

**Immunhistochemischer Nachweis
von Sklerostin im Rahmen der
Zementogenese bei der Maus**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Sandra Dorothea Margarethe Lehnen
aus Krefeld

2010

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. dent. A. Jäger
2. Gutachter: PD Dr. med. dent. A. Braun

Tag der Mündlichen Prüfung: 26.02.2010

Aus der Poliklinik für Kieferorthopädie des Zentrums für
Zahn-, Mund-, und Kieferheilkunde der Universität Bonn
Direktor: Prof. Dr. A. Jäger

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	8
1 Einleitung	10
1.1 Histologie, Biologie und Entwicklung des Zementes	10
1.2 Bedeutung bzw. physiologische Rolle der zementbildenden Zellen	14
1.3 Das Parodontalligament	15
1.4 Sklerostin	17
1.5 Weitere durch Antikörper nachgewiesene Proteine	19
1.6 Zielsetzung der vorliegenden Studie	21
2 Material und Methoden	23
2.1 Untersuchungsmaterial	23
2.1.1 Versuchstiere und Tierhaltung	23
2.1.2 Präparation	23
2.2 Methoden	24
2.2.1 Fixierung	24
2.2.2 Entkalkung	24
2.2.3 Einbettung	24
2.2.4 Silanisierung der Objektträger	25
2.2.5 Schnitthanfertigung	25
2.2.6 Entparaffinierung	26
2.2.7 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	26
2.2.8 Immunhistochemie	27
2.2.9 Kontrollen	28
2.2.9.1 Negativkontrollen	28

2.2.10 Photographische Dokumentation und Auswertung	28
2.2.11 Liste der verwendeten Reagenzien.....	30
2.2.12 Liste der verwendeten Chemikalien	31
2.2.13 Liste der verwendeten Geräte und Materialien	31
2.2.14 Liste der verwendeten Primärantikörper	32
3 Ergebnisse	33
3.1 Histologie.....	33
3.1.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	33
3.2 Immunhistochemie	39
3.2.1 Immunhistochemie von S100A4 und Cbfa1	40
3.2.1.1 S100A4.....	40
3.2.1.2 Cbfa1	47
3.2.2 Immunhistochemie des Sklerostins.....	52
3.3 Kontrollen	60
3.4 Zusammenfassung der erzielten Immunreaktionen.....	62
4 Diskussion.....	66
4.1 Einordnung in die Literatur.....	66
4.2 Methodische Diskussion.....	67
4.3 Diskussion der Ergebnisse	68
4.3.1 Diskussion der Ergebnisse im Bereich des Zementes	69
4.3.1.1 Sklerostin.....	69
4.3.1.2 S100A4.....	72
4.3.1.3 Cbfa1	73
4.3.2 Diskussion der Ergebnisse im Bereich des Alveolarknochens.....	73
4.3.2.1 Sklerostin.....	73
4.3.3 Diskussion der Ergebnisse im Bereich des Parodontalligamentes	74

4.3.3.1 S100A4.....	75
4.3.3.2 Cbfa1	75
4.3.4 Pulpa und Gingiva.....	76
4.4 Klinische Relevanz	77
5 Schlussfolgerung.....	78
6 Zusammenfassung.....	80
7 Anhang.....	82
7.1 Abbildungsverzeichnis.....	82
7.2 Tabellenverzeichnis	84
8 Literaturverzeichnis	85

Abkürzungsverzeichnis

Am	Ameloblasten
aSEp	äußeres Schmelzepithel
az	azelluläres Zement
BM	Basalmembran
BMP	Bone Morphogenetic Protein
Cbfa1	Core-Binding-Factor 1
D	Dentin
DAB-Färbung	3,3-Diaminobenzidin
DAN	Differential screening-selected gene Aberrative in Neuroblastoma
DZ	Dentin-Zement-Grenze
E	Epithelzellen
ECM	Extrazelluläre Matrix
F	Fibroblasten
G	Gefäß
Gi	Gingiva
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HES	Hertwigsche Epithelscheide
iSEp	inneres Schmelzepithel
K	Knochen
Ka	Kapillare
KM	Knochenmatrix
Kn	Knorpel
LRP	LDL-receptor related protein
M1	erster Molar
MEK	Malassez- Epithelkörper
MHE	Mundhöhlenepithel
Ob	Osteoblasten
Od	Odontoblasten
Ok	Oberkiefer

Oz	Osteozyten
Pap	Papille
Pd	Prädentin
PDL	Parodontalligament
Pod	Präodontoblasten
Pu	Pulpa
S	Schmelz
S-Pu	Schmelzpulpa
SD	Schmelz-Dentin-Grenze
SO	Schmelzorgan
St. i.	Stratum intermedium
St. r.	Stratum reticulare
SZ	Schmelz–Zementgrenze
UK	Unterkiefer
VBD	Van-Buchem-Desease
Wnt	wingless
Z	Zement
zaF	zemento-alveoläre Fasern des Desmodonts
Zb	Zementoblasten
Zz	Zementozyten
zz	zelluläres Zement

1 Einleitung

In der vorliegenden Arbeit wurden zahntragende Kiefer von Mäusen im Alter zwischen null und acht Wochen histologisch untersucht. Durch immunhistochemische Färbemethoden sollten Sklerostin sowie andere Osteogenesemarker bei der Zementogenese nachgewiesen werden und Schlussfolgerungen über mögliche biologische Bedeutungen dieser Marker diskutiert werden.

Zum besseren Verständnis der entwicklungsbedingten Veränderungen am Zement der Maus wird zunächst auf das Gewebe eingegangen.

1.1 Histologie, Biologie und Entwicklung des Zementes

Das Wurzelzement des Zahnes wurde im Jahre 1835 von Schülern des Prager Physiologen Jan Evangelista Purkinje entdeckt. Es ist ein mineralisiertes, uneinheitliches Bindegewebe. Mit seinen verschiedenen Subtypen überzieht es das gesamte Wurzelzement von der Schmelzzementgrenze bis zum Apex. Das Zement reicht zum Teil bis in die Foramina apicalia hinein, so dass auch Anteile der apikalen Wurzelkanalwände bedeckt werden. Auch auf zervikalen Schmelzanteilen kann Zement nachgewiesen werden.

Das Zement bildet die Berührungsfläche zwischen Wurzelzement und dem Parodontalligament (PDL). Aufgrund dieser zwischengeschalteten Lage ist das Zement sowohl eine Komponente des Zahnes selbst als auch ein Funktionsbestandteil des Zahnhalteapparates. Der Begriff Parodontalligament (PDL) ist auch als Wurzelhaut bzw. Desmodont bekannt und bezeichnet das Bindegewebe des Zahnhalteapparates (Bosshardt, 2005; Schroeder, 2000).

Neben reparativen, pulpaschützenden und regenerativen Aufgaben hat das hoch reaktionsfähige Zementgewebe die Hauptaufgabe, desmodontale Kollagenfaserbündel des PDLs, die sich wie ein Netzwerk zwischen Wurzel und Alveolarknochen spannen, mit der Wurzeloberfläche zu verankern. Das Zement hilft, als Bestandteil des Zahnhalteapparates (Parodont), die Zähne in ihrer funktionellen Position im Alveolarknochen zu halten und die Intaktheit der Wurzel zu bewahren. Neben dem

Wurzelzement gehören zu den vier Geweben des Zahnhalteapparates der Alveolarknochen, das Parodontalligament sowie die Gingiva (Bosshardt und Selvig, 1997; Bosshardt, 2005).

Die Zementstärke variiert je nach Lokalisation. Am Wurzelapex sowie in den interradikulären Regionen von mehrwurzeligen Zähnen liegt mit durchschnittlich 50-200 µm die stärkste Schicht vor.

Die zervikale Zahnregion zeigt mit 10-15 µm die dünnste Zementschicht. An der äußeren Fläche liegt das Zement direkt benachbart zum PDL, an der tieferen Oberfläche haftet es dem Dentin fest an (Berkovitz, 1994).

Zement, entwicklungsgeschichtlich ein Derivat des eigentlichen Zahnsäckchens, wird in einem unregelmäßigen Rhythmus abgelagert. Zusammen mit verschiedenen Mineralisationsgraden und der Matrixbeschaffenheit führt dies zu ungleichmäßigen Wachstumslinien.

Ein Teil des Wurzelzementes entsteht präeruptiv während der Zahnwurzelbildung. Der andere Teil wird während und nach Abschluss des Zahndurchbruches und später zeitlebens gebildet. Voraussetzung für den lebenslangen „turn-over“ ist das funktionsfähige Desmodont (Schroeder, 2000). Cohn (1957) fand bei der Maus heraus, dass die Wurzelentwicklung des ersten Molaren zwischen dem 11. und 15. Tag nach der Ovulation abschließt. Die Wurzelentwicklung des zweiten und dritten Molaren (M2 und M3) hält bis zum 17. bzw. 18. Tag nach der Ovulation an (Cohn, 1957).

Auf zellbiologischer Ebene ist die Zementbildung wenig erforscht. Die genauen Differenzierungsmechanismen der Zementoprogenitorzellen sind ebenso wenig untersucht wie die Zelldynamik der Zementoblasten während der normalen Entwicklung, Reparatur sowie Regeneration (Bosshardt und Selvig, 1997).

Es gibt verschiedene Theorien der Zemententwicklung. Bereits auf zellulärer Ebene divergieren die Meinungen der Wissenschaftler hinsichtlich der entwicklungsbedingten Vorläuferzellen. In diesem Zusammenhang sahen beispielsweise Studien von Slavkin und Bringas (1976) einen epithelialen (aus der Hertwigschen Epithelscheide) Ursprung der zementbildenden Zellen. Diekwitsch (2001) wiederum sah in seiner Studie den Ursprung eher im mesenchymalen Gewebe. Bosshardt (2005) differenzierte bei der Erklärung des zellulären Ursprungs zwischen zellulärem und azellulärem Zementtyp. Er erklärte das azelluläre Zement mit epithelialelem und das zelluläre Zement mit

mesenchyalem Ursprung (eine detaillierte Erläuterung der genannten Zementtypen folgt im nächsten Abschnitt).

Den seit Hertwig (1874) bekannten und bis heute weiterentwickelten folgenden Ansatz bezeichnete Diekwisch (2001) als klassisches Erklärungsmodell der Zementogenese:

Der Zementbildung geht die Bildung des Wurzeldentins voraus. Zunächst vereinigen sich die inneren und äußeren Schmelzepithelien zu der Hertwigschen Epithelscheide (HES). Diese dient als Leitstruktur für die Umdifferenzierung der Zahnpapille zu Odontoblasten. Nach der Dentinbildung löst sich die Epithelscheide wieder auf (beim Menschen) bzw. wird durchlässiger (bei Nagern). Folglich wird die Barriere der Hertwigschen Epithelscheide von mesenchymalen Zellen des Zahnsäckchens durchbrochen. Die Zellen treten in Kontakt mit dem Wurzeldentin.

Durch diesen Reiz differenzieren sich die Zellen zu verschiedenen Zelltypen, wie den Zementoblasten. Die für die Bildung und Entwicklung verantwortlichen Zelltypen sind neben den Zementoblasten, die Zementozyten und die Parodontalligamentzellen. Alle drei Gewebe sind Abkömmlinge des Ektomesenchyms (Bosshardt, 2005; Diekwisch, 2001; Hammarstrom et al., 1996; Schroeder, 2000; Zeichner-David et al., 2003).

Die Reste der Hertwigschen Epithelscheide finden sich im PDL als Malassezsche Epithelreste wieder.

In der Literatur werden folgende vier Zementarten genannt, die sich morphologisch, funktionell und entwicklungsbedingt unterscheiden (Bosshardt und Schroeder, 1996; Bosshardt und Selvig, 1997): Das Azellulär-afibrilläre Zement, das Azelluläre Fremdfasorzement, das Zelluläre Eigenfasorzement und das Zelluläre Gemischtfasorzement (Berkovitz, 1994; Bosshardt, 2005; Gonçalves, 2005).

Zwei Zementgruppen standen im Fokus dieser Studie: Das azelluläre und das zelluläre Zement:

Das azelluläre (Fremdfaser-) Zement ist im oberen und mittleren Wurzeldrittel der Zähne lokalisiert und weitet sich selten weiter nach apikal aus. Nach Beertsen und Everts (1990) wird das azelluläre Zement zusätzlich entlang der inneren Wand des Alveolarknochens gebildet (Beertsen und Everts, 1990). Das azelluläre Zement ist zellfrei und enthält dicht gepackte, von außen aus dem PDL einstrahlende, Kollagenfasern. Diese extrinsischen (zellfremden) Fasern werden auch als Sharpeysche Fasern bezeichnet. Sie sind für die Zahnverankerung verantwortlich.

Hierfür kann das Zement die Faserausrichtung der Zahnbewegung zeitlebens anpassen und möglichst parallel zur Zahnlängsachse halten. Die Bildung von azellulärem Zement wird bei regenerativen Behandlungstechniken angestrebt. Azelluläres Zement wird langsam aber kontinuierlich, prä- und posteruptiv gebildet (Akiyoshi et al., 1963).

Durch Studien, die u.a. an der Ratte durchgeführt wurden, konnte gezeigt werden, dass die zuerst abgelagerte Zementschicht zunächst einen azellulären Charakter aufweist, wodurch das azelluläre Zement auch als primäres Zement bezeichnet wird. Beim Reparaturzement lässt sich eine Wandlung ins zelluläre Zement nachweisen (Owman-Moll und Kuroi, 1998).

Durch die langsame Bildungsrate, die Abwesenheit von Zementozyten sowie die dicht gestalteten und parallel-orientierten Sharpeyschen Fasern erscheint das azelluläre Zement gleichmäßig (Bosshardt, 2005).

Das azelluläre Zement wird von Zellen gebildet, die den Fibroblasten des parodontalen Ligamentes ähneln. Azelluläres (Fremdfaser-) Zement entsteht, wenn die Zementoblasten während der Grundsubstanzbildung zurückweichen. Cohn zeigte im Jahre 1957 in seiner Studie, dass sich das azelluläre Zement bei M1, dem ersten Molaren, pränatal zwischen dem 16. und 20. Tag nach der Ovulation entwickelt. Dabei bezeichnete er den 19. Tag nach der Ovulation als 1. postnatalen Tag. M2 entwickelt das azelluläre Zement vom 18. bis zum 21. Tag nach der Ovulation. Das azelluläre Zement des dritten Molaren bildet sich nach Cohn erst am 31. Tag nach der Ovulation (Cohn, 1957).

Zelluläres Zement ist ein zellhaltiges Zementoblastenprodukt ohne Sharpeysche Fremdfasern. Es wird entweder als reguläre Komponente des Gemischtfaserzementes oder bei reparativen Prozessen in resorptiven oder frakturierten Arealen gebildet (Schroeder, 2000). Im Gegensatz zum sich langsam entwickelnden azellulären Zement wird das zelluläre Zement sehr rasch gebildet. Es hat keine Bedeutung bei der Zahnverankerung, da die intrinsischen (zelleigenen) Fasern keine Verbindung mit dem PDL zeigen (Bosshardt, 2005). Die intrinsischen Fasern entstehen als reines Zementoblastenprodukt. Zelluläres Zement entsteht prä- und posteruptiv. Präeruptiv, im

Rahmen der normalen Wurzelentwicklung, wird es auf apikalen Wurzeloberflächen unmittelbar auf entstandenem Dentin gelagert. Diese Areale werden später durch Gemischtfasorzement bedeckt. Posteruptiv entsteht es als Schicht des zellulären Gemischtfasorzementes bzw. bei Reparaturvorgängen. Lokalisiert ist es dabei apikal und in den Wurzelfurkationen (Bosshardt und Schroeder, 1992). Bei der Entstehung des zellulären Zementes entstehen zunächst Präzementoblasten. Diese treten mit dem Prädentin in Kontakt und es entsteht eine Präzementlinie. An den weiter koronal gelegenen Lokalisationen werden die Präzementoblasten zu Zementoblasten und bilden eine Zementmatrix. Die Matrix, bestehend aus zufällig angeordneten und gebündelten Kollagenfasern, wird gegen die äußere, noch unverkalkte Prädentinoberfläche gebildet. Des Weiteren bilden die Zementoblasten diese Matrix um sich herum und mauern sich damit ein. Auf der schnell verkalkenden Matrix werden, wesentlich langsamer, weitere Schichten von zellulärem oder azellulärem Eigenfasorzement gebildet und aufgelagert (Bosshardt et al., 1989). Durch die Schichtung entsteht das zelluläre Gemischtfasorzement, das die apikalen 10-40 % der gesamten Wurzellänge bei maxillären und mandibulären Zähnen bedeckt und sowohl Zementozyten als auch Fibroblasten enthält. Es zeigt Anteile von Sharpeyschen Fasern und zementeigenen Fasern (Schroeder, 2000). Zelluläres Zement entsteht, wenn die Zementoblasten während der Grundsubstanzbildung von dieser eingeschlossen werden und sich dann in Zementozyten umwandeln. Nach Cohn (1957) bildete sich das zelluläre Zement sowohl bei M1 als auch bei M2 zwischen dem 3. und 7. postnatalen Tag (Tag 21-25 nach der Ovulation). Auch hier bezeichnete Cohn den 19. Tag post Ovulation als 1. postnatalen Tag. Der 3. Molar zeigte erst ab dem 35. Tag post Ovulation (17 Tage postnatal) die vollständige Entwicklung des zellulären Zementes (Cohn, 1957).

1.2 Bedeutung bzw. physiologische Rolle der zementbildenden Zellen

Zementoblasten sind etwa 8-15 µm große, kubische Zellen mit einem runden, euchromatinreichen Zellkern. Sie liegen der Zementoberfläche auf und sind für die Zementsynthese verantwortlich. Analog zur Knochenentwicklung produzieren auch die Zementoblasten anfangs ein saumähnliches Gewebe: Das Präzement, bestehend aus

einer mukoproteinreichen Grundsubstanz und Kollagenfibrillen. Durch Mineralisierung entsteht aus dem Präzement das Wurzelzement (Bosshardt und Schroeder, 1992; Bosshardt, 2005; Schroeder, 2000).

Zementozyten liegen im Innern einer Lakune des zellulären Zementes. Sie entstehen aus zementbildenden, aktiven Zellen (Zementoblasten), die während der Zementogenese in das Zement eingeschlossen werden.

Die Kanäle, in denen viele Zellen liegen, sind häufig durch interzelluläre Verbindungen (GAP-Junctions) verbunden (Berkovitz, 1994). Ayasaka et. al. (1992) zeigten, dass die tiefer gelegenen Zementozyten im Gegensatz zu den Knochenzellen zunehmend leer und avital erscheinen. Sie zeigen eine geringere endozytotische Aktivität als die oberflächlich gelegenen Zellen, obwohl das Kanalsystem im zellulären Zement deutlich besser ausgebildet ist. Die Mehrzahl der Zementozyten weist jedoch die Struktur vitaler Zellen auf, deren metabolische Aktivität niedriger als die der Zementoblasten ist.

Zementozyten ähneln strukturell und funktionell den Osteozyten. Bosshardt (2005) diskutierte einen gemeinsamen Ursprung der beiden Zelltypen.

Verglichen mit den Osteozyten liegen Zementozyten weiter verstreut und sind wahlloser angeordnet. Die Kanäle sind weitestgehend in Richtung ihrer Haupternährungsquelle, dem Parodontalligament (PDL) orientiert. Im Gegensatz zum Knochen liegen die Zementozyten nicht um Blutgefäße herum, wie es in Form von Osteonen (Havers Kanälen) bei den Knochenzellen üblich ist.

Zementozyten besitzen zahlreiche, lange, zytoplasmatische Fortsätze, die mit benachbarten Zementozyten in Kontakt stehen.

Sie haben eher kleine Organellen, die für den Energiehaushalt und die Synthese verantwortlich sind (Berkovitz, 1994; Schroeder, 2000).

1.3 Das Parodontalligament

Im Einzelnen werden dem Zahnhalteapparat verschiedene Bestandteile zugerechnet (Bosshardt und Selvig, 1997; Gratzl und Pabst, 2005; Schroeder, 2000):

- das Zahnzement
- der Alveolarknochen
- das Parodontalligament
- die Gingiva.

Die Nomenklatur ist im Schrifttum nicht einheitlich, denn es wird für den Zahnhalteapparat als Gesamtheit eine Vielzahl von alternativen Begriffen benutzt (z. B. Parodontium, Periodontium oder Desmodontium). Analog gibt es für das Parodontalligament verschiedene Bezeichnungen, z. B. Ligamentum Periodontale, Wurzelhaut, Periodontium, Desmodont oder Alveolardentalmembran, die offenbar zu nomenklatorischen Überschneidungen mit dem vorgenannten Zahnhalteapparat führen (Leonhardt, 1990; Schroeder, 2000). In der vorliegenden Dissertation soll in Anlehnung an die Arbeit von Kawarizadeh (2002) für die Verbindung zwischen Alveolarknochen und Zahnzement der Terminus Parodontalligament- oder kurz PDL (abgeleitet aus dem Englischen „periodontal ligament“)- verwendet werden. Neben dem bisher beschriebenen Zementgewebe ist für die vorliegende Arbeit das Parodontalligament von großer Bedeutung. Das Parodontalligament ist ein Bindegewebe, das den Spalt zwischen dem Alveolarknochen und dem Zahnzement ausfüllt (Beertsen et al., 1997; Berkovitz, 2004). Oberhalb des Alveolarknochenkamms geht das PDL in die Lamina propria der Gingiva über; apikal steht es über das Foramen apicale mit der Zahnpulpa in Verbindung. Für die vorliegende Arbeit sind vor allem die Zellen des Parodontalligaments entscheidend. Die Parodontalligamentzellen sind sehr zahlreich und bilden eine funktionell unterschiedliche Population (Schroeder, 2000):

- Zementoblasten (an der Oberfläche des Zahnzements); Osteoblasten und Osteoklasten (an der Oberfläche des Alveolarknochens);
- Zellen der Blut- und Lymphgefäße;
- Nervenzellen;
- Zellen der Abwehr
- Fibroblasten/ Fibrozyten stellen die größte Gruppe der Zellen dar und bauen den Kollagenfaserapparat auf. Sie liegen meist parallel zu den Kollagenfasern angeordnet, zeigen Charakteristika von aktiv Protein synthetisierenden und sezernierenden Zellen (erkennbar durch raues endoplasmatisches Retikulum,

Golgi- Apparat und viele Vesikel) und verfügen über ein gut ausgebildetes Zytoskelett

- Die mesenchymalen Vorläuferzellen oder Stammzellen liegen als kleine, runde Zellen meist perivaskulär. Ob sich dabei allerdings aus einer einzigen Vorläuferzelle sowohl Fibroblasten, Zementblasten und Osteoblasten ausdifferenzieren können oder ob es drei verschiedene Arten von Vorläuferzellen gibt, ist noch ungeklärt (Avery, 2002; Beertsen et al., 1997; Berkovitz, 2004; Bosshardt, 2005; Freeman, 1998; Schroeder, 2000).
- Die epithelialen Zellen– oder auch Malassez-Zellreste– sind die Überreste der rückgebildeten Hertwigschen Wurzelscheide. Sie liegen meist zahnnah und bilden ein dreidimensionales Netzwerk. Ihre Funktion ist bis heute noch offen (Avery, 2002; Freeman, 1998). Diskutiert wurde eine Beteiligung sowohl am Erhalt des periodontalen Spaltes (Lindskog et al., 1988) sowie an der Zementogenese des azellulären Zements (Kagayama et al., 1998) und letztlich an der Regeneration von Zement (Hasegawa et al., 2003).

1.4 Sklerostin

Zum besseren Verständnis der immunhistochemischen Ergebnisse werden die in dieser Arbeit durch Antikörper nachgewiesenen Proteine hinsichtlich Lokalisation, Aufgabe und Nachweis kurz erläutert.

Das Glykoprotein Sklerostin ist ein Produkt des SOST- Gens, das auf der Chromosomenregion 17q12-q21 lokalisiert ist (van Bezooijen et al., 2004). Im Knochen lässt sich das Sklerostin in den Osteozyten nachweisen. Neuere Studien, die neben dem Knochengewebe auch das Zement untersuchten, zeigten zusätzlich eine Sklerostinexpression in zellulären Zementanteilen (van Bezooijen et al., 2009). Es konnte gezeigt werden, dass Sklerostin wichtig für die Knochengewebsbildung ist. Sklerostin ist ein Mitglied der DAN- Familie (Differential screening-selected gene Aberrative in Neuroblastoma) der Glykoproteine und antagonisiert die Aktivität von BMP (Bone Morphogenetic Protein) und/oder Wnt (Wingless) Proteinen. Es bindet an den Wnt-Korezeptor LRP5/6 (LDL-Receptor related Protein) und blockiert die nachfolgende

Wnt-Signalkaskade (Lowik und van Bezooijen, 2006; Winkler et al., 2003). Dadurch hemmt es die Aktivität der Osteoblasten und begünstigt deren Apoptose. Sowohl die BMPs also auch der Wnt-pathway beeinflussen die Osteoblastenentwicklung, indem sie die Bereitstellung der multipotenten, mesenchymalen Osteoblastenvorläuferzellen initial stimulieren (Winkler et al., 2003).

Bone Morphogenetic Proteins (BMP) sind eine Gruppe einander ähnlicher Signalproteine, die Zellen zur Beeinflussung ihrer Nachbarzellen ausschütten. Die Proteine können die Differenzierung von Mesenchymzellen zu Osteoblasten auslösen. Bei den Osteoblasten wiederum steigern BMPs deren Funktion. Sklerostin hindert die BMP-stimulierte Osteoblastendifferenzierung und die Knochenbildung. Der genaue Mechanismus ist noch unerforscht. Nach Lowik und van Bejooijen (2006) behindert das Sklerostin indirekte Wirkmechanismen der BMPs, während direkte Wirkmechanismen des BMP unbeeinflusst bleiben.

Der in der Literatur beschriebene „canonical-Wnt-signaling-pathway“ spielt ebenfalls eine Rolle bei der Knochenregulation. Die Besonderheit der in der Literatur als "kanonisch" bezeichneten Wnt-Signalkette ist, dass kein ruhendes System stimuliert wird. Vielmehr wird eine aktive Signalkette inhibiert. Das Signal für diesen Kontrollweg wird vom Wnt gesendet, das an extrazelluläre Rezeptoren bindet. Das Wnt ist ein von vielen Zellen sekretiertes und in vielen verschiedenen Formen vorkommendes Protein, dessen Name sich aus dem Mausgen *int-1* und dem *Drosophila* Homolog *Wingless* zusammensetzt.

Sklerostin kann durch direkte Bindung an den LRP5-Rezeptor in die komplexen Abfolgen des Signalweges eingreifen und die Wirkung von Wnt- Botenstoffen hemmen. Ob dies auf dem Niveau der Stimulierung der Osteoblastendifferenzierung, Osteozytenerhaltung oder an beiden Orten erfolgt, ist Gegenstand von aktuellen Forschungen (Lin et al., 2009; Weidauer et al., 2009).

Studien wiesen das LRP5-Protein nahezu ausschließlich in Osteozyten nach. In oberflächlichen Osteozyten wurde das Protein seltener nachgewiesen als in weiter entwickelten, tiefer liegenden Osteozyten. Poole et al. (2005) konnten in diesem Zusammenhang eine Sklerostinsekretion in den Osteozyten erst feststellen, nachdem sie von der mineralischen Matrix eingemauert wurden. Hierdurch wird nach Poole eine

weitere Knochenbildung durch Osteoblasten verhindert. Auf die Osteozyten selbst hatte das Sklerostin keinen Einfluss (Poole et al., 2005).

Es ist bekannt, dass Sklerosteose- und Van-Buchem-Syndrom (VBD)- Patienten, die unter einem übermäßigen Knochenwachstum des ganzen Skeletts leiden, ein gemeinsames defektes Gen aufweisen: Das sklerostinproduzierende SOST-Gen (van Bezooijen et al., 2005). Die Erkenntnisse und Untersuchungen zu diesen Erkrankungen bekräftigten die bereits erwähnte Bedeutung des Sklerostins als wichtiger Hemmer von übermäßiger Knochenbildung (van Bezooijen et al., 2009).

Durch Jäger et al. (2009) wurde Sklerostin ebenso im zellulären Zement nachgewiesen. Eine regulierende Bedeutung, wie bei der Knochengewebsbildung genannt, ist bisher für das Zement unbekannt.

1.5 Weitere durch Antikörper nachgewiesene Proteine

Neben dem Sklerostin wurden zwei weitere Proteine nachgewiesen, deren Lokalisation und Bedeutung im Folgenden beschrieben wird.

Das S100 ist ein niedrigmolekulares, kalziumbindendes Protein, das in zahlreichen Geweben nachweisbar ist (Schäfer und Heizmann, 1996). Gemäß Ryan et al. (2003) wird der Antikörper als Fibroblastenmarker bezeichnet und wurde im Rahmen dieser Arbeit auch zum Nachweis dieser Zellen verwendet.

Von den insgesamt 17 Untergruppen des S100 waren für die vorliegende Studie die physiologischerweise in oralen Geweben vorkommenden Formen wichtig: S100A4 (in dieser Studie genutzt, siehe 2.2.8) und S100A2. Nach Duarte et al. (1998) unterscheiden sich die beiden Formen hinsichtlich der Lokalisation und der damit verbundenen Bedeutung. Die Autoren fanden heraus, dass S100A4 in den oralen Geweben mit unterschiedlichen Expressionsstärken nachweisbar ist. Die stärkste Expression liegt im PDL vor, gefolgt von der Zahnpulpa, der Zahnpapille sowie dem Zahnfollikel. In der Gingiva wurde nach Duarte et al. (1998) die geringste Expression festgestellt.

In Übereinstimmung mit dem S100A4 weist das S100A2 eine hohe Expression in den PDL Zellen auf. Im Gegensatz zum S100A4 zeigt die Gingiva eine ebenso starke

Expression. Die anderen Gewebe ließen lediglich eine schwache bzw. keine Expression erkennen (Duarte et al., 1998).

Zahlreiche Studien, wie von Sutherland et al. (2004), verwiesen auf die hohe Expression von S100A4 in PDL-Zellen. Strutz et al. (1995) unterschieden zusätzlich verschiedene Entwicklungsstadien der PDL-Zellen. In PDLE-Zellen (nach der Zahneruption) war die Expression höher als bei PDLU-Zellen (während der Eruption). Dieser Unterschied wurde sowohl mit der Folge der PDL-Reifung als auch der PDL-Zell-Antwort auf mechanischen Stress begründet. Es wurde gezeigt, dass die PDL-Reifung erst nach Zahndurchbruch und Aussetzung von okklusalen Kräften vollzogen wurde (Strutz et al., 1995).

S100A4 spielt bei verschiedenen Zellvorgängen unter mechanischer Belastung eine Rolle. Der genaue Wirkmechanismus ist nicht bekannt (Duarte et al., 1998). Es wird angenommen, dass S100A4 eine Bedeutung als Mineralisationsinhibitor hat. Dies bietet einen Erklärungsansatz für die Bedeutung im PDL, welches als stets nicht mineralisiertes Gewebe zwei mineralisierte Gewebe, Zement und Alveolarknochen, verbindet (Hirata et al., 2009; Ogiso et al., 1991).

Als weiteres Markerprotein wurde in der vorliegenden Arbeit das Cbfa1 (Core-Binding-Factor 1), auch bekannt als Runx2, durch Antikörper identifiziert. Cbfa1 ist Mitglied der Runt-Domain Familie und wurde 1997 als Transkriptionsfaktor erstmalig beschrieben (Ducy et al., 1997). Bei Vertebraten sind drei Runx-Gene bekannt. Für diese Studie war ausschließlich das Runx 2 relevant. Cbfa1 gilt als Marker für die Präosteoblasten- und frühe Osteoblastendifferenzierung (Komori, 2003; Schroeder et al., 2005). Das Protein hat eine essentielle Bedeutung für die Knochenentwicklung. Ogawa et al. (2000) zeigten, dass z. B. das Osteopontin und das Osteocalcin Promotorregionen mit Bindungsstellen für Cbfa1 besitzen. Hierdurch nimmt das Protein Einfluss auf die Osteoblastenreifung und die Chondrozytenhypertrophie. Cbfa1 ist zum einen bei der Differenzierung von mesenchymalen Progenitorzellen in Osteoblasten wichtig, zum anderen in der Entwicklung hypertropher Chondrozyten. Bei Chondrozyten scheint die Cbfa1-Expression auf die praehypertrophe und hypertrophe Form beschränkt zu sein (Rabie et al., 2004; Takeda et al., 2001).

Die beiden genutzten Antikörper S100A4 und Cbfa1 wurden bisher nicht im Zementgewebe nachgewiesen. In der vorliegenden Studie dienten sie lediglich der zusätzlichen Charakterisierung des untersuchten Gewebes.

1.6 Zielsetzung der vorliegenden Studie

Das Wurzelzement spielt nach heutigem Kenntnisstand eine Schlüsselrolle bei der Zahnverankerung. Neben dem Alveolarknochen, dem PDL und der Gingiva bildet es das Parodont (den Zahnhalteapparat). Im Gegensatz zu den anderen Geweben des Parodonts liegen für das Zement zum aktuellen Zeitpunkt nur wenige Studien vor. Über den Ursprung, die Differenzierung, die Zelldynamik sowie über die Regulation der zementbildenden Zellen ist in der aktuellen Literatur wenig bekannt (Bosshardt und Schroeder, 1996).

Das Glykoprotein Sklerostin ist ein wichtiger Regulator der Knochenbildung und Reifung (Poole et al., 2005; van Bezooijen et al., 2005; Winkler et al., 2003). Viele Studien wie z.B. von Poole (2005) zeigten eine Sklerostinexpression in den Osteozyten. Neue Studien fanden Sklerostin auch in den Zementozyten des zellulären Zements (Jäger et al., 2009; van Bezooijen et al., 2009). Die vorliegende Arbeit knüpfte an die Studie von Jäger et al. (2009) an. Die mögliche funktionelle Bedeutung des Sklerostins in der Zemententwicklung der Maus wurde analysiert. Labormäuse eigneten sich zur Untersuchung von altersbedingten Veränderungen aufgrund ihrer schnellen Entwicklung sowie ihres im Bereich der Molaren ähnlichen Zahnaufbaus zum Menschen.

Der Nachweis von Sklerostin im zellulären Zement konnte die physiologische Bedeutung dieses Proteins im Zement nicht erklären. Zum besseren Verständnis sollten weitere Informationen hinsichtlich der Altersabhängigkeit, Lokalisation und Expressionsstärke des Sklerostins gesammelt werden. Bezüglich der Altersabhängigkeit stellte sich die Frage, ob das Sklerostin entscheidend für die anfängliche Wurzelbildung ist, ob es eher wichtig bei der Reifung und Entwicklung des Zementes ist oder ob es evtl. erst bei älteren Tieren in Verbindung mit mechanischem Stress bedeutend ist. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit Mäuse im Alter von null bis acht Wochen untersucht.

Bezüglich der Lokalisation des Sklerostins wurden in dieser Studie das zelluläre und das azelluläre Zement analysiert. Jäger et al. (2009) und van Bezooijen et al. (2009) wiesen lediglich auf die Expression im zellulären Zement hin. In diesem Zusammenhang stellte sich die Frage, ob die Zellen des azellulären Zements ebenfalls in der Lage sind, Sklerostin zu sekretieren. Bosshardt (2005) teilte den beiden Zementtypen unterschiedliche Entwicklungsvorläuferzellen zu. Angenommen wurde eine parallele Entwicklungslinie zwischen den zellulären Zementzellen und den Osteozyten. Andererseits wies Bosshardt (2005) darauf hin, dass das azelluläre Zement aus einer anderen Vorläuferpopulation hervorgeht. Eine ähnliche Sklerostinexpression bei Osteozyten und Zementozyten des zellulären Zementes könnte die These der gemeinsamen Vorläuferzelle bestärken. Auf der anderen Seite könnten unterschiedliche Expressionen im azellulären und zellulären Zement weitere Hinweise auf unterschiedliche Entwicklungen geben. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit die verschiedenen Zementarten getrennt untersucht.

Um aufschlussreichere und detailliertere Ergebnisse zu erhalten, wurde in der vorliegenden Studie zusätzlich versucht, die Expressionsstärke des Sklerostins zu differenzieren.

Neben der Relevanz des Zementes für die Kieferorthopädie ist ein besseres Verständnis über die Vorgänge im Zement auch für die Parodontologie von Interesse. Das Eingreifen in Veränderungen, Krankheiten, Resorptionen sowie in Regulationsprozesse des Knochens ist bereits beschränkt möglich. Fraglich ist, ob dies beim Zement auch möglich sein wird.

2 Material und Methoden

2.1 Untersuchungsmaterial

2.1.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Die untersuchten Präparate wurden erstellt von kommerziell erhältlichen Mäusen. Sie entstammen der Linie NMRI (Charles River Wiga GmbH, Sulzfeld, Deutschland). Die Tiere wurden in den tierexperimentellen Einrichtungen des Universitätsklinikums Bonn (Venusberg) gehalten. Sie unterlagen dabei einem künstlich erzeugten 24h Tag-Nacht - Rhythmus, einer Raumtemperatur von 21°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60%. Die Ernährung bestand aus Altromin Standard Nagernahrung (Fa. Altromin, Lage) sowie Wasser ad libitum.

Von 20 Tieren wurden die rechten- bzw. linken Ober- und Unterkiefer folgender Altersstufen untersucht: Neugeborene, 1 Woche, 2 Wochen, 4 Wochen und 8 Wochen. Hierbei beschränkte sich die Analyse primär auf die Molaren aufgrund der Besonderheit der permanenten Eruption der Inzisiven bei Nagern.

2.1.2 Präparation

Die Betäubung der Mäuse erfolgte durch eine Äthernarkose, die Tötung durch zervikale Dislokation. Nach Entfernung der Köpfe und unteren Extremitäten wurden die Weichgewebe - nach Fixierung in Formalin (siehe 2.2.1) – abpräpariert und die Schädel median-sagittal halbiert.

2.2 Methoden

2.2.1 Fixierung

Die Fixierung der Präparate erfolgte unmittelbar in 4%-ig gepufferter Formalinlösung (s. 2.2.12) für eine Woche bei Raumtemperatur.

2.2.2 Entkalkung

Über einen Zeitraum von 16 Wochen wurden die Präparate in Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA, s. 2.2.11) entkalkt wobei die Lösung wöchentlich erneuert wurde. Die Überprüfung der vollständigen Entkalkung erfolgte mechanisch durch eine Nadelstichprobe.

2.2.3 Einbettung

Nach 6-stündlicher Wässerung der Präparate erfolgte die Dehydrierung im Gewebewässerungs- und -einbettautomat V.I.P. 2000/3000 der Firma Vogel, Giessen (s. 2.2.13). Die Dehydrierung durch eine aufsteigenden Alkoholkonzentrationsreihe sowie die Einwirkzeiten sind im Folgenden dargestellt:

1.	70%-iger Alkohol, 40°C	1 Std.
2.	70%-iger Alkohol, 40°C	1 Std.
3.	80%-iger Alkohol, 40°C	1 Std.
4.	96%-iger Alkohol, 40°C	1 Std.
5.	96%-iger Alkohol, 40°C	1 Std.
6.	100%-iger Alkohol, 40°C	75 Min.
7.	100%-iger Alkohol, 40°C	75 Min.
8.	100%-iger Alkohol, 40°C	75 Min.
9.	Xylol, 40°C	1 Std.
10.	Xylol, 40°C	75 Min.
11.	Paraffin, 60°C	4 Std.

Nach Überführung der Präparate in kleine Kunststoffküvetten erfolgte die Einbettung in der Paraffinausgießstation Tissue-Tek-IV der Firma Vogel (s. 2.2.13).

2.2.4 Silanisierung der Objektträger

Zwecks besserer Haftung der Schnitte auf den Objektträgern wurden diese silanisiert. Sie wurden mit folgenden Lösungen behandelt:

- | | |
|---|--------|
| 1. Mischung aus Poly-L-Lysin und Aceton (s. 2.2.12) | 2 Min. |
| 2. Aceton | 2 Min. |
| 3. Aceton | 2 Min. |
| 4. Aceton | 2 Min. |

Die Objektträger verbleiben anschließend 12 Std. bei 37°C im Wärmeschrank.

2.2.5 Schnitthanfertigung

Mit dem Rotationsmikrotom HM 3559 der Firma Microm International GmbH (s. 2.2.13) wurden Serienschnitte mit einer Schnittdicke von 5µm angefertigt. Nach ca. 10 Min. in einem 42°C warmen Streckbad wurden sie einzeln auf einen Superfrostobjektträger (s. 2.2.13) aufgezogen. Unmittelbar vor dem Aufbringen des Schnittes wurden die Objektträger zusätzlich mit einer Mischung aus Pritt Bastelkleber und Poly -L- Lysin (s. 2.2.11) dünn bestrichen. Die Glättung erfolgt auf einer Heizplatte bei 42°C für mind. 10 Min. Anschließend erfolgte eine Aufbewahrung im Trockenschrank bei 37°C über zwölf Stunden.

2.2.6 Entparaffinierung

Für die nachfolgenden histochemischen und immunhistochemischen Untersuchungen wurden die Präparate manuell entparaffiniert. Die Substanzen und Einwirkzeiten sind in der folgenden Tabelle dargestellt:

1.	Xylolersatz	10 Min.
2.	Xylolersatz	10 Min.
3.	100%-iger Alkohol	5 Min.
4.	100%-iger Alkohol	5 Min.
5.	90%-iger Alkohol	5 Min.
6.	70%-iger Alkohol	5 Min.
7.	Aqua dest.	5 Min.

2.2.7 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Jeder zehnte Schnitt einer Schnittserie wurde zur Übersicht und mikroskopischen Kontrolle manuell mit HE gefärbt. Die Reagenzien, Einwirkzeiten und Behandlungen sind in folgender Tabelle dargestellt:

1. – 7.	siehe 2.2.6	
8.	Hämalaun	30 Sek.
9.	Spülen unter fließendem Leitungswasser	3-5 Min.
10.	Eosin	2 Min.
11.	Aqua dest.	schwenken
12.	Aqua dest.	schwenken
13.	70%-iger Alkohol	3 Sek.
14.	90%-iger Alkohol	1 Min.
15.	100%-iger Alkohol	2 Min.
16.	100%-iger Alkohol	2 Min.
17.	Xylolersatz	2 Min.
18.	Xylolersatz	2 Min.
19.	Eindecken mit DePex	

2.2.8 Immunhistochemie

Zum Nachweis der einzelnen Antikörper wurden immunhistochemische Färbemethoden an ausgewählten Schnitten angewandt. (siehe Tabelle 2.2.14) Im Folgenden ist der Ablauf der einzelnen Verfahren dargestellt:

2.2.8.1 Immunhistochemischer Nachweis von SOST, S100, Cbfa1

- | | |
|--|---------|
| 1. Entparaffinierung (Schritt 1-7, siehe 2.2.6) | 45 Min. |
| 2. Spülen in TBS (siehe 2.2.12) | 10 Min. |
| 3. Blockierung der endogenen Peroxidase in
70 ml Methanol und 700111 30%-ig. H ₂ O ₂
unter Lichtabschluss bei Raumtemperatur | 10 Min. |
| 4. Spülen in TBS | 10 Min. |
| 5. <u>nur bei Cbfa1</u>
bei Verwendung des Mausantikörpers Blockierung notwendig
Blockierung mit 4 % TBS/BSA | |
| 6. Inkubation mit dem primären Antikörper in feuchter Kammer | |
| a cbfa1
in einer Verdünnung von 1:30 in 1%ig. TBS/BSA bei 4° (s. Tab. 1) | ÜN |
| b SOST
in einer Verdünnung 1:100 in 1 %-iger TBS/BSA bei 4° (s. Tab. 1) | ÜN |
| c S100
in einer Verdünnung 1:100 in 1 %-iger TBS/BSA bei 4° (s. Tab. 1) | ÜN |
| 7. Spülen in TBS | 10 Min. |
| 8. Inkubation mit dem sekundären Antikörper in feuchter Kammer: | |
| a für cbfa1
DAKO anti goat 1:50 (s. Tab. 2) | 30 Min. |
| b für SOST:
DAKO anti goat HRP konjugiert 1:50 in 1%-ig. TBS/BSA (s. Tab. 2) | 30 Min. |
| c für S100:
Envision anti rabbit HRP konjugiert (s. Tab. 2) | 30 Min. |
| 9. Spülen in TBS | 10 Min. |
| 10. Färbung mit Diaminobenzidin (DAB von Pierce) (s. 2.2.13) | 10 Min. |

11. Spülen in TBS	10 Min.
12. Gegenfärbung mit Mayers saurem Hämalaun (s.2.2.13)	1 Sek
13. Bläuen unter fließendem Leitungswasser	4 Min.
14. Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe	
a 100%-ig. Alkohol	2 Min.
b 100%-ig. Alkohol	2 Min.
c Xylolersatz	2 Min.
d Xylolersatz	2 Min.
15. Eindecken mit DePex	

2.2.9 Kontrollen

2.2.9.1 Negativkontrollen

Als Negativkontrollen wurden Paraffinschnitte der Zahnkieferregionen der Maus herangezogen. Sie wurden mit 1%-iger TBS/BSA Lösung anstelle des primären Antikörpers inkubiert. Wie bei den übrigen Präparaten wurde der sekundäre Antikörper appliziert und anschließend DAB aufpipettiert. So konnte die Spezifität des sekundären Antikörpers getestet werden. Auch wurden die Präparate mit 1%-iger TBS/BSA Lösung anstelle des primären und sekundären Antikörpers inkubiert. Anschließend wurde DAB aufpipettiert. Eine unspezifische Farbreaktion konnte so ausgeschlossen werden.

2.2.10 Photographische Dokumentation und Auswertung

Die Schnitte wurden unter dem Lichtmikroskop Axioskop 2 der Firma Zeiss (s. 2.2.13) betrachtet und ausgewertet. Mit Hilfe des Practica Scan-Scanners der Firma Schneider Feinwerktechnik (s. 2.2.13) konnten ausgewählte Zahnregionen digital gespeichert werden.

Von den 40 verwendeten Kiefern, von denen jeweils 8 Kiefer einer Altersgruppe angehörten, wurden jeweils 20 Schnitte angefertigt (insgesamt 800 Schnitte). Von

diesen Schnitten wurden jeweils 10 repräsentative Schnitte pro Altersgruppe und pro Antikörper zur Immunhistochemie verwendet und ausgewertet (insgesamt 150 Schnitte). Hierbei wurden pro Schnitt jeweils 3 bezeichnende Ausschnitte bei einer 200- bzw. 400-fachen Vergrößerung analysiert.

Jeweils 5 repräsentative Schnitte pro Altersgruppe wurden für die HE-Färbung genutzt und ausgewertet (insgesamt 25 Schnitte). Jeweils 3 Schnitte pro Altersgruppe und pro Antikörper dienten als repräsentative Schnitte für die Negativkontrollen (insgesamt 45 Schnitte).

Bei den immunhistochemischen Färbungen wurde das Ausmaß der Färbung bei der Auswertung unter dem Lichtmikroskop je nach Intensität als schwach, mittelstark oder stark bezeichnet.

- = Keine Immunreaktion: In den untersuchten Zellen lassen sich keine Reaktionen nachweisen (identisch mit den Negativ-Kontrollen)
- (+) = Schwache Immunreaktion: Nur vereinzelte Zellen weisen eine schwache Immunreaktion auf
- + = Mittelstarke Immunreaktion: Circa die Hälfte der Zellen weist eine schwache bis mittelstarke Immunreaktion auf
- ++ = Starke Immunreaktion: Die überwiegende Zahl der untersuchten Zellen weist eine starke Immunreaktion auf

Aufgrund der primär qualitativen Fragestellung der Arbeit wurde auf eine weitergehende statistische Auswertung verzichtet. Die semiquantitative Formulierung der Ergebnisse sollte zunächst ausschließlich eine prinzipielle Aussage über das Auftreten der untersuchten Proteine und dabei vorrangig des Sklerostins ermöglichen.

2.2.11 Liste der verwendeten Reagenzien

TBS-Puffer:

-9,0 g NaCl

-6,0 g Tris

-beides in 1000 ml Aqua dest. lösen und mit 2 molarer HCl auf pH 7,6 einstellen

TBS-BSA-Puffer

-0,1 g Serumalbumin vom Rind

-10 ml TBS-Puffer

Äthylendiamintetraessigsäure (EDTA):

-200 g EDTA

-68 g Tris

-2000 ml Aqua dest

Lösung zur Silanisierung:

-300 ml Aceton

-6 ml Silan

Klebeadhäsiv:

-Pritt Bastelkleber 50 ml

-Poly-L-Lysin 50 ml

2.2.12 Liste der verwendeten Chemikalien

Aceton	Fa.Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken,
Alcianblau 8GS	Fa. Waldeck GmbH & Co. KG, Münster, Deutschland
Alkohole (70-100%ige)	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
DePex	Fa. Serra, Heidelberg, Deutschland
3,3-Diaminobenzidin (DAB)	Fa. Sigma, Steinheim, Deutschland
EDTA	Fa. Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Eosinlösung, 1%, wässrig	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure 3%-ig.	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Formaldehydlsg. 4%-ig.	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Formol 40%-ig.	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Hämatoxylin	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Mayers saure Hämalaunlsg.	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Paraffin Histo-Comp	Fa. Vogel, Giessen, Deutschland
Poly-L-Lysine Solution	Fa. Sigma Diagnostics INC., St. Louis, USA
Pritt Bastelkleber	Fa. Henkel KGaA, Düsseldorf, Deutschland
Salzsäure 2 mol/l (HCl)	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Tris	Fa. ICN Biomedicals, Ohio, USA
Wasserstoffperoxid 30%	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Xylol (echt)	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Xylolersatz XEM-200	Fa. Vogel, Giessen, Deutschland

Tabelle 1: Liste der verwendeten Chemikalien

2.2.13 Liste der verwendeten Geräte und Materialien

Analysenwaage	Fa. Sartorius, Göttingen, Deutschland
Brutschrank	Fa. Memmert, Schwabach, Deutschland
Deckgläser	Fa. Engelbrecht, Edermünde, Deutschland

Einbettautomat V.I.P. 2000 / 3000	Fa. Vogel, Giessen, Deutschland
Eppendorf-Pipetten	Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Glasküvetten	Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland
Lichtmikroskop Axioskop 2	Fa. Zeiss, Jena, Deutschland
Paraffinausgießstation Tissue-Tek	Fa. Vogel, Giessen, Deutschland
Petrischalen	Fa. Schott, Wiesbaden, Deutschland
Pipettenspitzen	Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Practica Scan	Fa. Schneider, Feinwerktechnik, Dresden, Dtl.
Rotationsmikrotom HM 3559	Fa. Microtom International, Walldorf, Deutschland
Superfrost Plus Objektträger	Fa. Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
Wärmeplatte	Fa. Medax Nagel, Kiel, Deutschland

Tabelle 2: Liste der verwendeten Geräte und Materialien

2.2.14 Liste der verwendeten Primärantikörper

Antikörper	Art	Spezies	Verdünnung	Inkubation bei	Firma
Anti-Human S100 A4	Polyclonal	Kaninchen	1:100	ÜN 4° C	Dako A 5114
Anti-mouse-SOST-Antibody	Polyclonal	Ziege	1:50	ÜN 4° C	R&D Systems AF 1589
PEBP 2 α A (S-19) (cbfa1)	Polyclonal	Ziege	1:30	ÜN 4° C	Santa Cruz Sc-12488

Tabelle 3: Liste der verwendeten Primärantikörper

3 Ergebnisse

Die im Folgenden beschriebene Versuchsreihe basierte auf insgesamt 40 Kiefern von Versuchstieren in fünf verschiedenen Altersgruppen. Dabei wurden je 20 Unterkiefer (UK) und 20 Oberkiefer (OK) verwendet. In jeder Gruppe wurden Kiefer von vier Tieren bearbeitet. Die gewonnenen Kieferparaffinblöcke wurden mit drei verschiedenen Antikörpern immunhistochemisch behandelt, unter dem Mikroskop untersucht und bewertet. Zusätzlich wurden für die histologische Übersicht jeweils Hämatoxylin-Eosin-Färbungen (HE-Färbungen) durchgeführt (siehe 2.2).

Gruppe 1 = Neugeborene- jeweils Sklerostin, Cbfa1, S100A4

Gruppe 2 = 1 Woche- jeweils Sklerostin, Cbfa1, S100A4

Gruppe 3 = 2 Wochen- jeweils Sklerostin, Cbfa1, S100A4

Gruppe 4 = 4 Wochen- jeweils Sklerostin, Cbfa1, S100A4

Gruppe 5 = 8 Wochen- jeweils Sklerostin, Cbfa1, S100A4

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen dargestellt.

Makroskopisch konnten keine Auffälligkeiten an den verwendeten Kiefern festgestellt werden.

3.1 Histologie

3.1.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Histologisch ließ sich ein normaler Zementüberzug bei allen ein- und mehrwurzeligen Zähnen erkennen. Die bereits in der Einleitung beschriebenen Zementarten, das azelluläre und das zelluläre Zement, konnten klar differenziert werden. Der Übergang der beiden Gewebe war nahtlos.

Bei den neugeborenen Tieren waren die histologischen Besonderheiten weniger stark ausgeprägt. Bei dieser Altersgruppe zeigte sich die noch nicht vollständig abgeschlossene Entwicklung des zellulären Zementes, welche auch bei den einwöchigen Mäusen zu erkennen war (Abb. 1 und 2).

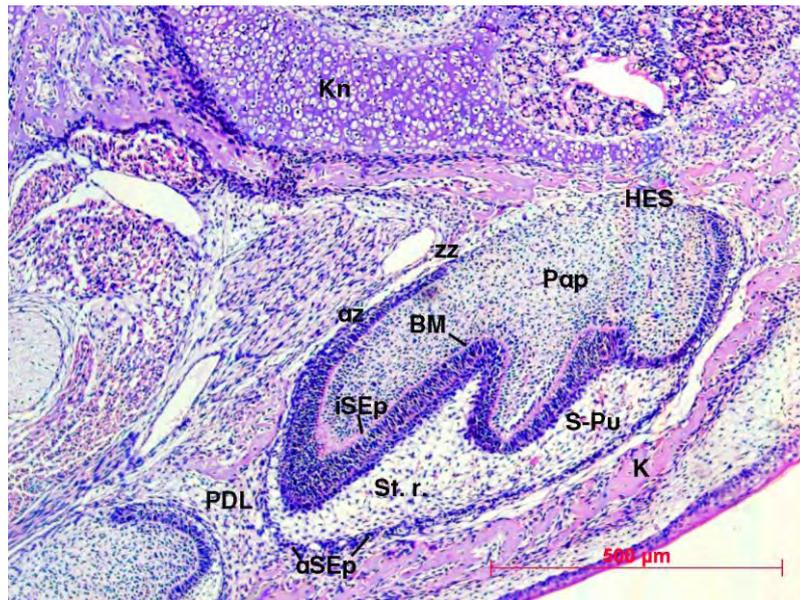


Abb. 1: Hämatoxylin-EosinFärbung: neugeborene Maus; Übersicht über die Schmelzglocke und das umgebende Gewebe im Bereich des ersten Molaren (M1) des OKs; das Schmelzorgan (SO) wird durch das äußere und innere Schmelzepithel (aSEp, iSEp) begrenzt; iSEp ist in dieser Abb. schon zu Präameloblasten entwickelt; Im Innern des Schmelzorgans liegt die Schmelzpulpa (S-Pu), bestehend aus Stratum reticulare (St. r.) und Stratum intermedium (St. i.); Im oberen Bereich der Papille (Pap) liegen die Präodontoblasten (pOd) der verdickten Basalmembran (BM) direkt an; fließender Übergang zwischen azellulärem Zement (az) und zellulärem Zement (zz); K = Knochengewebe; Kn = Knorpelgewebe; PDL = Parodontalligament mit PDL- Zellen; Hertwigsche Epithelscheide (HES) im apikalen Bereich (Vergrößerung: 10 x 10)

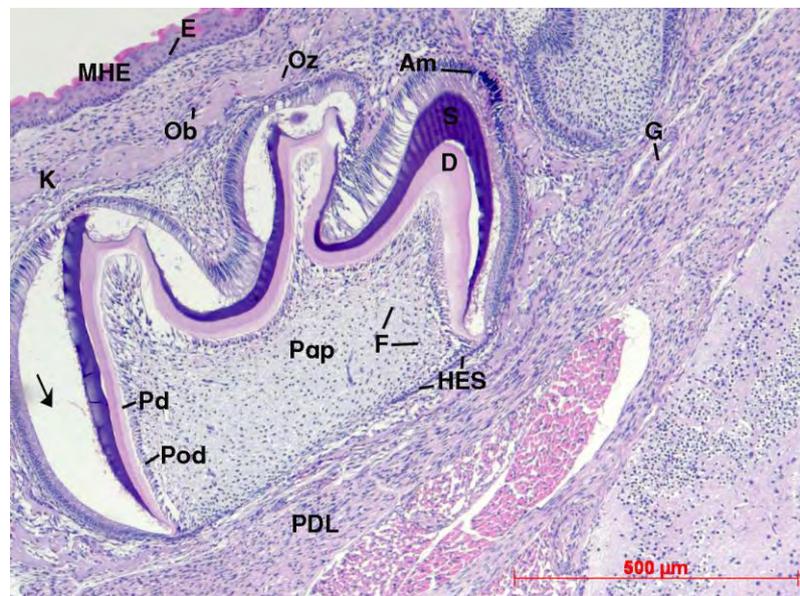


Abb. 2: Hämatoxylin-Eosin-Färbung: eine Woche alte Maus; Übersicht im Bereich des ersten Molaren (M1) des UKs; MHE = Mundhöhlenepithel mit Epithelzellen (E); Pap = Papille; Pod = Präodontoblasten ; Pd = Prädentin ; D = Dentin; S = Schmelz, zum Teil bearbeitungsbedingt fehlend (Pfeil); K = Knochen; Oz = Osteozyten; Ob = Osteoblasten; Am = Ameloblasten; G = Gefäße; F = Fibroblasten; HES = Hertwigsche Epithelscheide; PDL = Parodontalligament (Vergrößerung: 10 x 10)

Das azelluläre (Fremdfaser-) Zement konnte in der koronalen Wurzelregion, genauer am Wurzelentin des oberen und mittleren Wurzeltritts, sowie in den Furkationen nachgewiesen werden. Die HE- Färbung stellte, besonders bei den älteren Tieren, die deutliche lamelläre, geschichtete Struktur des azellulären Zementes dar.

Dieses Muster wurde durch Wachstums- und Appositionslinien hervorgerufen (siehe 1.1). Bei den acht Wochen alten Tieren war außerdem die Unterbrechung der lamellären Struktur durch einstrahlende Sharpeysche Fasern erkennbar.

Insgesamt konnte die bei Mäusen übliche Zementverteilung beobachtet werden: Das azelluläre Zement (azelluläres Fremdfaserzement) befand sich zervikal von der Schmelz-Zementgrenze nach apikal reichend sowie im interradikulären Bereich. Der Übergang zum zellulären Zementüberzug war fließend (siehe Abb. 3, 4, 5 und 6).

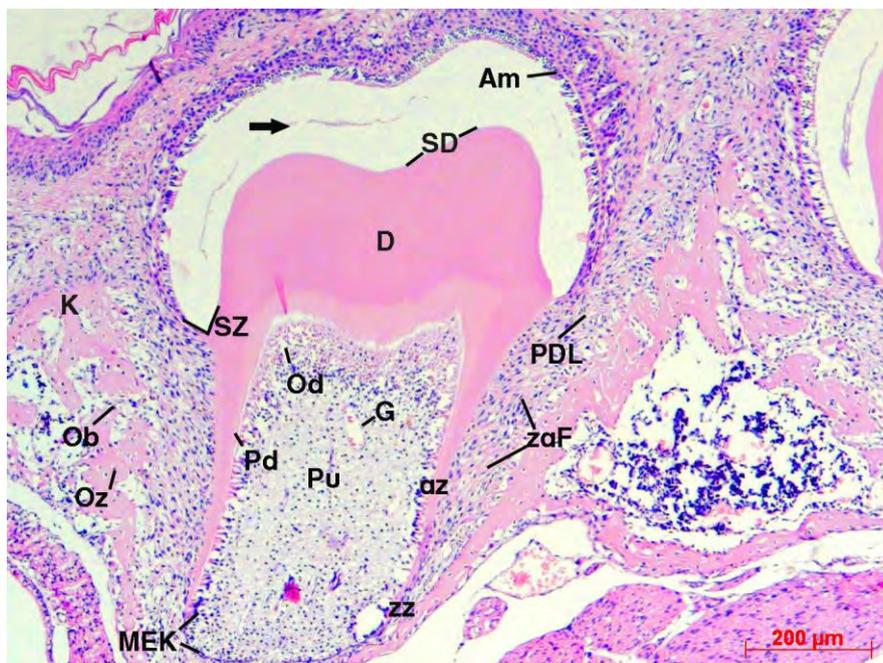


Abb. 3: Hämatoxylin-Eosin-Färbung: zwei Wochen alte Maus; Übersicht im Bereich des ersten Molaren (M1) des UKs; Pulpagewebe (Pu) mit randständigen Odontoblasten (Od) und zirkulär angrenzendem Dentin (D); G = Gefäße; Ameloblasten (Am) umgeben den ursprünglichen Schmelzbereich (Pfeil), der aufgrund des Entkalkungsprozesse leer ist; SD = Schmelz- Dentin- Grenze; SZ = Schmelz- Zement- Grenze; MEK = Malassez- Epithelkörper als Reste der Hertwigschen- Epithelscheide; az = azelluläres Zement im zervikalen Bereich der entstandenen Wurzel; zz = zelluläres Zement im apikalen Bereich der entstandenen Wurzel; Zementozyten und Zementoblasten hier nicht eindeutig erkennbar; zaF = zementoalveoläre Fasern (schräg verlaufend) des Parodontalligament (PDL); K = Knochen; Oz = Osteozyten; Ob = Osteoblasten (Vergrößerung: 10 x 10)

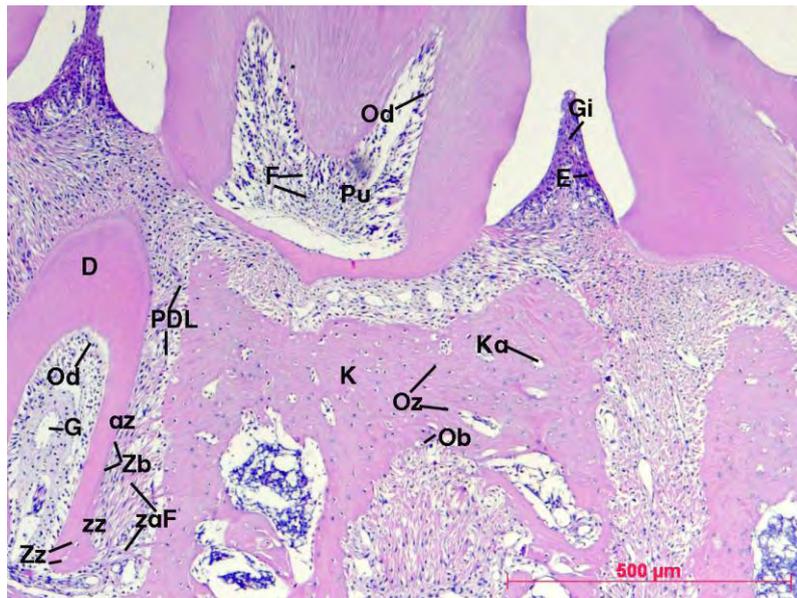


Abb. 4: Hämatoxylin-Eosin-Färbung: vier Wochen alte Maus; Übersicht im Bereich des ersten Molaren (M1) des UKs; Pu = mesenchymartiges Gewebe der Pulpa; F = Fibroblasten, G = Gefäße; Ka = Kapillare ; K = Knochen; Oz = Osteozyten; Ob = Osteoblasten; Od = Odontoblasten; D = Dentin; die Ameloblastenschicht ist während des Zahndurchbruchs zugrunde gegangen und hier nicht vorliegend; az = azelluläres (Fremdfaser-) Zement; PDL = Parodontalligament mit schräg verlaufenden, zementoalveolären Fasern (zaF); zz = zelluläres Zement; Zz = Zementozyten; Zb = Zementoblasten; Gi = gingivales Gewebe mit zahlreichen Epithelzellen (E) (Vergrößerung: 10 x 10)

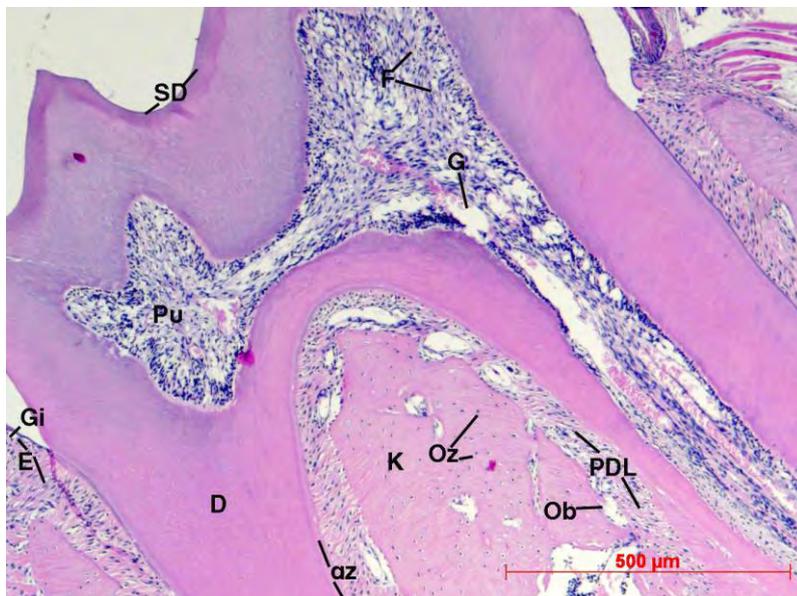


Abb. 5: Hämatoxylin-Eosin-Färbung: acht Wochen alte Maus; Übersicht im Bereich des ersten Molaren (M1) des UKs; Anschnitt durch den koronalen Bereich des durchgebrochenen Zahnes; Pu = mesenchymartiges Gewebe der Pulpa mit dunkel, lila gefärbten Fibroblasten (F); G = Gefäße; Ka = Kapillare; D = Dentin; SD = Schmelz- Dentin-Grenze, die in diesem entkalkten Bild die äußerste koronale Begrenzung bildet; PDL = Parodontalligament; Anschnitt des azellulären (Fremdfaser-) Zementes (az) im Bereich der Wurzel (siehe Abb. 6 als Erweiterung); Gi = gingivales Gewebe mit zahlreichen Epithelzellen (E); Knochen (K) mit eingeschlossenen Osteozyten (Oz), Ob = aufliegende Osteoblasten (Vergrößerung: 10 x 10)

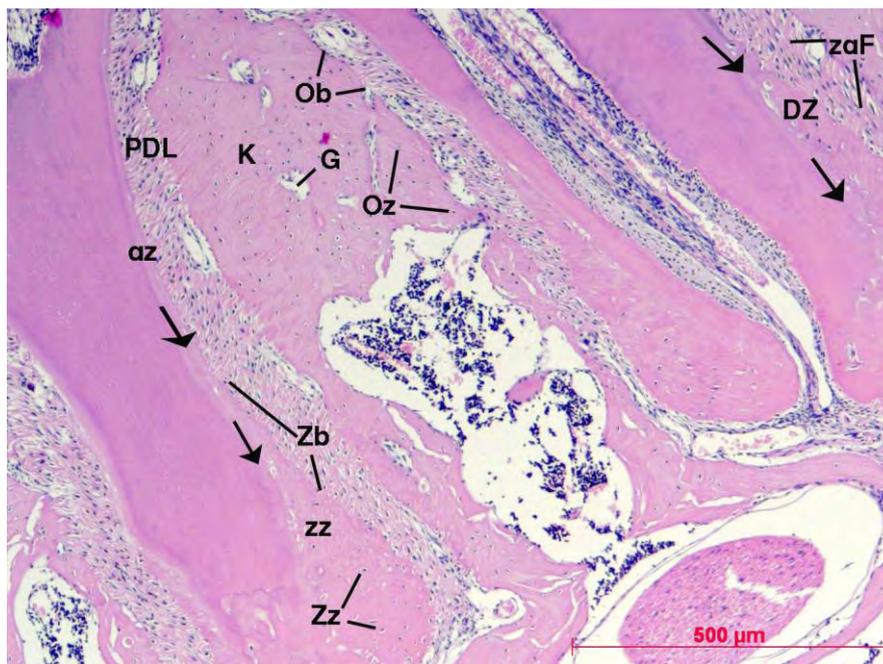


Abb. 6: Hämatoxylin-Eosin-Färbung: acht Wochen alte Maus; Übersicht im Bereich des ersten Molaren (M1) des UKs; Anschnitt durch den apikalen (Wurzel-) Bereich des durchgebrochenen Zahnes; DZ = Dentin- Zement- Grenze (mit Pfeilen gekennzeichnet); breite Schicht von azellulärem Zement (az) mit anhaftendem, zellhaltigem Parodontalligament (PDL); G = Gefäße; zaF = zementoalveoläre (schräg verlaufende) Fasern des PDLs (auch im Knochengewebe erkennbar); Zelluläres Zement im apikalen Bereich der Wurzel (zz) als stark rosa gefärbte, homogen erscheinende Gewebsmasse mit eingeschlossenen, lila gefärbten Zementozyten (Zz) und aufliegenden Zementoblasten (Zb); Knochen (K) mit eingeschlossenen Osteozyten (Oz) und aufliegenden Osteoblasten (Ob) (Vergrößerung: 10 x 10)

Das zelluläre Zement ließ sich besonders im apikalen Bereich nachweisen. Diese zementozytenreiche Schicht wurde außerdem in den Bi- und Trifurkationen der Molaren gefunden. Die zellulären Anteile der Zementozyten erschienen in der homogenen Masse des Zementgewebes als kleine, kreisrunde Gebilde. Aufgrund der genutzten HE-Färbung erschienen die Zementozyten lila, die Zellkerne lila-schwarz. Die basophilen Zementoblasten waren besonders bei den älteren Tieren erkennbar. Diese saßen, mit länglich- ovaler Form, den äußeren Zementgrenzen des zellulären Zementes auf.

Im koronalen Bereich konnte die Schmelz - Zement - Grenze nachgewiesen werden, obwohl die Zahnhartsubstanz des Schmelzes durch den in 2.1 beschriebenen Entkalkungsprozess herausgelöst wurde und daher nicht mehr erkennbar war (Abb. 3).

Das Zement lag mit der Dentin- Zement- Grenze dem Wurzeldentin an. Im koronalen Zahnbereich zeigte sich das Kronendentin, das mit der Schmelz- Dentin- Linie an den Zahnschmelz grenzte. Diese Linie bildete im vorliegenden entkalkten Zahn die äußerste koronale Begrenzung des Zahnes.

Die innen erkennbare Pulpenhöhle umfasste die Zahnpulpa, die sich als stark

vaskularisiertes, zellreiches Bindegewebe zeigte. Diese Pulpenhöhle wurde von unreifem Dentin (Prädentin) umschlossen (deutlich erkennbar in Abb. 2 der HE-Färbungen).

Die Zellkörper der prädentinbildenden Odontoblasten befanden sich teilweise an der äußeren Pulpenwand. Gelegentlich lag ein artifizierter Spalt zwischen Odontoblastenzellleibern und Prädentin vor (Abb. 3). Hierbei handelte es sich um ein Schrumpfungsartefakt, das durch die histologische Aufbereitung entstehen konnte. Bei den spindelförmigen Zellen mit dunklem, ovalem Zellkern handelte es sich überwiegend um Fibroblasten. In der HE-Übersichtsfärbung war eine Unterscheidung zwischen weiteren Zellpopulationen nicht möglich. Je nach Schnittebene wurden unterschiedliche Pulpenkammerareale als Kronen- oder Wurzelpulpa bzw. der Übergang ins Foramen apikale erkennbar.

Nach koronal schloss die Gingiva an (Abb. 4). Im Bereich der Interdentalspapille war die interdentale Gingiva dargestellt. Die marginale Gingiva war wiederum als freie Gingiva sichtbar. Die aus der Literatur bekannte befestigte Gingiva propria war schnittbedingt nicht dargestellt. Das Gingivaepithel ließ eine mehrschichtige, schwach verhornte Schichtung erkennen. Bei nahezu allen Präparaten haftete das PDL (Parodontalligament) an der Wurzeloberfläche. Dieses vaskularisierte, faserige Gewebe schien den Zahn über kollagene Fasern in der Alveole zu verankern. Zwischen den Fasern befanden sich zahlreiche Nerven, Blutgefäße und Parodontalligamentzellen. Letztgenannte stellten zahlenmäßig die größte Zellpopulation dar. Sie lagen dicht angeordnet im Bereich des PDL. Der Alveolarknochen war das letzte nennenswerte Gewebe in Bezug auf die vorliegende Arbeit. Wie in den Abbildungen 3 bis 6 erkennbar, bestand dieses Gewebe aus typischer, lamellärer Knochensubstanz. Die Osteoblasten zeigten sich als kubische, der Matrix aufliegende Zellen. Die Osteozyten erschienen in den entsprechenden Osteozytenhöhlen (Abb. 4).

Bezüglich der physiologischen Zahn- und Zemententwicklung wurden verschiedene Altersgruppen berücksichtigt.

Bei den neugeborenen und eine Woche alten Tieren war eine für dieses Entwicklungsstadium typische Glockenform erkennbar (Abb. 1 und 2).

Diese entsteht durch Proliferation des mesenchymalen Gewebes der Zahnpapille. Erkennbar waren hier die Odontoblasten, die das Prädentin abscheiden. Weiterhin

zeigten die untersuchten Stadien hochprismatische, schmelzbildende Ameloblasten. Inneres und äußeres Schmelzepithel, im Zahnhalsbereich eng aneinander liegend und die Hertwigsche Epithelscheide bildend, waren neben dem Stratum reticulare und dem Stratum intermedium erkennbar. Die Zellen des Stratum reticulare bildeten den voluminösesten Anteil der Glocke. Das Stratum intermedium, welches dem inneren Schmelzepithel auflag, bestand aus 3-4 Lagen dicht übereinander liegender Zellen (Abb. 1). Die zweiwöchigen Tiere zeigten die in die Tiefe wachsenden Epithelzellen, die die Wurzelbildung induzieren. Nach Verknöcherung der Kiefer begannen die Zellen des Zahnsäckchens in der Umgebung der Zahnanlage mit der Ablagerung des Alveolarknochens, der bei den einwöchigen Tieren bereits deutlich erkennbar war (Abb. 2). Auch die ab der zweiten Woche der Maus erkennbaren Haltefasern, die den Zahn innerhalb der Knochenalveole halten und als PDL bezeichnet werden, wurden von den Zellen des Zahnsäckchens gebildet (Abb. 3).

Bei den neugeborenen Mäusen war bereits der Ausformungsbeginn der Höckerspitzen der Zahnkronen erkennbar. Dieser endete nach einer Woche. Eine Entwicklung des azellulären Zementes konnte bei den einwöchigen Tieren nachgewiesen werden. Die Bildung des zellulären Zementes folgte in der ersten Woche bei dem ersten und zweiten Molaren. Anschnitte des dritten Molaren zeigten die zelluläre Zementbildung erst in der zweiten Woche.

3.2 Immunhistochemie

Die gefärbten Präparate wurden unter dem Auflichtmikroskop unter Verwendung von 5er, 10er, 20er und 40er Objektiven untersucht und ausgewertet. Eine installierte Farbkamera ermöglichte die digitale Dokumentation der Bilder. Alle Fotos wurden unter Verwendung verschiedener Objektive erstellt und mit einer individuellen Identifikationsnummer versehen. Insgesamt wurden 520 Fotos von Kieferanteilen im Bereich der Molaren der Maus angefertigt und analysiert. Für die direkte Vermessung von Strecken, Umfängen und Flächen wurde eine Maßstabangabe eingefügt.

Bei der hier durchgeführten Immunreaktion wurde 3,3-Diaminobenzidin (DAB) genutzt. DAB ist ein Peroxidasesubstrat, das ein in Alkohol unlösliches braunes Endprodukt

bildet. Bei Peroxidase positiven Substraten ist demnach von bräunlichen Arealen auszugehen, die die positiven Immunreaktionen charakterisieren. Die Ergebnisse der Immunfärbung werden folgend vorerst allgemein aufgeführt. Mithilfe dieser Färbung konnte bestimmt werden, in welchem Gewebe das entsprechende Protein vorhanden war bzw. in welchem Kompartiment der Zelle es lokalisiert war. Beispielsweise ist die Farbreaktion beim Nachweis von Transkriptionsfaktoren, die im Zellkern lokalisiert sind, nur über den Zellkern nachweisbar. Nach Oxidation wurde das braune Endprodukt am Lokus des Zielantigens gebildet.

Diese Arbeit basierte auf drei verschiedenen verwendeten Antikörpern: Sklerostin, cbfa1 und S100A4 (siehe Einleitung). Dabei dienten die Antikörper S100A4 und Cbfa1 lediglich der Charakterisierung der spezifischen Zellen.

Bei den immunhistochemischen Färbungen wurde das Ausmaß der Färbung bei der Auswertung unter dem Lichtmikroskop je nach Intensität als schwach, mittelstark, stark oder sehr stark bezeichnet. Folgende Ergebnisse wurden dabei erzielt:

3.2.1 Immunhistochemie von S100A4 und Cbfa1

3.2.1.1 S100A4

Das S100A4 ist ein Marker für Fibroblasten (siehe 1.4.). In allen Altersgruppen ließen sich relativ gleichmäßige Reaktionen nachweisen. Durchschnittlich ließ sich eine mittelstarke Immunreaktivität nachweisen.

Das S100A4 zeigte eine starke Reaktion in der extrazellulären Matrix (ECM) sämtlicher parodontaler Gewebe. S100A4 zeigte Immunreaktionen in den Parodontalligamentzellen und in den Fibroblasten der Zahnpulpa. Weitere Reaktionen konnten in den Epithelzellen der Gingiva, teilweise in den Zellen des Zementes sowie in den Zellen des Alveolarknochens nachgewiesen werden.

Die neugeborenen, ein- und zweiwöchigen Tieren wiesen keine Immunreaktionen des Zementes auf. Ebenso wie die Zementoblasten und Zementozyten blieben die

verschiedenen Zementgewebe ungefärbt (Abb. 7-10). Schwache Immunfärbungen lagen hingegen bei den vier Wochen alten Tieren im Bereich der Zementozyten und Zementoblasten des zellulären Wurzelzementes vor (Abb. 11B).

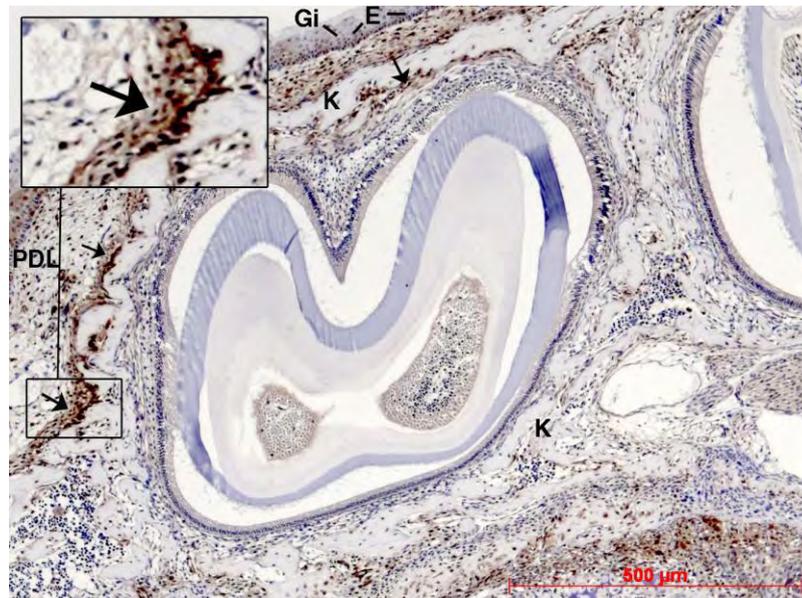


Abb. 7: S100A4- Immunreaktion im Bereich des ersten Molaren (M1) des OKs; eine Woche alte Maus; DAB- Färbung: Übersicht; K = Knochen, Gi = Gingiva mit S100- positiven Epithelzellen (mittelstarke Immunreaktion); S100- positive Fibroblasten im Bereich des PDL- Gewebes (starke Immunreaktionen siehe Pfeile) (Vergrößerung: 10 x 10)
Ausschnittsvergrößerung im Bereich des PDLs mit positiven PDL- Zellen (Pfeil)

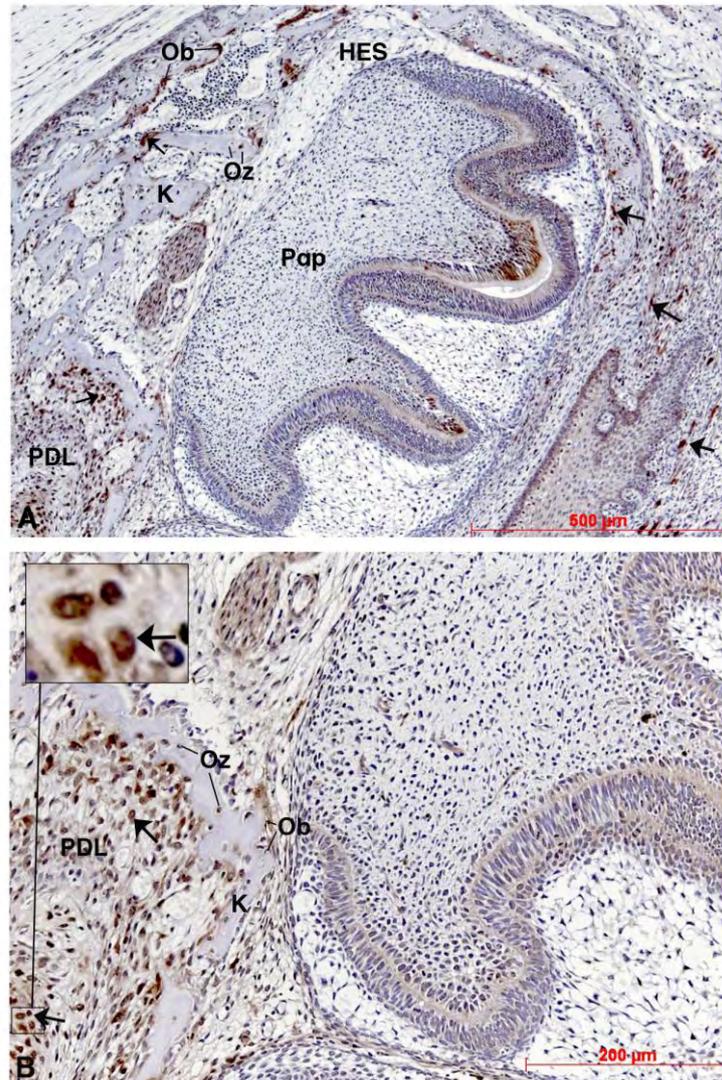


Abb.8: S100A4- Immunreaktion im Bereich des ersten Molaren (M1) des OKs; neugeborene Maus; DAB- Färbung:

A: Übersicht; K = Knochen, Ob = Osteoblasten; Oz = Osteozyten; Pap = Papille; HES = Hertwigsche Epithelscheide; S100- positive Zellen im PDL (mittelstarke Immunreaktionen siehe Pfeile) (Vergrößerung: 10 x 10)

B: Vergrößerung im Bereich des PDLs, des Knochens und der Wurzel; S100- positive PDL- Zellen (Pfeile) K = Knochen, Ob = Osteoblasten; Oz = Osteozyten; F = Fibroblasten (Vergrößerung: 10 x 20)

Ausschnittsvergrößerung im Bereich des PDLs mit positiven PDL- Zellen (Pfeil)

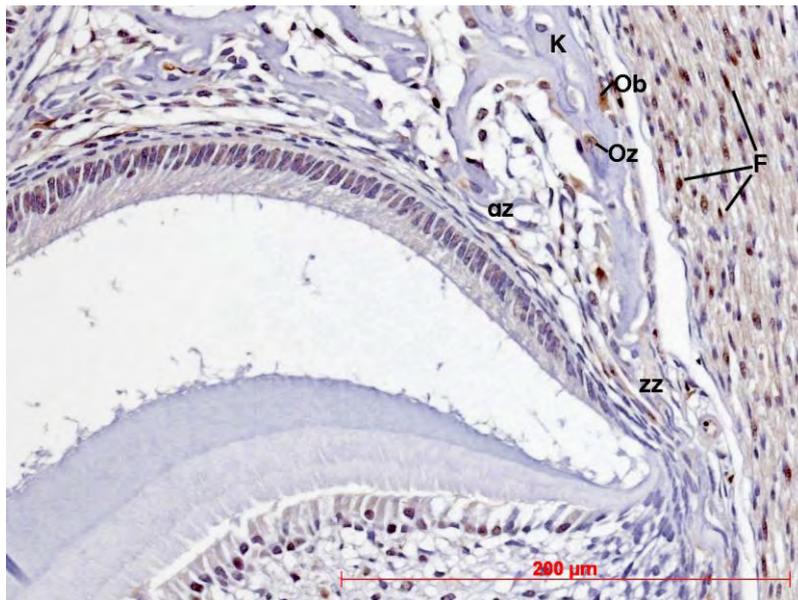


Abb 9: S100A4- Immunreaktion im Bereich des ersten Molaren (M1) des OKs; eine Woche alte Maus; DAB- Färbung; Vergrößerung im Bereich der Zahnwurzel mit Anschnitt des umgebenden Knochengewebes; schwache S100- Immunreaktionen im Bereich der Osteozyten (Oz) und Osteoblasten (Ob) im Bereich des Knochens (K); reaktionsloses azelluläres (az) und zelluläres (zz) Zement (Vergrößerung 10 x 40)

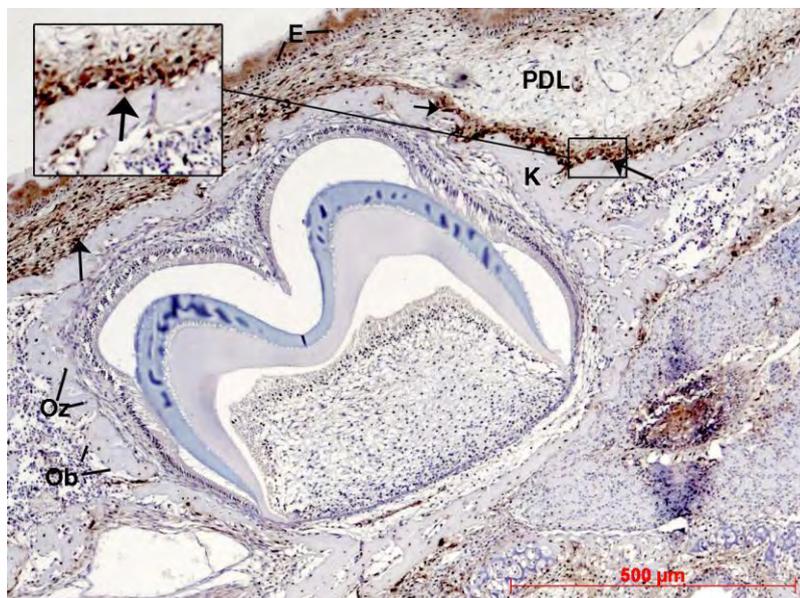


Abb 10: S100A4- Immunreaktion im Bereich des ersten Molaren (M1) des UKs; zwei Wochen alte Maus; DAB- Färbung; Übersicht; Oz = Osteozyten, Ob = Osteoblasten; PDL = Parodontalligament; S100- positive Parodontalligamentzellen (starke Immunreaktionen siehe Pfeile) besonders nahe des Knochens (K); S100- positive Knochen- und Epithelzellen (E) (Vergrößerung 10 x 10)
Ausschnittsvergrößerung im Bereich des knochenahnen PDLs mit positiven PDL- Zellen (Pfeil)

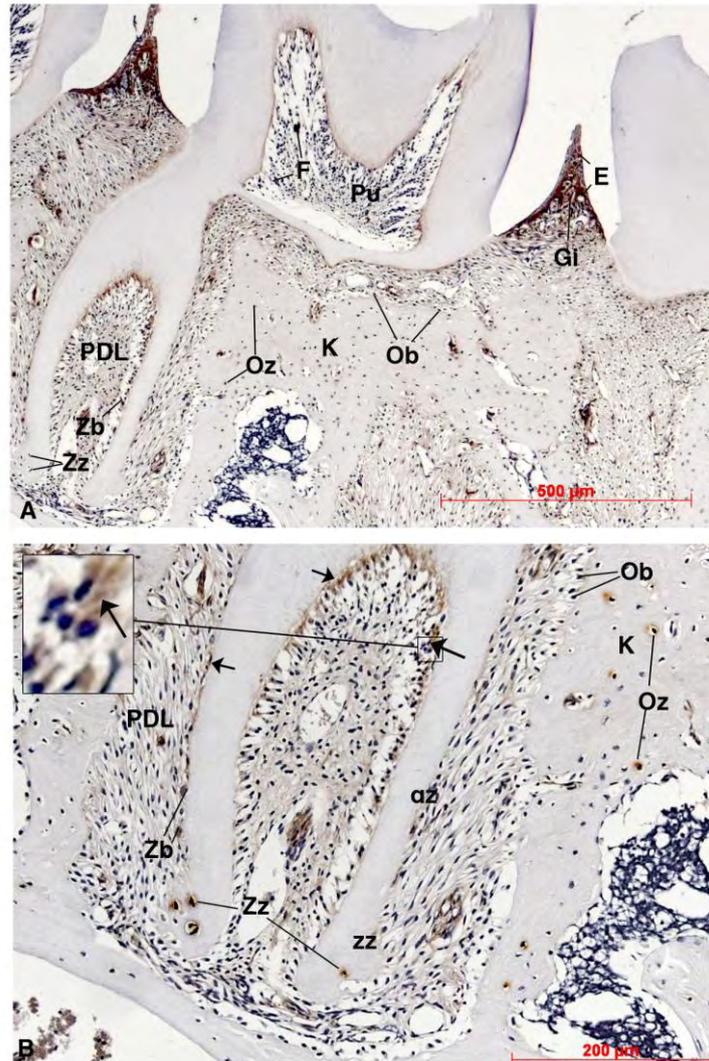


Abb. 11: S100A4- Immunreaktion im Bereich des ersten Molaren (M1) des UKs; vier Wochen alte Maus; DAB- Färbung:

A: Übersicht; K = Knochen, Ob = Osteoblasten; Oz = Osteozyten; PDL = Parodontalligament; S100-positive Fibroblasten (Pfeile); Pu = Pulpa mit Fibroblasten (F); Gi = Gingiva mit S100- positiven Epithelzellen (E); Zz = Zementozyten; Zb = Zementoblasten; az = azelluläres Zement; zz = zelluläres Zement (Vergrößerung: 10 x 10)

B: Vergrößerung im apikalen Bereich des ersten Molaren aus A. S100- positive PDL- zellen (mittelstarke Immunreaktion siehe Pfeile); Zz = S100- positive Zementozyten (schwache Immunreaktion); Zb = S100- positive Zementoblasten; az = azelluläres Zement; zz = zelluläres Zement; Oz = S100- positive Osteozyten; Ob = S100- positive Osteoblasten (schwache Immunreaktion) (Vergrößerung: 10 x 20)
Ausschnittsvergrößerung im Bereich des PDLs mit positiven PDL- Zellen (Pfeil)

Bei den acht Wochen alten Tieren ließen sich ebenfalls schwache Immunfärbungen im Bereich der Zementoblasten des zellulären Zementes beobachten. Weiterhin wurden starke Immunreaktionen der Zementozyten des zellulären Zementes nachgewiesen, wie Abbildung 12 illustriert. Hierbei wurde nicht immer deutlich, ob es sich in Randbereichen

bei den stark gefärbten Zellen in Wahrheit um Parodontalligamentzellen handelt. Aufgrund des nahtlosen Übergangs der beiden Zellarten ließ sich die genaue Zuordnung nicht immer eindeutig nachweisen. Die vorliegende Immunreaktion zeigte eine linienförmige Braunfärbung an der äußeren Grenzfläche des azellulären und teilweise des zellulären Zementes im Bereich der Zementoblasten (Abb. 13).

Im Alveolarknochen fand man schwache Reaktionen im Bereich der Osteozyten bei den neugeborenen und den einwöchigen Tieren (Abb. 7-10). Bei den zwei- bzw. vierwöchigen Tieren konnte eine mittelstarke Reaktionsintensität festgestellt werden. Die acht Wochen alten Tiere zeigten starke Immunreaktionen im Bereich der Osteozyten und Osteoblasten (Abb. 13). Die Osteoblasten der neugeborenen bis vierwöchigen Mäuse zeigten schwache Immunreaktionen.

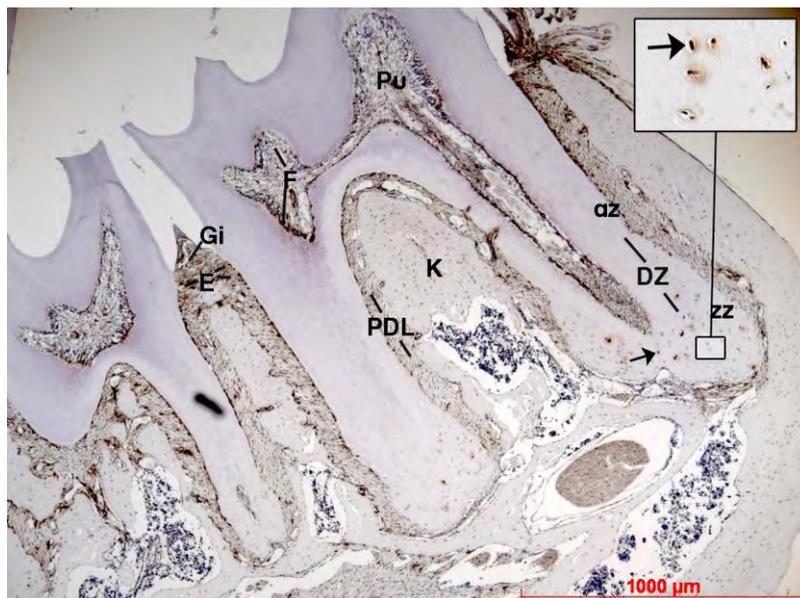


Abb. 12: S100A4- Immunreaktion im Bereich des ersten Molaren (M1) des UKs; acht Wochen alte Maus; DAB- Färbung; Übersicht; K = Knochen, Gi = Gingiva mit Epithelzellen (E); Pu = Pulpa mit F = Fibroblasten; DZ = Dentin- Zementgrenze; az = azelluläres Zement; zz = zelluläres Zement (Vergrößerung: 10 x 5)

Ausschnittsvergrößerung im Bereich des zellulären Zementes mit S100- positiven Zementozyten (starke Immunreaktionen siehe Pfeil)

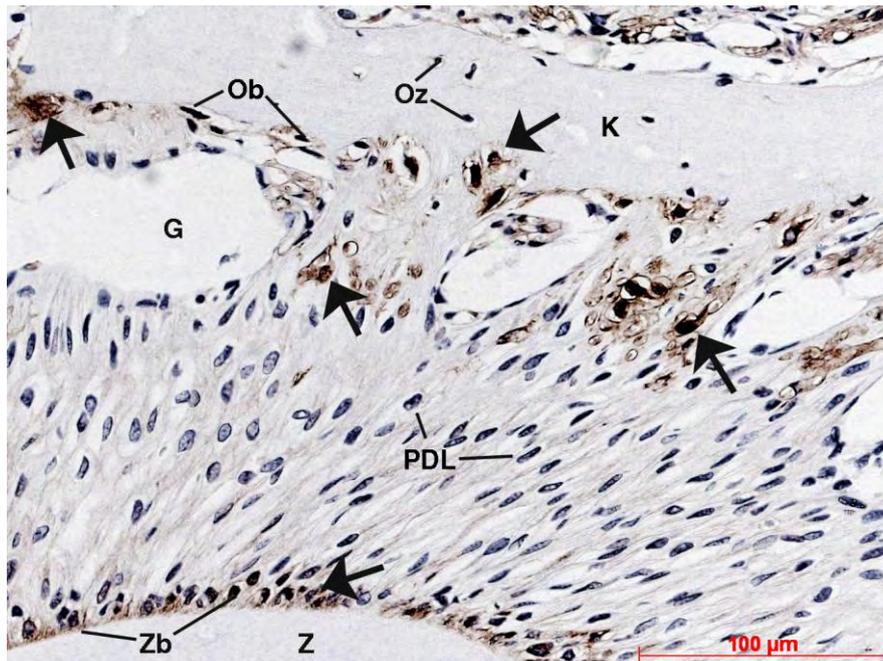


Abb. 13: S100A4- Immunreaktion im Bereich des ersten Molaren (M1) des UKs; acht Wochen alte Maus; DAB- Färbung; Vergrößerung des Übergangsbereiches bestehend aus Zement (Z), Parodontalligament (PDL) und Knochen (K); S100- positive Zellen (Pfeile); Zb = Zementoblasten (schwache Immunreaktion); Oz = Osteozyten (starke Immunreaktion); Ob = Osteoblasten (starke Immunreaktion) G = Gefäße; (Vergrößerung: 10 x 40)

Die für den Fibroblastenmarker zu erwartende Reaktion im Bereich des PDLs ließ sich auch in der vorliegenden Studie nachweisen (Ryan et al., 2003). Bei der durchweg positiven Reaktion ließen sich folgende Auffälligkeiten festhalten: Die Stärke der Zellfärbung, die die Immunreaktion kennzeichnete, nahm bei den neugeborenen bis zwei Wochen alten Mäusen besonders nahe des Alveolarknochengewebes zu. Bei den älteren Tieren zwischen vier und acht Wochen war die Färbung eher zur Wurzelseite hin stärker. Besonders bei den älteren Mäusen erkannte man einen dunkleren Randwall im Bereich der Wurzel. Die Zellen, die unmittelbar der Wurzeloberfläche auflagern, erschienen stärker gefärbt als die übrigen Parodontalligamentzellen (Abb. 11B). Die neugeborenen, vier- und acht Wochen alten Tiere zeigten mittlere Immunreaktionen. Bei den ein- und zweiwöchigen Mäusen waren die Immunreaktionen stark. Folglich ließ sich im Zeitablauf keine monotone Entwicklung der Immunreaktionsstärke feststellen. Die Markierung eines Großteils der Parodontalligamentzellen mit S100A4 zeigte, dass der überwiegende Teil dieser Zellen einen fibroblastischen Phänotyp aufwies. Im Hinblick auf die Fibroblasten der Pulpa wiesen die vier- und achtwöchigen Tiere eine mittlere Immunreaktionsstärke auf. Bei den neugeborenen, ein- und zweiwöchigen Tiere zeigte

sich hier keine Färbung. Im Bereich der Gingiva ließ sich eine durchweg bräunliche Färbung erkennen, die auf eine starke Reaktion des S100A4 zurückzuführen war. Starke Reaktionen fanden sich besonders bei den älteren Tieren zwischen zwei und acht Wochen. Bei den jüngeren Tieren lag eine mittlere Intensität vor.

3.2.1.2 Cbfa1

Cbfa1 gilt, wie bereits in 1.4. beschrieben, als Marker für Präosteoblasten und frühe Osteoblastendifferenzierung. Die zu erwartende Expressionsintensität in den Osteoblasten ließ sich auch in der vorliegenden Studie nachweisen. Farbreaktionen zeigten sich vorwiegend in den Osteoblasten und peripher gelegenen Osteozyten der Knochenregion.

Im Bereich des azellulären Zementes lag keine Reaktion vor. In den untersuchten Schnitten zeigte sich bei keiner Altersgruppe eine bräunliche Färbung. Im Bereich des zellulären Zementes ließ sich sowohl bei den Zementoblasten als auch bei den Zementozyten der vierwöchigen Tiere eine schwache Färbung feststellen und nachweisen. Die achtwöchigen Tiere zeigten im Bereich der Zementoblasten und Zementozyten mittlere Immunreaktionen. Hierbei war eine eindeutige Zuordnung der Zellen zu den Zementoblasten bzw. den benachbarten PDL- zellen nicht immer eindeutig nachweisbar (Abb. 17 und 19). Besonders auffällig schienen die Reaktionen im Bereich des Alveolarknochens. Cbfa1 zeigte bei den neugeborenen und einwöchigen Mäusen eine schwache Immunreaktion im Bereich der Osteozyten des Alveolarknochens. Bei den älteren Tieren (zwei bis acht Wochen) war bereits eine mittlere Intensität sichtbar. Auffällig war auf Ebene der Osteoblasten eine stark erscheinende Immunreaktion bei den neugeborenen Mäusen. Die anderen Altersklassen (eine bis acht Wochen) ließen im Bereich der Osteoblasten eine mittelstarke Intensität erkennen. Ähnlich starke Immunreaktionen lagen im Bereich des Parodontalligaments vor. Die neugeborenen bis zwei Wochen alten Mäuse wiesen eine mittlere Intensität auf. Bei den älteren Tieren (vier und acht Wochen) waren die Parodontalligamentzellen stark gefärbt. Die Ergebnisse hinsichtlich der Epithelzellen der Gingiva wiesen Parallelen zu dem beschriebenen S100A4 auf. Die Epithelzellen aller Altersgruppen zeigten mittlere Immunreaktionsintensitäten.

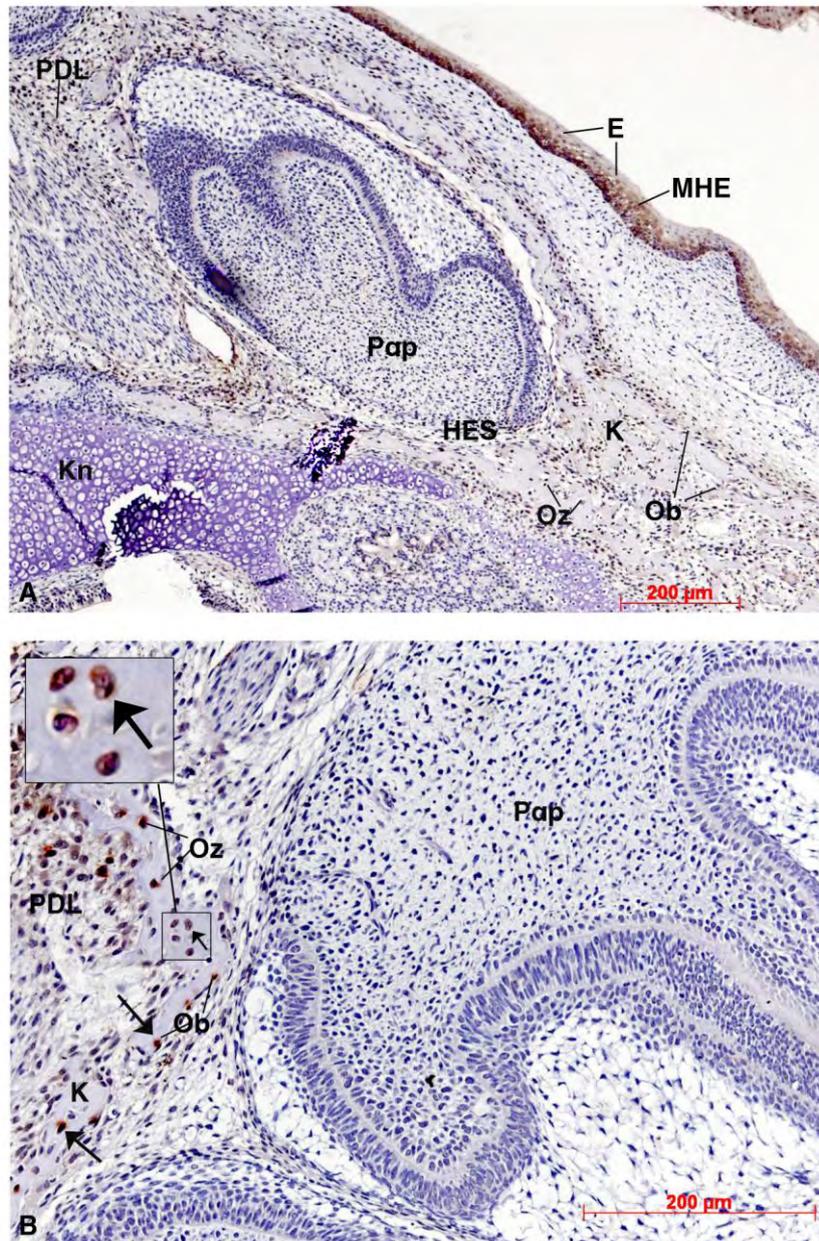


Abb.14: Cbfa1- Immunreaktion im Bereich des ersten Molaren (M1) des OKs; neugeborene Maus; DAB-Färbung:

A: Übersicht; K = Knochen, Ob = Osteoblasten; Oz = Osteozyten; Pap = Papille; HES = Hertwigsche Epithelscheide; Kn = Knorpel; MHE = Mundhöhlenepithel mit Cbfa1- positiven Epithelzellen (E, mittelstarke Immunreaktion); PDL = Parodontalligament (Vergrößerung: 10 x 10)

B: Vergrößerung im Bereich des PDLs, des Knochens und der Wurzel; Cbfa1- positive Zellen im PDL (mittelstarke Immunreaktion); Cbfa1- positive Zellen im Knochen (K, starke Immunreaktion), Ob = Osteoblasten; Oz = Osteozyten (Pfeile) (Vergrößerung: 10 x 20)

Ausschnittsvergrößerung im Bereich des Alveolarknochens der Maus mit Cbfa1-positiven Osteozyten (Pfeil)

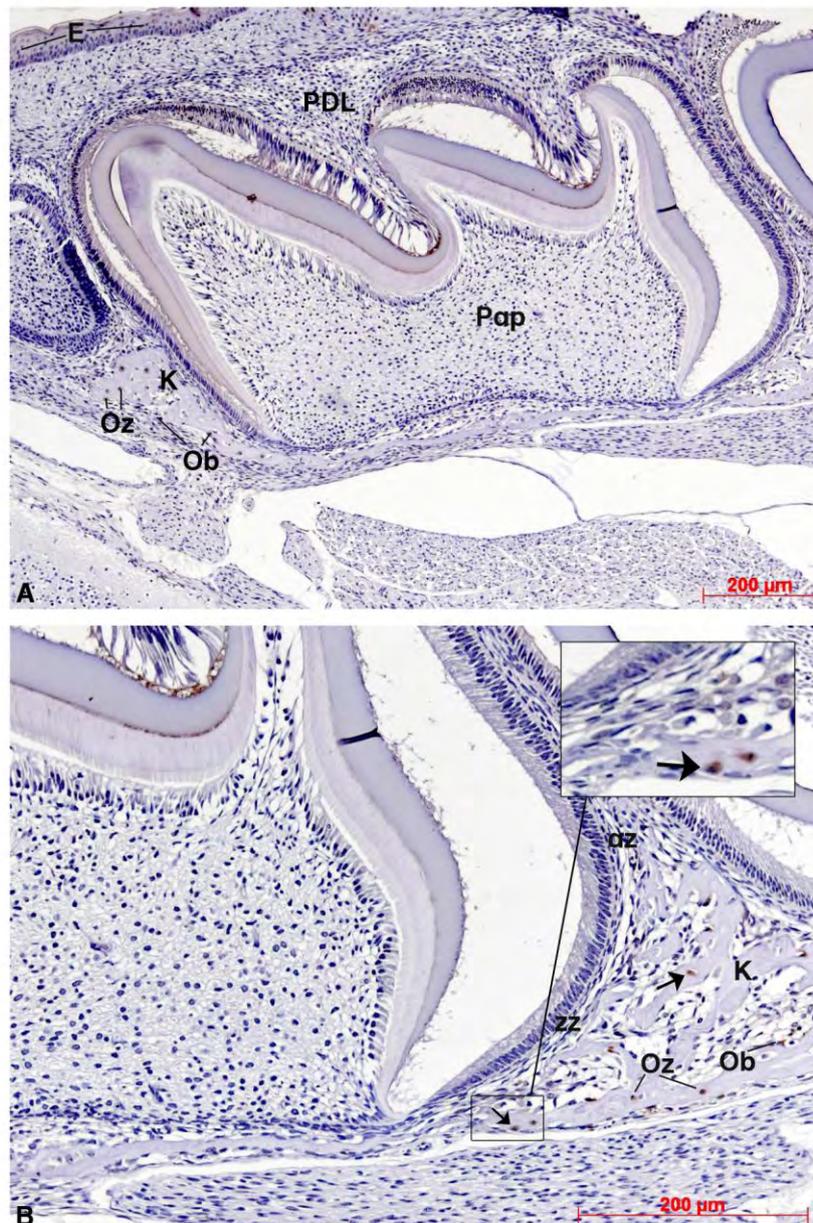


Abb.15: Cbfa1- Immunreaktion im Bereich des ersten Molaren (M1) des UKs; eine Woche alte Maus; DAB- Färbung:

A: Übersicht; K = Knochen mit Cbfa1- positiven Knochenzellen (mittelstarke Immunreaktion), Ob = Osteoblasten; Oz = Osteozyten; Pap = Papille; HES = Hertwigsche Epithelscheide; Cbfa1- positiven Epithelzellen (E, mittelstarke Immunreaktion); PDL = Parodontalligament (Vergrößerung: 10 x 10)

B: Vergrößerung im Bereich des PDLs, des Knochens und der Wurzel; vereinzelt Cbfa1- positive Zellen im PDL (mittelstarke Immunreaktion); Cbfa1- positive Zellen im Knochen (K), Ob = Osteoblasten; Oz = Osteozyten (Pfeile) (Vergrößerung: 10 x 20)

Ausschnittsvergrößerung im Bereich des Alveolarknochens der Maus mit Cbfa1-positiven Osteoblasten (Pfeil)

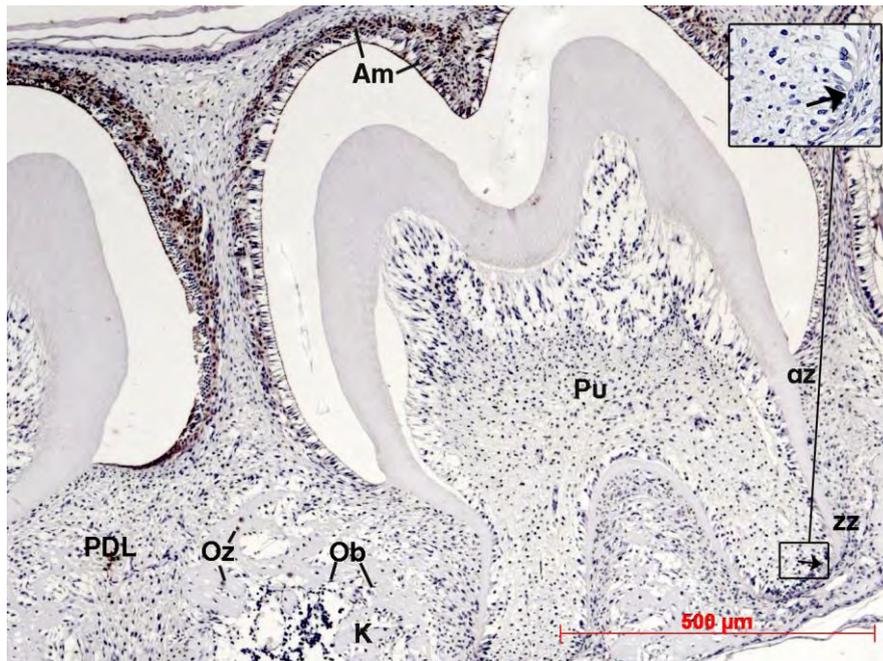


Abb 16: Cbfa1- Immunreaktion im Bereich des ersten Molaren (M1) des UKs; zwei Wochen alte Maus; DAB- Färbung: Übersicht; K = Knochen; Oz = Osteozyten, Ob = Osteoblasten; PDL = Parodontalligament; Pu = Pulpa; Cbfa1- positive Ameloblasten (Am); az = azelluläres Zement und zz = zelluläres Zement (Vergrößerung 10 x 10)

Ausschnittsvergrößerung im Bereich des zellulären Zementes der Maus mit Cbfa1- negativen Zementozyten (Pfeile)

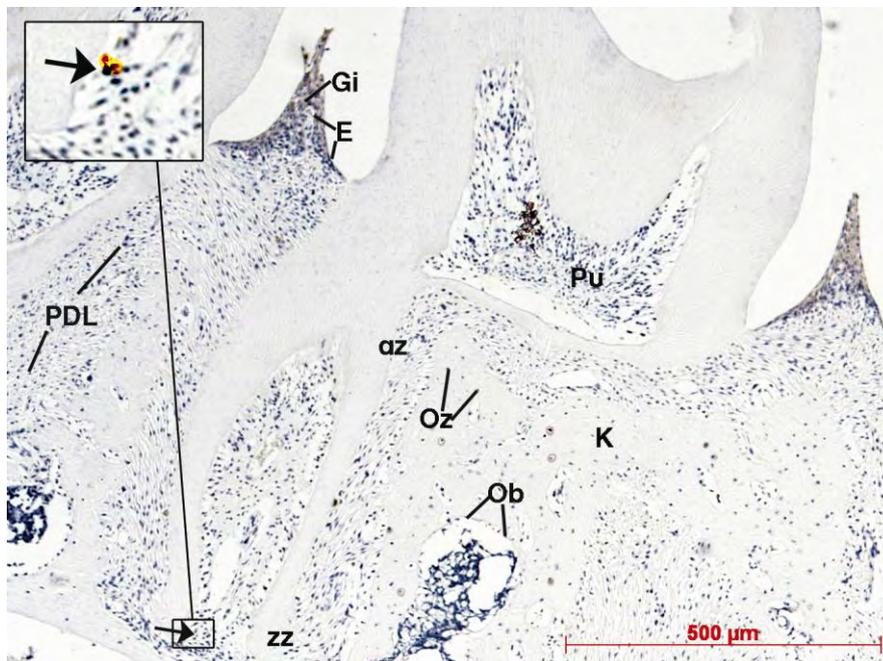


Abb 17: Cbfa1- Immunreaktion im Bereich des ersten Molaren (M1) des UKs; vier Wochen alte Maus; DAB- Färbung: Übersicht; K = Knochen; Oz = Osteozyten, Ob = Osteoblasten; PDL = Parodontalligament; Pu = Pulpa; az = azelluläres Zement und zz = zelluläres Zement (Vergrößerung 10 x 10)

Ausschnittsvergrößerung im Bereich des zellulären Zementes der Maus mit Cbfa1- positiven Zementozyten (schwache Immunreaktion siehe Pfeile)

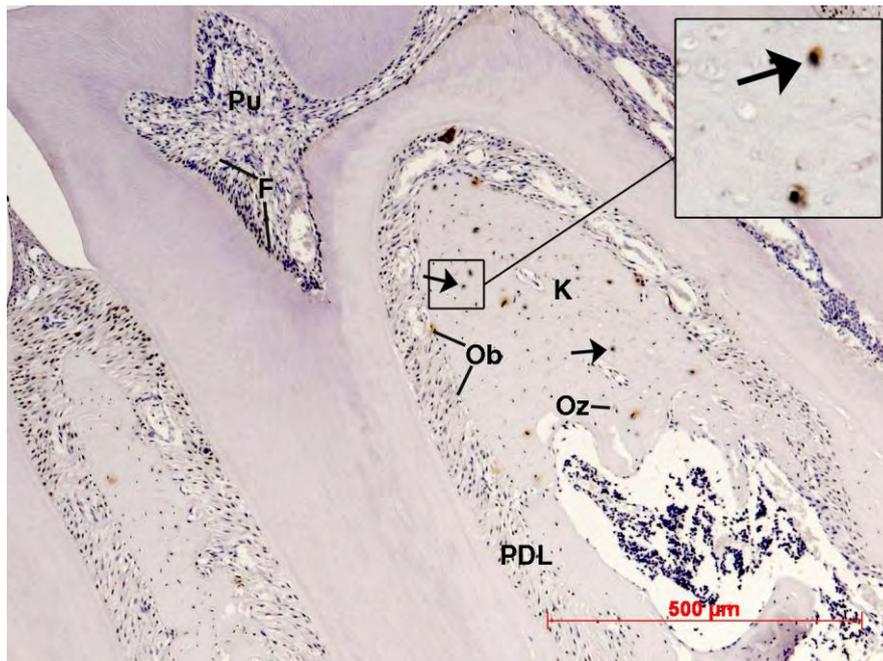


Abb 18: Cbfa1- Immunreaktion im Bereich des ersten Molaren (M1) des UKs; acht Wochen alte Maus; DAB- Färbung: Anschnitt durch den koronalen Bereich des durchgebrochenen Zahnes; K = Knochen; Oz = Osteozyten, Ob = Osteoblasten; PDL = Parodontalligament; Pu = Pulpa (Vergrößerung 10 x 10)
Ausschnittsvergrößerung im Bereich des Alveolarknochens der Maus mit Cbfa1- positiven Osteozyten (mittelstarke Immunreaktionen siehe Pfeile)

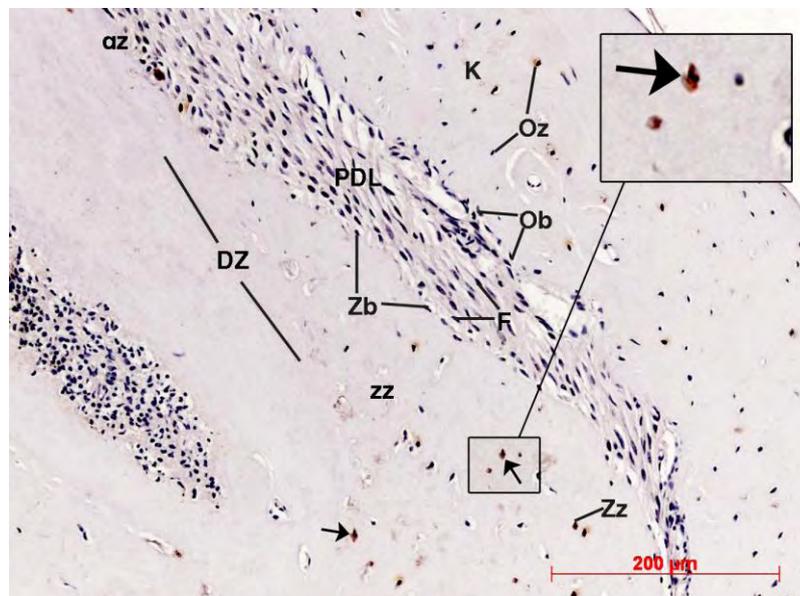


Abb 19: Cbfa1- Immunreaktion im Bereich des ersten Molaren (M1) des UKs; acht Wochen alte Maus; DAB- Färbung: Anschnitt durch den apikalen Bereich des durchgebrochenen Zahnes; K = Knochen; Oz = Osteozyten; Ob = Osteoblasten; PDL = Parodontalligament; DZ = Dentin- Zementgrenze; az = azelluläres Zement; zz = zelluläres Zement; Zz = Zementozyten (Pfeile); Zb = Zementoblasten (Vergrößerung 10 x 10)
Ausschnittsvergrößerung im Bereich des zellulären Zementes der Maus mit Cbfa1- positiven Zementozyten (mittelstarke Immunreaktion siehe Pfeile)

3.2.2 Immunhistochemie des Sklerostins

Gruppe 1: Neugeborene Mäuse:

Die neugeborenen Mäuse ließen keine Farbreaktionen im Zementbereich erkennen. Weder das sich entwickelnde zelluläre noch das azelluläre Zement zeigten eine bräunliche Färbung in diesem Bereich. Eine Reaktion bei den neugeborenen Mäusen war neben dem Zementbereich weder in Parodontalligamentzellen noch in denen der Pulpa erkennbar. Die Epithelzellen der Gingiva zeigten, im Gegensatz zu den anderen Antikörpern, keine Reaktion (siehe Tabelle 4, 6 und Abb. 20, 21).

Eine positive Immunreaktion war lediglich im Bereich des Alveolarknochens vorzufinden. Eine mittelstarke Immunfärbung bildete sich im Bereich der Osteozyten ab. Hier ließen sich Gemeinsamkeiten zu den neugeborenen Tieren bezüglich der Antikörper S100A4 sowie Cbfa1 finden, die jeweils ebenfalls Reaktionen in diesem Bereich aufwiesen. Auffällig war in diesem Zusammenhang, dass die Knochenmatrix gefärbt war. In dem Bereich der Matrix war eine großflächige Färbung erkennbar. Die Zellen konnten nicht klar differenziert werden.

Die Färbung schien unabhängig von den Knochenzellen vorzuliegen und ließ keine Regelmäßigkeit erkennen.

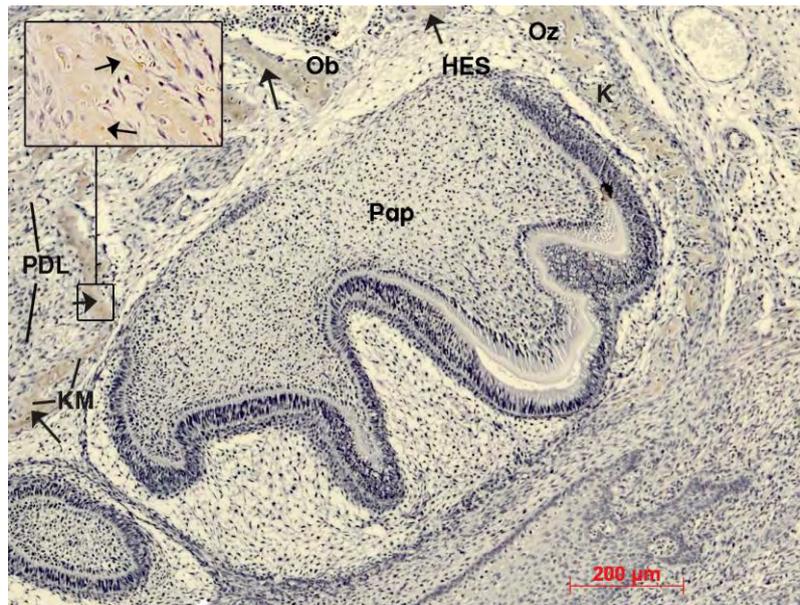


Abb.20: SOST- Immunreaktion im Bereich des ersten Molaren (M1) des OKs; neugeborene Maus; DAB-Färbung:

Übersicht; K = Knochen, KM = Knochenmatrix; SOST- positive Areale im Knochengewebe (Pfeile); Ob = Osteoblasten; Oz = Osteozyten; Pap = Papille; HES = Hertwigsche Epithelscheide; PDL = Parodontalligament; (Vergrößerung: 10 x 10)

Ausschnittsvergrößerung im Bereich des Knochengewebes der Maus mit SOST- positiven Osteozyten (mittelstarke Immunreaktion siehe Pfeile) und Knochenmatrix

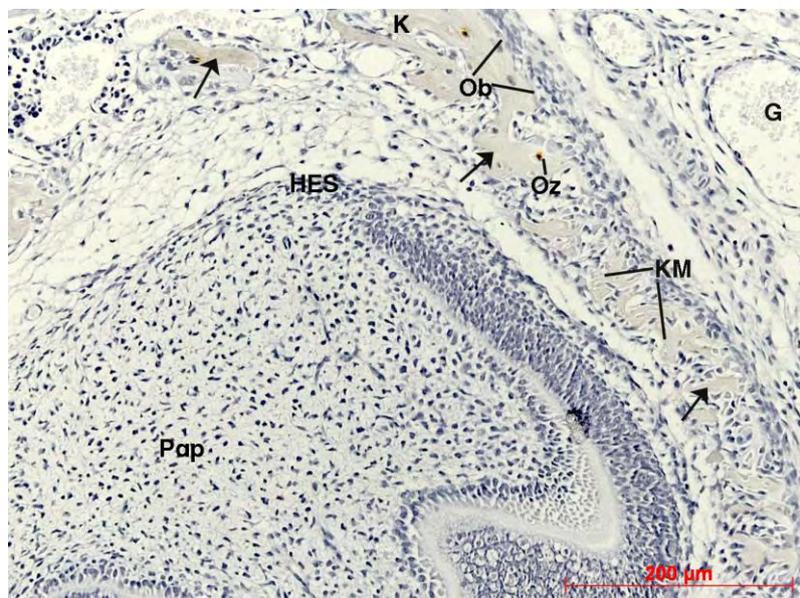


Abb.21: SOST- Immunreaktion im Bereich des ersten Molaren (M1) des OKs; neugeborene Maus; DAB-Färbung:

Vergrößerung im Bereich des PDLs, des Knochens und der Wurzel; K = Knochen, KM = Knochenmatrix; SOST- positive Areale im Knochengewebe (Pfeile); Ob = Osteoblasten; Oz = Osteozyten; Pap = Papille; HES = Hertwigsche Epithelscheide; G = Gefäße; PDL = Parodontalligament (Vergrößerung: 10 x 20)

Gruppe 2: Eine Woche alte Mäuse

Die Ergebnisse dieser Altersgruppe waren identisch zu denen der Gruppe 1. Wie auch bei den Tieren der Gruppe 1, konnte man bei den einwöchigen Tieren keine Immunreaktion im Bereich des Zementes, des PDLs, der Pulpa und der Gingiva nachweisen. Es fand demnach keine Reaktion in den Epithelzellen, Fibroblasten, Zementoblasten bzw. in den Zementozyten statt. Lediglich in den Osteozyten des Alveolarknochens ließ sich eine mittelstarke Reaktion erkennen (siehe Abb. 22, 23).

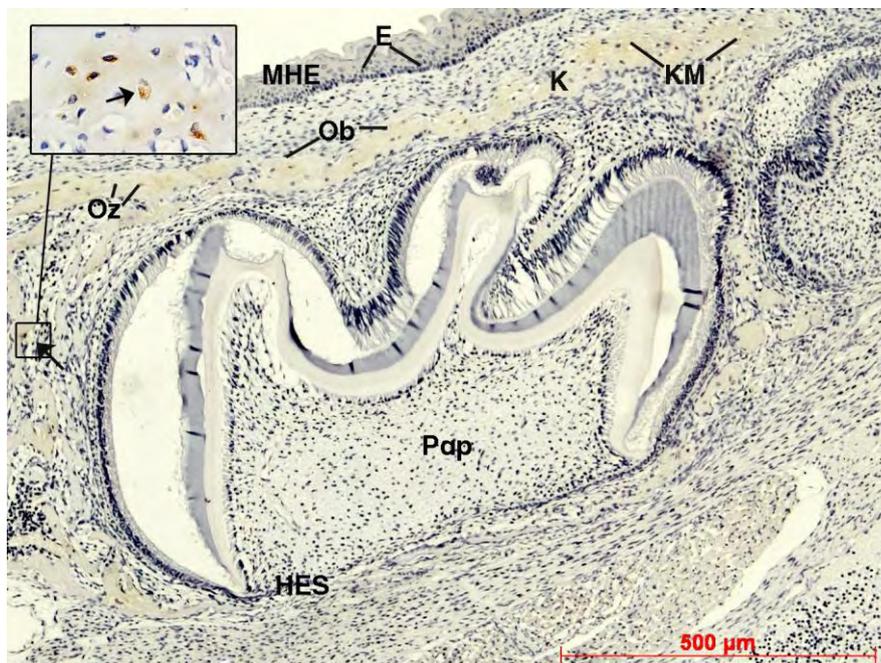


Abb.22: SOST- Immunreaktion im Bereich des ersten Molaren (M1) des UKs; eine Woche alte Maus; DAB- Färbung:

Übersicht; K = Knochen mit SOST- positiven Knochenzellen und Knochenmatrix (KM, mittelstarke Immunreaktion), Ob = Osteoblasten; Oz = Osteozyten; Pap = Papille; HES = Hertwigsche Epithelscheide; MHE = Mundhöhlenepithel; E = Epithelzellen (Vergrößerung: 10 x 10)

Ausschnittsvergrößerung im Bereich des Alveolarknochens der Maus mit SOST-positiven Osteozyten (Pfeil)

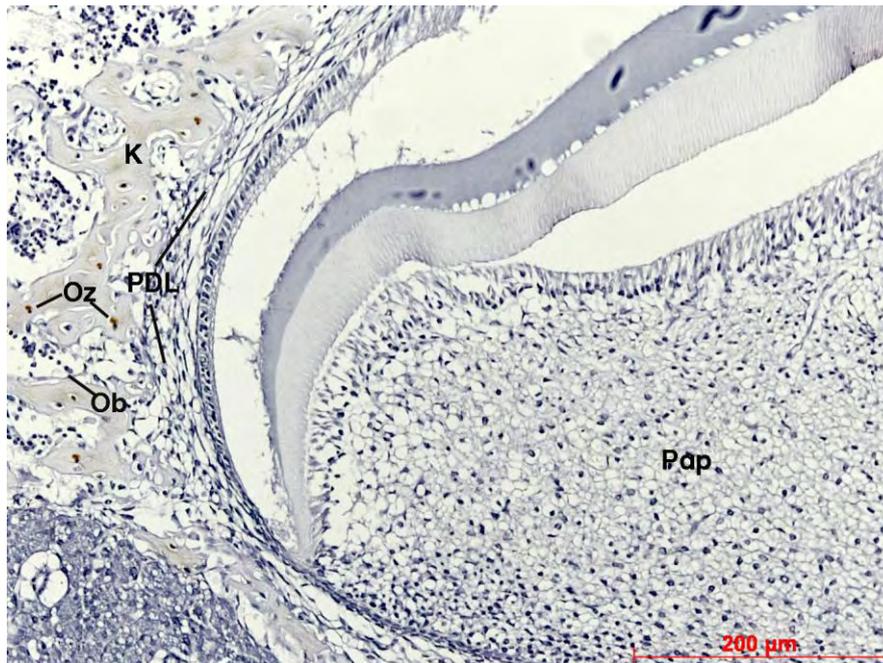


Abb.23: SOST- Immunreaktion im Bereich des ersten Molaren (M1) des UKs; eine Woche alte Maus; DAB- Färbung:

Vergrößerung im Bereich des PDLs, des Knochens und der Wurzel; K = Knochen mit SOST- positiven Knochenzellen und Knochenmatrix (KM, mittelstarke Immunreaktion), Ob = Osteoblasten; Oz = Osteozyten; Pap = Papille; PDL = Parodontalligament mit Zellen (Vergrößerung: 10 x 20)

Gruppe 3: Zwei Wochen alte Mäuse

Die Ergebnisse dieser Gruppe differierten in keinem untersuchten Gewebe von denen der Gruppen 1 und 2 (siehe Abb. 24).

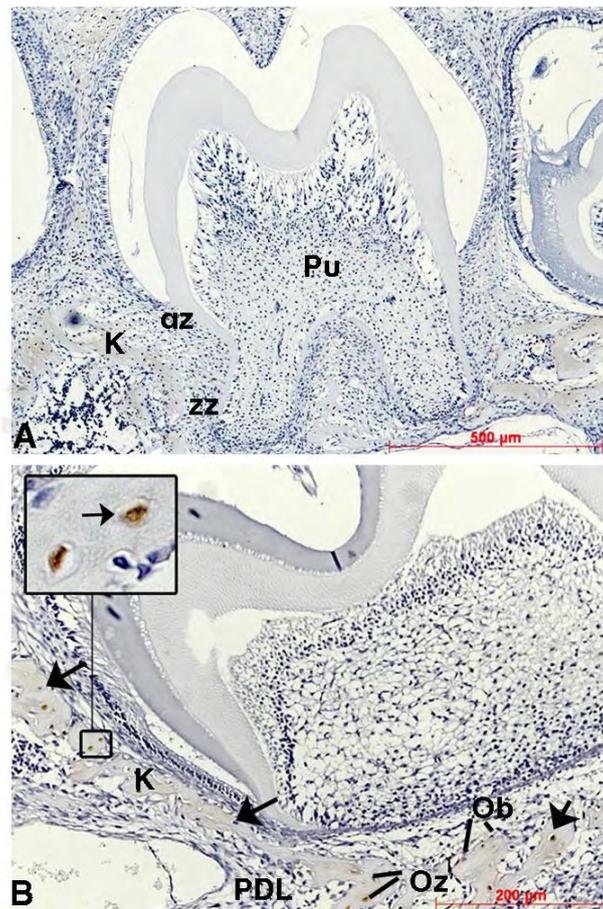


Abb 24: SOST- Immunreaktion im Bereich des ersten Molaren (M1) des UKs; zwei Wochen alte Maus; DAB- Färbung:

A: Übersicht; K = Knochen; Pu = Pulpa; az = azelluläres Zement; zz = zelluläres Zement (Vergrößerung 10 x 10)

B: Vergrößerung im Bereich des PDLs, des Knochens und der Wurzel; vereinzelt SOST- positive Osteozyten (mittelstarke Immunreaktion siehe Pfeile); Ob = Osteoblasten; SOST- negative Zellen im Parodontalligament (PDL) (Vergrößerung: 10 x 20)

Ausschnittsvergrößerung im Bereich des Alveolarknochens der Maus mit SOST- positiven Osteozyten (Pfeil)

Gruppe 4: Vier Wochen alte Mäuse

Die vier Wochen alten Mäuse zeigten einige Unterschiede und Besonderheiten verglichen mit den Gruppen 1 bis 3 sowie im Vergleich zu den bisher beschriebenen Antikörpern. Viele Gemeinsamkeiten zu den acht Wochen alten Tieren lagen vor, die in Gruppe 5 dargestellt werden.

Im Bereich des Zementes fielen bräunliche Farbänderungen besonders im Bereich der Zementozyten auf (Abb. 25). Diese Immunfärbungen befanden sich verstärkt in apikalen Abschnitten des zellulären Zementes. Auch der äußere Rand des Zementes, der dem Desmodont anlag, zeigte eine bräunliche, leicht linienförmige Markierung (Abb. 25). Die Intensität dieser Reaktion war mittelstark. Verglichen mit dem S100A4 und Cbfa1 war beim Sklerostin eine deutlich schwächere Immunreaktion im Bereich des Zementes vorhanden. Im weiter koronal gelegenen azellulären Zement ließ sich keine Immunreaktion nachweisen. Analog zum Cbfa1 waren die Zementoblasten des azellulären Zementes nicht gefärbt.

Im Gegensatz zu den Antikörpern Cbfa1 und S100A4, die in den Parodontalligamentzellen sehr starke Immunreaktionen erkennen ließen, zeigten sich im Bereich des PDLs lediglich mittlere Reaktionen.

Die immunhistochemische Reaktion im Bereich der Pulpa sowie der Gingiva waren ebenso wie bei den vorherigen Altersgruppen negativ. Es ließ sich keinerlei Braunfärbung in diesen Bereichen erkennen. Sklerostin zeigte bei den vierwöchigen Tieren ebenfalls eine mittlere Reaktion in der Region des Alveolarknochens. In diesem Bereich bestand kein Unterschied zu den bereits beschriebenen Gruppen 1-3.

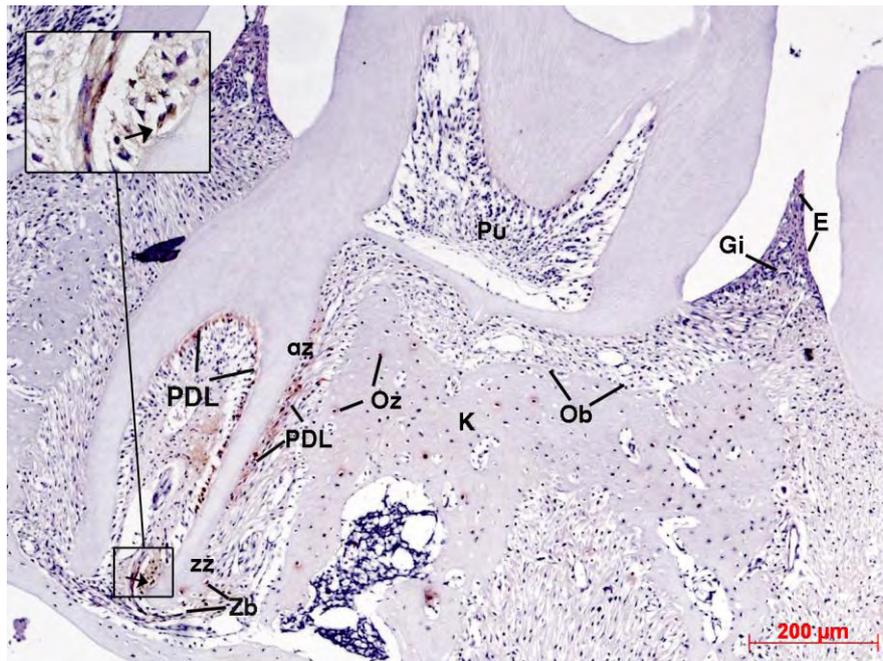


Abb 25: SOST- Immunreaktion im Bereich des ersten Molaren (M1) des UKs; vier Wochen alte Maus; DAB- Färbung:
 Übersicht; K = Knochen; Oz = Osteozyten, Ob = Osteoblasten; PDL = Parodontalligament mit SOST-positive PDL- zellen (mittelstarke Immunreaktion); Pu = Pulpa; az = azelluläres Zement; zz = zelluläres Zement mit teilweise SOST- positiven Zementozyten (Zz, mittelstarke Immunreaktion); Gi = Gingiva; E = Epithelzellen (Vergrößerung 10 x 10)
 Ausschnittsvergrößerung im Bereich des zellulären Zementes der Maus mit SOST- positiven Zementozyten (Pfeile)

Gruppe 5: Acht Wochen alte Mäuse

Die Ergebnisse dieser Gruppe unterschieden sich im Bereich des Zementes, Knochens und des Parodontalligamentgewebes von denen der Gruppen 1, 2 und 3. Zu den Ergebnissen der Gruppe 4 ließen sich deutliche Parallelen ziehen. Bei den acht Wochen alten Mäusen konnte man ebenfalls mittelstarke Immunreaktionen erkennen. Die Verteilung lag wie bei der Gruppe 4 verstärkt in apikalen Abschnitten des zellulären Zementes. Die Intensität dieser Reaktion war mittelstark (siehe Abb. 26 sowie Tabelle 1 und 2).

Im Bereich des Parodontalligamentes lag ebenfalls wie in Gruppe 4 der vierwöchigen Mäuse eine mittelstarke Immunreaktion vor (siehe Abb. 26, 27 sowie Tabelle 4).

Der einzige Unterschied zu der Gruppe 4 lag im Bereich des Alveolarknochens. Die Immunreaktion erschien bei den ältesten, untersuchten Mäusen stärker als bei den jüngeren Tieren. Im Bereich der Osteozyten konnte man von einer starken Immunreaktion sprechen (Tabelle 3). Wie in Abb. 27 gezeigt, erkannte man - neben

einer Färbung der Osteozyten – auch eine deutliche Färbung der Knochenmatrix. Die Osteozyten erschienen teilweise dunkel braun bis schwarz und lagen in einer bräunlich gefärbten Knochenmatrix. Diese Altersgruppe wies erstmalig deutlich kontrastierte dunkelbraun bis schwarz gefärbte Zellen auf, die sich von dem gefärbten Matrixbereich abhoben. Die Osteozyten waren in den lakunenartigen Hohlräumen, durch die sie in der Matrix eingemauert erschienen, deutlich erkennbar. Die Knochenmatrix um die Osteozyten herum erschien teilweise wie ein weißer Hof, der von einer stärker gefärbten bräunlichen Linie umrandet war (siehe Abb. 27).

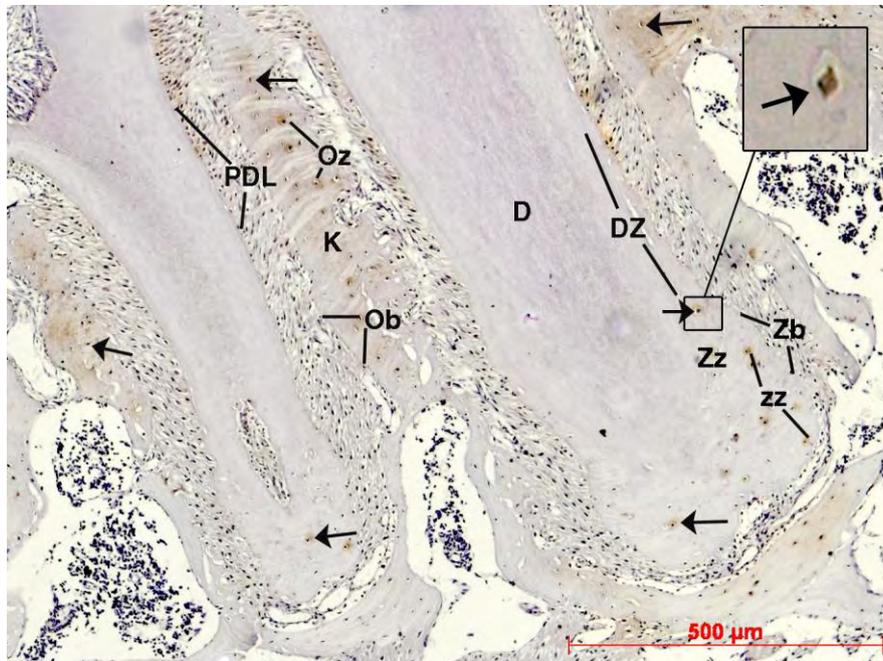


Abb 26: SOST- Immunreaktion im Bereich des ersten Molaren (M1) des UKs; acht Wochen alte Maus; DAB- Färbung:

Anschnitt durch den apikalen Bereich des durchgebrochenen Zahnes; Abbildung des apikalen Wurzelbereiches mit umgebenden Knochen- und Wurzelgewebe; K = Knochen; Oz = Osteozyten, Ob = Osteoblasten; PDL = Parodontalligament mit punktförmigen PDL- Zellen; Pu = Pulpa; D = Dentin; DZ = Dentin-Zementgrenze; zz = zelluläres Zement; az = azelluläres Zement; Zz = Zementozyten; Zb = Zementoblasten; SOST- positive Zellen im Bereich des Knochens (starke Immunreaktion), der Wurzel (mittelstarke Immunreaktion) sowie des Parodontalligamentes (Pfeile) (Vergrößerung 10 x 10)

Ausschnittsvergrößerung im Bereich des zellulären Zementes der Maus mit SOST- positiven Zementozyten (Pfeil)

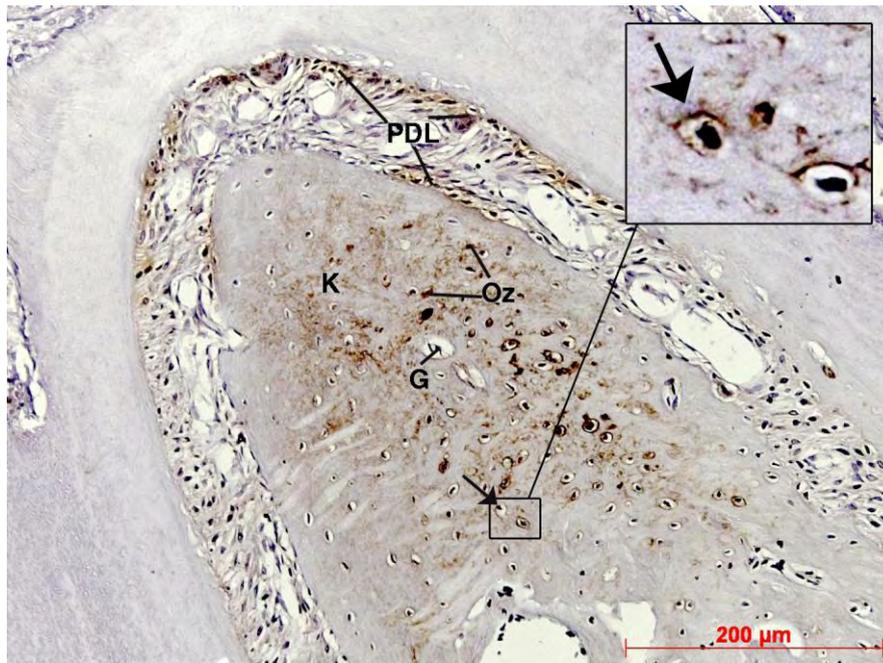


Abb 27: SOST- Immunreaktion im Bereich des ersten Molaren (M1) des UKs; acht Wochen alte Maus; DAB- Färbung:

Anschnitt durch den Bereich des Alveolarknochens der Maus; SOST- positive Osteozyten (starke Immunreaktionen, siehe auch Pfeil); K = Knochen; G = Gefäße; PDL = Parodontalligament mit SOST- positiven PDL- Zellen (Vergrößerung 10 x 20)

Ausschnittsvergrößerung im Bereich des Alveolarknochens der Maus mit SOST- positiven Osteozyten (Pfeile)

3.3 Kontrollen

Neben den beschriebenen histologischen und immunhistochemischen Reaktionen wurden von jedem der drei verwendeten Antikörper in allen beschriebenen Altersgruppen jeweils fünf Negativkontrollen durchgeführt. Alle 45 Negativkontrollen entsprachen den zu erwartenden Reaktionen. Exemplarisch sind an dieser Stelle drei Negativkontrolle für die drei verwendeten Antikörper einer vier Wochen alten Maus abgebildet (vergleiche Abb. 28 (S100A4), 29 (Cbfa1), 30 (Sklerostin). Die Schnitte wiesen im Gegensatz zu den Abbildungen 11 ,17 und 25 keinerlei Färbung auf.

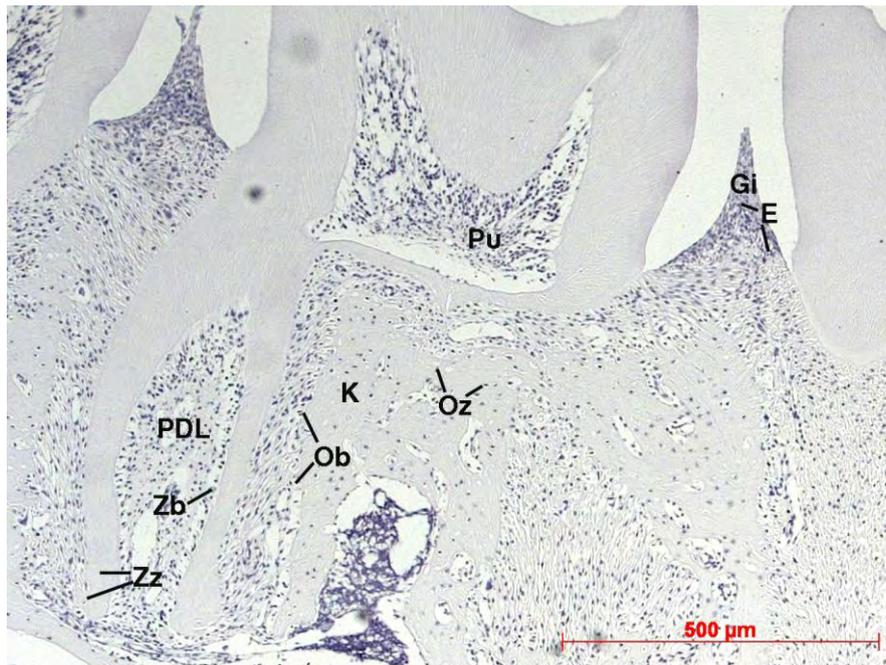


Abb. 28: S100A4– Negativkontrolle im Bereich des ersten Molaren (M1) des UKs; vier Wochen alte Maus; ungefärbte Bereiche (keine Immunreaktionen): PDL = Parodontalligament; K = Knochen; Ob = Osteoblasten; Oz = Osteozyten; Zb = Zementoblasten; Zz = Zementozyten; Pu = Pulpa; Gi = Gingiva; E = Epithelzellen (Vergrößerung: 10 x 10)

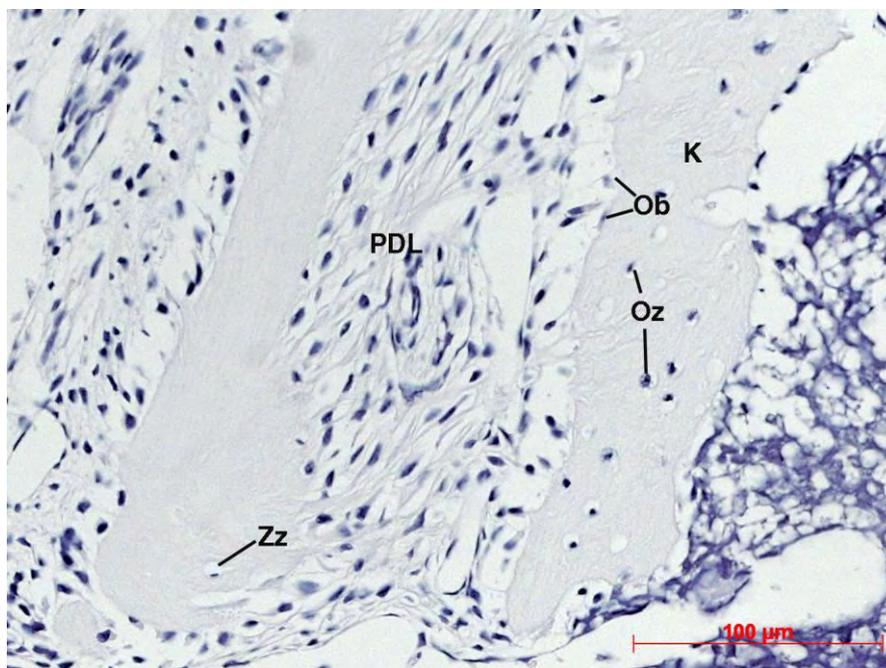


Abb. 29: Cbfa1– Negativkontrolle im Bereich des ersten Molaren (M1) des UKs; vier Wochen alte Maus; ungefärbte Bereiche (keine Immunreaktionen): PDL = Parodontalligament; K = Knochen; Ob = Osteoblasten; Oz = Osteozyten; Zz = Zementozyten (Vergrößerung: 10 x 40)

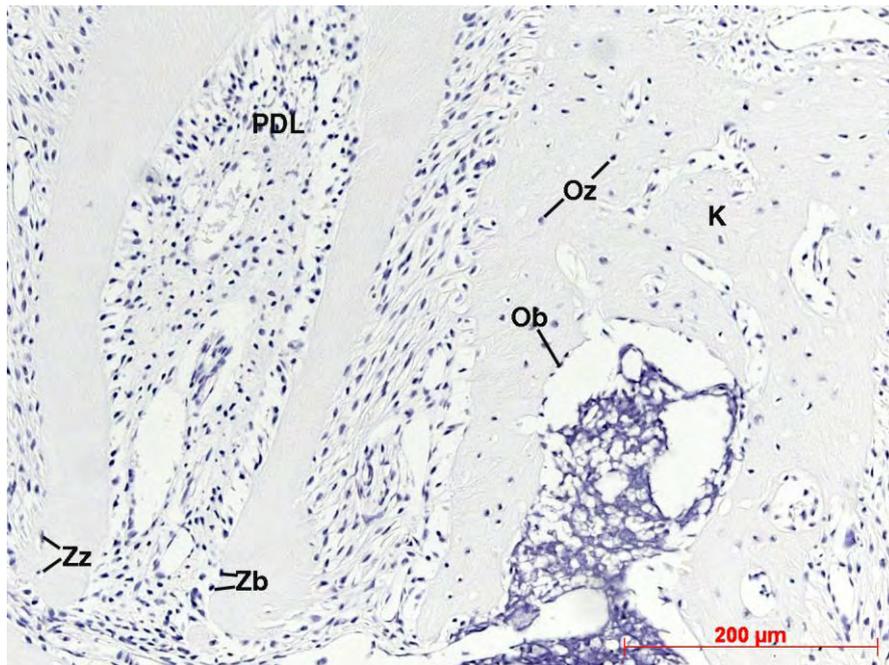


Abb. 30: SOST– Negativkontrolle im Bereich des ersten Molaren (M1) des UKs; vier Wochen alte Maus; ungefärbte Bereiche (keine Immunreaktionen): PDL = Parodontalligament; K = Knochen; Ob = Osteoblasten; Oz = Osteozyten; Zz = Zementozyten; Zb = Zementoblasten (Vergrößerung: 10 x 20)

3.4 Zusammenfassung der erzielten Immunreaktionen

Die folgende Tabelle fasst die Immunreaktionen, die an den Kiefern der Mäuse zu beobachten waren, zusammen. Wie bereits im zweiten Kapitel der Arbeit beschrieben, wurden insgesamt 800 Schnitte in die Analysen miteinbezogen. Die Ergebnisse der folgenden Tabellen fundieren auf einer repräsentativen Teilmenge von 150 Schnitten.

	SOST					S1004A					Cbfa1/Runx2				
	Neugeborene	1 Woche	2 Wochen	4 Wochen	8 Wochen	Neugeborene	1 Woche	2 Wochen	4 Wochen	8 Wochen	Neugeborene	1 Woche	2 Wochen	4 Wochen	8 Wochen
Zementozyten	-	-	-	+	+	-	-	-	(+)	++	-	-	-	(+)	+
Zementoblasten	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	(+)	-	-	-	(+)	+
Osteozyten															
Osteblasten															
PDL- Zellen															
Fibroblasten															
Epithelzellen															

Tabelle 4: Immunlokalisation von SOST, S100A4 und Cbfa1 in den **zellulären Anteilen des Wurzelzementes** in verschiedenen Stadien der Zemententwicklung bei der Maus. Die Ergebnisse basieren auf den Auswertungen von 150 repräsentativen Schnitten.

Abkürzungen: - = keine Immunreaktion; (+) = schwache Immunreaktion; + = mittelstarke Immunreaktion; ++ = starke Immunreaktion

	SOST					S1004A					Cbfa1/Runx2				
	Neugeborene	1 Woche	2 Wochen	4 Wochen	8 Wochen	Neugeborene	1 Woche	2 Wochen	4 Wochen	8 Wochen	Neugeborene	1 Woche	2 Wochen	4 Wochen	8 Wochen
Zementozyten	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Zementoblasten	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-
Osteozyten															
Osteblasten															
PDL- Zellen															
Fibroblasten															
Epithelzellen															

Tabelle 5: Immunlokalisation von SOST, S100A4 und Cbfa1 in den **azellulären Anteilen des Wurzelzementes** in verschiedenen Stadien der Zemententwicklung bei der Maus. Die Ergebnisse basieren auf den Auswertungen von 150 repräsentativen Schnitten.

Abkürzungen: - = keine Immunreaktion; (+) = schwache Immunreaktion; + = mittelstarke Immunreaktion; ++ = starke Immunreaktion

	SOST					S1004A					Cbfa1/Runx2				
	Neugeborene	1 Woche	2 Wochen	4 Wochen	8 Wochen	Neugeborene	1 Woche	2 Wochen	4 Wochen	8 Wochen	Neugeborene	1 Woche	2 Wochen	4 Wochen	8 Wochen
Zementozyten															
Zementoblasten															
Osteozyten	+	+	+	+	++	(+)	(+)	+	+	++	(+)	(+)	+	+	+
Osteblasten	-	-	-	-	-	(+)	(+)	(+)	(+)	++	++	+	+	+	+
PDL- Zellen															
Fibroblasten															
Epithelzellen															

Tabelle 6: Immunlokalisation von SOST, S100A4 und Cbfa1 im **Alveolarknochen** in verschiedenen Stadien der Zahnentwicklung bei der Maus. Die Ergebnisse basieren auf den Auswertungen von 150 repräsentativen Schnitten.

Abkürzungen: - = keine Immunreaktion; (+) = schwache Immunreaktion; + = mittelstarke Immunreaktion; ++ = starke Immunreaktion

	SOST					S1004A					Cbfa1/Runx2				
	Neugeborene	1 Woche	2 Wochen	4 Wochen	8 Wochen	Neugeborene	1 Woche	2 Wochen	4 Wochen	8 Wochen	Neugeborene	1 Woche	2 Wochen	4 Wochen	8 Wochen
Zementozyten															
Zementoblasten															
Osteozyten															
Osteblasten															
PDL- Zellen	-	-	-	+	+	+	++	++	+	+	+	+	+	++	++
Fibroblasten															
Epithelzellen															

Tabelle 7: Immunlokalisation von SOST, S100A4 und Cbfa1 im **PDL** in verschiedenen Stadien der Zahnentwicklung bei der Maus. Die Ergebnisse basieren auf den Auswertungen von 150 repräsentativen Schnitten.

Abkürzungen: - = keine Immunreaktion; (+) = schwache Immunreaktion; + = mittelstarke Immunreaktion; ++ = starke Immunreaktion

	SOST					S1004A					Cbfa1/Runx2				
	Neugeborene	1 Woche	2 Wochen	4 Wochen	8 Wochen	Neugeborene	1 Woche	2 Wochen	4 Wochen	8 Wochen	Neugeborene	1 Woche	2 Wochen	4 Wochen	8 Wochen
Zementozyten															
Zementoblasten															
Osteozyten															
Osteblasten															
PDL- Zellen															
Fibroblasten	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++	-	-	-	-	(+)
Epithelzellen															

Table 8: Immunlokalisation von SOST, S100A4 und Cbfa1 im **pulpalen Bereich** in verschiedenen Stadien der Zahnentwicklung bei der Maus. Die Ergebnisse basieren auf den Auswertungen von 150 repräsentativen Schnitten.

Abkürzungen: - = keine Immunreaktion; (+) = schwache Immunreaktion; + = mittelstarke Immunreaktion; ++ = starke Immunreaktion

	SOST					S1004A					Cbfa1/Runx2				
	Neugeborene	1 Woche	2 Wochen	4 Wochen	8 Wochen	Neugeborene	1 Woche	2 Wochen	4 Wochen	8 Wochen	Neugeborene	1 Woche	2 Wochen	4 Wochen	8 Wochen
Zementozyten															
Zementoblasten															
Osteozyten															
Osteblasten															
PDL- Zellen															
Fibroblasten															
Epithelzellen	-	-	-	-	-	+	+	++	++	++	+	+	+	+	+

Table 9: Immunlokalisation von SOST, S100A4 und Cbfa1 im Bereich der **Gingiva** in verschiedenen Stadien der Zahnentwicklung bei der Maus. Die Ergebnisse basieren auf den Auswertungen von 150 repräsentativen Schnitten.

Abkürzungen: - = keine Immunreaktion; (+) = schwache Immunreaktion; + = mittelstarke Immunreaktion; ++ = starke Immunreaktion

4 Diskussion

4.1 Einordnung in die Literatur

Die Bildung von Zahnzement (Zementogenese) ist ein lebenslang andauernder Prozess. Er tritt als primäre Zementbildung während der pränatalen Entwicklung und des postnatalen Wachstums auf. Davon unterscheidet sich die sekundäre Zementbildung, die nach dem Zahndurchbruch bei funktionellen Anforderungen bzw. bei regenerativen Prozessen einsetzt. Besonders sind hier kieferorthopädische Zahnbewegungen sowie parodontale Läsionen zu nennen (MacNeil und Somerman, 1993).

In den letzten Jahren stieg das Interesse an den menschlichen Geweben, die den Zahnhalteapparat bilden (Zement, Parodontalligament sowie Alveolarknochen). Der Grund ist das zunehmende Bestreben, natürliche Zähne durch verbesserte Therapie- und Regenerationsansätze zu erhalten (siehe 4.4).

Aufgrund zunehmender Kenntnisse bezüglich der besonderen Bedeutung des Zementes im Zahnhalteapparat aus physiologischer und pathologischer Hinsicht war dieses Gewebe in der vorliegenden Arbeit von besonderem Interesse und stand im Fokus der Untersuchungen.

Trotz einiger Gemeinsamkeiten mit dem Knochengewebe weichen die beiden Hartgewebe in wichtigen Punkten voneinander ab. Während der Knochen stark vaskularisiert ist, liegt beim Wurzelzement des Zahnes ein avaskuläres Gewebe vor, das keine physiologischen Umbauvorgänge zeigt (Bosshardt, 2005).

Sklerostin, als wichtige Komponente bei der Knochenentwicklung, beeinflusst die Osteoblastenentwicklung durch initiale Stimulierung der mesenchymalen Progenitorzellen (Winkler et al., 2003). Dies erfolgt durch verschiedene Regulationsmechanismen (siehe Kapitel 1.3). Bisherige Studien untersuchten die Lokalisation und Funktion des Sklerostins in unterschiedlichen Geweben:

Sklerostin wird in den Osteozyten des Alveolarknochens von Menschen und Mäusen exprimiert (Poole et al., 2005). Neuere Studien fanden Sklerostin auch in den Lakunen der Zementozyten des zellulären Zementes von Menschen und Mäusen (Jäger et al.,

2009; van Bezooijen et al., 2009). Die vorliegende Studie schließt an die Untersuchungen der o.g. Studien an.

In der vorliegenden Arbeit wurden zahnanlagentragende Kiefer von Mäusen im Alter von null bis acht Wochen histologisch im Laufe der Zementogenese untersucht, um Hinweise auf eine mögliche Rolle des Sklerostins während der Zemententwicklung diskutieren zu können.

Mit Hilfe eines immunhistochemischen Nachweises sollte die Expression von Sklerostin sowie zum Vergleich von S100A4 und Cbfa1 in den verschiedenen Komponenten des Zahnhalteapparates, insbesondere des Zementes, nachgewiesen werden.

Aktuell wurde mit dieser Studie erstmalig die Sklerostinexpression detailliert im Zementgewebe untersucht. Des Weiteren wurde die Sklerostinexpression während der Zementogenese beurteilt. Es erfolgte ein differenzierter Nachweis der Sklerostinexpression in den verschiedenen Zementarten (zellulär/ azellulär). Dies sollte die funktionelle Bedeutung dieses Proteins für die Zementogenese näher beleuchten (Jäger et al., 2009).

4.2 Methodische Diskussion

Die Immunhistochemie ist eine weit verbreitete, auf der Grundlage von Antigen-Antikörper-Reaktionen basierende Nachweismethode. Dabei werden die zu untersuchenden Proteine mit Hilfe von Antikörpern sichtbar gemacht.

Ein möglicher Grund für unterschiedliches und teilweise unerwartetes Färbeverhalten der fixierten Gewebe kann in der Methodik der Gewebefixierung und der Gewebeeinbettung liegen. Dies umfasst neben Ungenauigkeiten während der Materialaufbereitung auch eine verminderte Sensitivität der Methode bzw. der Antikörper. Besonders kritische Schritte im Arbeitsablauf der immunhistologischen Färbung sind die Fixation und die Paraffineinbettung. Die teilweise sehr schwachen Gewebsreaktionen, die in 4.2 diskutiert werden, können demnach teilweise durch Fixierungsartefakte sowie Gewebsüberhitzungen während der Materialaufbereitung erklärt werden.

Nach Noll et al. (2000) muss ein Antigen vorhanden, fixiert und für den Primärantikörper zugänglich sein. Ist ein Antigen nicht fixiert, so wird es aus dem Gewebe ausgewaschen und ist für eine Anfärbung nicht mehr zugänglich. Andererseits entstehen durch Überfixierung Probleme, wie Maskierung und Denaturierung des Antigens. Ferner können später bei der Paraffineinbettung des fixierten Gewebes durch zu hohe Temperaturen Antigenstrukturen des nachzuweisenden Proteins zerstört werden. Insgesamt können durch folgende Fehler unspezifische Färbereaktionen entstehen (Noll und Schaub-Kuhnen, 2000):

- Fehler im Verlaufe der Fixation
- Nekrotisches Material
- Nicht optimale Antikörperverdünnung
- Unvollständige Entfernung von Paraffin
- Unspezifische Bindung von Protein
- Beschichtungssubstanzen der Objektträger
- Unzureichendes Waschen zwischen den einzelnen Inkubationsschritten

4.3 Diskussion der Ergebnisse

Im Folgenden werden die im Ergebnissteil beschriebenen Befunde und Auffälligkeiten diskutiert. Zur besseren Übersicht wurden die Ergebnisse nach den verschiedenen Gewebsarten aufgeteilt und einzeln diskutiert.

4.3.1 Diskussion der Ergebnisse im Bereich des Zementes

4.3.1.1 Sklerostin

Das Wurzelzement des Zahnes ist das Hartgewebe, welches die Wurzeloberfläche bedeckt und den Zahn durch Kollagenfasern in seiner funktionellen Position verankert. Wie bereits in der Studie von Jäger et al. (2009) zum ersten Mal gezeigt, bestätigte auch diese Arbeit eine Sklerostinexpression im Bereich der Zementozyten.

Die vorliegenden Untersuchungen zeigten ausschließlich eine Expression des Sklerostins im zellulären Zement. Diese Expression war lediglich bei den vier- und achtwöchigen Mäusen nachweisbar (Abb. 25 und 26 sowie die Tabellen 1 und 2). Bei den jüngeren Tieren (Neugeborene, 1 Woche, 2 Wochen) konnte keine Sklerostinexpression nachgewiesen werden.

Die physiologische Rolle die das Sklerostin im Zementgewebe spielt, kann nur vermutet werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden daher mit aktuellen wissenschaftlichen Ergebnissen verglichen.

1. Denkbar ist eine Beteiligung des Sklerostins an Entwicklungs- und Reifungsprozessen der zementbildenden Zellen (Zementoblasten, Zementozyten). Bekannt ist ein derartiger Mechanismus für das Knochengewebe. Hier geht man davon aus, dass Sklerostin für die initiale Bereitstellung von knochenbildenden Zellen mitverantwortlich ist (van Bezooijen et al., 2004; van Bezooijen et al., 2005; Winkler et al., 2003).

Untersuchungen von Cohn zeigten bereits 1957, dass die Entwicklung des zellulären und azellulären Zementes bereits in den ersten postnatalen Tagen deutlich fortschreitet (Cohn, 1957). Demnach wäre eine Sklerostinexpression bereits bei den Neugeborenen bzw. einwöchigen Mäusen zu erwarten.

Tatsächlich war ein Sklerostinnachweis erst bei den älteren Tieren (vier- und achtwöchige) positiv. Bei den jüngeren Mäusen (jünger als 4 Wochen) konnte Sklerostin im Rahmen der Zemententwicklung in den vorliegenden Untersuchungen nicht nachgewiesen werden.

Im Gegensatz zur Knochenentwicklung, bei der Sklerostin während der gesamten Entwicklungsphase nachgewiesen werden kann, scheint Sklerostin an den initialen Zemententwicklungsstadien daher nicht beteiligt zu sein.

2. Untersuchungen des Knochengewebes zeigten zusätzlich eine wichtige Aufgabe des Sklerostins im Rahmen der späteren Knochenentwicklung bzw. der Knochenhomöostase (Taylor et al., 2007). Durch Homöostase, als Grundvoraussetzung für die Leistungsanpassung eines Gewebes, wird das Gleichgewicht zwischen dem Organismus und der Umwelt geregelt. Wahrscheinlich scheint eine vergleichbare Wirkung des Sklerostins auf die Zementhomöostase. Positive Reaktionen lediglich bei den älteren Mäusen (vier- bzw. achtwöchig) unterstützen diese These. Eine Aufrechterhaltung der Zementhomöostase scheint besonders bei den Mäusen eine bedeutende Rolle zu spielen, bei denen das Zementgewebe vollständig entwickelt ist. Verschiedene Autoren bestätigten bereits die Existenz von Proteinen, die auf das Zementgewebe einwirken. Steuerungsfaktoren der Zementogenese wurden ebenfalls bereits beschrieben. In diesem Zusammenhang wiesen MacNeil und Somerman (1993) in ihrer Studie den Einfluss von Wachstumsfaktoren nach, während eine Studie von Tenorio et al. (1993) die Bedeutung der Marker E11/ gp38 nachwies.

3. Resorptive Prozesse werden durch die sekundäre Zementbildung teilweise regeneriert. Bei der sekundären Zementbildung entsteht sekundäres Zement, welches je nach Spezies vorwiegend aus azellulärem oder aus zellulärem Zement gebildet wird (Bosshardt, 2005). Da in der vorliegenden Untersuchung lediglich positive Reaktionen im Bereich des zellulären Zementes nachgewiesen werden konnten, könnte Sklerostin so an regenerativen Prozessen des Zahnzementes der Maus beteiligt sein.

Physiologisch auftretende resorptive Vorgänge an der Zahnwurzel wurden bereits von Schroeder (2000) nachgewiesen. Es wurden physiologische und pathologische Resorptionen mit steigendem Alter gezeigt (Schroeder, 2000). In diesem Zusammenhang wurde bereits die Möglichkeit der eingeschränkten Regeneration im Bereich des zellulären Zementes beschrieben. Aussagen über die dafür verantwortlichen Proteine wurden jedoch nicht gemacht (Henry und Weinmann, 1951). Aufgrund der oben genannten Studien ist es wahrscheinlich, dass bei vier- und

achtwöchigen Mäusen aufgrund ihres Alters physiologische und pathologische Resorptionen vorlagen. Diese scheinen durch sekundäre Zementogenese regeneriert werden zu können. Hierbei ist eine Beteiligung von Sklerostin denkbar.

In den aktuellen wissenschaftlichen Untersuchungen gibt es unterschiedliche Meinungen bezüglich der Entwicklung der beiden Zementarten. Differenziert man die beiden Zementarten (zelluläres/ azelluläres) nicht voneinander und geht von einer gemeinsamen Entwicklung der beiden Gewebe aus, lässt sich auf die Ansätze von Diekwisch sowie Slavkin und Bringas zurückgreifen. Diese Autoren gehen von transformierten, mesenchymalen Vorläuferzellen der Zementgewebe (Diekwitsch, 2001), bzw. von einem gemeinsamen epithelialen Vorläufer (Slavkin und Bringas, 1976) aus. Ein gemeinsamer Ursprung der beiden untersuchten Gewebe ließe eher ähnliche Zell- und Expressionseigenschaften erwarten (Diekwitsch, 2001; Slavkin und Bringas, 1976).

In der vorliegenden Arbeit weist das unterschiedliche Expressionsverhalten in den beiden Zementarten daher eher auf getrennte Entwicklungen hin (siehe Abbildungen 25 und 26). Die vorliegenden Ergebnisse (siehe auch Tabelle 1 und 2) lassen sich tendenziell besser mit dem Standpunkt von Bosshardt (2005) vereinbaren. Bosshardt stellte die Notwendigkeit einer differenzierten Betrachtung des zellulären und azellulären Zementes heraus. Diskutiert wurden unterschiedliche Vorläuferpopulationen für das azelluläre bzw. das zelluläre Zement. Unterschiedliche Reaktionsfähigkeiten im Sinne einer ungleichen Sklerostinexpression in den beiden Zementgewebsarten bestärken diese Theorie nach Bosshardt (2005).

Es lassen sich zudem Parallelen zwischen den Ergebnissen im Wurzelzement und denen im Bereich des Alveolarknochens feststellen. Positive Färbungsreaktionen ließen sich ausschließlich in den differenzierten - in Lakunen eingelagerten Zellen - den Osteo- bzw. Zementozyten nachweisen. Die Zement- bzw. Knochensubstanz aufbauenden Zellen, Osteo- bzw. Zementoblasten zeigten ausschließlich negative Reaktionen.

Im Gegensatz zum Zementgewebe, in dem erst 2009 in der Studie von Jäger et al. die Sklerostinexpression nachgewiesen wurde, liegen hinsichtlich des Knochengewebes bereits viele Studien vor, die dies belegen (Jäger et al., 2009; Ott, 2005; Poole et al., 2005; Winkler et al., 2003) (siehe Kapitel 4.2.2).

In diesem Kontext ist für einen möglichen Erklärungsansatz erneut die Studie nach Bosshardt (2005) hilfreich. Bosshardt differenzierte dabei nicht nur das zelluläre vom azellulären Zement, wie bereits beschrieben, sondern ging zusätzlich von einer gemeinsamen Vorläuferpopulation von zellulärem Zement und Knochengewebe aus. Er wies damit auf eine gemeinsame Entwicklung von Zementozyten und Osteozyten hin (Bosshardt, 2005). Van Bezooijen et al. gingen in neuesten Studien davon aus, dass Sklerostin von Zellen unterschiedlicher Gewebe mit gleichem Ursprung exprimiert wird (van Bezooijen et al., 2009).

4.3.1.2 S100A4

S100A4, als Kalzium- bindendes Protein diente in zahlreichen Studien zum Nachweis fibroblastischer Zelllinien (Le Hir et al., 2005; Ryan et al., 2003). S100A4 wurde jedoch auch in Entzündungszellen (Mazzucchelli, 2002), Tumormetastasen (Garrett et al., 2006) usw. nachgewiesen.

Die Immunreaktivität für S100A4 im gesamten zellulären Zementgewebe bei den vier- und achtwöchigen Mäusen könnte als Hinweis auf einen fibroblastischen Phänotyp der positiven Zellen gewertet werden (Le Hir et al., 2005; Ryan et al., 2003). Berücksichtigt werden muss hierbei, dass S100A4 kein ausschließlicher Fibroblastenmarker ist und auch in anderen Geweben nachweisbar ist. Hierzu zeigte Mazzucchelli (2002) bei Zellen im Rahmen einer Entzündung positive Reaktionen für S100A4. Vermutlich führen mit dem Alter akkumulierende Belastungen zu Entzündungsreaktionen.

Donato (2003) definierte die Reparaturvorgänge nach Wurzelresorption als eine Art der Wundheilung und bezeichnete das S100A4 als wichtigen Regulator bindegewebiger Wundheilung. Zusammen mit den bereits in 4.3.1.1 beschriebenen Kenntnissen hinsichtlich der Wurzelresorptionen und -reparaturen dient dies als Erklärungsansatz für die Reaktionen des S100A4 im Bereich des Zementes. Den Reparaturzellen kann hierbei ein fibroblastischer Phänotyp zugeordnet werden (Donato, 2003).

4.3.1.3 Cbfa1

Cbfa1 charakterisiert eine osteoblastäre Differenzierung der Zellen (Camilleri und McDonald, 2006; Komori, 2003; Schroeder et al., 2005).

Positive Cbfa1- Reaktionen weisen daher auf einen osteoblastären Phänotyp hin. Ein osteoblastärer Phänotyp wird unter anderem von Ivanovski et al. (2001), der sich mit der parodontalen Regeneration beschäftigte, als charakteristisch für Reparaturzellen beschrieben.

Bosshardt (2005) wies bereits auf einen gemeinsamen Ursprung des zellulären Zementes und des Knochengewebes hin. Eine Charakterisierung mit Osteoblastenmarkern im zellulären Zement stellt eine Bestätigung dieser Vermutung dar. Bronckers et al. (2001) wiesen in ihrer Studie Cbfa1 im Zement nach.

4.3.2 Diskussion der Ergebnisse im Bereich des Alveolarknochens

4.3.2.1 Sklerostin

Die experimentellen Resultate im Bereich des Alveolarknochens bestätigen die Ergebnisse diverser anderer Autoren. (Li et al., 2009; Ott, 2005; Poole et al., 2005; Sutherland et al., 2004; van Bezooijen et al., 2004; Winkler et al., 2003).

Der Nachweis von Sklerostin wies positive Reaktionen nur in den Osteozyten auf, die Osteoblasten blieben ungefärbt. Dies wurde bereits bei der Maus und beim Menschen nachgewiesen und diskutiert (Jäger et al., 2009; Ott, 2005; Poole et al., 2005; Robling et al., 2008; ten Dijke et al., 2008; Winkler et al., 2003).

Auffällig war die in Kapitel 3.3.2. beschriebene diffus erscheinende positive Färbungsreaktion für Sklerostin im Bereich der Knochenmatrix bei den null bis zweiwöchigen Mäusen (Abb. 20, 21, 22 ,23). Eine differenzierte Darstellung der einzelnen Zellen (Osteozyten und Osteoblasten) war hier nicht möglich. Winkler et al. (2003) wiesen in ihrer Studie darauf hin, dass Osteoblasten bzw. Osteozyten erst ab einem gewissen Differenzierungsgrad zur Sklerostinsekretion befähigt sind. Eine diffuse Sklerostinabgabe in die Umgebung, in diesem Fall in das Matrixgewebe, ist

wahrscheinlich. Bei Untersuchungen der Sklereosteose wurde bereits gezeigt, dass Sklerostin auch einen Einfluss auf die Knochenmatrixbildung hat (Hill et al., 1986; Stein et al., 1983). Nach Canalis et al. (2003) und Hartmann (2006) ist das Sklerostin bereits für eine beginnende Differenzierung von Progenitorzellen zur osteoblastären Zellreihe wichtig, demnach schon bevor differenzierte Osteoblasten vorliegen. Daher kann von einer Sklerostinbeteiligung auch während der initialen Knochenentwicklung ausgegangen werden. Die Sklerostinbeteiligung erscheint jedoch aufgrund der noch unreifen Osteoblasten bzw. Osteozyten diffus verteilt in der Knochenmatrix. Erst nach Ausdifferenzierung der Osteozyten fokussiert sich die dann auch stärkere Expression auf diese Zellen.

4.3.3 Diskussion der Ergebnisse im Bereich des Parodontalligamentes

Das Parodontalligament, ein zell-, faser- und gefäßreiches Bindegewebe, verbindet das Zahnzement und den Alveolarknochen durch die sog. „Sharpeyschen Fasern“. Neben diesen Fasern lassen sich größtenteils Fibroblasten finden, die jedoch nicht immer eindeutig von den zahlreichen anderen Zellen des PDLs– wie Zementoblasten, Osteoblasten, Osteoklasten, epithelialen Zellen, Zellen der Blut- und Lymphgefäße, Nervenzellen, mesenchymalen Zellen und Abwehrzellen (siehe auch 1.3.) - zu unterscheiden sind.

Van Bezooijen et al. (2009) wiesen in ihrer Studie bereits darauf hin, dass Sklerostin nicht ausschließlich im Knochengewebe zu finden ist. Sie nahmen an, dass die Sklerostinexpression vom Mineralisationsgrad des Gewebes abhängt (van Bezooijen et al., 2009). Jäger et al. (2009) zeigten erstmalig, dass in – vitro mineralisierte PDL - Zellen immunreaktiv für Sklerostin waren. Tatsächlich zeigten die vier- und achtwöchigen Mäuse in der vorliegenden Arbeit vereinzelt positive Reaktionen einzelner Zellen im Parodontalligament und bestätigten das Ergebnis von Jäger et al. (2009). Die jüngeren Mäuse zeigten, wie erwartet, keine positiven Befunde.

4.3.3.1 S100A4

Die Markierung eines Großteils der PDL-Zellen mit dem Fibroblastenmarker S100A4 zeigte, dass der überwiegende Teil dieser Zellen einen fibroblastischen Phänotyp aufweist (Le Hir et al., 2005; Ryan et al., 2003) (siehe auch Tabelle 4).

1999 berichteten Duarte et al. von einer S100A4-Hochregulation in PDL-Zellen unter biomechanischem Stress (Duarte et al., 1999).

Einige Autoren sehen das S100A4 als negativen Marker für die Mineralisation (Duarte et al. (2003). Als Kalzium – bindendes Protein soll es eine Mineralisation des bindegewebigen Parodontalligamentes verhindern. Dies könnte die in Tabelle 4 gezeigten Ergebnisse erklären. Hier lag die höchste Expressionsstärke bei den ein- und zweiwöchigen Mäusen vor. Bei den älteren Tieren, d.h. in stärker mineralisierten Geweben, lagen weniger starke positive Ergebnisse für das S100A4 vor (siehe Tabelle 4).

Die PDL-Zellen waren vor allem knochen- und zementnah intensiver reaktiv. Einige Autoren vermuteten in ihren Studien, dass die Stammzellnischen für PDL- Zellen in perivaskulären Arealen im PDL selbst oder PDL-nahen endostalen Bereichen des Alveolarknochens zu finden sind (Bartold und Narayanan, 2006; Bosshardt, 2005; Foster et al., 2007; Ivanovski et al., 2006). Spezifische Untersuchungen zur möglichen Charakterisierung dieser Stamm- oder Progenitorzellen waren nicht Gegenstand dieser Studie und müssen weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

4.3.3.2 Cbfa1

Neben den bereits beschriebenen Immunreaktivitäten für Cbfa1 im Zement und Alveolarknochen zeigte die vorliegende Studie auch im gesamten PDL positive Färbungsreaktionen. Die Expressionsstärke nahm hierbei mit dem Alter zu.

Bereits 2002 wurde von Ziros et al. die Expression von Cbfa1 in den Zellen des PDLs nachgewiesen. Hierbei wurde eine Beteiligung von biomechanischen Faktoren als Ursache diskutiert (Ziros et al., 2002). In Anlehnung an diese Studie zeigten die

vorliegenden Ergebnisse die erwarteten positiven Färbungsreaktionen im gesamten PDL, dessen Stärke altersabhängig zunahm.

Lossdörfer et al. wiesen 2005 bereits mit Hilfe von Parathormonen (PTH 1-34) nach, dass PDL- Zellen ähnliche Reaktionsweisen wie Osteoblasten aufweisen (Lossdörfer et al., 2005). Auch in Zellkulturversuchen mit PDL – Zellen konnte die Expression von Cbfa1 positiv nachgewiesen werden. Tatsächlich wiesen bei den untersuchten Mäusen alle Altersgruppen positive Färbungsreaktionen für Cbfa1 auf. In weiteren Studien an Mäusen wurde eine Rolle der Cbfa1- Expression bei der Zahnentwicklung gezeigt. Hierbei wurden Cbfa1- positive PDL- Zellen in Abhängigkeit von der Odontogenese bei der Maus, insbesondere in späteren Stadien, nachgewiesen (Bronckers et al., 2001). Ein Anstieg der Expressionsstärke im Verlaufe der fortschreitenden Odontogenese wurde auch in der vorliegenden Arbeit deutlich.

4.3.4 Pulpa und Gingiva

Auffallend waren im Bereich von Pulpa und Gingiva starke positive Färbungsreaktionen nach immunhistochemischen Reaktionen mit Cbfa1 und S100A4. Die positiven Reaktionen ließen sich besonders in den Fibroblasten der Pulpa und den Epithelzellen der Gingiva nachweisen.

Die Zahnpulpa ist als stark vaskularisiertes, spezialisiertes Bindegewebe für die Vitalität und das Reaktionsvermögen des Dentins verantwortlich. Die Zahnpulpa und die Gingiva zeigten ausschließlich negative Färbungsreaktionen bei der Immunreaktion des Sklerostins. Der Nachweis von S100A4 und Cbfa1 wies positive Reaktionen bei den älteren Mäusen (vier und acht Wochen alte Mäuse) auf.

4.4 Klinische Relevanz

Verbesserte Regenerationsmöglichkeiten von beschädigten oder kranken Zähnen werden in vielen Teilgebieten der Zahnmedizin gesucht. Zahnsubstanzverluste -durch kieferorthopädische Zahnbewegungen, physiologische bzw. pathologische Zahnabnutzungserscheinungen, parodontale Erkrankungen etc. - sind durch fortschrittliche Behandlungsmöglichkeiten zwar minimierbar aber nicht vollständig zu unterbinden. Trotz der steigenden Kenntnis über die Gewebe des Parodonts (Parodontalligament, Alveolarknochen sowie Zementgewebe) besteht bis heute nur eingeschränkte Möglichkeit zur Regeneration der Gewebe. In einigen Teilbereichen bestehen noch weitestgehend unerforschte Probleme.

Nach Bosshardt (2005) ist das Zahnzement das von den o.g. Geweben am wenigsten untersuchte Gewebe. Dies ist umso erstaunlicher, als gerade das Wurzelzement ein wichtiger Bestandteil des Zahnhalteapparates ist und als solcher bei der Regeneration oder Reparatur, beispielsweise im Anschluss an eine infektiöse Zerstörung des Parodonts, eine wesentliche Rolle bei der Wiederbefestigung spielt. Nach Foster et al. (2007) ist es hierfür besonders wichtig, verschiedene, an der gesamten Wurzelregeneration beteiligte Faktoren zu bestimmen sowie zahlreiche Kenntnisse der natürlichen Entstehung und Befestigung von Zement zu gewinnen. Zellen, Gene, und Proteine, die die Wurzelentwicklung regulieren, müssten nach Foster et al. bedeutend besser verstanden werden, um den kompletten Zahn eines Tages regenerieren zu können (Foster et al., 2007). Als klinische Relevanz lässt sich demnach das Ziel nennen, zukünftig durch regenerative Therapien in die Zementogenese einzugreifen.

Mit dem Sklerostin wurde ein Protein gefunden, dessen Bedeutung für therapeutische Zwecke in Verbindung mit Knochenerkrankungen diskutiert wird. Aufgrund des Sklerostinnachweises im Zementgewebe sollten weitere Untersuchungen versuchen, die Bedeutungen für den Knochen evtl. auf das Zement zu übertragen.

5 Schlussfolgerung

Die vorliegende Studie hat erstmals systematisch die Expression des knochenspezifischen Proteins (Sklerostin) im Zementgewebe untersucht.

- Das Vorkommen von Sklerostin im Bereich der Zementozyten des zellulären Zementes wurde nachgewiesen. Der in diesem Zusammenhang gezeigte Nachweis in der Studie von Jäger et al. (2009) wurde damit bestätigt.
- Der Nachweis lediglich im zellulären Zement lässt Sklerostin als wichtigen Faktor bei der sekundären Zementogenese erscheinen.
- Die negativen Reaktionen im Bereich des azellulären Zementes machen eine Sklerostinbeteiligung an Verankerungsprozessen unwahrscheinlich.
- Eine Beteiligung des Sklerostins an knochenähnlichen Homöostaseregulationen im Zement ist anzunehmen.
- Eine Sklerostinbeteiligung an den initialen Entwicklungsphasen (bis zur vierten Woche) der Zementogenese war nicht nachweisbar.
- Wahrscheinlich ist eine Sklerostinbeteiligung an späteren Zementogenesephasen (ab der vierten Woche). Aufgrund des relativ großen Altersabstandes der untersuchten Mäuse von ein bis zwei Wochen war eine genauere Zeitangabe der Sklerostinbeteiligung an der Zementogenese nicht möglich.
- Anzunehmen ist eine differierende Entwicklung des zellulären bzw. azellulären Zementgewebes mit unterschiedlichen Vorläuferpopulationen. Dies bestärkt den von Bosshardt (2005) aufgestellten Ansatz.
- Naheliegend ist aufgrund der parallelen Sklerostinexpression in Zemento- bzw. Osteozyten ein gemeinsamer Ursprung von Osteozyten und den Zellen des zellulären Zementes (Bosshardt, 2005).

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zum Nachweis von Sklerostin während der Zementogenese bei der Maus könnten als Grundlage zum Verständnis der Sklerostinwirkungen und –funktionen im Rahmen von physiologischen und pathologischen Prozessen im Bereich des Wurzelzementes dienen. Aufgrund seiner Komplexität und dem steigenden Interesse in verschiedenen Fachbereichen der Zahnmedizin sollte das Zementgewebe und die dieses Gewebe bildenden Zellen in den

nächsten Jahren Ziel weiterer Forschungen und Untersuchungen sein, um das vielfältige Wirkungsspektrum besser zu verstehen und die nachweisbaren Ergebnisse und Erkenntnisse therapeutisch nutzbar machen zu können.

Untersuchungen an Patienten mit erblichen Erkrankungen im Bereich der Sklerostinregulation (van Buchem Erkrankung, Sklerosteosis) und der damit verbundenen möglichen Auswirkungen im Bereich des Zementes könnten bei den weiterführenden Studien ebenso nützlich sein wie Studien mit gezüchteten knock-out-Mäusen.

6 Zusammenfassung

Die Existenz von Wurzelzement am Zahn gilt als eine der wichtigsten Grundvoraussetzungen für die Verankerung des Zahnes in seiner funktionellen Position im Alveolarknochen. Steigendes Bestreben nach dem Erhalt natürlicher Zähne erklärt das wachsende Interesse an dem Hauptverankerungs- und Reparaturgewebe, dem Zahnzement.

Wie eine Vielzahl von Studien nachwies, ist Sklerostin als regulatorische Komponente der Entwicklung im Knochengewebe von großer Bedeutung.

In dieser Arbeit wird erstmalig versucht das Auftreten von Sklerostin im Verlaufe der Zementogenese zu untersuchen.

In der vorliegenden Studie wurden die Expressionsstärke, die Lokalisation und der Zeitpunkt der Sklerostinexpression während der Zemententwicklung an 800 histologischen Schnitten von Mäusekiefern ermittelt. Kiefer von null, ein, zwei, vier und acht Wochen alten Mäusen wurden hierbei histologisch und immunhistochemisch zum Nachweis von Sklerostin sowie zusätzlich von Cbfa1 und S100A4 mit Hilfe kommerziell erhältlicher Antikörper untersucht. Cbfa1 und S100A4 dienten dabei der ergänzenden Gewebscharakterisierung.

In den untersuchten Präparaten konnten positive Immunreaktionen für Sklerostin im Zahnzement vor allem in den Zementozyten beobachtet werden. Dieser Befund deutet an, dass Sklerostin eine Bedeutung im Zementgewebe hat. Positive Immunreaktionen waren ausschließlich im zellulären Zement vorzufinden. Möglicherweise ist dies auf getrennte Vorläuferpopulationen der Zementgewebe und folglich auf divergierende Entwicklungen bzw. Reaktionseigenschaften zurückzuführen.

Hinsichtlich der Zementogenese konnten ausschließlich bei den vier und acht Wochen alten Mäusen positive Färbungsreaktionen identifiziert werden. Dies lässt vermuten, dass Sklerostin keine Relevanz für die initialen Zemententwicklungsstadien besitzt.

Analysen im Bereich des Alveolarknochengewebes bestätigten, dass Sklerostin eine Funktion bei der Knochenhomöostase besitzt. Die Aufrechterhaltung des Gleichgewichtes im Knochengewebe (Homöostase) spielt besonders nach der initialen Knochenbildung eine Rolle. Folglich könnten die ausschließlich bei den älteren Mäusen

gezeigten Reaktionen im Zementgewebe im Sinne einer Zementhomöostase interpretiert werden.

Andererseits könnten diese Ergebnisse auch auf Sklerostinbeteiligungen an regenerativen Prozessen basieren, die aufgrund von altersbedingten physiologischen Resorptionen stattfinden.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

	Seite	
Abb. 1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung: Schmelzglocke einer neugeborenen Maus	33
Abb. 2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung: Anlage des ersten Molaren einer eine Woche alten Maus	33
Abb. 3	Hämatoxylin-Eosin-Färbung: Anlage des ersten Molaren (M1) einer zwei Wochen alten Maus	34
Abb. 4	Hämatoxylin-Eosin-Färbung: Erster Molar (M1) einer vier Wochen alten Maus	35
Abb. 5	Hämatoxylin-Eosin-Färbung: Koronaler Bereich des ersten Molaren (M1) einer acht Wochen alten Maus	35
Abb. 6	Hämatoxylin-Eosin-Färbung: Apikaler (Wurzel-) Bereich des ersten Molaren (M1) einer acht Wochen alten Maus	36
Abb. 7	S100A4- Immunreaktion: Zahnanlage einer ein Wochen alten Maus	40
Abb. 8A	S100A4- Immunreaktion: Zahnanlage einer neugeborenen Maus	41
Abb. 8B	S100A4- Immunreaktion: PDL einer neugeborenen Maus	41
Abb. 9	S100A4- Immunreaktion: Zahnwurzelbereich einer eine Woche alten Maus	42
Abb. 10	S100A4- Immunreaktion: Zahnanlage einer zwei Wochen alten Maus	42
Abb. 11A	S100A4- Immunreaktion: Erster Molar (M1) einer vier Wochen alten Maus	43
Abb. 11B	S100A4- Immunreaktion: Apikaler Bereich des ersten Molaren (M1) einer vier Wochen alten Maus	43
Abb. 12	S100A4- Immunreaktion: Erster Molar (M1) einer acht Wochen alten Maus	44
Abb. 13	S100A4- Immunreaktion: PDL einer acht Wochen alten Maus	45
Abb. 14A	Cbfa1- Immunreaktion: Zahnanlage des ersten Molaren (M1) einer neugeborenen Maus	47
Abb. 14B	Cbfa1- Immunreaktion: Bereich zwischen PDL, Knochen und Zahnzement einer neugeborenen Maus	47
Abb. 15A	Cbfa1- Immunreaktion: Zahnanlage einer ein Wochen alten Maus	48
Abb. 15B	Cbfa1- Immunreaktion: Bereich zwischen PDL, Knochen und Zahnzement einer eine Woche alten Maus	48

Abb. 16	Cbfa1- Immunreaktion: Zahnanlage einer zwei Wochen alten Maus	49
Abb. 17	Cbfa1- Immunreaktion: Erster Molar (M1) einer vier Wochen alten Maus	49
Abb. 18	Cbfa1- Immunreaktion: Koronaler Bereich des ersten Molaren (M1) einer acht Wochen alten Maus	50
Abb. 19	Cbfa1- Immunreaktion: Apikaler Bereich des ersten Molaren (M1) einer acht Wochen alten Maus	50
Abb. 20	SOST- Immunreaktion: Zahnanlage einer neugeborenen Maus	52
Abb. 21	SOST- Immunreaktion: Bereich zwischen PDL, Knochen und Zahnzement einer neugeborenen Maus	52
Abb. 22	SOST- Immunreaktion: Zahnanlage einer ein Wochen alten Maus	53
Abb. 23	SOST- Immunreaktion: Bereich zwischen PDL, Knochen und Zahnzement einer eine Woche alten Maus	54
Abb. 24A	SOST- Immunreaktion: Zahnanlage einer zwei Wochen alten Maus	55
Abb. 24B	SOST- Immunreaktion: Bereich zwischen PDL, Knochen und Zahnzement einer zwei Wochen alten Maus	55
Abb. 25	SOST- Immunreaktion: Erster Molar (M1) einer vier Wochen alten Maus	57
Abb. 26	SOST- Immunreaktion: Apikaler (Wurzel-) bereich des ersten Molaren (M1) einer acht Woche alten Maus	58
Abb. 27	SOST- Immunreaktion: Alveolarknochen einer acht Wochen alten Maus	59
Abb. 28	Negativprobe für S100A4	60
Abb. 29	Negativprobe für Cbfa1	60
Abb. 30	Negativprobe für SOST	61

7.2 Tabellenverzeichnis

	Seite
Tab. 1 Liste der verwendeten Chemikalien	30
Tab. 2 Liste der verwendeten Geräte und Materialien	30
Tab.3 Liste der verwendeten Primärantikörper	31
Tab. 4 Immunreaktionen in zellulären Anteilen des Wurzelzementes	62
Tab. 5 Immunreaktionen in azellulären Anteilen des Wurzelzementes	62
Tab. 6 Immunreaktionen im Bereich des Alveolarknochens	63
Tab. 7 Immunreaktionen im Bereich des Parodontalligamentes	63
Tab. 8 Immunreaktionen im Bereich der Pulpa	64
Tab. 9 Immunreaktionen im Bereich der Gingiva	64

8 Literaturverzeichnis

Akiyoshi M, Inoue M. On the functional structure of cementum. Bull Tokyo Med Dent Univ 1963; 10: 41-59

Avery JK. Histology of the periodontium: Alveolar bone, cementum, and periodontal ligament. In: Avery JK, Steele PF. HRSG. Oral development and histology. Stuttgart-New York: Thieme, 2002: 226-242

Ayasaka N, Kondo T, Goto T, Kido MA, Nagata E, Tanaka T. Differences in the transport systems between cementocytes and osteocytes in rats using microperoxidase as a tracer. Arch Oral Biol 1992; 37: 363-369

Bartold PM, Narayanan AS. Molecular and cell biology of healthy and diseased periodontal tissues. Periodontol 2000, 2006; 40: 29-49

Beertsen W, Everts V. Formation of acellular root cementum in relation to dental and non-dental hard tissues in the rat. J Dent Res 1990; 69: 1669-1673

Beertsen W, McCulloch CA, Sodek J. The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue. Periodontol 2000 1997; 13: 20-40

Berkovitz BKB. Periodontal ligament: structural and clinical correlates. Dent Update 2004; 31: 46-54

Berkovitz BKB. Oral Anatomy, Embryology, and Histology. London-Baltimore: Mosby-wolfe, 1994

Bosshardt D, Luder HU, Schroeder HE. Rate and growth pattern of cementum apposition as compared to dentine and root formation in a fluorochrome-labelled monkey (*Macaca fascicularis*). J Biol Buccale 1989; 17: 3-13

Bosshardt DD, Schroeder HE. Initial formation of cellular intrinsic fiber cementum in developing human teeth. A light- and electron-microscopic study. Cell Tissue Res 1992; 267: 321-335

Bosshardt DD, Schroeder HE. Cementogenesis reviewed: a comparison between human premolars and rodent molars. Anat Rec 1996; 245: 267-292

- Bosshardt DD, Selvig KA. Dental cementum: the dynamic tissue covering of the root. *Periodontol* 2000 1997; 13: 41-75
- Bosshardt DD. Are cementoblasts a subpopulation of osteoblasts or a unique phenotype? *J Dent Res* 2005; 84: 390-406
- Bronckers AL, Engelse MA, Cavender A, Gaikwad J, D'Souza RN. Cell-specific patterns of Cbfa1 mRNA and protein expression in postnatal murine dental tissues. *Mech Dev* 2001; 101: 255-258
- Camilleri S, McDonald F. Runx2 and dental development. *Eur J Oral Sci* 2006; 114: 361-373
- Canalis E, Economides AN, Gaggero E. Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocr Rev* 2003; 24: 218-235
- Cohn SA. Development of the molar teeth in the albino mouse. *Am J Anat* 1957; 101: 295-319
- Diekwisch TG. The developmental biology of cementum. *Int J Dev Biol* 2001; 45: 695-706
- Donato R. Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microsc Res Tech* 2003; 60: 540-551
- Duarte WR, Kasugai S, Iimura T, Oida S, Takenaga K, Ohya K, Ishikawa, I. cDNA cloning of S100 calcium-binding proteins from bovine periodontal ligament and their expression in oral tissues. *J Dent Res* 1998; 77: 1694-1699
- Duarte WR, Mikuni-Takagaki Y, Kawase T, Iimura T, Oida S, Ohya K, Takenaga, K, Ishikawa L, Kasugai, S. Effects of mechanical stress on the mRNA expression of S100A4 and cytoskeletal components by periodontal ligament cells. *J Med Dent Sci* 1999; 46: 117-122
- Duarte WR, Shibata T, Takenaga K, Takahashi E, Kubota K, Ohya K, Ishikawa I, Yamauchi M, Kasugai S. S100A4: a novel negative regulator of mineralization and osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res* 2003; 18: 493-501
- Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 1997; 89: 747-754

Foster BL, Popowics TE, Fong HK, Somerman MJ. Advances in defining regulators of cementum development and periodontal regeneration. *Curr Top Dev Biol* 2007; 78: 47-126

Freeman E. Periodontium. In: Ten Cate AR, HRSG. *Oral histology: Development, structure, and function*. London: Mosby-Wolfe, 1998: 253-289

Garrett SC, Varney KM, Weber DJ, Bresnick AR. S100A4, a mediator of metastasis. *J Biol Chem* 2006; 281: 677-680

Gratzl M, Keller U, Bergmann M, Grube D, Ovtsharoff W, Pabst AM, Schmidt W, Schepp C, Prinz HD, Allescher R. Zähne. In: Junqueira LCU, Carneiro J, Gratzl M. HRSG. *Histologie*. Heidelberg: Springer, 2005: 245-249

Hammarstrom L, Alatl I, Fong CD. Origins of cementum. *Oral Dis* 1996; 2: 63-69

Hartmann C. A Wnt canon orchestrating osteoblastogenesis. *Trends Cell Biol* 2006; 16: 151-158

Hasegawa N, Kawaguchi H, Ogawa T, Uchida T, Kurihara H. Immunohistochemical characteristics of epithelial cell rests of Malassez during cementum repair. *J Periodontal Res* 2003; 38: 51-56

Henry JL, Weinmann JP. The pattern of resorption and repair of human cementum. *J Am Dent Assoc* 1951; 42: 270-290

Hill SC, Stein SA, Dwyer A, Altman J, Dorwart R, Doppman J. Cranial CT findings in sclerosteosis. *AJNR Am J Neuroradiol* 1986; 7: 505-511

Hirata A, Sugahara T, Nakamura H. Localization of runx2, osterix, and osteopontin in tooth root formation in rat molars. *J Histochem Cytochem* 2009; 57: 397-403

Ivanovski S, Haase HR, Bartold PM. Expression of bone matrix protein mRNAs by primary and cloned cultures of the regenerative phenotype of human periodontal fibroblasts. *J Dent Res* 2001; 80: 1665-1671

Ivanovski S, Gronthos S, Shi S, Bartold PM. Stem cells in the periodontal ligament. *Oral Dis* 2006; 12: 358-363

Jäger A, Gotz W, Lossdörfer S, Rath-Deschner B. Localization of SOST/sclerostin in cementocytes in vivo and in mineralizing periodontal ligament cells in vitro. *J Periodontal Res* 2009

Kagayama M, Sasano Y, Zhu J, Hirata M, Mizoguchi I, Kamakura S. Epithelial rests colocalize with cementoblasts forming acellular cementum but not with cementoblasts forming cellular cementum. *Acta Anat (Basel)* 1998; 163: 1-9

Kawarizadeh A. Experimentelle und numerische Bestimmung der initialen Zahnbeweglichkeit und der Materialparameter vom Parodontalligament im Rattenmodell. Med Diss. Universität Bonn, 2002

Komori T. Requisite roles of Runx2 and Cbfb in skeletal development. *J Bone Miner Metab* 2003; 21: 193-197

Le Hir M, Hegyi I, Cueni-Loffing D, Loffing J, Kaissling B. Characterization of renal interstitial fibroblast-specific protein 1/S100A4-positive cells in healthy and inflamed rodent kidneys. *Histochem Cell Biol* 2005; 123: 335-346

Leonhardt H. Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen. Stuttgart: Thieme, 1990

Li X, Ominsky MS, Warmington KS, Morony S, Gong J, Cao J, Gao, Y, Shalhoub V, Tipton B, Haldankar R, Chen Q, Winters A, Boone T, Geng Z, Niu QT, Ke HZ, Kostenuik PJ, Simonet WS, Lacey DL, Paszty C. Sclerostin antibody treatment increases bone formation, bone mass, and bone strength in a rat model of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 2009; 24: 578-588

Lin C, Jiang X, Dai Z, Guo X, Weng T, Wang J, Li, Y, Feng G, Gao X, He L. Sclerostin Mediates Bone Response to Mechanical Unloading via Antagonizing Wnt/beta-Catenin Signaling. *J Bone Miner Res* 2009; 24: 1651-1661

Lindskog S, Blomlof L, Hammarstrom L. Evidence for a role of odontogenic epithelium in maintaining the periodontal space. *J Clin Periodontol* 1988; 15: 371-373

Lossdorfer S, Gotz W, Jager A. PTH(1-34) affects osteoprotegerin production in human PDL cells in vitro. *J Dent Res* 2005; 84: 634-638

Lowik CW, van Bezooijen RL. Wnt signaling is involved in the inhibitory action of sclerostin on BMP-stimulated bone formation. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2006; 6: 357

MacNeil RL, Somerman MJ. Molecular factors regulating development and regeneration of cementum. *J Periodontal Res* 1993; 28: 550-559

Mazzucchelli L. Protein S100A4: too long overlooked by pathologists? *Am J Pathol* 2002; 160: 7-13

Ogawa S, Harada H, Fujiwara M, Tagashira S, Katsumata T, Takada H. Cbfa1, an essential transcription factor for bone formation, is expressed in testis from the same promoter used in bone. *DNA Res* 2000; 7: 181-185

Ogiso B, Hughes FJ, Melcher AH, McCulloch CA. Fibroblasts inhibit mineralised bone nodule formation by rat bone marrow stromal cells in vitro. *J Cell Physiol* 1991; 146: 442-450

Ott SM. Sclerostin and Wnt signaling--the pathway to bone strength. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 6741-6743

Owman-Moll P, Kurol J. The early reparative process of orthodontically induced root resorption in adolescents--location and type of tissue. *Eur J Orthod* 1998; 20: 727-732

Poole KE, van Bezooijen RL, Loveridge N, Hamersma H, Papapoulos SE, Lowik CW, Reeve J. Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation. *FASEB J* 2005; 19: 1842-1844

Rabie AB, Tang GH, Hagg U. Cbfa1 couples chondrocytes maturation and endochondral ossification in rat mandibular condylar cartilage. *Arch Oral Biol* 2004; 49: 109-118

Robling AG, Niziolek PJ, Baldrige LA, Condon KW, Allen MR, Alam I, Mantila SM, Gluhak-Heinrich J, Bellido TM, Harris SE, Turner CH. Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin. *J Biol Chem* 2008; 283: 5866-5875

Ryan DG, Taliana L, Sun L, Wei ZG, Masur SK, Lavker RM. Involvement of S100A4 in stromal fibroblasts of the regenerating cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: 4255-4262

Schafer BW, Heizmann CW. The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. *Trends Biochem Sci* 1996; 21: 134-140

Schroeder HE. *Orale Strukturbiologie*. Stuttgart-New York: Thieme, 2000

Schroeder TM, Jensen ED, Westendorf JJ. Runx2: a master organizer of gene transcription in developing and maturing osteoblasts. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2005; 75: 213-225

Slavkin HC, Bringas P. Epithelial-mesenchyme interactions during odontogenesis. IV. Morphological evidence for direct heterotypic cell-cell contacts. *Dev Biol* 1976; 50: 428-442

Stein SA, Witkop C, Hill S, Fallon MD, Viernstein L, Gucer G, McKeever P, Long D, Altman J, Miller NR, Teitelbaum SL, Schlesinger S. Sclerosteosis: neurogenetic and pathophysiologic analysis of an American kinship. *Neurology* 1983; 33: 267-277

Strutz F, Okada H, Lo CW, Danoff T, Carone RL, Tomaszewski JE, Neilson EG. Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. *J Cell Biol* 1995; 130: 393-405

Sutherland MK, Geoghegan JC, Yu C, Turcott E, Skonier JE, Winkler DG, Latham JA. Sclerostin promotes the apoptosis of human osteoblastic cells: a novel regulation of bone formation. *Bone* 2004; 35: 828-835

Takeda S, Bonnamy JP, Owen MJ, Ducy P, Karsenty G. Continuous expression of *Cbfa1* in nonhypertrophic chondrocytes uncovers its ability to induce hypertrophic chondrocyte differentiation and partially rescues *Cbfa1*-deficient mice. *Genes Dev* 2001; 15: 467-481

Taylor AF, Saunders MM, Shingle DL, Cimbala JM, Zhou Z, Donahue HJ. Mechanically stimulated osteocytes regulate osteoblastic activity via gap junctions. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 292: 545-552

ten Dijke P, Krause C, de Gorter DJ, Lowik CW, van Bezooijen RL. Osteocyte-derived sclerostin inhibits bone formation: its role in bone morphogenetic protein and Wnt signaling. *J Bone Joint Surg Am* 2008; 90: 31-35

Tenorio D, Cruchley A, Hughes FJ. Immunocytochemical investigation of the rat cementoblast phenotype. *J Periodontal Res* 1993; 28: 411-419

van Bezooijen RL, Roelen BA, Visser A, van der Wee-Pals L, de Wilt E, Karperien M, Hamersma H, Papapoulos SE, ten Dijke P, Löwik CW. Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist. *J Exp Med* 2004; 199: 805-814

van Bezooijen RL, ten Dijke P, Papapoulos SE, Lowik CW. SOST/sclerostin, an osteocyte-derived negative regulator of bone formation. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005; 16: 319-327

van Bezooijen RL, Bronckers AL, Gortzak RA, Hogendoorn PC, van der Wee-Pals L, Balemans W, Oostenbroek HJ, Van Hul W, Hamersma H, Dijkers FG, Hamdy NA, Papapoulos SE, Lowik CW. Sclerostin in mineralized matrices and van Buchem disease. *J Dent Res* 2009; 88: 569-574

Weidauer SE, Schmieder P, Beerbaum M, Schmitz W, Oschkinat H, Mueller TD. NMR structure of the Wnt modulator protein Sclerostin. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 380: 160-165

Winkler DG, Sutherland MK, Geoghegan JC, Yu C, Hayes T, Skonier JE, Shpektor D, Jonas M, Kovacevich BR, Staehling-Hampton K, Appleby M, Brunkow ME, Latham JA. Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. *EMBO J* 2003; 22: 6267-6276

Zeichner-David M, Oishi K, Su Z, Zakartchenko V, Chen LS, Arzate H, Bringas P. Role of Hertwig's epithelial root sheath cells in tooth root development. *Dev Dyn* 2003; 228: 651-663

Ziros PG, Gil AP, Georgakopoulos T, Habeos I, Kletsas D, Basdra EK, Papavassiliou AG. The bone-specific transcriptional regulator Cbfa1 is a target of mechanical signals in osteoblastic cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 23934-23941