

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Direktor: Prof. Dr. med. H. Dralle



**Expressionsnachweis der Wachstumsfaktoren
IGF1 Ligand, IGF Bindungsprotein 3 und IGF1 Rezeptor α
in menschlichen Weisheitszähnen**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Zahnmedizin (Dr. med. dent.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Stefan Ahrens
geboren am 08.03.1972 in Halle

Gutachter: 1. Prof. Dr. H. Dralle
 2. Prof. Dr. Dr. K.-L. Gerlach
 3. Prof. Dr. Dr. J. Schubert

Datum der Verteidigung: 18. Oktober 2005

urn:nbn:de:gbv:3-000009226

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000009226>]

Referat und bibliografische Beschreibung

In jüngster Zeit fokussiert sich die Erforschung der Zahnentwicklung auf die Rolle von Signalmolekülen und Transkriptionsfaktoren. Das dazu gehörende IGF-System aus der Familie der Wachstumsfaktoren ist ein integraler Bestandteil der Regulierung des postnatalen Körperwachstums. Es ist ubiquitär verbreitet und spielt eine Rolle in jedem Gewebe des Körpers.

Aufgrund der Durchbruchstendenzen von impaktierten Weisheitszähnen, die auch nach Abschluss des Körperwachstums anhalten, wurde in dieser Arbeit die mRNA- und die Proteinexpression von IGF1 Ligand (IGF1), IGF1 Bindungsprotein 3 (IGFBP3) und IGF1 Rezeptor α (IGF1R α) untersucht. Zur Verwendung kamen 60 operativ entfernte, impaktierte Weisheitszähne der Altersgruppen (AG) unter 18 Jahren (J.), 18–22J. sowie über 22J. In einem ersten Schritt wurden mittels RT-PCR die Transkriptionslevel der drei Gene am homogenisierten Zahngewebe von jeweils 48 Zähnen ermittelt. Ergänzend erfolgte ein immunhistochemischer Lokalisationsnachweis nach der Avidin/Biotin Komplex-Methode an Gefrierschnitten von 12 unentkalkten Zähnen im Bereich des offenen Foramen apicale.

Die RT-PCR-Analytik zeigte, dass IGF1-mRNA in allen Altersgruppen hoch, IGFBP3 und IGF1R α -mRNA hingegen signifikant schwächer exprimiert werden. In der AG 18-22 J. ist die IGF1-Transkriptionsrate gegenüber den benachbarten AG nichtsignifikant erhöht. Sogar in der AG über 22J. ist die Transkription mäßig stark. IGFBP3-mRNA zeigt in der AG bis 18J. eine mäßige, in den höheren AG weiter sinkende Expressionen. IGF1R α -mRNA zeigt in der AG bis 18J. eine schwache, danach weiter sinkende Expression.

Proteine von IGF1 wurden im Bereich des Foramen apicale zumeist mäßig stark exprimiert. Die Expression von IGFBP3 und IGF1R α war überwiegend niedrig. Die Immunreaktivität war beschränkt auf beide Zellpole innerhalb der Odontoblastenzellreihe und auf deren Fortsätze ins Dentin sowie auf Zementozyten/-blasten des Zahnhalteapparates, proliferierende Fibroblasten in der Umgebung von Nerven und Gefäßen und solitäre Zellhaufen innerhalb des Pulpamesenchyms.

Die im Rahmen dieser Studie gewonnenen Daten haben verdeutlicht, dass IGF1, IGFBP3 und IGF1R α mit der späten Odontogenese und den lebenslang andauernden Umbauprozessen in der Pulpa-Dentin-Einheit assoziiert sind.

Ahrens, Stefan: Expressionsnachweis der Wachstumsfaktoren IGF1 Ligand, IGF Bindungsprotein 3 und IGF1 Rezeptor α in menschlichen Weisheitszähnen.

Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 71 Seiten, 2004

Abstract

Introduction: The insulin-like growth factor 1 (IGF1) is a regulator of cell growth and cell differentiation. Furthermore, IGF1 regulates bone and hard tissue metabolism through binding to the IGF1 receptor α (IGF1R α) on target cells. The IGF binding protein 3 (IGFBP3) regulates the accessibility of IGF1 and its interaction with IGF1R α . **Objectives:** The aim of the study was to investigate the expression of IGF1, IGFBP3 and IGF1R α during the late stages of human third molar odontogenesis and dentition. **Materials and Methods:** Human third molars with unfinished root growth were obtained (n=60). The patient's age ranged from 15 to 67 years. We examined the expression of the three proteins by employing RT-PCR in n=48 specimen and by immunohistochemistry of apical frozen sections in n=12 specimen. **Results:** Transcripts were detectable in all teeth, irrespective of age. IGF1 mRNA was strongly expressed. The strongest IGF1-expression was found among teeth obtained from patients of 18-22 years age. Interestingly, in patients >22 years the expression remains at moderate levels. By contrast IGFBP3 and IGF1R α mRNA showed significantly weaker expression profiles. Both, IGFBP3 and IGF1R α showed moderate expression in patients <18 years, while decreasing in higher age. Immunoreactivity was detected in odontoblasts as well as in cementocytes/cementoblasts. IGF1 protein expression was moderate. IGFBP3 displayed an insignificant lower and IGF1R α a significant lower protein expression. **Conclusion:** The data suggest an important involvement of IGF1 family members in human third molar teeth odontogenesis and dentition. A lifelong sensitivity of odontoblasts and pulp cells to IGF1 is reasonable and could be the subject of further therapy related studies.

Ahrens, Stefan: Expression of Insulin like growth factor 1 (IGF1), IGF binding protein 3 (IGFBP3) and IGF receptor α (IGF1R α) in human wisdom teeth. Halle University, Medical Faculty, PhD, 71 pages, 2004

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	VI
1 Einleitung.....	1
1.1 Allgemeine Grundlagen der interzellulären Signalübertragung	1
1.1.1 Das IGF1 –System	3
1.1.2 IGF1 Ligand	5
1.1.3 IGF1 Bindungsprotein 3.....	6
1.1.4 IGF1 Rezeptor	7
1.1.5 Die Rolle des IGF-Systems bei der Zahnentwicklung	8
1.2 Allgemeine Grundlagen der Zahnentwicklung und Zahnalterung	9
1.2.1 Zeitablauf der Zahnentwicklung und Extraktionsgründe	10
1.2.2 Entwicklung des Zahnschmelzes.....	11
1.2.3 Entwicklung der Pulpa-Dentin-Einheit	12
1.2.4 Entwicklung des Zahnhalteapparates.....	16
2 Zielstellung der Arbeit	17
3 Material und Methodik	18
3.1 Weisheitszähne	18
3.2 RT-PCR	20
3.2.1 RNA-Präparation	20
3.2.2 cDNA-Synthese	20
3.2.3 PCR	21
3.2.4 Auswertung.....	22
3.3 Immunhistochemie.....	23
3.3.1 Gewebe	23
3.3.2 Mikroskopische Auswertung	24

4	Ergebnisse.....	26
4.1	RT-PCR	26
4.1.1	RT-PCR für IGF1 Ligand	26
4.1.2	RT-PCR für IGF1 Bindungsprotein 3	28
4.1.3	RT-PCR für IGF1 Rezeptor α	30
4.1.4	Gesamtübersicht der mRNA-Expression in der RT-PCR	33
4.2	Immunhistochemie.....	35
4.2.1	Proteinexpression für IGF1 Ligand	35
4.2.2	Proteinexpression für IGF1 Bindungsprotein 3.....	37
4.2.3	Proteinexpression für IGF1 Rezeptor α	40
4.2.4	Gesamtübersicht der Proteinexpression.....	42
5	Diskussion.....	43
5.1	Diskussion der Gewebeauswahl und der Methodik.....	43
5.2	Diskussion der Untersuchungsergebnisse	45
5.3	Diskussion der Klinischen Relevanz, Rolle der Wachstumsfaktoren beim Tissue Engineering und in Stammzellen	49
6	Zusammenfassung	54
7	Literaturverzeichnis	56
8	Thesen	70
	Lebenslauf.....	72
	Selbstständigkeitserklärung.....	73
	Publikationen	74
	Danksagung	75

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ABC	Avidin-Biotin-Komplex
ALS	Acid-labile Subunit, Säure-instabile Untereinheit
ATP	Adenosintriphosphat
BMP	Bone Morphogenetic Protein, Knochenzellwachstumsfaktor
BMSSCs	Bone Marrow Stromal Stem Cells, Knochenmarkstammzellen
bp	base pairs, Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin, Rinderserumalbumin
Ca ²⁺	Kalzium (II)-Ion
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA
°C	Grad Celsius
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxy Ribonucleic Acid, Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
DPSCs	Dental Pulpal Stem Cells, Zahnpulpastammzellen
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraazetessigsäure, Chelatbildner
Fa.	Firma
FGF	Fibroblast Growth Factor, Fibroblastenwachstumsfaktor
GBR	Guided Bone Regeneration, gesteuerte Knochenregeneration
GH	Growth Hormone, Wachstumshormon
GTR	Guided Tissue Regeneration, gesteuerte Geweberegeneration
IGF	Insulin-like Growth Factor, Insulinähnlicher Wachstumsfaktor
IGF1	IGF1 Ligand
IGFBP3	IGF1 Bindungsprotein 3
IGF1R α	IGF1 Rezeptor α
kDa	Kilodalton
μ g / l	Mikrogramm pro Liter
min	Minuten
ml	Milliliter
mRNA	messenger-RNA
MTA	Mineral Trioxide Aggregate, mineralisches Trioxidaggregat
ng	Nanogramm
OPE	Odontoblasten-Proteinexpression
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerase Kettenreaktion
PBS	Phosphate Buffered Saline, Phosphatgepufferte Salzlösung
RNA	Ribonucleic Acid, Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomal-RNA
RT	Reverse Transkription
sec	Sekunden
STH	Somatotropes Hormon
TGF	Transforming Growth Factor, Umwandlungsfaktor
TBE	Tris-, Borsäure-, EDTA-Lösung
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor, Gefäßendothel-Wachstumsfaktor

1 Einleitung

Die Initiation der Zahnentwicklung, die Morphogenese und die Differenzierung der Zahnanlage sowie die Eruption der ausgebildeten Zähne sind entwicklungsbiologische Prozesse. Sie erfolgen nach einem genetisch streng determinierten Muster und stellen einen multifaktoriell beeinflussten Prozess dar (*Philbrick et al. 1998; Rani, MacDougall 2000; Slavkin et al. 1992; Takahashi et al. 1998; Thomas et al. 1998*). Zahnentwicklung erfordert die Interaktion einer Vielzahl bereits identifizierter Gene (*Peters, Balling 1999; Thesleff 2000*). Als Bestandteil des Cranio-Mandibulären Systems sind die menschlichen Zähne nach ihrer Dentition Körperteile mit wichtigen Funktionen bei der Nahrungsaufnahme und der Phonation. An der Grenze zur extrakorporalen Umgebung müssen sie gewebelastenden Einflüssen standhalten. Sie stehen über fein abgestimmte mikrobiologische, sekretorische, neuronale oder muskulär ausbalancierte Systeme in enger Wechselbeziehung zum gesamten Körper (*Kopp 2002; Siebert 1992; Meyer 2001; Hoffmann 2000*).

1.1 Allgemeine Grundlagen der interzellulären Signalübertragung

Komplexe Organismen wie Säugetiere benutzen vornehmlich das Nervensystem und das endokrine System zur internen Informationsübertragung. Der Hypothalamus ist dabei die zentrale Region des vegetativen Nervensystems. Er beeinflusst und koordiniert über seine Verbindungen zur Hypophyse auch das endokrin-vaskuläre System. Dem Hypothalamus ist die Hypophysendrüse nachgeordnet. Sie steuert mit ihren glandotropen Hormonen die meisten peripheren Drüsen. Ein unter dem Einfluss von Somatostatin und Somatoliberein gebildetes Produkt der azidophilen Zellen des Vorderlappens ist das Somatotrope Hormon (STH) oder Growth Hormone (GH). Das einkettige Protein aus 191 Aminosäuren besitzt eine in hohem Maße artspezifische Sequenz und vermittelt seine Effekte auf eine Vielzahl von Zielzellen hauptsächlich über Somatomedine (*Devlin 2002*). Somatomedine werden unter STH-Einfluss in der Leber synthetisiert und wegen ihrer 50 %igen Strukturhomologie zum Insulin auch Insulin-like Growth Factors (IGFs) genannt.

Jede Zelle eines mehrzelligen Lebewesens ist während der Entwicklung auf das Beantworten spezifischer externer Signale anderer Zellen programmiert worden. Die Kommunikation erfolgt unter anderem über zirkulierende extrazelluläre Signalmoleküle und komplementäre membranständige Rezeptorproteine. Das Ende jedes intrazellulären

Signalpfades sind Zielproteine, welche verändert werden und das Verhalten der Zielzelle verändern. Die meisten Zell-Oberflächen Rezeptorproteine gehören zu einer der drei großen Klassen: Ionenkanal-Hormonrezeptoren, G-Protein-Hormonrezeptoren oder Protein-Kinasen-Hormonrezeptoren. Diesem Signalmechanismus unterliegen auch IGF1 und IGF2, sie gehören als Tyrosin-Kinasen zur Gruppe der Protein-Kinasen-Hormonrezeptoren.

Eine große Anzahl extrazellulärer sowie zelloberflächengebundener Signalproteine interagiert mit Tyrosin- oder Serin / Threonin-Kinasen-Rezeptoren. Man geht davon aus, dass zwei Prozent aller Gene nur für Proteinkinasen codieren und dass eine typische Säugetierzelle mit mehreren hundert verschiedenen Arten von Proteinkinasen versehen ist (*Alberts et al. 2002*). Tyrosin-Kinasen-Rezeptoren übermitteln Signale, welche die zellulären Prozesse der Proliferation, Differenzierung, des Metabolismus, der Endozytose und der Apoptose beeinflussen (*Rotem-Yehudar et al. 2001; Stewart, Rotwein 1996*). Tyrosinkinasen sind jedoch auch das Ziel onkogener Mutationen, die zu dysregulierter Kinaseaktivität und somit zu Tumorwachstum führen können.

Rezeptor-Tyrosin-Kinasen können in mehr als sechzehn strukturell verschiedene Unterfamilien klassifiziert werden, jede davon reagiert mit der komplementären Familie von Protein-Liganden (*Alberts et al. 2002*). Immer jedoch führt die Bindung eines Signalproteins an die extrazelluläre Ligand-bindende Domäne zu einer Aktivierung der intrazellulären Kinase-Domäne. Die Dissoziationskonstanten derartiger Komplexe liegen bezeichnenderweise in Bereichen, die den nanomolaren Konzentrationen von Hormonen im Blut entsprechen (*Kleinig, Sitte 1999*).

Beim Rezeptor für Insulin und IGF erfahren die zwei transmembranösen Rezeptorketten nach Ligandenbindung eine Annäherung und Konformationsänderung. Um diese Änderung auch über die Lipidmembran ins Zytosol hineinzutragen, schließen sich die beiden Dimer-Rezeptorketten zu einem Tetramer zusammen. Die intrazelluläre Kinase-Domäne transferiert eine Phosphatgruppe zu bestimmten Tyrosin-Seitenketten. Die daraufhin andockenden Proteine des Insulin-Rezeptor-Substrates-1 stellen zusätzliche Phosphorylierungsstellen zur Verfügung. Damit ist eine zytoplasmatische Phosphorylationskaskade angestoßen. Dieser Zustand ist durch Proteinphosphatasen umkehrbar. Die Zellantwort auf Wachstumsfaktoren ist typischerweise sehr langsam und liegt im Stundenbereich, sie erfordert mehrere intrazelluläre Signalschritte, welche oft zu einer veränderten Genexpression führen (*Alberts et al. 2002*).

1.1.1 Das IGF1 –System

Die Polypeptide Insulin-Like Growth Factor 1 (IGF1) und Insulin-Like Growth Factor 2 (IGF2) wurden 1978 isoliert und sequenziert (*Rinderknecht, Humbel 1978a,b*). Sie wurden nach ihrer Primärstruktur-Homologie zu Insulin benannt. Die Primärstruktur des Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 3 (IGFBP3) wurde 1988 determiniert (*Wood et al. 1988*), die des Insulin-Like Growth Factor Receptor (IGF1R) 1986 (*Ullrich et al. 1986*).

Die teilweise Strukturhomologie zwischen IGF und Insulin befähigt IGF1, mit deutlich niedrigerer Affinität an den Rezeptor für Insulin zu binden. Während Insulin primär in Leber, Muskel und Fettgewebe agiert (*Kahn 1985*), sind die insulinähnlichen Wachstumsfaktoren bedeutend für die Funktion fast eines jeden Organs im Körper (*Daughaday, Rotwein 1989*). Die metabolischen Mechanismen von Insulin und IGFs unterscheiden sich deutlich voneinander.

Das IGF-System zählt zur Familie der Wachstumsfaktoren und ist ein integraler Bestandteil der Regulierung des Wachstums durch den Körper. Es ist ubiquitär verbreitet und spielt eine Rolle in jedem Gewebe des Körpers (*Le Roith 2003*). Die Bestimmung von IGF-1 und IGFBP-3 wird derzeit als die effektivste Methode zur Abklärung von Störungen der Wachstumshormonsituation wie Gigantismus, Minderwuchs oder Akromegalie klinisch angewendet. In der Regel wirken Wachstumsfaktoren spezifisch auf bestimmte Zell- oder Gewebetypen, die einen entsprechenden Rezeptor auf der Zelloberfläche zum Andocken darbieten. Sie gehören zur Gruppe der Zytokine und sind multifunktionale Botenstoffe, welche die Kommunikation zwischen Zellsystemen regeln, die Zellproliferation und Differenzierung durch Bindung an spezifische Rezeptoren fördern und stimulierende Wirkung auf die DNS-Synthese besitzen (*Alberts et al. 2002*). Man unterscheidet Wachstumsfaktoren, die mit spezifischen Zelloberflächenrezeptoren interagieren (z.B. GH), Zelloberflächen-Hormonrezeptoren (z.B. Protein-Tyrosin-Kinasen), intrazelluläre Signaltransmitter (z.B. Proteinkinasen) und Transkriptionsfaktoren (z.B. Promoter). Die meisten Faktoren vermögen sowohl zu stimulieren als auch zu hemmen. Die Wirkungen von IGFs können in Abhängigkeit vom Gewebetyp und vom physiologischen oder pathologischen Zustand durch IGFBPs entweder positiv oder negativ moduliert werden (*Rajaram et al. 1997*).

Das Vorhandensein von IGF1 und IGF2 ist essentiell für die embryonale Entwicklung (*Baker et al. 1993; Le Roith 1997*). IGF2 ist fast ausschließlich in embryonalen und neonatalen Geweben exprimiert. Nach der Geburt fällt der Pegel des nachweisbaren IGF2 signifikant ab, weshalb es als fetaler Wachstumsfaktor angesehen wird. Beide Hormone sind im nanomolaren Bereich im Blut bis in das Erwachsenenalter nachweisbar. IGF1 behält seine

dominante Rolle für die postnatale Wachstumsregulation bei. Mutationen im IGF1R-Gen können zu intrauterin und postnatal retardiertem Wachstum führen (*Abuzzahab et al. 2003*).

Freies IGF wird von sechs verschiedenen IGF-Bindungsproteinen (IGFBPs) reguliert. Diese werden, wie IGF selbst, primär in der Leber synthetisiert, aber ebenso lokal in den meisten Geweben, wo sie auto- und parakrin wirken. Sie sorgen für eine Bindung und damit ubiquitäre Verteilung über das Serum. Die Rezeptoren bewirken das Zustandekommen der Zellantwort, indem sie den Informationsübertritt über die Barriere der Lipidmembran hinaus ermöglichen.

Änderungen, welche das Gleichgewicht zwischen der IGF / IGF1R-Aktivität gegen die Funktion der IGFBPs verschieben, können am Entstehen und Fortschreiten einer Neoplasie in verschiedenen Zelltypen beteiligt sein (*Grimberg et al. 1996*). Eine reduzierte Bioaktivität von IGFBPs kann zur Karzinogenese beitragen, weil somit deren IGF-unabhängigen Effekte auf Wachstum und Apoptose schwinden.

Untersuchungen an über zwanzig Krebsarten zeigten eine Wachstumsbeschleunigung vieler Tumorzellen nach Ansprechen auf IGF; viele Krebszellen sezernieren sogar IGF1 und IGF2 selbst, um durch autokrine Beeinflussung ihr Wachstum aufrecht zu erhalten (*Khandwala et al. 2000*). Eine Vielzahl von Studien demonstrierte den Zusammenhang zwischen Konzentrationen an zirkulierendem IGF und der erhöhten Inzidenz für verschiedene Karzinomarten (*Grimberg, Cohen 1999, Ma et al. 1999, Yu et al. 1999*). In manchen Geweben ist die IGF1-Genexpression überwiegend unter der Kontrolle von anderen Hormonen als GH, so zum Beispiel Estradiol im Endometrium oder TSH in der Schilddrüse (*Khandwala et al. 2000*).

Die hepatische IGF1-Produktion wird neben der dominanten zentralen Steuerung auch durch die Ernährung beeinflusst. Tierversuche zeigten, dass die IGF-Bildungsrate durch Fasten, eingeschränkte Proteinaufnahme und durch niedrige Energiezufuhr sinkt (*Lowe et al. 1989; Straus, Takemoto 1990, 1991*).

1.1.2 IGF1 Ligand

Das Gen für IGF1 ist auf dem Chromosom 12 lokalisiert. IGF selbst besteht aus 70 Aminosäuren und besitzt eine Molmasse von 7,6 kDa. Der Aufbau des einkettigen, basischen Polypeptids ist durch fünf Domänen und drei intramolekulare Disulfidbrücken gekennzeichnet. Durch alternatives Spleißen des primären Gentranskripts werden zwei IGF1-mRNAs gebildet (*Rotwein et al. 1986*). Zwei Isoformen eines Peptidvorläufers werden translatiert: IGF-A mit 153 Aminosäuren und einer Molmasse von 17 kDa sowie IGF-B mit 195 Aminosäuren und einer Molmasse von 21,8 kDa (<http://bioinfo.weizmann.ac.il> [a]).

IGF-I ist das wichtigste an der Zellantwort auf GH beteiligte Protein und Teil der GH-IGF-Achse, auf welcher GH die Synthese von IGF1 in verschiedenen Organen im Sinne eines negativen feedback-Mechanismus stimuliert. IGF1 induziert die meisten anabolen Zellaktivitäten des zirkulierenden GH auf endokrinem, parakrinem und autokrinem Wege und beeinflusst insbesondere das Wachstum von skelettalem Gewebe, Organen und Körpergewebe (*Devlin 2002*). IGFs werden als Antwort auf eine GH-Stimulation in den Hepatozyten produziert (*Olivecrona et al. 1999*). Die Serumkonzentrationen von IGF1 und GH verlaufen parallel zueinander (*Le Roith 1997*), die Serumkonzentrationen von freiem und gebundenem IGF nehmen im Laufe der Lebensjahrzehnte kontinuierlich ab (*Gomez et al. 2003*). Zirkulierendes, freies IGF1 ist die Hauptkomponente des negativen Feedback auf die GH-Sekretion (*Muller et al. 2001*). Genetische Defekte, die mit GH assoziiert sind, gehen mit intrauterin und postnatal retardiertem Wachstum sowie Taubheit und geistiger Retardiertheit einher.

Die Strukturhomologie von IGF1 und IGF2 beträgt etwa 70%. Die Produktionsrate für IGF1 und IGF2 wurde auf 10mg und 13mg täglich berechnet (*Guler et al. 1989*). Die Konzentrationen im Serum liegen bei $218 \pm 20 \mu\text{g/l}$ (*Iglesias et al. 2001*). Diese Konzentration nimmt ab dem dreißigsten Lebensjahr pro Dekade um circa 14% ab (*Terry 2001*). Etwa 1% des IGF1 zirkuliert in freier, bioaktiver Form im Serum, 99% des IGF im Blutkreislauf und im Extrazellulärraum ist an IGFBP3 gebunden (*Gomez et al. 2003*). Dieser Dimer aus IGF–IGFBP3 bildet einen Komplex mit einer weiteren sauren Protein-Untereinheit (ALS, Acid-labile Subunit) und formt einen 150 kDa großen Trimer-Komplex (*Baxter 1994*). Diese Konfiguration verlängert die IGF1-Serumhalbwertszeit von zehn Minuten auf über fünfzehn Stunden und verhindert damit einen hypoglykämischen Effekt durch freie IGFs (*Baxter, Daughaday 1991*). Die Komplexbildung bewirkt eine Regulation der biologischen Wirkung und vermeidet pulsatile Schwankungen. Wird IGF1 aus diesem Komplex entlassen, gelangt es zu den Zielgeweben.

IGFs haben auf Zellen mitogene, lebensverlängernde und insulinähnliche Effekte (*Holzenberger et al. 2003*), welche unabdingbar für die Embryogenese und die postnatale Wachstumsphysiologie sind. Sie sind Überlebens- und Differenzierungsfaktoren für verschiedene Typen von Progenitorzellen (*Rao und Mattson 2000*). Sie beeinflussen mitotische Zellteilungen beim Übergang von der G1- zur S-Phase (*Alberts et al. 2002*). IGF1 stimuliert die Proliferation immunkompetenter Zellen (*Auernhammer, Strasburger 1995*). Monozyten aus dem peripheren Blut können mindestens drei verschiedene IGFBPs sezernieren (*Auernhammer et al. 2002*).

IGFs werden in den meisten inneren Organen auch lokal produziert (*Übersicht in: <http://bioinfo.weizmann.ac.il> [a]*). Diese lokalen IGFs sind wichtig für die Aktivität der betreffenden Organsysteme. Im Knochen regulieren GH, Parathormon und Steroidhormone die Produktion von IGF, während Steroide die Hauptregulatoren lokaler IGF-Produktion in den Gonaden sind (*Le Roith 1997*).

1.1.3 IGF1 Bindungsprotein 3

Das Gen für IGFBP3 ist auf dem Chromosom 7 lokalisiert. IGFBP3 besteht aus 291 Aminosäuren und besitzt eine Molmasse von 31,7 kDa. (*<http://bioinfo.weizmann.ac.il> [b]*)

IGFBP3 kann prinzipiell auf zwei Wegen agieren, entweder über Bindung und Signalübermittlung an Zelloberflächenrezeptoren, oder auch seltener durch direkte Interaktion mit Transkriptionsfaktoren wie TGF- β , dem stärksten bekannten Polypeptidwachstumshemmer für Epitheliale und andere Zelltypen (*Leal et al. 1997*). IGFBP3 dient als Transportmolekül und moduliert die zelluläre Verfügbarkeit von freiem IGF für Interaktionen mit IGF1 Rezeptor. Alle IGF-Bindungsproteine haben einen wachstumshemmenden Effekt, da sie IGFs kompetitiv binden und somit verhindern, dass durch Rezeptorbindung eine intrazelluläre Phosphorylationskaskade ausgelöst wird (*Grimberg, Cohen 2000*). Die zelluläre Verfügbarkeit von freiem IGF für Interaktionen mit IGF1 Rezeptor wird von IGFBPs limitiert. IGFBP3 ist im postnatalen Serum das am weitesten verbreitete IGFBP, es wird primär im hepatischen Endothel und in Kupfferschen Sternzellen, ebenso aber in den meisten Geweben produziert (*Arany et al. 1994; Chin et al. 1994*). Seine Konzentration liegt bei $4,2 \pm 0,3 \mu\text{g/l}$ (*Iglesias et al. 2001*) mit einem Maximum während der Pubertät. Serumkonzentrationen von IGFBP3 erhöhen sich in der Gegenwart von Insulin, GH, Epidermal Growth Factor und Phorbolestern (*<http://bioinfo.weizmann.ac.il> [c]*). Etwa 99% des IGF im Serum ist an ein Trägermolekül gebunden. Seine Halbwertszeit ist damit verlängert. Die Bindung erfolgt über spezifische basische

Aminosäuren an mehreren Stellen des Glycoproteinmoleküls. Der Trimer-Komplex aus IGF1, IGFBP3 und ALS ist 150 kDa groß (*Baxter 1994*).

IGFBPs, besonders IGFBP3, haben einen IGF-unabhängigen Einfluß auf das Zellwachstum. Es wurden bereits sechs IGFBPs mit hoher Affinität zu IGFs identifiziert, vier weitere IGFBP-verwandte Moleküle mit geringerer Affinität wurden beschrieben (*Ferry et al. 1999*). Eine Wachstumshemmung erfolgt wahrscheinlich über IGFBP3-spezifische Zelloberflächenproteine und Translokationen im Zellkern (*Grimberg, Cohen 2000*). IGFBP3-vermittelte Apoptose wird von zahlreichen Zellzyklusregulatoren in gesunden und krankhaften Geweben ausgelöst (*Grimberg, Cohen 2000*). *Buckbinder et al. 1995* zeigten, dass der Tumorsuppressor p53 die IGFBP3-Expression unabhängig von IGF induzieren kann.

Die sechs IGFBPs regulieren die IGF-Aktivität, das Zellwachstum und die Apoptose auf IGF-unabhängige Weise (*Grimberg, Cohen 2000*). Durch Proteolyse erfahren die IGFBPs eine Auflösung der Bindung zu IGFs und damit einen Affinitätsverlust. Gebundenes IGF kann daraufhin freigesetzt werden. Solche Proteasen sind zum Beispiel das prostataspezifische Antigen, Kathepsine und Matrixmetalloproteinasen (*Cohen et al. 1992; Durham et al. 1999*).

1.1.4 IGF1 Rezeptor

Das Gen für IGF1-Rezeptor ist auf dem Chromosom 15 lokalisiert. IGF1R besteht aus 1.367 Aminosäuren und besitzt eine Molmasse von 154,8 kDa ([http://bioinfo.weizmann.ac.il/\[c\]](http://bioinfo.weizmann.ac.il/[c])). Der IGF1-Rezeptor ist das komplementäre Rezeptorprotein für IGF1. Er ähnelt dem Insulinrezeptor.

Das Typ1-Membranprotein gehört zur Familie der Protein-Kinasen und ist ein $\alpha\beta$ 2-Tetramer, bestehend aus zwei kovalent verbundenen Dimeren. Jedes Dimer enthält zwei durch Disulfidbrücken verbundene α -und β -Peptide. Die transmembranösen β -Peptide tragen die Kinase, die extrazellulären α -Peptide enthalten die Bindungsstellen für den Liganden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird die α -Untereinheit des Rezeptor-Dimers untersucht. Nach Ligandenbindung erfolgen Autophosphorylierung und die Phosphorylierung des Rezeptor-Substrats. Dieses phosphorylierte Protein stellt den Kontakt zu Proteinen mit SH2-Domäne her (*Kleinig, Sitte 1999*). Auf diese Weise vermittelt der IGF1-Rezeptor die wachstumsfördernden Wirkungen von IGF1 und IGF2 (*Ulrich et al. 1986*).

Der IGF1-Rezeptor hat eine zentrale Rolle bei der normalen Proliferation und Transformation der Zelle. Die Transkription des Gens ist durch eine Anzahl von Tumorsuppressorgenen kontrolliert. In malignen Geweben wirkt es antiapoptotisch durch Verstärkung von Überlebensmechanismen der Tumorzellen.

Der Rezeptor ermöglicht die Signalübernahme in das Innere der Zelle und erfüllt drei Hauptfunktionen. Er stimuliert die Mitogenese in vielen verschiedenen Zelltypen, eine Funktion, die auf die C-terminale Domäne der β -Untereinheit zurückzuführen ist (*Esposito et al. 1997*). Er schützt weiterhin Zellen vor Apoptose, eine Eigenschaft, die wiederum an andere Domänen auf der β -Untereinheit gebunden ist (*O'Connor et al. 1997*). Der IGF1-Rezeptor besitzt außerdem eine wichtige Rolle bei der zellulären Transformation durch Umbau des Zytoskeletts (*Blakesley et al. 1998*).

1.1.5 Die Rolle des IGF-Systems bei der Zahnentwicklung

Da IGF in Leber und inneren Organen synthetisiert wird, ist seine Rolle bei der Odontogenese erst ab einem bestimmten Entwicklungsstand relevant und im Schrifttum der frühembryonalen Odontogenese unterrepräsentiert. Die Forschungsergebnisse aus Versuchen an zumeist tierischen Zellkulturen und tierischen embryonalen Zahnanlagen geben erste Einblicke in die Funktionsweise des IGF-Systems bei der Zahnentwicklung. Die Interaktionen zwischen GH und seinem Rezeptor spielen eine Rolle, schon bevor die Hypophyse des Fötus kompetent ist. GH, sein Rezeptor und das Bindungsprotein existieren in der Zahnanlage schon vor jeglicher hypophysärer Produktion (*Zhang et al. 1997*). *Kawase et al. 1995* bewiesen die Existenz von Signalwegen, die auf Tyrosin-Kinase-Aktivität beruhen. GH und IGF1 beeinflussen die mitotische Aktivität, das Zellvolumen und die Differenzierung von Zellen im Rahmen der Odontogenese (*Young et al. 1995*).

IGF1 wird für die Stimulation der Polarisierung von Zellorganellen verantwortlich gemacht, nicht jedoch für die funktionelle Differenzierung von Odontoblasten (*Begue-Kirn et al. 1994*). Morphologische Änderungen der Zellgestalt sind also möglicherweise unabhängig von der sekretorischen Funktion der Zelle (*Tziafas et al. 2000*). Untersuchungen am Mäusezahn belegen die variierende Verteilung und Ausbildung von IGF1R mit den verschiedenen phänotypischen Stufen der Ameloblasten. In der aktiven Sekretionsphase war IGF1R immunhistochemisch zunehmend nachweisbar. Die Anfärbbarkeit nahm daraufhin mit dem Grad der Schmelzreifung ab (*Joseph et al. 1994*). Die Induktion der Schmelz-Biomineralisation wird durch Wachstumsfaktoren in bestimmter Weise reguliert, isolierte und in Serum gehaltene Mäuse-Molaren zeigten nach Stimulation mit Insulin, IGF1 und IGF2

eine vermehrte Syntheserate für die Schmelzmatrixproteine Ameloblastin und Amelogenin (*Takahashi et al. 1998*).

Denholm et al. 1998 wiesen eine erhöhte Proliferationsaktivität humaner Pulpafibroblastenkulturen unter Mitbeeinflussung durch IGF nach. Bovine proliferierende Pulpazellen inkorporieren unter Einfluss von IGF1 vermehrt Nukleotide und Sulfatverbindungen (*Nakashima 1992*). Pulpazellkulturen erhöhen nach Zusatz von IGF1 und IGF2 ihre DNS-Synthese und die Aktivität des Mineralisationsenzym Alkalische Phosphatase (*Onishi et al. 1999*). Ein antiapoptotischer Effekt von IGF-1 auf Fibroblasten der Gingiva und des Parodontalligaments wurde von *Han und Amar 2003* nachgewiesen.

GH kann Odontoblasten zur Expression verschiedener Wachstumsfaktoren stimulieren (*Young et al. 2001*). So stellt sich die Zusammensetzung von Prädentin- und Präzement-Matrixproteoglykanen als eine lokale Antwort auf den Einfluß von GH dar (*Young 1995*). *Li et al. 1998* belegten die durch GH und IGF1 induzierbare Expression zweier bedeutender Morphogene (BMP2 und BMP4). Deren Expression in menschlichen Pulpafibroblasten ist bis zum Fünffachen erhöht. Am sich entwickelnden Mäusezahn konnte nachgewiesen werden, dass IGF1 von denjenigen zahnbildenden Zellen lokal synthetisiert wird, welche IGF1 und den Rezeptor für GH besitzen (*Joseph et al. 1996*).

1.2 Allgemeine Grundlagen der Zahnentwicklung und Zahnalterung

Die Zahnentwicklung ist auf molekularbiologischer Ebene erst in Grundzügen erforscht und stellt einen sehr komplexen Prozess dar. Er erfordert in präziser zeitlicher und räumlicher Abfolge die Vorgänge der Zelldeterminierung, Proliferation, Migration, Gewebs-Gewebs-Interaktion, Morphogenese, Apoptose und Zelldifferenzierung (*Matalova et al. 2004*). Die Initiation und das Fortschreiten der Zahnkeimentwicklung ist von einem intensiven Zusammenwirken epithelialer und mesenchymaler Zellen abhängig (*Chai und Slavkin 2003, Koyama et al. 2003, Ruch 1998*). Es wurde bereits eine Vielzahl spezifischer Signalmoleküle (BMPs, FGFs) und Transkriptionsregulatoren (Msx-, Pax-, Barx- und Dlx-Gene) identifiziert (*Peters et al. 1998; Frazier-Bowers 2002*). Molekulare Signalwege und frühembryonale Differenzierungsprozesse sind teilweise schon bekannt (*Chai et al. 2000; Chai und Slavkin 2003, Tucker, Sharpe 1999; Peters, Balling 1999*). Sie sind elementar für die Zahnbildung und die Ausbildung der vier verschiedenen Zahnformen von Schneide- und Eckzzähnen sowie Prämolaren und Molaren (Übersicht in *Jernvall und Thesleff 2000*).

Odontogenese beginnt mit der Formierung der Dentallamina entlang des oralen Epithels. Zellen der Lamina proliferieren und wandern in das darunterliegende Ektomesenchym. Nach dem Knospen-, Kämpchen- und Glöckchenstadium führt die terminale Differenzierung zum Auftauchen von Ameloblasten und Odontoblasten und deren Ablagerung extrazellulärer Matrix. Als morphologisch und funktionell unterscheidbare Resultate der Odontogenese, differenziert sich die Zahnanlage in den Zahnschmelz, die Pulpa-Dentin-Einheit und den Zahnhalteapparat.

1.2.1 Zeitablauf der Zahnentwicklung und Extraktionsgründe

Der chronologische Entwicklungsstand der Zahnanlagen ist sehr gut untersucht und unterliegt geschlechtsspezifischen sowie starken interindividuellen Schwankungen.

Abb.1: Panoramaschichtaufnahmen von Patienten, deren Weisheitszähne im Rahmen der Studie untersucht wurden. Typische Entwicklungsstadien von Weisheitszähnen bei Platzmangel oder Keimfehlage und daraus resultierende Lageanomalien.

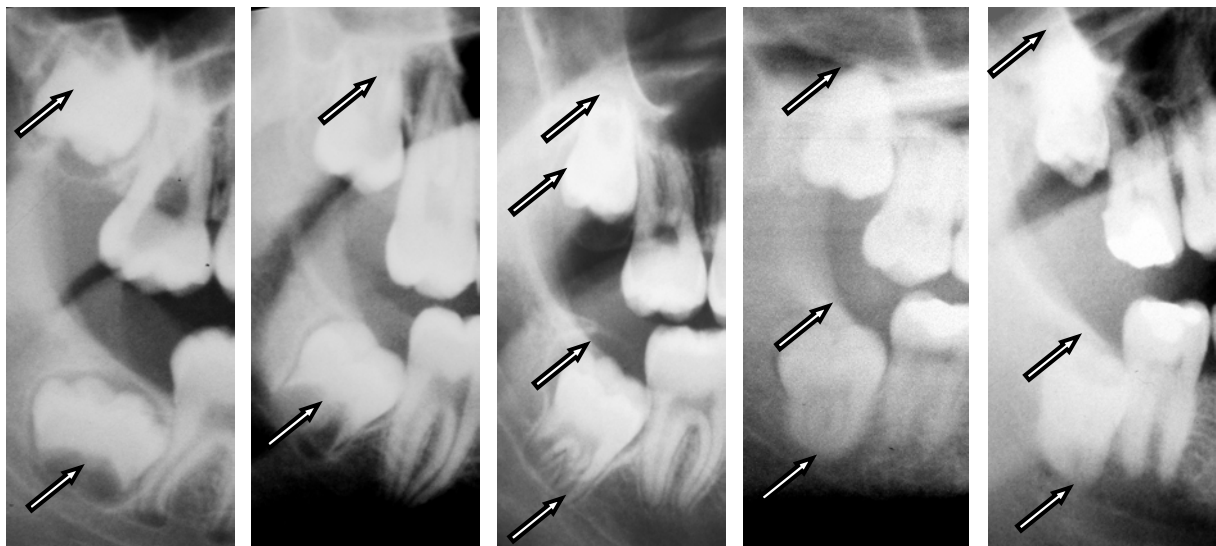
A: abgeschlossene Hartsubstanzbildung der Kronen (12-14 J.)

B: Stadium der Furkationsbildung (14-16 J.)

C: fortschreitendes Wurzelwachstum und beginnende Durchbruchstendenzen (ab 17 J.)

D: abgeschlossenes Wurzelwachstum (19-21 Jahre), retinierter Zahn (Pat.Alter 40 J.)

E: voll ausgebildete, aber retinierte Zähne (Pat.Alter 60 Jahre)



A

B

C

D

E

Das Schmelzorgan dritter Molaren ist circa 6 Jahre postnatal ausgebildet. Die Mineralisation dieser Kronenmatrix beginnt zwischen dem 7. und 10. Lebensjahr. Die Hartsubstanzbildung der Kronen ist nach 12 - 14 Jahren abgeschlossen (Abb.1A) und es schließt sich die fortschreitende Kalzifizierung der Wurzelscheide an. Ab einem Alter von 17 – 19 Jahren weisen die Zähne Durchbruchstendenzen in die Zahnreihe auf. Im Alter von 20 Jahren ist die Wurzelbildung beendet und nach dem Erreichen des 22. Lebensjahres weisen die Weisheitszähne nur noch selten Durchbruchstendenzen auf (*Schroeder 2000*).

Zum Zeitpunkt des programmierten Durchbruchs der 3. Molaren ist das Gesichtswachstum abgeschlossen. Beim heutigen Menschen fehlt die interdentale Abrasion durch veränderte Ernährungsgewohnheiten nahezu völlig. Das somit ausbleibende Nachrücken der posterioren Zähne stellt den wahrscheinlichsten Grund für die hohe Retentions- und Komplikationshäufigkeit dar. Eine Verkeilung und damit Retention ist bei 20 % der Zähne zu erwarten (*Waes, Stoeckli 2001*). Der unvollständige Durchbruch geht oft mit den Komplikationen einer *Dentitio difficilis* einher. Bei vollständigem Durchbruch resultieren häufig ungünstige Parodontalverhältnisse, weil befestigte Gingiva vor allem bukkal und distal fehlt. Persistierende Schleimhautkapuzen und erschwerte Zugänglichkeit bei der Mundhygiene bedingen eine stark erhöhte Kariesinzidenz.

Aus diesen Gründen ist die frühzeitige Extraktion erwägenswert, sie ist vor Ausbildung der vollen Wurzellänge technisch einfacher und mit weniger Komplikationen behaftet. Der ideale Zeitpunkt ist das Furkationsstadium der Wurzelbildung mit 14 - 16 Jahren (*Waes, Stoeckli 2001*). Ab diesem Stadium ist aufgrund der Kroneninklination zum zweiten Molaren hin die Wahrscheinlichkeit eines gestörten Durchbruchs vorhersagbar.

1.2.2 Entwicklung des Zahnschmelzes

Mit dem weiteren Wachstum der Aussprossungen der Zahnleiste formieren sich zu Beginn der Amelogenese ektodermale Schmelzzellen zu einer glockenförmigen Schmelzpulpa (*Langmann 1985*). Aus deren inneren Schmelzzellen gehend Ameloblasten hervor, sie sind hochspezialisierte multifunktionelle Zellen für die Produktion, die Resorption und den Umbau der Schmelzmatrix sowie für den aktiven Kalziumtransport während der Schmelzbildung (*Sasaki 1997*). Nach zentral gerichtete Fortsätze der Ameloblasten sezernieren eine aus nichtkollagenen Proteinen, Kohlenhydraten und Lipiden bestehende Schmelzmatrix mit genetisch determinierter Ausdehnung (*Schroeder 2000*).

Schmelzmatrixproteine wie Amelogenine formieren sich zu kugeligen Konglomeraten mit Platzhalterfunktion für das gerichtete Wachstum der Schmelzkristallite (*Moradian-*

Oldak 2001; Wen et al. 2001). Das Auftreten von Keimen aus Apatitkristallen kennzeichnet die initiale Mineralisation der Schmelzmatrix (*Fincham et al. 1999*). Die Proteinase der Ameloblasten übernehmen von jetzt an die Rückresorption organischer Anteile dieser Matrix (*Bartlett, Simmer 1999; Sasaki 1984*). Die sich anschließenden Prozesse der präeruptiven Schmelzreifung lassen aus einer initial nur schwach mineralisierten Matrix ein kristallines Gefüge werden. Die ist der Abschluss eines einzigartigen Prozesses zur Entstehung des härtesten Gewebes im menschlichen Körper.

Umbauvorgänge des Zahnschmelzes

Aufgrund der Degeneration der Ameloblasten zum Schmelzoberhäutchen kann Zahnschmelz vom Körper nicht nachgebildet werden. Von Wachstumsfaktoren beeinflusste Prozesse haben für Umbauvorgänge im Schmelz keine Bedeutung mehr. Die Reparaturmechanismen des Schmelzes für die Wahrung der Integrität der Pulpa sind passiv und beschränken sich auf das dichte Wiederverschließen von Schmelzsprüngen durch Einlagerung von Mineralien.

Infolge einer Abnahme des Carbonatgehaltes und der Substitution der Hydroxylgruppen durch Fluor und andere chemische Elemente ändert sich die Zusammensetzung des Schmelzes (*Schroeder 2000*). Die Prismen fungieren durch ihre Anordnung wie ein Molekularsieb und Ionenaustauscher für diffundierende Flüssigkeiten (*Waters 1971*). Entlang der Prismen können Mineralien und Farbstoffe aus Speichel und Nahrung reversibel oder irreversibel abgelagert werden. Daraus resultiert im Laufe des Lebens eine Abnahme der Porosität und eine Zunahme der Dichte des Schmelzes (*Brudevold et al. 1982*), klinische Parameter wie die Anätzbarkeit und das Verhalten beim Lichtdurchtritt verändern sich. Extern applizierte Fluoride können lebenslang am Schmelz präzipitieren und kariesprotektiv wirken (*Murray et al. 1991*). Intern aufgenommen Fluoride werden über Blut und Speichel den Zahnhartgeweben teilweise zugeführt (*Marthaler 1994*).

1.2.3 Entwicklung der Pulpa-Dentin-Einheit

Pulpa und Dentin reagieren als vitales Gewebe auf äußere Signale und bilden funktionell und entwicklungsgeschichtlich eine Einheit. Dem Inneren der glockenförmigen Schmelzpulpa liegen die Mesenchymzellen der Zahnpapille an. Es ist bekannt, dass Sie sich unter dem Einfluss verschiedener Signalstoffe (z.B.: IGF1,-2; BMP-2,-4,-7; TGF; Nestin) zu einer Schicht von Odontoblasten differenzieren (*Finkelman et al. 1990; Åberg et al. 1997; Ruch et*

al. 1995; About et al. 2000; Shiba et al. 1998). Odontoblasten, die nach ihrer Ausdifferenzierung nicht mehr proliferationssfähig sind, können irreversibel geschädigte Nachbarzellen nicht ersetzen (*Murray et al. 2000*). Odontoblasten stellen stark spezialisierte Zellen dar, welche eine unmineralisierte Matrix, das Prädentin, aus kollagenen und nichtkollagenen Bestandteilen synthetisieren und später zu dessen Mineralisation beitragen. Die extrazellulären Matrixproteine bestehen überwiegend aus Typ 1-Kollagenen, sauren und nichtkollagenen Proteinen sowie Proteoglykanen und bilden das Gitterwerk für mineralische Ablagerungen (*Butler et al. 1997, Thesleff et al. 1991*).

Die Dentinogenese beginnt bei den Weisheitszähnen mit 7-10 Jahren und besteht in Analogie zur Schmelzbildung zunächst in der Anhäufung einer organischen Vorstufe, welche nachfolgend mineralisiert und durch lebenslange Apposition verstärkt wird. Bis zur Ausbildung der Wurzelform wird beim Menschen während der Zahnentwicklung das Primärdentin mit einer Ablagerungsrate von ca. 4µm pro Tag sezerniert. (*Kawasaki et al. 1980*). Die Biomineralisation des Dentins wird über membrangebundene Matrixvesikel eingeleitet (*Schroeder 2000*). Kollagenaseaktivitäten führen zum Abbau von Matrixbestandteilen (*Palosaari et al. 2000*). Von den entstehenden Mineralisationskeimen ausgehend, schreitet die globuläre Verkalkung der Dentinmatrix mittels polyanionischer Proteine fort, die das orientierte Kristallwachstum dirigieren. Grundsubstanz und kollagene Fibrillen werden von der Verkalkung mit Kalziumphosphatkristallen des Hydroxylapatit-Typs erfasst. Die Mineralisationszentren wachsen infolge der Bildung und Vergrößerung neuer Kristalle und verschmelzen miteinander. Das mineralisierte Dentin besitzt eine sehr komplexe Struktur.

Die Expression von über zweihundert Genen ist an Zähnen bereits untersucht worden, die meisten Expressionsmuster sind in einer Internetdatenbank einsehbar (<http://bite-it.helsinki.fi>). IGF1 konnte im Dentin in Konzentrationen nachgewiesen werden, die unterhalb der Konzentrationen im Knochen liegen (*Finkelman et al. 1990*). *Buchaille et al. 2000* identifizierten einhundertunddreißig bevorzugt in Odontoblastenkulturen exprimierte Genfragmente. Die Rolle einiger dieser Dentin-spezifischen Matrixproteine konnte bereits aufgeklärt werden (*Butler 1998; Gu et al. 2000*). Ihnen werden Funktionen bei der Initiation und Kontrolle des Kristallwachstums zugeschrieben (*Butler et al. 1997*). Das Vorhandensein von IGFs, Transforming Growth Factors (TGFs), BMPs und angiogenen Wachstumsfaktoren in der Dentinmatrix verdeutlicht die Rolle der Matrix als nicht inertes Hartgewebe und als wahrscheinlicher Lagerort für bioaktive Moleküle, vornehmlich Wachstumsfaktoren, welche unter bestimmten Bedingungen freigesetzt werden können (Review in *Tziafas et al. 2000*). *Roberts-Clark und Smith 2000* wiesen das Vorhandensein und die Freisetzung verschiedener angiogener Wachstumsfaktoren in der Dentinmatrix nach.

Die verbliebenen Zellen der Papille bilden die Zahnpulpa. Aus deren undifferenzierten Mesenchymzellen gehen die Ersatzzellen sowie die Fibroblasten als zahlreichste Zellpopulation im ruhenden oder aktiven Funktionszustand hervor (*Schroeder 2000*). Die anderen Zellpopulationen des subodontoblastischen Raumes und der Pulpahörner sind ebenfalls für die Dentinogenese wichtig, jedoch spielen sie bei der Sekretion der Dentinmatrix keine direkte Rolle (*Linde 1985*). Mediatoren wie die Wachstumsfaktoren BMP4 oder VEGF können die Proliferation und Differenzierung der mesenchymalen Zellen induzieren (*Matsushita et al. 2000; Tucker et al. 1998*). Einige Zellen der Wurzelpulpa behalten ihre Differenzierungspotenz bei (*Ranly et al 1997*). In der Pulpa konnten Zellen nachgewiesen werden, welche die Eigenschaften von Stammzellen besitzen (*Gronthos et al. 2000*). Unter IGF-Einfluß bilden sich in der Pulpa anastomosierende Kapillarkreisläufe und Nervengeflechte von A-Delta- und C-Fasern aus (*Raab 2000*). Blind endende Lymphkapillaren sind in zentralen Bereichen der Pulpa zahlreicher als in Peripherie vorhanden (*Matsumoto et al. 1997*). Verschiedene neurotrophe Faktoren wie Nervenwachstumsfaktoren oder Neurotrophine sind während verschiedener Entwicklungsstadien der Zahnanlage in vitro nachweisbar (*Nosrat et al. 1998*).

Umbauvorgänge der Pulpa-Dentin-Einheit, Reizantwort und Gewebsneubildung

Die Anatomie der Pulpa-Dentin-Einheit deutet darauf hin, dass im subodontoblastischen Raum aufgrund der zellulären Ersatz- und Reparationsmöglichkeiten und der Bereitschaft zur Verteidigung der dentinbildenden Gewebsfront ein hoher Grad an physiologischer Aktivität besteht. Pulpa und Primärdentin stellen nach Abschluss des Wurzelwachstums das entscheidende zelluläre Abwehrsystem gegen äußere Einflüsse bereit. Dies äußert sich im Gegensatz zu Knochengewebe nicht durch lebenslangen Gewebsumbau (turnover), sondern durch additives Dentinwachstum während der gesamten Lebenszeit des Zahnes (*Nitzan et al. 1986*), was zur Ausbildung von Sekundärdentin führt. Dieses wird unter Einfluss von Wachstumsfaktoren wie TGFs und BMPs und extrazellulären Dentinmatrixmolekülen (*Tziafas et al. 2000*) ein Leben lang an der Pulpa-Dentin-Grenze mit einer Rate von 0,5µm täglich abgelagert (*Morse 1991, Solheim 1992*). Schließlich führt diese lebenslange Sekretion der Odontoblasten zu einer Rückwärtsbewegung in Richtung Pulparaum und zu einer Verkleinerung des Pulpalumens mit klinischen Konsequenzen.

Die Pulpa zeigt mit Zellproliferation und Neovaskularisation nach einer Verletzung die typischen Zeichen der Wundheilung (*Magloire et al. 1996*). Eine Dentinapposition, welche bei jugendlichen Zähnen mit offenem Foramen apicale stärker stattfindet als an älteren Zähnen

(*Larmas et al. 1992*), erfolgt immer am Ort der Schädigung im Bereich der Kronenpulpa. Die Dentinwunde ist durch eine sich pulpawärts vergrößernde Anzahl von Dentinkanälchen gekennzeichnet. Extern applizierte Medikamente wie auch Noxen mit Wirkung auf die Pulpa haben daher an einem pulpanahen Applikationsort den jeweils kürzesten und permeabelsten Weg zum Odontoblasten. Die Dentinmatrix kann als ein Reservoir für Wachstumsfaktoren wie BMPs, FGFs oder TGFs angesehen werden (*About et al. 2000; Smith et al. 1995*). Während der Dekalzifizierung nach einer kariösen Irritation werden diese Signalmoleküle aus der Matrix freigesetzt und erreichen durch Diffusion benachbarte Zellen. Pulpazellen in der Nähe der Läsion können sich unter dem Einfluss der aus Dentin und Pulpa diffundierten Wachstumsfaktoren (z.B.: BMP4) in odontoblastenähnliche Zellen differenzieren und die Sekretion und Ablagerung von irregulär strukturiertem Tertiärdentin vollziehen (*About et al. 2000, Cox 2003, Shiba et al. 1995, Smith et al. 1995*). *Kitamura et al. 1999* bewiesen eine erhöhte Expression von BMP-induzierten Proto-Onkogenen nach Kavitätenpräparation an Stellen der Reparaturdentinbildung. Die Tertiärdentinapposition erfolgt mit einer Rate von circa 1,5µm täglich und ist damit dreimal so hoch wie die normale Sekundärdentinapposition (*Stanley et al. 1966*).

Bereiche mit exponierter Pulpa werden heutzutage durch Calciumhydroxidpräparate überkappt. Reporte in der Literatur seit den 1950er Jahren haben demonstriert, dass innerhalb weniger Wochen nach Applikation von Calciumhydroxid eine tubuläre Matrix in variierendem Abstand zum Applikationsort ausgebildet wird, welche von elongierten und stark polarisierten odontoblastenähnlichen Zellen gesäumt wird (*Übersicht in Tziafas et al. 2000*). Odontoblasten können durch Calciumhydroxid-Applikation auf pulpanahe Dentinbereiche zur Tertiärdentinbildung angeregt werden (*Yoshida et al. 1996*). Dieser stereotype Verteidigungsmechanismus beruht auf der initialen Irritation des traumatisierten Pulpengewebes durch freigesetzte Hydroxyl-Ionen (*Cvek et al. 1987*). Calciumhydroxid besitzt antibakterielle Effekte, hat Einfluss auf die Erhöhung der Differenzierung von odontoblastenähnlichen Zellen (*Tziafas et al. 2000*) und besitzt einen herauslösenden Effekt auf matrixgebundene Komponenten wie zum Beispiel TGF (*Smith, Smith 1998*). Die Überlebensdauer der Pulpa wird dadurch meist wesentlich verlängert, doch sind die Resultate nicht vorhersagbar. Auch neuere Materialien wie mineralische Trioxidaggregate (MTA), die zur Überkappung der Pulpa eingesetzt werden, haben trotz besserer Erfolgsraten den gleichen konventionellen Wirkmechanismus: die Dentinbildung erfolgt immer unter einer Nekrosezone (*Tziafas 2002*). Überkappungen mit Wachstumsfaktoren befinden sich auf dem Stand des Laborversuchs (*Tziafas et al. 1998*). Die Behandlung von experimentell exponiertem Pulpengewebe von Hundezähnen mit IGF2 führte nicht zu einer Formierung von Reparaturdentin, jedoch nahm in umliegenden Bereichen die Absonderung von knochentypischer Matrix zu (*Tziafas et al. 1998*).

Die Fähigkeit junger wie auch älterer Zähne, durch reparative Dentinogenese auf Verletzung zu reagieren, ließ vermuten, dass innerhalb der Pulpa eine Population von kompetenten Progenitorzellen existiert, welche sich zu einem späteren Zeitpunkt zu odontoblastoiden Zellen differenzieren können. Wenn die Pulpa exponiert ist, erfordert es die Heilung, dass Odontoblasten durch odontoblastoide Zellen ersetzt werden, welche aller Wahrscheinlichkeit nach den mesenchymalen Stammzellpopulationen der Pulpa entstammen (*Murray und Garcia-Godoy 2004*). Die Stammzellforschung steht jedoch erst in ihrem Anfangsstadium und viele offene Fragen sind noch gänzlich ungeklärt (*Bianco et al. 2001*).

1.2.4 Entwicklung des Zahnhalteapparates

Die Formierung des Parodontiums ist bestimmt durch die Interaktionen des Epithels mit Mesenchym und Hartgewebe (*Åberg et al. 1997; Lekic, McCulloch 1996*). Die an das Wurzeldentin angrenzenden Mesenchymzellen differenzieren sich zu Zementoblasten (*Langmann 1985*). Sie bilden später aus einer Präzement-Matrix den inhomogen strukturierten Wurzelzement. In den Zement strahlen die aus verschiedenen Kollagentypen bestehenden Fasern des Zahnhalteapparates ein (*Lukinmaa, Waltimo 1992*). Darüber bildet sich, dem Mesenchym entstammend, das Desmodont. Das Parodontium des durchgebrochenen Zahnes besteht in seiner Gesamtheit aus funktionell sehr verschiedenen Zellen des Wurzelzements, des Alveolarknochens, des Desmodonts und der Lamina propria der Gingiva.

Umbauvorgänge des Zahnhalteapparates

Als Ausdruck der Verankerungsdynamik im Alveolarknochen unterliegt der Zement mit dem Alter einer linearen Dickenzunahme (*Nitzan et al. 1986*). Dabei verschiebt sich der Zementansatz nach koronal (*Bocutoglu, Yakan 1997*). Die Anzahl und Dicke der Fasern des Desmodonts korrelieren mit dem Grad der funktionellen Belastung durch Kau- und andere Kräfte. Zeitlebens erfolgen Remodellierungen im Parodontium als Folge einer physiologischen Zahnwanderung sowie als Folge einer pathologischen oder iatrogenen Zahnstellungsänderung. Die Knochenresorption, der Gewebeumbau sowie der Kollagenmetabolismus sind besonders in den Druckzonen erhöht (*Bumann et al. 1997*). *Götz et al. 2001* und *Heinen et al. 2003* wiesen im Wurzelzement Komponenten des IGF-Systems nach und konnten das Parodontalligament als Reservoir für IGF charakterisieren. IGF1 stimuliert die Syntheserate mineralisationsassoziierte Gene in Zementoblasten (*Saygin et al. 2000*). Umbauvorgänge im Rahmen der Wundheilung finden auch nach intraalveolären

Zahnfrakturen statt. Dabei kann durch wachstumsfaktorstimulierte reparative Leistungen von Pulpa und Parodontium der Frakturspalt bindegewebig oder sogar hartgewebig überbrückt werden (Andreasen 1994). Saygin et al. 2000 belegten, dass durch vorhandenes IGF1 Mitogenese, Expression und Biomineralisation in Zementoblasten im Rahmen der Regeneration parodontaler Gewebe getriggert wird.

2 Zielstellung der Arbeit

Die Mehrzahl der bisherigen wissenschaftlichen Studien auf dem vorliegenden Gebiet untersuchte die Genexpressionen zumeist an tierischen Zähnen in sehr frühen Stadien der Zahnentwicklung. Über die Beteiligung des IGF1-Systems bei der menschlichen Odontogenese existieren bisher nur wenige Erkenntnisse. Zur Bestimmung des Vorhandenseins von IGF beim Zahndurchbruch und bei der Zahnentwicklung wurden in der vorliegenden Arbeit mineralisierte menschliche Weisheitszähne verschiedenen Alters in finalen Entwicklungsstadien untersucht.

Ziel der Arbeit ist der Expressionsnachweis der Wachstumsfaktoren IGF1 Ligand, IGF1 Bindungsprotein 3 und IGF1 Rezeptor α an menschlichen Weisheitszähnen mittels RT-PCR und Immunhistochemie.

Folgende Schwerpunkte sollten abgehandelt werden:

- mRNA-Expressionsnachweis der Wachstumsfaktoren IGF1 Ligand, IGF1 Bindungsprotein 3 und IGF1 Rezeptor α an homogenisiertem Zahngewebe,
- zelluläre Lokalisation der exprimierten Proteine in der apikalen Zahnpulpa und
- Korrelation von Patientenalter, Expression und Entwicklungsstand des Zahnes.

3 Material und Methodik

3.1 Weisheitszähne

Die 48 untersuchten Gewebe stammen von Patienten, die der Kieferchirurgin überwiesen wurden und bei denen aus klinischer Indikation die betreffenden Weisheitszähne im Zeitraum von März bis Mai 2001 operativ entfernt wurden. Alle Patienten gaben ihr schriftliches Einverständnis zur molekularbiologischen Weiterverwendung ihrer Zähne im Rahmen dieser Arbeit. Das Patientenalter betrug 15 bis 67 Jahre, wobei der Hauptanteil auf jugendliche Patienten entfiel (Tab.2). Die Altersverteilung (Tab.1) wurde gemäß dem zeitlichen Ablauf der Odontogenese bei menschlichen Weisheitszähnen getroffen. Die Altersgruppe 1 (<18 Jahre) setzt sich aus den Patienten zusammen, bei denen auf Röntgenbildern eine drohende Durchbruchsbehinderung aufgrund der Kroneninklination schon im Stadium der Wurzelbildung um das 15. Lebensjahr erkannt worden ist. Die meisten Patienten der Altersgruppe 2 (18-22 Jahre) unterzogen sich aufgrund beginnender Beschwerden im Verlaufe einer Dentitio difficilis einer operativen Weisheitszahnentfernung. Spätere Zahnentfernungen wurden in der Altersgruppe 3 (>22 Jahre) erfasst.

Der jeweilige Zahn wurde sofort nach Luxation aus der Alveole in einem sterilen, kältestabilen und luftdichten Röhrchen verschlossen. Das Röhrchen wurde innerhalb weniger Sekunden in -196°C kalten flüssigen Stickstoff überführt. Nach dem Transport erfolgte eine Zwischenlagerung bei -80°C bis zum Zeitpunkt der RNA-Präparation. Es wurden 48 Zähne mit Hilfe der RT-PCR und 12 Gewebe nach immunhistochemischer Färbung untersucht (Tab.2, Tab.7).

Tab.1: Altersgruppenaufteilung und Anzahl der Gewebe

	Alter	Anzahl untersuchter Zähne (PCR + Immunhistochemie)
Altersgruppe 1	unter 18 Jahren	11+10
Altersgruppe 2	18 – 22 Jahre	14+2
Altersgruppe 3	über 22 Jahre	23

Tab.2: Untersuchte Gewebe mit Alters- und Geschlechtsverteilung und Indikation zur Entfernung. m, w: männlich, weiblich. DBH: Durchbruchsbehinderung. DD: Dentitio difficilis. KFO: Kieferorthopädische Indikation

Altersgruppe	Fall	Alter (Jahre)	Geschlecht	Indikation
Altersgruppe 1 bis 18 Jahre	1	15	w	DBH
	2	15	w	DBH
	3	15	w	DBH
	4	15	m	KFO
	5	16	w	DBH
	6	16	m	DBH
	7	16	m	KFO
	8	17	w	DBH
	9	17	m	DBH
	10	17	m	DBH
	11	17	w	DBH
Altersgruppe 2 18 bis 22 Jahre	12	18	m	DBH
	13	19	w	DBH
	14	20	m	DBH
	15	20	w	DBH
	16	20	w	DBH
	17	20	w	DBH
	18	20	w	DBH
	19	20	m	DBH
	20	20	m	DBH
	21	20	m	DBH
	22	20	m	DBH
	23	21	w	DBH
	24	21	w	DBH
	25	22	w	DD
Altersgruppe 3 über 22 Jahre	26	23	w	DBH
	27	23	w	DBH
	28	25	w	DBH
	29	26	w	DBH
	30	26	w	DBH
	31	26	w	DBH
	32	27	m	DBH
	33	27	w	DBH
	34	29	m	DBH
	35	29	m	DBH
	36	30	m	DBH
	37	32	m	DBH
	38	33	w	DBH
	39	34	w	DBH
	40	34	w	DD
	41	38	w	DBH
	42	39	m	DBH
	43	41	m	DBH
	44	42	m	DBH
	45	42	m	DBH
	46	50	m	DBH
	47	59	m	DBH
	48	67	w	DD

3.2 RT-PCR

3.2.1 RNA-Präparation

Die grobmechanische Zerkleinerung des betreffenden Zahnes erfolgte durch Hammerschläge bei lückenloser Kühlkette unter RNase-freien Bedingungen. Sämtliche Bruchstücke wurden zusammen mit einer Stahlkugel in ein Teflongefäß gegeben und in einem Gewebehomogenisator (Mikro-Dismembrator S[®], Fa. B. Braun Biotech International, Melsungen) pulverisiert. Die Schüttelfrequenz betrug 2.500 rpm. Der Homogenisiervorgang dauerte 2 x 20 Sekunden. Zur RNA-Präparation wurde das Zahnhomogenisat entsprechend der Zahngröße mit 5 bis 9 ml phenolhaltiger Reagenz (Trizol[®]-Reagent, Life Technologies / Fa. Invitrogen GmbH, Karlsruhe) versetzt und nach dem Protokoll des Herstellers aufgearbeitet. Nach anschließender Isopropylalkoholfällung und dem Waschen in 75%-igem Ethanol wurde die Gesamt-RNA in RNase-freiem Wasser aufgenommen. Durch Absorptionsmessungen im Photometer (UV-1602[®], Fa. Shimadzu, Japan) bei 260 nm konnte die Konzentration der RNA für einen definierten Mengeneinsatz bei der PCR bestimmt werden. Die anschließende Einlagerung erfolgte bei -80°C.

3.2.2 cDNA-Synthese

Mit Hilfe eines Reverse Transkriptase enthaltenden Kits (Superscript[®] II, Gibco BRL / Fa. Invitrogen GmbH, Karlsruhe) wurde 1µg Gesamt-RNA durch Reverse Transkription in eine komplementäre cDNA umgeschrieben. Dies erfolgte im Thermocycler (T3 Thermoblock[®], Fa. Biometra, Göttingen) bei 70°C für 3 Minuten, bei 42°C für 45 Minuten und anschließender Denaturierung bei 95°C für 3 Minuten.

RT-Ansatz:

5,0	µl	5 x RT-Puffer
1,0	µl	12,5 mM dNTP-Mix (dNTP-Set [®] , Fa. Invitex, Berlin)
3,0	µl	100 ng/µl random Primer (Random Primers [®] , Fa. Invitrogen GmbH, Karlsruhe)
2,5	µl	0,01 M DTT
0,5	µl	RNasin (40 U/µl)
0,3	µl	Superscript [®] II (200 U/µl)
2,7	µl	DEPC-H ₂ O

3.2.3 PCR

Unter Verwendung eines Polymerase-Enzyms (Taq-Polymerase®, Fa. Invitrogen GmbH, Karlsruhe) aus *Thermophilus aquaticus* wurden die gesuchten Genabschnitte auf der c-DNA mit spezifischen Primern für IGF1 Ligand, IGF1 Rezeptor α und IGF Bindungsprotein 3 (Fa. Metabion, Planegg-Martinsried, Tab.3) amplifiziert. IGF1 Rezeptor α ist die α -Untereinheit des Rezeptor-Dimers. Zur internen Kontrolle wurde ein zusätzlicher Primer für 18S (Fa. Metabion, Planegg-Martinsried) angewendet: Das Molekül der 18S-rRNA mit einem Sedimentationskoeffizienten von 18 Svedberg ist Bestandteil der kleineren Untereinheit eines jeden eukaryontischen Ribosoms.

Tab.3: Liste der verwendeten Primer und deren Sequenzen. S: sense, AS: Antisense

Primer		Sequenz									
IGF1L	S	5'	ATC	CTT	CTC	TCC	TCA	TTC	TTC		3'
IGF1L	AS	5'	GAT	ACA	CAG	ACA	CAG	ATA	AAA	G	3'
IGFBP3	S	5'	TCA	GAG	CAC	AGA	TAC	CCA	G		3'
IGFBP3	AS	5'	ACA	GCC	GCC	TAA	GTC	AC			3'
IGF1R	S	5'	TCC	ACA	TCC	TGC	TCA	TCT	CC		3'
IGF1R	AS	5'	AGA	AGT	CAC	GGT	CCA	CAC	AG		3'
18S	S	5'	GTT	GGT	GGA	GCG	ATT	TGT	CTG	G	3'
18S	AS	5'	AGG	GCA	GGG	ACT	TAA	TCA	ACG	C	3'

Der **PCR-Ansatz (25µl)** besteht aus:

10 x PCR-Puffer	2,50 µl	
100 µM dNTP-Mix	3,00 µl	(dNTP-Set®, Fa. Invitex, Berlin)
10 pM sense-Primer	0,25 µl	(Fa. Metabion, Planegg-Martinsried)
10 pM antisense-Primer	0,25 µl	(Fa. Metabion, Planegg-Martinsried)
Taq-Polymerase (5U/µl)	0,20 µl	(Fa. Metabion, Planegg-Martinsried)
c-DNA	2 µl.	

Er wurde mit Aqua bidestillata auf 25 µl Endvolumen aufgefüllt. Die PCR-Protokolle zur Amplifikation der DNA-Sequenzen sind aus Tab.4 ersichtlich. Die Größe der Amplifikate, die Annealing-Temperatur und die optimale Zyklenzahl zeigt Tab.5. Zur Identifikation wurde das RT-PCR-Produkt in einem 1 %-igen Agarosegel (peqGold Universal Agarose®, Fa. peqLab, Erlangen) mit Ethidiumbromid (0,5µg/l in 1 x TBE-Puffer) bei 70 mA über etwa zwei Stunden elektrophoretisch aufgetrennt. Als Positivkontrolle für die Transkripte von IGF1L, IGFBP3, IGF1R α und 18S diente Gesamt-RNA der Ovarialfibroblasten-Zelllinie SW 480.

Tab.4: PCR-Protokolle für IGF1 Ligand, IGF1 Bindungsprotein 3 IGF1 Rezeptor α und 18S

IGF1L			
1.	1	min	95°C
2.	30	sec	94°C
3.	30	sec	Annealing-Temperatur
4.	30	sec	72°C (Zykluswiederholung Schritte 2 bis 4)
5.	5	min	72°C
IGFBP3			
1.	1	min	95°C
2.	30	sec	94°C
3.	30	sec	Annealing-Temperatur
4.	30	sec	72°C (Zykluswiederholung Schritte 2 bis 4)
5.	5	min	72°C
IGF1R α			
1.	3	min	95°C
2.	30	sec	94°C
3.	30	sec	Annealing-Temperatur
4.	40	sec	72°C (Zykluswiederholung Schritte 2 bis 4)
5.	5	min	30°C
18S			
1.	1	min	95°C
2.	30	sec	94°C
3.	30	sec	Annealing-Temperatur
4.	30	sec	72°C (Zykluswiederholung Schritte 2 bis 4)
5.	5	min	72°C

Tab.5: Größe der Amplifikate, Annealing-Temperatur und Zyklenzahl der verwendeten Primer

Primer	Amplifikatgröße	Annealing-Temperatur	Zyklenzahl
IGF1L	498 bp	56°C	40
IGFBP3	660 bp	58°C	37
IGF1R α	668 bp	60°C	30
18S	346 bp	62°C	28

3.2.4 Auswertung

Die Gele wurden eingescannt (Kodak Digital Science Image Station® 440CF) und die Intensität der Banden ermittelt (Kodak Digital Science 1D® V.3.0.2). Die Bande der Ovarialfibroblasten-Zelllinie SW 480 wurde als 100 % definiert und diente als Bezugsgröße für die softwareunterstützte Auswertung der mRNA-Expression (Tab.6):

Tab.6: Auswertungsparameter der PCR-Gele

	Expressionsgrad	Verhältnis zur Vergleichsbande
-	schwache Expression	entspricht < 30% der Intensität
+	mäßige Expression	entspricht >30 – 50% der Intensität
++	hohe Expression	entspricht >50 – 100% der Intensität
+++	sehr hohe Expression	entspricht > 100% der Intensität.

3.3 Immunhistochemie

3.3.1 Gewebe

Zur zellulären Lokalisation der exprimierten Proteine in der apikalen Zahnpulpa wurden Schnitte am apikalen Pol der Wurzel immunhistochemisch behandelt. Die Schnittgewinnung am unentkalkten Zahn ist bis zu einer Dicke der mineralisierten Wurzelscheide von circa 0,4 mm möglich. Schnitte in weiter koronal gelegenen Arealen führen zu unverwertbaren Präparaten. Daher waren nur 12 Gewebe der Altersgruppe 1 und 2 (Tab.7) zum Schneiden geeignet, deren Wurzelwachstum noch nicht abgeschlossen war.

Tab.7: Auflistung der immunhistochemisch untersuchten Gewebe

Nummer	Alter (Jahre)
49, 50, 51	15
52, 53, 54, 55, 56, 57	16
58	17
59	19
60	22

Der tiefgefrorene Zahn wurde in Carbowachs (Tissue Tek®, Fa. Sakura Finetek, Niederlande) eingebettet, in n-Hexan getaucht und mit Aceton und Trockeneis gekühlt. Am Mikrotom (Cryostat®, Fa. Leica, Switzerland) wurden Serienschnitte von 7-8 µm Dicke im Bereich der Wurzelspitze senkrecht zur Zahnachse angefertigt und auf Superfrost®-Objektträgern (Fa. Menzel-Glaser, Germany) faltenfrei appliziert. Transport und Kurzlagerung erfolgten bei -80°C.

Immunhistochemische Färbung

Die immunhistochemische Färbung erfolgte nach der Avidin-Biotin-Komplex-Methode mit einem Peroxidase-Kit und einem Chromogen-Kit (LSAB-Kit® und Liquid-DAB-Substrate-

Chromogen System®, Fa. DAKO®, USA). Folgende Methodik wurde in Kapillarspalt-Objektträgern bei Raumtemperatur durchgeführt:

1. Fixierung in Methanol mit 3% H₂O₂ (4:1) für 20 min
2. Waschen mit PBS-Puffer für 2 x 5 min
3. Inkubation mit Blockserum: normales Schweineserum (Fa. DAKO®, USA) 1:5 mit PBS + 1% BSA (Fa. DAKO®, USA) für 5 min; Negativkontrolle mit PBS
4. Inkubation mit dem jeweiligen monoklonalen Primärantikörper (Tab.8) für 40 min
5. Inkubation für weitere 90 min bei 37°C
6. nach Abkühlen auf Raumtemperatur 3 x Waschen mit PBS
7. Inkubation mit biotinyliertem Brückenantikörper (Anti-Kaninchen, Anti-Maus, Anti-Ziege Immunglobulin, Fa. DAKO®, USA) für 30 min
8. Waschen mit PBS
9. Inkubation mit Streptavidin-Peroxidase für 30 min
10. Waschen mit PBS
12. Substratreaktion durch Substrat- Chromogen- Lösung (Liquid-DAB-Substrate-Chromogen System®, Fa. DAKO®, USA) für 10 min
13. Waschen mit Aqua bidestillata
14. Gegenfärbung mit Hämalaun (1:5 mit Aqua bidestillata verdünnt) für 3 min
15. Spülen mit reichlich Leitungswasser

Nach Spülen mit Aqua bidestillata wurden die Schnitte mit Aquatex® (Merck, Darmstadt) eingedeckt. Als Positivkontrolle diente ein Papilläres Schilddrüsenkarzinom im T4-Stadium. Die Spezifität der Immunhistochemie wurde durch das Auslassen einzelner Schritte im Protokoll überprüft.

Antikörper

Für den immunhistochemischen Nachweis der Antigene kamen folgende polyklonale Primärantikörper (Fa. Santa Cruz Biotechnology®, USA) zur Anwendung (*Referenzen: Hayden et al. 1996, Kelley et al. 1996, Li et al. 1993*).

Tab.8: Verzeichnis der verwendeten Antikörper

Antikörper	Ursprung und Klon	Ig-Unterklasse	Verdünnung
IGF1L	Kaninchen-polyklonal, Klon H-70	IaG	1 : 100
IGFBP3	Kaninchen-polyklonal, Klon H-98	IgG	1 : 100
IGF1R α	Kaninchen-polyklonal, Klon H-78	IgG	1 : 100

3.3.2 Mikroskopische Auswertung

Die histologischen Schnitte wurden lichtmikroskopisch (Axioplan 2® mit AxioCam®, Zeiss® KS 300 3.0, Fa. Zeiss, Oberkochen) von zwei unabhängigen Untersuchern betrachtet. Zur besseren Quantifizierung erfolgte eine planimetrische Vermessung der immunoreaktiven Zellcluster und Gewebssareale mit der PalmRobo 1.0 Software eines Lasermikrodissektors (Palm Microlaser®, Bernried, Deutschland). Diese Software ermöglicht das Umzeichnen von

Zellen und Gewebsarealen zur interaktiven Flächenberechnung in der Größenordnung von Quadratmikrometern.

In auswertbaren Arealen des Schnittes wurde die Gesamtfläche des Odontoblastensaums (100%) umrandet (Abb.2A) und berechnet. Dagegen werden die immunhistochemisch positiv markierten Areale innerhalb der Odontoblasten (Abb.2C,D) ins Verhältnis gesetzt. Aus dieser Ratio ergibt sich ein quantitativ fassbarer Wert für die Odontoblasten-Proteinexpression (OPE) (vgl. *Mustafa et al. 2004*). Verwendet wurde der Mittelwert der Ergebnisse beider Untersucher.

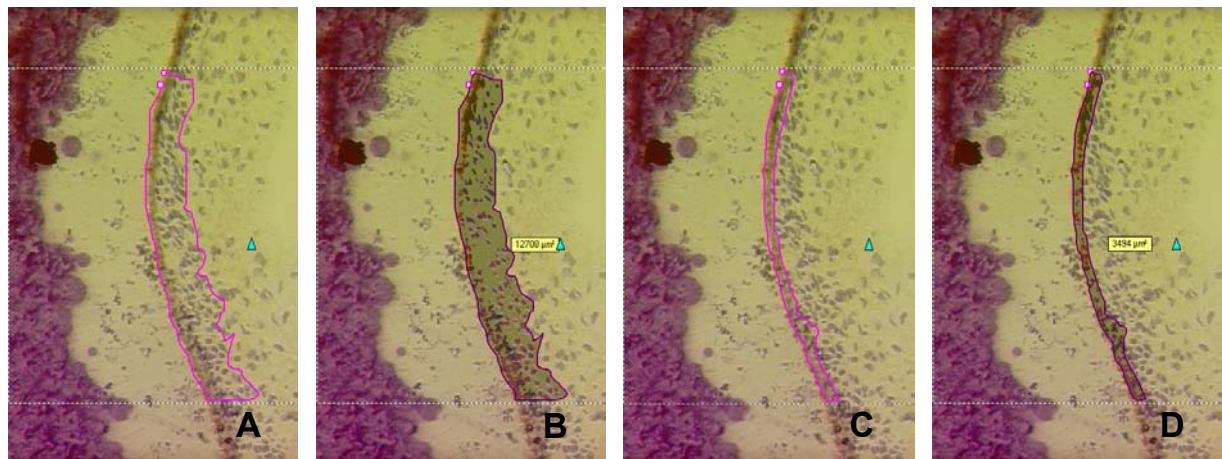
Abb.2: Darstellung der Flächenberechnung nach immunhistochemischer Färbung, Fall Nr.2

A: Markierung der Zellgruppen des Odontoblastensaums

B: Grafische und numerische Flächendarstellung

C: Markierung der immunhistochemisch positiven Zellareale der Odontoblastenzellgruppe

D: Grafische und numerische Flächendarstellung



Der Grad der Färbung wurde in vier Gruppen eingeteilt (Tab.9):

Tab.9: Auswertungsparameter der Odontoblasten-Proteinexpression

	Expressionsgrad	Odontoblasten-Proteinexpression
-	keine Expression	0 – 25% der umrandeten Fläche
+	niedrige Expression	25 – 50% der umrandeten Fläche
++	mäßige Expression	50 – 75% der umrandeten Fläche
+++	hohe Expression	75 - 100% der umrandeten Fläche

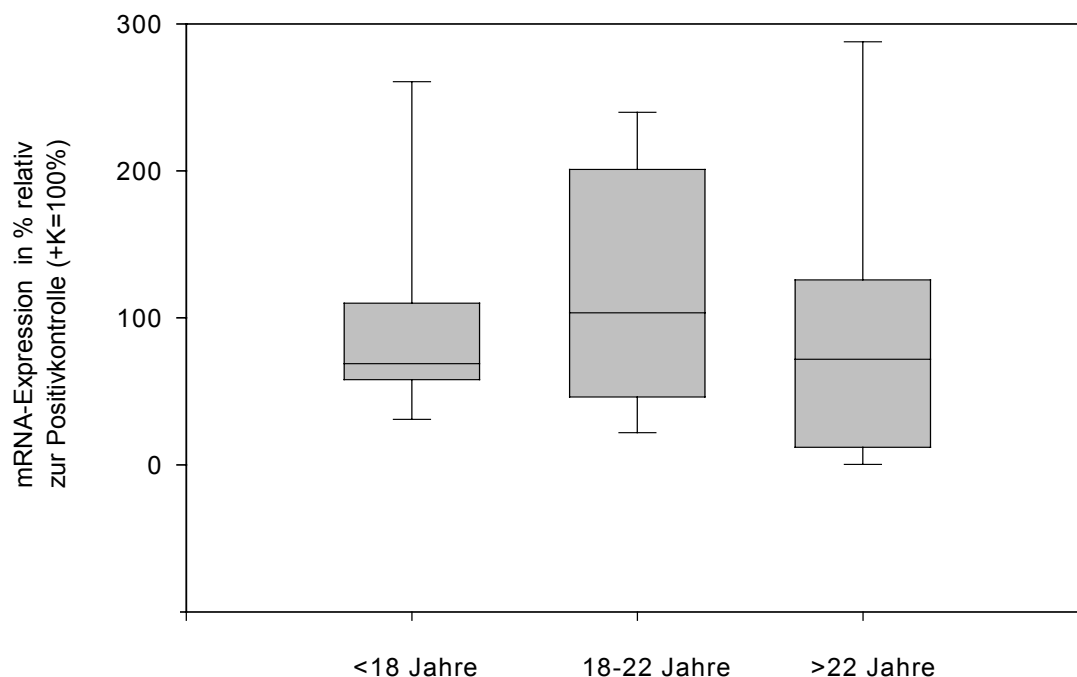
4 Ergebnisse

4.1 RT-PCR

4.1.1 RT-PCR für IGF1 Ligand

Die Agarose-PCR-Gele mit den detektierten PCR-Banden sind in Abb.4-1 und Abb.4-2 dargestellt. Die vergleichende Auswertung mit der Positivkontrolle SW480 zeigte eine sehr hohe Expression in der mittleren Altersgruppe (18-22 Jahre) sowie eine insgesamt hohe Expression von IGF1 Ligand in den beiden Altersgruppen <18 Jahren und >22 Jahren (Abb.3). Die Unterschiede sind nicht signifikant.

Abb.3: mRNA-Expression von IGF1 Ligand für alle Altersgruppen. Die Kontrollbande der Ovarialfibroblasten-Zelllinie SW 480 wurde als 100 % definiert und diente als Bezugsgröße für die Auswertung der mRNA-Expression (+K=100%).



Eine Expression der mRNA für IGF1 Ligand mit mindestens 30% des Schwärzungsgrades der Vergleichsbande konnte in 36 von 48 Geweben (75%) nachgewiesen werden, wobei 17 von 48 Geweben (35%) eine sehr hohe Expression, 14 von 48 Geweben (29%) eine hohe Expression und 5 von 48 Geweben (10%) eine mäßige Expression zeigten. In 12 von 48 Geweben (25%) zeigte sich eine nur schwache oder gar fehlende Expression.

Die Banden auf den PCR-Gelen der Abb.4-1 und veranschaulichen die verschieden stark exprimierten spezifischen Amplifikate für IGF1L bei 498bp und für 18S bei 346bp.

Abb.4-1: mRNA-Expression von IGF1 L bei 498bp im homogenisierten Zahngewebe. Als Bezugsgröße (+K) für die Auswertung der mRNA- Expression diente die Bande der Ovarialfibroblasten-Zelllinie SW 480. Diese Bande wurde als starke Expression definiert, im Vergleich dazu wurden entsprechend schwächere Banden in niedrigere Kategorien eingestuft. (vgl.Tab.10) Die internen Kontrollbanden für 18S befinden sich bei 346bp.

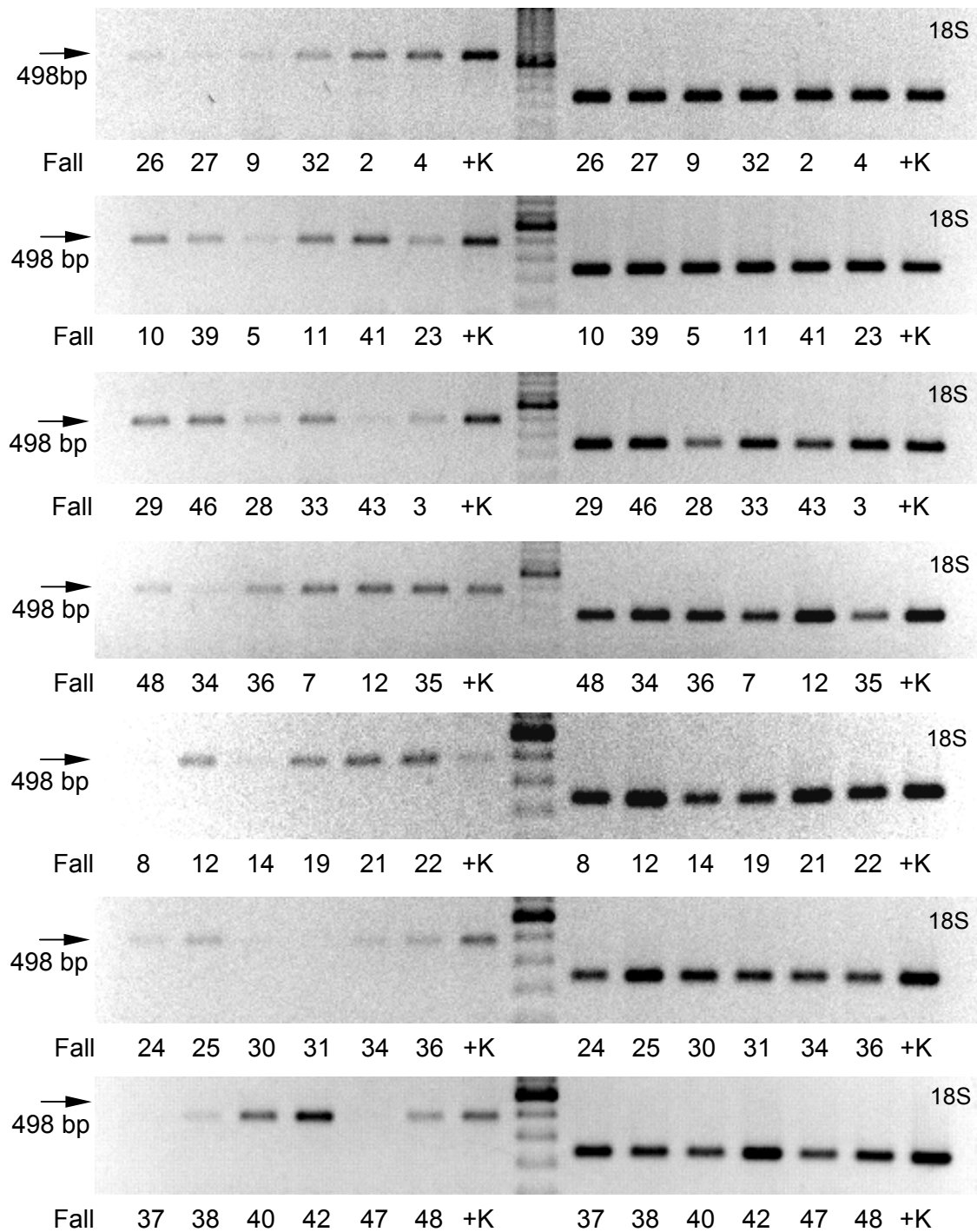
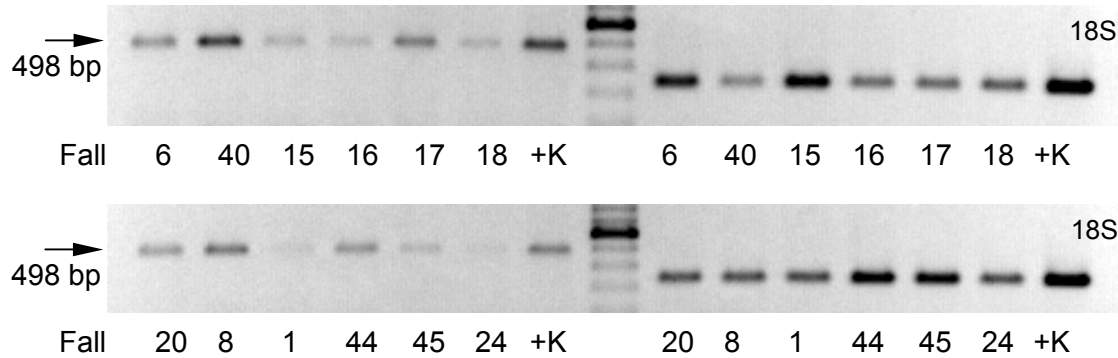


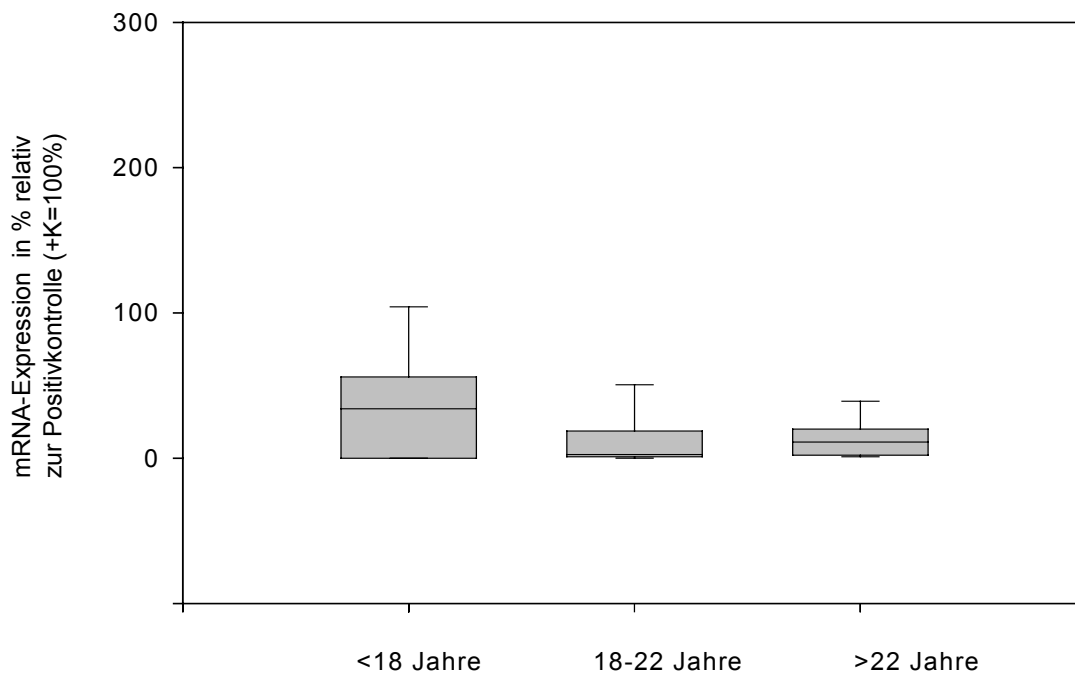
Abb.4-2: mRNA-Expression von IGF1 L (Fortsetzung)



4.1.2 RT-PCR für IGF1 Bindungsprotein 3

Die vergleichende Auswertung der detektierten Gelbanden (Abb.6-1 und Abb.6-2) mit der Positivkontrolle SW480 zeigte eine mäßige Expression von IGF1 Bindungsprotein 3 in der Altersgruppe <18 Jahren. Die beiden höheren Altersgruppen (18-22 Jahre und >22 Jahre) zeigen eine schwache Expression (Abb.5). Die Unterschiede sind nicht signifikant.

Abb.5: mRNA-Expression von IGF1 BP3 für alle Altersgruppen. Die Kontrollbande der Ovarialfibroblasten-Zelllinie SW 480 wurde als 100 % definiert und diente als Bezugsgröße für die Auswertung der mRNA-Expression (+K=100%).



Eine Expression der mRNA für IGF1 Bindungsprotein 3 mit mindestens 30% des Schwärzungsgrades der Vergleichsbande konnte in lediglich 11 von 48 Geweben (23%) nachgewiesen werden, in 37 von 48 Geweben (77%) zeigten sich eine nur schwache oder

gar fehlende Expression. Daneben zeigten 6 von 48 Geweben (13%) eine mäßige Expression, 4 von 48 Geweben (8%) eine hohe Expression und 1 von 48 Geweben (2%) eine sehr hohe Expression. Die PCR-Gele veranschaulichen die verschieden stark exprimierten spezifischen Amplifikate für IGFBP3 bei 660bp und für 18S bei 346bp in Bandenform.

Abb.6-1: mRNA-Expression von IGF1 Bindungsprotein 3 bei 660bp im homogenisierten Zahngewebe. Als Bezugsgröße (+K) für die Auswertung der mRNA- Expression diente die Bande der Ovarialfibroblasten-Zelllinie SW 480. Diese Bande wurde als starke Expression definiert, im Vergleich dazu wurden entsprechend schwächere Banden in niedrigere Kategorien eingestuft. (vgl.Tab.10) Die internen Kontrollbanden für 18S befinden sich bei 346bp.

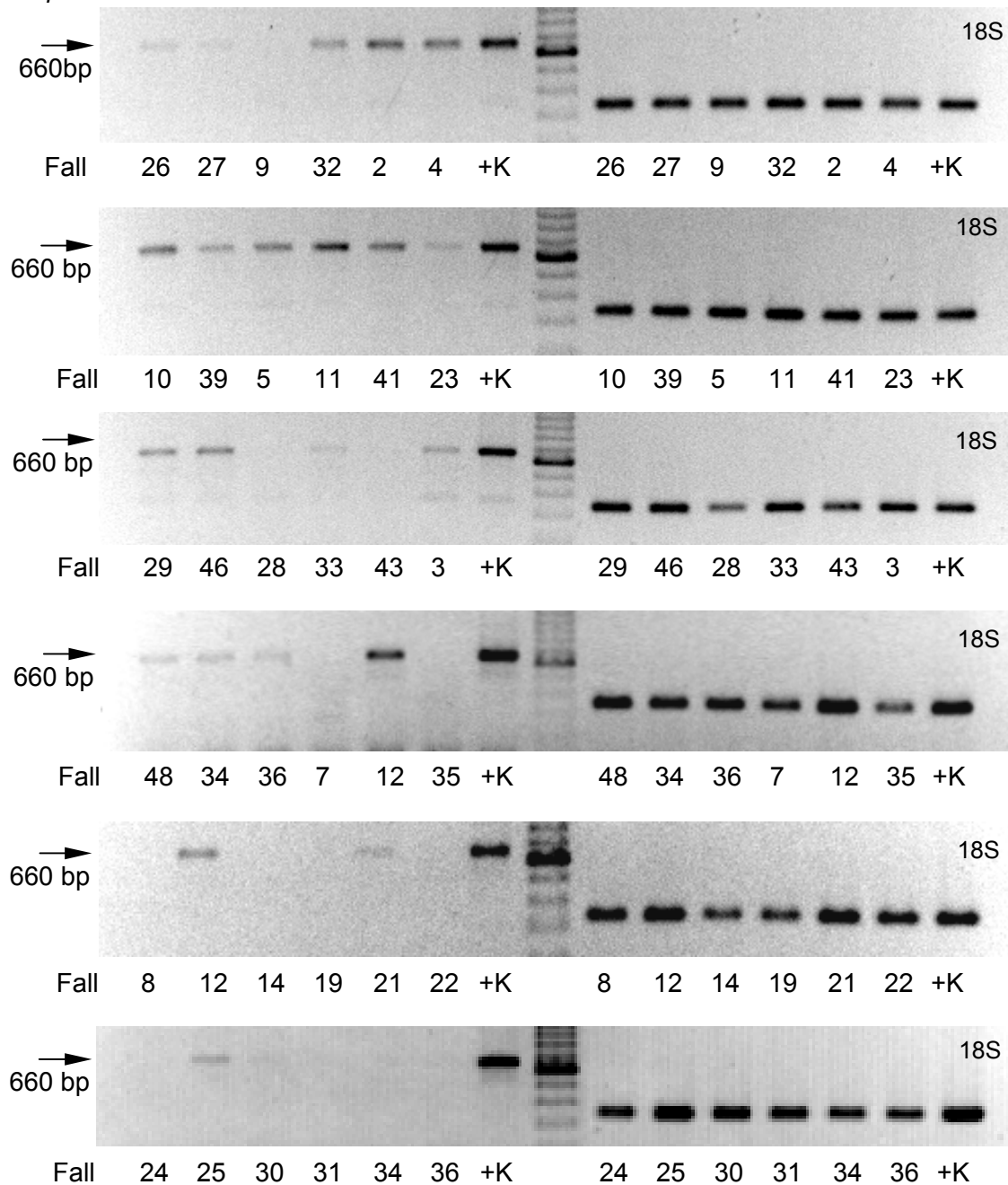
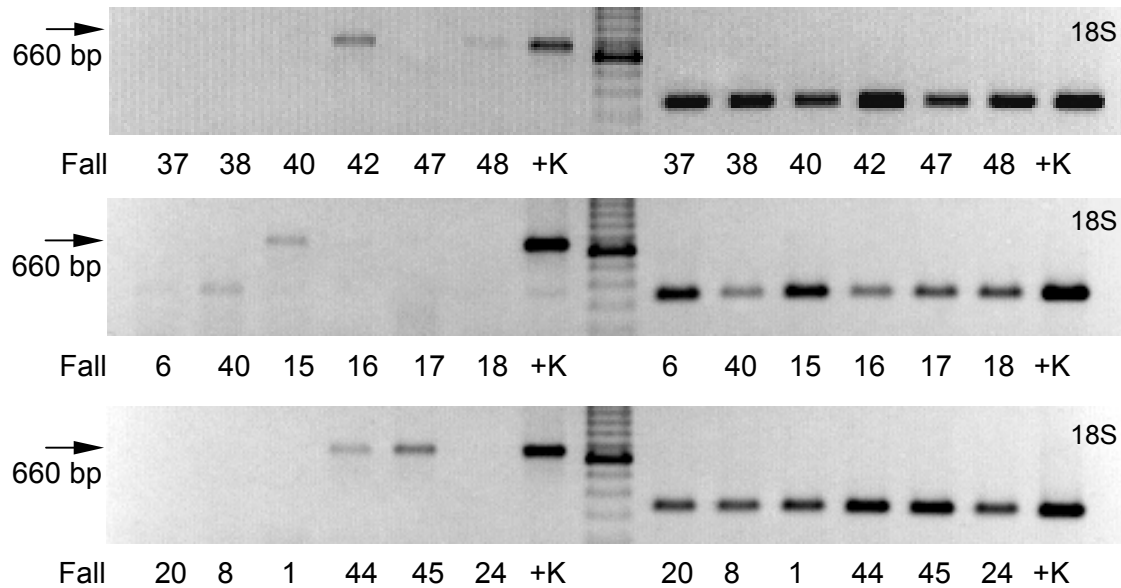


Abb.6-2: mRNA-Expression von IGF1 Bindungsprotein 3 (Fortsetzung)



4.1.3 RT-PCR für IGF1 Rezeptor α

Die vergleichende Auswertung der detektierten PCR-Banden (vgl. PCR-Gele in Abb.8-1 und Abb.8-2) mit der Positivkontrolle SW480 zeigte eine schwache bis mäßige Expression von IGF1 Rezeptor in der Altersgruppe <18 Jahren. Die beiden höheren Altersgruppen (18-22 Jahre und >22 Jahre) zeigen keine bzw. eine schwache Expression (Abb.7).

Auch eine Expression der mRNA für IGF1 Rezeptor α mit mindestens 30% des Schwärzungsgrades der Vergleichsbande konnte in lediglich 8 von 48 Geweben (17%) nachgewiesen werden, In 40 von 48 Geweben zeigten sich eine nur schwache oder gar fehlende Expression (83%). Daneben zeigten 4 von 48 Geweben eine mäßige Expression (8%), 3 von 48 Geweben eine hohe Expression (6%) und 1 von 48 Geweben eine sehr hohe Expression (2%). Die PCR-Gele veranschaulichen die verschieden stark exprimierten spezifischen Amplifikate für IGF1L bei 668bp und für 18S bei 346bp in Bandenform.

Abb.7: mRNA-Expression von IGF1 $R\alpha$ für alle Altersgruppen. Die Kontrollbande der Ovarialfibroblasten-Zelllinie SW 480 wurde als 100 % definiert und diente als Bezugsgröße für die Auswertung der mRNA-Expression (+K=100%).

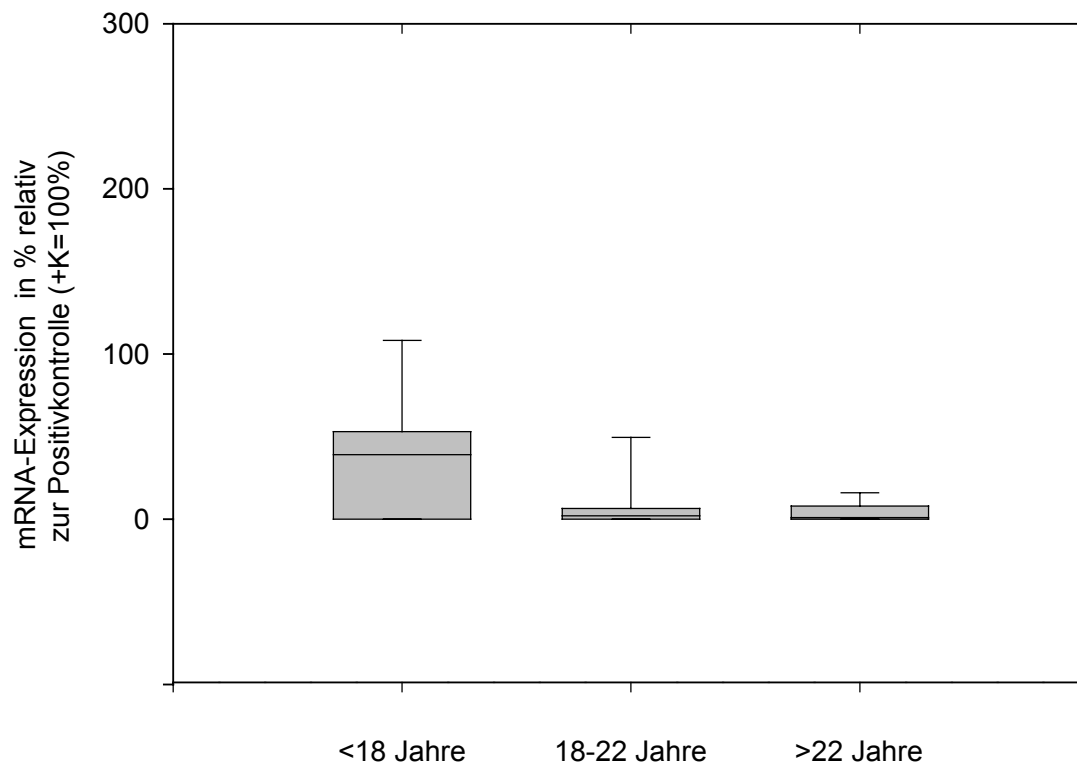


Abb.8-1: mRNA-Expression von IGF1 Rezeptor α bei 668bp im homogenisierten Zahngewebe. Als Bezugsgröße (+K) für die Auswertung der mRNA- Expression diente die Bande der Ovarialfibroblasten-Zelllinie SW 480. Diese Bande wurde als starke Expression definiert, im Vergleich dazu wurden entsprechend schwächere Banden in niedrigere Kategorien eingestuft. (vgl.Tab.10) Die internen Kontrollbanden für 18S befinden sich bei 346bp.

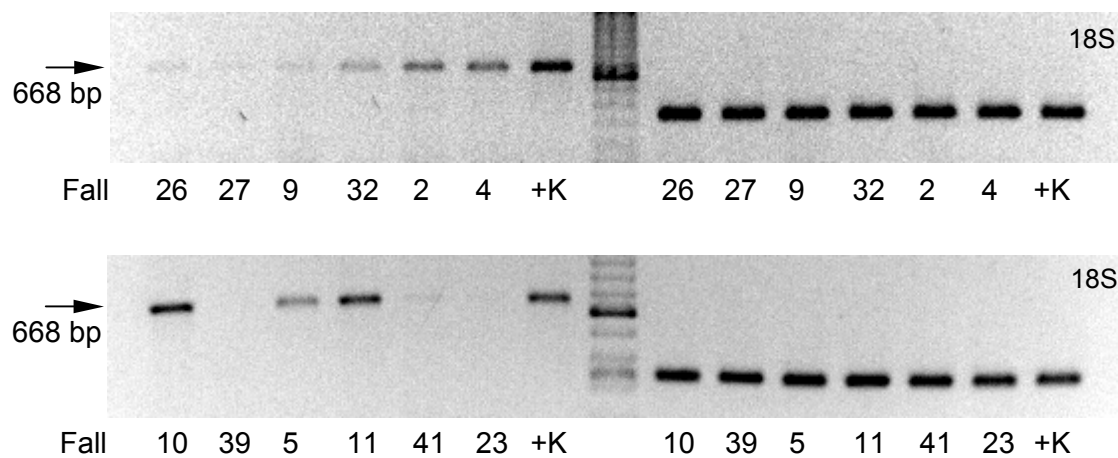
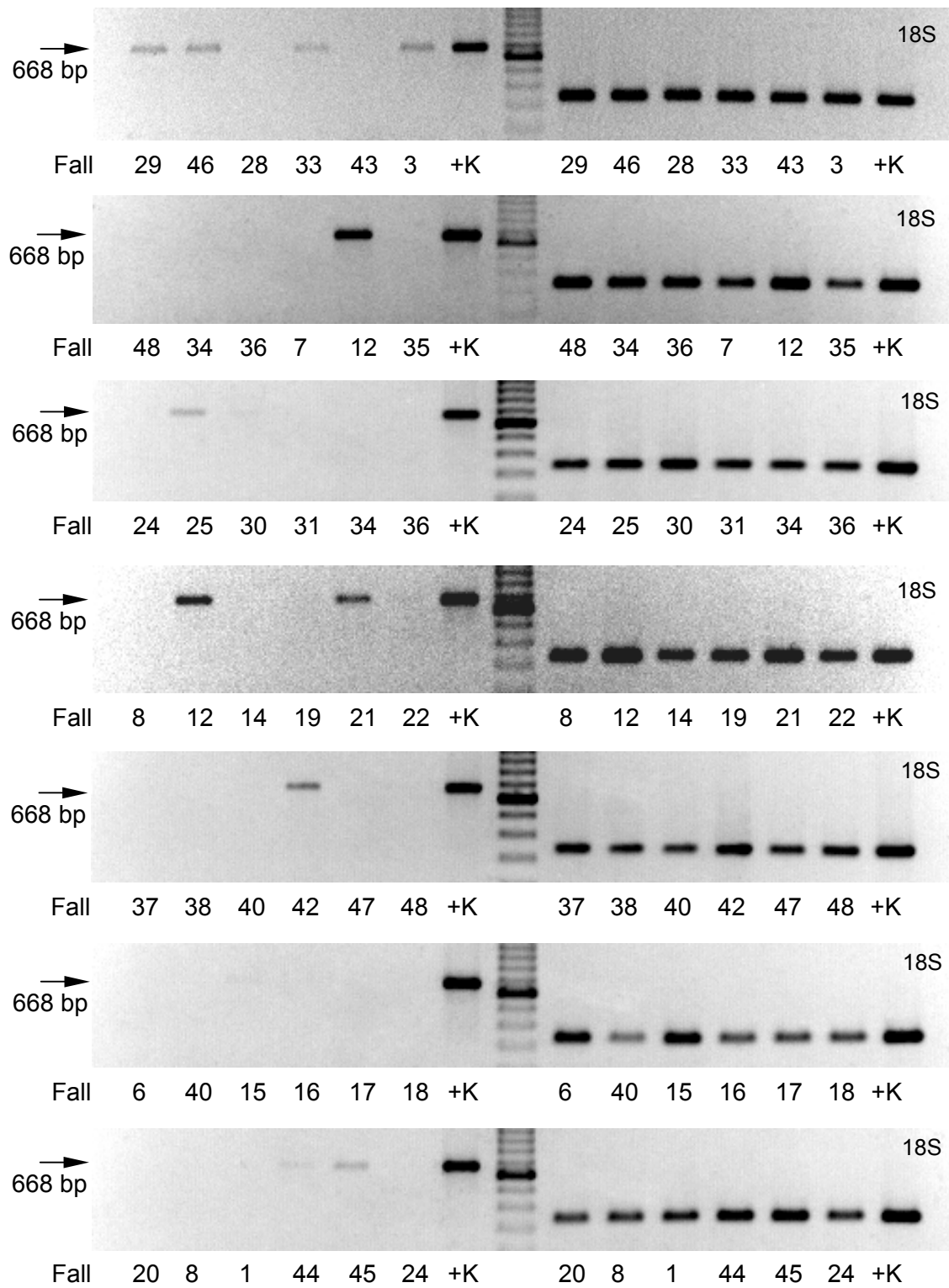


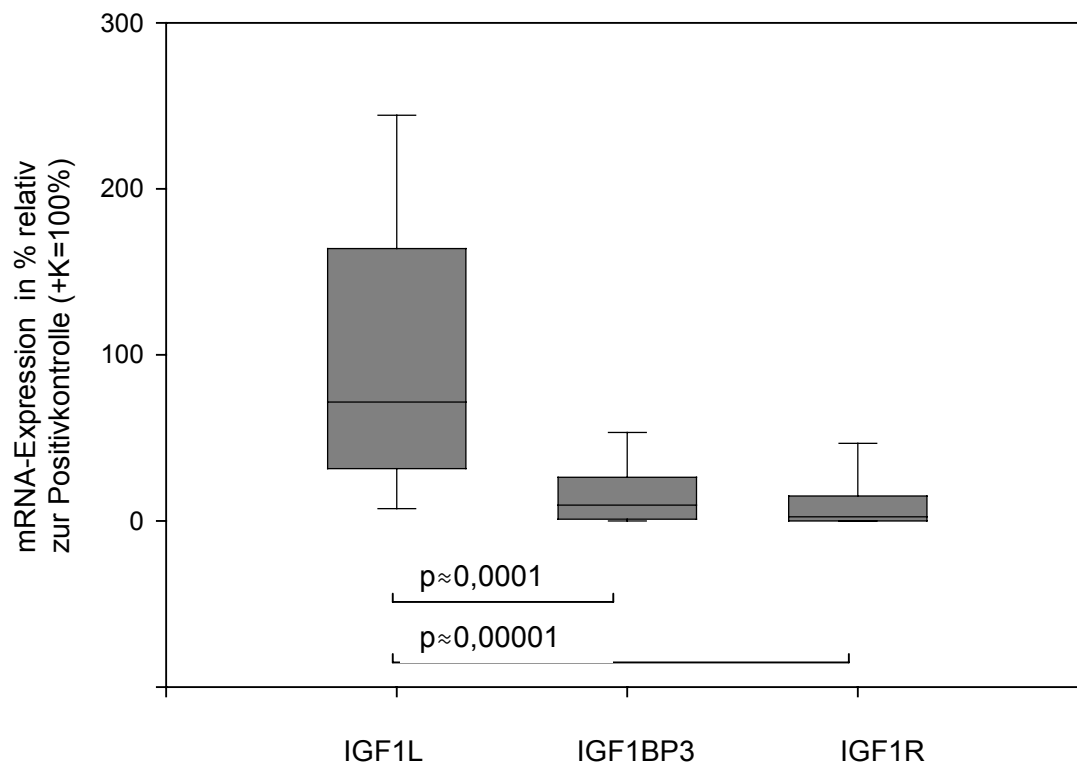
Abb.8-2: mRNA-Expression von IGF1 Rezeptor α (Fortsetzung)



4.1.4 Gesamtübersicht der mRNA-Expression in der RT-PCR

Die RT-PCR Untersuchungen für IGF1 Ligand, IGF1 Bindungsprotein 3 und IGF1 Rezeptor α wurden an 48 Zähnen durchgeführt. Die vergleichende Auswertung der detektierten PCR-Banden mit der Positivkontrolle SW480 (vgl. PCR-Gele in Abb.4, Abb.6 und Abb.8) zeigt eine insgesamt hohe bis sehr hohe Expression von IGF1 Ligand. Diese ist signifikant höher als die insgesamt schwache Expression von IGF1 Bindungsprotein 3 und IGF1 Rezeptor α (Abb.9).

Abb.9 : mRNA-Expression von IGF1 Ligand, IGF1 Bindungsprotein 3 und IGF1 Rezeptor α für alle Altersgruppen (Gesamtübersicht). Die Kontrollbande der Ovarialfibroblasten-Zelllinie SW 480 wurde als 100 % definiert und diente als Bezugsgröße für die Auswertung der mRNA-Expression (+K=100%). p-Wert mit Angabe statistisch signifikanter Unterschiede



Der variierende Grad der Expression innerhalb der drei Altersgruppen korreliert in der vorliegenden Arbeit nicht mit dem Geschlecht und stellt sich wie folgt dar: In der jüngsten Altersgruppe (<18Jahre, vgl.Tab.10-1) exprimiert IGF1 in 9 von 11 Geweben sehr hoch und hoch. IGFBP3 ist in 4 von 11 Geweben sehr hoch und hoch exprimiert, in 7 Geweben mäßig bis schwach. Die Expression von IGF1R α ist in 6 von 11 Geweben sehr hoch bis mäßig, in 5 Geweben hingegen schwach ausgeprägt.

Tab.10-1: mRNA-Expression von IGF1 Ligand, IGF1 Bindungsprotein 3 und IGF1 Rezeptor α im homogenisierten Zahngewebe der AG 1 (<18Jahre). Als Positivkontrolle und Bezugsgröße für die Auswertung der mRNA- Expression diente die Bande der Ovarialfibroblasten-Zelllinie SW 480. Diese Bande wurde als starke Expression (100%) definiert. – keine oder schwache Expression, entspricht <30% des Schwärzungsgrades der Vergleichsbande; + mäßige Expression, entspricht 30–50% des Schwärzungsgrades der Vergleichsbande; ++ hohe Expression, entspricht >50 – 100% des Schwärzungsgrades der Vergleichsbande; +++ sehr hohe Expression, entspricht >100% des Schwärzungsgrades der Vergleichsbande

Nummer	Alter	Geschlecht	IGF1L	IGF1BP3	IGF1R α
1	15	w	43(+)	0(-)	0(-)
2	15	w	65(++)	56(++)	40(+)
3	15	w	69(++)	17(-)	17(-)
4	15	m	58(++)	57(++)	39(+)
5	16	w	66(++)	34(+)	41(+)
6	16	m	110(+++)	0(-)	0(-)
7	16	m	283(+++)	0(-)	0(-)
8	16	w	78(++)	53(++)	116(+++)
9	17	m	28(-)	2(-)	7(-)
10	17	m	172(+++)	116(+++)	53(++)
11	17	w	78(++)	47(+)	77(++)

In der mittleren Altersgruppe (18-22Jahre, vgl.Tab.10-2) ist die Expression von IGF1 in 10 von 14 Geweben sehr hoch und hoch, in den anderen 4 Geweben mäßig und schwach. IGFBP3 wird in 2 von 14 Geweben hoch und mäßig, sonst schwach oder nicht exprimiert. Die Gewebe der mittleren Altersgruppe exprimieren IGF1R α in 2 von 14 Geweben hoch bis mäßig und in 12 Geweben schwach oder nicht.

Tab.10-2 mRNA-Expression von IGF1 Ligand, IGF1 Bindungsprotein 3 und IGF1 Rezeptor α im homogenisierten Zahngewebe, AG 2 (18-22Jahre). Legende analog zu Tab.10-1.

Nummer	Alter	Geschlecht	IGF1L	IGF1BP3	IGF1R α
12	18	m	136(+++)	37(+)	53(++)
13	19	w	200(+++)	0(-)	46(+)
14	20	m	16(-)	0(-)	1(-)
15	20	w	41(+)	18(-)	2(-)
16	20	w	59(++)	3(-)	3(-)
17	20	w	198(+++)	1(-)	0(-)
18	20	w	61(++)	1(-)	0(-)
19	20	m	180(+++)	3(-)	0(-)
20	20	m	240(+++)	1(-)	1(-)
21	20	m	204(+++)	21(-)	8(-)
22	20	m	240(+++)	2(-)	3(-)
23	21	w	71(++)	8(-)	2(-)
24	21	w	28(-)	1(-)	0(-)
25	22	w	48(+)	64(++)	6(-)

In der Altersgruppe >22 Jahren (siehe Tab.10-3) zeigen 12 von 23 Geweben eine sehr hohe und hohe Expression für IGF1. Der Grad der Expression von IGF1BP3 ist in 3 von 23 Geweben mäßig, in der Mehrzahl der Gewebe schwach oder nicht nachweisbar. IGF1R α ist ausnahmslos schwach oder nicht exprimiert.

Tab.10-3: mRNA-Expression von IGF1 Ligand, IGF1 Bindungsprotein 3 und IGF1 Rezeptor α im homogenisierten Zahngewebe, AG 3 (>22Jahre). Legende analog zu Tab.10-1.

Nummer	Alter	Geschlecht	IGF1L	IGF1BP3	IGF1R α
26	23	w	16(-)	11(-)	8(-)
27	23	w	8(-)	7(-)	4(-)
28	25	w	39(+)	2(-)	1(-)
29	26	w	152(+++)	20(-)	19(-)
30	26	w	1(-)	11(-)	3(-)
31	26	w	2(-)	2(-)	0(-)
32	27	m	29(-)	28(-)	16(-)
33	27	w	104(+++)	3(-)	8(-)
34	29	m	24(-)	18(-)	1(-)
35	30	m	413(+++)	0(-)	0(-)
36	30	m	94(++)	13(-)	1(-)
37	32	m	0(-)	7(-)	0(-)
38	33	w	12(-)	1(-)	0(-)
39	34	w	72(++)	20(-)	1(-)
40	34	w	385(+++)	1(-)	1(-)
41	38	w	84(++)	35(+)	7(-)
42	39	m	339(+++)	42(+)	1(-)
43	41	m	74(++)	1(-)	0(-)
44	42	m	126(+++)	19(-)	4(-)
45	42	m	50(+)	44(+)	12(-)
46	50	m	168(+++)	18(-)	16(-)
47	59	m	-4(-)	2(-)	0(-)
48	67	w	81(++)	12(-)	1(-)

4.2 Immunhistochemie

4.2.1 Proteinexpression für IGF1 Ligand

Die Mehrzahl der Schnitte von 12 Geweben zeigten positiv gefärbte Zellareale als Ausdruck einer Proteinexpression von IGF1 Ligand (Abb.10-1 und Abb.10-2). In 7 Geweben wurde IGF1 Ligand mäßig exprimiert, 3 Gewebe zeigten eine niedrige, 2 Gewebe keine Expression.

Abb.10-1: Immunreaktivität von IGF1 Ligand im Zahngewebe

A: IGF1L-Immunreaktivität im Bereich der apikalen Dentinscheide; starke Färbung des Odontoblastensaums (Fall 57, x10)

B: IGF1L-Immunreaktivität im Bereich der apikalen Dentinscheide; starke Färbung des peripheren Zytoplasmas ausdifferenzierter Odontoblasten (Fall 57, x40)

C: IGF1L-Immunreaktivität im Bereich der apikalen Dentinscheide; starke Färbung von Zahnpapille, Odontoblastenschicht und Zementoblasten (Fall 51, x20)

D: IGF1L-Immunreaktivität im Bereich der Bifurkation; starke Färbung der Odontoblastenschicht (Fall 51, x20)

E: IGF1L-Immunreaktivität im Bereich der Prädentinscheide; starke Färbung der Odontoblastenschicht (Fall 51, x20)

F: IGF1L-Immunreaktivität im Bereich der entstehenden Prädentinscheide; starke Färbung von Mesenchymzellen des Zahnsäckchens und der Reihe von Präodontoblasten (Fall 51, x20)

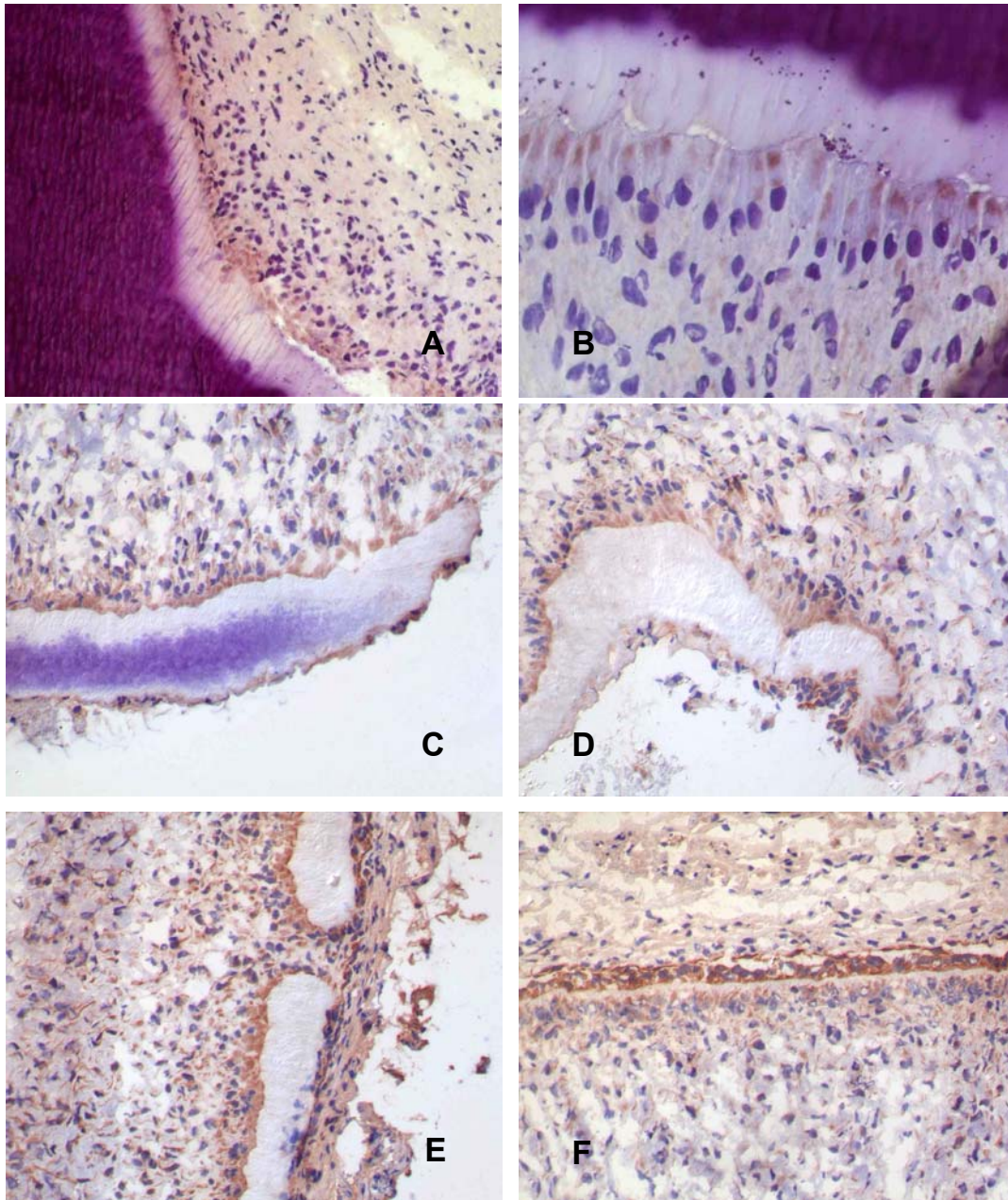


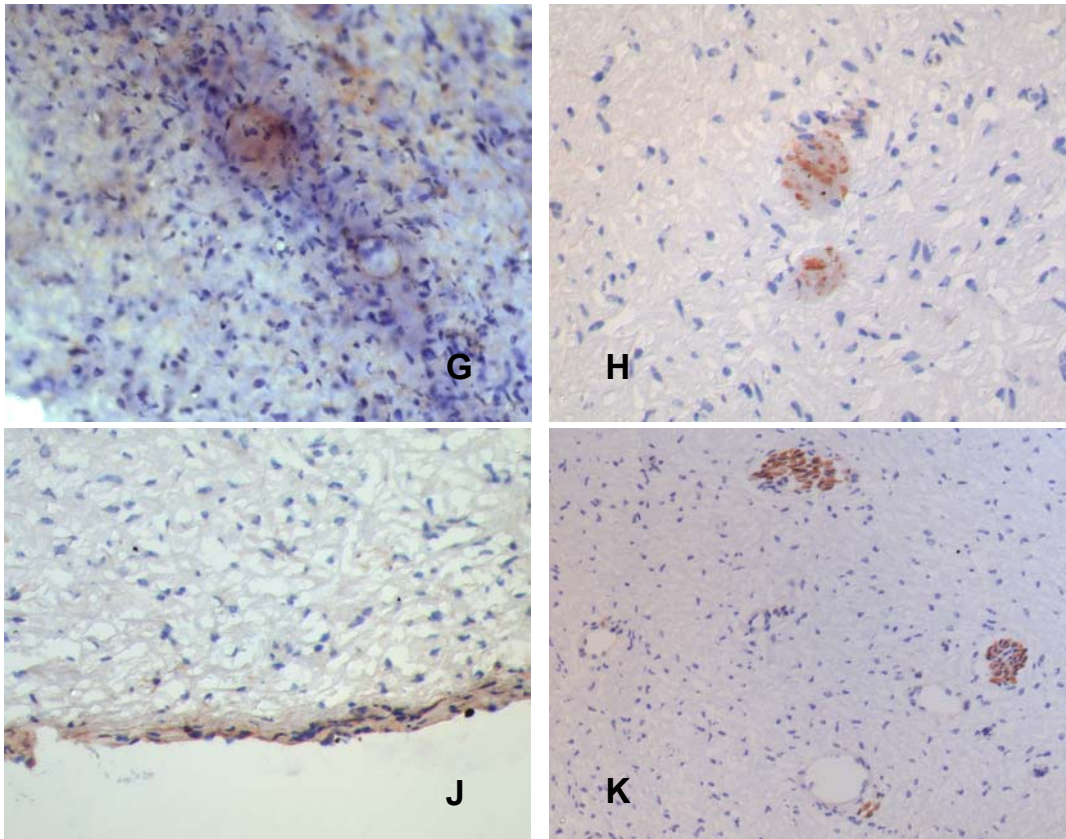
Abb.10-2: Immunreaktivität von IGF1 Ligand im Zahngewebe

G: IGF1L-Immunreaktivität im Bereich der Zahnpulpa; schwache Färbung im Zytoplasma von Mesenchymzellen, Fibroblasten und Gefäßwänden (Fall 58, x20)

H: IGF1L-Immunreaktivität im Bereich der Zahnpulpa; starke Färbung des Zytoplasmas von Zellaggregationen/Stammzellen (Fall 49, x20)

J: IGF1L-Immunreaktivität im Bereich des noch offenen Foramen apicale; starke Färbung von Mesenchymzellen und Bindegewebsfasern des Zahnsäckchens und von Präzementoblasten (Fall 49, x20)

K: IGF1L-Immunreaktivität im Bereich der Pulpa, starke Färbung disseminierter Zellcluster in Gefäßnähe (Fall 50, x40)



4.2.2 Proteinexpression für IGF1 Bindungsprotein 3

Von den 12 untersuchten Geweben zeigten 3 Gewebe eine mäßige Expression, 6 erwiesen sich als niedrig exprimierend, 3 Gewebe zeigten keine Expression von IGF1 Bindungsprotein 3 (vgl Abb. 11-1 und Abb.11-2.)

Abb. 11-1: Immunreaktivität von IGF1 Bindungsprotein 3 im Zahngewebe

A: IGFBP3-Immunreaktivität im Bereich der apikalen Dentinscheide; starke Färbung des Odontoblastensaums, der zellkernarmen Weilschen Zone und der zellkernreichen Bipolaren Zone sowie der äußeren Zementoblastenschicht (Fall 50, x20)

B: IGFBP3-Immunreaktivität im Bereich der apikalen Dentinscheide; starke Färbung des Zytoplasmas ausdifferenzierter Odontoblasten und der zellkernarmen Weilschen Zone (Fall 54, x40)

C: IGFBP3-Immunreaktivität im Bereich der apikalen Dentinscheide; starke Färbung von Zellen der Zahnpapille, der Schicht junger Odontoblasten und des Zahnsäckchens samt Zementoblasten (Fall 51, x20)

D: IGFBP3-Immunreaktivität im Bereich der Bifurkation; starke Färbung der jungen Odontoblasten und der Mesenchymzellen (Fall 51, x10)

E: IGFBP3-Immunreaktivität im Bereich der Zahnpulpa; mäßige Färbung in Gefäßwänden (Fall 54, x20)

F: IGFBP3-Immunreaktivität im Bereich der Zahnpulpa; schwache Färbung von Bindegewebszellen und Fibroblasten (Fall 51, x40)

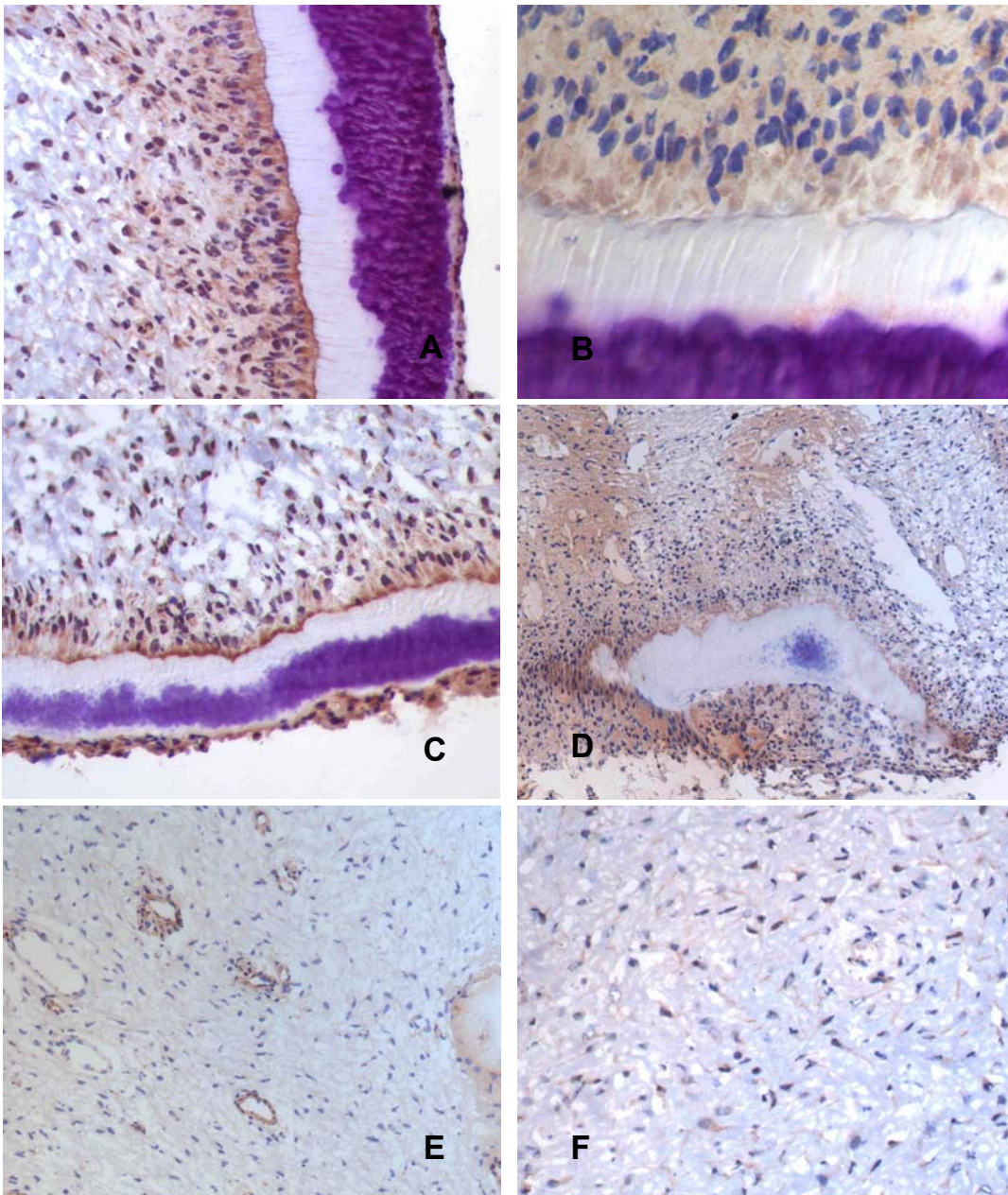


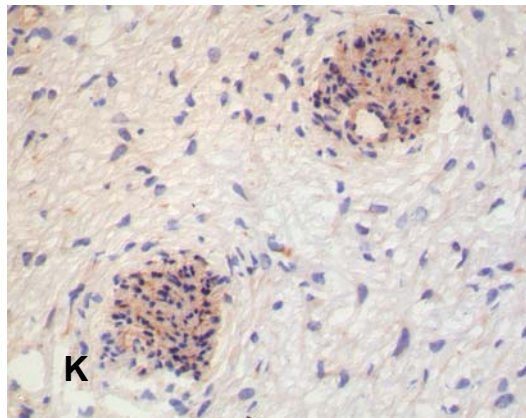
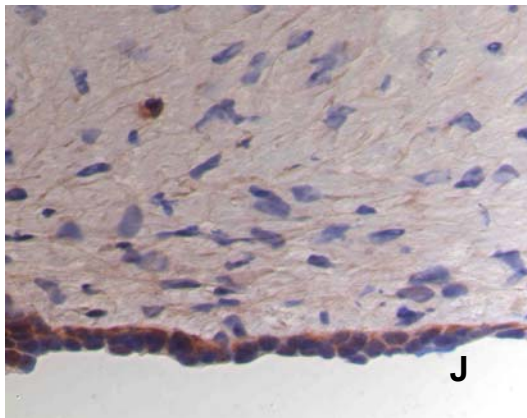
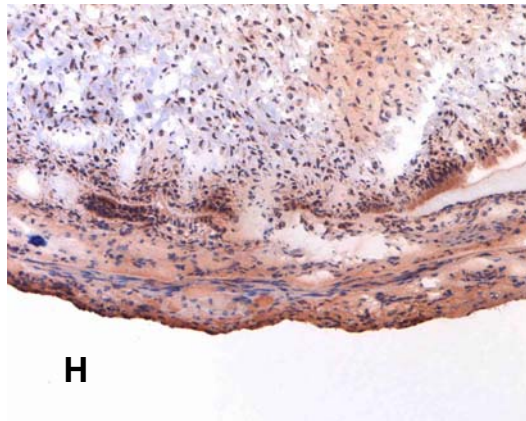
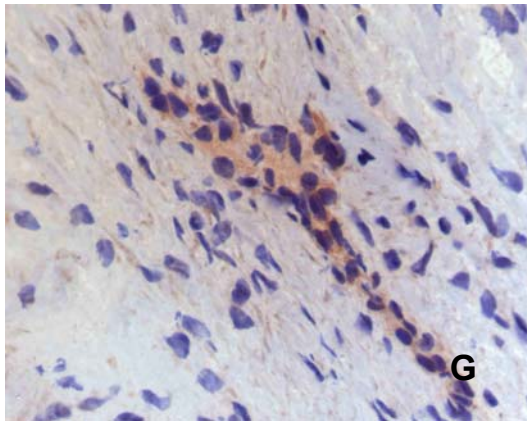
Abb.11-2: Immunreaktivität von IGF1 Bindungsprotein 3 im Zahngewebe

G: IGFBP3-Immunreaktivität im Bereich der Zahnpulpa; starke Färbung im Zytoplasma von Gefäßwänden (Fall 50, x40)

H: IGFBP3-Immunreaktivität im Bereich der Prädentinscheide; starke Färbung des Zytoplasmas von Präodontoblasten und Bindegewebsfasern des Zahnsäckchens (Fall 51, x10)

J: IGFBP3-Immunreaktivität im Bereich des noch offenen Foramen apicale; starke Färbung von Zellen des Zahnsäckchens (Fall 54, x40)

K: IGFBP3-Immunreaktivität in der Pulpa, starke Färbung disseminierter Zellhaufen in Gefäßnähe (Fall 54, x20)



4.2.3 Proteinexpression für IGF1 Rezeptor α

Von den 12 untersuchten Geweben zeigten 3 eine mäßige, 5 Gewebe eine niedrige und 4 Gewebe keine Expression von IGF1 Rezeptor α .

Abb.12-1: Immunreaktivität von IGF1 Rezeptor α im Zahngewebe

A: IGF1R α -Immunreaktivität im Bereich der apikalen Dentinscheide; starke Färbung des Odontoblastensaums und des Zahnsäckchens (Fall 54, x10)

B: IGF1R α -Immunreaktivität im Bereich der apikalen Prädentinscheide; starke Färbung des Zytoplasmas junger Odontoblasten, des Pulpamesenchyms und des Zahnsäckchens samt Zementoblasten (Fall 54, x40)

C: IGF1R α -Immunreaktivität im Bereich der apikalen Prädentinscheide; diffus starke Färbung des Zytoplasmas junger Odontoblasten, fokal schwache Färbung des Pulpamesenchyms und des Zahnsäckchens (Fall 50, x10)

D: IGF1R α -Immunreaktivität im Bereich des Prädentins; starke Färbung des Zahnsäckchens und des Zytoplasmas der Präodontoblasten, mäßige Färbung des Pulpamesenchyms (Fall 51, x20)

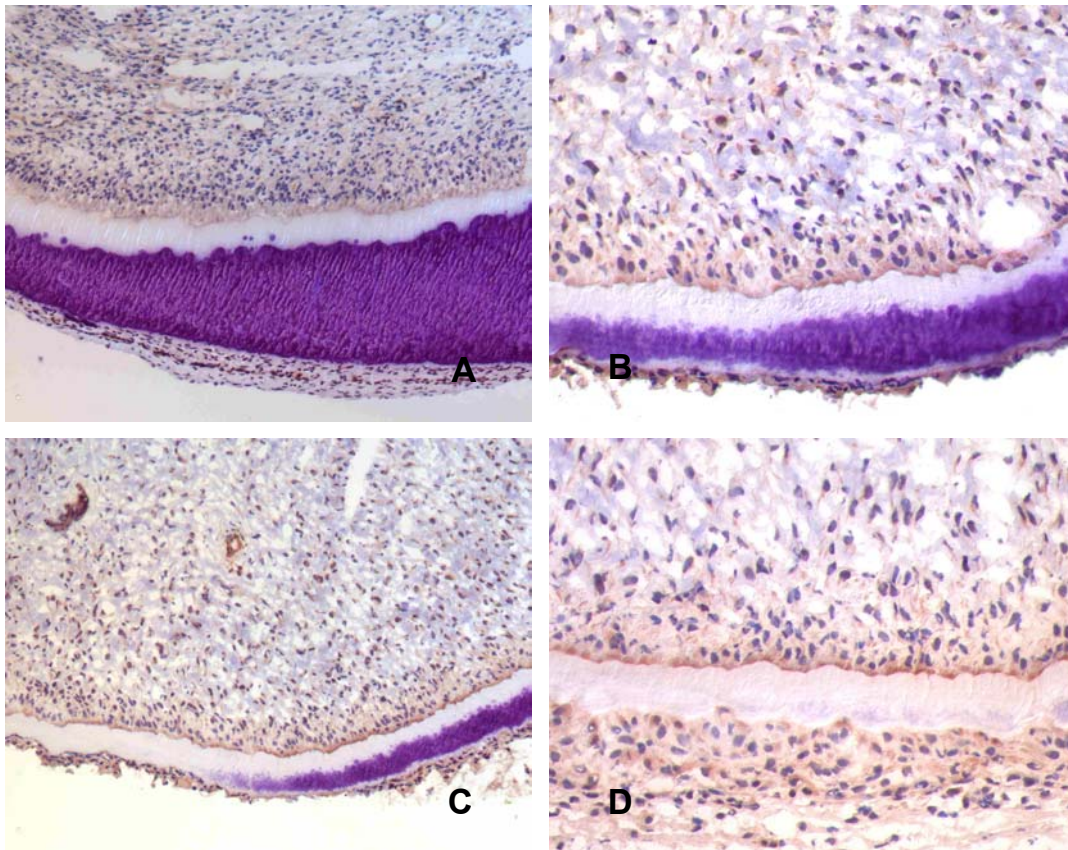


Abb.12-2: Immunreaktivität von IGF1 Rezeptor α im Zahngewebe

E: IGF1R α -Immunreaktivität im Bereich von Prädentininseln; mäßige Färbung des Pulpamesenchyms (Fall 51, x20)

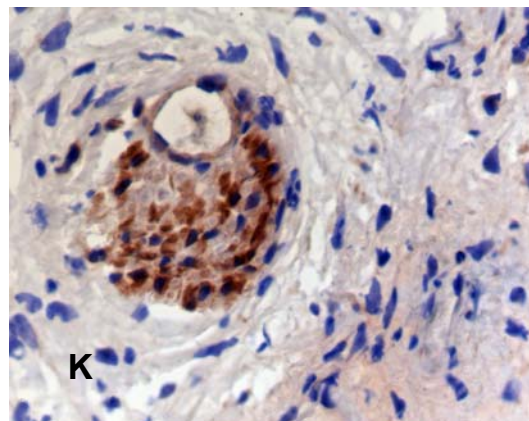
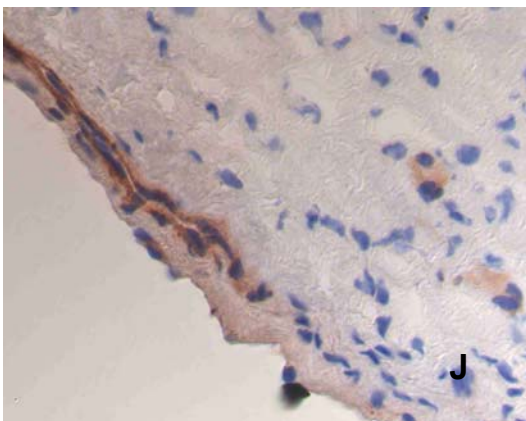
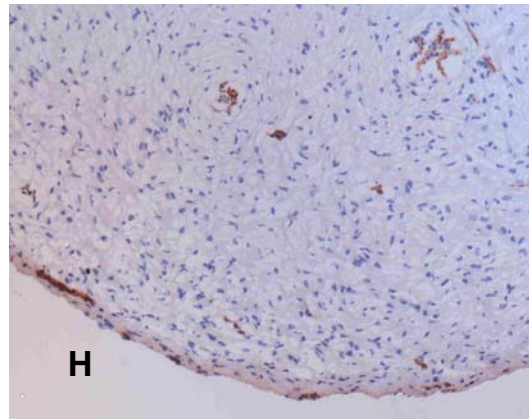
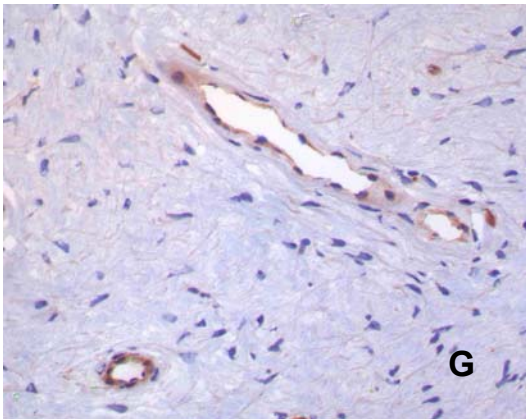
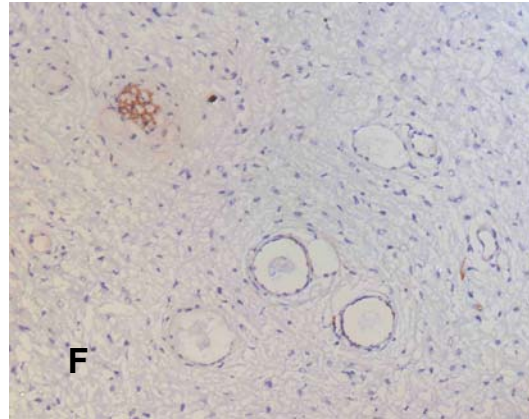
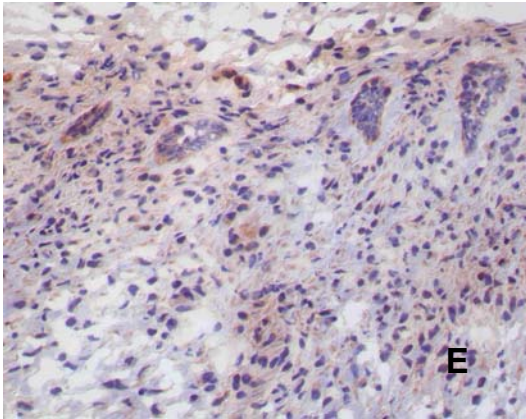
F: IGF1R α -Immunreaktivität im Bereich von Pulpagesäßen; schwache Färbung von Gefäßwänden (Fall 49, x20)

G: IGF1R α -Immunreaktivität im Bereich von Pulpagesäßen; starke Färbung von Gefäßwänden (Fall 50, x20)

H: IGF1R α -Immunreaktivität im Bereich des noch offenen Foramen apicale; schwache Färbung von Zellen des Zahnsäckchens (Fall 49, x10)

J: IGF1R α -Immunreaktivität im Bereich des noch offenen Foramen apicale; starke Färbung von Zellen des Zahnsäckchens (Fall 49, x40)

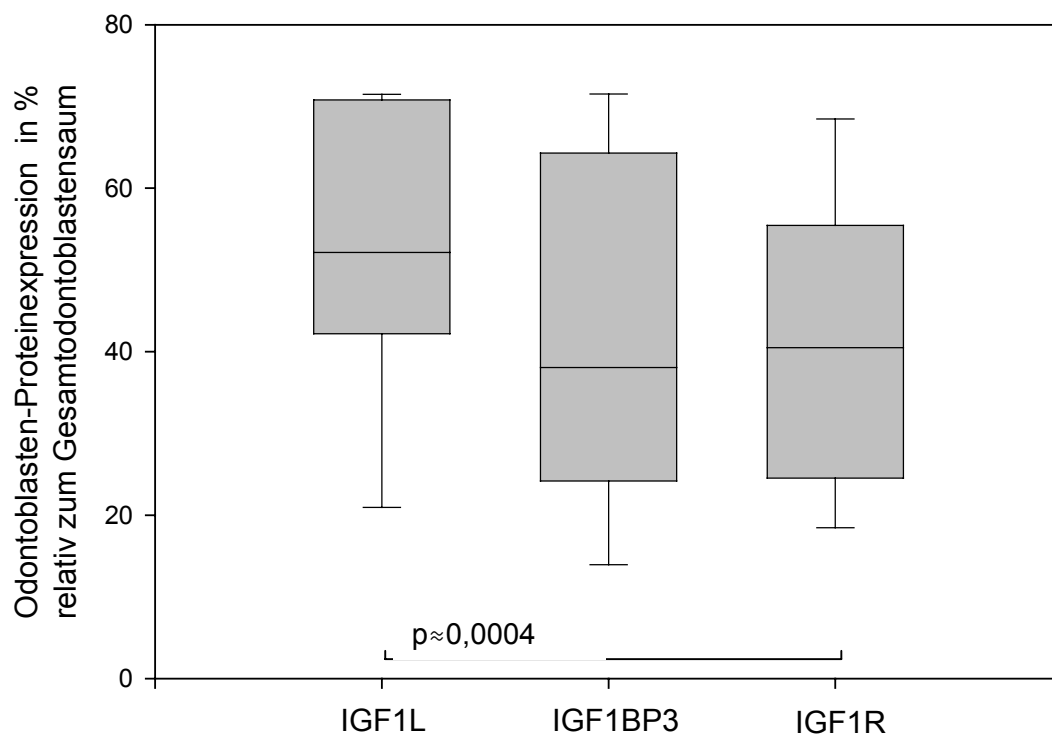
K: IGF1R α -Immunreaktivität in der Pulpa, starke Färbung disseminierter Zellhaufen in Gefäßnähe (Fall 50, x40)



4.2.4 Gesamtübersicht der Proteinexpression

Die Auswahl und die Behandlung zwölf geeigneter Nativgewebe ermöglichten den Expressionsnachweis der Wachstumsfaktoren IGF1 Ligand, IGF1 Bindungsprotein 3 und IGF1 Rezeptor α . Die Proteinexpression am Odontoblastensaum der Apikalregion variierte dabei stark (Tab.11 und Abb.13) und stellt sich in über der Hälfte der Gewebe als mäßige beziehungsweise niedrige Expression dar (siehe Tab.11). In Korrelation mit den Ergebnissen der RT-PCR zeigt die Gesamtübersicht in Abb.13 eine gegenüber IGF1 Rezeptor signifikant höhere Expression von IGF1 Ligand. Der Odontoblastensaum weist an den untersuchten Stellen stets über ein Drittel positiv gefärbte Zellareale auf.

Abb.13: Übersicht über die Immunreaktivität von IGF1 Ligand, IGF1 Bindungsprotein 3 und IGF1 Rezeptor α im Zahngewebe. *p*-Wert mit Angabe statistisch signifikanter Unterschiede.



Tab.11: Übersicht über die Immunreaktivität von IGF1 Ligand, IGF1 Bindungsprotein 3 und IGF1 Rezeptor α im Zahngewebe: die Odontoblasten-Proteinexpression wurde in vier Kategorien aufgeteilt: keine (-), niedrige (+), mäßige (++) und hohe (+++) Expression. (vgl Auswertungsparameter in Tab.9).

Nummer	Alter	Geschlecht	IGFL	IGFBP3	IGF1R α
49	15	w	++	+	++
50	15	w	+	++	++
51	15	m	++	++	++
52	16	w	-	+	+
53	16	m	++	-	-
54	16	m	++	++	+
55	16	w	++	+	-
56	16	w	++	+	+
57	16	m	++	-	+
58	17	m	+	+	-
59	19	w	-	-	+
60	22	w	+	+	-

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Gewebeauswahl und der Methodik

Mit der durchgeführten Methode der Gewinnung von mRNA aus homogenisiertem Zahngewebe und der Anfertigung von Dünnschnitten am unentkalkten Zahn lässt sich die altersabhängige Expression von IGF1-mRNA in humanen Weisheitszähnen belegen.

Impaktierte menschliche Weisheitszähne stellen nach ihrer operativen Entfernung mittels Osteotomie eine hervorragende Grundlage für molekularbiologische und immunhistochemische Analysen odontogener Expressionsprofile in zahnbildenden Geweben dar. Komplette von Knochen umgeben, sind sie frei von exogenen Einflüssen. Das Studiendesign basiert auf der Tatsache, dass diese Zähne keinen Kariesbefall aufweisen und während der Operation dem Mundhöhlenmilieu kaum ausgesetzt waren. Die Osteotomie ist ein häufig durchgeführter chirurgischer Eingriff, daher ist eine gezielte Auswahl des Patientengutes realisierbar. Die Altersgruppe 1 (bis 17 Jahre) setzt sich aus Patienten zusammen, bei denen eine drohende Durchbruchsbehinderung aufgrund der Kroneninklination schon im Stadium der Wurzelbildung um das 15. Lebensjahr erkannt worden ist. Die meisten Patienten der Altersgruppe 2 (18-22 Jahre) unterzogen sich

aufgrund beginnender Beschwerden im Verlaufe einer Dentitio Difficilis einer operativen Weisheitszahnentfernung. Spätere Zahnentfernungen wurden in der Altersgruppe 3 (ab 23 Jahre) erfasst. Die Wurzelbildung zum Extraktionszeitpunkt war durch Röntgenuntersuchungen erfassbar. Der bei professioneller Ausführung sehr zügige Ablauf der operativen Zahnentfernung mit sofortiger Überführung in flüssigen Stickstoff gewährleistet eine zeitnahe Arretierung aller Stoffwechselvorgänge im Zahninneren zum Moment kurz nach der Durchtrennung der pulpaversorgenden Blutgefäße.

Diese Überlegung war die Grundlage bei der Extraktion der Gesamt-RNA und für das Vorgehen bei der Schnittgewinnung am Nativpräparat. Unter Inkaufnahme einer Unzugänglichkeit koronaler Pulpaanteile gelang eine Aufbereitung von Gewebe aus dem Apexbereich. Die Präparategewinnung am unentkalkten Zahn (siehe 3.3.1) ist auf Bereiche beschränkt, die am Mikrotom noch zerstörungsfrei geschnitten werden können, was bis zu einer Dicke der mineralisierten Dentinwurzelscheide von etwa 0,4 mm gewährleistet ist. Die Zertrennbarkeit weiter koronal gelegener Areale nimmt mit dem Mineralisationsstand des Zahnes ab und führt zu unverwertbaren Präparaten. Unter Ausnutzung dieser Einschränkung wurden die normalerweise üblichen Schritte der mehrstündigen Formalinfixation und der mehrere Monate dauernden Dekalzifizierung in EDTA-Lösung umgangen (Götz *et al.* 2001). Dadurch wurden die gesuchten Antigene lediglich einer kältethermischen Belastung jedoch keiner langanhaltenden chemischen Belastung mit nicht auszuschließenden unerwünschten Reaktionen oder einer Proteindegradation ausgesetzt. Da im Schnittpräparat die interessierenden Gewebebereiche unterschiedlich starke Färbungen aufwiesen, wurden zur Auswertung nur die den Idealzustand darstellenden Zellareale vermessen und berechnet. Der Lokisationsnachweis für eine Genexpression ist damit in vorliegender Studie klar auf den geschnittenen apikalen Bereich der Wurzelscheide beschränkt.

Aufgrund der ubiquitären Verbreitung des IGF-Systems und seiner Rolle in jedem Körpergewebe (Le Roith 2003) war ein weiterer Grundgedanke der Arbeit, dass die impaktierten Weisheitszähne aufgrund anhaltender Durchbruchstendenzen besonders nach Abschluss des Körper- und Gesichtswachstums noch weiterhin Aufschluss über die Expression von IGF1, IGFBP3 und IGF1R α geben würden. Daher wurde zur Bestimmung von Genexpressionen im Zahngewebe die RT-PCR verwendet. Diese molekularbiologische Standardanalyse für die Evaluierung von Genaktivitäten in Zellen basiert auf der Isolierung der Gesamt-RNA, ihrem Umschreiben in komplementäre cDNA durch das Enzym Reverse Transkriptase und der anschließenden Vermehrung des gesuchten cDNA-Fragments in der Polymerasekettenreaktion. Die Anwendung der RT-PCR führt bei molekularbiologischen Fragestellungen zu sehr verlässlichen Ergebnissen. Die Sensitivität des Verfahrens erlaubt

auch bei Zahngewebe die Verwendung kleinster Mengen an Ausgangsmaterial (*Sens et al. 1996*).

Hierbei ist von Bedeutung, dass der jeweilige entfernte Zahn schon intraoperativ ohne jegliche Aufbereitung kryokonserviert wird. Eine Entfernung anhaftender parodontaler Haltestrukturen oder eine Trennung von Pulpa und Hartgewebe ist daher - auch beim nachfolgenden Prozess der Homogenisierung - nicht möglich. Demzufolge beziehen sich die Ergebnisse der PCR-Auswertung immer auf ein Konglomerat von Geweben: Pulpa mit Gefäßen und Nerven, Schmelz, Dentin verschiedener Verkalkungsstufen, sämtlichen Zementarten sowie dem Parodontalligament. Im Parodontalligament fanden *Götz et al. 2003* am humanen Zahn Immunreaktivitäten für IGF1R in Fibroblasten und den residuierenden Malassez'schen Epithelzellen sowie Immunreaktivitäten für IGFBP3 in der ligamentären Extrazellulärmatrix. Dies beweist die Notwendigkeit eines immunhistochemischen Lokisationsnachweises der exprimierten Proteine, da die Ergebnisse der PCR-Berechnung aus dem homogenisiertem Material mehrerer verschiedener Gewebearten des Zahnapparates nicht identisch sein müssen mit dem Verteilungsmuster der Expression im Pulpengewebe.

5.2 Diskussion der Untersuchungsergebnisse

Die RT-PCR Analytik konnte nachweisen, dass die IGF1-Transkriptionsrate bei 18-22 jährigen Patienten beiden Geschlechts gegenüber den benachbarten Altersgruppen am höchsten ist (vgl. Abb.3). Die Unterschiede sind nicht signifikant. In dieser Zeit findet üblicherweise der Durchbruch der dritten bleibenden Molaren statt. Interessanterweise lässt sich eine starke und mäßige IGF1-mRNA-Transkription nicht nur in der Altersgruppe 2 (18-22 Jahre), sondern auch in der Altersgruppe 3 (über 22 Jahre), also auch noch weit über dem statistisch zu erwartenden Durchbruchsalter, nachweisen. Die Erkenntnisse der vorliegenden Studie über das Vorhandensein der Transkripte von IGF1 und der IGF1-Expression im humanen Zahn decken sich teilweise mit den Ergebnissen erfolgreicher Studien am Mäusezahn. Danach detektierten *Joseph et al. 1996* IGF1 in sich differenzierenden Odontoblasten. *Finkelman et al. 1990* ermittelten die Konzentrationen von IGF1 und 2 im Dentin. *Begue-Kirn et al. 1994* hingegen konnten keine korrespondierenden Transkripte im Zahngewebe zum Zeitpunkt der Odontoblastendifferenzierung detektieren und messen dem zirkulatorischen Ursprung von IGF1 eine entsprechend größere Rolle bei.

IGF1 ist in humanen Odontoblasten immunoreaktiv. Die immunhistochemische Färbung der Zahnwurzelschnitte konnte die IGF1-Expression in den Altersgruppen 1 und 2 deutlich dem

Zytoplasma von Odontoblasten sowie Gefäß-Nervenstrukturen der Pulpa zuordnen (vgl. Abb.10). Damit besteht im Zahnwurzelbereich sowohl eine autonome lokale Expression, als auch eine systemische Versorgung mit diesem Wachstumsfaktor durch im Blutkreislauf zirkulierendes IGF1. Allerdings ist mit der zur Verfügung stehenden Technik nicht ausschließbar, ob es sich bei dem immunhistochemisch markierten IGF1 lediglich um ehemals zirkulierendes und um membrangebundenes Protein handelt, welches seine Wirkung nur in der Odontoblastenzielzelle entfaltet. Die Interaktion von IGF1 mit dem IGF1R α förderte dann die Mitose in der Zielzelle. Die Zelle kann somit aus der G0-Phase heraustreten, wieder in die G1-Phase zurückkehren und nach Überschreiten eines Restriktionspunktes in eine neue S-Phase übertreten.

Eine autokrine Rolle des in zahnbildenden Zellen lokal synthetisierten IGFs ist eine sehr wahrscheinliche Wirkungsweise (*Joseph et al. 1996*). Eine parakrine Wirkung des in Odontoblasten vorhandenen IGF1 targetiert hingegen mit höchster Wahrscheinlichkeit die dem Odontoblastensaum benachbarten Zellgruppierungen. Dazu gehören die via Thomes-Fortsatz erreichbaren Zementoblasten, pulpale Mesenchymzellen und Fibroblasten. Es ist interessant, dass IGF1 nicht nur am Dentinmatrix-sezernierenden Pol des Odontoblastenzytoplasmas nachweisbar ist, sondern auch im Zytoplasma, entlang des Odontoblastenfortsatzes und im Lumen des Dentintubulus (vgl. Abb.10B). Dies lässt den Schluß zu, dass Odontoblasten durch ihr eigenes IGF1 weiter entfernte Zellgruppen, wie z.B. Progenitorzellen aus dem Mesenchym der Pulpa oder Zementoblasten beeinflussen können und deckt sich mit den Erkenntnissen anderer Studien (*About et al. 2000, Cox 2003, Shiba et al. 1995, Smith et al. 1995*). Dieser „IGF1-Effekt“ beteiligt Odontoblasten aktiv an der Gewebedifferenzierung und der Odontogenese. Damit ist einerseits ein mitogener Effekt in den Zellen der Wurzelscheide erklärbar, andererseits auch eine Induktion von lytischen Prozessen, bei denen durch die Kathepsin-Ausschüttung mesenchymaler Zellen die IGF1-IGFBP3-Bindung aufgehoben werden kann. *Grimberg und Cohen 2000* haben erläutert, dass IGFBP3 durch Ankopplung an den IGFBP3-Rezeptor Apoptose auslösen kann. Das Überwiegen der Apoptose vor dem Zahndurchbruch ist notwendig für die raumfordernden Prozesse während der Wurzelformierung. Pulpale Zellen im Bereich der späteren Wurzelspitze, die mit dem umliegenden Bindegewebe und dem Kieferknochen kommunizieren, induzieren Apoptose im Wurzelgrund und schaffen Raum für einsprossende Wurzelscheidenzellen. Dieser Mechanismus muss von entscheidender Bedeutung bei der Odontogenese sein. Die Studie von *Grimberg und Cohen 2000* beschrieb weiterhin die Funktion von IGFBP3. IGFBP3 dient als IGF1-Transportmolekül und moduliert die zelluläre Verfügbarkeit von freiem IGF1. Solange IGF1 mit IGFBP3 assoziiert ist, kann es nicht am IGF1R α gebunden werden und die intrazelluläre Phosphorylationskaskade nicht auslösen. IGFBP3 reguliert somit den IGF1 Rezeptor. Durch Proteolyse wird der IGFBP3-IGF1

Komplex gespalten und IGF1 freigesetzt. Unter IGF-Einfluß erfolgt eine starke Vermehrung der Bindungsstellen für IGF, wie *Reichenmiller et al. 2004* an Pulpofibroblasten-Zellkulturen festgestellt haben.

Die These, dass IGF1 in aktive Wachstumsprozesse involviert ist, wird indirekt durch die Tatsache gestützt, dass Transkripte und Protein von IGF1 in der Patientengruppe 3 nur schwach nachweisbar waren. IGF1 ist nach Stillstand der Wachstumsprozesse an der Zahnwurzel nicht mehr von Bedeutung. Vertretbare Begründungen für eine fehlende oder schwache Expression nach dem 21. Lebensjahr sind gegenregulative Mechanismen im Sinne einer Promotermethylierung oder Phosphorylierung mit daraus resultierender Nichtablesbarkeit der codierenden Genabschnitte (*Chang et al. 2002*).

Obwohl das Studiendesign auf die IGF-Expression innerhalb der Pulpa fokussiert, bedürfen die Nebenfunde ebenfalls eingehender Betrachtung. In mehreren Schnitten (Abb.10C-F,J, Abb. 11A,C,D,H,J, Abb.12A-D,H,J) zeigt sich eine starke bis mäßige Immunreaktivität im Zement, in der Schicht der Zementozyten und auch in Bereichen anhaftender Strukturen des Zahnsäckchens. Teile des Zahnsäckchens bleiben im Verlauf der operativen Zahnentfernung regelmäßig am entfernten Zahn haften. Da die Sekretion und Reifung von Wurzelzement prinzipiell auf die gleiche Art wie die von Dentin geschieht, finden sich belegende Analogien in der immunhistochemischen Anfärbung der Zementozyten. Die sezernierte Matrix und der maturierte Zement können als bedeutende Quelle für IGFs und IGFBPs angesehen werden, wie *Heinen et al. 2003* und *Götz et al. 2003* am menschlichen Milchzahn nachgewiesen haben. Daher führt die mRNA-Expression in parodontalen Strukturen, zu denen das parodontale Ligament und der Wurzelzement zählen, zu einem höheren Grad der Expression in der rechnerischen Auswertung. Für den Expressionsnachweis der Proteine in der Pulpa allerdings ist er nicht relevant. Diese methodisch bedingte Einschränkung wird durch die immunhistochemische Lokalisierbarkeit von IGF1, IGFBP3 und IGF1R α relativiert.

Im Falle der Wurzelentwicklung sind diese Prozesse anhand der erarbeiteten Forschungsergebnisse nachvollziehbar. IGFBP3 wird besonders in der stark regulierten Körperwachstums-aktiven Zeit vor dem Weisheitszahndurchbruch in der Altersgruppe 1 stark exprimiert. Erst mit 18 und 22 Jahren (Altersgruppe 2) sinkt die IGFBP3 Expression signifikant. In diesem Zeitraum findet mit größter Wahrscheinlichkeit der Durchbruch der 3. Molaren statt. Offensichtlich ist der komplizierte Durchbruchprozess mit einer verminderten Expression von IGFBP3 und somit einer verringerten Bindung von IGF1 verbunden. Daraus resultiert die verstärkte Kopplung von IGF1 an den IGF1R α , was wiederum in einer erhöhten Mitoserate in den Odontoblasten und Zellen des Wurzelgrundes resultiert. Dieses Erklärungsmodell kann im Rahmen der Arbeit allerdings nicht die

untrennbar mit der Eruption verbundenen osteoklastischen und osteoblastischen Vorgänge im Kieferknochen berücksichtigen. An der Freisetzung von gebundenem IGF1 sind Kathepsine und Matrixmetalloproteinasen (*Cohen et al. 1992; Durham et al. 1999*) direkt beteiligt. Die IGF1-IGF1R α Interaktion kann die Freisetzung von Kathepsinen und Matrixmetalloproteasen im Sinne eines positiven Feedbacks zusätzlich induzieren.

Die Studien von *Götz 2001* und *Heinen 2003* führen anschaulich den immunhistochemischen Nachweis für das IGF-System in humanen Zähnen der ersten und zweiten Dentition. Neben anderen untersuchten Mitgliedern der IGF-Achse kommen demnach IGF1 und IGFBP3 im Zement verstärkt vor. Überraschenderweise findet sich im Dentin der Milchzähne für keines der Mitglieder eine Immunreaktivität. Ausgehend von klinischen Beobachtungen mag dies neben anatomischen Besonderheiten dazu beitragen, dass die Regenerations- und Abwehrfähigkeit von Milchzahnpulpen deutlich kompromittiert ist, da nach entsprechenden chemischen oder mechanischen Reizen keine Wachstumsfaktoren aus ihren Lagerorten im Dentin freigesetzt werden können, die für eine Tertiärdentinapposition den notwendigen Impuls an kompetente Zellen geben könnten.

Da sich in der perivaskulären Extrazellulärmatrix die Region der proliferierenden Fibroblasten mit entsprechender IGF-Beteiligung befindet (*Lekic et al. 1996*), ist in der Umgebung von Gefäßen und Nerven eine erhöhte immunhistochemische Reaktion auf IGF1, IGF1BP3 und IGF1R α sichtbar (vgl. Abb.10G, Abb. 11G, Abb.12G). Diese findet sich auch scheinbar bezugslos vielerorts im Pulparaum. Allerdings ist in bereits veröffentlichten Studien gezeigt worden, dass IGF1 anti-apoptotisches Potential besitzt und dadurch die Apoptoserate in pulpalen Fibroblasten reduziert (*Han et al. 2003*). Dieser Effekt ist auf die proliferationsfördernde IGF1-Wirkung zurückzuführen und ist in Gebieten des Wandels von Mesenchym in Parenchym relevant und notwendig.

Die schwache bis mäßige mRNA-Expression von IGF1 R α in der Altersgruppe 1 (<18 Jahre, vgl. Abb.7) deckt sich mit den Ergebnissen der Studie von *Joseph et al. 1996*, wonach am Mäusezahn lediglich Odontoblasten in den frühen Entwicklungsstufen IGF1R α exprimierten. In späteren Entwicklungsstadien war dies nicht mehr detektierbar. Allerdings konnte diese Gruppe auch IGF1 nicht mehr in späteren Entwicklungsstufen nachweisen. Wahrscheinlich offenbart sich an genau dieser Stelle ein wichtiger Unterschied zwischen der zweiten Dentition beim Menschen mit ausgebildeten Zähnen und dem abrasionsbedingt ständig nachwachsenden Nager-Frontzahn.

Die erarbeiteten Daten deuten daraufhin, dass die Expression des IGF1R α in Odontoblasten und anderen Pulpazellen zeitlich limitiert ist. Die stärkste Expression ist in der Altersgruppe 1

nachweisbar. In diesem Zeitraum ist die Zahnwurzel noch nicht voll ausgebildet. Es ist denkbar, dass in diesem Zeitraum die sich differenzierenden Wurzelzellen auf die Mitoseinduktion durch systemisches IGF1 hepatischen Ursprungs angewiesen sind. Die hohe Expression von IGF1R α ermöglicht die Bindung von möglichst viel systemischem IGF1. Erst im Zuge der daraus resultierenden Differenzierung pulpaler Mesenchymzellen und der Aufteilung in Odontoblastensaum und Pulpa erlangen die Zellen die Fähigkeit, IGF1 selbst zu produzieren, was mit einer erniedrigten Rezeptorexpression einhergeht. Die Interaktion des IGF1R α und seines Liganden IGF1 wurde bereits in der Studie von Götz *et al.* 2003 am Beispiel der Malassezschen Epithelreste detailliert belegt. Eine schwache Expression von IGF1R α korreliert mit einem Mitosestop.

Des weiteren ist auch eine Reaktivierung des Rezeptors nach Abschluss der Zahnentwicklung denkbar, was der Fall wäre, wenn inflammatorische Prozesse im parodontalen oder pulpalen Bereich zur erneuten Proliferation anregen. In diesem Falle würden von Leukozyten und Lymphozyten sezernierte Interleukine und Kathepsine nicht nur die IGF1R α -Expression induzieren, sondern auch die IGFBP3-Degradierung bewirken. Die Reaktivierung des IGF1R α Systems durch diese exogenen Einflüsse würde den Weg für einen erneuten Mitoseeintritt der Zielzelle durch systemisches „zirkulierendes“ IGF1 bewirken. Klinisch und pathologisch sind solche Prozesse mit hoher Wahrscheinlichkeit an der Entstehung von radikulären oder follikulären Zysten beteiligt. Die Reaktivierung von Wachstumsprozessen bei entsprechender genetischer Entgleisung könnte möglicherweise auch bei der Entstehung von Odontomen eine Rolle spielen.

5.3 Diskussion der Klinischen Relevanz, Rolle der Wachstumsfaktoren beim Tissue Engineering und in Stammzellen

Die im Rahmen dieser Studie gewonnenen Daten und wissenschaftlichen Erkenntnisse aus der aktuellen Forschungsliteratur haben gezeigt, dass IGF1 Ligand, IGF1 Bindungsprotein 3 und IGF1 Rezeptor α stark mit der Odontogenese und den lebenslang andauernden Prozessen in der Pulpa-Dentin-Einheit assoziiert sind und zu neuen Therapieansätzen in der Zahnheilkunde führen. Der Focus der internationalen Zahnforschung bestätigt die Tendenz, dass die Zukunft der konservierenden zahnärztlichen Therapie sich von der Restauration mit Füllungswerkstoffen zur Regeneration zahneigener und zahnumgebender Hartgewebe (Mann 1997) und Weichgewebe (Buurma *et al.* 1999) wandeln wird. Neue Präparate zur Vitalerhaltung der Pulpa werden die traditionellen Methoden verändern. Bei Maßnahmen zur Vitalerhaltung der Pulpa oder dem Ersatz von Zahnhartsubstanz sind dabei die

Eigenschaften der Wachstumsfaktoren im Rahmen ihrer Bioaktivität bei der Regulation zellulärer Aktivitäten in embryonalen und adulten Geweben und im Rahmen des Tissue Engineering von außerordentlichem klinischem Interesse.

Man weiß heute, dass nach Kavitätenpräparation oder Karies sowie nach einer Pulpaexposition (Cox 2003) eine Freisetzung von Wachstumsfaktoren erfolgt. Diese führt zur Proliferation von Odontoblasten-Vorläuferzellen, deren Migration und Differenzierung odontoblastoide Zellen hervorbringen kann. Die Freisetzung wird unter anderem dann angeregt, wenn nach Kavitätenpräparationen eine Restdentindicke von weniger als 0,5mm verbleibt (Murray *et al.* 2002) oder wenn Dentinpartikel in das Pulpenkavum gelangen (Six *et al.* 2004). Die Sekretionsmenge von Tertiärdentin ist proportional zum Grad der Schädigung des Pulpa-Dentin-Komplexes und zur Zahl der überlebenden Odontoblasten (Murray *et al.* 2000). Ausdruck der Tertiärdentinbildung und Endpunkt eines vielstufigen regenerativen Prozesses ist die Formierung einer inhomogen strukturierten Dentinbrücke über alterierten Arealen der Pulpa.

Die Verletzung oder Infektion der Pulpa sowie eine gescheiterte Überkappungstherapie mit Calciumhydroxidpräparaten erfordert heutzutage oft eine Wurzelkanalbehandlung, welche die Vitalität der Pulpa und damit die Pulpa selbst eliminiert. Die Dentinproduktion und die spätere Zahnreifung kommen zum Erliegen. Überdies sind die in der Endodontie und der postendodontischen Versorgung verwendeten heterologen Materialien nicht in der Lage, die Funktion des verlorengegangenen Gewebes adäquat zu ersetzen. Das ultimative Ziel in der Behandlung der erkrankten Pulpa ist es jedoch, die Vitalität und die Funktion des Pulpa-Dentin-Komplexes zu erhalten und eine schützende Hartschichtbarriere respektive die physiologische Gewebsarchitektur wiederherzustellen. Diese Ziel kann auf konventionelle Weise nicht suffizient oder vorhersagbar erreicht werden. Der klinische Erfolg der indirekten Überkappung liegt zwar in einem sicheren Bereich von etwa 86% (Barthel *et al.* 2000), demgegenüber steht allerdings bei direkter Überkappung eine ungenügende klinische Erfolgsrate von 37% nach fünf Jahren und nur 13% nach zehn Jahren (Mertz-Fairhurst *et al.* 1998). Eine verbesserte Wundheilung zeigen im Tierversuch die betreffenden Bereiche nach der Überkappung mit Wachstumsfaktoren wie TGF β 1 und BMP2, 4 (Hu *et al.* 1998; Nakashima 1994) oder mit EDTA-gelösten Dentinmatrixbestandteilen (Smith *et al.* 1990). Überkappungsmaterialien mit bioaktiven amorphen Kalziumphosphaten werden derzeit untersucht (Skrtic *et al.* 2002, 2003). Six *et al.* 2004 konnten im Tierversuch nachweisen, dass die Spleißprodukte A+4 und A-4 des Amelogenin-Gens unter eröffneten Pulpaarealen zu einer Akzeleration und Formierung von Reparaturdentin sowohl in der koronalen Pulpa als auch im Wurzelkanallumen führen. Im Tierversuch konnte bindungsproteinresistentes IGF1 die Vitalität iatrogen exponierter Pulpen über mehrere Wochen

erhalten (*Haddad et al. 2003*). Der Wachstumsfaktor IGF1 reiht sich somit ein in die Reihe der Proteine, die zukünftig potentiell wirksam in der Behandlung alterierter Zahnpulpen und bei der Gewebsproliferation im Rahmen des Tissue Engineering sein könnten.

Einen Schritt weiter gehen mehrere Forschergruppen mit der Nutzung von Stammzellen. Für die zukunftsversprechende Verwendung humaner dentaler Pulpastammzellen kommt erleichternd hinzu, dass sie nicht im entferntesten mit den ethischen Problem der Verwendung fetaler Stammzellen assoziiert sind, da sie bei der Milchzahnexfoliation (*Miura 2003*) oder einer notwendigen Weisheitszahnentfernung (*Gronthos et al. 2002*) sehr leicht zu gewinnen sind. Die Transplantation odontoblastoider Stammzellen in Zähne zur Gewebsregeneration eliminiert das Problem, Wachstumsfaktoren und Gene in die Zielzellen befördern zu müssen und darauf zu warten, dass diese sich differenzieren, proliferieren und an den Ort der Verletzung migrieren. Erst dann können Reparaturaktivitäten beginnen. Dies sind wichtige Überlegungen, da die Wiederherstellung von verletztem Pulpengewebe erfolgen muß, bevor eine durchgeführte restaurative Therapie unumkehrbar fehlschlägt.

Bisher existiert kein Material, welches nach Einbringen in den Zahn die Pulpa besser zu schützen imstande wäre als das Dentin selbst (*Hilton 2003*). Klinische Misserfolge in der Bewährung von Restaurationsmaterialien und der Anwendung bestimmter Behandlungsmethoden schufen das Interesse für die Implantation natürlicher Zahnschubstanz, welche zuvor in vitro hergestellt würde. Bisher jedoch ist die Erschaffung neuer Zähne nur partiell erfolgreich und klinisch nicht getestet.

Tissue Engineering im klassischen Sinne beinhaltet die Benutzung organspezifischer Zellen, um ex vivo oder in vivo eine Gerüststruktur (autograft, allograft) zu bepflanzen (*Buurma, Rutherford 1999; Yang et al. 2002*). Dazu werden am häufigsten multipotente adulte Stammzellen verwendet (*Tuan 2002*). Im Bereich der Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde sind im Tierversuch erfolgreich verschiedene Gewebe ersetzt worden, zum Beispiel mikro- und makroskopische Gerüste zum experimentellen Ersatz von Speicheldrüsen (*Aframian et al. 2002*). Auf Gerüsten mit mikrometergrossen Dimensionen (*Yang et al. 2002*) gelingt es, mittels Wachstumsfaktoren, darunter IGF1, experimentell Chondrozyten zu einer verstärkten Produktion anzuregen (*Blunk et al. 2002*). *Alhadlaq und Mau 2003* gelang die Herstellung eines passgenauen Kiefergelenks-Knorpelreplikates aus adulten Stammzellen. Es wurden bereits experimentelle Unterkieferrekonstruktionen mittels vaskularisierten Knochentransplantats aus xenogenen Knochenmineralien durchgeführt (*Terheyden et al. 2001a,b*). Im Grenzbereich zwischen Tissue Engineering und "Guided Bone / Tissue Regeneration" (GBR / GTR) werden in der Implantologie und Parodontologie klinisch routiniert Membranen aus Titan oder Teflon sowie Schmelzmatrixproteine (*Heden 2000*;

Froum et al. 2001; Stellungnahme der DGP und DGZMK) oder xenogene Knochengranulate verwendet. Auch auf dem Gebiet der Wiederherstellung von Zahnschmelz werden biomimetische Ansätze verfolgt. Dabei können auf der Stufe des Laborversuchs aus Gelatine-Gelen durch Selbstorganisation sphärische Apatit-Protein-Aggregate bis zu mehreren hundert Mikrometern Größe gezüchtet werden. (*Busch et al. 2001*).

Jüngere Untersuchungen erbrachten den Beweis, dass adulte Stammzellen ein sehr viel höheres Maß an Entwicklungspotential besitzen, als vorher angenommen. Dies führte zu Überlegungen, das Potential stammzellvermittelter Regeneration von Muskeln, Knochen oder Dentin näher zu erforschen (*Bianco et al. 2001, Bianco und Robey 2001, Gronthos et al. 2000*). Stammzellen sind in den Zahnanlagen des späten Kappenstadiums und des Glockenstadiums enthalten, postnatal ebenfalls im Schmelzorganepithel und dem Zahnpapillenmesenchym, wo sie solitär oder in Nachbarschaft von Gefäßen als Agglomeration undifferenzierter Zellen auffallen (vgl. Abb.10K, Abb. 11 K, Abb.12K). In den letzten Jahren wurden humane pulpale Stammzellen betreffs der Herkunft auf perivaskuläre Areale lokalisiert und als myofibroblastoide Zellen identifiziert (*Cox 2003*). Überraschend konnten *Miura et al. 2003* leicht zugängliche Stammzellen auch in der Pulpa von natürlicherweise exfoliierten Milchzähnen nachweisen.

Die für Plastizität, Differenzierung, Proliferation und Überleben notwendigen Faktoren sind noch nicht vollständig bekannt, schließen aber lokale Umgebungsfaktoren und Signale, mehrere Zytokine, Zelladhäsionsmoleküle und Wachstumsfaktoren wie FGFs, TGFs, IGFs und BMPs ein (*Bianco, Robey 2000; Orlic et al. 2002; Shah, Anderson 1997; Arjomand et al. 2000, Review in Bianco et al. 2001; Harada et al. 2001; Onishi et al. 1999; Rao und Mattson 2000*). Viele Studien belegen die Effektivität der regenerativen Stammzelltherapie im Tierversuch. Unipotente adulte Stammzellen, zu denen Zahnpulpastammzellen zählen, sind undifferenzierte Zellen, die in bereits differenzierten Geweben angetroffen werden (Mesenchymale Stammzellen). Sie können sich selbst erneuern, posttraumatisch Gewebe ersetzen und jene Zellen der Gewebe bilden, denen sie entstammen (*Krebsbach, Robey 2002; Pittenger et al. 1999*). Odontogene Stammzellen aus erwachsenen und kindlichen Zahnpulpen wurden identifiziert, isoliert und getestet (*Gronthos et al. 2000, Miura 2003*). Transplantationsstudien zeigten, dass Knochenmarkstammzellen (BMSSCs) und Zahnpulpastammzellen (DPSCs) in vivo Knochen und Dentin formen können (*Krebsbach et al. 1997; Gronthos et al. 2000*).

Ein Vergleich der Expressionsprofile von menschlichen DPSCs und BMSSCs zeigte eine Ähnlichkeit in über viertausend bekannten humanen Genen (*Shi et al. 2001*). DPSCs besitzen die Fähigkeit, nach subkutaner Transplantation in Mäuse einen Pulpa-Dentin-

ähnlichen Komplex zu regenerieren. Dieser besteht aus mineralisierter Matrix mit Tubuli über einer Odontoblastenreihe und Bindegewebe mit Blutgefäßen in einer dem Zahn vergleichbaren Anordnung (*Gronthos et al. 2000*). *Gronthos et al. 2002* gelang weiterhin die Charakterisierung von DPSCs, die demnach als adulte Stammzellpopulation mit hoch proliferativem Potential, der Fähigkeit zur Selbsterneuerung nach in vivo-Transplantation und der Differenzierungsmöglichkeit in Odontoblasten oder fibroblastenähnliche Zellen eingestuft werden können.

In der Zahnheilkunde werden etwa zwei Drittel des Behandlungsaufkommens für die Erneuerung fehlgeschlagener Therapien erbracht. Der dafür verantwortliche Ursachenkomplex beinhaltet auch Material- und Gewebsveränderungen und somit verbleibt ein enormes Potential für Verbesserung. Die Einführung stammzellbasierter Therapien könnte helfen, mehr Zähne zu erhalten und die Aufwendungen für zahnersetzennde Behandlungen mit all ihren sozialen und ökonomischen Auswirkungen dramatisch zu reduzieren. Wissenschaftliche Fortschritte bei der Erschaffung restaurativer Biomaterialien, die in vitro Zellkultur-Technologie, Tissue Engineering, Molekularbiologie und das Human Genom Projekt bereiten die Basis für die Einführung neuer Technologien in die Zahnheilkunde. Dabei ist die Stammzelltherapie eine der vielversprechendsten Gebiete des Tissue Engineering. Das Erlangen von Wissen über die molekularen Werkzeuge zur Aktivierung und Nutzung der Stammzellen berechtigt zu den besten Hoffnungen zur Realisierung der Regeneration menschlicher Zähne in nicht allzu ferner Zukunft (*Bianco und Robey 2001*).

6 Zusammenfassung

Neueste Forschungen in der Zahnheilkunde befassen sich seit wenigen Jahren intensiv mit der Rolle von Signalmolekülen und Transkriptionsfaktoren während der Zahnentwicklung. Dabei zeigte sich, dass das IGF-System aus der Familie der Wachstumsfaktoren als integraler Bestandteil der Regulierung des postnatalen Körperwachstums für die Odontogenese eine Bedeutung hat. Es beeinflusst im Rahmen der Odontogenese die mitotische Aktivität und die Differenzierung von Zellen der Zahnanlage, führt zu einer vermehrten Syntheserate von Matrixproteinen und hat antiapoptotische Effekte. In Pulpazellkulturen ist unter IGF-Stimulation die DNS-Synthese und Proliferationsaktivität erhöht.

Da bisherige Forschungsergebnisse überwiegend aus embryonalen tierischen Geweben gewonnen wurden, sind in der vorliegenden Arbeit mineralisierte menschliche Weisheitszähne verschiedenen Alters in finalen Entwicklungsstadien untersucht worden. Dabei war es Ziel der Untersuchungen, die mRNA- und die Proteinexpression von IGF1 Ligand (IGF1), IGF1 Bindungsprotein 3 (IGFBP3) und IGF1 Rezeptor α (IGF1R α) mittels RT-PCR und Immunhistochemie zu untersuchen.

Zur Verwendung kamen 60 operativ entfernte, impaktierte Weisheitszähne der Altersgruppen bis 17J., 18 –22J. sowie 23J. und älter. In einem ersten Schritt wurden mittels RT-PCR die Transkriptionslevel der drei Gene am homogenisierten Zahngewebe von jeweils 48 Zähnen ermittelt. Ergänzend folgte ein immunhistochemischer Lokalisationsnachweis nach der Avidin/Biotin Komplex-Methode an Gefrierschnitten von 12 unentkalkten Zähnen im Bereich des noch offenen Foramen apicale.

Mit Hilfe der RT-PCR konnte eine Korrelation zwischen der mRNA-Expression und der Proteinexpression von IGF1, IGFBP3 und IGF1R α verdeutlicht werden. Die Gesamt-RT-PCR-Analytik zeigte, dass IGF1-mRNA in allen Altersgruppen hoch exprimiert wird, IGFBP3 und IGF1R α -mRNA hingegen werden signifikant schwächer exprimiert.

Im Alter des Weisheitszahndurchbruchs (Altersgruppe 18-22 J.) ist die IGF1-Transkriptionsrate gegenüber der jüngeren und älteren Altersgruppe nichtsignifikant erhöht. Sogar in der Altersgruppe über 22J., in der statistisch der Durchbruch der Weisheitszähne bereits erfolgte, ist die Transkription mäßig stark. IGFBP3-mRNA zeigt in der Altersgruppe bis 18J. eine mäßige, in den höheren Altersgruppen weiter sinkende Expressionen. IGF1R α -

mRNA zeigt in der Altersgruppe bis 18J. eine schwache, danach weiter sinkende Expression.

Proteine von IGF-1 wurden im Bereich des Foramen apicale zumeist stark bis mäßig exprimiert. Die Expression von IGFBP3 und IGF1R α war überwiegend schwach. Die Immunreaktivität war beschränkt auf beide Zellpole innerhalb der Odontoblastenzellreihe und deren Fortsätze ins Dentin sowie auf Zementozyten des Zahnhalteapparates, proliferierende Fibroblasten in der Umgebung von Nerven und Gefäßen und solitäre Zellhaufen innerhalb des Pulpamesenchyms. Das räumlich orientierte Auftreten der Komponenten des IGF-Systems bei Differenzierungs- und Proliferationsaktivitäten deutet darauf hin, dass spezifische Funktionen an genau definierte Gewebsareale geknüpft sind.

Die hohe Expression von IGF1 fördert die Differenzierung und Proliferation. Nach Stillstand der Wachstumsprozesse an der Wurzelspitze verringert sich dessen Bedeutung. Offensichtlich ist der komplizierte Durchbruchprozess mit einer verminderten Expression von IGFBP3 und somit einer verringerten Bindung von IGF1 verbunden. Daraus resultiert die verstärkte Kopplung von IGF1 an den IGF1R α , was zu einer erhöhten Mitoserate in den Odontoblasten und Zellen des Wurzelgrundes führt. Die anfangs noch schwache Expression von IGF1R α könnte eine Reaktion auf systemisches IGF aus der Leber begünstigen.

Die Diskussion der Ergebnisse führt zum Thema der Regeneration von Zahngewebe. Bei Maßnahmen zur Vitalerhaltung der Pulpa oder dem Ersatz von Zahnhartsubstanz sind dabei die Eigenschaften von Wachstumsfaktoren wie zum Beispiel IGF1 im Rahmen ihrer Bioaktivität bei der Regulation zellulärer Aktivitäten in embryonalen und adulten Geweben und im Rahmen des Tissue Engineering von außerordentlichem klinischem Interesse.

Die im Rahmen dieser Studie gewonnenen Daten und wissenschaftlichen Erkenntnisse aus der aktuellen Forschungsliteratur haben gezeigt, dass IGF1 Ligand, IGF1 Bindungsprotein 3 und IGF1 Rezeptor α stark mit der Odontogenese und den lebenslang andauernden Prozessen in der Pulpa-Dentin-Einheit assoziiert sind und zu neuen Therapieansätzen in der Zahnheilkunde führen.

7 Literaturverzeichnis

- 1 **Abuzzahab MJ, Schneider A, Goddard A, Grigorescu F, Lautier C, Keller E, Kiess W, Klammt J, Kratzsch J, Osgood D, Pfaffle R, Raile K, Seidel B, Smith RJ, Chernausk SD; Intrauterine Growth Retardation (IUGR) Study Group.**
IGF-I receptor mutations resulting in intrauterine and postnatal growth retardation.
N Engl J Med. 2003 Dec 4;349(23):2211-22.
- 2 **Åberg T, Wozney J, Thesleff I.**
Expression patterns of bone morphogenetic proteins (Bmps) in the developing mouse tooth suggest roles in morphogenesis and cell differentiation.
Dev Dyn 1997 Dec;210(4):383-96.
- 3 **About I, Laurent-Maquin D, Lendahl U, Mitsiadis TA.**
Nestin expression in embryonic and adult human teeth under normal and pathological conditions.
Am J Pathol 2000 Jul;157(1):287-95.
- 4 **Aframian DJ, Redman RS, Yamano S, Nikolovski J, Cukierman E, Yamada KM, Kriete MF, Swaim WD, Mooney DJ, Baum BJ.**
Tissue compatibility of two biodegradable tubular scaffolds implanted adjacent to skin or buccal mucosa in mice.
Tissue Eng 2002 Aug;8(4):649-59.
- 5 **Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P.**
Molecular biology of the cell.
4th ed. New York, NY: Garland Science; 2002.
- 6 **Alhadlaq A, Mao JJ.**
Tissue-engineered neogenesis of human-shaped mandibular condyle from rat mesenchymal stem cells.
J Dent Res. 2003 Dec;82(12):951-6.
- 7 **Andreasen JO.**
Textbook and Colour Atlas of Traumatic injuries to the teeth.
3rd ed. Munksgaard, Copenhagen; 1994.
- 8 **Arany E, Afford S, Strain AJ, Winwood PJ, Arthur MJ, Hill DJ.**
Differential cellular synthesis of insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1) and IGFBP-3 within human liver.
J Clin Endocrinol Metab 1994 Dec;79(6):1871-6.
- 9 **Arjomand M, Nahas R, Jepsen S, Heinz B.**
Wachstumsfaktoren und Knochenheilung. Grundlagen von Regenerationsvorgängen. Die Bedeutung von BMPs und PRP.
Implantol J. 2000(4);34-42.
- 10 **Auernhammer CJ, Strasburger CJ.**
Effects of growth hormone and insulin-like growth factor 1 on the immune system.
Eur J Endocrinol 1995 Dec;133(6):635-45.
- 11 **Auernhammer CJ, Fottner C, Engelhardt D, Bidlingmaier M, Strasburger CJ, Weber MM.**
Differential regulation of insulin-like growth factor-(IGF) I and IGF-binding protein (IGFBP) secretion by human peripheral blood mononuclear cells.
Horm Res 2002;57(1-2):15-21.
- 12 **Baker J, Liu JP, Robertson EJ, Efstratiadis A.**
Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth.
Cell 1993 Oct 8;75(1):73-82.
- 13 **Barthel CR, Rosenkranz B, Leuenberg A, Roulet JF.**
Pulp capping of carious exposures: treatment outcome after 5 and 10 years: a retrospective study.
J Endod. 2000 Sep;26(9):525-8.

- 14 **Bartlett JD, Simmer JP.**
Proteinases in developing dental enamel.
Crit Rev Oral Biol Med 1999;10(4):425-41.
- 15 **Baxter RC.**
Insulin-like growth factor binding proteins in the human circulation: a review.
Horm Res 1994;42(4-5):140-4.
- 16 **Baxter RC, Daughaday WH.**
Impaired formation of the ternary insulin-like growth factor-binding protein complex in patients with hypoglycemia due to nonislet cell tumors.
J Clin Endocrinol Metab 1991 Oct;73(4):696-702.
- 17 **Begue-Kirn C, Smith AJ, Lorient M, Kupferle C, Ruch JV, Lesot H.**
Comparative analysis of TGF beta s, BMPs, IGF1, msxs, fibronectin, osteonectin and bone sialoprotein gene expression during normal and in vitro-induced odontoblast differentiation.
Int J Dev Biol 1994 Sep;38(3):405-20.
- 18 **Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG.**
Bone marrow stromal stem cells: Nature, biology and potential applications.
Stem Cells 2001;19:180-192.
- 19 **Bianco P, Robey PG.**
Marrow stromal stem cells.
J Clin Invest 2000;105:1663-1668.
- 20 **Bianco P, Robey PG.**
Stem cells in tissue engineering.
Nature 2001 Nov 1;414(6859):118-21.
- 21 **Blakesley VA, Koval AP, Stannard BS, Scrimgeour A, LeRoith D.**
Replacement of tyrosine 1251 in the carboxyl terminus of the insulin-like growth factor-I receptor disrupts the actin cytoskeleton and inhibits proliferation and anchorage-independent growth.
J Biol Chem 1998 Jul 17;273(29):18411-22.
- 22 **Blunk T, Sieminski AL, Gooch KJ, Courter DL, Hollander AP, Nahir AM, Langer R, Vunjak-Novakovic G, Freed LE.**
Differential effects of growth factors on tissue-engineered cartilage.
Tissue Eng 2002 Feb;8(1):73-84.
- 23 **Bocutoglu Ö, Yakan B.**
Coronal displacement of cementum: Correlation between age and coronal movement of cementum in impacted teeth.
Austral Dent J 1997;42(3):185-8.
- 24 **Brudevold F, Aasenden R, Bakhos Y.**
A preliminary study of post-eruptive maturation of teeth in situ.
Caries Res 1982;16(3):243-8.
- 25 **Buchaille R, Couble ML, Magloire H, Bleicher F.**
A subtractive PCR-based cDNA library from human odontoblast cells: identification of novel genes expressed in tooth forming cells.
Matrix Biol 2000 Sep;19(5):421-30.
- 26 **Buckbinder L, Talbott R, Velasco-Miguel S, Takenaka I, Faha B, Seizinger BR, Kley N.**
Induction of the growth inhibitor IGF-binding protein 3 by p53.
Nature 1995 Oct 19;377(6550):646-9.
- 27 **Bumann A, Carvalho RS, Schwarzer CL, Yen EH.**
Collagen synthesis from human PDL cells following orthodontic tooth movement.
Eur J Orthod. 1997 Feb;19(1):29-37.
- 28 **Busch S, Schwarz U, Kniep R.**
Morphogenesis and structure of human teeth in relation to biomimetically grown fluorapatite-gelatin composites.
Chem Mat 2001(13);3260-71.

- 29 **Butler WT.**
Dentin matrix proteins.
Eur J Oral Sci 1998 Jan;106 Suppl.
- 30 **Butler WT, Ritchie HH, Bronckers AL.**
Extracellular matrix proteins of dentine.
Ciba Found Symp 1997;205:107-15; discussion 1154-7.
- 31 **Buurma B, Gu K, Rutherford RB.**
Transplantation of human pulpal and gingival fibroblasts attached to synthetic scaffolds.
Eur J Oral Sci. 1999 Aug;107(4):282-9.
- 32 **Chai Y, Jiang X, Ito Y, Bringas P Jr, Han J, Rowitch DH, Soriano P, McMahon AP, Sucov HM.**
Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis.
Development. 2000 Apr;127(8):1671-9.
- 33 **Chai Y, Slavkin HC.**
Prospects for tooth regeneration in the 21st century: a perspective.
Microsc Res Tech. 2003 Apr 1;60(5):469-79.
- 34 **Chang YS, Wang L, Liu D, Mao L, Hong WK, Khuri FR, Lee HY.**
Correlation between insulin-like growth factor-binding protein-3 promoter methylation and prognosis of patients with stage I non-small cell lung cancer.
Clin Cancer Res. 2002 Dec;8(12):3669-75.
- 35 **Chin E, Zhou J, Dai J, Baxter RC, Bondy CA.**
Cellular localization and regulation of gene expression for components of the insulin-like growth factor ternary binding protein complex.
Endocrinology 1994 Jun;134(6):2498-504.
- 36 **Cohen P, Graves HC, Peehl DM, Kamarei M, Giudice LC, Rosenfeld RG.**
Prostate-specific antigen (PSA) is an insulin-like growth factor binding protein-3 protease found in seminal plasma.
J Clin Endocrinol Metab 1992 Oct;75(4):1046-53.
- 37 **Couble ML, Farges JC, Bleicher F, Perrat-Mabillon B, Boudeulle M, Magloire H.**
Odontoblast differentiation of human dental pulp cells in explant cultures.
Calcif Tissue Int. 2000 Feb;66(2):129-38.
- 38 **Cox CF.**
Odontoblastoid cell activity and dentin bridge formation.
Oral presentation, 81st General Session & Exhibition of the IADR, Gothenborg, Sweden, 25.-28.06.2003.
- 39 **Cvek M, Granath L, Cleaton-Jones P, Austin J.**
Hard tissue barrier formation in pulpotomized monkey teeth capped with cyanoacrylate or calcium hydroxide for 10 and 60 minutes.
J Dent Res 1987 Jun;66(6):1166-74.
- 40 **Daughaday WH, Rotwein P.**
Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations.
Endocr Rev 1989 Feb;10(1):68-91.
- 41 **Denholm IA, Moule AJ, Bartold PM.**
The behaviour and proliferation of human dental pulp cell strains in vitro, and their response to the application of platelet-derived growth factor-BB and insulin-like growth factor-1.
Int Endod J. 1998 Jul;31(4):251-8.
- 42 **Devlin TM.**
Textbook of biochemistry with clinical correlations.
5th Ed. 2002, Wiley-Liss.
- 43 **Durham SK, Suwanichkul A, Hayes JD, Herington AC, Powell DR, Campbell PG.**
The heparin binding domain of insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-3 increases susceptibility of IGFBP-3 to proteolysis.
Horm Metab Res 1999 Feb-Mar;31(2-3):216-25.

- 44 **Esposito DL, Blakesley VA, Koval AP, Scrimgeour AG, LeRoith D.**
Tyrosine residues in the C-terminal domain of the insulin-like growth factor-I receptor mediate mitogenic and tumorigenic signals.
Endocrinology 1997 Jul;138(7):2979-88.
- 45 **Ferry RJ Jr, Katz LE, Grimberg A, Cohen P, Weinzimer SA.**
Cellular actions of insulin-like growth factor binding proteins.
Horm Metab Res 1999 Feb-Mar;31(2-3):192-202.
- 46 **Fincham AG, Moradian-Oldak J, Simmer JP.**
The structural biology of the developing dental enamel matrix.
J Struct Biol. 1999 Jun 30;126(3):270-99. Review.
- 47 **Finkelman RD, Mohan S, Jennings JC, Taylor AK, Jepsen S, Baylink DJ.**
Quantitation of growth factors IGF-I, SGF/IGF-II, and TGF-beta in human dentin.
J Bone Miner Res 1990 Jul;5(7):717-23.
- 48 **Frazier-Bowers SA, Guo DC, Cavender A, Xue L, Evans B, King T, Milewicz D, D'Souza RN.**
A novel mutation in human PAX9 causes molar oligodontia.
J Dent Res 2002 Feb;81(2):129-33.
- 49 **Froum SJ, Weinberg MA, Rosenberg E, Tarnow D.**
A comparative study utilizing open flap debridement with and without enamel matrix derivative in the treatment of periodontal intrabony defects: a 12-month re-entry study.
J Periodontol 2001; 72: 25-34.
- 50 **Gemeinsame Stellungnahme der DGP (Deutsche Gesellschaft für Parodontologie) und der DGZMK (Deutsche Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde) Jepsen S, Heinz B, Wachtel H.**
Thema: Regenerative Therapie mit einem Schmelzmatrixprotein (Emdogain®).
1. Juli 2000.
- 51 **Goetz W, Kruger U, Ragotzki S, Lossdoerfer S, Jaeger A.**
Immunohistochemical localization of components of the insulin-like growth factor-system in human deciduous teeth.
Connect Tissue Res. 2001;42(4):291-302.
- 52 **Goetz W, Lossdoerfer S, Kruger U, Braumann B, Jaeger A.**
Immunohistochemical localization of insulin-like growth factor-II and its binding protein-6 in human epithelial cells of Malassez.
Eur J Oral Sci. 2003 Feb;111(1):26-33.
- 53 **Gomez JM, Maravall FJ, Gomez N, Navarro MA, Casamitjana R, Soler J.**
Interactions between serum leptin, the insulin-like growth factor-I system, and sex, age, anthropometric and body composition variables in a healthy population randomly selected.
Clin Endocrinol (Oxf) 2003 Feb;58(2):213-9.
- 54 **Grimberg A, Cohen P.**
Growth hormone and prostate cancer: guilty by association?
J Endocrinol Invest 1999;22(5 Suppl):64-73.
- 55 **Grimberg A, Cohen P.**
Role of insulin-like growth factors and their binding proteins in growth control and carcinogenesis.
J Cell Physiol 2000 Apr;183(1):1-9.
- 56 **Grimberg A, Rajah R, Zhao H, Cohen P.**
The prostatic IGF system: new levels of complexity. In: Takano K, Hizuka N, Takahashi SI (editors). Molecular mechanisms to regulate the activities of insulin-like growth factors.
Amsterdam: Elsevier Science 1996; B.V.p 205-213.
- 57 **Gronthos S, Brahimi J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, DenBesten P, Robey PG, Shi S.**
Stem cell properties of human dental pulp stem cells.
J Dent Res. 2002 Aug;81(8):531-5.

- 58 **Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S.**
Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Dec 5;97(25):13625-30.
- 59 **Gu K, Chang S, Ritchie HH, Clarkson BH, Rutherford RB.**
Molecular cloning of a human dentin sialophosphoprotein gene.
Eur J Oral Sci 2000 Feb;108(1):35-42.
- 60 **Guler HP, Zapf J, Schmid C, Froesch ER.**
Insulin-like growth factors I and II in healthy man. Estimations of half-lives and production rates.
Acta Endocrinol (Copenh) 1989 Dec;121(6):753-8.
- 61 **Han X, Amar S.**
Role of insulin-like growth factor-1 signaling in dental fibroblast apoptosis.
J Periodontol. 2003 Aug;74(8):1176-82.
- 62 **Haddad M, Lefranc G, Aftimos G.**
Local application of IGF1 on dental pulp mechanically exposed; in vivo study on rabbit.
Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol. 2003 Jan-Apr;45(1):12-7.
- 63 **Harada H, Toyono T, Toyoshima K, Yamasaki M, Itoh N, Kato S, Sekine K, Ohuchi H.**
FGF10 maintains stem cell compartment in developing mouse incisors.
Development 2002 Mar;129(6):1533-41
- 64 **Hayden JM, Mohan S, Baylink DJ.**
The insulin-like growth factor system and the coupling of formation to resorption.
Bone. 1995 Aug;17(2 Suppl):93S-98S.
- 65 **Heden G.**
A case report study of consecutive Emdogain-treated intrabony periodontal defects: clinical and radiographic findings after one year.
Int J Periodontics Restorative Dent. 2000;20(2): 127-139.
- 66 **Heinen M, Goetz W, Braumann B, Jaeger A.**
Immunohistochemical localization of insulin-like growth factor system components in permanent human teeth.
Poster presentation, 81st General Session & Exhibition of the IADR, Gothenborg, Sweden, 25.-28.06.2003.
- 67 **Hilton TJ.**
Sealers, liners, and bases.
J Esthet Restor Dent. 2003;15(3):140-1.
- 68 **Hoffmann T.**
Erkrankungen des marginalen Parodonts und allgemeine Gesundheitsstörungen.
Epidemiologische Aspekte.
Vortrag Chemnitz, 6. Oktober 2000.
- 69 **Holzenberger M, Dupont J, Ducos B, Leneuve P, Geloën A, Even PC, Cervera P, Le Bouc Y.**
IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice.
Nature 2003 Jan 9;421(6919):182-7.
- 70 **<http://bite-it.helsinki.fi>**
<http://bite-it.helsinki.fi>
Seitenaufruf vom 26.02.2003.
- 71 **<http://bioinfo.weizmann.ac.il> [a]**
<http://bioinfo.weizmann.ac.il/cards-bin/carddisp?IGF1>
Seitenaufruf vom 26.02.2003.
- 72 **<http://bioinfo.weizmann.ac.il> [b]**
<http://bioinfo.weizmann.ac.il/cards-bin/carddisp?IGFBP3&search=IGFBP3&suff=txt>
Seitenaufruf vom 26.02.2003.
- 73 **<http://bioinfo.weizmann.ac.il> [c]**
http://bioinfo.weizmann.ac.il/cards-bin/carddisp?IGF1R&search=*igf1*&suff=txt
Seitenaufruf vom 26.02.2003.

- 74 **Hu CC, Zhang C, Qian Q, Tatum NB.**
Reparative dentin formation in rat molars after direct pulp capping with growth factors.
J Endod. 1998 Nov;24(11):744-51.
- 75 **Iglesias P, Bayon C, Mendez J, Gancedo PG, Grande C, Diez JJ.**
Serum insulin-like growth factor type 1, insulin-like growth factor-binding protein-1, and insulin-like growth factor-binding protein-3 concentrations in patients with thyroid dysfunction.
Thyroid 2001 Nov;11(11):1043-8.
- 76 **Jernvall J, Thesleff I.**
Reiterative signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis.
Mech Dev. 2000 Mar 15;92(1):19-29.
- 77 **Joseph BK, Savage NW, Daley TJ, Young WG.**
In situ hybridization evidence for a paracrine/autocrine role for insulin-like growth factor-I in tooth development.
Growth Factors. 1996;13(1-2):11-7
- 78 **Joseph BK, Savage NW, Young WG, Waters MJ.**
Insulin-like growth factor-I receptor in the cell biology of the ameloblast: an immunohistochemical study on the rat incisor.
Epithelial Cell Biol 1994;3(2):47-53.
- 79 **Kahn CR.**
The molecular mechanism of insulin action.
Annu Rev Med 1985;36:429-51.
- 80 **Kawasaki K, Tanaka S, Ishikawa T.**
On the daily incremental lines in human dentine.
Arch Oral Biol. 1979;24(12):939-43.
- 81 **Kawase T, Orikasa M, Ogata S, Burns DM.**
Protein tyrosine phosphorylation induced by epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I in a rat clonal dental pulp-cell line.
Arch Oral Biol. 1995 Oct;40(10):921-9.
- 82 **Kelley KM, Oh Y, Gargosky SE, Gucev Z, Matsumoto T, Hwa V, Ng L, Simpson DM, Rosenfeld RG.**
Insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBPs) and their regulatory dynamics.
Int J Biochem Cell Biol. 1996 Jun;28(6):619-37.
- 83 **Ketterl, W.**
Studie über das Dentin der permanenten Zähne des Menschen.
Stoma 14 (1961) 79-96 und 148-163.
- 84 **Khandwala HM, McCutcheon IE, Flyvbjerg A, Friend KE.**
The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth.
Endocr Rev 2000 Jun;21(3):215-44.
- 85 **Kitamura C, Kimura K, Nakayama T, Terashita M.**
Temporal and spatial expression of C-jun and jun-B proto-oncogenes in pulp cells involved with reparative dentinogenesis after cavity preparation of rat molars.
J Dent Res 1999 Feb;78(2):673-80.
- 86 **Kleinig H, Sitte P.**
Zellbiologie: Ein Lehrbuch.
4., neubearb. Aufl. - Stuttgart [u.a.] : Fischer, 1999.
- 87 **Kopp S.**
Therapie mit Aufbißbehelfen.
Praktischer Arbeitskurs. Magdeburg, 2./3. Nov 2002.
- 88 **Koyama E, Wu C, Shimo T, Pacifici M.**
Chick limbs with mouse teeth: an effective in vivo culture system for tooth germ development and analysis.
Dev Dyn. 2003 Jan;226(1):149-54.

- 89 **Krebsbach PH, Kuznetsov SA, Satomura K, Emmons RV, Rowe DW, Robey PG.**
Bone formation in vivo: comparison of osteogenesis by transplanted mouse and human marrow stromal fibroblasts.
Transplantation 1997 Apr 27;63(8):1059-69.
- 90 **Krebsbach PH, Robey PG.**
Dental and skeletal stem cells: potential cellular therapeutics for craniofacial regeneration.
J Dent Educ 2002 Jun;66(6):766-73.
- 91 **Langmann J.**
Medizinische Embryologie. Die normale menschliche Entwicklung und ihre Fehlbildungen.
7. Aufl.-Stuttgart; New York: Thieme 1985.
- 92 **Larmas M, Kortelainen S, Backman T, Hietala EL, Pajari U.**
Odontoblast-mediated regulation of the progression of dentinal caries.
Proc Finn Dent Soc. 1992;88 Suppl 1:313-20.
- 93 **Leal SM, Liu Q, Huang SS, Huang JS.**
The type V transforming growth factor beta receptor is the putative insulin-like growth factor-binding protein 3 receptor.
J Biol Chem. 1997 Aug 15;272(33):20572-6.
- 94 **Lee KW, Cohen P.**
Nuclear effects: unexpected intracellular actions of insulin-like growth factor binding protein-3.
J Endocrinol. 2002 Oct;175(1):33-40.
- 95 **Lekic P, McCulloch CA.**
Periodontal ligament cell population: the central role of fibroblasts in creating a unique tissue.
Anat Rec 1996 Jun;245(2):327-41.
- 96 **Le Roith D.**
Seminars in medicine of the Beth Israel Deaconess Medical Center. Insulin-like growth factors.
N Engl J Med 1997 Feb 27;336(9):633-40.
- 97 **Le Roith D.**
The insulin-like growth factor system.
Exp Diabetes Res. 2003 Oct-Dec;4(4):205-12.
- 98 **Li H, Bartold PM, Zhang CZ, Clarkson RW, Young WG, Waters MJ.**
Growth hormone and insulin-like growth factor I induce bone morphogenetic proteins 2 and 4: a mediator role in bone and tooth formation?
Endocrinology. 1998 Sep;139(9):3855-62.
- 99 **Li SL, Kato J, Paz IB, Kasuya J, Fujita-Yamaguchi Y.**
Two new monoclonal antibodies against the alpha subunit of the human insulin-like growth factor-I receptor.
Biochem Biophys Res Commun. 1993 Oct 15;196(1):92-8.
- 100 **Linde A.**
The extracellular matrix of the dental pulp and dentin.
J Dent Res. 1985 Apr;64 Spec No:523-9.
- 101 **Linnemann M, Kühl M.**
Biochemie für Mediziner. Ein Lern- und Arbeitsbuch mit klinischem Bezug.
6., überarb. Aufl. 2002, Springer, New York.
- 102 **Lowe WL Jr, Adamo M, Werner H, Roberts CT Jr, LeRoith D.**
Regulation by fasting of rat insulin-like growth factor I and its receptor. Effects on gene expression and binding.
J Clin Invest 1989 Aug;84(2):619-26.
- 103 **Lukinmaa PL, Waltimo J.**
Immunohistochemical localization of types I, V and IV collagen in human permanent teeth and periodontal ligament.
J Dent Res. 1992 Feb ;71(2) :391-7.

- 104 **Ma J, Pollak MN, Giovannucci E, Chan JM, Tao Y, Hennekens CH, Stampfer MJ.**
Prospective study of colorectal cancer risk in men and plasma levels of insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding protein-3.
J Natl Cancer Inst 1999 Apr 7;91(7):620-5.
- 105 **Magloire H, Joffre A, Bleicher F.**
An in vitro model of human dental pulp repair.
J Dent Res. 1996 Dec;75(12):1971-8.
- 106 **Mann S.**
The biomimetics of enamel: a paradigm for organized biomaterials synthesis.
Ciba Found Symp. 1997;205:261-9; discussion 269-74.
- 107 **Marthaler TM.**
Präventive Kariologie und Parodontologie. In: Stöckli PW, Ben-Zur ED: Zahnmedizin bei Kindern und Jugendlichen.
3.Aufl.Thieme, Stuttgart 1994 (S.70-100).
- 108 **Matalova E, Tucker AS, Sharpe PT.**
Death in the life of a tooth.
J Dent Res. 2004 Jan;83(1):11-6.
- 109 **Matsumoto Y, Kato S, Miura M, Yanagisawa S, Shimizu M.**
Fine structure and distribution of lymphatic vessels in the human dental pulp: a study using an enzyme-histochemical method.
Cell Tissue Res. 1997 Apr;288(1):79-85.
- 110 **Matsushita K, Motani R, Sakuta T, Yamaguchi N, Koga T, Matsuo K, Nagaoka S, Abeyama K, Maruyama I, Torii M.**
The role of vascular endothelial growth factor in human dental pulp cells: induction of chemotaxis, proliferation, and differentiation and activation of the AP-1-dependent signaling pathway.
J Dent Res. 2000 Aug;79(8):1596-603.
- 112 **Mertz-Fairhurst EJ, Curtis JW Jr, Ergle JW, Rueggeberg FA, Adair SM.**
Ultraconservative and cariostatic sealed restorations: Results at year 10.
J Am Dent Assoc. 1998 Jan;129(1):55-66
- 113 **Meyer G.**
Dysfunktionsbedingte Erkrankungen des Kauorgans-Diagnostik, Initialtherapie durch Einschleifen, Aufbißbehelfe.
Vortrag, Halle, 17. März 2001.
- 114 **Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S.**
SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 May 13;100(10):5807-12. Epub 2003 Apr 25.
- 115 **Moradian-Oldak J.**
Amelogenins: assembly, processing and control of crystal morphology.
Matrix Biol 2001 Sep;20(5-6):293-305.
- 116 **Morse DR.**
Age-related changes of the dental pulp complex and their relationship to systemic aging.
Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1991 Dec;72(6):721-45.
- 117 **Muller AF, Janssen JA, Lamberts SW, Bidlingmaier M, Strasburger CJ, Hofland L, van der Lely AJ.**
Effects of fasting and pegvisomant on the GH-releasing hormone and GH-releasing peptide-6 stimulated growth hormone secretion.
Clin Endocrinol (Oxf) 2001 Oct;55(4):461-7.
- 118 **Murray PE, About I, Lumley PJ, Franquin JC, Remusat M, Smith AJ.**
Cavity remaining dentin thickness and pulpal activity.
Am J Dent. 2002 Feb;15(1):41-6.
- 119 **Murray PE, About I, Lumley PJ, Smith G, Franquin JC, Smith AJ.**
Postoperative pulpal and repair responses.
J Am Dent Assoc. 2000 Mar;131(3):321-9.

- 120 **Murray P.E.; Garcia-Godoy F.**
Stem Cell Responses in Tooth Regeneration.
Stem Cells Dev. 2004 June; 13(3): 255-262.
- 121 **Murray PE, Lumley PJ, Ross HF, Smith AJ.**
Tooth slice organ culture for cytotoxicity assessment of dental materials.
Biomaterials. 2000 Aug;21(16):1711-21.
- 122 **Murray JJ, Rugg-Gunn AJ, Jenkins GN.**
Fluorides in Caries prevention. 3rd ed. Butterworth-Heinemann.
London 1991.
- 123 **Mustafa T, Klonisch T, Hombach-Klonisch S, Kehlen A, Schmutzler C, Koehrle J, Gimm O, Dralle, Hoang.Vu C.**
Expression of CD97 and CD55 in human medullary thyroid carcinomas.
Int J Oncol 2004;24:285-294.
- 124 **Nakashima M.**
The effects of growth factors on DNA synthesis, proteoglycan synthesis and alkaline phosphatase activity in bovine dental pulp cells.
Arch Oral Biol 1992 Mar;37(3):231-6.
- 125 **Nakashima M.**
Induction of dentin formation on canine amputated pulp by recombinant human bone morphogenetic proteins (BMP)-2 and -4.
J Dent Res 1994 Sep;73(9):1515-22.
- 126 **National Institute of Dental and Craniofacial Research.**
<http://www.nidcr.nih.gov/Spectrum/NIDCR4/4grasec3.htm>.
Seitenaufruf vom 15.5.2004.
- 127 **Neubuser A, Peters H, Balling R, Martin GR.**
Antagonistic interactions between FGF and BMP signaling pathways: a mechanism for positioning the sites of tooth formation.
Cell. 1997 Jul 25;90(2):247-55.
- 128 **Nitzan DW, Michaeli Y, Weinreb M, Azaz B.**
The effect of aging on tooth morphology: a study on impacted teeth.
Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1986 Jan;61(1):54-60.
- 129 **Nosrat CA, Fried K, Ebendahl T, Olson L.**
NGF, BDNF, NT3, NT4, and GDNF in tooth development.
Eur J Oral Sci 1998 Jan;106 Suppl 1:94-9.
- 130 **O'Connor R, Kauffmann-Zeh A, Liu Y, Lehar S, Evan GI, Baserga R, Blattler WA.**
Identification of domains of the insulin-like growth factor I receptor that are required for protection from apoptosis.
Mol Cell Biol 1997 Jan;17(1):427-35.
- 131 **Olivecrona H, Hilding A, Ekstrom C, Barle H, Nyberg B, Moller C, Delhanty PJ, Baxter RC, Angelin B, Ekstrom TJ, Tally M.**
Acute and short-term effects of growth hormone on insulin-like growth factors and their binding proteins: serum levels and hepatic messenger ribonucleic acid responses in humans.
J Clin Endocrinol Metab 1999 Feb;84(2):553-60.
- 132 **Onishi T, Kinoshita S, Shintani S, Sobue S, Ooshima T.**
Stimulation of proliferation and differentiation of dog dental pulp cells in serum-free culture medium by insulin-like growth factor.
Arch Oral Biol. 1999 Apr;44(4):361-71.
- 133 **Palosaari H, Wahlgren J, Larmas M, Ronka H, Sorsa T, Salo T, Tjaderhane L.**
The expression of MMP-8 in human odontoblasts and dental pulp cells is down-regulated by TGF-beta1.
J Dent Res 2000 Jan;79(1):77-84.
- 134 **Peters H, Balling R.**
Teeth. Where and how to make them.
Trends Genet 1999 Feb;15(2):59-65.

- 135 Peters H, Neubüser A, Kratochwil K, Balling R.**
Pax9-deficient mice lack pharyngeal pouch derivatives and teeth and exhibit craniofacial and limb abnormalities.
Genes Dev. 1998 September 1;12(17):2735-2747.
- 136 Philbrick WM, Dreyer BE, Nakchbandi IA, Karaplis AC.**
Parathyroid hormone-related protein is required for tooth eruption.
Proc Natl Acad Sci USA. 1998 Sep 29;95(20):11846-51.
- 137 Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR.**
Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.
Science 1999 Apr 2;284(5411):143-7.
- 138 Raab WHM.**
Diagnostische Aspekte des Zahnschmerzes.
Zahnärztliche Mitteilungen. 2000; 19:58-62.
- 139 Rajaram S, Baylink DJ, Mohan S.**
Insulin-like growth factor-binding proteins in serum and other biological fluids: regulation and functions.
Endocr Rev. 1997 Dec;18(6):801-31.
- 140 Rani CS, MacDougall M.**
Dental cells express factors that regulate bone resorption.
Mol Cell Biol Res Commun. 2000 Mar;3(3):145-52.
- 141 Ranly DM, Thomas HF, Chen J, MacDougall M.**
Osteocalcin expression in young and aged dental pulps as determined by RT-PCR.
J Endod. 1997 Jun;23(6):374-7.
- 142 Rao MS, Mattson MP.**
Stem cells and aging: expanding the possibilities.
Mech Ageing Dev 2001 May 31;122(7):713-34.
- 143 Reichenmiller KM, Mattern C, Ranke MB, Elmlinger MW.**
IGFs, IGFBPs, IGF-binding sites and biochemical markers of bone metabolism during differentiation in human pulp fibroblasts.
Horm Res. 2004;62(1):33-9. Epub 2004 May 27.
- 144 Rinderknecht E, Humbel RE.**
Primary structure of human insulin-like growth factor II.
FEBS Lett 1978 May 15;89(2):283-6.
- 145 Rinderknecht E, Humbel RE.**
The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin.
J Biol Chem 1978 Apr 25;253(8):2769-76.
- 146 Roberts-Clark DJ, Smith AJ.**
Angiogenic growth factors in human dentine matrix.
Arch Oral Biol. 2000 Nov;45(11):1013-6.
- 147 Rotem-Yehudar R, Galperin E, Horowitz M.**
Association of insulin-like growth factor 1 receptor with EHD1 and SNAP29.
J Biol Chem 2001 Aug 31;276(35):33054-60.
- 148 Rotwein P, Pollock KM, Didier DK, Krivi GG.**
Organization and sequence of the human insulin-like growth factor I gene. Alternative RNA processing produces two insulin-like growth factor I precursor peptides.
J Biol Chem 1986 Apr 15;261(11):4828-32.
- 149 Ruch JV.**
Odontoblast commitment and differentiation.
Biochem Cell Biol 1998;76(6):923-38.
- 150 Ruch JV, Lesot H, Begue-Kirn C.**
Odontoblast differentiation.
Int J Dev Biol 1995 Feb;39(1):51-68.
- 151 Sasaki T**
Structure and function of secretory ameloblasts in enamel formation.
Ciba Found Symp 1997;205:32-46.

- 152 **Sasaki T.**
Tracer, cytochemical, and freeze-fracture study on the mechanisms whereby secretory ameloblasts absorb exogeneous proteins.
Acta Anat (Basel) 1984;118(1):23-33.
- 153 **Saygin NE, Tokiyasu Y, Giannobile WV, Somerman MJ.**
Growth factors regulate expression of mineral associated genes in cementoblasts.
J Periodontol. 2000 Oct;71(10):1591-600.
- 154 **Schroeder HE.**
Orale Strukturbilogie: Entwicklungsgeschichte, Struktur und Funktion normaler Hart- und Weichgewebe der Mundhöhlen und des Kiefergelenks.
5.Aufl., Stuttgart, New York: Thieme 2000.
- 155 **Sens DA, McGuirt JP, Khan W, Todd JH, Howell RM.**
Expression of heat shock protein 27 in adult human third molar dental pulp.
J Oral Pathol Med. 1996 Aug;25(7):382-7.
- 156 **Shah NM, Anderson DJ.**
Integration of multiple instructive cues by neural crest stem cells reveals cell-intrinsic biases in relative growth factor responsiveness.
Proc Natl Acad Sci USA 1997 Oct 14;94(21):11369-74.
- 157 **Shi S, Robey PG, Gronthos S.**
Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis.
Bone 2001 Dec;29(6):532-9.
- 158 **Shiba H, Fujita T, Doi N, Nakamura S, Nakanishi K, Takemoto T, Hino T, Noshiro M, Kawamoto T, Kurihara H, Kato Y.**
Differential effects of various growth factors and cytokines on the syntheses of DNA, type I collagen, laminin, fibronectin, osteonectin/secreted protein, acidic and rich in cysteine (SPARC), and alkaline phosphatase by human pulp cells in culture.
J Cell Physiol 1998 Feb;174(2):194-205.
- 159 **Shiba H, Nakamura S, Shirakawa M, Nakanishi K, Okamoto H, Satakeda H, Noshiro M, Kamihagi K, Katayama M, Kato Y.**
Effects of basic fibroblast growth factor on proliferation, the expression of osteonectin (SPARC) and alkaline phosphatase, and calcification in cultures of human pulp cells.
Dev Biol 1995 Aug;170(2):457-66.
- 160 **Siebert GK.**
Zahnärztlich-Funktionell bedingte Gesichts- und Kopfschmerzen. In: Gesichts- und Kopfschmerzen. Ein interdisziplinärer Überblick für Mediziner, Zahnmediziner und Psychologen.
Hrsg.: Siebert GK. Carl Hanser Verlag München Wien.
- 161 **Six N, Tompkins K, Septier D, Veis A, Goldberg M.**
Recruitment and characterization of the cells involved in reparative dentin formation in the exposed rat molar pulp after implantation of amelogenin gene splice products A+4 and A-4.
Oral Biosciences Medicine 2004 Mar, 1(1):35-44.
- 162 **Skrtic D, Antonucci JM, Eanes ED, Brunsworth RT.**
Silica- and zirconia-hybridized amorphous calcium phosphate: effect on transformation to hydroxyapatite.
J Biomed Mater Res. 2002 Mar 15;59(4):597-604.
- 163 **Skrtic D, Stansbury JW, Antonucci JM.**
Volumetric contraction and methacrylate conversion in photo-polymerized amorphous calcium phosphate/methacrylate composites.
Biomaterials. 2003 Jun;24(14):2443-9.
- 164 **Slavkin HC, Hu CC, Sakakura Y, Diekwisch T, Chai Y, Mayo M, Bringas P Jr, Simmer J, Mak G, Sasano Y, et al.**
Gene expression, signal transduction and tissue-specific biomineralization during mammalian tooth development.
Crit Rev Eukaryot Gene Expr 1992;2(4):315-29.

- 165 **Smith AJ, Cassidy N, Perry H, Begue-Kirn C, Ruch JV, Lesot H.**
Reactionary dentinogenesis.
Int J Dev Biol 1995 Feb;39(1):273-80.
- 166 **Smith AJ , Smith G.**
Solubilisation of TGF β 1 by dentine conditioning agents.
J Dent Res. 1998;77:1034 abstr. 3224.
- 167 **Smith AJ, Tobias RS, Plant CG, Browne RM, Lesot H, Ruch JV.**
In vivo morphogenetic activity of dentine matrix proteins.
J Biol Buccale 1990 Jun;18(2):123-9.
- 168 **Solheim T.**
Amount of secondary dentin as an indicator of age.
Scand J Dent Res. 1992 Aug;100(4):193-9.
- 169 **Stanley HR, White CL, McCray L.**
The rate of tertiary (reparative) dentine formation in the human tooth.
Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1966 Feb;21(2):180-9.
- 170 **Stewart CE, Rotwein P.**
Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors.
Physiol Rev 1996 Oct;76(4):1005-26.
- 171 **Straus DS, Takemoto CD.**
Specific decrease in liver insulin-like growth factor-I and brain insulin-like growth factor-II gene expression in energy-restricted rats.
J Nutr 1991 Aug;121(8):1279-86.
- 172 **Straus DS, Takemoto CD.**
Effect of dietary protein deprivation on insulin-like growth factor (IGF)-I and -II, IGF binding protein-2, and serum albumin gene expression in rat.
Endocrinology 1990 Oct;127(4):1849-60.
- 173 **Takahashi K, Yamane A, Bringas P, Caton J, Slavkin HC, Zeichner-David M.**
Induction of amelogenin and ameloblastin by insulin and insulin-like growth factors (IGF-I and IGF-II) during embryonic mouse tooth development in vitro.
Connect Tissue Res. 1998;38(1-4):269-78; discussion 295-303.
- 174 **Terheyden H, Knak C, Jepsen S, Palmie S, Rueger DR.**
Mandibular reconstruction with a prefabricated vascularized bone graft using recombinant human osteogenic protein-1: an experimental study in miniature pigs. Part I: Prefabrication.
Int J Oral Maxillofac Surg 2001 Oct;30(5):373-9.
- 175 **Terheyden H, Warnke P, Dunsche A, Jepsen S, Brenner W, Palmie S, Toth C, Rueger DR.**
Mandibular reconstruction with prefabricated vascularized bone grafts using recombinant human osteogenic protein-1: an experimental study in miniature pigs. Part II: transplantation.
Int J Oral Maxillofac Surg 2001 Dec;30(6):469-78.
- 176 **Terry LC.**
Insulin-like growth factor-1 (IGF-1, somatomedin C) blood levels are not associated with prostate sSpecific antigen (PSA) levels or prostate cancer: A Study of 749 patients
<http://www.worldhealth.net/news/prost-igf1/> Seitenaufruf vom 30.10.2001.
- 177 **Thesleff I.**
Genetic basis of tooth development and dental defects.
Acta Odontol Scand 2000 Oct;58(5):191-4.
- 178 **Thesleff I, Partanen AM, Vainio S.**
Epithelial-mesenchymal interactions in tooth morphogenesis: The roles of extracellular matrix, growth factors, and cell surface receptors.
J Craniofac Genet Dev Biol 1991 Oct-Dec;11(4):229-37.

- 179 Thomas BL, Tucker AS, Ferguson C, Qiu M, Rubenstein JL, Sharpe PT.**
Molecular control of odontogenic patterning: positional dependent initiation and morphogenesis.
Eur J Oral Sci 1998 Jan;106 Suppl 1:44-7.
- 180 Tucker AS, Matthews KL, Sharpe PT.**
Transformation of tooth type induced by inhibition of BMP signaling.
Science 1998 Nov 6;282(5391):1136-8.
- 181 Tucker AS, Sharpe PT.**
Molecular genetics of tooth morphogenesis and patterning: the right shape in the right place.
J Dent Res 1999 Apr;78(4):826-34.
- 182 Tziafas D, Alvanou A, Papadimitriou S, Gasic J, Komnenou A.**
Effects of recombinant basic fibroblast growth factor, insulin-like growth factor-II and transforming growth factor-beta 1 on dog dental pulp cells in vivo.
Arch Oral Biol. 1998 Jun;43(6):431-44.
- 183 Tziafas D, Smith AJ, Lesot H.**
Designing new treatment strategies in vital pulp therapy.
J Dent. 2000 Feb;28(2):77-92. Review.
- 184 Tziafas D, Pantelidou O, Alvanou A, Belibasakis G, Papadimitriou S.**
The dentinogenic effect of mineral trioxide aggregate (MTA) in short-term capping experiments.
Int Endod J. 2002 Mar;35(3):245-54.
- 185 Ullrich A, Gray A, Tam AW, Yang-Feng T, Tsubokawa M, Collins C, Henzel W, Le Bon T, Kathuria S, Chen E, et al.**
Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity.
EMBO J 1986 Oct;5(10):2503-12.
- 186 Waes HJM van, Stoeckli PW.**
Farbatlanten der Zahnmedizin. Bd.17: Kinderzahnmedizin.
New York: Thieme, 2001.
- 187 Waters NE.**
Evidence for regarding enamel as an ion exchange membrane.
In :Fearnhead RW, Stack MV. Tooth enamel II. Wright, Bristol 1971 (p.166).
- 188 Wen HB, Fincham AG, Moradian-Oldak J.**
Progressive accretion of amelogenin molecules during nanospheres assembly revealed by atomic force microscopy.
Matrix Biol 2001 Sep;20(5-6):387-95J.
- 189 Wood WI, Cachianes G, Henzel WJ, Winslow GA, Spencer SA, Hellmiss R, Martin JL, Baxter RC.**
Cloning and expression of the growth hormone-dependent insulin-like growth factor-binding protein.
Mol Endocrinol 1988 Dec;2(12):1176-85.
- 190 Yang S, Leong KF, Du Z, Chua CK.**
The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering. Part II. Rapid Prototyping Techniques.
Tissue Engineering 2002;8(1):1-11.
- 191 Young WG.**
Growth hormone and insulin-like growth factor-I in odontogenesis.
Int J Dev Biol 1995 Feb;39(1):263-72.
- 192 Young WG, Li H, Xiao Y, Waters MJ, Bartold PM.**
Growth-hormone-stimulated dentinogenesis in Lewis dwarf rat molars.
J Dent Res 2001 Aug;80(8):1742-7.
- 193 Young WG, Ruch JV, Stevens MR, Begue-Kirn C, Zhang CZ, Lesot H, Waters MJ.**
Comparison of the effects of growth hormone, insulin-like growth factor-I and fetal calf serum on mouse molar odontogenesis in vitro.
Arch Oral Biol 1995 Sep;40(9):789-99.

- 194 Yoshiba K, Yoshiba N, Nakamura H, Iwaku M, Ozawa H.**
Immunolocalization of fibronectin during reparative dentinogenesis in human teeth after pulp Capping with calcium hydroxide.
J Dent Res. 1996 Aug;75(8):1590-7.
- 195 Yu H, Spitz MR, Mistry J, Gu J, Hong WK, Wu X.**
Plasma levels of insulin-like growth factor-I and lung cancer risk: a case-control analysis.
J Natl Cancer Inst 1999 Jan 20;91(2):151-6.
- 196 Zhang CZ, Li H, Young WG, Bartold PM, Chen C, Waters MJ.**
Evidence for a local action of growth hormone in embryonic tooth development in the rat.
Growth Factors 1997;14(2-3):131-43.

8 Thesen

1. Das IGF-System aus der Familie der Wachstumsfaktoren ist ein integraler Bestandteil des Körperwachstums und beeinflusst im Rahmen der Odontogenese die mitotische Aktivität und die Differenzierung von Zellen der embryonalen Zahnanlage.
2. Im Knochen impaktierte Weisheitszähne zeigen auch nach Abschluß des Körperwachstums Durchbruchstendenzen in die Mundhöhle und wurden deshalb im Rahmen dieser Studie molekularbiologisch auf das Vorhandensein von Wachstumsfaktoren hin untersucht.
3. Ziel der Studie war der Expressionsnachweis der Wachstumsfaktoren IGF1 Ligand (IGF1), IGF1 Bindungsprotein 3 (IGFBP3) und IGF1 Rezeptor α (IGF1R α) an menschlichen Weisheitszähnen.
4. Mittels RT-PCR wurden die Transkriptionslevel von IGF1, IGFBP3 und IGF1R α im homogenisierten Gewebe operativ entfernter Weisheitszähne bestimmt. Immunhistochemisch wurde der Nachweis der Proteinexpression von IGF1, IGFBP3 und IGF1R α an Gefrierdünnschnitten im Bereich des offenen Foramen apicale geführt.
5. Transkripte der Wachstumsfaktoren sind in Zähnen jeden Alters nachweisbar. IGF1-mRNA wird in allen Altersgruppen hoch, IGFBP3 und IGF1R α -mRNA hingegen signifikant schwächer exprimiert.
6. Die IGF1-Transkriptionsrate ist im Alter des Weisheitszahndurchbruchs (Altersgruppe 18-22 J.) gegenüber der jüngeren und älteren Altersgruppe nichtsignifikant erhöht. Auch nach der statistisch zu erwartenden Durchbruchszeit der Weisheitszähne ist die Transkription noch mäßig stark.
7. IGF-BP3-mRNA zeigt in der Altersgruppe bis 18J. eine mäßige, in den höheren Altersgruppen weiter sinkende Expressionen.
8. IGF-R α -mRNA zeigt in der Altersgruppe bis 18J. eine schwache, danach ebenfalls eine weiter sinkende Expression.

9. Die Expression von IGF1 Bindungsprotein 3 und IGF1 Rezeptor α nimmt nach der Wurzel- und Pulpadifferenzierung (>21 Jahre) ab.
10. Im Bereich des Odontoblastensaums am offenen Foramen apicale war die Proteinexpression von IGF1 mäßig stark ausgeprägt. Die Proteine von IGFBP3 und IGF1R α wurden überwiegend niedrig bis mäßig stark exprimiert.
11. Eine Immunreaktivität ließ sich an beiden Zellpolen des Odontoblastensaums nachweisen. Immunreaktivität zeigten ebenfalls Zementozyten, pulpale Fibroblasten in der Umgebung von Nerven und Gefäßen sowie solitäre Zellhaufen innerhalb des Pulpamesenchyms.
12. Die räumliche Verteilung der Komponenten des IGF-Systems deutet darauf hin, dass spezifische Funktionen an genau definierte Gewebsareale geknüpft sind. Analogien zur koronalen Pulpa sind mit diesem Studiendesign nicht beweisbar.
13. Differenzierung und Proliferation von Pulpagewebe wird durch eine hohe Expression von IGF1 gefördert. Die Bedeutung verringert sich nach Stillstand der Wachstumsprozesse an der Wurzelspitze.
14. Die verminderte Expression von IGFBP3 und die daraus resultierende verringerte Bindung von IGF1 scheint mit dem komplizierten Durchbruchprozess assoziiert zu sein. Daraus resultiert die verstärkte Kopplung von IGF1 an den IGF1R α , was zu einer erhöhten Mitoserate in den Odontoblasten und Zellen des Wurzelgrundes führen kann. Die schwache Expression von IGF1R α in der jüngeren Altersgruppe könnte eine Reaktion auf systemisches IGF1 begünstigen.
15. Unsere Daten zeigen, dass IGF1 Ligand, IGF1 Bindungsprotein 3 und IGF1 Rezeptor α in die humane Odontogenese involviert sind. Pulpazellen scheinen eine lebenslange Sensibilität für IGF1 zu besitzen.
16. Aktueller Tendenzen in der Zahnforschung weisen darauf hin, dass zukünftig Wachstumsfaktoren, darunter mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit auch IGF1, für Therapieansätze in der Therapie alterierter Pulpen eine Rolle spielen werden.

Lebenslauf

Name	Stefan Ahrens
Geburtsdatum, -ort	08.03.1972, Halle/Saale
Eltern	Ursula Ahrens, geb. Keßner; Lehrerin Manfred Ahrens, Lehrer
Schulbildung	
1978 - 1986	Polytechnische Oberschule in Halle
1986 - 1990	Erweiterte Oberschule Halle, Altsprachenklasse
Juni 1990	Abitur der EOS August Hermann Francke
Sept. 1990 - Sept.1991	Zivildienst in der Kieferchirurgischen Ambulanz der Medizinischen Akademie Carl Gustav Carus, Dresden
Oktober 1991 - April 1992	Arbeit im Bezirkskrankenhaus Halle, Anästhesiologische Intensivstation
April 1992 - Juli 1992	Auslandsaufenthalt in Großbritannien
August 1992 - Okt. 1992	Arbeit im Dentallabor
Studium	
1992 - 1997	Studium der Zahnheilkunde an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Juli 1993	Naturwissenschaftliche Vorprüfung
Mai 1995	Zahnärztliche Vorprüfung
Oktober 1997	Zahnärztliche Prüfung
November 1997	Erteilung der Approbation
Klinischer und Wissenschaftlicher Werdegang	
Aug. 1998 - Sept. 1999	Ausbildungsassistent in ZAP Dr. H.-Chr. Maletz, Bleicherode
Nov. 1999 – Juni 2004	Ausbildungsassistent, später Vertreter und Entlastungsassistent in ZAP Dr. Steffi Otto, Halle
seit März 2001	Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der AG Experimentelle und Chirurgische Onkologie der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie an der MLU Halle
Aug. 2004 - Juli 2005	Associate Dentist in zwei Praxen in Devon, Südengland
Oktober 2004	Niederlassung in eigener Praxis in Halle
Oktober 2004	Promotionsverteidigung

Selbständigkeitserklärung

Gemäß §6 der Promotionsordnung der Universität Halle erkläre ich hiermit an Eides statt, dass ich vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Frühere Promotionsversuche bestehen nicht. Die vorliegende Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Halle, den 16.10.2004

Stefan Ahrens

Publikationen

Das methodische Vorgehen wurde veröffentlicht mit dem Artikel:

Ahrens S, Mustafa T, Ernst A, Schubert J, Hoang-Vu C.

RNA-Gewinnung aus Pulpazellen.

ZMK (17), 12/2001, 756-760.

Wesentliche Ergebnisse der Arbeit wurden durch Posterpräsentation bei folgender Veranstaltung vorgestellt:

Ahrens S, Mustafa T, Boehm B, Reichert S, Eckert A, Schubert J, Hoang-Vu C.

Expression of IGF-1, IGF-BP3 and IGF-R α in human wisdom teeth.

81st General Session & Exhibition of the IADR

25. – 28.06.2003 Göteborg, Schweden

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand in der Arbeitsgruppe Experimentelle und Chirurgische Onkologie an der Universitätsklinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Gefäßchirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Dem Kliniksdirektor Herrn Prof. Dr. med. Henning Dralle gilt mein Dank für die großzügig gewährten hervorragenden Arbeitsmöglichkeiten und die Überlassung dieses zahnmedizinischen Themas.

Dem Arbeitsgruppenleiter Herrn PD Dr. Cuong Hoang-Vu danke ich sehr herzlich für die individuelle Betreuung, das Lehren wissenschaftlicher Methodik sowie die menschliche und respektvolle Führung.

Ich danke ebenfalls Frau Kathrin Hammje und Frau Christel Sauer für die sorgfältige Einweisung in die molekularbiologische Laborarbeit. Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, einschließlich Herrn Carsten Sekulla, möchte ich für die Freundlichkeit, ihr kollegiales Verhalten und die gute Zusammenarbeit danken.

Herzlichen Dank auch an das gesamte Team der Zahnarztpraxis Ernst & Schenk in Halle für die stets reibungslose Logistik und Mitarbeit, an Frau Andrea Ernst für ihre professionelle Arbeit bei der Gewebebegewinnung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Tarek Mustafa für die weitblickenden sachlichen Anregungen und die stets gewährte Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Meiner Familie danke ich sehr für die moralische Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.