

C. Morszeck¹, G. Schmalz¹, T.E. Reichert², O. Driemel²

Stammzellbiologie und regenerative Zahnmedizin

Stem cell biology and regenerative dentistry



C. Morszeck

Einführung: In den letzten Jahren genießen Stammzellen eine große Aufmerksamkeit in der zahnmedizinischen Forschung. Allerdings werden Stammzellen in der zahnmedizinischen Praxis noch nicht verwendet. Dies liegt nicht zuletzt auch daran, dass wir aktuell nicht sehr viel über die zur Verfügung stehenden Stammzellen wissen. Auf der anderen Seite findet die Grundlagenforschung, die sich mit den molekularen Mechanismen dieser undifferenzierten Zellen beschäftigt, weniger Beachtung in der breiten Öffentlichkeit.

Methode: Für diesen Beitrag wurden wichtige Publikationen der Stammzellforschung zusammengefasst.

Ergebnisse, Diskussion und Schlussfolgerung: Der vorliegende Beitrag stellt unterschiedliche Stammzellen vor, die für eine Therapie von dentalem Gewebe bzw. der Erforschung regenerativer Therapien in Frage kommen könnten. Anschließend werden wichtige Begriffe und Fragestellungen der Stammzellbiologie erörtert, deren Aufklärung nicht nur die Grundlagenforschung voranbringen, sondern auch eine schnellere Zulassung von Stammzellen als Medizinprodukt ermöglichen könnte. Damit hat diese Forschung auch praktische Konsequenzen für den Einsatz von Stammzellen in einer regenerativen Zelltherapie in der Zahnheilkunde. (Dtsch Zahnärztl Z 2010, 65: 479–487)

Schlüsselwörter: Stammzellen, regenerative Therapien, Grundlagenforschung, Zelltherapie

Introduction: In recent years stem cells have received much attention in dental research. However, stem cells are currently not used in dentistry. This is not at least due to the fact that we do not know much about the biology of stem cells. On the other hand, the general public is not aware of the fact that basic research investigates the biology of these undifferentiated cells.

Methods: This work summarizes important papers about stem cell biology.

Results and Discussions: This article presents different stem cells that are suggested for the treatment of dental tissues and for the research of regenerative therapies. Moreover, major concepts and issues of stem cell biology are discussed that do not only advance our knowledge about stem cells, but that will also accelerate the approval of stem cells as a medical device. This research has practical implications for the use of stem cells in regenerative cell therapy in dentistry.

Keywords: stem cells, regenerative therapy, basic research, cell therapy

¹ Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie, Universitätsklinikum Regensburg

² Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Universitätsklinikum Regensburg

Peer reviewed article: eingereicht: 22.07.2009, revidierte Fassung akzeptiert: 07.09.2009

DOI 10.3238/dzz.2010.0479

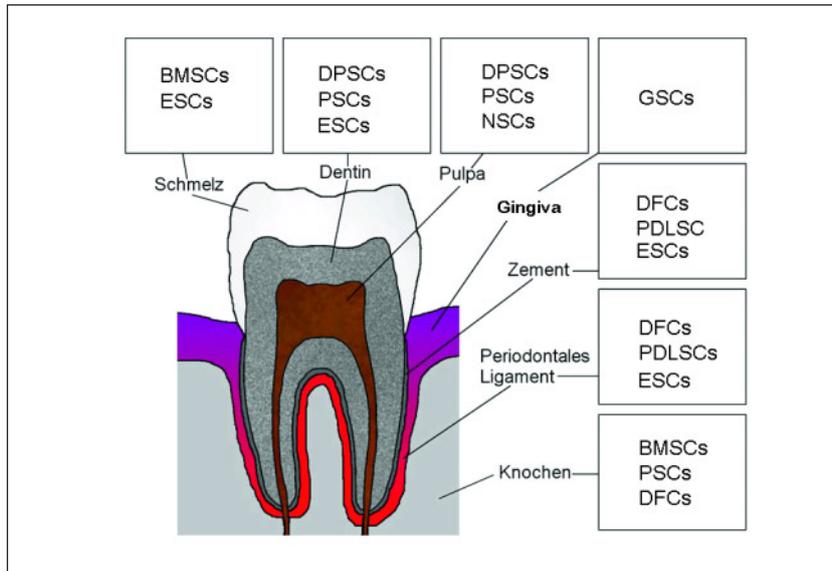


Abbildung 1 Mögliche Stammzellen für die Regeneration dentaler Gewebe. Abkürzungen: BMSCs: mesenchymale Stammzellen des Knochenmarks (Bone Marrow Stromal Cells); ESCs: Embryonale Stammzellen; DPSCs: Dentale Pulpa-Stammzellen; PSCs: Stammzellen der dentalen apikalen Papille; NSCs: Neurale Stammzellen; GSCs: Gingiva-Stammzellen; DFCs: Stammzellen des dentalen Follikels; PDLSCs: PDL-Stammzellen.

Figure 1 Stem cells for regenerative dentistry; Abbreviation: BMSCs: Bone Marrow Stromal Cells; ESCs: Embryonic Stem Cells; DPSCs: Dental Pulp Stem Cells; PSCs: Stem Cells from the Dental Papilla; NSCs: Neural Stem Cells; GSCs: Gingiva-Stem Cells; DFCs: Dental Follicle Cells; PDLSCs: PDL-Stem Cells.

1. Einleitung

Der Ausdruck „Stammzelle“ wird verwendet, um unterschiedliche Typen von undifferenzierten Zellen in einer gemeinsamen Klasse zusammen zu fassen. Dies führt häufig zu Missverständnissen, da unter diesen Begriff ganz unterschiedliche Arten von Zellen fallen, z. B. pluripotente embryonale Stammzellen, aber auch die undifferenzierten Zellen somatischer Gewebe, die nur ein sehr begrenztes Differenzierungspotential haben. Diese auch als adulte oder somatische Stammzellen bezeichneten Zellen findet man in allen Geweben, die sich zur Aufrechterhaltung ihrer Funktion erneuern müssen. Hierbei sind die sich selbsterneuernden, undifferenzierten Stammzellen die Quelle für neue differenzierte, funktionelle Gewebezellen. Unklar ist, wie Stammzellen differenzieren, also funktionelle Gewebezellen bilden. Für eine spätere klinische Anwendung der Stammzellen ist es daher auch von Interesse, bessere Kenntnisse über die Regulation der Stammzellproliferation (Zellteilung) und -differenzierung zu erhalten. Speziell der Übergang der undifferenzierten Stammzelle in eine differenzierte Zelle mit einer spezialisierten Aufgabe ist bislang unklar. Hierbei scheint der Status der undifferenzierten Stammzelle, der sowohl durch die Gesamtheit der exprimierten Gene als auch durch epigenetische und post-translationalen Modifikationen definiert ist, von exogenen Faktoren determiniert zu sein. Andererseits sind diese Faktoren

auch von sezernierten Genprodukten der Stammzellen und der Zellen des umgebenden Gewebes geschuldet, die sich selbst aus den Stammzellen entwickelt haben. Erst dieses Zusammenspiel definiert eine Stammzellnische, die zum einen der Selbsterneuerung der adulten Stammzelle dient und zum anderen ihre funktionelle Rolle im Gewebe festlegt. Die Stammzellbiologie beschäftigt sich im Speziellen mit diesen Interaktionen und versucht diese auch für spätere medizinische Anwendungen zu nutzen.

Hier soll ein Überblick über exemplarische Stammzelltypen gegeben werden. In Abbildung 1 ist eine Zusammenstellung von potentiellen Stammzellen dargestellt, die für eine regenerative Therapie von dentalem Gewebe und zu dessen Erforschung verwendet werden können. Es wird anschließend versucht der Frage nachzugehen, was allgemein bislang über die Interaktionen von exogenen Faktoren und Stammzellen bekannt ist und welche Bedeutung diese Faktoren für Stammzellen haben.

2. Embryonale Stammzellen

Embryonale Stammzellen haben theoretisch die Möglichkeit, sich in alle Körperzellen zu differenzieren und sich theoretisch unbegrenzt zu vermehren. Stammzellen stellen aber auch einen Teil des körpereigenen Reparatursystems dar. Humane embryonale Stammzellen lassen sich aus der inneren Zellmasse einer Blastozyste von acht bis neun Tage alten

Embryonen gewinnen. Anschließend ist es möglich, diese embryonalen Stammzellen durch Kultivierung zu vermehren [3]. Um embryonale Stammzellen unter *In-vitro-Bedingungen* zu vermehren, ist es notwendig, sie auf einem Zellrasen zu kultivieren, der aus embryonalen Fibroblasten – so genannten „Feeder-Zellen“ – besteht. Unter diesen Bedingungen sollen die Stammzellen auch in einem undifferenzierten Zustand verbleiben und eine ungezielte, zufällige Differenzierung in Gewebezellen, z. B. Fibroblasten, sollte ausgeschlossen bleiben. Auf diesem Zellrasen bilden die embryonalen Stammzellen auch kompakte Kolonien, wodurch es möglich ist, monoklonale Zelllinien zu erhalten [3]. Bei diesem Prozess erhält man eine Zellpopulation, die auf eine einzige (Stamm)zelle zurückgeführt werden kann. Ein solches Vorgehen ist wichtig, da eine Zellkultur mit Stammzellen sehr häufig auch Zellen enthalten kann, die möglicherweise keine Stammzellen sind. Dies gilt besonders für Zellkulturen, die Stammzellen aus somatischen Geweben enthalten.

Für eine Differenzierung unter *In-vitro-Bedingungen* werden embryonale Stammzellen in „Feeder-Zellen“-freiem Medium kultiviert. Dies geschieht häufig in einem Medium, das fötales Kälberserum enthält, welches mit Wachstumsfaktoren etc. supplementiert ist, die den Differenzierungsprozess unterstützen. Allerdings läuft diese Differenzierung relativ ungezielt ab, da über die genauen Mechanismen und Faktoren, die die Differenzierung unterstützen, nicht sehr

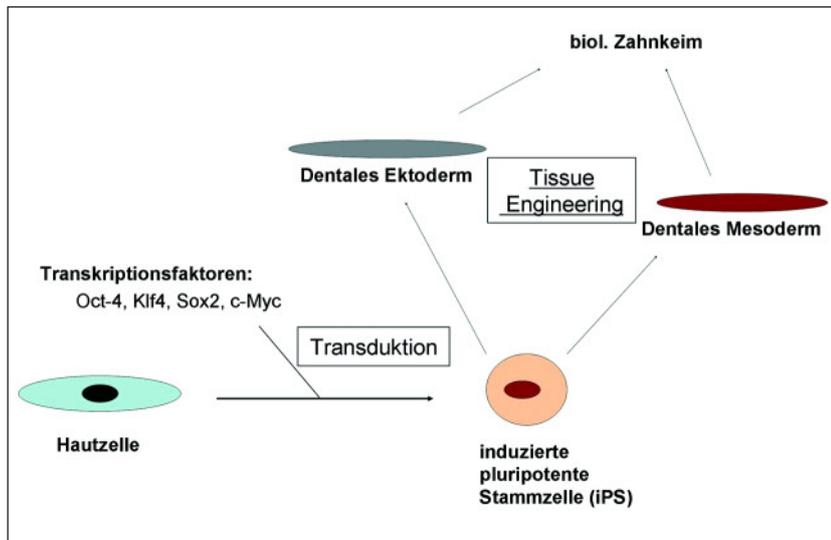


Abbildung 2 Induktion von pluripotenten Stammzellen aus Hautzellen durch die Transkriptionsfaktoren Oct-4, c-Myc, Klf4 und Sox2, die als Fusionsproteine in die Zelle eingebracht werden konnten. Eine Vision könnte eine Verwendung dieser iPS-Zellen zur Herstellung eines biologischen Zahnkeims sein mit Hilfe des Tissue Engineering (s. Abb. 3).
Figure 2 Induced pluripotent stem cells (iPS). Transduction of skin fibroblast with fusion-proteins of following transcription-factors: Oct-4, c-Myc, Klf4 und Sox2. A Vision for iPS is the engineering (Tissue Engineering) of a biological tooth germ (for more details fig. 3).

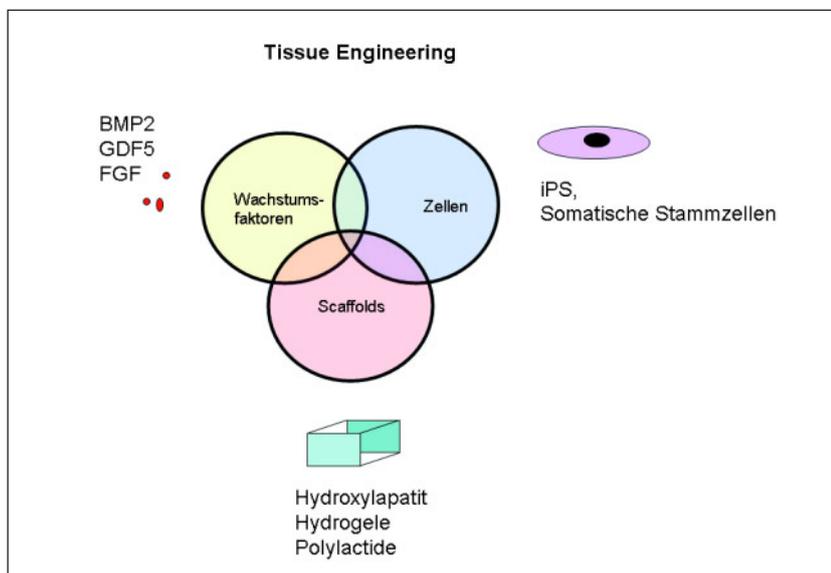


Abbildung 3 Beim Tissue Engineering werden unter In-vitro-Bedingungen Gewebe gezüchtet. Es kombiniert Wachstumsfaktoren, Zellen und Materialgerüste (Scaffolds), auf dem die Zellen kultiviert werden können.
Figure 3 Tissue Engineering under in vitro conditions combines growth-factors, cells and scaffolds.

viel bekannt ist. Nach der Differenzierung bilden sich so genannte „embryonic bodies“. Es handelt sich hierbei um ein Gewebe, das aus Zellen aller drei Keimblätter besteht. Theoretisch kann man je nach Differenzierungsprotokoll aus diesen „embryonic bodies“ die gewünschten Vorläuferzellen für Zelltherapien gewinnen. Jedoch können vordifferenzierte embryonale Stammzellen nach einer Zelltransplantation Tumore bilden, wodurch sie für eine klinische Behandlung noch nicht geeignet sind [1]. Noch evidenter sind die ethischen und damit verbundenen rechtlichen Probleme, die bei der Gewinnung von embryonalen Stammzellen bestehen. Der Gesetzgeber verbietet für die Gewinnung von Stammzellen die Erzeugung und Tötung von Embryonen. Deshalb wurden und werden in Deutschland

auch keine embryonalen Stammzelllinien gewonnen. Laut dem deutschen Stammzellgesetz können allerdings embryonale Stammzelllinien aus dem Ausland eingeführt werden, die bis zu einem bestimmten Stichtag, aktuell der 1. Mai 2007, erzeugt worden sind. Die Stammzellen müssen aber hochrangigen wissenschaftlichen Zwecken dienen, für die tierische Stammzellen nicht als Forschungsobjekte ausreichen. Die Verwendung dieser Zellen für eine Therapie ist nicht vorgesehen. Ein Zeitpunkt für die Anwendung embryonaler Stammzellen für eine Zelltherapie in der Zahnmedizin ist ebenfalls noch nicht abzusehen. Es gibt allerdings ein Patent (WO2001/060981) von Prof. Paul Sharpe (London, King's College), das eine Verwendung von embryonalen Stammzellen für die Erzeugung von dentalen Zel-

len beschreibt und mit dessen Hilfe ein Zahnkeim gezüchtet werden kann.

In den letzten Jahren konnte ein ganz neuer Zelltyp gezüchtet werden, der eine große Ähnlichkeit mit embryonalen Stammzellen hat. Dabei wurden pluripotente Stammzellen aus differenzierten Zellen, z. B. Hautfibroblasten, induziert (Abb. 2). Diese Zellen nennt man deshalb auch induzierte pluripotente Stammzellen oder kurz iPS. Um diese Zellen herzustellen, werden differenzierte Körperzellen mit vier verschiedenen Transkriptionsfaktoren manipuliert, die in embryonalen Stammzellen differentiell exprimiert sind. Diese Transkriptionsfaktoren sind Oct-4, Klf4, Sox2 und Myc. Sie werden u. a für die Aufrechterhaltung des undifferenzierten Zustandes der embryonalen Stammzellen verantwortlich gemacht und ver-

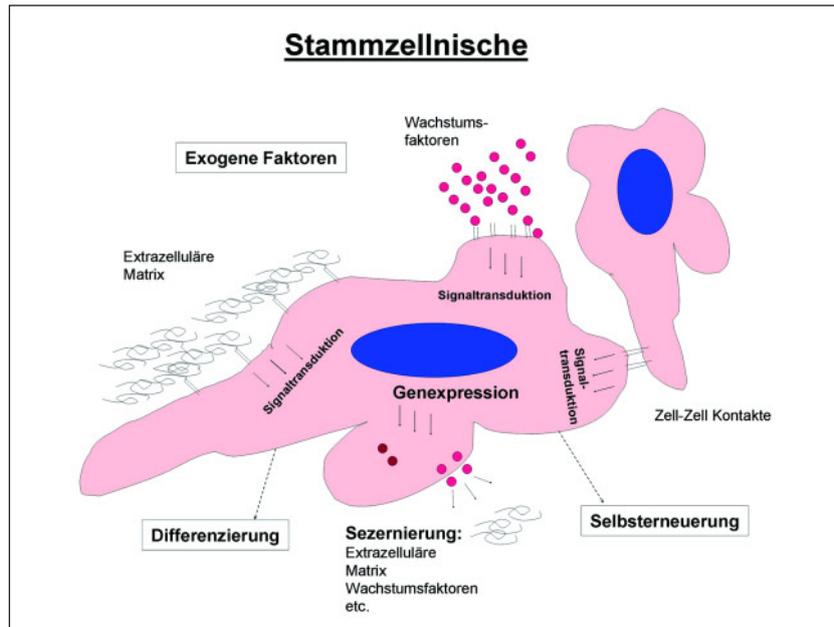


Abbildung 4 Vereinfachtes Modell einer Stammzellnische: Mögliche Interaktionen zwischen den exogenen Faktoren – extrazelluläre Matrix, Wachstumsfaktoren, Zell-Zell-Kontakte – und einer Stammzelle.

Figure 4 Simple model of a stem cell niche: Interactions between exogenic factors – extracellular matrix, growth factors, cell-cell contacts – and stem cells define the niche.

ändern die differenzierten Zellen so, dass diese iPS von embryonalen Stammzellen molekular kaum zu unterscheiden sind. Als im Jahre 2007 iPS erstmals beschrieben worden sind, wurden diese Stammzellen-spezifischen Transkriptionsfaktoren noch mittels Viren als Gefahren in adulte Gewebezellen eingebracht [36]. Diese Art der zellulären Veränderung könnte unter bestimmten Umständen dazu führen, dass die manipulierten Zellen zu Tumorzellen werden. Eine klinische Anwendung von iPS war deshalb eher zurückhaltend beurteilt worden. Nun ist man aber seit kurzem in der Lage, die Transkriptionsfaktoren als Fusionsproteine direkt – ohne Viren – in die Zelle einzuschleusen [42]. Es bleibt abzuwarten, wann und wo diese Zellen Eingang in präklinische Studien finden und welche Bedeutung sie für die Zahnmedizin haben werden.

3. Somatische Stammzellen

Adulte Stammzellen lassen sich im Allgemeinen als selbsterneuernde und undifferenzierte Zellen in somatischen Geweben identifizieren und anhand ihres Differenzierungspotentials und ihrer Herkunft unterscheiden. Es gibt multipotente adulte Stammzellen und weniger potente Vorläuferzellen, die sich meist nur in wenige Zelltypen ihres Ausgangsgewebes differenzieren lassen [34]. Bei Zellen, die sich nur in eine spezielle

funktionelle Gewebezelle differenzieren lassen, wird auch von uni-potenten Stammzellen gesprochen. Neben der Differenzierungsfähigkeit lassen sich Stammzellen auch durch ihre Herkunft unterscheiden. Exemplarisch werden hier zwei Typen von adulten Stammzellen vorgestellt.

Neben den bekannten hämatopoetischen Stammzellen befinden sich im Knochenmark mesenchymale Stammzellen. Diese Zellen werden auch als „Bone Marrow Stromal Cells“ (BMSCs) bezeichnet und wurden bereits vor mehr als drei Jahrzehnten das erste Mal beschrieben [8]. Sie lassen sich aus Einzelsuspensionen von Knochenmarksaspiraten über ihre hohe Plastik-Adhärenz und Klonogenität isolieren [26]. BMSCs können unter In-vitro-Bedingungen in Zellen differenzieren, die Marker für Osteoblasten, Chondrozyten oder Netzhautzellen exprimieren [26, 34, 37]. Sie sind auch in der Lage, in dentale Zellen (Odontoblasten, Ameloblasten) zu differenzieren und könnten sich daher als eine ausgezeichnete Quelle für zukünftige Zelltherapien in der Zahnmedizin erweisen [14, 25].

Zu einer anderen Gruppe der adulten Stammzellen gehören die neuronalen Stammzellen. Diese sind multipotent und bilden unter In-vitro-Bedingungen nicht-adhärenzte Sphäroide. Sie konnten erstmals aus Mäusembryonen isoliert werden [28], man konnte sie aber inzwischen auch aus adulten humanen Gewe-

ben isolieren [36]. Aus den unter In-vitro-Bedingungen in Sphäroiden (Neurospheres) kultivierten Zellen können einzelne neurale Vorläuferzellen auswachsen, die in der Lage sind, in Nervenzellen, Astrozyten und Oligodendrozyten zu differenzieren [36]. In den letzten Jahren wurden auch Stammzellen aus der Netzhaut isoliert [35]. In Transplantationsexperimenten konnte gezeigt werden, dass retinale Stammzellen in reife Nerven- und Gliazellen differenzieren können [35]. Eine Verwendung von neuronalen Stammzellen könnte auch in der Zahnmedizin z. B. zur Regeneration von Nervenzellen in einer Zahnpulpa und im Parodont Verwendung finden. Allerdings ist die Isolierung von neuronalen Stammzellen schwieriger als die Isolierung von BMSCs.

4. Stammzellen aus dedifferenzierten somatischen Zellen

Eine weitere Zellpopulation, die für eine Stammzelltherapie interessant sein könnte, sind dedifferenzierte somatische Zellen. Diese undifferenzierten Zellen sind Körperzellen, die nach ihrer Isolierung unter speziellen In-vitro-Bedingungen ihre Spezialisierung verloren haben. Man kann diese Zellen unter In-vitro-Bedingungen vermehren und wie adulte Stammzellen differenzieren. Ein Beispiel hierfür sind Müllerzellen, die

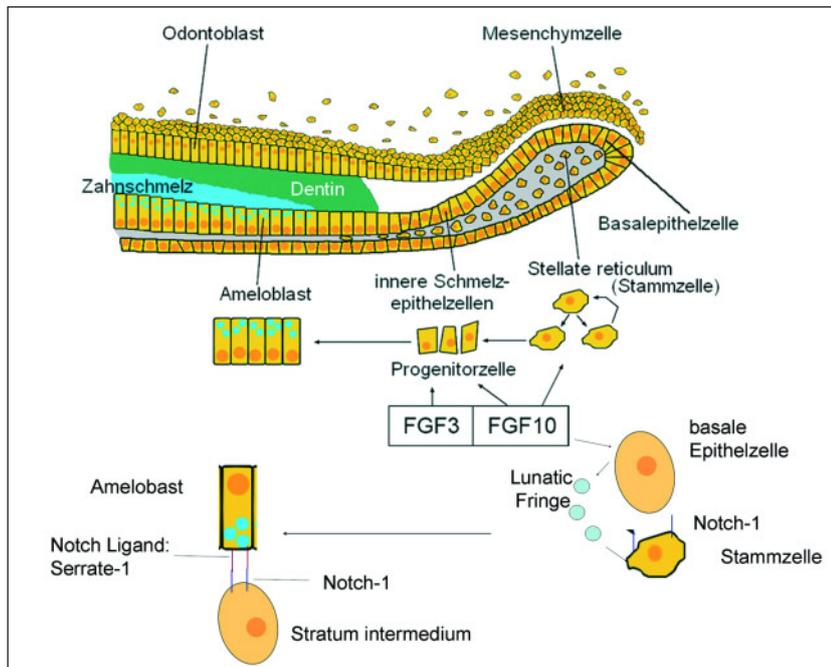


Abbildung 5 Steuerung der Selbsterneuerung und der Differenzierung von Stammzellen des dentalen Epithels von Nagern. Die Abbildung wurde erstellt nach folgenden Publikationen [13, 20].

Figure 5 Self-renewing and differentiation of rodent dental epithelial stem cells. The figure was created with the following publications [13, 20].

nicht nur eine große Bedeutung für den Stoffwechsel und die Struktur der Netzhaut haben, sondern auch ruhende Stammzellen zu sein scheinen. So waren Müllerzellen in der Retina von Ratten in der Lage, sich in neurale- und Photorezeptorzellen zu differenzieren, wenn die Retina zuvor künstlich gestresst wurde [26]. Kürzlich wurde unter In-vitro-Bedingungen auch die Dedifferenzierung von Müllerzellen in neurale Stammzellen beschrieben, wobei die isolierten Müllerzellen Neurospheres gebildet haben und anschließend in Nervenzellen differenzieren konnten [4, 7]. Diese Versuche zeigen, dass differenzierte Zellen in der Lage sind, zu dedifferenzieren und als weitere Quelle für Stammzellen dienen könnten. Es ist jedoch unklar, ob es dieses Phänomen auch bei adulten dentalen Zellen gibt. In diesem Zusammenhang muss auch daran erinnert werden, dass gewöhnliche Fibroblasten durch gentechnische Veränderung in iPS dedifferenziert werden können (s. o.) [19, 40]. Es bleibt abzuwarten, wie dedifferenzierte Zellen erzeugt und für eine mögliche Therapie oder für Forschungszwecke verwendet werden können.

5. Dentale Stammzellen

Die Gruppe von Stammzellen, die in der Zahnmedizin in den letzten Jahren die

größte Aufmerksamkeit erregten, sind die aus der Neuralleiste abgeleiteten ektomesenchymalen Stammzellen aus dentalem Gewebe. Diese dentalen Stammzellen konnten z. B. aus der Zahnpulpa isoliert werden, und lassen sich entweder wie BMSCs als fibroblastoide, plastikadhärente Zellen oder wie neurale Stammzellen als Sphäroide kultivieren [12, 21]. Eine weitere Quelle für dentale Stammzellen ist das Desmodont oder Periodontal-Ligament (PDL). Diese Zellen konnten bereits im Tiermodell für eine parodontale Therapie verwendet werden [30]. Außerdem kann man bei heranwachsenden oder erwachsenen Personen embryonal-ähnliches dentales Gewebe finden und daraus Stammzellen isolieren. So besitzt die dentale Papille Stammzellen, die sich z. B. für das dentale Tissue Engineering in ersten Versuchen sehr gut eignen [32]. Auch aus dentalen Follikeln konnten Stammzellen isoliert werden, die nicht nur in Zementoblasten, sondern auch in Adipozyten oder Chondrozyten differenzieren [15, 22, 23].

Unlängst konnte mit einer Kombination von PDL- und Papilla-Stammzellen im Mini-Pig-Tiermodell ein Zahnhalteapparat konstruiert werden, in dem eine künstliche Zahnkrone befestigt werden konnte, die eine ähnliche Stabilität bewies wie ein natürlicher Zahn [32]. Gerade dieser geglückte Versuch hat viel Mut gemacht, Stammzel-

len in der Zahnmedizin verwenden zu können. Allerdings gibt es bislang keine Daten über die Stabilität eines solchen künstlichen Zahns im Langzeitversuch. Es ist nicht ausgeschlossen, dass die eingesetzten Stammzellen dedifferenzieren und so diesen künstlichen Halteapparat destabilisieren. Dieser Probleme zum Trotz, Tissue Engineering wird in den nächsten Jahren eine der Schlüsseldisziplinen sein (Abb. 3). Sie kombiniert das Wissen aus Natur- und Ingenieurwissenschaften, indem Sie Materialforschung und Zellbiologie kombiniert, um komplexe Gewebe zu züchten.

Um diese Fragen zu klären, aber auch um einen Einsatz von endogenen dentalen Stammzellen z. B. für die Parodontologie zu evaluieren, müssen diese Stammzellen genauer erforscht werden. Dabei ist es wichtig, Informationen über die Stammzellnische und über die molekularen Mechanismen der Selbsterneuerung und Differenzierung von humanen dentalen Stammzellen zu erhalten. Die Stammzellbiologie kann dazu sehr viel beitragen.

6. Stammzellbiologie

Die Stammzellbiologie setzt sich u. a. zum Ziel, die aus embryonalen und adulten Geweben gewonnenen Stammzellen für zukünftige Therapien in der regenerativen Medizin und für sonstige

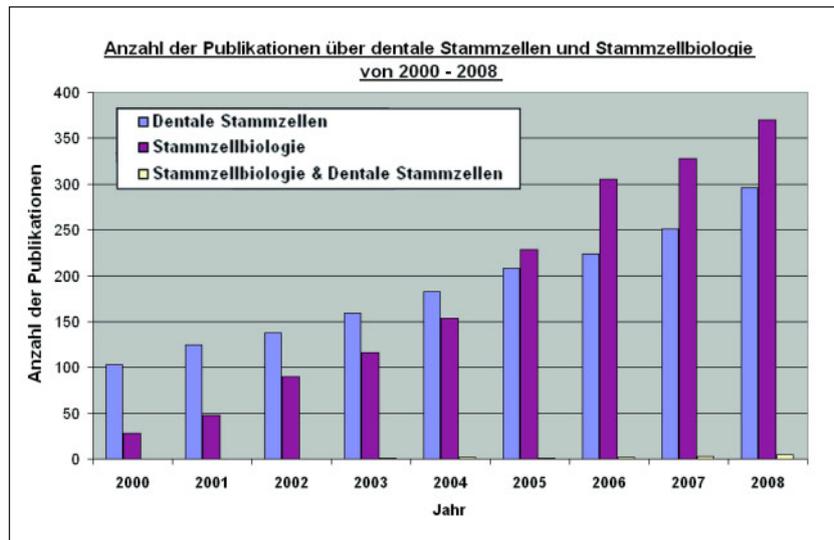


Abbildung 6 Anzahl der Publikationen, die in der Datenbank der U.S. National Library of Medicine (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/advanced>) in den Jahren 2000 bis 2008 mit den Suchbefehlen: dentale Stammzellen (dental stem cells), Stammzellbiologie („stem cell biology“) und der Kombination von beiden Suchbegriffen gefunden wurden. Es wurden keine Einschränkungen bei der Suche vorgenommen.

Figure 6 Number of publications published in the years between 2000 and 2008. For the search the national library of medicine (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/advanced>) was used with following keywords (without restriction): „dental stem cells“, „stem cell biology“ and a combination of both keywords. (Abb. 1-6: C. Morszeck)

Forschungszwecke zu charakterisieren. Neben vielfältigen Versuchen, embryonale und adulte Stammzellen ohne besondere Kenntnisse über die Differenzierungsmechanismen in Gewebezellen zu differenzieren und für Zelltherapien zu verwenden, wie dies bereits oben kurz angesprochen wurde, werden auch detaillierte Studien durchgeführt, in denen die Mechanismen der Selbsterneuerung und der Differenzierung einer Stammzelle analysiert werden sollen. Für diese Studien werden verschiedene exogene Faktoren unter In-vitro-Bedingungen mit ausgewählten Stammzellen kombiniert. Es lassen sich dabei allgemein drei exogene Faktoren unterscheiden: 1. lösliche Faktoren, z. B. Wachstumsfaktoren; 2. die extrazelluläre Matrix des Gewebes und mechanische Faktoren, z. B. die Elastizität des umgebenden Gewebes; 3. interzelluläre Kontakte (Abb. 4). Es soll experimentell eine Rekonstruktion der biologischen Stammzellnische ermöglicht werden, was auch zu einem besseren Verständnis der Zelldifferenzierung, z. B. in einer funktionellen Zementoblasten, führen könnte. Im Folgenden werden – anhand von Beispielen – die unterschiedlichen Möglichkeiten vorgestellt, eine Stammzelle durch exogene Faktoren zu manipulieren und zu charakterisieren.

6.1 Lösliche Faktoren

Zurzeit ist ein Schwerpunkt der embryonalen Stammzellforschung die Evaluation von Faktoren, die für die Aufrecht-

erhaltung des undifferenzierten Status der Zelle essentiell sind. In einer kürzlich erschienenen Publikation wurden die sehr frühen Schritte der Differenzierung von embryonalen Stammzellen untersucht [2]. Hier konnte gezeigt werden, dass speziell die Expression des Insulin-like Growthfactor (IGF)-II, essentiell für die Aufrechterhaltung des Proliferationsvermögens und des undifferenzierten Status der Zelle ist. IGF-II wird von differenzierten Zellen, den sogenannten „autologously derived human ES cell fibroblast-like cells“, exprimiert, die aus embryonalen Stammzellen entstanden sind. Diese Zellen bilden eine Nische für die pluripotenten embryonalen Stammzellen, die eine gezielte Proliferation, d. h. Zellteilung, aber auch eine Einleitung der Differenzierung der embryonalen Stammzelle ermöglicht. Auch für dentale Stammzellen könnte IGF-II ein wichtiger Faktor sein. IGF-II wird in dentalen Stammzellen im Vergleich zu mesenchymalen Stammzellen differentiell exprimiert und könnte an der Aufrechterhaltung des undifferenzierten Zustandes der Zelle beteiligt sein [22, 31].

Ein weiterer Wachstumsfaktor, der Stammzellen beeinflusst, ist der Fibroblast Growth Factor (FGF)-2. Dieser Faktor kann unterschiedliche Signalwege, z. B. die sogenannten mitogen abhängigen Kinasen (MAPK), aktivieren und ist u. a. für die Erhaltung des undifferenzierten Zustandes von subventrikulären neuralen Stammzellen essentiell [41]. Ebenfalls wird dieser Wachstumsfaktor

in Kombination mit dem Epidermal Growth Factor (EGF) für die Kultur von neuralen oder retinalen Stammzellen verwendet [5, 17]. Eine andere Wirkung hat FGF-2 auf mesenchymale Stammzellen. Hier bewirkt FGF-2 zum einen eine stärkere Proliferation der Zellen, es schränkt aber auch das multipotente Differenzierungspotential der Zelle auf sein osteogenes Potential ein [33].

Eine wichtige Rolle für die Regulation der Differenzierung bei verschiedenen Stammzelllinien hat die Transforming Growth Factor (TGF)- β -Superfamilie, zu der auch die verschiedenen Bone morphogenetic proteins (BMPs) gehören. So können BMPs in adulten Stammzellen die Differenzierung aber auch die Apoptose einleiten. In dentalen Stammzellen leitet BMP-2 die osteogene Differenzierung [16] und bei neuralen Vorläuferzellen BMP-4 die Apoptose ein [11]. Bei dentalen Stammzellen scheinen neben dem für BMP typischen SMAD-Signaltransduktionsweg auch der MAPK-Weg eine entscheidende Rolle für die osteogene Differenzierung zu spielen [16]. In diesem Zusammenhang konnte eine Gruppe um *Matthias Mann* auch zeigen, dass für eine osteogene Differenzierung bei mesenchymalen Stammzellen der MAPK-Signaltransduktionsweg aktiviert wird [18].

Eine weitere Gruppe von Faktoren sind kleine chemische Moleküle. Ein gutes Beispiel ist das Glukokortikoid Dexamethason, das zwar ein künstliches Molekül ist, aber auch ein exzellenter Induktor für eine osteogene Differenzie-

rung [12, 21]. Ein anderes Molekül ist die Retinolsäure, die unter In-vitro-Bedingungen ein wichtiger exogener Faktor für eine Differenzierung von neuronalen Vorläuferzellen ist [28, 29], im Gegensatz dazu aber auch die terminale Differenzierung von epidermalen Stammzellen unterdrücken kann [9].

6.2 Extrazelluläre Matrix und mechanische Faktoren

Neben löslichen Faktoren spielt auch die extrazelluläre Matrix eine wichtige Rolle für die Regulation der Stammzellen. Dies ist allein schon dadurch nahe liegend, weil Stammzellen sehr häufig in sehr definierten Bereichen ihres Gewebes lokalisiert sind. Ein Beispiel dafür ist die Lokalisation der Haarfollikel-Stammzellen in einer markanten Wölbung (bulge) der Haarwurzel [20]. Diese strukturell und molekular einzigartige Umgebung (Nische) ist für die Aufrechterhaltung des undifferenzierten Zustandes der Stammzelle essentiell. So findet man z. B. neurale Progenitorzellen fast ausschließlich in zwei unterschiedlichen Regionen, dem Gyrus dentatus und in der subventrikulären Zone. Hier sind die neuronalen Stammzellen in Kontakt mit der Basallamina, die u. a. aus den Matrixproteinen Laminin und verschiedenen Kollagenen bestehen und die ebenfalls eine große Anzahl unterschiedlicher Glykoproteine und Zytokine enthält. Eine Initiation der Differenzierung findet nach diesem Modell erst nach einer Mobilisierung der Stammzelle oder deren Tochterzellen, den sogenannten „transient amplifying cells“, statt. Studien, in denen der Einfluss der extrazellulären Matrix auf die Differenzierung und auch auf die Proliferation von Stammzellen untersucht werden, werden aktuell mit Gewebe-Explantaten oder unter artifiziellen Bedingungen mit Hilfe unterschiedlicher definierter Trägermaterialien (Scaffolds) z. B. Hydrogelen, die u. a. eine dreidimensionale Struktur bilden können, durchgeführt. In den letzten Jahren wurden auch Materialien verwendet, die z. B. aus Nanopartikeln bestehen. Durch die Verwendung dieser Nanopartikel ist man in der Lage, sehr kleine, definierte Strukturen zu bilden, die nicht größer sind als eine Zelle. Man kann diese Moleküle ebenfalls mit biologischen Matrixproteinen modifizieren [10]. Es ist damit möglich,

den Einfluss einer Matrix auf die Proliferation, die Morphologie und die Differenzierung der Stammzellen zu untersuchen. Hierbei ist auch eine Verknüpfung der Stammzellbiologie mit dem Tissue Engineering möglich, da möglicherweise die Plastizität einer Vorläufer- oder Stammzelle durch diese künstliche „Nische“ erhöht werden kann. Da es sich dabei um eine aufwendige, empirische Evaluation unterschiedlicher Bedingungen handelt, entwickelte eine Gruppe um den Gen-Chip Pioneer *Pat Brown* einen neuartigen Zellkultur-Träger (Array), der mit unterschiedlichen Kombinationen von Wachstumsfaktoren und Matrixproteinen versetzt wurde und auf dem die Reaktionen von Stammzellen untersucht werden können [24]. Hierdurch ist es möglich sehr viele unterschiedliche Bedingungen gleichzeitig zu testen.

Eine weiterer exogener Faktor sind die mechanischen Eigenschaften einer festen Oberfläche oder einer Flüssigkeit, in der sich eine Zelle befindet. Hier ist besonders eine Arbeit von *Engler et al.* [6] zu nennen, die präsentieren konnten, dass die Differenzierung einer Stammzelle auch durch die Oberflächenspannung bzw. Steifigkeit einer Oberfläche beeinflusst wird. Es konnte gezeigt werden, dass bei unterschiedlichen Oberflächenspannungen, die denen von Knochen-, Muskel- und Nervengewebe sehr ähnlich sind, mesenchymale Stammzellen entsprechende Gewebemarker exprimierten. Ebenfalls wiesen die differenzierten Stammzellen Morphologien auf, die für die entsprechenden Gewebzellen typisch sind. Ein Rezeptor für diesen Mechanismus ist wahrscheinlich das nicht muskuläre Myosin II. Ebenfalls konnte in anderen Arbeiten der Einfluss von Scherkräften auf die Differenzierung von endothelialen Vorläuferzellen nahegelegt werden [39].

6.3 Zelluläre Interaktionen

In Abbildung 5 ist die Stammzellnische des Nager-Schneidezahns dargestellt, die ein gutes Beispiel für eine gewebespezifische Stammzellnische ist [13, 20]. Beim Nager werden die Ameloblasten das ganze Leben lang neu gebildet, wodurch die Regeneration des Zahns garantiert ist. Die epithelialen Stammzellen im posterioren, apikalen Teil des Schmelzorgans, dem sogenannten Cer-

vical Loop (Zervikalschlinge), sind daher in direktem Kontakt mit den Zellen des inneren und äußeren Epithels sowie den sternförmigen Zellen des Stellate Reticulums und den kuboiden Zellen des Stratum intermedium (Abb. 5). Die Aufrechterhaltung des undifferenzierten Zustandes wird in den dentalen Stammzellen über Zellkontakte kontrolliert, was über den Notch-Signalweg geschieht. Hier findet die Signalweitergabe mittels eines Liganden und des Notch-Rezeptors statt, der an der Zellmembran der dentalen Stammzellen lokalisiert ist. Die dentalen Epithelzellen der Zervikalschlinge stehen darüber hinaus in engem Kontakt zu den mesenchymalen Zellen des dentalen Gewebes, die wahrscheinlich durch die Sezernierung der Wachstumsfaktoren FGF3 und FGF10 die Zellteilung der Stammzellen und die Expression des Proteins Lunatic Fringe in den Basalepithelzellen induzieren. Dieses Protein kann danach die Expression von Notch in den Stammzellen verändern. Man muss allerdings davon ausgehen, dass sich die beiden Tochterzellen einer sich teilenden Stammzelle unterschiedlich verhalten. Eine Zelle bleibt eine undifferenzierte Stammzelle, die konstitutiv Notch-1 exprimiert, und die andere Tochterzelle, die sich weiterhin teilt, modifiziert die Notch-1-Expression und leitet wahrscheinlich dadurch die Differenzierung in Ameloblasten ein. Diese Zellen wandern dann von der Zervikalschlinge in Richtung des inneren Schmelzepithels und weiter zu einer Zellschicht, die aus Ameloblasten besteht. Interessanterweise wird Notch-1 nur von undifferenzierten Zellen exprimiert, jedoch nicht von den differenzierten Ameloblasten. Ameloblasten exprimieren im Gegenteil Liganden von Notch, z. B. Serrate-1, wodurch wahrscheinlich die funktionelle Differenzierung in Ameloblasten gesteuert wird (Abb. 5).

7. Schlussfolgerung

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass es eine große Anzahl von (dentalen) Stammzellpopulationen gibt, die sich für eine Therapie in der Zahnmedizin eignen könnten. Ebenfalls gibt es erste Erfolge Zahngewebe zu züchten; so z. B. im Mausmodell einen vitalen Zahn [15]. Obwohl diese großen Fort-

schritte bereits erzielt wurden, steckt die humane dentale Stammzellbiologie noch in den Kinderschuhen. Bislang ist z. B. noch sehr wenig über die Selbsterneuerung von humanen dentalen Stammzellen bekannt. Hier werden extrazelluläre Faktoren, Zell-Zell-Kontakte und mechanische Eigenschaften des Gewebes eine große Rolle spielen. Im Gegensatz dazu, wissen wir schon viel über die dentalen Stammzellen der Maus (s. 6.3). Die Mechanismen ihrer Selbsterneuerung und ihrer Differenzierung in Ameloblasten sind in den letzten zehn Jahren sehr gut aufgeklärt worden. Allerdings ist dies auch der besonderen Eigenschaft von Nagerzähnen zu verdanken. Die Natur des menschliche Zahns und seiner Stammzellen ist wahrscheinlich mit dem Nagerzahn nicht gänzlich identisch. Es

sind deshalb auch andere Mechanismen für die Differenzierung und Proliferation der humanen, dentalen Stammzellen möglich. Leider gibt es bei einer steigenden Zahl von Publikationen über dentale Stammzellen (103 Publikationen im Jahr 2000 auf 278 Arbeiten im Jahr 2008) nur sehr wenige Publikationen über die dentale Stammzellbiologie (fünf Publikationen im Jahr 2008, Abb. 6). Im Vergleich dazu ist die Zahl der Publikationen über die „Stammzellbiologie“ sprunghaft angestiegen; von 28 Arbeiten im Jahr 2000 auf 370 Artikel im Jahr 2008 (Abb. 6). Jedoch kann nur eine fundierte dentale Stammzellbiologie neue Perspektiven für zukünftige Stammzelltherapien in der Zahnmedizin eröffnen. Es bleibt zu hoffen, dass sich die deutsche Oralbiologie in den nächsten Jahren an diesem

wichtigen Forschungsgebiet beteiligen wird. DZ

Interessenkonflikt: Die Autorin/der Autor erklärt, dass kein Interessenkonflikt im Sinne der Richtlinien des International Committee of Medical Journal Editors besteht. *Ch. Morsczeck* ist Co.-Erfinder des Patent WO/2003/066840.

Korrespondenzadresse

Dr. Christian Morsczeck
Poliklinik für Zahnerhaltung und
Parodontologie
Universitätsklinikum Regensburg
Franz-Josef-Strauss-Allee 11
93053 Regensburg
Tel.: 09 41 / 944 - 61 61
E-Mail: christian.morsczeck@klinik.
uni-regensburg.de

Literatur

1. Arnold S, Klein H, Semkova I, Addicks K, Schraermayer U: Neurally selected embryonic stem cells induce tumor formation after long-term survival following engraftment into the subretinal space. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45, 4251–4255 (2004)
2. Bendall SC, Stewart MH, Menendez P et al.: IGF and FGF cooperatively establish the regulatory stem cell niche of pluripotent human cells in vitro. *Nature* 448, 1015–1021 (2007)
3. Cowan CA, Klimanskaya I, McMahon J et al.: Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. *N Engl J Med* 350,1353–1356 (2004)
4. Das AV, Mallya KB, Zhao X et al.: Neural stem cell properties of Muller glia in the mammalian retina: regulation by Notch and Wnt signaling. *Dev Biol* 299, 283–302 (2006)
5. Engelhardt M, Bogdahn U, Aigner L: Adult retinal pigment epithelium cells express neural progenitor properties and the neuronal precursor protein doublecortin. *Brain Res* 1040, 98–111 (2005)
6. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE: Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* 126,677–689 (2006)
7. Florian C, Langmann T, Weber BH, Morsczeck C: Murine Muller cells are progenitor cells for neuronal cells and fibrous tissue cells. *Biochem Biophys Res Commun* 374,187–191 (2008)
8. Friedenstein A, Kuralesova AI: Osteogenic precursor cells of bone marrow in radiation chimera. *Transplantation* 12, 99–108 (1971)
9. Fuchs E, Green H: Regulation of terminal differentiation of cultured human keratinocytes by vitamin A. *Cell* 25,617–625 (1981)
10. Galler KM, Cavender A, Yuwono V et al.: Self-assembling peptide amphiphile nanofibers as a scaffold for dental stem cells. *Tissue Eng Part A*. 214, 2051–2058 (2008)
11. Gambaro K, Aberdam E, Virolle T, Aberdam D, Rouleau M: BMP-4 induces a Smad-dependent apoptotic cell death of mouse embryonic stem cell-derived neural precursors. *Cell Death Differ* 13, 1075–1087 (2006)
12. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S: Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13625–13630 (2000)
13. Harada H, Kettunen P, Jung HS, Mustonen T, Wang YA, Thesleff I: Localization of putative stem cells in dental epithelium and their association with Notch and FGF signaling. *J Cell Biol* 147, 105–120 (1999)
14. Hu B, Unda F, Bopp-Kuchler S et al.: Bone marrow cells can give rise to ameloblast-like cells. *J Dent Res* 85, 416–421 (2006)
15. Keda E, Morita R, Nakao K et al.: Fully functional bioengineered tooth replacement as an organ replacement therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 13475–13480 (2009)
16. Kemoun P, Laurencin-Dalicieux S, Rue J et al.: Human dental follicle cells acquire cementoblast features under stimulation by BMP-2/-7 and enamel matrix derivatives (EMD) in vitro. *Cell Tissue Res* 329, 283–294 (2007)
17. Klassen HJ, Ng TF, Kurimoto Y et al.: Multipotent retinal progenitors express developmental markers, differentiate into retinal neurons, and preserve light-mediated behavior. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45, 4167–4173 (2004)
18. Kratchmarova I, Blagoev B, Haack-Sorensen M, Kassem M, Mann M: Mechanism of divergent growth factor effects in mesenchymal stem cell differentiation. *Science* 308, 1472–1477 (2005)
19. Lewitzky M, Yamanaka S: Reprogramming somatic cells towards pluripotency by defined factors. *Curr Opin Biotechnol* 18, 467–473 (2007)
20. Mitsiadis TA, Barrandon O, Rochata A, Barrandon Y, De BC: Stem cell niches in mammals. *Exp Cell Res* 313, 3377–3385 (2007)
21. Miura M, Gronthos S, Zhao M et al.: SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 5807–5812 (2003)
22. Morsczeck C: Gene expression of runx2, Osterix, c-fos, DLX-3, DLX-5, and MSX-2 in dental follicle cells during osteogenic differentiation in vitro. *Calcif Tissue Int* 78, 98–102 (2006)
23. Morsczeck C, Gotz W, Schierholz J et al: Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol* 24, 155–165 (2005)
24. Nielsen TO, Hsu FD, O’Connell JX et al.: Tissue microarray validation of epidermal growth factor receptor and SALL2 in synovial sarcoma with comparison to tumors of similar histology. *Am J Pathol* 163, 1449–1456 (2003)
25. Ohazama A, Modino SA, Miletich I, Sharpe PT: Stem-cell-based tissue engineering of murine teeth. *J Dent Res* 83, 518–522 (2004)
26. Ooto S, Akagi T, Kageyama R et al.: Potential for neural regeneration after neurotoxic injury in the adult mamma-

- lian retina. Proc Natl Acad Sci U S A 101, 13654–13659 (2004)
27. Pittenger MF, Mosca JD, McIntosh KR: Human mesenchymal stem cells: progenitor cells for cartilage, bone, fat and stroma. *Curr Top Microbiol Immunol* 251, 3–11 (2000)
 28. Reynolds BA, Rietze RL: Neural stem cells and neurospheres – re-evaluating the relationship. *Nat Methods* 2, 333–336 (2005)
 29. Reynolds BA, Weiss S: Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. *Dev Biol* 175, 1–13 (1996)
 30. Seo BM, Miura M, Gronthos S et al.: Investigation of multipotent postnatal stem cells for human periodontal ligament. *Lancet* 364, 149–155 (2004)
 31. Shi S, Robey PG, Gronthos S: Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis. *Bone* 29, 532–539 (2001)
 32. Sonoyama W, Liu Y, Fang D et al.: Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *Plos One* 1, e79 (2006)
 33. Sotiropoulou PA, Perez SA, Salagianni M, Baxevasis CN, Papa-michail M: Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24, 462–471 (2006)
 34. Terskikh AV, Bryant PJ, Schwartz PH: Mammalian stem cells. *Pediatr Res* 59, 13R–20R (2006)
 35. Tomita M, Mori T, Maruyama K et al: A comparison of neural differentiation and retinal transplantation with bone marrow-derived cells and retinal progenitor cells. *Stem Cells* 24, 2270–2278 (2006)
 36. Uchida N, Buck DW, He D et al.: Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14720–14725 (2000)
 37. Wernig M, Meissner A, Foreman R et al.: In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 448, 318–324 (2007)
 38. Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB: Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 61, 364–370 (2000)
 39. Yamamoto K, Takahashi T, Asahara T et al.: Proliferation, differentiation, and tube formation by endothelial progenitor cells in response to shear stress. *J Appl Physiol* 95, 2081–2088 (2003)
 40. Yamanaka S: Pluripotency and nuclear reprogramming. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363, 2079–2087 (2008)
 41. Zheng W, Nowakowski RS, Vaccarino FM: Fibroblast growth factor 2 is required for maintaining the neural stem cell pool in the mouse brain subventricular zone. *Dev Neurosci* 26, 181–196 (2004)
 42. Zhou H, Wu S, Joo JY et al.: Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* 4, 381 (2009)



24. Kongress der DGI
25.-27. November 2010 · Hamburg

Misserfolge erkennen und beherrschen

- ✓ Das Implantologie-Highlight 2010
- ✓ Die Plattform für den Austausch zwischen Wissenschaft und Praxis
- ✓ International renommierte Referenten
- ✓ Interdisziplinäre Themenvielfalt
- ✓ Neue internationale Fachmesse Implant Expo
- ✓ 16 Fortbildungspunkte

