

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR ZAHNERHALTUNG UND PARODONTOLOGIE
PROF. DR. WOLFGANG BUCHALLA
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**TISSUE ENGINEERING DENTALER STAMMZELLEN
IN EINEM PEGYLIERTEN FIBRIN HYDROGEL**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von Umut Köklü

2014

*Meinen Eltern.
In Dankbarkeit und Liebe.*

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR ZAHNERHALTUNG UND PARODONTOLOGIE
PROF. DR. WOLFGANG BUCHALLA
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**TISSUE ENGINEERING DENTALER STAMMZELLEN
IN EINEM PEGYLIERTEN FIBRIN HYDROGEL**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von Umut Köklü

2014

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Gottfried Schmalz
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
Tag der mündlichen Prüfung:	17.07.2014

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	1
2. Literaturübersicht	3
2.1 Tissue Engineering	3
2.2 Stammzellen	5
2.2.1 Embryonale und postnatale Stammzellen	6
2.2.2 Dentale Stammzellen	10
2.2.2.1 Dentale Pulpa-Stammzellen (DPSCs)	12
2.2.2.2 Stammzellen aus humanen Milchzähnen (SHEDs)	13
2.2.2.3 Stammzellen des parodontalen Ligaments (PDLSCs)	13
2.3 Fibrinhydrogele als Trägermaterialien	15
2.4 Bioaktive Moleküle und Stammzelldifferenzierung	20
2.5 Tissue Engineering in der Zahnmedizin	22
2.5.1 Pulpa-Dentin-Komplex	23
2.5.2 Parodontale Geweberegeneration	25
3. Fragestellung	29
4. Material und Methoden	31
4.1 Materialübersicht	31
4.2 Zellkultur	32
4.2.1 Einstellung der gewünschten Zellzahl	34
4.2.2 Herstellung der Fibringele und Zellaussaat	34
4.2.3 Zellvitalität	36
4.2.4 Alkalische Phosphatase Aktivität	37
4.2.5 Zellproliferation	37
4.2.6 Histologie	38

4.2.7	Quantitative Real-Time PCR	39
4.3	Datenverarbeitung	43
5.	Ergebnisse	44
5.1	Zellvitalität und Proliferation	44
5.2	Alkalische Phosphatase Aktivität	45
5.3	Zelldifferenzierung	46
5.4	Histologie	48
6.	Diskussion	49
7.	Zusammenfassung	53
8.	Literaturverzeichnis	55
9.	Danksagung	64
10.	Lebenslauf	65

1. Einleitung

Milchzähne und bleibende Zähne entwickeln sich im menschlichen Embryo als Ergebnis sequenzieller und reziproker Interaktionen vom ektodermalen Epithel der Mundbucht und dem Mesenchym im Kopfbereich, das sich aus eingewanderten Zellen der Neuralleiste gebildet hat [1;2]. Die ektodermalen epithelialen Zellen bilden letztendlich den Zahnschmelz, während alle übrigen Strukturen von den mesenchymalen Zellen gebildet werden [3;4]. Induziert wird die Odontogenese in der fünften Embryonalwoche ausgehend vom oralen Epithel, wobei die Steuerung der Zelldifferenzierung während Zahnkronen- und Wurzelbildung durch das darunterliegende Mesenchym der Zahnpapille reguliert wird [5;6]. Mehr als 200 regulatorische Gene sind an der Odontogenese beteiligt. Die Zellkommunikation erfolgt über Signalmoleküle und Wachstumsfaktoren. Etwa in der 10. Embryonalwoche beginnt beim Menschen die Entwicklung der Zähne [7]. Die Entwicklung der Weisheitszähne beginnt erst postnatal, ihr Schmelzorgan wird etwa bis zum 72. Lebensmonat ausgebildet [5]. Das bedeutet, dass sich bis zu dieser Zeit undifferenziertes Gewebe im Kiefer befindet. Die Entwicklung der dritten Molaren ist die einzige Organogenese, die komplett nach der Geburt abläuft.

Jeder Zahn setzt sich aus verschiedenen Geweben zusammen, welche unterschiedliche Eigenschaften besitzen und auch unterschiedliche Funktionen erfüllen. Das Weichgewebe der Pulpa im Zahninneren bildet das Kernstück, das von den mineralisierten Substanzen Dentin, Schmelz und Wurzelzement umgeben ist. Das parodontale Ligament inseriert sowohl in das Wurzelzement als auch in den umgebenden Knochen und verankert so den Zahn in der Alveole.

Karies, Trauma, Erosionen oder die Destruktion des Zahnhalteapparates infolge von Parodontitiden sind die häufigsten Ursachen, welche den Ersatz der betroffenen Zahnhart- bzw. Zahnweichgewebe nach Durchbruch in die Mundhöhle erfordern. Für den Verlust von

Zahnhartgewebe ist meist Karies die Ursache, ein degradativer Zerstörungsprozess verursacht durch Zucker und kariogene Mikroorganismen mit anschließender Demineralisation und Kavitation des Zahnschmelzes. Dieser kann sich über das Dentin bis hin zur Pulpakammer fortsetzen und durch Eindringen bakterieller Toxine zu einer irreversiblen Entzündung des darunterliegenden Weichgewebes mit anschliessender Nekrose führen. Das Einbringen von synthetischen Füllungsmaterialien wie z.B. Keramik, Zement oder Kompositen stellt heute die fachgerechte therapeutische Intervention für die Wiederherstellung von Schmelz- und Dentindefekten dar. Bei eröffneter Pulpa ist die konventionelle Therapie mit Kalziumhydroxid als direkte oder indirekte Pulpaüberkappung im Sinne einer „caries profunda-Behandlung“ eine erfolgreiche Methode um die Bildung von reparativem (Tertiär-)Dentin zu induzieren [8]. Im Falle einer Nekrose muss das gesamte Pulpagewebe entfernt werden und die Wurzelkanäle gereinigt, desinfiziert und anschliessend bakteriendicht abgefüllt werden, um ein weiteres Ausbreiten des Entzündungsprozesses zu unterbinden. Frakturen nach traumatischer Einwirkung können sowohl Zahnhart- als auch Zahnweichgewebe betreffen und bis hin zum Zahnverlust führen. Als Zahnersatz können Implantate eingegliedert werden. Das Zusammenspiel von bakterieller Flora, Mundhygiene und Effizienz der körpereigenen Immunabwehr bestimmt die individuelle Anfälligkeit des Menschen, vor allem für das Auftreten von parodontalen Erkrankungen. Hierbei ist eine meist chronische Entzündung des Zahnhalteapparates vorhanden, die zum Abbau der Sharpeyschen (Ligament-) Fasern und des umgebenden Knochen führt.

Die Kosten für zahnärztlichen Behandlungen belaufen sich laut WHO (World Health Organisation) in industrialisierten Ländern auf ca. 5-10 % des Budgets des gesamten Gesundheitssystems [9;10]. Fortschritte im Bereich der Stammzellbiologie und des Tissue Engineering scheinen jedoch mittlerweile attraktive Optionen zu bieten, zerstörte oder verloren gegangene Zähne sowie einzelne Zahnstrukturen zu ersetzen.

Das zugrunde liegende Prinzip des Tissue Engineering ist die Kombination von Stammzellen mit einem geeigneten Trägermaterial sowie Wachstums- bzw. Differenzierungsfaktoren, um Gewebebildung und -regeneration zu fördern und den physiologischen, funktionellen Originalzustand des jeweiligen Gewebes wiederherzustellen. Das Trägermaterial soll hierbei die Funktion der natürlichen extrazellulären Matrix erfüllen und den Zellen die Ausbreitung und Proliferation ermöglichen [11].

In der vorliegenden Arbeit wurden Stammzellen aus dentalen Geweben mit einem modifizierten Fibrin-Trägermaterial kombiniert. Ziel war es, Proliferation und Differenzierung dieser dentalen Stammzellen in der Fibrinmatrix zu evaluieren und abzuschätzen, inwieweit Fibrin als Trägermaterial für Strategien zur Regeneration dentaler Hart- und Weichgewebe geeignet ist.

2. Literaturübersicht

2.1. Tissue Engineering

Tissue Engineering ist ein relativ neues, hochgradig interdisziplinäres Wissenschaftsfeld, welches die Bereiche Entwicklungs-, Zell- und Molekularbiologie, Genetik, Medizin, Chemie, Materialwissenschaften und Medizintechnik vereint. Die grundlegende Methode des Tissue Engineering (TE) bzw. der Gewebekonstruktion (auch Gewebezüchtung) beruht darauf, lebende Zellen eines Organismus als dreidimensionales Konstrukt zu kultivieren [12]. Dieses kann dann in meist denselben Organismus implantiert werden und somit die Gewebefunktion erhalten oder wiederherstellen. Daher ist das TE eine der zentralen Technologien für die Regenerative Medizin.

Geprägt wurde der Begriff des Tissue Engineering 1985 von Skalak als „... Anwendung von Prinzipien und Methoden der Ingenieur-, Werkstoff- und Lebenswissenschaften zur

Gewinnung eines fundamentalen Verständnisses von Struktur-Funktions-Beziehungen in normalen und pathologisch veränderten Geweben; welches der Entwicklung von biologischem Ersatz zur Erneuerung, Erhaltung oder Verbesserung der Gewebefunktion dienen kann“ [13]. Im engeren Sinne beinhaltet dies die Zellentnahme am Patienten zur Züchtung des gewünschten Organs.

Das Tissue Engineering beinhaltet vier Grundelemente:

- ein biokompatibles strukturelles Gerüst bzw. Trägermedium („Scaffold“ oder „Matrix“),
- lebende (Stamm-) Zellen oder Gewebe,
- bioaktive Moleküle, z.B. Wachstumsfaktoren, die zelluläre Differenzierung und Gewebeformation induzieren,
- ein Kulturmedium (Nährlösung) bzw. ein Organismus / Wirt.

Das Gerüst, sei es biologischer oder synthetischer Art, wird vor Kultivierung mit den entnommenen Zellen kombiniert. Die Kultivierung kann sowohl im Körper (*in vivo*- Tissue Engineering) als auch im Labor (*in vitro*- Tissue Engineering) erfolgen. In beiden Fällen sollte die Freisetzung und die Wirksamkeit der Signalstoffe, die die Zelle erreichen, kontrollierbar sein und die Gewebeneubildung optimal unterstützen. Diese aus Zellen und Trägermaterial zusammengesetzten Konstrukte werden wieder in die Zielregion des Organismus implantiert. Beim TE kann mit autologen, d.h. vom Patienten stammenden Zellen gearbeitet werden, wodurch nicht mit einer Abstoßung dieser transplantierten Gewebe gerechnet werden muss [14]. Auch die Grundlagenforschung ist in den Bereich des Tissue Engineering eingebunden. Die dem natürlichen Gewebe nachempfundenen Konstrukte können hier zur Erforschung zellulärer Reaktionen und Signaltransduktionswege dienen. Darüber hinaus ermöglichen die Methoden des TE die Herstellung dreidimensionaler gewebeähnlicher Zellkonstrukte, an denen sich die Wirkung von Schadstoffen, aber auch von Pharmazeutika testen lässt [15].

Durch den steigenden Bedarf an Ersatzgeweben und –organen [16] ist im Bereich des Tissue Engineering und der Regenerativen Medizin eine rasante Entwicklung zu verzeichnen.

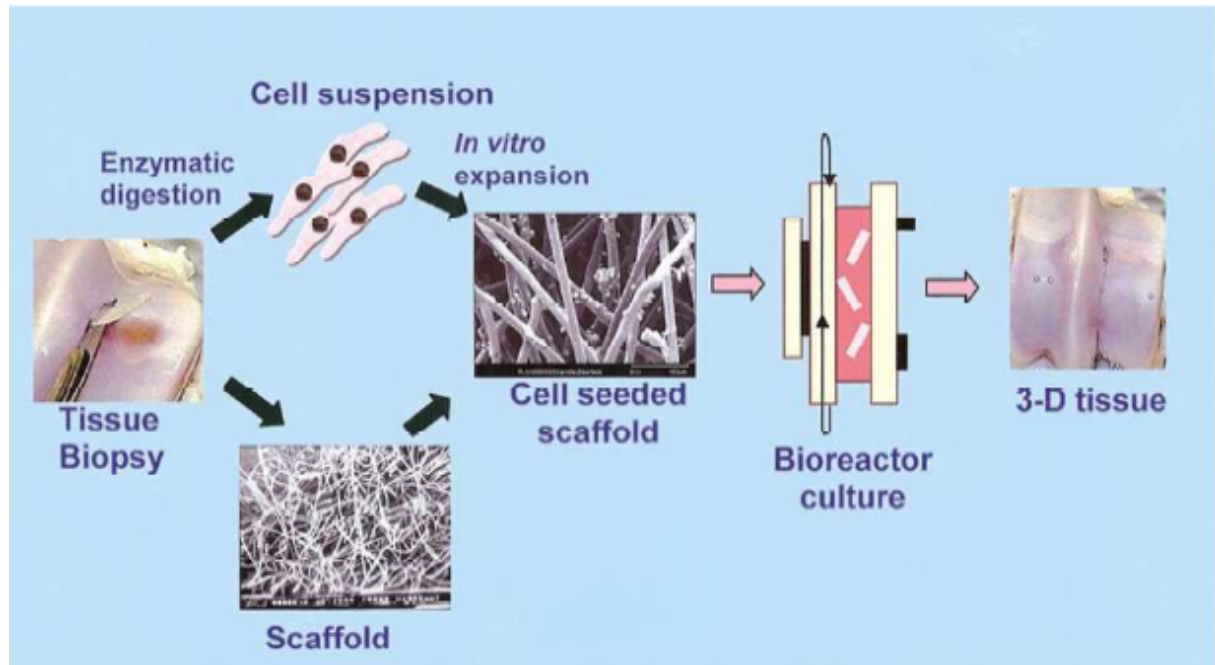


Abb.1 Prinzip des Tissue Engineering [17]

2.2. Stammzellen

Die wertvollsten Zellen für die regenerative Medizin sind Stammzellen. Als Stammzellen allgemein werden Körperzellen bezeichnet, die in verschiedene Zelltypen oder Gewebe differenzieren können. Die Eigenschaft, keimblattübergreifend in Zellen mit definierten Expressionsprofilen und funktionellen Phänotypen zu differenzieren, bezeichnet man als Plastizität [18;19]. Stammzellen generieren in der Regel zwei Tochterzellen, von denen eine wiederum Stammzelleigenschaften besitzt, und die zweite den Pfad der Differenzierung einschlägt [20]. Hierzu befähigt sie ein noch nicht vollständig geklärter Mechanismus der asymmetrischen Zellteilung. Neben dieser asymmetrischen Teilung können sich Stammzellen auch je nach Bedarf symmetrisch in weitere Stammzellen oder in differenzierte Zellen teilen.

Über das jeweilige Schicksal der Zellen entscheidet dabei vor allem das biologische Milieu, in dem diese sich befinden, die sogenannte Stammzellnische.

2.2.1. Embryonale und postnatale Stammzellen

Es werden embryonale von adulten Stammzellen unterschieden. Der wohl bedeutendste Unterschied liegt in der Pluripotenz embryonaler Stammzellen (embryonic stem cells, ESC), d.h. diese können sich in Zellen aller drei Keimblätter (Endo-, Ekto- und Mesoderm) differenzieren und sich theoretisch unendlich oft teilen [21]. Sie können mithilfe der Immunchirurgie aus dem frühen Blastozystenstadium (4. Tag der Embryonalentwicklung) gewonnen werden. Die Trophoblasten der Blastozyste werden hierbei durch eine antikörperaktivierte Komplementreaktion zerstört. Der für die Stammzellforschung interessante Teil der Blastozyste, die Embryoblastenzellen, wird erhalten und kann aufgrund seiner stammzelltypischen Fähigkeit zur Selbsterneuerung vermehrt werden. Ihre Pluripotenz geht hierbei nicht verloren. Sie können gezielt durch den Einsatz von Wachstumsfaktoren zur Differenzierung in unterschiedliche Zelltypen stimuliert werden [3;22;23]. Ethisch ist die Nutzung humaner embryonaler Stammzellen umstritten, da zu ihrer Gewinnung die Zerstörung menschlicher Embryonen erforderlich ist. Es wurden daher auch nur vereinzelte Untersuchungen an tierischen embryonalen Stammzellen durchgeführt [24-27].

Während embryonale Stammzellen nur im frühen Embryo vorkommen, sind adulte Stammzellen im Organismus auch nach der Geburt (postnatal) vorhanden. Einerseits dienen sie im Körper als Ersatzzellen beim gewöhnlichen Gewebeumsatz und können andererseits nach Gewebeschädigung oder -zerstörung verlorene Zellen im Sinne der Regeneration und Heilung ersetzen. Ihrer Gewinnung können Gewebeproben unterschiedlicher Ausgangsgewebe dienen. Adulte Stammzellen können nur begrenzt oft proliferieren. Man unterscheidet sie nach ihrem Entwicklungspotenzial. Somit werden uni- und bipotente

Vorläuferzellen, die sich meist nur in terminal differenzierte Zellen ihres Ausgangsgewebes differenzieren lassen, von multipotenten adulten Stammzellen unterschieden, welche auch Gewebe bilden können, die mit ihrem Ausgangsgewebe nicht identisch sind [21]. Adulte Stammzellen sind theoretisch in jedem Gewebe vorhanden und lassen sich sehr gut z.B. aus Knochenmark [28], aus der Nabelschnur bzw. aus Nabelschnurblut [29] gewinnen. Um den Defekt durch die Gewebeentnahme möglichst gering zu halten und das Organ oder den Organismus nicht zu stark zu schwächen, sollte der prozentuale Stammzellanteil in der gewonnenen Gewebeprobe möglichst groß sein [30].

Stammzellen können heute mit Hilfe verschiedener Techniken aus gemischten Zellpopulationen selektiert und isoliert werden:

- a) Zellfärbung mit spezifischen Antikörper-Markern unter Benutzung eines Durchflusszytometers (Fluorescent Antibody Cell Sorting, FACS)
- b) Immunomagnetische Selektion
- c) Immunhistochemische Färbung
- d) Physiologische und histologische Kriterien wie Phänotyp (Erscheinungsbild), Chemotaxis, Proliferation, Differenzierung und Mineralisationsaktivität
- e) Plastikadhärenz

Bisher bieten postnatale Stammzellen somit aufgrund ihrer Verfügbarkeit ein vielversprechendes Mittel für künftige klinische Anwendung, trotz ihrer geringen Plastizität. Eine sinnvolle Ergänzung des Prinzips des Tissue Engineering könnte in Zukunft in der Kombination mit der Gentherapie liegen [31]. Hierbei wird genetische Information in Zellen eingeschleust (Transfektion), wodurch die transformierten Zellen beginnen, das entsprechende Zielgen zu exprimieren, und ein gewünschtes Produkt, beispielsweise einen Wachstums- oder Differenzierungsfaktor, zu bilden. Der Transfer zusätzlicher genetischer

Information in eukaryontische Zellen kann einerseits dazu dienen, die funktionellen Bedeutungen der Gene und deren regulatorischer Sequenzen zu verstehen, andererseits aber auch die Entwicklung zukünftiger Strategien für Gentherapien voranzutreiben [32]. Durch Transfektion ist es auch möglich, aus humanen mesenchymalen Stammzellen oder Körperzellen, Zellen embryonalen Charakters zu erzeugen mit dem Vorteil, ethische und legale Bedenken auszuschalten. Es bleibt jedoch abzuwarten, inwiefern diese Zellen in Zukunft für regenerative Zwecke eingesetzt werden können.

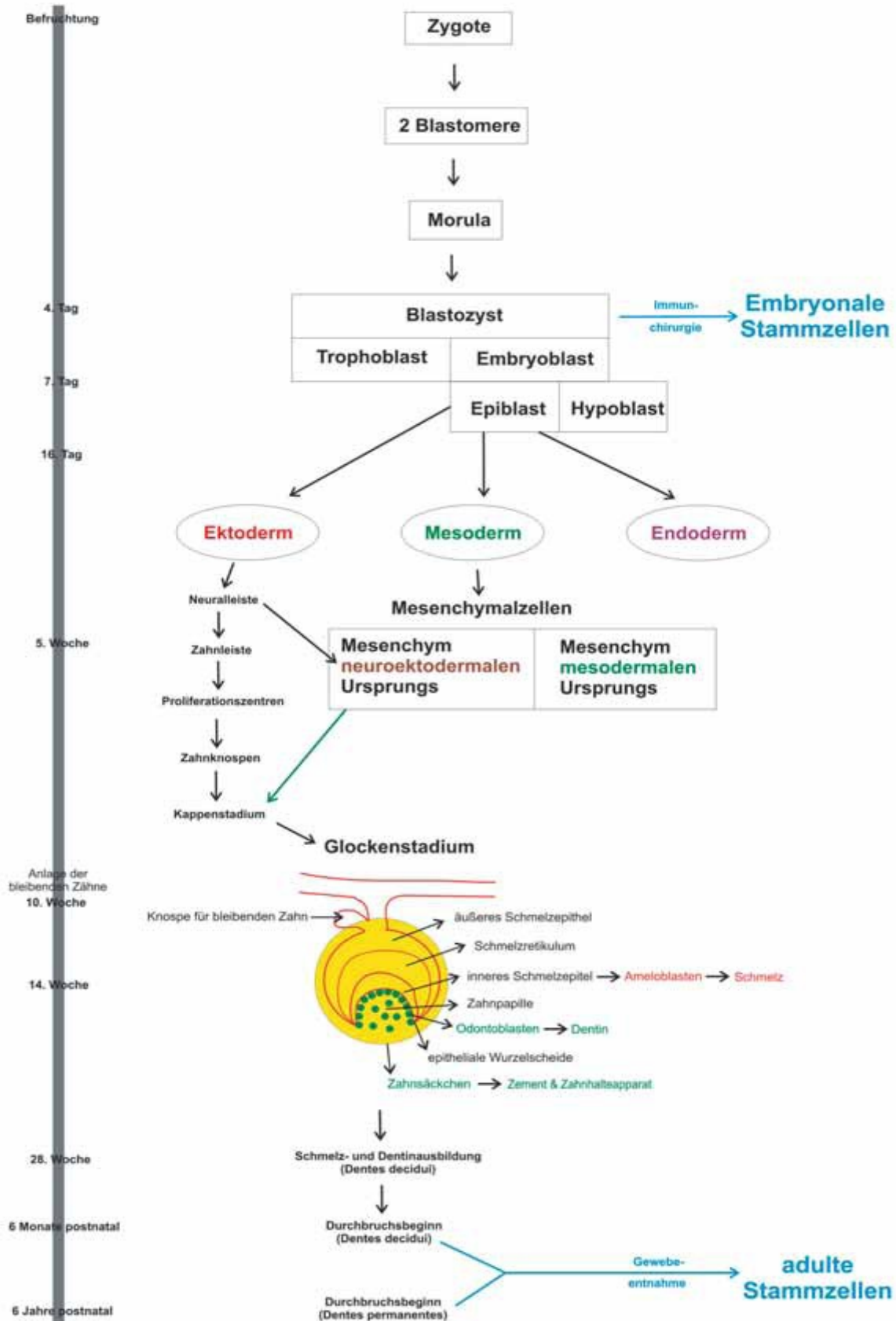


Abb.2: Embryogenese und Zahnentwicklung [33]

2.2.2. Dentale Stammzellen

Mit Ausnahme der Ameloblastenvorläuferzellen sind alle an der Odontogenese beteiligten Stammzellen mesenchymalen Ursprungs (Abb. 2). Bis zur dritten Woche stammt das Mesenchym der Mund- und Gesichtsregion fast ausschließlich vom paraxialen Mesoderm ab. In der 4. Woche wandern Neuralleistenzellen des Ektoderms in die Schlundbögen ein, sodass der größere Teil des Mesenchyms letztendlich neuroektodermalen Ursprungs ist. Man spricht von einem ektomesenchymalen Ursprung dieser Zellen [3].

Generell sind mesenchymale Stammzellen (MSCs) durch ihre Fähigkeit charakterisiert, in die verschiedenen Zelltypen differenzieren zu können, die vom embryonalen Mesenchym abstammen, somit Osteoblasten, Chondrozyten, Adipozyten und Myoblasten [28;34;35]. Kriterien für undifferenzierte mesenchymale Stammzellen sind, dass sie negativ für hämatopoetische Progenitorzellmarker wie CD14 (Monozyten, Makrophagen), CD45 (gemeinsames Leukozyten Antigen) und CD34 (hämatopoetische Stamm- / Progenitorzellen) sind, dafür aber mesenchymale Stammzellmarker exprimieren, darunter CD105, CD166, CD29, CD44 und STRO-1 [36-38].

Das Knochenmark ist eine der wichtigsten Quellen für postnatale mesenchymale Stammzellen (BMSSC, bone marrow stral stem cells), diese sind auch die am besten charakterisierten MSCs. Friedenstein et al. [34;35] konnten als Erste feststellen, dass BMSSCs in Kultur adhärente, klonogene, sich selbst- erneuernde und fibroblastenähnliche Zellpopulationen hervorbringen (colony forming unit–fibroblastic, CFU-F), daher auch die Zellbezeichnung.

Mittlerweile wurden aus verschiedenen dentalen Geweben Stammzellen isoliert. Erstmals gelang es im Jahre 2000, Stammzellen aus der Zahnpulpa bleibender Zähne zu isolieren (dental pulp stem cells, DPSCs) [39-41]. Da die in der Pulpa befindlichen dentinproduzierenden Odontoblasten postmitotische Zellen sind und die Fähigkeit der Pulpa zur Bildung reparativen Dentins hinlänglich bekannt ist, wurde das Vorhandensein von

Progenitorzellen in der Pulpa bereits seit längerem vermutet. Wenig später wurden auch aus der Pulpa von Milchzähnen Stammzellen gewonnen (stem cells from human exfoliated deciduous teeth, SHEDs) [42]. Auch das parodontale Ligament kann als Stammzellquelle dienen (periodontal ligament stem cells, PDLSCs) [43], ebenso die apikale Papille [44] und der Follikel des sich bildenden Zahnes [45]. Es wurde festgestellt, dass diese Zellen wie die BMSSCs die Fähigkeit haben, klonogene adhärente Zellgruppen zu bilden. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Häufigkeit kolonienbildender Zellen bei DPSCs, SHEDs und PDLSCs signifikant höher war als bei den BMSSCs. Weiterhin wurden in Proliferationsstudien für DPSCs und PDLSCs 30 % und für SHEDs 50% höhere Wachstumsraten im Vergleich zu den Knochenmarkstammzellen festgestellt [39-41;43;46;47]. Alle genannten dentalen Stammzelltypen besitzen die Fähigkeit, in verschiedene Zelltypen zu differenzieren und nach Transplantation *in vivo* ihre jeweiligen Ursprungsgewebe zu bilden [39;40;42;43]. Diese Ergebnisse lassen ahnen, welche Bedeutung diese Zellen schon anhand der bisher gewonnenen Kenntnisse für künftige Studien im Bereich des dentalen Tissue Engineering haben könnten.

Zur Gewinnung von Stammzellen aus dentalen Geweben ist hinzuzufügen, dass diese einerseits aus Abfallprodukten (z.B. aus Milchzähnen bzw. nach Zahnextraktion oder Weisheitszahnentfernung) relativ leicht gewonnen werden können, autologe Stammzellen aber häufig zum benötigten Zeitpunkt nicht verfügbar sind, da Therapiebedarf bei Karies oder Parodontitiden meist wesentlich später auftritt und somit diese Stammzellquellen nicht mehr vorhanden sind bzw. abgerufen werden können. Eine denkbare Lösung wäre die Gewinnung der Zellen zum jeweiligen Zeitpunkt der Verfügbarkeit mit anschließender patientenbezogener Lagerung („stem cell banking“).

2.2.2.1 Dentale Pulpa-Stammzellen (DPSCs)

Schon seit geraumer Zeit wird in der Zahnmedizin das Potenzial der Pulpa, ein Leben lang reparatives Dentin zu bilden, therapeutisch bei direkten und indirekten Pulpaüberkappungen nach pulpanaher Kariesexkavation genutzt. Unter anderem wandern nach Applikation von Calciumhydroxid pulmale Stamm- oder Vorläuferzellen an der verletzten Stelle ein, differenzieren zu Odontoblasten-ähnlichen Zellen und bilden eine Hartgewebsbarriere als aktive Abwehrleistung der Pulpa gegen chemische und mechanische Reize [8]. Diese Pulpa-Stammzellen konnten von der Arbeitsgruppe um Stan Gronthos erstmals vor im Jahr 2000 aus der Pulpa von Weisheitszähnen gewonnen werden [39].

In der dentalen Pulpa befinden sich verschiedene Progenitorzellen-Subpopulationen, welche sich in ihrer Fähigkeit zur Selbsterneuerung, der Proliferationsrate und dem Differenzierungspotential unterscheiden, d.h. die gewonnene Stammzellpopulation stellt meist ein heterogenes Zellgemisch dar [40;48;49]. DPSCs können aus dritten Molaren oder aus pulpektomierten, *in situ* belassenen Zähnen gewonnen werden [30]. Auch nach zeitweiliger Lagerung in flüssigem Stickstoff verlieren die DPSCs nicht ihre Fähigkeit, sich multipotent zu differenzieren [50-52]. *In vitro* können sich DPSCs in Odontoblasten, Osteoblasten, Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Adipozyten, Chondrozyten und Neurone differenzieren. Jedoch ist ihre Entwicklungsfähigkeit *in vitro* begrenzt. *In vivo* ist die Entstehung komplexerer Gewebe möglich. Beispielsweise differenzieren DPSCs *in vitro* zwar zu reifen Osteoblasten, die LAB-Gewebe (living autologous fibrous bone-tissue) produzieren können [53], *in vivo* hingegen kann kalzifiziertes Knochengewebe mit Haverskanälen und Osteozyten entstehen [53-56]. Darüber hinaus sind DPSCs in der Lage, Dentin-Pulpa-ähnliche Gewebekomplexe zu generieren, an welchen Pulpagewebe, eine Odontoblastenschicht und Prädentin erkennbar sind [39;57].

2.2.2.2 Stammzellen aus humanen Milchzähnen (SHEDs)

Desweiteren stellen Milchzähne nach der Exfoliation eine gut zugängliche Quelle adulter Stammzellen dar. Das in der Zahnkorne verbleibende Pulpagewebe enthält diese Stammzellen (stem cells from human exfoliated deciduous teeth, SHEDs). SHEDs können nach Zugabe entsprechender Medienzusätze oder nach Transplantation in vivo myogen, odontogen, osteogen, adipogen, chondrogen oder neuronal differenzieren [42]. Die aus Milchzähnen gewonnene Stammzellpopulation ist, ähnlich der aus bleibenden Zähnen, ein heterogenes Zellgemisch. Implantiert man dieses Gemisch zusammen mit Hydroxylapatit/Tricalciumphosphat (HA/TCP) – Pulver subkutan bei Mäusen, so differenzieren 25 Prozent der Klone in Odontoblasten-ähnliche Zellen und bilden tubuläres Dentin, während die restlichen Klone knochenähnliche Strukturen formen. SHEDs sind jedoch nicht wie DPSCs in der Lage, dem Pulpa-Dentin-Komplex ähnliche Gewebe zu generieren. Andererseits weisen sie eine hohe Proliferationsrate auf, können murine Wirtszellen zur Differenzierung in Osteoblasten und Osteozyten anregen um Knochen zu formen und können desweiteren in endotheliale Zellen differenzieren und somit die Blutgefäßbildung unterstützen [58].

2.2.2.3 Stammzellen des parodontalen Ligaments (PDLSCs)

Das parodontale Ligament (PDL), das die Zahnwurzel über die Sharpeyschen Fasern mit dem knöchernen Alveolarfortsatz verbindet, dient der Aufhängung des Zahnes im Knochen und erfüllt Funktionen der Propriozeption und Abpufferung einwirkender Kräfte.

Stammzellen des parodontalen Ligaments (periodontal ligament stem cells, PDLSCs) wurden erstmals von der Arbeitsgruppe um Seo aus extrahierten Weisheitszähnen isoliert [43]. Ex-vivo konnten Kalziumablagerungen und die Bildung mineralisierter Bereiche festgestellt werden. PDLSCs exprimieren eine Reihe von Zementoblasten- und Odontoblastenmarker, darunter alkalische Phosphatase (ALP), Matrix-extrazelluläres Phosphoglykoprotein

(MEPE), Bone Sialoprotein (Bsp), und Osteokalzin (Oc) [43]. Nach der Implantation von PDLSCs in vivo mit HA/TCP bildeten die Zellen ein dem Parodontium ähnliches Gewebe mit Wurzelzement und kollagenen Ligamentfasern. Hierbei war eine dünne Schicht zementähnlichen Gewebes auf der Oberfläche des Trägers mit verdichteten Kollagenfasern sichtbar, das PDL-Zellen ähnelt. Die Kollagenfasern wiesen eine Vernetzung mit dem neu gebildeten zementähnlichen Gefüge auf und imitierten somit das physiologische Attachment der Sharpeyschen Fasern im Wurzelzement [43]. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Zellen fähig sind, in Osteoblasten, Zementoblasten und Fibroblasten zu differenzieren und den parodontalen Geweben ähnelnde extrazelluläre Matrix aufzubauen [59;60]. Bereits Melcher stellte sich vor über 20 Jahren die Frage, ob diese 3 Zellgruppen des Parodonts nur von einer einzigen Stammzellpopulation abstammen konnten [61]. Seo et al. [43] konnten mit Hilfe der Klontechnik feststellen, dass nur ein geringer Prozentsatz der Zellen des parodontalen Ligaments Stammzellencharakter aufweisen, also morphologische, phänotypische und proliferative Eigenschaften adulter mesenchymaler Stammzellen besitzen [43]. Allein diese Zellen fördern den Zellumsatz und die Gewebekomöostase und dienen als Ressource für erneuerbare Vorläuferzellen, welche lebenslang zu Zementoblasten, Osteoblasten und Fibroblasten heranreifen können. Bei der Schädigung parodontaler Gewebe aufgrund von Entzündungsprozessen können PDLSCs durch lösliche Mediatoren wie Wachstumsfaktoren, Adhäsionsmoleküle und Strukturproteine aktiviert werden, um die Geweberegeneration bzw. -reparatur voranzutreiben [46]. In vivo konnten nach Transplantation in Mäuse Knochen-, Zement-, Knorpel- sowie PDL-artige Strukturen festgestellt werden [43]. In einer Studie am Tiermodell (Schwein) wurden PDLSCs zur Deckung parodontaler Defekte angewandt [62]. Diese Untersuchungen zeigen, dass menschliche PDLSCs durchaus eine Schlüsselrolle bei der parodontalen Regeneration spielen.

2.3. Fibrinhydrogele als Trägermaterialien

Um ein dreidimensionales (3D) Mikromilieu für die Stammzellen zur Verfügung zu stellen, welches deren Adhäsion, Wachstum und Differenzierung ermöglichen kann, wird ein geeignetes Trägermaterial oder Scaffold benötigt. Das Trägermaterial dient der mechanischen Stabilisierung und gleichzeitig als Leitstruktur und Gerüst für die dreidimensionale Organisation der wachsenden Gewebekultur, während die zelluläre Komponente die Grundlage für das neu entstehende Gewebe durch die Bildung der extrazellulären Matrix bildet [11]. Die Zellen werden auf das Scaffold gesät und entweder *in vitro* kultiviert, um das gewünschte Gewebe vor der Transplantation zu schaffen, oder direkt nach der Zellaussaat implantiert. Ein sich davon unterscheidender Ansatz ist die Transplantation eines primär zellfreien Systems, wobei durch die Inkorporation von Signalmolekülen in das Scaffold die Rekrutierung der in den jeweiligen Geweben befindlichen Stammzellen veranlasst wird. Durch anschließende Zellproliferation und -differenzierung soll Regeneration erzielt werden [63]. Vorteile dieser zellfreien biokompatiblen Scaffolds sind vor allem die einfachere Handhabung. Probleme beim Gebrauch von Stammzellen wie Lagerung, Haltbarkeit, Kosten, Immunreaktion des Wirtes und Übertragung von Krankheitserregern können durch ihre Expansion *in vitro* somit eliminiert werden.

Ein ideales Scaffold sollte folgende Eigenschaften besitzen:

- nicht toxisch, biokompatibel und nicht immunogen zum Schutz der implantierten Zellen und des umliegenden Gewebes,
- bioabbaubar (enzymatisch oder hydrolytisch), wobei die Abbaurate so eingestellt sein sollte, dass ein Gleichgewicht zwischen Abbau und Ersatz des Trägermaterials durch neu gebildetes Gewebe bestehen bleibt,
- vielseitig modifizierbar, so dass bioaktive Moleküle und Differenzierungsfaktoren eingebunden und kontrolliert freigesetzt werden können.

Eine ganze Reihe von Materialien steht für das Tissue Engineering zur Verfügung. Es werden natürliche und synthetische Polymere verwendet, anorganische Materialien oder Komposite, welche als poröse Scaffolds, nanofibröse Gerüste, Mikropartikel und Hydrogele verarbeitet werden können. Zu den natürlichen Materialien werden Kollagen, Elastin, Fibrin, Alginat, Seide und Glykosaminoglykane wie Hyaluronsäure und Chitosan gezählt [63-67]. Diese Werkstoffe bieten zwar eine hohe strukturelle Stabilität, sind biokompatibel und biologisch abbaubar, jedoch wirft die Verarbeitung oft Probleme auf, und deren Einsatz geht mit dem Risiko der Übertragung tierisch-pathogener Krankheitserreger oder der Auslösung einer Immunreaktion einher [64]. Auch können Parameter wie chemische Zusammensetzung, Festigkeit oder Abbaurate schlechter kontrolliert werden als bei synthetischen Materialien. Kollagen beispielsweise, das in Form von Gelen, Nanofasern, porösen Trägern und Filmen hergestellt werden kann und auch häufig im Bereich des dentalen Tissue Engineering verwendet wird, ist mechanisch instabil und unterliegt schnellem Abbau [65].

Synthetische Polymere zeichnen sich durch hervorragende chemische und mechanische Eigenschaften aus und erlauben eine gute Kontrolle der physikochemischen Eigenschaften [68], so wie Molekulargewicht, Anordnung der Polymerketten oder dem Vorhandensein funktioneller Gruppen. Als nachteilig wäre zu erwähnen, dass diese beim Träger chronische oder akute Entzündungsreaktion hervorrufen können, auch kann ein lokaler Abfall des pH-Wertes infolge des hohen Säuregehalts der durch die Hydrolyse entstehenden Abbauprodukte das umliegende Gewebe schädigen. Die heute am häufigsten verwendeten synthetischen Scaffolds werden aus Polylactidsäure (PLLA) oder Polyglykolsäure (PGA) und deren Copolymer Polylactid [69;70] hergestellt. PLLA ist ein Polymer, welches eine hohe Festigkeit aufweist und daher vielerlei Anwendungsbereiche gefunden hat, bei denen die strukturelle Stabilität eine wichtige Rolle spielt. PGA wird als Träger zur Zelltransplantation angewandt und durch Hydrolyse abgebaut wobei die von den Zellen gebildete Extrazellulärmatrix die PGA ersetzt. Sowohl PLLA als auch PGA erfüllen die oben genannten Anforderungen an

Biomaterialien und haben in den Vereinigten Staaten die Zulassung für eine Reihe von Anwendungen erhalten [71;72].

Eine rasche Weiterentwicklung zeichnet sich für Hydrogel- Trägermaterialien ab, welche zunehmend für das Tissue Engineering eingesetzt werden [73]. Hydrogele bieten - je nach Material – besondere Vorteile, darunter Biokompatibilität, hohen Wassergehalt, eine den Weichgeweben ähnelnde Viskoelastizität, effizienten Transport von Nährstoffen und Metaboliten, die Möglichkeit der homogenen Zellverteilung im Gel sowie Injizierbarkeit und Gelbildung *in situ* [67;74;75]. Ferner können sie chemisch oder physikalisch (quer)vernetzt werden und durch Einbindung von bioaktiven Molekülen oder von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren ist eine Modifikation der Gele erzielbar [73;76].

Für die vorliegende Studie wurden Fibringele als Trägermaterial für die Zellen ausgewählt. Die Eigenschaften und besonderen Vorteile dieser Gele und Gründe für ihre Verwendung in dieser Arbeit sollen im folgenden Abschnitt dargelegt werden:

Fibrin ist das Biopolymer des Monomers Fibrinogen. Das Monomer setzt sich aus zwei Sets von jeweils drei Polypeptidketten A-alpha, B-beta und gamma zusammen, die durch sechs Disulfidbrücken verbunden sind. [77] Fibrin entsteht durch die thrombin-induzierte Abspaltung des Fibrinopeptids A von der A-alpha-Kette und des Fibrinopeptids B von der B-beta-Kette [78] mit anschließender Konformationsänderung und der Exposition von Polymerisationsstellen. Das somit gebildete Fibrinmonomer hat eine hohe Tendenz zur Selbstassoziation und formt unlösliches Fibrin. Darüber hinaus erfolgt eine schnelle Vernetzung der gamma-Ketten im Fibrinpolymer [79] durch Einbau von kovalenten intermolekularen gamma-Glutamyl-Lysinbindungen zwischen dem Lysin der einen gamma-Kette und der Glutamygruppe der anderen [75]. Der Koagulationsfaktor XIIIa als Transglutaminase leitet hierbei den Vorgang ein. Das somit entstandene Fibrinnetzwerk ist

stabil und gegen den Abbau durch Proteasen resistent [80]. Der Prozess kann durch Zugabe des chemischen Vernetzers Genipin verstärkt werden [81].

Fibrin und Fibrinogen spielen eine bedeutende Rolle für die lebensnotwendigen Vorgänge im Körper wie z.B. bei der Blutgerinnung, der Fibrinolyse, bei Entzündungsreaktionen und Wundheilung, aber auch bei der Entstehung von Neoplasien [86]. Bisher hat Fibrin bei einer Reihe von klinischen Anwendungen Gebrauch gefunden. Einige sind hier aufgezählt [82]:

- Blutstillendes Agens bei kardiovaskulären, Leber- oder Milzoperationen
- Als „Dichtungsmittel“ bei Darmanastomosen oder zur Vermeidung von Seromen (Ansammlung von Wundsekret in Gewebeshohlräumen) mit anschließender Weichgewebsdissektion
- Förderung von Fistelheilungen
- Bei laparoskopischen / endoskopischen Verfahren

Fibrinkleber wie Tisseel, Evicel und Crosseal sind heute für den klinischen Einsatz als blutstillende Agenzien zugelassen. Im Rahmen dieser Arbeit wird jedoch im Weiteren nur auf Fibringlee eingegangen.

Fibrinhydrogele können aus handelsüblichem puren allogenem Fibrinogen und Thrombin hergestellt werden [83]. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, Fibrin und Thrombin aus körpereigenem Blut zu gewinnen, was das Infektionsrisiko bzw. die Gefahr einer unerwünschten Immunantwort verringert [64]. Fibringlee sind relativ einfach herstellbar, und im Vergleich zu den bisher weiter verbreiteten Polymerscaffolds weisen sie den Vorteil auf, dass sowohl hohe Zelldichte als auch homogene Zellverteilung erzielt werden können [84].

Als potenzielles Trägermaterial weist es aber auch Nachteile auf. Zu nennen sind geringe mechanische Steifigkeit sowie rapider zellvermittelter Abbau noch vor der Entstehung neuer Extrazellulärmatrix oder von Gewebe im Sinne des Tissue Engineering [64;85]. Der Schrumpfung kann durch den Einbau eines Fixationsenzym wie z.B. dem poly-L-Lysin in

das Fibrinnetz während der Kultivierungsphase entgegengewirkt werden [64]. Zur Verbesserung der Festigkeit kombiniert man Fibrin meist mit einem anderen Scaffold-Material, um die gewünschten viskoelastischen und mechanischen Eigenschaften einzustellen bzw. zu variieren. Beispiele zur Konstruktion solcher Verbundträger sind Polyurethan [86], Polycaprolacton-basierte Polyurethane [87], Polycaprolacton (PCL) [88], β -Trikalziumphosphat (β -TCP) [89], β -TCP/PCL [90] und wie das in dieser Arbeit angewandte Polyethylenglykol (PEG) [91].

Die meisten Herstellungsverfahren für Fibrinogen beinhalten üblicherweise andere Plasmaproteine wie Fibronektin, Wachstumsfaktoren, Enzyme, Enzyminhibitoren und Proenzyme [92]. Außerdem ist das Serum-Plasminogen normalerweise ein Bestandteil des Zellkulturmediums [64]. Als weitere Besonderheit ist zu nennen, dass Plasminogen und Matrix-Metalloproteasen innerhalb des Fibrinnetzes von den eingekapselten Zellen sezerniert werden können [83]. Das Zusammenwirken dieser Faktoren führt zwar zum schnelleren Abbau des Fibrinhydrogels, kann aber durch verschiedene Strategien hinausgezögert werden. Ziel ist es, den pH-Wert und die Konzentrationen von Fibrinogen und Kalziumionen (Ca^{++}) zu optimieren [93]. Ein weiterer Ansatz ist der Einsatz einer hochvernetzten dichten und denaturierten dreidimensionalen Fibrinmatrix, auch FMB genannt [94;95]. Wie bereits erwähnt trägt besonders die Modifikation des Fibrins mit PEG zu einer hohen Stabilität der Fibrinstruktur bei [96]. Die Verwendung von Proteaseinhibitoren als Zusatz für das *in-vitro* Kulturmedium [64;83], die charakteristisch für Plasmin und Matrix-Metalloproteasen sind kann z.B. bei Zugabe von Aprotinin als Inhibitor zum Gel, die Abbaurate verlangsamen [97].

2.4. Bioaktive Moleküle und Stammzelldifferenzierung

Wachstumsfaktoren oder Morphogene sind Signalmoleküle, welche in den Extrazellularraum ausgeschüttet werden und dort während der Gewebeentwicklung und Morphogenese die Interaktion zwischen epithelialen und mesenchymalen Geweben steuern. Das morphogenetische Signalnetzwerk beinhaltet fünf Hauptklassen: Bone morphogenetic proteins (BMPs), Fibroblast growth factors (FGFs), Wingless und wntrelated Proteine (Wnts), Hedgehog Proteine (Hhs) und Tumor-Nekrose-Faktoren (TNFs) [98-100]. Eine Vielzahl von Morphogenen wird während der Zahnentwicklung in einem exakt festgelegten räumlichen und zeitlichen Muster exprimiert, wodurch die Initiation der Organentwicklung, die weitere Morphogenese und Gewebedifferenzierung gesteuert werden [101]. Von den Morphogenen, welche während der Zahnentwicklung eine Rolle spielen, sind etliche auch später bei Heilungsvorgängen massgeblich beteiligt. Es konnte in *in vitro*- und *in vivo*-Versuchen gezeigt werden, dass diese Zelldifferenzierung und Tertiärdentinbildung anzuregen vermögen [98;102-104]. Das zunehmende Verständnis der biologischen Abläufe bei der Gewebeentwicklung und -reparation ermöglicht es mittlerweile, regenerative Prozesse gezielt zu unterstützen. Weiterhin ist bekannt, dass während der Zahnentwicklung von den dentinproduzierenden Odontoblasten Wachstumsfaktoren sezerniert werden, die in der organischen Matrix des Dentins abgelagert werden [103-105]. Im Zusammenspiel mit anderen Komponenten bleiben diese geschützt und in einem aktiven Zustand [106]. Nach Schädigung der dentalen Pulpa kann die Tertiärdentinbildung von diesen im Dentin eingeschlossenen Wachstumsfaktoren stimuliert werden. Durch Demineralisationsvorgänge bei der Karies, aber auch infolge von Kavitätenkonditionierung bei der Füllungstherapie werden diese Wachstumsfaktoren freigesetzt [107-109]. Vor allem die aus der Familie der Transforming growth factor β (TGF- β) stammenden Wachstumsfaktoren sind bedeutend für die intrazelluläre Signalübertragung bei der Differenzierung und zur Stimulation der Sekretion

von Proteinen der Dentinmatrix. Eine weitere wichtige Gruppe von Wachstumsfaktoren bei der Zahnentwicklung und auch der Regeneration sind die Bone morphogenetic proteins (BMPs). BMPs, welche ursprünglich aus demineralisierter Knochenmatrix isoliert wurden [110], können in Monolayerkulturen [111;112] und in dreidimensionalen Pelletkulturen [113] die Differenzierung von Pulpazellen zu Odontoblasten stimulieren. *In vivo* wird die Bildung von Tertiärdentin durch Zugabe von rekombinantem BMP-2, -4, und -7 induziert [114;115]. Ein ähnlicher Effekt konnte mit TGF beta 1-3 und BMP7 in kultivierten Zahnscheiben gezeigt werden [116;117]. BMP4 - freisetzende Agaroseketten induzierten in Kulturen von dentalen Mesenchymzellen eine transluzente Zone, die dentalen Epithelzellen während der Zahnentwicklung ähnelt [118]. Rekombinantes humanes GDF 11 (growth/differentiation factor 11) stimulierte bei Mesenchymzellen aus der Pulpa von Mäusen die Expression von Dentin Sialoprotein (Dsp), der einen Differenzierungsmarker für Odontoblasten darstellt [119]. Eine *in vitro* Studie von Begue-Kirn et al. lässt ebenfalls die Differenzierung mesenchymaler Zellen zu Odontoblasten unter Einfluss von TGF beta 1 und BMP2 vermuten [102].

Weiterhin konnte auch für Dentin Matrixprotein-1 (Dmp-1) gezeigt werden, dass dieses effektiv die Pulpazelldifferenzierung anzuregen vermag. Dmp-1, welches zu den nicht-kollagenen Dentinproteinen gehört, induzierte Zelldifferenzierung, erhöhte Kollagenproduktion und Mineralisation in der Pulpa in einer an Ratten durchgeführten Studie [120].

Aber auch pulpaferme Moleküle können die Zelldifferenzierung beeinflussen. So wurde gezeigt, dass durch Zugabe des synthetischen Glukokortikoids Dexamethason die Zellproliferation bei primären menschlichen Pulpazellen verringert und gleichzeitig die Expression der Differenzierungsmarker Alkalische Phosphatase (ALP) und Dentin-Sialophosphoprotein (DSPP) induziert wurde [121]. Zugabe von β -Glycerophosphat zum Nährmedium bei *ex-vivo* – Kulturen extrahierter menschlicher Zähne führte zu einer

Veränderung der Zellmorphologie, zu Kollagensynthese und Mineralbildung [122]. Während anorganisches Phosphat und Dexamethason *in vitro* bereits seit längerem standardmäßig als Medienzusätze zur Induktion der osteogenen Differenzierung verwendet werden, ist mittlerweile erwiesen, dass nach Zugabe dieser Zusätze auch die Differenzierung dentaler Stammzellen mit anschließender Mineralablagerung zu beobachten ist [40;42]. Dies mag darauf zurückzuführen sein, dass Osteogenese und Dentinogenese sehr ähnliche Vorgänge sind und es sich bei Osteoblasten und Odontoblasten um eng verwandte Zelllinien handelt. Trotzdem sind sie aufgrund ihrer unterschiedlichen Genexpressionsmuster und der strukturellen Unterschiede ihrer jeweiligen Endprodukte, Knochen und Dentin, voneinander abgegrenzte Zelltypen.

Ziel ist es, das gewonnene Wissen aus der Zahnentwicklung auf die Stammzellforschung zu übertragen, indem man Stammzellen entscheidenden Faktoren aussetzt und so deren Differenzierung in zahnbildende Zellen veranlasst. Mit zunehmendem Kenntnisstand dieser biologischen Prozesse können wir nun Materialien entwickeln, welche über die Grundvoraussetzung der Biokompatibilität hinausgehende Eigenschaften besitzen. War früher die Verwendung bioinertter Materialien zur Schonung der an die Implantationsstelle angrenzenden Gewebe das Ziel, so ist man heute bemüht, Matrix- bzw. Scaffold-Systeme bioaktiv zu gestalten, wobei durch den Einbau von Wachstums- oder Differenzierungsfaktoren die erwünschte zelluläre Reaktion aktiv gefördert werden soll.

2.5. Tissue Engineering in der Zahnmedizin

Mit der Isolation von Stammzellen aus dentalen Geweben und der rasanten Entwicklung von Biomaterialien als Zellträger hat das Tissue Engineering auch im Bereich der Zahnmedizin Einzug gehalten. Zahnverlust, sei er verursacht durch Karies, parodontale Erkrankungen oder

Trauma, betrifft die meisten Erwachsenen in ihrem Leben. Eine biologische Zahnregeneration statt dem synthetischen Ersatz könnte verlockende Alternativen zu derzeit herkömmlichen Versorgungsmöglichkeiten darstellen. Beim Tissue Engineering in der Zahnmedizin unterscheidet man zwei unterschiedliche Ansätze: 1) die Regeneration einzelner Zahngewebe oder 2) das „Whole Tooth Engineering“ oder Züchten ganzer Zähne. Während bei ersterem das Tissue Engineering Konzept im klassischen Sinne (Stammzellen-Trägermaterial-Wachstumsfaktoren) angewandt wird [58; 123], wird bei letzterem durch Kombination embryonaler Zellen aus der Zahnanlage mit mesenchymalen Zellen die Ausbildung eines Zahnkeimes induziert [124]. Obwohl das Züchten ganzer Zähne ein erstrebenswertes Ziel bleibt, ist die Verwendung humaner embryonaler Zellen zu diesem Zwecke undenkbar, weswegen die Regeneration einzelner Zahnkomponenten derzeit vielversprechender im Hinblick auf baldigen Einsatz in der klinischen Therapie erscheint.

2.5.1. Pulpa-Dentin-Komplex

Das Dentin stellt den Hauptteil des mineralisierten Gewebes im Zahn dar, sowohl in der Krone als auch der Wurzel. Im Gegensatz zum Knochen wird das Dentin nicht lebenslang durch An- und Abbauvorgängen remodelliert. Es gibt jedoch Hinweise auf eine limitierte Regeneration, woraus die Hypothese entstand, dass in der dentalen Pulpa Progenitorzellen vorhanden sind, die zu Odontoblasten differenzieren können [39]. Odontoblasten sind postmitotische Zellen, die die organische Matrix des Dentins synthetisieren. Während der Zahnentwicklung bilden sie Primärdentin und verringern ihre sekretorische Fähigkeit, verbleiben aber funktionsfähig und setzen ihre Arbeit zur Sekundärdentinproduktion fort, selbst wenn dies viel langsamer erfolgt. Strukturell sind beide gleich. Sekundärdentin wird lebenslang gebildet und engt so im Laufe der Jahre die Pulpahöhle ein, wobei Dentin direktional synthetisiert wird und jeder Odontoblast einen Zellfortsatz im Dentin zurücklässt,

der in der Dentinmatrix eingebettet ist. Aufgrund dessen kann Dentin als „vitales Reaktionsgewebe“ wie jedes andere im Körper betrachtet werden.

Bakterielle Toxine und mechanische Reize führen zur Erhöhung der Odontoblastenaktivität und Bildung von Sekundärdentin als Schutzbarriere zwischen dem Pulpagewebe und der Verletzungsstelle. Selbst nach Freilegung der Pulpa und somit Zerstörung der Odontoblastenschicht kann sie mittels einer direkten Pulpaüberkappung mit Calciumhydroxid behandelt werden [8]. Der hohe pH-Wert desinfiziert bzw. nekrotisiert die benachbarte Zellschicht und stimuliert Abwehrmechanismen zur Bildung reparativen Dentins. Dieses Vorgehen gelingt aber meist nur bei enger Indikationsstellung. Bei Misserfolg und persistierender Entzündung werden endodontische Maßnahmen zum Zahnerhalt notwendig, wodurch eine Devitalisierung und Schwächung des Zahnes resultiert.

Verschiedene Arbeitsgruppen haben daher versucht, Verfahren zur „Züchtung“ von Pulpagewebe zu entwickeln. Ein erster Schritt dahingehend, Zahnpulpa mit biologischen Methoden zu generieren, wurde von Bohl et al. im Jahr 1998 beschrieben. Ihm gelang es erstmals, ein pulpaähnliches Gewebe auf verschiedenen Trägermaterialien zu kultivieren [125]. Um die Bedeutung der synthetischen Matrices genauer zu erforschen, wurden drei verschiedene Träger für die Pulpafibroblasten verwendet. Während auf Alginat kein und auf Kollagen-Gelen nur moderates Wachstum erkennbar war, zeigten die Zellen auf einem Polyglykolsäure (PGA) - Fasernetz einen dichten Bewuchs mit Kollagenablagerung.

Zu der gleichen Ansicht kamen Mooney et al. [126]. Aus der humanen Zahnpulpa gewonnene Fibroblasten wurden auf PGA Träger gesät und die Zellen konnten an die Fasern binden, sich vermehren und über 60 Tage ein neues Gewebe formen, in dem die Zellen denen der natürlichen Pulpa entsprachen [126]. Mooney ging von einer zukünftigen Verwendung dieser Kulturen in der Regeneration von Zahngewebe sowie in neuen Untersuchungen zur Biokompatibilität von Chemikalien und Materialien, die in der Zahnmedizin zum Einsatz kommen, aus.

Vor kurzem konnte die Bildung von Pulpagewebe *in vivo* gezeigt werden (Abb. 3). Dentale Stammzellen wurden auf Polylaktid (PLLA) - Trägern gesät und in die Pulpakavität von Zahnscheiben nach Entfernung des Eigengewebes inseriert und anschließend subkutan bei immunsupprimierten Mäusen implantiert. Es konnte gezeigt werden, dass dentale Stammzellen in odontoblastenähnliche Zellen differenzieren und zur Ausbildung des Blutgefäßnetzwerkes beitragen [58].

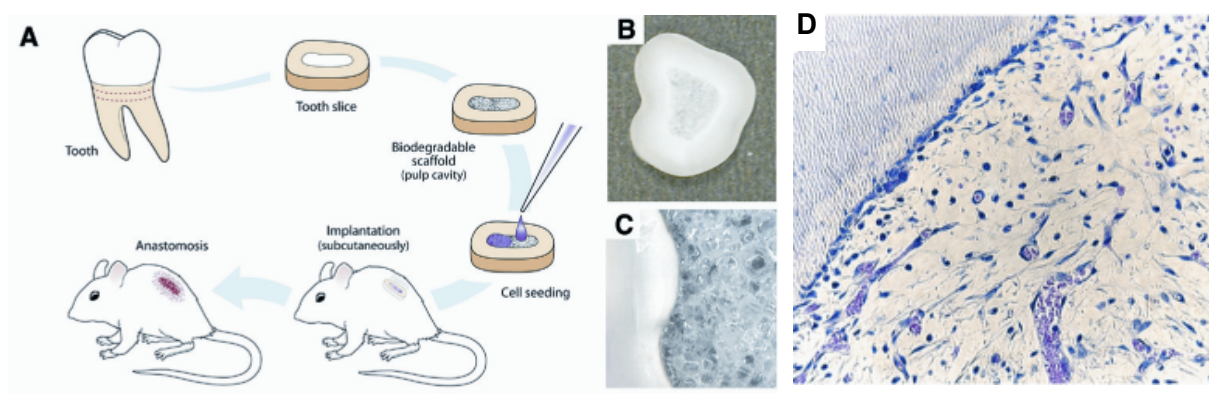


Abb.3: Engineering dentaler Pulpastammzellen. (A) Schematisches Diagramm der Vorgehensweise. (B) Ein bioabbaubares Scaffold wird in die Pulpakammer gefüllt und die Stammzellen anschließend eingesät. Die Zahnscheibe wird subkutan bei immunsupprimierten Mäusen implantiert. (C) Höhere Vergrößerung des Zahnschnittes mit Grenzschicht zwischen Scaffold und Dentin. (D) Ausbildung eines pulpaähnlichen Gewebes 14 Tage nach Implantation (400x) [58].

2.5.2. Parodontale Geweberegeneration

In den USA leiden ca. 35 % der über 30 jährigen unter parodontalen Erkrankungen [127]. Parodontale Infektionen führen zur Zerstörung des Zahnhalteapparates d.h. des Alveolarknochens, Wurzelzements und dem parodontalen Ligament, welches den Zahn im Knochen verankert. Maßnahmen zur Regeneration dieses komplexen Gewebes werden durch die mikrobielle Kontamination und Immunreaktion des Wirtes erschwert. Heute angewandte

Methoden im Sinne der konventionellen oder chirurgischen Parodontaltherapie beinhalten die Säuberung (Kürettage) und Desinfektion der infizierten Wurzeloberflächen, sowie chirurgische Maßnahmen, sei es mit Knochenersatzmaterial, Schmelzmatrixproteinen oder der Einbringung von Barrieremembranen. Die Membranmethode wird heute als Goldstandard angesehen [128] und in der Zahnmedizin im Rahmen der gesteuerten Geweberegeneration (GTR, Guided Tissue Regeneration) eingesetzt [129-131]. In der Heilungsphase nach der Kürettage parodontal geschädigter Zähne wird die Proliferation vitaler, apikal befindlicher Desmodontalzellen nach koronal durch das schnell nach apikal wachsende Saumepithel unterdrückt, so dass es nach konventioneller Parodontitistherapie mit Wurzelreinigung nur zu einer reparativen Heilung mit marginal geschrumpfter Gingiva, geringem neuen Attachment und einem langen Saumepithel kommt. Angestrebt wird jedoch die regenerative Heilung, mit Bildung eines kurzen Saumepithels, neuem Knochen, Zement und Desmodont, also einem intakten Zahnhalteapparat. Die GTR versucht nun mittels einer mechanischen Barriere, einer Membran, während der Wundheilung die Zellen des gingivalen Bindegewebes und Epithels von der Wurzeloberfläche für 4-6 Wochen fernzuhalten. So wird den desmodontalen und knochenbildenden Zellen Zeit gegeben, sich an der Zahnoberfläche zu etablieren und dort dem Zahnhalteapparat ähnelnde Strukturen auszubilden. Trotzdem muss festgestellt werden, dass die Ergebnisse unvorhersehbar sind, vor allem bei fortgeschrittenen parodontalen Defekten [132], was zur Erforschung alternativer regenerativer Verfahren angeregt hat.

Der Effekt von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren auf parodontale Regeneration wurde *in vitro* ausgiebig an Tiermodellen studiert. Platelet-derived growth factor (PDGF) oder FGF-2 fördern Proliferation, Zellmigration und Matrixsynthese und verbessern die Heilung von Knochendefekten und parodontalen Geweben insgesamt [133-135]. Ähnliche Ergebnisse konnten für BMPs gezeigt werden [136;137]. *In vivo* angewandte Wachstumsfaktoren werden jedoch durch schnelle Diffusion, kurze Halbwertszeiten und

raschen proteolytischen Abbau in ihrer Wirkung beeinflusst und es bedarf der Weiterentwicklung dieser Methoden, um voraussagbare Resultate zu erzielen.

Die Gentherapie ermöglicht eine längere Verfügbarkeit von Wachstumsfaktoren *in situ*. Die DNA von Genen kann mit Hilfe viraler oder non-viraler Vektoren in die Gewebezellen eingebracht werden. Aufgrund des Transkriptions- und Translationspotenzials der Zellen kann eine anhaltende Genexpression und Proteinverfügbarkeit gewährleistet werden. Ferner ermöglicht der Gentransfer von PDGFs oder BMPs eine hohe Proliferationsrate der Zellen und beschleunigt zusammen mit Knochenneubildung die Wundheilung [138-140]. In diesem Zusammenhang müssen aber die Risiken beim Gebrauch viralen Genmaterials und der Aufwand für die Kontrolle bzw. Dauer der Genexpression vermerkt werden.

Ein weiterer Ansatz ist die Verwendung von sogenannten embryonalen Schmelzmatrixproteinen (EMPs), die von Klinikern für die Behandlung parodontaler Defekte verwendet werden [141]. Diese Amelogenine werden durch schmelzbildende Zellen während der Zahnentwicklung exprimiert und spielen eine kritische Rolle für das Wachstum der HA-Kristalle und die Zelldifferenzierung.

Eine durchaus zukunftsorientierte Methode zur Behandlung parodontaler Defekte stellt die Verwendung mesenchymaler Stammzellen dar (Abb. 4). Die Transplantation autologer Stammzellen aus dem Knochenmark (BMSSCs, bone marrow stromal stem cells) auf Kollagenträger führt bei Hunden zur Bildung von Wurzelzement, PDL und Alveolarknochen [142]. Wie bereits erwähnt können aus den Weisheitszähnen gewonnene PDLSCs komplexe parodontale Strukturen nach Transplantation bei immunsupprimierten Mäusen mit HA-Trägern regeneriert werden [43].

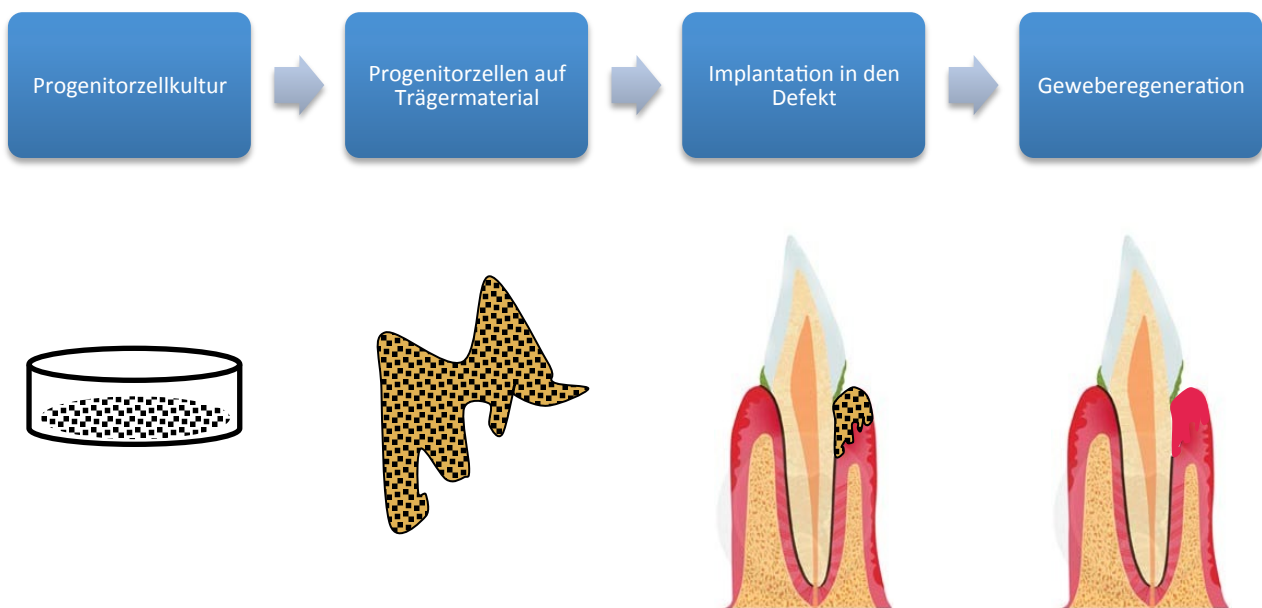


Abb.4 Schematische Darstellung des Tissue Engineering Verfahrens für parodontale Regeneration durch Kombination von Stammzellen und eines Scaffold-/Matrizensystems. In Anlehnung an [128].

Interessante Erkenntnisse liefert auch eine Studie, bei der PDLSCs mit Stammzellen aus der apikalen Papille bei Zähnen im Entwicklungsstadium (SCAPs, stem cells from apical papilla) kombiniert wurden, um einen im Kieferknochen von Minischweinen operativ hergestellten Defekt mit wurzelförmig geformtem HA-Träger abzudecken. Nach 5 Wochen *in situ* konnte die Bildung von PDL konstatiert werden, was eine vollständig funktionsfähige Verankerung einer Keramikkrone in der „Bio-Wurzel“ ermöglichte (Abb. 5) [44]. Da jedoch bei diesem Versuch nicht von einem vorgeschädigten Zahn ausgegangen wird d.h. der Defekt künstlich geschaffen wird und nicht durch Entzündung des Parodonts entsteht, könnten diese Ergebnisse bei abweichender klinischer Ausgangssituation unterschiedlich ausfallen.

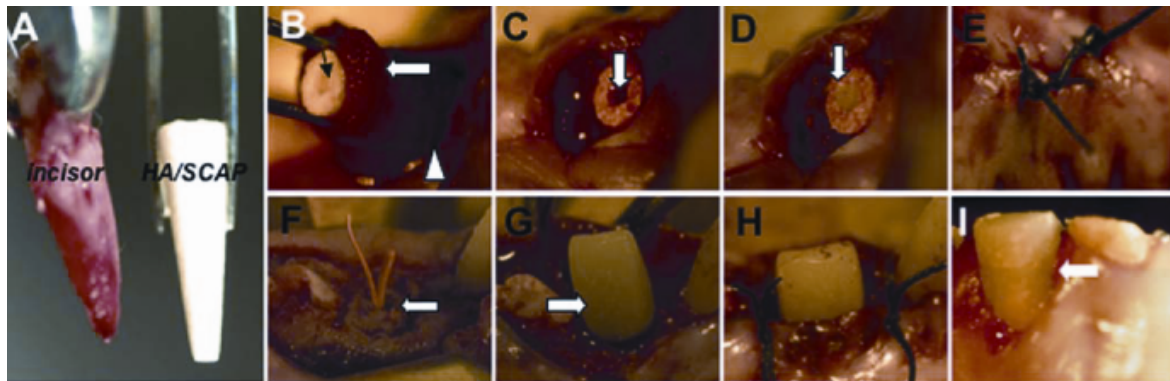


Abb.5: Implantation eines zahnwurzelförmigen Trägers mit dentalen Stammzellen als „Bioimplantat“. (A) Extrahierter unterer Frontzahn beim Minischwein und wurzelförmig gestalteter HA-TCP-Träger mit Stammzellen. (B – E) „Gel foam“ Träger mit PDLSCs zur Versorgung des Defekts durch Transplantation in die Alveole. Pfeil: künstlich geschaffener Wurzelkanal im Träger, der mit einer temporären Füllung zur Aufnahme einer späteren Keramikkrone beschickt wird. (F – I) Freilegung des Implantats drei Monate später, Entfernung der temporären Füllung und anschließende Zementierung einer Keramikkrone auf den Wurzelträger; Naht um die Krone; Zustand vier Wochen nach Zementierung: Krone verbleibt nach Kaubelastung im Kiefer [44].

3. Fragestellung

Um das Tissue Engineering und den gewinnbringenden Einsatz von Stammzellen in der Zahnmedizin zu etablieren sind geeignete Trägermaterialien notwendig. Diese müssen kompatibel mit den zu implantierenden Zellen sein, weiterhin sollten sie injizierbar sein, um auf engem Raum in der Mundhöhle kleine Defekte füllen zu können.

Als biokompatibles, bioabbaubares und zelladhäsives Material bietet sich Fibrin *per se* für das Tissue Engineering an. Der rasche zellvermittelte enzymatische Abbau kann hierbei durch die Modifikation mit PEG verlangsamt und das Material stabiler gestaltet werden. Durch die Verwendung von Benzotriazolderivaten des Polyethylenglykols (BTC-PEG-BTC) können die Materialeigenschaften von Fibrin optimiert werden [143]. Die elektrophilen Gruppen an

beiden Molekülen können mit Aminogruppen reagieren und so die Anzahl der Quervernetzungen mit Fibrinmonomeren ermöglichen.

Im Hinblick auf dentale Geweberegeneration könnte die Kombination dentaler Stammzellen mit einem PEGylierten Fibrinnetz zukünftig vielversprechende Ansätze bieten.

In der vorliegenden Arbeit sollten die Kompatibilität von dentalen Stammzellen aus der Zahnpulpa (SHEDs, DPSCs) und aus dem parodontalen Ligament (PDLSCs) mit diesem PEGylierten Fibrinnetz getestet werden. Hierzu sollten die Proliferation der Zellen sowie ihre Fähigkeit zur Differenzierung in diesem Trägermaterial untersucht werden.

Folgende konkrete Fragestellungen oder Aufgaben ergaben sich hieraus:

1. Bestimmung der Proliferationsrate der drei Stammzelltypen in PEGyliertem Fibrin
2. Untersuchung der Zellmorphologie der drei Stammzelltypen in PEGyliertem Fibrin
3. Untersuchung der Abbaubarkeit des Gels durch die Zellen sowie dessen Ersatz durch Extrazellulärmatrix
4. Bestimmung der Differenzierungsfähigkeit der drei Stammzelltypen in PEGyliertem Fibrin nach Zugabe von osteogenen Zusätzen zum Kulturmedium
 - a) Analyse der Genexpression
 - b) Untersuchung der Fähigkeit zur Mineralisation als Zeichen der Differenzierung

4. Material und Methoden

4.1. Materialübersicht

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die verwendeten Zellkulturlösungen und Chemikalien:

Fibrinogen	Sigma Aldrich, St. Louis, MO
Thrombin	Sigma Aldrich, St. Louis, MO
TBS	Sigma Aldrich, St. Louis, MO
PEG-Nitrophenolcarbonat (MW=3400 Da)	Sunbio, Orinda, CA
PBS	Sigma Aldrich, St. Louis, MO
CaCl ₂	Sigma Aldrich, St. Louis, MO
β-Glycerophosphat (βGP)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO
MEMα-Medium (Minimum Essential Mediumα	Invitrogen GIBCO , Carlsbad, CA
Kaliumphosphat (KH ₂ PO ₄) (KPh)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO
Dexamethason (dex)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO
Penicillin 100U/ml	Sigma Aldrich, St. Louis, MO
Streptomycin 100 µg/ml	Sigma Aldrich, St. Louis, MO
L-Glutamin	Sigma Aldrich, St. Louis, MO
Aprotinin 0,03 %	Sigma Aldrich, St. Louis, MO
Fetales Bovines Serum (FBS), Dulbecco's phosphat buffered saline	Invitrogen GIBCO , Carlsbad, CA
Trypsin – EDTA (500 U Trypsin + 180 µg EDTA/ml in PBS)	Invitrogen GIBCO , Carlsbad, CA
MTT(3-(4,5dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazoliumbromid) 1 mg/ml	Sigma Aldrich, St. Louis, MO
Phosphatsubstrat (1 Kapsel = 100 mg in 25 ml dH ₂ O)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma Aldrich, St. Louis, MO
p-Nitrophenol Standard	Sigma Aldrich, St. Louis, MO
CyQuant cell proliferation assay kit	Invitrogen GIBCO , Carlsbad, CA
RNA Stat 60	Tal-Test Inc. Friendswoos, TX
Alkoholreihe 20% - 100%	Sigma Aldrich, St. Louis, MO

Folgende Geräte und Verbrauchsmaterialien wurden verwendet:

Zellkulturflaschen T 75	75 cm ² Falcon, Oxnard
Einmalpipette	5 ml / 10 ml / 25 ml, COSTAR Stripette, New York
96-Well-Platte	Falcon, Oxnard
Zentrifugenröhrchen 12 ml / 25 ml	Falcon, Oxnard
Sicherheitswerkbank	Heraeus Instruments Lamin Air
Begasungsbrutschrank	Heraeus Type BB 6620
Autoklav	Fedegari Autoclavi, Zürich
Zentrifuge	Hettich Rotixa IP 2181
Umkehrmikroskop	Leica Diavert
Kolbenhubpipetten	Eppendorf
Kolbenhubpipettenspitzen	Eppendorf
Plattenphotometer	Micro Reader El 312
Plattenschüttler	GFL 3018
Wasserbad	Ecotherm E10 U
Pipettierhilfe	Brand accu-jet
Pipettierhilfe	Transferpette-8 20-200yl
Tischzentrifuge	Centrifuge 5415 C, Eppendorf
Eppendorfcups	1,5 ml Eppendorfcups
Kühlschrank	Liebherr Profi Line
Zählkammer	Neubauer IMPROVED 0,0025 mm ² , Tiefe 0,100mm
Gefrierschrank	Liebherr
Pinzetten	Aesculap
Chirurgische Schere	Aesculap
Spektralphotometer	FluoStar Optima, BMG Lab, Durham, NC

4.2. Zellkultur

Für diese Studie wurden drei dentale Stammzelltypen verwendet und in den Fibringelen kultiviert:

1. DPSCs (dental pulp stem cells)

aus der Zahnpulpa bleibender Weisheitszähne [39],

2. SHEDs (stem cells from human exfoliated teeth)
aus der Zahnpulpa humaner Milchzähne [42], und
3. PDLSCs (periodontal ligament stem cells) aus dem parodontalen Ligament bleibender
Zähne sofort nach Extraktion [43].

Alle drei Stammzelltypen wurden freundlicherweise von Dr. Songtao Shi von der University of Southern California (UCS), Los Angeles, USA, zur Verfügung gestellt.

Die Zellen wurden wie folgt kultiviert:

Gruppe 0 (Kontrollgruppe):

MEM α -Medium mit 15% FBS, 50 $\mu\text{g/ml}$ L-Ascorbinsäure-2-Phosphat, 100 U/ml Penicillin und 100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin, 2 mM L-Glutamin
(Kontrollgruppe, 0-Control)

Gruppe 1:

MEM α -Medium mit 15% FBS + 10 mM β -Glycerophosphat und 10 nM Dexamethason, 50 $\mu\text{g/ml}$ L-Ascorbinsäure-2-Phosphat, 100 U/ml Penicillin und 100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin, 2 mM L-Glutamin
(MEM α -Medium + β - GP + dex)

Gruppe 2:

MEM α -Medium mit 15% FBS + 10 mM Kaliumphosphat und 10 nM Dexamethason, 50 $\mu\text{g/ml}$ L-Ascorbinsäure-2-Phosphat, 100 U/ml Penicillin und 100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin, 2 mM L-Glutamin
(MEM α -Medium + KH_2PO_4 + dex)

Die Zellen wurden in T 75 Zellkulturflaschen (75 cm² Wachstumsfläche) gezüchtet und im Brutschrank bei 37 °C, 5% CO₂ und Wasserdampfsättigung inkubiert. Das Zellkulturmedium wurde jeden zweiten Tag gewechselt (je 20 ml in einer T 75 Flasche). Bei subkonfluentem Zellwachstumsbestand von etwa 80 % wurden die Zellen passagiert. Nach Zugabe von 1 ml Trypsin-EDTA-Lösung konnten die Zellen vom Flaschenboden gelöst und durch mehrmaliges auf- und abpipettieren der Zellen eine Clusterbildung nach erneuter Aussaat vermieden werden. Anschliessend wurden die Zellen im entsprechenden Verhältnis auf neue Flaschen verteilt oder zur Zellaussaat verwendet.

4.2.1. Einstellung der gewünschten Zellzahl

Die Ermittlung der gewünschten Zellzahl erfolgte mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer. Dazu wurden die Zellen nach dem Ablösen mit Trypsin-EDTA und Zugabe von MEM α -Medium in ein Falcon-Röhrchen überführt und für 5 min bei 1500 Umdrehungen pro Minute abzentrifugiert. Nach Abschluss des Zentrifugievorganges wurde das Medium abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml frischem MEM α -Medium resuspendiert. Nach geeigneter Verdünnung eines Aliquots konnten die Zellen in der Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop gezählt werden.

4.2.2. Herstellung der Fibringle und Zellaussaat

Nach Bestimmung der Zellzahl folgte die Herstellung der Zellsuspension mit der jeweils benötigten Zelllinie, wobei für jedes Gel 25 μ l der Zellsuspension mit einer Konzentration von 4×10^6 Zellen/ml benötigt wurden. Die Zellzahl pro Gel (Gesamtvolumen pro Gel: 100 μ l) belief sich somit auf 1×10^5 Zellen. Diese Anzahl galt für alle 3 Zelllinien und wurde nicht verändert. Die Suspension im Falcon-Röhrchen wurde dann beiseite gelegt.

Anschliessend wurden die Lösungen für die Herstellung der Fibringele vorbereitet. Die Gele setzen sich zusammen aus einem 1:1 Fibrinogen / PEG- Gemisch, der Zellsuspension und Thrombin. Zunächst werden gleiche Mengen Fibrinogen (80 mg/ml in TBS bei pH 7,8) und PEG (16 mg/ml in TBS) in ein 50 ml Falcon-Röhrchen gegeben, mit dem Rüttler gründlich vermischt und im Wasserbad bei 37°C für 1 Stunde inkubiert. Für den Vergelungsprozess wurde noch Thrombin in einer Konzentration von 50 U/ml in CaCl₂ in einem separaten Röhrchen hergestellt. Für die Versuche wurden 96-Well-Platten verwendet, wobei das Volumen jedes Gels insgesamt 100 µl betrug, davon 25 µl das Fibrinogen/PEG – Gemisch, 25 µl Zellsuspension und schließlich 50 µl Thrombin. Alle hergestellten Lösungen wurden steril filtriert. Vor Beginn der Aussaat wurden jeweils gleiche Mengen des Fibrinogen/PEG – Gemisches mit der Zellsuspension in einem großen Falcon-Röhrchen vermischt und daraufhin jeweils 50 µl in ein Well gegeben. Danach wurde dieselbe Menge an Thrombin beigelegt. Der Vergelungsprozess setzte 2-3 Sekunden nach Thrombinzugabe ein. Für jede Probe, jeden Zeitpunkt und jede Mediumbedingung erfolgte eine dreifache Anfertigung der Gele (Triplikate). Nach abgeschlossenem Vorgang wurden die Platten 30 min im Brutschrank inkubiert und daraufhin jedem Well 200 µl MEM α -Medium hinzugegeben. 24 Stunden darauf wurde das Medium gewechselt und die osteogenen Faktoren hinzugefügt. Dabei wurden die drei beschriebenen Zellkulturmedien verwendet: eine Gruppe wurde weiterhin mit dem bereits beschriebenen Medium kultiviert (Kontrollgruppe 0), bei der nächsten Gruppe wurden dem Medium 10 mM β - Glycerophosphat und 10 nM Dexamethason (β GP + dex) zugesetzt (Gruppe 1), bei einer weiteren Gruppe 10 mM Kaliumphosphat und 10 nM Dexamethason (KH₂PO₄ + dex) (Gruppe 2). Die Endkonzentrationen waren somit 10 mg/ml für Fibrinogen, 2 mg/ml für PEG, 25 U/ml für Thrombin. Das Zellkulturmedium wurde jeden zweiten Tag gewechselt, und die Gele insgesamt 4 Wochen lang kultiviert. Generell wurde für alle Tests der Zeitpunkt 24 Stunden nach Aussaat der Zellen als Tag 0 datiert.

4.2.3. Zellvitalität

Die Ermittlung der Zellvitalität wurde mit Hilfe des MTT-Tests [144] folgendermaßen durchgeführt:

Verwendet wurden für alle Zelllinien nur die Gele, die mit MEM α -Medium ohne Zusatz (Kontrollgruppe, 0-Control) kultiviert wurden. Der Test wurde an den Tagen 0, 3, 5, 7, 10, 14, 18, 21, 25 und 28 vorgenommen. Nach Abnahme des Kulturmediums und zweimaliger Spülung mit PBS –Puffer, wurden die Gele in den 96-Well-Platten mit 100 μ l MTT-Lösung (1mg/ml), die vorher auf 37 °C erwärmt worden war, überschichtet. Die MTT-Lösung wurde mit MEM α -Medium ohne Phenolrot vor jedem Versuch neu vorbereitet und steril filtriert. Zum Lichtschutz wurde die Platte mit Alufolie umwickelt und drei Stunden in der MTT-Lösung im Brutschrank bei 37°C inkubiert, um den Zellen die Aufnahme des Farbstoffs zu ermöglichen. Nach dieser Inkubationszeit wurde die MTT-Lösung abpipettiert. Von den Gelen wurde überschüssige MTT-Lösung mit PBS-Puffer abgewaschen. Danach wurden die Gele vorsichtig mit einer Spatelspitze als Ganzes von den Wells gelöst und in Eppendorfcups überführt. Das Gelpellet wurde anschliessend mit 1 ml DMSO- Lösung überschichtet und 24 Stunden bei Raumtemperatur stehengelassen, um den Farbstoff aus den Zellen zu lösen. Das blaue Gelpellet wurde komplett entfärbt. Anschliessend wurden die Cups nochmal geschüttelt und 100 μ l der Lösung für die Messung auf eine 96-Well-Platte übertragen. Ein Well der 96-Well-Platte wurde mit je 200 μ l reinem DMSO gefüllt, um den Leerwert zu bestimmen. Die Absorption der Lösung wurde im Plattenphotometer bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen. Die Ergebnisse wurden graphisch dargestellt, wobei auf der Ordinate die Absorptionswerte und auf der Abszisse die Zeitpunkte aufgetragen wurden, an denen eine MTT-Messung durchgeführt wurde.

4.2.4. Alkalische Phosphatase Aktivität

Um die Aktivität der alkalischen Phosphatase (ALP) zu ermitteln wurde wie folgt vorgegangen:

Die Gele wurden nach zweimaliger Spülung mit PBS-Puffer wieder in Eppendorfcups überführt. Um die Fibringle aufzulösen wurden die Gele mit einer chirurgischen Schere zerkleinert, dann 300 µl Trypsin-EDTA hinzugegeben und die Proben bei 37°C im Wasserbad für 10-15 Minuten inkubiert. Anschliessend erfolgte ein Zentrifugationsvorgang bei 1500 U/min für 5 Minuten. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Zellpellet in 60 µl PBS-Puffer resuspendiert und in 96-Well-Platten pipettiert. Nach Zugabe von 60 µl alkalischer Pufferlösung und 100 µl Phosphatsubstrat wurden die Proben für eine Stunde bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Das freigesetzte p-Nitrophenol wurde im Spektralphotometer bei 410 nm gemessen. Die Proben wurden mit einer p-Nitrophenol Standardverdünnungsreihe verglichen und die Alkalische-Phosphatase-Aktivität auf die dazugehörigen Zellzahlen, die aus dem Zellproliferationstest erhalten wurden, genormt, wobei die Enzymaktivität pro 1000 Zellen pro Stunde berechnet wurde. Der Test wurde an den Tagen 0, 7, 14, 21 und 28 sowohl für die Kontrollgruppe als auch für die Zusätze β-GP und KH₂PO₄ durchgeführt.

4.2.5. Zellproliferation

Dieser Test diente der schnellen und zuverlässigen Bestimmung der Zelldichte bzw. der Zellzahl unter Zuhilfenahme eines Farbstoffes, welcher an die DNA bindet und dann spektralphotometrisch bestimmt werden kann.

Die Gele wurden bis zum Erhalt des Zellpellets wie bereits für den ALP – Assay beschrieben (5.2.4.) behandelt. Anschliessend wurde das Zellpellet in 200 µl Lysepuffer (1:20 in aqua bidest.) resuspendiert und in eine 96-Well-Platte gegeben. Zusätzlich wurden auch hier zur Kalibrierung bzw. zur Berechnung der Zellzahl anhand der Fluoreszenzwerte

Zellsuspensionen mit eingestellter Zellzahl für die Standardkurve im Sinne einer Verdünnungsreihe hergestellt. Dies ermöglichte die Umrechnung der Fluoreszenzwerte der Proben in Zellzahlen, wobei die Zelltypen jeweils dieselben sein mussten, wie für das Experiment verwendet. Dazu wurden bereits bei der Zellaussaat bzw. der Herstellung der Fibringle zusätzlich Stammzellen der entsprechenden Zelllinie mit einer Anzahl von 1×10^6 in Eppendorfcups bei -86°C eingefroren, um diese nun beim Proliferationstest für die Verdünnungsreihe zu verwenden. Als Leerwert diente reiner Lysepuffer. Abschließend wurden vor der Messung im Spektralphotometer FluoStar Optima jedem Well $2 \mu\text{l}$ des Farbstoffes CyQuant GR dye hinzugegeben. Der Zellproliferationstest wurde zu denselben Zeitpunkten durchgeführt wie der ALP – Test (Tag 0, 7, 14, 21 und 28).

4.2.6. Histologie

Für die histologische Analyse wurden die Gele nach 28 Tagen in Kultur für 3 Stunden in 4 % Paraformaldehyd fixiert, mit Hilfe der Alkoholreihe entwässert und mit Xylol geklärt. Anschliessend wurden sie in Paraffin eingebettet, bei 4°C gekühlt und Schnitte von $5 \mu\text{m}$ Dicke angefertigt und diese auf Objektträger gebracht. Für das Kollagen wurden die Schnitte zunächst mit Hämatoxylin-Eosin (HE) und Masson's Trichrom und um Kalziumablagerungen sichtbar zu machen anschließend nach van Kossa gefärbt. Es wurden hierfür die üblichen Standardmethoden angewandt. Die HE-Färbung dient in der Histologie als Standardfärbung und bietet einen guten Überblick über die Struktur des jeweiligen Gewebes. Im ersten Schritt werden die Kerne mit einer Hämatoxylinlösung gefärbt, die blau oder dunkelviolett bis schwarz erscheinen. Der zweite Schritt ist die Gegenfärbung mit einem Xanthen- Farbstoff wie z.B. Eosin G, Eosin B oder Erythrosin B. Dabei werden Zytoplasma, Kollagen, Keratin und Erythrozyten rosa oder rot gefärbt. Die Trichromfärbung nach Masson liefert sehr kräftige Färbungen. Wie bei anderen Färbungen auch werden Nerven- und Gefäßstrukturen am deutlichsten hervorgehoben mit dem Unterschied, dass alle Farben intensiver wirken als

im HE-Präparat: Die Odontoblasten erscheinen in einem dunklen Lila, ihre einzelnen Fortsätze sind gut zu erkennen. Dieselbe Farbe zeigen die Endothelzellen der Arterien und Venolen; die dicht darum angeordneten Kollagenfasern sind dunkelblau. Im Gegensatz dazu sind die fibrillären Netzwerke in der Zahnpulpa in blau und hellem Lila dargestellt. Eine positive Färbung durch van Kossa erbringt den Nachweis kalkhaltiger und kalkproduzierender Zellen und ist spezifisch für Osteoblasten. Die van Kossa-Färbung besteht aus einer Färbung mit Silbernitrat und der Gegenfärbung durch Kernechtrot. Durch das Silbernitrat nehmen kalkhaltige Substanzen eine dunkelgraue bis tiefschwarze Farbe an. Mit der Gegenfärbung durch Kernechtrot werden die Zellen, v.a. deren Zellkerne, rötlich angefärbt.

4.2.7. Quantitative Real-Time PCR

Um den Effekt der osteogenen Induktion auf die Expression der Gene für Differenzierung, Matrixbildung und Mineralisation festzustellen wurde eine quantitative real-time Polymerase Ketten Reaktion (RT-PCR) für die Zellen nach 28 Tagen in Kultur durchgeführt. 5 Gele wurden gepoolt und die RNA mit Hilfe des RNA Stat60 für die reverse Transkription extrahiert. Diese wurde entsprechend der Standardprotokolle für die cDNA-Synthese anhand eines oligo-dT Primers umgeschrieben. Verwendet wurden 100 ng RNA, was cDNA für 10 RT-PCR zur Verfügung stellt. Die folgenden Gene, die für Osteoblasten- und Odontoblastendifferenzierung relevant sind, wurden untersucht: Kollagen $\alpha 1(I)$ (Col I), Kollagen III (Col III), Matrix-Metalloproteinase 2 (MMP-2), Bone Sialoprotein (Bsp), Osteokalzin (Oc), Runx2 (Runx2), Dentin Sialophosphoprotein (Dspp) und Dentin Matrixprotein 1 (Dmp-1). Die dafür notwendige Software lieferte Primer 3 [145]. Vor der Quantifizierung wurde die Primereffizienz bestimmt.

Die Real-Time PCR wurde wie folgt angewandt:

Nach Denaturierung bei 95° C für 15 Minuten wurden 60 Zyklen bei 95° C (15 sek), 58° C (30 sek), 72° C (30 sek) und einem abschließenden Dissoziationsschritt zum Erhalt des Dissoziationsprofils der PCR Produkte durchgeführt. Die Reaktionen wurden in dreifacher Ausfertigung angesetzt und die Genexpression anhand des DNA-Farbstoffes SYBR green quantifiziert. Zur Normalisierung wurde das Housekeeping-Gen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) verwendet. Mit Hilfe der Pfaffl-Methode für relative Quantifizierung bei der RT-PCR wurde der Multiplikationsfaktor der Genexpression zwischen den Kontrollproben und den behandelten Gelen errechnet.

Die RT-PCR stellt eine Methode zur zuverlässigen und exakten Quantifizierung spezifischer mRNA dar. Um die Methode nach Pfaffl zu verstehen, werden im folgenden Text im Wesentlichen die effizienzkorrigierte relative Quantifizierung, die Normalisierung der Expressionsergebnisse anhand eines nicht regulierten „Housekeeping Gens“, die Berechnung der RT-PCR Effizienz, sowie die Verrechnung und statistische Auswertung der Expressionsergebnisse erläutert.

In der hier vorgestellten Arbeit wurde das Prinzip der relativen Quantifizierung angewandt. Hierbei wird die Genexpression eines Zielgens auf ein weiteres, nicht reguliertes „Housekeeping Gen“, hier GAPDH, bezogen. Man nennt diesen Vorgang auch Normalisierung der Expressionsergebnisse [146]. In der RT-PCR wird heute nicht mehr primär in DNA Produktmengen oder – konzentrationen gerechnet, sondern als Maß für die Quantifizierung der Startmenge werden die sog. Ct oder CP (= Crossing Point)-Werte herangezogen. Sie entsprechen der Anzahl der PCR Zyklen, die nötig sind, um ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau zu erreichen. Am CP befindet sich in allen Reaktionsgefäßen die gleiche Menge an neu synthetisierter DNA. Im Falle einer 100 % Effizienz der PCR verdoppelt sich mit jedem Zyklus die DNA Produktmenge und analog dazu das

Fluoreszenzsignal. Ein um eine Einheit geringerer CP entspricht der doppelten Menge eingesetzter cDNA und respektive mRNA Startmenge.

Nun wird die Expression der Zielgene mit der eines nicht regulierten Housekeeping-Gens normalisiert. Dabei werden nicht die absoluten Startkopienzahlen oder -konzentrationen bestimmt, sondern die Expression des zu untersuchenden Gens wird auf ein zweites, ubiquitär und homogen exprimiertes Gen bezogen. Die Vorteile der Normalisierung liegen in der Reduzierung der Varianz der Expressionsergebnisse, da Gewebe- und Matrixeffekte, unterschiedliche RNA Extraktionseffizienzen sowie Fehler bei der RT innerhalb einer experimentellen Probe gleichermaßen das Zielgen und das Housekeeping Gen betreffen. In den folgenden Berechnungen des Expressionsunterschiedes heben sich diese individuellen Probeneffekte wieder auf. GAPDH, ribosomale Untereinheiten (18S und 28S), Ubiquitin, Histon Untereinheiten und β -Aktin sind wohl die geläufigsten HKG die zur Normalisierung herangezogen werden. Die relative Expression des zu untersuchenden Gens in den behandelten experimentellen Proben wird auf ein Kontrollprobenmaterial bezogen. Die Berechnung des Expressionsunterschiedes (Ratio) kann über die sog. $\Delta\Delta$ CP Methode erfolgen. Dabei wird im ersten Schritt für jede untersuchte Probe der CP-Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert ($\Delta CP = CP \text{ Zielgen} - CP \text{ Referenzgen}$). Nach dieser Normierung wird vom ΔCP Wert der experimentell behandelten Proben der ΔCP Wert einer Kontrolle abgezogen ($\Delta\Delta CP$); man kommt zum sog. „delta-delta CP“ Berechnungsmodell. Der relative Expressionsunterschied einer Probe zwischen der Behandlung und der Kontrolle (Ratio), normalisiert zum Referenzgen und bezogen auf eine Standardprobe, ergibt sich aus der arithmetischen Formel $2^{-\Delta\Delta CP}$ [147].

$$\begin{aligned}\Delta CP &= CP \text{ Zielgen} - CP \text{ Referenzgen} \\ \Delta\Delta CP &= \Delta CP \text{ Behandlung} - \Delta CP \text{ Kontrolle} \\ \text{Ratio} &= 2^{-\Delta\Delta CP}\end{aligned}$$

Dieses Berechnungsschema setzt eine Verdoppelung der DNA Menge in jedem Zyklus voraus. Man geht von einer optimalen RT-PCR Effizienz in allen Proben aus, was natürlich nicht der Praxis entspricht. Die „wahre RT-PCR Effizienz“ dürfte sich unter optimierten Reaktionsbedingungen im Bereich von 1,7 bis 1,9 bewegen und weist Schwankungsbreiten von 1,5 bis über 2,0 auf. Geringste Schwankungen in den Effizienzen von Zielgen zu Referenzgen führen zu enormen Expressionsunterschieden [148]. Die Effizienz der Primer kann jedoch in einem Vorversuch ermittelt und für die Berechnung herangezogen werden. In der Regel wird eine Standardkurve aus unterschiedlichen Verdünnungsstufen erstellt [146], aus dessen Steigung die RT-PCR Effizienz bestimmt werden kann.

Das Berechnungsmodell setzt sich aus der Berechnung des Expressionsunterschiedes zwischen Behandlung und Kontrolle im Zielgen im Zähler und aus der Berechnung des Expressionsunterschiedes des Referenzgens im Nenner zusammen.

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{Zielgen}})^{\Delta \text{CP}_{\text{Zielgen}} (\text{Kontrolle} - \text{Behandlung})}}{(E_{\text{Referenzgen}})^{\Delta \text{CP}_{\text{Referenzgen}} (\text{Kontrolle} - \text{Behandlung})}}$$

Idealerweise ist das Referenzgen nicht reguliert und sowohl in der Behandlung als auch in der Kontrolle sind die Cts identisch, d.h. die Cts heben sich in der Berechnungsformel auf. Der Nenner wird gleich eins, das Referenzgen fällt heraus und die berechnete Ratio ist nur von den Expressionsunterschieden des Zielgens abhängig.

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{Zielgen}})^{\Delta \text{CP}_{\text{Zielgen}} (\text{Kontrolle} - \text{Behandlung})}}{(E_{\text{Referenzgen}})^0}$$

$$\text{Ratio} = (E_{\text{Zielgen}})^{\Delta \text{CP}_{\text{Zielgen}} (\text{Kontrolle} - \text{Behandlung})}$$

4.3. Datenverarbeitung

Für die Versuche zur Zellvitalität und Proliferation wurden jeweils Triplikate ausgesät, die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden berechnet und die Zellproliferation graphisch dargestellt.

Zur Aktivität der Alkalischen Phosphatase wurden zwei unabhängige Versuche mit jeweils 3 Stichproben durchgeführt ($n = 6$). Die Alkalische-Phosphatase-Aktivität wurde dabei auf die zugehörigen Zellzahlen aus dem Proliferationstest normalisiert und pro 1000 Zellen pro Stunde berechnet. Die Ergebnisse wurden graphisch dargestellt.

Für die quantitative Bestimmung der Genexpression mittels RT-PCR wurden ebenfalls Triplikate angesetzt. Die Veränderung der Genexpression in Bezug auf die unbehandelte Kontrolle (= 1) wurde graphisch dargestellt.

5. Ergebnisse

5.1. Zellvitalität und Proliferation

Zellvitalitäts- und Zellproliferationsversuche lieferten übereinstimmende Kurvenverläufe. Die graphische Darstellung der Zellproliferation ist in Abbildung 6 gezeigt. Alle drei Stammzelltypen bleiben über den gesamten Untersuchungszeitraum von vier Wochen vital und die Zellzahl in Fibringelen nimmt zu. Ein Plateau ist bei den dentalen Stammzellen nach etwa 3 Wochen erreicht. Insgesamt zeigen SHEDs die höchsten Zellzahlen. Insgesamt kann hier ein Anstieg der Zellzahlen um das etwa 20-fache festgestellt werden. Die Knochenmarksstammzellen (BMSSCs), welche hier als Kontrolle mitaufgeführt wurden, zeigen die niedrigste Proliferationsrate.

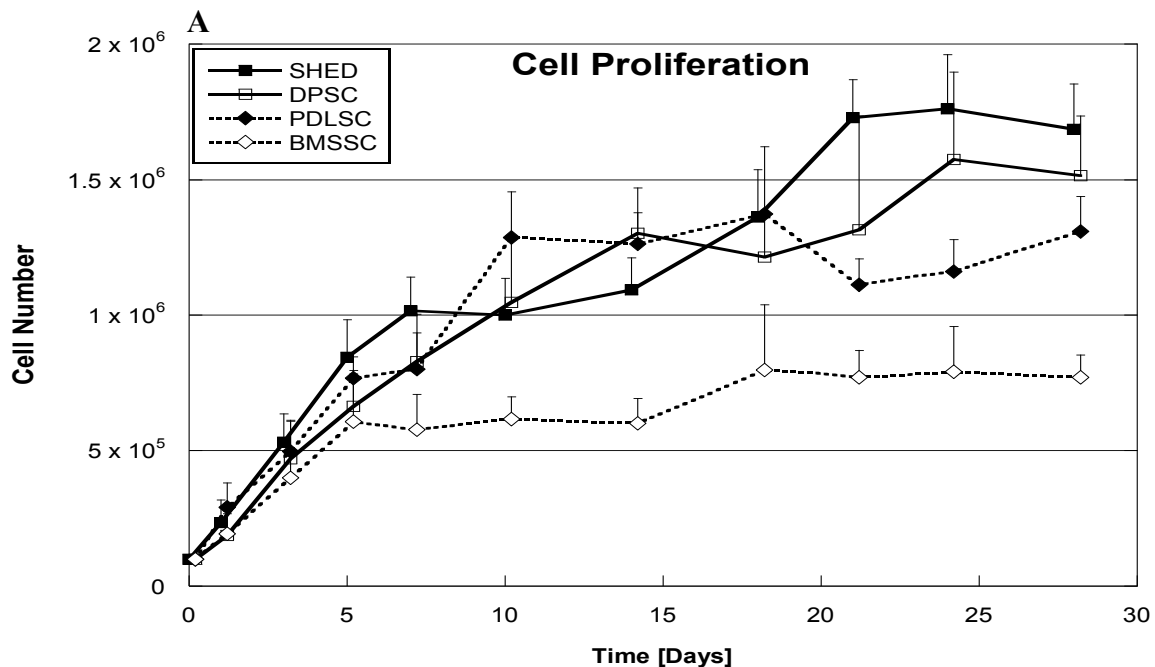


Abb.6: Zellzahlen der SHEDs, DPSCs und PDLSCs zu verschiedenen Zeitpunkten während der vierwöchigen Kulturperiode in PEGyliertem Fibrin. BMSSCs dienen als Kontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen ($n = 3$).

5.2. Alkalische Phosphatase Aktivität

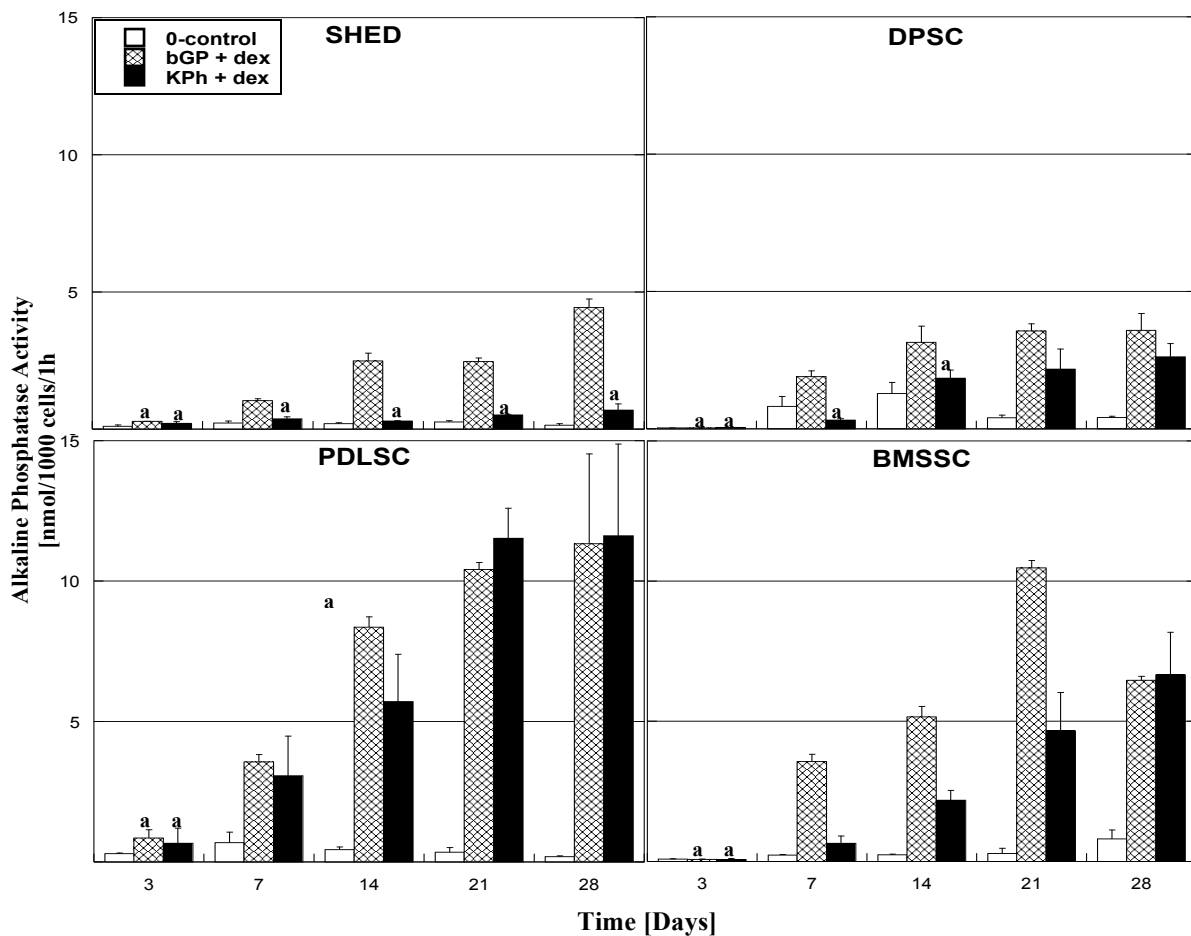


Abb.7: Alkalische Phosphatase Aktivität bei SHEDs (A), DPSCs (B) und PDLSCs (C) und BMSSCs (D) für die Kontrollgruppe und nach Zugabe der osteogenen Zusätze. Bei allen Zelllinien konnte generell eine erhöhte ALP-Aktivität der behandelten Gruppen festgestellt werden. β GP + dex und KPh + dex zeigten bei den DPSCs und PDLSCs ähnliche Ergebnisse, SHEDs erhöhen die ALP-Werte mit β GP + dex, nicht aber mit KPh + dex. Bei den PDLSCs konnte im Vergleich zu SHEDs und DPSCs ein deutlicher Anstieg der ALP-Aktivität beobachtet werden. Die Werte der ALP-Aktivität für die Kontrollgruppe der DPSCs waren höher als die der SHEDs und PDLSCs. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen ($n = 6$).

Quantitative Messungen ergaben höhere ALP-Werte für die mit osteogenen Zusätzen behandelten Zellen in PEGyliertem Fibrin. Der höchste Anstieg war bei PDLSCs festzustellen, wo das Niveau an Alkalischer Phosphatase im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe um das 50-fache anstieg. DPSCs und SHEDs zeigten eine Erhöhung um das 20-fache, wobei beide auf Behandlung mit β GP + dex mit höherer ALP Aktivität reagieren als

auf Behandlung mit KPh + dex. Bei SHEDs wird die ALP Aktivität mit KPh + dex im Vergleich zur Kontrollgruppe nur unwesentlich gesteigert. Die ALP Aktivität der vier Stammzelltypen über den Versuchszeitraum von 4 Wochen ist in Abbildung 7 zusammengefasst.

5.3. Zelldifferenzierung

Die Analyse der Expression von Markergenen für Osteoblasten- und Odontoblasten zeigt bei allen Stammzelltypen einen Anstieg der Genexpression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nach 28 Tagen in Kultur. Kollagen I und III, die für extrazelluläre Matrixkomponenten kodieren, zeigten mit beiden osteogenen Zusätzen ähnliche Werte, wobei die Kollagen I - Expression bei den SHEDs mit KPh + dex etwas höher ist als mit β GP + dex. Insgesamt etwas geringer fällt die Kollagen I – Expression bei den PDLSCs aus, wo aber mit β GP eine etwas höhere Expression nachweisbar ist als mit KPh + dex. Kollagen III hingegen zeigt bei den PDLSCs eine Steigerung um den Faktor 15 bei Zugabe von β GP zum Medium, bei SHEDs ist diese um zwei Drittel geringer. KPh + dex wirkt sich allgemein etwas schwächer aus. Das für den Ab- und Umbau der Extrazellulärmatrix verantwortliche MMP-2 kann mit osteogenen Zusätzen kaum stimuliert werden. Die späten Osteoblastenmarker Bsp, Oc und Runx2 werden bei allen Zellgruppen vor allem durch KPh + dex stimuliert. Die Erhöhung der Expression von Bsp und Oc war bei den DPSCs und PDLSCs, die von Runx2 bei den SHEDs am deutlichsten. Dspp und Dmp-1, beides spezifische Differenzierungsmarker der dentinbildenden Zellen, sind nach Behandlung bei den SHEDs etwas stärker erhöht als bei den DPSCs. Hierbei wirken sich beide osteogenen Zusätze in ähnlicher Weise auf die Expression dieser Gene aus. Von PDLSCs wurde der Marker Dspp nicht exprimiert und die Werte für Dmp-1 blieben im Vergleich zur Kontrolle unverändert. Die Zusammenfassung der Ergebnisse der Genexpressionsanalyse ist in Abbildung 8 grafisch dargestellt.

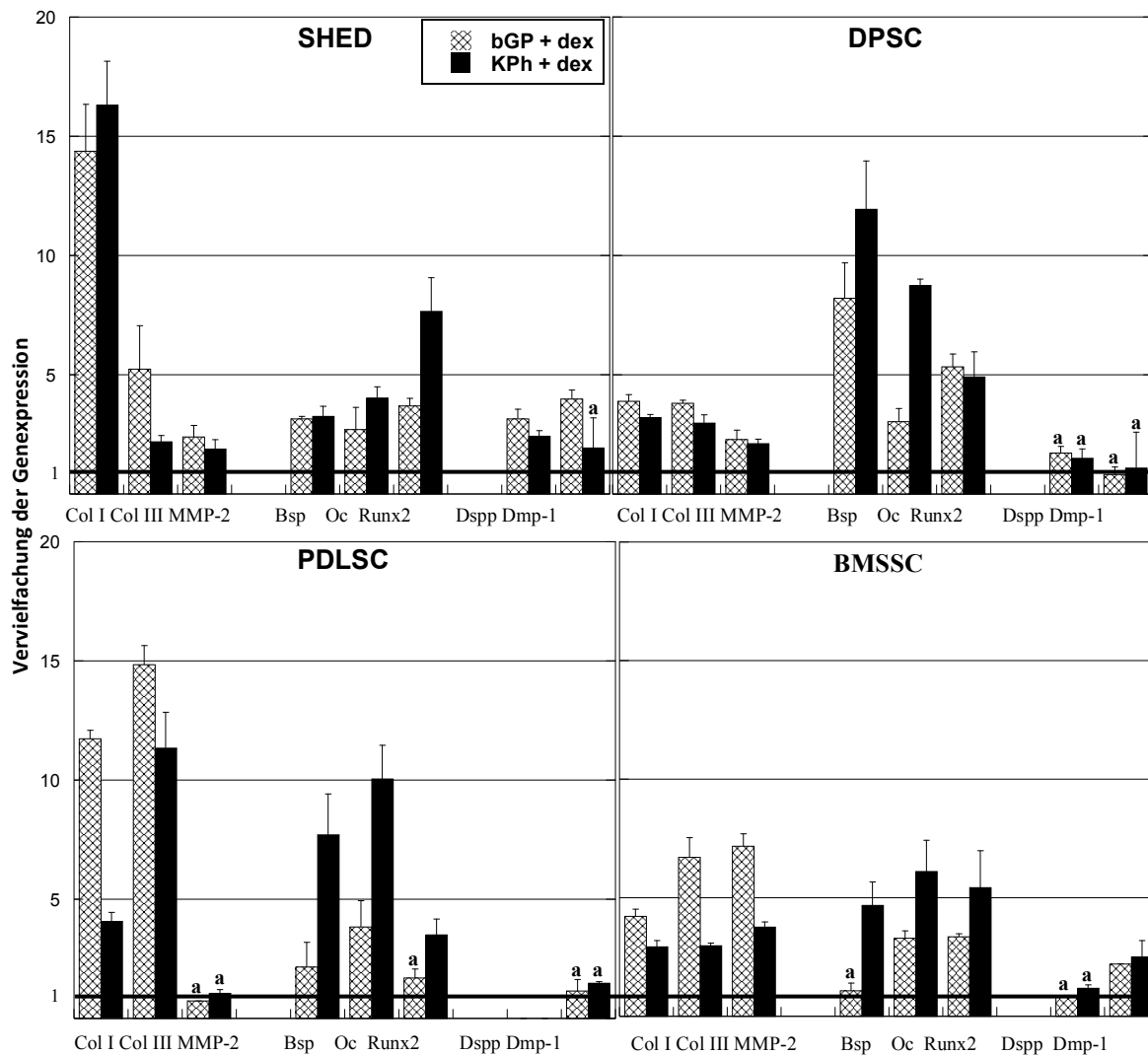


Abb.8: Genexpressionsprofil für die vier Zellgruppen vier Wochen nach osteogener Induktion. Der Wert der unbehandelten Gruppen wurde auf 1 gesetzt (durchgezogene Linie). Die Ordinate zeigt die Vervielfachung der Genexpression gegenüber den unbehandelten Kontrollgruppen. Die Fehlerbalken stellen die zugehörigen Standardabweichungen dar ($n = 3$). SHEDs und PDLSCs zeigen eine verstärkte Zunahme der Kollagenexpression; MMP-2 als Indikator für Matrixremodellation ist bei den SHEDs und DPSCs leicht erhöht, nicht aber bei den PDLSCs. Die späten Osteoblastenmarker Bsp, Oc und Runx2 zeigen einen Anstieg bei allen Zelllinien, wobei dieser mit KPh + dex größer ist als mit β GP + dex. Die spezifischen Marker für Dentin, Dspp und Dmp-1, steigen etwas an bei den SHEDs, nicht aber bei den DPSCs. Für die PDLSCs konnte keine messbare Expression von Dspp festgestellt werden. (Col I = Kollagen α I (I) , Col II = Kollagen III , MMP-2 = Matrix-Metalloprotease 2 , Bsp = Bone Sialoprotein , Oc = Osteokalzin , Runx2 = Runx2 , Dspp = Dentin Sialophosphoprotein, Dmp-1 = Dentin-Matrixprotein I)

5.4. Histologische Analyse

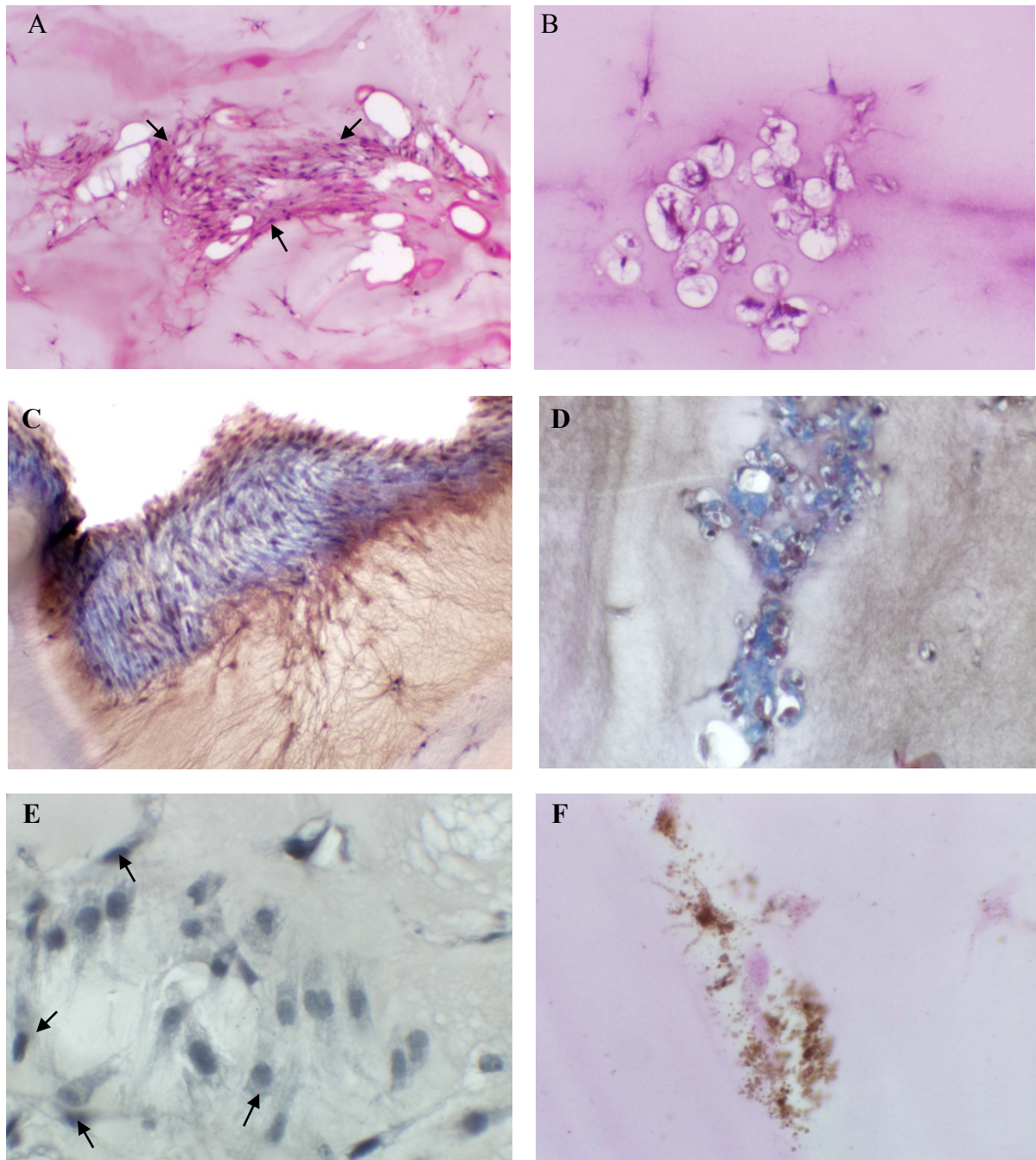


Abb.9: Histologische Bilder verschiedener Stammzelltypen in PEGyliertem Fibrin nach 4 Wochen in Kultur. (A) SHEDs zeigen fibroblastenähnliche Morphologie und bilden Cluster (Anhäufungen) im Gel (Pfeil) [HE-Färbung]. (B) DPSCs erscheinen runder und osteoblastenähnlich, das Gel um die Zellen ist bereits abgebaut [HE-Färbung]. (C) PDLSCs ähneln SHEDs hinsichtlich der Zellmorphologie und produzieren viel Kollagen [Masson's Trichrom]. (D) Kollagenproduktion der DPSCs um die Zellkörper herum [Masson's Trichrom]. (E) PDLSCs zeigen die höchste Intensität (dunkles Zytoplasma) bei Färbung für ALP-Aktivität (Pfeile). (F) Mineralablagerungen um die PDLSCs - Zellen werden nach von Kossa Färbung deutlich.

Die histologischen Untersuchungen zeigen die Zellmorphologie der Stammzelltypen in PEGyliertem Fibrin nach vierwöchiger Kulturzeit. Die Gele erscheinen in der HE-Färbung rosa, in der Masson's Färbung bräunlich-gräulich. SHEDs und PDLSCs weisen eine fibroblastenähnliche, längliche Zellform auf und bilden Zellcluster aus. DPSCs bleiben eher spärlich im Gel verteilt und erinnern mit ihrer runden Form an die Morphologie von Osteoblasten. Sowohl bei PDLSCs als auch bei DPSCs ist nach der Masson's Trichrom Färbung deutlich Kollagen um die Zellen herum sichtbar, die diese nach Abbau des Fibrins synthetisieren. Mineralablagerungen können bei DPSCs und PDLSCs nach Behandlung mit beiden osteogenen Zusätzen beobachtet werden, wobei KPh + dex einen stärkeren Effekt auf die Mineralisation erkennen lassen. Abbildung 9 zeigt einige der histologischen Bilder.

6. Diskussion

In dieser Studie untersuchten wir das Potenzial eines mit PEG modifizierten Fibringels in Kombination mit den drei dentalen Stammzelltypen SHEDs, DPSCs und PDLSCs als Trägersystem für zukünftige zellbasierte Behandlungsmethoden zur Regeneration dentaler Strukturen. Als Kontrollzellen wurden BMSSCs mitgeführt. Nachgewiesen wurde hierbei, dass die Zellen vital bleiben und proliferieren, die Fibrin-Matrix abbauen und durch eigene Extrazellulärmatrix (Kollagen) ersetzen. Nach Zugabe osteogener Zusätze zum Zellkulturmedium kommt es zur Steigerung der Expression von mineralisations-assoziierten Genen als auch zu erhöhter Mineralisationsablagerung. Unterschiede hinsichtlich Zellmorphologie, Bildung extrazellulärer Matrix und Mineralisation konnten sowohl in Abhängigkeit vom Zelltypus als auch von den Zusätzen beobachtet werden.

Die Ergebnisse für die höheren Proliferationsraten bei den SHEDs im Vergleich zu den BMSSCs und DPSCs wurden bereits zuvor beschrieben [42] und stimmen mit denen früherer

Untersuchungen [149] überein. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass SHEDs eine noch unausgereifere Zellpopulation sind, wie bereits von Miura et al. [42] postuliert wurde, und dass DPSCs im Differenzierungsprozess bereits weiter fortgeschritten sind. Hierin mag sich auch die physiologische Aktivität der Zellen in den entsprechenden Ausgangsgeweben widerspiegeln, wo sich die Zellpopulation der Milchzähne von denen bleibender Zähne unterscheidet. Pulpazellen der Milchzähne sind weniger zur Bildung von Reparaturdentin befähigt [150], scheinen aber aktiv bei Knochenresorptionsprozessen zur Förderung des Durchbruchs der bleibenden Zähne involviert zu sein [151]. Die Pulpa bleibender Zähne besitzt ein größeres Potenzial zur Tertärdentinbildung, was anhand des Phänomens der direkten Pulpaüberkappung erklärt werden kann [152]. Die histologischen Beobachtungen dieser Arbeit zeigen bei SHEDs deutlich weniger Mineralablagerungen verglichen mit DPSCs und PDLSCs, was sich mit den klinischen Beobachtungen deckt. Die alkalische Phosphatase-Aktivität als Indikator bereits früh nachweisbarer Mineralisation erhöht sich jedoch nach Zugabe von β GP + dex über den Versuchszeitraum bei allen drei Zellgruppen und der Unterschied zu den unbehandelten Gruppen sieben Tage nach Kultivierung ist signifikant. Erstaunlicherweise hat KPh + dex nur einen geringen Effekt auf die ALP-Aktivität bei SHEDs, obwohl es bei DPSCs und PDLSCs einen deutlichen Anstieg verursacht. Allerdings ist die Alkalische Phosphatase ein früher Marker des Differenzierungsprozesses und lässt nicht notwendigerweise auf die terminale Differenzierung schließen.

Das Genexpressionsprofil unterscheidet sich in Abhängigkeit vom osteogenen Zusatz bei allen drei Zelllinien. SHEDs und PDLSCs erhöhen die Expression von Kollagen I und III erheblich. Bestätigt wird dies auch in der histologischen Färbung, wo Kollagenablagerungen nach Masson's Trichrom sichtbar gemacht werden können.

Der Anstieg später Differenzierungsmarker kann bei DPSCs und PDLSCs beobachtet werden, was aber wiederum frühere Ergebnisse bestätigt, bei der SHEDs eine geringer ausgereifte Zellpopulation darstellen. Generell hat die Zugabe von Kaliumphosphat mit Dexamethason

größeren Einfluß auf diese Marker, wie z.B. Bsp, Oc und Runx2. Die Unterschiede im Expressionsniveau der dentinspezifischen Proteine Dspg und Dmp-1 waren nicht signifikant. PDLSCs konnten Dspg nicht nachweislich exprimieren, was insofern nachvollziehbar erscheint, als dass die biologische Aufgabe der Zellen des parodontalen Ligaments nicht - wie es bei den Pulpazellen der Fall ist - in der Produktion von Dentin besteht. Das Mineralisationspotenzial ist bei Betrachtung der histologischen Ergebnisse bei DPSCs und PDLSCs höher als bei SHEDs, die mit Kaliumphosphat und Dexamethason nur wenig, und mit β -Glycerophosphat und Dexamethason keine Mineralisation zeigten. Folger lässt sich daraus, dass Kaliumphosphat möglicherweise als Zusatz die Mineralablagerung intensiver stimuliert als β -Glycerophosphat.

Die zahlreichen Möglichkeiten und Anwendungsbereiche von mesenchymalen dentalen Stammzellen haben in letzter Zeit immer mehr an Aufmerksamkeit erregt, und ihre klinische Anwendbarkeit wird anhand neuer Studien weiter erforscht. Die Eigenschaften der Zellen sind mittlerweile gut erforscht, die Zellen können auf einfache Art und Weise gewonnen werden, in der Regel mit minimal-invasiven Eingriffen bzw. in Kombination mit Behandlungen, die aus zahnärztlicher Sicht sowieso erforderlich wären. Bemerkenswert ist außerdem, dass diese Zellen immunsuppressive Funktionen ausüben, ähnlich wie die mesenchymalen Knochenmarkstammzellen (BMSSCs), was im Hinblick auf die Verwendung von allogenen Zellen zur Transplantation vielversprechend erscheint [153].

Darüber hinaus fungiert anscheinend die Vaskulogenese in der Pulpa als „angeborenes“ Programm und reguliert fortlaufend die Blutgefäßstruktur [154;155], wobei Pulpastammzellen angiogenetische Faktoren wie FGF-2 und VEGF [155] exprimieren und die vermehrte Bildung von Blutgefäßen stimulieren [156;157]. Aus diesem Grund wurden dentale Stammzellen bereits für zahlreiche Anwendungen im Tissue Engineering erforscht. Sät man DPSCs auf einen mit Dmp-1 versetzten Kollagenträger und bringt diese in die Pulpakammer

von Zahnschnitten mit anschließender Transplantation *in vivo*, so kann die Neubildung sowohl von Pulpagewebe als auch von Blutgefäßen beobachtet werden [158]. Induktion von DPSCs in einem spezifischen Kulturmedium über einen Zeitraum von drei Wochen führte vor Implantation im Tiermodell zu fortschreitender Zelldifferenzierung auf den Kollagenträgern [159]. DPSCs können unter entsprechenden Bedingungen auch lamellären Knochen mit Haverschen Kanälen und entsprechenden Blutgefäßen bilden [160]. Werden PDLSCs zusammen mit SCAPs (stem cells from apical papilla), einer weiteren Stammzelllinie, auf Hydroxylapatitträgern gesät, führt dies bei Implantation im Alveolarknochen von Mischweinen zur Bildung von parodontalem Ligament und bietet ausreichenden Halt für die später zementierte Keramikstiftkrone [44].

Abschließend kann gesagt werden, dass PEG-basiertes Fibrinogen als Zellträger ein durchaus geeignetes Material darstellt. Eine gleichmäßige Verteilung der Zellen im Gel ist möglich und das Gel kann leicht in kleine Defekte in der Mundhöhle injiziert werden. Vorangehende Studien haben gezeigt, dass die Kompatibilität sowohl embryonaler als auch postnataler mesenchymaler Stammzellen mit dem PEG-Fibrinogen gewährleistet ist [143;161]. Die vorliegende Arbeit zeigt in Übereinstimmung mit diesen Untersuchungen eine sehr gute Kompatibilität der mesenchymalen dentalen Stammzellen mit diesem Material. Desweiteren ist auch die Zelldifferenzierung in PEGyliertem Fibrin möglich. Sollten die osteogenen Zusätze nicht mehr wie in diesem Modell, kontinuierlich zugegeben werden, so bietet Fibrin auch die Möglichkeit, diese Faktoren durch Modifikation des Materials direkt einzubinden [83].

Die hier gezeigten Ergebnisse lassen darauf schließen, dass PEGyliertes Fibrin in Kombination mit dentalen Stammzellen durchaus vielversprechende Ansätze für zukünftige zellbasierte Therapien im Bereich des kraniofazialen Tissue Engineering bietet. Dank seiner vorteilhaften Materialeigenschaften könnte das PEG-Fibrinogen bisher genutzte Trägermaterialien wie Kollagen ersetzen und beispielsweise als Verfahren zur Applikation

der Zellen in kleine Defekte zur Regeneration von Dentin oder parodontalem Ligament genutzt werden. Aufgrund dieser bisherigen Kenntnisse wird man künftig anhand von *in vivo* Studien das Potenzial dieses Trägersystems noch weiter prüfen und verifizieren müssen.

7. Zusammenfassung

Dentale Stammzellen wurden aus verschiedenen Zahngeweben gewonnen und sind in der Lage in verschiedene Zelltypen zu differenzieren. Sie können nach ihrer Transplantation *in vivo* sowohl Dentin-Pulpa-ähnliche Komplexe als auch dem parodontalen Ligament ähnelnde Strukturen bilden. Hierzu wurden bereits charakterisierte, mesenchymale Stammzellen aus drei unterschiedlichen dentalen Geweben mit einem PEGylierten Fibringel kombiniert, um die Bedeutung dieses Trägersystems für künftige regenerative Behandlungsmethoden in der Zahnmedizin hervorzuheben. Ziel war es, die Proliferations- und Differenzierungsfähigkeit zu bewerten, indem Stammzellen aus der Pulpa humaner Milchzähne (SHEDs), dentale Pulpa-Stammzellen (DPSCs) und Stammzellen aus dem parodontalen Ligament (PDLSCs) mit verschiedenen osteogenen Zusätzen behandelt wurden. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Zellvitalität, Proliferation und alkalische Phosphatase-Aktivität untersucht. Die RNA wurde nach 4 Wochen extrahiert und anschließend eine quantitative real-time PCR zur Bestimmung von Markergenen, die für Odontoblastendifferenzierung verantwortlich sind, durchgeführt. Für die histologische Analyse bediente man sich der H&E, Masson's und von Kossa Färbung. Über einen Zeitraum von 28 Tagen konnte eine fortlaufende Proliferation der Zellen im Fibringel beobachtet werden. Nach Zugabe der osteogenen Zusätze (β -GP+*dex* und KPh+*dex*) zeigten SHEDs und DPSCs eine 20-fach höhere, PDLSCs eine sogar 50-fach höhere ALP-Aktivität. Ein Wachstum bei der Produktion der Gene, die für Odontoblasten spezifisch sind, konnte bei allen Zelllinien konstatiert werden. Die Histologie zeigte Fibrinabbau und Produktion von Kollagenmatrix, wohingegen Mineralablagerungen nach

Behandlung mit osteogenen Zusätzen sichtbar wurden. Letztendlich kann gesagt werden, dass Fibringele das Wachstum und die Differenzierung der 3 Stammzelllinien ermöglichen und darüberhinaus die mechanischen Eigenschaften des Fibrins es zu einem durchaus vielversprechenden Trägersystem zur Injektion in kleine Defekte machen.

8. Literaturverzeichnis

- [1] Pispa J, Thesleff I: Mechanisms of ectodermal organogenesis. *Dev Biol*, 262: 195–205 (2003).
- [2] Bloch-Zupan A: Genetische Störungen der Zahnentwicklung und Dentition. *Medizinische Genetik*, 19: 399–406 (2007).
- [3] Moore K L, Persaud T V N: Embryologie (Entwicklungsstadien – Frühentwicklung – Organogenese– Klinik). Elsevier Urban & Fischer, (2007).
- [4] Hacking S A, Khademhosseini A: Applications of microscale technologies for regenerative dentistry. *J Dent Res*, 88: 409–421 (2009).
- [5] Schröder H E: Orale Strukturbilogie. Thieme Verlag, (2000).
- [6] Bluteau G, Luder H U, De Bari C, Mitsiadis T A: Stem cells for tooth engineering. *Eur Cell Mater*, 16: 1–9 (2008).
- [7] Koch M J: Entwicklung der Zähne. *Medizinische Genetik*, 19: 392–398 (2007)
- [8] Goldberg M, Smith A J. Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: a biological basis for repair and tissue engineering. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004; 15: 13-27.
- [9] Petersen P E. The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century – the approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Community Dent Oral Epidemiol.*, 31: 3-23 (2003).
- [10] Petersen P E. World Health Organisation global policy for improvement of oral health – World Health Assembly 2007. *Int Dent J.*, 58: 115-21 (2008).
- [11] Bonassar L J, Vacanti C A. Tissue engineering: the first decade and beyond. *J Cell Biochem Suppl* 1998; 30-31: 297-303.
- [12] Toni Lindl, Gerhard Gstraunthaler: Zell- und Gewebekultur: Von den Grundlagen zur Laborbank. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2008.
- [13] Skalak R and Fox C F. Tissue Engineering. Preface P .xx. New York, Alan R. Riss (1988).
- [14] Minuth W W, Strehl R, Schumacher K. Von der Zellkultur zum Tissue engineering. Lengerich: Pabst Science Publishers; 2002.
- [15] K. Andreas, C. Lübke, T. Häupl u.a.: Key regulatory molecules of cartilage destruction in rheumatoid arthritis: an in vitro study. In: Arthritis research and therapy. Ausgabe v10n1, Januar 2008, BioMed Central, London 2008.
- [16] Mooney D J, Mikos A G. Growing new organs. *Sci Am.*, 1999, 280: 60-5
- [17] Bone tissue engineering: hope vs hype, Rose F R, Oreffo R O, *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Mar 22;292(1):1-7. Review.
- [18] Herzog, E. L., Chai, L. and Krause, D. S. (2003). Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood* 102, 3483-3493.
- [19] Goodell, M. A. (2003). Stem-cell "plasticity": befuddled by the muddle. *Curr. Opin. Hematol.* 10, 208-213.
- [20] Morrison, Shah et al. 1997, Regulatory mechanisms in stem cell biology, *Cell*, 88: 287-298
- [21] Morsczeck C, Reichert T E, Vollner F, Gerlach T, Driemel O: The state of the art in human dental stem cell research. *Mund Kiefer Gesichtschir* 11: 259–266 (2007).
- [22] Cowan C A, Klimanskaya I, McMahon J, Atienza J, Witmyer J, Zucker J P, Wang S, Morton C C, McMahon A P, Powers D, Melton D A: Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. *N Engl J Med* 350: 1353–1356 (2004).
- [23] Terskikh A V, Bryant P J, Schwartz P H: Mammalian stem cells. *Pediatr Res* 59: 13R–20R (2006).

- [24] Honda M J, Fong H, Iwatsuki S, Sumita Y, Sarikaya M: Tooth-forming potential in embryonic and postnatal tooth bud cells. *Med Mol Morphol* 41: 183–192 (2008).
- [25] Kang H K, Roh S, Lee G, Hong S D, Kang H, Min B M: Osteogenic potential of embryonic stem cells in tooth sockets. *Int J Mol Med* 21: 539–544 (2008).
- [26] Zhu F, Nie R R, Wu L, Liu L, Tang W, Tian W D: Spontaneous odontogenic differentiation and critical gene expression of mouse dental papilla mesenchymal cell in vitro. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 39: 286–289, 297 (2008).
- [27] Ikeda E, Morita R, Nakao K, Ishida K, Nakamura T, Takano-Yamamoto T, Ogawa M, Minuzo M, Kasugai S, Tsuji T: Fully functional bioengineered tooth replacement as an organ replacement therapy. *PNAS* 106: 13475–13480 (2009).
- [28] Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., & Mosca, J. D. (1999), *Science*, 284: 143-147.
- [29] Noll T: Stammzellen – Möglichkeiten ihrer Expansion am Beispiel hämatopoetischer Stammzellen aus Nabelschnurblut. *Medizinische Klinik* 98: 7–10 (2003).
- [30] d'Aquino R, De Rosa A, Laino G, Caruso F, Guida L, Rullo R, Checchi V, Laino L, Tirino V, Papaccio G: Human dental pulp stem cells: from biology to clinical applications. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* (2008).
- [31] Kim, H. T., Zaffagnini, S., Mizuno, S., Abelow, S., Safran, M. R. A peek into the possible future of management of articular cartilage injuries: gene therapy and scaffolds for cartilage repair. *J Orthop. Sports Phys. Ther.* (2006) 36: 765 - 773
- [32] Colosimo, A., Goncz, K. K., Holmes, A. R., Kunzelmann, K., Novelli, G., Malone, R. W., Bennett, M. J. and Gruenert, D. C. (2000). Transfer and expression of foreign genes in mammalian cells. *Biotechniques* 29, 314-2, 324.
- [33] Franziska L. Ulmer, Andreas Winkel, Philipp Kohorst, Meike Stiesch: *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 120; S. 865 (2010).
- [34] Friedenstein A. J., Petrakova, K. V., & Kurolesova, A. I. (1968), *Transplantation*, 6: 230-247.
- [35] Friedenstein A. J., Chailakhyan, R. K., & Gerasimov, U. V. (1987), *Cell and Tissue Kinetics*, 20: 263-272.
- [36] Shi, S., Bartold, P. M., Miura, M., Seo, B. M., Robey, P. G., & Gronthos, S. (2005), *Orthod Craniofacial Res*, 8: 191-199.
- [37] Tremain, N., Korkko, J., Ibberson, D., Kopen, G. C., DiGirolamo, C., & Phinney, D. G. (2001), *Stem Cells*, 19: 408-418
- [38] Gronthos, S., Zannettino, A. C., Hay, S. J., Shi, S., Graves, S. E., & Kortedisis, A. (2003), *Journal of Cell Science*, 116: 1827-1835.
- [39] Gronthos, S., Mankani, M., Brahim, J., Robey, P. G., & Shi, S. (2000), *PNAS*, 97: 13625-13630.
- [40] Gronthos, S., Brahim, J., Li, W., Fisher, L. W., Cherman, N., Boyde, A., et al. (2002), *Journal of Dental Research*, 81: 531-535.
- [41] Batouli, S., Miura, M., Brahim, J., Tsutsui, T. W., Fisher, L. W., Gronthos, S., et al. (2003), *Journal of Dental Research*, 82: 976-981.
- [42] Miura, M., Gronthos, S., Zhao, M., Lu, B., Fisher, L. W., Robey, P. G., et al. (2003), *PNAS*, 100: 5807-5812.
- [43] Seo, B. M., Miura, M., Gronthos, S., Bartold, P. M., Batouli, S., Young, M., Robey, P. G., Wang, C. Y., Shi, S., Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament, *Lancet* (2004), 364: 149-155.
- [44] Sonoyama, W., Liu, Y., Fang, D., Yamaza, T., Seo, B. M., Zhang, C., Liu, H., Gronthos, S., Wang, C. Y., Shi, S., Wang, S., Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine, *PLoS ONE* (2006), 1: e79.
- [45] Morczek, C., Gotz, W., Scierholz, J., Zeilhofer, F., Kunh, U., Mohl, C., et al. (2005), *Matrix Biology*, 24: 155-165.

- [46] Bartold, P. M., Shi, S., & Gronthos, S. (2006), *Periodontology* 2000, 40: 164-172.
- [47] Shi, S., Robey, P. G., & Gronthos, S. (2001), *Bone*, 29: 532-539.
- [48] Honda M, Sumita Y, Kagami H, Asahina I, Ueda M: Enamel-dentin and dentin-cementum complex structure formation in tooth-tissue regeneration. *Eur Cell Mater* 14: 60 (2007).
- [49] Sumita Y, Tsuchiya S, Asahina I, Kagami H, Honda M J: The location and characteristics of two populations of dental pulp cells affect tooth development. *Eur J Oral Sci* 117: 113–121 (2009).
- [50] Papaccio G, Graziano A, d'Aquino R, Graziano M F, Pirozzi G, Menditti D, de Rosa A, Carinci F, Laino G: Long-term cryopreservation of dental pulp stem cells (SBP-DPSCs) and their differentiated osteoblasts: a cell source for tissue repair. *J Cell Physiol* 208: 319–325 (2006).
- [51] Zhang W, Walboomers X F, Shi S, Fan M, Jansen J A: Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation. *Tissue Eng* 12: 2813–2823 (2006).
- [52] Woods E J, Perry B C, Hockema J J, Larson L, Zhou D, Goebel W S: Optimized cryopreservation method for human dental pulp-derived stem cells and their tissues of origin for banking and clinical use. *Cryobiology* (2009).
- [53] Laino G, d'Aquino R, Graziano A, Lanza V, Carinci F, Naro F, Pirozzi G, Papaccio G: A new population of human adult dental pulp stem cells: a useful source of living autologous fibrous bone tissue (LAB). *J Bone Miner Res* 20: 1394–1402 (2005).
- [54] Kumabe S, Nakatsuka M, Kim G S, Jue S S, Aikawa F, Shin J W, Iwai Y: Human dental pulp cell culture and cell transplantation with an alginate scaffold. *Okajimas Folia Anat Jpn* 82: 147–155 (2006).
- [55] Yang X, Walboomers X F, Van Den Beucken J J, Bian Z, Fan M, Jansen J A: Hard Tissue Formation of STRO-1-Selected Rat Dental Pulp Stem Cells In Vivo. *Tissue Eng Part A* (2008).
- [56] Yu V, Damek-Poprawa M, Nicoll S B, Akintoye S O: Dynamic hydrostatic pressure promotes differentiation of human dental pulp stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* (2009).
- [57] El-Backly R M, Massoud A G, El-Badry A M, Sherif R A, Marei M K: Regeneration of dentine/pulp-like tissue using a dental pulp stem cell/poly(lactic-co-glycolic) acid scaffold construct in New Zealand white rabbits. *Aust Endod J* 34:52–67 (2008).
- [58] Cordeiro, M. M., Dong, Z., Kaneko, T., Zhang, Z., Miyazawa, M., Shi, S., Smith, A. J., Nör, J. E., Dental pulp tissue engineering with stem cells from human exfoliated deciduous teeth, *J Endod* (2008), 34: 962-969.
- [59] Bartold, P. M., McCulloch, C. A., Narayanan, A. S., & Pitaru, S. (2000), *Periodontology* 2000, 24: 253-269.
- [60] Bartold, P. M., & Narayanan, A. S. (2006), *Periodontology* 2000, 40: 29-49.
- [61] Melcher, A. H., (1985), *Annals of the Royal College of Surgeons of England*, 67: 130-131.
- [62] Liu Y, Zheng Y, Ding G, Fang D, Zhang C, Bartold P M, Gronthos S, Shi S, Wang S: Periodontal ligament stem cell-mediated treatment for periodontitis in miniature swine. *Stem Cells* 26: 1065–1073 (2008).
- [63] Whang, K., Tsai, D.C., Nam, E.K., Aitken, M., Sprague, S.M., Patel, P.K., and Healy, K.E. Ectopic bone formation via rhBMP-2 delivery from porous bioabsorbable polymer scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res.* 42, 491, 1998.
- [64] Jockenhoevel, S., Zund, G., Hoerstrup, S.P., Chalabi, K., Sachweh, J.S., Demircan, L., Messmer, B.J., and Turina, M. Fibrin gel—advantages of a new scaffold in cardiovascular tissue engineering. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 19, 424, 2001.

- [65] Mano JF, Silva GA, Azevedo HS, Malafaya PB, Sousa RA, Silva SS, Boesel LF, Oliveira JM, Santos TC, Marques AP, Neves NM, Reis RL. Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: present status and some moving trends. *J R Soc Interface.*, 2007, 4, 999-1030.
- [66] Cummings, C.L., Gawlitta, D., Nerem, R.M., and Stegemann, J.P. Properties of engineered vascular constructs made from collagen, fibrin, and collagen-fibrin mixtures. *Biomaterials* 25, 3699, 2004.
- [67] Williams, C.G., Kim, T.K., Taboas, A., Malik, A., Manson, P., and Elisseeff, J. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in photopolymerizing hydrogel. *Tissue Eng.* 9, 679, 2003.
- [68] Shea LD, Smiley E, Bonadio J, Mooney DJ. DNA delivery from polymer matrices for tissue engineering. *Nat Biotechnol* 1999 Jun;17(6):551-4.
- [69] Hutmacher DW. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* 2000 Dec;21(24):2529-43.
- [70] Zein I, Hutmacher DW, Tan KC, Teoh SH. Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications. *Biomaterials* 2002 Feb;23(4):1169-85.
- [71] Chan, G., Mooney, D. J., New materials for tissue engineering: towards greater control over the biological response, *Trends Biotechnol*, 2008, 26: 382-392.
- [72] Langer, R., Tirrell, D. A., Designing materials for biology and medicine, *Nature*, 2004, 428: 487-492.
- [73] Nicodemus GD, Bryant SJ. Cell encapsulation in biodegradable hydrogels for tissue engineering applications. *Tissue Eng Part B Rev.*, 2008, 14, 149-65.
- [74] Lavik, E., and Langer, R. Tissue engineering: current state and perspectives (mini-review). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65, 1, 2004.
- [75] Ramaswamy, S., Wang, D.A., Fishbein, K.W., Elisseeff, J.H., and Spencer, R.G. An analysis of the integration between articular cartilage and nondegradable hydrogel using magnetic resonance imaging. *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* 77, 144, 2006.
- [76] Ahmed TA, Dare EV, Hincke M. Fibrin: a versatile scaffold for tissue engineering applications. *Tissue Eng Part B Rev.*, 2008, 14, 199-215.
- [77] Mosesson, M.W. Fibrinogen and fibrin structure and functions (review). *J. Thromb. Haemost.* 3, 1894, 2005.
- [78] Mosesson, M.W., Siebenlist, K.R., and Meh, D.A. The structure and biological features of fibrinogen and fibrin. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 936, 11, 2001.
- [79] Horan, J.T., and Francis, C.W. Fibrin degradation products, fibrin monomer and soluble fibrin in disseminated intravascular coagulation. *Semin. Thromb. Hemost.* 27, 657, 2001.
- [80] Schense, J.C., and Hubbell, J.A. Cross-linking exogenous bifunctional peptides into fibrin gels with factor XIIIa. *Bioconjug. Chem.* 10, 75, 1999.
- [81] Dare, E.V., Griffith, M., Poitras, P., Kaupp, J.A., Waldman, S.D., Carlsson, D.J., Dervin, G., Mayoux, C., and Hincke, M.T. Genipin cross-linked fibrin hydrogels for in vitro human articular cartilage tissue engineered regeneration (submitted).
- [82] Spotnitz, W.D., and Prabhu, R. Fibrin sealant tissue adhesive— review and update. *J. Long-Term Eff. Med. Implants* 15, 245, 2005.
- [83] Ahmed, T.A., Griffith, M., and Hincke, M. Characterization and inhibition of fibrin hydrogel-degrading enzymes during development of tissue engineering scaffolds. *Tissue Eng.* 13, 1469, 2007.
- [84] Swartz, D.D., Russel, J.A., and Andreadis, S.T. Engineering of fibrin-based functional and implantable small-diameter blood vessels. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 288, H1451, 2005.

- [85] Mol, A., van Lieshout, M.I., Dam-de Veen, C.G., Neuenschwander, S., Hoerstrup, S.P., Baaijens, F.P., and Bouten, C.V. Fibrin as a cell carrier in cardiovascular tissue engineering applications. *Biomaterials* 26, 3113, 2005.
- [86] Lee, C.R., Grad, S., Gorna, K., Gogoleswski, S., Goessl, A., and Alini, M. Fibrin-polyurethane composites for articular cartilage tissue engineering: a preliminary analysis. *Tissue Eng.* 11, 1562, 2005.
- [87] Eyrich, D., Wiese, H., Maier, G., Skodacek, D., Appel, B., Sarhan, H., Tessmar, J., Staudenmaier, R., Wenzel, M.M., Goepferich, A., and Blunk, T. In vitro and in vivo cartilage engineering using a combination of chondrocytes-seeded long-term stable fibrin gels and polycaprolactone-based polyurethane scaffolds. *Tissue Eng.* 13, 2207, 2007.
- [88] Van Lieshout, M., Peters, G., Rutten, M., and Baaijens, F. A knitted, fibrin-covered polycaprolactone scaffold for tissue engineering of the aortic valve. *Tissue Eng.* 12, 481, 2006.
- [89] Weinand, C., Gupta, R., Huang, A.Y., Weinberg, E., Madisch, I., Qudsi, R.A., Neville, C.M., Pomerntseva, I., and Vacanti, J.P. Comparison of hydrogels in the in vivo formation of tissue-engineered bone using mesenchymal stem cells and beta-tricalcium phosphate. *Tissue Eng.* 13, 757, 2007.
- [90] Weinand, C., Gupta, R., Weinberg, E., Madisch, I., Jupiter, J.B., and Vacanti, J.P. Human shaped thumb bone tissue engineered by hydrogel-beta-tricalcium/poly-epsiloncaprolactone scaffolds and magnetically sorted stem cells. *Ann. Plast. Surg.* 59, 46, 2007.
- [91] Peled, E., Boss, J., Bejar, J., Zinman, C., and Seliktar, D. A novel poly (ethylene glycol)-fibrinogen hydrogel for tibial segmental defect repair in rat model. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 80, 874, 2007.
- [92] Clark, R.A. Fibrin is a many splendored thing. *J. Invest. Dermatol.* 121, xxi, 2003.
- [93] Eyrich, D., Brandle, F., Appel, B., Wiese, H., Maier, G., Wenzel, M., Staudenmaier, R., Goepferich, A., and Blunk, T. Long-term stable fibrin gels for cartilage engineering. *Biomaterials* 28, 55, 2007.
- [94] Rivkin, R., Ben-Ari, A., Kassis, I., Zangi, L., Gaberman, E., Leviansky, L., Marx, G., and Gorodetsky, R. High-yield isolation, expansion, and differentiation of murine bone marrow-derived mesenchymal stem cells using fibrin microbeads (FMB). *Cloning Stem Cells* 9, 157, 2007.
- [95] Kassis, I., Zangi, L., Rivkin, R., Leviansky, L., Samuel, S., Marx, G., and Gorodetsky, R. Isolation of mesenchymal stem cells from G-CSF-mobilized human peripheral blood using fibrin microbeads. *Bone Marrow Transplant.* 37, 967, 2006.
- [96] Dikovsky, D., Bianco-Peled, H., and Seliktar, D. The effect of structural alterations of PEG-fibrinogen hydrogel scaffolds on 3d-cellular morphology and cellular migration. *Biomaterials* 27, 1496, 2006.
- [97] Smith, J.D., Chen, A., Ernst, L.A., Waggoner, A.S., and Campbell, P.G. Immobilization of aprotinin to fibrinogen as a novel method for controlling degradation of fibrin gels. *Bioconjug. Chem.* 18, 695, 2007.
- [98] Thesleff I, Mikkola M. The role of growth factors in tooth development. *Int Rev Cytol* 2002; 217: 93-135.
- [99] Ohazama A, Sharpe PT. TNF signalling in tooth development. *Curr Opin Genet Dev* 2004 Oct;14(5):513-9.
- [100] Ohazama A, Tucker A, Sharpe PT. Organized tooth-specific cellular differentiation stimulated by BMP4. *J Dent Res* 2005 Jul;84(7):603-6.
- [101] Thesleff I. Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. *J Cell Sci* 2003 May 1;116(Pt 9):1647-8.

- [102] Begue-Kirn C, Smith AJ, Ruch JV, Wozney JM, Purchio A, Hartmann D, et al. Effects of dentin proteins, transforming growth factor beta 1 (TGF beta 1) and bone morphogenetic protein 2 (BMP2) on the differentiation of odontoblast in vitro. *Int J Dev Biol* 1992 Dec;36(4):491-503.
- [103] D'Souza RN, Flanders K, Butler WT. Colocalization of TGF-beta 1 and extracellular matrix proteins during rat tooth development. *Proc Finn Dent Soc.*, 1992, 88, 419-26.
- [104] D'Souza RN, Happonen RP, Ritter NM, Butler WT. Temporal and spatial patterns of transforming growth factor-beta 1 expression in developing rat molars. *Arch Oral Biol.* 1990, 35, 957-65.
- [105] Roberts-Clark DJ, Smith AJ. Angiogenic growth factors in human dentine matrix. *Arch Oral Biol.*, 2000, 45, 1013-6.
- [106] Smith AJ, Matthews JB, Hall RC. Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) in dentine matrix. Ligand activation and receptor expression. *Eur J Oral Sci.* 1998, 106 Suppl 1:179-84.
- [107] Murray PE, Smith AJ. Saving pulps--a biological basis. An overview. *Prim Dent Care.*, 2002, 9, 21-6.
- [108] Tziafas D. Basic mechanisms of cytodifferentiation and dentinogenesis during dental pulp repair. *Int J Dev Biol.*, 1995, 39, 281-90.
- [109] Tziafas D, Alvanou A, Panagiotakopoulos N, Smith AJ, Lesot H, Komnenou A, Ruch JV. Induction of odontoblast-like cell differentiation in dog dental pulps after in vivo implantation of dentine matrix components. *Arch Oral Biol.*, 1995, 40, 883-93.
- [110] Reddi AH. Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nat Biotechnol* 1998 Mar;16(3):247-52.
- [111] Nakashima M, Nagasawa H, Yamada Y, Reddi AH. Regulatory role of transforming growth factor-beta, bone morphogenetic protein-2, and protein-4 on gene expression of extracellular matrix proteins and differentiation of dental pulp cells. *Dev Biol* 1994 Mar;162(1):18-28.
- [112] Saito T, Ogawa M, Hata Y, Bessho K. Acceleration effect of human recombinant bone morphogenetic protein-2 on differentiation of human pulp cells into odontoblasts. *J Endod* 2004 Apr;30(4):205-8.
- [113] Iohara K, Nakashima M, Ito M, Ishikawa M, Nakasima A, Akamine A. Dentin regeneration by dental pulp stem cell therapy with recombinant human bone morphogenetic protein 2. *J Dent Res* 2004 Aug;83(8):590-5.
- [114] Nakashima M. Induction of dentin formation on canine amputated pulp by recombinant human bone morphogenetic proteins (BMP)-2 and -4. *J Dent Res.*, 1994, 73, 1515-22.
- [115] Six N, Decup F, Lasfargues JJ, Salih E, Goldberg M. Osteogenic proteins (bone sialoprotein and bone morphogenetic protein-7) and dental pulp mineralization. *J Mater Sci Mater Med.*, 2002, 13, 225-32.
- [116] Sloan AJ, Smith AJ. Stimulation of the dentine-pulp complex of rat incisor teeth by transforming growth factor-beta isoforms 1-3 in vitro. *Arch Oral Biol* 1999 Feb;44(2):149-56.
- [117] Sloan AJ, Rutherford RB, Smith AJ. Stimulation of the rat dentine-pulp complex by bone morphogenetic protein-7 in vitro. *Arch Oral Biol* 2000 Feb;45(2):173-7.
- [118] Vainio S, Karavanova I, Jowett A, Thesleff I. Identification of BMP-4 as a signal mediating secondary induction between epithelial and mesenchymal tissues during early tooth development. *Cell* 1993 Oct 8;75(1):45-58.
- [119] Nakashima M, Mizunuma K, Murakami T, Akamine A. Induction of dental pulp stem cell differentiation into odontoblasts by electroporation-mediated gene delivery of growth/differentiation factor 11 (Gdf11). *Gene Ther* 2002 Jun;9(12):814-8.

- [120] Almushayt A, Narayanan K, Zaki AE, George A. Dentin matrix protein 1 induces cytodifferentiation of dental pulp stem cells into odontoblasts. *Gene Ther.*, 2006, 13, 611-20.
- [121] Alliot-Licht B, Bluteau G, Magne D, Lopez-Cazaux S, Lieubeau B, Daculsi G, Guicheux J. Dexamethasone stimulates differentiation of odontoblast-like cells in human dental pulp cultures. *Cell Tissue Res.*, 2005, 321, 391-400.
- [122] Couble ML, Farges JC, Bleicher F, Perrat Mabillon B, Boudeulle M, Magloire H. Odontoblast differentiation of human dental pulp cells in explant cultures. *Calcif Tissue Int.*, 2000, 66, 129-38.
- [123] Huang G T, Shagramanova K, Chan S W: Formation of odontoblast-like cells from cultured human dental pulp cells on dentin in vitro. *J Endod* 32: 1066–1073 (2006)
- [124] Wang S L, Wang X J: Tooth regeneration – dream to reality. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 26: 115–117 (2008)
- [125] Bohl KS, Shon J, Rutherford B, Mooney DJ. Role of synthetic extracellular matrix in development of engineered dental pulp. *J Biomater Sci Polym Ed* 1998;9(7):749-64.
- [126] Mooney DJ, Powell C, Piana J, Rutherford B. Engineering dental pulp-like tissue in vitro. *Biotechnol Prog* 1996 Nov;12(6):865-8.
- [127] Albandar JM, Brunelle JA, Kingman A. Destructive periodontal disease in adults 30 years of age and older in the United States, 1988-1994. *J Periodontol.*, 1999, 70,13-29.
- [128] Lin NH, Gronthos S, Bartold PM. Stem cells and periodontal regeneration. *Aust Dent J.*, 2008, 53, 108-21.
- [129] Nyman S, Lindhe J, Karring T, Rylander H. New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1982 Jul;9(4):290-6.
- [130] Christgau M, Bader N, Schmalz G, Hiller KA, Wenzel A. GTR therapy of intrabony defects using 2 different bioresorbable membranes: 12-month results. *J Clin Periodontol* 1998 Jun;25(6):499-509.
- [131] Christgau M, Bader N, Felden A, Gradl J, Wenzel A, Schmalz G. Guided tissue regeneration in intrabony defects using an experimental bioresorbable polydioxanon (PDS) membrane. A 24-month split-mouth study. *J Clin Periodontol* 2002 Aug;29(8):710-23.
- [132] Needleman IG, Worthington HV, Giedrys-Leeper E, Tucker RJ. Guided tissue regeneration for periodontal infra-bony defects. *Cochrane Database Syst Rev.*, 2006, 19, CD001724.
- [133] Nevins M, Camelo M, Nevins ML, Schenk RK, Lynch SE. Periodontal regeneration in humans using recombinant human platelet-derived growth factor-BB (rhPDGF-BB) and allogenic bone. *J Periodontol.*, 2003, 74, 1282-92.
- [134] Takayama S, Murakami S, Miki Y, Ikezawa K, Tasaka S, Terashima A, Asano T, Okada H. Effects of basic fibroblast growth factor on human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res.*, 1997, 32, 667-75.
- [135] Murakami S, Takayama S, Kitamura M, Shimabukuro Y, Yanagi K, Ikezawa K, Saho T, Nozaki T, Okada H. Recombinant human basic fibroblast growth factor (bFGF) stimulates periodontal regeneration in class II furcation defects created in beagle dogs. *J Periodontal Res.*, 2003, 38, 97-103.
- [136] Sigurdsson TJ, Lee MB, Kubota K, Turek TJ, Wozney JM, Wikesjö UM. Periodontal repair in dogs: recombinant human bone morphogenetic protein-2 significantly enhances periodontal regeneration. *J Periodontol.*, 1995, 66, 131-8.
- [137] Choi SH, Kim CK, Cho KS, Huh JS, Sorensen RG, Wozney JM, Wikesjö UM. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2/absorbable collagen sponge (rhBMP-2/ACS) on healing in 3-wall intrabony defects in dogs. *J Periodontol.*, 2002, 73, 63-72.

- [138] Giannobile WV, Lee CS, Tomala MP, Tejeda KM, Zhu Z. Platelet-derived growth factor (PDGF) gene delivery for application in periodontal tissue engineering. *J Periodontol.*, 2001, 72, 815-23.
- [139] Jin QM, Anusaksathien O, Webb SA, Rutherford RB, Giannobile WV. Gene therapy of bone morphogenetic protein for periodontal tissue engineering. *J Periodontol.*, 2003, 74, 202-13.
- [140] Hu WW, Wang Z, Hollister SJ, Krebsbach PH. Localized viral vector delivery to enhance in situ regenerative gene therapy. *Gene Ther.*, 2007, 14, 891-901.
- [141] Esposito M, Grusovin MG, Coulthard P, Worthington HV. Enamel matrix derivative (Emdogain) for periodontal tissue regeneration in intrabony defects. *Cochrane Database Syst Rev.*, 2005, CD003875.
- [142] Kawaguchi H, Hirachi A, Hasegawa N, Iwata T, Hamaguchi H, Shiba H, Takata T, Kato Y, Kurihara H. Enhancement of periodontal tissue regeneration by transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells. *J Periodontol.*, 2004, 75, 1281-7.
- [143] Zhang G, Wang X, Wang Z, Zhang J, Suggs L: A PEGylated fibrin patch for mesenchymal stem cell delivery. *Tissue Eng.* 12:9-19 (2006).
- [144] Radosevich JA, Haines GK, Elseth KM, Shambaugh GE 3rd, Maker VK. A new method for the detection of viable cells in tissue sections using 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): an application in the assessment of tissue damage by surgical instruments. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.* 1993;63(6):345-50.
- [145] http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi
- [146] Rasmussen, R.: Quantification on the LightCycler. In: Meuer S, Wittwer C, Nakagawara K, eds. *Rapid Cycle Real-time PCR, Methods and Applications*: 21-34 (2001).
- [147] Livak, K. J., Schmittgen, T. D.: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method. *Methods.*, 25(4): 402-404 (2001).
- [148] LightCycler Relative Quantification Software (2001): Version 1.0, Roche Molecular Biochemicals.
- [149] Galler KM, Cavender A, Yuwono V, Dong H, Shi S, Schmalz G, Hartgerink JD, D'Souza RN. Self-Assembling Peptide Amphiphile Nanofibers as a Scaffold for Dental Stem Cells. *Tissue Eng.* (2008).
- [150] Ranley DM, Garcia-Godoy F. Current and potential pulp therapies for primary and young permanent teeth. *J Dent.* 28:153-161 (2000).
- [151] Yildirim S, Yapar M, Sermet U, Sener K, Kubar A. The role of dental pulp cells in resorption of deciduous teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 105:113-20 (2008).
- [152] Olsson H, Petersson K, Rohlin M. Formation of hard tissue barrier after pulp cappings in humans. A systematic review. *Int Endod J.* 39:429-42 (2006).
- [153] Pierdomenico L, Bonsi L, Calvitti M, Rondelli D, Arpinati M, Chirumbolo G, Becchetti E, Marchionni C, Alviano F, Fossati V, Staffolani N, Franchina M, Grossi A, Bagnara GP. Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp. *Transplantation.* 80:836-42 (2006).
- [154] Trubiani O, Tripodi D, Delle Fratte T, Caputi S, Di Primio R. Human dental pulp vasculogenesis evaluated by CD34 antigen expression and morphological arrangement. *J Dent Res.* 82:742-7 (2003).
- [155] Tran-Hung L, Mathieu S, About I. Role of human pulp fibroblasts in angiogenesis. *J Dent Res.* 85:819-23 (2006).
- [156] Gandia C, Armiñan A, García-Verdugo JM, Lledó E, Ruiz A, Miñana MD, Sanchez-Torrijos J, Payá R, Mirabet V, Carbonell-Uberos F, Llop M, Montero JA, Sepúlveda P.

- Human dental pulp stem cells improve left ventricular function, induce angiogenesis, and reduce infarct size in rats with acute myocardial infarction. *Stem Cells*. 26:638-45 (2008).
- [157] d'Aquino R, Graziano A, Sampaolesi M, Laino G, Pirozzi G, De Rosa A, Papaccio G. Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation. *Cell Death Differ*. 14:1162-71 (2007).
- [158] Prescott RS, Alsanea R, Fayad MI, Johnson BR, Wenckus CS, Hao J, John AS, George A. In vivo generation of dental pulp-like tissue by using dental pulp stem cells, a collagen scaffold, and dentin matrix protein 1 after subcutaneous transplantation in mice. *J Endod*. 34:421-6 (2008).
- [159] Zhang W, Walboomers XF, Van Kuppevelt TH, Daamen WF, Van Damme PA, Bian Z, Jansen JA. In vivo evaluation of human dental pulp stem cells differentiated towards multiple lineages. *J Tissue Eng Regen Med* 2:117-25 (2008).
- [160] d'Aquino R, Papaccio G, Laino G, Graziano A. Dental Pulp Stem Cells: A Promising Tool for Bone Regeneration. *Stem Cell Rev*. Epub ahead of print (2008).
- [161] Liu H, Collins SF, Suggs LJ. Three-dimensional culture for expansion and differentiation of mouse embryonic stem cells. *Biomaterials*. 27:6004-14 (2006).

9. Danksagung

Herrn Professor Dr. G. Schmalz möchte ich für die Überlassung des Themas, die Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten sowie für die tatkräftige Unterstützung bei der Vermittlung für meinen Aufenthalt in Houston, insbesondere für die Kontaktaufnahme zu Prof. Dr. Rena D'Souza, sehr herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Kerstin Galler für die wertvolle gemeinsame Zusammenarbeit und Ermöglichung meines Aufenthaltes in Houston, ferner für die lebenslange positive Erfahrung.

I want to thank Dr. Rena D'Souza and Adriana Cavender for their support in the IBT lab and for taking care of me, I am really grateful for the experience that I could get at doing research. Furthermore, I want to thank Adriana Cavender for her help with the real-time PCR.

Allen die mich mit Rat und Tat unterstützt und aufgebaut haben, insbesondere meinen Eltern und meiner Schwester danke ich.

10. Lebenslauf

Name	Köklü
Vorname:	Umut Mustafa
Geburtsdatum:	29. Mai 1981
Geburtsort:	Pfarrkirchen
Eltern:	Gündüz Köklü, Füsün Köklü, geb. Demircay
Geschwister:	Melis Köklü
Schulausbildung:	1987-1991 Grundschule Arnstorf 1991-2000 Gymnasium Pfarrkirchen
Schulabschluss:	2000 Abitur am Gymnasium Pfarrkirchen
Allgemeine Wehrpflicht:	August 2000 bis Juli 2001 Zivildienst in der Altenpflege im Parkwohnstift Arnstorf
Studium:	Oktober 2000: Beginn des Studiums der Zahnheilkunde an der Universität Regensburg Oktober 2002: Naturwissenschaftliche Vorprüfung April 2004: Zahnärztliche Vorprüfung
Studiumabschluss:	Dezember 2006 Zahnärztliche Prüfung
Berufliche Tätigkeit:	Seit 2009 Zahnarzt in der Gemeinschaftspraxis Köklü