

Susanne Winter
Dr. med dent.

Molekulare Grundlagen der Interaktionen von Parodontalligament-Fibroblasten und Zellen des Alveolarknochens: Eine vergleichende *in vitro*-Untersuchung zur mRNA Gen-Transkription in Monolayern und Kokulturen

Geboren am 02.04.1975 in Ludwigshafen am Rhein
Staatsexamen am 09.07.2003 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Mund-Zahn-Kieferheilkunde
Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. P. Tomakidi

Das Parodontium ist ein Gewebekomplex, welches den Zahn im Alveolarknochen verankert. Es besteht aus einem Teil der Gingiva, dem Wurzelzement, dem Parodontalen Ligament und dem Alveolarknochen. Um die Gewebshomöostase des Parodontiums aufrechtzuerhalten, kommunizieren die verschiedenen Gewebe miteinander, indem sie über diffusible Wachstumsfaktoren interagieren. Zur Aufklärung dieser Zell-Zell-Interaktionen fehlte bisher ein komplexes Kulturmodell, das eine Annäherung an die äußerst komplexe *in vivo*-Situation ermöglicht. Obwohl es zwischenzeitlich gelungen ist, den komplexen Kulturmodellen der Haut und Oralmukosa auch eines für das Parodontium hinzuzufügen, wurden bisher die bei den Interaktionen im Parodontium beteiligten diffusiblen Faktoren noch nicht näher analysiert. Somit wurden bei dem in der vorliegenden Arbeit entwickelten Modell die Zellen des Parodontalen Ligaments und des Alveolarknochens im Sinne einer organotypischen Kokultur kultiviert, bei der die beiden Zelltypen räumlich getrennt voneinander wuchsen und nur über die sezernierten diffusiblen Faktoren in Interaktion treten konnten. Dabei wurden Multiwell-Platten mit kompatiblen Filter-Hängeeinheiten verwendet, die eine getrennte Extraktion der zellulären RNA aus beiden Zelltypen erlaubte. Durch diese Annäherung an die Gewebsphysiologie wurde ein *in vitro*-System geschaffen, das im Vergleich zum Monolayer, bei dem die Zellen eines Zelltyps einen geschlossenen Zellrasen bilden, eine deutlich höhere *in vivo*-Relevanz besitzt.

Um nun einen Einblick in die Zell-Zell-Interaktionen zwischen PDL-Fibroblasten und Osteoblasten in den Kokulturen zu erhalten, war das Hauptziel der Arbeit, die unterschiedlichen Genexpressionsprofile der PDL-Fibroblasten und der Osteoblasten in der Kokultur im Vergleich zum Monolayer und innerhalb der Kokultur in Abhängigkeit zur Kulturzeit mittels semi-quantitativer PCR zu untersuchen. Hierfür wurden putative Differenzierungsmarker, extrazelluläre Matrixmoleküle, Moleküle des Matrixumbaus und Wachstumsfaktoren, sowie deren Rezeptoren, die eine Rolle in der Gewebshomöostase des Parodontiums spielen können, als Zielgene ausgewählt. Die qualitative Detektion einzelner ausgewählter Moleküle auf Proteinebene mit Hilfe der Indirekten Immunfluoreszenz ermöglichte eine Verifizierung vorausgegangener Untersuchungen auf Genexpressionsebene. Ein weiteres Ziel der Arbeit war es, das Wachstumsverhalten der PDL-Fibroblasten und Osteoblasten zu untersuchen, indem die Morphogenese dieser Zelltypen in der Kokultur im Vergleich zu den Monolayern beobachtet wurde.

In der Arbeit wurde diesbezüglich festgestellt, dass für die Zellschichtung der PDL-Fibroblasten das Vorhandensein der Osteoblasten erforderlich ist. Diese üben offensichtlich einen unterstützenden Einfluss auf die PDL-Fibroblasten aus, da in dem Monolayer keine Schichtung beobachtet werden konnte, sondern nur in der Kokultur.

Hinsichtlich des Vergleiches der Genexpression in den Kokulturen von PDL-Fibroblasten und Osteoblasten nach einer Woche mit zwei Wochen konnte generell eine stärkere Expression der untersuchten Moleküle nach zwei Wochen beobachtet werden. Bei den PDL-Fibroblasten

blieb jedoch die *mRNA*-Expression von ALP, COL3, OC, PDGF-B und PDGFR-B relativ konstant, während die von IGF-2 und PDGF-A geringer wurde. Bei den Osteoblasten war nach zwei Wochen eine gleichbleibende Genexpression von ALP und EGF-R und eine schwächere lediglich für IGF-2 zu erkennen. Daher ist anzunehmen, dass die beobachteten Modulationen der Genexpressionen innerhalb der Kokultur über die Kulturzeit entstehen, da in dem etablierten Kultursystem *in vivo*-nähere Bedingungen vorherrschen und somit Interaktionen zwischen den Zelltypen der beiden Gewebe ablaufen können.

Auch bei dem Vergleich der Kokulturen nach einer und zwei Wochen mit den korrespondierenden Monolayern konnten Unterschiede der Genexpressionsniveaus festgestellt werden. Nach einer Kulturzeit von zwei Wochen konnte in PDL-Fibroblasten und Osteoblasten im Vergleich zum Monolayer in der Regel eine stärkere Expression der *mRNA* der untersuchten Moleküle detektiert werden. Nach einer Woche war beides, eine stärkere und schwächere Expression zu erkennen. Somit ist die Modulation der Genexpression auch abhängig vom Kulturtyp, d.h. ob die beiden Zelltypen miteinander interagieren können oder nicht. Unterstützt wurden diese Annahmen auch durch die durchgeführten Immunfluoreszenz-Experimente, die einen Anstieg des Fluoreszenzsignals und damit einen Anstieg der Proteinexpression in der Kokultur und über die Zeit nahe legen. Hierdurch besteht eine Korrelation der Befunde zur Proteinexpression zu denen der Genexpression.

Zusammenfassend kann berichtet werden, dass diese Untersuchungen an PDL-Fibroblasten und Osteoblasten zum ersten Mal demonstriert haben, dass auf der Ebene der Gen- und Proteinexpression eine Modulation der für die beiden Zelltypen relevanten Moleküle detektiert werden konnte, und dass diese Modulation von der Kulturzeit und von dem Kulturtyp, also den interzellulären Interaktionen, abhängig ist. Weiterhin kann festgestellt werden, dass die Expression der analysierten Differenzierungsmarker, der extrazellulären Matrixmoleküle, der Matrix Metalloproteinase-13, der Wachstumsfaktoren, sowie der Wachstumsfaktor-Rezeptoren eine entscheidende Rolle in und während der Interaktion von PDL-Fibroblasten und Osteoblasten spielt, sodass die untersuchten Moleküle auch als putative Kandidaten in der Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase *in vivo* angesehen werden können.