

Aus der Abteilung Prothetik
(Komm. Direktor: Dr. med. dent. N. Gersdorff)
im Zentrum Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Lichtmikroskopische Untersuchungen zur Lokalisation
verschiedener Matrixkomponenten in oralen Geweben der
Maus

INAUGURAL-DISSERTATION

**zur Erlangung des Doktorgrades für Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen**

**vorgelegt von
Stephanie Tilpe
aus Bad Harzburg
Göttingen 2010**

Dekan:	Prof. Dr. med. C. Frömmel
I. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. N. Miosge
II. Berichterstatter/ in:	Priv.-Doz. Dr. med. Männer
III. Berichterstatter/ in:	Prof. Dr. med. dent. Mausberg
Tag der mündlichen Prüfung:	04. Juli 2011

Inhaltsverzeichnis

<u>Abbildungsverzeichnis</u>	V	
<u>Tabellenverzeichnis</u>	VII	
<u>Abkürzungsverzeichnis</u>	VIII	
1	Einleitung	1
1.1	Das Parodontium	1
1.1.1	Bestandteile, Strukturen und Zusammensetzung.....	2
1.2	Die Malassez'schen Epithelreste (ERM) im PDL	10
1.2.1	Geschichtlicher Hintergrund der ERM.....	10
1.2.2	Embryologie der ERM.....	11
1.2.3	Ultrastruktur der ERM.....	12
1.3	Unterschiede zwischen menschlichem und murinem Gebiss	13
1.4	Die Extrazelluläre Matrix (EZM)	16
1.4.1	Definition und Funktion.....	16
1.4.2	Komponenten der EZM.....	16
1.5	Funktion und Aufbau von Basalmembranen (BM)	19
1.5.1	Biochemie und Bedeutung von Kollagen IV.....	20
1.5.2	Biochemie und Bedeutung von Lamininen.....	21
1.5.3	Biochemie und Bedeutung von Nidogenen.....	22
1.5.4	Biochemie und Bedeutung von Perlecan.....	23
1.6	Aufgabenstellung	25
2	Material und Methoden	26
2.1	Vorbereitungen zu der Lichtmikroskopie.....	26
2.1.1	Versuchstiere.....	26
2.1.2	Präparation.....	26
2.1.3	Fixierung und Einbettung.....	26

2.1.4	Anfertigung der Gewebsschnitte.....	27
2.1.5.1	Entparaffinierung und Rehydrierung.....	28
2.1.5.2	Beschaffenheit und Herkunft der verwendeten Antikörper.....	29
2.1.5.3	PAP-Protokolle der einzelnen Antikörper.....	31
2.1.5.4	Gegenfärben und Rehydrieren.....	41
2.1.6	Kontrollen.....	41
2.1.7	Verwendete Reagenzien.....	41
3	Ergebnisse.....	43
3.1	Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen.....	44
3.1.1	Die differentielle Expression der einzelnen Matrixkomponenten im Bereich der Malassez'schen Epithelzellen.....	44
3.1.2	Die differentielle Expression der einzelnen Matrixkomponenten im Bereich der Incisivi.....	48
3.1.3	Die differentielle Expression der einzelnen Matrixkomponenten im Bereich der Molaren.....	52
3.1.4	Die differentielle Expression der einzelnen Matrixkomponenten im Bereich weiterer relevanter oraler Strukturen.....	57
4	Diskussion.....	62
5	Zusammenfassung.....	73
6	Literaturverzeichnis.....	74

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Übersichtsaufnahme - Zahnhalteapparat und Zahn der Maus ...	1
Abbildung 2:	HE-Färbung; Histologischer Aufbau der Gingiva einer 6 Monate alten Maus; Vergrößerung:40fach.....	3
Abbildung 3:	Toluidin-Färbung: Parodontalspalt mit PDL-Zellen einer 6 Monate alten Maus; Vergrößerung: 40fach.....	7
Abbildung 4:	Dreidimensionale Darstellung transversaler Schnitte des Incisivus der Maus (entnommen aus Oshima et al. 2005, S.155); a) Knospen-Stadium b) Kappen-Stadium c) Glocken-Stadium d+e) die Hertwigsche Wurzelscheide verlängert sich in lingualer Richtung und umschließt letztendlich die dentale Pulpa	15
Abbildung 5:	Biochemische Interaktionen der Basalmembranproteine.....	24
Abbildung 6a:	Spezifische COMP-Reaktion; Vergrößerung: 100fach..	46
Abbildung 6b:	Negativkontrolle der COMP-Reaktion im Parodontium einer 6 Monate alten Maus; Vergrößerung: 40fach.....	46
Abbildung 7:	Spezifische Kollagen IV-Reaktion; Vergrößerung 100fach.....	47
Abbildung 8:	Spezifische Laminin 332-Reaktion; a: Übersichtsaufnahme eines Molaren im Zahnhalteapparat mit spezifischer Reaktion im Bereich der Basalmembran der Mundschleimhaut sowie im Bereich der Malassez'schen Epithelzellen; Vergrößerung: 10fach b: Vergrößerungsausschnitt der Malassez'schen Epithelzellen; Vergrößerung: 40fach.....	48
Abbildung 9:	Spezifische Reaktion Laminin α 1; Detailaufnahme eines Incisivus labialseitig; Vergrößerung: 60fach	50

Abbildung 10:	Spezifische Reaktion Laminin β 1; Vergrößerung: 10fach; Detailaufnahme Incisivus mit Zahnhalteapparat, Vergrößerung: 10fach.....	51
Abbildung 11:	Spezifische Reaktion Nidogen-1; Vergrößerung: 40fach.....	51
Abbildung 12:	Spezifische Reaktion Kollagen I; Incisivus mit Zahnhalteapparat; Vergrößerung 10fach.....	52
Abbildung 13:	Spezifische Reaktion von Nidogen I einer 6 Monate alten Maus; Vergrößerung: 40fach.....	54
Abbildung 14:	Spezifische Reaktion Kollagen I; Übersichtsaufnahme – Molar im Zahnhalteapparat; Vergrößerung: 10fach.....	55
Abbildung 15:	Spezifische Reaktion Kollagen II; Übersichtsaufnahme eines Molaren im Zahnhalteapparat; Vergrößerung: 10fach	56
Abbildung 16:	Spezifische Reaktion Laminin 332 ; Ausschnittsaufnahme der Basalmembran der Mundschleimhaut; Vergrößerung: 40fach..	59
Abbildung 17:	Spezifische Reaktion Kollagen I; Übersichtsaufnahme – Incisivus und Molaren im Zahnhalteapparat; Vergrößerung: 40fach.....	60
Abbildung 18:	Spezifische Reaktion Nidogen I ; Detailaufnahme labialwärts am Incisivus; Vergrößerung: 60fach.....	61

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Beschaffenheit und Herkunft der Antikörper.....	29
Tabelle 2:	Die differentielle Expression der einzelnen Matrixkomponenten im Bereich der Malassez´schen Epithelzellen.....	44
Tabelle 3:	Die differentielle Expression der einzelnen Matrixkomponenten im Bereich der Incisivi.....	49
Tabelle 4:	Die differentielle Expression der einzelnen Matrixkomponenten im Bereich der Molaren.....	53
Tabelle 5:	Die differentielle Expression der einzelnen Matrixkomponenten im Bereich weiterer relevanter oraler Strukturen.....	57

Abkürzungsverzeichnis

A	Alveolarknochen
AAZ	Azelluläres, afibrilläres Zement
AFZ	Azelluläres, fibrilläres Zement
Aqua dest.	Aqua destillata
AS	Ameloblastensaum
BM	Basalmembran
BMP	Bone Morphogenic Protein
BSA	Bovine Serum Albumin
COMP	Cartilage Oligomeric Matrix Protein
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
D	Dentin
DAB	Diaminobenzidin
Dept.	Department
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor

EM	Elektronenmikroskop
ERM	Epithelial Rests of Malassez
EZM	Extrazelluläre Matrix
FGF	Fibroblast Growth factor
G	Gingiva
GaGs	Glykosaminoglykane
HE	Hämatoxylin-Eosin
HERS	Hertwig'sche Wurzelscheide
I	Incisivus
LRR	Leucin Rich-Repeat
M	Molar
MED	Multiple epiphysäre Dysplasie
P	Pulpa
PAP	Peroxidase Anti-Peroxidase
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBS/BSA	Phosphate Buffered Saline with Bovine Serum Albumin
PD	Prädentin

PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PDL	Parodontalligament
PSACH	Pseudoachondroplasie
Sb	Stratum basale
Sc	Stratum corneum
Sg	Stratum granulosum
SM	Schmelzmatrix
SP	Schmelzpulpa
SZ	Schmelzzone
T	Tooth
TBS	Thrombospondin
TGF	Transforming Growth Factor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
Z	Zement
ZEZ	Zelluläres Eigenfaserzement
ZGZ	Zelluläres Gemischtfaserzement

1. Einleitung

1.1 Das Parodontium

Seinen Ursprung hat das Wort Parodontium im Griechischen und leitet sich von den Worten para – „bei, neben, entlang“ und odons – „Zahn“ her (Müller 2001). Das Parodontium stellt ein funktionelles biologisches System dar, welches die Gesamtheit alle Zahnstützgewebe umfasst (Mutschelknauss 2000).

Hierbei handelt sich im Detail um die Gewebe, die

- die Zähne im Kieferknochen verankern,
- die interdentale Verbindung der Zähne in der Zahnreihe gewährleisten,
- sowie die epitheliale Auskleidung der Mundhöhle, auch im Bereich des durchgebrochenen Zahnes aufrechterhalten (Müller 2001).

Die funktionelle Einheit des Parodontiums besteht anatomisch gesehen aus zwei Weichgeweben, der Gingiva und dem Parodontalligament (PDL) und zwei Hartgeweben, dem Alveolarknochen und dem Wurzelzement.



Abbildung 1: Hämatoxylin-Eosin (HE) -Färbung; Übersichtsaufnahme - Zahnhalteapparat und Zahn der Maus; G=Gingiva; T=Tooth; PDL= Parodontalligament; A=Alveolarknochen; Vergrößerung: 10fach

Die Hauptaufgaben des Parodontiums bestehen darin, die Zähne im Knochen zu verankern, Kaukräfte zu dämpfen, äußere Noxen abzuwehren und eine Trennung zwischen Mundhöhlenmilieu und Zahnwurzel herbeizuführen (Hellwig et al. 1999).

1.1.1 Bestandteile, Strukturen und Zusammensetzung

Gingiva

Die Gingiva bildet zusammen mit der Bedeckung des harten Gaumens die mastikatorische Mukosa der Mundhöhle (Mutschelknauss 2000).

Als Bestandteil der Mundschleimhaut handelt es sich dabei um den manschettenförmigen koronalen Abschluss des Zahnhalteapparates (Baumhoer et al. 2003). Sie bedeckt die koronalen Abschnitte des Alveolarfortsatzes, überzieht den Alveolarkamm, die interdentalen Knochensepten und umfasst die Zähne mittels eines epithelialen Ringes, dem sogenannten Saumepithel (Schroeder 2000).

Die Integrität der Gingiva ist essentiell für den Erhalt gesunder Parodontalverhältnisse (Nanci und Bosshardt 2006).

Makroskopisch lassen sich 3 verschiedene Gingivaabschnitte, die freie, die befestigte (attached) und die interdental Gingiva unterscheiden (Renggli et al. 1984).

Die freie bzw. marginale Gingiva bildet die Verbindung zwischen zwei Interdentalpapillen und umschließt den Zahnhals kragenartig (Mutschelknauss 2000). Über das sogenannte Saumepithel ist sie am zervikalen Schmelz befestigt. Sie wird von einem Gewebstreifen in der Ausdehnung von 1,1 mm bis 2,1 mm (je nach Alter) gebildet, der girlandenförmig der Kontur des Zahnhalses und der Schmelz-Zementgrenze folgt (Schroeder 1982).

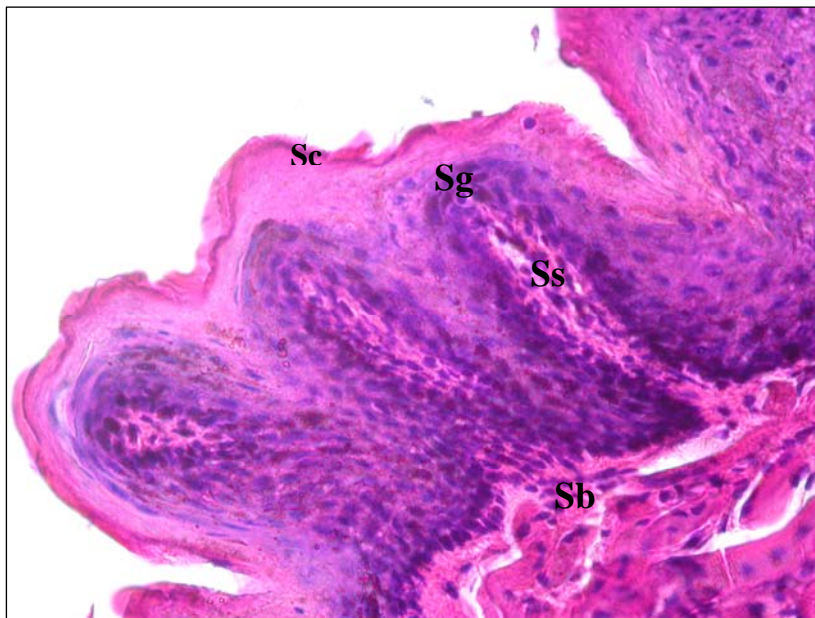
Die befestigte Gingiva ist ca. 1-9 mm breit und ist über Bindegewebsfasern fest mit dem Wurzelzement und dem Alveolarknochen verbunden (Hellwig et al. 1999). Nach koronal wird sie durch die gingivale Furche begrenzt und geht an der mukogingivalen Grenzlinie vestibulär in die Alveolarschleimhaut und lingual in die Mundbodenschleimhaut über. Weiterhin zeichnet sie sich durch eine variable Breite von 1-10 mm aus (Coatoam et al. 1981; Ainamo und Löe 1966) und hat im gesunden

Zustand eine blass rosa und matt glänzend gestipfelte Oberfläche (Lehmann und Hellwig 2002).

Form und Struktur der interdentalen Gingiva sind jeweils davon abhängig, ob die benachbarten Zähne in breitflächig engem oder vollständig ohne Kontakt stehen (Schröder 1982; Bergström 1984). Diese Zone teilt sich in den Bereich der Interdentalpapille und den des interdentalen Sattels. Die Interdentalpapille kommt dadurch zustande, dass sich vestibulär sowie palatinal bzw. lingual das Gewebe nach okklusal aufwölbt. Durch die Einsenkung der Gingiva apikal des Zahnkontaktes kommt es zur Bildung des interdentalen Sattels (Cohen 1959).

Im Bereich des Epithels unterscheidet man das orale Epithel von dem dentogingivalen, welches das Sulkus- sowie das Saumepithel umfasst.

Das orale Epithel wird von einem mehrschichtigen, geringfügig verhornten Plattenepithel gebildet, das der Mundhöhle zugewandt ist und die typischen Schichten der Haut, eine keratinisierte Schicht (Stratum corneum), eine granulöse Schicht (Stratum granulosum), eine Stachelzellschicht (Stratum spinosum) und eine Basalschicht (Stratum basale), aufweist (Schroeder und Theilade 1966).



Schichten von außen
nach innen:

Sc: Stratum corneum

Sg: Stratum granulosum

Ss: Stratum spinosum

Sb: Stratum basale

Abbildung 2: HE-Färbung; Histologischer Aufbau der Gingiva einer 6 Monate alten Maus; Vergrößerung: 40fach

Die keratinproduzierenden Zellen machen dabei ungefähr 90% der Zellpopulation aus. Neben diesen Zellen enthält das orale Epithel noch andere Zelltypen in Form von Melanozyten, Langerhans'schen Zellen, unspezifischen Zellen und Merkel Zellen (Kalykakis et al. 1993).

Der Teil der Gingiva, der dem Zahn zugewandt ist wird als orales Sulkusepithel bezeichnet. Dieses ist strukturell dem oralen Epithel sehr ähnlich, doch unterscheidet es sich von diesem dadurch, dass es weniger Bindegewebszapfen aufweist und in einem viel geringeren Maße keratinisiert ist (Wolf et al. 2003; Schroeder und Listgarten 1971).

Das Sulkusepithel ist ein wichtiger Bestandteil der Gingiva, da es die Funktion einer semipermeablen Membran übernimmt. Es stellt keine Barriere für Gewebsflüssigkeit dar, ist aber für toxische bakterielle Substanzen undurchlässig (Theilade 1964).

Das so genannte Saumepithel grenzt koronal an das Sulkusepithel an, vermittelt den epithelialen Ansatz der Gingiva am Zahn und garantiert so die Kontinuität der epithelialen Auskleidung der Mundhöhle. Es handelt sich um ein nicht differenziertes, mehrschichtiges, nicht keratinisiertes Plattenepithel mit einer hohen Umsatzrate.

Koronal beträgt die Breite bis zu 15 – 30 Zellschichten und wird in Richtung Schmelzzementgrenze zunehmend dünner (Wolf et al. 2003).

Parodontalligament (PDL)

Bei dem PDL handelt es sich um ein Bindegewebe, das zwischen dem wurzelbedeckenden Zement und dem Alveolarknochen liegt. Die Breitenausdehnung variiert von 0.15 bis 0.38 mm und nimmt mit dem Alter an Stärke ab.

Zum größten Teil handelt es sich bei den fibrösen Elementen um Kollagen Typ I und III, die den parodontalen Spalt durchziehen und als so genannte Sharpey'sche Fasern in das Zement inserieren (Bartold und Narayanan 2006).

Das PDL funktioniert wie eine Art Sensor, der es ermöglicht die Kiefer während der Mastikation (Kauakt) richtig zu positionieren. Zusätzlich stellt es ein Zellreservoir für Gewebshomöostase sowie für Reparatur- und Regenerationsmechanismen dar (Nanci und Bosshardt 2000; Bartold und Narayanan 2000).

Die Gesamtpopulation der im PDL vorkommenden Zellen setzt sich aus Fibroblasten, Osteo- und Zementoprogenitorzellen, Osteoblasten und Osteoklasten, Zementoblasten und Dentoklasten, Epithelzellen und Leukozyten zusammen (Schroeder 2000).

Der Hauptbestandteil des PDLs sind Fibroblasten, die durch eine schnelle Turnover-Rate gekennzeichnet sind. Sie weisen ein ausgedehntes Zytoplasma mit zahlreichen Organellen auf, die in Verbindung mit Proteinsynthese und –sekretion stehen, sowie ein gut entwickeltes Zytoskelett mit zahlreichen Haftverbindungen und *gap junctions* (Zell-Zell-Kanälen), die ihrerseits die funktionelle Verantwortung der Zellen widerspiegeln.

Die Kollagenfibrillenbündel unterliegen einem ständigen Umbauprozess durch die Fibroblasten, die die Fähigkeit besitzen, zeitgleich Kollagen zu synthetisieren und abzubauen (Nanci und Bosshardt 2000).

Bei den epithelialen Zellen des PDLs handelt es sich um Reste der Hertwig'schen Wurzelscheide (HERS), die als Malassez'sche Epithelzellen bezeichnet werden. Diese Zellen treten nahe des Zements als Zellnester auf und bilden ein epitheliales Netzwerk. Ihre Funktion ist zu großen Teilen noch ungeklärt (Becktor et al. 2007).

Im Faserapparat des PDLs dominieren die Kollagen- Typen I, III und XII. Die überwiegende Mehrheit der Kollagenfibrillen liegt in Faserbündeln vor, die einem Seil gleichen. Individuelle Stränge können kontinuierlich erneuert werden, während das Gesamtgebilde seine Architektur und Funktion beibehält. Auf diese Weise ist es den Faserbündeln möglich sich dem kontinuierlichen Stress anzupassen (Nanci und Bosshardt 2000, Dangaria et al. 2009).

Die äußeren Enden der Kollagenfaserbündel sind in das Zement oder den Knochen eingebettet. Diese senkrecht zur Oberfläche verlaufenden Kollagenfasern, die von dem Alveolarknochen zum Zement verlaufen und dort inserieren, werden Sharpey'sche Fasern genannt (Schroeder 1982; Nanci und Bosshardt 2000).

Die Hauptfunktion dieser Fasern ist die Aufhängung des Zahnes in der Alveole. Hierfür inserieren die Sharpey'schen Fasern in der Zementoberfläche des Zahnes, wobei auf 1 mm² Zementoberfläche eines in Funktion stehenden Zahnes durchschnittlich 28.000 kollagene Faserbündel ansetzen. Auf der anderen Seite inserieren die Sharpey'schen Fasern an der dem PDL angrenzenden Alveolarknochenfläche. Die hier zur Verfügung stehende Fläche ist etwas geringer,

da der Alveolarknochen hier mit zahlreichen kleinen Foramina (Mündungen der Volkmann-Kanäle), die 5-10% der Fläche einnehmen, versehen ist (Birn 1966).

Ein weiterer Bestandteil des PDLs und Bestandteil der extrazellulären Matrix sind elastische Fasern, von denen drei verschiedene Typen bekannt sind: Elastin, Oxytalan und Elaunin.

Bei dem im PDL vorkommenden Typ handelt es sich um die Oxytalanfasern. Der Name Oxytalan stammt aus dem Griechischen und leitet sich von den Worten oxus = Säure, scharf und talas = resistent (gegen Säuren) her. Es wird angenommen, dass es sich hierbei um eine Form unreifer elastischer Fasern oder entwirrter Kollagenfasern handelt (Sampson 1979, Edmunds et al. 1979). Der Unterschied zwischen den elastischen und den Oxytalanfasern ist die Abwesenheit der amorphen Elastinkomponente bei den letzteren (Briggaman und Wheeler 1975).

Diese liegen als Mikrofibrillenbündel vor und verlaufen als dreidimensionales Geflecht vertikal von der Zementoberfläche, die Wurzel umgebend und enden in einem apikalen Komplex aus Arterien, Venen und Lymphgefäßen (Nanci und Bosshardt 2000). Ihre Funktion ist noch nicht vollends erforscht, man vermutet jedoch, dass die Oxytalanfasern die jeweilige Zahnstellung bei funktioneller Beanspruchung registrieren und den Blutdurchfluss im PDL regulieren (Jonas und Riede 1980; Sims 1975).

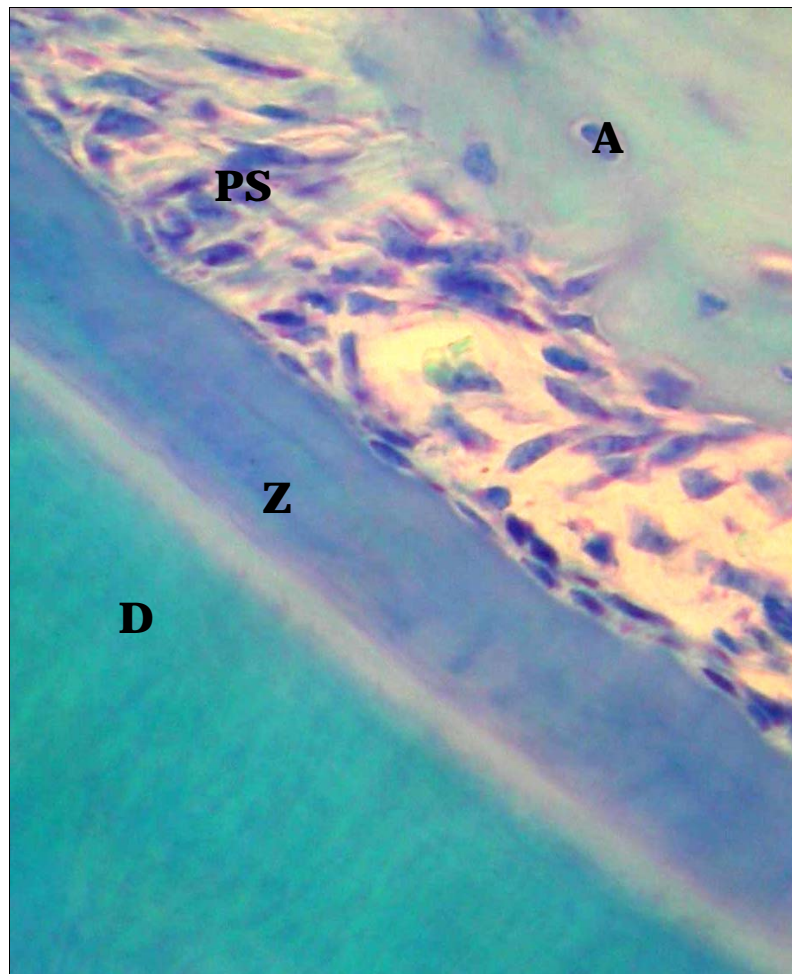


Abbildung 3: Toluidin-Färbung: Parodontalspalt mit PDL-Zellen einer 6 Monate alten Maus; Vergrößerung: 40fach; A=Alveolarknochen; PS=Parodontalspalt ; Z=Zement; D=Dentin

Alveolarknochen

Der Alveolarknochen umgibt die Wurzel des Zahnes und stellt das knöcherne Fach zur Aufnahme der Zähne dar (Zahnalveolen). Der Alveolarknochen besteht aus dem Processus alveolaris (Maxilla) und der Pars alveolaris (Mandibula). Bei diesen Strukturen handelt es sich um zahnabhängige Strukturen. Sie entwickeln sich mit der Bildung und dem Durchbruch der Zähne und bilden sich nach ihrem Verlust wieder zurück.

Die Funktion der Alveolarfortsätze umfasst die Verankerung der Zähne in den Alveolen (Zahnfächern) und die Aufnahme sowie die Verteilung der einwirkenden Kräfte (Hassell TM 2000).

Der Alveolarfortsatz besteht zur Wange sowie zur Mundhöhle hin gerichtet aus kortikalen Kompakta-Knochenplatten, zentral liegender Spongiosa und dem Alveolarknochen (Nanci und Bosshardt, 2006).

Die biochemische Zusammensetzung ist noch unzureichend erforscht. Ähnlich wie in den anderen Geweben des Parodontiums sind Kollagen Typ I und III vorherrschend. Weiterhin wurde die Präsenz biologisch aktiver Polypeptide, Sialoprotein und Osteopontin eingeschlossen, nachgewiesen (Chen et al. 1993). Bei den dominierenden Proteoglykanen handelt es sich vorrangig um Decorin und Biglykan (Bartold 1990).

Zement

Das Zement ist ein hartes avaskuläres Gewebe, das die Oberflächen der Zahnwurzeln bedeckt. Es gehört zum Zahnhalteapparat, da an ihm die Sharpey-Fasern (Kollagenfasern des PDLs) haften, die den Zahn in der Alveole beweglich aufhängen.

Histologisch ist es aus Zementoblasten, Zementozyten, Fibroblasten und der extrazellulären Matrix aufgebaut (Berkovitz, 2004).

Ungefähr 50% der anorganischen Matrix bestehen aus Hydroxylapatit, wohingegen über 90% der organischen Matrix aus Kollagen Typ I und III bestehen (Bartold und Narayanan 2000).

Hauptaufgabe des Zements ist es, die desmodontalen Kollagenfaserbündel in der Wurzeloberfläche zu verankern und somit zur Befestigung des Zahnes in der Alveole beizutragen.

Grundsätzlich unterscheidet man azelluläres ursprüngliches Zement, das die gesamte Wurzeloberfläche bedeckt, vom zellulären, sekundären Zement, das später auf funktionellen Reiz hin entsteht und hauptsächlich in den apikalen Regionen zu finden ist.

Die Dicke der Zementschicht beträgt koronal zwischen 50 – 150 µm und apikal zwischen 200 – 600 µm (Mutschelknauss 2000).

Im Rahmen einer detaillierteren Differenzierung erhält man 4 verschiedene Zementtypen.

1. Das azelluläre, afibrilläre Zement (AAZ)

Dieses Zement enthält somit weder Zementozyten noch nachweisbare kollagene Fibrillen und befindet sich meistens nahe der Schmelz-Zementgrenze (Bosshardt und Selvig 1997; Mutschelknauss 2000).

2. Das azelluläre, fibrilläre Zement (AFZ)

Das AFZ ist im koronalen Drittel lokalisiert, enthält ebenfalls keine Zementozyten, schließt aber das extrinsic Fasersystem, das aus den Sharpey'schen Fasern besteht, mit ein (Bosshardt und Selvig 1997). Das AFZ spielt eine Hauptrolle in der Zahnverankerung.

3. Das zelluläre Eigenfaserzement (Z EZ)

Bei diesem Zementtyp lassen sich in Zementlakunen eingeschlossene Zementozyten und parallel zur Oberfläche laufende zementeigene Fasern lokalisieren. Das Z EZ ist im apikalen Bereich der Zähne angesiedelt.

4. Zelluläres Gemischtfaserzement (ZGZ)

Hierbei handelt es sich um einen Zementtyp, bei dem sich aktive Zementoblasten mit Fibroblasten abwechseln (Schroeder, 2000). Das ZGZ ist zwischen den Wurzeln (Furkationen) und im Bereich des apikalen Wurzeldrittels zu finden. ZGZ beinhaltet Bereiche von AFZ und Z EZ und enthält somit Zementozyten, einstrahlende Sharpey'sche Fasern sowie zementeigene Faserbündel.

1.2 Die Malassez'schen Epithelreste (ERM) im PDL

1.2.1 Geschichtlicher Hintergrund der ERM

Erste Erwähnung fanden die Malassez-Zellen im Jahre 1817 durch den Forscher Serres, der sie als "restes de l'organe de l'email" und somit als Reste des Schmelzorgans beschrieb (Serres 1817). Serres war sich zu dieser Zeit über das Vorhandensein der Hertwigschen Wurzel-Epithel-Scheide bewusst, die er auf Atrophie und das Schwinden im Alter untersuchte.

1885 war der Physiologe Louis-Charles Malassez der erste, der die Zellen näher beschrieb und sich mit deren Verteilung beschäftigte. Er untersuchte Quer- und Längsschnitte von menschlichen Zähnen, fertigte Zeichnungen an und stellte fest, dass diese epithelialen Reste sich als eine Art Netzwerk um die Zahnwurzel formieren. Weiterhin gelang es ihm nachzuweisen, dass diese Zellen auch im erwachsenen Parodontalligament verbleiben und betonte die Bedeutung der epithelialen Reste hinsichtlich der Ätiologie von epithelialen Zysten (Malassez 1885). Die Untersuchungen des Forschers Albert von Brunn (1887) ergaben hinsichtlich der Wurzelentwicklung von Rattenmolaren weitere Erkenntnisse. Er verdeutlichte, dass die Hertwigsche Wurzelscheide, die aus einem äußeren und einem inneren Schmelzepithel besteht, als determinierender Faktor hinsichtlich der Wurzelbildung und der Differenzierung der Bindegewebszellen der Pulpa in Odontoblasten anzunehmen ist (von Brunn 1887).

In demselben Jahr betrachtete Green Vardiman Black (1887) die epithelialen Reste als Lymphbahnen, die von Epithel umsäumt und mit Lymphe gefüllt sind. 1899 wiederum interpretierte er diese Strukturen als ganglose Drüsen, die eine netzartige Anordnung um den Zahn bilden (Black 1887, 1899).

Joseph Lartschneider (1929) erhob den Anspruch, dass die epithelialen Reste, bei denen es sich um Abkömmlinge der Zahnlamina handelt, zu mehrkammerigen Zysten und schmelzbildenden Tumoren führen, wohingegen die epithelialen Reste, die der Hertwig'schen Wurzelscheide (HERS) entspringen, sich zu einfachen Zysten

entwickeln (Lartschneider 1929). Kurz darauf wurde festgestellt, dass epitheliale Reste eine reguläre Erscheinung sind (Orban 1929; Fischer 1932; Meyer 1932). 1972 beschrieb Ten Cate die epithelialen Zellen nach Malassez (ERM) unter Verwendung von Lichtmikroskopie (Ten Cate 1972). Die Zellen wurden als kleine Nestanhäufungen von epithelialen Zellen innerhalb des Parodontalligaments identifiziert, die nahe der Zementoberfläche angelagert sind. Jede Zelle wies einen dunkel gefärbten Zellkern und einen schmalen peripheren Zytoplasmasaum vor. Zusätzlich kam man zu der Erkenntnis, dass es sich bei den ERM nicht um isolierte Zellgruppen sondern um ein Netzwerk, vergleichbar mit einem Fischnetz, handelt, welches die Wurzel umgibt (Malassez 1885; Black 1899; Spouge 1984). Zusammengefasst lässt sich sagen, dass, obwohl die Existenz dieser Zellen seit mehr als einem Jahrhundert bekannt ist, der Wissensstand auch zum jetzigen Zeitpunkt bezüglich der Funktion der ERM lückenhaft ist (Rincon et al. 2006).

Die Untersuchungen hinsichtlich der Funktion verfolgten und verfolgen nach wie vor zahlreiche Richtungen, wie z.B. hinsichtlich der Regulation der Homöostase- oder Breitenregulation des Parodontalspalts (Rincon et al. 2006), als Schutz vor Wurzelresorption, ihre Rolle in der Pathogenese von odontogenen Zysten (Ten Cate 1972; Browne 1975) und anderen parodontalen Erkrankungen (Spouge 1984, 1986; Grant 1969).

1.2.2 Embryologie der ERM

Die Formierung der Malassez'schen Epithelzellen findet zur Zeit der Wurzelentwicklung statt, die kurz vor dem Zahndurchbruch beginnt. Zu diesem Zeitpunkt ist die Schmelzbildung abgeschlossen und die noch nicht durchgebrochene Zahnkrone ist von Schmelzepithel bedeckt.

Die Wurzelbildung beginnt einige Zeit nach Abschluss der Kronenbildung. Zu dieser Zeit sind aus der zervikalen Schlinge des Schmelzorgans die Hertwig'sche Epithelscheide und das Diaphragma entstanden. Ihre Zellen differenzieren sich nicht, teilen sich häufig und induzieren die Differenzierung der ektomesenchymalen Zellen

der Zahnpapille zu Odontoblasten. Letztere beginnen Dentinmatrix auszuschcheiden, die bald darauf mineralisiert. Während die Dentinwand der Wurzel länger wird und an Dicke zunimmt, bewegt sich der Zahn koronalwärts. Das Diaphragma behält seine Lokalisation bei. Die klassische Konzeption der Zementogenese besagt, dass die Hertwig'sche Epithelscheide ihre Kontinuität verliert und sich in ein lockeres Netzwerk epithelialer Zellstränge auflöst, sobald die äußeren Dentinschichten zu mineralisieren begonnen haben. Die Reste der Hertwig'schen Epithelscheide werden Malassez'sche Epithelzell-Reste (ERM) genannt (Rincon 2006).

1.2.3 Ultrastruktur der ERM

Bei den ersten Untersuchungen der Ultrastruktur der ERM-Zellen mit Hilfe der Transmissionselektronenmikroskopie wurde festgestellt, dass eine Basalmembran die ERM-Zell-Inseln vom Bindegewebe trennt (Valderhaug und Nylen 1966; Valderhaug und Zander 1967). Weiterhin wurden Hemidesmosomen, *tight junctions*, zahlreiche Filamente sowie Tonofilamente im Zytoplasma dargestellt, die als so genannte Tonofibrillen in gebündelter Form vorliegen. In dieser Studie gab es keine Hinweise darauf, dass ERM in direktem Kontakt mit dem Wurzelzement stehen (Rincon 2006).

Weitere Studien der menschlichen ERM-Zellen ergaben weitere charakteristische Eigenschaften; irreguläre Zellkerne mit dichtem Heterochromatin, Tonofilamente im Zytoplasma, reichlich Mitochondrien, jedoch nur schwach entwickeltes raues endoplasmatisches Retikulum (Hamamoto et al. 1989).

Fortwährend wurde in anderen darauf folgenden Studien (sowohl human als auch an Tieren) der epitheliale Charakter der ERM-Zellen durch die Präsenz von Tonofilamenten, Desmosomen und einer Basalmembran mit Hemidesmosomen, die die Zellreste umgeben, bestätigt (Hamamoto et al. 1989, 1991; Yamasaki und Pinero 1989; Berkowitz et al. 1997).

Zudem wurde mit Hilfe der Transmissions-Elektronen-Mikroskopie festgestellt, dass ERM-Anhäufungen in Gebieten auftreten, in denen Reparaturmechanismen stattfinden (Brice et al. 1991).

1.3 Unterschiede zwischen menschlichem und murinem Gebiss

Die Maus ist im Gegensatz zum Menschen, der im Laufe seines Lebens einen physiologischen Zahnwechsel erlebt, ein Monophyodont, also ein Lebewesen ohne Zahnwechsel.

Obwohl in der Odontogenese der Maus zunächst mehr Zahnanlagen vorhanden sind (Peterková et al., 1995), weist das adulte Gebiss der Maus pro Quadrant nur einen Incisivus und je drei Molaren, insgesamt also 16 Zähne, vor (Coady et al. 1967).

Der Incisivus der Nager ist bogenförmig und durch kontinuierliches Wachstum nahe seinem apikalen Ende charakterisiert. Der Zahn besitzt keine gewöhnliche, wie bei dem Menschen übliche anatomische Zahnkrone bzw. Wurzel. Seine labiale Oberfläche ist mit Schmelz bedeckt, und wird somit als Äquivalent der anatomischen Krone gesehen, hingegen ist der linguale Anteil mit Zement versehen und übernimmt somit den Wurzel-analogen Part (Beertsen und Niehof 1986).

Verantwortlich hierfür ist eine Stammzellnische, die am labial-apikalen Ende sitzt und Stammzellen für alle Epitheltypen des kontinuierlich durchbrechenden Zahnes vorweist (Harada und Ohshima 2004). Stammzellen sind generell als Zellen definiert, die sich selbst erneuern können und dazu führen, dass sich verschiedene Abkömmlinge differenzieren.

Auf der labialen Seite findet eine Differenzierung in 4 Strukturen statt:

- Das innere Zahnepithel
- Die Zwischenschicht (Stratum intermedium)
- Das sternförmige Retikulum
- Das äußere Zahnepithel.

Die Zellen, die dabei mit der Basalmembran in Kontakt treten, differenzieren sich zu Prädentin-sekretierenden Odontoblasten, die Zellen des inneren Zahnepithels hingegen differenzieren sich in funktionelle Ameloblasten, die Schmelz produzieren. Im Kontrast hierzu führt die Histogenese des linguale Epithels zur Formierung der

epithelialen Wurzelscheide, die nur aus einem äußeren und einem inneren Zahnepithel besteht.

Folge hiervon ist, dass das innere Epithel der Wurzelscheide Dentinbildung induziert, jedoch nicht die Fähigkeit zur Ausbildung von Schmelzmatrix besitzt.

Daraus resultiert eine Asymmetrie zwischen der labialen und der lingualen Zahnhälfte (Smith und Warshawsky 1975, 1976).

Neuere Untersuchungen gehen davon aus, dass die Asymmetrie Folge der unterschiedlichen Expression von Follistatin ist, welches auf der lingualen Seite die Ameloblastendifferenzierung hemmt, indem es die BMP (Bone morphogenic protein)-Aktivität inhibiert.

Die Asymmetrie ist funktionell wichtig, da sie der Schneidekante zu der nötigen Schärfe verhilft (Wang et al. 2004). Incisivi von Nagern werden also durch Zellproliferation am apikalen Ende des Zahnes und durch Attrition an der Inzisalkante aufrechterhalten (Harada und Oshima 2004).

Eine weitere Unterscheidung findet im Bereich des Dentins statt. Man unterscheidet so genanntes schmelzassoziertes Kronendentin, welches einen hohen Calcium- und einen niedrigeren Magnesiumgehalt vorweist, von zementassoziertem Wurzelndentin, welches hingegen einen hohen Magnesium- und einen niedrigen Calciumgehalt beinhaltet. Auffällig ist, dass die Umwandlung von Prädentin zu Dentin auf der lingualen, also der zementassozierten Seite, schneller abläuft als auf der schmelzassozierten (Everts et al. 1994; Beertsen und Niehof 1986).

Es wird angenommen, dass dies auf den niedrigeren Gehalt an sulfatierten Matrixkomponenten auf der lingualen Seite zurückzuführen ist.

Der bogenförmige Verlauf des Incisivus kommt durch Unterschiede in der Eruptionsrate bezüglich der lingualen und der labialen Zahnseite zustande. Die innere Krümmung entspricht ca. 87.5 % der äußeren Krümmung. Somit ist die Eruptionsrate auf der Wurzel-analogen Seite um 12.5% geringer als auf der Kronen-analogen.

Das Verhältnis von Wurzel- zu Kronen-analogenem Dentin beträgt 1:1.3 (Beertsen und Niehof 1986).

Eine weitere Besonderheit ist, dass alle Stufen der Odontogenese (Knospen- bis Glockenstadium), Amelogenese und Dentinogenese eingeschlossen, wie eine Reflektion der Zahnentwicklung im pränatalen Stadium vorzufinden sind, wenn man den Zahn von apikal, inzisalwärts untersucht (Oshima et al. 2005).

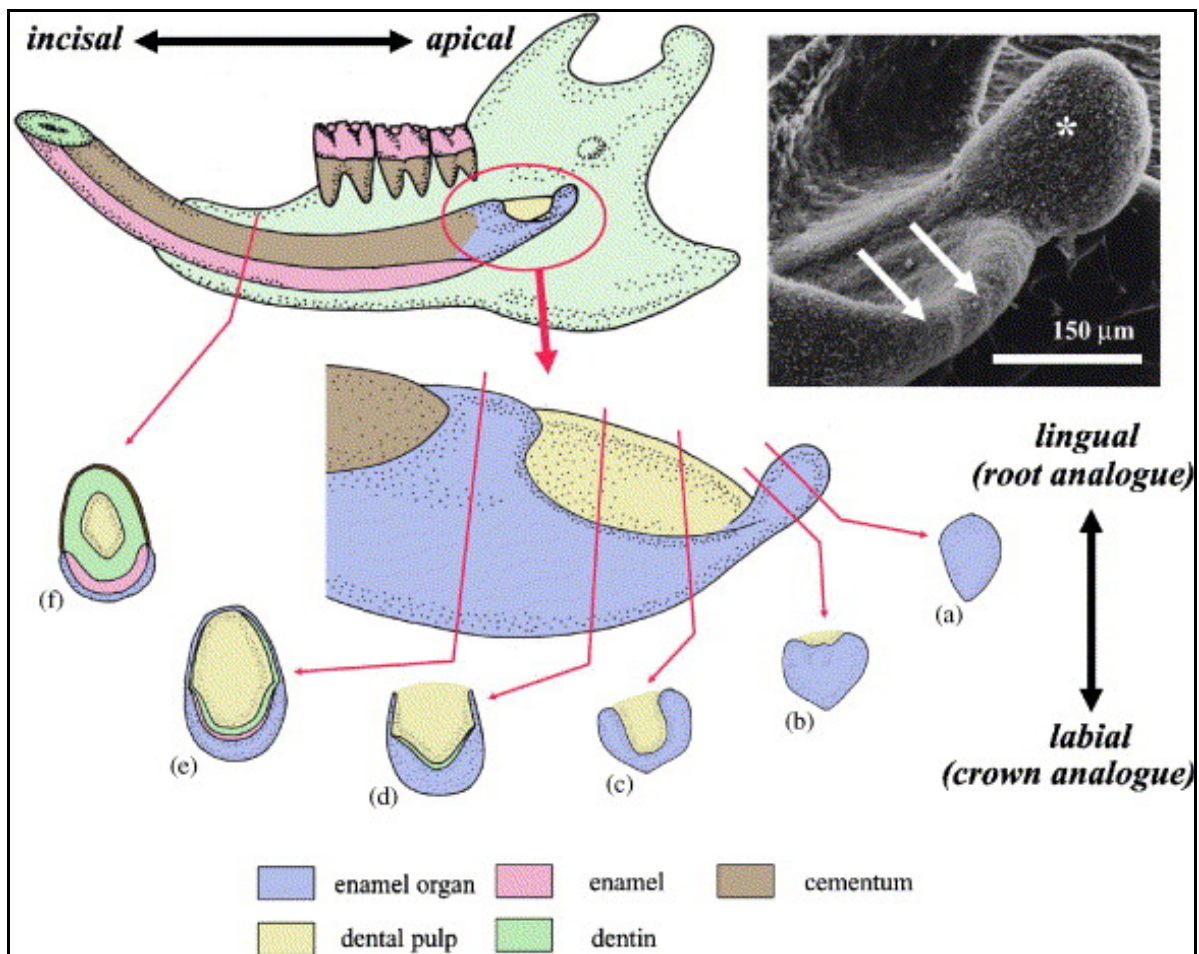


Abbildung 4: Darstellung transversaler Schnitte des Incisivus der Maus (entnommen aus Oshima et al. 2005, S.155); a) Knospen-Stadium b) Kappen-Stadium c) Glocken-Stadium d+e) die Hertwig'sche Wurzelscheide verlängert sich in linguale Richtung und umschließt letztendlich die dentale Pulpa

1.4 Die Extrazelluläre Matrix (EZM)

1.4.1 Definition und Funktion

Als EZM wird der Anteil des Gewebes bezeichnet, der von Zellen in den Interzellularraum (Raum zwischen den Zellen) sezerniert wird, so dass sich dieser zu der EZM ausweitet. Sie stellt das strukturelle Gerüst für die Interaktionen dar, die unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren die Entwicklung, Form und Funktion jeder zellulären Komponente beeinflussen.

Im Grunde genommen fällt der EZM die Aufgabe der Fixierung der in ihr eingebetteten Zellen zu. Bei genauerer Betrachtung lässt sich jedoch feststellen, dass die EZM mit den in ihr liegenden Zellen interagiert. Die Komponenten der EZM werden von Zellen synthetisiert und sezerniert, aber auch extrazellulär oder (nach Endozytose) intrazellulär abgebaut. Darüber hinaus wird durch die Bindung an bestimmte Komponenten der EZM durch Zellrezeptoren die Expression von Genen in den Zellen reguliert.

1.4.2 Komponenten der EZM

Die Komponenten der EZM umfassen die Gruppe der Kollagene, die Gruppe der Glykosaminoglykane, die Oxytalanfasern, die nicht-kollagenen Proteine sowie Monozyten und Makrophagen.

Kollagene

Die Kollagene machen mit 60% den Hauptbestandteil der EZM des PDLs aus (Sodek et al. 1977). Mit circa 80% stellt Kollagen Typ I die Hauptkomponente der charakteristischen Fasern dar, Kollagen Typ III ist mit 15% in den retikulären Fasern, die die Blutgefäße und peripheren Nerven umgeben, vertreten und zusätzlich in den Hauptfasern mit Kollagen Typ I assoziiert (Butler et al. 1975; Huang et al. 1991).

Kollagen Typ IV stellt den Hauptanteil von Basalmembranproteinen der Blutgefäße und Nerven. Das Kollagen- Typ V hingegen ist mit Zelloberflächen und der Ummantelung von längeren Kollagen- Typ- I und Typ- III- Fibrillen assoziiert (Everts et al. 1996).

Kollagen Typ VI ist ein mikrofibrillärer Bestandteil der Oxytalanfasern sowie der Verbundstrukturen der Basalmembran zur benachbarten EZM.

Weiterhin wurden Kollagen Typ XII und XIV im PDL lokalisiert (Karimbux und Nishimura 1995).

Sämtliche Kollagene werden von einer Vielzahl von Zellen (Fibroblasten, Chondroblasten und Osteoblasten) synthetisiert und in die EZM sezerniert. Im Parodontium kommt den Kollagenfasern (Sharpey-Fasern) die Aufgabe der Verankerung des Zahnes im Alveolarknochen zu (Mutschelknauss 2000).

Proteoglykane und Glykosaminoglykane (GAGs)

Hierbei handelt es sich um langkettige Polysaccharide aus Disaccharideinheiten die in der EZM in großen Mengen vorhanden sind. Abhängig von der Kombination von Hexosaminen und Uronsäure sind verschiedene GAGs bekannt (Nanci 2003). Erwähnenswert sind hierbei die Hyaluronsäure, Heparansulfate, Dermatansulfate, Chondroitinsulfate und Keratansulfate. Alle GAGs bis auf die Hyaluronsäure sind an Proteine gebunden und bilden so Proteoglykane.

Zwei Mitglieder der Familie der Proteoglykane sind Aggrecan und Decorin. Aggrecan stellt eines der Hauptbestandteile der EZM des Gelenkknorpels dar. Es besteht aus zwei extendierten Bereichen, welche die Hauptmasse der Glykosaminoglykane und die drei globuläre Domänen, G1 und G2 am N-Terminus und G3 am C-Terminus des Kernproteins, beinhalten. Durch hochspezifische Interaktionen gliedert sich Aggrecan in die Matrix ein, indem es große Aggregate bildet welche aus einem zentralen Hyaluronfilament und über Hyaluronbindungsdomänen angehefteten Aggrecanmonomeren bestehen (Caterson et al. 2000).

Decorin hingegen ist ein Mitglied der leucin-rich repeat (LRR) Proteinfamilie und besteht aus einem 36.5 kDa schweren Kernprotein welches mit einer

Glykosaminglykankette an dem N-terminalen Ende versehen ist (Ruoslahti et al. 1986). Decorin besitzt die Fähigkeit, über sein Kernprotein mit Kollagen zu interagieren und so die Fibrillogenese zu beeinflussen (Vogel et al. 1984). Die Namensgebung ist in der Affinität zu den D- und E- Banden an der Kollagenoberfläche begründet (Scott und Orford 1981).

Es interagiert zusätzlich zu den fibrillären Kollagenen I, II, III und V (Bidanset et al. 1992, Hedbom und Heinegård 1993, Whinna et al. 1993) auch mit Kollagen VI, XII, und XIV (Bidanset et al. 1992, Font et al. 1993, Font et al. 1996) sowie Fibronectin (Schmidt et al.1987), Thrombospondin (Winnemöller et al. 1992), dem *epidermal growth factor receptor* (EGFR)(Iozzo et al. 1999) und dem transforming *growth factor-β* (TGF-β) (Hildebrand et al 1994).

Oxytalanfasern

Oxytalanfasern machen nur einen geringen Teil der Proteine des PDLs aus. Es handelt es sich um unreife elastische Fasern, die eine mikrofibrilläre Kollagen Typ VI-Komponente und geringe Anteile von Elastin beinhalten (Everts et al. 1998). Sie entspringen von der Knochenoberfläche sowie aus dem Zement und verlaufen in apikokoronarer Richtung, parallel und in enger Beziehung zu den Blutgefäßen und Nervenbündeln (Everts et al. 1996; Beertsen et al. 2000).

Nichtkollagene Proteine

Im Vergleich zu den Kollagenen und den Proteoglykanen treten die nichtkollagenen Proteine nur in geringer Anzahl auf. Zwischen den Glykoproteinen sind die Adhäsionsmoleküle Fibronectin, Tenascin und Vitronectin zu finden. Während Fibronectin im PDL weit verstreut vorliegt, scheint es, als sei Tenascin vermehrt auf der Oberfläche von mineralisiertem Zement und Knochen zu finden (Beertsen et al. 2000; Steffensen et al. 1992; Lukinmaa et al. 1991). Bei Vitronectin handelt es sich um einen Attachmentfaktor, der mit elastischen Fasern im lockeren Bindegewebe assoziiert ist, sich an der Regulation der Blutkoagulation, der Plasminogenaktivierung

und der Fibrinolyse beteiligt und im gesamten PDL vorkommt (Tremble et al. 1994; Kapila et al. 1996).

Ein weiteres gewebespezifisches, nicht-kollagenes Matrixprotein ist das Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP). Im Detail handelt es sich um ein oligomeres Glykoprotein, welches hauptsächlich in jeder Art von Knorpelgewebe, Ligamenten und Sehnen synthetisiert wird (Posey und Hecht 2008). Es gehört zu der Familie der Thrombospondine (TBS) und wird auch als TBS 5 bezeichnet (Oldberg et al. 1992). COMP weist fünf identische Untereinheiten auf, die nahe des N-terminus lokalisiert sind, und so ein fünfsträngiges coiled coil bilden, welches durch zwei Disulfidbrücken stabilisiert wird (Zaia et al. 1997). Die Bedeutung von COMP hinsichtlich Knorpelstrukturen wird verdeutlicht durch die Tatsache, dass COMP-Mutationen zu skelettalen Erkrankungen wie Pseudoachondroplasie (PSACH) und Multipler Epiphysärer Dysplasie (MED) führen (Briggs et al. 1995).

1.5 Funktion und Aufbau von Basalmembranen (BM)

Basalmembranen (BM) sind biologisch wichtige, extrazelluläre Protein-Grundgerüste, die in der Nähe von Epithelien, Endothelien, Muskeln und anderen Zellen des Körpers verlaufen. Sie trennen diese Zellen von darunterliegendem Bindegewebe und dienen als Hauptfiltrationsbarriere.

Sie sind in jedem vielzelligen Organismus zu finden, der sich aus drei Keimblättern entwickelt.

Mit dem Elektronenmikroskop lässt sich eine Unterteilung der BM in 3 Schichten ausmachen: a) die Lamina densa, die aus einer festen verwobenen Schicht ungeordneter Fibrillen besteht und in eine dichte Matrix eingebettet ist, b) die Lamina lucida, die als helle Schicht imponiert und die Lamina densa von den parenchymalen Zellen trennt, sowie auf der anderen Seite der Lamina densa c) die sogenannte Lamina fibroreticularis, die die Verknüpfung der BM zum Bindegewebe darstellt (Vracko 1974; Laurie und Leblond 1985).

Die BM besteht chemisch gesehen aus 90% Proteinen, mit einem ausgeglichenen Verhältnis zwischen kollagenen und nichtkollagenen Proteinen, 8% Kohlenhydraten und 2% Lipiden, wobei es sich hier um Glykoproteine handelt, die Glucose, Galactose, Mannose, Fucose, Hexosamine und Sialsäure enthalten (Kefalides 1969; Kefalides und Winzler 1966).

Proteine, die sich in fast allen Basalmembranen nachweisen lassen, werden als universelle Basalmembran-Komponenten bezeichnet. Im Detail handelt es sich dabei um die Proteine Kollagen Typ IV (Kefalides 1973), Laminin-1 (Timpl et al. 1979), Nidogen-1 (Timpl et al. 1983) sowie das heparansulfathaltige Proteoglykan Perlecan (Noonan und Hassel 1993).

1.5.1. Biochemie und Bedeutung von Kollagen IV

Bei Typ IV Kollagen handelt es sich um ein besonderes Mitglied der großen Familie der Kollagene, die bei Wirbeltieren 28 verschiedene Typen umfasst .

Im Gegensatz zu den meisten Kollagenen tritt Kollagen Typ IV nur in der Basalmembran auf und beinhaltet bis zu sechs genetisch ausgeprägten alpha-Ketten, die als alpha 1 (IV) bis alpha 6 (IV) bezeichnet werden (Khoshnoodi et al. 2008).

Diese Ketten sind in der für Kollagene typischen Anordnung, einer Tripelhelix, zusammengefügt (Brazel et al. 1988) und bilden ein ca. 400 nm langes gestrecktes Molekül, welches aus drei Domänen und einer vorangestellten Signalsequenz besteht.

An dem C-terminalen Ende des Moleküls befindet sich die ca. 10 nm lange globuläre Domäne NC1, die aus drei Untereinheiten besteht, welche wiederum jeweils aus sechs Cysteinen aufgebaut sind. An dem N-terminalen Ende befindet sich eine 28 nm lange, Cystein- und Lysin-haltige sogenannte 7S-Domäne.

Zwischen diesen beiden Domänen befindet sich die 400 nm lange Tripel-Helix-Domäne (Timpl et al. 1981; Siebold et al. 1987, 1988). Kollagen Typ IV ist in der Lage, sich zu großen Polymeren zu formieren, indem die NC1-Domänen

benachbarter Moleküle interagieren, Disulfidbrücken entstehen und Dimere gebildet werden (Weber et al. 1988). Diese Dimere lagern sich über ihre 7S- Domänen zu Tetrameren zusammen (Duncan et al. 1982).

1.5.2. Biochemie und Bedeutung von Lamininen

Laminine gehören zu der Gruppe der Glykoproteine und sind ebenfalls Hauptbestandteile der Basalmembranen. Bei dem Molekül handelt sich um ein Heterotrimer, das aus drei verschiedenen Polypeptidketten (α , β , γ) aufgebaut ist und ein Molekulargewicht von 900 kDa aufweist (Beck et al. 1990). Es stellt sich als kreuzförmiges Gebilde mit drei kurzen und einem langen Arm dar (Martin und Timpl 1987).

Lamininähnliche Domänen finden sich in zahlreichen Proteinen. Um jedoch als Lamininkette bezeichnet werden zu können, muss eine eindeutige Klassifikation als α , β , oder γ -Kette möglich sein. Besonders wichtig ist das Vorliegen einer α -helicalen coiled-coil Domäne (Ekblom und Timpl 1996).

Die erste Isoform der Laminine wurde 1979 entdeckt. Bislang sind fünf verschiedene α -Ketten ($\alpha 1$ - $\alpha 5$), 3 verschiedene β -Ketten ($\beta 1$ - $\beta 3$) und 3 verschiedene γ -Ketten ($\gamma 1$ - $\gamma 3$) bekannt, aus denen sich die Lamininisoformenten zusammensetzen (Miner und Yurchenco 2004). Seit jeher gab es immer wieder verschiedene Klassifikationen bezüglich der Laminine. 2005 wurde eine neue vereinfachte Klassifikation der Laminine vorgeschlagen. Demnach werden die 16 verschiedenen Laminine anhand ihrer enthaltenen α -, β - und γ - Ketten als Laminin 111 bis Laminin 523 bezeichnet (Aumailley et al. 2005).

Laminin bindet an Kollagen IV, Perlecan, Nidogen und an sich selbst, um integrierte Strukturen innerhalb der Basalmembran zu bilden. Aufgrund ihrer Form und Größe, ist es den Molekülen zusätzlich möglich, die Basalmembran zu durchspannen und verschiedene Oberflächensubstanzen von Zellen zu binden.

Die Bindung an Laminin löst zahlreiche zellspezifische Antworten aus. Sekretorische Zellen werden polarisiert, Nervenzellen bilden axonähnliche Fortsätze aus und zahlreiche Zellen migrieren oder differenzieren sich. Diese Ergebnisse deuten darauf

hin, dass es sich bei Laminin um ein sowohl strukturell als auch regulatorisch wichtiges Molekül handelt (Martin und Timpl 1987).

1.5.3. Biochemie und Bedeutung von Nidogenen

Nidogen, auch Entactin genannt, ist ein Glykoprotein, das aus zwei Amino- (G1, G2) und einer Carboxyl- (G3) Domäne besteht, die durch eine stabförmige Domäne, die hauptsächlich aus sich wiederholenden Sequenzen des epithelialen Wachstumsfaktors (EGF) besteht, verbunden sind (Kramer 2005).

Bisher ist neben dem Nidogen-1 die Isoform Nidogen-2 bei Säugetieren identifiziert worden. Der Unterschied bezieht sich hauptsächlich auf die Moleküllänge und die Glycosylierung. Bei Nidogen-1 handelt es sich um ein 150 kDa schweres und 30 nm langes Protein. Nidogen-2 ist mit 200 kDa und 50 nm sowohl schwerer als auch länger (Kohfeldt et al. 1998). Bei wirbellosen Lebewesen hingegen konnte nur eine Nidogenart festgestellt werden (Ackley et al. 2003).

Biochemische Untersuchungen an Wirbeltieren zeigten, dass die G3 Domäne eine hohe Bindungsaffinität zu der Laminin γ -Kette hat, während die G3 Domäne Perlecan und Kollagen Typ IV binden kann.

Nidogen beinhaltet 10% Kohlenhydrate einschließlich Mengen an Glukosaminen und Galaktosaminen. Unüblich für ein Matrixprotein ist der hohe Gehalt an Galaktosaminen (2%), der auf die Anwesenheit von 8 bis 12 Oligosaccharidketten hindeutet, die mit Serin oder Threonin in Verbindung stehen. Laminin im Vergleich dazu enthält gerade mal 0,2% Galaktosamine. Somit dürfte Nidogen für den deutlichen Anteil der Galaktosamine in der Basalmembran verantwortlich sein (Timpl et al. 1983).

Die Fähigkeit des Nidogen-1, dreifach Komplexe mit Laminin und Kollagen IV zu bilden, als auch andere Basalmembrankomponenten miteinander zu verknüpfen, lässt die Vermutung zu, dass Nidogen als Verknüpfungsprotein fungiert (Kramer 2005) und die Basalmembranarchitektur auf supramolekularer Ebene stabilisiert (Aumailley et al. 1993). Neben dem Laminin und Kollagen Typ IV kann auch Perlecan mit Nidogen-1 interagieren. Die Hauptbindungsstelle für das Kernprotein des Perlecans befindet sich auf der G2-Domäne (Battaglia 1992).

Gegenüber Integrinen konnte wiederum nur eine geringe Bindungsaffinität nachgewiesen werden (Dedhar et al. 1992).

1.5.4. Biochemie und Bedeutung von Perlecan

Perlecan ist ein allgegenwärtiges Proteoglykan der Basalmembran und vaskularisiertem Gewebe, ist aber ebenso in Gelenkknorpeln, Menisken und Bandscheiben anzutreffen, die frei von jeglicher Basalmembran und vornehmlich avaskulär sind (Melrose et al. 2008).

Aufgrund des perlenschnurartigen Erscheinungsbildes des Proteins im Elektronenmikroskop (EM) ist der Name Perlecan entstanden.

Das Heparansulfat-haltige Perlecan stellt die größte Basalmembran-Komponente dar. Es besteht aus einem 500 kDa schweren Kern-Protein, das aus zahlreichen globulären Domänen aufgebaut ist und drei Heparansulfat-haltigen Ketten, die an einem der beiden Enden aufgehängt sind. Untersuchungen ergaben, dass das Protein aus fünf unterschiedlichen Domänen (I bis V) besteht (Noonan et al. 1991). Die Domäne I enthält ein Start-Methionin, gefolgt von einer typischen Signaltransfersequenz und einem besonderen Segment von 172 Aminosäuren, die drei Anhaftungsstellen für Heparansulfat vorweisen. Die Domäne II beinhaltet vier LDL-Rezeptor-ähnliche Cysteinwiederholungen.

Die Domäne III weist cysteinreiche und globuläre Regionen und eine deutliche Ähnlichkeit mit dem kurzen Arm der Laminin A (α)-Kette auf. Die Domäne IV enthält 14 Immunglobulin-Wiederholungen und die Domäne V weist eine Ähnlichkeit mit der C-terminalen Domäne von Laminin auf und besteht aus drei Subdomänen, die mit EGF-Wiederholungen durchsetzt sind (Noonan et al. 1991; Iozzo und Murdoch 1996).

Perlecan aktiviert einige Wachstumsfaktoren (FGFs, PDGF, VEGF und CTGF) und fördert so Zellsignale, Zellproliferation und Zelldifferenzierung. Außerdem besitzt Perlecan die Fähigkeit, mit zahlreichen Proteinen der EZM zu interagieren, es stabilisiert und organisiert die EZM und fördert die Kollagenfibrillenbildung (Noonan et al. 1991).

Perlecan stabilisiert zudem Basalmembranen, indem es mit anderen Basalmembranproteinen Wechselwirkungen unterhält. Es konnte gezeigt werden, dass Perlecan sowohl mit Laminin als auch mit Nidogen-1 interagiert (Battaglia et al. 1992).

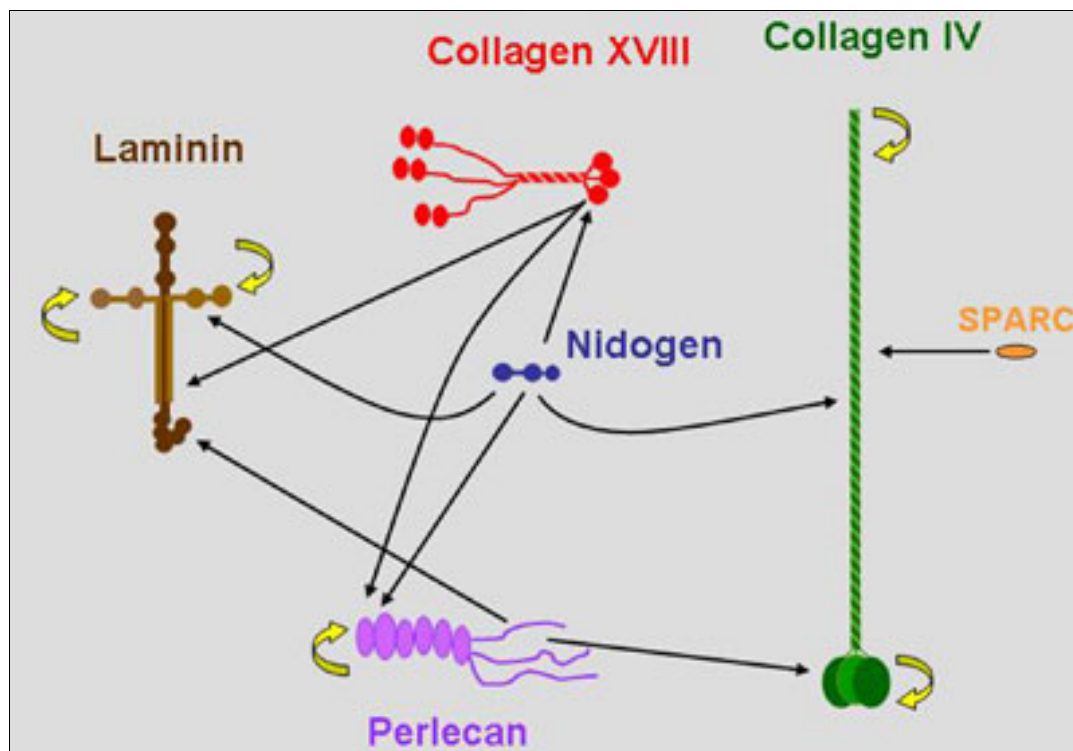


Abbildung 5: Basalmembranproteine maßstabsgetreu dargestellt; Die Pfeile repräsentieren biochemische Interaktionen. Die Fähigkeit von Kollagen IV und Laminin, zu polymerisieren, und die Fähigkeit von Perlecan, Oligomere zu bilden, sind mittels gelb-gewölbten Pfeils markiert (entnommen aus Kramer 2005).

1.6 Aufgabenstellung

Mit der vorliegenden Arbeit sollen die Kenntnisse bezüglich des Vorkommens, der Verteilung und möglicher, daraus resultierender Aufgaben von Matrixkomponenten in oralen Geweben der Maus vertieft werden. Hierfür werden neben den Incisivi und den Molaren insbesondere die Malassezschen Epithelzellen, die Basalmembranen der Mundschleimhaut, der Muskulatur und der Blutgefäße sowie der Alveolarknochen und das Parodontalligament der Versuchstiere analysiert.

Eine genaue Untersuchung erfolgt in dieser Arbeit mittels der immunohistochemischen Peroxidase-Antiperoxidase-Methode und der sich anschließenden lichtmikroskopischen Untersuchung.

2. Material und Methoden

Der Schwerpunkt dieser Arbeit, hinsichtlich Material und Methoden lag im Bereich der Lichtmikroskopie.

2.1 Vorbereitungen zu der Lichtmikroskopie

2.1.1 Versuchstiere

Bei den verwendeten Versuchstieren handelt es sich um sogenannte C57B6 J Mäuse, welche dem Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin, ansässig in der Hermann-Rein-Strasse 3 in 37075 Göttingen, entstammen.

2.1.2 Präparation

Die verwendeten Tiere wurden mit Nahrung sowie Wasser ad libitum versorgt und mittels zervikaler Dislokation im Alter von 6 Monaten getötet. Anschließend wurden die Unterkiefer herauspräpariert.

2.1.3 Fixierung und Einbettung

Nachdem die Präparate soweit vorbereitet waren, wurden sie über Nacht in gepuffertem Formalin fixiert.

Formolfixierung nach Lillie (gepuffertes Formalin) (Lillie 1954)

1 Teil Formaldehyd 37% (Merck) wurden mit 9 Teilen 0,1 M Sörensen- Puffer gemischt.

Anschließend wurden die Präparate unter ständiger Kontrolle (Nadelprobe) über mehrere Tage mittels EDTA entkalkt. Hierfür wurden 895 ml Aqua dest. mit 105 ml 5N NaOH und 200g EDTA (AppliChem, Darmstadt Deutschland) versetzt, bei 50°-70°C gelöst und anschließend der pH-Wert (7,5) überprüft.

Danach erfolgte über Nacht eine Behandlung mit 70 % Ethanol, bevor die Präparate dem Einbettautomaten (Duplex Processer, Shandon Southern Products LTD, Runcorn, Cheshire) zugeführt wurden.

Abfolge im Einbettautomaten

- Pos.1 70% Ethanol 3h
- Pos.2 80% Ethanol 1h
- Pos.3 90% Ethanol 1h
- Pos.4 96% Ethanol 1h
- Pos.5 100% Ethanol 2h
- Pos.6 Isopropylalkohol 2h
- Pos.7 Isopropylalkohol 1,5h
- Pos.8 Xylol 30 min
- Pos.9 Xylol 45 min
- Pos.10 Xylol 45 min
- Pos.11 Paraplast (52°C) 6h (Wechsel nach 30 min)
- Pos.12 Paraplast (56°C) 4 1/2h

Anschließend wurden die Präparate in entsprechenden Förmchen positioniert, mit Paraffin ausgegossen und anschließend ausgehärtet.

2.1.4 Anfertigung der Gewebsschnitte

Mit Hilfe eines Microtoms (Fa. Jung Biocut 2035) wurden 6 µm dicke Paraffinschnitte hergestellt und anschließend auf Superfrost® - Objektträger (Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) aufgebracht. Um die Präparate maximal zu strecken, wurden sie anschließend auf einer Heizplatte bei 37°C gelagert und letztendlich zum Trocknen für 24 Stunden in einen Wärmeschrank gestellt.

2.1.5.1 Entparaffinierung und Rehydrierung

Zur Vorbereitung der immunohistochemischen Untersuchung wurden die Präparate nach folgenden Schritten entparaffiniert und rehydriert:

- Xylol 5 min
- Xylol 5 min
- 100% Alkohol 3 min
- 90% Alkohol 3 min
- 70% Alkohol 3 min
- 50% Alkohol 3 min
- Aqua dest. 1 min

2.1.5.2 Beschaffenheit und Herkunft der verwendeten Antikörper

Tabelle 1: Beschaffenheit und Herkunft der Antikörper

Antikörper	Spezies	Klonalität	Wirtstier	Herkunft
Laminin α1	human, mouse	monoklonal	rat	Prof. Miosge
Laminin α2	mouse	polyklonal	rabbit	Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, Dr Timpl
Laminin α4	mouse	polyklonal	rabbit	Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, Dr Timpl
Laminin α5	mouse	monoklonal	rabbit	Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, Dr Timpl
Laminin β1	mouse	polyklonal	rabbit	Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, Dr Timpl
Laminin γ2	mouse	polyklonal	rabbit	Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, Dr Timpl
Laminin γ3	mouse	polyklonal	rabbit	Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, Dr Timpl
Laminin-332	mouse	polyklonal	rabbit	Massachusetts General Hospital, Charlestown, Dr Burgeson
Kollagen IV	human, mouse	polyklonal	rabbit	Chemicon International
Perlecan	mouse, bovine, pig, human	polyklonal	mouse	Chemicon International
Nidogen-1	mouse	polyklonal	rabbit	Nikolaus-Fiebiger Zentrum, Erlangen, Dr Takako Sasaki
Nidogen-2	human, mouse	polyklonal	rabbit	Nikolaus-Fiebiger Zentrum, Erlangen, Dr Takako Sasaki
Aggrecan	human, mouse	polyklonal	mouse	Santa Cruz
COMP	human, rat, bovine	polyklonal	rabbit, chicken	Heinegard, Paulsson
Decorin	mouse	polyklonal	rabbit	Prof. Bruckner, Westf. Wilhelms-Universität Münster, Physiologische Chemie

Kollagen I	mouse	polyklonal	rabbit	Chemicon International
Kollagen II	human, mouse, rat	monoklonal	mouse	Dept. of Medical & Physiological Chemistry, University of Uppsala, R. Holmdahl

Wie aus der vorangestellten Tabelle ersichtlich, handelt es sich bei den Antikörpern Laminin $\alpha 2$, Laminin $\alpha 4$, Laminin $\alpha 5$, Laminin $\beta 1$, Laminin $\gamma 2$, Laminin $\gamma 3$ und Decorin um freundliche Gaben des Max-Planck-Instituts für Biochemie.

Die Antikörper Nidogen-1 und Nidogen-2 wurden freundlicherweise von Frau Dr. Takako Sasaki, die zur Zeit im Department of Biochemistry and Molecular Biology an der Oregon Health & Science University in Portland, USA, als Wissenschaftlerin tätig ist, überlassen.

Der Antikörper COMP wurde uns von den Wissenschaftlern Dick Heinegård und Magnus Paulsson von dem Department of Medical and Physiological Chemistry an der Universität in Lund (Schweden) zur Verfügung gestellt.

Weiterhin wurden der Antikörper Laminin-332 von dem General Hospital in Charlestown, sowie der Antikörper Kollagen II von dem Department of Medical and Physiological Chemistry an der Universität in Uppsala überlassen. Die Antikörper Kollagen I, Kollagen IV und Perlecan wurden käuflich bei der Firma Chemicon International und der Antikörper Aggrecan bei der Firma Antibodies Online in Aachen erworben.

Bei dem Antikörper Laminin $\alpha 1$ handelte es sich um einen Antikörper unserer Forschungsgruppe.

2.1.5.3 PAP-Protokolle der einzelnen Antikörper

PAP-Protokoll Laminin $\alpha 1$

- 1) 10 min mit PBS spülen
- 2) 45 min: Blocken der körpereigenen Peroxidasen unter Lichtausschluss (70ml Methanol + 700 μ l H₂O₂)
- 3) 10 min mit PBS spülen
- 4) 20 min mit Protaq II bei 60°C behandeln
- 5) 10 min mit PBS spülen (feuchte Kammer vorbereiten)
- 6) 5 min Chondroitinase, 100 μ l/Schnitt (in feuchter Kammer)
- 7) 5 min mit PBS spülen
- 8) 5 min Hyaluronidase, 100 μ l/Schnitt
- 9) 5 min mit PBS spülen
- 10) 5 min Protease 24, 100 μ l/Schnitt
- 11) 5 min mit PBS spülen
- 12) 10 min PBS/BSA, 100 μ l/Schnitt
- 13) Primärer AK, Rat-A-Laminin $\alpha 1$ in PBS, Verdünnung 1:100, über Nacht Reaktion bei Raumtemperatur
- 14) 10 min mit PBS spülen
- 15) Bridge Ak-Anti-Rat/HRP in PBS/BSA, 50 μ l/Schnitt, Verdünnung 1:50, 1h bei Raumtemperatur
- 16) 5 min mit PBS spülen
- 17) Behandlung mit Diaminobenzidin (DAB)-Lösung, (Dauer unter Sicht)-Lichtausschluss

PAP-Reaktion Laminin $\alpha 2$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\beta 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$ und Laminin-332

- 1) 10 min mit PBS spülen
- 2) 45 min: Blocken der körpereigenen Peroxidasen unter Lichtausschluss (70ml Methanol + 700 μ l H₂O₂)
- 3) 10 min mit PBS spülen

- 4) 20 min mit Protaq II bei 60°C behandeln
- 5) 10 min mit PBS spülen (feuchte Kammer vorbereiten)
- 6) 5 min Chondroitinase, 100 μ l/Schnitt
- 7) 5 min mit PBS spülen
- 8) 5 min Hyaluronidase, 100 μ l/Schnitt
- 9) 5 min mit PBS spülen
- 10) 5 min Protease 24, 100 μ l/Schnitt
- 11) 5 min mit PBS spülen
- 12) 10 min PBS/BSA, 100 μ l/Schnitt
- 13) Primärer Antikörper, Verdünnung 1:100, Übernachtreaktion bei Raumtemperatur
- 14) 10 min mit PBS spülen
- 15) Bridge Antikörper: Anti-Rabbit, Verdünnung 1:50 in PBS/BSA, 50 μ l/Schnitt, 30 min bei Raumtemperatur
- 16) 5 min mit PBS spülen
- 17) PAP-Komplex- Rabbit, Verdünnung 1:150 in PBS/BSA, 50 μ l/Schnitt, 30 min bei Raumtemperatur
- 18) 10 min mit PBS spülen
- 19) Behandlung mit DAB-Lösung, (Dauer unter Sicht)-Lichtausschluss

PAP-Reaktion Kollagen IV

- 1) 10 min mit PBS spülen
- 2) 45 min: Blocken der körpereigenen Peroxidasen unter Lichtausschluss
(70ml Methanol + 700µl H₂O₂) 45' 70ml Methanol + 700µl H₂O₂
- 3) 10 min mit PBS spülen
- 4) 20 min mit Protaq II bei 60°C behandeln
- 5) 10 min mit PBS spülen (feuchte Kammer vorbereiten)
- 6) 5 min Hyaluronidase, 100µl/Schnitt
- 7) 5 min mit PBS spülen
- 8) 5 min Protease 24, 100µl/Schnitt
- 9) 5 min mit PBS spülen
- 10) 10 min PBS/BSA, 100µl/Schnitt
- 11) Primärer Antikörper, Verdünnung 1:100, Übernachtreaktion bei Raumtemperatur
- 12) 10 min mit PBS spülen
- 13) Bridge Antikörper: Anti-Rabbit, Verdünnung 1:50 in PBS/BSA, 50 µl/Schnitt, 30 min bei Raumtemperatur
- 14) 10 min mit PBS spülen
- 15) PAP-Rabbit in PBS/BSA, Verdünnung 1:150, 30 min bei Raumtemperatur
- 16) 10' PBS
- 17) Behandlung mit DAB-Lösung, (Dauer unter Sicht)-Lichtausschluss

PAP-Protokoll Perlecan

- 1) 10 min mit PBS spülen
- 2) 45 min: Blocken der körpereigenen Peroxidasen unter Lichtausschluss (70ml Methanol + 700µl H₂O₂)
- 3) 10 min mit PBS spülen
- 4) 20 min mit Protaq II bei 60°C behandeln
- 5) 10 min mit PBS spülen (feuchte Kammer vorbereiten)
- 6) 5 min Hyaluronidase- 100µl/Schnitt
- 7) 5 min mit PBS spülen
- 8) 5 min Protease 24, 100µl/Schnitt
- 9) 5 min mit PBS spülen
- 10) 10 min PBS/BSA, 100µl/Schnitt
- 11) Primärer Antikörper, Verdünnung 1:100, über Nacht Reaktion bei Raumtemperatur
- 12) 10 min mit PBS spülen
- 13) A-Rat/HRP in PBS/BSA, Verdünnung 1:100, 1h bei Raumtemperatur
- 14) 10 min mit PBS spülen
- 15) Behandlung mit DAB-Lösung, (Dauer unter Sicht)-Lichtausschluss

PAP-Protokoll Nidogen I, II

- 1) 10 min mit PBS spülen
- 2) 45 min: Blocken der körpereigenen Peroxidasen unter Lichtausschluss (70ml Methanol + 700µl H₂O₂)
- 3) 10 min mit PBS spülen
- 4) 20 min mit Protaq II bei 60°C behandeln
- 5) 10 min mit PBS spülen (feuchte Kammer vorbereiten)
- 6) 5 min Hyaluronidase, 100µl/Schnitt
- 7) 5 min mit PBS spülen
- 8) 5 min Protease 24, 100µl/Schnitt
- 9) 5 min mit PBS spülen
- 10) 10 min PBS/BSA, 100µl/Schnitt
- 11) Primärer Antikörper, Verdünnung 1:100, über 1h -Reaktion bei Raumtemperatur
- 12) 10 min mit PBS spülen
- 13) Bridge Antikörper: Anti-Rabbit, Verdünnung 1:50 in PBS/BSA, 50 µl/Schnitt, 30 min bei Raumtemperatur
- 14) 10 min mit PBS spülen
- 15) PAP-Rabbit in PBS/BSA, Verdünnung 1:150, 30 min bei Raumtemperatur
- 16) 5 min mit PBS spülen
- 17) Behandlung mit DAB-Lösung, (Dauer unter Sicht)-Lichtausschluss

PAP-Reaktion Aggrecan

- 1) 10 min mit PBS spülen
- 2) 45 min: Blocken der körpereigenen Peroxidasen unter Lichtausschluss (70ml Methanol + 700µl H₂O₂)
- 3) 10 min mit PBS spülen
- 4) 20 min mit Protaq II bei 60°C behandeln
- 5) 10 min mit PBS spülen (feuchte Kammer vorbereiten)
- 6) 5 min Chondroitinase, 100µl/Schnitt (in feuchter Kammer)
- 7) 5 min mit PBS spülen
- 8) 5 min Hyaluronidase, 100µl/Schnitt
- 9) 5 min mit PBS spülen
- 10) 5 min Protease 24, 100µl/Schnitt
- 11) 5 min mit PBS spülen
- 12) 10 min PBS/BSA, 100µl/Schnitt
- 13) Primärer AK, Rat-A-Laminin α1 in PBS, Verdünnung 1:100, über Nacht
Reaktion bei Raumtemperatur
- 14) 10 min mit PBS spülen
- 15) Bridge Ak-Anti-Mouse in PBS/BSA, 50 µl/Schnitt, Verdünnung 1:50, 30 min bei Raumtemperatur
- 16) 10 min mit PBS spülen
- 17) PAP-Komplex: PAP Mouse in PBS/BSA, 50 µl/Schnitt, Verdünnung 1:150, 30 min bei Raumtemperatur
- 18) 5 min mit PBS spülen
- 19) Behandlung mit DAB-Lösung, (Dauer unter Sicht)-Lichtausschluss

PAP-Reaktion COMP

- 1) 10 min mit PBS spülen
- 2) 45 min: Blocken der körpereigenen Peroxidasen unter Lichtausschluss (70ml Methanol + 700µl H₂O₂)
- 3) 10 min mit PBS spülen
- 4) 20 min mit Protaq II bei 60°C behandeln
- 5) 10 min mit PBS spülen (feuchte Kammer vorbereiten)
- 6) 5 min Chondroitinase, 100µl/Schnitt (in feuchter Kammer)
- 7) 5 min mit PBS spülen
- 8) 5 min Hyaluronidase, 100µl/Schnitt
- 9) 5 min mit PBS spülen
- 10) 5 min Protease 24, 100µl/Schnitt
- 11) 5 min mit PBS spülen
- 12) 10 min PBS/BSA, 100µl/Schnitt
- 13) Primärer Antikörper, Verdünnung 1:100, 1h Reaktion bei Raumtemperatur
- 14) 10 min mit PBS spülen
- 15) Bridge Ak-Anti-Mouse in PBS/BSA, 50 µl/Schnitt, Verdünnung 1:50, 30 min bei Raumtemperatur
- 16) 10 min mit PBS spülen
- 17) PAP-Rabbit in PBS/BSA, Verdünnung 1:150, 30 min bei Raumtemperatur
- 18) 5 min mit PBS spülen
- 19) Behandlung mit DAB-Lösung, (Dauer unter Sicht)-Lichtausschluss

PAP-Reaktion Decorin

- 1) 10 min mit PBS spülen
- 2) 45 min: Blocken der körpereigenen Peroxidasen unter Lichtausschluss (70ml Methanol + 700µl H₂O₂)
- 3) 10 min mit PBS spülen
- 4) 20 min mit Protaq II bei 60°C behandeln
- 5) 10 min mit PBS spülen (feuchte Kammer vorbereiten)
- 6) 5 min Chondroitinase, 100µl/Schnitt (in feuchter Kammer)
- 7) 5 min mit PBS spülen
- 8) 5 min Hyaluronidase, 100µl/Schnitt
- 9) 5 min mit PBS spülen
- 10) 5 min Protease 24, 100µl/Schnitt
- 11) 5 min mit PBS spülen
- 12) 10 min PBS/BSA, 100µl/Schnitt
- 13) Primärer Antikörper, Verdünnung 1:50, Übernachtreaktion bei Raumtemperatur
- 14) 10 min mit PBS spülen
- 15) Bridge Antikörper: Anti-Rabbit, Verdünnung 1:50 in PBS/BSA, 50 µl/Schnitt, 30 min bei Raumtemperatur
- 16) 10 min mit PBS spülen
- 17) PAP-Komplex-Rabbit in PBS/BSA, Verdünnung 1:150, 30 min bei Raumtemperatur
- 18) 5 min mit PBS spülen
- 19) Behandlung mit DAB-Lösung, (unter Sicht)-Lichtausschluss

PAP-Reaktion Kollagen I

- 1) 10 min mit PBS spülen
- 2) 45 min: Blocken der körpereigenen Peroxidasen unter Lichtausschluss (70ml Methanol + 700µl H₂O₂)
- 3) 10 min mit PBS spülen
- 4) 20 min mit Protaq II bei 60°C behandeln
- 5) 10 min mit PBS spülen (feuchte Kammer vorbereiten)
- 6) 5 min Chondroitinase, 100µl/Schnitt (in feuchter Kammer)
- 7) 5 min mit PBS spülen
- 8) 5 min Hyaluronidase, 100µl/Schnitt
- 9) 5 min mit PBS spülen
- 10) 5 min Protease 24, 100µl/Schnitt
- 11) 5 min mit PBS spülen
- 12) 10 min PBS/BSA, 100µl/Schnitt
- 13) Primärer Antikörper, Verdünnung 1:100, Übernachtreaktion bei Raumtemperatur
- 14) 10 min mit PBS spülen
- 15) Bridge Antikörper: Anti-Rabbit, Verdünnung 1:50 in PBS/BSA, 50 µl/Schnitt, 30 min bei Raumtemperatur
- 16) 10 min mit PBS spülen
- 17) PAP-Komplex-Rabbit in PBS/BSA, Verdünnung 1:150, 30 min bei Raumtemperatur
- 18) 5 min mit PBS spülen
- 19) Behandlung mit DAB-Lösung, (Dauer unter Sicht)-Lichtausschluss

PAP-Protokoll Kollagen II

- 1) 10 min mit PBS spülen
- 2) 45 min: Blocken der körpereigenen Peroxidasen unter Lichtausschluss (70ml Methanol + 700µl H₂O₂)
- 3) 10 min mit PBS spülen
- 4) 20 min mit Protaq II bei 60°C behandeln
- 5) 10 min mit PBS spülen (feuchte Kammer vorbereiten)
- 6) 5 min Chondroitinase, 100µl/Schnitt (in feuchter Kammer)
- 7) 5 min mit PBS spülen
- 8) 5 min Hyaluronidase, 100µl/Schnitt
- 9) 5 min mit PBS spülen
- 10) 5 min Protease 24, 100µl/Schnitt
- 11) 5 min mit PBS spülen
- 12) 10 min PBS/BSA, 100µl/Schnitt
- 13) Primärer Antikörper, Verdünnung 1:100, Übernachtreaktion bei Raumtemperatur
- 14) 10 min mit PBS spülen
- 15) Bridge Ak-Anti-Mouse in PBS/BSA, 50 µl/Schnitt, Verdünnung 1:50, 30 min bei Raumtemperatur
- 16) 10 min mit PBS spülen
- 17) PAP-Komplex: PAP Mouse in PBS/BSA, 50 µl/Schnitt 1:150, 30 min bei Raumtemperatur
- 18) 5 min mit PBS spülen
- 19) Behandlung mit DAB-Lösung, (Dauer unter Sicht)-Lichtausschluss

2.1.5.4 Gegenfärben und Rehydrieren

Nach der Behandlung mit DAB-Lösung werden die Schnitte erneut 5 min mit PBS gespült, anschließend mit Hämalaun-Lösung nach Mayer kurz gegengefärbt, unter fließendem Wasser gespült und schließlich wie folgt dehydriert:

- Aqua dest. 1 min
- 50% Alkohol 3 min
- 70% Alkohol 3 min
- 90% Alkohol 3 min
- 100% Alkohol 3 min
- Xylol 5 min
- Xylol 5 min.

Zum Abschluss werden die Schnitte mit Eukitt® (Fa.Fluka, Basel, Schweiz), einem Schnelleinschlussmittel, und einem Deckglas eingedeckt.

2.1.6 Kontrollen

Um die Spezifität der Reaktionen zu belegen, wurden parallel zu jedem der Versuche Kontrollen durchgeführt. Diese wurden wie unter 2.1.5.2 aufgeführt behandelt, mit dem Unterschied, dass die Reaktionen ohne Primärantikörper durchgeführt wurden. Keine der Kontrollen wies eine Färbung auf.

2.1.7 Verwendete Reagenzien

- PBS: 5 Tabletten (Sigma-Aldrich) werden in 1 Liter destilliertem Wasser gelöst
- BSA: Sigma-Aldrich

-
- PBS/BSA: 5 ml 10xPBS werden mit Aqua dest. auf 50 ml aufgefüllt und mit 0,5 g BSA versetzt.
 - ProTaq_s II- Antigenverstärker: Immunodiagnostika und Biotechnologie GmbH
 - Chondroitinase ABC-Lösung: In 100 ml Aqua dest. werden 0,61 g Tris $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$ (50 mM, pH 8.0), 0,492 g Natriumacetat $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ (60 mM) und 0,02 g BSA (0,02%) gelöst. Schließlich wird eine Unit (0,36 mg) Chondroitinase in 1 ml dieses Ansatzes gelöst.
 - Hyaluronidase-Lösung: Zunächst bedarf es der Herstellung der so genannten Sörensen-Pufferlösung, welche aus einer Lösung A und einer Lösung B besteht.
Die Lösung A wird durch Lösen von 40,872 g Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) in 1 Liter Aqua dest. hergestellt.
Durch lösen von 42,588 g di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) in 1 Liter Aqua dest. entsteht Lösung B.
Jetzt werden 6,66 ml einer 0,3 M Sörensen-Pufferlösung (A+B) mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt und mit 0,45 g NaCl, 0,01 g BSA und 100 mg Hyaluronidase versetzt.
 - Protease XXIV-Lösung: Hierfür werden 25 mg Protease XXIV mit 25 mg CaCl_2 , 45 ml destilliertem Wasser und 5 ml 0,05 M Tris HCL Puffer (pH 7,6) vermischt.
 - DAB: Hierfür werden 1 ml H_2O mit einer Tablette DAB und einer Tablette H_2O_2 (beides SIGMA BIOSCIENCE) versetzt.

3. Ergebnisse

Im Rahmen der für diese Arbeit notwendigen Untersuchungen wurden die Schnittpräparate von verschiedenen Versuchstieren immunhistochemisch mit Hilfe der PAP-Methode behandelt und hinsichtlich der verschiedenen Antikörperreaktionen lichtmikroskopisch untersucht. Die so gewonnenen Ergebnisse sollen im Folgenden dargestellt werden.

3.1 Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen

3.1.1 Die differentielle Expression der einzelnen Antikörper im Bereich der Malassez'schen Epithelzellen

Zur Erstellung dieser Tabelle wurde das Vorkommen von Malassez'schen Epithelzellen im Parodontium der einzelnen Zahnwurzelabschnitte und die jeweiligen spezifischen Reaktionen erfasst.

	zervikale Region	mittlerer Wurzelbereich	apikales Drittel	interradikulär
Laminin α 1	-	-	-	-
Laminin α 2	-	-	-	+
Laminin α 4	-	-	-	-
Laminin α 5	-	-	-	-
Laminin β 1	+	-	-	-
Laminin γ 2	+	-	-	+
Laminin γ 3	+	-	-	+
Laminin-332	-	+	+	+
Kollagen IV	+	-	-	+
Perlecan	+	-	-	-
Nidogen-1	+	-	-	+
Nidogen-2	-	-	-	-
Aggrecan	-	-	-	-
COMP	+	-	-	+
Decorin	-	-	-	-
Kollagen I	-	-	-	-
Kollagen II	-	-	-	-

Tabelle 2: Die differentielle Expression der einzelnen Antikörper im Bereich der Malassez'schen Epithelzellen

Aus der Gruppe der Laminine ließ sich Laminin $\alpha 2$ in der interradiikulären Region und Laminin $\beta 1$ in den ERM im zervikalen Bereich des Parodontiums nachweisen.

Laminin $\gamma 2$ sowie Laminin $\gamma 3$ zeigten sich im zervikalen und im interradiikulären Bereich Laminin-332 konnte immunhistochemisch im mittleren Wurzelbereich, im apikalen Drittel und interradiikulär dargestellt werden (siehe Abbildung 8).

Laminin $\alpha 1$, Laminin $\alpha 4$ und Laminin $\alpha 5$ erbrachten keine spezifischen Reaktionen.

Kollagen IV ließ sich ebenfalls in den im zervikalen und interradiikulären Parodontium gelegenen ERM nachweisen (siehe Abbildung 7).

Das Vorkommen des Proteoglykans Perlecan konnte im zervikalen Bereich gezeigt werden. Im Gegensatz zu Nidogen-1, welches in keinerlei spezifischer Reaktion dargestellt werden konnte, wurde Nidogen-2 sowohl in zervikal gelegenen ERM als auch in interradiikulär gelegenen ERM angefärbt.

Der Antikörper Aggrecan ließ sich in den untersuchten Bereichen nicht nachweisen, das Knorpeloligomermatrixprotein COMP hingegen wurde in den zervikalen und interradiikulären Epithelanhäufungen vorgefunden (siehe Abbildung 6).

Decorin erzielte in keinem der untersuchten Areale eine Anfärbung. Kollagen I konnte ebenso wie Kollagen II nicht nachgewiesen werden.

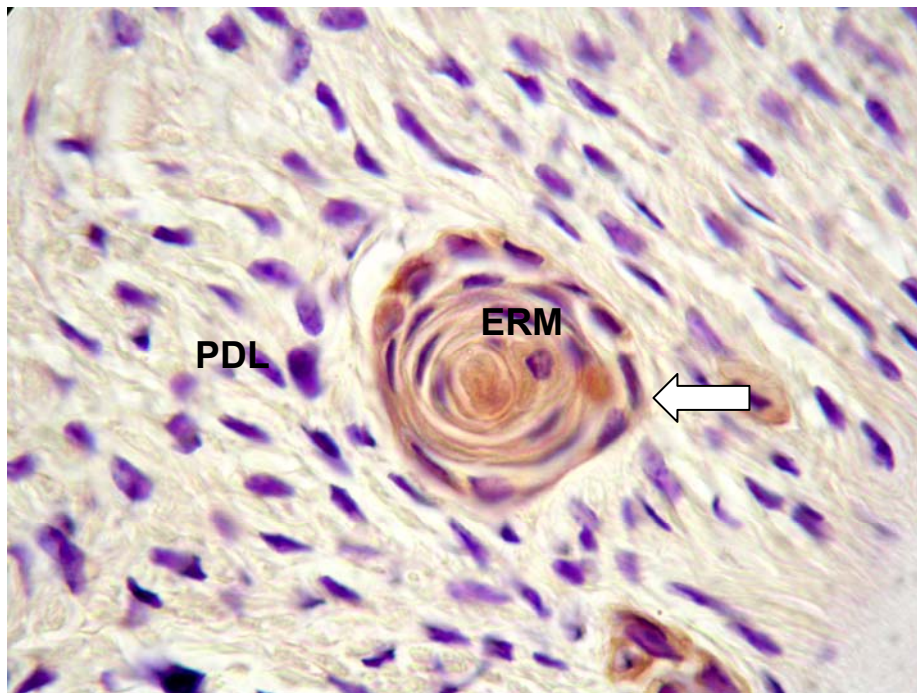


Abbildung 6a: Spezifische COMP-Reaktion im Parodontium einer 6 Monate alten Maus; Vergrößerung: 100fach; PDL= Parodontalligament, ERM= Malassez'sche Epithelzellen.

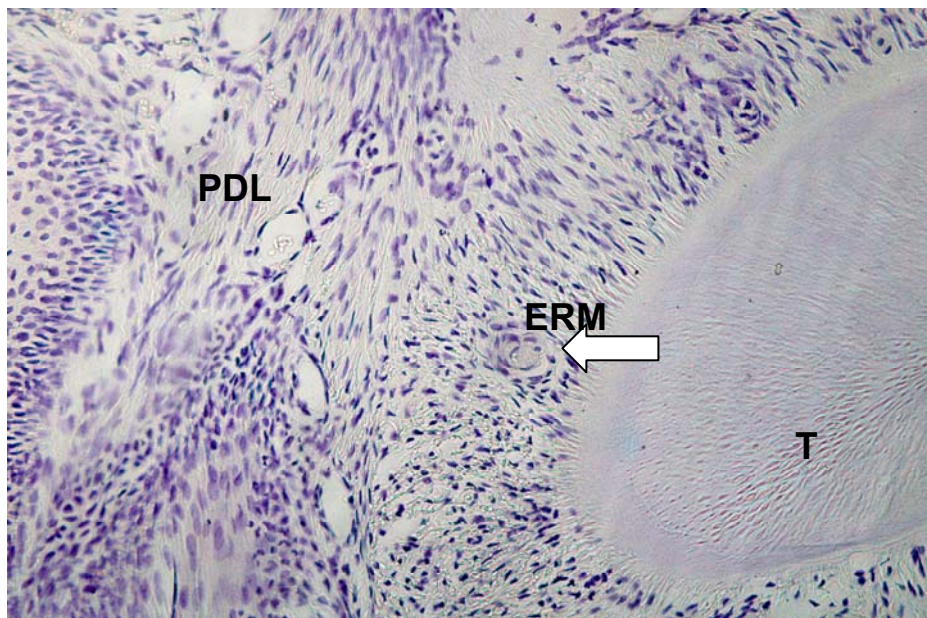


Abbildung 6b: Negativkontrolle der COMP-Reaktion im Parodontium einer 6 Monate alten Maus; Vergrößerung: 40fach; PDL= Parodontalligament, ERM= Malassez'sche Epithelzellen.

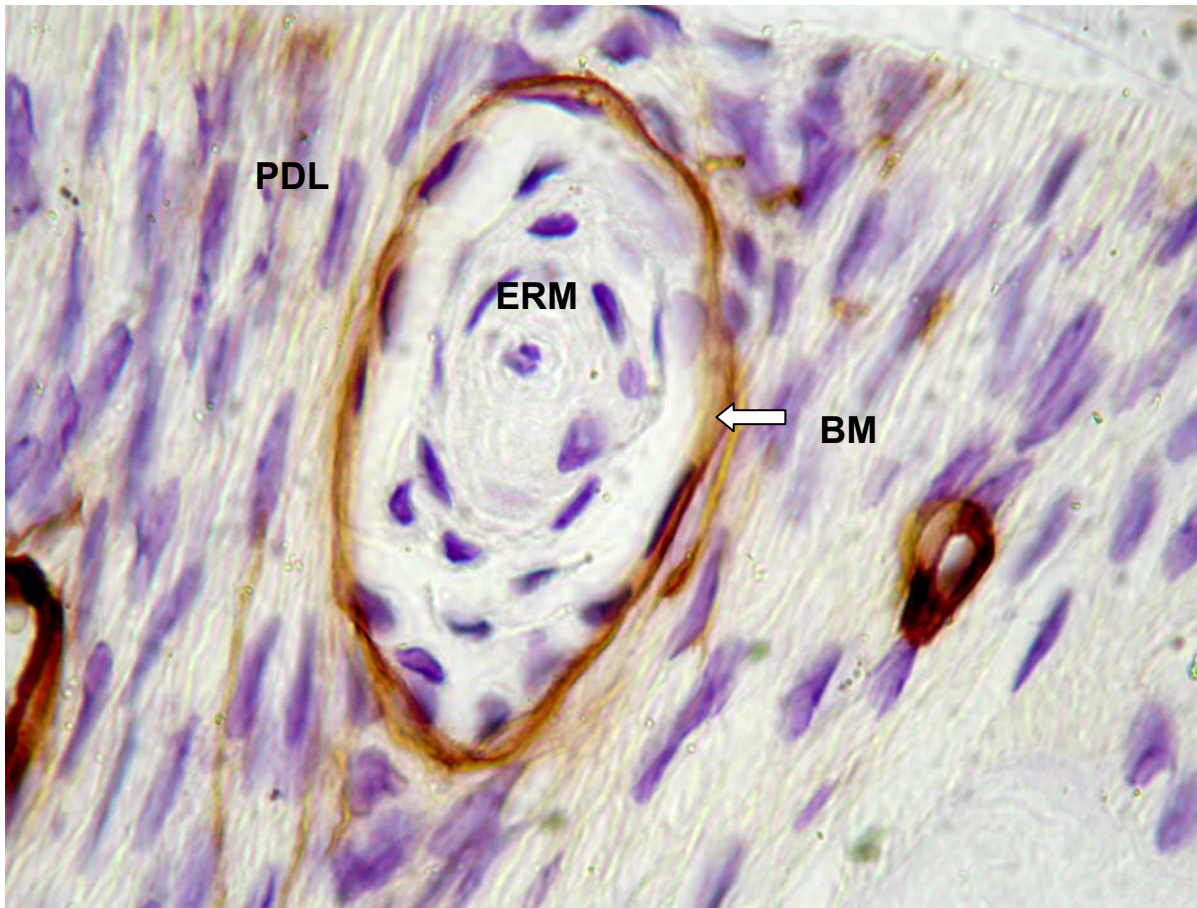


Abbildung 7: Spezifische Kollagen IV-Reaktion im Parodontium einer 6 Monate alten Maus; Vergrößerung: 100fach; PDL= Parodontalligament, ERM= Malassez'sche Epithelzellen, BM= Basalmembran (weißer Pfeil).

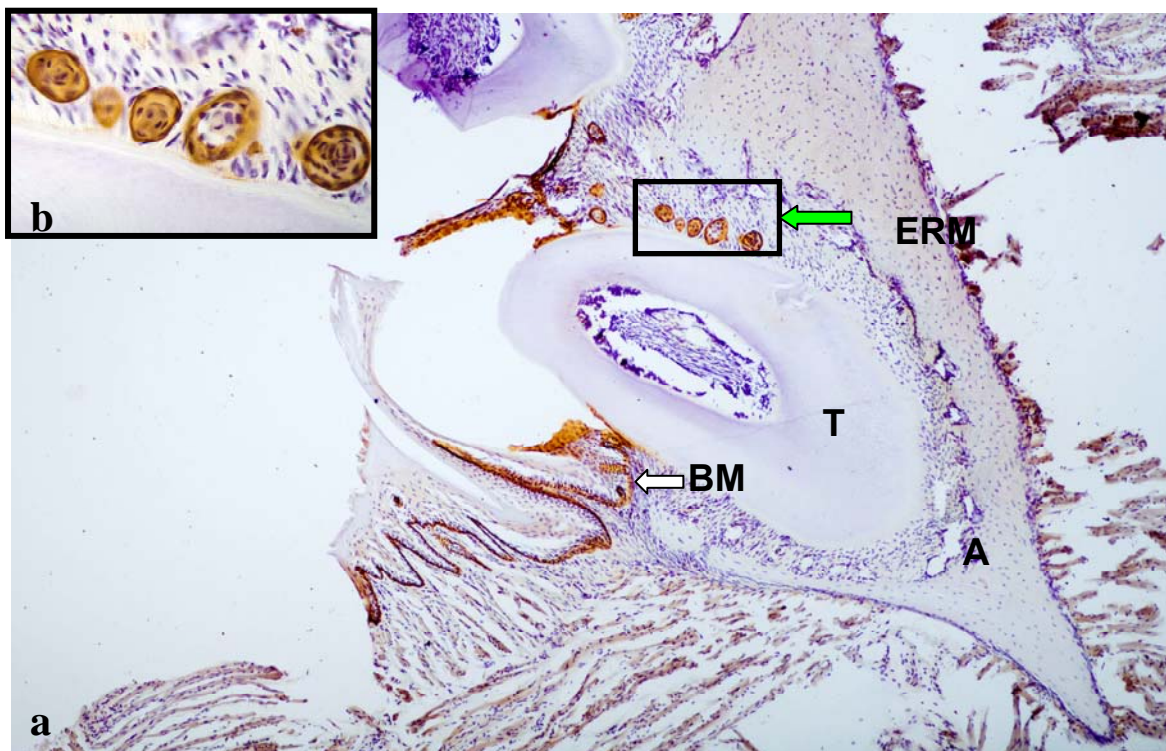


Abbildung 8: Spezifische Laminin-332-Reaktion; **a:** Übersichtsaufnahme eines murinen Molaren samt Zahnhalteapparat mit spezifischer Reaktion im Bereich der Basalmembran der Mundschleimhaut sowie im Bereich der Malassez'schen Epithelzellen; Vergrößerung: 10fach; **b:** Vergrößerungsausschnitt der Malassez'schen Epithelzellen; Vergrößerung: 40fach
 A= Alveolarknochen, BM= Basalmembran der Mundschleimhaut (weißer Pfeil), ERM= Malassez'sche Epithelzellen, T= Tooth; Der schwarz umrandete Bereich markiert den Ausschnitt für Abbildung 8b.

3.1.2 Die differentielle Expression der einzelnen Antikörper im Bereich der Incisivi

Zur Erstellung dieser Tabelle wurden die spezifischen Reaktionen der verschiedenen Antikörper im Bereich der einzelnen Bestandteile der Incisivi erfasst.

Bei den im Detail untersuchten Strukturen handelte es sich um das Pulpengewebe, die Odontoblasten, das Prädentin, das Dentin, die Ameloblasten, das Zement sowie den Blutgefäßen im angrenzenden Parodontium.

	Pulpa	Odontoblasten	Prädentin	Dentin	Ameloblasten	Zement	Blutgefäße
Laminin α 1	-	-	-	-	-	-	+
Laminin α 2	-	-	-	-	+	-	-
Laminin α 4	-	-	+	-	+	-	-
Laminin α 5	-	-	+	-	+	-	-
Laminin β 1	+	-	+	-	-	-	+
Laminin γ 2	+	+	-	-	+	-	-
Laminin γ 3	-	-	-	-	+	-	+
Laminin-332	-	-	-	-	+	-	-
Kollagen IV	+	-	-	-	-	-	+
Perlecan	+	-	+	-	+	-	+
Nidogen-1	+	-	+	-	+	-	+
Nidogen-2	+	-	-	-	-	-	+
Aggrecan	+	-	+	-	+	-	-
COMP	+	-	+	-	+	-	-
Decorin	-	-	-	-	+	-	-
Kollagen I	-	-	+	-	+	+	-
Kollagen II	+	-	+	-	-	-	-

Tabelle 3: Die differentielle Expression der einzelnen Antikörper im Bereich der Incisivi

Laminin α 1 konnte in den Blutgefäßen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 9). Laminin α 2 ließ sich lediglich im Bereich der Ameloblasten nachweisen, Laminin α 4 und Laminin α 5 in der Zone des Prädentins, sowie in der Zone der Ameloblasten. Laminin β 1 konnte in der Pulpa, in der Zone des Prädentins und in der Basalmembran der Blutgefäße dargestellt werden (siehe Abbildung 10). Eine spezifische Reaktion in den Abschnitten der Ameloblasten und der Blutgefäße wurde mittels Laminin γ 3 erzielt. Laminin-332 konnte durch eine Reaktion im Bereich der

Ameloblasten dargestellt werden, wohingegen Kollagen IV in der Pulpa sowie den Blutgefäßen nachgewiesen werden konnte.

Die Untersuchung auf Perlecan und Nidogen I erzielten sowohl eine Anfärbung in der Pulpa, dem Prädentin, den Ameloblasten, als auch in den Blutgefäßen (Abbildung 11 + 12), wohingegen Nidogen II lediglich in der Pulpa und den Blutgefäßen nachgewiesen werden konnte.

Aggrecan und COMP konnten mittels spezifischer Reaktionen in den Abschnitten der Pulpa, des Prädentins und der Ameloblasten nachgewiesen werden.

Decorin ließ ausschließlich einen Nachweis im Bereich der Ameloblasten zu, wohingegen Kollagen I sehr deutlich in der Zone des Prädentins, der Ameloblasten und des Zements nachgewiesen werden konnte (siehe Abbildung 12).

Kollagen II ließ sich in der Pulpa und der Zone des Prädentins nachweisen.

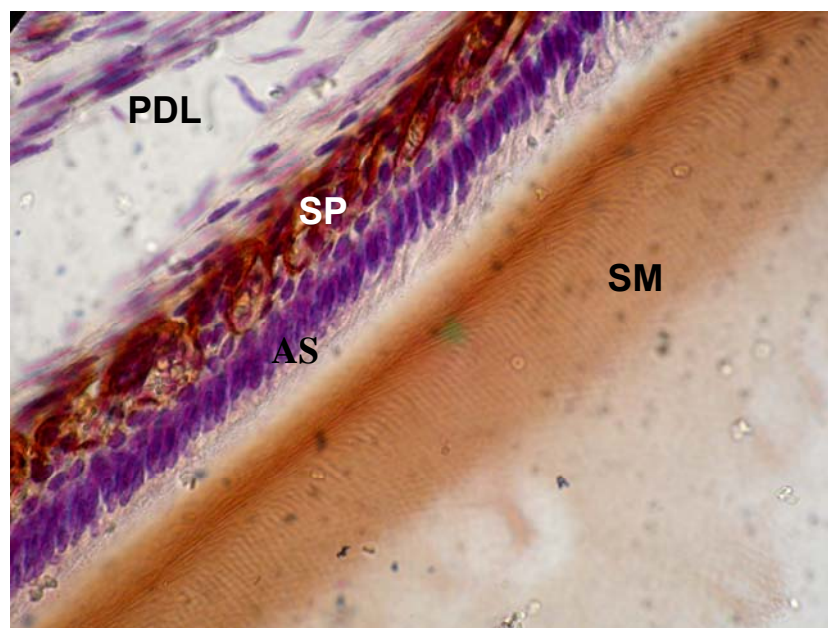


Abbildung 9: Spezifische Reaktion von Laminin $\alpha 1$; Detailaufnahme eines Incisivus labialseitig; Vergrößerung: 60fach ; PDL= Parodontalligament, SP= Schmelzpulpa/ Stratum intermedium, AS= Ameloblastensaum/ inneres Schmelzepithel, SM= Schmelzmatrix.

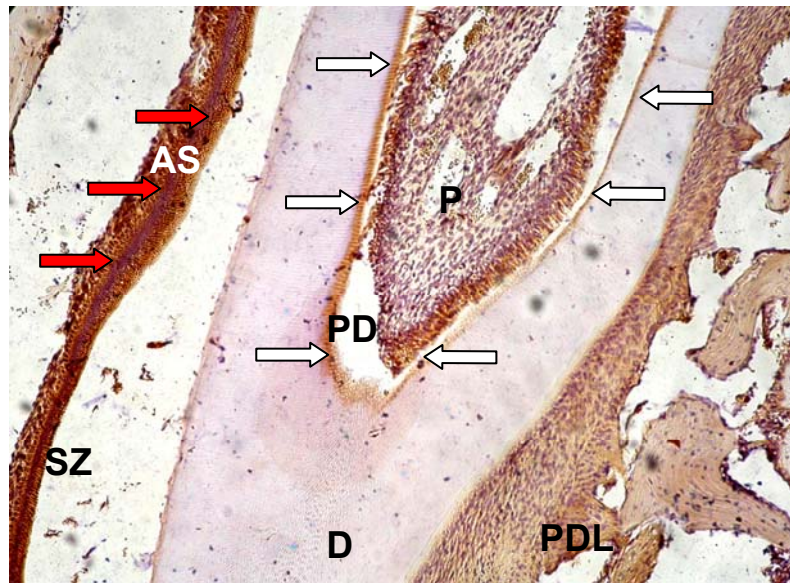


Abbildung 10: Spezifische Reaktion der Laminin β 1-Kette; Detailaufnahme Incisivus mit Zahnhalteapparat, Vergrößerung: 10fach; AS= Ameloblastensaum mit angrenzender Schmelzpulpa (rote Pfeile), SZ= Schmelzzone (herausgelöst), D= Dentin, PD= Prädentin (weiße Pfeile), P= Pulpa, PDL= Parodontalligament.



Abbildung 11: Spezifische Reaktion Nidogen I; Vergrößerung: 40fach; Ausschnittsaufnahme eines murinen Incisivus labialwärts mit Zahnhalteapparatanteilen; P= Pulpa, PD= Prädentin, D= Dentin, SM= Schmelzmatrix, die trotz entkalktem Material noch vorhanden ist, rote Pfeile= Ameloblastenschicht, weiße Pfeile= Blutgefäße, PDL= Parodontalligament.

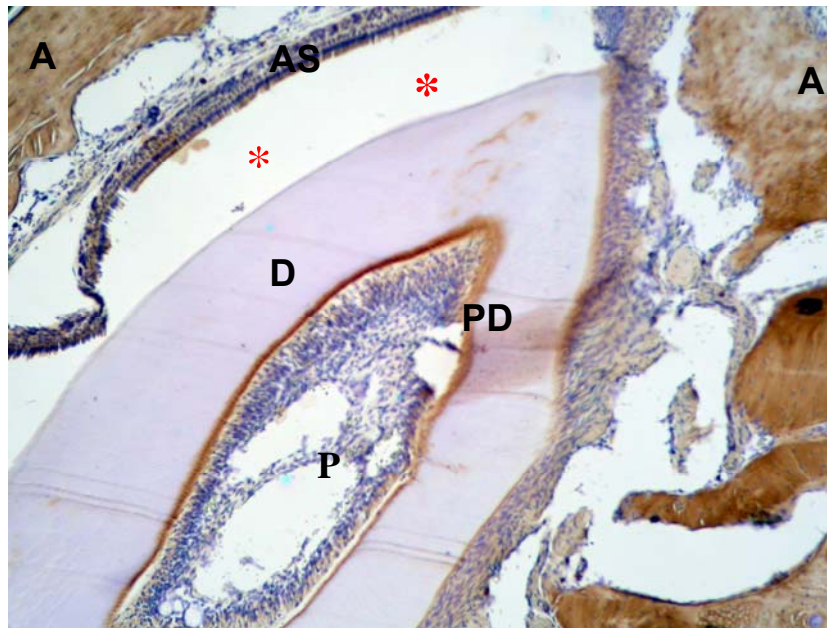


Abbildung 12: Spezifischer Nachweis von Kollagen I im Schnitt eines Incisivus mit Zahnhalteapparat; Vergrößerung 10fach; A= Alveolarknochen, AS= Ameloblastenschicht, D= Dentin, PD= Prädentin, P= Pulpa, die roten Sterne markieren die Zone der herausgelösten Schmelzmatrix.

3.1.3 Die differentielle Expression der einzelnen Antikörper im Bereich der Molaren

Zur Erstellung dieser Tabelle wurden die spezifischen Reaktionen der verschiedenen Antikörper im Bereich der einzelnen Bestandteile der Molaren erfasst.

Bei den hier im Detail untersuchten Strukturen, handelte es sich, wie bei der Untersuchung der Incisivi, um das Pulpengewebe, die Odontoblasten, das Prädentin, das Dentin, die Ameloblasten, das Zement sowie den Blutgefäßen im angrenzenden Parodontium.

	Pulpa	Odontoblasten	Prädentin	Dentin	Zement	Blutgefäße
Laminin α 1	-	-	-	-	-	-
Laminin α 2	-	-	-	-	+	-
Laminin α 4	-	-	-	-	-	-
Laminin α 5	-	-	-	-	-	-
Laminin β 1	+	-	+	-	-	-
Laminin γ 2	-	-	-	-	-	-
Laminin γ 3	-	-	-	-	-	-
Laminin-332	-	-	-	-	-	-
Kollagen IV	+	-	-	-	-	+
Perlecan	+	-	+	-	-	+
Nidogen-1	+	-	-	-	-	+
Nidogen-2	+	-	-	-	-	+
Aggrecan	+	-	+	-	-	+
COMP	-	-	-	-	-	-
Decorin	-	-	-	-	+	-
Kollagen I	-	-	+	-	+	+
Kollagen II	-	-	+	-	-	-

Tabelle 4: Die differentielle Expression der einzelnen Antikörper im Bereich der Molaren

Laminin $\alpha 1$, Laminin $\alpha 4$, Laminin $\alpha 5$, Laminin $\gamma 2$, Laminin $\gamma 3$ sowie Laminin-332 konnten nicht nachgewiesen werden. Laminin $\alpha 2$ hingegen konnte in der Zementschicht nachgewiesen werden, sowie Laminin $\beta 1$ im Bereich der Pulpa und des Prädentins.

Kollagen IV konnte lediglich im Gebiet der Pulpa und in den Basalmembranen der Blutgefäße erfasst werden.

Perlecan ließ sich anhand einer spezifischen Reaktion im Bereich der Pulpa, des Prädentins und der Blutgefäße nachweisen.

Nidogen I und II ließen sich in den Zonen der Pulpa und der Blutgefäße anfärben. Das Proteoglykan Aggrecan wurde durch eine Reaktion sowohl in der Pulpa, dem Prädentin als auch den Blutgefäßen sichtbar.

COMP ließ sich in keinem der untersuchten Gewebe durch eine spezifische Reaktion darstellen, wohingegen Decorin in der Zementzone nachgewiesen werden konnte.

Bezüglich des Nachweises von Kollagen I konnte sowohl eine Anfärbung der Prädentin-, der Zementzone als auch im Bereich der Blutgefäße vermerkt werden (siehe Abbildung 13), wohingegen Kollagen II im Pulpenbereich, dem Prädentin und der Blutgefäße nachgewiesen werden konnte (siehe Abbildung 14).

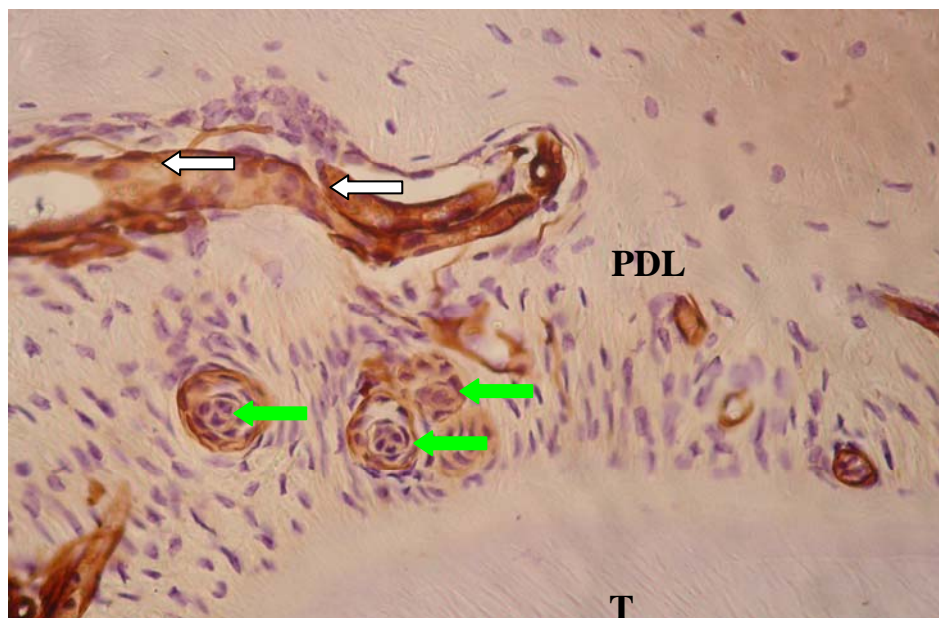


Abbildung 13: Spezifische Reaktion von Nidogen I einer 6 Monate alten Maus; Vergrößerung: 40fach; A= Alveolarknochen, PDL= Parodontalligament, weiße Pfeile= Blutgefäße, grüne Pfeile= ERM

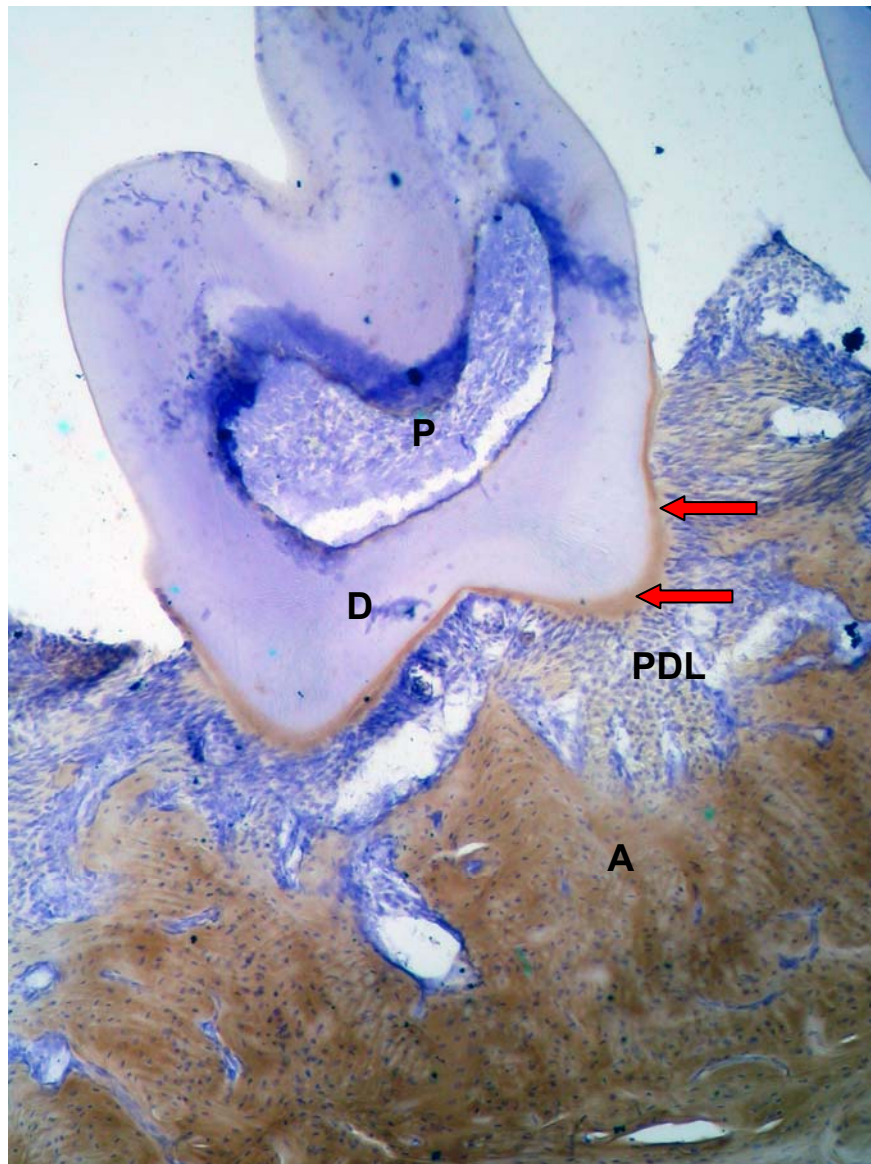


Abbildung 14: Spezifische Reaktion von Kollagen I eines Molaren einer 6 Monate alten Maus; Vergrößerung: 10fach; A= Alveolarknochen, PDL= Parodontalligament, rote Pfeile= Zement, D=Dentin, P= Pulpa.

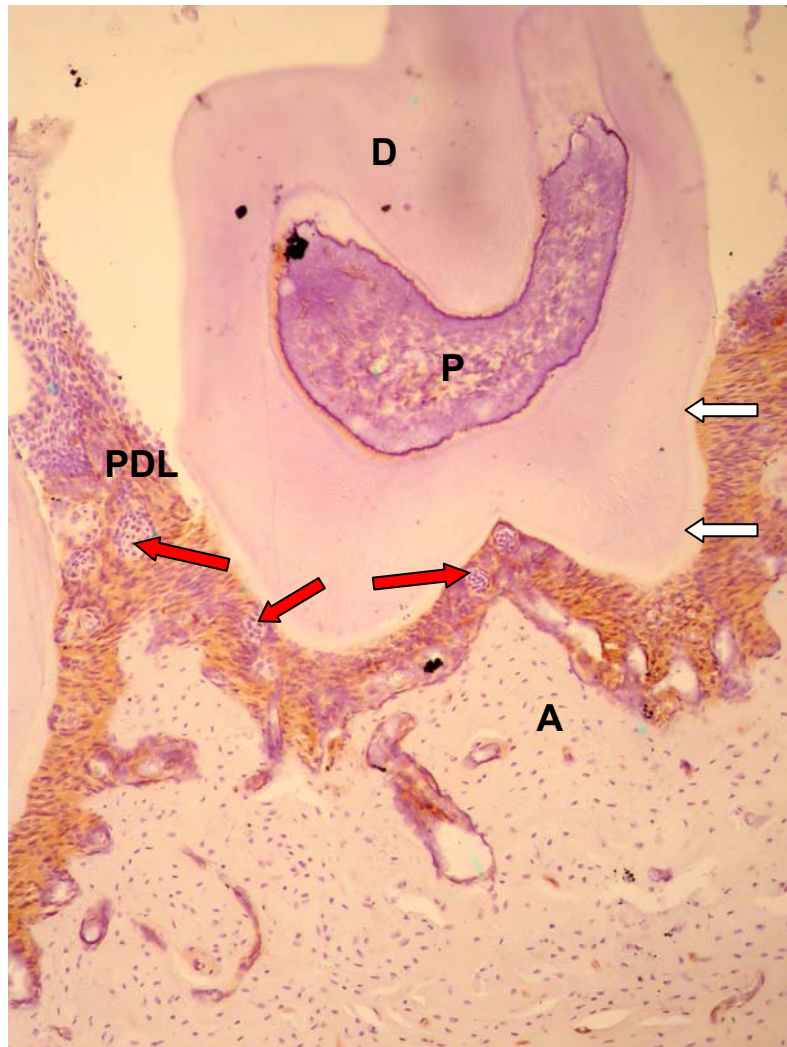


Abbildung 15: Spezifische Reaktion von Kollagen II eines Molaren im Zahnhalteapparat; Vergrößerung: 10fach; A= Alveolarknochen, PDL= Parodontalligament, weiße Pfeile= Zement, rote Pfeile= Malassez'sche Epithelzellen, D= Dentin, P= Pulpa.

3.1.4 Die differentielle Expression der einzelnen Antikörper im Bereich weiterer relevanter oraler Strukturen

Zur Erstellung dieser Tabelle wurden die spezifischen Reaktionen der verschiedenen Antikörper im Bereich zusätzlicher relevanter oraler Strukturen erfasst. Im Einzelnen handelte es sich dabei um die Mundschleimhaut, die Muskulatur, den Alveolarknochen, die Blutgefäße sowie das Parodontalligament.

	BM der Mundschleimhaut	BM der Muskulatur	BM des Alveolarknochens	BM der Blutgefäße	BM des PDL
Laminin α 1	-	-	-	-	-
Laminin α 2	+	+	+	-	+
Laminin α 4	+	+	-	-	-
Laminin α 5	+	+	-	-	-
Laminin β 1	+	+	+	+	+
Laminin γ 2	-	+	-	-	-
Laminin γ 3	+	+	-	-	-
Laminin-332	+	+	-	-	-
Kollagen IV	+	+	-	+	+
Perlecan	+	+	+	-	+
Nidogen-1	+	+	+	+	+
Nidogen-2	+	+	+	+	+
Aggrecan	+	+	+	-	+
COMP	+	+	+	-	+
Decorin	+	+	+	-	+
Kollagen I	-	+	+	-	+
Kollagen II	-	+	-	-	+

Tabelle 5: Die differentielle Expression der einzelnen Antikörper im Bereich weiterer relevanter oraler Strukturen.

Laminin $\alpha 1$ führte zu keinerlei spezifischer Reaktion, Laminin $\alpha 2$ hingegen ließ sich sowohl in der Mundschleimhaut, der Muskulatur, dem Alveolarknochen als auch dem PDL nachweisen. Laminin $\alpha 4$ und Laminin $\alpha 5$ führten zu spezifischen Reaktionen in der Mundschleimhaut und der Muskulatur.

Eine spezifische Reaktion in allen fünf untersuchten Strukturen zeigte Laminin $\beta 1$. Laminin $\gamma 2$ zeigte eine spezifische Färbung im Bereich der Muskulatur auf, wohingegen Laminin $\gamma 3$ und Laminin-332 zusätzlich zu dem Muskulaturbereich noch in der Mundschleimhaut (siehe Abbildung 17) dargestellt werden konnten.

Kollagen IV zeigte eine spezifische Reaktion in der Mundschleimhaut, der Muskulatur, den Blutgefäßen, sowie im PDL. Perlecan manifestierte sich ebenfalls in der Mundschleimhaut, der Muskulatur dem Alveolarknochen und dem PDL.

Nidogen I und Nidogen II ließen sich jeweils in spezifischen Färbungen sowohl in der Mundschleimhaut, der Muskulatur, dem Alveolarknochen, den Blutgefäßen als auch dem PDL nachweisen (siehe Abbildung 20).

Das Proteoglykan Aggrecan ließ sich in der Mundschleimhaut, der Muskulatur, dem Alveolarknochen und dem PDL nachweisen.

COMP und Decorin führten in den untersuchten Geweben ebenfalls jeweils zu einer spezifischen Reaktion in der Region Mundschleimhaut, der Muskulatur, dem Alveolarknochen und dem PDL.

Kollagen I konnte sowohl in der Mundschleimhaut, der Muskulatur, dem Alveolarknochen (siehe Abbildung 19), den Blutgefäßen, als auch in dem PDL verzeichnet werden, wohingegen die spezifische Reaktion von Kollagen II sich auf den Bereich der Muskulatur (siehe Abbildung 18) und des PDLs beschränkte.

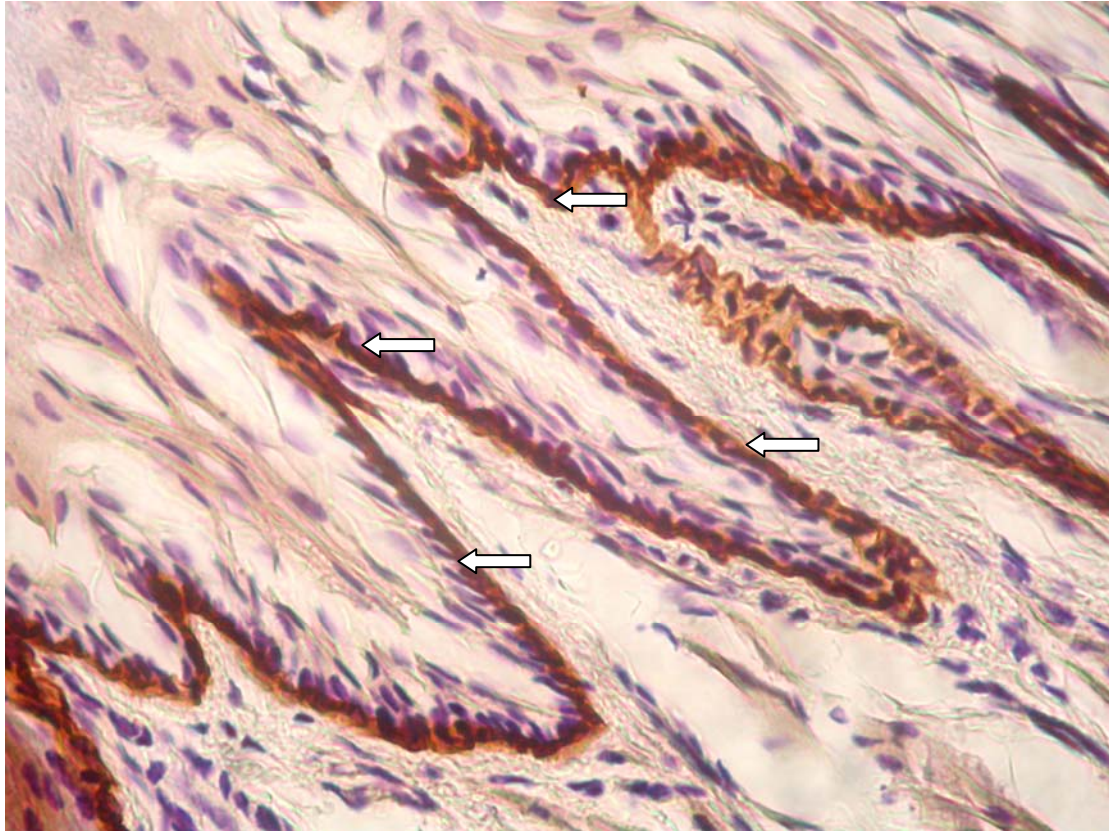


Abbildung 16: Spezifische Reaktion von Laminin-332 in der Basalmembran der Mundschleimhaut einer 6 Monate alten Maus; Vergrößerung: 40fach; weiße Pfeile= Basalmembran.

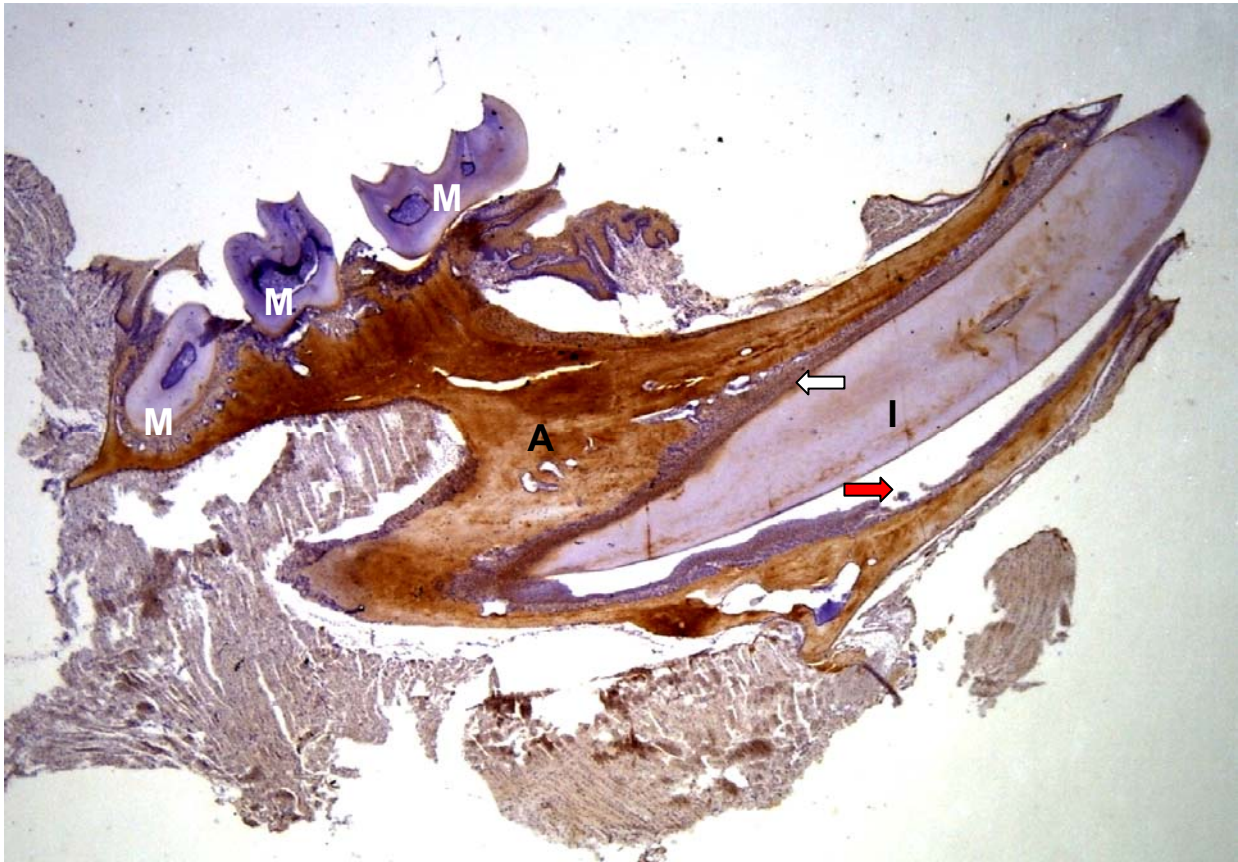


Abbildung 17: Spezifische Reaktion von Kollagen I im Bereich von Incisivus und der Molaren einer 6 Monate alten Maus; Vergrößerung: 8fach; A= Alveolarknochen, I= Incisivus, weißer Pfeil= linguale, schmelzfreie Seite des Incisivus, roter Pfeil= labiale, schmelzhaltige Seite des Zahnes, wobei der Schmelz durch die Entkalkung herausgelöst wurde.

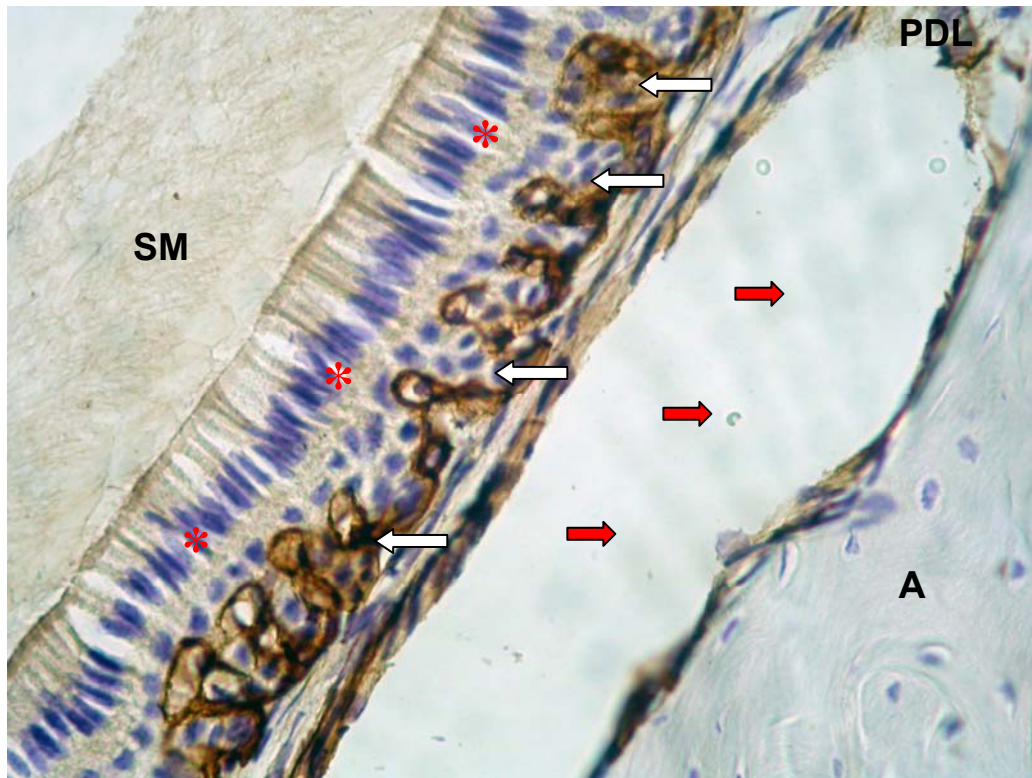


Abbildung 18: Spezifische Reaktion Nidogen-1 ; Detailaufnahme labialwärts am Incisivus; Vergrößerung 60-fach; A= Alveolarknochen, PDL= Parodontalligament, rote Pfeile= Artefakt, weiße Pfeile= Blutgefäße, rote Sterne= Ameloblastenschicht, SM= Schmelzmatrix.

4. Diskussion

Das Ziel dieser Doktorarbeit war der lichtmikroskopische Nachweis verschiedener Matrix-Komponenten im murinen Zahnhalteapparat von Front- und Seitenzähnen sowie im Bereich weiterer relevanter oraler Strukturen. Hierbei wurden Antikörper für die Laminin-Ketten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\beta 1$, $\gamma 2$ und $\gamma 3$, Laminin 332, Kollagen Typ I, II und IV, Perlecan, Nidogen-1, Nidogen-2, Aggrecan 2, COMP sowie Decorin verwendet, um eine lichtmikroskopische Übersicht über das Vorkommen dieser Matrix-Komponenten zu erhalten.

In dieser Arbeit wurde das Mausmodell benutzt, um die o.g. lichtmikroskopischen Untersuchungen durchzuführen. Die Maus ist im Gegensatz zum Menschen ein Monophyodont. Zusätzlich sind bei Nagern Besonderheiten zu erkennen: Trotz einer erhöhten Anzahl an Zahnanlagen weist das adulte murine Gebiss pro Quadrant lediglich einen Incisivus sowie drei Molaren vor (Coady et al. 1967, Peterková et al. 1995). Eine weitere Besonderheit liegt darin, dass der Incisivus bogenförmig verläuft und durch ein kontinuierliches Wachstum charakterisiert ist. Zudem weist dieser Zahn keine gewöhnliche anatomische Zahnkrone bzw. Wurzel auf, da lediglich die labiale Kronenfläche von Schmelz bedeckt ist und die orale Fläche des Zahnes nur mit Zement bedeckt ist. Diese Fläche übernimmt somit den Wurzel-analogen Part (Beertsen und Niehof 1986). Trotz dieser Unterschiede wurde in dieser Arbeit das Mausmodell für die Lichtmikroskopie gewählt, da das Mausmodell trotz der genannten Unterschiede zum menschlichen Zahn einen geeigneten Modellorganismus darstellt, um die gewünschten oralen Strukturen zu untersuchen. Zwar unterscheiden sich Mensch und Maus genetisch stärker als bisher angenommen (Church et al. 2009), jedoch ist das Mausmodell nach wie vor ein sehr gutes Modell, um orale Gewebe mikroskopisch zu untersuchen (Haruyama et al. 2009, Sehic et al. 2009). Zudem ist es möglich, vergleichsweise einfach transgene Mäuse zu züchten, um die Rolle von interessanten bzw. potentiell wichtigen Proteinen näher zu untersuchen. Als transgen bezeichnet man Tiere, die im Wesentlichen nach Einfügen fremder DNA in ihrem Erbgut verändert und dadurch zu künstlichen Mutanten geworden sind. Zurzeit unterscheidet man – je nach wissenschaftlicher Zielsetzung der Erbgutveränderung und Technik ihrer Erzeugung – zwei verschiedene Varianten transgener Tiere: „klassische“ transgene Tiere und

Tiere mit „Knock-out Genen“, d.h. mit gezielt ausgeschalteten Genen. In dieser Arbeit wird ein gängiger nicht transgener Mausstamm (C57B6J) gewählt, um ein mögliches Vorhandensein von Matrixkomponenten im „normalen“ Zustand zu untersuchen. Hierbei handelt es sich um einen häufig gezüchteten Labormausstamm. Er ist der mit am häufigsten verwendete Stamm in Bezug auf genetisch modifizierte Mäuse, die als Modelle für menschliche Erkrankungen benutzt werden. Dies ist durch die Verfügbarkeit kongener Stämme, ihre einfache Aufzucht und ihre Robustheit bedingt.

4.1 Diskussion der Ergebnisse im Bereich der Malassezschen Epithelreste

Die ERM sind in der Literatur beschrieben als inaktive Zell-Anhäufungen von wenigen Zellen, welche von einer Basalmembran umgeben sind (Hamamoto et al. 1991). Trotz der Tatsache, dass die Existenz dieser Zellen seit mehr als einem Jahrhundert bekannt ist, ist der Wissensstand auch zum jetzigen Zeitpunkt bezüglich der Funktion der ERM lückenhaft (Rincon et al. 2006). In dieser Arbeit wurden die ERM untersucht, da die ERM einen Stammzell-Charakter zu haben scheinen und somit eine wichtige Rolle bei der Geweberegeneration spielen könnten (Ohshima et al. 2008).

Es konnten die untersuchten Matrix-Komponenten in den Basalmembran-Zonen der ERM unterschiedlicher Regionen dargestellt werden. Die Laminin $\alpha 2$ -Kette ließ sich in der interradiikulären Region lokalisieren und die Laminin $\beta 1$ -Kette konnte in den ERM im zervikalen Bereich des Parodontiums dargestellt werden. Die Ketten Laminin $\gamma 2$ sowie Laminin $\gamma 3$ zeigten sich im zervikalen als auch im interradiikulären Bereich und Laminin 332 konnte im mittleren Wurzelbereich, im apikalen Drittel und interradiikulär dargestellt werden. Jedoch konnten die Ketten Laminin $\alpha 1$, Laminin $\alpha 4$ und Laminin $\alpha 5$ nicht in den Basalmembranzonen der ERM dargestellt werden. Sahlberg et al. (1998) untersuchten die mRNA-Expression der Laminin $\gamma 2$ -Kette mithilfe der In-situ-Hybridisierung während der Zahnentwicklung der Maus bis zum Abschluss der Zahnentwicklung. Hier konnte gezeigt werden, dass das Gen für die Laminin $\gamma 2$ -Kette nur von epithelialen Zellen des äußeren Schmelzepithels sowie des sternförmigen Retikulums des Schmelzorgans exprimiert wird, nicht jedoch vom inneren Schmelzepithel (Sahlberg et al. 1998). Des Weiteren konnte in der Arbeit aus

dem Jahre 1998 gezeigt werden, dass die Expression der Laminin γ 2-Kette in Ameloblasten stark hochreguliert ist, sobald die Präameloblasten zu reifen Ameloblasten differenzieren (Sahlberg et al. 1998). Diese Ergebnisse lassen auf eine besondere Rolle von Laminin-332 bei der Befestigung der Ameloblasten-Zellschicht am Schmelz während der Zahnentwicklung schließen (Sahlberg et al. 1998). Auch die Ergebnisse, welche in dieser Arbeit vorgestellt werden, lassen die Vermutung zu, dass je nach Lage der ERM verschiedene Laminin-Ketten in den Epithelzellen produziert werden, welches wiederum dazu führt, dass unterschiedliche Laminin-Tripelhelizes in den Basalmembranen der ERM vorliegen, um – je nach Lage – spezifische Aufgaben wahrzunehmen. Zudem wird in dieser Arbeit erstmals auf Proteinebene das Vorhandensein verschiedener Laminin-Ketten gezeigt. Des Weiteren ließ sich Kollagen IV ebenfalls in den im zervikalen und interrädikulären Parodontium gelegenen ERM nachweisen. Perlecan konnte in den ERM im zervikalen Bereich lokalisiert werden. Bei den Nidogenen konnte lediglich Nidogen-2 sowohl in zervikal gelegenen ERM als auch in interrädikulär gelegenen ERM dargestellt werden, im Gegensatz zu Nidogen-1, welches nicht in den BMs der ERM vorhanden war. Die Nidogene scheinen als Linkermoleküle zwischen den unabhängigen Netzwerken der Laminine und des Kollagen Typ IV zu fungieren. Jedoch führte der Einzel-Knockout von Nidogen-1 und Nidogen-2 beziehungsweise der Doppel-Knockout von beiden Nidogenen zu keiner Veränderung in der Zusammensetzung der renalen Basalmembran (Gersdorff et al. 2007). Einzig bei den Nidogen-1/-2 Doppel-Knockout-Mäusen war teilweise eine Verdickung bzw. ein komplettes Fehlen der Basalmembran vorhanden. Das Vorkommen der restlichen Hauptkomponenten der Basalmembran jedoch war bei allen drei Knockout-Maus-Modellen nicht verändert im Vergleich zur normalen Maus (Gersdorff et al. 2007). Trotz eines nahezu ubiquitären Vorkommens von Nidogen-1 in den verschiedensten Basalmembranen beziehungsweise extrazellulären Matrices ist es im Falle der hier dargestellten Ergebnisse möglich, dass einzig Nidogen-2 die Rolle als mögliches Linker-Molekül einnimmt und auch die Rolle von Nidogen-1 übernimmt (Baranowsky et al. 2009).

Der Antikörper für Aggrecan zeigte sich nur im interrädikulären Bereich und COMP wurde in den zervikalen und interrädikulären Epithelanhäufungen nachgewiesen.

Decorin konnte nicht lokalisiert werden in den BMs der ERM, Kollagen Typ I zeigte sich in dem apikalen Drittel und in den interradikulär gelegenen ERM, wohingegen Kollagen Typ II sich zusätzlich zu diesen beiden Gebieten im mittleren Wurzelbereich nachweisen ließ.

4.2 Diskussion der Ergebnisse im Bereich der Incisivi und Molaren

Neben der Lokalisation der bereits genannten Matrix-Komponenten in den ERM befasste sich diese Arbeit zudem mit der Lokalisation in weiteren relevanten Strukturen der Incisivi sowie der Molaren. In der Pulpa der Incisivi konnten die Laminin-Ketten $\beta 1$ und $\gamma 2$, Kollagen Typ IV, Perlecan, Nidogen-1, Nidogen-2, Aggrecan, COMP und Kollagen Typ II lokalisiert werden. Darüber hinaus konnte die Laminin $\gamma 2$ -Kette in der Odontoblastenschicht der Incisivi dargestellt werden. Yuasa et al. (2004) untersuchten die Rolle der Laminin $\alpha 2$ -Kette während der Zahnentwicklung bei Laminin- $\alpha 2$ - Knockout-Mäusen mit Hilfe der Immunhistochemie, der Zellkultur sowie der PCR. Laminin $\alpha 2$ Knockout-Mäuse haben eine dünne Dentinschicht und erweiterte Dentinkanäle (Yuasa et al. 2004). Dieses Erscheinungsbild gleicht dem der *Dentinogenesis imperfecta* beim Menschen. Es konnte gezeigt werden, dass diese Laminin-Kette wichtig ist für die Odontoblasten-Differenzierung. Des Weiteren wurde in jener Arbeit erstmals beschrieben, dass Laminin $\alpha 2$ die Expression des Dentin Sialoprotein reguliert (Yuasa et al. 2004). Die lichtmikroskopische Lokalisation verschiedener Matrix-Komponenten in dieser Arbeit zeigt ein Vorkommen der Laminin- $\gamma 2$ -Kette in der Odontoblastenschicht adulter Mäuse. Obwohl diese Kette eher in Epithelien zu finden ist, scheint sie eine Rolle bei der Odontoblastenfunktion inne zu haben. Auch im Prädentin konnten in dieser Arbeit mehrere Matrix-Komponenten – darunter die Laminin-Ketten $\alpha 4$, $\alpha 5$ und $\beta 1$, Perlecan, Nidogen-1, Aggrecan-2, COMP, Kollagen I und II – lokalisiert werden. Das Prädentin, welches auch Vordentin genannt wird, ist eine gallertige Substanz, die nicht mineralisierte organische Matrix des Dentins, welches von den Odontoblasten ausgeschieden wird und später durch den Prozess der Mineralisation zum Dentin wird. In einer Arbeit aus dem Jahre 1989 wurde die

immunhistochemische Lokalisation verschiedener extrazellulärer Matrixkomponenten während einzelner Stadien der Dentinogenese untersucht.

Hier konnte gezeigt werden, dass verschiedene Kollagene am Mineralisationsprozess von Dentin beteiligt sind und Osteocalcin als Marker für Odontoblasten gilt (Bronckers et al. 1989). In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die organische Matrix des Prädentins der Incisivi unter anderem aus den Laminin-Ketten $\alpha 4$, $\alpha 5$ und $\beta 1$, Perlecan, Nidogen-1, Aggrecan-2, COMP, Kollagen I und II besteht. Jedoch im Bereich des fertig mineralisierten Dentins der Incisivi konnten keine extrazellulären Matrixmoleküle lokalisiert werden. Im Vergleich zu den Incisivi konnte im Bereich der Molaren lediglich die Laminin $\beta 1$ -Kette in der Pulpa sowie im Prädentin lokalisiert werden. Somit scheinen sich die Pulpa und das Prädentin der murinen Incisivi im Vergleich zu den murinen Molaren in ihrer Matrix-Zusammensetzung zu unterscheiden.

4.3 Diskussion der Ergebnisse im Bereich weiterer untersuchter oraler Strukturen

Außerhalb der o.g. untersuchten Strukturen befasste sich diese Arbeit mit der Lokalisation von Matrixkomponenten in weiteren relevanten oralen Strukturen. Hierbei handelte es sich um die Mundschleimhaut, die Muskulatur, den Alveolarknochen, die Blutgefäße, sowie dem PDL der Maus.

In der Mundschleimhaut, insbesondere in der Basalmembran, ließen sich zahlreiche Matrixproteine nachweisen. Die Familie der Laminine betreffend, handelte es sich hierbei um die Lamininketten $\alpha 2$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\beta 1$, $\gamma 3$ sowie Laminin 332.

An sich besitzt dieses Protein die Fähigkeit an Kollagen IV, Perlecan, Nidogen sowie an sich selbst zu binden und trägt auf diese Weise zu den charakteristischen Strukturen innerhalb der Basalmembran bei. Zudem ist zu erwähnen, dass die Bindung an Laminin zahlreiche zellspezifische Antworten, wie z.B. die Polarisierung von sekretorischen Zellen, auslöst (Martin und Timpl 1987). Insbesondere bei Laminin 332 handelt es sich um eine typische Komponente der epithelialen Basalmembranen. Dieses Protein wird als biochemisches Äquivalent zu den verankernden Filamenten, welche die basalen Keratinozyten fixieren, angesehen und

spielt eine wichtige Rolle hinsichtlich des mechanischen Widerstandes und der Abwehrfunktion des Epithels (Kosmehl et al. 1999).

Aus der Gruppe der Kollagene konnte das Vorkommen von Kollagen I, welches Hauptbestandteil der charakteristischen Fasern ist (Butler et al. 1975), sowie von Kollagen IV, welches Hauptbestandteil der Basalmembranen und nur hier zu finden ist, vermerkt werden (Khoshnoodi et al. 2008).

Fortführend konnte ein weiterer Hauptbestandteil der Basalmembran, das Proteoglykan Perlecan, nachgewiesen werden. Dieses Protein stabilisiert die Basalmembran, indem es Wechselwirkungen mit anderen Basalmembran-komponenten, wie dem Laminin, als auch dem Nidogen-1, unterhält (Battaglia et al. 1992).

Die Gruppe der Glykoproteine betreffend, wurden sowohl Nidogen-1 als auch Nidogen-2 nachgewiesen. Diesbezüglich wird vermutet, dass Nidogen für den hohen Anteil an Galaktosaminen in der Basalmembran verantwortlich ist (Timpl et al. 1983). Zudem ist Nidogen-1, ähnlich wie Perlecan, in der Lage, Dreifachkomplexe mit Laminin und Kollagen IV zu bilden und so vermutlich als Verknüpfungprotein zu fungieren, welches die Basalmembran auf supramolekularer Ebene stabilisiert (Aumailley et al. 1993). Neben diesen bereits erwähnten Matrixproteinen konnten zusätzlich die Glycosaminoglykane Aggrecan 2 und Decorin, sowie das nicht-kollagene COMP nachgewiesen werden.

Im Bereich der angeschnittenen Muskulatur auf den verwendeten Präparaten konnten aus der Familie der Laminine das Laminin α 2, Laminin α 4, Laminin α 5, Laminin β 1, Laminin γ 2 sowie Laminin γ 3 als auch Laminin 332 nachgewiesen werden. Die Relevanz der Laminine wird deutlich, wenn man sich die Folgen von Laminin-Mutationen vor Augen führt. Die Muskulatur betreffend, sind insbesondere Mutationen im Bereich des Laminin α 2 zu erwähnen. Diese zeichnen sich neben Hypotonie, Gehirndefekten und Gelenkkontrakturen durch kongenitale Muskeldystrophie mit allgemeiner Muskelschwäche aus (Jimenez-Mallebrera et al. 2005).

Insbesondere die Stabilität der Basalmembranen ist von dem Kollagen IV Gerüst abhängig (Pöschl et al. 2004).

Ein weiteres Protein, welches vorgefunden wurde, ist das Protein Perlecan, welches eine wichtige Rolle bei der muskulären, sowie der vaskulären Entwicklung spielt, da

ein Knockout des Perlecans an Mäusen zu generalisierten vaskulären und muskulären Abnormalitäten führt (Hassell et al. 2002).

Weiterhin wurden erneut die Basalmembrankomponenten Nidogen I und II sowie Aggrecan II, COMP und Decorin nachgewiesen. Decorin besitzt die Fähigkeit mit Kollagen zu interagieren und so die Fibrillogenese zu beeinflussen (Vogel et al. 1984).

Bei der genaueren Untersuchung des Alveolarknochens fand ein spezifischer Nachweis der Proteine Laminin $\alpha 2$ sowie Laminin $\beta 1$ statt. Weiterhin konnte das Protein Perlecan dargestellt werden. Die Bedeutung des Perlecans in der Skelettentwicklung wird anhand von Perlecan-Knockout Mäusen verdeutlicht. Diese Mäuse weisen verkürzte Röhrenknochen sowie eine defekte endochondrale Ossifikation auf, die zu Dwarfismus (Kleinwuchs) und zahlreichen Chondroplasien führen können (Arikawa-Hirasawa et al. 1999, Arikawa-Hirasawa et al. 2001). Zusätzlich zu der Präsenz des Perlecans im Knochenmark, dem Gastrointestinaltrakt, der Niere, der Leber, der Lunge sowie der Milz, ist eine signifikante Steigerung der Perlecan-Expression während der Knorpelentwicklung zu vermerken (SundarRaj et al. 1995). Perlecan scheint somit das vorherrschende Heparansulfat-Proteoglycan in Knorpelgeweben zu sein (Govindraj et al. 2002, Melrose et al. 2002).

Perlecan-Knockout Mäuse weisen sowohl Beeinträchtigungen bezüglich der Entwicklung der Augen, der Muskulatur der Knorpelstrukturen als auch der Skelettentwicklung auf (Arikawa-Hirasawa et al. 1999, Costell et al. 1999).

Bezüglich der Nidogene konnten sowohl das Nidogen-1 als auch die Isoform, das Nidogen-2 im Alveolarknochen aufgezeigt werden.

Die Relevanz der Nidogene insbesondere im Bereich des Knochens wird erneut anhand des Beispiels von Knockout-Mäusen belegt. Mäuse, denen beide Nidogenformen fehlen, sterben kurz nach der Geburt, sind für normal kleiner und weisen Defekte im Bereich der Lungen- und Herzentwicklung auf. Weiterhin haben diese Mäuse Entwicklungsfehler

an Vorder- und Hinterläufen und eine häufig reduzierte Osteoidentwicklung in den mittleren Phalangen (Böse et al. 2006).

Darüber hinaus ließen sich zusätzlich die Proteine Aggrecan, COMP sowie Decorin und Kollagen I vorweisen.

Besonders zu erwähnen hinsichtlich der Betrachtung von Knorpelgewebe ist, dass ein Abbau von Aggrecan, einem der Hauptbestandteile der EZM, der für die hohe Widerstandsfähigkeit gegen Kompression lasttragender Gewebe zuständig ist, zu arthritischen Erkrankungen führt (Arner 2002, Sandy 2006).

Es wurde weiterhin gezeigt, dass ein Erhalt von Aggrecan vor einer proteolytischen Spaltung des Kollagen II in Knorpelgeweben schützt. Die genauen Mechanismen dieses Vorgangs müssen jedoch noch explizierter untersucht werden (Pratta et al. 2003).

Das ebenfalls dargestellte Matrixprotein COMP ist vorrangig in Knorpel- sowie muskuloskelettalen Geweben angesiedelt. Eine Mutation innerhalb dieses Proteins ist, wie bereits erwähnt, von Interesse, da sie zwei skelettale Dysplasien, die *Pseudoachondroplasie*, sowie die *Multiple Epiphyseale Dysplasie*, zur Folge hat (Posey et al. 2008).

Ferner konnte das Vorhandensein von Decorin gezeigt werden, welches zusammen mit Biglycan stark in sämtlichen Knochenstrukturen exprimiert wird. Während Biglycan im sich entwickelnden Knochen an den Wänden der Osteozytenlakunae und den Knochenzelloberflächen zu finden ist, ist Decorin durchgehend in der Knochenmatrix präsent (Bianco et al. 1990).

Studien an ausgereiften Knochen zeigen, dass Decorin in der perilakunären Matrix sowie den Canaliculi der Osteozyten zu finden ist, während Biglycan sich in der gesamten Knochenmatrix absetzt.

Bei dem nachgewiesenen Kollagen I handelt es sich um den am häufigsten vertretenen Kollagentypen mit Vorkommen in allen Bindegeweben- mit Ausnahme des hyalinen Knorpels. Es ist das Hauptprotein in allen Knochenstrukturen, Haut, Sehnen, Ligamenten, der Sklera, der Kornea und den Blutgefäßen. Typ I Kollagen beinhaltet annähernd 95% des gesamten Knochenkollagens und 80% des gesamten Proteingehaltes des Knochens (Viguet-Carrin et al. 2005).

Mutationen im Bereich der Aminosäuresequenz des Kollagen I können zu einer verzweigten Formation der Fasern führen, die wiederum für brüchige Knochen, anormale Mineralisierung und Erkrankungen wie *Osteogenesis imperfecta* verantwortlich zeichnen (Baum et al. 1999).

Die genauere Betrachtung der angeschnittenen Blutgefäße ergab einen Nachweis der Proteine Laminin $\beta 1$, Kollagen IV, Nidogen I, Nidogen II sowie Kollagen I.

Hallmann et al. (2005) untersuchte die Expression und Funktion der Laminine in embryonalen und ausgereiften Blutgefäßen.

Als maßgebliche Grundlage dienten unter anderem die Ergebnisse von Timpl 1989. Diese Arbeit verdeutlicht, dass es sich bei Basalmembranen um hoch spezialisierte extrazelluläre Matrix handelt, die in Blutgefäßen unter Endothelzellen liegen und assoziierte Perizyten, sowie glatte Muskelzellen in Venen und Arterien, umhüllen (Timpl 1989). Es handelt sich um dünne, 50nm dicke Proteinschichten, deren Hauptkomponenten Laminine, Kollagen IV, Nidogene und Perlecan sind.

Folge der Eliminierung des Kollagen IV in Mäusen ist die Ruptur der Reicherts-Membran zwischen dem Embryonaltag 10,5 und 11,5 (Pöschl et al. 2004). Zwar kommt es zu einer Bildung der Blutgefäße, diese weisen jedoch abweichende Verzweigungen auf, sind undicht und instabil. Besonders interessant hinsichtlich der Hypothese, dass Kollagen IV das Gerüst zur Integration der anderen Basalmembrankomponenten bereitstellt, ist, dass sowohl Laminine, Nidogene als auch Perlecan in Kollagen IV Knockout-Mäusen sezerniert werden und sich in Netzwerken einbauen. Jedoch war eine sukzessive Abschwächung der Anfärbung dieser Moleküle ersichtlich, was wiederum darauf hindeuten könnte, dass sie in der Abwesenheit von Kollagen IV nicht in der Basalmembran gespeichert werden können.

Das Knockout des Proteins Perlecan hingegen führt zu einer Dilatation und Blutungen in Mikrogefäßen in der Hälfte der Schwangerschaft und somit zu perinataler Sterblichkeit. Alles deutet daraufhin, dass Perlecan sowohl direkte Effekte als adhäsives Molekül bei der Gefäßbildung ausübt, als auch die Angiogenese moduliert, indem es den Endothelzellen Wachstumsfaktoren bereitstellt (Hallmann et al. 2005).

Der Grund, warum verschiedene Gefäßtypen unterschiedliche Laminine exprimieren und unterschiedlich in den Endothelzellen reguliert werden, ist weitestgehend unbekannt, suggeriert jedoch funktionelle Unterschiede (Thyboll et al. 2002).

Der Knockout von Nidogen-1 hingegen beeinflusst die Formation der murinen Basalmembran nicht (Murshed et al. 2000). Man nimmt jedoch an, dass diese Proteine in speziellen pathologischen Situationen, wie Entzündungsprozessen oder der Metastasierung, Funktionen übernehmen (Hallmann et al. 2005).

Die Untersuchung hinsichtlich der Matrixproteine im PDL ergab einen Nachweis von Laminin $\alpha 2$, Laminin $\beta 1$, Kollagen IV, Perlecan, Nidogen I und II, Aggrecan, COMP, Decorin sowie Kollagen I und II.

Bezüglich der Basalmembranproteine wurden spezifische Reaktionen im Bereich der Laminine ersichtlich. Laminine gehören zu der Familie der multifunktionalen Proteine, die den Hauptanteil der nichtkollagenen Proteine der Basalmembranen stellen (Colognato und Yurchenco 2000). Laminine binden sowohl an sich selbst, als auch an die ebenfalls nachgewiesenen Proteine Kollagen IV, Perlecan und Nidogen und bilden auf diesem Weg integrierte Strukturen innerhalb der Basalmembranen (Martin und Timpl 1987). Durch zahlreiche Interaktionen tragen die Laminine wesentlich zu den Vorgängen der Zelldifferenzierung, der Zellformung, der Zellbewegung sowie der Aufrechterhaltung der Gewebsphänotypen bei (Colognato und Yurchenco 2000).

Bei den Kollagenen allgemein handelt es sich, mit einer Größenordnung von 60%, um den Hauptbestandteil der EZM des PDLs (Sodek et al. 1977). Im Parodontium kommt den Kollagenfasern die Aufgabe der Verankerung des Zahnes im Alveolarknochen zu. Sämtliche Kollagene werden von einer Vielzahl von Zellen, wie z.B. Fibroblasten, Chondrozyten und Osteoblasten synthetisiert und in die EZM sezerniert (Mutschelknauss 2000). Kollagen IV lässt sich in den Blutgefäßen und Nerven nachweisen (Everts et al. 1996), wohingegen Kollagen I mit circa 80% die Hauptkomponente der charakteristischen Fasern darstellt (Butler et al. 1975).

Die größte Basalmembrankomponente stellt das Heparansulfat-haltige Protein Perlecan dar (Noonan et al. 1991). Es handelt sich hierbei um ein allgegenwärtiges, perizelluläres Proteoglycan welches so platziert ist, dass es Zellsignale vermitteln kann, die für die Zellwanderung, die Proliferation und die Differenzierung zuständig sind (Whitelock et al. 2008).

Weitere spezifische Nachweise konnten hinsichtlich der Proteine Nidogen-1 und Nidogen-2 erbracht werden. Nidogen-1 ist in der Lage 3fach Komplexe mit Laminin und Kollagen IV zu bilden und zusätzlich andere Basalmembrankomponenten miteinander zu verknüpfen.

Unter den nichtkollagenen Proteinen der EZM findet sich, wie auch in dieser Arbeit dargestellt, das Matrixprotein COMP wieder (Posey und Hecht 2008).

Aus der Familie der Proteoglykane ließen sich die Proteine Aggrecan und Decorin nachweisen. Besonderes Augenmerk liegt hierbei auf dem Protein Decorin, welches

im Stande ist die Fibrillogenese durch Interaktionen mit Kollagen mittels seines Kernproteins zu beeinflussen (Vogel et al. 1984).

Die Hemmung der Kollagenbindung und anschließende Internalisierung ist ein Indiz dafür, dass Decorin möglicherweise die Kollagenphagozytose in vivo blockiert und auf diesem Weg einen bestimmenden Faktor in der Gewebshömeostase darstellen könnte (Bhide et al. 2005).

5. Zusammenfassung

Die extrazelluläre Matrix (EZM) ist ein Sammelbegriff für alle Matrix-Komponenten im extrazellulären Raum aller Grundgewebstypen. Es handelt sich um Makromoleküle, die von Zellen sezerniert und im Extrazellulärraum durch Interaktionen mit anderen Molekülen immobilisiert werden. Im Binde- und Stützgewebe ist der extrazelluläre Anteil am Gesamtvolumen verglichen mit anderen Gewebstypen relativ groß und daher sind die Funktionen der EZM entsprechend wichtig.

In der Mundhöhle gibt es eine Reihe von spezialisierten Geweben mit einer Vielzahl an Funktionen. Diese Arbeit hat es sich zur Aufgabe gemacht, eine systematische Übersicht der extrazellulären Matrix-Komponenten mittels Lichtmikroskopie in den verschiedenen oralen Geweben der Maus zu erstellen. Hierbei wurden die Zahnhalteapparate von murinen Front- und Seitenzähnen untersucht. Ein besonderes Augenmerk lag hierbei auf der Untersuchung der Malassez'schen Epithelzellen (ERM), welche sich im Parodontalligament befinden. Darüber hinaus wurden der Alveolarknochen, die Mundschleimhaut, die Muskulatur sowie die Blutgefäße erforscht.

Es konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass die Zusammensetzung der Basalmembranen der ERM bezüglich ihrer Lage Unterschiede aufweist. So konnten die Laminin-Untereinheit $\beta 1$ einzig in den ERM im Bereich der zervikalen Region und die Laminin-Ketten $\alpha 2$, $\gamma 2$ und $\gamma 3$ einzig im interradikulären Bereich lokalisiert werden. Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass die Basalmembran-Zusammensetzung der ERM hinsichtlich ihrer Lage variiert, um den spezifischen Anforderungen dieser jeweiligen Regionen zu entsprechen. Des Weiteren konnten spezifische Laminin-Ketten in anderen oralen Geweben, wie beispielsweise in Basalmembranzonen der Pulpa, der Mundschleimhaut, der Muskulatur und der Blutgefäße, nachgewiesen werden.

Der systematische Nachweis einer Vielzahl von extrazellulären Matrixkomponenten in verschiedenen oralen Geweben der Maus in dieser Arbeit trägt dazu bei, die spezifischen Zusammensetzungen der verschiedenen Gewebe weiter zu präzisieren und soll als Grundlage weiterer Untersuchungen dienen.

6. Literaturverzeichnis

Ainamo J, Löe H (1966): Anatomical characteristics of gingiva. A clinical and microscopic study of the free and attached gingiva. J Periodontol; 37: 5-13

Ackley BD, Kang SH, Crew JR, Suh C, Jin Y, Kramer JM (2003): The basement membrane components nidogen and type XVIII collagen regulate organization of neuromuscular junctions in *Caenorhabditis elegans* J Neurosci; 23(9):3577-87

Arikawa-Hirasawa E, Yamada Y (2001): Roles of perlecan in development and disease: studies in knockout mice and human disorders. Seikagaku.; 73(10):1257-1261

Arikawa-Hirasawa E, Watanabe H, Takami H, Hassell JR, Yamada Y (1999): Perlecan is essential for cartilage and cephalic development. Nat Genet; 23(3): 354-358

Arner EC (2002): Aggrecanase-mediated cartilage degradation. Curr Opin Pharmacol; 2(3):322-329

Aumailley M, Battaglia C, Mayer U, Reinhardt D, Nischt R, Timpl R, Fox JW (1993): Nidogen mediates the formation of ternary complexes of basement membrane components. Kidney Int; 43(1): 7-12

Aumailley M, Bruckner-Tuderman L, Carter WG, Deutzmann R, Edgar D, Ekblom P, Engel J, Engvall E, Hohenester E, Jones JC, Kleinman HK, Marinkovich MP, Martin GR, Mayer U, Meneguzzi G, Miner JH, Miyazaki K, Patarroyo M, Paulsson M, Quaranta V, Sanes JR, Sasaki T, Sekiguchi K, Sorokin LM, Talts JF, Tryggvason K, Uitto J, Virtanen I, von der Mark K, Wewer UM, Yamada Y, Yurchenco PD (2005): A simplified laminin nomenclature. Matrix Biol; 24: 326-332

-
- Baranowsky A, Mokkapati S, Bechtel M, Krügel J, Miosge N, Wickenhauser C, Smyth N, Nischt R (2010):** Impaired wound healing in mice lacking the basement membrane protein nidogen 1. *Matrix Biol*; 29(1):15-21
- Bartold PM (1990):** A biochemical and immunohistochemical study of the proteoglycans of alveolar bone. *J Dent Res*; 69(1): 7-19
- Bartold PM, Narayanan AS (2006):** Molecular and cell biology of healthy and diseased periodontal tissues. *Periodontol 2000*; 40: 29-49
- Battaglia C, Mayer U, Aumailley M, Timpl R (1992):** Basement-membrane heparan sulfate proteoglycan binds to laminin by its heparan sulfate chains and to nidogen by sites in the protein core. *Eur J Biochem*; 208(2): 359-366
- Baum J, Brodsky B (1999):** Folding of peptide models of collagen and misfolding in disease. *Curr Opin Struct Biol*; 9(1):122-128
- Baumhoer, Steinbrück, Götz (2003):** Histologie, Urban & Fischer Verlag, München-Jena
- Beck K, Hunter I, Engel J (1990):** Structure and function of laminin: anatomy of a multidomain glycoprotein. *FASEB J*; 4(2): 148-160
- Becktor KB, Nolting D, Becktor JP, Kjaer I (2007):** Immunohistochemical localization of epithelial rests of Malassez in human periodontal membrane. *Eur J Orthod*; 29(4): 350-353
- Beertsen W, Niehof A (1986):** Root-analogue versus crown-analogue dentin: a radioautographic and ultrastructural investigation of the mouse incisor. *Anat Rec*; 215(2): 106-118

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

Bergström J (1984): The topography of papillary gingiva in health and early gingivitis. *J Clin Periodontol*; 11(7): 423-431

Berkovitz BK (2004): Periodontal ligament: structural and clinical correlates. *Dent Update*; 31(1): 46-50, 52, 54

Berkovitz BK, Whatling R, Barrett AW, Omar SS (1997): The structure of bovine periodontal ligament with special reference to the epithelial cell rests. *J Periodontol*; 68: 905–913

Bhide VM, Laschinger CA, Arora PD, Lee W, Hakkinen L, Larjava H, Sodek J, McCulloch CA (2005): Collagen phagocytosis by fibroblasts is regulated by decorin. *J Biol Chem*; 280(24):23103-23113

Bianco P, Fisher LW, Young MF, Termine JD, Robey PG (1990): Expression and localization of the two small proteoglycans biglycan and decorin in developing human skeletal and non-skeletal tissues. *J Histochem Cytochem*; 38(11):1549-1563

Bidanset DJ, Guidry C, Rosenberg LC, Choi HU, Timpl R, Hook M (1992): Binding of the proteoglycan decorin to collagen type VI. *J Biol Chem*; 267(8): 5250-5256

Birn H (1966): The vascular supply of the periodontal membrane. An investigation of the number and size of perforations in the alveolar wall. *J Periodontal Res*; 1: 51-68

Black, GV (1887): Periosteum and Peridental Membrane, W. T. Keener Co., Chicago

Black GV (1899): The fibers and glands of the peridental membrane. *Dental Cosmos*; 41: 101–122

Bosshardt DD, Selvig KA (1997): Dental cementum: the dynamic tissue covering of the root. *Periodontol* 2000; 13: 41-75

Böse K, Nischt R, Page A, Bader BL, Paulsson M, Smyth N (2006): Loss of nidogen-1 and -2 results in syndactyly and changes in limb development. *J Biol Chem*; 281(51):39620-39629

Brazel D, Pollner R, Oberbäumer I, Kühn K (1988): Human basement membrane collagen (type IV). The amino acid sequence of the alpha 2(IV) chain and its comparison with the alpha 1(IV) chain reveals deletions in the alpha 1(IV) chain. *Eur J Biochem*; 172(1): 35-42

Brice GL, Sampson WJ, Sims MR (1991): An ultrastructural evaluation of the relationship between epithelial rests of Malassez and orthodontic root resorption and repair in man. *Aust Orthod J*; 12: 90–94

Briggaman RA, Wheeler CE Jr (1975): The epidermal-dermal junction. *J Invest Dermatol*; 65(1): 71-84

Briggs MD, Hoffman SM, King LM, Olsen AS, Mohrenweiser H, Leroy JG, Mortier GR, Rimoin DL, Lachman RS, Gaines ES, Cekleniak JA, Knowlton RG, Cohn DH (1995): Pseudoachondroplasia and multiple epiphyseal dysplasia due to mutations in the cartilage oligomeric matrix protein gene. *Nat Genet*; 10: 330-336

Bronckers AL, Lyaruu DM, Wöltgens JH: Immunohistochemistry of extracellular matrix proteins during various stages of dentinogenesis. *Connect Tissue Res* 22: 65-70

Browne RM (1975): The pathogenesis of odontogenic cysts. *J Oral Pathol*; 4(1):31-46

Butler WT, Birkedal-Hansen H, Beegle WF, Taylor RE, Chung E (1975): Proteins of the periodontium. Identification of collagens with the [alpha1 (I)] 2alpha2 and [alpha1 (III)] 3 structures in bovine periodontal ligament. *J Biol Chem*; 250(23): 8907-8912

Caterson B, Flannery CR, Hughes CE, Little CB (2000): Mechanisms involved in cartilage proteoglycan catabolism. *Matrix Biol*; 19(4): 333-344

Chen J, McCulloch CA, Sodek J (1993): Bone sialoprotein in developing porcine dental tissues: cellular expression and comparison of tissue localization with osteopontin and osteonectin. *Arch Oral Biol*; 38(3): 241-249

Church DM, Goodstadt L, Hillier LW, Zody MC, Goldstein S, She X, Bult CJ, Agarwala R, Cherry JL, DiCuccio M, Hlavina W, Kapustin Y, Meric P, Maglott D, Birtle Z, Marques AC, Graves T, Zhou S, Teague B, Potamosis K, Churas C, Place M, Herschleb J, Runnheim R, Forrest D, Amos-Landgraf J, Schwartz DC, Cheng Z, Lindblad-Toh K, Eichler EE, Ponting CP; Mouse Genome Sequencing Consortium (2009): Lineage-specific biology revealed by a finished genome assembly of the mouse. *PLoS Biol*; 7(5)

Coady JM, Toto PD, Santangelo MV (1967): Histology of the mouse incisor. *J Dent Res*; 46(2): 384-388

Coatoam GW, Behrents RG, Bissada NF (1981): The width of keratinized gingiva during orthodontic treatment: its significance and impact on periodontal status. *J Periodontol*; 52(6): 307-313

Colognato H, Yurchenco PD (2000): Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev Dyn*; 218(2): 213-234

Costell M, Gustafsson E, Aszódi A, Mörgelin M, Bloch W, Hunziker E, Addicks K, Timpl R, Fässler R (1999): Perlecan maintains the integrity of cartilage and some basement membranes. *J Cell Biol*; 147(5): 1109-1122

Dangaria SJ, Ito Y, Walker C, Druzinsky R, Luan X, Diekwisch TG (2009): Extracellular matrix-mediated differentiation of periodontal progenitor cells. *Differentiation*; 78(2-3):79-90

Dedhar S, Jewell K, Rojiani M, Gray V (1992): The receptor for the basement membrane glycoprotein entactin is the integrin alpha 3/beta 1. *J Biol Chem*; 267(26): 18908-18914

Edmunds RS, Simmons TA, Cox CF, Avery JK (1979): Light and ultrastructural relationship between oxytalan fibers in the periodontal ligament of the guinea pig. *J Oral Pathol*; 8(2): 109-120

Ekblom P, Timpl R (1996): The Laminins. Harwood Academic Press, Amsterdam, The Netherlands, 1-321

Everts V, Schutter M, Niehof A (1995): Proteoglycans in cementum- and enamel-related predentin of young mouse incisors as visualized by cuproinic blue. *Tissue Cell*; 27(1): 55-60

Everts V, Niehof A, Jansen D, Beertsen W (1998): Type VI collagen is associated with microfibrils and oxytalan fibers in the extracellular matrix of periodontium, mesenterium and periosteum. *J Periodontal Res*; 33(2): 118-125

Fischer, G (1932): Über die Bedeutung des Epithels im periodontalen Raum menschlicher und tierischer Zähne, *Vierteljahrschr. Zahn.* 48: 413-425

Font B, Aubert-Foucher E, Goldschmidt D, Eichenberger D, van der Rest M (1993): Binding of collagen XIV with the dermatan sulfate side chain of decorin. *J Biol Chem*; 268(33): 25015-25018

Font B, Eichenberger D, Rosenberg LM, van der Rest M (1996): Characterization of the interactions of type XII collagen with two small proteoglycans from fetal bovine tendon, decorin and fibromodulin. *Matrix Biol*; 15(5): 341-348

Gersdorff N, Otto S, Roediger M, Kruegel J, Miosge N (2007): The absence of one or both nidogens does not alter basement membrane composition in adult murine kidney. *Histol Histopathol*; 22: 1077-1084

Govindraj P, West L, Koob TJ, Neame P, Doege K, Hassell JR (2002): Isolation and identification of the major heparan sulfate proteoglycans in the developing bovine rib growth plate. *J Biol Chem*; 277(22): 19461-19469

Grant DA, Bernick S (1969): A possible continuity between epithelial rests and epithelial attachment in miniature swine. *J Periodontol*; 40(2): 87-95

Hallmann R, Horn N, Selg M, Wendler O, Pausch F, Sorokin LM (2005): Expression and function of laminins in the embryonic and mature vasculature. *Physiol Rev*; 85(3): 979-1000

Hamamoto Y, Nakajima T, Ozawa H (1989): Ultrastructure of epithelial rests of Malassez in human periodontal ligament. *Arch Oral Biol*; 34: 179–185

Hamamoto Y, Suzuki I, Nakajima T, Ozawa H (1991): Immunocytochemical localization of laminin in the epithelial rests of Malassez of immature rat molars. *Arch Oral Biol*; 36: 623–626

Harada H, Oshima H (2004): New perspectives on tooth development and the dental stem cell niche. *Arch Histol Cytol*; 67(1): 1-11

Haruyama N, Sreenath TL, Suzuki S, Yao X, Wang Z, Wang Y, Honeycutt C, Iozzo RV, Young MF, Kulkarni AB (2009): Genetic evidence for key roles of decorin and biglycan in dentin mineralization. *Matrix Biol*; 28: 129-136

Hassell J, Yamada Y, Arikawa-Hirasawa E (2002): Role of perlecan in skeletal development and diseases. *Glycoconj J*; 19(4-5): 263-267

Hassell TM (2000): Tissues and cells of the periodontium. *Periodontol*; 3: 9-38

Hedbom E, Heinegård D (1993): Binding of fibromodulin and decorin to separate sites on fibrillar collagens. *J Biol Chem*; 268(36): 27307-27312

Hellwig E, Klimek J, Attin Th (1999): Einführung in die Zahnheilkunde, Urban & Fischer Verlag, München-Jena

Hildebrand A, Romarís M, Rasmussen LM, Heinegård D, Twardzik DR, Border WA, Ruoslahti E (1994): Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta. *Biochem J*; 302: 527-534

Huang YH, Ohsaki Y, Kurisu K (1991): Distribution of type I and type III collagen in the developing periodontal ligament of mice. *Matrix*; 11(1): 25-35

Iozzo RV, Moscatello DK, McQuillan DJ, Eichstetter I (1999): Decorin is a biological ligand for the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem*; 274(8): 4489-4492

Jimenez-Mallebrera C, Brown SC, Sewry CA, Muntoni F (2005): Congenital muscular dystrophy: molecular and cellular aspects. *Cell Mol Life Sci*; 62(7-8): 809-823

Jonas IE, Riede UN (1980): Reaction of oxytalan fibers in human periodontium to mechanical stress. A combined histochemical and morphometric analysis. *J Histochem Cytochem*

Kalykakis G.K, Zafiropoulos G.-G.K, Spiekermann H, Romanos G.E (1993): Structural characteristics of the health gingiva and periimplant mucosa.

Stomatol 90/7: 367 - 401

Kapila YL, Kapila S, Johnson PW (1996): Fibronectin and fibronectin fragments modulate the expression of proteinases and proteinase inhibitors in human periodontal ligament cells. Matrix Biol; 15(4): 251-261

Karimbux NY, Nishimura I (1995): Temporal and spatial expressions of type XII collagen in the remodeling periodontal ligament during experimental tooth movement. J Dent Res; 74(1): 313-318

Kefalides NA (1969): The chemistry and structure of basement membranes. Arthritis Rheum 12: 427-443

Kefalides NA (1973): Structure and biosynthesis of basement membranes. Int Rev Connect Tissue Res; 6: 63-104

Kefalides NA, Winzler RJ (1966): The chemistry of glomerular basement membrane and its relation to collagen. Biochemistry 5:702,713

Khoshnoodi J, Pedchenko V, Hudson BG (2008): Mammalian collagen IV. Microsc Res Tech; 71(5): 357-370

Kohfeldt E, Sasaki T, Göhring W, Timpl R (1998): Nidogen-2: a new basement membrane protein with diverse binding properties. J Mol Biol; 282(1): 99-109

Kosmehl H, Berndt A, Strassburger S, Borsi L, Rousselle P, Mandel U, Hyckel P, Zardi L, Katenkamp D (1999): Distribution of laminin and fibronectin isoforms in oral mucosa and oral squamous cell carcinoma. Br J Cancer; 81(6): 1071-1079

Kramer JM (2005): Basement membranes. WormBook; 1: 1-15

Lartschneider J (1929): Die Pathogenese, pathologische Anatomie, Prognose und Therapie, der folliculären Zahncysten. *Stomatol* 27: 210-238

Laurie GW, Leblond CP (1985): Basement membrane nomenclature. *Nature*; 313(6000):272

Lehmann, Hellwig: Zahnärztliche Propädeutik, Urban & Fischer Verlag, München-Jena 2002

Lillie R. D (1954): Histopathologic Technic and Practical Histochemistry, Blakiston, New York, 33-34

Lukinmaa PL, Mackie EJ, Thesleff I (1991): Immunohistochemical localization of the matrix glycoproteins--tenascin and the ED-sequence-containing form of cellular fibronectin--in human permanent teeth and periodontal ligament. *J Dent Res*; 70(1): 19-26

Malassez L (1885): Sur l'existence d'amas epitheliaux autour de la racine des dents chez l'homme adulte et a l'etat normal (debris epitheliaux paradentaires). *Arch Physiol*; 5: 129–148

Martin GR, Timpl R (1987): Laminin and other basement membrane components. *Annu Rev Cell Biol*; 3: 57-85

Melrose J, Smith S, Knox S, Whitelock J (2002): Perlecan, the multidomain HS-proteoglycan of basement membranes, is a prominent pericellular component of ovine hypertrophic vertebral growth plate and cartilaginous endplate chondrocytes. *Histochem Cell Biol*; 118(4): 269-280

Meyer, W (1932): Lehrbuch der Normalen Histologie und Entwicklungsgeschichte des Zahne des Menschen, J. F. Lehmanns Verlag, München

Miner JH, Yurchenco PD (2004): Laminin functions in tissue morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*; 20: 255-284

Murshed M, Smyth N, Miosge N, Karolat J, Krieg T, Paulsson M, Nischt R (2000): The absence of nidogen 1 does not affect murine basement membrane formation. *Mol Cell Biol*; 20(18):7007-7012

Mutschelknauss R E (2000): Lehrbuch der klinischen Parodontologie, Quintessenz Verlags-GmbH, Berlin

Müller H (2001): Parodontologie, Thieme Verlag, Stuttgart, New York

Nanci Antonio (2003): Ten Cate`s Oral Histology, Mosby, Inc

Nanci A, Bosshardt DD (2006): Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontol 2000*; 40: 11-28

Noonan DM, Hassell JR (1993): Perlecan, the large low-density proteoglycan of basement membranes: structure and variant forms. *Kidney Int*; 43(1): 53-60

Noonan DM, Fulle A, Valente P, Cai S, Horigan E, Sasaki M, Yamada Y, Hassell JR (1991): The complete sequence of perlecan, a basement membrane heparan sulfate proteoglycan, reveals extensive similarity with laminin A chain, low density lipoprotein-receptor, and the neural cell adhesion molecule. *J Biol Chem*; 266(34): 22939-22947

Oldberg A, Antonsson P, Lindblom K, Heinegård D (1992): COMP (cartilage oligomeric matrix protein) is structurally related to the thrombospondins. *J Biol Chem*; 267(31): 22346-22350

Orban, B (1929): Epithelial Rests in the Teeth and Their Supporting Structures, Proc. Am. Ass. Dent. Schools, 5th Ann. Meet., Washington, D. C., 121, 129,

Oshima M, Yamaguchi Y, Micke P, Abiko Y, Otsuka K (2008): In vitro characterization of the cytokine profile of the epithelial cell rests of Malassez. J Periodontol; 79(5): 912-919

Peterková R, Peterka M, Vonesch JL, Ruch JV (1995): Contribution of 3-D computer-assisted reconstructions to the study of the initial steps of mouse odontogenesis. Int J Dev Biol; 39(1): 239-247

Posey KL, Hecht JT (2008): The role of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) in skeletal disease. Curr Drug Targets; 9(10): 869-877

Posey KL, Yang Y, Veerisetty AC, Sharan SK, Hecht JT (2008): Model systems for studying skeletal dysplasias caused by TSP-5/COMP mutations. Cell Mol Life Sci; 65(5):687-699

Pöschl E, Schlötzer-Schrehardt U, Brachvogel B, Saito K, Ninomiya Y, Mayer U (2004): Collagen IV is essential for basement membrane stability but dispensable for initiation of its assembly during early development. Development; 131(7): 1619-1628

Pratta MA, Yao W, Decicco C, Tortorella MD, Liu RQ, Copeland RA, Magolda R, Newton RC, Trzaskos JM, Arner EC (2003): Aggrecan protects cartilage collagen from proteolytic cleavage. J Biol Chem; 278(46): 45539-45545

Renggli HH, Allet B, Spanauf AJ (1984): Splinting of teeth with fixed bridges: biological effect. J Oral Rehabil; 11(6): 535-537

Rincon JC, Young WG, Bartold PM (2006): The epithelial cell rests of Malassez – a role in periodontal regeneration? J Periodont Res; 41: 245–252

Sahlberg C, Hormia M, Airene T, Thesleff I (1998): Laminin gamma2 expression is developmentally regulated during murine tooth morphogenesis and is intense in ameloblasts. J Dent Res; 77: 1589-1596

Sampson WJ (1979): A comparative light microscopic evaluation of oxytalan fiber staining with a variety of dye substances. *Stain Technol*; 54(4): 181-191

Sandy JD (2006): A contentious issue finds some clarity: on the independent and complementary roles of aggrecanase activity and MMP activity in human joint aggrecanolytic. *Osteoarthritis Cartilage*; 14(2):95-100

Schmidt G, Robenek H, Harrach B, Glössl J, Nolte V, Hörmann H, Richter H, Kresse H (1987): Interaction of small dermatan sulfate proteoglycan from fibroblasts with fibronectin. *J Cell Biol*; 104(6): 1683-1691

Schroeder H E (2000): *Orale Strukturbiologie*. 5. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart-New York

Schroeder H E (1982): *Orale Strukturbiologie*. 2. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart-New York

Schroeder HE, Listgarten MA (1971): Fine structure of the developing epithelial attachment of human teeth. *Monogr Dev Biol*; 2: 1-134

Scott JE, Orford CR (1981): Dermatan sulphate-rich proteoglycan associates with rat tail-tendon collagen at the d band in the gap region. *Biochem J*; 197(1): 213-216

Schroeder HE, Theilade J (1966): Electron microscopy of normal human gingival epithelium. *J Periodontal Res*; 1(2):95-119

Sehic A, Khuu C, Risnes S, Osmundsen H (2009): Differential gene expression profiling of the molar tooth germ in peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPAR-alpha) knockout mouse and in wild-type mouse: molar tooth phenotype of PPAR-alpha knockout mouse. *Eur J Oral Sci*; 117: 93-104

Serres A (1817): *Essai sur L'anatomie et la physiologie des dents ou nouvelle theorie de la dentition*. Mequignon-Marvis, Paris

Siebold B, Deutzmann R, Kühn K (1988): The arrangement of intra- and intermolecular disulfide bonds in the carboxyterminal, non-collagenous aggregation and cross - linking domain of basement-membrane type IV collagen. Eur J Biochem; 176(3): 617-624

Siebold B, Qian RA, Glanville RW, Hofmann H, Deutzmann R, Kühn K (1987): Construction of a model for the aggregation and cross-linking region (7S domain) of type IV collagen based upon an evaluation of the primary structure of the alpha 1 and alpha 2 chains in this region. Eur J Biochem; 168(3): 569-575

Sims MR (1975): Oxytalan-vascular relationships observed in histologic examination of the periodontal ligaments of man and mouse. Arch Oral Biol; 20(11): 713-716

Smith CE, Warshawsky H (1975): Histological and three dimensional organization of the odontogenic organ in the lower incisor of 100 gram rats. Am J Anat; 142(4): 403-429

Smith CE, Warshawsky H (1976): Movement of entire cell populations during renewal of the rat incisor as shown by radioautography after labeling with 3H-thymidine. The concept of a continuously differentiating cross-sectional segment. (With an appendix on the development of the periodontal ligament). Am J Anat; 145(2): 225-259

Sodek J, Brunette DM, Feng J, Heersche JN, Limeback HF, Melcher AH, Ng B (1977): Collagen synthesis is a major component of protein synthesis in the periodontal ligament in various species. Arch Oral Biol; 22(12): 647-653

Spouge JD (1984): The rests of Malassez and chronic marginal periodontitis. J Clin Periodontol; 11: 340–347

Steffensen B, Duong AH, Milam SB, Potempa CL, Winborn WB, Magnuson VL, Chen D, Zardeneta G, Klebe RJ (1992): Immunohistological localization of cell adhesion proteins and integrins in the periodontium. J Periodontol; 63(7): 584-592

SundarRaj N, Fite D, Ledbetter S, Chakravarti S, Hassell JR (1995): Perlecan is a component of cartilage matrix and promotes chondrocyte attachment. *J Cell Sci*; 108:2663-7672

Ten Cate AR (1972): The epithelial cell rests of Malassez and the genesis of the dental cyst. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*; 34(6): 956-964

Theilade J (1964): Electron microscopic study of calculus attachment to smooth surfaces. *Acta Odontol Scand*; 22: 379-87

Thyboll J, Kortesmaa J, Cao R, Soininen R, Wang L, Iivanainen A, Sorokin L, Risling M, Cao Y, Tryggvason K (2002): Deletion of the laminin alpha4 chain leads to impaired microvessel maturation. *Mol Cell Biol*; 22(4): 1194-202

Timpl R (1989): Structure and biological activity of basement membrane proteins. *Eur J Biochem*; 180(3): 487-502

Timpl R, Dziadek M, Fujiwara S, Nowack H, Wick G: Nidogen (1983): a new, self-aggregating basement membrane protein. *Eur J Biochem*; 137(3): 455-565

Timpl R, Rohde H, Robey PG, Rennard SI, Foidart JM, Martin GR (1979): Laminin--a glycoprotein from basement membranes. *J Biol Chem*; 254(19): 9933-9937

Timpl R, Wiedemann H, van Delden V, Furthmayr H, Kühn K (1981): A network model for the organization of type IV collagen molecules in basement membranes. *Eur J Biochem*; 120(2): 203-211

Tremble P, Chiquet-Ehrismann R, Werb Z (1994): The extracellular matrix ligands fibronectin and tenascin collaborate in regulating collagenase gene expression in fibroblasts. *Mol Biol Cell*; 5(4): 439-453

Valderhaug JP, Nylen MU (1966): Function of epithelial rests as suggested by their ultrastructure. *J Periodont Res*; 1: 69–78

Valderhaug J, Zander HA (1967): Relationship of epithelial rests of Malassez to other periodontal structures. *Periodontics*; 5: 254–258

Viguet-Carrin S, Garnero P, Delmas PD (2006): The role of collagen in bone strength. *Osteoporos Int*; 17(3):319-336

Vogel KG, Paulsson M, Heinegård D (1984): Specific inhibition of type I and type II collagen fibrillogenesis by the small proteoglycan of tendon. *Biochem J*; 223(3): 587-597

von Brunn A (1887): Über die Ausdehnung des Schmelzorgans und seine Bedeutung für die Zahnbildung, *Arch. f. mi/kr. Anat.* 29: 367-383

Vracko R (1974): Basal lamina scaffold-anatomy and significance for maintenance of orderly tissue structure. *Am J Pathol*; 77(2): 314-346

Wang XP, Suomalainen M, Jorgez CJ, Matzuk MM, Werner S, Thesleff I (2004): Follistatin regulates enamel patterning in mouse incisors by asymmetrically inhibiting BMP signaling and ameloblast differentiation. *Dev Cell*; 7(5): 719-730

Weber S, Dölz R, Timpl R, Fessler JH, Engel J (1988): Reductive cleavage and reformation of the interchain and intrachain disulfide bonds in the globular hexameric domain NC1 involved in network assembly of basement membrane collagen (type IV). *Eur J Biochem*; 175(2): 229-236

Whinna HC, Choi HU, Rosenberg LC, Church FC (1993): Interaction of heparin cofactor II with biglycan and decorin. *J Biol Chem*; 268(6): 3920-3924

Whitelock JM, Melrose J, Iozzo RV (2008): Diverse cell signaling events modulated by perlecan. *Biochemistry*; 47(43): 11174-11183

Winnemöller M, Schön P, Vischer P, Kresse H (1992): Interactions between thrombospondin and the small proteoglycan decorin: interference with cell attachment. *Eur J Cell Biol*; 59(1): 47-55

Wolf H F, Rateitschak K H, Rateitschak E M (2003): 3. Auflage. Thieme Verlag, Stuttgart-New York

Yamasaki A, Pinero GJ (1989): An ultrastructural study of human epithel rests of Mallasez maintained in a differentiated state in vitro. *Arch Oral Biol*; 34: 443-451

Yuasa K, Fukumoto S, Kamasaki Y, Yamada A, Fukumoto E, Kanaoka K, Saito K, Harada H, Arikawa-Hirasawa E, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Okamoto K, Kato Y, Fujiwara T (2004): Laminin alpha2 is essential for odontoblast differentiation regulating dentin sialoprotein expression. *J Biol Chem*; 279(11):10286-10292

Zaia J, Boynton RE, McIntosh A, Marshak DR, Olsson H, Heinegård D, Barry FP (1997): Post-translational modifications in cartilage oligomeric matrix protein. Characterization of the N-linked oligosaccharides by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Biol Chem*; 272(22): 14120-14126

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Nicolai Miosge für die Überlassung des Themas und die hervorragende wissenschaftliche Betreuung.

Herrn Oberarzt Dr. Nikolaus Gersdorff danke ich für seine Unterstützung meiner Arbeit und die Übernahme der Betreuung.

Ein herzliches Dankeschön gilt allen wissenschaftlichen Mitarbeitern der Abteilung, insbesondere Frau Boguscha Sadowski , Frau Jenny Krügel sowie Herrn Sebastian Kölling, die mir stets hilfsbereit und geduldig mit Rat und Tat zur Seite standen.

Meiner Kollegin und Freundin Anna Maria Entorf möchte ich für die vielen gemeinsamen Stunden im Labor danken.

Lebenslauf

Am 03. Februar 1981 wurde ich in Bad Harzburg als erstes Kind der Eheleute Bärbel Tilpe, geb. Matheisl, z. Zt. Hausfrau, und Ulrich Tilpe, z. Zt. Automobilkaufmann, geboren.

Von 1987 bis 1991 besuchte ich die Gerhard-Hauptmann Grundschule in Bad Harzburg, von 1991 bis 1993 die Orientierungsstufe Deilich in Bündheim und im Anschluss daran von 1993 bis 2000 das Werner-von-Siemens-Gymnasium in Bad Harzburg, wo ich im Frühjahr 2000 mein Abitur absolvierte.

In demselben Jahr begann ich eine Ausbildung zur Reiseverkehrskauffrau, die ich im Januar 2003 erfolgreich abschloss.

Darauffolgend, im April 2003, begann ich mein Studium der Zahnheilkunde an der Georg-August-Universität zu Göttingen. Die naturwissenschaftliche Vorprüfung absolvierte ich im März 2004, die zahnärztliche Vorprüfung im September des Jahres 2005.

Meine Dissertation begann ich im Oktober 2006 bei Herrn Prof. Dr. med. Nicolai Miosge in der Abteilung Prothetik des Zentrums für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde. Im Juli 2008 beendete ich an der Georg-August-Universität erfolgreich mein Staatsexamen. Seit September 2008 bin ich als wissenschaftliche Mitarbeiterin der Abteilung Prothetik des Universitätsklinikums Göttingen beschäftigt.