

# **Molekulare Untersuchung des Einflusses der Proteinkinase C auf die osteogene Differenzierung von dentalen Follikelzellen**



Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Biomedizinischen Wissenschaften  
(Dr. rer. physiol.)

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Oliver Peter Pieles  
aus  
Regensburg

im Jahr  
2022



# **Molekulare Untersuchung des Einflusses der Proteinkinase C auf die osteogene Differenzierung von dentalen Follikelzellen**



Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Biomedizinischen Wissenschaften  
(Dr. rer. physiol.)

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Oliver Peter Pieles  
aus  
Regensburg

im Jahr  
2022

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig  
Betreuer: Prof. Dr. Christian Morsczeck  
Tag der mündlichen Prüfung: 24.04.2023

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b> .....	6
<b>1.1 Regenerative Zahnmedizin</b> .....	6
<b>1.2 Dentale Stamm-/Vorläuferzellen</b> .....	7
<b>1.3 Dentale Follikelzellen (DFCs)</b> .....	8
<b>1.3.1 Die Rolle von DFCs während der Zahnentwicklung</b> .....	8
<b>1.3.2 Isolierung und Charakterisierung von DFCs</b> .....	10
<b>1.3.3 Die Bedeutung von DFCs für die regenerative Medizin</b> .....	11
<b>1.4 Die osteogene Differenzierung von DFCs</b> .....	13
<b>1.4.1 Induktion der osteogenen Differenzierung</b> .....	13
<b>1.4.2 Molekulare Signalwege während der osteogenen Differenzierung mesenchymaler Stamm-/Vorläuferzellen</b> .....	13
<b>1.4.3 Besonderheiten der osteogenen Differenzierung von DFCs</b> .....	18
<b>1.5 Proteinkinase C (PKC)</b> .....	23
<b>1.5.1 Struktureller Aufbau und Aktivierungsmechanismen von PKC</b> .....	23
<b>1.5.2 Die Regulierung biologischer Prozesse durch PKC</b> .....	26
<b>1.5.3 Die Regulierung der Differenzierung mesenchymaler Stamm-/Vorläuferzellen durch PKC</b> .....	28
<b>1.6 Ziel der Arbeit</b> .....	33
<b>2 Material und Methoden</b> .....	36
<b>2.1 Material</b> .....	36
<b>2.1.1 Geräte</b> .....	37
<b>2.1.2 Verbrauchsmaterialien</b> .....	39
<b>2.1.3 Zellkulturmedien</b> .....	39
<b>2.1.4 Aktivatoren und Inhibitoren</b> .....	40
<b>2.1.5 Puffer und sonstige Lösungen</b> .....	41
<b>2.1.6 Antikörper</b> .....	43
<b>2.1.7 Primer</b> .....	45
<b>2.1.8 siRNAs</b> .....	46
<b>2.1.9 Kits</b> .....	46
<b>2.1.10 Software</b> .....	47
<b>2.2 Methoden</b> .....	47
<b>2.2.1 Zellkultur</b> .....	47
<b>2.2.2 Induktion der osteogenen Differenzierung und Behandlung von DFCs</b> .....	48
<b>2.2.3 Western Blot</b> .....	48

---

2.2.4	Aufreinigung von Proteinen aus dem Zellkern.....	50
2.2.5	ALP-Assay .....	50
2.2.6	RT-qPCR zur Genexpressionsanalyse.....	50
2.2.7	Alizarin-Färbung.....	51
2.2.8	siRNA-Transfektion .....	52
2.2.9	NF- $\kappa$ B-Assay .....	52
2.2.10	Proliferationsassay .....	53
2.2.11	PKA-Assay .....	53
2.2.12	Immunpräzipitation .....	54
2.2.13	Immunfluoreszenzfärbung.....	54
2.2.14	qPCR zur Quantifizierung mitochondrialer DNA.....	55
2.2.15	Durchflusszytometrie zur Bestimmung von oxidativem Stress .....	56
2.2.16	Glutathion-Assay.....	56
2.2.17	Statistische Auswertung.....	57
3	Ergebnisse.....	58
3.1	Klassische PKCs hemmen die osteogene Differenzierung von DFCs über Akt und $\beta$ -Catenin .....	58
3.1.1	Die Regulierung von $\beta$ -Catenin in DFCs nach osteogener Induktion und nach Hemmung von klassischen PKCs.....	58
3.1.2	Die Regulierung von PKA und Akt in DFCs nach osteogener Induktion und nach Hemmung von klassischen PKCs.....	60
3.1.3	Der Einfluss von Akt auf die osteogene Differenzierung von DFCs .....	62
3.1.4	Die Regulierung von GSK3 $\beta$ und $\beta$ -Catenin stromabwärts von Akt .....	64
3.1.5	Die Regulierung der Aktivität von PKC und Akt durch PTHrP und WNT5A ...	69
3.2	Klassische PKCs und Akt regulieren die osteogene Differenzierung von DFCs über NF- $\kappa$ B .....	71
3.2.1	Die Regulierung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs während der osteogenen Differenzierung von DFCs.....	71
3.2.2	Der Einfluss von NF- $\kappa$ B auf die Proliferation und osteogene Differenzierung von DFCs .....	74
3.2.3	Die Regulierung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs durch klassische PKCs.....	78
3.2.4	Die Regulierung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs durch Akt .....	80
3.3	BMP2 induziert die Aktivität von PKA über die endogene Expression von PTHrP .....	83
3.3.1	Die Aktivierung von PKA während der BMP2-induzierten osteogenen Differenzierung von DFCs.....	83
3.3.2	Evaluierung der Rolle von Smad-Proteinen, klassischen PKCs und Akt für die Aktivierung von PKA.....	83

3.3.3	Evaluierung der Rolle von DLX3 und PTHrP für die Aktivierung von PKA	85
3.3.4	Mechanismus der Aktivierung von PKA durch PTHrP	87
3.3.5	Die Rückkopplung von PKA auf den BMP-Signalweg und PTHrP	88
3.4	Klassische PKCs regulieren den mitochondrialen Metabolismus und oxidativen Stress während der osteogenen Differenzierung von DFCs	90
3.4.1	Die Regulierung des Energiemetabolismus während der osteogenen Differenzierung von DFCs	90
3.4.2	Die Regulierung von Proteinen zur Neutralisierung von oxidativem Stress während der osteogenen Differenzierung von DFCs	90
3.4.3	Die Regulierung des mitochondrialen Metabolismus durch klassische PKCs und Akt	94
3.4.4	Die Regulierung des oxidativen Stresses durch klassische PKCs und Akt	95
4	Diskussion	98
4.1	Die Bedeutung von klassischen PKCs und Akt für die osteogene Differenzierung von DFCs	99
4.2	Die Regulierung von $\beta$ -Catenin während der osteogenen Differenzierung von DFCs	101
4.3	Die Rolle des NF- $\kappa$ B-Signalwegs in DFCs	103
4.4	Die Bedeutung von PTHrP und PKA für die osteogene Differenzierung von DFCs	107
4.5	Die Rolle des Energiemetabolismus für die osteogene Differenzierung von DFCs	109
4.6	Die Bedeutung des oxidativen Stresses und dessen Neutralisierung während der osteogenen Differenzierung von DFCs	112
4.7	Schlussfolgerung und Ausblick	116
5	Zusammenfassung	118
6	Abstract	120
7	Anhang	121
7.1	Angehängte Ergebnisse	121
7.2	Abkürzungsverzeichnis	125
7.3	Abbildungsverzeichnis	128
7.4	Tabellenverzeichnis	130
8	Literaturverzeichnis	131
9	Danksagung	161
10	Lebenslauf	162
11	Selbstständigkeitserklärung	164

# 1 Einleitung

## 1.1 Regenerative Zahnmedizin

Zahnerkrankungen zählen zu den Volkskrankheiten und können die Lebensqualität erheblich beeinträchtigen (1). Eine der häufigsten Zahnerkrankungen mit einer weltweiten Prävalenz von über 10% ist die Parodontitis, welche zur Schädigung des Zahnhalteapparats bis hin zum Zahnverlust führen kann (2,3). Während die Ursachen für eine Parodontitis vielschichtig sind und aus dem Zusammenspiel von mikrobiellen Pathogenen, Entzündungsreaktionen und Umwelteinflüssen resultieren (4,5), zielen Therapien darauf ab, den Krankheitsprozess aufzuhalten und beschädigtes bzw. verloren gegangenes Gewebe zu ersetzen. Falls gute Aussichten bestehen, den betroffenen Zahn zu erhalten, ist die Therapie der Wahl bei Parodontitis zunächst die Entfernung von Konkrementen mit anschließender Wurzelglättung. Anderenfalls ist der therapeutische Goldstandard der Ersatz des Zahns und von beschädigtem Gewebe des Zahnhalteapparats durch künstliche Implantate (3,6). Allerdings sind Implantat-basierte Therapien nicht risikofrei (7). So kommt es nach dem Einsetzen von Implantaten z. B. häufig zu einer Entzündung des umliegenden Gewebes, welche als Periimplantitis bezeichnet wird (8). Darüber hinaus sind künstliche Implantate in ihrer Funktionalität und Langlebigkeit in der Regel unterlegen im Vergleich zu natürlichen Zähnen (9). Auf der Suche nach Alternativen zielen moderne Therapieansätze darauf ab, dentale Stamm-/Vorläuferzellen zur Regeneration dentaler Gewebe bis hin zum gesamten Zahn einzusetzen (10,11). Beim sogenannten „Tissue Engineering“ erfolgt eine künstliche Nachbildung von Geweben auf Basis von Zellen, wobei diese häufig mit Wachstumsfaktoren und nicht-zellulären Trägermaterialien kombiniert werden (12).

Ein bedeutender Meilenstein des dentalen „Tissue Engineering“ gelang der Arbeitsgruppe um Takashi Tsuji durch Erzeugung eines künstlichen Zahnkeims im Mausmodell. Hierfür wurden Stammzellen aus den epithelialen und mesenchymalen Geweben, welche zu Beginn der Zahnentwicklung den natürlichen Zahnkeim bilden, isoliert und anschließend *in vitro* wieder zusammengeführt. Dieser künstliche Zahnkeim konnte sowohl *in vitro* als Organkultur als auch *in vivo* nach Transplantation unter eine murine Nebennierenkapsel zu einem künstlichen Zahn heranwachsen (13). Ein solcher ektopisch entwickelter Zahn konnte schließlich in die leere Knochenhöhle eines murinen Zahnverlustmodells transplantiert werden und dort physiologische Zahnfunktionen ausüben (14). Darüber hinaus gelang es, einen künstlichen Zahnkeim nach wenigen

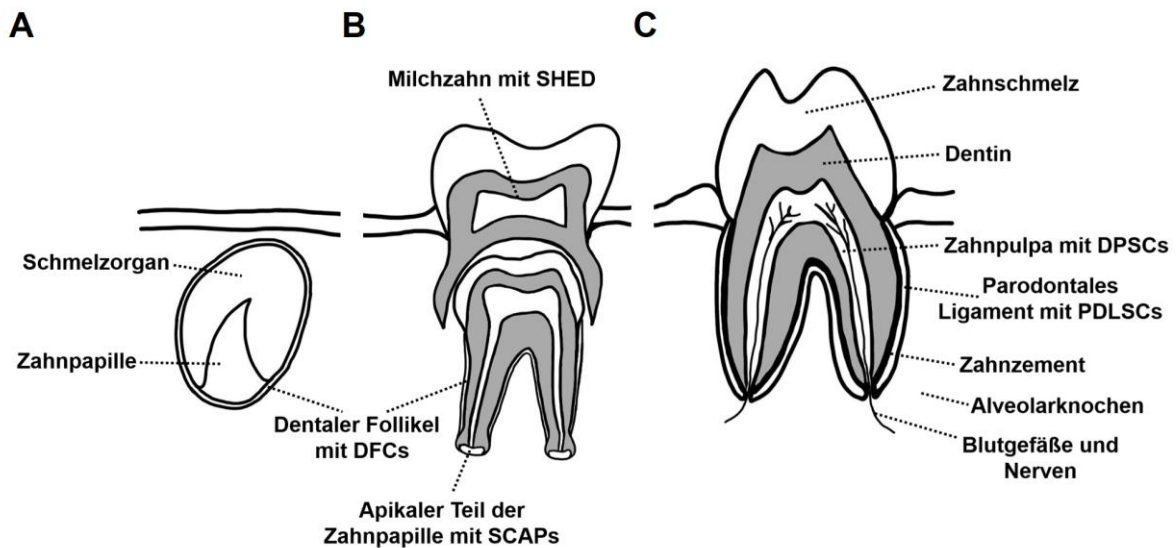


Tagen Organkultur direkt in eine leere Zahnhöhle zu transplantieren und zu einem funktionellen künstlichen Zahn heranwachsen zu lassen (15).

In einem anderen Ansatz erfolgte die Erzeugung eines biologischen Zahnimplantats durch Kombination von dentalen Stammzellen mit einer Matrix aus Hydroxylapatit und Tricalciumphosphat, einer Gelmatrix sowie einer Porzellankrone (16). Außerdem zeigten Studien, dass auch eine direkte Transplantation von Stamm-/Vorläuferzellen ohne Trägermaterial insbesondere die Regeneration des Zahnhalteapparats begünstigen kann (17,18). Darüber hinaus konnten Versuchen an Ratten zeigen, dass eine Transplantation von konditioniertem Medium oder Exosomen aus Stamm-/Vorläuferzellen, mit einer Matrix als Trägermaterial, zur Regeneration von parodontalen Schäden beitragen kann (19,20). Klinische Studien zeigten bereits einen möglichen therapeutischen Nutzen der Anwendung von „Tissue Engineering“ am Menschen zur Behandlung von Schäden des Zahnhalteapparats (21–23) und der Zahnpulpa (24).

## 1.2 Dentale Stamm-/Vorläuferzellen

Verschiedene Stamm-/Vorläuferzellen können zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Entwicklung von menschlichem Zahngewebe isoliert werden. Aus dem mesenchymalen Anteil eines Zahnkeims, dessen Ursprung in der embryonalen Neuralleiste liegt, entwickeln sich zunächst die Zahnpapille, aus deren apikalem Anteil Stammzellen (SCAPs, engl. *Stem cells from apical papilla*) gewonnen werden können, sowie der dentale Follikel mit seinen Stamm-/Vorläuferzellen (DFCs, engl. *Dental follicle cells*). Ausgehend von der Zahnpapille bilden sich im weiteren Verlauf Dentinbildende Odontoblasten und die Zahnpulpa, welche weiterhin Stammzellen (DPSCs, engl. *Dental pulp stem cells*) enthält, während der dentale Follikel den Zahnhalteapparat ausbildet, der innerhalb des parodontalen Ligaments ebenfalls Stamm-/Vorläuferzellen (PDLSCs, engl. *Periodontal ligament stem cells*) beinhaltet (25–28). Aus dem epithelialen Anteil eines Zahnkeims, dessen embryonaler Ursprung im Ektoderm des ersten Kiemenbogens liegt, entwickelt sich das Schmelzorgan, woraus Ameloblasten hervorgehen, die den Zahnschmelz bilden. Da diese Zellen aber nach Abschluss der Zahnentwicklung im Menschen nicht mehr vorhanden sind, kann der Zahnschmelz eines vollständig entwickelten Zahns nicht mehr endogen regeneriert werden (25,26). Abbildung 1 zeigt den Aufbau eines menschlichen Zahns während und nach der Zahnentwicklung und wo die mesenchymalen Stamm-/Vorläuferzellen zu finden sind.



**Abb. 1: Zahnentwicklung und dentale Stammzellen.** Die Abbildung zeigt einen Zahn in einer frühen (A) und späteren (B) Entwicklungsphase sowie einen vollständig entwickelten Zahn (C) mit den wichtigsten Bestandteilen und den enthaltenen dentalen Stammzellen. Über dem heranwachsenden Zahn in der späteren Entwicklungsphase ist ein Milchzahn dargestellt, welcher ebenfalls Stammzellen (SHED, engl. Stem cells from human exfoliated deciduous teeth) enthält (B). Eigene Darstellung nach (25–30).

Aus der Zahnentwicklung wird ersichtlich, dass eine Isolierung von SCAPs und DFCs – im Gegensatz zu DPSCs und PDLSCs – nur aus Zähnen möglich ist, die sich noch in der Entwicklung befinden (27,31). Eine mögliche Alternative für regenerative Therapien stellen mesenchymale Stammzellen nicht-dentalen Ursprungs dar, wie z. B. mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark (engl. *Bone marrow mesenchymal stem cells*, BMMSCs) oder Stammzellen aus Fettgewebe (engl. *Adipose-derived stem cells*, ADSCs), welche ebenfalls Potential zur Regeneration dentaler Gewebe besitzen (32).

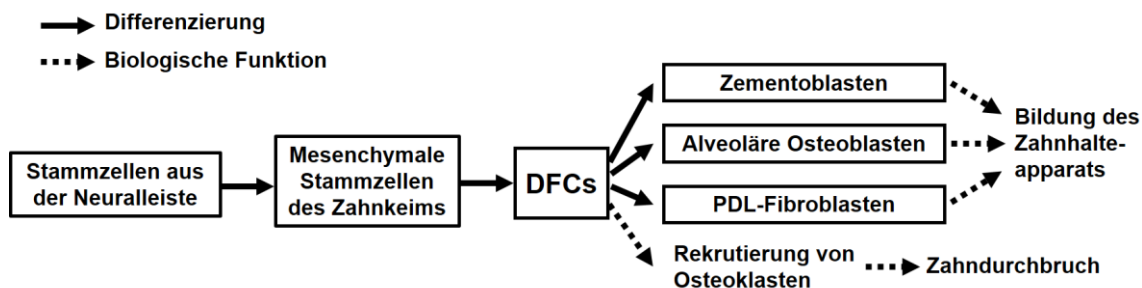
### 1.3 Dentale Follikelzellen (DFCs)

#### 1.3.1 Die Rolle von DFCs während der Zahnentwicklung

Für die Entwicklung regenerativer Therapien des Zahnhalteapparats, beispielsweise zur Behandlung von Parodontitis, sind DFCs als dessen endogene Vorläuferzellen besonders interessant. Im dentalen Follikel (auch Zahnfollikel genannt) befinden sich die Zellen innerhalb von lockerem Bindegewebe, welches um die Zahnpapille und das

Schmelzorgan liegt (vgl. Abb. 1). Im Laufe der Zahnentwicklung bildet der dentale Follikel den gesamten Zahnhalteapparat, bestehend aus dem Wurzelzement, dem umliegenden Alveolarknochen sowie dem parodontalen Ligament, welches die mineralisierten Gewebe miteinander verankert (28,33,34). Besonders wichtig für die Entwicklung der Zahnwurzel ist dabei die Interaktion mit der Hertwig-Epithelscheide – einem epithelialen Gewebe, das nach Ausbildung der Zahnkrone apikal auswandert und die Form der Zahnwurzel festlegt (35,36).

Neben der Entwicklung des Zahnhalteapparats ist der Zahnfollikel – im Zusammenspiel mit den umliegenden Geweben – von zentraler Bedeutung für den Durchbruch heranwachsender Zähne (37,38). Ein wesentlicher Bestandteil dieses Prozesses ist die Resorption von Alveolarknochen durch Osteoklasten zur Freilegung eines Eruptionswegs über der Zahnkrone. Daraufhin führt die Osteogenese im Bereich der Zahnwurzel zur Bewegung des Zahns durch den Eruptionsweg (38). Abbildung 2 fasst schematisch den Ursprung von DFCs und die Bedeutung der Zellen für die Zahnentwicklung zusammen.



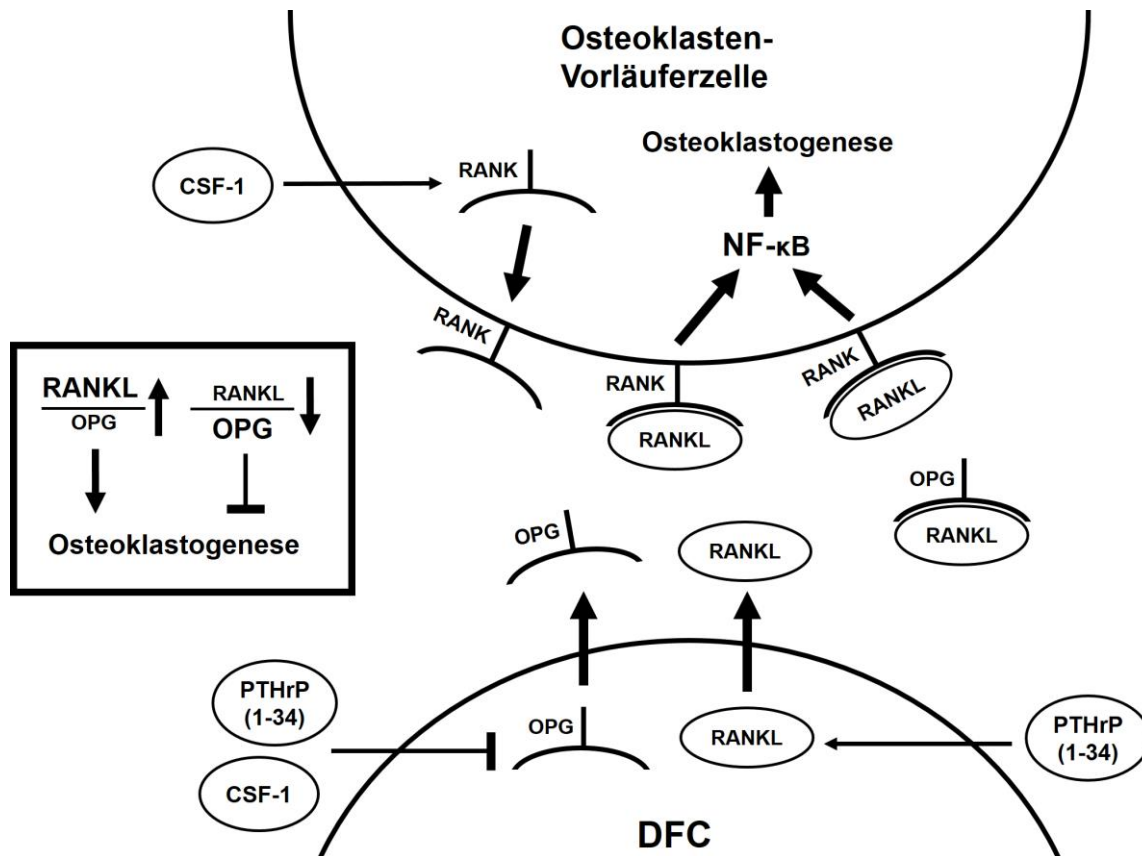
**Abb. 2: Ursprung von DFCs und Rolle während der Zahnentwicklung.** Die Abbildung zeigt schematisch den embryonalen Ursprung von DFCs und deren Rolle während der Zahnentwicklung. Zelltypen sind von einem Rahmen umgeben, während biologische Prozesse ohne Rahmen dargestellt sind. Nähere Details sind im Fließtext beschrieben. Eigene Darstellung nach (25–28,33,34,37,38).

Dabei unterscheiden sich DFCs entsprechend ihrer Lokalisierung innerhalb des dentalen Follikels. Beispielsweise produzieren Zellen des koronalen Follikels bei der Initiierung des Zahndurchbruchs – im Gegensatz zu Zellen des apikalen Anteils – kein Collagen I (39). Dahingegen fördert der koronale Zahnfollikel ein Milieu, welches mononukleäre Zellen anlockt und deren Differenzierung in Osteoklasten stimuliert (40). Hierzu trägt eine erhöhte Expression und Sekretion von RANKL (engl. *Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand*) bei (41–43). Dieses Protein bindet an den

Rezeptor RANK (engl. *Receptor activator of nuclear factor kappa B*), welcher sich auf der Zellmembran von Osteoklasten und Vorläuferzellen befindet und deren Aktivität stimuliert (44). Darüber hinaus spielt die Sekretion des Proteins Osteoprotegerin (OPG) eine Rolle. OPG ist ebenfalls ein Rezeptor für RANKL und kann dieses „abfangen“, was folglich die Aktivierung von RANK hemmt (45,46). Daher wird die Osteoklastogenese durch einen hohen RANKL/OPG-Quotienten stimuliert (38). Des Weiteren führt eine hohe Expression von CSF-1 (engl. *Colony-stimulating factor 1*) im dentalen Follikel zur Herunterregulierung von OPG in DFCs sowie zur Induktion von RANK in Osteoklastenvorläufern, was folglich den Zahndurchbruch unterstützt (47,48). Darüber hinaus fördert die Stimulierung mit einem posttranslational erzeugten Spaltprodukt (Aminosäuren 1-34) des Proteins PTHrP (engl. *Parathyroid hormone-related protein*) diesen Prozess durch Erhöhung des RANKL/OPG-Quotienten (49). Anschließend führt die Aktivierung des Rezeptors RANK innerhalb der Zelle insbesondere zur Induktion des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B (engl. *Nuclear factor kappa B*), um die weitere Osteoklastogenese zu steuern (50). Passend hierzu konnten Que et al. zeigen, dass die Expression von NF- $\kappa$ B im dentalen Follikel während des Höhepunkts der Einwanderung mononukleärer Zellen am stärksten ist (51). Abbildung 3 fasst die molekularen Mechanismen, welche den Zahndurchbruch steuern, schematisch zusammen.

### 1.3.2 Isolierung und Charakterisierung von DFCs

DFCs wurden zum ersten Mal im Jahr 1992 aus molaren Zähnen von Ratten isoliert (52). Daraufhin gelang Morsczeck et al. 2005 die Isolierung von Zellen aus Zahnfollikeln humaner Weisheitszähne (53). Die isolierten DFCs sind plastikadhärent und bilden Kolonien nach Aussäen in geringer Dichte, wodurch sie von anderen Zellpopulationen aus dem dentalen Follikel selektiert werden können und wichtige Eigenschaften mit BMMSCs teilen (53–55). Humane DFCs exprimieren typische Stammzellmarker wie OCT4, Notch1, STRO und CD44 (56) und lassen sich *in vitro* über mindestens zehn Passagen ohne Induktion zellulärer Seneszenz vermehren (57). Dabei besitzen sie die Fähigkeit, in die verschiedenen Zelltypen des Zahnhalteapparats – Osteoblasten, Zementoblasten und PDL-Fibroblasten (Fibroblasten des parodontalen Ligaments) – zu differenzieren (11). Somit weisen DFCs Eigenschaften multipotenter Stammzellen auf. Dabei legen Studien nahe, dass DFCs ein heterogenes Gemisch von Stamm- und Vorläuferzellen mit verschiedenen Differenzierungspotentialen sind (56,58).



**Abb. 3: Molekulare Mechanismen während der Initiierung des Zahndurchbruchs.** Die Abbildung zeigt schematisch die molekularen Mechanismen, welche im koronalen Anteil des dentalen Follikels die Osteoklastogenese und folglich den Zahndurchbruch steuern. Dabei wird die Osteoklastogenese durch einen hohen RANKL/OPG-Quotienten stimuliert und durch einen niedrigen RANKL/OPG-Quotienten gehemmt. Weitere Details sind im Fließtext beschrieben. Eigene Darstellung nach (38,40–50).

### 1.3.3 Die Bedeutung von DFCs für die regenerative Medizin

Aufgrund ihrer Stammzeleigenschaften besitzen DFCs Potential für den Einsatz in regenerativen Therapien verschiedener Gewebe und insbesondere des Zahnhalteapparats. Darüber hinaus eignen sich DFCs besonders für die Regeneration von Knochen des Gesichtsschädels, deren embryonaler Ursprung ebenfalls in der Neuralleiste liegt (28,59), wobei die Zellen auch für die Regeneration von Knochengewebe mesodermalen Ursprungs in Betracht gezogen werden (60).

Ein großer Vorteil von DFCs, vor allem im Vergleich zu nicht-dentalen Stammzellen, ist die verhältnismäßig leichte Verfügbarkeit aus impaktierten Weisheitszähnen, welche oft aus medizinischen Gründen entfernt werden und die Isolierung folglich keine Zusatzbelastung für den Spender darstellt (53,60). Zudem legten verschiedene Studien nahe, dass DFCs eine höhere Differenzierungskapazität als andere dentale

Stamm-/Vorläuferzellen aufweisen (61), wobei in einer Arbeit von Qu et al. gezeigt wurde, dass PDLSCs und Stamm-/Vorläuferzellen aus dem alveolaren Knochen noch besser osteogen differenzieren (62). Des Weiteren zeichnen sich DFCs durch ein breites Differenzierungsspektrum aus. So konnte gezeigt werden, dass sie nicht nur in Zellen des Zahnhalteapparats, sondern durch entsprechende Stimulierung auch in Adipozyten und neuronale/gliale Zellen differenzieren können (63–65). Passend dazu konnte die Expression neuronaler und glialer Stammzellmarker wie Nestin und GFAP (engl. *Glial fibrillary acidic protein*) in DFCs nachgewiesen werden (56).

Mehrere Studien konnten bereits das therapeutische Potential von DFCs *in vivo* aufzeigen. So führte eine subkutane Transplantation dieser Zellen in Mäusen nach einigen Wochen zur Bildung parodontaler Strukturen (66). Eine lokale Transplantation von DFCs in Parodontitis-geschädigtes Gewebe von Hunden konnte sogar den gesamten Zahnhalteapparat wiederherstellen (67). Außerdem zeigten verschiedene Arbeiten einen immunsupprimierenden Einfluss durch die Zellen, welcher bei der Behandlung von Parodontitis aufgrund des dort vorherrschenden inflammatorischen Milieus besonders vorteilhaft sein könnte und auch für die Behandlung anderer entzündlicher Krankheiten und Autoimmunerkrankungen in Frage kommt (68–71). Darüber hinaus konnten DFCs im Rahmen von „Tissue Engineering“ gezielt zur Regeneration verschiedener Gewebe eingesetzt werden. So kombinierten Takahashi et al. humane DFCs mit einer Gelatinematrix, was nach Transplantation auf eine Schädelkalotte im Rattenmodell zur Bildung von neuem Knochenmaterial führte (72). In einer anderen Studie unterstützte die Transplantation extrazellulärer Vesikel aus den Zellen – verpackt in einer Kollagenmatrix – die Heilung alveolärer Knochendefekte (73). Außerdem konnte in Mäusen durch Kombination von DFCs mit einem Zahnimplantat ein kompletter Zahn funktionell ersetzt werden (74). Viele Forschungsarbeiten beschäftigten sich überdies mit der Frage, welche Trägermaterialien am besten für die Regeneration von Knochendefekten geeignet sind. So wurde beispielsweise gezeigt, dass eine Kultivierung von DFCs auf Tricalciumphosphat die osteogene Differenzierung unterstützt (75). Zudem wirkt sich insbesondere das Verwenden einer Matrix mit geringer Oberflächensteifigkeit positiv auf die Osteogenese aus (76). Hierin besteht ein Unterschied zu mesenchymalen Stammzellen nicht-dentalen Ursprungs, welche am besten auf Materialien mit einer knochenähnlichen Steifigkeit in Osteoblasten differenzieren (77). In einem Matrix-freien Ansatz gelang Chu et al. außerdem die dreidimensionale Nachbildung eines

parodontalen Ligaments durch DFCs *in vitro*, welche sich für eine direkte Transplantation in beschädigtes Gewebe eignen könnte (78).

## 1.4 Die osteogene Differenzierung von DFCs

### 1.4.1 Induktion der osteogenen Differenzierung

Für den Erfolg regenerativer Therapien ist ein detailliertes Verständnis der molekularen Abläufe während der Differenzierung von DFCs in Zellen des Zielgewebes von großer Bedeutung, um eine bestmögliche Steuerung des Differenzierungsprozesses zu ermöglichen. Von besonderem Interesse ist die osteogene Differenzierung von DFCs, in dessen Folge die Zellen mineralisiertes Gewebe bilden können. Dabei erfolgt die Mineralisierung im Zahnhalteapparat direkt ausgehend von DFCs durch desmale Ossifikation, wobei im Gegensatz zur endochondralen Ossifikation – welche bei der Entwicklung der meisten Knochen des menschlichen Körpers stattfindet – keine knorpelige Zwischenstufe gebildet wird (79,80). Im Jahr 2002 gelang erstmals eine osteogene Differenzierung dieser Zellen *in vitro*, indem murine DFCs mit dem Protein BMP2 (engl. *Bone morphogenetic protein 2*) stimuliert wurden (81). Studien der Arbeitsgruppe um Christian Morscheck zeigten 2005, dass eine osteogene Differenzierung humaner DFCs *in vitro* durch Stimulierung mit Dexamethason oder Insulin möglich ist (53,82). Wenig später konnte gezeigt werden, dass sich humane DFCs auch durch Behandlung mit BMP2 oder IGF-2 (engl. *Insulin-like growth factor 2*) osteogen differenzieren lassen (83,84). Dabei war das osteoinduktive Potential dieser vier Substanzen bereits zuvor aus nicht-dentalen Stamm-/Vorläuferzellen bekannt (85–88). Die molekularen Mechanismen bei Stimulierung mit den verschiedenen Induktoren weisen, trotz einiger Unterschiede, wichtige Parallelen auf. So spielt beispielsweise das Protein BMP2 bei den Dexamethason-, IGF-2-, und Insulin-vermittelten Differenzierungswegen ebenfalls eine Rolle, da diese die Genexpression von BMP2 stark induzieren (84,89).

### 1.4.2 Molekulare Signalwege während der osteogenen Differenzierung mesenchymaler Stamm-/Vorläuferzellen

Der BMP (engl. *Bone morphogenetic protein*)-Signalweg ist – neben weiteren molekularen Signalwegen – von großer Bedeutung für die Differenzierung von dentalen und nicht-dentalen Stamm-/Vorläuferzellen (90,91). Die Aktivierung des Signalwegs erfolgt

klassischerweise durch Bindung von BMP-Liganden wie z. B. BMP2 oder BMP4, die zur TGF- $\beta$  (engl. *Transforming growth factor  $\beta$* )-Superfamilie gehören, an einen tetrameren Komplex aus BMP-Rezeptoren der Typen I und II. Daraufhin phosphorylieren die Typ II-Rezeptoren die Typ I-Rezeptoren, welche folglich die intrazellulären Proteine Smad1/5/8 phosphorylieren. Diese binden anschließend an Smad4 und translozieren gemeinsam in den Zellkern (92,93), wo die Smad-Proteine schließlich mit Transkriptionsfaktoren interagieren und die Expression von Zielgenen beeinflussen (94). Eine nukleäre Translokation von Smad4 kann außerdem durch phosphoryliertes Smad2/3 erfolgen, wobei deren Phosphorylierung durch Bindung von TGF- $\beta$  an dessen Rezeptorkomplex – ebenfalls zusammengesetzt aus Typ I- und Typ II-Rezeptoren – induziert wird (90). Eine endogene Regulierung dieser Signalwege findet über die beiden Smad-Proteine 6 und 7 statt, welche die Phosphorylierung von Smad1/5/8 bzw. Smad2/3 hemmen (90,95). Zudem existieren nicht-kanonische BMP- und TGF- $\beta$ -Signalwege, welche die Expression von Zielgenen durch MAP (engl. *Mitogen-activated protein*)-Kinasen und unabhängig von Smad-Proteinen beeinflussen (90). Eine Aktivierung der MAP-Kinasen kann außerdem durch Proteine der FGF (engl. *Fibroblast growth factor*)-Familie wie z. B. FGF2 nach Bindung an deren Rezeptoren erfolgen (96,97). Im Zellkern führt die Signaltransduktion durch die Smad-Proteine und die MAP-Kinasen unter anderem zur Induktion des Transkriptionsfaktors RUNX2 (engl. *Runt-related transcription factor 2*), um den weiteren Verlauf der osteogenen Differenzierung zu steuern (96,98).

Der osteoinduktive Effekt des BMP-Signalwegs in mesenchymalen Stamm-/Vorläuferzellen kann überdies durch den PTH/PTHrP-Signalweg verstärkt werden (99–102). Dabei führt eine Bindung von PTH (engl. *Parathyroid hormone*) oder PTHrP an den gemeinsamen Rezeptor PTH1R (engl. *Parathyroid hormone 1 receptor*) zur Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration, wodurch die Proteinkinase A (PKA) aktiviert wird (103). Durch diese Kinase wird der Transkriptionsfaktor CREB (engl. *cAMP response element-binding protein*) phosphoryliert, welcher die BMP-induzierte Expression von RUNX2 weiter unterstützt (103–105).

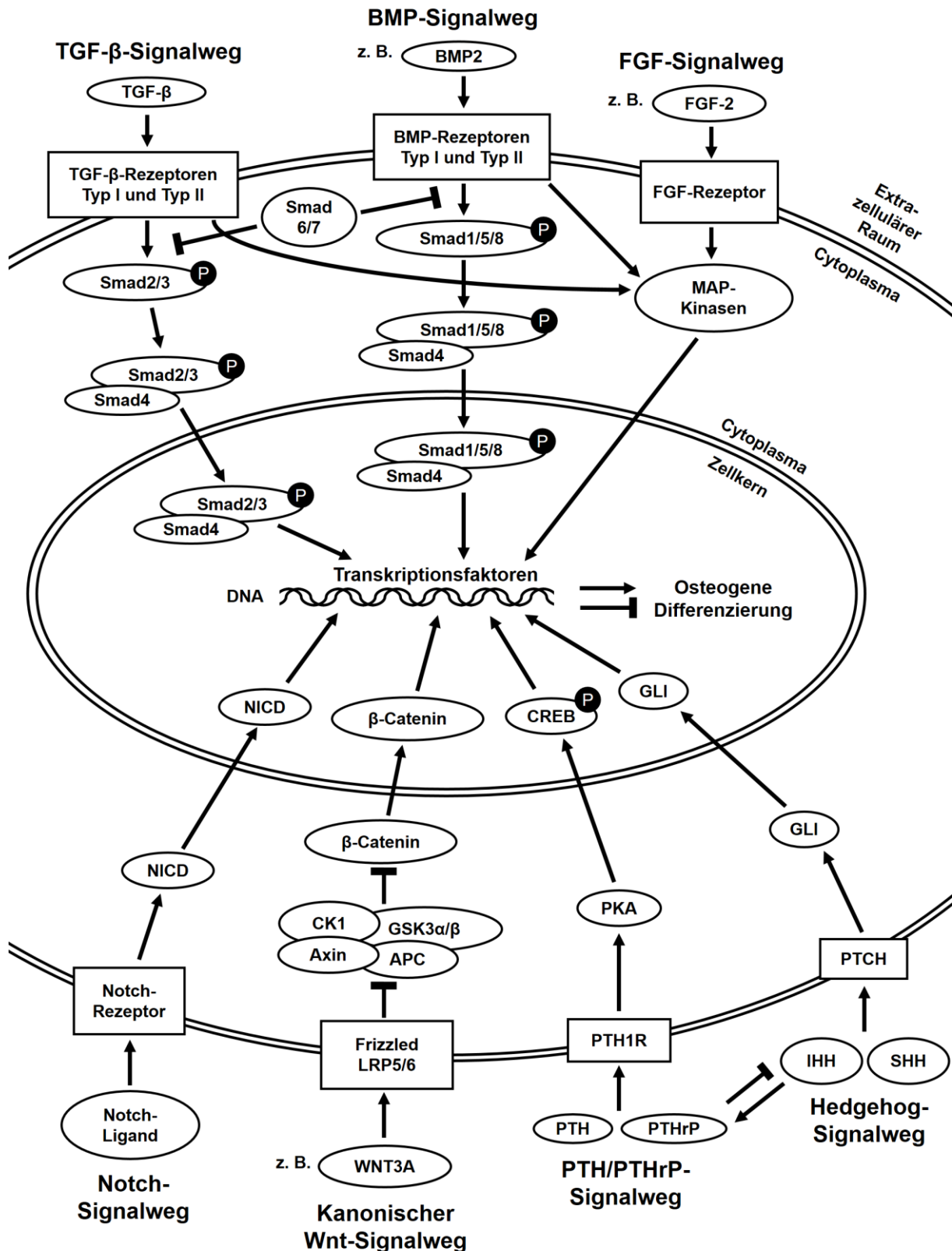
Ebenfalls bedeutend für die Entwicklung von Knochen und Zähnen ist der kanonische Wnt-Signalweg, dessen Schlüsselprotein  $\beta$ -Catenin die Expression von Zielgenen steuert (106,107). Dabei wird die Expression von  $\beta$ -Catenin im nicht-induzierten Zustand durch einen Komplex reguliert, der aus den Proteinen Axin, APC (engl. *Adenomatous polyposis coli*) sowie Kinasen der CK1 (engl. *Casein kinase 1*)-Familie und den



Kinasen GSK3 $\alpha$  (Glykogensynthase-Kinase 3 $\alpha$ ) und GSK3 $\beta$  (Glykogensynthase-Kinase 3 $\beta$ ) besteht (108,109). Die Kinasen phosphorylieren  $\beta$ -Catenin im N-terminalen Proteinabschnitt, woraufhin es ubiquitiniert und im Proteasom abgebaut wird (109,110). Nach Aktivierung des Wnt-Signalwegs durch Bindung eines Liganden wie z. B. WNT3A (engl. *Wnt family member 3A*) an die beiden Rezeptoren Frizzled und LRP5/6 (engl. *Low-density lipoprotein receptor related protein 5/6*) wird zunächst das Protein Dishevelled an den Frizzled-Rezeptor rekrutiert, was daraufhin zur Bindung und Inaktivierung des  $\beta$ -Catenin-regulierenden Proteinkomplexes über Axin an LRP5/6 führt (111). Folglich wird  $\beta$ -Catenin nicht mehr abgebaut, kann in den Zellkern translozieren und an weitere Proteine wie z. B. Transkriptionsfaktoren der TCF (engl. *T-cell factor*)/LEF (engl. *Lymphoid enhancer-binding factor*)-Familie binden (112,113). Des Weiteren existiert ein nicht-kanonischer Wnt-Signalweg, welcher die Expression von Zielgenen unabhängig von  $\beta$ -Catenin reguliert und z. B. durch die Liganden WNT5A (engl. *Wnt family member 5A*) oder WNT11 (engl. *Wnt family member 11*) aktiviert wird (114–116). Einige Studien lassen vermuten, dass der nicht-kanonische Wnt-Signalweg die osteogene Differenzierung mesenchymaler Stamm-/Vorläuferzellen ebenfalls stimulieren kann (117–119), während Versuche von Hasegawa et al. zeigten, dass WNT5A zur Herunterregulierung osteogener Marker in PDLSCs führt (120).

Die BMP- und Wnt-Signalwege werden unter anderem durch den Notch-Signalweg beeinflusst, wobei sowohl unterstützende als auch inhibitorische Wechselwirkungen in verschiedenen Studien gezeigt wurden (121–124). Der Notch-Signalweg wird nach Bindung eines Notch-Liganden, der sich in der Plasmamembran einer benachbarten Zelle befindet, an einen Notch-Rezeptor der Zielzelle aktiviert. Daraufhin wird die intrazelluläre Domäne des Rezeptors (NICD, engl. *Notch intracellular domain*) abgespalten und transloziert in den Zellkern, um die Expression von Zielgenen zu steuern (125). Während der Notch-Signalweg die Proliferation von osteogenen Vorläuferzellen unterstützt, werden die Aktivität von RUNX2 und folglich die Differenzierung gehemmt (126,127).

Dahingegen wird die osteogene Differenzierung mesenchymaler Stamm-/Vorläuferzellen durch den Hedgehog-Signalweg unterstützt (128). Bei diesem führt die Bindung von z. B. SHH (engl. *Sonic hedgehog*) oder IHH (engl. *Indian hedgehog*) an Rezeptoren der PTCH (engl. *Patched*)-Familie zur Induktion von Transkriptionsfaktoren der



**Abb. 4: Molekulare Signalwege während der osteogenen Differenzierung in mesenchymalen Stamm-/Vorläuferzellen.** Die Abbildung zeigt schematisch die molekularen Signalwege, welche die osteogene Differenzierung von mesenchymalen Stamm-/Vorläuferzellen steuern. Weitere Details lassen sich dem Fließtext entnehmen. Eigene Darstellung nach (90,92–98,103–113,121–134).

GLI-Familie (129–132), welche die Osteogenese unter anderem über RUNX2 unterstützen können (133,134). Darüber hinaus stimuliert IHH die Expression von PTHrP, welches den Signalweg allerdings über eine negative Rückkopplung hemmt (132).

Zusammengefasst zeigt sich, dass die osteogene Differenzierung mesenchymaler Stamm-/Vorläuferzellen durch verschiedene Signalwege gesteuert wird, welche sich zum Teil gegenseitig regulieren. Die wesentlichen molekularen Mechanismen dieser Signalwege sind in Abbildung 4 graphisch dargestellt.

Nach der osteogenen Induktion von mesenchymalen Stamm-/Vorläuferzellen steuern zunächst Transkriptionsfaktoren den Prozess der Osteogenese. Neben RUNX2 gehören hierzu insbesondere MSX2 (engl. *Msh homeobox 2*) und DLX3 (engl. *Distal-less homeobox 3*), die beide eine DNA-bindende Homöobox-Domäne besitzen (135,136). Sowohl MSX2 als auch DLX3 werden für die korrekte Entwicklung von Knochen und Zähnen benötigt (137–140). Allerdings beeinflussen sie die osteogene Differenzierung gegenläufig, da diese durch DLX3 unterstützt und durch MSX2 gehemmt wird (136,141–143). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Promotoraktivität von RUNX2 durch DLX3 erhöht und durch MSX2 unterdrückt wird (144,145). Der Transkriptionsfaktor RUNX2, dessen Expression ebenfalls essentiell für die Knochenbildung ist, nimmt eine zentrale Rolle ein und stimuliert die Expression von Genen/Proteinen, welche für die osteogene Differenzierung benötigt werden (135,146–148). Dabei wird stromabwärts von RUNX2 mit Osterix ein weiterer Transkriptionsfaktor induziert, der für die Knochenbildung unabdingbar ist (149,150). Allerdings zeigten Studien, dass die Expression von Osterix auch unabhängig von RUNX2, beispielsweise durch den Transkriptionsfaktor ZBTB16 (engl. *Zinc finger and BTB domain containing 16*), induziert werden kann (151,152). Ausgehend von der Aktivität der Transkriptionsfaktoren werden im weiteren Verlauf der Differenzierung Matrixproteine wie z. B. Collagen I produziert und die Aktivität der alkalischen Phosphatase (ALP) induziert (153). Das Enzym ALP spaltet Phosphat-Moleküle von Pyrophosphaten und weiteren Substraten ab. Die freien Phosphate werden für die Bildung von Hydroxylapatit benötigt, welches in der Collagen-Matrix abgelagert wird und sie somit mineralisiert (154). Weitere Bestandteile mineralisierter Matrix sind unter anderem die Proteine Osteopontin und BSP (engl. *Bone sialoprotein*), die von osteogen differenzierenden Zellen sezerniert werden, sowie Osteocalcin, welches nach vollständiger Differenzierung exprimiert wird. Studien zeigten, dass der Transkriptionsfaktor RUNX2 die Expression von Osteopontin und BSP unterstützt, aber die Expression von Osteocalcin hemmt (155,156).

Somit kommt RUNX2 – neben seiner Bedeutung für die Initiierung der Osteogenese – eine inhibitorische Rolle für die späte Phase der Differenzierung zu. Dahingegen wird die Aktivität des Transkriptionsfaktors Osterix für die Expression aller drei Matrixproteine benötigt (149).

### 1.4.3 Besonderheiten der osteogenen Differenzierung von DFCs

Im Gegensatz zu den bekannten molekularen Mechanismen der osteogenen Differenzierung mesenchymaler Stamm-/Vorläuferzellen weisen die Mechanismen während der Osteogenese von DFCs Besonderheiten auf. So wird in DFCs interessanterweise die Genexpression von RUNX2 und MSX2 nach osteogener Stimulierung durch Dexamethason oder Insulin nicht induziert, während die Genexpression von DLX3 bei längerer Kultivierung unabhängig von osteogenen Induktoren ansteigt (157). Für RUNX2 ist eine bedeutende Rolle während der osteogenen Differenzierung von DFCs aber ebenfalls naheliegend, da eine Mutation von RUNX2, welche die Sekundärstruktur des Proteins verändert, zu einem verminderten Mineralisierungsvermögen führt (158). Allerdings konnten Versuche von Viale-Bouroncle et al. zeigen, dass DLX3 der zentrale Transkriptionsfaktor bei der Osteogenese von DFCs ist, welcher die Expression von RUNX2 und weiteren osteogenen Markern stimuliert (159). Überdies kann DLX3 die Expression des Transkriptionsfaktors ZBTB16 induzieren (159), welcher die osteogene Differenzierung von DFCs ebenfalls positiv beeinflusst (151).

Die Expression von DLX3 wird in humanen DFCs insbesondere durch Stimulierung mit BMP2 induziert (159,160). Dabei erfolgt die Induktion über einen Transkriptionsfaktor-komplex, der aus Smad4,  $\beta$ -Catenin und LEF1 besteht und über LEF1 an den DLX3-Promotor bindet (160). Somit sind sowohl der BMP-Signalweg als auch das Schlüsselprotein des kanonischen Wnt-Signalwegs an der osteogenen Differenzierung von DFCs beteiligt. Überraschenderweise führt eine Stimulierung der Zellen mit WNT3A aber nicht zur Induktion der DLX3-Expression. Dahingegen konnte gezeigt werden, dass  $\beta$ -Catenin über eine C-terminale Phosphorylierung durch PKA aktiviert wird, wobei die PKA-Aktivität durch BMP2 stark induziert wird (160), was die zentrale Rolle des BMP-Signalwegs für die DLX3-Expression und die osteogene Differenzierung in DFCs weiter verdeutlicht. Eine Beteiligung von BMP2 und PKA an der Induktion von DLX3 konnte darüber hinaus in anderen Zellen gezeigt werden. So unterstützt PKA die BMP2-induzierte Expression von DLX3 in murinen Vorläuferzellen und phosphoryliert außerdem DLX3 direkt, was möglicherweise dessen Stabilität erhöht (161). Zudem

wurde eine Induktion der DLX3-Expression durch BMP2 über Smad1 und Smad4 in murinen Keratinozyten beobachtet (162). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der osteoinduktive Einfluss von DLX3 in DFCs abhängig von BMP2 ist und dass DLX3 den BMP-Signalweg in einer positiven Rückkopplung verstärkt (159). Allerdings ist die gegenseitige Induktion begrenzt, da eine bereits hohe DLX3-Expression durch BMP2 nicht weiter stimuliert werden kann und eine übermäßige Expression von DLX3 oder BMP2 die ALP-Aktivität in den Zellen nicht weiter erhöht (160). Die Bedeutung von BMP2 für die alveoläre Osteogenese äußert sich zudem in der Beobachtung, dass DFCs bereits eine basale Expression von BMP2 aufweisen, die im periapikalen Anteil des Zahnfollikels höher als im Bereich der Zahnkrone ist (43).

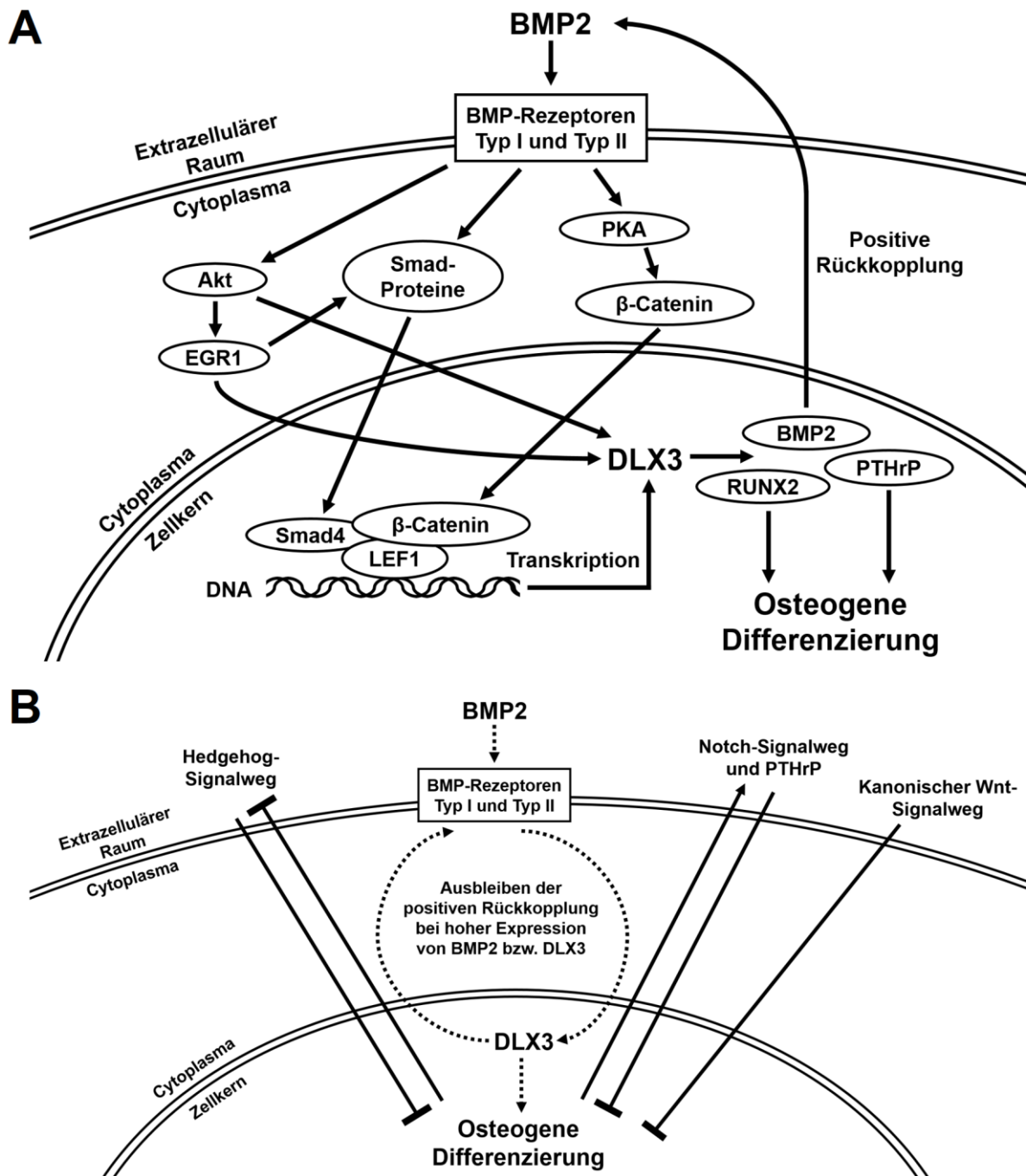
Anders verhält es sich beim kanonischen Wnt-Signalweg, da eine Stimulierung von DFCs mit WNT3A nicht nur die DLX3-Expression, sondern die gesamte Osteogenese hemmt (160,163). Dahingegen unterstützt das Protein APCDD1 (engl. *Adenomatosis polyposis coli down-regulated 1*), welches als Inhibitor des Wnt-Signalwegs bekannt ist, die Differenzierung und interessanterweise auch die Expression von  $\beta$ -Catenin (164). Außerdem zeigte eine Studie an DPSCs, dass DLX3 die Expression von DKK1 (engl. *Dickkopf related protein 1*), einem weiteren Inhibitor des Wnt-Signalwegs, über Bindung an die Promotorregion des Gens induziert (165). Die Beobachtungen legen somit nahe, dass der kanonische Wnt-Signalweg für die Osteogenese ausgehend von dentalen Stamm-/Vorläuferzellen eine andere Rolle spielt als in nicht-dentalen Geweben, wobei  $\beta$ -Catenin in diesen Zellen trotzdem benötigt wird und durch alternative Mechanismen aktiviert wird (106,160). Im Gegensatz hierzu wird der nicht-kanonische Wnt-Signalweg oft positiv mit der Osteogenese ausgehend von DFCs assoziiert. So konnte gezeigt werden, dass WNT5A in DFCs exprimiert wird (166–168) und dass eine Behandlung von murinen DFCs mit dem Liganden die osteogene Differenzierung und Mineralisierung verstärkt (166). Allerdings führte in einer anderen Studie die Behandlung von murinen DFCs mit WNT5A zu einer Inhibition der Differenzierung (167). In humanen DFCs zeigte WNT5A keinen eindeutigen Einfluss auf osteogene Marker, dafür aber einen unterstützenden Einfluss auf die Zellviabilität (168). Daneben ist der nicht-kanonische Wnt-Signalweg möglicherweise an der Regulierung des Zahndurchbruchs beteiligt, da WNT5A in Versuchen von Maeda et al. die Expression von RANK in murinen Osteoklasten-Vorläuferzellen stimulierte (169).

Eine negative Rückkopplung des BMP2/DLX3-Signalwegs findet in DFCs unter anderem über den Notch-Signalweg statt, der ebenfalls während der osteogenen Differenzierung und durch DLX3 induziert wird, aber die Osteogenese sowie die DLX3-Expression hemmt (170). Überraschenderweise werden die Differenzierung von DFCs und die DLX3-Expression außerdem durch extrazelluläres PTHrP gehemmt, das nach osteogener Induktion – unabhängig vom Hedgehog-Signalweg, der ebenfalls PTHrP induzieren kann (132) – von den Zellen sezerniert wird (171). Hier unterscheiden sich DFCs von anderen mesenchymalen Stamm-/Vorläuferzellen, bei welchen die osteogene Differenzierung durch Behandlung mit PTHrP verstärkt wird (101,102). Allerdings konnten Experimente zeigen, dass nukleär exprimiertes PTHrP den BMP-Signalweg und die Differenzierung von DFCs unterstützt (172). Da PTHrP posttranslational gespalten wird und die erzeugten Spaltprodukte verschiedene Funktionen ausüben können (173), lassen sich die gegensätzlichen Einflüsse auf die Differenzierung von DFCs vermutlich auf unterschiedliche PTHrP-Fragmente zurückführen.

Der Hedgehog-Signalweg, welcher positiv mit der osteogenen Differenzierung nicht-dentaler Stamm-/Vorläuferzellen assoziiert ist (128), spielt in DFCs ebenfalls eine andere Rolle. So zeigten Experimente, dass BMP2 den Signalweg in DFCs unterdrückt und eine Stimulierung der Zellen mit IHH zur Herunterregulierung osteogener Marker führt (174). Die Ursache dieses Gegensatzes könnte in der BMP2-vermittelten Induktion von PKA während der osteogenen Differenzierung von DFCs liegen, da in verschiedenen Studien gezeigt wurde, dass PKA den Hedgehog-Signalweg hemmt (175,176).

Ein weiteres Protein, welches in DFCs stromabwärts von BMP2 induziert wird, ist der Transkriptionsfaktor EGR1 (engl. *Early growth response 1*), welcher positiv mit der Expression osteogener Marker wie DLX3 und der ALP-Aktivität assoziiert ist (177,178). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass EGR1 an die Smad-Proteine 1/5 bindet und deren Phosphorylierung stimuliert (30,178). Außerdem wird die EGR1-Expression durch die Proteinkinase Akt (auch Proteinkinase B genannt) hochreguliert, welche ebenfalls durch BMP2 induziert wird und die Differenzierung unterstützt (178). Eine Studie von Choi et al. zeigte zudem, dass Akt den Transkriptionsfaktor DLX3 phosphorylieren kann und in murinen Vorläuferzellen die Stabilität von DLX3 und die Osteogenese positiv beeinflusst (179). Eine Regulierung der Expression von DLX3 kann überdies durch verschiedene epigenetische Mechanismen erfolgen (180–183).

Zusammenfassend wird deutlich, dass der BMP2/DLX3-Signalweg und die osteogene Differenzierung in DFCs durch viele molekulare Mechanismen beeinflusst werden. Diese sind in Abbildung 5 schematisch dargestellt unter Aufteilung in unterstützende (Abb. 5A) und hemmende (Abb. 5B) Mechanismen.

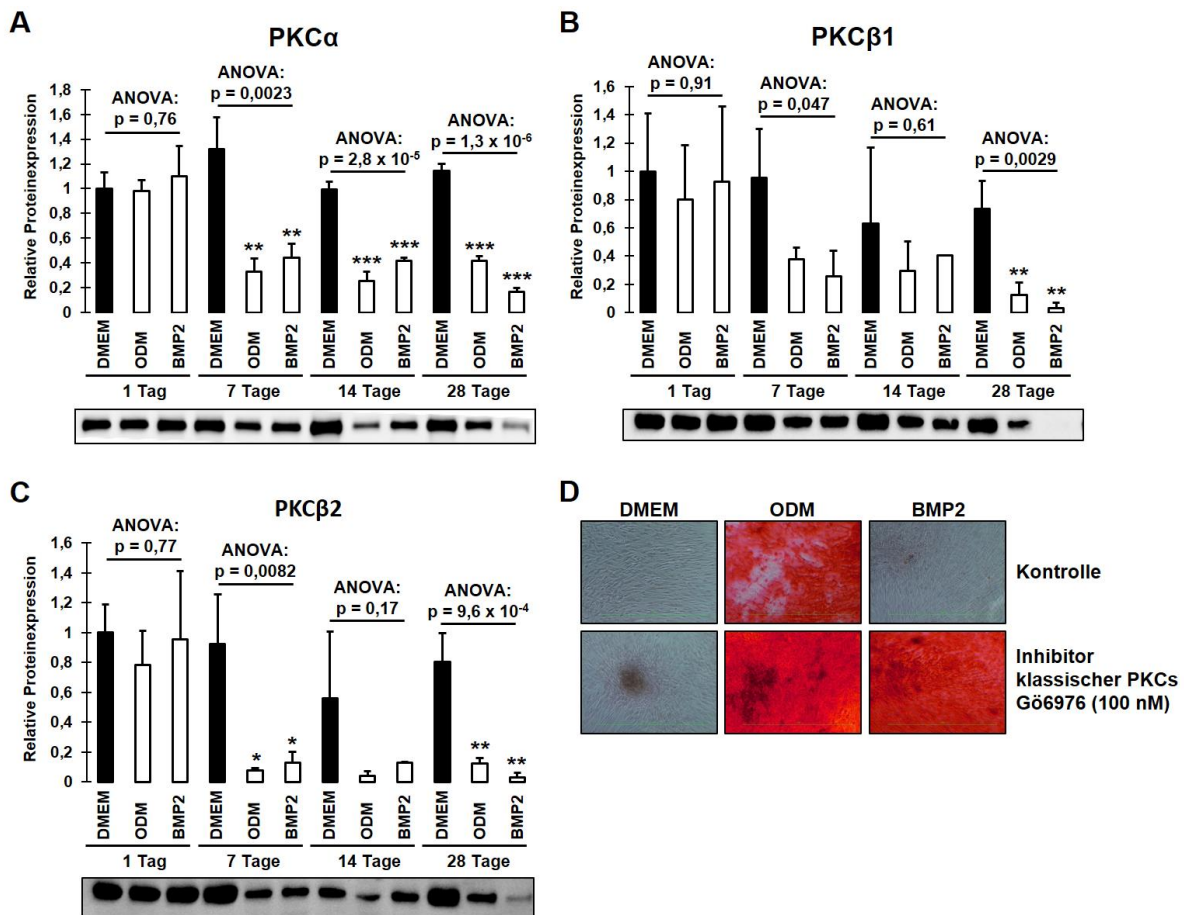


**Abb. 5: Molekulare Mechanismen während der osteogenen Differenzierung von DFCs.** Die Abbildung zeigt schematisch die molekularen Mechanismen, welche die osteogene Differenzierung von DFCs stimulieren (A) bzw. hemmen (B). Genauere Erläuterungen lassen sich dem Fließtext entnehmen. Eigene Darstellung nach (159,160,163,164,170–172,174,177–179).

Da DLX3 mit einer Vielzahl von Signalwegen interagiert, überrascht es nicht, dass der Transkriptionsfaktor neben der osteogenen Differenzierung von DFCs auch an vielen anderen biologischen Prozessen beteiligt ist. So unterstützt DLX3 beispielsweise die Differenzierung von Odontoblasten (184–186), Keratinozyten (187) und Haarfollikeln (188,189). Zudem konnte gezeigt werden, dass DLX3 die Viabilität und Proliferation von DFCs unterstützt (159), wohingegen der Transkriptionsfaktor die Zellteilung von BMMSCs und DPSCs inhibiert (165,184,190,191).

Die Proteinkinase C (PKC) ist ein weiteres Protein, welches den Transkriptionsfaktor DLX3 regulieren kann (187,192). Eine Beteiligung von PKC an der osteogenen Differenzierung von DFCs liegt daher nahe und wurde zunächst in unveröffentlichten Vorarbeiten innerhalb der Arbeitsgruppe untersucht, wobei gezeigt wurde, dass eine PKC-Inhibition in den Zellen die BMP2-induzierte ALP-Aktivität hemmt. Diese Beobachtung konnte in weiteren Experimenten, welche im Rahmen der dieser Arbeit vorausgegangenen Masterarbeit erfolgten, allerdings nicht reproduziert werden. Dahingegen konnte eine Hemmung von osteogenen Markern und der Mineralisierung bei Überaktivierung von PKC festgestellt werden. Eine genauere Betrachtung einzelner PKC-Isoformen zeigte, dass die Isoformen PKC $\alpha$ , PKC $\beta$ 1 und PKC $\beta$ 2 – welche zu den sogenannten klassischen PKC-Isoformen zählen (193) – während der osteogenen Differenzierung von DFCs deutlich herunterreguliert werden (Abb. 6A – C). Passend hierzu konnte die Mineralisierung durch Behandlung der Zellen mit einem spezifischen Inhibitor klassischer PKCs verstärkt werden (Abb. 6D). Somit üben klassische PKC-Isoformen einen hemmenden Einfluss auf die osteogene Differenzierung von DFCs aus. Um die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen zu evaluieren, wurde in der vorausgegangenen Masterarbeit untersucht, ob PKC die Osteogenese durch Stabilisierung des Transkriptionsfaktors MSX2 hemmt, wie bereits in murinen Vorläuferzellen von Jeong et al. gezeigt wurde (194). Allerdings konnte diese Hypothese nicht bestätigt werden. Des Weiteren wurde evaluiert, ob das Protein CEMP1 (engl. *Cementum protein 1*) die Osteogenese stromabwärts von PKC reguliert, da Komaki et al. einen hemmenden Einfluss von CEMP1 auf das Mineralisierungsvermögen von PDLSCs zeigten (195) und die Expression dieses Proteins in internen Vorarbeiten der Arbeitsgruppe durch PKC reguliert wurde. Jedoch konnte durch CEMP1 ebenso kein eindeutiger Einfluss auf die Differenzierung von DFCs gefunden werden. Somit hemmen klassische Isoformen von PKC die osteogene Differenzierung von DFCs unabhängig von MSX2 und CEMP1.





**Abb. 6: Klassische PKC-Isoformen hemmen die osteogene Differenzierung von DFCs.** (A – C) Die Western Blots zeigen die Proteinexpression von PKC $\alpha$  (A), PKC $\beta$ 1 (B) und PKC $\beta$ 2 (C) in DFCs nach Induktion der osteogenen Differenzierung mit ODM (Osteogenes Differenzierungsmedium) bzw. BMP2-Medium oder Kultivierung in Kontrollmedium (DMEM) zu verschiedenen Zeitpunkten. One-way ANOVA (engl. One-way analysis of variance, kurz ANOVA) wurde angewandt zum Vergleich zwischen den verschiedenen Medien zum gleichen Zeitpunkt, mit anschließenden Tukey-Tests zum Vergleich zwischen ODM bzw. BMP2-Medium und DMEM: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . (D) Die Alizarin-Färbung zeigt die Mineralisierung ausgehend von DFCs nach 28 Tagen Kultivierung in DMEM, ODM bzw. BMP2-Medium und gleichzeitiger Behandlung mit dem Inhibitor klassischer PKCs Gö6976 (100 nM). Die Ergebnisse dieser Abbildung stammen aus der vorausgegangenen Masterarbeit und wurden teilweise bereits 2021 veröffentlicht in der Zeitschrift „Stem Cell Research & Therapy“ (196).

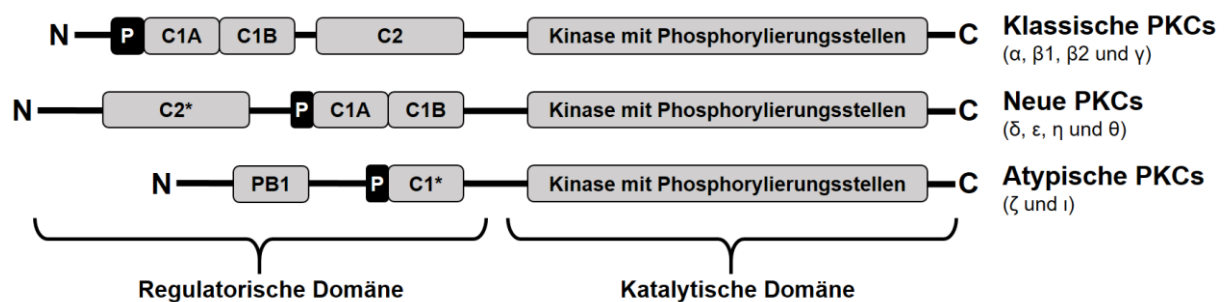
## 1.5 Proteinkinase C (PKC)

### 1.5.1 Struktureller Aufbau und Aktivierungsmechanismen von PKC

Das Enzym PKC ist eine Serin/Threonin-Kinase, die an der Steuerung einer Vielzahl von biologischen Prozessen beteiligt ist. Humane PKCs umfassen eine Familie aus

mindestens zehn verschiedenen Isoformen, die sich in klassische Isoformen ( $\alpha$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  und  $\gamma$ ), neue Isoformen ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$  und  $\theta$ ) sowie atypische Isoformen ( $\zeta$  und  $i$ ) einteilen lassen, wobei sich die Gruppen unter anderem in ihren Aktivierungsmechanismen unterscheiden (193,197). So werden klassische PKCs durch Diacylglycerol (DAG) und Phospholipide in der Plasmamembran – vor allem Phosphatidylserin – sowie intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aktiviert, während die Aktivierung neuer Isoformen nur durch DAG und Phospholipide erfolgt. Atypische Isoformen hingegen werden unabhängig von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und DAG aktiviert (197,198). Allerdings können atypische PKCs ebenfalls mit Phospholipiden interagieren und so aktiviert werden (199).

Die verschiedenen Abhängigkeiten von Co-Faktoren resultieren aus strukturellen Unterschieden zwischen den PKC-Gruppen, welche in Abbildung 7 schematisch dargestellt sind. Dabei besteht der grundlegende Aufbau aller Isoformen aus einer N-terminalen regulatorischen Domäne, welche für die Interaktion mit den Co-Faktoren zuständig ist, sowie einer C-terminalen katalytischen Domäne. Je nach PKC-Gruppe ist die regulatorische Domäne in verschiedene weitere Domänen unterteilt: Die sogenannten C1-Domänen, C1A und C1B, sind Bestandteile klassischer und neuer PKC-Isoformen und binden DAG (insbesondere die C1B-Domäne), während die C2-Domäne in klassischen PKCs mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen interagiert. Phospholipide können mit unterschiedlicher Spezifität sowohl von C1- als auch von C2-Domänen gebunden werden. Einige PKC-Isoformen beinhalten zum Teil Varianten dieser Domänen, welche nicht mehr mit Co-Faktoren interagieren können (vgl. Abb. 7). In atypischen PKCs befindet sich außerdem die sogenannte PB1-Domäne (Phox/Bem1-Domäne), welche für die Bindung von

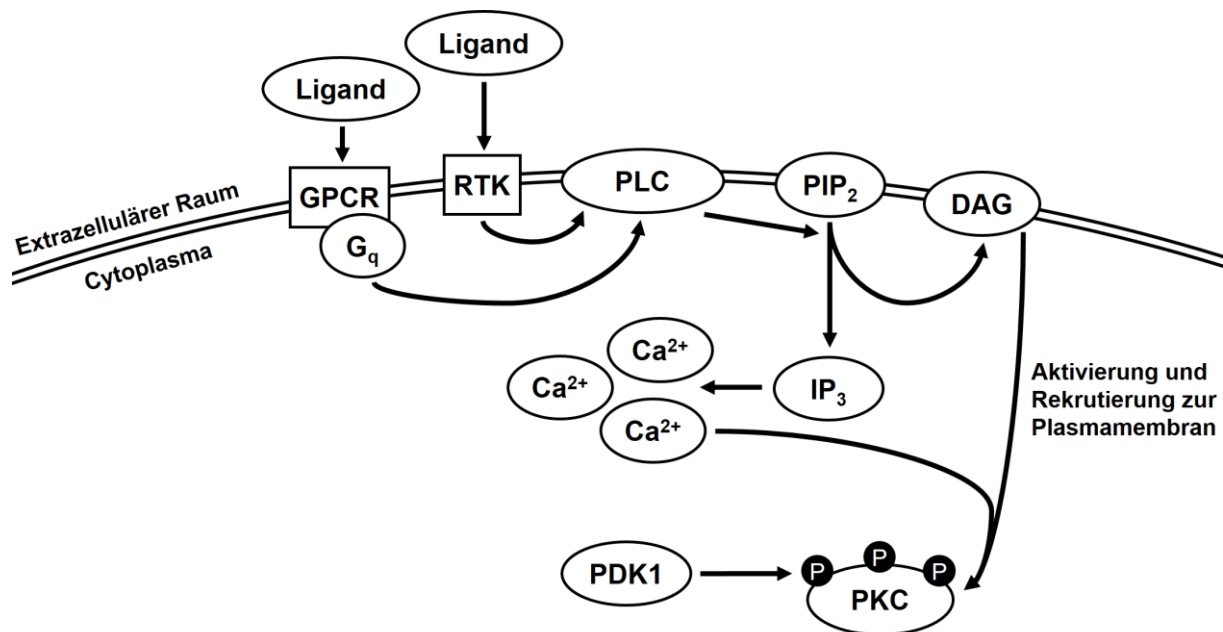


**Abb. 7: Schematischer Aufbau der verschiedenen PKC-Isoformen.** Die Abbildung zeigt schematisch den Aufbau der verschiedenen Gruppen von PKC-Isoformen mit den wichtigsten Domänen. Mit Sternchen gekennzeichnete Domänen sind gruppenspezifische Varianten, welche im Gegensatz zu den Domänen ohne Sternchen nicht mehr zur Bindung der jeweiligen Co-Faktoren fähig sind. P bezeichnet die Pseudosubstratdomäne. Weitere Details sind im Fließtext beschrieben. Eigene Darstellung nach (193,197,200–203).

Interaktionspartnern zuständig ist (200–202). Der regulatorische Enzymteil aller Isoformen enthält darüber hinaus eine autoinhibitorische Pseudosubstrat-Sequenz, die im inaktivierten Zustand die Substratbindestelle von PKC blockiert (203).

Im Ausgangszustand – nach Synthese des Enzyms – liegt PKC in der Zelle zunächst membrangebunden vor (204). Um das Enzym für die Aktivierung vorzubereiten, sind bei allen PKC-Isoformen drei Phosphorylierungen innerhalb der katalytischen Domäne notwendig: Die erste Phosphorylierung findet an der Aminosäure T500 statt, bevor anschließend T641 und zuletzt S660 phosphoryliert werden (die Positionen der Aminosäuren beziehen sich auf PKC $\beta$ 2 und variieren zwischen den Isoformen). Während die erste Phosphorylierungsreaktion durch die Kinase PDK1 (engl. *3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1*) ausgeführt wird, erfolgen die zwei weiteren Schritte durch Autophosphorylierung. Schließlich wird das Enzym nach der dritten Phosphorylierung ins Zytosol freigesetzt und kann erst jetzt durch die Co-Faktoren aktiviert werden (205–207). Aufgrund der Notwendigkeit der Phosphorylierungen kann eine Regulierung des Enzyms über Dephosphorylierungen durch die Aktivität von Phosphatasen vermittelt werden (208).

Da in Zellmembranen normalerweise kaum DAG vorhanden ist, muss für die Aktivierung klassischer und neuer PKCs zunächst die Konzentration dieses Co-Faktors erhöht werden. Dies geschieht durch die Aktivität von Phospholipasen, insbesondere durch die Phospholipase C (PLC), die membranständiges Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) in DAG und Inositol-1,4,5,-triphosphat (IP<sub>3</sub>) spaltet. Darüber hinaus führt IP<sub>3</sub> zur Freisetzung von Ca<sup>2+</sup>-Ionen aus intrazellulären Speichern (209,210). Die Interaktion mit den membrangebundenen Co-Faktoren führt schließlich zur Rekrutierung von PKC an die Plasmamembran oder die Membran von Organellen wie z. B. des Golgi-Apparats und zur Freisetzung des hemmenden Pseudosubstrats (203,211,212). Die Aktivierung von PLC erfolgt in der Zelle durch Bindung eines Liganden an eine Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK) oder einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor (GPCR, engl. *G-Protein-coupled receptor*) mit einem G<sub>q</sub>-Protein (213). Beispielsweise kann das Protein PTHrP durch Bindung an den Rezeptor PTH1R zur Aktivierung von G<sub>q</sub>-Proteinen führen und über PLC schließlich PKC aktivieren (214,215). Durch die Aktivität der Diacylglycerolkinase kann die Konzentration von DAG in der Membran durch Umwandlung in eine Phosphatidsäure wieder gesenkt werden (210). Abbildung 8 zeigt schematisch die Aktivierung von PKC am Beispiel klassischer Isoformen.



**Abb. 8: Molekularer Mechanismus der Aktivierung klassischer PKC-Isoformen.** Die Abbildung zeigt schematisch die molekularen Mechanismen, welche über DAG und Ca<sup>2+</sup>-Ionen zur Aktivierung klassischer PKC-Isoformen führen. Nähere Details können dem Fließtext entnommen werden. Eigene Darstellung nach (203,205–207,209–213).

### 1.5.2 Die Regulierung biologischer Prozesse durch PKC

Das Enzym PKC kann eine Vielzahl von Substraten phosphorylieren und ist an zahlreichen biologischen Prozessen beteiligt. Zudem weisen die verschiedenen Mitglieder der PKC-Familie Überschneidungen in ihrer Substratspezifität auf, was eine einfache Zuordnung von Isoformen zu bestimmten biologischen Prozessen erschwert (197). So wird beispielsweise der Zellzyklus von PKC in vielfältiger Weise beeinflusst und kann abhängig von PKC-Isoform, Zellzyklusphase und äußeren Einflüssen sowohl stimuliert als auch gehemmt werden (216,217). Eine generelle Inhibition des Enzyms führt aber meist zur Hemmung der Proliferation (218–220). Überraschenderweise wurde in einer Studie von Barboule et al. gezeigt, dass eine Stimulierung von PKC ebenfalls zum Zellzyklusarrest führen kann, indem die Expression des Zellzyklusinhibitors p21 induziert wird (221). Dem gegenüber konnten andere Studien einen positiven Einfluss der Kinase auf die Proliferation von unter anderem Tumorzellen feststellen (222–224). Interessanterweise wurden vor allem klassische PKCs gegenläufig mit der Zellproliferation assoziiert. So zeigten einige Studien einen unterstützenden Einfluss dieser Isoformen (225,226), wohingegen in Versuchen an Tumorzellen ein hemmender Einfluss gefunden wurde, welcher mit einer Inhibition des Zellzyklusproteins CDK1 (engl. *Cyclin-dependent kinase 1*) einherging (227). Somit beeinflussen klassische PKCs den

Zellzyklus auf vielfältige Weise, wobei insbesondere PKC $\alpha$  in der Literatur ebenso positiv (228–230) wie negativ (231,232) mit dem Zellzyklus assoziiert wurde, während die Isoformen PKC $\beta$ 1/2 und PKC $\gamma$  die Proliferation überwiegend unterstützen (225,226,233). Die gegensätzlichen Beobachtungen in Bezug auf PKC $\alpha$  könnten daraus resultieren, dass diese Isoform sowohl mit Zellzyklusproteinen wie Cyclin D1 als auch mit Zellzyklusinhibitoren wie z. B. p53, p21 und p27 interagiert (234–237), wohingegen PKC $\beta$ 1/2 und PKC $\gamma$  vor allem die Expression von Cyclin D1 induzieren (238,239). Darüber hinaus wurden die Isoform PKC $\delta$  sowie atypische PKCs meist positiv mit der Zellproliferation assoziiert (240–244).

Neben dem Zellzyklus wird außerdem die Apoptose durch PKC beeinflusst. So können beispielsweise Caspasen nach Induktion des programmierten Zelltods die Isoformen PKC $\delta$ , PKC $\epsilon$  und PKC $\theta$  spalten und deren Pseudosubstrat-Domänen abtrennen. Infolgedessen werden die Kinasen aktiviert und können die weitere Apoptose regulieren (245–247). Ferner konnte gezeigt werden, dass eine Herunterregulierung von PKC $\alpha$  zur Induktion Apoptose-assoziiierter Proteine führt (248), während eine Inhibition von PKC $\beta$ 2 oder PKC $\zeta$  antiapoptotisch wirkt (249,250).

Die PKC-Enzyme sind außerdem an der Regulierung des Energiestoffwechsels von Zellen beteiligt. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass das Enzym AMPK (AMP-aktivierte Proteinkinase), welches bei Energiemangel durch Erhöhung des AMP/ATP-Quotienten aktiviert wird und wesentlich an der Steuerung des Energiehaushalts der Zelle beteiligt ist, durch PKC phosphoryliert und dadurch inaktiviert werden kann (251). Zudem konnten Studien einen Einfluss von PKC auf Prozesse feststellen, die stromabwärts von AMPK reguliert werden, wie z. B. die Glykolyse und die Autophagie (252–254).

Des Weiteren spielt PKC eine Rolle für die Migrationsfähigkeit von mesenchymalen Stamm-/Vorläuferzellen und somit deren Mobilisierung in Richtung von beschädigtem Gewebe bei der Regeneration von Defekten. So konnte gezeigt werden, dass PKC $\epsilon$  die Migrationsfähigkeit von BMMSCs unterstützt (255). Darüber hinaus sind die Isoformen PKC $\alpha$ , PKC $\delta$  und PKC $\zeta$  an der Regulierung der Migration mesenchymaler Stamm-/Vorläuferzellen beteiligt (256,257).

Verschiedene Studien berichteten zudem von einer Regulierung der Osteoklastogenese und folglich des Zahndurchbruchs durch PKC. So wurde eine Herunterregulierung der RANKL-induzierten Aktivität von Osteoklasten nach unselektiver PKC-Hemmung beobachtet (258,259). Insbesondere für die Isoformen PKC $\beta$ 2 und PKC $\delta$  konnte

eine Beteiligung an der Osteoklastogenese gezeigt werden (260,261). Außerdem sind atypische PKCs an diesem Prozess beteiligt. Diese bilden in Osteoklasten-Vorläuferzellen nach Stimulierung durch RANKL einen Komplex gemeinsam mit TRAF6 (engl. *TNF receptor associated factor 6*) und p62, der für die Aktivierung von NF- $\kappa$ B und die Differenzierung in Osteoklasten benötigt wird (262). Darüber hinaus stimuliert PKC den Transport von NF- $\kappa$ B in den Zellkern (263). Ein positiver Einfluss von PKC auf den Zahndurchbruch konnte im Jahr 2004 von Yao et al. gezeigt werden, in deren Versuchen die Injektion eines PKC-Aktivators in Ratten zwischen fünf und elf Tagen nach der Geburt den Durchbruch der ersten molaren Zähne des Unterkiefers beschleunigte (264).

### **1.5.3 Die Regulierung der Differenzierung mesenchymaler Stamm-/Vorläuferzellen durch PKC**

Neben der Osteoklastogenese ist PKC insbesondere am Aufbau von Knochengewebe beteiligt, wobei die Kinase bereits in der frühen embryonalen Entwicklung eine wichtige Rolle spielt. So konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von PKC $\delta$  in embryonalen Stammzellen zur Differenzierung in einen mesenchymalen Phänotyp und zur Expression endodermaler Marker führt (265). Im Folgenden steuern die Kinasen der PKC-Familie die weitere Entwicklung zu spezialisierten Zellen des Zielgewebes in einer sehr komplexen und vielfältigen Weise. In vielen Studien wurde PKC positiv mit der osteogenen Differenzierung von Stamm-/Vorläuferzellen assoziiert (117,266–270). Im Gegensatz dazu führte eine PKC-Überaktivierung in Experimenten mit murinen Vorläuferzellen zur Herunterregulierung osteogener Marker, während eine PKC-Hemmung diese induzierte (194). Da die Ergebnisse der Arbeitsgruppen-internen Vorversuche zur Rolle von PKC für die Differenzierung von DFCs ebenfalls nicht immer eindeutig waren (vgl. Kapitel 1.4.3), lässt sich eine duale Rolle von PKC für die Osteogenese vermuten. Passend hierzu konnte eine Studie von Lotz et al. zeigen, dass eine PKC-Inhibition in humanen BMMSCs zwar die Expression von Osteocalcin erhöht, aber die BMP2-Expression hemmt (271). Übereinstimmend mit den Vorversuchen in DFCs ließ sich die osteogene Differenzierung durch spezifische Hemmung klassischer PKCs aber meist stimulieren (194,272–274). Vor allem die Isoformen PKC $\beta$ 1/2 inhibieren die Osteogenese (274,275), während PKC $\alpha$  teilweise positiv (274,276,277) und teilweise negativ mit der Differenzierung assoziiert wurde (230,273). Ein positiver Einfluss auf die Osteogenese ließ sich überdies für die neue Isoform PKC $\delta$  feststellen

(272,274,278–282). Dabei fällt auf, dass PKC $\beta$ 1/2 und PKC $\delta$  einen gegensätzlichen Einfluss auf die osteogene Differenzierung von Stamm-/Vorläuferzellen haben, aber beide die Zellproliferation stimulieren (vgl. Kapitel 1.5.2). Somit liegt nahe, dass einzelne PKC-Isoformen in den Zellen zeitabhängig sehr gezielt reguliert werden müssen, um biologische Prozesse korrekt zu steuern.

Tabelle 1 zeigt einen Überblick der wichtigsten Ergebnisse von Studien, die sich mit der Rolle von PKC oder einzelner Isoformen für die osteogene Differenzierung beschäftigt haben. Da sich die meisten Studien lediglich mit der Regulierung osteogener Marker befassten, ist nur wenig über die molekularen Mechanismen bekannt, mittels derer PKC die Osteogenese steuert. Allerdings konnte bereits gezeigt werden, dass PKC insbesondere mit dem kanonischen Wnt-Signalweg interagiert (230). Des Weiteren zeigten Studienergebnisse, dass PKC die Stabilität von  $\beta$ -Catenin beeinflusst (283–285) und dass der Transkriptionsfaktor MSX2 direkt durch verschiedene PKC-Isoformen phosphoryliert und stabilisiert werden kann (194).

**Tabelle 1: Die Regulierung der osteogenen Differenzierung von mesenchymalen Stamm-/Vorläuferzellen durch PKC.**

Zellen	Isoform	Einfluss auf osteogene Differenzierung	Referenz
ADSCs (human)	<b>allgemein</b>	<b>+</b> WNT5A induzierte sowohl PKC-Aktivität als auch osteogene Marker und Mineralisierung	(117)
ADSCs (human)	<b>allgemein</b>	<b>+</b> PKC-Überaktivierung unterstützte osteogene Differenzierung, außer bei Vorbehandlung mit PKC-Inhibitor	(270)
BMMSCs (human)	<b>allgemein</b>	<b>+</b> PKC-Aktivität und osteogene Differenzierung wurden durch Behandlung mit N-terminalem Peptid von Amelogenin induziert	(266)
ADSCs (Maus)	<b>allgemein</b>	<b>+</b> Überexpression von miR-26a-5p hemmte osteogene Differenzierung und PKC-Phosphorylierung	(267)
BMMSCs (Maus)	<b>allgemein</b>	<b>+</b> Inhibition der Cystathionin- $\beta$ -Synthase hemmte osteogene Differenzierung und Expression von phosphoryliertem PKC; Differenzierung wurde bei gleichzeitiger PKC-Überaktivierung nicht gehemmt	(268)
M2-10B4 (Maus)	<b>allgemein</b>	<b>+</b> Osteogene Marker wurden durch Inhibition von PKC gehemmt	(269)
C2C12 (Maus)	<b>allgemein, klassische PKCs</b>	<b>-</b> Osteogene Marker wurden durch Inhibition klassischer PKCs und generelle PKC-Inhibition induziert und durch PKC-Überaktivierung gehemmt	(194)
BMMSCs (human)	<b>allgemein</b>	<b>+/-</b> PKC-Inhibition hemmte Osteocalcin-Expression, aber stimulierte BMP2-Expression	(271)

(Fortsetzung auf nächster Seite)

BMMSCs (human)	<b>klassische PKC<math>\alpha</math>, PKC<math>\delta</math></b>	- +	Osteogene Marker und Mineralisierung wurden durch Inhibition klassischer PKCs induziert; ALP-Aktivität wurde durch Inhibition von PKC $\delta$ gehemmt	(272)
BMMSCs (human und Maus)	<b>PKC<math>\alpha</math></b>	+	Osteogene Marker (humane und murine BMMSCs) und Mineralisierung (murine BMMSCs) wurden durch Überexpression von PKC $\alpha$ induziert	(276)
C3H10T1/2 (Maus)	<b>PKC<math>\alpha</math></b>	+	Osteogene Marker und Mineralisierung wurden durch Hemmung von PKC $\alpha$ inhibiert	(277)
MC3T3-E1 (Maus)	<b>PKC<math>\alpha</math></b>	-	Osteogene Differenzierung wurde durch Hemmung der Expression von PKC $\alpha$ unterstützt	(273)
BMMSCs (human)	<b>PKC<math>\alpha</math>, PKC<math>\beta</math>1, PKC<math>\delta</math></b>	+/- - +	Co-Kultivierung von BMMSCs mit Myeloma-Zellen hemmte die Mineralisierung und Expression von phosphoryliertem PKC $\alpha$ und PKC $\delta$ , aber erhöhte die Expression von phosphoryliertem PKC $\beta$ 1; Inhibition klassischer PKCs unterstützte die Mineralisierung	(274)
PDLSCs (human)	<b>PKC<math>\beta</math>2</b>	-	Verringerte Expression von phosphoryliertem PKC $\beta$ 2 wurde mit erhöhter Expression osteogener Marker assoziiert	(275)
ADSCs (human)	<b>PKC<math>\delta</math></b>	+	Osteogene Differenzierungsmarker wurden durch Inhibition von PKC $\delta$ gehemmt	(278)
BMMSCs (human)	<b>PKC<math>\delta</math></b>	+	Osteogene Differenzierung nach Induktion mit Jagged-1 wurde durch Inhibition von PKC $\delta$ gehemmt	(279)
BMMSCs (human)	<b>PKC<math>\delta</math></b>	+	PKC $\delta$ wurde während osteogener Differenzierung induziert; PKC $\delta$ -Inhibition hemmte Differenzierung	(280)
ADSCs (Maus)	<b>PKC<math>\delta</math></b>	+	Oncostatin M stimulierte osteogene Differenzierung und Aktivität von PKC $\delta$ ; Differenzierung wurde durch Herunterregulierung von PKC $\delta$ gehemmt	(281)
ST2 (Maus)	<b>PKC<math>\delta</math></b>	+	Osteogene Differenzierung nach Induktion mit WNT3A wurde durch Herunterregulierung von PKC $\delta$ unterdrückt	(282)
MC3T3-E1 (Maus)	<b>PKC<math>\eta</math>, PKC<math>\theta</math></b>	+ -	Expression von PKC $\eta$ wurde mit Expression osteogener Marker assoziiert; Expression von PKC $\theta$ wurde nach osteogener Induktion herunterreguliert	(286)

Der vielseitige Einfluss von PKC auf die Osteogenese lässt eine ebenso komplexe Regulierung der Adipogenese vermuten, da die beiden Prozesse in der Regel gegenläufig reguliert werden (270,274,280). Dabei wird die adipogene Differenzierung mesenchymaler Stammzellen *in vitro* teilweise durch dieselben Stoffe induziert wie die Osteogenese, z. B. durch Insulin, IGF-1 (engl. *Insulin-like growth factor 1*) und IGF-2 (287–289). Zudem lässt sich die Adipogenese durch eine Kombination aus Dexamethason und 3-Isobutyl-1-methylxanthin induzieren (290). Allerdings sind die hierbei verwendeten Konzentrationen von Dexamethason, Insulin und IGF-2 höher als bei der Induktion der osteogenen Differenzierung (82,84). Wie bei der Osteogenese zeigten unterschiedliche Studien widersprüchliche Ergebnisse bei der Evaluierung des PKC-Einflusses auf die Adipogenese. So konnte PKC oftmals positiv (283,291–293) und



negativ (270,294,295) mit der adipogenen Differenzierung in Verbindung gebracht werden. Ebenso wurden für klassische PKC-Isoformen gegensätzliche Studienergebnisse in Hinblick auf die adipogene Differenzierung berichtet (292,296). Lediglich Studien zur isolierten Betrachtung von PKC $\beta$ -Isoformen zeigten übereinstimmend einen induktiven Einfluss auf die Adipogenese (274,297). Die klassische Isoform PKC $\gamma$  unterstützt ebenfalls die adipogene Differenzierung (274), wohingegen für PKC $\alpha$  weitestgehend eine negative Beeinflussung der Differenzierung festgestellt wurde (274,298,299). Zudem wurde PKC $\delta$  stets negativ mit der Adipogenese assoziiert (274,280,292,298). Dabei legten Versuche von Carter et al. nahe, dass insbesondere bestimmte Splicing-Varianten von PKC $\delta$  die adipogene Differenzierung regulieren (300). Da für die osteogene Differenzierung überwiegend ein positiver Einfluss durch PKC $\delta$  gefunden wurde (272,274,278–282), lässt sich vermuten, dass diese Isoform eine zentrale Rolle bei der Festlegung auf einen bestimmten Differenzierungsweg in Stamm-/Vorläuferzellen spielt. In Tabelle 2 sind die wichtigsten Ergebnisse aus Studien zur Rolle von PKC für die adipogene Differenzierung zusammengefasst.

**Tabelle 2: Die Regulierung der adipogenen Differenzierung von mesenchymalen Stamm-/Vorläuferzellen durch PKC.**

Zellen	Isoform	Einfluss auf adipogene Differenzierung	Referenz
BMMSCs (human)	<b>allgemein, PKC<math>\epsilon</math></b>	+ + Allgemeine PKC-Aktivität wurde während adipogener Differenzierung induziert; Adipogene Marker wurden durch allgemeine PKC-Inhibition und durch spezifische PKC $\epsilon$ -Inhibition gehemmt	(291)
3T3-L1 (Maus)	<b>allgemein, klassische PKCs, PKC<math>\delta</math></b>	+ + - Adipogene Differenzierung wurde durch generelle PKC-Inhibition und spezifische Inhibition klassischer PKCs gehemmt; Inhibition von PKC $\delta$ unterstützte die Differenzierung	(292)
3T3-L1 (Maus)	<b>allgemein</b>	+ Adipogene Differenzierung wurde durch PKC-Inhibition gehemmt	(283)
Ob1771 (Maus)	<b>allgemein</b>	+ PKC-Überaktivierung unterstützte adipogene Differenzierung bei Behandlung mit Substanzen, welche die cAMP-Konzentration erhöhen	(293)
ADSCs (human)	<b>allgemein</b>	- Adipogene Differenzierung wurde durch PKC-Überaktivierung gehemmt, außer bei Vorbehandlung mit PKC-Inhibitor	(270)
3T3-L1 (Maus)	<b>allgemein</b>	- Adipogene Differenzierung wurde durch PKC-Inhibition unterstützt	(294)
Adipogene Vorläufer- zellen (Ratte)	<b>allgemein</b>	- Adipogene Differenzierung wurde durch PKC-Inhibition unterstützt	(295)

(Fortsetzung auf nächster Seite)

3T3-F442A (Maus)	<b>PKC<math>\alpha</math>,</b> <b>PKC<math>\delta</math>,</b> <b>PKC<math>\gamma</math>,</b> <b>PKC<math>\epsilon</math></b>	- - + +	Expression von PKC $\alpha$ und PKC $\delta$ wurde während adipogener Differenzierung inhibiert; Adipogenese wurde durch Herunterregulierung von PKC $\gamma$ und PKC $\epsilon$ gehemmt	(298)
3T3-L1 (Maus)	<b>PKC<math>\alpha</math></b>	-	Expression von PKC $\alpha$ wurde während adipogener Differenzierung herunterreguliert	(299)
3T3-L1 (Maus)	<b>PKC<math>\alpha/\beta</math></b>	-	Phosphorylierung von PKC $\alpha/\beta$ wurde assoziiert mit Hemmung der Adipogenese nach Evodiamin-Behandlung	(296)
BMMSCs (human)	<b>PKC<math>\alpha</math>,</b> <b>PKC<math>\beta</math>1,</b> <b>PKC<math>\delta</math></b>	+/- + -	Co-Kultivierung von BMMSCs mit Myeloma-Zellen unterstützte die adipogene Differenzierung und erhöhte die Expression von phosphoryliertem PKC $\beta$ 1, aber hemmte die Expression von phosphoryliertem PKC $\alpha$ und PKC $\delta$ ; Adipogene Differenzierung wurde durch Inhibition klassischer PKCs gehemmt	(274)
ADSCs (human)	<b>PKC<math>\beta</math></b>	+	Aktivierung von PKC $\beta$ wurde assoziiert mit Induktion der adipogenen Differenzierung durch atypische Antipsychotika; Adipogenese wurde durch Inhibition von PKC $\beta$ gehemmt	(297)
BMMSCs (human)	<b>PKC<math>\delta</math></b>	-	Adipogene Differenzierung wurde durch Inhibition von PKC $\delta$ induziert	(280)
3T3-F442A (Maus)	<b>PKC<math>\epsilon</math></b>	+	Expression von PKC $\epsilon$ wurde während adipogener Differenzierung stimuliert; Adipogenese wurde durch Überexpression von PKC $\epsilon$ unterstützt	(301)
3T3-L1 (Maus)	<b>PKC<math>\epsilon</math></b>	+	Adipogene Differenzierung wurde durch Stimulierung von PKC $\epsilon$ unterstützt und durch Herunterregulierung von PKC $\epsilon$ gehemmt	(302)
Adipogene Vorläufer- zellen (Ratte)	<b>PKC<math>\zeta</math></b>	+	Expression von PKC $\zeta$ im Cytoplasma wurde während adipogener Differenzierung stimuliert; Expression von PKC $\zeta$ stieg im Cytoplasma, in der Plasmamembran und im Zellkern nach Behandlung mit Insulin	(303)
Fetale braune Adipozyten (Ratte)	<b>PKC<math>\zeta</math></b>	+	Aktivierung von PKC $\zeta$ wurde assoziiert mit der adipogenen Differenzierung nach Induktion mit IGF-1	(287)

Ein dualer Einfluss von PKC auf die Differenzierung mesenchymaler Stamm-/Vorläuferzellen lässt sich darüber hinaus bei der Chondrogenese finden. So konnte eine Studie einerseits zeigen, dass PKC die chondrogene Differenzierung von BMMSCs bei einer hohen Glucose-Konzentration in der Zellkultur unterdrückt. Andererseits war bei Kultivierung mit einer niedrigen Glucose-Konzentration sowohl eine bessere Chondrogenese als auch eine höhere Expression von phosphoryliertem PKC feststellbar (304). Überdies konnte die chondrogene Differenzierung in einer weiteren Studie durch PKC-Inhibition unterstützt werden (305), während in einer anderen Studie das Gegenteil

beobachtet wurde (306). Bei differenzierter Betrachtung der Isoformen wird deutlich, dass insbesondere PKC $\alpha$  essentiell für die chondrogene Differenzierung ist (307–309). Spezifische Einflüsse verschiedener PKC-Isoformen lassen sich außerdem bei der Differenzierung mesenchymaler Stammzellen in weitere Zelltypen finden. So steigt die Expression von PKC $\epsilon$  während der neuronalen Differenzierung von humanen BMMSCs an (310), während klassische PKCs die neuronale Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen aus der Nabelschnur hemmen (311). Des Weiteren sind die atypischen Isoformen PKC $\zeta$  und PKC $\iota$  an der Regulierung der neuronalen Differenzierung beteiligt (312,313). Dahingegen wird die Differenzierung von Keratinozyten vor allem durch die Isoformen PKC $\alpha$  und PKC $\eta$  unterstützt (187,314,315). Darüber hinaus induziert eine PKC-Überaktivierung die cardiomyogene Differenzierung von Stammzellen (316,317), wobei weiterführende Untersuchungen nahelegten, dass die Isoform PKC $\delta$  für die induktive Wirkung verantwortlich ist (318). Die cardiomyogene Regeneration konnte in einem Herzinfarktmodell von Ratten zudem durch Überexpression von PKC $\epsilon$  unterstützt werden (319).

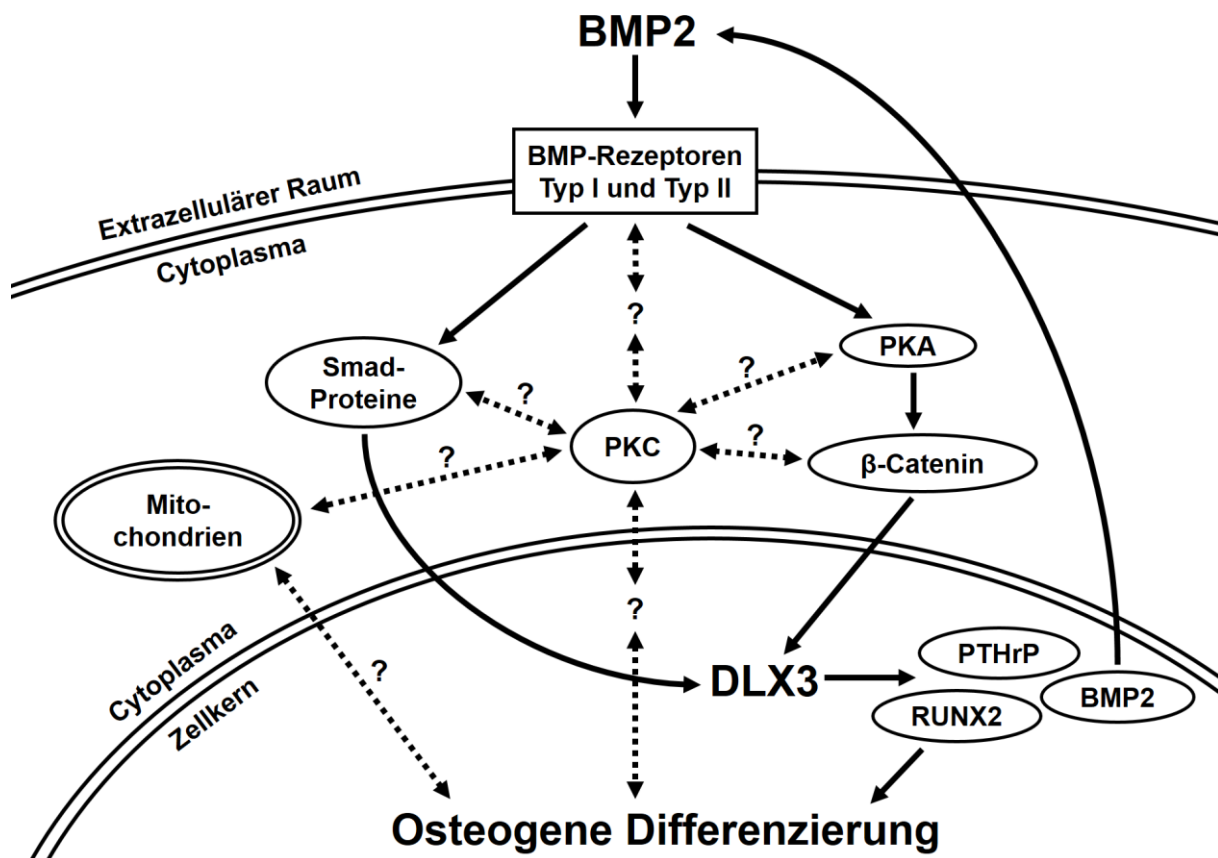
Zusammenfassend wird deutlich, dass die Regulierung von Differenzierungsvorgängen durch PKC sehr komplex ist und von einer Vielzahl von Einflüssen reguliert wird, sodass dieselbe Isoform unter verschiedenen Bedingungen andere Auswirkungen auf einen Differenzierungsweg haben kann. Die aufgeführten Beispiele legen dar, dass insbesondere klassische PKC-Isoformen hiervon betroffen sind, weshalb sich vermuten lässt, dass auch die osteogene Differenzierung von DFCs einer komplexen Regulierung durch klassische PKCs unterliegt, bei der stromabwärts mehrere Proteine und Signalwege involviert sein könnten.

## 1.6 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Evaluierung der molekularen Mechanismen, über welche klassische PKC-Isoformen die osteogene Differenzierung von DFCs hemmen. Hierbei lag das Augenmerk vor allem auf möglichen Interaktionen mit dem BMP2/DLX3-Signalweg. Untersucht wurde einerseits eine Beeinflussung des Transkriptionsfaktorkomplexes um  $\beta$ -Catenin, welcher die Expression von DLX3 induziert. Dabei war eine Regulierung von  $\beta$ -Catenin besonders naheliegend, da bereits in Mäusen gezeigt werden konnte, dass der kanonische Wnt-Signalweg durch PKC $\alpha$  reguliert wird (230). Andererseits sollten Wechselwirkungen mit den durch BMP2 induzierten

Proteinen Smad1/5/8 und PKA untersucht werden. Denkbar war vor allem eine Beteiligung von PKC an der Aktivierung von PKA. Eine weitere zu untersuchende Hypothese war die Beeinflussung von Transkriptionsfaktoren, für die bislang kein Zusammenhang mit der osteogenen Differenzierung von DFCs bekannt war, wie beispielsweise NF- $\kappa$ B. Da sich klassische PKC-Isoformen besonders auf den energieintensiven Prozess der Mineralisierung auswirken, sollte außerdem untersucht werden, ob klassische PKCs Marker des mitochondrialen Stoffwechsels beeinflussen und möglicherweise hierdurch die Osteogenese von DFCs steuern.

Des Weiteren war unklar, wie PKC selbst in DFCs reguliert und nach osteogener Induktion gehemmt wird. Daher sollte zusätzlich untersucht werden, ob bekannte Signalproteine, welche die osteogene Differenzierung von DFCs beeinflussen, wie z. B. PTHrP, an der Steuerung der Aktivität von PKC beteiligt sind.



**Abb. 9: Hypothesen zur Regulierung der osteogenen Differenzierung von DFCs durch PKC.** Die Abbildung zeigt schematisch die untersuchten Hypothesen, wie PKC die osteogene Differenzierung von DFCs regulieren könnte. Genauere Erläuterungen lassen sich dem Fließtext entnehmen.

Die untersuchten Hypothesen sind in Abbildung 9 schematisch dargestellt. Die erwarteten Erkenntnisse sollten schließlich dazu beitragen, das Verständnis über die molekularen Abläufe während der osteogenen Differenzierung von DFCs sowie über die zellulären Funktionen klassischer PKC-Isoformen zu erweitern, und eine Grundlage für die zielgerichtete Verwendung von DFCs in regenerativen Therapien von (parodontalen) Knochendefekten zu schaffen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

**Tabelle 3: Herstellerverzeichnis und im Text verwendete Kürzel.**

<b>Kürzel im Text</b>	<b>Herstellerangaben</b>
<b>Abcam</b>	„Abcam plc.“, Cambridge, Vereinigtes Königreich
<b>Active Motif</b>	„Active Motif, Inc.“, Carlsbad, CA, USA
<b>Agilent</b>	„Agilent Technologies, Inc.“, Santa Clara, CA, USA
<b>Air Liquide</b>	„Air Liquide S.A.“, Paris, Frankreich
<b>AllCells</b>	„AllCells, LLC“, Alameda, CA, USA
<b>BD</b>	„Becton, Dickinson and Company“, Franklin Lakes, NJ, USA
<b>Biomol</b>	„Biomol GmbH“, Hamburg, Deutschland
<b>BIO-RAD</b>	„BIO-RAD Laboratories, Inc.“, Hercules, CA, USA
<b>Biozym</b>	„Biozym Scientific GmbH“, Hessisch Oldendorf, Deutschland
<b>Bosch</b>	„Robert Bosch GmbH“, Gerlingen, Deutschland
<b>Cayman</b>	„Cayman Chemical“, Ann Arbor, MI, USA
<b>Cell Signaling</b>	„Cell Signaling Technology“, Cambridge, Vereinigtes Königreich
<b>Corning</b>	„Corning, Inc.“, Corning, NY, USA
<b>Cytiva</b>	„Cytiva“, Marlborough, MA, USA
<b>Dojindo</b>	„Dojindo Laboratories“, Kumamoto, Japan
<b>Düperthal</b>	„Düperthal Sicherheitstechnik GmbH & Co. KG“, Karlstein am Main, Deutschland
<b>Eppendorf</b>	„Eppendorf SE“, Hamburg, Deutschland
<b>Gilson</b>	„Gilson, Inc.“, Middleton, WI, USA
<b>Greiner</b>	„Greiner Bio-One GmbH“, Frickenhausen, Deutschland
<b>Heidolph</b>	„Heidolph Instruments GmbH & Co. KG“, Schwabach, Deutschland
<b>Hettich</b>	„Andreas Hettich GmbH & Co. KG“, Tuttlingen, Deutschland
<b>Heraeus</b>	„Heraeus Instruments GmbH“, Hanau, Deutschland
<b>IBM</b>	„International Business Machines Corporation“, Armonk, NY, USA
<b>Kisker</b>	„Kisker Biotech GmbH & Co. KG“, Steinfurt, Deutschland
<b>Lauda</b>	„Lauda Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG“, Lauda-Königshofen, Deutschland
<b>Liebherr</b>	„Liebherr-International AG“, Bulle, Schweiz
<b>Lonza</b>	„Lonza Group AG“, Basel, Schweiz
<b>Medite</b>	„MEDITE Medical GmbH“, Burgdorf, Deutschland
<b>Memmert</b>	„Memmert GmbH + Co. KG“, Schwabach, Deutschland

(Fortsetzung auf nächster Seite)

<b>Merck Millipore</b>	„Merck Millipore“, Billerica, MA, USA
<b>Mettler-Toledo</b>	„Mettler-Toledo International Inc.“, Columbus, OH, USA
<b>Microsoft</b>	„Microsoft Corporation“, Redmond, WA, USA
<b>Nerbe</b>	„nerbe plus GmbH & Co. KG“, Winsen (Luhe), Deutschland
<b>NIH</b>	„National Institutes of Health“, Bethesda, MD, USA
<b>Nikon</b>	„Nikon Corporation“, Tokio, Japan
<b>Promega</b>	„Promega Corporation“, Madison, WI, USA
<b>PromoCell</b>	„PromoCell GmbH“, Heidelberg, Deutschland
<b>PeproTech</b>	„PeproTech, Inc.“, Cranbury, NJ, USA
<b>Qiagen</b>	„Qiagen GmbH“, Hilden, Deutschland
<b>Roche</b>	„Roche Holding AG“, Basel, Schweiz
<b>Roth</b>	„Carl Roth GmbH + Co. KG“, Karlsruhe, Deutschland
<b>Santa Cruz</b>	„Santa Cruz Biotechnology, Inc.“, Dallas, TX, USA
<b>Sarstedt</b>	„Sarstedt AG & Co. KG“, Nümbrecht, Deutschland
<b>Sartorius</b>	„Sartorius AG“, Göttingen, Deutschland
<b>Scotsman</b>	„Scotsman Ice Systems“, Vernon Hills, IL, USA
<b>Sigma</b>	„Sigma-Aldrich, Inc.“, St. Louis, MO, USA
<b>Supelco</b>	„Supelco, Inc.“, Bellefonte, PA, USA
<b>Swiss A. S.</b>	„Swiss Academic Software GmbH“, Wädenswil, Schweiz
<b>Thermo</b>	„Thermo Fisher Scientific Inc.“, Waltham, MA, USA
<b>Tocris</b>	„Tocris Bioscience“, Bristol, Vereinigtes Königreich
<b>Turku Bioscience</b>	„Turku Bioscience“, Turku, Finnland
<b>Vector</b>	„Vector Laboratories, Inc.“, Newark, CA, USA
<b>VWR</b>	„VWR International, LLC“, Radnor, PA, USA
<b>Waldner</b>	„WALDNER Laboreinrichtungen GmbH & Co. KG“, Wangen im Allgäu, Deutschland

### 2.1.1 Geräte

**Tabelle 4: Verwendete Geräte.**

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Agarose-Gelelektrophoresekammer und Vorrichtung zum Gießen der Gele</b>	VWR
<b>Blot-Apparatur „Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell“</b>	BIO-RAD (#1703940)
<b>Blot-Apparatur „Trans-Blot® Turbo™ Transfer System“</b>	BIO-RAD (#1704150)
<b>Blot-/Gel-Dokumentationsgerät „ChemiDoc™ Touch Imaging System“</b>	BIO-RAD (#1708370)
<b>Brutschrank „HERAcell™ 150“</b>	Thermo

(Fortsetzung auf nächster Seite)

<b>Digestorium</b>	Waldner
<b>Durchflusszytometer „FACSCanto™ II“</b>	BD
<b>Eismaschine „SCOTSMAN® AF 80“</b>	Scotsman
<b>Fluoreszenzmikroskop „ECLIPSE Ts2-FL“</b>	Nikon
<b>Gelelektrophoresekammer „Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell for Precast Gels“</b>	BIO-RAD (#1658004)
<b>Heizschüttler „Thermomixer Compact 5350“</b>	Eppendorf
<b>Kühlblock für PCR-Reaktionsgefäße</b>	Eppendorf
<b>Kühlplatte „COP 30“</b>	Medite
<b>Kühl- und Gefrierschränke</b>	Bosch, Liebherr, Thermo
<b>Mikroskop „Nikon Eclipse TS100“</b>	Nikon
<b>Mikroskopkamera „DS-Fi2“</b>	Nikon
<b>Mikroskopkamera-Kontrolleinheit „DS-L3“</b>	Nikon
<b>Mikrowellenherd</b>	Bosch
<b>Netzgerät „PowerPac™ 3000“</b>	BIO-RAD (#1655056)
<b>PCR-Cycler „StepOnePlus™ Real-Time PCR System“</b>	Thermo
<b>pH-Meter „FiveEasy™ FE20“ mit Elektrode „LE409“</b>	Mettler-Toledo
<b>Pipetten („Thermo Scientific™ Finnpipette™“, „Eppendorf Research®/Research® Plus“ und „Gilson Pipetman®“)</b>	Thermo, Eppendorf, Gilson
<b>Plattenreader „iMark™ Mikroplate Reader“</b>	BIO-RAD (#1681135)
<b>Reinstwassersystem „TKA X-CAD“</b>	Thermo
<b>Schüttler „REAX top“</b>	Heidolph
<b>Sicherheitsschränke</b>	Düperthal
<b>Spektrophotometer „NanoDrop™ 2000“</b>	Thermo
<b>Sterilbank „HERASafe® HS 12“</b>	Heraeus
<b>Stickstofftank „ARPEGE 110“</b>	Air Liquide
<b>TC20-Zellzähler „TC20™ Automated Cell Counter“</b>	BIO-RAD (#1450102)
<b>Thermocycler „MJ Mini™ 48-Well Personal Thermal Cycler“</b>	BIO-RAD (#PTC1148)
<b>Waage „DENVER INSTRUMENT S-402“</b>	Sartorius
<b>Wärmeschrank „UNB 400“</b>	Memmert
<b>Wasserbad „GFL 1092“</b>	Lauda
<b>Zentrifuge „Biofuge pico“</b>	Heraeus
<b>Zentrifuge „BIO-RAD C1301“</b>	BIO-RAD (#C1301)
<b>Zentrifuge „Eppendorf 5417R“</b>	Eppendorf
<b>Zentrifuge „Labofuge 400R“</b>	Heraeus
<b>Zentrifuge „MIKRO 185“</b>	Hettich
<b>Zentrifuge „Sprout™“</b>	Kisker



### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 5: Verwendete Verbrauchsmaterialien.**

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller</b>
10 cm-Zellkulturschalen	Greiner (#664160)
175 cm <sup>2</sup> -Zellkulturflaschen	Corning (#431080)
24-Well-Platten	Greiner (#662160)
6-Well-Platten	Corning (#353046)
96-Well-Platten für Assays, transparent	Corning (#3598)
96-Well-Platten für Assays, weiß	Corning (#353296)
96-Well-Platten für Zellkultur	Thermo (#167008)
Blot-Filterpapiere	BIO-RAD (#1703965)
Blot-Membranen aus Nitrocellulose „Amersham™ Protran® 0.2 µm“	Cytiva
Blot-Membranen „Trans-Blot Turbo Mini 0.2 µm Nitrocellulose Transfer Packs“	BIO-RAD (#1704158)
Kryoröhrchen	Sarstedt
Mikropistillen	Eppendorf
Mikrozentrifugationsgefäße	Kisker, Sarstedt
PCR-Reaktionsgefäße, -deckel, -blöcke, -platten und -adhäsionsfilme („MicroAmp™“)	Thermo
Pipettenspitzen	Biozym, Sarstedt, Nerbe
Proteingele „4–15% Mini-PROTEAN® TXG Stain-Free™ Protein Gels“	BIO-RAD (#4568086)
„QIAshredder“-Säulen für die RNA-Isolierung	Qiagen (#79656)
Stripetten	Corning, Greiner
Zellschaber	Sarstedt
Zellzähler-Kammern	BIO-RAD (#1450011)
Zentrifugationsröhrchen (50 und 15 ml)	Greiner

### 2.1.3 Zellkulturmedien

**Tabelle 6: Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien.**

<b>Medium</b>	<b>Zusammensetzung</b>
<b>Wachstumsmedium</b>	DMEM („Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium – high glucose“, Sigma, #D5796); 10 % FBS (engl. <i>Fetal bovine serum</i> , Sigma, #F0804 oder #F7524); 1 % Penicillin (10000 U/ml)/Streptomycin (10 mg/ml)-Lösung (Sigma, #P0781)

(Fortsetzung auf nächster Seite)

<b>Einfriermedium</b>	DMEM (wie zuvor); 20 % FBS (wie zuvor); 10 % DMSO (Roth, #A994)
<b>DMEM (Kontrollmedium)</b>	DMEM (wie zuvor); 2 % FBS (wie zuvor); 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung (wie zuvor)
<b>ODM (Osteogenes Differenzierungsmedium)</b>	DMEM (Kontrollmedium); 20 mM HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure, Sigma #H0887); 10 mM $\beta$ -Glycerophosphat (Sigma #G9422); 100 $\mu$ M Ascorbinsäure-2-phosphat (Sigma #49752); 100 nM Dexamethason (Sigma #D2915)
<b>BMP2-Medium</b>	wie ODM, anstelle von Dexamethason mit 50 ng/ml BMP2 (Biomol, #54299)
<b>Medium für siRNA-Transfektionen</b>	wie Wachstumsmedium, aber ohne FBS

## 2.1.4 Aktivatoren und Inhibitoren

**Tabelle 7: Verwendete Aktivatoren/Inhibitoren und Proteine zur Behandlung in der Zellkultur.**

Bezeichnung	Wirkung	Hersteller	Artikelnummer
<b>3-AT</b>	Inhibitor der Catalase (320)	Sigma	#A8056
<b>ACHP</b>	Inhibitor von IKK $\alpha$ und IKK $\beta$ (321)	Tocris	#4547
<b>CID2858522</b>	Inhibitor von PKC-stimulierter NF- $\kappa$ B-Aktivierung (322)	Tocris	#4246
<b>Forskolin</b>	Aktivator der Adenylatcyclase (323)	Cayman	#11018
<b>Gö6976</b>	Inhibitor klassischer PKCs (324)	Tocris Cayman	#2253 #13310
<b>MK2206</b>	Inhibitor von Akt (325)	Santa Cruz	#sc-364537
<b>PMA</b>	Aktivator von PKC und NF- $\kappa$ B (326,327)	Abcam	#ab120297
<b>PTH (7-34)</b>	Protein, hemmt Rezeptor PTH1R (328)	PromoCell	#C-66648
<b>PTHrP</b>	Protein, stimuliert Rezeptor PTH1R (329)	PeptoTech	#100-09
<b>Rotenon</b>	Inhibitor des mitochondrialen Complex I (330)	Supelco	#45656
<b>SC-79</b>	Aktivator von Akt (331)	Sigma	#SML0749

### 2.1.5 Puffer und sonstige Lösungen

**Tabelle 8: Verwendete Puffer und sonstige Lösungen, die nicht selbst hergestellt wurden.**

Puffer/Lösung	Hersteller	Artikelnummer
„10x Tris/Glycin/SDS“-Elektrophoresepuffer	BIO-RAD	#1610732
2x Laemmli-Puffer	BIO-RAD	#1610737
4x Laemmli-Puffer	BIO-RAD	#1610747
Alizarinrot-Färbelösung (pH-Wert 4,1 ± 0,1)	Sigma	#TMS-008-C
Eindeckmedium „VECTASHIELD® Mounting Medium with DAPI“	Vector	#H-1200
Entwicklerlösung „Clarity™ Western ECL Substrate“	BIO-RAD	#1705061
Formaldehydlösung	Sigma	#1.03999
Größenstandard „PageRuler™ Prestained Protein Ladder (10 bis 180 kDa)“	Thermo	#26616
NGS (engl. <i>Normal goat serum</i> )-Lösung (91 g/l)	Agilent	#X090710-8
PBS (engl. <i>Phosphate-buffered saline</i> ) für Zellkultur und Assays	Sigma	#D8537
PBS für Western Blot (in Pulverform)	Lonza	#BE15-516F
p-Nitrophenylphosphat-Lösung (mit Zusätzen, pH 9,6 – 10,2)	Sigma	#P7998
„ReBlot Plus Mild Antibody Stripping Solution, 10x“	Merck Millipore	#2502
„ReBlot Plus Strong Antibody Stripping Solution, 10x“	Merck Millipore	#2504
Trypsin-EDTA (Ethylendiamintetraacetat)-Lösung	Thermo	#25200072
Trypanblau-Lösung	Sigma	#T8154
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )-Lösung	Merck Millipore	#88597

**Tabelle 9: Verwendete Puffer, die selbst hergestellt wurden.**

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Agarose-Gel-elektrophoresepuffer	50 mM Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethan)/HCl pH 8,0 (Tris: Biomol, #08003, HCl: Roth, #K025); in H <sub>2</sub> O
Blotpuffer	25 mM Tris/HCl pH 8,6 (Hersteller wie zuvor); 190 mM Glycin (Merck Millipore, #3570); 10 % Methanol (Supelco, #1.06007); in H <sub>2</sub> O

(Fortsetzung auf nächster Seite)

<b>PKA-Lysepuffer</b>	25 mM Tris/HCl pH 8,0 (Hersteller wie zuvor); 0,5 mM EGTA (Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetra- essigsäure, Sigma, #03777); 0,5 mM EDTA (Merck Millipore, #324504); 10 mM 2-Mercaptoethanol (s. Tabelle 10); 1 % „Phosphatase Inhibitor Cocktail 3“ (Sigma, #P0044); 1 Tablette/10 ml „cOmplete™ Mini Protease Inhibitor Cocktail“ (Roche, #11836153001); in H <sub>2</sub> O
<b>TBS (engl. <i>Tris- buffered saline</i>)</b>	25 mM Tris/HCl pH 7,6 (Hersteller wie zuvor); 150 mM NaCl (VWR, #27810295); in H <sub>2</sub> O
<b>TBST (engl. <i>Tris- buffered saline with Tween® 20</i>)</b>	25 mM Tris/HCl pH 7,6 (Hersteller wie zuvor); 150 mM NaCl (wie zuvor); 0,1 % Tween® 20 (Sigma, #P1379); in H <sub>2</sub> O
<b>Western Blot- Lysepuffer</b>	20 mM Tris/HCl pH 8,0 (Hersteller wie zuvor); 137 mM NaCl (wie zuvor); 48 mM NaF (Sigma, #S7920); 1 % „Nonidet™ P 40 Ersatz“ (Sigma, #74385); 10 % Glycerol (s. Tabelle 10); 2 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> (Sigma, #S6508); 1 % „Phosphatase Inhibitor Cocktail 3“ (wie zuvor); 1 Tablette/10 ml „cOmplete™ Mini Protease Inhibitor Cocktail“ (wie zuvor); in H <sub>2</sub> O

**Tabelle 10: Sonstige verwendete Chemikalien.**

<b>Puffer/Lösung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Artikelnummer</b>
<b>2-Mercaptoethanol</b>	Sigma	#M3148
<b>Aceton</b>	Roth	#9372
<b>Agarose</b>	Promega	#V3121

(Fortsetzung auf nächster Seite)

<b>BSA (Bovines Serumalbumin)</b>	Biomol	#01400
<b>Cetylpyridiniumchlorid</b>	Sigma	#C0732
<b>Ethanol</b>	Roth	#9065
<b>Glycerol</b>	Sigma	#G5516
<b>H2DCFDA (2',7'-Dichlordihydrofluorescein-diacetat)</b>	Abcam Tocris	Bestandteil des Kits #ab113851 #5935
<b>H<sub>2</sub>O (nukleasefrei)</b>	Qiagen	#129114
<b>Milchpulver</b>	Roth	#T145
<b>Stickstoff (flüssig)</b>	Universitätsklinikum Regensburg (intern bezogen)	
<b>Triton™ X-100</b>	Sigma	#T9284

### 2.1.6 Antikörper

**Tabelle 11: Verwendete Primärantikörper für Western Blots**

<b>Antigen</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Antigen- gewicht</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Sekundärantikörper</b>
<b>β-Catenin (aktiv)</b>	Sigma (#05-665)	92 kDa	1:750 in Milchpulver	1:10.000 Anti-mouse
<b>β-Catenin (Phospho Ser552)</b>	Cell Signaling (#5651)	92 kDa	1:1.000 in BSA	1:2.000 Anti-rabbit
<b>β-Catenin (Phospho Ser675)</b>	Cell Signaling (#4176)	92 kDa	1:1.000 in BSA	1:2.000 Anti-rabbit
<b>Akt (gesamt)</b>	Cell Signaling (#4685)	60 kDa	1:1.000 in BSA	1:1.000 Anti-rabbit
<b>Akt (Phospho Ser473)</b>	Cell Signaling (#4060)	60 kDa	1:1.000 in BSA	1:2.000 Anti-rabbit
<b>COX IV</b>	Cell Signaling (#4850)	17 kDa	1:1.000 in BSA	1:1.000 Anti-rabbit
<b>GAPDH</b>	Cell Signaling (#5174)	37 kDa	1:1.000 in Milchpulver	1:1.000 Anti-rabbit
<b>GPX1</b>	Cell Signaling (#3286)	22 kDa	1:1.000 in BSA	1:1.000 Anti-rabbit
<b>GSK3α/β</b>	Cell Signaling (#5676)	46 kDa	1:1.000 in BSA	1:1.000 Anti-rabbit
<b>GSK3β (Phospho Ser9)</b>	Cell Signaling (#5558)	46 kDa	1:1.000 in BSA	1:1.000 Anti-rabbit
<b>Hexokinase 1</b>	Cell Signaling (#2024)	102 kDa	1:1.000 in BSA	1:1.000 Anti-rabbit
<b>HIF-1α</b>	Cell Signaling (#36169)	120 kDa	1:1.000 in BSA	1:1.000 Anti-rabbit

(Fortsetzung auf nächster Seite)

<b>I<math>\kappa</math>B<math>\alpha</math></b>	Cell Signaling (#4814)	39 kDa	1:1.000 in BSA	1:1.000 Anti-mouse
<b>I<math>\kappa</math>B<math>\alpha</math> (Phospho Ser32)</b>	Cell Signaling (#2859)	40 kDa	1:1.000 in BSA	1:1.000 Anti-rabbit
<b>IKK<math>\alpha</math></b>	Cell Signaling (#11930)	85 kDa	1:1.000 in BSA	1:1.000 Anti-mouse
<b>IKK<math>\beta</math></b>	Cell Signaling (#8943)	87 kDa	1:1.000 in BSA	1:1.000 Anti-rabbit
<b>IKK<math>\alpha</math>/<math>\beta</math> (Phospho Ser176/180)</b>	Cell Signaling (#2697)	85 und 87 kDa	1:1.000 in BSA	1:1.000 Anti-rabbit
<b>LEF1</b>	Sigma (#17-604)	38 kDa	1:1.000 in BSA	1:1.000 Anti-mouse
<b>NF-<math>\kappa</math>B (p65)</b>	Cell Signaling (#8242)	65 kDa	1:1.000 in BSA	1:1.000 Anti-rabbit
<b>NF-<math>\kappa</math>B (p65, Phospho Ser536)</b>	Cell Signaling (#3033)	65 kDa	1:1.000 in BSA	1:1.000 Anti-rabbit
<b>„Oxidative Stress Defense-Cocktail“ (Catalase, Smooth Muscle Actin, SOD1, Thioredoxin)</b>	Abcam (#ab179843)	60, 42, 16 und 12 kDa (selbe Reihenfolge wie links)	1:250 in Milchpulver	1:1.000 Anti-rabbit
<b>PKA</b>	Cell Signaling (#5842)	42 kDa	1:1.000 in BSA	1:1.000 Anti-rabbit
<b>PKA (Phospho Thr197)</b>	Cell Signaling (#5661)	42 kDa	1:1.000 in BSA	1:1.000 Anti-rabbit
<b>PKC<math>\alpha</math></b>	Cell Signaling (#2056)	80 kDa	1:1.000 in BSA	1:10.000 Anti-rabbit
<b>PKC (Phospho Ser660 bei PKC<math>\beta</math>2)</b>	Cell Signaling (#9371)	78, 80, 82 und 85 kDa	1:1.000 in BSA	1:1.000 Anti-rabbit
<b>PKC-Substrat (Phospho Ser in spezifischem Motiv für PKC-Phosphoryl.)</b>	Cell Signaling (#2261)	verschiedene	1:1.000 in BSA	1:1.000 Anti-rabbit
<b>PTHrP</b>	Abcam (#ab224503)	60 kDa	1:1.000 in BSA	1:1.000 Anti-rabbit
<b>Smad1</b>	Cell Signaling (#6944)	60 kDa	1:1.000 in BSA	1:1.000 Anti-rabbit
<b>Smad1/5 (Phospho Ser463/465)</b>	Cell Signaling (#9516)	60 kDa	1:1.000 in BSA	1:1.000 Anti-rabbit

**Tabelle 12: Verwendete Sekundärantikörper für Western Blots**

Antikörper	Hersteller
Anti-mouse IgG, HRP (engl. <i>Horseradish peroxidase</i> )-gebunden	Cell Signaling (#7076), Promega (#W4021)
Anti-rabbit IgG, HRP-gebunden	Cell Signaling (#7074)

**Tabelle 13: Verwendete Antikörper für Immunpräzipitationen**

Antigen	Hersteller	Verdünnung
Kontrollantikörper (Rabbit IgG)	Cell Signaling (#2729)	1:100 (Kontrolle für IP von Smad1) 1:200 (Kontrolle für IP von Smad4)
Smad1	Cell Signaling (#6944)	1:100
Smad4	Cell Signaling (#38454)	1:200

**Tabelle 14: Verwendete Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbung**

Antigen	Hersteller	Verdünnung
Primärantikörper gegen PTHrP	Abcam (#ab224503)	1:250
Sekundärantikörper Anti-rabbit IgG, Alexa Fluor 488-gebunden	Cell Signaling (#4412)	1:1.000

### 2.1.7 Primer

**Tabelle 15: Verwendete Primer-Mischungen von der Firma BIO-RAD für Genexpressionsanalysen.**

Zielgen	mit/ohne TaqMan-Sonden	„Assay ID“ des Herstellers
CAT	ohne	qHsaCID0014941
COL1A2	mit	qHsaCEP0024891
DLX3	mit	qHsaCEP0024509
GAPDH	mit	qHsaCEP0041396
GPX1	ohne	qHsaCED0037003
PTH1H	mit	qHsaCEP0049830
RUNX2	mit	qHsaCEP0051329

**Tabelle 16: Verwendete Primer für die Quantifizierung mitochondrialer DNA.**

Zielgen	Sequenz Forward-Primer
MT-RNR2 (mitochondriale DNA)	Forward: 5'-GCCTTCCCCCGTAAATGATA-3' Revers: 5'-TTATGCGATTACCGGGCTCT-3'
B2M (genomische DNA)	Forward: 5'-TGCTGTCTCCATGTTTGATGTATCT-3' Revers: 5'-TCTCTGCTCCCCACCTCTAAGT-3'

### 2.1.8 siRNAs

**Tabelle 17: Verwendete siRNAs von der Firma Qiagen.**

Zielgen	Artikelnummer des Herstellers	Kurzbezeichnung im Text
BMP2	#SI00023366	siBMP2
DLX3	#SI00073962	siDLX3
Negativkontrolle „AllStars Negative Control siRNA“	#SI03650318	siCTRL
PRKACA	#SI00605857	siPRKACA
PRKCA	#SI00301308	siPRKCA #1
	#SI00605927	siPRKCA #2
PTHLH	#SI03030377	siPTHLH
SMAD4	#SI00076020	siSMAD4 #1
	#SI00076041	siSMAD4 #2
WNT5A	#SI00051779	siWNT5A

### 2.1.9 Kits

**Tabelle 18: Verwendete Kits.**

Kit	Hersteller	Artikelnummer
Cell Counting Kit-8	Dojindo	#CK04
GSH/GSSG-Glo™ Assay	Promega	#V6611
HiPerFect® Transfection Reagent	Qiagen	#301705
Immunoprecipitation kit	Abcam	#ab206996
iScript™ cDNA Synthesis Kit	BIO-RAD	#1708891
NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents	Thermo	#78833
PepTag® Non-Radioactive cAMP-Dependent Protein Kinase Assay	Promega	#V5340
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo	#23225
PKA Kinase Activity Assay Kit	Abcam	#ab139435
QIAamp® DNA Mini Kit	Qiagen	#51304
RNeasy® Plus Mini Kit	Qiagen	#74136
SsoAdvanced™ Universal Probes Supermix	BIO-RAD	#1725282
SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix	BIO-RAD	#1725272
TransAM® NF-κB Family Kit	Active Motif	#43296



### 2.1.10 Software

**Tabelle 19: Verwendete Software.**

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Citavi (Version 6.7)</b>	Swiss A. S.
<b>FACSDiva™ Software (Version 5.0.2)</b>	BD
<b>Flowing Software (Version 2.5.1)</b>	Turku Bioscience (Perrtu Terho)
<b>ImageJ (Version 1.52a)</b>	NIH (Wayne Rasband)
<b>Image Lab™ Software (Version 6.0.1)</b>	BIO-RAD
<b>Microplate Manager® Software (Version 6.3)</b>	BIO-RAD
<b>Microsoft Office (Version 2016)</b>	Microsoft
<b>SPSS® Statistics (Version 25)</b>	IBM
<b>StepOne™ Software (Version 2.3)</b>	Thermo

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

Humane DFCs (AllCells, #FT002F) wurden kommerziell bezogen und unter sterilen Bedingungen im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und angefeuchteter Atmosphäre kultiviert. Die Zellen wurden in Wachstumsmedium (s. Kapitel 2.1.3) vermehrt, welches dreimal wöchentlich gewechselt wurde. Bei Erreichen von Subkonfluenz wurden die Zellen passagiert. Hierfür wurde das Wachstumsmedium zunächst abgesaugt und die Zellen in PBS gewaschen, bevor sie nach Zugabe von Trypsin-EDTA-Lösung fünf Minuten lang im Brutschrank inkubierten. Daraufhin wurde die Trypsin-Reaktion mit Wachstumsmedium abgestoppt und die Zellsuspension bei 1200 g fünf Minuten lang zentrifugiert. Als Nächstes wurde das Zellpellet in Wachstumsmedium resuspendiert, bevor die Konzentration der Zellen – in einem Aliquot mit Trypanblau-Lösung gemischt – im TC20-Zellzähler gemessen wurde. Die Zellsuspension wurde schließlich in Wachstumsmedium verdünnt und mit einer Dichte von 5000 Zellen/cm<sup>2</sup> in neue Zellkulturgefäße ausgesät. Für Experimente wurden DFCs bis einschließlich Passage 11 (in der Regel Passagen 6 – 8) verwendet.

Wurden Zellen vorübergehend nicht verwendet, konnten diese in flüssigem Stickstoff eingefroren werden. Hierfür wurden die Zellen während des Passagierens nach der Konzentrationsbestimmung nochmals fünf Minuten lang bei 1200 g zentrifugiert und nach Absaugen des Überstands in Einfriermedium (s. Kapitel 2.1.3) resuspendiert

(1 Mio. Zellen/ml). Daraufhin wurden die Zellen zunächst über Nacht bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren und anschließend in einem Tank mit flüssigem Stickstoff gelagert. Wurden eingefrorene Zellen benötigt, erfolgte das Auftauen für drei Minuten im Wasserbad bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , bevor die Zellen in ein vorbereitetes Zellkulturgefäß mit Wachstumsmedium pipettiert wurden.

### **2.2.2 Induktion der osteogenen Differenzierung und Behandlung von DFCs**

Um die osteogene Differenzierung in DFCs zu induzieren, wurden die Zellen mit ODM oder BMP2-Medium behandelt. Als Kontrolle wurden Zellen in Kontrollmedium (DMEM) mit derselben FBS-Konzentration kultiviert. Die Zusammensetzung der Medien ist in Kapitel 2.1.3 beschrieben. Des Weiteren erfolgte gleichzeitig zur Kultivierung in Wachstumsmedium oder in den Differenzierungsmedien bzw. in Kontrollmedium die Behandlung mit Aktivatoren/Inhibitoren oder Proteinen, welche in Kapitel 2.1.4 aufgelistet sind.

### **2.2.3 Western Blot**

Für die Untersuchung der Proteinexpression mittels Western Blot wurden zunächst Proteine aus Zellen isoliert. Hierfür wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend in Western Blot-Lysepuffer (s. Kapitel 2.1.5) auf Eis mit einem Zellschaber abgekratzt und fünf Minuten lang bei  $14.000\text{ rpm}$  und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert, bevor die Lyse-Überstände weiterverwendet wurden.

Anschließend erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration in den Proben mit dem „Pierce™ BCA Protein Assay Kit“. Hierfür wurden die Proben im Verhältnis 1:5 mit  $\text{H}_2\text{O}$  verdünnt und zur Generierung einer Standardgerade verschiedene Verdünnungen von BSA in  $\text{H}_2\text{O}$  (0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 und  $1,0\text{ mg/ml}$ ) verwendet. Nach Zugabe der BCA-Lösung, welche nach Protokoll des Kits hergestellt wurde, erfolgte eine 30-minütige Inkubation bei  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , was zur quantitativen Bildung eines violetten Farbkomplexes relativ zur Proteinkonzentration führte. Nach 15-minütigem Auskühlen bei Raumtemperatur wurde schließlich die Absorbanz bei einer Wellenlänge von  $490\text{ nm}$  mit Hilfe des „iMark Mikroplate Reader“ gemessen. Schließlich wurde die Proteinkonzentration in den Proben mit Hilfe der BSA-Standardgerade ermittelt.

War die Konzentration für die weitere Verwendung zu gering, wurde in allen Proben desselben Experiments eine Acetonfällung durchgeführt. Hierfür wurde Aceton ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , mindestens vierfaches Probenvolumen) hinzupipettiert. Daraufhin inkubierten

die Proben über Nacht bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , bevor sie zehn Minuten lang bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  mit  $4500\text{ g}$  zentrifugiert wurden. Die Proteinpellets wurden anschließend in Western Blot-Lysepuffer resuspendiert und die Konzentrationsbestimmung erneut durchgeführt.

Als Nächstes wurden die Proben mit 2x Laemmli-Puffer oder 4x Laemmli-Puffer, welche zusätzlich 2-Mercaptoethanol (Endkonzentration  $355\text{ mM}$ ) enthielten, verdünnt. Anschließend erfolgte die Denaturierung der Proteine durch Inkubation für fünf Minuten bei  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  im Heizschüttler (Schüttelgeschwindigkeit  $550\text{ rpm}$ ), bevor die Proben anschließend wieder auf Eis gekühlt wurden.

Daraufhin wurden die Proben sowie der Größenstandard „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ auf „4–15% Mini-PROTEAN® TXG Stain-Free™“-Proteingele aufgetragen und durch Gelelektrophorese aufgetrennt, wobei innerhalb eines Experiments für jede Probe dieselbe Proteinmasse (mindestens  $6\text{ }\mu\text{g}$ ) eingesetzt wurde. Als Nächstes erfolgte eine fünfminütige Bestrahlung der Gele mit ultraviolettem Licht im „ChemiDoc™ Touch Imaging System“, um die in den Gelen enthaltenen Trihalogen-Moleküle an Tryptophan-Reste in den Proteinen zu binden, woraufhin diese nachweisbar fluoreszierten (332). Anschließend wurden die Proteine mit Hilfe der „Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell“ oder des „Trans-Blot® Turbo™ Transfer System“ auf Nitrocellulose-Membranen übertragen und ein Bild des Gesamtproteins (anhand der fluoreszierenden Tryptophan-Reste) im „ChemiDoc™ Touch Imaging System“ aufgenommen, bevor die Membranen zunächst für fünf Minuten in TBS geschwenkt und dann mindestens eine Stunde lang in fünfprozentiger BSA- oder Milchpulverlösung (je nach Primärantikörper) geblockt wurden. Darauf folgte die Inkubation mit einem Primärantikörper (in fünfprozentiger BSA- oder Milchpulverlösung in TBST, s. Kapitel 2.1.6) über Nacht bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  oder zwei Stunden lang bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen mit TBST wurden die Membranen mindestens eine Stunde lang mit einem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper (in fünfprozentiger Milchpulverlösung in TBST, s. Kapitel 2.1.6) inkubiert, bevor sie zweimal mit TBST, einmal mit PBS und einmal mit TBS gewaschen wurden. Für die Entwicklung eines Chemilumineszenzsignals wurden die Membranen nun für mindestens fünf Minuten in der Entwicklerlösung „Clarity™ Western ECL Substrate“ geschwenkt und das entstandene Signal im „ChemiDoc™ Touch Imaging System“ aufgenommen. Die Auswertung der Chemilumineszenz-Banden erfolgte densitometrisch unter Normalisierung auf das Gesamtprotein des Blots sowie auf die Kontrollgruppe des jeweiligen Experiments mit Hilfe der „Image Lab™ Software“.

Sollten weitere Antigene detektiert werden, erfolgte nach mehrmaligem Waschen in PBS eine Inkubation der Membranen für 15 Minuten in „ReBlot Plus Antibody Stripping Solution“ („Mild“, „Strong“ oder gemischt). Nach weiteren zwei Waschschrritten in PBS wurde mit erneutem Blocken der Membranen wie zuvor beschrieben fortgefahren. Dieses sogenannte „Reblotten“ wurde bis zu zweimal je Membran durchgeführt.

#### **2.2.4 Aufreinigung von Proteinen aus dem Zellkern**

Für die getrennte Aufreinigung nukleärer und cytoplasmatischer Proteinfractionen wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und in Trypsin-EDTA-Lösung bei fünfminütiger Inkubation im Brutschrank abgelöst. Die Reaktion wurde daraufhin mit Kontrollmedium abgestoppt und die Zellsuspension bei 1200 g fünf Minuten lang zentrifugiert. Als Nächstes wurden die Zellen in PBS resuspendiert und erneut – diesmal für drei Minuten bei 500 g und 4 °C – zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Isolierung mit Hilfe der „NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents“ nach Protokoll des Herstellers. Die aufgereinigten Proteinfractionen wurden anschließend für Western Blots (s. Kapitel 2.2.3) oder NF-κB-Assays verwendet (s. Kapitel 2.2.9).

#### **2.2.5 ALP-Assay**

Für die Messung der ALP-Aktivität wurden Zellen zunächst mit PBS gewaschen und anschließend in einer „Triton™ X-100“-Lösung (0,1 % in PBS) lysiert. Zur Generierung eines Leerwerts wurde „Triton™ X-100“-Lösung ohne Zellen verwendet. Als Nächstes wurde *p*-Nitrophenylphosphat-Lösung (pH 9,6 – 10,2) zu den Lysaten pipettiert, welche daraufhin 60 Minuten lang bei 37 °C im Brutschrank inkubierten. Die quantitative Umsetzung in das gelbliche Produkt *p*-Nitrophenol bei alkalischem pH-Wert (333) wurde schließlich im „iMark Mikroplate Reader“ (Absorbanz bei der Wellenlänge 415 nm) gemessen und der Leerwert von den übrigen Werten subtrahiert. Die gemessenen Werte wurden auf die Kontrollgruppe des jeweiligen Experiments normalisiert.

#### **2.2.6 RT-qPCR zur Genexpressionsanalyse**

Um die Expression von Genen mittels RT-qPCR (engl. *Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction*) bestimmen zu können, wurde zunächst RNA mit Hilfe des „RNeasy® Plus Mini Kit“ und „QIAshredder“-Säulen nach Protokoll des Herstellers aus den Zellen isoliert. Hierfür wurden die Zellen mit PBS gewaschen und lysiert, bevor

die RNA, nach Entfernung genomischer DNA, durch eine pufferabhängige Bindung an eine Silica-Membran aufgereinigt und anschließend in je 30 µl H<sub>2</sub>O eluiert wurde.

Die RNA-Konzentration wurde daraufhin mit dem „NanoDrop 2000“-Spektralphotometer gemessen und die größtmögliche gemeinsame RNA-Menge jeder Probe des Experiments mit dem „iScript™ cDNA Synthesis Kit“ nach zugehörigem Protokoll in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben.

Daraufhin erfolgte die PCR (engl. *Polymerase chain reaction*) unter Verwendung des „SsoAdvanced™ Universal Probes Supermix“ und Primer-Mischungen mit sequenzspezifischen Taq-Man-Sonden, an welchen der Fluoreszenzfarbstoff FAM (5-Carboxyfluorescein) gebunden war, oder alternativ mit dem SYBR® Green-haltigen „SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix“ in Kombination mit Primern ohne Sonden im „StepOnePlus™ Real-Time PCR System“ mit folgendem Protokoll: Nach zweiminütiger Aktivierung bei 95 °C folgten 40 Zyklen, die jeweils aus fünf Sekunden Denaturierung bei 95 °C und 30 Sekunden Primeranlagerung/Elongation bei 60 °C bestanden. Die Fluoreszenzintensität von FAM bzw. SYBR® Green wurde auf die Intensität des Referenzfarbstoffs ROX (5-Carboxy-X-rhodamin), der in beiden „Supermixen“ enthalten war, normalisiert. Eine Liste der verwendeten Primer-Mischungen ist in Kapitel 2.1.7 zu finden. Bei PCRs mit SYBR® Green wurde außerdem zur Beurteilung der Spezifität der amplifizierten Genprodukte eine Schmelzkurvenanalyse mit folgendem Protokoll durchgeführt: Nach 15 Sekunden bei 95 °C folgte eine Minute bei 60 °C, bevor die Temperatur davon ausgehend in 0,3 °C-Schritten mit einer Dauer von je 15 Sekunden bis 95 °C anstieg. Die Expression der Zielgene wurde schließlich auf die Expression von GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) sowie auf die Kontrollgruppe des jeweiligen Experiments normalisiert unter Anwendung der „Delta-Delta C<sub>t</sub>-Methode“ (334).

### 2.2.7 Alizarin-Färbung

Für die Untersuchung der Mineralisierung extrazellulärer Matrix mittels Alizarin-Färbung wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und mit vierprozentiger Formaldehydlösung fixiert. Daraufhin wurden die Zellen dreimal mit H<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend mindestens 20 Minuten lang in Alizarinrot-Färbelösung (pH-Wert 4,1 ± 0,1) inkubiert, was zur Rotfärbung Calcium-haltiger Ablagerungen führte (335). Als Nächstes wurden die Zellen nochmals dreimal mit H<sub>2</sub>O gewaschen, bevor die Färbung unter dem Mikroskop betrachtet und Fotoaufnahmen erstellt wurden. Um die Färbung zu

quantifizieren, wurden die Alizarinrot-Kristalle in Cetylpyridiniumchlorid-Lösung (10 % in PBS) aufgelöst und die Absorbanz bei einer Wellenlänge von 595 nm spektrophotometrisch im „iMark Mikroplate Reader“ gemessen. Als Leerwert diente Cetylpyridiniumchlorid-Lösung ohne Zellen. Nach Subtraktion des Leerwerts wurden die gemessenen Werte der Proben auf die Kontrollgruppe des jeweiligen Experiments normalisiert.

### **2.2.8 siRNA-Transfektion**

Für die Herunterregulierung von Zielgenen wurden Zellen direkt nach dem Aussäen in neue Zellkulturgefäße mit spezifischen siRNAs (engl. *Small interfering RNAs*, Endkonzentration bei den Zellen je 5 nM) transfiziert. Hierfür wurden die siRNAs gemeinsam mit dem „HiPerFect® Transfection Reagent“ nach dessen zugehörigem Protokoll in Medium für siRNA-Transfektionen (vgl. Kapitel 2.1.3) verdünnt und tropfenweise auf die ausgesäten Zellen pipettiert. Als Negativkontrolle wurden Zellen mit „AllStars Negative Control siRNA“ transfiziert. Eine Liste mit den verwendeten siRNAs ist in Kapitel 2.1.8 zu finden.

### **2.2.9 NF-κB-Assay**

Für die Evaluierung der Aktivität von NF-κB wurden nukleäre Proteinfractionen verwendet (s. Kapitel 2.2.4). Die Proteinkonzentration in den Proben wurde mit dem „Pierce™ BCA Protein Assay Kit“, wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben, gemessen. Daraufhin wurden die Proben eines Experiments auf eine gemeinsame Konzentration von mindestens 0,5 µg/ml in Lysepuffer aus dem „TransAM® NF-κB Family Kit“ verdünnt. Mit Hilfe dieses Kits wurde anschließend die Aktivität der NF-κB-Untereinheiten p50 und p65 nach Protokoll des Herstellers untersucht. Dabei erfolgte eine Bindung von NF-κB aus den Proben an immobilisierte Oligonukleotide mit NF-κB-Bindestelle auf einer Mikrotiterplatte, woraufhin einzelne NF-κB-Untereinheiten durch Bindung spezifischer Antikörper und eine gekoppelte colorimetrische Reaktion nachgewiesen wurden. Die Quantifizierung dieser Reaktion erfolgte im „iMark Mikroplate Reader“ durch Messung der Absorbanz bei einer Wellenlänge von 450 nm, wovon die Absorbanz bei 655 nm als Referenzwellenlänge subtrahiert wurde. Als Leerwert wurde Lysepuffer aus dem Kit verwendet. Nach Subtraktion des Leerwerts erfolgte eine Normalisierung der gemessenen Werte auf die Kontrollgruppe des jeweiligen Experiments.

### 2.2.10 Proliferationsassay

Die Proliferation der Zellen wurde mit Hilfe des „Cell Counting Kit-8“ untersucht. Hierfür wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und anschließend zwei Stunden lang in der Lösung aus dem Kit (1:11 verdünnt in Wachstumsmedium) im Brutschrank inkubiert. Dabei erfolgte ein Farbumschlag der Lösung durch stoffwechselaktive Zellen (336), welcher bei einer Wellenlänge von 450 nm im „iMark Mikroplate Reader“ quantifiziert wurde. Als Leerwert wurde die verdünnte Lösung des Kits ohne Zellen verwendet. Die gemessenen Werte wurden nach Subtraktion des Leerwerts auf die Kontrollgruppe des jeweiligen Experiments normalisiert.

### 2.2.11 PKA-Assay

Für die Untersuchung der PKA-Aktivität in den Zellen wurden diese zunächst mit PBS gewaschen und PKA-Lysepuffer (vgl. Kapitel 2.1.5) auf Eis hinzupipettiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst und mit Mikropistillen homogenisiert. Als Nächstes wurden die Proben für fünf Minuten bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Daraufhin erfolgte die Messung der PKA-Aktivität in den unverdünnten Lysat-Überständen mit dem „PepTag® Non-Radioactive cAMP-Dependent Protein Kinase Assay“ nach Angaben des Herstellers. Bei diesem Nachweis wurde das positiv geladene und fluoreszenzmarkierte Peptid Kemptid durch PKA in den Proben phosphoryliert und dadurch negativ geladen (337,338). Mittels Agarose-Gelelektrophorese (Agarose-Konzentration 0,8 %) wurden die unterschiedlich geladenen Substrate daraufhin getrennt und nach Aufnahme unter ultraviolettem Licht im „ChemiDoc™ Touch Imaging System“ densitometrisch quantifiziert. Die PKA-Aktivität wurde schließlich als Quotient aus den Werten des phosphorylierten und des gesamten Substrats sowie relativ zur Kontrollgruppe des jeweiligen Experiments berechnet.

Da der Vertrieb des Kits eingestellt wurde, erfolgte die Messung der PKA-Aktivität alternativ mit dem „PKA Kinase Activity Assay Kit“. Hierfür wurde zunächst die Proteinkonzentration in den Proben relativ zueinander durch gelelektrophoretische Auftrennung und densitometrische Quantifizierung des Gesamtproteins nach Aufnahme im „ChemiDoc™ Touch Imaging System“ wie beim Western Blot bestimmt (vgl. Kapitel 2.2.3). Anschließend wurden die Proben innerhalb eines Experiments auf dieselbe Konzentration in Puffer aus dem Kit verdünnt, wobei die erste Probe im Verhältnis 1:100 verdünnt und der Verdünnungsfaktor der anderen Proben entsprechend angepasst wurde. Daraufhin erfolgte die Bestimmung der PKA-Aktivität nach zugehörigem

Protokoll, wobei die PKA-Enzyme in den Proben immobilisierte Substrate auf einer Mikrotiterplatte phosphorylierten. Mittels spezifischer Antikörper wurde das phosphorylierte Substrat detektiert und in einer colorimetrischen Reaktion nachgewiesen, welche im „iMark Mikroplate Reader“ durch Messung der Absorbanz bei einer Wellenlänge von 450 nm quantifiziert wurde. Zur Generierung eines Leerwerts wurde Verdünnungspuffer aus dem Kit verwendet. Nach Subtraktion des Leerwerts wurden die gemessenen Werte relativ zur Kontrollgruppe des jeweiligen Experiments normalisiert. Innerhalb eines unabhängigen Experiments wurde nur eines der beiden Kits verwendet.

### **2.2.12 Immunpräzipitation**

Mit Hilfe der Immunpräzipitation (IP) wurden Interaktionen zwischen Proteinen unter Verwendung des „Immunoprecipitation kit“ evaluiert. Hierfür wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und in nicht-denaturierendem Lysepuffer aus dem Kit mit einem Zellschaber auf Eis abgelöst. Daraufhin wurden die Lysate 30 Minuten lang bei 4 °C geschwenkt, bevor sie zentrifugiert und die Überstände weiterverwendet wurden. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration in den Proben mit Hilfe des „Pierce™ BCA Protein Assay Kit“ wie in Kapitel 2.2.3 beschrieben. Als Nächstes wurden 250 µg jeder Probe in nicht-denaturierendem Lysepuffer aus dem Kit verdünnt und Antikörper (Verdünnungen s. Kapitel 2.1.6) hinzupipettiert. Als Negativkontrolle wurde ein entsprechender Kontrollantikörper (s. Kapitel 2.1.6) in derselben Verdünnung verwendet. Die Ansätze wurden über Nacht bei 4 °C geschwenkt und die Antikörper inklusive gebundenen Proteinen daraufhin mit „Protein A/G Sepharose®“-Kügelchen aus dem Kit nach Protokoll des Herstellers präzipitiert. Die aufgereinigten Kügelchen wurden schließlich mit 2x Laemmli-Puffer (mit 5 % 2-Mercaptoethanol) gemischt und fünf Minuten lang bei 95 °C im Heizschüttler (Schüttelgeschwindigkeit 550 rpm) inkubiert, bevor die Proben auf Eis gekühlt und fünf Minuten lang bei 5000 g zentrifugiert wurden. Die Überstände wurden anschließend für die Untersuchung mittels Western Blots (s. Kapitel 2.2.3) verwendet.

### **2.2.13 Immunfluoreszenzfärbung**

Um Proteine mittels Immunfluoreszenzfärbung in Zellen anzufärben, wurden diese zunächst mit PBS gewaschen und mit vierprozentiger Formaldehydlösung fixiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und daraufhin in PBS mit



5 % NGS-Lösung und 0,3 % „Triton™ X-100“ eine Stunde lang geblockt und permeabilisiert, bevor sie anschließend in Primärantikörper (s. Kapitel 2.1.6, verdünnt in PBS mit 1 % BSA und 0,3 % „Triton™ X-100“) bei 4 °C über Nacht inkubierten. Als Negativkontrolle inkubierten Zellen in Verdünnungslösung ohne Primärantikörper. Daraufhin wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und anschließend eine Stunde lang in fluoreszenzmarkiertem Sekundärantikörper (s. Kapitel 2.1.6, verdünnt in PBS mit 1 % BSA und 0,3 % „Triton™ X-100“) inkubiert. Als Nächstes wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und in Eindeckmedium eingedeckelt. Schließlich wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop „ECLIPSE Ts2-FL“ im Durchlicht sowie nach Anregung bei einer Wellenlänge von 470 nm durch einen Epifluoreszenzfilter (Anregungsfilter 440–470 nm, dichroitischer Spiegel 500 nm, Emissionsfilter 534–555 nm) betrachtet und Fotoaufnahmen erstellt. Die Software „ImageJ“ wurde verwendet, um die Durchlichtaufnahme mit der Fluoreszenzaufnahme zu überlagern. Die Immunfluoreszenzfärbung wurde von Frau Anja Reck durchgeführt.

#### **2.2.14 qPCR zur Quantifizierung mitochondrialer DNA**

Für die Quantifizierung mitochondrialer DNA mittels qPCR (engl. *Quantitative polymerase chain reaction*) wurde zunächst die gesamte DNA aus den Zellen mit Hilfe des „QIAamp® DNA Mini Kit“ isoliert. Hierfür wurden die Zellen mit PBS gewaschen und fünf Minuten lang im Brutschrank in Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst. Nach Abstoppen der Reaktion mit Kontrollmedium wurde die Zellsuspension fünf Minuten lang bei 1200 g zentrifugiert und die Zellen in PBS resuspendiert. Das weitere Vorgehen erfolgte gemäß dem Protokoll des Herstellers, wobei die in den Proben enthaltenen Proteine zunächst durch Proteinase K aus dem Kit verdaut wurden, bevor die DNA durch pufferabhängige Bindung an eine Silica-Membran aufgereinigt und schließlich in „AE“-Puffer aus dem Kit eluiert wurde.

Daraufhin wurde die Konzentration der DNA mit dem „NanoDrop 2000“-Spektralphotometer gemessen und diese mit H<sub>2</sub>O auf die größtmögliche gemeinsame Konzentration in allen Proben des Experiments verdünnt. Anschließend erfolgte die PCR mit Verwendung von Primern spezifisch für das Gen MT-RNR2 (mitochondriale DNA) bzw. B2M (genomische DNA als Referenz) und dem „SsoAdvanced™ Universal SYBR Green Supermix“ mit folgendem Protokoll im „StepOnePlus™ Real-Time PCR System“: Nach zweiminütiger Aktivierung bei 95 °C folgten 40 Zyklen aus jeweils 15 Sekunden Denaturierung bei 95 °C und 30 Sekunden Primeranlagerung/Elongation bei

62 °C. Anschließend wurde eine Schmelzkurvenanalyse nach demselben Protokoll wie in Kapitel 2.2.6 durchgeführt. Die Fluoreszenzintensität von SYBR® Green wurde auf die Intensität des Referenzfarbstoffs ROX normalisiert und die Menge mitochondrialer DNA relativ zur Menge genomischer DNA und zur Kontrollgruppe des jeweiligen Experiments mittels der „Delta-Delta C<sub>t</sub>-Methode“ (334) berechnet. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Kapitel 2.1.7 zu finden. Das PCR-Protokoll und die verwendeten Primersequenzen wurden von Venegas und Halberg übernommen (339).

### **2.2.15 Durchflusszytometrie zur Bestimmung von oxidativem Stress**

Für die Evaluierung des oxidativen Stresses mittels Durchflusszytometrie wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und in Trypsin-EDTA-Lösung für fünf Minuten im Brutschrank abgelöst. Anschließend wurden die Zellen bei 1200 g fünf Minuten lang zentrifugiert und in demselben Medium resuspendiert, mit welchem sie zuvor behandelt wurden, mit zusätzlich 20 µM H<sub>2</sub>DCFDA, welches von den Zellen aufgenommen und nach Abspaltung der Acetat-Reste durch Oxidation in das fluoreszierende 2',7'-Dichlorfluorescein umgesetzt wurde (341). Ansätze ohne H<sub>2</sub>DCFDA dienten als Negativkontrolle. Daraufhin inkubierten die Zellen 30 Minuten lang im Brutschrank, bevor sie im „FACSCanto™ II“ mit Hilfe der „FACSDiva™ Software“ analysiert wurden. Die im FITC (Fluoresceinisothiocyanat)-Kanal detektierte Fluoreszenz der Proben wurde nach Subtraktion der Fluoreszenz der Negativkontrolle auf die Kontrollgruppe des jeweiligen Experiments normalisiert.

### **2.2.16 Glutathion-Assay**

Mit dem „GSH/GSSG-Glo™ Assay“ wurde der Anteil von oxidiertem an gesamtem Glutathion in den Zellen als Marker des oxidativen Stresses nach Protokoll des Herstellers evaluiert. Hierfür wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend in zwei verschiedenen Lysepuffern aus dem Kit für die Messung von entweder oxidiertem oder gesamtem Glutathion lysiert, wobei im Lysepuffer für die Bestimmung des oxidierten Anteils die Substanz N-Ethylmaleimid enthalten war, die mit reduziertem Glutathion reagierte, das folglich nicht mehr an den Nachweisreaktionen teilnehmen konnte (340). Daraufhin erfolgte die Bestimmung von Glutathion über Luciferase-gekoppelte Reaktionen, woraufhin die entstehende Biolumineszenz im „ChemiDoc™ Touch Imaging System“ aufgenommen und densitometrisch quantifiziert wurde. In jeder Gruppe

eines Experiments wurden je drei biologische Replikate mit jedem der beiden Lysepuffer untersucht. Die Menge von oxidiertem Glutathion wurde auf die Menge von gesamtem Glutathion sowie auf die Kontrollgruppe des jeweiligen Experiments normalisiert.

### **2.2.17 Statistische Auswertung**

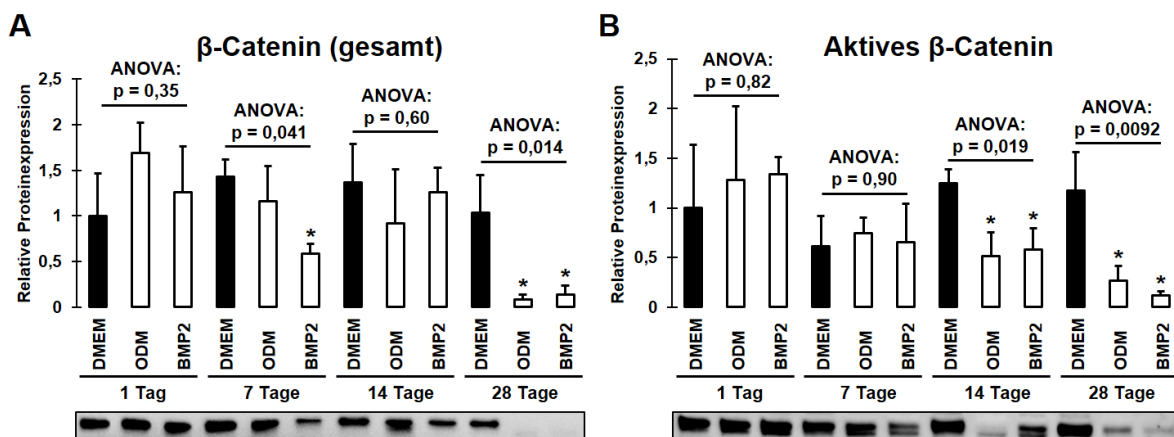
Alle Experimente wurden, insofern in den Abbildungslegenden nicht anders beschrieben, in biologischen Triplikaten durchgeführt und die Ergebnisse als Mittelwerte + Standardabweichungen dargestellt. Zum statistischen Vergleich zwischen experimentellen Gruppen wurden, entsprechend den Abbildungslegenden, entweder einfaktorielle Varianzanalysen (engl. *One-way analysis of variance*, kurz ANOVA) mit anschließenden Tukey-Tests oder ungepaarte T-Tests durchgeführt. Bei einem p-Wert kleiner als 0,05 wurden Unterschiede als statistisch signifikant betrachtet und in den Abbildungen entsprechend gekennzeichnet.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Klassische PKCs hemmen die osteogene Differenzierung von DFCs über Akt und $\beta$ -Catenin

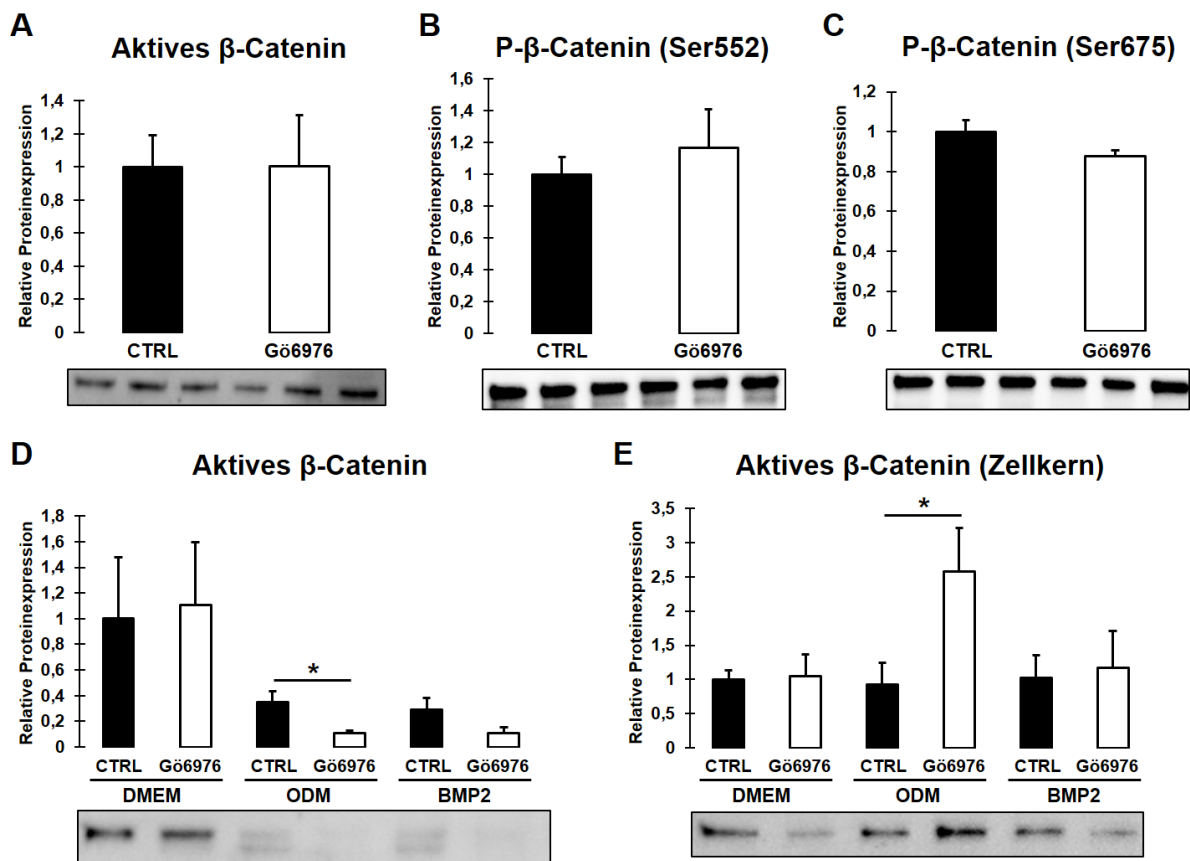
#### 3.1.1 Die Regulierung von $\beta$ -Catenin in DFCs nach osteogener Induktion und nach Hemmung von klassischen PKCs

Um die molekularen Ursachen des inhibitorischen Einflusses von klassischen PKCs auf die osteogene Differenzierung von DFCs zu evaluieren, wurden zuerst mögliche Interaktionen mit dem Protein  $\beta$ -Catenin untersucht, das eine zentrale Rolle für die Induktion der Differenzierung spielt (160). Um einen Überblick über die endogene Regulierung des Proteins im Laufe der Differenzierung zu erhalten, wurden DFCs mit einem Dexamethason-haltigen (kurz ODM genannt) oder BMP2-haltigen Differenzierungsmedium behandelt und die Proteinexpression von gesamtem und aktivem  $\beta$ -Catenin nach verschiedenen Zeiträumen durch Western Blots analysiert. Dabei zeigte sich eine relativ konstante Expression und Aktivität von  $\beta$ -Catenin nach einem und sieben Tagen, die allerdings im späteren Verlauf der Differenzierung deutlich herunterreguliert wurde (Abb. 10).



**Abb. 10: Die Regulierung von  $\beta$ -Catenin während der osteogenen Differenzierung.** Die Western Blots zeigen die Proteinexpression von gesamtem  $\beta$ -Catenin (A) bzw. aktivem  $\beta$ -Catenin (B) in DFCs nach Induktion der osteogenen Differenzierung mit ODM bzw. BMP2-Medium oder Kultivierung in Kontrollmedium (DMEM) zu verschiedenen Zeitpunkten. One-way ANOVA wurde angewandt zum Vergleich zwischen den verschiedenen Medien zum gleichen Zeitpunkt, mit anschließenden Tukey-Tests zum Vergleich zwischen ODM bzw. BMP2-Medium und DMEM: \*  $p < 0,05$ .

Daraufhin wurde evaluiert, wie  $\beta$ -Catenin durch PKC reguliert wird, indem DFCs mit Gö6976, einem spezifischen Inhibitor von klassischen PKC-Isoformen (für Referenz zur Wirkung vgl. Kapitel 2.1.4; für Effizienz der PKC-Inhibition s. Anhang, Abb. A-1A), behandelt wurden. Dabei zeigte sich nach 15 Minuten weder ein Einfluss auf die Aktivität von  $\beta$ -Catenin, welche durch N-terminale Phosphorylierungen inhibiert wird (110), noch auf C-terminale Phosphorylierungen an Ser552 und Ser675 des Proteins (Abb.



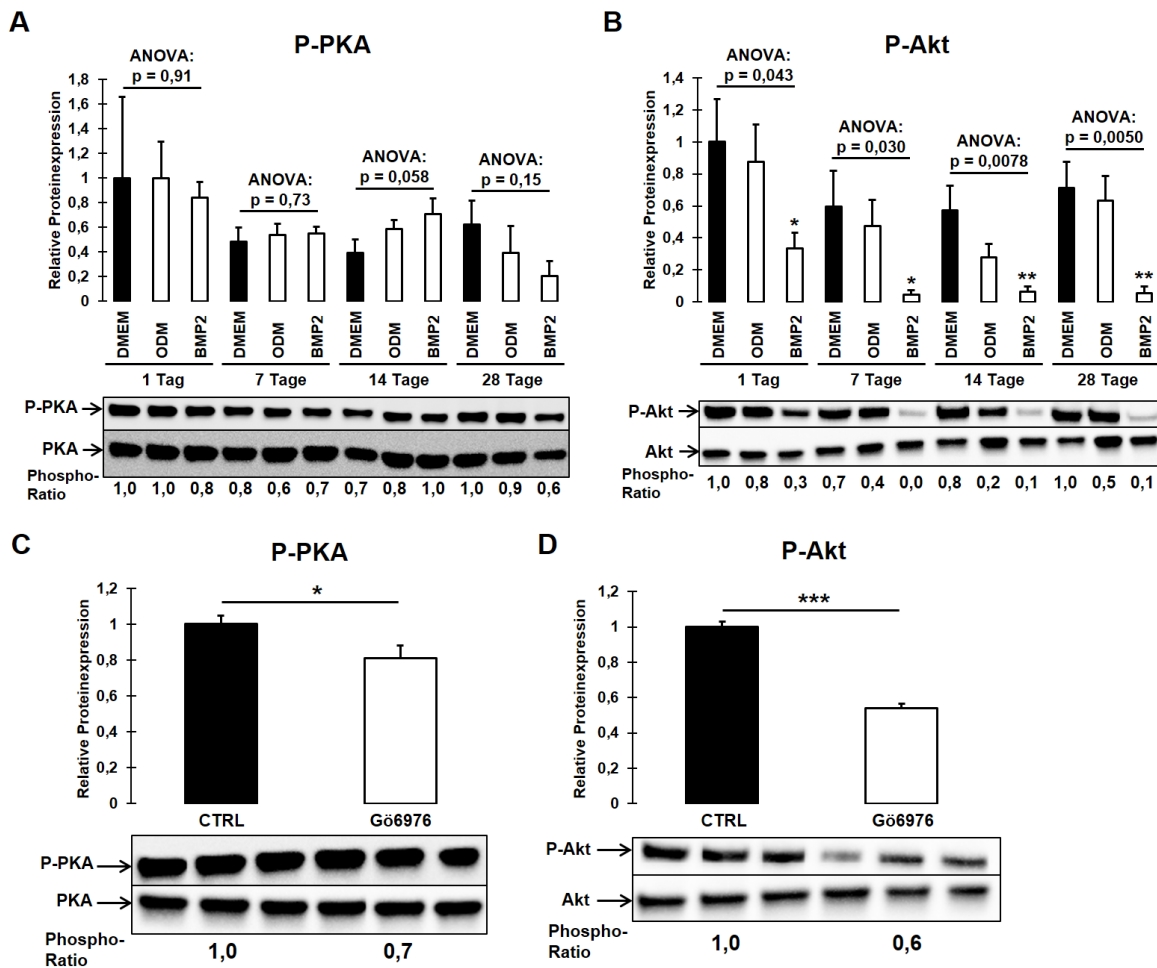
**Abb. 11: Die Regulierung von  $\beta$ -Catenin nach Inhibition klassischer PKCs.** (A – C) Die Western Blots zeigen die Proteinexpression von aktivem  $\beta$ -Catenin (A), Ser552-phosphoryliertem  $\beta$ -Catenin (B) und Ser675-phosphoryliertem  $\beta$ -Catenin (C) nach 15 Minuten Behandlung mit dem Inhibitor klassischer PKCs Gö6976 (100 nM) in Wachstumsmedium. (D, E) Die Western Blots zeigen die Proteinexpression von aktivem  $\beta$ -Catenin im löslichen Anteil von Lysaten gesamter Zellen (D) bzw. in aufgereinigten Zellkernfraktionen (E) nach sieben Tagen Induktion der osteogenen Differenzierung mit ODM bzw. BMP2-Medium oder Kultivierung in Kontrollmedium (DMEM) sowie gleichzeitiger Behandlung mit Gö6976 (100 nM). T-Tests wurden angewandt zum Vergleich zwischen Gö6976-Behandlung und Kontrolle im selben Medium (A – E) sowie zwischen ODM bzw. BMP2-Medium und DMEM (D, E): \*  $p < 0,05$ . Die Ergebnisse dieser Abbildung wurden teilweise bereits 2021 veröffentlicht in der Zeitschrift „Stem Cell Research & Therapy“ (196).

11A – C). Dahingegen führte eine PKC-Inhibition in osteogen differenzierenden Zellen nach sieben Tagen zwar zur Herunterregulierung der Expression von aktivem  $\beta$ -Catenin in den Zellen insgesamt (Abb. 11D), aber zu einer höheren Aktivität des Proteins im Zellkern, wenn die Zellen mit Dexamethason osteogen induziert wurden (Abb. 11E).

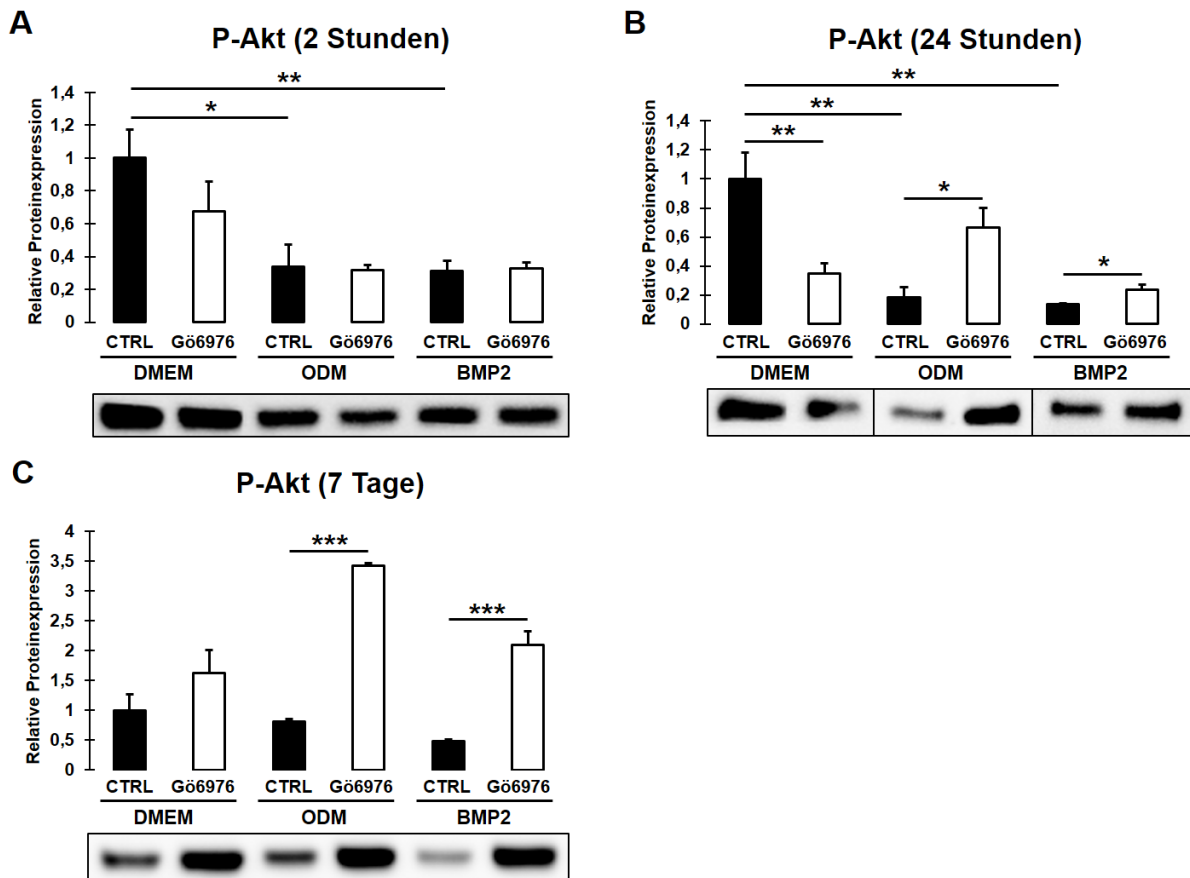
### **3.1.2 Die Regulierung von PKA und Akt in DFCs nach osteogener Induktion und nach Hemmung von klassischen PKCs**

Da die Ergebnisse nur eine indirekte Regulierung von  $\beta$ -Catenin durch PKC vermuten ließen, sollte als Nächstes eine mögliche Beteiligung der beiden Proteinkinasen PKA und Akt evaluiert werden, von welchen bereits bekannt war, dass sie  $\beta$ -Catenin im C-terminalen Bereich phosphorylieren (160,342). Hierfür wurde zunächst die endogene Regulierung der beiden Kinasen im Laufe der Osteogenese untersucht. Dabei zeigte sich eine weitestgehend konstante Expression und Phosphorylierungsrate von PKA (Abb. 12A), während Akt zwar ebenfalls relativ konstant exprimiert wurde, aber eine deutliche Hemmung der Phosphorylierung an Ser473, welche für die Aktivität der Kinase benötigt wird (343), zu beobachten war (Abb. 12B). Interessanterweise wurde die Phosphorylierung beider Kinasen nach 15 Minuten PKC-Inhibition in DFCs signifikant gehemmt, wobei der Einfluss auf Akt größer war (Abb. 12C, D). Darüber hinaus konnte eine verringerte Expression von phosphoryliertem Akt festgestellt werden, wenn PKC $\alpha$  in DFCs mit einer siRNA herunterreguliert wurde (Anhang, Abb. A-2).

Da Akt im Vergleich zu PKA stärker durch PKC-Inhibition und nach osteogener Induktion reguliert wurde, sollte zunächst evaluiert werden, wie die Aktivität von Akt im weiteren Verlauf der Differenzierung durch PKC beeinflusst wird. Interessanterweise konnte dabei festgestellt werden, dass die Expression von Ser473-phosphoryliertem Akt durch PKC-Inhibition nicht dauerhaft herunterreguliert wurde, insbesondere bei gleichzeitiger Induktion der osteogenen Differenzierung. So war bereits nach zwei Stunden keine Hemmung mehr nachweisbar (Abb. 13A), während die Expression von phosphoryliertem Akt nach 24 Stunden (Abb. 13B) und – noch deutlicher – nach sieben Tagen PKC-Inhibition (Abb. 13C) sogar signifikant hochreguliert war. Lediglich in Kontrollmedium konnte ein hemmender Einfluss des PKC-Inhibitors noch nach 24 Stunden nachgewiesen werden, allerdings nicht mehr nach sieben Tagen.



**Abb. 12: Die Regulierung der Proteinkinasen PKA und Akt während der osteogenen Differenzierung und nach Inhibition klassischer PKCs.** DFCs wurden bis zu 28 Tage lang mit DMEM, ODM oder BMP2-Medium behandelt (A, B) oder 15 Minuten lang mit 100 nM Gö6976 in Wachstumsmedium (C, D) stimuliert. Die Säulendiagramme zeigen die durch Western Blots ermittelte Proteinexpression von Thr197-phosphoryliertem PKA (A, C) und Ser473-phosphoryliertem Akt (B, D) jeweils mit repräsentativen Blots sowie Blots von gesamtem PKA bzw. Akt und den Quotienten zwischen phosphorylierter Form und Gesamtmenge („Phospho-Ratio“). One-way ANOVA wurde angewandt zum Vergleich zwischen den verschiedenen Medien zum gleichen Zeitpunkt, mit anschließenden Tukey-Tests zum Vergleich zwischen ODM bzw. BMP2-Medium und DMEM (A, B); T-Tests wurden angewandt zum Vergleich zwischen Gö6976-Behandlung und Kontrolle (C, D): \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . Die Ergebnisse dieser Abbildung wurden teilweise bereits 2021 veröffentlicht in der Zeitschrift „Stem Cell Research & Therapy“ (196).



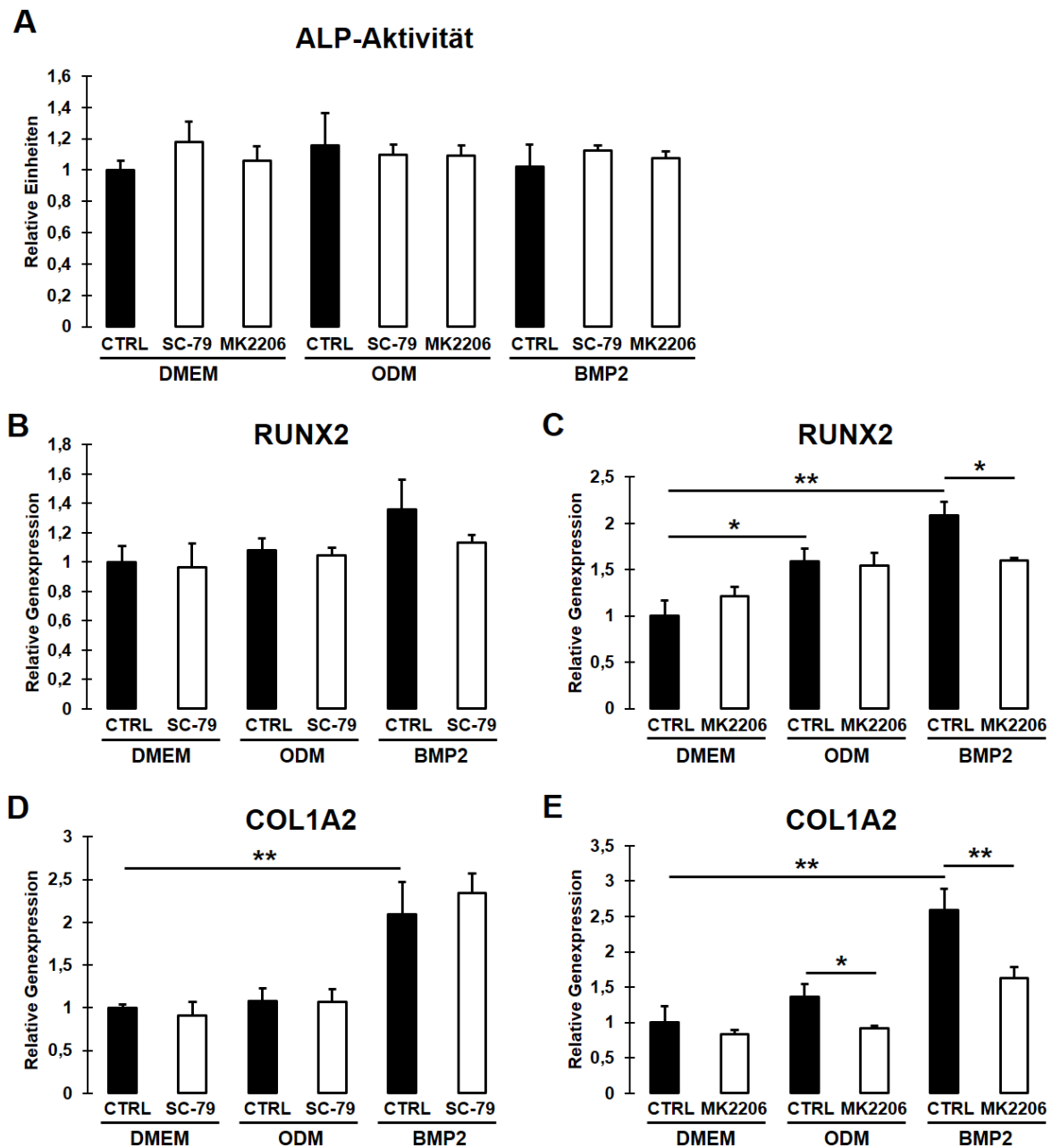
**Abb. 13: Die Regulierung der Akt-Aktivität durch klassische PKCs zu verschiedenen Zeitpunkten.** DFCs wurden mit DMEM, ODM oder BMP2-Medium behandelt und gleichzeitig mit 100 nM Gö6976 stimuliert. Die Western Blots zeigen die Proteinexpression von Ser473-phosphoryliertem Akt nach 2 Stunden (A), 24 Stunden (B) und 7 Tagen (C) Behandlung. T-Tests wurden angewandt zum Vergleich zwischen ODM bzw. BMP2-Medium und DMEM sowie zwischen Gö6976-Behandlung und Kontrolle im selben Medium: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . Die Ergebnisse dieser Abbildung wurden teilweise bereits 2021 veröffentlicht in der Zeitschrift „Stem Cell Research & Therapy“ (196).

### 3.1.3 Der Einfluss von Akt auf die osteogene Differenzierung von DFCs

Um eine mögliche Beteiligung an der Regulierung der Differenzierung zu evaluieren, sollte daraufhin untersucht werden, wie Akt die Expression von osteogenen Markern und das Mineralisierungsvermögen von DFCs beeinflusst. Eine Behandlung der Zellen mit dem Akt-Aktivator SC-79 oder dem Akt-Inhibitor MK2206 (vgl. Kapitel 2.1.4) führte allerdings zu keiner Änderung der ALP-Aktivität (Abb. 14A). Während eine Überaktivierung von Akt die Genexpression von RUNX2 und COL1A2 (engl. *Collagen type I alpha 2 chain*) ebenfalls nicht beeinflusste (Abb. 14B, D), konnte nach Hemmung der

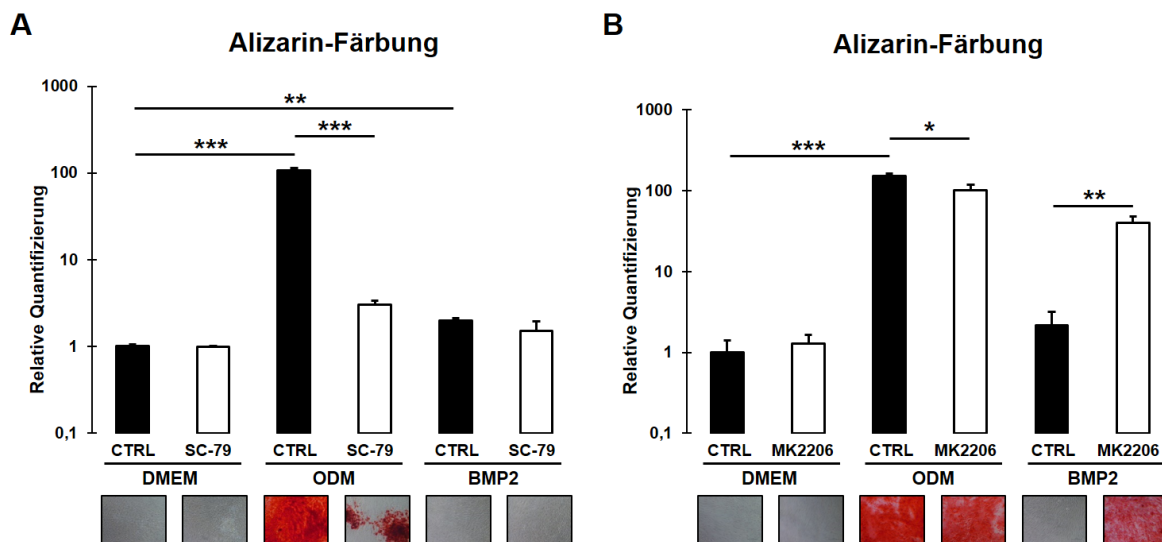


Kinase eine Herunterregulierung von RUNX2 in BMP2-induzierten Zellen (Abb. 14C) und von COL1A2 in beiden Differenzierungsmedien (Abb. 14E) festgestellt werden.



**Abb. 14: Die Regulierung der ALP-Aktivität und der Genexpression osteogener Marker durch Akt.** DFCs wurden sieben Tage lang mit DMEM, ODM oder BMP2-Medium behandelt und gleichzeitig mit 10  $\mu$ M des Akt-Aktivators SC-79 (A, B, D) oder 200 nM des Akt-Inhibitors MK2206 (A, C, E) stimuliert. Anschließend wurden die ALP-Aktivität (A) sowie mittels RT-qPCR die Genexpression von RUNX2 (B, C) und COL1A2 (D, E) bestimmt. T-Tests wurden angewandt zum Vergleich zwischen ODM bzw. BMP2-Medium und DMEM sowie zwischen Aktivator/Inhibitor-Behandlung und Kontrolle im selben Medium: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ . Die Ergebnisse dieser Abbildung wurden teilweise bereits 2021 veröffentlicht in der Zeitschrift „Stem Cell Research & Therapy“ (196).

Im Gegensatz zu den früheren osteogenen Markern wurde die Mineralisierung ausgehend von DFCs durch Überaktivierung von Akt stark herunterreguliert (Abb. 15A). Interessanterweise führte auch die Akt-Inhibition zu einer leicht verminderten Mineralisierung nach Induktion mit Dexamethason, aber zu einer deutlichen Verbesserung des sonst sehr schwachen Mineralisierungsvermögens BMP2-behandelter Zellen (Abb. 15B).

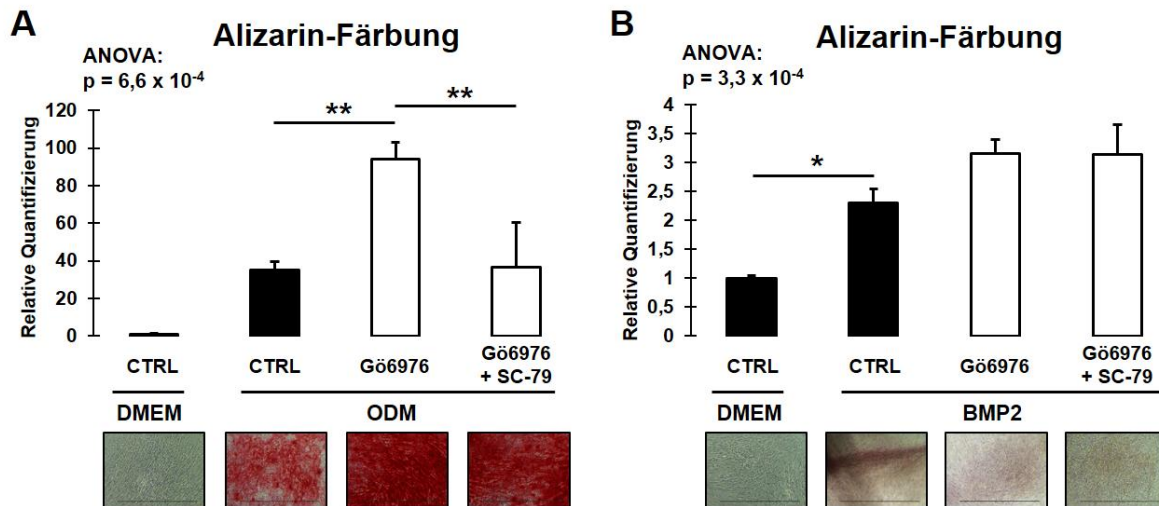


**Abb. 15: Die Regulierung der Mineralisierung durch Akt.** DFCs wurden 28 Tage lang mit DMEM, ODM oder BMP2-Medium behandelt und gleichzeitig mit 10  $\mu$ M des Akt-Aktivators SC-79 (A) oder 200 nM des Akt-Inhibitors MK2206 (B) stimuliert. Anschließend wurde die Mineralisierung extrazellulärer Matrix mittels Alizarin-Färbung analysiert. T-Tests wurden angewandt zum Vergleich zwischen ODM bzw. BMP2-Medium und DMEM sowie zwischen Aktivator/Inhibitor-Behandlung und Kontrolle im selben Medium: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . Die Ergebnisse dieser Abbildung wurden bereits 2021 veröffentlicht in der Zeitschrift „Stem Cell Research & Therapy“ (196).

Überdies konnte bei osteogener Induktion mit Dexamethason gezeigt werden, dass eine PKC-Inhibition die Mineralisierung nicht mehr verstärken konnte, wenn gleichzeitig Akt in DFCs überaktiviert wurde (Abb. 16A). In BMP2-induzierten Zellen konnte ein solcher Einfluss nicht nachgewiesen werden (Abb. 16B).

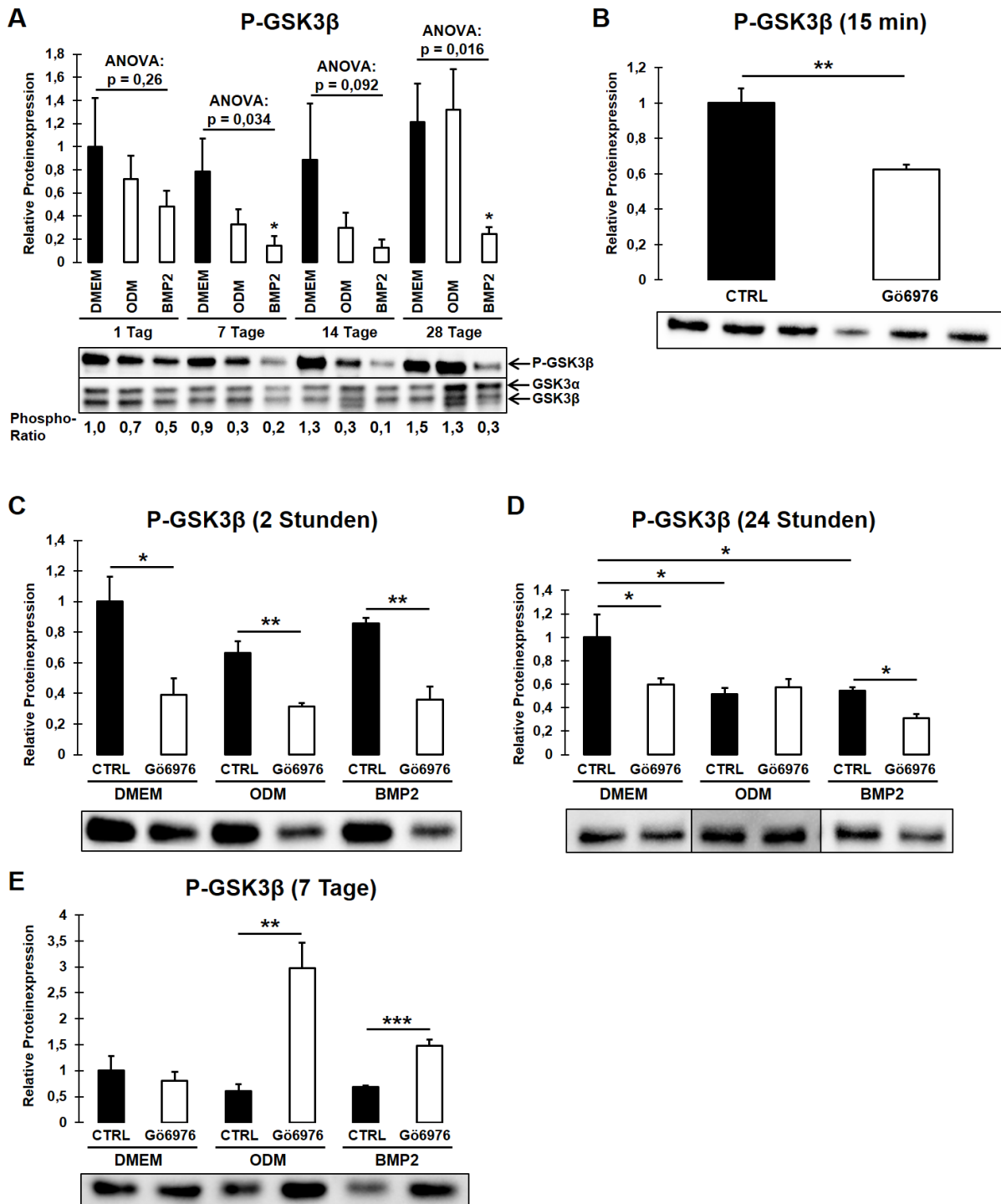
### 3.1.4 Die Regulierung von GSK3 $\beta$ und $\beta$ -Catenin stromabwärts von Akt

Um zu evaluieren, über welche molekularen Mechanismen die Differenzierung durch Akt reguliert wird, sollte eine mögliche Beteiligung von GSK3 $\beta$  untersucht werden, welches einerseits durch Akt phosphoryliert und dadurch inaktiviert werden kann (344)



**Abb. 16: Der Einfluss einer Akt-Überaktivierung auf die Regulierung der Mineralisierung durch klassische PKCs.** DFCs wurden 28 Tage lang mit ODM (A) oder BMP2-Medium (B) osteogen differenziert oder als Kontrolle in DMEM kultiviert. Die Zellen in den Differenzierungsmedien wurden zusätzlich mit dem Inhibitor klassischer PKCs Gö6976 (100 nM) alleine oder in Kombination mit dem Akt-Aktivator SC-79 (10  $\mu$ M) behandelt. Anschließend wurde die Mineralisierung extrazellulärer Matrix mittels Alizarin-Färbung analysiert. One-way ANOVA wurde angewandt zum Vergleich zwischen allen Gruppen des Experiments, mit anschließenden Tukey-Tests zum Vergleich zwischen ODM bzw. BMP2-Medium und DMEM sowie zwischen den verschiedenen Behandlungen im selben Medium paarweise zueinander: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ . Die Ergebnisse dieser Abbildung wurden bereits 2021 veröffentlicht in der Zeitschrift „Stem Cell Research & Therapy“ (196).

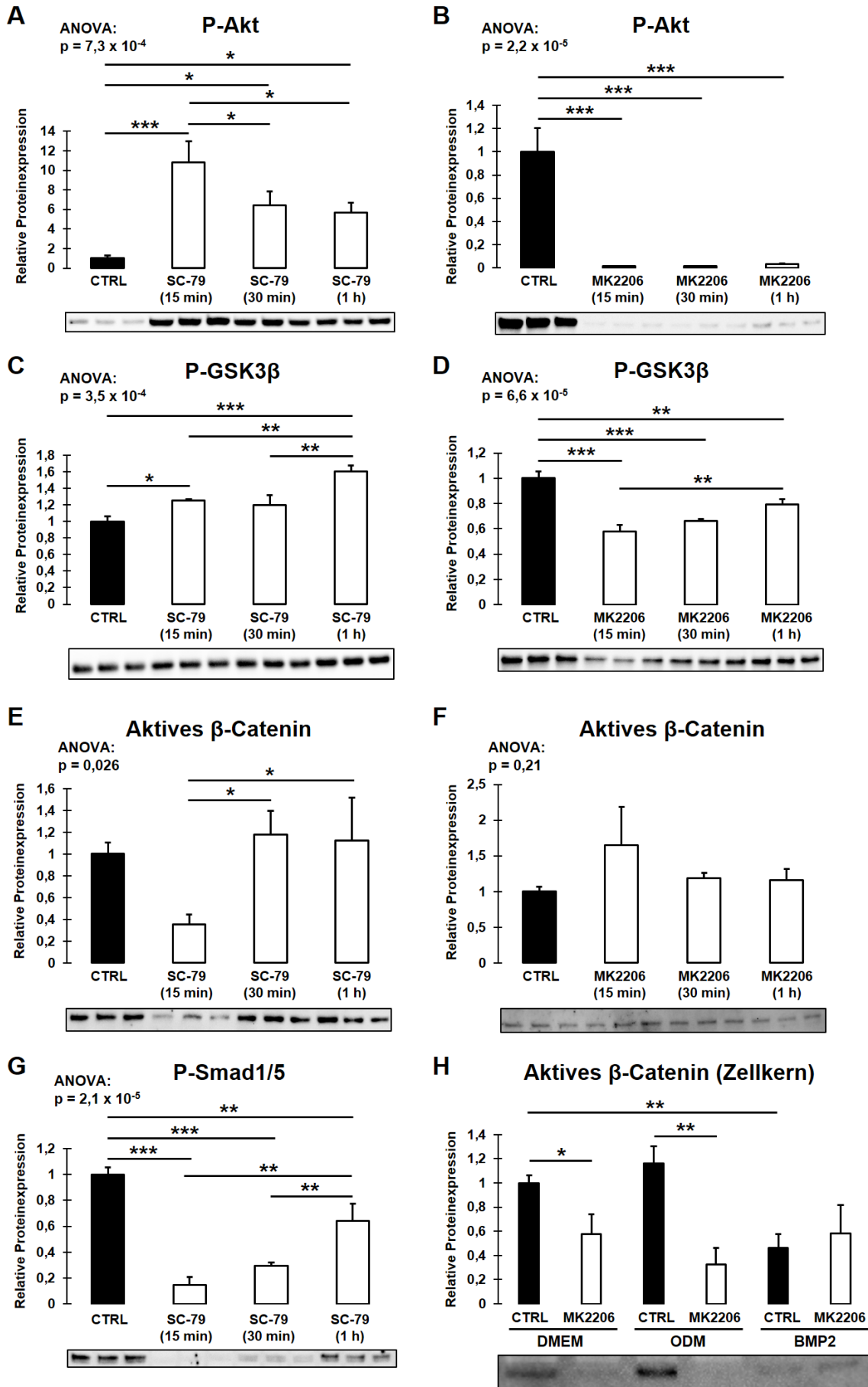
und andererseits die Expression von  $\beta$ -Catenin beeinflusst (110). Während der osteogenen Differenzierung von DFCs konnte eine endogene Herunterregulierung von phosphoryliertem GSK3 $\beta$  insbesondere nach Induktion mit BMP2 beobachtet werden (Abb. 17A). Darüber hinaus wurde die Phosphorylierung von GSK3 $\beta$  durch PKC-Inhibition sehr ähnlich wie die Aktivität von Akt reguliert. So zeigte sich nach 15 Minuten zunächst eine deutliche Herunterregulierung (Abb. 17B), welche im Gegensatz zur Akt-Aktivität nach zwei Stunden (Abb. 17C) und bei BMP2-induzierter Differenzierung sogar nach 24 Stunden (Abb. 17D) noch nachweisbar war. Erst nach sieben Tagen konnte eine deutliche Induktion der GSK3 $\beta$ -Phosphorylierung nach PKC-Inhibition in differenzierenden Zellen festgestellt werden (Abb. 17E). Außerdem war die Expression von phosphoryliertem GSK3 $\beta$  nach siRNA-vermittelter Herunterregulierung von PKC $\alpha$  gehemmt (Anhang, Abb. A-2).



**Abb. 17: Die Regulierung von GSK3 $\beta$  während der osteogenen Differenzierung und nach Inhibition klassischer PKCs.** (A) DFCs wurden bis zu 28 Tage lang mit DMEM, ODM oder BMP2-Medium behandelt. Das Säulendiagramm zeigt die durch Western Blots ermittelte Proteinexpression von Ser9-phosphoryliertem GSK3 $\beta$  mit repräsentativem Blot sowie einem Blot von gesamtem GSK3 $\alpha/\beta$  und den Quotienten zwischen phosphorylierter Form und Gesamtmenge von GSK3 $\beta$  („Phospho-Ratio“). (B) DFCs wurden 15 Minuten lang mit 100 nM Gö6976 in Wachstumsmedium stimuliert und die Proteinexpression von Ser9-phosphoryliertem GSK3 $\beta$  durch Western Blots ermittelt. (C – E) DFCs wurden mit DMEM, ODM oder BMP2-Medium behandelt und die Proteinexpression von Ser9-phosphoryliertem GSK3 $\beta$  durch Western Blots ermittelt. (Fortsetzung auf nächster Seite)

*BMP2-Medium behandelt und gleichzeitig mit 100 nM Gö6976 stimuliert. Die Western Blots zeigen die Proteinexpression von Ser9-phosphoryliertem GSK3 $\beta$  nach 2 Stunden (C), 24 Stunden (D) und 7 Tagen (E) Behandlung. One-way ANOVA wurde angewandt zum Vergleich zwischen den verschiedenen Medien zum gleichen Zeitpunkt, mit anschließenden Tukey-Tests zum Vergleich zwischen ODM bzw. BMP2-Medium und DMEM (A); T-Tests wurden angewandt zum Vergleich zwischen Gö6976-Behandlung und Kontrolle im selben Medium (B – E) sowie zwischen ODM bzw. BMP2-Medium und DMEM (C – E): \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .*

Um eine direkte Regulierung von GSK3 $\beta$  und stromabwärts von  $\beta$ -Catenin durch Akt in DFCs nachzuweisen, wurde der Einfluss einer Überaktivierung bzw. Inhibition von Akt auf die Aktivität dieser Proteine nach kurzen Zeiträumen untersucht. Dabei war eine Stimulierung von Akt durch Behandlung mit dem Aktivator SC-79 nach 15 Minuten am stärksten und wurde daraufhin wieder schwächer (Abb. 18A), während eine Inhibition mit MK2206 innerhalb der ersten Stunde durchgehend in deutlichem Ausmaß nachweisbar war (Abb. 18B). Die Phosphorylierung von GSK3 $\beta$  wurde in Folge der Akt-Überaktivierung ebenfalls hochreguliert, wobei die maximale Induktion zeitversetzt und erst nach einer Stunde gemessen wurde (Abb. 18C), während die Expression von phosphoryliertem GSK3 $\beta$  bei Akt-Inhibition bereits nach 15 Minuten stark gehemmt war und folglich wieder anstieg (Abb. 18D). Interessanterweise wurde die Aktivität von  $\beta$ -Catenin nach 15 Minuten Akt-Überaktivierung deutlich gehemmt (Abb. 18E) und nach 15 Minuten Akt-Hemmung tendenziell – aber nicht signifikant – induziert (Abb. 18F), wobei diese Regulierung bereits nach 30 Minuten nicht mehr nachweisbar war. Allerdings ließ sich nach sieben Tagen eine deutliche Herunterregulierung von aktivem  $\beta$ -Catenin im Zellkern von DFCs feststellen, wenn die Zellen in Kontrollmedium oder Dexamethason-haltigem Medium gleichzeitig mit dem Akt-Inhibitor MK2206 behandelt wurden (Abb. 18H). Zudem zeigte sich nach Akt-Überaktivierung eine direkte Beeinflussung des BMP-Signalwegs, da die Expression von phosphoryliertem Smad1/5 stark gehemmt wurde (Abb. 18G).



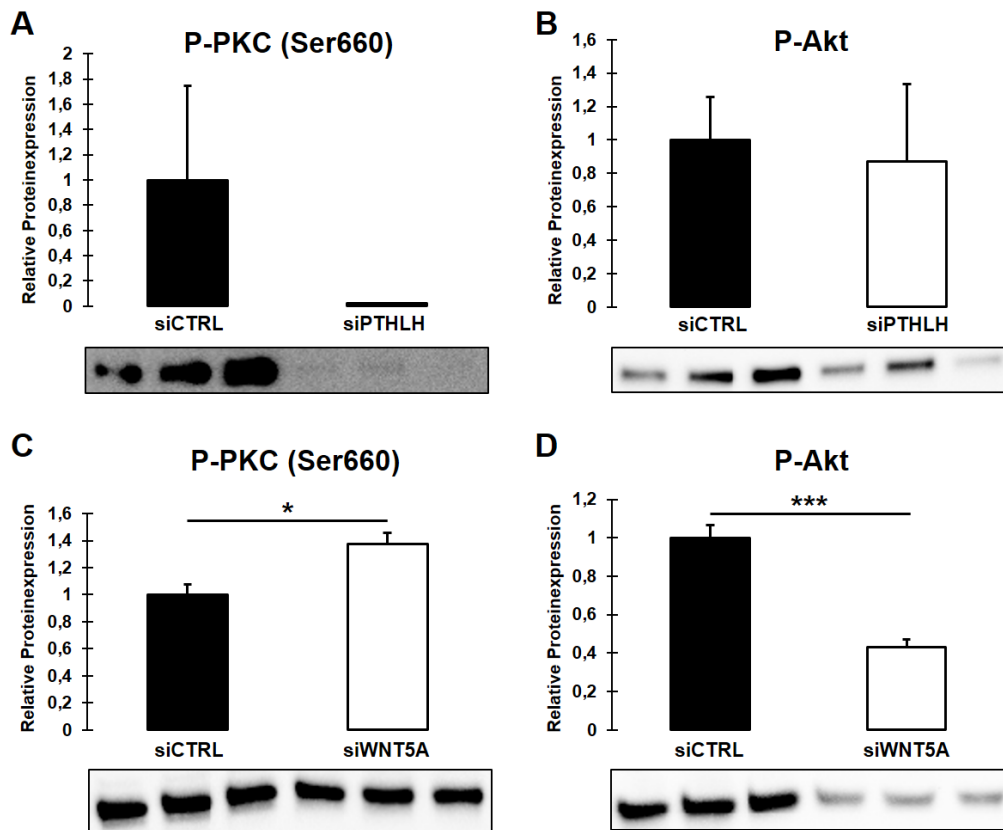
(Abbildungsbeschriftung auf nächster Seite)

**Abb. 18: Die Regulierung des kanonischen Wnt-Signalwegs und BMP-Signalwegs durch Akt.** (A – G) DFCs wurden für eine Zeitdauer von 15 Minuten, 30 Minuten oder eine Stunde mit 10  $\mu$ M des Akt-Aktivators SC-79 (A, C, E, G) oder 200 nM des Akt-Inhibitors MK2206 (B, D, F) in Wachstumsmedium behandelt. Als Kontrolle wurden Zellen eine Stunde lang ohne Aktivator/Inhibitor kultiviert. Anschließend wurde die Proteinexpression von Ser473-phosphoryliertem Akt (A, B), Ser9-phosphoryliertem GSK3 $\beta$  (C, D), aktivem  $\beta$ -Catenin (E, F) und Ser463/465-phosphoryliertem Smad1/5 (G) durch Western Blots ermittelt. (H) DFCs wurden mit DMEM, ODM oder BMP2-Medium behandelt und gleichzeitig mit 200 nM MK2206 stimuliert. Die Western Blots zeigen die Proteinexpression von aktivem  $\beta$ -Catenin in aufgereinigten Zellkernfraktionen nach sieben Tagen Behandlung. One-way ANOVA wurde angewandt zum Vergleich zwischen allen Gruppen des Experiments, mit anschließenden Tukey-Tests zum Vergleich zwischen den verschiedenen Behandlungen paarweise zueinander (A – G); T-Tests wurden angewandt zum Vergleich zwischen ODM bzw. BMP2-Medium und DMEM sowie zwischen MK2206-Behandlung und Kontrolle im selben Medium (H): \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . Die Ergebnisse dieser Abbildung wurden teilweise bereits 2021 veröffentlicht in der Zeitschrift „Stem Cell Research & Therapy“ (196).

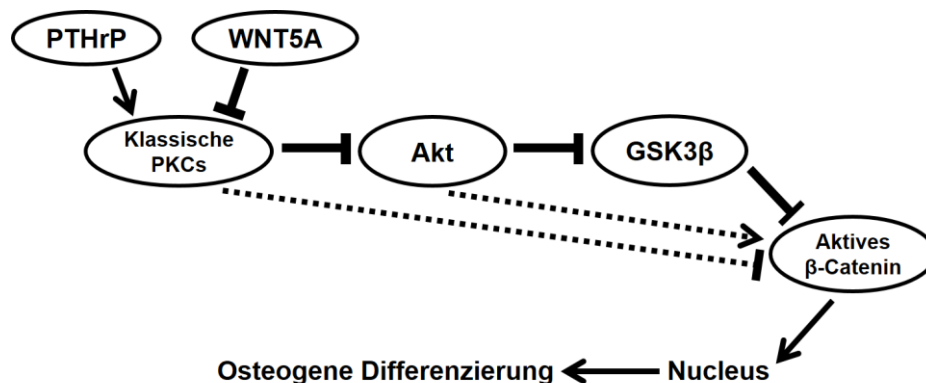
### 3.1.5 Die Regulierung der Aktivität von PKC und Akt durch PTHrP und WNT5A

Neben der Beeinflussung der osteogenen Differenzierung wurde darüber hinaus evaluiert, wie PKC und in der Folge Akt in DFCs endogen reguliert werden, wobei PTHrP und WNT5A als mögliche Regulatoren untersucht wurden. Dabei führte eine siRNA-vermittelte Herunterregulierung von PTHLH (Gen für PTHrP, für Effizienz der Herunterregulierung von PTHLH s. Anhang, Abb. A-4) zur Hemmung der Phosphorylierung von PKC an Ser660 (Position bezieht sich auf PKC $\beta$ II, Abb. 19A), welche für die Aktivierung der Kinase benötigt wird (205), wobei jedoch keine Regulierung der Akt-Aktivität nachgewiesen werden konnte (Abb. 19B). Eine Transfektion von DFCs mit einer siRNA gegen WNT5A führte dahingegen zur Induktion der PKC-Phosphorylierung (Abb. 19C) und zur Hemmung der Akt-Aktivität (Abb. 19D).

Zusammengefasst konnten die Versuche zeigen, dass klassische PKC-Isoformen die osteogene Differenzierung von DFCs unter anderem durch Akt und stromabwärts durch die Regulierung der Aktivität von  $\beta$ -Catenin inhibieren, während klassische PKCs in den Zellen durch PTHrP stimuliert und durch WNT5A gehemmt werden (schematisch dargestellt in Abb. 20). Die Ergebnisse des Kapitels 3.1 wurden zum Teil bereits 2021 in der Zeitschrift „Stem Cell Research & Therapy“ publiziert (196).



**Abb. 19: Die Regulierung der PKC- und Akt-Aktivierung durch PTHrP und WNT5A.** DFCs wurden drei Tage lang mit spezifischen siRNAs gegen PTHLH (Gen für PTHrP, **A, B**) oder WNT5A (**C, D**) transfiziert. Als Negativkontrolle wurde eine Kontroll-siRNA (siCTRL) verwendet. Anschließend wurde die Proteinexpression von phosphoryliertem PKC (homolog zur Ser660-Phosphorylierung bei PKC $\beta$ II, **A, C**) und von Ser473-phosphoryliertem Akt (**B, D**) durch Western Blots bestimmt. T-Tests wurden angewandt zum Vergleich zwischen siRNA-Behandlung und Kontroll-siRNA: \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . Die Ergebnisse dieser Abbildung wurden bereits 2021 veröffentlicht in der Zeitschrift „Stem Cell Research & Therapy“ (196).



**Abb. 20: Klassische PKCs regulieren die osteogene Differenzierung von DFCs über Akt und  $\beta$ -Catenin.** Schematische Zusammenfassung des inhibitorischen Einflusses von klassischen PKCs auf die osteogene Differenzierung von DFCs über Akt, GSK3 $\beta$  und  $\beta$ -Catenin sowie der endogenen Regulierung von PKC durch PTHrP und WNT5A.

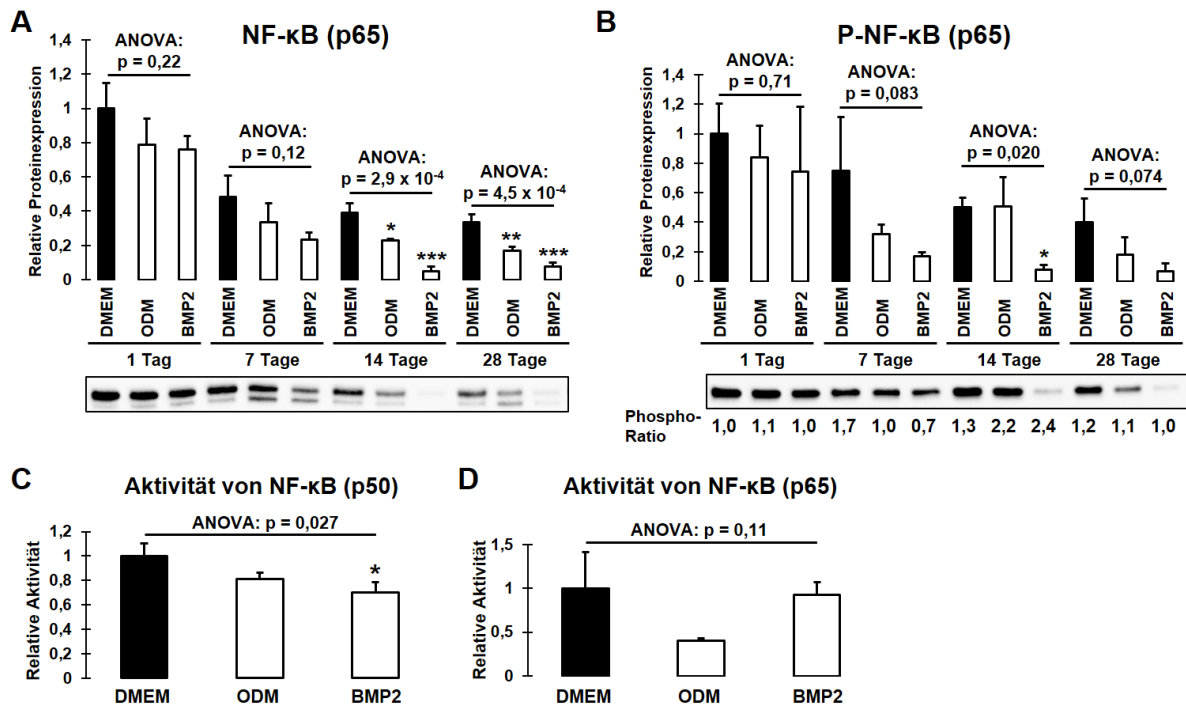


## 3.2 Klassische PKCs und Akt regulieren die osteogene Differenzierung von DFCs über NF- $\kappa$ B

### 3.2.1 Die Regulierung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs während der osteogenen Differenzierung von DFCs

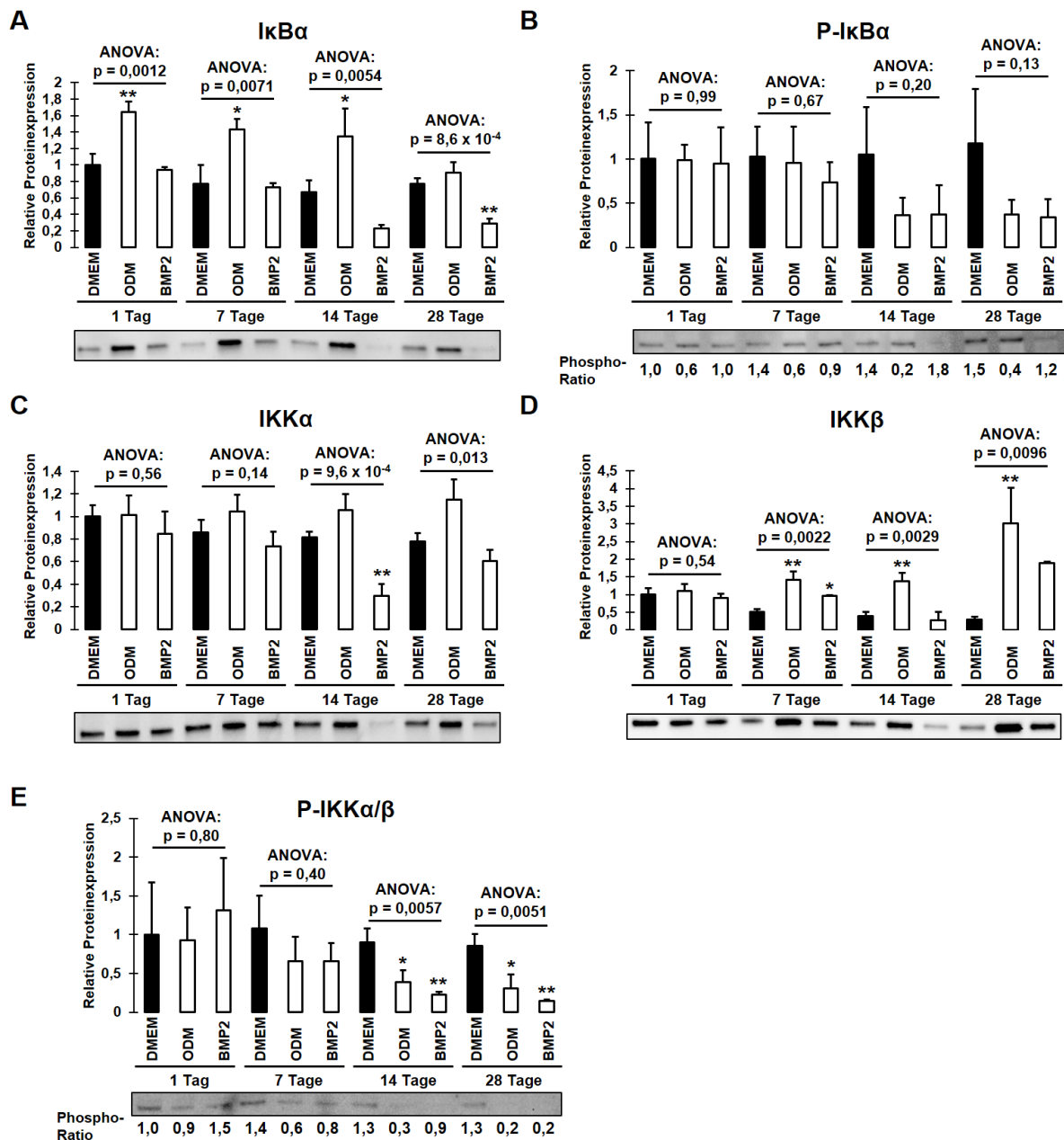
Eine Beteiligung am hemmenden Einfluss klassischer PKCs auf die osteogene Differenzierung von DFCs ließ sich darüber hinaus für den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B vermuten, da dieser durch PKC aktiviert werden kann (263,345) und bereits mit der Regulierung der osteogenen Differenzierung anderer Stamm-/Vorläuferzellen wie z. B. DPSCs und ADSCs assoziiert wurde (346,347). Um die Rolle des Transkriptionsfaktors während der Differenzierung von DFCs zu evaluieren, wurden zunächst dessen Expression und Aktivität im Laufe der Osteogenese untersucht. Dabei zeigten Western Blots eine Herunterregulierung der Proteinexpression der NF- $\kappa$ B-Untereinheit p65 in der zweiten Hälfte der Differenzierung (Abb. 21A) und von dessen Phosphorylierung an Ser536 (Abb. 21B), welche in mehreren Studien positiv mit der Aktivität des Transkriptionsfaktors assoziiert wurde (348–350). Darüber hinaus war die Aktivität der NF- $\kappa$ B-Untereinheiten p50 und p65 sieben Tage nach osteogener Induktion gehemmt (Abb. 21C, D), wobei aber nur die Inhibition von p50 nach BMP2-Induktion statistisch signifikant nachweisbar war.

Daraufhin wurde die endogene Regulierung von weiteren Proteinen analysiert, welche dem NF- $\kappa$ B-Signalweg zugeordnet werden und die Aktivität des Transkriptionsfaktors beeinflussen. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Expression des Proteins I $\kappa$ B $\alpha$  (engl. *Inhibitor of NF- $\kappa$ B, alpha*), welches NF- $\kappa$ B inhibiert (351), durch osteogene Induktion mit Dexamethason hochreguliert wurde, wohingegen sie durch BMP2 zunächst nicht beeinflusst und im späteren Verlauf der Differenzierung gehemmt wurde (Abb. 22A). Die Ser32-Phosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$ , welche durch das Enzym IKK (I $\kappa$ B-Kinase) vermittelt wird und zur Inaktivierung des Proteins führt (352,353), wurde in der zweiten Hälfte der Differenzierung in beiden Differenzierungsmedien tendenziell inhibiert, wobei sich im Verhältnis zur Gesamtexpression von I $\kappa$ B $\alpha$  betrachtet nur nach osteogener Induktion mit Dexamethason eine deutliche Hemmung der Phosphorylierungsrate beobachten ließ (Abb. 22B). Bei der Analyse der endogenen Regulierung



**Abb. 21: Die Regulierung von NF-κB während der osteogenen Differenzierung.** (A, B) DFCs wurden bis zu 28 Tage lang mit ODM oder BMP2-Medium osteogen differenziert bzw. in Kontrollmedium (DMEM) kultiviert. Die Säulendiagramme zeigen die durch Western Blots ermittelte Proteinexpression von NF-κB (Untereinheit p65, A) bzw. von Ser536-phosphoryliertem NF-κB (Untereinheit p65, B) mit repräsentativen Blots und den Quotienten zwischen phosphorylierter Form und Gesamtmenge („Phospho-Ratio“, B). (C, D) DFCs wurden sieben Tage lang mit DMEM, ODM bzw. BMP2-Medium behandelt und die Aktivität der NF-κB-Untereinheiten p50 (C) und p65 (D) bestimmt. One-way ANOVA wurde angewandt zum Vergleich zwischen den verschiedenen Medien zum gleichen Zeitpunkt, mit anschließenden Tukey-Tests zum Vergleich zwischen ODM bzw. BMP2-Medium und DMEM: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . Die Ergebnisse dieser Abbildung wurden bereits 2021 veröffentlicht in der Zeitschrift „Stem Cell Research & Therapy“ (196).

von IKK zeigte sich, dass die Expression der Untereinheit IKK $\alpha$  kaum reguliert wurde (Abb. 22C), wohingegen die Expression von IKK $\beta$  im Laufe der Differenzierung deutlich anstieg (Abb. 22D). Allerdings wurde die Ser176/180-Phosphorylierung der beiden IKK-Untereinheiten, welche für die Aktivität des Enzyms benötigt wird (353,354), in der späteren Phase der Osteogenese gehemmt, was sich zudem in einer deutlich verminderten Phosphorylierungsrate im Verhältnis zur Gesamtexpression der beiden Untereinheiten äußerte (Abb. 22E).

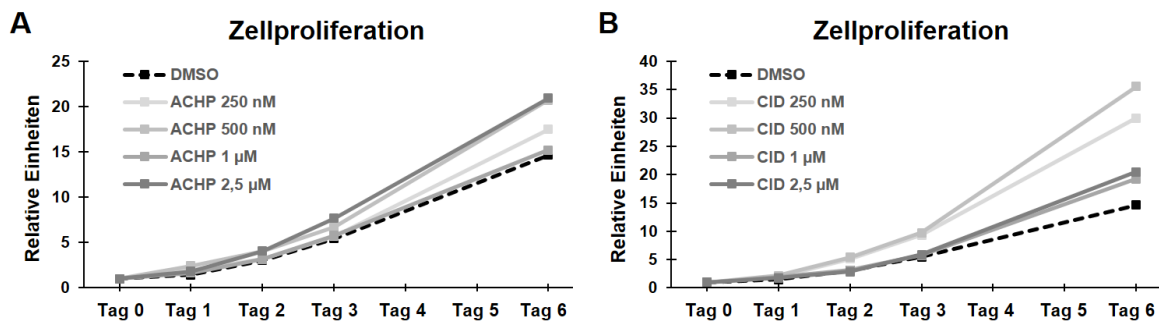


**Abb. 22: Die Regulierung der NF-κB-assoziierten Proteine während der osteogenen Differenzierung.** DFCs wurden bis zu 28 Tage lang mit ODM oder BMP2-Medium osteogen differenziert bzw. in Kontrollmedium (DMEM) kultiviert. Die Säulendiagramme zeigen die durch Western Blots ermittelte Proteinexpression von *IκBα* (A), Ser32-phosphoryliertem *IκBα* (B), *IKKα* (C), *IKKβ*, (D) und Ser176/180-phosphoryliertem *IKKα/β* (E) mit repräsentativen Blots und den Quotienten zwischen phosphorylierter Form und Gesamtmenge („Phospho-Ratio“) von *IκBα* (B) und *IKKα/β* (E). One-way ANOVA wurde angewandt zum Vergleich zwischen den verschiedenen Medien zum gleichen Zeitpunkt, mit anschließenden Tukey-Tests zum Vergleich zwischen ODM bzw. BMP2-Medium und DMEM: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

### 3.2.2 Der Einfluss von NF- $\kappa$ B auf die Proliferation und osteogene

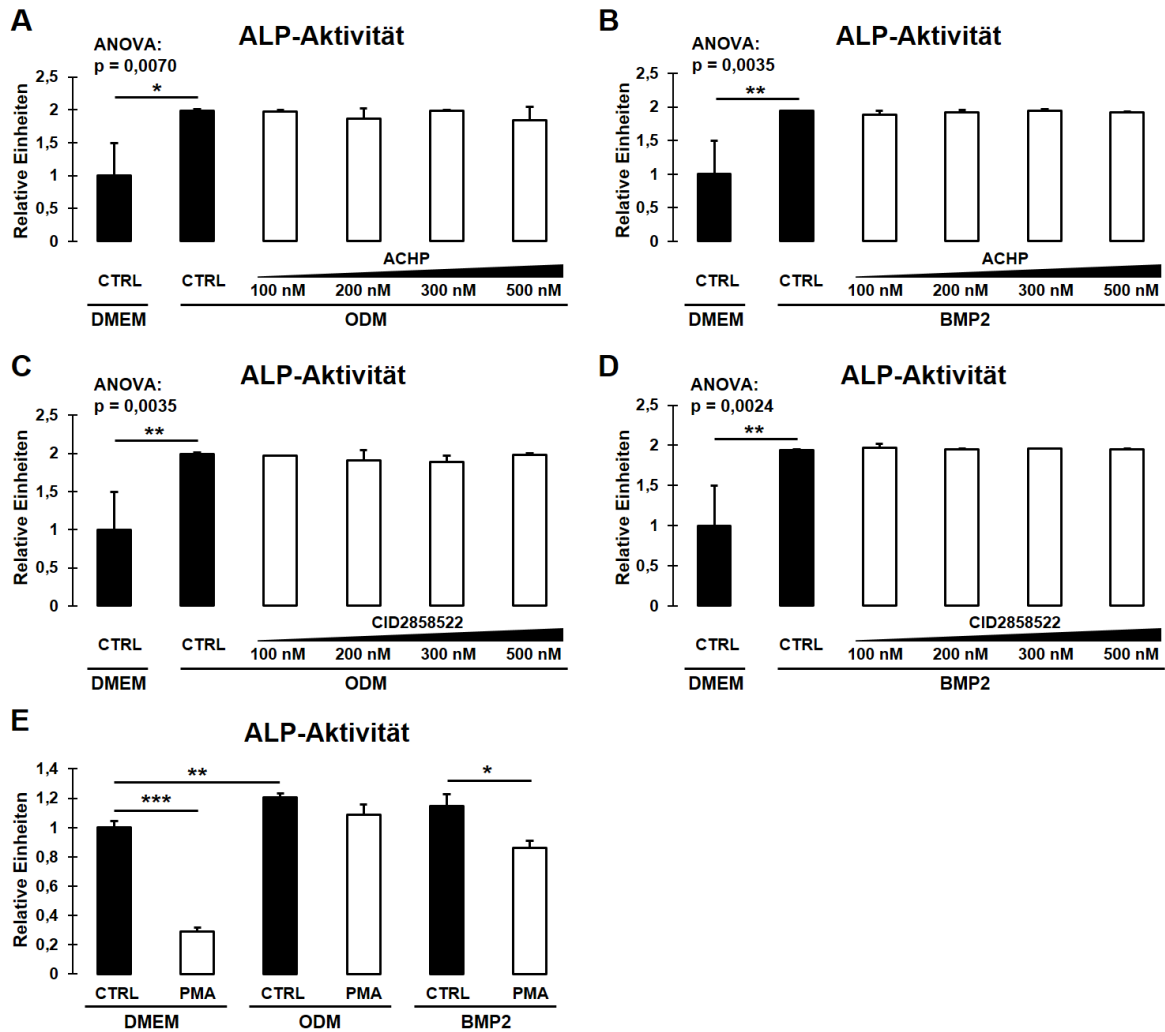
#### Differenzierung von DFCs

Um die Rolle von NF- $\kappa$ B für die osteogene Differenzierung von DFCs – insbesondere in Bezug auf PKC – zu evaluieren, wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des allgemeinen NF- $\kappa$ B-Inhibitors ACHP (2-Amino-6-[2-(cyclopropylmethoxy)-6-hydroxyphenyl]-4-(piperidin-4-yl)-nicotinonitril) oder des Inhibitors CID2858522, welcher spezifisch die PKC-induzierte NF- $\kappa$ B-Aktivierung hemmt, behandelt (für Referenzen zur Wirkung vgl. Kapitel 2.1.4; für Effizienz der NF- $\kappa$ B-Inhibition s. Anhang, Abb. A-3). Interessanterweise führte die Stimulierung mit beiden Substanzen in allen getesteten Konzentrationen zu einer Erhöhung der Zellproliferation (Abb. 23).



**Abb. 23: Die Regulierung der Zellproliferation durch NF- $\kappa$ B.** DFCs wurden bis zu sechs Tage lang mit verschiedenen Konzentrationen des allgemeinen NF- $\kappa$ B-Inhibitors ACHP (**A**) oder des Inhibitors der PKC-spezifischen NF- $\kappa$ B-Aktivierung CID2858522 (CID, **B**) stimuliert und die Proliferation der Zellen mittels Proliferationsassay bestimmt ( $n = 3$ , Darstellung ohne Standardabweichung). Als Kontrolle wurden Zellen mit der jeweils höchstverwendeten DMSO-Konzentration behandelt.

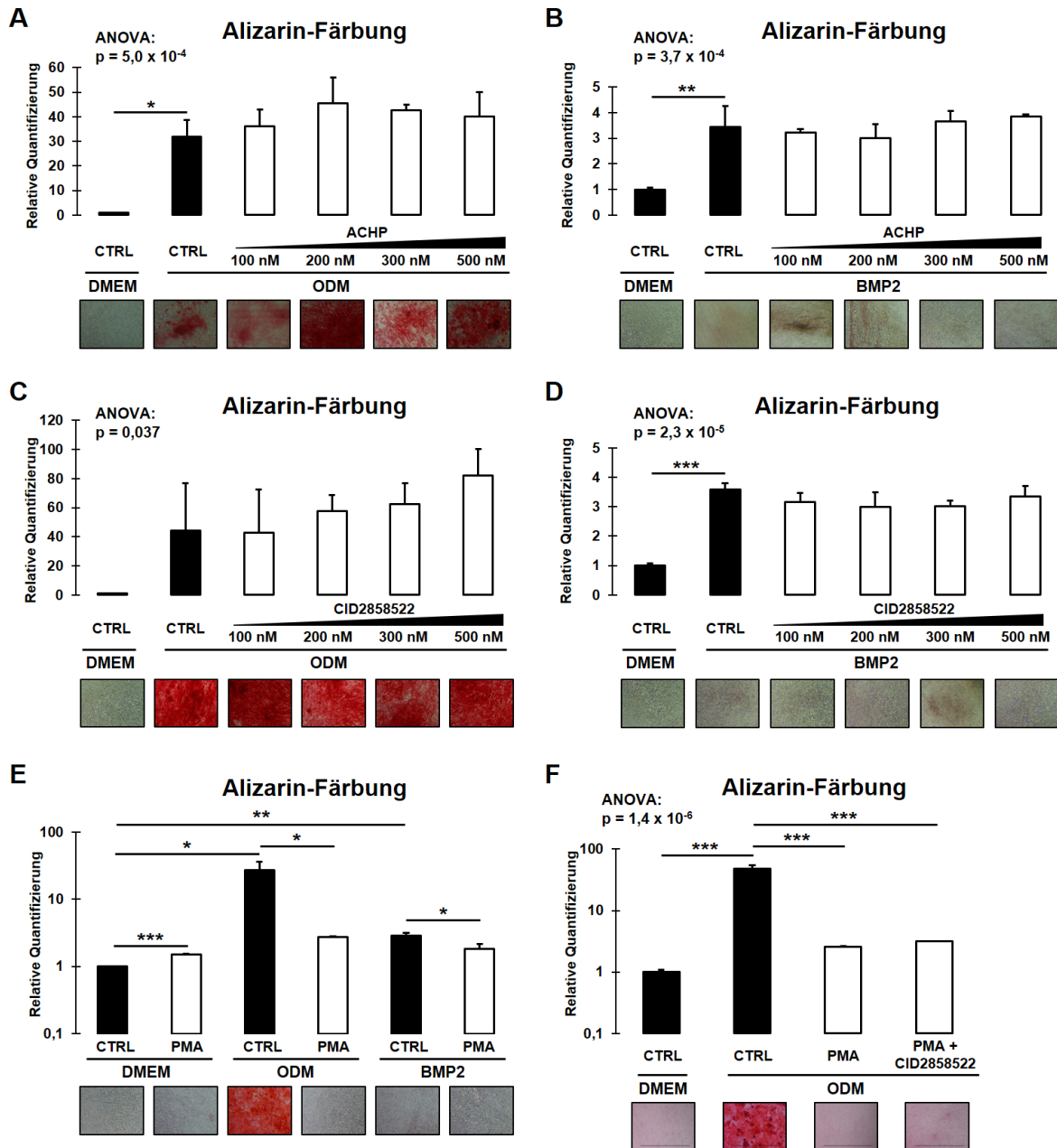
Da die Inhibitoren insbesondere bei Konzentrationen von 250 und 500 nM die Proliferation stimulierten, wurden DFCs im Folgenden mit verschiedenen Konzentrationen zwischen 100 und 500 nM behandelt und anschließend die Expression osteogener Marker untersucht. Dabei konnte allerdings kein Einfluss auf die ALP-Aktivität der Zellen festgestellt werden (Abb. 24A – D). Alternativ wurden die Zellen mit der Substanz PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat) behandelt, welche NF- $\kappa$ B über PKC aktiviert (für Referenzen zur Wirkung vgl. Kapitel 2.1.4; für Effizienz der PKC-Stimulierung s. Anhang, Abb. A-1B). Diese PKC/NF- $\kappa$ B-Überaktivierung führte zur Herunterregulierung der ALP-Aktivität von DFCs (Abb. 24E).



**Abb. 24: Die Regulierung der ALP-Aktivität durch NF- $\kappa$ B.** DFCs wurden sieben Tage lang mit ODM (A, C, E) oder BMP2-Medium (B, D, E) osteogen differenziert bzw. in Kontrollmedium (DMEM) kultiviert. Gleichzeitig wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des allgemeinen NF- $\kappa$ B-Inhibitors ACHP (A, B) bzw. des Inhibitors der PKC-spezifischen NF- $\kappa$ B-Aktivierung CID2858522 (C, D) oder mit 200 nM des PKC/NF- $\kappa$ B-Aktivators PMA (E) stimuliert. Anschließend wurde die ALP-Aktivität gemessen. One-way ANOVA wurde angewandt zum Vergleich zwischen allen Gruppen des Experiments, mit anschließenden Tukey-Tests zum Vergleich zwischen ODM bzw. BMP2-Medium und DMEM sowie zwischen den verschiedenen Behandlungen im selben Medium paarweise zueinander (A – D); T-Tests wurden angewandt zum Vergleich zwischen ODM bzw. BMP2-Medium und DMEM sowie zwischen PMA-Behandlung und Kontrolle im selben Medium (E): \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . Die Ergebnisse dieser Abbildung wurden teilweise bereits 2021 veröffentlicht in der Zeitschrift „Stem Cell Research & Therapy“ (196).

Darüber hinaus wurde die Mineralisierungskapazität der Zellen nach Hemmung bzw. Überaktivierung von NF- $\kappa$ B evaluiert. Dabei zeigte eine Behandlung mit beiden Inhibitoren in allen angewandten Konzentrationen wieder keinen Einfluss (Abb. 25A – D), wohingegen eine Behandlung mit dem Aktivator PMA das Mineralisierungspotential osteogen induzierter DFCs deutlich unterdrückte (Abb. 25E). Um zu untersuchen, ob die PMA-vermittelte Hemmung auf einer Aktivierung von NF- $\kappa$ B beruhte, wurden die Zellen in einem weiteren Versuch zusätzlich zu PMA gleichzeitig mit dem spezifischen Inhibitor CID2858522 behandelt, wodurch die Herunterregulierung der Mineralisierung teilweise revidiert werden konnte (Abb. 25F). Der beobachtete Unterschied war zwar im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit PMA im Tukey-Test nach One-way ANOVA nicht statistisch signifikant, allerdings wurde die Aussagekraft des Tests durch die hohe Standardabweichung bei der ODM-Behandlung (vgl. Abb. 25F, aufgrund der logarithmischen Darstellung wirkt die Standardabweichung jedoch kleiner) beeinträchtigt. Infolgedessen war keine Homoskedastizität gegeben, die jedoch eine Voraussetzung für die verlässliche Anwendung des Tests ist. Daher wurde zusätzlich ein ungepaarter T-Test zwischen der Behandlung mit PMA alleine und in Kombination mit CID2858522 durchgeführt, nach welchem der Unterschied zwischen den beiden Gruppen statistisch signifikant war ( $p = 1,1 \times 10^{-4}$ ).

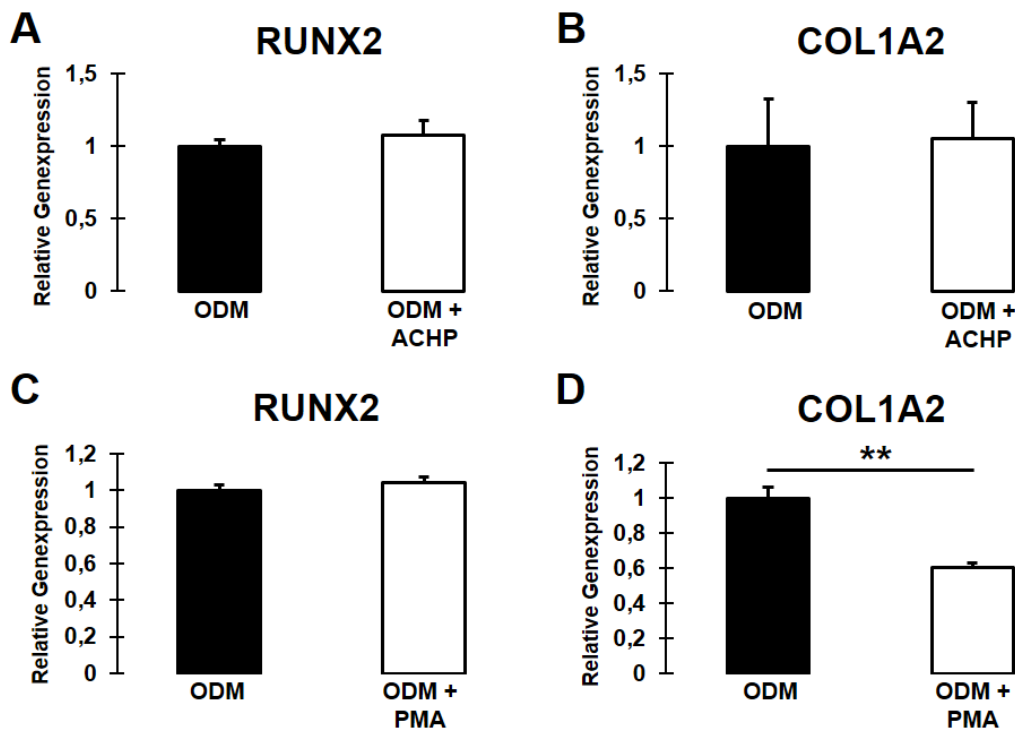
Ergänzend zur Evaluierung der ALP-Aktivität und der Mineralisierung wurde schließlich die Genexpression der beiden osteogenen Marker RUNX2 und COL1A2 nach Inhibition von NF- $\kappa$ B mit AHP bzw. Überaktivierung mit PMA in Dexamethason-induzierten DFCs untersucht. Dabei zeigte sich keine Regulierung der beiden Gene durch NF- $\kappa$ B-Hemmung (Abb. 26A, B), wobei die Expression von RUNX2 nach Behandlung mit dem NF- $\kappa$ B-Aktivator ebenfalls unverändert war (Abb. 26C). Lediglich die Expression von COL1A2 wurde durch Überaktivierung von NF- $\kappa$ B signifikant herunterreguliert (Abb. 26D).



**Abb. 25: Die Regulierung der Mineralisierung durch NF- $\kappa$ B.** DFCs wurden 28 Tage lang mit ODM (A, C, E, F) oder BMP2-Medium (B, D, E) osteogen differenziert bzw. in Kontrollmedium (DMEM) kultiviert. Gleichzeitig wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des allgemeinen NF- $\kappa$ B-Inhibitors ACHP (A, B) bzw. des Inhibitors der PKC-spezifischen NF- $\kappa$ B-Aktivierung CID2858522 (C, D) oder mit 200 nM des PKC/NF- $\kappa$ B-Aktivators PMA (E, F) oder einer Kombination aus 200 nM PMA und 500 nM CID2858522 (F) stimuliert. Anschließend wurde die Mineralisierung extrazellulärer Matrix mittels Alizarin-Färbung analysiert. One-way ANOVA wurde angewandt zum Vergleich zwischen allen Gruppen des Experiments, mit anschließenden Tukey-Tests zum Vergleich zwischen ODM bzw. BMP2-Medium und DMEM sowie zwischen den verschiedenen Behandlungen im selben Medium paarweise zueinander (A – D, F); T-Tests wurden angewandt zum Vergleich zwischen ODM bzw. BMP2-Medium und

(Fortsetzung auf nächster Seite)

DMEM sowie zwischen PMA-Behandlung und Kontrolle im selben Medium (E): \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . Die Ergebnisse dieser Abbildung wurden teilweise bereits 2021 veröffentlicht in der Zeitschrift „Stem Cell Research & Therapy“ (196). Zudem wurden die Daten in (E) schon in der vorangegangenen Masterarbeit gezeigt.

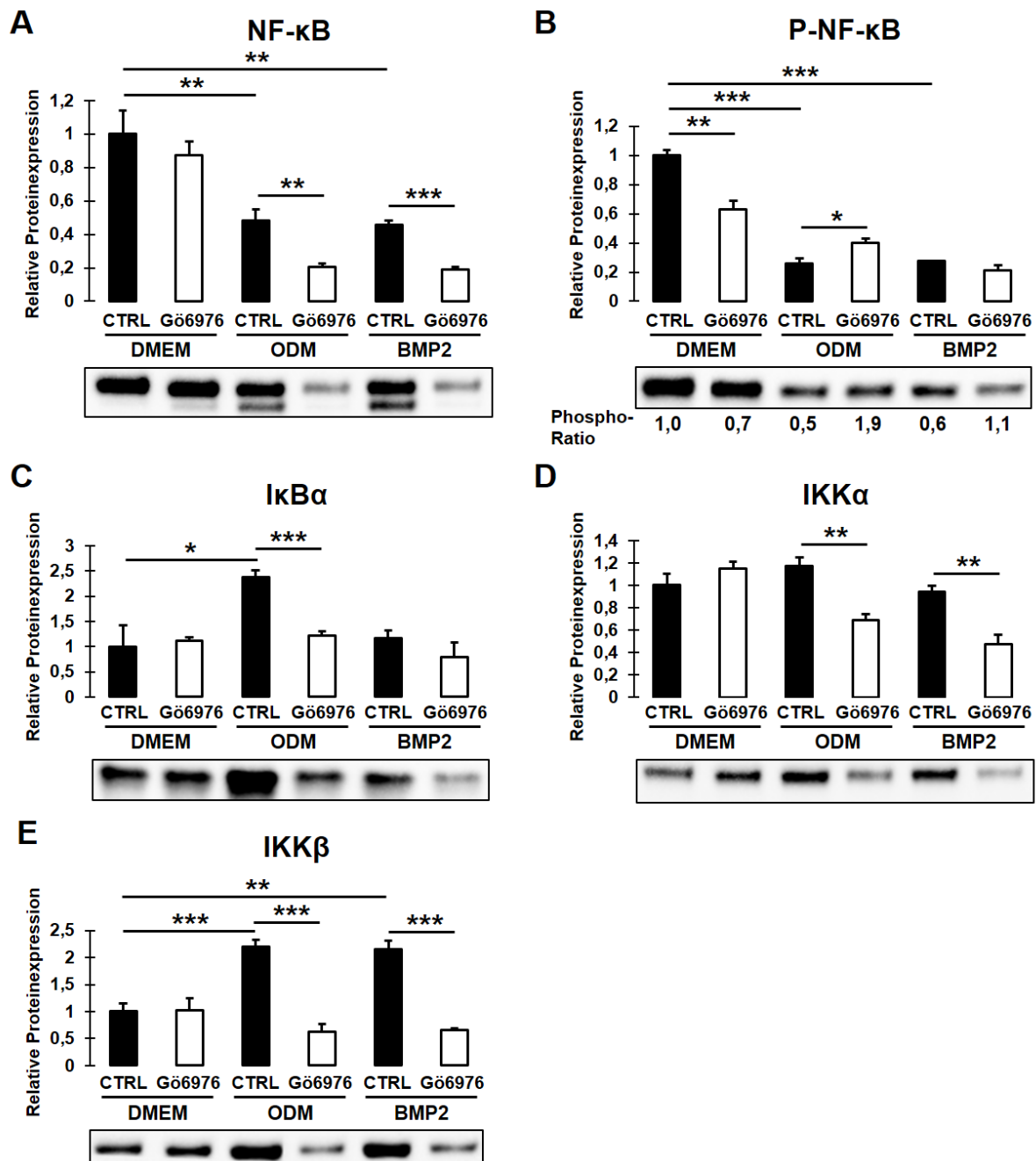


**Abb. 26: Die Regulierung der Genexpression osteogener Marker durch NF- $\kappa$ B.** DFCs wurden drei (A, B) oder sieben (C, D) Tage lang mit ODM differenziert und gleichzeitig mit 500 nM des NF- $\kappa$ B-Inhibitors ACHP (A, B) oder 200 nM des PKC/NF- $\kappa$ B-Aktivators PMA (C, D) stimuliert. Anschließend wurde mittels RT-qPCR die Genexpression von RUNX2 (A, C) und COL1A2 (B, D) bestimmt. T-Tests wurden angewandt zum Vergleich zwischen Aktivator/Inhibitor-Behandlung und Kontrolle: \*\*  $p < 0,01$ . Die Ergebnisse dieser Abbildung wurden teilweise bereits 2021 veröffentlicht in der Zeitschrift „Stem Cell Research & Therapy“ (196). Zudem wurden die Daten in (C) und (D) schon in der vorangegangenen Masterarbeit gezeigt.

### 3.2.3 Die Regulierung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs durch klassische PKCs

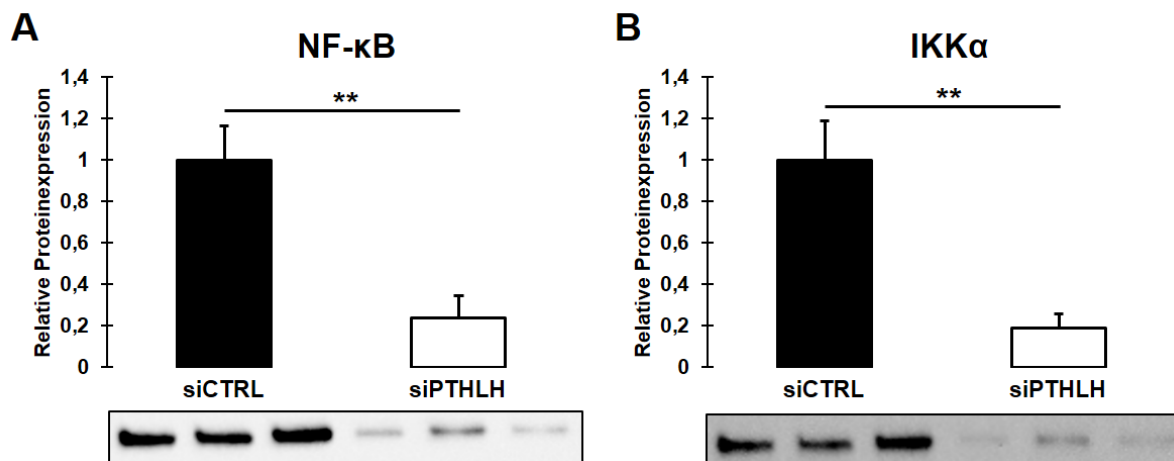
Im nächsten Schritt wurde die Beeinflussung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs durch PKC in DFCs untersucht. Nach Behandlung der Zellen mit dem PKC-Inhibitor Gö6976 war die Expression der NF- $\kappa$ B-Untereinheit p65 deutlich herunterreguliert (Abb. 27A). Allerdings war die Ser536-Phosphorylierung nur in Kontrollmedium signifikant und in BMP2-Medium tendenziell gehemmt, während bei Dexamethason-induzierten Zellen das Gegenteil beobachtet werden konnte. Die Phosphorylierungsrate im Verhältnis zur





**Abb. 27: Die Regulierung des NF-κB-Signalwegs durch klassische PKCs.** DFCs wurden sieben Tage lang mit ODM oder BMP2-Medium osteogen differenziert bzw. in Kontrollmedium (DMEM) kultiviert und gleichzeitig mit 100 nM des Inhibitors klassischer PKCs Gö6976 behandelt. Die Säulendiagramme zeigen die durch Western Blots ermittelte Proteinexpression von NF-κB (Untereinheit p65, **A**), Ser536-phosphoryliertem NF-κB (Untereinheit p65, **B**), IκBα (**C**), IKKα (**D**) und IKKβ (**E**) mit repräsentativen Blots und den Quotienten zwischen phosphorylierter Form und Gesamtmenge von NF-κB („Phospho-Ratio“, **B**). T-Tests wurden angewandt zum Vergleich zwischen ODM bzw. BMP2-Medium und DMEM sowie zwischen Gö6976-Behandlung und Kontrolle im selben Medium: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . Die Ergebnisse dieser Abbildung wurden bereits 2021 veröffentlicht in der Zeitschrift „Stem Cell Research & Therapy“ (196).

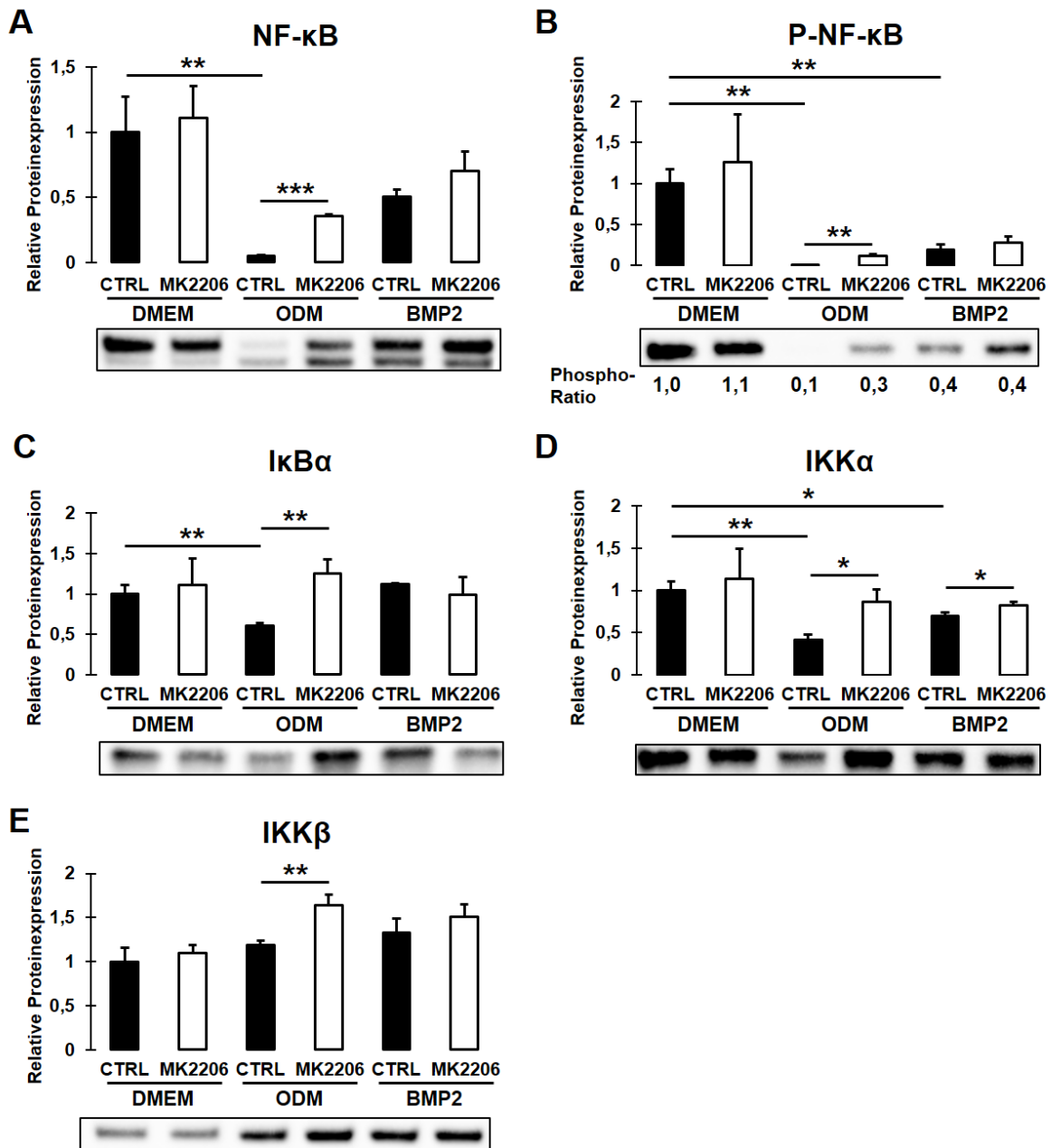
Gesamtmenge des Proteins war jedoch nach Hemmung von PKC in beiden Differenzierungsmedien erhöht (Abb. 27B). Darüber hinaus war die Expression von I $\kappa$ B $\alpha$  nach Dexamethason-stimulierter Osteogenese und PKC-Inhibition herunterreguliert (Abb. 27C), während die Expression von IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  in beiden Differenzierungsmedien durch den Inhibitor signifikant gehemmt wurde (Abb. 27D, E). Insgesamt betrachtet zeigte sich eine weitestgehende Herunterregulierung des gesamten NF- $\kappa$ B-Signalwegs nach PKC-Hemmung. Ergänzend hierzu konnte festgestellt werden, dass die Expression der phosphorylierten NF- $\kappa$ B-Untereinheit p65 nach siRNA-vermittelter Herunterregulierung von PKC $\alpha$  verringert war (Anhang, Abb. A-2). Darüber hinaus konnte eine signifikante Hemmung der Expression von NF- $\kappa$ B und IKK $\alpha$  nach Transfektion von DFCs mit einer siRNA gegen PTHLH beobachtet werden (Abb. 28).



**Abb. 28: Die Regulierung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs durch PTHrP.** DFCs wurden drei Tage lang mit einer spezifischen siRNA gegen PTHLH (Gen für PTHrP) oder einer Kontroll-siRNA (siCTRL) transfiziert. Anschließend wurde die Proteinexpression von NF- $\kappa$ B (Untereinheit p65, **A**) und IKK $\alpha$  (**B**) durch Western Blots bestimmt. T-Tests wurden angewandt zum Vergleich zwischen siRNA-Behandlung und Kontroll-siRNA: \*\*  $p < 0,01$ . Die Ergebnisse dieser Abbildung wurden teilweise bereits 2021 veröffentlicht in der Zeitschrift „Stem Cell Research & Therapy“ (196).

### 3.2.4 Die Regulierung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs durch Akt

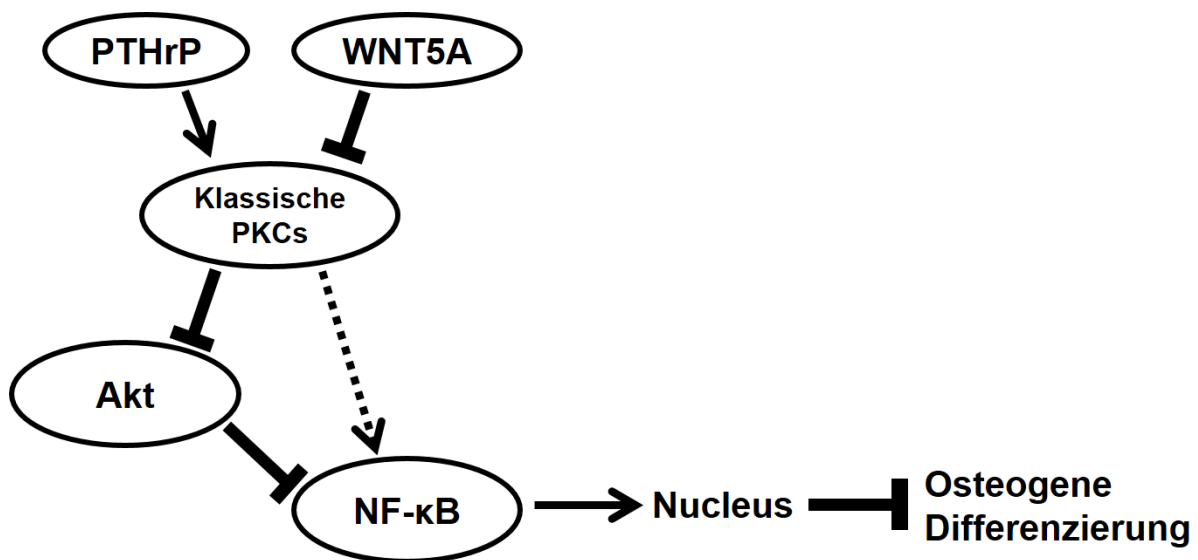
Außerdem wurde die Beeinflussung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs durch die stromabwärts von PKC regulierte Kinase Akt evaluiert. Dabei konnte eine Behandlung von DFCs mit dem Akt-Inhibitor MK2206 die Expression der NF- $\kappa$ B-Untereinheit p65 stimulieren, wobei der Unterschied nur in Dexamethason-induzierten Zellen statistisch signifikant war



**Abb. 29: Die Regulierung des NF-κB-Signalwegs durch Akt.** DFCs wurden acht Tage lang mit ODM oder BMP2-Medium osteogen differenziert bzw. in Kontrollmedium (DMEM) kultiviert und gleichzeitig mit 200 nM des Akt-Inhibitors MK2206 behandelt. Die Säulendiagramme zeigen die durch Western Blots ermittelte Proteinexpression von NF-κB (Untereinheit p65, **A**), Ser536-phosphoryliertem NF-κB (Untereinheit p65, **B**), IκBα (**C**), IKKα (**D**) und IKKβ (**E**) mit repräsentativen Blots und den Quotienten zwischen phosphorylierter Form und Gesamtmenge von NF-κB („Phospho-Ratio“, **B**). T-Tests wurden angewandt zum Vergleich zwischen ODM bzw. BMP2-Medium und DMEM sowie zwischen MK2206-Behandlung und Kontrolle im selben Medium: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . Die Ergebnisse dieser Abbildung wurden bereits 2021 veröffentlicht in der Zeitschrift „Stem Cell Research & Therapy“ (196).

(Abb. 29A). Außerdem konnte eine leichte Induktion der Ser536-Phosphorylierung festgestellt werden, wobei die Phosphorylierungsrate nach Akt-Inhibition annähernd konstant blieb (Abb. 29B). Des Weiteren wurde die Expression der Proteine I $\kappa$ B $\alpha$ , IKK $\alpha$  sowie IKK $\beta$  durch Hemmung von Akt zumeist hochreguliert (Abb. 29C – E). Insgesamt zeigte sich ein stimulierender Einfluss auf den NF- $\kappa$ B-Signalweg durch Akt, welcher im Kontrast zur Regulierung durch klassische PKCs steht.

Zusammenfassend legten die Ergebnisse nahe, dass klassische Isoformen von PKC den NF- $\kappa$ B-Signalweg in osteogen induzierten DFCs durch Inhibition von Akt unterstützen, und dass NF- $\kappa$ B die Differenzierung der Zellen hemmt (schematisch dargestellt in Abb. 30). Die Ergebnisse des Kapitels 3.2 wurden zum Teil bereits 2021 in der Zeitschrift „Stem Cell Research & Therapy“ publiziert (196).



**Abb. 30: Klassische PKCs und Akt regulieren die osteogene Differenzierung von DFCs über NF- $\kappa$ B.** Schematische Zusammenfassung des Einflusses von klassischen PKCs und Akt auf NF- $\kappa$ B zur Regulierung der osteogenen Differenzierung von DFCs. Dargestellt ist außerdem die endogene Regulierung von PKC durch PTHrP und WNT5A.

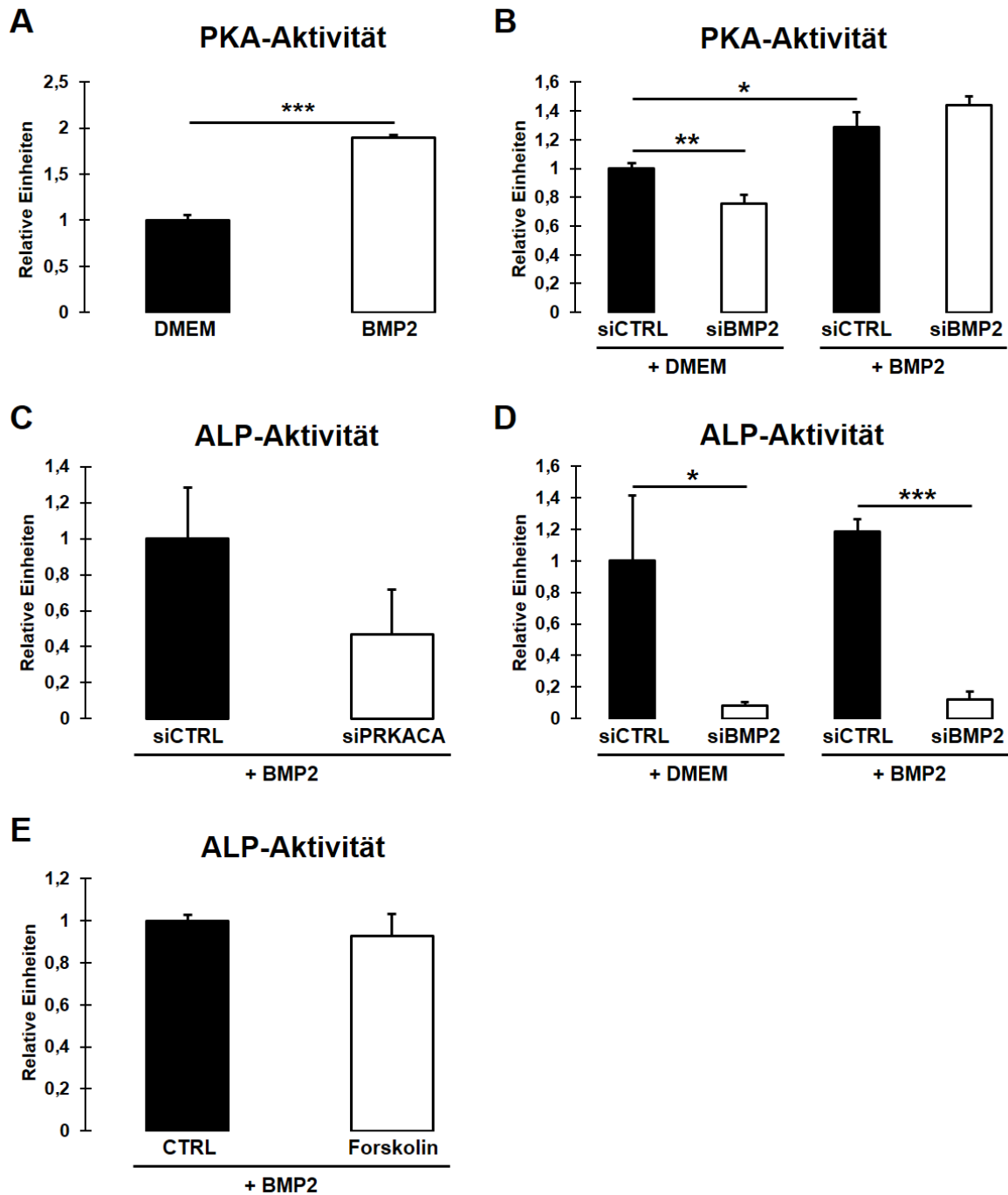
### **3.3 BMP2 induziert die Aktivität von PKA über die endogene Expression von PTHrP**

#### **3.3.1 Die Aktivierung von PKA während der BMP2-induzierten osteogenen Differenzierung von DFCs**

Darüber hinaus sollte eine mögliche Beteiligung klassischer PKC-Isoformen an der Induktion der Aktivität von PKA stromabwärts von BMP2 evaluiert werden. In den durchgeführten Experimenten konnte eine erhöhte PKA-Aktivität bei Behandlung von DFCs mit BMP2-haltigem Differenzierungsmedium reproduziert werden (Abb. 31A). Darüber hinaus führte eine Herunterregulierung der Expression von BMP2 mit einer spezifischen siRNA (für Effizienz der Herunterregulierung s. Anhang, Abb. A-4) zu einer signifikanten Hemmung der PKA-Aktivität, außer wenn BMP2 durch Behandlung mit dem Differenzierungsmedium extern supplementiert wurde (Abb. 31B). Die Bedeutung von PKA für die Differenzierung zeigte sich in der Beobachtung, dass die ALP-Aktivität von DFCs reduziert war, wenn die Zellen mit einer siRNA gegen PRKACA (Gen für die katalytische Untereinheit  $\alpha$  von PKA, für Effizienz der Herunterregulierung s. Anhang, Abb. A-4) behandelt wurden (Abb. 31C). Eine verringerte ALP-Aktivität konnte zudem nach siRNA-vermittelter Herunterregulierung von BMP2 festgestellt werden (Abb. 31D). Überraschenderweise war die Aktivität von ALP jedoch unverändert, wenn die Zellen mit Forskolin, einem Aktivator der Adenylatcyclase (vgl. Kapitel 2.1.4), behandelt wurden (Abb. 31E). Somit konnte nahegelegt werden, dass die PKA-Aktivierung während der BMP2-induzierten Osteogenese in DFCs unabhängig von der cAMP-Konzentration ist, deren Erhöhung ein typischer Aktivierungsmechanismus der Kinase ist (355).

#### **3.3.2 Evaluierung der Rolle von Smad-Proteinen, klassischen PKCs und Akt für die Aktivierung von PKA**

Infolgedessen wurde als Nächstes untersucht, ob die stromabwärts von BMP2 induzierten Smad-Proteine für die Aktivierung von PKA verantwortlich sind. Allerdings zeigte eine siRNA-vermittelte Herunterregulierung des Gens von Smad4 (für Effizienz der Herunterregulierung s. Anhang, Abb. A-4) nur einen geringen und statistisch nicht signifikanten Einfluss auf die Aktivität der Kinase (Abb. 32A). Darüber hinaus wurde mittels Immunpräzipitation überprüft, ob Smad4 oder Smad1 in DFCs an PKA binden,



**Abb. 31: Die Rolle von PKA während der BMP2-induzierten osteogenen Differenzierung.**

(A) DFCs wurden drei Tage lang mit BMP2-Medium osteogen differenziert bzw. in Kontrollmedium (DMEM) kultiviert. Anschließend wurde die PKA-Aktivität bestimmt. (B–D) DFCs wurden zwei Tage lang mit einer spezifischen siRNA gegen BMP2 (B, D) oder PRKACA (Gen für die katalytische Untereinheit  $\alpha$  von PKA, C) transfiziert. Als Negativkontrolle wurden Zellen mit einer Kontroll-siRNA (siCTRL) transfiziert. Anschließend wurden die Zellen drei (B) bzw. sieben (C, D) Tage lang mit BMP2-Medium osteogen differenziert oder in DMEM kultiviert, bevor die PKA-Aktivität (B) bzw. die ALP-Aktivität (C, D) bestimmt wurden. (E) DFCs wurden sieben

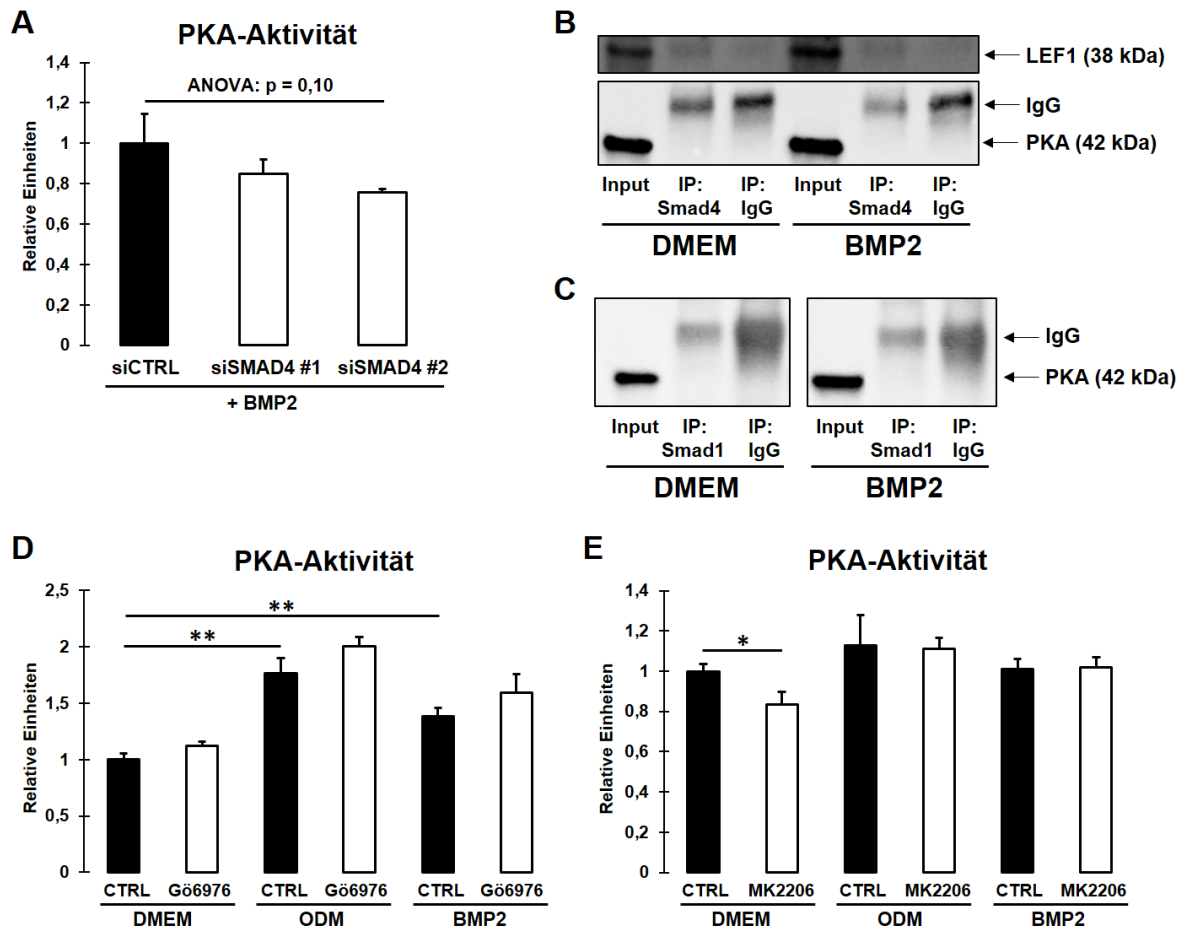
(Fortsetzung auf nächster Seite)

*Tage lang in BMP2-Medium mit bzw. ohne 100 nM des Adenylatcyclase-Aktivators Forskolin kultiviert und anschließend die ALP-Aktivität analysiert. T-Tests wurden angewandt zum Vergleich zwischen BMP2-Medium und DMEM (A), zwischen Kontroll-siRNA in BMP2-Medium und DMEM (B, D), zwischen siRNA-Behandlung und Kontroll-siRNA im selben Medium (B – D) sowie zwischen Forskolin-Behandlung und Kontrolle (E): \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . Die Ergebnisse dieser Abbildung wurden bereits 2022 veröffentlicht in der Zeitschrift „Archives of Oral Biology“ (356).*

wobei aber keine Interaktion gefunden wurde (Abb. 32B, C). Nachdem somit kein direkter Mechanismus zur PKA-Aktivierung ausgehend vom BMP-Signalweg gezeigt werden konnte, wurde untersucht, ob die Hemmung klassischer PKC-Isoformen nach Induktion der Osteogenese an der Regulierung der Kinase beteiligt ist. Jedoch wurde die PKA-Aktivität durch Behandlung von DFCs mit dem PKC-Inhibitor Gö6976 nicht signifikant verändert und nur tendenziell geringfügig hochreguliert (Abb. 32D). Dahingegen wurde die Aktivität von PKA durch Akt-Inhibition marginal gehemmt (Abb. 32E).

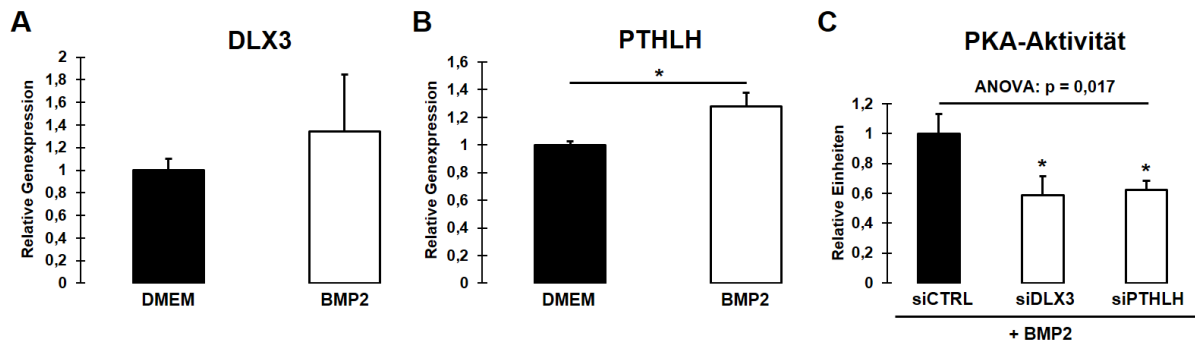
### **3.3.3 Evaluierung der Rolle von DLX3 und PTHrP für die Aktivierung von PKA**

Daraufhin wurde eine mögliche Beteiligung der beiden stromabwärts des BMP-Signalwegs induzierten Proteine DLX3 und PTHrP an der Aktivierung von PKA evaluiert. Nach Behandlung von DFCs mit BMP2-haltigem Differenzierungsmedium war die Genexpression sowohl von DLX3 als auch von PTHLH erhöht, wobei nur die Induktion von PTHLH statistisch signifikant war (Abb. 33A, B). Interessanterweise konnte eine siRNA-vermittelte Herunterregulierung beider Gene die PKA-Aktivität deutlich hemmen (Abb. 33C).



**Abb. 32: Die Rolle der Smad-Proteine, klassischer PKC-Isoformen und Akt für die BMP2-induzierte PKA-Aktivierung.** (A) DFCs wurden drei Tage lang mit zwei verschiedenen spezifischen siRNAs gegen SMAD4 (Gen für Smad4) oder einer Kontroll-siRNA transfiziert und anschließend drei Tage lang mit BMP2-Medium behandelt, bevor die PKA-Aktivität gemessen wurde. (B, C) DFCs wurden drei (B) bzw. sieben (C) Tage lang mit BMP2-Medium osteogen differenziert bzw. in Kontrollmedium (DMEM) kultiviert. Die Western Blots zeigen die Proteinexpression von PKA ( $n = 1$ ) in DFCs nach Immunpräzipitation (IP) von Smad4 (B) bzw. Smad1 (C) sowie in den jeweiligen Inputs vor der IP. Die Proteinexpression von LEF1 ( $n = 1$ ) diente als Positivkontrolle für die IP von Smad4 (B). (D, E) DFCs wurden drei Tage lang mit ODM oder BMP2-Medium osteogen differenziert bzw. in Kontrollmedium (DMEM) kultiviert und gleichzeitig mit 100 nM des Inhibitors klassischer PKCs Gö6976 (D) oder 200 nM des Akt-Inhibitors MK2206 (E) behandelt, bevor die PKA-Aktivität gemessen wurde. One-way ANOVA wurde angewandt zum Vergleich zwischen allen Gruppen des Experiments, mit anschließenden Tukey-Tests zum Vergleich zwischen siRNA-Behandlung und Kontroll-siRNA (A); T-Tests wurden angewandt zum Vergleich zwischen ODM bzw. BMP2-Medium und DMEM sowie zwischen Inhibitor-Behandlung und Kontrolle im selben Medium (D, E): \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ . Die Ergebnisse dieser Abbildung wurden teilweise bereits 2022 veröffentlicht in der Zeitschrift „Archives of Oral Biology“ (356).

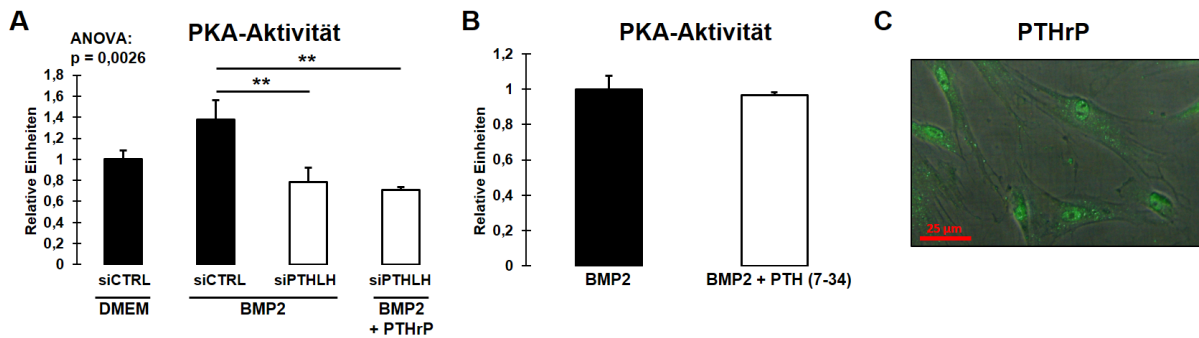




**Abb. 33: Die Rolle von DLX3 und PTHrP für die BMP2-induzierte PKA-Aktivierung.** (A, B) DFCs wurden sieben Tage lang mit BMP2-Medium osteogen differenziert bzw. in Kontrollmedium (DMEM) kultiviert, bevor die Genexpression von DLX3 (A) und PTHLH (Gen für PTHrP, B) mittels RT-qPCR analysiert wurde. (C) DFCs wurden drei Tage lang mit spezifischen siRNAs gegen DLX3 oder PTHLH bzw. einer Kontroll-siRNA transfiziert und anschließend drei Tage lang mit BMP2-Medium behandelt, bevor die PKA-Aktivität analysiert wurde. T-Tests wurden angewandt zum Vergleich zwischen BMP2-Medium und DMEM (A, B); One-way ANOVA wurde angewandt zum Vergleich zwischen allen Gruppen des Experiments, mit anschließenden Tukey-Tests zum Vergleich zwischen siRNA-Behandlung und Kontroll-siRNA (C): \*  $p < 0,05$ .

### 3.3.4 Mechanismus der Aktivierung von PKA durch PTHrP

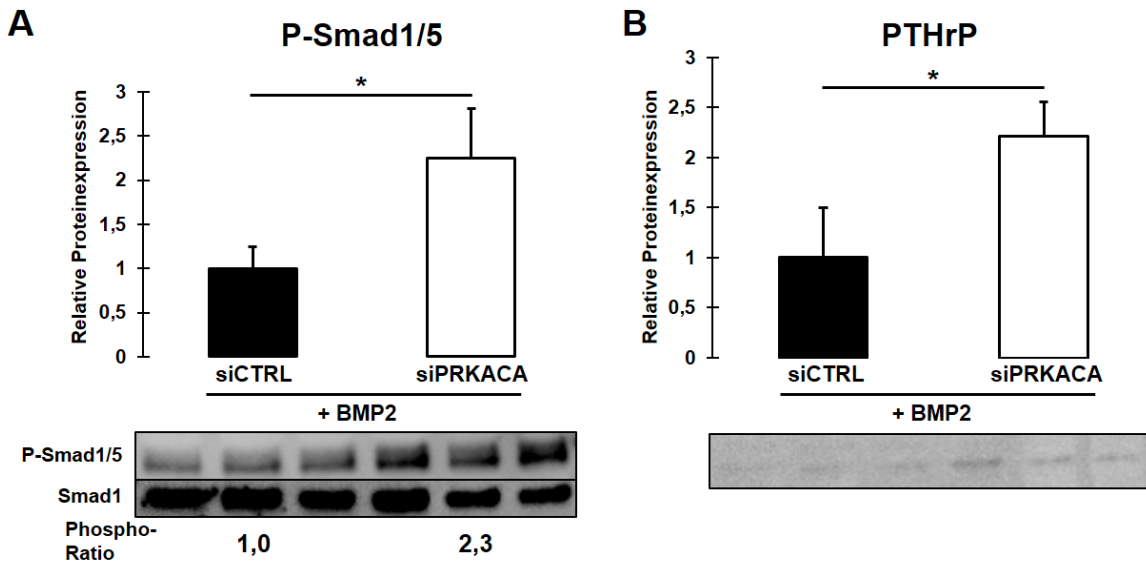
Da verschiedene Studien nahelegten, dass PTHrP nach BMP2-Stimulierung weiter stromabwärts als DLX3 induziert wird (160,171), wurde die Bedeutung von PTHrP für die PKA-Aktivierung im Folgenden detaillierter untersucht. Überraschenderweise konnte die unterdrückte Aktivität der Kinase nach siRNA-vermittelter Herunterregulierung von PTHLH nicht wieder erhöht werden, wenn die Zellen gleichzeitig mit extern zugeführtem PTHrP behandelt wurden (Abb. 34A). Darüber hinaus war nach Behandlung der Zellen mit PTH (7-34), um den membranständigen PTH/PTHrP-Rezeptor PTH1R zu hemmen (vgl. Kapitel 2.1.4), keine Regulierung der PKA-Aktivität (Abb. 34B) feststellbar, weshalb nahegelegt werden konnte, dass die endogene PTHrP-Expression in den Zellen für den Einfluss auf die PKA-Aktivierung verantwortlich war. Überdies konnte mittels Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen werden, dass PTHrP in DFCs insbesondere im Zellkern exprimiert wird (Abb. 34C).



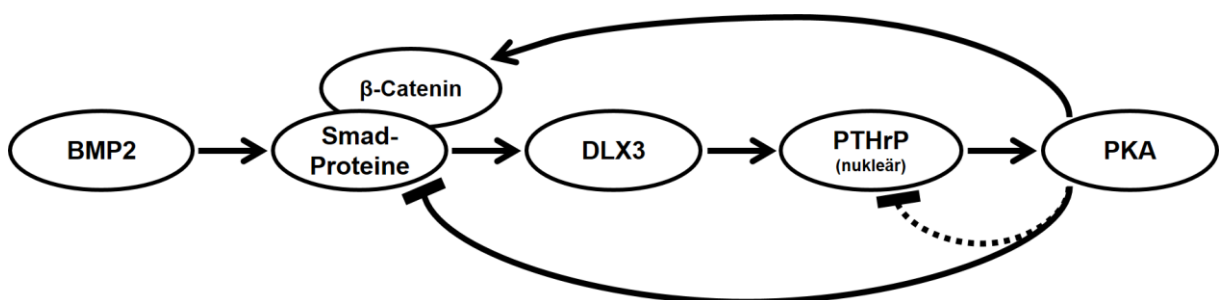
**Abb. 34: Die Aktivierung von PKA über PTHrP.** (A) DFCs wurden zwei Tage lang mit einer spezifischen siRNA gegen PTHLH (Gen für PTHrP) bzw. einer Kontroll-siRNA transfiziert und anschließend drei Tage lang mit BMP2-Medium oder DMEM (nur Kontroll-siRNA) behandelt. Außerdem wurden Zellen nach Transfektion mit siRNA gegen PTHLH mit 500 ng/mL PTHrP in BMP2-Medium stimuliert. Anschließend wurde die PKA-Aktivität gemessen. (B) DFCs wurden drei Tage lang mit BMP2-Medium behandelt und gleichzeitig mit 350 ng/ml PTH (7-34) stimuliert, bevor die PKA-Aktivität analysiert wurde. (C) Die Lokalisierung von PTHrP wurde in DFCs mittels Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen. Das Bild zeigt eine Überlagerung der Durchlichtaufnahme (Belichtungszeit 0,02 Sekunden) mit der Fluoreszenzaufnahme (Belichtungszeit 3 Sekunden) in 400-facher Vergrößerung. One-way ANOVA wurde angewandt zum Vergleich zwischen allen Gruppen des Experiments, mit anschließenden Tukey-Tests zum Vergleich zwischen BMP2-Medium und DMEM nach Transfektion mit Kontroll-siRNA sowie zwischen den verschiedenen Behandlungen in BMP2-Medium paarweise zueinander (A); T-Test wurde angewandt zum Vergleich zwischen PTH (7-34)-Behandlung und Kontrolle (B): \*\*  $p < 0,01$ . Die Ergebnisse dieser Abbildung wurden bereits 2022 veröffentlicht in der Zeitschrift „Archives of Oral Biology“ (356). Die Immunfluoreszenzfärbung (C) wurde von Frau Anja Reck durchgeführt.

### 3.3.5 Die Rückkopplung von PKA auf den BMP-Signalweg und PTHrP

Anschließend wurde ergänzend untersucht, wie sich eine Herunterregulierung von PKA durch eine siRNA gegen PRKACA auf den BMP-Signalweg und die Expression von PTHrP auswirkt. Dabei konnte eine signifikante Induktion der Proteinexpression von P-Smad1/5 und PTHrP festgestellt werden (Abb. 35), was einen negativen Rückkopplungsmechanismus durch PKA vermuten ließ. Die molekularen Mechanismen der PKA-Aktivierung durch BMP2 und den stromabwärts induzierten Proteinen sind in Abbildung 36 schematisch dargestellt. Die Ergebnisse des Kapitels 3.3 wurden zum Teil bereits 2022 in der Zeitschrift „Archives of Oral Biology“ publiziert (356).



**Abb. 35: Die Regulierung des BMP-Signalwegs und von PTHrP durch PKA.** DFCs wurden zwei Tage lang mit einer spezifischen siRNA gegen PRKACA (Gen für die katalytische Untereinheit  $\alpha$  von PKA) oder einer Kontroll-siRNA transfiziert und anschließend zwei Tage lang mit BMP2-Medium behandelt. Die Säulendiagramme zeigen die durch Western Blots ermittelte Proteinexpression von Ser463/465-phosphoryliertem Smad1/5 (**A**) und PTHrP (**B**) mit zugehörigen Blots sowie einem Blot von gesamtem Smad1 und den Quotienten zwischen phosphorylierter Form und Gesamtmenge („Phospho-Ratio“, **A**). T-Tests wurden angewandt zum Vergleich zwischen siRNA-Behandlung und Kontroll-siRNA: \*  $p < 0,05$ . Die Ergebnisse dieser Abbildung wurden bereits 2022 veröffentlicht in der Zeitschrift „Archives of Oral Biology“ (356).



**Abb. 36: BMP2 induziert die PKA-Aktivität über endogenes PTHrP.** Schematische Darstellung der Aktivierung von PKA durch BMP2 über die Expression von intrazellulärem PTHrP mit negativer Rückkopplung von PKA auf den BMP-Signalweg.

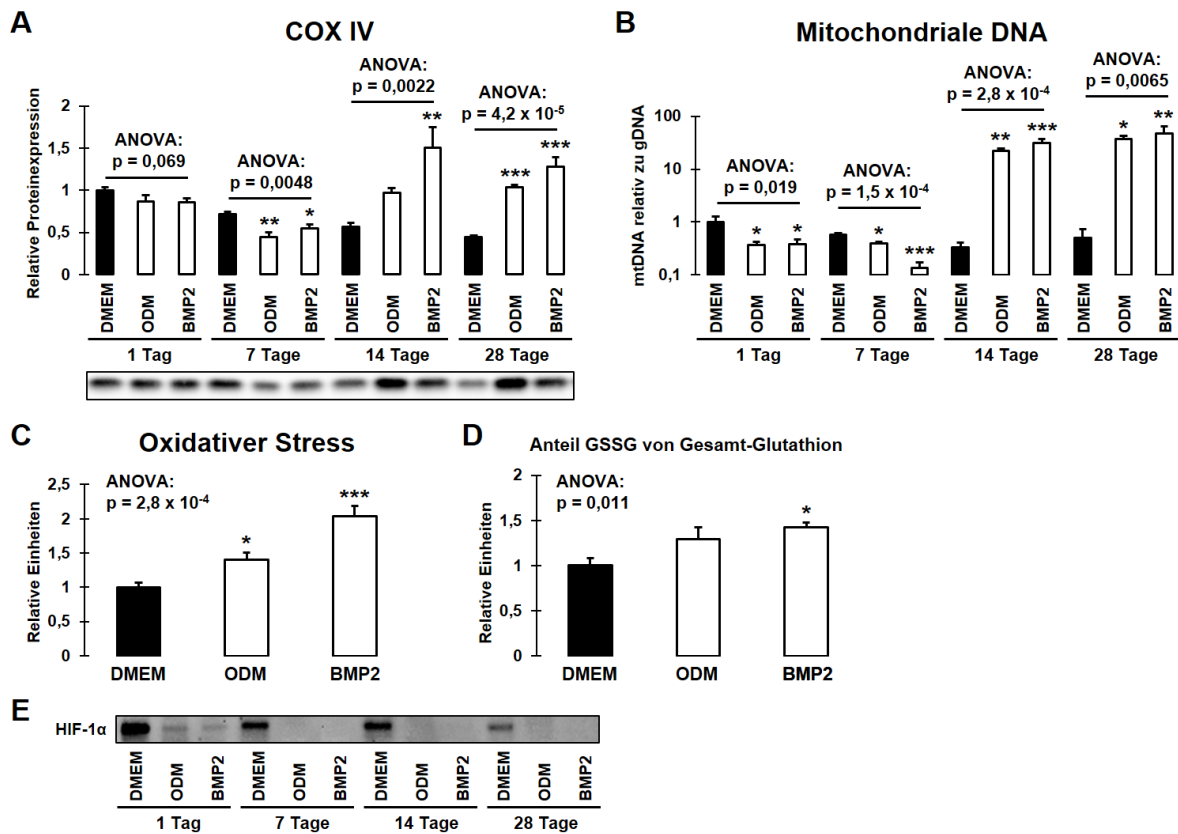
### **3.4 Klassische PKCs regulieren den mitochondrialen Metabolismus und oxidativen Stress während der osteogenen Differenzierung von DFCs**

#### **3.4.1 Die Regulierung des Energiemetabolismus während der osteogenen Differenzierung von DFCs**

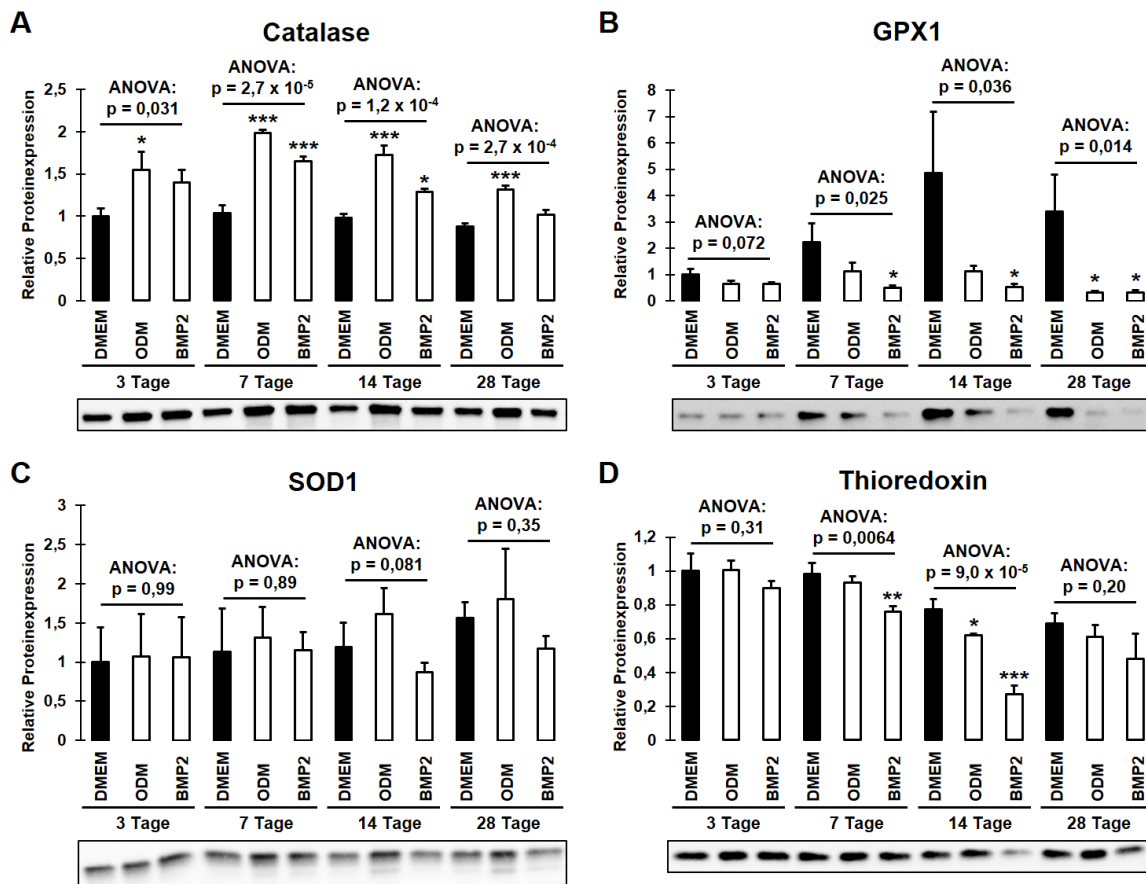
Zuletzt sollten schließlich die Rolle des Energiemetabolismus und mögliche Zusammenhänge mit PKC während der osteogenen Differenzierung von DFCs untersucht werden. Die Ergebnisse zeigten, dass die Proteinexpression des mitochondrialen Markers COX IV (engl. *Cytochrome c oxidase subunit 4*) zu frühen Zeitpunkten der Osteogenese herunterreguliert wurde, während sie in der späteren Phase deutlich anstieg (Abb. 37A). Die Menge mitochondrialer DNA relativ zu genomischer DNA wurde analog reguliert (Abb. 37B). Parallel konnte eine Erhöhung des oxidativen Stresses (Abb. 37C) und des relativen Anteils von oxidiertem an gesamtem Glutathion (Abb. 37D) in den Zellen zu frühen Zeitpunkten nach Induktion der Differenzierung festgestellt werden. Außerdem war während des gesamten Verlaufs der Osteogenese die Expression der  $\alpha$ -Untereinheit des Transkriptionsfaktors HIF-1 (Hypoxie-induzierter Faktor 1), welcher von Zellen bei Sauerstoffmangel induziert wird (357), deutlich herunterreguliert (Abb. 37E). Auffällig war, dass die untersuchten Marker des Energiehaushalts und oxidativen Stresses durch die beiden Differenzierungsmedien mit Dexamethason und BMP2 sehr ähnlich reguliert wurden.

#### **3.4.2 Die Regulierung von Proteinen zur Neutralisierung von oxidativem Stress während der osteogenen Differenzierung von DFCs**

Aufgrund der Induktion des oxidativen Stresses während der osteogenen Differenzierung von DFCs wurde als Nächstes die Expression der Proteine Catalase, GPX1 (Glutathionperoxidase 1), SOD1 (Superoxiddismutase 1) und Thioredoxin untersucht, welche eine Rolle bei der zellulären Antwort auf oxidativen Stress spielen und diesen neutralisieren können (358). Dabei zeigte sich, dass die Expression des Enzyms Catalase im gesamten Verlauf der Osteogenese hochreguliert (Abb. 38A) und die Expression von GPX1 gehemmt wurde (Abb. 38B). Im Gegensatz dazu wurde das Protein SOD1 nicht reguliert (Abb. 38C), während die Expression von Thioredoxin zunächst ebenfalls nicht beeinflusst wurde und erst nach sieben und 14 Tagen herunterreguliert war (Abb. 38D).

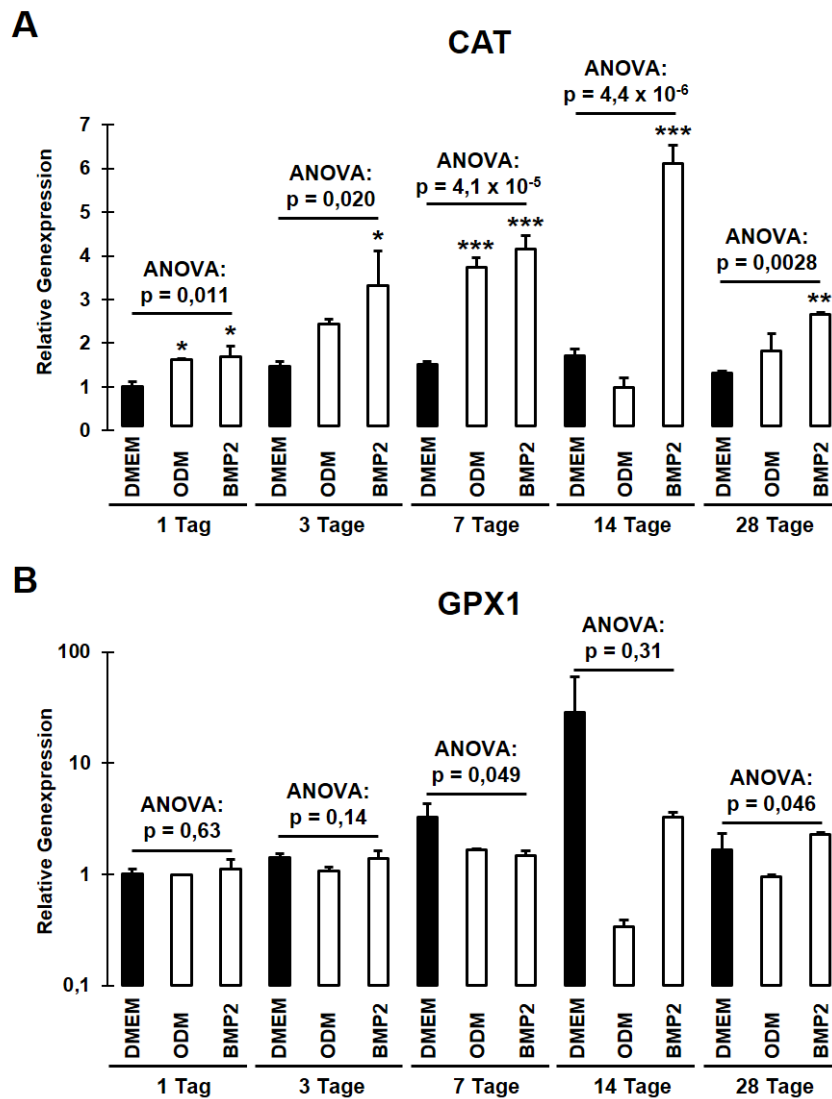


**Abb. 37: Die Regulierung des mitochondrialen Stoffwechsels und des oxidativen Stresses während der osteogenen Differenzierung.** DFCs wurden bis zu 28 Tage lang (A, B, E), drei Tage lang (C) oder sieben Tage lang (D) mit ODM oder BMP2-Medium osteogen differenziert bzw. in Kontrollmedium (DMEM) kultiviert. Anschließend wurden mit Hilfe von Western Blots die Proteinexpression von COX IV (A) und HIF-1 $\alpha$  (E,  $n = 1$ ), mittels qPCR die Menge mitochondrialer DNA (mtDNA) relativ zu genomischer DNA (gDNA, B), mittels Durchflusszytometrie der oxidative Stress in den Zellen (C) sowie mittels Glutathion-Assay der Anteil von oxidiertem (GSSG) an gesamtem Glutathion (D) analysiert. One-way ANOVA wurde angewandt zum Vergleich zwischen den verschiedenen Medien zum gleichen Zeitpunkt, mit anschließenden Tukey-Tests zum Vergleich zwischen ODM bzw. BMP2-Medium und DMEM (A – D): \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . Die Ergebnisse dieser Abbildung wurden teilweise bereits 2022 veröffentlicht in der Zeitschrift „Stem Cells International“ (359).



**Abb. 38: Die Regulierung von Proteinen zur Abwehr gegen oxidativen Stress während der osteogenen Differenzierung.** DFCs wurden bis zu 28 Tage lang mit ODM oder BMP2-Medium osteogen differenziert bzw. in Kontrollmedium (DMEM) kultiviert. Anschließend wurde die Proteinexpression von Catalase (A), GPX1 (B), SOD1 (C) und Thioredoxin (D) durch Western Blots analysiert. One-way ANOVA wurde angewandt zum Vergleich zwischen den verschiedenen Medien zum gleichen Zeitpunkt, mit anschließenden Tukey-Tests zum Vergleich zwischen ODM bzw. BMP2-Medium und DMEM: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

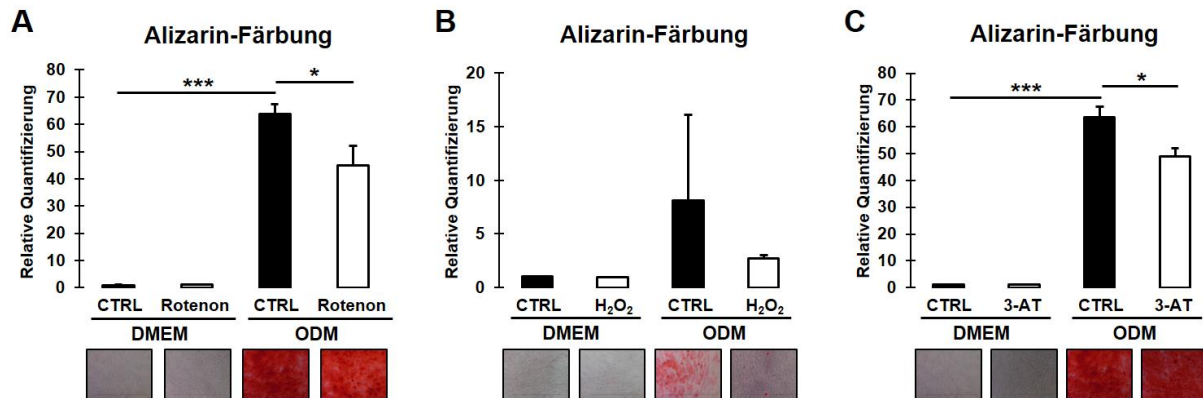
Passend zu den Ergebnissen der Western Blots wurde die Genexpression von CAT (Gen für Catalase) während der Differenzierung ebenfalls induziert (Abb. 39A), wohingegen die Genexpression von GPX1 herunterreguliert wurde (Abb. 39B). Daraufhin wurde der Einfluss einer Manipulierung des mitochondrialen Metabolismus und des oxidativen Stesses auf die osteogene Differenzierung von DFCs evaluiert. Da die Regulierung der untersuchten Marker im Laufe der Osteogenese mit beiden Differenzierungsmedien sehr ähnlich war, wurden die Zellen bei den folgenden Experimenten nur mit Dexamethason osteogen induziert. Dabei konnte zunächst festgestellt werden, dass eine Inhibition des mitochondrialen Stoffwechsels durch Rotenon (vgl. Kapitel



**Abb. 39: Die Regulierung der Genexpression von GPX1 und CAT während der osteogenen Differenzierung.** DFCs wurden bis zu 28 Tage lang mit ODM oder BMP2-Medium osteogen differenziert bzw. in Kontrollmedium (DMEM) kultiviert. Anschließend wurde die Genexpression von CAT (Gen für Catalase, **A**) und GPX1 (**B**) mittels RT-qPCR analysiert. One-way ANOVA wurde angewandt zum Vergleich zwischen den verschiedenen Medien zum gleichen Zeitpunkt, mit anschließenden Tukey-Tests zum Vergleich zwischen ODM bzw. BMP2-Medium und DMEM: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

2.1.4) zu einer signifikanten Herunterregulierung des Mineralisierungsvermögens osteogen induzierter DFCs führte (Abb. 40A). Um den oxidativen Stress in den Zellen zu stimulieren, wurden diese außerdem mit einer nicht-toxischen Konzentration Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) behandelt, was ebenfalls zu einer deutlichen – aufgrund der großen Abweichung in der Kontrollgruppe aber nicht signifikanten – Herunterregulierung der

Mineralisierung nach osteogener Induktion führte (Abb. 40B). Ferner wurde die Bedeutung der Catalase für die Differenzierung evaluiert, indem DFCs mit dem Catalase-Inhibitor 3-AT (3-Amino-1,2,4-triazol, vgl. Kapitel 2.1.4) behandelt wurden, wodurch das Mineralisierungsvermögen differenzierender Zellen ebenso gehemmt wurde (Abb. 40C).

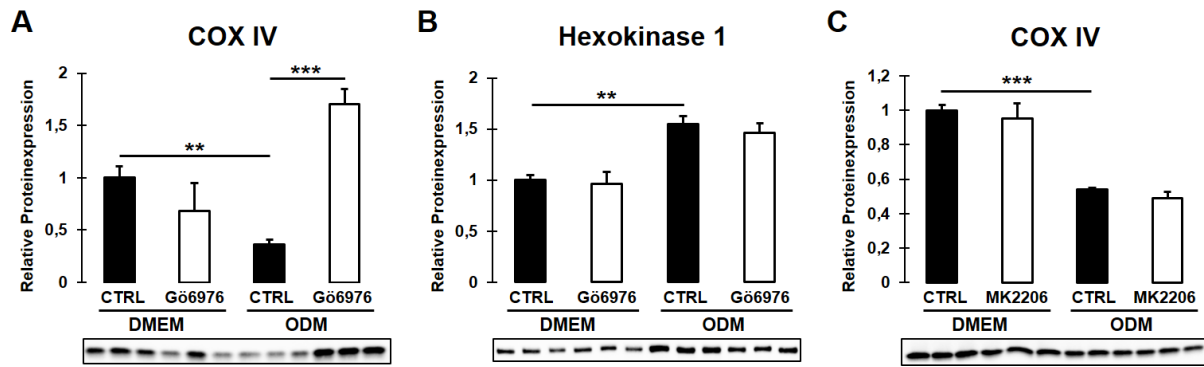


**Abb. 40: Die Regulierung der osteogenen Differenzierung von DFCs nach Manipulation des mitochondrialen Metabolismus und oxidativen Stresses.** DFCs wurden 28 Tage lang mit ODM osteogen differenziert bzw. in Kontrollmedium (DMEM) kultiviert und gleichzeitig mit 100 nM des Mitochondrien-Inhibitors Rotenon (A), 4  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (B) oder 10 mM des Catalase-Inhibitors 3-AT (C) behandelt, bevor die Mineralisierung extrazellulärer Matrix mittels Alizarin-Färbung untersucht wurde. T-Tests wurden angewandt zum Vergleich zwischen ODM und DMEM sowie zwischen Rotenon-, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- bzw. 3-AT-Behandlung und Kontrolle im selben Medium: \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 3.4.3 Die Regulierung des mitochondrialen Metabolismus durch klassische PKCs und Akt

Als Nächstes wurde der Einfluss von klassischen PKCs auf den Energiemetabolismus untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Expression des mitochondrialen Markers COX IV nach Behandlung mit dem PKC-Inhibitor Gö6976 in differenzierenden DFCs deutlich hochreguliert wurde (Abb. 41A), wohingegen keine Beeinflussung des Glykolyse-Markers Hexokinase 1 feststellbar war (Abb. 41B). Um zu evaluieren, ob die Stimulierung der Mitochondrien nach PKC-Inhibition durch Akt vermittelt wird, wurde außerdem die Expression von COX IV nach Akt-Hemmung untersucht, wobei allerdings keine Regulierung gefunden wurde (Abb. 41C).



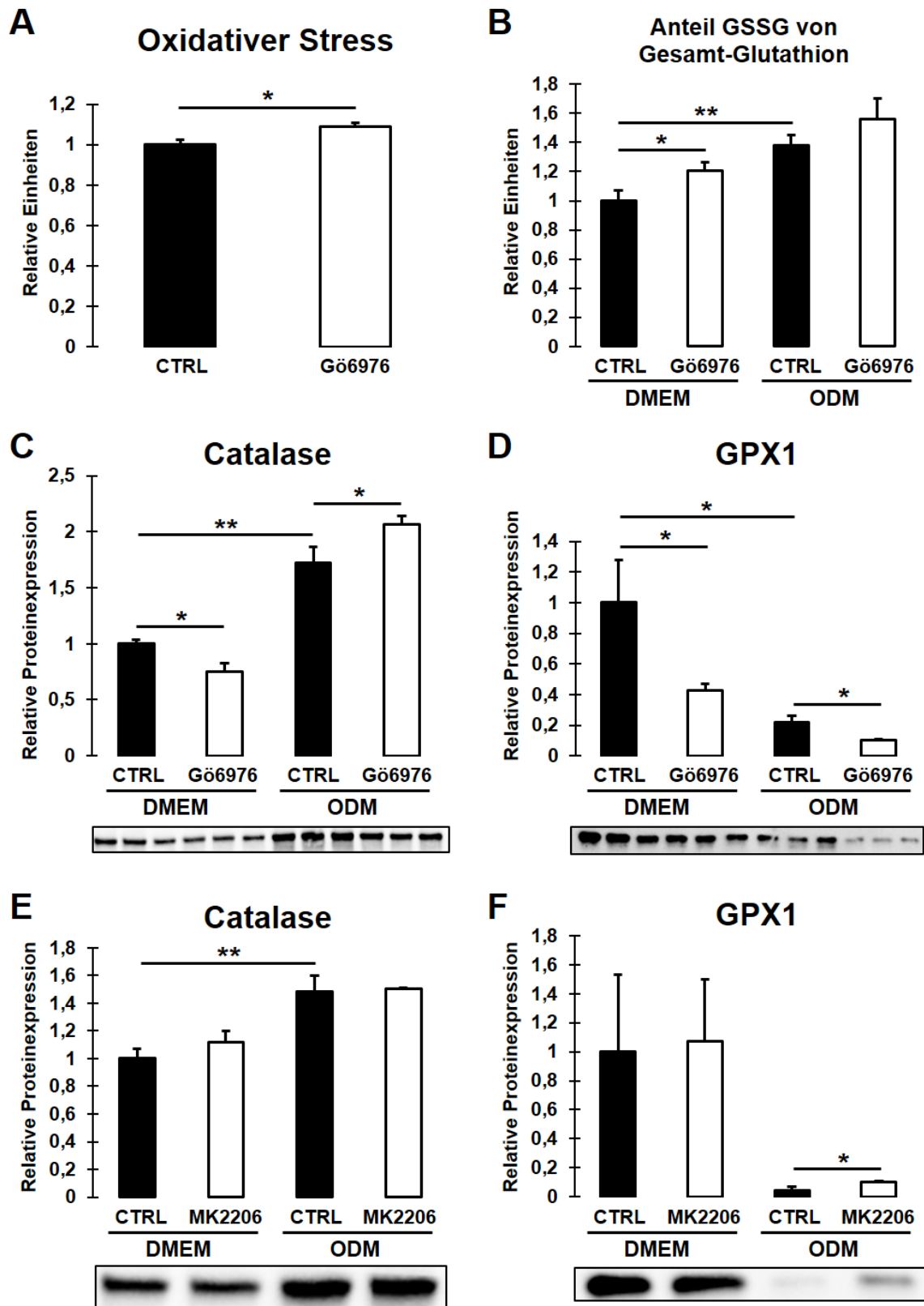


**Abb. 41: Die Regulierung des Energiemetabolismus durch klassische PKCs. (A – C)** DFCs wurden sieben (A, B) bzw. acht (C) Tage lang mit ODM osteogen differenziert bzw. in Kontrollmedium (DMEM) kultiviert und gleichzeitig mit 100 nM des Inhibitors klassischer PKCs Gö6976 (A, B) oder 200 nM des Akt-Inhibitors MK2206 (C) behandelt, bevor die Proteinexpression von COX IV (A, C) bzw. Hexokinase 1 (B) durch Western Blots ermittelt wurde. T-Tests wurden angewandt zum Vergleich zwischen ODM und DMEM sowie zwischen Inhibitor-Behandlung und Kontrolle im selben Medium: \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### 3.4.4 Die Regulierung des oxidativen Stresses durch klassische PKCs und Akt

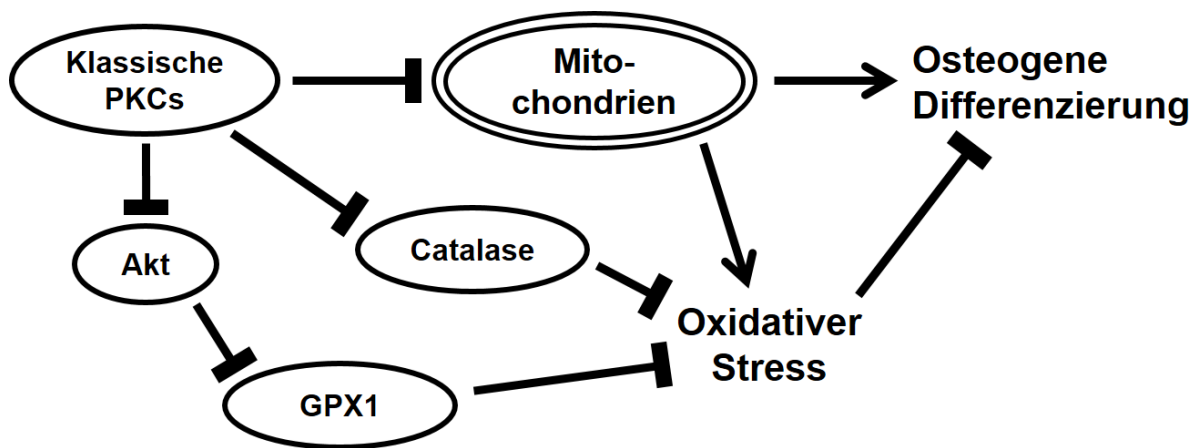
Darüber hinaus wurde evaluiert, inwiefern klassische PKCs den oxidativen Stress in DFCs beeinflussen. Dabei zeigte sich zunächst, dass der oxidative Stress und der Anteil von oxidiertem an gesamtem Glutathion nach PKC-Inhibition erhöht waren (Abb. 42A, B). Daraufhin wurde untersucht, wie Proteine zur Abwehr des oxidativen Stresses durch klassische PKCs und möglicherweise stromabwärts durch Akt reguliert werden. Dabei konnte eine Induktion der Catalase-Expression und eine Unterdrückung der Expression von GPX1 nach PKC-Inhibitor in differenzierenden Zellen beobachtet werden (Abb. 42C, D). Durch Inhibition der stromabwärts von PKC regulierten Kinase Akt konnte allerdings keine Regulierung der Catalase, sondern nur eine Unterstützung der GPX1-Expression in differenzierenden Zellen festgestellt werden (Abb. 42E, F).

Die Ergebnisse legten somit nahe, dass klassische PKCs die osteogene Differenzierung von DFCs unter anderem durch einen inhibitorischen Einfluss auf den mitochondrialen Stoffwechsel regulieren, während als Nebenprodukt oxidativer Stress entsteht, welcher nach PKC-Inhibitor durch eine Induktion der Catalase zum Teil neutralisiert wird (schematisch dargestellt in Abb. 43). Die Ergebnisse des Kapitels 3.4 wurden zum Teil bereits 2022 in der Zeitschrift „Stem Cells International“ publiziert (359).



**Abb. 42: Die Regulierung des oxidativen Stresses durch klassische PKCs und Akt.** (A) DFCs wurden 24 Stunden lang in DMEM mit bzw. ohne 100 nM Gö6976 kultiviert und der oxidative Stress mittels Durchflusszytometrie analysiert. (B) DFCs wurden sieben Tage lang in DMEM oder ODM kultiviert und gleichzeitig mit 100 nM Gö6976 behandelt, bevor der Anteil (Fortsetzung auf nächster Seite)

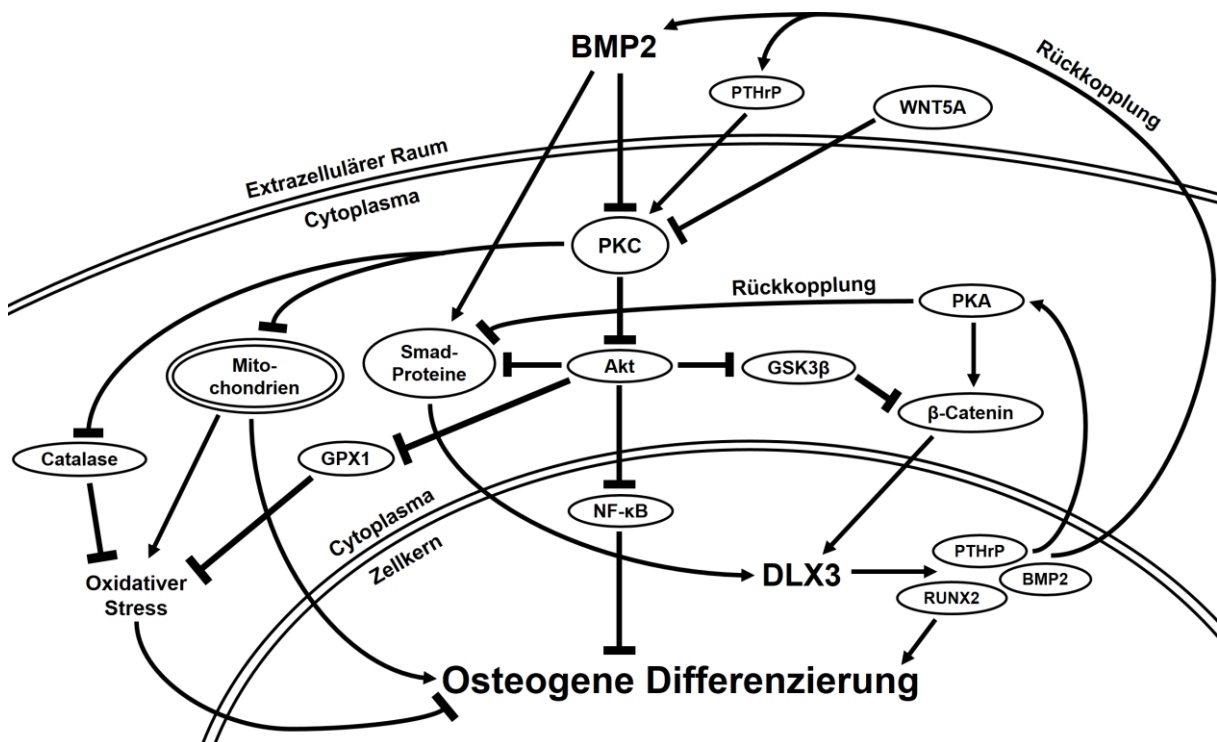
von oxidiertem (GSSG) an gesamtem Glutathion mittels Glutathion-Assay bestimmt wurde. (C – F) DFCs wurden sieben (C, D) bzw. acht (E, F) Tage lang mit ODM osteogen differenziert oder in DMEM kultiviert und gleichzeitig mit 100 nM des Inhibitors klassischer PKCs Gö6976 (C, D) oder 200 nM des Akt-Inhibitors MK2206 (E, F) behandelt, bevor die Proteinexpression von Catalase (C, E) und GPX1 (D, F) durch Western Blots ermittelt wurde. T-Tests wurden angewandt zum Vergleich zwischen ODM und DMEM (B – F) sowie zwischen Inhibitor-Behandlung und Kontrolle im selben Medium (A – F): \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ . Aufgrund von Unterschieden in der Gesamtproteinmenge erscheint die relative Quantifizierung der Catalase-Expression nach Gö6976-Behandlung abweichend vom Bild des Blots (C), weshalb in der Abbildung A-5 des Anhangs ergänzend ein Bild des Gesamtproteins dargestellt ist.



**Abb. 43: Klassische PKCs hemmen die osteogene Differenzierung von DFCs durch Regulierung der Mitochondrien.** Schematische Darstellung der Regulierung von Mitochondrien und des oxidativen Stresses durch klassische PKCs während der osteogenen Differenzierung von DFCs.

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die molekularen Mechanismen untersucht, über welche klassische PKC-Isoformen die osteogene Differenzierung von DFCs regulieren, indem Interaktionen mit möglichen Zielproteinen und Signalwegen evaluiert wurden. Die durchgeführten Experimente konnten zeigen, dass klassische PKCs in DFCs über PTHrP stimuliert und durch WNT5A gehemmt werden können, während sie die Osteogenese insbesondere über eine Regulierung der Kinase Akt inhibieren, wobei stromabwärts die Aktivität von  $\beta$ -Catenin und der NF- $\kappa$ B-Signalweg beeinflusst werden. Des Weiteren unterdrücken klassische PKCs die Differenzierung über eine Manipulation des mitochondrialen Energiemetabolismus und des oxidativen Stresses in den Zellen. Dahingegen sind klassische PKCs nicht direkt an der Aktivierung der Kinase PKA stromabwärts von BMP2 beteiligt, welche stattdessen von der endogenen Expression des Proteins PTHrP abhängt. Die aufgezeigten molekularen Mechanismen ergänzen das zuvor beschriebene Modell der osteogenen Differenzierung von DFCs (vgl. Kapitel 1.4) und sind in Abbildung 44 schematisch dargestellt.



**Abb. 44: Die Regulierung der osteogenen Differenzierung von DFCs durch klassische PKCs.** Schematische Darstellung der molekularen Mechanismen während der osteogenen Differenzierung von DFCs mit den in dieser Arbeit hinzugewonnenen Erkenntnissen zur Rolle von PKC, welche die Ergebnisse vorheriger Studien (159,160,172) ergänzen.

## 4.1 Die Bedeutung von klassischen PKCs und Akt für die osteogene Differenzierung von DFCs

Während klassische PKC-Isoformen einen eindeutig inhibitorischen Einfluss auf die osteogene Differenzierung von DFCs ausüben, zeigten die Experimente eine vielseitigere Rolle der stromabwärts regulierten Kinase Akt. Auffällig war insbesondere, dass eine Inhibition von Akt die Mineralisierung nach Induktion mit Dexamethason im Vergleich zu BMP2 gegensätzlich regulierte. Außerdem wurde die endogene Aktivität der Kinase nur nach BMP2-induzierter Differenzierung signifikant unterdrückt. Die beobachteten Unterschiede könnten durch eine Wechselwirkung mit dem BMP-Signalweg bedingt sein, da eine Akt-Überaktivierung die Phosphorylierung von Smad1/5 hemmte. Im Gegensatz dazu konnte Akt in anderen Zelltypen positiv mit der Phosphorylierung von Smad1/5/8 assoziiert werden (360–362). Allerdings ist eine Grundaktivität der Kinase für den BMP-Signalweg in DFCs vermutlich ebenfalls notwendig, da in einer vorherigen Studie die Inhibition von Akt in diesen Zellen zur Herunterregulierung der Smad1/5-Phosphorylierung führte (178).

Des Weiteren konnte nach Hemmung klassischer PKCs in differenzierenden Zellen eine Stimulierung der sonst unterdrückten Akt-Aktivität beobachtet werden, was mit einer höheren Aktivität von  $\beta$ -Catenin und einer Hemmung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs einherging und somit die Differenzierung unterstützte. Eine weitere Akt-Stimulierung mit dem Aktivator SC-79 konnte die Mineralisierung jedoch nicht weiter verstärken und führte in Dexamethason-induzierten Zellen sogar zur deutlichen Hemmung der Differenzierung und dem Ausbleiben des stimulierenden Einflusses nach PKC-Inhibition. Die Beobachtungen legen nahe, dass die Aktivität von Akt für eine erfolgreiche Osteogenese zwar benötigt wird, wie bisherige Studien an DFCs und anderen Stamm-/Vorläuferzellen ebenfalls zeigten (178,363–365), aber gleichzeitig nicht zu hoch sein darf. Somit scheint es eine für die Differenzierung von DFCs optimale Akt-Aktivität zu geben, die für BMP2-induzierte Zellen aufgrund der Wechselwirkungen mit Smad1/5 niedriger ist als nach Behandlung mit Dexamethason. Dies wird ferner durch die Beobachtung gestützt, dass das Ausmaß der Akt-Stimulierung nach PKC-Inhibition in BMP2-behandelten DFCs geringer war. Dabei lässt sich vermuten, dass eine Hemmung klassischer PKCs die Aktivität von Akt in Richtung dieses optimalen Werts beeinflusst, was die Herunterregulierung der sonst eher hohen Aktivität in Kontrollmedium und die Stimulierung der inhibierten Aktivität in den Differenzierungsmedien

erklären würde. Darüber hinaus konnten Hung et al. zeigen, dass die endogene Aktivität von Akt in epithelialen MCF10A (engl. *Michigan Cancer Foundation-10A*)-Zellen stark fluktuiert, während eine Behandlung mit Insulin zu einer erhöhten, aber kaum noch fluktuiierenden Aktivität der Kinase führte (366). Da Insulin die osteogene Differenzierung von Stamm-/Vorläuferzellen induziert (82,87), könnte eine stabile Akt-Aktivität auf einem optimalen Niveau eine allgemeine, wichtige Voraussetzung für den erfolgreichen Ablauf der Osteogenese sein. Dabei ist naheliegend, dass eine Hemmung klassischer PKCs ebenso die Aktivität von Akt stabilisiert und Schwankungen unterdrückt.

Obwohl das Mineralisierungspotential von DFCs in BMP2-Differenzierungsmedium durch Akt-Inhibition unterstützt werden konnte, wurden die ALP-Aktivität sowie die Genexpression osteogener Marker nicht stimuliert und teilweise sogar gehemmt. Dagegen führte eine Akt-Überaktivierung zwar zur deutlichen Hemmung der Mineralisierung, aber zu keiner signifikanten Herunterregulierung der früheren osteogenen Marker. Somit kann angenommen werden, dass der Einfluss von Akt auf die Osteogenese weniger die Induktion der Differenzierung betrifft, als vielmehr biologische Prozesse und Signalwege, welche die späte Differenzierungsphase und die Funktionalität von Osteoblasten steuern. Passenderweise konnte gezeigt werden, dass sich eine Inhibition klassischer PKCs ebenfalls erst in späteren Phasen auf die osteogene Differenzierung von DFCs auswirkt und in der ersten Differenzierungswoche keinen Einfluss auf das spätere Mineralisierungsvermögen der Zellen hat (196).

Da nach kurzzeitiger PKC-Inhibition zunächst eine Hemmung von Akt feststellbar war, ist der Einfluss klassischer PKCs auf Akt vermutlich indirekt und von weiteren Faktoren während der Differenzierung abhängig. Möglich wäre beispielsweise eine Beteiligung der Kinase Src, die während der Osteogenese reguliert wird (367), von PKC aktiviert werden kann (368,369) und selbst schließlich Akt stimuliert (370). Des Weiteren legte eine Studie von Yang et al. nahe, dass PKC $\alpha$  außerdem Akt direkt phosphorylieren kann (371). Demnach könnten sowohl eine direkte Phosphorylierung als auch eine indirekte Beeinflussung über weitere Mediatoren an der PKC-abhängigen Regulierung von Akt beteiligt sein, deren jeweilige Einflussnahme durch äußere Bedingungen wie beispielsweise die Induktion der Differenzierung verändert wird. Dadurch könnte erklärt werden, warum klassische PKCs in einigen Studien positiv mit der Aktivierung von Akt assoziiert wurden (372,373), während sie Akt in anderen Experimenten hemmten (374,375).

## 4.2 Die Regulierung von $\beta$ -Catenin während der osteogenen Differenzierung von DFCs

Eines der stromabwärts von Akt regulierten Proteine in DFCs war  $\beta$ -Catenin, welches eine wichtige Rolle für die osteogene Differenzierung der Zellen spielt (160). Dabei unterstützte Akt die Aktivität dieses Proteins indirekt durch eine inaktivierende Phosphorylierung von GSK3 $\beta$ , woraufhin der Abbau von  $\beta$ -Catenin gehemmt wurde (110,344). Entsprechend konnte dessen Expression im Zellkern durch eine Akt-Inhibition erhöht werden. Passenderweise zeigten Experimente an nicht-dentalen Stamm-/Vorläuferzellen ebenfalls, dass Akt die Aktivität von  $\beta$ -Catenin über GSK3 $\beta$  stimuliert (376).

Überraschenderweise konnten die Ergebnisse außerdem einen kurzfristigen direkten Einfluss von Akt auf die Aktivität von  $\beta$ -Catenin nahelegen, da diese nach 15 Minuten Akt-Überaktivierung gehemmt und nach 15 Minuten Akt-Inhibition tendenziell erhöht war. Allerdings konnte nach 30 Minuten sowie nach einer Stunde keine Regulierung mehr beobachtet werden. Denkbar wäre, dass eine Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin nahe des N-Terminus, welche eigentlich durch die Kinasen CK1 und GSK3 $\beta$  vermittelt wird (109,110), durch übermäßige Akt-Aktivierung ebenfalls erfolgen könnte, aber unter physiologischen Umständen schnell gegenreguliert wird und daher kaum Bedeutung hat. Im Gegensatz dazu berichteten Fang et al. von einer C-terminalen Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin durch Akt, welche die Stabilität des Proteins nachhaltig erhöht, ähnlich der C-terminalen Phosphorylierung durch die Kinase PKA (160,342).

Während Akt und PKA die Aktivität von  $\beta$ -Catenin unterstützen, zeigten die durchgeführten Experimente einen hemmenden Einfluss von klassischen PKCs auf die nukleäre Expression von aktivem  $\beta$ -Catenin. Passend hierzu konnte eine Studie an HEK293 (engl. *Human embryonic kidney 293*)-Zellen zeigen, dass PKC die N-terminale Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin und somit dessen Abbau unterstützt, wobei sogar eine direkte Phosphorylierung durch die Kinase nachgewiesen wurde (377). Weitere Studien legten nahe, dass die klassische Isoform PKC $\alpha$  für die direkte Phosphorylierung verantwortlich ist (378,379). Dahingegen konnte in DFCs keine direkte Phosphorylierung von  $\beta$ -Catenin durch klassische PKC-Isoformen festgestellt werden, weshalb die Regulierung in DFCs indirekt, wahrscheinlich vor allem durch Stimulierung von Akt, erfolgt. Darüber hinaus berichteten Studien von einer direkten Phosphorylierung des Proteins GSK3 $\beta$  durch klassische PKCs (380,381), was für die Regulierung von  $\beta$ -Catenin in DFCs ebenfalls eine Rolle spielen könnte.

Die durchgeführten Experimente lassen vermuten, dass eine Hemmung klassischer PKCs in DFCs insbesondere die Translokalisierung von  $\beta$ -Catenin in den Zellkern stimuliert, da die Expression des Proteins in gesamten Zellen zeitgleich herunterreguliert wurde. Unklar ist allerdings, warum die nukleäre Expression des Proteins bei osteogener Induktion mit BMP2 nicht durch PKC-Inhibition erhöht werden konnte. Möglicherweise unterstützte die BMP2-Behandlung – durch Aktivierung von PKA – bereits frühzeitig die Aktivität von  $\beta$ -Catenin und dessen Translokalisierung in den Zellkern ausreichend, sodass keine weitere Stimulierung mehr benötigt wurde. Darüber hinaus legten Versuche von Viale-Bouroncle et al. nahe, dass die Lokalisierung von  $\beta$ -Catenin im Zellkern zwar erforderlich, aber nicht ausreichend ist, um die Prozesse stromabwärts zu stimulieren, da eine gleichzeitige Behandlung von DFCs mit BMP2 und WNT3A zwar zu einer höheren nukleären Expression von  $\beta$ -Catenin verglichen mit alleiniger BMP2-Stimulierung führte, aber das Zielgen DLX3 nur durch BMP2, nicht aber durch WNT3A induziert werden konnte (160). Während  $\beta$ -Catenin zu Beginn der osteogenen Differenzierung wichtig ist, könnte das Protein die späteren Differenzierungsphasen in DFCs möglicherweise sogar hemmen, da in diesem Zeitraum die endogene Expression und Aktivität stark herunterreguliert waren. Passenderweise konnte im Mausmodell festgestellt werden, dass eine konstitutive Aktivierung von  $\beta$ -Catenin zwar die Expression von Osterix und ALP in Osteoblasten erhöht, aber die Mineralisierung und die Expression des späten Differenzierungsmarkers Osteocalcin unterdrückt (382).

Die Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin über den PKC/Akt/GSK3 $\beta$ -Signalweg stellt neben der Phosphorylierung durch PKA einen weiteren Mechanismus dar, über welchen die Aktivität des Proteins in DFCs unabhängig vom kanonischen Wnt-Signalweg unterstützt wird. Außerdem konnte eine Verknüpfung zum nicht-kanonischen Wnt-Signalweg hergestellt werden, da die Herunterregulierung von WNT5A die PKC-Aktivierung stimulierte. Folglich sollte WNT5A durch Hemmung von PKC die Osteogenese eigentlich unterstützen, allerdings konnten frühere Experimente keinen Einfluss auf die Differenzierung von DFCs nachweisen (168). Dahingegen konnte eine Studie an humanen ADSCs einen solchen induzierenden Einfluss von WNT5A mittels PKC auf die Osteogenese zeigen (117), während WNT5A in murinen DFCs ebenfalls positiv mit der Differenzierung assoziiert wurde (166). Somit lässt sich vermuten, dass die Aktivierung von PKC in humanen DFCs vor allem von anderen Faktoren abhängig ist wie beispielsweise der Expression von PTHrP, dessen Herunterregulierung die PKC-Aktivität sowie



die Expression des stromabwärts induzierten Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B stark hemmte.

### 4.3 Die Rolle des NF- $\kappa$ B-Signalwegs in DFCs

Während die Bedeutung von  $\beta$ -Catenin für die osteogene Differenzierung bereits zuvor bekannt war, ist der hemmende Einfluss durch NF- $\kappa$ B ein neu entdeckter Mechanismus in DFCs. Eine Steuerung der Osteogenese durch NF- $\kappa$ B wurde zwar schon in anderen Stamm-/Vorläuferzellen gezeigt, jedoch unterschied sich der Einfluss interessanterweise in Abhängigkeit des Zellursprungs. So wurde die osteogene Differenzierung in PDLSCs und ADSCs durch NF- $\kappa$ B gehemmt (347,383–386), wohingegen der Transkriptionsfaktor die Differenzierung von SCAPs und BMMSCs unterstützte (387–391). Darüber hinaus wird die Aktivität von NF- $\kappa$ B für die osteogene Differenzierung von DPSCs benötigt (346). Demnach unterscheidet sich die Wirkung von NF- $\kappa$ B auf die Differenzierung selbst zwischen verschiedenen Stamm-/Vorläuferzellen aus Zahn- gewebe. Weil NF- $\kappa$ B aber zudem eine bedeutende Rolle für den Zahndurchbruch spielt (51,392), könnte dessen Herunterregulierung in DFCs – anders als bei SCAPs und DPSCs – wichtig sein, um die Osteoklasten-stimulierende Wirkung zu unterdrücken und die Osteogenese zu ermöglichen. Da das parodontale Ligament aus dem dentalen Follikel hervorgeht, ist es naheliegend, dass NF- $\kappa$ B in PDLSCs eine ähnliche Rolle übernimmt.

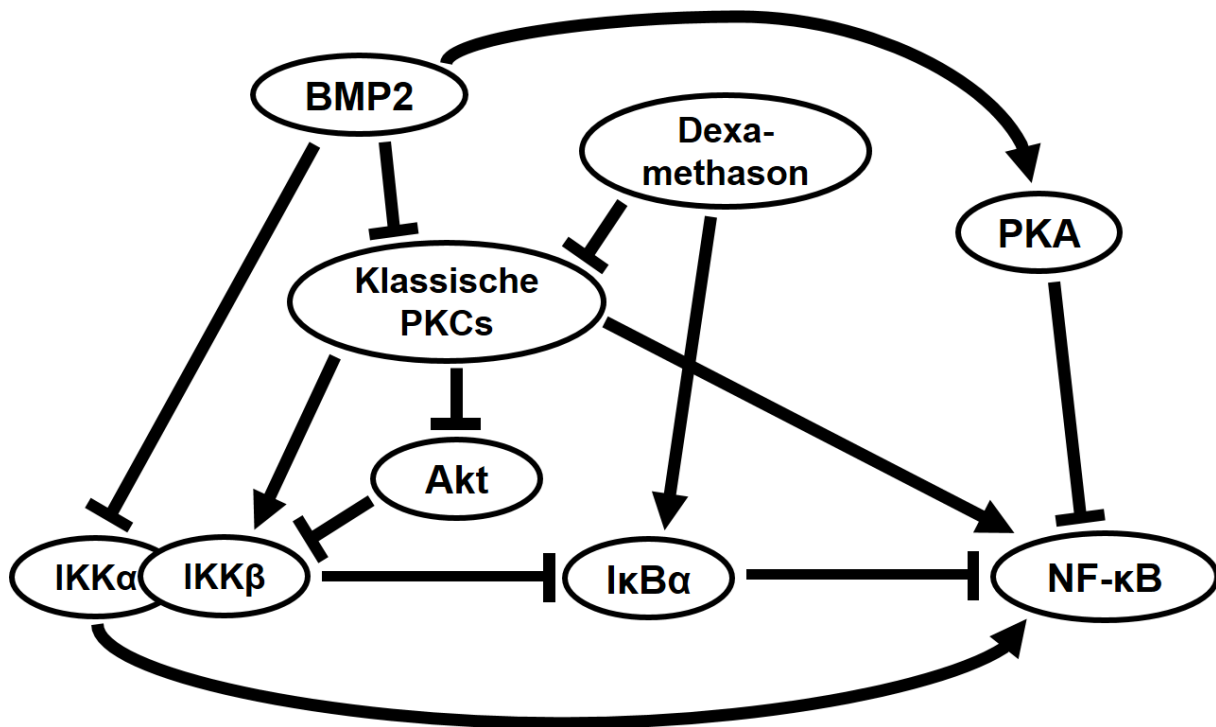
Dabei war eine Herunterregulierung von NF- $\kappa$ B in DFCs zumindest bei osteogener Induktion mit dem Glucocorticoid Dexamethason nicht überraschend, da bereits bekannt war, dass die Aktivität des Transkriptionsfaktors nach Glucocorticoid-Stimulierung durch eine vermehrte Synthese des regulatorischen Proteins I $\kappa$ B $\alpha$  gehemmt wird (393). Passenderweise konnte eine höhere Expression von I $\kappa$ B $\alpha$  in Dexamethason-induzierten DFCs nachgewiesen werden. Viel interessanter hingegen war die starke Herunterregulierung von NF- $\kappa$ B nach Behandlung mit BMP2. Da die Expression des Transkriptionsfaktors und anderer Proteine des Signalwegs durch Inhibition klassischer PKCs deutlich gehemmt wurde, ist die Inhibition von NF- $\kappa$ B während der osteogenen Differenzierung wahrscheinlich unter anderem eine Folge der endogenen PKC-Herunterregulierung. Die Bedeutung klassischer PKCs für die Aktivität von NF- $\kappa$ B konnte zudem in mehreren Studien gezeigt werden. So wurde festgestellt, dass sowohl die IKK-Untereinheit  $\beta$  als auch die NF- $\kappa$ B-Untereinheit p65 direkt durch PKC $\alpha$

phosphoryliert werden können (394,395). Darüber hinaus konnte PKC $\beta$  positiv mit der Aktivierung von NF- $\kappa$ B und IKK assoziiert werden (396,397). Die Kinase IKK phosphoryliert mit ihren beiden katalytischen Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$  schließlich das regulatorische Protein I $\kappa$ B $\alpha$  und markiert es somit für den Abbau (352,353).

Da die Expression von I $\kappa$ B $\alpha$  durch BMP2 – im Gegensatz zu Dexamethason – nicht stimuliert, sondern sogar herunterreguliert wurde, scheinen sich die Mechanismen der Hemmung von NF- $\kappa$ B in den beiden verwendeten Differenzierungsmedien teilweise zu unterscheiden, weshalb neben PKC noch andere Faktoren beteiligt sein müssen. Dabei fällt insbesondere auf, dass die Expression der IKK-Untereinheit  $\alpha$  nur nach Stimulierung mit BMP2 gehemmt war, wobei die Phosphorylierung von IKK $\alpha/\beta$ , welche für die Aktivität der Kinase benötigt wird (353,354), durch beide osteogene Induktoren inhibiert wurde. Fraglich ist allerdings, warum die Hemmung von IKK nicht zur Akkumulation von I $\kappa$ B $\alpha$  in BMP2-induzierten DFCs führte und wie NF- $\kappa$ B ohne Induktion von I $\kappa$ B $\alpha$  inhibiert wurde. Senftleben et al. beschrieben einen alternativen Aktivierungsmechanismus, in welchem IKK $\alpha$  die Proteolyse der NF- $\kappa$ B-Untereinheit p100 in die aktive Untereinheit p52 stimuliert (398). Darüber hinaus konnte in verschiedenen Studien ein negativer Einfluss von PKA auf die NF- $\kappa$ B-Aktivität gezeigt werden (399–401). Die Herunterregulierung von IKK $\alpha$  und die Aktivierung von PKA nach BMP2-Behandlung könnten demnach eine wichtige Rolle für die Hemmung von NF- $\kappa$ B spielen. Die Ergebnisse legen nahe, dass die Aktivität von NF- $\kappa$ B in DFCs vor allem nach BMP2-Stimulierung weniger vom klassischen Aktivierungsweg über den Abbau von I $\kappa$ B $\alpha$  abhängt, sondern eher von Mechanismen der direkten NF- $\kappa$ B-Phosphorylierung durch beispielsweise klassische PKCs, PKA und IKK $\alpha$ .

Stromabwärts der PKC-Herunterregulierung könnte außerdem die Induktion der Kinase Akt an der Hemmung des Transkriptionsfaktors beteiligt sein, da der gesamte NF- $\kappa$ B-Signalweg durch Akt-Inhibition stimuliert wurde. Diese Beobachtung überrascht, da Akt in vergangenen Studien überwiegend positiv mit der Aktivierung von NF- $\kappa$ B assoziiert wurde (402–406). Darüber hinaus kann Akt die IKK-Untereinheit  $\alpha$  in Tumorzellen phosphorylieren und somit aktivieren (407). Der beobachtete inhibitorische Einfluss von Akt stellt möglicherweise einen neuartigen Mechanismus zur Regulierung von NF- $\kappa$ B dar, der auf DFCs begrenzt ist. Allerdings ist dieser Einfluss vermutlich nicht von großer Bedeutung für die Differenzierung der Zellen und die Regulierung

von NF- $\kappa$ B stromabwärts von klassischen PKCs eher von anderen Mechanismen abhängig, da die endogene Aktivität des Transkriptionsfaktors in BMP2-behandelten Zellen trotz geringer Expression von phosphoryliertem Akt gehemmt wurde. Abbildung 45 zeigt ein Modell der molekularen Mechanismen, über welche NF- $\kappa$ B während der osteogenen Differenzierung von DFCs gehemmt werden könnte, ausgehend von den Ergebnissen dieser Arbeit und anderer Studien.



**Abb. 45: Modell der Regulierung des NF- $\kappa$ B-Signalwegs während der osteogenen Differenzierung von DFCs.** Schematisches Modell der molekularen Mechanismen zur Regulierung von NF- $\kappa$ B während der osteogenen Differenzierung von DFCs ausgehend von den Ergebnissen dieser Arbeit und anderer Studien (352–354,393–401).

Aufgrund der zellabhängigen Unterschiede in der Regulierung der osteogenen Differenzierung durch NF- $\kappa$ B liegt nahe, dass der Transkriptionsfaktor die Osteogenese stromabwärts über verschiedene molekulare Mechanismen steuert. So konnten Hess et al. zeigen, dass eine Behandlung humaner BMMSCs mit TNF- $\alpha$  (engl. *Tumor necrosis factor alpha*) die Expression von BMP2 und ALP über NF- $\kappa$ B stimuliert (387). Dahingegen konnten Experimente an murinen Vorläuferzellen einen hemmenden Einfluss von NF- $\kappa$ B auf den BMP/Smad-Signalweg feststellen (408,409). Des Weiteren wurde in einer Studie das Protein  $\beta$ -Catenin durch IKK $\alpha$  stabilisiert (410), wohingegen der NF- $\kappa$ B-Signalweg in einer anderen Studie den Abbau von  $\beta$ -Catenin unterstützte

(411). In DFCs konnte ein hemmender Einfluss insbesondere auf die ALP-Aktivität, die Genexpression von COL1A2 und die Mineralisierung, aber keine Regulierung der Genexpression des frühen Markers RUNX2 nachgewiesen werden, wenn die Zellen mit dem PKC/NF- $\kappa$ B-Aktivator PMA behandelt wurden. Ähnlich wie klassische PKCs scheint NF- $\kappa$ B die Differenzierung von DFCs also erst in späteren Phasen zu beeinträchtigen, was außerdem die Annahme bestärkt, dass die Inhibition des Transkriptionsfaktors insbesondere auf die PKC-Herunterregulierung zurückzuführen ist. Eine Behandlung der Zellen mit Inhibitoren von NF- $\kappa$ B zeigte hingegen keine Auswirkung auf osteogene Marker, was aufgrund der ohnehin sehr niedrigen Aktivität von NF- $\kappa$ B während der Osteogenese aber nicht überraschend war. Allerdings ließ sich der hemmende Einfluss einer PKC/NF- $\kappa$ B-Überaktivierung auf die Mineralisierung durch gleichzeitige Behandlung mit einem Inhibitor der PKC-induzierten NF- $\kappa$ B-Aktivierung abschwächen. Da der beobachtete Unterschied jedoch sehr klein war, lässt sich vermuten, dass die Unterdrückung von NF- $\kappa$ B nur einen geringen Anteil am hemmenden Einfluss klassischer PKCs auf die Differenzierung besitzt.

Eine weitere interessante Beobachtung war, dass die Proliferation von DFCs durch NF- $\kappa$ B-Hemmung unterstützt wurde. Dies überrascht, da NF- $\kappa$ B in bisherigen Studien überwiegend positiv mit dem Zellzyklus assoziiert wurde (391,412–414) und beispielsweise die Expression von Cyclin D1 induzierte (415,416). Allerdings wurde unter bestimmten Umständen auch eine negative Regulierung der Zellproliferation durch den Transkriptionsfaktor beobachtet (417,418). Zudem konnten Wu et al. in Tumorzellen eine Aktivierung des Zellzyklus-hemmenden Proteins p53 durch NF- $\kappa$ B zeigen (419). Dabei ist naheliegend, dass die Regulierung der Zellproliferation stromaufwärts von NF- $\kappa$ B durch die Aktivität klassischer PKCs erfolgt, welche ebenfalls die Expression von Cyclin D1 und p53 beeinflussen können (234,235,238,239). Versuche an seneszenten DFCs konnten außerdem zeigen, dass p53 in diesen Zellen nicht nur die Proliferation, sondern auch die osteogene Differenzierung hemmt (420), weshalb die Regulierung dieser beiden Prozesse in DFCs möglicherweise mittels PKC und NF- $\kappa$ B eng verknüpft ist. Darüber hinaus ist NF- $\kappa$ B mit Entzündungsprozessen und der Entstehung von Parodontitis assoziiert (421–424), was einen weiteren Grund darstellen könnte, weshalb dessen Hemmung den erfolgreichen Ablauf der osteogenen Differenzierung unterstützt. Insgesamt betrachtet besitzt der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B eine

zentrale Rolle für biologische Prozesse im dentalen Follikel und ist sowohl an der Steuerung physiologischer Funktionen wie der Zelldifferenzierung und des Zahndurchbruchs als auch an pathologischen Prozessen beteiligt.

#### **4.4 Die Bedeutung von PTHrP und PKA für die osteogene Differenzierung von DFCs**

Während PKC und Akt die osteogene Differenzierung von DFCs erst in späteren Phasen beeinflussen, ist die stromabwärts von BMP2 induzierte Kinase PKA wesentlich an der Induktion der Osteogenese beteiligt (160). Die durchgeführten Experimente konnten aufweisen, dass das Protein PTHrP, dessen Expression stromabwärts vom BMP-Signalweg induziert wird, für die Aktivierung von PKA erforderlich ist. Diese Beobachtung steht im Einklang mit einer früheren Studie, in welcher die Genexpression von PTHLH und PRKAR1A (Gen für die regulatorische Untereinheit Typ I $\alpha$  von PKA) während der BMP2-stimulierten Differenzierung von DFCs zeitgleich induziert wurde (174). Auf die Bedeutung von intrazellulärem PTHrP für die Osteogenese von DFCs konnte bereits eine frühere Studie hinweisen, in welcher endogenes PTHrP die Expression osteogener Marker unterstützte (172). Passenderweise zeigte eine Studie am Mausmodell außerdem, dass die nukleäre Translokalisierungsdomäne und die C-terminale Domäne von PTHrP für die korrekte Entwicklung von Knochen und Zähnen benötigt werden (425).

Entgegen bisheriger Studien, die eine Aktivierung von PKA durch den PTH/PTHrP-Rezeptor PTH1R über eine Induktion der Adenylatcyclase und der darauf folgenden Erhöhung der cAMP-Konzentration nachweisen konnten (426,427), ließ sich die Kinase in DFCs nicht durch extrazelluläres PTHrP aktivieren. Zudem wurde die BMP2-induzierte Aktivierung der Kinase durch eine pharmakologische Hemmung von PTH1R nicht beeinträchtigt. Darüber hinaus führte eine Stimulierung der Adenylatcyclase zu keiner Beeinflussung der ALP-Aktivität. Die ausbleibende Aktivierung von PKA steht im Einklang mit früheren Versuchen, in welchen extrazelluläres PTHrP die osteogene Differenzierung von DFCs hemmte (171). Hierbei offenbart sich ein Kontrast zu anderen Stamm-/Vorläuferzellen, in welchen die BMP2-induzierte Differenzierung durch extrazelluläres PTHrP über eine Aktivierung von PKA unterstützt wird (428,429). Allerdings wird nach Bindung von PTH/PTHrP an PTH1R außerdem das Enzym PLC stimuliert, was in der Folge zur Aktivierung von PKC führt (427). Da die durchgeführten Experimente zeigten, dass die Phosphorylierung von PKC in DFCs stark von PTHrP

abhängt, könnte der inhibitorische Einfluss von PTH1R durch eine bevorzugte Aktivierung von PLC im Vergleich zur Adenylatcyclase in diesen Zellen bedingt sein. Interessanterweise wurde in einer Studie von Lossdörfer et al. die osteogene Differenzierung von Zellen aus dem parodontalen Ligament erst durch Stimulierung von PTH1R über PKC gehemmt, wenn die Zellen bereits konfluent gewachsen waren, wohingegen die Aktivierung des Rezeptors in präkonfluenten Zellen zur Induktion osteogener Marker über PKA führte (430). Somit scheint die Rolle von PTH1R für die Osteogenese flexibel zu sein und stromabwärts in Abhängigkeit weiterer Stimuli entweder die Aktivierung von PKC oder von PKA zu bevorzugen. Da die Stimulierung des Rezeptors im dentalen Follikel außerdem den Zahndurchbruch unterstützt (49,431), könnte in DFCs möglicherweise die Aktivierung von PKC stark bevorzugt werden, um eine vom Zahndurchbruch unabhängige Stimulierung von PKA und der osteogenen Differenzierung – über die nukleäre Expression von PTHrP – zu ermöglichen. Des Weiteren konnte eine Studie von Takahashi et al. zeigen, dass die Aktivität von PTH1R eine vorzeitige Mineralisierung des Zahnzements verhindert und diese Regulierung unabdingbar für die korrekte Entwicklung des Zahnhalteapparats ist (432). Während bereits bekannt war, dass PTHrP eine wichtige Rolle für die Zahnentwicklung und insbesondere für die Koordinierung von Zahndurchbruch und Osteogenese spielt (433), konnten die durchgeführten Experimente auf die Bedeutung einer spezifischen Regulierung von PKA und PKC hinweisen.

Interessanterweise wurde die PKA-Aktivität außerdem nach Inhibition klassischer PKCs tendenziell induziert und nach Akt-Inhibition in Kontrollmedium gehemmt. Da die Regulierung aber sehr gering war, lässt sich vermuten, dass die Aktivierung von PKA durch PKC und Akt nur indirekt beeinflusst und durch die Stimulierung von  $\beta$ -Catenin und die Induktion von PTHrP stromabwärts vermittelt wurde. Darüber hinaus war die Aktivierung von PKA unabhängig von einer Phosphorylierung an Thr197, welche für die katalytische Aktivität der Kinase benötigt wird (434,435), aber nach osteogener Induktion in DFCs nicht reguliert wurde.

Darüber hinaus konnte in DFCs ein negativer Rückkopplungsmechanismus von PKA auf den BMP-Signalweg und die PTHrP-Expression gezeigt werden. Dieser bildet einen Kontrast zur positiven Rückkopplung zwischen BMP2 und DLX3 (159) und könnte möglicherweise einen Grund darstellen, weshalb die gegenseitige Stimulierung von BMP2 und DLX3 begrenzt ist, da PKA als negativer Regulator simultan mit den beiden Proteinen induziert wird. Des Weiteren wurde PKA in einer Studie an Zementoblasten

ebenfalls negativ mit der Expression osteogener Marker assoziiert (436). Interessanterweise konnten Siddappa et al. zeigen, dass eine Stimulierung von PKA die osteogene Differenzierung von BMMSCs in Abhängigkeit von der Stimulierungsdauer entweder unterstützt oder hemmt (437). Die Erkenntnisse legen nahe, dass die Kinase eine wichtige Rolle für den erfolgreichen Ablauf der Osteogenese spielt, indem sie einerseits an der Induktion des Prozesses durch Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin beteiligt ist, aber andererseits als physiologischer Regulator eine übermäßige Aktivierung der beteiligten Signalwege verhindert.

In einer vorangegangenen Studie an DFCs wurde die Induktion von PKA zudem mit der Unterdrückung des Hedgehog-Signalwegs nach BMP2-induzierter Differenzierung assoziiert (174). Darüber hinaus wurde in der Literatur ein hemmender Einfluss von PKA auf den Hedgehog-Signalweg beschrieben (175,176,438), wobei im Speziellen eine stabilisierende Phosphorylierung des Proteins SUFU (engl. *Suppressor of fused homolog*), welches ein Inhibitor des Signalwegs ist (439), beschrieben wurde (438). Somit ließe sich vermuten, dass PTHrP ebenfalls den Hedgehog-Signalweg unterdrückt. Allerdings wurde in einer früheren Studie nach osteogener Induktion von DFCs mit Dexamethason zwar – analog zur Differenzierung mit BMP2 – eine erhöhte PTHrP-Expression, aber keine Regulierung der Expression von SUFU festgestellt (171). Da die durchgeführten Experimente eine Abhängigkeit der PKA-Aktivierung von PTHrP zeigen konnten, lässt sich schlussfolgern, dass die Unterdrückung des Hedgehog-Signalwegs während der Differenzierung von DFCs wahrscheinlich unabhängig von PKA ist und nur zufällig gleichzeitig mit der Induktion der Kinase stattfindet. Weil SUFU außerdem durch GSK3 $\beta$  phosphoryliert und stabilisiert werden kann (438), könnte stattdessen die Herunterregulierung von GSK3 $\beta$  stromabwärts von BMP2 zur Hemmung des Hedgehog-Signalwegs führen. Dies würde außerdem den fehlenden Einfluss von Dexamethason auf die Expression von SUFU erklären, da das Glucocorticoid zu einer deutlich geringeren Regulierung von GSK3 $\beta$  führte als BMP2.

#### **4.5 Die Rolle des Energiemetabolismus für die osteogene Differenzierung von DFCs**

Während in DFCs insbesondere der PKC/Akt/GSK3 $\beta$ -Signalweg und die Aktivierung von PKA zur Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin beitragen, wurde in einer Studie an murinen Stamm-/Vorläuferzellen ein positiver Einfluss durch die Aktivität von Mitochondrien beschrieben (440). Allerdings wurden mitochondriale Marker nach osteogener Induktion

in DFCs zunächst herunterreguliert, weshalb ein möglicher Einfluss auf  $\beta$ -Catenin in diesen Zellen vermutlich keine Rolle spielt. Dahingegen erfolgte eine starke Induktion von mitochondrialer DNA und der Expression des Markerproteins COX IV in der zweiten Hälfte der Differenzierung, während eine Hemmung des mitochondrialen Metabolismus zur Herunterregulierung des Mineralisierungsvermögens differenzierender Zellen führte. Möglicherweise ist eine erhöhte Energieproduktion durch die oxidative Phosphorylierung in Mitochondrien eine wichtige Voraussetzung für die energieaufwändigen Prozesse der Matrixsekretion und Mineralisierung. Dabei legten die Experimente nahe, dass die Induktion der Mitochondrien in DFCs durch die Herunterregulierung klassischer PKC-Isoformen erfolgte, da die Expression von COX IV nach PKC-Inhibition stark induziert war. Die Beobachtungen stehen im Einklang mit einer Studie, in welcher PKC $\alpha$  den Energiemetabolismus von proximalen Tubuluszellen der Niere hemmte (441).

Weitere Studien konnten auf die enorme Bedeutung des Energiehaushalts für die Osteogenese hinweisen. Beispielsweise beschrieben Wang et al. eine Methode, welche die odontogene Differenzierung von DPSCs in fünf Tagen ermöglichte, indem die Zellen mit Gold-Nanopartikeln behandelt wurden, die nach Bestrahlung mit einem Laser das mitochondriale Membranpotential und somit den Energiestoffwechsel stimulierten (442). Eine positive Beeinflussung der Differenzierung von DPSCs durch die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien konnte zudem in weiteren Studien nachgewiesen werden (443,444). Darüber hinaus zeigten Versuche an BMMSCs, dass während der Osteogenese dieser Zellen ebenfalls mitochondriale Marker induziert werden, wohingegen die Glykolyse aber kaum reguliert oder sogar unterdrückt wurde (445,446). Im Gegensatz dazu konnten Experimente an DFCs durchaus eine Stimulierung der Glykolyse während der Differenzierung zeigen (359). Passenderweise war die Expression der Hexokinase 1 nach siebentägiger Induktion mit Dexamethason in den durchgeführten Experimenten signifikant erhöht, jedoch unabhängig von der Inhibition klassischer PKCs. Somit werden oxidative Phosphorylierung und Glykolyse in DFCs über unterschiedliche Signalwege induziert, was die wichtige Rolle des Energiemetabolismus während der osteogenen Differenzierung dieser Zellen verdeutlicht. Allerdings konnte eine Studie von Kosaisawe et al. feststellen, dass eine Inhibition der oxidativen Phosphorylierung, z. B. mittels Rotenon, auf einzelne Zellen innerhalb einer Zellpopulation unterschiedliche Auswirkungen haben kann (447). Somit wäre denkbar, dass in



einem Zellgemisch einige DFCs ihren Energieverbrauch eher über die oxidative Phosphorylierung decken, während in anderen Zellen vermehrt Glykolyse stattfindet. In diesem Fall wäre eine interessante Fragestellung für zukünftige Experimente, ob sich das Mineralisierungspotential der Zellen in Abhängigkeit der aktivierten metabolischen Prozesse unterscheidet.

Fraglich ist außerdem, welche weiteren Prozesse neben der Herunterregulierung klassischer PKCs an der Induktion des Energiestoffwechsels von DFCs beteiligt sind. In murinen Vorläuferzellen konnte gezeigt werden, dass der mitochondriale Metabolismus stromabwärts von BMP2 durch die Induktion von Akt stimuliert wird (448). Jedoch scheint Akt in DFCs keine zentrale Rolle bei der Regulierung der Mitochondrien zu spielen, da die Expression von COX IV nach Akt-Hemmung nicht verändert war. Darüber hinaus kann die Aktivität von Mitochondrien durch das bei Energiemangel induzierte Enzym AMPK angeregt werden, welches katabole Prozesse wie die oxidative Phosphorylierung und die  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren stimuliert, um ATP zu generieren (254). Interessanterweise wurde die AMPK-Expression in Versuchen an DFCs während der Osteogenese herunterreguliert, während eine Inhibition des Enzyms die Genexpression osteogener Marker erhöhte (449). Dahingegen konnte die osteogene Differenzierung von BMMSCs und anderer Stamm-/Vorläuferzellen durch eine Aktivierung des Enzyms stimuliert werden (280,450–452). In DFCs führte allerdings sowohl eine Überaktivierung als auch eine Inhibition der AMPK zur Unterdrückung der Mineralisierung (449). Daher liegt nahe, dass die Aktivität der AMPK – ähnlich wie Akt – insbesondere für den späteren Verlauf der Osteogenese benötigt wird, aber nicht zu hoch sein darf, zumal die AMPK anabole Prozesse hemmt (453), was ein Hindernis für die Matrixproduktion und Mineralisierung sein könnte. Hierbei besteht ein grundlegender Unterschied zur Kinase Akt, welche zwar ebenfalls die mitochondriale ATP-Produktion stimuliert, energieverbrauchende Prozesse jedoch anregt (453,454). Zudem zeigten Versuche an Tumorzellen, dass sich die beiden Kinasen in einer negativen Rückkopplungsschleife gegenseitig unterdrücken (454). Möglicherweise kann somit die fehlende Regulierung von COX IV nach Akt-Inhibition in DFCs durch ein Ausbleiben dieser negativen Rückkopplung und einer folglich stärkeren Stimulierung des mitochondrialen Markers durch die AMPK erklärt werden. Die Beobachtungen legen nahe, dass das Zusammenspiel der beiden Enzyme für die Koordinierung des Energiemetabolismus und in der Folge für die Produktion mineralisierter Matrix in DFCs von großer Bedeutung ist.

Des Weiteren konnten Versuche zeigen, dass nach osteogener Induktion in DFCs – trotz Hemmung der AMPK – vermehrt Lipide synthetisiert werden, und dieser Prozess essentiell für die Mineralisierung ist (359). Vermutlich werden die Lipide zur Energiegewinnung während der Mineralisierung benötigt, was in Experimenten an murinen BMMSCs ebenfalls nahegelegt wurde (455). Veränderungen des Lipidoms wurden zudem nach adipogener und osteogener Differenzierung weiterer Stamm-/Vorläuferzellen beschrieben, wobei die Regulierung im Vergleich zwischen Zellen unterschiedlichen Ursprungs sehr ähnlich war (456), was die allgemeine Relevanz des Lipidstoffwechsels für Differenzierungsprozesse verdeutlicht. Da sowohl Synthese als auch Abbau von Fettsäuren unter anderem in Mitochondrien stattfinden (457,458), könnte die Regulierung des Lipidmetabolismus neben der oxidativen Phosphorylierung einen weiteren Mechanismus darstellen, über welchen Mitochondrien die Osteogenese beeinflussen.

#### **4.6 Die Bedeutung des oxidativen Stresses und dessen**

##### **Neutralisierung während der osteogenen Differenzierung von DFCs**

Analog zu den Veränderungen des Energiestoffwechsels konnte in DFCs während der osteogenen Differenzierung ein erhöhter oxidativer Stress festgestellt werden. Da eine weitere Stressung der Zellen mit  $H_2O_2$  zu einer erheblichen Beeinträchtigung der Mineralisierung führte, lässt sich davon ausgehen, dass oxidativer Stress die Differenzierung stört und eine antioxidative Gegenregulierung für den erfolgreichen Verlauf der Osteogenese bedeutsam ist.

Der Ursprung des oxidativen Stresses lässt sich zunächst in den Mitochondrien vermuten, da mitochondrialer Metabolismus als Hauptursache von oxidativem Stress in Zellen bekannt ist (459). Passend hierzu wies die Herunterregulierung des Hypoxie-Markers HIF-1 auf eine erhöhte Menge von Sauerstoffspezies in den Zellen hin, welche eine mögliche Ursache für oxidativen Stress sind (460). Die Ergebnisse stehen im Einklang mit Versuchen an BMMSCs, in welchen ebenfalls eine verringerte Expression von HIF-1 während der osteogenen Differenzierung festgestellt wurde, wobei eine Reaktivierung des Transkriptionsfaktors zur Unterdrückung der oxidativen Phosphorylierung und der ALP-Expression führte (446). Darüber hinaus zeigte HIF-1 in einer Studie an murinen Stamm-/Vorläuferzellen – neben einem hemmenden Einfluss auf die Osteogenese – in Kombination mit BMP2 einen positiven Einfluss auf die chondrogene

Differenzierung (461). Somit liegt nahe, dass die Regulierung des Transkriptionsfaktors HIF-1 nach osteogener Induktion nicht nur eine Folge von Veränderungen des oxidativen Zustands ist, sondern den Differenzierungsprozess aktiv beeinflussen könnte. Auffällig ist zudem, dass die Erhöhung des oxidativen Stresses und die Herunterregulierung der  $\alpha$ -Untereinheit von HIF-1 in DFCs wesentlich früher als die Induktion mitochondrialer Marker erfolgte. Somit kann der Metabolismus in den Mitochondrien nicht die einzige Erklärung für den erhöhten oxidativen Stress in den differenzierenden Zellen sein.

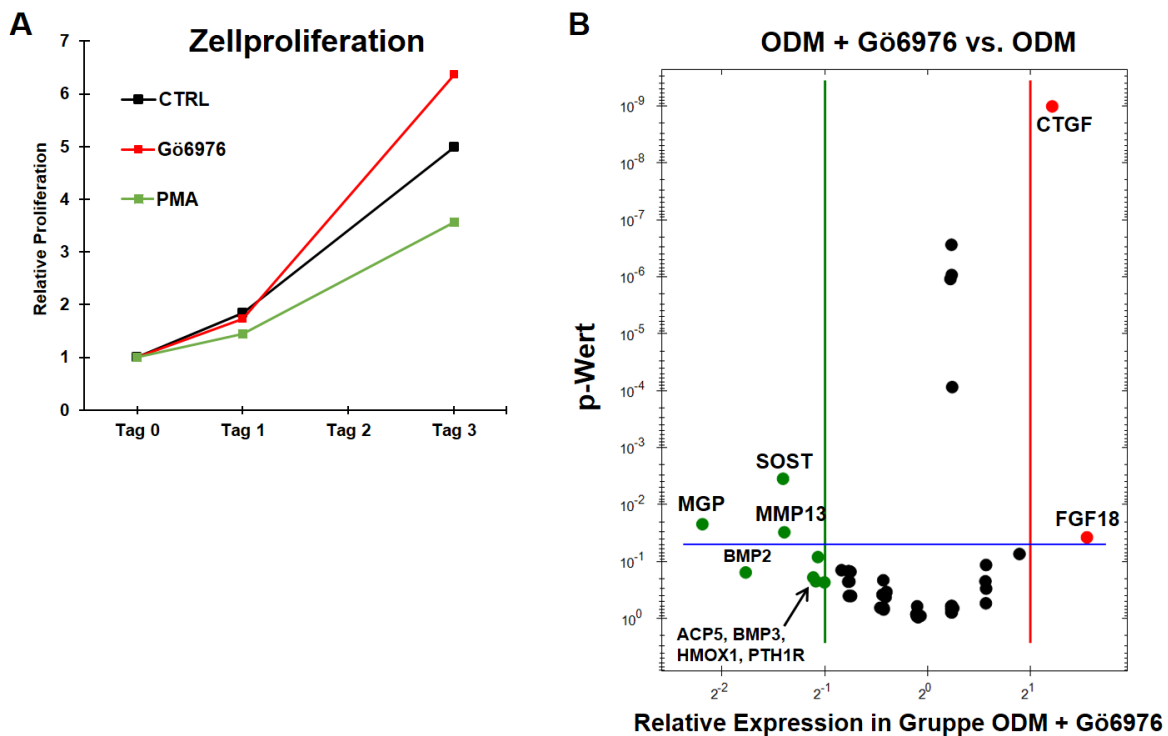
Eine weitere Ursache des oxidativen Stresses könnte in der veränderten Expression von Proteinen liegen, die den Stress neutralisieren, nachdem bereits zu frühen Zeitpunkten während der Differenzierung eine Hemmung der Expression von GPX1 und eine Stimulierung der Catalase-Expression beobachtet wurden. Hierbei weisen DFCs einen Unterschied zu BMMSCs auf, in welchen die Expression beider Proteine während der Osteogenese induziert wird (445,462). Somit trägt die ausbleibende GPX1-Stimulierung in DFCs möglicherweise zu einer verringerten antioxidativen Kapazität und folglich zu einer Erhöhung des oxidativen Stresses bei. Allerdings könnte die verringerte GPX1-Expression – zumindest teilweise – durch die Induktion der Catalase kompensiert werden, da beide Enzyme an der Neutralisierung von  $H_2O_2$  beteiligt sind (358). Dabei ist unklar, weshalb differenzierende DFCs vermehrt Catalase anstelle von GPX1 exprimieren. Möglicherweise wird  $H_2O_2$  in Abhängigkeit von externen Faktoren bevorzugt von einem der beiden Enzyme neutralisiert, wie bereits in murinen Herzzellen und humanen Erythrozyten gezeigt werden konnte (463,464). Eine große Bedeutung der Catalase für die osteogene Differenzierung von DFCs lässt sich zudem aufgrund der Beobachtung vermuten, dass die Mineralisierungskapazität nach Inhibition des Enzyms herunterreguliert war. Überdies konnte ein positiver Einfluss der Catalase auf die Osteogenese von ADSCs gezeigt werden (465). Darüber hinaus wurde in DFCs eine weitestgehend konstante Expression der Proteine SOD1 und Thioredoxin festgestellt, die somit ebenfalls zur antioxidativen Antwort beitragen können.

Da sich die Aktivität der Enzyme zur Neutralisierung von oxidativem Stress durch posttranslationale Modifikationen wie z. B. Phosphorylierungen beeinflussen lässt (466), könnten in DFCs klassische PKCs entscheidend an der Regulierung beteiligt sein, zumal deren Inhibition die Stimulierung der Catalase und die Herunterregulierung von GPX1 nach osteogener Induktion verstärkte. Ferner legen die Ergebnisse nahe, dass stromabwärts von klassischen PKCs die Kinase Akt zwar an der Regulierung von

GPX1, nicht aber an der Induktion der Catalase beteiligt ist. Interessanterweise führte in einer Studie an Tumorzellen eine Inhibition von NF- $\kappa$ B zur Herunterregulierung von GPX1 (467). Aufgrund der durchgeführten Versuche lässt sich vermuten, dass die Expression von GPX1 in DFCs stromabwärts von klassischen PKCs und Akt ebenfalls von NF- $\kappa$ B abhängen könnte und deshalb analog zum Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B durch PKC-Inhibition herunterreguliert und durch Akt-Inhibition erhöht wurde. Da NF- $\kappa$ B die osteogene Differenzierung von DFCs unterdrückt, könnte die Herunterregulierung von GPX1 demnach ein unvermeidbarer Nebeneffekt sein, was erklären würde, wieso die oxidative Abwehr folglich verstärkt durch die Catalase erfolgt und weshalb GPX1 – genau wie NF- $\kappa$ B – während der Osteogenese von DFCs im Vergleich zu anderen Stamm-/Vorläuferzellen wie BMMSCs unterschiedlich reguliert wird.

Ein Ungleichgewicht aus erhöhtem oxidativem Stress und unzureichender antioxidativer Antwort kann in Zellen schließlich zur Induktion der Apoptose führen (468,469). Somit könnte eine Unterstützung der Zellviabilität ebenfalls dazu beitragen, die negativen Auswirkungen des oxidativen Stresses während der Osteogenese abzuschwächen und eine erfolgreiche Differenzierung zu ermöglichen. In vergangenen Studien konnten bereits viele Proteine, welche an der osteogenen Differenzierung beteiligt sind – darunter BMP2, DLX3, Osterix und WNT5A – positiv mit der Zellviabilität assoziiert werden (159,168,470,471). Des Weiteren konnten Experimente der dieser Arbeit vorausgegangenen Masterarbeit eine erhöhte Proliferationsrate von DFCs nach Inhibition klassischer PKC-Isoformen nachweisen, wohingegen eine PKC-Überaktivierung die Zellteilung hemmte (Abb. 46A). Zudem zeigte ein qPCR-Array zur Evaluierung von Genen, welche mit dem Knochenmetabolismus assoziiert sind, dass eine Inhibition klassischer PKCs in differenzierenden Zellen die Genexpression von CTGF (engl. *Connective tissue growth factor*) und FGF18 (engl. *Fibroblast growth factor 18*) unterstützt (Abb. 46B). Beide Wachstumsfaktoren stimulieren die Zellproliferation (472,473) und konnten bereits positiv mit der osteogenen Differenzierung von Stamm-/Vorläuferzellen assoziiert werden (473,474). Daher lässt sich vermuten, dass eine Erhöhung der Zellviabilität einen weiteren Mechanismus darstellt, über welchen die Inhibition klassischer PKC-Isoformen zur Unterstützung der Osteogenese von DFCs beiträgt. Darüber hinaus ist die Kinase Akt, welche in differenzierenden DFCs nach Inhibition klassischer PKCs induziert wurde, positiv mit der Zellviabilität assoziiert (475,476), während Experimente dieser Arbeit einen negativen Einfluss des stromabwärts regulierten NF- $\kappa$ B-Signalwegs auf die Proliferation von DFCs zeigten. Möglicherweise ist

die Regulierung von klassischen PKCs, Akt und NF- $\kappa$ B während der osteogenen Differenzierung von entscheidender Bedeutung, um die Zellviabilität trotz erhöhtem oxidativen Stress aufrechtzuerhalten. Somit könnte die Hemmung osteogener Marker nach Überaktivierung von PKC und NF- $\kappa$ B einen Schutzmechanismus darstellen, welcher die Zellen vor dem wahrscheinlichen Zelltod bewahrt und sicherstellt, dass der energieaufwändige Differenzierungsprozess erst dann vollständig abläuft, wenn die Viabilität ausreichend stimuliert wird.



**Abb. 46: Die Regulierung der Zellproliferation durch klassische PKCs.** (A) DFCs wurden bis zu drei Tage lang mit 100 nM des Inhibitors klassischer PKCs Gö6976 oder 200 nM des PKC-Aktivators PMA behandelt und die Proliferation der Zellen mittels Proliferationsassay bestimmt ( $n = 3$ , Darstellung ohne Standardabweichung). (B) DFCs wurden drei Tage lang in DMEM mit bzw. ohne 100 nM Gö6976 kultiviert, bevor die Expression von 88 Genen, welche mit dem Knochenmetabolismus assoziiert sind, mit Hilfe des qPCR-Arrays „Ossification and Bone Remodeling Tier 1 H96“ (BIO-RAD, #10040302) untersucht wurde. Die Expression der Gene rechts der roten Gerade war nach PKC-Inhibition um mehr als Faktor 2 induziert, die Expression der Gene links der grünen Gerade um mehr als Faktor 2 herunterreguliert. Die Gene oberhalb der blauen Gerade wurden statistisch signifikant reguliert ( $p < 0,05$ ). Die Ergebnisse dieser Abbildung stammen aus der vorausgegangenen Masterarbeit.

## 4.7 Schlussfolgerung und Ausblick

Während vergangene Studien hauptsächlich die Bedeutung von Signalwegen untersuchten, welche für die Induktion der osteogenen Differenzierung wichtig sind, konnten die Experimente dieser Arbeit auf molekulare Mechanismen hinweisen, welche den weiteren Verlauf der Osteogenese und die Produktion mineralisierter Matrix beeinflussen. Dabei übernehmen klassische PKC-Isoformen eine zentrale Rolle und fungieren möglicherweise sogar als Masterregulatoren, welche nach osteogener Stimulierung die weiteren Prozesse unterdrücken und daher inhibiert werden müssen. Diese Annahme wird durch die Beobachtung bekräftigt, dass die Inhibition klassischer PKCs in nahezu allen durchgeführten Versuchen zu einer zuverlässigen Mineralisierung ausgehend von DFCs führte, wohingegen sich nach alleiniger Stimulierung mit Differenzierungsmedien – vor allem im BMP2-haltigen Medium – teilweise nur eine mäßige Mineralisierung beobachten ließ.

Somit ist für eine erfolgreiche Verwendung von DFCs zur Regeneration (dentaler) Knochendefekte nicht nur wichtig, die Zellen *in vivo* osteogen zu induzieren, sondern insbesondere die von klassischen PKCs regulierten biologischen Prozesse im weiteren Verlauf der Osteogenese zu steuern, um zielgerichtet mineralisierte Matrix entstehen zu lassen. Allerdings ist fraglich, ob sich eine direkte Hemmung klassischer PKCs im Rahmen von Therapien eignet, da aufgrund des Einflusses auf die Proliferation ein unkontrolliertes Wachstum von Zellen als unerwünschte Nebenwirkung nicht ausgeschlossen werden kann, zumal PKC teilweise als Tumorsuppressor beschrieben wurde (477,478). Vielversprechend könnte hingegen eine gezielte Beeinflussung stromabwärts regulierter Signalwege und biologischer Prozesse sein, beispielsweise durch Stimulierung der mitochondrialen Aktivität oder durch eine indirekte Erhöhung der Zellviabilität mittels Unterstützung der antioxidativen Abwehr. So konnten Versuche von Meng et al. zeigen, dass eine Behandlung von DFCs mit der antioxidativen Substanz N-Acetylcystein zur Verbesserung der osteogenen Differenzierung und Proliferationsrate führt und *in vivo* die Knochenbildung in einem Rattenmodell fördert (479). Darüber hinaus könnte eine Kontrolle der stromabwärts von PKC induzierten NF- $\kappa$ B-Aktivität nützlich sein. Da der Transkriptionsfaktor aber ebenfalls eine wichtige Bedeutung als Tumorsuppressor haben könnte (480), sollten mögliche Strategien anstelle einer direkten Inhibition darauf abzielen, eine übermäßige Aktivierung durch z. B. Entzündungsreaktionen zu vermeiden.

Obwohl die durchgeführten Experimente wichtige Mechanismen zeigen konnten, über welche klassische PKCs die osteogene Differenzierung von DFCs hemmen, sind wahrscheinlich noch viele weitere Signalwege beteiligt. Dabei scheinen die meisten Veränderungen, insbesondere ausgehend von klassischen PKCs, erst in späteren Differenzierungsphasen stattzufinden. Passend hierzu konnte während der osteogenen/odontogenen Differenzierung von DPSCs festgestellt werden, dass die Expression von Nukleinsäuren und Proteinen um Tag 14 ein Maximum erreicht und danach wieder sinkt (481). Somit könnte es in zukünftigen Versuchen lohnenswert sein, die Regulierung von Zielproteinen und biologischen Prozessen durch klassische PKCs in diesem Zeitraum zu untersuchen. Bislang unklar ist beispielsweise, welche Mechanismen die Viabilität von DFCs stromabwärts von der Kinase beeinflussen. Hierbei wären vor allem eine Unterdrückung apoptotischer Prozesse oder eine Stimulierung von Zellzyklusproteinen denkbar, wie bereits in anderen Zellen gezeigt wurde (226,228–230,233,249,250). Aufbauend auf den Ergebnissen dieser Arbeit und vergangener Studien könnte durch die weitere Erforschung der molekularen Mechanismen während der osteogenen Differenzierung und stromabwärts von klassischen PKCs eine solide Grundlage für die möglichst gezielte und nebenwirkungsfreie Verwendung von DFCs in regenerativen Therapien geschaffen werden.

## 5 Zusammenfassung

Dentale Follikelzellen (DFCs, engl. *Dental follicle cells*) sind die endogenen Stamm-/Vorläuferzellen des Zahnhalteapparats und können in alveoläre Osteoblasten, Zementoblasten und Fibroblasten des parodontalen Ligaments differenzieren. DFCs besitzen großes Potential für regenerative Therapien von (dentalem) Knochengewebe, wobei zunächst eine genaue Kenntnis der molekularen Mechanismen während der osteogenen Differenzierung, welche sich *in vitro* durch BMP2 (engl. *Bone morphogenetic protein 2*) oder Dexamethason induzieren lässt, erforderlich ist. Nachdem Vorarbeiten zeigten, dass klassische Isoformen der Proteinkinase C (PKC) während der Osteogenese von DFCs herunterreguliert werden und diese hemmen, sollten in der vorliegenden Arbeit die zugrundeliegenden Mechanismen evaluiert werden. Hierfür wurde die Regulierung potentieller Zielproteine und Signalwege nach osteogener Induktion und Hemmung klassischer PKCs untersucht sowie deren Einfluss auf osteogene Marker evaluiert. Dabei wurde festgestellt, dass klassische PKCs die Kinase Akt regulieren und stromabwärts durch Phosphorylierung von GSK3 $\beta$  (Glykogensynthase-Kinase 3 $\beta$ ) die Aktivität des Proteins  $\beta$ -Catenin beeinflussen, welches eine wichtige Rolle für die Induktion der Osteogenese spielt. Während Akt zwar die Expression von aktivem  $\beta$ -Catenin unterstützte, führte eine Überaktivierung der Kinase jedoch zur Inhibition der Differenzierung und des Signalwegs stromabwärts von BMP2. Darüber hinaus konnte eine Regulierung des NF- $\kappa$ B (engl. *Nuclear factor kappa B*)-Signalwegs durch klassische PKCs und Akt nachgewiesen werden, wobei NF- $\kappa$ B die Proliferation und osteogene Differenzierung von DFCs unterdrückte. Dahingegen konnte keine direkte Beteiligung von klassischen PKCs oder Akt an der BMP2-induzierten Aktivierung der Proteinkinase A (PKA), welche die Osteogenese unterstützt, gefunden werden. Stattdessen zeigten die Versuche, dass die PKA-Aktivierung von der intrazellulären Expression des Proteins PTHrP (engl. *Parathyroid hormone-related protein*) abhängt, und dass PKA den Signalweg stromabwärts von BMP2 durch eine negative Rückkopplung hemmt. Des Weiteren konnte eine Induktion des mitochondrialen Energiemetabolismus und des oxidativen Stresses während der osteogenen Differenzierung und nach Inhibition klassischer PKCs festgestellt werden, während eine Hemmung des mitochondrialen Stoffwechsels die Mineralisierung unterdrückte. Eine Evaluierung von Proteinen, welche oxidativen Stress neutralisieren können, zeigte eine Stimulierung der Catalase-Expression und eine Herunterregulierung der Expression von GPX1 (Glutathionperoxidase 1) während der Differenzierung und nach



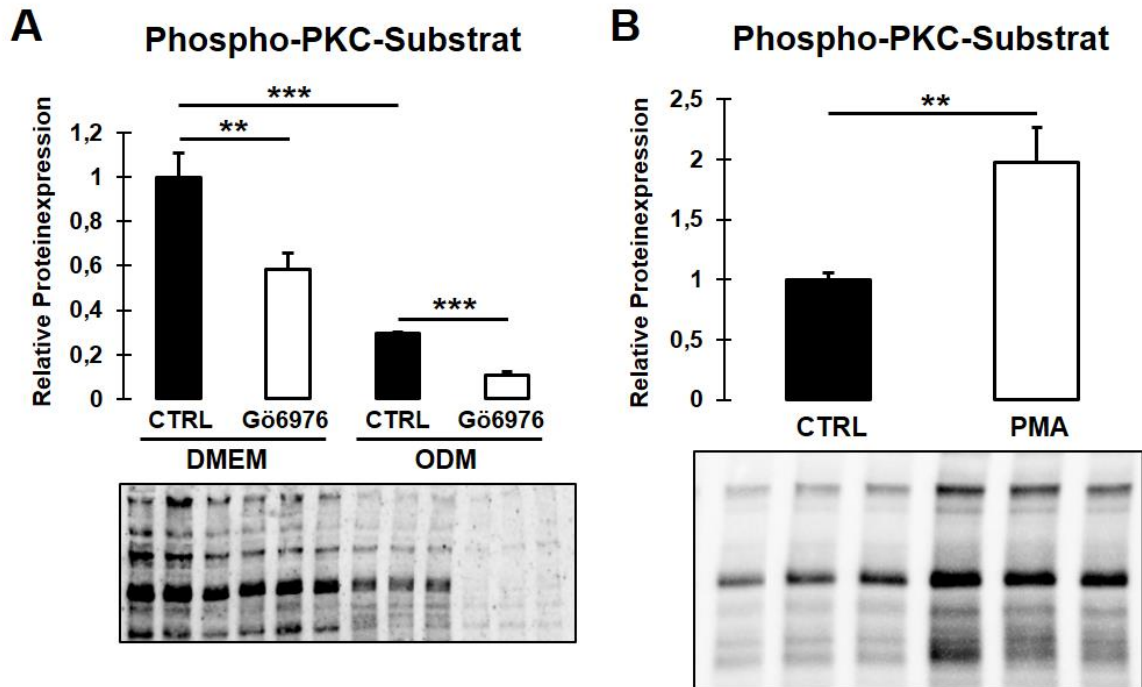
Inhibition klassischer PKCs. Überdies führte eine Hemmung der Catalase zu einer verringerten Mineralisierung. Stromaufwärts von PKC wurde PTHrP für die Aktivität der Kinase benötigt, während das Protein WNT5A (engl. *Wnt family member 5A*) diese unterdrückte. Die Ergebnisse legten dar, dass klassische Isoformen von PKC die osteogene Differenzierung von DFCs über verschiedene Mechanismen hemmen, wobei insbesondere biologische Prozesse reguliert werden, die in späteren Differenzierungsphasen wichtig sind.

## 6 Abstract

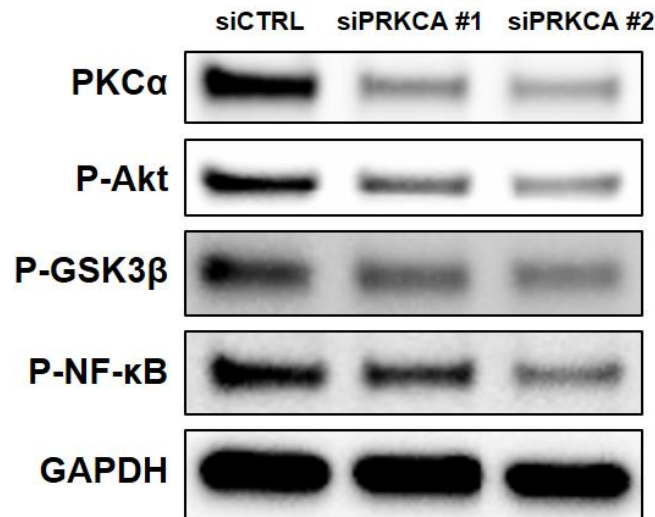
Dental follicle cells (DFCs) are the genuine stem/precursor cells of the periodontium and capable of differentiating into alveolar osteoblasts, cementoblasts and periodontal ligament fibroblasts. DFCs possess great potential for regenerative therapies of (dental) bone tissue, but their usage first requires a profound knowledge of the molecular mechanisms during the osteogenic differentiation, which can be induced *in vitro* by BMP2 (Bone morphogenetic protein 2) or dexamethasone. After previous experiments showed that classical isoforms of PKC (Protein kinase C) are downregulated during osteogenesis of DFCs and inhibit the differentiation, this thesis aimed to evaluate the underlying mechanisms. For this, regulation of potential target proteins and signaling pathways was analyzed after osteogenic induction and inhibition of classical PKCs, and their impact on osteogenic markers was investigated. The results showed that classical PKCs regulate the kinase Akt, which in turn phosphorylates GSK3 $\beta$  (Glycogen synthase kinase 3 $\beta$ ) and consequently affects the stability of  $\beta$ -catenin, which plays an important role for the induction of osteogenesis. While Akt supported the expression of active  $\beta$ -catenin, overactivation of the kinase, however, inhibited the differentiation and the signaling pathway downstream of BMP2. Furthermore, classical PKCs and Akt regulated the NF- $\kappa$ B (Nuclear factor kappa B) signaling pathway, and NF- $\kappa$ B was shown to suppress proliferation and osteogenic differentiation of DFCs. By contrast, classical PKCs and Akt were not directly involved in the BMP2-induced activation of protein kinase A (PKA), which is known to support osteogenesis. Instead, the experiments showed that activation of PKA depends on the intracellular expression of the protein PTHrP (Parathyroid hormone-related protein) and that PKA inhibits the signaling pathway downstream of BMP2 via negative feedback. Moreover, mitochondrial energy metabolism and oxidative stress were induced during the osteogenic differentiation as well as after inhibition of classical PKCs, and inhibition of the mitochondrial metabolism suppressed mineralization. Evaluation of proteins which are capable of neutralizing oxidative stress revealed that expression of catalase was upregulated and expression of GPX1 (Glutathione peroxidase 1) was inhibited during differentiation and after inhibition of classical PKCs. Besides, inhibition of catalase attenuated mineralization. Upstream of PKC, PTHrP was required for kinase activity, while WNT5A (Wnt family member 5A) suppressed it. The results showed that classical isoforms of PKC inhibit the osteogenic differentiation of DFCs via different mechanisms, which especially involve biological processes important for later differentiation periods.

## 7 Anhang

### 7.1 Angehängte Ergebnisse

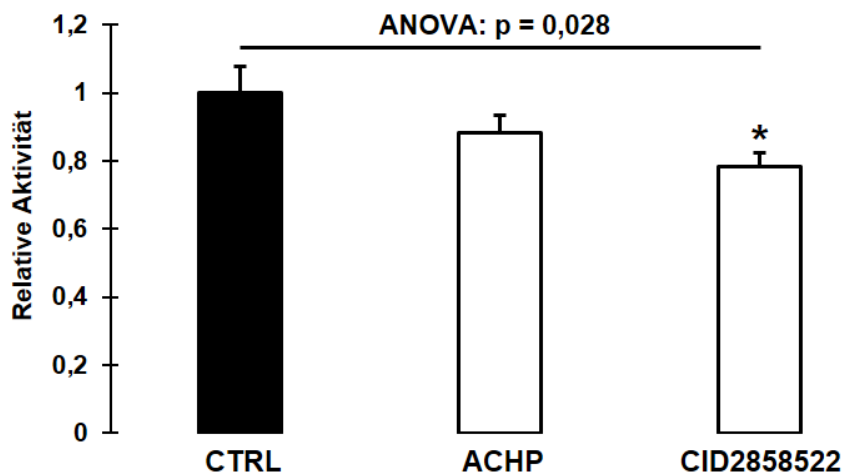


**Abb. A-1: Die Regulierung der PKC-Aktivität durch Gö6976 und PMA.** (A) DFCs wurden sieben Tage lang in ODM oder Kontrollmedium (DMEM) kultiviert und gleichzeitig mit 100 nM des spezifischen Inhibitors klassischer PKCs Gö6976 behandelt, bevor die Expression phosphorylierter PKC-Substrate mittels Western Blot bestimmt wurde. (B) DFCs wurden 30 Minuten lang mit 200 nM des PKC-Aktivators PMA behandelt, bevor die Expression phosphorylierter PKC-Substrate mittels Western Blot bestimmt wurde. T-Tests wurden angewandt zum Vergleich zwischen ODM und DMEM sowie zwischen Gö6976-Behandlung bzw. PMA-Behandlung und Kontrolle im selben Medium: \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

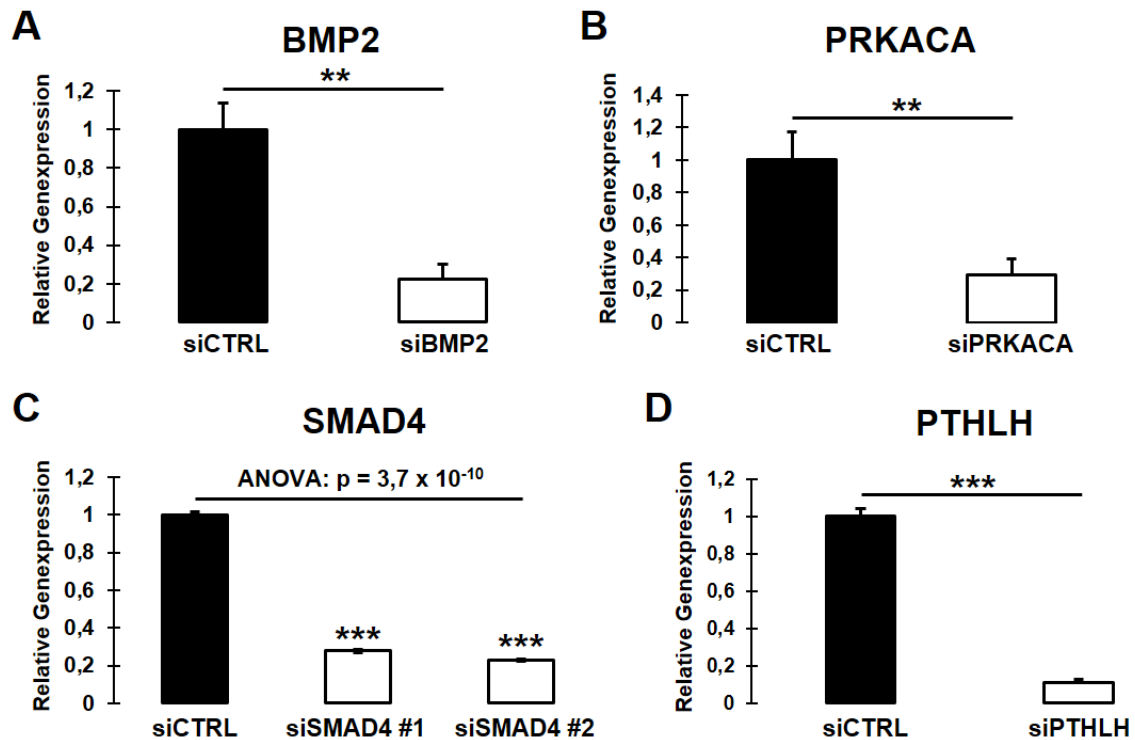


**Abb. A-2: Die Regulierung von P-Akt, P-GSK3β und P-NF-κB nach siRNA-Herunterregulierung des Gens von PKCα.** DFCs wurden drei Tage lang mit zwei verschiedenen siRNAs gegen PRKCA (Gen für PKCα) oder einer Kontroll-siRNA transfiziert, bevor die Proteinexpression von PKCα, Ser473-phosphoryliertem Akt, Ser9-phosphoryliertem GSK3β und Ser536-phosphoryliertem NF-κB (Untereinheit p65) sowie GAPDH als Ladekontrolle durch Western Blots bestimmt wurde ( $n = 1$ ). Die Ergebnisse dieser Abbildung wurden bereits 2021 veröffentlicht in der Zeitschrift „Stem Cell Research & Therapy“ (196).

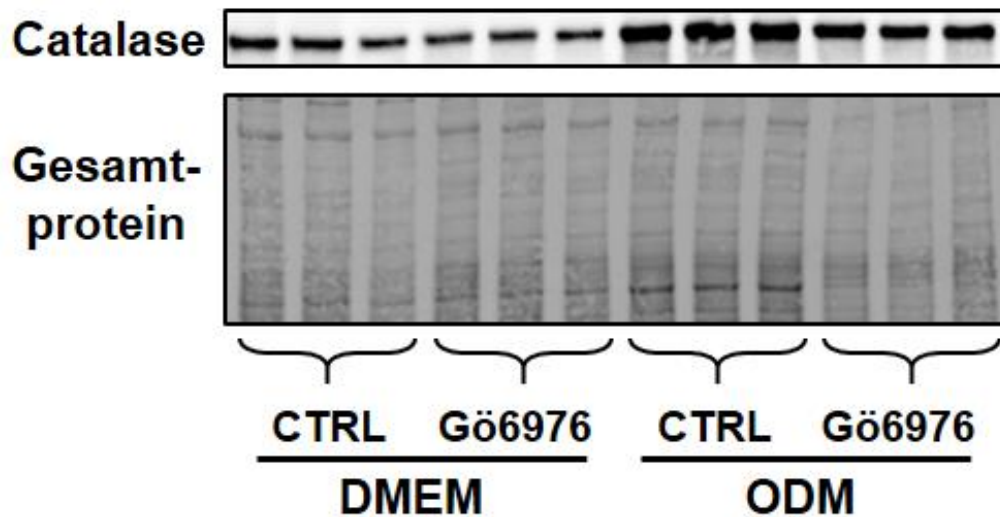
### Aktivität von NF-κB (p50)



**Abb. A-3: Die Inhibition von NF-κB durch ACHP und CID2858522.** DFCs wurden drei Tage lang in Kontrollmedium kultiviert und mit 500 μM des allgemeinen NF-κB-Inhibitors ACHP oder 500 μM des Inhibitors der PKC-spezifischen NF-κB-Aktivierung CID2858522 behandelt, bevor die Aktivität der NF-κB-Untereinheit p50 bestimmt wurde. One-way ANOVA wurde angewandt zum Vergleich zwischen allen Gruppen des Experiments, mit anschließenden Tukey-Tests zum Vergleich zwischen Inhibitor-Behandlung und Kontrolle: \*  $p < 0,05$ .



**Abb. A-4: Effizienz der siRNA-Herunterregulierung von BMP2, PRKACA, SMAD4 und PTHLH.** DFCs wurden zwei (A, B, D) bzw. drei (C) Tage lang mit spezifischen siRNAs gegen BMP2 (A), PRKACA (B), SMAD4 (C) oder PTHLH (D) transfiziert. Als Negativkontrolle wurden Zellen mit einer Kontroll-siRNA (siCTRL) transfiziert. Anschließend wurde die Genexpression der jeweils herunterregulierten Gene mittels RT-qPCR bestimmt. T-Tests wurden angewandt zum Vergleich zwischen siRNA-Behandlung und Kontroll-siRNA (A, B, D); One-way ANOVA wurde angewandt zum Vergleich zwischen allen Gruppen des Experiments, mit anschließenden Tukey-Tests zum Vergleich zwischen siRNA-Behandlung und Kontroll-siRNA (C): \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . Die Ergebnisse dieser Abbildung wurden bereits 2022 veröffentlicht in der Zeitschrift „Archives of Oral Biology“ (356).



**Abb. A-5: Regulierung der Catalase durch klassische PKCs mit Darstellung des Gesamtproteins.** DFCS wurden sieben Tage lang mit ODM osteogen differenziert bzw. in DMEM kultiviert und gleichzeitig mit 100 nM des Inhibitors klassischer PKCs Gö6976 behandelt, bevor die Proteinexpression der Catalase durch Western Blots ermittelt wurde. Der Catalase-Blot und die relative Quantifizierung der Proteinexpression sind in Abb. 42C dargestellt. Aufgrund der sehr ungleichmäßigen Gesamtproteinmenge in den verschiedenen Proben zeigt diese Abbildung ergänzend ein Bild des Gesamtproteins.

## 7.2 Abkürzungsverzeichnis

**Tabelle 20: Verwendete Abkürzungen.**

<b>Abkürzung</b>	<b>ausgeschrieben</b>
<b>3-AT</b>	3-Amino-1,2,4-triazol
<b>ACHP</b>	2-Amino-6-[2-(cyclopropylmethoxy)-6-hydroxyphenyl]-4-(piperidin-4-yl)-nicotinonitril
<b>ADSCs</b>	engl. <i>Adipose-derived stem cells</i>
<b>ALP</b>	Alkalische Phosphatase
<b>AMPK</b>	AMP-aktivierte Proteinkinase
<b>ANOVA</b>	engl. <i>One-way analysis of variance</i>
<b>APC</b>	engl. <i>Adenomatous polyposis coli</i>
<b>APCDD1</b>	engl. <i>Adenomatosis polyposis coli down-regulated 1</i>
<b>BMMSCs</b>	engl. <i>Bone marrow mesenchymal stem cells</i>
<b>BMP</b>	engl. <i>Bone morphogenetic protein</i>
<b>BMP2</b>	engl. <i>Bone morphogenetic protein 2</i>
<b>BSA</b>	Bovines Serumalbumin
<b>BSP</b>	engl. <i>Bone sialoprotein</i>
<b>CAT</b>	Gen für Catalase
<b>CDK1</b>	engl. <i>Cyclin-dependent kinase 1</i>
<b>cDNA</b>	Komplementäre DNA
<b>CEMP1</b>	engl. <i>Cementum protein 1</i>
<b>CID</b>	CID2858522
<b>CK1</b>	engl. <i>Casein kinase 1</i>
<b>COL1A2</b>	engl. <i>Collagen type I alpha 2 chain</i>
<b>COX IV</b>	engl. <i>Cytochrome c oxidase subunit 4</i>
<b>CREB</b>	engl. <i>cAMP response element-binding protein</i>
<b>CSF-1</b>	engl. <i>Colony-stimulating factor 1</i>
<b>CTGF</b>	engl. <i>Connective tissue growth factor</i>
<b>DAG</b>	Diacylglycerol
<b>DKK1</b>	engl. <i>Dickkopf related protein 1</i>
<b>DMEM</b>	Kontrollmedium, engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
<b>CTRL</b>	Kontrolle, engl. <i>Control</i>
<b>DFCs</b>	engl. <i>Dental follicle cells</i>
<b>DLX3</b>	engl. <i>Distal-less homeobox 3</i>
<b>DPSCs</b>	engl. <i>Dental pulp stem cells</i>
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat
<b>EGR1</b>	engl. <i>Early growth response 1</i>
<b>EGTA</b>	Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
<b>FAM</b>	5-Carboxyfluorescein

(Fortsetzung auf nächster Seite)

<b>FBS</b>	engl. <i>Fetal bovine serum</i>
<b>FGF</b>	engl. <i>Fibroblast growth factor</i>
<b>FGF18</b>	engl. <i>Fibroblast growth factor 18</i>
<b>FITC</b>	Fluoresceinisothiocyanat
<b>GAPDH</b>	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
<b>gDNA</b>	Genomische DNA
<b>GFAP</b>	engl. <i>Glial fibrillary acidic protein</i>
<b>GPCR</b>	engl. <i>G-Protein-coupled receptor</i>
<b>GPX1</b>	Glutathionperoxidase 1
<b>GSK3<math>\alpha</math></b>	Glykogensynthase-Kinase 3 $\alpha$
<b>GSK3<math>\beta</math></b>	Glykogensynthase-Kinase 3 $\beta$
<b>GSSG</b>	Oxidiertes Glutathion
<b>H2DCFDA</b>	2',7'-Dichlordihydrofluorescein-diacetat
<b>HEK293</b>	engl. <i>Human embryonic kidney 293</i>
<b>HEPES</b>	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
<b>HIF-1</b>	Hypoxie-induzierter Faktor 1
<b>HRP</b>	engl. <i>Horseradish peroxidase</i>
<b>I<math>\kappa</math>B<math>\alpha</math></b>	engl. <i>Inhibitor of NF-<math>\kappa</math>B, alpha</i>
<b>IGF-1</b>	engl. <i>Insulin-like growth factor 1</i>
<b>IGF-2</b>	engl. <i>Insulin-like growth factor 2</i>
<b>IHH</b>	engl. <i>Indian hedgehog</i>
<b>IKK</b>	I $\kappa$ B-Kinase
<b>IP</b>	Immunpräzipitation
<b>IP<sub>3</sub></b>	Inositol-1,4,5,-triphosphat
<b>LEF</b>	engl. <i>Lymphoid enhancer-binding factor</i>
<b>LRP5/6</b>	engl. <i>Low-density lipoprotein receptor related protein 5/6</i>
<b>MAP</b>	engl. <i>Mitogen-activated protein</i>
<b>MCF-10A</b>	engl. <i>Michigan Cancer Foundation-10A</i>
<b>MSX2</b>	engl. <i>Msh homeobox 2</i>
<b>mtDNA</b>	Mitochondriale DNA
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	engl. <i>Nuclear factor kappa B</i>
<b>NGS</b>	engl. <i>Normal goat serum</i>
<b>NICD</b>	engl. <i>Notch intracellular domain</i>
<b>ODM</b>	Osteogenes Differenzierungsmedium
<b>OPG</b>	Osteoprotegerin
<b>PB1-Domäne</b>	Phox/Bem1-Domäne
<b>PBS</b>	engl. <i>Phosphate-buffered saline</i>
<b>PCR</b>	engl. <i>Polymerase chain reaction</i>
<b>PKD1</b>	engl. <i>3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1</i>

(Fortsetzung auf nächster Seite)



<b>PDL-Fibroblasten</b>	Fibroblasten des parodontalen Ligaments
<b>PDLSCs</b>	engl. <i>Periodontal ligament stem cells</i>
<b>PIP<sub>2</sub></b>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
<b>PKA</b>	Proteinkinase A
<b>PKC</b>	Proteinkinase C
<b>PLC</b>	Phospholipase C
<b>PMA</b>	Phorbol-12-myristat-13-acetat
<b>PRKACA</b>	Gen für die katalytische Untereinheit $\alpha$ von PKA
<b>PRKAR1A</b>	Gen für die regulatorische Untereinheit Typ I $\alpha$ von PKA
<b>PRKCA</b>	Gen für PKC $\alpha$
<b>PTCH</b>	engl. <i>Patched</i>
<b>PTH</b>	engl. <i>Parathyroid hormone</i>
<b>PTH1R</b>	engl. <i>Parathyroid hormone 1 receptor</i>
<b>PTHrP</b>	Gen für PTHrP
<b>PTHrP</b>	engl. <i>Parathyroid hormone-related protein</i>
<b>qPCR</b>	engl. <i>Quantitative polymerase chain reaction</i>
<b>RANK</b>	engl. <i>Receptor activator of nuclear factor kappa B</i>
<b>RANKL</b>	engl. <i>Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand</i>
<b>ROX</b>	5-Carboxy-X-rhodamin
<b>RTK</b>	Rezeptor-Tyrosinkinase
<b>RT-qPCR</b>	engl. <i>Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction</i>
<b>RUNX2</b>	engl. <i>Runt-related transcription factor 2</i>
<b>SCAPs</b>	engl. <i>Stem cells from apical papilla</i>
<b>SHED</b>	engl. <i>Stem cells from human exfoliated deciduous teeth</i>
<b>SHH</b>	engl. <i>Sonic hedgehog</i>
<b>siRNAs</b>	engl. <i>Small interfering RNAs</i>
<b>SOD1</b>	Superoxiddismutase 1
<b>SUFU</b>	engl. <i>Suppressor of fused homolog</i>
<b>TBS</b>	engl. <i>Tris-buffered saline</i>
<b>TBST</b>	engl. <i>Tris-buffered saline with Tween® 20</i>
<b>TCF</b>	engl. <i>T-cell factor</i>
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	engl. <i>Transforming growth factor <math>\beta</math></i>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	engl. <i>Tumor necrosis factor alpha</i>
<b>TRAF6</b>	engl. <i>TNF receptor associated factor 6</i>
<b>Tris</b>	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
<b>WNT3A</b>	engl. <i>Wnt family member 3A</i>
<b>WNT5A</b>	engl. <i>Wnt family member 5A</i>
<b>WNT11</b>	engl. <i>Wnt family member 11</i>
<b>ZBTB16</b>	engl. <i>Zinc finger and BTB domain containing 16</i>

### 7.3 Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1: Zahnentwicklung und dentale Stammzellen</b> .....	8
<b>Abb. 2: Ursprung von DFCs und Rolle während der Zahnentwicklung</b> .....	9
<b>Abb. 3: Molekulare Mechanismen während der Initiierung des Zahndurchbruchs</b> .....	11
<b>Abb. 4: Molekulare Signalwege während der osteogenen Differenzierung in mesenchymalen Stamm-/Vorläuferzellen</b> .....	16
<b>Abb. 5: Molekulare Mechanismen während der osteogenen Differenzierung von DFCs</b> .....	21
<b>Abb. 6: Klassische PKC-Isoformen hemmen die osteogene Differenzierung von DFCs</b> .....	23
<b>Abb. 7: Schematischer Aufbau der verschiedenen PKC-Isoformen</b> .....	24
<b>Abb. 8: Molekularer Mechanismus der Aktivierung klassischer PKC-Isoformen</b> .....	26
<b>Abb. 9: Hypothesen zur Regulierung der osteogenen Differenzierung von DFCs durch PKC</b> .....	34
<b>Abb. 10: Die Regulierung von <math>\beta</math>-Catenin während der osteogenen Differenzierung</b> .....	58
<b>Abb. 11: Die Regulierung von <math>\beta</math>-Catenin nach Inhibition klassischer PKCs</b> .....	59
<b>Abb. 12: Die Regulierung der Proteinkinasen PKA und Akt während der osteogenen Differenzierung und nach Inhibition klassischer PKCs</b> .....	61
<b>Abb. 13: Die Regulierung der Akt-Aktivität durch klassische PKCs zu verschiedenen Zeitpunkten</b> .....	62
<b>Abb. 14: Die Regulierung der ALP-Aktivität und der Genexpression osteogener Marker durch Akt</b> .....	63
<b>Abb. 15: Die Regulierung der Mineralisierung durch Akt</b> .....	64
<b>Abb. 16: Der Einfluss einer Akt-Überaktivierung auf die Regulierung der Mineralisierung durch klassische PKCs</b> .....	65
<b>Abb. 17: Die Regulierung von GSK3<math>\beta</math> während der osteogenen Differenzierung und nach Inhibition klassischer PKCs</b> .....	66
<b>Abb. 18: Die Regulierung des kanonischen Wnt-Signalwegs und BMP-Signalwegs durch Akt</b> .....	68
<b>Abb. 19: Die Regulierung der PKC- und Akt-Aktivierung durch PTHrP und WNT5A</b> .....	70
<b>Abb. 20: Klassische PKCs regulieren die osteogene Differenzierung von DFCs über Akt und <math>\beta</math>-Catenin</b> .....	70
<b>Abb. 21: Die Regulierung von NF-<math>\kappa</math>B während der osteogenen Differenzierung</b> .....	72
<b>Abb. 22: Die Regulierung der NF-<math>\kappa</math>B-assoziierten Proteine während der osteogenen Differenzierung</b> .....	73
<b>Abb. 23: Die Regulierung der Zellproliferation durch NF-<math>\kappa</math>B</b> .....	74
<b>Abb. 24: Die Regulierung der ALP-Aktivität durch NF-<math>\kappa</math>B</b> .....	75
<b>Abb. 25: Die Regulierung der Mineralisierung durch NF-<math>\kappa</math>B</b> .....	77
<b>Abb. 26: Die Regulierung der Genexpression osteogener Marker durch NF-<math>\kappa</math>B</b> .....	78
<b>Abb. 27: Die Regulierung des NF-<math>\kappa</math>B-Signalwegs durch klassische PKCs</b> .....	79

<b>Abb. 28: Die Regulierung des NF-<math>\kappa</math>B-Signalwegs durch PTHrP</b> .....	80
<b>Abb. 29: Die Regulierung des NF-<math>\kappa</math>B-Signalwegs durch Akt</b> .....	81
<b>Abb. 30: Klassische PKCs und Akt regulieren die osteogene Differenzierung von DFCs über NF-<math>\kappa</math>B</b> .....	82
<b>Abb. 31: Die Rolle von PKA während der BMP2-induzierten osteogenen Differenzierung</b> .....	84
<b>Abb. 32: Die Rolle der Smad-Proteine, klassischer PKC-Isoformen und Akt für die BMP2-induzierte PKA-Aktivierung</b> .....	86
<b>Abb. 33: Die Rolle von DLX3 und PTHrP für die BMP2-induzierte PKA-Aktivierung</b> .....	87
<b>Abb. 34: Die Aktivierung von PKA über PTHrP</b> .....	88
<b>Abb. 35: Die Regulierung des BMP-Signalwegs und von PTHrP durch PKA</b> .....	89
<b>Abb. 36: BMP2 induziert die PKA-Aktivität über endogenes PTHrP</b> .....	89
<b>Abb. 37: Die Regulierung des mitochondrialen Stoffwechsels und des oxidativen Stresses während der osteogenen Differenzierung</b> .....	91
<b>Abb. 38: Die Regulierung von Proteinen zur Abwehr gegen oxidativen Stress während der osteogenen Differenzierung</b> .....	92
<b>Abb. 39: Die Regulierung der Genexpression von GPX1 und CAT während der osteogenen Differenzierung</b> .....	93
<b>Abb. 40: Die Regulierung der osteogenen Differenzierung von DFCs nach Manipulation des mitochondrialen Metabolismus und oxidativen Stresses</b> .....	94
<b>Abb. 41: Die Regulierung des Energiemetabolismus durch klassische PKCs</b> .....	95
<b>Abb. 42: Die Regulierung des oxidativen Stresses durch klassische PKCs und Akt</b> .....	96
<b>Abb. 43: Klassische PKCs hemmen die osteogene Differenzierung von DFCs durch Regulierung der Mitochondrien</b> .....	97
<b>Abb. 44: Die Regulierung der osteogenen Differenzierung von DFCs durch klassische PKCs</b> .....	98
<b>Abb. 45: Modell der Regulierung des NF-<math>\kappa</math>B-Signalwegs während der osteogenen Differenzierung von DFCs</b> .....	105
<b>Abb. 46: Die Regulierung der Zellproliferation durch klassische PKCs</b> .....	115
<b>Abb. A-1: Die Regulierung der PKC-Aktivität durch Gö6976 und PMA</b> .....	121
<b>Abb. A-2: Die Regulierung von P-Akt, P-GSK3<math>\beta</math> und P-NF-<math>\kappa</math>B nach siRNA-Herunterregulierung des Gens von PKC<math>\alpha</math></b> .....	122
<b>Abb. A-3: Die Inhibition von NF-<math>\kappa</math>B durch ACHP und CID2858522</b> .....	122
<b>Abb. A-4: Effizienz der siRNA-Herunterregulierung von BMP2, PRKACA, SMAD4 und PTHLH</b> .....	123
<b>Abb. A-5: Regulierung der Catalase durch klassische PKCs mit Darstellung des Gesamtproteins</b> .....	124

## 7.4 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1: Die Regulierung der osteogenen Differenzierung von mesenchymalen Stamm-/Vorläuferzellen durch PKC</b> .....	29
<b>Tabelle 2: Die Regulierung der adipogenen Differenzierung von mesenchymalen Stamm-/Vorläuferzellen durch PKC</b> .....	31
<b>Tabelle 3: Herstellerverzeichnis und im Text verwendete Kürzel</b> .....	36
<b>Tabelle 4: Verwendete Geräte</b> .....	37
<b>Tabelle 5: Verwendete Verbrauchsmaterialien</b> .....	39
<b>Tabelle 6: Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien</b> .....	39
<b>Tabelle 7: Verwendete Aktivatoren/Inhibitoren und Proteine zur Behandlung in der Zellkultur</b> .....	40
<b>Tabelle 8: Verwendete Puffer und sonstige Lösungen, die nicht selbst hergestellt wurden</b> .....	41
<b>Tabelle 9: Verwendete Puffer, die selbst hergestellt wurden</b> .....	41
<b>Tabelle 10: Sonstige verwendete Chemikalien</b> .....	42
<b>Tabelle 11: Verwendete Primärantikörper für Western Blots</b> .....	43
<b>Tabelle 12: Verwendete Sekundärantikörper für Western Blots</b> .....	45
<b>Tabelle 13: Verwendete Antikörper für Immunpräzipitationen</b> .....	45
<b>Tabelle 14: Verwendete Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbung</b> .....	45
<b>Tabelle 15: Verwendete Primer-Mischungen von der Firma BIO-RAD für Genexpressionsanalysen</b> .....	45
<b>Tabelle 16: Verwendete Primer für die Quantifizierung mitochondrialer DNA</b> .....	45
<b>Tabelle 17: Verwendete siRNAs von der Firma Qiagen</b> .....	46
<b>Tabelle 18: Verwendete Kits</b> .....	46
<b>Tabelle 19: Verwendete Software</b> .....	47
<b>Tabelle 20: Verwendete Abkürzungen</b> .....	125

## 8 Literaturverzeichnis

1. Laudenbach JM, Kumar SS (2020). Common Dental and Periodontal Diseases. *Dermatol Clin*, 38(4), 413–20. doi:10.1016/j.det.2020.05.002
2. Kassebaum NJ, Bernabé E, Dahiya M, Bhandari B, Murray CJL, Marcenes W (2014). Global burden of severe periodontitis in 1990–2010: a systematic review and meta-regression. *J Dent Res*, 93(11), 1045–53. doi:10.1177/0022034514552491
3. Kwon T, Lamster IB, Levin L (2021). Current Concepts in the Management of Periodontitis. *Int Dent J*, 71(6), 462–76. doi:10.1111/idj.12630
4. Yucel-Lindberg T, Båge T (2013). Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis. *Expert Rev Mol Med*, 15, e7. doi:10.1017/erm.2013.8
5. Darby I (2022). Risk factors for periodontitis & peri-implantitis. *Periodontol 2000*, 90(1), 9–12. doi:10.1111/prd.12447
6. Jokstad A, Braegger U, Brunski JB, Carr AB, Naert I, Wennerberg A (2003). Quality of dental implants. *Int Dent J*, 53(6 Suppl 2), 409–43. doi:10.1111/j.1875-595x.2003.tb00918.x
7. Zucchelli G, Wang H-L, Chambrone L (2022). Complications and treatment errors in periodontal and implant therapy. *Periodontol 2000*, 00, 1–4. doi:10.1111/prd.12442
8. Smeets R, Henningsen A, Jung O, Heiland M, Hammächer C, Stein JM (2014). Definition, etiology, prevention and treatment of peri-implantitis – a review. *Head Face Med*, 10, 34. doi:10.1186/1746-160X-10-34
9. Clark D, Levin L (2019). In the dental implant era, why do we still bother saving teeth? *Dent Traumatol*, 35(6), 368–75. doi:10.1111/edt.12492
10. Morsczeck C, Reichert TE (2018). Dental stem cells in tooth regeneration and repair in the future. *Expert Opin Biol Ther*, 18(2), 187–96. doi:10.1080/14712598.2018.1402004
11. Zhai Q, Dong Z, Wang W, Li B, Jin Y (2019). Dental stem cell and dental tissue regeneration. *Front Med*, 13(2), 152–9. doi:10.1007/s11684-018-0628-x
12. Langer R, Vacanti JP (1993). Tissue engineering. *Science*, 260(5110), 920–6. doi:10.1126/science.8493529
13. Nakao K, Morita R, Saji Y, Ishida K, Tomita Y, Ogawa M, Saitoh M, Tomooka Y, Tsuji T (2007). The development of a bioengineered organ germ method. *Nat Methods*, 4(3), 227–30. doi:10.1038/nmeth1012
14. Oshima M, Mizuno M, Imamura A, Ogawa M, Yasukawa M, Yamazaki H, Morita R, Ikeda E, Nakao K, Takano-Yamamoto T, Kasugai S, Saito M, Tsuji T (2011). Functional tooth regeneration using a bioengineered tooth unit as a mature organ replacement regenerative therapy. *PLoS One*, 6(7), e21531. doi:10.1371/journal.pone.0021531
15. Ikeda E, Morita R, Nakao K, Ishida K, Nakamura T, Takano-Yamamoto T, Ogawa M, Mizuno M, Kasugai S, Tsuji T (2009). Fully functional bioengineered tooth replacement as an organ replacement therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(32), 13475–80. doi:10.1073/pnas.0902944106
16. Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo B-M, Zhang C, Liu H, Gronthos S, Wang C-Y, Wang S, Shi S (2006). Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS One*, 1(1), e79. doi:10.1371/journal.pone.0000079
17. Du J, Shan Z, Ma P, Wang S, Fan Z (2014). Allogeneic bone marrow mesenchymal stem cell transplantation for periodontal regeneration. *J Dent Res*, 93(2), 183–8. doi:10.1177/0022034513513026
18. Baik HS, Park J, Lee KJ, Chung C (2014). Local application of periodontal ligament stromal cells promotes soft tissue regeneration. *Oral Dis*, 20(6), 574–81. doi:10.1111/odi.12175

19. Nagata M, Iwasaki K, Akazawa K, Komaki M, Yokoyama N, Izumi Y, Morita I (2017). Conditioned Medium from Periodontal Ligament Stem Cells Enhances Periodontal Regeneration. *Tissue Eng Part A*, 23(9-10), 367–77. doi:10.1089/ten.TEA.2016.0274
20. Wu J, Chen L, Wang R, Song Z, Shen Z, Zhao Y, Huang S, Lin Z (2019). Exosomes Secreted by Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth Promote Alveolar Bone Defect Repair through the Regulation of Angiogenesis and Osteogenesis. *ACS Biomater Sci Eng*, 5(7), 3561–71. doi:10.1021/acsbiomaterials.9b00607
21. Ferrarotti F, Romano F, Gamba MN, Quirico A, Giraudi M, Audagna M, Aimetti M (2018). Human intrabony defect regeneration with micrografts containing dental pulp stem cells: A randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol*, 45(7), 841–50. doi:10.1111/jcpe.12931
22. Sánchez N, Fierravanti L, Núñez J, Vignoletti F, González-Zamora M, Santamaría S, Suárez-Sancho S, Fernández-Santos ME, Figuero E, Herrera D, García-Sanz JA, Sanz M (2020). Periodontal regeneration using a xenogeneic bone substitute seeded with autologous periodontal ligament-derived mesenchymal stem cells: A 12-month quasi-randomized controlled pilot clinical trial. *J Clin Periodontol*, 47(11), 1391–402. doi:10.1111/jcpe.13368
23. Abdal-Wahab M, Abdel Ghaffar KA, Ezzatt OM, Hassan AAA, El Ansary MMS, Gamal AY (2020). Regenerative potential of cultured gingival fibroblasts in treatment of periodontal intrabony defects (randomized clinical and biochemical trial). *J Periodontol Res*, 55(3), 441–52. doi:10.1111/jre.12728
24. Nakashima M, Iohara K, Murakami M, Nakamura H, Sato Y, Arijji Y, Matsushita K (2017). Pulp regeneration by transplantation of dental pulp stem cells in pulpitis: a pilot clinical study. *Stem Cell Res Ther*, 8(1), 61. doi:10.1186/s13287-017-0506-5
25. Yuan Y, Chai Y (2019). Regulatory mechanisms of jaw bone and tooth development. *Curr Top Dev Biol*, 133, 91–118. doi:10.1016/bs.ctdb.2018.12.013
26. Balic A (2018). Biology Explaining Tooth Repair and Regeneration: A Mini-Review. *Gerontology*, 64(4), 382–8. doi:10.1159/000486592
27. Sharpe PT (2016). Dental mesenchymal stem cells. *Development*, 143(13), 2273–80. doi:10.1242/dev.134189
28. Bi R, Lyu P, Song Y, Li P, Song D, Cui C, Fan Y (2021). Function of Dental Follicle Progenitor/Stem Cells and Their Potential in Regenerative Medicine: From Mechanisms to Applications. *Biomolecules*, 11(7), 997. doi:10.3390/biom11070997
29. Lopes Dias J, Borges A, Lima Rego R (2016). Primary intraosseous squamous cell carcinoma of the mandible: a case with atypical imaging features. *BJR Case Rep*, 2(4), 20150276. doi:10.1259/bjrcr.20150276
30. Chiba N, Noguchi Y, Seong CH, Ohnishi T, Matsuguchi T (2022). EGR1 plays an important role in BMP9-mediated osteoblast differentiation by promoting SMAD1/5 phosphorylation. *FEBS Lett*, 596(13), 1720–32. doi:10.1002/1873-3468.14407
31. Aydin S, Şahin F (2019). Stem Cells Derived from Dental Tissues. *Adv Exp Med Biol*, 1144, 123–32. doi:10.1007/5584\_2018\_333
32. Hu L, Liu Y, Wang S (2018). Stem cell-based tooth and periodontal regeneration. *Oral Dis*, 24(5), 696–705. doi:10.1111/odi.12703
33. Cate AR ten (1997). The development of the periodontium – a largely ectomesenchymally derived unit. *Periodontol 2000*, 13, 9–19. doi:10.1111/j.1600-0757.1997.tb00093.x
34. Han J, Menicanin D, Gronthos S, Bartold PM (2014). Stem cells, tissue engineering and periodontal regeneration. *Aust Dent J*, 59 Suppl 1, 117–30. doi:10.1111/adj.12100
35. Huang X, Bringas P, Slavkin HC, Chai Y (2009). Fate of HERS during tooth root development. *Dev Biol*, 334(1), 22–30. doi:10.1016/j.ydbio.2009.06.034
36. Li J, Parada C, Chai Y (2017). Cellular and molecular mechanisms of tooth root development. *Development*, 144(3), 374–84. doi:10.1242/dev.137216

37. Cahill DR, Marks SC (1980). Tooth eruption: evidence for the central role of the dental follicle. *J Oral Pathol*, 9(4), 189–200. doi:10.1111/j.1600-0714.1980.tb00377.x
38. Wise GE (2009). Cellular and molecular basis of tooth eruption. *Orthod Craniofac Res*, 12(2), 67–73. doi:10.1111/j.1601-6343.2009.01439.x
39. Shroff B, Pileggi R, Morris K, Orbegoso R, Wilson T, Sauk JJ (1994). Dynamic variations in the expression of type I collagen and its molecular chaperone Hsp47 in cells of the mouse dental follicle during tooth eruption. *Arch Oral Biol*, 39(3), 231–43. doi:10.1016/0003-9969(94)90049-3
40. Kawakami M, Kuroda S, Yoshida CA, Yamashita K, Takada K (2000). Dental follicle cell-conditioned medium enhances the formation of osteoclast-like multinucleated cells. *Eur J Orthod*, 22(6), 675–82. doi:10.1093/ejo/22.6.675
41. Yao S, Ring S, Henk WG, Wise GE (2004). In vivo expression of RANKL in the rat dental follicle as determined by laser capture microdissection. *Arch Oral Biol*, 49(6), 451–6. doi:10.1016/j.archoralbio.2004.01.009
42. Ikeda T, Kasai M, Utsuyama M, Hirokawa K (2001). Determination of three isoforms of the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and their differential expression in bone and thymus. *Endocrinology*, 142(4), 1419–26. doi:10.1210/endo.142.4.8070
43. Wise GE, Yao S (2006). Regional differences of expression of bone morphogenetic protein-2 and RANKL in the rat dental follicle. *Eur J Oral Sci*, 114(6), 512–6. doi:10.1111/j.1600-0722.2006.00406.x
44. Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, Solovyev I, Colombero A, Timms E, Tan HL, Elliott G, Kelley MJ, Sarosi I, Wang L, Xia XZ, Elliott R, Chiu L, Black T, Scully S, Capparelli C, Morony S, Shimamoto G, Bass MB, Boyle WJ (1999). Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(7), 3540–5. doi:10.1073/pnas.96.7.3540
45. Nakagawa N, Kinoshita M, Yamaguchi K, Shima N, Yasuda H, Yano K, Morinaga T, Higashio K (1998). RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 253(2), 395–400. doi:10.1006/bbrc.1998.9788
46. Simonet W, Lacey D, Dunstan C, Kelley M, Chang M-S, Lüthy R, Nguyen H, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan H-L, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes T, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle W (1997). Osteoprotegerin: A Novel Secreted Protein Involved in the Regulation of Bone Density. *Cell*, 89(2), 309–19. doi:10.1016/S0092-8674(00)80209-3
47. Wise GE, Yao S, Odgren PR, Pan F (2005). CSF-1 regulation of osteoclastogenesis for tooth eruption. *J Dent Res*, 84(9), 837–41. doi:10.1177/154405910508400911
48. Arai F, Miyamoto T, Ohneda O, Inada T, Sudo T, Brasel K, Miyata T, Anderson DM, Suda T (1999). Commitment and differentiation of osteoclast precursor cells by the sequential expression of c-Fms and receptor activator of nuclear factor kappaB (RANK) receptors. *J Exp Med*, 190(12), 1741–54. doi:10.1084/jem.190.12.1741
49. Zhang J, Liao L, Li Y, Xu Y, Guo W, Tian W, Zou S (2019). Parathyroid hormone-related peptide (1-34) promotes tooth eruption and inhibits osteogenesis of dental follicle cells during tooth development. *J Cell Physiol*, 234(7), 11900–11. doi:10.1002/jcp.27857
50. Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger JM (2006). RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol Med*, 12(1), 17–25. doi:10.1016/j.molmed.2005.11.007
51. Que BG, Lumpkin SJ, Wise GE (1999). Implications for tooth eruption of the effect of interleukin-1 $\alpha$  on nuclear factor- $\kappa$ B gene expression in the rat dental follicle. *Arch Oral Biol*, 44(11), 961–7. doi:10.1016/s0003-9969(99)00071-0
52. Wise GE, Lin F, Fan W (1992). Culture and characterization of dental follicle cells from rat molars. *Cell Tissue Res*, 267(3), 483–92. doi:10.1007/BF00319370

53. Morsczeck C, Götz W, Schierholz J, Zeilhofer F, Kühn U, Möhl C, Sippel C, Hoffmann KH (2005). Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol*, 24(2), 155–65. doi:10.1016/j.matbio.2004.12.004
54. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet*, 3(4), 393–403. doi:10.1111/j.1365-2184.1970.tb00347.x
55. Gronthos S, Graves SE, Ohta S, Simmons PJ (1994). The STRO-1+ fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. *Blood*, 84(12), 4164–73. doi:10.1182/blood.V84.12.4164.bloodjournal84124164
56. Lima RL, Holanda-Afonso RC, Moura-Neto V, Bolognese AM, DosSantos MF, Souza MM (2017). Human dental follicle cells express embryonic, mesenchymal and neural stem cells markers. *Arch Oral Biol*, 73, 121–8. doi:10.1016/j.archoralbio.2016.10.003
57. Morsczeck C (2021). Effects of Cellular Senescence on Dental Follicle Cells. *Pharmacology*, 106(3-4), 137–42. doi:10.1159/000510014
58. Zhaosong M, Na F, Shuling G, Jiacheng L, Ran W (2021). Heterogeneity affects the differentiation potential of dental follicle stem cells through the TGF- $\beta$  signaling pathway. *Bioengineered*, 12(2), 12294–307. doi:10.1080/21655979.2021.2009974
59. Chai Y, Jiang X, Ito Y, Bringas P, Han J, Rowitch DH, Soriano P, McMahon AP, Sucov HM (2000). Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. *Development*, 127(8), 1671–9. doi:10.1242/dev.127.8.1671
60. Honda MJ, Imaizumi M, Tsuchiya S, Morsczeck C (2010). Dental follicle stem cells and tissue engineering. *J Oral Sci*, 52(4), 541–52. doi:10.2334/josnurd.52.541
61. Tian Y, Bai D, Guo W, Li J, Zeng J, Yang L, Jiang Z, Feng L, Yu M, Tian W (2015). Comparison of human dental follicle cells and human periodontal ligament cells for dentin tissue regeneration. *Regen Med*, 10(4), 461–79. doi:10.2217/rme.15.21
62. Qu G, Li Y, Chen L, Chen Q, Zou D, Yang C, Zhou Q (2021). Comparison of Osteogenic Differentiation Potential of Human Dental-Derived Stem Cells Isolated from Dental Pulp, Periodontal Ligament, Dental Follicle, and Alveolar Bone. *Stem Cells Int*, 2021, 6631905. doi:10.1155/2021/6631905
63. Yao S, Pan F, Prpic V, Wise GE (2008). Differentiation of stem cells in the dental follicle. *J Dent Res*, 87(8), 767–71. doi:10.1177/154405910808700801
64. Felthaus O, Ernst W, Driemel O, Reichert TE, Schmalz G, Morsczeck C (2010). TGF-beta stimulates glial-like differentiation in murine dental follicle precursor cells (mDFPCs). *Neurosci Lett*, 471(3), 179–84. doi:10.1016/j.neulet.2010.01.037
65. Völlner F, Ernst W, Driemel O, Morsczeck C (2009). A two-step strategy for neuronal differentiation in vitro of human dental follicle cells. *Differentiation*, 77(5), 433–41. doi:10.1016/j.diff.2009.03.002
66. Guo S, Guo W, Ding Y, Gong J, Zou Q, Xie D, Chen Y, Wu Y, Tian W (2013). Comparative study of human dental follicle cell sheets and periodontal ligament cell sheets for periodontal tissue regeneration. *Cell Transplant*, 22(6), 1061–73. doi:10.3727/096368912X656036
67. Guo S, Kang J, Ji B, Guo W, Ding Y, Wu Y, Tian W (2017). Periodontal-Derived Mesenchymal Cell Sheets Promote Periodontal Regeneration in Inflammatory Microenvironment. *Tissue Eng Part A*, 23(13-14), 585–96. doi:10.1089/ten.TEA.2016.0334
68. Chatzivasileiou K, Lux CA, Steinhoff G, Lang H (2013). Dental follicle progenitor cells responses to Porphyromonas gingivalis LPS. *J Cell Mol Med*, 17(6), 766–73. doi:10.1111/jcmm.12058
69. Yildirim S, Zibandeh N, Genc D, Ozcan EM, Goker K, Akkoc T (2016). The Comparison of the Immunologic Properties of Stem Cells Isolated from Human Exfoliated Deciduous Teeth, Dental Pulp, and Dental Follicles. *Stem Cells Int*, 2016, 4682875. doi:10.1155/2016/4682875



70. Topcu Sarica L, Zibandeh N, Genç D, Gül F, Akkoç T, Kombak EF, Cinel L, Akkoç T, Cinel I (2020). Immunomodulatory and Tissue-preserving Effects of Human Dental Follicle Stem Cells in a Rat Cecal Ligation and Perforation Sepsis Model. *Arch Med Res*, 51(5), 397–405. doi:10.1016/j.arcmed.2020.04.010
71. Zibandeh N, Genc D, Ozgen Z, Duran Y, Goker K, Baris S, Ergun T, Akkoc T (2021). Mesenchymal stem cells derived from human dental follicle modulate the aberrant immune response in atopic dermatitis. *Immunotherapy*, 13(10), 825–40. doi:10.2217/imt-2020-0257
72. Takahashi K, Ogura N, Tomoki R, Eda T, Okada H, Kato R, Iwai S, Ito K, Kuyama K, Kondoh T (2015). Applicability of human dental follicle cells to bone regeneration without dexamethasone: an in vivo pilot study. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 44(5), 664–9. doi:10.1016/j.ijom.2014.11.006
73. Yi G, Zhang S, Ma Y, Yang X, Huo F, Chen Y, Yang B, Tian W (2022). Matrix vesicles from dental follicle cells improve alveolar bone regeneration via activation of the PLC/PKC/MAPK pathway. *Stem Cell Res Ther*, 13(1), 41. doi:10.1186/s13287-022-02721-6
74. Oshima M, Inoue K, Nakajima K, Tachikawa T, Yamazaki H, Isobe T, Sugawara A, Ogawa M, Tanaka C, Saito M, Kasugai S, Takano-Yamamoto T, Inoue T, Tezuka K, Kuboki T, Yamaguchi A, Tsuji T (2014). Functional tooth restoration by next-generation bio-hybrid implant as a bio-hybrid artificial organ replacement therapy. *Sci Rep*, 4, 6044. doi:10.1038/srep06044
75. Viale-Bouroncle S, Bey B, Reichert TE, Schmalz G, Morsczeck C (2011).  $\beta$ -tricalcium-phosphate stimulates the differentiation of dental follicle cells. *J Mater Sci Mater Med*, 22(7), 1719–24. doi:10.1007/s10856-011-4345-0
76. Viale-Bouroncle S, Völlner F, Möhl C, Küpper K, Brockhoff G, Reichert TE, Schmalz G, Morsczeck C (2011). Soft matrix supports osteogenic differentiation of human dental follicle cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 410(3), 587–92. doi:10.1016/j.bbrc.2011.06.031
77. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE (2006). Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, 126(4), 677–89. doi:10.1016/j.cell.2006.06.044
78. Chu J, Pieves O, Pfeifer CG, Alt V, Morsczeck C, Docheva D (2021). Dental follicle cell differentiation towards periodontal ligament-like tissue in a self-assembly three-dimensional organoid model. *Eur Cell Mater*, 42, 20–33. doi:10.22203/eCM.v042a02
79. Morsczeck C (2022). Mechanisms during Osteogenic Differentiation in Human Dental Follicle Cells. *Int J Mol Sci*, 23(11), 5945. doi:10.3390/ijms23115945
80. Long F, Ornitz DM (2013). Development of the endochondral skeleton. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5(1), a008334. doi:10.1101/cshperspect.a008334
81. Zhao M, Xiao G, Berry JE, Franceschi RT, Reddi A, Somerman MJ (2002). Bone morphogenetic protein 2 induces dental follicle cells to differentiate toward a cementoblast/osteoblast phenotype. *J Bone Miner Res*, 17(8), 1441–51. doi:10.1359/jbmr.2002.17.8.1441
82. Morsczeck C, Moehl C, Götz W, Heredia A, Schäffer TE, Eckstein N, Sippel C, Hoffmann KH (2005). In vitro differentiation of human dental follicle cells with dexamethasone and insulin. *Cell Biol Int*, 29(7), 567–75. doi:10.1016/j.cellbi.2005.03.020
83. Kémoun P, Laurencin-Dalicioux S, Rue J, Farges J-C, Gennero I, Conte-Auriol F, Briand-Mesange F, Gadelorge M, Arzate H, Narayanan AS, Brunel G, Salles J-P (2007). Human dental follicle cells acquire cementoblast features under stimulation by BMP-2/-7 and enamel matrix derivatives (EMD) in vitro. *Cell Tissue Res*, 329(2), 283–94. doi:10.1007/s00441-007-0397-3
84. Saugspier M, Felthaus O, Viale-Bouroncle S, Driemel O, Reichert TE, Schmalz G, Morsczeck C (2010). The differentiation and gene expression profile of human dental follicle cells. *Stem Cells Dev*, 19(5), 707–17. doi:10.1089/scd.2010.0027
85. Katagiri T, Yamaguchi A, Ikeda T, Yoshiki S, Wozney JM, Rosen V, Wang EA, Tanaka H, Omura S, Suda T (1990). The non-osteogenic mouse pluripotent cell line, C3H10T1/2, is induced to differentiate into osteoblastic cells by recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Biochem Biophys Res Commun*, 172(1), 295–9. doi:10.1016/S0006-291X(05)80208-6

86. McCulloch CA, Tenenbaum HC (1986). Dexamethasone induces proliferation and terminal differentiation of osteogenic cells in tissue culture. *Anat Rec*, 215(4), 397–402. doi:10.1002/ar.1092150410
87. Young HE, Steele TA, Bray RA, Detmer K, Blake LW, Lucas PW, Black AC (1999). Human pluripotent and progenitor cells display cell surface cluster differentiation markers CD10, CD13, CD56, and MHC class-I. *Proc Soc Exp Biol Med*, 221(1), 63–71. doi:10.1046/j.1525-1373.1999.d01-55.x
88. Palermo C, Manduca P, Gazzero E, Foppiani L, Segat D, Barreca A (2004). Potentiating role of IGFBP-2 on IGF-II-stimulated alkaline phosphatase activity in differentiating osteoblasts. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 286(4), E648-57. doi:10.1152/ajpendo.00049.2003
89. Morsczeck C, Schmalz G, Reichert TE, Völlner F, Saugspier M, Viale-Bouroncle S, Driemel O (2009). Gene expression profiles of dental follicle cells before and after osteogenic differentiation in vitro. *Clin Oral Investig*, 13(4), 383–91. doi:10.1007/s00784-009-0260-x
90. Chen G, Deng C, Li Y-P (2012). TGF- $\beta$  and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *Int J Biol Sci*, 8(2), 272–88. doi:10.7150/ijbs.2929
91. Liu M, Goldman G, MacDougall M, Chen S (2022). BMP Signaling Pathway in Dentin Development and Diseases. *Cells*, 11(14), 2216. doi:10.3390/cells11142216
92. Karner CM, Lee S-Y, Long F (2017). Bmp Induces Osteoblast Differentiation through both Smad4 and mTORC1 Signaling. *Mol Cell Biol*, 37(4), e00253-16. doi:10.1128/MCB.00253-16
93. Wharton K, Derynck R (2009). TGFbeta family signaling: novel insights in development and disease. *Development*, 136(22), 3691–7. doi:10.1242/dev.040584
94. Shi X, Yang X, Chen D, Chang Z, Cao X (1999). Smad1 interacts with homeobox DNA-binding proteins in bone morphogenetic protein signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 274(19), 13711–7. doi:10.1074/jbc.274.19.13711
95. Lowery JW, Rosen V (2018). The BMP Pathway and Its Inhibitors in the Skeleton. *Physiol Rev*, 98(4), 2431–52. doi:10.1152/physrev.00028.2017
96. Xiao G, Di Jiang, Gopalakrishnan R, Franceschi RT (2002). Fibroblast growth factor 2 induction of the osteocalcin gene requires MAPK activity and phosphorylation of the osteoblast transcription factor, Cbfa1/Runx2. *Journal of Biological Chemistry*, 277(39), 36181–7. doi:10.1074/jbc.M206057200
97. Kouhara H, Hadari Y, Spivak-Kroizman T, Schilling J, Bar-Sagi D, Lax I, Schlessinger J (1997). A Lipid-Anchored Grb2-Binding Protein That Links FGF-Receptor Activation to the Ras/MAPK Signaling Pathway. *Cell*, 89(5), 693–702. doi:10.1016/S0092-8674(00)80252-4
98. Lee K-S, Hong S-H, Bae S-C (2002). Both the Smad and p38 MAPK pathways play a crucial role in Runx2 expression following induction by transforming growth factor-beta and bone morphogenetic protein. *Oncogene*, 21(47), 7156–63. doi:10.1038/sj.onc.1205937
99. Hollnagel A, Ahrens M, Gross G (1997). Parathyroid hormone enhances early and suppresses late stages of osteogenic and chondrogenic development in a BMP-dependent mesenchymal differentiation system (C3H10T1/2). *J Bone Miner Res*, 12(12), 1993–2004. doi:10.1359/jbmr.1997.12.12.1993
100. Yu B, Zhao X, Yang C, Crane J, Xian L, Lu W, Wan M, Cao X (2012). Parathyroid hormone induces differentiation of mesenchymal stromal/stem cells by enhancing bone morphogenetic protein signaling. *J Bone Miner Res*, 27(9), 2001–14. doi:10.1002/jbmr.1663
101. Zhang K, Zhang F-J, Zhao W-J, Xing G-S, Bai X, Wang Y (2014). Effects of parathyroid hormone-related protein on osteogenic and adipogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 18(11), 1610–7.
102. Castro LF de, Lozano D, Portal-Núñez S, Maycas M, La Fuente M de, Caeiro JR, Esbrit P (2012). Comparison of the skeletal effects induced by daily administration of PTHrP (1-36) and PTHrP (107-139) to ovariectomized mice. *J Cell Physiol*, 227(4), 1752–60. doi:10.1002/jcp.22902

103. Karaplis AC, Goltzman D (2000). PTH and PTHrP effects on the skeleton. *Rev Endocr Metab Disord*, 1(4), 331–41. doi:10.1023/a:1026526703898
104. Zhang H, Li L, Dong Q, Wang Y, Feng Q, Ou X, Zhou P, He T, Luo J (2015). Activation of PKA/CREB Signaling is Involved in BMP9-Induced Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Cell Physiol Biochem*, 37(2), 548–62. doi:10.1159/000430376
105. Zhang R, Edwards JR, Ko S-Y, Dong S, Liu H, Oyajobi BO, Papasian C, Deng H-W, Zhao M (2011). Transcriptional regulation of BMP2 expression by the PTH-CREB signaling pathway in osteoblasts. *PLoS One*, 6(6), e20780. doi:10.1371/journal.pone.0020780
106. Clevers H (2006). Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell*, 127(3), 469–80. doi:10.1016/j.cell.2006.10.018
107. Duan P, Bonewald LF (2016). The role of the wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in formation and maintenance of bone and teeth. *Int J Biochem Cell Biol*, 77 (Pt A), 23–9. doi:10.1016/j.biocel.2016.05.015
108. Xing Y, Clements WK, Kimelman D, Xu W (2003). Crystal structure of a beta-catenin/axin complex suggests a mechanism for the beta-catenin destruction complex. *Genes Dev*, 17(22), 2753–64. doi:10.1101/gad.1142603
109. Amit S, Hatzubai A, Birman Y, Andersen JS, Ben-Shushan E, Mann M, Ben-Neriah Y, Alkalay I (2002). Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway. *Genes Dev*, 16(9), 1066–76. doi:10.1101/gad.230302
110. Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R (1997). beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J*, 16(13), 3797–804. doi:10.1093/emboj/16.13.3797
111. MacDonald BT, Tamai K, He X (2009). Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell*, 17(1), 9–26. doi:10.1016/j.devcel.2009.06.016
112. Behrens J, Kries JP v., Kühl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, Birchmeier W (1996). Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature*, 382(6592), 638–42. doi:10.1038/382638a0
113. Molenaar M, van de Wetering M, Oosterwegel M, Peterson-Maduro J, Godsave S, Korinek V, Roose J, Destree O, Clevers H (1996). XTcf-3 Transcription Factor Mediates  $\beta$ -Catenin-Induced Axis Formation in *Xenopus* Embryos. *Cell*, 86(3), 391–9. doi:10.1016/S0092-8674(00)80112-9
114. Oishi I, Suzuki H, Onishi N, Takada R, Kani S, Ohkawara B, Koshida I, Suzuki K, Yamada G, Schwabe GC, Mundlos S, Shibuya H, Takada S, Minami Y (2003). The receptor tyrosine kinase Ror2 is involved in non-canonical Wnt5a/JNK signalling pathway. *Genes Cells*, 8(7), 645–54. doi:10.1046/j.1365-2443.2003.00662.x
115. Maeda K, Kobayashi Y, Koide M, Uehara S, Okamoto M, Ishihara A, Kayama T, Saito M, Marumo K (2019). The Regulation of Bone Metabolism and Disorders by Wnt Signaling. *Int J Mol Sci*, 20(22), 5525. doi:10.3390/ijms20225525
116. Lojk J, Marc J (2021). Roles of Non-Canonical Wnt Signalling Pathways in Bone Biology. *Int J Mol Sci*, 22(19), 10840. doi:10.3390/ijms221910840
117. Santos A, Bakker AD, Blicck-Hogervorst JMA de, Klein-Nulend J (2010). WNT5A induces osteogenic differentiation of human adipose stem cells via rho-associated kinase ROCK. *Cytotherapy*, 12(7), 924–32. doi:10.3109/14653241003774011
118. Rui S, Kubota T, Ohata Y, Yamamoto K, Fujiwara M, Takeyari S, Ozono K (2022). Phosphate promotes osteogenic differentiation through non-canonical Wnt signaling pathway in human mesenchymal stem cells. *Bone*, 164, 116525. doi:10.1016/j.bone.2022.116525
119. Zhu J-H, Liao Y-P, Li F-S, Hu Y, Li Q, Ma Y, Wang H, Zhou Y, He B-C, Su Y-X (2018). Wnt11 promotes BMP9-induced osteogenic differentiation through BMPs/Smads and p38 MAPK in mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem*, 119(11), 9462–73. doi:10.1002/jcb.27262

120. Hasegawa D, Wada N, Yoshida S, Mitarai H, Arima M, Tomokiyo A, Hamano S, Sugii H, Maeda H (2018). Wnt5a suppresses osteoblastic differentiation of human periodontal ligament stem cell-like cells via Ror2/JNK signaling. *J Cell Physiol*, 233(2), 1752–62. doi:10.1002/jcp.26086
121. Wagley Y, Chesi A, Acevedo PK, Lu S, Wells AD, Johnson ME, Grant SFA, Hankenson KD (2020). Canonical Notch signaling is required for bone morphogenetic protein-mediated human osteoblast differentiation. *Stem Cells*, 38(10), 1332–47. doi:10.1002/stem.3245
122. Ye Y-C, Zhao J-L, Lu Y-T, Gao C-C, Yang Y, Liang S-Q, Lu Y-Y, Wang L, Yue S-Q, Dou K-F, Qin H-Y, Han H (2019). NOTCH Signaling via WNT Regulates the Proliferation of Alternative, CCR2-Independent Tumor-Associated Macrophages in Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Res*, 79(16), 4160–72. doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-1691
123. Deregowski V, Gazzero E, Priest L, Rydziel S, Canalis E (2006). Notch 1 overexpression inhibits osteoblastogenesis by suppressing Wnt/beta-catenin but not bone morphogenetic protein signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 281(10), 6203–10. doi:10.1074/jbc.M508370200
124. Jayasena CS, Ohyama T, Segil N, Groves AK (2008). Notch signaling augments the canonical Wnt pathway to specify the size of the otic placode. *Development*, 135(13), 2251–61. doi:10.1242/dev.017905
125. Pakvasa M, Haravu P, Boachie-Mensah M, Jones A, Coalson E, Liao J, Zeng Z, Di Wu, Qin K, Wu X, Luo H, Zhang J, Zhang M, He F, Mao Y, Zhang Y, Niu C, Wu M, Zhao X, Wang H, Huang L, Shi D, Liu Q, Ni N, Fu K, Lee MJ, Wolf JM, Athiviraham A, Ho SS, He T-C, Hynes K, Strelzow J, El Dafrawy M, Reid RR (2021). Notch signaling: Its essential roles in bone and craniofacial development. *Genes Dis*, 8(1), 8–24. doi:10.1016/j.gendis.2020.04.006
126. Engin F, Yao Z, Yang T, Zhou G, Bertin T, Jiang MM, Chen Y, Wang L, Zheng H, Sutton RE, Boyce BF, Lee B (2008). Dimorphic effects of Notch signaling in bone homeostasis. *Nat Med*, 14(3), 299–305. doi:10.1038/nm1712
127. Sciaudone M, Gazzero E, Priest L, Delany AM, Canalis E (2003). Notch 1 impairs osteoblastic cell differentiation. *Endocrinology*, 144(12), 5631–9. doi:10.1210/en.2003-0463
128. Yuasa T, Kataoka H, Kinto N, Iwamoto M, Enomoto-Iwamoto M, Iemura S-I, Ueno N, Shibata Y, Kurosawa H, Yamaguchi A (2002). Sonic hedgehog is involved in osteoblast differentiation by cooperating with BMP-2. *J Cell Physiol*, 193(2), 225–32. doi:10.1002/jcp.10166
129. Marigo V, Davey RA, Zuo Y, Cunningham JM, Tabin CJ (1996). Biochemical evidence that patched is the Hedgehog receptor. *Nature*, 384(6605), 176–9. doi:10.1038/384176a0
130. Marigo V, Johnson RL, Vortkamp A, Tabin CJ (1996). Sonic hedgehog differentially regulates expression of GLI and GLI3 during limb development. *Dev Biol*, 180(1), 273–83. doi:10.1006/dbio.1996.0300
131. Carpenter D, Stone DM, Brush J, Ryan A, Armanini M, Frantz G, Rosenthal A, de Sauvage FJ (1998). Characterization of two patched receptors for the vertebrate hedgehog protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(23), 13630–4. doi:10.1073/pnas.95.23.13630
132. Vortkamp A, Lee K, Lanske B, Segre GV, Kronenberg HM, Tabin CJ (1996). Regulation of rate of cartilage differentiation by Indian hedgehog and PTH-related protein. *Science*, 273(5275), 613–22. doi:10.1126/science.273.5275.613
133. Shimoyama A, Wada M, Ikeda F, Hata K, Matsubara T, Nifuji A, Noda M, Amano K, Yamaguchi A, Nishimura R, Yoneda T (2007). Ihh/Gli2 signaling promotes osteoblast differentiation by regulating Runx2 expression and function. *Mol Biol Cell*, 18(7), 2411–8. doi:10.1091/mbc.e06-08-0743
134. Kogerman P, Grimm T, Kogerman L, Krause D, Undén AB, Sandstedt B, Toftgård R, Zaphiropoulos PG (1999). Mammalian suppressor-of-fused modulates nuclear-cytoplasmic shuttling of Gli-1. *Nat Cell Biol*, 1(5), 312–9. doi:10.1038/13031
135. Komori T (2006). Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *J Cell Biochem*, 99(5), 1233–9. doi:10.1002/jcb.20958

136. Hassan MQ, Javed A, Morasso MI, Karlin J, Montecino M, van Wijnen AJ, Stein GS, Stein JL, Lian JB (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(20), 9248–61. doi:10.1128/MCB.24.20.9248-9261.2004
137. Satokata I, Ma L, Ohshima H, Bei M, Woo I, Nishizawa K, Maeda T, Takano Y, Uchiyama M, Heaney S, Peters H, Tang Z, Maxson R, Maas R (2000). Msx2 deficiency in mice causes pleiotropic defects in bone growth and ectodermal organ formation. *Nat Genet*, 24(4), 391–5. doi:10.1038/74231
138. Aïoub M, Lézot F, Molla M, Castaneda B, Robert B, Goubin G, Néfussi JR, Berdal A (2007). Msx2 *-/-* transgenic mice develop compound amelogenesis imperfecta, dentinogenesis imperfecta and periodontal osteopetrosis. *Bone*, 41(5), 851–9. doi:10.1016/j.bone.2007.07.023
139. Price JA, Bowden DW, Wright JT, Pettenati MJ, Hart TC (1998). Identification of a mutation in DLX3 associated with tricho-dento-osseous (TDO) syndrome. *Hum Mol Genet*, 7(3), 563–9. doi:10.1093/hmg/7.3.563
140. Isaac J, Erthal J, Gordon J, Duverger O, Sun H-W, Lichtler AC, Stein GS, Lian JB, Morasso MI (2014). DLX3 regulates bone mass by targeting genes supporting osteoblast differentiation and mineral homeostasis in vivo. *Cell Death Differ*, 21(9), 1365–76. doi:10.1038/cdd.2014.82
141. Sun S, Yu M, Fan Z, Yeh I-T, Feng H, Liu H, Han D (2019). DLX3 regulates osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells via Wnt/ $\beta$ -catenin pathway mediated histone methylation of DKK4. *Biochem Biophys Res Commun*, 516(1), 171–6. doi:10.1016/j.bbrc.2019.06.029
142. Dodig M, Tadic T, Kronenberg MS, Dacic S, Liu YH, Maxson R, Rowe DW, Lichtler AC (1999). Ectopic Msx2 overexpression inhibits and Msx2 antisense stimulates calvarial osteoblast differentiation. *Dev Biol*, 209(2), 298–307. doi:10.1006/dbio.1999.9258
143. Newberry EP, Latifi T, Towler DA (1998). Reciprocal regulation of osteocalcin transcription by the homeodomain proteins Msx2 and Dlx5. *Biochemistry*, 37(46), 16360–8. doi:10.1021/bi981878u
144. Hassan MQ, Tare RS, Lee SH, Mandeville M, Morasso MI, Javed A, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, Lian JB (2006). BMP2 commitment to the osteogenic lineage involves activation of Runx2 by DLX3 and a homeodomain transcriptional network. *J Biol Chem*, 281(52), 40515–26. doi:10.1074/jbc.M604508200
145. Shirakabe K, Terasawa K, Miyama K, Shibuya H, Nishida E (2001). Regulation of the activity of the transcription factor Runx2 by two homeobox proteins, Msx2 and Dlx5. *Genes Cells*, 6(10), 851–6. doi:10.1046/j.1365-2443.2001.00466.x
146. Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GW, Beddington RS, Mundlos S, Olsen BR, Selby PB, Owen MJ (1997). Cbfa1, a Candidate Gene for Cleidocranial Dysplasia Syndrome, Is Essential for Osteoblast Differentiation and Bone Development. *Cell*, 89(5), 765–71. doi:10.1016/S0092-8674(00)80259-7
147. Franceschi RT, Xiao G, Di Jiang, Gopalakrishnan R, Yang S, Reith E (2003). Multiple signaling pathways converge on the Cbfa1/Runx2 transcription factor to regulate osteoblast differentiation. *Connect Tissue Res*, 44 Suppl 1(Suppl 1), 109–16.
148. Liu TM, Lee EH (2013). Transcriptional regulatory cascades in Runx2-dependent bone development. *Tissue Eng Part B Rev*, 19(3), 254–63. doi:10.1089/ten.TEB.2012.0527
149. Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, de Crombrughe B (2002). The Novel Zinc Finger-Containing Transcription Factor Osterix Is Required for Osteoblast Differentiation and Bone Formation. *Cell*, 108(1), 17–29. doi:10.1016/S0092-8674(01)00622-5
150. Zhou X, Zhang Z, Feng JQ, Dusevich VM, Sinha K, Zhang H, Darnay BG, de Crombrughe B (2010). Multiple functions of Osterix are required for bone growth and homeostasis in postnatal mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(29), 12919–24. doi:10.1073/pnas.0912855107

151. Felthaus O, Gosau M, Klein S, Prantl L, Reichert TE, Schmalz G, Morsczeck C (2014). Dexamethasone-related osteogenic differentiation of dental follicle cells depends on ZBTB16 but not Runx2. *Cell Tissue Res*, 357(3), 695–705. doi:10.1007/s00441-014-1891-z
152. Lee M-H, Kwon T-G, Park H-S, Wozney JM, Ryoo H-M (2003). BMP-2-induced Osterix expression is mediated by Dlx5 but is independent of Runx2. *Biochem Biophys Res Commun*, 309(3), 689–94. doi:10.1016/j.bbrc.2003.08.058
153. Mori G, Ballini A, Carbone C, Oranger A, Brunetti G, Di Benedetto A, Rapone B, Cantore S, Di Comite M, Colucci S, Grano M, Grassi FR (2012). Osteogenic differentiation of dental follicle stem cells. *Int J Med Sci*, 9(6), 480–7. doi:10.7150/ijms.4583
154. Orimo H (2010). The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *J Nippon Med Sch*, 77(1), 4–12. doi:10.1272/jnms.77.4
155. Komori T (2005). Regulation of skeletal development by the Runx family of transcription factors. *J Cell Biochem*, 95(3), 445–53. doi:10.1002/jcb.20420
156. Liu W, Toyosawa S, Furuichi T, Kanatani N, Yoshida C, Liu Y, Himeno M, Narai S, Yamaguchi A, Komori T (2001). Overexpression of Cbfa1 in osteoblasts inhibits osteoblast maturation and causes osteopenia with multiple fractures. *J Cell Biol*, 155(1), 157–66. doi:10.1083/jcb.200105052
157. 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(2), 98–102. doi:10.1007/s00223-005-0146-0
158. Liu Y, Sun X, Zhang X, Wang X, Zhang C, Zheng S (2019). RUNX2 mutation impairs osteogenic differentiation of dental follicle cells. *Arch Oral Biol*, 97, 156–64. doi:10.1016/j.archoralbio.2018.10.029
159. Viale-Bouroncle S, Felthaus O, Schmalz G, Brockhoff G, Reichert TE, Morsczeck C (2012). The transcription factor DLX3 regulates the osteogenic differentiation of human dental follicle precursor cells. *Stem Cells Dev*, 21(11), 1936–47. doi:10.1089/scd.2011.0422
160. Viale-Bouroncle S, Klingelhöffer C, Ettl T, Reichert TE, Morsczeck C (2015). A protein kinase A (PKA)/ $\beta$ -catenin pathway sustains the BMP2/DLX3-induced osteogenic differentiation in dental follicle cells (DFCs). *Cell Signal*, 27(3), 598–605. doi:10.1016/j.cellsig.2014.12.008
161. Li H, Jeong HM, Choi YH, Kim JH, Choi J-K, Yeo C-Y, Jeong HG, Jeong TC, Chun C, Lee KY (2014). Protein kinase A Phosphorylates Dlx3 and Regulates the Function of Dlx3 During Osteoblast Differentiation. *J Cell Biochem*, 115(11), 2004–11. doi:10.1002/jcb.24872
162. Park GT, Morasso MI (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(2), 515–22. doi:10.1093/nar/30.2.515
163. Silvério KG, Davidson KC, James RG, Adams AM, Foster BL, Nociti FH, Somerman MJ, Moon RT (2012). Wnt/ $\beta$ -catenin pathway regulates bone morphogenetic protein (BMP2)-mediated differentiation of dental follicle cells. *J Periodontol Res*, 47(3), 309–19. doi:10.1111/j.1600-0765.2011.01433.x
164. Viale-Bouroncle S, Klingelhöffer C, Ettl T, Morsczeck C (2015). The WNT inhibitor APCDD1 sustains the expression of  $\beta$ -catenin during the osteogenic differentiation of human dental follicle cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 457(3), 314–7. doi:10.1016/j.bbrc.2014.12.107
165. Zhan Y, Li X, Gou X, Yuan G, Fan M, Yang G (2018). DLX3 Inhibits the Proliferation of Human Dental Pulp Cells Through Inactivation of Canonical Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Pathway. *Front Physiol*, 9, 1637. doi:10.3389/fphys.2018.01637
166. Xiang L, Chen M, He L, Cai B, Du Y, Zhang X, Zhou C, Wang C, Mao JJ, Ling J (2014). Wnt5a regulates dental follicle stem/progenitor cells of the periodontium. *Stem Cell Res Ther*, 5(6), 135. doi:10.1186/scrt525

167. Sakisaka Y, Tsuchiya M, Nakamura T, Tamura M, Shimauchi H, Nemoto E (2015). Wnt5a attenuates Wnt3a-induced alkaline phosphatase expression in dental follicle cells. *Exp Cell Res*, 336(1), 85–93. doi:10.1016/j.yexcr.2015.06.013
168. Morsczeck C, Reck A, Reichert TE (2019). WNT5A supports viability of senescent human dental follicle cells. *Mol Cell Biochem*, 455(1-2), 21–8. doi:10.1007/s11010-018-3467-9
169. Maeda K, Kobayashi Y, Udagawa N, Uehara S, Ishihara A, Mizoguchi T, Kikuchi Y, Takada I, Kato S, Kani S, Nishita M, Marumo K, Martin TJ, Minami Y, Takahashi N (2012). Wnt5a-Ror2 signaling between osteoblast-lineage cells and osteoclast precursors enhances osteoclastogenesis. *Nat Med*, 18(3), 405–12. doi:10.1038/nm.2653
170. Viale-Bouroncle S, Gosau M, Morsczeck C (2014). NOTCH1 signaling regulates the BMP2/DLX-3 directed osteogenic differentiation of dental follicle cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 443(2), 500–4. doi:10.1016/j.bbrc.2013.11.120
171. Klingelhöffer C, Reck A, Ettl T, Morsczeck C (2016). The parathyroid hormone-related protein is secreted during the osteogenic differentiation of human dental follicle cells and inhibits the alkaline phosphatase activity and the expression of DLX3. *Tissue Cell*, 48(4), 334–9. doi:10.1016/j.tice.2016.05.007
172. Pieleś O, Reck A, Morsczeck C (2020). High endogenous expression of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) supports osteogenic differentiation in human dental follicle cells. *Histochem Cell Biol*, 154(4), 397–403. doi:10.1007/s00418-020-01904-7
173. Clemens TL, Cormier S, Eichinger A, Endlich K, Fiaschi-Taesch N, Fischer E, Friedman PA, Karaplis AC, Massfelder T, Rossert J, Schlüter KD, Silve C, Stewart AF, Takane K, Helwig JJ (2001). Parathyroid hormone-related protein and its receptors: nuclear functions and roles in the renal and cardiovascular systems, the placental trophoblasts and the pancreatic islets. *Br J Pharmacol*, 134(6), 1113–36. doi:10.1038/sj.bjp.0704378
174. Morsczeck C, Reck A, Beck HC (2017). The hedgehog-signaling pathway is repressed during the osteogenic differentiation of dental follicle cells. *Mol Cell Biochem*, 428(1-2), 79–86. doi:10.1007/s11010-016-2918-4
175. Hammerschmidt M, Bitgood MJ, McMahon AP (1996). Protein kinase A is a common negative regulator of Hedgehog signaling in the vertebrate embryo. *Genes Dev*, 10(6), 647–58. doi:10.1101/gad.10.6.647
176. Mukhopadhyay S, Wen X, Ratti N, Loktev A, Rangell L, Scales SJ, Jackson PK (2013). The ciliary G-protein-coupled receptor Gpr161 negatively regulates the Sonic hedgehog pathway via cAMP signaling. *Cell*, 152(1-2), 210–23. doi:10.1016/j.cell.2012.12.026
177. Press T, Viale-Bouroncle S, Felthaus O, Gosau M, Morsczeck C (2015). EGR1 supports the osteogenic differentiation of dental stem cells. *Int Endod J*, 48(2), 185–92. doi:10.1111/iej.12299
178. Viale-Bouroncle S, Klingelhöffer C, Ettl T, Morsczeck C (2015). The AKT signaling pathway sustains the osteogenic differentiation in human dental follicle cells. *Mol Cell Biochem*, 406(1-2), 199–204. doi:10.1007/s11010-015-2437-8
179. Choi YH, Choi H-J, Lee K-Y, Oh J-W (2012). Akt1 regulates phosphorylation and osteogenic activity of Dlx3. *Biochem Biophys Res Commun*, 425(4), 800–5. doi:10.1016/j.bbrc.2012.07.155
180. Nayak A, Viale-Bouroncle S, Morsczeck C, Müller S (2014). The SUMO-specific isopeptidase SENP3 regulates MLL1/MLL2 methyltransferase complexes and controls osteogenic differentiation. *Mol Cell*, 55(1), 47–58. doi:10.1016/j.molcel.2014.05.011
181. Rahimzadeh S, Rahbarghazi R, Aslani S, Rajabi H, Latifi Z, Farshdousti Hagh M, Nourazarian A, Nozad Charoudeh H, Nouri M, Abhari A (2020). Promoter methylation and expression pattern of DLX3, ATF4, and FRA1 genes during osteoblastic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells. *Bioimpacts*, 10(4), 243–50. doi:10.34172/bi.2020.31
182. Uribe RA, Buzzi AL, Bronner ME, Strobl-Mazzulla PH (2015). Histone demethylase KDM4B regulates otic vesicle invagination via epigenetic control of Dlx3 expression. *J Cell Biol*, 211(4), 815–27. doi:10.1083/jcb.201503071

183. Zeng L, Zhao N, Li F, Han D, Liu Y, Liu H, Sun S, Wang Y, Feng H (2018). miR-675 promotes odontogenic differentiation of human dental pulp cells by epigenetic regulation of DLX3. *Exp Cell Res*, 367(1), 104–11. doi:10.1016/j.yexcr.2018.03.035
184. Li X, Yang G, Fan M (2012). Effects of homeobox gene distal-less 3 on proliferation and odontoblastic differentiation of human dental pulp cells. *J Endod*, 38(11), 1504–10. doi:10.1016/j.joen.2012.07.009
185. Yang G, Yuan G, MacDougall M, Zhi C, Chen S (2017). BMP-2 induced Dspg transcription is mediated by Dlx3/Osx signaling pathway in odontoblasts. *Sci Rep*, 7(1), 10775. doi:10.1038/s41598-017-10908-8
186. Duverger O, Zah A, Isaac J, Sun H-W, Bartels AK, Lian JB, Berdal A, Hwang J, Morasso MI (2012). Neural crest deletion of Dlx3 leads to major dentin defects through down-regulation of Dspg. *J Biol Chem*, 287(15), 12230–40. doi:10.1074/jbc.M111.326900
187. Palazzo E, Kellett MD, Cataisson C, Bible PW, Bhattacharya S, Sun H-W, Gormley AC, Yuspa SH, Morasso MI (2017). A novel DLX3-PKC integrated signaling network drives keratinocyte differentiation. *Cell Death Differ*, 24(4), 717–30. doi:10.1038/cdd.2017.5
188. Hwang J, Mehrani T, Millar SE, Morasso MI (2008). Dlx3 is a crucial regulator of hair follicle differentiation and cycling. *Development*, 135(18), 3149–59. doi:10.1242/dev.022202
189. Sun H, He Z, Xi Q, Zhao F, Hu J, Wang J, Liu X, Zhao Z, Li M, Luo Y, Li S (2022). Lef1 and Dlx3 May Facilitate the Maturation of Secondary Hair Follicles in the Skin of Gansu Alpine Merino. *Genes (Basel)*, 13(8), 1326. doi:10.3390/genes13081326
190. Zhao N, Zeng L, Liu Y, Han D, Liu H, Xu J, Jiang Y, Li C, Cai T, Feng H, Wang Y (2017). DLX3 promotes bone marrow mesenchymal stem cell proliferation through H19/miR-675 axis. *Clin Sci (Lond)*, 131(22), 2721–35. doi:10.1042/CS20171231
191. Zeng L, Zhao N, Han D, Liu H, Liu Y, Wang Y, Feng H (2017). DLX3 mutation negatively regulates odontogenic differentiation of human dental pulp cells. *Arch Oral Biol*, 77, 12–7. doi:10.1016/j.archoralbio.2017.01.011
192. Park GT, Denning MF, Morasso MI (2001). Phosphorylation of murine homeodomain protein Dlx3 by protein kinase C. *FEBS Lett*, 496(1), 60–5. doi:10.1016/s0014-5793(01)02398-5
193. Dekker LV, Palmer RH, Parker PJ (1995). The protein kinase C and protein kinase C related gene families. *Current Opinion in Structural Biology*, 5(3), 396–402. doi:10.1016/0959-440X(95)80103-0
194. Jeong HM, Jin Y-H, Choi YH, Yum J, Choi J-K, Yeo C-Y, Lee K-Y (2012). PKC signaling inhibits osteogenic differentiation through the regulation of Msx2 function. *Biochim Biophys Acta*, 1823(8), 1225–32. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.05.018
195. Komaki M, Iwasaki K, Arzate H, Narayanan AS, Izumi Y, Morita I (2012). Cementum protein 1 (CEMP1) induces a cementoblastic phenotype and reduces osteoblastic differentiation in periodontal ligament cells. *J Cell Physiol*, 227(2), 649–57. doi:10.1002/jcp.22770
196. Pieleles O, Reichert TE, Morsczech C (2021). Classical isoforms of protein kinase C (PKC) and Akt regulate the osteogenic differentiation of human dental follicle cells via both  $\beta$ -catenin and NF- $\kappa$ B. *Stem Cell Res Ther*, 12(1), 242. doi:10.1186/s13287-021-02313-w
197. Mellor H, Parker PJ (1998). The extended protein kinase C superfamily. *Biochem J*, 332 (Pt 2), 281–92. doi:10.1042/bj3320281
198. Nishizuka Y (2003). Discovery and prospect of protein kinase C research: epilogue. *J Biochem*, 133(2), 155–8. doi:10.1093/jb/mvg035
199. Velnati S, Centonze S, Girivetto F, Capello D, Biondi RM, Bertoni A, Cantello R, Ragnoli B, Malerba M, Graziani A, Baldanzi G (2021). Identification of Key Phospholipids That Bind and Activate Atypical PKCs. *Biomedicines*, 9(1), 45. doi:10.3390/biomedicines9010045
200. Newton AC (2010). Protein kinase C: poised to signal. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 298(3), E395-402. doi:10.1152/ajpendo.00477.2009



201. Pu Y, Garfield SH, Kedei N, Blumberg PM (2009). Characterization of the differential roles of the twin C1a and C1b domains of protein kinase C-delta. *Journal of Biological Chemistry*, 284(2), 1302–12. doi:10.1074/jbc.M804796200
202. Sumimoto H, Kamakura S, Ito T (2007). Structure and function of the PB1 domain, a protein interaction module conserved in animals, fungi, amoebas, and plants. *Sci STKE*, 2007(401), re6. doi:10.1126/stke.4012007re6
203. Wu-Zhang AX, Newton AC (2013). Protein kinase C pharmacology: refining the toolbox. *Biochem J*, 452(2), 195–209. doi:10.1042/BJ20130220
204. Borner C, Filipuzzi I, Wartmann M, Eppenberger U, Fabbro D (1989). Biosynthesis and Posttranslational Modifications of Protein Kinase C in Human Breast Cancer Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 264(23), 13902–9. doi:10.1016/S0021-9258(18)80085-0
205. Keranen LM, Dutil EM, Newton AC (1995). Protein kinase C is regulated in vivo by three functionally distinct phosphorylations. *Current Biology*, 5(12), 1394–403. doi:10.1016/s0960-9822(95)00277-6
206. Le Good JA, Ziegler WH, Parekh DB, Alessi DR, Cohen P, Parker PJ (1998). Protein kinase C isoforms controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Science*, 281(5385), 2042–5. doi:10.1126/science.281.5385.2042
207. Balendran A, Hare GR, Kieloch A, Williams MR, Alessi DR (2000). Further evidence that 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) is required for the stability and phosphorylation of protein kinase C (PKC) isoforms. *FEBS Lett*, 484(3), 217–23. doi:10.1016/S0014-5793(00)02162-1
208. Gao T, Brognard J, Newton AC (2008). The phosphatase PHLPP controls the cellular levels of protein kinase C. *Journal of Biological Chemistry*, 283(10), 6300–11. doi:10.1074/jbc.M707319200
209. Battaini F, Pascale A (2005). Protein kinase C signal transduction regulation in physiological and pathological aging. *Ann N Y Acad Sci*, 1057, 177–92. doi:10.1196/annals.1356.011
210. Nishizuka Y (1984). The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature*, 308(5961), 693–8. doi:10.1038/308693a0
211. Westermann P, Knoblich M, Maier O, Lindschau C, Haller H (1996). Protein kinase C bound to the Golgi apparatus supports the formation of constitutive transport vesicles. *Biochem J*, 320 (Pt 2), 651–8. doi:10.1042/bj3200651
212. Shirai Y, Saito N (2002). Activation mechanisms of protein kinase C: maturation, catalytic activation, and targeting. *J Biochem*, 132(5), 663–8. doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a003271
213. Singer WD, Brown HA, Sternweis PC (1997). Regulation of eukaryotic phosphatidylinositol-specific phospholipase C and phospholipase D. *Annu Rev Biochem*, 66, 475–509. doi:10.1146/annurev.biochem.66.1.475
214. Laramée M, Simoneau L, Lafond J (2002). Phospholipase C axis is the preferential pathway leading to PKC activation following PTH or PTHrP stimulation in human term placenta. *Life Sciences*, 72(2), 215–25. doi:10.1016/S0024-3205(02)02238-5
215. Kronenberg HM (2006). PTHrP and skeletal development. *Ann N Y Acad Sci*, 1068, 1–13. doi:10.1196/annals.1346.002
216. Poli A, Mongiorgi S, Cocco L, Follo MY (2014). Protein kinase C involvement in cell cycle modulation. *Biochem Soc Trans*, 42(5), 1471–6. doi:10.1042/BST20140128
217. Black JD (2000). Protein kinase C-mediated regulation of the cell cycle. *Front Biosci*, 5(3), 406–23. doi:10.2741/black
218. Caverzasio J, Biver E, Thouverey C (2013). Predominant role of PDGF receptor transactivation in Wnt3a-induced osteoblastic cell proliferation. *J Bone Miner Res*, 28(2), 260–70. doi:10.1002/jbmr.1748

219. Russell C, Acevedo-Duncan M (2005). Effects of the PKC inhibitor PD 406976 on cell cycle progression, proliferation, PKC isozymes and apoptosis in glioma and SVG-transformed glial cells. *Cell Prolif*, 38(2), 87–106. doi:10.1111/j.1365-2184.2005.00333.x
220. Chang G, Zheng J, Xiao W, Chang S, Wei Q, Wu H, Tao Y, Yang G, Xie B, Lan X, Wang Y, Yu D, Hu L, Xie Y, Bu W, Kong Y, Dai B, Hou J, Shi J (2018). PKC inhibition of sotrastaurin has antitumor activity in diffuse large B-cell lymphoma via regulating the expression of MCT-1. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 50(4), 399–407. doi:10.1093/abbs/gmy021
221. Barboule N, Lafon C, Chadebech P, Vidal S, Valette A (1999). Involvement of p21 in the PKC-induced regulation of the G2/M cell cycle transition. *FEBS Lett*, 444(1), 32–7. doi:10.1016/S0014-5793(99)00022-8
222. Al-Alem LF, McCord LA, Southard RC, Kilgore MW, Curry TE (2013). Activation of the PKC pathway stimulates ovarian cancer cell proliferation, migration, and expression of MMP7 and MMP10. *Biol Reprod*, 89(3), 73. doi:10.1095/biolreprod.112.102327
223. Liu DS, Krebs CE, Liu SJ (2007). Proliferation of human breast cancer cells and anti-cancer action of doxorubicin and vinblastine are independent of PKC- $\alpha$ . *J Cell Biochem*, 101(2), 517–28. doi:10.1002/jcb.21202
224. Galron D, Tamir A, Altman A, Isakov N (1994). Inhibition of PMA-induced human T cell proliferation by bryostatin is associated with enhanced degradation of conventional protein kinase C (cPKC): Ca<sup>2+</sup> signals restore mitogenic activity without abrogating enhanced cPKC degradation. *Cell Immunol*, 158(1), 195–207. doi:10.1006/cimm.1994.1267
225. Wouters MM, Roeder JL, Tharayil VS, Stanich JE, Strega PR, Lei S, Bardsley MR, Ordog T, Gibbons SJ, Farrugia G (2009). Protein kinase C( $\gamma$ ) mediates regulation of proliferation by the serotonin 5-hydroxytryptamine receptor 2B. *Journal of Biological Chemistry*, 284(32), 21177–84. doi:10.1074/jbc.M109.015859
226. Murillo-Carretero M, Geribaldi-Doldán N, Flores-Giubi E, García-Bernal F, Navarro-Quiroz EA, Carrasco M, Macías-Sánchez AJ, Herrero-Foncubierta P, Delgado-Ariza A, Verástegui C, Domínguez-Riscart J, Daoubi M, Hernández-Galán R, Castro C (2017). ELAC (3,12-di-O-acetyl-8-O-tigloilingol), a plant-derived lathyrane diterpene, induces subventricular zone neural progenitor cell proliferation through PKC $\beta$  activation. *Br J Pharmacol*, 174(14), 2373–92. doi:10.1111/bph.13846
227. Aaltonen V, Koivunen J, Laato M, Peltonen J (2007). PKC inhibitor Go6976 induces mitosis and enhances doxorubicin-paclitaxel cytotoxicity in urinary bladder carcinoma cells. *Cancer Lett*, 253(1), 97–107. doi:10.1016/j.canlet.2007.01.011
228. Poli A, Ramazzotti G, Matteucci A, Manzoli L, Lonetti A, Suh P-G, McCubrey JA, Cocco L (2014). A novel DAG-dependent mechanism links PKC $\alpha$  and Cyclin B1 regulating cell cycle progression. *Oncotarget*, 5(22), 11526–40. doi:10.18632/oncotarget.2578
229. Qiao L, Xu Y, Liu X, Xie J, Wang J, Du C, Zhang J, Ni W, Chen S (2008). PKC promotes proliferation of airway smooth muscle cells by regulating cyclinD1 expression in asthmatic rats. *Acta Pharmacol Sin*, 29(6), 677–86. doi:10.1111/j.1745-7254.2008.00795.x
230. Galea GL, Meakin LB, Williams CM, Hulin-Curtis SL, Lanyon LE, Poole AW, Price JS (2014). Protein kinase C $\alpha$  (PKC $\alpha$ ) regulates bone architecture and osteoblast activity. *J Biol Chem*, 289(37), 25509–22. doi:10.1074/jbc.M114.580365
231. Poli A, Ratti S, Finelli C, Mongiorgi S, Clissa C, Lonetti A, Cappellini A, Catozzi A, Barraco M, Suh P-G, Manzoli L, McCubrey JA, Cocco L, Follo MY (2018). Nuclear translocation of PKC- $\alpha$  is associated with cell cycle arrest and erythroid differentiation in myelodysplastic syndromes (MDSs). *FASEB J*, 32(2), 681–92. doi:10.1096/fj.201700690R
232. Oliva JL, Caino MC, Senderowicz AM, Kazanietz MG (2008). S-Phase-specific activation of PKC  $\alpha$  induces senescence in non-small cell lung cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 283(9), 5466–76. doi:10.1074/jbc.M707576200

233. Luan Y, Zhang J, Wang M, Fu G, Zhang W (2020). Advanced glycation end products facilitate the proliferation and reduce early apoptosis of cardiac microvascular endothelial cells via PKC $\beta$  signaling pathway: Insight from diabetic cardiomyopathy. *Anatol J Cardiol*, 23(3), 141–50. doi:10.14744/AnatolJCardiol.2019.21504
234. Pysz MA, Hao F, Hizli AA, Lum MA, Swetzig WM, Black AR, Black JD (2014). Differential regulation of cyclin D1 expression by protein kinase C  $\alpha$  and  $\epsilon$  signaling in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem*, 289(32), 22268–83. doi:10.1074/jbc.M114.571554
235. Youmell M, Park SJ, Basu S, Price BD (1998). Regulation of the p53 protein by protein kinase C alpha and protein kinase C zeta. *Biochem Biophys Res Commun*, 245(2), 514–8. doi:10.1006/bbrc.1998.8471
236. Deeds L, Teodorescu S, Chu M, Yu Q, Chen C-Y (2003). A p53-independent G1 cell cycle checkpoint induced by the suppression of protein kinase C alpha and theta isoforms. *Journal of Biological Chemistry*, 278(41), 39782–93. doi:10.1074/jbc.M306854200
237. Gao Q, Tan J, Ma P, Ge J, Liu Y, Sun X, Zhou L (2009). PKC alpha affects cell cycle progression and proliferation in human RPE cells through the downregulation of p27kip1. *Mol Vis*, 15, 2683–95.
238. Li H, Weinstein IB (2006). Protein kinase C beta enhances growth and expression of cyclin D1 in human breast cancer cells. *Cancer Res*, 66(23), 11399–408. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-2386
239. Mazzoni E, Adam A, Bal de Kier Joffe E, Aguirre-Ghiso JA (2003). Immortalized mammary epithelial cells overexpressing protein kinase C gamma acquire a malignant phenotype and become tumorigenic in vivo. *Mol Cancer Res*, 1(10), 776–87.
240. BommaReddy RR, Patel R, Smalley T, Acevedo-Duncan M (2020). Effects of Atypical Protein Kinase C Inhibitor (DNDA) on Lung Cancer Proliferation and Migration by PKC- $\iota$ /FAK Ubiquitination Through the Cbl-b Pathway. *Onco Targets Ther*, 13, 1661–76. doi:10.2147/OTT.S224866
241. Pillai P, Desai S, Patel R, Sajan M, Farese R, Ostrov D, Acevedo-Duncan M (2011). A novel PKC- $\iota$  inhibitor abrogates cell proliferation and induces apoptosis in neuroblastoma. *Int J Biochem Cell Biol*, 43(5), 784–94. doi:10.1016/j.biocel.2011.02.002
242. Carlin S, Yang KX, Donnelly R, Black JL (1999). Protein kinase C isoforms in human airway smooth muscle cells: activation of PKC-zeta during proliferation. *Am J Physiol*, 276(3), L506-12. doi:10.1152/ajplung.1999.276.3.L506
243. Skaletz-Rorowski A, Eschert H, Leng J, Stallmeyer B, Sindermann JR, Pulawski E, Breithardt G (2005). PKC delta-induced activation of MAPK pathway is required for bFGF-stimulated proliferation of coronary smooth muscle cells. *Cardiovasc Res*, 67(1), 142–50. doi:10.1016/j.cardiores.2005.03.009
244. Okuwa H, Kanno T, Fujita Y, Gotoh A, Tabata C, Fukuoka K, Nakano T, Nishizaki T (2012). Sphingosine suppresses mesothelioma cell proliferation by inhibiting PKC- $\delta$  and inducing cell cycle arrest at the G(0)/G(1) phase. *Cell Physiol Biochem*, 30(4), 995–1004. doi:10.1159/000341476
245. Emoto Y, Manome Y, Meinhardt G, Kisaki H, Kharbanda S, Robertson M, Ghayur T, Wong WW, Kamen R, Weichselbaum R (1995). Proteolytic activation of protein kinase C delta by an ICE-like protease in apoptotic cells. *EMBO J*, 14(24), 6148–56. doi:10.1002/j.1460-2075.1995.tb00305.x
246. Basu A, Lu D, Sun B, Moor AN, Akkaraju GR, Huang J (2002). Proteolytic activation of protein kinase C-epsilon by caspase-mediated processing and transduction of antiapoptotic signals. *Journal of Biological Chemistry*, 277(44), 41850–6. doi:10.1074/jbc.M205997200
247. Datta R, Kojima H, Yoshida K, Kufe D (1997). Caspase-3-mediated cleavage of protein kinase C theta in induction of apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 272(33), 20317–20. doi:10.1074/jbc.272.33.20317

248. Jiang Z, Kong C, Zhang Z, Zhu Y, Zhang Y, Chen X (2015). Reduction of protein kinase C  $\alpha$  (PKC- $\alpha$ ) promote apoptosis via down-regulation of Dicer in bladder cancer. *J Cell Mol Med*, 19(5), 1085–93. doi:10.1111/jcmm.12503
249. Wang M, Zhang W, Xu S, Peng L, Wang Z, Liu H, Fang Q, Deng T, Men X, Lou J (2017). TRB3 mediates advanced glycation end product-induced apoptosis of pancreatic  $\beta$ -cells through the protein kinase C  $\beta$  pathway. *Int J Mol Med*, 40(1), 130–6. doi:10.3892/ijmm.2017.2991
250. Peng Y, Sigua CA, Murr MM (2011). Protein kinase C-zeta mediates apoptosis of mouse Kupffer cells via ERK-1/2: a novel mechanism. *Surgery*, 149(1), 135–42. doi:10.1016/j.surg.2010.04.017
251. Heathcote HR, Mancini SJ, Strembitska A, Jamal K, Reihill JA, Palmer TM, Gould GW, Salt IP (2016). Protein kinase C phosphorylates AMP-activated protein kinase  $\alpha$ 1 Ser487. *Biochem J*, 473(24), 4681–97. doi:10.1042/BCJ20160211
252. Blair D, Dufort FJ, Chiles TC (2012). Protein kinase C $\beta$  is critical for the metabolic switch to glycolysis following B-cell antigen receptor engagement. *Biochem J*, 448(1), 165–9. doi:10.1042/BJ20121225
253. Basu A (2020). Regulation of Autophagy by Protein Kinase C- $\epsilon$  in Breast Cancer Cells. *Int J Mol Sci*, 21(12), 4247. doi:10.3390/ijms21124247
254. Herzig S, Shaw RJ (2018). AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 19(2), 121–35. doi:10.1038/nrm.2017.95
255. He H, Zhao Z-H, Han F-S, Wang X-F, Zeng Y-J (2015). Activation of protein kinase C  $\epsilon$  enhanced movement ability and paracrine function of rat bone marrow mesenchymal stem cells partly at least independent of SDF-1/CXCR4 axis and PI3K/AKT pathway. *Int J Clin Exp Med*, 8(1), 188–202.
256. Lin C-Y, Zu C-H, Yang C-C, Tsai P-J, Shyu J-F, Chen C-P, Weng Z-C, Chen T-H, Wang H-S (2015). IL-1 $\beta$ -Induced Mesenchymal Stem Cell Migration Involves MLCK Activation via PKC Signaling. *Cell Transplant*, 24(10), 2011–28. doi:10.3727/096368914X685258
257. Picinich SC, Glod JW, Banerjee D (2010). Protein kinase C zeta regulates interleukin-8-mediated stromal-derived factor-1 expression and migration of human mesenchymal stromal cells. *Exp Cell Res*, 316(4), 593–602. doi:10.1016/j.yexcr.2009.11.011
258. Yao J, Li J, Zhou L, Cheng J, Chim SM, Zhang G, Quinn JMW, Tickner J, Zhao J, Xu J (2015). Protein kinase C inhibitor, GF109203X attenuates osteoclastogenesis, bone resorption and RANKL-induced NF- $\kappa$ B and NFAT activity. *J Cell Physiol*, 230(6), 1235–42. doi:10.1002/jcp.24858
259. Pang C, Wen L, Qin H, Zhu B, Lu X, Luo S (2020). Sotrastaurin, a PKC inhibitor, attenuates RANKL-induced bone resorption and attenuates osteochondral pathologies associated with the development of OA. *J Cell Mol Med*, 24(15), 8452–65. doi:10.1111/jcmm.15404
260. Lee S, Kwak H, Chung W, Cheong H, Kim H-H, Lee Z (2003). Participation of protein kinase c  $\beta$  in osteoclast differentiation and function. *Bone*, 32(3), 217–27. doi:10.1016/S8756-3282(02)00976-6
261. Kim MY, Lee K, Shin H-I, Jeong D (2019). Specific targeting of PKC $\delta$  suppresses osteoclast differentiation by accelerating proteolysis of membrane-bound macrophage colony-stimulating factor receptor. *Sci Rep*, 9(1), 7044. doi:10.1038/s41598-019-43501-2
262. Durán A, Serrano M, Leitges M, Flores JM, Picard S, Brown JP, Moscat J, Diaz-Meco MT (2004). The Atypical PKC-Interacting Protein p62 Is an Important Mediator of RANK-Activated Osteoclastogenesis. *Dev Cell*, 6(2), 303–9. doi:10.1016/S1534-5807(03)00403-9
263. Shirakawa F, Mizel SB (1989). In vitro activation and nuclear translocation of NF-kappa B catalyzed by cyclic AMP-dependent protein kinase and protein kinase C. *Mol. Cell. Biol.*, 9(6), 2424–30. doi:10.1128/MCB.9.6.2424

264. Yao S, Wise G (2004). In vivo expression of classic PKC isoforms in the rat dental follicle as related to tooth eruption. *Connect Tissue Res*, 45(4-5), 216–21. doi:10.1080/03008200490882628
265. Feng X, Zhang J, Smuga-Otto K, Tian S, Yu J, Stewart R, Thomson JA (2012). Protein kinase C mediated extraembryonic endoderm differentiation of human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 30(3), 461–70. doi:10.1002/stem.1018
266. Olivares-Navarrete R, Vesper K, Hyzy SL, Almaguer-Flores A, Boyan BD, Schwartz Z (2014). Role of the N-terminal peptide of amelogenin on osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Eur Cell Mater*, 28, 1-10. doi:10.22203/ecm.v028a01
267. Li S, Hu C, Li J, Liu L, Jing W, Tang W, Tian W, Long J (2016). Effect of miR-26a-5p on the Wnt/Ca(2+) Pathway and Osteogenic Differentiation of Mouse Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Calcif Tissue Int*, 99(2), 174–86. doi:10.1007/s00223-016-0137-3
268. Liu Y, Yang R, Liu X, Zhou Y, Qu C, Kikuri T, Wang S, Zandi E, Du J, Ambudkar IS, Shi S (2014). Hydrogen sulfide maintains mesenchymal stem cell function and bone homeostasis via regulation of Ca(2+) channel sulfhydration. *Cell Stem Cell*, 15(1), 66–78. doi:10.1016/j.stem.2014.03.005
269. Richardson JA, Amantea CM, Kianmahd B, Tetradis S, Lieberman JR, Hahn TJ, Parhami F (2007). Oxysterol-induced osteoblastic differentiation of pluripotent mesenchymal cells is mediated through a PKC- and PKA-dependent pathway. *J Cell Biochem*, 100(5), 1131–45. doi:10.1002/jcb.21112
270. Song JK, Lee CH, Hwang S-M, Joo BS, Lee SY, Jung JS (2014). Effect of phorbol 12-myristate 13-acetate on the differentiation of adipose-derived stromal cells from different subcutaneous adipose tissue depots. *Korean J Physiol Pharmacol*, 18(4), 289–96. doi:10.4196/kjpp.2014.18.4.289
271. Lotz EM, Berger MB, Boyan BD, Schwartz Z (2020). Regulation of mesenchymal stem cell differentiation on microstructured titanium surfaces by semaphorin 3A. *Bone*, 134, 115260. doi:10.1016/j.bone.2020.115260
272. Liu J, Someren E, Mentink A, Licht R, Dechering K, van Blitterswijk C, de Boer J (2010). The effect of PKC activation and inhibition on osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng Regen Med*, 4(5), 329–39. doi:10.1002/term.242
273. Nakura A, Higuchi C, Yoshida K, Yoshikawa H (2011). PKC $\alpha$  suppresses osteoblastic differentiation. *Bone*, 48(3), 476–84. doi:10.1016/j.bone.2010.09.238
274. Liu Z, Liu H, He J, Lin P, Tong Q, Yang J (2020). Myeloma cells shift osteoblastogenesis to adipogenesis by inhibiting the ubiquitin ligase MURF1 in mesenchymal stem cells. *Science signaling*, 13(633), eaay8203. doi:10.1126/scisignal.aay8203
275. Wang Z, Wang X, Zhang L, Wang B, Xu B, Zhang J (2020). GLP-1 inhibits PKC $\beta$ 2 phosphorylation to improve the osteogenic differentiation potential of hPDLSCs in the AGE microenvironment. *J Diabetes Complications*, 34(3), 107495. doi:10.1016/j.jdiacomp.2019.107495
276. Hua W-K, Shiao Y-H, Lee OK, Lin W-J (2013). Elevation of protein kinase C $\alpha$  stimulates osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells through the TAT-mediated protein transduction system. *Biochem Cell Biol*, 91(6), 443–8. doi:10.1139/bcb-2013-0035
277. Miraoui H, Oudina K, Petite H, Tanimoto Y, Moriyama K, Marie PJ (2009). Fibroblast growth factor receptor 2 promotes osteogenic differentiation in mesenchymal cells via ERK1/2 and protein kinase C signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 284(8), 4897–904. doi:10.1074/jbc.M805432200
278. Kuo S-W, Rimando MG, Liu Y-S, Lee OK (2017). Intermittent Administration of Parathyroid Hormone 1-34 Enhances Osteogenesis of Human Mesenchymal Stem Cells by Regulating Protein Kinase C $\delta$ . *Int J Mol Sci*, 18(10), 2221. doi:10.3390/ijms18102221

279. Zhu F, Sweetwyne MT, Hankenson KD (2013). PKC $\delta$  is required for Jagged-1 induction of human mesenchymal stem cell osteogenic differentiation. *Stem Cells*, 31(6), 1181–92. doi:10.1002/stem.1353
280. Lee S, Cho H-Y, Bui HTT, Kang D (2014). The osteogenic or adipogenic lineage commitment of human mesenchymal stem cells is determined by protein kinase C delta. *BMC Cell Biol*, 15, 42. doi:10.1186/s12860-014-0042-4
281. Smyth DC, Takenaka S, Yeung C, Richards CD (2015). Oncostatin M regulates osteogenic differentiation of murine adipose-derived mesenchymal progenitor cells through a PKCdelta-dependent mechanism. *Cell Tissue Res*, 360(2), 309–19. doi:10.1007/s00441-014-2099-y
282. Tu X, Joeng KS, Nakayama KI, Nakayama K, Rajagopal J, Carroll TJ, McMahon AP, Long F (2007). Noncanonical Wnt signaling through G protein-linked PKCdelta activation promotes bone formation. *Dev Cell*, 12(1), 113–27. doi:10.1016/j.devcel.2006.11.003
283. Cho M, Park S, Gwak J, Kim D-E, Yea SS, Shin J-G, Oh S (2008). Bisindolylmaleimide I suppresses adipocyte differentiation through stabilization of intracellular beta-catenin protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 367(1), 195–200. doi:10.1016/j.bbrc.2007.12.147
284. Duong M, Yu X, Teng B, Schroder P, Haller H, Eschenburg S, Schiffer M (2017). Protein kinase C  $\epsilon$  stabilizes  $\beta$ -catenin and regulates its subcellular localization in podocytes. *J Biol Chem*, 292(29), 12100–10. doi:10.1074/jbc.M117.775700
285. Choi S-W, Song J-K, Yim Y-S, Yun H-G, Chun K-H (2015). Glucose deprivation triggers protein kinase C-dependent  $\beta$ -catenin proteasomal degradation. *J Biol Chem*, 290(15), 9863–73. doi:10.1074/jbc.M114.606756
286. Lampasso J, Chen W, Marzec N (2006). The expression profile of PKC isoforms during MC3T3-E1 differentiation. *Int J Mol Med*, 17(6), 1125–31. doi:10.3892/ijmm.17.6.1125
287. Valverde AM, Lorenzo M, Navarro P, Benito M (1997). Phosphatidylinositol 3-kinase is a requirement for insulin-like growth factor I-induced differentiation, but not for mitogenesis, in fetal brown adipocytes. *Mol Endocrinol*, 11(5), 595–607. doi:10.1210/mend.11.5.9924
288. Zhang K, Wang F, Huang J, Lou Y, Xie J, Li H, Cao D, Huang X (2019). Insulin-like growth factor 2 promotes the adipogenesis of hemangioma-derived stem cells. *Exp Ther Med*, 17(3), 1663–9. doi:10.3892/etm.2018.7132
289. Zhang X-X, Wang Y-M, Su Y-D, Zuo F, Wu B, Nian X (2021). MiR-26a regulated adipogenic differentiation of ADSCs induced by insulin through CDK5/FOXC2 pathway. *Mol Cell Biochem*, 476(4), 1705–16. doi:10.1007/s11010-020-04033-w
290. Smas CM, Sul HS (1993). Pref-1, a protein containing EGF-like repeats, inhibits adipocyte differentiation. *Cell*, 73(4), 725–34. doi:10.1016/0092-8674(93)90252-L
291. Keats EC, Dominguez JM, Grant MB, Khan ZA (2014). Switch from canonical to noncanonical Wnt signaling mediates high glucose-induced adipogenesis. *Stem Cells*, 32(6), 1649–60. doi:10.1002/stem.1659
292. Zhou Y, Wang D, Li F, Shi J, Song J (2006). Different roles of protein kinase C-beta1 and -delta in the regulation of adipocyte differentiation. *Int J Biochem Cell Biol*, 38(12), 2151–63. doi:10.1016/j.biocel.2006.06.009
293. Gaillard D, Négrel R, Lagarde M, Ailhaud G (1989). Requirement and role of arachidonic acid in the differentiation of pre-adipose cells. *Biochem J*, 257(2), 389–97. doi:10.1042/bj2570389
294. Artemenko Y, Gagnon A, Aubin D, Sorisky A (2005). Anti-adipogenic effect of PDGF is reversed by PKC inhibition. *J Cell Physiol*, 204(2), 646–53. doi:10.1002/jcp.20314
295. Shinohara O, Murata Y, Shimizu M (1992). Endothelin-1 suppression of rat adipocyte precursor cell differentiation in serum-free culture. *Endocrinology*, 130(4), 2031–6. doi:10.1210/endo.130.4.1312437

296. Wang T, Wang Y, Yamashita H (2009). Evodiamine inhibits adipogenesis via the EGFR-PKC $\alpha$ -ERK signaling pathway. *FEBS Lett*, 583(22), 3655–9. doi:10.1016/j.febslet.2009.10.046
297. Pavan C, Vindigni V, Michelotto L, Rimessi A, Abatangelo G, Cortivo R, Pinton P, Zavan B (2010). Weight gain related to treatment with atypical antipsychotics is due to activation of PKC- $\beta$ . *Pharmacogenomics J*, 10(5), 408–17. doi:10.1038/tpj.2009.67
298. Fleming I, MacKenzie SJ, Vernon RG, Anderson NG, Houslay MD, Kilgour E (1998). Protein kinase C isoforms play differential roles in the regulation of adipocyte differentiation. *Biochem J*, 333 (Pt 3), 719–27. doi:10.1042/bj3330719
299. McGowan K, DeVente J, Carey JO, Ways DK, Pekala PH (1996). Protein kinase C isoform expression during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes: Loss of protein kinase C- $\alpha$  isoform correlates with loss of phorbol 12-myristate 13-acetate activation of nuclear factor  $\kappa$ B and acquisition of the adipocyte phenotype. *J Cell Physiol*, 167(1), 113–20. doi:10.1002/(SICI)1097-4652(199604)167:1<113:AID-JCP13>3.0.CO;2-C
300. Carter G, Apostolatos A, Patel R, Mathur A, Cooper D, Murr M, Patel NA (2013). Dysregulated Alternative Splicing Pattern of PKC $\delta$  during Differentiation of Human Preadipocytes Represents Distinct Differences between Lean and Obese Adipocytes. *ISRN Obes*, 2013, 161345. doi:10.1155/2013/161345
301. Webb PR, Doyle C, Anderson NG (2003). Protein kinase C-epsilon promotes adipogenic commitment and is essential for terminal differentiation of 3T3-F442A preadipocytes. *Cell Mol Life Sci*, 60(7), 1504–12. doi:10.1007/s00018-003-2337-z
302. Yu Y-H, Liao P-R, Guo C-J, Chen C-H, Mochly-Rosen D, Chuang L-M (2016). PKC-ALDH2 Pathway Plays a Novel Role in Adipocyte Differentiation. *PLoS One*, 11(8), e0161993. doi:10.1371/journal.pone.0161993
303. Lacasa D, Agli B, Giudicelli Y (1995). Zeta PKC in rat preadipocytes: modulation by insulin and serum mitogenic factors and possible role in adipogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 217(1), 123–30. doi:10.1006/bbrc.1995.2753
304. Tsai T-L, Manner PA, Li W-J (2013). Regulation of mesenchymal stem cell chondrogenesis by glucose through protein kinase C/transforming growth factor signaling. *Osteoarthritis Cartilage*, 21(2), 368–76. doi:10.1016/j.joca.2012.11.001
305. Kulyk WM, Reichert C (1992). Staurosporine, a protein kinase inhibitor, stimulates cartilage differentiation by embryonic facial mesenchyme. *J Craniofac Genet Dev Biol*, 12(2), 90–7.
306. Choi B, Chun JS, Lee YS, Sonn JK, Kang SS (1995). Expression of protein kinase C isozymes that are required for chondrogenesis of chick limb bud mesenchymal cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 216(3), 1034–40. doi:10.1006/bbrc.1995.2724
307. Yang MS, Chang SH, Sonn JK, Lee YS, Kang SS, Park TK, Chun JS (1998). Regulation of chondrogenic differentiation of mesenchymes by protein kinase C alpha. *Mol Cells*, 8(3), 266–71.
308. Yoon YM, Oh CD, Kim DY, Lee YS, Park JW, Huh TL, Kang SS, Chun JS (2000). Epidermal growth factor negatively regulates chondrogenesis of mesenchymal cells by modulating the protein kinase C-alpha, Erk-1, and p38 MAPK signaling pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 275(16), 12353–9. doi:10.1074/jbc.275.16.12353
309. Lim YB, Kang SS, Park TK, Lee YS, Chun JS, Sonn JK (2000). Disruption of actin cytoskeleton induces chondrogenesis of mesenchymal cells by activating protein kinase C-alpha signaling. *Biochem Biophys Res Commun*, 273(2), 609–13. doi:10.1006/bbrc.2000.2987
310. Tzeng H-H, Hsu C-H, Chung T-H, Lee W-C, Lin C-H, Wang W-C, Hsiao C-Y, Leu Y-W, Wang T-H (2015). Cell Signaling and Differential Protein Expression in Neuronal Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells with Hypermethylated Salvador/Warts/Hippo (SWH) Pathway Genes. *PLoS One*, 10(12), e0145542. doi:10.1371/journal.pone.0145542

311. Lim H-S, Joe YA (2013). A ROCK Inhibitor Blocks the Inhibitory Effect of Chondroitin Sulfate Proteoglycan on Morphological Changes of Mesenchymal Stromal/Stem Cells into Neuron-Like Cells. *Biomol Ther (Seoul)*, 21(6), 447–53. doi:10.4062/biomolther.2013.041
312. Doonachar A, Schoenfeld AR (2014). Expression of PKC iota affects neuronal differentiation of PC12 cells at least partly independent of kinase function. *Cellbio (Irvine, Calif)*, 3(1), 1–13. doi:10.4236/cellbio.2014.31001
313. Wooten MW, Zhou G, Seibenhener ML, Coleman ES (1994). A role for zeta protein kinase C in nerve growth factor-induced differentiation of PC12 cells. *Cell Growth Differ*, 5(4), 395–403.
314. Jerome-Morais A, Rahn HR, Tibudan SS, Denning MF (2009). Role for protein kinase C-alpha in keratinocyte growth arrest. *J Invest Dermatol*, 129(10), 2365–75. doi:10.1038/jid.2009.74
315. Kashiwagi M, Ohba M, Chida K, Kuroki T (2002). Protein kinase C eta (PKC eta): its involvement in keratinocyte differentiation. *J Biochem*, 132(6), 853–7. doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a003297
316. Song H, Hwang HJ, Chang W, Song B-W, Cha M-J, Kim I-K, Lim S, Choi EJ, Ham O, Lee CY, Park J-H, Lee S-Y, Choi E, Lee C, Lee M, Lee M-H, Kim S-H, Jang Y, Hwang K-C (2011). Cardiomyocytes from phorbol myristate acetate-activated mesenchymal stem cells restore electromechanical function in infarcted rat hearts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(1), 296–301. doi:10.1073/pnas.1015873107
317. Chang W, Lim S, Song B-W, Lee CY, Park M-S, Chung Y-A, Yoon C, Lee S-Y, Ham O, Park J-H, Choi E, Maeng L-S, Hwang K-C (2012). Phorbol myristate acetate differentiates human adipose-derived mesenchymal stem cells into functional cardiogenic cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 424(4), 740–6. doi:10.1016/j.bbrc.2012.07.022
318. Park E, Patel AN (2010). PKC-delta induces cardiomyogenic gene expression in human adipose-derived stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 393(4), 582–6. doi:10.1016/j.bbrc.2010.02.018
319. He H, Zhao Z-H, Han F-S, Liu X-H, Wang R, Zeng Y-J (2016). Overexpression of protein kinase C  $\epsilon$  improves retention and survival of transplanted mesenchymal stem cells in rat acute myocardial infarction. *Cell Death Dis*, 7, e2056. doi:10.1038/cddis.2015.417
320. Heim WG, Appleman D, Pyfrom HT (1955). Production of catalase changes in animals with 3-amino-1, 2, 4-triazole. *Science*, 122(3172), 693–4. doi:10.1126/science.122.3172.693
321. Sanda T, Iida S, Ogura H, Asamitsu K, Murata T, Bacon KB, Ueda R, Okamoto T (2005). Growth inhibition of multiple myeloma cells by a novel I $\kappa$ B kinase inhibitor. *Clin Cancer Res*, 11(5), 1974–82. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-1936
322. Shi R, Re D, Dudl E, Cuddy M, Okolotowicz KJ, Dahl R, Su Y, Hurder A, Kitada S, Peddibhotla S, Roth GP, Smith LH, Kipps TJ, Cosford N, Cashman J, Reed JC (2010). Chemical biology strategy reveals pathway-selective inhibitor of NF-kappaB activation induced by protein kinase C. *ACS Chem Biol*, 5(3), 287–99. doi:10.1021/cb9003089
323. Seamon KB, Padgett W, Daly JW (1981). Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78(6), 3363–7. doi:10.1073/pnas.78.6.3363
324. Martiny-Baron G, Kazanietz MG, Mischak H, Blumberg PM, Kochs G, Hug H, Marmé D, Schächtele C (1993). Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Gö 6976. *Journal of Biological Chemistry*, 268(13), 9194–7. doi:10.1016/S0021-9258(18)98335-3
325. Pal SK, Reckamp K, Yu H, Figlin RA (2010). Akt inhibitors in clinical development for the treatment of cancer. *Expert Opin Investig Drugs*, 19(11), 1355–66. doi:10.1517/13543784.2010.520701
326. Niedel JE, Kuhn LJ, Vandenberg GR (1983). Phorbol diester receptor copurifies with protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80(1), 36–40. doi:10.1073/pnas.80.1.36



327. Nelsen B, Hellman L, Sen R (1988). The NF-kappa B-binding site mediates phorbol ester-inducible transcription in nonlymphoid cells. *Mol. Cell. Biol.*, 8(8), 3526–31. doi:10.1128/mcb.8.8.3526-3531.1988
328. Horiuchi N, Holick MF, Potts JT, Rosenblatt M (1983). A parathyroid hormone inhibitor in vivo: design and biological evaluation of a hormone analog. *Science*, 220(4601), 1053–5. doi:10.1126/science.6302844
329. Karaplis AC, Deckelbaum RA (1998). Role of PTHrP and PTH-1 receptor in endochondral bone development. *Front Biosci*, 3, d795-803. doi:10.2741/a322
330. Murai M, Miyoshi H (2016). Current topics on inhibitors of respiratory complex I. *Biochim Biophys Acta*, 1857(7), 884–91. doi:10.1016/j.bbabi.2015.11.009
331. Jo H, Mondal S, Tan D, Nagata E, Takizawa S, Sharma AK, Hou Q, Shanmugasundaram K, Prasad A, Tung JK, Tejeda AO, Man H, Rigby AC, Luo HR (2012). Small molecule-induced cytosolic activation of protein kinase Akt rescues ischemia-elicited neuronal death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(26), 10581–6. doi:10.1073/pnas.1202810109
332. Holzmüller W, Kulozik U (2016). Protein quantification by means of a stain-free SDS-PAGE technology without the need for analytical standards: Verification and validation of the method. *Journal of Food Composition and Analysis*, 48, 128–34. doi:10.1016/j.jfca.2016.03.003
333. Neumann H, van Vreedendaal M (1967). An improved alkaline phosphatase determination with p-nitrophenyl phosphate. *Clinica Chimica Acta*, 17(2), 183–7. doi:10.1016/0009-8981(67)90117-9
334. Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25(4), 402–8. doi:10.1006/meth.2001.1262
335. McGee-Russell SM (1958). Histochemical methods for calcium. *J Histochem Cytochem*, 6(1), 22–42. doi:10.1177/6.1.22
336. Ishiyama M (1997). A highly water-soluble disulfonated tetrazolium salt as a chromogenic indicator for NADH as well as cell viability. *Talanta*, 44(7), 1299–305. doi:10.1016/S0039-9140(97)00017-9
337. MacAla LJ, Hayslett JP, Smallwood JI (1998). TECHNICAL NOTE: measurement of cAMP-dependent protein kinase activity using a fluorescent-labeled kemptide. *Kidney Int*, 54(5), 1746–50. doi:10.1046/j.1523-1755.1998.00140.x
338. Karege F, Schwald M, Lambercy C, Murama J-J, Cisse M, Malafosse A (2001). A non-radioactive assay for the cAMP-dependent protein kinase activity in rat brain homogenates and age-related changes in hippocampus and cortex. *Brain Research*, 903(1-2), 86–93. doi:10.1016/S0006-8993(01)02409-X
339. Venegas V, Halberg MC (2012). Measurement of mitochondrial DNA copy number. *Methods Mol Biol*, 837, 327–35. doi:10.1007/978-1-61779-504-6\_22
340. Güntherberg H, Rost J (1966). The true oxidized glutathione content of red blood cells obtained by new enzymic and paper chromatographic methods. *Analytical Biochemistry*, 15(2), 205–10. doi:10.1016/0003-2697(66)90025-X
341. Oparka M, Walczak J, Malinska D, van Oppen LMPE, Szczepanowska J, Koopman WJH, Wieckowski MR (2016). Quantifying ROS levels using CM-H2DCFDA and HyPer. *Methods*, 109, 3–11. doi:10.1016/j.ymeth.2016.06.008
342. Fang D, Hawke D, Zheng Y, Xia Y, Meisenhelder J, Nika H, Mills GB, Kobayashi R, Hunter T, Lu Z (2007). Phosphorylation of beta-catenin by AKT promotes beta-catenin transcriptional activity. *Journal of Biological Chemistry*, 282(15), 11221–9. doi:10.1074/jbc.M611871200
343. Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, Hemmings BA (1996). Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J*, 15(23), 6541–51. doi:10.1002/j.1460-2075.1996.tb01045.x

344. Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature*, 378(6559), 785–9. doi:10.1038/378785a0
345. Ghosh S, Baltimore D (1990). Activation in vitro of NF-kappa B by phosphorylation of its inhibitor I kappa B. *Nature*, 344(6267), 678–82. doi:10.1038/344678a0
346. Zhang P, Yang W, Wang G, Li Y (2018). miR-143 suppresses the osteogenic differentiation of dental pulp stem cells by inactivation of NF- $\kappa$ B signaling pathway via targeting TNF- $\alpha$ . *Arch Oral Biol*, 87, 172–9. doi:10.1016/j.archoralbio.2017.12.031
347. Wang Y, Liu Y, Zhang M, Lv L, Zhang X, Zhang P, Zhou Y (2019). Inhibition of PTGS1 promotes osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells by suppressing NF- $\kappa$ B signaling. *Stem Cell Res Ther*, 10(1), 57. doi:10.1186/s13287-019-1167-3
348. Sakurai H, Chiba H, Miyoshi H, Sugita T, Toriumi W (1999). IkappaB kinases phosphorylate NF-kappaB p65 subunit on serine 536 in the transactivation domain. *Journal of Biological Chemistry*, 274(43), 30353–6. doi:10.1074/jbc.274.43.30353
349. Bohuslav J, Chen L-F, Kwon H, Mu Y, Greene WC (2004). p53 induces NF-kappaB activation by an IkappaB kinase-independent mechanism involving phosphorylation of p65 by ribosomal S6 kinase 1. *Journal of Biological Chemistry*, 279(25), 26115–25. doi:10.1074/jbc.M313509200
350. Jiang X, Takahashi N, Matsui N, Tetsuka T, Okamoto T (2003). The NF-kappa B activation in lymphotoxin beta receptor signaling depends on the phosphorylation of p65 at serine 536. *Journal of Biological Chemistry*, 278(2), 919–26. doi:10.1074/jbc.M208696200
351. Verma IM, Stevenson JK, Schwarz EM, van Antwerp D, Miyamoto S (1995). Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev*, 9(22), 2723–35. doi:10.1101/gad.9.22.2723
352. Mercurio F, Zhu H, Murray BW, Shevchenko A, Bennett BL, Li J, Young DB, Barbosa M, Mann M, Manning A, Rao A (1997). IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IkappaB kinases essential for NF-kappaB activation. *Science*, 278(5339), 860–6. doi:10.1126/science.278.5339.860
353. DiDonato JA, Hayakawa M, Rothwarf DM, Zandi E, Karin M (1997). A cytokine-responsive IkappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB. *Nature*, 388(6642), 548–54. doi:10.1038/41493
354. Delhase M, Hayakawa M, Chen Y, Karin M (1999). Positive and negative regulation of IkappaB kinase activity through IKKbeta subunit phosphorylation. *Science*, 284(5412), 309–13. doi:10.1126/science.284.5412.309
355. Hemmings BA (1985). Regulation of cAMP-dependent protein kinase in cultured cells. *Curr Top Cell Regul*, 27, 117–32. doi:10.1016/b978-0-12-152827-0.50017-7
356. Pieleles O, Reichert TE, Morscizek C (2022). Protein kinase A is activated during bone morphogenetic protein 2-induced osteogenic differentiation of dental follicle stem cells via endogenous parathyroid hormone-related protein. *Arch Oral Biol*, 138, 105409. doi:10.1016/j.archoralbio.2022.105409
357. Wang GL, Semenza GL (1993). General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(9), 4304–8. doi:10.1073/pnas.90.9.4304
358. Forman HJ, Zhang H (2021). Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. *Nat Rev Drug Discov*, 20(9), 689–709. doi:10.1038/s41573-021-00233-1
359. Pieleles O, Höring M, Adel S, Reichert TE, Liebisch G, Morscizek C (2022). Energy Metabolism and Lipidome Are Highly Regulated during Osteogenic Differentiation of Dental Follicle Cells. *Stem Cells Int*, 2022, 3674931. doi:10.1155/2022/3674931

360. Jin X, Yin J, Kim S-H, Sohn Y-W, Beck S, Lim YC, Nam D-H, Choi Y-J, Kim H (2011). EGFR-AKT-Smad signaling promotes formation of glioma stem-like cells and tumor angiogenesis by ID3-driven cytokine induction. *Cancer Res*, 71(22), 7125–34. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1330
361. Wu J, Yu Z, Su D (2014). BMP4 protects rat pulmonary arterial smooth muscle cells from apoptosis by PI3K/AKT/Smad1/5/8 signaling. *Int J Mol Sci*, 15(8), 13738–54. doi:10.3390/ijms150813738
362. Wu Y, Zhang Z, Liao X, Qi L, Liu Y, Wang Z (2016). Effect of high-fat diet-induced obesity on the Akt/FoxO/Smad signaling pathway and the follicular development of the mouse ovary. *Mol Med Rep*, 14(4), 3894–900. doi:10.3892/mmr.2016.5671
363. Mukherjee A, Rotwein P (2009). Akt promotes BMP2-mediated osteoblast differentiation and bone development. *J Cell Sci*, 122 (Pt 5), 716–26. doi:10.1242/jcs.042770
364. Ghosh-Choudhury N, Abboud SL, Nishimura R, Celeste A, Mahimainathan L, Choudhury GG (2002). Requirement of BMP-2-induced phosphatidylinositol 3-kinase and Akt serine/threonine kinase in osteoblast differentiation and Smad-dependent BMP-2 gene transcription. *Journal of Biological Chemistry*, 277(36), 33361–8. doi:10.1074/jbc.M205053200
365. Dong J, Xu X, Zhang Q, Yuan Z, Tan B (2021). Critical implication of the PTEN/PI3K/AKT pathway during BMP2-induced heterotopic ossification. *Mol Med Rep*, 23(4), 254. doi:10.3892/mmr.2021.11893
366. Hung YP, Teragawa C, Kosaisawe N, Gillies TE, Pargett M, Minguet M, Distor K, Rocha-Gregg BL, Coloff JL, Keibler MA, Stephanopoulos G, Yellen G, Brugge JS, Albeck JG (2017). Akt regulation of glycolysis mediates bioenergetic stability in epithelial cells. *Elife*, 6, e27293. doi:10.7554/eLife.27293
367. Klein BY, Levitzki R, Ben-Bassat H (1998). Src protein and tyrosine-phosphorylated protein profiles in marrow stroma during osteogenic stimulation. *J Cell Biochem*, 69(3), 316–25. doi:10.1002/(sici)1097-4644(19980601)69:3<316:aid-jcb9>3.0.co;2-u
368. Nomura N, Nomura M, Sugiyama K, Hamada J-I (2007). Src regulates phorbol 12-myristate 13-acetate-activated PKC-induced migration via Cas/Crk/Rac1 signaling pathway in glioblastoma cells. *Int J Mol Med*, 20(4), 511–9. doi:10.3892/ijmm.20.4.511
369. Curcio MF, Batista WL, Castro ED, Strumillo ST, Ogata FT, Alkmim W, Brunialti MKC, Salomão R, Turcato G, Diaz RS, Monteiro HP, Janini LMR (2019). Nitric oxide stimulates a PKC-Src-Akt signaling axis which increases human immunodeficiency virus type 1 replication in human T lymphocytes. *Nitric Oxide*, 93, 78–89. doi:10.1016/j.niox.2019.09.004
370. Chen R, Kim O, Yang J, Sato K, Eisenmann KM, McCarthy J, Chen H, Qiu Y (2001). Regulation of Akt/PKB activation by tyrosine phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 276(34), 31858–62. doi:10.1074/jbc.C100271200
371. Yang L, Qiao G, Ying H, Zhang J, Yin F (2010). TCR-induced Akt serine 473 phosphorylation is regulated by protein kinase C- $\alpha$ . *Biochem Biophys Res Commun*, 400(1), 16–20. doi:10.1016/j.bbrc.2010.07.126
372. Nazarewicz RR, Salazar G, Patrushev N, San Martin A, Hilenski L, Xiong S, Alexander RW (2011). Early endosomal antigen 1 (EEA1) is an obligate scaffold for angiotensin II-induced, PKC- $\alpha$ -dependent Akt activation in endosomes. *J Biol Chem*, 286(4), 2886–95. doi:10.1074/jbc.M110.141499
373. Kleiman E, Carter G, Ghansah T, Patel NA, Cooper DR (2009). Developmentally spliced PKC $\beta$ all provides a possible link between mTORC2 and Akt kinase to regulate 3T3-L1 adipocyte insulin-stimulated glucose transport. *Biochem Biophys Res Commun*, 388(3), 554–9. doi:10.1016/j.bbrc.2009.08.063
374. Naruse K, Rask-Madsen C, Takahara N, Ha S, Suzuma K, Way KJ, Jacobs JRC, Clermont AC, Ueki K, Ohshiro Y, Zhang J, Goldfine AB, King GL (2006). Activation of vascular protein kinase C- $\beta$  inhibits Akt-dependent endothelial nitric oxide synthase function in obesity-associated insulin resistance. *Diabetes*, 55(3), 691–8. doi:10.2337/diabetes.55.03.06.db05-0771

375. Motley ED, Kabir SM, Gardner CD, Eguchi K, Frank GD, Kuroki T, Ohba M, Yamakawa T, Eguchi S (2002). Lysophosphatidylcholine inhibits insulin-induced Akt activation through protein kinase C- $\alpha$  in vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, 39 (Pt 2), 508–12. doi:10.1161/hy02t2.102907
376. Li J, Zhang T, Huang C, Xu M, Xie W, Pei Q, Xie X, Wang B, Li X (2021). Chemerin located in bone marrow promotes osteogenic differentiation and bone formation via Akt/Gsk3 $\beta$ / $\beta$ -catenin axis in mice. *J Cell Physiol*, 236(8), 6042–54. doi:10.1002/jcp.30290
377. Gwak J, Cho M, Gong S-J, Won J, Kim D-E, Kim E-Y, Lee SS, Kim M, Kim TK, Shin J-G, Oh S (2006). Protein-kinase-C-mediated beta-catenin phosphorylation negatively regulates the Wnt/beta-catenin pathway. *J Cell Sci*, 119 (Pt 22), 4702–9. doi:10.1242/jcs.03256
378. Gwak J, Jung S-J, Kang D-I, Kim E-Y, Kim D-E, Chung Y-H, Shin J-G, Oh S (2009). Stimulation of protein kinase C- $\alpha$  suppresses colon cancer cell proliferation by down-regulation of  $\beta$ -catenin. *J Cell Mol Med*, 13(8b), 2171–80. doi:10.1111/j.1582-4934.2008.00683.x
379. Dupasquier S, Blache P, Picque Lasorsa L, Zhao H, Abraham J-D, Haigh JJ, Ychou M, Prévostel C (2019). Modulating PKC $\alpha$  Activity to Target Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling in Colon Cancer. *Cancers (Basel)*, 11(5), 693. doi:10.3390/cancers11050693
380. Goode N, Hughes K, Woodgett JR, Parker PJ (1992). Differential regulation of glycogen synthase kinase-3 beta by protein kinase C isotypes. *Journal of Biological Chemistry*, 267(24), 16878–82. doi:10.1016/S0021-9258(18)41866-2
381. Moore SF, van den Bosch MTJ, Hunter RW, Sakamoto K, Poole AW, Hers I (2013). Dual regulation of glycogen synthase kinase 3 (GSK3) $\alpha/\beta$  by protein kinase C (PKC) $\alpha$  and Akt promotes thrombin-mediated integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 activation and granule secretion in platelets. *J Biol Chem*, 288(6), 3918–28. doi:10.1074/jbc.M112.429936
382. Bao Q, Chen S, Qin H, Feng J, Liu H, Liu D, Li A, Shen Y, Zhong X, Li J, Zong Z (2017). Constitutive  $\beta$ -catenin activation in osteoblasts impairs terminal osteoblast differentiation and bone quality. *Exp Cell Res*, 350(1), 123–31. doi:10.1016/j.yexcr.2016.11.013
383. Xu Y, Ren C, Zhao X, Wang W, Zhang N (2019). microRNA-132 inhibits osteogenic differentiation of periodontal ligament stem cells via GDF5 and the NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Pathol Res Pract*, 215(12), 152722. doi:10.1016/j.prp.2019.152722
384. Tang Y, Zhang X, Ge W, Zhou Y (2020). Knockdown of LAP2 $\alpha$  inhibits osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells by activating NF- $\kappa$ B. *Stem Cell Res Ther*, 11(1), 263. doi:10.1186/s13287-020-01774-9
385. Xue N, Qi L, Zhang G, Zhang Y (2018). miRNA-125b Regulates Osteogenic Differentiation of Periodontal Ligament Cells Through NKIRAS2/NF- $\kappa$ B Pathway. *Cell Physiol Biochem*, 48(4), 1771–81. doi:10.1159/000492350
386. Wang Q, Lin H, Ran J, Jiang Z, Ren Q, He W, Xiao H (2022). miR-200a-3p represses osteogenesis of human periodontal ligament stem cells by targeting ZEB2 and activating the NF- $\kappa$ B pathway. *Acta Odontol Scand*, 80(2), 140–9. doi:10.1080/00016357.2021.1964593
387. Hess K, Ushmorov A, Fiedler J, Brenner RE, Wirth T (2009). TNF $\alpha$  promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by triggering the NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Bone*, 45(2), 367–76. doi:10.1016/j.bone.2009.04.252
388. Cho HH, Shin KK, Kim YJ, Song JS, Kim JM, Bae YC, Kim CD, Jung JS (2010). NF- $\kappa$ B activation stimulates osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue by increasing TAZ expression. *J Cell Physiol*, 223(1), 168–77. doi:10.1002/jcp.22024
389. Li N, Li Z, Fu L, Yan M, Wang Y, Yu J, Wu J (2022). PD-1 Suppresses the Osteogenic and Odontogenic Differentiation of Stem Cells from Dental Apical Papilla via Targeting SHP2/NF- $\kappa$ B Axis. *Stem Cells*, 40(8), 763–77. doi:10.1093/stmcls/sxac037

390. Pang X, Wang Y, Wu J, Zhou Z, Xu T, Jin L, Yu Y, Li Z, Gobin R, Xue C, Yu J (2019). Yunnan Baiyao Conditioned Medium Promotes the Odonto/Osteogenic Capacity of Stem Cells from Apical Papilla via Nuclear Factor Kappa B Signaling Pathway. *Biomed Res Int*, 2019, 9327386. doi:10.1155/2019/9327386
391. Li J, Yan M, Wang Z, Jing S, Li Y, Liu G, Yu J, Fan Z (2014). Effects of canonical NF- $\kappa$ B signaling pathway on the proliferation and odonto/osteogenic differentiation of human stem cells from apical papilla. *Biomed Res Int*, 2014, 319651. doi:10.1155/2014/319651
392. Franzoso G, Carlson L, Xing L, Poljak L, Shores EW, Brown KD, Leonardi A, Tran T, Boyce BF, Siebenlist U (1997). Requirement for NF- $\kappa$ B in osteoclast and B-cell development. *Genes Dev*, 11(24), 3482–96. doi:10.1101/gad.11.24.3482
393. Auphan N, DiDonato JA, Rosette C, Helmborg A, Karin M (1995). Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF- $\kappa$ B activity through induction of I  $\kappa$ B synthesis. *Science*, 270(5234), 286–90. doi:10.1126/science.270.5234.286
394. Lallena MJ, Diaz-Meco MT, Bren G, Payá CV, Moscat J (1999). Activation of I $\kappa$ B kinase beta by protein kinase C isoforms. *Mol. Cell. Biol.*, 19(3), 2180–8. doi:10.1128/MCB.19.3.2180
395. Mut M, Amos S, Hussaini IM (2010). PKC alpha phosphorylates cytosolic NF- $\kappa$ B/p65 and PKC delta delays nuclear translocation of NF- $\kappa$ B/p65 in U1242 glioblastoma cells. *Turk Neurosurg*, 20(3), 277–85. doi:10.5137/1019-5149.JTN.3008-10.1
396. Wang H, Xu Y, Xu A, Wang X, Cheng L, Lee S, Tse G, Li G, Liu T, Fu H (2020). PKC $\beta$ /NF- $\kappa$ B pathway in diabetic atrial remodeling. *J Physiol Biochem*, 76(4), 637–53. doi:10.1007/s13105-020-00769-7
397. Basson MD, Zeng B, Downey C, Sirivelu MP, Tepe JJ (2015). Increased extracellular pressure stimulates tumor proliferation by a mechanosensitive calcium channel and PKC- $\beta$ . *Mol Oncol*, 9(2), 513–26. doi:10.1016/j.molonc.2014.10.008
398. Senftleben U, Cao Y, Xiao G, Greten FR, Krähn G, Bonizzi G, Chen Y, Hu Y, Fong A, Sun SC, Karin M (2001). Activation by IKK $\alpha$  of a second, evolutionary conserved, NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Science*, 293(5534), 1495–9. doi:10.1126/science.1062677
399. Takahashi N, Tetsuka T, Uranishi H, Okamoto T (2002). Inhibition of the NF- $\kappa$ B transcriptional activity by protein kinase A. *Eur J Biochem*, 269(18), 4559–65. doi:10.1046/j.1432-1033.2002.03157.x
400. King CC, Sastri M, Chang P, Pennypacker J, Taylor SS (2011). The rate of NF- $\kappa$ B nuclear translocation is regulated by PKA and A kinase interacting protein 1. *PLoS One*, 6(4), e18713. doi:10.1371/journal.pone.0018713
401. Gao N, Hibi Y, Cueno M, Asamitsu K, Okamoto T (2010). A-kinase-interacting protein 1 (AKIP1) acts as a molecular determinant of PKA in NF- $\kappa$ B signaling. *J Biol Chem*, 285(36), 28097–104. doi:10.1074/jbc.M110.116566
402. Kane LP, Shapiro VS, Stokoe D, Weiss A (1999). Induction of NF- $\kappa$ B by the Akt/PKB kinase. *Current Biology*, 9(11), 601–4. doi:10.1016/S0960-9822(99)80265-6
403. Ranjani S, Kowshik J, Sophia J, Nivetha R, Baba AB, Veeravarmal V, Joksić G, Rutqvist LE, Nilsson R, Nagini S (2020). Activation of PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B Signaling Mediates Swedish Snus Induced Proliferation and Apoptosis Evasion in the Rat Forestomach: Modulation by Blueberry. *Anticancer Agents Med Chem*, 20(1), 59–69. doi:10.2174/1871520619666191024115738
404. Yu C, Wu D, Zhao C, Wu C (2022). Overexpressed Thrombospondin 2 Induced Osteogenic Differentiation of Valve Interstitial Cells via Inhibition of Akt/NF- $\kappa$ B Signaling Pathway to Promote Calcific Aortic Valve Disease Development. *Dis Markers*, 2022, 2022958. doi:10.1155/2022/2022958
405. Sugimori K, Matsui K, Motomura H, Tokoro T, Wang J, Higa S, Kimura T, Kitajima I (2005). BMP-2 prevents apoptosis of the N1511 chondrocytic cell line through PI3K/Akt-mediated NF- $\kappa$ B activation. *J Bone Miner Metab*, 23(6), 411–9. doi:10.1007/s00774-005-0622-7

406. Romashkova JA, Makarov SS (1999). NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature*, 401(6748), 86–90. doi:10.1038/43474
407. Huang W-C, Chen W-S, Chen Y-J, Wang L-Y, Hsu S-C, Chen C-C, Hung M-C (2012). Hepatitis B virus X protein induces IKK $\alpha$  nuclear translocation via Akt-dependent phosphorylation to promote the motility of hepatocarcinoma cells. *J Cell Physiol*, 227(4), 1446–54. doi:10.1002/jcp.22860
408. Yamazaki M, Fukushima H, Shin M, Katagiri T, Doi T, Takahashi T, Jimi E (2009). Tumor necrosis factor alpha represses bone morphogenetic protein (BMP) signaling by interfering with the DNA binding of Smads through the activation of NF-kappaB. *J Biol Chem*, 284(51), 35987–95. doi:10.1074/jbc.M109.070540
409. Hirata-Tsuchiya S, Fukushima H, Katagiri T, Ohte S, Shin M, Nagano K, Aoki K, Morotomi T, Sugiyama G, Nakatomi C, Kokabu S, Doi T, Takeuchi H, Ohya K, Terashita M, Hirata M, Kitamura C, Jimi E (2014). Inhibition of BMP2-induced bone formation by the p65 subunit of NF- $\kappa$ B via an interaction with Smad4. *Mol Endocrinol*, 28(9), 1460–70. doi:10.1210/me.2014-1094
410. Carayol N, Wang C-Y (2006). IKK $\alpha$  stabilizes cytosolic beta-catenin by inhibiting both canonical and non-canonical degradation pathways. *Cell Signal*, 18(11), 1941–6. doi:10.1016/j.cellsig.2006.02.014
411. Chang J, Liu F, Lee M, Wu B, Ting K, Zara JN, Soo C, Al Hezaimi K, Zou W, Chen X, Mooney DJ, Wang C-Y (2013). NF- $\kappa$ B inhibits osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells by promoting  $\beta$ -catenin degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(23), 9469–74. doi:10.1073/pnas.1300532110
412. Wu X-B, Liu Y, Wang G-H, Xu X, Cai Y, Wang H-Y, Li Y-Q, Meng H-F, Dai F, Jin J-D (2016). Mesenchymal stem cells promote colorectal cancer progression through AMPK/mTOR-mediated NF- $\kappa$ B activation. *Sci Rep*, 6, 21420. doi:10.1038/srep21420
413. Yu S, Li P, Li B, Miao D, Deng Q (2020). RelA promotes proliferation but inhibits osteogenic and chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *FEBS Lett*, 594(9), 1368–78. doi:10.1002/1873-3468.13739
414. Nakajima T, Kitajima I, Shin H, Takasaki I, Shigeta K, Abeyama K, Yamashita Y, Tokioka T, Soejima Y, Maruyama I (1994). Involvement of NF-kappa B activation in thrombin-induced human vascular smooth muscle cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun*, 204(2), 950–8. doi:10.1006/bbrc.1994.2552
415. Hinz M, Krappmann D, Eichten A, Heder A, Scheidereit C, Strauss M (1999). NF-kappaB function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition. *Mol. Cell. Biol.*, 19(4), 2690–8. doi:10.1128/MCB.19.4.2690
416. Guttridge DC, Albanese C, Reuther JY, Pestell RG, Baldwin AS (1999). NF-kappaB controls cell growth and differentiation through transcriptional regulation of cyclin D1. *Mol. Cell. Biol.*, 19(8), 5785–99. doi:10.1128/MCB.19.8.5785
417. Seitz CS, Deng H, Hinata K, Lin Q, Khavari PA (2000). Nuclear factor kappaB subunits induce epithelial cell growth arrest. *Cancer Res*, 60(15), 4085–92.
418. Kühnel F, Zender L, Paul Y, Tietze MK, Trautwein C, Manns M, Kubicka S (2000). NFkappaB mediates apoptosis through transcriptional activation of Fas (CD95) in adenoviral hepatitis. *Journal of Biological Chemistry*, 275(9), 6421–7. doi:10.1074/jbc.275.9.6421
419. Wu H, Lozano G (1994). NF-kappa B activation of p53. A potential mechanism for suppressing cell growth in response to stress. *Journal of Biological Chemistry*, 269(31), 20067–74. doi:10.1016/S0021-9258(17)32128-2
420. Pieleles O, Reck A, Reichert TE, Morsczech C (2020). p53 inhibits the osteogenic differentiation but does not induce senescence in human dental follicle cells. *Differentiation*, 114, 20–6. doi:10.1016/j.diff.2020.05.003
421. Barnes PJ, Karin M (1997). Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med*, 336(15), 1066–71. doi:10.1056/NEJM199704103361506

422. Nichols TC, Fischer TH, Deliarhyris EN, Baldwin AS (2001). Role of nuclear factor-kappa B (NF-kappa B) in inflammation, periodontitis, and atherogenesis. *Ann Periodontol*, 6(1), 20–9. doi:10.1902/annals.2001.6.1.20
423. Sun H, Li Z, Fan C, Liu S, Yan K, Huang G, Li S (2022). Slit guidance ligand 2 promotes the inflammatory response of periodontitis through activation of the NF-κB signaling pathway. *J Periodontal Res*, 57(3), 578–86. doi:10.1111/jre.12987
424. Wang B, Bai S, Wang J, Ren N, Xie R, Cheng G, Yu Y (2021). TPCA-1 negatively regulates inflammation mediated by NF-κB pathway in mouse chronic periodontitis model. *Mol Oral Microbiol*, 36(3), 192–201. doi:10.1111/omi.12335
425. Miao D, Su H, He B, Gao J, Xia Q, Zhu M, Gu Z, Goltzman D, Karaplis AC (2008). Severe growth retardation and early lethality in mice lacking the nuclear localization sequence and C-terminus of PTH-related protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 105(51), 20309–14. doi:10.1073/pnas.0805690105
426. Yang D, Singh R, Divieti P, Guo J, Bouxsein ML, Bringhurst FR (2007). Contributions of parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide receptor signaling pathways to the anabolic effect of PTH on bone. *Bone*, 40(6), 1453–61. doi:10.1016/j.bone.2007.02.001
427. Abou-Samra AB, Jüppner H, Force T, Freeman MW, Kong XF, Schipani E, Urena P, Richards J, Bonventre JV, Potts JT (1992). Expression cloning of a common receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide from rat osteoblast-like cells: a single receptor stimulates intracellular accumulation of both cAMP and inositol trisphosphates and increases intracellular free calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89(7), 2732–6. doi:10.1073/pnas.89.7.2732
428. Chan GK, Miao D, Deckelbaum R, Bolivar I, Karaplis A, Goltzman D (2003). Parathyroid hormone-related peptide interacts with bone morphogenetic protein 2 to increase osteoblastogenesis and decrease adipogenesis in pluripotent C3H10T 1/2 mesenchymal cells. *Endocrinology*, 144(12), 5511–20. doi:10.1210/en.2003-0273
429. Swarthout JT, D'Alonzo RC, Selvamurugan N, Partridge NC (2002). Parathyroid hormone-dependent signaling pathways regulating genes in bone cells. *Gene*, 282(1-2), 1–17. doi:10.1016/S0378-1119(01)00798-3
430. Lossdörfer S, Kraus D, Abuduwali N, Jäger A (2011). Intermittent administration of PTH(1-34) regulates the osteoblastic differentiation of human periodontal ligament cells via protein kinase C- and protein kinase A-dependent pathways in vitro. *J Periodontal Res*, 46(3), 318–26. doi:10.1111/j.1600-0765.2011.01345.x
431. Boabaid F, Berry JE, Koh AJ, Somerman MJ, McCauley LK (2004). The role of parathyroid hormone-related protein in the regulation of osteoclastogenesis by cementoblasts. *J Periodontol*, 75(9), 1247–54. doi:10.1902/jop.2004.75.9.1247
432. Takahashi A, Nagata M, Gupta A, Matsushita Y, Yamaguchi T, Mizuhashi K, Maki K, Ruellas AC, Cevitanes LS, Kronenberg HM, Ono N, Ono W (2019). Autocrine regulation of mesenchymal progenitor cell fates orchestrates tooth eruption. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 116(2), 575–80. doi:10.1073/pnas.1810200115
433. Kitahara Y, Suda N, Kuroda T, Beck F, Hammond VE, Takano Y (2002). Disturbed tooth development in parathyroid hormone-related protein (PTHrP)-gene knockout mice. *Bone*, 30(1), 48–56. doi:10.1016/S8756-3282(01)00669-X
434. Steinberg RA, Cauthron RD, Symcox MM, Shuntoh H (1993). Autoactivation of catalytic (C alpha) subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase by phosphorylation of threonine 197. *Mol. Cell. Biol.*, 13(4), 2332–41. doi:10.1128/mcb.13.4.2332
435. Adams JA, McGlone ML, Gibson R, Taylor SS (1995). Phosphorylation modulates catalytic function and regulation in the cAMP-dependent protein kinase. *Biochemistry*, 34(8), 2447–54. doi:10.1021/bi00008a007

436. Ouyang H, Franceschi RT, McCauley LK, Wang D, Somerman MJ (2000). Parathyroid hormone-related protein down-regulates bone sialoprotein gene expression in cementoblasts: role of the protein kinase A pathway. *Endocrinology*, 141(12), 4671–80. doi:10.1210/endo.141.12.7819
437. Siddappa R, Doorn J, Liu J, Langerwerf E, Arends R, van Blitterswijk C, de Boer J (2010). Timing, rather than the concentration of cyclic AMP, correlates to osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Tissue Eng Regen Med*, 4(5), 356–65. doi:10.1002/term.246
438. Chen Y, Yue S, Xie L, Pu X, Jin T, Cheng SY (2011). Dual Phosphorylation of suppressor of fused (Sufu) by PKA and GSK3beta regulates its stability and localization in the primary cilium. *J Biol Chem*, 286(15), 13502–11. doi:10.1074/jbc.M110.217604
439. Monnier V, Dussillol F, Alves G, Lamour-Isnard C, Plessis A (1998). Suppressor of fused links Fused and Cubitus interruptus on the Hedgehog signalling pathway. *Current Biology*, 8(10), 583-6. doi:10.1016/S0960-9822(98)70227-1
440. Shares BH, Busch M, White N, Shum L, Eliseev RA (2018). Active mitochondria support osteogenic differentiation by stimulating  $\beta$ -catenin acetylation. *J Biol Chem*, 293(41), 16019–27. doi:10.1074/jbc.RA118.004102
441. Liu X, Godwin ML, Nowak G (2004). Protein kinase C-alpha inhibits the repair of oxidative phosphorylation after S-(1,2-dichlorovinyl)-L-cysteine injury in renal cells. *Am J Physiol Renal Physiol*, 287(1), F64-73. doi:10.1152/ajprenal.00216.2003
442. Wang J, Qu X, Xu C, Zhang Z, Qi G, Jin Y (2022). Thermoplasmonic Regulation of the Mitochondrial Metabolic State for Promoting Directed Differentiation of Dental Pulp Stem Cells. *Anal Chem*, 94(27), 9564–71. doi:10.1021/acs.analchem.2c00288
443. Guo J, Zhou F, Liu Z, Cao Y, Zhao W, Zhang Z, Zhai Q, Jin Y, Li B, Jin F (2022). Exosome-shuttled mitochondrial transcription factor A mRNA promotes the osteogenesis of dental pulp stem cells through mitochondrial oxidative phosphorylation activation. *Cell Prolif*, 2022, e13324. doi:10.1111/cpr.13324
444. Wang L, Cheng L, Wang H, Pan H, Yang H, Shao M, Hu T (2016). Glycometabolic reprogramming associated with the initiation of human dental pulp stem cell differentiation. *Cell Biol Int*, 40(3), 308–17. doi:10.1002/cbin.10568
445. Chen C-T, Shih Y-RV, Kuo TK, Lee OK, Wei Y-H (2008). Coordinated changes of mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 26(4), 960–8. doi:10.1634/stemcells.2007-0509
446. Shum LC, White NS, Mills BN, Bentley KLdM, Eliseev RA (2016). Energy Metabolism in Mesenchymal Stem Cells During Osteogenic Differentiation. *Stem Cells Dev*, 25(2), 114–22. doi:10.1089/scd.2015.0193
447. Kosaisawe N, Sparta B, Pargett M, Teragawa CK, Albeck JG (2021). Transient phases of OXPHOS inhibitor resistance reveal underlying metabolic heterogeneity in single cells. *Cell Metab*, 33(3), 649-665.e8. doi:10.1016/j.cmet.2021.01.014
448. Smith CO, Eliseev RA (2021). Energy Metabolism During Osteogenic Differentiation: The Role of Akt. *Stem Cells Dev*, 30(3), 149–62. doi:10.1089/scd.2020.0141
449. Pieleles O, Hartmann M, Morsczeck C (2021). AMP-activated protein kinase and the down-stream activated process of autophagy regulate the osteogenic differentiation of human dental follicle cells. *Arch Oral Biol*, 122, 104951. doi:10.1016/j.archoralbio.2020.104951
450. Smieszek A, Tomaszewski KA, Kornicka K, Marycz K (2018). Metformin Promotes Osteogenic Differentiation of Adipose-Derived Stromal Cells and Exerts Pro-Osteogenic Effect Stimulating Bone Regeneration. *J Clin Med*, 7(12), 482. doi:10.3390/jcm7120482
451. Zhao X, Pathak JL, Huang W, Zhu C, Li Y, Guan H, Zeng S, Ge L, Shu Y (2020). Metformin enhances osteogenic differentiation of stem cells from human exfoliated deciduous teeth through AMPK pathway. *J Tissue Eng Regen Med*, 14(12), 1869–79. doi:10.1002/term.3142



452. Kim E-K, Lim S, Park J-M, Seo JK, Kim JH, Kim KT, Ryu SH, Suh P-G (2012). Human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by AMP-activated protein kinase. *J Cell Physiol*, 227(4), 1680–7. doi:10.1002/jcp.22892
453. Zhao Y, Hu X, Liu Y, Dong S, Wen Z, He W, Zhang S, Huang Q, Shi M (2017). ROS signaling under metabolic stress: cross-talk between AMPK and AKT pathway. *Mol Cancer*, 16(1), 79. doi:10.1186/s12943-017-0648-1
454. Saha M, Kumar S, Bukhari S, Balaji SA, Kumar P, Hindupur SK, Rangarajan A (2018). AMPK-Akt Double-Negative Feedback Loop in Breast Cancer Cells Regulates Their Adaptation to Matrix Deprivation. *Cancer Res*, 78(6), 1497–510. doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-2090
455. Rendina-Ruedy E, Guntur AR, Rosen CJ (2017). Intracellular lipid droplets support osteoblast function. *Adipocyte*, 6(3), 250–8. doi:10.1080/21623945.2017.1356505
456. Da Silva CG, Barretto LSdS, Lo Turco EG, Santos AdL, Lessio C, Martins Júnior HA, de Almeida FG (2020). Lipidomics of mesenchymal stem cell differentiation. *Chem Phys Lipids*, 232, 104964. doi:10.1016/j.chemphyslip.2020.104964
457. Adeva-Andany MM, Carneiro-Freire N, Seco-Filgueira M, Fernández-Fernández C, Mouriño-Bayolo D (2019). Mitochondrial  $\beta$ -oxidation of saturated fatty acids in humans. *Mitochondrion*, 46, 73–90. doi:10.1016/j.mito.2018.02.009
458. Kastaniotis AJ, Autio KJ, Kerätär JM, Monteuiis G, Mäkelä AM, Nair RR, Pietikäinen LP, Shvetsova A, Chen Z, Hiltunen JK (2017). Mitochondrial fatty acid synthesis, fatty acids and mitochondrial physiology. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 1862(1), 39–48. doi:10.1016/j.bbalip.2016.08.011
459. Balaban RS, Nemoto S, Finkel T (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*, 120(4), 483–95. doi:10.1016/j.cell.2005.02.001
460. Giordano FJ (2005). Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J Clin Invest*, 115(3), 500–8. doi:10.1172/JCI24408
461. Zhou N, Hu N, Liao J-Y, Lin L-B, Zhao C, Si W-K, Yang Z, Yi S-X, Fan T-X, Bao W, Liang X, Wei X, Chen H, Chen C, Chen Q, Lin X, Huang W (2015). HIF-1 $\alpha$  as a Regulator of BMP2-Induced Chondrogenic Differentiation, Osteogenic Differentiation, and Endochondral Ossification in Stem Cells. *Cell Physiol Biochem*, 36(1), 44–60. doi:10.1159/000374052
462. Li M, Yan J, Chen X, Tam W, Zhou L, Liu T, Pan G, Lin J, Yang H, Pei M, He F (2018). Spontaneous up-regulation of SIRT1 during osteogenesis contributes to stem cells' resistance to oxidative stress. *J Cell Biochem*, 119(6), 4928–44. doi:10.1002/jcb.26730
463. Antunes F, Han D, Cadenas E (2002). Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxification in in vivo conditions. *Free Radic Biol Med*, 33(9), 1260–7. doi:10.1016/S0891-5849(02)01016-X
464. Rocha S, Gomes D, Lima M, Bronze-da-Rocha E, Santos-Silva A (2015). Peroxiredoxin 2, glutathione peroxidase, and catalase in the cytosol and membrane of erythrocytes under H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress. *Free Radic Res*, 49(8), 990–1003. doi:10.3109/10715762.2015.1028402
465. Sahlender B, Windolf J, Suschek CV (2022). Superoxide dismutase and catalase significantly improve the osteogenic differentiation potential of osteogenetically compromised human adipose tissue-derived stromal cells in vitro. *Stem Cell Res*, 60, 102708. doi:10.1016/j.scr.2022.102708
466. Rhee SG, Yang K-S, Kang SW, Woo HA, Chang T-S (2005). Controlled elimination of intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: regulation of peroxiredoxin, catalase, and glutathione peroxidase via post-translational modification. *Antioxid Redox Signal*, 7(5-6), 619–26. doi:10.1089/ars.2005.7.619
467. Chen B, Shen Z, Wu D, Xie X, Xu X, Lv L, Dai H, Chen J, Gan X (2019). Glutathione Peroxidase 1 Promotes NSCLC Resistance to Cisplatin via ROS-Induced Activation of PI3K/AKT Pathway. *Biomed Res Int*, 2019, 7640547. doi:10.1155/2019/7640547

468. Buttke TM, Sandstrom PA (1994). Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunology Today*, 15(1), 7–10. doi:10.1016/0167-5699(94)90018-3
469. Almeida M, Han L, Ambrogini E, Bartell SM, Manolagas SC (2010). Oxidative stress stimulates apoptosis and activates NF- $\kappa$ B in osteoblastic cells via a PKC $\beta$ /p66shc signaling cascade: counter regulation by estrogens or androgens. *Mol Endocrinol*, 24(10), 2030–7. doi:10.1210/me.2010-0189
470. Li X, Peng J, Wu M, Ye H, Zheng C, Wu G, Xu H, Chen X, Liu X (2011). BMP2 promotes chondrocyte proliferation via the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. *Mol Med Rep*, 4(4), 621–6. doi:10.3892/mmr.2011.474
471. Kim Y-J, Kim H-N, Park E-K, Lee B-H, Ryoo H-M, Kim S-Y, Kim I-S, Stein JL, Lian JB, Stein GS, van Wijnen AJ, Choi J-Y (2006). The bone-related Zn finger transcription factor Osterix promotes proliferation of mesenchymal cells. *Gene*, 366(1), 145–51. doi:10.1016/j.gene.2005.08.021
472. Hall-Glenn F, Lyons KM (2011). Roles for CCN2 in normal physiological processes. *Cell Mol Life Sci*, 68(19), 3209–17. doi:10.1007/s00018-011-0782-7
473. Jeon E, Yun Y-R, Kang W, Lee S, Koh Y-H, Koh Y-H, Kim H-W, Suh CK, Jang J-H (2012). Investigating the role of FGF18 in the cultivation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *PLoS One*, 7(8), e43982. doi:10.1371/journal.pone.0043982
474. Yan S, Zhang M, Yang G, Sun Y, Ai D (2022). CTGF Promotes the Osteoblast Differentiation of Human Periodontal Ligament Stem Cells by Positively Regulating BMP2/Smad Signal Transduction. *Biomed Res Int*, 2022, 2938015. doi:10.1155/2022/2938015
475. Kauffmann-Zeh A, Rodriguez-Viciana P, Ulrich E, Gilbert C, Coffey P, Downward J, Evan G (1997). Suppression of c-Myc-induced apoptosis by Ras signalling through PI(3)K and PKB. *Nature*, 385(6616), 544–8. doi:10.1038/385544a0
476. Songyang Z, Baltimore D, Cantley LC, Kaplan DR, Franke TF (1997). Interleukin 3-dependent survival by the Akt protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 94(21), 11345–50. doi:10.1073/pnas.94.21.11345
477. Newton AC, Brognard J (2017). Reversing the Paradigm: Protein Kinase C as a Tumor Suppressor. *Trends Pharmacol Sci*, 38(5), 438–47. doi:10.1016/j.tips.2017.02.002
478. Isakov N (2018). Protein kinase C (PKC) isoforms in cancer, tumor promotion and tumor suppression. *Semin Cancer Biol*, 48, 36–52. doi:10.1016/j.semcancer.2017.04.012
479. Meng Z, Liu J, Feng Z, Guo S, Wang M, Wang Z, Li Z, Li H, Sui L (2022). N-acetylcysteine regulates dental follicle stem cell osteogenesis and alveolar bone repair via ROS scavenging. *Stem Cell Res Ther*, 13(1), 466. doi:10.1186/s13287-022-03161-y
480. Perkins ND (2004). NF- $\kappa$ B: tumor promoter or suppressor? *Trends Cell Biol*, 14(2), 64–9. doi:10.1016/j.tcb.2003.12.004
481. Wang J, Qi G, Qu X, Ling X, Zhang Z, Jin Y (2020). Molecular Profiling of Dental Pulp Stem Cells during Cell Differentiation by Surface Enhanced Raman Spectroscopy. *Anal Chem*, 92(5), 3735–41. doi:10.1021/acs.analchem.9b05026

## 9 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt zunächst **Herrn Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert** für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit im Forschungslabor der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie durchzuführen sowie für seine Bereitschaft, den Vorsitz meiner mündlichen Promotionsprüfung zu übernehmen.

Einen großen und besonderen Dank möchte ich außerdem an meinen Betreuer **Herrn Prof. Dr. Christian Morsczeck** richten für die Möglichkeit, nach Abschluss meiner Masterarbeit an diesem spannenden Thema weiterzuarbeiten, für die stets hervorragende Unterstützung meiner Arbeit und für die vielen Gespräche und Diskussionen, durch welche ich mich sehr weiterbilden konnte.

Darüber hinaus möchte ich mich herzlich bei **Herrn PD Dr. Gerhard Liebisch** bedanken für die Begleitung meiner Doktorarbeit als Mentor und Zweitprüfer sowie für die tolle Unterstützung und Zusammenarbeit bei gemeinsamen Laborprojekten.

Ebenso bedanke ich mich bei **Frau Prof. Dr. Denitsa Docheva** für die Begleitung meiner Arbeit als Mentorin, für die vielen hilfreichen Ratschläge und für die fachliche Kooperation.

Des Weiteren möchte ich **Herrn Prof. Dr. Dr. Peter Proff** sowie **Herrn Prof. Dr. Wolfgang Buchalla** herzlich für ihre Bereitschaft danken, als Prüfer an meiner mündlichen Promotionsprüfung teilzunehmen.

Besonderer Dank gilt außerdem **Frau Anja Reck** für die tolle Arbeitsatmosphäre im Labor, für die vielseitige Unterstützung und insbesondere für die Ausführung der Immunfluoreszenzfärbung, welche Bestandteil meiner Arbeit wurde.

Zuletzt bedanke ich mich herzlich bei meiner Mutter **Sabine**, meiner Oma **Bruni** und meiner Freundin **Julia** für den bedingungslosen Rückhalt zu jeder Zeit und dafür, dass sie mein Leben enorm bereichern.

## 10 Lebenslauf

### Persönliche Angaben

Name: Oliver Peter Pieles  
Geburtsdatum: 05.06.1995  
Geburtsort: Regensburg, Deutschland  
Email: oliver.pieles@ukr.de

### Bildungsweg

- Seit 09/2018 **Doktorarbeit**  
Am Universitätsklinikum Regensburg, in der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, unter Betreuung von Prof. Dr. Christian Morsczeck
- 10/2016 – 08/2018 **Masterstudiengang Molekulare Medizin**  
An der Universität Regensburg  
Masterarbeit: Am Universitätsklinikum Regensburg in der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie unter Betreuung von Prof. Dr. Christian Morsczeck,  
Thema: Evaluierung der Rolle von PKC bei der osteogenen Differenzierung dentaler Follikelstammzellen
- 10/2013 – 09/2016 **Bachelorstudiengang Molekulare Medizin**  
An der Universität Regensburg  
Bachelorarbeit: Am Lehrstuhl Biochemie I unter Betreuung von Prof. Dr. Gunter Meister  
Thema: Kartierung der Dimerisierungsdomänen des humanen METTL3/METTL14 Proteinkomplexes
- 09/2005 – 06/2013 **Allgemeine Hochschulreife**  
Am Werner-von-Siemens-Gymnasium Regensburg

## Stipendium

10/2013 – 09/2018

**Max Weber-Programm** des Elitenetzwerks Bayern

## Publikationen

**Pieles O**, Reichert TE, Morsczeck C (2021). Classical isoforms of protein kinase C (PKC) and Akt regulate the osteogenic differentiation of human dental follicle cells via both  $\beta$ -catenin and NF- $\kappa$ B. *Stem Cell Res Ther*, 12(1), 242.

doi:10.1186/s13287-021-02313-w

**Pieles O**, Höring M, Adel S, Reichert TE, Liebisch G, Morsczeck C (2022). Energy Metabolism and Lipidome Are Highly Regulated during Osteogenic Differentiation of Dental Follicle Cells. *Stem Cells Int*, 2022, 3674931. doi:10.1155/2022/3674931

**Pieles O**, Reichert TE, Morsczeck C (2022). Protein kinase A is activated during bone morphogenetic protein 2-induced osteogenic differentiation of dental follicle stem cells via endogenous parathyroid hormone-related protein. *Arch Oral Biol*, 138, 105409. doi:10.1016/j.archoralbio.2022.105409

**Pieles O**, Reck A, Morsczeck C (2020). High endogenous expression of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) supports osteogenic differentiation in human dental follicle cells. *Histochem Cell Biol*, 154(4), 397–403. doi:10.1007/s00418-020-01904-7

**Pieles O**, Reck A, Reichert TE, Morsczeck C (2020). p53 inhibits the osteogenic differentiation but does not induce senescence in human dental follicle cells. *Differentiation*, 114, 20–6. doi:10.1016/j.diff.2020.05.003

**Pieles O**, Hartmann M, Morsczeck C (2021). AMP-activated protein kinase and the down-stream activated process of autophagy regulate the osteogenic differentiation of human dental follicle cells. *Arch Oral Biol*, 122, 104951. doi:10.1016/j.archoralbio.2020.104951

Chu J, **Pieles O**, Pfeifer CG, Alt V, Morsczeck C, Docheva D (2021). Dental follicle cell differentiation towards periodontal ligament-like tissue in a self-assembly three-dimensional organoid model. *Eur Cell Mater*, 42, 20–33. doi:10.22203/eCM.v042a02

## 11 Selbstständigkeitserklärung

Ich, Pieles, Oliver Peter, geboren am 05.06.1995 in Regensburg, erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

---

Ort, Datum

---

eigenhändige Unterschrift  
des Promovenden

