

Aus dem Zentrum für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Universität zu Köln
Poliklinik für Kieferorthopädie
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. B. Braumann

Zelluläre und subzelluläre Expression und Phosphorylierung
der MAP-Kinase ERK1/2 in Odontoblasten der gesunden und
der durch Dentinkaries, Caries profunda und Gangrän entzündlich veränderten
humanen Dentin-Pulpa-Einheit

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der zahnärztlichen Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Marleen Kufahl
aus Bremerhaven

promoviert am 5. Juli 2017

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. Dr. h. c. Th. Krieg

1. Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. med. B. Braumann

2. Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. B. Brachvogel

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich keine Unterstützungsleistungen erhalten.

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (http://typo3-8169.rz.unikoeln.de/fileadmin/templates/uni/PDF/Ordnung_gute_wiss_Praxis.pdf) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 07.06.2016

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Herrn Dr. med. dent. Yüksel Korkmaz von mir selbst durchgeführt worden.

Das humane Material, das in dieser Studie verwendet worden ist, wurde mit der Studiennummer 2980 von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf genehmigt.

Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Dr. Bert Braumann dafür, dass ich unter seiner Betreuung diese Promotionsarbeit anfertigen konnte.

Prof. Klaus Addicks als Leiter des Anatomischen Instituts I bis 2013 danke ich für die guten Forschungsbedingungen, unter denen ich die Experimente durchführen durfte.

Mein herzlichster Dank gilt Dr. med. dent. Yüksel Korkmaz für die sehr gute Betreuung während der gesamten Zeit, in der diese Arbeit entstanden ist. Von ihm durfte ich alle Methoden erlernen. Ich bin auch sehr dankbar für die Anregungen und hilfreichen Diskussionen.

Außerdem danke ich Dr. med. dent. Isabelle Graf für ihren Einsatz und Dr. med. dent. Hubert Christian Roggendorf für seine Unterstützung.

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	9
1. EINLEITUNG	12
1.1. Die physiologische Regulation der Zellen der Dentin-Pulpa-Einheit und Dentinmatrixbildung und Biomineralisation der Dentinmatrix	13
1.1.1. Primärdentinbildung	14
1.1.2. Sekundärdentinbildung	14
1.2. Entzündungen in der dentalen Pulpa und Dentinmatrixbildung und Biomineralisation der Dentinmatrix unter entzündlichen Bedingungen in der Dentin-Pulpa-Einheit	15
1.2.1. Hyperämie der dentalen Pulpa	15
1.2.2. Akute seröse Entzündung der dentalen Pulpa	15
1.2.3. Chronische purulente Entzündung der dentalen Pulpa	16
1.2.4. Pulpagangrän.....	16
1.2.5. Dentinmatrixbildung und Biomineralisation der Dentinmatrix unter entzündlichen Bedingungen in der Dentin-Pulpa-Einheit	17
1.2.5.1. Tertiärdentinbildung	17
1.3. Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK)	18
1.3.1. ERK1/2.....	18
1.3.2. Regulation der Matrixbildung und Biomineralisation der Matrix durch die Phosphorylierung von ERK1/2 in Osteoblasten	20
2. FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT	21
3. MATERIAL UND METHODEN	24
3.1. Materialien	24
3.1.1. Untersuchungsmaterial	24
3.1.2. Pufferlösungen	24
3.2. Methoden	26
3.2.1. Präparation und Immersionsfixation der humanen Molaren und Prämolaren	26
3.2.2. Entkalkung, Kryoprotektieren und Einbettung der Zähne	26
3.2.3. Anfertigen und Aufbewahrung der Schnitte	26
3.2.4. Hämatoxylin-Eosin-Färbung und Charakterisierung der Schnitte	27
3.2.5. Immunhistochemische Inkubationsmethoden	28
3.2.5.1. Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex Methode	28
3.2.5.2. Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen	29
3.2.6. Densitometrie (Quantifizierung der Immunhistochemie)	30
3.2.7. Statistische Auswertung	30
4. ERGEBNISSE	31
4.1. Histologische Charakterisierung der gesunden Dentin-Pulpa-Einheit	31
4.2. Histopathologische Diagnose der Entzündungen der Dentin-Pulpa-Einheit	31
4.2.1. Pulpahyperämie (initiale Dentinkaries)	32
4.2.2. Akute seröse Pulpaentzündung (Dentinkaries)	32
4.2.3. Chronische purulente Pulpaentzündung (Caries profunda)	32
4.2.4. Pulpagangrän (Infektion der Nekrose der Dentin-Pulpa-Einheit)	32

4.3.	Expression und Phosphorylierung von ERK1/2 in gesunden Odontoblasten	33
4.4.	Expression und Phosphorylierung von ERK1/2 in entzündeten Odontoblasten.....	35
4.4.1.	Expression und Phosphorylierung von ERK1/2 in Odontoblasten der akuten Pulpaentzündung infolge einer Dentinkaries	35
4.4.2.	Expression und Phosphorylierung von ERK1/2 in Odontoblasten der chronischen purulenten Pulpaentzündung infolge einer Caries profunda	36
4.4.3.	Expression und Phosphorylierung von ERK1/2 in Odontoblasten der Pulpagangrän	38
4.5.	Kontrolle der immunhistochemischen Färbung der ABC-Methode	39
4.6.	Subzelluläre Expression und Phosphorylierung von ERK1/2 in gesunden Odontoblasten.....	40
4.6.1.	Subzelluläre Expression von ERK1/2 in gesunden Odontoblasten.....	40
4.6.2.	Subzelluläre Lokalisation der Phosphorylierungsformen von ERK1/2 in gesunden Odontoblasten.....	41
4.7.	Subzelluläre Expression und Phosphorylierung von ERK1/2 in entzündeten Odontoblasten.....	42
4.7.1.	Subzelluläre Expression von ERK1/2 in akut entzündeten Odontoblasten (Dentinkaries).....	42
4.7.2.	Subzelluläre Expression von ERK1/2 in chronisch entzündeten Odontoblasten (Caries profunda)	43
4.7.3.	Subzelluläre Phosphorylierung von ERK1/2 in akut entzündeten Odontoblasten (Dentinkaries).....	44
4.7.4.	Subzelluläre Phosphorylierung von ERK1/2 in chronisch entzündeten Odontoblasten (Caries profunda)	45
4.8.	Kontrolle der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung	46
4.9.	Statistische Auswertung der Färbungsintensitäten	47
5.	DISKUSSION	50
5.1.	Diskussion der Methodik	50
5.1.1.	Fixierung, Entkalkung und Bearbeitung des Untersuchungsmaterials	50
5.1.2.	Immunhistochemische Methode	51
5.1.2.1.	Die Spezifität der Antikörper gegen t-ERK1/2 und p-ERK1/2 am Thr202/Tyr204	51
5.1.2.2.	Blockierung der endogenen Peroxidase-Aktivität.....	51
5.1.2.3.	Die Anwendung des Detergens Triton™ X-100	52
5.1.2.4.	Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen der IHC-Reagenzien	52
5.1.2.5.	Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen des sAK.....	53
5.1.2.6.	Visualisierung der spezifischen IHC-Bindungsstellen	54
5.2.	Diskussion der Ergebnisse.....	55
5.2.1.	Die subzelluläre Lokalisation und konstitutive Phosphorylierung von ERK1/2 in Odontoblasten und in Progenitoren der Odontoblasten der gesunden Dentin-Pulpa- Einheit	55
5.2.1.1.	Die Zellaktivität-abhängige Regulation der Odontoblasten durch die Phosphorylierung von ERK1/2	55
5.2.1.2.	Der Einfluss von ERK1/2 auf die Bildung und Biomineralisation der Dentinmatrix ...	57
5.2.1.3.	Die Migration und Zellaktivität-abhängige Regulation der Progenitoren durch die Phosphorylierung von ERK1/2	58
5.2.1.4.	Die Regulation der frühen und späten Differenzierung durch die konstitutive Phosphorylierung von ERK1/2	59
5.2.2.	Die subzelluläre Lokalisation und Phosphorylierung von ERK1/2 in Odontoblasten und Progenitoren der Odontoblasten der entzündeten Dentin-Pulpa-Einheit	60
5.2.2.1.	Die Phosphorylierung von ERK1/2 bei der akuten serösen Entzündung (Dentinkaries)	60
5.2.2.2.	Die Phosphorylierung von ERK1/2 bei der akuten purulenten Pulpaentzündung (Caries profunda).....	61

Inhaltsverzeichnis

5.2.2.3.	Die Phosphorylierung von ERK1/2 bei der Gangrän.....	64
5.3.	Schlussfolgerungen und klinische Relevanz der Ergebnisse	65
6.	ZUSAMMENFASSUNG	67
7.	LITERATURVERZEICHNIS	69
8.	LEBENS LAUF	75

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex
BSA	<i>bovine serum albumin</i> = Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca ²⁺	zweifach positiv geladenes Calciumion
CGRP	<i>calcitonin gene-related peptide</i>
Cp	<i>Caries profunda</i>
CREB-1	<i>cAMP response element-binding protein 1</i>
DAB	Diaminobenzidin
DGP	deamidierte Gliadin-Peptide
d.h.	das heißt
DMP-1	Dentinmatrixprotein-1
DPP	Dentinphosphoprotein
DSP	Dentinsialoprotein
DSPP	Dentinsialophosphoprotein
DU	densitometrische Units
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EM	Elektronenmikroskop
ERK	extrazellulär Signal-regulierte Kinase
ERK1	extrazellulär Signal-regulierte Kinase 1
ERK2	extrazellulär Signal-regulierte Kinase 2
ERK5	extrazellulär Signal-regulierte Kinase 5
evtl.	eventuell
Fab	<i>antigen-binding fragment</i> = Antigenbindendes Fragment
Fc	<i>crystallisable fragment</i> = kristallisierbares Fragment
FGF	<i>fibroblast growth factor</i> = Fibroblasten-Wachstumsfaktor
FRA1	<i>fos-related antigen 1</i>
g	Gramm
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HCl	Chlorwasserstoffsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid

(i)DK	(initiale) Dentinkaries
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
kDa	Kilo-Dalton
LM	Lichtmikroskop
M	molare Masse
MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAPKK	mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase
MAPKKK	mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase-Kinase
MEK	Mitogen/Extrazellulär Signal-regulierte Kinase
MEK1	Mitogen/Extrazellulär Signal-regulierte Kinase 1
MEK2	Mitogen/Extrazellulär Signal-regulierte Kinase 2
Mg ²⁺	zweifach positiv geladenes Magnesiumion
Min.	Minute
ml	Milliliter
MO	mesial-okklusal
MOD	mesial-okklusal-distal
n	Anzahl
N	Normalität einer Lösung
NaIO ₃	Natriumiodat
NaOH	Natriumhydroxid
NGS	<i>normal goat serum</i> = Normales Ziegenserum
OD	okklusal-distal
Osx	Osterix
p	statistischer Signifikanzwert
pAK	primärer Antikörper
PB	Phosphatpuffer
PBS	Phosphatpuffer-Natriumchlorid
p-ERK1/2	phosphorylierte Form von ERK1/2
PFA	Paraformaldehyd
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
Raf	Ratten Fibrosarkom
Ras	Ratten Sarkom
RSK2	<i>ribosomal s6 kinase 2</i>
Runx2	<i>Runt-related transcription factor 2</i>
sAK	sekundärer Antikörper

SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinasen
sig.	signifikant
TB	Trispuffer
TBS	Trispuffer-Natriumchlorid
t-ERK1/2	totale Form von ERK1/2
TGF- β	<i>transforming growth factor β</i> = transformierender Wachstumsfaktor β
Thr202	Threonin 202
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tyr204	Tyrosin 204
usw.	und so weiter
z.B.	zum Beispiel
μm	Mikrometer
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
%	Prozent
\leq	kleiner gleich
\pm	plus minus
\triangleq	entspricht

1. Einleitung

Die zellreiche Dentin-Pulpa-Einheit enthält terminal differenzierte Odontoblasten in der Odontoblastenschicht, Odontoblasten-Vorläuferzellen in der zellreichen Zone, Stromazellen in der zentralen Pulpa (Stammzellen), Fibroblasten, Blutgefäße, glatte Muskelzellen in den Blutgefäßwänden, Lymphgefäße, Immunzellen (Makrophagen, Dendritische Zellen, usw.), Schwann'sche Zellen und Axone, deren Zellkörper in peripheren Ganglien (zum Beispiel im Ganglion trigeminale oder Ganglion cervicale superius) liegen. Unter physiologischen Bedingungen befinden sich diese unterschiedlichen Zelltypen in der Dentin-Pulpa-Einheit in einer extrazellulären Matrix mit komplexen Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktionen in einer Homöostase (Goldberg und Smith, 2004). Diese Interaktionen sind von großer Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Vitalität und Integrität der Dentin-Pulpa-Einheit. In der Regulation der Homöostase, der Vitalität und Integrität der Dentin-Pulpa-Einheit sind zahlreiche zelluläre, neuronale, endotheliale und humorale Faktoren, welche die Bildung der Dentinmatrix und die Biomineralisation der Dentinmatrix regulieren, involviert (Goldberg und Smith, 2004; Korkmaz et al., 2006, 2011).

In der gesunden und entzündeten Dentin-Pulpa-Einheit sind in zellulären, neuronalen, endothelialen und humoralen Faktoren deutliche Unterschiede in Abhängigkeit des Entzündungsgrades zu erkennen (Korkmaz et al., 2011). Im Vergleich zur gesunden Dentin-Pulpa-Einheit zeigt die entzündete Dentin-Pulpa-Einheit ein entzündungsabhängig reduziertes Potential der sekundären und tertiären Dentinbildung, eine verringerte Vitalität und reduzierte Integrität. In der gesunden Dentin-Pulpa-Einheit existiert ein höheres reparatives und regeneratives Potential, um die Stromazellen in der zentralen Pulpa zu Odontoblasten-Vorläuferzellen und darauffolgend terminal zu differenzieren. Die molekularbiologischen Kenntnisse über die Mechanismen, welche die Reduzierung des regenerativen und reparativen Potentials der entzündeten Dentin-Pulpa-Einheit regulieren, sind weitgehend unbekannt.

MAPK sind Serin/Threonin-Kinasen, die bei der Weiterleitung extrazellulärer Signale von der Zelloberfläche zum Zellkern eingeschaltet sind. Sie spielen bei einer Vielzahl biologischer Vorgänge, wie Zellproliferation, Zelldifferenzierung oder Zelltod, eine entscheidende Rolle (Johnson und Lapadat, 2002). In Säugetierzellen wurden vier Gruppen von MAPK identifiziert: die extrazellulären Signal-regulierten Kinasen 1 und 2 (ERK1 und ERK2 oder p42/44 MAPK), die c-Jun-N-terminalen Kinasen (JNK), p38 MAPK und ERK5 (Nithianandarajah-Jones et al., 2012).

Die Aktivierung der MAPK ERK1/2 führt zur transkriptionellen Kontrolle von Genen, welche die Differenzierung von Osteoblasten regulieren. Es ist bekannt, dass ERK1/2 die Matrixbildung und die Biomineralisation der Matrix in Osteoblasten beeinflusst (Shim et al., 2013). Die MAPK ERK1/2 reguliert u.a. Zellwachstum, Zelldifferenzierung und die Anpassung von Zellen an ihre Umgebung in Antwort auf eine große Anzahl von Botenstoffen, einschließlich Zytokinen und mehreren Entzündungsmediatoren (Johnson und Lapadat, 2002).

Die regulatorischen Mechanismen der Dentinmatrixbildung und Biomineralisation der Dentinmatrix sind bisher nicht hinreichend geklärt. Es liegen keinerlei Befunde für die Beteiligung der MAPK ERK1/2 an der Dentinmatrixbildung oder der Biomineralisation der Dentinmatrix in der Dentin-Pulpa-Einheit vor. Nach der Hyperämie der dentalen Pulpa, akuter und chronischer Pulpaentzündung sind die Mechanismen der Sekundärdentinbildung und der Tertiärdentinbildung nicht klar. In der Transformation vom Osteoid zum Knochen und vom Prädentin zum Dentin wurden ähnliche zelluläre Mechanismen in der Extrazellulärmatrixbildung und in der Biomineralisation der Matrix gezeigt. Daher stellt sich die Frage, ob mit Hilfe der Untersuchung der Expression und Verteilung der MAPK ERK1/2 eine Regulation der Dentinbildung über die Aktivierung der MAPK ERK1/2 in Odontoblasten unter gesunden und entzündeten Bedingungen aufgeklärt werden kann.

1.1. Die physiologische Regulation der Zellen der Dentin-Pulpa-Einheit und Dentinmatrixbildung und Biomineralisation der Dentinmatrix

Odontoblasten sind die Zellen, die das Dentin bilden. Sie entwickeln sich aus mesenchymalen Vorläuferzellen und sind mit Osteoblasten ontogenetisch und funktionell verwandt. Odontoblasten sind ganz besondere Zellen des Körpers, da ihre Lebensspanne über mehrere Dekaden lang sein kann (Smith et al., 2012).

Die Odontoblasten werden durch einen Stimulus und eine MAPK-Kaskade dazu angeregt, Kollagen (hauptsächlich Kollagen I) und nicht-kollagene Proteine wie Dentinmatrixprotein-1 (DMP-1), Dentinsialophosphoprotein (DSPP) oder Dentinglykoprotein zu synthetisieren (Prasad et al., 2010). Diese Proteine bilden die Dentinmatrix. Anschließend wird die Dentinmatrix durch Einlagerung von Hydroxylapatitkristallen mineralisiert. Bei diesem Vorgang spielt das Dentinsialophosphoprotein eine große Rolle (Prasad et al., 2010; Suzuki et al., 2009). Das DSPP wird intrazellulär gespalten, wodurch die zwei extrazellulären Spaltprodukte, das Dentinsialoprotein (DSP) und das Dentinphosphoprotein (DPP) entstehen. Diese beiden Proteine haben im Folgenden

unterschiedliche Aufgaben. DSP reguliert die Organisation der Kollagenfibrillen, die endgültige Rolle von DSP bei der Biomineralisation der Dentinmatrix ist jedoch noch nicht endgültig geklärt (Prasad et al., 2010). DPP ist das wichtigste nicht-kollagene Protein der Mineralisation der Matrix. Es bildet in Anwesenheit von Ca^{2+} und Mg^{2+} unlösliche Aggregate, was vermutlich zur Bildung und zum Wachstum von Hydroxylapatitkristallen beiträgt (Prasad et al., 2010; Niño-Barrera et al., 2013).

Eine Schicht unmineralisierten Dentins um die Pulpa bleibt jedoch ein Leben lang erhalten und wird als Prädentin bezeichnet (Linde und Goldberg, 1993). Die Zellkörper der Odontoblasten befinden sich außerhalb des Prädentins in der peripheren Pulpa. Ihre Fortsätze reichen jedoch in Dentintubuli bis an die Schmelz-Dentin-Grenze (Goldberg et al., 2011).

1.1.1. Primärdentinbildung

Während der prä- und postnatalen Zahnentwicklung wird von den Odontoblasten Primärdentin gebildet, das die Hauptmasse des gesamten Dentins ausmacht. Induziert wird diese Entwicklung durch epithelial-mesenchymale Interaktionen, die dazu führen, dass sich die ektomesenchymalen Vorläuferzellen zu Odontoblasten differenzieren (Sloan und Smith, 2007). Das Primärdentin wird unterteilt in Manteldentin, das sich direkt am Zahnschmelz befindet und etwa 5 bis 30 μm dick ist und in zirkumpulpaes Dentin. Manteldentin enthält fast keine Dentinkanälchen. Das zirkumpulpale Dentin kann weiter in intertubuläres und peritubuläres Dentin unterschieden werden. Kollagen Typ I macht 90% der Proteine im intertubulären Dentin aus, wobei das peritubuläre Dentin kein Kollagen enthält (Goldberg et al., 2011).

1.1.2. Sekundärdentinbildung

Nachdem das Wachstum des Zahnes soweit abgeschlossen ist, dass dieser Kontakt zu seinen Antagonisten bekommt, wird von den Odontoblasten Sekundärdentin gebildet, welches dem Primärdentin Richtung Pulpa aufgelagert wird (Kuttler, 1959; Linde und Goldberg, 1993). Die Bildung des Sekundärdentins geschieht im Gegensatz zum Primärdentin lebenslang und sehr viel langsamer (Linde und Goldberg, 1993). Außerdem sind die Dentinkanälchen im Sekundärdentin eher S-förmig verglichen mit den geraden Kanälchen im Primärdentin, ansonsten gibt es keine großen Unterschiede (Goldberg et al., 2011).

1.2. Entzündungen in der dentalen Pulpa und Dentinmatrixbildung und Biomineralisation der Dentinmatrix unter entzündlichen Bedingungen in der Dentin-Pulpa-Einheit

1.2.1. Hyperämie der dentalen Pulpa

Die Hyperämie kann als erstes Stadium einer Entzündung in der dentalen Pulpa angesehen werden. Toxine der Bakterien einer Karies gelangen in die Pulpa und lösen dort eine Ausschüttung von beispielsweise Prostaglandinen und Bradykinin aus. Dies führt unter anderem zu einer Vasodilatation (Hsu et al., 2003; Goldberg et al., 2008; Cooper et al., 2011). Durch die Vasodilatation wird das Gewebe stärker durchblutet und es kommt zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität, wodurch eine Plasmaextravasation und im weiteren Verlauf eine Migration von Entzündungszellen in die betroffene Region ermöglicht wird. Die Ausschüttung von Neuropeptiden aus den sensiblen Nervenfasern (A-delta, A-beta und besonders C-Fasern) wie Substanz P und calcitonin gene-related peptide (CGRP) verstärkt die Vasodilatation in der dentalen Pulpa (Wakisaka, 1990; Kim 1990; Byers und Närhi, 1999). Die durch Neuropeptide verursachte oder verstärkte Vasodilatation und die gesteigerten entzündlichen Vorgänge werden als neurogene Entzündung bezeichnet (Kim, 1990; Byers und Närhi, 1999).

Klinisch kann der betroffene Zahn schmerzhaft auf bestimmte Reize reagieren (z.B. heiß, kalt) oder symptomlos sein (Dachi, 1965; Byers und Närhi, 1999). Die Hyperämie tritt bei einer Schmelzkaries bzw. einer initialen Dentinkaries auf.

1.2.2. Akute seröse Entzündung der dentalen Pulpa

Wenn die Ursache der Hyperämie nicht beseitigt wird und die Dentinkaries weiter voranschreitet, ist die Folge der Entzündung die Migration der Entzündungszellen. Im Fall einer Hyperämie wandern innerhalb kurzer Zeit zunächst neutrophile Granulozyten in die Entzündungsregion ein. Dann nimmt die Zahl der Makrophagen stark zu und es kommt zur Phagozytose, sodass zahlreiche Zytokine und Chemokine von unterschiedlichen Entzündungszellen (basophile Granulozyten, dendritische Zellen, Mastzellen) ausgeschüttet werden (Goldberg et al., 2008). Diese Zytokine führen zur Einwanderung weiterer Entzündungszellen wie Lymphozyten, zunächst v.a. T-Lymphozyten (Cooper et al. 2014). Die Gefäßpermeabilität wird weiter erhöht, sodass die Migration der Entzündungszellen erleichtert wird (Goldberg et al., 2008).

Wenn die Pulpa noch vital ist, d.h. sie reagiert positiv auf einen Kältetest, und nur lokal entzündlich verändert ist, spricht man von einer reversiblen Pulpitis. Diese lässt sich durch

Entfernung des irritierenden Reizes bzw. durch Versiegelung freiliegenden Dentins behandeln, sodass die Pulpa wieder gesund ist (Sigurdsson, 2003).

1.2.3. Chronische purulente Entzündung der dentalen Pulpa

Durch die vermehrte Einwanderung von Lymphozyten (T-, B-Zellen und Plasmazellen) in das Pulpengewebe kann dieses durch Abwehrreaktionen geschädigt werden. Es kommt verstärkt zur Phagozytose, die zur Vereiterung der Pulpa führen kann (Smith, 2001). Diese Form der Entzündung tritt bei der Caries profunda auf, bei der die Karies schon bis an die Pulpa vorgedrungen ist, diese aber noch nicht eröffnet hat. In diesem Stadium sind zahlreiche Entzündungszellen wie B- und T-Lymphozyten, Makrophagen und Granulozyten vorhanden (Cooper et al., 2014; Goldberg et al., 2008).

Im weiteren Verlauf kommt es zu einer Nekrose des Gewebes, wenn die entsprechende Therapie der Dentin-Pulpa-Einheit nicht durchgeführt wird.

1.2.4. Pulpagangrän

Als Folge einer nicht behandelten chronischen Pulpitis entwickelt sich eine Nekrose der dentalen Pulpa. Eine nekrotisch veränderte dentale Pulpa verliert ihre Vitalität und wird sehr anfällig für infektiöse Erreger. Durch diese Erreger entsteht ein unangenehmer, fauliger Geruch in der Gangrän. Im Fall einer Infektion der nekrotisch veränderten dentalen Pulpa kommen zahlreiche unterschiedliche chronische Entzündungszellen vor. Die vorherrschenden Zellen der Gangrän sind T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und Plasmazellen. Makrophagen und Mastzellen können in unterschiedlichen Regionen der Pulpa unterschiedliche Entzündungsherde bilden (Goldberg et al., 2008). Um die Blutgefäße im Bereich der Infektion sind zudem zahlreiche Granulozyten zu finden.

In der Gangrän kann sich die Entzündung sehr schnell Richtung apikal ausbreiten und dort eine apikale Parodontitis induzieren. Klinisch ist in diesem Fall die Perkussion des Zahnes häufig mit starken Schmerzen verbunden. Die apikale Parodontitis kann jedoch auch symptomlos sein und nur als Zufallsbefund auf einem Röntgenbild diagnostiziert werden (Sigurdsson, 2003).

1.2.5. Dentinmatrixbildung und Biomineralisation der Dentinmatrix unter entzündlichen Bedingungen in der Dentin-Pulpa-Einheit

1.2.5.1. Tertiärdentinbildung

Tertiärdentin wird nur auf Reize wie Karies gebildet. Es lässt sich in reaktives und reparatives Dentin unterteilen (Goldberg und Smith, 2004; Goldberg et al., 2011). Im Gegensatz zum Primär- und Sekundärdentin, das in der gesamten peripheren Pulpa gebildet wird, geschieht die Bildung von Tertiärdentin nur fokal am Ort des Reizes (Murray et al., 2003).

Reaktive Dentinbildung

Reaktives Dentin wird auf einen Stimulus (z.B. Karies, Präparation eines Zahnes) hin von Odontoblasten gebildet. Voraussetzung für die Bildung von reaktivem Dentin ist also, dass die Odontoblasten die Verletzung des Zahnes überleben konnten. In diesem Fall wird die Aktivität der Odontoblasten durch bioaktive Moleküle, beispielsweise aus der TGF- β -Familie, heraufreguliert (Sloan et al., 1999). Daraufhin sind die Odontoblasten in der Lage, mehr Dentin zu bilden.

Die Morphologie von reaktivem Dentin ist abhängig von der Geschwindigkeit des Fortschreitens und der Schwere der Karies, dem Verlauf der Reaktion und dem Alter des Patienten. Es erscheint entweder als unregelmäßig geformtes Osteodentin ohne Dentinkanälchen oder als reguläres Dentin mit oder ohne Dentinkanälchen, das dem Primär- und Sekundärdentin ähnelt (Goldberg und Smith, 2004).

Reparative Dentinbildung

Im Gegensatz zum reaktiven Dentin wird das reparative Dentin nicht von Odontoblasten, sondern von Odontoblasten-ähnlichen Zellen gebildet. Vorläuferzellen (Stromazellen) aus der Pulpa proliferieren, differenzieren sich zu Odontoblasten-ähnlichen Zellen und migrieren aus der zentralen Pulpa zum Ort des Reizes, z.B. zur Kariesläsion (Goldberg et al., 2008; Smith, 2001). Dies ist nötig, wenn die Odontoblasten auf Grund von sehr großen bzw. tiefen Kavitäten oder sehr schnellem Voranschreiten der Karies zu Grunde gegangen sind. Bei einer eventuellen Eröffnung der Pulpa können diese Zellen den Defekt durch die Bildung von reparativem Dentin wieder verschließen (Goldberg und Smith, 2004; Smith, 2001). Dieses Dentin ähnelt eher dem Knochen und zeigt eine diffuse Mineralisation ohne regelmäßige Dentinkanälchen (Goldberg und Smith, 2004).

1.3. Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK)

Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) kontrollieren ein enorm großes Feld an physiologischen Prozessen wie Genexpression, Mitose oder Apoptose und sind deshalb sehr bedeutsam (Johnson und Lapadat, 2002). Sie kommen in allen eukaryotischen Zellen vor. MAPK werden aufgeteilt in die vier Gruppen der extrazellulär Signal-regulierten Kinase 1 und 2 (ERK1/2), die p38-mitogenaktivierte Proteinkinase, die c-Jun-N-terminalen Kinasen (JNK) sowie ERK5 (Nithianandarajah-Jones et al., 2012). Diese MAPK lassen sich nach der Art der Stimuli in die extrazellulär Signal-regulierten Kinasen (ERK)-Familie und die Stress-aktivierten Proteinkinasen (SAPK) unterteilen. Zu den SAPK zählen p38, JNK und ERK5 (Cohen, 1997).

Proteinkinasen sind Enzyme, die bestimmte Proteine in der Zelle phosphorylieren können, d.h. sie hängen einen Phosphatrest kovalent an eine Serin-, Threonin-, oder Tyrosinkette des Proteins an. MAPK im speziellen phosphorylieren allerdings nur Serin- und Threoninketten.

Um andere Proteine phosphorylieren zu können, müssen MAPK jedoch selbst durch Phosphorylierung aktiviert sein. Dies geschieht durch einen mehrstufigen Signaltransduktionsweg, an dessen Anfang eine Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase-Kinase (MAPKKK) steht, die durch einen Stimulus von unterschiedlichen Wachstumsfaktoren und einen Aktivator aktiviert wird. Die MAPKKK aktiviert wiederum durch Phosphorylierung die MAPKK, die die MAPK aktiviert (Johnson und Lapadat, 2002). Schließlich phosphorylieren die MAPK Transkriptionsfaktoren im Zellkern und regulieren dadurch die Expression der Zielgene.

1.3.1. ERK1/2

ERK1/2 ist eine Gruppe der MAP-Kinasen. Synonym werden die Begriffe p44 für ERK1 und p42 für ERK2 verwendet. Diese leiten sich von der Größe der Proteine (44 bzw. 42 kDa) ab (Widmann et al., 1999). ERK1 und ERK2 stimmen in 84% der Sequenzen überein und haben die meisten Aufgaben gemeinsam (Roskoski, 2012). Deshalb werden sie meistens als ERK1/2 zusammengefasst. ERK1/2 beeinflusst die Mitose, Meiose und postmitotische Funktionen in differenzierten Zellen. Der ERK-Signalweg kann durch viele verschiedene Stimuli wie Wachstumsfaktoren, Zytokine oder eine Virusinfektion aktiviert werden (Johnson und Lapadat, 2002). Dabei führen alle bekannten Stimuli zu einer parallelen Aktivierung von ERK1 und ERK2.

In der speziellen Signaltransduktionskaskade von ERK1/2 wird zunächst ein inaktives Ras-GDP in ein aktives Ras-GTP durch einen Stimulus umgewandelt. Ras-GTP führt zur

Aktivierung der Raf-Familie (A-, B-, und C-Raf), welche die MAPKKK darstellt. Raf phosphoryliert die MAPKK MEK1 und MEK2, die dann wiederum ERK1/2 phosphoryliert (**Abb. 1**). ERK1/2 ist nur aktiv, wenn sowohl der Tyrosin- als auch der Threoninrest phosphoryliert sind. Raf und MEK1/2 haben eine enge Substratspezifität, ganz im Gegensatz zu ERK1/2, das im weiteren Verlauf über 175 Substrate hat (Roskoski, 2012).

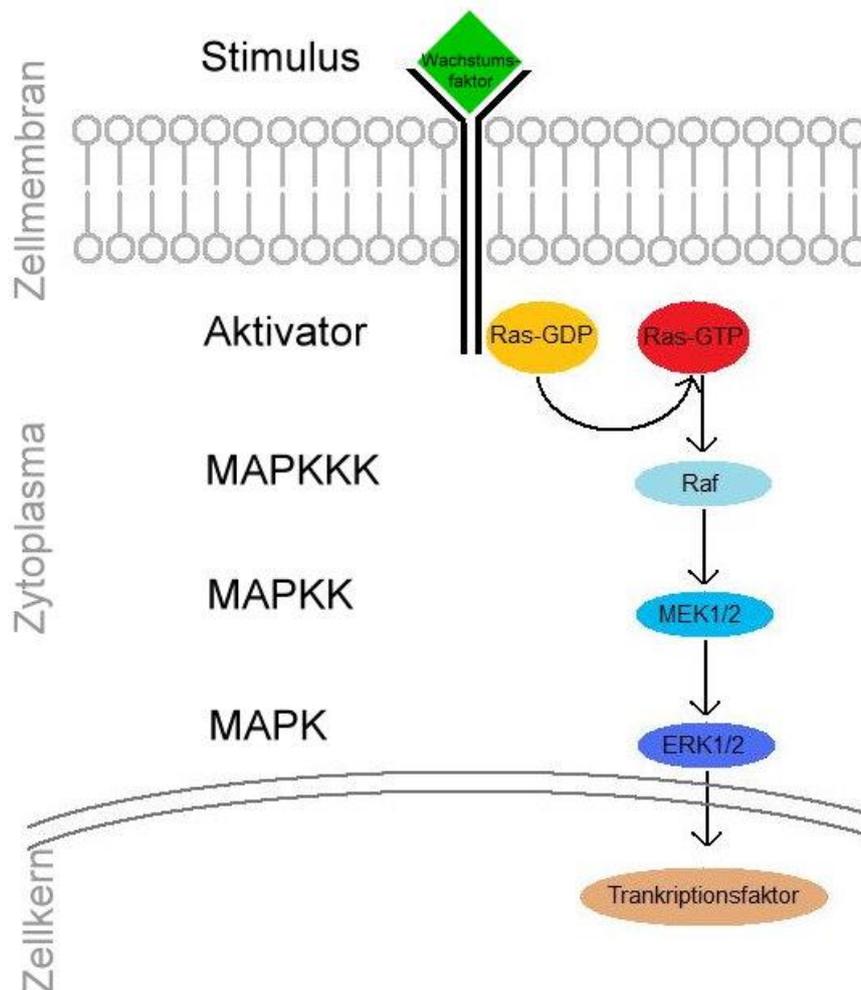


Abbildung 1: ERK1/2 Signaltransduktionskaskade. Beschreibung siehe Text.

Reguliert wird diese Kaskade durch unterschiedliche Mechanismen. Beispielsweise kann Raf1 von ERK1/2 phosphoryliert werden, was zur Inaktivierung von Raf1 führt. Dies ist als klassische negative Rückkopplung anzusehen (Widmann et al., 1999). Eine weitere Möglichkeit stellen die Proteinphosphatasen dar. Da für die Aktivierung von ERK1/2 sowohl der Tyrosin- als auch der Threoninrest phosphoryliert sein müssen, reicht die Dephosphorylierung eines Restes, um ERK1/2 zu deaktivieren. Die Phosphatasen sind entweder Tyrosin-spezifisch, Threonin/Serin-spezifisch oder doppelt spezifisch (Tyrosin und Threonin; Keyse, 2000). Eine doppelt spezifische Phosphatase, die selektiv ERK1/2 inaktiviert, ist die mitogen-aktivierte Proteinkinase Phosphatase-3 (Muda et al., 1998).

1.3.2. Regulation der Matrixbildung und Biomineralisation der Matrix durch die Phosphorylierung von ERK1/2 in Osteoblasten

Osteoblasten stammen von mesenchymalen Vorläuferzellen ab. Die Osteoblasten beider Kiefer und einiger Knochen der Schädelkalotte (Os frontale, Os temporale, Os nasale usw.) stammen aus der Neuralleiste, genau wie die Odontoblasten (Noden und Trainor, 2005; Chai et al., 2000).

Es ist bekannt, dass die Phosphorylierung von ERK1/2 die Bildung und die Biomineralisation der Matrix in Osteoblasten durch die terminale Differenzierung dieser Zellen reguliert (Shim et al., 2013). In Tierversuchen wurde gezeigt, dass das Fehlen von ERK1 und ERK2 zu einer wesentlich reduzierten Mineralisation des Knochens führt (Matsushita et al., 2009). Die transkriptionelle Regulation der Matrixbildung und der Biomineralisation der Matrix in Osteoblasten und in Odontoblasten werden über die gleichen Transkriptionsfaktoren (z.B. Runx2; Li et al., 2011) mit ähnlichen Mechanismen moduliert. Daher sind die *in vivo* immunhistochemischen zellulären und subzellulären Lokalisationen der totalen und phosphorylierten Form von ERK1/2 in Odontoblasten der gesunden und entzündeten humanen Dentin-Pulpa-Einheit wichtig, um die terminale Differenzierung der Odontoblasten, die Dentinmatrixbildung und Biomineralisation dieser Matrix unter physiologischen und entzündlichen Bedingungen verstehen zu können.

2. Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Terminal differenzierte Odontoblasten sind die Zellen, die das Dentin bilden. Für die terminale Differenzierung der Odontoblasten sind zahlreiche zelluläre, neuronale, endotheliale und humorale Faktoren in einer *in vivo* Bedingung in der Dentin-Pulpa-Einheit erforderlich. Für die Dentinmatrixbildung und die Biomineralisation der Dentinmatrix brauchen terminal differenzierte Odontoblasten Zell-Zell und Zell-Matrix Interaktionen, die unter *in vitro* Bedingungen nicht zu schaffen sind. Da *in vivo* terminal-differenzierte Odontoblasten in der Odontoblastenschicht *in vitro* nicht gezüchtet werden können (Klinz et al., 2012), sind die *in vivo* (in Gewebsschnitten) Bestimmungen der Expressionen der Signalproteine und die Bestimmung der Aktivität (zum Beispiel durch die Phosphorylierung und die subzelluläre Translokation der Proteine) dieser Signalproteine in Odontoblasten von großer Bedeutung.

Die Mechanismen der Bildung der Dentinmatrix und der Biomineralisation der Dentinmatrix wurden im Tiermaterial während der embryonalen und postnatalen Phase und in adulten Tiermodellen dargestellt. In unserer Arbeitsgruppe wurde in adulten Odontoblasten von Rattenmolaren eine Expression von ERK1/2 in gesunden Odontoblasten und eine Phosphorylierung von ERK1/2 in einer Subpopulation der gesunden Odontoblasten detektiert (Korkmaz et al., 2006). Es liegen jedoch keinerlei *in vivo* zellbiologische Kenntnisse über die zellulären Expressionen und Lokalisationen sowie die subzellulären Lokalisationen der MAPK ERK1/2 in Odontoblasten der humanen Dentin-Pulpa-Einheit vor, die auf Grund einer akuten oder chronischen Pulpaentzündung oder einer Pulpagangrän pathologisch verändert ist.

Die Hypothese, dass die Aktivität von ERK1/2 eine terminale Differenzierung der Odontoblasten in der Odontoblastenschicht regulieren kann, wurde durch die Untersuchung der Expressionen und Lokalisationen der Phosphorylierungsformen von ERK1/2 in der vorliegenden Studie sowohl in gesunden als auch in entzündeten Odontoblasten nach akuter Pulpitis, chronischer Pulpitis und Gangrän erforscht. Die Untersuchungen können uns wichtige Ergebnisse über die Aktivität von ERK1/2 in Odontoblasten unter gesunden und entzündlichen Bedingungen liefern. Beispielsweise Antworten auf die Frage, wie die Entzündungen der Dentin-Pulpa-Einheit die Expressionen und Lokalisationen von ERK1/2 in Odontoblasten auf zellulärer und subzellulärer Ebene beeinflussen und verändern können. In unterschiedlichen Entzündungen der dentalen Pulpa kommen verschiedene Entzündungszellen vor, von denen auch unterschiedliche

Entzündungsmediatoren in unterschiedlichen Konzentrationen ausgeschüttet werden. In entzündeten Odontoblasten nach Hyperämie, akuten und chronischen Pulpaentzündungen werden die Effekte von unterschiedlichen Entzündungsmediatoren auf die zellulären und subzellulären Lokalisationen der totalen und phosphorylierten Form von ERK1/2 getestet. Daher wurden in der vorliegenden Studie mit Hilfe der Immunhistochemie und konfokalen Doppelfärbung die Antworten auf die folgenden Fragen untersucht:

1. Kommen in Odontoblasten der gesunden Dentin-Pulpa-Einheit t-ERK1/2 und p-ERK1/2 vor?
2. Sind in Odontoblasten der entzündeten Dentin-Pulpa-Einheit t-ERK1/2 und p-ERK1/2 zu finden?
3. Gibt es Unterschiede in der Expression von t-ERK1/2 in Odontoblasten der gesunden und entzündeten Dentin-Pulpa-Einheit?
4. Welche Unterschiede sind in Lokalisationen und in Färbungsintensitäten von p-ERK1/2 in Odontoblasten der gesunden und entzündeten Dentin-Pulpa-Einheit zu erkennen?
5. Wie sind die subzellulären Expressionen und subzellulären Lokalisationen von t-ERK1/2 und p-ERK1/2 in Odontoblasten der gesunden Dentin-Pulpa-Einheit?
6. Sind Veränderungen in der subzellulären Expression und subzellulären Lokalisation von t-ERK1/2 und p-ERK1/2 in Odontoblasten der entzündeten Dentin-Pulpa-Einheit zu erkennen?

Im Gegensatz zu Zellen der gesunden Dentin-Pulpa-Einheit verlieren die Odontoblasten der entzündeten Dentin-Pulpa-Einheit ihr regeneratives und reparatives Potential allmählich mit aufsteigender Stärke des Entzündungsgrades wie Hyperämie, akute Pulpitis, chronische Pulpitis und Pulpagangrän. Die Abnahme des regenerativen und reparativen Potentials der Odontoblasten schränkt die Bildung von Dentinmatrix und die Biomineralisation der Dentinmatrix ein. Daher sind die Kenntnisse über die Biologie der Odontoblasten der mit Hyperämie, akuter und chronischer Entzündung und mit Gangrän erkrankten humanen Dentin-Pulpa-Einheit von der großen Bedeutung, um bei dem bestimmten Entzündungsgrad der dentalen Pulpa neue dentale Behandlungsstrategien zu

entwickeln oder um die gängigen dentalen Behandlungsmethoden bei den Entzündungen der Dentin-Pulpa-Einheit zu verbessern.

In der Transformation vom Osteoid zum Knochen und vom Prädentin zum Dentin zeigen Osteoblasten und Odontoblasten ähnliche zelluläre Mechanismen in der Matrixbildung und der Biomineralisation dieser Matrix. Die Aktivität der MAPK ERK1/2 reguliert die Bildung der Matrix und die Biomineralisation der Matrix in Osteoblasten (Shim et al., 2013). Der Vergleich der zellulären und subzellulären Lokalisationen und der Vergleich der Expressionen von t-ERK1/2 und p-ERK1/2 in Odontoblasten der gesunden und der entzündeten humanen Dentin-Pulpa-Einheit können uns zu der wichtigen klinischen Schlussfolgerung führen, ob die Expression und die Phosphorylierung von ERK1/2 bei der Induzierung der Dentinmatrixbildung und der Biomineralisation der Dentinmatrix während der Entzündung pharmakologisch beeinflusst werden können.

3. Material und Methoden

3.1. Materialien

3.1.1. Untersuchungsmaterial

In der vorliegenden Studie wurden Molaren und Prämolaren von Patienten, die zwischen 18 und 45 Jahre alt waren, untersucht. Die Patienten hatten das Material für eine wissenschaftliche Untersuchung mit ihrem Einverständnis für immunhistochemische Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Die Sammlung der Zähne wurde durch die Ethikkommission der HHU Düsseldorf bewilligt (Studiennummer: 2980).

Im Rahmen dieser Studie wurden Molaren und Prämolaren untersucht, die auf Grund von kieferorthopädischen und anderen Diagnosen extrahiert worden sind.

3.1.2. Pufferlösungen

Phosphatpuffer (PB):

Ein Liter Stammlösung 0,2 molarer PB mit einem pH-Wert von 7,4 wurde wie folgt angesetzt. Zunächst wurden 28,8 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat [Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland] und 5,2 g Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat [Carl Roth] abgewogen und in 900 ml destilliertem Wasser gelöst. Anschließend wurde der pH-Wert gemessen und mit Hilfe von NaOH und HCl auf 7,4 eingestellt. Danach wurde auf einen Liter mit destilliertem Wasser aufgefüllt.

Für die Gebrauchslösung 0,1 molarer PB wurde die Stammlösung 1:1 mit destilliertem Wasser verdünnt und der pH-Wert auf 7,4 eingestellt.

Phosphatpuffer-Natriumchlorid (PBS):

Für die Stammlösung 0,2 molarer PBS wurde wie bei PB 28,8 g Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat [Carl Roth] und 5,2 g Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat [Carl Roth] sowie zusätzlich 17,53 g Natriumchlorid [Merck, Darmstadt, Deutschland] abgewogen und in 900 ml destilliertem Wasser gelöst. Der pH-Wert wurde dann auf 7,4 eingestellt und anschließend auf einen Liter mit destilliertem Wasser aufgefüllt.

Um die Gebrauchslösung 0,1 molarer PBS zu erhalten, wurde die Stammlösung 1:1 mit destilliertem Wasser verdünnt und anschließend der pH-Wert auf 7,4 eingestellt.

Trispuffer (TB) und Trispuffer-NaCl (TBS):

Um einen Liter 0,5 molarer TB-Stammlösung zu erhalten, wurden zunächst 60,57 g Tris (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan) [Carl Roth] abgewogen und in 800 ml destilliertem Wasser gelöst. Mit Hilfe von HCl wurde der pH-Wert der Lösung auf 7,6 eingestellt und dann auf einen Liter mit destilliertem Wasser aufgefüllt.

Für die TBS-Gebrauchslösung wurden 8,76 g Natriumchlorid gewogen und in 900 ml destilliertem Wasser gelöst. Anschließend wurden 100 ml 0,5 molarer TB dazugegeben und der pH-Wert auf 7,6 eingestellt.

Tris-HCl Puffer:

Der 0,05 molare Tris-HCl Puffer wurde so angesetzt, dass 100 ml TB-Stammlösung mit 900 ml destilliertem Wasser verdünnt wurden und der pH-Wert anschließend auf 7,6 eingestellt wurde.

Fixativlösung:

Ein Liter der Fixativlösung bestand aus 40 g Paraformaldehyd [Merck], 998 ml 0,1 molarem Phosphatpuffer und 2 ml gesättigter Pikrinsäure (filtriert) [Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA].

Entkalkungslösung:

Für die Entkalkungslösung wurden 150,885 ml 4 N Ameisensäure [Sigma-Aldrich] und 849,115 ml 0,1 molarer Phosphatpuffer oder destilliertes Wasser gemischt.

3.2. Methoden

3.2.1. Präparation und Immersionsfixation der humanen Molaren und Prämolaren

Es wurden extrahierte Molaren und Prämolaren von Patienten zwischen 18 und 45 Jahren gesammelt, die entweder kariesfrei oder pathologisch mit initialer Dentinkaries, Dentinkaries, Caries profunda oder einer Pulpagangrän verändert waren.

Nach der Extraktion wurden die Zähne sofort in eine Fixationslösung (4% PFA + 0.2% Pikrinsäure + 0.1 M PBS, pH 7.4) gegeben und bei 4°C für 48-72 Stunden fixiert.

3.2.2. Entkalkung, Kryoprotektieren und Einbettung der Zähne

Um die Molaren und Prämolaren des Menschen zu entkalken, wurden die Proben mit 4 N Ameisensäure in 0.1 M PB, bei 4°C für die Lichtmikroskopie behandelt. Die Lösung wurde dreimal wöchentlich gewechselt. Die Entkalkung dauerte insgesamt drei Wochen.

Nach dem Waschen in 0.1 M PBS, pH 7.4, 24 h, bei 4°C, wurden die Proben mit 30% Saccharose [Carl Roth] in 0.1 M PB, pH 7.4, 24 h, bei 4°C, behandelt. Anschließend konnten sie eingebettet werden. Hierfür wurden aus Aluminiumfolie kleine, auf einer Seite offene Quader gefaltet. In den Quader wurde Tissue-Tek® [Sakura Finetek, Tokio, Japan] gegeben und der Zahn positioniert. Tissue-Tek® besteht aus wasserlöslichen Glykolen und Harzen und dient als Einbettmedium für das Kryostatschneiden. Wenn der Zahn richtig positioniert war, konnte die offene Seite mit Aluminiumfolie verschlossen und das Ganze mit einer Pinzette in flüssigen Stickstoff (-196°C) gehalten werden bis es tiefgefroren war. Anschließend wurde der Zahn mindestens eine Woche bei -82°C im Tiefkühlschrank gelagert.

3.2.3. Anfertigen und Aufbewahrung der Schnitte

Der zu schneidende Zahn wurde aus dem Tiefkühlfach genommen und zwei Stunden im Kryostat [Leica, Nußloch, Deutschland] bei -30°C gelagert, bis er dann bei -20°C geschnitten werden konnte. Zunächst musste der Zahn richtig fixiert, d.h. parallel zum Metallmesser ausgerichtet werden. Danach wurde so lange schnell manuell geschnitten bis die Zahnpulpa zu sehen war. Erst jetzt wurden die Schnitte automatisch bei ca. 35% Geschwindigkeit geschnitten und in vorbereiteten 24er Wellplatten [Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Belgien] mit 0,1 M PBS pH 7,4 gesammelt; so lange, bis die Pulpa nicht

mehr zu sehen war. Die Schichtdicke betrug 30 µm. Die Wellplatten wurden anschließend im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

3.2.4. Hämatoxylin-Eosin-Färbung und Charakterisierung der Schnitte

Um später geeignete Schnitte für die immunhistochemische Untersuchung auswählen zu können, musste zunächst je ein Schnitt pro 24er Wellplatte mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt werden. So konnten z.B. Entzündungsherde erkannt und Dentinarten unterschieden werden.

Die Schnitte wurden zunächst mit einem Pinsel in destilliertes Wasser überführt und dann auf einen Objektträger aufgebracht. Nach dem Trocknen konnten die Objektträger senkrecht in eine Halterung gestellt werden.

Bei der HE-Färbung ging man dann wie folgt vor. Zuerst wurde mit destilliertem Wasser gewaschen (5 Min.). Dann fand die Färbung mit der Hämatoxylin-Lösung (nach Mayer) statt (10 Min.). Hämatoxylin färbt alle basophilen Strukturen, besonders Zellkerne, blau. In der Hämatoxylin-Lösung nach Mayer befanden sich 50 g Kalium oder Ammonium, 1 g Hämatoxylin, 0,2 g NaIO₃, 1 g Zitronensäure und 1000 ml destilliertes Wasser.

Nach der Hämatoxylin-Färbung wurde unter laufendem warmen Leitungswasser 10 Min. gewaschen. Dies diente dazu den pH-Wert zu erhöhen, damit die Färbung intensiviert wurde. Die nächste Waschung fand wieder in destilliertem Wasser statt (2 Min.). Danach wurden die Schnitte auf den Objektträgern dreimal in 95% Ethanol gestellt, um sie erneut zu waschen. Dann folgte die Färbung in alkoholischer Eosin-Lösung (2 Min.). Diese ist sauer und färbt alle azidophilen Strukturen, insbesondere die Zytoplasma-Proteine, rot.

Um die Gewebeschnitte zu entwässern, mussten sie nach der Färbung in einer aufsteigenden Konzentrations-Reihe von Alkohollösungen von 90% über 95% bis zu absolutem Ethanol je 5 Min. gespült werden. Die anschließende Klärung fand in Xylol I (2 Min.) und Xylol II (5 Min.) statt.

Beim Eindecken in Entellan [Merck] musste dann darauf geachtet werden, dass zwischen dem Objektträger und dem Deckglas keine Luftbläschen eingeschlossen waren.

Für die Charakterisierung wurde jeder Schnitt einzeln unter dem Lichtmikroskop betrachtet. Um eine Auswahl geeigneter Schnitte für die immunhistochemische Untersuchung treffen zu können, wurde eine Diagnose erstellt und darauf geachtet, ob man in den kariösen Zähnen Entzündungsherde in der Pulpa und Tertiärdentin sehen konnte. Pro Patient wurde dann höchstens ein Schnitt ausgewählt, der den Anforderungen entsprach. Bei der Auswahl fiel auf, dass manche Schnitte eines Zahns unter dem Mikroskop vollkommen gesund aussahen, wobei in Folgeschnitten desselben Zahns eine

entzündete Pulpa und z.B. Caries profunda zu erkennen war. In diesem Fall musste jedoch die gesamte Pulpa als krank angesehen werden. Es war also sehr wichtig den gesamten Zahn zu betrachten und ca. jeden 24. Schnitt mit HE zu färben und unter dem Mikroskop zu untersuchen, damit keine falschen Diagnosen erstellt wurden.

Zudem stellte sich heraus, dass es eine gewisse Diskrepanz zwischen den Diagnosen, die in der Klinik bei der Extraktion der Zähne gestellt worden sind und den Diagnosen nach der histologischen Untersuchung gab.

3.2.5. Immunhistochemische Inkubationsmethoden

Die Inkubationen wurden an freischwimmenden Schnitten in 12er Wellplatten [Orange Scientific] durchgeführt.

3.2.5.1. Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex Methode

Bei der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex Methode (ABC-Methode) wurden die Schnitte der Zähne an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit unterschiedlichen Reagenzien inkubiert. Sofern keine Temperaturangabe gemacht wird, handelte es sich um Raumtemperatur. Das Waschen der Schnitte geschah, wenn nicht anders angegeben, mit 0,05 M TBS, pH 7,6.

Zu Beginn des ersten Tages wurden die Schnitte zweimal 15 Minuten gewaschen. Danach wurde TBS und 0,3% H₂O₂ in die Wellplatten gegeben, um die endogene Peroxidase zu hemmen (20 Min., im Dunkeln). Nach erneutem Waschen (5 Min.) wurden die Schnitte 30 Minuten mit 25% Triton™ X-100 [Sigma-Aldrich] inkubiert. Anschließend wurde wieder 15 Minuten gewaschen, danach erfolgte die Inkubation mit 2% bovine serum albumin (BSA) [Sigma-Aldrich] und 5% normal goat serum (NGS) [Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA] für 30 Minuten. Ein Tropfen dieses Blockierungspuffers (BSA und NGS) wurde dann mit dem primären Antikörper [Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA] in die Wellplatten gegeben und 24 Stunden bei 4°C inkubiert. Die Verdünnung des primären Antikörpers in 0,05 M TBS war sowohl bei t-ERK1/2 als auch bei p-ERK1/2 1:800.

Am zweiten Tage wurden die Schnitte wieder zweimal 15 Minuten gewaschen. Anschließend folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper [Vector Laboratories] verdünnt in TBS (Verdünnung 1:500) für eine Stunde. Hierbei handelte es sich um goat anti-rabbit IgG. Nach erneutem Waschen für zweimal 15 Minuten wurden die Schnitte eine Stunde mit dem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (Vectastain Elite ABC Reagenz, 1:100, verdünnt in TBS) [Vektor Laboratories] inkubiert. Da diese Lösung lichtempfindlich ist, wurden die Inkubation sowie das folgende Waschen für zweimal 15 Minuten im Dunkeln

ausgeführt. Die anschließende DAB-Substratentwicklung [Sigma-Aldrich] dauerte 15 Minuten. Danach wurden die Schnitte zweimal 15 Minuten mit destilliertem Wasser gewaschen und dann auf Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger aufgezogen. Die Schnitte wurden dann luftgetrocknet und anschließend in einer aufsteigenden Ethanolreihe (30%, 50%, 70%, 90%, 95%) für je 5 Minuten dehydriert. Dann folgte eine Klärung für je 5 Minuten in Xylol I und Xylol II. Abschließend wurden die Schnitte in Entellan eingedeckt.

Als Kontrolle wurde ein Schnitt ohne den primären Antikörper und ein Schnitt ohne den sekundären Antikörper aber mit Inkubation aller anderen immunhistochemischen Reagenzien behandelt.

3.2.5.2. Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen

Für die Immunfluoreszenz-Doppelfärbung wurden die Schnitte an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit unterschiedlichen Reagenzien inkubiert. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur und das Waschen der Schnitte mit 0,05 M TBS, pH 7,6.

Am ersten Tag wurden die Schnitte zunächst zweimal 15 Minuten gewaschen und dann 30 Minuten mit 25% Triton™ X-100 inkubiert. Nach erneutem Waschen für 15 Minuten folgte die Inkubation mit 5% NGS für 30 Minuten. Danach wurden die Schnitte mit dem ersten primären Antikörper (1. pAK) mouse monoclonal anti-human Nestin (1:800) [eBioscience, San Diego, CA, USA] für ca. 24 Stunden inkubiert.

Tag zwei begann mit dem Waschen der Schnitte für zweimal 15 Minuten. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem ersten sekundären Antikörper (1. sAK) goat anti-mouse IgG konjugiert mit 488-DyeLight [Pierce Biotechnology, Waltham, MA, USA], der 1:500 verdünnt war. Dies geschah eine Stunde im Dunkeln. Von nun an wurden alle Schritte im Dunkeln durchgeführt. Nach der Inkubation mit dem 1. sAK wurden die Schnitte zweimal 15 Minuten gewaschen und danach 30 Minuten mit 5% NGS inkubiert. Dann folgte die Inkubation mit dem zweiten primären Antikörper (2. pAK) rabbit anti-t-ERK1/2 bzw. rabbit anti-p-ERK1/2 [Cell Signaling Technology], jeweils 1:800 verdünnt, für ca. 24 Stunden.

Am dritten Tag wurden die Schnitte wieder zunächst zweimal 15 Minuten gewaschen und danach mit dem zweiten biotinylierten sekundären Antikörper (2. sAK; goat anti-rabbit IgG-konjugiert mit Biotin [Vector Laboratories]) für eine Stunde inkubiert (Verdünnung 1:500). Nach erneutem Waschen für zweimal 15 Minuten erfolgte die Inkubation der Schnitte mit NeutrAvidin-550 Dye-Light gekoppelt [Pierce Biotechnology] für eine Stunde. Anschließend wurden die Schnitte zweimal 15 Minuten gewaschen und dann mit dem Chromosomenmarker Hoechst Dye (1:2000; für konventionelles Fluoreszenzmikroskop) und DRAQ5® (1:2000; für Konfokalmikroskop) [New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland] inkubiert. Nach erneutem Waschen für zweimal 15 Minuten konnten

die Schnitte auf mit Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger aufgezogen werden. Danach wurden sie in Poly-Aqua-Mounting Medium [Polysciences Europe GmbH, Eppelheim, Deutschland] eingedeckt und anschließend bei 4°C im Dunkeln gelagert.

Die Kontrolle der Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen wurde mit dem Auslassen des ersten und zweiten primären Antikörpers aber mit Inkubationen aller anderen immunhistochemischen Reagenzien durchgeführt.

3.2.6. Densitometrie (Quantifizierung der Immunhistochemie)

Mit Hilfe einer Kamera, die mit einem Zeiss Axioscop-2 Plus Mikroskop gebunden war, wurden Bildausschnitte bei einer 20-fachen Vergrößerung aufgenommen. In mehreren separaten Messungen wurden die Aufnahmen mit dem Mikroskop gebundenen Image System Analysis, Axiovision Ver. 4.7 [Carl Zeiss, Jena, Deutschland] für die Bestimmung der immunhistochemischen Grauwerte von t-ERK1/2 und p-ERK1/2 in Odontoblasten der gesunden und kariös geschädigten Schnitte durchgeführt.

Die ausgewählten immunhistochemischen Hintergrundgrauwerte wurden in einer zellfreien Zone gemessen. Die Färbungsintensität von t-ERK1/2 und p-ERK1/2 wurden jeweils aus drei ausgewählten Zonen in den Odontoblastenschichten mit den Grauwerten von ihren immunhistochemischen Färbungen gemessen.

Die Färbungsintensität für jeden einzelnen Patienten wurde aus der Differenz des Mittelwerts der gemessenen Grauwerte des Hintergrundes und des Mittelwerts der gemessenen Grauwerte der Odontoblastenschicht, die mit t-ERK1/2 bzw. p-ERK1/2 immunhistochemisch gefärbt war, berechnet.

3.2.7. Statistische Auswertung

Die Erfassung der densitometrischen Daten erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS für Windows (Version 11.0). Die sich daraus ergebenden Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (n=8 gesund, n=6 (i)DK, n=6 Cp, n=8 Pulpagangrän; für t-ERK1/2 und p-ERK1/2) wurden gepaarten Student's t-Test unterworfen. Bei dieser Prüfung galt ein Signifikanzwert von $p \leq 0,05$.

4. Ergebnisse

4.1. Histologische Charakterisierung der gesunden Dentin-Pulpa-Einheit

Die Zähne, die klinisch als gesund diagnostiziert und aus kieferorthopädischen Gründen gezogen wurden, wurden zusätzlich mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt, um eine histologische Charakterisierung vornehmen zu können und um zu erkennen, ob die klinische und histologische Diagnose übereinstimmen.

Eine gesunde Pulpa zeigte eine typische Anordnung von Stromazellen, Blutgefäßen, Nervenfasern und Odontoblasten (**Abb. 2A**). Die Odontoblastenschicht war geordnet und breit (**Abb. 3B**).

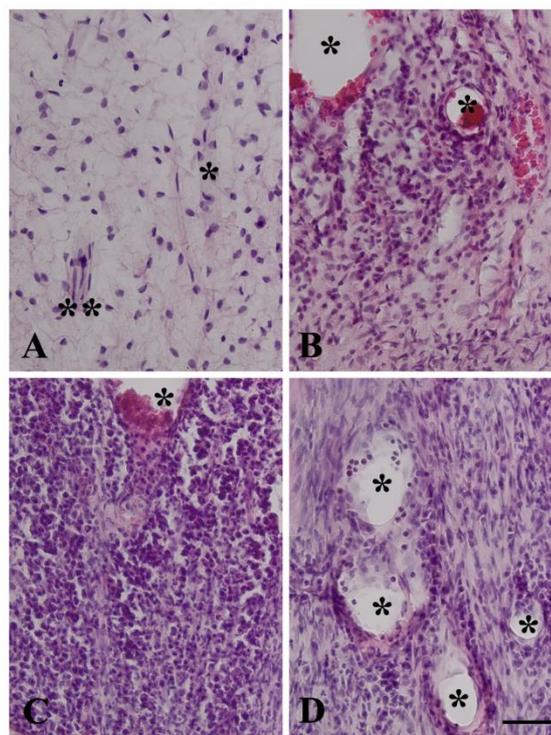


Abbildung 2: Histologie der gesunden und entzündeten Dentin-Pulpa-Einheit in HE-gefärbten Schnitten. Normale Anordnung von Zellen in der gesunden Pulpa (**A**). Blutgefäße (*) und Nervenfasern (**) sind zu erkennen. Pulpa der Caries profunda (**B**) zeigt vermehrt Entzündungszellen und erweiterte Blutgefäße (*). Pulpa der Gangrän (**C, D**) enthält noch mehr Entzündungszellen mit unterschiedlichen Entzündungsherden und auch erweiterte, zum Teil degradierte, Blutgefäße (*). Balken \triangleq 50 μ m

4.2. Histopathologische Diagnose der Entzündungen der Dentin-Pulpa-Einheit

In den verschiedenen Stadien der Entzündungen veränderte sich die Pulpa beispielsweise durch Weitung der Blutgefäße oder Einwanderung von Lymphozyten in das Pulpengewebe. Die Entzündungserscheinungen der dentalen Pulpa ließen sich durch die HE gefärbten Blutgefäße und Entzündungszellen erkennen.

4.2.1. Pulpahyperämie (initiale Dentinkaries)

Im Falle einer initialen Dentinkaries fand man in HE-Schnitten vermehrt Arteriolen im Bereich des subodontoblastischen Plexus. Im Vergleich zu den Blutgefäßen in der gesunden Pulpa waren die Blutgefäße der entzündeten Pulpa mit zahlreichen Erythrozyten gefüllt. Die Blutgefäße der hyperämisch veränderten Pulpa zeigten ein erweitertes Lumen sowohl im Bereich des subodontoblastischen Plexus als auch in der zentralen Pulpa. Teilweise waren im Lumen der Blutgefäße neutrophile Granulozyten zu finden.

In der Hyperämie der Pulpa waren die Odontoblasten in der Odontoblastenschicht in einer Ordnung, wie es in gesunden Odontoblasten der Fall war.

4.2.2. Akute seröse Pulpaentzündung (Dentinkaries)

Im Fall einer akuten serösen Pulpitis waren zahlreiche Blutgefäße mit erweiterten Durchmessern zu erkennen. Die vorherrschenden Zellen waren neutrophile Granulozyten und Makrophagen. Teilweise waren Entzündungsherde mit B- und Plasmazellen zu erkennen.

Die Odontoblasten in der Odontoblastenschicht waren nicht mehr wie in der eines gesunden Zahns angeordnet. Die Breite der Odontoblastenschicht wurde geringer und die Ordnung der Odontoblasten war teilweise durch die Dentinkaries geschädigt. Unterhalb der Kariesregion war eine Bildung von Tertiärdentin deutlich zu erkennen (**Abb. 4B**).

4.2.3. Chronische purulente Pulpaentzündung (Caries profunda)

Bei einer Caries profunda waren große Entzündungsherde mit Entzündungszellen wie Lymphozyten (T-Zellen, B-Zellen und Plasmazellen) in der Pulpa zu erkennen, außerdem auch große Blutgefäße, die mit Erythrozyten gefüllt waren. Dies führte zu einem diffusen Bild der Pulpa (**Abb. 2B**).

Die Odontoblastenschicht war im Gegensatz zu einer gesunden Pulpa ungeordneter und schmaler. Zusätzlich konnte deutlich Tertiärdentin mit unterschiedlichen Schichten (reaktives und reparatives Tertiärdentin) identifiziert werden (**Abb. 5A**).

4.2.4. Pulpagangrän (Infektion der Nekrose der Dentin-Pulpa-Einheit)

Auch bei einer Gangrän sah die Pulpa sehr diffus aus und war nicht mehr mit dem Bild einer gesunden Pulpa zu vergleichen. Das Gewebe enthielt sehr viele Entzündungszellen und sah dadurch sehr zellreich aus (**Abb. 2C, 2D**).

Es war keine Odontoblastenschicht in der peripheren Pulpa zu erkennen, da die Odontoblasten durch zahlreiche Entzündungsmediatoren und Entzündungszellen degradiert waren. In wenigen Fällen waren einzelne Odontoblasten mit sehr kurzen Fortsätzen ohne Prädentinschicht zu identifizieren.

4.3. Expression und Phosphorylierung von ERK1/2 in gesunden Odontoblasten

Die Schnitte der Zähne wurden zunächst mit HE gefärbt, um eine Diagnose stellen zu können. Anschließend wurde die ABC-Methode durchgeführt. Aufeinanderfolgende Schnitte wurden jeweils mit t-ERK1/2 oder p-ERK1/2 inkubiert. Diese stellen den primären Antikörper dar, der an totales ERK1/2 (t-ERK1/2) bzw. phosphoryliertes ERK1/2 (p-ERK1/2) bindet. Um diese gebundenen Antikörper nun sichtbar zu machen, wurden die Schnitte noch mit dem biotinylierten sekundären Antikörper und dem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex inkubiert sowie mit DAB entwickelt.

Die Odontoblasten eines gesunden Zahnes zeigten eine starke Färbungsintensität für die totale Form des ERK1/2-Antikörpers (**Abb. 3C, 3D**). Die Fortsätze der Odontoblasten ließen sich bis zum Sekundärdentin, das als weiße Schicht erkennbar war, finden (**Abb. 3C**). Im Sekundärdentin und im Primärdentin waren die Fortsätze der Odontoblasten nicht immunreaktiv für t-ERK1/2 (**Abb. 3C**). Im Vergleich zur Färbung der Stromazellen der Pulpa und zur Färbung der Fortsätze innerhalb des Prädentins war die Odontoblastenschicht deutlich stärker gefärbt (**Abb. 3D**). Eine Expression für t-ERK1/2 wurde auch in den Odontoblastenfortsätzen innerhalb des Prädentins und in der zellreichen Zone gefunden (**Abb. 3D**).

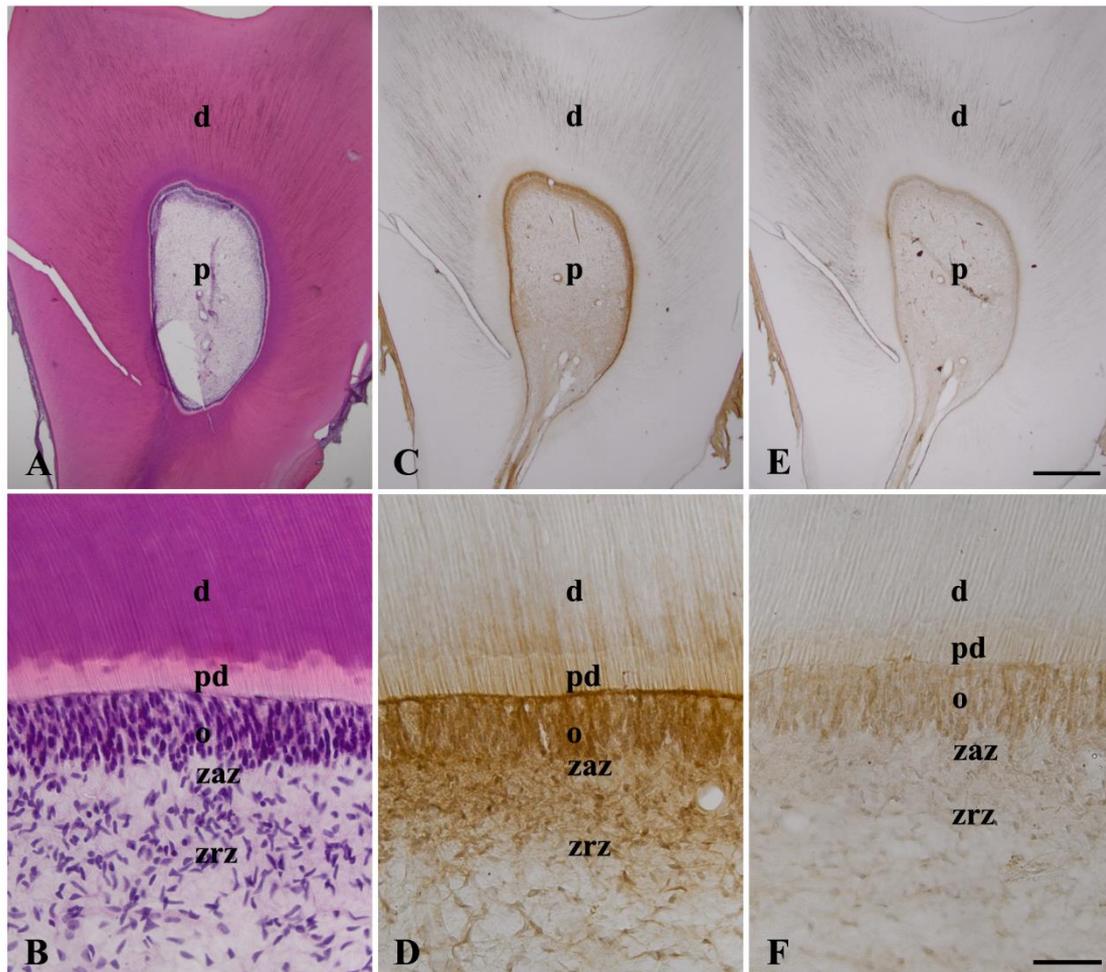


Abbildung 3: Expression und Phosphorylierung von ERK1/2 in Folgeschnitten der gesunden Dentin-Pulpa-Einheit. In der HE- Färbung ist eine physiologische Anordnung (A) mit Dentin, Prädentin, Odontoblastenschicht, zellarmer und zellreicher Region erkennbar (B: Detailaufnahme von A). Eine Expression von t-ERK1/2 (C) ist in Odontoblasten, Odontoblastenfortsätzen und Odontoblastenvorläuferzellen in der zellreichen Zone zu beobachten (D: Detailaufnahme von C). Eine Immunreaktivität für p-ERK1/2 (E) lässt sich schwach in Odontoblasten erkennen (F: Detailaufnahme von E). d = Dentin, p = Pulpa, pd = Prädentin, o = Odontoblastenschicht, zaz = zellarme Zone, zrz = zellreiche Zone. Balken A, C, E \triangleq 1mm; Balken B, D, F \triangleq 50µm

Grundsätzlich sah man in gesunden Odontoblasten eine sehr schwache Färbung für die phosphorylierte Form des ERK1/2-Antikörpers (Abb. 3E, 3F). Die Odontoblastenfortsätze im Prädentin und die Stromazellen der Pulpa waren noch schwächer gefärbt als die Odontoblastenschicht (Abb. 3F). Genau wie bei t-ERK1/2 waren die Fortsätze der Odontoblasten im Primär- und Sekundärdentin nicht immunreaktiv für p-ERK1/2 (Abb. 3E).

Es gab jedoch in sechs von acht untersuchten gesunden Zähnen Subpopulationen von Odontoblasten, die eine starke Färbung für p-ERK1/2 zeigten (Abb. 4A, 4B). Diese Subpopulationen lagen in Gruppen zusammen und waren über die komplette periphere Pulpa vorhanden, sie befanden sich also sowohl in der Kronen- als auch in der Wurzelpulpa. Die Fortsätze dieser Odontoblasten zeigten auch eine relativ starke Färbung

für p-ERK1/2, wobei die zellreiche Zone, in der sich die Stromazellen der Pulpa befanden, eher schwach gefärbt war (**Abb. 4B**).



Abbildung 4: Lokalisation von p-ERK1/2 in der gesunden Dentin-Pulpa-Einheit. An einzelnen Stellen sind Subpopulationen von Odontoblasten zu erkennen, die eine starke Immunreaktivität für p-ERK1/2 aufweisen (**A**). Kasten aus **A** ist in **B** vergrößert dargestellt. Man sieht eine Subpopulation der stark gefärbten Odontoblasten sowie deren Fortsätze. Die Odontoblastenvorläuferzellen sind schwach gefärbt (**B**). d = Dentin, o = Odontoblastenschicht, p = Pulpa, zrz = zellreiche Zone. Balken A \triangleq 1mm; Balken B \triangleq 50 μ m

4.4. Expression und Phosphorylierung von ERK1/2 in entzündeten Odontoblasten

4.4.1. Expression und Phosphorylierung von ERK1/2 in Odontoblasten der akuten Pulpaentzündung infolge einer Dentinkaries

Bei den Zähnen mit der Diagnose (initiale) Dentinkaries war eine etwas schwächere Färbung für t-ERK1/2 als bei gesunden Zähnen zu erkennen (**Abb. 5C, 5D**). Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Die Odontoblasten waren deutlich stärker gefärbt als ihre Fortsätze im Prädentin und die Stromazellen in der zellreichen Zone (**Abb. 5D**). Die Odontoblastenfortsätze im Tertiär-, Sekundär- und Primärdentin zeigten keine spezifische Färbung für t-ERK1/2 (**Abb. 3C**).

Für p-ERK1/2 konnte insgesamt eine schwache homogene Färbung ausgemacht werden (**Abb. 5E, 5F**). Verglichen mit der totalen Form des Proteins (**Abb. 5C, 5D**) war die Färbungsintensität deutlich schwächer. Sowohl die Odontoblastenschicht als auch die Odontoblastenfortsätze im Prädentin und die Stromazellen der Pulpa zeigten eine schwache Färbung. Die Fortsätze im Tertiär-, Sekundärdentin waren nicht immunreaktiv

für p-ERK1/2 (**Abb. 5E**). Im Primärdentin waren einige Stellen mit spezifischer Färbung für p-ERK1/2 zu erkennen (**Abb. 5E**).

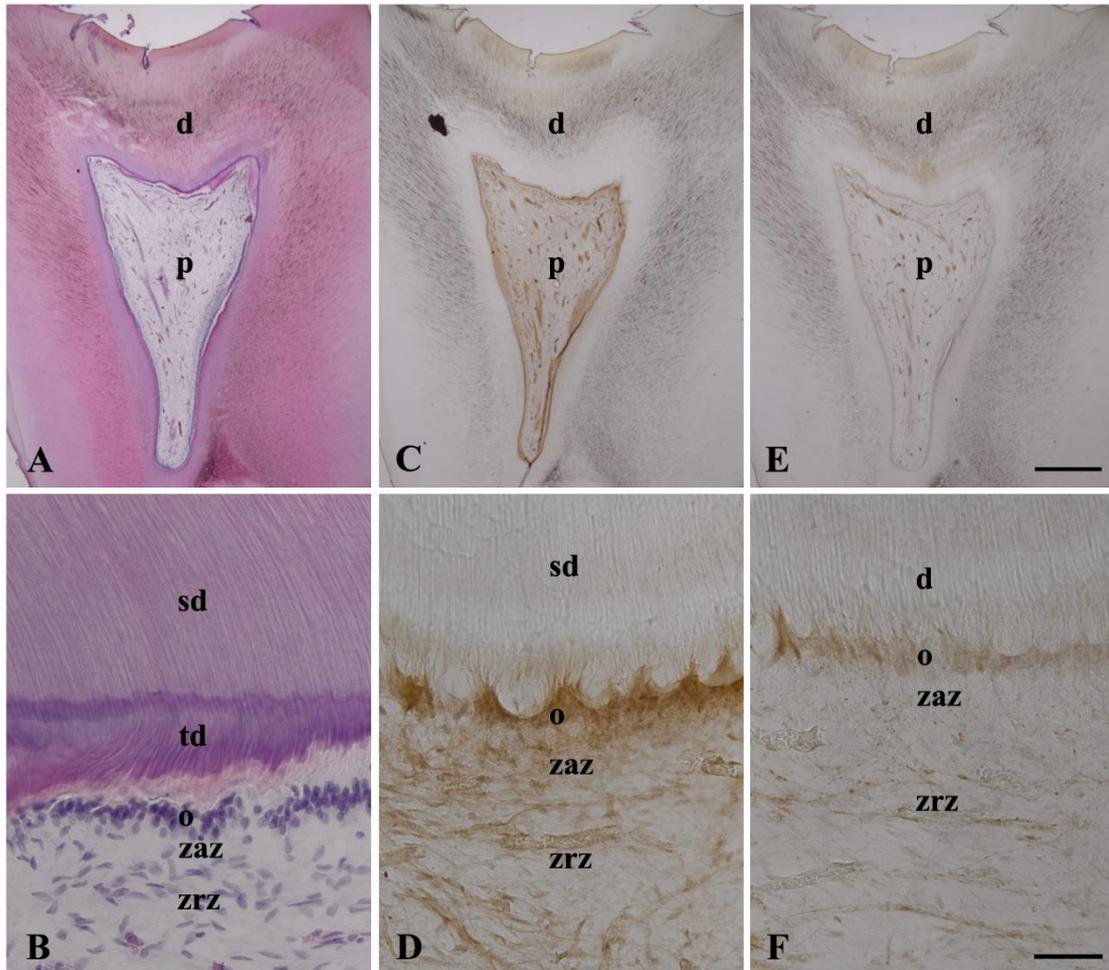


Abbildung 5: Expression und Phosphorylierung von ERK1/2 in Folgeschnitten der durch Dentinkaries geschädigten Dentin-Pulpa-Einheit. In der HE-Färbung (**A**) ist eine Schicht Tertiärdentin zu erkennen, außerdem eine schmale Odontoblastenschicht (**B**: Detailaufnahme von **A**). Eine Expression von t-ERK1/2 (**C**) ist in den Odontoblasten und deren Fortsätzen zu erkennen, eine schwächere Färbung auch in den Odontoblastenvorläuferzellen (**D**: Detailaufnahme von **C**). Die Immunreaktivität für p-ERK1/2 (**E**) ist sehr schwach in den Odontoblasten zu sehen (**F**: Detailaufnahme von **E**). d = Dentin, p = Pulpa, sd = Sekundärdentin, td = Tertiärdentin, o = Odontoblastenschicht, zaz = zellarme Zone, zrz = zellreiche Zone. Balken A, C, E \cong 1mm; Balken B, D, F \cong 50 μ m

4.4.2. Expression und Phosphorylierung von ERK1/2 in Odontoblasten der chronischen purulenten Pulpaentzündung infolge einer Caries profunda

In Odontoblasten der chronischen purulenten Pulpaentzündung (Caries profunda) sah man eine starke Färbung für die totale Form des ERK1/2-Antikörpers (**Abb. 6C, 6D**). Besonders die Odontoblasten in der Odontoblastenschicht und ihre Fortsätze im Prädentin zeigten eine starke Färbungsintensität (**Abb. 6D**). Auch die Stromazellen waren stark

immunreaktiv auf t-ERK1/2 (**Abb. 6D**). Die Odontoblastenfortsätze zeigten im Tertiärdentin und Sekundärdentin keine spezifische Färbung, im Primärdentin war jedoch eine Färbung auszumachen (**Abb. 6C**).

Bei der tiefen Karies waren die Odontoblasten ungeordnet und lagen in einer schmalen Odontoblastenschicht (**Abb. 6B**). Die Färbungsintensität für p-ERK1/2 war sehr stark (**Abb. 6E, 6F**). Im Vergleich zu den mit t-ERK1/2 gefärbten Schnitten (**Abb. 6B, 6C**) erkannte man eine viel stärkere Färbung. Auch die Odontoblastenfortsätze im Prädentin zeigten eine deutliche Färbung (**Abb. 6F**). Die Stromazellen waren auch gefärbt, allerdings etwas schwächer als die Odontoblastenschicht und die Fortsätze im Prädentin (**Abb. 6F**). Auch hier zeigten die Odontoblastenfortsätze im Primärdentin, im Gegensatz zu denen im Sekundär- und Tertiärdentin, an einigen Stellen eine Immunreaktivität für p-ERK1/2 (**Abb. 6E**).

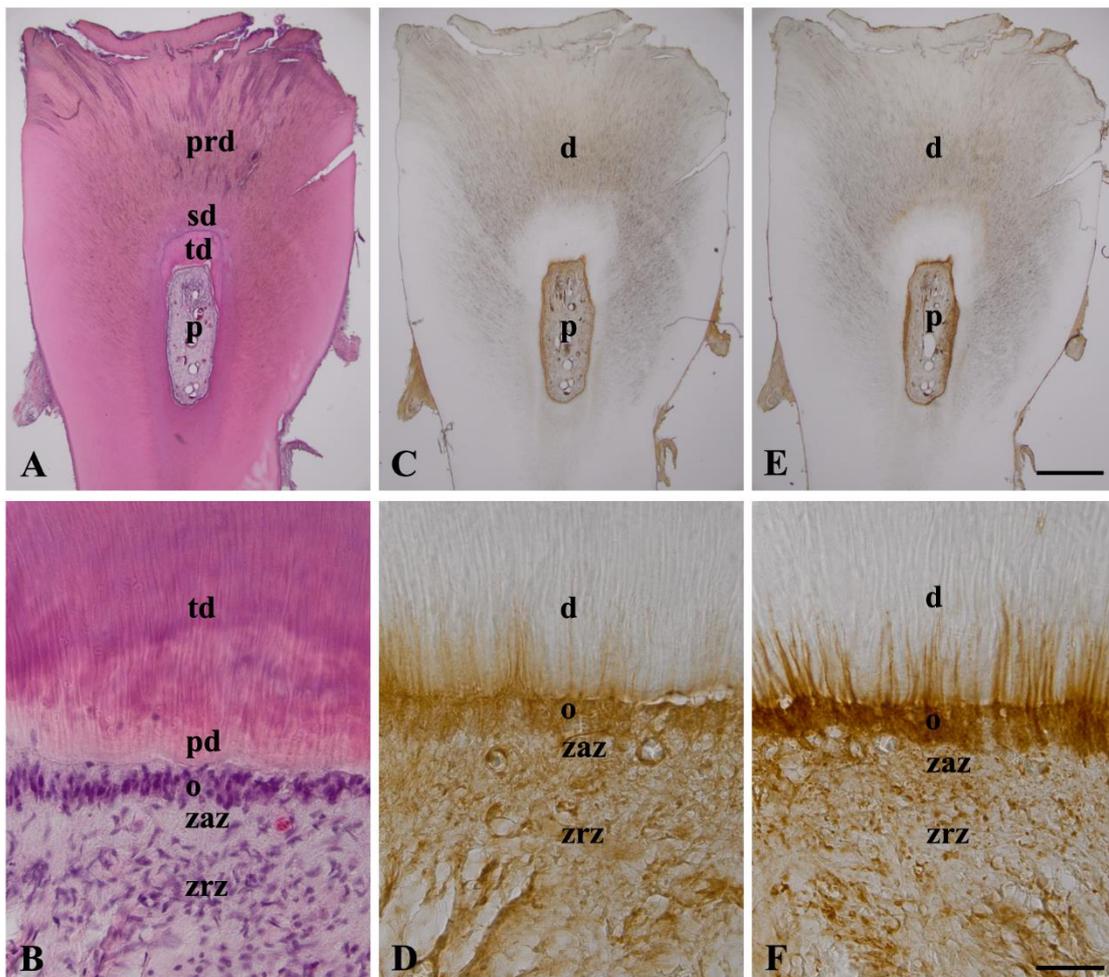


Abbildung 6: Expression und Phosphorylierung von ERK1/2 in Folgeschnitten der durch Caries profunda geschädigten Dentin-Pulpa-Einheit. In der HE-Färbung lässt sich eine Schicht Tertiärdentin vom Sekundär- und Primärdentin abgrenzen (**A**). Die Odontoblastenschicht ist schmal

und ungeordnet (**B**: Detailaufnahme von **A**). Eine starke Expression von t-ERK1/2 (**C**) ist in den Odontoblasten, deren Fortsätzen und in den Odontoblastenvorläuferzellen zu erkennen (**D**: Detailaufnahme von **C**). Die Immunreaktivität für p-ERK1/2 (**E**) ist besonders in den Odontoblasten zu sehen, auch die Fortsätze und Vorläuferzellen zeigen eine starke Färbung (**F**: Detailaufnahme von **E**). prd = Primärdentin, sd = Sekundärdentin, td = Tertiärdentin, p = Pulpa, pd = Prädentin, o = Odontoblastenschicht, zaz = zellarme Zone, zrz = zellreiche Zone, d = Dentin. Balken A, C, E \triangleq 1mm; Balken B, D, F \triangleq 50 μ m

4.4.3. Expression und Phosphorylierung von ERK1/2 in Odontoblasten der Pulpagangrän

Die Pulpagangrän zeigte ein sehr unterschiedliches Bild. Zum Teil war eine starke teilweise eine schwache Färbung für t-ERK1/2 zu erkennen. Häufig war keine Odontoblastenschicht mehr zu erkennen, da die Odontoblasten degeneriert waren. Dies erschwerte die Befundung und führte zu keinen eindeutigen Ergebnissen. Auf der Abbildung erkennt man, dass die Odontoblastenschicht im Bereich der Kronenpulpa bereits degeneriert war. Die gesamte Pulpa mit den vorhandenen Stromazellen war jedoch stark gefärbt (**Abb. 7C, 7D**).

Teilweise waren noch einzelne Odontoblasten vorhanden, die untersucht werden konnten. Diese zeigten meist eine sehr schwache Färbung für p-ERK1/2 (**Abb. 7E, 7F**). Auch die Stromazellen waren nur sehr schwach gefärbt (**Abb. 7F**).

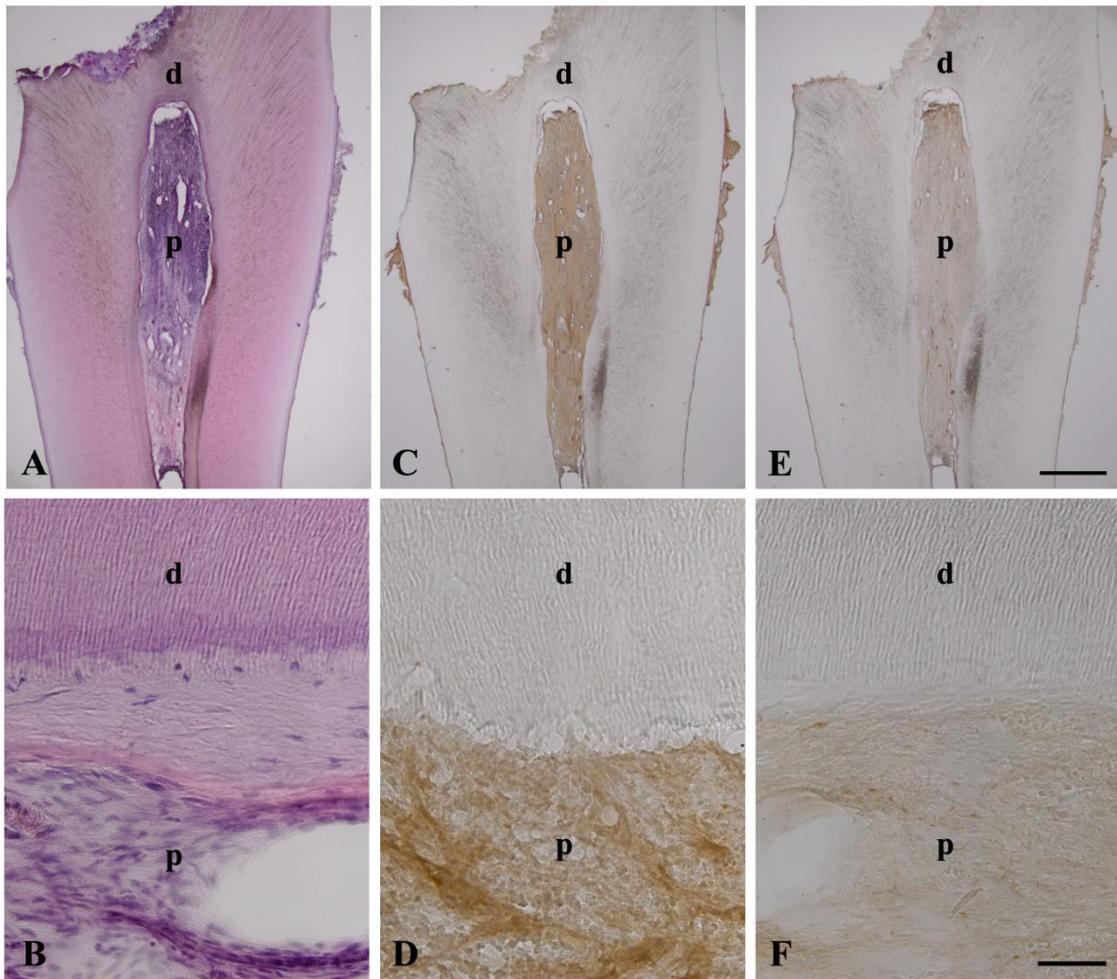


Abbildung 7: Expression und Phosphorylierung von ERK1/2 in Folgeschnitten der durch Gangrän geschädigten Dentin-Pulpa-Einheit. In der HE-Färbung (A) erkennt man keine Odontoblastenschicht mehr, außerdem ist kein Prädentin vorhanden (B: Detailaufnahme von A). Eine Expression von t-ERK1/2 (C) ist in den Stromazellen der Pulpa zu erkennen (D: Detailaufnahme von C). Eine Immunreaktivität für p-ERK1/2 (E) ist nicht auszumachen. Einzelne noch vorhandene Odontoblasten sind nur sehr schwach gefärbt (F: Detailaufnahme von E). d = Dentin, p = Pulpa. Balken A, C, E \cong 1mm; Balken B, D, F \cong 50 μ m

4.5. Kontrolle der immunhistochemischen Färbung der ABC-Methode

Als Kontrolle der immunhistochemischen Färbung mit der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex-Methode wurde ein Schnitt ohne den primären Antikörper und ein Schnitt ohne den sekundären Antikörper inkubiert. Alle anderen Schritte wurden wie oben beschrieben durchgeführt. Die Kontrollen zeigten keine spezifische Färbung (Abb. 8).

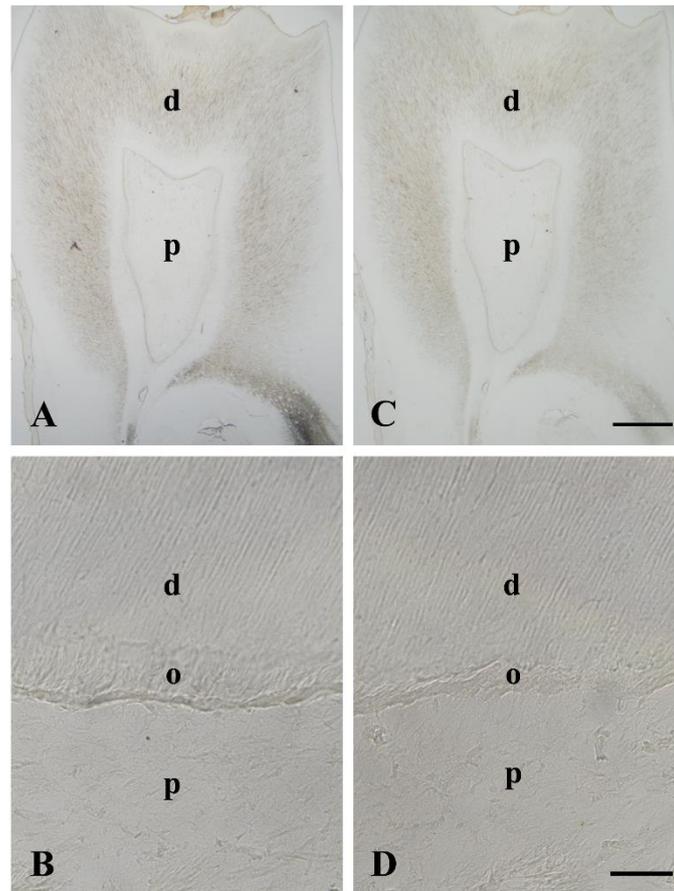


Abbildung 8: : Kontrolle der immunhistochemischen ABC-Methode. Sowohl in dem Schnitt ohne den primären Antikörper (**A, B**: Detailaufnahme von **A**) als auch in dem Schnitt ohne den sekundären Antikörper (**C, D**: Detailaufnahme von **C**) bleibt die spezifische Färbung aus. Weder die Odontoblasten, noch deren Fortsätze oder die Stromazellen sind gefärbt (**B, D**) d = Dentin, p = Pulpa, o = Odontoblastenschicht. Balken A, C \cong 1mm; Balken B, D \cong 50 μ m

4.6. Subzelluläre Expression und Phosphorylierung von ERK1/2 in gesunden Odontoblasten

4.6.1. Subzelluläre Expression von ERK1/2 in gesunden Odontoblasten

Die Zellkerne der Odontoblasten wurden mit DRAQ5[®] gefärbt (**Abb. 9A**). Nestin, das als ein Odontoblasten-Marker betrachtet wird, kam homogen in den Odontoblasten vor (**Abb. 9B**). In gesunden Odontoblasten fand man bei der konfokalen Färbung für t-ERK1/2 eine schwache aber homogene Färbung im Zytoplasma aller Odontoblasten (**Abb. 9C**). Dagegen kam eine punktförmige starke Färbung für die Expression von t-ERK1/2 in den Zellkernen einer Subpopulation der Odontoblasten vor (**Abb. 9C, 9D**).

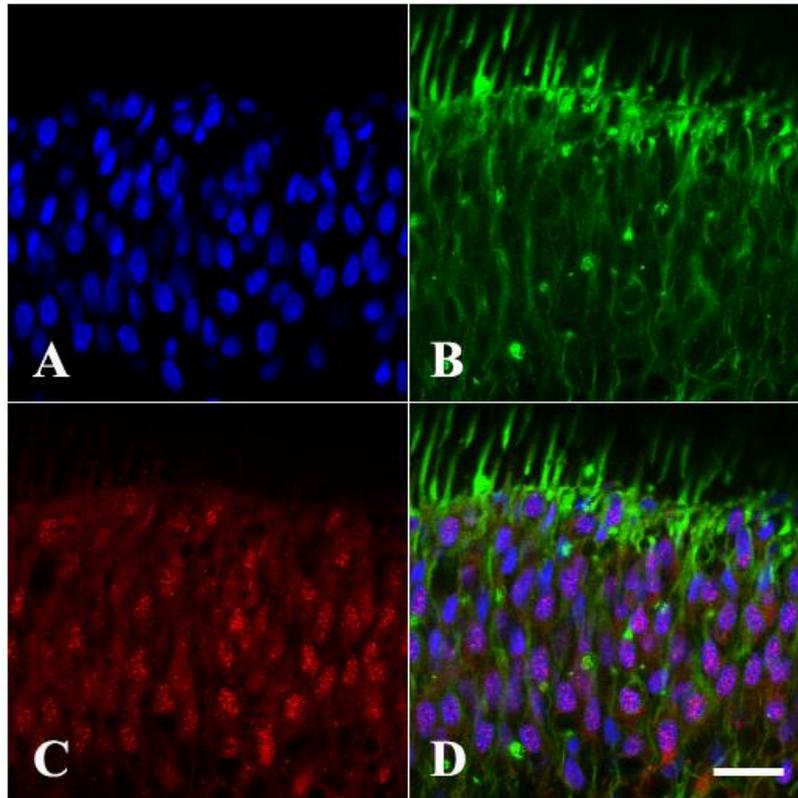


Abbildung 9: Konfokale Doppelfärbung für die Kolokalisation der t-ERK1/2-Expression mit Nestin in gesunden Odontoblasten. Der Chromosomenmarker DRAQ5[®] ist in den Nuclei der Odontoblasten lokalisiert (**A**). Der Odontoblastenmarker Nestin ist in den Zellkörpern und Zellfortsätzen der Odontoblasten zu finden (**B**). Im Zytoplasma der Odontoblasten ist eine moderate (**C**) und in den Zellkörpern einer Subpopulation der Odontoblasten eine stärkere Immunreaktivität für t-ERK1/2 zu beobachten (**C, D**). In der Überlagerung (**D**) ist eine Kolokalisation von DRAQ5[®] mit t-ERK1/2 zu erkennen. Balken \cong 20 μ m.

4.6.2. Subzelluläre Lokalisation der Phosphorylierungsformen von ERK1/2 in gesunden Odontoblasten

Der Chromosomenmarker DRAQ5[®] war in den Odontoblasten-Zellkernen zu finden (**Abb. 10A**). Odontoblasten-Zellkörper und die Fortsätze der Odontoblasten zeigten eine Färbung für Nestin (**Abb. 10B**). In einer Subpopulation von Odontoblasten wurde ERK1/2 im Zytoplasma schwach phosphoryliert. In einzelnen Odontoblasten kam jedoch eine starke Phosphorylierung für ERK1/2 im Zytoplasma vor (**Abb. 10C**). In einer Subpopulation der Odontoblasten war ERK1/2 in den Zellkernen sehr stark phosphoryliert (**Abb. 10C, 10D**). In zahlreichen Odontoblasten war eine Phosphorylierung für ERK1/2 sowohl im Zytoplasma als auch in den Zellkernen nicht zu finden.

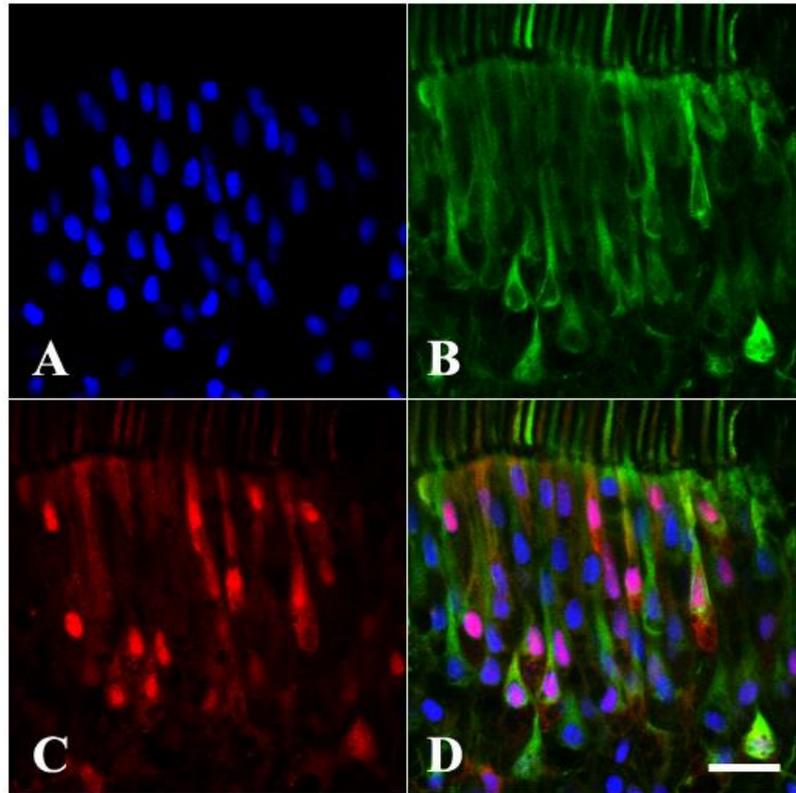


Abbildung 10: Konfokale Doppelfärbung für die Kolokalisation der p-ERK1/2-Phosphorylierungsformen mit Nestin in gesunden Odontoblasten. In den Nuclei der Odontoblasten findet man DRAQ5® (A). Der Odontoblastenmarker Nestin ist in den Zellkörpern und Zellfortsätzen der Odontoblasten zu finden (B). Einzelne Odontoblasten zeigen eine starke Phosphorylierung von ERK1/2 im Zytoplasma (C). Die Zellkerne einiger Odontoblasten sind stark gefärbt (C, D). In der Überlagerung (D) ist eine Kolokalisation von DRAQ5® mit p-ERK1/2 zu erkennen. Balken \cong 20 μ m.

4.7. Subzelluläre Expression und Phosphorylierung von ERK1/2 in entzündeten Odontoblasten

4.7.1. Subzelluläre Expression von ERK1/2 in akut entzündeten Odontoblasten (Dentinkaries)

DRAQ5® war in den Zellkernen der Odontoblasten zu detektieren (Abb. 11A). Nestin kam mit einem homogenen Färbungsmuster in allen Odontoblasten vor (Abb. 11B). Dentinkaries induzierte eine homogene und starke Expression von ERK1/2 im Zytoplasma der Odontoblasten (Abb. 11C). Nur in einzelnen Odontoblasten war eine Zellkernlokalisierung für t-ERK1/2 zu erkennen (Abb. 11C, 11D).

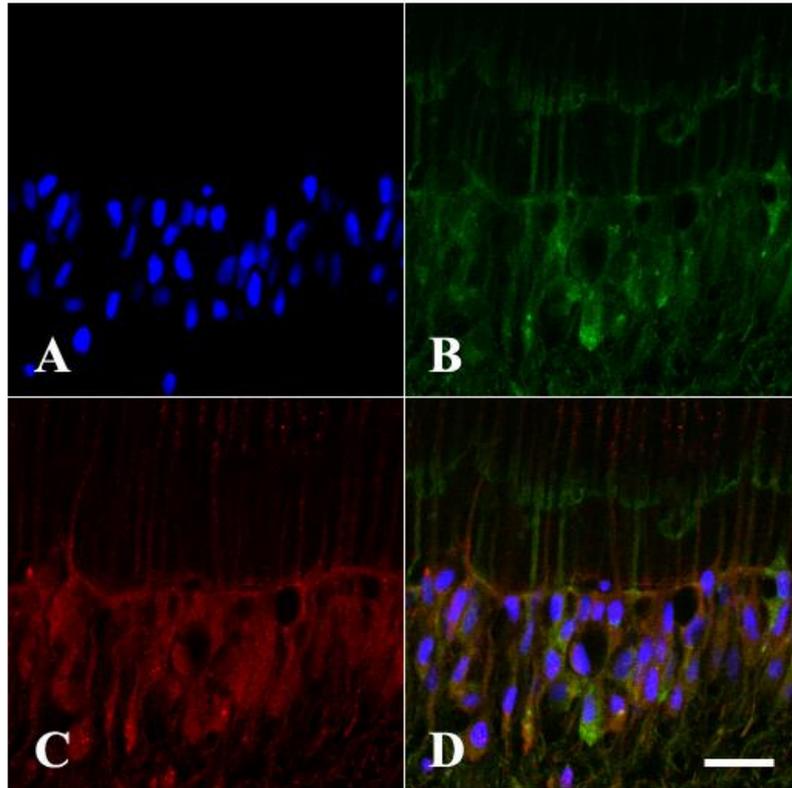


Abbildung 11: Konfokale Doppelfärbung für die Kollokalisierung der t-ERK1/2-Expression mit Nestin in Odontoblasten der Dentinkaries. DRAQ5® ist in den Odontoblastenzellkernen zu finden (A). Der Odontoblastenmarker Nestin ist in den Zellkörpern und Zellfortsätzen der Odontoblasten zu sehen (B). Eine Expression von t-ERK1/2 ist im Zytoplasma der Odontoblasten zu erkennen (C). Nur einzelne Odontoblasten zeigen eine Zellkernlokalisation für t-ERK1/2 (C, D). D zeigt die Überlagerung von A, B und C. Balken \triangleq 20 μ m

4.7.2. Subzelluläre Expression von ERK1/2 in chronisch entzündeten Odontoblasten (Caries profunda)

DRAQ5® war in den Zellkernen (Abb. 12A) und Nestin in den Odontoblastenzellkörpern und in den Fortsätzen der Odontoblasten zu erkennen (Abb. 12B). Die chronisch entzündeten Odontoblasten zeigten eine starke Färbung für t-ERK1/2 sowohl im Zytoplasma als auch in den Zellkernen der Odontoblasten (Abb. 12C, 12D). In einer Subpopulation der Odontoblasten war eine besonders starke Expression für t-ERK1/2 zu erkennen. Im Bereich der zellreichen Zone, in der sich die Odontoblasten-Vorläuferzellen befinden und sich zu Odontoblasten differenzieren, kam eine starke Zellkernfärbung für t-ERK1/2 vor (Abb. 12C, 12D).

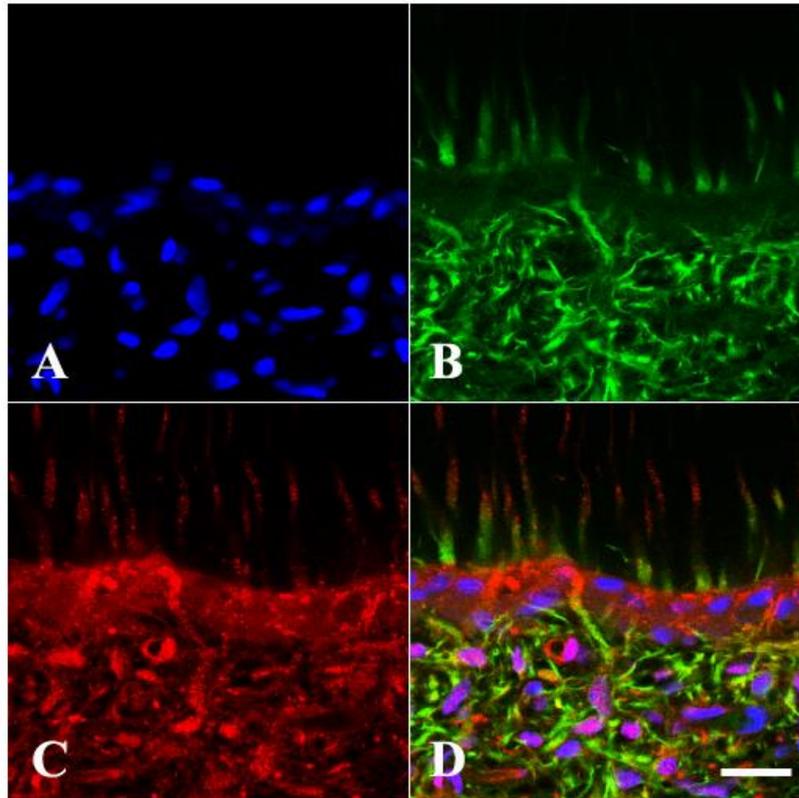


Abbildung 12: Konfokale Doppelfärbung für die Kolokalisation der t-ERK1/2-Expression mit Nestin in Odontoblasten der Caries profunda. DRAQ5[®] ist in den Odontoblastenzellkernen lokalisiert (**A**). In den Odontoblasten ist der Odontoblastenmarker Nestin zu finden (**B**). T-ERK1/2 kommt sowohl im Zytoplasma (**C**) als auch in den Zellkernen der Odontoblasten vor (**C, D**). Auch die Odontoblastenvorläuferzellen zeigen eine starke Immunreaktivität für t-ERK1/2 in den Zellkernen (**C, D**). **D** zeigt die Überlagerung von **A, B** und **C**. Balken \cong 20 μ m

4.7.3. Subzelluläre Phosphorylierung von ERK1/2 in akut entzündeten Odontoblasten (Dentinkaries)

Der Chromosomenmarker DRAQ5[®] kam in allen Zellkern der Odontoblasten vor (**Abb. 13A**). In der Odontoblastenschicht war eine Färbung für Nestin zu erkennen (**Abb. 13B**). Die phosphorylierte Form von ERK1/2 fand man schwach sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern (**Abb. 13C, 13D**). Dentinkaries induzierte eine homogene Färbung im Zytoplasma der Odontoblasten. Im Vergleich zum Gesunden nahm die Färbung um den Zellkern zu.

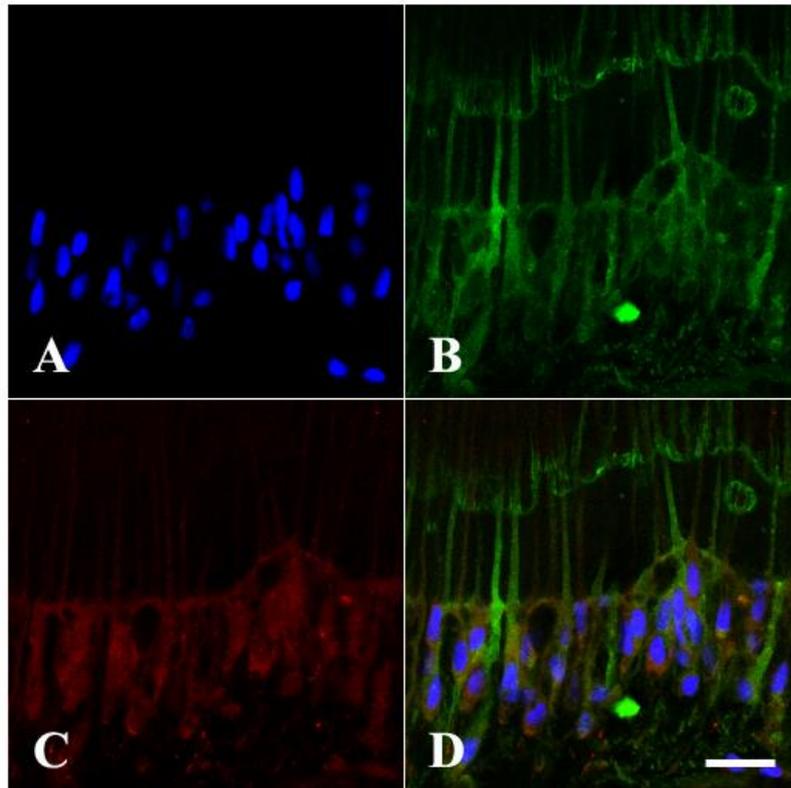


Abbildung 13: Konfokale Doppelfärbung für die Kolokalisation der p-ERK1/2-Phosphorylierungsformen mit Nestin in Odontoblasten der Dentinkaries. In den Nuclei der Odontoblasten findet man DRAQ5® (A). Der Odontoblastenmarker Nestin ist in den Zellkörpern und Zellfortsätzen der Odontoblasten zu finden (B). Eine schwache Färbung für p-ERK1/2 ist im Zytoplasma (C) und in den Zellkernen der Odontoblasten auszumachen (C, D). D zeigt die Überlagerung von A, B und C. Balken \triangleq 20 μ m

4.7.4. Subzelluläre Phosphorylierung von ERK1/2 in chronisch entzündeten Odontoblasten (Caries profunda)

DRAQ5® war in den Zellkernen der Odontoblasten zu finden (Abb. 14A), während alle Odontoblasten für Nestin positiv waren (Abb. 14B).

Im Vergleich zu Odontoblasten im Gesunden und in der Dentinkaries wurde eine starke Phosphorylierung von ERK1/2 sowohl im Zytoplasma als auch in den Zellkernen der Odontoblasten detektiert (Abb. 14C, 14D). In der zellreichen Zone, in der sich die Odontoblasten-Vorläuferzellen befinden, zeigten die Zellen eine starke Färbung für p-ERK1/2 in den Zellkernen (Abb. 14C, 14D). Innerhalb der Odontoblasten gab es einzelne Zellen, die sich mit einer noch stärkeren Phosphorylierung für ERK1/2 von den anderen abhoben.

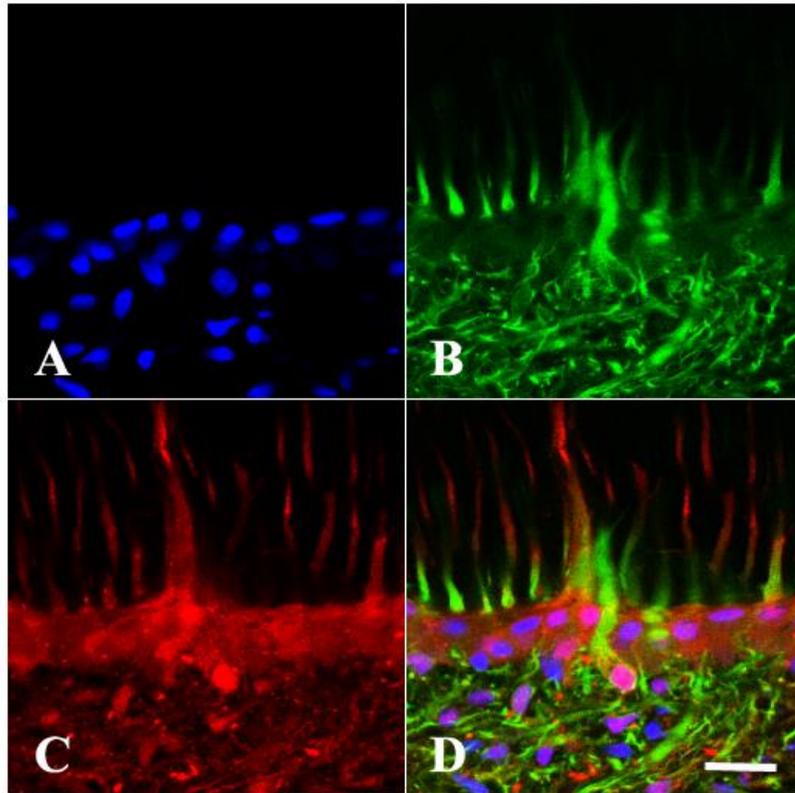


Abbildung 14: Konfokale Doppelfärbung für die Kolokalisation der p-ERK1/2-Phosphorylierungsformen mit Nestin in Odontoblasten der Caries profunda. In den Nuclei der Odontoblasten findet man DRAQ5® (A). Der Odontoblastenmarker Nestin ist in den Zellkörpern und Zellfortsätzen der Odontoblasten zu finden (B). Eine starke Färbung für p-ERK1/2 ist im Zytoplasma (C) und in den Zellkernen der Odontoblasten auszumachen (C, D). Auch die Odontoblastenvorläuferzellen zeigen eine starke Zellkernfärbung für p-ERK1/2 (C, D). D zeigt die Überlagerung von A, B und C. Balken \cong 20 μ m

4.8. Kontrolle der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung

Als Kontrolle der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung wurde ein Schnitt ohne den ersten primären Antikörper und ohne den zweiten primären Antikörper inkubiert. Das Ergebnis zeigte, dass die Odontoblastenfärbung durch Nestin und die spezifische Färbung für t-ERK1/2 ausblieb (Abb. 15B, 15C). Lediglich die Zellkernfärbung durch DRAQ5® war zu erkennen (Abb. 15A, 15D).

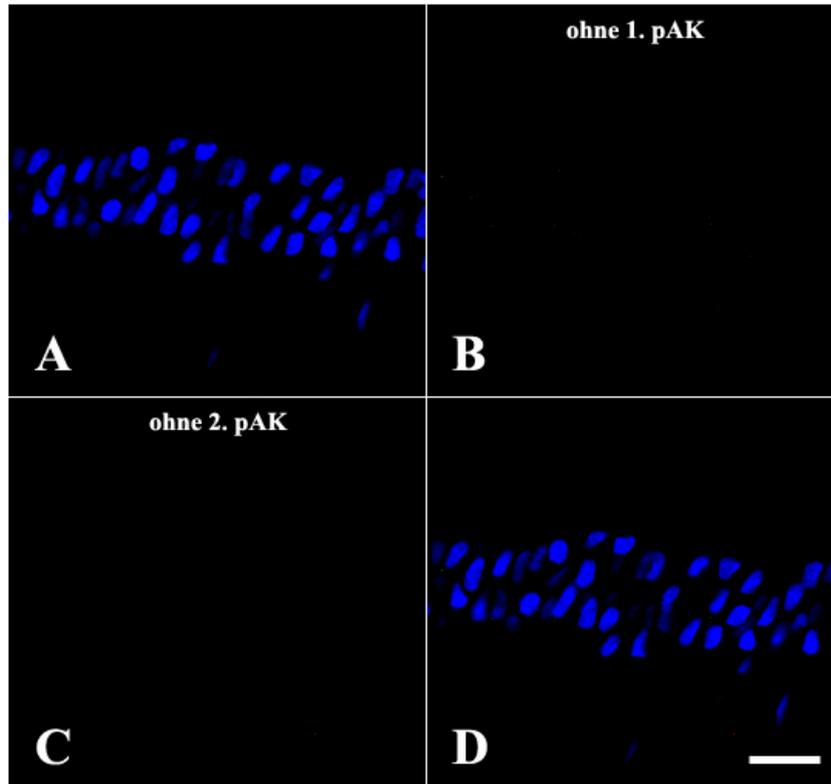


Abbildung 15: Kontrolle der Immunfluoreszenz-Doppelfärbung. Die Zellkernfärbung durch DRAQ5® ist zu erkennen (A). Auf Grund des Auslassens der Inkubation mit dem 1. pAK und 2. pAK bleibt sowohl die Färbung der Odontoblastenzellkörper und -fortsätze (B) als auch die spezifische Färbung für t-ERK1/2 aus (C). In der Überlagerung von A, B und C ist nur die Zellkernfärbung zu erkennen (D). Balken \cong 20 μ m

4.9. Statistische Auswertung der Färbungsintensitäten

Die densitometrischen Daten wurden mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS für Windows (Version 11.0) ausgewertet. Dabei wurden die Daten der unterschiedlichen Gruppen in einem gepaarten Student's t-Test verglichen. Hierbei galt ein Signifikanzwert von $p \leq 0,05$.

Auf Grund der differierenden Färbungsintensitäten einzelner Odontoblasten-Subpopulationen in gesunden Zähnen wurden diese bei der densitometrischen Messung in zwei Untergruppen aufgeteilt. Der Hauptanteil der gesunden Odontoblasten zeigte eine Färbung von 765,37 DU für t-ERK1/2 mit einer Standardabweichung von 228,07 DU. Die Intensität der Färbung mit p-ERK1/2 betrug 454,63 DU (\pm 132,89 DU).

Die Subpopulationen zeigten bei der Messung die Werte 862,50 DU (\pm 113,43 DU) für t-ERK1/2 und 1248,00 (\pm 204,99 DU) für p-ERK1/2.

Vergleich man bei diesen beiden Gruppen die Färbungsintensität von phosphoryliertem also aktiviertem ERK1/2 waren diese signifikant unterschiedlich (0,00).

Die Werte der Zähne mit Dentinkaries betragen 752,50 DU (\pm 135,92 DU) für t-ERK1/2 und 549,67 DU (\pm 283,47 DU) für p-ERK1/2. Sie unterschieden sich nicht signifikant von gesunden Odontoblasten, jedoch von der Subpopulation gesunder Odontoblasten für p-ERK1/2.

Die Zähne mit der Diagnose Caries profunda zeigten folgende Färbungsintensitäten: 896,83 DU (\pm 144,37 DU) bei t-ERK1/2 und 1151,83 (\pm 179,10 DU) bei p-ERK1/2. Die Werte für p-ERK1/2 unterschieden sich sowohl von den gesunden Odontoblasten ($454,63 \pm 132,89$ DU) sig. 0,00 als auch von der Dentinkaries ($549,67 \pm 283,47$ DU) sig. 0,001.

Die gemessenen Färbungsintensitäten der Odontoblasten in einer Pulpagangrän, sofern dies auf Grund von Odontoblastendegeneration möglich war, betragen 821,88 DU (\pm 276,48 DU) für t-ERK1/2 und 620,63 DU (\pm 311,86 DU) für p-ERK1/2. Da die Zähne mit Pulpagangrän kein einheitliches Bild zeigten, war die Standardabweichung in diesem Fall relativ groß. Verglichen mit den anderen Gruppen, ließen sich trotzdem signifikante Unterschiede feststellen und zwar für p-ERK1/2 bei der gesunden Subpopulation (sig. 0,00) und bei Caries profunda (sig. 0,002).

Insgesamt lässt sich sagen, dass für t-ERK1/2 zwischen keinen der untersuchten Gruppen signifikante Unterschiede in den Färbungsintensitäten bestanden. In der phosphorylierten Form waren jedoch deutliche Unterschiede in Abhängigkeit von der Diagnose zu sehen.

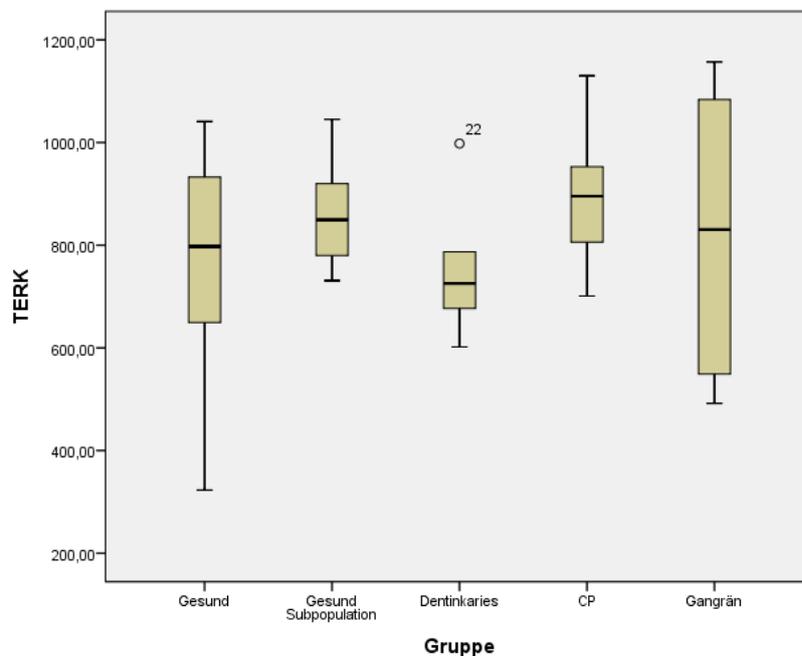


Abbildung 16: Statistische Analyse der Färbungsintensitäten für t-ERK1/2. Aufgeführt sind die Grauwerte der Odontoblastenschicht der mit t-ERK1/2 immunhistochemisch gefärbten Zähne. Verglichen werden die Gruppen gesund (n=8), Subpopulation der Gesunden (n=6), Dentinkaries (n=6), Caries profunda (n=6) und Gangrän (n=8).

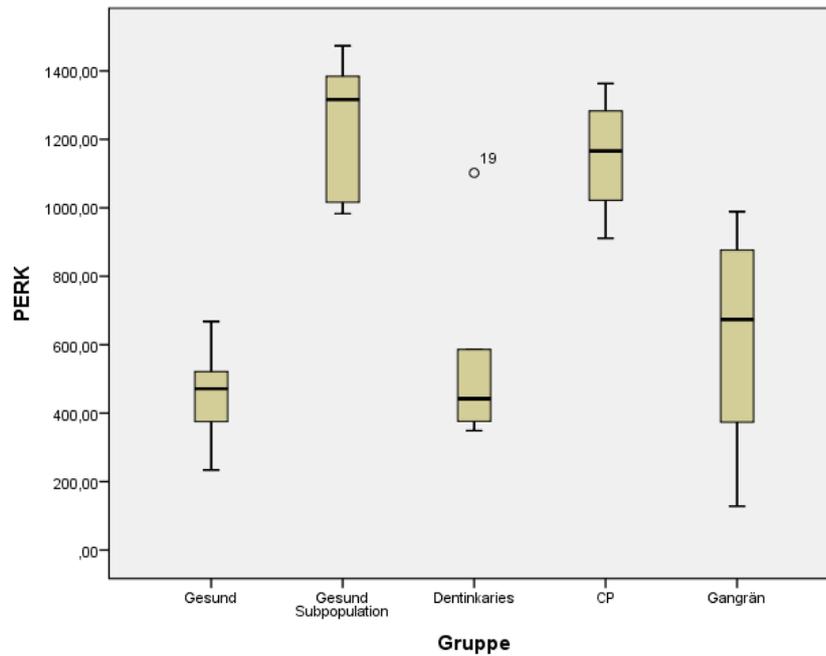


Abbildung 17: Statistische Analyse der Färbungsintensitäten für p-ERK1/2. Aufgeführt sind die Grauwerte der Odontoblastenschicht der mit p-ERK1/2 immunhistochemisch gefärbten Zähne. Verglichen werden die Gruppen gesund (n=8), Subpopulation der Gesunden (n=6), Dentinkaries (n=6), Caries profunda (n=6) und Gangrän (n=8).

5. Diskussion

5.1. Diskussion der Methodik

5.1.1. Fixierung, Entkalkung und Bearbeitung des Untersuchungsmaterials

Um die Epitope für die IHC-Inkubationen zu erhalten und das Untersuchungsmaterial während der Gewebearbeitung vor Schädigungen zu schützen, mussten die Proben fixiert werden. In der vorliegenden Studie wurde eine chemische Fixierung durchgeführt. Dies geschah mit 4% Paraformaldehyd und 0,2% Pikrinsäure in 0,1 M PBS pH 7,4. Durch die Fixierung wurde die enzymatische Autolyse durch die Lysosomen verhindert. Das Untersuchungsmaterial wurde somit stabilisiert. Die Proteine der Proben wurden dadurch denaturiert. In der vorliegenden Studie wurde die Pikrinsäure verwendet, um die neuronalen Strukturen (Nervenfasern, Schwann'sche Zellen) besser erhalten zu können.

Damit die Zähne geschnitten werden konnten, mussten sie mit 4M Ameisensäure entkalkt werden. Durch die Ameisensäure wurden die Ca^{2+} -Ionen aus dem Schmelz und Dentin gelöst. Der gesamte Schmelz wurde entkalkt und die anorganischen Strukturen der organisch-anorganischen Einheit des Dentins wurden gelöst, um die Dentin-Pulpa Einheit schneiden zu können. Ameisensäure ist nur für das Lichtmikroskop (LM) und nicht für das Elektronenmikroskop (EM) geeignet, da Zellstrukturen (Zellmembran, Zellorganellen) durch den Effekt der Ameisensäure zerstört werden können. Die Entkalkung mit Ethylendiamintetraacetat (EDTA) ist für EM geeignet, da die histologischen Zellstrukturen besser erhalten werden. Der Entkalkungsmechanismus durch EDTA geschieht über die Chelatbildung mit Metallionen im Schmelz und Dentin in einer gepufferten EDTA-Entkalkungslösung. Die Entkalkung mit Hilfe von EDTA ist auch für LM geeignet, jedoch ist die Entkalkungszeit deutlich länger (1-3 Monate) als bei der Ameisensäure.

Die Proben wurden mit 30% Saccharose-Lösung für 72 Stunden kryoprotectiert, bevor sie eingebettet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden. Die Kryoprotektion wurde durchgeführt, um das Entstehen von Wasser-Kristallen in der Probe bei dem Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff zu verhindern.

5.1.2. Immunhistochemische Methode

5.1.2.1. Die Spezifität der Antikörper gegen t-ERK1/2 und p-ERK1/2 am Thr202/Tyr204

In der vorliegenden Studie wurden in immunhistochemischen Inkubationen monoklonale phosphorylierte und totale ERK1/2 Kaninchen Antikörper verwendet. Zur Untersuchung der Expression der totalen Form von ERK1/2 der gesunden und kariösen Dentin-Pulpa-Einheit wurde Kaninchen monoklonal anti-Ratte t-ERK1/2 verwendet. Der Antikörper erkennt spezifisch die endogene totale (unphosphorylierte und phosphorylierte) Form von ERK1/2 und weist keine Kreuzreaktivität mit der JNK- oder p38-MAP-Kinase auf. Für die Detektion der Phosphorylierung von ERK1/2 in der gesunden und kariösen Dentin-Pulpa-Einheit wurde Kaninchen anti-Mensch p-ERK1/2 verwendet. Dieser Antikörper erkennt endogen phosphoryliertes ERK1 und ERK2 durch die duale Phosphorylierung am Thr202 und Tyr204. Es gibt keine Kreuzreaktivität zu den phosphorylierten Formen der JNK- oder p38-MAP-Kinase. Die Spezifität eines Antikörpers wird am besten mit Hilfe des Western Blot getestet (Burry, 2000). Die Antikörperspezifität der in der vorliegenden Studie verwendeten Antikörper wurde mittels Western Blot in mehreren Arbeiten dargestellt (Roux und Blenis, 2004; Rubinfeld und Seger, 2005; Meloche und Pouysségur, 2007).

5.1.2.2. Blockierung der endogenen Peroxidase-Aktivität

In vielen Zellen des Körpers wie Erythrozyten, Granulozyten oder Neuronen kommt physiologisch eine endogene Peroxidase-Aktivität vor (Bussolati et al, 2011). In der Dentin-Pulpa-Einheit kommen diese unterschiedlichen Zelltypen auch vor und enthalten in höheren Konzentrationen die endogene Peroxidase.

In den immunhistochemischen Inkubationen bindet der primäre Antikörper zunächst an die gesuchten Epitope und anschließend bindet der biotinylierte sekundäre Antikörper an den Fc-Teil des primären Antikörpers. Das Protein Avidin besitzt eine hohe Affinität zu dem Protein Biotin und bindet an die Biotinstellen der biotinylierten sekundären Antikörper. Die immunhistochemische Färbung kommt durch die chromogene Reaktion zwischen DAB und der exogenen Peroxidase zustande. Um eine Färbung der endogenen Peroxidase durch DAB zu verhindern, wurde diese Enzymaktivität mit Hilfe von 0,3% H₂O₂ inhibiert. Auf diese Weise konnten die Hintergrundfärbung und falsch positive Ergebnisse signifikant reduziert werden. In unserer Arbeitsgruppe wurde nach einer Reihe von Verdünnungen 0,3% H₂O₂ als optimale Konzentration für die chromogene Reaktion festgestellt (Korkmaz et al., 2009, 2011).

5.1.2.3. Die Anwendung des Detergens Triton™ X-100

Triton™ X-100 oder auch Polyethylenglycol-mono-[p-(1,1,3,3-tetramethyl-butyl)-phenyl]-ether ist ein ungeladenes und neutrales Detergens, das Proteine denaturiert. Hier wurde es verwendet, um die Proteine für den primären Antikörper zugänglich zu machen. Auf Grund der verwendeten wässrigen Lösungen können in immunhistochemischen Inkubationen auf der Schnittoberfläche ionische Spannungen und hydrophobe Kräfte entstehen. Diese hydrophoben Kräfte lösen unspezifische Bindungen zwischen dem Antikörper und einiger Proteine im Schnitt aus. Daher kann das gesuchte Protein nicht spezifisch detektiert werden. Triton™ X-100 ist ein neutrales, nicht-ionisches Detergens, das die Oberflächenspannung im Schnitt reduziert und somit unspezifische Bindungen verhindert. Die unspezifische Hintergrundfärbung wird somit stark reduziert.

Um die nicht-freien Epitope für die Bindung der primären Antikörper in der Zellmembran und im Zellkern zugänglich zu machen, müssen die Schnitte mit der Triton™ X-100-Lösung behandelt werden. Das chemische Fixierungsmittel 4% PFA kann die bestimmten Epitope maskieren, an die der primäre Antikörper binden soll. Durch den permeabilisierenden Effekt von Triton™ X-100 werden die Epitope für die Bindung des primären Antikörpers frei dargelegt.

Für die Inkubationen der vorliegenden Studie wurde 0,25% als am besten geeignete Konzentration festgestellt (Korkmaz et al., 2005). Hätten die Schnitte unter dem Elektronenmikroskop untersucht werden sollen, hätte das Detergens nicht verwendet werden können, da es Membranen und Zellorganellen destrukturiert (Korkmaz et al., 2010).

5.1.2.4. Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen der IHC-Reagenzien

Während der immunhistochemischen Inkubationen kann es zu unspezifischen Bindungen des primären Antikörpers und anderen verwendeten immunhistochemischen Reagenzien an freie Bindungsstellen von proteinbindenden Oberflächen kommen, sofern diese nicht mit Blockierungsreagenzien behandelt wurden. Um dies zu verhindern und die freien Bindungsstellen zu blockieren, wurde 2% Rinderserumalbumin (bovine serum albumin = BSA) verwendet.

An den Schnittoberflächen können unterschiedliche Proteine, in denen durch die verwendeten Pufferlösungen hydrophobe Kräfte entstehen, unspezifisch gefärbt werden.

Vor der Inkubation der Schnitte mit dem primären Antikörper müssen daher diese hydrophoben Kräfte durch Sättigung der Stellen aufgehoben werden. Für die Blockierung dieser unspezifischen Bindungsstellen ist BSA optimal geeignet. Zusätzlich ermöglicht es durch die Sättigung auch eine erleichterte Bindung der Antikörper an die spezifischen Epitope, da die Antikörper auf Grund der hydrophoben Kräfte nicht binden können. BSA induziert also durch die Sättigung eine starke Reduzierung der Hintergrundfärbung. Somit kann eine spezifische immunhistochemische Immunreaktivität detektiert werden. In unseren immunhistochemischen Inkubationen mit unterschiedlichen Verdünnungsreihen wurde eine 2% BSA Konzentration als optimale Konzentration festgelegt (Korkmaz et. al., 2008, 2011). In höheren Konzentrationen (z.B. in 5% oder 10%) ist die Intensität der Antigen-Antikörper Reaktion geschwächt.

5.1.2.5. Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen des sAK

Zusätzlich zum BSA, das als unspezifische Blockierungslösung eingesetzt wurde, war eine weitere Lösung nötig, die speziell unspezifische Bindungsstellen des sekundären Antikörpers blockiert. Hierfür wurde 5% Normales Ziegenserum (normal goat serum = NGS) verwendet. Es musste aus der gleichen Tierart stammen wie der sekundäre Antikörper.

Die Antikörper besitzen eine Fc-Region und zwei Fab-Regionen. Die Fab-Regionen enthalten die Domäne, die an die spezifischen gesuchten Epitope binden. Der sekundäre Antikörper bindet an die Fc-Region des primären Antikörpers. In der dentalen Pulpa kommen unterschiedlichen Typen von Immunzellen vor, wie Lymphozyten, Makrophagen und Granulozyten. Diese Zellen haben auf ihrer Plasmamembran auch die Rezeptoren, die von dem sekundären Antikörper erkannt werden. Somit können unspezifische Immunreaktionen die Folge sein. Um diese Bindungen zwischen sekundärem Antikörper und den Fc-Rezeptoren der Immunzellen im Schnitt zu blockieren, müssen die Schnitte mit dem nicht-immunisierten Normalserum der Tierart, in welcher der sekundäre Antikörper entwickelt wurde, inkubiert werden.

In der vorliegenden Studie wurden aufgereinigte biotinylierte polyklonale anti-Kaninchen IgG Antikörper verwendet, die in der Ziege entwickelt wurden. Um die endogenen Fc-Rezeptoren der Immunzellen, die auch unter normalen Bedingungen in der Dentin-Pulpa-Einheit vorkommen (z.B. Makrophagen), zu blockieren, müssen die Schnitte daher mit nicht-immunisiertem normalem Ziegenserum (NGS) inkubiert werden. So werden alle endogenen Fc-Rezeptoren, die für den sekundären Antikörper als falsche Bindungsstellen in Frage kommen können, blockiert. Der sekundäre Antikörper bindet somit nur die Fc-

Domäne des primären Antikörpers, wodurch eine spezifische Färbung entsteht. Die Behandlung der Schnitte mit NGS reduziert eine starke Hintergrundfärbung (Korkmaz et al., 2008, 2009, 2010, 2011). In unserer Arbeitsgruppe wurde die optimale Verdünnung von NGS bei 5% festgelegt. In höheren Konzentrationen (z.B. 10%) ist die spezifische Färbung gleichzeitig stark geschwächt. In niedrigeren Konzentrationen (z.B. 1%) von NGS war eine starke Hintergrundfärbung zu erkennen.

5.1.2.6. Visualisierung der spezifischen IHC-Bindungsstellen

Um die Antikörper, die an die spezifischen Bindungsstellen gebunden haben, sichtbar zu machen, wurde DAB eingesetzt. In unseren immunhistochemischen Inkubationen induzierten höhere Konzentrationen von H_2O_2 und Nickelammoniumsulfat eine starke Hintergrundfärbung. Daher mussten beide Substanzen in niedrigen Konzentrationen in der DAB-Lösung verwendet werden. Die Konzentrationen von 0,05 % 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid in 0,05 M Tris-HCl Puffer mit 0,01% H_2O_2 und 0,01% Nickelammoniumsulfat erwiesen sich hierfür als ideal (Korkmaz et al., 2006, 2008, 2011). DAB ist ein Substrat der Peroxidase und bindet deshalb an die exogene Peroxidase, die am Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex gebunden ist, der wiederum an den biotinylierten sekundären Antikörper gebunden ist. DAB wurde durch die Peroxidase oxidiert und bildete ein unlösliches braunes Präzipitat, das nicht ausbleicht und im normalen Licht sichtbar war.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Entwicklungszeit der DAB-Lösung für den verwendeten Antikörper in allen Inkubationen, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt wurden, mit 15 Minuten festgelegt. Dies war eine Voraussetzung, um die Färbungsintensitäten von t-ERK1/2 und p-ERK1/2 messen und die Ergebnisse statistisch analysieren zu können.

5.2. Diskussion der Ergebnisse

5.2.1. Die subzelluläre Lokalisation und konstitutive Phosphorylierung von ERK1/2 in Odontoblasten und in Progenitoren der Odontoblasten der gesunden Dentin-Pulpa-Einheit

In der vorliegenden Studie wurde mit Hilfe von immunhistochemischen Inkubationen in gesunden humanen Odontoblasten *in vivo* eine Expression von ERK1/2 detektiert. Mit der totalen Form des Antikörpers ließ sich nur eine Aussage darüber treffen, ob das gesuchte Protein vorhanden war oder nicht, unabhängig von dessen Aktivierung. Das ERK1/2-Protein kann durch unterschiedliche Wege posttranslational aktiviert werden. Einer dieser Aktivierungsvorgänge ist die posttranslationale Regulation von ERK1/2 durch die Phosphorylierung des Proteins.

Die Ergebnisse zeigen, dass t-ERK1/2 in gesunden Odontoblasten unter physiologischen Bedingungen gebildet wird. Es wurde eine homogene Färbung für t-ERK1/2 mit einer Färbungsintensität von $765,37 \pm 228,07$ DU detektiert. Die Bildung von ERK1/2 unter normalen Bedingungen in Odontoblasten zeigt, dass dieses Protein für die Aktivierung (z.B. durch die Phosphorylierung) subzellulär in unterschiedlichen Zellkompartimenten bereitliegt.

Die Phosphorylierung von ERK1/2 verhielt sich im Gegensatz zur Expression heterogen. Es kamen Subpopulationen von Odontoblasten und Vorläuferzellen vor, in denen ERK1/2 stark phosphoryliert war. Die restlichen Zellen waren schwach phosphoryliert. Hierauf wird im weiteren Verlauf der Diskussion genauer eingegangen.

5.2.1.1. Die Zellaktivität-abhängige Regulation der Odontoblasten durch die Phosphorylierung von ERK1/2

In einer Subpopulation der gesunden Odontoblasten wurde p-ERK1/2 mit einer Färbungsintensität von $1248,00 \pm 204,99$ DU detektiert, was einen signifikanten Unterschied zu den restlichen gesunden Odontoblasten mit $454,63 \pm 132,89$ DU ausmachte. Diese Befunde zeigten, dass ERK1/2 in einer Subpopulation der Odontoblasten stark aktiviert wurde.

Auch in einer Subpopulation der Odontoblastenprogenitoren konnte eine verstärkte Phosphorylierung von ERK1/2 beobachtet werden. Diese Lokalisationsmuster von phosphoryliertem ERK1/2 in Odontoblasten und deren Vorläuferzellen deuten darauf hin,

dass ERK1/2 nur in einer Subpopulation der Odontoblasten und in einer Subpopulation der Progenitoren, die sich in einem bestimmten Aktivitätszustand befinden, stark phosphoryliert wird. In anderen Odontoblasten und in anderen Progenitoren der Odontoblasten wird ERK1/2 im Vergleich zu diesen Subpopulationen schwach phosphoryliert.

Durch die Phosphorylierung wird ERK1/2 aus dem Zytoplasma in den Zellkern translokiert und dort in die transkriptionelle Regulation der spezifischen Gene involviert. Es wurde nachgewiesen, dass die Phosphorylierung von ERK1/2 in Osteoblasten die Mineralisations-assoziierten Gene (z.B. Runx2) reguliert, um die Knochenmatrix zu bilden und um die Biomineralisation der Knochenmatrix zu unterstützen (Greenblatt et al., 2013). Die Befunde der vorliegenden Arbeit zeigen, dass unter physiologischen Bedingungen in einer Subpopulation der Odontoblasten ERK1/2 in Zellkernen phosphoryliert vorliegt, um Mineralisations-assoziierte Gene durch die Transkription zu regulieren.

Es ist möglich, dass diese Subpopulationen der gesunden Odontoblasten im Vergleich zu den anderen gesunden Odontoblasten, in denen ERK1/2 nicht oder nur schwach phosphoryliert wird, über die Phosphorylierung von ERK1/2 aktiviert werden, sekundäres Dentin zu bilden. Weitere Untersuchungen sollen klären, ob diese Subpopulationen der gesunden Odontoblasten für die Differenzierung und/ oder für die transkriptionelle Regulation der bestimmten Gene (Runx2, Osx, CREB-1) eine erhöhte Menge von phosphoryliertem ERK1/2 brauchen.

In unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass Odontoblasten in der Odontoblastenschicht nicht homogen, sondern heterogen sind (Klinz et al., 2012, 2013). Sie befinden sich (während der Differenzierung zu terminal differenzierten Odontoblasten) in unterschiedlichen Differenzierungsphasen. Die Befunde dieser Arbeit stützen diese Annahme. Es ist möglich, dass eine starke Phosphorylierung von ERK1/2 in einer bestimmten Differenzierungsphase der Odontoblasten erforderlich ist. Neue Experimente sind nötig, um zu klären, in welcher Differenzierungsphase der Odontoblasten und der Odontoblastenprogenitoren ERK1/2 aktiviert wird.

Die Phosphorylierung von ERK1/2 in einer Subpopulation der Odontoblasten der Rattenmolaren wurde von unserer Arbeitsgruppe beschrieben (Korkmaz et al., 2006). Die Befunde der vorliegenden Studie in humanen Odontoblasten unterstützen diese Ergebnisse und zeigen, dass die Molaren der Ratte für das Verstehen der Dentinmatrixbildung und der Biomineralisation der Dentinmatrix mit humanen Molaren

vergleichbar sind und als ein Untersuchungsmodell für humane Molaren geeignet erscheinen.

5.2.1.2. Der Einfluss von ERK1/2 auf die Bildung und Biomineralisation der Dentinmatrix

In gesunden Odontoblasten wurde t-ERK1/2 subzellulär in allen Odontoblasten homogen im Zytoplasma detektiert, während in einer Subpopulation der Odontoblasten eine starke Expression in den Zellkernen vorkam. Auch für p-ERK1/2 konnte teilweise ein starkes Vorkommen in den Nuclei beobachtet werden. Dies deutet auf eine Teilnahme von ERK1/2 in einer Subpopulation der Odontoblasten an der transkriptionellen Regulation von bestimmten Genen (z.B. Runx2) hin.

Bei der Bildung der Dentinmatrix werden 90% Kollagen und 10% nicht-kollagene Proteine gebildet (Linde und Goldberg, 1993). Die nicht-kollagenen Proteine, die von Odontoblasten gebildet werden, Dentin Matrix Protein-1 (DMP-1), Dentinsialophosphoprotein (wird kurz nach der Bildung in Dentinsialoprotein und Dentinphosphoprotein gespalten) und Dentineglykoprotein, können bei der Biomineralisation eine entscheidende Rolle übernehmen (Prasad et al., 2010). Es ist bekannt, dass ERK1/2 über FGF-Rezeptoren aktiviert wird. In Osteoblasten reguliert FGF die Expression von Mineralisation-assoziierten Genen. Es wurde auch gezeigt, dass FGF bei der Bildung von DMP-1 einen stimulatorischen Effekt hat (Kyono et al., 2012). DMP-1 reguliert die Mineralisation des Knochens durch Osteoblasten (Feng et al., 2006). Bei der Biomineralisation der Dentinmatrix könnte DMP-1 synergistisch mit DSPP wirken (Prasad et al., 2010). Eine Deaktivierung von ERK1/2 ist mit dem Verlorengehen von DMP-1 in Osteoblasten assoziiert (Kyono et al., 2012). In Knockout-Mäusen induziert die Ausschaltung von ERK1/2-Genen in Osteoblasten eine starke Reduzierung der Biomineralisation während der Knochenbildung (Mathushita et al., 2009).

All diese Ergebnisse zeigen, dass die Bildung von DMP-1 in Osteoblasten über die Aktivierung von ERK1/2 reguliert wird. In den *in vivo* Befunden der vorliegenden Arbeit wurde eine starke Bildung von ERK1/2 in gesunden Odontoblasten detektiert. Da die extrazelluläre Matrixbildung und die Biomineralisation der extrazellulären Matrix in Osteoblasten und in Odontoblasten über gleiche Mechanismen reguliert werden (Li et al., 2011), unterstützen diese Befunde die Annahme, dass die Bildung und Aktivierung von ERK1/2 in Odontoblasten die Bildung des DMP-1 in der Dentinmatrix regulieren kann. ERK1/2 könnte über die Modulation von DMP-1 die Bildung der Dentinmatrix und die

Biomineralisation dieser regulieren. Es sind jedoch weitere Studien nötig, um diese Annahme zu testen.

In der vorliegenden Arbeit wurde ERK1/2 in der Dentinmatrix im Bereich des Prädentins und in den initialen Fortsätzen der Odontoblasten identifiziert. Ausgehend von diesen Befunden wurde angenommen, dass ERK1/2 im Prädentin und in den initialen Fortsätzen der Odontoblasten in die Regulation der Dentinmatrixbildung und in die Biom mineralisation der Dentinmatrix involviert ist.

5.2.1.3. Die Migration und Zellaktivität-abhängige Regulation der Progenitoren durch die Phosphorylierung von ERK1/2

In der zentralen Pulpa befinden sich Stromazellen, die als Stammzellen betrachtet werden. Von diesen Zellen werden einige durch eine Induktion (Karies, Kaukraft usw.) zur Migration von der zentralen zur peripheren Pulpa angeregt. In der Dentin-Pulpa-Einheit migrieren diese Progenitoren der Odontoblasten von der zellreichen Zone bis zur Odontoblastenschicht und differenzieren sich während dieser Migration zu Odontoblasten. Die Expression von ERK1/2 in Zellen der zentralen Pulpa und in der zellreichen Zone zeigt, dass ERK1/2 an unterschiedlichen posttranslationalen Regulationen in diesen Zellen involviert ist. Die Phosphorylierung von ERK1/2 wurde in einer Subpopulation der Odontoblastenvorläuferzellen in der zellreichen Zone der humanen Dentin-Pulpa-Einheit detektiert. Dies zeigt, dass ERK1/2 nur in bestimmten Odontoblastenprogenitoren physiologisch Zellaktivität-abhängig über die Phosphorylierung reguliert wird.

Die Mechanismen der Migration der Progenitoren von der zentralen Pulpa zu terminalen Odontoblasten sind nicht geklärt. Daher sind die Lokalisation von t-ERK1/2 und p-ERK1/2 in Progenitoren der dentalen Pulpa und in der zellreichen Zone von großer Bedeutung. In der vorliegenden Studie wurde die Lokalisation von p-ERK1/2 in einer bestimmten Subpopulation der zentralen Pulpa und in Odontoblastenvorläuferzellen in der zellreichen Zone detektiert. Eine Regulation der Migration der Osteoblasten durch die Phosphorylierung von ERK1/2 wurde in humanen Osteoblasten gezeigt (Lai et al., 2001). Diese Befunde legen daher die Annahme nahe, dass die Migration der Odontoblastenprogenitoren in der Dentin-Pulpa-Einheit über die Phosphorylierung von ERK1/2 reguliert werden kann. P-ERK1/2 kann in diesen Zellen eine Migration zur Odontoblastenschicht induzieren und nachfolgend diese Zellen zur terminalen Differenzierung in der Odontoblastenschicht unter physiologischen Bedingungen führen. Die Folge ist die physiologische Bildung des Sekundärdentins.

5.2.1.4. Die Regulation der frühen und späten Differenzierung durch die konstitutive Phosphorylierung von ERK1/2

Die Detektion von t-ERK1/2 und p-ERK1/2 in Odontoblastenvorläuferzellen lässt auf eine Bildung von ERK1/2 und eine posttranslationale Regulation dieser MAPK über die Phosphorylierung in Odontoblastenprogenitoren schließen.

Die Differenzierung der Odontoblastenvorläuferzellen in der zellreichen Zone kann als frühe Differenzierung bezeichnet werden. Die späte Differenzierung bedeutet dann in diesem Zusammenhang die terminale Differenzierung der Odontoblasten in der Odontoblastenschicht. Odontoblasten bilden die extrazelluläre Dentinmatrix und nachfolgend durch die Biomineralisation der Dentinmatrix das sekundäre Dentin mit regulären Dentintubuli, wenn die Odontoblasten in der Odontoblastenschicht terminal differenziert sind.

In Matrix-bildenden Zellen, z.B. Osteoblasten, spielen mehrere Transkriptionsfaktoren bei der Bildung der Matrix und bei der Biomineralisation dieser Matrix eine wichtige Rolle (Greenblatt et al., 2013). Während der frühen Differenzierung der Osteoblasten reguliert ERK1/2 den Transkriptionsfaktor Runx2 durch die Translokation von phosphoryliertem ERK1/2 in den Zellkern (Ge et al., 2009, 2012; Greenblatt et al., 2013). Zudem werden durch die Translokation von p-ERK1/2 die Transkriptionsfaktoren RSK2 (Dalby et al., 1998) und FRA1 (Young et al., 2002) reguliert.

Die Regulation der Differenzierung der Matrix-bildenden Zellen (Osteoblasten, Zementoblasten und Odontoblasten) wird über ähnliche Mechanismen reguliert (Prasad et al., 2010). Es wurde nachgewiesen, dass ERK1/2 in Matrix-bildenden Zellen, zum Beispiel in Osteoblasten, deren Differenzierung reguliert (Ge et al., 2012; Greenblatt et al., 2013). Da die terminalen Differenzierungen der Osteoblasten und der Odontoblasten über ähnliche Mechanismen reguliert werden (Prasad et al., 2010), wurde auf Grund der gewonnenen Ergebnisse der vorliegenden Studie angenommen, dass die Differenzierung der Odontoblasten und der Odontoblastenprogenitoren über die konstitutive Phosphorylierung von ERK1/2 reguliert wird.

Die Detektion von p-ERK1/2 in einer Subpopulation der Odontoblasten kann auf eine Regulation der Differenzierung dieser Odontoblasten in einem Aktivitätszustand durch die Phosphorylierung von ERK1/2 hindeuten. Es ist möglich, dass sich diese Subpopulation der Odontoblasten in einem physiologischen Aktivitätszustand befindet und sich durch die

Aktivierung von ERK1/2 terminal differenziert, um die Dentinmatrix zu bilden und um die Biomineralisation der Dentinmatrix zu regulieren.

5.2.2. Die subzelluläre Lokalisation und Phosphorylierung von ERK1/2 in Odontoblasten und Progenitoren der Odontoblasten der entzündeten Dentin-Pulpa-Einheit

In allen untersuchten entzündlichen Veränderungen der Dentin-Pulpa-Einheit ist eine Expression von ERK1/2 festzustellen. Es gibt weder signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen (akute seröse Pulpitis, chronische purulente Pulpitis und Gangrän) noch zu den gesunden Odontoblasten. Das bedeutet, dass das Protein unabhängig vom Zustand der Pulpa kontinuierlich gebildet wird. Es scheint also sowohl im physiologischen als auch im pathologisch veränderten Zustand der Pulpa wichtig zu sein, dass ERK1/2 bereitliegt, um evtl. nach Aktivierung durch Phosphorylierung in den Zellkern zu wandern und dort Transkriptionsfaktoren zu aktivieren. Die Menge an vorhandenem ERK1/2-Protein ist anscheinend relativ konstant.

5.2.2.1. Die Phosphorylierung von ERK1/2 bei der akuten serösen Entzündung (Dentinkaries)

Die Odontoblastenzellkörper in der Pulpa und deren Fortsätze innerhalb des Tertiärdentins, das als Folge der Dentinkaries gebildet wurde, zeigten eine starke Färbungsintensität für die Immunreaktivität ($742,50 \pm 135,92$ DU) von t-ERK1/2. Im Vergleich zu gesunden Odontoblasten ($454,63 \pm 132,89$ DU) wurden in den Odontoblasten der Dentin-Pulpa-Einheit, die an Dentinkaries erkrankt war, eine erhöhte Färbungsintensität für p-ERK1/2 ($549,67 \pm 283,47$ DU) detektiert. Diese Ergebnisse zeigen, dass Dentinkaries in Odontoblasten eine Zunahme der Phosphorylierung von ERK1/2 induziert.

Obwohl die Färbungsintensität für aktiviertes ERK1/2 in der mit Dentinkaries diagnostizierten akuten serösen Pulpitis im Vergleich zum aktivierten ERK1/2 in gesunden Odontoblasten höher war, wurde kein signifikanter Unterschied zur Phosphorylierung von ERK1/2 in gesunden Odontoblasten festgestellt. Dies legt die Vermutung nahe, dass der Stimulus bei einer Karies, die noch nicht in die Nähe der Pulpa vorgedrungen ist, zwar ausreicht, um eine Zunahme in der Phosphorylierung von ERK1/2 in den Odontoblasten zu ermöglichen, eine übermäßige Phosphorylierung wie in der Caries profunda blieb jedoch aus. Die Odontoblasten in der mit Dentinkaries diagnostizierten Dentin-Pulpa-

Einheit scheinen also in ihrer Aktivität eher mit den gesunden Odontoblasten vergleichbar zu sein.

Im Fall der Dentinkaries war die Beobachtung auffällig, dass in keiner der untersuchten Dentin-Pulpa-Einheiten eine starke Phosphorylierung von ERK1/2 in Subpopulationen der Odontoblasten, wie sie in der gesunden Dentin-Pulpa-Einheit vorkamen, zu erkennen war. Dies zeigt, dass die Differenzierung der Odontoblasten der gesunden und der entzündeten Dentin-Pulpa-Einheit unterschiedlich über die Phosphorylierung von ERK1/2 reguliert wird. Es ist möglich, dass die physiologische Differenzierung von dieser Subpopulation der Odontoblasten unter entzündlichen Bedingungen nicht mehr vorkommt.

Es wurde berichtet, dass die Aktivierung von ERK1/2 die Migration, Differenzierung und die Transkription (durch die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren im Zellkern) der Osteoblasten (Runx2) regulieren kann (Lai et al., 2001, Greenblatt et al., 2013). Unter inflammatorischen Bedingungen bilden die Entzündungszellen zahlreiche Mediatoren (Zytokine, Chemokine), welche die Phosphorylierung von ERK1/2 in Odontoblasten und in Progenitoren der Odontoblasten erhöhen.

In der zellreichen Zone wurde eine Expression von t-ERK1/2 detektiert. Dies bedeutet, dass das ERK1/2-Protein in Odontoblastenvorläuferzellen gebildet wird. Im Vergleich zu den Progenitoren der Odontoblasten der gesunden Dentin-Pulpa-Einheit induziert die Dentinkaries eine erhöhte Färbungsintensität für p-ERK1/2 in Progenitoren der Odontoblasten in der zellreichen Zone. Es ist möglich, dass die inflammatorischen Mediatoren, die in Folge der kariösen Läsion freigesetzt werden, eine Zunahme in der Phosphorylierung von ERK1/2 induzieren. Somit könnte die Migration und die Differenzierung der Progenitoren reguliert und beschleunigt werden, um durch Dentinkaries abgeschwächte Odontoblasten mit neuen differenzierten Odontoblasten zu ersetzen und weiter die Tertiärdentinbildung zu gewährleisten.

Dieser Befund der vorliegenden Arbeit ist von großer klinischer Relevanz. Im Vergleich zu der Bildung des Sekundärdentins wird reaktives Tertiärdentin schneller gebildet, während reaktives Tertiärdentin im Vergleich zu reparativem Tertiärdentin langsamer gebildet wird.

5.2.2.2. Die Phosphorylierung von ERK1/2 bei der akuten purulenten Pulpaentzündung (Caries profunda)

Bei der Caries profunda ist die Karies schon so weit vorangeschritten, dass sie die Pulpa erreicht hat, diese aber noch nicht eröffnet ist. Als Antwort auf die Caries profunda wurde Tertiärdentin in allen untersuchten Fällen mit reaktiven und reparativen Tertiärdentinschichten beobachtet.

Die signifikant starke Phosphorylierung für ERK1/2 wurde mit dem spezifischen Antikörper für p-ERK1/2 ausgeprägt detektiert. In Odontoblasten der Caries profunda wurde t-ERK1/2 mit einer Färbungsintensität von $896,83 \pm 144,37$ DU detektiert. In diesen Zellen wurde eine signifikant erhöhte Phosphorylierung für ERK1/2 mit $1151,83 \pm 179,10$ DU gefunden. Sie ist signifikant stärker als in Odontoblasten der gesunden Dentin-Pulpa-Einheit und der Dentinkaries. Dies zeigt, dass eine Karies, die in die Nähe der Pulpa vorgedrungen ist, einen adäquaten Stimulus (durch die Entzündungsmediatoren der kariösen Läsion) zum Auslösen der Signaltransduktionskaskade darstellt. Alle erkennbaren Odontoblasten in der Region der Karies (in der Kronenpulpa) sind stark gefärbt und enthalten somit die phosphorylierte Form von ERK1/2. Das phosphorylierte Protein kann unterschiedliche Transkriptionsfaktoren wie Runx2 aktivieren, die wiederum die Bildung und Mineralisation der Dentinmatrix fördern. Dies ist notwendig, damit Tertiärdentin zum Schutz der Pulpa gebildet werden kann.

Die Färbungsintensität dieser Odontoblasten ist vergleichbar mit jener der gesunden Subpopulation. Die Gruppen scheinen also, obwohl sie sich unter völlig unterschiedlichen Bedingungen befinden, ein ähnliches Maß an Aktivierung zu haben. Vermutlich bilden sie jedoch zwei unterschiedliche Arten von Dentin. Sekundärdentin ist dem Primärdentin sehr ähnlich, wobei Tertiärdentin häufig einen unregelmäßigen Aufbau besitzt. Da die Bildung des Sekundärdentins unter physiologischen Bedingungen langsamer abläuft, ist es möglich, dass diese Subpopulationen der Odontoblasten ihre terminale Differenzierung über das aktivierte ERK1/2 ohne den Effekt von Entzündungsmediatoren physiologisch erreichen. Die Bildung der Dentinmatrix und die Biomineralisation dieser Matrix durch die gesunden terminal differenzierten Odontoblasten führen zur sekundären Dentinbildung mit regulären Dentinkanälchen. Caries profunda hingegen greift die Odontoblasten schnell an. Diese bilden als Antwort auf die Caries profunda reaktives Tertiärdentin mit sehr wenigen und auch irregulären Dentintubuli. Im Fall der Caries profunda induzieren die Entzündungsmediatoren eine schnellere Differenzierung der Progenitoren der Odontoblasten und damit eine rasche reparative Tertiärdentinbildung.

Betrachtet man die zellreiche Zone in der peripheren Pulpa, fällt auf, dass in den Odontoblasten-Vorläuferzellen ERK1/2 nicht nur vorhanden, sondern auch sehr stark phosphoryliert ist. Um zur Differenzierung beizutragen, muss ERK1/2 in der phosphorylierten und damit aktivierten Form in den Zellen vorliegen. Dies ist hier der Fall. Es ist bekannt, dass die Aktivierung von ERK1/2 die Differenzierung und die Migration der unterschiedlichen Typen der Zellen, einschließlich der Osteoblasten, reguliert (Ge et al., 2007; Greenblatt et al., 2013). Die ersten *in vivo* Befunde der vorliegenden Studie zeigen,

dass die Differenzierung der Odontoblastenprogenitoren über die Phosphorylierung von ERK1/2 im Fall der Caries profunda stark reguliert werden kann.

Durch die Phosphorylierung wird ERK1/2 vom Zytoplasma in den Zellkern translokiert und dort in die transkriptionale Regulation bestimmter Gene involviert. Es wurde nachgewiesen, dass die Phosphorylierung von ERK1/2 in Osteoblasten die Mineralisations-assoziierten Gene (Runx2, Osx) reguliert, um die Knochenmatrix zu bilden und um die Biomineralisation der Knochenmatrix zu beeinflussen (Greenblatt et al., 2013). In Osteoblasten wurde eine ERK1/2-abhängige Regulation der DMP-1-Bildung dargestellt (Kyono et al., 2012). Die starke Phosphorylierung von ERK1/2 in den Nuclei der Odontoblasten im Fall der Caries profunda legt die Vermutung nahe, dass ERK1/2 auch in Odontoblasten die Bildung der Dentinmatrix und die Biomineralisation der Dentinmatrix über die Modulation von DMP-1 durch die Transkriptionsfaktoren (z.B. Runx2) bei der Tertiärdentinbildung regulieren kann.

Caries profunda induzierte eine starke Phosphorylierung von ERK1/2 in Progenitoren der Odontoblasten in der zellreichen Zone. Da eine starke Phosphorylierung von ERK1/2 die Migration (Lai et al., 2001) und die Differenzierung (Greenblatt et al., 2013) der Osteoblasten reguliert, deuten die vorliegenden Ergebnisse auf eine Beteiligung des aktivierten ERK1/2-Proteins an der Differenzierung und der Migration der Progenitoren der Odontoblasten hin. Dieser Befund ist von großer klinischer Relevanz, da die Differenzierung und die Migration der Progenitoren der Odontoblasten im Fall der Caries profunda mit Hilfe einer Unterfüllungseinlage über die Phosphorylierung von ERK1/2 beeinflussbar sein könnten.

Diese ersten *in vivo* Ergebnisse deuten auch auf eine Translokation von ERK1/2 vom Zytoplasma in den Zellkern der Progenitoren der Odontoblasten hin, um die transkriptionale Regulation der Biomineralisations-assoziierten Proteine zu modulieren. Die Befunde der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die akute und purulente Entzündung in der Pulpa in Odontoblasten und in deren Progenitoren eine Translokation von ERK1/2 vom Zytoplasma in den Zellkernen durch die starke Zunahme der Phosphorylierung von ERK1/2 induziert, um die Mineralisations-regulierenden Gene in diesen Zellen transkriptional zu beeinflussen.

5.2.2.3. Die Phosphorylierung von ERK1/2 bei der Gangrän

Im Fall der Gangrän wurden die Zellstrukturen in der Dentin-Pulpa-Einheit stark degradiert. Es kommen regionale Ansammlungen zahlreicher Entzündungszellen vor. In der gangränös veränderten Pulpa konnten nur wenige intakte Odontoblasten beobachtet werden. Andere Odontoblasten und Progenitoren waren nicht zu erkennen, da diese Zellen durch die stark infizierte dentale Pulpa degradiert wurden.

In den wenigen intakt gebliebenen Odontoblasten der gangränös veränderten dentalen Pulpa wurde eine Expression für die totale Form von ERK1/2 mit einer Färbungsintensität von $821,88 \pm 276,48$ DU detektiert. In diesen Odontoblasten wurde auch p-ERK1/2 mit einer Färbungsintensität von $620,63 \pm 311,86$ DU detektiert. Jedoch wurden diese Werte nur in ganz wenigen Odontoblasten, die noch nicht degradiert worden waren, gemessen. Im Vergleich zur Dentinkaries und zur Karies profunda, deuten diese Befunde auf eine Abnahme in der Aktivierung von ERK1/2 in diesen Odontoblasten hin. Es ist möglich, dass die Phosphorylierung von ERK1/2 in den Odontoblasten wegen der zahlreichen Effekte von Zytokinen und Chemokinen kontinuierlich abnimmt. Die wenigen Odontoblasten der gangränös veränderten dentalen Pulpa sind nicht mehr in der Lage, die Tertiärdentinbildung über die Aktivierung von ERK1/2 zu regulieren.

In der vorliegenden Studie wurde beobachtet, dass im Fall einer Gangrän kein Prädentin zu erkennen ist. Daher kann man annehmen, dass die Bildung der extrazellulären Dentinmatrix und die Biomineralisation dieser Matrix durch die starken Entzündungsmediatoren verhindert wurden. Im Bereich der einzelnen intakten Odontoblasten konnte auch kein Prädentin beobachtet werden. Dies zeigt, dass im Fall der Gangrän die Odontoblasten nicht mehr in der Lage sind, Dentinmatrix (Prädentin) zu bilden. Es ist möglich, dass Kollagen I und nicht-kollagene Dentinmatrixproteine (DMP-1, DSP, DPP und DGP) von Entzündungsmediatoren degradiert werden und somit nicht in den einzelnen Odontoblasten bereitliegen. Diese Proteine, zum Beispiel DMP-1 (Kyono et al., 2012), werden nicht mehr durch die Phosphorylierung von ERK1/2 in Odontoblasten der gangränös entzündeten Pulpa reguliert, um die Dentinmatrix zu bilden und die Biomineralisation dieser Matrix zu regulieren.

In der Gangrän ist die Heilungstendenz der dentalen Pulpa stark gesunken. Im Fall der Pulpagangrän waren keine Vorläuferzellen der Odontoblasten in der dentalen Pulpa zu erkennen. Es konnte weder Prädentin noch eine Odontoblastenschicht, eine zellarme Schicht oder eine zellreiche Schicht beobachtet werden. Diese Befunde zeigen, dass die dentale Pulpa in diesem Fall kein Regenerationspotential besitzt.

5.3. Schlussfolgerungen und klinische Relevanz der Ergebnisse

In der Therapie der kariösen Läsionen gibt es zurzeit keine medikamentöse Unterfüllungseinlage, die im Fall der Dentinkaries und Caries profunda eine physiologische Heilung der Dentinwunde ermöglichen kann, da die molekularbiologischen Mechanismen der Dentin-Wundheilung nicht geklärt sind. Da die Bildung des Tertiärdentins im Fall der Dentinkaries und der Caries profunda von wichtiger klinischer Bedeutung ist, führt uns die Klärung der molekularbiologischen Regulationen der Bildung von reaktivem und reparativem Tertiärdentin zu neuen Therapiemöglichkeiten.

Zurzeit werden in der Klinik hauptsächlich calciumhydroxidhaltige Unterfüllungsmaterialien in der Therapie der Dentinkaries und Caries profunda verwendet. Es ist jedoch bekannt, dass diese calciumhydroxidhaltigen Präparate in Odontoblasten keine Heilungsprozesse, sondern eine Nekrose induzieren. Ein weiterer Nachteil ist die chemische Unbeständigkeit. Durch Feuchtigkeit kann das Calciumhydroxid aus den Dentintubuli herausgelöst werden, wodurch Wasser gefüllte Hohlräume entstehen können. Zudem werden diese Materialien als Calciumhydroxid-Suspensionen in organischen Lösungsmitteln angeboten. Diese Lösungsmittel haben schädliche Effekte auf die Odontoblasten und die Pulpa.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression und Phosphorylierung von ERK1/2 im Gesunden, bei der Dentinkaries, Caries profunda und Gangrän untersucht. Auffällig war die starke Phosphorylierung von ERK1/2 in Odontoblasten der mit Dentinkaries und besonders in Odontoblasten der mit Caries profunda geschädigten Dentin-Pulpa-Einheit. Da die Odontoblasten in der adulten Dentin-Pulpa-Einheit unter kariösen Bedingungen bei der Dentinkaries und Caries profunda reaktives und reparatives Tertiärdentin bilden, sind die Befunde der vorliegenden Studie für die klinische Therapie von großer Bedeutung. Eine erhöhte Phosphorylierung von ERK1/2 reguliert die Matrixbildung und die Biomineralisation dieser Matrix in Osteoblasten. Die Matrixbildung und Biomineralisation in Osteoblasten, in Zementoblasten und in Odontoblasten werden über gleiche Mechanismen reguliert. Die vorliegende *in vivo* Untersuchung von ERK1/2 in Odontoblasten und in Progenitoren der Odontoblasten der humanen Dentin-Pulpa-Einheit zeigte, dass ERK1/2 sowohl im gesunden als auch im entzündeten Zustand in Odontoblasten exprimiert wird. Eine starke konstitutive Phosphorylierung von ERK1/2 wurde in einer Subpopulation der Odontoblasten detektiert, während die Phosphorylierung von ERK1/2 in Odontoblasten und in Progenitoren der Odontoblasten bei der Dentinkaries und besonders im Fall der Caries profunda stark zunimmt.

Diese Befunde können neue Therapiestrategien bei der Behandlung der Dentinkaries und Caries profunda ermöglichen. Erstrebenswert wäre ein Unterfüllungsmaterial, das spezielle Wachstumsfaktoren enthält, die dazu führen, dass ERK1/2 in den Odontoblasten phosphoryliert wird. Die Phosphorylierung von ERK1/2 kann die Odontoblasten durch die transkriptionale Regulation der mineralisierenden Proteinbildung und Biomineralisation der Dentinmatrix durch diese Proteine dazu anregen, mehr Tertiärdentin in kürzerer Zeit zu bilden. So könnte der Effekt der heraufregulierten Odontoblasten in der Dentinkaries und besonders in der Caries profunda noch verstärkt werden.

Die größte Relevanz dieser möglichen Unterfüllung wäre sicherlich in der Caries profunda Therapie zu sehen, da bei der Behandlung der Caries profunda die Erfolgsrate relativ gering ist, die Dentin-Pulpa-Einheit vital zu erhalten. Durch die vermehrte Bildung von Tertiärdentin wäre eine dickere Dentinschicht vorhanden, die die Pulpa schützt. Nach einer adhäsiven Füllungstherapie reagieren 5% bis 26% der Zähne, je nach Ausdehnung der Kavitätenpräparation (rein okklusale, MO/OD oder MOD), hypersensibel (Briso et al., 2007). Dies kann auch durch Calciumhydroxidliner nicht signifikant reduziert werden (Wegehaupt et al., 2009). Eine vermehrte Bildung von Tertiärdentin nach einer Unterfüllung, die ERK1/2 phosphoryliert und somit aktiviert, würde zu einer dickeren Dentinschicht führen, die diese Hypersensibilitäten evtl. reduzieren könnte.

6. Zusammenfassung

Die Klärung der molekularbiologischen Mechanismen der tertiären Dentinbildung in adulten Odontoblasten und in deren Progenitoren ist Voraussetzung für eine erfolgreiche Behandlung der Dentinkaries und der Caries profunda. Die Therapie der Dentinkaries und der Caries profunda basiert jedoch nicht auf der physiologischen Heilung der Dentinwunde, da die molekularbiologischen Mechanismen der Dentinbildung durch die Odontoblasten und deren Progenitoren in kariösen Läsionen nicht geklärt sind. MAP Kinasen sind Serin-/Threonin-Kinasen, die bei der Weiterleitung extrazellulärer Signale von der Zelloberfläche zum Zellkern eingeschaltet sind und dadurch wichtige Vorgänge wie Zellproliferation, Zelldifferenzierung aber auch die Matrixbildung und die Biomineralisation der Matrix regulieren. Bisher liegen keine *in vivo* Untersuchungen zur Expression und Phosphorylierung von ERK1/2 in humanen adulten Odontoblasten und in Progenitoren der Odontoblasten der gesunden und entzündeten Dentin-Pulpa-Einheit vor.

Um neue Erkenntnisse über die Expression und Phosphorylierung von ERK1/2 in Odontoblasten und in Progenitoren der Odontoblasten der gesunden Dentin-Pulpa-Einheit, in der Dentinkaries, der Caries profunda und in der Gangrän zu gewinnen, wurden aus kieferorthopädischen Gründen extrahierte humane Molaren und Prämolaren (n=68) in 4% Paraformaldehyd+0.2% Pikrinsäure immersionsfixiert, in 4 N Ameisensäure entkalkt, in 30% Saccharoselösung kryoprotectiert und in Tissue-Tek® eingebettet und tiefgefroren. Die freischwimmenden Gefrierschnitte wurden mit HE gefärbt, um die histopathologische Diagnose zu stellen. Die Schnitte der als gesund (n=8), Dentinkaries (n=6), Caries profunda (n=6) und Gangrän (n=8) diagnostizierten Zähne wurden für die Detektion des totalen und des phosphorylierten ERK1/2 in Zellen der humanen Dentin-Pulpa-Einheit durch die Anwendung der quantitativen Immunhistochemie (Avidin-Biotin-Peroxidase Methode) und der konfokalen Doppel-Immunfluoreszenz-Inkubationen für die subzelluläre Lokalisation untersucht.

In den untersuchten Schnitten wurde eine Expression von ERK1/2 in Odontoblasten und in Progenitoren der Odontoblasten der gesunden, akuter seröser, akuter purulenter und in chronisch purulenter Entzündung der Dentin-Pulpa-Einheit detektiert. Eine starke Phosphorylierung für ERK1/2 wurde in einer Subpopulation der gesunden Odontoblasten identifiziert. Im Vergleich zu diesen wurde eine moderate Phosphorylierung von ERK1/2 in Odontoblasten der Dentinkaries detektiert, während Caries profunda eine starke

signifikante Zunahme in der Phosphorylierung von ERK1/2 im Zytoplasma und in den Nuclei der entzündeten Odontoblasten und deren Progenitoren induzierte.

Die Ergebnisse deuten auf eine Kariesstärke-abhängige Zunahme in der Phosphorylierung von ERK1/2 in entzündeten Odontoblasten und in deren Progenitoren hin. Die Induktion der Phosphorylierung von ERK1/2 im Zytoplasma der Odontoblasten bei der Dentinkaries erreicht eine signifikante Zunahme subzellulär im Zytoplasma und besonders in den Nuclei der Odontoblasten bei der Caries profunda, in denen bestimmte Transkriptionsfaktoren (z.B. Runx2) über das aktivierte ERK1/2 bei der Bildung des reaktiven und reparativen Tertiärdentins reguliert werden können. Die starke Phosphorylierung von ERK1/2 in den Progenitoren der Odontoblasten bei der Caries profunda kann auf die Involvierung von p-ERK1/2 bei der Migration und Differenzierung dieser Zellen hindeuten. Die Beeinflussung der Tertiärdentinbildung durch Wachstumsfaktoren, die in Odontoblasten eine starke Phosphorylierung von ERK1/2 induzieren können, kann neue Therapiestrategien in der Behandlung der Caries profunda ermöglichen.

7. Literaturverzeichnis

1. **Briso, A. L. F.**, Mestrener, S. R., Delicio, G., Sundfeld, R. H., Bedran-Russo, A. K., De Alexandre, R. S., & Ambrosano, G. M. B. (2007). Clinical assessment of postoperative sensitivity in posterior composite restorations. *Oper dent*, 32(5), 421-426.
2. **Bussolati G.**, Radulescu R. T. (2011). Blocking endogenous peroxidases in immunohistochemistry: a mandatory, yet also subtle measure. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 19(5), 484.
3. **Burry, R. W.** (2000). Specificity controls for immunocytochemical methods. *J Histochem Cytochem*, 48(2), 163-165.
4. **Byers, M. R.**, & Närhi, M. V. O. (1999). Dental injury models: experimental tools for understanding neuroinflammatory interactions and polymodal nociceptor functions. *Crit Rev Oral Biol Med*, 10(1), 4-39.
5. **Chai, Y.**, Jiang, X., Ito, Y., Bringas, P., Han, J., Rowitch, D. H., ... & Sucov, H. M. (2000). Fate of the mammalian cranial neural crest during tooth and mandibular morphogenesis. *Development*, 127(8), 1671-1679.
6. **Cohen, P.** (1997). The search for physiological substrates of MAP and SAP kinases in mammalian cells. *Trends Cell Biol*, 7(9), 353-361.
7. **Cooper, P. R.**, Holder, M. J., & Smith, A. J. (2014). Inflammation and regeneration in the dentin-pulp complex: a double-edged sword. *J Endod*, 40(4), S46-S51.
8. **Cooper, P. R.**, McLachlan, J. L., Simon, S., Graham, L. W., & Smith, A. J. (2011). Mediators of inflammation and regeneration. *Adv Dent Res*, 23(3), 290-295.
9. **Dachi, S. F.** (1965). The relationship of pulpitis and hyperemia to thermal sensitivity. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 19(6), 776-785.

10. Dalby, K. N., Morrice, N., Caudwell, F. B., Avruch, J., & Cohen, P. (1998). Identification of regulatory phosphorylation sites in mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein kinase-1a/p90 rsk that are inducible by MAPK. *J Biol Chem*, 273(3), 1496-1505.
11. Feng, J. Q., Ward, L. M., Liu, S., Lu, Y., Xie, Y., Yuan, B., ... & White, K. E. (2006). Loss of DMP1 causes rickets and osteomalacia and identifies a role for osteocytes in mineral metabolism. *Nat Genet*, 38(11), 1310-1315.
12. Ge, C., Xiao, G., Jiang, D., Yang, Q., Hatch, N. E., Roca, H., & Franceschi, R. T. (2009). Identification and functional characterization of ERK/MAPK phosphorylation sites in the Runx2 transcription factor. *J Biol Chem*, 284(47), 32533-32543.
13. Ge, C., Yang, Q., Zhao, G., Yu, H., Kirkwood, K. L., & Franceschi, R. T. (2012). Interactions between extracellular signal-regulated kinase 1/2 and P38 Map kinase pathways in the control of RUNX2 phosphorylation and transcriptional activity. *J Bone Miner Res*, 27(3), 538-551.
14. Goldberg, M., Farges, J. C., Lacerda-Pinheiro, S., Six, N., Jegat, N., Decup, F., ... & Poliard, A. (2008). Inflammatory and immunological aspects of dental pulp repair. *Pharmacol Res*, 58(2), 137-147.
15. Goldberg, M., Kulkarni, A. B., Young, M., & Boskey, A. (2011). Dentin: Structure, Composition and Mineralization: The role of dentin ECM in dentin formation and mineralization. *Front Biosci (Elite Ed)*, 3, 711.
16. Goldberg, M., & Smith, A. J. (2004). Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: a biological basis for repair and tissue engineering. *Crit Rev Oral Biol Med*, 15(1), 13-27.
17. Greenblatt, M. B., Shim, J. H., & Glimcher, L. H. (2013). Mitogen-activated protein kinase pathways in osteoblasts. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 29, 63-79.
18. Hsu, Y. Y., Jou, Y. T., Wong, R., Karabucak, B., Simchon, S., & Kim, S. (2003). Effect of nitric oxide synthase inhibitor (L-NAME) on substance P-induced vasodilatation in the dental pulp. *Int Endod J*, 36(12), 840-847.

19. **Johnson, G. L., & Lapadat, R.** (2002). Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science*, 298(5600), 1911-1912.
20. **Keyse, S. M.** (2000). Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling. *Curr Opin Cell Biol*, 12(2), 186-192.
21. **Kim, S.** (1990). Neurovascular interactions in the dental pulp in health and inflammation. *J Endod*, 16(2), 48-53.
22. **Klinz, F. J., Korkmaz, Y., Bloch, W., Raab, W. H., & Addicks, K.** (2012). Histone deacetylases 2 and 9 are coexpressed and nuclear localized in human molar odontoblasts in vivo. *Histochem Cell Biol*, 137(5), 697-702.
23. **Klinz, F. J., Korkmaz, Y., Cho, B., Raab, W. H., & Addicks, K.** (2013). Nuclear Expression of p27 Kip1 Is Associated with In Vivo Differentiation of Adult Human Odontoblasts. *J Endod*, 39(8), 995-1000.
24. **Korkmaz, Y., Bloch, W., Schneider, K., Zimmer, S., Addicks, K., & Raab, W. M.** (2008). Time-dependent activation of ERK1/2 in nerve terminals of the dentin-pulp complex following bradykinin treatment. *J Dent Res*, 87(12), 1149-1154.
25. **Korkmaz, Y., Baumann, M. A., Steinritz, D., Schröder, H., Behrends, S., Addicks, K., ... & Bloch, W.** (2005). NO-cGMP signaling molecules in cells of the rat molar dentin-pulp complex. *J Dent Res*, 84(7), 618-623.
26. **Korkmaz, Y., Bloch, W., Klinz, F. J., Kübler, A. C., Schneider, K., Zimmer, S., ... & Raab, W. H. M.** (2009). The constitutive activation of extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 in periodontal ligament nerve fibers. *J Periodontol*, 80(5), 850-859.
27. **Korkmaz, Y., Bloch, W., Steinritz, D., Baumann, M. A., Addicks, K., Schneider, K., & Raab, W. M.** (2006). Bradykinin mediates phosphorylation of eNOS in odontoblasts. *J Dent Res*, 85(6), 536-541.
28. **Korkmaz, Y., Klinz, F. J., Beikler, T., Blauhut, T., Schneider, K., Addicks, K., ... & Raab, W. H.** (2010). The Ca²⁺-binding protein calretinin is selectively enriched in a subpopulation of the epithelial rests of Malassez. *Cell Tissue Res*, 342(3), 391-400.

-
- 29. Korkmaz Y.,** Lang H., Beikler T., Cho B., Behrends S., Bloch W., Addicks K., Raab W. H. (2011). Inflammation is associated with decreased levels of the α_1 -, β_1 - and α_2 -subunit of sGC in human odontoblasts. *J Dent Res*, 90(4), 517-522.
- 30. Kuttler, Y.** (1959). Classification of dentine into primary, secondary, and tertiary. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 12(8), 996-1001.
- 31. Kyono, A.,** Avishai, N., Ouyang, Z., Landreth, G. E., & Murakami, S. (2012). FGF and ERK signaling coordinately regulate mineralization-related genes and play essential roles in osteocyte differentiation. *J Bone Miner Metab*, 30(1), 19-30.
- 32. Lai, C. F.,** Chaudhary, L., Fausto, A., Halstead, L. R., Ory, D. S., Avioli, L. V., & Cheng, S. L. (2001). Erk is essential for growth, differentiation, integrin expression, and cell function in human osteoblastic cells. *J Biol Chem*, 276(17), 14443-14450.
- 33. Li, S.,** Kong, H., Yao, N., Yu, Q., Wang, P., Lin, Y., ... & Ni, L. (2011). The role of runt-related transcription factor 2 (Runx2) in the late stage of odontoblast differentiation and dentin formation. *Biochem Biophys Res Commun*, 410(3), 698-704.
- 34. Linde, A.,** & Goldberg, M. (1993). Dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med*, 4(5), 679-728.
- 35. Matsushita, T.,** Chan, Y. Y., Kawanami, A., Balmes, G., Landreth, G. E., & Murakami, S. (2009). Extracellular signal-regulated kinase 1 (ERK1) and ERK2 play essential roles in osteoblast differentiation and in supporting osteoclastogenesis. *Mol Cell Biol*, 29(21), 5843-5857.
- 36. Meloche, S.,** & Pouyssegur, J. (2007). The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1-to S-phase transition. *Oncogene*, 26(22), 3227-3239.
- 37. Muda, M.,** Theodosiou, A., Gillieron, C., Smith, A., Chabert, C., Camps, M., ... & Arkinstall, S. (1998). The mitogen-activated protein kinase phosphatase-3 N-terminal noncatalytic region is responsible for tight substrate binding and enzymatic specificity. *J Biol Chem*, 273(15), 9323-9329.

-
- 38. Murray, P. E.**, About, I., Lumley, P. J., Franquin, J. C., Windsor, L. J., & Smith, A. J. (2003). Odontoblast morphology and dental repair. *J Dent*, 31(1), 75-82.
- 39. Niño-Barrera, J. L.**, Gutiérrez, M. L., & Garzón-Alvarado, D. A. (2013). A theoretical model of dentinogenesis: Dentin and dentinal tubule formation. *Comput Methods Programs Biomed*, 112(1), 219-227.
- 40. Nithianandarajah-Jones, G. N.**, Wilm, B., Goldring, C. E., Müller, J., & Cross, M. J. (2012). ERK5: structure, regulation and function. *Cell Signal*, 24(11), 2187-2196.
- 41. Noden, D. M.**, & Trainor, P. A. (2005). Relations and interactions between cranial mesoderm and neural crest populations. *J Anat*, 207(5), 575-601.
- 42. Prasad, M.**, Butler, W. T., & Qin, C. (2010). Dentin sialophosphoprotein in biomineralization. *Connect Tissue Res*, 51(5), 404-417.
- 43. Roskoski, R.** (2012). ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res*, 66(2), 105-143.
- 44. Roux, P. P.**, & Blenis, J. (2004). ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev*, 68(2), 320-344.
- 45. Rubinfeld, H.**, & Seger, R. (2005). The ERK cascade: a prototype of MAPK signaling. *Mol Biotechnol*, 31(2), 151-174.
- 46. Shim, J. H.**, Greenblatt, M. B., Zou, W., Huang, Z., Wein, M. N., Brady, N., ... & Jones, D. C. (2013). Schnurri-3 regulates ERK downstream of WNT signaling in osteoblasts. *J Clin Invest*, 123(9), 4010.
- 47. Sigurdsson, A.** (2003). Pulpal diagnosis. *Endod Top*, 5(1), 12-25.
- 48. Sloan, A. J.**, Matthews, J. B., & Smith, A. J. (1999). TGF- β receptor expression in human odontoblasts and pulpal cells. *Histochem J*, 31(8), 565-569.
- 49. Sloan, A. J.**, & Smith, A. J. (2007). Stem cells and the dental pulp: potential roles in dentine regeneration and repair. *Oral Dis*, 13(2), 151-157.

-
50. **Smith, A. J.** (2001). Pulpal responses to caries and dental repair. *Caries Res*, 36(4), 223-232.
51. **Smith, A. J.**, Scheven, B. A., Takahashi, Y., Ferracane, J. L., Shelton, R. M., & Cooper, P. R. (2012). Dentine as a bioactive extracellular matrix. *Arch Oral Biol*, 57(2), 109-121.
52. **Suzuki, S.**, Sreenath, T., Haruyama, N., Honeycutt, C., Terse, A., Cho, A., ... & Kulkarni, A. B. (2009). Dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein have distinct roles in dentin mineralization. *Matrix Biol*, 28(4), 221-229.
53. **Wakisaka, S.** (1990). Neuropeptides in the dental pulp: distribution, origins, and correlation. *J Endod*, 16(2), 67-69.
54. **Wegehaupt, F.**, Betke, H., Solloch, N., Musch, U., Wiegand, A., & Attin, T. (2009). Influence of cavity lining and remaining dentin thickness on the occurrence of postoperative hypersensitivity of composite restorations. *J Adhes Dent*, 11(2), 137-141.
55. **Widmann C**, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL (1999). Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev*, 79(1), 143-80.
56. **Young, M. R.**, Nair, R., Bucheimer, N., Tulsian, P., Brown, N., Chapp, C., ... & Colburn, N. H. (2002). Transactivation of Fra-1 and consequent activation of AP-1 occur extracellular signal-regulated kinase dependently. *Mol Cell Biol*, 22(2), 587-598.

8. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Fassung meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

