin G (IgG) AK verwendet. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt. Nach Optimierung wurden die folgenden Konzentrationen verwendet:

Tabelle 4: Konzentrationen verwendeter Moleküle/Proteine/Antikörper.

Moleküle/Proteine/AK	Endkonzentration
BMP2 Antikörper	1,5 µg/ml
Camptothecin	0,5 µM
Dkk1	50 ng/ml
ITGA2B1 Antikörper	1,5 µg/ml
Lithium Chlorid	5 und 15 mM
Noggin	500 ng
PD98059	30 µM

Moleküle/Proteine/AK	Endkonzentration
PF573228	10 μ M
PKA Inhibitor, Amide 6-22	2 nM
WNT3A	25 ng/ml

3.2.1.3 Modifikationen der Zellkulturoberflächen mit extrazellulären Matrixproteinen

Die Kulturoberfläche wurde entweder mit Koll I (10 μ g/cm²) oder Laminin (2 μ g/cm²) benetzt.

Kollagen I:

Die Vertiefungen einer 48-/6-Well-Zellkulturplatte bzw. der Objektträger wurde mit 50 μ L/500 μ L bzw. 600 μ L Koll I-Lösung befüllt und für 3 bis 4 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde das überschüssige Material vorsichtig abgesaugt und die Platten bzw. Objektträger über Nacht (ÜN) getrocknet. Vor der Verwendung wurden die Oberflächen kurz mit UV-Licht sterilisiert und mit 1X PBS Puffer gewaschen.

Laminin:

Das rekombinante Laminin wurde langsam auf Eis aufgetaut und anschließend eine Laminin-Stocklösung in DMEM Medium hergestellt. Die Vertiefungen einer 48-/6-Well-Plate bzw. der Objektträger wurde mit 100 μ L/1000 μ L bzw. 1200 μ L Laminin-Lösung befüllt und für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde das überschüssige Material vorsichtig abgesaugt. Vor der Anwendung wurden die Oberflächen kurz mit UV-Licht sterilisiert und dann mit DMEM gewaschen.

3.2.2 Transfektion von DFV-Zellen

Für die Einbringung von Nukleinsäuren (Plasmid DNA oder siRNA) in DFVs wurde eine chemische Methode gewählt (Yalvac *et al.*, 2009; Viale-Bouroncle *et al.*, 2012). Die angewendeten Reagenzien enthielten kationische Lipide, welche die negativ geladene DNA binden. Folglich wird die DNA von der Zelle in Form von Liposomen endozytotisch aufgenommen. Die Zellen bleiben somit transient verändert.

3.2.2.1 Transfektion von DFV-Zellen mit Plasmiden

Die Transfektion wurde nach Etablierung gemäß der Transfektion mit dem FUGEN®HD-Protokoll durchgeführt. Eine Transfektionseffizienz in DFVs von etwa 80 % konnte nach transienter Transfektion mit einem das grün fluoreszierende Protein (engl.:green fluorescent protein, GFP) enthaltende Plasmid (pCMV-AC-GFP) nachgewiesen werden.

Durchführung:

Zwei Tage vor der Transfektion wurden die DFVs in einer Zelldichte von 7×10^3 /cm² in 48-Well-, 6-Well-Zellkulturplatten und 10-cm-Zellkulturschalen oder auf einem Objektträger ausgesät. DFVs wurden

in einem antibiotikahaltigen Standard Zellkulturmedium (DMEM) kultiviert. DFV-Zellen wurden 2 Tage lang bis zur Subkonfluenz (~ 60 – 70 %) in der Zellkultur proliferieren. Der FUGEN®HD (Promega) Transfektionskomplex wurde in einem Verhältnis von 5 : 2 (5 µL FUGEN®HD + 2 µg Plasmid) vorbereitet. Dafür wurde 2 µg Plasmid (siehe Kapitel 3.1.7) in 100 µL DMEM ohne Serum und Penicillin/Streptomycin verdünnt und 5 µL FUGEN®HD hinzugefügt. Die Lösung wurde 1 bis 2 sek auf einem Vortex gemischt und 15 min bei RT inkubiert. Das Medium wurde vor der Transfektion mit frischem Standardzellkulturmedium ohne Antibiotika (DMEM + 10 % FBS ohne Antibiotika) gewechselt. Die FUGEN®HD-Mischung wurde tropfenweise in die Kulturen dazugegeben. Um alle Bestandteile zu mischen, wurden die Platten geschwenkt. Die Überexpression des Proteins wurde nach 48 – 72 h kontrolliert. Für dosisabhängige Versuche wurde der Transfektionskomplex im Verhältnis 5 : 1, 5 : 2 und 5 : 4 verdünnt; dies ergab jeweils eine niedrige, mittlere oder hohe Konzentration des DLX3-enthaltenden Plasmids (siehe Abbildung 15).

3.2.2.2 Transfektion von DFV-Zellen mit siRNA

Die Transfektion wurde nach Etablierung wie im Hiperfecta (Qiagen)-Protokoll angegeben durchgeführt.

Durchführung:

Zwei Tage vor Transfektion wurden die DFVs in einer Zelldichte von $7 \times 10^3/\text{cm}^2$ in 48-Well-, 6-Well-Zellkulturplatten und 10-cm Zellkulturschalen oder auf Objektträgern ausgesät und in 2816 µL Standardzellkulturmedium bei 37 °C inkubiert. In 100 µL DMEM (ohne FBS/ohne Antibiotika) wurde 150 ng siRNA (siehe Kapitel 3.1.7) bis zu einer Endkonzentration von 50 nM eluiert. Zu dem die siRNA enthaltendem Medium wurden 12 µL Hiperfecta dazugegeben, durch vortexen gemischt und 5 – 10 min inkubiert. Die siRNA/Hiperfecta-Mischung wurde dann tropfenweise dazugegeben und für 48 – 72 h bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Inhibition der Genexpression auf mRNA bzw. Proteine Ebene überprüft.

3.2.3 Nachweis biologischer Funktionen

3.2.3.1 Nachweis der Zellmorphologie und Adhäsion mittels Fluoreszenzfärbungen des Zytoskeletts und Zellkerns

Der qualitative Nachweis und die Quantifizierung des filamentären Aktins erfolgten fluorospektrophotometrisch. Dazu wurde Rhodamine Phalloidin, ein Gift des Knollenblätterpilzes *Amanita phalloides*, welches spezifisch an F-Aktin bindet, verwendet (Chazotte, 2010). Durch den an Rhodamine Phalloidin gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat (TRITC) wird F-Aktin markiert und bei einer Emission von 552 nm/570 nm (Farbe: rot) detektiert. Zudem wurden die DNA in den Zellkernen durch Anfärben mit Hoechst 33258 (Farbe: blau) nachgewiesen.

Durchführung:

Die Zellen wurden mit 2%iger Formaldehydlösung für 20 min auf dem Objektträger fixiert. Um die Permeabilität der Zellen zu induzieren, wurden sie anschließend für 3 min mit Triton-X100 inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit 1X PBS gewaschen und anschließend gefärbt. Der Rhodamin-Phalloidin-Farbstoff wurde als Stocklösung in Methanol gelöst und vor dem Gebrauch in 1X PBS/1 % BSA, im Verhältnis 3 : 1000 verdünnt. Zunächst wurden 250 µL pro Objektträger angesetzt und für 20 min bei RT, unter lichtarmen Bedingungen inkubiert. Die Farblösung wurde vorsichtig abpipettiert und die Zellen mindestens 2 x 5 min mit 1X PBS (ohne BSA) gewaschen.

Anschließend wurden die Zellkerne mit 250 µL Hoechst 33258 für 15 min gefärbt. Danach wurden die auf einem Objektträger fixierten und gefärbten Zellen mit einer „mounting“-Lösung beschichtet und nach 24-stündiger Inkubation bei RT unter dem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) betrachtet. Die Adhäsion der Zellen wurde nach 8 h anhand der Verteilung und Zellanzahl in vier biologischen Replikaten gemessen. Die jeweilige Oberfläche der Zellen wurde mit Hilfe des „AxioVision“ Bildanalyseprogramms ausgemessen und die Mittelwerte aus jeweils drei zufällig ausgewählten Gesichtsfeldern für die vier biologischen Replikate verrechnet.

3.2.3.2 Nachweis der Proliferation

Zur Quantifizierung der Zellproliferation wurde der kolorimetrische WST1-Test verwendet. Im Test wird die Aktivität von mitochondrialen Dehydrogenasen, das Succinat-Tetrazoliumsalz-Reduktase-System, über die Umsetzung des leicht rötlichen WST1-Reagenz zu dunkelrotem Formazan gemessen. Die Farbveränderung kann anschließend spektrometrisch bei 450 nm Wellenlänge mit einem Plattenreader quantifiziert werden.

Durchführung:

Das WST-Reagenz wurde im Proliferationsmedium (DMEM) 1 : 100 verdünnt, die Zellen 2 h bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert und anschließend bei 450 nm gemessen. Zur Normalisierung (= 100 %) wurden die ermittelten Werte durch den Mittelwert des 24-stündigen Kontrollwertes dividiert.

3.2.3.3 Nachweis der Zellvitalität/Apoptose mittels der FITC-Annexin-V-Analyse

Die FITC-Annexin-V-Methode beruht auf dem Prinzip der Markierung einer Phospholipidkomponente, dem Phosphatidylserin, welches sich üblicherweise auf der Innenseite der Zellmembran einer lebenden Zelle befindet. Während der Apoptose wird Phosphatidylserin auf die Außenseite der Membran transloziert. Dort kann es sich an das Annexin-V binden. Die FITC-AnnexinV-Markierung ermöglicht die Messung und Sortierung der apoptotischen Zellen mit einem Fluss-Sortierer

(FACS-Gerät). Sobald die Zellen nekrotische werden, wird die Membran allerdings durchlässig und das FITC-Annexin-V bindet auch an das noch im Zellinneren befindliche Phosphatidylserin.

Um die Populationen von FITC-Annexin-V apoptotischen und nekrotischen Zellen voneinander zu unterscheiden, wurde eine Propidiumiodid (PI)-Färbung eingesetzt. Das PI ist nur in nekrotischen Zellen vorhanden, weil es ausschließlich in Zellen mit durchlässiger Membran eindringen kann. Durch dieses zweifache Anfärben können lebende Zellen (Annexin-V-negativ und PI-negativ) von apoptotischen (Annexin-V-positiv und PI-negativ) und Zellen in der späteren Phase der Apoptose (Annexin-V-positiv und PI-positiv) sowie nekrotischen (Annexin-V-negativ und PI-positiv) unterschieden werden.

Durchführung:

Die DFVs wurden mittels Trypsin-EDTA Behandlung abgelöst und zweimal mit 1 % FBS und 0,1 % Natriumazid in PBS (Kalzium- und Magnesium frei) durch 5 min bei 1000 rpm gewaschen. Die Lösung wurde auf eine Zelldichte von $\sim 5 \times 10^5$ Zellen/ml eingestellt. Bindungspuffer (100 μ l) und Zellpellet wurden mit 1 μ l Annexin-V-FITC in einem Microfuge-Röhrchen gemischt und für 15 min in der Dunkelkammer bei RT inkubiert. Vor der Messung wurden 5 μ l PI dazugegeben und für 1 min inkubiert. Die Proben wurden mit Hilfe eines Fluss-Sortiers analysiert. Die FITC-Fluoreszenz wurde durch einen 530/30-Bandpass-Filter und die PI-Fluoreszenz bei 650 nm gemessen.

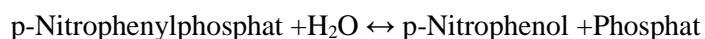
Die Etablierung, Durchführung sowie Datenerfassung der Annexin-V-PI-Messung in DFVs wurde mit Hilfe von Frau Carola Bolay (Institut für Zahnerhaltung und Parodontologie der Universitätsklinikum, Regensburg) durchgeführt.

3.2.3.4 Nachweise der osteogenen Differenzierung und Mineralisierung

3.2.3.4.1 Bestimmung der Aktivität der alkalischen Phosphatase

Der Nachweis der Aktivität der alkalischen Phosphatase (ALP) diente als früher Marker für die osteogene Differenzierung (Ashton *et al.*, 1985).

Die alkalische Phosphatase katalysiert die Hydrolyse von Phosphatesteren:



Die enzymatische Produktion von p-Nitrophenol kann mittels einer Farbveränderung (gelb) spektrometrisch bei 405 nm bestimmt werden.

Durchführung:

Die DFV-Zellen wurden mit 1X PBS gewaschen und durch Einfrieren auf -80°C aufgeschlossen. Zu jeder Probe wurde 60 μ l 1X PBS 0,05 % Triton-X100 gegeben und 10 min bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Um die ALP-Aktivität auf die Zellanzahl zu normalisieren, wurden 15 μ l des Zelllysats abgezogen und die DNA-Quantifizierung mit dem DNA Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit vorgenommen. Für die Durchführung der ALP-Reaktion wurde das restliche Zelllysats mit dem alkalischen

Puffer (1,5 M) 1 : 1 verdünnt. Anschließend wurden zu jeder Probe 150 µL p-Nitrophenyl Phosphate (100 mM) gegeben und der Reaktionsansatz bei 37 °C für 1 h inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 60 µl NaOH (0,3 M) gestoppt. Das ausgelöste p-Nitrophenol wurde bei 405 nm gemessen.

Die qualitative Färbung der ALP wurde unter Anwendung des alkalischen Phosphatase-Kits laut Protokoll des Herstellers durchgeführt.

3.2.3.4.2 Alizarin-Red S-Färbung und Quantifizierung

Die natürlich vorkommende chemische Verbindung Alizarin-Red S (1,2-Dihydroxy-anthrachinon), welche zur Farbstoffklasse der Anthrachinone gehört, wird für den histochemischen Kalziumnachweis angewendet. Alizarin-Red S bindet unter bestimmten pH-Bedingungen (~ pH 4,2) an Kalzium und bildet mit ihm ein intensiv rötliches Chelat.

Durchführung:

Bei der Alizarin-Red S-Färbung wurden die Zellen 10 min lang mit 70%igen kaltem Ethanol fixiert. Anschließend wurde dreimal mit 1X PBS-Puffer gewaschen und mit 2 % Alizarin-Red-Lösung (pH = 4,2, eingestellt mit Ammoniumhydroxyd) für 30 min angefärbt. Die Alizarin-Red-Lösung wurde abgenommen und die Zellen mehrmals sorgfältig mit dH₂O gewaschen. Die Kalziumaggregate der extrazellulären Matrix in osteogen differenzierten DFVs wurden mit dem Lichtmikroskop dokumentiert (z. B. siehe Abbildung 1C).

Um das Alizarin-Red S der gefärbten Proben spektrophotometrisch zu quantifizieren wurde das destillierte Wasser (dH₂O) komplett abgesaugt und die Alizarinkristalle mittels 50 µL 10%iger Cetylpyridinium-Chloride-Monohydrate-Lösung für 30 min bei RT aufgelöst. Die relative Bestimmung der Alizarin-Red S erfolgte auf einem Plattenreader bei einer Wellenlänge von 450 nm.

3.2.3.4.3 Hydroxylapatit-Nachweis

Um die Mineralisierung der DFVs nach Langzeitkultur im osteogenen Differenzierungsmedium nachzuweisen, wurde das entstandene Hydroxylapatit mit dem OsteoImage™ Mineralization Assay (Lonza) fluoreszenzmikroskopisch gemessen. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

Durchführung:

Für den Versuch wurden die DFVs (6×10^3 Zellen per cm²) in einer 48-Well-Zellkulturplatte ausgesät. Bei Erreichen der Konfluenz wurden die DFVs je nach Versuch für 14 Tage oder 4 oder 5 Wochen osteogen induziert. Zu diesen Zeitpunkten wurde das Medium entfernt, die Zellen mit 1X PBS gewaschen und anschließend für zehn Minuten mit eiskaltem Ethanol (70 %) fixiert. Nach der Fixierung und 2 Waschschritten mit 1X Waschpuffer wurde zu jeder Probe das Färbereagenz gegeben. Die Reaktion wurde für 30 min bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Im Anschluss wurde das Färbereagenz aufgenommen und

die Platte dreimal für jeweils 5 min mit Waschpuffer gewaschen und anschließend die Fluoreszenzemission gemessen (Anregung: 485 nm, Emission: 535 nm).

3.2.4 Genetische und Molekularbiologische Methoden

3.2.4.1 RNA Isolierung

Um die Genexpression von DFVs nach verschiedenen Behandlungen zu untersuchen, wurde zuerst die RNA von jeder der unterschiedlichen Versuchsbedingungen und von den drei biologischen Replikaten isoliert. Für die Isolierung wurde das RNeasy Plus mini Kit (Qiagen) verwendet.

Durchführung:

Die Isolation der Gesamt-RNA erfolgte aus 6-Well-Zellkulturplatten für jeweils $1 \times 10^6/\text{cm}^2$ Zellen. Die Zellen wurden zunächst mit 1X PBS-Puffer gewaschen und nach Zugabe des Lysispuffers mithilfe der Pipettenspitze von der Oberfläche gelöst. Durch den Einsatz einer QIASchredder-Säule (Qiagen) konnte die Zellsuspension homogenisiert werden. Die Isolierung erfolgte gemäß der Herstellerangaben. Die RNA wurde in 30 – 45 μL RNase-freiem ddH₂O eluiert. Die Konzentration wurde spektrophotometrisch mithilfe eines Nanodrops bestimmt. Die Lagerung der RNA erfolgte bei - 80 °C.

3.2.4.2 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Um aus der isolierten *messenger* RNA (mRNA) eine Matrize für die PCR zu bekommen, wurden mittels der reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) die mRNAs in cDNA umgeschrieben. Hierbei wird ein Oligo-(dT18) Primer, welcher an den poly(A)-Schwanz der mRNA bindet und eine RNA-abhängige DNA-Polymerase verwendet.

Durchführung:

Für die Umschreibung der mRNA in cDNA wurde das QuantiTect Reverse Transcriptase Kit (Qiagen) verwendet. Die Durchführung erfolgte wie vom Hersteller angegeben. Es wurden ~ 400 ng RNA pro Reaktion eingesetzt. Der 20 μL Reaktionsansatz mit der synthetisierten cDNA wurde 1 : 5 mit RNase-freiem ddH₂O verdünnt und entweder direkt für PCR oder RT-qPCR eingesetzt oder für spätere Anwendungen bei - 20 °C gelagert.

3.2.4.3 Amplifikation von DNA-Fragmenten mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion

Die PCR basiert auf einer zyklischen exponentiellen Verdopplung bestimmter Abschnitte eines DNA-Moleküls mittels einer thermostabilen DNA-Polymerase und spezifischen komplementären Oligonukleotiden (Primer).

Das zwischen den beiden Primern liegende DNA-Fragment wird über folgendes Zyklenschema mehrfach amplifiziert:

1. Thermische Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei ca. 96 °C.
2. Hybridisierung der Primer an die Zielsequenz bei optimaler Bindungstemperatur für die jeweiligen Primer (60 – 68 °C).
3. Verlängerung der Primer (Amplifikation) durch eine thermostabile DNA-Polymerase bei 72 °C.

Durchführung:

Die mittels ChIP gewonnenen DNA-Fragmente wurden mithilfe der PCR amplifiziert. Es wurde der GoTaq® Green Master Mix verwendet, welcher eine *Taq* DNA-Polymerase, dNTPs, MgCl₂ und den Reaktionspuffer beinhaltet. Um den Frontverlauf in der nachfolgenden gelelektrophoretischen Auftrennung zu visualisieren, enthält dieser Mix zusätzlich noch zwei Farbstoffe (blau und gelb). Ein 20 µL Reaktionsgemisch wurde wie folgt auf Eis zusammen pipettiert:

- 10 µl GoTaq® Green-Master Mix
- 7 µl RNase freiem Wasser und
- 2 µl *upstream* und *downstream* Primermix (jeweils 10 mM)

Die verwendeten Primer sind in Tabelle 2A aufgeführt.

Die Reaktionansatz wurde in ein PCR-Gefäß überführt und 1 µL template-DNA hinzugegeben. Nach kurzem abzentrifugieren des Ansatzes wurde der PCR-Lauf im Thermocycler gestartet. Die Amplifikationsbedingungen waren wie folgt:

<u>Temperatur (°C)</u>	<u>Dauer (s)</u>	
96 °C	180	
96 °C	30	} x 35 Zyklus
60 °C	45	
72 °C	60	
72 °C	600	
4 °C	Lagern über Nacht	

Die entstandenen PCR Produkte wurde mittels der Agarosegelelektrophorese aufgetrennt.

3.2.4.4 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient zur Auftrennung von DNA-Fragmenten in einem elektrischen Feld entsprechend ihres Molekulargewichts. Zur Visualisierung der DNA-Banden wird häufig Ethidiumbromid als fluoreszierender Farbstoff verwendet. Es interkaliert in die doppelsträngige DNA und kann anschließend durch Anregung mit UV-Licht sichtbar gemacht werden.

Durchführung:

Für die gelelektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente wurden ein 1 – 4%ige Agarosegele in 1X TBE-Puffer gegossen, der auch als Laufpuffer diente. Die Auftrennung erfolgte bei 80 Volt für ca. 50 min. Anschließend wurden die aufgetrennten und angefärbten DNA-Fragmente unter UV-Licht fotografiert. Mit Hilfe eines DNA-Größenstandards, der zusätzlich zu den Proben aufgetragen worden war, konnte die Länge der Produkte bestimmt werden. Eingesetzt wurde meistens 5 µL einer 1 kb oder der 100 bp Plus Ladder (Promega).

3.2.4.5 Quantitative Real Time PCR

Die *quantitative real time PCR* (RT-qPCR) ermöglicht die simultane Amplifikation und Quantifizierung der gewonnenen DNA. Erreicht wird dies entweder durch den Einsatz vom an doppelsträngige DNA bindenden Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I oder durch spezielle fluorogene Sonden.

Durchführung:

In dieser Arbeit wurde die RT-qPCR Methode verwendet, um das Expressionsniveau spezifischer mRNAs relativ zu quantifizieren. Als Thermocycler wurde der LightCycler der Firma Roche verwendet. In jede Kapillare wurden 15 µL Mastermix vorgelegt und mit 5 µL der jeweiligen cDNA aufgefüllt.

Der Mastermix wurde mit den 4x Mastermix, Light Cycler Fast Start DNA Master Plus Set SYBR Green oder Light Cycler Taq Man Master (unter Anwendung von Sonden) verwendet. Die verwendeten Oligonukleotide und zugehörigen Amplifikationsbedingungen sind in Tabelle 2B zusammengefasst. Die Messungen erfolgten in Duplikaten oder Triplikaten. Der Mastermix setzte sich wie folgt zusammen:

4 µL Mastermix

je 2 µL upstream und downstream Primermix (jeweils 10 mM)

9 µL RNasefreies Wasser

Die befüllten Kapillaren wurden abzentrifugiert und der Lauf gestartet.

Die Datenerfassung erfolgte mit der zugehörigen Software nach Vorgaben des Herstellers und die Analyse der Ergebnisse wurde mittels der relativen Quantifizierung nach der $\Delta\Delta$ Ct-Methode (Winer *et al.*, 1999) durchgeführt. Dafür wurde eine Probe der Kontrollgruppe als Kalibrator verwendet. Ihre Expression wurde auf den Wert 1 gesetzt und das Expressionsniveau aller anderen Proben damit verglichen. Zudem wurde die Genexpression eines Haushaltsgens für jede Probe nachgewiesen. Die Genexpression der Proben wurde auf die Menge der mRNA des Haushaltsgens angeglichen.

3.2.4.6 DNA-Microarray

Eine genomweite Analyse mittels der DNA-Microarray-Technologie ermöglicht aufgrund der hohen Anzahl gleichzeitig untersuchter Gene die Identifizierung von Expressionsmustern wie beispielsweise aktivierte biologische Prozesse nach bestimmter Behandlung.

Durchführung:

Um Aussagen über Genexpressionsmuster in DFVs nach DLX3-Überexpression in Kombination mit BMP2 (10 ng/ml) treffen zu können, wurde eine Microarray-Analyse durchgeführt. Dafür wurde die RNA der DFVs nach 48 h Transfektion mit dem DLX3-Plasmid pDLX3 bzw. mit einem leeren Vektor pEV und drei Tage osteogener Differenzierung mit 10 ng/ml BMP2 (vgl. dazu Kapitel 3.2.4.1) in biologische Duplikate isoliert. Diese RNA wurde an das Kompetenzzentrum Fluoreszente Bioanalytik (KFB, Regensburg) zur Analyse gesendet. Vor der Durchführung der Analyse wurde die Qualität der RNA-Proben kontrolliert. Die Proben wurden zunächst auf den Affimetrix GeneChip® Human Gene 1.0 ST Arrays hybridisiert. Jede einzelne Microarray-Konfiguration wurde unter folgender elektronischen Adresse: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE59949> veröffentlicht.

Vom KFB wurde die Datenanalyse mit dem *NetAffx Analysis Center*- und *Robusta Multi-array Analysis* (RMA)- Algorithmen durchgeführt. Dafür wurde ein Minimum des Expressionsunterschiedes von 2 und ein p-Value-Wert $< 0,05$ als signifikant betrachtet. Für die bioinformatische Analyse der Microarraydaten wurden die Datenbanken *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) und *Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships* (PANTHER) mit dem Programm *Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery* (DAVID, <http://niaid.abcc.ncifcrf.gov/>) verwendet.

3.2.5 Biochemische und analytische Methoden

3.2.5.1 Protein-Isolierung

Für die Proteinisolierung wurden 6×10^3 Zellen/cm² in 10-cm-Zellkulturschalen bzw. T-75-Zellkulturflaschen ausgesät und entsprechend den geplanten Versuchen behandelt.

3.2.5.1.1 Isolierung von Proteinen

Um die Expressionsmuster der Proteine in den mit verschiedenen Behandlungen regulierten DFVs zu charakterisieren, wurde die gesamten Proteinen der Zellen isoliert.

Durchführung:

Zunächst wurden die Zellen resuspendiert und gereinigt. Das Medium wurde abgesaugt und zweimal mit 1X PBS gewaschen. Anschließend wurde 1 ml eiskaltes 1X PBS zugegeben und ca. 5 min auf Eis gestellt. Mit dem Zellschaber wurden die restlichen Zellen sanft abgeschabt und zweimal mit 20 ml

eiskaltem PBS gewaschen. Die Zellen wurden in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen zugegeben und 3 min mit 4000 rpm bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgekippt und die Zellen mit 300 µL Lysispuffer (Lysispuffer- Stocklösung supplementiert mit Proteaseinhibitor, Roche; 2 mM Na₃VO₄ und Phosphatase-Inhibitor-Cocktail) 10 min auf Eis aufgeschlossen. Um die Proteine von dem Zelldebris zu trennen, wurde das Zellysate 13000 rpm für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Für die Langzeitlagerung wurden die Proteine bei - 80° aufbewahrt, für eine kurzfristige Lagerung bei - 20 °C.

3.2.5.1.2 Isolierung von Proteinen aus dem Zellkern

Um die Kernlokalisierung von β-Catenin zu identifizieren, wurde die Zellkernfraktion von der zytoplasmatischen Fraktion unter Verwendung des Kits *NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents* (Thermo Scientific) und des Herstellerprotokolls getrennt.

Durchführung:

Zuerst wurde das Medium abgesaugt und zwei Mal mit 1X PBS gewaschen. Anschließend wurde 1 ml eiskaltes 1X PBS dazugeben und ca. 5 min auf Eis gestellt. Mit dem Zellschaber wurden die restlichen Zellen sanft abgeschabt und 2 Mal mit 20 ml eiskaltem 1X PBS aus der Zellkulturoberfläche gewaschen. Die Zellen wurden in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und 3 min mit 4000 rpm bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgekippt und das Zellpellet mit einem Lysispuffer für die Extraktion der zytoplasmatischen Fraktion, welche Phosphatase und Proteaseinhibitoren enthält, resuspendiert. Danach wurden die Proben 3 min mit 4000 rpm bei 4 °C abzentrifugiert und der Überstand mit der zytoplasmatischen Fraktion in ein neues Eppendorf-Cup überführt. Das Pellet wurde mit einem Puffer für Proteinkernextraktion durch 15 sek Vortexen resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Der letzte Schritt wurde 5 Mal wiederholt. Abschließend erfolgte die Messung der Konzentration. Die Proteine wurden für kurzfristige Lagerung in - 20°C, für langfristige in - 80°C aufbewahrt.

3.2.5.2 Bicinchoninsäure (BCA) Proteinassay

Für eine quantitative Proteinbestimmung wurde der Bicinchoninsäure(BCA)-Protein Assay (Thermo Scientific) verwendet. Er basiert auf der kolorimetrischen Methode von Biuret. Die Cu²⁺-Ionen der Peptidbindungen reduzieren dabei alkalisch zu Cu⁺-Ionen, was nach Interaktion mit BCA einem Farbumschlag von grün zu lila einhergeht. Durch die Bildung eines violetten Farbkomplexes kann somit die Proteinkonzentration spektrometrisch bei 450 nm bestimmt werden.

Durchführung:

Die Messung wurde in einer 96-Well-Zellkulturplatte durchgeführt. 5 µL der zu bestimmenden Proteinlösung wurde 1 : 5 mit dH₂O verdünnt. Zur Quantifizierung wurde bei jeder Messung als Standard eine BSA-Eichgerade (dH₂O als Leerwert sowie 0,0 – 0,1 – 0,2 – 0,4 – 0,6 – 0,8 und 1,0 mg/ml BSA

enthaltend) erstellt. Nach Zugabe von 100 µl der BCA-Reaktionslösung und 30 min Inkubation bei 37 °C erfolgte die Messung der OD bei 450 nm mit Hilfe eines Plattenreaders. Die OD-Werte der Proben lagen immer im linearen Bereich der BSA-Standardkurve. Nach linearer Regressionsanalyse der Standardkurve konnten die Konzentrationen der Proteine berechnet werden.

3.2.5.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe des Detergens SDS (Natrium-Dodecylsulphat) bzw. Lithium-Dodecylsulphat (LDS) werden Tertiär- und Quartärstrukturen von Proteinen zerstört und sie erhalten eine ihrer Peptidkettenlänge entsprechende äquivalente negative Ladung. Diese negative Ladung ermöglicht die Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrer molekularen Masse im Polyacrylamidgel.

Durchführung:

Für die Trennung der Proteine wurde das Bolt™-System (Invitrogen) verwendet. Die Denaturierung des Proteins (20 µg) erfolgte mit dem DTT enthaltenden LDS-Ladepuffer (Bolt™ LDS Sample Buffer, 4x) bei 95 °C für 5 min unter gleichzeitigem Schütteln bei 550 rpm. Die Proben wurden danach sofort auf Eis abgeschreckt. Anschließend wurde das 4 – 12 % Bis-Tris-Gel (SDS-Polyacrylamide NuPAGE® Novex® Gel) vorbereitet und die Geltaschen mit den Proben geladen. Die Elektrophorese wurde bei 165 Volt für ca. 35 min durchgeführt. Mit Hilfe eines Proteingrößenstandards (SeeBlue®Plus2), der zusätzlich zu den Proben aufgetragen wurde, konnte die Größe der einzelnen Proteinbanden bestimmt werden.

3.2.5.4 Elektrotransfer der Proteine

Nach der Auftrennung durch Polyacrylamidgelelektrophorese wurden die Proteine für weitere immunologische Tests aus dem SDS-Gel auf eine Nitrocellulosemembran (WHATMAN) übertragen. Die Übertragung erfolgte elektrophoretisch unter Verwendung einer Western-Blot-Kammer mittels eines Semy-Dry Verfahrens.

Durchführung:

Die auf die Größe des Gels zugeschnittene Membran wurde zusammen mit den Filterpapieren im Transferpuffer für 30 min inkubiert. Anschließend wurden diese zusammen mit dem Gel in der Blot-Apparatur zu einem Sandwich geschichtet, so dass das Proteingel zur Anode und die Nitrocellulosemembran zur Kathode zeigten. Durch Anlegen eines Stromes von 1 mA je cm² Gelfläche für 1 h wurden die Proteine auf die Membran transferiert.

3.2.5.5 Immunologischer Nachweis

Durch Zugabe der Blockierlösung (3 % BSA in 1X TBST) und Inkubation für 1 h auf dem Schüttler bei RT, wurde die unspezifische Proteinbindung auf der Membran blockiert. Anschließend wurde der in 3 %

BSA in 1X TBST verdünnte Primärantikörper (vgl. Tabelle 3) ÜN bei 4 °C auf die Membran gegeben. Anschließend wurde die Membran dreimal für je 10 min mit 1X TBST gewaschen und danach der mit Meerrettich-Peroxidase (engl.: horschperoxidase, HRP) konjugierte Sekundärantikörper zugefügt und für 1 h bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Nach Ende der Inkubation wurde die Membran zweimal mit 1X TBST und einmal mit 1X PBS gewaschen. Mittels Chemilumineszenz wurden die Proteine sichtbar gemacht. Dafür wurde die Membran zunächst in einer Entwicklerlösung (ECL-Lösung) inkubiert und dann auf einen Röntgenfilm aufgelegt (18 x 24 cm Amersham Hyperfilm™ ECL), der durch das emittierte Lichtsignal der markierten Proteine geschwärzt wurde.

3.2.5.6 Immunfluoreszenz Färbung

Die Immunfluoreszenzfärbung ermöglicht den Nachweis von Proteinen innerhalb von Zellen über die spezifische Bindung eines primären Antikörpers an ein bestimmtes Epitop des zu untersuchenden Proteins. Ist der primäre Antikörper mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert kann dieser mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt werden und das jeweilige emittierte Licht mittels eines Fluoreszenzmikroskops detektiert werden. Für das hier verwendete Fluorochrom Fluoresceinisothiocyanat (FITC) ist die Anregungswellenlänge 465 nm, die Emissionswellenlänge 573 nm.

Durchführung:

Für die immunzytochemischen Färbungen wurden 6 x 10³/cm² DFVs in 4er, chamber slides' bzw. Objektträgern verwendet. Die Zellen, die sich auf dem Objektträger befanden, wurden mit 1X PBS-Puffer gewaschen und mit 4 % Formaldehydlösung zehn Minuten lang fixiert. Danach wurden sie zweimal mit 1X PBS-Puffer gewaschen. Zur Permeabilisierung der Zellen wurden diese mit 0,3 % Triton-X 100 in 1X PBS für 3 min inkubiert und danach zweimal mit 1X PBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die unspezifischen Bindungsstellen durch Inkubation für 30 min mit einer Blockierlösung (10 % FBS in PBS) gesättigt. Dann wurden die Zellen mit dem in Blockierlösung verdünnten (1 : 100-500) ersten Antikörper (siehe Tabelle 3) unter lichtarmen Bedingungen über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurde der ungebundene Antikörper durch dreimaliges Waschen mit 1X PBS-Puffer entfernt. Anschließend wurden die Zellen mit Rhodaminen Phalloidine und/oder Hoechst 33258, wie in Kapitel 3.2.3.1. beschrieben, gefärbt. Für die Auswertung wurden die Objektträger mit einer Mounting-Lösung beschichtet und nach einer 24-stündigen Inkubationszeit bei RT wurden die Färbungen mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Zeiss) betrachtet.

3.2.5.7 Chromatin-Immunopräzipitation

Als Methode zur Analyse von Protein-DNA-Interaktionen wurde die Chromatin-Immunopräzipitation(ChIP) angewendet. Bei der ChIP werden die zu einem bestimmten Zeitpunkt bestehenden Protein-DNA-Bindungen durch Fixierung mit Formaldehyd festgehalten. Anschließend werden

die Zellen lysiert und das Chromatin mittels Ultraschall bzw. DNA-Verdauung mit der Micrococcal Nuklease zu Stücken von einigen Basenpaaren zerkleinert. Alle DNA-Stücke, die das gewünschte Protein gebunden haben, werden mit einem proteinspezifischen Antikörper im Lysat gefangen und das an den Antikörper gebundene Zielprotein wird mit einem proteinspezifischen Antikörper immunpräzipitiert. Die so gebundene DNA wird zerkleinert. In den gelösten DNA-Protein-Komplexen kann die Identität der jeweiligen DNA-Sequenzen beispielweise mittels RT-PCR mit spezifischen Primer nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit wurde die ChIP-Analyse mit dem Pierce G Agarose ChIP -Kit (Thermo Scientific) und laut Protokoll des Herstellers durchgeführt.

Durchführung:

Für ein ChIP-Experiment wurden 6×10^3 Zellen per cm^2 in T75- Zellkulturflaschen verwendet. Um die Protein-DNA-Bindungen festzuhalten, wurden die Zellen mit 1% Formaldehyd für 10 min bei RT fixiert. Die Vernetzungsreaktion wurde durch Zugabe von Glycine gestoppt und die Zellen anschließend zweimal mit kaltem 1X PBS gewaschen und durch Zentrifugation (9000 rpm, 5 min, 4°C) pelletiert.

Für den Zellaufschluss wurden die DFVs mit 100 μL eines Lysispuffer für Membranextraktion gemischt. Anschließend wurde das Chromatin mittels DNA-Verdauung mit der Micrococcal Nuklease (MNase) in Stücke zertrümmert und die Zelltrümmer von der Probe durch Zentrifugation (9000 rpm, 5 min, 4 °C) getrennt.

Um die Zellkerne zu gewinnen, wurden die Zellen im Überstand mit einem Kernextraktions-Lysepuffer lysiert und nach kurzem Vortexen für 5 min auf Eis für insgesamt 15 min inkubiert. Das Chromatin wurde mittels Zentrifugation (9000 rpm, 5 min, 4 °C) isoliert.

Ein Aliquot (5 μL) des Chromatins wurde abgenommen und später als Input verwendet. Das übrige Chromatin wurde mit einem spezifischen Antikörper (siehe Tabelle 3) ÜN bei 4 °C inkubiert.

Um den immunpräzipitierten Chromatin-Komplex zu fangen, wurde eine Protein-A/G-Agarose dazugegeben und mit Waschpuffern (IP Waschpuffer 1, 2 und 3) extensiv gewaschen. Anschließend wurde das Präzipitat des Antikörper-Antigen-DNA-Komplexes mit dem Elutionspuffer (1X IP Elutionspuffer) eluiert. Zunächst wurden die Vernetzungen zwischen Transkriptionsfaktoren und DNA durch eine 2-stündige Inkubation der Proben bei 65 °C reversiert.

Anschließend wurde die DNA mit 750 μL DNA-Bindepuffer über eine DNA-Wasch-Säule gereinigt und isoliert. Die DNA wurde mittels PCR (siehe Kapitel 3.2.4.3) unter Anwendung von spezifischen Primern (siehe Tabelle 2A) analysiert. Das MatInspector/MatBase Programm der Genomatix-Software wurde benutzt, um die Sequenz der Bindestellen für Transkriptionsfaktoren auf dem Gen zu identifizieren.

3.2.5.8 Immunopräzipitation

Um die Interaktion zwischen bestimmten Proteinen nachzuweisen, wurde die Immunopräzipitation (IP) angewendet. Bei der IP wird ein Protein mit einem spezifischen Antikörper im Lysat gefangen. Der an das Protein gebundenen Antikörper wird über ein Antigen (Protein A/G Beads) präzipitiert und das präzipitierte Protein wird mit seinem Interaktionspartner, der zum Zeitpunkt des Versuchs an dieses gebunden war, kopräzipitiert und somit können die Interaktionspartner immunologisch erkannt werden (Kaboord and Perr, 2008). Die IP wurde mit dem The Protein G Agarose Immunoprecipitation-Kit (Abnova) und laut Protokoll des Herstellers durchgeführt.

Durchführung:

Für die IP wurden jeweils 1×10^6 Zellen per cm^2 in T162- Zellkulturflaschen verwendet. Die DFV-Zellen wurden in einem IP-Lysispuffer (enthält; 150 mM NaCl, 50 mM Tris, 1 % Triton X-100) zusammen mit frisch zugegebenen Protease- und Phosphataseinhibitoren aufgeschlossen. Das Zelllysate wurde mit einem spezifischen Antikörper (siehe Tabelle 3.1.2) bei 8°C inkubiert. Um den Antikörper-Protein-Komplex zu fangen, wurden Protein G Beads dazugegeben und 1 h unter fortwährendem Schütteln bei 8°C inkubiert.

Das Präzipitat wurde viermal in IP-Lysispuffer gewaschen. Anschließend wurde 1X LDS-PAGE-Ladepuffer zugegeben und der an das Zielprotein gebundenen Antikörper wurde durch 5-minütiges Kochen von den Beads eluiert.

Anschließend wurden die Proteine mit SDS-PAGE (siehe Kapitel 3.2.5.3) getrennt und die Interaktionspartner wurden mittels Western Blots mit spezifischem Antikörper (siehe Tabelle 3) detektiert. Als Kontrolle wurde eine IP mit dem Zelllysate und einem IgG Antikörper (IgG Kontrolle) bzw. ohne Antikörper verwendet, um unspezifische Bindungen an den Protein G-Beads auszuschließen (In dieser Dissertation nicht gezeigt).

3.2.5.9 PKA-Aktivitätstest

Der PepTag[®] Assay verwendet ein mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppeltes Peptid-Substrat, das PepTag[®]A1 Peptid. Die Nettoladung dieses Peptids verändert sich nach Phosphorylierung durch PKA von +1 zu -1. Somit können die positiv und negativ geladenen Peptid-Substrat-Anteile in einer Agarosegelelektrophorese getrennt werden. Während der phosphorylierte Anteil des Peptid-Substrats zu der positiven Elektrode wandert, wandert der nicht phosphorylierte Anteil zu den negativen Elektroden.

In dieser Arbeit wurde die Induktion der PKA-Aktivität in DFVs mit dem PepTag[®] Assay (Promega) nachgewiesen. Als positive Kontrolle wurde die cAMP abhängigen Proteinkinase ($2 \mu\text{g/ml}$) verwendet. Die Durchführung erfolgte gemäß dem Protokoll des Herstellers.

Durchführung:

Die auf 60 cm-Zellkulturschalen kultivierten DFVs ($6 \times 10^3/\text{cm}^2$) wurden mit 1X PBS gewaschen und anschließend in 0,5 ml PKA-Extraktionspuffer, der Proteinasen sowie Phosphatase-Inhibitoren enthielt, resuspendiert und mit dem Dounce-Homogenizator homogenisiert. Die Lysate wurden für 5 min bei 4°C und $14000 \times g$ abzentrifugiert. Der Überstand wurde für die Reaktion mit den Reaktionskomponenten des Pep®Tag Assay auf Eis zusammengemischt. Nach Aktivierung des Reaktionsansatzes (1 min, bei 30 °C) wurden 9 µL Lysat oder dH₂O als negative Kontrolle bzw. 5 µL der positiven Kontrolle zugegeben und die Proben für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert.

Die Reaktion wurde durch Kochen der Proben bei 95 °C für 10 min gestoppt. Die Reaktionen wurden auf Eis gelegt und mit 1 µL 80 % Glycerol versetzt. Danach wurden sie auf ein Agarosegel (0,8 %) in 50 mM Tri-HCl (pH 8, 0) aufgetragen und in 20 min bei 100 Volt aufgetrennt. Die phosphorylierten Anteile des Peptid-Substrats wurden als fluoreszierende Banden unter UV-Licht detektiert und photographisch dokumentiert. Die Intensität der Banden wurde mittels der ImageJ Software bestimmt. Die Proben wurden in biologischen Triplikaten bestimmt und diese zum Mittelwert der Kontrollgruppe (DFVs in DMEM) normalisiert.

3.2.5.10 Messung der Luciferase-Aktivität

Die Aktivierung eines bestimmten Signalweges kann mittels der Anwendung eines Luciferase-Reportergens nachgewiesen werden. In dem Reporterkonstrukt wird hinter dem Promotor des Zielgens aus dem untersuchten Signalweg eine Luciferasegen eingebaut. Nach Bindung eines Transkriptionsfaktors wie z. B. TCF/LEF1 oder CBF1 am Promotor wird die Genexpression des Luciferasereporters und infolgedessen des Luciferase-Enzyms verstärkt, welches ein spezifisches Substrat (Beetle Luciferin für *Firefly* und Coelenterazine für *Renilla*) durch Biolumineszenz katalysieren kann. Mit einem Luminometer (TECAN) können die relative Lichteinheiten (relative light units, RLU) gemessen werden.

Die Versuche wurde mit dem TCF/LEF1 bzw. CBP1 Reporter Assay Kit (Qiagen) nach Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Neben dem TCF/LEF1 bzw. CBF1 Luciferase-Reporterkonstrukt wurden eine negative (nicht induzierbares *Firefly*-Luciferase-Reporterkonstrukt) und eine positive (Reporterkonstrukt, der die *Firefly*-Luciferase konstitutiv exprimiert) Kontrolle getestet. Als zusätzliche interne Kontrolle wurde für jedes Konstrukt ein Reporterkonstrukt, welches die *Renilla*-Luciferase konstitutiv exprimiert, verwendet. Das emittierende Signal der *Firefly*-Luciferase bzw. *Renilla*-Luciferase wurde unter Zuhilfenahme des Dual-Luciferase® Reporter Assay Systems (Promega) in einem Lumineszenz Gerät (TECAN) gemessen.

Durchführung:

Für die Transfektion mit dem Reporterkonstrukt bzw. der Kotransfektion des Reporters mit siRNA bzw. Plasmid (siehe Kapitel 3.1.6) wurden die DFVs in einer Zelldichte von $1,5 \times 10^4/\text{cm}^2$ in 96-Well-Kulturplatten ausgesät. DFVs wurden im frischem Standard-Zellkulturmedium ohne Antibiotika (DMEM +

MATERIALIEN UND METHODEN

5 % FBS ohne Antibiotika kultiviert. Um den Transfektionskomplex zu bilden, wurden 0,75 μL des Konstrukts in 25 μL Opti-MEM (Invitrogen) eluiert und mit dem Transfektionsreagenz (0,6 μL Lipofectamine 2000, Invitrogen, in 25 μL Opti-MEM eluiert) zusammengemischt. Die Lösung wurde für 1 bis 2 sek auf einem Vortex gemischt und 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Transfektionskomplex zugegeben.

24 h nach der Transfektion wurden die Zellen entweder für zusätzliche 24 h mit unterschiedlichen Behandlungen inkubiert oder direkt lysiert. Nach der Lyse der Zellen mittels Schaben wurden die 20 μL des Lysats in eine weiß-opake 96-Well-Platte überführt und 100 μL des *Firefly*-Luciferase-Substrats dazugeben. Anschließend wurden die relativen Lichteinheiten (RLU) im Luminometer gemessen. Danach wurden 100 μL des Renilla-Luciferase zugegeben und erneut gemessen. Zur Normalisierung (= 100 %) wurden die ermittelten RLU-Werte durch den jeweiligen Mittelwert der Kontrolle dividiert.

4. Ergebnisse

Teile der hier vorgestellten Ergebnisse sind bereits in wissenschaftlichen Artikeln publiziert worden (siehe Anhang VI, Eigene Publikationen).

4.1 Induktion der osteogenen Differenzierung durch den BMP2/SMAD1-Signalweg

Die Differenzierung der DFVs in Zellen, die den Zementblasten/Osteoblasten ähnlich sind, durch Zugabe von BMP2 wurde bereits von Kémoun *et al.* (2007) und Saugspier *et al.* (2010) untersucht. Die vorliegende Arbeit bestätigte über den Nachweis der ALP-Aktivität, dass BMP2 die osteogene Differenzierung in DFVs induziert (siehe Abbildung 6A). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass DFVs den Wachstumsfaktor BMP2 nach Induktion mit BMP2 bzw. ODM *in vitro* differenziell exprimieren (siehe Abbildung 6B).

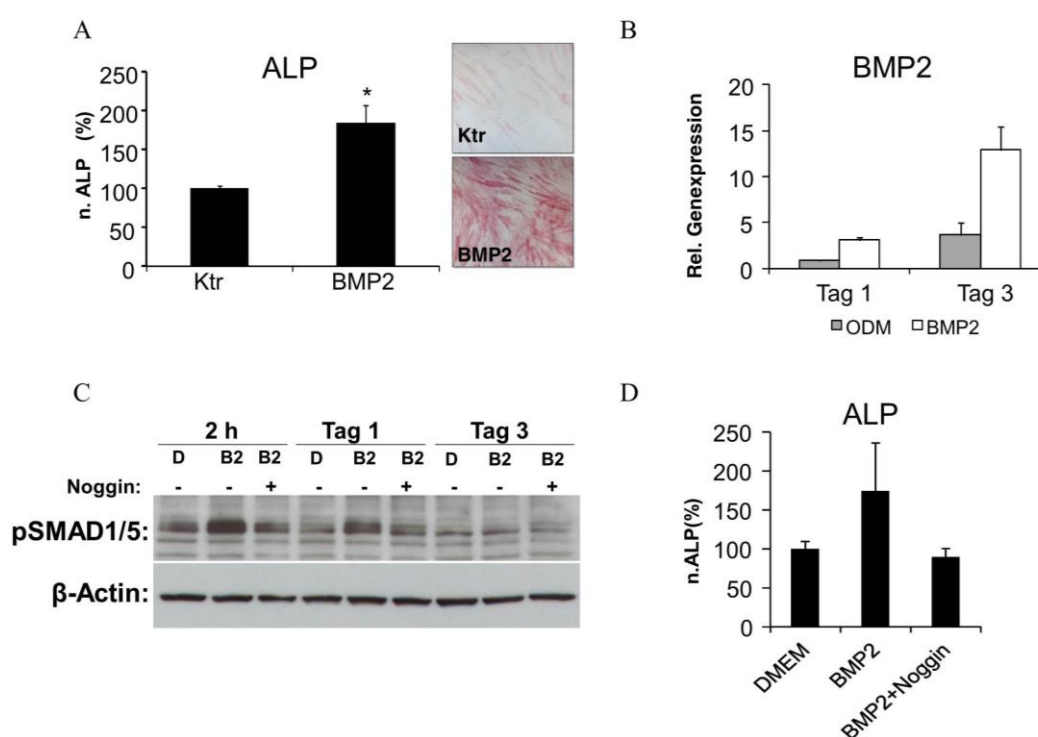


Abbildung 6: Beteiligung des BMP2/SMAD-Signalweges an der osteogenen Differenzierung in DFVs.

(A) Bestimmung der osteogenen Differenzierung mittels ALP-Aktivität in mit BMP2 induzierten DFVs. Quantitativer sowie qualitativer Nachweis der ALP-Aktivität in DFVs nach 10 Tagen Behandlung mit BMP2 (50 ng/ml) bzw. DMEM (Ktr). Die mikroskopischen Aufnahmen haben die gleiche Vergrößerung (20 X).

(B) Differenzielle Genexpression von *BMP2* in DFVs am Tag 1 und 3 nach Induktion mit BMP2 bzw. ODM. Als Kalibrator diente der Mittelwert der mit ODM induzierten DFV-Proben am Tag 1. GAPDH diente als Referenzgen. $n = 3, \pm \text{SEM}$.

(C) Western-Blot-Analysen mit dem Gesamtzelllysate von DFVs und Antikörpern für die phosphorylierte Form von SMAD1/5 und als Ladekontrolle, β -Actin, nach 2 h, 1 und 3 Tagen osteogener Induktion mit BMP2 (50 ng/ml) (B2) allein oder in Kombination mit Noggin (400 ng/ml) und DMEM (D) als Kontrolle (C).

(D) Quantifizierung der ALP-Aktivität nach Inhibition des BMP2/SMAD1-Signalweges mit Noggin (400 ng/ml) in mit BMP2 induzierten DFVs.

Zur Normalisierung wurde der Mittelwert der jeweiligen Kontrolle (Versuch A: Ktr; Versuch D: DMEM) verwendet. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem t-Student-Test. $n = 3, \pm \text{SEM}$. * = statistisch signifikant (p -Wert $< 0,05$).

BMP2 löst nach Bindung an den BMP-Rezeptor eine Signalkaskade durch die Phosphorylierung des SMAD1-Proteins aus, welche letztlich die Transkription von osteogenen Markern induziert (Shi *et al.*, 1999). Mittels Western-Blot-Analysen für die phosphorylierte Form von SMAD1 wurde nachgewiesen, dass nach Induktion mit BMP2 der BMP2/SMAD1-Signalweg induziert wird (siehe Abbildung 6C). Die Inhibition des BMP2/SMAD1-Signalweges mit Noggin, einem spezifischen Inhibitor des BMP2-Signalweges, bestätigte, dass BMP2 die osteogene Differenzierung in DFVs unterstützt (siehe Abbildung 6C, D).

Studien an Osteoblasten zeigten, dass BMP2 die Expression von typischen osteogenen Markern wie DLX5, DLX3, MSX2, OC und RUNX2 während der osteogen Differenzierung induziert (Hassan *et al.*, 2005). Jedoch zeigte Morscheck (2006) mittels RT-qPCR, dass in DFVs nur DLX3 während der osteogenen Differenzierung differenziell exprimiert wird. Mittels RT-qPCR und Western-Blot-Analyse wurde in dieser Arbeit bestätigt, dass DFVs den TF DLX3 nach Induktion mit BMP2 bzw. ODM *in vitro* differenziell exprimieren (siehe Abbildung 7A, D).

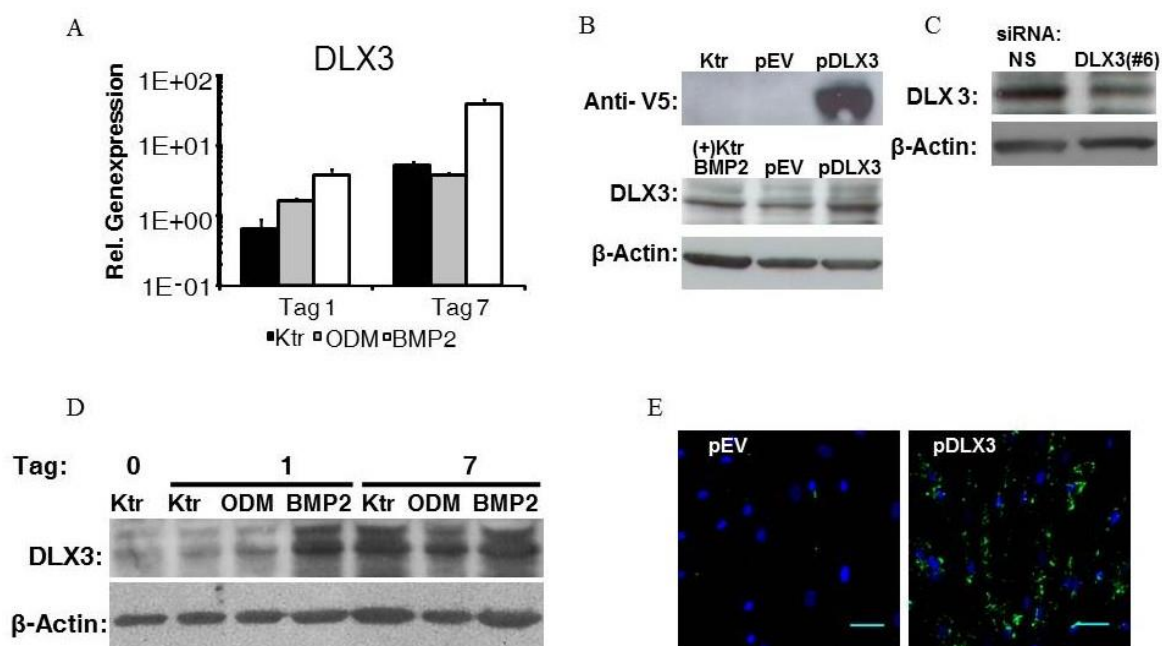


Abbildung 7: DLX3 Expression bzw. Überexpression in DFVs.

(A) Die DLX3-Expression in DFVs am Tag 1 und 7 nach Induktion mit BMP2 bzw. ODM wurde auf mRNA-Ebene mit RT-qPCR. Als Kalibrator diente der Mittelwert der Kontrolle (Ktr), Tag 0. n = 3, ± SEM.

(B) Die Western-Blot-Analysen erfolgten mit dem Gesamtzelllysat von DFVs und Antikörpern (AK) für V5-Epitop, DLX3 und β-Actin als Ladekontrolle nach 72 h transients Transfektion mit dem DLX3-Plasmid (pDLX3) bzw. einem Kontrollplasmid (pEV) sowie nach Kultivierung der DFVs in DMEM (Ktr) oder BMP2 als Positivkontrolle.

(C) Die Western-Blot-Analysen mit einem AK für DLX3 bestätigten die Herunterregulation von DLX3 nach Transfektion für 72 h mit einer DLX3-siRNA (# 6) bzw. einer unspezifischen siRNA (NS siRNA).

(D) Western Blots mit Gesamtzelllysat von DFVs am Tag 1 und 7 nach Induktion mit BMP2 bzw. ODM und AK für DLX3 und β-Actin als Ladekontrolle .

(E) Immunfluoreszenz-Analyse der mit pDLX3 oder pEV transient transformierten DFVs, Tag 3. Das pDLX3 wurde mit einem AK für V5-FITCS (grün) und die Zellkerne mit Hoechst 33258 (blau) nachgewiesen. Standardbalken: 50 µm.

4.2 Regulatorische Funktion des DLX3-Transkriptionsfaktors in DFVs

Um den Einfluss von DLX3 auf die osteogene Differenzierung in DFVs zu untersuchen, wurden DFVs mit einem DLX3-Plasmid (pDLX3) oder mit einer für DLX3 spezifischen siRNA (DLX3 siRNA) transient transfiziert. DLX3 wurde in DFVs erfolgreich überexprimiert (siehe Abbildung 7B, E) bzw. inhibiert (siehe Abbildung 7C).

4.2.1 Einfluss von DLX3 auf die Morphologie, Proliferation und Zellvitalität in DFVs

In Vorarbeiten zu dieser Dissertation war eine Microarray-Studie zur Überexpression von DLX3 durchgeführt worden. Die Ergebnisse zeigten, dass DLX3 an biologischen Prozessen wie Morphologie, Proliferation und Zellvitalität in DFVs beteiligt sein könnte (siehe Abbildung 8; Viale-Bouroncle *et al.*, 2012). Diese Prozesse sind für die Osteogenese notwendig.

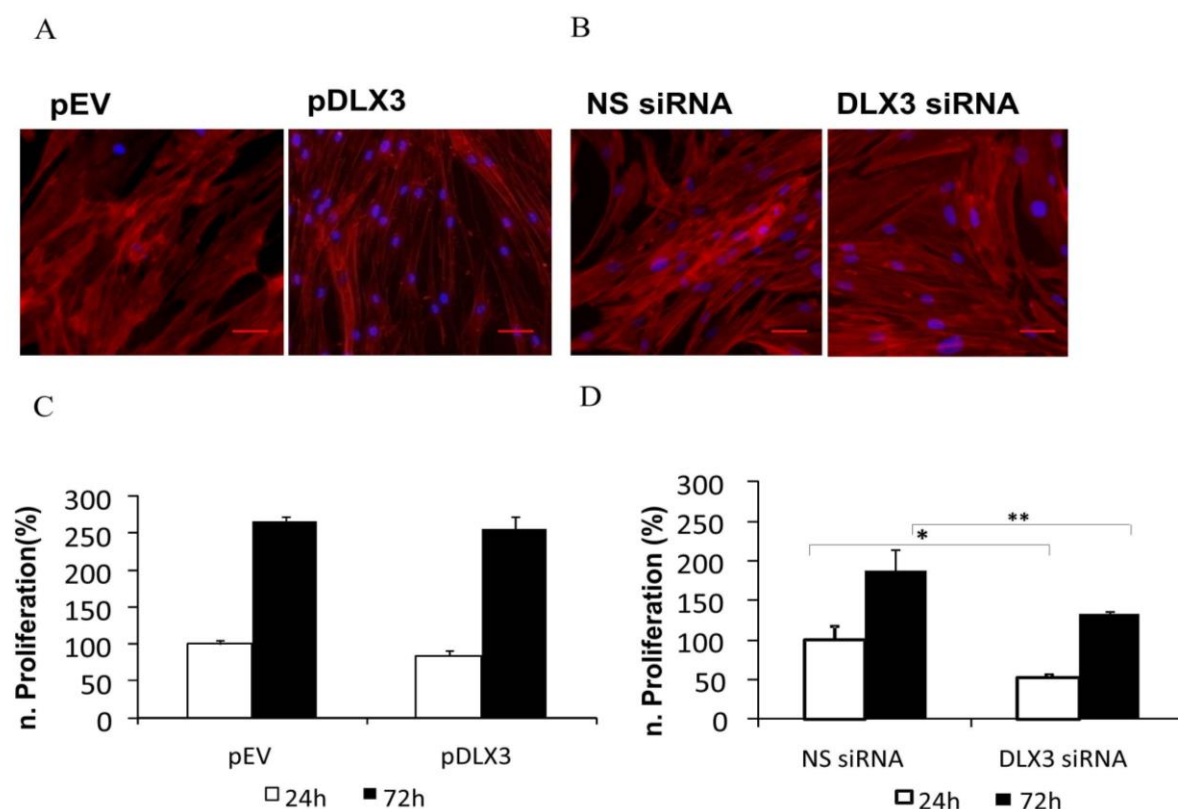


Abbildung 8: Einfluss von DLX3 auf die Zellmorphologie und -Vitalität der DFVs.

(A) Nachweis der Veränderungen des Zytoskeletts in DLX3 überexprimierenden DFVs nach 72 h Transfektion mit dem DLX3-Plasmid (pDLX3) bzw. einem Kontrollplasmid (pEV).

(B) Nachweis der Zellmorphologie nach 72 h DLX3-Inhibition mit DLX3 siRNA oder NS siRNA als Kontrolle. Das F-Aktin wurde mit Rhodamine Phalloidin (rot) und der Zellkerns mit Hoechst 33258 (blau) angefärbt. Standardbalken: 50 μ m.

(C) WST1-Tests nach 24 h und 72 h Transfektion mit pDLX3 oder pEV.

(D) WST1-Tests nach 24 h und 72 h Transfektion mit DLX3 siRNA oder NS siRNA. .

Zur Normalisierung (= 100 %) wurden die ermittelten Werte durch den Mittelwert des 24-stündigen Kontrollwertes (Versuch C: pEV; Versuch D: NS siRNA) dividiert. n = 4, \pm SEM. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem t-Student-Test. * = statistisch signifikant (p-Wert < 0,05); ** = statistisch signifikant (p-Wert < 0,025).

Die DFVs änderten nach DLX3-Überexpression ihr Aussehen und hatten eine stark spindelförmige Morphologie mit gestreckten länglichen Aktin-Stressfasern (siehe Abbildung 8A). Nach der Transfektion mit DLX3 siRNA zeigten die Zellen hingegen keinen Unterschied zur NS siRNA (siehe Abbildung 8B). Während nach DLX3-Silencing die Proliferationsrate von DFVs im Vergleich zur Kontrolle (unspezifische NS siRNA) sank (siehe Abbildung 8 D), blieb die Proliferation nach DLX3-Überexpression gleich (siehe Abbildung 8C).

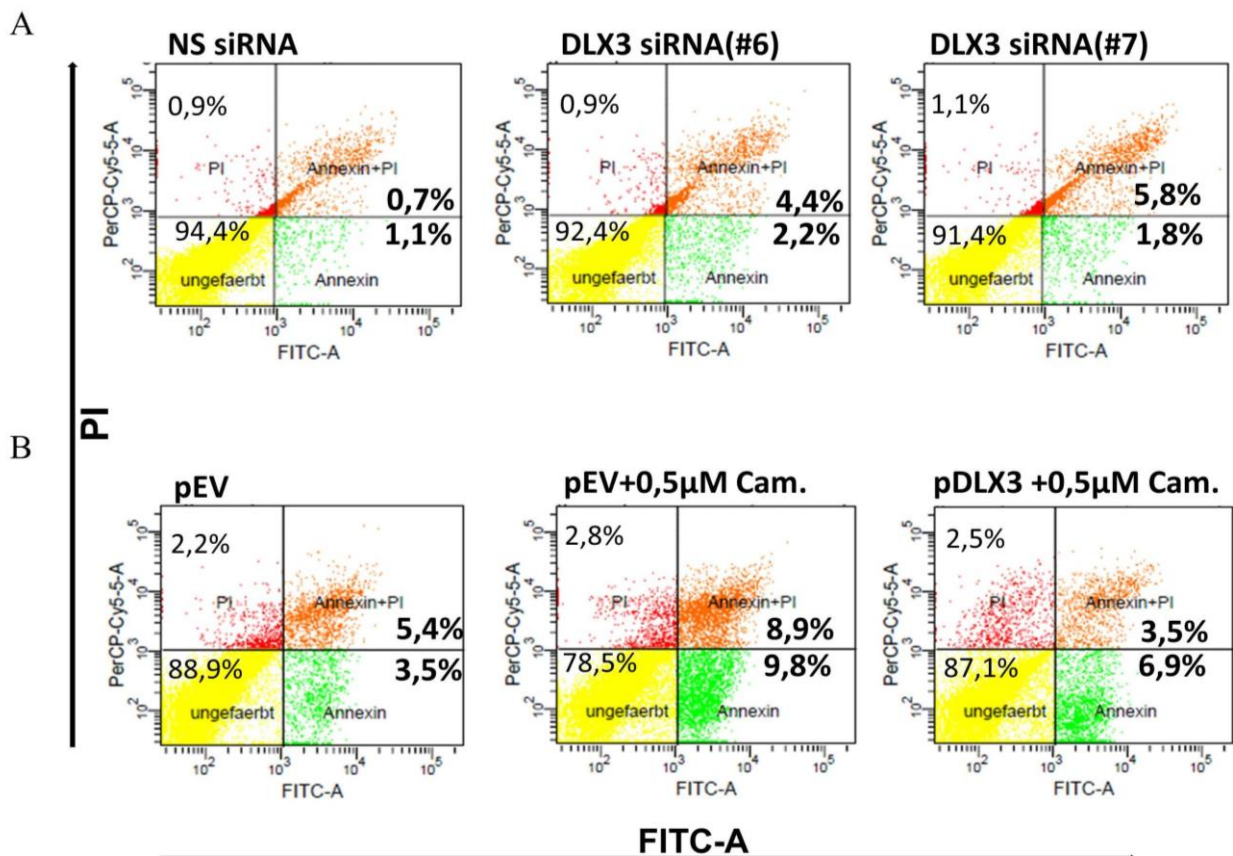


Abbildung 9: Einfluss von DLX3 auf die Zellvitalität bzw. Apoptose der DFVs.

(A) FACS-Analyse der Apoptose nach DLX3-Inhibition mit zwei unterschiedlichen siRNAs spezifisch für DLX3 (DLX3 siRNA # 6 und # 7) in DFVs

(B) FACS-Analyse der Apoptose nach DLX3-Überexpression mit dem DLX3-Plasmid (pDLX3) in Camptothecin-behandelten DFVs. Als Kontrolle dienten pEV (A) und NS siRNA(B). FITC-Annexin-V wurde für den Nachweis der Apoptose verwendet. Lebende Zellen (Annexin-V⁻, PI⁻) sind im unteren linken Quadranten, apoptotischen Zellen (Annexin-V⁺, PI⁻) im unteren rechten, Zellen in der späteren Phase der Apoptose (Annexin-V⁺, PI⁺) im oberen rechten sowie nekrotische Zellen (Annexin-V⁻, PI⁺) im oberen linken Quadranten des *Dot-Plots* dargestellt.

Nach DLX3-Inhibition erhöhte sich die Anzahl von DFVs in der Apoptose (siehe Abbildung 9A). Nach DLX3-Überexpression in mit Camptothecin behandelten DFVs sank hingegen die Anzahl der apoptotischen Zellen von 8,9 % auf 3,5 % (siehe Abbildung 9B). Dieses Ergebnis wurde durch WesternBlots

für die pro- bzw. anti-apoptotischen Proteine BAX bzw. BCL2 (siehe Abbildung 10A, B) und durch RT-qPCR-Analysen für eine repräsentative Gruppe von pro- bzw. anti-apoptotischen Genen (siehe Abbildung 10C, D) bestätigt.

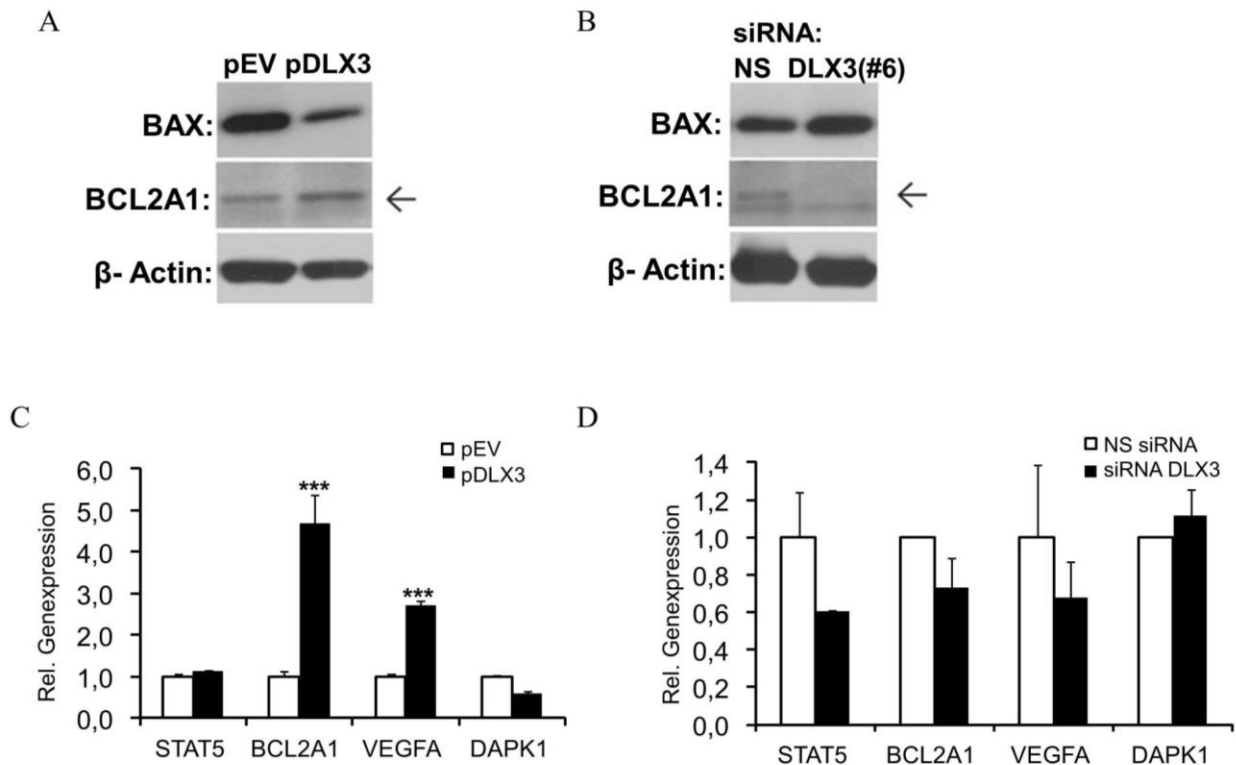


Abbildung 10: Einfluss von DLX3 auf die Regulation von apoptotischen bzw. antiapoptotischen Markern.

(A) Western-Blot-Analysen mit Antikörpern für BAX, BCL2A1 und β -Actin als Ladekontrolle nach 72 h transienter Transfektion mit dem DLX3-Plasmid (pDLX3) bzw. einem Kontrollplasmid (pEV).

(B) Western Blots nach Transfektion einer DLX3 siRNA (# 6) bzw. einer unspezifischen siRNA (NS siRNA).

(C) RT-qPCR-Analyse von apoptotischen bzw. antiapoptotischen Markern nach 48 h transienter Transfektion eines DLX3-Plasmids (pDLX3) bzw. eines Kontrollplasmids (pEV).

(D) RT-qPCR-Analyse von apoptotischen bzw. antiapoptotischen Markern nach 48 h Transfektion einer DLX3 siRNA (# 6) bzw. eine unspezifische siRNA (NS siRNA).

Als Kalibrator diente der Mittelwert der Kontrolle (Versuch C: pEV; Versuch D: NS siRNA), Tag 0. n = 3, \pm SEM. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem t-Student-Test. *** = statistisch signifikant (p-Wert < 0,0125).

4.2.2 Einfluss von DLX3 auf die Expression der osteogenen Differenzierung

DFVs wiesen nach Transfektion mit dem *DLX3*-enthaltenden Expressionsvektor (pDLX3) in Dexamethason-basiertem osteogenen Differenzierungsmedium (ODM) eine stärkere ALP-Aktivität (siehe Abbildung 11A) und eine stärkere Alizarin-Färbung (siehe Abbildung 11C) auf als diejenigen Zellen, die mit

dem Kontrollplasmid (pEV) transfiziert worden waren. Dagegen zeigten DFVs nach DLX3-Inhibition eine geringere ALP-Aktivität (siehe Abbildung 11B), jedoch eine ähnliche Alizarin-Red-Färbung (siehe Abbildung 11D) wie die Kontrolle.

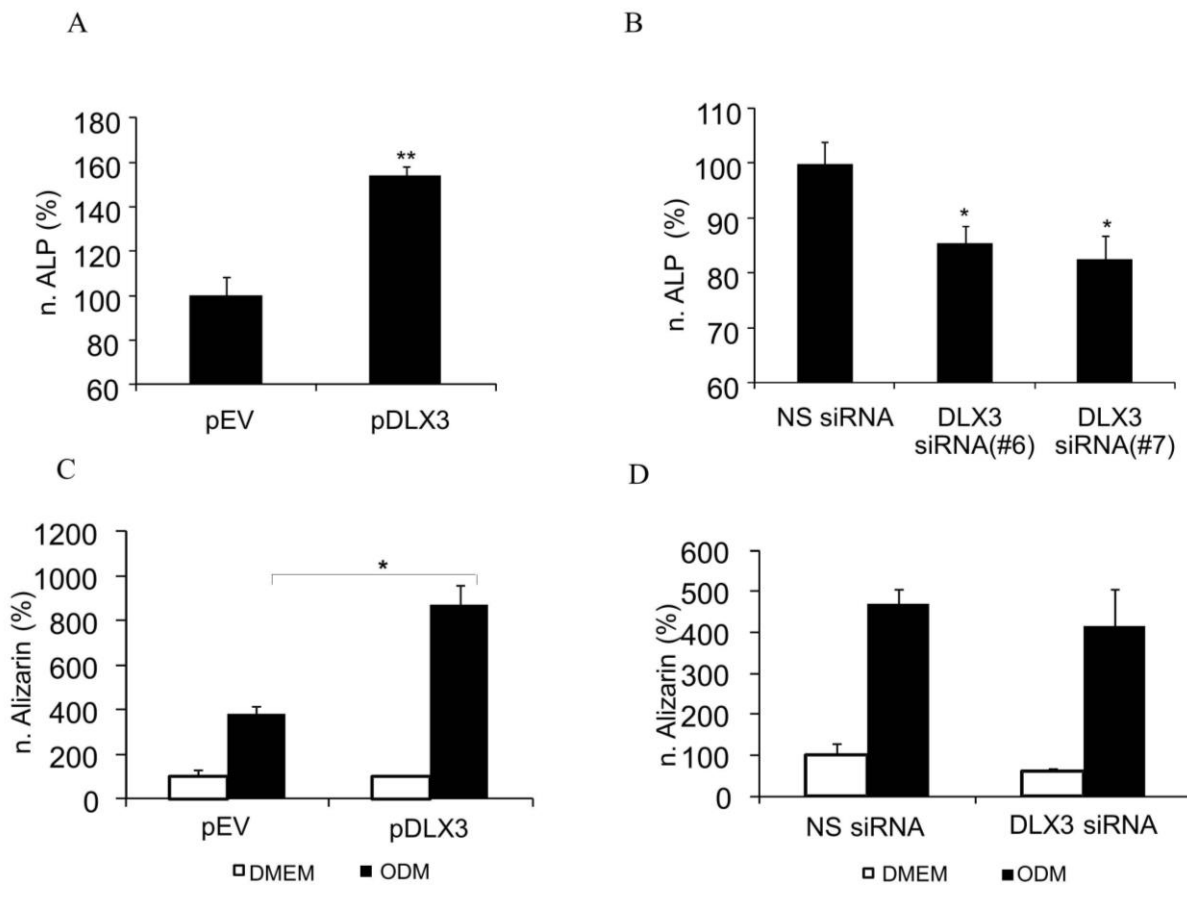


Abbildung 11: Einfluss von DLX3 auf die osteogene Differenzierung der DFV.

(A) Quantitativer Nachweis der ALP-Aktivität in DFVs nach 48 h DLX3-Überexpression bzw. DLX3-Silencing (B) und nach 10 Tagen Behandlung mit ODM (1 % FBS).

(C) Quantitativer Nachweis der Matrixmineralisierung mittels Alizarin-Red-Färbung in DFVs nach 48 h DLX3-Überexpression bzw. DLX3-Silencing (D) und nach 5 Wochen Induktion mit ODM (1% FBS) oder Kultivierung in DMEM.

Zur Normalisierung wurde für alle Versuche der Mittelwert der Kontrolle (Versuch A: pEV in ODM; Versuch B: NS siRNA in ODM; Versuch C: pEV in DMEM; Versuch D: NS siRNA in DMEM) verwendet. Für die statistische Auswertung wurde der t-Student-Test verwendet. n = 4, ± SEM. * = statistisch signifikant (p-Wert < 0,05); ** = statistisch signifikant (p-Wert < 0,025).

Nach einer DLX3-Überexpression wurden osteogene Marker wie RUNX2 hochreguliert (siehe Abbildung 12A, C); nach DLX3-Silencing wurden sie wieder herunterreguliert (siehe Abbildung 12B, D). Die Expression des osteogenen Transkriptionsfaktors ZBTB16 wurde durch DLX3-Überexpression ebenfalls induziert (siehe Abbildung 12A). Mittels Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) konnte eine direkte

Bindung von DLX3 an *RUNX2*- sowie am *ZBTB16*-Promotor nachgewiesen werden (siehe Abbildung 12E). Der ChIP-Versuch wurde innerhalb der Arbeitsgruppe in Kooperation mit Herrn Felthaus durchgeführt.

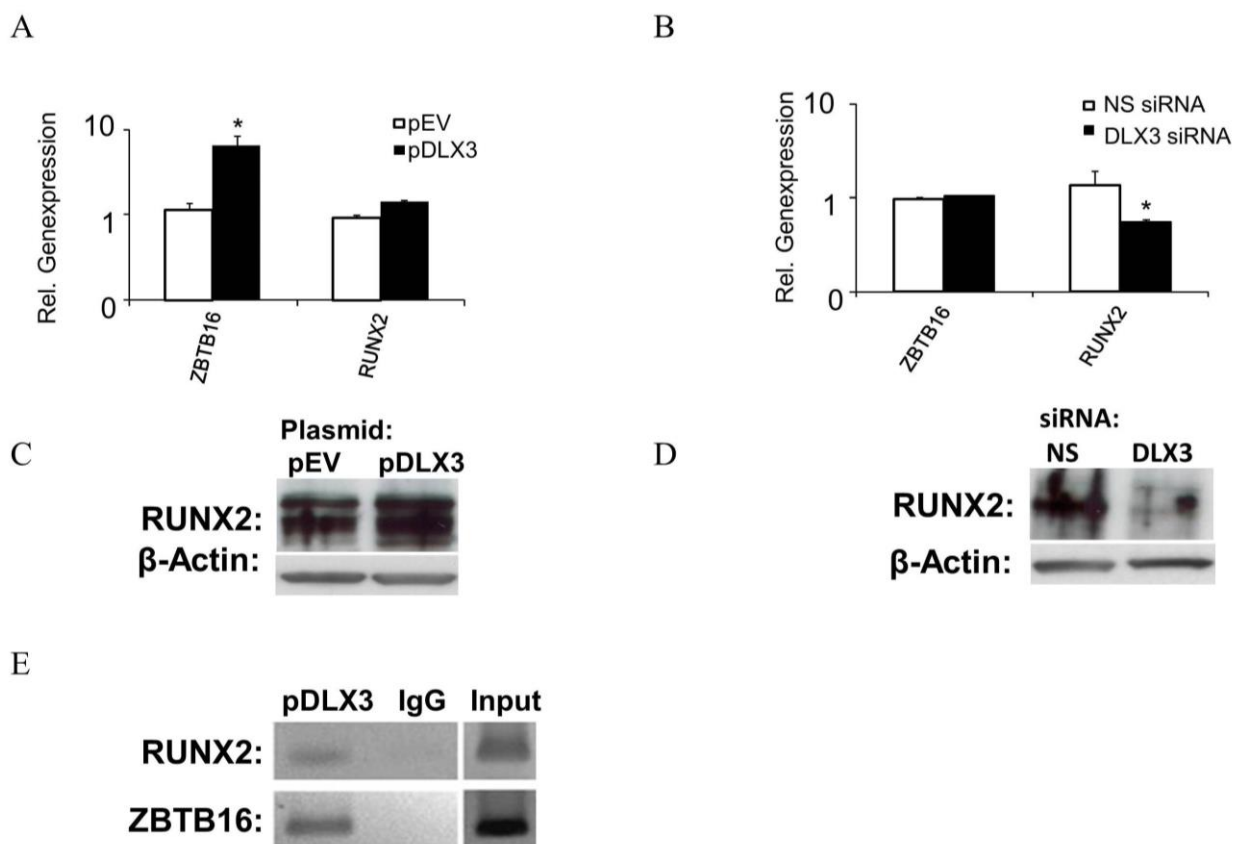


Abbildung 12: Regulation von osteogenen Markern durch DLX3.

(A) Analyse von *RUNX2*- und *ZBTB16*-Expression mittels RT-qPCR nach 48 h transients Transfektion mit dem DLX3-Plasmid (pDLX3) bzw. dem Kontrollplasmid (pEV) oder (B) nach Transfektion mit DLX3 siRNA (# 6) bzw. einer unspezifischen siRNA (NS siRNA).

Als Kalibrator diente der Mittelwert der Kontrolle (Versuch A: pEV; Versuch B: NS siRNA). n = 3, \pm SEM. Für die statistische Auswertung wurde der t-Student-Test verwendet. * = statistisch signifikant (p-Wert < 0,05).

(C) Western-Blot-Analysen mit dem Gesamtzelllysat der DFVs und Antikörper (AK) für RUNX2 und β -Actin als Ladekontrolle, nach 72 h transients Transfektion mit pDLX3 bzw. pEV (D) oder nach Transfektion mit DLX3 siRNA (# 6) bzw. der NS siRNA.

(E) Die Chromatin-Immünpräzipitation (ChIP) wurde nach 72 h Transfektion mit pDLX3 durchgeführt. Die Präzipitation der Proteine wurde mit einem DLX3-spezifischen AK und IgG als Kontrolle durchgeführt. Die DNA wurde mittels PCR unter Anwendung von spezifischen Primer (siehe Tabelle 2.A) analysiert.

Die in Abbildung 13 gezeigten Ergebnisse deuten zudem darauf hin, dass DLX3 den BMP2/SMAD1-Signalweg reguliert, denn die DFVs zeigten nach der DLX3-Überexpression eine erhöhte Expression des Wachstumsfaktors BMP2 (siehe Abbildung 13A). Darüber hinaus wurde mittels Western-Blot-Analyse mit der phosphorylierten Form des SMAD1-Proteins bestätigt, dass der BMP-Signalweg nach Überexpression bzw. Inhibition von DLX3 induziert bzw. inhibiert werden kann (siehe Abbildung 13B, C). Wie bereits

gezeigt worden war (siehe Abbildung 7A, D), wird die DLX3-Expression durch BMP2 ebenfalls induziert, was auf einen Feedbackmechanismus zwischen BMP2 und DLX3 hinweist. Zudem wurde mit einem BMP2-spezifischen Antikörper nachgewiesen, dass die Inhibition der osteogenen Differenzierung (siehe Abbildung 13D) in DFVs nach DLX3-Überexpression nur teilweise aufgehoben werden kann (siehe Abbildung 13E).

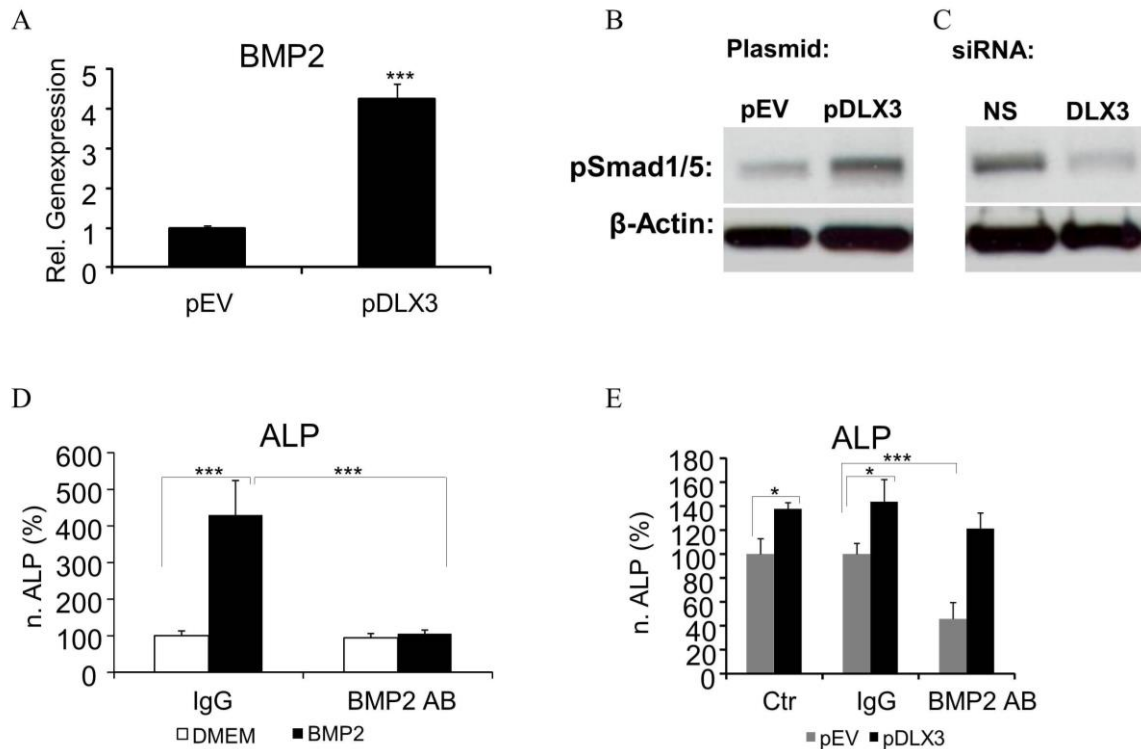


Abbildung 13: Induktion des BMP2/SMAD-Signalweges mit DLX3.

(A) RT-qPCR nach 48 h transients Transfektion mit dem DLX3-Plasmid pDLX3 bzw. dem Kontrollplasmid pEV.

(B) Western-Blot-Analyse mit Antikörpern (AK) für die phosphorylierte Form des SMAD1-Proteins und β-Actin als Ladekontrolle nach 72 h transients Transfektion mit pDLX3 bzw. dem pEV (C) oder nach Transfektion mit DLX3 siRNA (# 6) bzw. der unspezifischen siRNA (NS siRNA).

(D), (E) Inhibition des BMP2-Signalweges mittels eines BMP2-spezifischen AK. (D) Quantitativer Nachweis der ALP-Aktivität in DFVs nach 10 Tagen osteogener Differenzierung mit BMP2 bzw. Kultivierung in DMEM oder (E) nach 48 h transients Transfektion mit pDLX3 bzw. pEV und 10-tägiger Behandlung mit ODM (1 % FBS). Ein IgG-AK diene als Negativkontrolle.

Zur Normalisierung wurde für alle Versuche der Mittelwert der Kontrolle (Versuch A: pEV und BMP2; Versuch D: IgG und DMEM; Versuch E: pEV und ODM) verwendet. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem t-Student-Test. n = 3 bis 4, ± SEM. * = statistisch signifikant (p-Wert < 0,05); *** = statistisch signifikant (p-Wert < 0,0125).

4.2.3 Feedbackmechanismus zwischen DLX3 und dem BMP2/SMAD1-Signalweg

Die gegenseitige Regulation zwischen DLX3 und BMP2 wurde in dieser Arbeit ebenfalls näher untersucht. Dafür wurde nach DLX3-Überexpression bzw. -Inhibition in DFVs die Osteogenese mit BMP2 (50 ng/ml) induziert. Überraschenderweise induzierte nach einer BMP2-Supplementierung eine DLX3-Überexpression in DFVs die ALP-Aktivität nicht stärker (siehe Abbildung 14A). Zudem wurde durch die BMP2-Supplementierung der inhibitorische Effekt der DLX3 siRNA auf die osteogene Differenzierung aufgehoben (siehe Abbildung 14C). Dieser Effekt wurde möglicherweise durch die bereits hohe endogene Expression des *DLX3*-Gens herbeigeführt, die in den mit BMP2 induzierten DFVs ca. 80 - 100-fach höher war als in den mit ODM induzierten DFVs (pEV und NS siRNA) (siehe Abbildung 14B, D). Infolgedessen war beispielsweise die Erhöhung der *DLX3*-Genexpression in DLX3-überexprimierenden DFVs nach Behandlung mit BMP2 viel geringer als mit ODM (siehe Abbildung 14B).

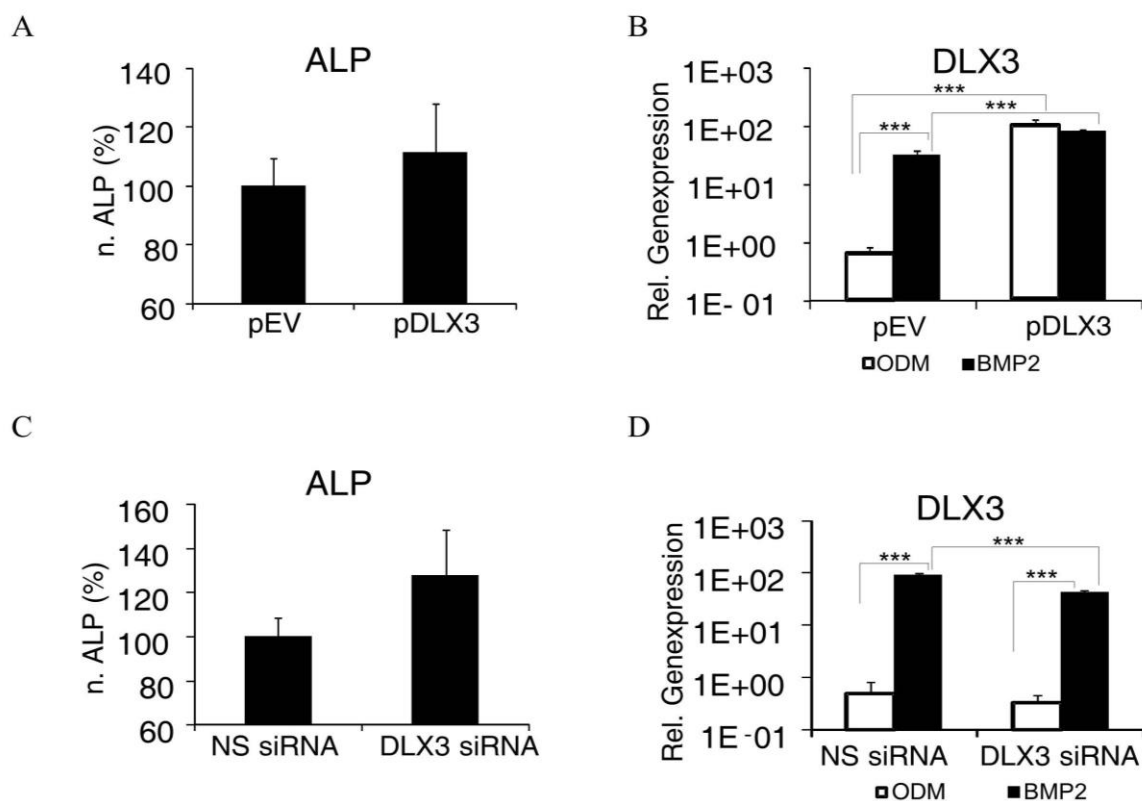


Abbildung 14: Interaktion von DLX3 und BMP2 während der osteogenen Differenzierung in DFVs.

(A) Quantitativer Nachweis der ALP-Aktivität in DFVs nach 48 h DLX3-Überexpression bzw. (C) DLX3-Silencing und nach 10 Tagen Behandlung mit BMP2 (50 ng/ml).

(B) Analyse der relativen *DLX3*-Genexpressions mittels RT-qPCR nach 48 h transients Transfektion mit einem DLX3-Plasmid (pDLX3) bzw. dem Kontrollplasmid pEV (D) oder nach Transfektion einer DLX3 siRNA (# 6) bzw. der unspezifischen NS siRNA und 3 Tage osteogener Induktion mit ODM (1 % FBS) oder BMP2 (50 ng/ml).

Zur Normalisierung wurde für alle Versuche der Mittelwert der Kontrolle (Versuch A: pEV in BMP2; Versuch B: pEV in ODM; Versuch C: NS siRNA in BMP2; Versuch D: NS siRNA in ODM) verwendet. n = 3, ± SEM. Für die statistische Auswertung wurde der t-Student-Test verwendet. *** = statistisch signifikant (p-Wert < 0,0125).

Um den Einfluss von DLX3 auf den BMP2-Signalweg weiter zu untersuchen, wurden DFVs mit drei unterschiedlichen DLX3-Plasmid-Konzentrationen (niedrig, mittel und hoch) transient transfiziert (siehe

Abbildung 15A) und die Differenzierung mit zwei verschiedenen Konzentrationen von BMP2 (10 ng/ml und 50 ng/ml) induziert (siehe Abbildung 15B). Der durch DLX3 und BMP2 induzierte Dosis-Effekt wurde in DFVs anhand der ALP-Aktivität untersucht. Bei der niedrigen BMP2-Konzentration von 10 ng/ml erhöhte sich sowohl die *DLX3*-Genexpression als auch die ALP-Aktivität in Korrelation mit der steigenden DLX3-Konzentration. Dagegen wurde die *DLX3*-Expression und die ALP-Aktivität in DFVs, die mit 50 ng/ml BMP2 und mit pDLX3 behandelt worden waren, mit steigender DLX3-Konzentration inhibiert (siehe Abbildung 15B,C).

Diese Ergebnisse deuten auf einen Differenzierungsmechanismus hin, der direkt von DLX3 bzw. von weiteren Signalwegen abhängt.

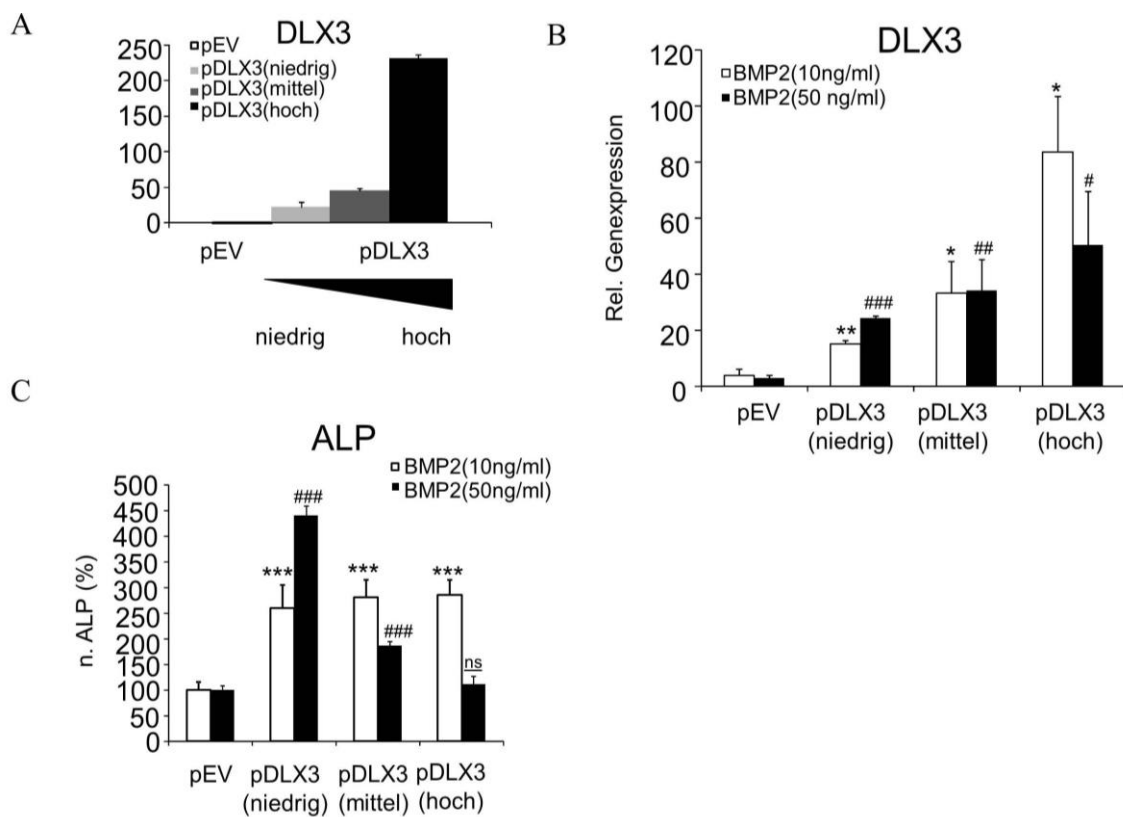


Abbildung 15: BMP2/DLX3-Feedbackmechanismus.

(A) Analyse der relativen *DLX3*-Genexpression mittels RT-qPCR nach 48 h Transfektion mit drei verschiedenen Konzentrationen (niedrig, mittel und hoch) des DLX3-Plasmids (pDLX3) bzw. dem Kontrollplasmid pEV und Kultivierung in DMEM

(B) bzw. für 3 Tage Behandlung mit BMP2 (10 ng/ml oder 50 ng/ml).

(C) Quantitativer Nachweis der ALP-Aktivität in DFVs nach 48 h Transfektion mit drei verschiedenen Konzentrationen (0,01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, niedrig; 0,02 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, mittel und 0,04 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, hoch) pDLX3 und bis zu 10 Tagen Behandlung mit BMP2 (10 ng/ml oder 50 ng/ml).

Zur Normalisierung wurde für der Mittelwert der Kontrolle (pEV) in DMEM bzw. BMP2 (10 ng/ml) verwendet. $n = 3$, \pm SEM. Für die statistische Auswertung wurde der t-Student-Test verwendet. * oder # = statistisch signifikant (P-Wert < 0,05); ** oder ### = statistisch signifikant (P-Wert < 0,025); *** oder #### = (P-Wert < 0,0125).

4.3 Weitere an der Regulation der DLX3/BMP- induzierten osteogenen Differenzierung beteiligte Signalwege

Um die Beteiligung weiterer Signalwege an der Regulation der osteogenen Differenzierung in DFVs näher zu untersuchen, wurde nach der Überexpression des DLX3-Transkriptionsfaktors mit der mittleren pDLX3-Konzentration und drei Tagen osteogener Induktion mit 10 ng/ml BMP2 das Transkriptom (DNA-Microarrays) der DFVs untersucht. Die Genomatrix-Analyse zeigte 141 hochregulierte und 176 herunterregulierte Gene (siehe Tabelle 1 und 2 im Anhang). Unter anderem waren *FRZB*, *VCAM1*, *EGR1* und *cMYC* signifikant hochreguliert, wohingegen nach DLX3-Transfektion *BCL2A* und *BMPRIB* signifikant herunterreguliert wurden (siehe Abbildung 16A). Die Ergebnisse der Microarray-Analyse wurden durch RT-qPCRs bestätigt (siehe Abbildung 16A).

Interessanterweise wurden nach DLX3-Überexpression und BMP2-Supplementierung Gene signifikant reguliert, welche Proteine kodieren, die an dem kanonischen WNT-Signalweg beteiligt sind wie *DKK1*, *LRP6* und *APCDD1* (siehe Abbildung 16B) sowie *PCDHB* (engl.: protocadherin beta), ein Gen des nicht kanonischen WNT-Signalweges (siehe Tabelle 1 im Anhang). Die bioinformatische Analyse der Microarraydaten deutete zudem auf hochregulierte Gene hin, die in Signalwegen wie fokale-Adhäsion, Rho GTPase und WNT überrepräsentiert sind (siehe Tabelle 3 im Anhang).

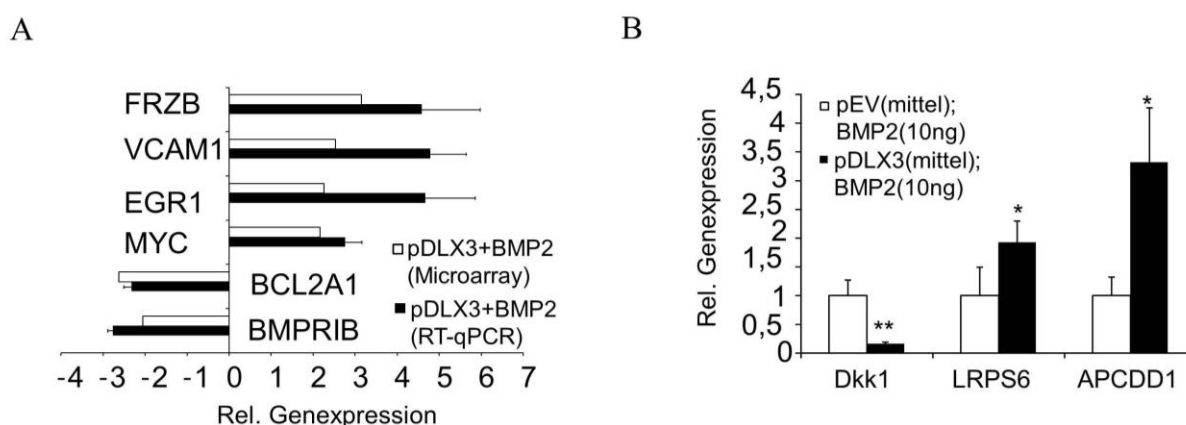


Abbildung 16: Microarray-Analyse der DFVs nach DLX3/BMP2-induzierter osteogener Differenzierung.

(A) Bestätigung der Ergebnisse der Microarray-Analyse nach Transfektion mit dem DLX3-Plasmid pDLX3 und 3 Tagen Behandlung mit BMP2 (10 ng/ml) durch RT-qPCR. Die weißen Balken zeigen den Mittelwert der relativen Genexpression aus dem Microarray-Versuch. die schwarzen Balken die entsprechenden Werte der RT-qPCRs.

(B) Analyse der Genexpression von WNT-Zielgenen mittels RT-qPCR nach 48 h Transfektion mit pDLX3 bzw. pEV und nach 3 Tagen Behandlung mit BMP2 (10 ng/ml). Zur Normalisierung wurde der Mittelwert der Kontrolle (pEV) verwendet. n = 3, ± SEM. Für die statistische Auswertung wurde der t-Student-Test verwendet. * = statistisch signifikant (p-Wert < 0,05); ** = statistisch signifikant (p-Wert < 0,025).

4.3.1 WNT-Signalweg

Studien in BMSCs haben gezeigt, dass BMP2 das β -Catenin induziert (Lee *et al.*, 2010). Die in Abbildung 17 dargestellten Ergebnisse weisen ebenso auf die Aktivierung des WNT/ β -Catenin-Signalweges nach BMP2-Zugabe in DFVs hin.

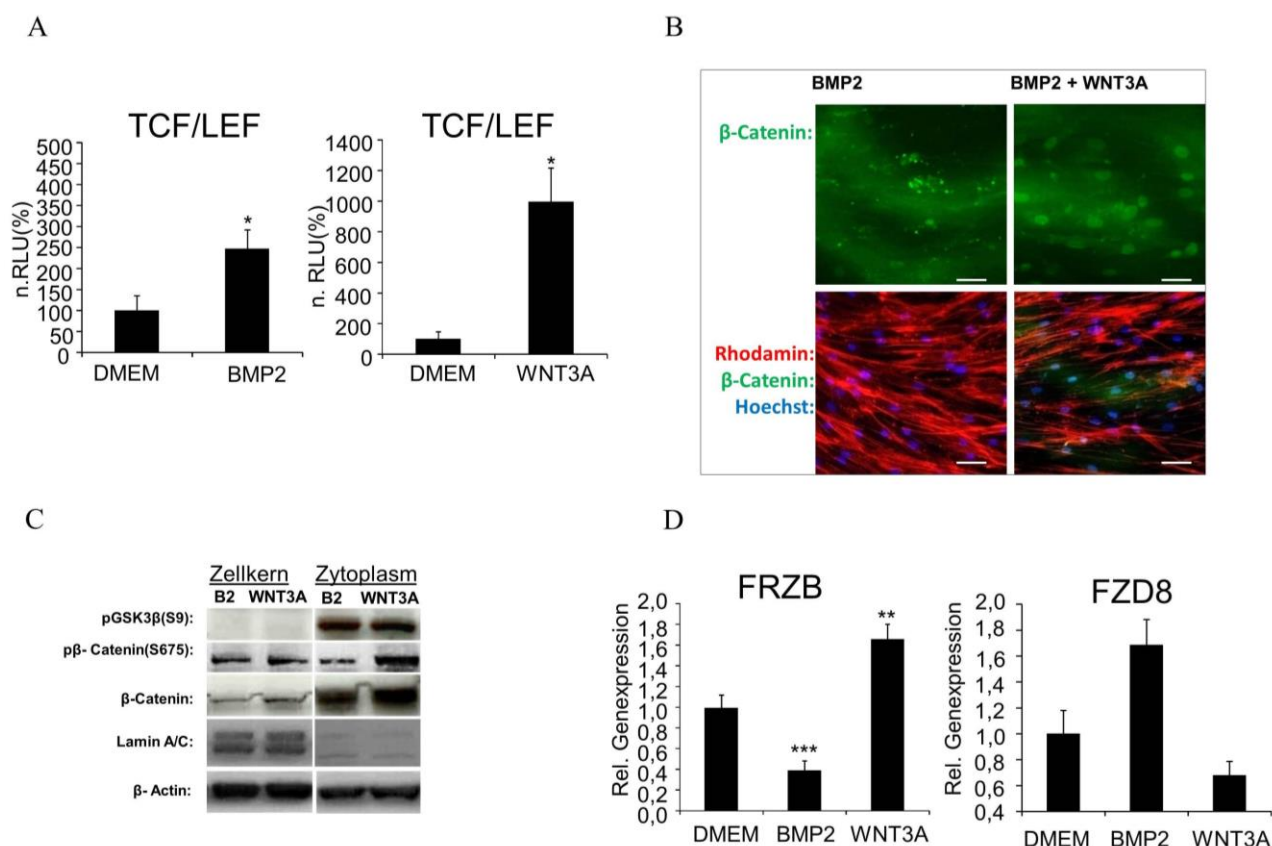


Abbildung 17: Aktivierung des WNT-Signalweges in DFVs.

(A) Nachweis der Aktivierung des WNT-Signalweges mittels eines TCF/LEF-Luciferase-Reporterassays nach 24 h Behandlung mit BMP2 (50 ng/ml) bzw. WNT3A (100 ng/ml).

(B) Nachweis der Kernlokalisierung des β -Catenins in DFVs mit Hilfe der Immunfluoreszenz mit einem β -Catenin-spezifischen Antikörper(grün), mit Rhodamine Phalloidin für die Aktinfasern (rot) und mit Hoechst 33258 für die Zellkerne (blau).

(C) Western-Blot-Analysen mit Zellkernlysaten und zytoplasmatischen Proteinlysaten von DFVs und Antikörpern für die phosphorylierte Form von GSK3 β (S9), von β -Catenin (S675), Lamin A/C als Zellkernkontrolle und β -Actin als Ladekontrolle nach 24 h osteogener Induktion mit BMP2 (50 ng/ml) bzw. WNT3A (100 g/ml).

(D) Analyse der Genexpression von WNT-Zielgenen mittels RT-qPCR nach 24 h Behandlung mit BMP2 bzw. WNT3A.

Zur Normalisierung wurde für alle Versuche der Mittelwert der Kontrolle (DMEM) verwendet. n = 3, \pm SEM. Für die statistische Auswertung wurde der t-Student-Test verwendet. * = statistisch signifikant (p-Wert < 0,05); ** = statistisch signifikant (p-Wert < 0,025); *** = statistisch signifikant (p-Wert < 0,0125).

Nach Induktion der DFVs mit BMP2 oder mit WNT3A konnte mittels eines Luciferase-Reporterassays für den Transkriptionsfaktor TCF/LEF1 eine jeweils etwa 50-fache oder 600-fache Erhöhung des Signales im Vergleich zur Kontrolle (DMEM) nachgewiesen werden (siehe Abbildung 17A). Darüber hinaus wurde zu frühen Zeitpunkten der osteogenen Differenzierung die Kernlokalisierung des β -Catenins in

DFVs mit Hilfe der Immunfluoreszenz nachgewiesen. Für das β -Catenin wurde ein spezifischer Antikörper (grün) verwendet, für die Aktinfasern RhodaminePhalloidin (rot) und für die Zellkerne Hoechst 33258 (blau) (siehe Abbildung 17B). Das Fluoreszenzsignal für β -Catenin in DFVs war nach Zugabe des WNT-Signalwegaktivators WNT3A stärker als nach Induktion mit BMP2 (siehe Abbildung 17B). In der Abbildung 17B sind weder mit BMP2 noch mit WNT3A morphologische Veränderungen der DFVs sichtbar.

Darüber hinaus bestätigte sich anhand von Western-Blot-Analysen mit spezifischen Antikörpern für Phospho-GSK3 β (S9), Phospho- β -Catenin(S675), β -Catenin, Lamin A/C (Kontrolle für die Zellkern-Fraktion) und β -Actin als Ladekontrolle, dass sowohl BMP2 als auch WNT3A die Aktivierung, Stabilisierung und Kernlokalisierung von β -Catenin in DFVs induzieren können (siehe Abbildung 17C). BMP2 inhibierte bzw. induzierte die Expression von *FRZB* bzw. *FZD8*. Allerdings modulierte WNT3A diese WNT-Zielgene in der entgegengesetzten Richtung als BMP2 (siehe Abbildung 17D).

4.3.1.1 Einfluss des WNT-Signalweges auf die osteogene Differenzierung in DFVs

In aus Mäusen isolierten DFVs hatte die Aktivierung des WNT-Signalweges eine inhibitorische Wirkung auf die osteogene Differenzierung (Silvério *et al.*, 2011). In dieser Arbeit wurde ähnliches gezeigt: Die Induktion des WNT-Signalweges mit WNT3A (siehe Abbildung 18A, C) oder LiCl (siehe Abbildung 18B) verringerte die ALP-Aktivität in DFVs nach zehn Tagen osteogener Differenzierung mit BMP2 (10 ng/ml oder 50 ng/ml), BMP6, ODM und sogar in mit DMEM kultivierten DFVs. Allerdings führte *Dkk1*, ein Inhibitor des WNT-Signalweges, zu einer deutlichen Erhöhung der ALP-Aktivität in den mit BMP2 induzierten DFVs (siehe Abbildung 18C). Zudem zeigten differenzierte DFVs nach der Behandlung mit WNT3A eine geringere, mit *Dkk1* dagegen eine höhere Mineralisierung (siehe Abbildung 18D). Alle diese Ergebnisse bestätigen die Relevanz des WNT-Signalweges für die Differenzierungsprozesse in DFVs. In Abbildung 18 sind die Ergebnisse zur negativen Wirkung des kanonischen WNT-Signalweges auf die osteogene Differenzierung humaner DFV-Zellen zusammengestellt.

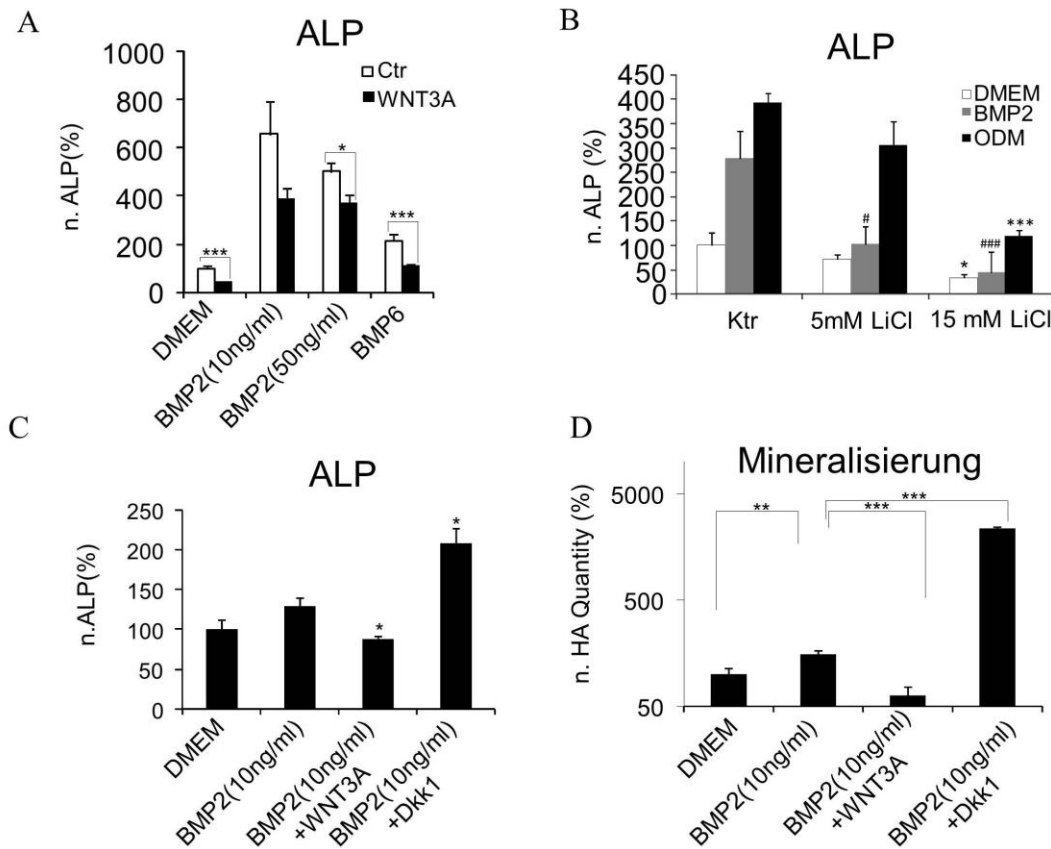


Abbildung 18: Negativer Einfluss des kanonischen WNT-Signalweges auf die osteogene Differenzierung in DFVs. (A),(C) Quantitativer Nachweis der ALP-Aktivität in DFVs nach der Induktion des WNT-Signalweges mit WNT3A, (C) Dkk1 oder (B) LiCl und 10 Tagen osteogener Differenzierung mit BMP2 (10 ng/ml oder 50 ng/ml), BMP6, ODM oder in mit DMEM kultivierten DFVs.

(D) Mineralisierungsanalyse anhand der Quantifizierung des Hydroxylapatits (HA) in DFVs nach 4 Wochen osteogener Induktion mit BMP2 oder BMP2 plus WNT3A bzw. Dkk1.

Zur Normalisierung wurde für alle Versuche der Mittelwert der Kontrolle (DMEM) verwendet. n = 3, ± SEM. Für die statistische Auswertung wurde der t-Student-Test verwendet. *, # oder * = statistisch signifikant (P-Wert < 0,05); ** = statistisch signifikant (P-Wert < 0,025); ***, ### oder *** = statistisch signifikant (P-Wert < 0,0125).

4.3.1.2 BMP2 induziert die Bindung von LEF1 am DLX3 Promotor

Nach 24-stündiger Induktion mit BMP2 war die *DLX3*-Expression in DFVs im Vergleich zur Kontrolle (DMEM) um das 50-fache erhöht, während WNT3A die Expression des *DLX3*-Gens leicht unterdrückte (siehe Abbildung 19A).

Mittels einer Chromatin-Immunopräzipitation wurde die direkte Bindung von LEF1 an die LEF1/TCF-Bindestelle auf dem *DLX3*-Promotor nach Induktion mit BMP2 DFVs nachgewiesen (siehe Abbildung 19B). Diese Bindung wurde allerdings durch WNT3A aufgehoben (siehe Abbildung 19B).

Darüber hinaus deuteten Immunopräzipitationsanalysen auf eine starke Bindung von LEF1 an β -Catenin (siehe Abbildung 19C) und an SMAD4 (siehe Abbildung 19D) hin. Diese Bindung wurde in mit

BMP2 behandelten DFVs induziert, während in DMEM oder in WNT3A allein bzw. zusätzlich mit BMP2 kultivierten DFVs nicht induziert oder sogar unterdrückt wurde (siehe Abbildung 19C, D).

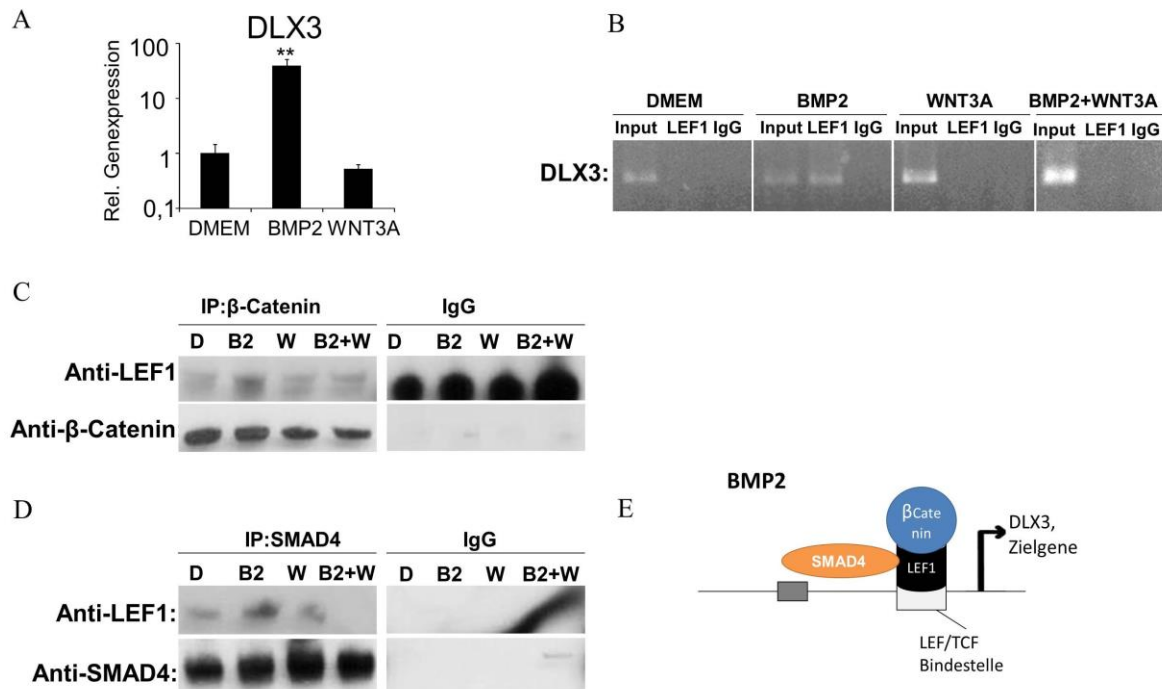


Abbildung 19: BMP2 induziert die DLX3-Expression via β-Actin.

(A) Analyse der *DLX3*-Expression in DFVs mittels RT-qPCR nach 24 h Behandlung mit BMP2 (10 ng/ml) oder WNT3A (25 ng/ml).

Zur Normalisierung wurde der Mittelwert der Kontrolle (DMEM) verwendet. $n = 3. \pm \text{SEM}$. Für die statistische Auswertung wurde der t-Student-Test verwendet. ** = statistisch signifikant (p -Wert $< 0,025$).

(B) Nachweis der Bindung von LEF1 an den *DLX3*-Promotor mittels Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) mit DFVs nach 3 Tagen Behandlung mit DMEM (D), BMP2 (B2) oder/und WNT3A (W). Die DNA wurde mittels PCR unter Verwendung spezifischer Primer für die Bindestelle des *DLX3*-Promotors analysiert.

(C) Immunopräzipitations(IP)-Analysen mit β-Catenin und **(D)** SMAD4 Antikörper und Proteinlysate der DFVs nach 3-tägiger Behandlung mit DMEM (D) oder BMP2 (B2) oder/und WNT3A (W). Das kopräzipitierte Protein LEF1 wurde immunologisch erkannt.

(E) Schematische Darstellung der möglichen Wechselwirkung zwischen SMAD4/LEF1/β-Catenin und der LEF1-Bindestelle des *DLX3*-Promotors nach Induktion mit BMP2.

Zusammenfassend weisen diese Daten auf eine durch BMP2 induzierte Wechselwirkung zwischen dem SMAD4/LEF1/β-Catenin-Komplex und der LEF1-Bindestelle des *DLX3*-Promotors in DFVs hin (siehe Abbildung 19E). Dies ist ein wichtiger Hinweis, auf die Bedeutung des β-Catenin-Signalweges für die Regulation der *DLX3*-Expression in DFVs. Infolgedessen scheint β-Catenin für die Regulation der osteogenen Differenzierung in humanen DFV-Zellen notwendig zu sein.

4.3.1.3 Einfluss des β -Catenins auf die osteogene Differenzierung in DFVs

Silvério *et al.* (2012) berichteten, dass bei Mäusen die Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges die osteogene Differenzierung zwar inhibierte, aber das endogene β -Catenin für die Induktion osteogener Markern wie RUNX2 dennoch eine wichtige Rolle spielte. In Übereinstimmung mit dieser Studie wurde hier gezeigt, dass das mit BMP2 induzierte β -Catenin für die osteogene Differenzierung in humanen DFVs notwendig ist (siehe Abbildung 20), während der kanonische WNT-Signalweg die osteogene Differenzierung in denselben DFV-Zelllinien inhibiert (siehe Abbildung 18).

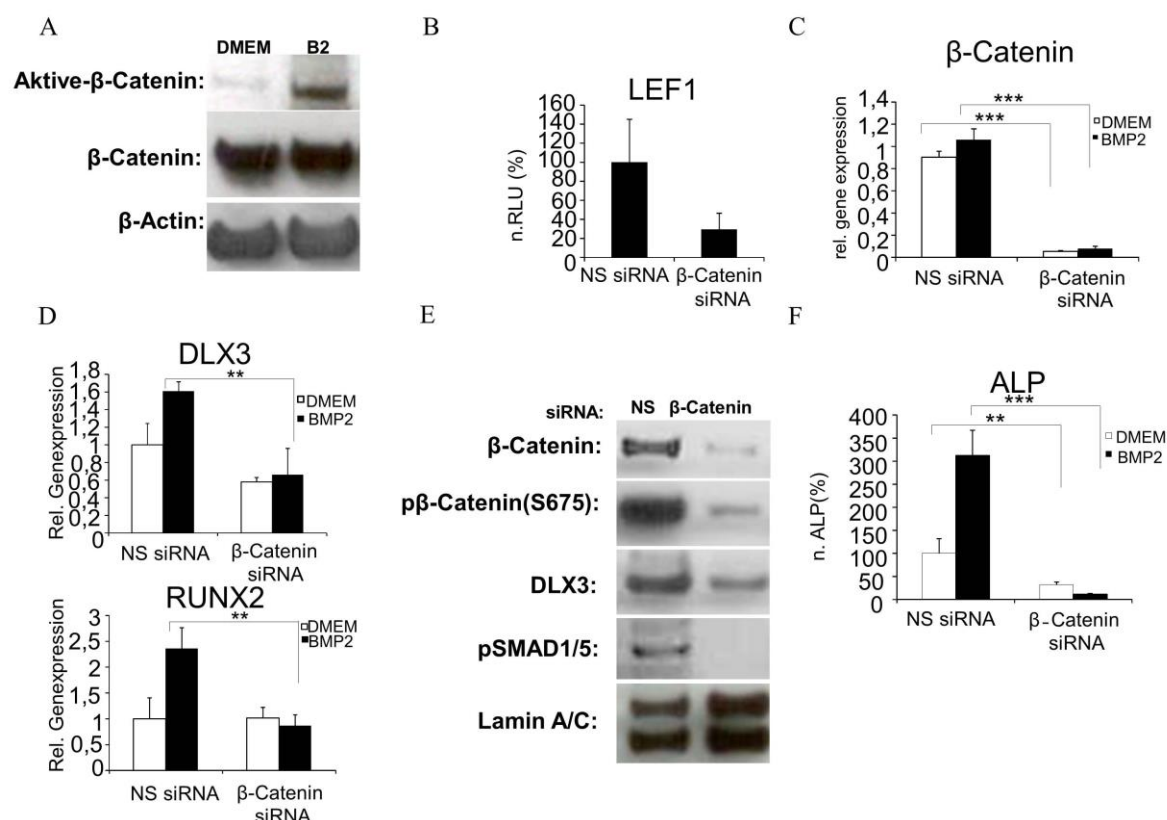


Abbildung 20: Einfluss des BMP2-induzierten β -Catenins auf die osteogene Differenzierung in DFVs.

(A) Western-Blot-Analysen mit Gesamtzelllysat und Antikörpern (AKs) für die Aktivform des β -Catenins, β -Catenin und β -Actin (Ladekontrolle) nach 1-tägiger Induktion mit BMP2 oder in DMEM.

(B) Nachweis der Aktivierung des WNT-Signalweges mittels eines TCF/LEF-Luciferase-Reporterassays nach 24 h Behandlung mit BMP2 (50 ng/ml) und 48 h Kotretransfektion des Reporters mit β -Catenin siRNA.

(C) Analyse der relativen Genexpression von β -Catenin in DFVs mittels RT-qPCR nach 48 h Transfektion mit β -Catenin siRNA oder NS siRNA und 3 Tagen Behandlung mit DMEM oder BMP2.

(D) RT-qPCR von DLX3 und RUNX2 in DFVs nach 48 h Transfektion mit β -Catenin siRNA oder NS siRNA und 3 Tagen Behandlung mit DMEM oder BMP2.

(E) Western-Blot-Analysen mit dem Zellkernlysat und AK für die phosphorylierte Form des β -Catenins (S675), β -Catenin, DLX3, pSMAD1/5 und Lamin A/C (Ladekontrolle) nach 3 Tagen BMP2-induzierter osteogener Differenzierung.

(F) Quantitativer Nachweis der ALP-Aktivität in DFVs nach 48 h β -Catenin Silencing und 10 Tagen Behandlung mit BMP2 oder DMEM.

Zur Normalisierung wurde für alle Versuche der Mittelwert der Kontrolle (Versuch A: NS siRNA in BMP2; Versuchen C, D und F: NS siRNA in DMEM) verwendet. $n = 3$, \pm SEM. Für die statistische Auswertung wurde der t-Student-Test verwendet. ** = statistisch signifikant (p -Wert $< 0,025$); *** = statistisch signifikant (p -Wert $< 0,0125$).

Darüber hinaus wurde die Aktivierung des β -Catenins zu einem frühen Zeitpunkt der mit BMP2 induzierten osteogenen Differenzierung in humanen DFVs untersucht (siehe Abbildung 20A). Weiterhin wurde β -Catenin mit einer spezifischen siRNA in DFVs inhibiert und somit dessen Einfluss auf die osteogene Differenzierung verifiziert (siehe Abbildung 20B – F). Das Ergebnis eines TCF/LEF1 Luciferase-Reporterassays bestätigte die verminderte Aktivität nach β -Catenin-Inhibition in mit BMP2 induzierten DFVs (siehe Abbildung 20B). Durch β -Catenin-Silencing in DFVs und Behandlung mit BMP2 oder DMEM wurde die β -Catenin-Genexpression (siehe Abbildung 20C), die Phosphorylierung des β -Catenins an Serin 675 sowie die Verfügbarkeit von β -Catenin im Zellkern (siehe Abbildung 20E) inhibiert. Zudem wurde die Expression des DLX3 Transkriptionsfaktors nach Inhibition des β -Catenins in mit BMP2 (siehe Abbildung 20D, E) oder mit DMEM (siehe Abbildung 20D) kultivierten DFVs herunterreguliert. Dazu wurde die Phosphorylierung des SMAD1-Proteins nach Transfektion der β -Catenin-siRNA in mit BMP2 für drei Tage osteogen induzierten DFVs verringert (siehe Abbildung 20E). Weiterhin beeinträchtigte die Inhibition des β -Catenin die ALP-Aktivität in mit BMP2 behandelten DFVs (siehe Abbildung 20F).

4.3.1.4 BMP2 induziert β -Catenin durch den PKA-Signalweg

Die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) induziert die Phosphorylierung von β -Catenin an Serin 675. Dadurch wird die β -Catenin-Stabilität und die β -Catenin-Transkriptionsaktivität gefördert (Hino et al., 2005).

Es wurde untersucht, ob BMP2 das β -Catenin über den PKA-Signalweg in DFVs induzieren kann. Mittels eines Western Blots mit einem spezifischen Antikörper für Phospho- β -Catenin(S675) wurde gezeigt, dass BMP2 das β -Catenin an Serin 675 phosphoryliert (siehe Abbildung 21A). Zudem verringerte sich das Phospho- β -Catenin(S675) nach Inaktivierung der PKA-Aktivität mit einem spezifischen Inhibitor für PKA in mit BMP2 behandelten DFVs (siehe Abbildung 21A).

Weiterhin wurde die Aktivierung des PKAs nach BMP2-Behandlung der DFVs mit Hilfe eines nicht-radioaktiven Assays bestätigt (siehe Abbildung 21B). Die PKA-Aktivität wurde dabei sowohl durch den PKA-Inhibitor als auch durch WNT3A unterdrückt (siehe Abbildung 21B). Zudem wurde nachgewiesen, dass WNT3A PKA in mit DMEM kultivierten DFVs nicht aktiviert werden kann (siehe Abbildung 21B).

Darüber hinaus zeigte eine Immunopräzipitation mit einem spezifischen Antikörper für Substrate der PKA-Phosphorylierung, dass in den DFVs nach der Induktion mit BMP2 Kontakte zwischen PKA und β -Catenin entstanden und dadurch die β -Catenin-Phosphorylierung induziert werden konnte. Im Gegensatz dazu induzierte WNT3A die Wechselwirkung zwischen PKA und β -Catenin nicht (siehe Abbildung 21C). Eine mögliche Interaktion von PKA mit phosphoryliertem SMAD1 wurde ebenfalls verworfen (siehe Abbildung 21C).

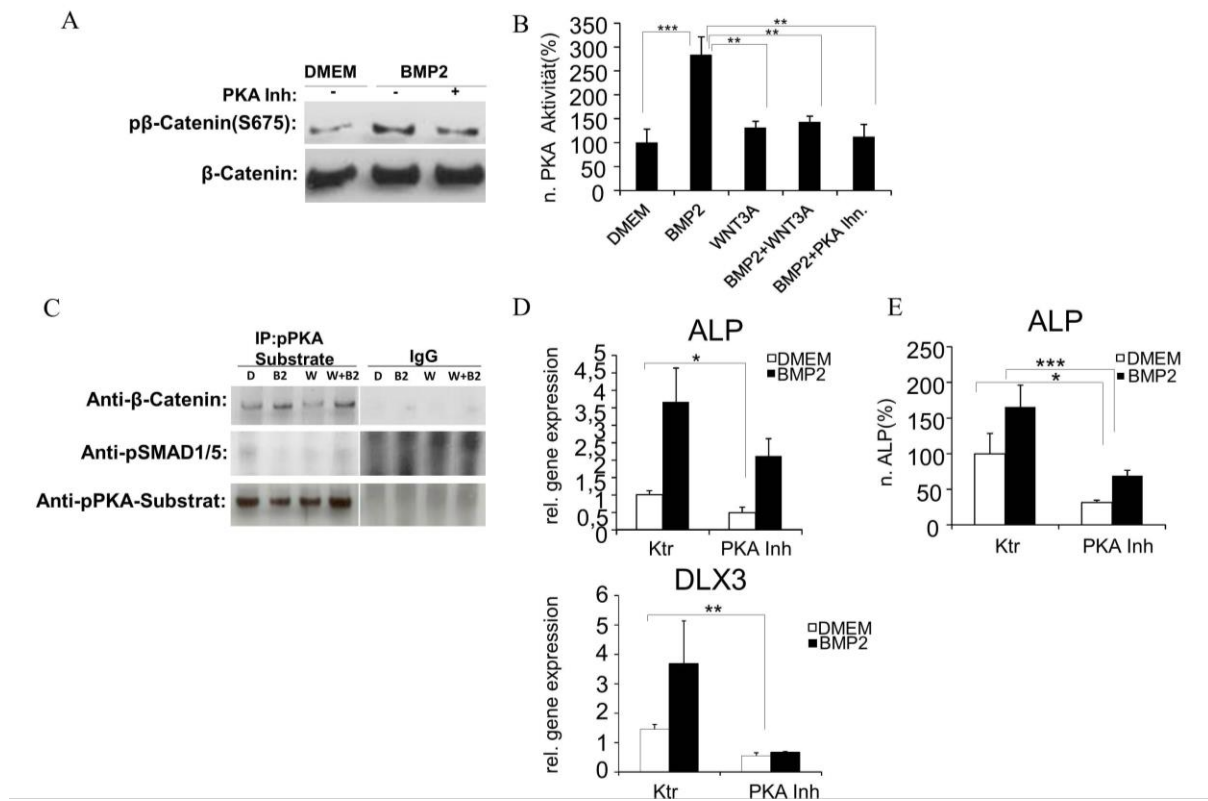


Abbildung 21: Einfluss der Proteinkinase A (PKA) auf die osteogene Differenzierung über β-Catenin.

(A) Western Blots mit einem spezifischen Antikörper für Phospho-β-Catenin (S675) und β-Catenin (Ladekontrolle) mit Gesamtzelllysat nach 6 h Induktion mit BMP2 oder BMP2 und mit einem spezifischen Inhibitor für PKA (PKA Inh) oder DMEM.

(B) Nachweis der Proteinkinase(PKA)-Aktivität nach 3-tägiger Behandlung mit BMP2 und/oder WNT3A, BMP2 und PKA Inh in DFVs.

(C) Die IP-Analyse mit einem spezifischen AK für Substrate der PKA-Phosphorylierung zeigte eine Wechselwirkung zwischen PKA und β-Catenin nach der Induktion mit BMP2 in DFVs. Eine mögliche Interaktion von PKA mit phosphoryliertem SMAD1 wurde ausgeschlossen. Der IgG-AK diente als Negativkontrolle.

(D) Analyse der relativen Genexpression von *ALP* (oben) und *DLX3* (unten) mittels RT-qPCR in DFVs, die für 3 Tage mit BMP2 und/oder dem PKA-Inhibitor induziert worden waren.

(E) Quantitativer Nachweis der ALP-Aktivität in DFVs nach 10-tägiger Behandlung mit BMP2 und/oder PKA-Inhibitor.

Zur Normalisierung wurde für alle Versuche der Mittelwert der jeweiligen Kontrolle (Versuch B: DMEM; Versuch E: NS siRNA in DMEM) verwendet. n = 3, ± SEM. Für die statistische Auswertung wurde der t-Student-Test verwendet.

* = statistisch signifikant (p-Wert < 0,05); ** = statistisch signifikant (p-Wert < 0,025); *** = statistisch signifikant (p-Wert < 0,0125).

Der Einfluss von PKA auf die osteogene Differenzierung in DFVs wurde nach PKA-Inhibition bestimmt (siehe Abbildung 21D, E). Die Hemmung des PKAs mittels des spezifischen Inhibitors für PKA unterdrückte die Expression von ALP und DLX3 in Zellen, die mit BMP2 induziert worden waren und ebenso die DLX3-Expression in DFVs, die im Kontrollmedium (DMEM) kultiviert worden waren (siehe Abbildung 21D). Darüber hinaus wurde die ALP-Aktivität nach PKA-Inhibition in DFVs, die in DMEM oder BMP2 enthaltendem Medium kultiviert worden waren, beeinträchtigt (siehe Abbildung 21E).

4.3.1.5 DLX3 induziert den WNT/ β -Catenin-Signalweg in DFVs

Ähnlich wie BMP2 und WNT3A induzierte die Überexpression des DLX3 Transkriptionsfaktors die Aktivität des TCF/LEF-Promotors in DFVs (siehe Abbildung 22A). Dazu waren nach DLX3-Überexpression in DFVs die Phospho- β -Catenin (S675) und die aktive Form des β -Catenins nach einem Tag osteogener Differenzierung im Vergleich zur Kontrolle (pEV) ohne (DMEM) oder mit BMP2 erhöht (siehe Abbildung 22B).

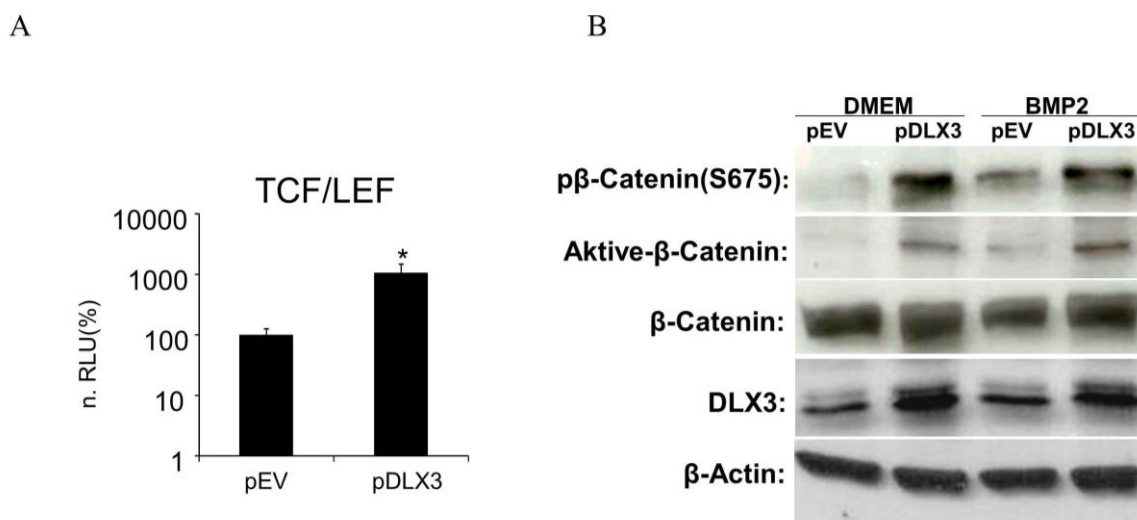


Abbildung 22: Aktivierung des WNT/ β -Catenin-Signalweges über DLX3.

(A) Nachweis der Aktivierung des WNT-Signalweges mittels eines TCF/LEF-Luciferase-Reporterassays nach 48 h Kotransfektion des Reporters mit dem DLX3-Plasmid pDLX3 oder dem Kontrollplasmid pEV.

Zur Normalisierung wurde der Mittelwert der Kontrolle (pEV) verwendet. n = 3, \pm SEM. Für die statistische Auswertung wurde der t-Student-Test verwendet. * = statistisch signifikant (p-Wert < 0,05).

(B) Western-Blot-Analysen mit dem Gesamtzelllysat und den AK für die phosphorylierte Form des β -Catenins (S675), β -Catenin, β -Catenin (Aktivform), DLX3 und β -Actin (Ladekontrolle) nach 48 h Transfektion mit pDLX3 oder pEV und 1-tägiger Behandlung mit BMP2 oder DMEM.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass DLX3 in Kombination mit BMP2 den WNT/ β -Catenin-Signalweg additiv aktiviert. Nach DLX3-Überexpression in mit BMP2 induzierten DFVs wurden u. a. die WNT-Zielgene MYC und APCDD1 signifikant hochreguliert (siehe Abbildung 16A, B; Tabelle 3 im

Anhang). Die Bedeutung des WNT-Targets APCDD1 für die osteogene Differenzierung in DFVs wurde näher untersucht.

4.3.1.6 APCDD1 moduliert die osteogene Differenzierung in DFVs

APCDD1 wird transkriptionell durch den β -Catenin/TCF4-Proteinkomplex in menschlichen Tumorzellen reguliert (Takashi *et al.* 2002; Zirn *et al.*, 2006). Die Funktion des APCDD1s in DFVs wurde nach Inhibition mit spezifischen siRNAs (# 1 und # 4) (siehe Abbildung 23A, B) untersucht.

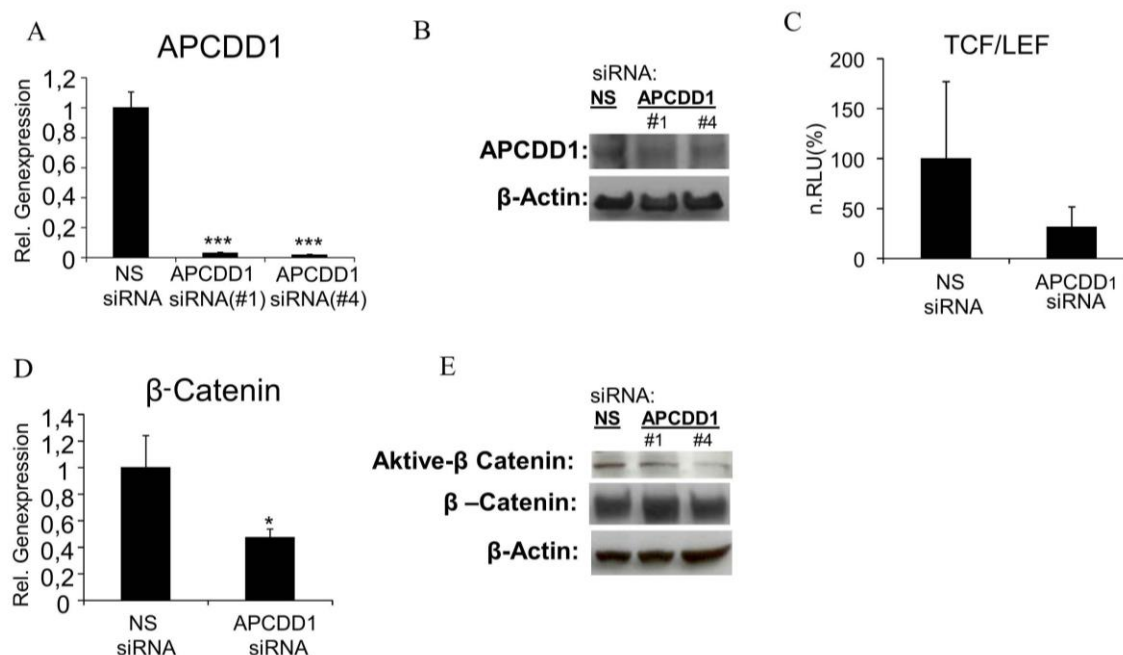


Abbildung 23: Einfluss von APCDD1 auf den WNT-Signalweg in DFVs.

(A) RT-qPCR-Analyse der Inhibition von APCDD1 nach 48 h Transfektion mit APCDD1 siRNA (# 1 oder # 4) oder NS siRNA. (B) Western-Blot-Analyse mit DFVs nach 72 h Transfektion mit APCDD1 siRNA (# 1 oder # 4) oder NS siRNA und Antikörpern (AK) für APCDD1 und β -Actin (Ladekontrolle). (C) Nachweis der Aktivierung des WNT-Signalweges mittels eines TCF/LEF-Luciferase-Reporterassays nach 48 h Koftransfektion des Reporters mit APCDD1 siRNA.

(D) RT-qPCR-Analyse von β -Catenin nach 48 h APCDD1-Silencing.

(E) Western-Blot-Analyse mit dem Gesamtzelllysat und spezifischen AK für die von β -Catenin (Aktivform), β -Catenin und β -Actin (Ladekontrolle) nach 72 h Transfektion mit APCDD1 siRNA (# 1 oder # 4) oder NS siRNA durchgeführt. Zur Normalisierung wurde für alle Versuche der Mittelwert der Kontrolle (NS siRNA) verwendet. $n=3$, \pm SEM. Für die statistische Auswertung wurde der t-Student-Test verwendet. *= statistisch signifikant (p -Wert $< 0,05$); *** = statistisch signifikant (p -Wert $< 0,0125$).

Shimomura *et al.* (2010) haben APCDD1 erstmalig als einen Inhibitor des WNT-Signalweges nachgewiesen. Eine autosomale-dominante Mutation in APCDD1 führt zu Haarausfall (Hypotrichosis-Simplex) (Shimomura *et al.*, 2010). Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen, wurde in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen, dass APCDD1 den Wnt/ β -Catenin-Signalweg positiv induziert und die Expression des β -Catenins reguliert. Wie ein Luciferse-Reporter-Assay zeigte, sank die TCF/LEF-Aktivität nach der APCDD1-Inhibition in DFVs (siehe Abbildung 23C). Darüber hinaus wurde die β -Catenin-Genexpression

(siehe Abbildung 23D) sowie die β -Catenin-Aktivierung (siehe Abbildung 23E) nach dem APCDD1-Silencing in DFVs inhibiert.

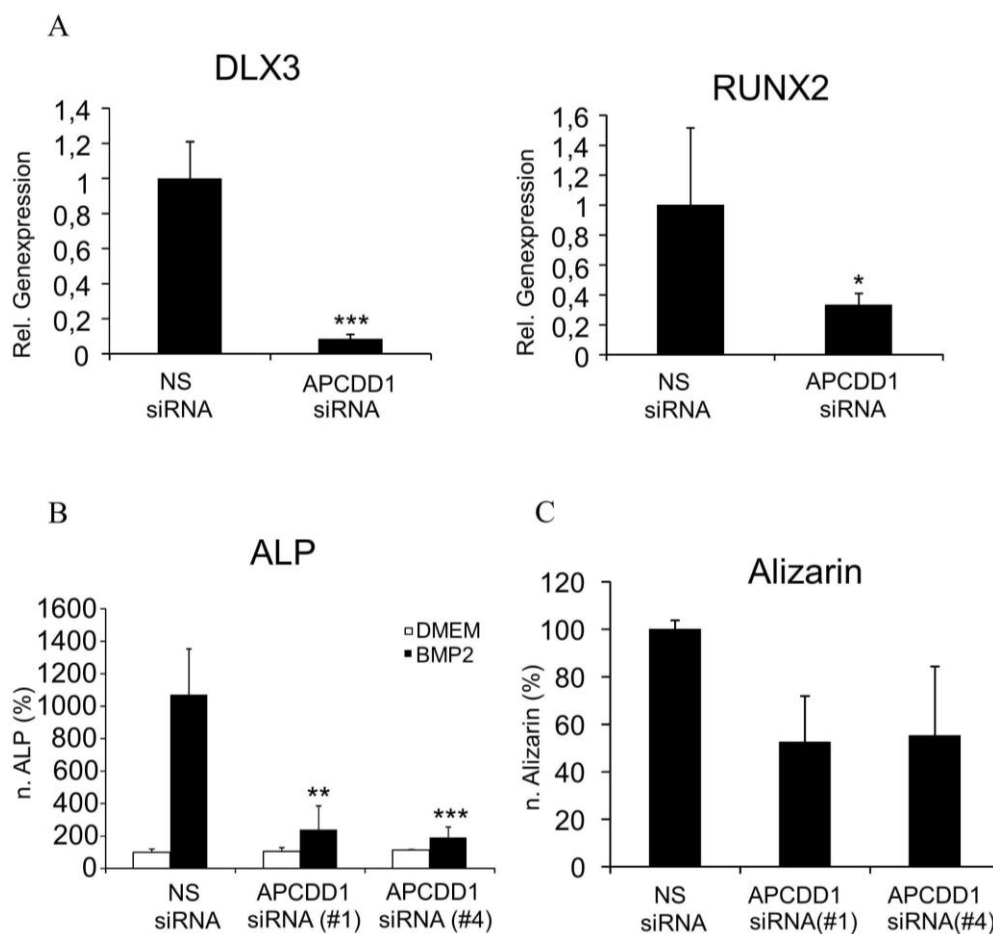


Abbildung 24: Einfluss von APCDD1 auf die osteogene Differenzierung in DFVs.

(A) RT-qPCR zur Bestimmung der relativen DLX3- und RUNX2-Genexpression nach 48 h Transfektion der APCDD1 siRNA(# 4) in DFVs.

(B) Bestimmung der ALP-Aktivität nach Inhibition des APCDD1s mit zwei unterschiedlichen siRNAs (# 1 und # 4) und einer 10-tägigen Behandlung mit DMEM oder BMP2 .

(C) Quantifizierung der Mineralisierung mittels Alizarin-Red-Färbung nach Inhibition des APCDD1s mit zwei unterschiedlichen siRNAs (# 1 und # 4) und nach 5 Wochen osteogener Differenzierung mit BMP2. Zur Normalisierung wurde für alle Versuche der Mittelwert der Kontrolle (Versuche A und B: NS siRNA in DMEM Versuch C: NS siRNA in BMP2) verwendet. n = 3, \pm SEM. Für die statistische Auswertung wurde der t-Student-Test verwendet. * = statistisch signifikant (p-Wert <0,05); ** = statistisch signifikant (p-Wert < 0,025); *** = statistisch signifikant (p-Wert < 0,0125).

Das APCDD1-Silencing wies auch die Bedeutung von APCDD1 für die osteogene Differenzierung in DFVs nach (siehe Abbildung 24). Nach Transfektion der APCDD1 siRNA (# 4) in DFVs wurde die DLX3- und RUNX2-Genexpression herunterreguliert (siehe Abbildung 24A). Die Inhibition des APCDD1 mit zwei unterschiedlichen siRNAs (# 1 und # 4) induzierte auch eine Abnahme der ALP-Aktivität (siehe Abbildung 24B) und der Mineralisierung (siehe Abbildung 24C) in den mit BMP2 behandelten DFVs.

4.3.2 NOTCH-Signalweg

Der NOTCH-Signalweg ist für die Aufrechterhaltung des Zellschicksal sowie des undifferenzierten Zustands der Zelle zuständig (Lardelli, 1995). NOTCH1 wurde für DFVs als spezifischer Marker für Stammzellen etabliert.

In den Vorarbeiten für diese Promotion wurde eine differenzielle Expression von Genen des NOTCH1-Signalweges während der osteogenen Differenzierung nachgewiesen (Morsczeck *et al.*, 2006). Darüber hinaus wurden mit einer Microarray-Analyse nach DLX3-Überexpression in DFVs hochregulierte Gene wie *HES1* gefunden, die im NOTCH-Signalweg beteiligt sind (Viale-Bouroncle *et al.*, 2012). Dieses Ergebnis wurde in der vorliegenden Arbeit bestätigt (siehe Abbildung 25A). Darüber hinaus wurde eine Erhöhung der Expression von NOTCH1 und NICD (die gespaltene Form von NOTCH1, g-NOTCH1) nach DLX3-Überexpression in DFVs gezeigt (siehe Abbildung 25B). Zudem wurde nach DLX3-Überexpression und osteogener Induktion mit BMP2 gezeigt, dass *DTX4*, ebenfalls ein Gen des NOTCH-Signalweges, in DFVs herunterreguliert wurde (siehe Tabelle 2 im Anhang). Eine Aktivierung des NOTCH-Signalweges wurde ebenfalls nach Induktion mit BMP2 oder ODM der osteogenen Differenzierung in DFVs nachgewiesen (siehe Abbildung 25C).

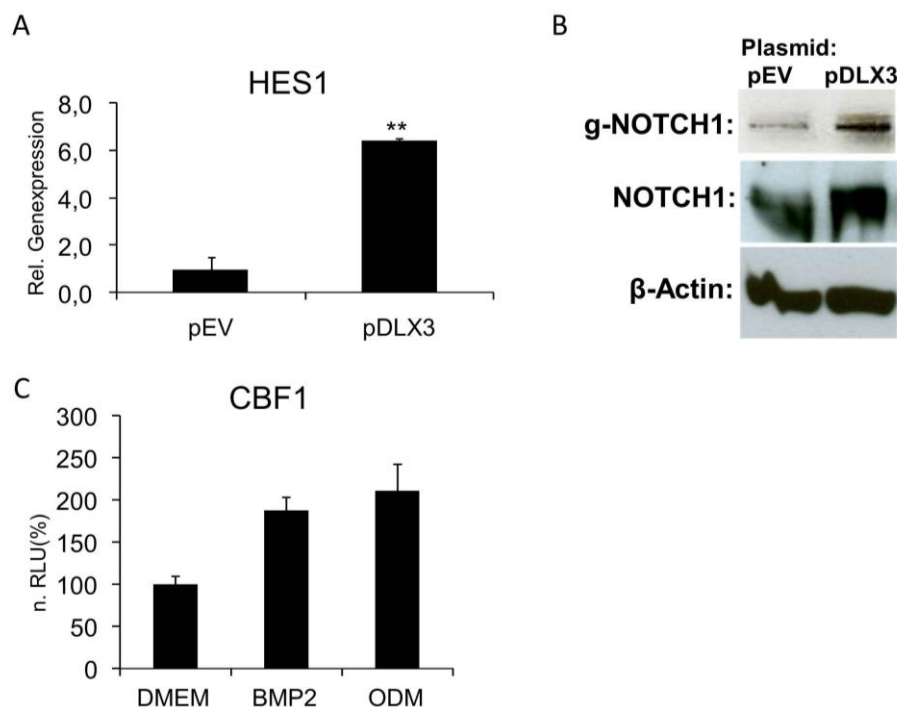


Abbildung 25: DLX3 induziert den NOTCH-Signalweg.

(A) RT-qPCR zur Bestimmung der relativen Genexpression von *HES1* nach 48 h Transfektion mit dem DLX3-Plasmid pDLX3 oder pEV in DFVs.

(B) Western-Blot-Analyse mit dem Gesamtzelllysat und spezifischen Antikörpern für die gespaltene Form von NOTCH1 (g-NOTCH1), NOTCH1 und β-Actin (Ladekontrolle) nach 72 h Transfektion mit pDLX3 oder pEV in DFVs.

(C) Nachweis der Aktivierung des NOCTH-Signalweges mittels eines CBF1-Luciferase-Assays nach 24 h osteogener Induktion mit BMP2 oder ODM.

Zur Normalisierung wurde für alle Versuche der Mittelwert der Kontrolle (Versuch A: pEV; Versuch B: DMEM) verwendet. n = 3, ± SEM. Für die statistische Auswertung wurde der t-Student-Test verwendet. ** = statistisch signifikant (p-Wert < 0,025).

4.3.2.1 Einfluss des NOTCH-Signalweges auf die osteogene Differenzierung in DFVs

Um den Einfluss des NOTCH-Signalweges auf die Differenzierung in DFVs näher zu untersuchen, wurde der NOTCH-Signalweg nach Überexpression der NICD (mit einem NICD-Plasmid, pTAN1) in DFVs induziert. Die Transfektion von NICD in DFVs war erfolgreich und demzufolge konnte der NOTCH-Signalweg stark induziert werden (siehe Abbildungen 26 und 27A).

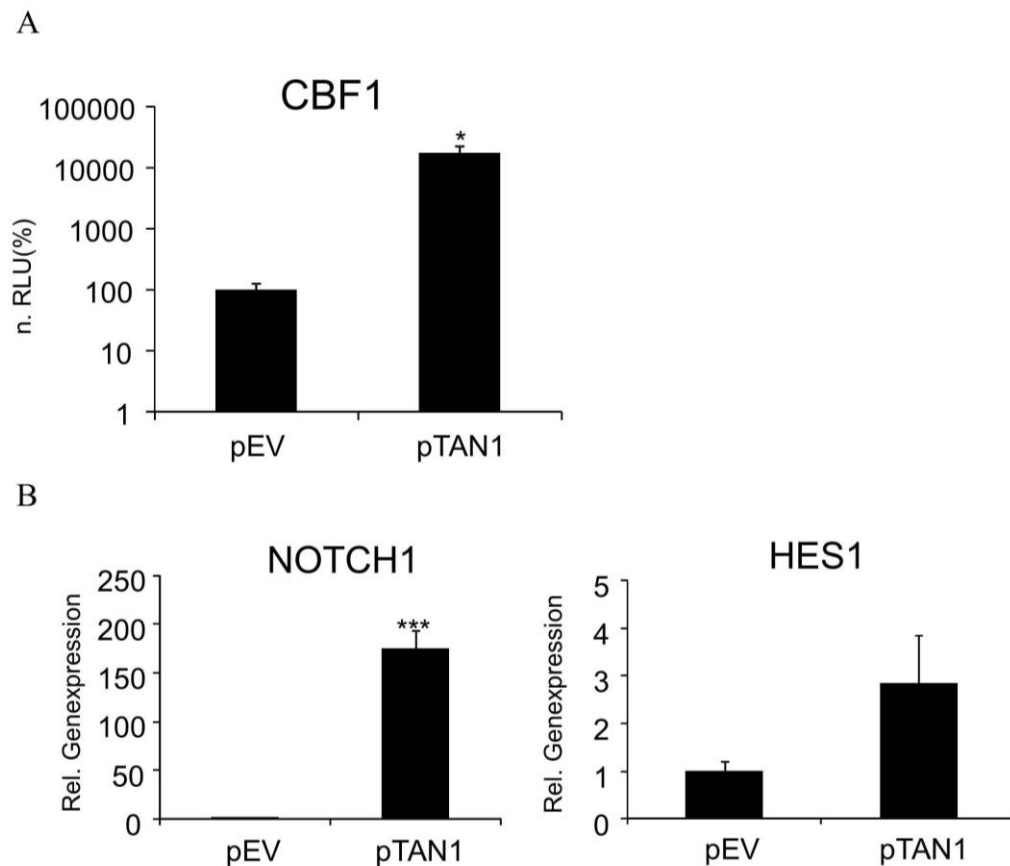


Abbildung 26: Induktion des NOTCH-Signalweges in DFVs.

(A) Nachweis der Aktivierung des NOTCH-Signalweges mittels eines CBF1-Luciferase-Reporterassays nach 48 h Kotransfektion des Reporters mit dem intrazelluläre Domäne von NOTCH (NICD1)-Plasmid pTAN1 oder dem Kontrollplasmid pEV in DFVs.

(B) RT-qPCR zur Bestimmung der relativen Genexpression von *NOTCH1* und *HES1* nach 48 h Transfektion von pTAN1 oder pEV in DFVs.

Zur Normalisierung wurde für alle Versuche der Mittelwert der Kontrolle (pEV) verwendet. n = 3, ± SEM. Für die statistische Auswertung wurde der t-Student-Test verwendet. * = statistisch signifikant (p-Wert <0,05); *** = statistisch signifikant (p-Wert < 0,0125).

Anschließend wurde die Wirkung des NOTCH-Signalweges auf die Regulation des BMP2/DLX3-Signalweges sowie der osteogenen Differenzierung untersucht. Nach Transfektion des NICD1-Plasmides pTAN1 in DFVs wurden die Inhibition der SMAD1-Phosphorylierung und eine Abnahme der *DLX3*-Genexpression beobachtet (siehe Abbildung 27A, B). Die Quantifizierung der ALP-Aktivität (siehe

Abbildung 27A) und Alizarin-Red-Färbung (siehe Abbildung 28B) bestätigten den negativen Einfluss des NOTCH-Signalweges auf die osteogene Differenzierung in DFVs.

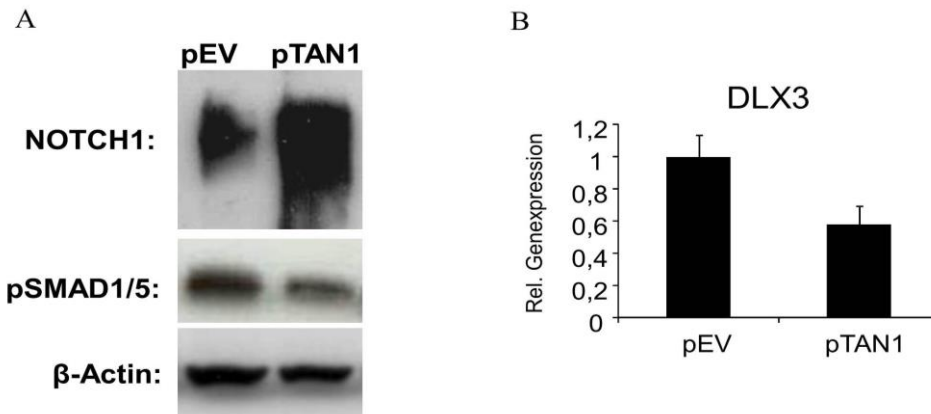


Abbildung 27: Negativer Einfluss des NOTCH-Signalweges auf den BMP2/DLX3-Signalweg.

(A) Western-Blot-Analyse mit dem Gesamtzelllysat von DFVs nach 72 h Überexpression mit dem NICD1-Plasmid (pTAN1), dem Kontrollplasmid und spezifischen Antikörpern für NOTCH1, für die phosphorylierte Form von SMAD1/5 und β-Actin (Ladekontrolle).

(B) Analyse der relativen *DLX3*-Genexpression mittels RT-qPCR nach 48 h Transfektion von pTAN1 oder pEV in DFVs.

Zur Normalisierung wurde der Mittelwert der Kontrolle (pEV) verwendet. n = 3, ± SEM.

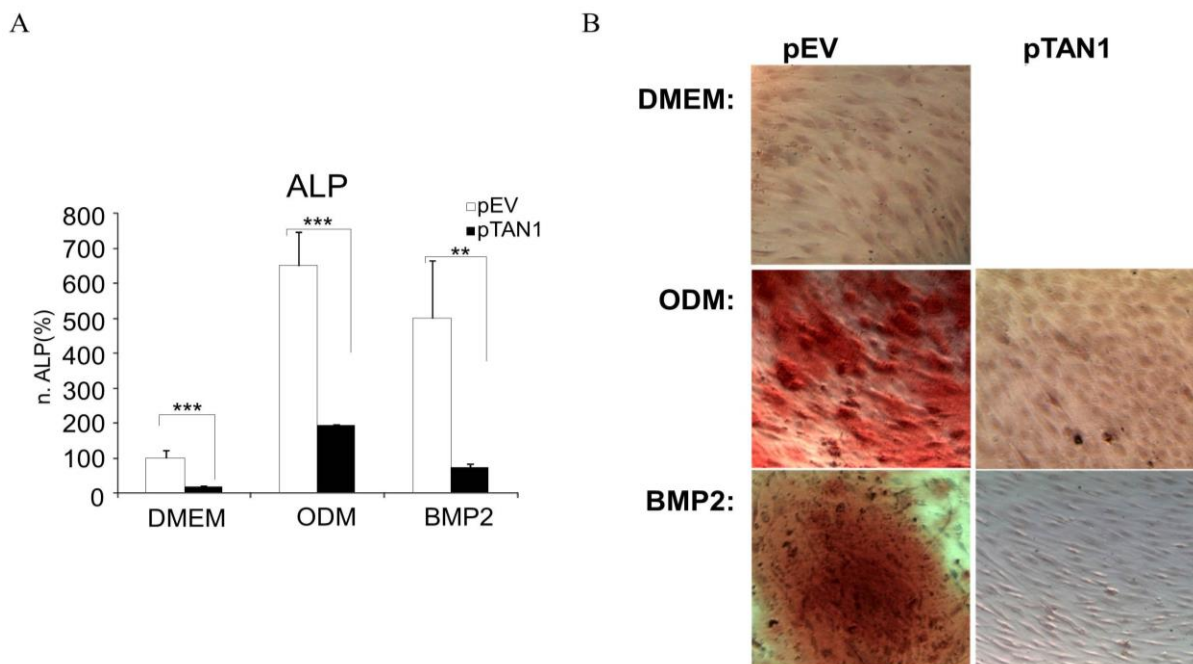


Abbildung 28: Einfluss des NOTCH-Signalweges auf die osteogene Differenzierung in DFVs.

(A) Bestimmung der ALP-Aktivität nach Aktivierung des NOTCH-Signalweges mittels Transfektion des NICD1-Plasmins (pTAN1) und nach Induktion der osteogenen Differenzierung mit ODM (10 % FBS) oder BMP2. Nach 10 Tagen wurde die ALP-Aktivität nachgewiesen.

Zur Normalisierung wurde der Mittelwert der Kontrolle (pEV in DMEM) verwendet. n = 3, ± SEM. Für die statistische Auswertung wurde der t-Student-Test verwendet. ** = statistisch signifikant (p-Wert < 0,025); *** = statistisch signifikant (p-Wert < 0,0125).

(B) Qualitativer Nachweis der Mineralisierung mittels Alizarin-Rot-Färbung nach 5-wöchiger osteogener Differenzierung.

4.3.3 Einfluss des extrazellulären Matrix/fokaler Adhäsionskinase-Signalweges auf die Differenzierung in DFVs

In früheren Arbeiten sowie in Vorarbeiten zu dieser Doktorarbeit wurde bereits eine differenzielle Expression von EZM-Molekülen wie Kollagen I, Laminin und Integrin nach osteogener Induktion sowie DLX3-Überexpression in DFVs nachgewiesen (Morsczeck *et al.*, 2009; Viale-Bouroncle *et al.*, 2012). Die Microarray-Analyse von DLX3/BMP2-induzierten DFVs zeigte, dass DLX3 Gene induziert, die mit dem fokalen Adhäsionskinase-Signalweg assoziiert sind (siehe Tabelle 3 im Anhang). Gene wie *COL1A1*, *COL14A1* und *LAMA2* waren signifikant hochreguliert, während Gene wie *ITGA2* signifikant herunterreguliert wurden (siehe Tabelle 1 und 2 im Anhang). Zudem wurde das Kollagenprotein, *Koll I* nach DLX3-Überexpression und osteogener Induktion mit BMP2 hochreguliert und nach DLX3-Silencing herunterreguliert (siehe Abbildung 29A).

Anhand von Western Blots mit einem spezifischen Antikörper für Koll I und β -Actin als Ladekontrolle konnte eine differenzielle Expression des Koll I Proteins während der osteogenen Differenzierung in DFVs nachgewiesen werden (siehe Abbildung 29B, C). Koll I war am Tag 1 der osteogenen Differenzierung mit ODM in DFVs hochreguliert, während es am Tag 14 in allen Zellkulturmedien (DMEM = Ktr, BMP2 und ODM) stark induziert war (siehe Abbildung 29B). Weiterhin erhöhte sich die endogene Koll-I-Expression in auf Koll I kultivierten DFVs mit DMEM oder ODM (siehe Abbildung 29C). Nach Störung der fokalen Adhäsion durch einen spezifischen Inhibitor für FAK (PF) wurde sie allerdings inhibiert (siehe Abbildung 29C).

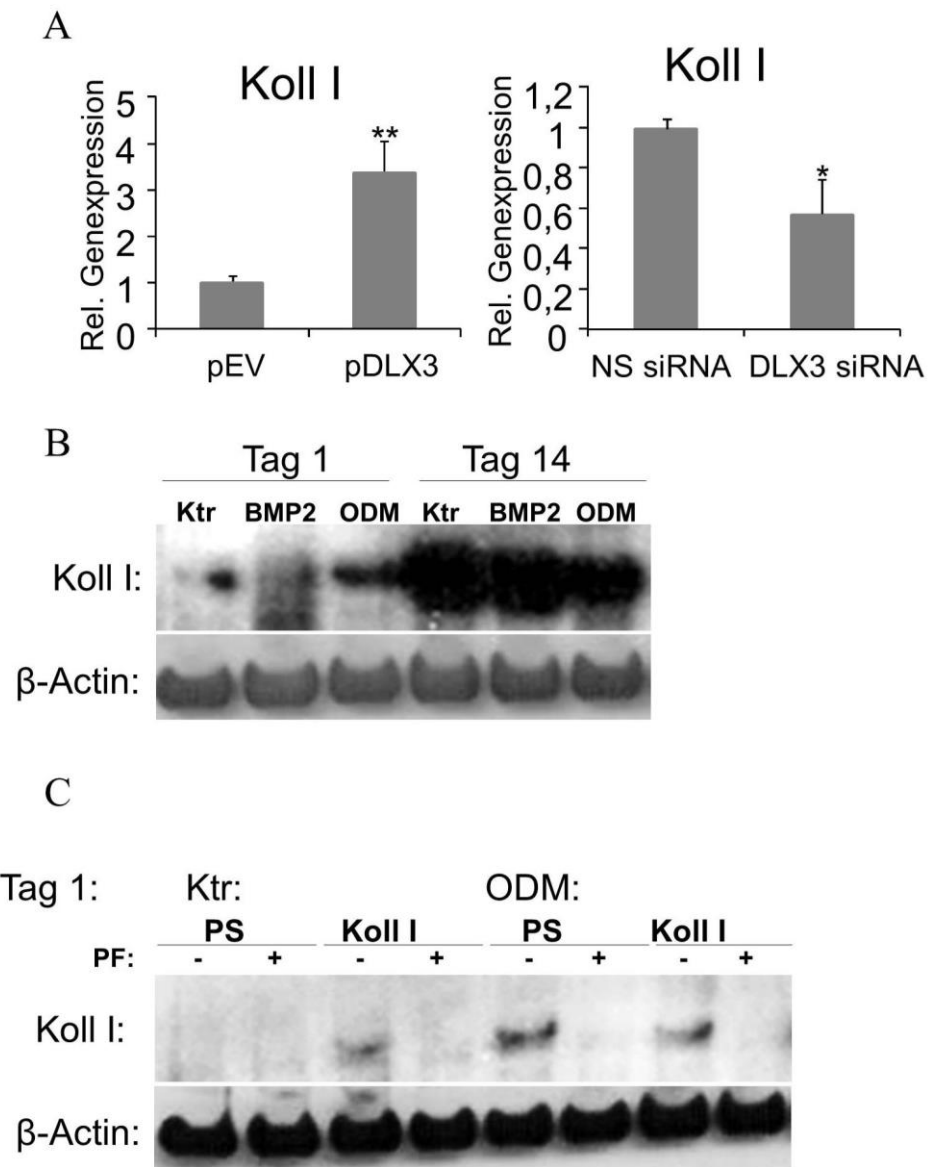


Abbildung 29: Expression von Kollagen I während der osteogenen Differenzierung.

(A) Analyse der relativen Genexpression von Kollagen I (Koll I) mittels RT-qPCR nach 48 h Transfektion mit dem DLX3-Plasmid pDLX3 oder dem Kontrollplasmid pEV bzw. DLX3 siRNA oder NS siRNA und drei Tagen osteogener Differenzierung mit BMP2.

Zur Normalisierung wurde der Mittelwert der Kontrolle (pEV oder NS siRNA) verwendet. $n = 3$, \pm SEM. Für die statistische Auswertung wurde der t-Student-Test verwendet. * = statistisch signifikant (p -Wert $< 0,05$); ** = statistisch signifikant (p -Wert $< 0,025$).

(B) Western-Blot-Analysen mit spezifischen AK für Koll I und β -Actin (Ladekontrolle) und Gesamtzelllysate nach 1 und 14 Tagen osteogener Differenzierung mit BMP2, ODM oder in DMEM (Ktr).

(C) Nachweis der endogenen Koll-I-Expression in auf Koll I kultivierten DFVs mit ODM und/oder mit einem spezifischen Inhibitor für FAK (PF).

Eine differenzielle Expression der Laminine wurde ebenfalls am Tag 1 und 14 der osteogenen Differenzierung in DFVs gezeigt (siehe Abbildung 30A). Zu einem früheren Zeitpunkt der Differenzierung wurde Laminin nur durch BMP2 induziert, während die Expression durch ODM am Tag 14 am stärksten hochreguliert war (siehe Abbildung 30A).

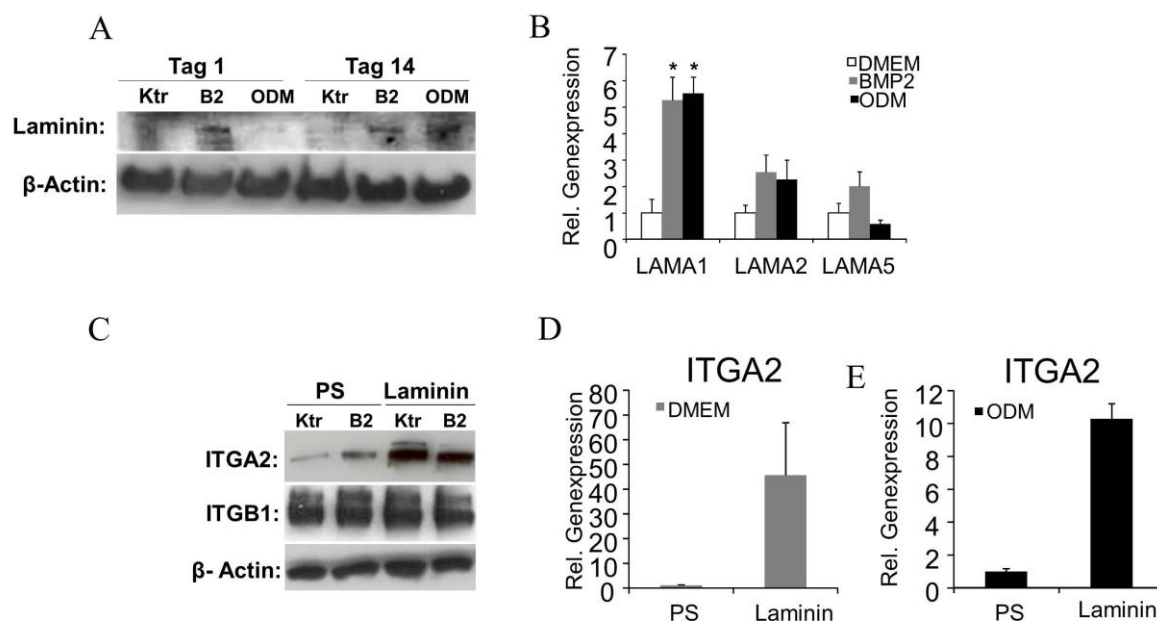


Abbildung 30: Expression von Laminin, Integrin- alpha 2 und -beta 1 während der osteogenen Differenzierung.

(A) Western-Blot-Analysen mit spezifischen Antikörpern (AK) für Laminin und β -Actin (Ladekontrolle) und Gesamtzelllysat am Tag 1 und 14 der osteogenen Differenzierung in DMEM (Ktr), BMP2 (B2) oder ODM.

(B) RT-qPCR-Analyse der relativen Genexpression der Laminin-Untereinheiten *LAMA1*, *LAMA2* und *LAMA5* nach 10 Tagen osteogener Induktion mit BMP2, ODM (1 % FBS) oder in DMEM.

(C) Western Blot mit einem spezifischen AK für Integrin- alpha 2 (ITGA2), -beta 1 (ITGB1) und β -Actin (Ladekontrolle) nach einem Tag Kultivierung der DFVs auf Laminin bzw. Kunststoff-Oberflächen (PS) mit BMP2 (B2) oder mit DMEM (Ktr).

(D) RT-qPCR-Analyse der relativen Genexpression von Integrin-alpha 2 (*ITGA*) nach einem Tag Kultivierung in DMEM (E) oder in ODM (1 % FBS) auf Laminin bzw. Kunststoff-Oberflächen (PS).

Zur Normalisierung wurde der Mittelwert der Kontrolle (Versuch B: DMEM; Versuche D und E: PS) verwendet. $n = 3$, \pm SEM. Für die statistische Auswertung wurde der t-Student-Test verwendet. * = statistisch signifikant (p -Wert $< 0,05$).*** = statistisch signifikant (p -Wert $< 0,0125$).

Zudem wurde die Genexpression der Laminin-Untereinheiten *LAMA1*, *LAMA2* und *LAMA5* in für 10 Tage mit BMP2 induzierten DFVs hochreguliert (siehe Abbildung 30B). In mit ODM induzierten DFVs war die Expression von *LAMA1* und *LAMA2* ebenfalls erhöht (siehe Abbildung 30B).

Darüber hinaus wurde mittels Western-Blot- und RT-qPCR-Analysen die Expression des EZM-Rezeptors, ITGA2 in auf Laminin kultivierten DFVs nach osteogener Differenzierung untersucht (siehe Abbildung 30C, D). Die Expression war sowohl mit dem Kontrollmedium (DMEM) als auch mit BMP2 (siehe Abbildung 30C, D) und ODM (siehe Abbildung 30E) stärker als in den auf Plastikoberflächen kultivierten DFVs.

Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurden Immunoblots mit Zelllysaten aus drei verschiedenen DFVs-Isolierungen durchgeführt. Anschließend wurden die Intensitätssignale mittels des ImageJ Programms quantifiziert. Der Mittelwert der auf β -Actin kalibrierten Intensitätssignale (Daten hier nicht gezeigt, siehe

dafür Viale-Bouroncle *et al.*, 2014). stimmte mit den Ergebnissen des repräsentativen Western Blots überein (siehe Abbildung 30A, C).

Um die Funktion und die regulatorischen Mechanismen der EZM-Moleküle Koll I und des gesamten Laminins bei der osteogenen Differenzierung zu klären, wurden diese in DFVs näher untersucht.

4.3.3.1 Einfluss der EZM-Proteine Kollagen I und Laminin auf die Adhäsion und Proliferation

Nach Kultivierung der DFVs auf mit Koll I oder Laminin beschichteten Zellkulturoberflächen wurde die Zelladhäsion mittels Fluoreszenz-Mikroskopie ausgewertet und die Zellproliferation/-vitalität mit dem WST1-Test gemessen (siehe Abbildung 31). Die Adhäsion der DFVs auf Laminin war ähnlich wie DFVs auf der Standard-Zellkulturoberfläche (Kontrolle, Ktr; siehe Abbildung 31C). Die Zellen waren jedoch kleiner und zeigten eine signifikant verminderte Proliferation bzw. Vitalität (siehe Abbildung 31A, B, D). Koll I hingegen unterstützte sowohl die Adhäsion (siehe Abbildung 31C, D) als auch die Proliferation/Vitalität (siehe Abbildung 31A, B, D) der DFVs.

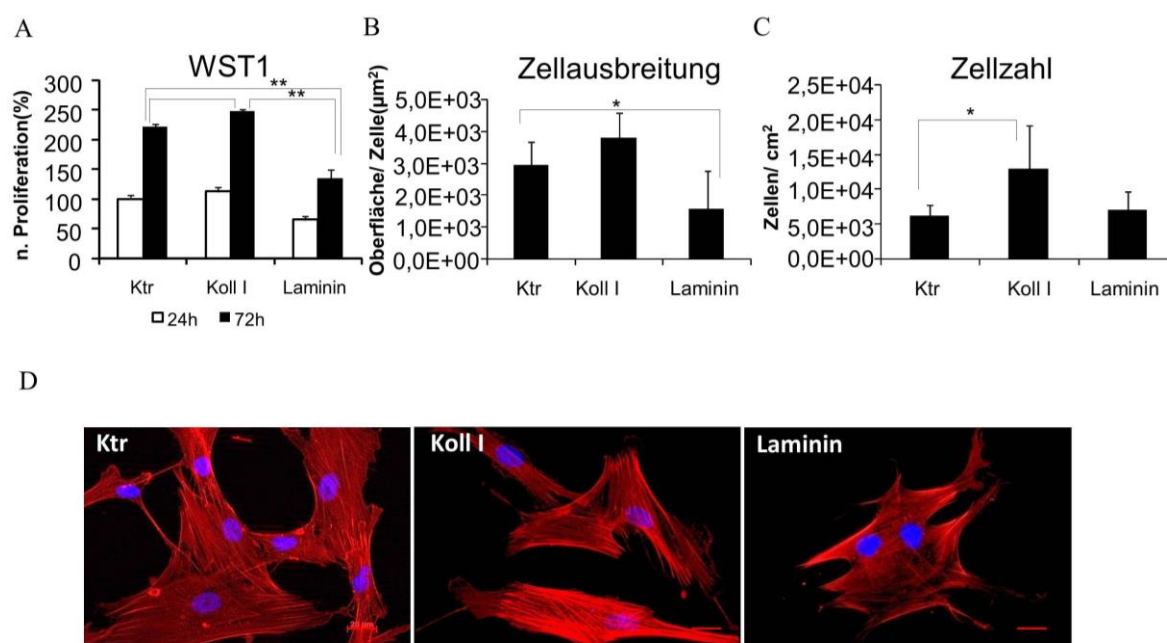


Abbildung 31: Adhäsion und Proliferation/Vitalität der auf Kollagen I bzw. Laminin kultivierten DFVs.

(A) Die Proliferation/Vitalität der auf Kollagen I (Koll I) oder Laminin kultivierten DFVs wurde mittels des WST-Tests nach 24 h und 72 h bestimmt.

Zur Normalisierung (= 100 %) wurden die ermittelten Werte durch den Mittelwert des 24-stündigen Kontrollwertes (Ktr) dividiert.

(B) Die Adhäsion der DFVs der auf Koll I oder Laminin kultivierten DFVs wurde nach 8 h anhand der Zellausbreitung und (C) Zellanzahl gemessen. n = 4, ± SEM.

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem t-Student-Test. * = statistisch signifikant (p-Wert < 0,05); ** = statistisch signifikant (p-Wert < 0,025).

(D) Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Bilder der DFVs auf mit Koll I oder Laminin beschichteten Zellkultur-oberflächen bzw. auf der Kontrolloberfläche. Standardbalken: 50 µm.

4.3.3.2 Kollagen I induziert die Expression früherer osteogenen Markern

Kollagen I stellt den Hauptbestandteil der organischen Komponenten der EZM im Knochen dar (Clarke, 2008).

Es wurde gezeigt, dass Koll I die Genexpression sowie die Aktivität des frühen osteogenen Markers ALP in DFVs induziert, die mit ODM (siehe Abbildung 32A, C) oder sogar mit DMEM (siehe Abbildung 32B, C) kultiviert worden waren. Die Expression des osteogenen Markers OPN wurde auch in mit ODM (siehe Abbildung 32A) sowie DMEM (siehe Abbildung 32B) auf Koll I kultivierten DFVs hochreguliert. Die Matrixmineralisierung in DFVs wurde durch Koll I hingegen nicht unterstützt, sondern sogar leicht inhibiert (siehe Abbildung 32D).

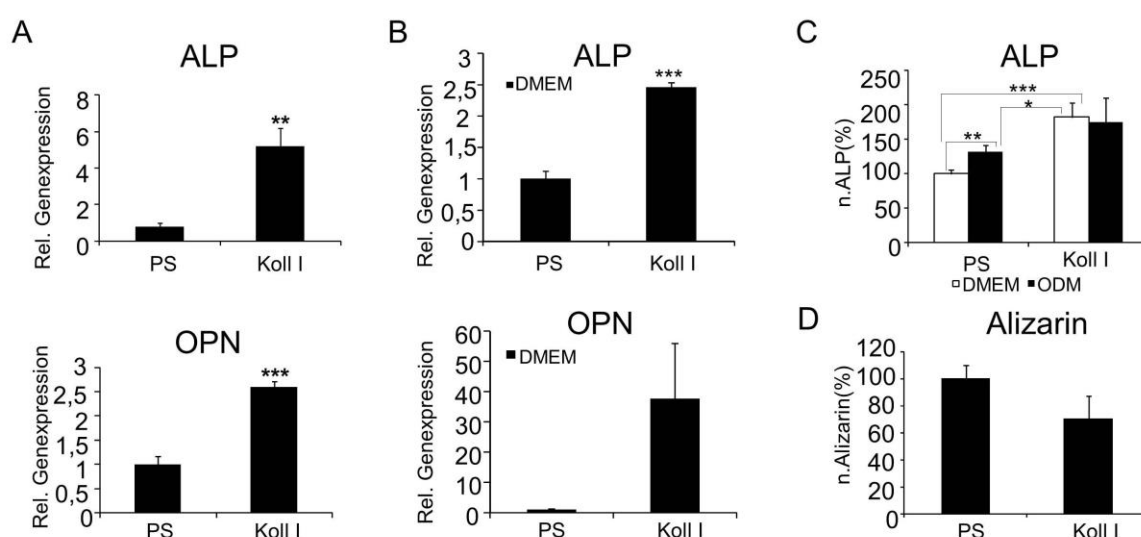


Abbildung 32: Kollagen I unterstützt die frühe Phase der osteogenen Differenzierung.

(A) RT-qPCR-Analyse der relativen Genexpression von *ALP* und *OPN* nach einem Tag osteogener Induktion mit ODM (1 % FBS) oder (B) DMEM von DFVs, die auf Kollagen I (Koll I) bzw. Kunststoffoberflächen (PS) kultiviert wurden.

(C) Bestimmung der ALP-Aktivität nach 10 Tagen Induktion mit ODM (10 % FBS) oder mit DMEM von DFVs, die auf Koll I bzw. PS kultiviert wurden.

(D) Quantifizierung der Mineralisierung mittels Alizarin-Red-Färbung nach 4 Wochen osteogener Differenzierung.

Zur Normalisierung wurde für alle Versuche der Mittelwert der Kontrolle (Versuche A und D: PS in ODM; Versuche B und C: PS in DMEM) verwendet. n = 3, ± SEM. Für die statistische Auswertung wurde der t-Student-Test verwendet. * = statistisch signifikant (p-Wert < 0,05); ** = statistisch signifikant (p-Wert < 0,025). *** = statistisch signifikant (p-Wert < 0,0125).

4.3.3.3 Regulation von ALP und OPN durch Kollagen I auf unterschiedlichen Signalwegen

Um die molekularen Mechanismen zu untersuchen, welche an der Regulation der osteogenen Markern in mit Koll I induzierten DFVs beteiligt sind, wurden FAK und ERK mit spezifischen Inhibitoren (PF573228 bzw. PD98059) reguliert (siehe Abbildung 33).

Die Ergebnisse weisen auf eine Aktivierung des FAK-Signalweges in DFVs nach Induktion mit Koll I hin (siehe Abbildung 33A). Diese Aktivierung gleicht derjenigen mit ODM.

Darüber hinaus wurde der ERK-Signalweg bei den mit ODM induzierten DFVs auf Koll I ebenfalls aktiviert. Dies bewirkte eine Erhöhung des pERK/ERK-Quotienten von 0,69 auf 0,85 (siehe Abbildung 33B). Zusätzlich wurde in dieser Arbeit untersucht, ob der ERK-Signalweg stromabwärts des FAK-Signals aktiviert wird. Nach Behandlung mit PF573228 (PF) der ODM-induzierten DFVs wurden sowohl FAK als auch ERK inhibiert (siehe Abbildung 33B), was auf eine ERK-Aktivierung stromabwärts von FAK hindeutet.

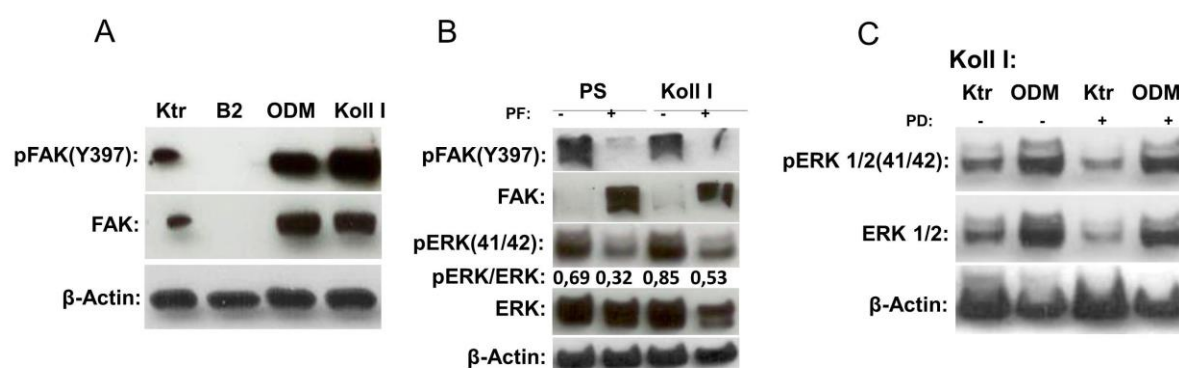


Abbildung 33: Kollagen I induziert den FAK/ERK-Signalweg in DFVs.

(A) Western-Blot-Analysen mit spezifischen AK für Phospho-FAK (Y397), FAK, Phospho-ERK (41/42), ERK und β -Actin (Ladekontrolle) und für Gesamtzelllysate nach 90 min Adhäsion der DFVs auf Kollagen I (Koll I) bzw. Induktion mit BMP2 (B2), OMD oder mit DMEM (Ktr = PS).

(B) Immunologischer Nachweis nach einem Tag Induktion mit ODM (10 % FBS) oder ODM (10 % FBS) plus FAK-Inhibitor PF573228 (PF) von DFVs, die auf Koll I bzw. Kunststoffoberflächen (PS) kultiviert wurden.

(C) Nachweis der Aktivierung des ERK-Signalweges in DFVs auf Koll I bzw. PS nach Inhibition der ERK-Phosphorylierung mit dem MEK1-Inhibitor PD98059.

Obwohl Koll I eine Steigerung des pERK/ERK-Quotienten von 0,32 auf 0,53 in den mit PF573228 und ODM kultivierten Zellen zur Folge hatte, wurde die Inhibierung des FAK-Signals mit PF573228 durch Koll I nicht aufgehoben (siehe Abbildung 33B). Dies könnte möglicherweise auf eine Inhibition des endogenen Koll I durch die PF-Behandlung (siehe Abbildung 33C) zurückzuführen sein. Die Ergebnisse weisen auf die Aktivierung des FAK- und ERK- Signalweges durch Koll I hin.

Nach Inhibition des FAK-Signals wurde allerdings die *OPN*-Expression in auf Koll I kultivierten DFVs anders reguliert als in den auf Standardoberflächen mit ODM kultivierten DFVs. Während nach FAK-Inhibition die *OPN*-Expression in auf Koll I kultivierten DFVs signifikant hochreguliert wurde, wurde die *ALP*-Expression sowohl auf Plastik als auch auf Koll I in den mit ODM kultivierten DFVs herunterreguliert. Zudem wurde die ERK-Phosphorylierung mit einem spezifischen Inhibitor für MEK1 (PD98059) in DFVs auf Koll I unterdrückt (siehe Abbildung 33C). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Koll I die Expression des *OPN*-Gens anders als die des *ALP*-Gens durch FAK-Inhibition und Aktivierung eines weiteren Signalweges wie ERK induzieren kann (siehe Abbildung 34A – C).

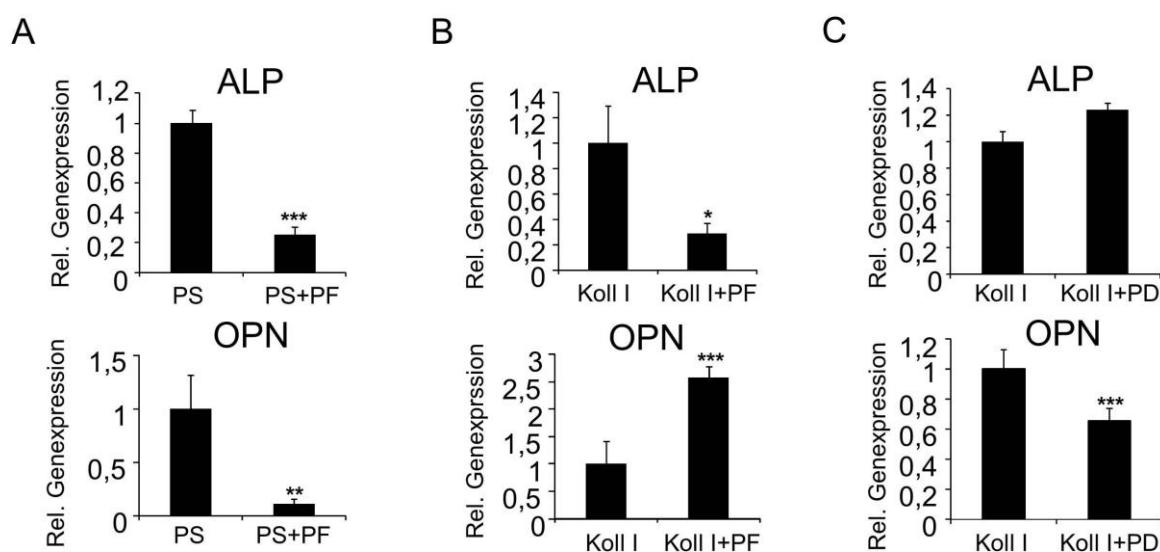


Abbildung 34: Kollagen I reguliert die Expression von osteogenen Markern via FAK/ERK.

(A), (B) RT-qPCR-Analyse der relativen Genexpression von *ALP* und *OPN* nach einem Tag osteogener Induktion mit ODM (1 % FBS) bzw. ODM (1 % FBS) plus FAK-Inhibitor PF573228 (PF) in DFVs (A) auf Kunststoffoberflächen (PS) oder (B) auf Kollagen I (Koll I).

(C) *ALP*- und *OPN*-Expression nach einem Tag osteogener Induktion mit ODM (1 % FBS) bzw. ODM (1 % FBS) plus MEK1-Inhibitor PD98059 in DFVs auf Koll I.

Zur Normalisierung wurde für alle Versuche der Mittelwert der Kontrolle (Versuch A: PS in ODM; Versuche B und C: Koll I in ODM) verwendet. n = 3, ± SEM. Für die statistische Auswertung wurde der t-Student-Test verwendet. * = statistisch signifikant (p-Wert < 0,05); ** = statistisch signifikant (p-Wert < 0,025); *** = statistisch signifikant (p-Wert < 0,0125).

4.3.3.4 Laminin inhibiert ALP und induziert späteren osteogene Marker sowie die Mineralisierung

Die Rolle des Gesamtlaminin auf die osteogene Differenzierung in DFVs wurde mittels RT-qPCR, Western Blot, Quantifizierung der ALP-Aktivität sowie Alizarin-Red untersucht (siehe Abbildung 35).

Die ALP-Genexpression wurde in den auf Laminin mit ODM kultivierten DFVs nicht beeinflusst (siehe Abbildung 35A). Hingegen ging die ALP-Aktivität in den auf Laminin kultivierten DFVs bei Verwendung von DMEM oder ODM signifikant zurück (siehe Abbildung 35D).

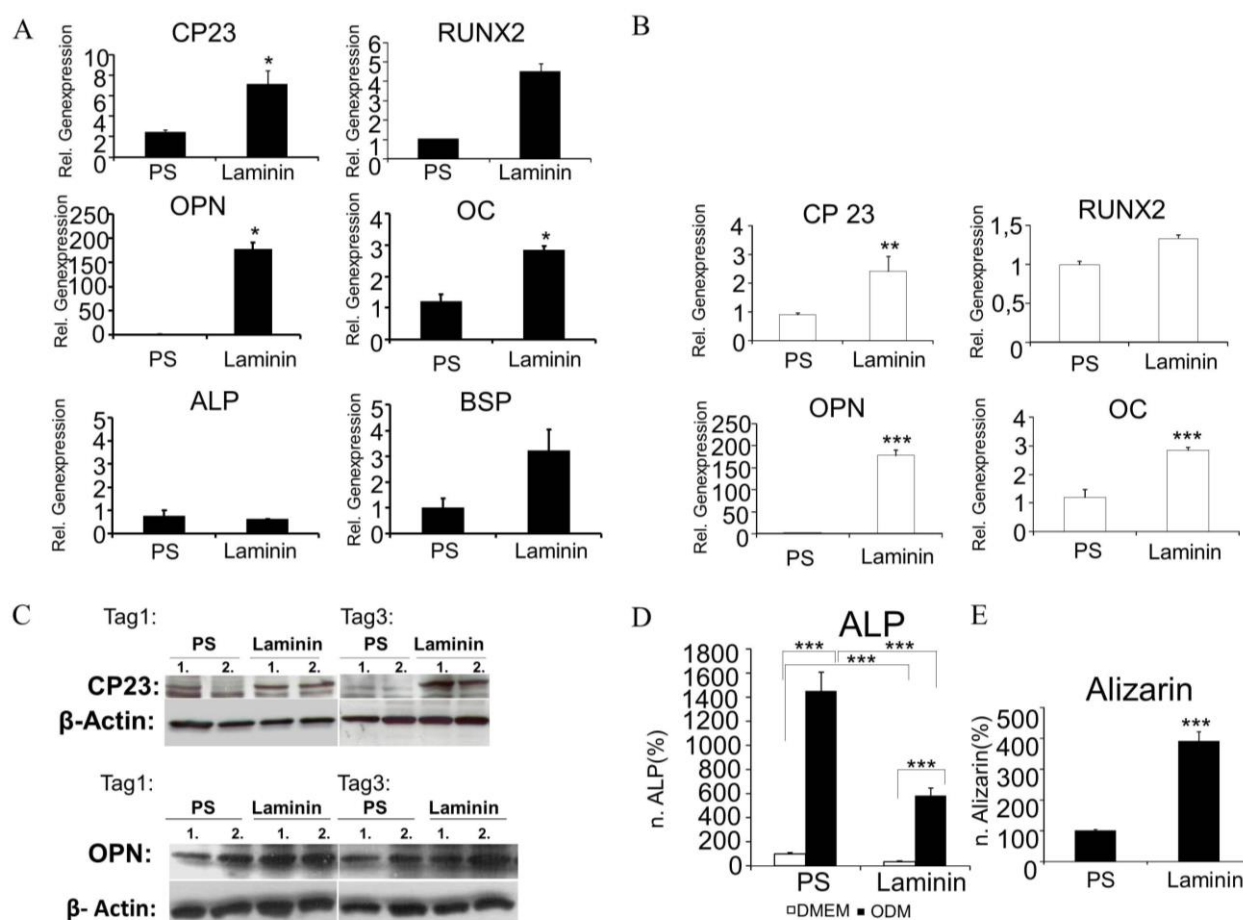


Abbildung 35: Einfluss von Laminin auf die osteogene Differenzierung und die Mineralisierung.

(A) Analyse der relativen Genexpression von osteogenen Markern nach einem Tag osteogener Induktion mit ODM (1 % FBS) bzw. (B) mit DMEM in auf Laminin oder auf Kunststoffoberflächen (PS) kultivierten DFVs.

(C) Western-Blot-Analysen mit spezifischen Antikörpern für die zementoblasten Marker CP23, OPN und β -Actin (Ladekontrolle) und Gesamtzelllysat von DFVs, die auf Laminin oder auf PS für ein und drei Tage mit DMEM (1.) oder ODM (1 % FBS) (2.) kultiviert wurden.

(D) Nachweis der ALP-Aktivität nach 10 Tagen osteogener Differenzierung der DFVs auf Laminin bzw. auf PS mit ODM (1 % FBS) oder mit DMEM.

(E) Quantifizierung der Mineralisierung mittels Alizarin-Red-Färbung nach 4 Wochen osteogener Differenzierung.

Zur Normalisierung wurde der Mittelwert der jeweiligen Kontrolle (Versuche A und E: PS in ODM; Versuche B und D: PS in DMEM) verwendet. $n = 3$, \pm SEM. Für die statistische Auswertung wurde der t-Student-Test verwendet. * = statistisch signifikant (p -Wert $< 0,05$); ** = statistisch signifikant (p -Wert $< 0,025$); *** = statistisch signifikant (p -Wert $< 0,0125$).

Darüber hinaus deuten die Ergebnisse auf eine starke Induktion späterer osteogener und zementogener Markern wie u. a. OPN und CP23 in den auf Laminin mit DMEM oder ODM kultivierten DFVs hin (siehe Abbildung 35A-C). Laminin bewirkte darüber hinaus eine hochsignifikante Erhöhung der Mineralisierung in mit ODM behandelten DFVs (siehe Abbildung 35E). Laminin unterstützte ebenfalls die Mineralisierung und

die Bildung der Kristallisationskeime in DFVs, die mit DMEM kultiviert worden waren (Ergebnis gezeigt in Viale-Bouroncle et al., 2014).

4.3.3.5 Beteiligung des Integrins-alpha 2/-beta 1 (ITGA2B1) an der durch Laminin regulierten osteogenen Differenzierung

Weil die Expression des Integrins ITGA2B1 durch Laminin deutlich induziert wurde (siehe Abbildung 30C, D), wurde der Einfluss des EZM-Rezeptors ITGA2B1 auf die osteogene Differenzierung in DFVs untersucht. Dafür wurde ein inhibitorischer Antikörper gegen ITGA2B1 verwendet.

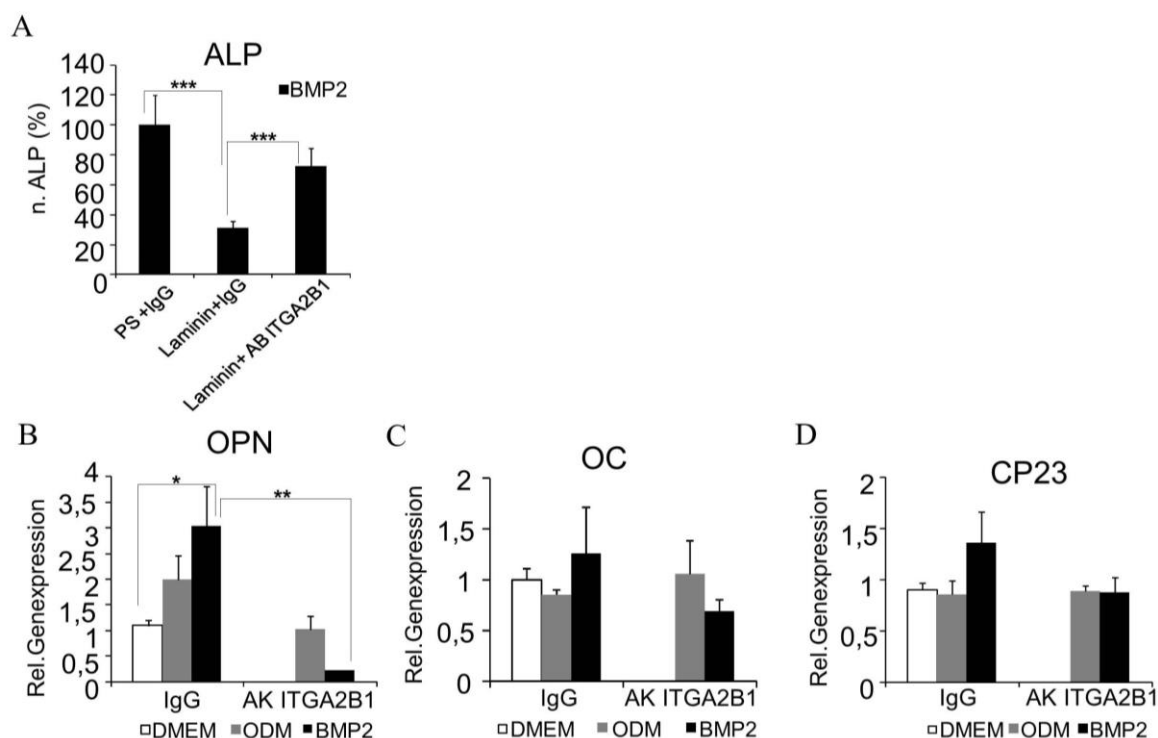


Abbildung 36: Einfluss von Integrin-alpha 2/-beta 1 auf die Laminin-induzierte osteogene Differenzierung.

(A) Nachweis der Aktivität der alkalischen Phosphatase (ALP) nach 10 Tage Inkubation mit einem spezifischen Antikörper (AK) gegen Integrin-alpha 2/-beta 1 (ITGA2B1) dem AK-ITGA2B1 und BMP2 in auf Laminin kultivierten DFVs. Als Kontrolle wurden ein unspezifisches AK (IgG) und Kunststoffoberflächen (PS) verwendet.

(B), (C) und (D) Analyse der Genexpression von osteogenen/zementogenen Markern mittels RT-qPCR nach einem Tag der Blockade von ITGA2B1 mit dem AK-ITGA2B1 und osteogener Induktion mit ODM oder BMP2 der DFVs, die auf Laminin kultiviert wurden.

Zur Normalisierung wurde für alle Versuche der Mittelwert der jeweiligen Kontrolle (Versuch A: IgG auf PS; Versuche B, C und D: IgG auf Laminin) verwendet. n = 3, ± SEM. Für die statistische Auswertung wurde der t-Student-Test verwendet. * = statistisch signifikant (p-Wert < 0,05); ** = statistisch signifikant (p-Wert < 0,025); *** = statistisch signifikant (p-Wert < 0,0125).

Die durch Laminin verursachte Inhibition der ALP-Aktivität wurde nach der Blockade des ITGA2B1 aufgehoben (siehe Abbildung 36A). Nach Inhibition des Integrines ITGA2B1 wurde außerdem die Genexpression des *OPN* in mit BMP2 oder ODM behandelten DFVs herunterreguliert, ebenso wie die des

späteren osteogenen Markers *OC* und des zementoblasten Markers *CP23* in den mit BMP2 induzierten DFVs (siehe Abbildung 36B). Diese Ergebnisse belegen, dass *ITGA2B1* das durch Laminin induzierte Signal weiterleitet und somit die osteogene Differenzierung in DFVs moduliert.

Darüber hinaus induzierte Laminin (siehe Abbildung 37) ähnlich wie Koll I (siehe Abbildung 33) den FAK/ERK-Signalweg in DFVs. Abbildung 37A zeigt die Western Blots der FAK- und ERK-Aktivierung in DFVs, welche auf Laminin sowohl mit ODM als auch mit DMEM kultiviert worden waren. Das Laminin löste in den DFVs die Phosphorylierung des FAK am Tyr Rest 576/577 sowie des ERK (41/42) aus.

Diese Ergebnisse wurden von Western Blots mit Zelllysaten aus drei verschiedenen DFVs-Isolierungen bestätigt. Der Mittelwert des auf β -Actin kalibrierten Intensitätssignals (Daten hier nicht gezeigt) entsprach den Ergebnissen des repräsentativen Western Blots (siehe Abbildung 37A).

Die Expression des *CP23*-Gens nach Inhibition des ERK-Signals mit dem ERK-Inhibitor PD98059 sank in auf Laminin mit ODM kultivierten DFVs signifikant (siehe Abbildung 37B).

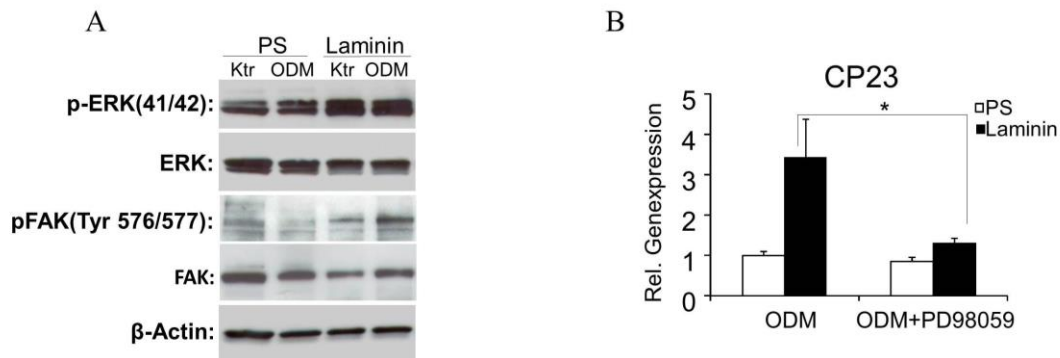


Abbildung 37: Aktivierung des FAK/ERK-Signalweges durch Laminin.

(A) Western-Blot-Analysen mit spezifischen AK für Phospho-ERK(41/42), ERK, Phospho-FAK(Y576/577), FAK und β -Actin (Ladekontrolle) und Gesamtzelllysaten der DFVs nach einem Tag auf Laminin bzw. Kunststoffoberflächen (PS) und osteogener Induktion mit ODM oder mit DMEM (Ktr = PS).

(B) RT-qPCR-Analyse der relativen Genexpression des zementoblasten Markers *CP23* nach osteogener Induktion mit ODM und Zugabe eines spezifischen Inhibitor des ERK-Signalweges (PD98059) von DFVs, die auf Laminin bzw. PS kultiviert wurden.

Zur Normalisierung wurde der Mittelwert der Kontrolle (PS) verwendet. $n = 3$, \pm SEM. Für die statistische Auswertung wurde der t-Student-Test verwendet. * = statistisch signifikant (p -Wert $< 0,05$).

5. Diskussion

Hinter den ersten Isolierungen dentaler Stammzellen wie z. B. der dentalen Follikel-Vorläuferzellen (DFVs) stand die Überlegung, sie als Quelle für die regenerative Zahnmedizin zu nutzen. Beispielsweise würden sich DFVs gut für die Neubildung eines Zahnhalteapparats zur Befestigung von Implantaten eignen. Allerdings sind die molekularen Mechanismen während der Differenzierung dentaler Stammzellen noch nicht hinreichend erforscht.

Die DFVs können sich zu Zementoblasten und alveolaren Osteoblasten differenzieren (Ten Cate, 1997; Morszeck *et al.*, 2005). Infolgedessen kann die Untersuchung der molekularen Mechanismen während der osteogenen Differenzierung in DFVs zu einem genaueren Verständnis der Entwicklung mineralisierender Gewebe im Parodont beitragen.

Die Regulation der Genexpression, die die Zelldifferenzierung leitet, erfolgt in erster Linie durch Transkriptionsfaktoren. Der TF DLX3 ist ein Mitglied der DLX-Familie, welche ihrerseits zu den homöotischen Genen gehört. DLX3 ist für die embryonale Entwicklung essenziell und spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Skeletts der Vertebraten (Morasso *et al.*, 1999; Qui *et al.*, 1997; Bendall and Abate-Shen, 2000). Darüber hinaus wurde DLX3 in verschiedenen mineralisierenden Zellen wie Odontoblasten und Osteoblasten beschrieben (Ghoul-Mazgar *et al.*, 2005; Hassan *et al.*, 2006). In Vorarbeiten für diese Arbeit wurde bereits gezeigt, dass DLX3 während der osteogenen Differenzierung auch in DFVs exprimiert wird (Morszeck *et al.*, 2006). Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher die Funktion von DLX3 während der osteogenen Differenzierung in DFVs näher untersucht.

5.1 Der Einfluss von DLX3 auf die osteogene Differenzierung in DFVs

DLX3 wurde im Ektoderm, im Mesoderm sowie in der Neuralleiste und in aus dieser abgeleiteten Strukturen wie z. B. Haarfollikeln, Zahnkeimen und kraniofazialen Knochen detektiert (Morasso *et al.*, 1996; Morasso *et al.*; 2005; Hassan *et al.*, 2004). Verschiedene Studien u. a. an Osteoblasten deuteten auf eine regulatorische Funktion von DLX3 bei der osteogenen Differenzierung hin (Hassan *et al.*, 2006; Hassan *et al.*, 2009; Duverger *et al.*, 2013). DLX3 ist beispielsweise an der Regulation der osteogenen Marker OC und RUNX2 beteiligt (Hassan *et al.*, 2004; Hassan *et al.*, 2006).

Vorarbeiten zu dieser Arbeit hatten Hinweise auf die Beteiligung von DLX3 an der Regulation der Zellproliferation sowie der Knochenbildung gegeben. Daher wurde der Einfluss von DLX3 auf die osteogene Differenzierung mittels eines DLX3-Plasmids und einer DLX3 siRNA untersucht. Die Ergebnisse bestätigten, dass DLX3 die Zellmorphologie, die Zellproliferation und die Vitalität/Apoptose beeinflussen kann. Diese biologischen Prozesse werden als notwendig für die Einleitung der Osteogenese angesehen (McBeath *et al.*, 2004, Yourek *et al.*, 2007). Zellmorphologie sowie Veränderungen der Zytoskelettkomponenten haben Schlüsselfunktionen für die Festlegung der MSCs während der Differenzierung (McBeath *et al.*, 2004; Yourek *et al.*, 2007; Clarke B, 2008). In der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass nach DLX3-Überexpression die Aktinstressfasern der DFVs sich neu

organisierten und folglich eine spindelartige Form annahmen. Die Ergebnisse deuten auf einen negativen Einfluss von DLX3 auf die Apoptose in DFVs hin, weil sich die Anzahl an apoptotischen Zellen nach DLX3-Inhibition erhöhte, nach einer DLX3-Überexpression jedoch die Expression des antiapoptotischen Markers BCL2A anstieg. Die Apoptose kann die osteoblastäre Differenzierung, die Aufrechterhaltung der Gestaltung des Gewebes sowie die Knochenhomöostase unterstützen (Lynch *et al.*, 1998; Manolagas 2000). Zudem sorgt das Gleichgewicht zwischen der Zellproliferation und der Apoptose für die Aufrechterhaltung der Gewebemöostase (Strasser *et al.*, 2000).

Die Ergebnisse der RT-qPCR-Analyse deuteten auf eine Regulation der osteogenen Marker *ZBTB16* und *RUNX2* durch DLX3 hin. ZBTB16 ist als osteogener Marker der DFVs beschrieben (Morszeck *et al.*, 2009b; Saugspier *et al.*, 2010). Die zugehörige ChIP-Analyse erbrachte den Nachweis, dass DLX3 direkt an den Promotor dieser beiden Marker bindet und so ihre Expression regulieren kann. Diese Ergebnisse stimmen teilweise mit älteren Studien zu osteoblastären Zelllinien überein, welche ebenfalls eine direkte Bindung von DLX3 an den RUNX2-Promotor zeigten (Hassan *et al.*, 2004; Hassan *et al.*, 2006). Dies unterstützt somit die Annahme, dass DLX3 an der osteogenen Differenzierung in DFVs direkt beteiligt ist.

5.2 Regulation der osteogenen Differenzierung durch einen DLX3/BMP2-Feedbackmechanismus

Der induktive Effekt des Wachstumsfaktors BMP2 auf die osteogene Differenzierung in DFVs ist bekannt (Kemoun *et al.*, 2007; Saugspier *et al.*, 2010). In der vorliegenden Arbeit wurde zudem gezeigt, dass BMP2 die DLX3-Expression während der osteogenen Differenzierung in DFVs induziert. Der BMP/SMAD-Signalweg scheint generell an der Induktion von DLX3 beteiligt zu sein (Park and Moraso, 2002; Hwang *et al.*, 2008). In Osteoblasten induziert BMP2 die Expression von DLX3 über den P38/SMAD5-Signalweg (Yang *et al.*, 2014). In DFVs wurde ähnlich wie in Haarfollikelzellen (Hwang *et al.*, 2008) festgestellt, dass BMP2 die DLX3-Expression über einen dosisabhängigen Feedbackmechanismus reguliert. Dieser DLX3/BMP2-Feedbackmechanismus ist auch an der Regulation der osteogenen Differenzierung beteiligt. Es gab jedoch auch Hinweise auf die Beteiligung weiterer Signalwege wie WNT oder NOTCH an dieser Regulation durch *Crosstalk Networks*. Daher wurde die Interaktion zwischen dem DLX3/BMP2- und dem WNT- sowie dem NOTCH-Signalweg in DFVs im Rahmen dieser Arbeit detailliert untersucht.

5.3 Einfluss des WNT-Signalweges in humanen DFVs

Diese Dissertation berichtet zum ersten Mal von einer Induktion des WNT-Signalweges über DLX3. Mittels einer DNA-Microarray-Analyse von DFVs während der DLX3/BMP2-induzierten osteogenen Differenzierung wurde der WNT-Signalweg unter den überrepräsentierten Signalwegen nachgewiesen. Zielgene des WNT-Signalweges wie z. B. *FRZB* und *APCDD1* waren signifikant hochreguliert. Darüber

hinaus wurde mittels einer RT-qPCR-Analyse die Hochregulation des WNT-Rezeptors LRP6 und die Herunterregulation des löslichen WNT-Inhibitors Dkk1 nachgewiesen.

Während eine Mutation in *LRP6* die Abnahme der Knochenmasse und Mineraleichte bedingt, ging die Inhibition von Dkk1 in Osteoblasten mit der Erhöhung der Knochenbildung und Knochenmasse einher (Riddle *et al.*, 2013; Kato *et al.*, 2002; Morvan *et al.*, 2006). Diese Studien stützen die Hinweise, dass der kanonische WNT-Signalweg die Osteoblasten-Differenzierung induziert.

WNT-Signale werden durch *Crosstalk* mit anderen Signalwegen, wie z. B. dem BMP-Signalweg, aktiviert (Liu *et al.*, 2008a; Lee *et al.*, 2010). In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass der BMP2-Signalweg den WNT-Signalweg induziert. BMP2 induzierte allerdings die Expression von WNT-Zielgenen sowie von DLX3 in der entgegengesetzten Richtung als der WNT-Induktor, WNT3A. Die Regulation des WNT-Signalweges durch DLX3 ist noch nicht untersucht.

Hwang *et al.* (2008) berichteten über die Regulation des DLX3 in Haarfollikelzellen durch die Bindung des LEF1 an den DLX3-Promotor. Dieses Ergebnis wird durch Daten der vorliegenden Arbeit ergänzt: BMP2 induziert die Wechselwirkung zwischen SMAD4/ β -Catenin/LEF1. Folglich stimuliert die BMP2-Signalkaskade die Interaktion des SMAD4/ β -Catenin/LEF1-Komplexes mit DLX3 durch die Bindung von LEF1 an den DLX3-Promotor. In DFVs wurde jedoch die Entstehung des SMAD4/ β -Catenin/LEF1-Komplexes und dessen Bindung an dem DLX3-Promotor durch WNT3A inhibiert. Möglicherweise inhibiert WNT3A somit die DLX3-Expression und als Folge davon auch die ALP-Aktivität.

Das heißt, anders als für MSCs gezeigt, wird die osteogene Differenzierung in humanen DFVs durch den kanonischen WNT-Signalweg inhibiert. Diese Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen der Studien an DFVs aus Nagern überein (Silvério *et al.*, 2012; Du *et al.*, 2012) und deuten auf eine essenzielle Rolle des endogenen β -Catenins in der BMP2-induzierten osteogenen Differenzierung hin (Silvério *et al.*, 2012). Die eigenen Experimente bestätigten diese Bedeutung von β -Catenin für die DLX3-Induktion und infolgedessen für die osteogene Differenzierung in DFVs. Zusätzlich wurden Signale detektiert, welche das β -Catenin in DFVs aktivieren. Es handelte sich um die Proteinkinase A (PKA) in mit BMP2 induzierten DFVs. PKA induziert die Phosphorylierung des β -Catenins an Ser 552 sowie Ser 675 (Hino *et al.*, 2005; Taurin *et al.*, 2006). Es ist Teil des nicht-kanonischen WNT-Signalweges und inaktiviert GSK3 β was wiederum die Zellkern-Translokation des β -Catenin-Proteins induziert (Torii *et al.*, 2008). In mesenchymalen Stammzellen gibt es Indizien, dass die osteoblastäre Differenzierung nach Induktion des kanonischen WNT/ β -Catenin-Signalweges durch TGF- β , das PKA induziert, inhibiert wird (Zhou *et al.*, 2011). Andere Studien wiesen hingegen nach, dass PKA in mesenchymalen Stammzellen die osteogene Differenzierung unterstützt (Siddappa *et al.*, 2008; Doorn *et al.*, 2012). In dieser Dissertation wurde gezeigt, dass BMP2 die Phosphorylierung von β -Catenin an Ser 675 durch PKA induziert und die osteogene Differenzierung in mit BMP2 supplementierten DFVs begünstigt. Die Aktivierung von PKA wurde jedoch von WNT3A inhibiert. Dies deutet auf einen negativen Feedbackmechanismus zwischen BMP2 und dem kanonischen WNT-Signalweg über PKA hin.

Eine Phosphorylierung von DLX3 durch PKA und die essenzielle Bedeutung für die osteogene Differenzierung wurde auch in der Studie von Li *et al.* (2014) nachgewiesen. Allerdings machten die Autoren keinerlei Aussagen über die Beteiligung von β -Catenin. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Steigerung der PKA-Aktivität nach DLX3-Überexpression in DFVs nachgewiesen [Daten hier nicht gezeigt]. Dieses Ergebnis stimmt mit den Beobachtungen überein, dass PKA die Phosphorylierung von β -Catenin an Ser 675 induziert und DLX3 Phospho- β -Catenin(Ser 675), β -Catenin und auch den TCF/LEF1-Luciferase-Reporter aktiviert. Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass ein Teil des WNT-Signalweges über DLX3 aktiviert werden kann.

Die über DLX3 hochregulierten Zielgene des WNT-Signalweges, wie *EGR1* und *APCDD1*, wurden ebenfalls näher untersucht. Der Transkriptionsfaktor EGR1 ist an der Regulation verschiedener biologischer Prozesse wie der Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose beteiligt (Pagel and Diendl, 2011). Beispielsweise scheint EGR1 die über BMP2/DLX3 regulierte osteogene Differenzierung dentaler Stammzellen in einer dosisabhängigen Weise zu modulieren (Press *et al.*, 2014).

5.4 Einfluss von APCDD1 auf die Differenzierung in DFVs

Das WNT-Zielgen *APCDD1* wird durch β -Catenin und TCF4 transkriptionell reguliert und spielt wahrscheinlich eine wichtige Rolle während der Embryogenese. *APCDD1* wurde mit der vererbaren *Hypotrichosis simplex*, einer autosomal-dominanten Form des Haarverlusts, assoziiert und z. B. im Epithel des embryonischen Augenlids nachgewiesen (Takahashi *et al.*, 2002; Zirn *et al.*, 2006). In Zelltypen wie Haarfollikeln wurde es als Inhibitor des WNT-Signalweges beschrieben (Shimomura *et al.*, 2010). *APCDD1* scheint den WNT-Signalweg in DFVs zu induzieren; nach *APCDD1*-Inhibition werden die β -Catenin-Expression und die Aktivierung des β -Catenins unterdrückt. In DFVs war die Expression von *APCDD1* 41-fach höher als in hMSCs (Vergleich von Microarray-Daten, Aonuma *et al.*, 2012). Daraus lässt sich ableiten, dass *APCDD1* in mesenchymalen Vorläuferzellen mit der Osteoklastogenese (Cho *et al.*, 2014) und in DFVs mit der Osteogenese assoziiert ist. Eigene Experimente mit einer *APCDD1* siRNA zeigten, dass *APCDD1* für die Expression von DLX3 und RUNX2 sowie die ALP-Aktivität und die Matrixmineralisierung in DFVs essenziell ist.

Aus den bisher diskutierten Daten (siehe Abbildung 38) lässt sich schließen, dass DLX3 für die osteogene Differenzierung in DFVs essenziell ist. Beispielsweise werden über DLX3 osteogene Marker wie ALP und RUNX2 direkt reguliert und ist ein DLX3/BMP2-Feedbackmechanismus in einer dosisabhängigen Weise an der Regulation der DLX3-Expression und der osteogenen Differenzierung beteiligt. Der WNT-Signalweg ist an dieser Regulation durch *Crosstalk Networks* beteiligt. Einerseits benötigt der BMP2-Signalweg β -Catenin, um DLX3 und die osteogene Differenzierung zu induzieren. Dafür wird β -Catenin via BMP2-PKA aktiviert. Andererseits ist der kanonische WNT-Signalweg z. B. mit WNT3A an der Inhibition der DLX3-Expression und der osteogenen Differenzierung beteiligt. Dies erfolgt möglicherweise durch die Hemmung von PKA. Diese gegenseitige Regulation des kanonischen WNT- und BMP2-Signalweges scheint

somit eine wichtige Funktion bei der Modulation der DLX3-Expression und der osteogenen Differenzierung in DFVs zu haben. DLX3 induziert wiederum Gene des WNT-Signalweges wie APCDD1, das seinerseits ebenfalls an der Aktivierung von β -Catenin beteiligt ist und möglicherweise darüber die osteogene Differenzierung in DFVs unterstützt.

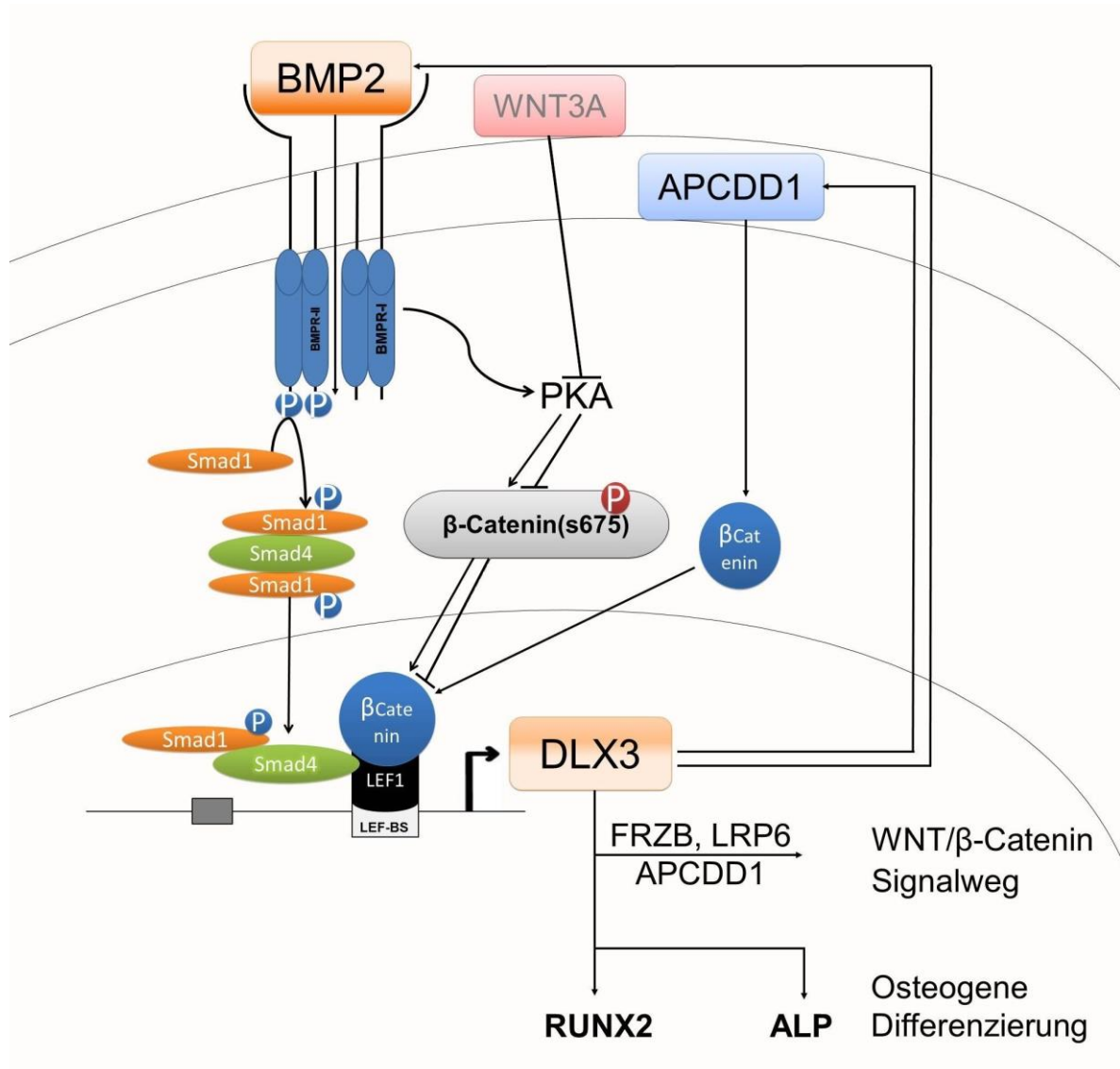


Abbildung 38: Schematische Darstellung der Regulation der osteogenen Differenzierung durch DLX3 via eines BMP2/β-Catenin-Feedbackmechanismus. (→: Aktivierung; †: Inaktivierung). (Eigene Darstellung).

5.5 Einfluss des NOTCH-Signalweges in humanen DFVs

Der NOTCH-Signalweg ist normalerweise für die Aufrechterhaltung des undifferenzierten Zustands bzw. für die Selbsterneuerung (engl.: self-renewal) einer Zelle zuständig. Er gewährleistet z. B. die Selbsterneuerung bzw. die Aufrechterhaltung des Zustandes von prä migratorischen neuralleistenähnlichen Zellen (engl.: premigratory neural-crest-like cells, pNCCs) (Noisa *et al.*, 2012). Auch an weiteren biologischen Prozessen wie der Zellproliferation, dem Zellzyklus und der Differenzierung ist er beteiligt. Die Proliferation und die Selbsterneuerung werden in DFVs durch die Modulation der G1/S-Transition und durch die Telomerase-Aktivität über den NOTCH1-Signalweg reguliert (Chen *et al.*, 2013). Zudem wurde in verschiedenen Studien berichtet, dass der NOTCH-Signalweg für die negative Regulation der Differenzierung essenziell ist. Beispielsweise wird die Differenzierung der pNCCs zu von den Neuralleisten abgeleiteten Neuronen durch die Inhibition des NOTCH-Signalweges ermöglicht. In DPSCs inhibiert seine Aktivierung die odontogene Differenzierung (Noisa *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2008). Studien an der MC3T3-Zelllinie und an MSCs kamen zu vergleichbaren Ergebnissen für die osteogene Differenzierung (Zamurovic *et al.*, 2004; Xing *et al.*, 2010): Die Induktion des NOTCH-Zielgens *HEY1* inhibierte die Expression von *RUNX2* (Zamurovic *et al.*, 2004). Die Aktivierung des NOTCH-Signalweges wurde nach Kultivierung von MSCs in einem mit Lipopolysacchariden supplementierten osteogenen Differenzierungsmedium nachgewiesen. Die Lipopolysacchariden induzierten den NOTCH-Signalweg, welcher die Osteogenese in MSCs inhibierte (Xing *et al.*, 2010).

In dieser Arbeit wurde die Aktivierung des NOTCH-Signalweges nach DLX3-Überexpression sowie während der osteogenen Differenzierung in DFVs nachgewiesen. Nach der Induktion des NOTCH-Signalweges nahmen allerdings die ALP-Aktivität und die Mineralisierung in den DFVs ab. Zudem waren die Aktivierung des BMP-Signalweges und die DLX3-Expression vermindert. Dagegen zeigten ältere Studien, dass ein aktivierter NOTCH-Signalweg für die mit BMP2 induzierte Osteogenese notwendig ist (Tezuka *et al.*, 2002; Nobta *et al.*, 2005).

Die für diese Arbeit durchgeführten Experimente lassen den Schluss zu, dass DLX3 den NOTCH-Signalweg in DFVs induziert. Andererseits inhibiert die Aktivierung des NOTCH-Signalweges den BMP2/SMAD1-Signalweg und die DLX3-Expression. Zudem inhibiert der NOTCH-Signalweg die osteogene Differenzierung in DFVs. Dies deutet auf eine Regulation der osteogenen Differenzierung durch einen negativen Feedbackmechanismus zwischen dem NOTCH- und dem BMP/DLX3-Signalweg hin.

5.6 Einfluss des EZM/fokalen Adhäsion-Signalweges auf die osteogene Differenzierung in DFVs

Die extrazelluläre Matrix spielt nicht nur eine unterstützende Funktion, sondern leitet extrazelluläre Signale zu den Zellen innerhalb der Matrix wie z. B. den Osteoblasten weiter (Thessleff & Mikkola, 2002). Solche Signale können über Chemokine, Wachstumsfaktoren oder mechanische Faktoren ausgelöst werden und induzieren ihrerseits verschiedene biologische Prozesse wie z. B. die Zelldifferenzierung (Engler *et al.* 2006, Hynes, 2009).

EZM-Moleküle wie Laminin und Koll I spielen eine wichtige Rolle bei der osteogenen Differenzierung der MSCs (Klees *et al.*, 2005; Klees *et al.*, 2007; Mittag *et al.*, 2012). Auch in DFVs scheinen sie eine wesentliche Funktion während der osteogenen Differenzierung zu haben (Morscbeck *et al.*, 2009; Saugspier *et al.*, 2010). Die Ergebnisse der Microarray-Studie lassen vermuten, dass DLX3 an der Regulation des fokalen Adhäsion-Signalweges in mit BMP2 induzierten DFVs beteiligt ist. Die Induktion der EZM-Moleküle Koll I und Laminin durch DLX3 wurde ebenfalls bestätigt.

Die eigenen Untersuchungen zu Expression von Koll I und Laminin in osteogen induzierten DFVs erbrachten folgende Ergebnisse: Am ersten Tag der osteogenen Induktion war die Expression von Koll I und Laminin vom Differenzierungsmedium abhängig. ODM stimulierte die Expression von Koll I, während Laminin durch BMP2 induziert wurde. An Tag 14 wurde Laminin sowohl durch BMP2 als auch ODM induziert. Zwar war das Expressionsniveau von Koll I insgesamt recht hoch, doch nahm es nach Behandlung mit ODM oder BMP2 im Vergleich zu DFVs im Proliferationsmedium (DMEM) ab. Diese Ergebnisse weisen auf die Induktion des Laminins über den BMP-Signalweg hin und auf seine Relevanz für die Reifephase der extrazellulären Matrix und die Mineralisierung in der späten Phase der osteogenen Differenzierung hin. Dagegen scheint Koll I eher an der Regulation der Proliferationsphase und der frühen Phase der durch ODM induzierten osteogenen Differenzierung beteiligt zu sein.

5.6.1 Kollagen I

Das Kollagen Typ I ist der Hauptbestandteil der organischen Knochenmatrix (Clarke, 2008). Koll I gehört zu den fibrillären Kollagenen, deren Fasern parallel angeordnet sind. Die Fibrillen setzen sich aus Tropokollagenmolekülen zusammen, und ein Molekül besteht aus einer α -Tripelhelix, die aus zwei $\alpha 1(I)$ und einer $\alpha 2(I)$ umeinander gedrehten fadenförmigen Proteinketten zusammengesetzt ist (Myllyharju & Kivirikko, 2004; Brodsky and Persikov, 2005). Die $\alpha 1(I)$ - und $\alpha 2(I)$ -Ketten werden jeweils von den *COLA1*- und *COLA2*-Genen kodiert. Sie werden während der Proliferationsphase bei der Knochenbildung erhöht exprimiert (Ducy *et al.*, 1997). Darüber hinaus korrelieren Mutationen in diesen Genen mit der autosomal-dominant vererbten Knochenentwicklungsstörung *Osteogenesis imperfecta* (Marini *et al.*, 2007). Studien in MCSs zeigten, dass Koll I die Zelladhäsion sowie die osteogene Differenzierung begünstigen kann (Salaszyk *et al.*, 2003). Eigene Experimente zeigten, dass Koll I auch in DFVs die Proliferation/Vitalität und die Zelladhäsion unterstützt. Darüber hinaus begünstigte es die osteogene Differenzierung durch

Induktion der Expression der frühen osteogenen Marker ALP sowie der ALP-Aktivität. Hingegen unterstützte Koll I die Mineralisierung in humanen DFVs nicht. Diese Ergebnisse unterschieden sich von denjenigen für DFVs von Schweinen, in denen Koll I auch die Mineralisierungsprozesse induzierte (Franceschi *et al.*, 2003; Tsuchiya *et al.*, 2008; Tsuchiya *et al.*, 2010).

Darüber hinaus wurden die Signalmechanismen stromabwärts des Koll I-Proteins aufgeklärt (siehe Abbildung 39). Die Signale FAK und ERK modulieren die osteogene Differenzierung. Von der Bedeutung des FAK- und ERK-Signalweges für die osteogene Differenzierung der osteoblastären Zelllinie MC3T3-E1 und hMSCs berichteten bereits Franceschi *et al.* (2003) und Salszynski *et al.* (2007). Beck *et al.* (2014) zeigten, dass DFVs über FAK-Signale Sphäroiden-Zell-Cluster bilden können (Beck *et al.*, 2014). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Koll I die Expression von ALP und OPN durch FAK und ERK jeweils unabhängig voneinander induzierte. Zudem zeigten die Ergebnisse eine Inhibition von OPN mittels FAK.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Koll I in DFVs nicht nur für die osteogene Differenzierung und die Entstehung der Knochenmatrix eine wichtige strukturelle Funktion hat, sondern es ist darüber hinaus auch als Induktor an regulatorischen Mechanismen der osteogenen Differenzierung via FAK/ERK-Signalweg in humanen DFVs beteiligt.

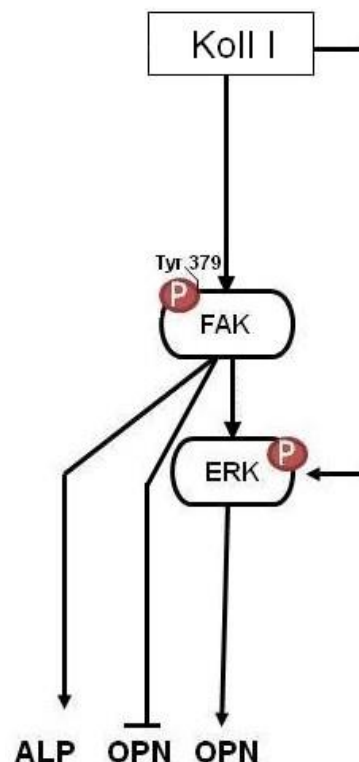


Abbildung 39: Schematische Übersicht der durch Kollagen I angewendeten Signale während der osteogenen Differenzierung in DFVs. (→: Aktivierung; †: Inaktivierung). (Eigene Darstellung).

5.6.2 Laminin

Laminine sind der Hauptbestandteil der Basallamina, welche als dünne Schicht die EZM in epithelialen Gewebe bildet. Während der Zahn- und Zahnwurzelentwicklung wurde Laminin in der Basallamina, im rauen endoplasmatischen Reticulum (*rough endoplasmatic reticulum*, RER) und in der Kernhülle von paradontalen Ligamentzellen, die dem azellulären Zement zugewandt sind, identifiziert (Andujar *et al.*, 1985; Thesleff *et al.*, 1981). Die Laminine setzen sich aus Polypeptidketten (α , β und γ) zusammen. In Säugetieren wurden fünf α ($\alpha 1$ bis $\alpha 5$), drei β ($\beta 1$ bis $\beta 3$) sowie drei γ ($\gamma 1$ bis $\gamma 3$) nachgewiesen. Aus Kombinationen dieser Ketten entstehen zwölf verschiedene gewebespezifische Isoformen (Miner & Yurchenco, 2000; Colognato & Yurchenco, 2000). Laut der neuen Nomenklatur (REF) werden die Laminin-Isoformen nach folgendem Schema benannt: Laminin 111 (Laminin $\alpha 1$, $\beta 1$ und $\gamma 1$; früher Laminin-1), Laminin 211 (Laminin $\alpha 2$, $\beta 1$ und $\gamma 1$; früher Laminin-2) oder Laminin 511 (Laminin $\alpha 5$, $\beta 1$ und $\gamma 1$; früher Laminin-10). In DFVs wurden die *LAM1*-, *LAM2*- und *LAM5*-Gene, welche für Laminin- $\alpha 1$, - $\alpha 2$ und - $\alpha 5$ kodieren, nach 10 Tagen osteogener Induktion sowohl mit ODM als auch mit BMP2 hochreguliert. Lediglich *LAMA5* wurde durch ODM nicht induziert. Demzufolge eignen sich Laminin-111 und -211 für weitere Studien, um die Funktion der einzelnen Laminin-Isoformen zu analysieren.

In dieser Studie wurde Gesamtlaminin, ein Komplex aus verschiedenen Laminin-Isoformen, verwendet. Dieses begünstigte die Proliferation und Adhäsion der DFVs nicht. Im Gegensatz dazu unterstützte Laminin-5 die Adhäsion sowie die osteogene Differenzierung in MSCs (Klees *et al.*, 2005). In DFVs konnte gezeigt werden, dass Laminin die osteogene Differenzierung bzw. Mineralisierung unterstützt. Beispielsweise induziert es späte osteogene Marker wie OC und den Zementblastenmarker CP23. Dennoch inhibiert Laminin die Expression und Aktivität des frühen osteogenen Markers ALP. Diese Ergebnisse stimmen nicht mit Studien an DFVs aus Schweinen überein, in denen Laminin die osteogene Differenzierung und die Zellproliferation unterdrückte (Tsuchiya *et al.*, 2008; Tsuchiya *et al.*, 2010; Honda *et al.*, 2010).

Darüber hinaus wurde in dieser Arbeit die von Laminin induzierten Integrine untersucht. Integrin- $\alpha 2$ - $\beta 1$ (ITGA2B1) wurde in den auf Laminin-kultivierten DFVs induziert. In früheren Arbeiten wurde die Wechselwirkung zwischen ITGA2B1 mit Koll I im Knochen nachgewiesen (Jikko *et al.*, 1999); ITGA2B1 hatte eine regulatorische Funktion bei der osteogenen Differenzierung. Es ist an der frühen Phase der über BMP2 induzierten Osteogenese beteiligt (Jikko *et al.*, 1999). Anders als in den genannten Veröffentlichungen induzierte in den eigenen Experimenten der über Laminin aktivierte ITGA2B1-Rezeptor den späten osteogene Marker OPN und den Zementblastenmarker CP23. Zudem ist ITGA2B1 an der Inhibition der ALP-Aktivität über Laminin beteiligt.

Außerdem wurde gezeigt, dass Laminin ähnlich wie Koll I die Aktivierung des FAK/ERK-Signalweges in DFVs induziert. In mesenchymalen Stammzellen ist die Aktivierung des FAK/ERK-Signalweges Voraussetzung für die Laminin-5-induzierte osteogene Differenzierung (Klees *et al.*, 2005; Salaszyk *et al.*, 2007). In DFVs wird ebenfalls die Laminin-induzierte osteogene Differenzierung über

FAK/ERK reguliert. Beispielsweise stimuliert Laminin den zementogenen Marker CP23 über den ERK-Signalweg.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Laminin die osteogene Differenzierung bzw. die Mineralisierung in DFVs über den ITGA2B1-Rezeptor und den FAK/ERK-Signalweg reguliert (vgl. Abbildung 40). Es ist einerseits an der Inhibition der frühen osteogenen Markern beteiligt und andererseits induziert es die Expression von späten Markern wie OPN, OC und dem zementogenen Marker CP23.

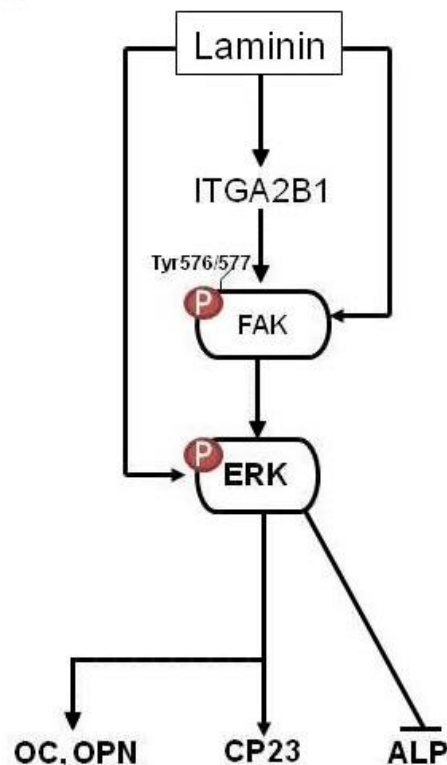


Abbildung 40: Schematische Übersicht der durch Laminin angewendeten Signale während der osteogenen Differenzierung in DFVs. (→: Aktivierung; †: Inaktivierung). (Eigene Darstellung).

5.7 Schlussfolgerung und Ausblick

Die regulatorischen Mechanismen, welche die Expression von DLX3 während der osteogenen Differenzierung *in vitro* beeinflussen, wurden zum Teil aufgeklärt. Aus den Ergebnissen lässt sich postulieren, dass die Regulation über einen dosisabhängigen DLX3/BMP2-Feedbackmechanismus erfolgt, an dem sowohl der WNT- als auch der NOTCH-Signalweg über *Crosstalk Networks* beteiligt sind.

Über den BMP2/PKA/ β -Catenin-Signalweg wird die DLX3-Expression und folglich auch die osteogene Differenzierung in DFVs induziert. Der NOTCH-Signalweg ist an der Aufrechterhaltung des undifferenzierten Zustandes der DFVs beteiligt und moduliert die über BMP2/DLX3 induzierte osteogene Differenzierung. Zudem ist DLX3 an der Regulation der EZM-Proteine beteiligt: Kollagen I induziert die Expression früher osteogener Marker, Laminin hingegen die späten.

DLX3 induziert auch Gene des WNT-Signalweges, die ihrerseits unabhängig von BMP2 sind. Um diese Regulation näher zu untersuchen, müsste man in weiteren Versuchen DLX3 in mit WNT3A induzierten DFVs differenziell exprimieren.

Darüber hinaus ist bekannt, dass auch epigenetische Modifikationen bei der osteogenen Differenzierung eine Rolle spielen (Nayak *et al.*, 2014, Cho *et al.*, 2014). Auch dieser Aspekt sollte für zukünftige Forschungen über die DLX3/BMP2-induzierte osteogene Differenzierung in DFVs berücksichtigt werden.

IV Literaturverzeichnis

- Ahumada, A., Slusarski, D.C., Liu, X., Moon, R.T., Malbon, C.C., and Wang, H. (2002). Signaling of rat Frizzled-2 through phosphodiesterase and cyclic GMP. *Science* 298, 2006–2010.
- Alberts, B. (2008). *Molecular Biology of the Cell*.
- Allendorph, G.P., Vale, W.W., and Choe, S. (2006). Structure of the ternary signaling complex of a TGF-beta superfamily member. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 7643–7648.
- Andujar, M.B., Magloire, H., Hartmann, D.J., Ville, G., and Grimaud, J.-A. (1985). Early mouse molar root development: Cellular changes and distribution of fibronectin, laminin and type-IV collagen. *Differentiation* 30, 111–122.
- Ashton, B.A., Abdullah, F., Cave, J., Williamson, M., Sykes, B.C., Couch, M., and Poser, J.W. (1985). Characterization of cells with high alkaline phosphatase activity derived from human bone and marrow: preliminary assessment of their osteogenicity. *Bone* 6, 313–319.
- Aonuma, H., Ogura, N., Takahashi, K., Fujimoto, Y., Iwai, S., Hashimoto, H., Ito, K., Kamino, Y., and Kondoh, T. (2012). Characteristics and osteogenic differentiation of stem/progenitor cells in the human dental follicle analyzed by gene expression profiling. *Cell Tissue Res.* 350, 317–331.
- Aurrekoetxea, M., Lopez, J., García, P., Ibarretxe, G., and Unda, F. (2012). Enhanced Wnt/ β -catenin signalling during tooth morphogenesis impedes cell differentiation and leads to alterations in the structure and mineralisation of the adult tooth. *Biol. Cell Auspices Eur. Cell Biol. Organ.* 104, 603–617.
- Bhargava, P. and Chatterji, D. (1992). DNA intervention in transcriptional activation. *FEBS Letters* 307, 245–248.
- Beck, H.C., Gosau, M., Kristensen, L.P., and Morscheck, C. (2014). A site-specific phosphorylation of the focal adhesion kinase controls the formation of spheroid cell clusters. *Neurochem. Res.* 39, 1199–1205.
- Bae, C.H., Lee, J.Y., Kim, T.H., Baek, J.A., Lee, J.C., Yang, X., Taketo, M.M., Jiang, R., and Cho, E.S. (2013). Excessive Wnt/ β -catenin signaling disturbs tooth-root formation. *J. Periodontal Res.* 48, 405–410.
- Balemans, W., and Van Hul, W. (2002). Extracellular regulation of BMP signaling in vertebrates: a cocktail of modulators. *Dev. Biol.* 250, 231–250.
- Beanan, M.J., and Sargent, T.D. (2000). Regulation and function of *Dlx3* in vertebrate development. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 218, 545–553.
- Behrens, J., von Kries, J.P., Kühl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R., and Birchmeier, W. (1996). Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 382, 638–642.
- Berghorn, K.A., Clark, P.A., Encarnacion, B., Deregis, C.J., Folger, J.K., Morasso, M.I., Soares, M.J., Wolfe, M.W., and Roberson, M.S. (2005). Developmental expression of the homeobox protein *Distal-less 3* and its relationship to progesterone production in mouse placenta. *J. Endocrinol.* 186, 315–323.
- Berghorn, K.A., Clark-Campbell, P.A., Han, L., McGrattan, M., Weiss, R.S., and Roberson, M.S. (2006). *Smad6* represses *Dlx3* transcriptional activity through inhibition of DNA binding. *J. Biol. Chem.* 281, 20357–20367.

- Bhanot, P., Brink, M., Samos, C.H., Hsieh, J.C., Wang, Y., Macke, J.P., Andrew, D., Nathans, J., and Nusse, R. (1996). A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature* 382, 225–230.
- Boland, G.M., Perkins, G., Hall, D.J., and Tuan, R.S. (2004). Wnt 3a promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells. *J. Cell. Biochem.* 93, 1210–1230.
- Brembeck, F.H., Rosário, M., and Birchmeier, W. (2006). Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of beta-catenin. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 16, 51–59.
- Brodsky, B., and Persikov, A.V. (2005). Molecular structure of the collagen triple helix. *Adv. Protein Chem.* 70, 301–339.
- Bryan, J.T., and Morasso, M.I. (2000). The Dlx3 protein harbors basic residues required for nuclear localization, transcriptional activity and binding to Msx1. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 22), 4013–4023.
- BurrIDGE, K., Molony, L., and Kelly, T. (1987). Adhesion plaques: sites of transmembrane interaction between the extracellular matrix and the actin cytoskeleton. *J. Cell Sci. Suppl.* 8, 211–229.
- Cai, X., Gong, P., Huang, Y., and Lin, Y. (2011). Notch signalling pathway in tooth development and adult dental cells. *Cell Prolif.* 44, 495–507.
- Candelieri, G.A., Liu, F., and Aubin, J.E. (2001). Individual osteoblasts in the developing calvaria express different gene repertoires. *Bone* 28, 351–361.
- Caplan, A.I. (2007). Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J. Cell. Physiol.* 213, 341–347.
- Chai, Y., and Maxson, R.E. (2006). Recent advances in craniofacial morphogenesis. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 235, 2353–2375.
- Chazotte, B. (2010). Labeling cytoskeletal F-actin with rhodamine phalloidin or fluorescein phalloidin for imaging. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2010, pdb.prot4947.
- Chen, X., Zhang, T., Shi, J., Xu, P., Gu, Z., Sandham, A., Yang, L., and Ye, Q. (2013). Notch1 signaling regulates the proliferation and self-renewal of human dental follicle cells by modulating the G1/S phase transition and telomerase activity. *PloS One* 8, e69967.
- Cho, Y.-D., Yoon, W.-J., Kim, W.-J., Woo, K.-M., Baek, J.-H., Lee, G., Ku, Y., van Wijnen, A.J., and Ryoo, H.-M. (2014). Epigenetic Modifications and Canonical WNT Signaling enable Trans-differentiation of non-osteogenic cells into osteoblasts. *J. Biol. Chem.*
- Choi, S.J., Song, I.S., Ryu, O.H., Choi, S.W., Hart, P.S., Wu, W.W., Shen, R.-F., and Hart, T.C. (2008). A 4 bp deletion mutation in DLX3 enhances osteoblastic differentiation and bone formation in vitro. *Bone* 42, 162–171.
- Choi, S.J., Song, I.S., Feng, J.Q., Gao, T., Haruyama, N., Gautam, P., Robey, P.G., and Hart, T.C. (2010). Mutant DLX 3 disrupts odontoblast polarization and dentin formation. *Dev. Biol.* 344, 682–692.
- Christodoulides, C., Scarda, A., Granzotto, M., Milan, G., Dalla Nora, E., Keogh, J., De Pergola, G., Stirling, H., Pannacciulli, N., Sethi, J.K., *et al.* (2006). WNT10B mutations in human obesity. *Diabetologia* 49, 678–684.
- Chui, A., Kalionis, B., Abumaree, M., Cocquebert, M., Fournier, T., Evain-Brion, D., Brennecke, S.P., and Murthi, P. (2013). Downstream targets of the homeobox gene DLX3 are differentially expressed in the

- placentae of pregnancies affected by human idiopathic fetal growth restriction. *Mol. Cell. Endocrinol.* *377*, 75–83.
- Clarke, B. (2008). Normal bone anatomy and physiology. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN* *3 Suppl 3*, S131–139.
- Colognato, H., and Yurchenco, P.D. (2000). Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *218*, 213–234.
- Di Costanzo, A., Festa, L., Roscigno, G., Vivo, M., Pollice, A., Morasso, M., La Mantia, G., and Calabrò, V. (2011). A dominant mutation etiologic for human tricho-dento-osseous syndrome impairs the ability of DLX3 to downregulate $\Delta Np63\alpha$. *J. Cell. Physiol.* *226*, 2189–2197.
- Dajani, R., Fraser, E., Roe, S.M., Young, N., Good, V., Dale, T.C., and Pearl, L.H. (2001). Crystal structure of glycogen synthase kinase 3 beta: structural basis for phosphate-primed substrate specificity and autoinhibition. *Cell* *105*, 721–732.
- Daniels, D.L., and Weis, W.I. (2005). Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *12*, 364–371.
- Dann, C.E., Hsieh, J.C., Rattner, A., Sharma, D., Nathans, J., and Leahy, D.J. (2001). Insights into Wnt binding and signalling from the structures of two Frizzled cysteine-rich domains. *Nature* *412*, 86–90.
- Day, T.F., Guo, X., Garrett-Beal, L., and Yang, Y. (2005). Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev. Cell* *8*, 739–750.
- De Boer, J., Siddappa, R., Gaspar, C., van Apeldoorn, A., Fodde, R., and van Blitterswijk, C. (2004). Wnt signaling inhibits osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Bone* *34*, 818–826.
- Depew, M.J., Liu, J.K., Long, J.E., Presley, R., Meneses, J.J., Pedersen, R.A., and Rubenstein, J.L. (1999). *Dlx5* regulates regional development of the branchial arches and sensory capsules. *Dev. Camb. Engl.* *126*, 3831–3846.
- Depew, M.J., Simpson, C.A., Morasso, M., and Rubenstein, J.L.R. (2005). Reassessing the *Dlx* code: the genetic regulation of branchial arch skeletal pattern and development. *J. Anat.* *207*, 501–561.
- Dollé, P., Price, M., and Duboule, D. (1992). Expression of the murine *Dlx-1* homeobox gene during facial, ocular and limb development. *Differ. Res. Biol. Divers.* *49*, 93–99.
- Doorn, J., Siddappa, R., van Blitterswijk, C.A., and de Boer, J. (2012). Forskolin enhances in vivo bone formation by human mesenchymal stromal cells. *Tissue Eng. Part A* *18*, 558–567.
- Du, Y., Ling, J., Wei, X., Ning, Y., Xie, N., Gu, H., and Yang, F. (2012). Wnt/ β -catenin signaling participates in cementoblast/osteoblast differentiation of dental follicle cells. *Connect. Tissue Res.* *53*, 390–397.
- Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A.L., and Karsenty, G. (1997). *Osf2/Cbfa1*: A Transcriptional Activator of Osteoblast Differentiation. *Cell* *89*, 747–754.
- Duverger, O., Lee, D., Hassan, M.Q., Chen, S.X., Jaisser, F., Lian, J.B., and Morasso, M.I. (2008). Molecular consequences of a frameshifted DLX3 mutant leading to Tricho-Dento-Osseous syndrome. *J. Biol. Chem.* *283*, 20198–20208.
- Duverger, O., Chen, S.X., Lee, D., Li, T., Chock, P.B., and Morasso, M.I. (2011). SUMOylation of DLX3 by SUMO1 promotes its transcriptional activity. *J. Cell. Biochem.* *112*, 445–452.

- Duverger, O., Isaac, J., Zah, A., Hwang, J., Berdal, A., Lian, J.B., and Morasso, M.I. (2013a). In vivo impact of *Dlx3* conditional inactivation in neural crest-derived craniofacial bones. *J. Cell. Physiol.* 228, 654–664.
- Duverger, O., Isaac, J., Zah, A., Hwang, J., Berdal, A., Lian, J.B., and Morasso, M.I. (2013b). In vivo impact of *Dlx3* conditional inactivation in neural crest-derived craniofacial bones. *J. Cell. Physiol.* 228, 654–664.
- Ehrlich, M., Horbelt, D., Marom, B., Knaus, P., and Henis, Y.I. (2011). Homomeric and heteromeric complexes among TGF- β and BMP receptors and their roles in signaling. *Cell. Signal.* 23, 1424–1432.
- Engin, F., Yao, Z., Yang, T., Zhou, G., Bertin, T., Jiang, M.M., Chen, Y., Wang, L., Zheng, H., Sutton, R.E., *et al.* (2008). Dimorphic effects of Notch signaling in bone homeostasis. *Nat. Med.* 14, 299–305.
- Engler, A.J., Sen, S., Sweeney, H.L., and Discher, D.E. (2006). Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* 126, 677–689.
- Etheridge, S.L., Spencer, G.J., Heath, D.J., and Genever, P.G. (2004). Expression profiling and functional analysis of wnt signaling mechanisms in mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* 22, 849–860.
- Felthaus, O., Gosau, M., and Morsczeck, C. (2014a). ZBTB16 induces osteogenic differentiation marker genes in dental follicle cells independent from RUNX2. *J. Periodontol.* 85, e144–e151.
- Felthaus, O., Gosau, M., Klein, S., Prantl, L., Reichert, T.E., Schmalz, G., and Morsczeck, C. (2014b). Dexamethasone-related osteogenic differentiation of dental follicle cells depends on ZBTB16 but not Runx2. *Cell Tissue Res.*
- Fischer, A., and Gessler, M. (2007). Delta-Notch--and then? Protein interactions and proposed modes of repression by Hes and Hey bHLH factors. *Nucleic Acids Res.* 35, 4583–4596.
- Fjeld, K., Kettunen, P., Furmanek, T., Kvinnsland, I.H., and Luukko, K. (2005). Dynamic expression of Wnt signaling-related Dickkopf1, -2, and -3 mRNAs in the developing mouse tooth. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 233, 161–166.
- Flores, M.V., Tsang, V.W.K., Hu, W., Kalev-Zylinska, M., Postlethwait, J., Crosier, P., Crosier, K., and Fisher, S. (2004). Duplicate zebrafish *runx2* orthologues are expressed in developing skeletal elements. *Gene Expr. Patterns GEP* 4, 573–581.
- Franz-Odenaal, T.A., Hall, B.K., and Witten, P.E. (2006). Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 235, 176–190.
- Franceschi, R.T., Xiao, G., Jiang, D., Gopalakrishnan, R., Yang, S., and Reith, E. (2003). Multiple signaling pathways converge on the *Cbfa1/Runx2* transcription factor to regulate osteoblast differentiation. *Connect. Tissue Res.* 44 *Suppl 1*, 109–116.
- Friedenstein, A.J., Gorskaja, J.F., and Kulagina, N.N. (1976). Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp. Hematol.* 4, 267–274.
- Frisch, S.M., and Francis, H. (1994). Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J. Cell Biol.* 124, 619–626.
- Geiger, B., Bershadsky, A., Pankov, R., and Yamada, K.M. (2001). Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 793–805.
- Ghanem, N., Jarinova, O., Amores, A., Long, Q., Hatch, G., Park, B.K., Rubenstein, J.L.R., and Ekker, M. (2003). Regulatory roles of conserved intergenic domains in vertebrate *Dlx* bigene clusters. *Genome Res.* 13, 533–543.

- Ghoul-Mazgar, S., Hotton, D., Lézot, F., Blin-Wakkach, C., Asselin, A., Sautier, J.-M., and Berdal, A. (2005). Expression pattern of *Dlx3* during cell differentiation in mineralized tissues. *Bone* 37, 799–809.
- Giles, R.H., van Es, J.H., and Clevers, H. (2003). Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1653, 1–24.
- Gorfinkiel, N., Morata, G., and Guerrero, I. (1997). The homeobox gene *Distal-less* induces ventral appendage development in *Drosophila*. *Genes Dev.* 11, 2259–2271.
- Gorski, J.P. (1998). Is all bone the same? Distinctive distributions and properties of non-collagenous matrix proteins in lamellar vs. woven bone imply the existence of different underlying osteogenic mechanisms. *Crit. Rev. Oral Biol. Med. Off. Publ. Am. Assoc. Oral Biol.* 9, 201–223.
- Grant, S.F.A., Thorleifsson, G., Reynisdottir, I., Benediktsson, R., Manolescu, A., Sainz, J., Helgason, A., Stefansson, H., Emilsson, V., Helgadottir, A., *et al.* (2006). Variant of transcription factor 7-like 2 (*TCF7L2*) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nat. Genet.* 38, 320–323.
- Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P.G., and Shi, S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 13625–13630.
- Gronthos, S., Mrozik, K., Shi, S., and Bartold, P.M. (2006). Ovine periodontal ligament stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Calcif. Tissue Int.* 79, 310–317.
- Groppe, J., Greenwald, J., Wiater, E., Rodriguez-Leon, J., Economides, A.N., Kwiatkowski, W., Baban, K., Affolter, M., Vale, W.W., Izpisua Belmonte, J.C., *et al.* (2003). Structural basis of BMP signaling inhibition by *Noggin*, a novel twelve-membered cystine knot protein. *J. Bone Joint Surg. Am.* 85-A Suppl 3, 52–58.
- Grummt, I. (1999). Regulation of mammalian ribosomal gene transcription by RNA polymerase I. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 62, 109–154.
- Guo, W., He, Y., Zhang, X., Lu, W., Wang, C., Yu, H., Liu, Y., Li, Y., Zhou, Y., Zhou, J., *et al.* (2009). The use of dentin matrix scaffold and dental follicle cells for dentin regeneration. *Biomaterials* 30, 6708–6723.
- Hall, B.K., and Miyake, T. (1992). The membranous skeleton: the role of cell condensations in vertebrate skeletogenesis. *Anat. Embryol. (Berl.)* 186, 107–124.
- Han, L., Dias Figueiredo, M., Berghorn, K.A., Iwata, T.N., Clark-Campbell, P.A., Welsh, I.C., Wang, W., O'Brien, T.P., Lin, D.M., and Roberson, M.S. (2007). Analysis of the gene regulatory program induced by the homeobox transcription factor *distal-less 3* in mouse placenta. *Endocrinology* 148, 1246–1254.
- Harmey, D., Hessle, L., Narisawa, S., Johnson, K.A., Terkeltaub, R., and Millán, J.L. (2004). Concerted regulation of inorganic pyrophosphate and osteopontin by *akp2*, *enpp1*, and *ank*: an integrated model of the pathogenesis of mineralization disorders. *Am. J. Pathol.* 164, 1199–1209.
- Hart, M.J., de los Santos, R., Albert, I.N., Rubinfeld, B., and Polakis, P. (1998). Downregulation of beta-catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, beta-catenin and GSK3 beta. *Curr. Biol. CB* 8, 573–581.
- Haskill, J.S., and Moore, M.A. (1970). Two dimensional cell separation: comparison of embryonic and adult haemopoietic stem cells. *Nature* 226, 853–854.
- Hassan, M.Q., Javed, A., Morasso, M.I., Karlin, J., Montecino, M., van Wijnen, A.J., Stein, G.S., Stein, J.L., and Lian, J.B. (2004). *Dlx3* transcriptional regulation of osteoblast differentiation: temporal recruitment of *Msx2*, *Dlx3*, and *Dlx5* homeodomain proteins to chromatin of the osteocalcin gene. *Mol. Cell. Biol.* 24, 9248–9261.

- Hassan, M.Q., Tare, R.S., Lee, S.H., Mandeville, M., Morasso, M.I., Javed, A., van Wijnen, A.J., Stein, J.L., Stein, G.S., and Lian, J.B. (2006). BMP2 commitment to the osteogenic lineage involves activation of Runx2 by DLX3 and a homeodomain transcriptional network. *J. Biol. Chem.* *281*, 40515–40526.
- Hassan, M.Q., Saini, S., Gordon, J.A.R., van Wijnen, A.J., Montecino, M., Stein, J.L., Stein, G.S., and Lian, J.B. (2009). Molecular switches involving homeodomain proteins, HOXA10 and RUNX2 regulate osteoblastogenesis. *Cells Tissues Organs* *189*, 122–125.
- Hino, S., Tanji, C., Nakayama, K.I., and Kikuchi, A. (2005). Phosphorylation of beta-catenin by cyclic AMP-dependent protein kinase stabilizes beta-catenin through inhibition of its ubiquitination. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 9063–9072.
- Holle, A.W., and Engler, A.J. (2011). More than a feeling: discovering, understanding, and influencing mechanosensing pathways. *Curr. Opin. Biotechnol.* *22*, 648–654.
- Honda, M.J., Imaizumi, M., Tsuchiya, S., and Morszeck, C. (2010). Dental follicle stem cells and tissue engineering. *J. Oral Sci.* *52*, 541–552.
- Hwang, J., Mehrani, T., Millar, S.E., and Morasso, M.I. (2008). Dlx3 is a crucial regulator of hair follicle differentiation and cycling. *Dev. Camb. Engl.* *135*, 3149–3159.
- Hynes, R.O. (2009). The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science* *326*, 1216–1219.
- Hynes, R.O., Lively, J.C., McCarty, J.H., Taverna, D., Francis, S.E., Hodivala-Dilke, K., and Xiao, Q. (2002). The diverse roles of integrins and their ligands in angiogenesis. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *67*, 143–153.
- Jikko, A., Harris, S.E., Chen, D., Mendrick, D.L., and Damsky, C.H. (1999). Collagen Integrin Receptors Regulate Early Osteoblast Differentiation Induced by BMP-2. *J. Bone Miner. Res.* *14*, 1075–1083.
- Jussila, M., and Thesleff, I. (2012). Signaling networks regulating tooth organogenesis and regeneration, and the specification of dental mesenchymal and epithelial cell lineages. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *4*, a008425.
- Kaboord, B., and Perr, M. (2008). Isolation of proteins and protein complexes by immunoprecipitation. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* *424*, 349–364.
- Kato, M., Patel, M.S., Levasseur, R., Lobov, I., Chang, B.H.-J., Glass, D.A., Hartmann, C., Li, L., Hwang, T.-H., Brayton, C.F., *et al.* (2002). Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor. *J. Cell Biol.* *157*, 303–314.
- Kémoun, P., Laurencin-Dalicioux, S., Rue, J., Farges, J.-C., Gennero, I., Conte-Auriol, F., Briand-Mesange, F., Gadelorge, M., Arzate, H., Narayanan, A.S., *et al.* (2007a). Human dental follicle cells acquire cementoblast features under stimulation by BMP-2/-7 and enamel matrix derivatives (EMD) in vitro. *Cell Tissue Res.* *329*, 283–294.
- Kémoun, P., Laurencin-Dalicioux, S., Rue, J., Vaysse, F., Roméas, A., Arzate, H., Conte-Auriol, F., Farges, J.C., Salles, J.P., and Brunel, G. (2007b). Localization of STRO-1, BMP-2/-3/-7, BMP receptors and phosphorylated Smad-1 during the formation of mouse periodontium. *Tissue Cell* *39*, 257–266.
- Kim, B.-K., Lee, H.-Y., Choi, J.-H., Kim, J.-K., Yoon, J.-B., and Yoon, S.K. (2012a). Hairless plays a role in formation of inner root sheath via regulation of Dlx3 gene. *J. Biol. Chem.* *287*, 16681–16688.

- Kim, J.-Y., Cho, S.-W., Hwang, H.-J., Lee, M.-J., Lee, J.-M., Cai, J., Choi, S.-H., Kim, C.-K., and Jung, H.-S. (2007). Evidence for expansion-based temporal BMP4/NOGGIN interactions in specifying periodontium morphogenesis. *Cell Tissue Res.* *330*, 123–132.
- Kim, T.-H., Bae, C.-H., Jang, E.-H., Yoon, C.-Y., Bae, Y., Ko, S.-O., Taketo, M.M., and Cho, E.-S. (2012b). *Col1a1-cre* mediated activation of β -catenin leads to aberrant dento-alveolar complex formation. *Anat. Cell Biol.* *45*, 193–202.
- Klees, R.F., Salaszyk, R.M., Vandenberg, S., Bennett, K., and Plopper, G.E. (2007). Laminin-5 activates extracellular matrix production and osteogenic gene focusing in human mesenchymal stem cells. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* *26*, 106–114.
- Klees, R.F., Salaszyk, R.M., Kingsley, K., Williams, W.A., Boskey, A., and Plopper, G.E. (2005). Laminin-5 Induces Osteogenic Gene Expression in Human Mesenchymal Stem Cells through an ERK-dependent Pathway. *Mol. Biol. Cell* *16*, 881–890.
- Koenig B B, J S Cook, D H Wolsing, J Ting, J P Tiesman, P E Correa, C A Olson, A L Pecquet, F Ventura, R A Grant, *et al.* (1994) Characterization and cloning of a receptor for BMP-2 and BMP-4 from NIH 3T3 cells. *Mol Cell Biol.* *14*, 5961–5974.
- Kohn, A.D., and Moon, R.T. (2005). Wnt and calcium signaling: beta-catenin-independent pathways. *Cell Calcium* *38*, 439–446.
- Komori, T. (2010). Regulation of osteoblast differentiation by Runx2. *Adv. Exp. Med. Biol.* *658*, 43–49.
- Koo, L.Y., Irvine, D.J., Mayes, A.M., Lauffenburger, D.A., and Griffith, L.G. (2002). Co-regulation of cell adhesion by nanoscale RGD organization and mechanical stimulus. *J. Cell Sci.* *115*, 1423–1433.
- Kozawa, O., Hatakeyama, D., and Uematsu, T. (2002). Divergent regulation by p44/p42 MAP kinase and p38 MAP kinase of bone morphogenetic protein-4-stimulated osteocalcin synthesis in osteoblasts. *J. Cell. Biochem.* *84*, 583–589.
- Krauss, G. (2008). *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*.
- Kula, K., Hall, K., Hart, T., and Wright, J.T. (1996). Craniofacial morphology of the tricho-dento-osseous syndrome. *Clin. Genet.* *50*, 446–454.
- Kunnimalaiyaan, M., Vaccaro, A.M., Ndiaye, M.A., and Chen, H. (2006). Overexpression of the NOTCH1 intracellular domain inhibits cell proliferation and alters the neuroendocrine phenotype of medullary thyroid cancer cells. *J. Biol. Chem.* *281*, 39819–39830.
- Kuznetsov, S.A., Krebsbach, P.H., Satomura, K., Kerr, J., Riminucci, M., Benayahu, D., and Robey, P.G. (1997). Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation in vivo. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* *12*, 1335–1347.
- Lardelli, M., Williams, R., and Lendahl, U. (1995). Notch-related genes in animal development. *Int. J. Dev. Biol.* *39*, 769–780.
- Latchman, D.S. (1997). Transcription factors: an overview. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *29*, 1305–1312.
- Lee, J.-H., Kim, B.-G., Ahn, J.-M., Park, H.-J., Park, S.-K., Yoo, J.-S., Yates, J.R., and Cho, J.-Y. (2010). Role of PI3K on the regulation of BMP2-induced beta-Catenin activation in human bone marrow stem cells. *Bone* *46*, 1522–1532.

- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S.H., and Kim, V.N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 23, 4051–4060.
- Li, H., Jeong, H.M., Choi, Y.H., Kim, J.H., Choi, J.-K., Yeo, C.-Y., Jeong, H.G., Jeong, T.C., Chun, C., and Lee, K.Y. (2014). Protein kinase A phosphorylates Dlx3 and regulates the function of Dlx3 during osteoblast differentiation. *J. Cell. Biochem.*
- Li, C., Yang, X., He, Y., Ye, G., Li, X., Zhang, X., Zhou, L., and Deng, F. (2012). Bone morphogenetic protein-9 induces osteogenic differentiation of rat dental follicle stem cells in P38 and ERK1/2 MAPK dependent manner. *Int. J. Med. Sci.* 9, 862–871.
- Li, J., Huang, X., Xu, X., Mayo, J., Bringas, P., Jiang, R., Wang, S., and Chai, Y. (2011). SMAD4-mediated WNT signaling controls the fate of cranial neural crest cells during tooth morphogenesis. *Dev. Camb. Engl.* 138, 1977–1989.
- Lichtenstein, J., Warson, R., Jorgenson, R., Dorst, J.P., and McKusick, V.A. (1972). The tricho-dento-osseous (TDO) syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 24, 569–582.
- Lin, M., Li, L., Liu, C., Liu, H., He, F., Yan, F., Zhang, Y., and Chen, Y. (2011). Wnt5a regulates growth, patterning, and odontoblast differentiation of developing mouse tooth. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 240, 432–440.
- Liu, F., Chu, E.Y., Watt, B., Zhang, Y., Gallant, N.M., Andl, T., Yang, S.H., Lu, M.-M., Piccolo, S., Schmidt-Ullrich, R., *et al.* (2008a). Wnt/beta-catenin signaling directs multiple stages of tooth morphogenesis. *Dev. Biol.* 313, 210–224.
- Liu, L., Ling, J., Wei, X., Wu, L., and Xiao, Y. (2009). Stem cell regulatory gene expression in human adult dental pulp and periodontal ligament cells undergoing odontogenic/osteogenic differentiation. *J. Endod.* 35, 1368–1376.
- Liu, W., Dong, X., Mai, M., Seelan, R.S., Taniguchi, K., Krishnadath, K.K., Halling, K.C., Cunningham, J.M., Boardman, L.A., Qian, C., *et al.* (2000). Mutations in AXIN2 cause colorectal cancer with defective mismatch repair by activating beta-catenin/TCF signalling. *Nat. Genet.* 26, 146–147.
- Liu, Y., Zheng, Y., Ding, G., Fang, D., Zhang, C., Bartold, P.M., Gronthos, S., Shi, S., and Wang, S. (2008b). Periodontal ligament stem cell-mediated treatment for periodontitis in miniature swine. *Stem Cells Dayt. Ohio* 26, 1065–1073.
- Logan, C.Y., and Nusse, R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, 781–810.
- Luan, X., Ito, Y., Dangaria, S., and Diekwisch, T.G.H. (2006). Dental follicle progenitor cell heterogeneity in the developing mouse periodontium. *Stem Cells Dev.* 15, 595–608.
- Lynch, M.P., Capparelli, C., Stein, J.L., Stein, G.S., and Lian, J.B. (1998). Apoptosis during bone-like tissue development in vitro. *J. Cell. Biochem.* 68, 31–49.
- Maier, M.M., and Gessler, M. (2000). Comparative analysis of the human and mouse Hey1 promoter: Hey genes are new Notch target genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275, 652–660.
- Manolagas, S.C. (2000). Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr. Rev.* 21, 115–137.
- McBeath, R., Pirone, D.M., Nelson, C.M., Bhadriraju, K., and Chen, C.S. (2004). Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. *Dev. Cell* 6, 483–495.

- Marie, P.J. (2008). Transcription factors controlling osteoblastogenesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 473, 98–105.
- Marini JC(1), Forlino A, Cabral WA, Barnes AM, San Antonio JD, Milgrom S, Hyland JC, Körkkö J, Prockop DJ, De Paepe A, Coucke P, Symoens S, Glorieux FH, Roughley PJ, Lund AM, Kuurila-Svahn K, Hartikka H, Cohn DH, Krakow D, Mottes M, Schwarze U, Chen D, Yang K, Kuslich C, Troendle J, Dalglish R, Byers PH. (2007). Consortium for osteogenesis imperfecta mutations in the helical domain of type I collagen: regions rich in lethal mutations align with collagen binding sites for integrins and proteoglycans. *Hum Mutat.* 28(3), 209-21.
- Mikels, A.J., and Nusse, R. (2006). Wnts as ligands: processing, secretion and reception. *Oncogene* 25, 7461–7468.
- Miller, J.R., Hocking, A.M., Brown, J.D., and Moon, R.T. (1999). Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/beta-catenin and Wnt/Ca²⁺ pathways. *Oncogene* 18, 7860–7872.
- Miner JH, Yurchenco PD. Laminin functions in tissue morphogenesis. (2004) *Annu Rev Cell Dev Biol.* 20, 255-84.
- Mitra, S.K., Hanson, D.A., and Schlaepfer, D.D. (2005). Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 56–68.
- Mittag, F., Falkenberg, E.-M., Janczyk, A., Götze, M., Felka, T., Aicher, W.K., and Kluba, T. (2012). Laminin-5 and type I collagen promote adhesion and osteogenic differentiation of animal serum-free expanded human mesenchymal stromal cells. *Orthop. Rev.* 4, e36.
- Miura, M., Gronthos, S., Zhao, M., Lu, B., Fisher, L.W., Robey, P.G., and Shi, S. (2003). SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 5807–5812.
- Morvan F, Boulukos K, Clément-Lacroix P, Roman Roman S, Suc-Royer I, Vayssière B, Ammann P, Martin P, Pinho S, Pognonec P, Mollat P, Niehrs C, Baron R, Rawadi G: Deletion of a single allele of the *Dkk1* gene leads to an increase in bone formation and bone mass. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res* 2006, 21:934–945.
- Mohr, O.L. (1919). Character changes caused by mutation of a entire region of a chromosome in *Drosophila*. *Genetics* 275–282.
- Moon, R.T., Kohn, A.D., De Ferrari, G.V., and Kaykas, A. (2004). WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nat. Rev. Genet.* 5, 691–701.
- Morasso, M.I., and Radoja, N. (2005). *Dlx* genes, p63, and ectodermal dysplasias. *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.* 75, 163–171.
- Morasso, M.I., Markova, N.G., and Sargent, T.D. (1996). Regulation of epidermal differentiation by a Distal-less homeodomain gene. *J. Cell Biol.* 135, 1879–1887.
- Morasso, M.I., Grinberg, A., Robinson, G., Sargent, T.D., and Mahon, K.A. (1999). Placental failure in mice lacking the homeobox gene *Dlx3*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 162–167.
- Morvan, F., Boulukos, K., Clément-Lacroix, P., Roman Roman, S., Suc-Royer, I., Vayssière, B., Ammann, P., Martin, P., Pinho, S., Pognonec, P., et al. (2006). Deletion of a single allele of the *Dkk1* gene leads to an increase in bone formation and bone mass. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 21, 934–945.

- Morsczeck, C., Götz, W., Schierholz, J., Zeilhofer, F., Kühn, U., Möhl, C., Sippel, C., and Hoffmann, K.H. (2005a). Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol. J. Int. Soc. Matrix Biol.* *24*, 155–165.
- Morsczeck, C., Moehl, C., Götz, W., Heredia, A., Schäffer, T.E., Eckstein, N., Sippel, C., and Hoffmann, K.H. (2005b). In vitro differentiation of human dental follicle cells with dexamethasone and insulin. *Cell Biol. Int.* *29*, 567–575.
- Morsczeck, C. (2006). Gene expression of runx2, Osterix, c-fos, DLX-3, DLX-5, and MSX-2 in dental follicle cells during osteogenic differentiation in vitro. *Calcif. Tissue Int.* *78*, 98–102.
- Morsczeck, C., Frerich, B., and Driemel, O. (2009a). Dental stem cell patents. *Recent Pat. DNA Gene Seq.* *3*, 39–43.
- Morsczeck, C., Schmalz, G., Reichert, T.E., Völlner, F., Saugspier, M., Viale-Bouroncle, S., and Driemel, O. (2009b). Gene expression profiles of dental follicle cells before and after osteogenic differentiation in vitro. *Clin. Oral Investig.* *13*, 383–391.
- Moustakas, A., and Heldin, C.-H. (2003). Ecsit-ement on the crossroads of Toll and BMP signal transduction. *Genes Dev.* *17*, 2855–2859.
- Mundlos, S., Otto, F., Mundlos, C., Mulliken, J.B., Aylsworth, A.S., Albright, S., Lindhout, D., Cole, W.G., Henn, W., Knoll, J.H., *et al.* (1997). Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell* *89*, 773–779.
- Murshed, M., Harmey, D., Millán, J.L., McKee, M.D., and Karsenty, G. (2005). Unique coexpression in osteoblasts of broadly expressed genes accounts for the spatial restriction of ECM mineralization to bone. *Genes Dev.* *19*, 1093–1104.
- Myllyharju, J., and Kivirikko, K.I. (2004). Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet.* *TIG 20*, 33–43.
- Nayak, Arnab; Viale-Bouroncle, Sandra; Morsczeck, Christian; Muller, Stefan (2014): The SUMO-specific isopeptidase SENP3 regulates MLL1/MLL2 methyltransferase complexes and controls osteogenic differentiation. In: *Mol. Cell* *55* (1), S. 47–58. DOI: 10.1016/j.molcel.2014.05.011.
- Nakamura, S., Stock, D.W., Wydner, K.L., Bollekens, J.A., Takeshita, K., Nagai, B.M., Chiba, S., Kitamura, T., Freeland, T.M., Zhao, Z., *et al.* (1996). Genomic analysis of a new mammalian distal-less gene: Dlx7. *Genomics* *38*, 314–324.
- Nelson, W.J., and Nusse, R. (2004). Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* *303*, 1483–1487.
- Nohe, A., Keating, E., Knaus, P., and Petersen, N.O. (2004). Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors. *Cell. Signal.* *16*, 291–299.
- Noisa P, Lund C, Kanduri K, Lund R, Lähdesmäki H, Lahesmaa R, Lundin K, Chokechuwattanalert H, Otonkoski T, Tuuri T, Raivio T. (2014). Notch signaling regulates the differentiation of neural crest from human pluripotent stem cells. *J Cell Sci.* *127*(Pt 9), 2083–2094.
- Nobta M, Tsukazaki T, Shibata Y, Xin C, Moriishi T, Sakano S, Shindo H, Yamaguchi A: Critical Regulation of Bone Morphogenetic Protein-induced Osteoblastic Differentiation by Delta1/Jagged1-activated Notch1 Signaling.(2005). *J Biol Chem.* *280*, 15842–15848.
- Nusse, R. (2005). Wnt signaling in disease and in development. *Cell Res.* *15*, 28–32.

- Nusse, R., van Ooyen, A., Rijsewijk, F., van Lohuizen, M., Schuurung, E., and van't Veer, L. (1985). Retroviral insertional mutagenesis in murine mammary cancer. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B Contain. Pap. Biol. Character R. Soc. G. B.* *226*, 3–13.
- Nusse, R., Brown, A., Papkoff, J., Scambler, P., Shackleford, G., McMahon, A., Moon, R., and Varmus, H. (1991). A new nomenclature for int-1 and related genes: the Wnt gene family. *Cell* *64*, 231.
- Nusse, R., Fuerer, C., Ching, W., Harnish, K., Logan, C., Zeng, A., ten Berge, D., and Kalani, Y. (2008). Wnt signaling and stem cell control. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *73*, 59–66.
- Ogata, S., and Uhthoff, H.K. (1990). The early development and ossification of the human clavicle--an embryologic study. *Acta Orthop. Scand.* *61*, 330–334.
- Ohtsuka, T., Ishibashi, M., Gradwohl, G., Nakanishi, S., Guillemot, F., and Kageyama, R. (1999). Hes1 and Hes5 as notch effectors in mammalian neuronal differentiation. *EMBO J.* *18*, 2196–2207.
- Okochi, M., Steiner, H., Fukumori, A., Tanii, H., Tomita, T., Tanaka, T., Iwatsubo, T., Kudo, T., Takeda, M., and Haass, C. (2002). Presenilins mediate a dual intramembranous gamma-secretase cleavage of Notch-1. *EMBO J.* *21*, 5408–5416.
- Panganiban, G. (2000). Distal-less function during *Drosophila* appendage and sense organ development. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *218*, 554–562.
- Paran, M., Sachs, L., Barak, Y., and Resnitzky, P. (1970). In Vitro Induction of Granulocyte Differentiation in Hematopoietic Cells from Leukemic and Non-Leukemic Patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *67*, 1542–1549.
- Park, G.T., and Morasso, M.I. (1999). Regulation of the *Dlx3* homeobox gene upon differentiation of mouse keratinocytes. *J. Biol. Chem.* *274*, 26599–26608.
- Park, G.T., and Morasso, M.I. (2002). Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) transactivates *Dlx3* through *Smad1* and *Smad4*: alternative mode for *Dlx3* induction in mouse keratinocytes. *Nucleic Acids Res.* *30*, 515–522.
- Park, G.T., Denning, M.F., and Morasso, M.I. (2001). Phosphorylation of murine homeodomain protein *Dlx3* by protein kinase C. *FEBS Lett.* *496*, 60–65.
- Press, T.; Viale-Bouroncle, S.; Felthaus, O.; Gosau, M.; Morsczeck, C. (2014): *EGR1* supports the osteogenic differentiation of dental stem cells. In: *Int Endod J.* DOI: 10.1111/iej.12299.
- Prockop, D.J. (2003). Further proof of the plasticity of adult stem cells and their role in tissue repair. *J. Cell Biol.* *160*, 807–809.
- Qiu, M., Bulfone, A., Ghattas, I., Meneses, J.J., Christensen, L., Sharpe, P.T., Presley, R., Pedersen, R.A., and Rubenstein, J.L. (1997). Role of the *Dlx* homeobox genes in proximodistal patterning of the branchial arches: mutations of *Dlx-1*, *Dlx-2*, and *Dlx-1* and *-2* alter morphogenesis of proximal skeletal and soft tissue structures derived from the first and second arches. *Dev. Biol.* *185*, 165–184.
- Riddle, R.C., Diegel, C.R., Leslie, J.M., Van Koeveering, K.K., Faugere, M.-C., Clemens, T.L., and Williams, B.O. (2013). *Lrp5* and *Lrp6* exert overlapping functions in osteoblasts during postnatal bone acquisition. *PLoS One* *8*, e63323.

- Ring, A., Kim, Y.-M., and Kahn, M. (2014). Wnt/Catenin signaling in adult stem cell physiology and disease. *Stem Cell Rev.* *10*, 512–525.
- Robinson, G.W., and Mahon, K.A. (1994). Differential and overlapping expression domains of *Dlx-2* and *Dlx-3* suggest distinct roles for Distal-less homeobox genes in craniofacial development. *Mech. Dev.* *48*, 199–215.
- Robledo, R.F., Rajan, L., Li, X., and Lufkin, T. (2002). The *Dlx5* and *Dlx6* homeobox genes are essential for craniofacial, axial, and appendicular skeletal development. *Genes Dev.* *16*, 1089–1101.
- Romer, L.H., McLean, N., Turner, C.E., and BurrIDGE, K. (1994). Tyrosine kinase activity, cytoskeletal organization, and motility in human vascular endothelial cells. *Mol. Biol. Cell* *5*, 349–361.
- Rubinfeld, B., Albert, I., Porfiri, E., Fiol, C., Munemitsu, S., and Polakis, P. (1996). Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly. *Science* *272*, 1023–1026.
- Ryoo, H.M., Hoffmann, H.M., Beumer, T., Frenkel, B., Towler, D.A., Stein, G.S., Stein, J.L., van Wijnen, A.J., and Lian, J.B. (1997). Stage-specific expression of *Dlx-5* during osteoblast differentiation: involvement in regulation of osteocalcin gene expression. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *11*, 1681–1694.
- Salasznyk, R.M., Klees, R.F., Williams, W.A., Boskey, A., and Plopper, G.E. (2007). Focal adhesion kinase signaling pathways regulate the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Exp. Cell Res.* *313*, 22–37.
- Samee, N., de Vernejoul, M.-C., and Levi, G. (2007). Role of DLX regulatory proteins in osteogenesis and chondrogenesis. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* *17*, 173–186.
- Saneyoshi, T., Kume, S., Amasaki, Y., and Mikoshiba, K. (2002). The Wnt/calcium pathway activates NF-AT and promotes ventral cell fate in *Xenopus* embryos. *Nature* *417*, 295–299.
- Sarkar, L., and Sharpe, P.T. (1999). Expression of Wnt signalling pathway genes during tooth development. *Mech. Dev.* *85*, 197–200.
- Saugspier, M., Felthaus, O., Viale-Bouroncle, S., Driemel, O., Reichert, T.E., Schmalz, G., and Morszeck, C. (2010). The differentiation and gene expression profile of human dental follicle cells. *Stem Cells Dev.* *19*, 707–717.
- Sen, C.K., and Roy, S. (2007). miRNA: licensed to kill the messenger. *DNA Cell Biol.* *26*, 193–194.
- Seo, B.-M., Miura, M., Gronthos, S., Bartold, P.M., Batouli, S., Brahimi, J., Young, M., Robey, P.G., Wang, C.-Y., and Shi, S. (2004). Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* *364*, 149–155.
- Shalhoub, V., Gerstenfeld, L.C., Collart, D., Lian, J.B., and Stein, G.S. (1989). Downregulation of cell growth and cell cycle regulated genes during chick osteoblast differentiation with the reciprocal expression of histone gene variants. *Biochemistry (Mosc.)* *28*, 5318–5322.
- Sheldahl, L.C., Slusarski, D.C., Pandur, P., Miller, J.R., Kühn, M., and Moon, R.T. (2003). Dishevelled activates Ca²⁺ flux, PKC, and CamKII in vertebrate embryos. *J. Cell Biol.* *161*, 769–777.
- Shi, S., Robey, P.G., and Gronthos, S. (2001). Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis. *Bone* *29*, 532–539.
- Shi, X., Yang, X., Chen, D., Chang, Z., and Cao, X. (1999). Smad1 interacts with homeobox DNA-binding proteins in bone morphogenetic protein signaling. *J. Biol. Chem.* *274*, 13711–13717.

- Shimamoto, T., Nakamura, S., Bollekens, J., Ruddle, F.H., and Takeshita, K. (1997). Inhibition of DLX-7 homeobox gene causes decreased expression of GATA-1 and c-myc genes and apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 3245–3249.
- Shimomura, Y., Agalliu, D., Vonica, A., Luria, V., Wajid, M., Baumer, A., Belli, S., Petukhova, L., Schinzel, A., Brivanlou, A.H., *et al.* (2010). APCDD1 is a novel Wnt inhibitor mutated in hereditary hypotrichosis simplex. *Nature* *464*, 1043–1047.
- Siddappa, R., Martens, A., Doorn, J., Leusink, A., Olivo, C., Licht, R., van Rijn, L., Gaspar, C., Fodde, R., Janssen, F., *et al.* (2008). cAMP/PKA pathway activation in human mesenchymal stem cells in vitro results in robust bone formation in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 7281–7286.
- Sieber, C., Kopf, J., Hiepen, C., and Knaus, P. (2009). Recent advances in BMP receptor signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* *20*, 343–355.
- Silvério, K.G., Davidson, K.C., James, R.G., Adams, A.M., Foster, B.L., Nociti, F.H., Somerman, M.J., and Moon, R.T. (2012). Wnt/ β -catenin pathway regulates bone morphogenetic protein (BMP2)-mediated differentiation of dental follicle cells. *J. Periodontal Res.* *47*, 309–319.
- Sneddon, J.B., Zhen, H.H., Montgomery, K., van de Rijn, M., Tward, A.D., West, R., Gladstone, H., Chang, H.Y., Morganroth, G.S., Oro, A.E., *et al.* (2006). Bone morphogenetic protein antagonist gremlin 1 is widely expressed by cancer-associated stromal cells and can promote tumor cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 14842–14847.
- Sonoyama, W., Liu, Y., Fang, D., Yamaza, T., Seo, B.-M., Zhang, C., Liu, H., Gronthos, S., Wang, C.-Y., Wang, S., *et al.* (2006). Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PloS One* *1*, e79.
- Sonoyama, W., Liu, Y., Yamaza, T., Tuan, R.S., Wang, S., Shi, S., and Huang, G.T.-J. (2008). Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J. Endod.* *34*, 166–171.
- Stock, D.W., Ellies, D.L., Zhao, Z., Ekker, M., Ruddle, F.H., and Weiss, K.M. (1996). The evolution of the vertebrate *Dlx* gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 10858–10863.
- Strasser, A., O'Connor, L., and Dixit, V.M. (2000). Apoptosis signaling. *Annu. Rev. Biochem.* *69*, 217–245.
- Struhl, G., and Greenwald, I. (1999). Presenilin is required for activity and nuclear access of Notch in *Drosophila*. *Nature* *398*, 522–525.
- Stupack, D.G., and Cheresch, D.A. (2002). Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival. *J. Cell Sci.* *115*, 3729–3738.
- Sumiyama, K., Irvine, S.Q., Stock, D.W., Weiss, K.M., Kawasaki, K., Shimizu, N., Shashikant, C.S., Miller, W., and Ruddle, F.H. (2002). Genomic structure and functional control of the *Dlx3-7* bigene cluster. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 780–785.
- Sylva, M., Li, V.S.W., Buffing, A.A.A., van Es, J.H., van den Born, M., van der Velden, S., Gunst, Q., Koolstra, J.H., Moorman, A.F.M., Clevers, H., *et al.* (2011). The BMP antagonist follistatin-like 1 is required for skeletal and lung organogenesis. *PloS One* *6*, e22616.
- Takahashi, K., Ogura, N., Aonuma, H., Ito, K., Ishigami, D., Kamino, Y., and Kondoh, T. (2013). Bone morphogenetic protein 6 stimulates mineralization in human dental follicle cells without dexamethasone. *Arch. Oral Biol.* *58*, 690–698.

- Takahashi, M., Fujita, M., Furukawa, Y., Hamamoto, R., Shimokawa, T., Miwa, N., Ogawa, M., and Nakamura, Y. (2002). Isolation of a novel human gene, APCDD1, as a direct target of the beta-Catenin/T-cell factor 4 complex with probable involvement in colorectal carcinogenesis. *Cancer Res.* *62*, 5651–5656.
- Taurin, S., Sandbo, N., Qin, Y., Browning, D., and Dulin, N.O. (2006). Phosphorylation of beta-catenin by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* *281*, 9971–9976.
- Ten Cate, A.R. (1997). The development of the periodontium—a largely ectomesenchymally derived unit. *Periodontol.* *2000* *13*, 9–19.
- Tezuka, N., Brown, A.M.C., and Yanagawa, S. (2007). GRB10 binds to LRP6, the Wnt co-receptor and inhibits canonical Wnt signaling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *356*, 648–654.
- Thesleff, I., Barrach, H.J., Foidart, J.M., Vaehri, A., Pratt, R.M., and Martin, G.R. (1981). Changes in the distribution of type IV collagen, laminin, proteoglycan, and fibronectin during mouse tooth development. *Dev. Biol.* *81*, 182–192.
- Thesleff, I., and Mikkola, M. (2002). The role of growth factors in tooth development. *Int. Rev. Cytol.* *217*, 93–135.
- Thomas, B.L., Tucker, A.S., Qui, M., Ferguson, C.A., Hardcastle, Z., Rubenstein, J.L., and Sharpe, P.T. (1997). Role of Dlx-1 and Dlx-2 genes in patterning of the murine dentition. *Dev. Camb. Engl.* *124*, 4811–4818.
- Tien, A.-C., Rajan, A., and Bellen, H.J. (2009). A Notch updated. *J. Cell Biol.* *184*, 621–629.
- Tolwinski, N.S., Wehrli, M., Rives, A., Erdeniz, N., DiNardo, S., and Wieschaus, E. (2003). Wg/Wnt signal can be transmitted through arrow/LRP5,6 and Axin independently of Zw3/Gsk3beta activity. *Dev. Cell* *4*, 407–418.
- Topper, J.N., DiChiara, M.R., Brown, J.D., Williams, A.J., Falb, D., Collins, T., and Gimbrone, M.A. (1998). CREB binding protein is a required coactivator for Smad-dependent, transforming growth factor beta transcriptional responses in endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 9506–9511.
- Torii, K., Nishizawa, K., Kawasaki, A., Yamashita, Y., Katada, M., Ito, M., Nishimoto, I., Terashita, K., Aiso, S., and Matsuoka, M. (2008). Anti-apoptotic action of Wnt5a in dermal fibroblasts is mediated by the PKA signaling pathways. *Cell. Signal.* *20*, 1256–1266.
- Tsuchiya, S., Honda, M.J., Shinohara, Y., Saito, M., and Ueda, M. (2008). Collagen type I matrix affects molecular and cellular behavior of purified porcine dental follicle cells. *Cell Tissue Res.* *331*, 447–459.
- Tsuchiya, S., Ohshima, S., Yamakoshi, Y., Simmer, J.P., and Honda, M.J. (2010). Osteogenic Differentiation Capacity of Porcine Dental Follicle Progenitor Cells. *Connect. Tissue Res.* *51*, 197–207.
- Urist, M.R., Mikulski, A.J., Nakagawa, M., and Yen, K. (1977). A bone matrix calcification-initiator noncollagenous protein. *Am. J. Physiol.* *232*, C115–127.
- Viale-Bouroncle, S., Völlner, F., Möhl, C., Küpper, K., Brockhoff, G., Reichert, T.E., Schmalz, G., and Morszeck, C. (2011). Soft matrix supports osteogenic differentiation of human dental follicle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *410*, 587–592.
- Viale-Bouroncle, S., Felthaus, O., Schmalz, G., Brockhoff, G., Reichert, T.E., and Morszeck, C. (2012). The transcription factor DLX3 regulates the osteogenic differentiation of human dental follicle precursor cells. *Stem Cells Dev.* *21*, 1936–1947.

- Viale-Bouroncle, Sandra; Gosau, Martin; Morszeck, Christian (2014): Laminin regulates the osteogenic differentiation of dental follicle cells via integrin- α 2/ β 1 and the activation of the FAK/ERK signaling pathway. In: *Cell Tissue Res.* 357 (1), S. 345–354. DOI: 10.1007/s00441-014-1869-x.
- Völlner, F., Ernst, W., Driemel, O., and Morszeck, C. (2009). A two-step strategy for neuronal differentiation in vitro of human dental follicle cells. *Differ. Res. Biol. Divers.* 77, 433–441.
- Watt, F.M., and Huck, W.T.S. (2013). Role of the extracellular matrix in regulating stem cell fate. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 467–473.
- Willis, I.M. (1993). RNA polymerase III. Genes, factors and transcriptional specificity. *Eur. J. Biochem. FEBS* 212, 1–11.
- Winer, J., Jung, C.K., Shackel, I., and Williams, P.M. (1999). Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro. *Anal. Biochem.* 270, 41–49.
- Wrighton, K.H., Lin, X., Yu, P.B., and Feng, X.-H. (2009). Transforming Growth Factor {beta} Can Stimulate Smad1 Phosphorylation Independently of Bone Morphogenic Protein Receptors. *J. Biol. Chem.* 284, 9755–9763.
- Xiao, Y.-T., Xiang, L.-X., and Shao, J.-Z. (2007). Bone morphogenetic protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 362, 550–553.
- Xing, Q., Ye, Q., Fan, M., Zhou, Y., Xu, Q., and Sandham, A. (2010). Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide inhibits the osteoblastic differentiation of preosteoblasts by activating Notch1 signaling. *J. Cell. Physiol.* 225, 106–114.
- Yalvac, M.E., Ramazanoglu, M., Gumru, O.Z., Sahin, F., Palotás, A., and Rizvanov, A.A. (2009). Comparison and optimisation of transfection of human dental follicle cells, a novel source of stem cells, with different chemical methods and electro-poration. *Neurochem. Res.* 34, 1272–1277.
- Yang, G., Yuan, G., Li, X., Liu, P., Chen, Z., and Fan, M. (2014). BMP-2 induction of Dlx3 expression is mediated by p38/Smad5 signaling pathway in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J. Cell. Physiol.* 229, 943–954.
- Yao, S., Prpic, V., Pan, F., and Wise, G.E. (2010). TNF-alpha upregulates expression of BMP-2 and BMP-3 genes in the rat dental follicle--implications for tooth eruption. *Connect. Tissue Res.* 51, 59–66.
- Yourek, G., Hussain, M.A., and Mao, J.J. (2007). Cytoskeletal changes of mesenchymal stem cells during differentiation. *ASAIO J. Am. Soc. Artif. Intern. Organs* 1992 53, 219–228.
- Zamurovic, N., Cappellen, D., Rohner, D., and Susa, M. (2004). Coordinated Activation of Notch, Wnt, and Transforming Growth Factor- β Signaling Pathways in Bone Morphogenic Protein 2-induced Osteogenesis Notch TARGET GENE Hey1 INHIBITS MINERALIZATION AND Runx2 TRANSCRIPTIONAL ACTIVITY. *J. Biol. Chem.* 279, 37704–37715.
- Zhang, C., Chang, J., Sonoyama, W., Shi, S., and Wang, C.-Y. (2008). Inhibition of Human Dental Pulp Stem Cell Differentiation by Notch Signaling. *J. Dent. Res.* 87, 250–255.
- Zhang, R., Yang, G., Wu, X., Xie, J., Yang, X., and Li, T. (2013). Disruption of Wnt/ β -catenin signaling in odontoblasts and cementoblasts arrests tooth root development in postnatal mouse teeth. *Int. J. Biol. Sci.* 9, 228–236.
- Zhou, S. (2011). TGF- β regulates β -catenin signaling and osteoblast differentiation in human mesenchymal stem cells. *J. Cell. Biochem.* 112, 1651–1660.

Zirn, B., Samans, B., Wittmann, S., Pietsch, T., Leuschner, I., Graf, N., and Gessler, M. (2006). Target genes of the WNT/beta-catenin pathway in Wilms tumors. *Genes. Chromosomes Cancer* 45, 565–574.

Zuk, P.A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D.A., Huang, J.I., Mizuno, H., Alfonso, Z.C., Fraser, J.K., Benhaim, P., and Hedrick, M.H. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell* 13, 4279–4295.

V Anhang

Tabelle 1: Hochregulierte Gene nach DLX3-Überexpression in DFVs

Gen Symbol	Gen Name	Log ² Ratio
<i>CHI3L1</i>	chitinase 3-like 1 (cartilage glycoprotein-39)	14,6582909
<i>PLXDC1</i>	plexin domain containing 1	8,10023071
<i>RGS5</i>	regulator of G-protein signaling 5	6,94907042
<i>LRRC32</i>	leucine rich repeat containing 32	6,71549386
<i>GPRC5B</i>	G protein-coupled receptor, family C, group 5, member B	5,29966438
<i>SEPP1</i>	selenoprotein P, plasma, 1	5,27589554
<i>WIF1</i>	WNT inhibitory factor 1	4,39682771
<i>EGR3</i>	early growth response 3	4,1432317
<i>VCAN</i>	versican	4,10337925
<i>ARRDC4</i>	arrestin domain containing 4	3,97152477
<i>GLDN</i>	gliomedin	3,89114704
<i>GXYLT2</i>	glucoside xylosyltransferase 2	3,56036586
<i>PTGIS</i>	prostaglandin I2 (prostacyclin) synthase	3,4059069
<i>ENTPD3</i>	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 3	3,29966715
<i>MAFB</i>	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B (avian)	3,28151039
<i>SLC7A11</i>	solute carrier family 7, (cationic amino acid transporter, y+ system) member 11	3,2734819
<i>MMP11</i>	matrix metalloproteinase 11 (stromelysin 3)	3,25546697
<i>FAM172A</i>	family with sequence similarity 172, member A	3,17778496
<i>FRZB</i>	frizzled-related protein	3,15417346
<i>OLFM2</i>	olfactomedin 2	3,10163195
<i>GPC4</i>	glypican 4	3,05154528
<i>C10orf10</i>	chromosome 10 open reading frame 10	2,95928163
<i>CLN8</i>	ceroid-lipofuscinosis, neuronal 8 (epilepsy, progressive with mental retardation)	2,91544377
<i>EGR2</i>	early growth response 2	2,90350295
<i>KBTD10</i>	kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 10	2,85910876
<i>A2M</i>	alpha-2-macroglobulin	2,85740394
<i>FAM171A2</i>	family with sequence similarity 171, member A2	2,82634876
<i>LRRN4CL</i>	LRRN4 C-terminal like	2,81295798
<i>METTL7B</i>	methyltransferase like 7B	2,80583758
<i>DCLK1</i>	doublecortin-like kinase 1	2,78062752
<i>ENTPD1</i>	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1	2,76182135
<i>MMP13</i>	matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3)	2,73363192
<i>HEPH</i>	hephaestin	2,7167447
<i>APCDD1</i>	adenomatosis polyposis coli down-regulated 1	2,71212937
<i>COL1A1</i>	collagen, type I, alpha 1	2,70720568
<i>TAGLN</i>	transgelin	2,70356867
<i>HMOX1</i>	heme oxygenase (decycling) 1	2,68445738
<i>WISP2</i>	WNT1 inducible signaling pathway protein 2	2,66561144
<i>PHKG1</i>	phosphorylase kinase, gamma 1 (muscle)	2,66447353
<i>HAVCR2</i>	hepatitis A virus cellular receptor 2	2,66421775

Gen Symbol	Gen Name	Log ² Ratio
<i>EMCN</i>	endomucin	2,64826409
<i>FIGF</i>	c-fos induced growth factor (vascular endothelial growth factor D)	2,64297266
<i>DIRAS3</i>	DIRAS family, GTP-binding RAS-like 3	2,61724503
<i>F2RL2</i>	coagulation factor II (thrombin) receptor-like 2	2,59745904
<i>MIR145</i>	microRNA 145	2,58310986
<i>ENPP5</i>	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 5 (putative)	2,57754837
<i>TLN2</i>	talin 2	2,55802347
<i>EXPH5</i>	exophilin 5	2,54968231
<i>C13orf15</i>	chromosome 13 open reading frame 15	2,54321777
<i>VCAM1</i>	vascular cell adhesion molecule 1	2,53295948
<i>LMOD1</i>	leiomodulin 1 (smooth muscle)	2,52646466
<i>ISLR</i>	immunoglobulin superfamily containing leucine-rich repeat	2,51091815
<i>YPEL1</i>	yippee-like 1 (Drosophila)	2,5084862
<i>CA12</i>	carbonic anhydrase XII	2,47900039
<i>TRIM16L</i>	tripartite motif-containing 16-like	2,47501111
<i>ARHGAP20</i>	Rho GTPase activating protein 20	2,47186508
<i>GPR77</i>	G protein-coupled receptor 77	2,46951632
<i>C14orf37</i>	chromosome 14 open reading frame 37	2,46687053
<i>PDGFD</i>	platelet derived growth factor D	2,45234508
<i>MMP10</i>	matrix metalloproteinase 10 (stromelysin 2)	2,44371324
<i>C20orf103</i>	chromosome 20 open reading frame 103	2,43934109
<i>SOX4</i>	SRY (sex determining region Y)-box 4	2,43003653
<i>RHOJ</i>	ras homolog gene family, member J	2,42266596
<i>GREM2</i>	gremlin 2	2,41926868
<i>ADAMTS9</i>	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 9	2,41759151
<i>RASL12</i>	RAS-like, family 12	2,41310802
<i>RHOBTB1</i>	Rho-related BTB domain containing 1	2,38897044
<i>SNCAIP</i>	synuclein, alpha interacting protein	2,38525664
<i>HLA-DRA</i>	major histocompatibility complex, class II, DR alpha	2,38072585
<i>CHRNA1</i>	cholinergic receptor, nicotinic, alpha 1 (muscle)	2,36331347
<i>EFCAB4B</i>	EF-hand calcium binding domain 4B	2,35934844
<i>TRIM16</i>	tripartite motif-containing 16	2,34284904
<i>CCDC102B</i>	coiled-coil domain containing 102B	2,34175152
<i>SLIT3</i>	slit homolog 3 (Drosophila)	2,33877569
<i>ODZ2</i>	odz, odd Oz/ten-m homolog 2 (Drosophila)	2,32950593
<i>LAMA2</i>	laminin, alpha 2	2,32937272
<i>ZNF608</i>	zinc finger protein 608	2,32599178
<i>LPAR6</i>	lysophosphatidic acid receptor 6	2,31634155
<i>NT5DC2</i>	5'-nucleotidase domain containing 2	2,30583056
<i>TXNIP</i>	thioredoxin interacting protein	2,30253406
<i>APOD</i>	apolipoprotein D	2,30216303
<i>HMCN1</i>	hemicentin 1	2,26895894
<i>ODZ3</i>	odz, odd Oz/ten-m homolog 3 (Drosophila)	2,26390356

Gen Symbol	Gen Name	Log ² Ratio
<i>VIT</i>	vitrin	2,26104233
<i>TSPAN11</i>	tetraspanin 11	2,2542109
<i>EGR1</i>	early growth response 1	2,25407185
<i>CC2D2B</i>	coiled-coil and C2 domain containing 2B	2,22992239
<i>SH3BGRL2</i>	SH3 domain binding glutamic acid-rich protein like 2	2,22200721
<i>FGF10</i>	fibroblast growth factor 10	2,2138884
<i>ADM</i>	adrenomedullin	2,21209907
<i>FAM198B</i>	family with sequence similarity 198, member B	2,20913946
<i>C2CD4A</i>	C2 calcium-dependent domain containing 4A	2,18714444
<i>OMD</i>	osteomodulin	2,18520329
<i>SNORA38B</i>	small nucleolar RNA, H/ACA box 38B (retrotransposed)	2,18464293
<i>FAM84A</i>	family with sequence similarity 84, member A	2,18352266
<i>RGMA</i>	RGM domain family, member A	2,17816388
<i>GPC3</i>	glypican 3	2,17625785
<i>ARHGAP28</i>	Rho GTPase activating protein 28	2,17573296
<i>LPHN3</i>	latrophilin 3	2,1600422
<i>CUBN</i>	cubilin (intrinsic factor-cobalamin receptor)	2,1555395
<i>MYC</i>	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	2,15518916
<i>CERK</i>	ceramide kinase	2,15173811
<i>BAALC</i>	brain and acute leukemia, cytoplasmic	2,14005741
<i>MIR214</i>	microRNA 214	2,13518415
<i>IFT80</i>	intraflagellar transport 80 homolog (Chlamydomonas)	2,12995212
<i>PCDHB5</i>	protocadherin beta 5	2,11005704
<i>MFAP5</i>	microfibrillar associated protein 5	2,1038196
<i>MYO1D</i>	myosin ID	2,09443992
<i>PCDHB14</i>	protocadherin beta 14	2,09435935
<i>FAM171A1</i>	family with sequence similarity 171, member A1	2,09287696
<i>PCDHB3</i>	protocadherin beta 3	2,08580675
<i>LOC100130713</i>	hypothetical LOC100130713	2,08105198
<i>IL16</i>	interleukin 16 (lymphocyte chemoattractant factor)	2,07830516
<i>BOC</i>	Boc homolog (mouse)	2,07348628
<i>PLXNC1</i>	plexin C1	2,06157722
<i>GFRA1</i>	GDNF family receptor alpha 1	2,05540757
<i>TSPAN11</i>	tetraspanin 11	2,0508941
<i>TMEFF1</i>	transmembrane protein with EGF-like and two follistatin-like domains 1	2,04984596
<i>EFCAB4B</i>	EF-hand calcium binding domain 4B	2,0460005
<i>IGDCC4</i>	immunoglobulin superfamily, DCC subclass, member 4	2,04221463
<i>COL14A1</i>	collagen, type XIV, alpha 1	2,03979476
<i>TTC3</i>	tetratricopeptide repeat domain 3	2,02913029
<i>PLTP</i>	phospholipid transfer protein	2,02737575
<i>TIAM2</i>	T-cell lymphoma invasion and metastasis 2	2,02348198
<i>RBP1</i>	retinol binding protein 1, cellular	2,01921775
<i>CCR1</i>	chemokine (C-C motif) receptor 1	2,01915827

Gen Symbol	Gen Name	Log² Ratio
<i>PCDHB10</i>	protocadherin beta 10	2,01473836
<i>RAB33A</i>	RAB33A, member RAS oncogene family	2,01461198
<i>LOC100128988</i>	hypothetical LOC100128988	2,01096852

Tabelle 2: Herunterregulierte Gene nach DLX3-Überexpression in DFVs

Gen Symbol	Gen Name	Log² Ratio
<i>TYMS</i>	thymidylate synthetase	-2,002839759
<i>BMPR1B</i>	bone morphogenetic protein receptor, type IB	-2,013287213
<i>TNFAIP3</i>	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	-2,014801905
<i>IRAK2</i>	interleukin-1 receptor-associated kinase 2	-2,016106709
<i>SEMA6D</i>	sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain, (semaphorin) 6D	-2,017816525
<i>ID3</i>	inhibitor of DNA binding 3, dominant negative helix-loop-helix protein	-2,017989965
<i>ME1</i>	malic enzyme 1, NADP(+)-dependent, cytosolic	-2,019033712
<i>SLC5A3</i>	solute carrier family 5 (sodium/myo-inositol cotransporter), member 3	-2,020167616
<i>ORC6</i>	origin recognition complex, subunit 6	-2,021571177
<i>SLC7A5</i>	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 5	-2,021719715
<i>NTSR1</i>	neurotensin receptor 1 (high affinity)	-2,026506075
<i>EPGN</i>	epithelial mitogen homolog (mouse)	-2,037992864
<i>NCAPH</i>	non-SMC condensin I complex, subunit H	-2,038144021
<i>CST2</i>	cystatin SA	-2,042058222
<i>KIF2C</i>	kinesin family member 2C	-2,047783222
<i>KCNT2</i>	potassium channel, subfamily T, member 2	-2,049507828
<i>TBX18</i>	T-box 18	-2,050270127
<i>KCNE4</i>	potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 4	-2,053901507
<i>ADAP1</i>	ArfGAP with dual PH domains 1	-2,055590657
<i>PTGS1</i>	prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	-2,05772473
<i>GALNTL2</i>	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-like 2	-2,071730007
<i>ASF1B</i>	ASF1 anti-silencing function 1 homolog B (<i>S. cerevisiae</i>)	-2,085365839
<i>ASL</i>	argininosuccinate lyase	-2,099013579
<i>ECT2</i>	epithelial cell transforming sequence 2 oncogene	-2,102067505
<i>AIM2</i>	absent in melanoma 2	-2,108324596
<i>C11orf96</i>	chromosome 11 open reading frame 96	-2,109337575
<i>NCAPG</i>	non-SMC condensin I complex, subunit G	-2,110747492
<i>ICAM2</i>	intercellular adhesion molecule 2	-2,111951933
<i>PLK4</i>	polo-like kinase 4	-2,116061415
<i>SHCBP1</i>	SHC SH2-domain binding protein 1	-2,116365786
<i>DTL</i>	denticleless homolog (<i>Drosophila</i>)	-2,116873413
<i>ANGPTL1</i>	angiopoietin-like 1	-2,118134937
<i>SAMD9</i>	sterile alpha motif domain containing 9	-2,124425866
<i>PLCB1</i>	phospholipase C, beta 1 (phosphoinositide-specific)	-2,133119811
<i>ACYP1</i>	acylphosphatase 1, erythrocyte (common) type	-2,135771048
<i>KRT34</i>	keratin 34	-2,139994368
<i>HMMR</i>	hyaluronan-mediated motility receptor (RHAMM)	-2,146640348
<i>FJX1</i>	four jointed box 1 (<i>Drosophila</i>)	-2,152828656
<i>SECTM1</i>	secreted and transmembrane 1	-2,153592066
<i>KRTAP1-1</i>	keratin associated protein 1-1	-2,159399988
<i>KRTAP1-1</i>	keratin associated protein 1-1	-2,159399988

Gen Symbol	Gen Name	Log ² Ratio
<i>MFSD2A</i>	major facilitator superfamily domain containing 2A	-2,175404222
<i>OBFC1</i>	oligonucleotide/oligosaccharide-binding fold containing 1	-2,177647589
<i>PRSS23</i>	protease, serine, 23	-2,180918715
<i>TYSND1</i>	trypsin domain containing 1	-2,18225244
<i>DTX4</i>	deltex homolog 4 (Drosophila)	-2,187642507
<i>CDK1</i>	cyclin-dependent kinase 1	-2,187718327
<i>SKA1</i>	spindle and kinetochore associated complex subunit 1	-2,190087484
<i>LYPD3</i>	LY6/PLAUR domain containing 3	-2,19177545
<i>GALNT3</i>	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 3 (GalNAc-T3)	-2,192484282
<i>LEPREL1</i>	leprecan-like 1	-2,194856319
<i>CDH2</i>	cadherin 2, type 1, N-cadherin (neuronal)	-2,206073717
<i>SGK1</i>	serum/glucocorticoid regulated kinase 1	-2,209716825
<i>FGF2</i>	fibroblast growth factor 2 (basic)	-2,209729844
<i>UCP2</i>	uncoupling protein 2 (mitochondrial, proton carrier)	-2,223379936
<i>RPS6KC1</i>	ribosomal protein S6 kinase, 52kDa, polypeptide 1	-2,245463856
<i>SOX5</i>	SRY (sex determining region Y)-box 5	-2,254897727
<i>THBD</i>	thrombomodulin	-2,256103103
<i>NUF2</i>	NUF2, NDC80 kinetochore complex component, homolog (S. cerevisiae)	-2,268297704
<i>VEGFC</i>	vascular endothelial growth factor C	-2,26943159
<i>SLC39A8</i>	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 8	-2,271060281
<i>PNP</i>	purine nucleoside phosphorylase	-2,274022455
<i>CKAP2L</i>	cytoskeleton associated protein 2-like	-2,274381864
<i>ISG15</i>	ISG15 ubiquitin-like modifier	-2,274663283
<i>PAQR5</i>	progesterin and adipoQ receptor family member V	-2,276611312
<i>FAM54A</i>	family with sequence similarity 54, member A	-2,277205517
<i>ID1</i>	inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein	-2,294206097
<i>IFI44</i>	interferon-induced protein 44	-2,295718102
<i>ADAMTS1</i>	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 1	-2,29984718
<i>HIST1H3B</i>	histone cluster 1, H3b	-2,314453376
<i>METTL7A</i>	methyltransferase like 7A	-2,322175486
<i>BUB1</i>	budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog (yeast)	-2,338737593
<i>IL18R1</i>	interleukin 18 receptor 1	-2,345675589
<i>SMOX</i>	spermine oxidase	-2,35262846
<i>HERC6</i>	hect domain and RLD 6	-2,355105192
<i>PGM2L1</i>	phosphoglucomutase 2-like 1	-2,357083717
<i>XBP1</i>	X-box binding protein 1	-2,360772467
<i>IFIT3</i>	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3	-2,372309925
<i>BRCA2</i>	breast cancer 2, early onset	-2,398386221
<i>HIST1H2BM</i>	histone cluster 1, H2bm	-2,409050272
<i>NCAM1</i>	neural cell adhesion molecule 1	-2,417470023
<i>LOC100291851</i>	putative ubiquitin-like protein FUBI-like protein ENSP00000310146-like	-2,434667908
<i>C13orf33</i>	chromosome 13 open reading frame 33	-2,45384139
<i>SH2B3</i>	SH2B adaptor protein 3	-2,456742242

Gen Symbol	Gen Name	Log² Ratio
FAM19A3	family with sequence similarity 19 (chemokine (C-C motif)-like), member A3	-2,457839144
VAT1L	vesicle amine transport protein 1 homolog (T. californica)-like	-2,47177513
FAM167B	family with sequence similarity 167, member B	-2,473869675
APOL3	apolipoprotein L, 3	-2,501066643
MAOB	monoamine oxidase B	-2,515225066
GLB1L3	galactosidase, beta 1-like 3	-2,515616494
IGFBP6	insulin-like growth factor binding protein 6	-2,526659928
LYPD1	LY6/PLAUR domain containing 1	-2,556189867
BRIP1	BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1	-2,56569735
LRRN3	leucine rich repeat neuronal 3	-2,583819876
SMOC1	SPARC related modular calcium binding 1	-2,601931534
CYP2S1	cytochrome P450, family 2, subfamily S, polypeptide 1	-2,606226554
XKR8	XK, Kell blood group complex subunit-related family, member 8	-2,606344882
CTSS	cathepsin S	-2,613767833
BCL2A1	BCL2-related protein A1	-2,622494051
CNNM1	cyclin M1	-2,634461324
TTK	TTK protein kinase	-2,63805931
RTP4	receptor (chemosensory) transporter protein 4	-2,655443807
APOL1	apolipoprotein L, 1	-2,661321859
SHISA2	shisa homolog 2 (Xenopus laevis)	-2,723469102
SULF1	sulfatase 1	-2,745368863
CNTN3	contactin 3 (plasmacytoma associated)	-2,749754844
IFIH1	interferon induced with helicase C domain 1	-2,776266381
KRTAP1-5	keratin associated protein 1-5	-2,824350231
KRTAP1-5	keratin associated protein 1-5	-2,824350231
NID2	nidogen 2 (osteonidogen)	-2,826013779
PAPL	iron/zinc purple acid phosphatase-like protein	-2,842997834
ZC3HAV1	zinc finger CCCH-type, antiviral 1	-2,889308995
KRTAP1-1	keratin associated protein 1-1	-2,922274091
MYPN	myopalladin	-2,930111368
LOXL3	lysyl oxidase-like 3	-2,972243885
CXCL10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	-2,976410472
PODXL	podocalyxin-like	-3,008347031
STX11	syntaxin 11	-3,013246086
TPD52L1	tumor protein D52-like 1	-3,118862607
TNFSF13B	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b	-3,14345367
RHEBL1	Ras homolog enriched in brain like 1	-3,171563
RAB27B	RAB27B, member RAS oncogene family	-3,189204257
SLCO4A1	solute carrier organic anion transporter family, member 4A1	-3,201252557
KLF4	Kruppel-like factor 4 (gut)	-3,282413516
TNFSF10	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	-3,310188789
CCL5	chemokine (C-C motif) ligand 5	-3,321540487
EREG	epiregulin	-3,348741467

Gen Symbol	Gen Name	Log² Ratio
<i>NR4A2</i>	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	-3,364273512
<i>IFI30</i>	interferon, gamma-inducible protein 30	-3,367455778
<i>IL6</i>	interleukin 6 (interferon, beta 2)	-3,383918917
<i>ITGA2</i>	integrin, alpha 2 (CD49B, alpha 2 subunit of VLA-2 receptor)	-3,409334137
<i>ASPHD2</i>	aspartate beta-hydroxylase domain containing 2	-3,427468721
<i>DDX58</i>	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58	-3,488650324
<i>ACTN2</i>	actinin, alpha 2	-3,633258463
<i>PRRG4</i>	proline rich Gla (G-carboxyglutamic acid) 4 (transmembrane)	-3,801601999
<i>GRB10</i>	growth factor receptor-bound protein 10	-3,874754753
<i>CMPK2</i>	cytidine monophosphate (UMP-CMP) kinase 2, mitochondrial	-3,99186934
<i>GNA14</i>	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 14	-4,00462874
<i>DDX60</i>	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 60	-4,051408337
<i>PMAIP1</i>	phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1	-4,054671401
<i>PDE8B</i>	phosphodiesterase 8B	-4,344674213
<i>SLC6A2</i>	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, noradrenalin), member 2	-4,45214321
<i>BAMBI</i>	BMP and activin membrane-bound inhibitor homolog (<i>Xenopus laevis</i>)	-4,736088369
<i>RARRES3</i>	retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 3	-4,749947277
<i>SLC6A15</i>	solute carrier family 6 (neutral amino acid transporter), member 15	-5,18663735
<i>RSAD2</i>	radical S-adenosyl methionine domain containing 2	-5,301725589
<i>PRSS35</i>	protease, serine, 35	-5,35150249
<i>CXCL11</i>	chemokine (C-X-C motif) ligand 11	-5,378724144
<i>IFIT2</i>	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2	-5,839818374
<i>REERG</i>	RAS-like, estrogen-regulated, growth inhibitor	-5,908529005
<i>IDO1</i>	indoleamine 2,3-dioxygenase 1	-5,947824174
<i>HERC5</i>	hect domain and RLD 5	-6,015743273
<i>KCNQ5</i>	potassium voltage-gated channel, KQT-like subfamily, member 5	-6,242216953
<i>CRLF2</i>	cytokine receptor-like factor 2	-6,369013809
<i>TFPI2</i>	tissue factor pathway inhibitor 2	-6,895687999
<i>OASL</i>	2'-5'-oligoadenylate synthetase-like	-8,600812771
<i>P2RY2</i>	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 2	-8,646744139
<i>GBP4</i>	guanylate binding protein 4	-8,662623408
<i>NCF2</i>	neutrophil cytosolic factor 2	-9,216225394
<i>UNC5C</i>	unc-5 homolog C (<i>C. elegans</i>)	-9,87348571
<i>DNER</i>	delta/notch-like EGF repeat containing	-12,78125857
<i>IL7R</i>	interleukin 7 receptor	-16,71646627
<i>RANBP3L</i>	RAN binding protein 3-like	-18,5693061

Tabelle 3: Analyse von Signalweg der hochregulierten Gene.

A) *Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationship* (PANTHER)-Datenbank

Term	%
Wnt	5,97
Cadherin	3,73

B) *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG)-Datenbank

Term	%
Focal adhesion	4,48

VI Eigene Publikationen

- **Viale-Bouroncle, S.**; Klingelhöffer, C.; Ettl, T.; Morsczeck, C. (2015): The WNT inhibitor APCDD1 sustains the expression of β -catenin during the osteogenic differentiation of human dental follicle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015 Feb 13;457(3):314-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.12.107. Epub 2015 Jan 12.
- **Viale-Bouroncle, S.**; Klingelhöffer, C.; Ettl, T.; Reichert, TE; Morsczeck, C. (2014): A protein kinase A (PKA)/ β -catenin pathway sustains the BMP2/DLX3-induced osteogenic differentiation in dental follicle cells (DFCs). *Cell Signal.* 2015 Mar;27(3):598-605. doi: 10.1016/j.cellsig.2014.12.008. Epub 2014 Dec 19.
- **Viale-Bouroncle, S.**; Gosau, M.; Morsczeck, C. (2014): Collagen I induces the expression of alkaline phosphatase and osteopontin via independent activations of FAK and ERK signalling pathways. *Arch. Oral Biol.* 59 (12), S. 1249–1255. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2014.07.013.
- Ettl, T., **Viale-Bouroncle, S.**, Hautmann, M.G., Gosau, M., Kölbl, O., Reichert, T.E., and Morsczeck, C. (2014). AKT and MET signalling mediates antiapoptotic radioresistance in head neck cancer cell lines. *Oral Oncol.*
- Nayak, Arnab; **Viale-Bouroncle, Sandra**; Morsczeck, Christian; Muller, Stefan (2014): The SUMO-specific isopeptidase SENP3 regulates MLL1/MLL2 methyltransferase complexes and controls osteogenic differentiation. *Mol. Cell* 55 (1), S. 47–58. DOI: 10.1016/j.molcel.2014.05.011.
- Press, T.; **Viale-Bouroncle, S.**; Felthaus, O.; Gosau, M.; Morsczeck, C. (2014): EGR1 supports the osteogenic differentiation of dental stem cells. *Int Endod J.* DOI: 10.1111/iej.12299.
- **Viale-Bouroncle, Sandra**; Gosau, Martin; Morsczeck, Christian (2014): Laminin regulates the osteogenic differentiation of dental follicle cells via integrin- α 2/ β 1 and the activation of the FAK/ERK signaling pathway. *Cell Tissue Res.* 357 (1), S. 345–354. DOI: 10.1007/s00441-014-1869-x.
- **Viale-Bouroncle, Sandra**; Gosau, Martin; Morsczeck, Christian (2014): NOTCH1 signaling regulates the BMP2/DLX-3 directed osteogenic differentiation of dental follicle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 443 (2), S. 500–504. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.11.120.
- **Viale-Bouroncle, S.**; Buegers, R.; Morsczeck, C.; Gosau, M. (2013): β -Tricalcium phosphate induces apoptosis on dental follicle cells. *Calcif. Tissue Int.* 92 (5), S. 412–417. DOI: 10.1007/s00223-012-9694-2.
- **Viale-Bouroncle, Sandra**; Felthaus, Oliver; Schmalz, Gottfried; Reichert, Torsten E.; Morsczeck, Christian (2013): Transcription factors for dental stem cell differentiation. *Int J Oral Maxillofac Implants* 28 (6), S. e478-86.
- Felthaus, Oliver; Oliver, Felthaus; **Viale-Bouroncle, Sandra**; Driemel, Oliver; Reichert, Torsten E.; Schmalz, Gottfried; Morsczeck, Christian (2012): Transcription factors TP53 and SP1 and the osteogenic differentiation of dental stem cells. *Differentiation* 83 (1), S. 10–16. DOI: 10.1016/j.diff.2011.08.008.
- **Viale-Bouroncle, Sandra**; Felthaus, Oliver; Schmalz, Gottfried; Brockhoff, Gero; Reichert, Torsten E.; Morsczeck, Christian (2012): The transcription factor DLX3 regulates the osteogenic differentiation of human dental follicle precursor cells. *Stem Cells Dev.* 21 (11), S. 1936–1947. DOI: 10.1089/scd.2011.0422.
- **Viale-Bouroncle, Sandra**; Gosau, Martin; Küpper, Kevin; Möhl, Christoph; Brockhoff, Gero; Reichert, Torsten E. *et al.* (2012): Rigid matrix supports osteogenic differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED). *Differentiation* 84 (5), S. 366–370. DOI: 10.1016/j.diff.2012.08.005.

- **Viale-Bouroncle, Sandra**; Bey, Brigitte; Reichert, Torsten E.; Schmalz, Gottfried; Morszeck, Christian (2011): β -tricalcium-phosphate stimulates the differentiation of dental follicle cells. *J Mater Sci Mater Med* 22 (7), S. 1719–1724. DOI: 10.1007/s10856-011-4345-0.
- **Viale-Bouroncle, Sandra**; Völlner, Florian; Möhl, Christoph; Küpper, Kevin; Brockhoff, Gero; Reichert, Torsten E. *et al.* (2011): Soft matrix supports osteogenic differentiation of human dental follicle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 410 (3), S. 587–592. DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.06.031.
- Saugspier, Michael; Felthaus, Oliver; **Viale-Bouroncle, Sandra**; Driemel, Oliver; Reichert, Torsten E.; Schmalz, Gottfried; Morszeck, Christian (2010): The differentiation and gene expression profile of human dental follicle cells. In: *Stem Cells Dev.* 19 (5), S. 707–717. DOI: 10.1089/scd.2009.0027.
- Morszeck, Christian; Schmalz, Gottfried; Reichert, Torsten Eugen; Völlner, Florian; Saugspier, Michael; **Viale-Bouroncle, Sandra**; Driemel, Oliver (2009): Gene expression profiles of dental follicle cells before and after osteogenic differentiation in vitro. *Clin Oral Investig* 13 (4), S. 383–391. DOI: 10.1007/s00784-009-0260-x.
- Zou, Peijian; Groves, Matthew R.; Viale-Bouroncle, **Sandra Viale-B.D.**; Ortiz de Orué Lucana, Darío (2008): Crystallization and preliminary characterization of a novel haem-binding protein of *Streptomyces reticuli*. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* 64 (Pt 5), S. 386–390. DOI: 10.1107/S1744309108008348.

